وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
جامعة الانبار
كلية العلوم

القسم: علوم الحياة
المادة: بايولوجي جزيئي عملي
عنوان المختبر: Recombination

المختبر الثامن

اعداد مدرس مساعد هاله مهدي حمد
كلية العلوم قسم علوم الحياة

تقانة الـDNA المأشوب Recombinant DNA Technology

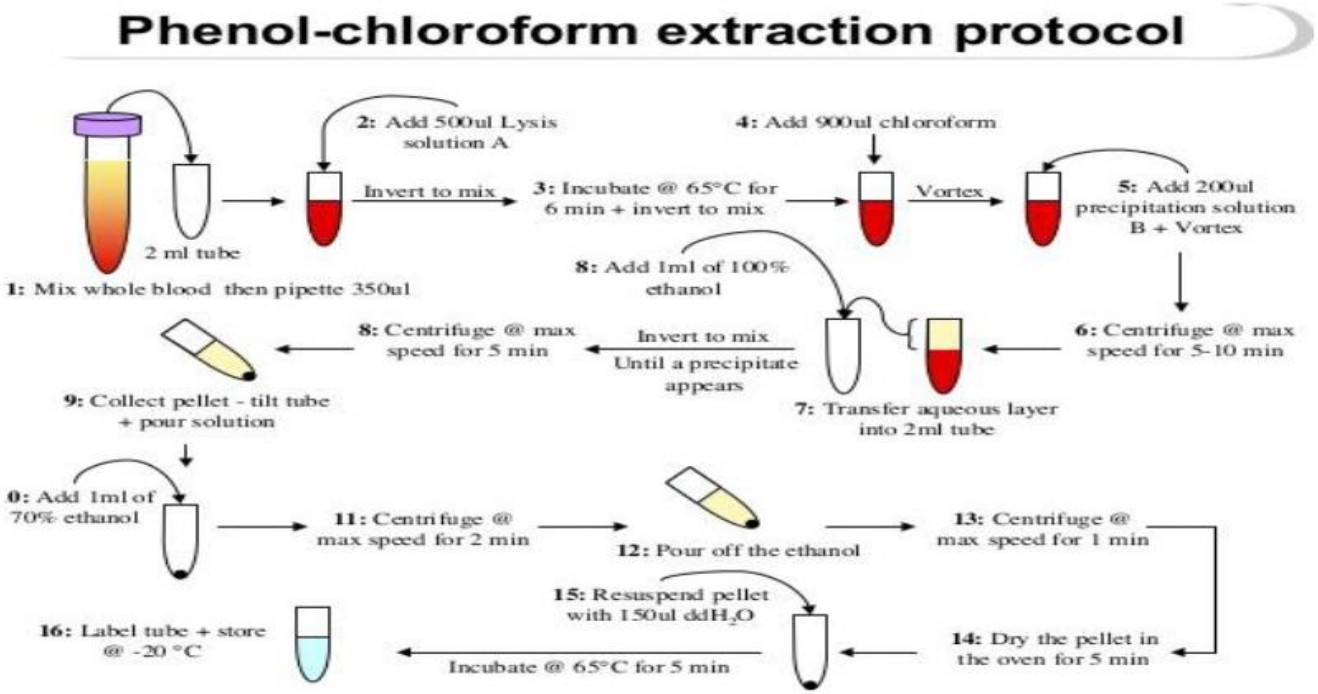
تعد تقانة الـDNA المأشوب حجر الزاوية في التقانة الحيوية والـ DNA المأشوب بالتعريف هو الـDNA الذي يتم تخليقه اصطناعياً اعتباراً من جزيئتي DNA أو أكثر كلّ منهما من مصدر بيولوجي مختلف لتكوين جزيئة واحدة مأشوبة مثل DNA بكتيري (بلاسميد*) مغروس ضمنه جزء من DNA بشري وهذا الشكل الجديد غير موجود في الحالة الطبيعية في المتعضيات الحية.

إن مصطلح تأشيب Recombinant يعني حرفياً ربط قطعتين من الـDNA من نوعين مختلفين وفي الحقيقة لقد قام الإنسان نوعاً ما بهذه العملية منذ عقود وذلك من خلال محاولته المزاوجة بين أنواع مختلفة من النباتات أو الحيوانات للحصول على سلالات ذات إنتاجية أفضل، في عام 1972 تمكن بول بيرغ من إنتاج أول جزيئة DNA مأشوب تجمع بين DNA الفيروس القردي SV40 و DNA فيروس اللمدا على اعتبار أن جزيئات DNA في جميع الكائنات الحية تتشارك بالبنية الكيميائية وبالتالي يمكن جمعها معاً.

كيف نحصل على الـDNA الجينومي؟

يتم عزل الـDNA الجينومي إما من الدم أو من الأنسجة باستخدام طاقم جاهزمثل :
((QIAGEN, Hilden, Germany) وتتم خطوات العمل فقاً لتعليمات الشركة الصانعة، أويتم العزل باستخدام الطريقة التقليدية مثل طريقة الفينول – كلوروفورم (phenol – chloroform) التي تُستخدَم لعزل الـ DNA من الدم المحيطي كما هو موضح في الشكل التالي.

من ميزات طريقة العزل باستخدام طاقم جاهز هي الحصول على الـ DNA خلال وقت قصير وبنقاوة عالية مقارنة بالطريقة التقليدية التي تتميز بالحصول على كمية أكبر من DNA



مصطلح الجينوم **Genome** هو مصطلح في علم الوراثة يجمع بين جزئي كلمتين هما **Gen** وهي الاحرف الثلاثة الأولى من كلمة **Gene** وتعني مورثة والجزء الثاني **ome** هي الأحرف الثلاثة الأخيرة من كلمة **Chromosome** وتعني الصبغي .

يُعرَف الجينوم بأنه مجموع المورثات والـ DNA في نواة كل خلية من خلايا الكائن الحي بالإضافة إلى DNA الجسيمات الكوندرية وكذلك DNA الصانعات الخضراء في النبات، يعد الجينوم البشري من الجينومات الكبيرة حيث يتكون من 6.4×10^{9} bp أي تقريباً من 6 مليارات زوج أساس يكون معظمها عبارة عن تسلسلات غير مرمزة للبروتينات أو لجزيئات RNAS وتدعى بالمناطق بين الجينية وهي تشكل نحو 95% من الجينوم أما مجموع الجينات فإنه لايشكل أكثر من 5% من مجمل الجينوم .

ساهم اكتشاف العديد من الأنزيمات الجرثومية المتنوعة كأنزيمات التقييد في قطع جزيء الـDNA الكبير إلى جزيئات أصغر يتراوح حجمها بين2K bp- 100 bp وإنّ تطبيق هذه الأنزيمات في تحوير الـDNA هو ما أدى إلى خلق تقنية الـDNA المأشوب

أنزيمات التقييد Restriction enzymes هي أنزيمات تقطع جزئ الـDNA عندما تتعرف على تتابع أزواج نكليوتيدات محددة ولكل أنزيم قطع تتابع محدد وموقع محدد للقطع.

تم التعرف على هذه الأنزيمات منذ عام 1962 عندما تم البحث عن ظاهرة المناعة التي تتمتع بها جراثيم الإيشيريكية القولونية E.colie في مواجهة أكلات الجراثيم أو مايسمى بالفاجات وذلك عن طريق تحطيم وتخريب المادة الوراثية لهذه الآكلات، وتأتي هذه الظاهرة نتيجة نشاط عدد كبير من الأنزيمات القادرة على تحطيم الـDNA أما سبب عدم تأثر الحمض النووي للجراثيم بهذه الإنزيمات فيعود إلى إجراء تحوير يتمثل بإضافة مجموعة متيل لبعض الأسس في مواقع القطع وتتم هذه العملية في مرحلة تالية لعملية تضاعف جزيءالـ DNA من أجل حمايته، وبالتالي تعمل أنزيمات التقييد على منح مناعة للجراثيم وقد تم معرفة آلية عملها لأول مرة عام 1970 وتم الكشف عن عدد كبير منها وصل إلى حوالي 900 أنزيم

لقد تم تقسيم هذه الأنزيمات وفقاً لقدرتها على القطع وللمتطلبات الكيميائية اللازمة لعملها إلى ثلاثة أنماط:

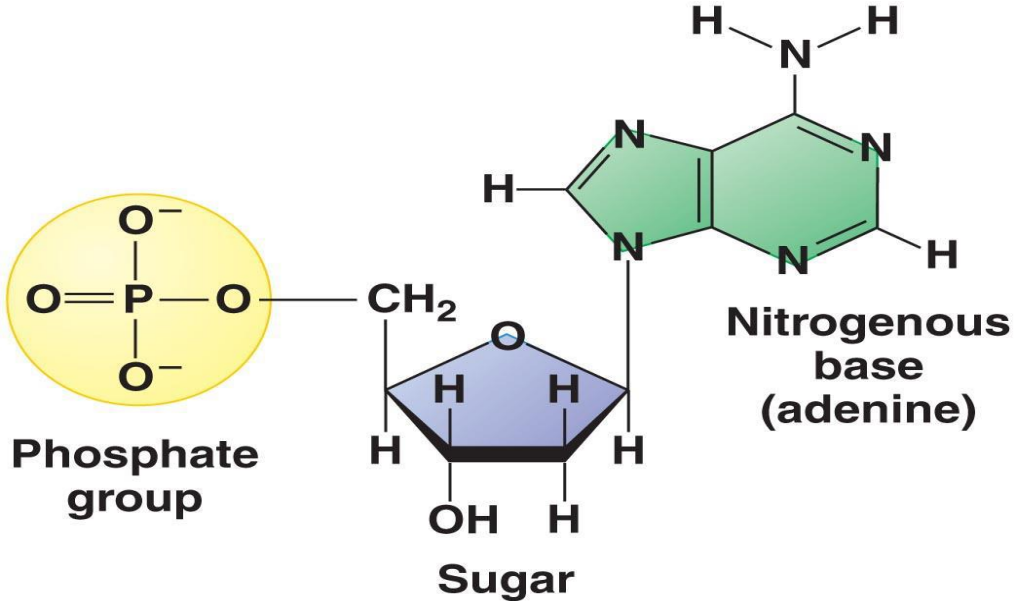
- **النمط الأول :** تضم الأنزيمات التي تقوم بالقطع عشوائياً لجزي الـDNA حيث ترتبط هذه الأنزيمات في مواقع القطع ثم تقوم بهدم السلاسل المزدوجة في اتجاه واحد لمسافة تتراوح بين 1000-5000 نيكليوتيد تبدأ بعدها بتحطيم سلسلة واحدة لمسافة أخرى ثم تتوقف عن العمل.
- **النمط الثاني :** هي أنزيمات تقطع في مواقع محددة Restrictions Sites بحيث تؤدي إلى عدد محدد من القطع لكل نمط من أنماط الـDNA عند الأحياء، يقوم أنزيم القطع بعمله في كل المواقع التي يتعرف عليها والتي تتمثل بتتالي محدد لعدد من النيكليوتيدات ويتباين عدد هذه المواقع التي يتم التعرف عليها من أنزيم قطع إلى آخر ومن نمط DNA إلى آخر
- **النمط الثالث:** هي أنزيمات تمتلك صفات النمطين السابقين

ماهو مبدأ عمل أنزيمات التقييد ؟

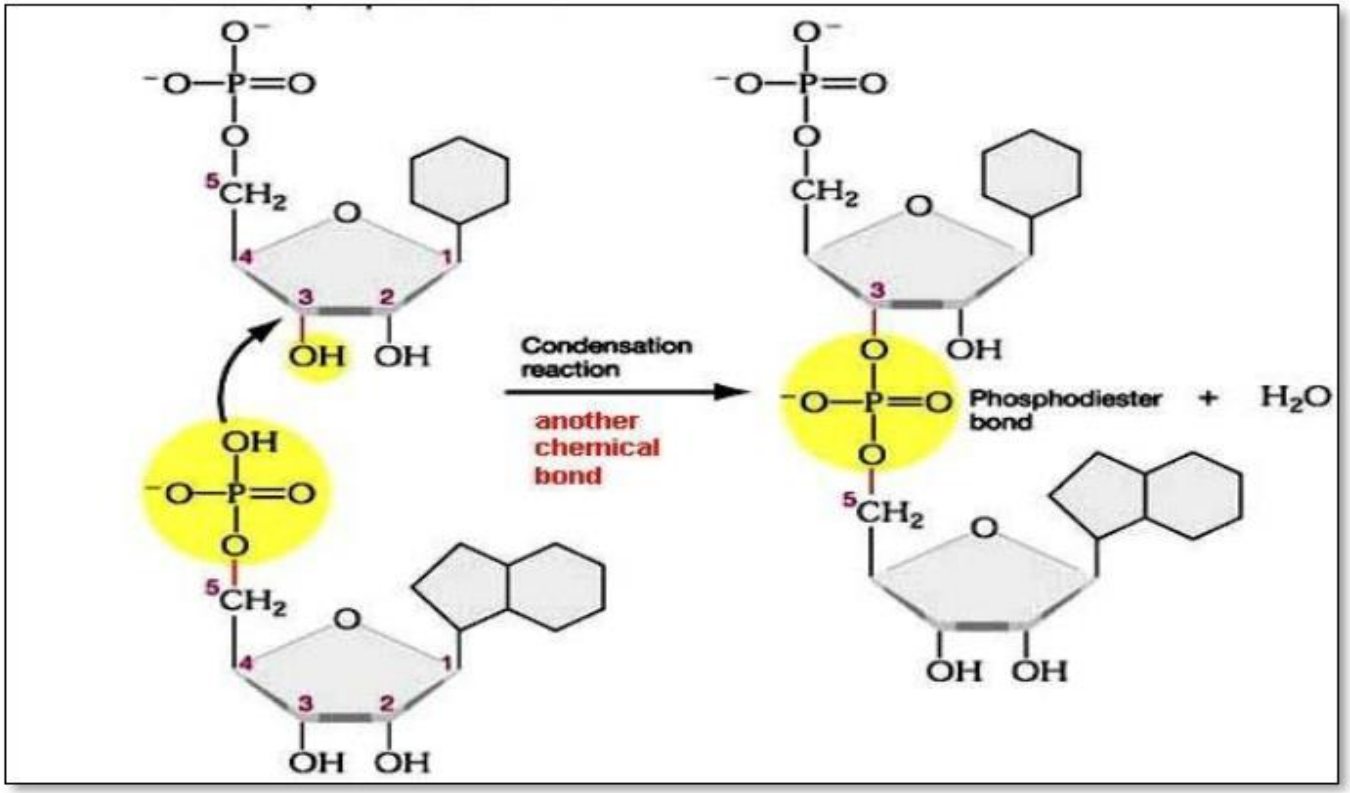
يعد النكليوتيد منقوص الأكسجين الوحدة الأساسية في بناء جزيء الـ DNA ويتألف من ثلاثة مكونات:

- سكر خماسي الكربون هوالريبوز منقوص الأكسجين
- مجموعة فوسفات
- أساس آزوتي

يرتبط كل أساس آزوتي إلى جزيئة سكر التي ترتبط بدورها إلى مجموعة فوسفات ليشكل الجميع سوية جزيئة تدعى بالنيكليوتيد Nucleotide كما هو موضح في الشكل التالي:



ترتبط النكليوتيدات المكونة لسلسلة الـ DNA مع بعضها البعض بروابط فوسفاتية ثنائية الإسترتتشكل بين زمرة الهيدروكسيل المرتبطة مع ذرة الكربون َ3 للسكر في النيكليوتيد الأول وبين الفوسفور المرتبط مع ذرة الكربون َ5 للنيكليوتيد الثاني كما هوموضح في الشكل التالي:



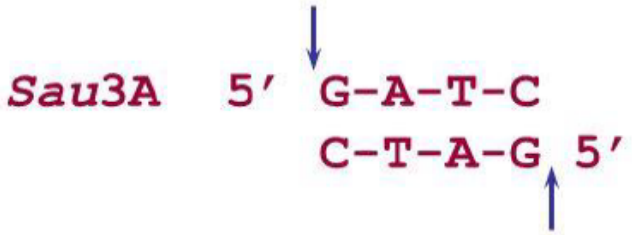
إذاً مبدأ عمل أنزيمات التقييد هو تحطيم الرابطة الفوسفاتية ثنائية الإستر بين النيكليوتيدات

كيف يتعرف أنزيم التقييد على المكان المفترض أن يحدث القطع فيه في جزيء الـDNA؟

كل أنزيم تقييد هو عبارة عن مقص خاص لقطع الـDNA في نقطة محددة و يتعرف الأنزيم على مكان القطع حسب تسلسل الـDNA للقطعة حيث أن كل أنزيم يقطع في تسلسل محدد، فمثلا أنزيم التقييد (Hpa I) يقطع عندما يجد التسلسل التالي من الأسس الآزوتية (GTTAAC) بينما أنزيم التقييد (Eco RI) يقطع عندما يجد 6 من الأسس الآزوتية وفق هذا التسلسل (GAATTC) و للعلم فإن أنزيم التقييد (Hpa I) سمي بهذا الاسم لأنه يوجد في بكتيريا (Hemophilus parainfluenzae) و هذا الإنزيم يعتبر من الإنزيمات التي تقطع بشكل رأسي مستقيم.بينما اسم انزيم (Eco RI) فهو مأخوذ من بكتيريا (Escherichia coli)، ويعتبر من الإنزيمات التي تقطع بشكل متعرج.

تتباين أنزيمات التقييد في عدد نيكليوتيدات الموقع الذي تتعرف عليه:

✓ بعض الأنزيمات تميز مواقع مؤلفة من أربعة نيكليوتيدات وتقطع قبلها أو بعدها أو خلالها



- ✓ بعضها الآخر تميز مواقع محددة بخمسة نيكليوتيدات
- ✓ الأنزيمات التي تميز مواقع محددة بمتتاليات لستة نيكليوتيدات هي الأكثر انتشاراً وتقوم بالتعرف على الموقع ومن ثم القطع بعد عدد من النيكليوتيدات

مالمقصود بالنهايات اللزجة Stick ends والنهايات العمياء Blunt ends

تعد أنزيمات التقييد من النمط الثاني الأكثر استعمالاً في مجال الهندسة الوراثية وهي تقوم بالقطع في مواقع محددة من جزيءالـ DNA ولكنها تتباين في طبيعة موقع القطع ومكانه ونواتجه ومن هذه التباينات:

- ➢ تؤدي بعض هذه الانزيمات إلى الحصول على نهايات لزجة Stick ends أي نهايات غير متساوية والسبب لأن موقع القطع في سلسلتي الـDNA يكون غير متناظر أي إنها تقطع بشكل متعرج
- ➢ يؤدي البعض الآخر من هذه الأنزيمات إلى الحصول على نهايات عمياء Blunt ends أي نهايات متساوية أي إنها تقطع بشكل رأسي

تسمح القطع الناتجة في حالة النهايات اللزجة بالإلتصاق مرة أخرى وبعبارة أخرى إمكانية وصلها مع قطع أخرى أما القطع الناتجة في حالة النهايات العمياء فيجب إجراء تعديلات عليها للتمكن من وصلها مع قطع أخرى

خريطة القطع المحددة

لقد أنشاء العلماء خريطة تسمى خريطة القطع المحددة لكثير من الكائنات الحية و تم إنجاز هذه الخريطة عن طريق تقطيع جميع الكروموسومات بإضافة أنواع مختلفة من الإنزيمات القاطعة ثم رتبت هذه القطع بشكل منتظم ، وتعد الخرائط التي تحدد مواقع عمل أنزيمات التقييد من الأمور الهامة حيث أن كل أنزيم يقوم بإعطاء عدد محدد ومعروف من قطع الـDNA لكل نوع وبالتالي تُمكِن معرفة مواقع عمل هذه الأنزيمات من التعرف على مواقع الجينات وكذلك في اختيار الانزيمات المناسبة لعملية العزل للجينات المرغوبة.

ماهي بالجين الهدف Target gene وكيف يتم عزلها ؟

الجين الهدف Target gene هي الجين التي سيتم ربطها ضمن بلاسميد مناسب لتشكيل جزيء DNA مأشوب بهدف الحصول على البروتين الذي ترمزه أو إجراء تعديل عليها أو معرفة تسلسل النكليوتيدات فيها

- يمكن الحصول على الجين الهدف من خلال عملية العزل لـDNA الجينومي ثم استخدام أنزيمات التقيد المناسبة للحصول على الجين الهدف
- من الممكن عزل mRNA الجين الهدف من الخلايا التي يتم فيها التعبير عن هذه الجين وإجراء عملية نسخ عكسي لتصنيع cDNA (Complementry DNA) الذي يمثّل الجين المطلوبة.

كيف يتم ربط الجين ضمن البلاسميد للحصول على الـ DNA المأشوب

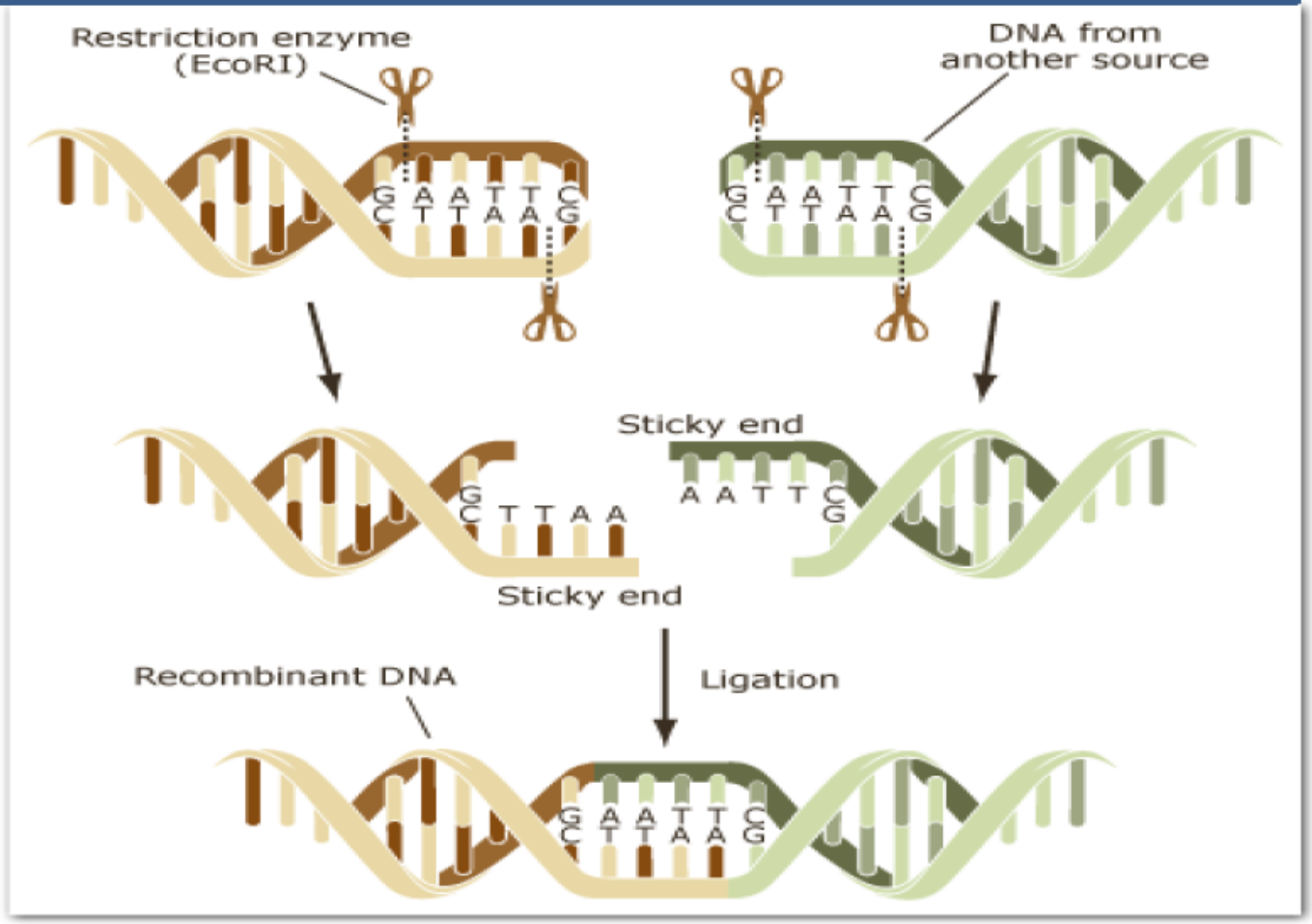
يجب أن يتم قطع الجين والبلاسميد بنفس أنزيم التقييد كي ترتبط النهايات اللزجة للجين مع النهايات اللزجة للبلاسميد وفق قاعدة الأسس المتتامة (الأدنين يرتبط مع التيمين والسيتوزين يرتبط مع الغوانين) ، وتتم عملية الربط بين قطع الـDNA عن طريق إعادة تشكيل الروابط الفوسفاتية ثنائية الإستر بين نيكليوتيدين متجاورين بواسطة أنزيمات الربط Ligases التي تم تمييز نمطين منها:

النمط الأول يتميز بقدرته على ربط قطع الـDNA ذات النهايات اللزجة والقطع ذات النهايات العمياء

النمط الثاني يعمل على إعادة ارتباط قطع الـDNA ذات النهايات اللزجة فقط

المبدأ العام في تقانة الـDNA المأشوب

- قطع جزيئين مختلفين من الـDNA بواسطة أنزيم تقييد واحد
- تشكل قطع ذات حواف لزجة
- ربط القطع المتتامة بواسط انزيم ربط



المصادر

- العجوري, رنا. بيولوجيا. 2019. جامعة الشام الخاصة. كلية الصيدلة.