علم الهندسة الوراثية

مقدمة في علم الهندسة الوراثية

حتى تاريخ ١٩٧٠ ميلادية كان إجراء الأبحاث على الحمض النووي (الدي إن أي)من أصعب الأمور التي كانت تواجه علماء الوراثة و الكيمياء.و كانت معظم الأبحاث تجرى بشكل غير مباشر على الحمض النووي الريبوزي (الأر إن أي)أو البروتين.و لكن الحال تحول بشكل كامل فأصبح علم الوراثة المتعلق بفحص الدي إن أي(و المعروف بعلم الوراثة الجزيئية)من أسهل العلوم و أكثرها تطورا.لقد أصبح من السهل صنع نسخ عديدة من أي جين (مورث) أو مقطع محدد من الدي إن أي.كما أمكن معرفة تسلسل الأحماض النووية بسرعة تتعدى المئات في اليوم الواحد.كما استطاع العلماء استكشاف الجينات الموجودة في على الكروموسومات كما استطاعوا تغيير و تعديلها بشكل الذي يريدون و ليس هذا فحسب بل استطاعوا أن يعيدوا هذه الجينات المعدلة إلى الخلية و غرزها في الكروموسوم الذي يريدون.كما أمكن إنتاج كميات كبيرة من البروتينات كالهرمونات و اللقاحات المختلفة و التي كانت تنتج في السابق من الجثث الميتة أو تستخلص من الحيوانات و التي كانت تحوفها المخاطر من انتقال العدوى إلى الإنسان.كما أن هذه الثورة العلمية فتحة المجال أمام الكثيرين من محبي هذا العلم في اختراع و اكتشاف طرق جديدة و حديثة في التعامل و حفظ و تغيير هذه المادة الحيوية في الإنسان و الحيوان و النبات.لقد غير هذه العلم المنطلق كالصاروخ الكثير من المفاهيم الطبية و التي دفعة كثير من كليات الطب إلى تعديل مقرراتها لتزويد طلابها بالمزيد من هذا العلم. لقد أُطلق على عملية نسخ و تعديل و زرع الجينات اسم الهندسة الوراثية و هو اسم عام لا يحدد فكرة معينة أو تقنيه محدده، ولكنه يعني بكل ما يقام به في تغيير أو تعديل المادة الوراثية.و يتفرع من هذا العلم الكثير من التقنيات و هي متناثرة و موزعة على الكثير من فروع الطب و العلوم.و ليس للحصر إليك أهم ٦ تقنيات تختص بالهندسة الوراثية :

-1قص و قطع الحمض النووي (Cleavage of DNA)بمقصاة خاصة تسمى (Restriction Nucleases)و اكتشاف هذه المقصاة ساعد كثيرا في مهمة التحكم

This PDF was created using the Sonic PDF Creator.
To remove this watermark, please license this product at www.investintech.com

في الدي إن أي .

-2فصل قطع الدي إن أي على لوح من الجل بالكهرباء (Gel Electrophoresis).

-3معرفة التسلسل النووي (DNA sequencing)لكل قطع الدي إن أي التي يتم عزلها بشكل سريع و دقيق.و التي تسمح للعلماء معرفة التركيب الإنشائي للجينات و معرفة و استنتاج نوع البروتين الذي ينتج منه .

-4تقنية تهجين الحمض النووي(Nucleic acid hybridization)، و التي مكنتنا في معرفة أحجام القطع من الحمض النووي و الكشف عن القطع المحددة من الحمض النووي في خليط معقد من القطع المتشابهة .

-5استنساخ الدي إن أي(DNA cloning)، و التي تسمح بإنشاء نسخ عديدة و متطابقة من القطع الدي إن أي .

-6تقنية هندسة أو تعديل الدي إن أي(DNA engineering) ، و التي تسمح بإنتاج نسخة معدلة من جين ما ثم أعادته مرة أخرى إلى الخلية .

الإنزيمات القاطعة وقص ال DNA

قص و قطع الحمض النووي :

كما هو معروف فان البروتينات موجودة داخل الخلية على شكل قطع منفصلة عن بعضها البعض و هذا بالطبع سهل عملية فصلها عن بعضها البعض بطرق فنية مناسبة.ولكن الجينات موجودة على الكروموسومات على شكل حبات متصلة ببعضها البعض و ليست على شكل قطع منفصلة.وهذا التسلسل و الترابط في الجينات جعل عملية فصله و عزل و استخلاص جين محدد من بقيه الجينات مهمة صعبة ان لم تكن مستحيلة قبل عام ١٩٧٠ .

ولكن اكتشاف الإنزيمات القاطعة (Restriction Nucleases)ساعد في عملية استخلاص الجينات و قطع الدي ان أي و نسخها .

الإنزيمات القاطعة (Restriction Nucleases)

لا شك أن كل كائن حي لديه طرق دفاع مختلفة تحميه من غارات الأعداء و هجوم

This PDF was created using the Sonic PDF Creator.
To remove this watermark, please license this product at www.investintech.com

المعتدين! و البكتيريا هي إحدى هذه الكائنات و لها أعداء كثر و من أهم أعدائها الفيروسات المختلفة.و لقد قامة بعض من البكتيريا بإنتاج خمائر(إنزيمات) مهمتها تدمير الفيروسات.و من هذه الإنزيمات الإنزيمات القاطعة أو Restriction) Nucleases).و تقوم هذه المقصاة أو القواطع بقص الحمض النووي(الدي إن أي)للفيروس و بذلك يشل عمله و يبطل مفعولة. و بما أن الدي إن أي مادة موجودة بشكل طبيعي في البكتيريا كما هو الحال في الفيروسات و الكثير من الكائنات الحية فان هذه المقصاة قد تشكل خطرا على البكتيريا نفسها في قصها لدي إن أي الخاص بها.ولكن هذا لا يحدث و السر في ذلك هو قيام البكتيريا بتحوير أجزاء من الدي إن أي الخاص بها عن طريق إضافة مجموعة الميثيل (Methyl)إلى بعض الأحماض النووي من نوع الادنين او السيتوسن (Methylation at an A or a C residue)فلا يستطيع المقص أو القاطع من قص الحمض النووي الخاص بالبكتيريا.و عند اكتشاف هذه القواطع في السبعينيات الميلادية بدأ العلماء في استخدامها كمقصاة لقص الدي إن أي .و ساعدتهم هذه المقصاة في عملية التحكم في الدي أن أي.و يوجد حاليا أكثر من مائه نوع من هذه المقصاة.و تقسم هذه المقصاة إلى نوعين رئيسيين، النوع الأول يقص شريط الدي إن أي المزدوج بشكل رأسي مستقيم (Blunt ends)و النوع الثاني يقص بشكل متعرج (,Staggered cuts)و بتالي يجعل طرفي الدي إن أي المقطوع مادة قابلة 'للزق'قطعة غريبة من الدي أن أي فيها.و عن لزق قطعة من الدي إن أي في داخل الفراغ الناتج من القطع ينتج لنا قطعة مركبة من قطعتين مختلفتين من الدي إن أي و هذه القطعة تسمى دي إن أي مهجّن أو .(Recombinant DNA)

كيف يتعرف الإنزيم القاطع على المكان المفترض أن يحدث القطع فيه؟

كل إنزيم قاطع يعتبر عن مقص خاص لقطع الدي إن أي في نقطة محددة.و يتعرف الإنزيم القاطع على مكان القطع حسب تسلسل الدي إن أي للقطعة.فكل إنزيم قاطع يقطع في تسلسل محدد.فمثلا الإنزيم القاطع المعروف بالهيبا و احد(Hpa I)يقطع عندما يجد ٦ من الأحماض النووية في هذا التسلسل (GTTAAC) بينما الإنزيم القاطع إيكو أر واحد (Eco RI)يقطع عندما يجد ٦ من الأحماض النووية في هذا التسلسل)

This PDF was created using the Sonic PDF Creator.
To remove this watermark, please license this product at www.investintech.com

.(GAATTCو للمعلومية فان هيبا واحد سمي بهذا الاسم لأنه يوجد في بكتيريا الهيموفلس بارا انفلونزا (Hemophilus parainfluenzae) و هذا الإنزيم يعتبر من الإنزيمات التي تقطع بشكل رأسي مستقيم.بنما انزيم الايكو ار واحد فهو مأخوذ من بكتيريا الايكو كولي(Escherichia coli) ، ويعتبر من الإنزيمات التي تقطع بشكل متعرج .

تسلسل مواقع القطع Recognition Sites لبعض الإنزيمات القاطعة

الإنزيم القاطع	المصدر	المقطع الذي تُميزة
BamHI	Bacillus amyloliquefaciens H	GGATCC
EcoRI	Escherichia coli RY13	GAATTC
HaeIII	Haemophilus aegyptius	GGCC
HindIII	Haemophilus influenzae Rd	AAGCTT
HpaI	Haemophilus parainfluenzae	GTTAAC
HpaII	Haemophilus parainfluenzae	CCGG
MboI	Moraxella bovis	GATC
NotI	Nocardia otitidis-caviarum	GCGGCCGC
SfiI	Streptomyces fimbriatus	GGCCNNNNNGGCC
TaqI	Thermus aquaticus	TCGA

القطع المحددة :(Restriction fragments)

عندما يضاف الإنزيم القاطع إلى محلول به شريط من الدي إن أي فانه يقطّعه إلى عدة قطع و ليس إلى قطعتين فقط.و كل قطعة مقطوعة بالإنزيم تسمى قطعة محددة.و يختلف طول هذه القطع على حسب المسافة التي بين كل مقطع و أخر.و لكن يجب أن تكون كل قطعة محددة لها نفس الحجم في كل نوع من الكائنات الحية.و ذلك يعني أن جميع الناس(الإنسان)لديه قطعة محددة معينه يقطعها الإنزيم القاطع هيبا واحد في الكروموسوم رقم ٢.و يمكن التأكد من ذلك بتحليل قياس لهذه القطعة بتقنيه حركة الدي إن أي الكهربائية على الجيل(انظر موضوع حركة الدي إن أي الكهربائية في الجل Gel)

.(Electrophoresisو إذا لم حدث أن وجد إنسان ليس لديه نفس الحجم المفترض

This PDF was created using the Sonic PDF Creator.
To remove this watermark, please license this product at www.investintech.com

للقطعة ففي هذه الحالة نستنتج أن هذا الشخص لدية طفرة(تغير في تسلسل الدي إن أي)في احد الأماكن التي كان من المفترض أن يقصها الإنزيم فلم يتم القطع فيها.و بذلك فان حجم القطعة قد اختلف تعرف هذه الظاهرة عند علماء الوراثة بتفاوت القطع المحددة المصحوب بطفرة (Restriction Fragment Length polymorphism. RFLP)

خريطة القطع المحددة RFLP's Map

لقد أنشاء العلماء خريطة تسمى خريطة القطع المحددة لكثير من الكائنات الحية.و هذه الخريطة تبين مكان القطع و محلها مقارنة بالقطع الأخرى .و عملت هذه الخريطة عن طريق تقطيع جميع الكروموسومات بإضافة أنواع مختلفة من الإنزيمات القاطعة ثم رتبت هذه القطع بشكل منتظم.و كان الهدف من هذه الخريطة هو لتحديد نقاط و علامات على طول الشريط الطويل من الدي إن أي التي تتركب منه الكروموسومات و لكي يستطيعوا أن يقارنوا بين هذه القطع في الكائنات المختلفة .

خريطة للقطع المحدودة لليمبدا فيج و فيروس الادينوفيرس.توضح مواقع القص لثلاث أنواع من الإنزيمات القاطعة ((BamHI, EcoRI, and HindIII

قطعة بطول ٤٨٫٥ كيلوبيس من البكاتريوفيج ليمبدا()قطع بالإنزيم القاطع ايكو واحد في خمس أماكن و نتج عنه ست قطع متفاوتة الطول و الحجم.و لقد وضعت هذه القطع على لوح من الاقروز و فصلة و اخرج حجمها كما هو موضح في الشريط الأسود في أسفل الصورة .

فصل قطع الدي إن أي على لوح من الجل بالكهرباء

استعمل العلماء تقنية فصل البروتينات عن بعضها البعض بطريق انتقالها(رحلان) و انفصالها عن بعضها البعض، و ذلك عن طريق تعريضها إلى تيار كهربائي و هي على لوح من المادة الهلامية المعروفة بالجل.ولقد استعمل العلماء نفس الفكرة في فصل قطع الدي إن أي عن

This PDF was created using the Sonic PDF Creator.
To remove this watermark, please license this product at www.investintech.com

بعضها البعض.ومن المعروف أن الحمض النووي عبارة عن شحنة سالبة و لذلك فعند و ضع بعض من الدي إن أي في طرف من أطراف لوح الجيل ثم وتعريضها لتيار كهربائي بحيث يكون القطب السالب عند الطرف الذي وضعنا فيه الدي إن أي و القطب الموجب عن الطرف الأخير من ألواح فان الدي إن إي ينتقل تلقائيا بتجاه الطرف الذي فيه القطب الموجب و تتوقف حركة قطع الدي إن أي على حسب إحجامها على طول اللوح.فالقطع الصغيرة تتحرك بشكل اكبر من القطع الكبيرة. و بذلك يمكن فصل هذه القطع عن بعضها البعض.و يمكن تحديد ا لحجم الفعلي لكل قطعة عن طريق إضافة قطع معروفة الحجم من الدي إن أي و التي تكون مقياس يرجع إليه لاستنتاج أحجام القطع .

وهناك نوعان أساسيان من ألواح الجيل.الأول يسمى بجيل الاقروز (Agarose gel) و الثاني بجيل البولي اكريليميد.(Polyacrylamide gel)و نظرا لصغر الفراغات التي بين البولي اكريليميد فانه يستخدم لفص القطع الصغيرة الحجم من الدي ان أي و في العادة التي تكون اصغر من ٥٠٠جزيء من الحمض النووي و التي تتفاوت بين بعضها البعض بجزيء أو جزيئين (انظر الرسم..(A بينما يستخدم الاقروز للأحجام الأكبر من الدي إن أي. و التي يتراوح حجمها بين ٣٠٠ إلى 10000 جزيء من الدي إن أي (انظر الرسم ..ومادة الاقروز هي مادة سكرية مستخرجة من الطحالب و عند تحضيرها فإنها تشبه في قوامها الجيلاتين الذي نأكله و لكنها أقوى في قوامها بعض الشيء و لكنها قابلة للتهتك أو الانقطاع عند نقلها بغير حرص .

و لقد واجهه العلماء صعوبات في فصل القطع الكبيرة من الدي إن أي و ذلك لان هذه القطع و عند وضعها على جيل الاقروز و بعد تسليط التيار الكهربائي عليها تتوقف لأنها تتمدد بشكل متعرج على شكل ثعبان ملتوي طرف باتجاه القطب السالب و الأخر بتجاه القطب الموجب.و لقد حلت هذه المشكلة عن طريق تعريض جل الاقروز إلى مستويات متفاوتة من القوة الكهربائية على طول اللوح و بذلك فان قطعة الدي إن أي الطويلة عندما تتعرض إلى تيار كهربائي مختلف يجعلها تعدل من تمددها المتعرج قبل أن تدخل في التيار الكهربائي الجديد و يستمر هذا التفاوت في التيار و التعديل في قوام القطعة حتى تصل إلى المكان الذي يجب أن تقف فيه حسب حجمها. و يسمى هذا النوع من الفصل بالفصل

This PDF was created using the Sonic PDF Creator.
To remove this watermark, please license this product at www.investintech.com

عن طريق المجال الكهربائي المتردد.(Pulsed-field gel electrophoresis) و أمكنت هذه التقنية من فصل قطع كبيرة من الدي إن أي و حتى فصل قطع من الكروموسومات على الجل و تتراوح القطع التي يمكن فصلها بهذه الطريقة بين ٢٢٠٠٠٠ إلى ٢.٥ مليون جزيء من الدي إن أي (انظر الرسم .(C

لا تكون القطع المفصولة بالبولي اكريليميد و الاقروز واضحة للعيان و لذلك فان لوح الجيل يعرض إلى مادة لصباغة الدي ان أي و اشهر هذه المواد هو مادة برميدات الاثيديوم (Ethidium Bromideو التي تلمع عند تعريضها للأشعة فوق البنفسجية.و هناك طريقه أكثر دقه لمشاهدة القطع على لوح الجيل و هذه الطريقة تعتمد على إضافة مادة مشعة نووية إلى الدي إن أي قبل أن يوضع على لوح الجيل و لكن هذه الطريقة تحتاج إلى احتياطيات معينه لكي لا تضر بمن يستخدمها .

معرفة التسلسل النووي (DNA sequencing)

لا شك أن العلماء يحتاجون إلى معرفة التركيبة التسلسلية لكل جين و هذا يمكنهم من معرفة المزيد عن البروتين الذي يصنعه ذلك الجين وعن التركيبة التنظيمية لعمل الجين و قد يصلون على ضوءه إلى معرفة الأمور التي تتحكم في عمله.كما انه بمعرفة التسلسل النووي للجين يمكن مقارنته بالجينات التي سبق اكتشافها و هذا قد يعطي معلومات غزيرة عن وضيفة هذا الجين و يختصر الكثير من الابحاث

و يتجنب اعادة اجرائها.وهناك طريقتان أساسيتان لمعرفة التسلسل النووي لأي قطعة من الدي إن أي.الأولى تسمى بالطريقة الإنزيمية (Enzymatic method) و الأخرى بالطريقة الكيميائية.(Chemical)و لقد طغت الطريقة الأولى حتى أصبحت هي الطريقة الأكثر استعمالا .

الطريقة الإنزيمية :(Enzymatic method)

يطلق على هذه الطريقة أيضا طريقة سنجر(Sanger procedure) نسبة إلى د.فريدريك سنجر و الذي أسس هذه الطريقة.كما أنها أيضا تعرف التسلسل عن طريق دي ديوكسي.(dideoxy sequencing) و تترتكز هذه الطريقة على مفهوم أن شريط الدي إن أي في الأساس مبنى من جزيئات من الديوكس

This PDF was created using the Sonic PDF Creator.
To remove this watermark, please license this product at www.investintech.com

يختلف الديوكسي نيوكلويتيد عن دي ديوكسي بيوكلوتيد بعدم و جود مجموعة (هيدروكسي)في النقطة الثالثة من حلقة السكر الخماسية الشكل .

نيوكلويتيد(deoxynucleotides (dNTPs و يوجد على النقطة الثالثة من حلقة السكر الريبوزي مجموعة مؤكسدة أي مجموعة هيدروكسيه(OH)و هذه النقطة هي التي ترتبط في النقطة الخامسة من الجزيء الذي يليها و هكذا يتم الترابط لتكوّن شريط طويل من الدي إن أي.و لقد قام د.ستنجر بالاستفادة من هذه الخاصية فبدّل الجزيء من(OH) إلى (H)عن طريق إضافة دي ديوكسيو بيوكلوتيد (ddNTPs)بدل من ديوكسي نيوكلوتيد (dNTPs)و ذلك عن طريق نسخ الشريط مرة أخرى و هذا يؤدي الى توقف ترابط الجزيئات و يكون في طرف كل جزيء نوع واحد من الأحماض النووية .

و إليك الخطوات الأساسية للقيام بهذا الاختبار بالترتيب :

-1القيام بنسخ الدي ان أي و ذلك على الشكل التالي :

أ -أضف إلى عينة الدي إن أي قطع من البريمر(specific primer)يعرف انه سوف يلتصق بالدي إن أي المراد نسخة و معرّف(ملتصق بطرفة) بعنصر مشع .

ب- قسم العينة إلى أربع أنابيب اختبار و كل أنبوبة اكتب عليها السماء التالية (dGTP, dATP, dCTP, and dTTP)..

ج- أضف إنزيم البولمريز (DNA polymerase)

د-أضف إلى كل أنبوبة نوع واحد من الدي ديوكسي نيوكليتيد حسب اسم الأنبوب.و أضيف معه كمية من ديوكسي نيولكليتيد.سوف يحدث التفاعل و يبداء البريمر ببنان و تركيب و رص هذه الأحماض النووية.وعند إضافته لدي ديوكسي نيوكليتيد فان الشريط يتوقف على هذه النقطة.ثم يحدث تفاعل أخر لنسخ شريط أخر و عند إضافة دي ديوكسي نيوكليتيد يتوقف التفاعل و هكذا تستمر العملية و ينتج عندي في النهاية قطع منسوخة و متفاوتة الطول في كل أنبوب اختبار .

-2أضيف كمية من كل الأربعة أنابيب في حقل خاص على لوح الاقروز ثم امرر تيار كهربائي و من ثم تظهر على طول اللوح القطع المنسوخة و المتفاوتة الأطوال كل حقل

This PDF was created using the Sonic PDF Creator.
To remove this watermark, please license this product at www.investintech.com

يعطيني ترتيب القطع .

3-تعريضها للأشعة (Autoradiography)لكي يتسنى رؤية الدي إن أي و الذي عليه مادة مشعة .

4-ابدأ بقراءة لوح الاقروز من أسفل إلى أعلى.وكل ما مر على نسخة من الدي إن أي اعرف ترتيب و نوع الديديوكسي نيوكليتيد الذي في طرفة و استمر في القراءة إلى أن ينتهي لوح الاقروز .

و لتسهيل عملية القراءة استخدم الكمبيوتر لكي يقرأها بشكل إلي و ذلك بتعريض لوح الاقروز إلى أشعة ليزر و عن طريق وحدة استشعار و مضخم للنبضات (photomultiplier)يستطيع الكمبيوتر أن يحدد نوع الدي ديوكسي نيوكليتيد و ثم يرتبها و يطبعها و يعطيك رسماً بيانياً لاماكن كل حمض نووي و بالألوان.و لا تستخدم المواد المشعة في القراءة الآلية بالكمبيوتر بل يستعاض عنها بمادة مضيئة (fluorescent)توضع على البريمر على أن يكون لكل دي ديوكسي نيوكليتيد لون مختلف عن الآخر(أي أربعة ألوان من المادة المضيئة) و بذلك يمكن أن تمر جميع القطع في ممر واحد كما هو واضح في الرسم الجانبي. و نظرا إلى أن جهاز الكمبيوتر قابل للخطاء فانه يلزم التدقيق و المراجعة لتفادي حدوث الأخطاء.و لقد قامة أجهزة كمبيوتر عملاقة تعمل على مدار الساعة و تحت مظلة مشروع الجينوم البشري بالكشف الكامل(٩٩% تقريباً)من التسلسل النووي لجميع الدي إن أي الموجود في الإنسان و قد سبق ذلك الكشف عن التسلسل النووي لكثير من الكائنات الحية و العمل جاري لمعرفة المزيد .

الناقلات (Vectors)

الناقل و التي تسمى باللغة الإنجليزية' فيكتور' هي في الغالب فيروسات أو قطع من الحمض النووي موجودة في البكتيريا.كما أن هناك أنواع صناعية تم صنعها في المختبرات الطبية و هي في العادة مواد شبه صناعية لأنها في الأصل مصنعة من مواد موجودة في الطبيعة .

البلازميد

This PDF was created using the Sonic PDF Creator.
To remove this watermark, please license this product at www.investintech.com

و هي من اشهر الناقلات ،و هو عبارة عن قطعة صغيرة من الحمض النووي قابلة للتكاثر بمعزل عن بقية الحمض النووي الموجود في الكروموسومات .و هي شبيهة بالفيروس الصغير و لكنها لا تحتوي على طبقة خارجية من البروتين .

.و البلازميد عبارة عن قطعة من الحمض النووي موجود في البكتيريا خاصة في الاي كولي (E.Coli)و بعض أنوع الخميرة. (Yeast) و لدية القدرة على التكاثر الذاتي و بمعزل من بقية الكروموسومات

الموجودة في الخلية.كما أن هناك بلازميدات تستطيع التكاثر داخل البكتيريا و الخميرة في آن واحد .و يوجد نوعان من البلازميد على حسب نوع الحمض النووي فيها فهناك البلازميد المصنوع من الدي إن أي (DNA) و نوع أخر مصنوع من الأر إن أي .(RNA) و هناك أنواع عديدة من البلازميد فمنها الصغير و منها الكبير كما أن منها ما لا يحتوي على أي جين بينما هناك أنواع كبيرة تحتوي على عدة جينات.و بالإضافة إلى وحدة التكاثر الذاتي الموجد على البلازميد هناك الكثير من الجينات التي قد تكون على البلازميد و هي مفيدة للعلماء في عملية نسخ الجينات و القطع النووية فمثلا فد يوجد على البلازميد جين خاص يكافح المضادات الحيوية كالمبيسيلين و التترسيكلين .و هذه الجينات الحامية من المضادات الحيوية تساعد في التعرف و عزل البكتيريا التي تحتوي على البلازميد الذي عليه الجين الذي كنا ننوي استنساخه (للمزيد راجع عملية نسخ الجينات و القطع النووية)و يعتقد نظريا أن الفيروسات المنتشرة في الأصل كانت بلازميدات حيث أنها اكتسبت غلاف بروتيني خارجي و أصبحت فيروساً .

أنواع البلازميد التي تنمو في خميرة الخبز

YIP, yeast integrating plasmid = selectable marker +cloning sites

This PDF was created using the Sonic PDF Creator.
To remove this watermark, please license this product at www.investintech.com

YRP, yeast replicating plasmid = YIP + ARS origin of replication

YEP, yeast expression plasmid = YIP + 2 micron origin of replication

YCP, yeast centromere plasmid = YRP + centromere sequence

الناقلات الفيروسية : (Viral Vectors)

إن اشهر هذه الأنواع هي الفيروسات البكتيرية المعروفة بالفيج .(Phage) و هي عبارة عن قطعة من الدي ان أي مغطاة بغلاف بروتيني. ومن اشهر أنواع الفيج ما يسمى بفيج لمدا (lambda phage) و هو فيروس موجود في الاي كولي .E. coli وهذا النوع من الناقلات تستطيع أن تحمل قطعة من الدي إن أي حتى غاية كيلوبيز.و لقد حوّرت هذه الفيروسات لكي تستطيع حمل كمية اكبر من الدي إن أي.فعلا سبيل المثال الكوزميد (Cosmids)عبارة عن تهجين جزء(قطعة من الدي ان تسمى اللاصقة cohesive sequenceو تعرف مختصرة بالكوز (Cos sequence من فيج ليمبدا (Phage) مع بلازميد (Plasmid) و الذي يستطيع نقل حتى ٤٠ كيلوبيز (٤٠ (kbو الباك الفيروسي المسمى بكروموسوم بي ١ الصناعي (PAC P1-derived Artificial Chromosomes / (عبارة عن تحوير للفيج بي ١ (P1 Bacteriophage) و إضافته إلى البلازميد ..

Cos sequence from Lambda phage + Plasmid Cosmid

P1 Phage + Plasmid PAC

Modified E.coli fertility plasmid-factor BAC

الناقلات الكروموسومية الصناعية :(Artificial Chromosomes)

نظرا للحاجة إلى نقل إحجام كبيرة من الدي إن أي فقد قام بعض العلماء بتحوير بعض الناقلات الطبيعية لكي تقوم بهذه المهمة.و يوجد حاليا ناقلات على شكل كروموسوم و فيها

This PDF was created using the Sonic PDF Creator.
To remove this watermark, please license this product at www.investintech.com

القطع الأساسية لكي تعمل على شكل كروموسوم.و من هذه الأنواع ما يعرف بـ الياك او كروموسوم الخميرة الصناعي (Yeast Artificial Chromosomes / YAC)و الذي يستطيع نقل أكثر من ٥٠٠ كيلوبيز (٥٠٠.(kb و الياك عبارة عن قطعة من الدي ان أي مترابطة و تحتوي على طرفين للكروموسوم(٢ (Telomeres و مركز للكروموسوم (Centromere)و مركز للتكاثر Autonomous replicating) sequence ARS).بينما الباك البكتيري Bacterial Artificial) Chromosomes / BAC (والذي يستطيع حمل حتى ١٥٠ كيلوبيز (١٥٠ (kb هو تحوير للبلازميد المعروف ببلازميد تناسل بكتيريا الايكولي E.coli fertility) plasmid-factor)).

نوع الناقل Vector حجم الدي ان أي الذي يستطيع حملة

البلازميد Standard plasmid 0- 10 KB

لمبدا بكتيريوفيج محور Lambda Bacteriophage 0-23 Kb

كوزميد Cosmid 30-44 Kb

بكتريوفيج بي ١ Bacteriophage P1 70-100 Kb

كروموسوم بي ١ الصناعي P1 P1Artificial chromosome PAC 130- Kb 150

كروموسوم البكتيريا الصناعي Bacterial Artificial Chromosome BAC بحد أقصى ٣٠٠ Kb

كروموسوم الخميرة الصناعي-Yeast Artificial Chromosome YAC 0.2 2 Mb

النسخ والاستنساخ :(Cloning)

يشتهر بين الناس كلمة الاستنساخ نظرا لارتباطها بخلق الكائنات أو إنشاء نُسخ منها.و لكن بالمصطلح الطبي فان كلمة نسخ أو استنساخ تعنى عملية إنشاء صورة طبقا الأصل من المادة التي يراد نسخها.و قد يكون النسخ لقطعة من الدي إن أي أو نسخ كائن حي متكامل.و لا شك أن لغتنا العربية تفرق بين كلمة نسخ و استنساخ و لكننا سوف نستخدم

This PDF was created using the Sonic PDF Creator.
To remove this watermark, please license this product at www.investintech.com

كلمة نسخ أو استنساخ في حديثنا لنعني نفس الشيء. و في كلمة استنساخ باللغة العربية تعني(Cloning) وينتج عنه نسخة أو مستنسخ .(Clone)

عندما قام الدكتور... و فريقه العلمي بنشر (Nature 385, 810-13, 1997)

(خبر استنساخ النعجة' دولي' في احد مختبرات اسكتلندا (مختبر روزيلين) عام ١٩٩٧ زاد اهتمام العالم بموضوع الاستنساخ و زاد الفضول العلمي في الحديث عن استنساخ الإنسان و فجر ذلك الخبر الكثير من التحفظات الدولية من كثير من المراكز الدينية و العلمية على الجانب الأخلاقي من عملية استنساخ الإنسان .

و بعد ذلك اخبر أصبحت كلمة استنساخ تستخدم بين العامة في الحديث عن عملية خلق نسخة أخرى من الحيوان أو الإنسان و بذلك بدأ البس بين الكثيرين في معنى هذه الكلمة.و لا شك فان العلماء كانوا و مازالوا يستعملون هذه الكلمة في الإشارة إلى عملية صنع نسخة من أي مادة وراثية و ليس بالضرورة خلق أو نسخ كائن حي بالكامل. و لذلك فالعلماء يقسمون الاستنساخ أو النسخ إلى ٣ أنواع :

1-نسخ أو استنساخ القطع من الدي إن أي عن طريق الهندسة الوراثية و بما يعرف بتهجين الدي إن أي . (Recombinant DNA technology)

2-الاستنساخ التكاثري أو الجنسي Reproductive cloning

3-الاستنساخ العلاجي Therapeutic cloning

نسخ أو استنساخ القطع من الدي إن أي عن طريق الهندسة الوراثية .

إن ما يهتم به العلماء في باب الاستنساخ هو نسخ قطع من الدي إن أي كانت هذه القطع عبارة عن جين(مورث)أو جميع الجينوم(أي كل الدي إن أي الموجود في الكائن الحي).و اشهر العمليات التي تجرى هي نسخ قطعة من الدي إن أي. و يحتاج العلماء للقيام بنسخ القطع لأنهم يحتاجون إلى كمية كبيرة من هذه النسخ و ذلك لندرة استخلاصها في كل مرة من داخل الخلية و ذلك لوجود التعقيدات الإنشائية للكروموسومات .و على سبيل المثال فان الجين المنتج لسلسلة بيتا في الهيموجلوبين و المعروف بمورث ببيتا جلوبين-Beta) Globin Gene)يمثل فقط ٠.٠٠٠٠٠٥% من حجم الدي إن أي الكلي في الخلية(و الذي يتراوح ب ٣بلايين قاعدة نووية).كما أن الجين العملاق و المعروف بجين الدستروفين)

This PDF was created using the Sonic PDF Creator.
To remove this watermark, please license this product at www.investintech.com

(Dystrophin Geneو الذي يتراوح حجمه بال٢.٥ ميقابيز
(٢.٥ (Megabasesلا يمثل أكثر من ٠.٠٠٨% من الحجم الكلي للدي إن أي في الخلية.و لذلك فان العلماء يحتاجون إلى إجراء نسخ لهذه الجينات أو القطعة من الدي إن أي لكي يتسنى لهم التعامل بها و إجراء التجارب عليها.و هناك طريقتان رئيسيتان للنسخ :

-1النسخ عن طريق استخدام الخلايا الحية (Cell-Based DNA cloning)

-2النسخ عن طريق غير الخلايا الحية (Cell-Free DNA cloning)و ذلك باستخدام البي سي أر.(Polymerase chain reaction PCR)سوف نورد لهذه الطريقة صفحة مستقلة إنشاء الله .

النسخ عن طريق استخدام الخلايا (Cell-Based DNA cloning)

يرتكز النسخ باستخدام الخلايا الحية على ثلاث خطوات :

-1تصميم قطعة مهجنة من الدي إن أي المراد نسخها و دي إن أي من ناقل (Vector)و لدية القدرة على التكاثر.و ذلك عن طريق استخدام الإنزيمات القاطعة .(Restriction enzymes)

1- Construction of recombinant DNA molecules by in Vitro attachment to Replicon(Vector).

-2نقل القطعة المهجنة و التي هي بداخل الناقل إلى خلية حية و في العادة تستخدم البكتيريا (Bacteria)خاصة النوع المعروف بالايكولي E,coli) او الخميرة .(Yeast)

2-Transformation using bacteria or yeast

-3اختيار المستعمرات البكتيرية التي تحتوي على الناقل و القطعة المهجنة و السماح لها

This PDF was created using the Sonic PDF Creator.
To remove this watermark, please license this product at www.investintech.com

بالتكاثر.عن طريق أطباق الزراعة (Culture Plates)أو في محاليل سائلة .

3- Selective propagation of cell clones.

-4استخلاص القطع المهجنة و استخراج الدي ان أي منها بكميات كبيرة .

3- Isolation of recombinant DNA clones

-1تصميم القطع مهجنة من الدي إن

يعتمد النسخ باستخدام الخلايا الحية على قدرة القطعة المراد نسخها على الانقسام أو التكاثر الذاتي عندما توضع داخل الخلية الحية.و لا شك أن قطع الدي إن أي العادية ليس لديها القدرة على التكاثر الذاتي و لذلك فان العلماء قاموا بتجاوز هذا الأمر بان ادخلوا القطعة التي يريدون نسخها في ناقل من النواقل (Vectors)المعروفة بقدرتها على التكاثر الذاتي(راجع موضوع النواقل).و بغض النظر عن نوع الناقل فان طريقة إدخال قطعة الدي ان أي المراد نسخها إلى الناقل تقريبا واحدة.و هذه الخطوات ببساطة كما يلي :

-1بعد أن يتم تحديد القطعة المراد نسخها يضاف إليها إنزيم قاطع محدد و ليكن مثلا إنزيم (أ)فيقوم هذا الإنزيم بقطع الدي إن أي في مكان محدد حسب التسلسل النووي .

-2يضاف نفس الإنزيم للناقل و الذي يقوم بقطعة أيضا في نفس التسلسل النووي .

-3تضاف القطع المراد نسخها بعد قطعها بالإنزيم القاطع إلى الناقل المقطّع. فتتداخل التسلسلات النووية بين الناقل و بين قطع الدي إن أي المراد نسخها. فنشاء من ذلك قطعة مهجنة من الناقل و بداخله القطعة المراد نسخها.و ترتبط قطعة الدي إن أي البلازميد من أطرافها برابطة هيدروجينية و هي رابطة ضعيفة لذلك يضاف إنزيم يسمى ليقيز أو اللاصق (Ligase)لكي يحول الترابط بين قطعة الدي إن أي و التناقل إلى رابطة قوية (Covalent Bond)

إن أكثر لناقلات استخداما هي البلازميد و لكن يمكن استخدام الفيج أو الياك أو أي ناقل أخر.و الذي يحدد نوع الناقل المراد استخدامه هو في العادة كبر القطعة المراد

This PDF was created using the Sonic PDF Creator.
To remove this watermark, please license this product at www.investintech.com

استنساخها.ففي حالة القطع الصغيرة يستخدم البلازميد أو الفيج بينما يستخدم الياك أو الباك في حالة القطع الكبيرة .

2-نقل القطعة المهجنة و التي هي بداخل الناقل إلى خلية حية

في الغالب تستعمل البكتيريا خاصة النوع المعروف الايكولي (E.Coli)في عملية الزراعة و ذلك لسهولة إدخال الناقل إليها، و إلى سرعة انقسامها (تنقسم البكتريا تقريبا كل ٢٠ دقيقة)، إضافة إلى توفر طرق الاختيار خاصة التي تعتمد على خاصة الحماية من المضادات الحيوية.و يدخل البلازميد أو الفيج تلقائيا إلى داخل البكتيريا بينما الناقلات الأخرى تحتاج إلى مساعدة ،و في العادة بتغيير تركيز الأملاح المحيطة بالبكتيريا أو تعرض إلى نبضة كهربائية لكي يسمح الجدار المحيط بالبكتيريا بدخول الناقلات.و من طبيعة البكتريا إنها تنقسم تلقائيا و بشكل سريع و كذلك البلازميدات .

3-اختيار المستعمرات البكتيرية التي تحتوي على الناقل و القطعة المهجنة

مع تكاثر الخلايا البكتيرية و تكاثر البلازميد التي بداخلها ينتج لدينا أعداد كثيرة من المستعمرات البكتيرية و بها البلازميد المهجن.و لكن قد يكون في داخل الطبق الذي زرع فيه البكتريا بعض البكتريا التي لا تحتوي على البلازميد المهجن و لكي يمكن التعرف على البكتيريا التي تحتوي على البلازميد المهجن فنه في العادة يقام باستعمال ناقلات عليها جينات واقية من المضادات الحيوية، كالجين الواقي من المضاد الحيوي امبيسيلين أو لاترسيلين و غيرها. و بذلك فالمضاد الحيوي سوف يمنع تكاثر أي خلية بكتيرية لا تحتوي على البلازميد المهجن و الذي علي الجين الواقي من المضاد الحيوي .

4-استخلاص القطع المهجنة و استخراج الدي ان أي منها بكميات كبيرة .

بعد أن يُتعرف على المستعمرات التي تحتوي على البلازميد المهجن فانه يمكن نقلها إلى طبق جديد و يحافظ عليها و تغذى لكي تستمر بالتكاثر.و هذه البكتيريا يكون فيها أعداد كثيرة من البلازميد و بذلك تنتهي عملية النسخ.و يستفاد من هذه القطع المنسوخة في القيام بالمزيد من البحوث أو التجارب عليها كان يقام مثلا إنتاج مكتبة من الدي إن أي أو محاولة استنتاج التسلسل النووي للقطعة.كما يمكن تحوير هذه العملية بحيث يحتوي البلازميد على قطعة من سي دي إن أي (cDNA)بدل و من ثم تحوير المراحل الأخيرة من الزراعة لإنتاج

This PDF was created using the Sonic PDF Creator.
To remove this watermark, please license this product at www.investintech.com

بروتين بدلا من الدي إن أي. و هذه الطريقة هي التي تستعمل في إنتاج بعض الهرمونات كهرمون النمو

This PDF was created using the Sonic PDF Creator.
To remove this watermark, please license this product at www.investintech.com