الأنزيمات والعوامل الناقلة للمورثات

أ.د.عامر دباغ

نواقل المورثات:
Genes Vectors

- تقوم بحمل الجينات الغريبة إلى DNA خلية أخرى وهذه الجينات الغريبة لا تلبث أن تعامل من قبل الخلية المضيفة كأحد الجينات الأصلية فيها.
- تتقبل الخلية المضيفة المعلومات والأوامر الوراثية التي يحملها للجين الغريب وتقوم بتنفيذها بالطريقة العادية.
- وهكذا يمكن الحصول على أعداد هائلة من نسخ الجين وتتحول تلك الخلايا إلى مصانع صغيرة لإنتاج البروتينات المرغوبة.

النواقل

- تتكون من جزيء أو أجزاء من DNAويجري العلماء بعد ذلك عملية ربط الجين بسلسلة الـ DNA الأصلية بواسطة انزيمات الربط ولا بد من توفر بعض الشروط في الناقل.
- أن يحوي الناقل منطقة تسهل الارتباط بالـ DNA المنقول إليه وهذه المنطقة تدعى بالمنساخ Replicon وهي قطعة من DNA تتقبل الارتباط ببعض الأنزيمات الخاصة بعملية القطع والربط بها و تؤمن بذلك عمليات فتح ال DNA الأصلي ثم ربط ال DNA الغريب وإعادة الوصل من جديد مع بقية سلسلة ال DNA الأصلي .

- أن يحتوي الناقل على واسماً marker واحداً على الأقل والواسم هو قطعة من DNA تحوي معلومات يسهل تحديد خواصها مخبرياً وهذا يسهل مهمة علماء الهندسة الوراثية في التعرف على الخلايا المزروعة التي تقبلت الجينات الغريبة.
- أن يحوي الناقل على مواقع انشطار خاصة ونوعية Specific cleavage Sites تستطيع أنزيمات التحديد فتحها للسماح للـ DNA الغريب بالاندماج فيها ويجب أن تكون مواقع الانشطار هذه بعيدة عن المنساخ وعن الواسم.
- أن يحوي الناقل على المتتاليات المعلوماتية الصحيحة المتعلقة بفهم وتنفيذ الأوامر الخاصة بمقاومة الصادات
- يفضل أن تكون بنية ال DNA المشكل للناقل مألوفة ومدروسة بشكل جيد ومفهومة أنواع ناقلات المورثات.

أهم النواقل المعروفة هي

- البلازميدات Plasmids: تحتوي البكتيريا على صبغي صغير إضافة للصبغي الأصلي الكبير وقد سمي بالبلازميد
- وظيفته إكساب الخلية المضيفة لصفة المناعة ضد بعض المضادات الحيوية أو الأشعة فوق البنفسجية.

للبلازميدات عدة خواص تجعلها مفيدة جداً

١. توجد كنسخة وحيدة أو عدة نسخ في الخلية البكتيرية
٢. تتناسخ مستقلة عن DNA البكتيري
٣. تتابع القواعد في جزيء DNA البلازميد معروف بالكامل مما يتيح معرفة المكان المضبوط لنشاط أنزيم القطع والذي يتم فيه إدخال DNA المراد إضافته .
٤. يكون البلازميد أصغر بكثير من كروموسوم الخلية المضيفة مما يجعل من السهل عزله منها ويحمل من ثلاث جينات إلى عدة مئات من الجينات
٥. يمكن للبلازميد استيعاب شظية DNA بطول حوالي (٦-١٠) كيلو قاعدة.

تقسم البلازميدات الى عدة أقسام:

- **أولا-حسب وظيفتها إلى عدة أنواع منها :**
- **بلازميدات المقاومة Resistance Plasmids: هي**

البلازميدات الحاملة لجينات المقاومة للمضادات الحيوية والعقاقير المضادة للبكتيريا ومنها البلازميد COLE1 الذي يحمل مورث المقاومة للمضاد الحيوي الكلورام فينيكول والبلازميد PSC101 الذي يحمل مورث المقاومة للتراسكلين والبلازميد RSF1010 الذي يحدد المقاومة للستربتومايسين كما تم الحصول على بلازميد هجين يحدد المقاومة لكلا المضادين الحيويين التترسكلين والستربتومايسين والبلازميد PBR322 الذي يحدد صفة المقاومة للمضادين الحيويين التترسكلين والإمبيسيللين .

- يمكن التميز بين البلازميد الأصلي والبلازميد الهجين بفقد الأخير لصفة المقاومة للأمبيسللين مع احتفاظه بالمقاومة للتراسكلين ويمكن التأكد من حدوث الإدخال عن طريق معرفة الفرق في الحجم بين البلازميد الأصلي والبلازميد الهجين بطريقة التفريد الكهربائي حيث يكون البلازميد الهجين أكبر حجماً من البلازميد الأصلي.

2- بلازميدات الجنس والنقل الجنسي :

- يعتبر عامل F مسؤول عن انتقال DNA أثناء التزاوج والاقتران Conjugation بين البكتيريا
- يوجد بحالتين

١. **الحالة المستقلة** وفيها يتكرر مستقلا عن كروموسوم العائل.

٢. **- الحالة المندمجة integrated state** والتي فيها يدخل إلى الكر وموسوم البكتيري ويتكرر معه مثل أي جينات أخرى على الكر وموسومات ويعد مثلا للعناصر الوراثية التي تسمى ايبيسومات episomes.

البلازميدات التي تشفر للكولسينات :

- الكولسينات هي البروتينات التي تقتل الخلايا الحساسة من بكتيريا القولون E coli

البلازميدات المحرضة للأورام

- الجراثيم الزراعية المورمة تدخل إلى النباتات عبر الأذيات السطحية ثم تحقن البلازميدات المحرضة للأورام في خلايا النبات .
- تستخدم هذه التقنية اليوم من قبل علماء الهندسة الوراثية لنقل بعض الجينات مثل الجينات المقاومة للعفونة وغيرها إلى خلايا النباتات ثنائية الفلقة فقط

تقسم حسب قدرتها على مساعدة الانتقال الذاتي اثناء الاقتران او عدم قدرتها على ذلك

- **بلازميدات الاقتران او النقل**

تتوسط في نقل ال DNA كما في تزاوج F مع F

- **البلازميدات غير المقترنه و غير المنتقله**

لا تنتقل مع انتقال الDNA من امثلتها بعض بلازميدات المقاومه.

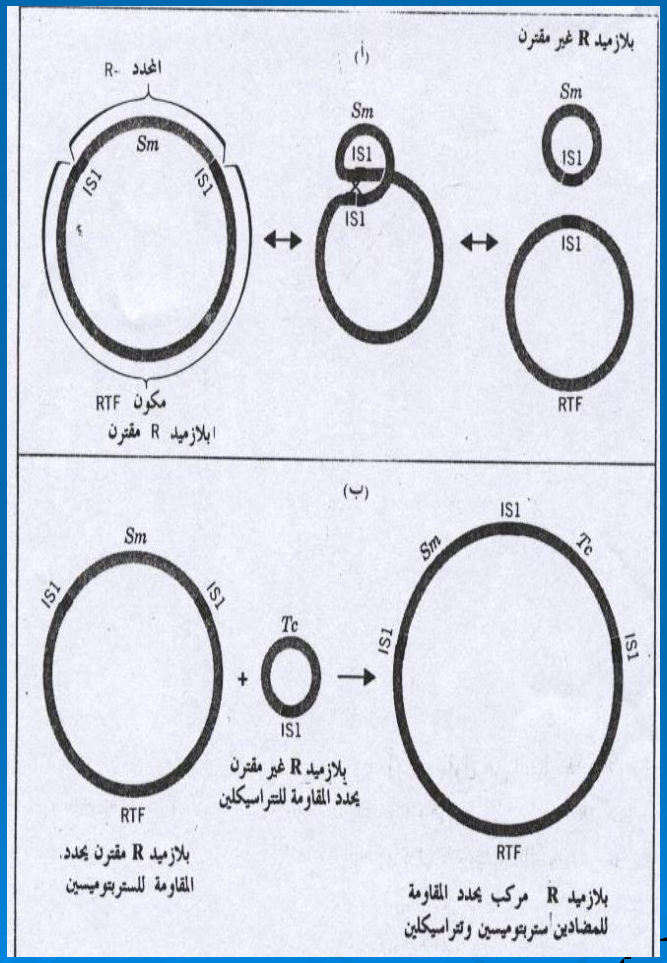
- تحتوي البلازميدات وكذلك كروموسوم العائل على عناصر IS(Insertion sequences) تتابعات الإدخال(الدمج) وهي عبارة عن تتابعات صغيرة من DNA يبلغ طولها حوالي (٨٠٠-١٤٠٠) زوج من النيوكليوتيدات وتتابعات الإدخال قادرة على الانتقال والتحرك من موقع ما على الكر وموسوم إلى مواقع أخرى سواء كان على نفس الكر وموسوم أو إلى كروموسومات أخرى في نفس الخلية
- تعتبر وسيلة لحدوث اتحادات وراثية بين عناصر وراثية غير متماثلة

- توجد Tn(Transposons) العناصر المنتقلة ا وهي عادة تحتوي على الحامله للمقاومة للعديد من أكثر من (٢٠٠٠) زوج من النيوكليوتيدات .
- تتابعات الإدخال والعناصر المتنقلة مسؤوله بوضوح عن انتقال الجينات المتحكمة في المقاومه للمضادات الحيوية والعقاقير الاخرى من مادة أو وحدة وراثية لوحدة أخرى.
- تتابعات ادخال العناصر المتنقلة تلعب الدور الرئيسي للتطور السريع في بلازميدات المقاومه .

جميع بلازميدات المقاومه المقترنه لها على الاقل مكونان

- عامل انتقال المقاومه RTF Resistance Transfer (Factor) وهو مقطع يحمل الجينات المتنقلة أي الجينات المتضمنة في انتقال ال DNA.
- محدد المقاومةDeterminant (Resistance) وهو المقطع الحامل لجين او جينات المقاومه للمضاد الحيوي اواحد العقاقير او كليهما (الشكل التالي)

R. plasmids تركيب بلازميد المقاومة



- وتظهر مكونات عامل انتقال المقاومه في العديد من بلازميدات المقاومه المقترنه كثير من التماثل على أساس تجارب التهجين بين خيوط ال DNA من جزيئات مختلفة .
- ويظهر المكون المحدد للمقاومة الكثير من الاختلاف في البلازميدات المختلفة ومحدد المقاومه يكون بجانب عوامل IS تتابعات الدمج المتماثلة
- يحمل العديد من بلازميدات المقاومه اثنين او أكثر من محددات المقاومه كل منها بجانب وحدات تتابعات الدمج .

يحتوي البلازميد المقترن على مكونين رئيسيين

- (1) مكونRTF يحتوي على جينات tra المسؤولة عن الانتقال المقترن للبلازميد .
- (2) المكون المحدد للمقاومة R-determinant والذي يحمل الجين أو الجينات المسؤولة عن المقاومة للمضاد الحيوي أو العقار

الفاج (العاثية) Phage

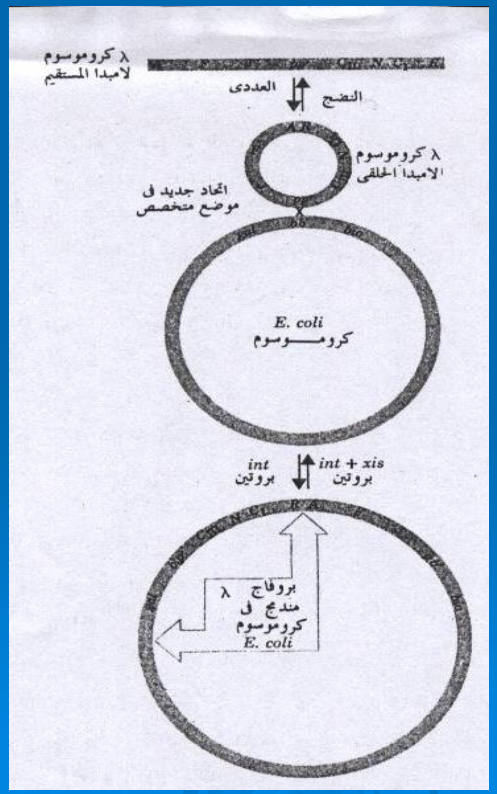
- هي الفيروس الذي يصيب البكتيريا وله القدرة على حقن المادة الوراثية التي يحملها في الجراثيم ويستفيد العلماء من هذه العملية الحيوية بزرع الجين الذي يريدون إدخاله إلى خلية ما باستخدام عاثية نوعية لتلك الخلية،وذلك بتعريض تلك الخلية للخمج بالعاثية الحاملة للجين وهكذا فإن العاثية تخدم كمحقنة تدخل الجين داخل الخلية

تقسيم عاتيات الجراثيم على أساس تفاعلها مع الخلية البكتيرية

- الفاجات الفعالة Virulent Phages تتضاعف وتحلل خلية العائل بعد العدوى .
- الفاجات المعتدلة Temperate Phages ولها الاختيار بين أسلوبين بعد العدوى فيمكنها إما الدخول في دورة تحلل وفيها يتكاثر الفاج ويحلل خلية العائل تماماً كما في الفاجات الفعالة وفي هذه الحالة يتكرر كروموسوم الفاج مستقلا عن تكرار كروموسوم العائل أو يمكنها الدخول في المسار المعتدل وفيها تدخل كروموسوماتها في كروموسومات العائل وتتكرر كأي مقطع منها

الميزة الر ئيسية للناقلات من نوع الفاج

- إدخال شظية DNA بطول يتراوح بين (١٠-٢٠) كليو قاعدة
- مثال على الفاجات المستعملة . فاج لمبدا المعدل الذي يعتبر من الفاجات المعتدلة



- الفيروس SV40(Simian Virus 40)فيروس حيواني يوجد في نسيج القرود يستطيع أن يحول الخلايا إلى الحالة السرطانية ولا يسبب مرض للإنسان وهذا الفيروس يستعمل كعامل ناقل للجينات عند الثدييات.
- **الفيروسات القهقرية Retro Virus**: تدمج الجينات في صبغيات العائل موفرة فرصة لثبات طويل الأمد وبعض سلبياتها تدمج الجينات عشوائياً مما قد يمزق جينات العائل ويتوقف تأثيرها على الخلايا الآخذة بالانقسام وكثير منها معدي

- **الفيروسات الغد ية Adeno Virus**: معظمها لا يسبب أمراض خطيرة . كما تتمتع بسعة كبيرة لاستيعاب الجينات الغريبة ومن سلبياتها أنها تفعل عمل الجينات بصورة انتقائية بسبب غياب التصدي للجهاز المناعي لها ومهاجمته .
- **الفيروسات المصاحبة للفيروسات الغدية** تدمج الجينات في صبغيات العائل. لا تسبب أمراضاً بشرية معروفة ومن سلبياتها سعتها ضئيلة لاستيعاب الجينات الغريبة
- –**فيروسات البابيلوما** والفيروس الذي يسبب الثأليل في الأبقار (BPV) يوجد في خلايا الثأليل لذلك يمكن استعماله كبلازميد.

الكوزميد Cosmid

- نوع من النواقل يمكنه أن يستقبل شظايا أطول من الDNA وهو يجمع بين أفضل مميزات البلازميد والفاج معاً .
- ا الكوزميد عبارة عن تهجين قطعة من الDNA تسمى اللاصقة (Cohesive Sequence)
- تنمو هذه الناقلات في صورة بلازميد في البكتيريا ويمكن للكوزميد أن يستوعب قطع DNA بطول من /٣٥/ إلى /٥٠/ كيلو قاعدة ٠

الناقلات الكروموزومية الصناعية

- الحاجة إلى نقل أحجام كبيرة من الDNA قام بعض العلماء بتحوير بعض الناقلات الطبيعية لكي تقوم بهذه المهمة ويوجد حاليا ناقلات على شكل صبغيات.
- ا لصبغيات الاصطناعية للخميرة :لتتسيل شظايا DNA وهذا الصبغي يستطيع نقل شظية من الDNA بطول أكثرمن 500 Kb.

الكروموزوم الصناعي للبكتريا
Bacterial Artificial Chromosome

- يستطيع حمل شظية من DNA بطول حتى300كيلو قاعدة والذي هو عبارة عن بلازميد عامل الخصوبة المعدل لبكتريا الإيكولاي
- الكروموزوم الصناعي P1 (P1Artificial) Chromosome PAC هو عبارة عن هجين بين الفاج المحور و البلازميد.

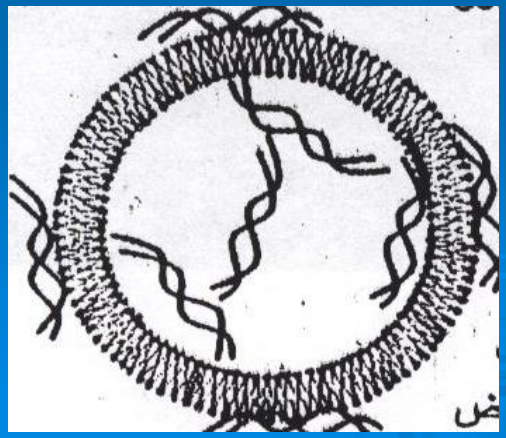
مقارنة بين الناقلات

الناقل	حجم DNA الذي يمكن إدخاله (Kb)
البلازميد القياسي	١٠-٠
بلازميد pBR322	١-٠.١
فاج لمبدا شارون A4	٢٠-١٠
كوسميد	٥٠-٣٥
بكتريوفاج p1	١٠٠-٧٠
الكروموزوم الصناعي P1 (PAC)	١٥٠-١٣٠
كروموسوم البكتريا الصناعيBAC	٣٠٠
كروموسوم الخميرة الصناعي YAC	Mb ٢ – ٠.٢

الكيلو قاعدة = ١٠٠٠ زوج من النيوكليوتيدات

Liposome's الليبوزومات

- كرات دقيقة جوفاء تتألف من غشاء شحمي خارجي ومحلول مائي داخلي.
- الجينات المدمجة في الليبوزومات تصل إلى النواة حيث تعمل ماكينة الخلية على هذه الجينات المدمجة وتدفعها إلى التعبير بإنتاج البروتينات وهي لا تسبب أي مرض
- سلبياتها أنها أقل كفاءة من الفيروسات في نقل الجينات إلى الخلايا .



معقد الليبوزوم

الليبوبلكسات وهي عبارة عن ليبوزوم استبدلت شحمياته المعيارية بشحميات موجبة والبنية المتشكلة من مزيج البلازميد مع الليبوبلكس أعقد من بنية الليبوزومات البسيطة

أثبتت هذه البنية جدارتها في إيلاج الجينات في الخلايا وهي أقل كفاءة من الفيروسات في نقل الجينات إلى الخلايا

دمج الخلايا : بتطبيق تيار كهربائي أو بإضافة مواد كيميائية أو فيروس سينداي

الحقن المباشر للجين بربط DNA الغريب مع شظية من الجين القافز ثم حقنه مباشرة إلى الهيولى وخاصة عند النباتات أو يمكن حقن الجين باستخدام مسدس الجينات

ناقلات التعبير: Expression vectors

- هي عبارة عن بلازميد أوفيروس يحوي علىcDNA المنسوخ (التكميلي) المتصل مباشرة بتتابع DNA
- يعمل كمشجع (Promotor) قوي لنسخ الDNA لإنتاج البروتينات بكميات غزيرة.
- تسمح باستخدام c DNA المنسوخ أو التكميلي في عملية الإنتاج الغزير للبروتينات إذ أنه في كثير من الأحيان لا تتوفر معلومات عن البروتين المشفر بواسطة شظية DNA وخاصة عندما يكون بكميات ضئيلة ،لذلك فإن أفضل الطرق المباشرة لإنتاج البروتين النوعي المشفر بواسطةc DNA هي أن يسمح لجزئ c DNA نفسه بأن يقوم بتوجيه عملية بناء البروتين في الخلية المضيفة باستخدام ناقلات التعبير.

- يوجد عدد من ناقلات التعبير والتي تم تكوين كل منها لكي تعمل في طراز الخلية التي سيتم فيها بناء البروتين وبهذه الوسيلة يمكن حث خلايا البكتيريا أو الخميرة أو الثدييات لإنتاج كميات هائلة من البروتينات المرغوبة مثل هرمون النمو البشري والانترفيرون والأمصال
- الخلايا البكتيرية المحتوية على هذه الناقلات ذات قدرات فائقة على إنتاج البروتين ،