Remove Watermark Now

المحاضرة الحادية عشر

الهندسة الوراثية Genetic Engineering: مبادئها، تقنياتها و مجالات تطبيقها .

ثورة البيوتكنولوجيا

توالت العجائب خلال القرنين 20م و 21م ، و يظهر ذلك جلياً من خلال الثورة العلمية الهائلة في شتى المجالات وبخاصة في مجال هندسة المورثات، مما جعلها علامة بارزة لطموح الإنسان قد يكون الدافع لها الحاجة أو حب الإبتكار، تتمثل فيما يأتي:

1- زراعة الأعضاء البشرية:

حيث تمت أول عملية زرع قلب عام 1967م على يد الطبيب "كريستيان برنارد"، ثم نجح آخرون في نقل أعضاء أخرى كالكبد و البنكرياس و الرئة.

2- الإخصاب الصناعي: حيث تمت ولادة أول طفل أنابيب في عام 1979م، ثم أنشى "بنك الأمشاج Sperm Bank"، ثم الأرحام المؤجرة، ثم الأم البديلة، ثم الرحم الصناعي.

3- الهندسة الوراثية: حيث بدأت فكرة التحكم في الجهاز الوراثي في 1973م، بهدف برمجة الجنس البشري وفق تصميمات مسبقة

4- الإستنساخ: بدأ باستنساخ أجنة بشرية في عام 1993م على يد العالمين "جيري هول" و "روبرت ستلمان"، ثم استنسخت النعجة "دوللي" في فبراير 1997م من خلية جسدية، ثم استنسخت قردة من خلايا جنينية في مارس من عام 1997م. ثم الاستنساخ البشري على غرار النعجة "دوللي" الذي يفرق عنها بخطورتهً و ذلك لمساسه بالجوانب الدينية والأخلاقية للإنسان.

5- مشروع الجينوم البشري: أول من اثار الفكرة هو العالم "روبرت سينهايمر" في عام 1987م، و بدء التنفيذ في عام 1990م بعشرين فريق عمل برئاسة الدكتور "ويليام هيزلتاين" و ذلك لرسم 3 أنواع من الخرائط لعدد 46 كروموسوم تحمل 100 ألف جين، ورصد له ميزانية قدرها 3 مليار دولار، و مدة 15 عام.

* الهندسة الوراثية Genetic Engineering، استنساخ DNA (DNA Cloning)، تكنولوجيا DNA المأشوب Recombinant DNA Technology، التكنولوجيا الحيوية Biotechnology، البصمة الوراثية: هي مصطلحات أغلبها مترادفات تصف مجالات علمية تعتمد على تقنيات للتلاعب بالحمض النووي خارج الخلية، بحيث يتم تعديل، حذف أو دمج جينات من كائنات مختلفة، ومن ثم وضعها داخل لخلية بغرض إنتاج صفات جديدة.

الهندسة الوراثية Genetic Engineering:

تمهيد: مند سنة 1975، و بعد اكتشاف بنية DNA و مكوناتها، تمكن العلماء من استخلاص أجزاء من DNA خلايا مختلفة و زرعها داخل خلايا أخرى، من أجل إكساب هذه الأخيرة خاصيات جديدة لتحسين مردوديتها أو لإنتاج مواد مرغوب فيها، فنشأت بذلك صناعة جديدة تعتمد على التغيير الوراثي للخلايا الحية عن طريق نقل مورثات، تسمى التقنيات المعتمدة في هذا التغيير بالهندسة الوراثية.

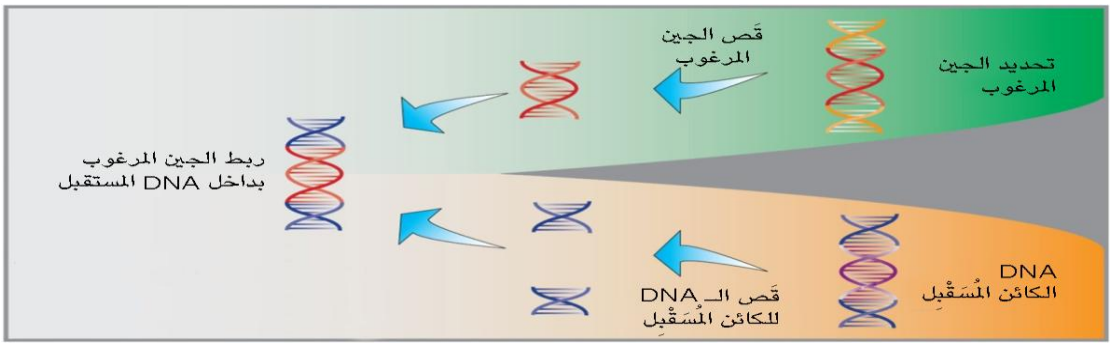
فما هي مبادئها؟ ما هي تقنياتها ؟ و ماهي مجالات تطبيقها ؟

ما هي الهندسة الوراثية

هي إحدى الفروع التطبيقية لعلم الوراثة، و تختص بمعالجة المادة الوراثية باستخدام تقنيات خاصة يمكن من خلالها قطع جزيئات حمض DNA في مكان محدد بدقة بالغة، و وصلها مع قطع أخرى. (يمكن تسميتها بـ التطعيم الجيني).

الهندسة الوراثية هي عملية يتم فيها تغيير الـDNA لمخلوق معين من اجل تغيير صفاته وذلك حسب رغبة الانسان واحتياجاته. تتم العملية بواسطة ادخال DNA مصدره مخلوق معين او DNA اصطناعي أُنتج في المختبر الى خلايا المخلوق المستقبِل، وبهذه الطريقة يمكن اكساب المخلوق " المُهندَس " صفة جديدة ، على سبيل المثال : القدرة على انتاج إنسولين .

Remove Watermark Now



يُنقل الجين من مخلوق لآخر بواسطة ناقل (Vector) : بلازميد أو فيروس ويسمى الكائن المُهندس مخلوق / كائن حي ترانسجيني

البلازميدات The plasmids

البلازميد هو جزيئة DNA ثنائية الشريط double strands DNA molecules غالبا ما تكون حلقية الشكل، تتراوح احجامها من 1-1000 kbp، وهي تمثل كوحدة وراثية خارج كروموسومية، تتواجد طبيعيا في البكتريا وفي بعض انواع الخمائر مثل Saccharomyces cervisiae يتميز البلازميد بأنه ذاتي التضاعف autonomous replication اي انه يتضاعف بشكل مستقل عن تضاعف الكروموسوم البكتيري. لا تعتبر البلازميدات شكل من اشكال الحياة تشبه بذلك الفيروسات ولكنها تختلف عنها من ناحية انها لا تشفر لبروتينات احتواء الماده الوراثية مثل protein coat ، مع انها تشفر لبعض البروتينات مثل الاهلاب الجنسية sex pili

الخصائص العامه للبلازميدات General characteristics of the plasmids

1- البلازميد هو قطعة DNA دائرية قصيرة موجودة بشكل طبيعي في خلايا البكتيريا. تتضاعف البلازميدات بشكل مستقل وتنقل لأنسال البكتيريا.

2- يمكن ان تُنقل البلازميدات من خلية بكتيريا الى اخرى (مثل عملية الاقتران). احياناً تُنقل الى بكتيريا من نوع اخر.

3- تحمل البلازميدات جينات مختلفة، وفي حالات كثيرة فان هذه الجينات هي من النوع الذي يُكسب صموداً امام مضادات حيوية من انواع مختلفة. هذه احدى الطرق المركزية التي تكتسب فيها البكتيريا في الطبيعة صموداً امام المضادات الحيوية).

4- توجد البلازميدات بأشكال مختلفة، النوع السائد هو جزيئة DNA حلقية الشكل وأحيانا توجد بشكل خطي linear DNA molecule

5- البلازميدات هي جزيئات صغيرة الحجم تتراوح احجامها من 1-1000kbp

6- على الرغم من انه يتضاعف بشكل مستقل عن تضاعف الكروموسوم البكتيري autonomous replication الا انه يعتمد على انزيمات الخليه لإنجاح عملية التضاعف والاستنساخ. ولكن عملية بدا التضاعف وتوزيع نسخ البلازميدات في الخليه البنوية يتم تنظيمها من خلال جينات البلازميدات

7- كل بلازميد يحتوي واحده على الاقل من منطقة اصل التضاعف origin of replication

8- اكثر البلازميدات تحتوي على جينات مسؤولة عن ابراز الطراز المظهري الخاص بالكائن الحي، مثل صفة المقاومه للمضادات الحيوية

9- بعض الخلايا البكتيرية تحتوي على نسخة واحده او عدد قليل منها، اثناء حدوث انقسام الخليه وتكوين الخلايا البنوية، هنالك احتماليه انتاج خلايا بنوية فاقده لذلك النوع من البلازميد

10- بعض البلازميدات تشتمل addiction system او مايدعى postsegregation killing (psk) ونعني بها ان الخلايا البنوية الفاقدة للبلازميد تعاني من الموت او اختزال في معدل النمو في حين تبقى الخلايا المحتفظة بنسخة البلازميد حية

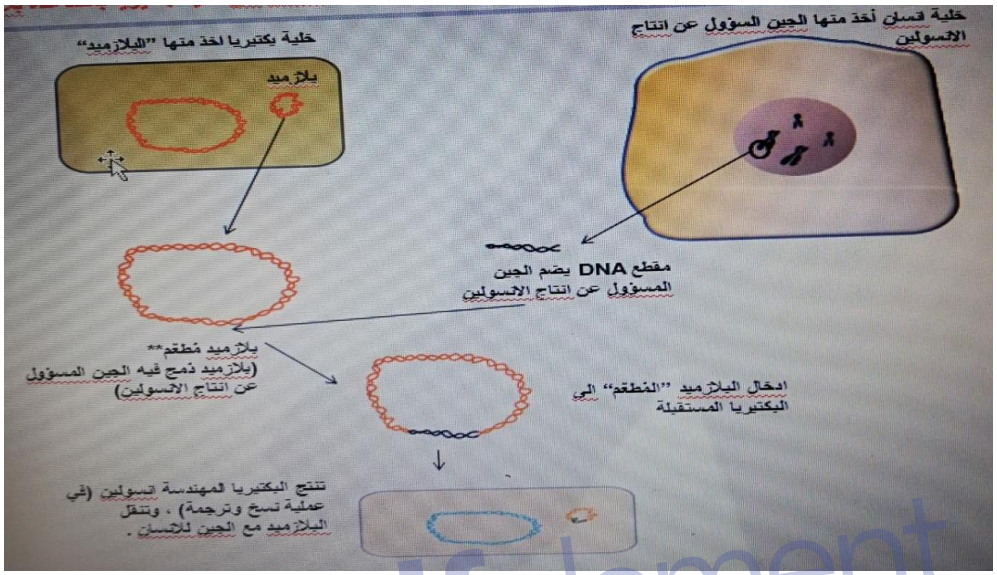
8- توجد عدة نسخ لكل نوع من البلازميد داخل الخلية الواحدة تتراوح من نسخه واحده لعدة آلاف من النسخ تحت ظروف خاصة

11-احتوائها على cloning site وهو منطقة الهضم بواسطة الانزيمات القاطعه المحدده التي عندها يتم اضافة القطعه الوراثية المراد استنسالها

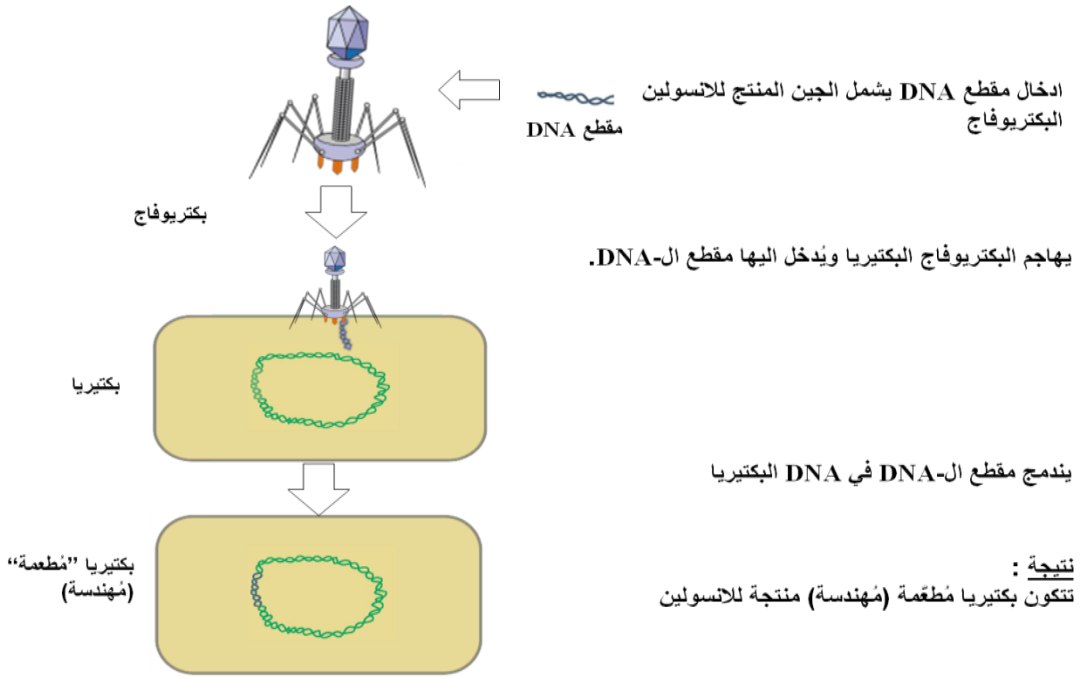
Remove Watermark Now

** في الهندسة الوراثية يستعملون البلازميدات كثيراً. ينتجون بلازميدات اصطناعية شبيهة بالبلازميدات الطبيعية الموجودة عادةً في خلايا البكتيريا، ويُدخلون اليها الجين المرغوب. تسمى البلازميدات المهندسة بلازميدات "مطعَّمة" (ذات تراكيب جديدة) .
وبعد ذلك يتم ادخال البلازميدات الى خلايا البكتيريا، بمساعدة علاج يجعل غشاء خلية البكتيريا نفاذاً أكثر من المعتاد خلال فترة زمنية قصيرة.

مثال للهندسة الوراثية: نقل الجين المسؤول عن إنتاج الانسولين من خلية إنسان إلى خلية بكتيريا بمساعدة بلازميد



مثال للهندسة الوراثية: نقل جين لإنتاج الانسولين من خلية انسان الى خلية بكتيريا بمساعدة بكتريوفاج تُستعمل البكتريوفاجات أحياناً كناقل لنقل الجين وذلك بسبب قدرتها الطبيعية على ادخال الـDNA الخاص بها الى خلايا البكتيريا .



Remove Watermark Now

انواع البلازميدات Types of plasmid

تختلف اسس تصنيف البلازميدات الى انواع مختلفة بالاعتماد على :

1 - التوافق compatibility

2 - الاندماج مع الكروموسوم البكتيري integration with bacterial chromosome

3 - امكانية انتقاله الى الخليه البكتيرية الاخرى ability to transfer to another bacteria

4 - الوظيفة function

تدعى البلازميدات التي ترافق الخليه البكتيرية حتى بعد تضاعفها وانتقالها الى الخلايا البنوية بالبلازميدات المتوافقه compatible plasmid في حين تدعى البلازميدات التي بالإمكان فقدانها من الخليه البنوية اثناء الانقسام بالبلازميدات غير المتوافقه incompatible plasmid

كذلك توجد البلازميدات بشكل حر في السايتوبلازم غير مندمج مع الكروموسوم تدعى بالبلازميدات غير المندمجة nonintegrated plasmid او انه يكون متحد مع الكروموسوم البكتيري ويدعى في هذه الحاله Episome

Episome : بعض البلازميدات لها القابلية على الاندماج مع البلازميدات الاخرى او مع الكروموسوم البكتيري وتدعى الحاله الاخيره بالـ Episome وبعبارة اخرى الابيسوم هو بلازميد بكتيري او DNA فايروسي بإمكانه الاندماج بالـ DNA الكروموسومي لخليه المضيف، يتضاعف بتضاعف الماده الوراثية الكروموسومية ويصبح جزء من المحتوى الوراثي لتلك الخلية. يمكن اكتساب الايبيسوم بواسطة الاصابة infection او بواسطة الاقتران البكتيري bacterial conjugation ومن الامثلة على الايبيسوم هو التسلسلات المنحشره insertion sequence (IS) والترانسبوزون Transposone و DNA الفايروسات التي بإمكان جينومها الاندماج مع كروموسوم الخلية المضيف

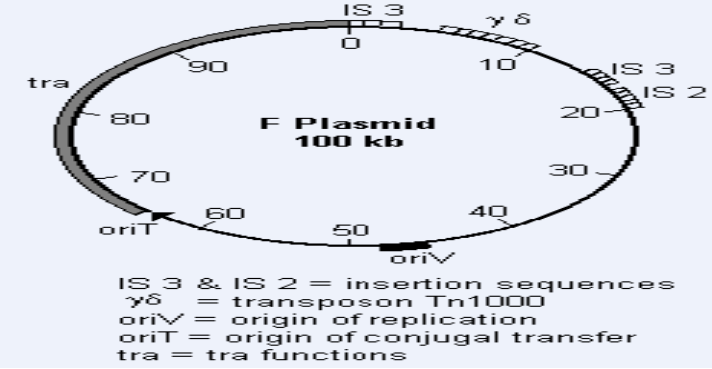
ومن الاسس المعتمده في تصنيف البلازميدات هو امكانية انتقالها الى الخليه البكتيرية الاخرى عن طريق الاقتران البكتيري. وتدعى البلازميدات المنتقلة الى الخليه المستلمه بالبلازميدات الاقترانيه conjugative plasmid وتكون هذه البلازميدات حاويه على Tra genes المسؤولة عن عملية انتقال الماده الوراثية البلازميدية، اما البلازميدات غير الاقترانية nonconjugative plasmid فهي غير قادرة على الانتقال الى الخليه البكتيرية المستلمة لأنها لا تحتوي على المعلومات الوراثية اللازمة لانجاز عملية الاقتران

وهنالك بلازميدات تدعى Mobilizable plasmid ، وهي بلازميدات تكون حالة وسط بين الصنفين السابقين، اذ تحتوي على بعض الجينات المتطلبه لعملية انتقاله الى الخليه الاخرى، اذ تقوم بعملية التطفل على بلازميدات الاقتران وبذلك يمكن ان تنتقل الى الخلية المستلمة.

ويمكن ايضا تصنيف البلازميدات بالاعتماد على الوظيفة الى:

1- عامل الخصوبة fertility factor or F plasmid

وهو بلازميد ينظم عملية النقل الجنسي (الاقتران البكتيري) للمادة الوراثية بين الخلايا البكتيرية. يحتوي F plasmid على مجموعه من الجينات مسؤولة عن عملية التضاعف الذاتي، وعن عملية تكوين الاهلاب الجنسيه sex pili، وعن عملية تكوين الجسور السايتوبلازمية، وأيضا يحتوي على Tra genes المسؤولة عن عملية نقل البلازميد اثناء الاقتران البكتيري



شكل يمثل F plasmid

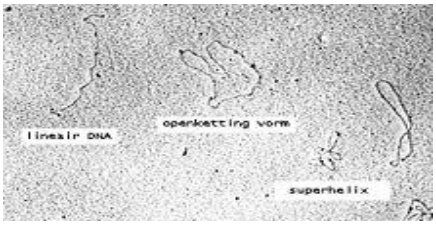
Remove Watermark Now

2- بلازميد مقاومة المضادات الحيوية Resistant plasmid (R plasmid)
يحتوي هذا النوع من البلازميد على مجموعة من الجينات المسؤولة عن مقاومة البكتريا للمضادات الحياتيه او السموم البكتيرية. تتألف مثل هذه البلازميدات من منطقتين من الـ DNA احدهما تدعى عامل نقل المقاومة resistant transfer factor وهي مسؤولة عن عملية نقل بلازميد المقاومة وعن عملية التضاعف، والمنطقة الاخرى تدعى محددات المقاومة (R- determinant) وهي جينات تشفر لمواد تعادل فعل المضادات الحياتيه او السموم البكتيرية . بلازميدات المقاومه هي من البلازميدات الاقترانية والتي تنقل من بكتريا الى اخرى بواسطة الاقتران البكتيري، اذ انها تحتوي على Tra genes
3- Col – plasmid
هذه البلازميدات تحتوي على جينات تشفر للسموم البكتيرية والتي تدعى بالبكتريوسين bacteriocin التي تعمل على قتل السلالات المختلفة لنفس الجنس البكتيري. تدعى السموم المفرزة من بكتريا *E-coli* بالـ colicin ومن هذا جاءت التسمية، والمفرزة من بكتريا *Pseudomonas aeruginosa* بالـ pyocin . بعض Col plasmid هي بلازميدات اقترانية اذ يمكن انتقالها الى الخلية المستلمة اثناء عملية الاقتران مثل Col B وبعضها غير اقترانية مثل Col E
4- انزيمات التحلل او التفسخ Degradative plasmid
تحتوي هذه البلازميدات على جينات تجهز البكتريا مثل بكتريا Peudomonas بالإنزيمات المتخصصة التي يمكن البكتريا من هضم بعض المشتقات النفطية والمركبات الهيدروكاربون الاروماتية . Xyl- plasmid الذي يساهم في تحلل الزايلين Xylene و Toleune
5- بلازميدات الضراوه Virulence plasmid
بعض اجناس البكتريا مثل *Shigella flexneri* تمتلك عوامل ضراوة Invasin و Interotoxin محمولة على البلازميد، haemolysin لبكتريا E.coli .مثل هذه البلازميدات تدعى بلازميدات الضراوة
6- بلازميدات المتخفية Cryptic plasmid
وهي البلازميدات التي لا تمتلك جينات وظيفية functional genes وبالتالي فهي لا تساهم في ابراز الطراز المظهري phenotype للكائن الحي
7- بلازميدات المقاومة للعناصر الثقيلة Heavy metal resistant plasmid
هذه البلازميدات تكسب البكتريا صفة المقاومه لبعض العناصر الثقيلة مثل الزئبق والنيكل والرصاص مثال على بكتريا E.coli ,P.aeruginosa P. florescens.
7- النواقل Vectors
تدعى البلازميدات المستخدمه في الهندسة الوراثية بالنواقل وتستخدم في عملية نقل الجينات من احد الكائنات الى الكائن الاخر وتكون على الاغلب حاوية على معلمات وراثية genetic marker مثل المقاومة للمضادات الحيوية التي يمكن انتقاءها مختبرياً. مثل هذه البلازميدات تحتوي على منطقه تدعى cloning site وهي منطقة الهضم بواسطة الإنزيمات المحددة (إنزيمات التقييد) Restriction enzyme وبالتالي تسمح لقطعة الـ DNA المراد تنسيلها بالاندماج في منطقة القطع لذلك البلازميد، ثم بعد ذلك يتم ادخال جزيئة الـ DNA البلازميدي في الخلية البكتيرية بطريقة التحول الوراثي، بعد ذلك يتم انتقاء البكتريا المتحولة عن طريق تنميتها على وسط حاوي على المضادات الحياتيه، بعدها يتم استخلاص البلازميدات بطريقة التحلل القاعدي

أشكال البلازميدات plasmid shapes

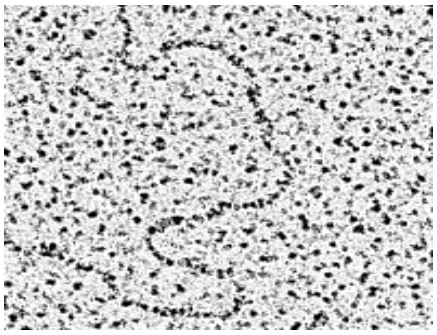
يتم التعرف على احجام قطع الـ DNA البلازميدي من خلال معاملة البلازميدات بإنزيمات القطع المحدده او المقيده Restriction enzyme ومن ثم تحديد اوزانها من خلال عملية الترحيل الكهربائي بالمقارنة مع المعلمات الحجمية DNA size marker . وعلى الرغم من ذلك فان البلازميدات غير المعامله بإنزيمات القطع يمكن تحديد اشكالها أيضاً، تظهر جزيئة البلازميد بأحد خمسة اشكال مختلفة والتي تسلسلها بالاعتماد على سرعتها في هلام الأجاروز من الأبطأ الى الأسرع
1- Nicked open circular . وفيها تمتلك جزيئة الـ DNA شق في احد اشرطتها DNA has one strand cut

Remove Watermark Now



2- جزيئة DNA خطية linear DNA molecule وتكون لهذه الجزيئة نهايات حرة، كلا الشريطين مقطوعين

3- الشكل المستريح لجزيئة الـ DNA الحلقية Relaxed circular DNA molecule : جزيئة DNA كاملة لا تمتلك نهايات حرة



4- جزيئة DNA فائقة اللف Supercoiled DNA molecule تكون جزيئة DNA كاملة ونهاياتها غير حرة مع امكانية التفاف الجزيئة على نفسها وتكوين الشكل ثلاثي الابعاد Tertiary structure

5- جزيئة DNA فائقة اللف الممسوخة Denatured supercoiled DNA molecules : تكون شبيهة بجزيئة دنا فائقة اللف مع وجود مناطق غير متزاوجة unpaired region

تطبيقات البلازميدات البكتيرية

1- استخدامها في مختبرات الهندسة الوراثية والتقنيات الحياتيه كناقل لبعض الجينات المراد استنسالها

2- تستخدم البلازميدات لتصنيع كميات كبيره من البروتينات، في هذه الحالة يتم تنمية البكتريا الحاوية على البلازميد الحامل لجين يشفر لبروتين معين (مثال الانسولين) بأعداد كبيره

3- من خلال استخدام تقنيات الهندسة الوراثية اصبح بالإمكان جعل البكتريا قادرة على تحليل المواد السامة وكوسيلة ايضا لمعالجة فضلات المياه

4- يستخدم في العلاج الجيني gene therapy تستخدم البلازميدات كوسيلة لإدخال الجين الناقص والمسؤول عن الحالة المرضية في جسم الانسان او الحيوان لمعالجة بعض الامراض.

اكتشاف الهندسة الوراثية: في السبعينات من القرن العشرين، و بعد دراسة مستفيضة لما أعلنه العالمان (واطسون و كريك " 1953م") من اكتشافهما للطريقة التي كتبت بها المعلومات الوراثية، و بالتالي تمكن العلماء من دراسة الوراثة في المعامل (في الأطباق و أنابيب الاختبار "بطريقة كيموحيوية") دون انتظار للتكاثر الطبيعي للكائن حتى يعطينا هذه المعلومات من نسله المتتابع الذي يستغرق سنوات عديدة.

Remove Watermark Now

دور الهندسة الوراثية:

هو محاولة جمع صفة (صفات) مفيدة تؤخذ من كائن (كائنات) وتنقل إلى كائن آخر، و ذلك بعزل الجينات المسئولة عنها وإضافتها للكائن الجديد مما يكسبه وظائف جديدة لم يسبق له أن امتلكها سابقاً (أي القدرة على إعادة برمجة الكائن بمعلومات وراثية مأخوذة من كائن آخر بطريقة مسيطر ة).

- تهدف الهندسة الوراثية إلى التلاعب بالجينات بطريقة تسمح بظهور صفات جديدة مفضلة أو إزالة صفة غير مرغوب فيها موجودة

تتم عملية الهندسة الوراثية بخطوات متتالية :

1- العثور على الجين وعزله: استخلاص الحمض النووي DNA أو RNA لعزل جين معين لازم لعملية الهندسة الوراثية وهناك عدة طرق لكن سنتكلم عن PCR

2- استخدام الإنزيمات القاطعة والفصل بالهجرة الكهربية عبر هلام الأغاروز لعزل الجين المطلوب أو قطع DNA المحتوية عليه

3- استخدام ناقل مناسب لربط الجين المطلوب معه وإدخاله إلى مضيف مناسب لتضخيمه وزيادة عدده هناك عدة نواقل يعتمد على المصنّع المستخدم وعلى الجين ونوع البروتين المنتج أهمها عندنا هي البلازميد والفيروسات

4- إدخال النواقل الهجينة إلى المضائف المطلوب تعديلها وراثيا

5- الكشف عن عمل الجين الجديد

المفاهيم الأساسية في تقنية الهندسة الوراثية

*عرفنا أن الكروموسوم مكون من شريطين ملتفين بشكل حلزوني، و كل شريط مكون من وحدات كيميائية لها ما يقابلها على الشريط الآخر (كل A تقابل T و كل C تقابل G) و يرتبطان بروابط هيدروجينية ضعيفة.

* عند انقسام الخلية تنفصل الكروموسومات إلى شريطين بعد فتح الحلزون المزدوج، ويصبح كل شريط كقالب ينسخ نفسه فيتكون حلزونين جديدين.

* في بعض الكائنات مثل البكتيريا يوجد جزيء حلقي إضافي من مادة الـ DNA يسمى "Plasmid" يتحرك حول الكروموسوم الأساسي (مثل تحرك القمر حول الأرض)، و يحمل جينات لبعض الصفات (مقاومة البكتيريا لبعض الأدوية كالبنسلين).

* يمكن نقل جينات البلازميد إلى كائن آخر.

تعتبر البكتيريا الكائن الحي المفضل لدى علماء الهندسة الوراثية لإجراء تجاربهم وذلك للأسباب التالية: 1- تنميتها سهلة و رخيصة.

2- تنتج جيلاً جديداً كل نصف ساعة.

3- لها سلالات متعددة بها تباين في الصفات الوراثية.

* ركز العلماء في دراستهم على سلالة (إيشيريشيا كولاي) و بخاصة السلالة "K_{12}" التي تعيش في قولون الإنسان و على الجروح و النسيج المحيط بالمخ.

تنقل الجينات في الطبيعة بـ 3 طرق هي:

1- التحول Transformation: هو نوع من الاتحادات الوراثية يحدث في البكتيريا بسبب إضافة DNA غريب إلى بيئة نمو بكتيرية و هذا لا يتطلب عامل وسيط

تجربة العالم جريفث: درس بكتيريا ذات الرئة (Diplococus pnemococus) التي لها سلالتين: سلالة معدية مستعمراتها ملساء (يرمز لها S)، و سلالة غير معدية مستعمراتها خشنة (R).

1- حقن خلايا S في فأر فمات الفأر.

2- حقن خلايا R في فأر فلم يتأثر الفأر.

3- حقن خلايا S بعد تسخينها بالحرارة (أصبحت ميتة) فلم يتأثر الفأر.

4- سخن خلايا S و نمى معها خلايا R ، ثم حقن بها الفأر فمات الفأر.

التفسير: فسر العلماء "إفري مكلويد و مكارثي" ما حدث بأن بعض خلايا السلالة R غير الممرضة تحولت إلى خلايا السلالة S الممرضة، وأن DNA هو العامل المحول حيث استقبلت "السلالة R" DNA "السلالة S" فأصبحت معدية .

Remove Watermark Now

2- النقل Transduction: حيث يحقن الفيروس DNA الخاص به في بكتيريا ، ثم يتكاثر الفيروس في داخلها مستخدماً الـ DNA الخاص بها ، و بعد موت الخلية البكتيرية تهاجم الفيروسات الجديدة خلايا بكتيرية أخرى و تحقنها بـ DNA الخلية البكتيرية السابقة.

3- الإقتران Conjugation: حيث تقوم إحدى خلايا البكتيريا بإلصاق نتؤ صغير على سطح بكتيريا قريبة (عشوائياً) تم يمرر حمض DNA إليها، تحت سيطرة البلازميد و ليس الـ DNA.

* استخدمت البلازميد و الفيروسات كناقلات في الهندسة الوراثية تحت درجة من السيطرة على كل خطوات النقل. وبرزت فكرة جعل كائن بسيط "البكتيريا" يقوم بوظائف راقية "وظائف الخلايا البشرية"؛ و لكن كيف يعزل الجين و ينقل؟

و الجواب: - عندما أكتشف فريق من العلماء مجموعة من الإنزيمات الموجودة في البكتيريا لحمايتها (حيث تقوم هذه الإنزيمات بقص أي DNA غريب يدخل في البكتيريا مما يجعله عديم الفاعلية) و سميت بـ "إنزيمات القطع Restriction enzymes or Endonucleses" التي عرف منها نحو 300 إنزيم كل منها يقص الـ DNA في موقع محدد (في تعاقب خاص من القواعد النيتروجينية مم يجعل أطراف القواعد المقصوص في رغبة شديدة للبحث عن قواعد مكملة لتزدوج معها ولهذا تسمى "نهايات لاصقة Sticky ends".

- كما أن اكتشاف علماء آخرين لإنزيمات أخرى لها القدرة على ربط قطعتين مكسورتين من الـ DNA و سموها "إنزيمات لاحمه Ligases" تستخدم للإسراع في وصل و لحم قطع DNA المطلوب لحمها.

* و هكذا، تم امتلاك العدة اللازمة لقطع الـDNA في مواقع خاصة و من ثم إصلاحه و إعادة ربطه مع قطع أخرى غريبة (أي إعادة هندسة الـDNA حسب الرغبة).

التجربة الأساس في الهندسة الوراثية إدخال قطع الـDNA الغريبة إلى البكتيريا:

في عام 1973م استطاع كل من العالمين الأمريكيين "Herbert Boyer" و "Stanly Cohen" إجراء تجربة عدت الأساس فيما عرف بالهندسة الوراثية، و ملخصها كالتالي:

1- إستخدام إنزيمات القطع لكسر شريط الـ DNA إلى قطع صغيرة.

2- إختيار الحامل أو الناقل "Vector" المناسب لنقل الجين إلى الخلية الجديدة (غالباً ما يكون الـ Plasmid).

3- فتح بلازميد الناقل باستخدام إنزيمات القطع "Restriction enzymes".

4- خلط قطع الـ DNA المراد نقله مع DNA البلازميد.

5- لحم قطع الـ DNA المراد نقله مع DNA البلازميد باستخدام إنزيمات اللحم "Ligases" لإنتاج DNA متزاوج Recombinant DNA.

6- السماح للناقل بإصابة مجموعة كبيرة من الخلايا المطلوب إدخال الـ DNA إليها (كالبكتيريا).

7- تنمى الخلايا في بيئة صناعية للكشف عن مدى نجاح التجربة.

أثارت الهندسة الوراثية جدلاً كبيراً في مختلف الأوساط خاصة فيما يتعلق بالإنسان، و كان هناك خوف من حدوث أضرار بالغة لا يمكن السيطرة عليها، و لكنها في الواقع سلاح يتوقف ضرره و نفعه على إنسانية الإنسان نفسه.

pdfelement

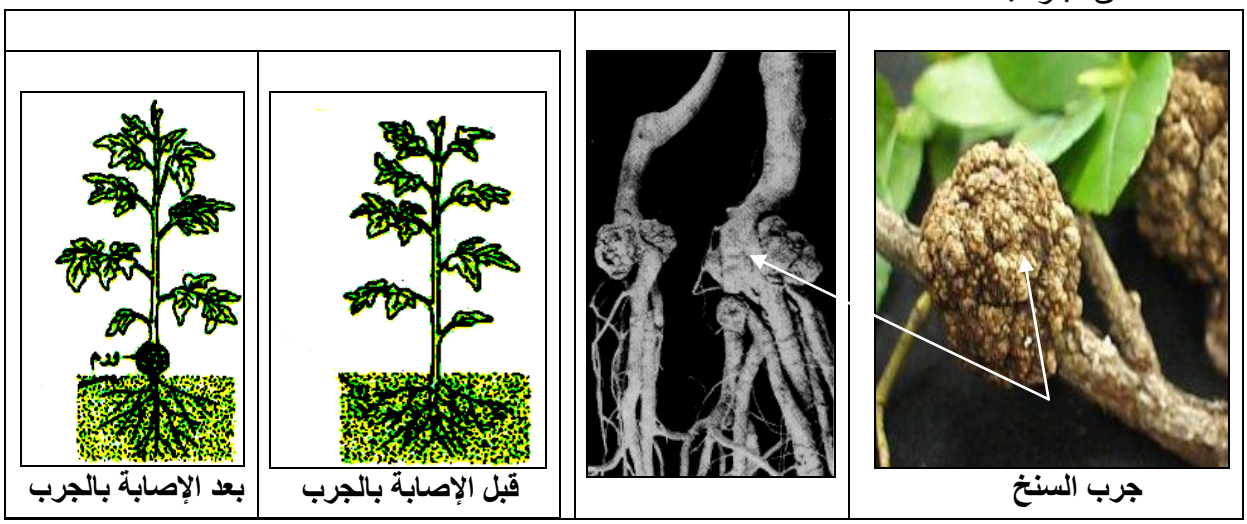
Remove Watermark Now

مبادئ و تقنيات الهندسة الوراثية.

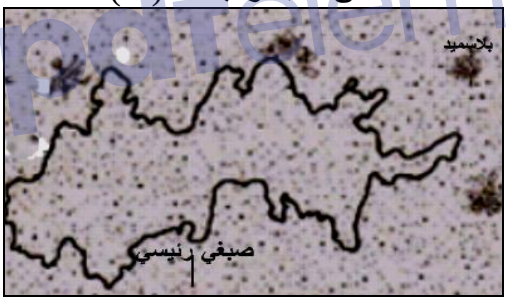
A – مفهوم التغيير الوراثي.

1- الكشف عن تغيير وراثي: انتقال طبيعي للمورثات .

* تبين الوثيقة نباتا مصابا بمرض جرب السنخ، يتجلى في ظهور انتفاخ أو ورم على مستوى سنخ النبات (بين منطقة اتصال الجذع و الجذور)، و هو مرض يصيب عدة أنواع نباتية خصوصا في المناطق الباردة.



* بينت بعض الملاحظات على مستوى التربة و جذور النبات المصاب وجود بكتيريات تدعى Agrobacterium tumefaciens ، تتكون مادتها الوراثية من صبغي بكتيري واحد و عدة جزيئات من DNA صغيرة ، حلقية الشكل ، تسمى : البلازميدات (Ti) les plasmides .



فما هو أصل مرض جرب السنخ؟ و هل هناك علاقة بين هذا المرض و البكتيريات At؟

معطيات تجريبية:

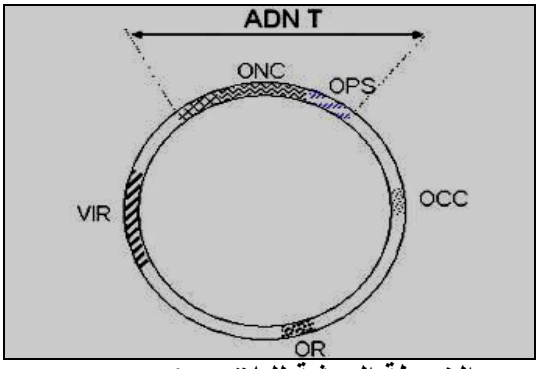
التجربة	نتـائجها	استنتاج
1- حقن نبات سليم ببكتيريا Agrobacterium tumefaciens	ظهور ورم سرطاني عند النبات	البكتيريا At هي المسؤولة عن مرض جرب السنخ .
2- زرع خلايا الورم في وسط اقتياتي يحتوي على سكر + أملاح معدنية	- تكاثر سريع و غير منتظم للخلايا النباتية. - إفراز الخلايا لمواد أزوتية تسمى : الأوبينات.	خلايا النبات فقدت القدرة على التحكم في انقساماتها و أصبحي تنتج مواد غير ضرورية لها.
3- وضع البكتيريا At في وسط زرع يحتوي على الأوبينات .	تكاثر البكتيريا مع استهلاك الأوبينات	الأوبينات مواد أزوتية ضرورية لتغذية البكتيريا من أجل نموها و تكاثرها.
4- زرع سلالة من البكتيريا Atفي وسط زرع درجة حرارته 37^0 ثم حقنها لنبات سليم	- اختفاء البلازميد البكتيري من البكتيريا At	البلازميد البكتيري هو المسؤول عن ظهور الورم و إفراز الأزبينات من طرف الخلايا النباتية.

Remove Watermark Now

الخريطة الوراثية للبلازميد:

يرمز للبلازميد بـ Ti ، أي البلازميد المحرض على ظهور الورم، و قد مكنت دراسة هذا البلازميد من وضع خريطته الوراثية و تحديد مختلف مورثاته، و هي على الشكل التالي:

صورة اليكترونوغرافية لبلازميدات بكتيرية



الخريطة الورثية للبلازميد Ti

- تتوفر البكتيريا Agrobacterium tumefaciens على ذخيرة وراثية مكونة من :

صبغي رئيسي دائري و عدة بلاسميدات تسمى Ti صغيرة الحجم متشابهة دائرية ولها القدرة على التضاعف الذاتي .

- يحتوي كل بلازميد على عدة مورثات ، لكل مورثة وظيفة معينة وأهمها :

المورثة VIR: وظيفة الحدة، تمكن البلازميد الدخول الطبيعي وانتقال المورثة ADN-T الى الخلايا النباتية

المورثة OR : وظيفة التضاعف

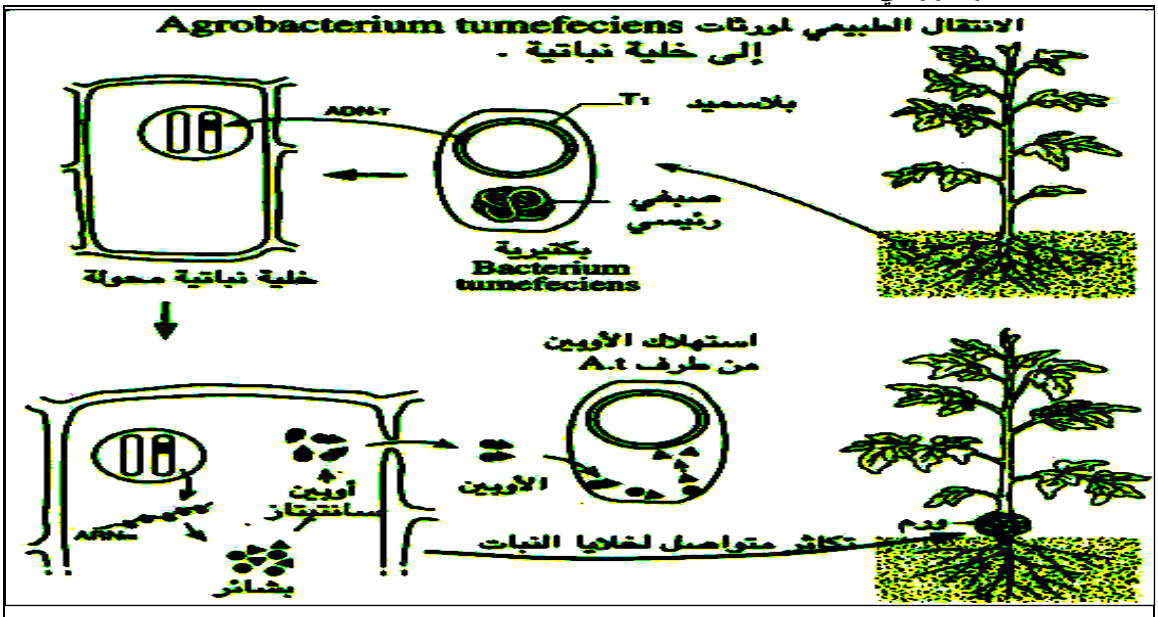
المورثة ONC : وظيفة التكاثر الخلوي المتواصل (الورمية)

المورثة OPS : وظيفة تركيب الأوبينات

المورثة OCC : وظيفة استعمال الأوبينات من طرف البكتيريا.

البلازميد Ti جزيئة صغيرة من الـ ADN حلقية الشكل تحمل مورثات اضافية غير المورثات التي توجد في ADN الصبغي الرئيسي . يمكن للبلازميد أن يكون من أصل بكتيري أو من أصل حموي (فيروسي) مثل العاثيات λ أو من أصل كائن حي من ذوات النواة الحقيقية مثل بلازميد الخميرة الذي يحمل اسم دائرة 2 ميكرون (le plasmide cercle a 2 microns) .

2- آلية التغيير الوراثي.



Remove Watermark Now

نلخص آلية التغيير الوراثي على الشكل التالي:

- دخول البكتيريا At إلى النبات عبر جرح.
- حقن البكتيريا للمورثات ADN-T الموجودة بالبلازميد Ti في الخلية النباتية.
- اندماج القطعة ADN-T ضمن أحد صبغيات الخلية النباتية.
- استنساخ ARNm انطلاقا من ADN-T و بداية تعبير المورثات.
- تركيب أنزيمات الأوبين سنتيتاز و بداية تركيب الأوبينات .
- تحرير الأوبينات في الوسط الخارجي واستهلاكها من طرف البكتيريا من أجل التكاثر.
- تكاثر متواصل و سريع للخلايا النباتية ثم ظهور ورم سرطاني يسمى : جرب السنخ.

3- خلاصة: يعتبر مرض جرب السنخ مرضا ناتجا عن تغيير وراثي طبيعي لخلايا نباتية، سببه بكتيريا من نوع At، حيث تقوم هذه الخلايا النباتية المغيرة وراثيا بإنتاج و إفراز مواد ضرورية لتغدية و تكاثر البكتيريا. هذا الإنتقال الطبيعي لمورثات البكتيريا At إلى خلايا نباتية أوحى باستعمال نفس المبدأ (إحداث تغيير وراثي عند خلايا معينة) لإنتاج مواد مرغوب فيها. فما هي مختلف التقنيات المستعملة في ذلك؟

تقنيات الهندسة الوراثية.

1- الوسائل المستعملة.

1.1- البكتيريا: يتم الاعتماد على البكتيريا E.coli في الهندسة الوراثية لعدة اعتبارات منها:

- كائنات حية بسيطة سريعة التكاثر (تنقسم كل 20 دقيقة).
- تتوفر على صبغي واحد و عدة بلازميدات يمكن استغلالها كناقلات للمورثات.
- لها سيتوبلازم غني بالجسيمات الريبية و العناصر الضرورية لتركيب البروتينات.

2.1- أنزيمات القطع أو الفصل:

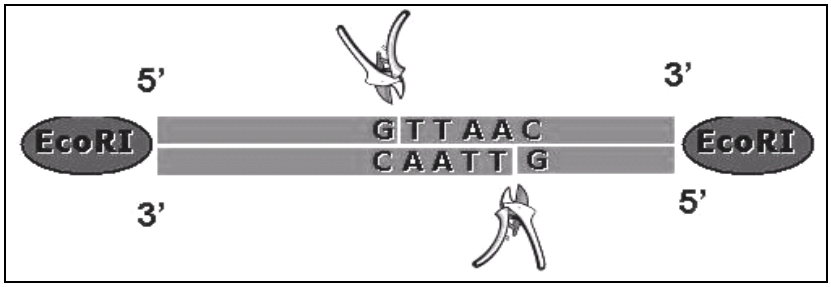
أنزيمات نوعية قادرة على التعرف في مستوى جزيئة ADN على تسلسل دقيق من النيكليوتيدات وقطع الجزيئة على مستواها.

كل أنزيم فصل يحمل إسم النوع البكتيري الذي يستخلص منه .

مثال: الأنزيم Eco-ri ، والذي يتم عزله من البكتيريا E.coli .

هدا الأنزيم يتعرف على التسلسل النيكليوتيدي .....GAATTC..... ، ويقوم بالقطع بين النكليوتيدين G و A، فينتج عن ذلك تحرير أجزاء من ADN ، لها أطراف تسمى: الأطراف الموحدة، قادرة على الارتباط بأطراف موحدة أخرى مطابقة و مكملة لها.

مثال أنزيم الفصل النوعي E.coRI وقد تم عزله من البكتيريا *Escherichia coli*

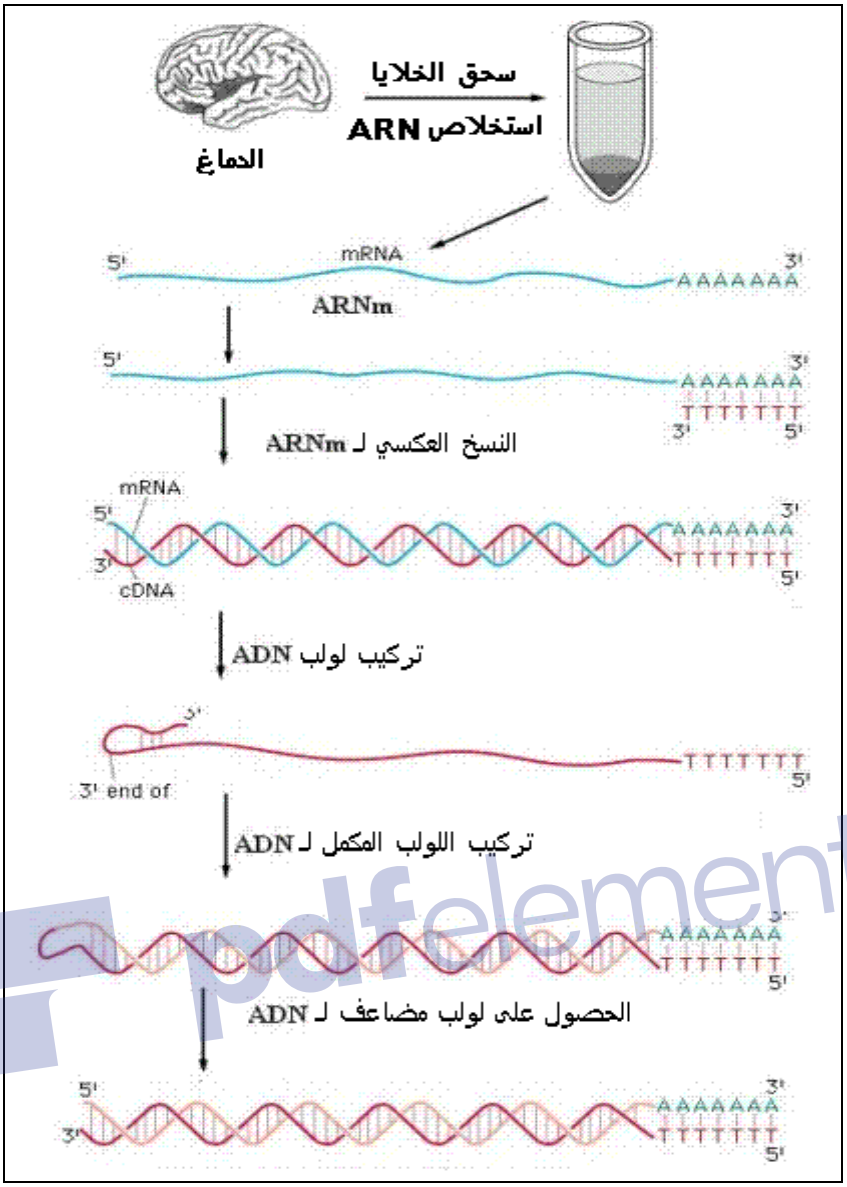


مثل هذه الأنزيمات تستعمل لقطع ADN الخلايا إلى مورثات، ثم عزل المورثة المرغوب فيها من بين القطع المحصل عليها . تستعمل كذلك لفتح البلازميد كناقل بيولوجي.

3.1- أنزيم الناسخ العكسي .

أنزيم يعمل على تركيب جزيئة ADN انطلاقا من جزيئة ARNm المستخلصة من الخلية النشيطة، وبهذا يتم تركيب المورثة التي ترمز لبروتين معين انطلاقا من ARNm .

Remove Watermark Now



pdfelement

4.1- أنزيمات الربط.

أنزيمات نوعية قادرة على ربط أجزاء ADN مقطوعة للمورثة وللناقل البيولوجي، وذلك بربط الأطراف الموحدة مع بعضها البعض حسب تكامل القواعد الآزوتية بين الأطراف الموحدة للمورثة والأطراف الموحدة للبلازميد المفتوح.

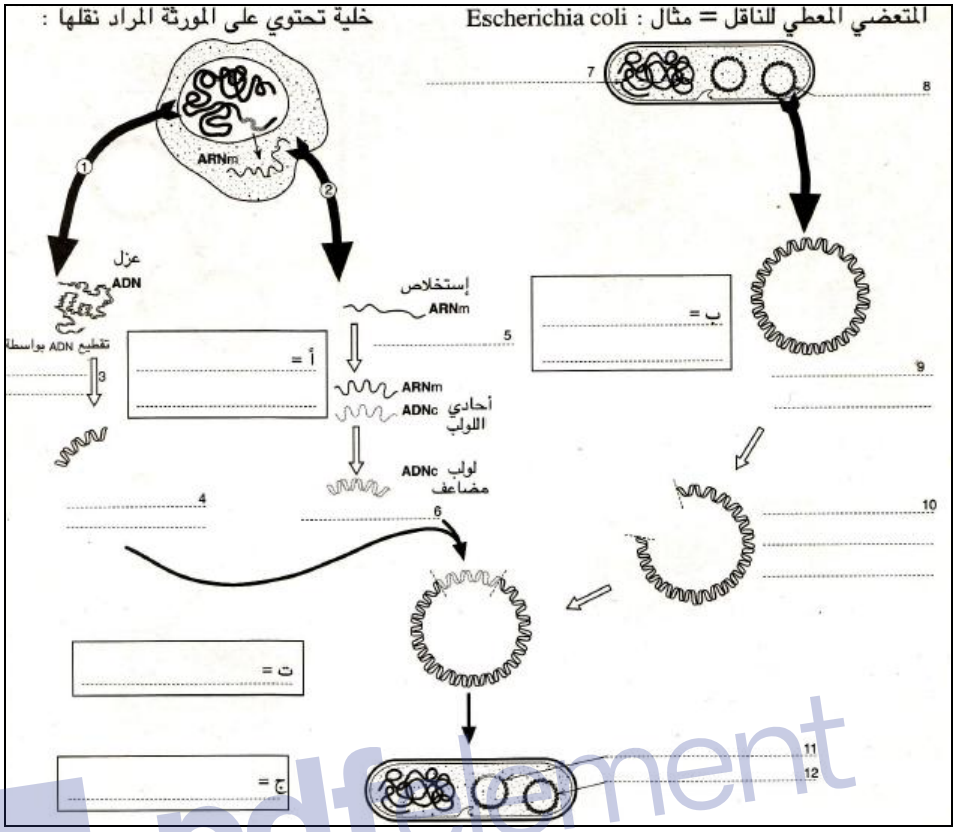
5.1- ناقل بيولوجي.

في أغلب الحالات، يستعمل البلازميد كناقل بيولوجي، حيث يتم فتحه بواسطة نفس أنزيم الفصل، فتصبح له أطراف موحدة مكملة و مطابقة للأطراف الموحدة للمورثة.

Remove Watermark Now

مراحل نقل مورثة إلى خلية معينة.

تبين الوثيقة التالية مراحل نقل مورثة من خلية و توظيفها داخل بكتيريا:



pdfelement

*المرحلة أ : عزل المورثة المرغوب فيها.

1- استخلاص ADN من الخلايا .

2- أو استخلاص ARNm من الخلايا النشيطة.

3- تقطيع ADN بواسطة أنزيمات الفصل .

4- عزل المورثة المرغوب فيها.

5- تركيب ADN أحادي اللولب بواسطة انزيم الناسخ العكسي .

6- تركيب لولب مضاعف من ADNc .

*المرحلة ب : عزل البلازميد الناقل و فتحه .

7- صبغي بكتيري.

8- بلاسميد بكتيري.

9- عزل البلازميد البكتيري .

10- فتح البلازميد بواسطة أنزيم القطع .

*المرحلة ت : دمج المورثة في البلازميد المفتوح بواسطة أنزيمات الربط.

*المرحلة ج : دمج البلازميد المغير وراثيا في البكتيريا.

11- بلازميد مغير وراثيا.

12- بلازميد غير مغير.

*المرحلة د : تلميم البكتيريا الحاملة للبلازميد المغير.

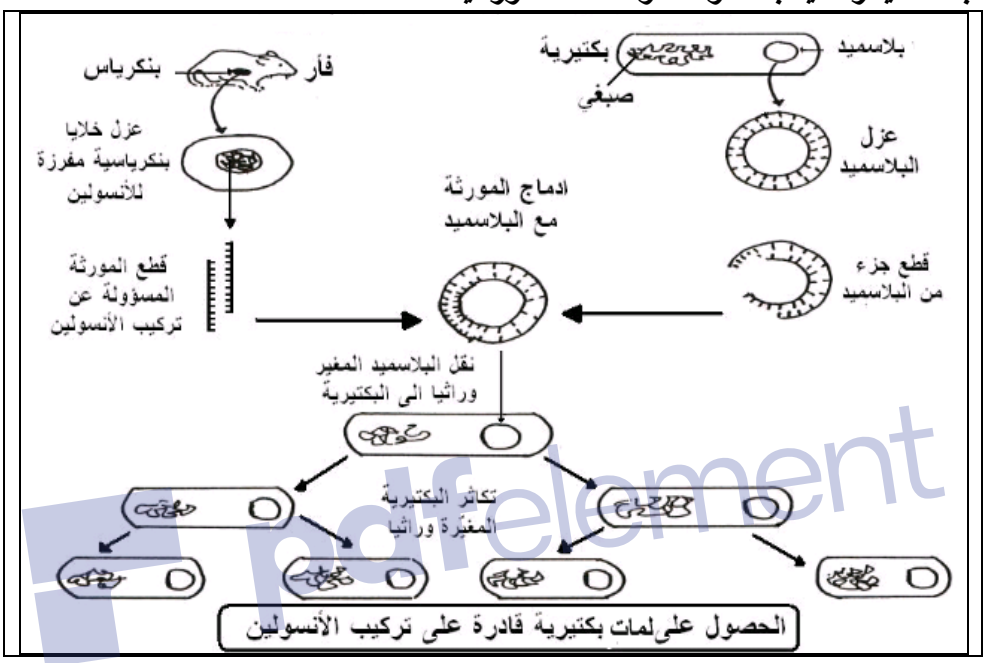
زرع البكتيريات الحاملة لـ ADN المغير وإعادة الزرع عدة مرات حتى الحصول على لمات تتوفر على المورثة المرغوب فيها، حيث يؤدي التكاثر البكتيري الى تكاثر البلازميدات.

*المرحلة هـ : رصد البكتيريا المغيرة وراثيا و تعبير المورثة لإنتاج البروتين المرغوب فيه.

يمكن تلخيص مراحل نقل مورثة خلية إلى بكتيريا في :

- عزل المورثة المرغوب فيها .
- عزل البلازميد و فتحه بواسطة أنزيمات الفصل.
- إدماج المورثة في البلازميد بواسطة أنزيمات الربط.
- إعادة البلازميد المغير وراثيا إلى البكتيريا.
- تلميم البكتريا للحصول على لمات.
- رصد البكتريا المغيرة وراثيا.
- تعبير المورثة و إنتاج المادة المرغوب فيها.

التلاعب المسيطر عليه بالمعلومات و الصفات الوراثية



* بعد التوصل لكيفية عزل الجينات ونقلها إلى خلايا مختلفة عنها تماماً سميت هذه التقنية بـ (تقنية DNA المتزاوج Recombinant DNA)، وأصبحت نظرة العلماء للكائنات الحية على أنها أجهزة تتصرف مأمورة من قبل مورثاتها الموجهة ببرامج محمولة على الـ DNA ، و فكروا في معالجة هذه المعلومات وفق الحاجة.

* في نهاية السبعينات من القرن 20م، أصبح مسمى الهندسة الوراثية يعني قمة التجارة حيث لمعت أسماء شركات تعتمد على هذه التقنية مثل : Transgene , Genex , Biogene , Genetech , Cell Tech.

* إن هندسة الجينات سلاح ذو حدين، فكما يمكن استخدامه في العديد من المجالات المفيدة للإنسان يمكن استخدامه لتدمير الحياة على الأرض.

* أصبح الإنسان يمتلك التقنيات المختلفة لتطويع الأطقم الوراثية في جميع الكائنات الحية (سواءً كانت نباتات أو حيوانات أو كائنات دقيقة) للجراحة الوراثية لتغيير وظائفها الطبيعية قد تستغل لأغراض دنيئة و هو ما يعرف بـ " قرصنة الجينات".

تقييم السلامة البيولوجية:

نظراً لأن بعض التعديلات الوراثية يكون هدفها غير نبيل، وذلك بإحداث تغيرات قد تسبب أضرار للإنسان أو للبيئة، تم وضع نظم و لوائح دولية، تحكم نقل الجينات، يشترط فيها القيام باختبارات "تقييم السلامة، تراقبها "الهيئة الأمريكية لحماية البيئة EPA" خاصة و أن بعض العلماء و الشركات المشتغلين بالتعديل الوراثي يبالغون في دفاعهم بعدم وجود سلبيات محتملة.

Remove Watermark Now

إذا ثبت بالاختبارات أن المنتج المعدل وراثياً مأمون على الإنسان و البيئة، يمكن أن يستخدم مع التعريف بالمنتج لأنه من حق المستهلك، الذي قد يتضرر من أكله كاللحوم و مشتقاتها، و المنتجات النباتية، أو حتى من خلال استنشاقه للهواء أو أكله للعسل المحملين بحبوب لقاح هذه النباتات.

إنزيمات الهندسة الوراثية

إضافة مجموعة كيميائية برابطة تساهمية :

تتغير فاعلية كثير من الإنزيمات بإضافة مجموعة مثل الفوسفات إلى جزيء الإنزيم و ذلك بإنشاء رابطة تساهمية بين هذه المجموعة و حامض أميني محدد في الإنزيم مثل السيرين، ويؤدي هذا إلى زيادة أو نقص في فاعلية الإنزيم حسب نوع ذلك الإنزيم .

ومن الأمثلة على هذه الطريقة إضافة مجموعة الفوسفات إلى إنزيم جليكوجين فوسفوريليز phosphorylase Gelycogens الذي يعمل على تحطيم جزيء الجليكوجين إلى جزيئات جلوكوز، فينشط هذا الإنزيم عندما تضاف إليها مجموعة فوسفات من إنزيم آخر

و بالعكس تضعف فاعلية الإنزيم المصنع للجليكوجين Glycogen Synthrtase بإضافة مجموعة الفوسفات

المنشطات Activators

تحتوي معظم الإنزيمات على موقع نشط واحد في كل جزيء، إلا أن هناك مجموعة من الإنزيمات تحتوي على أكثر من موقع نشط و تسمى هذه الإنزيمات بالإنزيمات ذات الموقع الآخر أو الإنزيمات الألوسترية. Allosteric Enzymes و يرتبط على أحد المواقع النشطة جزيء من المادة الهدف بينما يرتبط على الموقع الآخر مركب كيميائي معين برابطة ضعيفة غير تساهمية، و يؤدي ارتباط تلك المركبات الكيميائية إلى تغير في نشاط الإنزيم زيادة أو نقصانا، وهي لذلك تسمى معدلات Modifiers. والتي تزيد من نشاط الإنزيم نتيجة ارتباطها على الموقع الآخر

الإنزيمات المتماثلة Isoenzymes

وهي الإنزيمات التي توجد بأشكال مختلفة ولها نفس الفاعلية الحفزية ونفس التخصص على مادة التفاعل (الهدف) تختلف فيما بينها في خصائصها الكيميائية والفيزيائية والمناعية

يتم فصلها تحت تأثير التيار الكهربائي في المحلول electrophoresis

و من الأمثلة على ذلك إنزيم لاكتات ديهيدروجينيز LDH الذي وجد منه خمسة أشكال في مصل دم الإنسان . الإنزيمات المتماثلة ضرورية لتنظيم العمليات الحيوية وكذلك في تكون الأنسجة

ولها دور كبير في المجال الطبي للكشف عن الإمراض

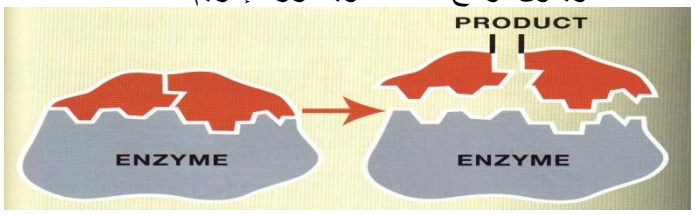
ميكانيكية الفعل الإنزيمي

الخطوة الأولى: في أي تفاعل إنزيمي يرتبط الإنزيم (E) مع المادة الهدف (S) مكونا معقد يسمى الإنزيم والهدف (ES)

$$E + S \rightarrow ES$$

و يتم هذا الارتباط على موقع معين في تركيب الإنزيم يسمى الموقع النشط أو الفعال Active site ويتم الارتباط بين الهدف والإنزيم بمشاركة مجموعة من القوى الضعيفة مثل الروابط الهيدروجينية والأيونية.

الخطوة الثانية: يتحلل المعقد ويكون نواتج التفاعل ويتحرر الإنزيم $ES \rightarrow E + P$

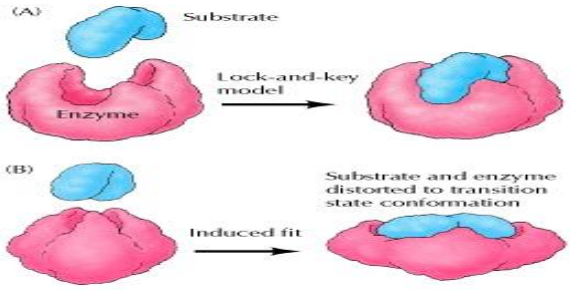


الفرضيات:

فرضية القفل والمفتاح

وضعت هذه الفرضية من قبل اميل فيشر لتفسير اصطفائية الأنزيمات حيث افترض ان موقع الارتباط في الأنزيم يشابه دور القفل الذي لا يفتحه إلا مفتاح مخصص له ينطبق شكله على متطلبات هذا القفل، وهذا ما يؤدي إلى ان جزيئات معينة فقط تستطيع الارتباط بالإنزيم في موقع ارتباطه التفاعلي لتخضع للتفاعلات التي ينجزها الأنزيم.

Remove Watermark Now



فرضية التلائم المحرض

اقترح كوشلاند فرضية معدلة عن فرضية القفل و المفتاح آخذاً بعين الاعتبار حركية الجزيئات البروتينية، حيث افترض أن السلاسل الببتيدية في موقع الارتباط تستطيع أن تغير مواقعها لتلائم ارتباط بعض الاهداف، كما ان هذه السلاسل الببتيدية تأخذ في شكلها الجديد وضعية تسهل عملها التحفيزي مما يؤدي إلى إنجاز التفاعل الكيميائي المطلوب .

العوامل المؤثرة على سرعة التفاعلات الانزيمية

1- درجة الحرارة :

الانزيمات حساسة لدرجة الحرارة فعند درجة الصفر يقف عمل الانزيم تماما ويمكن أن يستعيد نشاطه مرة اخرى تدريجيا برفع درجة الحرارة. ويصل نشاط الانزيم إلى ذروته عند درجة الحرارة تتراوح بين 37-40 (درجة حرارة الجسم) وينخفض النشاط برفع درجة الحرارة. كما ينخفض نشاط الانزيم بالتسخين حيث يفقد فاعليته تماما عند درجة الغليان وذلك لتغير طبيعة الانزيم.

2- تأثير مستوى حموضة الوسط PH:

لكل انزيم درجة حموضة PH مناسبة يكون نشاطه عندها أكبر ما يمكن ويقل نشاطه إذا تغير درجة PH ارتفاعا أو انخفاضا وذلك لما يطرأ على الانزيم من تغير وذلك لتغيير شحنة الأحماض الامينية المكونة لسلسلة البروتين والتي تشارك في ربط المواد المتفاعلة بمركز نشاط الانزيم.

3- تأثير تركيز مادة التفاعل على سرعة التفاعل:

تزيد سرعة التفاعل طرديا بزيادة تركيز المواد المتفاعلة حتى تصل إلى سرعة معينة لا تزيد بعدها سرعة التفاعل مهما زاد تركيز المواد المتفاعلة وتسمى هذه السرعة بالسرعة القصوى.

4- تأثير تركيز الانزيم على سرعة التفاعل:

هناك علاقة طردية بين سرعة التفاعل وزيادة تركيز الانزيم بوجود زيادة من المادة المتفاعلة فإن زيادة نسبة الانزيم يزيد من سرعة التفاعل، وذلك بشكل مطلق طالما وجدت مادة التفاعل.

تأثير وجود مثبطات:

يقصد بالمثبطات مركبات يترتب على وجودها انخفاض في نشاط الانزيم وفي بعض الاحيان توقف نشاط الانزيم كلية. وتنقسم لنوعين :

أولا : النوع الاول له تأثير مؤقت على النشاط الانزيمي حيث يستعيد الانزيم نشاطه بعد زوال المثبط

ثانيا: مثبطات لها تأثير دائم على الانزيم فلا يستعيد الانزيم نشاطه بزوال تأثير المثبط.

Remove Watermark Now

أنواع المثبطات:

1- المواد المثبطة بالتنافس: وفيه يكون المثبط له تركيب مشابه للمادة التي يؤثر عليها الانزيم ، وحيث أن الانزيم يرتبط بالمادة المتفاعلة مكونا مركبا وسيطا ثم ينفصل معطيا الانزيم ونواتج التحلل فإن المادة المثبطة تتحد مع الانزيم لتماثلها مع المواد المتفاعلة وتظل عالقة لا تنفصل عنه فتوقف نشاطه. ويمكن الاقلال من تأثير هذا النوع من المثبطات بزيادة تركيز مادة التفاعل المستهدفة.

2- التثبيط اللا تنافسي: هي مثبطات ترتبط بالإنزيم في مواقع غير تلك التي ترتبط بها المواد المتفاعلة (المراكز النشطة) وتسمى بالمثبطات الغير تنافسية حيث أنها لا تنافس مادة التفاعل ولا تؤثر على ارتباطها بالإنزيم ولكن تؤثر على التركيب الثلاثي الفراغي للإنزيم وبالتالي تعطل قدرته وكفاءة المراكزه النشطة ، ولا يمكن إزاحة هذا النوع من المثبطات بزيادة تركيز مادة التفاعل ويتوقف درجة التثبيط على تركيز المثبط فقط.

3- التثبيط عن طريق الناتج الأخير: ويحدث عندما يكون للناتج الخير القدرة على تثبيط الخطوة الأولى وهي ارتباط المادة المتفاعلة مع الانزيم وبالتالي تثبط كل الخطوات التالية ويثبط التفاعل.

تصنيف الإنزيمات وتسميتها

عندما عرفت الإنزيمات أعطيت أسماء بسيطة مشتقة من طبيعة عملها أو مكان وجودها

مثل إنزيم الببسين الهاضم للبروتين

ثم اشتق اسم الإنزيم من مادة التفاعل (الهدف) مع إضافة (آز) (ase)

مثل انزيم الليبيز (lipase) الذي يعمل على الليبيدات (lipid)

إنزيم اليوريز الذي يفكك اليوريا إلى امونيا وثاني أكسيد الكربون

وبسبب اكتشاف المزيد من الإنزيمات ووجود أكثر من إنزيم للهدف الواحد تم وضع الاتحاد الدولي للكيمياء الحيوية نظام خاص للتسمية حيث يعطى لكل إنزيم اسم خاص مؤلف من اسم الهدف ونوع التفاعل مع اضافة المقطع (آز) وقسمت بموجب هذا النظام إلى ستة أنواع رئيسية :

1- إنزيمات الأكسدة والاختزال Oxidoreductases

وهي تقوم بنقل الإلكترونات من مادة الهدف إلى أخر فتؤكسد الأولى و تختزل الثانية مثل Oxidases و Dehydrogenases

2- إنزيمات النقل Transferases

وتشمل جميع الإنزيمات التي تعمل على نقل مجموعة كيميائية من هدف إلى اخر مثل الإنزيمات التي تنقل مجموعة الفوسفات من ATP إلى الجلوكوز

3- إنزيمات التحلل المائي Hydrolases

وهي تقوم بتحطيم بعض الروابط بإضافة الماء، و منها الإنزيمات التي تعمل على تميؤ الروابط الجلايكوسيدية و الإسترية و الببتيدية مثل إنزيم Amylase و Sucrase

4- إنزيمات الفصل أو الحذف Layases

تعمل على نزع مجموعة كيميائية من المادة الهدف دون إضافة الماء، حيث يحل محل ذرات المجموعة المنزوعة رابطة مزدوجة مثل فصل مجموعة الأمين في صورة أمونيا

5- إنزيمات التشكل Isomerases

وتشمل جميع الإنزيمات التي تعمل على تحويل المادة الهدف إلى متشكل آخرمثل تحول الجلوكوز-6 فوسفات إلى فركتوز6- فوسفات بواسطة إنزيم فوسفوهيكسوزايزومريز phosphohexose isomerase

6- إنزيمات الإرتباط Ligases

وتشمل جميع الإنزيمات التي تعمل على إنشاء رابطة جديدة من مركبين مختلفين، و تعتمد في ذلك على الطاقة المختزنة في جزيء أدينوسين ثلاثي الفوسفات ATP مثل إنزيم RNA ligase الذي يعمل في بناء البروتين في الخلية

إنزيمات الهندسة الوراثية

1. أنزيمات هدم الحمض النووي Nuclease
2. إنزيمات بلمرة الحمض النووي polymerases
3. إنزيمات التحوير Modifying enzymes
4. إنزيمات إزالة الانطباق Topisomersase

pdfelement

Remove Watermark Now

1- أنزيمات هدم الأحماض النووية DNAases and Rnases Nuclease

أ. انزيمات الهدم الداخلي Endonuclease

- تكسر روابط الفوسفات ثنائية الاستر من داخل سلاسل الحمض النووي
- تنتج قطع مختلفة الحجم من الحمض النووي

ب. أنزيمات الهدم الخارجي Exonuclease

- تفصل النيكليوتيدات من نهايات سلاسل الحامض النووي لتنتج وحدات مفردة على الأغلب

أنواع الإنزيمات النووية

Type I : غير قادرة على قطع DNA عند مواقع ثابتة – تقطع بطريقة عشوائية – تحتاج مساعدة مثل أيونات الماغنسيوم وATP و S - adenosyl – methionine - غير هامة في الهندسة الوراثية

Type II : قادرة على قطع DNA عند مواقع ثابتة (أكثر من 200 إنزيم نووي)

Type III : وسط بين النوع الاول والثاني – تقطع الحمض النووي في اماكن محددة – تحتاج الي عوامل مساعدة

1. إنزيمات القطع التحديدية (الإنزيمات القاطعة/المقيّده) Restriction Endonuclease Enzymes

يؤرخ العلماء بدء زمن الهندسة الوراثية الى اكتشاف الأنزيمات المتقيدة بالقطع (restriction enzymes) لأنه قبل ذلك لم يكن باستطاعة العلماء التلاعب بالحمض النووي.

- وهي إنزيمات نووية (Restriction Endonuclease) متخصصة لديها القدرة على هضم وتكسير جزيء الحمض النووي DNA إلى قطع محددة الطول عند أماكن محددة.
- توجد في الخلايا البكتيرية وتعمل كجزء من آلية يطلق عليها عملية التحوير حيث:
- يحلل الإنزيم التحديدي مائياً أي DNA خارجياً يظهر في الخلية (تستطيع بعض الفيروسات إصابة البكتريا susceptible bacteria بينما يفشل البعض بسبب هضم DNA الفيروسي في البكتريا non- susceptible)
- يمنع الإنزيم التحديدي تحليل DNA الخلية عن طريق تحويره بواسطة إضافة المثيل لقواعد معينة في تتابع التعرف Recognition self Sequence

مصدر الإنزيمات القاطعة/المقيّدة وأهميتها

الوظيفة البيولوجية للإنزيمات القاطعة :

تم اكتشاف الإنزيمات القاطعة خلال عمل بحث حول موضوع العلاقات المتبادلة بين البكتيريا **والعاثيات** وهي إحدى أنواع الفيروسات التي تغزو البكتيريا.

وظيفة الإنزيمات القاطعة في البكتيريا هي قطع الـ **DNA** الخاص بفيروسات معينة (العاثيات) التي تغزو هذه البكتيريا، بهذه الطريقة تحدد وتقلص من تكاثر الفيروسات في البكتيريا.

العاثيات تلتصق بالبكتيريا وترسل لداخلها الـ DNA الخاص بها. في أعقاب دخول الـ DNA الخاص بالعاثيات للبكتيريا، تقوم العاثيات بالتكاثر في البكتيريا وذلك يؤدي إلى تحلل البكتيريا وبالتالي موتها.

في هذا البحث تبين للباحثين أن البكتيريا لديها آلية دفاع تمكنها من حماية نفسها من سلالات معينة للعاثيات، لكن ليس جميع سلالات العاثيات.

بناء على نتائج البحث تبين انّه بإمكان البكتيريا الحد والتقييد من تكاثر أنواع معينة من العاثيات التي تغزوها. سمى العلماء هذه الظاهر بظاهرة **التقييد/الحد** .

آلية التقييد هي على النحو التالي: تنتج البكتيريا إنزيمات معينة تسمى أنزيمات التغيير ووظيفة هذه الإنزيمات هي إضافة مجموعة ميثيل (CH_3) لإحدى القواعد المكونة للـ DNA وهي : إما أدينين/ (A) أو للـ سيتوزين/ (C) حيث تقوم بإضافة هذه المجموعة في مواقع يتراوح طولها ما بين 4-8 قواعد، هذا الموقع يسمى موقع القطع. مواقع القطع المحددة والمعينة تتواجد في كل DNA من كل مصدر بما في ذلك الـ DNA الخاص بالبكتيريا وأيضاً العاثيات

مجموعة الميثيل (CH_3) التي ترتبط بمواقع القطع تؤدي إلى حماية هذه المواقع المهيئة للقطع من الإنزيمات القاطعة وبذلك لا تتم عملية القطع من قبل هذه الإنزيمات.

إن الإنزيمات القاطعة تتعرف على التسلسل الخاص بمواقع القطع، وذلك بحسب تسلسل القواعد فيه، فتعرفه على انه موقع قطع لكي تباشر عملها في القطع، وذلك يستثني حاله معينة وهي أن تتواجد مجموعة الميثيل في مكان القطع، حينها لا تتمكن الإنزيمات القاطعة من إتمام عملية القطع وذلك بسبب وجود مجموعة الميثيل (CH_3).

Remove Watermark Now

كما ذكرنا اعلاه فأن البكتيريا تنتج أنزيمات تغيير خاصة بها، هذه الانزيمات تقوم بتغيير الـ DNA الخاص بالبكتيريا وذلك عن طريق اضافة مجموعة ميثيل (CH_3) لتسلسل القواعد الخاص بموقع القطع المتواجد في الـ DNA. خلال هذه العملية تقوم البكتيريا أيضاً بإنتاج انزيم قطع خاص بإمكانه القطع في نفس مكان القطع المتواجد في البكتيريا لكن فقط ان لم تتصل به مجموعة ميثيل.

استخدام الإنزيمات القاطعة في الهندسة الجينية/الوراثية :

- يتم استعمال الإنزيمات القاطعة في الهندسة الجينية من قبل العاملين فيها في المختبرات لقطع أي DNA من أي مصدر (بكتيريا، نباتات...) لكي يتم الحصول على مقاطع DNA قصيرة تساعد في تنفيذ مهام وعمليات أساسية في الهندسة الوراثية.
- المقاطع التي يتم الحصول عليها كنتيجة من تقطيع الـ DNA على يد الإنزيمات القاطعة تسمى مقاطع تقييد.

خصائص ومميزات الإنزيمات القاطعة/المقيِّدة

- بما انه من صفات الإنزيمات كلها أنها **تخصصية**، فهذا الأمر ينطبق أيضا على الإنزيمات القاطعة. كل إنزيم قاطع خاص يقوم بتحديد موقع قطع مناسب وخاص له. وهذا الموقع يحتوي على تسلسل خاص ومعين من القواعد يصل عددها وطولها على الأكثر لـ 4,6 أو 8 قواعد كحد أقصى.
- الإنزيم القاطع التخصصي يرتبط بموقع القطع الخاص والملائم له الذي يتعرف عليه الإنزيم ويحدده. ثم يقوم إنزيم القطع بقطع الـ DNA من مكان القطع الذي يحتوي على هذا التسلسل المعين للقواعد.
- هذا يعني أن إنزيمات القطع، ككل الإنزيمات الأخرى، هي تخصصية. أي لكل موقع قطع (يحتوي على تسلسل قواعد معين) يوجد إنزيم قطع معين وتخصصي خاص فقط بهذا الموقع، يختلف عن إنزيمات قطع أخرى خاصة بمواقع قطع أخرى.
- عملية القطع تتم عن طريق تفكيك الرباط الفوسفوديستري- الموجود بين كل نوكليوتيد والآخر في كلا سلسلتي الـ DNA.

يوجد المئات من الإنزيمات القاطعة التي تتميز عن بعضها البعض فيما يلي:

1. في ترتيب القواعد/النيوكليوتيدات في موقع القطع.
2. بطريقة القطع : مدرجة أو مستقيمة.
3. عدد القواعد في مواقع القطع 4,6 أو 8 قواعد.

المشترك لكل الإنزيمات القاطعة أن لكل منها مواقع قطع خاصة بها والتي تتميز بأن ترتيب النيوكليوتيدات فيها من النوع الباليندرومي.

ملاحظة: مواقع القطع موزعة في سلاسل الـ DNA بشكل عشوائي، وليست بالضرورة موجودة في أماكن ملاصقة للجينات.

مواقع القطع/التقييد

- **مبنى باليندرومي (متناظر معكوس)**

ان معظم تسلسل القواعد في موقع القطع يكون من النوع الباليندرومي. الباليندروم هو تسلسل يقرأ بصورة مماثلة من اليمين للشمال ومن الشمال لليمين. مثال، كلمة توت، ر ب ك ف ك ب ر، GAATTC:CTTAAG، 12321، حيث يمكن قراءتها على انها متماثلة عند القراءة بنفس الاتجاه من السلسلتين من اتجاه 3 ← 5 اي من 5 إلى 3.

5’ GGATCC 3’
3’ CCTAGG 5’ *القراءة دائماً من 5 إلى 3.

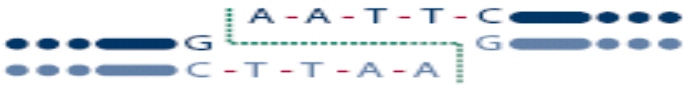
الموقع الباليندرومي في الـ DNA يتكون من كلا سلسلتي الـ DNA.

في هذا الموقع السلسلة المرموز لها من الطرف 5' إلى 3' تقرأ من اليسار إلى اليمين. وتكون مطابقة تماماً للتسلسل في السلسلة المقابلة لها في نفس الموقع والتي تقرأ من اليمين إلى اليسار، أيضا من الأطراف 5' إلى 3'.

بإمكان الإنزيمات القاطعة قطع مقاطع القطع/التقييد بصورتين مختلفتين، وهما على النحو التالي:

قطع متدرج عندما يتم القطع من كلا جانبي سلسلتي موقع القطع الباليندرومي قريب لوسطه. مظهر أطراف الـ DNA بعد عملية القطع يكون مشابه "للمدرج"، لذلك يطلق على هذا النوع من القطع، القطع المدرّج.

Remove Watermark Now



חיתוך מדורג
על-ידי האנזים EcoR I

في عملية القطع المتدرّج نحصل في كل طرف من أطراف الـ DNA المقطوع على "ذيل" DNA أحادي السلسلة. هذا الذيل وحيد السلسلة ينشأ لديه ميل كبير للالتصاق والارتباط لمقطع آخر أحادي السلسلة يكون ملائماً ومكملاً له، أي يحتوي على تسلسل نيكليوتيدات ملائم له ليرتبط به ويكمله. لذلك أطراف الـ DNA التي تنتج في عملية القطع المتدرجة تسمى "أطراف/نهايات لزجة"، أي أطراف دبقة تميل للالتصاق بأطراف تلاؤمها.

قطع ناعم/ سوي، مستقيم: عندما يتم القطع من وسط موقع القطع، ينتج بعد القطع أطراف DNA ذات مظهر سوي ومستقيم (مقسوم من الوسط بالتساوي) وملساء. لذلك يطلق على هذا النوع من القطع هذا الاسم.

חיתוך חלק
על-ידי האנזים Alu I

أهمية الأطراف اللزجة: الأطراف/النهايات اللزجة لها ميل قوي للارتباط بأطراف لزجة لمقاطع DNA أخرى من أي مصادر كانت. هذا الميل الشديد يوفر سهولة وسلاسة اكبر في عملية ربط مقاطع الـ DNA المختلفة من مصادر مختلفة مع بعضها البعض

تسمية إنزيمات القطع (Smith and Nathans 1973)

- يعطى الإنزيم اسماً حرفياً يتكون من 3 حروف. يرمز الحرف الأول إلى اسم جنس الكائن المستخلص منه الإنزيم ويكون كبير بينما يرمز الحرفان الآخران إلى اسم النوع ويكتبان بحروف صغيرة.
- نوع السلالة (نمط التميز) يرمز له بحرف يكتب بعد الاسم المشتق من الجنس والنوع.
- عندما تحتوي السلالة على أكثر من أنزيم تحديدي تعطى الإنزيمات أرقاماً تصاعدية وتكتب الأرقام بحروف رومانية

النظام المتبع في تسمية الإنزيمات المحددة

أسم الكائن	الاسم الرمزي للإنزيم	تتابع القواعد النيتروجينية
Acetobacter pasteurianus	Apa	GGGCCC CCCGGG
Haemophilus aegyptus	Hae	GGCC CCGG
Diplococcus pneumoniae	Dpn	GATC CTAG
Escherichia coli	Eco R I	GAATTC CTTAAG
Haemophilus influenza Rd	Hind III	AAGCTT TTCGAA

الانزيمات النووية الداخلية التحديد Type II restriction endonuclease

يضاف الإنزيم إلى DNA المستهدف في محلول منظم ويحضن عند 37 درجة م

يتعرف كل إنزيم على تتابع نوعي في DNA

يقطع الإنزيم داخل DNA بكسر رابطة الفوسفات ثنائي الاستر التي تربط النيكليوتيدات معا

يعبر عن النشاط الإنزيمي بالوحدة

1 وحدة = كمية الإنزيم التي يمكنها شطر بيكوجرام واحد من DNA في ساعة واحدة عند 37 م).

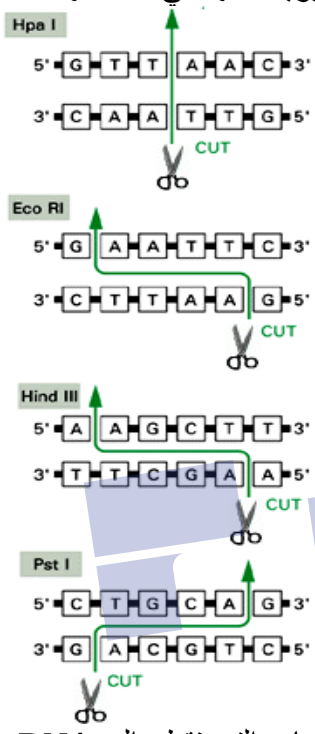
pdfelement

Remove Watermark Now

طريقة عمل الإنزيمات القاطعة Restraction enzymes

كما هو معروف فان البروتينات موجودة داخل الخلية على شكل قطع منفصلة عن بعضها البعض و هذا يسهل عملية فصلها عن بعضها بطرق مناسبة، ولكن الجينات موجودة على الكروموسومات على شكل حبات متصلة ببعضها البعض و ليست على شكل قطع منفصلة وهذا التسلسل والترابط في الجينات جعل عملية فصل وعزل واستخلاص جين محدد من بقيه الجينات مهمة صعبة ان لم تكن مستحيلة قبل عام 1970 ولكن اكتشاف الإنزيمات القاطعة قد ساعد في عملية استخلاص الجينات و قطع الـ DNA

إن لكل كائن حي طرق دفاع مختلفة تحميه من غارات الأعداء والبكتيريا هي إحدى هذه الكائنات و من أهم أعدائها الفيروسات المختلفة، وتقوم بعض البكتيريا بإنتاج إنزيمات قاطعة مهمتها تدمير الفيروسات، وتقوم هذه المقصات أو القواطع بقص الحمض النووي الـ DNA للفيروس و بذلك يشل عمله و يبطل مفعوله. و بما أن الـ DNA مادة موجودة بشكل طبيعي في البكتيريا كما هو الحال في الفيروسات و الكثير من الكائنات الحية فان هذه المقاص قد تشكل خطراً على البكتيريا نفسها في قصها للـ DNAالخاص بها. ولكن هذا لا يحدث بسبب قيام البكتريا بتحوير أجزاء من الـ DNA الخاص بها عن طريق إضافة مجموعة المثيل إلى الادنين او السيتوسين فلا يتمكن الانزيم القاطع من قص الحمض النووي الخاص بالبكتيريا. وعند اكتشاف هذه القواطع في السبعينيات بدأ العلماء في استخدامها كمقاص لقص الـ DNA وساعدتهم هذه المقاص في عملية التحكم في الـ DNA . ويوجد حاليا أكثر من مائه نوع من هذه المقاص وتقسم هذه المقاص إلى نوعين رئيسيين، النوع الأول يقص شريط الـ DNA المزدوج بشكل بشكل متعرج والنوع الثاني Staggered يقص شريط الـ DNA المزدوج بشكل رأسي مستقيم و بالتالي يجعل طرفي الـ DNA المقطوع مادة قابلة "للزق" قطعة غريبة من الـ DNA فيها وعند لزق قطعة من الـ DNA في داخل الفراغ الناتج من القطع ينتج لنا قطعة مركبة من قطعتين مختلفتين من الـ DNA وهذه القطعة تسمى الـ DNA مهجّن أو Recombinant DNA.



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

كل إنزيم قاطع عبارة عن مقص خاص لقطع الـ DNA في نقطة محددة. ويتعرف الإنزيم القاطع على مكان القطع حسب تسلسل الـ DNA للقطعة. فكل إنزيم قاطع يقطع في تسلسل محدد فمثلا GAATTC يقطع عندما يجد Eco RI الإنزيم القاطع وهو من الانزيمات التي تقطع الـ DNA بشكل متعرج

تسلسل مواقع القطع Recognition Sites لبعض الإنزيمات القاطعة		
الإنزيم القاطع	المصدر	المقطع الذي تُميزه
***Eco* RI**	***Escherichia coli***	**GAATTC**
***Hind* III**	***Haemophilus influenzae***	**AAGCTT**
***Taq*I**	***Thermus aquaticus***	**TCGA**

ملاحظة: اذا لم يقطع الانزيم في احد الاماكن التي كان من المفترض ان يقصها ولم يتم القطع فنستنتج ان الشخص لديه طفرة فتظهر لديه قطع متفاوتة بالطول وتدعى هذه الطريقة بتفاوت القطع المحددة Restriction Fragment Length polymorphism. (RFLP)

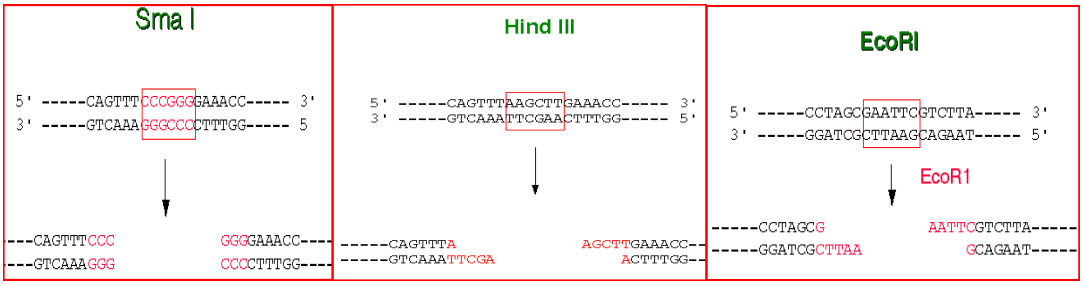
أماكن القطع:

E.co R I : المستخلص من بكتريا القولون *Escherichia coli*

- يكسر الحمض النووي DNA إلى قطع مختلفة الطول (100 و 200 و 300 و 400) قاعدة نيتروجينية
- يتعرف على التتابع G*AATTC -5 ويقطع بين A و G
- يولد نهايات لاصقة أو لزجة cohesive ends

Remove Watermark Now

Hind III : المستخلص من بكتريا *Haemophilus influenza Rd*
- يكسر الحمض النووي DNA إلى قطع مختلفة الطول (150 و 250 و 600) قاعدة نيتروجينية



ينتج عن عملية القطع:

أ. نهايات لزجة
- مناسبة لدمج قطع DNA مع جزيء أخر يمتلك تلك النهايات حيث يمكن أن تزدوج التتابعات البارزة مع تتابعات مكملة تتولد بنفس الإنزيم
- عند قطع عينتين مختلفتين من DNA بنفس الإنزيم ثم تخلط هاتين القطعتين معا فإنه يمكن إنتاج DNA معاود الارتباط مثال: إنزيمات Pst-1 , Eco R1

ب. نهايات مستوية Blunt ends: لا يمكنها الالتحام إلا إذا أجريت لها بعض التحورات لجعلها لزجة
مثال : إنزيمات HaeIII و Sam I و Hap I

2. إنزيمات البلمرة DNA polymerases
- تبني جزيئات الحامض النووي (DNA or RNA Dependent) في الاتجاه 5 إلى 3
- إنزيمات بلمرة DNA في بكتريا القولون تمتلك خواص قطع خارجي في الاتجاهين 5 إلى 3 و 3 إلى 5 لأنها تتكون من وحدتين:

أ. قطعة كلينو Klenow fragment تقوم بالبناء
ب. والنيكليز nuclease تقوم بالقطع
- في حقيقيات النواة لا تمتلك أنزيمات بلمرة الحمض النووي نشاط الهدم بل توجد إنزيمات مستقلة تقوم بذلك (إنزيم هدم داخلي وخارجي التي تزيل النيكليوتيدات من داخل أو خارج أشرطة الحمض النووي)

3. إنزيمات DNA المحورة DNA modifying enzymes

أ. أنزيمات اللحام ligase enzymes
- إعادة روابط الفوسفات ثنائية الاستر بين النيكليوتيدات (عكس إنزيمات القطع)
- DNA ligase الإنزيم المعزول من أنواع مختلفة من الكائنات الحية: يربط قطع الحامض النووي ذات النهايات اللزجة – يحتاج +NAD ثنائي نوكليوتيد الأدنين وأميد النيكوتين (أو اختصاراً: +NAD من الاسم الكامل (Nicotinamide adenine dinucleotide) هو معاون إنزيمي موجود في جميع الخلايا الحية.
- T4 ligase : المعزول من العاثي T4 بعد أصابته لبكتريا القولون *E. Coli* – له القدرة على إعادة التحام قطع DNA ذات النهايات اللزجة أو العمياء – يحتاج ATP
- لا تعمل على تكوين الروابط الهيدروجينية

** إذا كنا ذكرنا أهمية علاقة المفتاح بالقفل في عمل البروتينات وضعت هذه الفرضية من قبل اميل فيشر لتفسير اصطفائية الأنزيمات حيث افترض ان موقع الارتباط في الأنزيم يشابه دور القفل الذي لا يفتحه إلا مفتاح مخصص له ينطبق شكله على متطلبات هذا القفل، وهذا ما يؤدي إلى ان جزيئات معينة فقط تستطيع الارتباط بالإنزيم في موقع ارتباطه التفاعلي لتخضع للتفاعلات التي ينجزها الأنزيم.
ففي الحمض النووي يجب أن ندرك أهمية المطابقة التكميلية للقواعد النيتروجينية.
المطابقة التكميلية هي التي تحدد أي قطعة من الحمض النووي ستتطابق وترتبط بأية قطعة أخرى . بالتالي يمكن قطع وإلصاق DNA من كائنات مختلفة إذا قطعت بنفس الإنزيم القاطع.

pdfelement

Remove Watermark Now

بصمة الحامض النووي DNA Genetic Fingerprint

* تمكن العالم "إليك جيفرس" من جامعة لستر في بريطانيا من اكتشاف اختلافات في الشفرة الوراثية لمنطقة "الإنترون Intron" و ينفرد كل شخص بتركيب خاص (مثل بصمة الإصبع) بنسبة 1: 3000 مليون عدا نوع نادر من التوائم المتطابقة، و تورث "طبقاً لقوانين مندل" للنسل بحيث يحصل الطفل على نصف هذه الاختلافات من الأم و النصف الآخر من الأب، فيتكون مزيج يجمع خصائص الوالدين. وتختلف بصمة الجينات باختلاف الأنماط الجغرافية للجينات في شعوب العالم.

* في عام 1997م تمكن العالمان الأستراليان "رولند فان" و "ماكسويل جونز" من عزل الـ DNA من أشياء تم لمسها (مفاتيح – تليفون – كوب – عينة دم – عينة مني – شعيرات الجسم – جلد من تحت الأظافر ....) ثم عمل بصمة للجينات على فيلم أشعة كدليل جنائي في حالات قضايا إثبات البنوة - الإغتصاب – جرائم السطو – ضحايا الكوارث، بنسبة نجاح تصل إلى 96%. و شجع هذا الدول المتقدمة على حفظ بصمة لجينات المواطنين مع بصمة الإصبع لدى الجهات المختصة.

لم تُعرَف البصمة الوراثية للـ DNA حتى عام 1984 حينما نشر د. آليك جيفريز عالم الوراثة البريطاني بحثًا أوضح فيه أن المادة الوراثية قد تتكرر عدة مرات، وتعيد نفسها في تتابعات عشوائية غير مفهومة وهي تتابعات متكررة ولكن اعداد تكرارها هي التي تختلف من شخص لآخر او انها ترددات فريدة نادرة التكرار بين الافراد. وقد توصل أن هذه التتابعات مميِّزة لكل فرد، ولا يمكن أن تتشابه بين اثنين إلا في حالات التوائم المتماثلة فقط بل إن احتمال تشابه بصمتين وراثيتين بين شخص وآخر هو واحد في الترليون، مما يجعل التشابه مستحيلاً وأطلق على هذه التتابعات اسم "البصمة الوراثية للإنسان "The DNA Fingerprint" وعرفت على أنها "وسيلة من وسائل التعرف على الشخص عن طريق مقارنة مقاطع من الـ DNA وتُسمَّى في بعض الأحيان الطبعة الوراثية "DNA typing" .

اثبتت البصمة الوراثية فاعلية كبيرة في المجال التطبيقي عند استخدامها في كثير من المجالات حيث يستخلص الحامض النووي DNA المستخدم في هذه الأدلة من عينات مختلفة مثل الدم وبصيلات الشعر والانسجة والعظام والمني وغيرها وتعتمد طرق مختلفة من أجل الاستخلاص حيث يتم لاحقا تحديد تتابع تكرار الانماط القصيرة لها Short Tandem Repeats (STR) .

التتابعات المتكررة في الحامض النووي DNA تصنف الى :

- توابع الحامض النووي Satellite DNA: تتكرر بعدد كبير (1000_100000) مرة ويبلغ طول الجزء المكرر من التوابع (100-300) زوج قاعدي.
- توابع الحامض النووي الصغيرة Min Satellite DNA: تكرارها اقل (40-70) مرة وطول الجزء المكرر (10-60) زوج قاعدي.
- توابع الحامض النووي الميكروية Micro Satellite DNA: عدد التكرار اقل (40 -5) والتكرار قصير جدا (2-6) زوج قاعدي .

من امثلة التتابعات الميكروية المتكررة في الحامض النووي هي :

- احادي النيوكليوتيد GTAAAAAAAAAAAAAAAGGAT
- ثنائي النيكلوتيد GTCACACACACACACACAGGAT
- ثلاثي النيكلوتيد GTCACCACCACCACCACCACGGAT
- رباعي النيكلوتيد GTCAGACAGACAGACAGAGGAT
- خماسي النيكلوتيدGTCAAGACAAGACAAGACAAGAGGAT
- سداسي النيكلوتيدGTCCAAGACCAAGACCAAGACCAAGAGGAT

بعض تطبيقات الهندسة الوراثية

I : في الميدان الطبي و الصيدلي:

* انتاج هورمونات بواسطة نقل الجين المسؤول عن انتاجها من خلايا انسان الى خلايا البكتيريا :

ادخال جين بشري مسؤول عن انتاج هورمونات مثل هورمون النمو او الإنسولين الى البكتيريا يُمكِّن من الحصول على هذه الهورمونات بصورة أسرع ، أرخص وأنقى .

مثال1: الإنتاج الصناعي لهرمون الأنسولين البشري "Humalin" في عام 1982م و الذي كان ينتج من الأبقار و الخنازير مسبباً نوع من الحساسية لاختلاف بسيط في التركيب.

الأنسولين هرمون بيبتيد، يتم تركيبه من طرف خلايا بنكرياسية تسمى بالخلايا بيتا، و يتدخل هذا الهرمون في تنظيم تحلون الدم (نسبة السكر في الدم)، بحيث يعتبر الأنسولين هرمون مخفض لتحلون

Remove Watermark Now

الدم في حالة ارتفاعه. هورمون الأنسولين يؤدي الى مضاعفة وتيرة دخول الجلوكوز الى خلايا العضلات وخلايا أخرى. في الماضي حصلوا على الهرمون من الغدد النخامية للأبقار والخنازير. حالياً يتم انتاج الانسولين من بكتيريا مُهندسة

أفضليات انتاج الانسولين من بكتيريا مُهندسة وراثياً مقارنةً باستخلاصه من الحيوانات :

- الانسولين الناتج من البكتيريا هو انسولين بشري (استخلص من جين مصدره خلية انسان). لذلك لن يكون رد فعل مناعي لرفضه من قبل الجسم المتلقي . وكذلك فإنه متلائم أكثر مع المستقبلات في أغشية الخلايا، ولذلك فهو انجع .
- عملية أسرع بسبب زمن الجيل القصير عند البكتيريا. لذلك يمكن استخلاص كميات أكبر .
- تكاليف الاستخلاص أقل .
- من الأسهل الحصول على مُنتج أنقى . احتمال نقل أمراض أصغر .
- الهورمون الناتج بطريقة الهندسة الوراثية أرخص وأنقى من الهرمون الطبيعي .

يتم حاليا إنتاج هرمون الأنسولين باستعمال متعضيات مجهرية مثل خلايا الخميرة أو البكتيريا، و ذلك عبر المراحل التالية:

* مراحل العملية التي يتم الحصول فيها على بكتيريا منتجة لأنسولين انسان هي :

1. قص قطعة DNA انسان وعزل المقطع المشفر للأنسولين . (أي استخراج المورثتين الخاصتين بالسلسلة A و السلسلة B للأنسولين البشري).
2. عزل مقطع DNA بكتيريا وقصّه (عزل بلازميدات E.c).
3. زرع الجين المعزول من DNA انسان في بلازميد / مقطع DNA بكتيريا (إدماج المورثة A في بلازميد و المورثة B في بلازميد آخر). إدماج البلازميدات المغيرة في بكتيريا .
4. زرع البلازميد أو مقطع الـ DNA المحتوي على جين الانسان لبكتيريا وجعلها تتكاثر .
5. تلميم البكتيريا و رصد البكتيريا المغيرة وراثيا.
6. توظيف هذه البكتيريا لإنتاج السلسلتين ثم إنتاج هرمونات الأنسولين.

شكل يوضح الإنتاج الصناعي لهرمون الأنسولين البشري

* مثال2: إنتاج هرمونات النمو البشري لمعالجة حالات القزمية الناتجة عن قلة إفرازها طبيعياً من الجسم. أُنتج هرمون النمو لأول مرة في 1979. (هذه المادة الأولى في العالم التي أُنتجت بطريقة الهندسة الوراثية). يؤدي الهرمون الى نمو خلايا العظام. يُعطي الهورمون لأولاد يتأخر نموهم بسبب نقص شديد في الهرمون بالجسم قد يؤدي الى القزمية .

* انتاج مركبات تطعيم: ادخال جين مسؤول عن انتاج غلاف فيروس للبكتيريا يُمكِّن من الحصول على تراكيب تطعيمات آمنة ضد أمراض تسببها الفيروسات للإنسان. مركبات التطعيمات هذه أكثر أماناً من التراكيب التي تشمل الفيروس وهو مُضعفاً .

منذ سنوات كثيرة اعتادوا على تطعيم بني البشر تطعيماً فعالاً هدفه الوقاية من الأمراض . على سبيل المثال : التطعيم ضد البوليو – التطعيم ضد مرض شلل الأطفال .

محتوى التطعيم: يحتوي التطعيم على مسبب المرض – فيروس البوليو مماتاً او ضعيفاً .

هدف التطعيم: سيكون رد فعل مناعي أولي ضد الفيروسات، ستتكون في الجسم خلايا ذاكرة خاصة بالفيروس، وستبقى في الجسم لسنوات عديدة. اذا دخل الفيروس الى الجسم مرة أخرى، ستقوم خلايا الذاكرة برد فعل مناعي ثانوي: تتسبب بإنتاج أجسام مضادة وخلايا قاتلة أسرع وبكميات أكبر من المرة الأولى. وفي أعقاب الرد القوي والسريع لن يتمكن الفيروس من التكاثر في الجسم والتسبب بالمرض.

خطورة التطعيم: هنالك خطر (صغير جداً) أن لا تموت الفيروسات أو تضعف كما يجب، وعندها سيؤدي التطعيم نفسه الى مرض. (وستكون نتائجه كارثية : شلل)

Remove Watermark Now

حل محتمل: عدم وضع فيروسات كاملة في التطعيم بل زلاليات غلافها فقط . وتستخلص الزلاليات بطريقة الهندسة الوراثية .

- بطريقة الهندسة الوراثية يمكن ادخال الجينات المشفرة لزلاليات غلاف فيروس شلل الاطفال الى بكتيريا E.coli حيث ستتمكن بكتيريا E.coli " المهندسة " ان تستعمل لاستخلاص تطعيم فعال ضد شلل الاطفال وستنتج البكتيريا E.coli المهندسة زلاليات غلاف الفيروس، تستخلص زلاليات الغلاف من البكتيريا وتحقن لشخص (او تحقن البكتيريا للشخص)، وفي أعقاب ذلك ستتكون لدى الانسان أجسام مضادة لزلاليات غلاف الفيروس فتتكون ذاكرة مناعية. وفي حالة مهاجمة فيروس شلل الاطفال للإنسان، سيتعرف الجهاز المناعي على زلاليات غلاف الفيروس وتهاجمه.

- افضلية التطعيم بمساعدة E.coli " مُهندسة " مقارنة بالتطعيم بفيروس مضعف لشلل الاطفال:

مستنبت من الفيروسات المضعفة يمكن ان يحتوي على فيروسات لم تُضّعف او مرت بطفرة فأصبحت قادرة على التسبب بالمرض. زلاليات الغلاف لا يمكن ان تتحول الى فيروسات لكنها مولدة مضاد لشلل الأطفال، وهي لا تشكل خطراً للتسبب بالمرض .

* إنتاج مركبات الإنترفيرون المستخدمة في معالجة مرضى السرطان.
* إنتاج عامل التجلط رقم 8 الهام لمرضى "سيولة الدم" و إنتاج " إنزيم يوروكينيز" المذيب لجلطات الدم.
* إنتاج بروتين غذائي بتنمية البكتيريا على نفايات المزارع و المصانع لتتغذى عليها.
* إنتاج الفيتامينات مثل "$B_2 - B_{12} - C - D - etc$".
* نقل جينات هرمونات النمو من سمك السلمون الرقط إلى عدد من أنواع الأسماك الأخرى.

II : في الميدان الزراعي : الأهداف الأساسية لاستخدام الهندسة الوراثية في الزراعة هي تحسين الناتج الزراعي للمزروعات والحيوانات البيتية من خلال زيادة كمية المنتوج وكذلك تحسين جودته بزيادة القيمة الغذائية وتحسين الطعم .

أهداف اضافية للهندسة الوراثية في النباتات إكسابها صموداً أمام الآفات أو ظروف العيشة المتطرفة في بيت التنمية. على سبيل المثال، انتاج خيار مُهندس يُحفظ جيداً في الثلاجة لمدة عدة أسابيع .

* الإنتاج الصناعي لبروتينات سامة لمحاربة الحشرات الضارة

هناك العديد من الحشرات التي تتلف المحاصيل الزراعية، قد يمكن مقاومتها بالمبيدات الكيميائية لكن ذلك أعطى نجاحا محدودا لأن أغلب الأسروعات تتوغل داخل ساق النبتة فتحتمي من تأثير المبيدات، إضافة إلى أن لها انعكاسات سلبية على صحة الإنسان

حاليا يمكن مقاومتها عن طريق الهندسة الوراثية

مثال : انتاج نباتات التبغ مقاومة للأسروعة *Manduca sextaa*

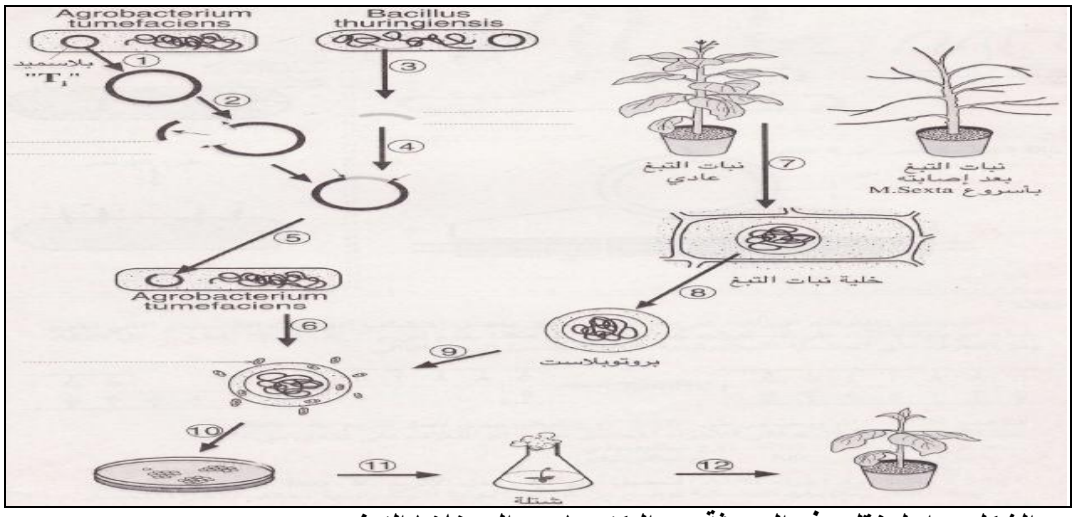
تتعرض بعض النباتات للضياع و الإتلاف بفعل تأثير بعض الحشرات، خصوصا الأسروعات، مثل: Manduca sexta ، التي تستهلك أوراق التبغ.

بينت تجارب أنجزت حول ظروف عيش الحشرة *Manduca sexta* أنها لا تستطيع العيش بوجود بكتيريا من نوع Bacillus thuringiensis .

قام الباحثون بعزل عدد من مكونات البكتيريا Bacillus thuringiensis ووضعها بوجود الحشرة *Manduca sexta* فتوصلو الى عزل مواد سامة تنتجها البكتيريا Bacillus thuringiensis وتقضي على هذه الحشرة : هذه المواد هي عبارة عن بروتينات تشكل بلورات داخل البكتيريا وتؤدي الى تحلل خلايا الأنبوب الهضمي للأسروعة.

تم تحديد المورثة المسؤولة عن تركيب البروتين السام عند Bacillus thuringiensis، و نقلها لخلايا نباتية لتصبح قادرة على مقاومة الأسروعات .

Remove Watermark Now



يبين الشكل مراحل نقل هذه المورثة من البكتيريا Bt إلى خلايا التبغ:

1- استخلاص البلازميد Ti من البكتيريا At .
2- تجريد البلازميد من المورثة ADN-T المسؤولة عن مرض جرب السنخ.
3- عزل المورثة المسؤولة عن تركيب البروتين المبيد من البكتيريا Bt .
4- إدماج المورثة في البلازميد المفتوح.
5- نقل البلازميد المغير إلى البكتيريا ثم تحفيزها على التكاثر.
6- وضع هده البكتيريا في وسط به بروتوبلاستات نبات التبغ.
7- عزل خلايا نباتية من نبات التبغ .
8- تجريد هذه الخلايا من جدارها الهيكلي، فتصبح عبارة عن بروتوبلاستات.
9- وضع البروتوبلاستات مع البكتيريا المغيرة وراثيا، و التي تدخل إلى البروتوبلاست.
10- زرع خلايا النبات في وسط ملائم.
11- كل خلية تنبت و تعطي شتلة جديدة.
12- الشتلات تنمو و تعطي نبتات جديدة مقاومة للأسروعات.

تأثير الحشرات الضارة في المحاصيل الزراعية

تعتبر أسروعات الفراشات النارية La pyrale du maïs أكبر متلف لنبات الذرة

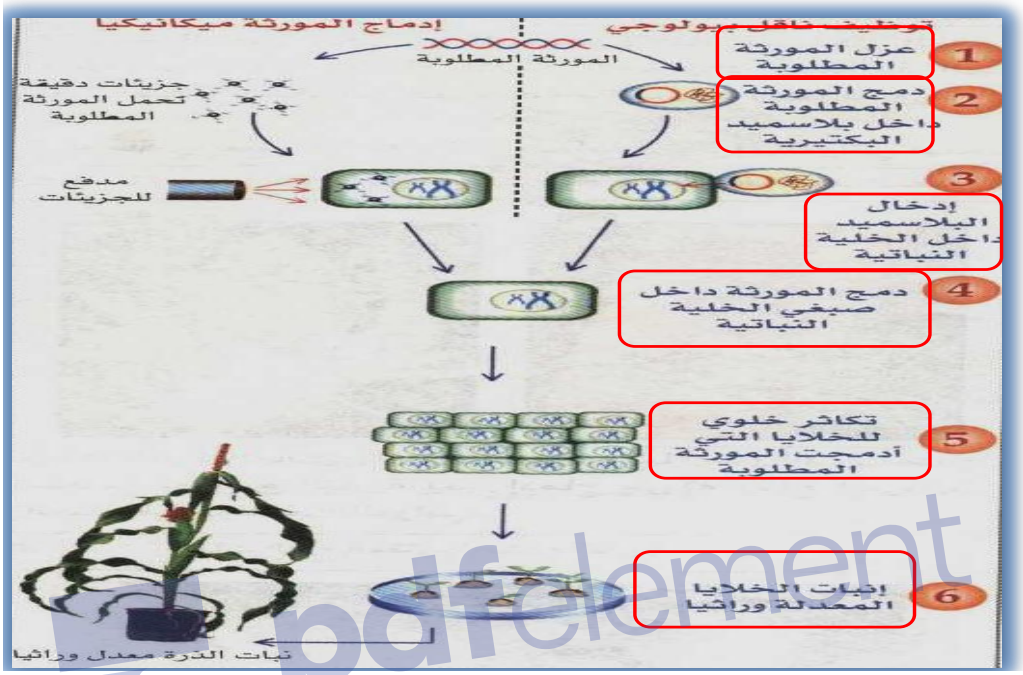
لمقاومة أسروعات الفراشات النارية، تم تسخير البكتيريا Bacillus thuringiensis التي تستطيع تركيب بروتين سهام بالنسبة للأسروعات، وغير ضار بالنسبة للفقريات.

استعمال الهندسة الوراثية في الزراعة : نقل جينات للنباتات لإكسابها صموداً امام الافات
يستعملون اليوم في تنمية بعض المزروعات كالذرة، نباتات مُهندسة ادخل اليها جين يُكسبها صموداً امام الافات (حشرات تتغذى على النبات وتؤدي الى انخفاض في كمية المحصول وجودته) .
1- البكتيريا باسيلوس ثورينجينسيس (Bt) هو منتج السم المؤدي الى موت الحشرات، التي تتغذى من غذاء يحتوي على البكتيريا.
2- نقلوا الجين المُشفِّر لإنتاج السم من البكتيريا لنباتات الذرة.

Remove Watermark Now

3- النتيجة: النبتة المُهندَسة تُنتج بنفسها السم القاتل للآفات التي تهاجم النبتة. السم قاتل للحشرات الضارة، لكنه لا يضر بالإنسان، لذلك لا يوجد تخوف من أكل الذرة .
اوراق النبات المُهندَس الذي أُدخل اليه جين انتاج السم، لا تتضرر من الافات. بالمقابل فان اوراق نبات عادية من نفس النوع، غير مُهندَس – فإنها تؤكل من قبل الحشرات.
4- الافضلية: لا توجد حاجة لاستعمال مبيدات، تسبب اضراراً للبيئة .
يستعملون البكتيريا نفسها كمبيد بيولوجي من خلال نشره مباشرة على النباتات.

اعتماد الهندسة الوراثية لإنتاج نباتات مقاومة للحشرات الضارة



* تحسين صفات النبات لإكسابه مناعة ضد الأمراض و القدرة على مقاومة الآفات للحد من استخدام المبيدات و زيادة الإنتاج.
* تحسين نباتات زراعية (تحسين صفات قائمة او ادخال صفات جديدة) بهدف زيادة كمية المنتوج وجودته. أمثلة: * إنتاج نباتات ذرة صامدة امام الحشرات الضارة، إنتاج بندورة صامدة امام الصقيع، إنتاج ارز محتواه من الزلال مرتفع

الغذاء	هدف التطوير	مصدر الجينات	النتيجة
بندورة	صمود أمام البرد	أسماك قطبية	تنمو البندورة بنجاح في البلاد الباردة
ذرة	صمود أمام الحشرات	بكتيريا	لا حاجة للرش بالمبيدات
أرز	زيادة القيمة الغذائية	بازيلاء	احتواء الأرز على زلاليات أكثر

* في عام 1982م تم إنتاج أول نبات مهجن جينياً، بتقنيات تعتمد على حذف أو إضافة مقاطع بهدف إعادة صياغة الشفرة الوراثية للخلية لإكسابها صفات لم تكن موجودة من قبل.
* إنتاج أنواع جديدة من النباتات و البذور القادرة على مضاعفة الإنتاج، و تحمل الظروف البيئية (ملوحة – جفاف – صقيع).
* تحوير النبات لينتج البلاستيك في بلاستيداته الخضراء.
* تعديل صفات الثمار لتحسين القيمة الغذائية، و تحمل ظروف النقل و التخزين.
* إنتاج مركبات الطعم و النكهة و الأصباغ من الطحالب

Remove Watermark Now

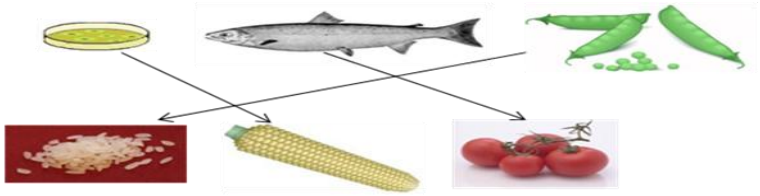
* زيادة عدد نُسخ الجينات لتثبيت نيتروجين لدى البكتيريا
* إنتاج كائنات دقيقة يمكنها تنظيف بقع البترول، بإستخدام تطبيقات إعادة إتحاد المادة الوراثية.

من المحاصيل المعدلة وراثياً: الذرة (40%) – فول الصويا (31%) – الكانولا (70%) – الكتان – القطن (40%) – الشوندر السكري– الكوسا – البندورة – البطاطا– الأرز.

- ما الذي يمكن تغييره وتحسينه بطريقة الهندسة الوراثية بالنسبة لنباتات الاكل والحيوانات البيتية

- تنشيط وتيرة نمو النباتات (هكذا يمكن تنمية غذاء أكثر في نفس الفترة الزمنية) .
- تحسين القيمة الغذائية للمنتجات الزراعية (دهن اقل في الحليب، زلال أكثر في البيض، فيتامينات أكثر في الخضراوات) .
- تحسين طعم المنتج الزراعي (فواكه حلوة أكثر، خضراوات فيها عصير أكثر) .
- اطالة "حياة " الفواكه والخضراوات على الرفوف .
- اكساب النباتات صموداً امام الافات (هكذا يمكن الامتناع عن رش مبيدات سامة) .
- العناية بنباتات صامدة امام الظروف الصعبة مثل الجفاف ودرجات حرارة متطرفة .

* تزيد الهندسة الوراثية احتمالات التحسين لأنها تكسر حاجز الانواع



تُمكّن الهندسة الوراثية من كسر حاجز الانواع

التحسين التقليدي (تهجينات)	التحسين بواسطة الهندسة الوراثية
مجمع الجينات اصغر لأنه يمكن التهجين بين ذكر وأنثى يتبعون لنفس النوع فقط	مجمع الجينات اكبر تُمكّن الهندسة الوراثية من نقل جينات بين مخلوقات من انواع مختلفة . تزيد هذه الامكانية كثيراً من مجمع الجينات المحتمل .
لا نحصل دائماً على انسال مع تشكيلة الصفات المرغوبة، وأحيانا يكون للأنسال صفات غير مرغوبة.	يمكن السيطرة بشكل افضل على تشكيلة صفات الأنسال، لان ذلك مرتبط بالجينات التي نُقلت .

pdfelement

III : في المجالات العسكرية:

* بعد ثورة إنتاج القنابل الذرية، تتسابق الدول الكبرى لإنشاء مراكز "ابحاث النظم الجينية" تعتمد على جمع الكائنات الدقيقة من مصانع الأسلحة و مستودعات الذخيرة (بكتريا تحلل الديناميت – بكتيريا تدمير الهيدروكربونات) ثم تنميتها في المعامل لعزل و تحليل النظم الوراثية لها و كذا للكائنات البيولوجية (الممرضة - المدمرة - عوامل مطفرة سيئة....)، بإستخدام "نظم الحاسبات" و إنتاج قنابل بيولوجية تحمل على الصواريخ لتفتك بالبشر دون وازع من ضمير و تحقق بذلك بعض الدول مصالحها من خلال ما يعرف بـ (حرب الجينات).
* إنتاج بكتيريا مطعمة بجينات من فيروسات ممرضة، فتتكاثر البكتيريا مكونةً أجيال ممرضة، يتم تحميلها داخل كبسولات خاصة، ثم إطلاقها في مجتمع ما فتخرج البكتيريا و تتكاثر و تغزو أجسام الكائنات الحية لتفتك بها (إحداث موت بطيء للمجتمع بأكمله).
* إنتاج حبوب قمح مطعمة بجينات ممرضة لإصابة الطاقم الوراثي البشري، أو بجينات تسمح بإكثار الآفات .
* تطوير أسلحة بيولوجية تستخدم لمهاجمة جماعات عرقية محددة، أو لمهاجمة جزء معين من جسد الإنسان.
* إنتاج أدوية ذات تأثيرات سيئة.

Remove Watermark Now

مخاطر الهندسة الوراثية

تطوير كائنات حية مهندسة تكمن فيها مخاطر ، لم تتحقق حتى الآن ، ومن جملة ما تشمل :

* مخاطر اختلال التوازن البيولوجي في النظام البيئي : خطر انتقال الجينات المهندسة للنباتات البرية عن طريق تهجينات، وتحوّل النباتات البرية في أعقاب ذلك الى نباتات ضارة، فالكائنات الحية المهندسة قد تتنافس مع أفراد نفس النوع (التي لم تُهندس)، تتكاثر وتُبعِد النباتات البرية والحيوانات في الطبيعة أو التسبب بأمراض لها، وهكذا تتضرر الأنظمة البيئية .

* تقليل التفاوت والتنوع الوراثي لدى النباتات الزراعية والحيوانات البيتية مما يؤدي الى مضاعفة حساسيتها للأمراض ولتغير ظروف البيئة، حيث أنها قد تضر بالتفاوت والتنوع الوراثي وتكوين تجانس وراثي كبير للغاية، وتغيير ملحوظ في ظروف البيئة قد يضر بشكل بالغ بالنوع الذي أفراده متماثلة. على سبيل المثال : في اعقاب استعمال نباتات مُهندسة من نفس الجنس. وفي حالة كانت جميع أشجار كرم معين ذات تجانس وراثي وأعديت بمرض معين هي حساسة له، ستتضرر كل الأشجار .

- احتمال حصول عمليات تهجين طبيعي غير مقصود بين نباتات محولة ونباتات أخرى وانتقال المورثات إلى أنواع نباتية غير مستهدفة. * هنالك خطر بأن يؤدي محصول المزروعات / الحيوانات المهندسة الى ضرر للإنسان لا نعرفه تماماً

* انتاج غير مقصود لنباتات / حيوانات / بكتيريا ضارة ذات صفات غير مرغوبة:

على سبيل المثال: نقل جينات غير مرغوبة (على سبيل المثال: صمود أمام مبيدات الأعشاب الضارة) من نباتات زراعية مُهندسة الى النباتات البرية من خلال تهجينات بين النباتات المهندسة والنباتات البرية، وهكذا يمكن ان تتكون أنواع من الأعشاب الضارة والصامدة امام المبيدات. أو "هروب" غير مقصود وبسبب الاهمال من مختبرات الأبحاث، لكائنات حية خطيرة كالبكتيريا المُهندسة الصامدة امام المضادات الحيوية.

* استخدام سيء: احتمال انتشار مقاومة للمضادات الحيوية التي يستخدمها الإنسان. انتاج بكتيريا مسببة للأمراض صامدة امام كل أنواع المضادات الحيوية واستخدامها كسلاح بيولوجي (أو مخلوقات مُهندسة أخرى ضارة) .

* مخاطر صحية: تسمم وحساسية لأغذية أنتجت بطريقة الهندسة الوراثية . تأثيرات سرطانية (الألبان واللحوم المنتجة باستعمال هرمون النمو)

* مشكلة أخلاقية: بأي حق يُغير الانسان صفات مخلوقات أخرى حسب رغبته ؟

********** انتهت المحاضرة

pdfelement