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 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).**

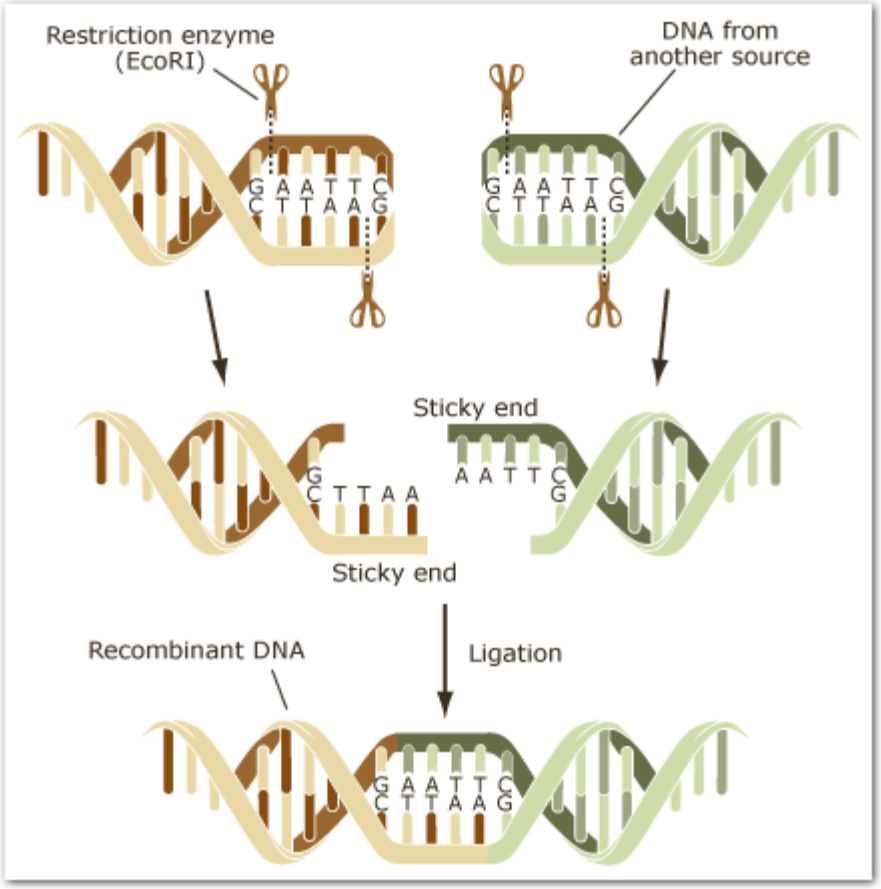
DNA Recombinant المؤشب DNA

المبدأ العام

قطع جزيئين من DNA من مصدرين مختلفين بوساطة أنزيم تقييد واحد

قطع متتامة بحواف لزجة

ربط القطع بوساطة أنزيم ربط

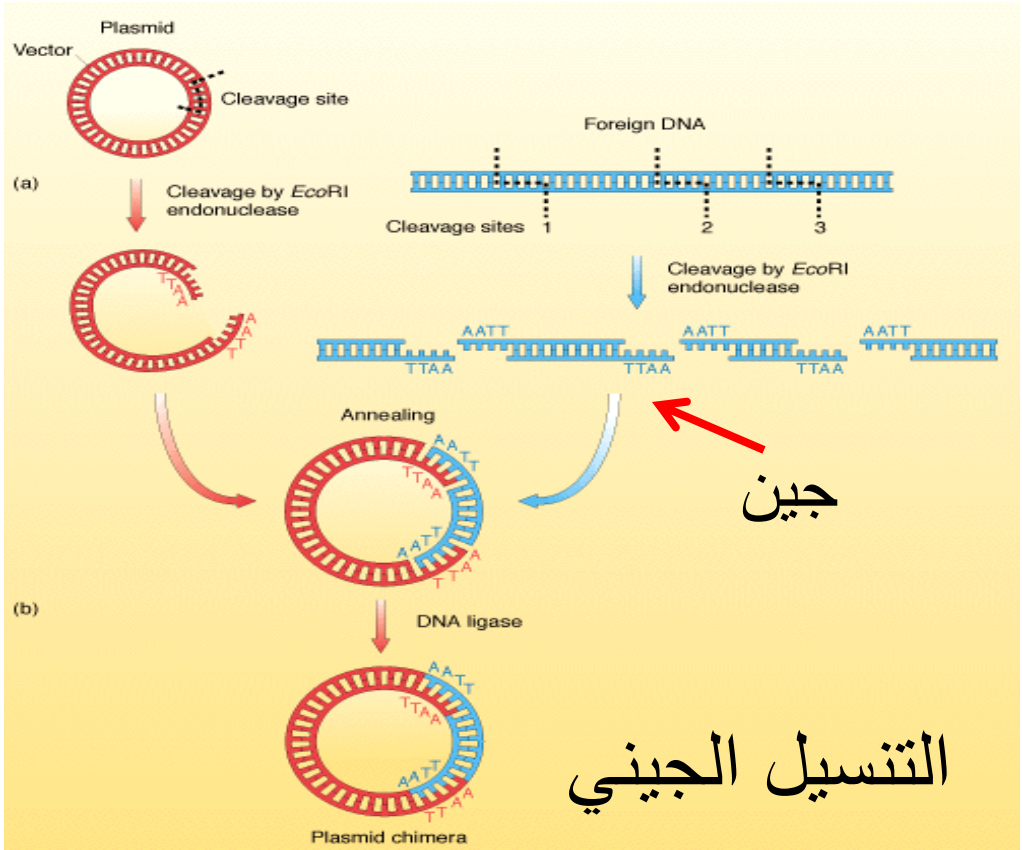


تقانة DNA المؤشب Recombinant DNA technology

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

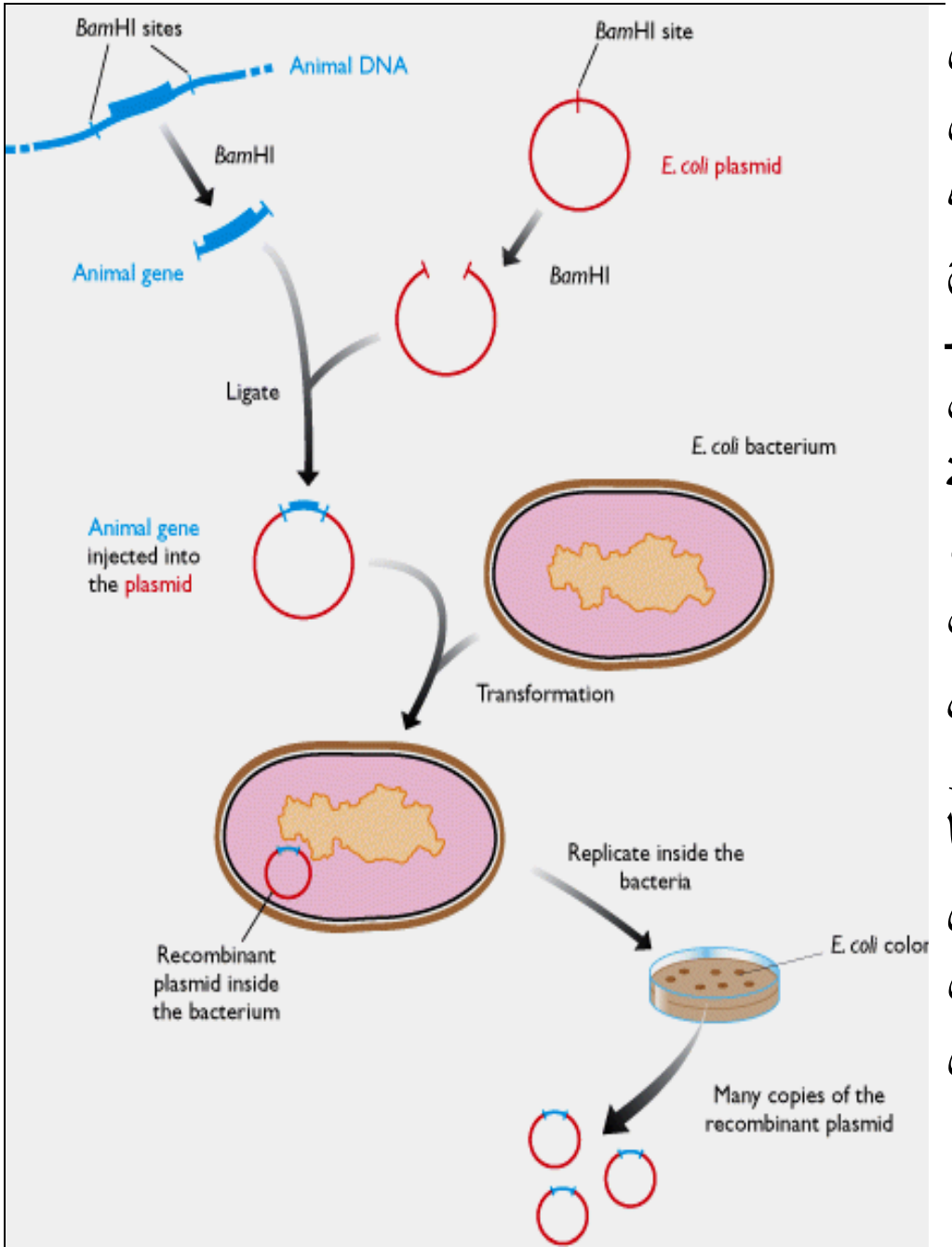
أحد أهم تقانات الهندسة الجينية Genetic engineering

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). 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 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 $١٠^{٦}$ 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

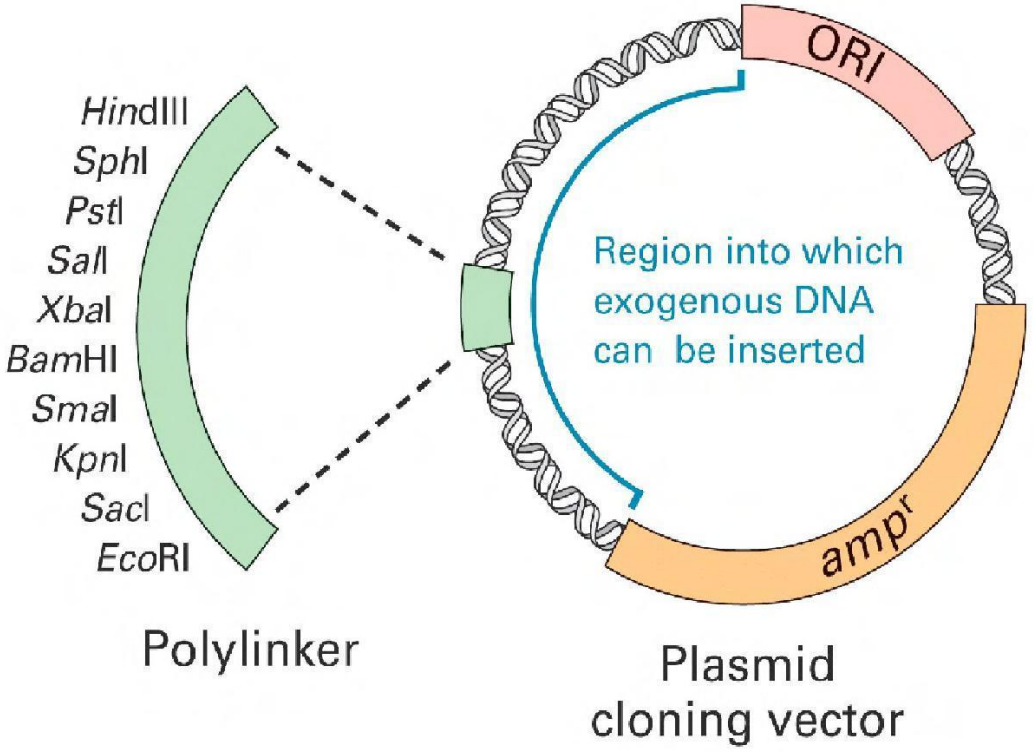
تتنوع الحوامل المستخدمة بتنوع الهدف من التنسيل وبالرغم من تنوعها يجب أن تتمتع بمجموعة من الخصائص.

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

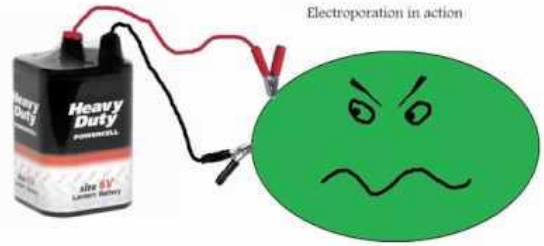
- **الصدمة الحرارية. البكتيريا.**
- **مواد تندمج مع الغشاء الستوبلاسمي. خلايا الثدييات.**
- **الحقن المجهري للمادة الجينية ضمن الخلايا البيضية مثلاً بهدف إنتاج حيوانات محورة جينياً.**
- **المدفع الجيني فيما يتعلق بالنباتات.**
- **استخدام الفيروسات كنواقل للمادة الجينية بالاعتماد على قدرتها على إصابة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

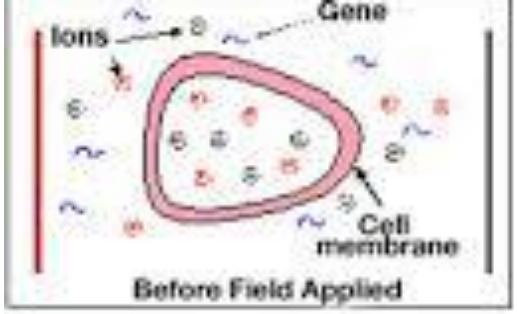
أهم طرائق تحوير الخلايا البكتيرية:

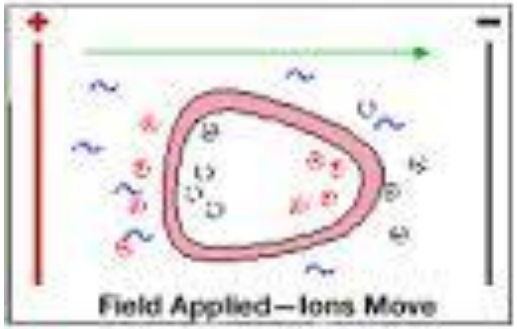
التثقيب الكهربائي Electroporation (الصدمة الكهربائية):

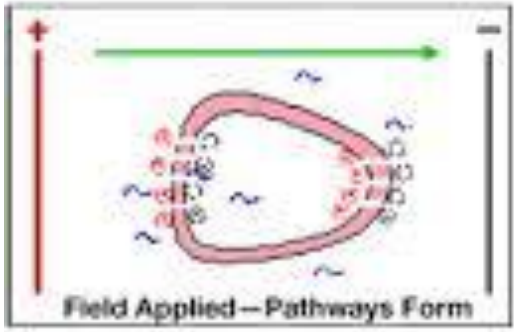
يستخدم لتحوير كلٍ من الخلايا البكتيرية وحقيقية النوى على حدٍ سواء. حيث يستخدم لذلك جهاز خاص يدعى المثقب الكهربائي Electroporator

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.







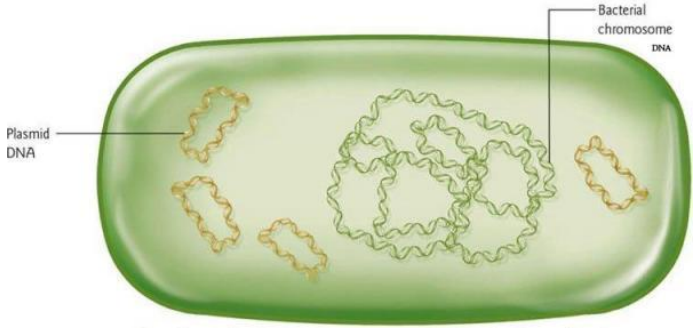


جهاز التثقيب الكهربائي Electroporator أو Micropulser

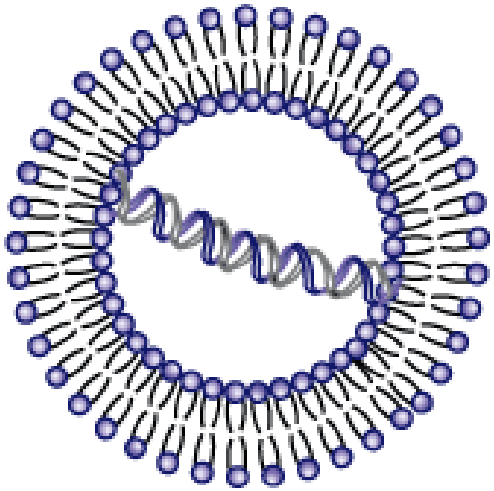
الصدمة الحرارية:

توضع الخلايا البكتيرية مع البلاسميد المأشوب في أنبوبٍ واحد ثم يخلط المزيج جيداً ويوضع عند درجة حرارة منخفضة (ثلج مبشور +٤م°) لعدة دقائق بعدها يعرض المزيج إلى صدمة حرارية (حرارة تقارب ٤٢ درجة) لعدة ثواني (حوالي ٤٥ ثانية) بنتيجة هذه الحرارة المرتفعة المفاجأة تفتح ثقوب مجهرية Micropores في الغشاء الخلوي البكتيري يدخل عبرها البلاسميد المأشوب ضمن الخلايا.

يعاد وضع المزيج بسرعة عند الدرجة +٤ م° فتغلق الثقوب على البلاسميد وتصبح عندها خلايا البكتيريا محورة جينياً.

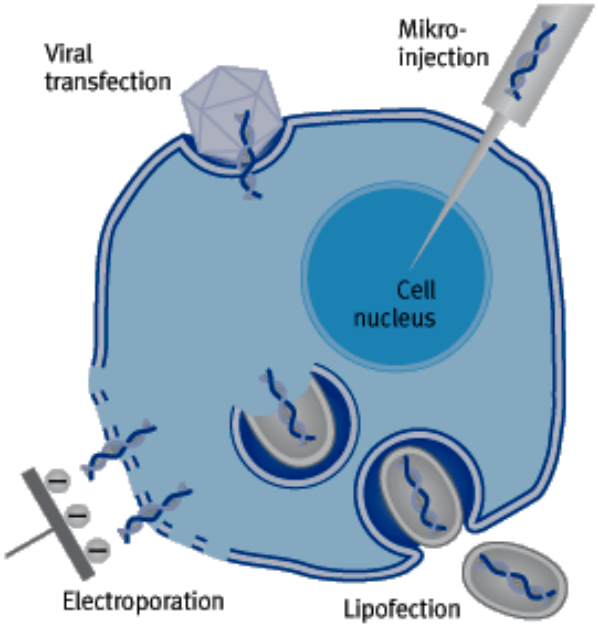


Transformation



مواد تندمج مع الغشاء الستوبلاسمي: أغلب هذه المواد من طبيعة فوسفولبيدية يمكن بتماسها مع الغشاء السيتوبلاسمي لبيدي البنية أن تندمج معه.

مثال: مادة الليبوفيكتامين lipofectamine التي تمزج مع الحامل المؤشب وتوضع على تماس مع الخلايا في وسط الزرع.

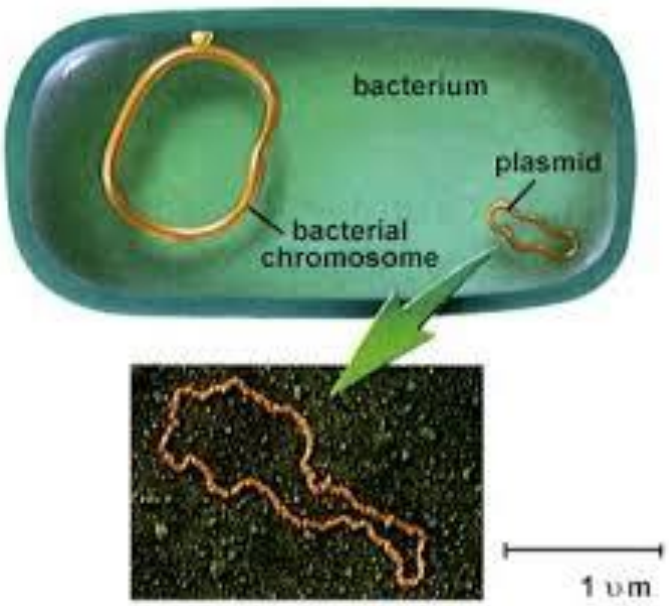


الحقن المجهري Microinjection والمدفع الجيني

بهدف إنتاج نباتات محورة جينياً

بهدف إنتاج حيوانات محورة جينياً

أهم الحوامل المستخدمة في التنسيل الجيني:
البلاسميدات Plasmids



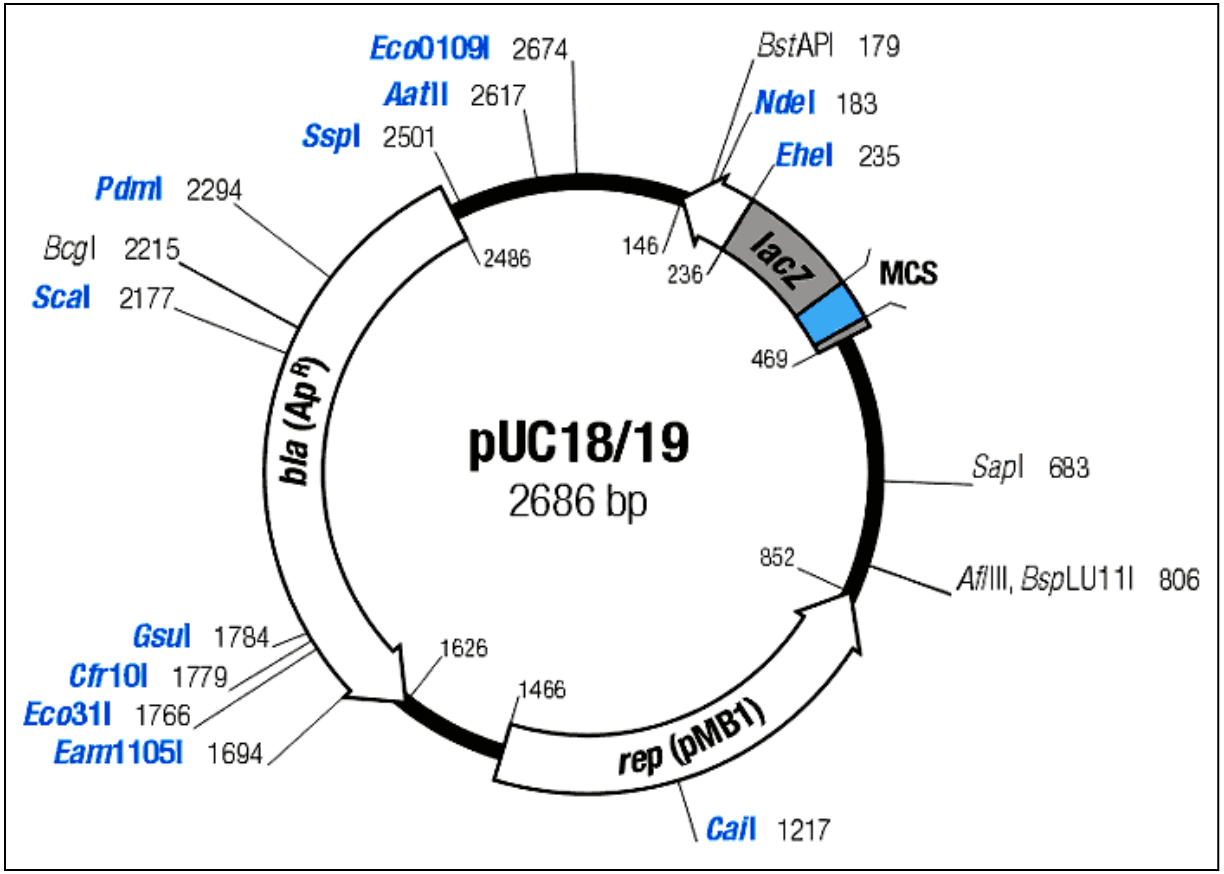
- تعد البلاسميدات أول الحوامل المستخدمة ولا تزال أكثر الحوامل استخداماً، وهي جزيئات من DNA حلقية الشكل وخارج كروموزومية Extrachromosomeic موجودة بشكل طبيعي لدى كثير من السلالات البكتيرية ولدى بعض حقيقيات النوى وحيدات الخلية.
- تتراوح حجوم Sizes البلاسميدات الطبيعية (أطوالها) بين ٢ و٢٠ كيلو أساس، واحتوائها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

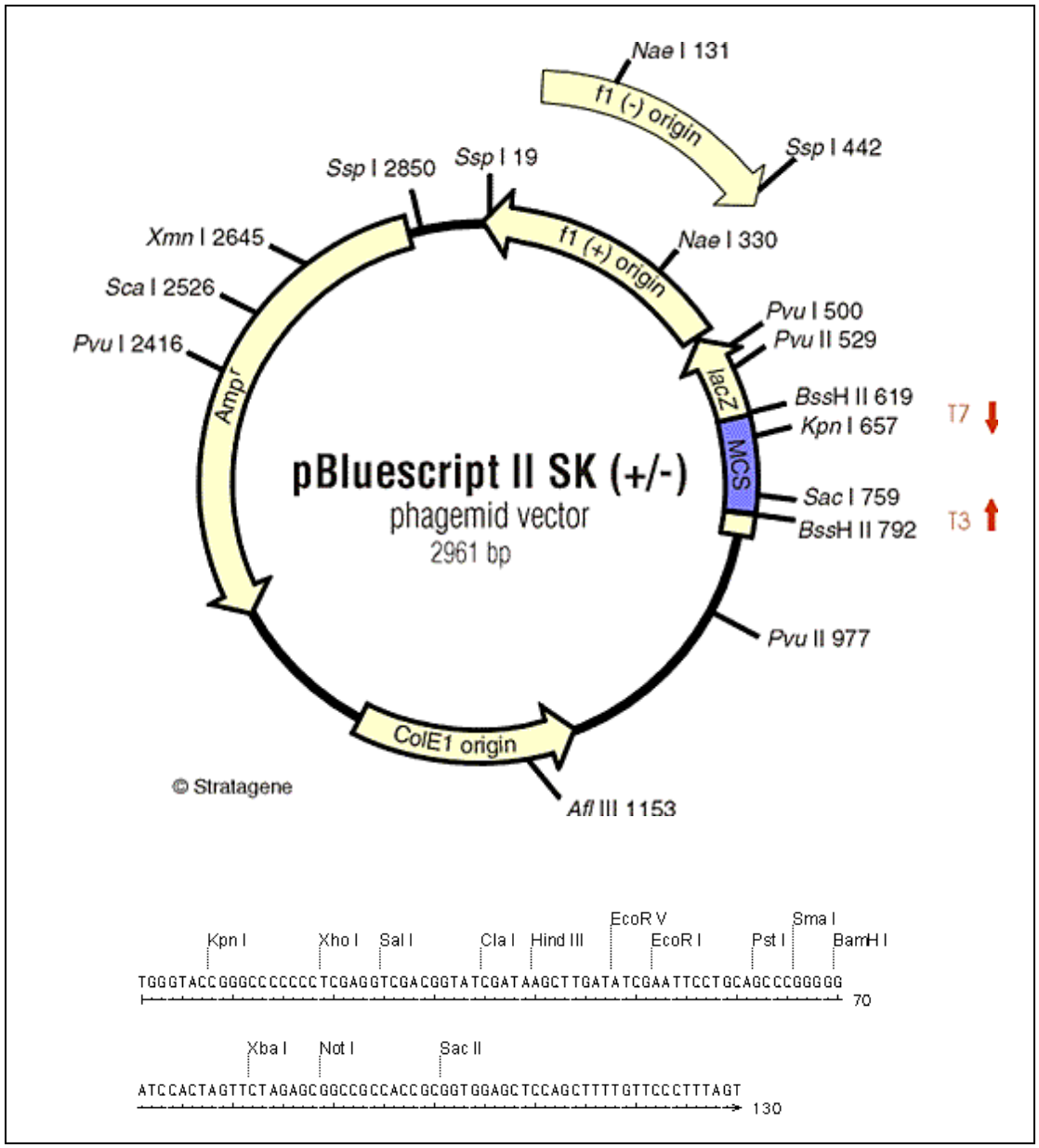
أهم ميزات هذه البلاسميدات إمكانية انتساخ رسيل الجين المنسلة ضمنا مباشرة في الزجاج بفضل أحد المحضضين الفاجيين كما أنه من السهل انتساخ RNA المضاد المعنى بفضل المحضض الثاني و استخدامه في تحضير مسابر ريبونكليوتيدية للكشف عن الرسيل.

- **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 Ampr، بالإضافة إلى الجين LacZ مرمزة لأحد السلاسل الببتيدية المكونة لأنزيم الغالاكتوزيداز.

لاحظ الشدفة MCS ضمن الجين LacZ والمحاطة بتسلسلي المحضضين الفاجين T7 و T3.

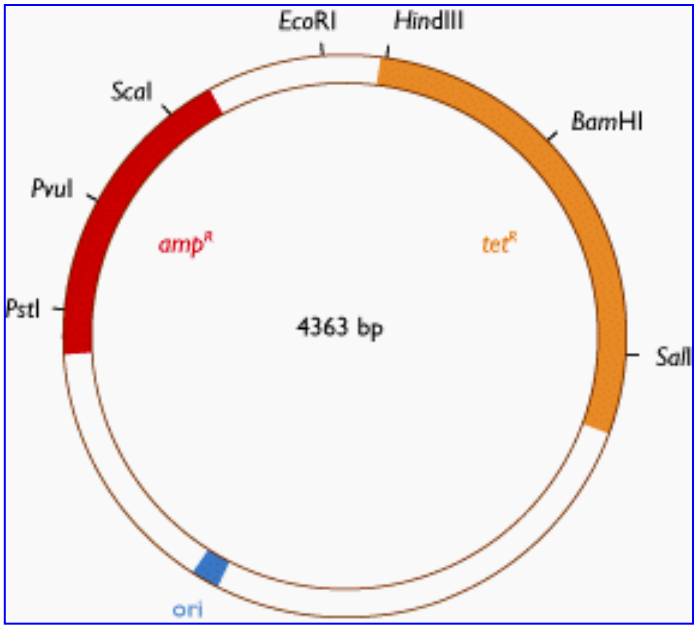
يعطى التسلسل النكليوتيدي للشدفة MCS أسفل البلاسميد مع مواقع التقييد المفردة التي تحويها. لاحظ أيضاً مواقع التقييد المنتشرة على محيط البلاسميد حيث تشير الأرقام إلى المواقع الذي يحدث عندها القطع.

انتقاء المستعمرات الجرثومية الحاوية على البلاسميد المأشوب

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

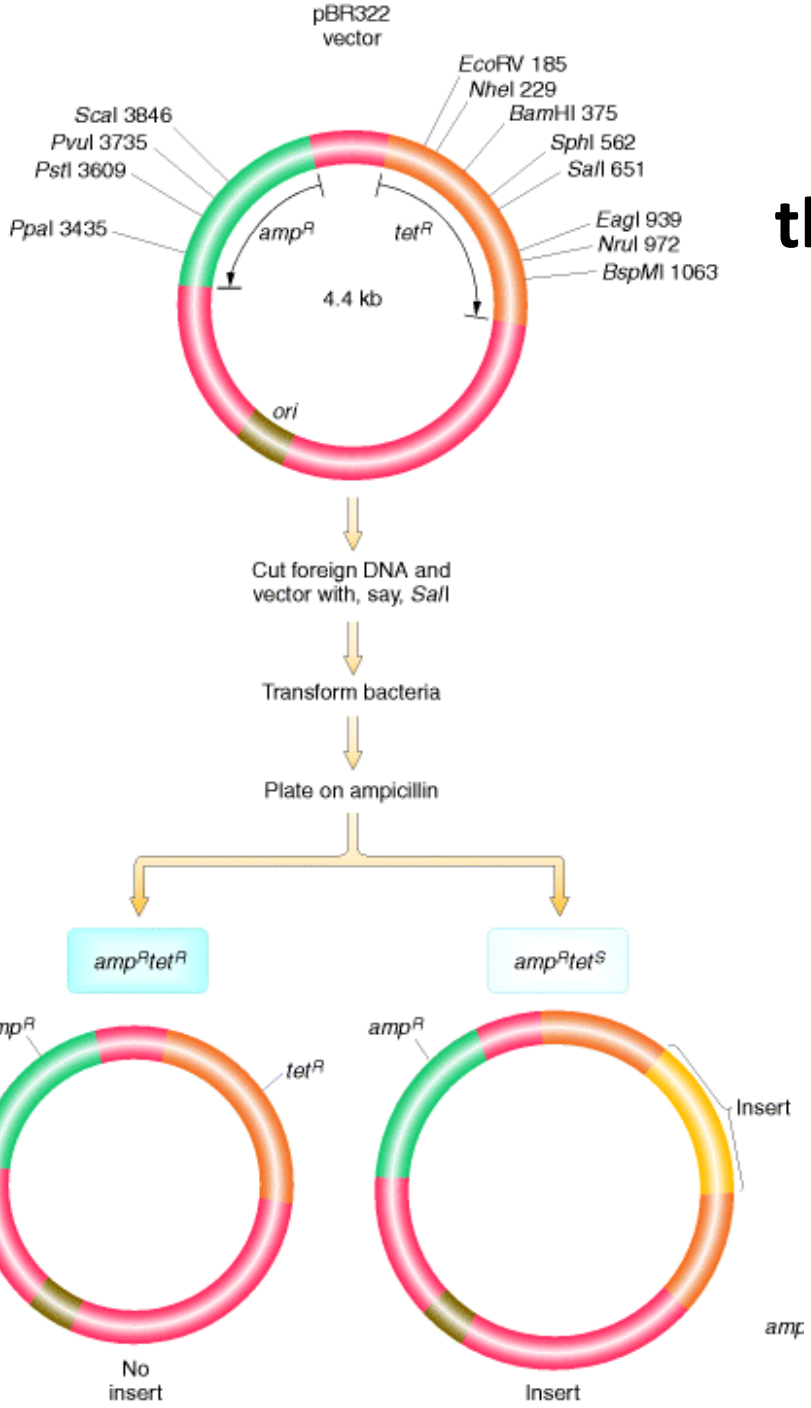
- الجيل الثاني من البلاسميدات يعتمد على طريقة الانتقاء السلبي Negative selection.
- الجيل الثالث الأحدث يعتمد على الانتقاء الايجابي Positive selection

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: *amp*^{R} ampicillin and *tet*^{R} tetracycline 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:

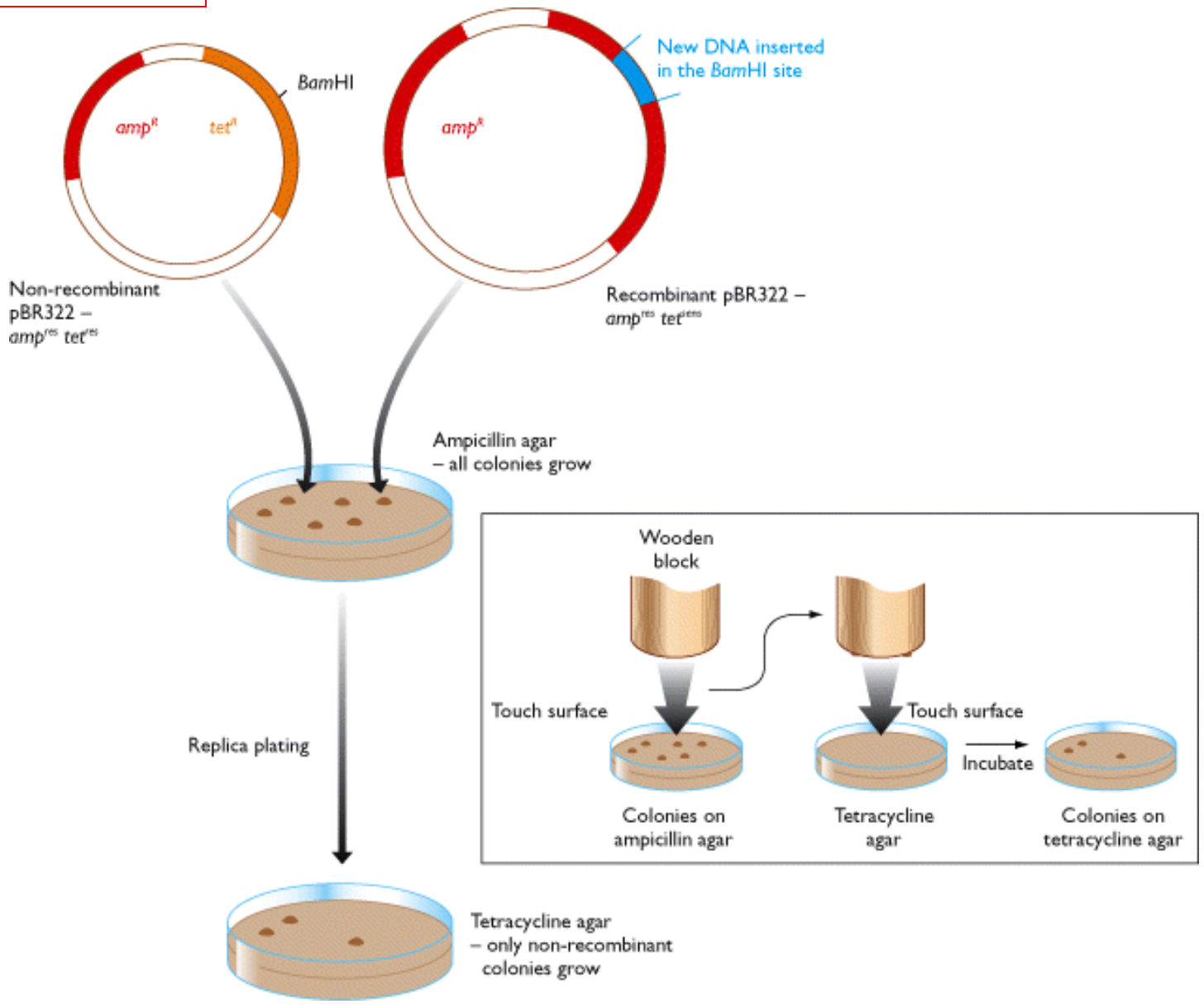
طريقة التنسيل ضمن الحامل:

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^RTet^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.

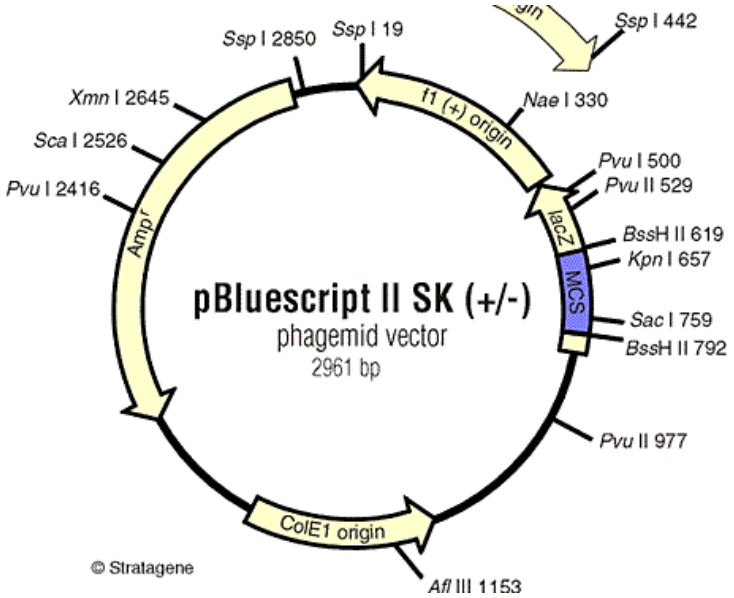
حيث يحوي هذا الابيرون في السلالات البكتيرية التي تستقلب اللاكتوز على ثلاثة جينات رئيسية، وجين LacZ المرمز لأنزيم بيتا غالاكتوزيداز واحد منها.

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.



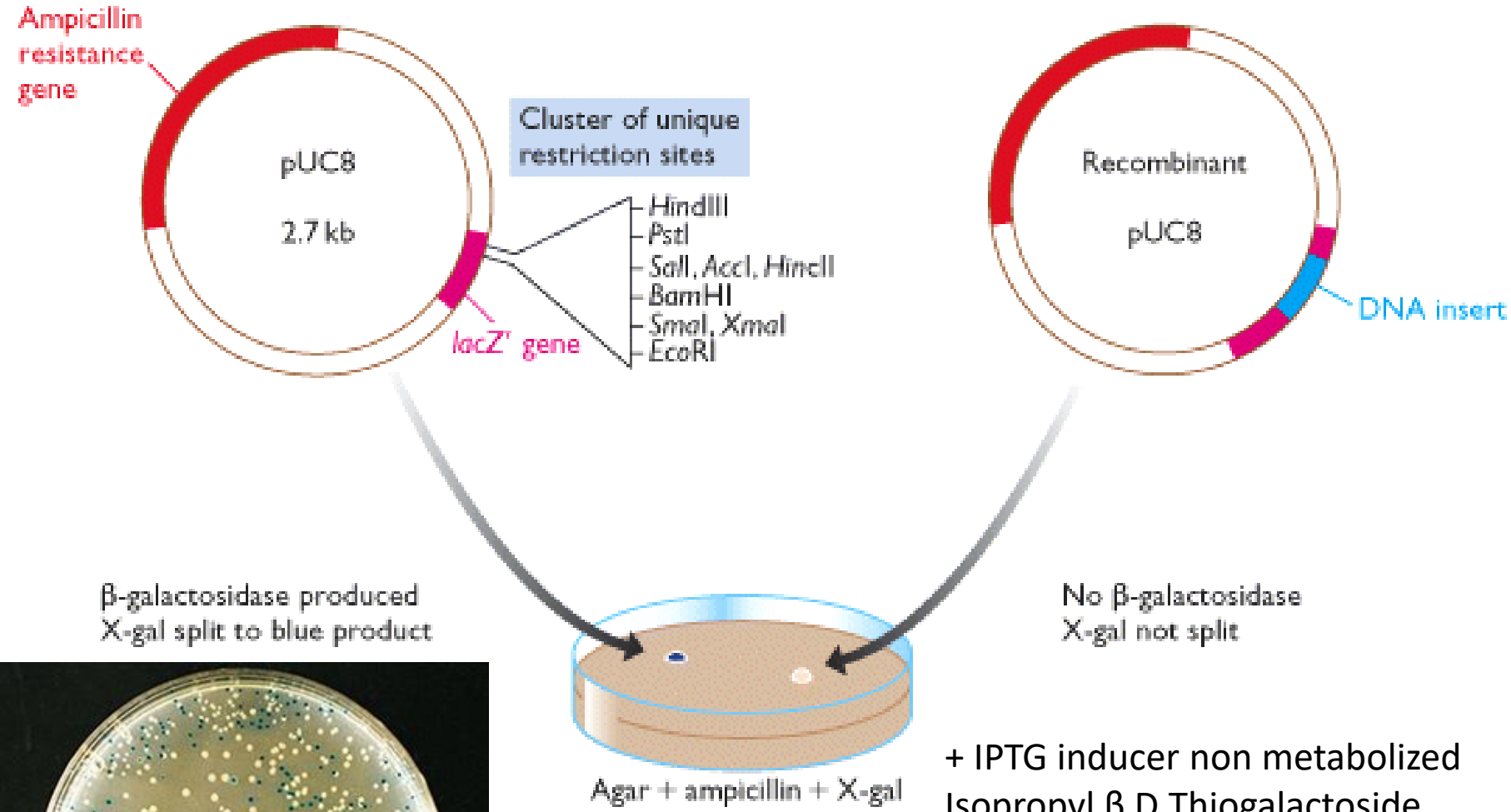
من الناحية العملية يتم استخدام هذا النمط البلاسميدي للانتقاء الايجابي للمستعمرات المأشوبة.

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