وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
جامعة الانبار
كلية العلوم

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

المختبر التاسع

اعداد مدرس مساعد هاله مهدي حمد
كلية العلوم قسم علوم الحياة

تنسيل ال DNA Cloning DNA

يشير مصطلح تنسيل ال DNA Cloning أو التنسيل الجزيئي Molecular Cloning إلى إدخال قطعة من ال DNA ضمن ناقل حتى يتم نسخها (تكثيرها) أو التعبير عنها داخل الكائن المضيف. ومن أهم المصطلحات العلمية في تقانة تنسيل ال : DNA

- ال DNA المقحم Insert DNA هو قطعة محددة من ال DNA يتم إدخالها (إقحامها) ضمن ناقل عن طريق تقانة ال DNA المأشوب مما يسمح بنسخها أو تحديدها أو إجراء تحوير عليها أو التعبير عنها في الكائن الضيف.
- الناقل : vector هو جزي من ال DNA يستطيع أن يحمل قطعة ال DNA الغريب وينقلها إلى الخلية المضيفة وهو قادر على التضاعف بشكل منفصل عن ال DNAالكروموسومي للكائن المضيف، ويوجد أربعة أنواع رئيسية من النواقل هي البلاسميدات، الناقلات الفيروسية، الكوزميدات، الكروموسومات الصناعية.
- ال DNA المأشوب: Recombinant DNA هو ال DNA الذي يتم تخليقه اصطناعيا اعتباراً من جزيئتي DNA أو أكثر مختلفتي المصدر يتم ربطهما لتكوين جزيئة واحدة مأشوبة (ال DNA المقحم +الناقل) vector وهي ستتضاعف في الكائن المضيف معطية نسخ (نسائل Clones).
- التحوير: Transformation هي عملية إدخال البلاسميد المأشوب إلى خلايا مضيفة Host cells مناسبة والتي تكون عادة أحد أنواع الخلايا الجرثومية مثل E.coli، وبالتالي يستطيع أن يتناسل في داخلها بشكل طبيعي حيث أن كل تضاعف للخلية الجرثومية يقابله تضاعف للبلاسميد المأشوب.

تنسيل الجين Gene cloning

يدعى أيضاً كلونة الجين ويُعرَف على انه عملية تصنيع نسخ كثيرة من نفس الجين وبالتالي الحصول على كمية اكبر من المنتج لايمكن ان نحصل عليها في الحالة الطبيعية وهو يتضمن الخطوات التالية:

عزل الجين المرغوب تنسيلها

↓

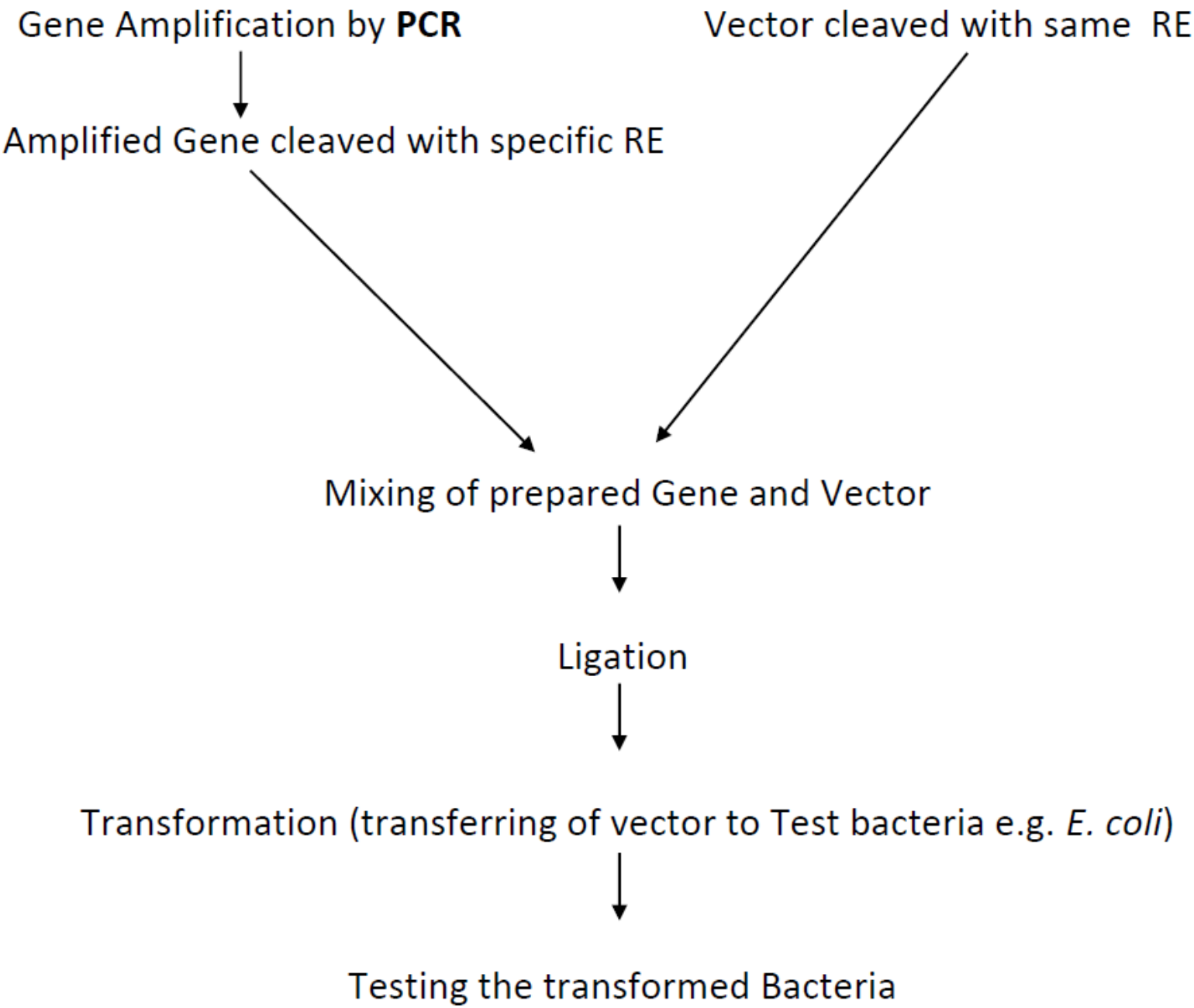
ربط الجين ضمن ناقل مناسب (بلاسميد مثلاً) لتخليق جزيئة DNA مأشوب

↓

إدخال البلاسميد المأشوب ضمن المضيف بعملية التحوير transformation

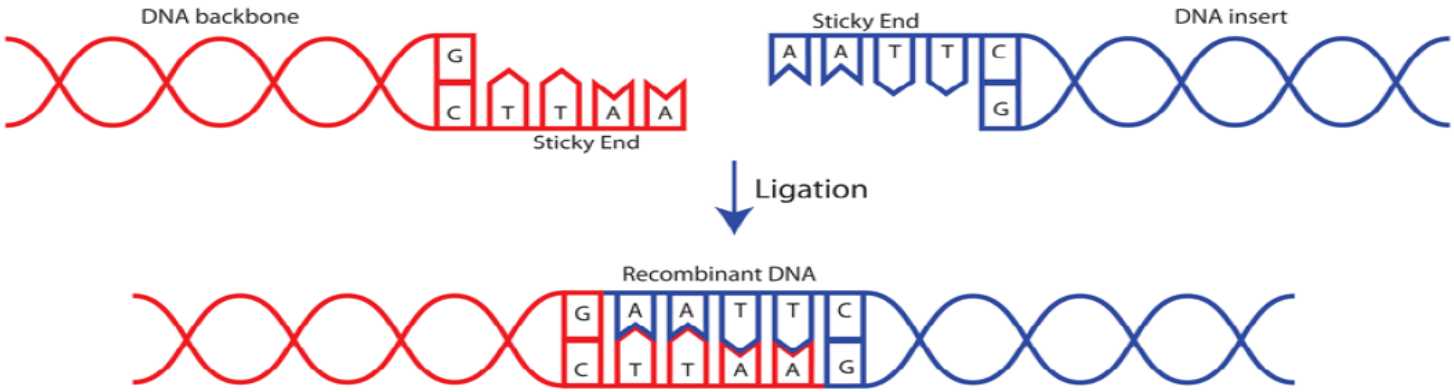
↓

تقصي دخول البلاسميد المأشوب إلى المضيف


Gene Amplification by **PCR**
Vector cleaved with same RE
Amplified Gene cleaved with specific RE
Mixing of prepared Gene and Vector
Ligation
Transformation (transferring of vector to Test bacteria e.g. *E. coli*)
Testing the transformed Bacteria

- **عزل الجين المرغوب تنسيلها**

الخطوة الأولى في عملية تنسيل الجين هي عزل الـDNA الذي يحتوي على الجين المرغوبة من الكائن الحي وفي حال كان تسلسل الجين معروفاً يتم تضخيمها بواسطة تفاعل البوليميراز التسلسلي PCR باستخدام بادئات نوعية ويجب أن تتضمن هذه البادئات تسلسل التعرف على أنزيمات التقييد التي تم اختيارها من منطقة التنسيل المتعدد* multiple cloning site للبلاسميد المستخدَم ، في خطوة تالية يتم اقتطاع الجين عن التسلسل المحيط بها بواسطة أنزيم تقييد* مناسب Restriction enzyme من نمط Restriction endonucleases بحيث يكون القطع بشكل مائل للحصول على نهايات لزجة Stick ends وهذه النهايات هي عبارة عن تسلسل من النكليوتيدات أحادي الطاق قادر على الإرتباط مع DNA آخر تمّ تقطيعه بنفس أنزيم التقييد



منطقة التنسيل المتعدد* multiple cloning site MCS

وهي عبارة عن تسلسل قصير من النيكليوتيدات تم تصنيعه بطرق الهندسة الجينية بربط عدة تسلسلات لمواقع تقييد Restriction sites خاصة بعدد من أنزيمات التقييد مجاورة لبعضها البعض مما يسمح لهذه الأنزيمات أن تتعرف على هذه المواقع وتقطع ضمنها، مما يسهل عملية التنسيل لأي شدفة مدخلة

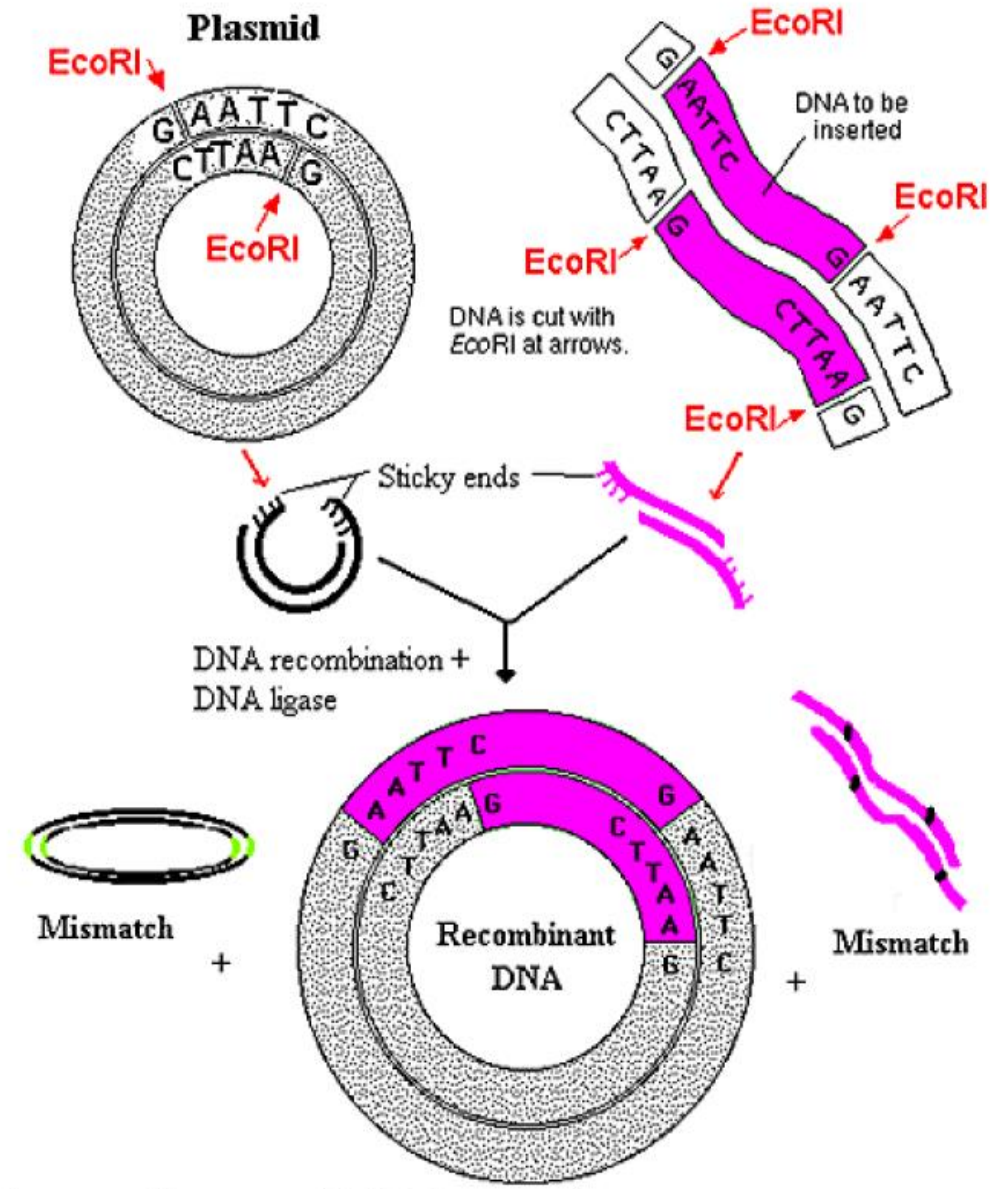
أنزيمات التقييد* Restriction enzymes

هي أنزيمات تستطيع قطع الـDNA في مواقع محددة تتألف عادةً من 4 أو 6 أو 8 نيكليوتيدات وتنتجها أنواع كثيرة من الجراثيم كوسيلة للدفاع عن نفسها ضد الهجمات الفيروسية مثل أنزيم التقييد EcoR I الذي يقطع بعد أن يتعرف على التسلسل GAATTC

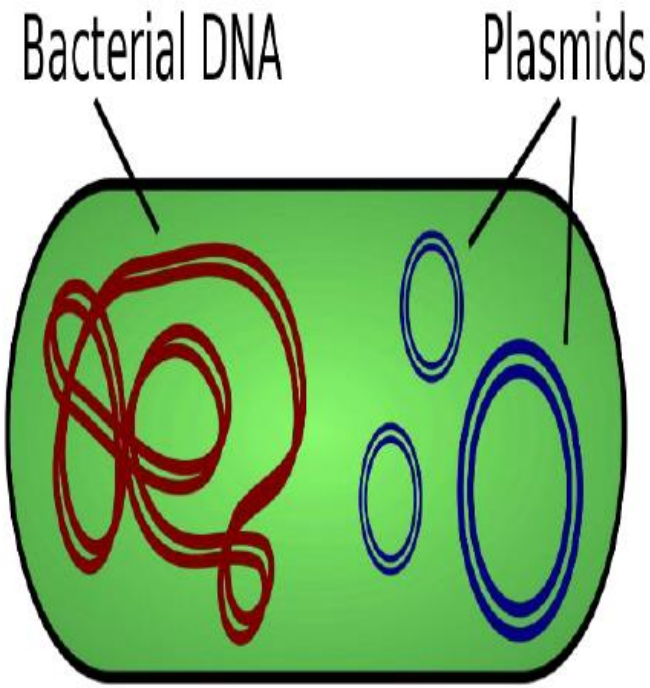
- **<u>ربط الجين ضمن ناقل مناسب (بلاسميد مثلاً) لتخليق جزيئة DNA مأشوب</u>**

يتم استخدام نفس أنزيم التقييد لاقتطاع الجين والبلاسميد للحصول على نفس النهايات اللزجة و يتم ربط كل من الجين المقحمة (المدخَلة) insert والبلاسميد بواسطة أنزيم ربط Ligase الذي يقوم بربط النهايات

المتتامة اللزجة مع بعضها من خلال تشكيل روابط فوسفاتية ثنائية الإستر لنحصل على بلاسميد مأشوب Recombinant Plasmid ، يجب أن يحتوي البلاسميد المستخدم في عملية تنسيل الجين على موقع تعرّف واحد لأنزيم التقييد المستخدم حتى يدخل قطعة واحدة فقط من الـ DNA الذي عزلناه فإذا قُطِع البلاسميد بأكثر من موقع سوف يأخذ أكثر من قطعة من الـDNA



Inserting a DNA Sample into a Plasmid



كيف يمكن تحسين كفاءة إدخال الجين المرغوبة إلى البلاسميد؟

يؤدي قطع البلاسميد بواسطة أحد أنزيمات التقييد إلى تحوله من الشكل الدائري إلى الشكل الخطي، و يسمح قطع الجين المراد تنسيلها بنفس أنزيم التقييد الذي قُطع به البلاسميد بحدوث الارتباط بين الجين و البلاسميد لكن لا يصل احتمال الحصول على بلاسميد مأشوب دوماً إلى نسبة 100 %، وذلك نتيجة إمكانية التحام البلاسميد بنفسه وعودته إلى الشكل الدائري، ولتقليل هذا الاحتمال يتم استخدام أنزيم الفوسفاتاز القلوية الذي يقوم بشطر مجموعة الفوسفات من النهاية َ5 للبلاسميد بعد قطعة بأنزيم التقييد مما يمنع إعادة ارتباط البلاسميد الخطي بنفسه، أو يتم قطع البلاسميد باستخدام أنزيمي تقييد مختلفين (وكذلك الجين بنفس الأنزيمين) لتوليد نهايتين غير متتامتين و بالتالي نمنع إعادة الإلتحام الذاتي للبلاسميد

النواقل Vectors

النواقل هي قطع صغيره من الـ DNA لها القدره على البقاء ثابته عند ربطها مع قطعة الـ DNA الغريب Forigin DNA كما تبقى ثابته عند ادخالها الى خلايا المضيف (لاتتعرف عليها انزيمات الـ endonuclease) ، تتصف بقدرتها على التضاعف الذاتي وهي تمثل قطع من بلاسميد ، فيروس ، او جزء من كروموسومات الكائنات متعدده الخلايا (خميره، نبات ، حيوان وانسان) **وتقسم النواقل إلى :**

أولاً البلاسميدات Plasmids

البلاسميدات هي حلقات صغيرة من الـDNA خارج الكروموسومات Extrachromosomeic ذاتية التضاعف توجد بشكل طبيعي في كثير من السلالات البكتيرية وفي بعض حقيقيات النوى وحيدات الخلية مثل بعض الخمائر، هي غير ضرورية لحياة البكتيريا وتكاثرها لكنها تمنحها صفات إضافية تمكنها من العيش في ظروف استثنائية مثل مقاومة الصادات الحيوية ، تتراوح أطوالها بين 5kb – 35 kb ، تعد البلاسميدات من اكثر النواقل شيوعا وهي قادرة على ربط قطعة DNA تصل الى 15kb حسب نوع البلاسميد وتزداد **كفاءة عملية التنسيل كلما قل حجم (طول) البلاسميد والعكس صحيح،** تُستَخدَم في الهندسة الوراثية بشكل كبير لأغراض عدة منها حمل الجينات من كائن لآخر ، اصطناع نسخ عديدة من جينات محددة ، نقل الجينات إلى موقع العلاج الجيني..... و تتميز البلاسميدات باحتوائها على مايلي:

- **أصل التضاعف** origin of replication **وتعرف بـ Ori:** تتألف من تسلسل معين من النيكليوتيدات يتعرف عليها معقد بروتيني لتبدء عملية التضاعف وهي تجعل البلاسميد قادر على التضاعف الذاتي self-replication
- **موقع التنسيل المتعدد Multiple Cloning Site :** هو تسلسل مميز تم تصنيعه وربطه ضمن البلاسميد ليتم التعرف عليه من قبل عدة أنواع من أنزيمات التقييد يحتوي على مناطق قطع restriction or cleavage site للعديد من أنزيمات التقييد ويسمى هذه الموقع MCS (multiple cloning sites) أو Polyliker وفي هذا الموقع سيتم إدخال الجين المرغوبة ضمنه مما يسهل عملية التنسيل لأي جين مدخلة Insert
- **المعلمات الانتقائية Selectable Marker** : وتمثل هذه جينات مقاومة لبعض الصادات الحيوية مثل جين مقاومة الامبسيلين ويرمز لها AmpR وجين مقاومة التتراسايكيلين TetR وهي تسمح بانتقاء المستعمرات المحورة بزراعتها على وسط مغذي انتقائي يحوي الأمبسيلين أو التتراسايكيلين
- **منطقة الجين الدليل Reporter gene - الجين lacZ:** يمكن من خلالها انتقاء المستعمرات التي تحوي على البلاسميد الماشوب و الجين lacZ هي أحد جينات أوبيرون اللاكتوز* و التي ترمز أنزيم بيتا غالاكتوزيداز الذي يحلل سكر اللاكتوز إلى غلوكوز وغالاكتوز

أوبيرون اللاكتوز* : الأوبيرون عبارة عن مجموعة جينات ذات هدف مشترك وظيفته تمكين الخلية من نسخ مجموعة جينات تتأثر برد فعل لإشارة داخل خلوية أو خارج خلوية وهدف أوبيرون اللاكتوز هو تمكين الخلية من استيعاب السكر الثنائي اللاكتوز وتحليله للحصول على الطاقة

- **منطقة المحضض Promoter region** : هي منطقة توجد فقط في نواقل التعبير الجيني وهذه المنطقة تقع عادةً الى الأمام Upstream من multiple cloning sites (MCS) وهي ضرورية لربط أنزيم RNA بوليميراز لنسخ وترجمة الجين التي نقلت بواسطة البلاسميد
- **موقع ارتباط الريبوزوم ribosomal binding site:** موجود في نواقل التعبير الجيني يفيد في بدء عملية الترجمة
- **تسلسلات إشارية Transcription termination sequence** : توجد في نواقل التعبير الجيني لإنهاء عملية الانتساخ
- **التسلسل المستهدف Targeting sequence**: يوجد في نواقل التعبير الجيني الحديثة وهو تسلسل إشاري صغير يوجه البروتين المأشوب المنتَّج إلى مكان محدد من الخلية المضيفة أو إلى خارج الخلية أي يصبح البروتين مفرَز
- **منطقة تسلسلات عديد الهيستيدين Polyhistidine sequence** : هي منطقة اوتسلسل اختياري من الـDNA موجودة في نواقل التعبير الجيني الحديثة ترمِز بيبتيدات قصيرة تكون جزء من البروتين المأشوب المنتَج بهدف تسهيل عملية تنقيته ، حيث يتميز البروتين المنتَج بأنه يحتوي على منطقه قصيرة تتألف من حوالي 6 ثمالات من الحمض الأميني الهيستيدين مما يسمح باستخلاصه بسهوله باستخدام أعمدة فصل النيكل التي يتحد معها البروتين بسبب الألفة العالية بين ثمالات الهيستيدين وشوارد النيكل وبالتالي نكون قد حصلنا على البروتين المطلوب بخطوه واحده

تقسم النواقل البلاسميدية بشكل عام الى:

- **نواقل تعبيرية Expression vectors**

ويقصد بها ان الناقل يحتوي على المحضض promoter وبالتالي يتم نسخ الجين المنقولة إلى mRNA والتعبير عنها لإنتاج كميات كبيرة البروتين المأشوب (المنتَج الهدف)

- **نواقل تنسيل Cloning vectors**

مثل الناقل pBR322 حيث يتم إقحام القطعة المراد تنسيلها ضمن منطقة lacZ بهدف تكثيرها

ثانياً الفاجات آكلات الجراثيم Bacteriophage

هي فيروسات تصيب جراثيم E.coli وتحقن مادتها الوراثية ضمنها ومن اشهرها الفاج M13 (Bacteriophage M13)و الفاج λ (Bacteriophage λ) ، وهي تستخدم بكثرة كنواقل للتنسيل ومن أهم ميزاتها هو قدرتها على حمل قطعة من الـDNA يتراوح حجمها بين 15 kb -25 kb ، سرعة تضاعفها وامتلاكها لموقع وحيد لعدد من أنزيمات التقييد ، قادرة على إحداث العدوى بسهولة بفضل قدرتها على التطفل على الجراثيم

- **ثالثاً الكوزميد Cosmid**

الكوزميد عباره عن بلاسميد صنعي يحوي الموقع cos (cohesive sit) المأخوذ من DNA الفاج λ وهذا الموقع يحتوي على الجينات الخاصه لتعبئة DNA ضمن الغلاف البروتيني للفاج λ، هذا النوع من النواقل له القدره على حمل قطعه DNA كبيرة يصل حجمها إلى (53 kb -50 kb) وهويسلك سلوك البلاسميد عند دخوله إلى الخلية الجرثومية وتكون كفاءة الكوزميد ضعف كفاءة التنسيل عند استخدام الناقل λ.

- **رابعاً الكروموسومات الصناعية Artificial Chromosomes**

نظرا للحاجة إلى نقل أحجام كبيرة من الـDNA فقد قام بعض العلماء بتحوير بعض الناقلات الطبيعية لكي تقوم بهذه المهمة و يوجد حاليا ناقلات على شكل كروموسوم فيها القطع الأساسية لكي تعمل على شكل كروموسوم و من هذه الأنواع كروموسوم الخميرة الصناعي Yeast artificial chromosome (YAC) و هوعباره عن كروموسوم محور يحتوي على الـ Telomer و منشأ التضاعف ori وسنترومير بالاضافه الى جينات تشفر لصفات انتقائيه يمكن ملاحظتها في خلايا الخميره، هذه النواقل يمكنها حمل قطع DNA بحجم (1000 kb -100kb) و من الأمثلة كذلك كروموسوم البكتريا الصناعي (BAC) Bacterial Artificial Chromosomes وهو تحوير للبلاسميد المعروف ببلاسميد تناسل بكتيريا الايكولي (E.coli fertility plasmid-factor) و الذي يستطيع حمل قطعة من الـDNA يصل حجمها حتى 150 kb

- **خامساً الفيروسات Virus**

النواقل الفيروسية عادةً ماتكون فيروسات معدلة وراثياً تحمل الحمض النووي الفيروسي DNA أو RNA الذي تم تعديله ليصبح غير ممرض (لا عدواني) noninfectious مثل الفيروسة العصوية . Baculovirus التي تتطفل على الحشرات، والفيروسات الرجعية Retrovirus وهي من أفضل النواقل الفيروسية وتملك ميزة حشر الـDNA ضمن الكروموسوم، تعد الفيروسات أقل الكائنات الدقيقة استخداماً كنواقل بسبب التعقيدات التي تتصف بها مادتها الوراثية و الأخطار التي يمكن أن تنتج من إجراء تحويرات وراثية عليها

بعد أن تعرفنا على النواقل وأنواعها في الفقرة السابقة

نتابع الآن مراحل تنسيل الجين وكنا قد تحدثنا عن المرحلة الأولى والثانية وهما:

عزل الجين المرغوب تنسيلها

↓

ربط الجين ضمن ناقل مناسب (بلاسميد مثلاً) لتخليق جزيئة DNA مأشوب

المرحلة الثالثة التي سنتحدث عنها هي:

↓

إدخال البلاسميد المأشوب ضمن المضيف بعملية التحوير transformation

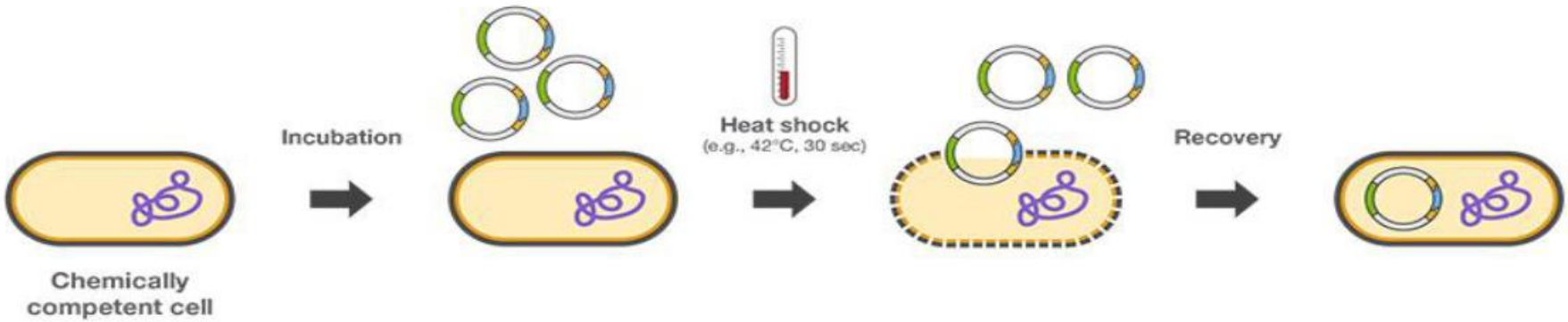
- **إدخال البلاسميد المأشوب ضمن المضيف بعملية التحوير transformation**

التحوير transformation هي عملية إدخال جزيئة البلاسميد المأشوب إلى المضيف المناسب والذي عادة يكون أحد أنواع الخلايا الجرثومية وتتم بإحدى الطريقتين التاليتين :

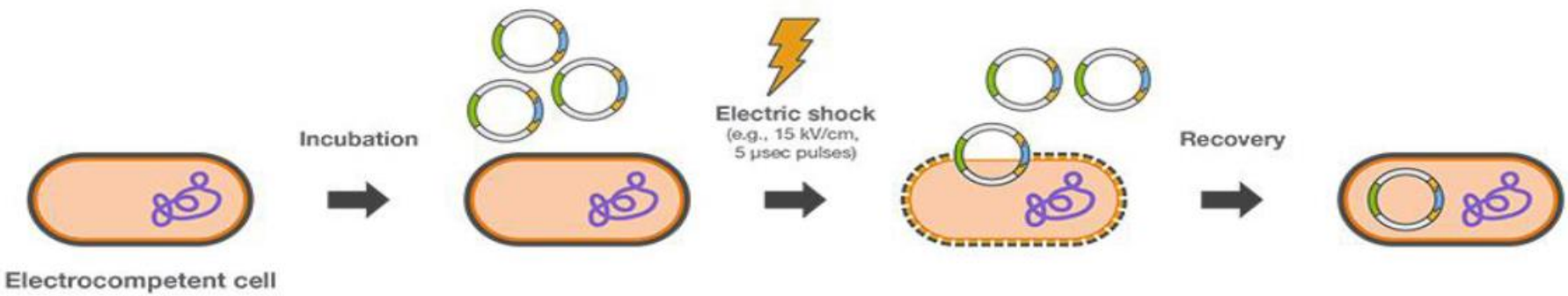
- التحريض بوجود شرجبات أحادية التكافؤ: وهي الطريقة التقليدية لتحضير الخلايا الجرثومية المؤهلة لعملية االتحوير وتتم بحضن الجراثيم في محلول مركز من أملاح الكالسيوم calcium chloride في وسط محاط بالثلج لمدة نصف ساعة تقريباً وذلك لتعديل الشحنة السالبة لغشاء الخلية الجرثومية وجعله موجب ثم تتم إضافة جزيئات البلاسميد المأشوب المشحونة سلبياً إليهم وبالتالي تنجذب إلى غشاء الخلية الجرثومية و هي مبدأ عملية التحوير ثم يتم تطبيق صدمة حرارية heat shock مما يسمح بدخول البلاسميد المأشوب خلال فترة الصدمة الحرارية بسهولة ضمن الجراثيم

- التثقيب الكهربائي electroporation : يتم فيها إخضاع الجراثيم إلى تيار كهربائي مما يؤدي إلى تشكّل ثقوب يتسرّب منها جزيء البلاسميد المؤشب إلى داخل الخلية الجرثومية

Chemical transformation

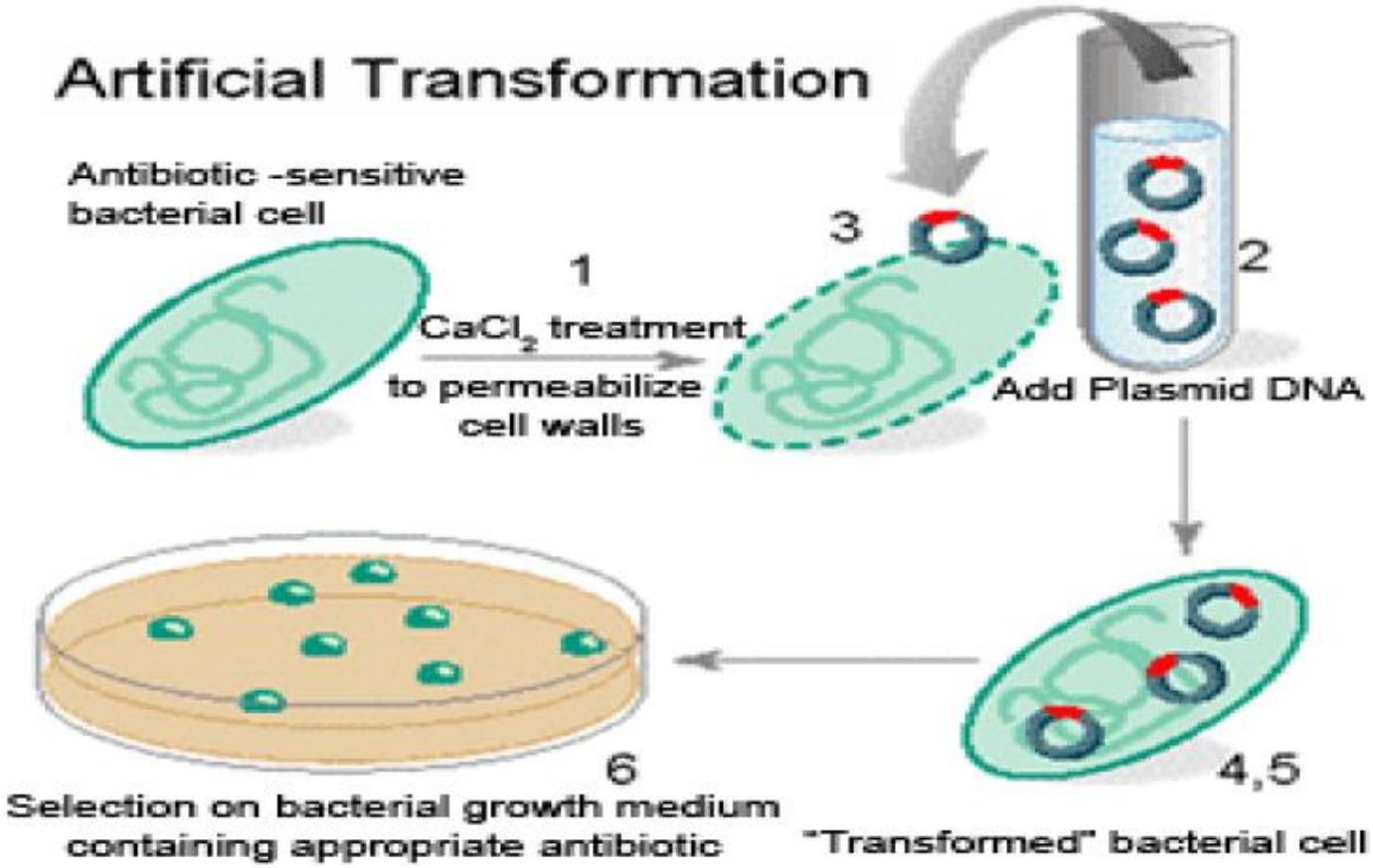


Electroporation



من الجراثيم المستعملة في عملية التحوير جراثيم E.coli DH5α و E.coli Top 10

بعد عملية التحوير يتم زراعة الخلايا الجرثومية المحورة على أطباق تحوي وسط مغذي انتقائي فتشكل مستعمرات يحوي كل منها حوالي 10^6 خلية جرثومية و كل تضاعف للخلية يقابله تضاعف لهذا البلاسميد ليتم في مرحلة تالية انتقاء المستعمرات الحاوية على البلاسميد المأشوب



- **تقصي دخول البلاسميد المأشوب إلى المضيف - الإنتقاء Selection**

يتم تصميم البلاسميدات المعدّة كنواقل لتحتوي على جين مقاومة لأحد الصادات الحيوية مثل الأمبسيلين (واسم اصطفائي) وهي جين تسمح باصطفاء الخلايا الجرثومية التي أدخلت البلاسميد، لذلك يجب أن يكون الوسط المغذي الذي تزرع عليه الجراثيم يحتوي على هذا الصاد الحيوي، وبالتالي فإن الجراثيم التي أدخلت البلاسميد فقط هي التي تنمو على هذا الوسط بسبب احتوائها على جين مقاومة لهذا الصاد.

بالنسبة للجراثيم التي نجحت معها عملية التحوير وأدخلت البلاسميد نكون أمام احتمالين :

- ✓ **إما أن تكون قد تلقت جزي البلاسميد المأشوب أي الناقل مع الجين المطلوبة**
- ✓ **أو أن تكون تلقت جزيء البلاسميد غير المأشوب أي الناقل بدون الجين المطلوبة**
- ✓ **يضاف إلى ذلك وجود جراثيم لم تنجح فيها عملية التحوير أي لم يدخل البلاسميد إليها**

من الطرق المستخدمة لتمييزالجراثيم التي تحتوي على البلاسميد المأشوب طريقة تقصي المستعمرات البيضاء / الزرقاء ، حيث تزرع الجراثيم و تنمى على أطباق بتري تحتوي على وسط مغذي مناسب يحتوي على صاد حيوي مثل أمبيسيلين و ركيزة X-gal* .

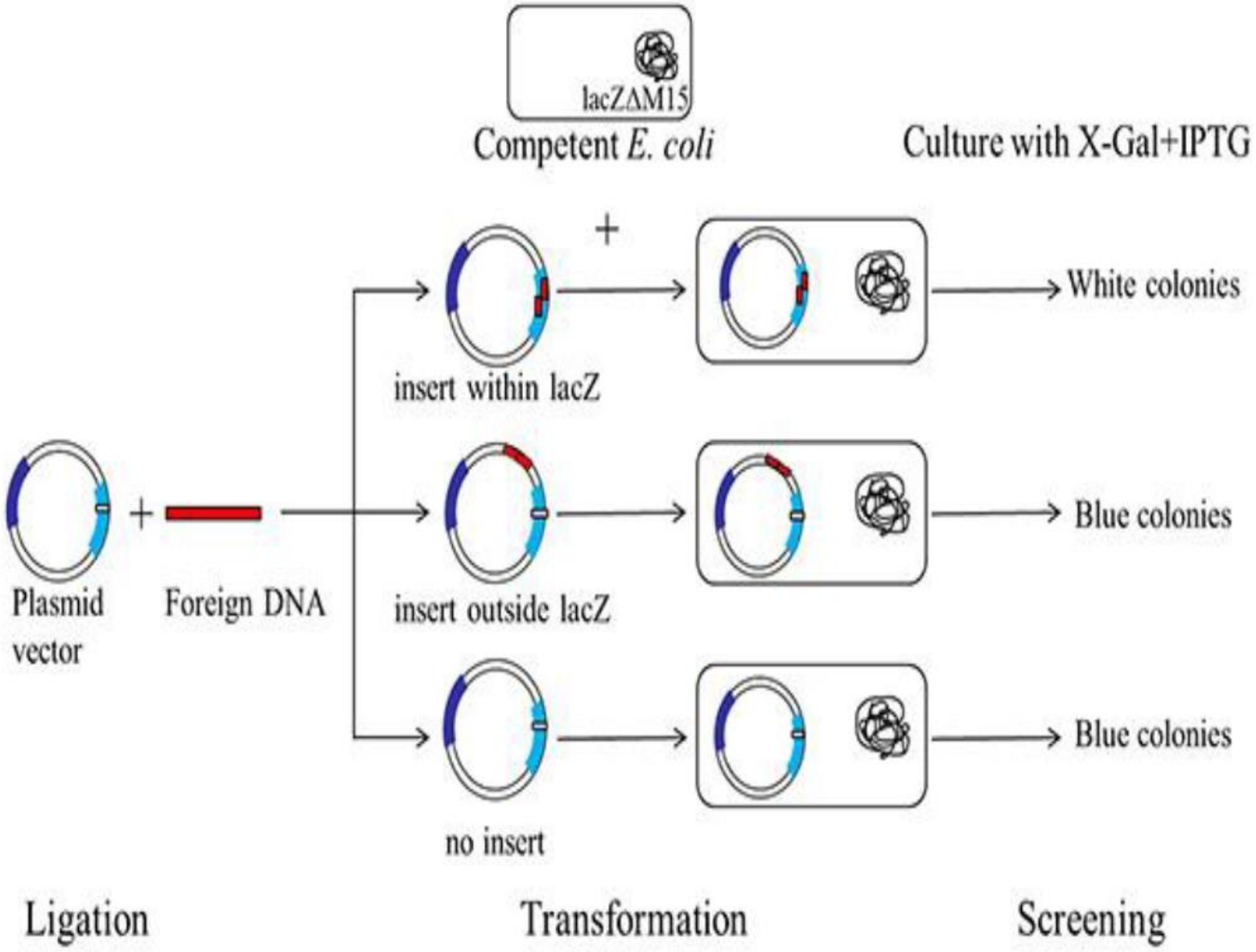
تتميز البلاسميدات التي يمكن استخدامها كنواقل بوجود موقع التنسيل المتعدد MCS وهو موقع تَعَرُف لأنزيم التقييد المستخدَم و الموقع الذي سيتم إدخال الجين المرغوب تنسيلها ضمنه ويكون هذا الموقع ضمن جين lac– Z ، يؤدي الربط الناجح للجين بالبلاسميد إلى تمزيق جين lac- Z و بالتالي لن يتم إنتاج إنزيم β-galactosidase (الذي يشطر رابطة β-glycosidic في جزيئة D- lactose)و سينتج لدينا مستعمرات جرثومية بيضاء تدل على وجود البلاسميد المأشوب ضمنها.

المرمّزة لإنزيم β-galactosidase (الذي يشطر رابطة β-glycosidic في جزيئة D- lactose)، وعلى اعتبار أن جز يئة X-gal تحاكي جزيئة D- lactose فإن إنزيمβ- galactosidase يقوم باستقلاب جزيئة X-gal ليتشكل نتيجة التفاعل الانزيمي رسابة زرقاء تؤدي إلى تلوين المستعمرات باللون الأزرق وهذا يعني أن المستعمرات الزرقاء تحوي البلاسميد غير المأشوب في حين ان المستعمرات البيضاء تحوي البلاسميد المأشوب ، يؤدي الربط الناجح للجين بالبلاسميد إلى تمزيق جين lac Z و بالتالي لن يتم إنتاج إنزيم β-galactosidase و سينتج لدينا مستعمرات جرثومية بيضاء تدل على وجود البلاسميد المأشوب ضمنها.

- إن موقع إدخال الجين المطلوبة يتم ضمن الجين lac– Z و في حال إدخال الجين بشكل صحيح للناقل ستتعطل معها الجين lac– Z ولن يتم التعبير عن أنزيم β-galactosidase
- أما في حال لم تدخل الجين المطلوبة ضمن البلاسميد لن تتعطل الجين lac– Z وبما أن الوسط يحتوي على X-gal سيتم العبير عن إنزيم β-galactosidase الذي يقوم باستقلاب X-gal لتنتج المستعمرات الجرثومية الزرقاء
- أما الخلايا الجرثومية التي لم تحصل عليها عملية التحوير أي لم يدخل الناقل إليها ستموت ضمن الوسط الحاوي صاد حيوي وذلك لأنها لم تدخل الناقل وبالتالي لم تحمل صفة المقاومة للصادات الحيوية.

ركيزة *X-gal : تتألف من IPTG وهي مادة شبيهة باللاكتوز و X-gal هو ملون فقط

وبهذه الطريقة نتمكن من انتقاء النسائل التي أدخل إليها البلاسميد المأشوب


lacZΔM15
Competent E. coli
Culture with X-Gal+IPTG
+
White colonies
insert within lacZ
Plasmid vector
+
Foreign DNA
insert outside lacZ
Blue colonies
no insert
Blue colonies
Ligation
Transformation
Screening

المصادر

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