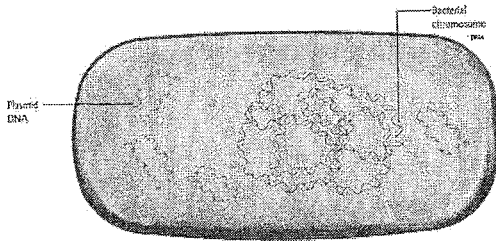


الصدمة الحرارية:

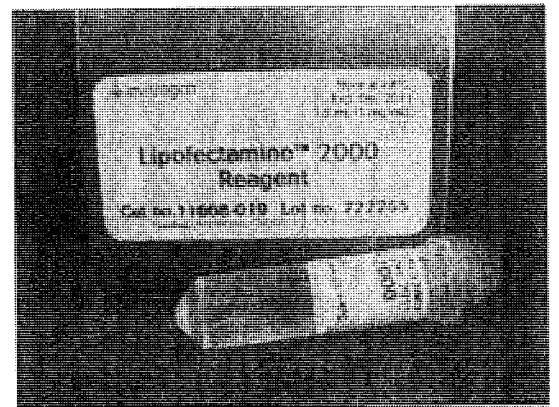
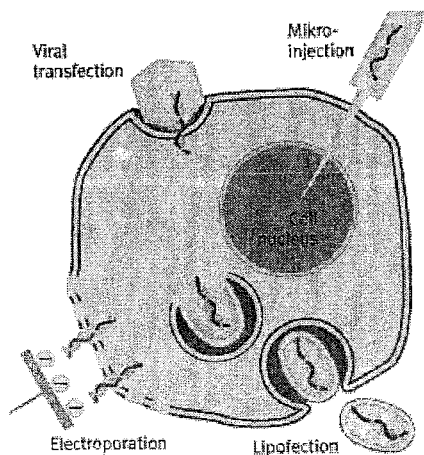
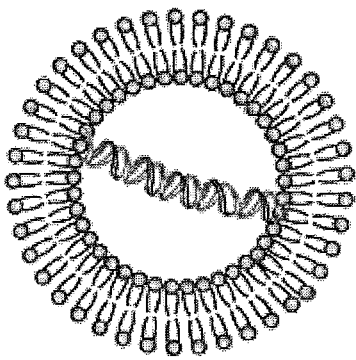
توضع الخلايا البكتيرية مع البلاسميد المأشوب في أنبوب واحد ثم يخلط المزيج جيداً ويوضع عند درجة حرارة منخفضة (تلق مباشر $+4^{\circ}\text{C}$) لعدة دقائق بعدها يعرض المزيج إلى صدمة حرارية (حرارة تقارب 42° درجة) لعدة ثواني (حوالي 45 ثانية) بنتيجة هذه الحرارة المرتفعة المفاجأة تفتح ثقب مجهرية Micropores في الغشاء الخلوي البكتيري يدخل عبرها البلاسميد المأشوب ضمن الخلايا.

يعاد وضع المزيج بسرعة عند الدرجة $+4^{\circ}\text{C}$ فتغلق الثقوب على البلاسميد وتصبح عندها خلايا بكتيريا محورة جينياً.



Transformation

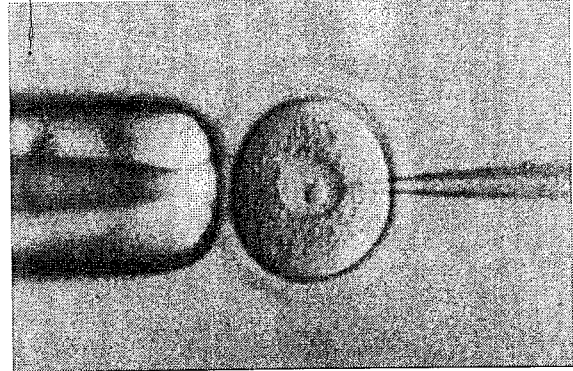
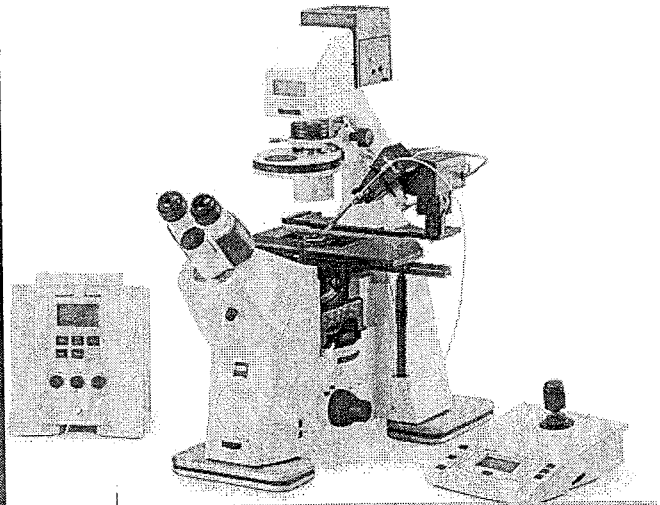
مواد تندمج مع الغشاء الستوبلاسمي: أغلب هذه المواد من طبيعة فوسفوليبيدية يمكن بتماسها مع الغشاء السيتوبلاسمي ليبيدي البنية أن تندمج معه. مثال: مادة الليبوفيكتامين lipofectamine التي تمزج مع الحامل المؤشب وتوضع على تماس مع الخلايا في وسط الزرع.



الحقن المجهرى Microinjection والمدفع الجينى



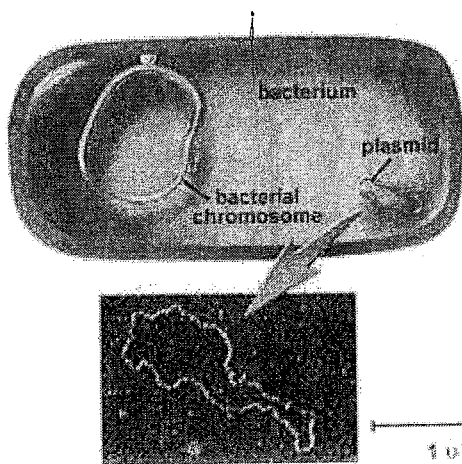
بهدف إنتاج نباتات محورة جينياً



بهدف إنتاج حيوانات محورة جينياً

أهم الحوامل المستخدمة في التنسيل الجيني:

البلاسميدات Plasmids



تعد البلاسميدات أول الحوامل المستخدمة ولا تزال أكثر الحوامل استخداماً، وهي جزيئات من DNA حلقة الشكل وخارج كروموزومية Extrachromosomic موجودة بشكل طبيعي لدى كثير من السلالات البكتيرية ولدى بعض حقيقيات النوى وحيدات الخلية.

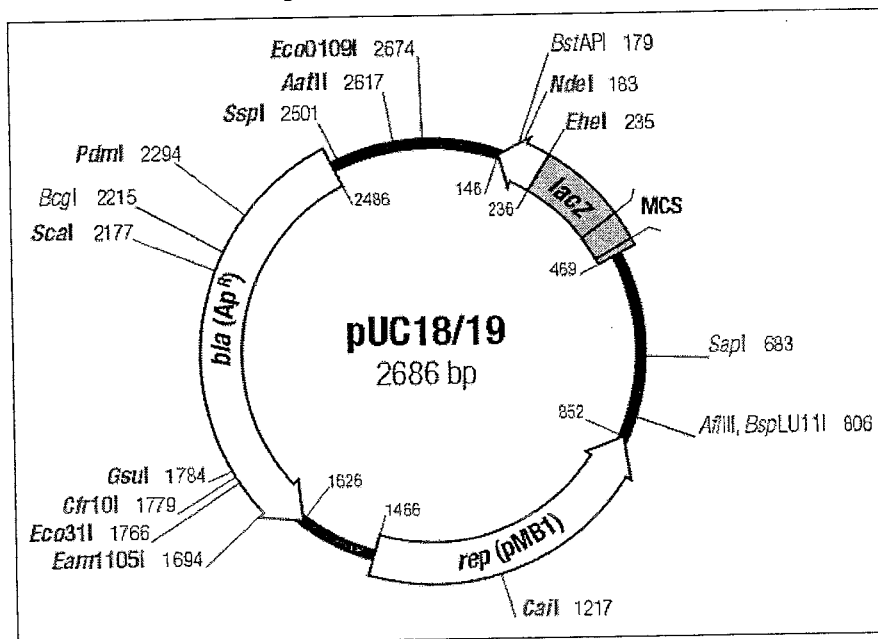
تتراوح أحجام Sizes البلاسميدات الطبيعية (أطوالها) بين ٢ و ٢٠ كيلو أساس، واحتوائها على أصل تضاعف ORI خاص يسمح لها بالتضاعف بمعزل عن DNA الجينومي للخلية وبالتالي يمكن أن توجد بأعداد (نسخ) كبيرة في الخلية الواحدة تصل إلى ٧٠٠ نسخة في بعض الأحيان.

أهم الحوامل المستخدمة في التنسيل الجيني: البلاسميدات Plasmids

- يصل طول DNA الذي يمكن إدخاله ضمن البلاسميدات إلى 15kb وذلك بحسب نوع البلاسميد.
- قامت شركات التقنية الحيوية باستخدام البلاسميدات الطبيعية في تطوير الكثير من عائلات البلاسميدات الصناعية بوساطة تقانات الهندسة الجينية.
- تستعمل البلاسميدات في التنسيل الجزيئي بهدف تكثير قطعة من DNA (حوامل التنسيل Cloning vectors) أو بهدف إنتاج بروتين مؤشب (حوامل التعبير الجيني expression vectors).

يتوافر حالياً عدة أجيال من البلاسميدات وتعد بلاسميدات الجيل الثالث أكثر البلاسميدات استخداماً وأهم أنواعها على سبيل المثال لا الحصر:

العائلة pUC



أحجام أفراد هذه العائلة حوالي ٢٦٠٠ bp تقريباً وتحتوي:

• الجين المقاومة للصاد الحيوي الأمبسيلين Ampicillin (Ap^R) تسمح بانتقاء المستعمرات المحورة بزراعتها على وسط مغذي انتقائي يحوي الأمبسلين.

• الجين LacZ (reporter gene) (أحد جينات أوبيرون اللاكتوزو التي ترمز البروتين الأنزيمي بيتا غالاكتوزيداز)، تسمح بانتقاء المستعمرات الحاوية على البلاسميد المؤشب وذلك بالاعتماد على الفعالية الأنزيمية للبيتا غالاكتوزيداز في استقلاب ركيزة مولدة للون Chromogene هي Xgal والتي تعطي نتيجة التفاعل الأنزيمي رسابة زرقاء تلون بها الخلايا التي تحويها وبالتالي المستعمرة.

• Polyliker أو التسلسل MCS الذي يسهل عملية التنسيل بفضل ما يحويه من مواقع تقييد مفردة.

• أصل تضاعف rep، يسمح له بالتضاعف ضمن الخلايا البكتيرية.

• العائلة Gemini[®]

أحجام أفراد هذه العائلة لا تتجاوز 3000bp و تحوي الجين المقاوم للصاد الحيوي الامبيسيلين بينما تفتقد لجين LacZ فلا يمكن استخدامها في عمليات انتقاء المستعمرات أبيض/أزرق. في حين تحوي على أطراف Polyliker تسلسلين لمحضضين Promoters فاجيين خاصين بانزيمي نسخ من نمط RNA بوليميراز وهما الأنزيم SP6 و الأنزيم T7.

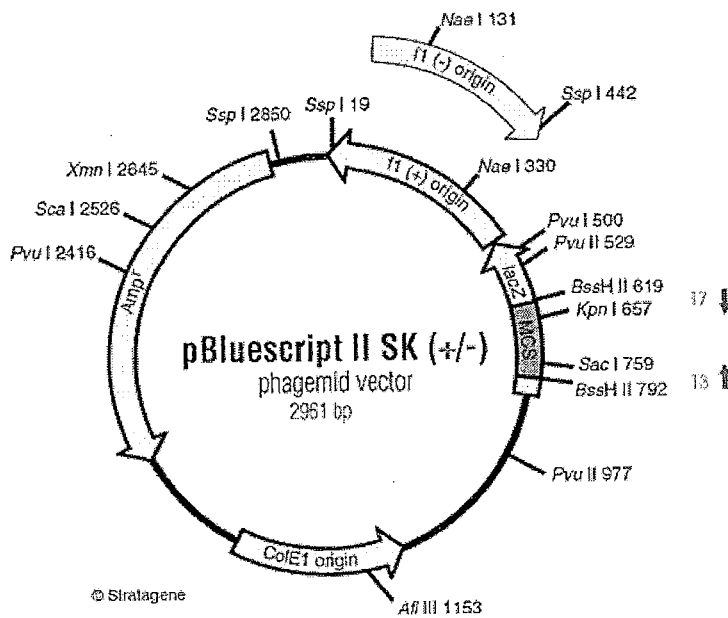
أهم ميزات هذه البلاسميدات إمكانية انتساخ رسيل الجين المنسلة ضمنا مباشرة في الزجاج بفضل أحد المحضضين الفاجيين كما أنه من السهل انتساخ RNA المضاد المعنى بفضل المحضض الثاني و استخدامه في تحضير مسابر ريبونكليوتيدية للكشف عن الرسيل.

• العائلة BlueScript

تعد هذه العائلة بما تحويه من أفراد واحدة من أكثر البلاسميدات تعقيداً و كمالاً و كفاءةً. و ذلك بسبب جمعها لميزات أفراد العائلتين السابقتين بالإضافة إلى ميزات أخرى جديدة. لقد تم تطوير هذه البلاسميدات ابتداءً من بلاسميدات العائلة Gemini بعد استبدال تسلسل المحضض الفاجي SP6 بتسلسل محضض فاجي آخر لكنه أكثر كفاءة و هو المحضض T3.

و قد تم إضافة التسلسل المرمر لجين LacZ الموجود في بلاسميدات العائلة pUC مما يسمح بإمكانية انتقاء المستعمرات المشوبة بطريقة لونية أبيض/أزرق.

كما أن لهذا البلاسميد إمكانية انتساخ الجين المنسلة ضمنه وذلك في الخلايا البكتيرية بفضل احتوائه على محضض الجين LacZ.



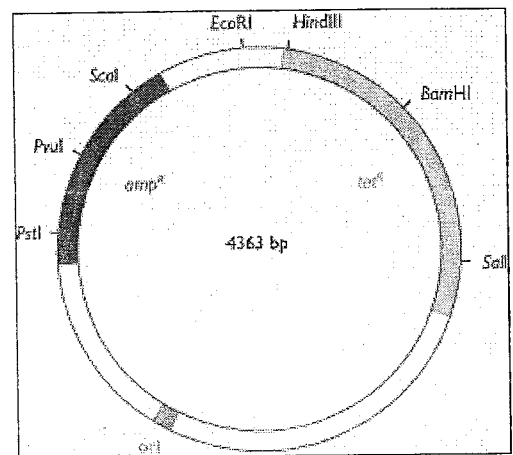
يحتوي البلاسميد على أصل تضاعف ColE1، وعلى جين المقاومة للصاد الحيوي الامبسلين Amp^r، بالإضافة إلى الجين LacZ مرمرزة لأحد السلاسل البيبتيدية المكونة لأنزيم الغالاكتوزيداز. لاحظ الشدفة MCS ضمن الجين LacZ والمحاطة بتسلسلي المحضضين الفاجين T7 و T3. يعطى التسلسل النكليوتيدي للشدفة MCS أسفل البلاسميد مع مواقع التقييد المفردة التي تحويها. لاحظ أيضاً مواقع التقييد المنتشرة على محيط البلاسميد حيث تشير الأرقام إلى المواقع الذي يحدث عندها القطع.

انتقاء المستعمرات الجرثومية الحاوية على البلاسميد المأشوب

يمكن انتقاء المستعمرات المأشوبة بالاعتماد على الصفات التي يحملها البلاسميد المستخدم للتنسيل (بالإضافة إلى المقاومة للصادات الحيوية).

- الجيل الثاني من البلاسميدات يعتمد على طريقة الانتقاء السلبي Negative selection.
- الجيل الثالث الأحدث يعتمد على الانتقاء الايجابي Positive selection

الحامل pBR322 بني بربط عدة شدف تقييد من ثلاث بلاسميدات طبيعية مأخوذة من *E. coli* وهي: R1, R6.5 and pMB1 .
بلاسميد بحجم 4363 شفع من الأسس. يحوي أصل تضاعف وجينتين مقاومتين للصادين الحيويين: tet^R tetracycline and amp^R ampicillin. تستعمل هاتين الجينتين كواسمات انتقاء selectable markers لانتهاء المستعمرات المؤشبة حيث عادة ما تكون البكتيريا حساسة لكل الصادين قبل دخول البلاسميد.



ampicillin-resistance gene (amp^R),
tetracycline-resistance gene (tet^R),
the origin of replication (ori)

الانتقاء السلبي

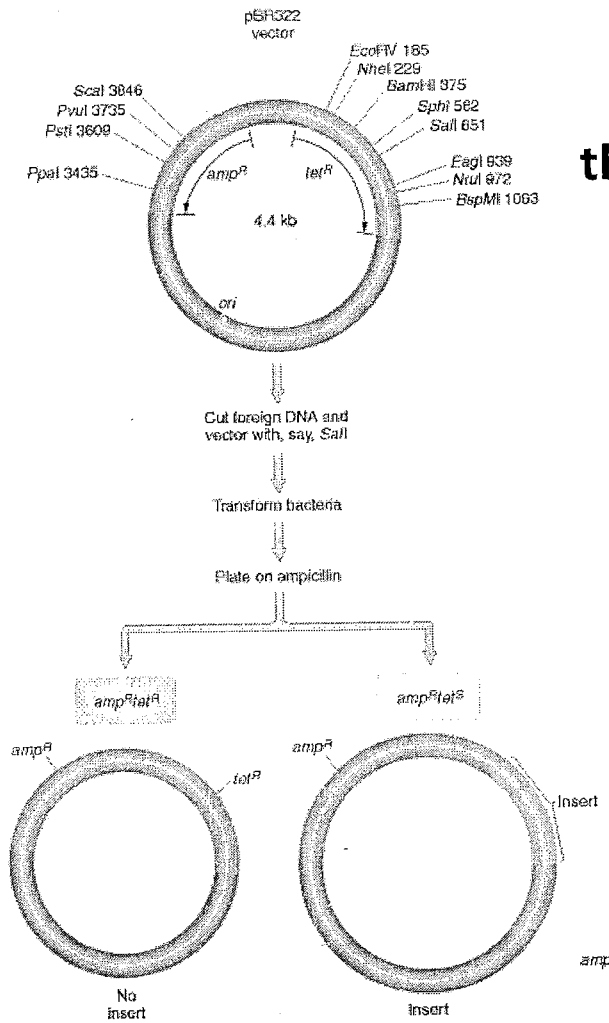
the cloning procedure:

طريقة التنسيل ضمن الحامل:

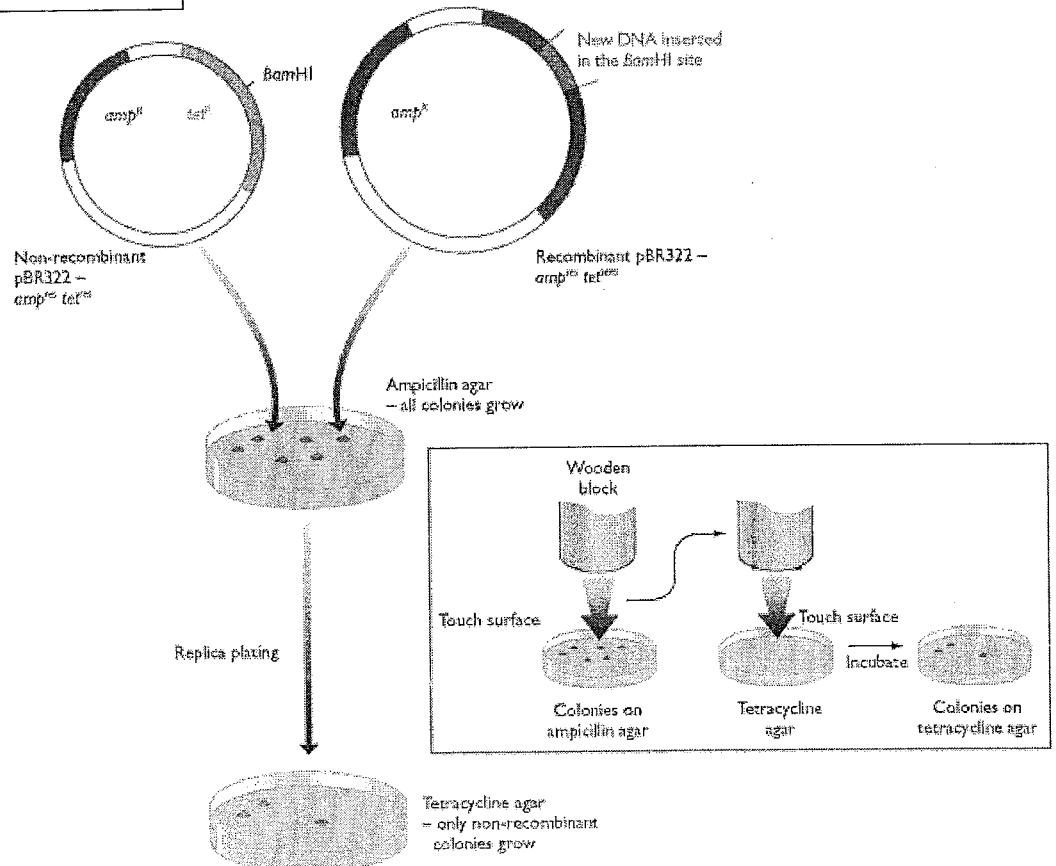
يدخل DNA ضمن الجين tet^R مما يؤدي إلى تعطيلها tet^R gene

(تصبح غير فعالة).

بعد التحويل تنمى الخلايا على مستعمرات: ويتم اختيار المستعمرات المؤشبة والتي تكون مقاومة للأمبسلين وحساسة للتيرتراسكلين $Amp^R Tet^S$ colonies



Negative selection



the $Amp^R Tet^S$ colonies are the ones that contain recombinant DNA.

احتواء البلاسميد على جينيين مقاومين لصادين حيويين مختلفين كالأمبسلين و التيتراسكلين، حيث يؤدي التأشيب غالباً إلى تعطيل إحدى الجينيتين مغيراً الصفات التي تحملها المستعمرات المحورة به، مما يؤدي إلى نموها على وسط يحوي احد الصادين الحيويين دون الآخر، وبالتالي يمكن التميز بين المستعمرات الحاوية على البلاسميد المأشوب تلك التي لا تستطيع النمو على وسط يحوي صاد معين نتيجة تخريب الجين المرمرز لمقاومته لأن تنسيل الشدفة المطلوبة تم ضمنه، وبين المستعمرات التي تنمو بوجود هذا الصاد نتيجة احتوائها على الجين المقاوم له بشكل سليم وهي المستعمرات التي لا تحوي على الشدفة المطلوبة أي المستعمرات غير المأشوبة. و بهذا الشكل يمكن التميز بين نوعين المستعمرات المأشوبة و غير المأشوبة في خطوتين متتاليتين.

الانتقاء الايجابي الانتقاء أبيض/أزرق

- الانتقاء الايجابي Positive selection أو ما يسمى تفاعل التتامية ألفا Alpha complementation الناتج عن احتواء البلاسميد على جزء من الجين الجرثومية LacZ المرمرزة للبيبتيد ألفا لأنزيم بيتا غالاكتوزيداز.

هو تفاعل يمكن انجازه بخطوة زراعة واحدة مما يختصر الكثير من الوقت.

تم استعارة فكرة هذا النمط من الانتقاء من أوبيرون اللاكتوز البكتيري.

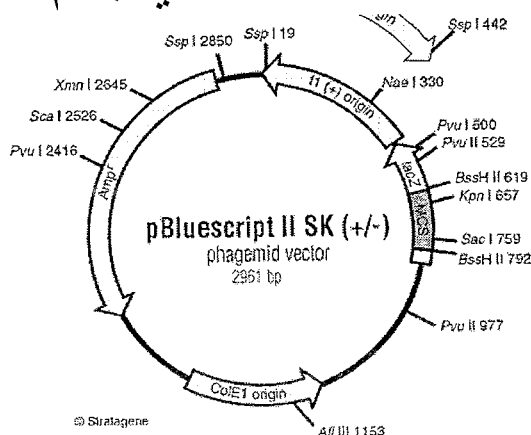
حيث يحوي هذا الأبيرون في السلالات البكتيرية التي تستقلب اللاكتوز على ثلاثة جينات رئيسية، وجين LacZ المرمز لأنزيم بيتا غالاكتوزيداز واحد منها.

يُفعل أوبيرون اللاكتوز عند توفر سكر اللاكتوز أو أحد مضاهئيه في وسط زرع الجراثيم.

في هذا النمط من الانتقاء يتم اختيار سلالات من البكتيريا معدلة جينياً لا تستقلب اللاكتوز لعوزها لبيبتيد هو جزء من الأنزيم بيتا غالاكتوزيداز يدعى هذا البيبتيد **ألفا**.

بينما يتم استخدام بلاسميد يحوي التسلسل المرمز للبيبتيد ألفا كما ويتم إدخال ضمن هذا التسلسل الموقع متعدد التنسيل MCS أو بوليلينكر Polyliker.

نظرياً تحويل هذه السلالة من البكتيريا المعدلة جينياً بهذا النمط من البلاسميد سيحمل صفة جديدة للبكتيريا وهي استقلاب اللاكتوز في وسط يحوي هذا السكر بفضل تعبيره عن البيبتيد ألفا الذي يتم أنزيم بيتا غالاكتوزيداز.



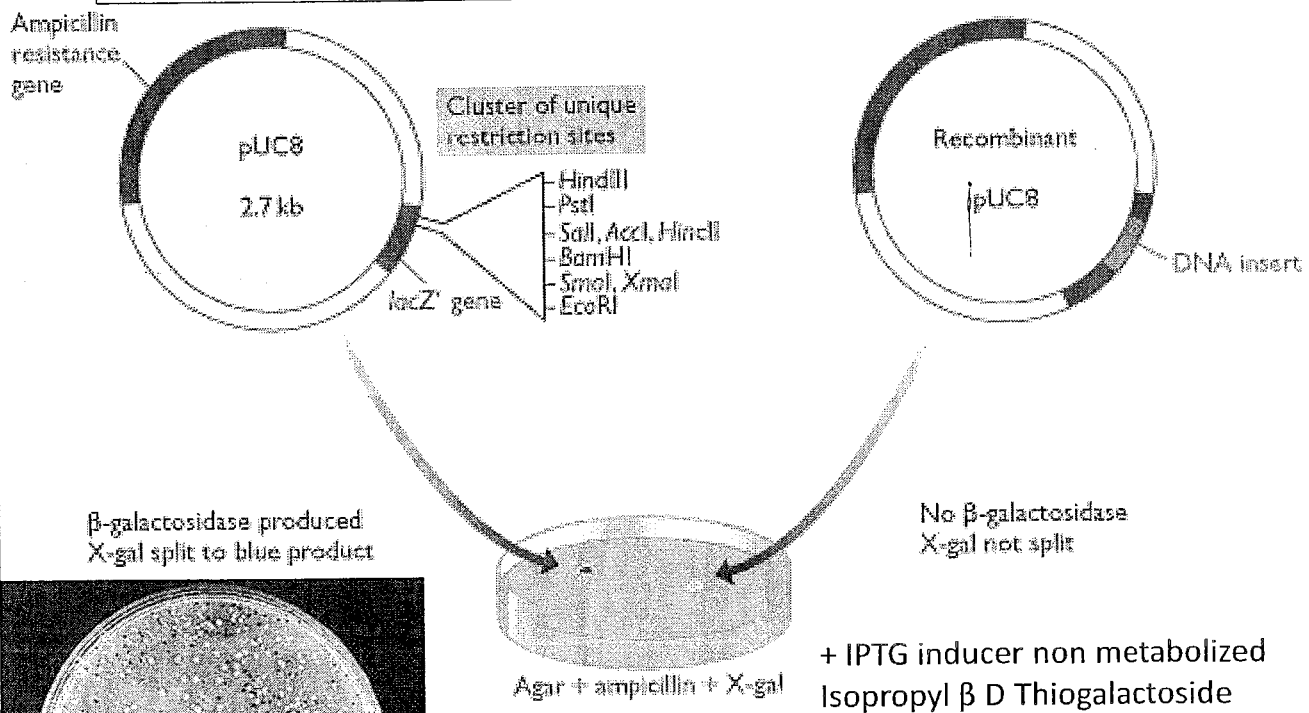
من الناحية العملية يتم استخدام هذا النمط البلازميدي للانتقاء الايجابي للمستعمرات المشوبة.

حيث يتم تنسيل الشدفة المدخلة Insert المطلوبة ضمن MCS البلازميد، حيث يؤدي هذا إلى إعطاب التسلسل المرمز للبيتيد ألفا ويوقف التعبير عنه.

فأخليا البكتيرية المحورة بالبلازميد الفارغ سوف يكون لها القدرة على استقلاب اللاكتوز بفضل البيتيد ألفا المتمم للأنزيم بينما لا تستطيع المستعمرات المحورة بالبلازميد المشوب استقلاب اللاكتوز.

في الحالة الطبيعية يحوي طبق الزرع نوعي المستعمرات المحورة بالبلازميد الفارغ والمحورة بالبلازميد المشوب، فإذا تم إضافة اللاكتوز أو احد المضاهئات مثل IPTG (β -D-1-Isopropyl thiogalactopyranoside) إلى طبق الزرع سيعمل عندها الاوبيرون.

Positive selection OR white bleu selection



Recombinant selection with pUC8.

ويمكن للأنزيم بيتا غالكتوزيداز الكامل (في المستعمرات المحورة بالبلاسميد الفارغ) أن يستقلب مادة تسمى X-Gal تضاف أيضاً إلى وسط الزرع أثناء تحضيره فينتج عن التفاعل الأنزيمي مادة زرقاء اللون تصبغ المستعمرة المحورة بالبلاسميد الفارغ باللون الأزرق.

بينما المستعمرات المأشوبة يعوزها أنزيم البيتا غالكتوزيداز الفعال فتفشل في استقلاب الركيزة وهي مادة X-Gal فتبقى بيضاء اللون ويمكن تمييزها بسهولة عن المستعمرات الملونة بالأزرق ومن هنا أتى اسم هذا الانتقاء ابيض/ازرق.

استراتيجيات التنسيل

تختلف تلك الاستراتيجيات باختلاف طبيعة الشدفة المراد تنسيلها. أهم الاستراتيجيات المستخدمة في تنسيل شدفة من DNA ضمن بلاسميد ما هي:

استراتيجيات تنسيل شدفة من DNA ناتجة عن عملية هضم بواسطة أنزيمات التقييد (شدفة تقييد).

يمكن التمييز بين طريقتين لتنسيل شدفة تقييد وذلك بحسب عدد أنزيمات التقييد المستخدمة لتحضيرها:

• استخدام أنزيم واحد لتحضير الشدفة المطلوب إدخالها Insert.

• استخدام أنزيمي تقييد مختلفين لتحضير الشدفة المدخلة Insert.

استخدام أنزيم واحد لتحضير الشدفة المطلوب إدخالها Insert

- في هذه الحال يجب استخدام نفس الأنزيم لقطع البلاسميد وفي هذه الحال يجب معالجة البلاسميد بعد قطعه بأنزيم ينزع الزمرة الفوسفاتية من النهاية 5' لتفادي عودة انغلاق البلاسميد على نفسه عند استخدام أنزيم الربط الليغاز بهدف ربط الشدفة المدخلة بالبلاسميد.
- في المرحلة التالية يتم تنقية كل من الشدفة والبلاسميد. تنقى الشدفة عن باقي DNA الذي اقتطعت منه بواسطة الرحلان الكهربائي التحضيري. بينما ينقى البلاسميد الذي تمت معالجته بالأنزيمات المطلوبة بهدف التخلص من هذه البروتينات وذلك بطريقة الاستخلاص الفينولي المتبوع بالترسيب الكحولي أو باستخدام كيت خاص بالتنقية.

استخدام أنزيمي تقييد مختلفين لتحضير الشدفة المدخلة

Insert

- في هذه الحال يجب قطع البلاسميد بنفس الأنزيمات ويعمد عندها إلى تنقية البلاسميد المعالج بالرحلان الكهربائي التحضيري لتخلص من الشدفة المبعدة من البلاسميد والتي توجد عادة بين موقعي التقييد تفادياً لإعادة ربطها بالبلاسميد عند استخدام الليغاز.
- إدخال الشدفة بهذه الطريقة يكون موجهاً أي لا يمكن لها أن تدخل إلا بشكل واحدٍ والنتيجة نمط واحد من البلاسميدات المشوبة.
- إدخال شدفة من DNA ضمن بلاسميد مقطوع بأنزيم تقييد واحد فقط يعد إدخالاً غير موجهاً حيث يمكن للشدفة أن تدخل بتوجهين مختلفين مما ينتج عنه نوعين من البلاسميدات المشوبة وذلك بحسب توجه الشدفة المدخلة الذي تحكمه الصدفة.

استخدام أنزيمي تقييد مختلفين لتحضير الشدفة المدخلة Insert

