الجامعة السورية الخاصة
SYRIAN PRIVATE UNIVERSITY

كـلـيـــة الصيدلة
Faculty of Pharmacy

السنة الثالثة

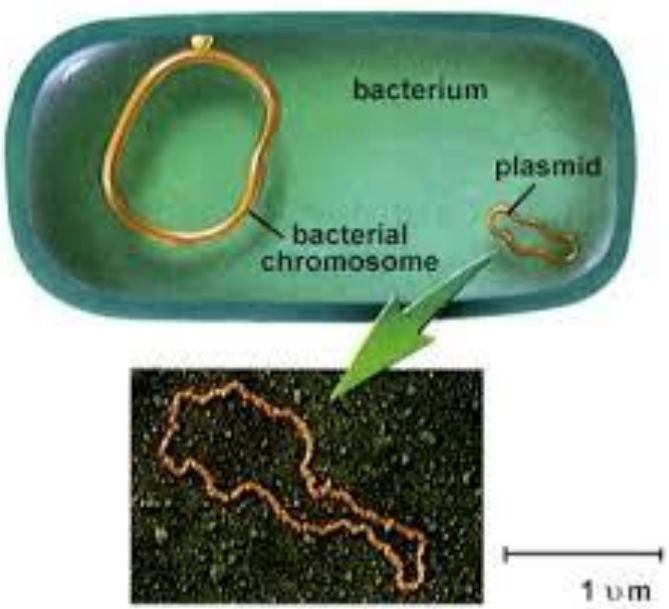
مقرر الهندسة الوراثية (الجينية)

المحاضرة الرابعة عشرة

2019-2020

د. شادي سكرية

أهم الحوامل المستخدمة في التنسيل الجيني:
البلاسميدات Plasmids



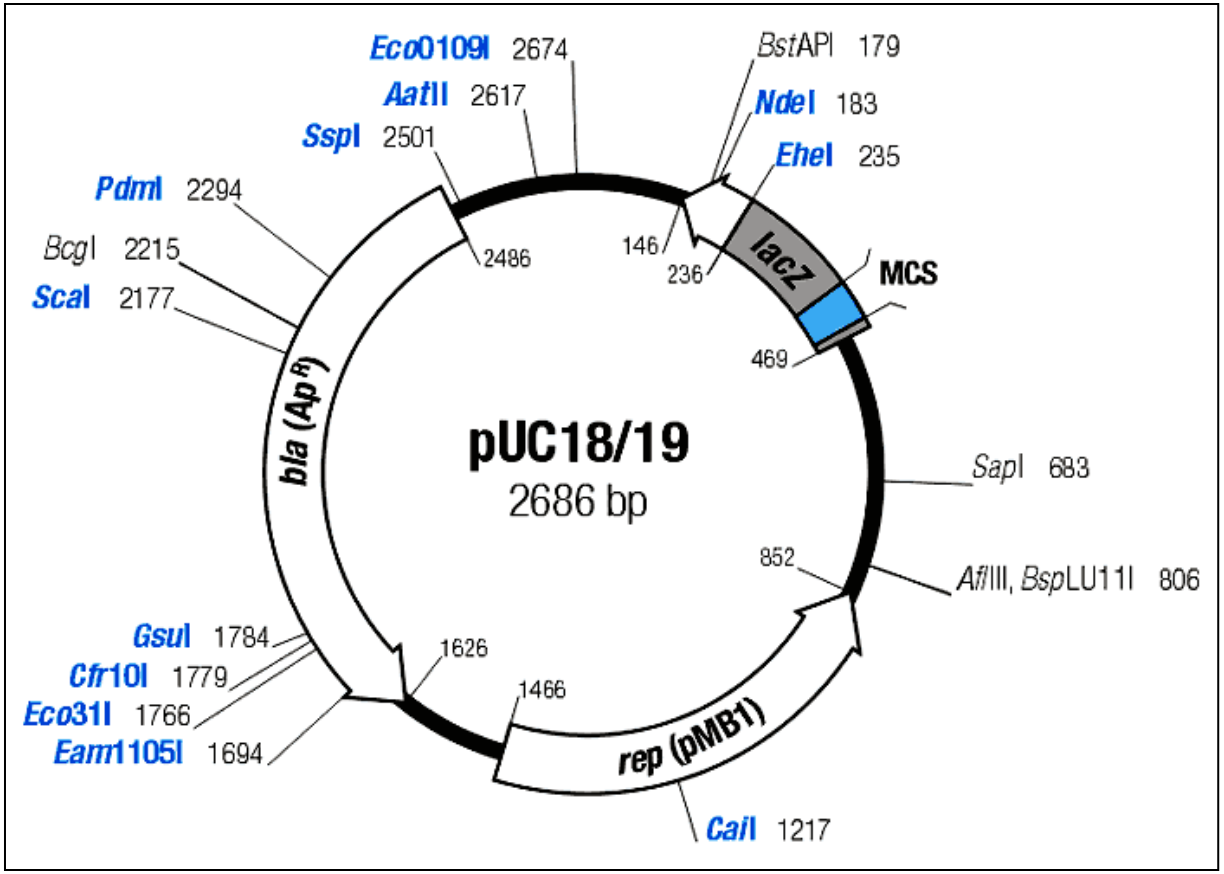
- تعد البلاسميدات أول الحوامل المستخدمة ولا تزال أكثر الحوامل استخداماً، وهي جزيئات من DNA حلقية الشكل وخارج كروموزومية Extrachromosomeic موجودة بشكل طبيعي لدى كثير من السلالات البكتيرية ولدى بعض حقيقيات النوى وحيدات الخلية.
- تتراوح حجوم Sizes البلاسميدات الطبيعية (أطوالها) بين ٢ و٢٠ كيلو أساس، واحتوائها 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 التقانة الحيوية باستخدام البلاسميدات الطبيعية في تطوير الكثير من عائلات البلاسميدات الصنعية 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 وتحوي:

•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.

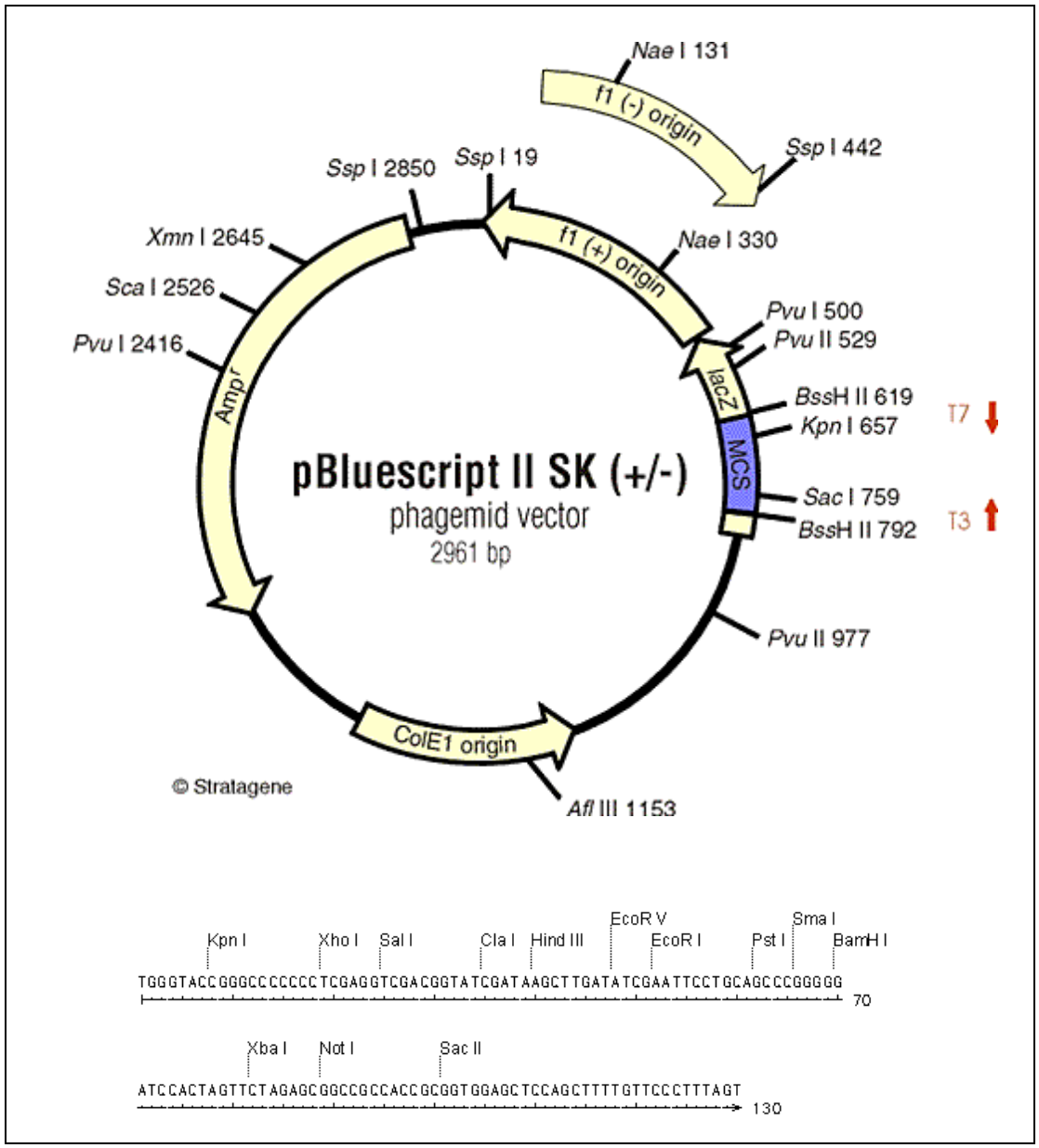
أهم ميزات هذه البلاسميدات إمكانية انتساخ رسيل الجين المنسلة ضمنا مباشرة في الزجاج بفضل أحد المحضضين الفاجيين كما أنه من السهل انتساخ RNA المضاد المعنى بفضل المحضض الثاني و استخدامه في تحضير مسابر ريبونكليوتيدية للكشف عن الرسيل.

- **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 المرمز لجين LacZ الموجود في بلاسميدات العائلة pUC مما يسمح بامكانية انتقاء المستعمرات المأشوبة 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 مرمزة 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.

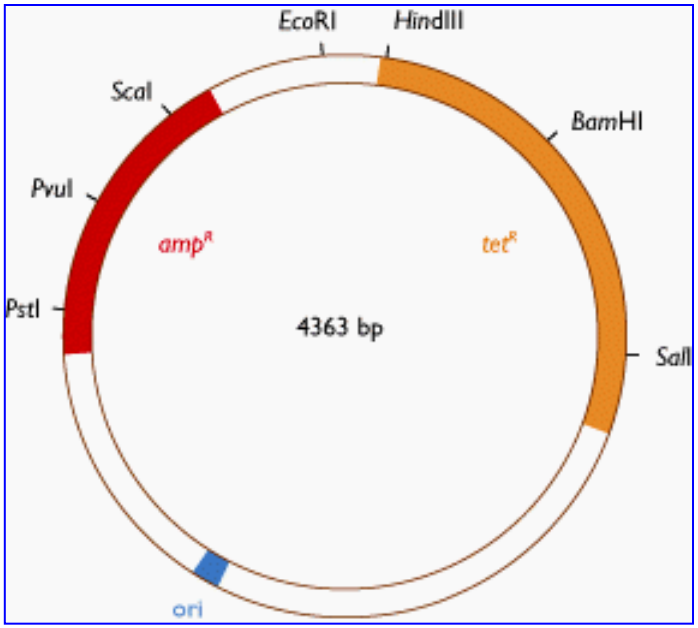
انتقاء المستعمرات الجرثومية الحاوية على البلاسميد المأشوب

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

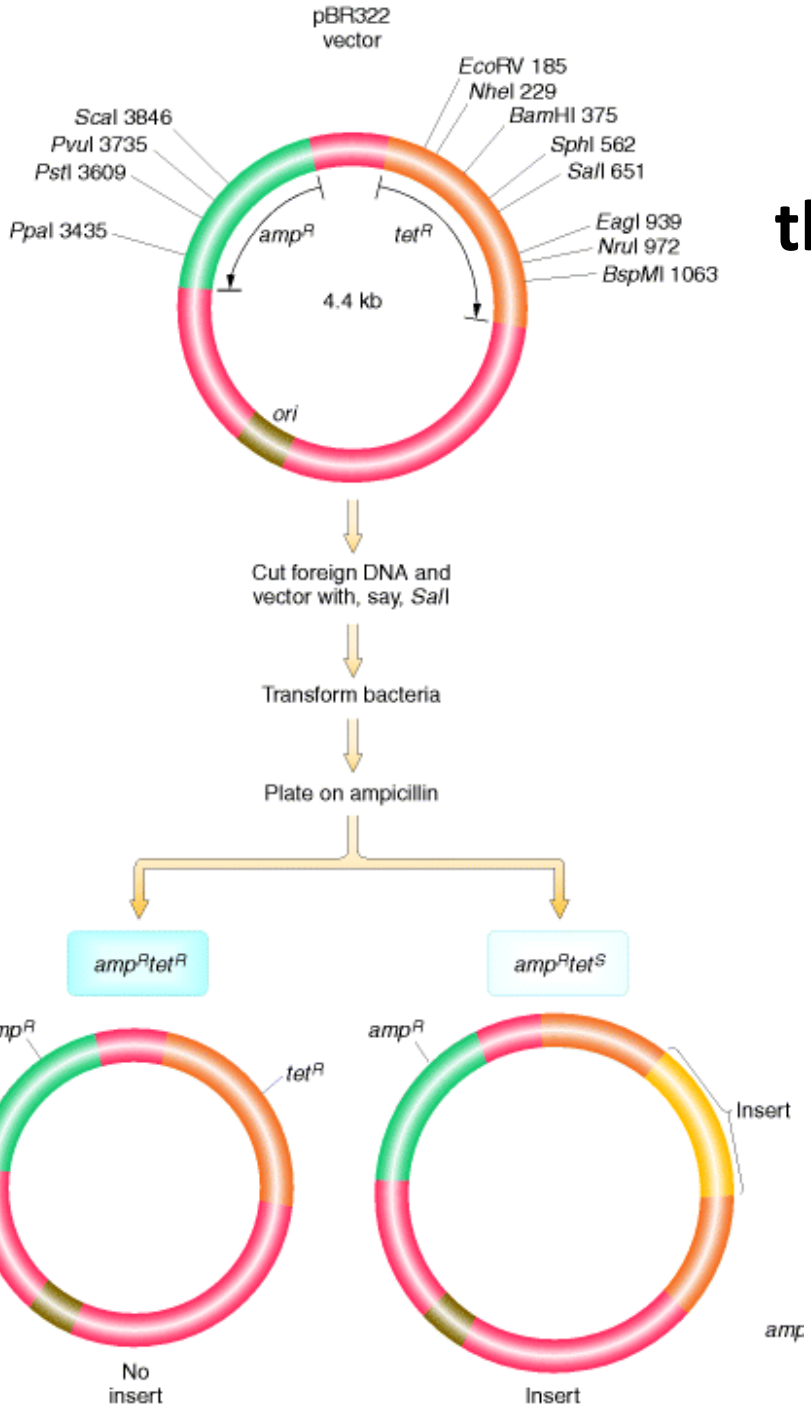
- الجيل الثاني من البلاسميدات يعتمد على طريقة الانتقاء السلبي Negative selection.
- الجيل الثالث الأحدث يعتمد على الانتقاء الايجابي Positive selection

الحامل **pBR322** بني بربط عدة شدف تقييد من ثلاث بلاسميدات طبيعية مأخوذة من *E. coli* وهي: R1, R6.5 and pMB1 .
بلاسميد بحجم ٤٣٦٣ شفع من الأسس. يحوي أصل تضاعف وجينتين مقاومتين للصادين الحيويين: ampicillin *amp*^{R} and tetracycline *tet*^{R}
تستعمل هاتين الجينتي كواسمات انتقاء selectable markers لانتقاء المستعمرات المؤشبة حيث عادة ما تكون البكتيريا حساسة sensitive لكلا الصادين قبل دخول البلاسميد.

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



الانتقاء السلبي



the cloning procedure:

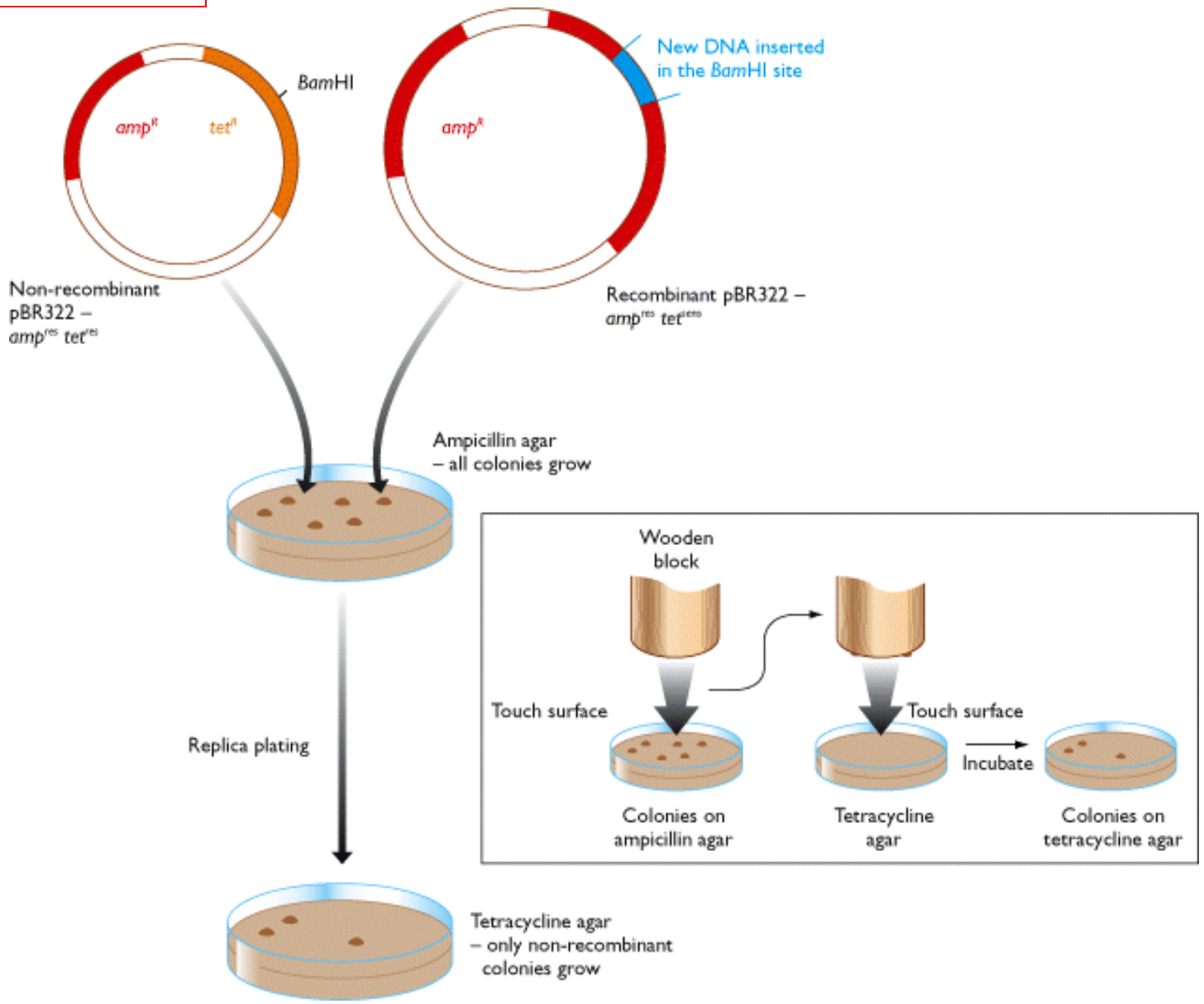
طريقة التنسيل ضمن الحامل:

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

(تصبح غير فعالة).

بعد التحوير تنمى الخلايا على مستعمرات: ويتم اختيار المستعمرات المؤشبة والتي تكون مقاومة للأمبسلين وحساسة للتيتراسكلين Amp^RTet^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 الجينتين 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 المرمز لمقاومته لأن تنسيل الشدفة المطلوبة تم ضمنه، وبين المستعمرات التي تنمو بوجود هذا الصاد نتيجة احتوائها على الجين المقاوم له بشكلٍ 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 متتالتين.

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 المرمزة 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.

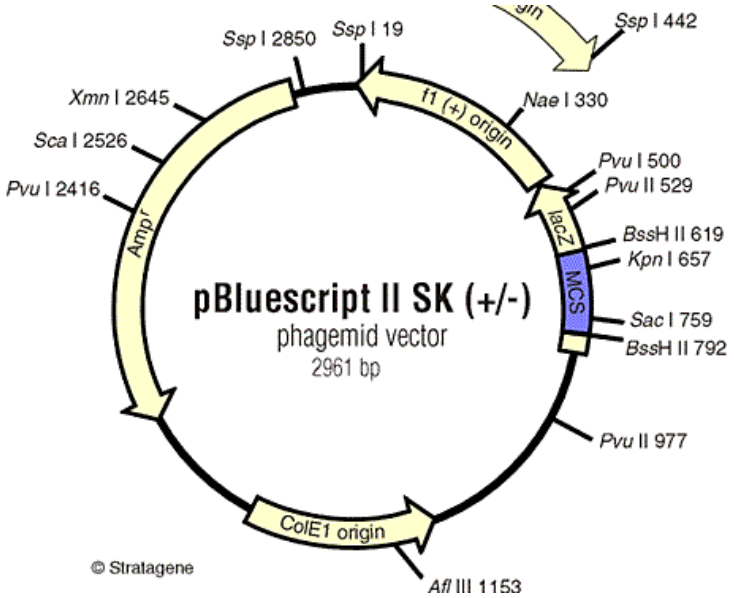
حيث يحوي هذا الابيرون في السلالات البكتيرية التي تستقلب اللاكتوز على ثلاثة جينات رئيسية، وجين LacZ المرمز لأنزيم بيتا غالاكتوزيداز واحد منها.

يُفَّعل اوبيرون 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 **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 تحوير 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 يتمم أنزيم بيتا غالاكتوزيداز.



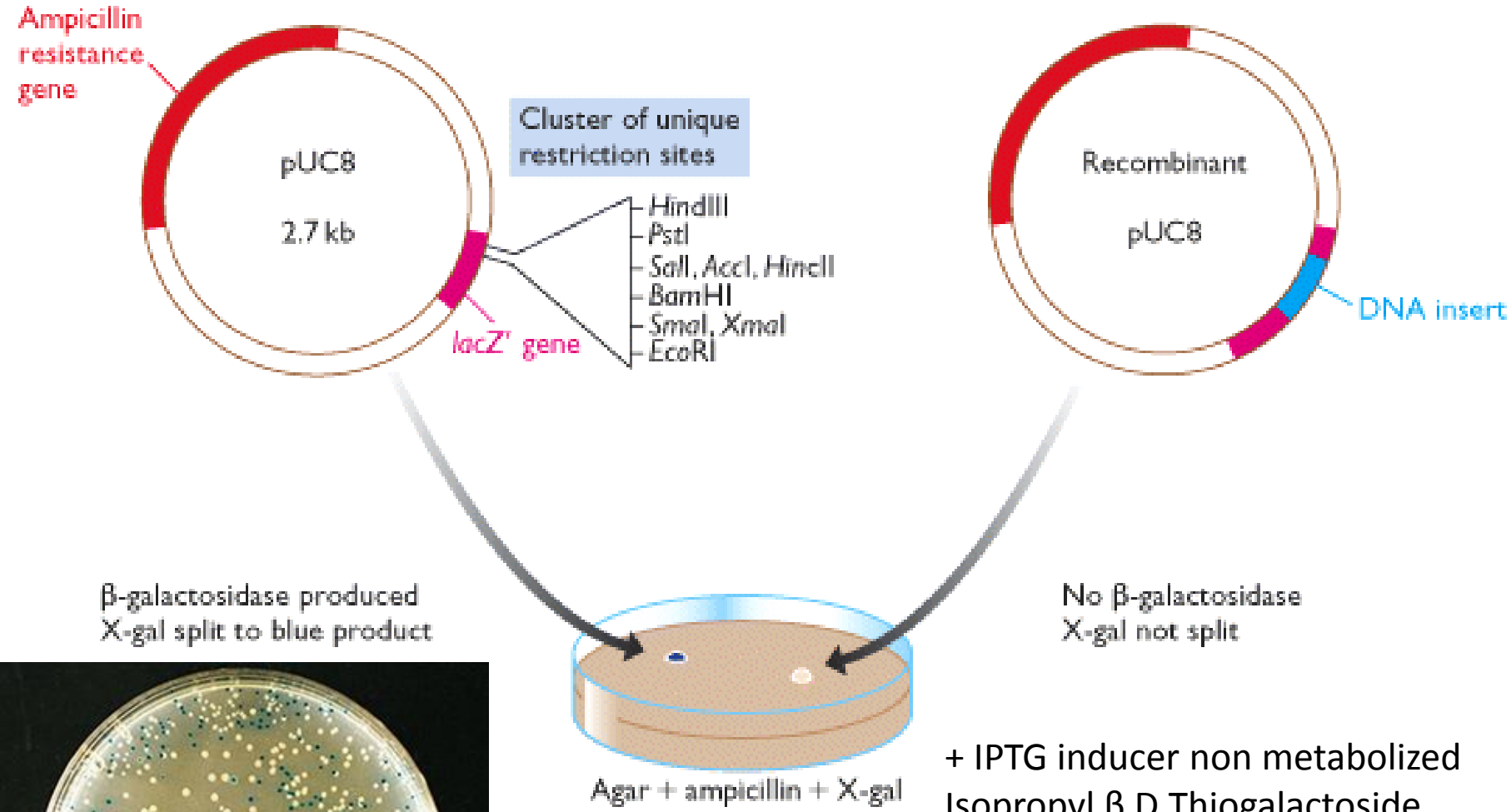
من الناحية العملية يتم استخدام هذا النمط البلاسميدي للانتقاء الايجابي للمستعمرات المأشوبة.

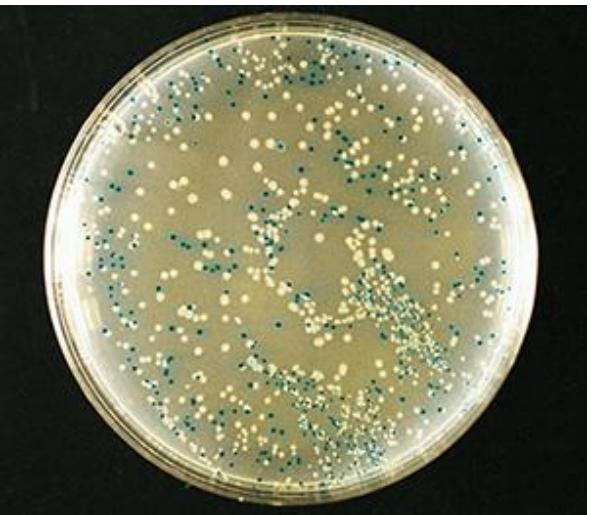
حيث يتم تنسيل الشدفة المدخلة Insert المطلوبة ضمن MCS البلاسميد، حيث يؤدي هذا إلى إعطاب التسلسل المُرمِّز للبيبتيد ألفا ويوقف التعبير عنه.

فالخلايا البكتيرية المحورة بالبلاسميد الفارغ سوف يكون لها القدرة على استقلاب اللاكتوز بفضل البيبتيد ألفا المتمم للأنزيم بينما لا تستطيع المستعمرات المحورة بالبلاسميد المأشوب استقلاب اللاكتوز.

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

Positive selection OR white bleu selection





+ IPTG inducer non metabolized
Isopropyl β D Thiogalactoside

Recombinant selection with pUC8.

ويمكن للأنزيم بيتا غالاكتوزيداز 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 غالاكتوزيداز الفعال فتفشل في استقلاب الركيزة وهي مادة X-Gal فتبقى بيضاء اللون ويمكن تميزها 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 بوساطة أنزيمات التقييد (شدفة تقييد).

يمكن التميز 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 بوساطة 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 البلاسيمد 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 بشكلٍ واحدٍ والنتيجة نمط واحد من البلاسميدات المأشوبة.

- 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 المأشوبة وذلك بحسب توجه الشدفة المدخلة الذي تحكمه الصدفة.

استخدام أنزيمي تقييد مختلفين لتحضير الشدفة المدخلة Insert