تنسيل الجينات (تقنية إكثار الجين)

أ.د.عامر دباغ

الجين Gene:

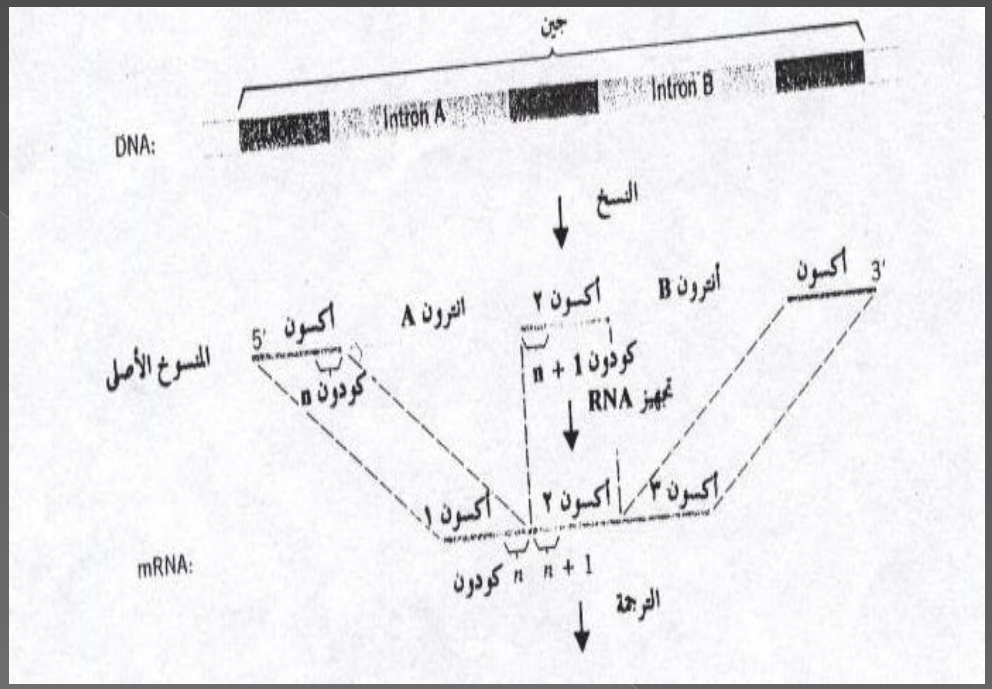
- هو الجزء الوظيفي للمادة الوراثية ،
- يعتبر قطعة من جزئ DNA (عند بعض الفيروسات قطعة من جزئ RNA)
- يتحكم بتخليق البنية الأولية للجزيء متعدد الببتيدات والجين الواحد يحتوي على ألف إلى عدة آلاف من أزواج النيوكليوتيدات
- يوجد هذا الجين في الكر وموسومات وكل كروموسوم يحوي حوالي مليون زوج من النيوكليوتيدات تقريباً
- يحمل الجين المعلومات الوراثية وينقلها من جيل لآخر عبر الأعراس التناسلية (أو تشفر إلى RNA واحد وذلك في الجينات التي لا تشفر إلى بروتين) ويتحكم في ظهور صفة ما

- الجين من الناحية الجزيئية هو الوحدة الوظيفية أو وحدة التوارث ، يشفر لسلسلة واحدة من عديد الببتيدات

- تتكون جينات غير مميزة النواة من تتابعات شفرية مستمرة يطلق عليها الاكسونات Exons

- تحتوي العديد من جينات الكائنات مميزة النوى على تتابعات شفرية تسمى الإكسوناتExons تفصل بينها تتابعات بينية غير شفرية تسمى أنترونات Introns .

- إن الأنترونات قد تمدنا بميزة انتخابية بزيادة الدرجة التي يمكن للتتابع الشفري في الأكسونات المختلفة لجين ما أن تتوزع مرة أخرى بالتركيب الجديد مما يعمل على إسراع العمليات التطورية



قص وإزالة الأنترون من النسخ الأولية أثناء تجهيز RNA. وتجرى هذه العملية بدقة حتى لا تخطئ نيكليوتيدة واحدة وبذلك تكون قراءة الكودونات الموجودة في الأكسوناتالمجاورة للأنترونات بالإطار المناسب لإثبات أن تتابعات الأنترونات تستبعد من المنسوخ الأصلي أثناء التجهيز

نسخ الDNA (المورث)عن طريق الهندسة الوراثية Gene cloning

- الحصول على عدد كبير من الجزيئات أو الخلايا المتطابقة التي تنشأ من أصل واحد ،
- إنتاج أعداد كبيرة من جزيئات DNA المتماثلة التي يمكن تعريفها أو استخدامها في أغراض شتى
- الحاجة إلى كمية كبيرة من ال DNA الذي يتحكم باصطناع بروتين ما.
- تنسيل المورث أوالDNA ضروري لتسهيل إجراء التجارب عليه

هناك طريقتان لتنسيل المورث.

- ١– التنسيل باستخدام الخلايا الحية
- ٢ – التنسيل باستخدام باستخدام طرق صناعية

التنسيل باستخدام الخلايا الحية

- يتم ذلك في مزارع الجراثيم أو الفطور أو خلايا الحيوان أو النبات
- تعتمد هذه التقنية على أن جزيئات DNA الهجينة يمكن تكوينها في الناقلات والتي تكون عادة إما بلازميد بكتيري أو فاج أو كوزميد الذي يستمر بعد ذلك في التناسخ في الخلية المضيفة Host Cell ولكن تحت تأثير نظم التحكم الخاصة بهم،
- يمكن الحصول على أعداد هائلة من نسخ الجين

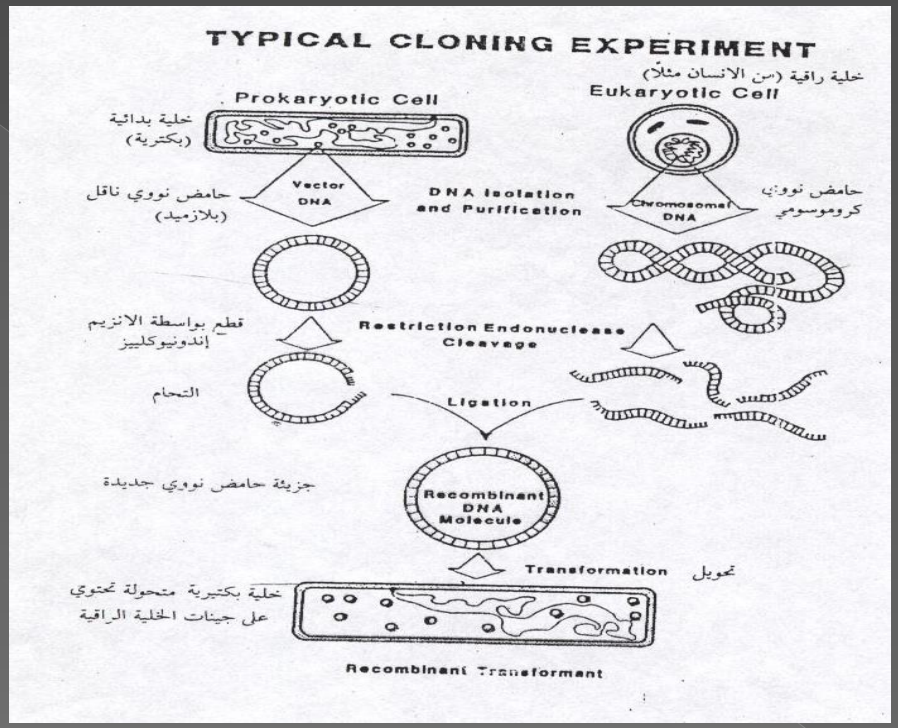
عمليات تنسيل الجين تتم حسب مراحل معينة ومتتالية

١. عزل الـ DNA من الكائن المراد نقل مادته الوراثية ثم تنقيته•

٢. قطع جزيئات الـ DNAباستخدام إنزيم القطع المناسب إلى شظايا تحتوي كل منها على جين وراثي معين أو يمكن تركيب ذلك المورث اصطناعياً خارج الجسم•

٣. ربط ذلك المورث(DNA الغريب) بعامل ناقل (بلازميد أوفاج وغيرها)بمساعدة إنزيمات الربط ويطلق عليه DNA المعاد صياغته ويتم حمله إلى الكائن المستقبل(مثل بكتريا الإكولاي أو نوع من الخميرةالذي لا يحوي هذا المورث حيث يحدث -تكرار للDNA Recombinant في الجسم المضيف وقيامه بوظائفه وذلك بتخليق mRNA) للجين المنقول والذي يترجم بدوره لإنتاج البروتين الخاص بهذا الجين

- ٤-انتقاء واختيار المستعمرات البكتيرية التي تحتوي على الناقل مع القطع المهجنة والسماح لها بالتكاثر في إطباق الزراعه (وسط أو سائل مغذي)
- ٥-استخلاص الDNA المهجن(المورث الغريب) بكميات كبيره من القطع المهجنة ويستخدم حسب الهدف من عملية التنسيل.



تجربة نموذجية لزراعة الجينات

هذه المراحل تتم على الشكل التالي:

عزل المورثات

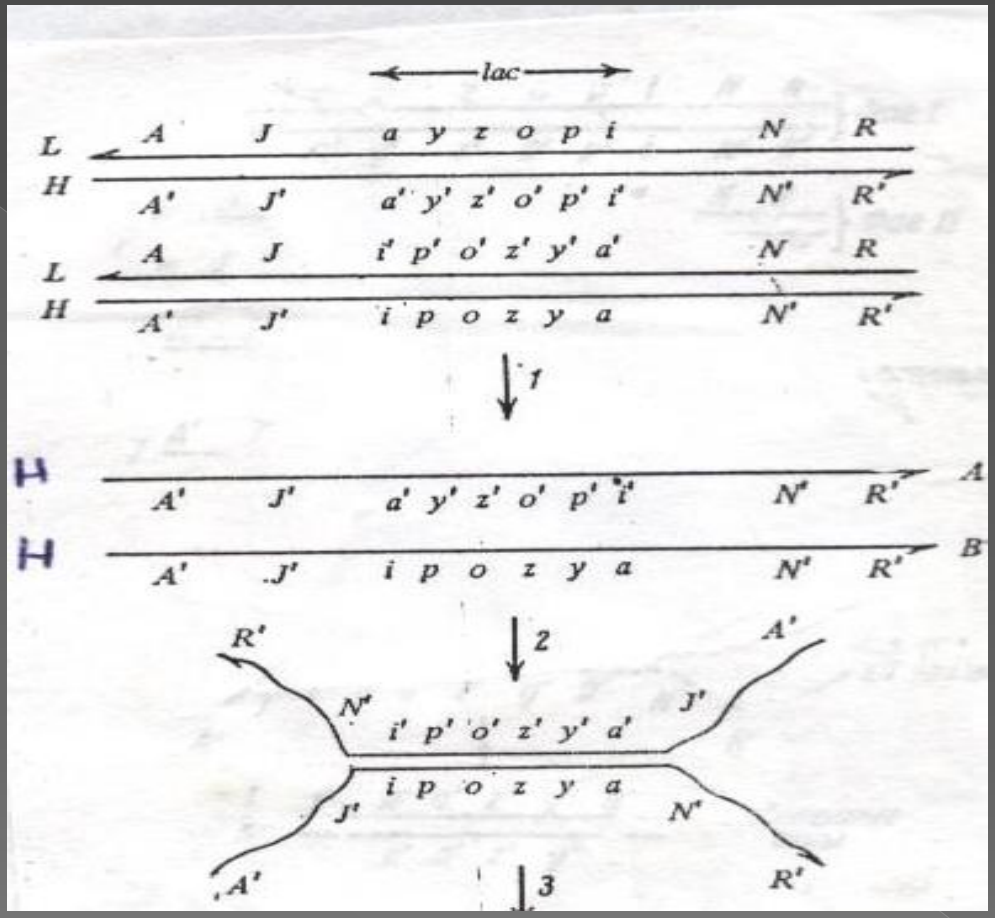
- المورثات المراد نقلها يتم الحصول عليها من المجين باستخدام الإنزيمات أو أن يتم تركيبها صناعياً بالطريقة إلا أن بعضها لا يحوي العناصر الضرورية للقيام بوظائفها وهذا ما يحد من استعما ل المورثات المركبة صناعياً في أعمال الهندسة الوراثية.
-

- عملية نقل المورثات تتم غالباً على المورثات الطبيعية المعزولة من المجين باستعمال أنزيمات القطع وفي حالات نادرة جداً باستخدام العاثيات.

- في الوقت الحاضر الطريقة الأكثر انتشاراً ، تسمى طريقة الطلق الناري (Shot gun) ، الـ DNA يقطع ميكانيكياً أو بأنزيمات القطع إلى شظايا صغيرة وكثيرة العدد وبعد ذلك يتم تهجينها مع جزيئات DNA للعامل الناقل.

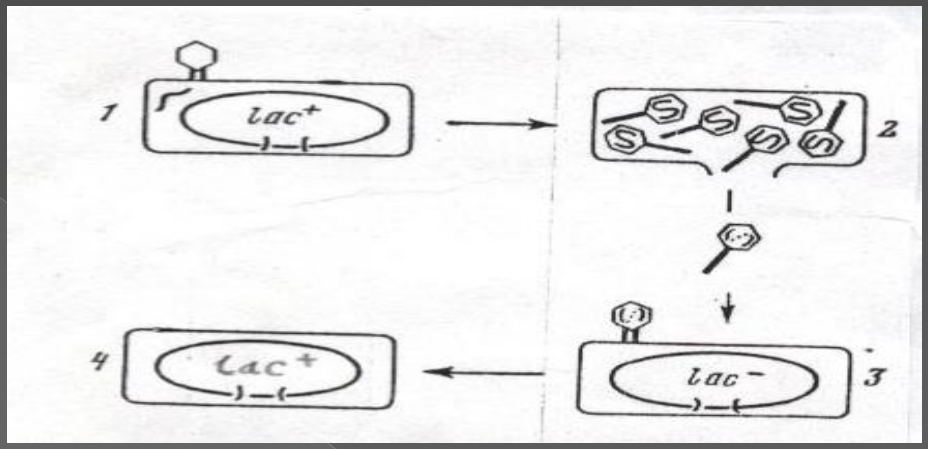
عزل المورثات باستعمال الفاجات (العاثيات) الناقلة

- استعمال نوعين مختلفين من الفاجات المعدلة الناقلة لمبدا و φ ٨٠. فعند تكاثر هذين النوعين في العصية المعوية فإن الفاجات تدمج في مجينها أو بيرون اللاكتوز للبكتيريا مع المورث المنظم الملتصق به ، في اتجاه مقلوب كما هو موضح في الشكل (١٠-٣و١٠-٤)يتركب أوبيرون اللاكتوز من مورث منظمi ومشجع p(بروموتور) ومشغل o(أوبيراتور) ومجموعة مورثات تركيبية a,y.z



مخطط عزل مورث أوبيرون اللاكتوز للعصية المعوية

L- الخيط الخفيف للـ DNA .H- الخيط الثقيل للـ DNAأماA,J,N,Rتمثل مورثات الفاجين إذ أن أحد الفاجات يربط هذه القطعة بالترتيب i ، p ، o ، z , y, a



الشكل يوضح انتقال اوبيرون اللاكتوز باستخدام الفاج

- الفاج الثاني يربط هذه القطعة بترتيب معاكس a , y , z , o . p , i ، وللتحرر من مورثات الفاجات ذاتها فإن الـ DNA لكل فاج يتم تفكيكها وبالتثفيل يتم فصل الخيط الثقيل للـ DNA (الغني بأزواج G – C) عن الخيط الخفيف (الغني بأزاوج A – T)
- يتم خلط الخيوط الثقيلة لكلا الفاجين ،
- المورثات المكملة لبعضها البعض في كروموسوم البكتيريا تشكل قطعة ثنائية الخيط ، أما القطع التي تقع على اليسار واليمين لـ DNA الفاج لم تقترن وبقيت أحادية الخيط وبعد ذلك باستخدام انزيم الـ DNA as الديناز يتم تحليل القطع أحادية الخيط وتبقى فقط القطع ثنائية الخيط التي تحتوي أوبيرون اللاكتوز للبكتيريا ومورثه المنظم
- إمكانية عزل مورثات محددة بشكل نقي فهذه الطريقة مناسبة فقط في حادثة معينة لهذا في الهندسة الوراثية تستعمل طرق أكثر شيوعاً وهذه الطرق هدفها عزل شظية DNA مع المورثات المراد نقلها وإدخالها في الناقل المناسب والذي بواسطتة هذه القطعة يمكن أن تتكاثر بعدة نسخ وتدمج في خلية المستقبل

تصميم القطع المهجنه منDNA:أو إدخال قطعة الDNAفي الناقل:

- يعتمد النسخ باستخدام الخلايا الحيه على قدرة القطعه المراد نسخها على الانقسام او التكاثر الذاتي عندما توضع داخل الخليه الحيه ولاشك ان قطع DNA العاديه ليس لديها القدره على التكاثر الذاتي
- ادخا ل القطعه المراد نسخها في ناقل من النواقل(VECTORS)المعروفه بقدرتهاعلى التكاثر الذاتي
- طريقة إدخال قطعه من الDNA (المراد نسخها) الى الناقل تقريباً واحده

وهذه الخطوات تتم كما يلي :

- —بعد أن يتم تحديد القطعة المراد نسخها يضاف إليها أحد الإنزيمات القاطعة المحددة فيقوم هذا الأنزيم بقطع إلDNA في مكان محد دحسب التسلسل النووي
- ٢-يضاف نفس الأنزيم للناقل والذي يقوم بقطعه أيضا في نفس التسلسل النووي

- -تضاف القطع المراد نسخها بعد قطعها بالأنزيم القاطع إلى الناقل المقطع فتتداخل التسلسلات النوويه بين الناقل وبين قطع الDNA المراد نسخهاحسب قاعدة تكامل القواعد فتنشا من ذلك قطعه مهجنه من الناقل وبداخله القطعه المراد نسخها وترتبط قطعة الDNA من أطرافها مع البلازميد من أطرافه برابطه هدروجينيه وهي رابطه ضعيفه لذلك يضاف أنزيم رابط (Ligase) لكي يحول الترابط بين قطعة DNA والناقل إلى رابطه قويه، إن أكثر الناقلات استخدام هو البلازميد ولكن يمكن استخدام ناقلات أخرى والذي يحدد نوع الناقل المراد استخدامه هو في العاده طول القطعه المراد استنساخها
- في حالة القطعه الصغيره يستخدم البلا زميد
- بينما في حالة القطع الكبيرة تستخدم الكروموزومات الصناعية

نقل الناقل وبداخله القطعة المهجنه إلى خلية حية :

- البلازميد المحتوي على قطعة DNA المضافة يطلق عليه DNA المعاد صياغته Recombinant DNA
- يتم إدخاله إلى الخليةالبكتيريةبطريقة التحول أوالعدوى
- الناقلات الأخرى تحتاج إلى مساعدة مثل تغير تركيز الشوارد الموجبة المحيطة بالبكتيريا أو تعرض البكتيريا إلى صدمة حرارية Heat Shock أوالتيار كهربائي بقوة عالية لكي يسمح الجدار المحيط بالبكتيريا بدخول الناقلات

التنسيل الوراثي gene cloning

- تأمين وسط زرع مناسب مع مغذيات ملائمة تنمو الخلايا المعدلة وراثياً وتتكاثر ، حيث تحدث دورات انقسام للخلية البكتيرية ومعها دورات متعددة لانقسام البلازميد مستقلة عن انقسام الخلية .وبالتالي ينتج لدينا أعداد كثيرة من المستعمرات وبها البلازميد المهجن الذي يحوي المورث الغريب

- يمكن لميكانيكية التناسخ للبلازميد أو الفاج إنتاج (١٢١٠) جزيء من DNA المعاد صياغته مماثل للجزيء الذي بدأنا به في فترة أقل من يوم واحد مما يزيد عدد وحدات الجين البشري المهجن مع البلازميد بنفس المعدل وبالتالي ستقوم هذه البكتريا بصنع كميات كبيرة من جزيئات البروتين المرغوب ،

عملية نقل المورثات أن تتعرقل **بأحد العوامل**

- تتعرف الخلية على الجين الغريب في البلازميد الناقل ، وعندها ستبادر لاستخدام أسلحتها الفتاكة الممثلة بأ نزيمات القطع التي تقطعه إلى قطع صغيرة غير فعالة وظيفياً لذلك يجب استخدام البلازميدات من الخلايا نفسها .
- قد لا تكون الخلية الجرثومية المعدلة وراثياً مؤهلة لفهم وتنفيذ المعلومات الوراثية المدخلة إليها على البلازميد ،، وبالتالي ستكون النواتج قليلة الكمية وغير فعالة حيوياً .

اختيارالمستعمرات البكتيريةالتي تحتوي على الناقل مع القطعة المهجنة

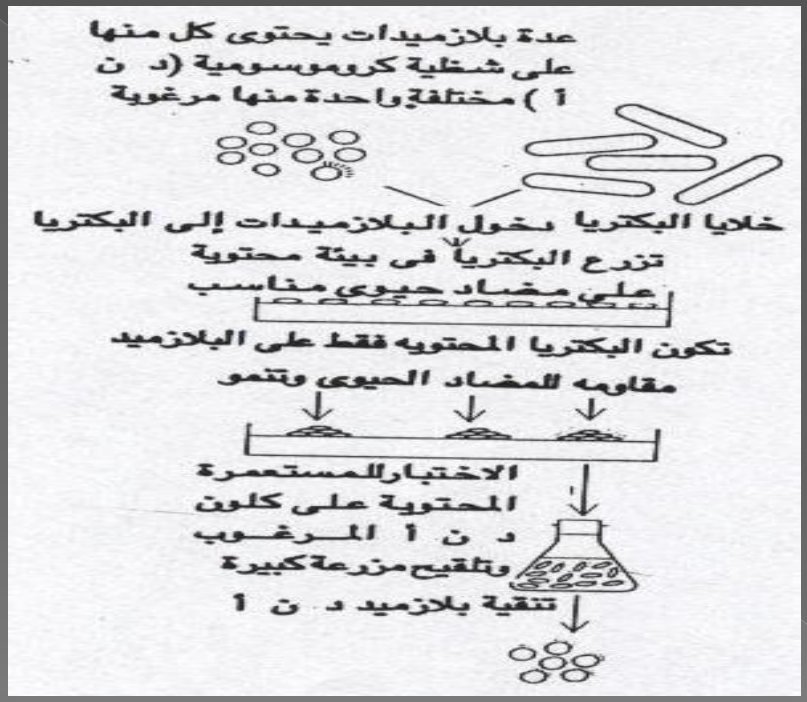
- لابد من التمييز بين البكتريا الحاوية وغير الحاوية على البلازميد المهجن
- التعرف على المجموعات النادرة من الكلونات التي تحتوي على شظية DNA المرغوبة
- ضرورة التعرف على المجموعات النادرة من الكلونات التي تحتوي على شظية DNA المرغوبة

طرق التعرف على شظايا DNAأو البكتيريا التي تحوي المورث المطلوب

- **زراعة البكتريا على وسط يحوي مضاد حيوي:**
- بعض الخلايا لن يدخلها البلاسميد الناقل المهجن ولابد من التعرف عليها والتخلص منها ،
- الاستعانة با لمورثات التي تتحكم بصفة المقاومة للصادات (المضادات الحيوية) التي يمكن إضافتها منذ البدء إلى البلاسميدات الناقلة

- تعريض جملة الخلايا للصادات ، فالخلايا التي لم تدخلها البلاسميدات ستموت بفعل الصادات ، بينما تبقى الخلايا التي دخلها البلاسميد الناقل لصفة المقاومة للصادات والحامل للمورث المرغوب
- المضاد الحيوي يمنع تكاثر الخلايا التي لاتحتوي علىالبلازميد المهجن والذي يحمل الجين الواقي من المضاد الحيوي

تنقية وإكثار تتابع نوعي منDNA بعملية التنسيل



(الكلونة Cloning) في البكتريا:

- البلازميدات الهجينة التي حصل عليها تندمج في العصية المعوية ثم تختار الخلايا البكتيرية ، التي تحوي الجزيئات المعاد صياغتها مع المورث الضروري .
- هذا المورث يحدد مقاومة البكتيريا لمضاد حيوي ما فإن البكتيريا مع الجزيئات المدمجة فيها تزرع على وسط مع هذا المضاد الحيوي – وبالتالي ستعيش فقط البكتيريا التي تحوي هذا المورث أما الأخرى تموت

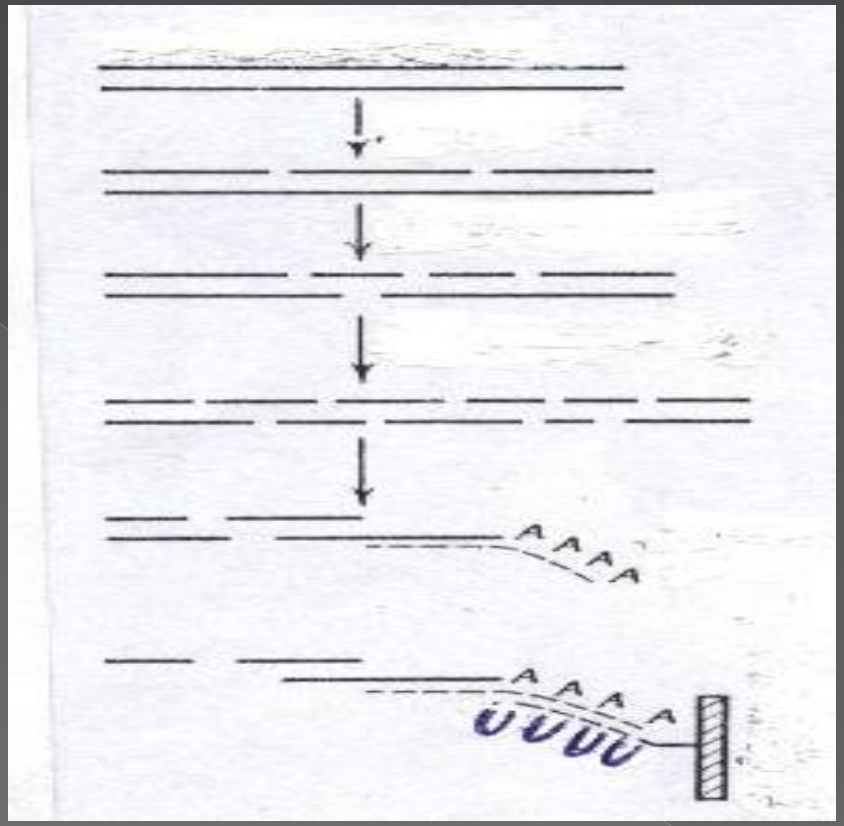
ادخال الجزيئات الناقلة التي تحوي المورث المطلوب في البكتريا الطافرة:

- إذا كان المورث يتحكم بتخليق مادة ضرورية لحياة البكتيريا على سبيل المثال عندما يراد عزل واستنساخ شظية DNA مع المورث الذي يساعد الخلية على تركيب أي من الأحماض الأمينية أو الانزيمات أو الأسس الآزوتية أو الفيتامينات. ففي هذه الحالة يتم إدخال الجزيئات الناقلة المعا د صياغتها التي تحوي المورث الذي يتحكم بتخليق تلك المادة

طريقة تهجين DNA مع m RNA

- تقطيع DNA بأنزيمات القطع أو ميكانيكياً
- تعامل الشظايا الناتجة بمحلول mRNA للمورث المراد عزله فجزيئات mRNA ترتبط (نتيجة التكامل) فقط مع شظايا DNA التي تحوي المورث المطلوب
- يوجد متعدد الادنين A عند نهاية جزيئات mRNA والذي يرتبط مع متعدد اليوراسيل (U) بعد ذلك يمرر المحلول من خلال عمود مملوء بمادة حبيبية (مثل السيفاروز) تحوي جزيئات متعدد اليوراسيل (U)

- شظايا DNA فقط الحاوية على المورث المطلوب تحتجز في العمود .أما شظايا DNA الباقية (التي لا تحوي المورث المطلوب) التي لم تتكامل مع جزيء mRNA تغسل وتخرج بشكل حر من العمود الذي يسمح بمرورها مع السائل وتبقى فقط شظايا DNA المتكاملة مع mRNA
- يتم استخلاص شظايا DNA التي تحوي المورث المطلوب وتحريرها من جزيء mRNA كما هو موضح



يمثل شظايا DNA الحاوية على المورث الضروري

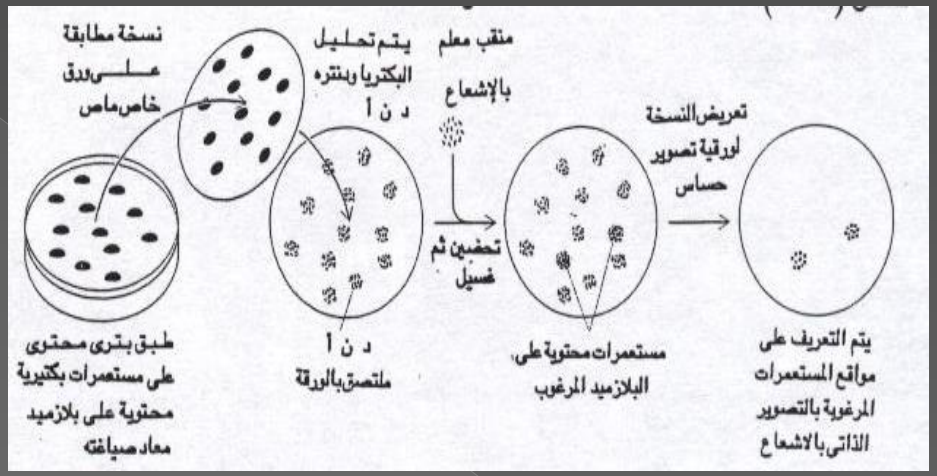
التهجين مع منقب معلم بالإشعاع Radioactive Probe:

- عبارة عن نوع من التهجين في الموضع In situ hybridization الذي يعتمد على خاصية تزاوج القواعد المكملة في جزيئات الأحماض النووية
- يستخدم في هذه التقنية منقب معلم بالإشعاع

وللتعرف على الكلون المحتوى على الجين المرغوب

- نقل أطباق المزرعة المحتوية على المستعمرات البكتيرية النامية على قطعة من ورق الترشيح
- يتم معاملة المستعمرات الملتصقة والتي تعرف بالنسخ المطابقة Replicas بالقلوي لتفكيك الخلايا وفصل سلسلتي ال DNA للبلازميد تمهيدا لتهجينها مع المنقب

- يتم تحضينها مع منقب مشع من DNA يحتوي على جزء من تتابع الجين المستهدف كما في الشكل
- يتم تحديد المستعمرات التي استجابت للتهجين بالتصوير بالاشعاع الذاتي.



طريقة نقل النسخة المطابقة Replica Plating

- لمعرفة وعزل المستعمرة البكتيرية التي تحتوي على كلون DNA تعمل نسخة مطابقة بضغط ورقة ترشيح ماصة على سطح البيئة ثم تعامل النسخة المطابقة بالقلوي (لتفكيك وتحليل الخلايا وفتحها ودنترة DNA البلازميد) ثم التهجين مع منقب من DNA عالي الإشعاع ويتم تحديد المستعمرات التي استجابت للتهجين بالتصوير بالإشعاع الذاتي

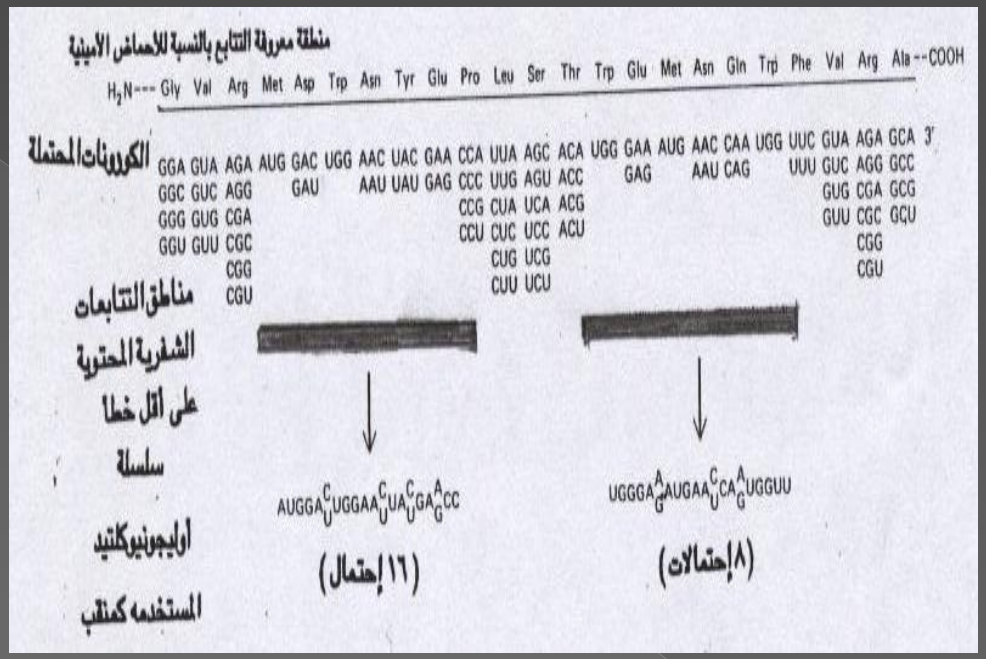
المنقب:

- عبارة عن شظية من DNA أوRNA معلمة بالفوسفور المشع (P32) يمكن استخدامها لاستكشاف المكتبات الوراثية بحثاً عن جين نوعي أوجزيء cDNA المنسوخ أو للتعريف الكمي لتتابعات من DNA أو RNA التي يتم فصلها
- يمكن استخدام c DNA الذي تم بناؤه على قالب نوعي من m RNA لمسح مكتبة c DNA المنسوخ بحثاً عن قطع أكبر منc DNA أو لمسح مكتبة جينوم لاستكشاف والتعرف على تتابع مكمل في المنطقة المشفرة للجين

طريقة تحضير المنقبات:

- تمييز البروتين المستهدف بالطرق البيوكيماوية و تنقيته بكميات صغيرة وحتى لو تم الحصول على ميكرو جرامات قليلة من البروتين النقي فإنها ستكفي لتحديد تتابع الثلاثين حامض أميني في سلسلة متعدد الببتيد وبمعرفة هذا التتابع يمكن معرفة التتابع الموازي للقواعد النتروجينية باستخدام معلومات الشفرة الوراثية

- بناء مجموعتين من سلاسل DNA القصيرة الطول (الأوليجو) والتي يتكون كل منها من حوالي (٢٠) نيوكليوتيدة . ويتم البناء بالطرق الكيماوية ويتم تعليمها بالإشعاع (P32) وتختار مجموعتي DNA المنقب لتتزاوج مع أجزاء مختلفة من التتابعات الجينية المتنبأ به



اختيار مناطق معروف فيها
تتابع الأحماض الأمينية

- نختار التتابعات المحتوية على أقل احتمالات خطأ ، وبعد إنتاج السلاسل القصيرة يتم تعليمها بالإشعاع لاستخدامها كمنقب فيما بعد والمستعمرات التي يمكنها تكوين هجين من لا المجموعتين مع منقبات DNA تكون لديها فرصة أكبر لأن تحتوي على الجين المرغوب ويتم الاحتفاظ بها لتعريفها واستخدامها

تعليم DNA المنقبات مخبرياً بالإشعاع:

- **الطريقة الأولى :**وفيها يستخدم أنزيم DNA بوليميراز ١ (DNA polyl) المستخلص من بكتيريا القولون لإدخال عدد كبير من النيوكليوتيدات المعلمة بالإشعاع (P32) في كل جزئ DNA مما يؤدي إلى الحصول على منقب مشع جداً من DNA الذي يستخدم في تقنية تهجين الأحماض النووية.

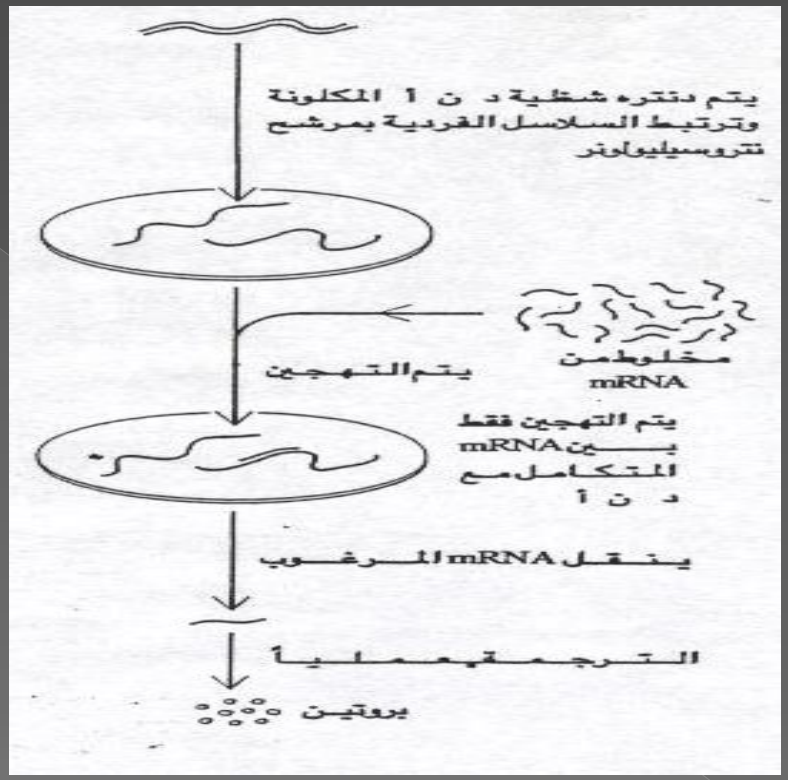
- **الطريقة الثانية :** تعتمد على استخدام انزيم بولي نيوكليوتيد كيناز Polynucleotide Kinase لنقل مجموعة فوسفات واحدة مشعة (P32) من جزئ ATP إلى النهاية 5َ في كل سلسلة
- جزيئات DNA الناتجة من هذه الحالة لا تصلح عادة للاستخدام كمنقبات نظراً لعدم احتوائها على قدر كاف من الإشعاع . تكون مفيدة جداً في تحديد تتابعات قواعد DNA

استخدام طريقتين انزيميتين لتشعيع جزيئات DNA

- (أ) يقوم أنزيم بلمرة DNA I بتعليم جميع النيوكلتيدات في جزئ DNA وبذلك تنتج منقبات من DNAعالية الإشعاع
- (ب) يقوم أنزيم بولي نيوكليوتيد كينيز بتعليم النهايات 5َ فقط من سلاسل DNA، فعندما يكون التعليم متبوعاً بالقطع المحدد بأنزيمات القطع فإنه يمكن الحصول بسهولة على جزيئات DNA محتوية على النهاية 5َ معلمة.

استخدام الترجمة المخبرية:
In Vitro Translation

- أدق من الطريقة السابقة لتسهيل التعرف على DNA
- كل شظية مكلونة من DNA مرشحة للاستخدام في تنقية جزيئات m RNA المكملة لها من مخلوط من m RNA الخلوي بعملية تسمى انتخاب الهجين
- فصل كمية وفيرة من شظايا DNA إلى سلاسل مفردة وتثبت على مرشح النيتروسيليولوز الذي يستخدم لاختبار جزيئات m RNA المكملة بتهجين RNA – DNA كما في الشكل



تقنية انتخاب الهجين

- يتم نقل جزيئات m RNA النقية من على ورقة الترشيح بتعريضهالظروف تؤدي إلى انفصال سلسلتي الهجين في الحلزون(RNA/ DNA)
- يستخدم m RNA الذي تمت تنقيته لتوجيه بناء البروتين في أنبوب الاختبار خارج الخلية باستخدام أحماض أمينية مشعة .
- يتم التعرف على البروتين الناتج المعلم بالإشعاع ويقارن بالبروتين المتوقع إنتاجه بواسطة هذا DNA

- اختبار المطابقة في هذا الاختبار أساس لاستنتاج أن شظية ما من DNA تشفر لبروتين معين يتم استخلاص القطع المهجنه واستخراج الDNA منها بكميات كبيره بعد أن يتم التعرف على المستعمرات البكتيرية التي تحتوي على البلازميد المهجن و تنقل الى طبق مغذي جديد لكي تستمر بالتكاثر وبالتالي هذه البكتريا سوف تحتوي على البلازميد المهجن وبذلك تنتهي عملية النسخ وبعد ذلك يمكن استخلاص قطع DNAالتي تحوي المورث الغريب

- يستفاد من هذه القطع المنسوخه بالقيام بالعديد من البحوث او اجراء التجارب عليها
- يمكن استخدامها في انتاج مكتبة ال DNAأو محاولة استنساخ أومعرفة التسلسل النووي للقطعه
- يمكن تحويل هذه العمليه بحيث يحتوي البلازميد على قطعه منcDNA المنسوخ المرتبطةمع المشجع لإنتاج البروتين بدلا من DNAفي المراحل الأخيره من الزراعه وهذه الطريقه تستعمل في انتاج بعض الهرمونات كهرمون النمو

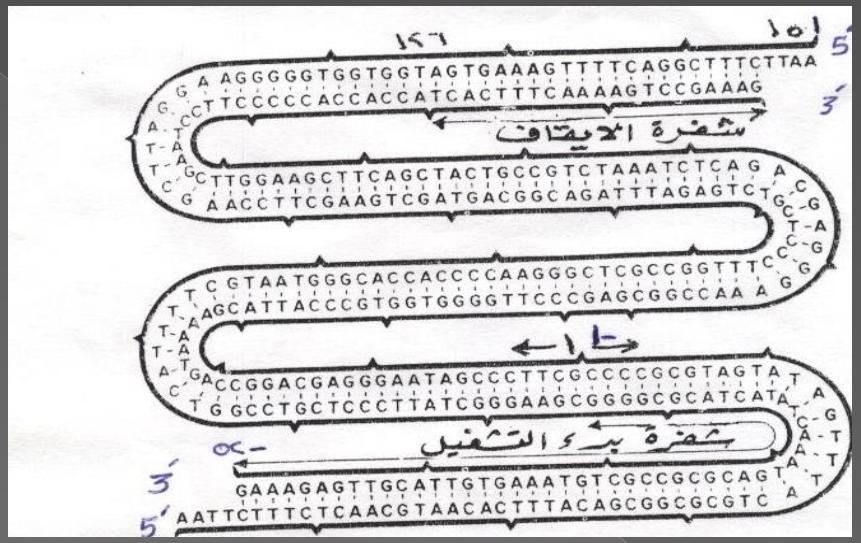
التنسيل باستحدام طرق صناعية

- الطريقة الكيميائية .
- الطريقة الانزيمية .
- التنسيل السريع للمورث (سلسلة تفاعل إنزيم البلمرة)

تركيب المورث بالطريقة الكيميائية

- المبدأ : معرفة تسلسل النيوكليوتيدات التي يتركب منها المورث
- باستخدام هذه الطريقة تم تركيب مورث TRNA الناقل للألنين عند الخميرة
- يتألف من (٧٧) زوج من النيوكليوتيدات

- تركيب شظية من DNA للعصية المعوية تحوي مورث TRNA الناقل للتيروزين بطول /١٢٦/ زوج من النيوكليوتيدات وربط به شيفرة بدء التشغيل (بروموتور) والمؤلف من /٥٢/ زوج من النيوكليوتيدات وكودونات الإيقاف



بنية شظية الـ DNA(مورث TRNA) للتيروزين المركبة كيميائياً والفعالة وظيفياً للعصية المعوية
الأرقام – ترقيم للنيوكليوتيدات ، شيفرة بدء التشغيل (المشجع) من ٥٢ حتى-١ ، مورث TRNA للتيروزين المثبط من ١-١٢٦ ، وشيفرة الإيقاف من ١٢٧-١٤٧، وعلى نهايات الشظية نيوكليوتيدات رباعيةTTAA , AATT.

تركيب المورث بالطريقة الإنزيمية Enzymatic method

- المبدأ هو بناء cDNAالمنسوخ (التكميلي)على قالب من mRNAباستخدام إنزيم النسخ العكسي.
- يجري في الأنبوب استنساخ خيط الـ DNA علىقالب من جزيئات m RNA

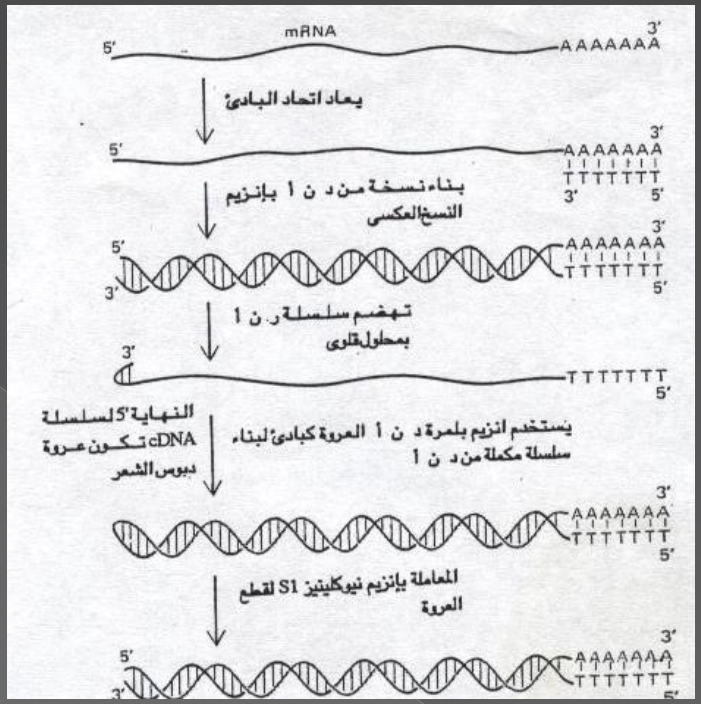
ولتركيب المورث بهذه الطريقة لابد من توفر المواد التالية:

- جزيء m RNA المشفر من قبل المورث الطبيعي المراد استنساخه.
- محلول لكل النيوكليوتيدات منقوصة الأوكسجين ثلاثية الفوسفات
- أنزيم الانتساخ العكسي المعزول من أي فيروس مولد للورم.
- شوارد الماغنيزيوم Mg++ (أحياناً المنغنيز)
- يضاف لتسريع التفاعل جزيئات ليست كبيرة تتألف من (٨-١٠) مكررات الثايمين
- أنزيم تكثيف DNA 1- (DNA بوليميراز-١) .
- أنزيم نيوكلينر S1 .

وتتم عملية البناء على الشكل التالي:

- تستخرج جزيئات m RNA لمورث الغلوبين ، على النهاية ´3لهذه الجزيئات ، تتحد تكرارات الأدنين ، التي تقود إلى ظهورمكررات التايمين
االمحرضةعلىالإستنساخ على شكل تتابع أزواج (A-T) ،بعد ذلك يبدأ الانتساخ العكسي باستعمال النيوكليوتيدات منقوصة الأوكسجين ثلاثية الفوسفات .وبإضافةأنزيم الانتساخ العكسي الذي عزل من فيروس ميوبلاستوز الطيري ،

- عند انتهاء عملية انتساخ خيط DNA على قالب m RNA فإن مركب RNA-DNA يعامل بالقلوي أوبالريبونيوكلياز لكي يتم تحرير DNA عن m RNA



تركيب مورث الغلوبين

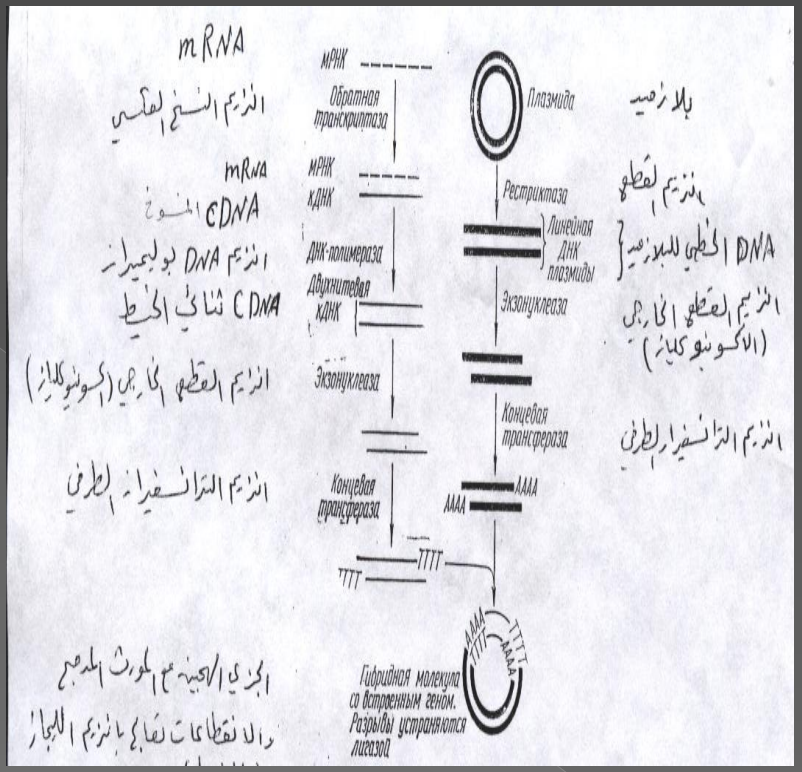
بالطريقة الإنزيمية بناء DNA المنسوخ cDNA

- تكوين نسخة من cDNA على قالب من RNA باستخدام انزيم النسخ العكسي بحيث يتكون هجين RNA / DNA
- يعامل الهجين بمحلول قلوي للتخلص من سلسلة RNA ثم يتم بناء نسخة DNA المكملة لسلسلة DNA باستخدام إنزيم بلمرة DNA

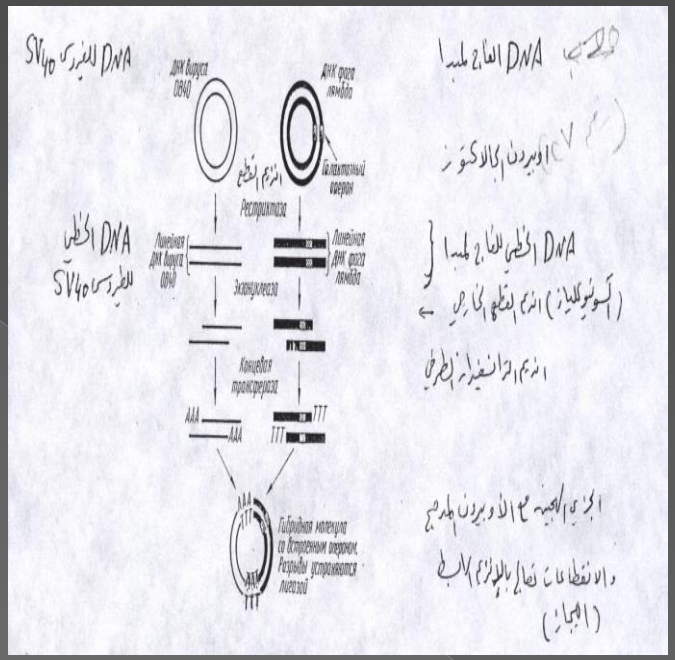
- سوف نحصل على سلسلة أحاديةمن DNA لمورث ا لغلوبين التركيبي ، وبعد التركيب التكاملي نتيجة استخدام انزيم بلمرة DNA تتشكل السلسلة الثانية لل DNAوبذلك يتشكل جزيء DNA ثنائي السلسلةالمطابق للمورث الطبيعي للغلوبين المأخوذ من كروموسوم الأرنب والذي يسمى cDNA
- المورثات المركبة بهذه الطريقة تشبه إلى حد كبير المورثات الطبيعية التركيبية المطابقة لـ m RNA الذي استخدم كقالب لبناءcDNA

- المورثات المركبة بهذه الطريقة لا تحوي في تركيبها الأجزاء المنظمة (بروموتور أوما يسمى المشجع الخ) ولا تحوي أسس معدلة ولذلك فهي غير نشطة وظيفياً لذلك لا بد من الحصول أولاً على نسخة DNA ليس من m RNA ولكن من طليعة mRNA (npo – mRNA)

- تم التوصل إلى نجاحات أولية في هذا الاتجاه إذ تم تركيب نسخ صناعية لبعض المجينات الفيروسية
- تم في مخابر الدول المختلفة تركيب مجموعة من المورثات بهذه الطريقة بأقل جهد وأكثر سرعة مقارنة مع الطريقة الكيميائية
- المورثات المحضرة بهذه الطريقة على سبيل المثال - المورثات التي تشفر لغلوبين كل من الإنسان ، الأرنب ، الفأر ، البط ، الحمام – الغلوبين المناعي للفأر – مورث بروتين عدسة العين للثور – الخ ....



التركيب الانزيمي للمورث وإدماجه في البلازميد الناقل



الشكل :يمثل إدماج اوبيرون الجالاكتوز للعصية المعوية في DNA SV 40الفيروس المستعمل كناقل (من اليسار – تحول DNA الحلقي لفيروس SV 40 إلى الحالة الخطية وربط بنهايات الخيط تتابعات من متعدد الأدنين)

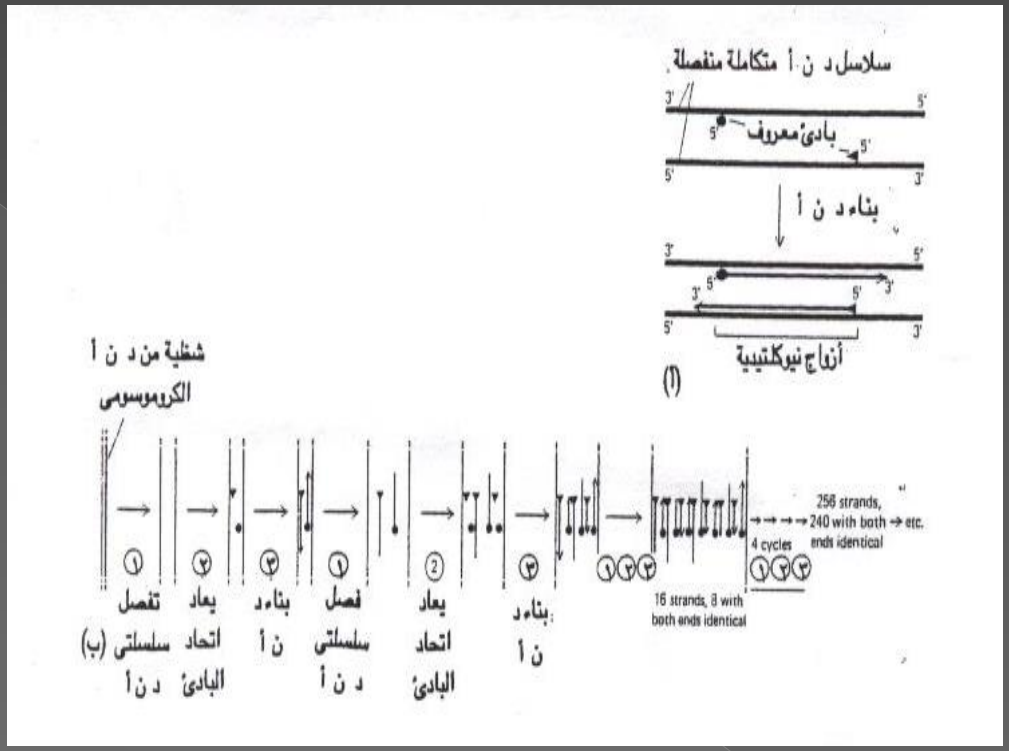
(من اليمين – نفس المعالجة لـ DNA للفاج لمبدا الناقل ، الذي يحمل اوبيرون الجالاكتوز للعصية المعوية ، تربط بنهايات الخيط متعدد الثايمين . وباتحاد كلا الجزيئين ، يتم الحصول على جزيء هجين يحوي DNA للفيروس SV 40 مع أوبيرون الجالاكتوز المدمج فيه)

Polymerase Chain Reaction) :(PCR

- إن الحصول على أنزيمات بلمرة DNA النقية و بناء DNA بالطريقة الكيماوية قد ساعد على استنساخ تتابعات نوعية من DNA بسرعة بدون الحاجة إلى خلية حية
- هذه التقنية تسمح لأي جزء من DNA مرغوب من الجينوم بالتزايد العددي Amplification إلى حوالي مليون ضعف على شرط أن يكون جزء على الأقل من التتابع النيوكليوتيدي معروف بالفعل

- تستخدم بعض التتابعات المحيطة بالمنطقة المراد إكثارها لتصميم سلسلتي بادئ من أوليجونيوكلتيدات تركيبية بحيث يكون كل واحدة منها مكملة للقواعد النيوكليوتيدية الطرفية لكل من سلسلتي DNA في الحلزون المزدوج.
- يستخدم جهاز خاص لإنتاج سلاسل نيوكليتدية قصيرة (اوليجونيوكلتيدية) بتتابع نوعي محدد يتكون من حوالي (٨٠) نيوكليوتيدة .

- تستخدم ا لسلاسل القصيرة كبادئات لبناء DNA في المخبربمساعدة أنزيم بلمرة DNA عالي الكفاءة Taq DNA Polymerase (محب للحرارة) وهي تحدد نهايات شظية DNA النهائية المتحصل عليها



طريقة سلسلة تفاعل أنزيم البلمرة (PCR) في الإكثار من تتابع نيوكلتيدي نوعي مخبرياً.

- (أ) يتم تسخين DNA المعزول من الخلايا لفصل السلاسل المتكاملة ثم يعاد اتحاد السلاسل في وفرة من سلاسل الأوليجو التي تم بناؤها كيماوياً ليطابق التتابع المعزول بنيوكلتيدات X وتعمل سلاسل الأوليجو كبادئ لبناء DNA مخبرياً بمساعدة انزيم بلمرة DNATaq الذي ينسخ DNAبين التتابعات الواقعة بين سلاسل الأوليجو
- (ب) بعد عدة دورات تفاعل يتم الحصول على كميات كبيرة من الشظايا الفردية من DNA بطول X نيوكلتيد

تتم كل دورة تفاعل حسب المراحل التالية

- - يتم فصل سلسلتي الحلزون المزدوج لجزيء DNA بتعريضه لمعاملة حرارية لفترة وجيزة (٩٤-٩٦ْم)
- تبريد بطيء (٥٠-٦٠ْم) لجزيء DNA في وجود فائض من سلسلتي الأوليجو DNA (البادىء) مما يعطي فرصة للتهجين النوعي لهما مع التتابعات المكملة على سلسلتي DNA

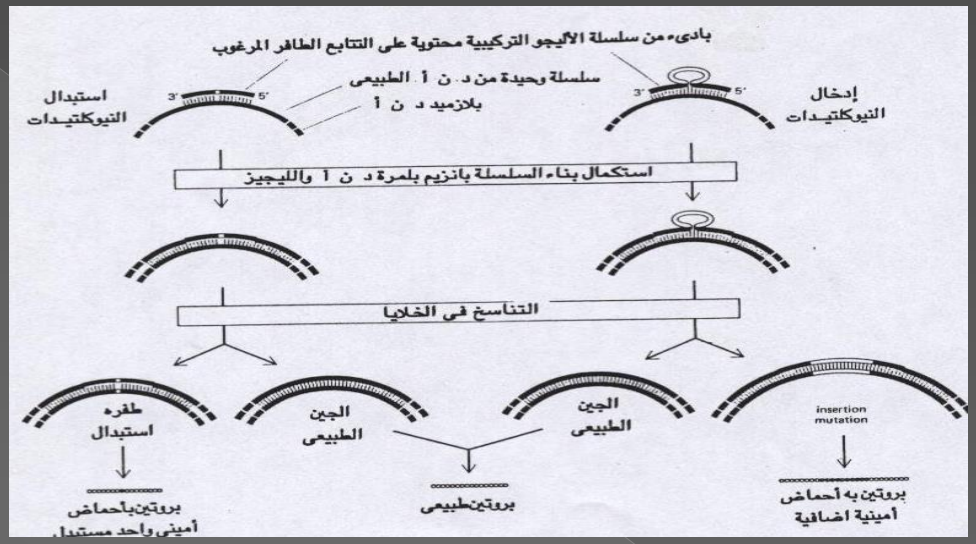
- يتم تحضين المخلوط المعاد اتحاده مع انزيم بلمرة DNA في وجود وفرة من النيوكليوتيدات الأربعة dC , dT , dG , dA ثلاثية الفوسفات بحيث يتم البناء النوعي لمناطق DNA التي تلي منطقة البادئ
- إجراء (٢٠-٣٠) دورة وتؤدي كل دورة إلى مضاعفة كمية DNA المبنية في الدورة السابقة لها وتحتاج كل دورة إلى حوالي خمس دقائق

- وتسمح الطرق الأوتوماتيكية باستنساخ DNA خارج الخلية لشظية من DNA في ساعات قليلة
- طريقة PCR حساسة جداً إذ يمكنها التعرف على جزئ DNA المرغوب في العينة
- ويمكن تحليل كميات قليلة جداً من RNA بطريقة مشابهة بعد تحويلها إلى c DNA المنسوخ (التكميلي) بواسطة أنزيم النسخ العكسي
- تستخدم في تشخيص الأمراض الوراثية قبل الولادة وللتعرف على المستويات المنخفضة من العدوى الفيروسية كما تبشر بالأمل في مجال الطب الشرعي

إعادة تصميم الجينات لإنتاج بروتينات بتتابعات مرغوبة

- يمكن إعادة ترتيب التتابعات الشفرية للجين وكذلك المناطق المنظمة الخاصة بها لتغيير الخواص الوظيفية للبروتين الناتج أو كمية البروتين التي يتم بناؤها
- يمكن إحداث تغيير كبير في التتابعات الشفرية للجين مثلاً عن طريق إدخال أو دمج جزء منه إلى تتابعات شفرية خاصة بجين آخر مما يؤدي إلى إنتاج جين هجين جديد

- الخطوة الأولى في هذه التقنية عبارة عن البناء الكيماوي لجزيء قصير من DNA المحتوي على التتابع النيوكليوتيدي المسؤول عن الاختلاف في البروتين الناتج ،
- يتم التهجين بين التتابع القصير لجزيء DNA مع بلازميد DNA أحادي السلسلة محتوياً على التتابع DNA المراد تغييره مع توفير الظروف التي تسمح بتزاوج جزيئات DNA ذات التناظرغير الكامل كما في الشكل



استخدام سلاسل النيوكلتيد الأوليجو التركيبية

- يمكن بهذه الطريقة احداث استبدال لأكثر من حامض أميني في نفس الوقت أو يمكن حذف حامض أميني أو أكثر في سلسلة متعدد الببتيد الناتج
- تعمل سلسلة DNA القصيرة كبادئ لبناء DNA بواسطة انزيم بلمرة DNA مما يؤدي إلى تكوين جزيء DNA مزدوج السلسلة مشتملاً على التتابع المتغير في الجين ويتم إدخال الجين المحور أو المعدل في ناقل التعبير حتى يمكن إنتاج كميات كبيرة من البروتين المستحدث .

- يمكن استعمال هذه الطريقة لتحديد الأجزاء من الجين المسؤولة عن تنظيم التعبير في مميزة النواة
- تم الحصول على معلومات جديدة وهامة عن تركيب المجين ونقل المعلومات الوراثية كما تم زيادة في إنتاج البروتينات العلفية والفيتامينات والمضادات الحيوية ومواد أخرى فعالية حيوياً من قبل الميكروبات

- للهندسة الوراثية أفاق واسعة في الحياة العملية كما أنها ستساعد على إيجاد طرق لتشخيص وعلاج الأمراض الوراثية عند الإنسان
- هناك مرض وراثي يتصف بزيادة تركيز الحمض الأميني الأرجنين في الدم
- تشخيص المرض بشكل مبكر عند الأطفال
- إدخال فيروس شوبا الغير ضار الى الجسم والذي يحوي المورث الذي يتحكم بتخليق انزيم الأرجيناز الذي يساعد على تمثيل الحمض الأميني الأرجنين

- الهندسة الوراثية يمكن أن تؤدي إلى نتائج خطيرة على الإنسان وبشكل خاص التجارب التي يمكن أن تقود إلى ظهور أشكال من البكتيريا الممرضة المقاومة للمضادات الحيوية والعقاقير الأخرى وأيضاً التجارب على الفيروسات التي تسبب الأورام الخبيثة .

شكرا لاصغائكم