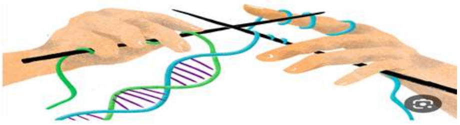
جامعة حماة
كلية الصيدلة
السنة الخامسة

ما هي الهندسة الوراثية، وما هي مجالات استعمالها؟ (1)

What is Genetic Engineering and What is used for?



المحاضرة الثالثة
الدكتورة ظلال محمد قطان

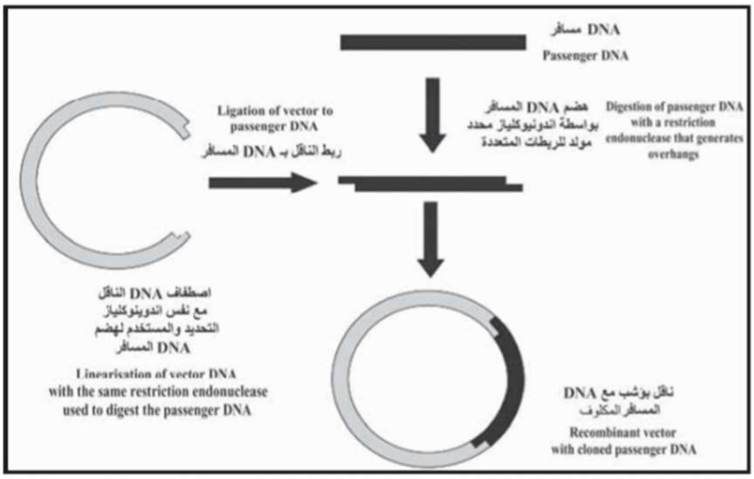
توقع العلماء في منتصف الستينات من القرن الماضي أن يصبح تحليل DNA والتلاعب به ممكناً بواسطة وسائل وأدوات الهندسة الوراثية مثل تقانة DNA المأشوب. وفي منتصف السبعينات بدأت تلك التوقعات تُثمر. من أهم المفاتيح لهذا العلم اكتشاف أنزيمات الاقتطاع (Restriction)، وأنزيمات التغيير (Modification) عند البكتريا من قبل العالم فيرنر أربر، مما وفّر أنزيمات قادرة على قطع DNA في مواقع محددة (Target sites). تُعرف هذه الأنزيمات بإسم أندونيوكلياز حصري (Restriction endonucleases) وتبسيطاً (Restriction enzymes).

استُثمرت تلك الأنزيمات سريعا في تحوير وتحليل DNA من مصادر مختلفة.

بعد تلك البداية المتواضعة، تم تطوير عدد من التقانات لتحوير وتحليل DNA و RNA بشكل أدق وأكثر فعالية، مثل تقانة سلسلة الـ DNA (DNA Sequencing)، والتصنيع الكيميائي لسلاسل نيوكليوتيد قصيرة، أوليغونيوكليوتيد (Oligonucleotide)، وتفاعل البلمرة المتسلسل PCR (Polymerase Chain Reaction). و بنفس الوقت ساهم بتطوير وتسهيل تلك التقانة توفُّر كميات كبيرة من المواد الكيميائية والكواشف (Reagent) والمعدات على مستوى صناعي بقيمة تتجاوز ملايين الدولارات.

لقد أدى قدوم تقانة DNA المأشوب إلى إمكانية تحليل DNA بدقة عالية لم يكن أحد يتخيلها قبل ذلك ببضع سنين فقط، وأدى بالتالي إلى إمكانية تحوير جينوم أي كائن حي (سواء كان بدائي النواة، أو أركيا، أو حقيقي النواة) لإنتاج مواد حيوية، والتي لم تكن تُنتج مسبقاً إلا في الخلايا الأصل. لقد سمحت هذه التقانة (المُبينة في الشكل 4) بإنتاج بعض البروتينات بكم ونوع غير مسبوقين ولم يتم التوصل إليهما من قبل.

ملاحظة: الأركيا (Archae) والتي تُسمى بالعتائق أو الجراثيم البدائية وهي كائنات وحيدة الخلية دون نواة (من بدائيات النوى)، تضم عدداً من الكائنات التي اعيش في ظروف قاسية جداً، مثل تلك التي تعيش في الينابيع الحارة و تختلف عن البكتريا بمادتها الوراثية و العمليات الحيوية.



الشكل 4: مخطط بياني للمبدأ الأساسي في الهندسة الوراثية باستعمال ناقل (Vector) و DNA منقول (Passenger)

الوسائل والأدوات الأساسية في الهندسة الوراثية

Basic tools of genetic engineering

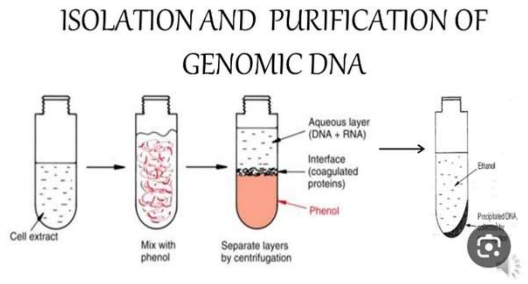
<u>أولاً- استخلاص وعزل الحمض النووي</u>

<u>Isolation and purification of nucleic acids</u>

1. **تكسير الخلايا بطرق ميكانيكية أو أنزيمية، الهدف إخراج المحتوى الذي يتضمن الأحماض النووية.**
2. **فصل الأحماض النووية عن المكونات الأخرى في الخلية، كالبروتين والكربوهيدرات المعقد كي نحصل على أحماض نووية ذات نقاوة مناسبة تسمح لأنزيمات تحوير الحمض النووي بالعمل.**

3. تُستخلص الأحماض النووية وتُجمع بواسطة عدة خطوات تنقيه تشمل جهاز الطرد المركزي (Centrifuge)، والرحلان الكهربائي.

4. الالتصــاق (Adsorption) علــى ســطح خامــل (Inset) غيــر قابــل للذوبان (Insoluble)، أو عبر عملية ترسيب باستعمال مذيب غير مــائي (Non-aqueous solvents).



الشكل 5

ثانياً- قطع جزيئات Cutting DNA Molecules DNA

تُشكل إمكانيــة قطــع DNA فــي مواضــع محــددة أو بشــكل عشــوائي إحــدى الضرورات للعديد من تقانات DNA المأشوب. يمكن قطع DNA بواسطة أنزيمات أو بطريقة ميكانيكية.

الطريقة الميكانيكيـة غيـر نوعيـة لأنهـا تـتم بشـكل غيـر محـدد وتُـنـتج قطعاً مختلفة مـن DNA ذات طول عشوائي يُستفاد منهـا عند تحضير مكتبـات جينيـة (Genomic Libraries).

باستعمال الطريقة الميكانيكية يصبح من الصعب عزل قطعة معينة تحتوي على مورث محدد أو على أوبرون (Operon). وعلى العكس يمكن عزل قطعة DNA محددة تحمل المورث المطلوب عند قطع DMA بأنزيمات الاقتطاع (الأنزيمات الحصرية) (Restriction enzymes) التي تقطع تسلسلاً معيناً في مواقع محددة على كلتا الجدلتين من dsDNA. عمل هذه الأنزيمات هو قطع روابط الفوسفو دي استر (Phosphodiester)، يؤدي هذا القطع إلى إنتاج طرفين لكل جديلة وهما 3َOH و 5َPO4.

تم عزل بضع مئات من تلك الأنزيمات من أنواع مختلفة من الجراثيم، صُنفت تلك الأنزيمات إلى أنواع ذات خصائص كيميائية حيوية مختلفة. النوع الثاني (type II) هو الأكثر استعمالاً في مجال الهندسة الوراثية.

تعتمد تسمية الأنزيمات الحصرية على نوع الخلية التي تم استخلاصها وعزلها منها. فمثلاً الأنزيم المُستخلص من بكتريا هيموفيلس إنفلونزا Haemophilus influenza يدعى Hin وذلك المعزول من عُصيات Bacillus amyloligrefacien يدعى Bam......الخ.

وإذا تم عزل أكثر من نوع أنزيم من سلالة واحدة، عندها تضاف الأرقام الرومانية بعد الاسم، على سبيل المثال: HindII HindI وHindIII وهي أنزيمات معزولة من *Haemophilus influenza* ومن سلالة Rd بالتحديد.

بخصوص أنزيمات النوع الثاني (type II)، يكون الموقع الحصري الذي يتعرف عليه هذا النوع من الأنزيمات قصير في معظم الحالات.

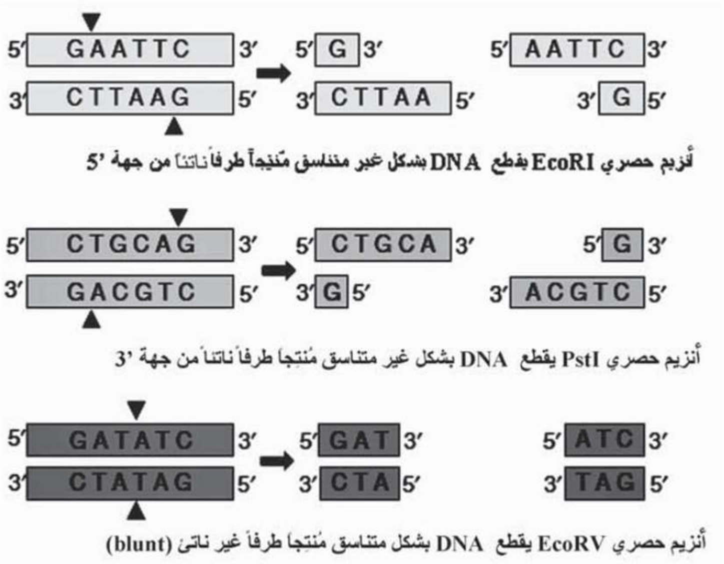
حيث يتراوح بين 4 و 6 أزواج من القواعد النتروجينية (القواعد النووية). يلعب طول الموقع الحصري (الموقع الحصري للقطع Restriction site) وتركيبته من النيوكليوتيدات (أي نسبة أزواج القواعد GC وAT)، والمقارنة بتركيبة بقية DNA دوراً لتحديد عدد مرات القطع أو "تردد القطع".

<u>على سبيل المثال:</u> في جزيء DNA مُكون عشوائياً وبنفس التردد من القواعد النيوكليوتيدية الأربع، في هكذا جزيء سيكون احتمال واحد لوجود تسلسل معين من أربعة قواعد في كل 256 bp أي (4^4)، وذلك كمعدل عام. بينما إذا بحثنا عن تسلسل من ستة قواعد فسيكون احتمال وجوده (بالمعدل) مرة واحدة كل 4096 pb (4^6).

في معظم الأحيان يتميز الموقع الحصري بنقطة تماثل، فهو متماثل ويسمى Palindromic (التسلسل معكوس يُقرأ بنفس الطريقة على الجدلتين)، أي إن التسلسل نفسه يُقرأ على كلتا الجدلتين في DNA، (الشكل 6).

يتم قطع الموقع الحصري وإنتاج أطراف غير ناتئة (Blunt) أو ناتئة (Overhang) حيث تبقى الأطراف المتراكبة القابلة للالتصاق (Cohesive) أحادية الجدلة (الشكل 6).

يبين الجدول في الشريحة 14، عدداً من الأنزيمات الشائعة الاستعمال ومواقع قطعها الحصرية.



الشكل 6: القطع الحصري للـ DNA على مواقع محددة بواسطة أندونيكلياز، يُنتج القَطع أطرافاً َ3 و َ5 قد تكون ناتئة أو غير ناتئة.

الموقع الحصري	المصدر	الأنزيم
GATCC ↓G	*Bacillus Amyloliquifaciens H*	BamHI
AATTC ↓G	*Escherichia coli RY13*	EcoRI
CC(T/A)GG↓	*Escherichia coli R245*	EcoRII
GG↓CC	*Haemophilus egyptius*	HaeIII
A↓AGCTT	*Haemophilus influenza Rd*	HindIII
GGTAC↓C	*Klebsiella pneumoniae*	KpnI
GC↓GGCCGC	*Nocardia otitidis-caviarum*	NotI
CTGCA↓G	*Piovidencia Stuartii*	PstI
↓GATC	*Staphylococcus aureus 3A*	Sau3A
CCC↓GGG	*Serratia marcescens*	SmaI

ثالثاً- لصق قطع DNA Joining DNA fragment:

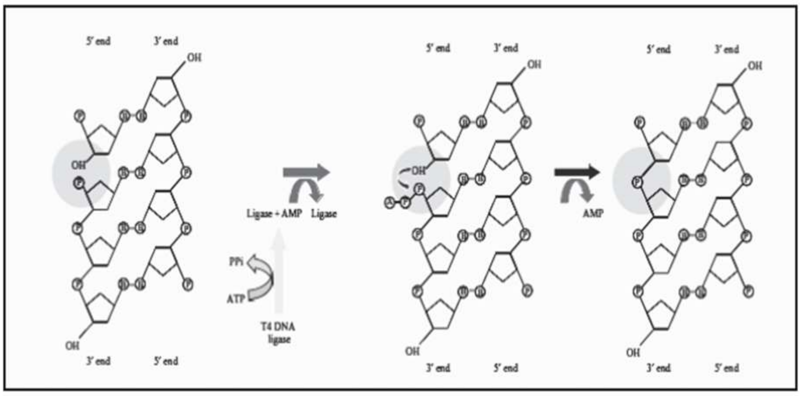
يمكن لصق قطع DNA ذات النهايات الناتئة والمتراكبة (Cohesive)، وأيضاً تلك غير الناتئة (Blunt). تتم هذه العملية مخبرياً In Vitro، بمساعدة أنزيم لصق DNA (DNA ligase). يُسهل هذا الأنزيم تكوين رابطة الفوسفو ثنائي الاستر (Phosphodiester) بين مجموعة 3َOH على طرف جدلة أولى ومجموعة 5َPO4 على طرف الجدلة الثانية. ويستعمل أنزيم لصق DNA (DNA ligase) المُستخرج من آكل الجراثيم T4 (T4 phage) بشكل شائع للصق النهايات الناتئة وغير الناتئة.

يحتاج أنزيم لصق T4 DNA لعامل مساعد (Co-factor) هو الـ ATP لكي يعمل، حيث يتم تنشيط الأنزيم من خلال ارتباطه مع الـ ATP لإنتاج

مركب وسطي (Enzyme AMP intermediary complex) الذي يلتحم بعدها بالأطراف 3َOH و 5َPO4 على نهايتي جدلتي DNA. فيصنع رابط تساهمي (Covalent) من الفوسفات ثنائي الاستر كما في الشكل رقم 7

تشمل عملية اللصق عادةً قطعة DNA المنقولة و جزيء الناقل (Vector)

وبهدف رفع احتمالية الالتحام بين جزيئات DNA للناقل والمنقول (بدون التحام بين جزيئات الناقل بعضها مع بعض وبدون انغلاق الجزيء الناقل على نفسه) يتم اعتماد التركيز المولي (لا تركيز الكتلة) بنسبة مول واحدة من الناقل إلى 10 مول من المنقول.



الشكل 7: النشاط المسرّع لأنزيم لاصق الـ DNA من ملتهم بكتيري T4

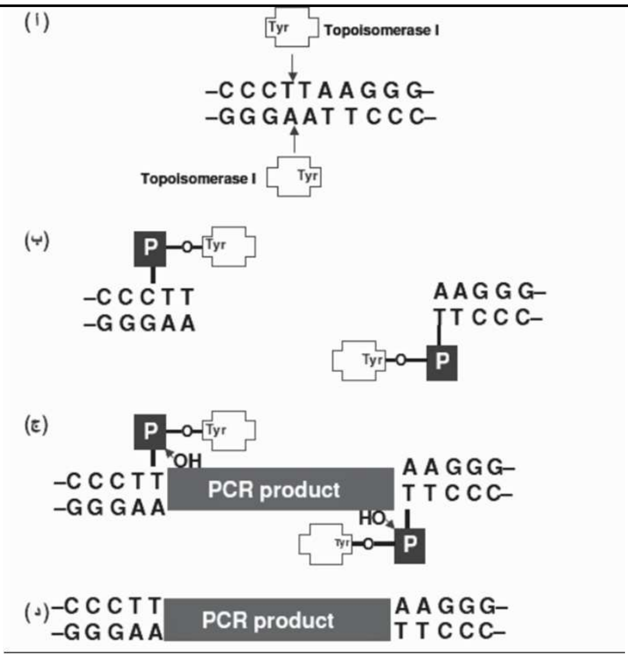
ويمكن أيضاً رفع ذلك الاحتمال إذا أُزيلت مجموعة الفوسفات من طرفي 5َ للـ DNA الناقل (في هيئته الخطية Linearised)، وذلك بمساعدة أنزيم قطع الفوسفات (Phosphatase) المُستخرج من أمعاء العجول (CIP أو Calf Intestinal Phosphatase). بما أن مجموعة الفوسفات (التي أُزيلت) ضرورية لالتحام طرفي الناقل مع بعضهما البعض، يستحيل إعادة لصق نهايتي الناقل مع بعضهما البعض وإرجاعه إلى شكله الدائري. وعليه فإن إزالة الفوسفات من DNA الناقل تزيد من فرصة التحام DNA المنقول معه، ذلك لأن هذا الأخير لا يزال يمتلك مجموعة فوسفات على طرفي 5َ، فسيكون DNA المنقول مصدر الفوسفات الضروري لعملية اللصق.

تُنتج هذه العملية جزيئات من DNA الناقل ثنائية الجديلة ودائرية، زُرع فيها DNA المنقول، وتحتوي كل جديلة على فجوة واحدة. وتُعدُّ تلك الجزيئات ثابتة بما يكفي لإدخالها، بعملية تحويل (Transformation)، إلى خلية انتساخ مُستقبلة حيث يتم إصلاح الفجوتين المتبقيتين.

إن تفاعل اللصق بمساعدة أنزيم لصق DNA من T4 هو ذو فعالية محدودة نسبياً (حوالي 60%) ويستغرق وقتاً طويلاً من 2 إلى 12 ساعة، خاصة عندما تكون أطراف DNA المراد لصقه غير ناتئة.

في السنوات الأخيرة تم إدخال تقانات جديدة بهدف تحسين كفاءة تفاعل اللصق.

على سبيل المثال، استخدام أنزيم توبويزوميراز I (Topoisomerase I) المستخرج من فيروس الفاكسينيا (*Vaccinia virus*)، الذي يقوم بدور أنزيم قطع حصري وأنزيم لصق بنفس الوقت (الشكل 8). يعمل هذا الأنزيم في الطبيعة على تحرير توتر الحلزنة والتفاف DNAعلى بعضه البعض، ويتميز بقدرته على تمييز التسلسل الخماسي 5(C/T)CCTT3َ وقطع جدلة واحدة فقط بعد هذا التسلسل مباشرة مما يسمح للـ DNA بالتخلص من الالتفافات الزائدة. وتعمل الطاقة المتحررة من عملية القطع هذه في تكون رابط فوسفوتايروسيل (Phosphotyrosyl) تساهمي (Covalent) بين الحمض الأميني تايروسين (Tyr) في الموقع 274 من سلسلة الأنزيم وطرف جديلة



الشكل 8

21

الدكتورة ظلال محمد قطان الفصل الأول 2023-2024

ثم يقوم طرف الجديلة 3́OH بعكس التفاعل من خلال مهاجمة رابط فوسفوتايروسيل على DNA الناقل مما يؤدي إلى تفاعل لصق ذي كفاءة عالية.

هناك طرق أخرى جديدة تم تطويرها لزيادة كفاءة الالتصاق خلال عملية تحويل DNA المنقول من ناقل أول إلى ناقل ثاني. إحدى هذه التقانات تعتمد على مميزات ميكانيكية في عملية استئصال ودمج تتم في موضع محدد التي توجد طبيعياً عند الملتهم البكتيري *E.Coli* ٨. فعندما يصيب الملتهم ٨ جرثومة *E.Coli* فإنه إما أن يدخل في حلقة انحلالية ينتج منها ولادة 200 نسخة من الملتهم، والتي تتم على حساب الخلية المضيفة، وإما أن يدخل في سبات أو حلقة مُنشئة للانحلال،

22

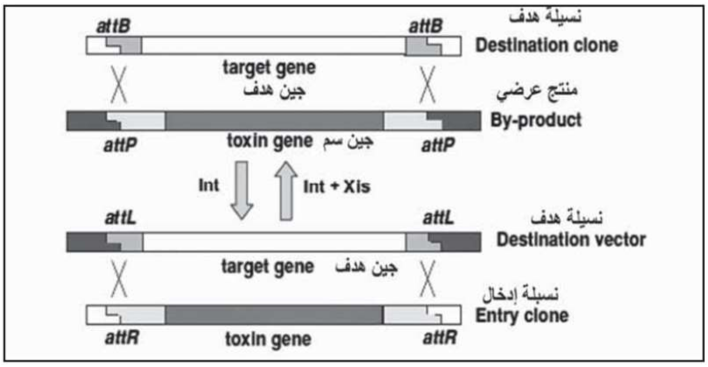
الدكتورة ظلال محمد قطان الفصل الأول 2023-2024

حيث يتحد فيها DNA الملتهم مع الكروموزوم البكتيري في موضع خاص يسمى att. تتم عملية الدمج بمساعدة أنزيم الاندماج أو انتغراز (Integrase) أو Int، الذي يفرزه الملتهم نفسه، ومن خلال تقاطع (عبور) في مواقع محددة بين كل من موقع attB على كروموزوم البكتريا مع attP على DNA الملتهم، فنحصل بذلك على attR وattL في موقع ارتباط جينوم البكتريا مع DNA الملتهم. إن هذا التفاعل منعكس (Reversible)، ولكن انعكاسه يتطلب عملاً مشتركاً بين كل من أنزيم الاندماج Int و أنزيم استئصال Xis تكمُن شفرته في DNA الملتهم. عندما تستخدم هذه الطريقة لنقل DNA بين الملتهم والخلايا المختلفة فإن DNA المستهدف (Target DNA) يتم دمجه بين موقعي

att للملتهم λ كما يبين الشكل (9)

(attB x attP↔ attl x attR). إن تحريك التفاعل باتجاه محدد يعتمد على إضافة إما Int أو Xis + Int وكذلك على المنتجات وتناسبها مع خلية *E.Coli* المضيفة.

ثم يتم انتقاء البلازميد المقصود والذي يحمل DNA المستهدف والمطلوب من خلال صفة المقاومة لمضاد حيوية معين. ولتفادي انتقاء البلازميد المقصود الأساسي (قبل دمج DNA المستهدف معه) فإن التسلسل الموضوع بين مواقع att هو جين فتاك يعطي سماً قاتلاً لبكتريا *E.Coli* .


attB
attB
نسيلة هدف
Destination clone
target gene
جين هدف
منتج عرضي
By-product
attP
toxin gene جين سم
attP
Int
Int + Xis
attL
attL
نسيلة هدف
Destination vector
target gene
جين هدف
نسيلة إدخال
Entry clone
attR
toxin gene
attR

الشكل 9