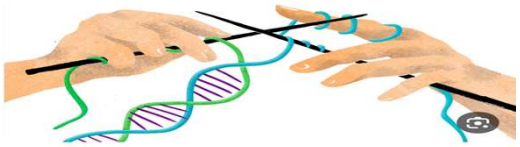
جامعة حماة
كلية الصيدلة
السنة الخامسة

تطبيقات التقانة الحيوية (1)

Applications of Biotechnology (1)



المحاضرة السادسه
الدكتورة ظلال محمد قطان

لقد أدت تكنولوجيا Recombinant DNA و Gene Cloning إلى انطلاق عصر جديد، وتوالى استخدام هذه التقانات في إنتاج الأدوية واللقاحات والكيماويات الصناعية والأغذية المُعدلة وراثياً.

كما تقوم تكنولوجيا الجين بدور كبير في مجال تشخيص وعلاج الأمراض الوراثية البشرية وتقليل تلوث البيئة وتحسين الإنتاج النباتي والحيواني كماً ونوعاً.

قبل استعراض بعض التطبيقات علينا التعرف على أنواع ناقلات الكلونة Cloning Vectors.

أنواع ناقلات الكلونة Cloning Vectors

1- البلازميدات Plasmids: تكون البلازميدات البكتيرية عادةً مكونة من جزيء صغير حلقي مزدوج من DNA والذي تكون وظيفته الطبيعية هي إكساب الخلية المُضيفة لصفة المناعة ضد بعض المضادات الحيوية.

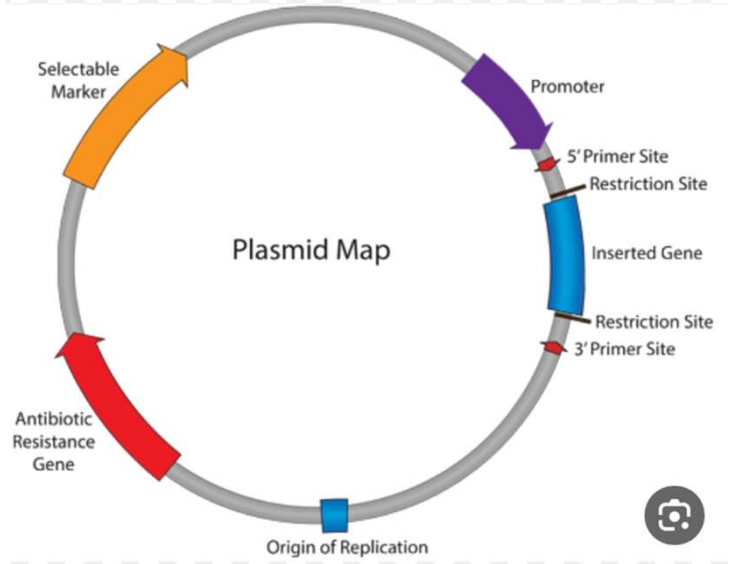
للبلازميدات عدة خواص تجعلها مفيدة جداً كناقلات للكلونة:

- توجد كنسخة واحدة أو عدة نسخ في البكتريا.

- تتابع القواعد في DNA البلازميد معروف بالكامل مما يتيح معرفة المكان الدقيق لنشاط القطع الأنزيمي والذي يتم فيه إدخال قطعة DNA المراد دراستها.

- البلازميد أصغر من كروموزوم الخلية المُضيفة يجعله من السهل عزله منها.

3 الدكتورة ظلال محمد قطان الفصل الأول 2023-2024



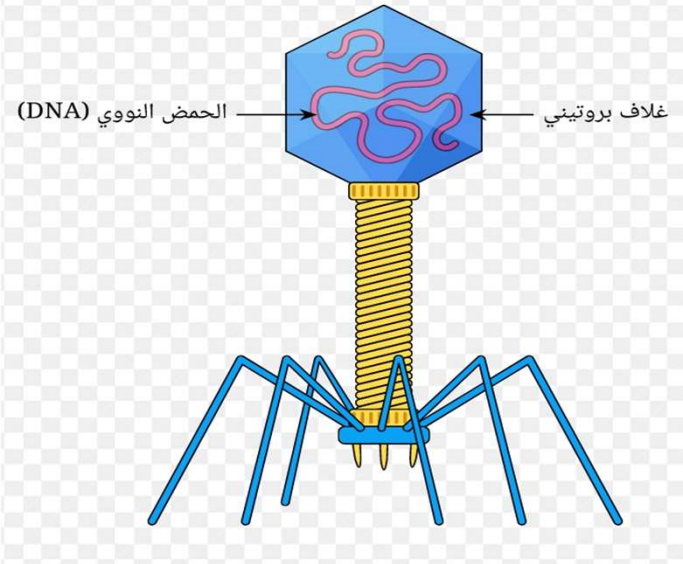
الشكل 27: البلازميد

4 الدكتورة ظلال محمد قطان الفصل الأول 2023-2024

2- الفاج: يتكون DNA الفاج من جزيء خطي من DNA الذي يمكن فيه إدخال القطع المرغوبة من DNA الجديد المراد دراسته في عدة مواقع للقطع الأنزيمي المُحدد.

فيما بعد يتم تجميع DNA الهجين (الكيميري) بعد أن يستكمل الفاج دورة التحلل للبكتريا Lyric Cycle وينتج وحدات فاج ناضجة مُعدية.

الميزة الرئيسية للناقلات من نوع الفاجات أنها تستطيع أن تُدخل قطعة DNA بطول يتراوح بين 10-20 كيلو قاعدة، بينما النواقل من نوع البلازميدات تستطيع إدخال قطعة أصغر بطول حوالي 1-10 كيلو قاعدة.



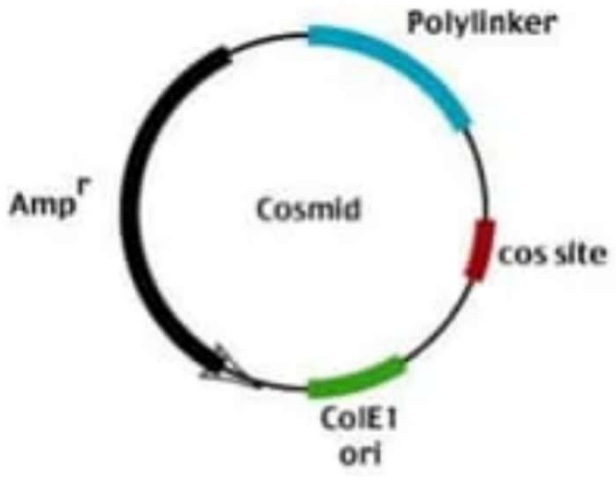
الشكل 28: البكتريوفاج

3- الكوزميد Cosmid: هي مجموعة من الناقلات يمكنها استقبال قطع أطول من الـ DNA وتكون ميزاتها أفضل من مميزات البلازميد والفاج معاً.

الكوزميد عبارة عن بلازميد يحتوي على تتابع من DNA يُسمى مواقع Cos (Cos sites) لتعبئة DNA لامبدا في حبيبة الفاج.

تنمو هذه الناقلات بصورة بلازميد في البكتريا، لكن حيث أن معظم DNA اللامبدا يتم استبعاده فإنه يُمكن إدخال قطع أكبر من DNA الكيميري في رأس الحبيبة الفيروسية.

يمكن للكوزميد أن يستوعب قطع DNA بطول 35 إلى 50 كيلو قاعدة.



الشكل 29: الكوزميد

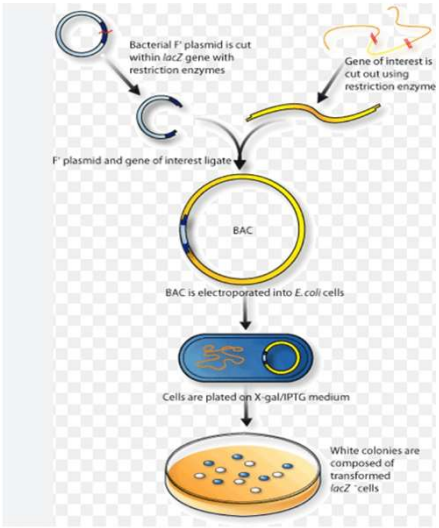
حديثا أُستُنبط ناقلات كلونة (Cloning vectors) لديها القدرة على استيعاب قطع DNA ذات أحجام كبيرة. من أهم هذه الناقلات:

4- الكروموزوم البكتري الصناعي:

Bacterial Artificial Chromosomes BACs

المُشتق من بلازميد F. ويستطيع هذا الناقل أخذ قطعة DNA بطول 300 إلى 600 كيلو قاعدة مما يؤدي إلى خفض عدد كلونات مكتبة الجينوم البشري إلى 30000 كلون فقط.

كما أُستُنبطت ناقلات تَجمع بين مزايا بكتريوفاج P1 وBACs ويُطلق عليها P1-Derived Artificial Chromosomes PACs وتصل سعة هذا الناقل إلى 300 كيلو قاعدة.



الشكل 30: BAC

من جهة أخرى أمكن تكوين ناقل ذو سعة كبيرة تصل من 600 إلى 1200 كيلو قاعدة ويطلق عليها Yeast Artificial Chromosome YACs وهو مشتق من بلازميد بكتريا القلون PBR322 مع إضافة عدد من جينات الخميرة إليه.

يبين الجدول التالي مقارنة بين سعة هذه الناقلات

الناقل vector	حجم د.ن.أ الذى يمكن ادخاله (kb)
Plasmid pBR 322	١٠ –٠,١
Lambda Phage 4 A	٢٠ – ١٠
Cosmids	٥٠ – ٣٥
BAC's	٦٠٠–٣٠٠
YAC's	١٢٠٠–٦٠٠
PAC's	٣٠٠

من تطبيقات تكنولوجيا الجين

إنتاج بروتينات معدلة وراثياً:

Production of Recombinant Proteins

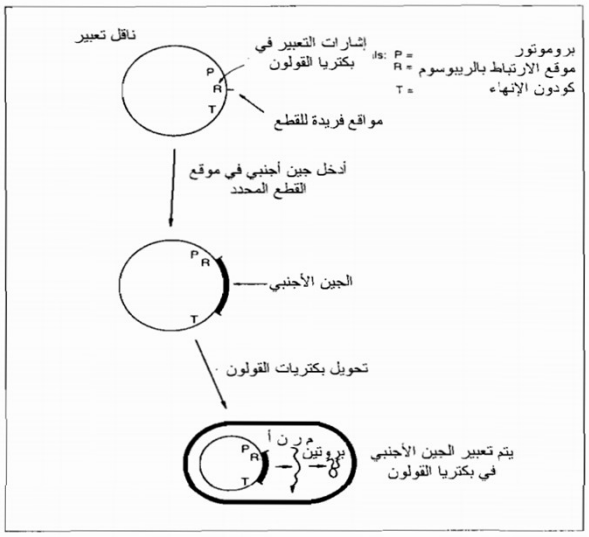
سبق الإشارة إلى أهمية هذه التكنولوجيا في إنتاج بروتينات معدلة وراثياً، ذات قيمة اقتصادية كبيرة مما أدى إلى نشأة مجال جديد من البيوتكنولوجي أطلق عليه هندسة البروتينات Protein Engineering. إلا انه قبل أن نتطرق إلى استعراض بعض الأمثلة عن التطبيقات، علينا التفريق بين نوعين من الناقلات وهما: ناقلات الكلونة Cloning Vectors وناقلات التعبير Expression Vectors والتي ينبغي أن تحتوي على بعض التتابعات التي تمكنها من إجراء عمليتي نسخ وترجمة الجين المكلون إلى البروتين المرغوب.

وتشمل هذه التتابعات:

1- تتابع المحرض (المحضض) Promoter والذي يكون تتابعه قبل الجين المطلوب Upstream.

2- تتابع الإنهاء Terminator والذي يحدد النقطة التي تنتهي عندها عملية نسخ الجين.

3- تتابع الارتباط بالريبوزوم Ribosome Binding Site وهو عبارة عن تتابع نيوكليوتيدي قصير يتعرف عليه الريبوزوم كنقطة ارتباط بجزيء mRNA ويقع كودون البدء AUG دائماً على بُعد نيوكليوتيدات قليلة بعد هذا الموقع Downstream.



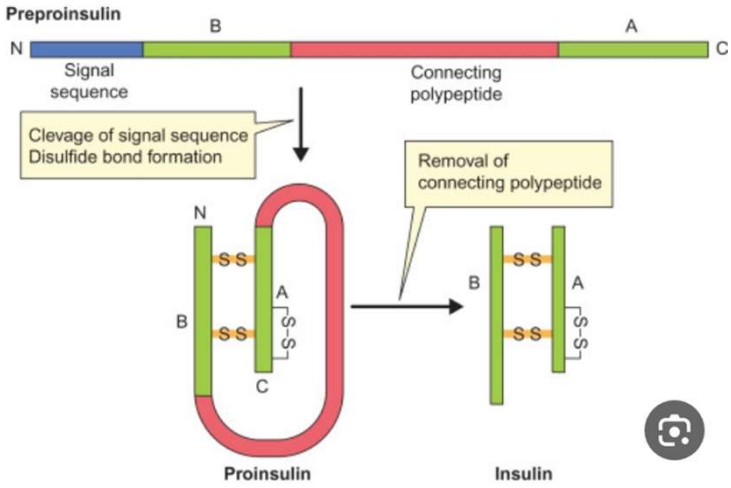
الشكل 31: استخدام ناقل تعبير للحصول على تعبير جين أجنبي في خلية بكتريا القولون

<u>أولاً- الأنسولين المعدل وراثياً Recombinant Insulin:</u>

يُنتج الأنسولين الطبيعي من مجموعة خلايا β في جزر لانغرهاس في البنكرياس البشري وهو يتحكم بمستوى الغلوكوز في الدم. ويؤدي نقص الأنسولين إلى الإصابة بمرض السكري Diabetes Mellitus والذي قد تؤدي تعقيداته إلى الموت إذا لم يتم علاجه. من حسن الحظ توجد بعض أنواع مرض السكري التي يمكن تقليل مضاعفاتها بالعلاج المُستمر بالحقن بالأنسولين لتعويض النقص في إنتاجه في خلايا الفرد المُصاب. <u>في الماضي</u>: كان مصدر الأنسولين عن طريق استخلاصه من بنكرياس الخنازير والأبقار. بالرغم من أن هذا الأنسولين الحيواني أعطى نتائج مقبولة، إلا أنه قد تنشأ بعض المشاكل الصحية لاستعماله في علاج مرض البول السكري في الإنسان.

<u>والسبب:</u> 1. نتيجة الاختلاف البسيط بين البروتينات الحيوانية والبشرية الذي قد يؤدي إلى ظهور بعض الأعراض الجانبية مثل الحساسية Allergy.
2. وأيضاً تَكمن في صعوبة تنقية الأنسولين الحيواني وإمكان وجود ملوثات خطرة يصعب التخلص منها.
يُعتبر الأنسولين مثالي لإنتاجه بتقانة Recombinant DNA في خلايا بكتريا القولون. إذ أن الأنسولين البشري لا يحدث له أي تعديل Modification بعد الترجمة (أي لا يُضاف إليه أي مجموعات إضافية مثل سلاسل الأوليغو السكرية.....).
كما أن جزيء الأنسولين صغير الحجم ويشتمل على سلسلتين ببتيديتين، الأولى مكونة من 21 حمض أميني (السلسلة A)،

والسلسلة الثانية مكونة من 30 حمض أميني (السلسة B) ويتم بناء هاتين السلسلتين كبادئ أنسولين يُسمى Preproinsulin والذي يحتوي على سلسلتي A و B معاً مرتبطتين بسلسلة ثالثة C ويسبقهم تتابع قائد Leader Sequence.
وتتم إزالة التتابع القائد وحذف السلسلة C بعد النسخ، وتبقى سلسلتي A و B مرتبطتين ببعضهما البعض برابطتين كبريتيتين Disulfide Bonds .

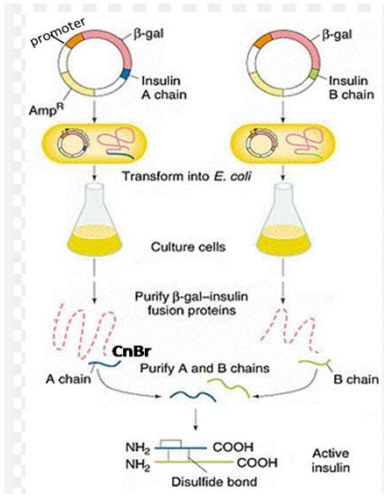


الشكل 32: تركيب جزيء الأنسولين من جزيء Preproinsulin

وقد أمكن بناء جين أنسولين صناعي وترجمته إلى بروتين الأنسولين الفعال.

عن طريق تكوين بلازميدين مؤشبين أحدهما يحتوي على الجين الصناعي الخاص بالسلسلة A والآخر يحتوي على جين السلسلة B.

وفي كل واحد تم وصل الجين الصناعي فيه بجين LacZ في ناقل تعبير Expression Vector من نوع PBR322 مما يجعل كل جين صناعي تحت تحكم بروموتور Lac القوي. ويتم ترجمة كل منهما كبروتين مندمج Fused Protein يتكون من الأحماض الأمينية الأولى من أنزيم β-Galactosidase مَتبوعة بسلسلة A أو B.



الشكل 33: بناء الأنسولين المؤشب باستخدام جينات صناعية لكل من سلسلتي A وB

وقد صُمم كل جين بحيث يكون الحمض الأميني الميثيونين يفصل بين β-Galac وسلسلة الأنسولين مما يمكن معه إزالة جزء β-Galac وفصلها عن سلسلة الأنسولين وذلك بالمعاملة بمادة Cyanogen Bromide(CBr) ويتم الارتباط بين سلسلة A و B برابطتين كبريتيتين تتم في المخبر. وقد أمكن تطوير عملية الأنسولين ببناء جين Proinsulin بحيث يشمل سلسلة A وB معاً وبالكامل.

يتميز بادئ الهرمون الناتج Prohormone بأنه يلتف ذاتياً Spontaneous Folding ليأخذ التركيب الصحيح بالروابط الكبريتيديه. ويمكن التخلص من سلسلة C بسهولة بتحليلها إنزيمياً.

ثانياً- إنتاج هرمون النمو البشري في خلايا بكتريا القولون

Synthesis of Growth Hormones in *E.coli*

في نفس الوقت تقريباً الذي أُنتج فيه هرمون الأنسولين في بكتريا القولون، كانت مجموعة أخرى من العلماء تعمل في مشروع لإنتاج هرموني النمو البشري:

سوماتوستاتين Somatostatin وسوماتوتروفين Somatotrophin.

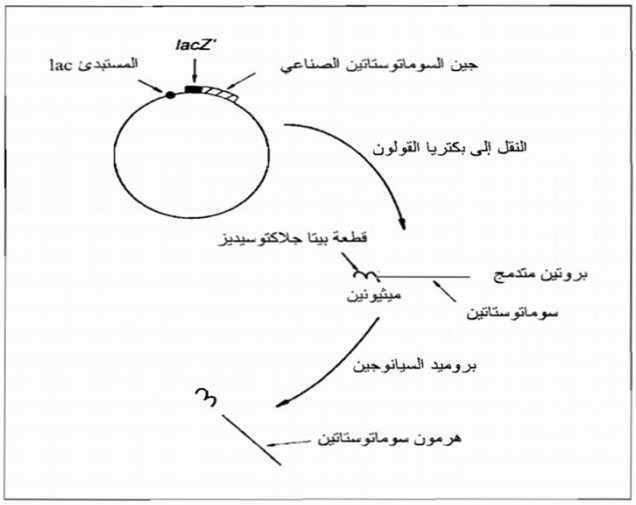
يعمل هذان الهرمونان بصورة مشتركة للتحكم في عمليات النمو في جسم الإنسان ويؤدي نقصهما إلى اختلال في نمو العظام Acromegaly والتقزم.

وكان هرمون سوماتوستاتين أول بروتين بشري يتم تكوينه في بكتريا القولون.

(إلا أن هرمون الأنسولين كان أول هرمون بشري يُصرح به على نطاق تجاري بعد موافقة هيئة الغذاء والدواء الأمريكية (FDA) ونظراً لأنه يتكون من سلسلة قصيرة من 14 حمض أميني فقط).

فقد كان من السهل بناء جين صناعي لهذا الهرمون.

أُستخدمت في إنتاج هذا الهرمون نفس الإستراتيجية التي سبق وضعها في إنتاج الأنسولين المؤشب بحيث أُدخل الجين الصناعي في ناقل التعبير LacZ وبناء بروتين مندمج Fusion Protein والقطع بمادة بروميد السيانوجين (CBr).



الشكل 34: إنتاج هرمون السوماتوستاتين المؤشب

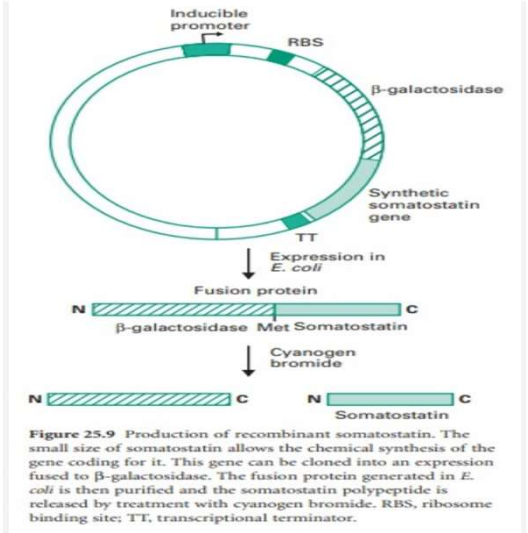


Figure 25.9 Production of recombinant somatostatin. The small size of somatostatin allows the chemical synthesis of the gene coding for it. This gene can be cloned into an expression fused to β-galactosidase. The fusion protein generated in *E. coli* is then purified and the somatostatin polypeptide is released by treatment with cyanogen bromide. RBS, ribosome binding site; TT, transcriptional terminator.

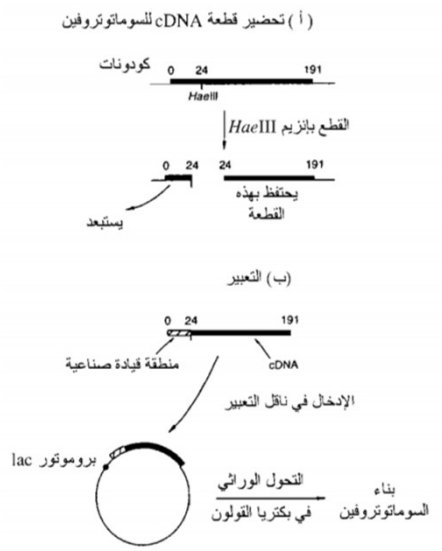
الشكل 35: إنتاج هرمون السوماتوستاتين المؤشب

ومن جهة أخرى ونظراً لأن هرمون السوماتوتروفين مكون من سلسلة طويلة نسبياً (191 حمض أميني) مُكافئة تقريباً لحوالي 600 زوج من القواعد النتروجينية.

فقد كان لابد من استخدام إستراتيجية مختلفة نظراً لأنه كان من الصعب في ذلك الوقت (أواخر السبعينات) بناء هذا الجين صناعياً بالكامل.

لذلك تم اعتماد cDNA من mRNA المُستخلص من الغدة النخامية للإنسان.

وتم قطع cDNA الناتج بأنزيم القطع HaeIII إلى قطعتين وكانت القطعة الأطول تحتوي على الكودونات من 24 إلى 191 وأُستُخدمت هذه القطعة لتكون البلازميد المُعدل في حين أُستُبدلت القطعة الصُغرى بجزيء DNA صناعي الذي اشتمل على نقطة بداية جين السوماتوتروفين، الذي احتوى على الإشارات الصحيحة لعملية الترجمة في بكتريا القولون وتم التحام هذا الجين المُعدل في ناقل تعبيري يحمل البروموتر Lac.



الشكل 36: إنتاج هرمون السوماتوتروفين المؤشب