

الباب الثالث

الإستنساخ الوراثي والإتجاهات الحديثة فى التكنولوجيا الحيوية

Cloning and New Trends in Biotechnology

خطوات هندسة الكائنات الحية وراثيا

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

أولا: تصميم الخرائط الوراثية Genetic Maps Design

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

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

المحصول ٠٠٠ الخ. وعلى أية حال، فإن طريق إجراء إختبارات علي مستوى DNA بإستخدام تقنيات البيولوجيا الجزيئية يمكن إنتخاب النباتات الحاملة لهذه المقاطع والتي ترشد المربي علي وجود الصفة المرغوب فيها مباشرة وبدقة مما يمكنه من الوصول إلي الهدف المنشود من برنامج التربية من خلال جيلين أو ثلاثة بدلا من ١ إلي ١٥ جيلا بإتباع الطرق التقليدية.

١- الإرتباط الوراثي أو الخرائط الهجينة

Genetic Linkage or Hybrid Maps

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

٢- تهجين الأحماض النووية وخرائط التماثل

Nucleic Acid Hybridization and Homology Map

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

المعروفة الوظيفة فإن الروابط الهيدروجينية بين أزواج القواعد النيتروجينية تنكسر فتفصل كلتا السلسلتين في كل جين وعند تبريد المعلق المحتوى على DNA فإن السلسلتين تعاودا الارتباط لأن كل منهما يمىلا لتكملة بعضهما البعض تماما، فإذا تم خلط DNA من خلية ما مع DNA مصنع أو الحامض النووى mRNA مصنع حيث يعزل البروتين المسبب لظاهرة فسيولوجية معينة ويتم دراسة تسلسل وترتيب الأحماض الأمينية به وتعطى تلك البيانات إلى الكمبيوتر لإستنباط وتوقع تسلسل الجين المسئول عن هذا البروتين ثم يقوم جهاز PCR بتكوين شظايا الحامض النووى DNA أو RNA المتوقع، لكن نظراً لوجود عدة احتمالات لتتابع النيوكليوتيدات داخل الجين محل الدراسة ونظراً لأن الشفرة الوراثية للأحماض الأمينية ليست شفرة واحدة فللحمض الأميني أكثر من شفرة واحدة فإذا ما خلط DNA المصنع وحدث الارتباط بين الجين المطلوب البحث عنه مع إحدى جزيئات DNA المصنع سمي الناتج **Homologous DNA** وتسمى تلك التقنية باسم **DNA Hybridization** ويمكن جعل أحد الأحماض النووية الداخلة في تركيب DNA المستخدم في التعرف على الجين مشع **Radioactive** بذلك يمكن إصطياده ومن طبق الزراعة **Petri dish** الذي يتم تحضينه تحت التبريد لمدة ٢٤ ساعة وعليه لوحة من فيلم حساس ليظهر عليها تأثير القواعد المشعة لتتعرف على الجينات التي حدث لها تهجين فيتم عزلها وتنقيتها وإكثارها ثم إستخدامها في هندسة نبات آخر .

٣- الخرائط الجزيئية **Molecular Maps**

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

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

٤- إستخدام الميكروسكوب الإلكتروني في رسم الخرائط الكروموسومية

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

٥- خرائط الإنتشار الإنزيمي المقيد

Restriction Fragment Length Polymorphism

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

ثانياً: دراسة تتابع النيكلوتيدات داخل الجين

Ultimate Structure Maps

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

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

ثالثاً: معالجة الجين المعزول لكي يعبر وراثياً عن نفسه

Gene Expression

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

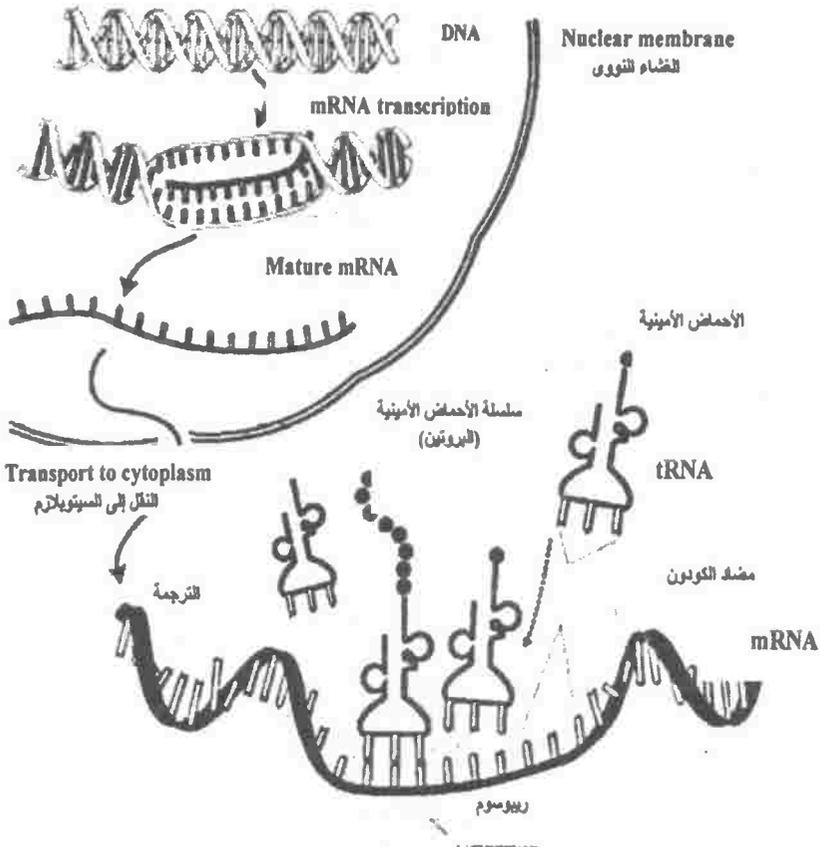
▪ **المنطقة الأولى** تسمى تسلسل المحفز **Promoter sequence** وهي تساعد في تحديد توقيت عمل الجين وموقع تعبير الجين فهي بمثابة شفرة للجين نفسه وتحدد مكان بدء نسخ الحامض النووي RNA الرسول (إبدأ من هنا) (شكل ٢٥) .

▪ **المنطقة الثانية** هي منطقة التشفير وهي تحمل معلومات تحدد طبيعة البروتين الذي يشفره الجين التركيبي **Structure gene** .

▪ **المنطقة الثالثة** والتي يطلق عليها منطقة الادينين المتعددة **Ploy adenylation (Poly-A)** وهي المسنولة عن إنهاء عمل نسخة الحامض النووي tRNA الرسول للحامض النووي RNA transcript Messenger على الوجه الصحيح وكأنها تقول للجين إنهى عملية النسخ هنا .

ولحسن الحظ أن أمام المتخصص في الهندسة الوراثية حرية واسعة في مزج هذه المناطق والموانمة بينهما وتجميعهما من جينات مختلفة لتنتج ما يسمى بالجينات الكيميرية أو الخليطة **Chimeric genes** وبذلك أمكن للمتخصصين في الهندسة الوراثية اختيار محفزات متباينة فأمكنهم توجيه تعبير الجين إلى أعضاء بذاتها مثل الأوراق أو البذور أو الجنور أو الدرناات

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



شكل ٢٥: التعبير الجيني Gen expression

رابعاً: مرحلة تطعيم الجين وإكثاره Gene Cloning

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

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

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

خامساً: نقل الجين إلى الجينوم Transformation

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

١- النقل بواسطة البكتيريا *Agrobacterium tumefaciens*

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

يؤدي إلى سرعة تكاثر الخلايا وتكوين كتل من الخلايا والتي تعرف بالتورد القمي (شكل ٢٦) .



شكل ٢٦: تكاثر الخلايا وتكوين كتل من خلايا بالتورد القمي

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

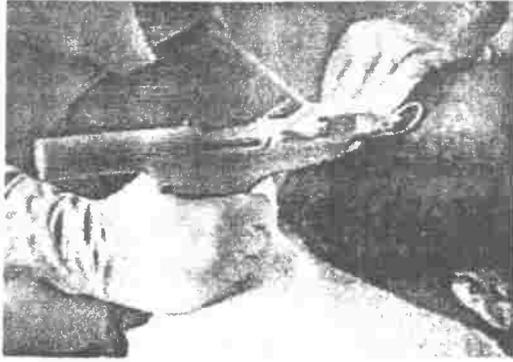
ب- دمج الجينات إلى خلايا البروتوبلاست

Competent Cells Technique

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

ج- طريقة الحقن المجهرى Microinjection Technique

طريقة الحقن المجهرى Microinjection تتم باستخدام إبر خاصة لحقن المادة الوراثية داخل نواة الخلية تحت ميكروسكوب خاص يسمى Micro manipulator وإستخدمت تلك الوسيلة في نقل DNA ولكن وجد أنها تقنية غير عملية لأسباب عدة منها أن طرف الإبرة المستخدمة عادة ما ينسد أو ينكسر بسهولة كما أن إدخال DNA للخلايا عملية مجهددة ولا تلائم العمل التجاري ولا يمكن بها ضمان إلتحام الجين المنقول إلى جينوم الخلية (شكل ٢٨)٠



شكل ٢٨: الحقن المجهرى

د- تقنية المسدس الجينى Gene Gun Technique

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



شكل ٢٩: تقنية قذفات الجسيمات النانوية

ونظراً لأن الثقوب التي يحدثها القنف السريع صغيرة للغاية فهذه الثقوب تكون مؤقتة ولا تعرض سلامة الخلايا للخطر ويتكون المسدس الجيني **gene gun** من قاذف خرطوشي عيار ٠,٢٢ مم كقوة دافعة يحتوى على بارود فقط.

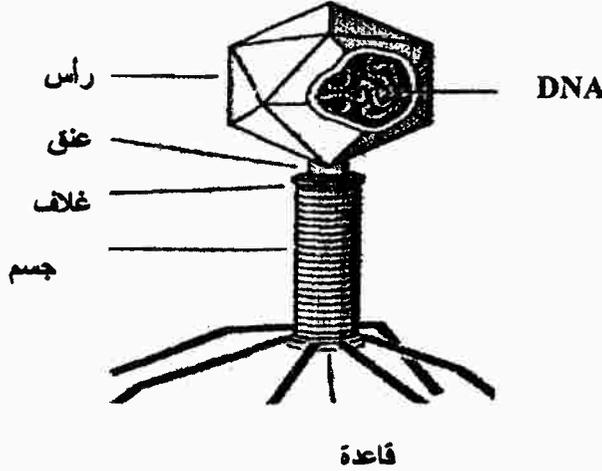
هـ النقل بالفاج Phage Transportation

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

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

قد تنفجر الخلية ولكن في حالات أخرى لا ينفصل الفاج الأولى من نفس نقطة الإتصال بل من أماكن أخرى لذا تحتوى حلقتة على DNA الفيروس مضافاً إليه قطعة من كروموسوم الخلية فإذا احتوى الفيروس على جين الجلاكتور سمي الفيروس باسم فاج لامبدا ناقصة الجلاكتور (وتسمى بذلك الإسم ناقصة **defective**) حيث أن كمية DNA التي يمكن تعبئتها في الغطاء

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



شكل ٣٠: النقل بالفاج لامبدا

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

سادسا: زراعة الأنسجة النباتية Plant Tissue Culture

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

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

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

وفيما يلي أهم خمس تقنيات تختص بالهندسة الوراثية والتكنولوجيا الحيوية:

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

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

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

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

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

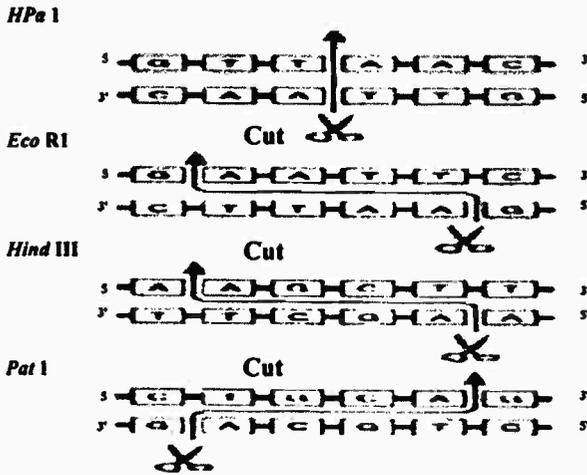
١- قص وقطع الحمض النووي **Cleavage of DNA**

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

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

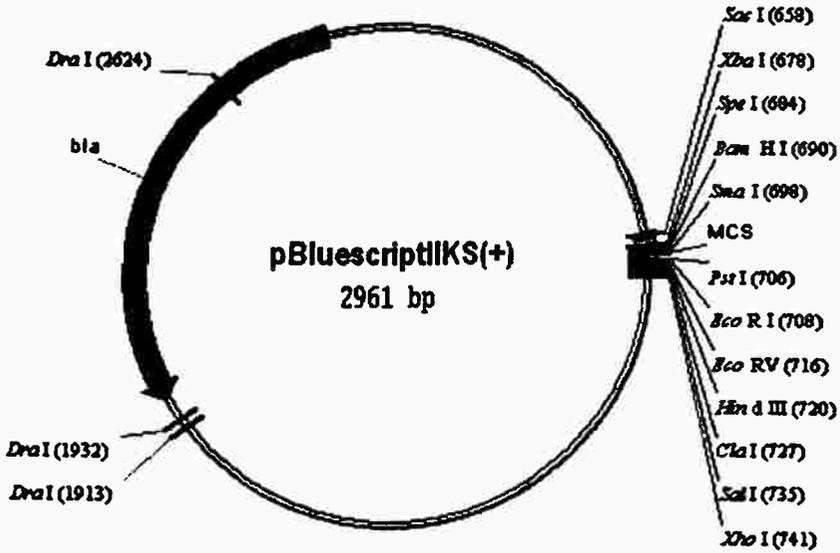
• الإنزيمات القاطعة Restriction Nucleases

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



شكل ٣١: الإنزيمات القاطعة

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



شكل ٣٢ : مثالا للإنزيمات القاطعة

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

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

• **Recombinant DNA**

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

كل إنزيم قاطع يعبر عن مقص خاص لقطع DNA في نقطة محددة . ويتعرف الإنزيم القاطع على مكان القطع حسب تسلسل DNA للقطعة . فكل إنزيم قاطع يقطع في تسلسل محدد . فمثلا الإنزيم القاطع المعروف بالهيبا و احد **Hpa I** يقطع عندما يجد 6 من الأحماض الأمينية في هذا التسلسل **GTTAAC** بينما الإنزيم القاطع إيكو آر واحد **Eco RI** يقطع عندما يجد 6 من الأحماض الأمينية في هذا التسلسل **GAATTC** . وللمعلومية فإن هيبا واحد سمي بهذا الاسم لأنه يوجد في بكتيريا الهيموفلس بارا إنفلونزا **Hemophilus parainfluenzae** وهذا الإنزيم يعتبر من الإنزيمات التي تقطع بشكل رأسي مستقيم، بينما إنزيم الإيكو آر **EcoRI** واحد فهو مأخوذ من بكتيريا **E. coli**، ويعتبر من الإنزيمات التي تقطع بشكل متعرج .

ويوضح جدول (٢) تسلسل مواقع القطع **Recognition sites** لبعض الإنزيمات الفاطعة كالاتي:

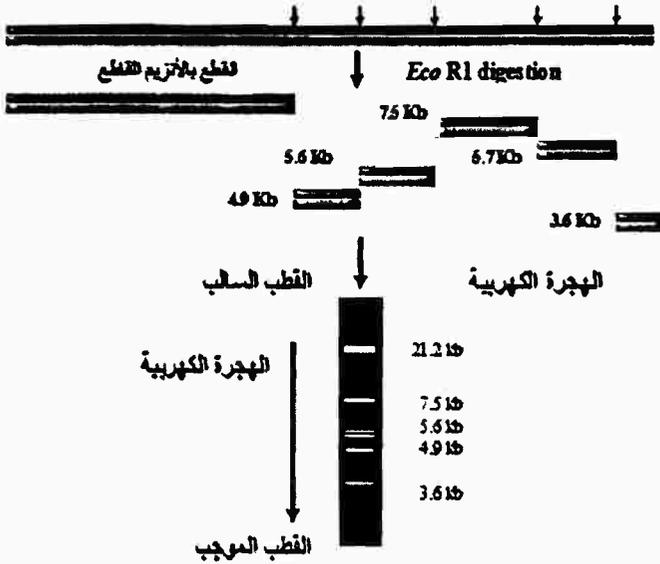
المقطع الذي يميزه القطع	المصدر	الإنزيم القاطع
GGATCC	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> H	BamHI
GAATTC	<i>Escherichia coli</i> RY13	EcoRI
GGCC	<i>Haemophilus aegyptius</i>	HaeIII
AAGCTT	<i>Haemophilus influenzae</i> Rd	HindIII
GTTAAC	<i>Haemophilus parainfluenzae</i>	HpaI
CCGG	<i>Haemophilus parainfluenzae</i>	HpaII
GATC	<i>Moraxella bovis</i>	MboI
GCGGCCGC	<i>Nocardia otitidis-caviarum</i>	NotI
GGCCNNNNGGCC	<i>Streptomyces fimbriatus</i>	SfiI

• القطع المحددة Restriction Fragments

عندما يضاف الإنزيم القاطع إلى محلول به شريط من DNA فإنه يقطعه إلى عدة قطع وليس إلى قطعتين فقط. وكل قطعة مقطوعة بالإنزيم تسمى قطعة محددة. ويختلف طول هذه القطع حسب المسافة التي بين كل مقطع وآخر. ولكن يجب أن تكون كل قطعة محددة لها نفس الحجم في كل نوع من الكائنات الحية. وذلك يعني أن للإنسان قطعة محددة معينه يقطعها الإنزيم القاطع *HpaI* واحد في الكروموسوم، ويمكن التأكد من ذلك بتحليل قياس لهذه القطعة بتقنيته حركة DNA الكهربائية على الجيل (شكل ٣٣).

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

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



شكل ٣٣: قطع DNA بإنزيمات القطع على لوح جيل الأجرز

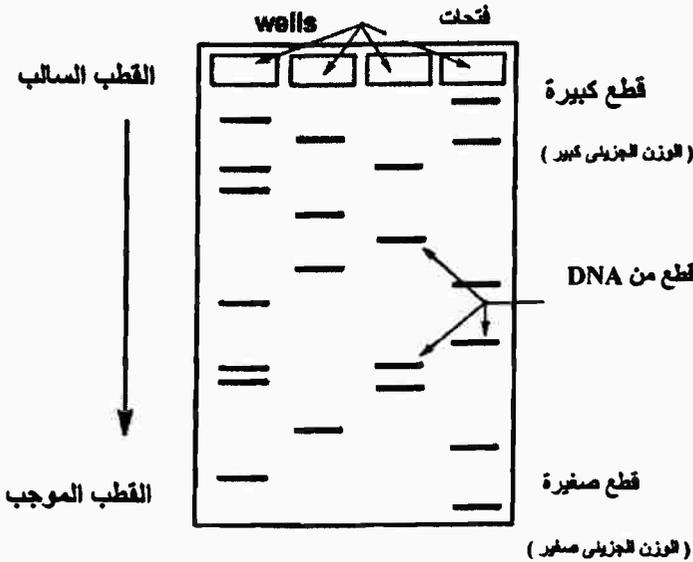
القاطعة ثم رتب هذه القطع بشكل منتظم. وكان الهدف من هذه الخريطة هو تحديد نقاط وعلامات على طول الشريط الطويل من DNA التي تتركب منه الكروموسومات وعند المقارنة بين هذه القطع في الكائنات المختلفة. ولقد

وضعت هذه القطع على لوح من الأجرور وفصله وأخرج حجمها كما هو موضح في الشريط الأسود، ويمكن وضع هذه القطع على لوح الجيل وفصلها إلى وحدات أصغر .

• قطع DNA على لوح من الجيل بالتفريد الكهربائي

Gel Electrophoresis

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



شكل ٣٤ : قطع DNA على لوح من الجيل بالكهرباء

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

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

ولقد واجه العلماء صعوبات في فصل القطع الكبيرة من DNA وذلك لأن هذه الشظايا وعند وضعها على جل الأجرور وبعد توصيل التيار الكهربائي إليها تتوقف لأنها تتمدد بشكل متعرج على شكل ثعبان ملتوي باتجاه القطب السالب والآخر باتجاه القطب الموجب، ولقد حلت هذه المشكلة عن

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

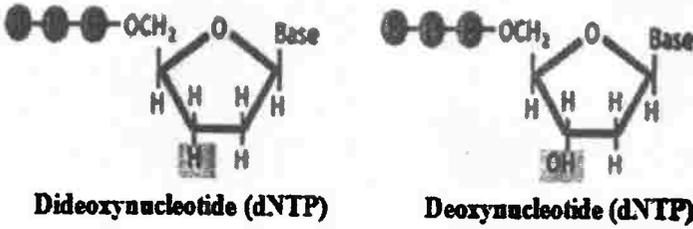
ولقد مكنت هذه التقنية من فصل قطع كبيرة من DNA وحتى فصل قطع من الكروموسومات على الجل وتتراوح القطع التي يمكن فصلها بهذه الطريقة بين ٢٢٠٠٠٠ إلى ٢٥ مليون جزيء من DNA. وتجدر الإشارة أن القطع المفصولة بالبولي أكريلاميد والأجرور لا تكون واضحة للعيان ولذلك يجب تعرض لوح الجل للصبغ بمادة بروميد الإثيديوم **Ethidium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

• معرفة التسلسل النووي DNA Sequencing

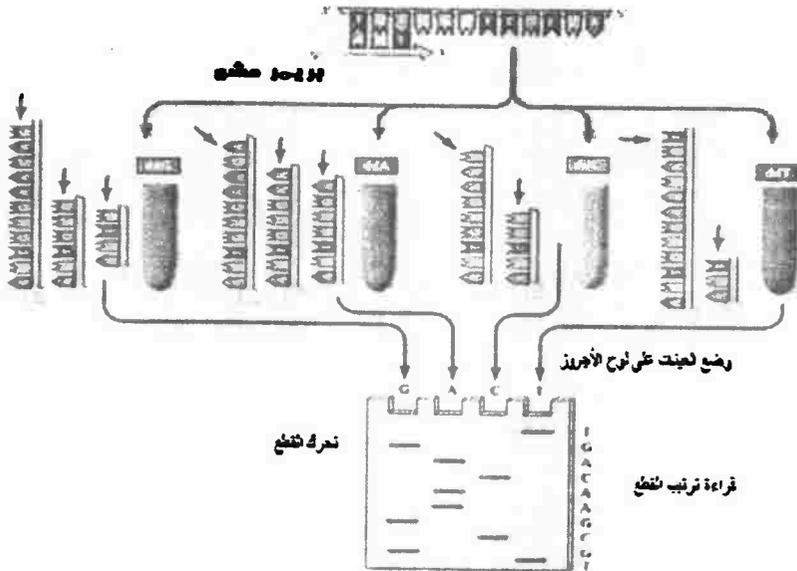
لا شك أن العلماء يحتاجون إلى معرفة التركيبية التسلسلية لكل جين وهذا يمكنهم من معرفة المزيد عن البروتين الذي يصنعه ذلك الجين وعن التركيبية التنظيمية لعمل الجين وقد يصلون على ضوء ذلك إلى معرفة الأمور التي تتحكم في عمله (شكل ٣٥). كما أنه بمعرفة التسلسل النووي للجين يمكن مقارنته بالجينات التي سبق إكتشافها،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

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

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



الفرق بين الديوكسي نيوكليوتيد عن الذي ديوكسي نيوكليوتيد



شكل ٣٥: الطريقة الإنزيمية لمعرفة التسلسل النووي

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

وفيما يلي الخطوات الأساسية للقيام بهذا الإختبار بالترتيب:

١- القيام بنسخ DNA وذلك على الشكل التالي:

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

ب- تقسم العينة إلى أربع أنابيب إختبار وكل أنبوبة يكتب عليها الإسماء التالية

dGTP, dATP, dCTP, and dTTP

ت- يضاف إنزيم DNA البوليمريز **DNA Polymerase**

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

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

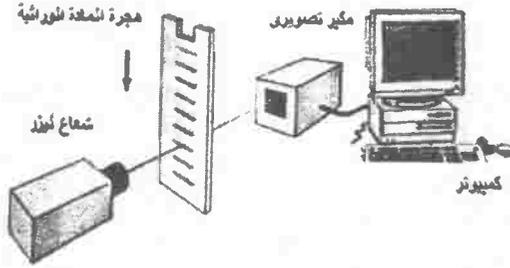
٢- يضاف كمية من كل الأنابيب الأربعة في فتحات خاصة wells على لوح جل الأجرز ثم يمرر تيار كهربائي ومن ثم تظهر على طول اللوح القطع المنسوخة والمتفاوتة الطول وكل فتحة تعطي ترتيب القطع .

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

٤- يتم القراءة على لوح جل الأجرز من أسفل إلى أعلى، وكلما تمر الأشعة على نسخة من DNA يتم التعرف عليها وكذلك ترتيبها ونوع الديوكسي نيوكليتييد الموجود في طرفها إلى أن ينتهي لوح الأجرز .

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

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



شكل ٣٦: استخدام الكمبيوتر في القراءة بشكل آلي

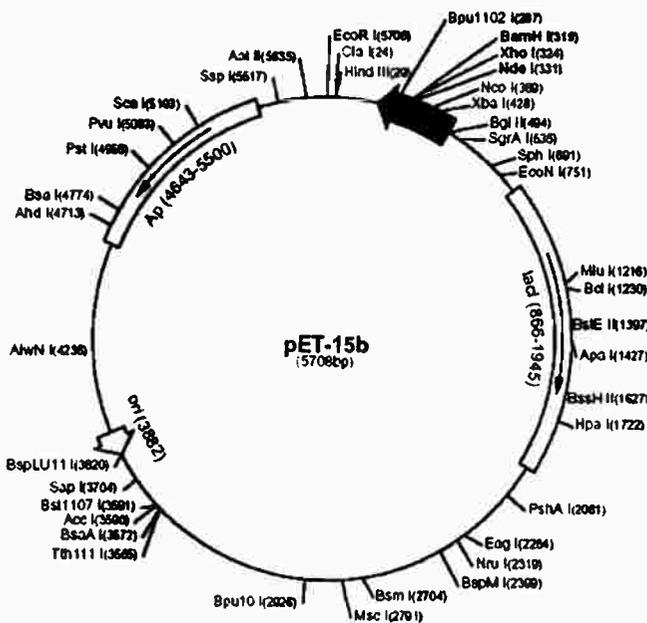
الناقلات Vectors

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

• البلازميدات Plasmids

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

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



شكل ٣٧: شكل من أشكال البلازميد

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

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

• الناقلات الفيروسية Viral Vectors

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

• الناقلات الكروموسومية الصناعية

Artificial Chromosomes

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

• النسخ والإستنساخ Cloning

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

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

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

ولذلك قسم العلماء الإستنساخ أو النسخ إلى ثلاثة أنواع :

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

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

Recombinant DNA Technology

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

DNA • ويحتاج العلماء للقيام بنسخ القطع لأنهم يحتاجون إلى كمية كبيرة من هذه النسخ وذلك لندرة إستخلاصها في كل مرة من داخل الخلية وذلك لوجود التعقيدات الإنشائية للكروموسومات. وعلى سبيل المثال، فإن الجين المنتج لسلسلة بيتا في الهيموجلوبين والمعروف بمورث بيتا جلوبيين (Beta-Globin Gene) يمثل فقط ٠,٠٠٠,٠٠٠,٠٠٥% من حجم DNA الكلي في الخلية (يتراوح حول ٣ بلايين قاعدة نيوكليوتيدية) . كما أن الجين العملاق والمعروف بجين الدستروفين Dystrophin gene والذي قد يصل حجمه ٢٥ ميجا قواعد (25 Megabases) لا يمثل أكثر من ٠,٠٠٠,٠٠٨% من الحجم الكلي DNA في الخلية. ولذلك فإن العلماء يحتاجون إلى إجراء نسخ لهذه الجينات أو القطعة من DNA لكي يتسنى لهم التعامل بها وإجراء التجارب عليها. وهناك طريقتان رئيسيتان للنسخ:

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

ويرتكز النسخ بإستخدام الخلايا الحية على ثلاث خطوات:

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

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

٢- النقل بإستخدام البكتيريا أو الخميرة

2- Transformation using bacteria or yeast

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

3- Selective propagation of cell clones in culture Plates

٤- عزل سلالات DNA المعاد توليفها

4- Isolation of recombinant DNA clones

وسوف نتناول الخطوات السابقة بشئ من التفصيل:

١- بناء جزيئات من DNA المعاد توليفها

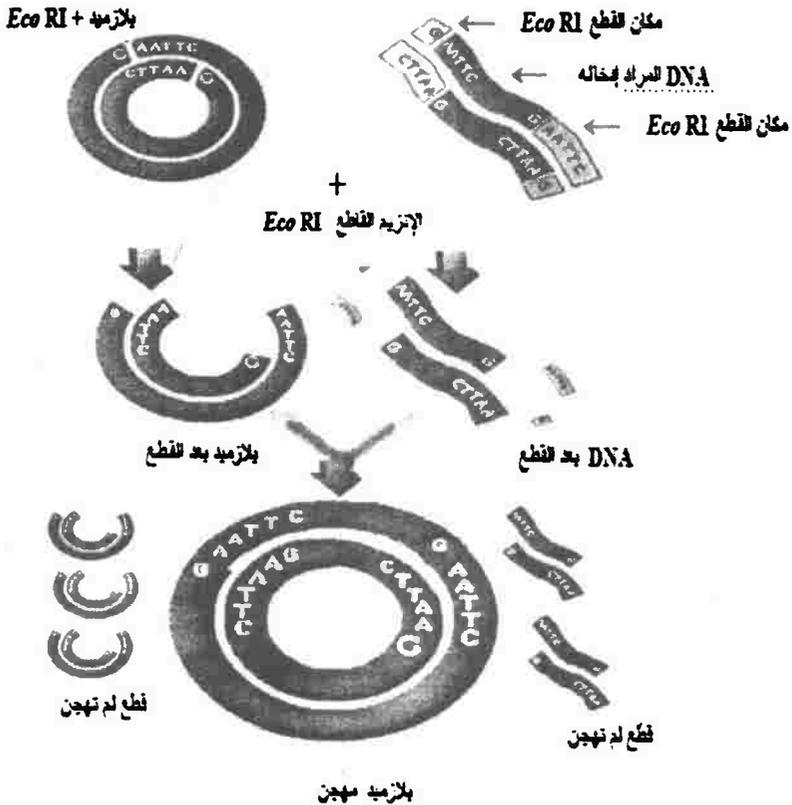
Construction of recombinant DNA molecules

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

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

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

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



شكل ٣٨: تصميم القطع المهجنة من DNA في كلاً من البلازميد و الحامض النووي DNA

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

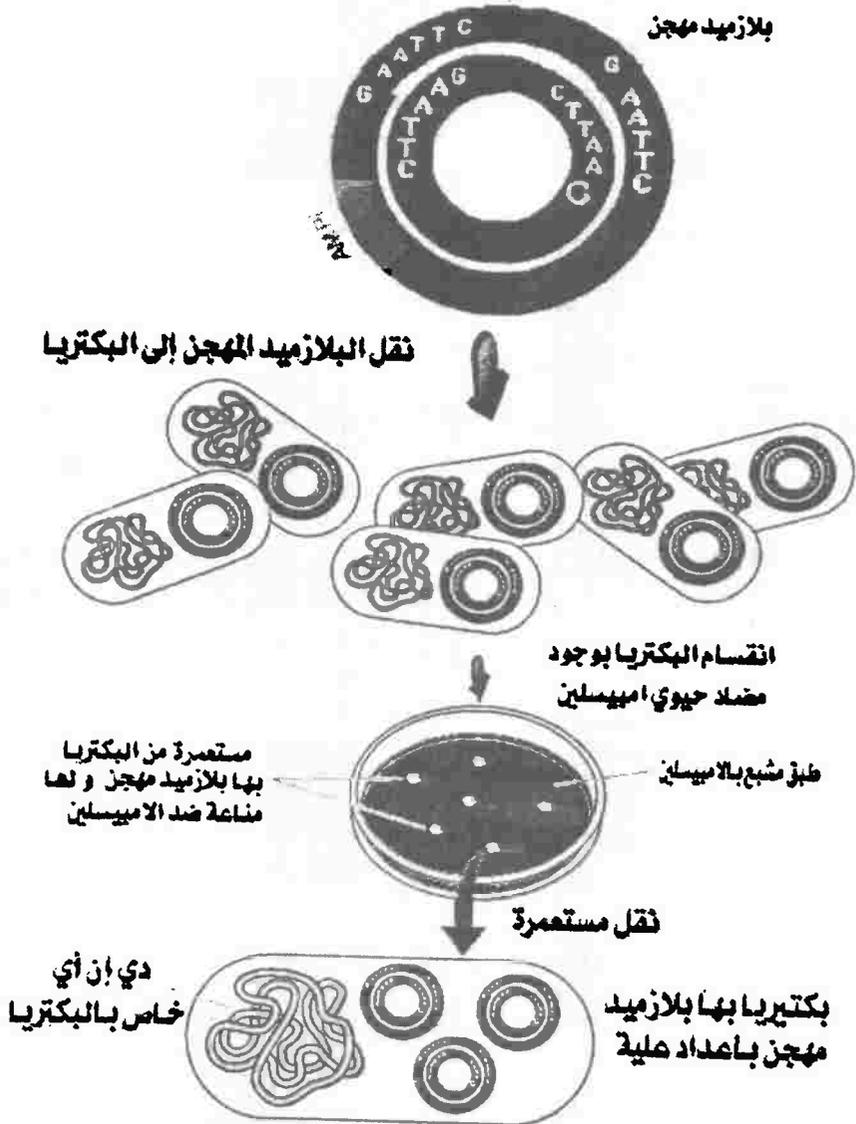
٢- نقل القطعة المهجنة والموجودة بداخل الناقل إلى خلية حية

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

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

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

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



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

٤- عزل المادة الوراثية المستنسخة

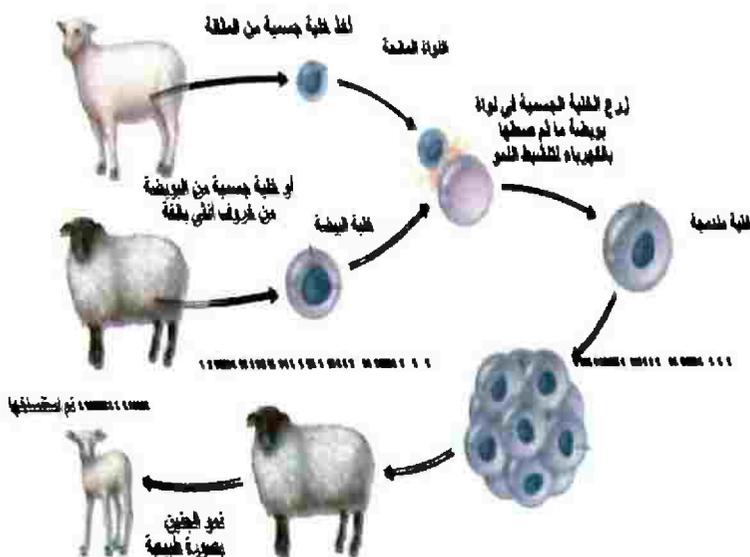
DNA Cloned Fragment Isolation

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

الإستنساخ التكاثري Reproductive Cloning

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

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



شكل ٤٠ : إستنساخ النعجة دوللي بالكامل

الإستنساخ العلاجي Therapeutic Cloning

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