الجامعة السورية الخاصة
SYRIAN PRIVATE UNIVERSITY

كـلـيـــة الصيدلة
Faculty of Pharmacy

السنة الثالثة

مقرر الهندسة الوراثية (الجينية)

المحاضرة الثانية عشرة

2019-2020

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.

تقانة DNA المؤشب Recombinant DNA technology

- ممكن انجاز DNA المؤشب من حيث المبدأ لأن جزيئات DNA في جميع الكائنات الحية تتشارك بالبنية الكيميائية وبالتالي يمكن جمعها معاً.

- عملياً ممكن تحضير DNA المؤشب لتوفر الأدوات الجزيئية وهي الأنزيمات (القطع والوصل بشكل رئيس).

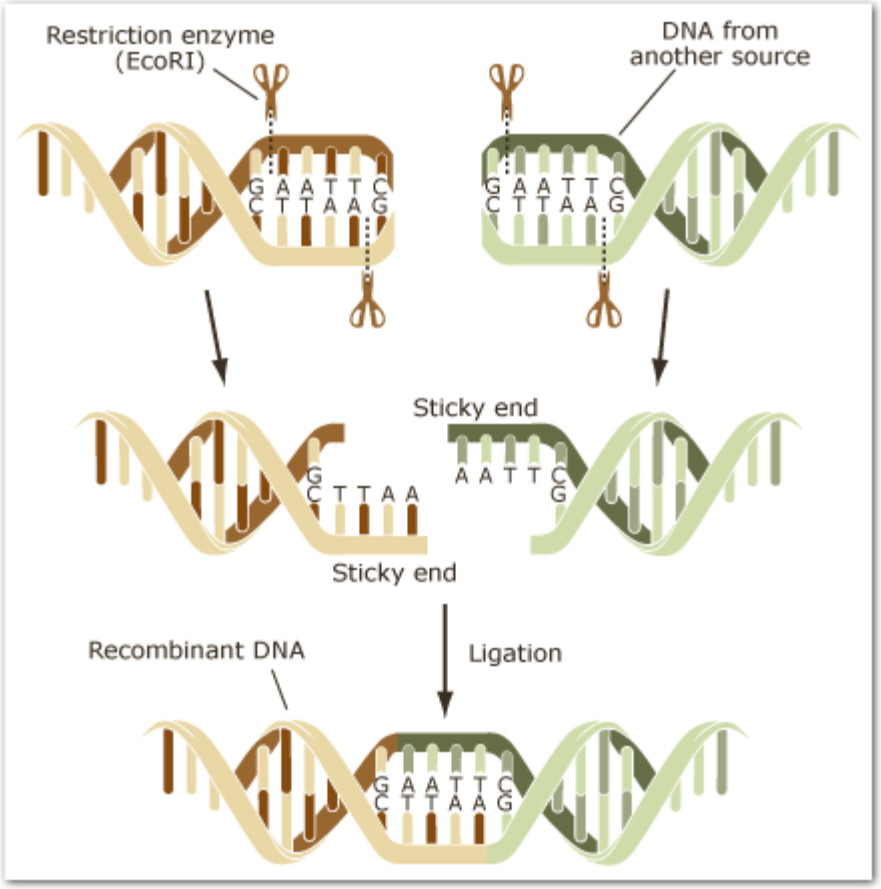
DNA Recombinant المؤشب DNA

المبدأ العام

قطع جزيئين من DNA من مصدرين مختلفين بوساطة أنزيم تقييد واحد

قطع متتامة بحواف لزجة

ربط القطع بوساطة أنزيم ربط

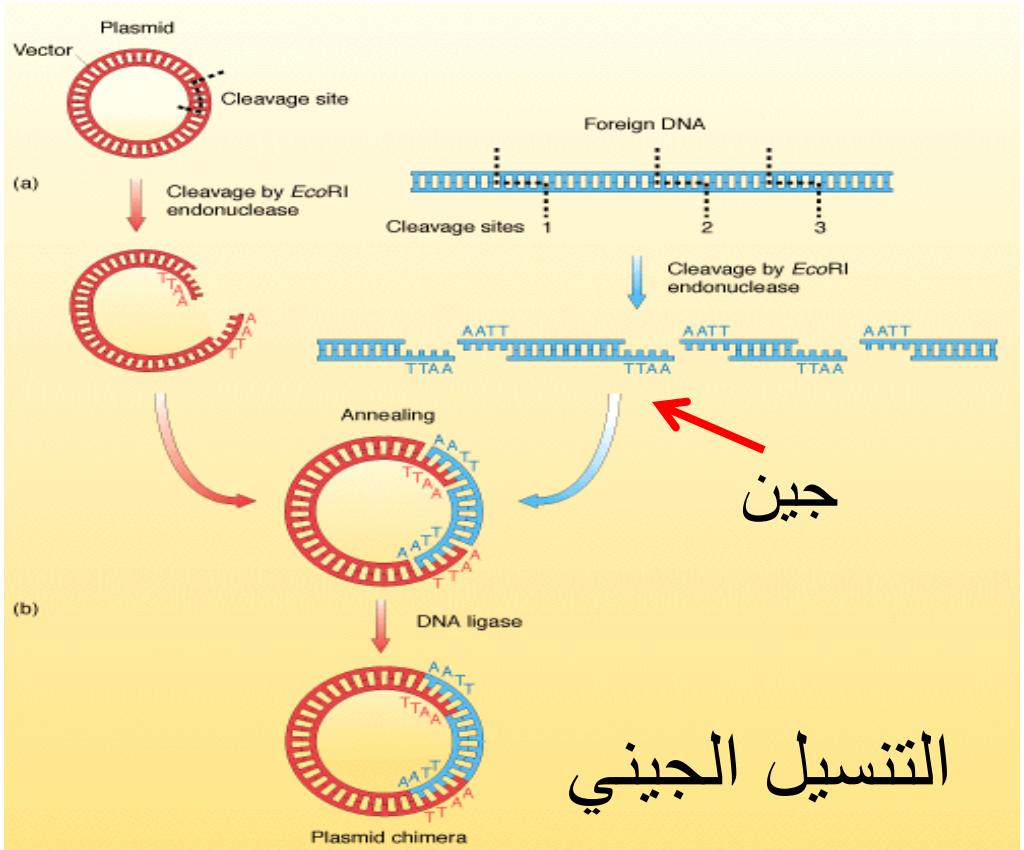


تقانة DNA المؤشب Recombinant DNA technology

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).

Molecular cloning

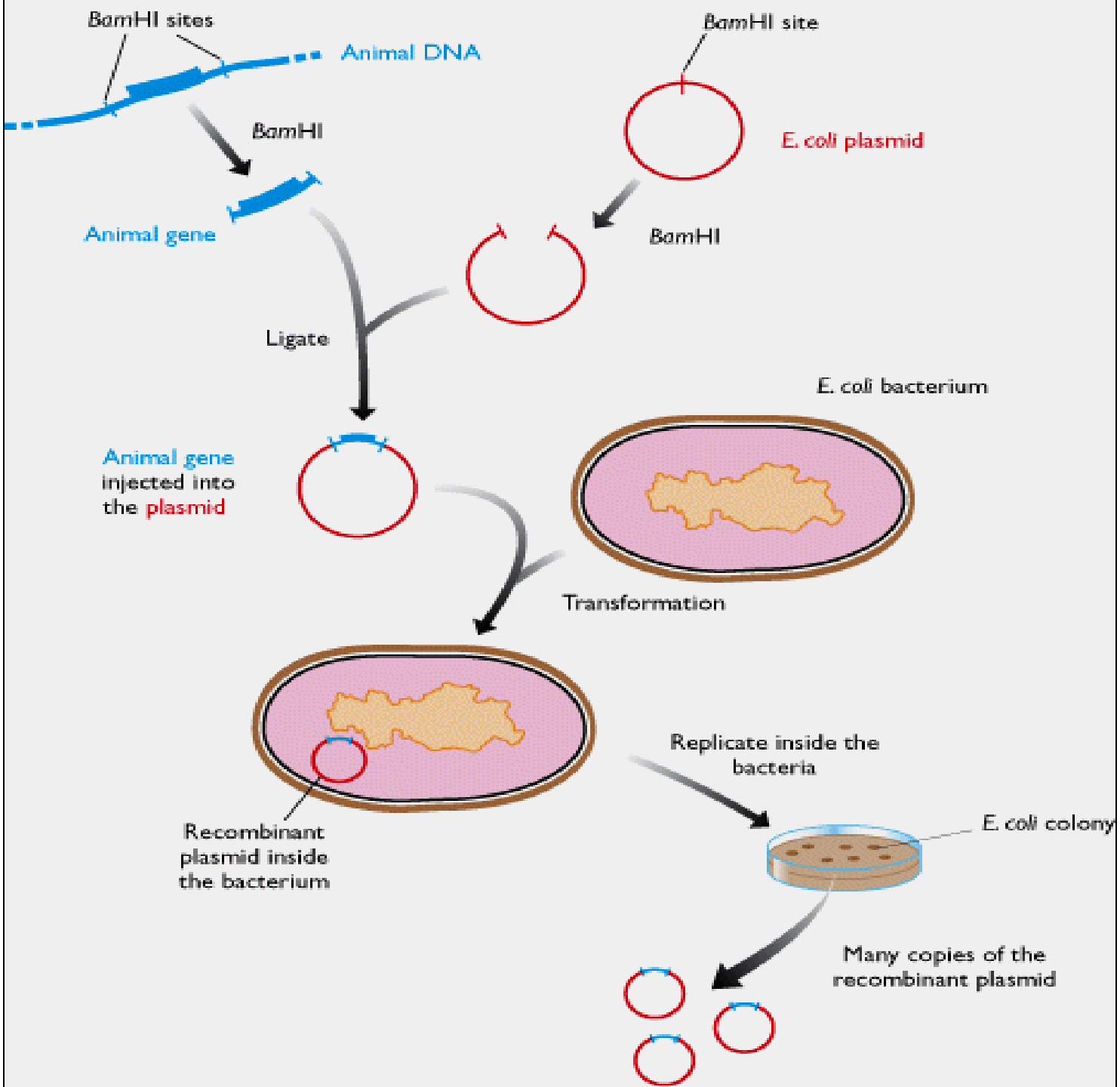
أحد أهم تقانات الهندسة الجينية Genetic engineering

المبدأ العام :

يتم الربط Ligation بوساطة أنزيم ربط Ligase. يدخل 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 Colonies Recombinant** وتمييزها عن المستعمرات التي تحوي الحامل الفارغ.


BamHI sites
Animal DNA
BamHI
Animal gene
BamHI site
E. coli plasmid
BamHI
Ligate
E. coli bacterium
Animal gene
injected into
the plasmid
Transformation
Recombinant
plasmid inside
the bacterium
Replicate inside the
bacteria
E. coli colony
Many copies of the
recombinant plasmid

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 10^6 خلية تحوي اقله نفس العدد من البلاسميدات المحورة.

بعض تطبيقات التنسيل الجزيئي

I. تحضير المكتبات (البنوك) الجينومية Genomic libraries.
II. تحضير مكتبات (بنوك) cDNA (الجينية).
III. تكثير شدفة معينة من DNA.
IV. تحضير رسيل جين ما في الزجاج (الانتساخ في الزجاج).
V. دراسة تسلسل المحضض Promoter لجين ما.
VI. انتساخ مسبار من RNA مضاد المعنى Antisense بهدف استخدامه في تجارب التهجين Hybridization.
VII. التحوير الجيني للعديد من الكائنات الحية البكتيرية أو الخلايا حقيقية النوى المزروعة أو إنتاج نباتات أو حيوانات محورة جينياً.
VIII. المعالجة الجينية.
IX. 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

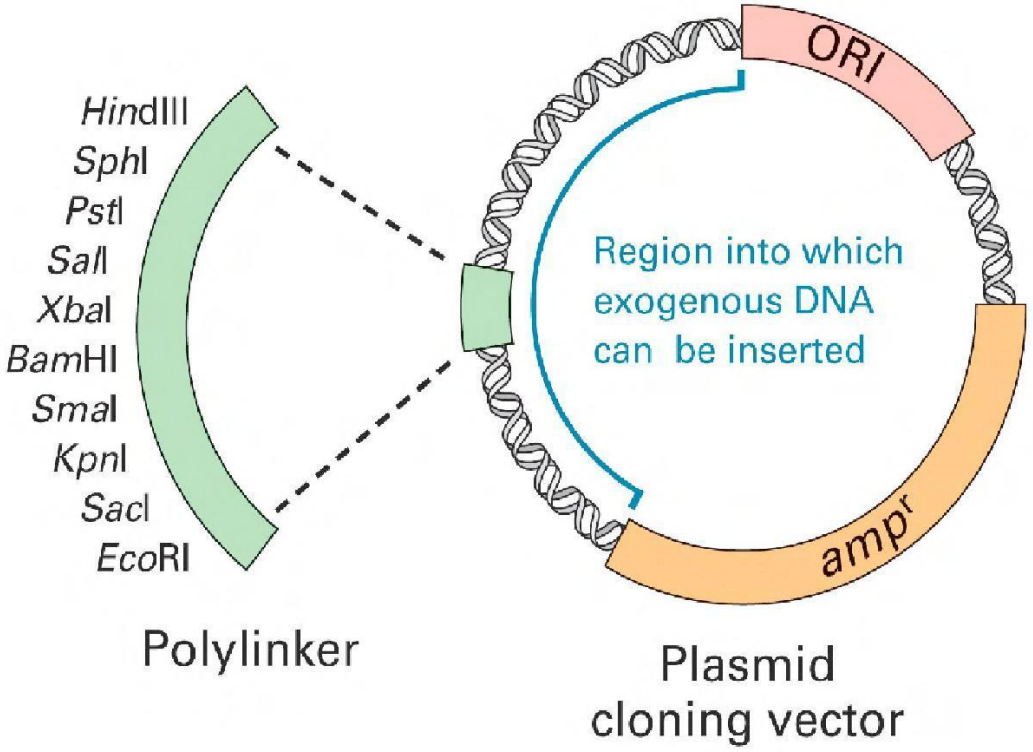
تتنوع الحوامل المستخدمة بتنوع الهدف من التنسيل وبالرغم من تنوعها يجب أن تتمتع بمجموعة من الخصائص.

الخصائص التي يجب أن يتمتع بها الحامل:

A. أن يكون حجمه أصغر ما يمكن كي يتمكن من حمل أطول تسلسل ممكن من DNA المطلوب تنسيله.
B. أن يكون التعامل معه سهلاً من حيث العزل والتنقية.
C. أن لا يؤثر وجوده في الخلية المضيفة على حياتها.
D. أن يتضاعف ضمن الخلية المضيفة بشكل مستقل عن DNA الجينومي للخلية أي يجب أن يحوي أصل تضاعف خاص به.
E. أن يحتوي على خصائص نوعية تسمح بانتقاء النسائل التي تحويه بسهولة، ويكتسب الحامل خصائصه النوعية من خلال احتوائه جينات مقاومة للصادات الحيوية.
F. أن يحوي على خصائص انتقاء تسمح بالتمييز بين المستعمرات الحاوية على البلاسميد الفارغ وتلك الحاوية على البلاسميد المؤشب.
G. 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 **Polylinker** 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.

Polylinker: 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).