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 فصم 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).

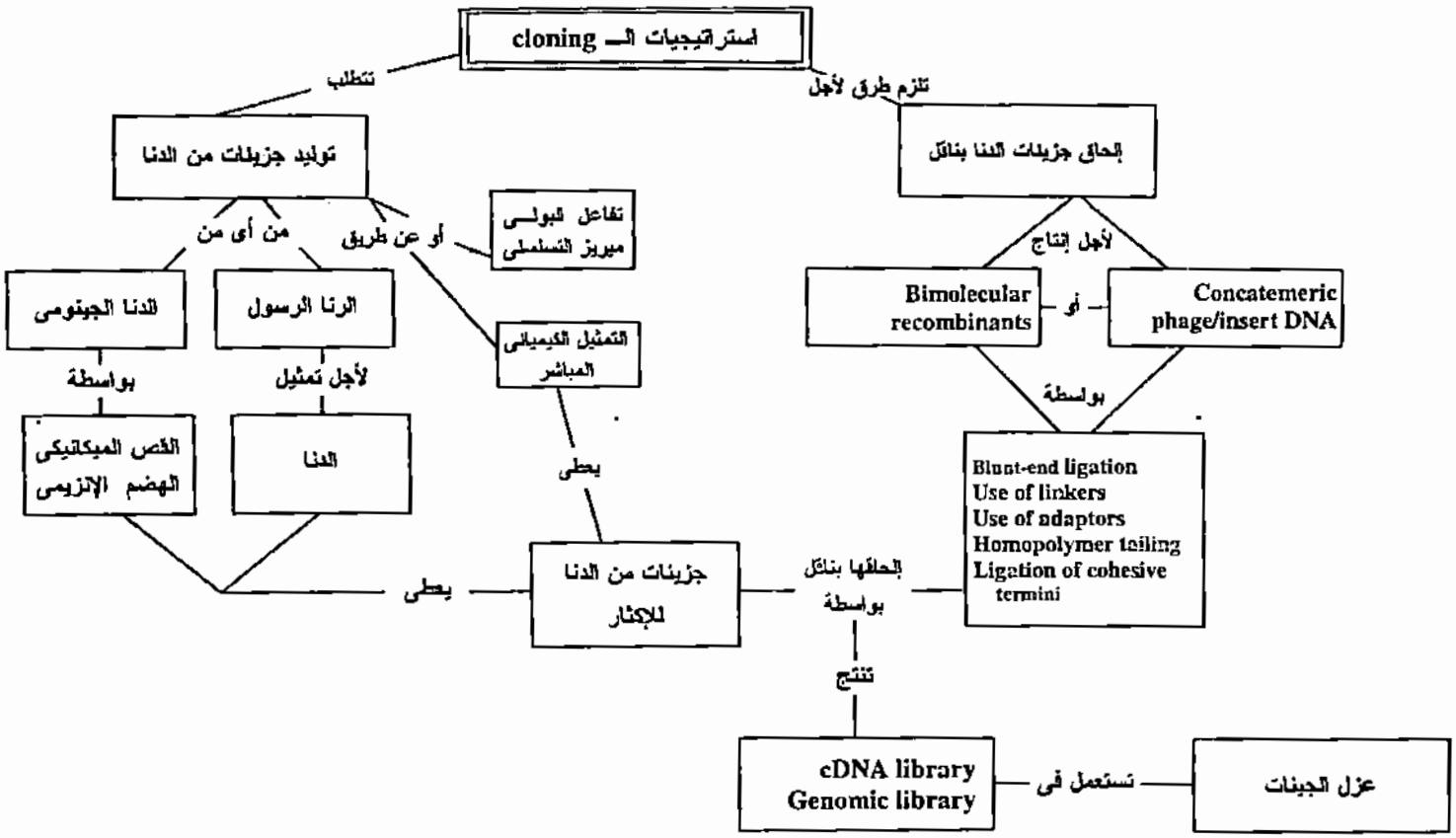
هذا .. ويلخص شكل (١١–٢) استراتيجيات عملية الـ gene cloning.

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



شكل (١١-٢): تخطيط لاستراتيجيات عملية التحول الوراثي gene cloning (عن Nicholl ١٩٩٤).

كذلك تجرى عملية إكثار الجينات ومضاعفة أعدادها من خلال تقنية الـ polymerase chain reaction (اختصارًا: PCR)، حيث تُنتج نسخ عديدة من شريط الدنا المطلوب مضاعفته صناعيًا

بعد أن يتم تركيب أو إنشاء دنا جديد recombinant DNA في المختبر، فإنه يتعين عزل التتابعات المرغوب فيها، الأمر الذى يتحقق بثلاثة أمور:

١ – فصل الجزيئات الجديدة عن بعضها البعض

٢ – إكثار وتكرار (amplification) التراكيب الجديدة لكى يتوفر قدر كافٍ منها للعمليات التالية

٣ – انتخاب جزء الدنا موضوع الاهتمام.

وتمثل الخطوتان الأولى والثانية أعلاه – ما يعرف باسم الـ gene cloning. ويتطلب إجراء هاتين الخطوتين استعمال حامل مناسب لجزيئات الدنا (vector) وكائن عائل آخر مناسب لإكثاره (host)

تتباين العوائل المناسبة لعملية إكثار الدنا، ومن أنواعها:

١ – البكتيريا (عائل prokaryotic)، مثل *Escherichia coli*، و *Bacillus subtilis*، و *Streptomyces* spp.

٢ – الفطريات (عائل eukaryotic)، مثل الخميرة *Saccharomyces cerevisiae*، و *Aspergillus nidulans*.

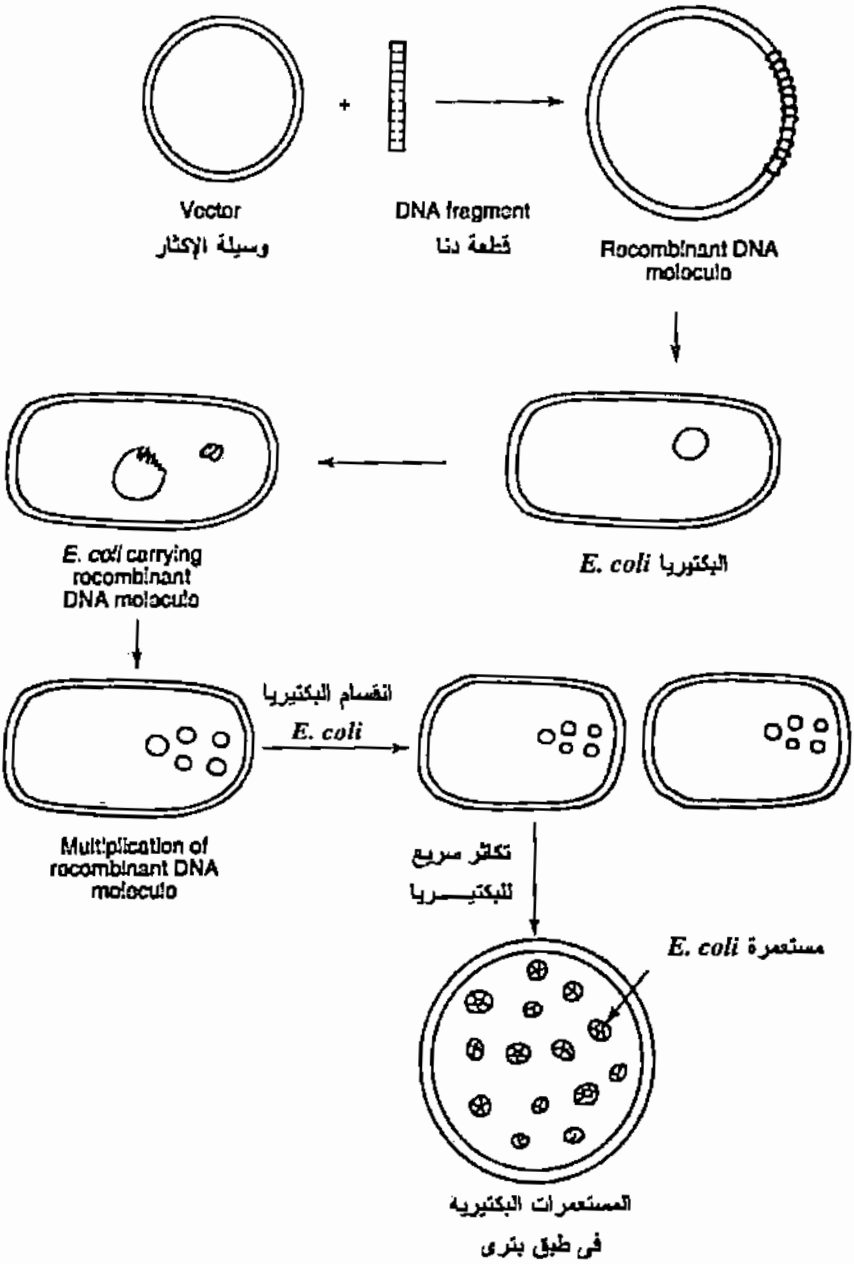
٣ – النباتات (عائل eukaryotic)، وقد تستعمل منها البروتوبلاستات، أو الخلايا أو النباتات الكاملة.

٤ – الحيوانات (عائل eukaryotic)، وهى قد تكون خلايا حشرية (مثل ذبابة الفاكهة *Drosophila melanogaster*)، وخلايا الثدييات، والـ oocytes، والكائنات الكاملة (Nicholl ١٩٩٤).

ويتضمن إكثار الجينات ومضاعفة أعدادها (gene cloning) أربع خطوات، كما يلى (شكل ١١-٣):

١ – تحديد قطعة الدنا التى يُرغب فى إكثارها وعزلها، وقطعها إلى أجزاء صغيرة،

ثم دمجها فى vector مناسب (فيرس أو بلازميد أو كوزميد) لإنتاج دنا محول وراثيًا recombinant DNA molecule.



شكل (١١-٣): خطوات الـ gene cloning.

٢ – حقن الدنا المحول وراثيًّا فى عائل مناسب أو خلية (هى غالبًا *E. coli*).

٣ – إكثار الدنا المحول وراثيًّا داخل خلية العائل ونقله – كذلك – إلى خلايا نسل العائل

٤ – يؤدى الانقسام المستمر للعائل إلى إنتاج سلالات clones تتكون من خلايا متطابقة تحتوى على نسخ من الدنا المحول وراثيًّا (عن Chahal & Gosal ٢٠٠٢).

التعرف على الجينات وعزلها وفصلها وتحديد تتابعاتها

إن التعرف على الجينات وعزلها ودراسة تتابعاتها من النيكليوتيدات يتطلب تحليلاً مفصلاً للدنا، وهو الأمر الذى أصبح ممكنًا من خلال نشاط مجموعة واسعة من الإنزيمات الميكروبية، من أهمها ما تعرف باسم type II restriction endonucleases، والـ reverse transcriptase.

تقوم الـ restriction enzymes بقطع خيط الدنا المزدوج عند مواقع محددة إلى أجزاء لا يزيد طول كل منها عن ٤–٨ نيكليوتيدات متتابعة تعد خاصة بكل إنزيم. تستعمل هذه الإنزيمات فى تقطيع أوصال الدنا إلى أجزاء صغيرة عديدة جدًّا، ويمكن تعليم كل الدنا بـ restriction sites خاصة على صورة restriction maps

تتواجد الـ reverse transcriptase فى الفيروسات التى تتكون فيها المادة الوراثية من الرنا تستعمل هذه الفيروسات تلك الإنزيمات لإنتاج خيط دنا مقابل للرنا فى البكتيريا العائل. وتستخدم تلك الإنزيمات فى دراسات التكنولوجيا الحيوية لتحضير نسخ من الدنا مقابلة للرنا الرسول لإنتاج نسخ عديدة من الجين.

المجسات

يستخدم المصطلح probe – بمعنى مجس – فى علم البيولوجيا الجزيئية – للإشارة إلى تتابع صغير من النيكليوتيدات فى الدنا أو الرنا يستعمل فى تحديد أجزاء الأحماض النووية التى تحتوى على تتابعات نيكليوتيدية متممة أو مقابلة لرنا أو دنا

يُراد معرفته وهى تستخدم فى عمل الخرائط الجزيئية، وتحديد الجينات وعزلها، أو التعرف على تتابعات معينة لاستخدامها فى دراسات الهندسة الوراثية، والتأكد من نقل الجينات إلى النباتات المحولة وراثيًا، والـ DNA fingerprinting لأجل تعريف الأصناف. كما تستخدم المجسات كذلك فى اختبار تواجد مسببات الأمراض فى النباتات والحيوانات والإنسان

الفصل الكهربائى للأجزاء الدنا المقطعة

يجرى تحليل الأحماض النووية بقطعها إلى أجزاء صغيرة من خلال نشاط الـ restriction enzymes، ثم توضع تلك الأجزاء المقطعة فى أحد أطراف طبق زجاجى أو بلاستيكى توجد به طبقة رقيقة من الأجاروز agarose أو البولى أكريلاميد polyacrylamide المصلب وبعد إضافة محلول منظم مناسب إلى الطبق . يمرر فيه تيار كهربائى ذات فولت عال (٦٠-١٠٠ فولت) خلال الجل وتبعا لشحنتها السالبة، فإن الأحماض النووية تتحرك من الكاثود (القطب السالب) إلى الآنود (القطب الموجب) على الجل بسرعة تتوقف على حجم جزء الحامض النووى، حيث تستقر أقصر الأجزاء فى أقصى نهاية الجل ويتم التعرف على الأجزاء التى تستقر فى مواضع مختلفة من الجل بالـ radio labelled probe hybridization (أى تُزاوج بمجسات مناسبة لها معلمه إشعاعيًا)، ثم تعرض لفيلم أشعة إكس. ويمكن تقدير أحجام أجزاء الدنا بمقارنة هجرة الأحزمة bands التى استقرت فيها بأجزاء أخرى قياسية فصلت على نفس الجل

وقد استخدمت خاصية قدرة خيوط الأحماض النووية المكملة لبعضها البعض للارتباط معا بواسطة E. M Southern فى تحليل أجزاء الأحماض النووية (أجزاء الدنا) بالتهجين بين خيوط الدنا (DNA-DNA hybridization) بالطريقة التى عرفت باسم Southern blotting وفيها تُخلط أجزاء الدنا ثم تنقل (تطبع) من الجل إلى مهاد ترشيح من النيلون (plotted) يصبح الدنا المنتشر على المرشح ثابتا إذا رفعت حرارته إلى ٨٠م. يلى ذلك إضافة مجس من خيط مفرد معلم إشعاعيًا، فإذا تهجن معه كان ذلك دليلاً على أن أجزاء الدنا تحمل التتابعات المقابلة لتتابعات المجس يتم غسل المجس الزائد حيث يمكن تعليم الجزء الذى يوجد به تزاوج على المرشح على فيلم أشعة إكس.

وقد استخدم المبدأ ذاته للكشف عن التتابعات فى الـ mRNA الذى يفصل إلى أجزاء بواسطة الفصل الكهربائى electrophoresis ثم يطبع على مرشح، فيما يعرف باسم Northern plots كذلك يمكن تحليل البروتينات، حيث تنتقل البروتينات بدلا من الأحماض النووية من الجل إلى حامل مثبت لها فيما يعرف باسم Western plotting ويتم التعرف على البروتينات فى الـ blots باستعمال الأجسام المضادة كمجسات (عن Chahal & Gosal ٢٠٠٢).

إكثار الجينات وأجزاء الأحماض النووية عن طريق الـ Vectors

يتطلب توصيف وتحوير ونقل الجين – أو أى جزء من الدنا – إكثاره بأعداد كبيرة، فيما يعرف باسم cloning تكون كل نسخ الدنا المكثر متماثلة تمامًا مثل أفراد السلالة الخضرية التى تكثر بطرق لاجنسية.

ويتحقق إكثار أى أجزاء من الدنا بإدماجها ضمن دنا آخر ينقسم ذاتيًا يطلق عليه اسم vector، ويكون عادة بلازميد بكتيرى bacterial plasmid، أو فيرس، أو تكوين مركب من كليهما وواقع الأمر أن الـ vector عبارة عن قطعة دنا ذات قدرة على الانقسام فى عائل مناسب توضع أجزاء الدنا التى يُراد إكثارها فى vectors تعرف باسم chimeric vectors، وهى التى تحقن – بالتالى – فى عائل مناسب مثل البكتيريا، حيث تنقسم تلقائيًا إلى نسخ عديدة وتعرف تلك العملية من بداية تضمين قطعة الدنا التى يُراد إكثارها فى الـ vector حتى حدوث الانقسام باسم recombinant gene technology. أو إكثار الجينات gene cloning، كما تسمى – كذلك – باسم الهندسة الوراثية genetic engineering

ومن أهم صفات الـ vector الجيد أن يكون من السهل عزله وحقنه فى خلايا العائل، وأن يتكاثر تلقائيًا، وأن يحتوى على مواقع خاصة لعديد من الـ restriction enzymes، بحيث يمكن إدماج قطع الدنا فيه دونما الإضرار بأى عملية حيوية ضرورية، وأن يحتوى على مُعَلِّم مناسب ليسهل التعرف على خلايا العائل (التى حقنت بالـ vector) التى تحولت وراثيًا. وقد تطورت أجزاء الدنا التى استعملت كـ vector صع

أنواع العوائل الطبيعية، بحيث أن اختيار الـ vector يعتمد على النوع العائل الذى يُرغب فى إكثار الجين فيه، ولا تحتوى تلك الـ vectors الطبيعية على كل الخصائص المطلوبة فى الـ vectors.

البلازميدات البكتيرية

إن البلازميدات البكتيرية bacterial plasmids عبارة عن جزيئات مزدوجة حلقية تنقسم ذاتيًا، وتوجد فى الخلايا كوحدات خارج النواة. يمكن لهذه البلازميدات أن تنقسم بالمعدل ذاته الذى تنقسم به الخلايا البكتيرية، ويتم الحفاظ عليها كبلازميدة واحدة أو عدد قليل منها بكل خلية. وتنقسم النسخ العديدة من البلازميدات – من ناحية أخرى – بمعدل مستقل عن معدل انقسام الخلية العائل إلى درجة إمكان تواجد أكثر من ١٠٠٠ نسخة من البلازميد بكل خلية ويفيد التركيب الحلقى للبلازميدات فى تفككها عند نقطة واحدة، وهى التى يمكن عندها إدماج قطعة الدنا الغريبة فيها، حيث تلتئم النهايات المقطوعة من الدنا الحلقى مع نهايتى الدنا الغريب؛ لإنتاج حلقة أكبر حجمًا يمكن فصلها بسهولة عن البلازميد الأصلى غير المحول وراثيًا. تعرف أى قطعة من الدنا يُراد إكثارها باسم DNA insert، وهى تزرع أولاً فى بلازميدة للحصول على vector كيميرى chimeric vector أو recombinant DNA، الذى يحقن بدوره فى العائل (*E. coli*). وتحتوى معظم الـ plasmid vectors على جينات تكسبها مقاومة لبعض المضادات الحيوية، مثل الامبسيلين ampicillin والتتراسيكلين tetracycline، والكلورمفينيكول chloramphenicol؛ بما يسمح بسهولة التعرف على الخلايا البكتيرية التى تحتوى على تلك الـ vectors لأن الخلايا الأخرى تقتل بفعل المضادات الحيوية.

البكتيروفاجات

إن الفيروسات التى تهاجم البكتيريا (البكتيريوفاجات bacteriophages) يمكن استعمالها كـ vectors لأنها يمكن أن تدمج فى الكروموسوم البكتيرى وتتكاثر. وأكثر البكتيروفاجات شيوعًا نوعان، هما: lambda (λ)، و M_{13} وبالمقارنة بالبلازميدات البكتيرية، فإن البلازميدات الفيروسية phage vectors يمكن التعرف عليها بسهولة

لأنها تكوّن مناطق خالية من النمو البكتيرى فى أطباق بترى المحقونة بالبكتيريا، وتعرف تلك المناطق باسم plaques وتعد البلازميدات الفيروسية أكثر كفاءة فى إكثار قطع الدنا الكبيرة، وتحقق تحولاً وراثيًا أكثر كفاءة لـ *E. coli*.

Cosmid vectors

إن الـ cosmid vectors عبارة عن جزيئات بلازميد محورة تحتوى على جزء معين من البكتيروفاج، متضمنًا تلك التى تعرف بالـ cos region ومثل البكتيروفاجات . فإن الكوزميدات بمكنها حمل قطع دنا كبيرة، ولها القدرة على التكاثر الذاتى مثل البلازميدات ويساعد تواجد مواقع الـ cos فى تسهيل دمج الدنا فى رؤوس الفاج. وتعد الكوزميدات عالية الكفاءة فى إكثار الدنا (cloning)، ولكنها لا تتسع لأكثر من ٤٠-٥٠ kbp من الدنا. ونظرًا لاحتواء الكوزميدات على معلمات خاصة من البلازميدات فإن التعرف على الـ vector المحول وراثيًا يكون بنفس الطريقة المستعملة مع البلازميد الأصلى

Phagemids

يطلق اسم phagemids على vectors مركبة صناعيًا بالجمع بين الصفات المرغوب فيها من كل من البلازميدات والبكتيروفاجات الخيطية filamentos bacteriophages إن البلازميدات تتضمن تتابعات قصيرة من الدنا تعد مسئولة عن انقسام البلازميدات، بينما توفر خلايا العائل الإنزيمات التى تلزم للانقسام أما البكتيريوفاجات فإن لها تحكمًا أكثر تعقيدًا فى عملية الانقسام لا يسهل إجراء أى تعديلات عليه. ويمكن استعمال الـ phage vectors لإكثار قطع صغيرة فقط من الدنا، ولكن المشكلة يمكن التغلب عليها بالجمع بين جزء من جينوم الفاج مع بلازميد الدنا لتكوين vector جديد يعرف باسم phagemid تتضمن هذه البلازميدات الـ ColE1 لبداية الانقسام، ومعلم خاص بالمقاومة لمضادات الحيوية، وتحمل نسخة إضافية من منطقة الجينات الخاصة بالبكتيريوفاج تحتوى على كل المعلومات (التعليمات) الخاصة ببداية ونهاية تمثيل الدنا، وكذلك التميز المظهرى لجزيئات البكتيريوفاج ويمكن إكثار هذه الـ vectors مثل البلازميدات بالطريقة العادية

Shuttle vectors

يتم تركيب الـ shuttle vectors من خلال تقنيات الهندسة الوراثية لكى تتكاثر فى خلايا نوعين من العوائل، حيث يمكنها بدء التكاثر فى أحد النوعين، ثم تنتقل إلى النوع الآخر دون أية إجراءات خاصة، وهى تتضمن معظم الـ vectors الـ eukaryotic.

Yeast vectors

تعتمد كل الـ vectors التى أسلفنا بيانها على الـ *E. coli*، بينما يمكن استعمال الـ yeast vectors – كذلك – فى الخمائر لإكثار أجزاء الدنا. تُعد الخمائر من الـ eukaryotes التى يمكنها النمو كخلايا مفردة وتنتج – كذلك – مستعمرات فى أطباق بترى. وأكثر الـ vectors شيوعًا فى الاستعمال (الخمائر) ربما تكون بلازميدات، مثل: الـ ARS vectors، والـ microchromosome vectors، والـ YAC vectors (أو الـ yeast artificial chromosomes)، والنوع الأخير هو الأكثر شيوعًا فى الاستعمال فى عملية زرع الجينات. يعتمد تكوين الـ YAC على تكوين جزئ دنا طويل، ربما يمثل الكروموسوم كله، ويمكن زرعه فى الخميرة ككروموسوم صناعى. ولهذه الـ vectors ثلاثة خصائص أساسية من خصائص كروموسومات الخميرة، وهى: الانقسام التلقائى التتابعى، والسنترومير centromere، والتلوميرات telomeres التى يمكن ربطها بأجزاء معينة من الدنا لتكوين كروموسومات صناعية، ويمكن إدماجها فى خلايا الخميرة. تحتوى الـ YAC – كذلك – على التتابعات الضرورية لتكاثر *E. coli*، ومواقع الـ cloning والمعلمات الخاصة selectable markers للخميرة العائل. ويمكن استعمال الـ YAC vectors فى إكثار عدة مئات من أزواج الـ kilobases مقارنة بنحو ١٠–١٥ kbp فقط فى البلازميدات، و ٢٢ kbp فى الـ lambda phage، وحتى ٤٠ kbp فى الـ cosmid vectors، إلاّ أن استخدام الـ YAC vectors يعد أقل كفاءة.

Bacterial Artificial Chromosomes

تعتمد الـ vectors التى تعرف باسم الكروموسومات البكتيرية المركبة معمليًّا artificial bacterial chromosomes على ما يعرف باسم الـ Factors أو الـ fertility

factors التى توجد فى البكتيريا، وهى يمكن أن تستقبل حتى ٣٠٠ kbp من الدنا الغريب. وتعد هذه الـ vectors جزيئات دنا حلقية، وتسلك سلوك البلازميدات، ويسهل تداولها، ونقلها، وعزلها من الخلايا البكتيرية دونما إضرار بالدنا، كما أنها تتجنب كثيرًا من مشاكل الـ YAC مثل ضعف كفاءة عملية التحول الوراثى (عن Chahal & Gosal ٢٠٠٢)

إكثار واستنساخ الجينات بتقنية الـ PCR

أمكن إكثار واستنساخ الجينات بالكامل فى الـ eppendorf tube بتقنية الـ polymerase chain reaction (اختصارًا PCR) وبينما يبدأ انقسام الدنا فى الخلايا باستعمال خيط دنا قالب a template DNA strand (الذى يبدأ فى إنتاج نظيره بفعل الإنزيم DNA polymerase)، فإن انقسام الدنا فى الـ PCR لا يبدأ إلاّ من بادئ primer مهجن إلى خيط دنا تضاف إليه نيكليوتيدات أخرى تحت التأثير الإنزيمى. تكتمل العملية فى الـ PCR فى أنبوبة eppendorf يُجمع فيها بين الـ polymerase enzyme، والبادئ، والنيكليوتيدات الأربع الرئيسية التى تبدأ فى إنتاج نسخ من الدنا المطوقة flanked بزوج من البادئات.

وتتلخص خطوات الـ PCR فيما يلى:

١ – عزل خيط مزدوج كامل من الدنا dsDNA، أو يحصل على الـ cDNA ويدنتر denatures بالتسخين على ٩٥–٩٨م؛ مما يؤدى إلى انفصال خيطين مفردين من الدنا ssDNA يخدما كقالبين templates للاستنساخ.

٢ – تضاف بادئات مركبة (مخلقة) synthetic primers (تكون عبارة عن oligonucleotides، وبمثابة قطع قصيرة من خيط مفرد من الدنا بتتابعات مناظرة للدنا المراد إكثاره target DNA) . تضاف تلك البادئات بكثرة إلى مخلوط التفاعل هى والنيكليوتيدات

٣ – يبرد مخلوط التفاعل إلى ٣٧م، حيث تلتحم البادئات مع التتابعات المقابلة لها على كل من خيطى الدنا المفرد.

٤ – يضاف الإنزيم المتحمل للحرارة، Taq polymerase – الذى يُحضر من البكتيريا المتحملة للحرارة *Thermus aquaticus* – يضاف إلى مخلوط التفاعل لينشط فى بسط البادئات – على ٧٢°م – من نهاية الـ target region بإضافة نيكليوتيدات مناسبة لتكوين تتابعات دنا مقابلة.

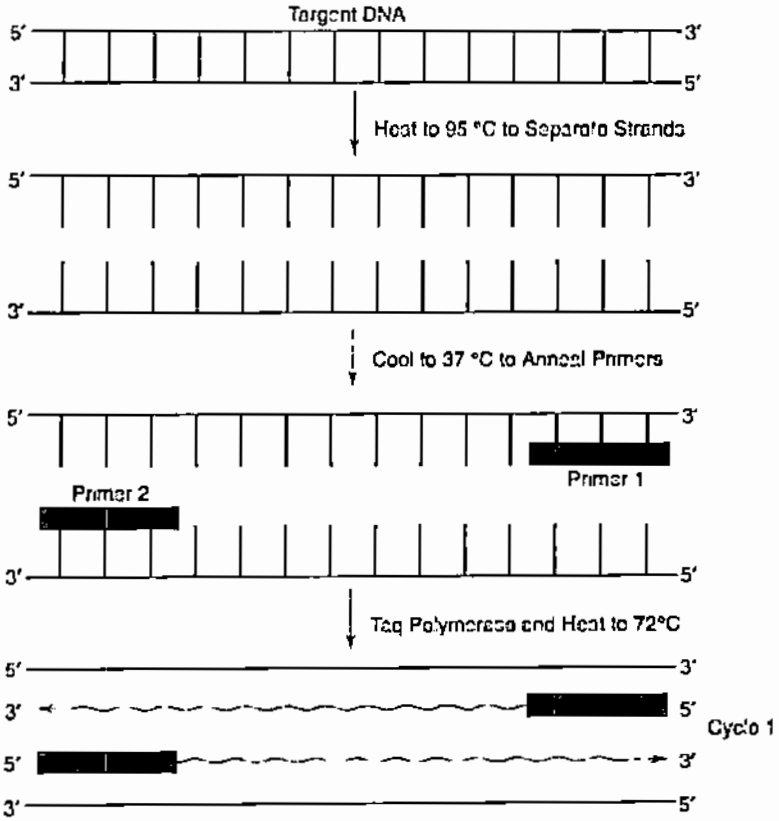
٥ – يُسمح بفترة حضانة مناسبة ليتم بسط البادئات إلى أن يكتمل تكوين نسخة من خيطى الدنا المزدوج الأصلى، وتلك هى نهاية الدورة الأولى. أى إن كل دورة تؤدى إلى مضاعفة الدنا الأصلى. ويتم تكرار الدورات برفع الحرارة لأجل دنترة الدنا .. وهكذا إلى أن تستكمل دورة ثانية، فثالثة ... إلخ. ونظريًا فإن الـ PCR ينتج 2^n نسخة من الدنا المطلوب، حيث ن تمثل عدد الدورات. ويعنى ذلك أن ٢٥–٣٠ دورة (وهى التى تستغرق نحو ٣–٤ ساعات) ينتج عنها ملايين النسخ من الدنا المطلوب (شكل ١١–٤).

ولطريقة الـ PCR استخداماتها المتزايدة – ليس فقط فى إكثار واستنساخ الجينات – وإنما كذلك فى عزل الجينات، وفى دراسات التطور، وفى عمل بصمة الدنا للنباتات، ورسم الخرائط الجينومية، وفى التحقق من التحول الوراثى، وتمييز الهجين الجسمية.

هذا . وقد استخدمت حديثًا إنزيمات DNA polymerase جديدة، مثل VENT polymerase المستخلص من البكتيريا *Thermococcus litoralis*، وأيضًا polymerase آخر مستخلص من البكتيريا *Pyrococcus furiosus*، وهما يفضلان الـ Taq polymerase فى جوانب معينة (عن Chahal & Gosal ٢٠٠٢).

المكتبة الجينومية

يعرف الجين الذى يُراد عزله لأجل إكثاره باسم DNA insert. تتوقف الطريقة التى يُعزل بها الجين على طبيعته والمعلومات التى تتوفر عنه وعن البروتين الذى يتحكم الجين فى إنتاجه. ويمكن عزل الجين إما بصورة مباشرة باستخلاص الدنا الخاص به من الجينوم، أو باستخدام المعلومات التى يحملها الرنا الرسول الذى ينتج مقابل الجين، لكن فى كلتا الحالتين يتعين عمل خريطة لأجزاء الدنا تمثل الجينوم النباتى، إما على صورة مكتبة جينومية genomic library، وإما على صورة مكتبة للدنا المستنسخ من الرنا الرسول cDNA library.

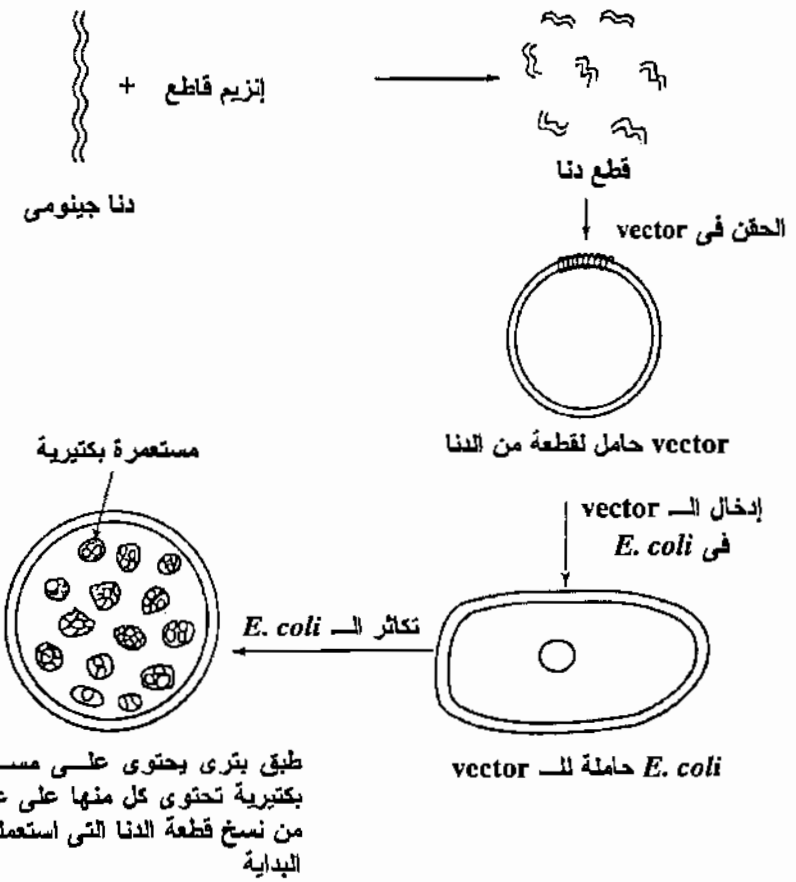


شكل (١١-٤) خطوات الـ **polymerase chain reaction**.

مقارنة بين الـ genomic library، **والـ** cDNA library

تُمثِّل الـ genomic library دنا الجينوم الكامل الموجود بنواة النوع النباتى المعنى، والذى يكثر - عادة - فى صورة قطع كبيرة، وهو يتضمن كل أجزاء الدنا، تتساوى فى ذلك كلاً من الأجزاء التى يُعبر عنها والتى لا يعبر عنها، والتى يمكن عزل الجين المرغوب فيه منها بغربلة المكتبة بمساعدة مجسات probes مناسبة، لكن حقيقة ما يحدث أن بعض أجزاء الدنا قد لا تُمثَّل، بينما قد يُمثَّل بعضها الآخر أكثر من اللازم يعزل الدنا الكلى ويقطَّع إلى أجزاء صغيرة باستعمال الـ restriction enzymes، ثم تدمج هذه القطع فى vector مناسب (فيرس، أو بلازميد، أو كوزميد، أو YAC، أ، BAC)، حيث يحقن - بدوره - فى عائل مناسب مثل *E. coli* لكى يتكاثر. يؤدى التكاثر المستمر

لخلايا العائل إلى إنتاج عدد كبير من المستعمرات التى تحمل أجزاء الدنا (شكل ١١-٥). وبذا .. فإن الـ genomic library تتكون من مجموعة من الـ restriction fragments المتداخلة overlaping موزعة عشوائيًا فى vector مناسب، وتحمل كل مستعمرة (سلالة clone) منها قطعة من الدنا الخلوى (عن Chahal & Gosal ٢٠٠٢).



شكل (١١-٥): إنشاء مكتبة جينومية.

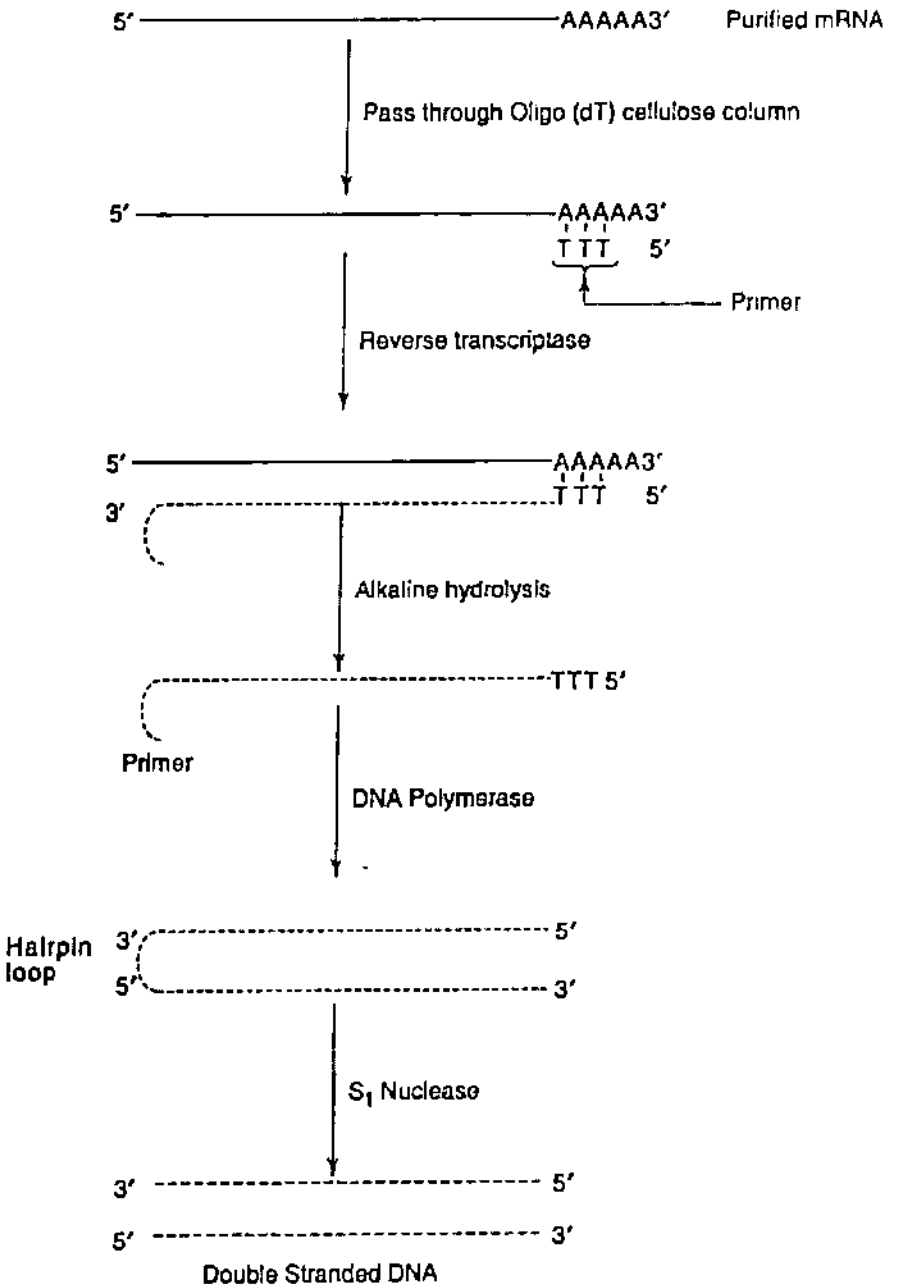
وبالمقارنة بالـ genomic library، فإن الـ cDNA library تتكون فقط من ذلك الجزء من الجينوم الذى يُعبَّر عنه على صورة mRNA، والذى يتم تمثيل الدنا المقابل منه - أى يتم تمثيل الـ cDNA - باستعمال الـ reverse transcriptase enzyme. ويؤدى تجميع كل أجزاء الـ cDNA فى vector مناسب -- مثل البلازميدات - فى مستعمرات

بكتيرية إلى تكوين الـ cDNA library ويمكن بهذه الطريقة انتخاب الأنسجة التى يُعبّر فيها عن الجينات المرغوب فيها لأجل عمل cDNA libraries خاصة بتلك الأنسجة، فمثلا لأجل عزل الجينات المسئولة عن إنتاج البروتينات، يُعزل الـ mRNA الكلى من البذور النامية للمحاصيل ذات محتوى البذور البروتينى العالى. ويلى ذلك تنقية الـ mRNA بطريقة خاصة وتهجينه مع primer خاص يعمل كبادئ للإنزيم reverse transcriptase (أى RNA- dependent DNA polymerase) الذى يستعمل الـ RNA كقالب template لتمثيل خيط الدنا المقابل (شكل ١١ ٦) وفى نهاية الأمر نجد أن تتابعات النيكليوتيدات فى الرنا الرسول تتحول إلى خيط مزدوج من الدنا يطلق عليه – عادة – اسم complementary DNA، أو copy DNA، أو cDNA ويؤدى إكثار الـ cDNA إلى تكوين مكتبة من تلك الجينات التى تشفر بسهولة لعدم احتوائها على الـ introns التى توجد فى الـ splitgenes وبذا فإن تلك التقنية تزيد من فرصة الحصول على الجين المرغوب فيه نظرًا لصغر حجم المكتبة عما فى الـ genomic library (عن Chahal & Gosal ٢٠٠٢)

التعرف على الجين فى المكتبة

تحتوى المكتبة على مستعمرات بكتيرية تحتوى كل منها على قطع مختلفة من الدنا تمثل الجينوم الكامل. وهو الذى يتعين غربلته للتعرف على المستعمرات التى تحتوى على قطع الدنا المرغوب فيها وإذا ما عرفت بعض التتابعات فى الجين لمعنى، فإنه يمكن التعرف عليها بالتهجين مع مجس محدد معلم بالمستعمرة وتستعمل لهذا الغرض عديد من التقنيات، مثل Northern blotting، والـ Western blotting، والـ Southern blotting (أو DNA/DNA hybridization) فى التعرف على الجين المرغوب فيه

فعلى سبيل المثال يتضمن التعرف على الدنا المرغوب فيه بطريقة الـ Southern blotting عزل الدنا وهضمه بـ endonuclease، وفصل القطع المختلفة بالـ gel electrophoresis ويلى ذلك طبع هذه القطع (plotting) من الجل الخاص بالدنا لعزل



شكل (١١-٦): تنقية رنا رسول متعدد الأدينين، وتمثيل الـ cDNA.

إلى مرشح filter بضغط مرشح من النيتروسيليلوز nitrocellulose filter على طبق البترى الذى تنمو فيه المستعمرات تمثل هذه المرشحات مكررات مكتبة الدنا التى يمكن غربلتها، بينما يُحافظ على الأطباق للرجوع إليها عند اللزوم. يعامل المرشح بهدف تثبيت الدنا، وذلك بدنترة denaturation الدنا بمعاملة قلوية، ويتم التعرف على الدنا بتهجينه مع مجس معلم إشعاعيًا ويمكن بالـ autoradiography التعرف على وضع المستعمرة المرغوب فيها على المرشح الذى يتم تعريفها وتفريغها من الموضع المقابل بالطبق (شكل ١١-٧)

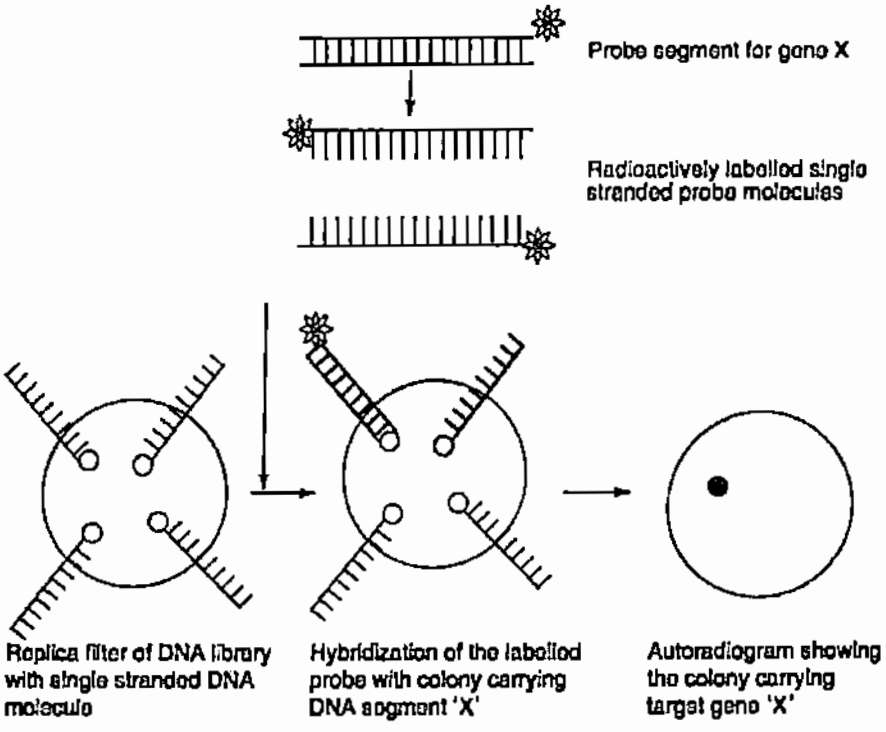
ومن بين الطرق الأخرى التى تستعمل فى التعرف على الجينات المرغوبة فيها، ما يلى:

١ - طريقة الـ chromosome walking:

إن الـ chromosome walking هى عملية عزل قطع الدنا المتداخلة overlapping فى الـ genomic DNA من الـ DNA library، وتستعمل القطع الطرفية بكل مستعمرة كمجسات متتالية للتهجين (شكل ١١-٨) تعتمد هذه التقنية على حقيقة أن المستعمرات التى تحتوى على أجزاء دنا متجاورة يوجد بها قطع متداخلة، بما يسمح بـ "السير" على امتداد طول الكروموسوم إلى أن يتم تحديد مواضع الجين المرغوب فيه. ولا تصلح هذه التقنية إلا فى الحالات التى تتوفر فيها خرائط وراثية ارتباطية كاملة.

٢ - طريقة الـ transposon tagging:

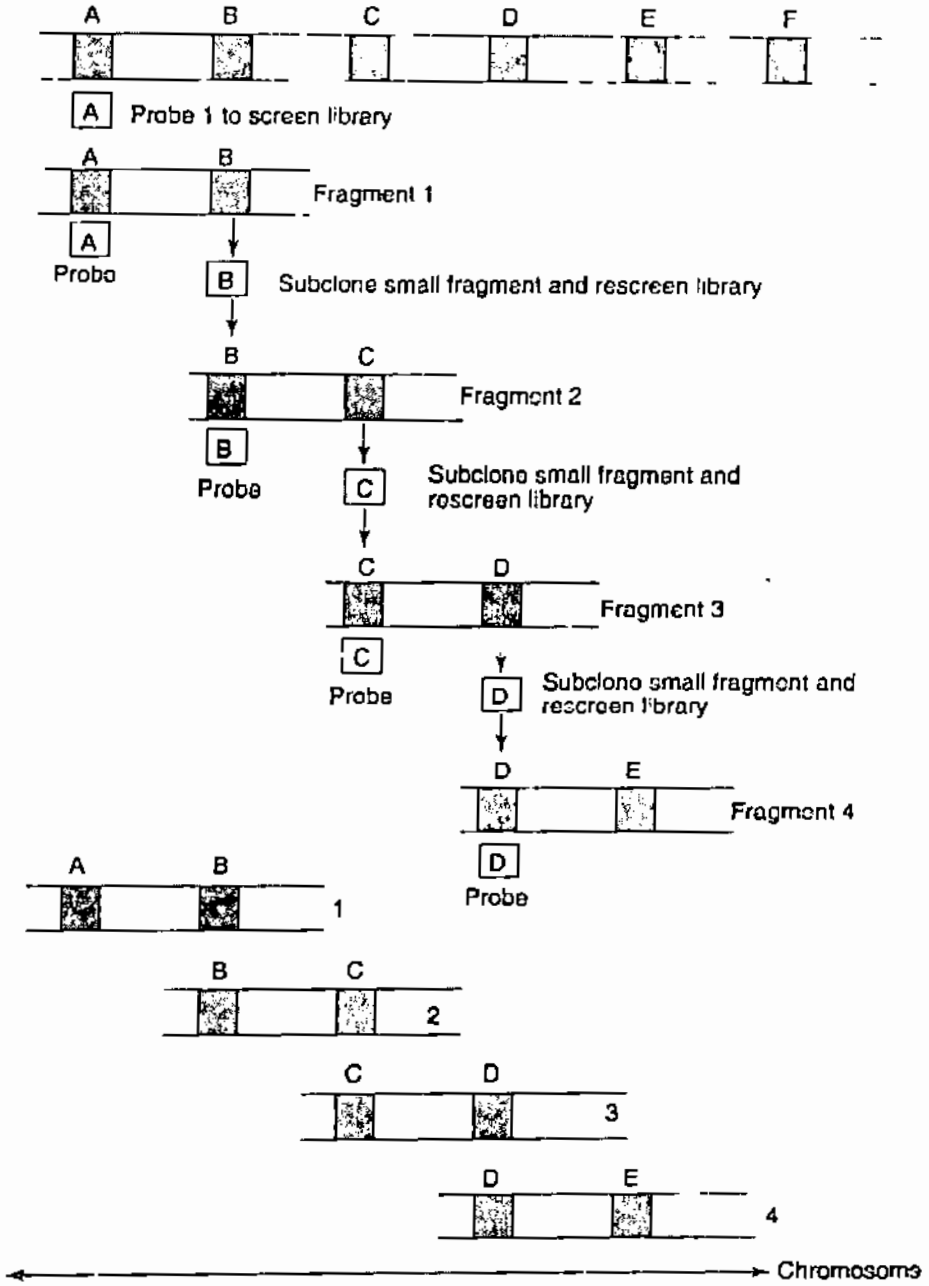
تتواجد الـ transposons (التى تعرف - كذلك - باسم jumping genes) فى عديد من الأنواع النباتية، وهى قادرة على القفز jump أو تغيير مكانها transpose من موقع جينومى لآخر فى نفس الكروموسوم أو فى كروموسوم آخر، مما يؤدى إلى اختلاف التعبير الجينى فى الموقع الجديد؛ بما يعنى حدوث طفرة ويمكن استعمال هذه الـ transposones كمجسات لعزل التتابعات التى اندمج فيها الـ transposone، وبذا يمكن تحديد الجينات المتأثرة بالـ transposones.



شكل (١١-٧): تهجين الدنا مع الدنا للتعرف على قطعة الدنا المرغوب فيها.

٣ - تقنية الـ differencial screening:

يهدف الـ differential screening للـ cDNA libraries إلى عزل مجموعات من الجينات التى تتحكم فى بعض الصفات أو العمليات الخاصة، مثل الإصابة بمسببات الأمراض، والمسار الأيضى المعبر عنه فى نسيج معين، أو فى عضو معين مثل الأزهار، والجذور، والثمار ... إلخ. وتعتمد التقنية على تعبيرات خاصة بالجينات تُسْتَحثّ بفعل بعض العمليات أو بتعبيرات جينية تختص بأنسجة معينة. يتم جسّ الـ cDNA library التى تقام من الـ mRNA المستخلص من الأنسجة المستحثة .. تُجسّ بواسطة مجموعتين من المجسات المعلمة إشعاعيًا radiolabelled probes. فمثلاً .. لعزل cDNA خاص بالأزهار، تقام cDNA library من الـ mRNA، ويلى ذلك غربلة فلاتر هذه المكتبة باستعمال mRNA خاص بالأزهار معلم إشعاعيًا أو cDNA، بينما تغربل مجموعة أخرى



شكل (١١-٨): طريقة الـ **chromosome walking** للتعرف على الجينات.

من الفلاتر ذاتها بـ mRNA خاص بالأوراق معلم إشعاعيًا. يتم التعرف على الـ cDNAs الخاصة بالأزهار كبقع لا تضئ إلاّ بمجسات الـ mRNA الخاص بالأزهار أما البقع الأخرى التى تتهجن – كذلك – بالـ mRNA الخاص بالأوراق فإنها تمثل جينات الـ house keeping. يفيد عزل الجينات بهذه الطريقة فى التعرف على تلك التى تتحكم فى بعض العمليات الحيوية الخاصة (عن Chahal & Gosal ٢٠٠٢).

الإنزيمات المستعملة فى مجال الـ Gene Cloning

منذ أن اكتشفت الإنزيمات القادرة على قطع شريط الدنا عند تتابعات معينة من النيكليوتيدات، واكتشاف إنزيمات الليجيز ligase القادرة على وصل قطع الدنا معًا .. أصبح من الممكن تحفيز تكوين أى توافيق جديدة من الجينات فى المختبر، وتزويدها بتتابعات دنا يمكنها تنظيم عملية التعبير عن تلك الجينات فى النباتات المحولة وراثيًا فى المرحلة المناسبة من النمو (temporal expression)، وفى الأنسجة التى يُراد التعبير فيها (spatial expression).

توفر إنزيمات القطع restriction enzymes وإنزيمات الوصل الخاصة بالدنا DNA ligase عمليات القطع والوصل لأجزاء الدنا، وهى التى تعد ضرورية لإنتاج جزيئات دنا جديدة recombinant DNA molecules. أما الإنزيمات الأخرى التى تستعمل فى مجال الهندسة الوراثية فإنها تعرف مجتمعة بإنزيمات تحوير الدنا DNA modifying enzymes، وهى تقوم بعمليات التحلل degradation، والتمثيل synthesis، والتحوير alteration للدنا.

تحلل إنزيمات النيوكلييز nucleases الأحماض النووية بكسر الروابط الـ phosphodiester التى تربط النيكليوتيدات معًا. وتعد إنزيمات القص من الأمثلة الجيدة للـ endonucleases التى تقطع الدنا فى مواقع داخل الخيوط. وتوجد مجموعة أخرى من الـ nucleases تقوم بتحليل الدنا من جزيئاته الطرفية، وهى التى تعرف باسم exonucleases (عن Nicholl ١٩٩٤).