

كلية الصيدلة  
**Faculty of Pharmacy**

السنة الثالثة

مقرر الهندسة الوراثية (الجينية)

المحاضرة الثالثة عشرة

2019-2020

د. شادي سكرية

# 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 المضيئة

## 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 الريبكومبيناز 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

- وذلك 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

خلايا 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 ومشكلة مستعمرات.

# التحويل 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.

فحصل 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 ثغوب 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.**

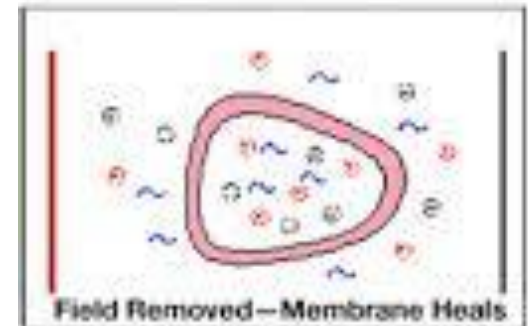
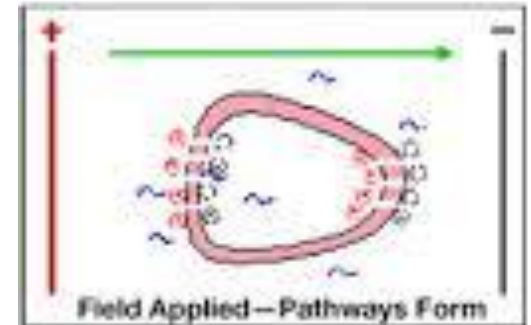
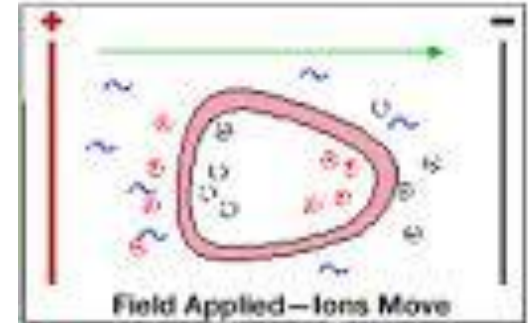
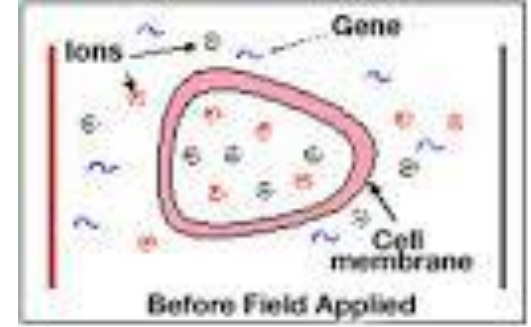
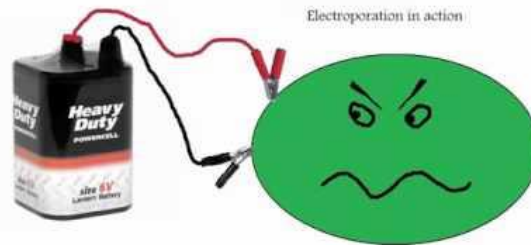
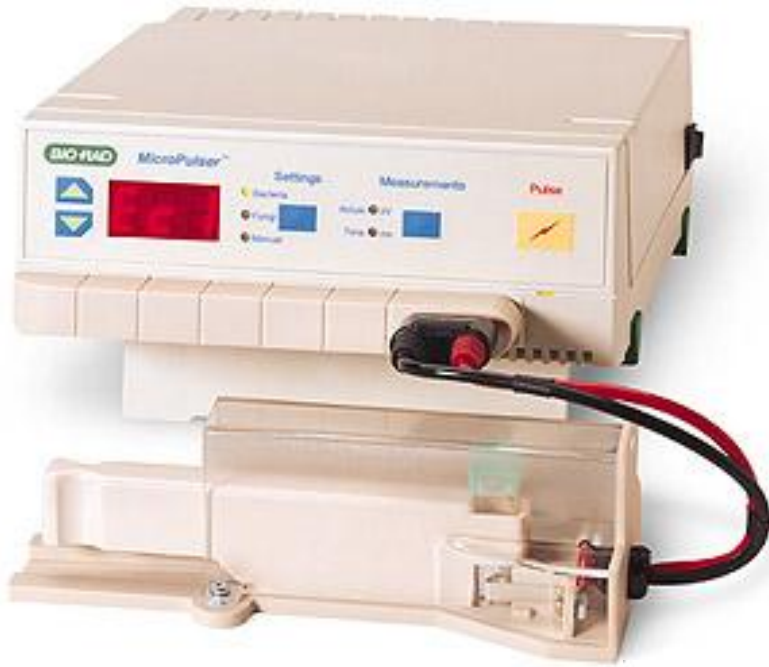
# أهم طرائق تحوير الخلايا البكتيرية:

## التثقيب الكهربائي Electroporation (الصدمة الكهربائية):

يستخدم لتحويل كل من الخلايا البكتيرية وحقيقية النوى على حد 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 أني والتي لا تلبث أن تغلق من جديد بنفس السرعة التي تشكلت فيها مبقية على البلاسميد داخل الخلية التي تصبح محورة جينياً.



Electroporator أو Micropulser جهاز التنقيب الكهربائي

## الصدمة الحرارية:

توضع الخلايا البكتيرية مع البلاسميد المأشوب في أنبوب واحد ثم يخلط المزيج جيداً ويوضع عند درجة حرارة منخفضة (ثلج مبشور +4م°) 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 +4م° فتغلق الثقوب على البلاسميد وتصبح عندها خلايا بكتيريا محورة جينياً.

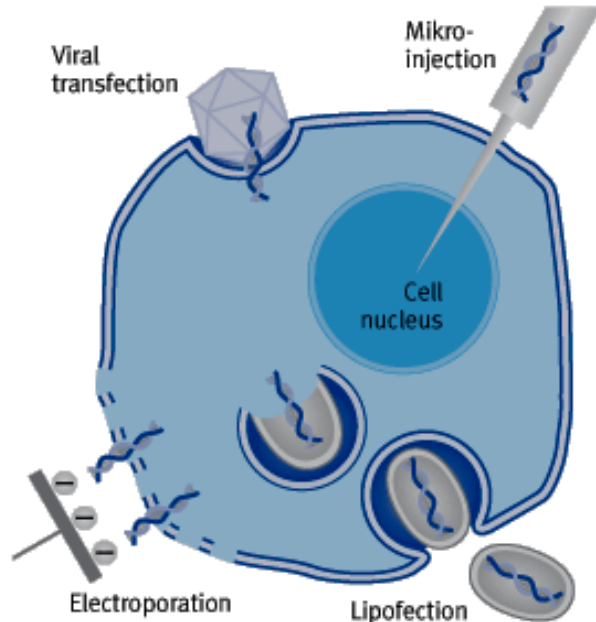
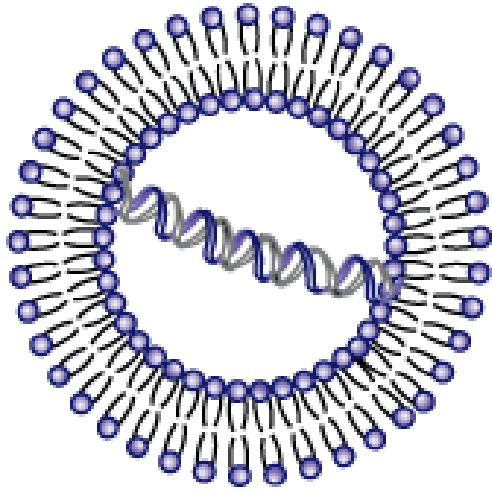


# Transformation

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 الجيني



بهدف إنتاج نباتات محورة جينياً

بهدف إنتاج حيوانات محورة جينياً

