اسم المحاضرة : نواقل الكلونة

رقم المحاضرة : الحادية عشر

المصادر :

1- **Watson, J.D.; Baker, T.A,; Bell, S.P.; Gann, A. (2004). Molecular Biology of the Gene. 5th Ed. Pearson edution.**
2- **Clark, D. (2006). Molecular Biology Understanding the Genetic Revolution. Elsevier Inc.**
3- **Santos, D.M. (2011). Genetic Engineering, Recent Developments in application. Apple Academic press.**

٤-عماش، هدى صالح مهدي.(١٩٩٤). مبادئ علم الحياة الجزيئي. كلية العلوم . جامعة بغداد.

٥-البكري ، غالب حمزة.(١٩٩٠). مبادئ الهندسة الوراثية. جامعة البصرة.

نواقل الكلونة

تعني الكلونة ادخال قطعة دنا غريبة داخل مضيف لا يتحتوي اصلا على مثل هذه القطعة بحيث يمكن ان تديم نفسها في المضيف الجديد وان تتوارث بثبات خلال الاجيال المتعاقبة وان عدم ديمومة الدنا الغريبة داخل خلايا المضيف كانت تمثل اهم معوقات نجاح تجارب الكلونة . ولاجل التغلب على هذه المشكلة اتجه التفكير إلى ربط الدنا الهذف إلى مكرر Replicon مناسب قبل ادخالها إلى المضيف بحيث يمكنها التكرار والتوارث بثبات مع هذا المكرر خلال الاجيال المتعاقبة وكان من البديهي ان تتجه الانظار نحو البلازميدات وبعض العاثيات لما هو معروف عنهما في قابليتها على التكرار المستقل عن الكروموسوم البكتيري لاحتوائها على منشا تكرار خاص بها.

نتيجة لتطور تقنيات الهندسة الوراثية وتشعب البحوث في هذا المجال فقد اصبح هناك حاجة لتطوير العديد من نواقل الكلونة اعتمادا على نوع المضيف والغرض المطلوب من عملية الكلونة .

انواع نواقل الكلونة :-

١- البلازميدات plasmids
٢- العاثي لامدا λ phage
٣- الكوزميدات Cosmids
٤- العاثيات مفردة الخيط

البلازميدات

هي عبارة عن قطع دنا داثرية لها القابلية على التكرار المستقل عن كروموسوم المصيف وهي تتوارث بثبات على شكل قطع منفصلة عن الكروموسوم Extrachromosomal DNA . اكتشفت البلازميدات لاول مرة عام في بداية الخمسينات من قبل Joshua Lederberg . تختلف البلازميدات في الحجم وهي عادة غير ضرورية لحياة المضيف إلا إن وجودها يعطي المضيف صفات إضافية تمكنه من العيش تحت ظروف استثنائية او إنتاج بعض المواد مثل الهيمولايسين و تخمير السكريات او مقاومة المضادات الحياتية او مقومة المعادن الثقيلة او غيرها من الصفات .

بالنظر لوجود اعداد كبيرة من البلازميدات المختلفة واستمرار اكتشاف بلازميدات جديدة فقد تم تقسيمها اعتمادا على نظم مختلفة من اجل تسهيل دراستها فقد قسمت إلى :-

١- البلازميدات الاقترانية conjugative plasmids : التي تحتوي على الجينات الناقلة والتي تسمى tra Gene والتي تعطي للخلية صفة الاقتران مع خلايا اخرى .
٢- البلازميدات غير الاقترانية non-conjugative plasmids : التي لاتحتوي على جين tra وبهذا تكون البكتريا الحاوية على هذه البلازميدات غير قادرة على البدء بعملية الاقتران .

وقد يعتمد تقسيم البلازميد على عدد النسخ الموجودة في المضيف وبهذا تقسم إلى نوعين :-

١- البلازميدات المسترخية Relaxed Plasmids : وهذه توجد باعداد كبيرة من النسخ داخل الخلية قد تصل إلى اكثر من ٢٠٠ نسخة .
٢- البلازميدات المتشددة Restricted Plasmids : وهي التي توجد بعدد قليل جدا من النسخ داخل المضيف

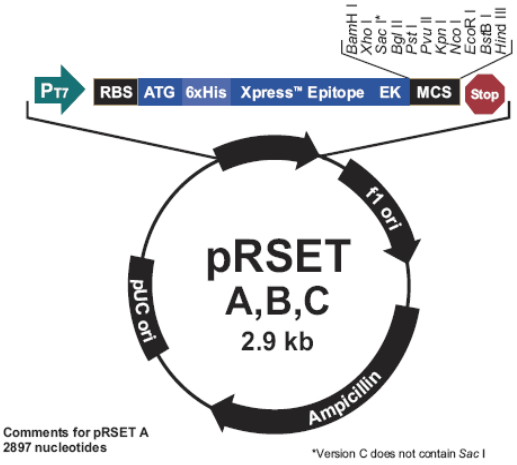
قد تكون البلازميدات متوافقة Compatible plasmid وهي البلازميات التي تعود إلى عائلتين مختلفتين من البلازميدات وتستطيع ان تتواجد في نفس المضيف حتى وان كانت تحمل نفس الجينات او قد تكون بلازميدات من نوع غير المتوافقة Incompatible plasmids وهذه النوع من البلازميدات لا يمكنه البقاء نفس المضيف كونه يعود إلى نفس العائلة البلازميدة ولا تحتفظ الخلية الا بنوع واحد منهما وتفقد الاخر حتى وان اكن البلازميدان يحملان جينات مختلفة.

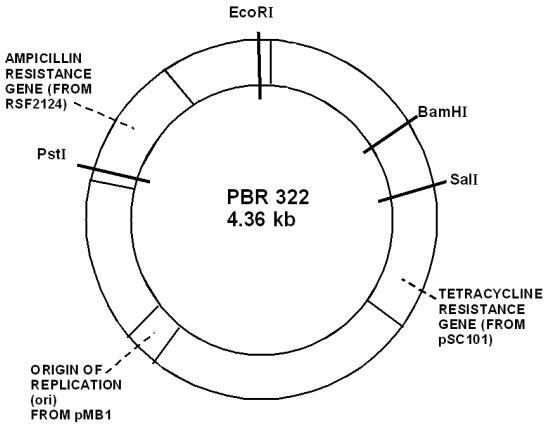
خصائص البلازميد المستخدم كناقل كلونة

١- ان يكون صغير الحجم (ذو وزن جزيئي قليل) ولهذا الخاصية فاوئد كثيرة منها سهولة التعامل معه حيث تكون البلازميدات الصغيرة اكثر مقاومة للاضرار الناتجة اثناء عملية استخلاصها وعادة تكون البلازميدات الصغيرة بشكل مسترخي مما يزيد من كفاءة عزلها اضافة إلى ان البلازميدات الصغيرة تكون اكثر كفاءة من البلازميدات الكبيرة في عملية التحول في تجارب الكلونة واخيرا ان صغر حجم البلازميد يقلل من فرص وجود مواضع حساسة متعددة لانزيم التقييد الواحد.
٢- ان تكون خصائصه مفروفة بشكل جيد بالنسبة لمواقع الجينات ومواقع المواضع الحساسة لانزيمات التقييد وان يكون تتابع نيوكليوتيداته معروفا .
٣- ان يكون من النوع المسترخي وله القابلية على التكاثر السريع .
٤- ان يحتوي على صفة انتقائية يمكن على اساسها انتقاء الخلايا المتحولة كان تكون صفة المقاومة لاحد المضادات الحياتية .
٥- تكون البلازميدات داخل الخلية بشكل ملتف حول نفسها مكونة جزيئات عالية الالتفاف supercoiled molecules وتبقى جزيئات البلازميد بهذا الشكل ما دام كلا خيطي الحلزون سليمين بدون كسر ويطلق عليها الجزيئات الدائرية المغلقة تساهميا covalently closed circular molecule (ccc) . وفي حالة تعرض احد خيطي الحلزون إلى كسر تفقد الجزيئة خاصية الالتفاف العالي مكونة جزيئة دائرية مفتوحة open circular (oc) اما في حالة قطع خيطي الحلزون بنفس المكان فستنتج جزيئة خطية(L) Linear molecule .

كان الاتجاه في اول الامر على البلازميدات الموجودة بصورة طبيعة في بكتريا E. coli خصوصا وقد تم بالقعل اختيار عدد منها واستدمت بنجاح كنواقل كلونة ويعتبر البلازميد ColE1 احد بلازميدات E.coli الطبيعية التي استخدمت في كلونة الجينات .وعلى الرغم من

استعمال اللازميدات الطبيعية كنواقل كلونة الا انها تعاني من نقص كبير في بعض الصفات المرغوبة منها قلة المواضع الحساسة المفردة لعدد من انزيمات التقييد وكبر حجم البلازميد وصعوبة الكشف عن صفته المظهرية وانخفاض عدد النسخ في خلايا المضيف . وكان الهدف هو الحصول على ناقل لكونة مثالي حاوي على جميع الصفات المرغوبة التي تؤهلها لتكون نواقل كلونة مثالية وكفوءة. ومع تطور تقنيات الهندسة الوراثية نجح الباحثون في بناء نواقل كلونة مهندسة وراثيا حاوية على كل الصفات المطلوبة وكان الناقل pBR322 اول ناقل كلونة مهندس وراثيا وكان من النوع المسترخي وذو حجم صغير (٤٣٦٣ زوج قاعدي) وكان تتابع نيوكليوتيداته معروف بشكل جيد وحاوي على مواضع مفردة لعدد من انزيمات التقييد .





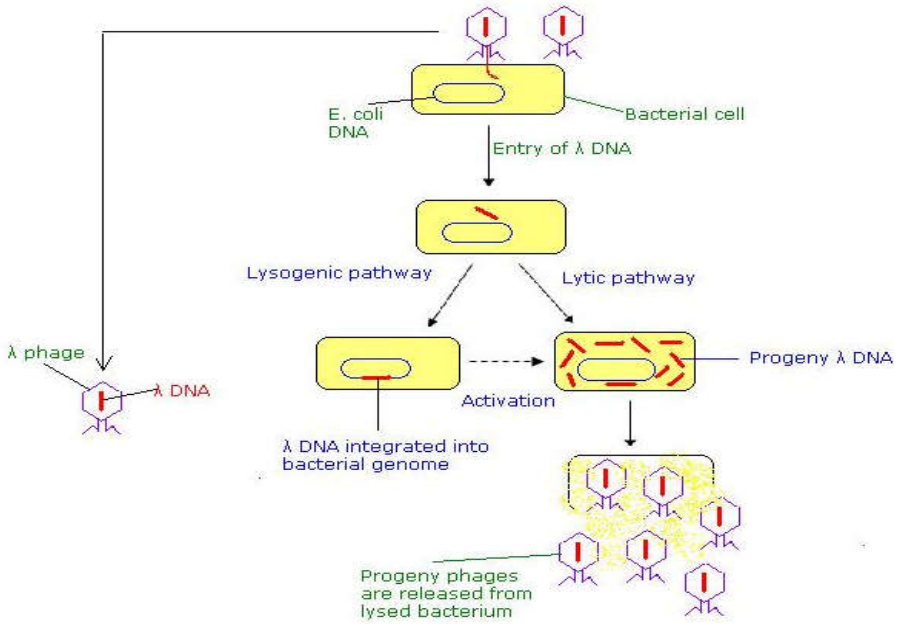
العاثي لامدا

يعد العاثي لاما من اكثر عاثيات *E.coli* المدروسة من الناحية الوراثية وادى هذا إلى تراكم المعلومات على المستوى الجزيئي لذلك اتجهت الانظار إلى العاثي لامدا لاستخدامه كناقل كلونة لبكتريا *E.coli* . ان دنا العاثي بشكله الطبيعي عبارة عن جزيئة خطية من الدنا مزدوجة الخيط يبلغ حجمها 48.5 كليو زوج قاعدي وتم تحديد تتابعاتها بالكامل وتتصف هذه الجزيئة باحتوائها على نهايات لاصقة ناتة على الجانبين بطول ١٢ نيوكليوتيدة وان التتابع لهذين النتوئين مكملين لبعضهما البعض وعند دخول دنا العاثي إلى الخلية المضيف ترتبط النهايتان مع بعضهما لتكوين ما يعرف بموضع اللصق cohesive (Cos) site مما يجعل الجزيئة تاخذ الشكل الدائري داخل المضيف.

بعد دخول دنا العاثي إلى داخل المضيف سرعان ما ترتبط النهايات الاصقة لتكون جزيئة دائرية وتسلك احد الطريقين للاصابة ، الاول يسمى بالدورة التحللية Lytic cycle حيث يبدا الدنا اولا بالتكرار ، حيث تتضاعف الجزيئة الدائرية بطريقة الدائرة المتدحرجة Rolling Circle Mode حيث تتكون سلسلة من الجزيئات الخطية المتصلة مع بعضها في مواضع cos يرافق عملية تكرار الدنا عملية تكوين رؤوس العاثيات وذيل العاثي من خلال التشفير لها من

الجينات المتواجدة على يسار جزيئة الدنا للعاثي . تبا بعدها عملية تعبئة جزئيات الدنا في راس العاثي بعد ان يتم فصل الجزيئات المتكونة عن بعضها بواسطة انزيم قاطع يسمى بروتين A ينتجه الجين a للعاثي لامدا ويستهدف هذا البروتين القاطع التتابع في الموضع cos . لينتج جزيئات خطية ذات نهايات مفردة الخيط. يرتبط بعدها ذيل العاثي بالراس لتكوين عاثيات ناضجة تتم بعدها عملية تحلل الخلية المضيف نتيجة لتكاثر العاثيات داخل الخلية .

اما الطريق الثاني الذي يسلكه العاثي لامدا هو الدورة التحلحلية Lysogenic cycle حيث تقوم جزيئة الدنا الدائرية بالندماج مع كروموسوم المضيف وبموقع معين (موقع att) وتصبح بذلك جزيئة دنا العاثي جزء من كروموسوم البكتريا . بعد اندماجه مع الدنا الكروموسومي يقوم العاثي بانتاج بروتين كابح يعمل على ايقاف جينات العاثي بصورة كاملة وبهذا يبقى العاثي متوقف عن العمل ويسمى العاثي المندمج بالعاثي الاولي Prophage ويبقى جزء ثابت من الكروموسوم البكتيري ويتضاعف معه عند الانقسام البكتيري وتملك الخلية المصابة بالعاثي الاولي مناعة من الاصابة بعاثي اخر . ويبقى العاثي جزء من الكرموسوم البكتيري الا اذا تعرضت الخلية إلى ظروف معينة تساعده على الخروج من كروموسوم البكتريا لتكوين جزيئة دائرية تدخل الدورة التحللية تؤدي إلى تحلل المضيف.



نواقل الكلونة المشتقة من العاثي لامدا

ان الدنا الطبيعية للعاثي لامدا لا تصلح بحد ذاتها ان تكون ناقل كلونة مناسب لوجود مشكلتين اساسيتين كان لابد تجاوزهما فلا ان يمكن استخدامه كناقل كلونة وهاتان المشكلتان هما :-

١- صغر حجم الدنا التي يمكن كلونتها في العاثي الطبيعي حيث كمية الدنا الدنا التي يمكن تحميلها على العاثي لا تتجاوز ٣ كيلو زوج قاعدي ، لان كمية الدنا المسموح بتعبئتها براس العاثي لا تتجاوز ٥٢ كيلو زوج قاعدي .

٢- وجود مواضع حساسة متعددة لانزيمات التقييد وهذا يعني ان معاملتها باي من هذه الانزيمات سيؤدي إلى تقطيعها إلى قطع صغيرة يصعب ربطها مرة اخرى وبنفس الترتيب .

تم تجاوز المشكلة الاولى من خلال استغلال المعلومات المتوفرة عن طبيعة جزيئة دنا العاثي حيث تم حذف المنطقة الوسطى من الخارطة الكروموسومية والتي لاتؤثر على فعالية العاثي في الاصابة والنمو وهذا سيؤدي إلى اختزال حجم دنا العاثي بحوالي ١٥ كيلو زوج قاعدي مما يعني امكانية كلونة دنا غريبة يصل طولها إلى حوالي ١٨ كيلو زوج قاعدي دون ان يزداد طول الدنا عن الحد المسموح به في عملية التعبئة.

اما بالنسبة لتعدد المواضع الحساسة لانزيمات التقييد فقد اتبعت عدة وسائل للحصول على عاثيات طافرة فاقدة لبعض هذه المواضع لتصبح مناسبة لعملية الكلونة ومنها الانتخاب الطبيعي .

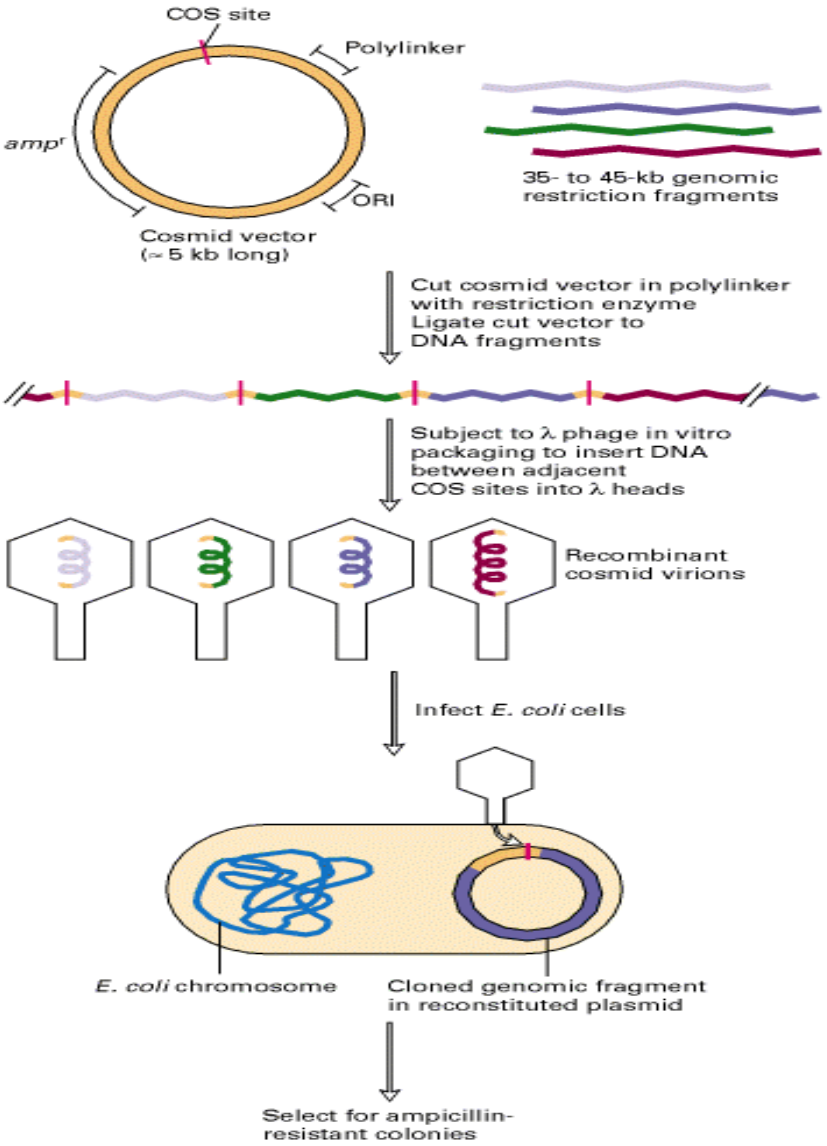
يمكن تقسيم نواقل الكلونة المشتقة من العاثي لامدا إلى ك-

١- نواقل الغرس Insertion vectors : وتتم عن طريق حذف المنطقة الوسطى من دنا العاثي ومن ثم اعادة ربط الطرفين الايمن والايسر مع بعضهما. تحوي هذه النواقل على موضع حساس منفرد لانزيم تقييد واحد على الاقل يمكن غرس الدنا فيه ويعتمد حجم قطع الدنا المكلونة في هذه النواقل على حجم قطعة الدنا المحذوفة من كروموسوم العاثي.
٢- نواقل الاستبدال Replacement vectors : يحتوي هذا النوع من النواقل على موضعبن حساسين لانزيم تقييد معين يحيطان قطعة دنا يمكن استبدالها اثناء الكلونة لفطعة الدنا الغريبة وغالبا ما تحتوي القطعة القابلة للاستبدال على مواضع متعددة لانزيم تقييد اخر بحيث يمكن تقطيعها اثناء عملية الكلونة إلى عدة قدع صغيرة لمنع اعادة غرسها مرة اخرى اثناء عملية اللطق

الكوزميدات

الكوزميد عبارة عن جزيئة هجينة مكونة من بلازميد يحتوي على الموضع cos المشتق من العاثي لامدا ويحتوي تتابع البلازميد في ناقل الكوزميد على منشا للتكرار ومواضع حساسة مفردة لعدد من انزيمات التقييد وصفة مظهرية واحدة .

اعتمدت فكرة بناء الكوزميد على طبيعة نظام التعبئة للعاثي لامدا ، حيث وجد ان اطوال الجزيئات التي يمكن تعبئتها براس العاثي تتروح بين ٣٧ إلى ٥٢ كيلو زوج قاعدي وهذا يعني عدم امكانية تعبئة جزئية الدنا الا اذا كانت مواضع كوس تبعد عن بعضها بالمسافة المذكورة اعلاه. وهذا يعني ان الكوزميدات متخصصة باستيعاب قطع دنا غريبة كبيرة قد يصل طولها إلى ٤٠ كيلو زوج قاعدي.



يوضح الشكل مخططا لكلونة باستخدام الكوزميد حيت يتم قطع الكوزميد بانزيم ملائم وخلطه مع الدنا الغريبة بوجود انزيم الـ Ligase وينتج عن عملية اللصق هذه تكوين انواع مختلفة من الجزيئات وبعد اتمام عملية اللصق يتم تقطيعها من منطقة cos site يعدها يتم تعيئتها في راس العاثس بطريقة التعبئة الخارجية in vitro packaging لتكوين العاثيات الناضجة . تستعمل العاثيات الهجينة لاصابة سلالات من E. coli حيث تعمل العاثيات على حقن الكوزميد الهجين إلى داخل الخلايا ، ترتبط النهايات الاصقة للكوزميد الهجين حال دخوله للخلية لتكوين جزيئة حلقية تبدا بالتكرار شانها شان اي بلازميد دون اظهار اي صفة من صفات العاثي. ويمكن انتقاء الخلايا الحاوسة على الكوزميدات الهجينة على اساس الصفة الانتقائية المظهرية التي يحملها الكوزميد .

العاثيات مفردة الخيط

تتطلب بعض تقنيات الهندسة الوراثية مثل تحديد تتابعات الدنا DNA Sequencing او التطفير خارج الخلايا in vitro mutagenesis لن تكون قطعة الدنا على شكل خيط مفرد وليس حلزون مزدوج ، وتتطلب هذه العملية معملات خاصة لتحويل الخيط المزدوج إلى خيط مفرد ، لذا عمد الباحثون إلى استخدام نواقل كلونة اكثر ملائمة من البلازميدات او العاثيات فكان الاختيار للعاثيات مفردة الخيط ومنها العاثي M13 الذي يتميز بكونه جزيئة مفردة الخيط صغيرة الحجم يبلغ طولها 6.4 كيلو زوج قاعدي تكون على شكل خيط مفرد داخل غلاف العاثي البروتيني ويتحول إلى شكل خيط حلقي عند دخول العاثي إلى داخل الخلية المضيف ويمكن استخدام العاقي كناقل كلونة في هذه الحالة (الشكل الحلقي) والذي يطلق عليه بالشكل المتكرر Replicative form (RF) .

يختلف العاثي M13 عن العاثي لامدا بانه لايوجد حد معين من الدنا الممكن تعبئتها في الغلاف البروتيني . ويتالف العاثي من ١٠ جينات ملتصقة مع بعضها ولا توجد مناطق غير ضرورية لتكرار ونمو العاثي ويكون المكان الوحيد لغرس الدنا الغريبة هو قطعة صغيرة يبلغ طولها ٥٠٧ نيوكليوتيدة تقع بين الجينات يطلق عليها تسمية Intergenic sequence (IS) علما ان هذا التتابع يكون حاوي على منشا التكرار للعاثي الذي يجب ان يبقى سليما اثناء عملية الغرس .