مستويات نقل المورثات

نقل المورثات عند إدخال الكر وموسومات أو شظايا منها في الخلية

- الكروموسومات المعزولة من الخلية في المرحلة الاستوائية تستطيع التغلغل في خلية أخرى بطريقة التشرب .
- الكروموسومات التي تنقل إلى خلية غريبة تتفكك إلى شظايا صغيرة ، البعض منها يبقى في وضع حر في سيتوبلازم الخلية المستقبلة وعلى مدى عدة أجيال من الخلايا ، لكن بعد ذلك يختفي .
- البعض الآخر يندمج بقوة في كروموسومات المستقبل وبالتالي فإن مورثات المعطي المنقولة يمكن أن تقوم بوظائفها في خلية المستقبل .

- عند معاملة خلايا الفأر التي تحوي طفرة غير منشطة لمورث أنزيم هيبوكسانتين - غوانين – فوسفوريبوزيل – ترانسفيراز (HGPRT) بمستحضرات الكروموسومات في المرحلة الاستوائية لنوع من القوارض الصينية التي تحوي المورث الطبيعي الذي يتحكم بظهور هذا الانزيم ،

- زراعة هذه الخلايا على وسط مغذي لا يحوي هذا الانزيم ، تستطيع أن تعيش فقط تلك الخلايا التي حصلت على المورث الطبيعي من كروموسومات القارض الصيني

- استعمال طرق إدخال كروموسومات الإنسان أو قطع منها في خلايا نوع آخر سمح بوضع خريطة المورثات على الصبغيات عند الإنسان وباستخدام طرق التلوين للكروموسومات وظهور الحزم عليها أصبح ممكناً معرفة أي الأجزاء من الكروموسومات تشارك في عملية النقل وكذلك مكان توضع المورثات في هذه الحزم.

- تم نقل مورث الثميدين كيناز ومورث غلاكتوكيناز التي تقع في كروموسوم الإنسان رقم (١٧) إلى خلايا الفئران مع أن خلايا الفئران عند التكاثر تحتفظ بهذه المورثات بشكل ثابت إلى حد ما

- تم بمساعدة أشعة رونتجن نقل شظية من كروموسوم إحدى النباتات البرية (Aegilops umbellulata) تحوي مورث المقاومة لمرض صدأ الورق إلى كروموسوم نبات القمح الطري وبالتالي اكتسب نبات القمح وبشكل مبكر صفة المقاومة لصدأ الورق

- تم استعمال حالات نقل شظايا من الكروموسومات في تعين الجنس عند دودة الحرير
- بعض السلاسل تكون متجانسة بالمورث المتنحي الجسمي (b) الذي يشترط اللون الأبيض للبويضات بالاختلاف عن اللون الأسود (B)
- عند نقل شظية من الكروموسوم الجسمي الذي يحوي مورث اللون الأسود للبويضات إلى الكروموسوم الجنسي W تم الحصول على سلاسل من ديدان الحرير التي تعطي نوعين من البويضات بيوض سوداء اللون تعطي أجنة أنثوية وبيوض بيضاء تعطي أجنة ذكرية مع العلم أن الذكور أكثر إنتاجاً لشرانق الحرير
- إن نظام تحديد الجنس عند دودة الحرير هو ZZ للذكر وZW للأنثى .

نقل المورثات عند إدخال مجمل DNA (المجين) في الخلية :

- تم تعليم الكروموسومات التي في خلايا الدجاج بالبروم دي أوكسي يوريدين وبعد ذلك عوملت بمحلول DNA للفئران المعلم بالتريتيوم بالنتيجة لوحظ تغلغل DNA الفئران المعلم بالتريتيوم في DNA خلايا الدجاج ، إن توزيع العلامات أظهر أن شظايا DNA الفأر اندمجت بمساعدة العبور المزدوج في كروموسومات الدجاج وبالتالي يمكن استخدام هذه الطريقة لأغراض علاجية

- غرس نوى الخلايا الجسمية في الخلايا البيضية المزالة نواتها (ما يعرف بالاستنساخ) له معنى هام في مجال تربية الحيوان
- يمكن الحصول على مجموعة من الأجيال المشابهة وراثياً للفرد الذي أخذت منه نواة الخلية الجسمية
- هناك طريقة مشابهة لحد ماللإستنساخ تسمح بالحصول على إناث متجانسة نوعاً ما بمورثات الآباء هذه الطريقة تم تجريبها على الفئران والأرانب والأبقار

نقل المورثات على مستوى الخلية (تهجين الخلايا الجسمية) :

١. **تهجين الخلايا الجسمية Somatic cell Hybridization لرسم الخريطة الوراثية للإنسان :**

- حدث تقدم كبير في تحديد مواقع الجينات على الخريطة الوراثية للإنسان بسبب
- تهجين الخلايا الجسمية .
- تحسين الطرق الخلوية للتعرف على كروموسومات الإنسان أو أجزاء محددة في الكروموسومات المختلفة
- طرق تكوين DNA المعاد صياغته والمستخدمة في عزل والتعرف على مواقع الجينات داخل جزيئات DNA والكروموسومات .

- تمت أول محاولة لتهجين الخلايا الجسمية في الفأر بواسطة بارسكي Barski وزملاؤه عام /١٩٦٠/ بدمج الخلايا الجسمية النامية في المخبر وتتم عملية الدمج إما بإضافة فيروس سينداي المثبط بالأشعة فوق البنفسجية أو إضافة المادة الكيميائية بولي ايثيلين جليكول Poly etheylene glycol وتشجع هذه العوامل عملية الدمج الخلوي بزيادة التلاصق بين الخلايا وتغير الأغشية الخلوية فعندما ترتبط الفيروسات بخليتين تجعلهما في وضع متقارب جدا من بعضهما كما تسهل العمليات التي تساعد عادة على نفاذية الفيروس في إندماج الخلايا المتلاصقة وينتج عن اتحاد الخلايا خلايا هجينة ثنائية النوى

- ويتبع الاتحاد الخلوي اتحاد نووي منتجاً خلايا وحيدة النواة هجينة Synkaryons
- تعتبر هجن الخلايا بين الفأر والإنسان بصفة خاصة نافعة لرسم الخريطة الجينية للإنسان
- تستخدم في هذه التقنية سلالات معينة من الفئران التي تحوي على كشافات وراثية مميزة تنتج عن الطفرات تتم عادة باستعمال مزرعة خلايا الفأر مع الخلايا الليفية أو خلايا كريات الدم البيضاء في الإنسان

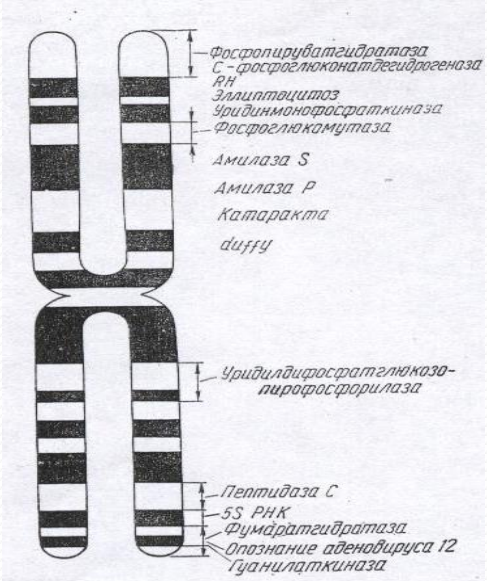
هجن خلايا الفأر والإنسان الجسمية لها ثلاث خواص هامة تجعلها مفيدة وخاصة في التحاليل الوراثية

- التمييز بسهولة بين كروموسومات الفأر والإنسان مما يجعل التعرف على كروموسومات الإنسان الموجودة في الخلايا الهجينة مهمة بسيطة تماماً وذلك على أساس الفروق الشكلية.
- تحتفظ مستعمرات الخلايا الهجينة عادة بكل كروموسومات الفأر بينماييقى فقط حوالي (١-٢٠) كروموسوم من كروموسومات الإنسان في هذه المستعمرات
- كل من مجموعتي كروموسومات الإنسان والفأر تعبر عن نفسها في الخلايا الهجينة ويمكن تميز نواتج جينات كل من الإنسان والفأر – بيوكيميائياً في الخلايا الهجينة

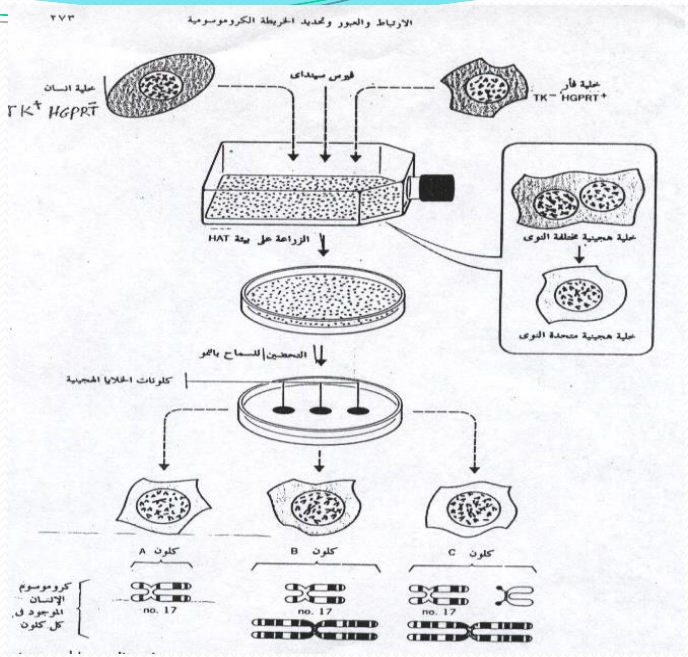
- الجين المسؤول عن بناء انزيم الثيميدين كيناز (جين +TK) يقع على كروموسوم (١٧) لأنه الكروموسوم البشري الوحيد الموجود في كل الأربعة مستعمرات للخلايا الهجينة والإيجابية لأنزيم +TK . يمكن التعرف الآن وبدقة على كل من الكروموسومات الـ (٢٣) المختلفة في الإنسان باستخدام طرق الصبغ المحسنة مثل طريقة صبغة جيمزا .

كروموسومات الإنسان (−) غير موجودة (+) موجودة													نشاط الثميدين كيناز + إيجابي − سلبي	كلون هجين
21	18	17	15	10	9	7	4	2	1	Y	X			
+	−	+	+	+	+	−	+	−	−	+	+		+	1
−	+	+	+	−	+	+	−	+	+	−	+		+	2
−	−	+	−	−	−	+	+	+	+	−	−		+	3
+	−	+	−	+	−	−	−	−	+	−	−		+	4
−	−	−	+	−	+	−	−	+	−	−	+		−	5

- تتم معظم دراسات تهجين الخلايا الجسمية حالياً باستخدام طرق الانتخاب التي تمنع الخلايا الأبوية الطافرة من النمو بينما تسمح بنمو الخلايا الهجينة الناتجة من الدمج الخلوي
- إحدىطرق الإنتخاب الشائعة الموضحة في الشكل()هي إجراء إتحادات بين خلايا فأر لايمكنها بناء إنزيم الثيميدين كينازوخلايا فأرلايمكنها بناء إنزيم هيبو كزانثين- جوانين- فوسفوريبوزيل ترانسفيريز Hypoxanthine-GuaninPhosphoribosylTransferase وفي بيئة إنتخابية مناسبة يكون كلا الإنزيمين لازمين للنمو. وعلى ذلك فلايمكن للخلايا الأبوية أن تنمو بينما تستطيع الخلايا الهجينة الناتجة من الإتحاد بينهما أن تنمو.وبهذه الطريقة تم التعرف علىمواقع الجينات على كروموسومات الإنسان



مخطط بنيبة الكروموسوم رقم (١) عند الإنسان



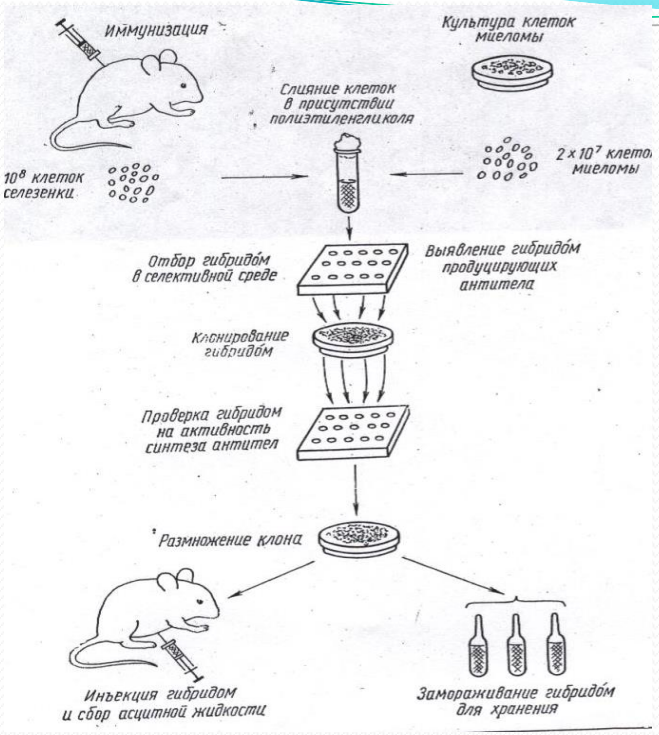
طريقة عزل الخلايا الهجينة الجسمية

تهجين الخلايا الجسمية لإنتاج الأجسام المضادة أحادية النسيلة

- تهجين الخلايا الجسمية يفتح أفاق واسعة لإعداد طرق لإنتاج الأجسام المضادة النوعية (أحادية النسيلة) الهامة جداً بكميات كبيرة لأجل الحقل الطبي العملي ، هذا ما أظهرته الأبحاث التي أجريت على الهبريدوما (Hybridoma) والهيبريدوما هي الخلية الهجينة الناتجة من اندماج الخلية المنتجة للأجسام المضادة مع الخلية السرطانية فالخلية السرطانية تعطي للخلية الهجينة القدرة الغير محدودة على التكاثر عند زراعتها على الوسط المغذي خارج الجسم والخلية الهجينة تمتلك الصفات المناعية للخلية المنتجة للأجسام المضادة مع صفة التكاثر السريع المميزة للخلية الورمية

- يمكن الحصول على خطوط من الخلايا الورمية الهجينة (الخلايا الهجينة الهبريدوما) التي تركب أجسام مضادة أحادية النسيلة.
- إن الاندماج السريع للخلايا يحصل بإضافة بولي ايتيلين غليكول إلى وسط الزرع بعد ذلك الخليط المؤلف من الخلايا التي بقيت حرة تزرع على وسط انتخابي خاص على هذا الوسط تستطيع أن تتكاثر فقط الخلايا الهجينة
- وبعد ذلك بالاختبار المناعي الإشعاعي يتم إظهار الخلايا الهجينة المنتجة للأجسام المضادة ضد مولد الضد المستعمل لأجل التمنيع ، ومن ثم يجري تكاثرها واختبارها على فعالية تركيب الأجسام المضادة

- إن حقن الخلايا الهجينة المختارة في التجويف البطني للفئران يؤدي إلى تشكل (١٠ مل) من السائل الاستسقائي ، الذي يحوي كمية كبيرة من الأجسام المضادة أحادية النسيلة (Monoclonal antibodis) ،
- تم الحصول بنجاح على الخلايا الهجينة التي تركب الأجسام المضادة وذلك باندماج خلايا الطحال مع خلايا ميلانوما الإنسان فالأجسام المضادة الأحادية يمكن استخدامها للحصول على مولدات الضد بشكل نقي التي يمكن استعمالها في تصنيع لقاحات بروتينية ذات نوعية عالية وغير حاوية على الأحماض النووية للعامل الممرض.
- تستخدم الأجسام المضادة أحادية النسيلة في تشخيص وعلاج بعض الأورام السرطانية (سرطان الأمعاء الغليظة عند الإنسان – والليمفوما) وذلك بتحميلها مواد مشعة قاتلة للورم



طريقة الحصول على الأجسام المضادة أحادية النسيلة

تهجين الخلايا الجسمية من أنواع مختلفة (هجن بعيدة) :

- الخلايا النباتية (البروتوبلاست) قادرة على الاندماج

- يمكن استخدام نترات الآزوت الحامضية ، بولي ايتيلين غليكول كمحرض على الاندماج بعد معاملة خلايا النبات بأنزيمات البكتيناز والتسيليولاز التي تؤثر على الأجزاء المتحدة للورقة والغلاف الخلوي ،بعض توافيق المجينات ، التي حصل عليها باندماج الخلايا الجسيمة.

نمط التهجين	التوفيق	نمط التهجين	التوفيق
هجـن داخـل النوع	إنسان × إنسان	هجن بعيدة	الأبقار × القندس
	فأر × فأر		
	الخميـــــاجوك الصيني (نـوع من القـــوارض) × الخميـــــاجوك الصيني		الخميـــــاجوك الذهبي×السلحفاة
	التبغ × التبغ		الدجاج ،× الخميرة
هجن بعيدة	الإنسان × الأرنب		الصويا × الذرة
	الإنسان × الفأر		الجـزز × البكتيريـا المثبتة للأزوت
	الإنســـــان × الضـــــفدع ذو المخالب		الصويا × الحمص
	الإنســـــان × البعوض		الإنسان × الجزر
	الإنسان × التبغ		الإنسان × القرد
	الإنسان × الجرذ		الإنسان × أبوسوم
	الفأر × الدجاج		

تم الحصول على خلايا هجينة من اندماج خلايا الجزر مع البكتيريا المثبتة للأزوت وفي الخلايا الهجينة كانت تجمع صفة المقاومة للبنسلين المميزة لخلايا الجزر والمقدرة على النمو على الوسط الفقير بالأزوت المميزة للبكتيريا المثبتة للأزوت كما تم الحصول على نباتات هجينة تجمع أنماط وراثية لأصناف مختلفة من التبغ

مكتبة DNA(بنك الجينات) DNA Library (Genes Bank)

- هي مجموعة من شظايا DNA والتي تمثل إما المجين الخلوي الكامل أو الجينات المعبر عنها في نسيج معين أو خط من الخلايا يمكن لهذه المجموعة أن تشتق من DNA (وتسمىمكتبة مجينية) أو من الحمض (mRNA) (وتسمى مكتبة الحمض الريبي النووي ناقص الأوكسجين التكميلي DNA المنسوخ على (m RNA) كما يمكن زرع شظايا الحمض الريبي النووي ناقص الأوكسجين المنسلة في نواقل مختلفة مثل (عاثية البكتيريا ، البلازميد ، كوزميد) .

هناك أنواع لمكتبة DNA

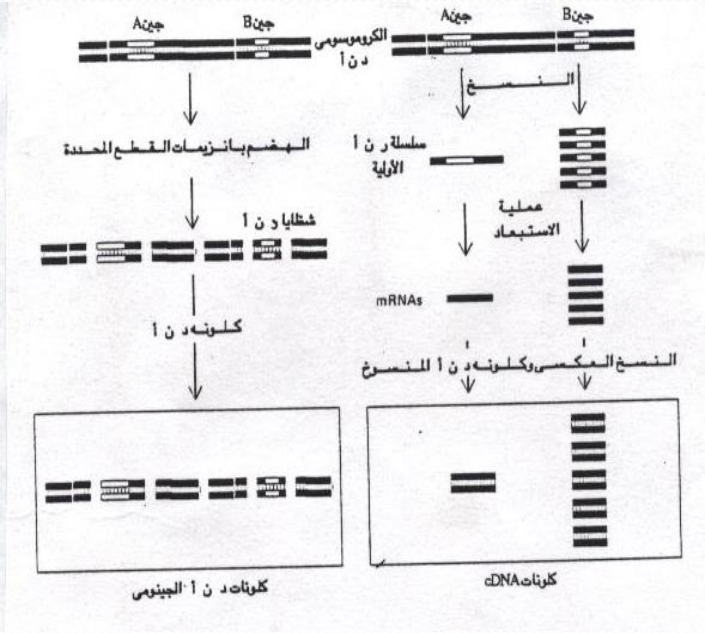
- **المكتبة المجينية (مكتبة الجينوم) :** يمكن إنتاج المكتبة المجينية بإجراء عملية هضم جزئي للـ DNA بانزيم قطع يتميز بارتفاع معدل نشاطه القطعي مثل Sau IIIA . المعزول من جراثيم (StaphyloCoccus aureus) والغرض من ذلك هو الحصول على شظايا DNA طويلة نسبياً مما يضمن أن معظم الجينات ستكون سليمة ولم يحدث لأي منها أي تجزئة نتيجة القطع
- يفضل استخدام الفاج كناقل في مثل هذه المكتبات لأنها تسمح بإدخال شظايا DNA كبيرة نسبياً (حوالي ٢٠ كيلو قاعدة) وللحصول على مكتبة كاملة فإن عدد الشظايا المطلوبة يكون متناسباً عكسياً مع حجم الشظية وطردياً مع حجم المجين كما في الجدول

المصدر	عدد شظايا DNA في المكتبة الكاملة
بكتيريا القولون	١.٥٠٠ شظية
الخميرة	٤.٥٠٠ شظية
الدروسوفيلا	٥٠.٠٠٠ شظية
الثدييات	٨٠٠.٠٠٠ شظية

تكوين مكتبة جينوم كاملة

مكتبة c DNA الدنا المنسوخ أو التكميلي Complementary DNA :

- استخلاص m RNA من الخلايا المتخصصة في إنتاج بروتين معين بكميات كبيرة حيث تزداد نسبة m RNAالنوعي الذي يشفر لهذا البروتين ثم يتم إنتاج نسخ complementary DNA (c DNA) من DNA المنسوخ على قالب من m RNA المراسل باستخدام أنزيم النسخ العكسي ويتم تحويل جزيئات DNA الوحيدة السلسلة الناتجة إلى جزيئات مزدوجة بفعل أنزيم بلمرة DNA (DNA poly I) ثم يتم بعد ذلك إدخال هذه الجزيئات إلى البلازميد ثم تجري عمليةالتنسيل كما في الشكل ()



شكل تخطيطي للفروق بين كلونات DNA المنسوخ c DNA وكلونات DNA المجيني

يتم نسخ الجين A بتكرار منخفض في حين يتم نسخ الجين B بتكرار مرتفع تتم عملية الربط Splicing من كلا النوعين من سلاسل DNAالأولية الناتجة لإزالة انترون واحد لتكوين DNA الناضج m RNA.

توجد عدة مميزات لاستخدام مكتبة c DNA المنسوخ لتنسيل(لكلونة)الجينات:

- إن وفرة c DNA المنسوخ المرغوب فيه في المكتبة يقلل بشكل كبير مشكلة التعرف على الكلون المرغوب في المكتبة .
- البروتينات يتم إنتاجها بكميات كبيرة جداً بواسطة الخلايا المتخصصة ، مما يعني أن m RNA الذي تنتجه هذه الخلايا للترجمة لهذه البروتينات سيكون وفيراً لدرجة أن مكتبة c DNA المحضرة من الخلايا ستكون غنية في جزيئات DNA المنسوخ الذي يشفر للبروتينات النوعية .

- - إن جزيء c DNA المنسوخ يحتوي على التتابعات الشفرية فقط Exons بدون الانترونات وعلى ذلك فإذا كان الهدف من التنسيل (الكلونة) هو التوصل إلى تتابع الأحماض الأمينية للبروتين من تتابع القواعد في DNA الموازي أو لإنتاج البروتين بكميات كبيرة بدفع الجين المنسل (المكلون) إلى التعبير في خلية البكتيريا أو الخميرة ، فإنه من الأفضل أن نبدأ باستخدام c DNA المنسوخ

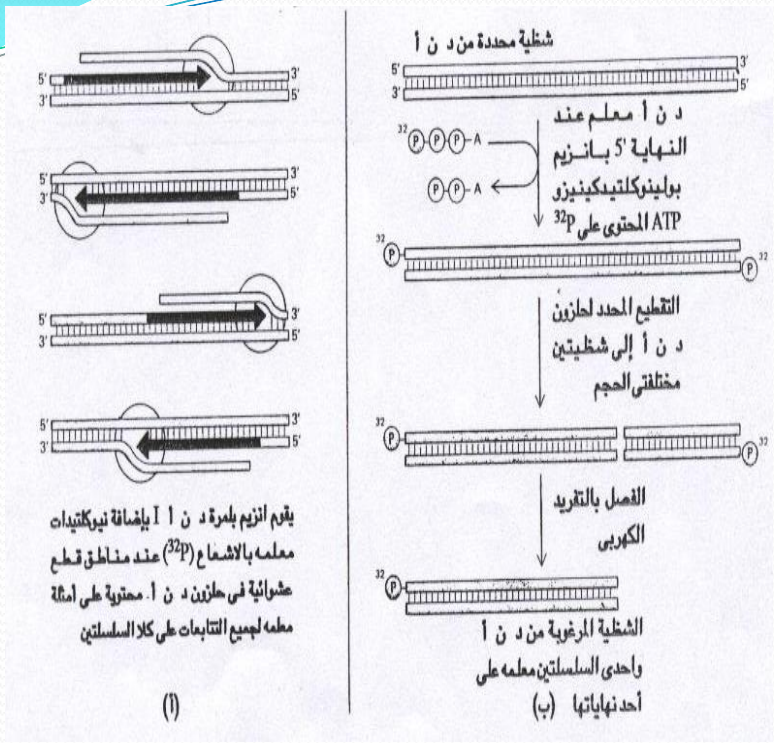
تكوين مكتبةc DNA المنسوخ من جزيئات منتخبة من m RNA :

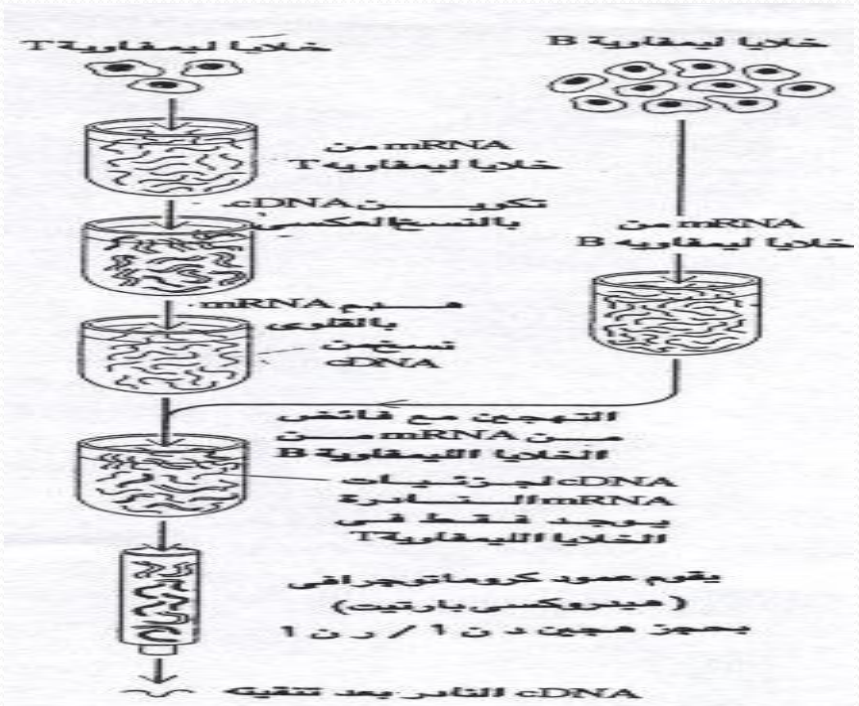
- عندما يتم تحضير c DNA من خلايا يكون فيها تعبير الجين المرغوب عالياً جداً فإن غالبية جزيئات (كلونات)c DNA يتوقع أن تحتوي على تتابع الجين المرغوب هذا مما يعطي فرصة للحصول عليه بأقل جهد ممكن وبدرجة عالية من الكفاءة
-

- أما في حالة الجينات الأقل درجة في معدل النسخ فتوجد عدة طرق يمكن استخدامها للإكثار من جزيئات m RNA النوعي قبل تكوين مكتبة c DNA
- **توفر جسم مضاد للبروتين المستهدف:**
- يستخدم للترسيب الموجه لتلك البولي ربيوسومات المحتوية على سلاسل متعدد الببتيد المرغوبة ، وحيث أن تلك البولي ريبوسومات ستحتوي أيضاً على m RNA الذي يشفر لذلك البروتين فإنه يمكن إكثار جزيئات m RNA المرغوبة إلى أكثر من ألف ضعف

- **طريقة التهجين الطرحي Subtractive hybridization**
- تستخدم إذا توفر نوعان متقاربان بشدة من طراز الخلايا من نفس الكائن ولكن أحد الطرازين فقط ينتج البروتين المرغوب
- استخدمت هذه الطريقة لأول مرة لمعرفة بروتينات مستقبلات سطح الخلية الموجودة على الخلايا T الليمفاوية (T-Lymphocytes) وليست تلك الموجودة على الخلايا B (B-Lymphocytes)
- يمكن استخدامها في الخلية التي يتم فيها تعبير المورث إلى بروتين في حين لا يحدث أي تعبير للأليل الطافر في نفس الخلية .

- وتكون أول خطوة هي بناءc DNA باستخدام m RNA من طراز الخلية الذي ينتج البروتين المرغوب
- تهجين هذه الجزيئات من c DNA مع كمية وفيرة من جزيئات m RNA المستخلصة من الطراز الخلوي الآخر،
- يجرى التعرف على تلك التتابعات من c DNA النادرة التي تفشل في العثور على جزيئات مكملة من m RNA للتزاوج معها
- يتم فصل هذه التتابعات غير المتزاوجة وتنقيتها بطرق بيوكيماوية سهلة والتي تتضمن فصل الأحماض النووية وحيدة السلسلة عن مزدوجة السلسلة
-





استخدام طريقة التهجين الطرحي لتنقية الكلونات النادرة من c DNA التي يوجد لها m RNA في الخلايا الليمفاوية من النوع T ولكن ليس في النوع

شكرا لإصغائكم