مفهوم الهندسة الوراثية

المقدمة

شهدت حقول الوراثة وعلم الحياة الجزيئي والكيمياء الحياتية خلال العقدين الماضيين ثورة هائلة غيرت الكثير من المفاهيم الحياتية وفتحت أبواب واسعة لمعرفة الكثير من الاسرار الخفية التي لازالت تكتشف طبيعة الكائن الحي وخاصة على المستوى الوراثي ، لم تكن هذه الثورة وليدة اكتشاف تقنية مفردة او ناتجة عن انبثاق فكرة نظرية واحدة، وانما كانت نتيجة تطوير مجموعة من التقنيات تعرف بمجموعها بتقنية الهندسة الجينية Genetic engineering او تقنية الدنا الهجينة Recombinant DNA technology او تطويع الجين Gene manipulation ومحورها الأساس هو كلونة الجين Gene cloning .

وتعرف الهندسة الوراثية على انها : التلاعب بالمحتوى الوراثي لكائن معين من اجل تغيير صفاته الوراثية ، يشمل هذا التعريف العام كل الطرق التي من شانها تغيير البنى الوراثية للكائن مثل طرق تربية الحيوانات والنباتات والطرق الوراثية التقليدية الأخرى مثل احداث الطفرات الوراثية والتزاوجات في الاحياء المجهرية فضلا عن تقنيات الهندسة الوراثية الحديثة التي تعرف بتقنية الدنا الهجينة التي تعتمد على تكوين بنى وراثية جديدة عن طريق ربط مواد وراثية مختلفة في انابيب الاختبار (خارج الخلايا) .

لا تقتصر فائدة الهندسة الوراثية على انتاج كائنات هجينة ذات مواصفات مرغوبة فحسب ، فقد كانت وسيلة ممتازة للتعرف على الكثير من الاسرار العلمية وبالذات تلك التي تخص بناء ووظيفة الجين التي اغنت المعرفة الإنسانية بكثير من المعلومات التي ستكون بلا شك ذات فائدة كبيرة في التعرف على طبيعة الكائن الحي بشكل افضل

كلونة الجين

تعد كلونة الجين المحور الأساس في تقنية الهندسة الوراثية اذ تنقل من خلالها الجينات من كائن حي الى اخر ، ويمكن تعريف كلونة الجين على انها عملية تكوين اتحادات وراثية جديده عن طريق غرس جزيئات دنا (منتجه خارج الخلايا باي طريقة مناسبة) في بلازميد او فايروس او أي ناقل كلونه cloning vector مناسب ليتسنى إدخالها الى كائن اخر لا يحتوي اصلاً مثل هذه الجزيئات بحيث يمكنها الاستمرار في المضيف الجديد .

ويؤكد هذا التعريف على نقطتين مهمتين الأولى هي إمكانية ادخال قطعة دنا غريبة الى كائنات لا تحتويها أصلا وهذا يعني تجاوز حاجز النوع اذ يمكن نقل الجينات من كائن معين الى أي كائن اخر حتى لو كان يعود الى نوع مختلف تماما.

اما النقطة الثانية التي يؤكد عليها التعريف فهي إمكانية اكثار الجين المكون في مضيف الجديد والحصول على ملاين النسخ منه، حيث تحتوي كل خلية من خلايا المضيف على نسخة او اكثر من الجين المكلون. ان لعملية اكثار الجين فائدة كبيرة اذ يمكن من خلالها الحصول على كميات هايلة من الجين المرغوب ويمكن استعمالها لأغراض تحديد تتابع النيوكليوتيدات لذلك الجين DNA sequencing او اجراء عمليات التطفير خارج الخلايا in-vitro mutagenesis او التلاعب في

تتابع الجين للحصول على جين ذو مواصفات افضل من الجين الأصلي او لأغراض أخرى مفيدة في تقنيات الهندسة الوراثية.

الخطوات الأساسية في كلونة الجين

لاتمام عملية كلونة الجين يجب توفير وسائل مختلفة يمكن من خلالها الوصول الى الهدف المنشود ويوضح الشكل 1-1 مخطط لكلونة احد الجينات الحيوانية في خلية بكتريا ويلاحظ من هذا المخطط الوسائل المختلفة المطلوبة لإجراءات الكلونة المطلوبة وهذه الوسائل هي

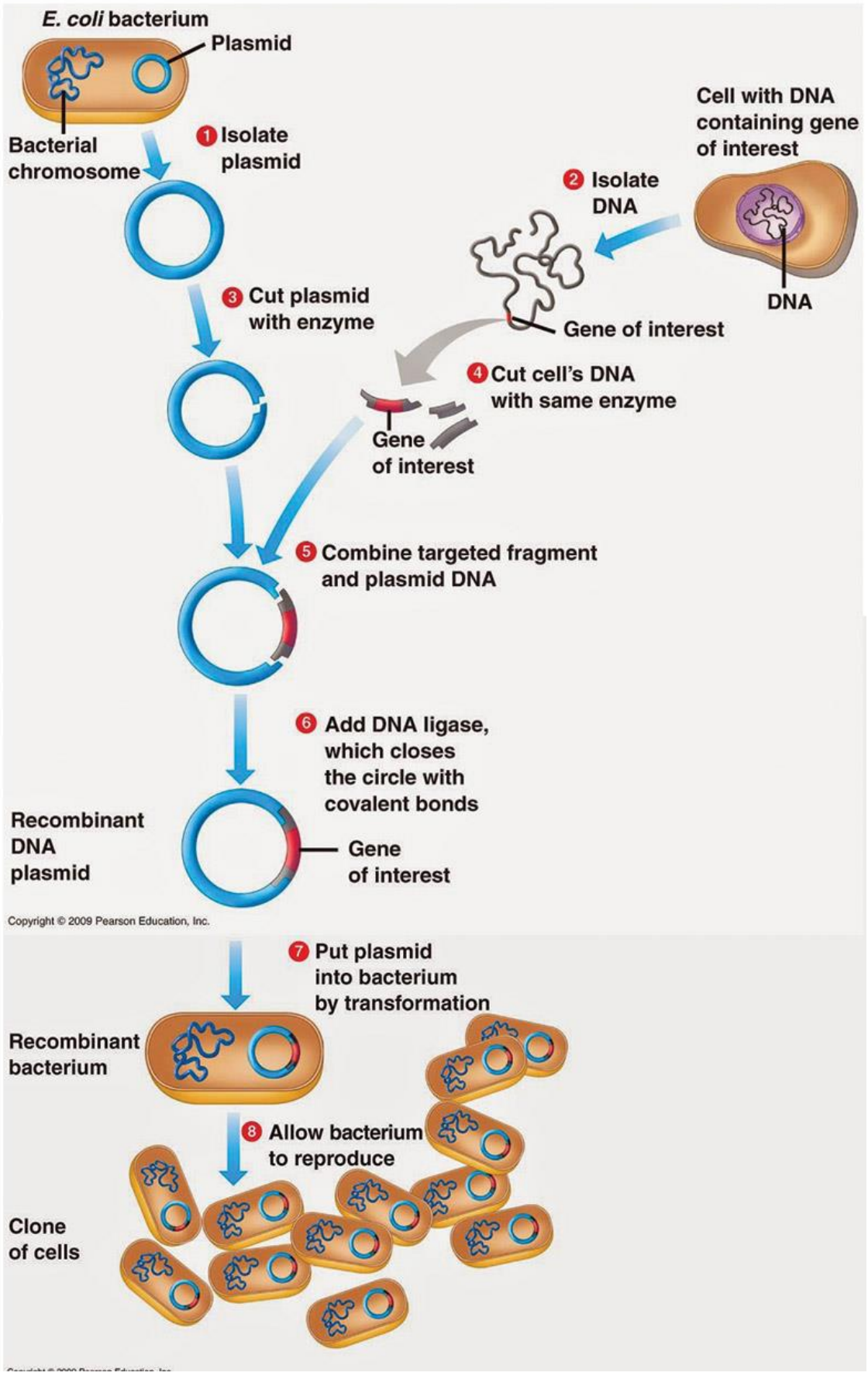
1- عزل وتنقية جزيئة الدنا المرغوب كلونتها، ويطلق على هذا الدنا مصطلح الدنا الغريبة foreign DNA او الدنا المسافرة passenger DNA او الدنا الهدف target DNA. طورت طرق عديدة لعزل الدنا الكروموسومي من الخلايا البكتيرية وخلايا حقيقية النواة وتعتمد جميعها على تكسير جدران الخلايا بشكل لا يؤثر على الكروموسومات ومن ثم فصلها عن باقي مكونات الخلية الأخرى باتباع طرق مختلفة تضمن الحصول على جزيئات الدنا بصورة نقية.
2- توفير ناقل كلونة مناسب والحصول عليه بصورة نقية ليتم ربط قطعة الدنا الغريبة بهذا الناقل، وتتوفر في الوقت الحاضر نواقل كلونة مختلفة يمكن استخدام المناسب منها حسب نوع التجربة ومعظم هذه النواقل مشتقة من البلازميدات والفايروسات. طورت طرق عديدة لعزل وتنقية نواقل الكلونة بحيث يمكن من خلالها الحصول على هذه النواقل بشكل نقي ملائم لتجارب الكلونة.
3- يجب توفر وسيلة مناسبة لتقطيع جزيئة الدنا الغريبة للحصول على قطعة دنا صغيرة قابلة للكلونة تحتوي على الجين المرغوب وكذلك لقطع ناقل الكلونة مرة واحدة لجعله مناسبا لاستقبال قطعة الدنا الغريبة. أصبحت عملية تقطيع جزيئات الدنا بشكل مسيطر عليه ممكنة بعد اكتشاف انزيمات التحييد Restriction enzymes في الخلايا البكتيرية. وهذه الانزيمات تتميز بقابليتها على التعرف على تتابعات معينة من النيوكليوتيدات في جزيئة الدنا، ومن ثم تقطع الجزيئة داخل او قرب هذه التتابعات لانتاج قطع دنا محددة الاطوال مما يعني إمكانية التحكم في عملية تقطيع جزيئات الدنا من خلال اختيار انزيم التقييد الملائم.
4- يجب توفر وسيلة مناسبة لربط قطع الدنا الغريبة مع ناقل الكلونة لتكوين الجزيئة الهجينة recombinant molecule، ان لاكتشاف انزيم اللحام Ligase الذي يعمل على ربط قطع الدنا مع بعضها عن طريق إعادة بناء الاصرة الفوسفاتية ثنائية الاستر أهمية كبيرة جدا لجعل ربط قطع الدنا المختلفة ممكنا، وبهذا اصبح بالإمكان ربط قطع دنا مشتقة من مصادر مختلفة لتكوين جزيئات هجينة لا توجد أصلا في الطبيعة.
5- يجب توفر وسيلة مناسبة لمراقبة عمليات تقطيع وربط جزيئات الدنا وذلك لانه من الضروري جدا معرفة فيما اذا كان انزيم التحييد المستعمل قادرا على تقطيع جزيئة الدنا ام لا قبل الاستمرار في التجربة كما انه من الضروري معرفة عدد قطع الدنا المرغوبة وتقدير حجومها لمعرفة صلاحيتها للكلونة، علاوة على ذلك فان التأكد من حدوث عملية الربط بين قطع الدنا الغريبة وناقل الكلونة يعد ضروريا جدا للاستمرار في التجربة.
6- يجب توفر وسيلة يمكن من خلالها ادخال جزيئات المهجنة الناتجة عن عمليات الربط الى خلايا الكائن المضيف بحيث يمكن لهذه الجزيئات ان تديم نفسها في داخل المضيف الجديد وتوارثها

بثبات عبر الأجيال المتعاقبة ومن اكثر الطرق المستخدمة في ادخال القطع المكلونة هي طريقة التحول Transformation وطريقة تحول العاثي Transduction فضلا عن طرق أخرى يمكن استخدامها في حالة تعذر استخدام الطريقتين السابقتين لاجل زيادة كفاءة ادخال الجزيئات الهجينة الى الخلايا المضيفة.

7- بعد ادخال الجزيئات الهجينة الى خلايا المضيف يجب توفر طريقة ملائمة لانتقاء الخلايا المستقبلة للجزيئة الهجينة الحاملة للجين المرغوب وتمييزها عن الاعداد الهائلة من الخلايا المستقبلة للجزيئات الهجينة الأخرى. طورت عدة طرق للانتقاء المباشر وغير المباشر التي يمكن من خلالها انتقاء الخلايا الهجينة المرغوبة بسهولة وكفاءة عالية.

8- بعد الحصول على الخلايا الحاوية على الجين المكلون يمكن انمائها في وسط زرعي مناسب للحصول على اعداد هائلة منها، وبمعنى اخر سيتم الحصول على اعداد هائلة من نسخ الجين المرغوب الذي يوجد بشكل نسخة واحدة في الكائن الأصلي وعندها سيكون من السهولة عزل الجين المكلون من هذه الخلايا والحصول عليه بكميات كبيرة مناسبة لاجراء الدراسات المختلفة عليه.

الشكل 1-1 خطوات كلونة الجين



التقنيات الأخرى

لا تقتصر تقنيات الهندسة الوراثية على تلك المستخدمة في تجارب الكلونة فحسب وانما تشمل تقنيات أخرى مهمة وضرورية لاكمال الصورة والوصول للهدف المنشود من تجارب الكلونة ، تستخدم هذه التقنيات عادة بعد الحصول على الجين المكلون بشكل نقي حيث يمكن من خلالها دراسة الجين المكلون من الناحية البنائية والوظيفية فضلا عن تطويعه بالشكل الذي يخدم هدف التجربة ، تضم هذه التقنيات تقنية تحديد تتابعات الدنا DNA sequencing التي يمكن بواسطتها تحديد تتابع نيوكليوتيدات الجين المكلون بشكل دقيق مما ساعد في كشف الكثير من الاسرار التي تحيط بتركيب الجين ووظيفته واعطت أجوبة واضحة حول العديد من التساؤلات التي كانت تدور حول طبيعة عمل الجينات ، من التقنيات الأخرى المهمة هي تقنية التطفير خارج الخلايا in-vitro mutagenesis التي يمكن بواسطتها احداث طفرة وراثية في الجين المكلون عن طريق احدى طرق التطفير التقليدية التي تحدث عادة داخل الخلايا و خضوعها الكامل لسيطرة الباحث ، اذ يمكن تغيير نيوكليوتيد واحد معين بدون التاثير على أي من التتابعات الأخرى وبهذا يمكن من خلال هذه التقنية الحصول على طفرات مرغوبة تغير من طبيعة الجين بالشكل الذي يريده الباحث ، وقد ساهمت هذه التقنية بتطوير معلوماتنا حول طبيعة ووظيفة الجين فضلا عن فائدتها في تحسين مواصفات الجين المكلون .

يمكن تطويع الجين المكلون باستعمال تقنيات أخرى لزيادة معدلات تعبيره الجيني Gene expression rate من اجل الحصول على كميات كبيرة من ناتجه وهذا هو احد الأهداف الرئيسية لتقنية الهندسة الوراثية.

تطبيقات الهندسة الوراثية

- تطبيقات طبية
- تطبيقات صناعية
- تطبيقات زراعية

التطبيقات الطبية

- استخدمت تقنيات الهندسة الوراثية في تشخيص الأمراض الوراثية ومن اهم هذه الامراض فقر الدم المنجلي والثلاسيميا وفي الكشف عن أمراض السرطانات كما انها تستخدم في تحديد القرابة بين الأشخاص اثبات النسب وفي التحقيق الاجرامي باستخدام طريقة بصمة الحامض النووي DNA-fingerprints

التطبيقات الصناعية

- باستخدام الهندسة الوراثية فقد تم التعرف على العديد من مواقع المورثات للكائنات المختلفة واصبح بالامكان عزلها و هندستها وراثيا ونقلها الى كائنات جديدة لغرض انتاج العديد من المركبات ذات الفائدة مثل إنتاج بعض المضادات الحيوية مثل البنسلين و السيفالوسبورين الستربتومايسين وايضا المثال الأشهر هو إنتاج الهرمونات مثل هرمون الأنسولين و هرمون النمو وكذلك انتاج اللقاحات وغيرها كما تم تصنيع أنواع مهمة من البروتينات و الأصباغ الغذائية الطبيعية

التطبيقات الزراعية

- استخدمت الهندسة الوراثية في تطوير نباتات مقاومة للفيروسات او الاصابات المرضية و نباتات مقاومة لمبيدات الأعشاب بالإضافة الى إنتاج نباتات تتميز بناتجها الوفير و انتاج ثمار مقاومة لظروف التسويق والخزن

مقدمة

تتطلب الهندسة الوراثية تقطيع الحامض النووي DNA وعزل القطع الناتجة لاختيار المناسب منها . كما قد تتطلب هذه العمليات تحوير هذه القطع لجعلها مناسبة أو معاملة هذه القطع لإضافة أو إزالة مجاميع كيميائية معينة أو لحامها مع ناقل مناسب أو قطع إضافية لزيادة كفاءة الهندسة . تتم جميع هذه العمليات عن طريق عمل مجموعة كبيرة من الأنزيمات التي يطلق عليها أنزيمات الهندسة الوراثية . وتعتبر هذه الأنزيمات من أكثر ركائز الهندسة الوراثية أهمية لما لها من دور كبير في عزل المورثات والتعرف على تركيبها . فمثلاً الخرائط الأنزيمية للمورثات تساعدنا في تمييز مواقع المورثات ومواقع الأنزيمات فيها . ويمكن من خلالها أيضاً اختيار الأنزيمات المناسبة لعزل مورثات معينة . وهكذا نجد أن الهندسة الوراثية في حقيقة الأمر بدأت مع بزوغ معرفة واكتشاف هذه الأنزيمات ونظراً لاختلاف وظائف هذه الأنزيمات فقد قسمت تبعاً لذلك إلى خمس مجاميع رئيسة هي :

1 . أنزيمات هدم الأحماض النووية

Nucleic acids hydrolysis enzymes or Nucleases

2 . أنزيمات اللحام Ligases

3 . أنزيمات البلمرة Polymerases

4 . أنزيمات التحوير Modifying enzymes

5 . أنزيمات إزالة الانطباق Toporsomerases

انزيمات هدم الأحماض النووية *Nucleases*

تعمل هذه الأنزيمات على استهداف رابطة الفسفور ثنائي الأستر Phospho-diester bonds التي تربط النيوكليوتيدات بعضها ببعض طولياً والتي تمثل العمود الفقري لسلاسل الأحماض النووية ، قسمت هذه الأنزيمات على مجموعتين هما :

أ . **أنزيمات الهدم الداخلي** Endonucleases : وهي أنزيمات الهدم التي تهاجم روابط الفوسفور ثنائي الأستر من داخل سلاسل الحامض النووي وتؤدي إلى إنتاج قطع مختلفة الحجم من الحامض النووي (الشكل 3-1) .

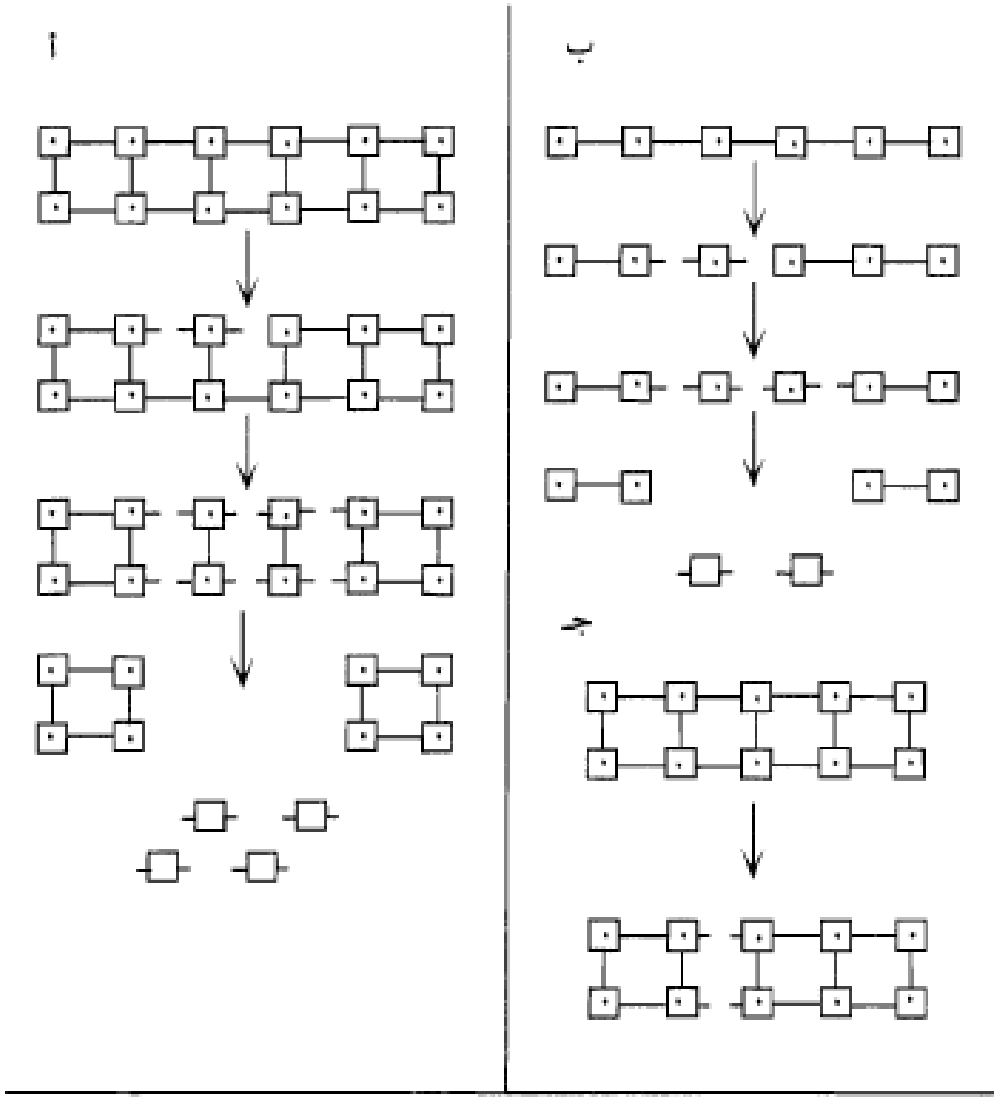
ب . **أنزيمات الهدم الخارجي** Eonucleases : وهي أنزيمات الهدم التي تهاجم روابط الفوسفور ثنائي الأستر في نهايات سلاسل الحامض النووي مؤدية إلى إنتاج وحدات مفردة على الأغلب من النيوكليوتيدات (الشكل 3-2) .

وفي كلتا المجموعتين فأنه يمكن وجود أنزيمات هدم خاصة بالحامض النووي DNA تدعى Deoxyribonucleases - DNases وأخرى خاصة بالحامض النووي RNA تدعى Ribonucleases- RNases .

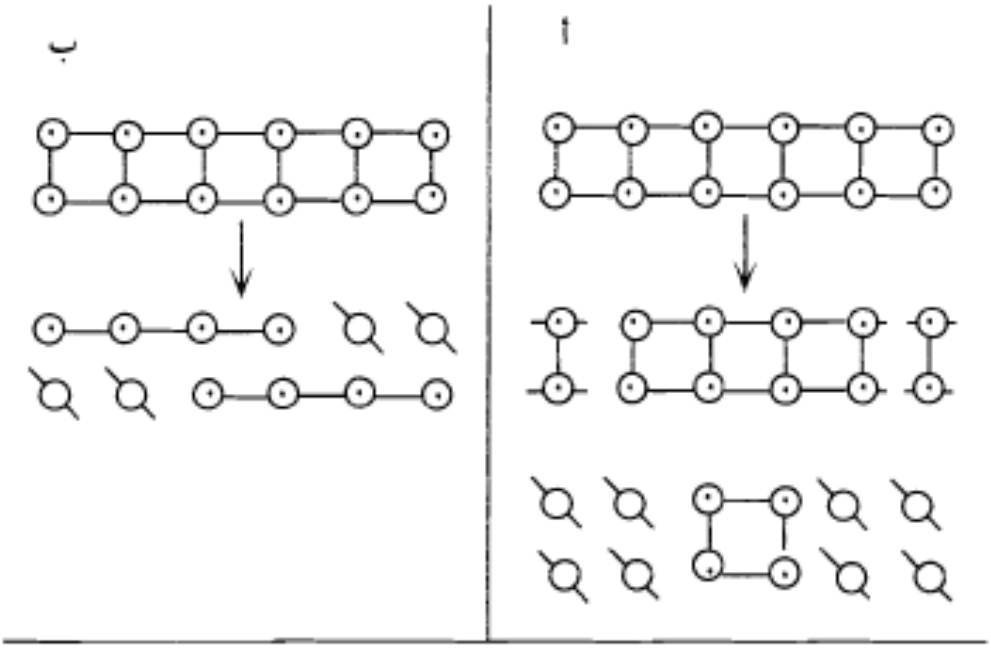
أنزيمات هدم الحامض النووي *RNases (RNA)*

استخلصت هذه الأنزيمات من مصادر مختلفة . فقد استخلصت ثلاثة أنواع من هذه الأنزيمات من بكتيريا القولون E.coli وهي RNase I الذي يعمل على هدم سلسلة الحامض النووي داخلياً أعتباراً من النهاية الثالثة لإنتاج قطع مؤلفة من نيوكليوتيده واحدة وأنزيم RNase II الذي يعمل على هدم سلسلة الحامض النووي داخلياً وخارجياً اعتباراً من النهاية الخامسة لإنتاج قطع مؤلفة من نيوكليوتيده مفردة وأنزيم RNase III الذي يعمل على الهدم الداخلي للمناطق المزدوجة من الحامض النووي .

كما تم استخلاص أنزيم هدم داخلي من بنكرياس الحيوانات سمي (RNase A) يهاجم داخلياً مواقع ارتباط البيرميدينات مع ذرة الكاربون الثالثة في السكر الخماسي ، حصراً لإنتاج قطع حامض نووي مؤلفا من نيوكليوتيدات بيرميدينية مفردة إضافة إلى قطع حامض نووي مختلفة الطول . كما تم عزل أنزيم هدم داخلي آخر من قطر الاسبرجلس Aspergillus oryzae سمي (RNase T1) يعمل على مهاجمة روابط الأستر الموجودة في مواقع نيوكليوتيدات تحتوي على الجوانين فقط ومن النهاية الخامسة .



(الشكل3-1): عمل انزيمات الهدم الداخلي. تستهدف هذه الأنزيمات اواصر السكر - فوسفات الداخلية لأشرطة الحامض النووي DNA المفردة او المزدوجة لإنتاج نيوكليوتيدات مفردة أو مزدوجة عن طريق تحطيم هذه الاشرطة (أ و ب) فيما تقوم أنزيمات أخرى بفك أصرة السكر - فوسفات بين زوج واحد من نيوكليوتيدات شريط مزدوج من الحامض النووي DNA (جـ) دون فصل النيوكليوتيدات عن الشريط.



(الشكل3-2) : عمل انزيمات الهدم الخارجي. تستهدف هذه الأنزيمات نفس الأواصر التي تستهدفها أنزيمات الهدم الداخلي الا انها تختلف عنها في الموقع الخارجي او الطرفي لعملها

أنزيمات هدم الحامض النووي *DNases -(DNA)*

تعمل هذه الأنزيمات على مهاجمة روابط الفوسفور ثنائي الأستر في سلاسل الحامض النووي DNA . وقد تم عزلها من أنواع مختلفة من الأحياء .

فقد وجد أن لبكتيريا القولون E.coli ثلاثة أنزيمات DNases خارجية الهدم أطلق عليها (Exonuclease I,II,III) . حيث يعمل الأنزيم الأول على مهاجمة روابط الأستر في السلاسل المفردة للحامض النووي DNA أو RNA مؤدياً الى تقطيعها الى وحدات ثلاثية النيوكليوتيدات ومن النهاية التي ترتبط فيها مجاميع الهيدروكسيل مع ذرة الكاربون الثالثة للسكر . بينما يهاجم الأنزيم الثاني السلاسل المزدوجة للحامض النوويDNA عند نفس مواقع عمل الأنزيم الأول . ويختص

الأنزيم الثالث في مهاجمة روابط الأستر في السلاسل الحلزونية المزدوجة من الحامض النوويDNA .

كما تم استخلاص نوعين من أنزيمات الهدم الداخلي وذلك من طحال وبعض غدد الحيوانات سميت بـ II و DNaseI . حذف يعمل الانزيم الأول DNase I على مهاجمة الروابط الداخلية للحامض النووي DNA مؤدياً إلى إنتاج وحدات لا يتجاوز طولها أربعة نيوكليوتيدات تحتوي كل وحدة منها على مجموعة فوسفات مرتبطة مع ذرة الكاربون الخامسة ومجموعة هيدروكسيل مرتبطة مع ذرة الكاربون الثالثة للسكر . بينما يعمل الأنزيم الثاني DNaseII المستخلص من الطحال والغدة الثيموسية لبعض الحيوانات على هدم الحامض النووي DNA داخلياً منتجاً وحدات لا يزيد طولها على ستة نيوكليوتيدات ترتبط مجاميع الهيدروكسيل فيها مع ذرة الكاربون الخامسة بينما ترتبط مجاميع الفوسفات مع ذرة الكاربون الثالثة .

وبالإضافة إلى هذه الأنزيمات فقد تم عزل مجموعة أخرى من أنزيمات الهدم الداخلي للحامض النووي DNA سميت بالأنزيمات المقيدة أو المحددة أو القاطعة Restriction enzymes أكثر تخصصاً من سابقاتها وأكثر أهمية في الهندسة الوراثية .

الأنزيمات المقيدة أو القاطعة

Restriction endonucleases or enzymes

يرجع تأريخ اكتشاف هذه الأنزيمات إلى عام 1962 حيث تم تفسير ظاهرة المناعة Host-controlled restriction التي تبديها بكتيريا القولون E.coli من السلالات K و E عند إصابتها بالعايثات الى وجود أجهزة تقييد تعمل على منع أو عرقلة نمو وتكاثر العاثيات .

تتألف هذه الأجهزه من مجموعة أنزيمات تعمل بطريقة ما على إتلاف المادة الوراثية للعاثيات أو تقييد فعاليتها . لذلك أطلق على هذه الأنزيمات بالأنزيمات المقيدة أو المحددة .

لقد وجد دوسيوكس و آربر Dussiox &Arber في عام 1962 أثناء عملهم مع بكتيريا القولون والعائي لامبدا بأنه يحدث انخفاض كبير في كفاءة إصابة العائي عندما يراد إصابة بكتيريا القولون سلاله K بعائيات معزولة من السلالة E أو العكس . وكذلك انخفاض في كفاءة الإصابة عند تربية عائيات معزولة من السلالةK في السلاله E وإعادة الإصابة للسلالةK أو العكس .

وقد عزيت هذه الظاهرة إلى الفعل المناعي للمضيف الأخير والمتمثل بتحديد فعالية العائيات عن طريق الأنزيمات المقيدة أو المحددة . كما فسر عدم تأثير هذه الأنزيمات في المادة الوراثية للمضيف بحصول تحوير في مواقع معينة وعلى طول المادة الوراثية للمضيف بحيث لا تتمكن هذه الأنزيمات من التأثير في المضيف . وقد وجد لاحقاً أن هذا التحوير يتمثل في المثيلة Methylation التي تتضمن إضافة مجاميع المثيل CH_3 -إلى مواقع عمل هذه الأنزيمات .

وعلى الرغم من معرفة آلية الفعل المناعي في البكتيريا اعتماداً على الأنزيمات المقيدة إلا أن فهم كيفية عمل هذه الآلية أستغرق سنوات طويلة بعد ذلك . وقد نال كل من آربر وسمث وناثان جائزة نوبل للعام 1978 كونهم اكتشفوا هذه الآلية التي تمثل أحد المفاتيح المهمة في الهندسة الوراثية . لقد تم عزل أنواع عديدة من الأنزيمات المقيده منذ العام1970 . ويصل عدد الأنزيمات المكتشفة لحد الآن أكثر من300 أنزيم قادرة على تمييز أكثر من 100 موقع تقييد أو قطع على المادة الوراثية .

أنواع الأنزيمات المقيدة أو القاطعة

قسمت هذه الأنزيمات اعتماداً على قدرتها على القطع المتخصص واحتياجاتها الكيميائية للقيام بوظائفها الى ثلاثة أنواع هي :

أولاً : الأنزيمات المقيدة – الطراز الأول Type I Restriction enzymes : وتشمل الأنزيمات الأولية المستخلصة من بكتيريا القولون السلالة K و E المصابة بالعائي لامبدا وتعمل هذه الأنزيمات على القطع العشوائي للحامض النووي DNA . ولوحظ بأن هذه الأنزيمات ترتبط في مواقع القطع ثم تبدأ بهدم السلاسل المزدوجة في اتجاه واحد لمسافة تتراوح بين 1000-5000 نيوكليوتيد ثم تبدأ بعدها بهدم سلسلة

مفردة لمسافة أخرى وتتوقف بعدها عن العمل . تحتاج هذه الأنزيمات لعوامل مساعدة مثل أيونات المغنيسيوم Mg^{+2} وجزيئة أدينوسين ثلاثي الفوسفات ATP وأدينوسيل ميثونين S-adenosyl . Methionine .

ثانياً : الأنزيمات المقيدة- الطراز الثاني Type II Restriction enzymes : تعتبر هذه المجموعة من الأنزيمات من أهم مجاميع أنزيمات التقييد لاستخدامها واسع النطاق في الهندسة الوراثية . تمتاز هذه الانزيمات بقدرتها على قطع الحامض النوويDNA عند مواقع معينة Restriction sites فقط بحيث تعطي عدداً ثابتاً من القطع لكل نوع من الأحياء . تستهدف هذه الأنزيمات ترددات معينة بحيث إنها تقوم بالقطع قبل أو بعد هذه الترددات مباشرة .

فمثلاً يمكن للأنزيم القاطع Eco R1 أن يتعرف على التردد 5´ G^AATTC´3 ويقوم بالقطع بين الجوانين والادنين من النهاية الخامسة . وهكذا فأن الأنزيم يقوم بقطع سلاسل الحامض النووي DNA في جميع المواقع التي تحتوي على هذا التردد . ويختلف عدد ترددات مواقع القطع التي تتعرف عليه الأنزيمات من أنزيم الى آخر ولكنها في الغالب تتراوح بين أربعة الى ستة ترددات (جدول 3-1) . ونظراً للأعداد الكبيرة التي أكتشفت من هذه الأنزيمات فأنه تم اقتراح نظام تسمية وضعه كل من سميث وناثان Smith & Nathan عام 1973 وعلى النحو التالي :

أ) يرمز لجنس الكائن الذي اكتشف فيه الأنزيم بالحرف الأول من اسم الأنزيم ويرمز لنوع الكائن بالحرفين الثاني والثالث من اسم النوع . فمثلاً الأنزيم المسمى Eco مأخوذ من البكتيريا E.coli فالحرف الأول من اسم الأنزيم مأخوذ من اسم جنس البكتيريا Eschericia والحرفان الثاني والثالث مأخوذان من اسم نوع البكتيريا coli .

وكذلك الحال بالنسبة للأنزيم Hin المأخوذ من اسم البكتيريا **Haemophilus influenzae** والأنزيم Hpa مأخوذ من اسم البكتيريا **Haemophilus parai mfluenzae** وكذلك الحال بالنسبة لبقية الأنزيمات .

(جدول 3) : بعض الأنزيمات المقيدة ومواقع التقييد والقطع الخاصة بها.

Aha III	TTT↓AAA
AsuI	G↓G (N) CC
Ava II	G↓G TCC
Alu I	AG↓CT
AvoI	C↓CCGGG. C↓TCGAG
AvrII	C↓CTAGG
Aluy II	GA↓CGTC.
Aha II	GG↓CGCC
AcyI	GG↓CGCC
	GA↓CGTC
Acc I	GT↓ATAC
	GT↓CGAC
Ata II	GACGT↓C
ApaI	GGGCC↓C
AsuII	TT↓CGAA
Bal I	TGG↓CCA
Bsr NI	CC↓TGG
Bst EII	G↓GT(N)ACC
Bbv I	GCAGC(N)8
	CGTCG(N)12
Bin I	GGATC(N)4
	CCTAG(N)5
Bgl II	A↓GATCT
Bsp PI	G↓CGCGC

Bam HI	G↓GATCC
Bde I	GGCGC↓C
BCII	T↓GATCC
Clo I	AT↓CGAT
ChI	T↓GGCCC
Dde I	C↓T(N)AG
DpnI	GA↓TC
EcoRII	↓CCTGG
EcoRI	G↓AATTC
EcoRV	GAT↓ATC
Fnv 4HI	GC↓(N)GC
Fok I	GGATG(N)9
	CCTAC(N)13
Fnv DII	CG↓CG
Hae I	TGG↓CCA
Hinf I	G↓A(N)TC
Hpa II	C↓CGG
Hae III	GG↓CC
Hha I	GC↓GC
HindIII	A↓AGCTT
Hap I	AGG↓CCT
Hae II	AGCGC↓T.GG CGC↓C
Hgr CI	G↓GCGCC.G↓GTACC
Hind II	GTC↓GAC
Hpa I	GTT↓AAC
Hund II	GTT↓AAC
HgI JII	GGGCC↓C
Hgr AI	GTGCA↓C
KpnI	GGTAC↓C

Mba I	⇩GATC
Mlu I	A⇩CGCGT
Mst I	TG⇩CGCA
Mst II	CC⇩T(N) AGG
Nru I	TC⇩GCGA
Nc II	CC⇩$\genfrac{}{}{0pt}{}{G}{C}$ GG
Nat I	GC⇩GGCCGC
Not I	GC⇩GGCCGC
Nsp CI	ACATG⇩T
Nsp BII	CAG⇩CTG. CCG⇩CGG
Nar I	GG⇩CGCC
Nae I	GCC⇩GGC
Pvu II	CAG⇩CTG
Pvv I	CGAT⇩CG
Pst I	CTGCA⇩G
Rso I	GT⇩AT
Sau I	CC⇩T (N) AGG
Sau 3A	⇩GATC
So NI	G⇩CGC
Stv I	AGG⇩CCT
ScaI	AGT⇩ACT
SmaI	CCC⇩GGG
Sac II	CCGC⇩GG
Sa II	G⇩TCGAC
SphI	GCATG⇩C
TaqI	T⇩CGA
Xmn I	GAA(NN⇩NN)TTC
Xho II	A⇩GATCT. G⇩GATCC
Xma I	C⇩CCGGG
Xma III	C⇩GGCCG
Xho I	C⇩TCGAG
Xba I	T⇩CTAGA

ب) في حالة إحتواء السلالة البكتيرية على بلازميد أو عاث فأنه يجب إضافة اسم البلازميد أو العاثي إلى اسم الأنزيم . فمثلاً في حالة الأنزيم Eco المشتق من أسم البكتيريا E.coli فأذا كانت البكتيريا تحتوي على البلازميدR1 فأن اسم الأنزيم يصبح EcoR1 وكذلك الحال بالنسبة للأنزيم Hind المستخرج من البكتيريا **H.influenzae** الحاوية على البلازميد Rd .

جـ) في حالة وجود أكثر من أنزيم لنفس النوع من البكتيريا فأنه تستخدم الأرقام الرومانية بعد نهاية الأسم كما هي الحال في الأنزيم EcoR1 و EcoRII و HindIو Hind II و Hind III .

ثالثاً : الأنزيمات المقيدة – الطراز الثالث Type III Restriction enzymes :

وهي أنزيمات وسط في صفاتها بين الطراز الأول والطراز الثاني الذي يحتاج أيونات المغنسيوم وجزيئات ATP وأدنيلات الميثونين . تقوم أنزيمات الطراز الثالث بالقطع في مواقع محدده وتحتاج إلى أيونات المغنيسيوم وجزيئات ATP إلا أن حاجتها لادنيلات الميثونين تكون جزئية .

مواقع عمل أنزيمات التقييد

كما ذكرنا سابقاً فأن أنزيمات التقييد- الطراز الثاني تمتلك مواقع معينة على الحامض النوويDNA تتخصص في قطعها . لكن تختلف هذه الأنزيمات في بعض الأمور فيما يخص طبيعية موقع التقييد أو القطع ومكان القطع ونواتجه . ومن أهم هذه الاختلافات ما يلي :

أولاً : من ملاحظة نواتج قطع بعض الأنزيمات فأنه يتبين بأن بعض هذه الأنزيمات يؤدي إلى إنتاج قطع ذات نهايات لزجة Cohesive or sticky ends بينما تنتج أنزيمات أخرى قطعاً ذات نهايات عمياء وغير لزجة Blunt ends . فمثلاً يقوم الأنزيم Bam H1 بتمييز موقع التردد 5´GGATCC3´ وقطعه بين الجوانين عند النهاية الخامسة منتجاً 5´-G و 3´-GATCC .

ب) في حالة إحتواء السلالة البكتيرية على بلازميد أو عاث فأنه يجب إضافة اسم البلازميد أو العاثي إلى اسم الأنزيم . فمثلاً في حالة الأنزيم Eco المشتق من أسم البكتيريا E.coli فأذا كانت البكتيريا تحتوي على البلازميدR1 فأن اسم الأنزيم يصبح EcoR1 وكذلك الحال بالنسبة للأنزيم Hind المستخرج من البكتيريا **H.influenzae** الحاوية على البلازميد Rd .

جـ) في حالة وجود أكثر من أنزيم لنفس النوع من البكتيريا فأنه تستخدم الأرقام الرومانية بعد نهاية الأسم كما هي الحال في الأنزيم EcoR1 و EcoRII و HindIو Hind II و Hind III .

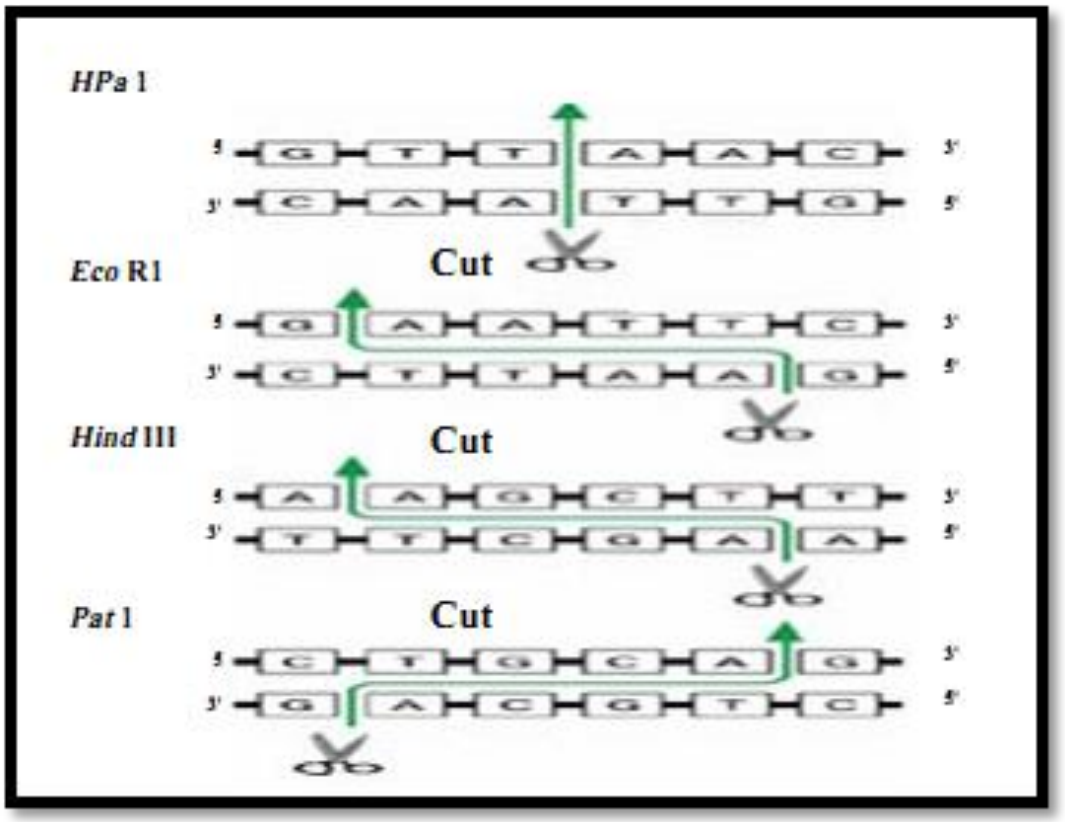
ثالثاً : الأنزيمات المقيدة – الطراز الثالث Type III Restriction enzymes :

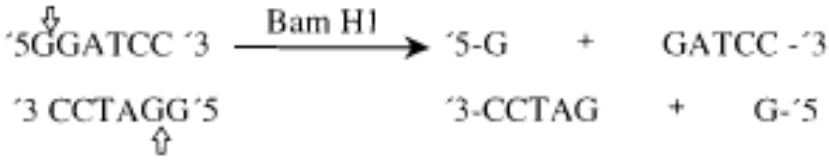
وهي أنزيمات وسط في صفاتها بين الطراز الأول والطراز الثاني الذي يحتاج أيونات المغنسيوم وجزيئات ATP وأدنيلات الميثونين . تقوم أنزيمات الطراز الثالث بالقطع في مواقع محدده وتحتاج إلى أيونات المغنيسيوم وجزيئات ATP إلا أن حاجتها لادنيلات الميثونين تكون جزئية .

مواقع عمل أنزيمات التقييد

كما ذكرنا سابقاً فأن أنزيمات التقييد- الطراز الثاني تمتلك مواقع معينة على الحامض النوويDNA تتخصص في قطعها . لكن تختلف هذه الأنزيمات في بعض الأمور فيما يخص طبيعية موقع التقييد أو القطع ومكان القطع ونواتجه . ومن أهم هذه الاختلافات ما يلي :

أولاً : من ملاحظة نواتج قطع بعض الأنزيمات فأنه يتبين بأن بعض هذه الأنزيمات يؤدي إلى إنتاج قطع ذات نهايات لزجة Cohesive or sticky ends بينما تنتج أنزيمات أخرى قطعاً ذات نهايات عمياء وغير لزجة Blunt ends . فمثلاً يقوم الأنزيم Bam H1 بتمييز موقع التردد 5´GGATCC3´ وقطعه بين الجوانين عند النهاية الخامسة منتجاً 5´-G و 3´-GATCC .

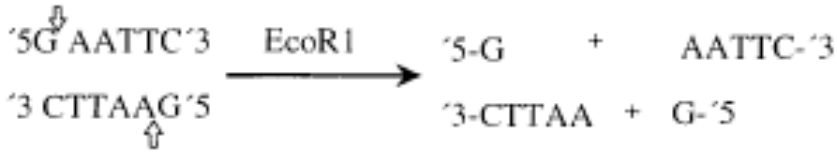

HPa 1
5' G T T A A C 3'
3' C A A T T G 5'
Cut
Eco R1
5' G A A T T C 3'
3' C T T A A G 5'
Hind III
Cut
5' A A G C T T 3'
3' T T C G A A 5'
Pat 1
Cut
5' C T G C A G 3'
3' G A C G T C 5'



´5GGATCC ´3 —Bam H1→ ´5-G + GATCC -´3

´3 CCTAGG´5 ´3-CCTAG + G-´5

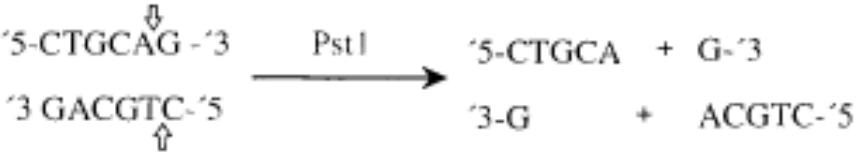
كما أن الأنزيم Eco R1 يميز موقع التردد ´5G*AATTC-´3 ويقوم بالقطع بين الجوانين والأدنين عند النهاية الخامسة منتجاً القطع التالية : ´5-G , AATTC-3.



´5G AATTC´3 —EcoR1→ ´5-G + AATTC-´3

´3 CTTAAG´5 ´3-CTTAA + G-´5

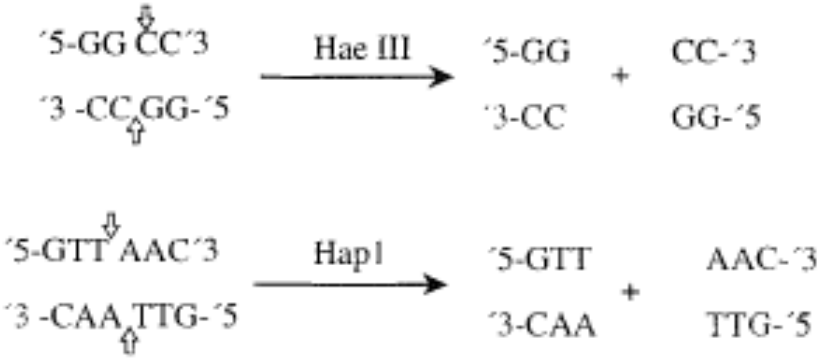
أما الأنزيم Pst1 فأنه يميز التردد ´5-ATGCA* G-´3 ويقطع بين الجوانين والأدنين عند النهاية الثالثة منتجاً القطع التالية :



´5-CTGCAG -´3 —Pst1→ ´5-CTGCA + G-´3

´3 GACGTC-´5 ´3-G + ACGTC-´5

ويلاحظ من القطع الناتجة عن عمل هذه الأنزيمات بأن نهايات القطع الناتجة تكون مكملة أو متممة Complementary مما يسمح لها بالالتصاق مرة أخرى لذلك تسمى هذه القطع بالقطع ذات النهايات اللزجة . ويعود إنتاج هذه النهايات إلى موقع القطع على سلسلتي مزودج الحامض النووي حيث يكون غير متناظر . أما في الأنزيمات Hpa1 و Hae III و Sma1 فأن مواقع القطع هذه تكون متناظرة تماماً كما يلاحظ مما يلي :



لذلك فأنه لا وجود للتكامل في نهايات القطع الناتجة وتدعى مثل هذه القطع بالقطع ذات النهايات العمياء لعدم قدرتها على الالتحام مره أخرى إلا بعد تحويرات معينة .

ثانياً : من ملاحظة القطع الناتجة من عمل الأنزيمات Bam H1 و Eco R1 والقطع الناتجة عن الأنزيم Pst1 فأنه يلاحظ بأن النتوءات الخاصة بالنهايات اللزجة مختلفة الاتجاه ، فمثلاً نتوءات القطع الناتجة عن الأنزيمات Bam H1 وEco R1 ممتدة من النهاية الثالثة بينما تكون ممتدة من النهاية الخامسة في القطع الناتجة من الأنزيم Pst1 .

ثالثاً : إن ترددات مواقع التقييد تختلف في عدد نيوكليوتيداتها . فبعض الأنزيمات يميز مواقع تقييد رباعية التردد وتقطع قبلها أو بعدها أو بينها كما هي الحال في الأنزيمات Mbo1 و HaeIII و Sau 3A .

Mbo1	´5-GATC-´3	HaeIII	´5- GGCC-´3
Sau 3A	´5-GATC -´3		

والبعض الآخر من الأنزيمات يميز مواقع تقييد خماسية التردد مثل الأنزيم

Avo II الذي يميـــز الموقع ´5-G⇩GTCC´3 والأنـــزيم EcoRII الذي يميـــز الموقع ´5-⇩CCAGG-´3 وغيرها من الأنزيمات .

وتكون معظم الأنزيمات الأخرى ذات مواقع تقييد سداسية التردد وتشذ عن ذلك مجموعة من الأنزيمات مثل الأنزيم HgaI الذي يميز الموقع ´5-⇩GACGA-´3 ويقوم بالقطع بعده بخمسة نيوكليوتيدات في السلسلة الاولى وعشرة نيوكليوتيدات في السلسلة الثانية .

´5-GACGC(N)$_5$⇩

´3⇧(N)$_{10}$ CAGCG´5

وكذلك الأنزيم BbvI الذي يقوم بالقطع بعد ثمانية نيوكليوتيدات من موقع التقييد ⇩8(N)´5-GCAGC في السلسلة الأولى وبعد أثني عشر نيوكليوتيد في السلسلة الثانية ´5 CGTCG $_{12}$(N)⇩´3 . هذا إضافة إلى أنزيمات أخرى (لاحظ جدول الأنزيمات المقيدة ومواقع عملها) .

رابعاً : أن معظم ترددات مواقع تقييد الأنزيمات هي ترددات بالندرومية Palindromes حيث يمكن قراءة تردد موقع التقييد بنفس الاتجاه في كلتا سلسلتي الحامض النووي . فمثلاً يمكن قراءة التردد ´5-GAATTC-´3 لموقع تقييد الأنزيم Eco R1 بنفس الاتجاه في سلسلتي الحامض النووي .

´5-GAATTC-´3

´3-CTTAAG-´5

إلا أن مواقع تقييد البعض الآخر منها غير بالندرومية مثل مواقع تقييد الأنزيمات BbVI و Bin I و Fok 1 حيث تختلف مواقع تقييد هذه الأنزيمات في سلسلتي الحامض النووي . فمثلاً يقطع الأنزيم BinI بعد أربعة نيوكليوتيدات من التردد ´5-CGATC(N)$_4$´3 في السلسلة الأولى وبعد خمسة نيوكليوتيدات من التردد في السلسلة الثانية ´5-CTAGC(N)$_5$-´3 .

خامساً : الاختلاف في قطع الحامض النووي الناتجة عن القطع بالأنزيمات . إن معظم الأنزيمات المقيدة ذات مواقع تقييد ثابتة لذلك فإن قطع الحامض النووي الناتجة عن فعل هذه الأنزيمات تكون ذات نهايات معروفة وثابتة ، فمثلاً القطع الناتجة من عمل الأنزيم EcoR1 تنتهي دائماً بالترددات التالية 5-G´ و3-CTTAA´ وكذلك الحال في معظم الأنزيمات . إلا أنه في أنزيمات أخرى مثل الأنزيم DdeI و HinfI و AsuI فإن نهايات القطع الناتجة عن نشاطها تكون مختلفة ذلك لأن هذه الأنزيمات تستطيع تمييز أكثر من موقع تقييد مختلف . فمثلاً الأنزيم DdeI يميز الترددات التالية كمواقع قطع له وهي 5-CTTAG-3´ و 5-CTGAG-3´ و5-CTCAG-3´ و 5-CTAAG-3´ ومن ملاحظة مواقع قطع هذا الأنزيم المؤشرة بالأسهم فأنه القطع الناتجة عن نشاطه ستكون بأربع نهايات مختلفة وهي :

5-C´	5-C´	5-C´	5-C´
3-GATTC و	3-GAGTC و	3-GACTC و	3-GAATC

ويلاحظ أن الاختلاف هنا هو دائماً في النيوكليوتيد الوسطي من النهاية الثالثة الناتئة .

والحال نفسه مع الأنزيم HinfI الذي يميز موقع التقييد 5-GANTC-3 (حيث إن N يمكن أن تكون A أو T أو C أو G) والأنزيم AsuI الذي يميز موقع التقييد 5-GGNCC-3 . كما أنه يمكن الحصول على قطع حامض نووي DNA بنهايات مختلفة عديدة كما هي الحال مع القطع الناتجة عن الأنزيم BglI الذي يميز موقع التقييد 5-GCCNNNNNNHC-3 والأنزيم XmnI الذي يميز موقع التقييد5-GAANN NNTTC-3 وغيرها من الأنزيمات.

سادساً : بعض الأنزيمات له مواقع تقييد مشتركة وقد تقطع هذه المواقع بنفس المكان أو أماكن مختلفة بنفس الموقع . تدعى هذه الأنزيمات بالأنزيمات المتناظرة Isoschizomers وقد تكون متناظرة تماماً Perfect isoschizomers عندما يكون مكان قطعها متشابهاً كما هي الحال مع الأنزيمات Hind III و Hsul والأنزيمات BamHI و Xho I .

Hind III, HsuI: ´5-AAGCTT-´3

Xho I, Bam HI: ´5-GGATCC -´3

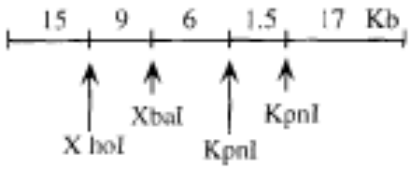
كما أن بعض الأنزيمات المتناظرة تكون غير تامة التناظر -Imperfect isoschiz omers حيث إن لها مواقع تقييد متشابهة وأماكن قطع مختلفة مثل الأنزيمات SmaI وXmaI والأنزيمات Sal I وHind II .

Sma I : ´5-CCCGGG-´3 Hind II: ´5-GTCGAC-´3

Xma I: ´5- CCC GGG-´3 Sal I : ´5-GTCGAC-´3

سابعاً : يمكن لعدد من الأنزيمات القاطعة أن تعمل في تردد مشترك لموقع تقييد معين حيث إن لكل منها موقع تقييد داخل التردد المشترك . فمثلاً الأنزيمات BamH I وMboI و Sau 3A تعمل على التردد 5´-GGATCC-´3 حيث يتمكن الأنزيمان MboI و Sau 3A من العمل على التردد الرباعي GATC الذي يقع ضمن التردد السداسي الذي يمثل موقع تقييد الأنزيم BamHI .

وكذلك الأنزيمات Alu I وHind III حيث يقطع الأنزيم الأول في التردد الرباعيAGCT الذي يقع ضمن التردد السداسي AAAGCTT الذي يمثل موقع تقييد الانزيم الثاني . أن هذه الأنزيمات تؤدي إلى إنتاج قطع حامض نووي لزجة النهايات لذلك فأنه من المحتمل أن يتم استخدام قطع حامض نووي ناتجة عن أحد هذه الأنزيمات وهندستها في ناقل مقطوع بأنزيم آخر من نفس هذه المجموعة . وقد يؤدي ذلك الى فقدان موقع تقييد أحد هذه الأنزيمات وربما كليهما .



أنزيمات اللحام *Ligases*

تعمل هذه الأنزيمات على إعادة روابط الفوسفور ثنائي الأستر بين النيوكليوتيدات . وهي بهذه الوظيفة تكون على عكس وظيفة الأنزيمات القاطعة أو المقيدة التي تحطم هذه الروابط . يتوفر نوعان من هذه الأنزيمات هما DNA Ligase المعزول من أنواع مختلفة من الكائنات الحية ويعمل هذا الأنزيم على إعادة ارتباط قطع الحامض النووي ذات النهايات اللزجة فقط ويحتاج الى العامل المساعد NAD^+ في هذه العملية . أما الأنزيم الآخر فهو الأنزيم T4 Ligase المعزول من العائي T4 بعد إصابته لبكتيريا القولون E.coli . يتميز هذا الأنزيم عن الأنزيم الأول في أن له القدرة على إعادة التحام قطع الحامض النووي ذي النهايات اللزجة أو العمياء على حد سواء . إضافة إلى احتياجه للعامل المساعد ATP لاتمام عمله . ونظراً لعزل المورثات المشفرة لهذه الأنزيمات فقد تم هندستها وراثياً وأصبح بالإمكان الحصول على كميات كبيرة منه مختبرياً وبطرق سهلة نسبياً .

إن الوظيفة الطبيعية لأنزيمات اللحام في الخلايا الحية هي لحام مناطق مجاميع الهيدروكسيل في النهاية الثالثة 3-OH في النيوكليوتيدات مع مجاميع الفوسفات في النهاية الخامسة 5-P للنيوكليوتيدات المجاورة لها وتكوين روابط الفوسفور ثنائية الأستر وذلك أثناء تضاعف الحامض النووي DNA . كما أن لها نفس الدور أثناء عمليات تصليح الحامض النووي DNA Repair حيث تقوم هذه الأنزيمات بتكوين روابط فوسفات ثنائي الأستر بين النيوكليوتيدات المستصلحة . وتحتاج هذه الأنزيمات في سبيل إقامة هذه الروابط الى عوامل مساعده تتحول كيميائياً إلى مركب الأدنين أحادي الفوسفات AMP Adenosine monophosphate الذي يرتبط مع الأنزيم محفزاً إياه على توليد هذه الروابط .

لا تعمل أنزيمات اللحام على توليد الروابط الهيدروجينية التي تربط القواعد النتروجينية للنيوكليوتيدات المتكاملة لشريطي الحامض النووي DNA بل أنها تعمل فقط على تكوين روابط الأستر النهائية في موقع الالتحام . كما أن أنزيمات اللحام لاتعمل إلا بعد التقاء النهايات الصحيحة وهو ما تحدده الصدفة . لذلك فأنه يستخدم تركيز عالٍ من الحامض النووي مختبرياً في عمليات اللحام لزيادة هذه الفرصة وخصوصاً عندما تكون نهايات القطع عمياء .

بينما تكون فرصة الالتقاء الصحيح لهذه النهايات كبيرة في حالة وجود النهايات اللزجة . إذ تساعد أواصر الهيدروجين بين قواعد النيوكليوتيدات المتكاملة على توفير هذه الفرصة . ومع ذلك فأنه في حالة عدم بناء رابطتي الأستر في النهايات المتقاربة في الوقت المناسب فأن هذه القطع ربما تنفصل مرة أخرى بسبب ضعف روابط الهيدروجين . وعلى ذلك فأن تركيز قطع الحامض النووي المطلوب لحامها سواء كانت نواقل أو قطعاً أخرى أو قطعاً مختلفة وتركيز أنزيم اللحام ونوع النهايات لها دور كبير في سرعة حصول العملية . هذا إضافة إلى الظروف الفيزيائية الصحيحة اللازمة لمثل هذه التفاعلات . وتبقى في جميع الأحوال عملية لحام النهايات اللزجة أسهل بكثير من لحام النهايات العمياء . إلا أنه من الممكن تحوير هذه النهايات بأساليب مختلفة بحيث يمكن تحويلها إلى نهايات لزجة .

ومن أهم أساليب التحوير هذه استخدام جزئيات رابطة Linkers أو توصيلات Adaptors أو ذيول متجانسة Homopolymer Tails

تحوير النهايات العمياء في قطع الحامض النووي *DNA*

في عمليات الهندسة الوراثية يفضل استخدام قطع حامض نووي وناقل ذات نهايات متجانسة بحيث يمكن إجراء الهندسة في أفضل صورة ممكنة . وعلى الرغم من أن هذه النهايات يمكن توفيرها عن طريق قطع الحامض النووي المراد هندسته والناقل بنفس الأنزيم القاطع أو بأنزيمات متناظرة . لأن ذلك لا يمكن الحصول عليه دائماً . إذ أن الصورة الأكثر توفراً في تجارب الهندسة الوراثية هي وجود نهايات لزجة للناقل ونهايات عمياء لقطع الحامض النووي المراد هندستها . لذلك فأنه تحت مثل

هذه الظروف فأنه يتطلب تحوير النهايات العمياء لجعلها متجانسة مع النهايات اللزجة للناقل . وسنتحدث عن أشهر طرق التحوير هذه وتطبيقاتها .

أولاً: الروابط *Linkers*

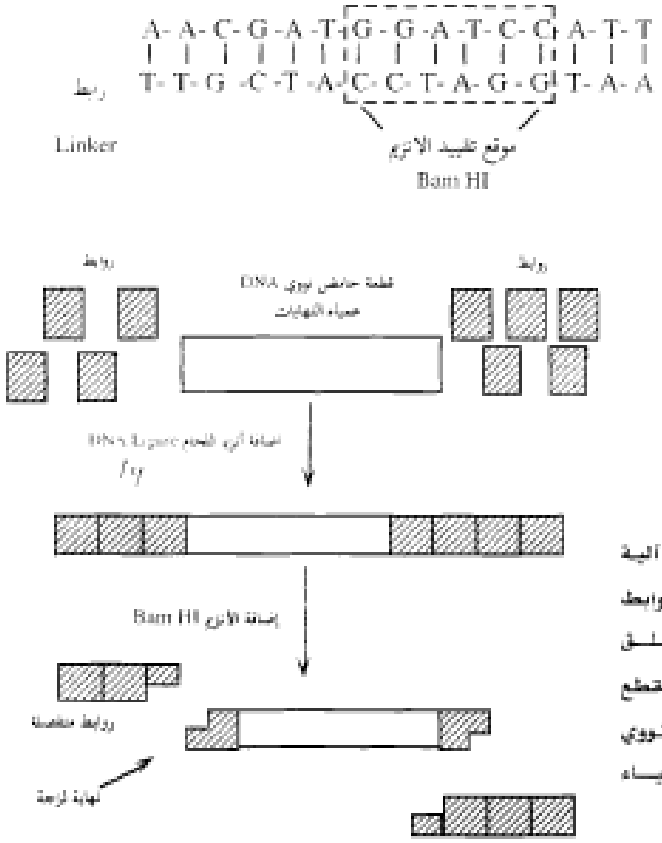
الروابط هي جزئيات حامض نووي DNA مزدوجة معروفة التردد ومصنعة مختبرياً . وهي أيضاً جزئيات ذات نهايات عمياء إلا أن ترددها يحتوي على موقع تقييد مفرد لأنزيم تقييد معين أو أكثر من موقع لأكثر من أنزيم . يتم العمل باستخدام هذه الروابط عن طريق توفيرها في التفاعل بتركيز عالٍ مع وجود قطع الحامض النووي ذات النهايات العمياء المراد تحويرها ووجود أنزيم اللحام T4 والظروف المناسبة لإجراء هذا التفاعل .

يتم التحام أكثر من جزيئة رابط في كل نهاية من النهايات العمياء لقطع الحامض النووي . وبعد الانتهاء من هذا التفاعل تتم تنقية نواتج التفاعل ثم معاملتها مع الأنزيم الذي له موقع تقييد في الروابط حيث يعمل هذا الأنزيم على قطع جزء من الروابط بصورة غير متناظرة منتجاً النهايات اللزجة . فلو افترضنا أن الروابط المستخدمه في هذا المثال تحتوي على موقع تقييد للأنزيم BamHI فأن النهايات اللزجة الناتجة من تفاعل هذا الأنزيم مع الروابط ستحتوي على التردد 5- GATCC-3 كنهاية لزجة في كل نهاية من نهايات قطع الحامض النووي (الشكل 3-7) .

ثانياً: التوصيلات *Adaptors*

إن استخدام الروابط في عملية خلق نهايات لزجة لنهايات عمياء تعتبر وسيلة ممتازة لزيادة كفاءة اللحام وكفاءة الكلونة أيضاً . ولكن مع جميع المزايا الجيدة للروابط يبقى استخدامها محفوفاً بالمشاكل في حالة احتواء قطع الحامض النووي ذات النهايات العمياء على مواقع تقييد لنفس الأنزيم الذي له موقع تقييد في جزيئة الرابط . ويمكن أن تكون المشكلة مستحيلة الحل في حالة أن قطع الحامض النووي المراد تحوير نهاياتها كبيرة الحجم ويمكن أن تحتوي على العديد من مواقع التقييد الخاصة بهذا الأنزيم . لذلك فأن الروابط لا تعتبر الحل المناسب على الاطلاق في مثل

هذه الحالات ويتوجب استخدام طرق أخرى للتحوير . وتعتبر التوصيلات أحد أنجع هذه الطرق والتي يمكن استخدامها بنجاح دون الوقوع في المشاكل التي تواجهنا عند استخدام الروابط . التوصيلات كالروابط في أنها ذات جزيئات حامض نووي DNA مزدوج معروفة التردد ومصنعة مختبرياً . لكنها تختلف عن الروابط في أن لها نهاية عمياء وأخرى لزجة . ويهدف استخدامها في إتمام نهاياتها العمياء مع النهايات العمياء لقطع الحامض النووي المراد تحوير نهاياته وهكذا فتتلك هذه القطع نهايات لزجة جديدة .



(الشكل3-7) : آلية استخدام الروابط Linkers لخلق نهايات لزجة لقطع حامض نووي DNA عمياء النهايات.

إن النهاية اللزجة للتوصيلات لا تحمل مجموعة فوسفات نهائية في النهاية الخامسة لذلك فأنه لا توجد فرصة أمام هذه النهايات على الالتحام مع النهايات العمياء لقطع الحامض النووي المراد تحويرها وتبقى فرصة الالتحام مفتوحة تماماً أمام النهاية العمياء للتوصيلات . لذلك فأنه يتوجب إضافة مجموعة فوسفات إلى النهايات اللزجة للتوصيلات بعد الانتهاء من عملية التحوير وقبل إجراء عملية الهندسة مع ناقل معين . ويتم ذلك بمعاملة القطع محورة النهايات مع أنزيم كاينيز متعدد النيوكليوتيدات Polynucleotide kinase بوجود جزيئة أدينوسين ثلاثي الفوسفات ATP حيث يقوم الأنزيم بنزع مجموعة فوسفات من جزئية ATP وربطها مع النهاية الخامسة للنهايات اللزجة (شكل 3-8) .

وعلى الرغم من أن التوصيلات جيدة في مواصفاتها إلاّ أن العمل معها لا يخلو من صعوبات . تكمن هذه الصعوبات في احتمال وجود مواقع تقييد للأنزيم المنتج للنهايات اللزجة للتوصيلات في قطع الحامض النووي المحور النهايات حيث يصبح من الصعوبة استخلاص التوصيلات من قطع الحامض النووي المحورة والمهندسة مع ناقل . لذلك فأنه من أجل التغلب على هذه الصعوبات فقد صممت توصيلات تحتوي على مواقع تقييد لأنزيمات أخرى إضافة للأنزيم المنتج للنهايات اللزجة مما يسهل استخلاصها باستخدام هذه الأنزيمات .

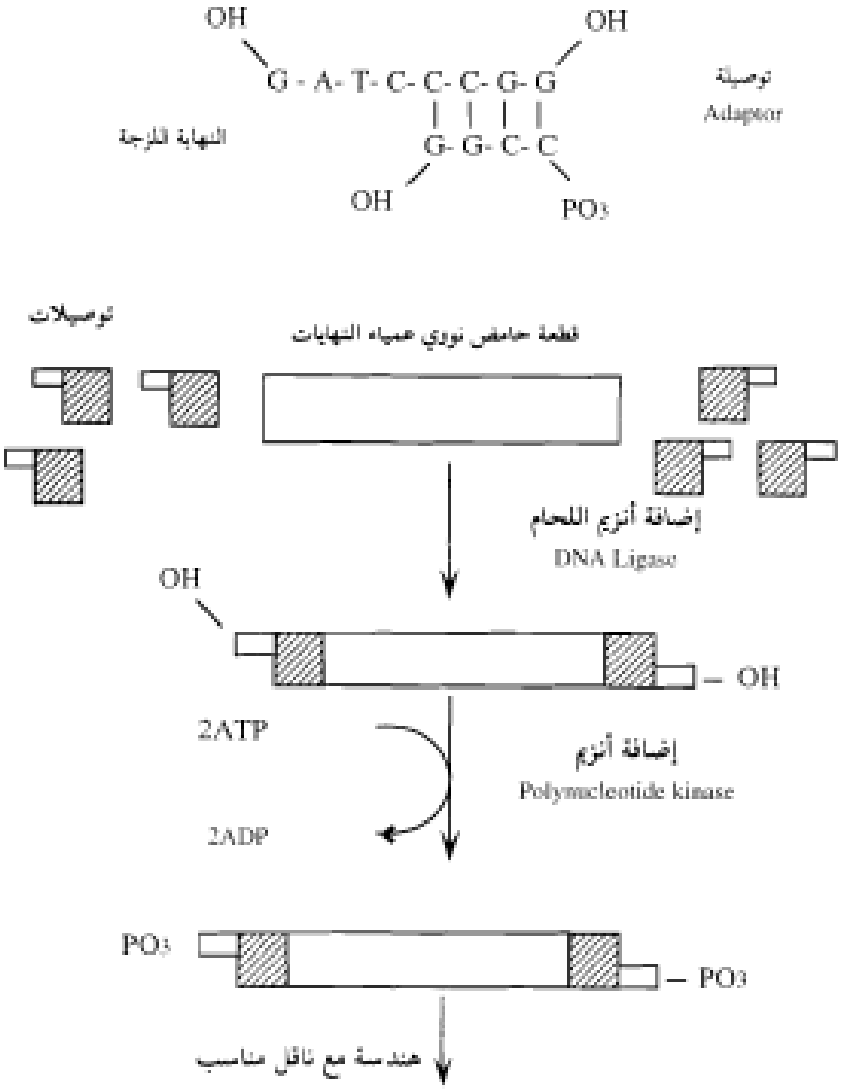
ثالثاً: التذييل بالبوليمر المتجانس *Homopolymer tailing*

يعتبر التذييل بالبوليمرات المتجانسة طريقة جديدة تختلف عن الطرق التي ذكرت سابقاً ولكنها تؤدي الى نفس النتيجة . البوليمرات المتجانسة هي عبارة عن ترددات متشابهة لنيوكليوتيد واحد ويتراوح عددها بين 5-50 نيوكليوتيداً ويتم تصنيعها مختبرياً باستخدام أنزيم الترانسفيريز النهائي أو الطرفي Terminal(TdT) deoxynucleotidyl transferase الذي يقوم بإضافة هذه النيوكليوتيدات بصورة متعاقبة إلى النهاية الهيدروكسيلية الثالثة المكشوفة (3-OH) . ونظراً لحاجة هذا الأنزيم لنهاية هيدروكسيلية مكشوفة (ناتئة) لذلك فأنه يتم معاملة قطع الحامض

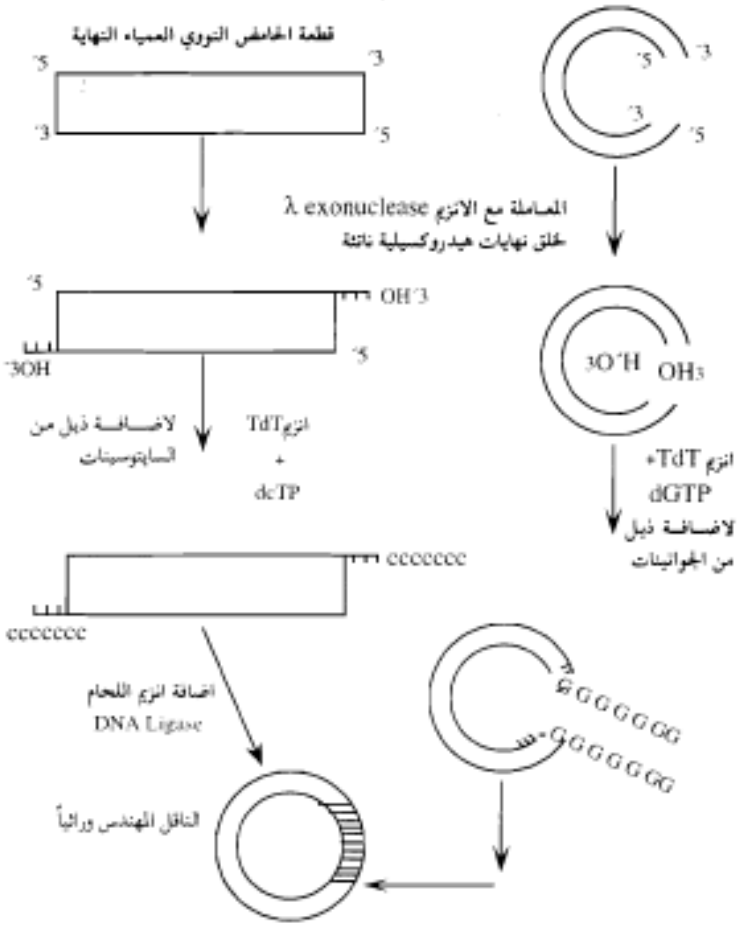
النووي ذات النهايات العمياء بأنزيم النيوكليز الخارجي المعزول من العائي لامبدا λ exonuclease الذي يقوم بإزالة النيوكليوتيدات من النهاية الخاصة لهذه القطع مؤدياً إلى الحصول على نهايات هيدروكسيلية ناتئة أو مكشوفة وجاهزة لعمل الأنزيمTdT (شكل3-9) . ولأجل تذييل هذه النهايات فأنه تتم إضافة نيوكليوتيدات تحتوي على السايتوسين مثلاً للتفاعل إضافة للأنزيم حيث يقوم الأنزيم عندها بربط هذه النيوكليوتيدات اعتباراً من النهاية الهيدروكسيلية الناتئة للقطع منتجاً ذيولاً سايتوسينية عند هذه النهايات . كما تتم معاملة الناقل المراد هندسة هذه القطع معه بنفس الطريقة وبإضافة نيوكليوتيدات تحتوي على الجوانين لإنتاج ذيول جوانين مكملة لذيول السايتوسين في قطع الحامض النووي المراد هندسته .

كما يمكن استخدام نيوكليوتيدات تحتوي على الادنين أو الثايمين لانتاج ذيول وذيول مكملة لها بنفس الأسلوب السابق .

لا يمكن التكهن بعدد النيوكليوتيدات المؤلفة للذيول المرتبطة مع النهايات الهيدروكسيلية لقطع الحامض النووي المراد هندستة أو الناقل . ولكن لعددها أهمية في استقرار منتجات الهندسة . إذ أنه كلما كان عدد النيوكليوتيدات المؤلفة للذيول أكثر كلما إزداد استقرار نواتج الكلونة . وفي حالة وجود اختلاف كبير في عدد هذه النيوكليوتيدات في أطراف قطع الحامض النووي والناقل فأنه يتوجب استخدام أنزيم الكليتو Klenow fragments لأجل بناء الفراغات الناتجة عن هذا الاختلاف إضافة لاستخدام أنزيم اللحام . وعلى أية حال فأنه إذا كان عدد النيوكليوتيدات المرتبطة في المناطق المتكاملة 20 نيوكليوتيداً أو أكثر فأنه لاحاجه لاستخدام أنزيم البلمرة (الكلينو) ذلك لوجود استقرارية كافية في نواتج الهندسة تسمح بنقلها الى المضائف دون عمليات إضافية حيث ستقوم أنزيمات الخلايا المضيفة بتصليح الفراغات وإجراء اللحام لها طبيعياً .



شكل3-8 : آلية استخدام التوصيلات Adaptors لخلق نهايات لزجة لقطعة حامض نووي DNA عديم النهايات.



شكل 9-3، آلية التذييل بالبوليمر المتجانس Homopolymer.

مقدمة

نواقل الهندسة الوراثية Vehicles هي جزئيات بايولوجية مؤلفة من الحامض النووي DNA أو الحامض النووي وكمية من البروتينات . تستخدم هذه كوسائط لنقل مورث معين أو أجزاء معينة من الحامض النووي DNA إلى خلايا أخرى لإظهار صفة جديده فيها .

تتميز هذه النواقل بقدرتهاعلى التضاعف داخل الخلايا الجديدة ، وكذلك مضاعفة الأجزاء المهندسة فيها كما يمكن لها الانتقال إلى الأجيال الجديدة من الخلايا . وبالإضافة إلى ذلك فأن هذه النواقل يجب أن تكون مستقرة وغير قابلة للتحلل داخل الخلايا الجديدة وأن لها قدرة أستيعابية جيدة تمكن الباحثين من هندسة قطع حامض نووي لا بأس بها كما يمكن الحصول عليها واستخلاصها من الخلايا عند الحاجة .

ونظراً لاختلاف أهداف الهندسة الوراثية فقد توفر الآن العديد من هذه النواقل كالبلازميدات والعاثيات والكوزميدات والرواشح وغيرها .

البلازميدات *Plasmids*

هي جزيئات حامض نووي DNA حلقي ذو تضاعف مستقل عن الصبغيات . لذا فهي تمثل وحدة تضاعف مستقلة Replicon . يتراوح حجم البلازميدات بين0.05 إلى 20% من حجم الصبغي (بين 0.1 كيلو قاعدة الى 250 كيلو قاعدة) (جدول 5-1) ، على الرغم من أن البلازميدات مواد وراثية غير ضرورية لنمو وتكاثر الخلايا إلا أنها قادرة على تزويد الخلايا بصفات إضافية في ظروف معينة لاحتوائها على مورثات خاصة بها مثل مورثات مقاومة المضادات الحيوية .

جدول5-1 : احجام وعدد نسخ بعض البلازميدات وصفاتها المظهرية.

البلازميد	الحجم بالكيلو قاعدة kb	الصفة المظهرية	عدد النسخ	البكتيريا المضيفة
PBR345	0.46	مقاومة الامبسلين	150-100	E.coli
PUC 8	2.75	مقاومة الامبلسين	150-100	E.coli
PAT 153	3.658	مقاومة الامبلسين والتتراسايكلين	150-100	E.coli
PBR 322	4.362	مقاومة الامبلسين والتتراسايكلين	100-50	E.coli
CVg-YIP	5.5	مقاومة الامبلسين والتتراسايكلين	حوالي30	yeast
YRp7	5.7	مقاومة الامبلسين والتتراسايكلين	حوالي30	yeast
PBR 325	5.995	مقاومة الامبلسين والتتراسايكلين والكلورمفينكون	حوالي30	E.coli
2 µ n.	6.3	لا يوجد	100-30	yeast
COL E1	6.36	أنتاج الكولسين	15-10	E.coli
RSF 1030	8.48	مقاومه الامبلسين	40-20	?
RSF 2124	11.205	مقاومه الامبلسين	40-20	
PSC101	12 871	مقاومة التتراسايكلين	30-15	E.coli
RP4	54	مقاومة الامبلسين والتتراسايكلين والكنامايسين	5-2	pesudomonas and other
R1	93.885	عدد من المضادات الحياتية	6-3	
F	95	---	2-1	E.coli
Ent P307	98.42	انتاج سموم داخلية	3-1	
TOL	117	--	2-1	Pesudomonas putide
PTi Ach5	213	--	2-1	Agrobacterium tumefaciens

$X^6 10$ دالتن 4.2 = 6.36 Kb

$X^6 10$ دالتن 62 = 95 Kb

يمكن إيجاد هذه البلازميدات في الكثير من البكتيريا وبعض الخمائر وتعتبر هذه الأحياء مصدر معظم البلازميدات المستخدمة في الهندسة الوراثية . تتضاعف البلازميدات داخل الخلايا الحية مستخدمة الأنزيمات الخلوية لذلك إلا أنها تسيطر على عملية تأسيس هذا لتضاعف عن طريق مورثاتها الخاصة . فبعض البلازميدات تقوم بالاتحاد مع الحامض النووي DNA الخلوي لأجل التضاعف وتدعى هذه بالايبوسومات Episomes وعادة ما تكون هذه البلازميدات صغيرة الحجم بينما تمتلك البلازميدات الكبيرة الحجم أنزيماتها الخاصة بها .

ويختلف عدد نسخ البلازميدات من خلية إلى أخرى تبعاً لذلك حيث تمتلك بعض الخلايا أكثر من خمسين نسخة كما هي الحال في البلازميدات PBR322 و PBR345 . تدعى مثل هذه البلازميدات بالبلازميدات عالية النسخ High copy number . بينما توجد بعض البلازميدات بهيئة نسخة مفردة أو ثنائية كما هي الحال في البلازميدات كبيره الحجم مثل البلازميدات TOL و PTiAch5 . ويمثل عدد النسخ عدد جزيئات البلازميد الموجود في الحالة الطبيعية في خلية واحدة . وعلى الرغم من عدم معرفة تفاصيل أسباب زيادة نسخ البلازميدات أو انخفاضها إلا أنه يعتقد أن قدرة البلازميدات على السيطره على تأسيس التضاعف تمكنها من زيادة أعدادها . إلا أنه بالإمكان زيادة أعداد البلازميدات داخل الخلايا وخصوصاً من غير الايبوسومات بإضافة مثبطات إنتاج البروتينات مثل الكلورمفنيكول Chloramphen-icol إلى الوسط الغذائي حيث يتوقف تضاعف الصبغيات بينما يشتد تضاعف البلازميدات . قد تحتوي الخلايا على أكثر من نوع من البلازميدات ولا بد لهذه البلازميدات أن تكون متطابقة Compatible حيث يتم فقدان البلازميدات غير المتطابقة تدريجياً من الخلية ولا يعرف سبب ذلك ولكن يعتقد أن تضاعف البلازميدات له دور في ذلك .

تعتبر البلازميدات ذات أهمية بايولوجية وطبية وصناعية ذلك لاحتوائها على مورثات ذات أهمية كبيره في هذه المجالات . ففي مجال علوم الحياة فأن البلازميدات تعتبر أهم نواقل الهندسة الوراثية وتستخدم في العديد من الأبحاث العلمية التي

تستهدف سبر أغوار المادة الوراثية وتهيئة الخرائط الوراثية بالإضافة الى استخداماتها العديدة في دراسات التطور والتطبيقات العملية لعلوم الحياة . أما في المجال الطبي فأنه يكفي معرفة أن العديد من البلازميدات تحتوي على مورثات مقاومة المضادات الحياتية لتتضح أهميتها الطبية . إضافة إلى أن بعضها يقوم بتصنيع بعض البروتينات التي تستخدم في قتل أنواع معينة من البكتيريا والسيطره على أنواع أخرى كما هي الحال في البلازميدات الكوليسنية في بكتيريا القولون القادرة على إنتاج بروتين الكولسين الذي يقتل البكتيريا ذات العلاقة التطورية المتقاربة أو الخلايا الحساسة التي تفتقر إلى هذا البلازميد . وكذلك البلازميدات القادرة على إنتاج بروتين الفبريوسين Vibriocin الذي يقتل بكتيريا الكوليرا .

كما تعتبر المكورات المسبحية **Streptococcus lactis** من أفضل الأمثلة على الأهمية الصناعية والتي تحتوي على بلازميدات قادرة على إنتاج أنزيمات ذات أهمية كبيرة في صناعة الأجبان والتخمر .

البلازميدات الاقترانية وغير الاقترانية:

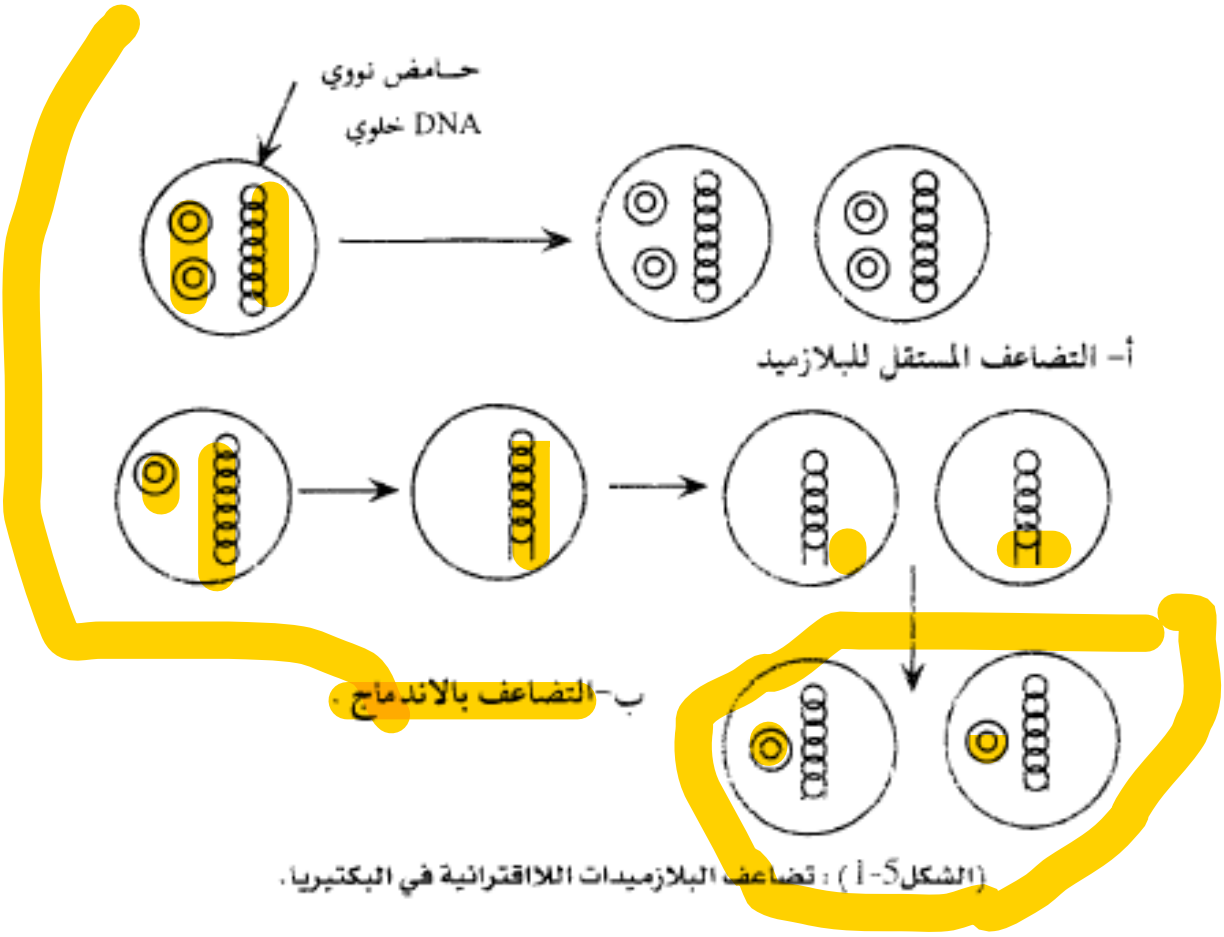
Conjugative and Non-conjugative Plasmids

تقسم البلازميدات إلى مجموعتين هما البلازميدات الاقترانية والبلازميدات اللااقترانية . وقد تدعى البلازميدات الاقترانية ببلازميدات الخصوبة Fertility Plasmids أو بلازميدات الجنس Sex Plasmids . وقد يوجد كلا النوعين من البلازميدات في خلية واحدة أو تكون منفصلة .

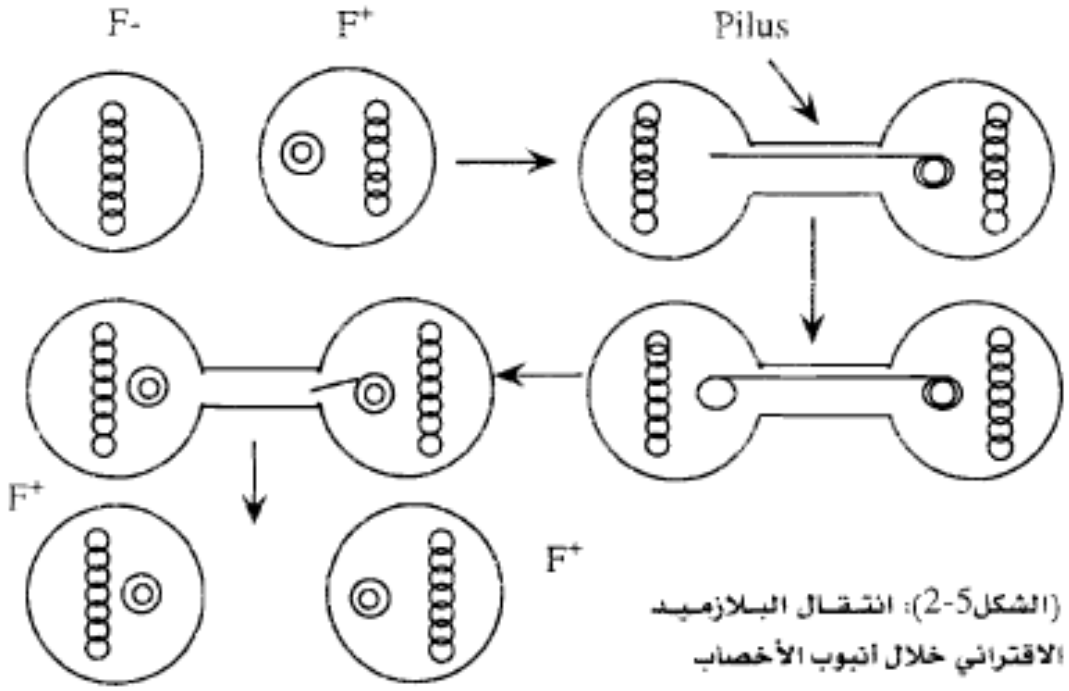
البلازميدات الاقترانية : هي البلازميدات التي لها القدرة على السماح بحصول اقتران جنسي بين خليتي بكتيريا بحيث يتمكن البلازميد الاقتراني من تزويد الخلية الثانية بنسخة منه . يتم السيطرة على عملية الاقتران عن طريق مجموعة من المورثات التي تدعى بالمورثات الناقلة Transfer genes ويرمز لها بـ tra . توجد هذه المورثات في البلازميدات الاقترانية فقط . وقد تتمكن البلازميدات غير الاقترانية تحت بعض الظروف من الانتقال من خلية إلى أخرى عند حصول الاقتران وذلك عند وجودهما

معاً في إحدى الخليتين . أما البلازميدات اللاأقترانية فأنها تتضاعف داخل الخلية بصورة مستقلة عن الحامض النووي DNA الخلوي أو بالاندماج كأيبوسومات (الشكل5-1) .

يرمز للخلايا ذات القدرة الاقترانية بـ F^+ وهي الخلايا التي تحتوي على بلازميد اقتراني ، بينما يرمز بـ F^- للخلايا الخالية منه . وعند حصول الاقتران بين خلية F^+ وأخرى F^- فأنهما يرتبطان بواسطة أنبوب أخصاب Pilus ينتقل عبره أحد أشرطة الحامض النووي DNA المزدوج البلازميدي إلى الخلية F^- بعدها يتضاعف الشريطان في كل من الخليتين وبذلك تتحول الخليه F^- إلى خلية F^+ ذات بلازميد اقتراني (شكل5-2) وعلى الرغم من القدرة التضاعفية المستقلة للبلازميد الاقتراني Autonomous إلا أنه يلتحم مع الحامض النووي الخلوي من وقت إلى آخر وترجع قابليته هذه لاحتوائه على ترددات تدعى بالعناصر الانتقالية Transposable (Tn) elements أو عناصر الاندماج Insersion elements (IS) وهي ترددات من القواعد النايتروجينية المكملة لترددات مماثلة موجودة في الحامض النووي الخلوي . تقوم الأنزيمات الخلوية بفتح حلقة الحامض النووي البلازميدي وكذلك الحامض النووي الخلوي عند هذه الترددات يتم بعدها التحام نهايات البلازميد المفتوح مع الأطراف المفتوحة للحامض النووي الخلوي حيث يتم استيعاب جزيئة البلازميد الاقتراني . تدعى مثل هذه الخلايا بالخلايا الاتحادية عالية التردد High frequency re-(Hfr) combinant cells (الشكل5-3) .



(الشكل5-1) : تضاعف البلازميدات اللاقترانية في البكتيريا .



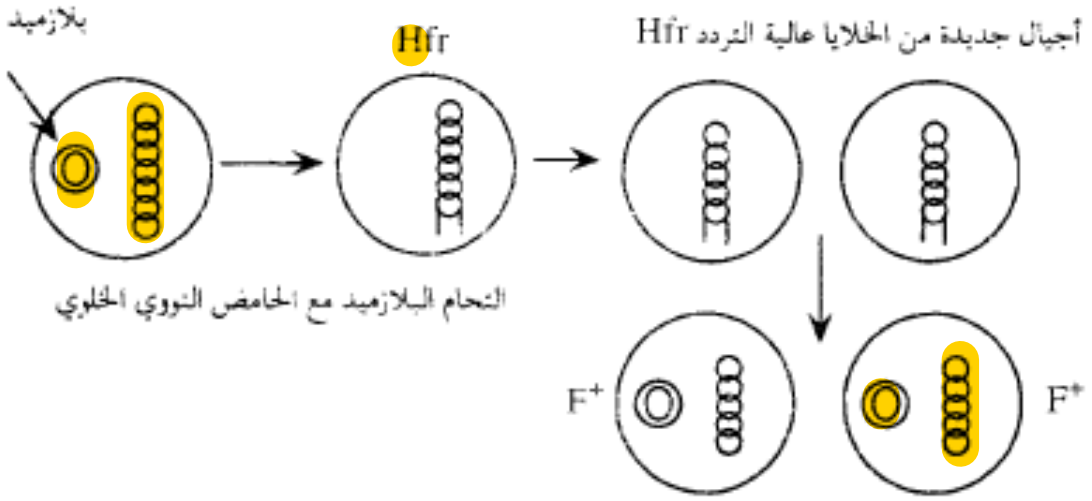
(الشكل5-2): انتقال البلازميد الاقتراني خلال أنبوب الأخصاب

تقوم الخلية بعدها بمضاعفة الحامض النووي المركب وتنقسم . وبهذه الطريقة ينتقل البلازميد الى الأجيال الجديدة من الخلايا .

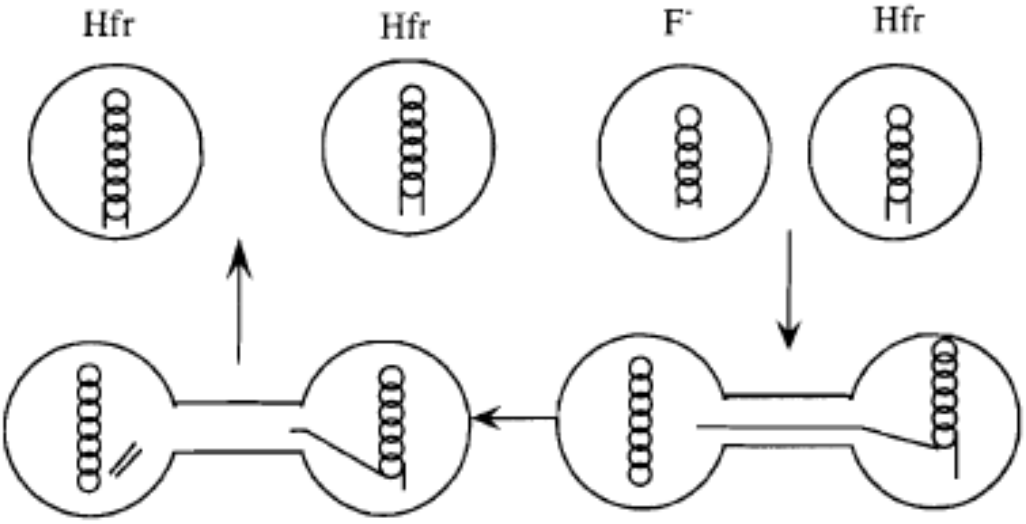
وقد تقوم خلايا Hfr بنقل البلازميد الى خلايا F^- . ويؤدي مثل هذا الانتقال إلى الحصول على اتحادات وراثية جديدة حيث تنتقل أجزاء من الحامض النووي الخلوي مع البلازميد الى الخلايا الجديدة . (الشكل5-4) .

أما البلازميدات اللااقترانية فأنها كما قلنا تتضاعف داخل الخلية بصورة مستقلة أو بالاندماج مع الحامض النووي الخلوي كأيبوسومات . وتعود قدرتها على الاندماج لوجود عناصر الأندماج . يختلف عدد نسخ عناصر الاندماج من نوع الى آخر . ففي بكتيريا القولون E.coli K ثماني نسخ من العنصر IS1 وخمس نسخ من العنصر IS2 ونسخة أو أكثر من العناصر IS3 وIS4 .

وقد تحتوي بعض البلازميدات والبكتيريا على عناصر انتقالية .وتختلف العناصر الانتقالية عن الاندماجية في أن الأولى تحتوي على مورث مقاومة مضاد حياتي معين أو أكثر من مورث .



(الشكل5-3) : تكوين الخلايا الاتحادية عالية التردد Hfr من خلال التحام البلازميد مع الحامض النووي الخلوي



(الشكل5-4) : الاقتران بين الخلايا الاتحادية عالية التردد Hfr والخلايا الخالية من البلازميد الاقتراني لإنتاج أجيال جديدة من خلايا Hfr

تصنيف البلازميدات

تصنف البلازميدات الطبيعية اعتماداً على طبيعة المورثات المحمولة إلى خمس مجاميع هي :

أولاً : بلازميدات الخصوبة F-Plasmids : وهي البلازميدات التي تحتوي على المورثاتtra التي تساهم في حصول الاقتران الجنسي بين الخلايا البكتيرية .

ثانياً : بلازميدات المقاومة R-Plasmids : وهي مجموعة البلازميدات التي تحتوي في مادتها الوراثية على مورث واحد أو أكثر لمقاومة المضادات الحيوية .

ثالثاً : بلازميدات الكوليسين Col-Plasmids : وهي البلازميدات التي تمتلك مورث الكوليسين القادر على إنتاج بروتين الكوليسين .

رابعاً : البلازميدات التحللية Degradative Ps : وهي بلازميدات تمتلك مورثات تساعد الخلايا البكتيرية من تمثيل الجزيئات غير الاعتيادية مثل التولوين وحامض السيلسيلك .

خامساً : البلازميدات الممرضة Virulence Ps : وهي البلازميدات التي تسبب الأمراض لخلايا العائل مثل البلازميدات Ti الموجود في بكتيريا Agrobacterium tumifaciens والتي تؤدي إلى إصابة نباتات ذوات الفلقتين بمرض الثآليل التاجية Crowngall disease .

البلازميدات كنواقل في الهندسة الوراثية

تعتبر البلازميدات أفضل أنواع النواقل في الهندسة الوراثية وذلك لحجمها المناسب في العمل وتنوعها وسهولة استخلاصها والتعامل معها إضافة إلى صفات أخرى مثل وجود مواقع كسر أنزيمية متعددة وموروثات مقاومة المضادات الحيوية وغيرها وتضاعفها المستقل ووجودها بأشكال مختلفة (مسترخيةRelaxed وحلقيةCircular وخطية Linera) بالإضافة إلى سهولة تربية البكتيريا ذات البلازميدات ومميزات أخرى عديدة .

ونتيجة إلى التطور الهائل في تقنيات الوراثة الجزيئية والكيمياء الحيوية والهندسة الوراثية فقد أمكن الحصول على أعداد متنوعة من البلازميدات المحورة من البلازميدات الطبيعية وجعلها أكثر ملائمة كنواقل للهندسة الوراثية . إذ يتم إزالة الأجزاء غير المرغوب فيها في البلازميد الطبيعي عن طريق تقطيع البلازميد بالانزيمات القاطعة Restriction enzymes ثم عزل القطع المرغوب فيها عن طريق الهجرة الكهربائية خلال هلام Gel electrophoresis واستخلاصها وربطها مع بعضها بواسطة الأنزيمات اللاحمة Ligases مع إضافة أجزاء بلازميدية أخرى أو عدمها لتهيئة بلازميد جديد ذي مواصفات أجود وأكثر كفاءة . لقد تم باستخدام هذه التقنيات بناء العديد من البلازميدات المختبرية التي أدت إلى تطور هائل ومتنوع في قدرات الهندسة الوراثية . إلا أنه وفي كل الاحوال فأن القدرة الاستيعابية للبلازميدات تظل محدودة ولا تزيد عن 5-10 كيلو قاعدة من القطع الجديدة .

مميزات البلازميدات النموذجية المستخدمة في الهندسة الوراثية

أولاً : أن يكون البلازميد بحجم مناسب (20-10 كيلو قاعدة) . إذ أن البلازميدات الصغيرة الحجم عادة ما تكون عديدة النسخ في الخلايا كما أنها سهلة التعامل ومع ذلك فأن الضرورة تتطلب أحياناً استخدام بلازميدات أكبر حجماً لاستيعاب قطع مهندسة كبيرة الحجم كما هي الحال في الصبغيات الكاملة .

ثانياً : أن يكون البلازميد معروف الخريطة الوراثية حيث يمكن عندها بسهولة معرفة مواقع المورثات والأنزيمات القاطعة .

ثالثاً : أن يكون ذا صفة انتقائية خاصة Selectable markers يمكن من خلالها تمييز الخلايا الحاوية عليه مثل وجود مورثات مقاومة المضادات الحيوية أو العوز الغذائي أو العيش في ظروف خاصة .

رابعاً: أن يكون قادراً على التضاعف داخل خلايا المضيف وله قدرة على الانتقال إلى الأجيال الجديدة من الخلايا .

خامساً : أن يكون مستقراً Stable داخل المضيف ولا يضيع أو يفقد عند انقسام الخلايا .

سادساً : أن يحتوي على أكثر من موقع مفرد لأنزيمات قاطعة .

سابعاً: أن يحتوي البلازميد على الأقل على تردد واحد يعمل كمنشأ تضاعف لتمكين البلازميد من التضاعف المستقل عن الحامض النووي الخلوي – وعلى أية حال فأنه يمكن استخدام الأيبوسومات في الهندسة الوراثية على الرغم من عدم احتوائها على منشأ للتضاعف .

العاثيات أو البكتيريوفاج *Bacteriophages*

تختلف العاثيات كثيراً عن البلازميدات . إذ تعتبر العاثيات أحياء مستقلة ذات معيشة تطفلية إجبارية بينما لا تمثل البلازميدات مثل ذلك . كما تحاط العاثيات بأغلفة بروتينية تستقر بداخل الحامض النووي DNA . يتراوح حجم الحامض النووي العاثي من 6-50 كيلو قاعدة . كما تختلف العاثيات في أنها لا تستقر داخل خلايا العائل بل تغادره حال انتهاء التضاعف وقد تترك جزءاً من ذريتها لاستمرار التضاعف كما هي الحال في العاثي M13 إلا أنها جميعاً تغادر الخلايا المصابة بصورة أو أخرى بينما يحافظ البلازميد على استقراره داخل الخلايا حتى وأن ازداد عدد نسخه ولا ينتقل إلا في حالة الاقتران .

تفضل العاثيات في الهندسة الوراثية لانها تتمكن من استيعاب 15-25 كيلو قاعدة وهو أكثر قدرة من ثلاث إلى أربع مرات من قدرة استيعاب البلازميد دون أضرار . كما تفضل العاثيات لتوفر الحامض النووي الخاص بها وكذلك بروتيناتها بشكل منفصل ويمكن تخليق العاثي مختبرياً من خلال مزج الحامض النووي مع البروتين بطريقة تدعى بالتعبئة الحياتيةIn vitor packaging .

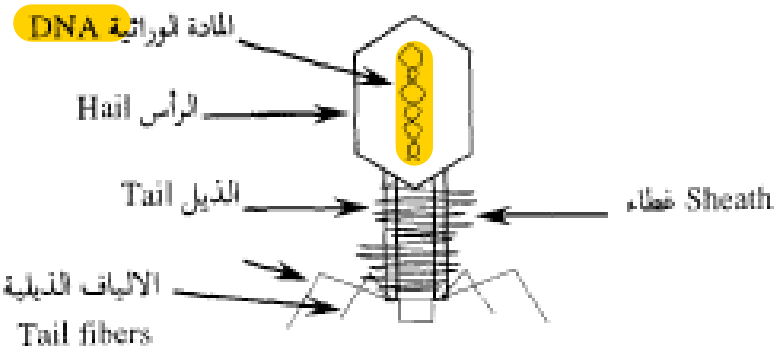
وعلى الرغم من أن هناك حرية أقل في تحوير الحامض النووي للعاثيات مقارنة بالبلازميدات وذلك لوجود العديد من الورثات الضرورية للتضاعف والتي لا يمكن إزالتها إلا أن كفاءة الهندسة الوراثية باستخدام العاثيات يبقى عالياً حيث يمكن الحصول على كمية كبيرة من العاثيات الهجينة (المهندسة وراثياً) من المايكروغرام الواحد(mg) من الحامض النووي مقارنة مع كفاءة البلازميدات . تعتبر العاثيات احدى مجاميع الرواشح وتنتمي إلى مجموعتي الرواشح المعقدة والمتحلزنةComplex and Helical viruses . فالعاثي لامبدا Lambda λ ينتمي إلى مجموعة الرواشح المعقدة . إذ يتألف من رأس عديد الأضلاع وذيل وملحقات أخرى تتألف جميعاً من وحدات بروتينية خاصة ويستقر الحامض النووي DNA المزدوج الذي يبلغ حجمه

حوالي 49 كيلو قاعدة في رأس العاثي . يتمكن العاثي من دخول البكتيريا عن طريق استقراره بواسطة الأشواك الموجودة في نهاية منطقة الذيل على سطح الخلية . يقوم بعدها بحقن مادته الوراثية إلى سايتوبلازم الخلية (الشكل5-12) .

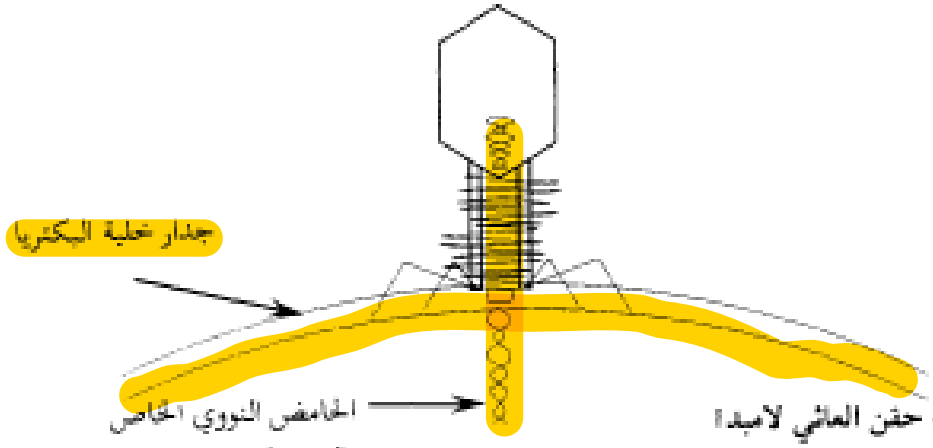
أما العاثي M13 فينتمي الى مجموعة الرواشح المتحلزنة الخيطية ويتصف بشكله العصوي وتتميز بروتيناته الغلافية بأنها على هيئة أسطوانة مجوفة يستقر بداخلها حامض نووي DNA مفرد الخيط يبلغ حجمه حوالي 6.4 كيلو قاعدة ويترتب بهيئة اللولب .

يتمكن هذا العاثي من إصابة البكتيريا عن طريق تحفيز جدارها الخارجي لتكوين أنبوب أوبروز أنبوبي Pilus يتم من خلاله حقن مادته الوراثية نحو السايتوبلازم (الشكل 5-13) .

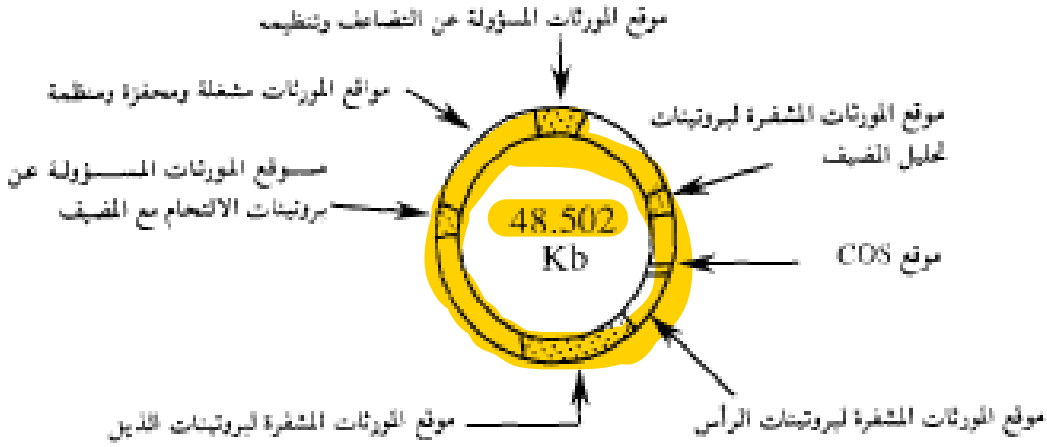
تعتبر أغلب العاثيات أيبوسومات حيث تتمكن من الالتحام مع الحامض النووي DNA الخلوي للبكتيريا نظراً لاحتوائها على ترددات الاندماج أو العناصر الانتقالية وتسلك في ذلك سلوك بلازميدات الخصوبة F-Plasmids . العاثيات ذات أهمية بايولوجية خاصة عندما تستخدم في مجالات الهندسة الوراثية وبناء بنوك المورثات وغيرها . ويمكن تمييز نوعين من العاثيات اعتماداً على طبيعة الحامض النووي . فهناك عاثيات مزدوجة الحامض النووي DNA كالعاثي لامبدا وعاثيات مفردة الحامض النووي DNA كالعاثي M13 . كما يمكن تمييز ثلاثة أنواع من دورات تضاعف العاثيات .



أ- الشكل الخارجي للعاثي لامبدا

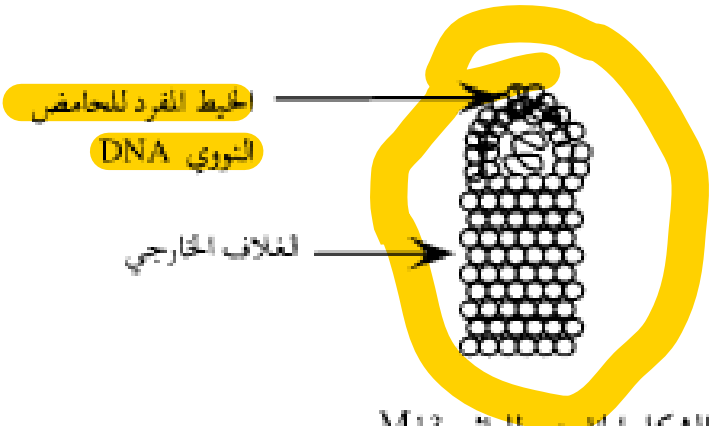


ب- آلية حقن العاثي لامبدا
مادته الوراثية في خلية البكتريا

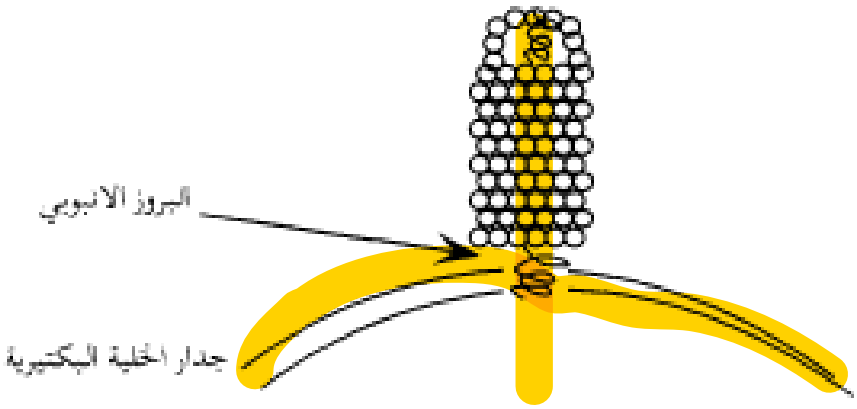


جـ- خريطة لمواقع المورثات المهمة في الحامض النووي DNA

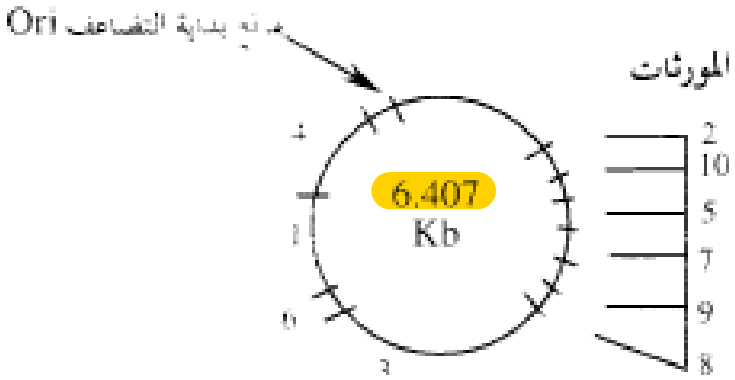
(الشكل 5-12): تخطيط للعاثي لامبدا واهم المورثات الموجودة في مادته الوراثية.



أ- الشكل الخارجي للعاثي M13 .



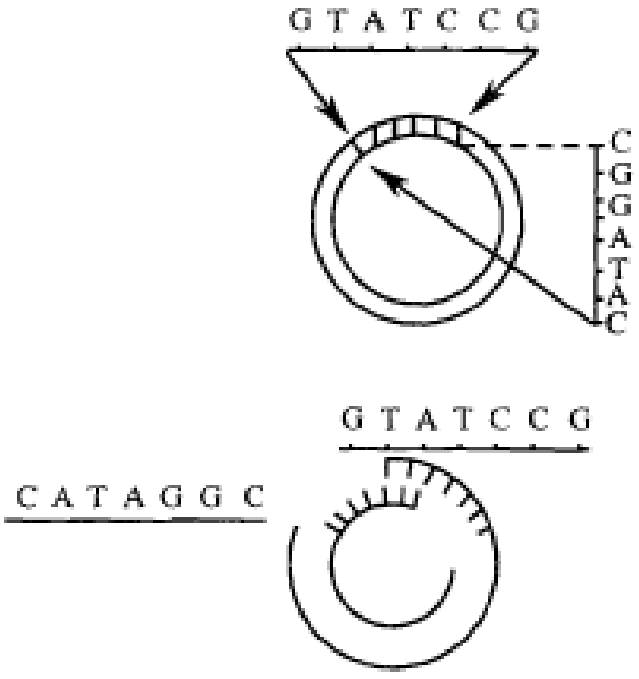
ب- آلية حقن للعاثي M13 لمادته الوراثية في البكتريا



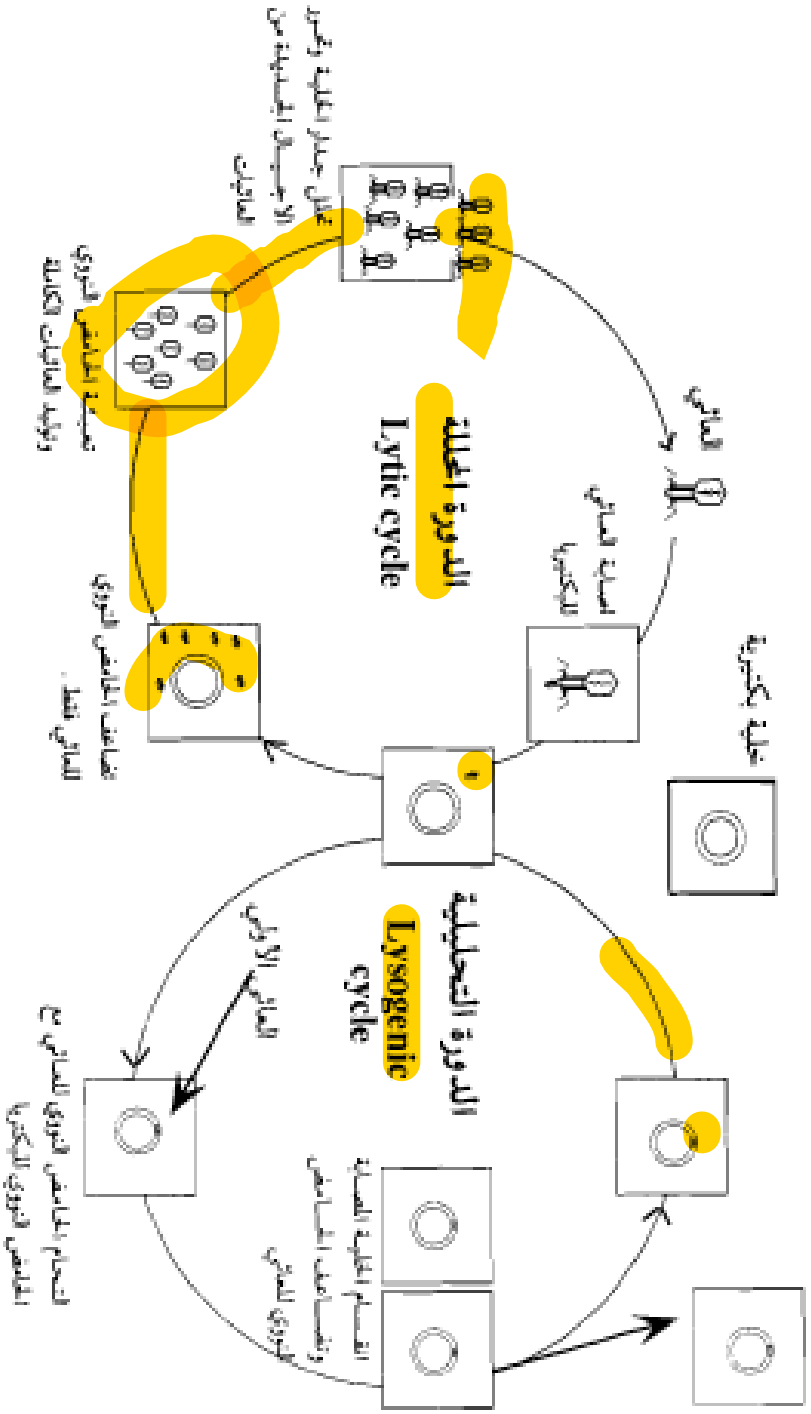
جـ- خريطة تخطيطية لمواقع مورثات الحامض النووي للعاثي M13 .

(الشكل5-13) : تخطيط للعاثي M13 وخريطته الوراثية

فهناك العاثيات المحللة Lytic phages والتي لا تستغرق دورتها في الخلية سوى أقل من عشرين دقيقة . تطلق بعدها جيلاً من العاثيات التي تقوم بتحليل جدار الخلية البكتيرية . تتميز هذه العاثيات في أنها تهيئ بروتينات اغلفتها (الكابسيد capsid) مباشرة بعد تضاعف المادة الوراثية في كل مرة . كما أن العاثيات الجديدة لاتتمكن من الاستقرار داخل العائل أبداً بل تغادره مباشرة بعد تعبئتها في الأغلفة . يتم تضاعف المادة الوراثية لها دون الالتحام مع المادة الوراثية للبكتيريا حيث يتحول الشكل الخيطي للمادة الوراثية الخاصة بالعاثي داخل خلية البكتيريا الى الشكل الحلقي عن طريق استخدام النهايات اللزجة Cohesive ends لمزدوج الحامض النووي . إذ تحتوي كل نهاية منه على ترددات من القواعد النايتروجينية المتممة للأخرى (الشكل5-14) . يتضاعف بعدها الحامض النووي بطريقة التضاعف شبه المحافظ . إذ يبدأ التضاعف عن طريق شوكة تضاعف ناشئة عن انفصال خيطي الحلقة المزدوجة للحامض النووي في نقطة واحدة يتم بعدها بناء أشرطة حامض نووي جديده استناداً إلى قالب المادة الوراثية الأصلية .



(الشكل5-14) : النهايات اللزجة COS في العاثي لا مبدا التي تساهم في وجوده بهيئة خيطية او حلقية.



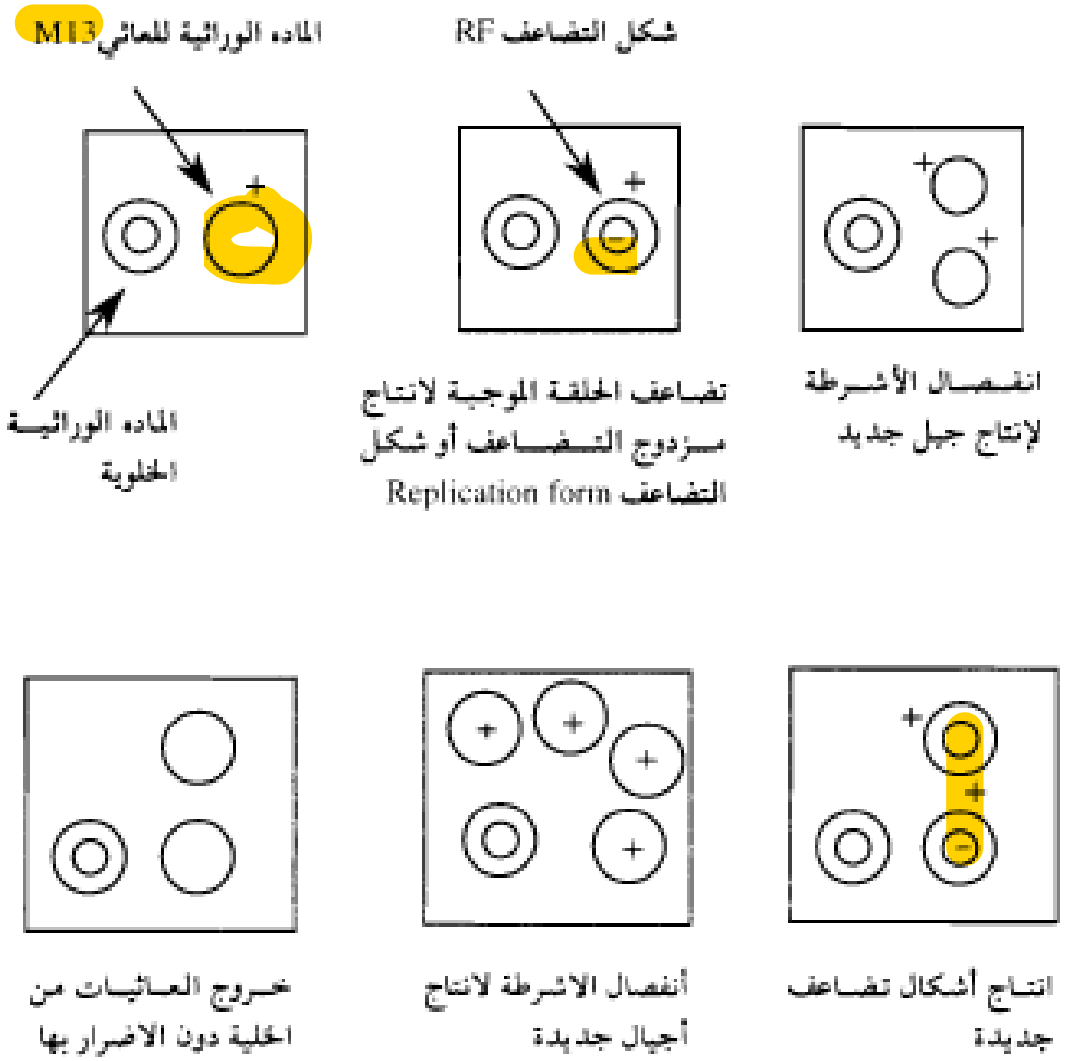
(الشكل5-15) : دورتا تضاعف العاثي لامبدا. يلاحظ أن المادة الوراثية للعاثي تتضاعف بصورة مستقلة عن المادة الوراثية الخلوية في الدورة المحللة كما يؤدي التضاعف الى تحلل الخلية المضيفة. بينما تلتحم المادة الوراثية للعاثي مع المادة الوراثية الخلوية كمحات أولي ويتضاعف مع انقسام الخلية وينفصل بعد ذلك ويغادر الخلايا أو يعيد اصابتها ولا يؤدي ذلك إلى موت الخلايا المضيفة

وبعد إتمام التضاعف تنفصل أزواج أشرطة المادة الوراثية ثم تتحول إلى الشكل الخيطي عن طريق فتح الحلقة من منطقة التحام النهايات اللزجة ليتم تعبئتها بالاغلفة البروتينية وثم تخرج الأجيال الجديدة بعد أن تقوم بتدمير جدار البكتيريا المضيفة (الشكل5-15) .

ويذكر أن هذه العاثيات تقوم باستخدام أحد مورثاتها الذي يرمز له بالمورث A والذي يشفر لأنزيم القطع الذي يقوم بفتح حلقات المادة الوراثية بعد الانتهاء من التضاعف .

أما النوع الثاني من دورات التضاعف فهو الدورة الانحلالية Lysogenic cycle . تختلف هذه الدورة عن الدورة السابقة في أن المادة الوراثية (DNA) للعاثيات تبقى داخل البكتيريا وربما لالاف من الانقسامات الخلوية . إن المادة الوراثية لهذه العاثيات تلتحم مع المادة الوراثية للخلية المصابة عندما تكون بالشكل الخيطي وذلك لامتلاكها القدرة على التصرف كأبيوسومات . تدعى هذه بالعاثيات الابتدائية أو الأولية Prophages وتمر بعدها بفترة كمون quiescent ولا يمكن عندها تمييز البكتيريا المصابة عن غيرالمصابة حيث يتوقف نشاط العاثي الابتدائي نهائياً فيما عدا إنتاج البروتين الكابت الذي يحافظ على حالة الكمون . وبين الحين والاخر ينفصل العاثي الابتدائي من المادة الوراثية الخلوية ويبدأ بمضاعفة نفسه كعاث محلل Lytic phage (شكل5-15) . ويمر العاثي لا مبدا في كلا دورتي التضاعف هذه .

أما العاثي M13 فتمثل دورته التضاعفية النوع الثالث حيث لا يحتاجه تضاعفه للاندماج مع المادة الوراثية الخلوية للبكتيريا ، كما أن العاثي لا يكمن عند دخوله للمضيف كما هي الحال في الدورة الانحلالية ، إضافة إلى أن الأجيال الجديدة منه تخرج بطريقة لا تؤدي إلى قتل الخلية البكتيرية وتبقى خلايا المصابة تُنتج بأستمرار أجيالاً جديدة من العاثي (شكل5-16) .



(الشكل5-16) : دورة التضاعف الخاصة بالعاثي M13 ويلاحظ استقلال تضاعف العاثي عن المضيف وكذلك إمكانية وجود العاثي بهيئة حلقة مزدوجة أو مفردة وهو مهم جداً في الهندسة الوراثية.

الهندسة الوراثية والبايوتكنولوجي (التقنية الحياتية)

لقد اعتبرت تقنيات الهندسة الوراثية ثورة حقيقية منذ بزوغها في أوائل سبعينات هذا القرن . وإلى الآن فأننا نستطيع أن نجد آثار هذه الثورة واضحة في حقول المعرفة الاخرى المختلفة حتى أصبح الآن وجود ترابط كبير بين هذه التقنيات والصناعة والزراعة بحيث أدى ذلك إلى ظهور ما يطلق عليه اليوم بالتقنية الحياتية أو البايوتكنولوجي . والتقنية الحياتية علم قائم من ترابط الأحياء المجهرية والوراثة والكيمياء والهندسة الكيميائية وهندسة الإنتاج . ولكل من هذه الفروع دور حيوي جزئي في هذه التقنية .

لقد أدت الطرق الكثيرة للهندسة الوراثية إلى توفير الإمكانية الآن للحصول على أحياء دقيقة متحوله أمتلكت القابلية على تصنيع بروتينات حيوانية . أن الكثير من هذه البروتينات هو ذات أهمية طبية أو صيدلانية ويتم تصنيعها من قبل الحيوانات ولكن بكمية قليلة جداً يصعب استخلاصها إضافة إلى تكاليف الكبيرة التي تستهلكها عملية الاستخلاص هذه .

وأصبح الآن عن طريق التقنية الحياتية الحصول على مثل هذه البروتينات بكميات جيدة وبطرق رخيصة تعتمد على هندسة المورثات المشفرة لهذه البروتينات في أحياء دقيقة مثل الخميرة أو البكتيريا حيث يمكن تربيتها بأعداد كبيرة في حيز صغير من المواد الغذائية .

كما يمكن إنتاج بروتينات كائن معين مثل الإنسان في كائنات أخرى مثل الفئران والأرانب والماشية وغيرها .

وسنستعرض في هذا الجزء ما يمكن استعراضه عن تطبيقات الهندسة الوراثية في مجال التقنية الحياتية .

إنتاج الهرمونات البشرية في الأحياء الدقيقة:

إن العديد من الأمراض البشرية تعزى إلى نقص في بروتين وظيفي مهم أو وبسبب خمول وظيفي في هذا البروتين . وافضل الامثلة على ذلك هو مرض السكري Diabetes الذي ينشأ من نقص في كمية الأنسولين الذي تفرزه خلايا جزر لانكرهانس في البنكرياس B-cells يعمل الانسولين على السيطرة على مستوى الجلوكوز في الدم ويبقيه في مستوى طبيعي 80-120 ملغم/100سم3 . وينشأ تحكمه هذا من قدرته على السماح لجزيئات الجلوكوز الزائدة في المرور عبر أغشية خلايا الأنسجة من خلال الدم مما يؤدي إلى التخلص من الكمية الزائدة من الجلوكوز . ويؤدي نقص مستوى الأنسولين أو عدم افرازه إلى زيادة مستوى الجلوكوز في الدم الذي يؤدي إلى اضطرابات عديدة قد تؤدي بالمريض إلى الموت . وعلى الرغم من نقص الأنسولين هو السبب الوحيد في ظهور مرض السكري إلا أنه النوع الأكثر شيوعاً .

لذلك فأن مرضى السكري يلجأون إلى حقن الأنسولين في مجرى الدم لتعويض الكمية الناقصة منه . أن معظم الأنسولين المستخدم في مثل هذه الحالات هو أنسولين غير بشري يأتي من خلال استخلاصه من بنكرياس حيوانات مثل الخنازير والأبقار . أن الأنسولين المستخلص من هذه الحيوانات يعتبر هرموناً مناسباً للاستعمال البشري ولكن يمكن أن تنشأ من استعماله مشاكل مختلفة لبعض المرضى .

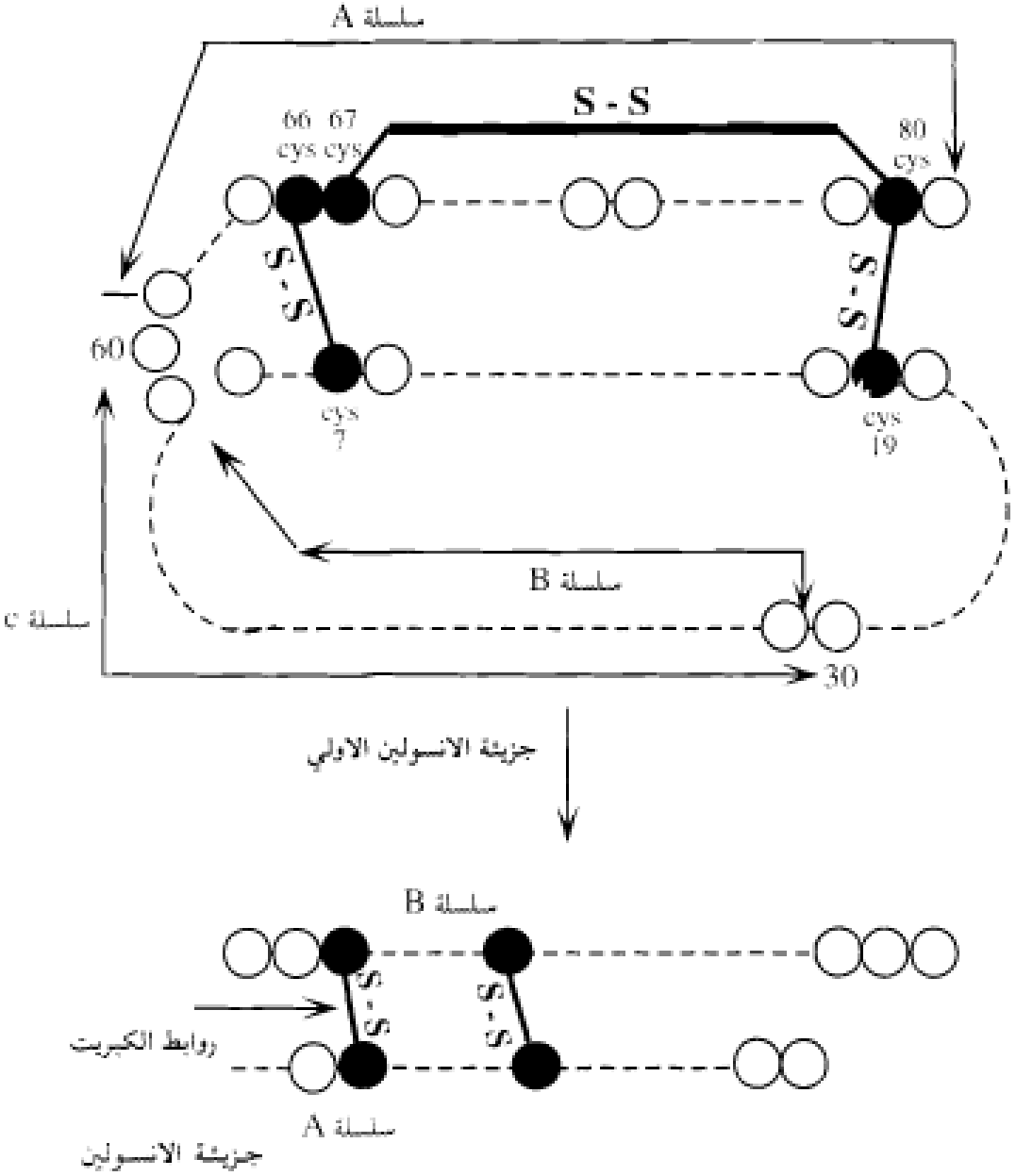
تأتي هذه المشاكل من الاختلاف بين تركيب الأنسولين البشري والحيواني مما يؤدي ذلك الى ردة فعل مناعية ضد الانسولين الحيواني . إضافة إلى ذلك فأن الأنسولين الحيواني غير نقي تماماً ويمكن أن يحتوي على مواد ملوثة بايولوجية خطرة لا يمكن ازالتها تماماً كما هي الحال في الفايروسات أو غيرها . لذلك فأن أفضل طريقة لتجنب مثل هذه المشاكل هو استخدام الأنسولين البشري . وحيث إن مثل هذا الانسولين لا يمكن الحصول عليه لذلك فأنه تم التفكير باستخدام تقنيات الهندسة الوراثية لإنتاجه في أحياء دقيقة مثل البكتيريا .

ونظراً لأن الأنسولين لا يتم تحويره بعد ترجمة الاحماض النووية المرسالة لمورثاته في الريبوسومات لذلك فأنه في حالة هندسة هذه المورثات ونقلها إلى البكتيريا فأن البروتين الذي تقوم البكتريا بصناعته سيكون نشيطاً .

هذا إضافة إلى أن بروتين الأنسولين من البروتينات صغيرة الحجم نسبياً إذ يتألف من سلسلتين عديد الببتيد مرتبطتين بأواصر كبريتية . يبلغ حجم السلسلة الأولى التي تدعى بسلسلة الفا أو (A) حوالي 21 حامضاً أمينياً بينما يبلغ حجم سلسلة بيتا أو (B) حوالي 30 حامضاً أمينياً ويمكن للأحياء الدقيقة بناء مثل هذه الجزيئات دون عرقلة تذكر .

في التصنيع الطبيعي للأنسولين في خلايا بيتا البنكرياسية فأنه يتم إنتاج سلسلتي A وB ترتبطان بسلسلة ثالثة تدعى بسلسلةC الرابطة ويدعى مثل هذا الأنسولين بالأنسولين الأولى Poinsulin . تلتف بعد ذلك جزيئة الأنسولين الأولى بطريقة معينة مستخدمة قطعة بروتينية صغيرة تدعى بالقائد Leader حيث تلتقي سلسلة A مع سلسلةB وترتبطان بروابط كبريتية تتم بعدها إزالة سلسلةC وقطعة القائد (شكل 10-7) لإنتاج جزيئة الأنسولين الطبيعيه .

مختبرياً تتوفر الآن طرق مختلفة لإنتاج جزيئة الانسولين الطبيعية وسنتحدث عن التقنية المستخدمة في صناعة هذه السلاسل وإنتاج الجزيئة الكاملة للأنسولين في الجزء التالي .



(الشكل 10-7): الصوره الاولية والنهائية لهرمون الأنسولين البشري

استراتيجية إنتاج الأنسولين عن طريق الهندسة الوراثية:

إن بروتين الأنسولين مشفر من قبل مورثين معروفين وسبق الكشف عن تردد نيوكليوتيداتهما . لذلك فأنه وبكل سهولة يمكن عزلهما من مكتبة مورثات مؤلفة من قطع DNA وعند استخدام هذه المورثات كمجسات . كما يمكن استخدام مورثات الأنسولين الخاصة بالفئران أو الأرانب كمجسات أيضاً في عزل مورثات الأنسولين من مكتبة مورثات بشرية . ونظراً لأن مثل هذا العمل يأخذ وقتاً غير قليل لأجل تهيئة هذه المورثات فأنه تم اللجوء إلى تقنية حديثة سبق الحديث عنها وهي تفاعل سلسلة البوليمريز (PCR) . نظراً لعزل مورثات الأنسولين من قبل العديد من الباحثين والشركات فأنه يمكن الحصول على هذه المورثات عن طريق الشراء أو كهدية . تفصل أشرطة المورثات بعد ذلك كل على إنفراد عن طريق وضع محلول هذه الأشرطة في حمام مائي ساخن (غليان) لمدة عشر دقائق وترك محاليل المورثات بدرجة حرارة الغرفة لمدة نصف ساعة أخرى . يؤدي الغليان إلى تدمير الأواصر الهيدروجينية التي تربط القواعد النتروجينية لأشرطة المورثات ويؤدي التبريد بدرجة حرارة الغرفة إلى الإبقاء على هذه الأشرطة مفصولة .

تستخدم الأشرطة المفردة لهذه المورثات في تفاعل سلسلة البوليميريز .تفاعل سلسلة البوليميريز هو تفاعل أنزيمي يستخدم فيه أنزيم قطع الكلينوKlenow fragments enzyme أو انزيم Taq ومحلول النيوكليوتيدات الأربعة لأجل بناء أشرطة متممة لكل شريط مفرد من أشرطة المورثات . ويمكن بهذه الطريقة مضاعفة أعداد المورثات . كما يمكن زيادة العدد أكثر وأكثر عن طريق فصل الأشرطة المزدوجة الناتجة من التفاعل بواسطة الحرارة والتبريد كما سبق وإعادة التفاعل مرة أخرى

كما تستخدم اليوم تقنيات متطورة أخرى لأجل تصنيع مورثات الانسولين مختبرياً دون الحاجة إلى وجود مورث حقيقي .

تستند هذه التقنية إلى وجود حاسوب مرتبط مع جهاز تفاعل أنزيمي . يحتوي الجهاز الانزيمي على ست قنان مرتبطة معه تمثل هذه القناني النيوكليوتيدات الأربعة

اللازمة وقنينة لأنزيم قطع الكلينو وأخرى لمحلول البفر اللازم للتفاعل ويتم تزويد جهاز التفاعل من مكونات هذه القناني آلياً واعتماداً على برنامج الحاسوب . نظراً لمعرفة تردد نيوكليوتيدات مورثات الأنسولين فأنه يمكن من خلال هذه التقنية تغذية الحاسوب بالمعلومات الخاصة بتردد مورث A مثلاً ثم إعطاء الأمر لأجل إيصال هذه المعلومات بجهاز التفاعل الأنزيمي المرتبط مع الحاسوب حيث يبدأ عندها تفاعل بناء شريط للمورث صناعياً اعتماداً على تردد نيوكليوتيدات المورث التي تم برمجتها بالحاسوب .

ويستغرق الحصول على مورث صناعي بواسطة هذه التقنية حوالي 2-5 ساعات . يجمع محلول الأشرطة الصناعية الخاصة بالمورث وتضخم باستخدام تفاعل PCR . وسواء تم الحصول على مورثات B وA بالطريقة الأولى أو الطريقة الثانية فأنه تتم هندسة هذه المورثات إلى ناقل تعبير مناسباً . ونواقل التعبير هي نواقل تسمح للمورث المهندس معها بالتعبير عن نفسه عبر إنتاج البروتين أو سلسلة عديد الببتيد المشفر لها .

تأتي قدرة هذه النواقل على السماح بتعبير المورث على احتوائها على مواقع تحفيزية Promoters قوية تعود لمورثات بكتيرية غالباً مثل البادئ التحفيزي الخاص بالمورث Lac . Lac Promoter أو موقع تحفيز الميتالوثيونين Met -Promoter أو غيرها من المحفزات .

ولنفترض أنه استخدم في الهندسة الوراثية ناقل تعبير يحتوي على المحفز Lac . تنقل النواقل الهجينة إلى بكتيريا القولون E.coli باستخدام طريقة التحول التي سبق الحديث عنها وتنمى البكتيريا المتحولة في أوساط غذائية سائلة بدرجة حرارة مناسبة .

تستخلص بعد ذلك سلاسل عديد الببتيد من كل وسط زرعي ثم يتم التخلص من القطع الخاصة بأنزيم بيتا جلاكتوسايديز B-glactosidase المرتبطة مع سلاسلB وA عن طريق إضافة مادة بروميد السيانوجين Cyanogen Bromide .

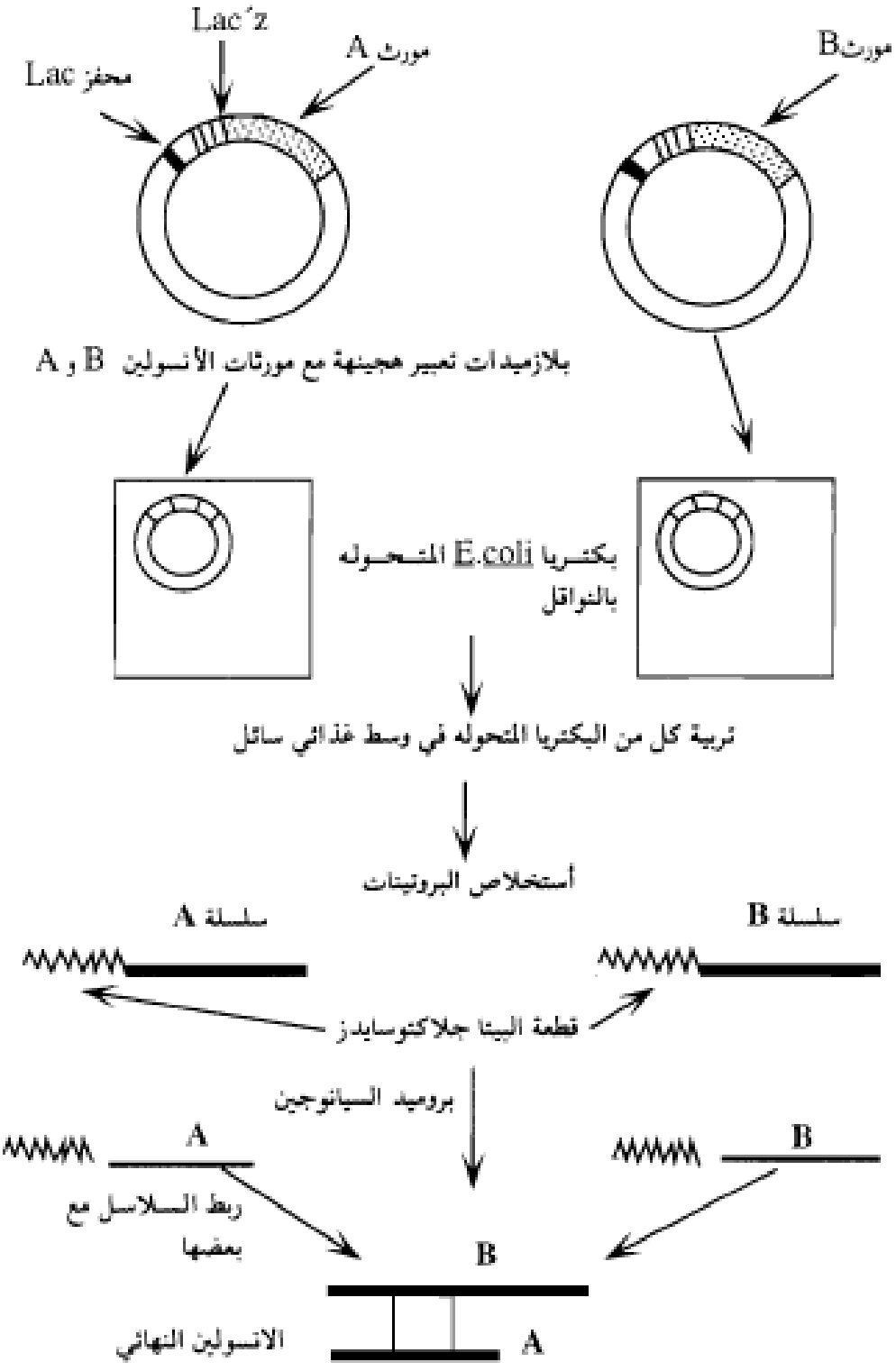
ترتبط سلسلة A مع B بواسطة الأواصر الكبريتية تلقائياً عند وجودهما معاً في محلول واحد (شكل10-8) أو عن طريق تفاعل . إن سلاسل عديد الببتيد الناتجة عن التعبير في البكتريا تكون هجينة مع قطعة صغيره تمثل أنزيم بيتا جلاكتوسايديز . وتفصل هذه القطع عن تردد سلاسل عديد الببتيد الخاصة بالأنسولين بواسطة الميثونين . وينتج هذا الهجين بسبب وجود مورث(A) أو (B) بجوار جزء من مورث LacZ المرتبط مع المحفز . يعمل بروميد السيانوجين على فصل سلاسل عديد الببتيد A وB عن القطع الزائده الخاصة ببروتين المورث Lacz من موقع وجود الميثونين .

استراتيجية إنتاج الهرمونات البشرية المنظمة للنمو

يخضع نمو الإنسان إلى عدد مختلف من الهرمونات إلا أن أكثرها تأثيراً هما هرمون السوماتوتروبين Somatotropin الذي يطيل العظام البشرية وهرمون السوماتو ستاتين Somatostatin الذي يؤدي إلى عرقلة نمو العظام الطولي وهو بذلك الهرمون المسيطر على عمل الهرمون الأول . ويعتبر هذان الهرمونات من الهرمونات ذات الأهمية الطبية الفائقة في مجال اختلال النمو الطولي للأفراد . فهرمون السوماتوستاتين يستخدم طبياً لمعالجة حالات الطول الفائق لدى الأطفال بينما يستخدم هرمون السوماتوتروبين لمعالجة حالات التقزم لدى الاطفال .

تختلف ستراتيجية إنتاج هذين الهرمونين بسبب الاختلاف في تعقيدهما فيبلغ طول هرمون السوماتوستاتين حوالي 14 حامضاً أمينياً وهو بذلك يمثل سلسلة عديد ببتيد قصيره جداً تشفر من مورث صغير الحجم لا يتجاوز 50 زوجاً قاعدياً ويمكن بكل سهولة بناء مورث صناعي شبيه له مختبرياً باستخدام تقنية PCR السابقة .

بينما يبلغ طول بروتين هرمون السوماتوتروبين حوالي 191 حامضاً أمينياً تشفر من مورث كبير يبلغ حجمه حوالي 600 زوج قاعدة . ونظراً لسعة حجم المورث المشفر لهرمون السوماتوتروبين لذلك فأن أفضل طريقة لهندسته هو باستخدام مكتبة مورثات cDNA مستخلصة من الغدة النخامية التي هي مصدر إفراز هذا الهرمون .



(الشكل 10-8): ستراتيجية انتاج الانسولين عن طريق الهندسة الوراثية