الجامعة السورية الخاصة
SYRIAN PRIVATE UNIVERSITY

السنة الثالثة

هندسة وراثية

د.شادي سكرية

المحاضرة الخامسة

200

الجامعة السورية الخاصة
SYRIAN PRIVATE UNIVERSITY

كلية الصيدلة

Faculty of Pharmacy

السنة الثالثة

مقرر الهندسة الوراثية (الجينية)

الفصل الخامس

2018 -2017

د. شادي سكرية

تقانة DNA المؤشب Recombinant DNA technology

- هي تحضر تسلسل معين من DNA بطريقة مخبرية بجمع المادة الجينية من مصادر بيولوجية مختلفة genetic material from multiple sources بشكل جديد غير موجود طبيعياً في المتعضيات الحية.
- ممكن انجاز **DNA المؤشب من <u>حيث المبدأ</u> لأن جزيئات DNA في جميع الكائنات الحية تتشارك بالبنية الكيميائية وبالتالي يمكن جمعها معاً.**
- **<u>عملياً</u> ممكن تحضير DNA المؤشب لتوفر الأدوات الجزيئية وهي الأنزيمات (القطع والوصل بشكل رئيس).**

DNA Recombinant المؤشب DNA

المبدأ العام

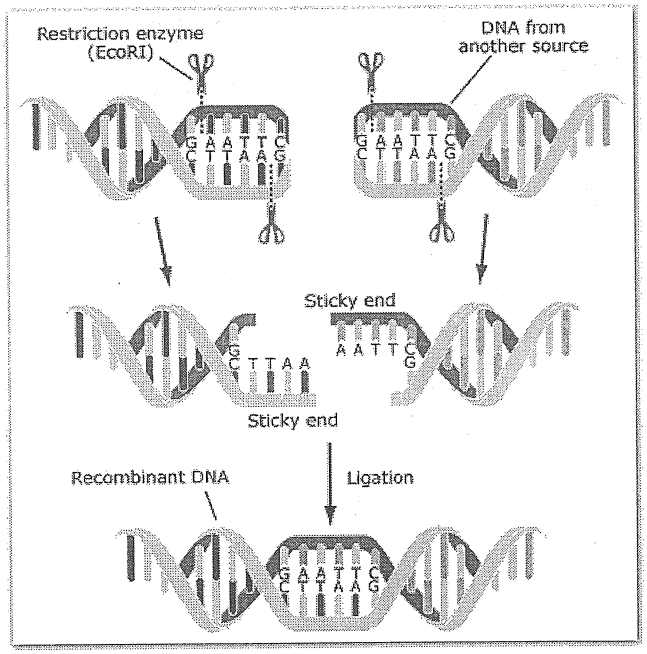
قطع جزيئين من DNA من مصدرين مختلفين بوساطة أنزيم تقييد واحد

⬇

قطع متتامة بحواف لزجة

⬇

ربط القطع بوساطة أنزيم ربط

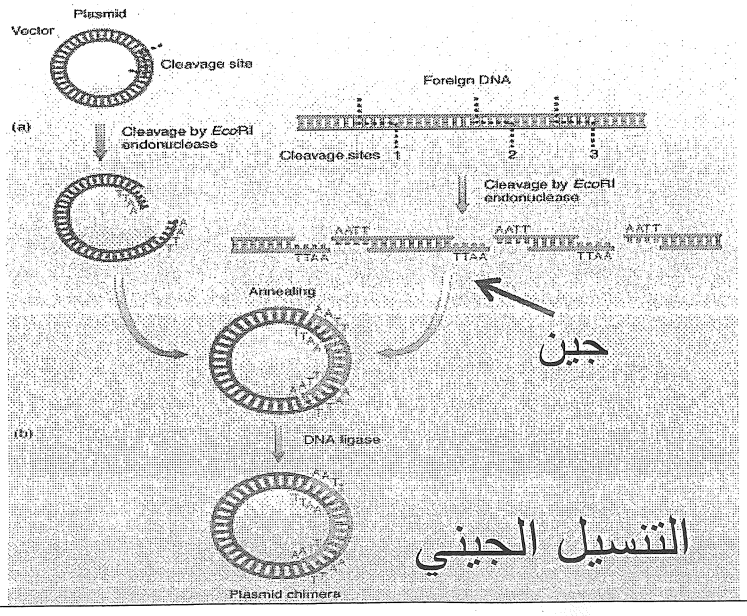


تقانة DNA المؤشب Recombinant DNA technology

وهي أحد أهم تقانات الهندسة الجينية Genetic engineering.

يطلق على هذه التقانة التنسيل الجزيئي Molecular cloning إذا تضمنت إدخال شدف من DNA ضمن حامل أو التنسيل الجيني Gene cloning إذا تضمنت إدخال جين ضمن حامل.

بلاسميد أو حامل



Molecular cloning

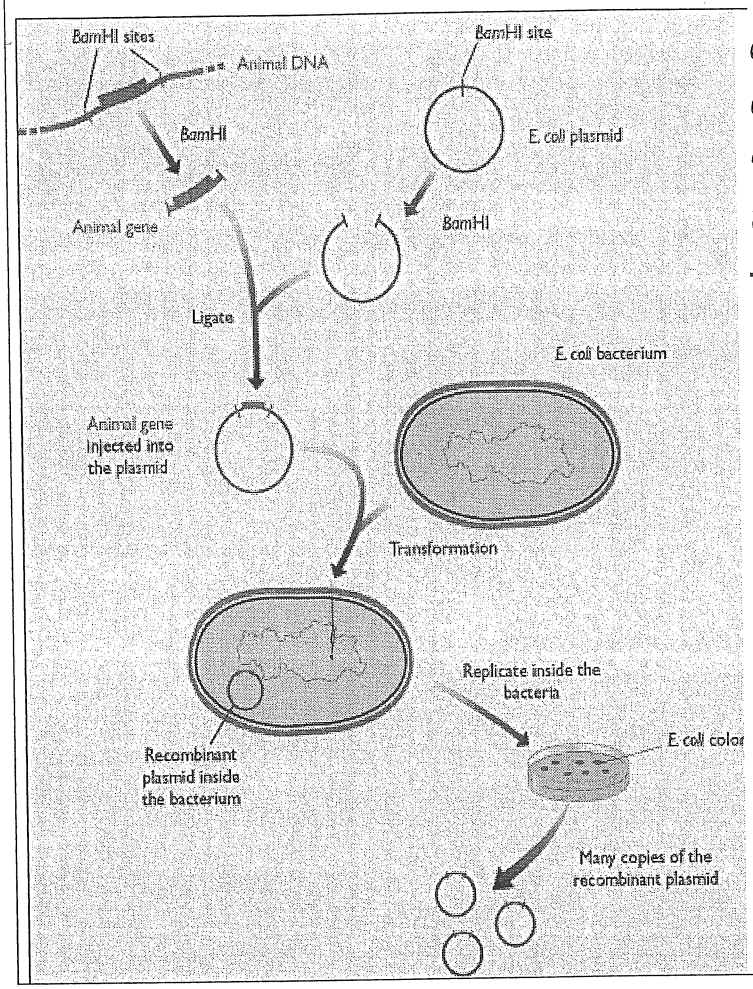
أحد أهم تقانات الهندسة الجينية Genetic engineering

المبدأ العام :

ينجز التنسيل بشكلٍ عام بربط شدفة من DNA هي **المدخل Insert** والتي تكون إما شدفة تقييد أو شدفة ناتجة عن تفاعل PCR أو عبارة عن cDNA مزدوج السلسلة، بـ**الحامل Vector** أو **الناقل Vehicle** (مادة جينية تتصف بقدرتها على التضاعف الذاتي Autoreplication، أي تحوي أصل تضاعف Origin of replication). يتم الربط Ligation بوساطة أنزيم ربط Ligase. يِدخل الجزيء الناتج المسمى **الحامل المأشوب Recombinant Vector** ضمن خلية مضيفة Host بكتيرية غالباً أو في خلايا حقيقية النوى في بعض الأحيان بعملية تسمى **التحوير Transformation**.

تزرع بعدها هذه الخلايا في وسطٍ مغذٍ فيقوم العامل الجيني المأشوب من جهة بالتكاثر ضمن هذه الخلية بفضل أصل التضاعف الخاص به، ومن جهة أخرى تقوم الخلية بالتكاثر بدورها على الوسط المغذي مكاثرةً معها الحامل المأشوب ومشكلةً مستعمرات.

وبفضل ما تحويه الحوامل من جينات انتقاء نستطيع في كثير من الأحيان غربلة المستعمرات المحورة التي تحوي الحامل المأشوب، أي **المستعمرات المأشوبة Recombinant Colonies** وتمييزها عن المستعمرات التي تحوي الحامل الفارغ.



تقطع الشدفة المراد تنسيلها عن التسلسل المحيط بها بوساطة أنزيم تقييد والمثال المستخدم الأنزيم BamHI، تعرف هذه الشدفة بالمُدخل. يستعمل نفس الأنزيم لفتح الجزيء الحامل والمثال أحد أنماط البلاسميدات المستخرج من إحدى سلالات البكتيريا. يتم ربط كل من الشدفة المدخلة والحامل بوساطة أنزيم ربط Ligase، فنحصل على بلاسميد مأشوب Recombinant Plasmid يتم إدخاله في خلايا جرثومية بعملية تعرف بالتحوير Transformation. تزرع بعدها الخلايا الجرثومية المحورة على أطباق تحوي وسطاً مغذياً فتشكل مستعمرات يحوي كل منها حوالي ١٠٦ خلية تحوي اقله نفس العدد من البلاسميدات المحورة.

بعض تطبيقات التنسيل الجزيئي

١. تحضير المكتبات (البنوك) الجينومية Genomic libraries.
٢. تحضير مكتبات (بنوك) cDNA (الجينية).
٣. تكثير شدفة معينة من DNA.
٤. تحضير رسيل جين ما في الزجاج (الانتساخ في الزجاج).
٥. دراسة تسلسل المحضض Promoter لجين ما.
٦. انتساخ مسبار من RNA مضاد المعنى Antisense بهدف استخدامه في تجارب التهجين Hybridization.
٧. التحوير الجيني للعديد من الكائنات الحية البكتيرية أو الخلايا حقيقية النوى المزروعة أو إنتاج نباتات أو حيوانات محورة جينياً.
٨. المعالجة الجينية.
٩. تحضير بروتين مؤشب.

الحوامل المستخدمة في التنسيل

- تتنوع الحوامل المستخدمة بتنوع التطبيق.
- يوضح الجدول التالي أهم الحوامل والأطوال الأعظمية للشدف التي يمكن أن يستوعبها الحامل.

Vector type	Insert size (kb)
Plasmids	up to 15
Phage lambda (λ)	up to 25
Cosmids	up to 45
Bacterial artificial chromosomes (BACs)	120 to 300
Yeast artificial chromosomes (YACs)	250 to 2000

تتنوع الحوامل المستخدمة بتنوع الهدف من التنسيل وبالرغم من تنوعها يجب أن تتمتع بمجموعة من الخصائص.

الخصائص التي يجب أن يتمتع بها الحامل:

١. أن يكون حجمه أصغر ما يمكن كي يتمكن من حمل أطول تسلسل ممكن من DNA المطلوب تنسيله.

٢. أن يكون التعامل معه سهلاً من حيث العزل والتنقية.

٣. أن لا يؤثر وجوده في الخلية المضيفة على حياتها.

٤. أن يتضاعف ضمن الخلية المضيفة بشكل مستقل عن DNA الجينومي للخلية أي يجب أن يحوي أصل تضاعف خاص به.

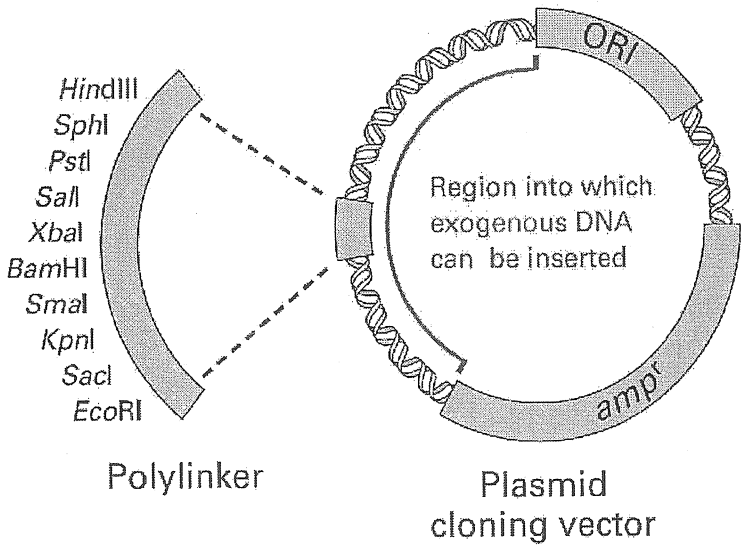
٥. أن يحتوي على خصائص نوعية تسمح بانتقاء النسائل التي تحويه بسهولة، ويكتسب الحامل خصائصه النوعية من خلال احتوائه جينات مقاومة للصادات الحيوية.

٦. أن يحوي على خصائص انتقاء تسمح بالتمييز بين المستعمرات الحاوية على البلاسميد الفارغ وتلك الحاوية على البلاسميد المؤشب.

٧. أن يحوي أكبر عدد ممكن من **مواقع التنسيل المفردة** لتزيد احتمال إدخال الشدف.

- مواقع التنسيل هي عبارة عن تسلسلات تحوي مواقع تقييد مفردة (وحيدة) تسمح بقطع الحامل مرة واحدة فقط.
- الحوامل الطبيعية تحوي عدد قليل من مواقع التقييد التي يمكن استعمالها في التنسيل (مواقع تنسيل).
- أغلب الحوامل المتوفرة حديثاً وهي حوامل طبيعية تم هندستها جينياً تحوي على ما يسمى **Polyliker** أو مواقع التنسيل المتعدد **MCS** Multiple Cloning Sites وهو عبارة عن تسلسل صنعي من DNA، حُضّر بطرائق الهندسة الجينية، يحوي عدداً كبيراً من مواقع التقييد المفردة بجوار بعضها بعض وظيفته تسهيل عملية التنسيل.

Polyliker: MCS



1 2 3 4 5 6 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 7 8

Sac I *Sma I* *Xba I* *Pst I* *Hind III*

atg acc atg att acg aat tcg agc tcg gta ccc ggg gat cct cta gag tcg acc tgc agg cat gca agc ttg gca ctg gcc

EcoRI *Kpn I* *BamH I* *Sal I* *Sph I*

mp19

1 2 3 4 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 5 6 7 8

Hind III *Pst I* *Xba I* *Sma I* *Sac I*

atg acc atg att acg cca agc ttg cat gcc tgc agg tcg act cta gag gat ccc cgg gta ccg agc tcg aat tca ctg gcc

Sph I *Sal I* *BamH I* *Kpn I* *EcoRI*

الحوامل الطبيعية تحوي عدد قليل من مواقع التقييد التي يمكن استعمالها في التنسيل (مواقع تنسيل).

الخلايا المضيفة

أهم أنماط الخلايا المضيفة :

- **البكتيريا** بشكل خاص: *Escherichia coli* و *Bacillus subtilis*
- **الخميرة Yeast** خاصة النوع *Saccharomyces cerevisiae*.
- **الخلايا الحيوانية المزروعة (خلايا الثدييات)**، بشكل خاص: الخلايا Chinese hamster ovary cells (CHO)، والخلايا HEK 293 Human Embryonic Kidney 293 cells.

الخصائص التي يجب أن تتمتع بها الخلايا المضيفة

السلالات البكتيرية المستخدمة:

- أن تكون السلالات غير ممرضة.
- أن لا تحوي على بلاسميدات طبيعية كي لا تشوب البلاسميد المأشوب عند تنقيته.
- أن لا تملك أي نمط من أنزيمات التقييد لتفادي تخريب الحوامل المدخلة ضمنها.

فيما يخص خلايا الثدييات المزروعة:

- أن لا تحوي السلالات المستخدمة على أنزيمات من نمط الريكومبيناز لتفادي أي تفاعل تأشيب يمكن أن يحدث بين DNA المُدخل Insert و DNA الخلية.

- في حال كون الهدف من التنسيل هو تكثير البلاسميد المأشوب فقط، كما هي الحال في معظم استخدامات التنسيل، نلجأ إلى استخدام سلالة غير ممرضة من البكتيريا لإدخال الحامل المأشوب ضمنها.
- غالباً ما يستخدم هذا النوع من الخلايا المضيفة للحوامل المأشوبة وذلك لسهولة التعامل معها ولعدم حاجتها إلى أوساط زرع معقدة ولقدرتها على التكاثر السريع.
- كما يمكن استخدام خلايا الخميرة كخلايا مضيفة و ذلك عند استخدام حوامل YAC وفي بعض التجارب يمكن استخدام خلايا الثدييات المزروعة وذلك في حال كون الهدف من عملية التنسيل هو إنتاج بروتين فعال حيث نستخدم عندها خط خلوي حقيقي النوى غالباً ما يكون بشري أو محضر ابتداءً من خلايا القوارض.

- عندما يكون الهدف من التنسيل هو تحضير حوامل مأشوبة لاستخدامها في الحصول على حيوانات (أو نباتات) محورة جينياً (فئران Knock Out مثلاً)

نستخدم عندها الخلايا البيوض الملقحة أو الجنينية الجذعية Embryonic Stem Cells (ES) فيما يتعلق بالحيوانات.

والخلايا الجذعية المزوعة فيما يتعلق بالنباتات.

- وفي جميع الأحوال تزرع بعدها الخلايا المحورة Transformed cells في وسطٍ مغذٍ فيقوم العامل الجيني المأشوب من جهة بالتكاثر ضمن هذه الخلايا بفضل أصل التضاعف الخاص به ومن جهة أخرى تنقسم الخلايا متكاثرة بدورها على الوسط المغذي ومكاثرة معها الحامل المأشوب ومشكلةً مستعمرات.

التحوير Transformation

وهي آلية تحدث بالطبيعة عندما يدخل DNA عاري الخلايا الجرثومية من الوسط المحيط. عندها يمكن لـDNA المدخل أن يغير صفات الخلايا البكتيرية التي دخل إليها، بحسب ما يحمله من جينات.

بما أن كفاءة هذه الآلية منخفضة جداً في البكتريا الطبيعية لذلك تحضر البكتريا بطريقة خاصة بحيث تزداد كفاءتها على استقبال البلاسميد.

فنحصل نتيجة التحضير على ما يعرف بالخلايا المهيئة لاستقبال البلاسميد competent cells.

يؤدي التحضير إلى إزالة الجدار الخلوي للخلية أو أحياناً إضعافه فقط مما يسمح لهذه البكتيريا باستقبال البلاسميد بكفاءة عالية.

Transformation

- **التثقيب الكهربائي Electroporation.** باستخدام جهاز خاص يعتمد على تعريض الخلايا لصدمة كهربائية مدروسة الشدة والزمن مما يؤدي إلى فتح ثقوب لحظية في جدرانها تسمح بدخول الحامل المؤشب.

البكتيريا+الخميرية+ الثدييات

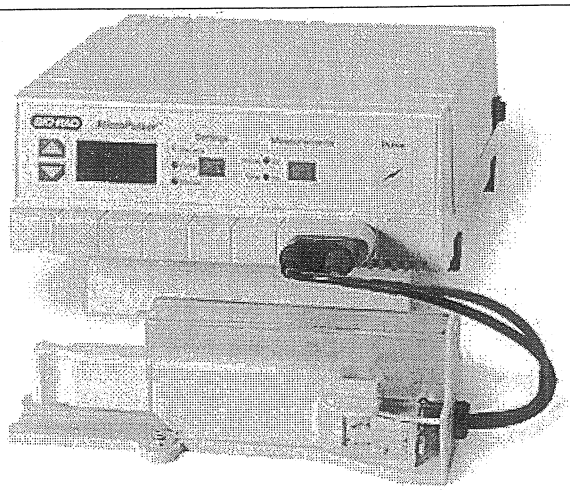
- **الصدمة الحرارية. البكتيريا.**
- **مواد تندمج مع الغشاء الستوبلاسمي. خلايا الثدييات.**
- **الحقن المجهري للمادة الجينية ضمن الخلايا البيضية مثلاً بهدف إنتاج حيوانات محورة جينياً.**
- **المدفع الجيني فيما يتعلق بالنباتات.**
- **استخدام الفيروسات كنواقل للمادة الجينية بالاعتماد على قدرتها على إصابة الخلايا.**

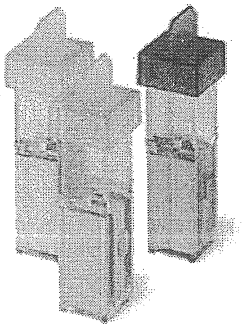
أهم طرائق تحوير الخلايا البكتيرية:

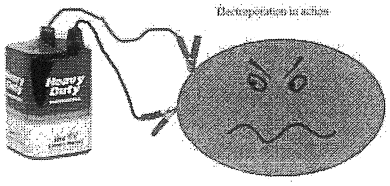
التثقيب الكهربائي Electroporation (الصدمة الكهربائية):

يستخدم لتحوير كلٍ من الخلايا البكتيرية وحقيقية النوى على حدٍ سواء. حيث يستخدم لذلك جهاز خاص يدعى المثقب الكهربائي Electroporator

يُعمد بعدها إلى إحداث صدمة كهربائية ذات فرق كمون مرتفع جداً خلال فترة زمنية قصيرة جداً (ميلي ثانية). تولد هذه الصدمة الكهربائية في جدران الخلايا ما يشبه الثقوب الدقيقة لحظية التشكل وتؤدي إلى حركة البلاسميد المأشوب ضمن الوسط، كونه جزيئة مشحونة، إلى دخوله ضمن ثقوب الخلايا المتشكلة بشكل آني والتي لا تلبث أن تغلق من جديد بنفس السرعة التي تشكلت فيها مبقية على البلاسميد داخل الخلية التي تصبح محورة جينياً.







جهاز التثقيب الكهربائي Electroporator أو Micropulser