بسم الله الرحمن الرحيم

تقنات حياتية Biotechnology **محاضرة (1) الاحد/2012/10/21**

Genetic Engineering :- the technique of removing ,modifying or adding genes to a DNA molecule in order to change the information it contains by changing this information ,genetic engineering change the type or amount of proteins an organism is capable of producing.

هي تقنية ازالة او تغير او اضافة جينات جديدة الى جزيئة ال DNA بهدف تغير المعلومات الوراثية التي تحويها وبتغير هذه المعلومات فانه يؤدي الى تغير كمية اونوعية البروتينات التي ينتجها الكائن الحي.

Recombinant DNA [rDNA] technology :- the laboratory manipulation of DNA in which DNA or fragments from different of DNA sources and cut and recombined by using enzymes .This rDNA is then inserted in to a living organism rDNA technology is usually synonymous the genetic engineering .

تقنية اعادة ترقيع اوتوليف او تهجين ال DNA:- هي عمليات التلاعب المختبري بجزيئة الDNA من مختلف المصادر وربطها بواسطة الانزيمات الرابطة .....

Application of rDNA :-

1.Biomedical application

2.Agriculltural application

3.Basic biological application

4.Industrial application

Biotechnology

Broad definition:-

The use of living organisms to solve problems and make useful products .

التعريف القديم او العام:- هو استخدام الكائنات الحية لحل المشاكل وانتاج كائنات مفيدة .

Dr. Muayed F. Abbas Basrah University

Modern definition:-

Biotechnology is a collection of technologies that use living cells and or biological molecules to solve problems and make useful products .

التعريف الحديث :- هو عبارة عن مجموعة التقنيات التي تستخدم الخلايا الحية او الجزيئات البايلوجية لحل المشاكل والحصول على منتجات مفيدة . الجزيئات العملاقة (Biological molecules) مثل DNA ,RNA ,Proteins .

ويوضح المخطط الاتي العلاقة بين العلوم المختلفة التي يعتمد عليها علم التقانات الحياتية والتطبيقات المستخدمة Fig(1-2) .

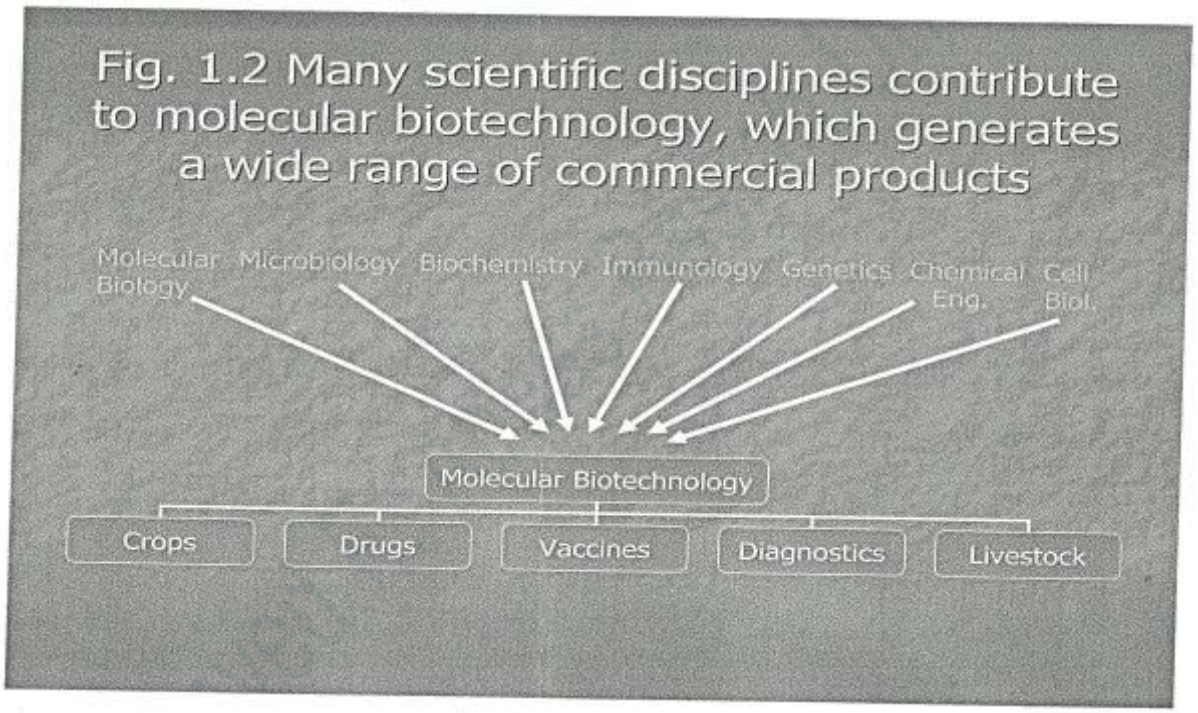


Fig. 1.2 Many scientific disciplines contribute to molecular biotechnology, which generates a wide range of commercial products

ان علم التقنات الحياتية هو من العلوم التي يؤمل ان تكون لها تطبيقات تؤدي الى احداث ثورة Revolution في كل نواحي الحياة ففي مجال صحة الانسان فان التقانات الاحيائية سوف تجلب لنا او توفر طرق جديدة في تشخيص ومعالجة ومنع الامراض وفي مجال العلوم الزراعية فان كل شئ ابتدا بالبذرة التي توضع في التربة الى الغذاء الذي نتناوله سوف يتاثر بهذا العلم وحتى في المجال البيئي فان علم التقانات الاحيائية يعمل على تزويدنا بطرق نظيفة لتنقية البيئة والتخلص من الملوثات البيئية بطرق اكثر امانا ان علم التقانات الاحيائية يستخدم العديد من الوسائل التي تستخدم في مجال العلوم الزراعية وهذه الوسائل التي تستخدم في مجال العلوم الزراعية وهذه الوسائل تقع ضمن مايسمى بالتقانات الاحيائية نذكر مايلي :-

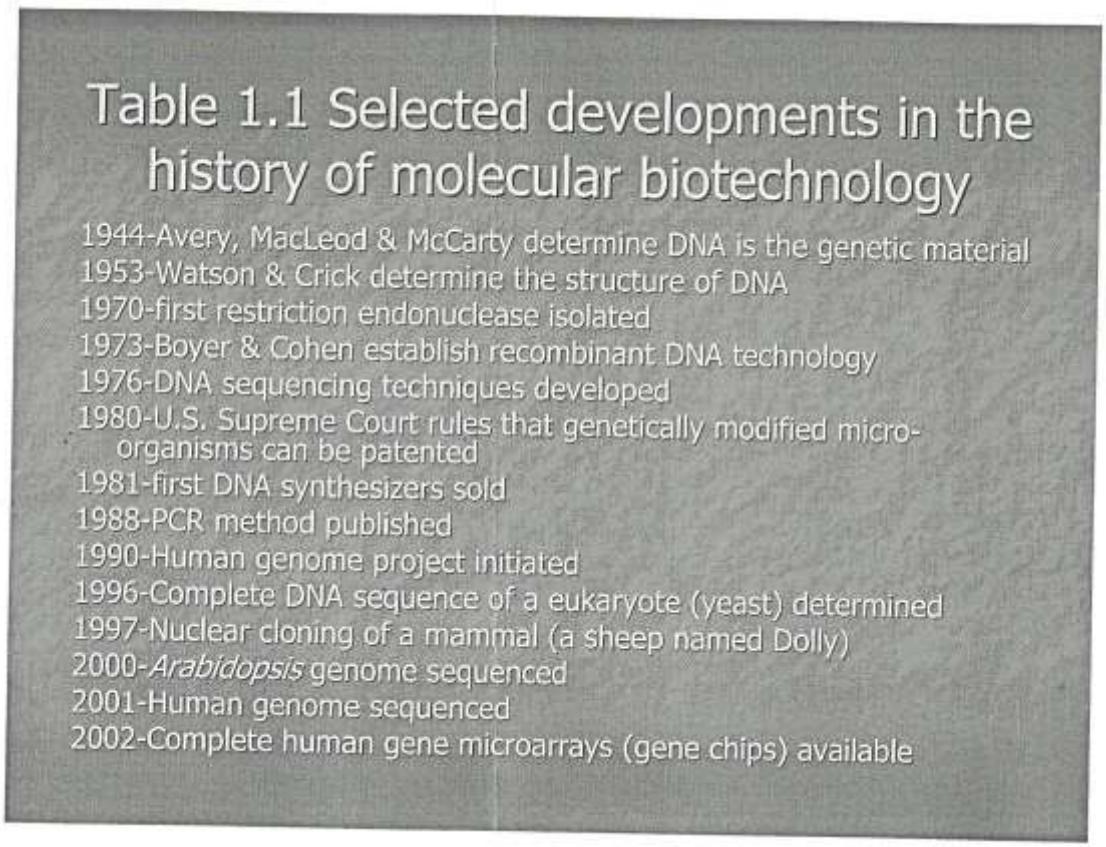
Techniques used in plant biotechnology

1.plant cell and tissue culture

2.plant genetic engineering

3.anti-sense RNA technology

وفيما يلي عرض يوضح التطور التاريخي لعلم التقانات الاحيائية :-



مقارنة بين هندسة النبات الوراثية وتربية النبات التقليدية :-

Table shows comparison between G.E and selective breeding

Parameter	**S.B.**	**G.E.**
1.level	Whole organism	Cell or molecule
2.Precision	Set of genes	Single gene
3.certainity	Genetic change poorly characterized	Genes well characterized
4.Taxonomic limitation	Usable only within and between species	None

وكما ذكرنا سابقا فان اول وسيلة في تقنية النبات الحياتية هي زراعة الخلايا والانسجة النباتية وهذه الخاصية الفريدة Unique تمتاز بها الخلايا النباتية دون الخلايا الحيوانية والتي يطلق عليها اصطلاح القدرة الكامنة الخلوية Totipotency والتي تعني بان الخلية النباتية تحتوي على كافة المعلومات الوراثية الازمة لتكوين كائن حي ولكن هذه الظاهرة غير موجودة في الخلايا الحيوانية الا ان هناك بعض التقارير العلمية التي اشارت الى الحصول على مثانة بشرية عن طريق زراعة خلايا المثانة خارج الجسم الحي Bladder cells ولكن يجب الاشارة هنا الى ان المثانة البشرية عبارة عن نسيج عضلي بسيط جدا ومعظم المحاولات التي اجريت على الاعظاء التي هي على درجة عالية من التخصص كانت غير ناجحة .

ان عملية هندسة النبات وراثيا تتم على المستوى الخلوي وعند هندسة خلية بحيث تحتوي على جينات مقاومة للحشرات مثلا فان من الضروري ان تتحول الخلية الى نبات كامل لكي تصبح مفيدة للمزارعين ويتم تحقيق ذلك عن طريق عملية اخلاف Regeneration ويتم تحقيق ذلك عن طريق زراعة الخلايا والانسجة النباتية اما التقنية الثانية هي عملية ترقيع الDNA او هندسة النبات الوراثية فانها تؤدي الى حصول تغيرات جديدة وذلك عن طريق استخدام تقنيات جزيئية دقيقة نتمكن بواسطتها من دمج او ربط قطع من جزيئات ال DNA ويتم تقطيع الDNA باستخدام الانزيمات القاطعة اما الدمج فيستخدم الانزيمات الرابطة والتي سوف نتطرق لها لاحقا ولغرض نقل الDNA الهجين المرقع والمؤلف الى الكائن الحي المستهدف فنحن نستخدم البكتريا والفيروسات التي تقوم بنقل ال DNA تحت الظروف الطبيعة اما الطريقة الثالثة ففي تقنية عدم التحسس للRNA Anti-Sense RNA Technology تعتبر طريقة فعالة وذلك لمنع عملية التعبير الجيني Gene expression (منع انتاج البروتين).

بسم الله الرحمن الرحيم

محاضرة (2) الثلاثاء 2012/11/6

تقنية عدم التحسس Anti-sensel RNA Technology

تقنية عدم التحسس أي تقنية عدم انتاج ناتج جيني وهي البروتينات .وهي طريقة فعالة لمنع عملية التعبير الجيني .

هذه التقنية تتضمن ادخال RNAالذي هو مكمل Complementary للجين المستهدف داخل الخلية وعادة يحدث تكامل قاعدي مع القواعد النيوكليوتيدية (قاعدة + سكر + مجموعة فوسفات) الموجودة في الRNA الموجود بالخلية وبذلك تتم عملية منع الترجمة اوقراءة رسالة الRNA الرسول ولايتم تكوين بروتين .ان الميكانيكية التي يتم فيها عملية التعبير الجيني بواسطة جزيئة RNA عديمة التحسس غير معروفة بالظبط ولكن يعتقد بحدوث عملية تهجين hybridization او تكامل بين جزيئتي الRNA الطبيعية وجزيئة

Dr. Muayed F. Abbas Basrah University

الRNA عديمة التحسس وهذا التهجين عادة قد يمنع مرور الRNA الرسول الاعتيادي الى السايتوبلازم او يمنع من ترجمة اوقراءة رسالة الRNA الرسول .

هناك ثلاث طرق يتم بواسطتها ادخال جزيئة Antisense RNA الى الخلية وهذه الطرق هي :-

الطريقة الاولى :-

في هذه الطريقة تتم عملية بناء الRNA عديمة التحسس خارج الجسم الحي *in vitro* باستخدام الانزيمات التي تم الحصول عليها من بعض الفايروسات وهو انزيم ال RNA polymerase (poly وتعني متعدد و mer تعني وحدة ال RNA)ثم يتم اجراء عملية حقن دقيق والتي تسمى micro induction لهذا ال RNA عديم التحسس الى داخل الخلية .

الطريقة الثانية :-

تتضمن هذه الطريقة بناء هيكل جيني Gene construst لجزيئة RNA والتي يتم ادخالها الى داخل الخلية. وفي هذه الحالة فان الخلايا تجرى لها عملية تحويل Transformation وهي عملية اضافة RNA او DNA غريب باستخدام البلازميدات الناقلة Plasmid vector (حلقة دائرية من ال DNA) ويتم الحصول عليه من البكتريا (البكتريا الزراعية Agrobucterioum) الاسم العلمي لها Tumefocens وهيئتها الجينية .يستطيع ان يعبر عن نفسه (يكون بروتين) اذا ما نقل من البكتريا الى خلية اخرى ويسمى بال DNA الخارجي Extanuclear DNA .لاجراء عملية التحويل والتي تجعل الخلية محتوية على الجين الجديد فان هذا الجين سوف يوضع بحيث يكون ترتيبه معاكس الى ترتيب القواعد النتروجينية الموجودة في الجين الاصلي الموجود في الخلية والنتيجة فان ال RNA الناتج من هذا الجين سوف يتكامل قاعديا مع الRNA الطبيعي الاصلي ويصبح مكمل له كما هو موضح بالشكل وبذلك تتوقف عملية بناء البروتين (ورقة استنساخ).

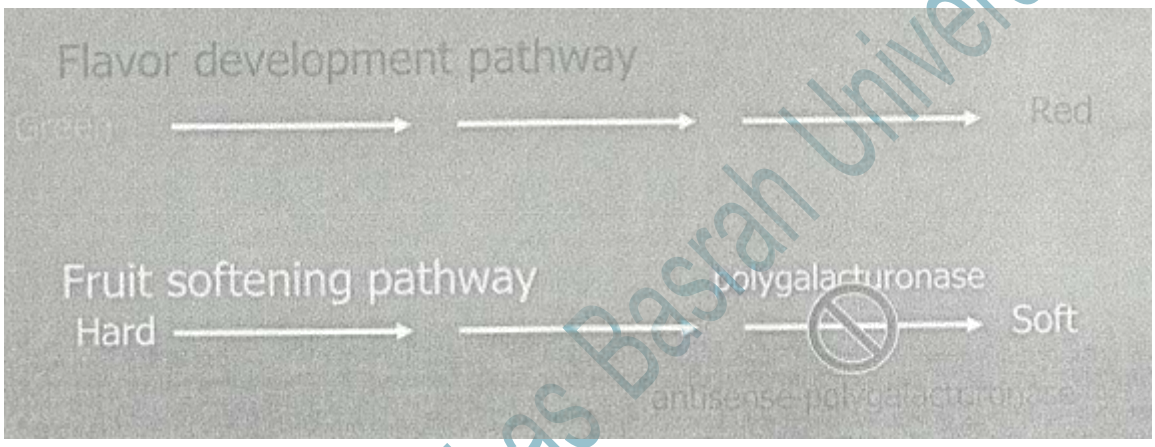
الطريقة الثالثة :-

هذه الطريقة تتضمن ادخال قطع من ال DNA احادي الشريط – short segments of single standerd DNA وهذه القطع الصغيرة عديدة النيوكليوتيد سوف تكون مكملة الى المنطقة التي تكون فيها عملية الترجمة وبذلك تتكامل قاعديا مع جزيئة mRNA الطبيعية وتمنع حدوث عملية الترجمة translation وهذه العملية تتم في السايتوسول CYTOSOL وهذه الطريقة ايضا بالامكان تحقيقها وذلك عن طريق اضافة تراكيز عالية من هذا ال DNA احادي الشريط الى معلق من الخلايا النباتية suspension cell culture في وسط الزراعة او احيانا تحدث عملية تحويل كيميائي chemical modification لقطع الDNA وذلك لتسهيل عملية امتصاصه والمحافظة على صفاته عند دخوله الخلية.

وقد استخدمت هذه التقنية (عدم التحسس) في نواحي عديدة من هذه النواحي مثلا :-

Dr. Muayed F. Abbas Basrah University

التلاعب في لون الازهار في بعض النباتات مثل البيتونيا Petunia حيث تم ايقاف انتاج الانزيم المسؤول عن عملية بناء المركبات الكيميائية المسؤولة عن تكوين طبقة الانثوسيانين . كما استخدمت هذه التق نية ايضا للتاثير في نوعية الثمار على سبيل المثال ثمار الطماطة حيث تم ايقاف نشاط انزيم ال polycalactourinase يؤثر على المركبات البكتينية يحولها من غير ذائبة ال pectin محافظ على صلابة الثمار وهو المسؤول عن فقدان الصلابة في الثمار اثناء النضج وفي الطماطة على سبيل المثال تم ايقاف انتاج او انتاج كميات قليلة منه اقل من الكميات العادية وهذه العملية ادت الى احتفاظ الثمار بصلابتها لفترة طويلة .



كما استخدمت هذه الطريقة ايضا في التقليل من انتاج غاز الاثلين (هرمون النضج) حيث كما هو معروف ان انتاج هذا الهرمون في الثمار الكلايمكترية .

يعمل على تنشيط الجينات المسؤولة عن حدوث عملية النضج وقد تم ايقاف انتاج غاز الاثلين وذلك عن طريق ايقاف انتاج الانزيم الرئيسي المسؤول عن تكوين هذا الهرمون النباتي والثمار الناتجة احتفظت بحالتها الطازجة مدة 50 يوم وهذه الثمار تسمى flavor –sarr .

واستخدمت هذه التقنية في زيادة التحمل الملحي لبعض النباتات حيث تم ايقاف انتاج بعض الروتينات المسؤولة عن نقل ايون الصوديوم الى داخل الخلايا النباتية .

سؤال مهم :-

لماذا نقوم بهندسة النبات وراثيا؟ Why genetically engineer plants ?

1-to improve the agricultural ,horticultural or ormantenl value of acrop plant

لتحسين القيمة الزراعية والبستنية او التزينية لمحصول النباتات الزراعية .

2-to server as aliving bioreactor for the production of economically important proteins or metabolites.

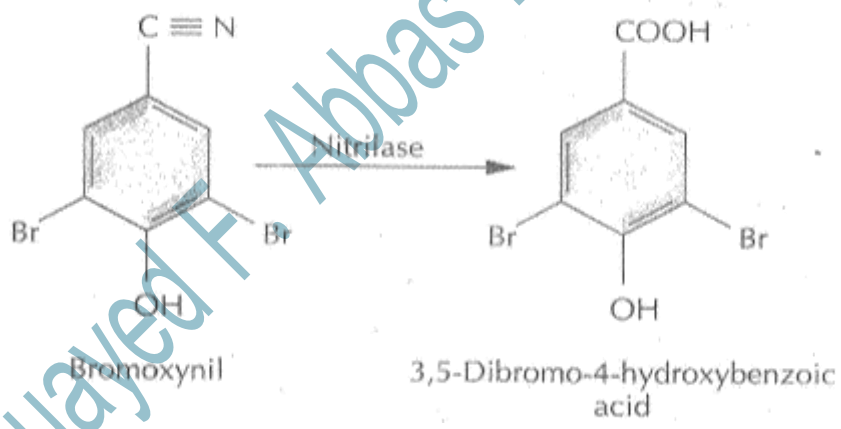
Dr. Muayed F. Abbas Basrah University

استخدام النباتات المهندسة وراثيا كمفاعلات حيوية لغرض انتاج العديد من البروتينات المهمة اقتصاديا او المواد الايضية المختلفة.

3-to provide a powerful means for studying the action of genes (and gene products) during development and other and biological processes .

هندسة النبات وراثيا توفر لنا وسائل قوية لدراسة فعل الجينات وكذلك النواتج الجينية خلال عملية تطور النبات وكذلك العمليات البيلوجية الاخرى.

1- بالنسبة للنقطة الاولى (التحسين) على سبيل المثال انتاج نباتات مقاومة لمبيدات الادغال – Herbicide resistant plants وهذه الطريقة اعطت النباتات المقدرة على تثبيط فعالية المبيد وهذا المبيد Herbicide bromoxynil الذي يعتبر مثبط للنظام الضوئي الثاني inhibiter inphotosenthisis (الصبغة 680 هي التي تمتص الطاقة والماء يتاين وينطلق الاوكسجين). تم الحصول عليا من نقل جين من احد انواع البكتريا وهذه البكتريا التي نقل منها الجين هي (*Klebsiella ozaenae*) وهذا الجين اسمه nitrilase gen يشفر الى الانزيم الذي يعمل على تحطيم هذا المبيد .

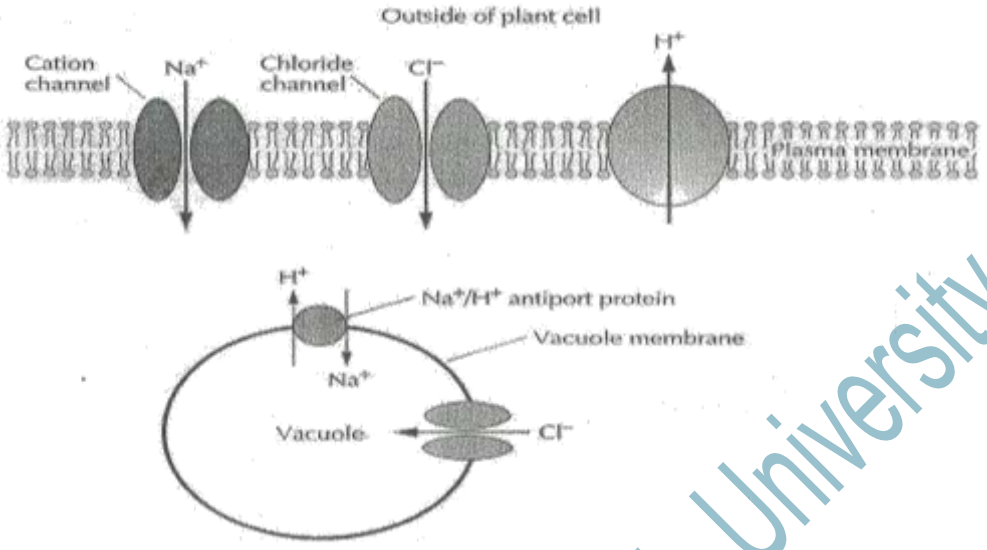


2- الحصول على نباتات مقاومة للشد الملحي ثم تحقيق هذا الهدف عن طريق زيادة عملية التعبير الجيني . (over expression of genes) زيادة كمية البروتينات المتواجدة في الخلية .

الجين المسؤول عن انتاج البروتين الناقل المسمى Na^{+}/H^{+} antiport proteins (يدخل صوديوم ويخرج الهيدروجين) .هو الذي يعمل على تنظيم عملية دخول ايون الصوديوم وخروج ايون الهيدروجين او البروتين من الفجوة .وزيادة عملية التعبير الجيني سوف تؤدي الى دخول كميات كبيرة من ايون الصوديوم الى داخل الفجوة بحيث تمكن النبات من التحمل والبقاء على مستويات ملحية تصل الى حوالي 200 ملي مولر. 200mm NaCl = 20 ds/m .

Dr. Muayed F. Abbas Basrah University

Figure 18.22 Schematic representation of ion transport in the plant *A. thaliana* showing the Na^+ ions being sequestered in the large vacuole.



Dr. Muayed F . Abbas Basrah University

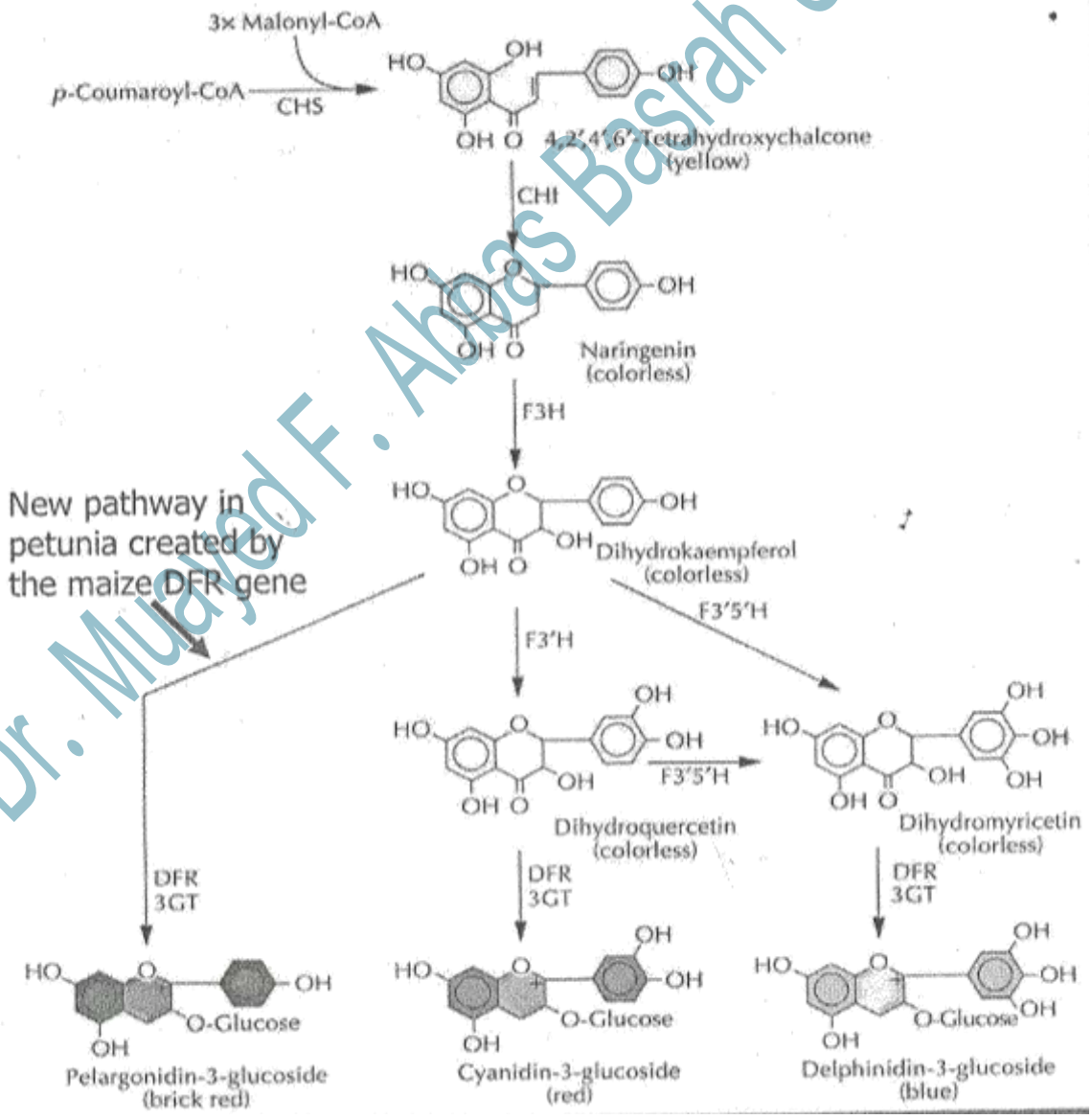
بسم الله الرحمن الرحيم

محاضرة (3) الثلاثاء 2012/11/13

3-التلاعب الجيني في الصبغات النباتية genetic manipulation of flower pigmentation

هذا الجزء يشمل التلاعب الجيني بالمسالك الحيوية لبناء صبغة الانثوسيانين anthocyanin وهذه العملية تتضمن نقل جين من الذرة الصفراء وهذا الجين يقوم بانتاج انزيم dyhydroflavonol 4 reductase (DFR) هذا الجين نقل الى نبات البتونيا petunia هذا يؤدي الى انتاج لون هو عبارة عن ال-brick –red orange ويسمى النبات transgenic petunia ان انتاج ازهار ذو لون فريد في علم البستنة يعتبر مشروع تجاري مهم.وهناك محولات لانتاج نباتات من الورد الشجيري ازهارها ذات لون ازرق blue-roses .

شكل يوضح التلاعب الجيني في الصبغات النباتية :-



Dr. Muayed F. Abbas Basrah University

4-تحوير المحتوى الغذائي modification of plant nutritional content

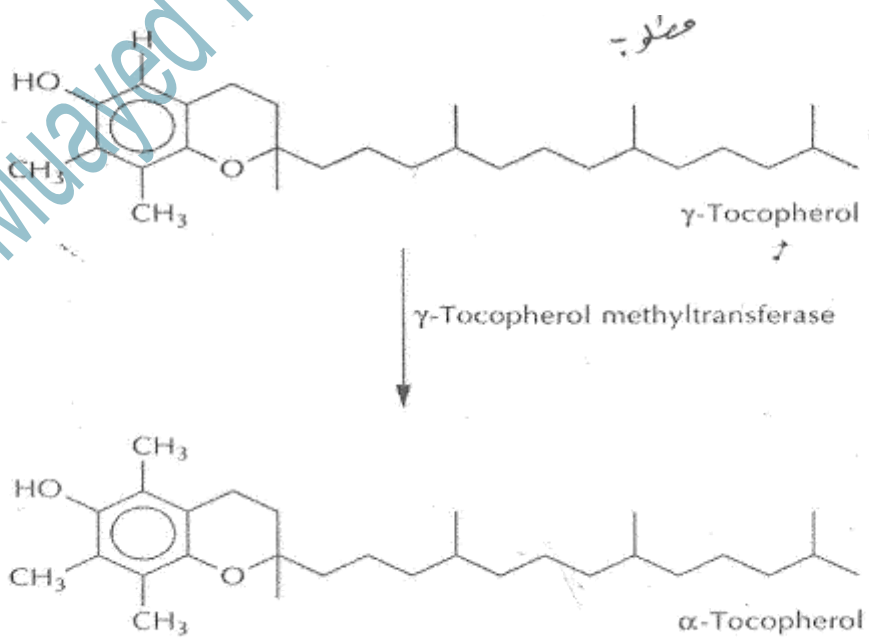
بعض المحاصيل الزراعية تعاني من نقص في بعض الاحماض الامينية الاساسية مثلا نبات الذرة عادة يعاني من نقص في الحامض الاميني اللايسين وقد ادت البحوث في مجال الهندسة الوراثية الى زيادة محتوى هذا النبات من هذا الحامض الاميني ، وكذلك البقوليات عادة تعاني من نقص في الاحماض الامينية مثل الميثونين methionine والسايين cyteine واللايسين lysine الى زيادة المحتوى للمحاصيل البقولية من هذين الحامضين .

5- اللبيد (الزيوت) lipids

في هذا المجال تركزت الابحاث على تغير طول السلسلة للاحماض الدهنية وكذلك درجة عدم التشبع degree of nusaturation والهدف منها تحسين نوع الزيت وقد تم التعرف على الجينات المسؤولة عن ذلك وتم استخدامها .

6- زيادة فيتامين أي increasing the vitamin E(α-tocopherol) content of plant

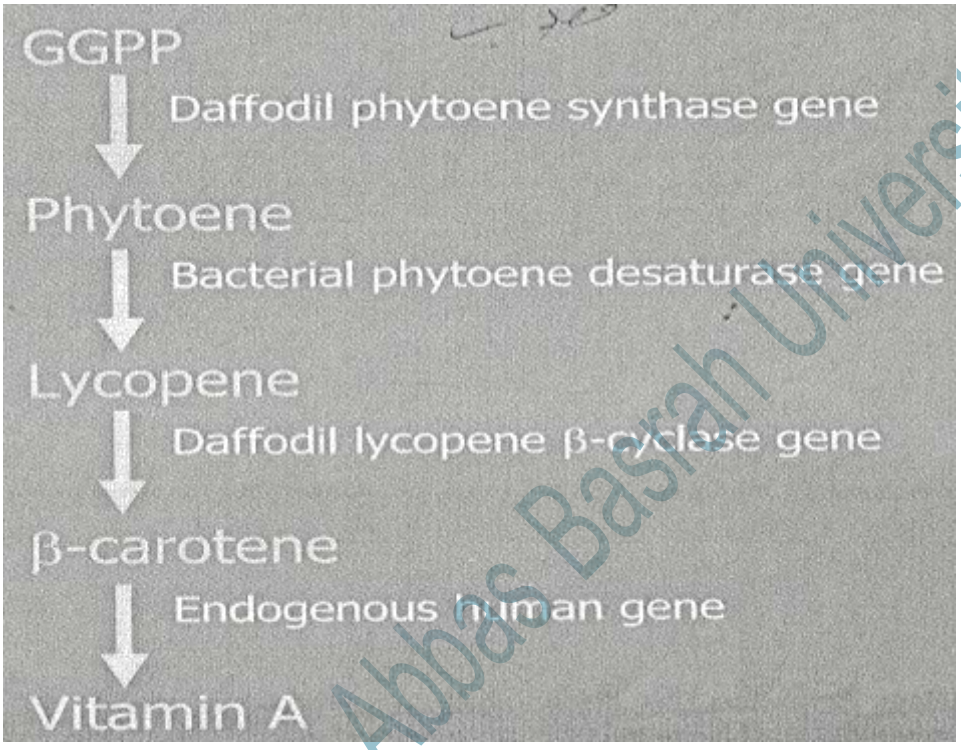
فيتامين أي عبارة عن مادة مضادة للاكسدة ، وكما هو معروف فان النباتات تنتج كميات قليلة من (α- tocopherol) الانها تنتج كميات كبيرة من الكاما (γ- tocopherol) وهي لاتنتج كميات كبيرة من انزيم methyl transferase وقد تم التعرف على الجين المسؤول عن انتاج هذا الانزيم من احد انواع البكتريا ثم نقل الى نبات Arabidopsis ووجد ان هذا النبات ينتج حوالي 80 مرة فيتامين E مقارنة بالنباتات التي لم يتم لها نقل هذا الجين .شكل يوضح زيادة محتوى النبات من فيتامين E.



Dr. Muayed F. Abbas Basrah University

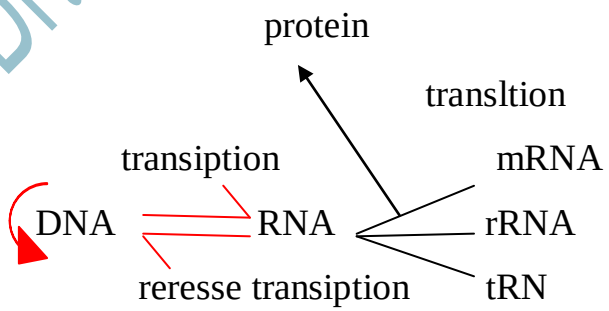
7- زيادة فيتامين A increasing the vitamin A content of plant (golden rise)

هذه العملية تتضمن الهندسة الوراثية للمسلك الذي يؤدي الى انتاج البيتا كاروتين β–carotene في نبات الرز ويوضح المخطط الاتي عملية انتاج فيتامين A وعادة الرز الناتج يكون اصفر اللون او ذهبي ويطلق عليه الرز الذهبي golden rise .



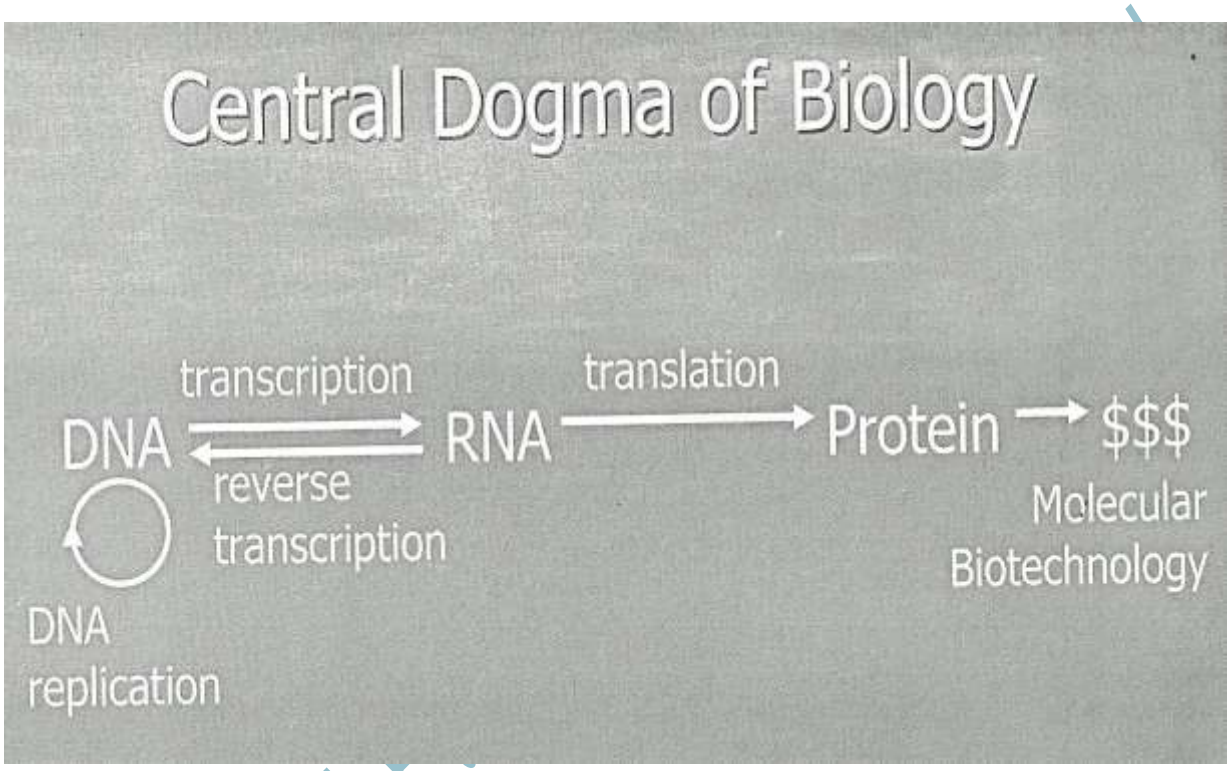
المبدأ العام للبايولوجي الجزيئي Central dogma of molecular biology

يوضح المخطط الاتي تدفق المعلومات الوراثية من الDNA الى جزيئة البروتين .وهذه بالحقيقة يمكن تفسيرها على اساس ان المعلومات التي تحتويها الجينات او جزيئة الDNA يتم التعبير عنها بصورة نهائية على هيئة المظهر الخارجي للكائن الحي والمسؤولة عنه البروتينات.الDNA يكرر نفسه ثم تحدث له عملية نسخ RNA وهذا يعطي البروتينات المسؤولة عن وهذا الmRNA سوف يعطي .



Dr. Muayed F. Abbas Basrah University

هذا المخطط موجود في العضيات النباتية وكما هو معلوم فان العضيات الموجودة في الخلية هي بدائية مثل البلاستيدات والميتوكوندريا وحقيقية مثل النواة وهذه العضيات تحتوي على جميع الخطوات الضرورية التابعة لمبدأ البايلوجي الجزيئي اما الاستنساخ العكسي فهو لم يتم ايضاحه في العضيات الا ان هناك الكثير من الفيروسات التي تحتوي على انزيمات الاستنساخ العكسي وهذه الانزيمات تستخدم RNA كقالب لبناء جزيئة الDNA عليه .



تعريف الجين definition of gene

هناك العديد من التعاريف الجزئية للجين وهذه التعاريف تعتمد على دور الجينات في توجيه بناء بروتينات محددة هذا التعريف ينبع في الحقيقة من التحاليل التي اجريت على النباتات الطافرة mutants والتي تعرضت الى طفرة حيث وجد ان غياب بروتين معين يعود الى حدوث طفرة mutation حيث ان الطفرة ادت الى ايقاف عملية انتاج هذا البروتين .وان البروتينات عتبر مكونات اساسية في المبدأ العام للبايلوجي الجزيئي الا ان لها ايضا ادوار اخرى مهمة جدا وهذه الادوار تشمل :-

1-وظائف انزيمية enzymatic

2-وظائف تركيبية structural

3-وظائف تنظيمية regulatory roll

ان الفكرة الاولية عن دور الجينات هو ان الجين الواحد يعطي انزيم واحد الا ان هذه الفكرة غير صحيحة لتلك البروتينات التي تتكون من اثنين او اكثر من تحت الوحدات subunit على سبيل المثال انزيم الرابسكو Rubisco (ribulose -1,5- bis phosphate carboxylase) المسؤول عن تحويل ال CO_2 الى كاربوهيدرات .

هذا مكون من عدة وحدات بحدود 16 تحت وحدة وهي كالاتي :-

8subunits (small) يتم الشفر لها (بنائها) عن طريق النواة arge subunit اما الكلوروبلاست (chloroplast encoded) يتم الشفر لها في البلاستيدات الخضراء .وعليه فان الفكرة المعدلة لدور الجين في بناء البروتين تقول ان :- 1gene = 1peptide

تعريف البايلوجي الجزيئي molecular biology

Molecular biology :- is that branch of biology that deals with information structure and function of macro molecules essential to life such as nucleic acids and proteins and especially with their role in all replication and the transmission of genetic information .

هو احد فروع علوم الحياة الذي يهتم بالمعلومات وتركيب ووظيفة الجزيئات العملاقة الضرورية للحياة مثل الاحماض النووية والبروتينات وخاصة دورها في تكرار الخلية وتكاثرها وانتقال المعلومات الوراثية .

نظرة عامة في البايلوجي الجزيئي An over view of molecular biology

ان الصفة او الميزة العظيمة التي تميز الكائنات الحية هي مقدرتها على اكثار نفسها وللعديد من السنين فان احدى المسائل الغامضة في العلم هو اللغز الذي يقول كيف ان اصغر بذرة او بيضة مخصبة تحتوي على جميع المعلومات الوراثية الضرورية للكائن الحي ،علماء الوراثة التقليدين استنتجوا ان الصفات الوراثية الفردية يسيطر عليها من قبل وحدات غير مرئية اطلقوا عليا اسم الجينات وقد افترظوا ان كل خلية تضاعف جيناتها عند الا نقسام لذا فان الخلايا الناتجة من الانقسام تسمى daughter cells سوف تحصل على المجموعة الكاملة من الجينات ،كما افترضوا ان الجينات الموجودة في الخلايا مثل خلايا البذرة تحمل المعلومات الوراثية من جيل لاخر وبعد ذلك فان هذه الجينات بطريقة ما تسيطر وتوجه عملية التطور في الكائنات الحية الجديدة فقد ان من الواضح ان المادة الوراثية يجب ان يكون لها القدرة على :-

genetic materials must be :-

Dr. Muayed F. Abbas Basrah University

1-able to store information used to control both the development and metabolic activities of the cell.

ان تكون لها القدرة على خزن المعلومات المستخدمة للسيطرة على عملية التطور والفعاليات الايضية للخلية.

2-stable ,so it can be replication accurately during cell division and be transmitted for generation .

المادة الوراثية يجب ان تكون مستقرة بحيث يمكن تكرارها بصورة دقيقة ومظبوطة وبدقة متناهية خلال عملية انقسام الخلايا .

3-able to undergo mutations providing genetic variability for evolution .

لها القدرة ان تحصصل لها طفرات وهذه الطفرات تجهزها بالتغيرات الوراثية الضرورية لعملية التطور.

السؤال الان ماهو الجزئ الذي يعنى بهذه الاحتياجات المعقدة والدقيقة للغاية ؟

اعتقد العلماء ان المادة الوراثية يجب ان تكون جزيئات او جزئ غاية في العقيد واليوم نحن نعلم ان المادة الوراثية هي الDNA وهو المادة الوراثية وان جميع صور الحياة تشترك في هذا الجزئ العجيب كمادتها الوراثية ولكن في البداية ان بعض الباحثين او العلماء رفضوا قبول ذلك والسبب ان جزيئة الDNA هي جزيئة بسيطة جدا فكيف ان جزيئة بهذه البساطة مسؤولة عن الاختلافات غير الاعتيادية الخارقة لصور الحياة على هذا الكوكب ان تحدد التركيب الكيميائي للDNA وحل شفرته الوراثية هي بالتاكيد من اكثر الانجازات العلمية اهمية في القرن الماضي .

DNA molecule جزيئة الDNA

The watson –crick double helit model من الثابت ان جزيئة الDNA هي عبارة عن حلزون المزدوج الذي اقترحه الباحثان watson و crick وهذا الحلزون المزدوج هو المادة الوراثية في جميع الكائنات الحية حقيقية النواة وهو يتكون من :-

1-two helical polynucleotide chains .سلسلة عديدة النيوكليوتيد

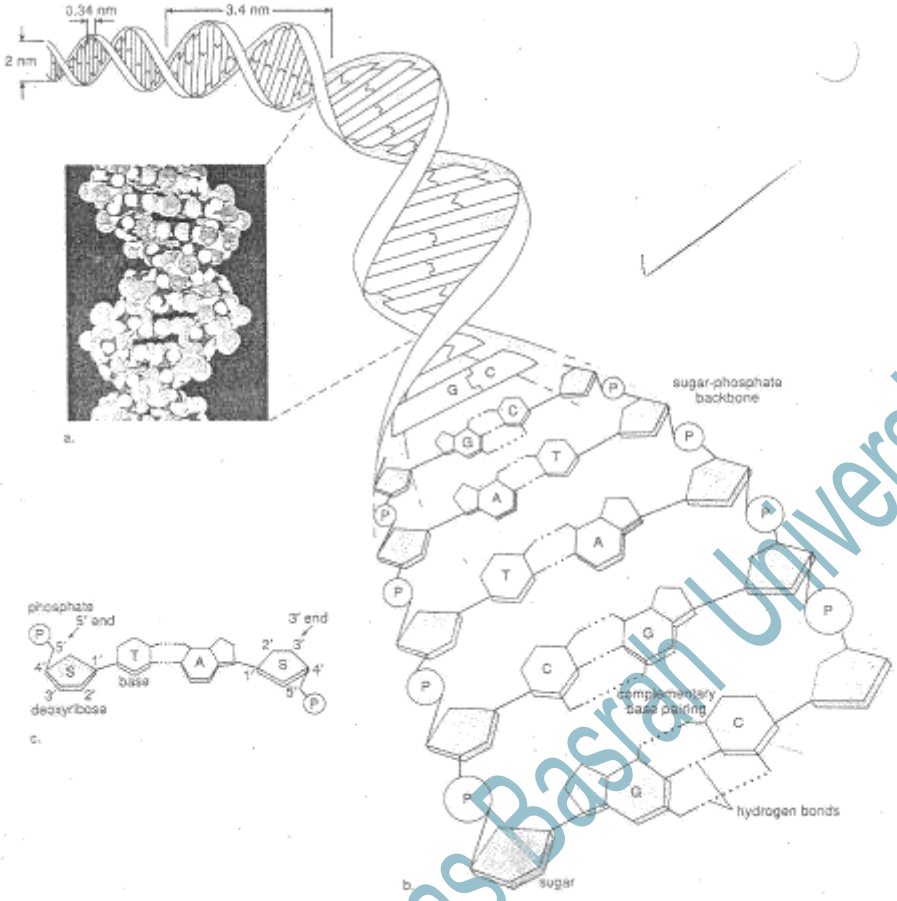
2-purins and pyrimidens on the inside and deoxyribose outside.

3-two chains are held by hydrogen bonds.

4-the procise sequence of bases carries genetic information .

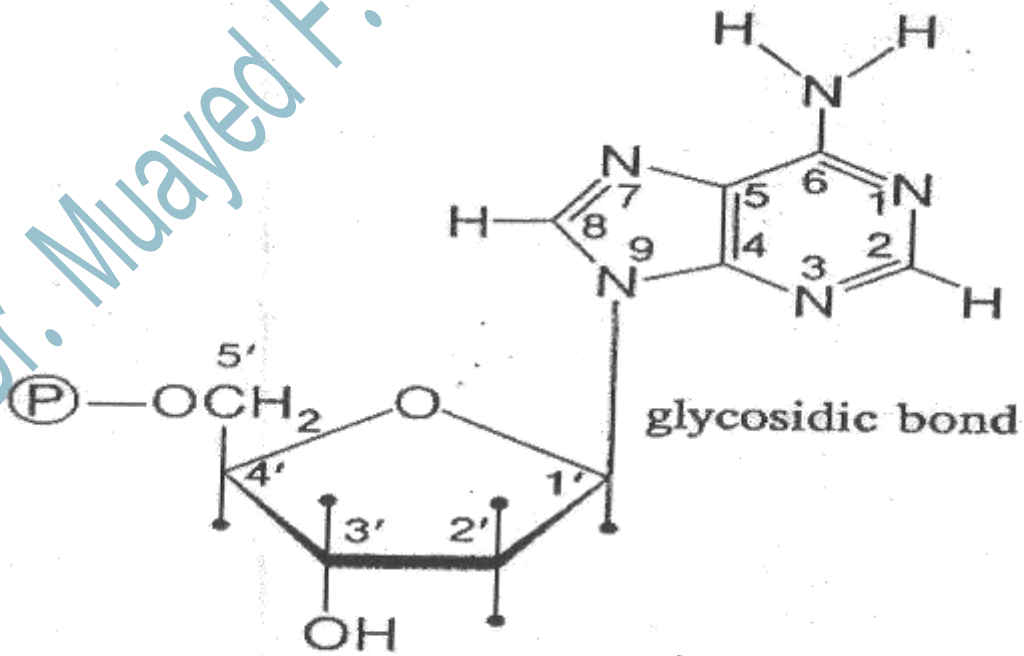
تركيب القواعد النتروجينية يحمل المادة الوراثية اما السكر والفوسفات هي العمود الفقري الذي يحمل القواعد.

Dr. Muayed F. Abbas Basrah University



The building blocks of DNA

Purine base = adenine

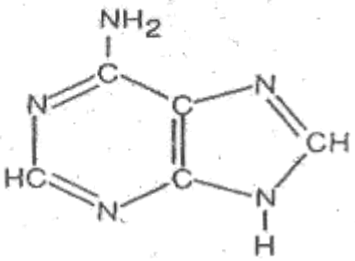


Sugar = deoxyribose

Dr. Muayed F. Abbas Basrah University

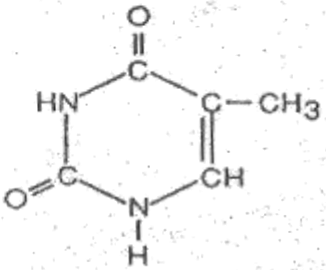
Basis of DNA

Purines

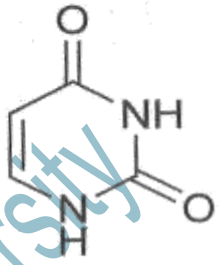


Adenine (A)

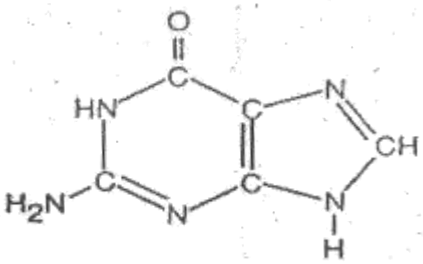
Pyrimidines



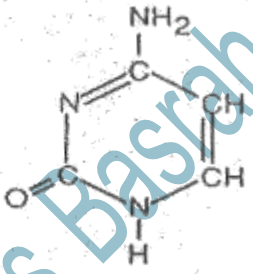
Thymine (T)



Uracil (U)

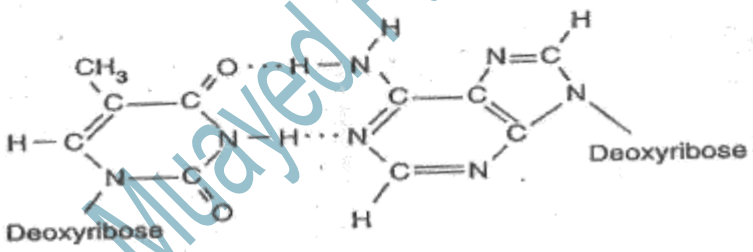


Guanine (G)

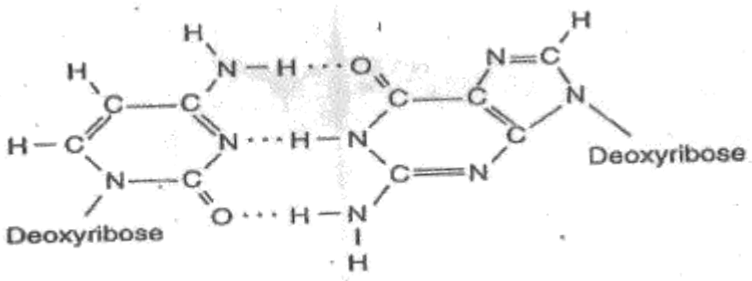


Cytosine (C)

Hydrogen bonding of the bases



A-T base pair



G-C base pair

Dr. Muayed F. Abbas Basrah University

جدول يوضح اهم الفروقات بين جزئ الDNA والRNA :-

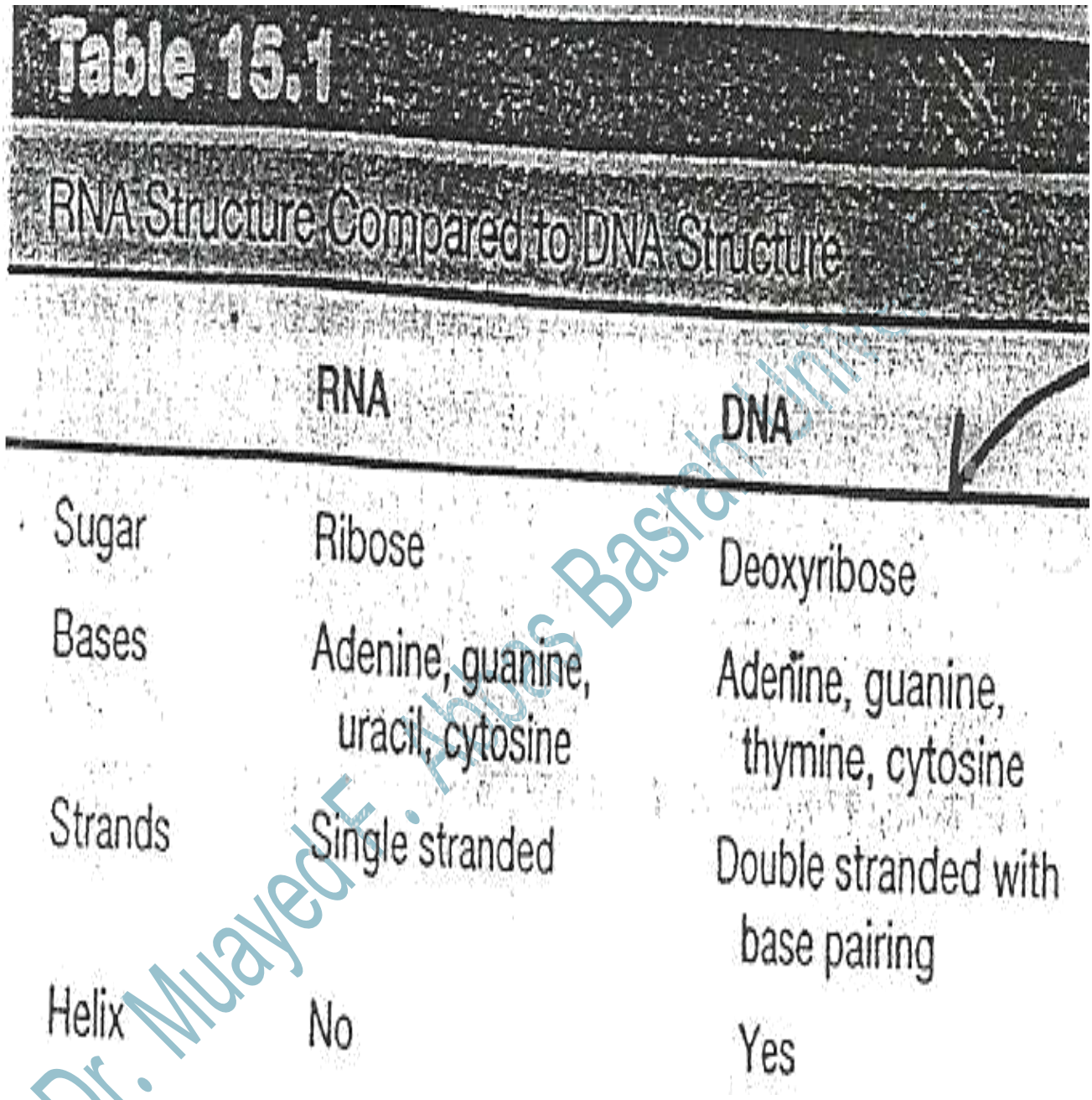


Table 15.1

RNA Structure Compared to DNA Structure

	RNA	DNA
Sugar	Ribose	Deoxyribose
Bases	Adenine, guanine, uracil, cytosine	Adenine, guanine, thymine, cytosine
Strands	Single stranded	Double stranded with base pairing
Helix	No	Yes

Dr. Muayed F. Abbas Basrah Univ

بسم الله الرحمن الرحيم

محاضرة (4) الثلاثاء 2012/11/27

التزاوج القاعدي المتكامل Complementary base pairing

The parid relationship between purinec and pyrimidens in DNA such as that A is hydrogen bundled to T G is hydrogen bonded to C .

العلاقة المتزاوجة بين البيورين والبايرميدين في DNA .

DNA replication تكرار ال DNA

Is the process of copying a DNA molecule .

هي عملية استنساخ جزيئة من ال DNA وتتكون من الخطوات التالية :-

1-الانفصال او الابتعاد Un winding

في هذه الخطوة الشرائط القديمة تبتعد عن بعضها البعض في جزيئة الDNA نظرا لان الاواصر الهيدروجينية التي تربط القواعد المتكاملة يتم تكسيرها بواسطة انزيم Heliscase .

2-الخطوة الثانية التزاوج القاعدي المتكامل Complementary base pairing

في هذه الخطوة فأن القواعد النتروجينية الحرة الموجودة دائما في النواة بصورة حرة ترتبط بصورة تكاملية مع القواعد الموجودة على شريطي ال DNA الاصلية هذه العملية تحفز بواسطة انزيم يسمى DNA Polymerase.

3-الخطوة الثالثة الارتباط Joining

في هذه الخطوة فأن القواعد النتروجينية المتكاملة ترتبط مع بعضها البعض مكونة شرائط جديدة بحيث ان جزيئة ال DNA الناتجة تحتوي على شريط قديم وشريط جديد كما موضح بالشكل وهذه العملية يحفزها انزيم DNA polymerase ومن الجدير بالذكر ان عملية تكرار ال DNA تحدث قبل عملية انقسام الخلية ولهذا السبب هناك بعض الادوية التي تعطى الى مرضى السرطان لمنع انقسام الخلية حيث ان تركيبها شبيه بتركيب القواعد النتروجينية لذلك لاتحدث عملية التكرار ومن ثم لاتنقسم الخلية .

تكرار الDNA شبه محافظ replication of DNA Semi-conservative

يسمى شبه محافظ نظرا لان كل حلزون مزدوج من الDNA الجديد والهدف من هذا هو حماية المعلومات الوراثية وقد يحدث مايطلق عليه اصطلاح اخطاء التكرار replication error هذه الاخطاء في التكرار قد تؤدي الى حدوث الطفرة mutation والتي تعرف (permanent change in the sequence of bases) تغير ثابت في تسلسل القواعد النيوكليوتيدية .

ان التغير في القواعد النتروجينية عند حدوث عملية التكرار هو احد اسباب حدوث الطفرة وعادة يحدث عدم التلتفاف (عدم حدوث تكامل قاعدي) miss match وعادة يحدث مرة واحدة لكل 100000 قاعدة

Dr. Muayed F. Abbas Basrah University

متكاملة وفي حالة عدم حدوث اللتفاف فأن هذا يؤدي الى توقف مؤقت pause وهذا التوقف يتم التخلص منه بواسطة انزيمات يطلق عليها انزيمات تصليح ال DNA repaired enzymes .

هذه الانزيمات تقوم بقراءة التسلسل القاعدي ثم تحدث في القواعد غير المماثلة او المطابقة وعادة هذه الانزيمات تقلل من نسبة الخطأ بحيث تبقى 1 بالمليون one in pillion ppm والقواعد غير الصحيحة اذا بقيت في جزيئة الDNA بعد عملية التصليح التي تجري بواسطة هذه الانزيمات عادة تساهم في حدوث الطفرة الوراثية .

Figure 14.7 Semiconservative replication (simplified).

Dr. Muayed F. Abbas Basrah University

What DNA encodes ? ماذا يشفر ال DNA ؟

Alto mutely ,through transcription of translation ⟶ protein

في النهاية خلال عمليتي الاستنساخ والترجمة فأن الDNA يعطينا البروتين .

DNA is like instruction in a book A,T,C,G

Transcription function of synthesis of RNA النسخ والاستنساخ

the proses of transcription involves :- عملية النسخ او الاستنساخ

a- Promoters :- المنشطات

Specific sequence at the beginning of gene عبارة عن اول شئ في الجين والذي يعطي الاشارة للبدء .

b- RNA polymerase انزيم بلمرة ال انزيم بلمرة الRNA

هذا الانزيم يبدأ عملية ارتباط القواعد النيوكليوتيدية لجزيئة الDNA .

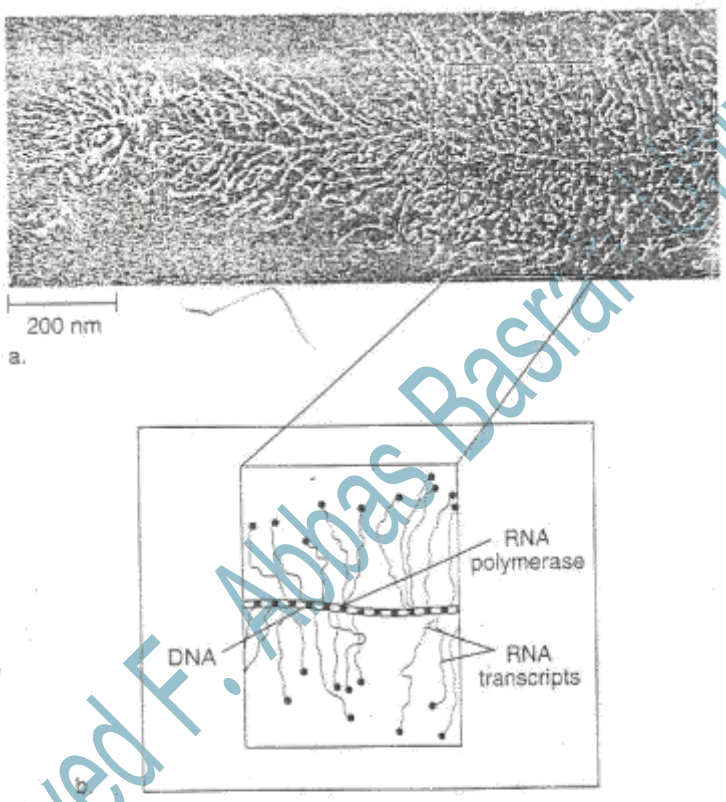


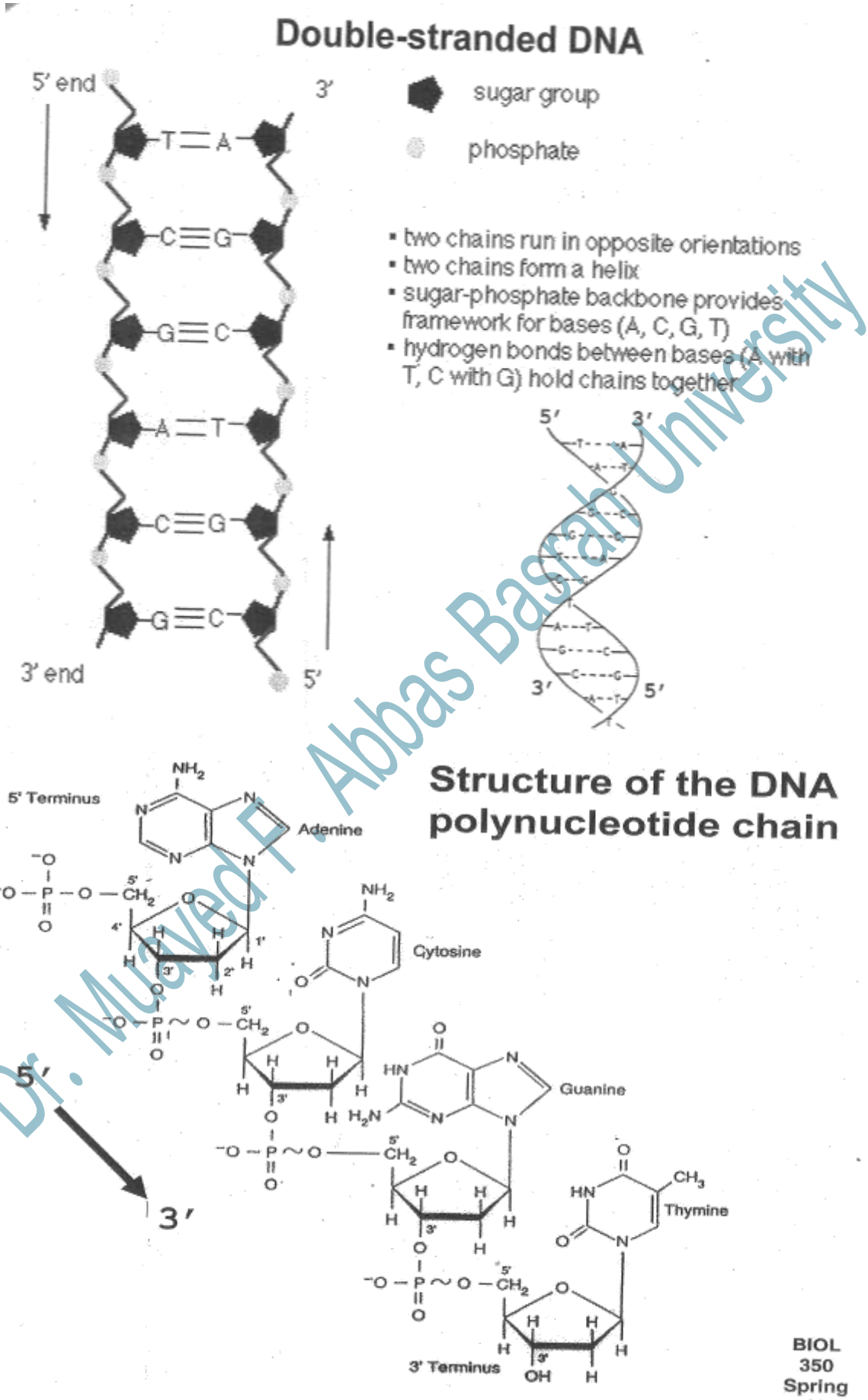
Figure 15.6 RNA polymerase.
a. Numerous RNA transcripts extend from a horizontal gene in an amphibian egg cell. b. The strands get progressively longer because transcription begins to the left. The dark dots along the DNA are RNA polymerase molecules. The dots at the end of the strands are spliceosomes involved in RNA processing (Fig. 15.7).

Dr. Muayed F. Abbas Basrah University

c- 5õõó-3

تبدأ عملية النسخ بالاتجاه 3–5 وعادة فأن القواعد المتكاملة تتكامل قاعديا مع احد اشرطة الDNA كما هو موضح بالشكل ويلاحظ ان هناك اختلاف بسيط في جزيئة mRNA حيث ان الثيامين يحل محلها اليوراسيل .

وجود القاعدة النتروجينية اليوراسيل في جزيئة ال RNA يمكننا من تمييزه عن جزيئة ال DNA .



Dr. Muayed F. Abbas Basrah University

d- Release of mRNA transcription

هذه العملية يصاحبها مايلي :-

1- Intrans are removed ازالة الانزونز

Exons are the portions that are read . هي عبارة عن الاجزاء التي تقرأ من قبل الرايبوسومات

2- Cap at one end and poly at ail on the other.

اضافة قبعة في احد اطرافه وذيل مكون من عدة جزيئات من الادنين وذلك لتسهيل عملية خروجه في النواة وجلوسه على الرايبوسومات في السايتوبلازم لتسهيل عملية بناء البروتين .

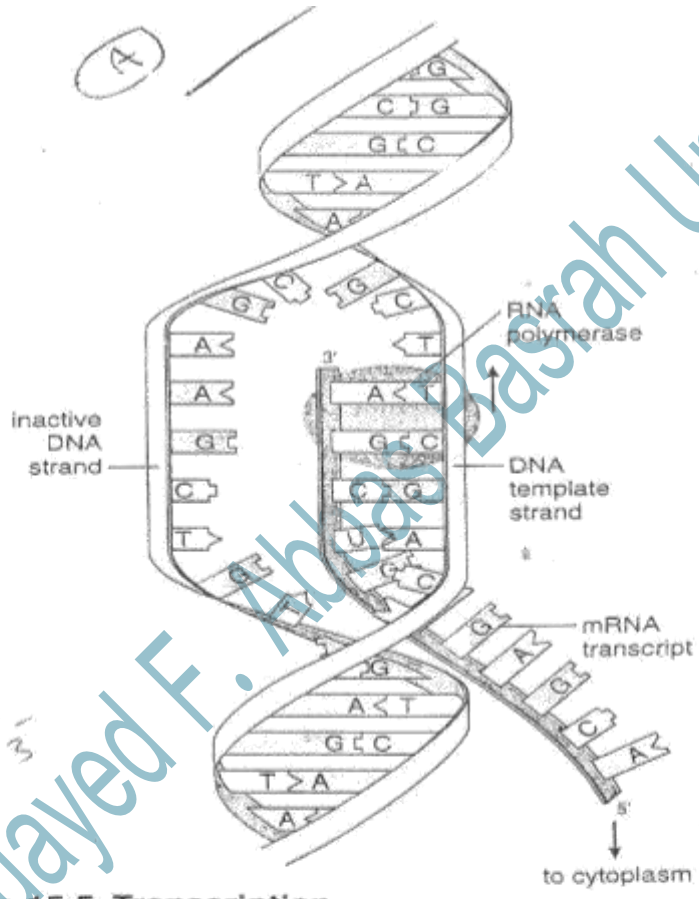


Figure 15.5 Transcription.
During transcription, complementary RNA is made from a DNA template. At the point of attachment of RNA polymerase, the DNA helix unwinds and unzips, and complementary RNA nucleotides are joined together. After RNA polymerase has passed by, the DNA strands rejoin and the RNA transcript dangles to the side.

Dr. Muayed F. Abbas Basrah University

Translation :- synthesis of protein الترجمة

المبدأ الاساس في علم البايلوجي الجزيئي يقول ان تسلسل او تعاقب النيوكليوتايد في جزيئة الDNA والتي نسخة منها في جزيئة الRNA ماعدى اليوراسيل هي التي تحدد تسلسل الاحماض الامينية في جزيئات عديد الببتيد (البروتين) ويبدو انه من الضروري وجود شفرة CODEكلمة لكل من الاحماض

الامينية ال20 الموجودة في جزيئة البروتين ولكن كيف بالامكان لاربعة نيوكليوتيدات A,T,C,G ان تجهز التوافقات اللازمة للشفر الى 20 حامض اميني ؟

الجواب:-

من الواضح انه اذا تكونت الشفرة (الكلمة) من حرف واحد فقط فان القواعد الاربعة لم تشفر الى الاربعة من الاحماض الامينية . وحتى لو شملت الكلمة على حرفين اثنين فأن عدد الاتحادات الثنائية التي يمكن تشكيلها من بين القواعد الاربعة أي 16 أي ان الكلمات الناتجة سوف تكون اقل من الاحماض الامينية اما اذا تكونت كل كلمة منثلاث احرف ارتفع العدد المتمكن تشكيله الى 4×4×4 أي 64 كلمة . وهو اكثر مما يكفي للتعبير عن الاحماض الامينية ال20 وكما هو الحال في كل لغة ان مايقصد بترتيب الحروف من كل كلمة اداء معنى معين بحيث اذا تغير التركيب تغير المعنى المقصود.

وهكذا بتغير حروف كلمة ثلاثية الاحرف تتالف كلمات مختلفة ترمز لكل منها الى حامض اميني معين ويؤخذ من الادلة المتوفرة في الوقت الحاضر ان الكلمات الثلاثية الاحرف Triplets هي التي تستعملها الخلايا وكما يؤدي ترتيب معين لعدة كلمات التي تكون جملة ذات معنى خاص كذلك فان ترتيب الكلمات الثلاثية من الاحرف في الحامض النووي انما يعبر عن تسلسل معين لوحدات الاحماض الامينية في جزيئة البروتين ولابد من تواجد في جزيئة الDNA تحمل المعلومات الخاصة بتخليق كل بروتين على حدة وهذه تتألف بدورها من مناطق مفيدة (كلمات ثلاثية) لقواعد الحروف يجد موضع لكل منها مكان حامض اميني معين في جزيئة البروتين ونظرا لتراص الكلماتا أي الثلاثيات القاعدية لجزيئة االDNA بطريقة محكمة للغاية بحيث لاتوجد قواعد احادية او ثنائية بين كلمة واخرى فانه من الاهمية يمكن ان مايبدا استقراء هذه الرموز الشفرة عند تحويلها الى رسائل من نقطة محددة والاكانت القراءة غير صحيحة وعند ذلك جدير بالذكر انه توجد اشارات خاصة تحدد موعد البدء start وموضع التوقفstop بالنسبة لكل رسالة .

ويطلق على مجموعة تضم ثلاثة نيوكليوتيدات على جزيئةmRNA بالشفر codon شفرة وراثية . المقابل الشفري anti-codon والذي يمثل مجموعة الاحماض الامينية الموجودة بالرسالة ونظرا لا الشفرات المكملة codon يبلغ عددها 64 وان عدد الاحماض الامينية التي تتطلب رموز شفرية هي 20 فقط وبلا عجب ان لبعض الاحماض الامينية اكثر من شفرة واحدة. كما موضح بالجدول التالي:-

Dr. Muayed F. Abbas Basrah University

The table shows which codons code for which amino acids:

AMINO ACID	RNA CODON
ALANINE	GCC, GCA, GCG, GCU
ARGININE	AGA, AGG, CGU, CGA, CGC, CGG
ASPARAGINE	AAC, AAU
ASPARTIC ACID	GAC, GAU
CYSTEINE	UGC, UGU
GLUTAMIC ACID	GAA, GAG
GLUTAMINE	CAA, CAG
GLYCINE	GGA, GGC, GGG, GGU
HISTIDINE	CAC, CAU
ISOLEUCINE	AUA, AUC, AUU
LEUCINE	UUA, UUG, CUA, CUC, CUG, CUU
LYCINE	AAA, AAG
METHIONINE (INITIATION)	AUG
PHENYLALANINE	UUC, UUU
PROLINE	CCA, CCC, CCG, CCU
SERINE	UCA, UCC, UCG, UCU, AGC, AGU
THREONINE	ACA, ACC, ACG, ACU
TRYPTOPHAN	UGG
TYROSINE	UAC, UAU
VALINE	GUA, GUC, GUG, GUU
STOP	UAA, UAG, UGA

Dr. Muayed F. Abbas Basrah University

بسم الله الرحمن الرحيم

محاضرة (5) الثلاثاء 2012/12/4

كيف تحدث عملية الترجمة Translation ؟

ان خطوة الترجمة التي تحدث في السايتوبلازم لخلايا حقيقية النواة هي الخطوة الثانية في عملية التعبير الجيني والتي تؤدي في النهاية الى بناء البروتين .

واثناء عملية الترجمة فان تسلسل الشفرات النيوكليوتيدية في جزيئة mRNA يوجه تسلسل الاحماض الامينية في السلسلة الببتيدية بمعنى اخر ان لغة الاحماض النووية (القواعد النيوكليوتيدية) تتم ترجمتها الى لغة اخرى التي هي لغة البروتينات (الاحماض الامينية) وعملية الترجمة هذه تحدث على سطح الرايبوسومات وعادة تحدث على مجاميع من الرايبوسومات Clusters of ribosome متعدد الرايبوسوم polysomes ويلعب الحامض النووي الناقل tRNA دورا اساسيا في عملية الترجمة حيث يقوم بنقل جزيئات الاحماض الامينية الى الرايبوسومات.

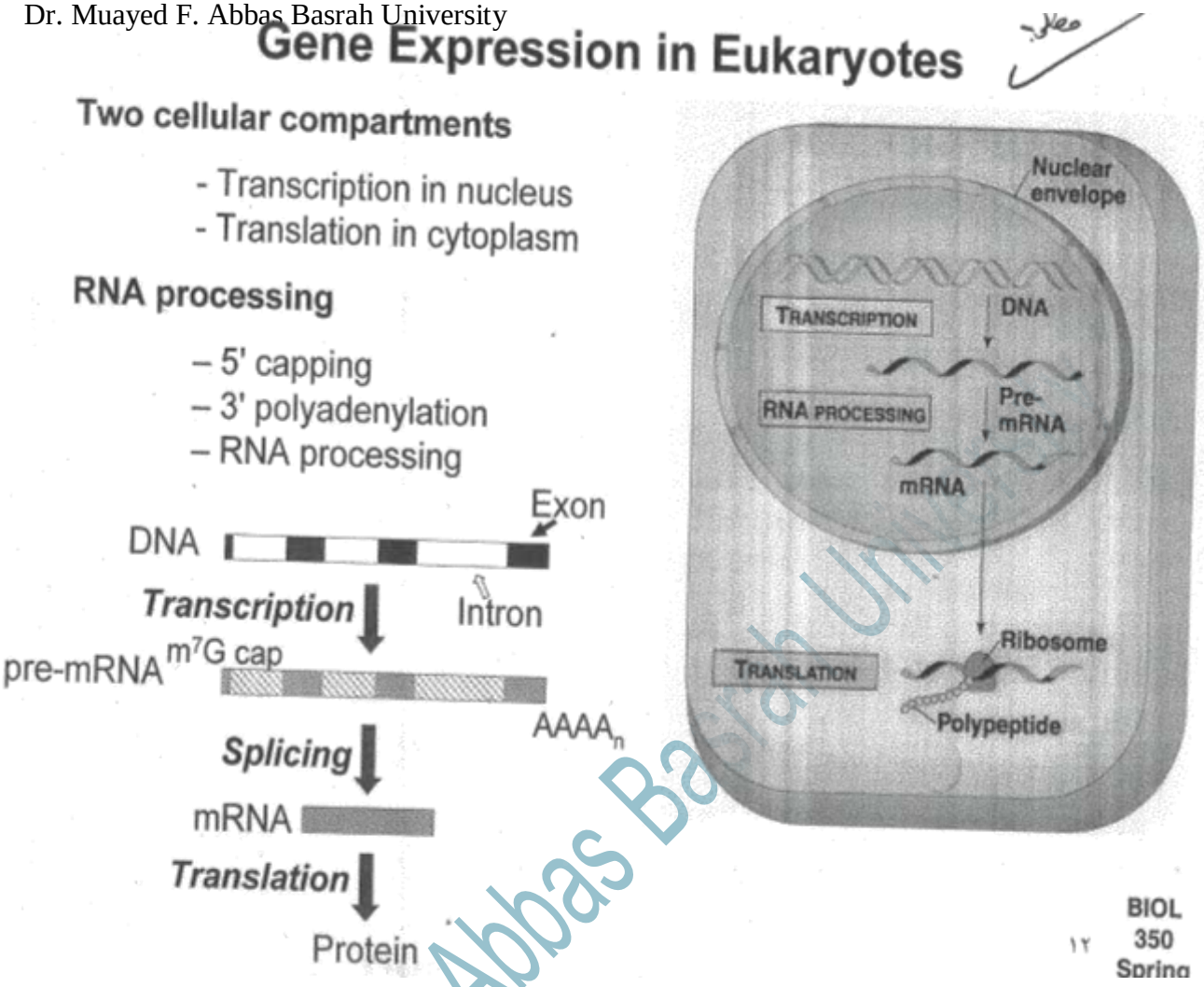
ان حامض tRNA هو عبارة عن حامض نووي رايبوزي احادي الشريط الذي ينطوي على نفسه لكي يكون المناطق التي فيها تتمكن القواعد النتروجينية من التكامل القاعدي بواسطة روابط هيدروجينية وعادة مايرسم tRNA بأنه يشبه ورقة البرسيم ثلاثية الفصوص كما في الشكل التالي

ويوجد على الاقل جزيئة واحدة من tRNA لكل حامض من الاحماض الامينية ال20 الموجودة في جزيئة البروتين ان الاحماض الامينية الناقلة عادة ماترتبط الى النهاية التي تحمل فوسفات طليقة في الموضع 3^- اما النهاية الثانية من tRNA وهي تحتوي على المقابل الشفري anti –codon التي هي مجموعة من ثلاث قواعد نيوكليوتيدية الموجودة على جزيئة mRNA على سبيل المثال الحامض الناقل tRNA الذي يحتوي على المقابل الشفري GAA يرتبط بالمقابل CUU والان السؤال كيف يمكن للحامض الاميني الصحيح ان يرتبط بجزيئة tRNA الصحيحة ؟

الجواب:-

هذا العمل يقوم به انزيم منشط للاحماض الامينية يسمى tRNA synthatase وكما يدخل المفتاح في القفل فان كل انزيم له مكان تعريف يتعرف عليه الحامض الاميني الذي سوف يرتبط بجزيئة tRNA وهذه العملية تحتاج الى طاقة يتم تزويدها عن طريق ATP وكلما يتكون معقد من tRNA+ amino acid فأن هذا المعقد سوف يتحرك الى الرايبوسومات التي عندها تحدث عملية بناء البروتين .

Dr. Muayed F. Abbas Basrah University



Dr. Muayed F. Abbas Basrah Uni

بناء البروتين Protein synthesis

ان عملية بناء البروتين تتم بثلاث خطوات هي :-

1-بداية تكوين السلسلة البيتيدية chain initiation

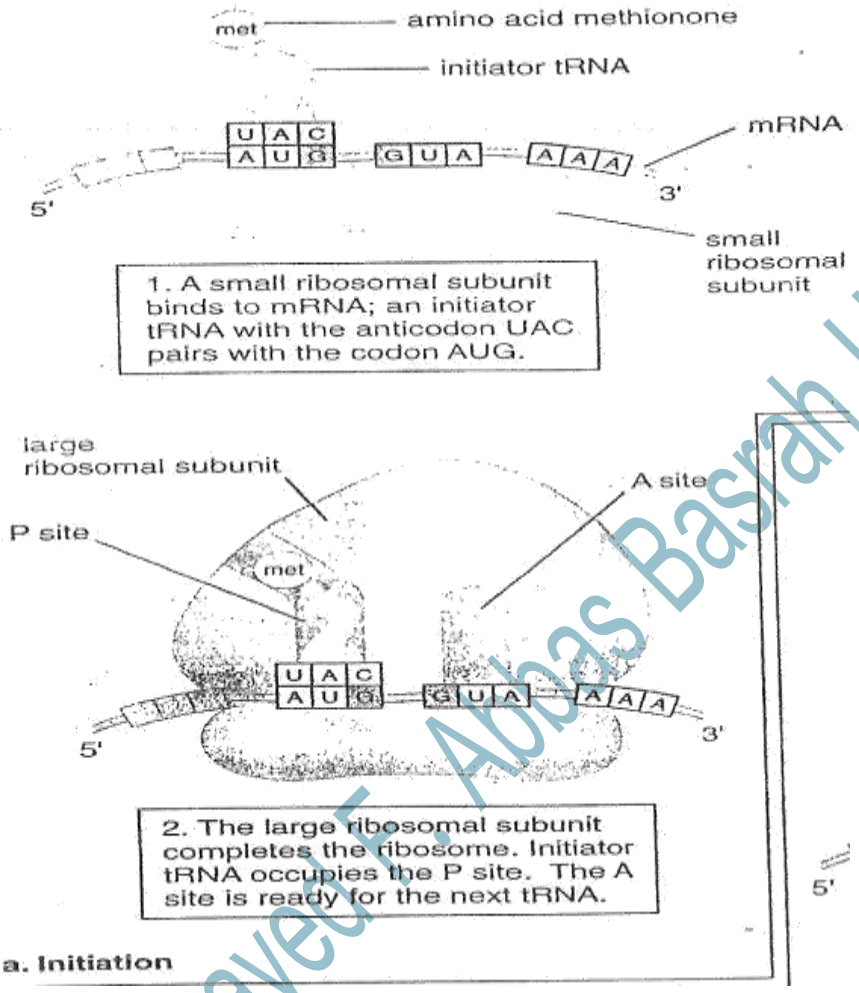
2-استطالة السلسلة البيتيدية chain elongation

3-انتهاء او فصل السلسلة البيتيدية chain termination

1-ابتداء السلسلة البيتيدية Chain initiation

تبدأ عملية بناء البروتين بان يتجزاء الرايبوسوم الكامل الى مكوينيه الصغير والكبير ثم يرتبط بالمكون الرايبوسمي الاصغر شريطmRNA مكونا معقد انشاء initiation complex لايلبث ان يرتبط به في موضع الشفرة الاولى على شريط mRNA جزئ معين من الtRNA يسمى الحامض الاميني الناقل البادئ initiator tRNA مشحون بحامضه الاميني وهنا تجدر الاشارة الى ان بناء البروتينات جميعا يبدأبوحدة الحامض الاميني المثيونين methionine (مركب بادئ للاثلين) وما ان يرتبط الtRNA المحتوي على الميثيونين بموضع الشفرة الاولى AUG codon حتى يرتبط المعقد الرايبوسومي الصغير بالمكون الرايبوسومي الكبير مكونا الرايبوسوم الكامل الفعال وتؤدي هذه المرحلة الابتدائية عن استقرار

الtRNA المشحون بوحدة الحامض الاميني المثيونين في P site وهذا الموضع مواجه تماما للشفرة الاولى على شريط ال mRNA الخاص بالحامض الاميني الاول وهكذا تبدأ الترجمة من النقطة الصحيحة على شريط mRNA وقد بان واضحا ان ترجمة الشفرات تتم بالاتجاه 5^{-}-3^{-} أي من طرف السلسلة الذي يرتبط بمجموعة فوسفات طليقة في الموضع -5 من السكر الرايبوزي نحو الطرف الاخر الذي يرتبط بفوسفات طليقة ثلاثية الموضع .



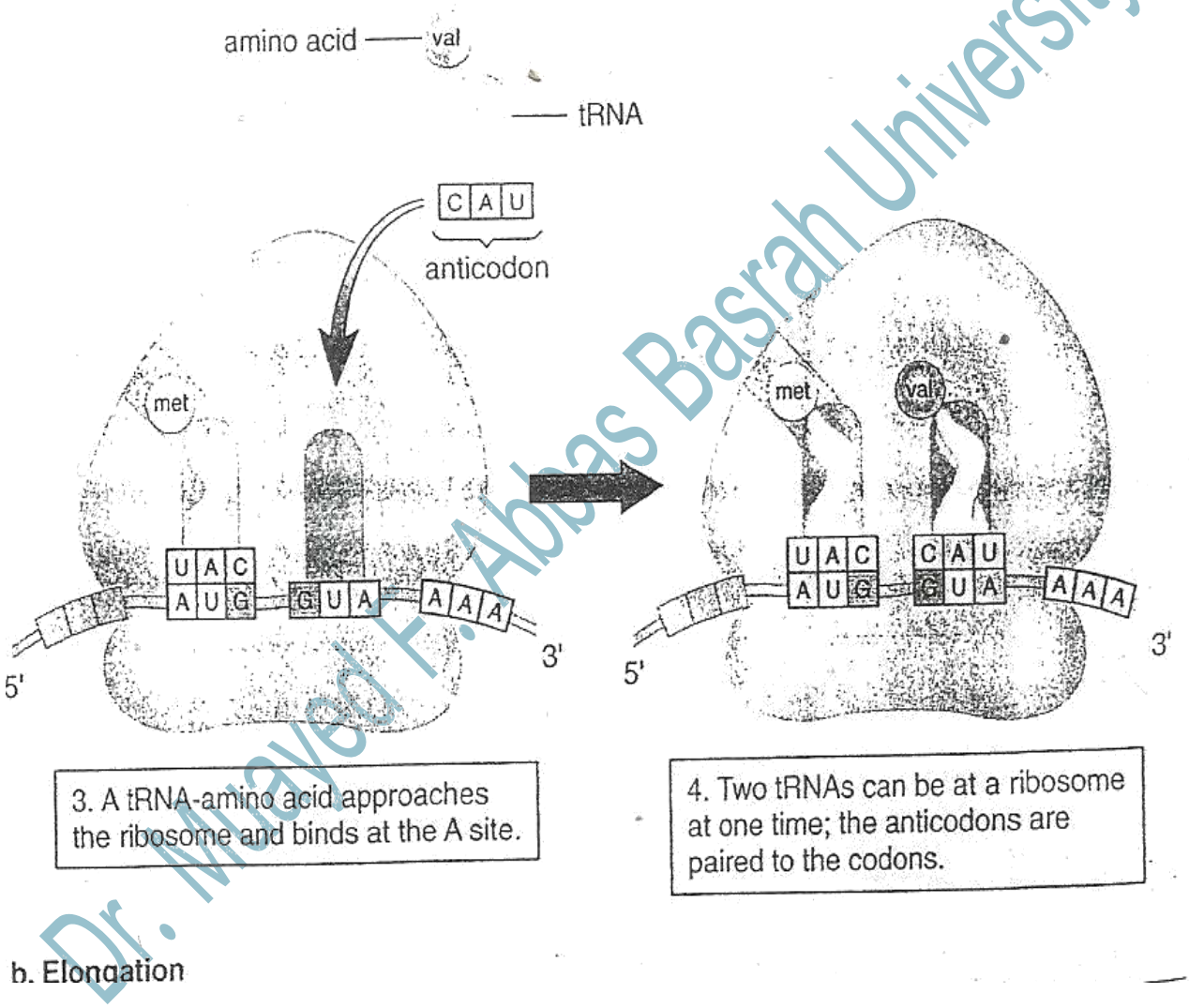
Dr. Muayed F. Abbas Basrah University

2-استطالة السلسلة الببتيدية Elongation

وفي المرحلة الثانية والتي تسمى دورة الاستطالة يتحرك جزئ اخر مشحون من لحامض الناقل tRNA نحو موضع ارتباط مجاور على المكون الرايبوسومي الاكبر يطلق عليه A site ثم يرتبط مع معقد الرايبوسوم بالطريقة نفسها بحيث تتيح للجزئ tRNA والذي يكون بالموضعA ان يرتبط بمقابله الشفري Anti codon CAU بروابط هيدروجينية مع الشفرة الثانية على شريط mRNA وهي GUA وبذلك يكون ناقل وحدة الحامض الاميني الفالين Valineفي الموضع A وفي هذه الاثناء تتكون اول رابطة ببتيدية بوجود انزيم Peptide transferase (الانزيمات الناقلة) يربط المثيونين مع الفالين methionine= valine .

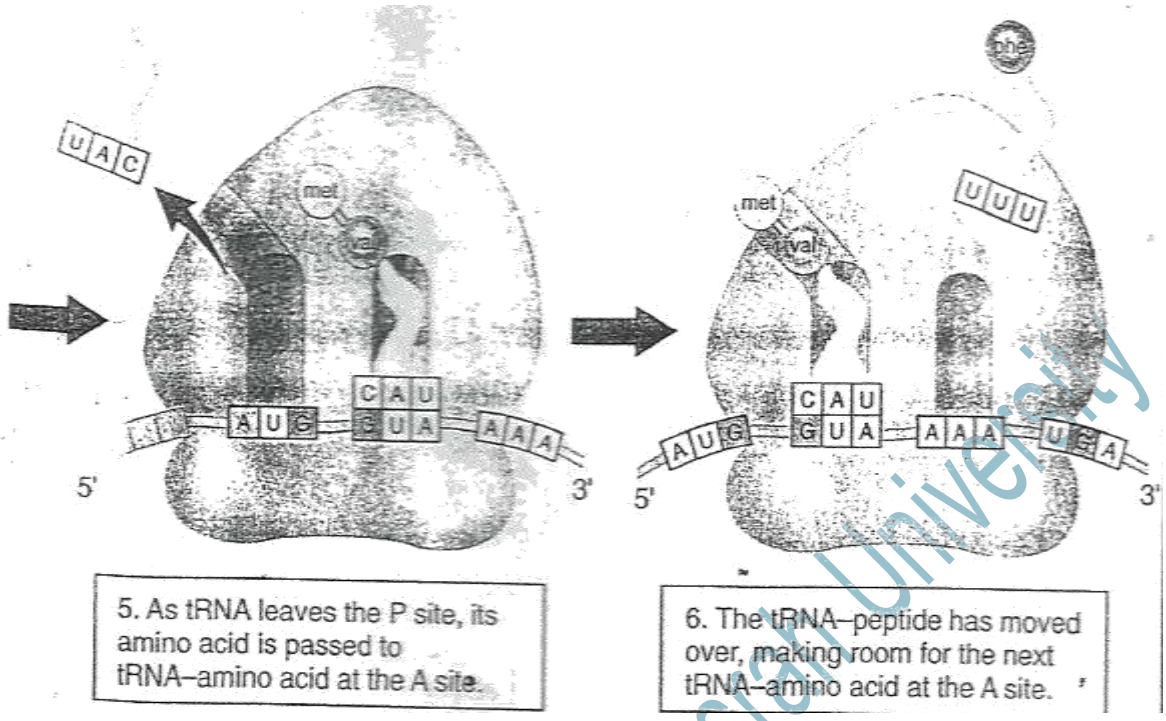
وفي الخطوة التالية والتي تسمى بخطوة الانتقال يتحرك الرايبوسوم نحو موضع الشفرة التالية على شريط mRNA وفي الوقت ذاته ينتقل الحامض الاميني المشحون بثنائي الببتيد في الموضع A الى الموضعP

الشاغر وكذا يصبح الموضع A شاغرا وذلك لاستقبال جزئ حامض نووي ناقل مشحون بحامض اميني جديد يتكامل بمقابله الشفري مع الشفرة الجديدة الثالثة وهي الحامض الاميني Phenyl alanine UUU والذي يتكامل قاعديا مع شفرة AAA . وبتكرار هذه العملية تتكون الروابط الببتيدية واحدة فواحدة وتنمو السلسلة الببتيدية عن طريق اضافات متتابعة لاحماض ناقلة مشحونة بدورها التتابع الشفري على شريط mRNA والمحدود بدوره بالتتابع القاعدي الناتج من الDNA .



b. Elongation

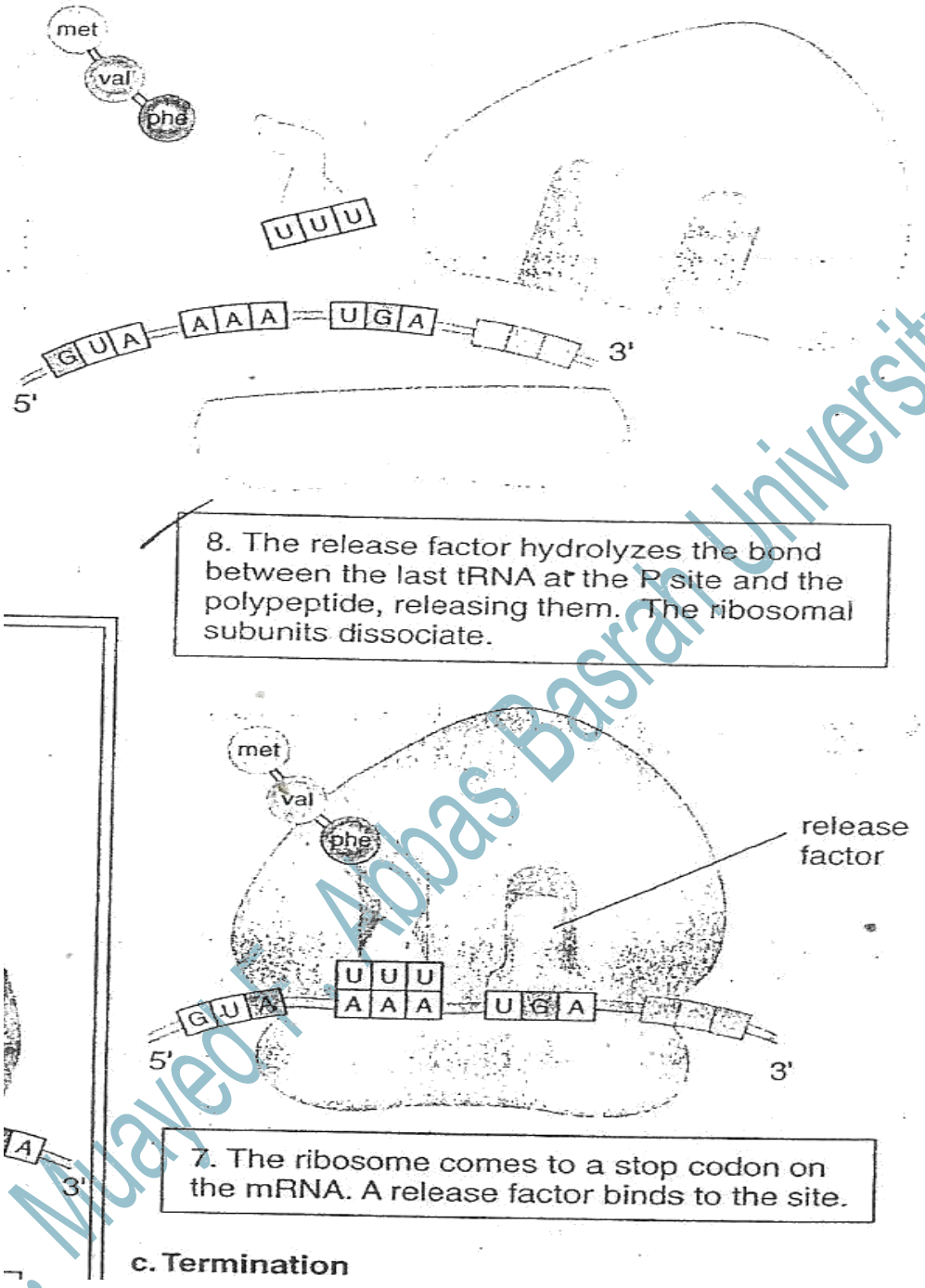
Dr. Muayed F. Abbas Basrah University



3-عملية الفصل (انفصال السلسلة الببتيدية) Chain termination

وفي هذه الخطوة يتم انهء السلسلة الببتيدية وانفصالها عن الرايبوسوم حيث تتضمن استخدام احد شفرات التوقف stop codon هي ثلاثة موجودة على شريطmRNA وشفرات التوقف هذه هي UGA ,UAG, UAA . فلو فرضنا انه تم استخدام شفرة التوقف UGA يتكون لدينا عامل فصل يسمى release factor موجود بالموضع A من الرايبوسوم وعامل الفصل هذا يعمل على التحلل المائي للرابطة الموجودة التي تربط عديد الببتيد والحامض الناقل وشريط mRNA ثم بعد ذلك تتحرك السلسلة الببتيدية الى السايتوبلازم ولايلبث ان يعود الرايبوسوم الطليق لتكوين مكونيه الصغير والكبير وذلك لاعادة الدورة من جديد مرة اخرى وهكذا .

Dr. Muayed F. Abbas Basrah University



Dr. Muayed F. Abbas Basrah University

بسم الله الرحمن الرحيم

محاضرة (6) الثلاثاء 2012/12/11

تطبيقات البايلوجي الجزيئي Applications of molecular biology

لقد شهد القرن العشرين ثورة في معلوماتنا عن البايلوجي الجزيئي ولقد اظهرت هذه المعرفة العلمية الجديدة اكثر من أي وقت مضى بان صور الحياة على وجه الكرة الارضية هي مرتبطة بعضها ببعض.
ان كل كائن حي يقوم باستخدام DNA و RNA لخزن ونقل المعلومات الوراثية وان كل كائن حي يستخدم نفس الشفرة الوراثية لغرض تخليق وبناء البروتينات.
ومع تقدم معرفتنا في علم الوراثة اضحى العلماء يتسالون عن امكانية التلاعب بالمادة الوراثية وكذلك بعملية التعبير الجيني . لقد بدا العلماء بالاستفسار وطرح الكثير من الاسئلة منها:-

1- هل بالامكان نقل جين من كائن حي الى اخر؟ ومن ثم جعل هذا الجين يعبر عن نفسه بالمضيف الجديد؟
2- هل بالامكان دمج جينين في جين واحد؟
3- هل بالامكان استخدام خصوصية ال DNA للانسان في سبيل التعرف عليه ؟
4- هل بالامكان تنظيم عملية التعبير الجيني؟
5- هل ان التغيرات في جزيئة ال DNA تعطينا بعض المعلومات عن عملية التطور؟
6- هل بالامكان النظر الى جزيئة الDNA ثم تحديد الطفرات التي قد تؤدي الى حدوث امراض معينة؟
7- هل بالامكان التعرف على الكائنات الحية على اساس تعاقب جزيئات ال DNA ؟
8- هل بالامكان تغيير التركيب الجيني للكائن الحي بطريقة تجعله مفيد للبشرية ؟

قبل الاجابة عل هذه الاسئلة فانه من الضروري ايجاد الطرق اللازمة للتلاعب بجزيئة ال DNA ان هذا الشئ قد تنبين انه سهل نسبيا لان جزيئة الDNA تحدث لها عملية تلاعب وتغييرات كثيرة بصورة مستمرة في الطبيعة. فجزيئة الDNA تستنسخ ثم تقطع ثم يعاد ربطها مرة تلو اخرى بالخلايا الحية .ان الادوات الطبيعية في التلاعب بجزيئة ال DNA هي الانزيمات وعليه فان التقنيات التي تستخدم فيها جزيئة الDNA تستخدم هذه الانزيمات التي تمكن الباحثون من التعرف عليها ومن ثم فصلها او عزلها واستخدامها في المختبر .انم اهم تطبيقات البايلوجي الجزيئي هي عملية ترقيع او توليف او تهجين جزيئة الDNA Recombinant DNA technology (rDNA). ان ظهور هذا العلم او هذه التقنية الى الوجود قد تحقق وذلك بعد ان تم اكتشاف الادوات التي تستخدم في هذه التقنية . واهم هذه الادوات هي الانزيمات ومن اهم هذه الانزيمات التي ادت الى ظهور تقنية ترقيع ال DNA هي الانزيمات القاطعة او المحددة وغالبا مانقرأ بان اكتشاف الانزيمات القاطعة هو الذي جعل علم الهندسة الوراثية ممكننا فما هي الانزيمات القاطعة ؟

1- الانزيمات المحددة او القاطعة Restriction enzymes
2- Restriction endonucleases

هذه الانزيمات اول ما اكتشفت في البكتريا عام 1962 وفي سنة 1973 قام الباحثان Cohen و Boyer باكتشاف تقنية القطع واللصق cut and paste لقطع ال DNA هذه الانزيمات موجودة في البكتريا في الاصل وعادة فان الفايروسات تعتبر البكتريا ضيفها المفضل وعلى هذا الاساس فان البكتريا طورت وسيلة

Dr. Muayed F. Abbas Basrah University

للدفاع عن نفسها وهذه الوسيلة هي نظام قطع انزيمي هذا النظام مكن البكتريا من تقطيع الفايروسات الى قطع صغيرة بحيث يصبح عديم التاثير وهذه الانزيمات تستطيع ان تتعرف على ال DNA الخاص بالبكتريا ومن ثم لاتهاجمه.

ان اكتشاف هذه الانزيمات ادى في الواقع الى ظهور علم الهندسة الوراثية وذلك لان هذه الانزيمات هي التي جعلت ولاول مرة امكانية العمل مع قطع صغيرة ومحددة من الDNA وفي السابق كان الباحثون يتعاملون مع الكروموسومات وهي جزيئات عملاقة يصعب التفاعل معها ولكن توفر الانزيمات القاطعة يعتبر هو المسؤول عن احداث ثورة في علم البايلوجي الجزيئي .

1-انواع الانزيمات القاطعة

Nuclease ويقصد به انزيم يقطع الروابط الفوسفواسترية التي تكون العمود الفقري للDNA .

Endonuclease -1

هو عبارة عن انزيم يقطع الDNA في داخل الجزيئ ال DNA (ليس من البداية لكن من الوسط).

Exonucleases-2

هو الانزيم الذي يقوم بقطع الروابط الفوسفواسترية في النهاية الحرة او الطليقة من البداية ويستمر للداخل.

صفات الانزيمات القاطعة

كما ذكرنا سابقا ان الانزيمات القاطعة اكتشفت لاول مرة من خلال مقدرتها على تقطيع الDNA الغريب .

أي ان الانزيمات القاطعة لها القدرة على تقطيع الDNA الموجود بصورة طبيعية في الخلايا Self-DNA وال DNA الغريب .

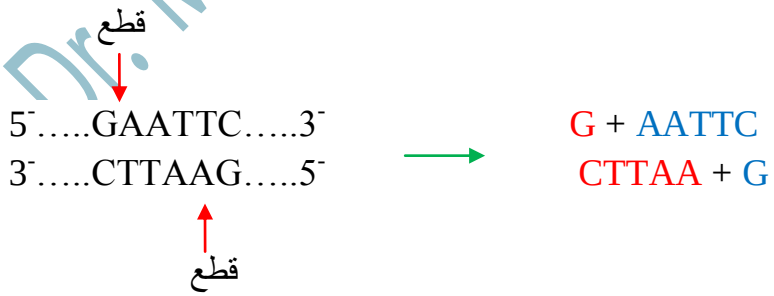
الانزيمات القاطعة

هي عبارة عن بروتينات لها القدرة على التعرف على تسلسل محدد من القواعد النيوكليوتيدية ومن ثم تقوم بقطع الDNA في المكان المحدد . هذه الانزيمات عادة تتعرف على تعاقبات من القواعد النيوكليوتيدية التي قد تكون 4 او 6 وبعضها ايضا تهاجم التعاقبات التي طولها 8 وعادة يكون تسلسل القواعد النيوكليوتيدية الذي يتم التعرف عليه هو متماثلا في كلا الاتجاهين .

انواع القطع في الانزيمات القاطعة

Eco R1-1 بكتريا القولون

هذا الانزيم يتعرف على التسلسل او التعاقب النيوكليوتيدي الاتي:-

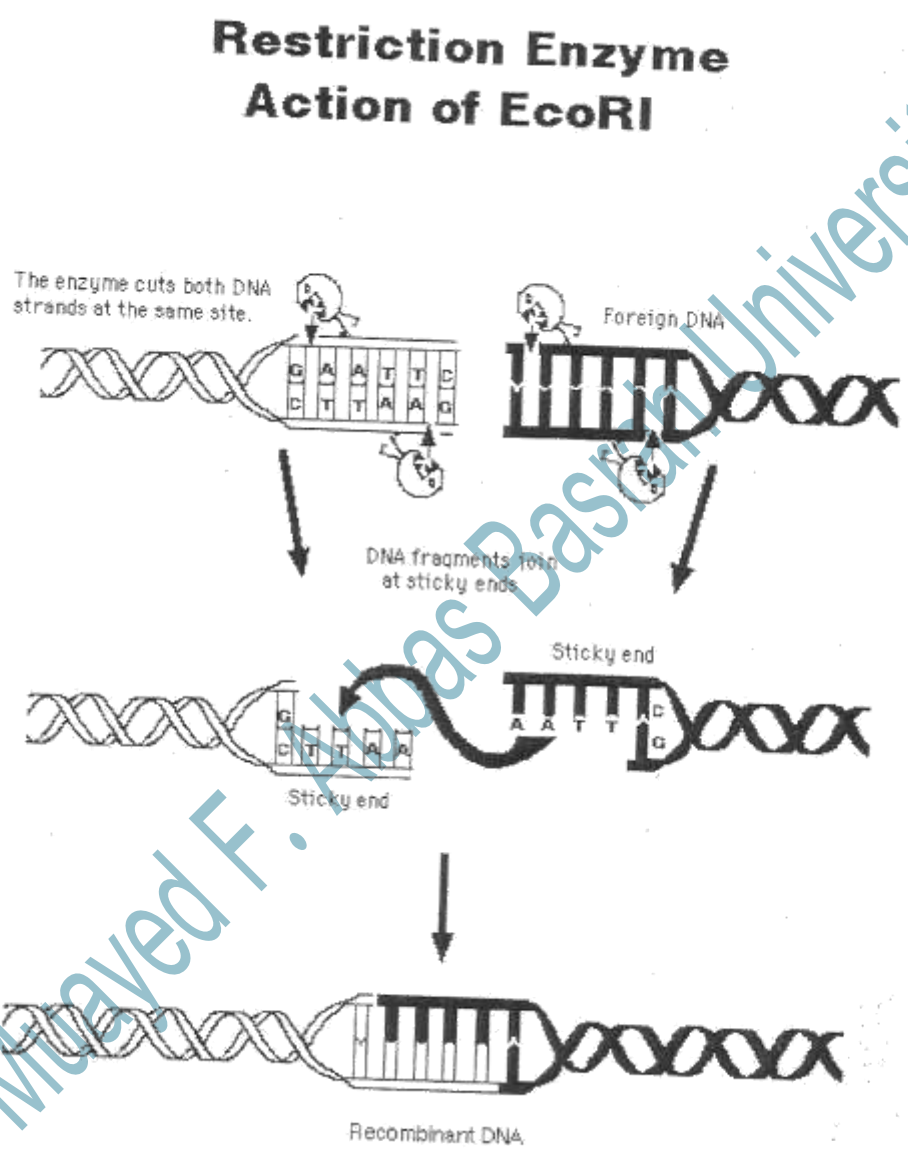


القطع يقع دائما بين الكوانين والادنين .

وباستخدام هذا الانزيم نحصل على قطع Fragments تحتوي على نهايات احادية الشريط هذه النهايات الاحادية الشريط يطلق عليها اصطلاح stick ends النهايات اللاصقة . نظرا لمقدرتها على الارتباط الى

Dr. Muayed F. Abbas Basrah University

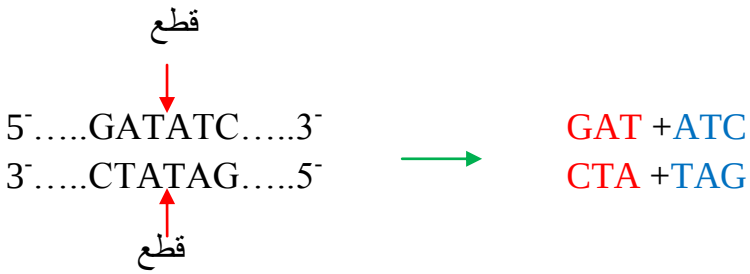
منطقة احادية الشريط مكملة لها وعلى هذا الاساس فان هذه النهايات اللاصقة لاحد القطع يمكن ان تتكامل قاعديا مع أي قطعة اخرى من الDNA بمافي ذلك تلك التي تعود الى كائنات حية مختلفة والتي تمتلك تسلسل قاعدي مكمل لها.



Dr. Muayed F. Abbas Basrah University

Eco Rv -2

هذا النوع من القطع تقوم به بعض الانزيمات القاطعة مثل Eco Rv هذا الانزيم يقطع بشكل نهايات حادة عند الادنين والثيامين كما هو موضح بالشكل :-



هذا النوع من القطع او مايطلق عليه اصطلاح blunt cut او blunt ends القطع الاعمى او النهايات العمياء . هذا الانزيم يستخرج من بكتريا القولون وعلى العكس من الانزيمات التي تؤدي الى الحصول على نهايات لاصقة فلا يشترط توفر توافق او تكامل قاعدي بحيث ان هذه النهايات يمكن ربطها باستخدام الانزيمات الرابطة او اللاصقة والتي سوف نتطرق لها فيما بعد وتسمى الانزيمات القاطعة DNA scissors مقصات الDNA .

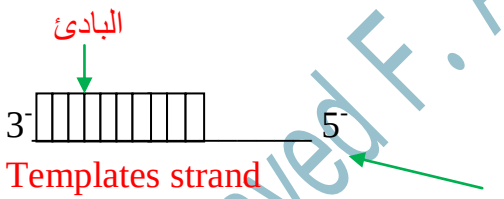
2-مجموعة انزيمات بلمرة ال DNA polymerase

هذه المجموعة من الانزيمات هي عبارة عن انزيمات تقوم باستنساخ الDNA كما تقوم ببناء شريط جديد منفرد الذي هو مكمل تماما للشريط الام او القديم old strand وتسمى ايضا بالDNA Replicators مكررة للDNA ولكي يقوم هذا الانزيم بعمله فانه من الضروري توفر شيئين هما:-

1-القالب Templates strand

2-البادئات Primers

البادئات هي عبارة عن قطعة من الDNA وهذه القطعة تتكامل قاعديا مع القالب الام الاصلي بطريقة بحيث ان النهاية للبادئ التي تحتوي على فوسفات ثلاثية طليقة هي دائما متوفرة كنقطة بداية للDNA الجديد هو موضح بالشكل المبسط التالي :-

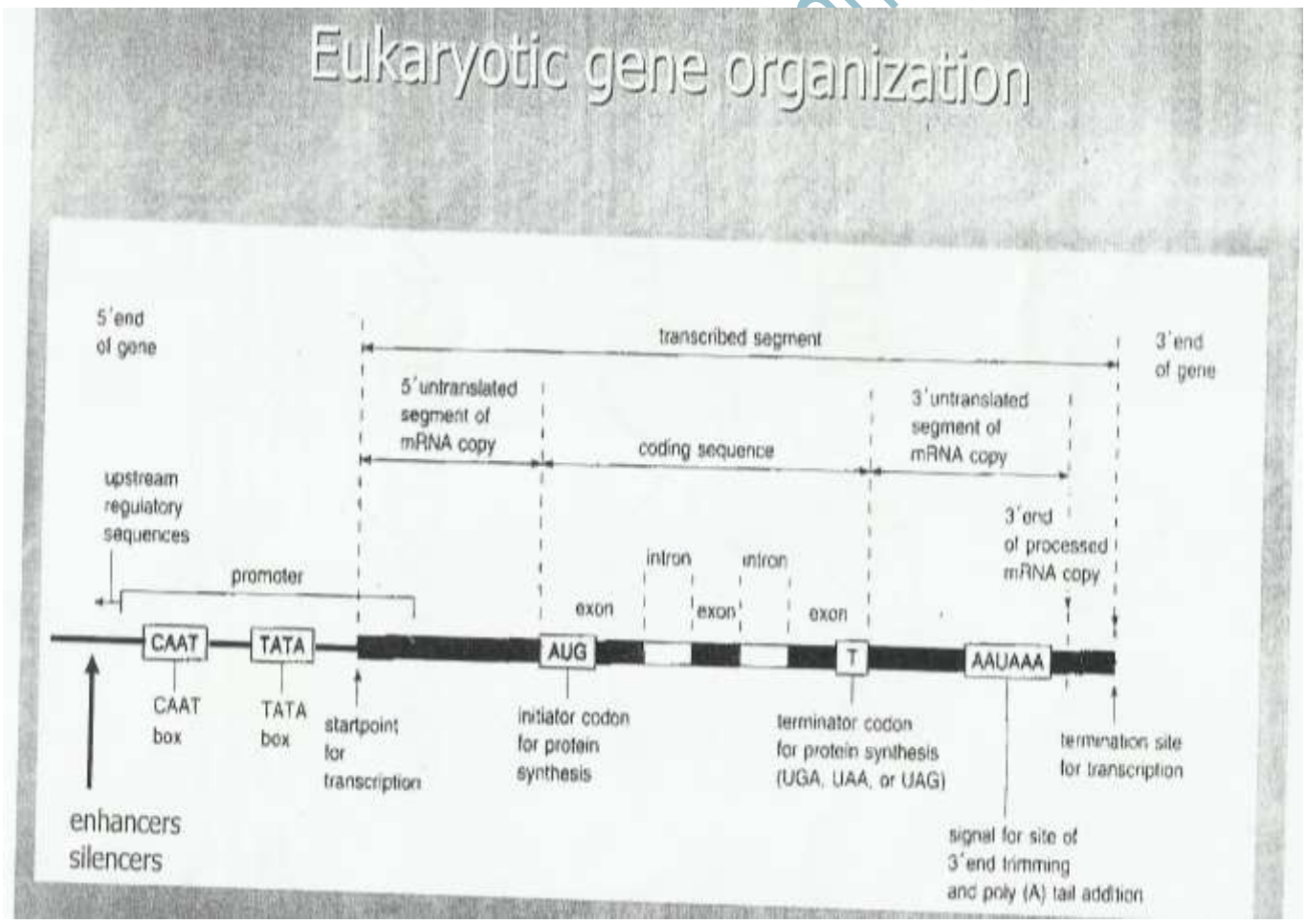


ان القاعدة الجزيئية للDNA الجديدة سوف ترتبط بالبادئ بواسطة روابط فوسفو استرية مع النهاية التي تحتوي على فوسفات ثلاثية طليقة في المركب البادئ وهي مكملة للقاعدة الموجودة على الشريط الاصلي وتستمر عملية البناء باضافة قواعد جديدة الى المركب البادئ.

ان انزيم بلمرة الDNA قد تم استخلاصه وتنقيته من العديد من الكائنات الحية وهذا الامر طبيعي لان جميع الكائنات الحية تستخدم هذا الانزيم وذلك لتكرار الDNA الخاص بها . وغالبا مايطلق عبارة Replicator المكرر على انزيم بلمرة الDNA وذلك لان عملية الاستنساخ الدقيق والمضبوط للDNA هو واحد من اهم الوظائف الرئيسية لاي كائن حي يجب ان يقوم بها خلال حياته كما ان انزيم بلمرة الDNA يقوم ليس فقط ببناء القواعد النيوكليوتيدية الموجودة في الخلايا الحية بل ايضا يقوم بعملية تدقيق Proof reading ويدقق القواعد الجديدة لغرض التاكد والدقة .

Dr. Muayed F. Abbas Basrah University

ان جميع البكتريا والكائنات الحية الراقية والفايروسات لها انزيم بلمرة الDNA الخاص بها والذي هو مشهور في جزيئة الDNA وتمتاز انزيمات بلمرة الDNA انها تعمل بنفس الطريقة وكذلك يشبه احدهما الاخر وعليه فان الباحثون في مجال البايلوجي الجزيئي غالبا مايقومون بدراسة تكرار الDNA في انظمة بايلوجية بسيطة مثل خلايا بكترية اوفايروسات حيوانية ومن هذه الدراسات التي اجريت على الكائنات الحية البسيطة ثم الحصول على العديد من الحقائق حول انزيم بلمرة الDNA وهناك مجموعة من الكائنات الحية التي اصبح انزيم بلمرة الDNA العائد لها ذو اهمية قصوى من مراكز الابحاث الا وهي البكتريا التي يطلق عليها اسم *Thermus aquticus* البكتريا الحرارية . تعيش في الينابيع الحارة وقد وجد ان انزيم بلمرة الDNA المستخلص من هذه البكتريا يتحمل درجة حرارة تصل الى 95 م وفي الوقت الحاضر تم استخدام هذا الانزيم المتحمل للحرارة من استنساخ قطع من الDNA باستخدام تفاعل يطلق عليه تفاعل البلمرة المتسلسل او المتعاقب Polymerase chain reaction (PCR) والذي يحتاج الى اجراء عملية تسخين متكرر لمزيج الانزيم والDNA .



بسم الله الرحمن الرحيم

محاضرة (7) الثلاثاء 2012/12/18

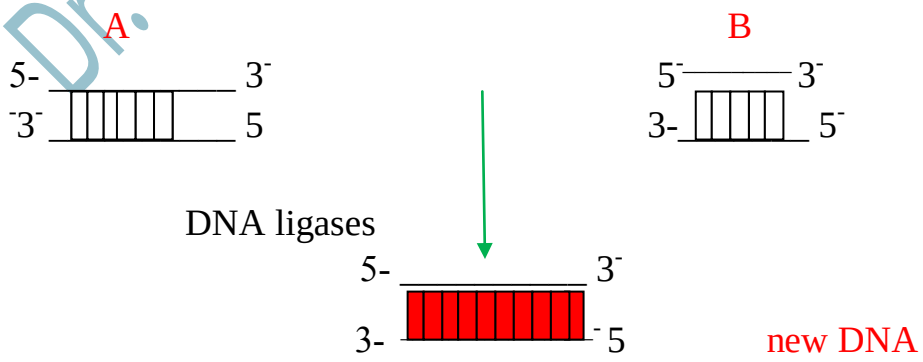
3-مجموعة انزيمات بلمرة ال RNA polymerase

ان انزيم بلمرة الRNA هو عبارة عن انزيم يقوم بقراءة التسلسل القاعدي في جزيئة الDNA ويقوم بتخليق جزيئة RNA مكملة .تخليق جزيئة RNA يحتاج الى تسلسل خاص من القواعد على قالب الDNA يسمى المنشط Promoter حيث انه يعطي اشارة لبدء عملية الاستنساخ الا ان نزيم بلمرة الRNA لايحتاج الى بادئات Primers وكما هو الحال في انزيم بلمرة الRNA تم تنقيته والحصول عليه من العديد من الكائنات الحية نظرا لان جميع الكائنات الحية يجب عليها ان تستنسخ جيناتها.

4-الانزيمات اللاصقة او اللاحمة DNA Ligases

هذه الانزيمات تربط قطع من الDNA سوية بتكوين روابط فوسفو استرية جديدة .ان قطع ال DNA Fragments الناتجة من استخدام الانزيمات القاطعة بالامكان وضعها سوية من جديد باستخدام الانزيمات اللاصقة او اللاحمة والتي تكون روابط فوسفو استرية بين النهايات 3- و5- للنيوكليوتيدات وكما متوقع فان النهايات العمياء لل DNA بالامكان ربطها لاي نهاية عمياء اخرى دون اعتبار للتسلسل النيوكليوتيدي للجزيئتن التي يتم ربطهما.

اما القطع الناتجة من الانزيمات القاطعة والتي تحتوي على نهايات لاصقة او ذيول Tails الناتجة من بكتريا Eco R1 تكون اكثر كفاءة لحدوث تهجين بين هذه النهايات اللاصقة بسهولة بالمقارنة بلقطع ذات النهايات العمياء ان الانزيمات القاطعة مع الانزيمات اللاصقة للDNA تلعب الدور الحاسم في عملية كلونة الDNA Cloning وبالنسبة للشخص المتخصص في البايولوجي الجزيئي فان كلونة قطعة من الDNA تعني اضافة تلك القطعة من الDNA الى بلازميد Plasmid او ناقل اخر ثم وضع هذا الناقل او البلازميد مرة ثانية في خلية النبات المضيف ومن الطرق السهلة والمضمونة لتحقيق ذلك هو ربط قطع الDNA بالبلازميد والتي تم قطعها مرة واحدة وبنفس الانزيم القاطع. ان الجزء المقطوع من الDNA سوف يصبح جزء من ذلك البلازميد وذلك عندما يقوم انزيم الDNA اللاصق بتكوين روابط فوسفواسترية بين ال DNA والDNA العائد للبلازميد ويوضح المخطط المبسط الاتي:-



Dr. Muayed F. Abbas Basrah University

5-مجموعة انزيمات الاستنساخ العكسي Reverse Transcriptase

وهي من الانزيمات المهمة جدا في علم البايولوجي الجزيئي وهذه الانزيمات كما يلاحظ من اسمها عادة تقوم بقراءة التسلسل النيوكليوتيدي من جزيئة الRNA ثم نقوم بتخليق اوبناء جزيئة DNA مكملة Complementary DNA ويرمزلها cDNA لتميزها عن الDNA الاعتيادي الناتج من تكرار الDNA هذه الانزيمات تقوم بتخليقها فايروسات تسمى Retro viruses وهي تهاجم الحيوانات والانسان ولكن لاتهاجم النبات . هذه الفايروسات تمتاز بمقدرتها على تحويل هيئتها الجينية من الRNA الى الDNA وذلك عندما تقوم باصابة كائن حي .

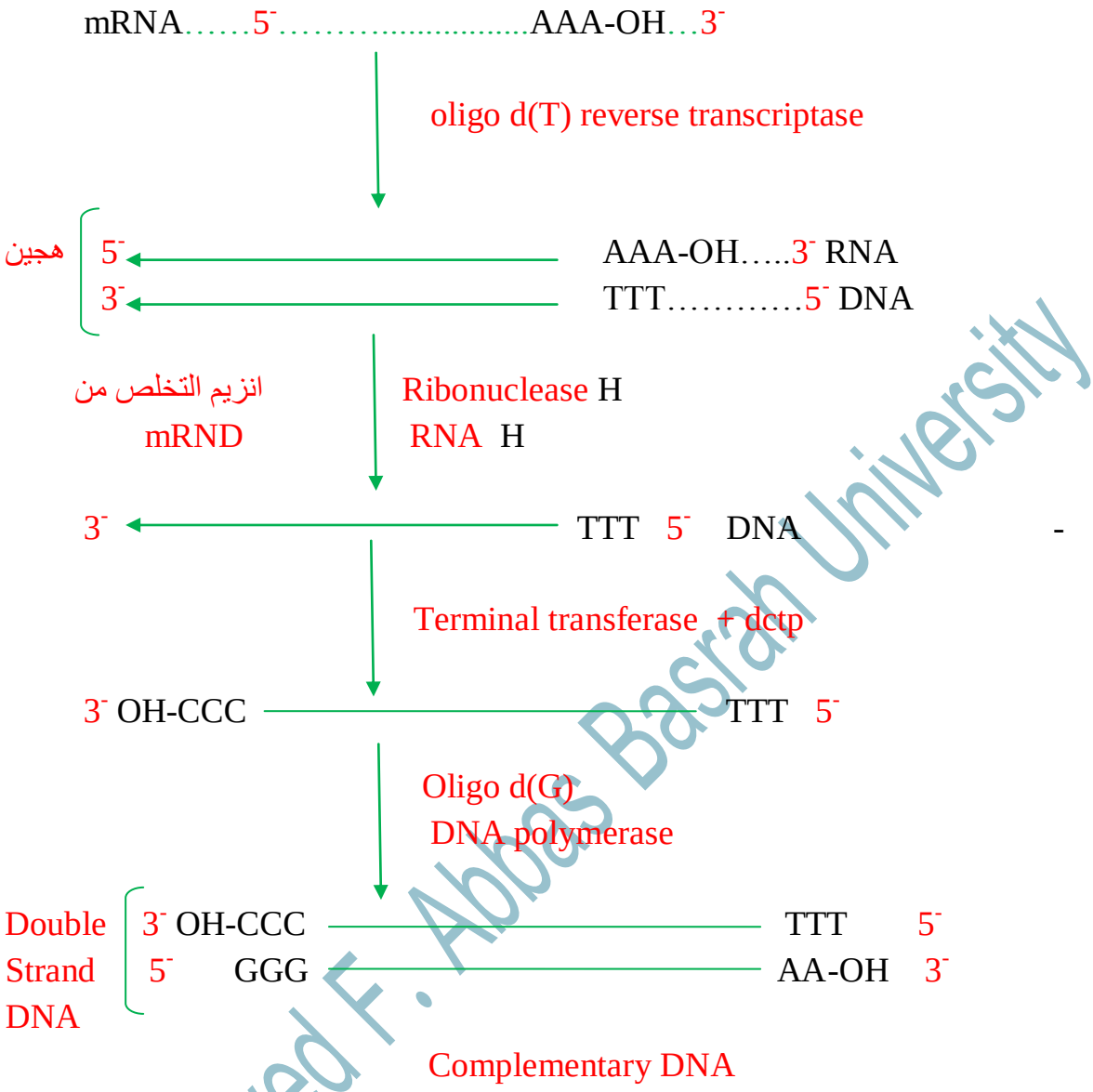
ان انزيمات الاستنساخ العكسي قد مكنت الباحثين في مجال الهندسة الوراثية من تخليق جين في رسالة الRNA وهذه المقدرة مهمة جدا بالنسبة لجينات الكائنات الحية حقيقية النواة الا ان هذه الجينات تكون مقسمة الى جزيئات صغيرة منفصلة بالانزون والاكسون التي هي الاجزاء غير الشافرة للجين ولذلك فان الmRNA في هذه الجينات قد حدثت له عملية ازالة او التخلص من الانزون بحيث تبقى الاجزاء الشافرة فقط والتي تسمى الاكسون . ان انزيم الاستنساخ العكسي قادر على تحويل mRNA الى جين (DNA) يتكون من التسلسلات النيوكليوتيدية التي تقوم بالشفر للبروتينات.

السؤال الان كيف تحدث عملية الاستنساخ العكسي لجزيئة cDNA ؟

الجواب:-

ان الجزء الرئيسي لعملية الاستنساخ لجزيئة cDNA من جزيئة mRNA والمستخدم كقالب ،تدور حول نقطة اساسية هو انزيم الاستنساخ العكسي هذا الانزيم كما هو الحال في الانزيمات التي تستخدم في تخليق الDNA يحتاج الى بادئ Primer لبدء عملية التخليق او البناء ولحل هذا الاشكال فاننا سوف نستفاد من الذيل poly d,a tail الموجود في نهاية جزيئة mRNA ثم نستخدم مركب بادئ هذا المركب هو عبارة عن oligo d(T) وهو مكمل قاعديا لل poly d(A) وبالتالي يحدث الارتباط مع poly d(A) الموجود في النهاية 3- للحامض الرايبوزي الرسول mRNA ثم تبدا عملية تخليق الDNA مستخدمين ال mRNA كقالب بوجود انزيم الاستنساخ العكسي . وبعد عملية الاستنساخ اعتمادا على قالب mRNA نحصل على DNA احادي الشريط (الشريط الاول) وبعد ذلك يجب ازالة شريط mRNA . وهذه عملية الازالة يمكن تحقيقها اما بواسطة قاعدة مثل NaOH الا اننا عادة نستخدم انزيم يسمى Ribonuclease Helicase هذا الانزيم يفصل جزيئة الRNA من الهجين الذي يتكون من شريط ال RNA وشريط الDNA باستخدام الشريط الاول كقالب ، ومرة ثانية فاننا نحتاج الى مركب بادئ ، ولكن في هذه الحالة لانملك الpoly d(A) الذي حدث له تهجين مع المركب البدئ في الحالة الاولى .الان نقوم باضافة ذيل صناعي هذا الذيل مكون من oligo d(c) يضاف على النهاية التي تحوي على فوسفات ثلاثية طليقة من الشريط الاول وذلك باستخدام انزيم يسمى Terminal transferase ونستخدم deoxy cytosine triphosphat هذه المادة تضاف مرة بعد اخرى الى النهاية 3- في الشريط الاول . الان اصبح لدينا ذيل oligo d(c) dctp في الشريط الاول من الDNA .والان نقوم باضافة قطعة صغيرة من الoligo d(G) والذي يستخدم كبادئ ويتكامل قاعديا مع السايتوزين وبذلك تبدا عملية تخليق الشريط الثاني من الDNA ونحصل على جزيئة DNA مكملة وهيcDNA ومزدوجة الشريط كماهو موضح بالمخطط المبسط الاتي:-

Dr. Muayed F. Abbas Basrah University



بعض الطرق الاساسية في التقانات الاحيائية .

1-الترحيل الهلامي الكهربائي Gel electrophoresis

الانزيمات القاطعة التي اشرنا اليها سابقا تقوم بتقطيع الDNA الى قطع صغيرة هذه القطع او عملية التقطيع يطلق عليها .اصطلاحRestriction digest . المحلول المهضوم الناتج وتجري هذه العملية ببساطة.باضافة الDNA والانزيم معا في انبوبة الاختبار الانه لايمكن الاستفادة من نتيجة الهضم هذه .وعلى هذا الاساس ولكي تصبح عملية الDNA لها معنى فانه من الضروري ان يقوم الشخص المختص بالتعرف على هذه القطع للDNA والنظر اليها . هناك بعض الصبغات الكيميائية التي تقوم بتصبيغ الDNA الانه لاتوجد فائدة تذكر من اضافة تلك الصبغات الى مزيج من الانزيم والDNA المقطع في انبوبة اختبار.

Dr. Muayed F. Abbas Basrah University

وعلى هذا الاساس فانه من الضروري استخدام تقنية في المختبر تمكنا من التعرف على قطع الDNA هذه التقنية يطلق عليها اصطلاح الترحيل الهلامي الكهربائي .هذه التقنية تعتمد على كيمياء المادة التي تتعامل .وفي حالة جزيئة الDNA فانه تحت الظروف الطبيعية الPH ودرجة الحرارة فان وجود مجاميع الفوسفات التي تكون العمود الفقري لجزيئة الDNA تعطي هذه الجزيئة شحنة سالبة وفي أي مجال كهربائي معين فان الشحنات المختلفة سوف تتجاذب ولهذا فان جزيئة الDNA سوف تتحرك نحو القطب الموجب ان المجال الكهربائي يجعل جزيئات الDNA تتحرك ثم تنفصل بعضها عن بعض ثم تسهل عملية رؤيتها .وهذه العملية تتم باكملها في الجلاتين Gel ومن اكثر انواع الgel استخداما في تقنية الترحيل الهلامي الكهربائي هو المسمى الAgarose وهو عبارة عن مادة عديدة التسكر polysugare والتي تذوب بالماء الحار ثم تتصلب عند التبريد ولاجراء عملية الترحيل الهلامي الكهربائي يتم تحضير الAgarose ثم تضاف عينات الDNA في حفر صغيرة تسمى بالابار وبعد ذلك تقوم بتسليط تيار كهربائي خلال الجيل ونظرا لان الDNA مشحون بشحنة سالبة قوية فانه سوف يتحرك نحو القطب الموجب. حركة قطع الDNA تسمى الهجرة الكهربائية هذه الحركة تتناسب عكسيا مع اللوغارتم للاساس 10 للوزن الجزيئي هذا يعني انه عند اضافة قطع من الDNA ثم نقوم بتمرير تيار كهربائي لفترة من الزمن فان جزيئات الDNA الصغيرة هي الاقرب الى القطب الموجب وبعدها القطع الاكبر فالاكبر وهكذا . وبالنظر لوجود هذه العلاقة اللوغارتمية العكسية وباستخدام محاليل قياسية نستطيع معرفة حجم هذه القطع. وعادة يتم استخدام بعض الصبغات وذلك لتوضيح عملية الترحيل وبالنسبة للجزيئات العملاقة مثل ال DNA والRNA فاننا نستخدم صبغة تسمى Ethidiume Bromide (ETBR) وعند اضافة هذه الصبغة يتكون معقد وهذا يتفلور (يعطي وميض عند تعرضه للاشعة) اما في اما في حالة البروتينات فان الصبغة المستخدمة (Coomassie Blue) زرقاء اللون.

Dr. Muayed F. Abbas Basrah University

بسم الله الرحمن الرحيم

محاضرة (8) الثلاثاء 2013/1/8

2- تقنية التحليل بالتهجين (تحديد تسلسل اوتعاقب الDNA)

Delection of specific DNA sequencing (Hybridization analysis)

التهجين :-هي عملية طبيعية تجهز المختص في مجال البايولوجي الجزيئي باحد الوسائل المهمة للقيام بعمله. ان عملية التهجين تحدث بصورة تلقائية فاذا تم خلط شريطين منفردين من الDNA بينهما تكامل قاعدي فسوف تحدث عملية تهجين .الوقت اللازم لحدوث عملية التهجين مرتبط بصورة مباشرة بطول قطع الDNA وكما هو متوقع فان القطع الصغيرة من الDNA يمكن ان تصطف ويحدث لها تكامل قاعدي بصورة سريعة مقارنة بالقطع الطويلة . والسؤال الان ماهي اهمية التحليل بالتهجين بالنسبة للشخص المختص في التقنية الحياتية النباتية ؟.

الجواب:-

ان عملية تقطيع الDNA باستخدام الانزيمات القاطعة والترحيل الهلامي الكهربائي والتصبيغ يعطينا بعض المعلومات عن حجم هذه القطع الا اننا لانستطيع الحصول على أي معلومات عن التسلسل النيوكليوتيدي في جزيئة الDNA وعليه فان التحليل بالتهجين هو عبارة عن تقنية تمكنا من تحديد التسلسل او التعاقب النيوكليوتيدي للDNA في خليط منه .ان عملية التحليل بالتهجين تتم كالاتي :-

اولا قبل كل شئ تنفصل شرائط ال DNA بعملية تسمى بالدنترة عادة بالتسخين بدرجة حرارة عالية .بعد ذلك يتم خلط الشرائط المفصولة مع العديد من نسخ الDNA احادية الشريط التي تمتاز بامتلاكها التكامل القاعدي المثالي للقواعد الموجودة في جزيئة الDNA المرغوب تحديدها ، وعادة التسلسل القاعدي يستخدم جزيئات من الDNA احادي الشريط معلمة بمواد مشعة وهذه الجزيئات الDNA يطلق عليها اصطلاح probes مجسات وعند خلط هذا المجس مع الDNA الاحادي الشريط في العينة التي تم استخلاصها وتحت الظروف الصحيحة (درجة حرارة ،PH ، مواد كيميائية معينة) فان اواصر هيدروجينة تتكون بين المجس والقواعد المكملة له في جزيئة الDNA في العينة التي نرغب بدراستها . ان تكوين الاواصر الهيدروجينية بين الشرائط المتكاملة يؤدي الى اعادة تكوين الحلزون المزدوج وهذه العملية يطلق عليها اصطلاح التهجين او الAnnulling الالتصاق اما اذا كان نموذج العينة المراد دراستها لايحتوي على التسلسل القاعدي المطلوب والذي هو مكمل بالمجس فلا يحدث الالتصاق لجزيئات المجس بالعينة . وبعد مدة محدودة من اجراء التهجين نقوم بعملية شطب او غسل Rinsing وذلك لازالة المجسات غير الممتدة او الملتصقة مع الDNA المرغوب واذا حصلنا على مجس ملتصق فهذا يعني ان التسلسل المرغوب في جزيئة ال DNA موجود في عينة الدراسة. ان دنترة الDNA الهدف منها هو فصل شريط جزيئة الDNA بتكسير الاواصر الهيدروجينية بين القواعد المتكاملة وكسر هذه الروابط يمكن تحقيقه اما بوسائل فيزيائية مثل الحرارة او كيميائية مثل القواعد NaOH (قد تقوم الاحماض بالمهمة) ولكنها قد تعمل على ترسيب جزء من النيوكليوتيدات خلال هذه العملية ولذلك فهي لاتستخدم . ولغرض تسهيل عملية التهجين وبالتالي تحديد التسلسل النيوكليوتيدي المرغوب بواسطة المجسات فان جزيئة الDNA المراد تحديد تسلسلها عادة ما يتم نقلها الى غشاء membrane وهذا الغشاء يكون مصنوع اما من النايلون او مادة النتروسلسلوز Nitro cellulose (الشفافيات) اما المجسات فهي من الناحية النظرية هي هي جزيئة من

Dr. Muayed F. Abbas Basrah University

الDNA عديدة النيوكليوتيد صناعية والتي تحتوي على 15-30 قاعدة وهي تستخدم نظرا لسهولة الحصول عليها والسبب الاخر هو ان الباحث له سيطرة تامة على التسلسل القاعدي فيها هذه المجسات يمكن تعليمها Labeling بعدة طرق اما ان تكون المادة المشعة موجودة في القاعدة النيوكليوتيدية نفسها او تضاف لها مجاميع فوسفاتية مشعة . اضافة الى ذلك هناك العديد من الطرق التي تستخدم فيها المجسات المشعة . وفي هذه الطرق فان المجس الذي يستخدم للكشف عن قطعة الDNA المرغوبة يحور كيميائيا بطريقة بحيث ان النتيجة تؤدي الى الحصول على ناتج اما ان يكون ملون او نحصل على لمعان او تفلور خاص وذلك بعد اضافة الDNA لغرض حدوث عملية التهجين .ان اهم شئ في اختيار المجس هو التاكد من ان المجس سوف يلتصق بالDNA المرغوب وعلى هذا الاساس فان احتمالات حدوث التهجين العشوائي تحصل بدرجة كبيرة واذا حدث اللتصاق مع وجود خلل فان الحلزون المزدوج الناتج سوف يكون اقل استقرارا من الحلزون المتكامل والصحيح والشكل الاتي يوضح استخدام مجس معلم بالمواد المشعة وذلك لاجراء عملية التحليل بالتهجين .

3- التعرف على الجينات Identification of gene

هناك العديد من الطرق التي يمكن استخدامها في التعرف على ثم عزل جين محدد او معين جميع هذه الطرق تحتاج الى مايطلق عليه DNA Library البنك الجيني وهناك نوعان من البنوك الجينية :-

الاول:- يسمى Genomic DNA library (البنك الجيني الكامل)

في هذه الطريقة يتم استخدام الهيئة الجينية باكملها WHOL GENE للكائن الحي وعادة تقطع هذه الهيئة الجينية الى قطع حجمها من 15-100kb وعملية التقطيع تتم باستخدام الانزيمات القاطعة بعد ذلك يتم ادخال هذه القطع الى نواقل خاصة هي البلازميدات وتعاد هذه البلازميدات الى البكتريا التي اخذت منها ثم تكثر هذه البكتريا ونحصل على خلايا بكتيرية محولة 0تحتوي على DNA غريب) Transformed bacterial cell نظرا لاحتوائها على الDNA الغريب الذي اتى من عملية التقطيع . هذه الخلايا البكتيرية المحولة هي عبارة عن بنك جيني كامل لذلك الكائن الحي واذا كان الباحث يعرف ماهو الجين الذي يرغب بدراسته فما عليه الا النظر الى هذا البنك ثم سحبه بواسطة المجسات . ونظرا لان الهيئة الجينية الكاملة للكائن الحي تحتوي على مساحات كبيرة من مناطق غير شافرة non coodonig regions فانه من الضروري ان يكون لدينا عدد كبير من هذه البكتريا التي تمثل جميع الجينات .

الثاني:- يسمىcDNA library

في هذه الطريقة نحصل فيها او نعمل فيها البنك الجيني وهذه الطريقة تستخدم في الكائنات الحية حقيقية النواة حيث كما هو معلوم معظم الDNA للكائنات الحية حقيقية النواة يحتوي علة قطع غير شافرة Entron وهي بالتالي غير مفيدة بالنسبة للباحث الذي يقوم بدراسة البروتينات المشفرة لهذه الجينات . ولغرض ان نتجنب اكثار اجزاء غير شافرة من ال DNA فاننا نستخدم البنك الجيني المكمل cDNA . ان الخطوة الاولى في عمل مثل هذه البنوك الجينية المكملة هي عزل او فصل الmRNA الذي يشفر الى بروتين معين ، ثم نقوم بتحويل الmRNA المعزول الى cDNA باستخدام انزم الاستنساخ العكسي ، والDNA احادي الشريط الناتج نقوم بتحويله الDNA ثنائي الشريط وذلك باستخدام انزيم بلمرة الDNA بعد ذلك هذا

Dr. Muayed F. Abbas Basrah University

الcDNA المكمل نقوم بادخاله في نواقل خاصة (البلازميدات) ثم تحدث عملية تحويل للبكتريا بعد ذلك نقوم باكثار هذه البكتريا التي بداخلها الcDNA المكمل او الغريب . عدد السلالات الناتجة من الاكثار هو اقل من حالة البنك الجيني الكامل الا ان فائدة هذه الطريقة هي ان كل قطعة من الDNA تمثل جين فعال في عملية الاستنساخ.

ونظرا لان البنوك الجينية تحتوي على الاقل مليون جين فيجب ان تتوفر طرق دقيقة وسريعة بهدف التعرف على كل جين ومن اكثر الطرق استخداما عملية غربلة الDNA DNA screening عملية الغربلة يتم اجرائها باستخدام التحليل بالتهجين والتي فيها يستخدم مجسات وهذه المجسات عادة تكون معلمة بمواد مشعة . ولاجراء ذلك فان البكتريا المحتوية على النواقل البلازميدات التي تحوي على جميع القطع الجينية للبنك الجيني نقوم بتخفيفها حيث توزع في اطباق بتري بحيث تسمح لكل البكتريا ان تكون مستعمرة خاصة بها وذلك عندما تتم تنميتها على قطع الاكر . بعد ذلك نضع غشاء من النايلون (الشفافيات) على كل طبق لغرض اللتصاق هذه القطع ،ثم بعد ذلك نقوم باجراء عملية الدنترة لهذه الجينات فصل شريطي الDNA للحصول على شرائط احادية هذه الشرائط يتم تحظينها مع المجسات التي هي عبارة عن قطع من الDNA المعلمة وبهذا فان الجين المطلوب او المرغوب سوف يتكامل قاعديا مع المجس وهذا يمكن التعرف عليه بطريقة التصوير الشعاعي الذاتي Autoradiography فتظهر الجينات المرغوبة على شكل بقع سوداء وهذه البقع السوداء تؤخذ وتوضع على الطبق الاصلي الذي اخذت منه المستعمرة هذه البقع السوداء التي تمثل الجينات الهجينة مع الDNA المرغوب سوف تنطبق على المستعمرة . هذا يعني ان خلايا هذه المستعمرة يجب ان تحوي على الجين المرغوب وللتاكد من ذلك فان المستعمرة المشار اليها تنقل من جديد الى وسط زراعة منفصل ثم تاخذ البلازميد المحتوي على الDNA المرغوب ونجري له عملية دراسة القواعد النيوكليوتيدية الموجودة وهذه العملية يطلق عليها DNA sequencing (DNA sequence) كما موضح بالشكل.

Dr. Muayed F. Abbas Basrah University

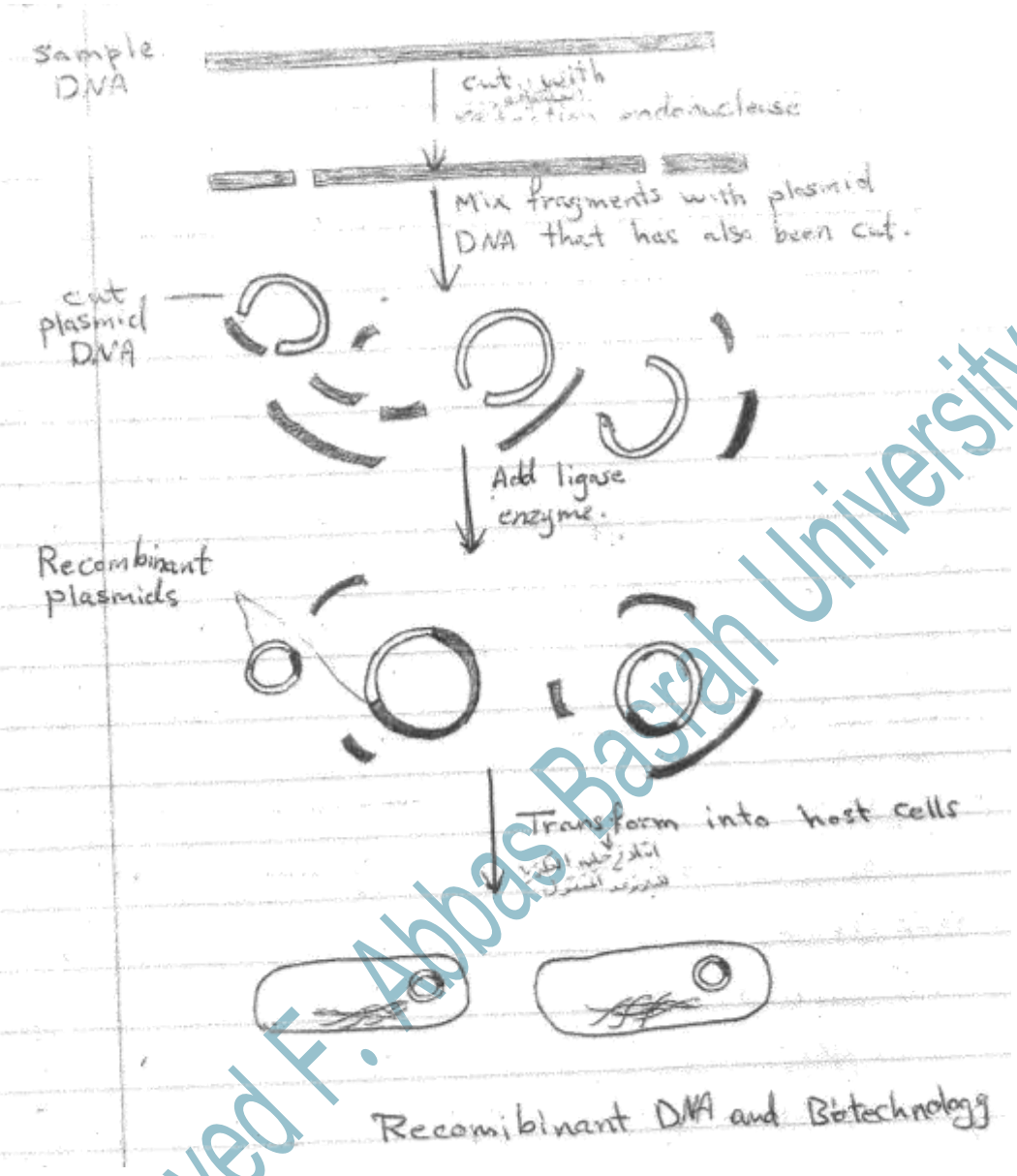
بسم الله الرحمن الرحيم

محاضرة (9) الثلاثاء 2013/1/15

4- كلونة الDNA DNA Cloning

ان عبارة الCloning تعني حرفيا انتاج نسخ متماثلة من شئ ما وعندما تستخدم هذه العبارة هنا المقصود انها تعني ادخال قطع من DNA الى خلية ما بطريقة بحيث ان هذا الDNA الغريب سوف تحدث له عملية استنساخ او تكرار copying وايضا يحافظ عليه. ان عملية ادخال قطع الDNA بالقوة (وسائل فيزيائية) الى داخل الخلية عادة لاتؤدي الى حدوث عملية الاستنساخ والمحافظة على جزيئة الDNA والسبب هو ان الخلايا سواء كانت حقيقية او بدائية النواة تحتوي على العديد من الانزيمات المحطمة لل DNA وبالتالي سوف تحطم قطع الDNA هذه عند ادخالها على حالها Naked DNA ولغرض كلونة قطع من الDNA قد تكون جين معين فانه يجب ان توضع قطع الDNA في جزيئة حاملة او ناقلة للDNA تسمى بالVector وهذا الناقل او الحامل عادة يكون تركيبه منيع لايتأثر بهذه الانزيمات التي تقوم بتحطيم جزيئة الDNA فيما لو تم ادخالها على حالها . ان الناقل عادة يعمل على حماية قطع الDNA التي تم كلونتها ويوفر عملية التكرار او الاستنساخ كذلك المحافظة على الDNA في خلية المضيف الجديد . ومن النواقل المستخدمة بكثرة الفايروسات والبلازميدات ولكن النواقل الفايروسية لاتستخدم مع النبات لان اغلب الفايروسات هي RNA Viruses وبذلك فهي غير مفيدة للنبات. ان عملية كلونة الDNA تتضمن من حيث المبدأ تقطيع جزيئة الDNA الى قطع صغيرة باستخدام الانزيمات القاطعة كما ان الناقل الذي نقوم باختياره ايضا نقوم بتقطيعه بنفس الانزيمات ثم بعد ذلك نقوم بعملية خلط الاجزاء المقطعة مع الناقل ثم نستخدم الانزيم اللاصق DNA ligase الذي يقوم بربط الاجزاء المقطوعة من الDNA مع الناقل. البلازميدات التي تحتوي على قطعة او قطع من الDNA من مصدر غريب عادة يطلق عليها اصطلاح البلازميدات الهجينة او المرقعة Recombinant plasmids ويوضح المخطط الاتي كلونة قطعة من الDNA الى داخل البلازميد.

Dr. Muayed F. Abbas Basrah University

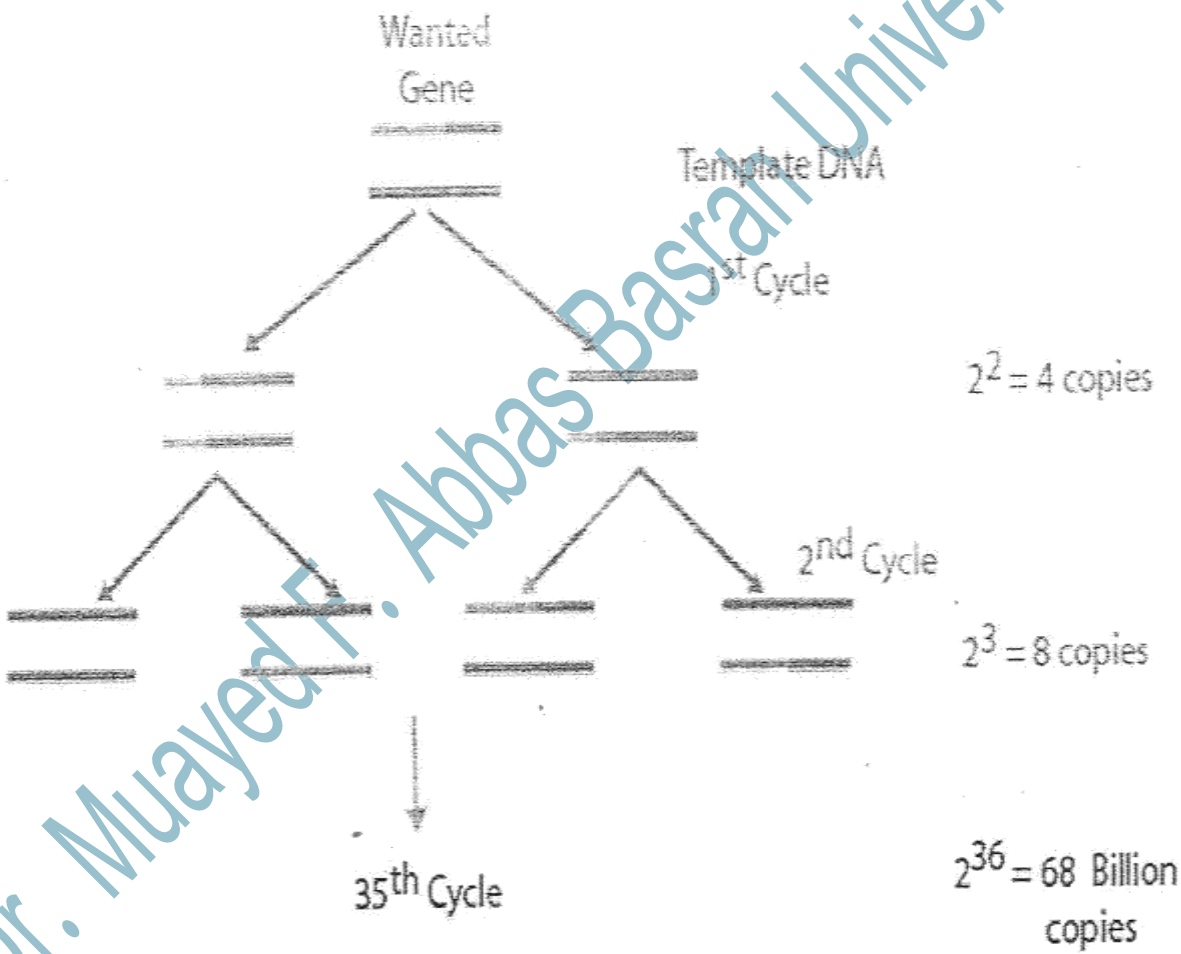


5-تفاعل البلمرة المتسلسل او المتعاقب Polymerase Chain Reaction (PCR)

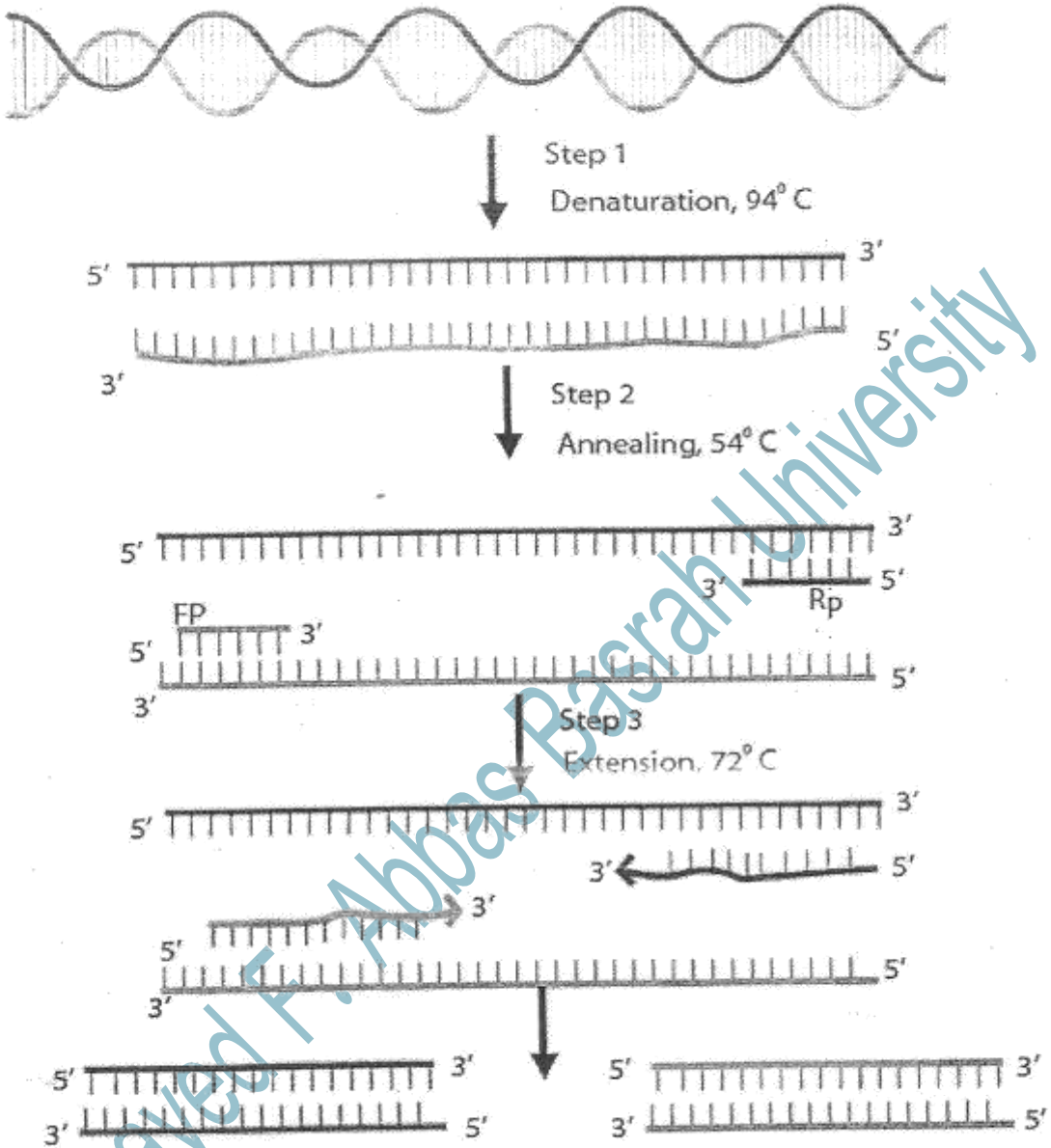
ان تفاعل البلمرة المتسلسل او المتعاقب يمكننا من الحصول على بلايين النسخ من جين منفرد او من قطعة محددة من الDNA وذلك بالمختبر ويمتاز هذا التفاعل بانه متخصص جدا بمعنى ان التسلسل المرغوب في قطعة من الDNA يمكن اكثارها حتى اذا كانت موجودة في عينة او نموذج يحوي على مليون قطعة اخرى وهذا يعني ان جين واحد فقط من مجموع جينات الانسان مثلا يمكن اكثارها بواسطة هذا التفاعل . ان PCR اخذ اسمه من انزيم بلمرة الDNA وهذا الانزيم هو المسؤول عن عملية تكرارالDNA في الخلية ويسمى متسلسل اومتعاقب او على شكل سلسلة لان انزيم بلمرة الDNA يقوم بعملية التكرار المرة تلو الاخرى الى ان نحصل على ملايين النسخ من الDNA المستهدف او المطلوب. ان هذا التفاعل لايحل محل عملية كلونة الجينات حيث ان الكلونة تستخدم حيثما توفر هناك امكانية الحصول على ناتج بروتيني كبير وقبل البدأ بهذا التفاعل فمن الضروري ان تتوفر المركبات البادئة والتي اطلقنا عليها اصطلاح البرايمر Primer والتي

Dr. Muayed F. Abbas Basrah University

تعني تسلسل من القواعد مزدوجة يبلغ طولها حوالي 20 قاعدة وعادة توضع هذه البادئات على جانبي قطعة الDNA المراد اكثارها كما موضح بالشكل ان البادئات تعتبر ضرورية لان انزيم بلمرة الDNA لايبدأ عملية التكرار وانما يعمل على استمرارية او استطالة السلسلة. وبعد ان ترتبط المركبات البادئة حيث التكامل القاعدي مع الDNA فان انزيم بلمرة الDNA المستهدف كما موضح بالشكل وفي الوقت الحاضر فان كل مختبر تقريبا يحتوي على ماكنة اوتماتيكية تقوم بهذا التفاعل والتي تسمى ب(PCR) ان جراء العملية بصورة اوتماتيكية اصبح ممكنا بعد الحصول على انزيم بلمرة الDNA من بكتريا *Thurmus aquaticus* التي تمتاز بان انزيمها غير حساس للحرارة حيث يتحمل درجات الحرارة العالية التي تستخدم عادة لفصل شرائط الDNA .



Dr. Muayed F. Abbas Basrah University



Dr. Muayed F. Abbas Basrah University

6-تقنية طبعة الاصابع DNA Typing or DNA finger printing

ان الDNA يمكن ان يعرض لعملية طبع الاصابع كما موضح بالشكل وبهذه الطريقة نقوم بمعاملة الDNA للكائن الحي بالانزيمات القاطعة فنحص على تجمع خاص من قطع مختلفة الاحجام من الDNA وهذه القطع نطلق عليها اصطلاح Restriction fragment length polymorphism(RFLP) بعد عملية الهضم للDNA تجرى له عملية ترحيل هلامي كهربائي والهدف منها هو فصل قطع الDNA حسب طولها (عدد القواعد فيها) والنتيجة هي اننا نحصل على عدد من الحزم.

الخطوة التالية هي نقل هذه الحزم الة غشاء(شفافيات) ثم بعد ذلك نقوم بعملية الدنترة (فصل الجزيئات المزدوجة الى مفردة) ثم بعد ذلك نقوم باستخدام المجسات الRobs وهذه المجسات اما ان تكون معلمة بمواد مشعة او مواد كيميائية لامعة وبعد ذلك نحصل على طبعة الاصابع الخاصة بالكائن الحي تحت الدراسة . ان

طبعة الاصابع للكائن الحي هي مشابهة للاباء كما ان طبعة الاصابع تختلف بين جميع الافراد بغض النظر عن عددهم ماعدى طبعة الاصابع في التوائم المتماثلة الناتجة عن انقسام نفس خلية البيضة المخصبة وهي تختلف بين التوائم غير المتماثلة التي تنتج او تاتي من بيضتين مختلفتين او اكثر.

طرق التلاعب الجيني بالنبات Methods of manipulation plants

توجد دة طرق لغرض التلاعب او مطاوعة التركيب الجيني اوالهيئة الجينية للنبات ومن هذه الطرق نذكر مايلي:-

1-زيادة عملية التعبير الجيني Increasing the process of gene expression(over expression)

في هذه الطريقة يتم ادخال عدة جينات او عدة نسخ من الجينات المفيدة وذلك بهدف زيادة انتاج الناتج الجيني (البروتين) وقد اتخدمت هذه الوسيلة في زيادة عمل النبتات لظروف الشد البيئي مث الملوحة والجفاف وقد تضمن مثل هذه الدراسات زيادة عملية التعبير الجيني للبروتين Na^+/H^+ anti porter protein هذا البروتين موجود على الغشاء الفجوي وتحت الظروف الطبيعية فانه ينظم دخول ايون الصوديوم وحصره داخل الفجوة العصارية وذلك للتقليل من اثره السمي على الفعاليات الحيوية للخلية مثل الاغشية والعضيات وبهذه الطريقة يتم انتاج نباتات معدلة وراثيا تتحمل مستويات ملوحة تصل الى حوالي 20 ديسي سمنز بالمتر مثل نباتات الطماطة وهذه النباتات نمت وازهرت واثمرت ولم تختلف عن النباتات النامية تحت ظروف غير ملحية .عملية زيادة التعبير الجيني استخدمت ايضا في زيادة عدد نسخ البروتين المسؤول عن دخول ايون الصوديوم الى المجموع الجذري وكذلك دخول الصوديوم في خلايا برنكيم الخشب حيث ادت هذه العملية الى زيادة تركيز ايون الصوديوم في منطقة الجذور وخصوصا في الجزء الميت من الجذر وكذلك خلايا البشرة بحيث قللت من كمية الصوديوم التي تصل الى المجموع الخضري كما ان عملية زيادة التعبير الجيني ايضا استخدمت في زيادة بناء الذائبات المتألفة comtabile solutes او osmolytes مثل البرولين والكلايسين بيتين glycine betaine والسكريات الكحولية sugar alcohols . حيث اجريت الكثير من الابحاث لزيادة بنائها عن طريق هذه التقنية مما ادى الى زيادة تحمل النباتات لظروف الشد البيئي مثل الملوحة والجفاف والشد الحراري بالاضافة الى ذلك استخدمت هذه التقنية وذلك في زيادة انتقال ايون البوتاسيوم (k+) الى داخل الخلايا النباتية وفي هذه الحالة تم اخذ جين من الخميرة ثم نقل الى داخل النبات وادى الى زيادة دخول البوتاسيوم في نباتات الطماطة المعدلة وراثيا واستطاعت هذه النباتات ان تتحمل مستويات ملوحة تصل الى 35 ملي مولر NaCl .

2-طريقة اسكات الجين Gene silencing Turning of genes or Anti-sense RNA

في بعض الاحيان من المفيد اسكات او تقليل او ايقاف عملية التعبير الجيني وقد استخدمت هذه الوسيلة في عدة حالات الحالة الاولى والمشهورة هي انتاج اصناف الطماطة flavor-saver حين عن طريق هذه العملية تم ايقاف انتاج الانزيمات المسؤولة عن تخليق غاز الاثلين (هرمون النضج) وكذلك تم ايقاف انتاج الانزيم المسؤول عن صلابة الثمار وهو polygalactourenase وبهذا اصبحت ثمار الطماطة المعدلة وراثيا محتفظة بخصائصها الاكلية لفترة قاربت ال50 يوما.

وهذه التقنية استخدمت بنجاح وذلك للتلاعب بنسبة الصوديوم الى البوتاسيوم K+ / Na+ Ratio في السايتوبلازم في النباتات النامية تحت ظروف ملحية حيث تم ايقاف عملية التعبير الجيني المسؤولة عن انتاج

Dr. Muayed F. Abbas Basrah University

البروتين المسؤول عن دخول ايون الصوديوم مما ادى الى تقليل مستويات الصوديوم بدرجة كبيرة وكانت النبتات المعدلة وراثيا ذات نمو جيد مقارنة بنباتات السيطرة.

3- اضافة جينات جديدة Adding new genes

هذه التقنية او الطريقة من التلاعب في التركيب الجيني تم تحقيقها عن طريق تقنية ترقيع او توليف الrDNA حيث بواسطتها نتمكن من نقل جين من أي كائن حي الى أي نبات تقريبا ثم تحدث عملية تعبير جيني لذلك الجين الذي تم نقله وعادة يتم نقل الجينات هذه باستخدام العديد من الوسائل والنباتات الناتجة من عملية نقل الجينات هذه تسمى بالنباتات المعدلة وراثيا Transgenic plants وهناك عدة طرق او وسائل نستطيع بواسطتها نقل الجينات للنبات وهذه الطرق يمكن توضيحها بالجدول الاتي:-

Table 17.1 Plant cell DNA-delivery methods

Method	Comment
Ti plasmid-mediated gene transfer *	Excellent and highly effective, but limited to dicots
Microprojectile bombardment *	Easy and effective; used with a wide range of plants
Viral vectors	Not very effective
Direct gene transfer into plant protoplasts	Only certain protoplasts can be regenerated into whole plants
Microinjetion	Tedious and slow
Electroporation *	Limited to protoplasts that can be regenerated into whole plants
Liposome fusion	Limited to protoplasts that can be regenerated into whole plants

بسم الله الرحمن الرحيم

محاضرة (10) الثلاثاء 2013/1/22

خطوات هندسة النبات وراثيا Steps of plant genetic engineering

توجد عدة خطوات لهندسة النبات وراثيا وهذه الخطوات تتضمن :-

1-استخلاص الDNA DNA Extraction

ان استخلاص الDNA يعتبر الخطوة الاولى في عملية هندسة النبات وراثيا ولغرض اجراء أي دراسة مع الDNA فيجب على الباحث اولا استخلاص الDNA من الكائن الحي المرغوب او المستهدف وعادة يتم الحصول على عينة من الكائن الحي وتوجد هناك عدة خطوات يتم اتباعها لاستخلاص الDNA وتنقيته من العينة النباتية .

2-كلونة الجينات Gene cloning

في الخطوة السابقة التي هيعملية استخلاص الDNA فان جميع الDNA للكائن الحي يتم استخلاصه وعادة فان المختص في مجال البايولوجي الجزيئي يرغب في عزل جين منفرد من بين بقية الجينات المستخلصة وعمل الاف النسخ منه لذلك يلجا الى خطوة كلونة الجين. وكلونة الجينات يقصد بها العملية التي من خلالها يتم تحديد الجين المرغوب ثم استنساخه او كلونته وبالنظر لعدم وجود أي طريقة لتحديد موقع الجين بالنظر الى كل الDNA المستخلص للكائن الحي .فعادة يلجا الباحث الى عملية البنك الجيني gene library بهدف تربنت الDNA للكائن الحي ولقد تم التطرق الى كيفية عمل البنك الجيني واختيار الجين في محاضرات سابقة.

3-تصميم الهيكل الجيني Gene design

بعد الانتهاء من عملية تحديد الجين وكلونته فالمهندس الوراثي يبدا بعملية يطلق عليها تصميم الهيكل الجيني الهدف منها هو تحوير الهيكل بهدف حدوث عملية التعبير الجيني gene expiration عندما يتم ادخال هذا الهيكل الجيني الى النبات وهذا التحوير في الهيكل الجيني يتضمن اجراء تغيير في تسلسل او تعاقب المناطق المحددة في الجين والتي هي مسؤولة عن عملية التعبير الجيني وهذه المناطق هي:-

A. Promoter المنشط اعطاء اشارة البدء turn the gene on وهو اول منطقة من الجين والتي يطلق عليها المنشط ويعمل عمل المفتاح الجيني هذا المفتاح يقوم بالفتح او الغلق وبنفس الوقت يحدد عدد النسخ من البروتين التي يمكن انتاجها بصورة عامة في مجال انتاج النباتات المعدلة وراثيا ويوجد نوعان من المنشطات :-

Dr. Muayed F. Abbas Basrah University

النوع الاول:- 35S Promoter

وكل منشط من هذه المنشطات يتم فتحه او اشتغاله بصورة مختلفة في النباتات . المنشط 35S هذا المنشط يسمى منشط عام Universal promoter يعني انه تحتاجه بصورة مستمرة كل خلية في النبات وبالتالي فان هذا المنشط يطلق اشارة لجميع الجينات ان تعمل في كل خلية من خلايا النبات التي هي نشطة من الناحية الايضية وعلى هذا الاساس فعندما يستخدم المتخصص في مجال الهندسة الوراثية هذا المنشط في مجال معدل وراثيا فان البروتين المشفور بواسطة هذا المنشط سوف يتم انتاجه في كل خلية من خلايا النبات وفي كل الاوقات الى ان تموت الخلية.

النوع الثاني:- PEP Carboxylase promoter

هذا المنشط يشفر الى انزيم مهم في عملية البناء الضوئي وعند استخدام هذا المنشط في انتاج نبات معدل وراثيا فانه سوف يقوم بانتاج بروتين فقط في تلك الخلايا التي هي نشطة في بناء بروتينات البناء الضوئي ان الشخص المختص بالهندسة الوراثية يستخدم هذا المنشط وذلك لكي يحدد عملية التعبير الجيني في تلك الخلايا التي تكون النسيج الاخضر هذه لاتشمل الجذور بالاضافة الى ذلك فان عملية التعبير الجيني في هذا النوع من المنشط تكون بطيئة وتتوقف في نهاية موسم النمو وذلك عندما يكمل النبات دورة حياته وتصبح عملية البناء الضوئي قليلة.

وكمثال جيد على هذين النوعين من المنشطات في تاثيراتهما هو ماتم الحصول عليه في بعض نباتات الذرة المقاومة لبعض الحشرات القارضة بعض النباتات المقاومة تم تعديلها وراثيا بحيث تقاوم هذه الحشرات القارضة على طول موسم النمو في كل جزء من اجزاء النبات وهذه النباتات تحتوي على المنشط 35S كما تم انتاج انواع اخرى من النباتات تمتلك مقاومة فقط في الانسجة الخضراء وليس من اجزاء النبات الاخرى مثل البذور والجذور وبالتالي فهي تحتوي فقط على المنشط الPEP Promoter في اوراقها وبقية المقاومة حتى نهاية موسم النمو.

B. Codon region

الشفر تحتوي على المعلومات المسؤولة عن بناء البروتين المرغوب المنطقة الثانية من الجين التي هي منطقة الشفر Codon region المسؤولة عن المعلومات الضرورية لبناء البروتين هذه المنطقة يحدث لها توير وذلك في النباتات المعدلة وراثيا وكما هو معروف فان هذه المنطقة تحتوي معلومات مشفورة التي تحدد تسلسل الاحماض الامينية المكونة للبروتين الذي يتم انتاجه . تسلسل الاحماض الامينية كما هو معروف يحدد شكل البروتين وبالتالي وظيفته وخلال عملية انتاج البروتين يتكون لدينا نسخة مكملة من منطقة الشفر من الmRNA حيث يتحرك الى السايتوبلازم من النواة حيث تبدا عملية بناء البروتينات .

المختصين في هذا المجال قاموا بعدة محاولات للحصول على مناطق شفر مختلفة حسب الرغبة فمثلا في مجال مكافحة الحشرات تم تغير منطقة الشفر الاصلية بحيث اصبحت هذه المنطقة تؤدي الى الى انتاج بروتين وهذا البروتين يكون سام ليرقات الحشرات وعندما يتم التهام الحشرات للنبات المعدل وراثيا المحتوي على هذا البروتين فانه يلتصق في معدة هذه الحشرات ويسبب انفجار في خلايا المعدة

Dr. Muayed F. Abbas Basrah University

نتيجة حدوث اختلال في التوازن المائي وبالتالي موت الحشرات وهناك نواحي اخرى كثيرة يتم بها استخدام هذه التقنية للحصول على نباتات معدلة وراثيا ومن اشهرها التلاعب بالوان الازهار.

C. Termination sequence التسلسل الذي يعطي الاشارة بالتوقف.

المنطقة الثالثة من الجين تسمى تسلسل الانتهاء وهو الذي يمثل اخر منطقة من مناطق الهيكل الجيني او الجين هذه المنطقة عادة لايحدث لها أي تحوير واثناء عملية انتاج البروتين فانها تعطي اشارة توقف العملية بعد الانتهاء والا سوف يتم قراءة الكروموسوم باكمله واذا حدث ذلك فان هذا يؤدي الى تغيير جينات اخرى وانتاج بروتينات غير مرغوبة.

4-التحويل Transformation

يقصد بعملية التحويل هو تغيير الهيئة الجينية للكائن الحي المستهدف او المرغوب وذلك عن طريق ادخال الجين الغريب وعند اجراء عملية التحويل دائما يلجا الباحث الى استخدام نواقل التي تكون اقرب مايكون للظروف الطبيعية التي يعيش فيها النبات . ومن النواقل المحتملة هي الفايروسات النباتية الاان الفايروسات لاتصلح لعملية التحويل نظرا لان معظمها RNA viruses على عكس الفايروسات الحيوانية التي تهاجم الحيوان والانسان وهذه تعرف ب retro viruses وهذه تحتوي انزيم الاستنساخ العكسي والذي يحول الRNA الى DNA وعلى هذا الاساس تم اللجوء الى النواقل البكتيرية ومن حسن الحظ ان هناك بكتريا تعيش في التربة هي Agrobacterum البكتريا الزراعية وهي مسببة للاورام وهذه البكتريا هي قريبة من الناحية التصنيفية من بكتريا العقد الجذرية والبكتريا الزراعية تسبب العقد او الدرنات على سيقان النباتات في منطقة التاج (منطقة اتصال الجذر بالساق) ولها القدرة على نقل الDNA وعلى هذا الاساس فان اول طريقة مستخدمة في عملية التحويل هي استخدام البكتريا الزراعية المسببة للاورام Agrobacterum tumefactions هذه الطريقة المستخدمة في اجراء عملية التحويل تتم بوسيلتين -:

A- زراعة البكتريا مع البروتوبلاست هي زراعة البكتريا الزراعية المسببة للاورام مع البروتوبلاست (cell without cell wall) ففي هذه الحالة فان البروتوبلاست المزروعة والتي في مرحلة انقسام خلوي نشط يتم تلويثه بالبكتريا الزراعية المحتوية على البلازميد الهجين وبعد يومين من زراعة البكتريا والبروتوبلاست تقتل البكتريا باحد المضادات الحياتية مثل جرامايسين ثم يسمح للبروتوبلاست بان يتطور الى كتل صغيرة من الخلايا تسمى بالكالس الدقيقmicro callus هذا الكالس الدقيق ينتقل بعد ذلك الى وسط يحتوي على مضاد حيوي . والهدف من هذه الخطوة هو ان الكالس الناتج فقط من الخلايا المحولة أي التي حدث لها تغير في تركيبها الجيني والذي يحتوي على جين المقاومة المضاد الحيوي .

B- اخذ اقراص discs من اوراق النبات يتم تثقيبها ثم تدمج مع البكتريا المحتوية على البلازميد الهجين وتصيب البكتريا الاوراق عن طريق الجروح وبعد ذلك تقتل البكتريا ثم تنتخب الخلايا المحولة (المقاومة للمضاد الحيوي) كما تم ذكره .

Dr. Muayed F. Abbas Basrah University

وفي كلتا الحالتين فان الخطوة النهائية هو التلاعب في التوازن الهرموني والغذائي لوسط النمو induction لغرض الحث على تكوين مجموع خضري وجذري والنتيجة هي الحصول على نبات محول يقوم بعملية التعبير عن الجينات الجديدة والتي سوف تنتقل الى ذرية النبات خلال عملية التكاثر الجنسي الطبيعية. ان عملية نقل الجينات الى النباتات باستخدام البكتريا الزراعية تعتبر طريقة ممتازة وفعالة جدا لاجراء عملية التحويل (نقل DNA غريب) الانها تعاني من بعض المنحدرات :-

1- هذه البكتريا لاصيب جميع النباتات بنفس الكفاءة ولاتصيب نباتات ذوات الفلقة الواحدة على الاطلاق. هذا يعني ان الهندسة الوراثية لمحاصيل الحبوب بهذه الطريقة ليست ممكنة في الوقت الحاضر ولو انه من الممكن اجبار البكتريا الزراعية على اصابة انسجة نباتات ذوات الفلقة الواحدة عن طريق اجراء بعض المعاملات.

2- ان النباتات التي تصيبها هذه البكتريا يجب اخلافها من نسيج الكالس الذي هو ناتج اما من انسجة نباتية او من البروتوبلاست وهذه العملية غير ممكنة في العديد من الانواع النباتية ومع ذلك فان استخدام هذه البكتريا الزراعية اصبحت الان عملية روتينة للحصول على نباتات معدلة وراثيا وخاصة نباتات العائلة الباذنجانية كالتبغ والطماطة والبطاطا وكذلك نباتات العائلة الصليبية اللهانة والقرنابيط بحيث ان استخدام هذه البكتريا اصبحت عملية روتينية في اكثر المختبرات العلمية ومن التقدمات الحديثة Recent advances لهندسة النبات وراثيا باستخدام البكتريا الزراعية نذكر مايلي:-

A- التخلص من مرحلة زراعة الانسجة النباتية ومن احد هذه الطرق الجديدة فان النبات الكامل يمكن ان يحظن مع مزرعة من هذه البكتريا المحتوية على الهيكل الجيني المرغوب وفي احد الدراسات تغمر العناقيد الزهرية للنبات المراد اجراء عملية التحويل له في محلول يحتوي مزرعة من هذه البكتريا ثم يتم ادخال البكتريا باستخدام تقنية الترشيح تحت السحب vaccum infiltration بعد ذلك يسمح للنباتات المعاملة بالازهار وتكوين البذور ثم يتم انبات البذور والنباتات المحولة الناتجة منها يتم التعرف عليها وذلك عن طريق الانتخاب على اساس مقاومتها لمضاد حيوي معين والذي كان جزءا من الهيكل الجيني الذي تحتويه هذه البكتريا . فائدة هذه الطريقة هو التخلص من التغيرات الوراثية التي تنتج من زراعة الانسجة كما ان هذه الطريقة تعتبر سهلة نسبيا نظرا لعدم الحاجة لاي زراعة انسجة بهدف اخلاف مجموع خضري او جذري (غير مستخدمة تجاريا) somaclonl variation.

Dr. Muayed F. Abbas Basrah University

بسم الله الرحمن الرحيم

محاضرة (11) الثلاثاء 2013/1/29

B- الحقن الدقيق Micro injection

ان طريقة الحقن الدقيق هي عبارة عن تجديد لفكرة قديمة فقد استخدم الباحثون في مجال علوم الحيات اجزاء زجاجية دقيقة منذ نهاية القرن الثامن عشر في مجال الانسجة الحيوانية وفي الوقت الحاضر يستخدم الباحثون المكرسكوب المركب (العادي) واجهزة دقيقة محتوية على ماصات زجاجية دقيقة جدا لغرض حقن الDNA مباشرة الى داخل النواة في الخلايا النباتية وكما هو معروف فان الخلايا النباتية تختلفف عن الخلايا الحيوانية بوجود جدار الخلية الذي هو جزء صلب وقوي جدا ولذلك قبل ان تبدا عملية الحقن الدقيق للDNA داخل الخلايا النباتية فانه من الضروري ان نعمل على ازالة الجدار ونستخدم لهذا الغرض بعض الانزيمات التي تقوم باذابة الجدار الخلوي مثل انزيم السليليزCellulase وانزيم البكتنيزPectinase وبعد ازالة الجدار الخلوي فان مايبقى هو عبارة عن بروتوبلاست وبعد ذلكنقوم بعملية اخلاف Regeneration الى نباتات كاملة باستخدام تقنية زراعة الانسجة النباتية.

C. الابتلاع المباشر للDNA Direct DNA uptake

نظرا لان البكتريا الزراعية لاتصيب نباتات ذوات الفلقة الواحدة (الحنطة ، شعير ، رز) فقد استخدمت طرق اخرى لهندسة هذه النباتات وراثيا وهذا يمكن استخدامها مع نباتات ذوات الفلقتين. وهذه الطريقة تعتمد على ادخال الDNA الهجين او المرقع او المعاد توليفه rDNA خلال الغشاء البلازمي للبروتوبلاست ومن ثم اخلاف البروتوبلاست الى نبات كامل.عملية ابتاع او اخذ الrDNA الهجين بصورة مباشرة تتم بتحظين البروتوبلاست مع الهيكل الجيني المحتوي على ثلاثة مقاطع وبوجود مادة البولي اثلين كلايكول Polyethylene glycol (PEG) (يحافظ على العلاقات المائية في الخلايا) او باستخدام التثقيب الكهربائي electroporation والتي يتم فيها تعريض البروتوبلاست الى فترات قصيرة من التيار الكهربائي المباشر ان كل من المعاملة بالبولي اثلين كلايكول والتثقيب الكهربائي تجعل الغشاء البلازمي يصبح اكثر لزوجة مما يؤدي الى تكوين ثقوب دقيقة في الغشاء بحيث يستطيع الغشاء ابتلاع جزيئات الDNA او البلازميدات ونظرا لان استخدام طريقة التثقيب الكهربائي تسبب ضررا قليلا للخلايا وانها سهلة نسبيا وغير باهضة التكاليف وهي مفضلة على طريقة تعريض الخلايا الى الكحول (PEG).

D. قصف الانسجة النباتية بالقذائف الدقيقة (طريقة المسدس الجيني)

Microprojectide bombardment of plant tissues (shot-gun method)

في هذه الطريقة يتم تعريض النسيج النباتي الى سيل من القذائف وقد استخدمت هذه الطريقة مع نباتات ذوات الفلقة الواحدة وتتضمن هذه الطريقة اطلاق قذائف دقيقة من معدن الذهب او التنكستك قطرها حوالي 4 مايكرومتر وتكون مطلية بالDNA او الهيكل الجيني المراد نقله الى النبات. هذا الهيكل الجيني يحتوي على المنشط والجين المراد نقله (الجين المعلم marker gene) .

Dr. Muayed F. Abbas Basrah University

الانسجة النباتية التي هي اكثر ملائمة للاستخدام مع هذه الطريقة هي تلك التي لها قابلية عالية على الاخلاف .على سبيل المثال الاجنة غير الناضجة والكالس الناتج من البذور والانسجة النباتية التي هي في مرحل انقسام نشط كما في نبات الذرة على سبيل المثال فان معلق من خلايا جنينية يعرض الى سيل من هذه القذائف وبعد ذلك يتم انتخاب الخلايا المحولة عن طريق التعرف عليها بوجود مبيد ادغال معين . ان المقاومة لهذا المبيد قد تم ادخالها في الهيكل الجيني الاصلي على شكل جين معلم . وفي نباتات الرز فان الاجنة غير الناضجة والكالس الجنيني والعناقيد الزهرية غير الناضجة تكون اكثر ملائمة اما الحنطة فان الاجنة غير الناضجة هي الانسجة المثالية لادخال الDNA بهذه الطريقة.

ان استخدام هذه الطريقة قد ادى الى اختزال الوقت مقارنة مع الوقت الذي تستغرقه النباتات عندما تكون على هيئة كالس او معلق من الخلايا وبذلك يتم التقليل من اخطار التغيرات الوراثية الناتجة من زراعة الانسجة وفي بعض الحالات فان مرحلة زراعة الانسجة قد تم الاستغناء عنها كليا حيث يستخدم الاجزاء المرستيمية من النباتات الكاملة (نبات باكمله) حيث تعرض المناطق المرستيمية الى سيل من القذائف الدقيقة المحتوية على الهيكل الجيني المراد نقله بالاضافة الى ذلك فان الاستغناء عن خطوة زراعة الانسجة تعني الاختصار الدقيق في الوقت والفائدة الاخرى لطريقة المسدس الجيني هي الحصول على نسبة عالية من التحويل ففي نبات الرز على سبيل المثال وجد ان نسبة الخلايا المحولة او النباتات التي تم تعريضها الى سيل من القذائف الدقيقة. وبالرغم من ان هذه الطريقة هي ناجحة مع العديد من النباتات التي هي صعبة الاكثار بطريقة زراعة الانسجة فان لها بعض العيوب(عيوب طريقة المسدس الجيني):- الكلفة العالية للاجهزة المستخدمة وهذا يعني ان المختبرات المحولة بصورة جيدة هي التي تستطيع الحصول عليها وبذلك فهي طريقة بعيدة المنال في معظم الدول النامية.

E. تجريح الانسجة النباتية باستخدام الليف كاربيد السليكون (الياف الزجاج)

Wounding of plant tissue by silicon carbide fibers

ان التطورات الحديثة في ادخال الDNA تمتاز بسهولتها وفعاليتها ومن هذه التطورات استخدام الليف كاربيد السليكون. هذه الالياف عبارة عن بلورات قطرها حوالي 0.6 مايكرومتر اما طولها فيتراوح من 10-80 مايكرومتر وتمتاز بانها قوية جدا وعادة تستخدم هذه الالياف مع معلق الخلايا المفردة التي تمتاز بان لها القدرة العالية على الاخلاف. مزرعة الخلايا التي تحتوي على خلايا معلقة تخلط باستخدام خباطة كهربائية Blender مع هذه الالياف مع البلازميد المحتوي على الDNA المراد نقله. النهايات الحادة لهذه الالياف سوف تحدث جروح دقيقة جدا في هذه الخلايا بحيث تسمح للبلازميدات ان تبتلع بواسطة السايتوبلازم للخلايا كما لوتم ادخاله من قبل البكتريا الزراعية ويعتقد بان الDNA الهجين او المرقع يدخل عن طريق اللتصاقه على سطح هذه الالياف ونسبة التحويل عالية ومماثلة لما تم الحصول عليه مع طريقة القذائف الدقيقة . المشكلة الكبيرة مع هذه الطريقة هي محدوديتها حيث انها ناجحة فقط مع معلق الخلايا للانسجة الجنينية لنباتات ذوات الفلقة الواحدة كما ان هناك بعض التحذيرات للصحة العامة لبعض الاشخاص.

Dr. Muayed F. Abbas Basrah University

5-التضريب العكسي Back crossing

بعد الحصول على نباتات معدله وراثيا والمحتوية على الصفة المرغوبة مثلا مقاومة الملوحة ثم تضريب هذه النباتات مع نباتات نفس النوع ذات صفات جيدة وذلك للحصول على نباتات بمواصفات جيدة ومقاومة للملوحة.

استخدام البروتوبلاست في تقنية الهندسة الوراثية

ان استخدام البروتوبلاست تعتبر نقطة البداية لعملية التحويل الجيني للخلايا النباتية نظرا لان البروتوبلاست يعتبر المستقبل المثالي للDNA الغريب او الجزيئات الكبيرة بالاضافة الى ذلك فان هذا البروتوبلاست له القدرة على الاندماج Fuse مع العديد من البروتوبلاست لانواع نباتية مختلفة . فالجينات مثلا التي تؤدي الى مقاومة الامراض يمكن نقلها باستخدام تقنية الدمج البروتوبلاستي وبذلك تستطيع ان تنتقل المقاومة من نوع لاخر بهدف توسيع القاعدة الجينية لتربية النبات ومن الناحية النظرية فان جميع الخلايا النباتية تحتوي على كافة المعلومات الوراثية اللازمة للتطور الى نبات كامل . وبالرغم من ان معظم الاجزاء النباتية المفصولة Explants تستخدم كمصدر للبروتوبلاست الى ان عملية الحصول على بروتوبلاست حي وقادر على الاستمرار بعملية الانقسام وتكوين او اخلاف نبات كامل لاتزال مقتصرة على عدد قليل من الانواع النباتية. السليليز والبكتنيز هذه الانزيمات عادة تضاف الى الخلايا النباتية الموضوعة في محاليل ذات ضغط ازموزي عالي وذلك لمنع انفجار البروتوبلاست(ينفجر لانه عديم الجدار) وعادة يتالف هذا المحلول من السكريات الكحولية والتي تستخدم كمواد ملطفة ازموزيا Osmoltes مثل السوربيتول Sorbitol والمانيتول mannitol وبعد تحضين البروتوبلاست لمدة ليلة كاملة.

Dr. Muayed F. Abbas Basrah University

بسم الله الرحمن الرحيم

محاضرة (12) الثلاثاء 2013/2/5

وبعد ذلك تتم ازالة المتبقيات الخلوية التي لانحتاجها بالترشيح ثم تجري عملية طرد مركزي وبعد ذلك نقوم بعملية جمع البروتوبلاست من سطح انابيب الطرد المركزي ثم يغسل هذا البروتوبلاست ونقوم بعملية حساب لعدد الخلايا الضرورية للنمو كما تم دراسة حيوية البروتوبلاست باستخدام بعض الصبغات التي تعطي الوان بعض او بعض الصبغات التي تعطي لمعان. عادة يفضل ان يطمر البروتوبلاست في وسط شبه صلب بدلا من استخدام الوسط السائل . والاكرعادة يوفر وسط اسناد لتسهيل عملية تطور البروتوبلاست . والبروتوبلاست لايبدا بالانقسام الا بعد ان تكتمل عملية تكوين الجدار الخلوي. مزارع البروتوبلاست عادة تكون ساكنة static وتحتاج الى حرارة تتراوح من 25-30 م وتحت اضاءة مستمرة الاان شدة الاضاءة منخفضة وتتم زراعة البروتوبلاست بثلاث طرق رئيسية هي:-

1- طمر البروتوبلاست في الاكر
2- الزراعة في وسط سائل موضوع على وسط اساسي من الاكر (شبه صلب)
3- استخدام طريقة الزراعة بالقطرة المعلقة Hanging drop culture method

وفي هذه الطريقة توضع قطيرات صغيرة محتوية على البروتوبلاست في تجويف الشريحة المقعرة بعد ذلك يوضع الغطاء ويقلب ثم يوضع في طبق بتري يحوي على المحلول المغذي.

التهجين الخضري Somatic hybridization

حال الانتهاء من عملية عزل البروتوبلاست فعادة نجري عليها عمليات الاندماج Fusion بعد ذلك يتم انتخاب الهجن الناتجة ثم تجرى عملية اخلاف النبات وذلك عن طريق تكوين الاجنة ثم تكوين الاعضاء وبعد ذلك الحصول على نباتات كاملة والتي تجري عليها عملية تحليلات معينة للتاكد من انها تحمل (سواء اجنة او اعضاء) الصفات المرغوبة.

عملية الدمج البروتوبلاستي protoplast fusion ممكن حثها اما كيميائيا او كهربائيا. الغشاء البلازمي عادة يعرض اما الى مادة كيميائية او صعقة كهربائية سريعة جدا هاتين العمليتين تؤدي الى تكوين فتحات وروابط سايتوبلازمية بين البروتوبلاستات المتجاورة مما يؤدي الى اندماجها في حالة طريقة الدمج كيميائيا تستخدم تراكيز عالية اما من مادة PEG او Dextran او polyamyl alcohol احيانا نحتاج الى محلول قياسي (بفر) محلول منظم ذو قيمة PH عالية ومحتوى عالي من الكالسيوم او محلول بفر ذو PH عالي الانه قد يكون ناقص القوة Hypotonic ضرورية لغرض احداث ثقوب في الاغشية السايتوبلازمية وحدوث عملية الاندماج بسرعة وذلك بين الاغشية البلازمية المتجاورة وعادة تحدث عملية الاندماج في اقل او حوالي 30 دقيقة اما في الطريقة الكهربائية والتي هي مفضلة بالغالب على الطريقة الكهربائية وذلك نظرا لانها اكثر نجاحا ولاتؤثر بدرجة كبيرة (تاثيرات ضارة على البروتوبلاست) الا انها تتطلب توفر اجهزة متطورة وغالية الثمن.

والطريقة الكهربائية تستخدم التيار المتناوب لغرض صف او ترتيب البروتوبلاست الواحد بقرب الاخر وذلك لغرض بدء عملية الاتصال بين الاغشية كما انها تستخدم ايضا تيار مباشر(مستمر) لفترة قصيرة

Dr. Muayed F. Abbas Basrah University

لغرض حث عملية تحطيم الاغشية فتندمج بسرعة عملية الاندماج عادة عشوائية وتؤدي الى تكوين خليط من :-

1-البروتوبلاست غير المندمج

2-بروتوبلاست مندمج الا انه متماثل (نفس البروتوبلاست وليس هجين)

3-والحالة المهمة هي حدوث بروتوبلاست او تهجين تؤدي الى الحصول على بروتوبلاست هجين وهو المطلوب.

الهجين المرغوب يتم انتقاءه او انتخابه وهذه العملية قد تكون صعبة اذا كانت نسبة الاندماج الهجيني قليلة. المقاييس المستخدمة في انتخاب البروتوبلاست الهجين تتضمن خواص مرفولوجية مثل الاصطباغ بصبغات معينة وكذلك دراسات سايتولوجية خلوية والتي تتضمن على سبيل المثال عدد الكروموسومات . ان الخلايا الهجينة عادة تمتاز بانها ذات نمو غزير وبذلك فهي تمتاز بسرعة نموها مقارنة بنمو البروتوبلاست الام الذي استخدم وعليه فعند انتخاب هذا الهجين البروتوبلاستي يتم نقله الى وسط بهدف اجراء عملية الاخلاف(تكوين النبات) هذه الخلايا التي نقوم بنقلها والتي تكون جدارا جديدا ثم تكون نباتات كاملة هجينة . بعد ذلك هذه النباتات الناتجة من عملية التهجي الخضري يجرى عليها دراسات مقارنة مع النباتات الام التي اخذ منها البروتوبلاست وهذه الدراسات تشمل دراسات مرفولوجية وبايوكيميائية وسايتولوجية . ومن المفاقات او الدراسات البايوكيميائية التي تجرى على النباتات الهجينة الناتجة نذكر التحليل الانزيمي Iso enzyme analysis وتحليل التطابق الوراثي RAPD وكذلك مقاومة النبات للاصابات المرضية ومبيدات الادغال اضافة الى حساسية النبات للسموم الفطرية.

ومما يجب ان نشير اليه هنا انه لحد الان لم نحصل على محاصيل زراعية جديدة عن طريق الدمج البروتوبلاستي بالرغم من ان بعض المحاصيل الزراعية Rep و اللهانة والدخن هي نباتات من السهولة فيها دمج البروتوبلاست وكذلك اخلافها الى نباتات كاملة الا ان عملية الفصل ودمج البروتوبلاست كانت ولاتزال غير ناجحة مع المحاصيل البقولية ومحاصيل الحبوب ومع ذلك فان معظم التجارب الاولية التي اجريت على الدمج البروتوبلاستي قد ركزت على انتاج هجن خضرية لايمكن تحقيقها عن طريق التهجين الجنسي.

نبات Arabidopsis النبات النموذج، جيناته ، عملية التعبير الجيني فيه والوراثة

-a

1- عبارة عن نبات صغير يمكن زراعة كمية كبيرة منه في مساحة صغيرة.

2-يمتاز بانه يمتلك اصغر هيئة جينية نباتية فقط (5 كروموسومات وكمية قليلة من الDNA المكرر).

3- تلقيحه ذاتي ودورة حياته قصيرة.

4-يحتوي على العديد من الطفرات الوراثية (تحدث فيه طفرات وراثية عديدة).

5-تم الحصول على خريطة جينية ممتازة للهيئة الجينية اكتملت ونشرت في 19/ 2000 في عدد مجلة Nature .

6-تم تطوير الكثير من الطرق او التقنيات الجزيئية التي يتلاعب بها في الناحية الجزيئية باستخدام هذا النبات والهدف من منها الحصول على الاكثار السريع للجينات.

Dr. Muayed F. Abbas Basrah University

b- اكتشاف جميع الجينات في هذا النبات (مكن من كتابة تسلسل الهيئة الجينية للنبات)
1-عند الحصول على خريطة الهيئة الجينية لاي نبات يجعل عملية التعرف على الجينات سهلة (الجين الذي حدثت فيه الطفرة).
2-يسمح بدراسة صورة كاملة لكل الجينات المسؤولة عن وظيفة معينة (العديد من البروتينات يتم الشفر لها بواسطة عدة جينات مختلفة).
3-تمكن من دراسة نمط عملية التعبير الجيني على نطاق واسع مثلا دراسة 1000 جين في كل مرة استجابة اما لمؤثر خارجي مثل الملوحة او التطور من النمو الخضري الى الزهري.
4-يمكن من دراسة العلاقات التطورية للكروموسومات في كائنات حية مختلفة مثل (بكتريا القولون والخميرة والنيماتودا) ثم حل شفرتهم بصورة كاملة وبعد ذلك Drosophila ونبات ال Arabidopsis والانسان.

c- هذا النبات يمكن استخدامه كوسيلة قوية للحصول على معلومات للكائن الحي عن طريق الطفرات الناتجة.
1-المظهر الخارجي للنبات الناتج من طفرة يخبرنا عن الوظيفة الطبيعية لذلك الجين.
2-بعد ايجاد الطفرة تستطيع ان ترسم خريطة على نقطة معينة على الكروموسوم.
3-هذا النبات له خريطة مفصلة جدا والتي تسمح من معرفة أي جزء من الكروموسوم حدثت له الطفرة.
4-وبعد تحديد الموقع ناخذ الDNA ونكلونه بحيث بحيث يكون مماثل لتلك البقعة والتعرف عليه.
5-انواع البروتين المشفور بهذا الجين يخبرنا الكثير عن وظيفة ذلك النبات الذي حدثت له الطفرة والذي لم تحدث له (طبيعي).

d- وبعدما عرفنا تسلسل الDNA في ذلك الجين وعندما نريد دراسة تاثيرالطفرة في ذلك الجين على وظيفة النبات.
1-الادخال العشوائي لنوع من الجينات الطافرة او البكتريا الزراعية المسؤولة عن التورمات.
2-هناك بنوك لهذه النباتات الناتجة من طفرات.
3-وبعد معرفة تسلسل الجينات نستطيع معرفة الجين الطافر والمظهر الخارجي للنبات المحتوي على الجين اذ يمكن دراسة 1000 جين او الاف الجينات يمكن استخدامها على شريحة باستخدام الرجل الالي. وبعد وضع الجين المكلون يهجن مع RNA وبعد ذلك نعرف ان هذا الجين ينتج هذا الRNA الذي ينتج البروتين الماسح الضوئي (سكنر) يحدد لنا كم RNA للجين المكلون لصق على الشريحة.

Dr. Muayed F. Abbas Basrah University