كلية العلوم

القسم : علم الحياة

السنة : الرابعة

المادة : وراثة جزيئية

المحاضرة : العاشرة/نظري/

{{ مكتبة A to Z }}

Facebook Group : مكتبة A to Z



كلية العلوم ، كلية الصيدلة ، الهندسة التقنية

يمكنكم طلب المحاضرات برسالة نصية (SMS) أو عبر(What's app-Telegram)على الرقم 0931497960

# الجزء الثاني

# الهندسة الوراثية

## مقدمة

حتى تاريخ 1970 ميلادية كان إجراء الأبحاث على الحمض النووي ( DNA)من أصعب الأمور التي كانت تواجه علماء الوراثة و الكيمياء. وكانت معظم الأبحاث تجرى بشكل غير مباشر على الحمض النووي الريبوزي (RNA)أو البروتين. و لكن الحال تحول بشكل كامل فأصبح علم الوراثة المتعلق بفحص DNA (و المعروف بعلم الوراثة الجزيئية) من أسهل العلوم و أكثرها تطورا. لقد أصبح من السهل صنع نسخ عديدة من أي جين (مورث) أو مقطع محدد من DNA.كما أمكن معرفة تسلسل الأحماض النووية بسرعة تتعدى المئات في اليوم الواحد. كما استطاع العلماء استكشاف الجينات الموجودة على الكروموسومات كما استطاعوا تغيير وتعديلها بشكل الذي يريدون وليس هذا فحسب بل استطاعوا أن يعيدوا هذه الجينات المعدلة إلى الخلية وغرزها في الكروموسوم الذي يريدون. كما أمكن إنتاج كميات كبيرة من البروتينات كالهرمونات واللقاحات المختلفة والتي كانت تنتج في السابق من الجثث الميتة أو تستخلص من الحيوانات والتي كانت تحوفها المخاطر من انتقال العدوى إلى الإنسان. كما أن هذه الثورة العلمية فتحة المجال أمام الكثيرين من محبي هذا العلم في اختراع واكتشاف طرق جديدة وحديثة في التعامل وحفظ وتغيير هذه المادة الحيوية في الإنسان والحيوان والنبات. لقد غير هذه العلم المنطلق كالصاروخ الكثير من المفاهيم الطبية والتي دفعت كثير من كليات الطب إلى تعديل مقرراتها لتزويد طلابها بالمزيد من هذا العلم.

لقد أُطلق على عملية نسخ وتعديل وزرع الجينات اسم الهندسة الوراثية وهو اسم عام لا يحدد فكرة معينة أو تقنيه محدده، ولكنه يعني بكل ما يقام به في تغيير أو تعديل المادة الوراثية. ويتفرع من هذا العلم الكثير من التقنيات وهي متناثرة وموزعة على الكثير من فروع الطب والعلوم. وليس للحصر إليك أهم 6 تقنيات تختص بالهندسة الوراثية:

1-قص و قطع الحمض النووي (Cleavage of DNA ) بمقصاة خاصة تسمى ( Restriction Nucleases )و اكتشاف هذه المقصاة ساعد كثيرا في مهمة التحكم DNA.

2- فصل قطع DNA على لوح من الجل بالكهرباء ( Gel Electrophoresis).

3-معرفة التسلسل النووي (DNA sequencing ) لكل قطع DNA التي يتم عزلها بشكل سريع و دقيق. و التي تسمح للعلماء معرفة التركيب الإنشائي للجينات و معرفة و استنتاج نوع البروتين الذي ينتج منه.

4- تقنية تهجين الحمض النووي (Nucleic acid hybridization )، و التي مكنتنا في معرفة أحجام القطع من الحمض النووي و الكشف عن القطع المحددة من الحمض النووي في خليط معقد من القطع المتشابهة.

5-استنساخ DNA (DNA cloning )، و التي تسمح بإنشاء نسخ عديدة و متطابقة من القطع DNA

6-تقنية هندسة أو تعديل DNA (DNA engineering )، و التي تسمح بإنتاج نسخة معدلة من جين ما ثم أعادته مرة أخرى إلى الخلية.

هنالك العديد من التطبيقات للهندسة الوراثية نذكر منها:

- إنتاج بعض الأدوية بكميات كبيرة: يعتبر الإنسولين أول الأدوية البشرية المصنعة بطريق الهندسة الوراثية عام 1982.كما أُمكن من خلال هذه الهندسة الحصول على عامل التجلط البشري وعوامل إذابة الجلطة.
- إنتاج الهرمونات بكميات وافرة: مثل هرمون النمو عند الإنسان.
- إنتاج بعض اللقاحات مثل لقاح التهاب الكبد الفيروسي.B
- إنتاج كائنات معدلة وراثياً: مثل الخضروات المقاومة للطاعون والعدوى لجرثومية كما وتبقى طازجة لمدة أطول من الخضروات الطبيعية.

في مقررنا هذا سنتحدث عن كيفية انتاج البنانات المعدلة وراثياُ وكيفية تحليلها بشيء من التفصيل

# المحاضرة الثانية عشر

## /1/ Transgenesis نقل الجينات

**تعريف**

نقل الجينات بالمعنى العام هو إدخال مورثة أو عدة مورثات إلى مجموع المعلومات الوراثية الخاصة بمنظومة حية بطرق ليست طبيعية، وبدون إحداث التزاوج الجنسي.

إن هذه التقنية موجهة بشكل أساسي للباحثين والعاملين في مجال الهندسة الوراثية، وذلك بغاية دراسة وظائف الجينات المختلفة، بالإضافة إلى إن هذه التقنية تستخدم لغايات صناعية وطبية، وتعتبر واحدة من التقنيات المستخدمة في الحصول على أصناف نباتية مقاومة للإجهادات الحيوية واللاحيوية. وتسمى هذه الأصناف الناتجة نباتية كانت أم حيوانية تحت مسمى كائنات معدلة وراثيا أو:

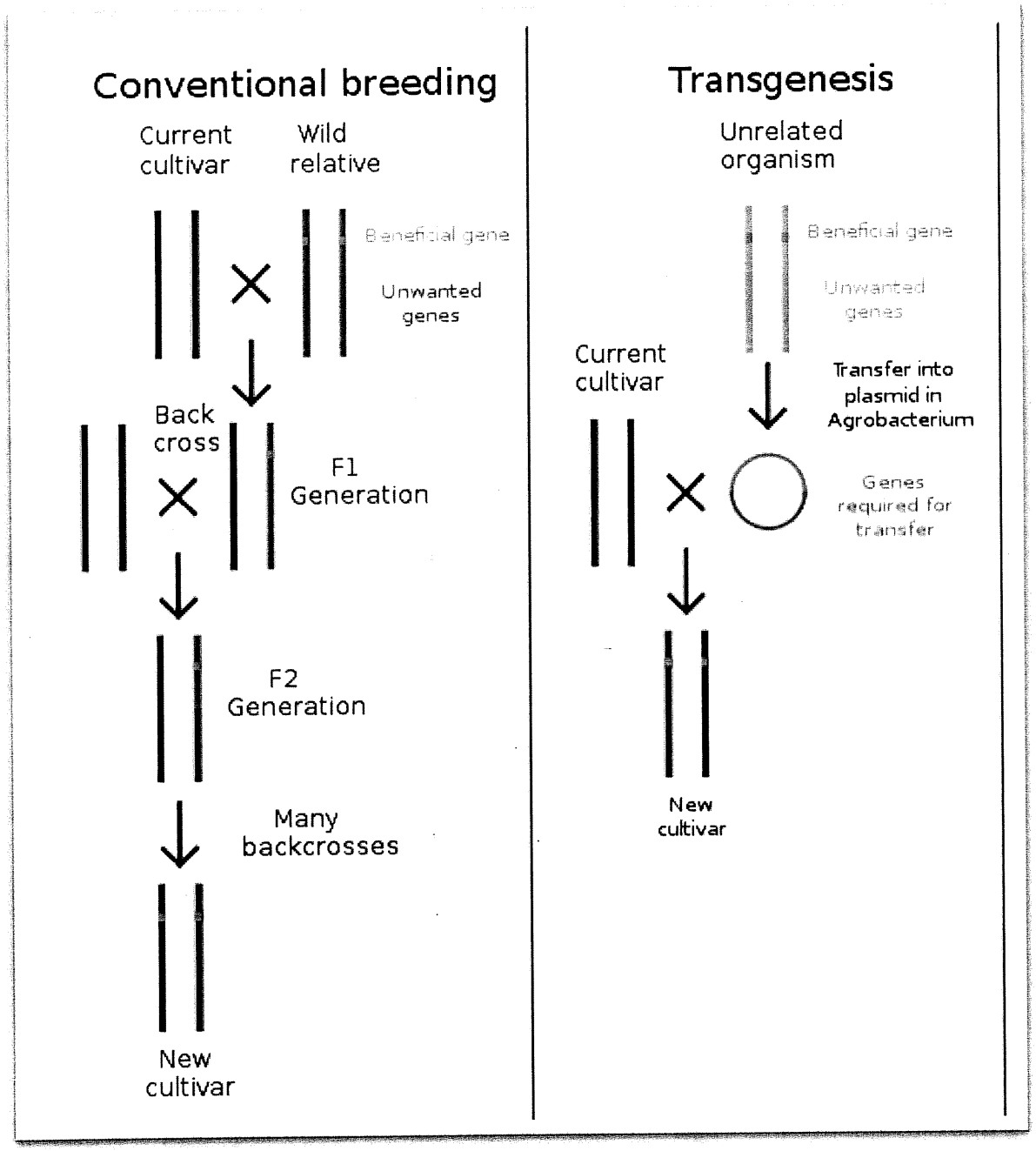
**. Genetically Modified Organism (GMO)**

إن أكثر ما يميز هذه التقنية عن التقنيات التقليدية الأخرى المستخدمة في تربية النبات وتحسينه ( الإنتخاب والتهجين وزراعة الأجنة ...) هو ما يلي :

1- يمكن نقل المورثات أو قطع الDNA بين أنواع غير قابلة للتزاوج فيما بينها.

2- يمكن نقل مورثات من أصل بكتيري أو حيواني أو حتى اصطناعي إلى النباتات.

3 - السرعة في الحصول على النباتات التي تحوي المورثة المطلوبة وبالتالي الصفة المطلوبة مقارنة مع الطرق التقليدية الأخرى التي تتطلب انتاج عدة أجيال من أجل الوصول الى الصفة المرغوبة كما يوضح الشكل رقم (١).




**الشكل رقم (١): مقارنة بين Transgenesis والطرق التقليدية الأخرى المستخدمة في الحصول على صنف جديد بصفات مرغوبة.**

## شروط نجاح Transgenesis:

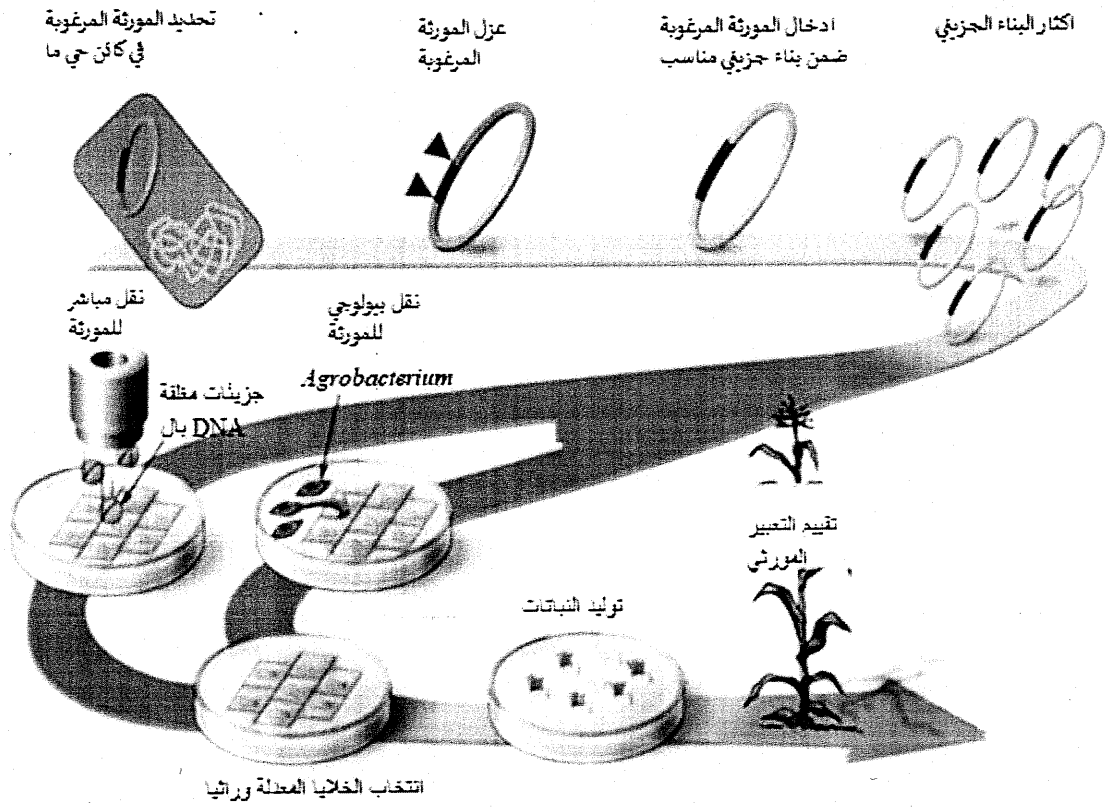
إن نجاح عملية نقل الجينات تتطلب تحقق مجموعة من العوامل وهذه العوامل يجب أن تكون مجتمعة معاً حتى يتحقق الغرض المطلوب من نقل الجينات:

- دخول ال DNA الغريب(Transgene) إلى الخلية النباتية وصولاً إلى النواة، واندماجه بالمادة الوراثية الخاصة بالخلية النباتية مع القدرة على انتقاله إلى الخلية البنت.
- ضرورة توفر عناصر جزيئية مناسبة تساعد على نسخ الDNA الغريب وترجمته والتعرف عليها من قبل الخلية المضيفة (كما سنرى لاحقا).
- القدرة على انتخاب الخلايا المعدلة وذلك من خلال استخدام جينات دالة على التعديل.
- القدرة على إعطاء أو تكوين نباتات كاملة انطلاقاً من الخلية التي تم تعديلها(totipotency)

### خطوات نقل الجينات Transgenesis

إن خطوات نقل الجينات موضحة في الشكل رقم (2) وهي كما يلي:

1 - **cloning a gene**: الخطوة الأولى في نقل الجينات هي تحديد المورثة أو قطعة الDNA المراد نقلها (Transgene)وبعد ذلك يتم عزلها وإكثارها، وهذا ما يسمى **الاستنساخ** (سيتم الحديث عن اكثاراو نسخ المورثة بالتفصيل في الجزء العملي)




**الشكل رقم (2) خطوات التعديل الوراثي**

2- **molecular construction أو البناء الجزيئي** : في هذه الخطوة يتم وضع المورثة المرغوبة ضمن بناء جزيئي مناسب كما في الشكل رقم (3) وهذا البناء يتألف من :

- قطعة نكليوتيدية تسمى promoter أو المحفز وعادة يقع أمام المورثة up stream وظيفته تكون: تحفيز عملية النسخ والتعبير المورثي وهذا المحفز يكون خاص أي إنه يظهر التعبير المورثي في بيئة معينة أو نسيج معين أو حتى خلال مرحلة معينة من تطور النبات، ويمكن أن نعطي مثالا هنا المحفز **Cauliflower Mosaic Virus (CaMV):** المستخرج من فيروس موزاييك نبات القرنبيط.

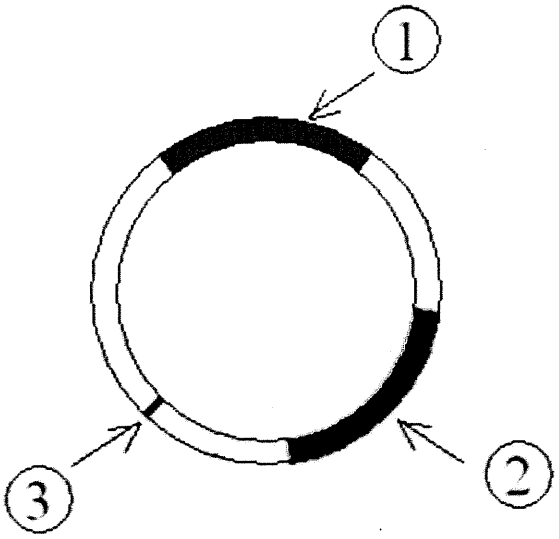
- وبعد المورثة Down stream نضع قطعة نكليوتيدية تسمى terminator وتكون وظيفتها إنهاء عملية النسخ .

كل هذه الأجزاء تسمح معاً بانتاج بروتين والذي سوف يعمل لاحقاً إما كأنزيم لينشط، أو يثبط تفاعل حيوي كيميائي ما، أو سوف يكون كوحدة بناء إضافية في الخلية، وفي كلتا الحالتين سوف تظهر المنظومة الحية الهدف صفة جديدة .

في كثير من الحالات نحتاج إلى وضع هذا البناء الجزيئي ضمن ناقل، وعادة يكون أحد أنواع البلازميدات البكتيرية كما في الشكل رقم (4)

حيث يحوي هذا الناقل على عدة مناطق مميزة أهمها: منطقة تسمى أصل منطقة التضاعف وهي المسؤولة عن تتضاعف هذا البلازميد عند انقسام البكتريا، بالإضافة إلى مناطق مسؤولة عن عدة أنواع من المقاومة مثل مقاومة المضادات الحيوية أو مبيدات الاعشاب.

**الشكل رقم (3): البناء الجزيئي للمورثة**




**الشكل رقم (4): تخطيط عام للبلازميد المستخدم لتحميل المورثة المرغوب**

١-المورثة المرغوبة ٢- منطقة مقاومة لمضاد حيوي أو مبيد أعشاب او غيرها ٣- منطقة التضاعف

**3 - نقل المورثة** : بعد الحصول على المورثة المطلوبة ووضعها ضمن البناء الجزيئي المناسب يتم نقلها الى النبات المدروس .هناك طريقتان أساسيتان لنقل المورثة وادخالها إلى الكائن الحي المستهدف هما :

- بكتريا الاجرو بكتريوم *Agrobacterium tumefaciens*
- biolistic

سيتم الحديث عن هاتين الطريقتين بالتفصيل في المحاضرة القادمة.

**4 ـ انتخاب الخلايا المعدلة وراثيا**

في اغلب التجارب يكون نسبة قليلة جداً من الخلايا قد حصلت على نسخة من المورثة المطلوبة، ولذلك من الضروري معرفة الخلايا المستقبلة أو المضيفة، ومن أجل ذلك يجب تطبيق نوع من الإنتخاب من خلال إضافة مورثة انتخاب، وعادة تحمل هذه الأخيرة على نفس البلازميد الذي يحمل المورثة المرغوبة تكون وظيفتها السماح فقط للخلايا التي تلقت المورثة المطلوبة بالنمو والتطور .

استخدم العلماء في حوالي ٩٠٪ من تجارب نقل الجينات ثلاثة أنواع من الإنتخاب :

- الانتخاب مع وجود مضاد حيوي مثل kanamycine
- الانتخاب مع وجود المانوز
- الانتخاب مع وجود مبيد اعشاب

فمثلا النوع الثاني من الانتخاب وهو الأكثر استخداما عند النباتات يعتمد على وجود مورثة تسمى **phosphomannose isomerase (*PMI*)** تحول المانوز-٦- فوسفات إلى فركتوز-٦- فوسفات . المانوز هو سكر لا يمكن تصنيعة بشكل طبيعي ضمن الخلايا النباتية لذلك فإن ***PMI*** أو البروتين الناتج عنها يسمح للخلايا النباتية باستخدام المانوز كمصدر وحيد للسكر، والذي هو أساسي للنمو والتطور، وبذلك تكون النباتات التي تلقت نسخة من ***PMI*** قادرة على استخدام المانوز الموجود في وسط النمو، بينما النباتات التي لم تتلقى نسخة من ***PMI*** لا يمكن أن تتطور وبالتالي تموت.

**5- توليد وتقييم النباتات المحورة وراثيا :**

النباتات المحورة وراثيا هي التي تلقت نسخة نشطة وكاملة على الأقل من المورثة المطلوبة.

إن الخلايا المستقبلة للمورثة المرغوبة تكون إما خلايا جنينية والتي سوف تشكل كالوس، أو يتم العمل على الكالوس مباشرة، وفي كلتا الحالتان يتم تنمية الكالوس في وسط غذائي يسمح بتشكل أعضاء النبات المختلفة، وحالما تتشكل الجذور بشكل كافي سوف يتم نقل هذة البادرات إلى أحواض زراعة في البيت الزجاجي المناسب من حيث الإضاءة والحرارة والرطوبة، وبعد تطور البادرات في البيت الزجاجي يتم اخذ عينات من الأوراق ليتم تحليلها والتأكد من وجود المورثة المدخلة كما سنرى لاحقا.

**6- دراسة ثباتيه التعبير المورثي للمورثة المدخلة في الأجيال اللاحقة :**

لا يكفي التأكد من وجود التعبير المورثي للمورثة المدخلة في الجيل الأول حتى نقول إننا قد حصلنا على نبات معدل وراثيا، وإنما يجب التأكد من وجود هدا التعبير في الأجيال اللاحقة.

## النسج المستخدمة من إجل انتاج نباتات معدلة وراثياً

إن المادة النباتية المستخدمة من أجل إنتاج نباتات معدلة وراثيا هي إما الكالوس أو كتلة من الخلايا قد تكون اجنة ناضجة أو غير ناضجة، وفي هذه الحالة يتم تكون أجنة جسدية في عملية تسمى:

somatic embryogenesis أي الحصول على اجنة انطلاقا من خلايا جسدية وليست جنسية، ومن اجل هذا يجب أن تدخل الخلايا المستخدمة في مرحلة فقدان التمايز ضمن وسط مغدي غني بالأوكسين، وخلال هذه الفترة فان الخلايا سوف تتكاثر من أجل تشكيل كتلة ذات قطبين والتي سوف تتطور فيما بعد لإنتاج نباتات كاملة ، ولكن هذا الطريق يحتاج الكثير من الوقت وهناك احتمال كبير من حصول طفرات غير مرغوبة.

يوجد طرق اخرى من التعديل الوراثي وبدون المرور بمرحلة زراعة الأنسجة ومنها ما يسمى:

***in planta*** والتي تعني استخدام نباتات فتية جدا مباشرة من أجل احداث التعديل الوراثي عليها. تتميز هذه الطرق عن طرق التعديل الوراثي بزراعة الانسجة، بإمكانية إنتاج عدد كبير من النباتات المتشابهة وبقليل من الوقت والجهد، بالإضافة إلى قدرتها على تعديل الأنواع النباتية التي لها مقدرة ضعيفة على التوالد نسيجياً أوجسدياً، وبشكل عام فإن هذه الطرق تتم إما بحقن النباتات الفتيه بمحلول يحوي *Agrobacterium tumefaciens* أو بغمرها بمحلول يحوي البكتريا السابقة الذكر.

## تحليل النباتات المعدلة وراثيا:

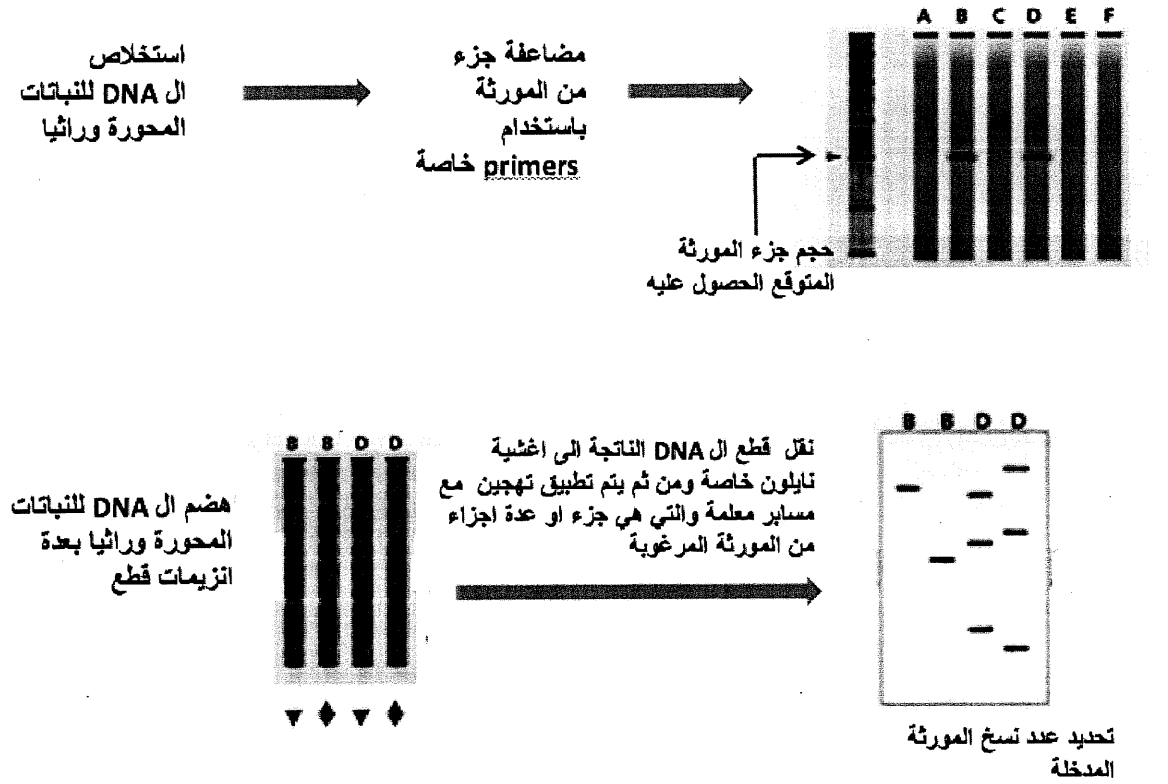
بعد الحصول على النباتات المعدلة يجب اجراء عدة تحاليل للتأكد من تعديلها ،حيث إن تطبيق الانتخاب في مراحل تشكل النباتات لا يعني بالضرورة أنه تم تعديلها، لذلك يجب اجراء عدة تحاليل للتأكد من إن المورثة المرغوبة قد تم ادخالها بشكل صحيح وكامل، ويجب التأكد ايضاً من إنها تعمل بشكل صحيح وتنتج البروتين المطلوب وهذه التحاليل هي بالترتيب كما يلي:

### 1 - تحاليل جزيئية:

للتأكد من إن المورثة المراد ادخالها قد تم نقلها إلى النبات المرغوب فان التحليل الأول والأسرع هو تحليل PCR(Polmerase Chain Reaction). هذا التحليل يسمح بتضاعف قطعة محددة من المورثة المدخلة عدد كبير جداً من المرات، بحيث نتمكن من رؤيتها على جيل الأجاروز بتقنية الرحلان الكهربائي ثم نقارن حجمها مع الحجم المتوقع. الشكل رقم (5)

إن سلبية هذا التحليل هي عدم دقته الكبيرة لأنه يبين فقط إن جزء محدد من المورثة المدخلة موجود أو لا، لذلك لا يمكننا الحكم على أن النبات قد تم تعديله وراثياً بناء على هذا التحليل، لّذلك لابد من إجراء تحليل أكثر دقة وهو تحليل « Southern blot » والذي يعتمد على هضم الDNA للنبات المدروس بعدة انزيمات هضم بحيث نحصل على عدة قطع مختلفة في الطول من DNA ، ومن ثم يتم نقلها على غشاء من النايلون ليتم تهجينها مع مسابر خاصة معلمة بعناصر مشعة و مطابقة لعدة أجزاء من المورثة المرغوبة،

وبذلك يتم الكشف عن عدد النسخ المدخلة من المورثة من خلال عدد الأشرطة الظاهرة بالإضافة طبعا إلى معرفة إذا كان هناك دخول كامل للمورثة أو لا.




**الشكل رقم (5): التحاليل الجزيئية للنباتات المعدلة وراثيا**

**2- تحاليل كيميائية حيوية:**

بعد التأكد من إن المورثة المطلوبة قد تم دخولها بشكل تام الى النبات يجب التأكد ايضا من إن هذه المورثة تنتج البروتين المطلوب. ومن أجل التاكد إذا كان البروتين المطلوب نشط أو لا هناك عدة فحوصات يمكن إجراؤها مثل

Elisa (*enzyme-linked immunosorbent assay*)

والذي هو اختبار كيميائي حيوي يعتمد على استعمال الأجسام المضادة والتغير اللوني في التعرف على وجود مادة ما أو بروتين في عينة ما.

**3- تحاليل أو فحوصات زراعية:**

وهو فحص هام أيضاً ومطلوب اجرائه على النباتات المعدلة وراثياً. هنا يجب معرفة فيما إذا كان هناك توافق بين البروتين المنتج من قبل المورثة الجديدة مع الاستقلاب العام للنبات وبالتالي إنتاج الصفة المطلوبة.

حيث إنه في بعض الحالات لا يتم التوافق ويتم انتاج صفات معاكسة أو غير مطلوبة .

وأخيراً يجب التأكد من إن الصفة الجديد ة يتم تورثها للأجيال التالية وبشكل ثابت.

# /2 / Transgenesis

**طرق نقل الجينات**

يمكننا نقل الجينات بطرق متعددة ولكن سوف نذكر في هذه المحاضرة فقط طريقتان، واللتان تعدان الأكثر استخداماً في وقتنا الراهن في أغلب مختبرات العالم وهما:

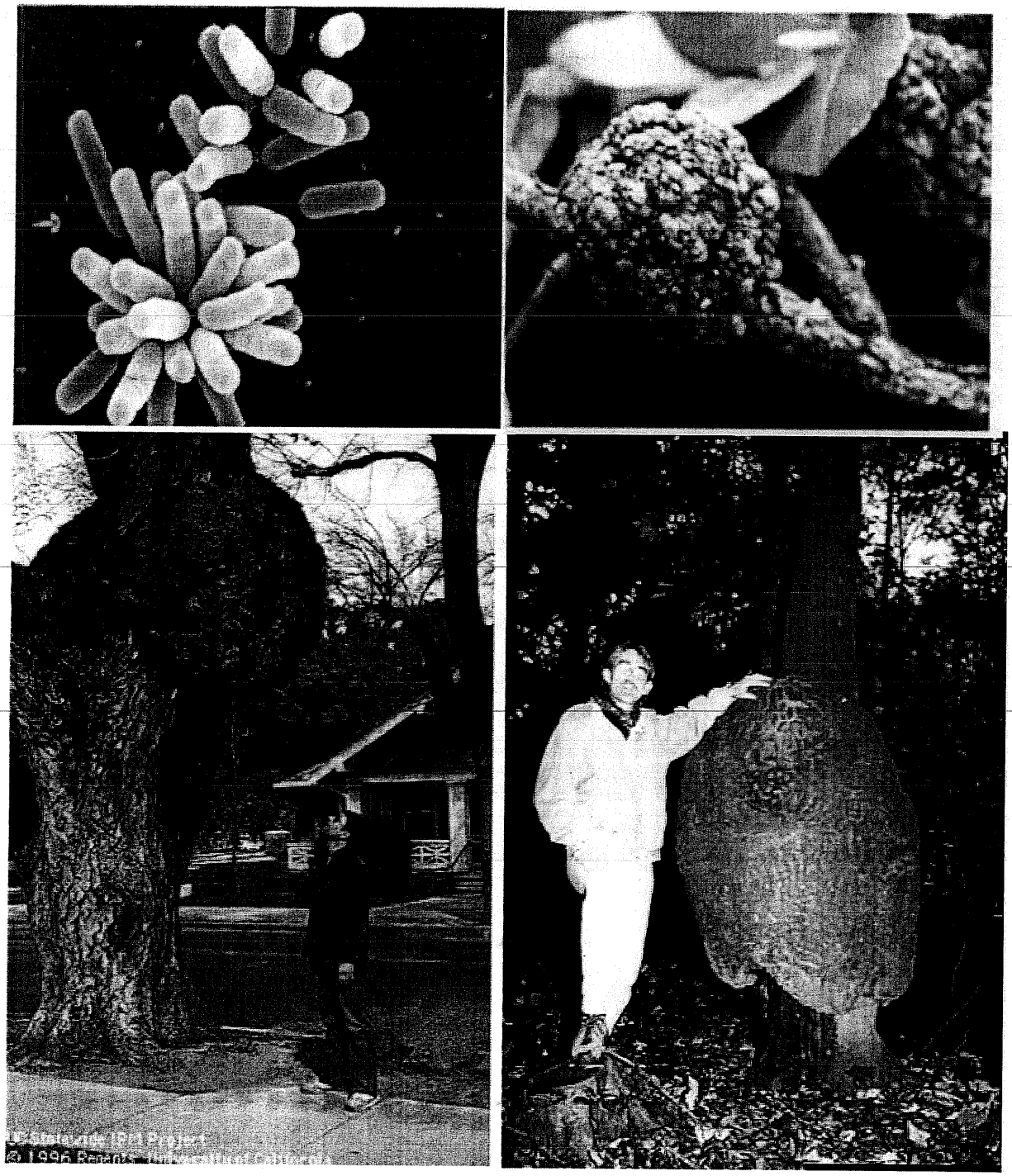
**الطريقة الأولى:**

وهي طريقة بكتريا الأجرو بكتريوم *Agrobacterium tumefaciens* التي هي طريقة غير مباشرة من اجل إيصال ال DNA الغريب إلى داخل الخلية النباتية.

إن القدرة الطبيعة والوحيدة لبكتريا Agrobacterium tumefaciens على نقل أجزاء من الDNA الخاص بها إلى خلايا النبات قد تم استغلالها على نطاق واسع في الربع الأخير من القرن الماضي من أجل التعديل الوراثي عند النباتات الراقية .

لقد تم إيجاد هذه التقنية انطلاقاً من ظاهرة تشكل أورام على النباتات الناتجة عن إصابتها بهذه البكتريا شكل رقم (١)

وخلال الإصابة فإن البكتريا تنقل جزء من مادتها الوراثية والتي تسمى T – DNA (transfer DNA) إلى داخل الخلية النباتية المصابة لتصبح جزء من مادتها الوراثية ومحمولة على الجينوم .



**الشكل رقم (١): بكتريا الأجرو بكتريوم والأورام التي تسببها على النبات**

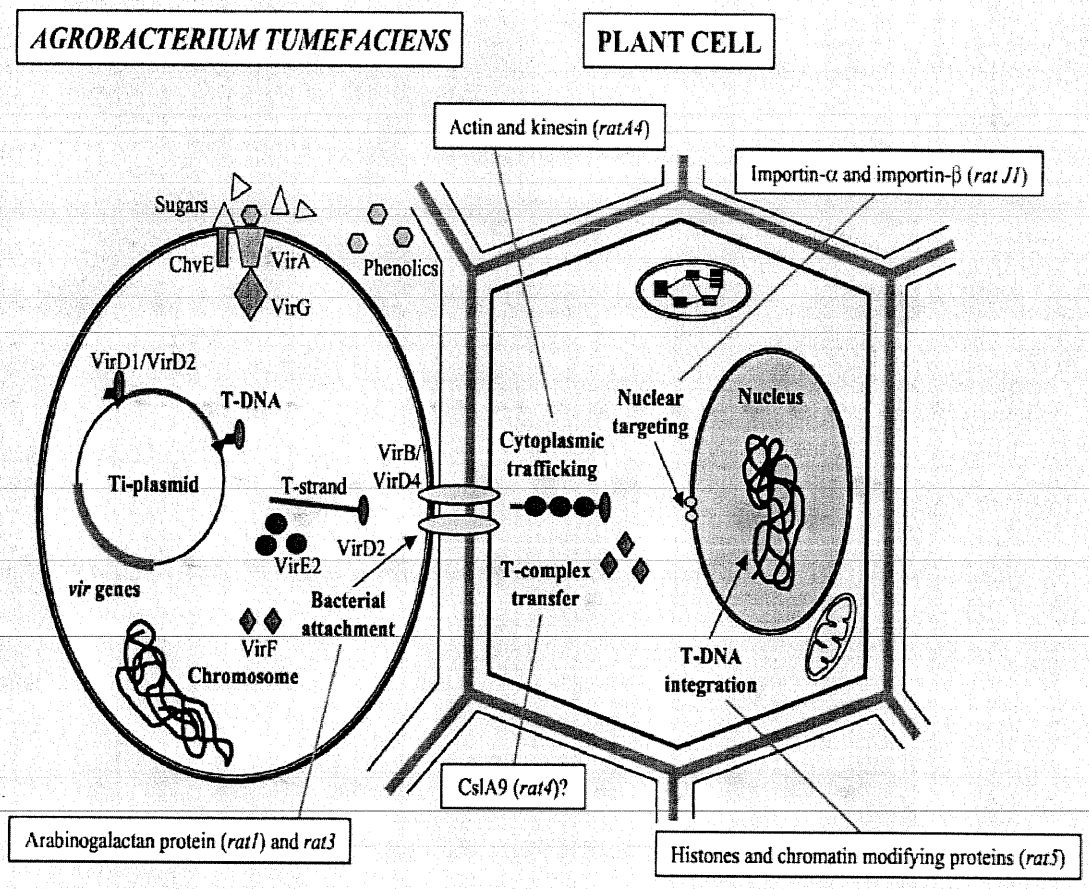
يقع T -DNA على البلازميد المسبب للتورم والذي يسمى بلازميد Ti: Tumor inducing الشكل رقم (٢)

وعند حدوث الإصابة فإن خلايا النبات وفي منطقة الإصابة بالتحديد تبدأ بإفراز السكر والمركبات الفينولية كردة فعل على هذه الإصابة. وهذه المركبات المفروزة هي من تنشط جينات الإصابة vir(Virulence) التي تسمى الجينات الشرسة أو الضارية والتي تكون محمولة على البلازميدTi . إن هذه الجينات تكون مجتمعة معاً ولها عدة وظائف وقد قسمت إلى عدة مجموعات (vir ABCDEFG) فمثل vir D ينحصر دورها في تصنيع بروتينات خاصة تقوم بقطع إحدى شريطيDNA - T، وهذا الأخير ينتقل بدوره بعملية بيولوجية معقدة ويدخل الخلية النباتية عابراً ثقوب النواة إلى الداخل مندمجاً بجينوم الخلية النباتية. الشكل رقم (٢).

إن T -DNA يملك جينات مسؤولة عن تصنيع هرمون الأوكسين الذي من شأنه التحريض على انقسام ونمو الخلية النباتية المضيفة، ويتم انتاج هذا الهرمون بطرق خاصة غير الطرق الطبيعية، لذلك الكمية المفروزة من الاوكسين لا يتم استقلابها وتقوم بزيادة وانقسام الخلية بشكل غير طبيعي تنتهي بتشكل كتل نطلق عليها اسم crown gall .

إن T -DNA يملك أيضاً جينات مسؤولة عن تكوين انزيمات من شأنها العمل على تحريض خلية النبات المضيفة على افراز مادة تسمى اوبين(Opine) والتي تكون وظيفتها تزويد البكتريا بالنيتروجين والطاقة الشكل رقم (٣).

وعلى الرغم من إن*Agrobacterium. T* تملك مجموعة كبيرة من النباتات المضيفة، إلا إنها لاتصيب بشكل عام أحادية الفلقة، وقد كان ذلك سبب في محدودية استخدامها لفترة طويلة .




**الشكل رقم (٢): رسم توضيحي يبين كيفية إصابة النبات ببكتريا Agrobacterium.T**

**استخدام *Agrobacterium .T* في نقل الجينات**

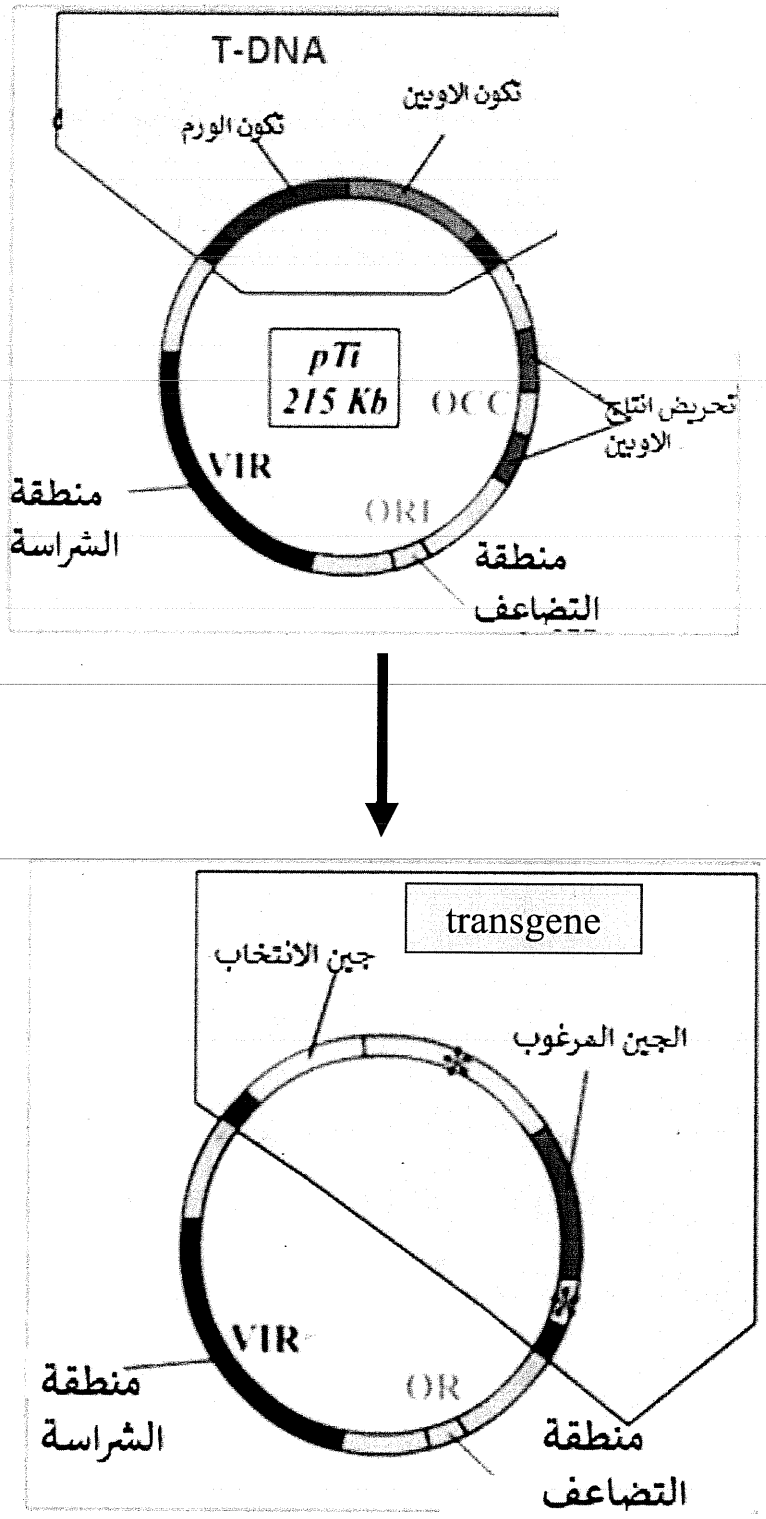
يتم استخدام البلازميد Ti بعد تعديل الجينات المسببة للإصابة بحيث تفقد قدرتها على احداث التورم عند النباتات، ولكن مع الإبقاء على قدرتها على الإصابة والدخول إلى خلايا النبات. يطلق على سلالات البكتريا التي تحوي البلازميد المعدل والتي فقدت قدرتها على إحداث الورم باسم سلالة غير فعالة أو سلالة منزوعة السلاح .

إن خطوات التعديل باستخدام *Agrobacterium .T* تعتمد على استبدال T -DNA باي جين نختار

إن الناقل الأكثر بساطة للاستخدام هو الناقل الذي يبدل فيه T -DNA بـDNA آخر يحوي الجين المرغوب بالإضافة الى جين المقاومة الشكل رقم (٣)، وهذه الأخيرة تكون وظيفتها تعليم الخلايا التي تلقت ال DNA الخارجي. بعد الحصول على البلازميد Ti المعدل نستطيع أن ننتج نباتات معدلة وراثياً وذلك بأجراء عدوى للمادة النباتية المستخدمة بالبكتريا التي تحمل البلازميد المعدل. (بكتريا محورة) إما عن طريق الحقن أو عن طريق الغمر بمحلول البكتريا.

في بداية عام ١٩٨٠ تم انتاج أول نبات معدل وراثياً عن طريق استخدام هذه البكتريا .

على الرغم من حسنات هذه الطريقة والتي أهمها ادخال نسخة واحدة أو عدد قليل من النسخ للمورثة المدخلة، ظلت هذه الطريقة محدودة الاستعمال عند أحاديات الفلقة مثل القمح والرز باستثناء عدد قليل جداً من الأعمال.



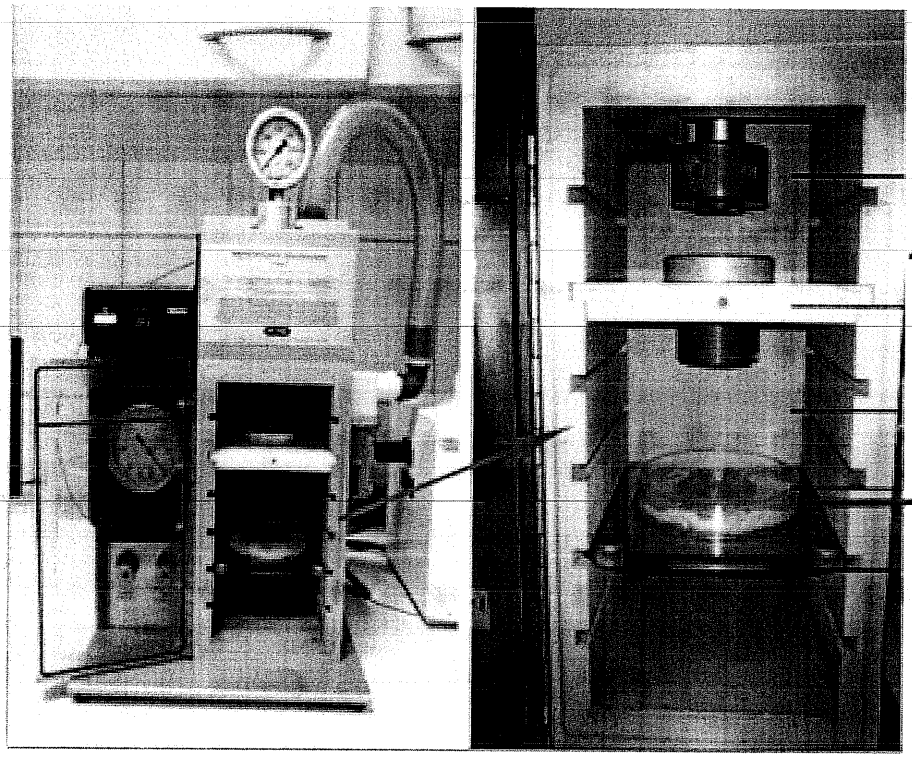

**الشكل رقم (٣): كيفية استخدام البلازميد في نقل الجينات**

**الطريقة الثانية**

وهي طريقة biolisticتم إيجاد هذه التقنية للمرة الاولى في العام ١٩٨٧ من قبل الباحث جون سانفورد. تعتمد هذه الطريقة على قذف المادة النباتية بجزيئات دقيقة جدا محاطة بال DNA المراد إدخالها الشكل رقم (٤)

وهذه الجزيئات قد تكون كريات صغيرة جداً مصنوعة من الذهب أو التنغستن (عناصر خاملة) وبأبعاد تتراوح بين ٠،٦ إلىμm ١،٦ .ويتم قذف هذه الكريات بسرعات عالية تحت ضغط غاز الهليوم. عندما يتم قذف هذه الجزيئات فإن عدد منها سوف يخترق عدد من الخلايا وتصل إلى النواة، وهناك احتمال كبير أن يختلط ال DNA الداخل بإحدى كروموزمات الخلية .

تعد هذه الطريقة سهلة الاستخدام ويمكن استخدامها مع الأنواع النباتية التي لا يمكن تعديلها عن طريق البكتريا. ولكن من سلبياتها إنها تؤدي إلى دخول عدد كبير من نسخ الجين المطلوب مما قد يؤدي في بعض الأحيان الى حدوث إطفاء للتعبير المورثي بالإضافة إلى تكلفتها المرتفعة نوعاً ما. ولكن بالرغم من سلبيات هذه الطريقة إلا إنها الأكثر استخداماً وخاصة عند الحبوب .




**الشكل رقم (٤): جهاز الbiolistic**

إذا أردنا تعديل نبات القمح مثلا ستكون خطوات التعديل بهذه الطريقة كما يلي :

- نقوم أولا باستخراج الأجنة غير الناضجة لاستخدامها كمادة أولية من أجل التعديل الوراثي (نضعها على وسط غذائي مناسب.
- نقوم بتحضيرمحلول كريات الذهب أو التنغستن ونضيف إليها كمية كافية من البلازميد الذي يحوي الجين ويتم خلطهما بشكل جيد.
- نقوم بعملية قذف المحلول السابق فوق الأوساط الغذائية التي تحمل الأجنة غير الناضجة. نتركها لمدة اسبوعان ريثما يتشكل الكالوس.
- نقوم بتغيير الوسط الغذائي بآخر مناسب لنمو أعضاء النبات المختلفة انطلاقاً من الكالوس المتشكل.
- يجب ألا ننسى أن نطبق الانتخاب للخلايا المعدلة في كل مرحلة.
- عندما يتم الحصول على البادرات يتم نقلها إلى البيت الزجاجي المناسب من حيث الحرارة والإضاءة و... وبعد نمو هذه البادرات قليلا يمكن البدء بعمليات التحاليل الجزيئة المطلوبة.

## سلبيات نقل الجينات

على الرغم من النجاحات العديدة التي تم تحققها عن طريق تقنية نقل الجينات إلا إن هذه التقنية لها العديد من السلبيات ومنها :

❖ **الحاجة الضرورية لاستخدام جين انتخاب:**

كما رأينا في المحاضرة الماضية فإن نسبة الخلايا المعدلة وراثياً قليل جداً مقارنة مع العدد الكلي للخلايا الموجودة في الوسط المحيط، ولذلك لا بد من استخدام جين انتخاب يسمح فقط للخلايا المعدلة بالنمو والتطور. ولكن القوانين العالمية الناظمة لإنتاج النباتات المعدلة وراثياً، تتطلب التخلص من هذه المورثة بعد الحصول على النبات بالصفة المطلوبة، لما لها من تأثير سيئ على البيئة والصحة وعلى النباتات المجاورة مثل المقاومة لمبيدات الأعشاب. ويمكن التخلص من هذا الجين بعدة طرق سنراها في المحاضرة القادمة .

❖ **الدخول العشوائي للجين المطلوب إلى الجينوم:**

إن موقع دخول الجين أو قطعة ال DNA الغريبة غير معروف، وهذا قد يكون له آثار سلبية مثل إمكانية الدخول ضمن الجزء المشفر لجين آخر داخلي، مما يعطل عملها بالإضافة إلى إن هذه السلبية تجعل تقنية نقل الجينات محدودة الاستعمال إذا أردنا استبدال جين معطل بآخر صحيح.

❖ **ثباتية التعبير المورثي عبر الأجيال اللاحقة: في كثير من الحالات نفقد التعبير المورثي للجين**

المدخل، ولذلك يجب اجراء فحوصات على كل جيل خلال عدة أجيال متتالية حتى يتم التأكد من الثبوتية .

# نقل الجينات Transgenesis /٣/

## إزالة أو حذف جين الانتخاب

لقد رأينا في المحاضرة الماضية إن من سلبيات تقنية نقل الجينات هو الحاجة الضرورية لاستعمال جين انتخاب /Selectable marker Gene: SMG/ ، والذي لا بد من التخلص منه فيما بعد لأسباب صحية وبيئية وتقنية متعددة: فوجود جين الانتخاب في النبات النهائي المعدل وراثيا يعيق عملية التعديل الوراثي مرة أخرى على نفس النبات وذلك لعدم القدرة على تمييز النباتات المعدلة الجديدة من خلال الانتخاب لنفس جين الانتخاب، ولابد من البحث عن جين انتخاب آخر وادخاله حتى يمكننا التمييز بين النباتات، وهذا قد يسبب تكلفة إضافية ووقت اكثر بالنسبة للباحثين والمراكز العلمية التي تستعمل نفس نظام الانتخاب.

يطلق على عملية إزالة جين الانتخاب بتقنية تنظيف جين clean-gene technology لذلك سنتحدث هنا عن الطرق الحديثة منها والتقليدية المتبعة للتخلص من جين الانتخاب .

### ١- انتاج نباتات معدلة وراثيا خالية من جين الانتخاب مباشرة :

رأينا في محاضرة سابقة إن أولى خطوات التأكد من أن النباتات قد تم تعديلها وراثيا أو على الأقل تم ادخال الجين المرغوب إليها هي تقنية الPCR لذلك يمكننا أن ننتج نباتات معدلة وراثيا وبدون استخدام جين انتخاب التي تكون وظيفتها الأساسية هي تمييز النباتات التي أدخلت الجين المرغوب

**(GOI: Gene Of Interest)**، ولكن من سلبيات هذه الطريقة هي النسبة القليلة جداً من النباتات المعدلة. في اغلب التجارب لم تتجاوز هذه النسبة 0.2% ، وهذه النسبة قليلة جداً مقارنة مع التجارب في

حال استخدام جين الانتخاب والتي قد تصل في بعض الأحيان الى % 10 .

إذاً هذه الطريقة غير مجدية بالإضافة إلى تكلفتها العالية، حيث يتطلب الأمر تحليل الآلاف من النباتات حتى نحصل على عدد قليل جداً من النباتات المعدلة وراثيا .

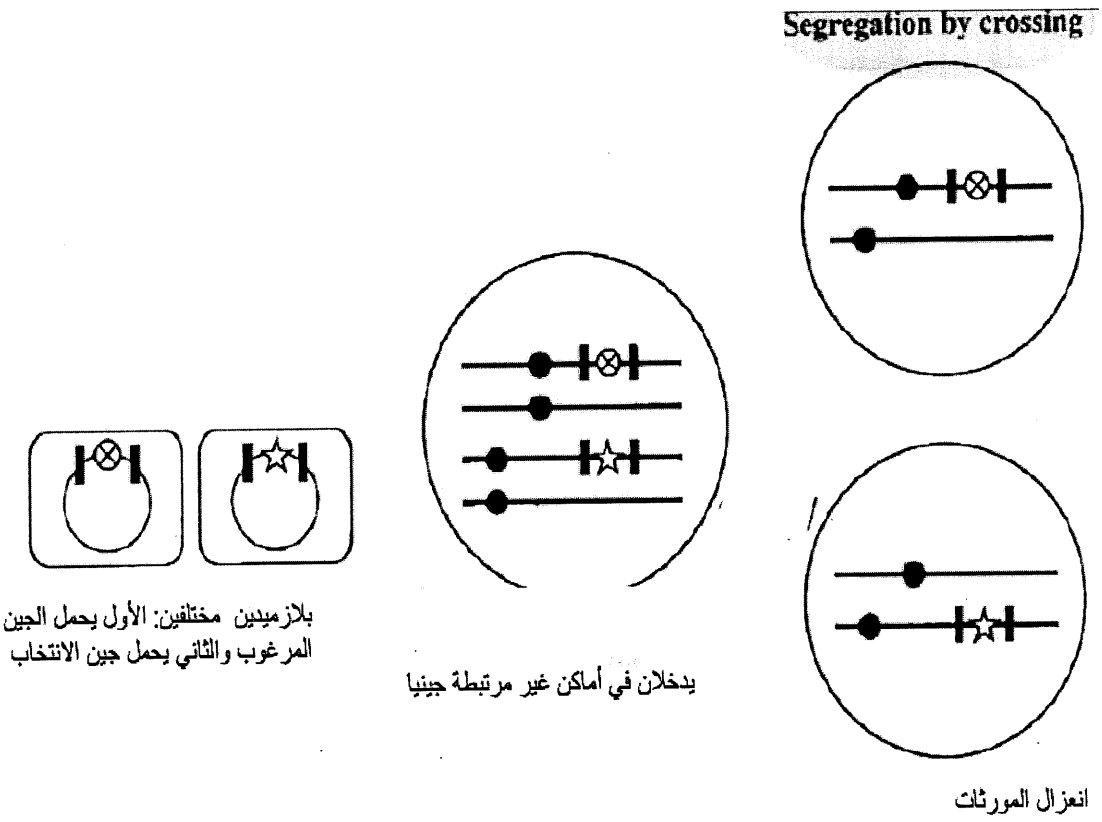
## ٢- انتاج نباتات معدلة وراثيا من خلال نقل جين الانتخاب والجين المرغوب بشكل منفصل:

من الطبيعي أن يكون النبات الذي تلقى نسخة من الجين المرغوب(GOI ) قد تلقى نسخة أيضا من جين الانتخاب (SMG)، لذلك فإنه في الجيل التالي من المرجح جداً أن يتم نقل الجينان معا، إلا في حالة توضع الجينان على كروموزومين مختلفين مما يعطي فرصة كبيرة بأن يتم فصل الجينان عن بعضهما في الجيل الثاني. لذلك فإن مبدأ هذه الطريقة يعتمد على ادخال الجينان بواسطة ناقلين مختلفين وبالتالي هناك احتمال أن يتم اندماج كل جين على كروموزوم مختلف، مما يسهل التخلص من جين الانتخاب حسب مبدأ انعزال الصفات (قانون ماندل) في الجيل الثاني وذلك بسبب كون الجينان غير مرتبطان الشكل رقم (١).

يمكن إجراء هذه الطريقة إما:

- استعمال سلالتين مختلفتين من البكتريا وكل منهما تحمل بلازميد مع T-DNA مختلف
- استعمال سلالة واحدة من البكتريا مع تحميلها بلازميدين يحملان T-DNA مختلفان
- استعمال سلالة واحدة من البكتريا مع بلازميد واحد واثنين من T-DNA مختلفان

إن سلبية هذه الطريقة تكمن في الوقت اللازم لإجراء التراكيب الجزيئية المناسبة حيث يتطلب إنتاج البلازميد واكثاره الكثير من الوقت، كما إن اتباع هذه الطريقة يكون صعب في حال النباتات التي تكون دورة حياتها طويلة بالإضافة إلى التحاليل الجزيئية للنباتات في كل مرحلة من المراحل .




**الشكل رقم (١): استخدام ناقلين (بلازميدين) بدل من ناقل أو بلازميد واحد**

## ٣- تطبيق انتخاب سلبي:

الانتخاب السلبي يعني إن النباتات التي تلقت نسخة من جين محدد يتم إبعادها. بالطبع مثل هذا الانتخاب

يتم تطبيقه بعد اجراء انتخاب إيجابي (الانتخاب المعروف).

بشكل عام عند إجراء الانتخاب الإيجابي فإنه يتم انتخاب الخلايا التي تلفت الجين المرغوب(**GOI**) وجين الانتخاب (SMG)، ولكن عندما نطبق الانتخاب السلبي في الجيل الثاني أي بعد انعزال الصفات أو المورثات فإنه يمكن أن نحصل على نباتات تحوي الجين المرغوب (**GOI**) فقط دون جين الانتخاب. ومن اجل تطبيق هذه الطريقة يجب أن يحوي ناقل التعديل الوراثي على الجينان معا أي جين الانتخاب الإيجابي SMG وبجنبه منطقة مسؤولة عن الانتخاب السلبي:N negative .

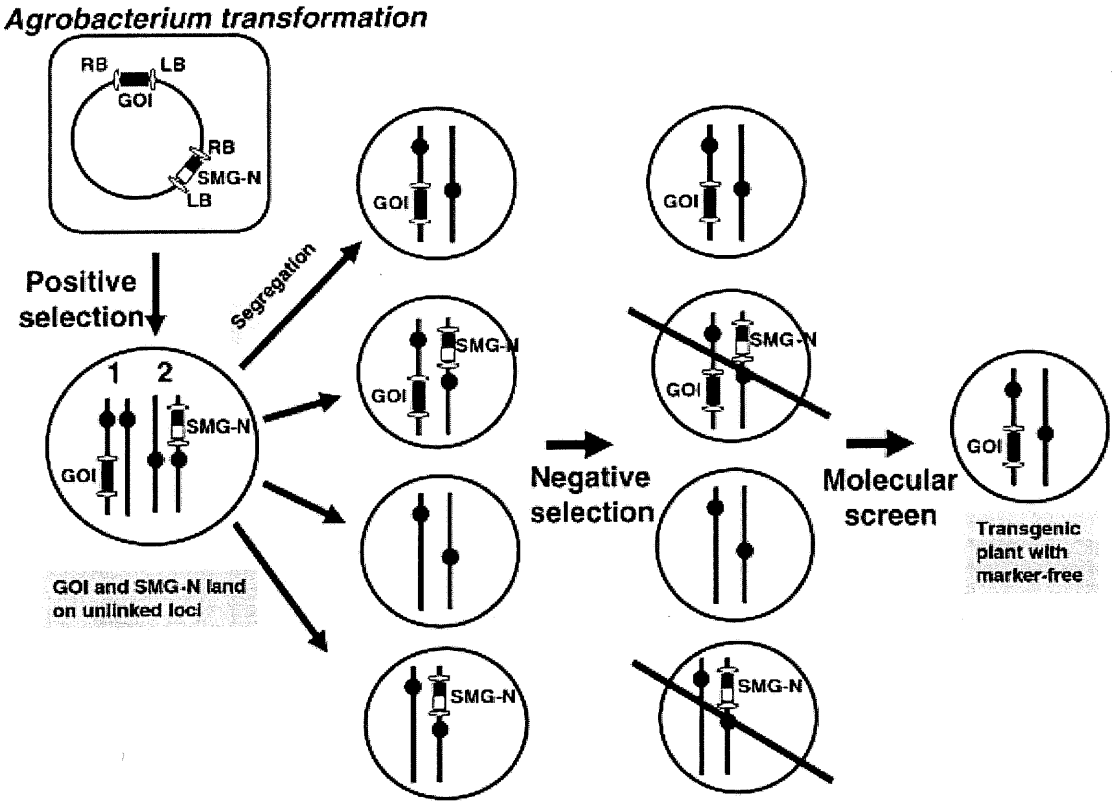
في الجيل الأول وبعد تطبيق الانتخاب الإيجابي نحصل على افراد تحوي التركيب الجزيئي SMG - N بالإضافة طبعا إلى الجين GOI، في الجيل الثاني وبعد انعزال المورثات سنحصل على ما يلي: الشكل رقم (٢)

**١- افراد تحوي فقط GOI**

**٢- افراد تحوي GOI و SMG - N**

**٣- افراد لا تحوي أيا من الجينات السابقة**

**٤- افراد تحوي فقط التركيبSMG - N**




**الشكل رقم (٢): طريقة تطبيق انتخاب سلبي بعد الانتخاب الإيجابي**

عند تطبيق الانتخاب السلبي بعد الحصول على التركيبات الوراثية السابقة فإننا نقوم بالتخلص من نصف الأفراد أو التركيبات الوراثية التي تحوي التركيب الجزيئي SMG- N

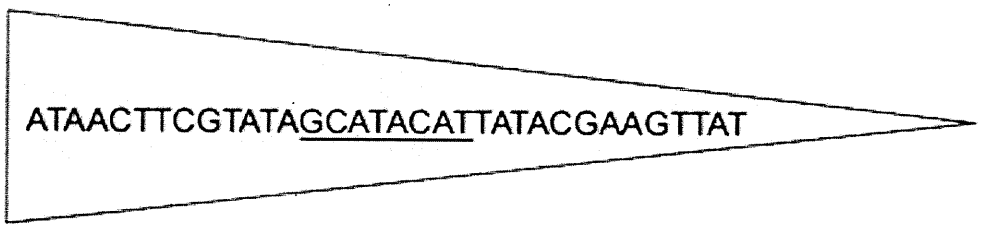
إن هذه الطريقة تختصر الكثير من عدد التحاليل الجزيئية المطلوبة (٥٠ ) %

## ٤- نظام القطع وإعادة الالتحام من خلال موقع خاص: Cre/*loxP*

- إن نظام Cre/loxP مستمد بالأصل من أحد أنواع البكتريو فاج P1 :
- حيث إن **Cre** هو عبارة عن انزيم قطع في أماكن خاصة على ال DNA والتي هي loxP .
- إن التسلسل النكليوتيدي لموقع **loxP** هو:

ATAACTTCGTATA -NNNTANNN-TATACGAAGTTAT

يتألف من ٣٤ زوج قاعدي ١٣-٨-١٣ حيث ال١٣نكليوتيد على يسار ويمين الموقع يشير إلى ثبات هذه القواعد أما ال ٨ نكليوتيد في الوسط فهي قواعد متغيرة وعادة ما يشار إلى هذا الموقع كما في الشكل رقم (٣)



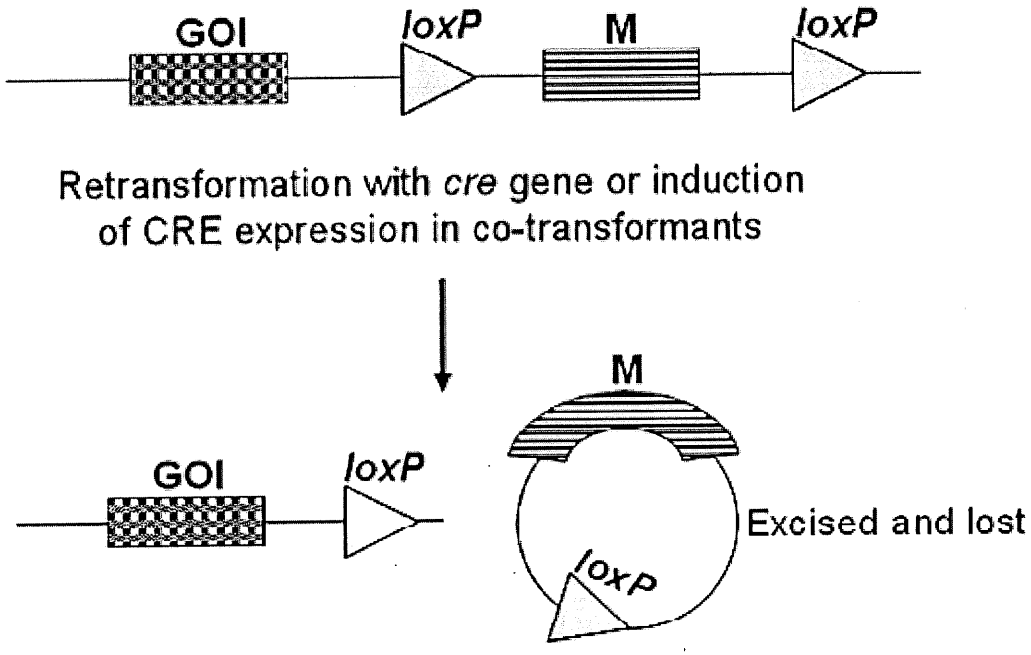

**الشكل رقم (٣): إن التسلسل النكليوتيدي لموقع loxP**

عندما نستخدم هذا النظام لإزالة جين الانتخاب GOI يجب أن يتم التعديل بوجود ناقل اخر يحمل مورثة

**Cre**التي سيتم نسخها لاحقا وترجمتها لتعطي الأنزيم **Cre** الشكل رقم (٤)

ولا ننسى بالطبع ادخال موقعي **loxP** على جانبي مورثة الانتخاب M: marker Gene

وعندما تدخل جميع العناصر المذكورة إلى نواة الخلية النباتية وتصبح جزء من مادتها الوراثية فإن Cre سيقوم بالقطع على موقع loxP **المحيطين ب** M وسيقوم أيضا بإعادة لحم المناطق المتشابهة منتجا حلقة تحوي M وهذه الحلقة سوف يتم تهديمها والتخلص منها لاحقا من قبل الخلية نفسها .



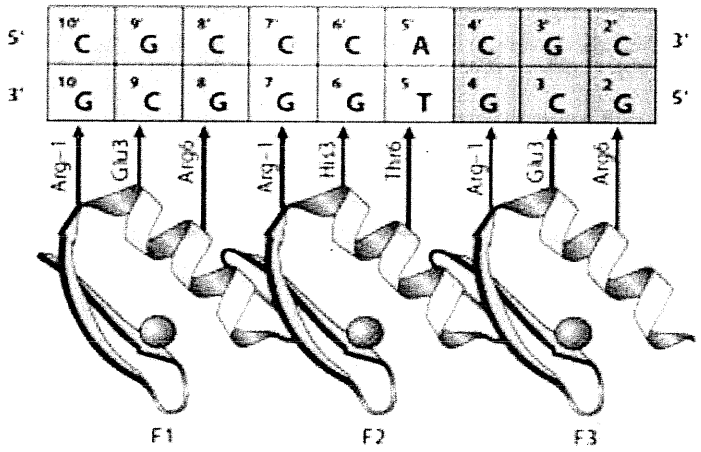

recombination system (M: marker gene, and GOI: gene of interest)

**الشكل رقم (٤): طريقة استخدام نظام Cre/loxP للتخلص من جين الانتخاب M: marker Gene**

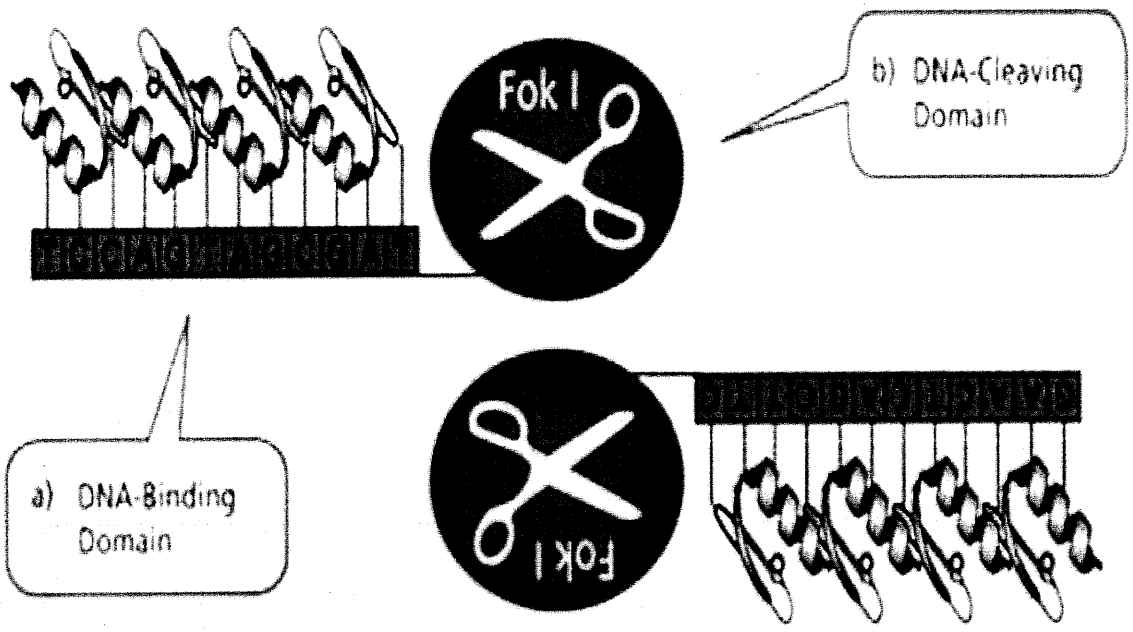
وحديثا يتم استعمال نفس المبدأ لنظام Cre/loxP ولكن مع استعمال نيكولياز nuclease اصطناعي

تمت إعادة هندسته بحيث يتمكن من التعرف على مكان قطع مدخل بشكل مسبق إلى الجينوم الهدف، حيث إن ال **nuclease** بالأساس هو انزيم قطع له القدرة على قطع شريطي ال DNAعند مواقع محددة ونذكر مثال هنا:

zinc finger nuclease الذي هو **nuclease** اصطناعي حيث إن zinc finger هو بروتين طبيعي صغير يتألف من أصابع الزنك وكل أصبع يستطيع التعرف على ٣ من ازواج القواعد الازوتية أي إنه يملك مجال بروتيني يستطيع الالتصاق بتسلسل نكليوتيدي معين على DNA( DNA-binding domain)وقد اضيف إلى هذا المجال مجال بروتيني آخر (FOK1)يستطيع القيام بعملية القطع للقواعد السابقة(DNA-cleaving domain) وقد تم أخذ هذا المجال من nuclease داخلي عند احد أنواع البكتريا .




**الشكل رقم (٤): أصابع بروتين zinc finger حيث ان كل إصبع يتعرف على ثلاث ازواج من القواعد الازوتية**




**الشكل رقم (٥): zinc finger nuclease**