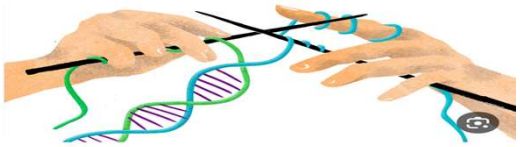
جامعة حماة
كلية الصيدلة
السنة الخامسة

تطبيقات التقانة الحيوية (4)

Applications of Biotechnology (4)



المحاضرة التاسعه
الدكتورة ظلال محمد قطان

استخدام تكنولوجيا الحين في الزراعة:

Gene Cloning and DNA Analysis in Agriculture

استخدام تكنولوجيا الجين في النبات :

معظم برامج التربية التقليدية للنبات تعتمد بشكل كبير على عنصر الصدفة في الحصول على اتحادات جديدة في النسل أو النباتات المهجنة الناتجة من التلقيح بين الآباء.

أيضاً إن استنباط صنف جديد يستغرق عادةً وقتاً طويلاً قد يصل إلى أكثر من عشر سنوات. وفضلاً عن ذلك فإن مربي النبات عادةً ما يشكو من وجود تلازم عكسي بين صفات جودة المحصول في نبات ما وبين كمية هذا المحصول.

ولذلك تقدم تكنولوجيا الجين أسلوباً متطوراً في تربية النبات حيث يمكن من خلالها إحداث تغيرات موجهة ومحددة في الطرز الوراثية للنبات بدلاً من الاعتماد على الصدفة.

كما أنها تتميز باختصار كبير من الوقت والمجهود يصل إلى نصف الوقت الذي تطلبه طرق التربية التقليدية.

<u>وتُستخدم إستراتيجيتين رئيستين لتكنولوجيا الجين في النبات:</u>

1- إضافة الجين Gene Addition: حيث تُستخدم كلونة الجين لتغيير بعض الصفات النباتية بإدخال جين أو جينات جديدة مسؤولة عن تحسين هذه الصفات.

2- طرح (حذف) الجين Gene Subtraction: ويؤدي استخدام تكنولوجيا الجين فيها إلى إيقاف نشاط جين أو أكثر داخل النبات.

<u>أولاً . إضافة الجين:</u>

<u>إنتاج نباتات مقاومة للحشرات:</u> أدت المخاوف الناجمة عن التوسع في استخدام المبيدات الكيماوية إلى اتجاه العلماء إلى تبني إستراتيجية استنباط أصناف من نباتات المحاصيل الحقلية كالذرة والقطن وغيرها ذات مقاومة ذاتية للحشرات بإدخال جين يشفر لبروتين سام بحيث تؤدي تغذية الحشرة عليه إلى هلاكها دون أن يؤثر ذلك على النبات نفسه. ومن أهم الجينات التي استُخدمت في هذا المجال هو جين Endotoxin الموجود في جينوم بكتريا *Bacillus thuringiensis* أطلق عليه Bt جين.

وقد وُجد أن البروتين الذي يُشفر له هذا الجين تصل درجة سميته إلى 80 ألف ضعف سمية المبيدات الكيماوية، كما يتميز بأنه انتقائي Selective بمعنى وجود سلالات بكتيرية مختلفة يتخصص كل منها في بروتينات فعالة ضد يرقات مجموعات معينة من الحشرات.

مثال:

السلالة	الحشرات المتأثرة
Cry I	يرقات حرشفية الأجنحة Lepidoptera
Cry II	يرقات حرشفية وثنائية الأجنحة Lepidoptera and Diptera
Cry VI	ثنائية الأجنحة Diptera
Cry V	دودة النيماتودا Nematoda

أُستخدمت تقنية تكنولوجيا الجين في نبات الذرة الشامية لمقاومة حشرة ثاقبات الذرة الأوربية European Corn Borer وقد استخدمت السلالة Cry 1A (b) المنتجة للبروتين السام والتي تحتوي على 1155 حمض أميني والتي تقع منطقة النشاط السمي فيها في القطعة الواقعة بين الأحماض الأمينية 29 إلى 706.

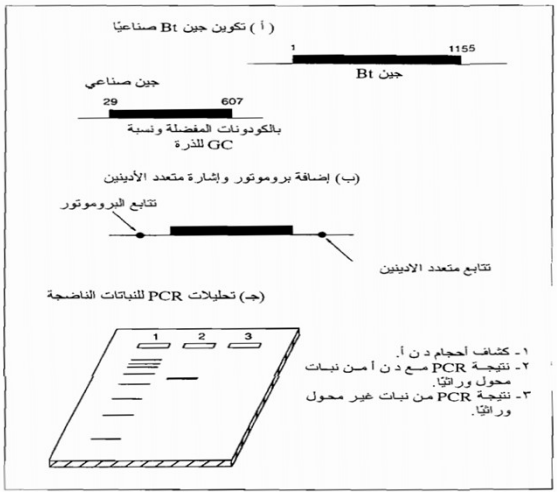
وقد تم تعديل الجين ليكون أكثر فاعلية حيث تم بناء سلسلة من النيوكليوتيدات صناعياً تشمل الكودونات من 29 إلى 706 حيث تبين أنها كافية لإعطاء التعبير الكامل للسمية. كما تم مراعاة استبدال الكودونات الموجودة في الجين الأصلي بتلك المفضل استخدامها في نبات الذرة (Codon Bais) وتمت زيادة نسبة GC إلى 65% بدلاً من 38%،

وتم اختبار Promotor القوي CaMV بخصوص قيادة التعبير الجيني.

حيث يتم إدخال الجين المكلون في أجنة الذرة بواسطة Microprojectile.

وتم فيما بعد إنماء هذه الأجنة لتصبح نبات كامل وتم التحقق من حدوث التحول الوراثي بنجاح بتقانة PCR وتم التأكد من نجاح إنتاج البروتين السام بواسطة تقانة Western Blotting.

كما نجحت تجارب اختبار التأكد من أن نبات الذرة المحول وراثياً يستطيع بالفعل مقاومة ثاقبات الذرة. أيضاً استخدمت نفس التقنية لنبات القطن والرز والبطاطس والطماطم وغيرها. ولم يقتصر الأمر على استخدام جين Bt لهذا الغرض بل استخدمت بروتينات سامة من مصادر نباتية مثل مثبطات Proteinase Inhibitors Enzymes.



الشكل45: الخطوات الرئيسية في الطريقة المستخدمة للحصول على نباتات ذرة شامية مهندسة وراثياً يحدث فيها تعبير جين صناعي للبروتين السام δ.(βt)

ثانياً. الطرح الجيني:

المقصود به ليس بحذف الجين أو إزالته ولكن إيقاف نشاطه في خلايا النبات الحي.

وإن استخدام تقانة RNA مضاد المعنى Antisense RNA Technology من أكثر التقنيات نجاحاً والتي أدت إلى إنتاج نباتات محولة وراثياً تُستخدم على نطاق تجاري.

استخدام RNA مضاد المعنى لتنظيم التعبير الجيني:

Antisense RNA and Regulation of Gene Expression:

تعتمد هذه الطريقة على بناء جزيئات من RNA متكاملة في التتابع مع mRNA الناتج من نسخ جين معين.

يُطلق على هذا الأخير اسم RNA ذو المعنى Sense RNA نظراً لأنه يحمل الكودونات التي تتم قراءتها أثناء عملية الترجمة لإنتاج بروتين فعال يحتوي على تتابع نوعي من الأحماض الأمينية.

ومن جهة أخرى، يُطلق على النسخة المُكملة من RNA مضاد المعنى Anti Sense نظراً لأن تتابع النيوكليوتيدات بها يكون معكوس بالنسبة للتتابع الموجود على النسخة الأصلية مما يترتب عليه عدم إمكان قراءة كودونات مشفرة صحيحة وذات معنى بل تقرأ على أنها كودونات إنهاء الترجمة في أي إطار قراءة من الإطارات الثلاث لها.

يؤدي وجود RNA Antisense مع mRNA الطبيعي لنفس الجين في سيتوبلازما الخلية إلى حدوث تجاذب نوعي بينهما بحيث ينتج جزيء

مزدوج هجين من mRNA. وبديهي أنه لا يمكن ترجمة مثل هذا الجزيء المزدوج مما يعني عدم الحصول على الناتج النهائي لتعبير هذا الجين (البروتين) وبالتالي يكون بمقدورنا تحديد وظيفة هذا الجين.

تتلخص طريقة إنتاج RNA Antisense لجين ما في الخلية كالآتي:

1- كَلونة الجين المطلوب دراسته.

2- فصل التتابع المشفر للجين عن منطقة البروموتور الخاص به باستخدام أنزيمات القطع المحددة المناسبة.

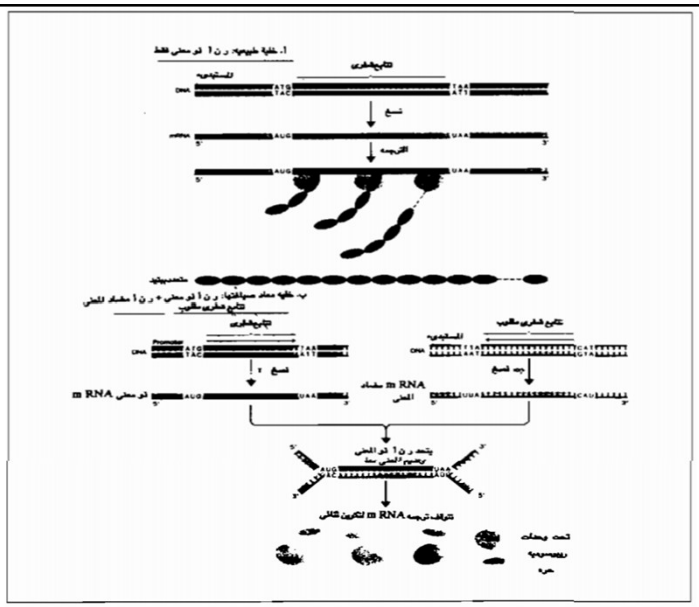
3- إعادة اتحاد التتابع المشفر للجين مع نفس البروموتور ولكن في اتجاه معكوس التتابع.

4- إعادة إدخال هذا التتابع المعكوس المتحد للبروموتور إلى الخلية المضيفة

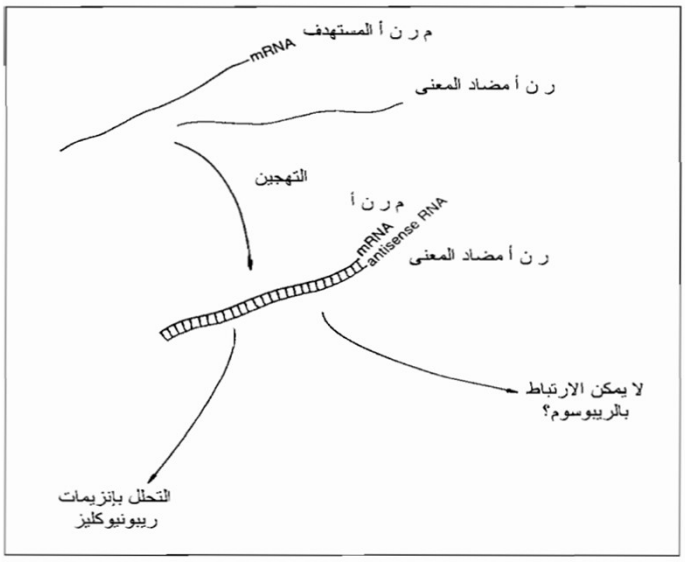
ويبين الشكل التالي خطوات هذه العملية ونتائجها وتكون المحصلة النهائية لهذه التقنية هي أن الجين المعكوس التتابع سيتم نسخه إلى نسخ من RNA Antisense وهذه بدورها عند اصطدامها بالنسخ الطبيعية لـ mRNA لنفس الجين (ذو المعنى Gene Sense) تتزاوج معها مكونة جزيء RNA مزدوج لا يمكن ترجمته مما يؤدي إلى توقف إنتاج البروتين الذي يشفر له هذا الجين.

ويتلخص تفسير ميكانيكية RNA Antisense في وقف أو منع ترجمة mRNA إما:- إلى أن RNA مزدوج السلسلة الناتج يحدث له تحلل سريع بواسطة أنزيمات ريبونيوكلياز.

أو:- RNA Antisense يمنع الريبوزومات من الارتباط مع RNA الفعال



الشكل46: رسم تخطيطي لاستخدام تقنية RNA Antisense لإيقاف التعبير الجيني



الشكل47: الميكانيكيات المقترحة لتثبيط تعبير الجين بواسطة RNA Antisense

وقد تم استخدام RNA Antisense في إيقاف تعبير عدد كبير من الجينات في كل من بدائيات النوى وحقيقيات النوى. وبالإضافة إلى استخدامه في إيقاف تعبير الجينات معروفة الوظيفة فإنه يمكن استخدامه أيضا في التعرف على وظيفة الجينات المجهولة الوظيفة.

إذ يمكن استخدام RNA Antisense في إنتاج طفرات وظيفية بحيث يعطي الشكل الظاهري الطافر للكائن الذي حدثت به هذه العملية، معلومات هامة عن وظيفة الجين في الخلية المتأثرة.

ولكي نضمن الحصول على إيقاف تام للتعبير الجيني فإنه إما أن يستخدم بروموتور قوي جداً لدفع عملية نسخ التتابع المشفر المعكوس، أو أن يتم إدخال عدد كبير من نسخ RNA Antisense إلى الخلية المضيفة.

وقد تم مؤخراً تطوير هذه التقنية بحيث اقتصر طول قطعة RNA Antisense (asRNA) على عدد محدود من التتابع النيوكليوتيدي المكمل لمنطقة محفوظة في RNA الطبيعي لا تزيد 25-30 نيوكليوتيدة إلا أنها تؤدي إلى نفس النتيجة.

استخدام asRNA لإنتاج ثمار طماطم طويلة العمر:

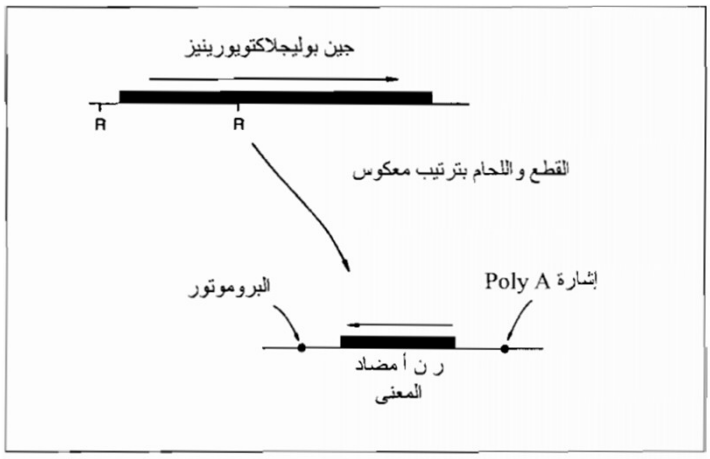
asRNA and The Engineering of Fruit Ripening in Tomato:

من المعروف أن ثمار الطماطم بعد النضج تكون قصيرة العمر وقابلة للتلف والعطب بعد أيام قليلة من قطفها، وقد تبين أن أحد أسباب ذلك يرجع إلى نشاط أنزيم Polygalacturonase الذي يقوم بتحليل حمض Polygalactouronic من جدر خلايا الثمرة مما يؤدي إلى خفض صلابتها

بالتـدريج وينتهـي الأمـر بتلـف أو عطـب ثمـار الطمـاطم وعـدم صـلاحيتها للاستخدام البشري.

ومـن هنـا نشـأت فكـرة وقـف تعبيـر الجـين المسؤول عـن هذا الأنـزيم بتقنيـة asRNA مما يؤدي إلى إطالة عمر الثمار قبل فسادها.

ويبين الشكل التالي تكوين جين Antisense Polygalactourinase حيث تم الحصول على قطعة قطع محددة بطول 730 قاعدة من النهايـة ´5 للجين الطبيعي للغلاكتويوريناز والذي يمثل حوالي نصف التتـابع المشفر الكامل. وتـم عكس اتجـاه هذه القطعـة ووضـعها مـع بروموتـور CaMV عنـد بدايـة تتـابع التسلسل، كمـا تـم إضـافة ذيل Poly A فـي النهايـة ´3 لهـذا التسلسل وتمت عملية التحول الوراثي بواسطة ناقل الكلونة pBIN19T1.



الشكل48: تكوين RNA Antisense للجين المشفر لأنزيم Polygalactourinase في الطماطم (R= موقع قطع محدد)

وقد تم بالفعل بطرق الوراثة الجزيئية التحقق من دخول الجين وإنتاج نسخ asRNA.

تم تقدير مستوى أنزيم Polygalacturinase في ثمار النبات المحولة ومقارنته بتلك الموجودة في ثمار النباتات غير المحولة (الطبيعية) حيث تبين أن مستوى بناء الأنزيم كان منخفضاً جداً في النباتات المحولة وراثياً. والأهم من ذلك أن ثمار الطماطم المحولة وراثياً أمكن تخزينها لمدد طويلة قبل فسادها مما يدل على asRNA لم يوقف تماماً تعبير جين Polygalacturinase إلا أنه أحدث خفض مؤثر في التعبير الجيني مما أدى إلى تأخير فساد الثمار لفترة أطول. وكان أول صنف تجاري تم تسويقه بهذه التقنية هو الصنف Flavor Savor.

<u>الأمان الحيوي والكائنات المعدلة وراثياً Biosafety and GMO:</u>

لا شك أن الكائنات المعدلة وراثياً سواء كانت نبات أو حيوان أو كائنات دقيقة قد ساهمت بشكل كبير في تقديم كثير من الحلول غير التقليدية لمشاكل كثيرة سواء بالنسبة للأمن الغذائي أو إنتاج مستحضرات دوائية أكثر فاعلية أو الحصول على لقاحات رخيصة وآمنة لعدد من الأمراض المعدية أو في مقاومة الآفات الزراعية وغيرها.

إلا أن البعض يرى أن استخدام مثل هذه الكائنات المعدلة وراثياً ينطوي على بعض المخاطر.

فمثلاً: في حالة الطماطم المعدلة وراثياً Flavar Savor يُستخدم ناقل تعبيري يحتوي على نسخة من المضاد الحيوي كناميسين Kan^R

كجين كاشف Marker Gene لمتابعة نجاح التحول الوراثي Transformation وهذا المضاد الحيوي ذو مصدر بكتيري ويشفر لأنزيم Neomycin Phosphotransferasee (نيومايسين فوسفوترانسفراز) ويوجد هذا الجين والأنزيم الناتج في جميع خلايا النبات المعدل وراثياً.

وقد برزت المخاوف من أن هذا الأنزيم قد يكون ضاراً للإنسان، وعلى الرغم من أن هذه المخاوف لم يعد لها ما يبررها بعد أن ثبت عدم صحتها بتجارب عديدة على نماذج حيوانية، إلا أنه مازالت هناك قضيتين متعلقتين بالأمان الحيوي بالنسبة للأغذية المعدلة وراثيا.

القضيتين هما:

1- هل من الممكن لجين KanR الموجود في هذه الأغذية أن ينتقل إلى البكتريا الموجودة في الجهاز الهضمي للإنسان ويحولها إلى بكتريا مقاومة للكانامايسين وغيره من المضادات الحيوية؟

2- هل يمكن لجين KanR أن ينتقل إلى كائنات أخرى في البيئة مما يؤدي إلى الإخلال بالنظام البيئي Ecosystem؟

وحتى الآن ما زال النقاش محتدماً بين مؤيد ومعارض، إلا أنه لو أخذنا بعين الاعتبار أن عمليات الهضم ستؤدي إلى تحطيم وهدم كامل لجميع جينات Kan^R في الغذاء المعدل وراثياً قبل أن تصل إلى الفلورا البكتيرية في القناة الهضمية، حتى لو لم يحدث هدم للجين فإن فرصة انتقاله للبكتريا ضئيلة جداً

إلا أن مستوى الخطورة لا يمكن أن يصل إلى الصفر بمعنى أنه لا يوجد معدل لانعدام الخطورة تماماً There is no zero risk factor وبالمثل وعلى الرغم من أن نتائج التجارب افترضت أن زراعة النباتات المعدلة وراثياً سيكون لها تأثير ضئيل جداً على البيئة نظراً لأن جينات Kan^R شائعة بالفعل في النظم البيئية الطبيعية، إلا أن إمكان حدوث بعض الاختلالات المستقبلية غير المنظورة لا يمكن إنكارها.

وقد أدت هذه المخاوف من استخدام Kan^R وغيره من المضادات الحيوية إلى استنباط طرق للتخلص من هذه الجينات لـ DNA النبات بعد التحقق من نجاح عملية التحول الوراثي.

ويستخدم في إحدى التقنيات أنزيم مصدره بكتريوفاج P1 ويسمى Cre والذي يؤدي نشاطه إلى استئصال تسلسل DNA المحاطة من طرفيها بتتابع التعرف Recognition Sequence مكون من 34 قاعدة. وفي هذه الحالة يتم إدخال نوعين من ناقلات التعبير إلى خلايا النبات بحيث يكون الأول محتوياً على الجين المرغوب ومعه الجين الكشاف Kan^R محاطاً بتتابع التعرف Cre بينما يحتوي Vector الثاني على جين Cre.

وبعد التحول الوراثي سيؤدي تعبير جين Cre إلى استئصال جين Kan^R من DNA النبات المحول.

المخاطر المحتملة على البيئة:

هناك أيضاً مخاوف من تأثير استخدام GMO على البيئة وقد برزت هذه المخاوف بصفة خاصة عند إنتاج نباتات معدلة وراثياً ومقاومة للفيروس، إذ أنه في مثل هذه الحالة تستخدم الجينات المشفرة للغطاء البروتيني للفيروس الممرض. ولا يؤدي تعبير هذه الجينات إلى ظهور أعراض مرضية ولكنه يعطي النبات بعض الحماية من الإصابة بالفيروس الحي.

وهناك مخاوف من أن النبات الذي يبني بروتين غطاء فيروسي ممرض، ربما يهاجم نوع آخر من الفيروس والذي يؤدي تكاثره إلى إنتاج نسل هجيني يحتوي على جينوم الفيروس المعدي معبأ في الغطاء البروتيني الذي يبنيه النبات.

وقد يكون النسل الهجيني محتوياً على صفات خطرة وغير متوقعة.

فمثلاً: من الممكن لبروتين الغطاء الجديد أن يوسع مدى العوائل Host Range للفيروس الثاني مما يمكنه من إصابة نباتات جديدة كانت مقاومة أصلاً للمرض الناتج.

كما أن هناك مخاوف حول ما إذا كان الجين المكلون في النبات المحول يمكنه الهروب والانتقال إلى نباتات برية، وإذا حدث ذلك فما هي حجم المخاطر المحتملة على النظام البيئي من جراء ذلك. هناك الكثير من البحوث التي تُجرى حالياً لإعطاء إجابات كافية لمثل هذه الأسئلة وغيرها سواء بالنسبة لحماية البيئة تحت إشراف وكالة حماية البيئة EPA أو بالنسبة للأغذية المعدلة وراثياً تحت إشراف هيئة الغذاء والدواء FDA.