

## المحاضرة العاشرة

## الهندسة الوراثية Genetic Engineering

## تنظيم المورثة (بدائيات النوى - حقيقيات النوى):

التنظيم الوراثي: قدرة المخلوق الحي على التحكم في اختيار أي الجينات تنتسخ استجابة للبيئة. تستخدم الخلية خلال نشاطاتها عدداً محدوداً من المورثات الموجود على سلسلة DNA بأن تستنسخها إلى mRNA ، بينما تبقى المورثات الأخرى غير فاعلة حيث لا تستنسخ إلى mRNA. \* من العديد من الدراسات استنتج العلماء ان هناك آلية تتحكم في بدء عمل المورث و توقفه، ومن اشهر النظريات: نظرية العالمين الفرنسيين جاكوب و مونر: بعد دراسات على بكتيريا *E. Coli* التي تنتج عدد محدود من الإنزيمات عند زراعتها في بيئة بها لاكتوز، و لا تنتج هذه الخمائر في غياب اللاكتوز من بيئة التمنية.

## التنظيم الوراثي في الخلايا بدائية النوى

تركيب المورثة في بدائيات النوى: تمتلك مورثات بدائيات النوى منطقة مشفرة تصل إلى حوالي 90% من كامل المجين بسبب غياب الإنترونات وتوجد المورثات في الخلايا الحية بدائية النوى كالبكتيريا على شكل مجاميع تدعى الأوبرونات حيث يمثل الأوبرون عنقود من المورثات المشتركة والتي تكون تحت سيطرة المنطقة الفعالة: هي قطعة من الـ DNA تحتوي على مورثات تشفر بروتينات ضرورية لعملية أيض محددة. عملها / أهميتها : تتحكم في نسخ المورثات استجابة للتغيرات البيئية. أجزاء المنطقة الفعالة (الأوبرون) :

- 1- المشغل أو الفاعل : قطعة من الـ DNA تعمل كمفتاح لبدء النسخ وإيقافه
- 2- المحفز أو البادئ :

قطعة من الـ DNA تقع حيث يرتبط انزيم بلمرة RNA مع بداية جزئ الـ DNA

- 3- المورثات التركيبية genes Structural مجموعة المورثات التي تشفر البروتينات (أي: تقوم بالسيطرة على تكوين بروتينات معينة). وهي تقع تحت سيطرة مورث آخر يقع على احد جوانبها، ينظم عملها و يسمى (المورث المنظم Regulating genes).

## 4- المورث المنظم: ينظم إنتاج الأوبرون

وفقاً لما سبق: - يستنسخ المورث المنظم عند تكوين نسخة mRNA ويكون كامناً، ولكن عند خروجه إلى السيتوبلازم ينشط ويحفز مورثات المجموعة. - إذاً للسيتوبلازم دور في عملية ترجمة شفرة mRNA، وهو يعرف بالتفاعل النووي السيتوبلازمي فقد يجعل الترجمة فورية أو يؤخرها لفترة قد تطول كما في البويضة المخصبة.

مثال: بكتيريا *E.coli* تستجيب الى: 1- الحمض الأميني (التربتوفان) و 2- سكر اللاكتوز من خلال منطقتين فعاليتين إثننتين : 1- منطقة الترتوفان و 2- منطقة اللاكتوز

**التنظيم الوراثي في الخلايا الحقيقية النوى:**

تركيب المورثة في حقيقيات النوى: تمتلك مورثات حقيقيات النوى قطع إضافية من ال - DNA لا تُرمز تسمى الأنترونات وقطع مرمرزة (تتابعات) تدعى الأكسونات (مناطق مُشَفَّرَة) \* بنيت نظرية "جاكوب و مونر" على دراسة للأحياء الدقيقة، وهناك أدلة تؤيد وجود ذات النظام في جينات الأحياء المعقدة مثل:

1- العديد من المورثات يتفاعل بعضها مع بعض في الخلايا الحقيقية النوى : حيث يوجد 3 مجموعات رئيسية من المورثات في خلايا الكبد (واحدة لبناء الجلوكوز وأخرى لتفكيك الجلايكوجين وثالثة مختلطة) تكون كل منها هرمونات ينخفض تركيزها عند الجوع، ويرتفع تركيزها عند وجود الأنسولين (داء السكري) مما يدل على وجود فاعلية مشتركة بين المجموعات الثلاثة.

2- أن خلايا الكائن البالغ تكون مخصصة للقيام بوظائف محددة (وجميعها تملك نفس عدد الصبغيات)، وهذا يعني ان جينات معينة تكون في حالة فعالة بينما الجينات الباقية تكون في حالة سكون.

3- عند استبدال نواة خلية فأر بنواة خلية بشرية، وجد ان النواة استجابت لحاجة سيتوبلازم خلية الفأر وكونت mRNA و بالتالي بروتينات جديدة. وهذا يعني ان محفزات السيتوبلازم ليس لها خصوصية لنواة معينة بل يمكنها ان تحفز جينات أي نواة حتى ولو كانت منقولة إليها.

4- تتحكم الخلايا في المورثات التي سيتم التعبير عنها في أوقات محددة من حياة المخلوق الحي  
5- يجب توافر أكثر من محفز ومشغل واحد لمجموعة من المورثات  
6- الخلايا حقيقية النوى أكثر تعقيداً تتطلب نظام تحكم أكثر تعقيداً

**التحكم في عملية النسخ**

عوامل النسخ : هي بروتينات من خلالها تتحكم الخلايا الحقيقية النوى بالتعبير الجيني الأهمية / الوظيفة : 1- تضمن استعمال المورث في الوقت المناسب  
2- انتاج البروتينات بالكميات الصحيحة

المجموعتان الرئيسيتان لعوامل النسخ :

(أ): عوامل النسخ التي تكون مركبات معقدة: تنظم انزيم بلمرة RNA وتوجه ارتباطه بالمنظم  
(ب) بروتينات منظمة تساعد على التحكم بسرعة النسخ. مثل :

البروتينات النشطة : تطوي جزئ ال- DNA لتجعل مواقع المحفزات قريبة من المركب المعقد فتزيد سرعة نسخ الجين

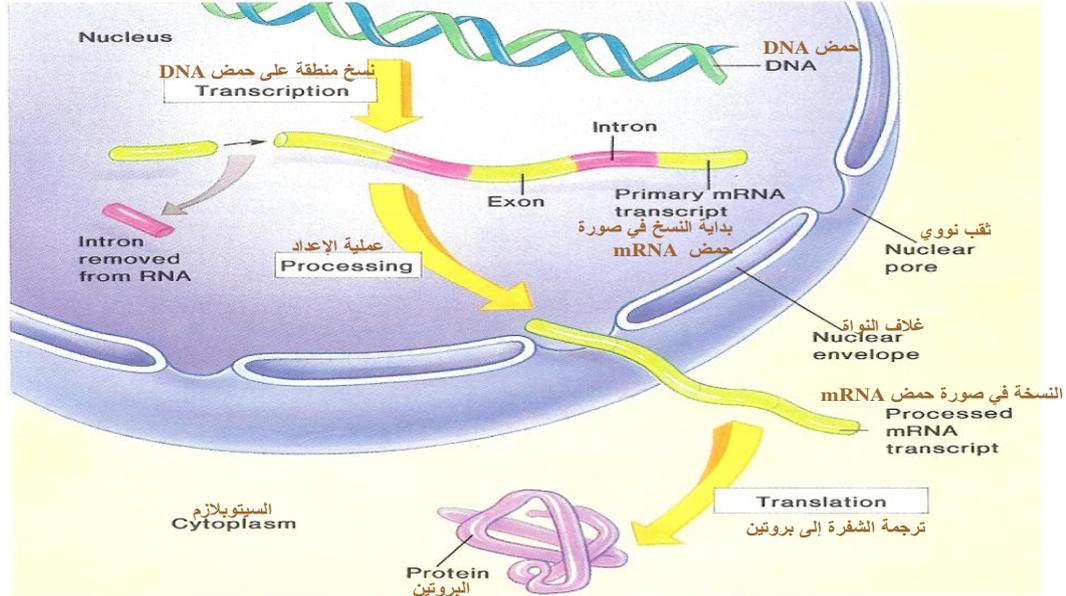
البروتينات المثبطة : ترتبط مع مواقع محددة على DNA لتمنع ارتباط المحفزات بعد تعقيد تركيب DNA في الخلايا حقيقية النوى منظماً لعملية النسخ لأن هذا التركيب المعقد يوفر تثبيطاً لعملية النسخ.

كما يعتبر تداخل RNA طريقة أخرى لتنظيم مورثات الخلايا الحقيقية النوى  
جزيئات RNA المتداخلة الصغيرة : هي القطع ثنائية السلسلة الناتجة من تقطيع ال- RNA الى قطع صغيرة بواسطة إنزيمات القطع

جامعة حماة - كلية الهندسة الزراعية الوراثة والبيولوجيا الجزيئية/السنة الثانية الدكتورة. ايمان مسعود

ترتبط (جزيئات RNA المتداخلة الصغيرة) ببروتين معقد <---> يكسر سلسلة واحدة من RNA ترتبط السلسلة المفردة الصغيرة مع مقاطع محددة ومتسلسلة على mRNA في السيتوبلازم <---> يؤدي الى تقطيع mRNA <---> فتمنع ترجمته

### نسخ شفرة و ترجمتها



Gene Processing

تفسير الجين

### ما هي الهندسة الوراثية

الهندسة الوراثية أو ما يعرف أحياناً بهندسة المورثات هي أحدث الطرق العلمية في تغيير التركيب الوراثي، والتحكم في الصفات الوراثية للكائن الحي (نبات - حيوان - إنسان) مع إضافة بعض المورثات ذات الصفات الاقتصادية المهمة، وبطريقة سريعة بهدف زيادة الإنتاج الزراعي بشقيه النباتي والحيواني كماً ونوعاً. وقد نشأ علم الهندسة الوراثية عام 1984م كتطبيق عملي على المعلومات النظرية المستمدة من بحوث المجين التي عرفتنا بالخريطة الوراثية البشرية.

### اكتشاف الهندسة الوراثية:

في السبعينات من القرن العشرين، وبعد دراسة مستفيضة لما أعلنه العالمان واطسون وكريك 1953م من اكتشافهما للطريقة التي كتبت بها المعلومات الوراثية، وبالتالي تمكن العلماء من دراسة الوراثة في المعامل (في الأطباق وأنابيب الاختبار بطريقة كيموحيوية) دون انتظار للتكاثر الطبيعي للكائن حتى يعطينا هذه المعلومات من نسله المتتابع الذي يستغرق سنوات عديدة. دور الهندسة الوراثية: هو محاولة جمع صفة أو صفات مفيدة تؤخذ من كائن أو كائنات وتنقل إلى كائن آخر، وذلك بعزل الجينات المسؤولة 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 مسيطرة). وبالتالي تهدف الهندسة الوراثية إلى التلاعب بالجينات بطريقة تسمح بظهور صفات جديدة مفضلة أو إزالة صفة غير مرغوب فيها موجودة

**تنقل المورثات في الطبيعة بـ 3 طرق هي:**

1- التحويل Transformation: هو نوع من الاتحادات الوراثية يحدث في البكتيريا بسبب إضافة DNA غريب إلى بيئة نمو بكتيرية وهذا لا يتطلب عامل وسيط ؛ مثال تجربة العالم جريفيث على بكتيريا ذات الرئة *Diplococcus pnemococcus* التي لها سلالتين وتجربة العلماء إيفري مكلويد ومكارثي حيث فسروا ما حدث بأن بعض خلايا السلالة R غير الممرضة (وهي غير معدية ومستعمراتها خشنة)، تحولت إلى خلايا السلالة S الممرضة (سلالة معدية مستعمراتها ملساء)، وأن DNA هو العامل المحول حيث استقبلت السلالة R الـ DNA من السلالة S فأصبحت معدية. (شرحت بالتفصيل بالمحاضرة السابقة).

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

3- الاقتران Conjugation: حيث تقوم إحدى خلايا البكتيريا بالصاق نتوء صغير على سطح بكتيريا قريبة (عشوائياً) تم يمرر حمض DNA إليها، تحت سيطرة البلازميد وليس الـ DNA. **الحوامل والنواقل الوراثية:**

النواقل هي في الغالب فيروسات أو بلازميدات كما أن هناك أنواع مصنعة تُستخدم في المختبرات الطبية.

**خلايا بدائيات النوى المضيئة:**

تُعد هذه الخلايا من أفضل الخلايا المضيئة كونها خلايا سهلة الاستخدام وتتميز بسهولة ورخيصة، ولها القابلية العالية على التكاثر حيث تنتج جيلاً جديداً كل نصف ساعة، وتتضمن سلالات متنوعة ومعروفة وراثياً، وكذلك مدى إمكانيتها في استقبال النواقل. تستخدم الخلايا البكتيرية في معظم عمليات التنسيل المورثي في المختبرات كخلايا مضيئة، وخاصة خلايا (بكتريا إيشيرشيا كولاي *E. coli*) حيث ركز العلماء في دراستهم بالتحديد على السلالة  $K_{12}$  منها والتي تعيش في أمعاء الإنسان والثدييات (القولون) وعلى الجروح والنسيج المحيط بالمخ. وتعد بكتريا *E. coli* الكائن الحي المفضل لدى علماء الهندسة الوراثية لإجراء تجاربهم وهي خلايا غير مميزة النواة سالبة الغرام ومفردة الصبغي ويتميز سيتوبلازما البكتيريا بوجود أ- صبغي حلقي وحيد (يمثل الـ DNA الحمض الريبي النووي منقوص الأوكسجين الرئيسي للبكتيريا). ب- جزيء حلقي إضافي من مادة الـ DNA صغير الحجم يسمى البلازميد Plasmid وهي عنصر وراثي مستقل (كل بلازميد يضم حوالي 100 مورثة) ويحمل البلازميد مورثات لبعض الصفات (مثل مقاومة البكتيريا لبعض الأدوية كالبنسلين). يتضاعف البلازميد بتضاعف البكتيريا، وفي حالات خاصة يتضاعف خارج أوقات تضاعف البكتيريا، أي أنه ذاتي التضاعف يتضاعف بشكل مستقل عن تضاعف البكتيريا. فيصبح عدد البلازميدات في البكتيريا الواحدة من 50 - 100. ومن المعوقات الرئيسية لاستخدام *E. coli* في عملية التنسيل كونها من بدائيات النوى التي ينقصها الغشاء النووي ويعني ذلك أن مورثات محددة لحقيقيات النوى قد لا يمكنها أداء وظيفتها في خلايا *E. coli* فقد لا يكون من السهل التأكد بأن الخلية بدائية النوى تستطيع إنتاج البروتين الكامل الوظيفة.

**خلايا حقيقيات النوى المضيفة:**

تُعد خمائر *Saccharomyces cerevisiae* من أفضل الكائنات حقيقيات النوى المجهرية استخداماً في الهندسة الوراثية. لقد استخدمت هذه الكائنات الحية لقرون عديدة في إنتاج الخبز وصناعة البيرة. وتتميز بأن ذخيرتها الوراثية تزيد بما يقرب من ثلاث أضعاف ونصف عن الذخيرة الوراثية لبكتيريا *E. coli*.

**النواقل البلازميدية المستخدمة في بكتيريا *E. coli*****ما هي البلازميدات:**

البلازميد هو جزيئة DNA شبيهة بالفيروسات الصغيرة ولكنها لا تحتوي على غلاف من البروتين، تتكون البلازميدات من جزيئات الـ DNA ثنائية الشريط (مضاعفة السلسلة) حلقة الشكل، وتكون صغيرة نسبياً بالمقارنة مع صبغي الخلية، تتراوح أحجامها من 1-1000 kpb، وغالباً موجودة في حالة صبغي إضافي. وهي تمثل كوحدة وراثية خارج كروموسومية، تتواجد طبيعياً في البكتيريا وفي بعض أنواع الخميرة.

**الخصائص العامة للبلازميدات:**

- 1- تتميز البلازميدات بقدرتها على التضاعف الذاتي بشكل مستقل عن تضاعف البكتيريا وبمعزل عن بقية الصبغيات الموجودة في الخلية وذلك لاحتوائها على وحدة التضاعف الذاتي (وهي تسلسل نوعي من الحمض الريبي النووي منقوص الأوكسجين، مؤلف من 50-100 pb وموجودة ضمن البلازميد).
- 2- تحمل البلازميدات مورثات كثيرة مختلفة، وهي مفيدة للعلماء في عملية نسخ المورثات، فمثلاً يوجد على البلازميد مورثة خاصة تكافح الـ مضادات الحيوية (كالأمبيسلين، والتترا سيكلين، والبنسلين، والكاناميسين، والكلوروموفينيكول). هذه المورثة هي من النوع الذي يُكسب البكتيريا في الطبيعة صموداً أمام مضادات حيوية من أنواع مختلفة. حيث تساعد هذه المورثات الحامية من المضادات الحيوية في التعرف على البكتيريا التي تحتوي على البلازميد الذي يحمل المورثة التي نود استنساخها وعزلها.
- 3- تمتلك البلازميدات أيضاً منطقة التنسيل المتعددة (أماكن وجود إنزيمات القطع) ويتم في هذه المنطقة إدخال الـ DNA الغريب.
- 4- يمكن أن تُنقل البلازميدات من خلية بكتيريا إلى خلية بكتيريا أخرى (مثل عملية الاقتران)، وأحياناً تُنقل إلى بكتيريا من نوع آخر.
- 5- يوجد بلازميدات تستطيع التكاثر داخل البكتيريا والخميرة في أن واحد.
- 6- اعتماداً على نوع الحمض النووي نستطيع تمييز نوعين من البلازميدات: البلازميدات ذات الحمض الريبي النووي منقوص الأوكسجين DNA والبلازميدات ذات الحمض الريبي النووي RNA. وتتميز أيضاً عن طريق وزنها الجزيئي فمنها الصغير (وزن جزيئي منخفض 2-5 كيلوباز)، ومنها الكبير (وزن جزيئي عالي). تستخدم هذه البلازميدات في الهندسة الوراثية كحامل للمورثات الغريبة.

## النواقل المستخدمة بعملية التنسيل Cloning Vectors

**الناقل vector** : هو جزي من الـDNA يستطيع أن يحمل قطعة الـDNA الغريب وينقلها إلى الخلية المضيفة وهو قادر على التضاعف بشكل منفصل عن الـDNA الكروموسومي للكائن المضيف، ويوجد أربعة أنواع رئيسية من النواقل هي

- البلازميد Plasmids
- البكتريوفاج Bacteriophages
- الكوزميد Cosmids
- النواقل الصبغية الصناعية YAC و BAC

### بلازميدات التنسيل الأساسية:

تُحور البلازميدات الموجودة طبيعياً - بشكل واسع- في الهندسة الوراثية لإنتاج النواقل التي تحمل الصفات المرغوبة، أي تستخدم في عملية نقل المورثات من أحد الكائنات إلى الكائن الآخر ، يستقبل البلازميد قطعة DNA ذات متوسط طول 5 كيلو زوج نيوكليوتيدي. ومن البلازميدات شائعة الاستخدام البلازميد pBR 322 وهو يمتلك سمات الناقل الجيد مثل الوزن الجزيئي المنخفض، يمتلك عدة مواقع أحادية القطع، كما أن هذه البلازميدات تكون على الأغلب حاوية على معلومات وراثية genetic marker مثل مورثات المقاومة للمضادات الحيوية التي يمكن انتقاؤها مخبرياً. مثل هذه البلازميدات تحتوي على منطقة تدعى cloning site وهي منطقة الهضم بواسطة الإنزيمات المحددة (إنزيمات التقيد) وبالتالي تسمح لقطعة الـ DNA المراد تنسيقها 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 البكتيريا المتحولة عن طريق تنميتها على وسط حاوي على المضادات الحيائية، بعدها يتم استخلاص البلازميدات بطريقة التحلل القاعدي

### نواقل بلازميدية مبتكرة أخرى:

على الرغم من الاستخدام الواسع لبلازميدات pBR322 و PAT153 لغرض التطبيقات العديدة في التنسيل المورثي، فإنه توجد نواقل بلازميدية أخرى ملائمة، ومنها سلسلة بلازميدات العائلة البلازميدية pUC التي لاقت انتشاراً واسعاً وهي تحتوي على سمات خاصة لا توجد في النواقل الأبسط حيث تمتلك هذه البلازميدات منطقة تحتوي على عدة مواقع قطع مفردة لإنزيم الأندونيوكلياز (أنزيمات القطع)، ضمن امتداد قصير للـDNA وتعرف هذه المنطقة بموقع التنسيل المتعدد (البولي لينكر Polylinker site )

مقطع نيوكليوتيدي قصير يحتوي على مواقع لإنزيمات التحديد أو القطع ( قد يصل عددها حتى 20 موقع)، الموقع الخاص بكل انزيم موجود مرة واحدة على قطعة الـ DNA ويستخدم هذا الموقع لهضم الناقل وتجهيزه لربط القطعة المراد مكائرتها. كما تعتبر هذه المواقع مفيدة بسبب إمكانية الاختيار للموقع القابل لإدخال قطعة الـDNA المراد مكائرتها بعد ربطها مع الناقل

**الفاجات البكتيرية:**

هي ببساطة فيروسات آكلات البكتيريا وتعتمد في توالدها (تضاعفها) على البكتيريا. وتصنف الفاجات تركيبياً ضمن ثلاث مجموعات رئيسية: (عديمة الذنب - المذنبة - خيطية). البكتريوفاج لامبدا  $\lambda$  phage: وهو فيروس آكل البكتيريا موجود في *E. coli*، وهو من الفاجات المذنبة أي مكون من رأس (يحتوي الـ DNA المادة الوراثية)، ومن غلاف بروتيني يحيط بالمادة الوراثية (الموجودة بالرأس)، وذيل (الذنب) ويستخدم لإصابة الخلايا المضيفة (*E. coli*). تتكون المادة الوراثية (المجين) للبكتريوفاج لامبدا من (48.5 Kbp) طولاً لتؤلف ما يقرب من 46 مورثة. على الرغم من أن النواقل التي بنيت على أساس الفاجات البكتيرية هي أكثر تخصصاً من النواقل البلازميدية إلا أنها متشابهة معها في الوظيفة من الناحية الجوهرية أي أنها تعمل كحاملة لقطع جزيئات الـ DNA.

وتعد الفاجات أفضل من البلازميدات للأسباب التالية:

- كونها نواقل لها القابلية على استقبال قطع أكبر من الـ DNA.
- تستطيع الفاجات إصابة الخلايا بفعالية أكبر من البلازميدات.
- معدل ظهور المستعمرات عادة يكون أعلى.
- تعود فعالية الفاجات لأنها تستخدم في بناء المكتبات الوراثية.

- الكوزميد **Cosmids**: عبارة عن تهجين جزء من فاج لامبدا  $\lambda$  phage مع البلازميد Plasmids لقد حورت هذه النواقل لكي تستطيع حمل أكبر كمية من الـ DNA، وبذلك تكون ملائمة لتنسيل قطع الـ DNA، لما يقرب 47 كيلوباز في الطول

- النواقل الصبغية الصناعية (وتسمى النواقل المخصصة لتنسيل القطع الكبيرة **Vectors for cloning very large DNA fragments**): نظراً للحاجة إلى نقل أحجام كبيرة من الحمض الريبي النووي منقوص الأوكسجين فقد قام العلماء بتحويل بعض الناقلات الطبيعية لكي تقوم بهذه المهمة. من هذه النواقل:

1- صبغية الخميرة الصناعي YAC (Yeast Artificial Chromosomes)

بلازميد خطي يتناسخ في الخميرة وهو عبارة عن قطعة من الـ DNA مترابطة، يستطيع هذا الناقل نقل قطعة كبيرة من الـ DNA أكبر من 500 كيلوباز (500kb) ولإنتاج مكتبة وراثية لكائن حي ما.

2- صبغية البكتيريا الصناعي BAC (Bacterial Artificial Chromosomes)

يستطيع هذا الناقل حمل قطعة من الـ DNA حتى 150 كيلوباز (وهو عبارة عن تحويل للبلازميد المعروف بعامل تكاثر بكتيريا *E. coli*).

**إنزيمات الهندسة الوراثية****1- أنزيمات هدم الأحماض النووية DNAases and Rnases Nuclease enzymes**

أ. إنزيمات الهدم الداخلي Endonuclease

- تكسر روابط الفوسفات ثنائية الاستر من داخل سلاسل الحمض النووي

- تنتج قطع مختلفة الحجم من الحمض النووي

ب. أنزيمات الهدم أو الهضم الخارجي Exonuclease

- يهضم النيوكليوتيدات من سلسلة الـ DNA بالتدرج بالاتجاه من 3' إلى 5' .

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

**RNase A** أنزيم متخصص بهضم جزيئة الـ RNA

**2- إنزيمات بلمرة أو تكثيف الحمض النووي polymerases enzymes**

أنزيم التكثيف 1 DNA PolymeraseI يصنع الـ DNA المكمل للـ DNA القالب بالاتجاه

من 5' الى 3' ، يبدأ بالإضافة من البادئة ( مقطع قصير من النيوكليوتيدات ) من الـ OH عند

النهاية 3' (للترميم)

أنزيم التكثيف Taq DNA Polymerase Taq وهو أنزيم مقاوم لدرجات الحرارة المرتفعة

لأنه مستخلص من بكتريا تعيش في مياه الينابيع الحارة (Thermophilus aquaticus) في

درجة حرارة أعلى من 110 م°، يعد هذا الإنزيم مسؤولاً عن تضاعف الـ DNA

**3- إنزيمات الربط Ligase enzymes****4- إنزيمات التحوير أو التعديل Modifying enzymes****5- إنزيمات إزالة الانطباق Topoisomerase enzymes****6- أنزيمات القطع (التحديد -التقييد- القصر البكتيري) Restriction Enzymes**

## أنزيمات القطع (أنزيمات التحديد أو التقييد أو القصر

## Restriction Enzymes (البكتيري)

لا شك في أن لكل كائن حي طرق دفاعية مختلفة تحميه من غارات الكائنات الأخرى والتي تعتبر الأعداء.

والبكتيريا هي إحدى هذه الكائنات ومن أهم أعضائها الفيروسات المختلفة. حيث تقوم بعض أنواع من البكتيريا بإنتاج إنزيمات قاطعة مهمتها تدمير الفيروسات التي تهاجمها.

ومن هذه الإنزيمات: الإنزيمات القاطعة التي تقوم بقص الحمض النووي الـ DNA للفيروس وبذلك يُشل عمله ويُبطل مفعوله. وبما أن الـ DNA مادة موجودة بشكل طبيعي في

البكتيريا كما هو الحال في الفيروسات والكثير من الكائنات الحية فإِنَّ هذه الإنزيمات قد تشكل خطراً على البكتيريا نفسها في قصها للـ DNA الخاص بها. ولكن هذا لا يحدث بسبب

قيام البكتيريا بتحويل أجزاء من الـ DNA الخاص بها عن طريق إضافة مجموعة الميثيل إلى بعض الأسس الأزوتية من نوع الأدينين أو السيتوسين فلا يتمكن الإنزيم Methyl القاطع من قص الحمض النووي الخاص بالبكتيريا.

يؤرخ العلماء بدء زمن الهندسة الوراثية إلى اكتشاف إنزيمات القطع لأنه قبل ذلك لم يكن باستطاعة العلماء التلاعب

بالحمض النووي. وعند اكتشاف هذه القواطع في السبعينيات بدأ العلماء في استخدامها كمقاص لقص الـ DNA وساعدتهم هذه الإنزيمات في عملية التحكم في الـ DNA. ويوجد حالياً

أكثر من مائة نوع من هذه الإنزيمات

تسمى أنزيمات القطع أيضاً بلمقصات البيولوجية، وهي إنزيمات نووية متخصصة تتعرف على مقاطع نيوكليوتيدية معينة وتقوم بحلمة وهضم وتكسير جزيئة الـ DNA عندها

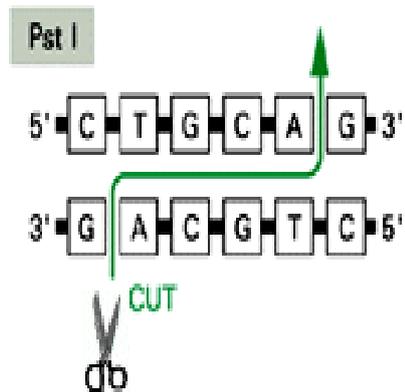
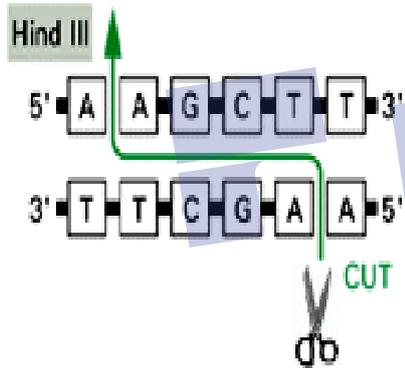
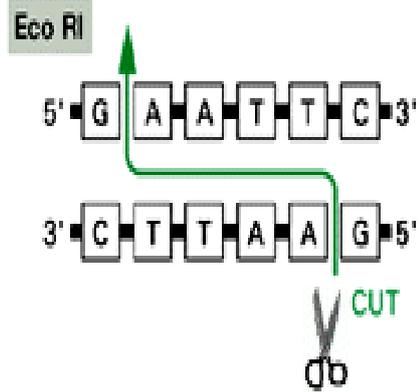
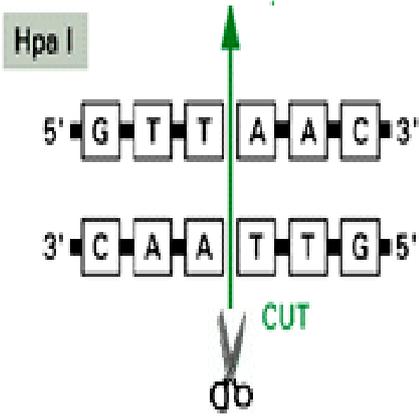
منتجاً قطعاً متباينة في عددها ووزنها الجزيئي (طولها ما بين 4-8 قواعد) ومتشابهة بنهايتها تسمى قطع التحديد. ولا يقتصر عمل هذه الإنزيمات على جزيئات DNA محددة، إنما

تعمل على كافة أنواع الـ DNA مزدوج السلسلة.

الغاية من استخدام أنزيمات التحديد:

- تقطيع جزيئات الـ DNA الكبيرة إلى قطع بحدود 2-200 Kbp ، لسهولة التعامل معها.

- الحصول الدائم على نفس القطع عند اجراء عمليات الهضم لنفس الـ DNA مع نفس الإنزيمات.



## تسمية الانزيمات القاطعة

نظراً للأعداد الكبيرة التي اكتشفت من هذه الإنزيمات فإنه تم اقتراح نظام تسمية وضعه العالمان Smith and Nathan عام 1973م على النحو التالي:

أ - يرمز لجنس الكائن الذي اكتشف فيه الإنزيم بالحرف الأول من اسم الإنزيم ويرمز لنوع الكائن بالحرفين الثاني والثالث من اسم النوع .

فمثلاً الإنزيم المسمى Eco مأخوذ من البكتيريا *E. coli* فالحرف الأول من اسم الإنزيم مأخوذ من اسم جنس البكتيريا *Eschericia* والحرفان الثاني والثالث مأخوذان من اسم نوع البكتيريا *coli*. وكذلك الحال بالنسبة للإنزيم Hin المأخوذ من اسم البكتيريا *Haemophilus influenzae* والإنزيم Hpa مأخوذ من اسم البكتيريا *Haemophilus parainfluenza* وكذلك الحال بالنسبة لبقية الإنزيمات.

ب- في حالة احتواء البكتيريا على بلازميد فإنه يجب إضافة اسم البلازميد إلى اسم الإنزيم . فمثلاً في حالة الإنزيم Eco المشتق من اسم البكتيريا *E. coli* فإذا كانت البكتيريا تحتوي على البلازميد R1 فإن اسم الإنزيم يصبح Eco R1 . وهو إنزيم تم اكتشافه في السلالة Ry13 من البكتيريا *Eschericia coli* .

ج- في حالة وجود أكثر من إنزيم لنفس النوع من البكتيريا فإنه تُستخدم الأرقام الرومانية بعد نهاية الاسم كما هي الحال في الإنزيم: Eco RI و Eco RII و Hind I و Hind II و Hind III .

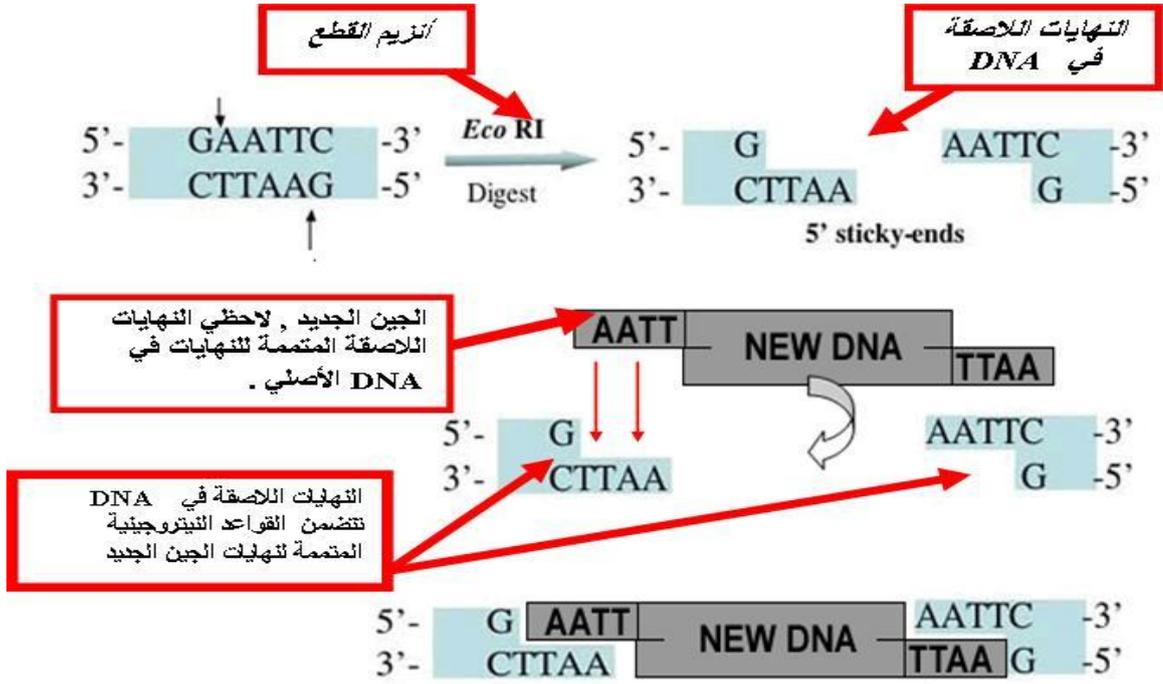
تقسم الانزيمات القاطعة إلى نوعين رئيسيين:

1. النوع الأول يقص شريط DNA المزدوج بشكل رأسي مستقيم ويعطي نهايات عمياء أو غير لزجة .



2. النوع الثاني يقص بشكل متعرج ، وبلقالي يجعل طرفي DNA المقطوع مادة قابلة للزق قطعة غريبة من DNA فيها. وعند لصق قطعة من الـDNA في داخل الفراغ الناتج من القطع ينتج لنا قطعة مركبة من قطعتين مختلفتين من الـDNA و هذه القطعة تسمى DNA المهجن أو المؤشب (ذات الارتباطات الجديدة، مكونة من جزيئين DNA مختلفتين أو Recombinant DNA).





### مواقع عمل إنزيمات القطع :

إن إنزيمات القطع تمتلك مواقع معينة على الحامض النووي DNA تتخصص في قطعها ولكن تختلف هذه الإنزيمات في بعض الأمور فيما يخص طبيعة موقع القطع ومكان القطع ونواتجه . ومن أهم هذه الاختلافات ما يلي: 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 . فمثلاً الإنزيم القاطع ( Hpa I ) يقطع عندما يجد 6 من الأحماض النووية في هذا التسلسل (GTTAAC) وهذا الإنزيم يعتبر من الإنزيمات التي تقطع بشكل رأسي مستقيم. بينما الإنزيم القاطع (Eco RI) يقطع عندما يجد 6 من الأحماض النووية في هذا التسلسل (GAATTC). ويعتبر من الإنزيمات التي تقطع الـ DNA بشكل متعرج.

تسلسل مواقع القطع Recognition Sites لبعض الإنزيمات القاطعة		
المقطع الذي تميزه	المصدر	الإنزيم القاطع
GAATTC CTTAAG	Escherichia coli RY13	Eco RI
AAGCTT TTCGAA	Haemophilus influenzae Rd	Hind III
TCGA	Thermus aquaticus	TaqI
GGGCC CCCGG	Acetobacter pasteurianus	Apa
GGCC CCGG	Haemophilus aegyptus	HaeII
GATC CTAG	Diplococcus pneumoniae	Dpn

تتم عملية الهندسة الوراثية بخطوات متتالية :

### عملية تنسيل الـ DNA (Cloning DNA) أو التنسيل الجزيئي Molecular Cloning

تشير إلى إدخال قطعة من الـ DNA ضمن ناقل حتى يتم نسخها (تكاثرها) أو التعبير عنها داخل الكائن المضيف بشكل نقي وبكمية كبيرة، من خلال:

- 1- العثور على المورثة المرغوبة وعزلها: استخلاص الحمض النووي DNA أو RNA لعزل مورث معين لازم لعملية الهندسة الوراثية وهناك عدة طرق منها تقنية الـ PCR مثلاً.
- 2- هضم الـ DNA المراد تنقيته والـ DNA الخاص بالناقل بلفزيمات القطع نفسها. والفصل بالهجرة الكهربائية عبر هلام الأغاروز لعزل الجين المطلوب أو قطع DNA المحتوية عليه
- 3- استخدام ناقل وراثي مناسب لربط الجين المطلوب معه ثم العمل على الربط والحصول على الـ (DNA المؤشب) المعاد ارتباطه
- 4- إدخال DNA الناقل المؤشب (الهجين) إلى خلايا مضيف مناسب لتضخيمه وزيادة عدده وهناك عدة نواقل يعتمد على المصنّع المستخدم وعلى الجين ونوع البروتين المنتج أهمها عندنا هي البلازميدات والفيروسات 5- اختيار الخلايا التي تحوي على الناقل المؤشب.
- 6- مكاثرة الـ DNA المؤشب والحصول عليه بكمية كبيرة.
- 7- فصل الـ DNA المنسل عن DNA الناقل. والكشف عن عمل الجين الجديد.

### التجربة الأساس في الهندسة الوراثية إدخال قطع الـ DNA الغريبة إلى البكتيريا:

استخدمت البلازميدات والفيروسات كناقلات في الهندسة الوراثية تحت درجة من السيطرة على كل خطوات النقل. وبرزت فكرة جعل كائن بسيط كالبكتيريا يقوم بوظائف راقية كوظائف الخلايا البشرية؛ ولكن كيف يعزل الجين وينقل؟ في عام 1973م استطاع كل من العالمين الأمريكيين Herbert Boyer و Stanly Cohen إجراء تجربة عدت الأساس فيما عرف بالهندسة الوراثية، وملخصها كالتالي:

- 1- عزل المورثة المرغوب فيها لتصميم قطعة مهجنة من الـ DNA أي المورثة المراد نسخها، والـ DNA من ناقل وراثي لديه القدرة على التضاعف باستخدام إنزيمات القطع Restriction enzymes or Endonucleases حيث يضاف إنزيم قطع محدد إلى قطعة الـ DNA فيقوم هذا الإنزيم بقطع شريط الـ DNA في مكان محدد حسب التسلسل الخاص به. (وإنزيمات القطع هي إنزيمات موجودة في البكتيريا تعمل على حمايتها حيث تقوم هذه الإنزيمات بقص أي DNA غريب يدخل في البكتيريا مما يجعله عديم الفاعلية حيث عرف منها نحو 300 إنزيم كل منها يقص الـ DNA في موقع محدد (في تعاقب خاص من القواعد النيتروجينية مما يجعل أطراف القواعد المقصوصة في رغبة شديدة للبحث عن قواعد مكملية لتزوج معها ولهذا تسمى نهايات لاصقة Sticky ends). - ويضاف إنزيم القطع نفسه إلى الناقل لفتح بلازميد الناقل حيث يقوم بقطعه أيضاً في نفس التسلسل.

- ومن ثم تضاف وتخلط قطع الـ DNA (المراد نقلها ونسخها بعد قطعها بالإنزيم القاطع) مع DNA البلازميد أي الناقل المقطع فتتداخل التسلسلات النووية بين الناقل وبين قطع الـ DNA المراد نسخها، وينتج قطعة مهجنة من الناقل وبداخله القطعة المراد نسخها (مورثة).

جامعة حماة - كلية الهندسة الزراعية الوراثة والبيولوجيا الجزيئية/السنة الثانية الدكتور. ايمان مسعود

- يضاف إنزيم الوصل أو الربط Ligases لربط قطعة الـ DNA الحمض الريبي النووي منقوص الأوكسجين المراد نقله مع DNA البلازميد لإنتاج DNA متزاوج Recombinant DNA.  
- إن أكثر النواقل استخداماً هي البلازميد Plasmid، ولكن يمكن استخدام الفاج أو أي ناقل آخر، والذي يحدد نوع الناقل المراد استخدامه هو في العادة كبر القطعة المراد استنساخها، ففي حال القطع الصغيرة يستخدم البلازميد أو الفاج بينما يستخدم YAC أو BAC في حالة القطع الكبيرة من الحمض الريبي النووي منقوص الأوكسجين.

**2- اختيار الحامل أو الناقل Vector المناسب لنقل القطعة المهجنة المحمولة أو الموجودة داخل الناقل إلى خلية حية جديدة** غالباً ما تستخدم الخلايا البكتيرية وخاصة بكتريا *E.coli* في عملية التنسيل أو الزراعة بالهندسة الوراثية وذلك لسهولة إدخال الناقل إليها، ولكونها كائنات حية بسيطة سريعة التكاثر والانقسام إذ تنقسم تقريباً كل 20 دقيقة، لها سيتوبلازم غني بالجسيمات الريبية والعناصر الضرورية لتكوين البروتينات، كما تحتوي على صبغى واحد وعدة بلازميدات يمكن استغلالها كناقلات للمورثات، إضافةً إلى توافر طرق الاختيار خاصة التي تعتمد على خاصية الحماية من المضادات الحيوية. ويدخل البلازميد أو الفاج تلقائياً إلى داخل البكتريا، بينما النواقل الأخرى تحتاج إلى مساعدة وفي العادة تتمثل بتغيير تركيز الأملاح المحيطة بالبكتريا أو تعرضها إلى نبضة كهربائية لكي يحرض الجدار المحيط بالبكتريا لإدخال النواقل.

### 3- اختيار المستعمرات البكتيرية التي تحتوي على الناقل والقطعة المهجنة:

ينتج لدينا مع تكاثر الخلايا البكتيرية وتكاثر البلازميد بداخلها أعداد كثيرة من المستعمرات البكتيرية وبها البلازميد المهجن. ولكن قد يكون في داخل الطبق الذي زرعت فيه البكتريا بعض البكتريا التي لا تحتوي على البلازميد المهجن ويمكن التعرف عليها عن طريق استعمال نواقل تحمل مورثات مقاومة للمضادات الحيوية، كالمورثة المقاومة للمضاد الحيوي الأمبيسلين أو التتراسيكلين وغيرها فيضاف المضاد الحيوي إلى وسط النمو وهو سوف يمنع تكاثر أي خلية بكتيرية أخرى.

### 4- استخلاص القطع المهجنة والاستخراج الكمي للحمض الريبي النووي منقوص الأوكسجين:

بعد أن نميز المستعمرات التي تحتوي على البلازميد المهجن، فإنه يمكن نقلها إلى طبق جديد للمحافظة عليها، والتكاثر. ويستفاد من قطع الـ DNA المنسوخة في القيام بالمزيد من البحوث أو التجارب عليها مثلاً إنتاج مكتبة الحمض الريبي النووي منقوص الأوكسجين أو محاولة استنتاج التسلسل النووي للقطعة). ويمكن الكشف عن البكتريا التي تحمل قطع الـ DNA المهجن وذلك بوضع IPTG (ISO- propylthiogalactoside) (مصدر لنسخ المورثة LacZ)، و ( -5 X gal (bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactopyranoside في وسط النمو. حيث تعمل هذه المواد على تلون البكتريا بلون أزرق وهو دليل على أن الحمض الريبي النووي منقوص الأوكسجين المهجن لم يدخل ضمن البكتريا، أما إذا تلونت البكتريا بلون أبيض فهو دليل على دخول الحمض الريبي النووي منقوص الأوكسجين المهجن إليها.

**مميزات الهندسة الوراثية:**

- 1- السرعة في نقل المورثات من كائن حي إلى آخر، وذلك بمرور أسابيع قليلة ومحددة بدلاً من الطريقة التقليدية والسائدة، والمتعارف عليها في تغيير التركيب المورثي، وباستعمال التهجين والتربية، والتي تحتاج إلى سنوات طويلة.
- 2- نقل المورثات بطرق مباشرة ومضمونة النتائج، حيث لا تسمح بنقل المورثات غير المرغوبة التي قد تكون مرتبطة بالصبغي والتي قد تنتقل بالطرق التقليدية مسببة لأهم مشاكل وعيوب طريقة التهجين والتربية العادية.
- 3- نقل المورثات بواسطة الهندسة الوراثية قضى على البعد النوعي بين الكائنات الحية، حيث يمكن نقل صفة وراثية مرغوبة ميكانيكياً من كائن حي إلى آخر حتى ولو لم يكن بينهما قرابة مثلاً نقل صفة من بكتريا إلى إنسان أو نبات (قمح مثلاً)، أو العكس، خلاف ما هو متبع بالطرق التقليدية لتربية النبات كالتهجين مثلاً والذي يتطلب وجود صلة قرابة بين الكائنين.
- 4- نقل مورثات خالية من الأمراض، وذات صفات وراثية مرغوبة، إلى كائنات حية جديدة تنقصها هذه الصفات.

**بعض تطبيقات الهندسة الوراثية**

**I : في الميدان الطبي و الصيدلي :** أهمها إنتاج بروتينات وهورمونات مهمة للإنسان بواسطة نقل المورث المسؤول عن إنتاجها من خلايا إنسان إلى خلايا أنواع من البكتيريا: على سبيل المثال \*إنتاج هرمون الأنسولين الخاص بمرض السكر في الدم. \*إنتاج هرمون النمو لزيادة الطول للأشخاص قصيري القامة. \*إنتاج لقاح التطعيم ضد مرض شلل الأطفال، و لقاح التطعيم ضد مرض الالتهاب الكبدي. \*إنتاج عامل التجلط رقم 8 الهام لمرضى سيولة الدم وإنتاج إنزيم يوروكينيز المذيب لجلطات الدم. \*إنتاج الفيتامينات مثل B<sub>2</sub>- B<sub>12</sub>- C- D.

\*إنتاج بروتين غذائي بتنمية البكتيريا على نفايات المزارع والمصانع لتتغذى عليها.

\*إنتاج مركبات الإنترفيرون المستخدمة في معالجة مرضى السرطان.

\*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 البيئية من خلال زيادة كمية الإنتاج وكذلك تحسين جودته بزيادة القيمة الغذائية وتحسين الطعم. \*أتاحت الهندسة الوراثية نقل جينات للنباتات لإكسابها صموداً أمام الآفات. \*إكساب النباتات صموداً أمام الظروف المناخية المحيطة بها في وسط التنمية، على سبيل المثال، إنتاج خيار مُهندَس يُحفظ جيداً في الثلاجة لمدة عدة أسابيع.

\*الإنتاج الصناعي لبروتينات سامة لمحاربة الحشرات الضارة. \*تحسين صفات النبات لإكسابه مناعة ضد الأمراض والقدرة على مقاومة الآفات للحد من استخدام المبيدات الكيميائية، التي تسبب أضراراً للبيئة، وزيادة الإنتاج. \*إنتاج أنواع جديدة من النباتات والبذور القادرة على مضاعفة الإنتاج، وتحمل الظروف البيئية من (ملوحة- جفاف- صقيع- والأراضي المشبعة بالماء). \*تعديل صفات الثمار لتحسين القيمة الغذائية، وتحمل ظروف النقل و التخزين. \* إنتاج مركبات الطعم والنكهة والأصباغ من الطحالب \* إنتاج نباتات مثبتة للأزوت

**III : في المجالات العسكرية:**

\*بعد ثورة إنتاج القنابل الذرية، تتسابق الدول الكبرى لإنشاء مراكز أبحاث النظم الجينية والتي تعتمد على جمع الكائنات الدقيقة من مصانع الأسلحة ومستودعات الذخيرة (بكتيريا تحلل الديناميت- بكتيريا تدمير الهيدروكربونات) ثم تنميتها في المعامل لعزل وتحليل النظم الوراثية لها وكذا للكائنات البيولوجية (المرضة- المدمرة- عوامل مطفرة سيئة...)، باستخدام نظم الحاسبات وإنتاج قنابل بيولوجية تحمل على الصواريخ لتفتك بالبشر دون وازع من ضمير تحقق بذلك بعض الدول مصالحتها من خلال ما يعرف بـ (حرب الجينات).

\*إنتاج بكتيريا مطعمة بجينات من فيروسات ممرضة، فنتكاثر البكتيريا مكونةً أجيال ممرضة، يتم تحميلها داخل كبسولات خاصة، ثم إطلاقها في مجتمع ما فتخرج البكتيريا وتتكاثر وتغزو 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.

**مخاطر الهندسة الوراثية**

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

\*تقليل التفاوت والتنوع الوراثي لدى النباتات الزراعية والحيوانات البيئية مما يؤدي الى مضاعفة حساسيتها للأمراض وتغيير 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. مثال: في أعقاب استعمال نباتات مُهندسة من نفس الجنس و في حالة كانت جميع أشجار كرم معين ذات تجانس وراثي وأعديت بمرض معين هي حساسة له، ستتضرر كل الأشجار . \*انتاج غير مقصود لنباتات أو حيوانات أو بكتيريا ضارة ذات صفات غير مرغوبة: على سبيل المثال: نقل جينات غير مرغوبة (كالصمود أمام مبيدات الأعشاب الضارة) من نباتات زراعية مُهندسة الى النباتات البرية من خلال تهجينات طبيعية غير مقصودة بين النباتات المهندسة والنباتات البرية، وبالتالي انتقال المورثات إلى أنواع نباتية غير مستهدفة وهكذا يمكن ان تتكون أنواع من الأعشاب الضارة والصامدة امام المبيدات أو هروب غير مقصود وبسبب الإهمال من مختبرات الأبحاث، لكائنات حية خطيرة كالبكتيريا المُهندسة الصامدة امام المضادات الحيوية. \*الاستخدام السيء: احتمال انتشار مقاومة للمضادات الحيوية التي يستخدمها الإنسان ، إنتاج 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 \*\*\*\*\*