الجمهورية العربية السورية

وزارة التربية

المركز الوطني للمتميزين

الهندسة الوراثية

Genetic Engineering

تقديم الطالبة: هديل الحلبي

التاريخ: 2015/2016

الملخص:

سوف نتحدث في هذا البحث عن الهندسة الوراثية: أهميتها، المبادئ العامة، وأهم تطبيقاتها. حيث تعتبر الهندسة الوراثية تقنية مستقلة بحد ذاتها دخلت إلى نواحي الحياة من أوسع أبوابها حتى أننا الآن نجد اليوم استخداماً واسعاً لما تم التوصل إليه في هذا الميدان في الزراعة والصحة والصناعة والإنتاج الحيواني والعديد من المجالات الأخرى.

▪ الفهرس:

العنوان		رقم الصفحة
المقدمة		7
الباب الأول: *المبادئ العامة في الهندسة الوراثية*	الفصل الأول: أهمية الهندسة الوراثية	9
	الفصل الثاني: الخطوات العامة في الهندسة الوراثية أولاً: عزل المورث المطلوب وربطه إلى ناقل مناسب ثانياً: إدخال النواقل الهجينة إلى المضائف ثالثاً: لكشف عن تعبير المورثة الجديدة	9 12 12
الباب الثاني: *الأنزيمات اللازمة في الهندسة الوراثية*	الفصل الأول: أنزيمات هدم الأحماض النووية أولاً: أنزيمات هدم الحمض النووي RNA ثانياً: أنزيمات هدم الحمض النووي DNA	15 16 16
	الفصل الثاني: الأنزيمات المقيدة أو القاطعة	17
	الفصل الثالث: أنزيمات اللحام أولاً: الروابط ثانياً: التوصيلات ثالثاً: التذييل بالبوليمير المتجانس	20 21 22 22
	الفصل الرابع: أنزيمات بلمرة الأحماض النووية	24
	الفصل الخامس: أنزيمات تحوير الحمض النووي	25
	الفصل السادس: أنزيمات إزالة الانطباق	26
الباب الثالث: *طرق استخلاص الأحماض النووية*	الفصل الأول: الطرق العامة لفصل الحمض النووي أولاً: طريقة الفينول: كلوروفورم: إيزوبروبانول ثانياً: الطرد المركزي الفائق مع كلوريد السيزيوم	27 29
الباب الرابع: *نواقل الهندسة الوراثية*	الفصل الأول: البلازميدات أولاً: البلازميدات: تعريفها وأنواعها ثانياً: البلازميدات كنواقل في الهندسة الوراثية	32 34
	الفصل الثاني: العاثيات أولاً: تعريفها ثانياً: العاثيات كنواقل في الهندسة الوراثية	34 35
	الفصل الثالث: الكوزميدات	36
الباب الخامس: *تقنيات أخرى مستخدمة في الهندسة الوراثية*	المكتبة الوراثية المجسات الموسمة عزل المورثات	37
الباب السادس: *تطبيقات الهندسة الوراثية*	الفصل الأول: الهندسة الوراثية والبايو تكنولوجي أولاً: الاستراتيجية العامة لإنتاج الأوكتينورودين ثانياً: استخدام الحيوانات النقيلة للأغراض العلاجية وزراعة الأعضاء	38

الخاتمة 40

▪ فهرس الصور:

الشكل	الشرح	رقم الصفحة
الشكل(1,2,1)	الخطوات العامة في فصل الحمض النووي بطريقة الفينول: كلوروفورم: إيزوبروبانول	10
الشكل(2،2،1)	أنبوبة النتروسليلوز بعد الانتهاء من الطرد المركزي الفائق	10
الشكل(3،2،1)	بعض الأنزيمات القاطعة الشائعة الاستخدام ومواقع عمل كل منها	10
الشكل(4،2،1)	قطع الحمض النووي المهجرة كهربائياً عبر هلام الأجاروز	11
الشكل(2،5،1)	أشكال مختلفة من النواقل المستخدمة في الهندسة الوراثية	11
الشكل(6،1،2)	الكشف عن تعبير المورثات عن طريق التهجين المناعي	13
الشكل(1،1،2)	عمل أنزيمات الهدم الداخلي	16
الشكل(2،1،2)	عمل أنزيمات الهدم الخارجي	16
الشكل(1،2،2)	بعض الأنزيمات المقيدة ومواقع التقييد والقطع الخاصة بها	18
الشكل(1،2،3)	آلية استخدام الروابط	20
الشكل(2،3،2)	آلية استخدام التوصيلات	22
الشكل(3،2،3)	آلية استخدام التذييل بالبوليمير المتجانس	22
الشكل(1،2،4)	نشاط البناء والهدم في أنزيم بلمرة الحمض النووي	23
الشكل(2،4،2)	آلية استصلاح قطع الحمض النووي DNA باستخدام نشاط البناء فقط لأنزيم بلمرة الحمض النووي DNA POL I	24
الشكل(1،2،5)	آلية عمل بعض الأنزيمات المستخدمة في تحوير جزيئات الحمض النووي DNA	25
الشكل(1،1،3)	تخطيط لطريقة فصل الحمض النووي بواسطة الفينول والكلوروفورم والإيزوبروبانول	28

الشكل(1،2،3)	أنبوبة النتروسيليلوز بعد إجراء الطرد المركزي الفائق مع ملح كلوريد السيزيوم	29
الشكل(3،1،3)	طريقة تجميع نموذج الحمض النووي DNA من أنبوبة النتروسيليلوز بعد إجراء الطرد المركزي الفائق	30
الشكل(1،1،4)	أحجام وعدد نسخ بعض البلازميدات وصفاتها المظهرية	32
الشكل(1،4،2)	تخطيط للعاثي لامبدا وأهم المورثات الموجودة في مادته الوراثية	34
الشكل(2،2،4)	تخطيط للعاثي M13 وخريطته الوراثية	35
الشكل(4،3،1)	الكوزميد PJB8	36
الشكل(4،3،2)	استراتيجية استخدام الكوزميد في الهندسة الوراثية	36
الشكل(4،3،3)	استراتيجية استخدام كوزميد C2XB في الهندسة	36

▪ فهرس المصطلحات:

المصطلح باللغة العربية	باللغة الإنكليزية	الشرح
المورثات	Genes	عبارة عن ترددات من النكليوتيدات تترتب ضمن ترددات الحمض النووي DNA.
الحمض النووي الريبي المنقوص الأوكسجين	DNA	حمض نووي يحتوي على المعلومات الوراثية للخلية يوجد في الكروموسومات ويعد المستودع الدائم للمعلومات في الخلية.
الحمض النووي الريبوزي	RNA	يختلف عن DNA في السكر الريبوزي وإحدى القواعد النتروجينية وله ثلاث أنواع وظيفية: الرنا الريبوزي الذي يساهم في بناء مصانع تركيب البروتين، والرنا المرسال يقوم بنقل الشيفرة الوراثية من دنا بداخل النواة إلى مصانع التركيب البروتيني داخل السيتوبلازم والرنا الناقل الذي يقوم بنقل الحوامض الأمينية إلى مصانع التركيب البروتيني.
الصبغيات	Chromosome	جسيمات مجهرية خيطية الشكل، تترتب الجينات أو المورثات على امتدادها.
التحول	Transformation	انتقل جين أو أكثر من خلية بكتيرية متهشمة إلى أخرى حية نتيجة احتفاظ المادة الوراثية على فعاليتها بعد مقتل الخلية وتهشمها
الراشح	Virus	دقائق متناهية في الصغر تتكون خارج الخلايا المضيفة من حمض نووي دنا أو رنا محاط بغلاف بروتيني.

▪ الأهداف:

- التعرف على تقنية الهندسة الوراثية.
- التعرف على أهم الأنزيمات المستخدمة فيها، وكيفية فصل الأحماض النووية وعزل المورثات، ونواقل الهندسة الوراثية.
- التعرف على أهم تطبيقاتها.

▪ إشكالية البحث:

- ما المقصود بالهندسة الوراثية؟؟ وما هي أهم تطبيقات هذا العلم؟؟
- إن الهندسة الوراثية سلاح ذو حدين، فهل من الممكن أن يسبب هذا العلم فناء البشرية على الرغم من جميع الفوائد الزراعية والصناعية والطبية التي قدمها؟؟
- كيف يتم تنقية الجينات وعزلها ومن ثم حشرها في موقع محدد على كروموسوم معين في خلايا المضيف؟؟

▪ المقدمة:

تعتبر الوراثة الصفة المشتركة لجميع صور الحياة القادرة على التكاثر وإنتاج نسل. وقد حاولت الوراثة بفروعها المختلفة تفسير آلية انتقال الصفات من جيل إلى آخر، كما ساهمت أيضاً بتقديم تفسيرات علمية دقيقة لظهور الاختلافات بين أفراد النوع الواحد، أو أفراد النسيلة الواحدة أو حتى بين الجماعات. ومنذ إعادة اكتشاف قوانين الوراثة عام 1900، اتضح وبشكل مقنع تماماً بأن كل التفصيلات البيولوجية تعود لجذور وراثية، فالصفات العامة للأفراد مثل لون العين والبشرة والشعر الطويل وما إلى ذلك من الصفات العامة، وكذلك أنواع البروتينات وغيرها ما هي إلا نواتج حقيقية لفعل المادة الوراثية.

لقد أصبح اليوم علم الوراثة العلم الذي يوفر كل العناصر الأساسية التي يبحث عنها البيولوجيون حتى أطلقوا على المادة الوراثية بالكأس المقدسة أو المادة المقدسة، فقد كشفت الأبحاث العلمية التي تلت إثبات الأهمية الوراثية للحمض النووي DNA بأن هذه المادة تحمل كل أسرار الكائنات الحية.

لذلك ما إن أصبح العلماء على قاب قوسين أو أدنى من كشف تركيب المورثات وتحديد خرائطها التفصيلية حتى بدأت الأصوات تتعالى من خطورة مثل هذه الأبحاث. وسبقت صيحات التحذير هذه ظهور الهندسة الوراثية كعلم مستقل. لقد استند أصحاب صيحات التحذير هذه إلى المنطق العلمي وإلى الالتزام الديني وهم ليسوا بمخطئين في ذلك، فالهندسة الوراثية سلاح ذو حدين قادر على مساعدة البشرية في حل الكثير من المعضلات الصحية والزراعية والصناعية وتخطي صعوباتها كما أنه في نفس الوقت قادر على إحداث أكبر الأضرار وأفدحها.

وما الصحوة الزراعية التي يشهدها العالم اليوم والتي من خلالها ازداد الإنتاج الزراعي كماً ونوعاً إلا نتيجة لتطور الأساليب الزراعية واستعمال الوسائل العلمية في الزراعة ودخول الهندسة الوراثية كعامل رئيسي، كما أن الكثير من الأدوية والعقاقير والهرمونات والمضادات الحيوية واللقاحات وغيرها التي تعج به مستشفياتنا يعود الفضل بإنتاجه إلى الهندسة الوراثية، ومن جانب آخر فإن

الهندسة الوراثية تبقى المشتبه الرئيس في ظهور أمراض قاتلة مثل مرض نقص المناعة المكتسب(الإيدز) الذي يسببه راشح غريب يدعى HIV وربما أمراض أخرى.

▪ الباب الأول:

المبادئ العامة في الهندسة الوراثية:

• الفصل الأول: أهمية الهندسة الوراثية:[1]

تكمن أهمية الهندسة الوراثية، في إحداث تغيرات وراثية مسيطر عليها ذات أهمية اقتصادية أو علمية، وعن طريق ذلك تمكن العلماء من الكشف عن كثير من الحقائق حول دور المورثات في الحياة الخلوية، والتي كانت قبل ذلك مجرد افتراضات نظرية. وبسبب هذه الحقائق أعيدت صياغة العديد من النظريات البيولوجية التي كانت سائدة. ودخل العلماء معتركاً جديداً أطلقوا عليه البايو تكنولوجي Biotechnology أو ما يطلق عليه اليوم بالتقنيات الحياتية، فقد تمكن العلماء من إنتاج سلالات بكتيرية وأخرى مختلفة تقوم بتنفيذ أوامر جديدة لم تعرفها من قبل، حيث تجري لهذه الكائنات عمليات إضافة أو حذف وراثي تم من خلالها إزالة الحواجز بين الأحياء بدائية النوى والأحياء حقيقية النوى، فقد تم إنتاج بكتريا قادرة على إنتاج الأنسولين البشري وهرمون النمو البشري والمضادات الحياتية واللقاحات وأشكال المركبات الكيميائية والتي لم يكن متوقعاً بأنها ستنتج من معامل حيايتية وبهذه الطريقة. كما ظهرت اليوم المحاصيل الزراعية الناتجة عن الهندسة الوراثية وظهرت نباتات مقاومة للأملاح وأخرى مقاومة للحشرات والأعشاب وتنوعت ضروب الفواكه والثمار. ولا أحد يعرف السقف الذي ستقف عنده مثل هذه التقنية.

• الفصل الثاني: الخطوات العامة في الهندسة الوراثية: [2]

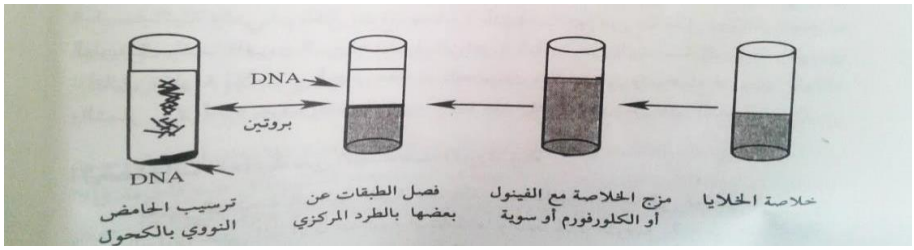
تعتمد الهندسة الوراثية على التلاعب بالمورثات بطريقة تسمح بإنتاج كائنات حية بصفات متقدمة، ويستخدم العديد من الوسائل والمواد لهذا الغرض، وبشكل عام فإن خطوات ووسائل الهندسة الوراثية:

أولاً: عزل المورث المطلوب وربطه إلى ناقل مناسب:

إن الخطوة الأولى في عزل مورث معين من مجين كائن ما هو استخلاص الحمض النووي DNA وتنقيته من الشوائب. وتستخدم طرق عدة لاستخلاص الحمض النووي DNA أهمها: طريقة

[1] الوراثة العامة، الفيصل، عبد الجسين مويت 1999، الدار الأهلية للنشر والتوزيع، عمان المملكة الأردنية الهاشمية.
[2] التقنيات المعملية في الهندسة الوراثية، عبد الجسين مويت 1999، الدار الأهلية للنشر والتوزيع، عمان المملكة الأردنية الهاشمية.

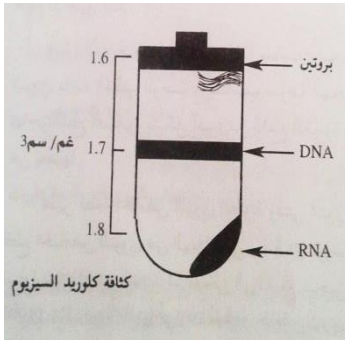
الفينول: كلوروفورم: إيزوبروبانول: والتي يتم فيها تحطيم الجدران الخلوية باستخدام محلول سلفات دودوسيل الصوديوم Sodium Dodycil Sulfate(SDS) وفصل البروتينات عن الحمض النووي بمعاملة الخلايا المحطمة بالفينول أو الكلوروفورم والإيزوبروبانول أو الفينول والكلوروفورم سوية بدرجة حرارة 65مْ مع المزج الجيد الهادئ. تتم بعد ذلك إزالة الطبقة العلوية التي تمثل طبقة الحمض النووي وترسيب الحمض بالإيثانول المثلج ومن ثم تجمع الخيوط البيضاء التي تمثل الحامض النووي بالطرد المركزي والتجفيف كما في الشكل(1،2،1).



الشكل(1،2،1)

الخطوات العامة في فصل الحمض النووي باستخدام الفينول: كلوروفورم: إيزوبروبانول

أما الطريقة الثانية الشائعة أيضاً فهي استخدام مدرج السيزيوم. يضاف كلوريد السيزيوم بعيارية معينة إلى محلول الخلايا المحطمة ويمزج جيداً في أنبوبة نايتروسليلوز. تغلق الأنبوبة جيداً ويطرد الخليط مركزياً بقوة 50000 دورة في الدقيقة لمدة 48 ساعة ينفصل بعدها الحمض النووي DNA عند مستوى كثافة السيزيوم 1.7g/Cm3 ويستخدم بروميد الأثيديوم لتعيين منطقة الحمض النووي إضافة إلى جهاز أشعة بنفسجية. تفصل طبقة الحمض النووي عن طريق ثقب في جدار الأنبوبة تحت الطبقة ويجمع محلول الحمض في أنبوبة خاصة ليتم تخليصه من الأملاح وترسيبه، كما في الشكل(2،2،1).



الشكل(2،2،1)

أنبوبة النتروسليلوز بعد الانتهاء من الطرد المركزي الفائق حيث يستقر الحمض النووي DNA عند الكثافة $1.7g/Cm^3$.

ولأجل عزل قطعة حمض نووي معينة تحمل المورث المطلوب، فإنه يجب تقطيع الحمض النووي بأحد الأنزيمات القاطعة Restriction enzymes. والأنزيمات القاطعة هي أنزيمات متخصصة غالباً في تقطيع سلاسل الحمض النووي من مواقع معينة تختلف اعتماداً على نوع الأنزيم. ومنذ اكتشاف هذه الأنزيمات عام 1970 وما تلاها من هذه الأنزيمات. ونظراً لاختلاف طبيعة عمل هذه الأنزيمات فقد قسمت إلى ثلاث مجاميع، وتعتبر أنزيمات المجموعة الثانية أهم هذه الأنزيمات لقطعها المتخصصة جداً وتمثل هذه المجموعة العمود الفقري في أعمال الهندسة الوراثية، كما في الشكل(3،2،1).

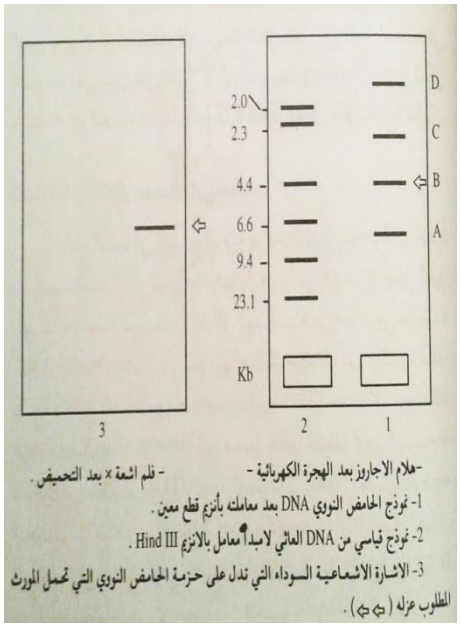
الأنزيم	موقع قطعه على الحامض النووي DNA
Hind III	A↓AGCTT
Eco R1	G↓AATTC
Bam H1	G↓GATCC
Sau 3A	↓GATC
Hae III	GG↓CC
Pvu I	CGAT↓CG
Pvu II	CAG↓CTG

الشكل(3،2،1)

بعض الأنزيمات القاطعة الشائعة الاستخدام ومواقع عملها

يعامل تركيز معين(10 ميكروغرام مثلاً) من الحمض النووي مع عدة وحدات من الأنزيم القاطع(10 وحدات مثلاً) بوجود محلول دارئ Buffer خاص بالأنزيم في قنينة خاصة ويحضن التفاعل بدرجة حرارة مناسبة للأنزيم لفترة 2 إلى 24 ساعة. ترحل قطع الحمض النووي كهربائياً بوجود قطع حمض نووي معلومة الحجم Marker عبر هلام الأجاروز مثلاً.

ونظراً لأن الحمض النووي DNA سالب الشحنة فإن قطع الحمض النووي تهاجر باتجاه القطب الموجب، وتتناسب سرعة الهجرة مع حجم هذه القطع حيث تهاجر القطع الصغيرة بشكل أسرع من القطع الكبيرة، مما يؤدي إلى فصل هذه القطع عن بعضها.

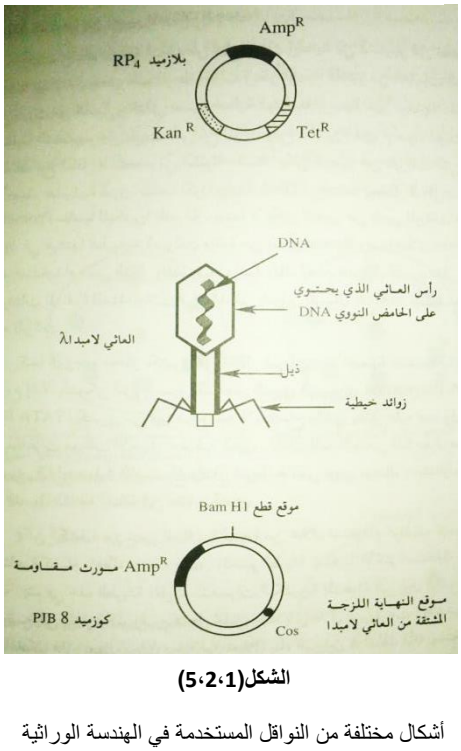


-هلام الاجاروز بعد الهجرة الكهربائية - - فلم اشعة x بعد التحميض.
1- نموذج الحامض النووي DNA بعد معاملته بأنزيم قطع معين.
2- نموذج قياسي من DNA العائي لامبدا معامل بالانزيم Hind III.
3- الاشارة الاشعاعية السوداء التي تدل على حزمة الحامض النووي التي تحمل المورث المطلوب عزله (⇦).

الشكل(1،2،4)

قطع الحمض النووي DNA مهجرة كهربائيا عبر هلام الأجاروز ونتائج تهجينها بعد نقلها إلى ورق خاص باستخدام مجس موسم إشعاعيا. الحزمة رقم (3) تمثل قطعة الحمض النووي B المهجنة مع المجس.

تعين قطعة الحمض النووي المطلوبة والتي تحتوي على المورث المطلوب بعد نقل قطع الحمض النووي من الهلام إلى ورقة نايتروسليلوز أو نايلون حسب طريقة ساوثرن Southren Blot ثم تهجن الورقة مع مجس موسم إشعاعياً Labelled probe يمثل مورثاً نظيراً أو تردداً لقطعة حمض نووي نظيرة للمورث السابق المطلوب عزله. بعد تنظيف الورقة عن طريق غسلها بمحاليل غسيل معينة تغطى بفلم أشعة إكس وتحفظ في غطاء خاص لمدة 14-7 يوماً. تظهر قطعة الحمض النووي التي تحمل المورث المطلوب كحزمة سوداء على الفلم بعد تحميضه كما في الشكل(1،2،4).



الشكل(1،2،5)

أشكال مختلفة من النواقل المستخدمة في الهندسة الوراثية

في كثير من الأحيان يتم اللجوء إلى ما يسمى ببنك المورثات أو مكتبة المورثات Genes Bank لعزل مثل تلك المورثات، ويمكن أن تبنى مثل تلك المكتبات باستخدام قطع الحمض النووي أو قطع حمض نووي متمم Complementary DNA (cDNA) مستمدة من الحمض النووي المرسال Messenger RNA (mRNA).

بعد تعيين موقع الحمض النووي التي تحمل المورث المطلوب تربط هذه مع ناقل مناسب. النواقل: هي جزيئات حمض نووي DNA قصيرة دائرية غالباً وقادرة على التضاعف المستقل عن الخلية أو سوية معها. وأفضل النواقل المعروفة جيداً والمستخدمة كثيراً في أعمال الهندسة الوراثية هي البلازميدات

والعاثيات والكوزميدات، كما في الشكل(5،2،1). تحتوي معظم هذه النواقل على مورثات معينة تسمح بالتعرف عليها في حالة وجودها في خلايا مضيف معين. ويمكن أن تكون هذه المورثات طبيعية مثل مورثات مقاومة المضادات الحيوية الموجودة في البلازميدات أو مورثات مزروعة في الناقل. وبفرض أن الناقل المستخدم هو بلازميد PBR322 ولأجل زرع قطعة الحمض النووي أو المورث في الناقل فإنه لابد من فتح الناقل بنفس أنزيم القطع المستخدم في تقطيع الحمض النووي لجين الكائن الأول. تلحم بعد ذلك قطعة المورث مع الناقل باستخدام أنزيم اللحام Ligase ويكون عندئذٍ الناقل الهجين جاهزاً للخطوة التالية.

ثانياً: إدخال النواقل الهجينة إلى المضائف:

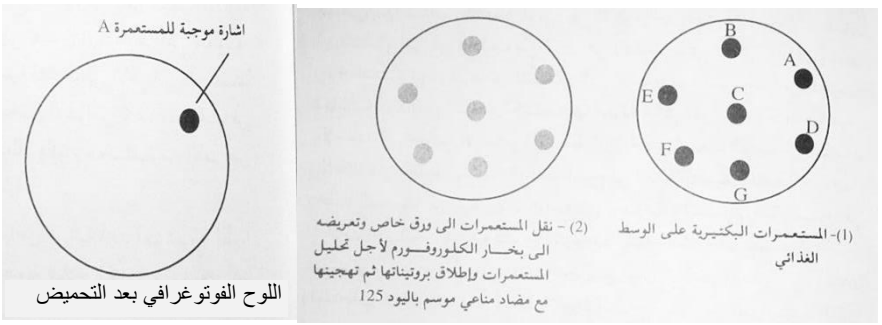
وهي الخطوة التالية في الهندسة الوراثية حيث يتم فيها إدخال النواقل الهجينة إلى خلايا مضائف مناسبة تسمح للمورث الجديد بالتعبير عن نفسه. إن أفضل الطرق المستخدمة في إدخال النواقل الهجينة هي ما تدعى بطريقة التحول Transformation التي يتم فيها معاملة خلايا المضيف(بكتريا عادة) بواسطة محاليل ملحية بدرجة حرارة منخفضة لزيادة نفاذية جدرانها ثم مزج الخلايا المؤهلة للتحول Competent cells مع محول الناقل الهجين لأجل السماح له بالدخول إلى الخلايا على وسط غذائي مناسب. إن طريقة التحول ليست صالحة لجميع أنواع البكتريا ولكنها مناسبة جداً لأفضل المضائف المستخدمة في المختبرات وهي بكتريا القولون E.Coli، وقد تم تطوير هذه الطريقة مراراً لزيادة كفاءتها وشمل أنواع مختلفة من البكتريا والخلايا الحية الأخرى.كما تستخدم خلايا البروتوبلاست Protoplasts عند استخدام خلايا مضيفة بنائية.

ثالثاً: الكشف عن تعبير المورثات الجديدة:

تتضمن هذه المرحلة التأكد من نجاح المورث الجديد في التعبير عن نفسه في الخلايا المضيفة. وتعتبر هذه المرحلة حاسمة نظراً لوجود الكثير من العقبات التي تمنع المورثة من العمل وفي هذه الحالة تصبح الهندسة الوراثية برمتها غير مجدية. تعتبر عملية التعبير عن المورث على نوع المورث ونوع الكائن الذي تم عزل المورث منه وكذلك نوع الناقل المستخدم، فمثلاً يمكن التعبير عن المورثات التي تعود للأحياء حقيقية النوى عندما تكون بهيئة cDNA وعندما يحمل الناقل محفزاً Promoter مناسباً للبكتريا المضيفة. بينما لا يمكن التعبير عن نفس المورثات عندما تكون في هيئتها الطبيعية(مورثات مؤلفة من محاورExons ومتداخلات Introns) عند استخدام نفس الناقل والمضيف، ويعود ذلك لعدم قدرة البكتريا على إزالة الترددات المشفرة للمتداخلات في الحمض النووي المرسال mRNA المستنسخ من

هذه المورثات.كما أن وجود محفز بكتيري في الناقل ضروري جداً لعملية استنساخ المورث المزروع إذ لا يتمكن أنزيم بلمرة الحمض النووي الريبوزي RNA Polymerase البكتيري من تمييز موقع بدء الاستنساخ والذي يطلق عليه صندوق تاتا TATA Box في محفزات مورثات الأحياء حقيقية النوى. لذلك فإنه لابد من استعمال محفز بكتيري لإنجاح عملية الاستنساخ وإنتاج شريط حمض نووي مرسال.

يمكن الكشف عن تعبير المورثات الجديدة من خلال استعمال كواشف كيميائية أو مناعية كفيلة بإعطاء نتيجة ذلك. وتعتبر الطريقة المناعية الأكثر استخداماً في ذلك. يتم في هذه الطريقة نقل المستعمرات البكتيرية المتحولة إلى ورق ترشيح ثم تعريضه إلى بخار الكلوروفورم لأجل تحليل الخلايا وإطلاق البروتينات. وبفرض أن المراد الحكم على تعبير مورث معين من خلال بناء البروتين A لذلك فإنه يستخدم مضاداً مناعياً للبروتين A وموسم إشعاعياً بنظير اليود 125(I^{125}) مثلاً. وعند ورقة الترشيح مع محلول المضاد المناعي الموسم فإنه في حالة وجود البروتين A في أية مستعمرة من المستعمرات المنقولة على ورقة الترشيح فإن المضاد المناعي سيلتصق معه لتكوين معقد مشع. تغسل ورقة الترشيح لإزالة المواد المناعية الزائدة وتغطى بفلم حساس وتحفظ لفترة أسبوع أو أكثر وستظهر المستعمرات التي تحتوي البروتين A سوداء اللون على الفلم بعد التحميض بينما لا يظهر أثر للمستعمرات التي فشلت في التعبير عن المورث، كما في الشكل(6،2،1).



الشكل(6،2،1)

الكشف عن تعبير المورثات عن طريق التهجين المناعي، الإشارة الموجبة تمثل منطقة ارتباط المجس المناعي مع البروتين الخاص بالمورث الجديد

كما يمكن توسيم المضاد المناعي بمواد متوهجة فلورسنية يمكن الكشف عن معقداتها بكل سهولة وخلال فترة قصيرة جداً باستخدام المجهر الفلورسني(المجهر المتوهج). أما بالنسبة لاستخدام الكواشف

الكيميائية فيتطلب ذلك استخلاص البروتينات الخلوية من كل مستعمرة نامية وتحليله، حيث يعتبر الكشف ناجحاً في حالة الحصول على بروتين إضافي للبروتينات الطبيعية الأخرى الموجودة في البكتريا وذات مواصفات مماثلة لمواصفات البروتين A مثلاً. كما أن هناك طرقاً كيميائية أكثر تعقيداً وتحديداً من الطريقة السابقة.

▪ الباب الثاني:

الأنزيمات اللازمة في الهندسة الوراثية:[3]

تتطلب الهندسة الوراثية تقطيع الحمض النووي DNA وعزل القطع الناتجة لاختيار المناسب منها، كما تتطلب هذه العمليات تحوير هذه القطع لإضافة أو إزالة مجاميع كيميائية معينة أو لحامها مع ناقل مناسب أو قطع إضافية لزيادة كفاءة الهندسة، وتتك جميع هذه العمليات عن طريق عمل مجموعة كبيرة من الأنزيمات التي يطلق عليها أنزيمات الهندسة الوراثية. ونظراً لاختلاف وظائف هذه الأنزيمات فقد قسمت إلى خمس مجموعات رئيسة هي:

1) أنزيمات هدم الأحماض النووية Nucliec acids hydrolises enzymes or nucleases.
2) أنزيمات اللحام Ligases.
3) أنزيمات البلمرة Polymerases.
4) أنزيمات التحوير Modifying enzymes.
5) أنزيمات إزالة الانطباق Topoisomerases.

• *الفصل الأول: أنزيمات هدم الأحماض النووية:*

تعمل هذه الأنزيمات على استهداف رابطة الفوسفور ثنائي الأستر Phospho-diester bonds التي تربط النكليوتيدات بعضها ببعض طولياً والتي تمثل العمود الفقري لسلاسل الأحماض النووية، وتقسم هذه الأنزيمات إلى قسمين:

أ- *أنزيمات الهدم الداخلي* Endonucleases. وهي أنزيمات الهدم التي تهاجم روابط الفوسفور ثنائي الأستر من داخل سلاسل الحمض النووي وتؤدي إلى إنتاج قطع مختلفة الحجم من الحمض النووي، كم في الشكل(2،1،1).

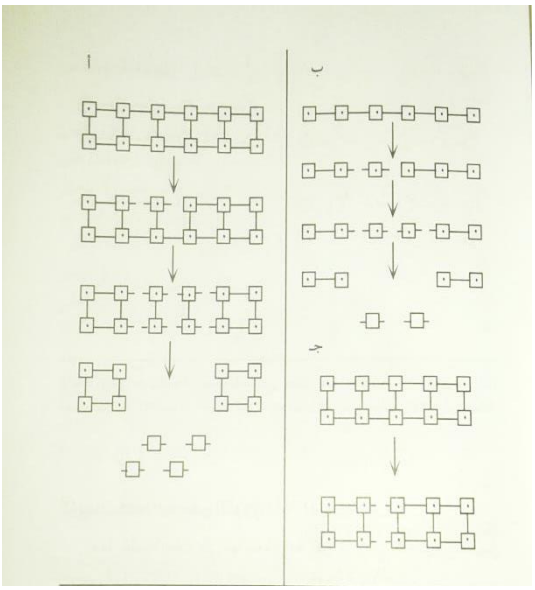
ب- *أنزيمات الهدم الخارجي* Eonucleases. وهي أنزيمات الهدم التي تهاجم روابط الفوسفور ثنائي الأستر في نهايات سلاسل الحمض النووي مؤدية إلى إنتاج وحدات مفردو على الأغلب من النكليوتيدات، كما في الشكل(2،1،2).

[3] علم الوراثة، السهريجي، محمد أحمد، 1990، دار المطبوعات الحديدة.
[3] الوراثة العامة، الفيصل، عبد الجسين مويت 1999، الدار الأهلية للنشر والتوزيع، عمان المملكة الأردنية الهاشمية.

وفي كلتا المجموعتين فإنه يمكن وجود أنزيمات هدم خاصة بالحمض النووي DNA تدعى Deoxyribonucleases-DNases وأخرى خاصة بالحمض النووي RNA تدعى Ribonucleases- RNases.

أنزيمات هدم الحمض النووي (RNA) RNases:

استخلصت هذه الأنزيمات من مصادر مختلفة. فقد استخلصت ثلاثة أنواع من هذه الأنزيمات من بكتريا القولون E.Coli وهي RNase I الذي يعمل على هدم سلسلة الحمض النووي داخلياً اعتباراً من النهاية الثالثة لإنتاج قطع مؤلفة من نكليوتيدة واحدة وأنزيم RNase II الذي يعمل على هدم سلسلة الحمض النووي داخلياً وخارجياً اعتباراً من النهاية الخامسة لإنتاج قطع مؤلفة من نكليوتيدة مفردة وأنزيم RNase III الذي يعمل على الهدم الداخلي للمناطق المزدوجة من الحمض النووي.

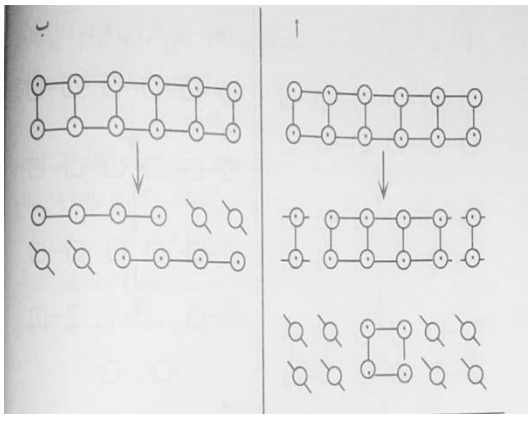


الشكل(2،1،1)

عمل أنزيمات الهدم الداخلي. تستهدف هذه الأنزيمات أواصر السكر-الفوسفات الداخلية لأشرطة الحمض النووي DNA المفردة أو المزدوجة لإنتاج نيكليوتيدات مفردة أو مزدوجة عن طريق تحطيم هذه الأشرطة (أ و ب) فيما تقوم أنزيمات أخرى بفك أصرة السكر- (ج) فوسفات بين زوج واحد من نكليوتيدات شريط مزدوج من الحمض النووي DNA دون فصل النيكليوتيدات عن الشريط.

كما تم استخلاص أنزيم هدم داخلي من بنكرياس الحيوانات سمي(A RNase) يهاجم داخلياً مواقع ارتباط البيرميدينات مع ذرة الكربون الثالثة في السكر الخماسي، حصراً لإنتاج قطع حمض نووي مؤلف من نيكليوتيدات بيرميدينية مفردة إضافة إلى قطع حمض نووي مختلفة الطول. كما تم عزل أنزيم هدم داخلي آخر من قطر الإسبرجلس Aspergillus Oryzea سمي(RNase T1) يعمل على مهاجمة روابط الأستر الموجودة في مواقع نيكليوتيدات تحتوي على الجوانين فقط ومن النهاية الخامسة.

أنزيمات هدم الحمض النووي(DNase (DNA:



الشكل(2،1،2)

عمل أنزيمات الهدم الخارجي. تستهدف هذه الأنزيمات نفس الأواصر التي تستهدفها أنزيمات الهدم الداخلي إلا أنها تختلف عنها في الموقع الخارجي أو الداخلي لعملها.

تعمل هذه الأنزيمات على مهاجمة روابط الفوسفور ثنائي الأستر في سلاسل الحمض النووي DNA. وقد تم عزلها من أنواع مختلفة من الأحياء، فقد وجد أن لبكتريا القولون E.Coli ثلاثة أنزيمات DNases خارجية الهدم أطلق

عليها(Exonuclease I,II,III). حيث يعمل الأنزيم الأول على مهاجمة روابط الأستر في السلاسل المفردة للحامض النووي DNA أو RNA مؤدياً إلى تقطيعها إلى وحدات ثلاثية النيوكليوتيدات ومن النهاية التي ترتبط فيها مجاميع الهيدروكسيل مع ذرة الكربون الثالثة للسكر. بينما يهاجم الأنزيم الثاني السلاسل المزدوجة للحامض النووي DNA عند نفس مواقع عمل الأنزيم الأول. ويختص الأنزيم الثالث في مهاجمة روابط الأستر في السلاسل الحلزونية المزدوجة من الحمض النووي DNA.

كما تم استخلاص نوعين من أنزيمات الهدم الداخلي وذلك من طحال وبعض غدد الحيوانات سميت II و DNase l. يعمل الأنزيم الأول DNase I على مهاجمة الروابط الداخلية للحمض النووي DNA مؤدياً إلى إنتاج وحدات لا يتجاوز طولها أربعة نكليوتيدات تحتوي كل وحدة منها على مجموعة فوسفات مرتبطة مع ذرة الكربون الخامسة ومجموعة هيدروكسيل مرتبطة مع ذرة الكربون الثالثة للسكر. بينما يعمل الأنزيم الثاني DNase II المستخلص من الطحال والغدة الثيموسية لبعض الحيوانات على هدم الحمض النووي DNA داخلياً منتجاً وحدات لا يزيد طولها على ستة نيكليوتيدات، ترتبط مجاميع الهيدروكسيل فيها مع ذرة الكربون الخامسة بينما ترتبط مجاميع الفوسفات مع ذرة الكربون الثالثة.

- ***الفصل الثاني: الأنزيمات المقيدة أو القاطعة*** *Restriction endonucleases or enzymes:*

يرجع تاريخ اكتشاف هذه الأنزيمات إلى عام 1962 حيث تم تفسير ظاهرة المناعة Host-controlled restriction التي تبديها بكتريا القولون E.coli من السلالات K و E عند إصابتها بالعاثيات إلى وجود أجهزة تقييد تعمل على منع عرقلة نمو وتكاثر العاثيات.

تتألف هذه الأجهزة من مجموعة أنزيمات تعمل بطريقة ما على إتلاف المادة الوراثية للعاثيات أو تقييد فعاليتها. لذلك أطلق على هذه الأنزيمات اسم الأنزيمات المقيدة أو المحددة.

لقد وجد دوسيوكس وآربر Dussiox & Arber في عام 1962 أثناء عملهم مع بكتريا القولون والعاثي لامبدا بأنه يحدث انخفاض كبير في كفاءة إصابة العاثي عندما يراد إصابة بكتريا القولون سلالة K بعاثيات معزولة من السلالة E أوالعكس، وكذلك انخفاض في كفاءة الإصابة عند تربية عاثيات معزولة من السلالة K في السلالة E وإعادة الإصابة للسلالة K أو العكس.

وقد عزت هذه الظاهرة إلى الفعل المناعي للمضيف الأخير والمتمثل بتحديد فعالية العاثيات عن طريق الأنزيمات المقيدة أو المحددة، كما فسر عدم تأثير هذه الأنزيمات في المادة الوراثية للمضيف بحصول تحوير في مواقع معينة وعلى طول المادة الوراثية للمضيف بحيث لا تتمكن هذه الأنزيمات من التأثير في المضيف، وقد وجد لاحقاً أن هذا التحوير يتمثل في المثيلة Methylation التي تتضمن إضافة مجاميع المثيل CH_3– إلى مواقع عمل هذه الأنزيمات.

وعلى الرغم من معرفة آلية الفعل المناعي في البكتريا اعتماداً على الأنزيمات المقيدة إلا أن فهم كيفية عمل هذه الآلية استغرقت سنوات طويلة بعد ذلك. وقد نال كل من آربر وسمث وناثان جائزة نوبل للعام 1978 كونهم اكتشفوا هذه الآلية التي تمثل أحد المفاتيح المهمة في الهندسة الوراثية. لقد تم عزل أنواع عديدة من الأنزيمات المقيدة منذ العام 1970، ويصل عدد الأنزيمات المكتشفة لحد الآن أكثر من 300 أنزيم قادرة على تمييز أكثر من 100 تقييد أو قطع على المادة الوراثية.

Mba I	⇩GATC
Mlu I	A⇩CGCGT
Mst I	TG⇩CGCA
Mst II	CC⇩T(N) AGG
Nru I	TC⇩GCGA
Nc II	CC⇩G⇩C GG
Nat I	GC⇩GGCCGC
Not I	GC⇩GGCCGC
Nsp CI	ACATG⇩T
Nsp BII	CAG⇩CTG, CCG⇩CGG
Nar I	GG⇩CGCC
Nae I	GCC⇩GGC
Pvu II	CAG⇩CTG
Pvv I	CGAT⇩CG
Pst I	CTGCA⇩G
Rso I	GT⇩AT
Sau I	CC⇩T (N) AGG
Sau 3A	⇩GATC
So NI	G⇩CGC
Stv I	AGG⇩CCT
ScaI	AGT⇩ACT
SmaI	CCC⇩GGG
Sac II	CCGC⇩GG
Sa II	G⇩TCGAC
SphI	GCATG⇩C
TaqI	T⇩CGA
Xmn I	GAA(NN⇩NN)TTC
Xho II	A⇩GATCT, G⇩GATCC
Xma I	C⇩CCGGG
Xma III	C⇩GGCCG
Xho I	C⇩TCGAG
Xba I	T⇩CTAGA

الشكل(1،2،2)

بعض الأنزيمات المقيدة ومواقع التقييد والقطع الخاصة بها

أنواع الأنزيمات المقيدة أو القاطعة:

قسمت هذه الأنزيمات اعتماداً على قدرتها على القطع المتخصص واحتياجاتها الكيميائية للقيام بوظائفها إلى ثلاثة أنواع هي:

أولاً: الأنزيمات المقيدة- الطراز الأول Type I Restriction enzymes : وتشمل الأنزيمات الأولية المستخلصة من بكتريا القولون السلالة K و E المصابة بالعاثي لامبدا وتعمل هذه الأنزيمات على القطع العشوائي للحمض النووي DNA، ولوحظ بأن هذه الأنزيمات ترتبط في مواقع القطع ثم تبدأ بهدم السلاسل المزدوجة في اتجاه واحد لمسافة تتراوح بين 1000-5000 نكليوتيد ثم تبدأ بعد ذلك بهدم سلسلة

مفردة لمسافة أخرى وتتوقف بعدها عن العمل. تحتاج هذه الأنزيمات لعوامل مساعدة مثل أيونات المغنزيوم Mg^{+2} وجزيئة أدينوسين ثلاثي الفوسفات ATP وأدينوسيل ميثونين S-adenosyl.Methionone.

ثانياً: الأنزيمات المقيدة- الطراز الثاني Type II Restriction enzymes: تعتبر هذه المجموعة من الأنزيمات من أهم مجموعات أنزيمات التقييد لاستخدامها واسع النطاق في الهندسة الوراثية. تمتاز هذه الأنزيمات بقدرتها على قطع الحمض النووي DNA عند مواقع معينة فقط بحيث تعطي عدداً ثابتاً من القطع لكل نوع من الأحياء. تستهدف هذه الأنزيمات ترددات معينة بحيث أنها تقوم بالقطع قبل أو بعد هذه الترددات مباشرة، فمثلاً يمكن للأنزيم القاطع Eco R1 أن يتعرف التردد `5 G* AATTC 3` ويقوم بالقطع بين الجوانين والأدنين من النهاية الخامسة. وهكذا فإن الأنزيم يقوم بقطع سلاسل الحمض النووي DNA في جميع المواقع التي تحتوي على هذا التردد. ويختلف عدد ترددات مواقع القطع التي تتعرف عليه الأنزيمات من أنزيم إلى آخر ولكنها في الغالب تتراوح بين أربعة إلى ستة ترددات كما في الشكل(2،2،1)، ونظراً للأعداد الكبيرة التي اكتشفت من هذه الأنزيمات فإنه تم اقتراح نظام تسمية وضعه كل من سميث وناثان عام 1973 على النحو التالي:

أ- يرمز لجنس الكائن الذي اكتشف فيه الأنزيم بالحرف الأول من اسم الأنزيم ويرمز لنوع الكائن بالحرفين الثاني والثالث من اسم النوع، فمثلاً الأنزيم المسمى Eco مأخوذ من اسم البكتريا E.Coli فالحرف الأول من اسم الأنزيم مأخوذ من اسم جنس البكتريا Eschericia والحرفان الثاني والثالث مأخوذان من اسم نوع البكتريا Coli.

ب-في حالة احتواء السلالة البكتيرية على بلازميدات أو عاث فإنه يجب إضافة اسم البلازميد أو العاثي إلى اسم الأنزيم، فمثلاً في حالة الأنزيم Eco المشتق من اسم البكتريا E.Coli فإذا كانت البكتريا تحتوي على البلازميد R1 فإن اسم الأنزيم يصبح EcoR1.

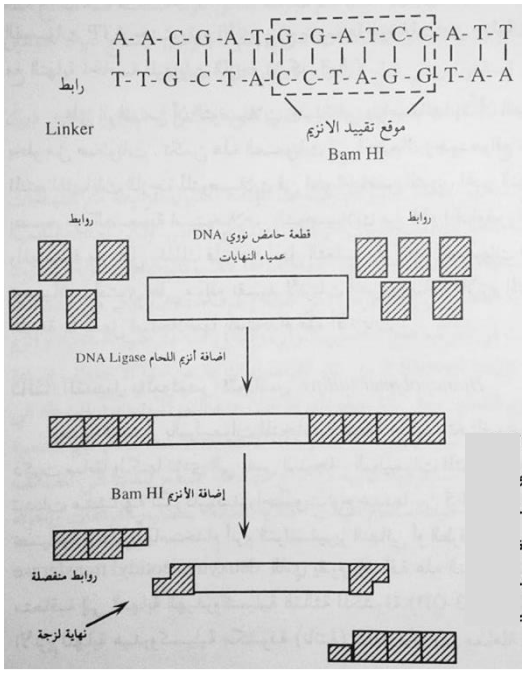
ت-في حالة وجود أكثر من أنزيم لنفس النوع من البكتريا فإنه تستخدم الأرقام الرومانية بعد نهاية الاسم كما الحال في الأنزيم EcoR I و EcoR II.

ثالثاً: الأنزيمات المقيدة- الطراز الثالث Type III Restriction enzymes: وهي أنزيمات وسط في صفاتها بين الطراز الأول والثاني الذي يحتاج أيونات المغنزيوم وجزيئات ATP وأدنيلات

الميثونين. تقوم أنزيمات الطراز الثالث بالقطع في مواقع محددة وتحتاج إلى أيونات المغنزيوم وجزيئات ATP إلا أن حاجتها لأدنيلات الميثونين تكون جزئية.

- ***الفصل الثالث: أنزيمات اللحام Ligases:***

إن عمل هذه الأنزيمات معاكس لعمل الأنزيمات القاطعة حيث أنها تعمل على إعادة روابط الفوسفور ثنائي الأستر بين النيكليوتيدات. ويوجد نوعان من هذه الأنزيمات هما DNA Ligase المعزول من أنواع مختلفة من الكائنات الحية، ويعمل هذا الأنزيم على إعادة ارتباط قطع الحمض النووي ذات النهايات اللزجة فقط ويحتاج إلى العامل المساعد NAD^+ في هذه العملية. أما الأنزيم الآخر فهو الأنزيم T4 Ligase المعزول من العاثي T4 بعد إصابته لبكتريا القولون E.Coli. يتميز هذا الأنزيم عن الأنزيم الأول في أن له القدرة على إعادة التحام قطع الحمض النووي ذي النهايات اللزجة أو العمياء على حد سواء إضافة إلى احتياجه للعامل المساعد ATP لإتمام عمله. ونظراً لعزل المورثات المشفرة لهذه الأنزيمات فقد تم هندستها وراثياً وأصبح بالإمكان الحصول على على كميات كبيرة منه مختبرياً وبطرق سهلة نسبياً.



الشكل(2،3،1)

آلية استخدام الروابط لخلق نهايات لزجة لقطع حمض نووي DNA عمياء

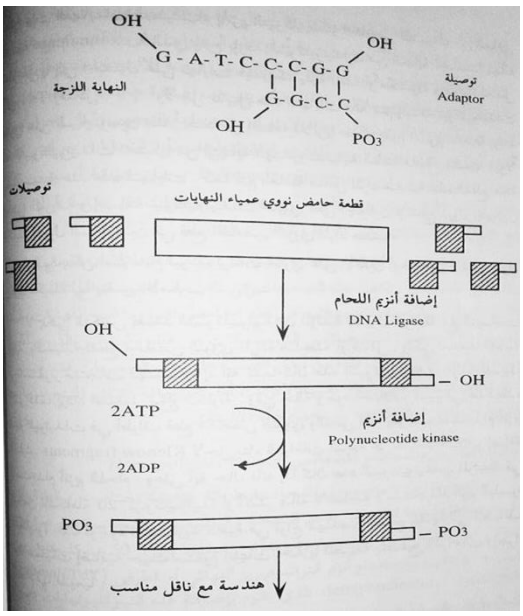
إن الوظيفة الطبيعية لأنزيمات اللحام في الخلايا الحية هي لحام مناطق مجموعات الهيدروكسيل في النهاية الثالثة 3-OH في النكليوتيدات مع مجموعات الفوسفات في النهاية الخامسة 5-P للنكليوتيدات المجاورة لها وتكوين روابط الفوسفور ثنائية الأستر وذلك أثناء تضاعف الحمض النووي DNA، كما أن لها نفس الدور أثناء عمليات تصليح الحمض النووي DNA Repair حيث تقوم هذه الأنزيمات بتكوين روابط فوسفات ثنائي الأستر بين النكليوتيدات المستصلحة، وتحتاج هذه الأنزيمات في سبيل إقامة هذه الروابط إلى عوامل مساعدة تتحول كيميائياً إلى مركب الأدنين أحادي الفوسفات AMP Adenosine monophosphate الذي يرتبط مع الأنزيم محفزاً إياه على توليد هذه الروابط.

لا تعمل أنزيمات اللحام على توليد الروابط الهيدروجينية التي تربط القواعد النتروجينية للنكليوتيدات المتكاملة لشريطي الحمض النووي DNA بل أنها تعمل فقط على تكوين روابط الأستر النهائية في مواقع الالتحام، كما أن أنزيمات اللحام لا تعمل إلا بعد التقاء النهايات الصحيحة وهو ما تحدده الصدفة. لذلك فإنه يستخدم تركيز عال من الحمض النووي مخبرياً في عمليات اللحام لزيادة هذه الفرصة وخصوصاً عندما تكون نهايات القطع عمياء. بينما تكون فرصة الالتقاء الصحيح لهذه النهايات كبيرة في حالة وجود النهايات اللزجة، إذ تساعد أواصر الهيدروجين بين قواعد النكليوتيدات المتكاملة على توفير هذه الفرصة، ومع ذلك فإنه في حالة عدم بناء رابطتي الأستر في النهايات المتقاربة في الوقت المناسب فإن هذه القطع ربما تنفصل مرة أخرى بسبب ضعف روابط الهيدروجين، وعلى ذلك فإن تركيز قطع الحمض النووي المطلوب لحامها سواء كانت نواقل أو قطعاً أخرى وتركيز أنزيم اللحام ونوع النهايات لها دور كبير في سرعة حصول العملية، هذا إضافة إلى الظروف الفيزيائية الصحيحة اللازمة لمثل هذه التفاعلات، وتبقى في جميع الأحوال عملية لحام النهايات اللزجة أسهل بكثير من لحام النهايات العمياء إلا أنه من الممكن تحوير هذه النهايات بأساليب مختلفة بحيث يمكن تحويلها إلى نهايات لزجة، ومن أهم أساليب التحوير هذه استخدام جزيئات رابطة Linkers أو توصيلات Adaptors أو ذيول متجانسة Homopolymer Tails.

أولاً: الروابط: هي جزيئات حمض نووي DNA مزدوجة معروفة التردد ومصنعة مخبرياً. وهي أيضاً جزيئات ذات نهايات عمياء إلا أن ترددها يحتوي على موقع تقييد مفرد لأنزيم تقييد معين أو أكثر من موقع لأكثر من أنزيم. يتم العمل باستخدام هذه الروابط عن طريق توفيرها في التفاعل بتركيز عال مع وجود قطع الحمض النووي ذات النهايات العمياء المراد تحويرها ووجود أنزيم اللحام T4 والظروف المناسبة لإجراء هذا التفاعل، حيث يتم التحام أكثر من جزيئة رابط في كل نهاية من النهايات العمياء لقطع الحمض النووي، وبعد الانتهاء من هذا التفاعل تتم تنقية نواتج التفاعل ثم معاملتها مع الأنزيم الذي له موقع تقييد في الروابط حيث يعمل هذا الانزيم على قطع جزء من الروابط بصورة غير متناظرة منتجاً النهايات اللزجة، فلو افترضنا أن الروابط المستخدمة في هذا المثال تحتوي على موقع تقييد للأنزيم BamHI فإن النهايات اللزجة الناتجة من تفاعل هذا الأنزيم مع الروابط ستحتوي على التردد 5-GATCC-3 كنهاية لزجة في كل نهاية من نهايات قطع الحمض النووي، كما في الشكل(1،3،2).

ثانياً: التوصيلات: يبقى استخدام الروابط محفوفاً بالمشاكل في حالة احتواء قطع الحمض النووي ذات النهايات العمياء على مواقع تقييد لنفس الأنزيم الذي له موقع تقييد في جزيئة الرابط، ويمكن أن تبدو المشكلة مستحيلة الحل في حالة أن قطع الحمض النووي المراد تحوير نهاياتها كبيرة الحجم ويمكن أن تحتوي على العديد من مواقع التقييد الخاصة بهذا الأنزيم، لذلك فإن الروابط لا تعتبر الحل المناسب على الإطلاق في مثل هذه الحالات.

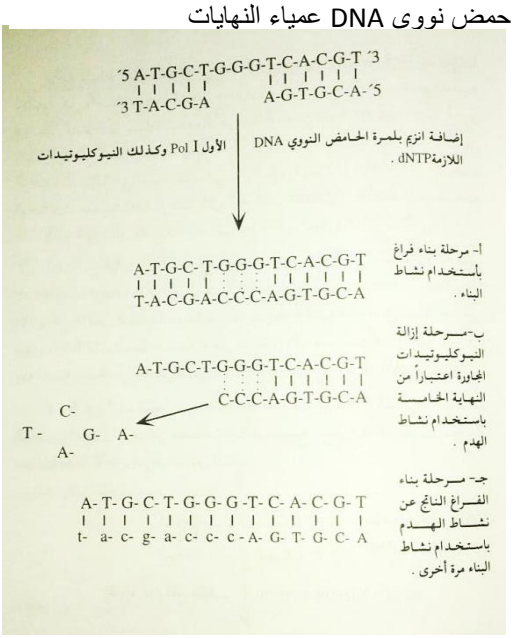
تعتبر التوصيلات أحد أنجح هذه الطرق والتي يمكن استخدامها بنجاح دون الوقوع بالمشاكل الناتجة عند استخدام الروابط. التوصيلات كالروابط في أنها ذات جزيئات حمض نووي DNA مزدوج معروفة التردد ومصنعة مخبرياً، لكنها



الشكل(2،3،2)

آلية استخدام التوصيلات لخلق نهايات لزجة لقطعة حمض نووى DNA عمياء النهايات

تختلف عن الروابط في أن لها نهاية عمياء وأخرى لزجة، ويهدف استخدامها في لحام نهايتها العمياء مع النهايات العمياء لقطع الحمض النووي المراد تحوير نهاياته وهكذا تمتلك هذه القطع نهايات لزجة جديدة.



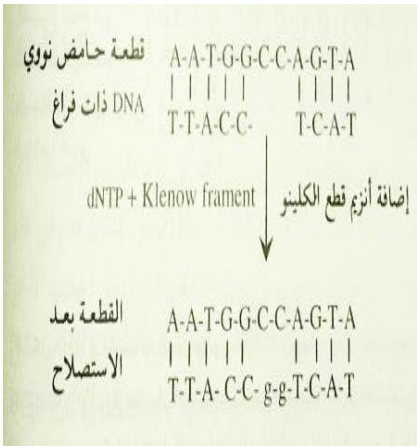
الشكل(3،3،2)

آلية التذييل بالبوليمير المتجانس

إن النهاية اللزجة للتوصيلات لا تحمل مجموعة فوسفات نهائية في النهاية الخامسة لذلك فإنه لا توجد فرصة أمام هذه النهايات على الالتحام مع النهايات العمياء لقطع الحمض النووي المراد تحويرها وتبقى فرصة الالتحام مفتوحة أمام النهاية العمياء للتوصيلات، لذلك فإنه يتوجب إضافة مجموعة فوسفات إلى النهايات اللزجة للتوصيلات بعد الانتهاء من عملية التحوير وقبل إجراء عملية الهندسة مع ناقل معين، ويتم ذلك بمعاملة القطع محورة النهايات مع أنزيم كاينيز متعدد النكليوتيدات Polynucleotide Kinase بوجود جزيئة أدينوسين ثلاثي الفوسفات ATP حيث يقوم الأنزيم بنزع مجموعة فوسفات من جزيئة ATP وربطها مع النهاية الخامسة للنهايات اللزجة، كما في الشكل(2،3،2).

ثالثاً: التذييل بالبوليمير المتجانس: البوليميرات المتجانسة عبارة عن ترددات نتشابهة لنكليوتيد واحد ويتراوح عددها بين 50-5 نيكليوتيد ويتم تصنيعها مخبرياً باستخدام أنزيم الترانسفيريز النهائي أو

الطرفي(TdT) Terminal deoxynucleotidy transferase الذي يقوم بإضافة هذه النيكليوتيدات صورة متعاقبة إلى النهاية الهيدروكسيلية الثالثة المكشوفة(3`-OH). ونظراً لحاجة هذا الأنزيم لنهاية هيدروكسيلية مكشوفة(ناتئة) لذلك فإنه يتم معاملة قطع الحمض النووي ذات النهايات العمياء بأنزيم النيوكلييز الخارجي المعزول من العاثي لامبدا الذي يقوم بإزالة النيكليوتيدات من النهاية الخامسة لهذه القطع مؤدياً إلى الحصول على نهايات هيروكسيلية ناتئة أو مكشوفة وجاهزة لعمل الأنزيم TdT، كما في الشكل(2،3،3). ولأجل تذييل هذه النهايات فإنه تتم إضافة نكليوتيدات تحتوي على السايتوسين مثلاً للتفاعل إضافة للأنزيم حيث يقوم الأنزيم عندها بربط هذه النكليوتيدات اعتباراً من النهاية الهيدروكسيلية الناتئة للقطع منتجاً ذيولاً سايتوسينية عند هذه النهايات. كما تتم معاملة الناقل المراد هندسة هذه القطع معه بنفس الطريقة وبإضافة نكليوتيدات تحتوي على الجوانين لإنتاج ذيول جوانين مكملة لذيول السايتوسين في قطع الحمض النووي المراد هندسته.كما يمكن استخدام نكليوتيدات تحتوي على الأدنين أوالثايمين لإنتاج ذيول وذيول مكملة لها بنفس الأسلوب السابق.لا يمكن توقع عدد النكليوتيدات المؤلفة للذيول المرتبطة مع النهايات الهيدروكسيلية لقطع الحمض النووي المراد هندسته أو الناقل، ولكن لعددها أهمية في استقرار منتجات الهندسة، إذ إنه كلما كان عدد النكليوتيدات المؤلفة للذيول أكثر كلما ازداد استقرار نواتج الكلونة، وفي حالة وجود اختلاف كبير في عدد هذه النكليوتيدات في أطراف قطع الحمض النووي والناقل فإنه يتوجب استخدام أنزيم الكلينو Klenow fragments لأجل بناء الفراغات الناتجة عن هذا الاختلاف إضافة لاستخدام أنزيم اللحام. وعلى أية حال فإنه إذا كان عدد النكليوتيدات المرتبطة في المناطق المتكاملة 20 نكليوتيد أو أكثر فإنه لا حاجة لاستخدام أنزيم البلمرة(الكلينو) ذلك لوجود استقرارية كافية في نواتج الهندسة تسمح بنقلها إلى المضائف دون عملية إضافية حيث ستقوم أنزيمات الخلايا المضيفة بتصليح الفراغات وإجراء اللحام لها طبيعياً.

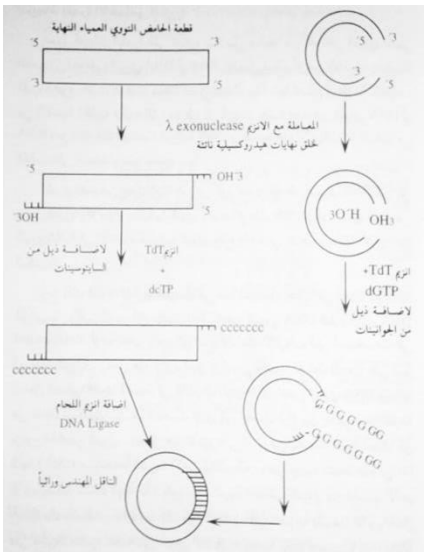


الشكل(2،4،1)

نشاط البناء والهدم في أنزيم بلمرة الحمض النووي ويلاحظ بأن الأنزيم استخدم الشريط الكامل كقالب واستخدم قطعة الشريط القصير كبادئة لأجل البناء اعتباراً من النهاية الثالثة بينما ابتدأ نشاط الهدم من النهاية الخامسة.

- ***الفصل الرابع: أنزيمات بلمرة الأحماض النووية*** *Nucleic acids polymerases:*

تعمل أنزيمات البلمرة على تصنيع سلاسل جديدة من الحمض النووي المتمم لقالب من الحمض النووي DNA أو RNA، وتعمل معظم أنزيمات البلمرة مستخدمة قالب مزدوج بحيث أن هناك منطقة تعمل كبادئة يبدأ منها تصنيع السلسلة الجديدة. من الناحية الخلوية فإن هناك عدة طرز من أنزيمات بلمرة الحمض النووي DNA أو RNA ومع ذلك فإن الهندسة الوراثية لا تحتاج جميع هذه الأنزيمات إنما تقتصر على استخدام عدد محدود منها. فقد تم تشخيص وعزل ثلاثة طرز من أنزيم بلمرة الحمض النووي DNA في كل من البكتريا والأحياء حقيقية النوى، بينما تم عزل ثلاثة أنزيمات



الشكل(2،4،2)

آلية استصلاح قطع الحمض النووي DNA باستخدام نشاط البناء فقط لأنزيم بلمرة الحمض النووي DNA POL I

بلمرة للحمض النووي RNA في الأحياء حقيقية النوى ونوع واحد في الأحياء بدائية النوى مثل البكتريا. ومع ذلك فإن هناك أربعة أنزيمات من هذه تستخدم حالياً في مجال الهندسة الوراثية، ويعتبر أنزيم بلمرة الحمض النووي DNA الطراز الأول DNA Polymerasel أو ما يدعى يدعى بأنزيم كورنبرج أول هذه الأنزيمات التي استخدمت في الهندسة الوراثية. يعمل هذا الأنزيم الذي عزل من بكتريا القولون E.Coli على تمييز المناطق الصغيرة المفردة الشريط في الأشرطة المزدوجة للحمض النووي DNA والناتجة عن فقدان نكليوتيدات قليلة بحيث تؤدي إلى حصول فراغ بين جانبي أحد أشرطة مزدوج الحمض النووي، ويعمل هذا الأنزيم على البدء في بناء هذا الفراغ اعتباراً من النهاية الثالثة مستخدماً الشريط الآخر كقالب له، ونظراً لوجود نشاط هدم في هذا الأنزيم إضافة لنشاط البناء فإنه يقوم بهدم شريط الحمض النووي من الجانب الآخر واستكمال بناء الشريط الجديد، كما في الشكل(1،4،2)، أما مخبرياً فإن هذا الأنزيم يعمل على شريط مفرد للحمض النووي كقالب بوجود بادئة قصيرة ذات نهاية هيدروكسيلية إضافة إلى النكليوتيدات وأيونات المغنزيوم لتصنيع شريط ثان مكمل للقالب.

يرجع نشاط البناء والهدم في هذا الأنزيم لوجود عدة تحت وحدات مؤلفة للأنزيم، كل واحدة من هذه التحت وحدات مؤلفة من سلاسل ببتيدية معينة ويختص قسم منها بنشاط البناء والآخر بنشاط الهدم فيما تقوم تحت وحدة أخرى بالسيطرة على هذه الأنشطة، ونظراً لتطور الإمكانات التكنولوجية فقد تم

فصل الوحدة المسؤولة عن نشاط البناء في أنزيم البلمرة رقم I(DNAPOLI) عن بقية الوحدات، سميت هذه الوحدة بأنزيم قطع كلينو، ويستخدم هذا الأنزيم على نطاق واسع في بناء أشرطة الحمض النووي DNA، كما في الشكل(2،4،2).

أما الأنزيم الثالث المستخدم في الهندسة الوراثية فهو أنزيم الاستنساخ العكسي Reverse transcriptase المعزول من الرواشح المرتدة retroviruses. يختلف هذا الأنزيم عن أنزيمات البلمرة السابقة في أنه يستخدم قالباً مؤلفاً من شريط حمض نووي RNA لبناء نسخة متممة له من شريط DNA ويستخدم هذا الأنزيم كثيراً في بناء ما يدعى بسلاسل الحمض النووي DNA المتمم DNA-Complementary Strands.

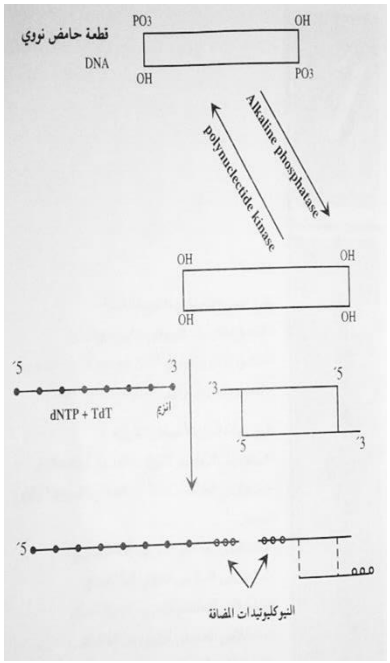
أما الأنزيم الرابع فهو أنزيم بلمرة الحمض النووي RNA الثاني المعزول من البكتريا E.Coli، ويمكن استخدامه في تصنيع نسخ mRNA لمورث معين أو مورثات معينة لأجل معرفة البروتين المشفر له.

- ***الفصل الخامس: أنزيمات تحوير الحمض النووي*** *DNA modifying enzymes:*

تتطلب بعض طرق الهندسة الوراثية تحويراً للحمض النووي المستخدم في الهندسة أو ناقله وذلك عن طريق إضافة أو حذف بعض المجاميع الكيميائية بواسطة الأنزيمات.

أنزيم الفوسفاتيز القاعدي Alkaline phosphatase: وهو من أهم هذه الأنزيمات، معزول من بكتريا القولون E.Coli أو من أنسجة أمعاء الأبقار ويعمل هذا الأنزيم على إزالة مجموعة الفوسفات الموجودة في النهاية الخامسة لقطع الحمض النووي، وتساعد هذه الإزالة في تقليل احتمالية التصاق قطع الحمض النووي اللزجة مع بعضها بعد القطع بالأنزيمات المحددة.

أما أنزيم كاينز متعدد النكليوتيد Polynucleotide Kinase: فإن له القدرة على إضافة مجموعة فوسفات للنهاية الخامسة من قطع الحمض النووي، وهو هنا يؤدي وظيفة معاكسة لأنزيم الفوسفاتيز القاعدي. أما الأنزيم الآخر المهم في عمليات التحوير فهو أنزيم الترانسفيريز النهائي أو الطرفي Terminal deoxynucleotidal transferase الذي يقوم بإضافة نكليوتيد أو أكثر للنهاية الهيدروكسيلية الثالثة لقطع الحمض النووي، كما في الشكل(1،5،2).



الشكل(1،5،2)

آلية عمل بعض الأنزيمات المستخدمة في تحوير جزيئات الحمض النووي DNA

- ***الفصل السادس: أنزيمات إزالة الانطباق*** *Topoisomerases:*

وهي الأنزيمات التي تعمل على إزالة البرم من أنواع الحمض النووي DNA شديدة الانطباق Supercoiled، ونظراً إلى أن عمليات تضاعف هذا الحمض النووي أو تصنيعه تحتاج أولاً لإزالة الانطباقات الشديدة لتسهيل عمل أنزيمات البلمرة لذلك يجب فإنه يتطلب أولاً إزالة الانطباق من شريطي الحمض النووي DNA، ويتم ذلك بواسطة أنزيمات إزالة الانطباق أو البرم. اكتشف نوعان من الأنزيمات التي لها علاقة بهذه العملية منذ العام 1971 سميت هذه بأنزيم التوبوايزميريز Topoisomerase I, I والتوبوايزميريزTopoisomerase II, II. تقوم هذه الأنزيمات بوظيفة قطع وغلق مزدوج الحمض النووي مما يؤدي إلى إزالة الانطباقات الشديدة مؤدية إلى الحصول على حمض نووي مزدوج حلقي وغير مبروم. تعمل هذه الأنزيمات على التخلص من الانطباقات من خلال كسر أواصر السكر- فوسفات المؤلفة للعمود الفقري لشريط واحد مفرد والتآصر مع النهايات المفتوحة في هذا الموقع والتحرك بعكس اتجاه البرم أو الالتفاف أو الانطباق حيث تنتهي العملية بإزالة البرم في هذا الموقع. ويقوم بهذه المهمة الأنزيم الأول فيما يقوم الأنزيم الثاني أو ما يدعى بالجايرز Gyrase بلحام نهايات الشريط مرة أخرى. ويذكر بأن هذه العملية تحصل في كل موقع يحتوي على برم أو انطباق وعلى ذلك فإنه يتم كسر ولحام مناطق مختلفة من الحمض النووي لأجل إزالة البرم كلياً، وعلى الرغم منأهمية هذه الأنزيمات إلا أنه لا تستخدم حالياً إلا بحدود ضيقة في مجالات الهندسة الوراثية وذلك لأن الشركات العالمية تزود المختبرات بنواقل بلازميدية جاهزة للعمل.

▪ الباب الثالث:

طرق استخلاص الأحماض النووية:

إن عملية تحليل الحمض النووي تتطلب وجود نموذج نقي للحمض النووي لأجل دراسة ومعرفة كل ما يتعلق به من معلومات، لذلك فإن عمليات الاستخلاص تعتبر إحدى الركائز المهمة في دراسة الأحماض النووية. ونظراً لاختلاف مصادر الأحماض النووية فقد تنوعت طرق الاستخلاص.

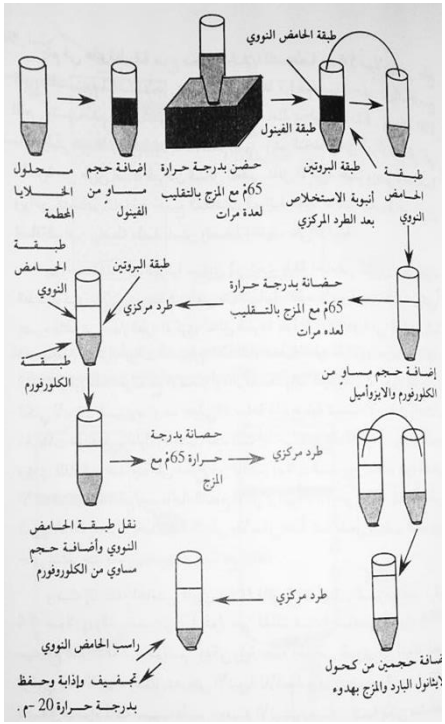
● الفصل الأول: الطرق العامة لفصل الأحماض النووية[4]:

أولاً: طريقة الفينول: كلوروفورم: إيزوبروبانول: تعتمد هذه الطريقة على قدرة الفينول والكلوروفورم على مسخ البروتينات الموجودة في النموذج وعزلها عن الأحماض النووية. كما أن لها القدرة على تثبيط عمل الأنزيمات المحطمة للحمض النووي DNA وكذلك تثبيط البروتينات وبالتالي الحفاظ على الأحماض النووية من التدمير، ويزيد الإيزوبروبانول من كفاءة الكلوروفورم في التخلص من البروتينات.

إن الفينول السائل المجهز من قبل الشركات العالمية يحتوي على العديد من المعادن الثقيلة والشوائب والتي من الممكن أن تتآصر مع الأحماض النووية وخصوصاً الحمض النووي DNA مما يعرقل عمل العديد من الأنزيمات التي من الممكن استخدامها فيما بعد. إضافة إلى ذلك فإنه لابد من إجراء عملية غسيل لسائل الفينول قبل استخدامه.تتم هذه العملية في كابينة كيميائية هود(Hood) وذلك بوضع قنينة الفينول في حمام مائي بدرجة حرارة 65مْ لمدة ساعة قبل إجراء الغسيل وإضافة 0.1 من مادة 8-Hydroxy quinolone. تعمل هذه المادة على تلوين الفينول باللون الأصفر إضافة إلى قدرتها الكبيرة على التآصر مع المعادن الثقيلة الموجودة في الفينول ويتم التخلص منها عند إجراء عملية الغسيل. يستخدم محلول STE في عملية الغسيل وهو محلول ملحي ضعيف، حيث يضاف 50Cm3 من محلول الغسيل STE لكل $100Cm^3$ فينول ويمزج جيداً بواسطة الخلط بواسطة ماصة Pipet زجاجية ويترك لدقيقتين حتى انفصال طبقة الغسيل عن الفينول(طبقة الغسيل علوية دائماً) حيث تصبح طبقة الغسيل بيضاء عكرة تمزج هذه الطبقة مرة أخرى وتترك الطبقات لتنفصل مرة ثانية وتعاد عملية الخلط أو المزج لمرة ثالثة تزال بعدها طبقة الغسيل ويضاف $50Cm^3$ من محلول الغسيل إلى قنينة الفينول وتعاد العملية السابقة لعدة مرات حتى تصبح طبقة محلول

[4] [4] الوراثة العامة، الفيصل، عبد الجسين مويت 1999، الدار الأهلية للنشر والتوزيع، عمان المملكة الأردنية الهاشمية.
[4] التقنيات المعملية في الهندسة الوراثية، عبد الجسين مويت 1999، الدار الأهلية للنشر والتوزيع، عمان المملكة الأردنية الهاشمية.

الغسيل رائقة تماماً، عندها تغطى طبقة الفينول بطبقة من محلول الغسيل لمنع تأكسد الفينول مع الهواء ويحفظ الفينول قنان صغيرة معتمة(Cm^3 40-20) ويخزن بدرجة حرارة 20-مْ. لأجل استخلاص وفصل الحمض النووي DNA يخلط حجم مساو من الفينول مع محلول الخلايا المحطمة في أنبوبة زجاجية صلبة ومعقمة(أنبوبة الطرد المركزي). يمزج المحلول جيداً وبهدوء عن طريق غلق الأنبوبة بواسطة ورق برافين أو قطعة مطاط وتقليبها إلى الأعلى والأسفل بهدوء لعدة مرات حتى امتزاج المحلول جيداً. توضع الأنبوبة في حمام مائي بدرجة حرارة 65مْ لدقيقتين أو ثلاث تعاد عملية المزج مرة أخرى وهكذا لثلاث أو أربع مرات. تفصل بعدها طبقة الحمض النووي DNA عن طريق الطرد المركزي بقوة 5000 دورة في الدقيقة لمدة خمس دقائق. ينفصل المحلول بعدها إلى ثلاث طبقات علوية تمثل الحمض النووي DNA وسفلية تمثل طبقة الفينول، بينما يتكتل البروتين كطبقة بيضاء اللون لزجة بينهما.

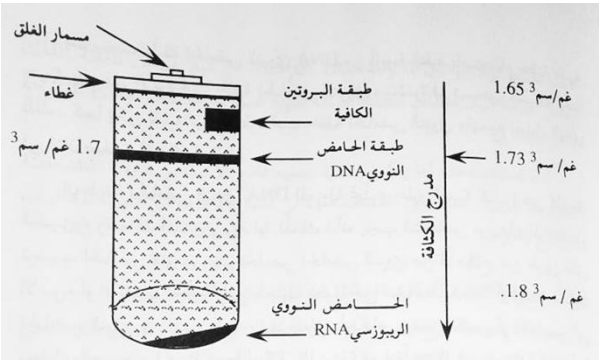


الشكل(1،3،1)

تخطيط لطريقة فصل الحمض النووي بواسطة الفينول والكلوروفورم والإيزوبروبانول

عن محلول الحمض النووي DNA يكون لزجاً في هذه المرحلة(خصوصاً DNA الأحياء حقيقية النوى لضخامته) لذلك يتوجب فصل طبقة الحمض النووي العلوية بواسطة ماصة باستور معقمة وبحذر شديد لأجل عدم سحب طبقة البروتين معها. ينقل سائل الحمض النووي DNA إلى أنبوبة نظيفة ومعقمة ثانية ويضاف حجم مساو من الكلوروفورم: إيزوبروبانول بنسبة 1:24 ويمزج جيداً كما سبق وتفصل طبقة الحمض النووي DNA بواسطة الطرد المركزي. تفصل طبقة الحمض النووي وتنقل إلى أنبوبة ثالثة ويضاف حجم مساو من الكلوروفورم وتعاد عملية المزج مرة ثالثة وكما سبق. يفصل الحمض النووي DNA بعدها بواسطة الطرد المركزي. تنقل طبقة الحمض النووي بعدئذٍ إلى أنبوبة رابعة ويضاف 10 ميكروليتر من محلول ملح الطعام Nacl ذي عيارية 2.5M ويمزج المحلول جيداً ثم يضاف حجمان ونصف من كحول الإيثانول المطلق المثلج(20- مْ) ويمزج المحلول بعد ذلك بهدوء شديد عن طريق التقليب إلى الأسفل والأعلى حيث يظهر الحمض النووي DNA كخيوط بيضاء. تخزن بعد ذلك الأنبوبة بدرجة 20-مْ لمدة ساعتين ثم يطرد المحلول مركزياً بقوة 5000-2000 دورة في الدقيقة لمدة خمس دقائق لأجل ترسيب جميع خيوط الحمض النووي. تزال طبقة الكحول من الأنبوبة ويجفف نموذج الحمض النووي بدرجة حرارة 37مْ ثم يذاب بواسطة 200 ميكروليتر من الماء المقطر المعقم أو محلول TE (0.01MTris.cl,0.5mEDTA.PH7.0) وينقل المحلول إلى أنبوبة صغيرة الحجم ويخزن بدرجة حرارة

20-مْ حتى استخدامه. تؤدي إضافة محلول ملح الطعام إلى زيادة كفاءة الكحول في سحب الماء من الحمض النووي. كما يمكن استخدام كحول الإيزوبروبانول بدلاً من الإيثانول المطلق في ترسيب الحمض النووي ويضاف بنسبة مساوية لحجم المحلول، كما في الشكل(1،1،3).



الشكل(2،1،3)

أنبوبة النتروسيليلوز بعد إجراء الطرد المركزي الفائق مع ملح كلوريد السيزيوم ويلاحظ أن حلقة الحمض النووي DNA تقع في نفس موقع كثافة كلوريد السيزيوم المستخدم

ثانياً: طريقة الطرد المركزي الفائق مع ملح كلوريد السيزيوم:

يعتبر الطرد المركزي الفائق Ultracentrifugation من الطرق الشائعة الاستخدام في فصل الجزيئات العضوية والبايولوجية. يتعرض الجسيم المتحرك أثناء الطرد المركزي في دائرة نصف قطرها r عند سرعة زاوية قدرها W إلى مجال طرد خارجي يساوي W2r، وتساوي القوة الطاردة المركزية Fc على هذا الجسيم حاصل ضرب كتلته m^- في مجال الطرد:

$$Fc = m^- W^2 r = m(1 - V^- P)W^2 r$$

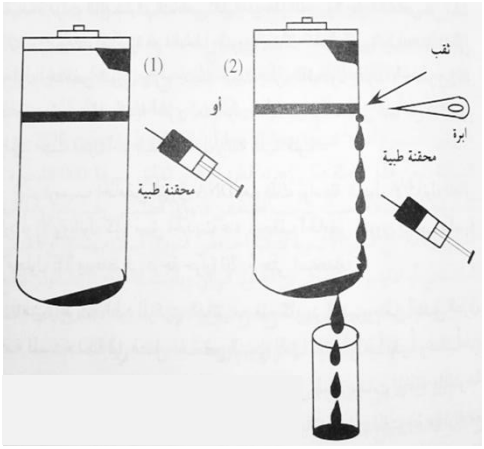
والكتلة m^- أقل من الكتلة m لأن السائل المزاح يبذل قوة معاكسة ويساوي هذا(1-V^-P) حيث أن V^- هي الحجم الجزئي النوعي للجسيم و P هي كثافة المحلول.

ويتحرك الجسيم في هذا المجال بسرعة ثابتة V عندما تساوي Vf=Fc حيث أن f هو معامل احتكاك الجسيم، لذلك فإن سرعة ترسيب هذا الجسيم تساوي:

$$V = \frac{Fc}{f} = \frac{m(1 - V^- P)W^2 r}{f}$$

ويلاحظ من ذلك بأن سرعة الترسيب تتناسب طردياً مع شدة مجال الطرد المركزي، وتأتي أهمية هذه الطريقة في فصل الحمض النووي من أنها توفر مدرج كثافة عن طريق انتشار جزيئات كلوريد السيزيوم بكثافات مختلفة على طول الأنبوبة أثناء عملية الطرد المركزي الفائق. يتم في هذه الطريقة مزج محلول الخلايا المتحطمة مع 5.6M من ملح كلوريد السيزيوم CsCl (لأجل توفي كثافة قدرها $1.7g/cm^3$) حتى ذوبان جميع الملح. وتستخدم لذلك أنبوبة نايتروسليلوز معاملة بمحلول EDTA. يضاف 100 ميكروليتر من الأثيديوم بروماید $10mlg/cm^3$ ويتم التخلص من الهواء المتبقي في الأنبوبة عن طريق إضافة البرافين السائل المعقم. تغلق الأنبوبة جيداً وبصورة محكمة ويراعى التخلص تماماً من جميع

الفقاعات الهوائية مهما كانت صغيرة عن طريق إضافة البرافين بواسطة ماصة باستور والضغط الخفيف على الأنبوبة، وذلك لأن وجود الفقاعات الهوائية سيؤدي إلى تبعثر طبقة الحمض النووي عند إجراء الطرد المركزي لذلك يتوجب التخلص منها نهائياً. تطرد الأنبوبة بعد ذلك مركزياً بصورة فائقة في جهاز الطرد المركزي الفائق السرعة بقوة 48000 في الدقيقة لمدة 48 ساعة. تتحرك أيونات السيزيوم Cs^+ أثناء عملية الطرد المركزي تدريجياً باتجاه القعر وتترافق هذه الحركة مع الانتشار أو الحركة العشوائية للجزيئات مما يعيق الترسيب الكلي لأيونات السيزيوم. وبعد حوالي 48 ساعة فإن عملية ترسب الأيونات وانتشار الجزيئات تتوازن في المحلول ولا تحدث بعد ذلك أية حركة انتقال للأيونات باتجاه القعر



الشكل(3,1،3)

طريقة تجميع نموذج الحمض النووي DNA من أنبوبة النتروسيليلوز بعد إجراء الطرد المركزي الفائق

يؤدي ذلك إلى الحصول على مدرج من تراكيز أيونات السيزيوم ابتداء من القعر الأكثر تركيزاً $1.8g/cm^3$ باتجاه السطح الأقل تركيزاً $1.65g/cm^3$ إن الحمض النووي DNA يتحرك أيضاً باتجاه الأعلى والأسفل تماماً كما تفعل أيونات السيزيوم حتى يستقر عند مستوى معين يتناسب مع كثافته. وحيث أن كثافة الحمض النووي DNA تماثل كثافة أيونات السيزيوم عند تركيز 5.6M والتي تساوي $1.7g\cm^3$ لذلك فإن الحمض النووي يتجمع عند كثافة $1.7g\cm^3$ ويمكن رؤية حلقة الحمض النووي في أنبوبة الطرد المركزي بعد الانتهاء وذلك بتعريض الأنبوبة للأشعة فوق البنفسجية حيث يظهر كطبقة حمراء لامعة بسبب تآصر بروميد الأثيديوم معه. كما يمكن مشاهدة البروتينات كطبقة طافية بينما يترسب الحمض النووي RNA في قعر الأنبوب، كما في الشكل(2،1،3).

يتم سحب طبقة الحمض النووي DNA من أنبوبة الطرد المركزي باستخدام حقنة طبية حيث يتم غرز الإبرة تحت حلقة الحمض النووي مباشرة ثم تسحب الطبقة بعد ذلك. كما يمكن ثقب أنبوبة الطرد تحت حلقة الحمض النووي وتجميع المحلول النازل في قنان صغيرة، كما في الشكل(3،1،3).

إن طبقة الحمض النووي DNA المعزولة تحتوي على كمية كبيرة من كلوريد السيزيوم وكذلك أثيديوم بروماید لذلك فإن يجب التخلص من هذه المواد قبل ترسيب الحمض النووي. يتم تخليص الحمض النووي من الأملاح عن طريق غلق الأنبوبة أو الأنابيب الحاوية على محلوله بطبقة من غشاء شبه نفاذ أو وضع محلول الحمض النووي في كيس شبه نفاذ مغلق بإحكام. يوضع الكيس أو الأنابيب في محلول

ملحي ضعيف مثل محلول TE وتترك النماذج لمدة 24 ساعة بدرجة حرارة 4مْ ويراعى استبدال المحلول ثلاث أو أربع مرات خلال هذه الفترة حيث تخرج أيونات الملح نحو محلول TE بسبب الاختلاف في التركيز وباستبدال محلول TE عدة مرات فإنه سيتم التخلص كلياً من هذا الملح. ولأجل التخلص من مادة الأثيديوم بروماید المتآصرة مع الحمض النووي يضاف كحول البيوتانول Butanol إلى محلول الحمض النووي ويمزج جيداً حيث يتلون الكحول باللون الأحمر وبإزالة الكحول وباستبداله بكمية أخرى لعدة مرات فإنه سيتم التخلص كلياً من الأثيديوم بروماید حيث تكون آخر طبقة للكحول رائقة عديمة اللون. يتم ترسيب الحمض النووي DNA بعد ذلك بواسطة كحول الإيثانول المطلق البارد أو الإيزوبروبانول كما سبق. يجفف الحمض النووي ويذاب بكمية من محلول TE ويحفظ في درجة حرارة -20مْ حتى استخدامه.

تعتبر هذه الطريقة من أفضل الطرق العامة المستخدمة في فصل الحمض النووي لأنها توفر نموذج نقياً وخالياً من الشوائب، وتستخدم هذه الطريقة بشكل واسع في فصل البلازميدات المغلقة والمفتوحة، حيث إن الأثيديوم بروماید يرتبط بكفاءة عالية مع البلازميدات المفتوحة مقارنة مع الارتباط المحدود مع البلازميدات المغلقة ويؤدي ذلك إلى الاختلاف في كثافتيهما حيث تصبح البلازميدات المفتوحة الحلقة أكثر كثافة من البلازميدات المغلقة لذلك تنفصل طبقة البلازميدات المغلقة كطبقة علوية تليها طبقة البلازميدات المفتوحة الأكثر كثافة. كما تستخدم هذه الطريقة في تنقية جميع نماذج الأحماض النووية المستخلصة بالطرق الأخرى. كما يمكن استخدامها في فصل الأحماض النووية للعاثيات والرواشح وغيرها.

▪ الباب الرابع:

نواقل الهندسة الوراثية:[5]

نواقل الهندسة الوراثية vehicles هي جزيئات بيولوجية مؤلفة من الحمض النووي DNA أو الحمض النووي وكمية من البروتينات، تستخدم هذه كوسائط لنقل مورث معين أو أجزاء معينة من الحمض النووي DNA إلى خلايا أخرى لإظهار صفة جديدة فيها. تتميز هذه النواقل بقدرتها على التضاعف داخل الخلايا الجديدة، وكذلك مضاعفة الأجزاء المهندسة فيها كما يمكن الانتقال إلى الأجيال الجديدة من الخلايا. وبالإضافة إلى ذلك فإن هذه النواقل يجب أن تكون مستقرة وغير قابلة للتحلل داخل الخلايا الجديدة أو لها قدرة استيعابية جيدة تمكن الباحثين من هندسة قطع حمض نووي لا بأس بها كما يمكن الحصول عليها واستخلاصها عند الحاجة.

ونظراً لاختلاف أهداف الهندسة الوراثية فقد توفر العديد من هذه النواقل منها البلازميدات والعاثيات والكوزميدات والرواشح وغيرها.

البلازميد	الحجم بالكيلو قاعدة kb	الصفة المظهرية	عدد النسخ	البكتيريا المضيفة
PBR345	0.46	مقاومة الاميسلين	150-100	E.coli
PUC 8	2.75	مقاومة الامبلسين	150-100	E.coli
PAT 153	3.658	مقاومة الامبلسين والتتراسايكلين	150-100	E.coli
PBR 322	4.362	مقاومة الامبلسين والتتراسايكلين	100-50	E.coli
CVg-YIP	5.5	مقاومة الامبلسين والتتراسايكلين	حوالي30	yeast
YRp7	5.7	مقاومة الامبلسين والتتراسايكلين	حوالي30	yeast
PBR 325	5.995	مقاومة الامبلسين والتتراسايكلين والكلورمفينكول	حوالي30	E.coli
2 µ m	6.3	لا يوجد	100-30	yeast
COL E1	6.36	أنتاج الكولسين	15-10	E.coli
RSF 1030	8.48	مقاومه الامبلسين	40-20	?
RSF 2124	11.205	مقاومه الامبلسين	40-20	
PSC101	12.871	مقاومة التتراسايكلين	30-15	E.coli
RP4	54	مقاومة الامبلسين والتتراسايكلين والكنامايسين	5-2	pesudomonas and other
R1	93.885	عدد من المضادات الحياتية	6-3	
F	95	---	2-1	E.coli
Ent P307	98.42	انتاج سموم داخلية	3-1	
TOL	117	--	2-1	Pesudomonas putide
PTi Ach5	213	--	2-1	Agrobacterium tumefaciens

$X^6$10 دالتن 4.2 = 6.36 Kb
$X^6$10 دالتن 62 = 95 Kb

الشكل(4،1،1)

أحجام وعدد نسخ بعض البلازميدات وصفاتها المظهرية

●الفصل الأول: البلازميدات:

هي جزيئات حمض نووي DNA حلقي ذو تضاعف مستقل عن الصبغيات، لذا فهي تمثل وحدة تضاعف مستقلة Replicon. يتراوح حجم البلازميدات بين 0.05-20% من حجم الصبغي(بين 0.1 كيلو قاعدة إلى 250 كيلو قاعدة)، كما في الشكل(4،1،1).

على الرغم من أن البلازميدات مواد وراثية غير ضرورية لنمو وتكاثر الخلايا إلا أنها قادرة على تزويد الخلايا بصفات إضافية في ظروف معينة لاحتوائها على مورثات خاصة بها مثل مورثات مقاومة المضادات الحيوية. يمكن إيجاد هذه البلازميدات في الكثير من البكتريا وبعض الخمائر وتعتبر هذه الأحياء مصدر معظم البلازميدات المستخدمة في الهندسة الوراثية. تتضاعف البلازميدات داخل الخلايا الحية

[5] [5] الوراثة العامة، الفيصل، عبد الجسين مويت 1999، الدار الأهلية للنشر والتوزيع، عمان المملكة الأردنية الهاشمية.
[5] التقنيات المعملية في الهندسة الوراثية، عبد الجسين مويت 1999، الدار الأهلية للنشر والتوزيع، عمان المملكة الأردنية الهاشمية.
مبادئ علم الوراثة، جاردنر، أ.ج وسنستاد، د.ب، 1987، ترجمة الدكتور أحمد شوقي، الدار العربية للنشر والتوزيع.

مستخدمة الأنزيمات الخلوية لذلك إلا أنها تسيطر على عملية تأسيس هذا التضاعف عن طريق مورثاتها الخاصة، فبعض البلازميدات تقوم بالاتحاد مع الحمض النووي DNA الخلوي لأجل التضاعف وتدعى هذه بالإيبوزومات Eposomes وعادة ما تكون هذه البلازميدات صغيرة الحجم بينما تمتلك البلازميدات الكبيرة الحجم أنزيماتها الخاصة بها. ويختلف عدد نسخ البلازميدات من خلية إلى أخرى تبعاً لذلك حيث تمتلك بعض الخلايا أكثر من خمسين نسخة كما هي الحال في البلازميدات PBR322 و PBR345، تدعى مثل هذه البلازميدات بالبلازميدات عالية النسخ High copy number. بينما توجد بعض البلازميدات بهيئة نسخة مفردة أو ثنائية كما هي الحال في البلازميدات كبيرة الحجم مثل البلازميدات TOL و PTiAch5. ويمثل عدد النسخ عدد جزيئات البلازميدات الموجود في الحالة الطبيعية في خلية واحدة. وعلى الرغم من عدم معرفة تفاصيل أسباب زيادة نسخ البلازميدات أو انخفاضها إلا أنه يعتقد من أن قدرة البلازميدات على السيطرة على تأسيس التضاعف تمكنها من زيادة أعدادها، إلا أنه بالإمكان زيادة أعداد البلازميدات داخل الخلايا وخصوصاً من غير الإيبوزومات بإضافة مثبطات إنتاج البروتينات مثل الكلورمفنيكول Chloramphen-icol إلى الوسط الغذائي حيث يتوقف تضاعف الصبغيات بينما يشتد تضاعف البلازميدات. قد تحتوي الخلايا على أكثر من نوع من البلازميدات ولابد لهذه البلازميدات أن تكون متطابقة Compatible حيث يتم فقدان البلازميدات غير المتطابقة تدريجياً من الخلية ولا يعرف سبب ذلك ولكن يعتقد أن تضاعف البلازميدات له دور في ذلك. تعتبر البلازميدات ذات أهمية بيولوجية وطبية وصناعية ذلك لاحتوائها على مورثات ذات أهمية كبيرة في هذه المجالات، ففي مجال علوم الحياة تعتبر البلازميدات من أهم نواقل الهندسة الوراثية وتستخدم في العديد من الأبحاث العلمية التي تستهدف سبر أغوار المادة الوراثية وتهيئة الخرائط الوراثية بالإضافة إلى استخداماتها العديدة في دراسات التطور والتطبيقات العملية لعلوم الحياة. أما في المجال الطبي فإنه يكفي معرفة أن العديد من البلازميدات تحتوي على مورثات مقاومة المضادات الحيوية لتتضح أهميتها الطبية إضافة إلى أن بعضها يقوم بتصنيع بعض البروتينات التي تستخدم في قتل أنواع معينة من البكتريا والسيطرة على أنواع أخرى كما هي الحال في البلازميدات الكولينسية في بكتريا القولون القادرة على إنتاج بروتين الكولسين الذي يقتل البكتريا ذات العلاقات التطورية المتقاربة أو الخلايا الحساسة التي تفتقر إلى هذا البلازميد وكذلك البلازميدات القادرة على إنتاج بروتين الفبريوسين Vibricin الذي يقتل بكتريا

الكوليرا. كما تعتبر المكورات المسبحية Streptococcus lactis من أفضل الأمثلة على الأهمية الصناعية والتي تحتوي بلازميدات قادرة على إنتاج أنزيمات ذات أهمية كبيرة في صناعة الأجبان والتخمر.

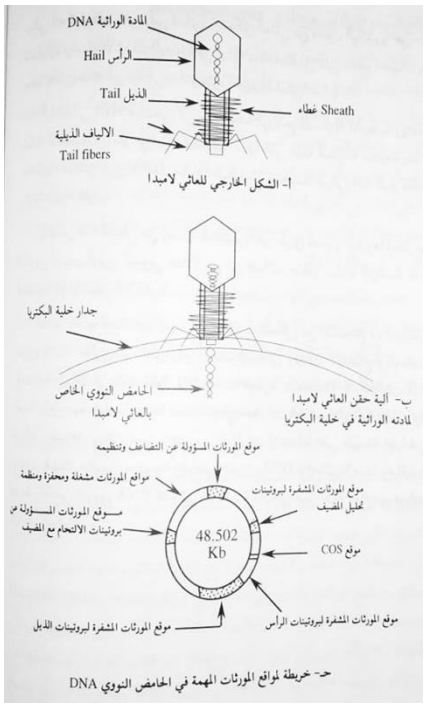
البلازميدات كنواقل في الهندسة الوراثية:

نتيجة إلى التطور الهائل في تقنيات الوراثة الجزيئية والكيمياء الحيوية والهندسة الوراثية فقد أمكن الحصول على أعداد متنوعة من البلازميدات المحورة من البلازميدات الطبيعية وجعلها ملائمة أكثر كنواقل للهندسة الوراثية. إذ يتم إزالة الأجزاء غير الرغوب فيها في البلازميد الطبيعي عن طريق تقطيع البلازميد بالأنزيمات القاطعة Restriction enzymes ثم عزل القطع المرغوب فيها عن طريق الهجرة الكهربائية خلال هلام Gel electroghoresis واستخلاصها وربطها مع بعضها بواسطة الأنزيمات اللاحمة Ligases مع إضافة أجزاء بلازميدية أخرى أو عدمها لتهيئة بلازميد جديد ذي مواصفات أجود وأكثر كفاءة. لقد تم باستخدام هذه التقنيات بناء العديد من البلازميدات المختبرية التي أدت إلى تطور هائل ومتنوع في قدرات الهندسة الوراثية، إلا أنه في كل الأحوال فإن القدرة الاستيعابية للبلازميدات تظل محدودة ولا تزيد عن 10-5 كيلو قاعدة من القطع الجديدة.

- ***الفصل الثاني: العاثيات Bacteriophages:***

تعتبر العاثيات أحياء مستقلة ذات معيشة تطفلية إجبارية كما تحاط بأغلفة بروتينية يستقر بداخلها الحمض النووي DNA، كما تختلف العاثيات في كونها لا تستقر داخل خلايا العائل بل تغادره حال انتهاء التضاعف وقد تترك جزءاً من ذريتها لاستمرار التضاعف كما هي الحال في العاثي M13 إلا أنها جميعها تغادر الخلايا المصابة في حين البلازميد يحافظ على استقراره داخل الخلايا وحتى إن ازداد عدد نسخه ولا يغادر إلا في حالة الاقتران.

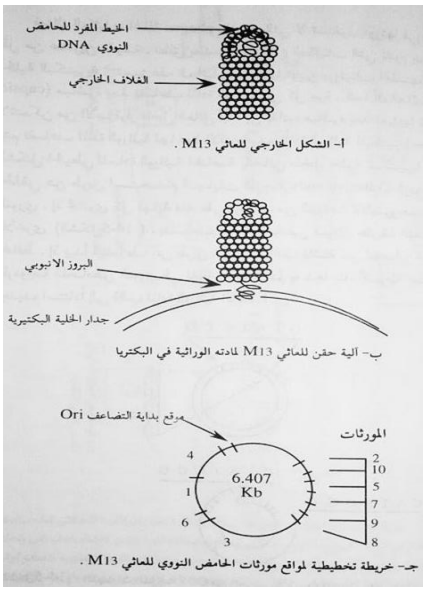
تفضل العاثيات في الهندسة الوراثية لأنها تتمكن من استيعاب 25-15 كيلو قاعدة وهو أكثر قدرة من ثلاث إلى أربع مرات من قدرة استيعاب البلازميد دون أضرار. كما تفضل العاثيات العاثيات لتوفر الحمض النووي الخاص بها وكذلك بروتيناتها بشكل منفصل ويمكن تخليق العاثي مخبرياً من خلال مزج الحمض النووي مع البروتين بطريقة تدعى بالتعبئة الحياتية In vitor packaging. وعلى الرغم من أن هناك حرية



الشكل(4،2،1)

تخطيط للعاثي لامبدا وأهم المورثات الموجودة في مادته الوراثية

أقل في تحوير الحمض النووي للعاثيات مقارنة بالبلازميدات وذلك لوجود العديد من المورثات الضرورية للتضاعف والتي لا يمكن إزالتها إلا أن كفاءة الهندسة الوراثية باستخدام العاثيات تبقى عالية حيث يمكن الحصول على كمية كبيرة من العاثيات الهجينة(المهندسة وراثياً) من الميكروغرام الواحد من الحمض النووي مقارنة مع كفاءة البلازميدات. تعتبر البلازميدات إحدى مجاميع الرواشح وتنتمي إلى مجموعتي الرواشح المعقدة والمتحلزنة Complex and Helical viruses، فالعاثي لامبدا λ ينتمي إلى مجموعة الرواشح المعقدة، إذ يتألف من رأس عديد الأضلاع وذيل وملحقات أخرى تتألف جميعها من وحدات بروتينية خاصة ويستقر الحمض النووي DNA الذي يبلغ حجمه حوالي 49 كيلو قاعدة في رأس العاثي، يتمكن العاثي من دخول البكتريا عن طريق استقراره بواسطة الأشواك الموجودة في نهاية منطقة الذيل على سطح الخلية، ويقوم بعدها بحقن مادته الوراثية إلى سيتوبلازما الخلية، كما في الشكل(1،2،4).



الشكل(2،2،4)

تخطيط للعاثي M13 وخريطته الوراثية

أما العاثي M13 فينتمي إلى مجموعة الرواشح المتحلزنة الخيطية ويتصف بشكله العصوي وتتميز بروتيناته الغلافية بأنها على هيئة اسطوانة مجوفة يستقر بداخلها حمض نووي DNA مفرد الخيط يبلغ حجمه حوالي 6.4 كيلو قاعدة ويترتب بهيئة اللولب. يتمكن هذا العاثي من إصابة البكتريا عن طريق تحفيز جدارها الخارجي لتموين أنبوب أوبروز أنبوبي Pilus يتم من خلاله حقن مادته الوراثية نحو السيتوبلازما، كما في الشكل(2،2،4).

تعتبر العاثيات إيبوزومات حيث تتمكن من الالتحام مع الحمض النووي DNA الخلوي للبكتريا نظراً لاحتوائها على ترددات الاندماج أو العناصر الانتقالية. العاثيات ذات أهمية بيولوجية خاصة عندما تستخدم في مجالات الهندسة الوراثية وبناء بنوك المورثات وغيرها، ويمكن تمييز نوعين من العاثيات بالاعتماد على طبيعة الحمض النووي فهناك عاثيات مزدوجة الحمض النووي DNA كالعاثي لامبدا λ وعاثيات مفردة الحمض النووي كالعاثي M13.

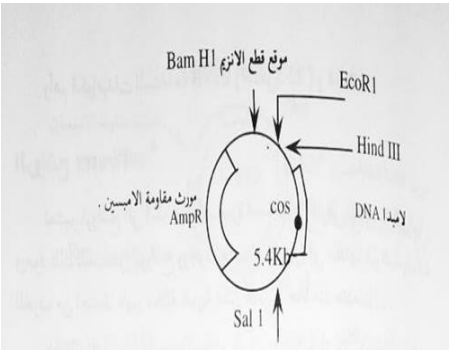
العاثيات كنواقل في الهندسة الوراثية:

تعتبر العاثيات من النواقل المناسبة للهندسة الوراثية لسهولة التعامل معها وسرعة تضاعفها واحتوائها على مواقع مفردة للعديد من الأنزيمات القاطعة، إضافة إلى سهولة ترتيبها واستخلاصها، وتتقارب في مميزاتها هذه من مميزات البلازميدات. ويعتبر العاثي لامبدا من أهم العاثيات المستخدمة في الهندسة

الوراثية، وتكمن أهميته ليس بصورته بل بالمشتقات العديدة له. بينما يعتبر العاثي M13 من أهم الواقل المستخدمة في قراءة ترددات الأحماض النووية DNA، هذا بالإضافة إلى معرفة كامل خرائطهما الوراثية.

- ***الفصل الثالث: الكوزميدات:***

هي هجن تجمع جزيئة حمض نووي عاثٍ وأخرى بلازميدية، تم تصميم الكوزميدات اعتماداً على حقيقة أن أنزيم تعبئة الحمض النووي العاثي في جزيئة البروتين لا يحتاج سوى إلى المواقع اللزجة التي يرمز لها Cos للعمل، لهذا فإن عملية التعبئة المخبرية يمكن أن تحصل لأية قطعة الحمض النووي تحمل المواقع اللزجة والتي يفصل بينها 52-37 كيلو قاعدة، لهذا فإن الكوزميدات هي بالحقيقة

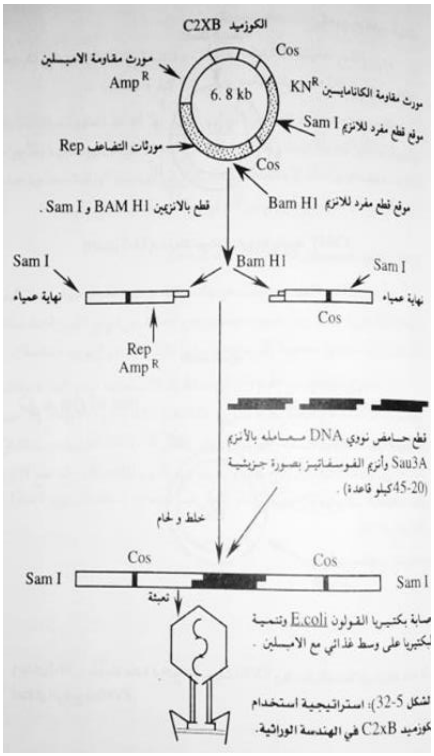


الشكل(1،3،4)

الكوزميد PJB8

بلازميدات تحتوي على مواقع لزجة، كما في الشكل(1،3،4). هذا بالإضافة إلى أهمية إلى ضرورة وجود موقع مورث انتقائي مثل مورث مقاومة الأمبسلين وموقع أصل التضاعف، ونظراً لافتقاد الكوزميد لمورثات العاثي الأخرى فإنه لا ينتج التبقعات Plaques التي تتميز بها عاثيات لامبدا بل ينمو كبلازميد داخل خلايا المضيف.

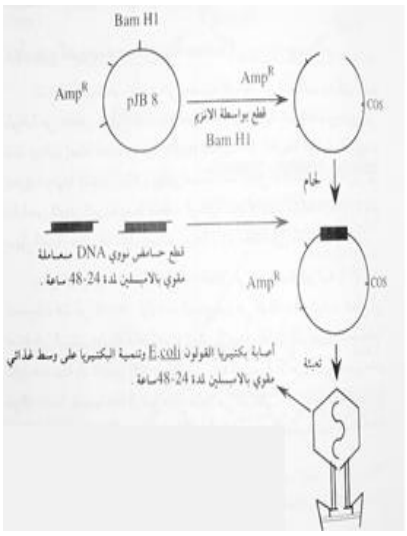
يتم استخدام الكوزميدات في الهندسة الوراثية عن طريق فتح موقع أنزيم القطع وغرس قطع الحمض النووي الغريبة بينها، وعادة ما يتم إنتاج قطع الحمض النووي المراد هندستها في الكوزميدات عن طريق الهضم الجزئي للحمض النووي بواسطة أنزيم قاطع معين، إذ أن الهضم الكلي يؤدي إلى إنتاج قطع حمض نووي صغيرة الحجم لا تصلح للهندسة في الكوزميدات، وبعد ذلك تعبأ هذه في البروتين لإنتاج عاثيات تستخدم لإصابة البكتريا التي تنمى بعد ذلك على وسط انتقائي حاوية على الأمبلسين. إن جميع المستعمرات النامية تكون حاوية على الكوزميدات الهجينة حيث لا تتمكن الكوزميدات غير الهجينة أصلاً من التعبئة، كما في الشكل(2،3،4). تصل كفاءة الهندسة الوراثية في الكوزميدات إلى أعلى ما يمكن فهي تستوعب قطعاً من الحمض النووي DNA يبلغ حجمها أكثر من 40 كيلو قاعدة. وهو أكثر بكثير مما تستوعبه البلازميدات أو العاثيات. تعود هذه الكفاءة العالية إلى الحجم الصغير



الشكل(2،3،4)

استراتيجية استخدام الكوزميد في الهندسة الوراثية

للكوزميدات وهو ما جعلها أفضل النواقل المستخدمة في بناء بنوك المورثات Gene Banks وأهم الكوزميدات المستخدمة C2XBالشكل(3،3،4)PJB8 .



الشكل(3،3،4)

استراتيجية استخدام كوزميد C2XB في الهندسة

▪ الباب الخامس:

تقنيات أخرى مستخدمة في الهندسة الوراثية:[6]

المكتبة الوراثية:

تبدأ تقنية الهندسة الوراثية في مرحلتها الأولى بتهيئة ما يسمى بالمكتبة الوراثية Gene Library أو بنك المورثات Genes Bank، ويهدف بناء هذه المكتبة إلى تمثيل جميع أو معظم المجين الذي يمثل المادة الوراثية لكائن معين على هيئة قطع حمض نووي DNA مهندسة بناقل معين. يتم فيما بعد استخدامها لعزل مورث أو مجموعة مورثات تخدم أهداف الهندسة الوراثية.

المجسات الموسمة:

تعتبر المجسات Probes إحدى التقنيات الرائعة التي ساهمت في كشف العديد من التفاعلات التي تجري في الخلايا الحية، تقوم هذه التقنية على استبدال عنصر معين مثل الهيدروجين أو الكربون أو النتروجين أو الفوسفور وغيرها بعناصر نظيرة ذات نشاط إشعاعي، وتهدف هذه التقنية إلى تتبع أثر النشاط الإشعاعي أو الضوئي للنظائر والمواد المستخدمة ومعرفة حركة المركبات والتفاعلات الأنزيمية والنواتج التفاعلية وغير ذلك الكثير. تستخدم هذه التقنية في الحقل الطبي في تشخيص بعض الأمراض مثل قصور الغدة الدرقية والأورام السرطانية، أما في الهندسة الوراثية فقد استخدمت لأجل التعرف على آلية تضاعف الحمض النووي DNA من خلال النظائر المشعة للكبريت S^{35} والفوسفور P^{32}، وقد أثبتت التجارب أن الحمض النووي DNA يسلك سلوكاً شبه محافظ في التضاعف، واعتبرت هذه التجارب إثباتاً واضحاً لنظرية الحلزون المزدوج، كما استخدمت المجسات في عام 1958لإثبات التضاعف شبه المحافظ للحمض النووي DNA في البكتريا والأحياء الراقية والرواشح، بعد ذلك تم تطوير استخدام هذه التقنية للحصول على قطع حمض نووي ومورثات موسمة وقد ساهم هذا التطوير في تقدم علو الوراثة قدماً للأمام.

[66] التقنيات المعملية في الهندسة الوراثية، عبد الجسين مويت 1999، الدار الأهلية للنشر والتوزيع، عمان المملكة الأردنية الهاشمية.

عزل المورثات:

إن استخلاص الحمض النووي DNA من خلايا معينة وتقطيعه بالأنزيمات القاطعة وهندسة القطع الناتجة بنواقل معينة لا تستهدف سوى الحصول على قطعة حمض نووي صغيرة تمثل مورثاً معيناً مطلوباً لأجل تطبيقات الهندسة الوراثية.

عزل المورثات بالانتخاب المباشر: هي طريقة يتم فيها هندسة قطع الحمض النووي DNA لكائن معين في جزيئات ناقل معين بحيث تتوفر بعد الانتهاء من عمليات الهندسة جزيئات معينة من الناقل تحمل المورث المطلوب عزله. ويمكن تمييز النواقل الهجينة ذات المورث المطلوب بعد تنمية مضائف الناقل على وسط غذائي انتخابي بحيث لا تنمو عليه الخلايا التي تحتوي النواقل الهجينة مع المورث المطلوب. يتم بعد ذلك عزل المستعمرة المطلوبة وتكثيرها ثم يستخلص الناقل منها ويتم عزل المورث المطلوب بعد تقطيع الناقل بأنزيم قاطع مناسب.

▪ الباب السادس:

تطبيقات الهندسة الوراثية:

●الفصل الأول: الهندسة الوراثية والبيوتكنولوجي(التقنية الحياتية):

تعتبر تقنيات الهندسة الوراثية ثورة حقيقية منذ بزوغها، وإلى الآن نستطيع أن نجد آثار هذه الثورة واضحة في حقول المعرفة الأخرى المختلفة حتى أصبح الآن وجود ترابط كبير بين هذه التقنيات والصناعة والزراعة بحيث أدى ذلك إلى ظهور التقنية الحياتية أو البيوتكنولوجي وهي علم قائم من ترابط الأحياء المجهرية والوراثة والكيمياء والهندسة الكيميائية وهندسة الإنتاج، ولكل من هذه الفروع دور حيوي جزئي في هذه التقنية.

الاستراتيجية العامة لإنتاج الأكتينورودين:[7]

هو عبارة عن مضاد حيوي تفرزه طبيعياً أعفان مسبحية تدعى Streptomyces coelicolor وذلك عن طريق سلسلة من تفاعلات كيميائية تحكمها سبعة مورثات تقع جميعها بصورة متجاورة على صبغي واحد. إن قطعة الحمض النووي DNAالتي تحوي المورثات السبعة المطلوبة يمكن ربطها إلى ناقل مناسب

[7] المضادات الجيوية، المفتي، محمد محمد، 1985، منشورات الهيئة القومية للبحث العلمي، الجماهيرية الليبية العظمى

ونقلها إلى مسبحيات S.coelicolor ذات طفرة وراثية لا تسمح لها بإنتاج المضاد الحيوي. تنمى البكتريا المتحولة في وسط غذائي سائل مناسب تحت ظروف مناسبة لإنتاج المضاد الحيوي.

استخدام الحيوانات النقيلة للأغراض العلاجية وزراعة الأعضاء:

يمكن الاستفادة من الحيوانات النقيلة للأغراض العلاجية بطرق مختلفة، ومن أهمها هو إنتاج عوامل تخثر الدم VIIوVIII وغيرها الضرورية لمعالجة حالة الهيموفيليا المرتبطة بفقدان هذه العوامل. فمثلاً يمكن استخلاص هذه العوامل من الحليب المنتج من الشياه النقيلة بالمورثات المشفرة لهذه العوامل والمرتبطة مع محفز المورث المشفر لبروتين بيتا لاكتوجلوبيلين والذي يتم التعبير عنه في الخلايا الفارزة للحليب. كما تم إنشاء سلالات حيوانات نقيلة يأمل منها العلماء الحصول على أعضاء وأنسجة يمكن استخدامها في زراعة الأعضاء بدلاً من الأعضاء البشرية المعطوبة وغير الفعالة، فمثلاً تم الحصول على خنازير نقيلة قامت بالتعبير عن البروتينات البشرية المسؤولة عن الرفض المناعي في أسطح خلايا أنسجتها وأعضائها بحيث أصبحت هذه الأعضاء من الناحية النظرية والعلمية ممكنة الاستخدام في زراعة الأعضاء في البشر دون الخوف من رفضها، وينتظر العلماء حالياً التجارب النهائية للبت النهائي في أهميته.

▪ الخاتمة والنتائج:

لقد فتحت الهندسة الوراثية الأبواب على مصراعيها في مجال تكوين كائنات جديدة عملها الرئيسي هو خدمة الإنسان، وقد رافق تطور هذا العلم الكثير من النقاش وأثيرت الشكوك حول إمكانية هروب بكتريا أو فيروس مميت من المختبر بعد تكوينه، مما يؤدي إلى انتشار وباء لا يعرف الإنسان كيفية القضاء عليه، وبالرغم من كل ذلك فإن البحوث مستمرة وتتطور بصورة تصاعدية، والسبب هو أن بعد سنوات بدأت الهندسة الوراثية بإزاحة الستار عن أسرار الحياة الهائلة وعن الطبيعة الكيميائية للمورثات والجوهر البيولوجي لوحدة الحياة والنمو الخلوي، كما أن تطور الطرق الفعالة للسيطرة على عمل المورثات سيؤدي بلا شك إلى إيجاد أساليب جديدة للتغلب على مختلف المشاكل الزراعية والطبية، فهناك محاولات عديدة لإنجاح تطبيقات الهندسة الوراثية على النباتات فعلى سبيل المثال عزل مورثات جهاز ناف من بكتريا عقد البقوليات (الرايزوبيون) والتي تستخدم لأجل تثبيت النتروجين الجوي عن طريق تصنيع الجلوتامين وتمريره إلى النبات، وتستهدف هذه المحاولة نقل المورثات إلى النباتات الأخرى لاستخدام النتروجين الجوي كسماد طبيعي، كما أن هناك محاولات أخرى تستهدف الحصول على محاصيل زراعية ذات بروتينات حيوانية وغير ذلك. [8] ويظهر أن الخطر الوحيد من الهندسة الوراثية هو إمكانية استخدامها عسكرياً لإنتاج مختلف الأسلحة الجرثومية الفتاكة، فالكثير من مما يستخدم لتقدم البشرية وتوطيد الرخاء والسلام يمكن استخدامه بشكل آخر لفناء البشرية.

[8] الهندسة الوراثية تقنية حديدة أم خطر كوني،عماش، هدى صالح مهدي، 1987، سلسلة كتب الثقافة العلمية، وزارة الثقافة والإعلام، بغداد.

المراجع:

- أحمد, ا. م. (1990). "علم الوراثة(دار المطبوعات الجديدة)."
- المهدي, ع. ه. ص. (1987). "الهندسة الوراثية تقنية جديدة أم خطر كوني(سلسلة كتب الثقافة العلمية)."
- شوقي, ج. أ. ج. و. ت. د. أ. (1987). "مبادئ علم الوراثة(الدار العربية للنشر والتوزيع)."
- مويت, ا. ع. ا. (1999). "التقنيات المعملية في الهندسة الوراثية(الدار الأهلية للنشر والتوزيع)."
- مويت, ا. ع. ا. (1999). "الوراثة العامة(الدار الأهلية للنشر والتوزيع)."