الفصل الحادى عشر

الهندسة الوراثية : الأسس العلمية وتقنيات الدنا

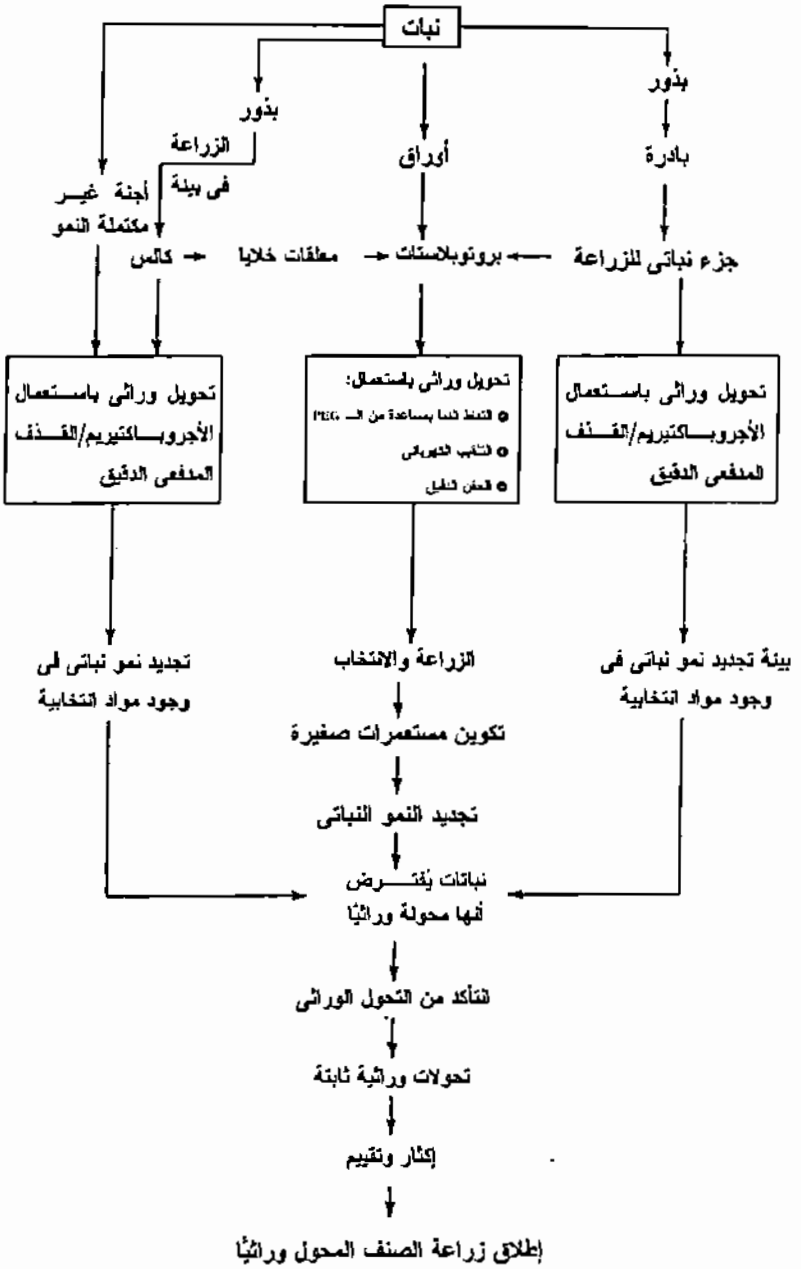
تمهيد

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 - أنتج 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 النيكليوتيدية

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 التى 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 فى 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 الحى والمسببات المرضية (Chahal & Gosal ٢٠٠٢).

الرنا كمصدر للتتابعات النيكليوتيدية

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

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

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

٢ - إن كان الجين المرغوب فيه مُعَبّرًا عنه بشكل جيد، فإن ذلك قد يترتب عليه وفرة فى 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 – تلقائيًا – 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 معمليًا 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 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).

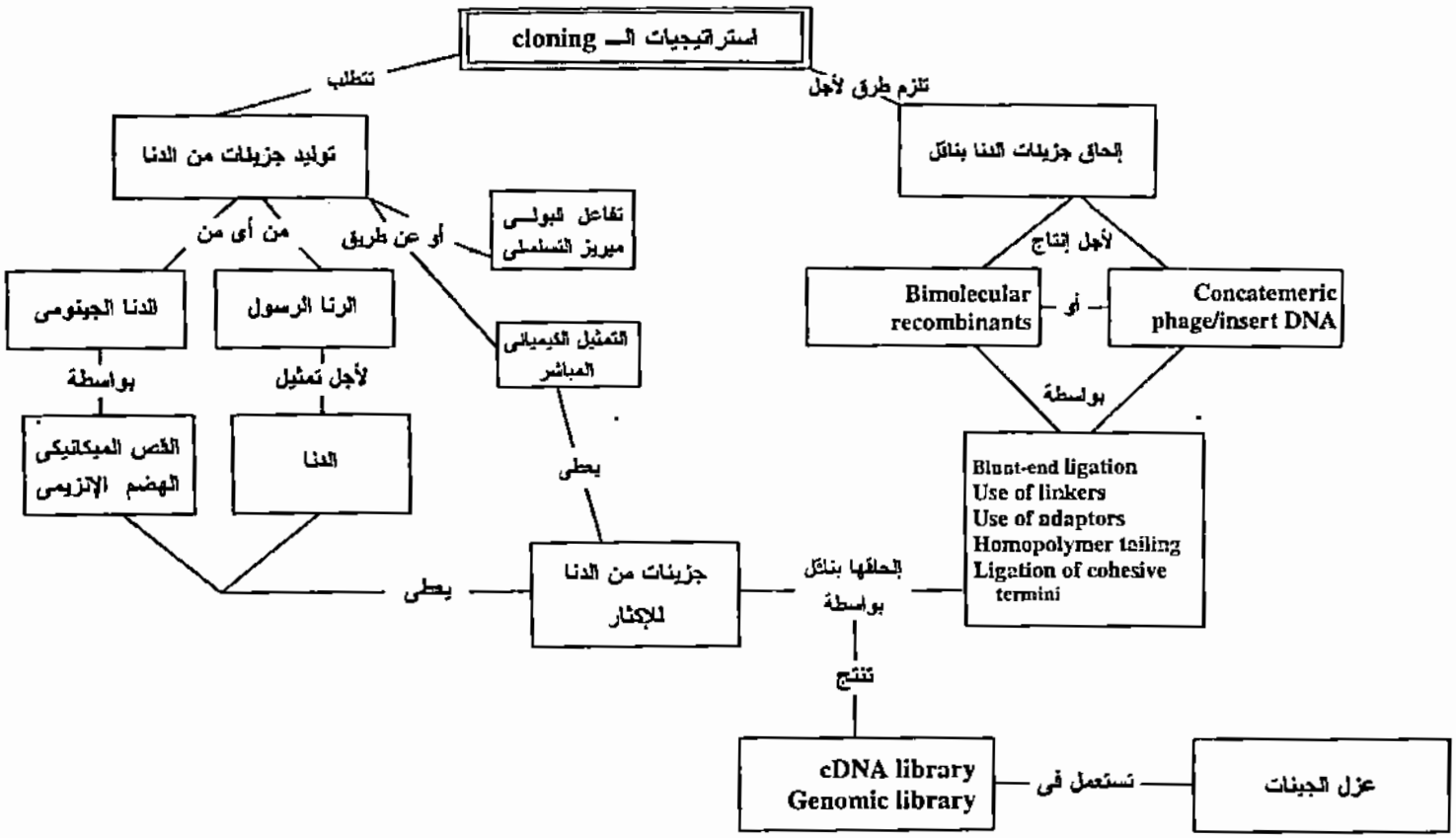
هذا .. ويلخص شكل (١١–٢) استراتيجيات عملية الـ gene cloning.

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*.

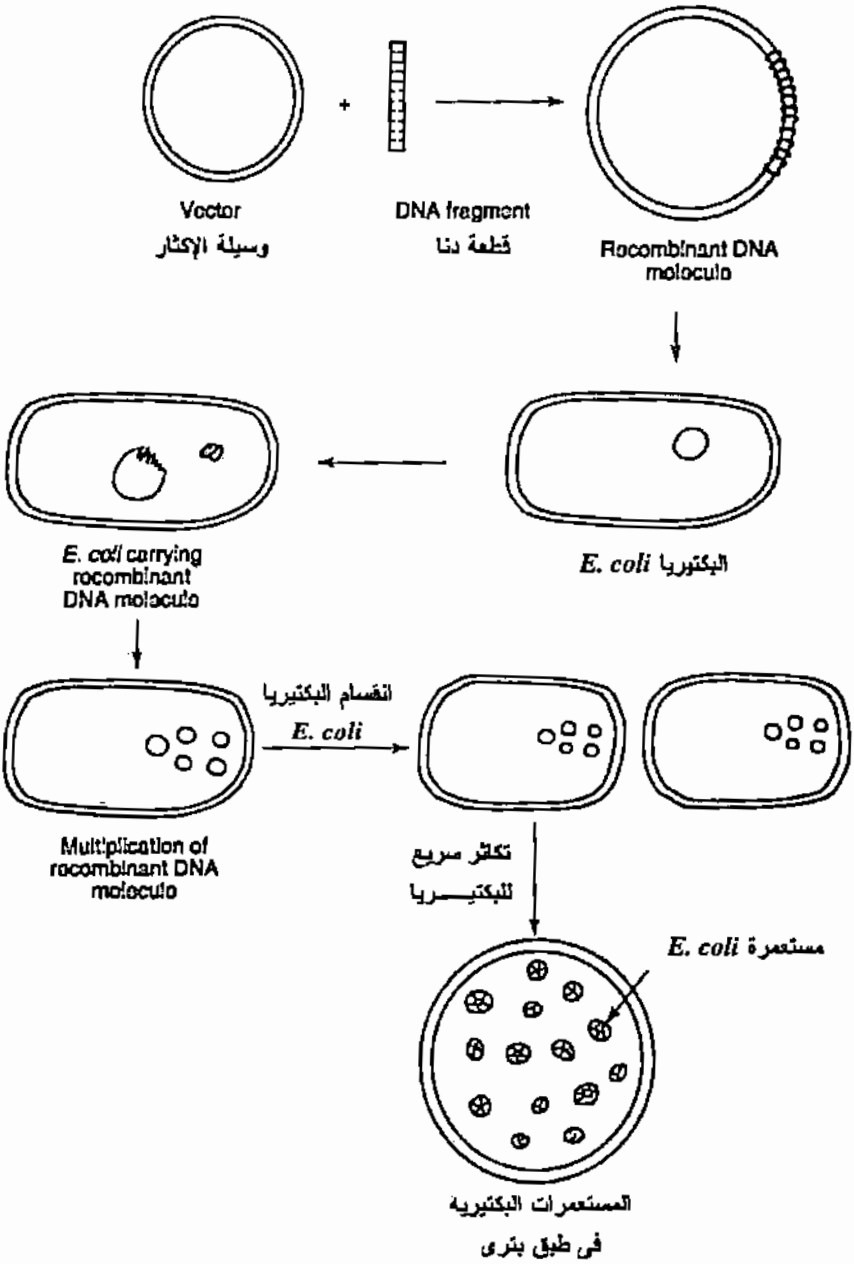
٣ – النباتات (عائل eukaryotic)، وقد تستعمل منها البروتوبلاستات، أو الخلايا أو النباتات الكاملة.

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.

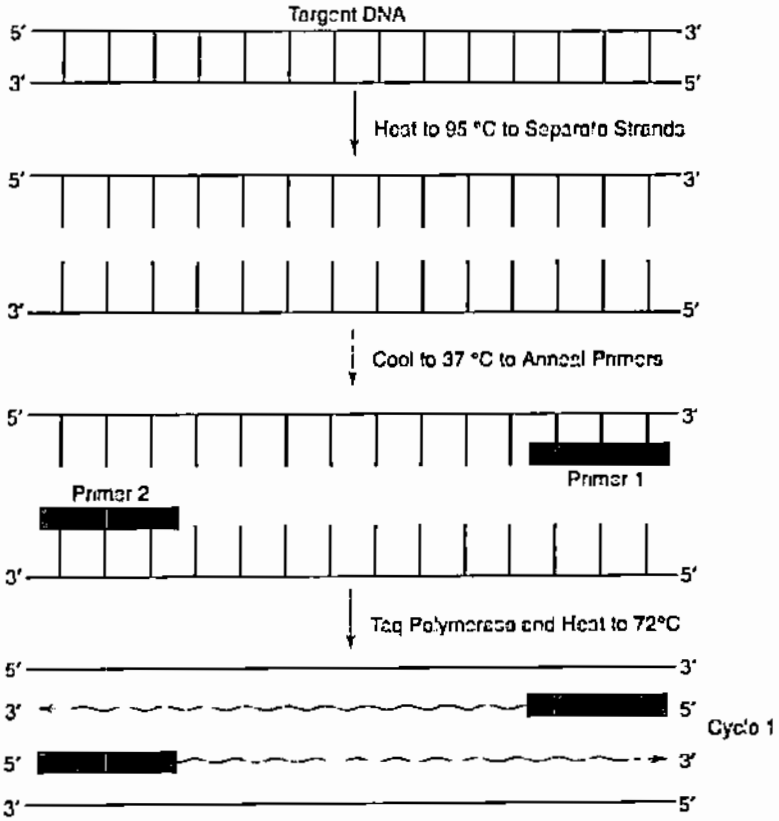
٥ – يُسمح بفترة حضانة مناسبة ليتم بسط البادئات إلى أن يكتمل تكوين نسخة من خيطى الدنا المزدوج الأصلى، وتلك هى نهاية الدورة الأولى. أى إن كل دورة تؤدى إلى مضاعفة الدنا الأصلى. ويتم تكرار الدورات برفع الحرارة لأجل دنترة الدنا .. وهكذا إلى أن تستكمل دورة ثانية، فثالثة ... إلخ. ونظريًا فإن الـ PCR ينتج 2^n 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.

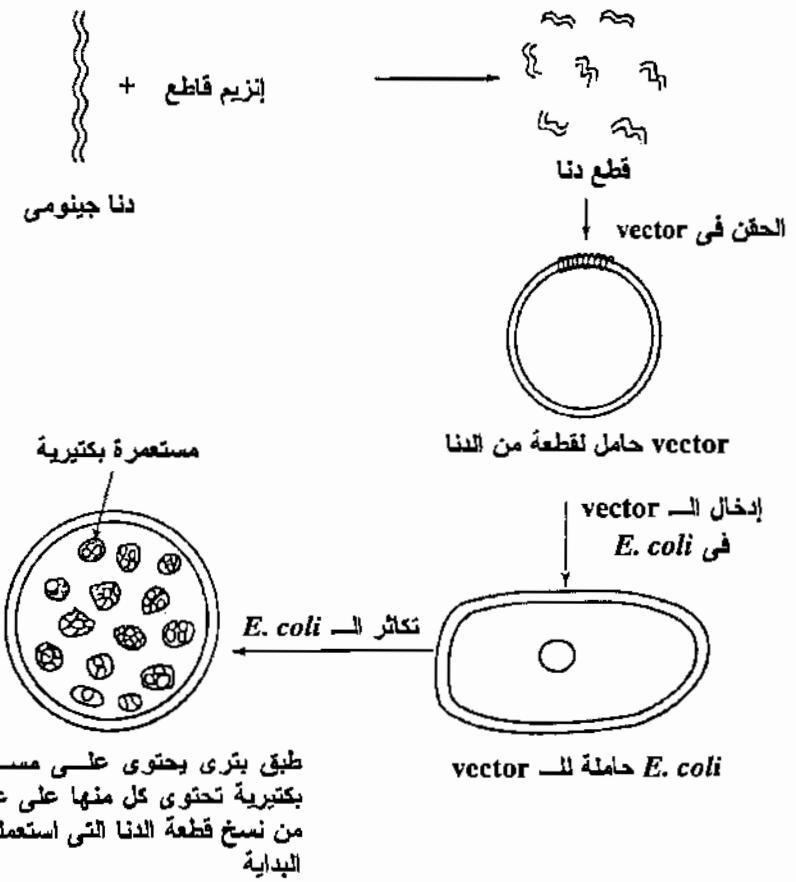


شكل (١١-٤) خطوات الـ **polymerase chain reaction**.

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.

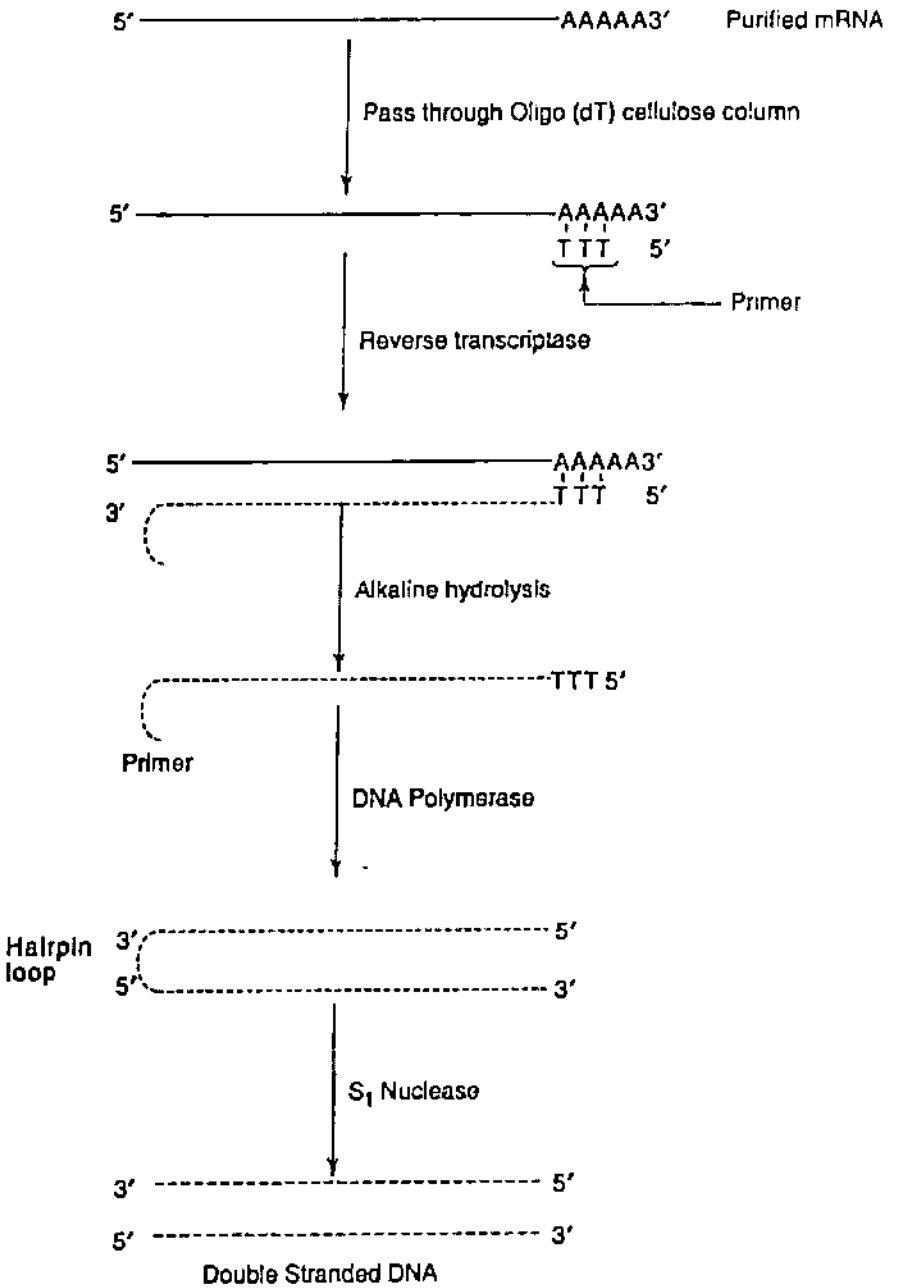
وبالمقارنة بالـ genomic library، فإن الـ cDNA library تتكون فقط من ذلك الجزء من الجينوم الذى يُعبَّر عنه على صورة mRNA، والذى يتم تمثيل الدنا المقابل منه - أى يتم تمثيل الـ cDNA - باستعمال الـ reverse transcriptase enzyme. ويؤدى تجميع كل أجزاء الـ cDNA فى vector مناسب -- مثل البلازميدات - فى مستعمرات

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)

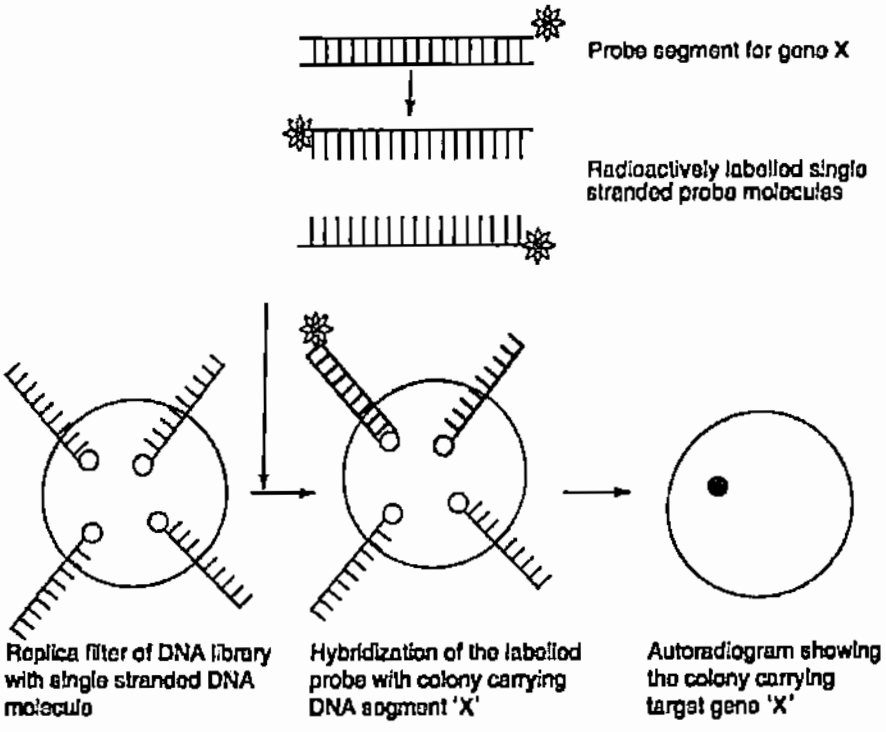
ومن بين الطرق الأخرى التى تستعمل فى التعرف على الجينات المرغوبة فيها، ما يلى:

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:

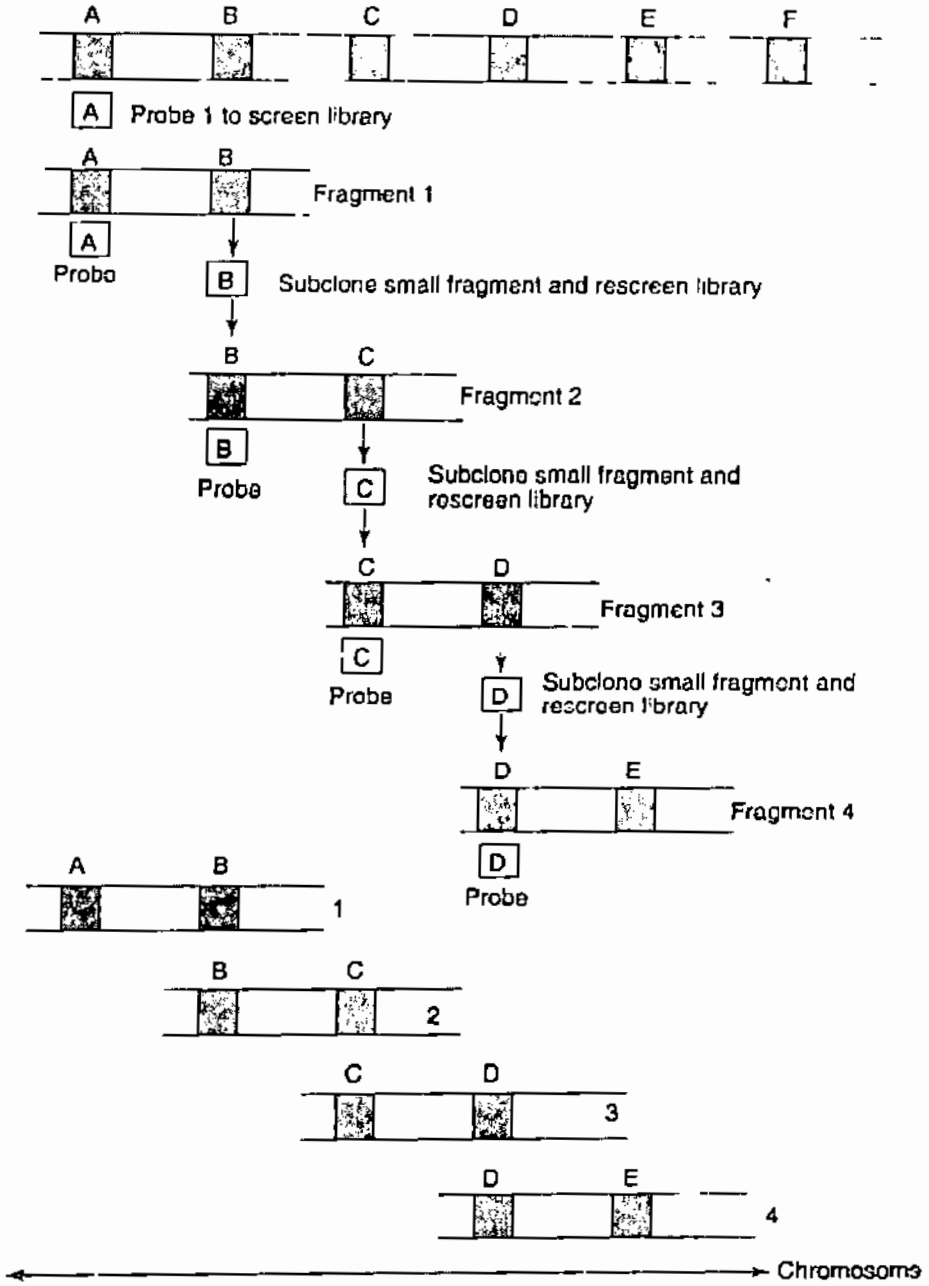
تتواجد الـ transposons (التى تعرف - كذلك - باسم jumping genes) فى عديد من الأنواع النباتية، وهى قادرة على القفز jump أو تغيير مكانها transpose من موقع جينومى لآخر فى نفس الكروموسوم أو فى كروموسوم آخر، مما يؤدى إلى اختلاف التعبير الجينى فى الموقع الجديد؛ بما يعنى حدوث طفرة ويمكن استعمال هذه الـ transposones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

إنزيمات القطع

يلزم عند تكوين جزئ دنا جديد recombinant DNA molecule قطع الحامض النووى الحلقى للناقل فى نقطة واحدة محددة، هى التى يمكن عندها إيلاج جزئ الدنا المراد زراعته . ويتعين أن يحدث القطع فى جزيئات الناقل فى نفس مكان القطع فيها جميعاً يتحقق ذلك بفضل إنزيمات القطع الداخلية restriction endonucleases التى تقوم بقطع الدنا فى مواقع محددة

ولقد عزل أول تلك الإنزيمات من *Haemophilus influenzae* فى عام ١٩٧٠، وتعرف حاليًا عديد من تلك الإنزيمات التى أمكن عزلها من أنواع بكتيرية كثيرة ومتباينة

تتميز معظم الأنواع البكتيرية بالقدرة على مقاومة الدنا الغريب عنها، فهى تحتوى على إنزيمات خاصة من الـ endonucleases (الإنزيمات القاطعة المحددة restriction enzymes) وتقوم البكتيريا بحماية دناها الخاص من التأثير القاتل المحتمل لإنزيماتها القاطعة المحددة بتحويره مسبقا – عادة – بواسطة DNA methylase مناسب، يؤدى إلى مثلمة methylation بعض القواعد الآزوتية للدنا عند تتابعات محدودة، فلا يمكن للإنزيمات التعرف عليها كمواقع للقطع

ونظرًا لأن الإنزيمات القاطعة المحدِّدة استخدمت تقليديًا لأجل تقطيع أوصال الدنا، فإنها أصبحت تُعرَّف – أساسا بالتتابعات التى تتعرف عليها لأجل قطع الدنا عندها ويمكن للغالبية العظمى من تلك الإنزيمات تمييز تتابعات يتراوح طولها بين ٤، و ٦ نيكليوتيدات، إلاّ أن البعض منها يمكنه التعرف على تتابعات تصل إلى ثمانى نيكليوتيدات يقوم الإنزيم بقطع الدنا فى كل موضع يتضمن تتابع أزواج القواعد الآزوتية التى يمكنه التعرف عليها فيه، ولذا فإنه كلما قل عدد النيكليوتيدات فى أى موقع تُعرَّف للإنزيم كلما زاد عدد مرات قطع الإنزيم للدنا (Webb & Wilson ١٩٩١)

تعرف ثلاثة طرز من الإنزيمات القاطعة restriction enzymes، هى I، و II، و III، وبعظم ما يستعمل منها حاليًا هو من الطراز II، وهو أبسطها من حيث طريقة فعله تعد هذه الإنزيمات من التى تعمل فى النواة nucleases ونظرًا لأنها تقطع خيط

الدنا فى موقع داخلى منه (مقارنة بتلك التى تبدأ القطع عند أحد الأطراف)؛ لذا .. فإنها تعرف باسم endonucleases؛ ومن هنا جاء اسمها الكامل type II restriction endonucleases، ولكنها غالبًا ما تسمى restriction enzymes للتبسيط، وهى فى جوهرها مقصات جزيئية.

تعطى الإنزيمات القاطعة أسماء متباينة، ويشكل اسم الكائن الذى اكتشف فيه الإنزيم لأول مرة الجزء الأول من اسم هذا الإنزيم، حيث يؤخذ من الكائن الحرف الأول من اسم جنسه، والحرفين الأولين من اسم نوعه. وبذا .. فإن إنزيمًا قاطعًا من سلالة من البكتيريا *Escherichia coli* يأخذ الرمز Eco، وآخر من البكتيريا *Bacillus amyloliquefaciens* يأخذ الرمز Bam ... وهكذا. ويمكن أن يدخل فى اسم الإنزيم مواصفات أخرى، مثل السلالة البكتيرية. ومن أكثر الإنزيمات استخدامًا من بين تلك المشار إليها أعلاه EcoRI، و BamHI.

وترجع أهمية الإنزيمات القاطعة إلى تخصصها؛ فكل إنزيم منها لا يمكنه التعرف إلاّ على تتابعات محددة من القواعد الآزوتية بالدنا. وأكثر التتابعات التى تميز بتلك الإنزيمات شيوعًا تتكون من أربعة أزواج من القواعد، أو خمسة، أو ستة أزواج طولاً. وعليه .. فمع العلم بأنه يوجد أربعة من القواعد فى الدنا، وبافتراض أن توزيعها عشوائى .. فإن المعدل المتوقع لأى تتابع يكون $٤^{ن}$، حيث ن هى طول التتابع المعنى. ويعنى ذلك أن موقعًا يحتوى على أربعة تتابعات محددة يمكن أن يقع مرة فى كل ٢٥٦ حالة لأربعة تتابعات، بينما يمكن أن يقع تتابع محدد لخمس قواعد مرة فى كل ١٠٢٤ حالة، ويقع التتابع المحدد لست قواعد مرة فى كل ٤٠٩٦ حالة. ونظرًا لأن القواعد الآزوتية لا تكون موزعة عشوائيًا - بطبيعة الحال - فإن النسب المختلفة لأطول التتابعات المختلفة تختلف - عمليًا - عن النسب المتوقعة لها، والتى تعد مجرد مؤشرات إلى احتمالات حدوثها. وبناء على ما أسلفنا بيانه .. فإن الإنزيم الذى يمكنه التعرف على تتابع معين لأربع نيكليوتيدات (والذى يسمى أحيانًا قاطع الأربع four-cutter) سوف ينتج أجزاء من الدنا أقصر من تلك التى ينتجها قاطع الست.

ويعطى جدول (١١-١) أمثلة لأكثر الإنزيمات القاطعة استعمالاً والتتابعات التى

يمكن لتلك الإنزيمات التعرف عليها، وأين يحدث القطع (عن Nicholl ١٩٩٤)، كما يعطي جدول (١١–٢) مزيدًا من التفاصيل عن تلك الإنزيمات وغيرها (عن Chawla ٢٠٠٠).

جدول (١١–١): مواقع القَطع التي تتعرف عليها إنزيمات القطع في تتابعات الحامض النووي وأنواع نهايات سلاسل النيكليوتيدات التي تترتب على عملية القطع.

النهايات	مواقع القَطع	التتابعات التي يتعرف عليها	الإنزيم
5′	G↓GATCC CCTAG↑G	5′-GGATCC-3′	*BamHI*
5′	G↓AATTC CTTAA↑G	5′-GAATTC-3′	*EcoRI*
Blunt	GG↓CC CC↑GG	5′-GGCC-3′	*HaeIII*
Blunt	GTT↓AAC CAA↑TTG	5′-GTTAAC-3′	*HpaI*
3′	CTGCA↓G G↑ACGTC	5′-CTGCAG-3′	*PstI*
5′	↓GATC CTAG↑	5′-GATC-3′	*Sau3A*
Blunt	CCC↓GGG GGG↑CCC	5′-CCCGGG-3′	*SmaI*
3′	GAGCT↓C C↑TCGAG	5′-GAGCTC-3′	*SstI*
5′	C↓CCGGG GGGCC↑C	5′-CCCGGG-3′	*XmaI*

وتنتج إنزيمات مثل PstI، و EcoRI قِطَع دنا ذات أطراف "لزجة" sticky، نظرًا لأن التتابعات البارزة منها يمكنها التقارن مع القواعد ذات التتابعات المكملة لها والتي ينتجها الإنزيم ذاته. وبذا . فإنه يمكن بقطع عينتان من الدنا بإنزيم واحد ثم خلط قطع الدنا الناتجة معًا الحصول على دنا جديد انعزالي recombinant DNA، كما يظهر شكل (١١–٩). ويعد ذلك من أهم استعمالات إنزيمات القص.

جدول (١١-٢): بيان ببعض الإنزيمات القاطعة، وخصائصها، والكائنات التى تقوم بإنتاجها.

الإنزيم	الكائن المنتج له	التتابعات التى يتعرف عليها
Staggered cut (sticky ends)		
BamHI	*Bacillus amyloliquefaciens* H	G↓GATCC
BglII	*Bacillus globigi*	A↓GATCT
EcoRI	*Escherichia coli* R	G↓AATTC
HindIII	*Haemophilus infuenzae* Rd	A↓AGCTT
PstI	*Providencia stuartii*	CTGCA↓G
SalI	*Streptomyces albus* G	G↓TCGAC
TaqI	*Thermus aquaticus*	T↓CGA
PstI	*Providencia stuartii*	CTGCA↓G
Blunt ends		
AluI	*Arthrobacter luteus*	AG↓CT
HaeIII	*Haemophilus aegypticus*	GG↓CC
HpaI	*Haemophilus parainfuenzae*	GTT↓AAC
PvuII	*Proteus vulgaris*	CAG↓CTG
Sau3A	*Staplylococcus aureus* 3A	↓GATC
SmaI	*Serratia marcescens*	CCC↓GGG

شكل (١١-٩): تكوين دنا جديد recombinant DNA، وذلك بوصل قطع دنا من مصادر مختلفة بعضها ببعض عند أطرافها اللزجة sticky ends؛ وهى الأطراف التى تتكون بفعل عديد من إنزيمات القص restriction enzymes، ويحدث الالتحام بفعل إنزيم وصل الدنا DNA ligase.

تستعمل الإنزيمات القاطعة بطريقة بسيطة للغاية، حيث تضاف كمية مناسبة من الإنزيم إلى الدنا المعنى فى محلول منظم، مع تحضين التفاعل على ٣٧م. يتم التعبير عن النشاط الإنزيمى بالوحدات، تحدد كل وحدة منها بكمية الإنزيم التى يمكنها هضم (قص) ميكروجرام واحد من الدنا خلال ساعة واحدة على ٣٧م. وعلى الرغم من تتطلب معظم الدراسات إجراء هضم كامل للدنا المعنى، فإن هناك حالات تستخدم فيها توافيق مختلفة من تركيز الإنزيم مع وقت التحضين لتحقيق هضم جزئى فقط.

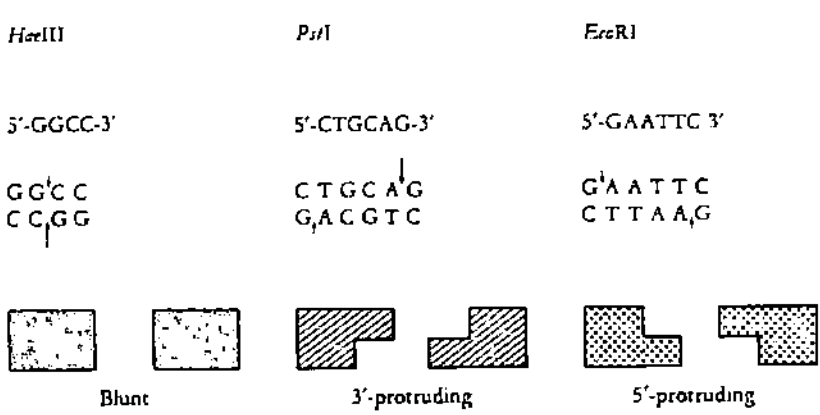
يتوقف نوع جزئ الدنا الذى ينتجه إنزيم معين على كل من التتابع الذى يتعرف عليه الإنزيم، وعلى موقع القطع داخل ذلك التتابع. وكما أسلفنا فإن طول قطعة الدنا يتوقف على معدل حدوث التتابع الذى يمكن للإنزيم التعرف عليه على امتداد الدنا ويحدد مكان القطع الفعلى للإنزيم نوع النهايات الممكنة لقطع الدنا المقطوعة. ولذلك أهمية كبيرة بالنسبة لعمليات التداول التالية للدنا

ويمكن أن تنتج ثلاثة طرز من النهايات لقطع الدنا، هى (شكل ١١-١٠).

١ – قطع دنا ذات نهايات مسطحة blunt ends

٢ – قطع دنا تبرز منها الـ 3'ends.

٣ – قطع دنا تبرز منها الـ 5'ends (عن Nicholl ١٩٩٤).



شكل (١١-١٠): أنواع النهايات التى تحدث بفعل أنواع مختلفة من إنزيمات القص تُميز الإنزيمات فى الشكل بكل من: (أ) التتابعات التى يمكنها التعرف عليها، و (ب، جـ) مواقع القص، و (د) نوعيات النهايات التى تتكون نتيجة لذلك.

وتجدر الإشارة إلى أن معظم المواقع تحتوى على محورين متناظرين، وتكون القواعد الآزوتية فى الموقع محددة بصورة فريدة، إلا أن ذلك لا يصدق فى كل الحالات. تقوم الإنزيمات القاطعة التى تتعرف على المواقع المتناظرة بقطع بصورة متناظرة فى الموقع ذاته وفيما يجاوره، بينما تقوم الإنزيمات القاطعة التى تتعرف على المواقع غير المتناظرة assymetrical sites بقطع الدنا فى مكان يبعد بمسافة عن الموقع ذاته.

وكما أسلفنا فإن لطبيعة القطع أهمية كبيرة؛ نظرًا لأن النهايات المترتبة على عملية القطع تحدد مدى مناسبة قِطَع الدنا الناتجة للإجراءات التى تلى عملية القطع. إن جميع الإنزيمات القاطعة تقطع الدنا الذى تعمل عليه؛ لتنتج نهاية 5′phosphate، و 3′hydroxy على كل خيط عند كل قطع. ويمكن لتلك الكسور أن تنتظم لتعطى إما 5′phosphate overhangs (شكل ١١-١١أ)، وإما 3′hydroxyl overhangs (شكل ١١-١١ب)، وإما قد تعطى الكسور نهايات blunt (شكل ١١-١١جـ).

```
أ   ...GAATTC...   EcoRI    ...G 3'        5'AATTC...
    ...CTTAAG...  ------>   ...CTTAA             G...

ب   ...CTGCAG...   PstI     ...CTGCA 3'          5'G...
    ...GACGTC...  ------>   ...G             ACGTC...

جـ  ...CCCGGG...   SmaI     ...CCC 3'          5'GGG...
    ...GGGCCC...  ------>   ...GGG              CCC...
```

شكل (١١-١١): ثلاثة نهايات يمكن أن تتكون نتيجة لقطع الدنا بالإنزيمات القاصة، هى: (أ) 5′-overhangs، (ب) 3′-overhangs، و (جـ) النهايات المتساوية **blunt ends**.

يؤدى هضم الدنا بتلك الإنزيمات إلى إنتاج أجزاء متباينة الطول، حسب توزيع مواقع القطع فى الدنا. ويمكن فصل تلك الأجزاء بالـ gel electrophoresis (Webb & Wilson ١٩٩١).

تحتوى معظم قطع الدنا على مواقع التعرف لمختلف إنزيمات القص، ويكون - غالبًا - من المفيد التعرف على المواقع النسبية لبعضها البعض. وتعرف التقنية التى تستعمل للحصول على هذه المعلومات باسم restriction mapping. ويتضمن ذلك قطع جزء من

الدنا بعدد من إنزيمات القص المختارة إما منفردة، وإما فى توافيق مختلفة. يلى ذلك تمرير القطع الناتجة فى agarose gel لأجل فصل الأحجام وتحديدها. ويمكن من نتائج ذلك الاختبار تحديد المواقع النسبية لأماكن القطع.

نفترض – مثلاً – أننا نرغب فى رسم خريطة أماكن القطع لإنزيمات القطع BamHI، و EcoRI، و PstI، وأن الدنا المعنى يبلغ طوله ١٥ kb. يتم إجراء عدة عمليات هضم، ثم تمرر قطع الدنا الناتجة فى جل الأجاروز وتحدد أحجامها (جدول ١١–٣). ونظرًا لأن كل عملية قطع إنزيمى ينتج عنها قطعتان من الدنا، فإنه يمكننا الاستنتاج بأن الدنا يوجد به مكان قطع واحد لكل إنزيم ويمكن الهضم المزدوج (باستعمال إنزيمين) من رسم خريطة جزيئية، ويؤكد الهضم الثلاثى (باستعمال ثلاثة إنزيمات) تلك الخرائط (شكل ١١–١٢) (عن Nicholl ١٩٩٤)

جدول (١١–٣): هضم قطعة دنا طولها **15 kb** باستعمال ثلاثة إنزيمات قاطعة[أ]

BamHI	EcoRI	PstI	BamHI + EcoRI	BamHI + PstI	EcoRI + PstI	BamHI + EcoRI + PstI
14	12	8	11	8	7	6
1	3	7	3	6	5	5
			1	1	3	3
						1

أ – القيم التى تظهر بالجدول هى بالـ kb لقطع الدنا التى تتكون نتيجة لهضم القطعة الـ 15kb باستعمال إنزيمات BamHI، و EcoRI، و PstI وتظهر نتائج عمليات الهضم الفردى والمزدوج والثلاثى كما هو مبين بالجدول.

الإنزيمات النووية nucleases الأخرى

بخلاف إنزيمات القطع فإنه تعرف أربعة أنواع من الـ nucleases التى غالبًا ما تستعمل فى مجال الهندسة الوراثية، وهى:

Bal 31 (exonuclease)
exonuclease III (exonucleas)
deoxyribonuclease I or Dnase I (endonuclease)
S_1-nuclease (endonuclease)

النباتات الوحيدة الفلقة التى تستعصى إصابتها بالبكتيريا يمكن - تحت ظروف خاصة - تحويلها وراثيًا بالأجروباكتيريم (عن Jahne وآخرين ١٩٩٥).

وكما سبق أن أوضحنا .. فقد ثبت إمكان نقل الـ T-DNA من الأجروباكتيريم إلى الخلايا النباتية لعديد من وحيدات الفلقة الهامة، مثل الذرة، والأرز، والقمح. ولقد وجد فى الذرة أن النبات ينتج مركب أيض ثانوى ذات فعل بكتيرى مثبط يمنع حث الـ vir genes، إلا أن هذا المركب ليس ثابتًا، حيث أدت فترة من الزراعة فى مزارع الأنسجة قبل التلقيح بالبكتيريا، أو إطالة فترة مزرعة الأنسجة مع البكتيريا إلى التغلب على هذا التأثير المثبط.

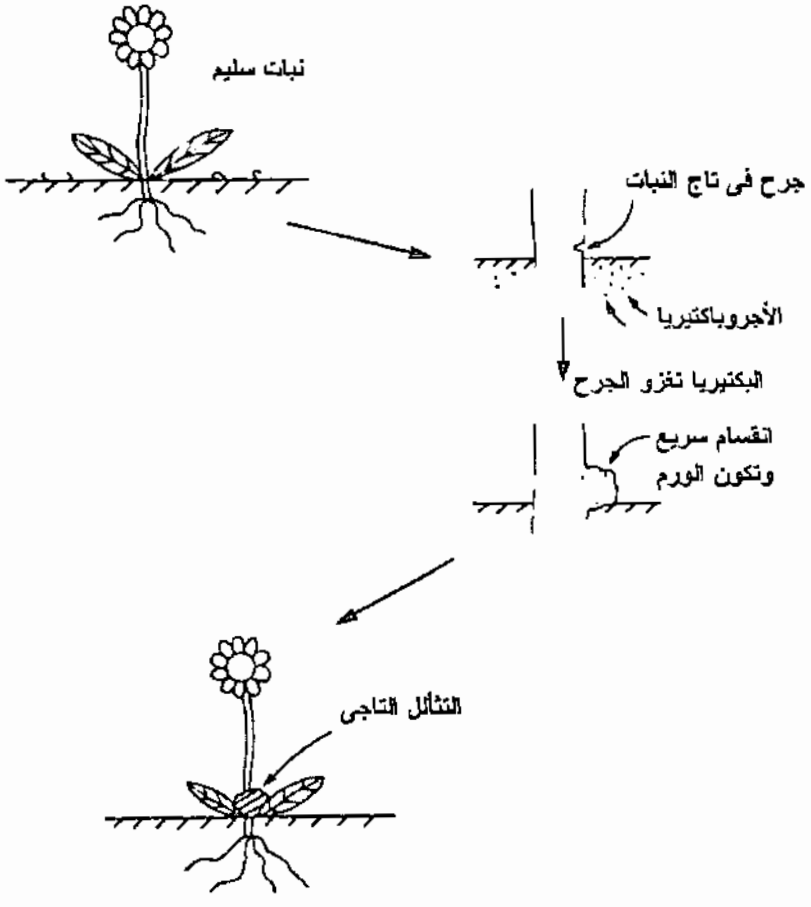
هذا وتنتج سلالات الأجروباكتيريم المختلفة آليلات خاصة من الـ vir A gene، يمكن لبعضها أن يشفر لبروتين vir A غير حساس للمركب الأيضى الثانوى الذى تطلقه النباتات الأحادية الفلقة. ولذا . فإنه من الضرورى فى عمليات التحول الوراثى للنباتات الأحادية الفلقة استعمال سلالة أجروباكتيريم تحتوى على جين vir A متوافق معها (عن Block ١٩٩٣).

كذلك أمكن زيادة كفاءة التحويلات الوراثية المعتمدة على بكتيريا الأجروباكتيريم، والتغلب على مشكلة عدم قدرة البكتيريا على إصابة عوائل معينة باللجوء إلى الترددات الصوتية العالية sonication. وفى هذه الطريقة يُعَرَّض النسيج النباتى المستهدف لفترات قصيرة من الموجات الصوتية الفائقة ultrasound فى وجود الأجروباكتيرم. ولقد أمكن بهذه الطريقة الحصول على تحويلات وراثية ثابتة فى فول الصويا. وأوضح التحليل الهستولوجى أن المعاملة أحدثت فى النسيج النباتى تشققات دقيقة ومتجانسة وقنوات، وهى التى ربما تكون قد ساعدت فى تسهيل الإصابة بالبكتيريا (عن Simmond & Smartt ١٩٩٩)

باثولوجى الإصابة بالأجروباكتيريم

عندما تحدث الجروح فى منطقة تاج النبات - أو فى أى مكان آخر منه - فإنه يمكن أن تحدث العدوى بالبكتيريا *A. tumefaciens* بسهولة، حيث تبدأ الخلايا النباتية فى

مكان الإصابة فى الانقسام والتضخم لتكون ورمًا tumor، أو ما يعرف بالتثأل التاجى (شكل ١٢-٢)، ثم تبدأ فى تمثيل مشتق من الأرجنين يطلق عليه اسم أوبين opine، يكون - عادة - إما نوبالين nopaline، وإما أوكتابين octapine، الأمر الذى يتوقف على سلالة الأجروباكتيريم المستعملة فى العدوى تستخدم هذه الأوبينات كمصادر للطاقة بواسطة البكتيريا وجدير بالذكر أن سلالات بكتيريا الأجروباكتيريم التى تستحث تمثيل النوبالين يمكنها النمو على النوبالين وليس الأوكتابين، والعكس بالعكس. وبينما توجه البكتيريا أيض النبات لإنتاج الأوبينات التى تستفيد منها كمصدر للطاقة، فإن تلك المركبات ليست لها فائدة للنبات (عن Gardner وآخرين ١٩٩١).



شكل (١٢-٢): كيفية ظهور أعراض التثأل التاجى crown gall

وعند وصف إنزيم polymerase يستعمل مصطلح DNA-dependent، أو RNA-dependent للدلالة على نوع الحامض النووى الذى يستعمله الإنزيم كقالب له. وبذا .. فإن DNA-dependent DNA polymerase ينسخ الدنا ليكون دنا جديد، والـ RNA-dependent RNA polymerase ينسخ الرنا ليكون رنا جديد. وتقوم تلك الإنزيمات بتمثيل الأحماض العضوية بوصل نيكليوتيدات معًا تكون قواعدها متممة لخيط الحامض النووى القالب.

أما الإنزيم reverse transcriptase فإنه يعد RNA-dependent DNA polymerase، وهو يقوم بإنتاج خيط دنا من قالب من الرنا. ويستعمل هذا الإنزيم أساسًا فى نسخ جزيئات RNA عند تحضير الـ cDNA (وهو الـ complementary DNA، أو الـ copy DNA، عن Nicholl ١٩٩٤).

الإنزيمات التى تحور نهايات جزيئات الدنا

تعمل مجموعة من الإنزيمات على نهايات جزيئات الدنا، ومن أمثلتها ما يلى:

Alkaline phosphatase

Polynucleotide kinase

Terminal transferase

ومن خلال وظائف تلك الإنزيمات، فإنه يستفاد منها فى أوجه شتّى.

وكما يستدل من الإسم، فإن إنزيمات الـ phosphatase، والـ kinase تقوم بوظيفة إزالة أو إضافة مجموعات الفوسفات. فمثلاً يقوم الإنزيم البكتيرى alkaline phosphatase بإزالة مجموعات الفوسفات من الأطراف الـ 5′ للدنا، تاركًا مجموعة الـ 5′-OH، ويستعمل الإنزيم فى منع الربط ligation غير المرغوب فيه لجزيئات الدنا، وهو الذى قد يتسبب فى مشكلة فى بعض إجراءات عزل الجينات.

أما الإنزيم terminal transferase فإنه يضيف - بصورة متكررة - نيكليوتيدات لأى نهاية 3′ متوفرة، وهو يستعمل أساسًا فى إضافة ذيل من الـ homopolymer لجزيئات الدنا قبل إنشاء التركيب الجديد له (عن Nicholl ١٩٩٤).

إنزيمات وصل الدنا

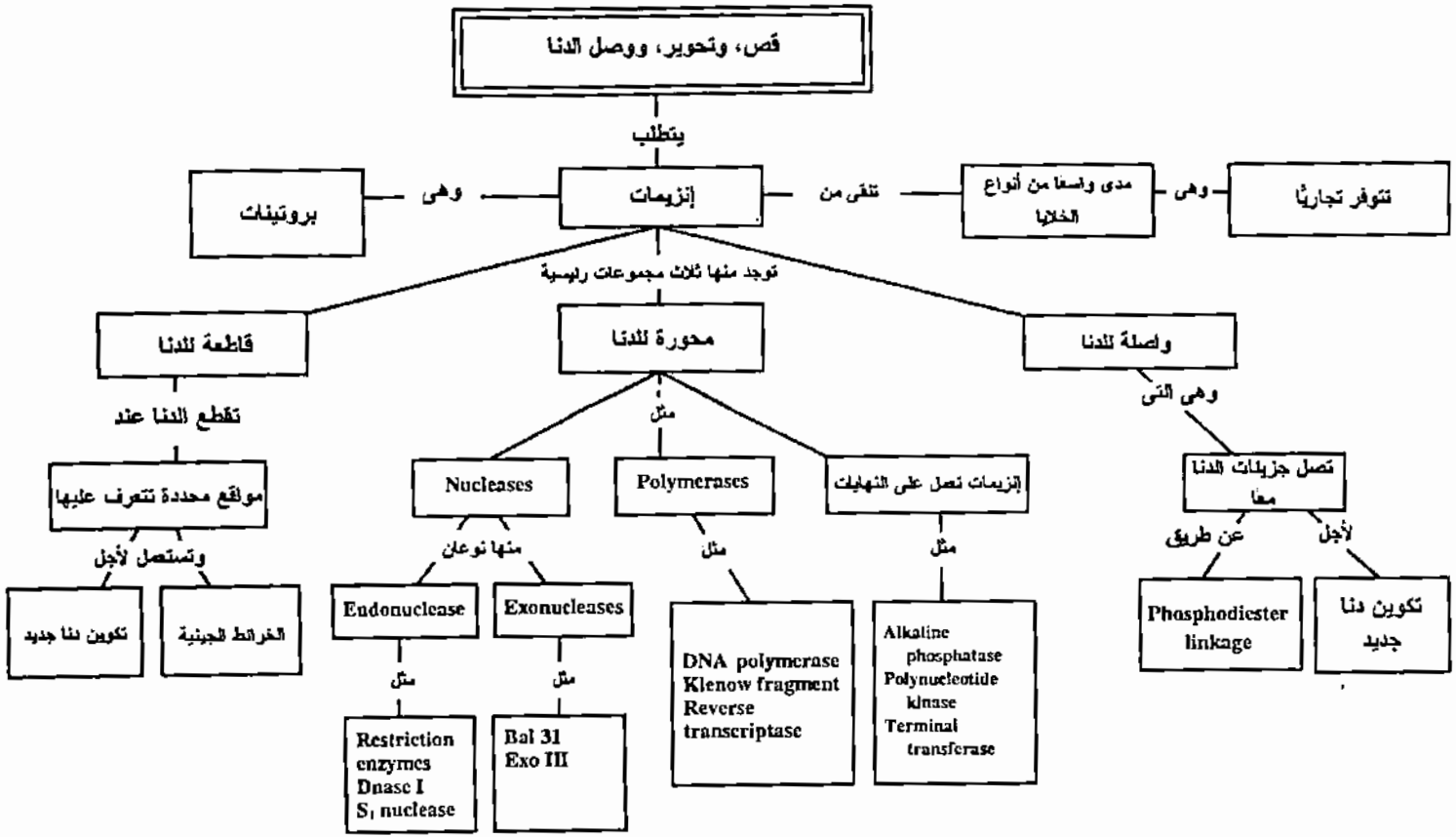
إن الإنزيمات التى تستعمل فى وصل جزيئات الدنا تعرف باسم DNA ligases وعندما يقطع كلاً من دنا الناقل vector DNA والدنا الغريب foreign DNA بالإنزيم القاطع restriction enzyme ذاته، فإن النهايتين المتطابقتين جزئيًا لكل من دنا الناقل والدنا الغريب تكونا متوافقتين ومكملتين لبعضهما البعض وعند خلط أجزاء الدنا وجزيئات الناقل معًا فإنهما يكونا أزواج متكاملة من القواعد بين التتابعات الطرفية المتطابقة جزئيًا لخيط الدنا المفرد. تعمل إنزيمات الـ ligases على الدنا ذات مجموعات الفوسفات الطرفية من النوع 5′، وتكون الرابطة الـ phosphodiester بين تتابعات كل من دنا الناقل والدنا الغريب لربطهما معًا. وتلك هى الخطوة الأخيرة فى تركيب جزئ دنا جديد recombinant DNA molecule. وتعرف تلك العملية باسم ligation (عن Chawla ٢٠٠٠)

تعد إنزيمات ربط الدنا DNA ligase من الإنزيمات الخلوية الهامة؛ إذ إنها تعمل على إصلاح الروابط الـ phosphodiester التى قد تحدث عشوائيًا، أو كنتيجة لانقسامات الدنا أو انعزالاته وتستعمل هذه الإنزيمات فى مجال الهندسة الوراثية فى لحام حالات عدم الاستمرارية فى سلاسل الـ sugar-phosphate التى تنشأ عند تكون الدنا الجديد، وذلك بربط جزيئات دنا من مصادر مختلفة، وهى بذلك تعد بمثابة صمغ جزيئى يستعمل فى لصق قطع من الدنا مع بعضها البعض وتعد هذه الوظيفة أساسية لنجاح عديد من الخطوات.

وأكثر إنزيمات الربط استعمالاً الإنزيم T4 DNA ligase. الذى يُحصل عليه من البكتيريا *E coli* المصابة بالبكتيريوفاج (الفاج البكتيرى) T4

وجدير بالذكر أن جميع عمليات قص الدنا ولصقه تتم فى أنابيب الاختبار، إلا أنه ما أن يُحصل على الدنا الجديد recombinant DNA، فإنه يتعين إكثاره حتى يتوفر لدينا قدر كافٍ منه لعمليات التداول التالية وتجرى عملية الإكثار هذه فى كائن حىّ

هذا ويلخص شكل (١١-١٤) الأنواع المختلفة من الإنزيمات المستعملة فى مجال التعامل مع الدنا ووظائفها (عن Nicholl ١٩٩٤)



شكل (١١-١٤): الإنزيمات المستعملة فى مجال التعامل مع الدنا ووظائفها.