محاضرة :طبيعة المادة الوراثية في النبات وتضاعفها

Nature and Replication of Genetic Material in Plant

تنظيم النواة والكروماتين **Nucleus and chromatin organization**

يعد العالم الألماني Friedrich Miescher أول من عزل النواة من خلايا كريات الدم البيضاء عام 1865م وأطلق عليها اسم *Nuclein*. تحتوي النواة في النبات على غالبية المادة الوراثية وتكون عادة كروية الشكل أو بيضوية وقد تكون في بعض الأحيان فصية الشكل ويبلغ قطرها 10 مايكرومتر وحجمها حوالي 2-30 مايكرومتر مكعب. وتحاط النواة بغشائين مزدوجين منفصلين عن بعضهما بفسحة أو حيز يحتوي الغشاء على ثقوب وان عدد هذه الثقوب ومواقعها يتغير في النواة بسرعة خلال التمايز الخلوي والذي يعكس الطبيعة الديناميكية لغشاء النواة. يرتبط غشاء النواة عادة بغشاء الشبكة الاندوبلازمية وفي بعض الأحيان على اتصال مع اغشية المايتوكوندريا الكلوروبلاست. تحتوي النواة على نوية (Nucleolus) تظهر بعد الانقسام الاعتيادي (Mitosis) بالقرب من احد الكروموسومات وكذلك تحتوي النواة على الكتلة الكروموسومية (الكروماتين Chromatin) ويعرف على انه تركيب معقد يحتوي على الدنا والبروتين الكروموسومي وغيرها من المحتويات الكروموسومية. وكذلك تحتوي على محتويات نووية غير كروماتينية مثل بروتينات Tubulin و Actin وإنزيمات Polymerases، ويوجد نوعين من البروتينات النووية في الكروماتين:

1. البروتينات القاعدية (Basic proteins) وهي ذات شحنة موجبة عند درجة الحموضة المتعادلة وتسمى بالهستونات (Histones).
2. البروتينات الحامضية (Acidic proteins): وهي ذات شحنة سالبة عند درجة الحموضة المتعادلة وتسمى اللاهستونات (Nonhistones).

تؤدي الهستونات دوراً رئيسا في الكروماتين. فهي توجد في كروماتين جميع الكائنات الراقية ذات النواة الحقيقية وبكميات تكافئ كمية الدنا الموجودة (وزن جزيئي:وزن جزيئي).

الحامض النووي الرايبوزي منقوص الأوكسجين

(DNA) Deoxyribonucleic acid

الحامض النووي الرايبوزي منقوص الأوكسجين (الدنا DNA) عبارة عن سلسلة طويلة من الوحدات البنائية تسمى النيوكليوتيدات (Nucleotides) ويمثل تسلسل نيكليوتيدات الحامض النووي الدنا جميع المعلومات الوراثية المتعلقة بالكائن الحي وتعد الأساس في ما تحتويه الخلية الحية من بروتين وهو المكون الأساس في بناء هيكلها وعملها. ويمثل الدنا كذلك مصدر التغايرات المظهرية (Phenotypic variations) في كائنات النوع الواحد. أهتم العلماء بدراسة المادة الوراثية في الخلية كونها المسيطر على جميع صفاتها وفعاليتها، وكان يعتقد سابقاً أن البروتين هو المادة الوراثية في الخلية، الا أن العالمين Hershey وChase أثبتا بما لايقبل الشك أن الدنا هو المادة الوراثية في الخلية عام 1952 اذ استخدما العاثيات البكتيرية (Bacteriophages) التي تتكاثر داخل البكتريا في اثبات ذلك.
يتكون كل نيوكليوتيد من سكر خماسي رايبوزي منقوص الأوكسجين مرتبط بمجموعة فوسفات وقاعدة نتروجينية وتعود القواعد النتروجينية التي تدخل في تركيب الاحماض النووية الى مجموعتين رئيسيتين هي:

3. **البيورينات (Purines):** وتشمل الادنين Adenine (A) والكوانين Guanine (G).
4. **البريميدينات (Pyrimidines):** وتشمل السايتوسين Cytosine (C) والثايمين Thymine (T) وكذلك اليوراسيل Uracil (U) الذي يدخل في تركيب الحامض النووي الرايبوزي الرنا (RNA) بدلاً من الثايمين كما يكون السكر الرايبوزي في الرنا بدلاً من السكر الرايبوزي منقوص الأوكسجين كما في الدنا. ويمكن توضيح ذلك في الشكل(7-3).

ترتبط البيورينات والبريميدينات مع السكر الخماسي عن طريق أواصر كلايكوسيدية بين ذرة الكاربون رقم 1 للسكر الخماسي وذرة النتروجين رقم 1 للبريميدين أو ذرة النتروجين رقم 9 للبيورين وتدعى الجزيئة الناتجة عن هذا الارتباط بالنيوكليوسيد. لكي يمكن للنيوكليوسيد ان يكون جزءاً من الدنا أو الرنا فعليه أولا ان يرتبط مع مجموعة فوسفات ليكون الوحدة البنائية للاحماض النووية هي النيوكليوتيد (Nucleotide) .

تعتمد تسمية النيوكليوتيدات على نوع السكر الخماسي الموجود وعلى نوع القاعدة النتروجينية. ترتبط النيوكليوتيدات المكونة للحامض النووي عن طريق أواصر كيميائية تتكون بين مجموعة الفوسفات المرتبطة مع ذرة الكربون للسكر الخماسي لأحد النيوكليوتيدات وذرة الكاربون للسكر الخماسي التالي وبهذا تتكون سلسلة من الأواصر الفوسفاتية ثنائية الاستر (Phosphodiester bond) تحمل النيوكليوتيدات مع بعضها على طول شريط الدنا أو الرنا . يكون السكر الخماسي ومجموعة الفوسفات العمود الفقري لسلسلة نيوكليوتيدات الدنا في حين تبرز القواعد النتروجينية من هذا العمود الفقري وبما انها جزيئات مسطحة فإنها تكون مرتبطة واحدة فوق الاخرى. ان طريقة ارتباط النيوكليوتيدات بواسطة الأواصر الفوسفاتية ثنائية الاستر تعطي سلسلة الدنا صفة القطبية، إذ يحمل احد طرفي السلسلة مجموعة فوسفات مرتبطة بذرة الكربون رقم 5(P-5) للسكر الخماسي في حين يحمل الطرف الآخر مجموعة هيدروكسيل مرتبطة مع ذرة الكربون رقم 3 (3-OH) للسكر الخماسي. وقد أوضح واطسن Watson وكريك Crick لأول مرة عام 1953 البنية الحلزونية المزدوجة للدنا ويعد هذا الإنجاز الرائع واحد من أهم الإنجازات في تاريخ علوم الحياة اذ مهد الطريق لفهم وظائف الجين على المستوى الجزيئي. ترتبط سلسلتا الحلزون مع بعضها عن طريق الأواصر الهيدروجينية المتكونة بين ازواج القواعد النتروجينية اذ يزدوج الادنين (A) دائما مع الثايمين (T) باصرتين هدروجينيتين، والكوانين (G) مع السايتوسيل (C) بثلاث أواصر هدروجينية (شكل 7-7). تعد خاصية الازدواج القاعدي (Base pairing) من أهم صفات حلزون الدنا المزدوج اذ ينتج عنها علاقة تكاملية بين تتابع القواعد في السلسلتين الملتفتين فعلى سبيل المثال اذا وجد التتابع ATGTC على احد السلسلتين فان السلسلة المقابلة يجب ان تحتوي على التسلسل TACAG وعل هذا الاساس فان سلسلتي الحلزون ستكونان متخالفتين في القطبية اي انهما تتجهان باتجاهين متعاكستين، احدهما بالاتجاه 5—›3 والأخرى باتجاه 3———›5.

التكرار شبه المحافظ للحامض النووي الدنا

عندما وضع واتسون وكريك فرضية اللولب المزدوج لتركيب الدنا وبتكامل القواعد فيه ادركا مباشرة فائدة التخصص في اقتران القواعد كاساس لالية تكرار الدنا فاذا انفصل شريطي اللولب المزدوج (عن طريق كسر الأواصر الهيدروجينية بين ازواج القواعد) فان كل شريط ابوي يمكن ان يوجه تصنيع شريط جديد مكمل بسبب احتياجات اقتران القواعد، اي ان كل شريط ابوي يمكن ان يعمل كقالب (Template) للشريط المكمل، فعلى سبيل المثال يعمل الادنين في الشريط الابوي كقالب عبر الأواصر الهيدروجينية لربط الثايمين في الشريط المكمل النامي. يطلق على هذه الالية لتكرار الدنا بالية التكرار شبه المحافظ

Semi) (conservative replication) ومن خلالها يتم الحفاظ على كل من الاشرطة الابوية المكملة لبعضها (اي يتم المحافظة على نصف اللولب المزدوج خلال العملية). درست عملية تكرار الدنا في النبات عن طريق تعليم النبات بمعلمات الدنا المشعة وأوضحت النتائج بان كل جزيئة دنا تتكرر من مئات النقاط على طول الشريط المزدوج ويتقدم التكرار باتجاهين متعاكسين مكونة شوكتي تكرار Replication forks متقابلتين من نقطة التكرار. كل قطعة دنا متكونة تدعى Replicon والربلكون في النباتات الراقية يبلغ طوله 20-30 µm أو 60-90 kbp، اما شوكات التكرار فعددها 5000-60000 بالمجين الثنائي تتحرك حوالي 10µm بالساعة. وجد حوالي 2-25 نوع مختلفة من الربلكون بمختلف النباتات الراقية. وان كل الربلكونات التي تنتمي الى فئة واحدة تعمل بوقت واحد. اما الفئات الاخرى من الربلكونات فتعمل بأوقات مختلفة خلال مرحلة (S). ان الإنزيم الفعال في تكرار الدنا في النبات هو DNA Polymerase بأنواعه ألفا (∝) وبيتا (β) و كاما (γ).

آلية التكرار **Replication mechansim:**

بالرغم من قلة المعلومات حول تكرار الدنا في النبات ولكن يمكن تلخيصها بما يلي (قطع ثم فك ارتباط شريطي الدنا بوساطة إنزيم Topoisomerase (Unwinding Enzyme).

5. مسك شريطي الدنا بوساطة إنزيم Helicase.
6. يقوم إنزيم خاص يسمى RNA primase بتخليق خيط قصير من RNA ذي تتابع مكمل لبداية خيط الدنا الأبوي اذ ترتبط هذه القطعة مع الشريط بأواصر هيدروجينية.
7. يقوم إنزيم DNA polymerase III بإضــافة النيوكليوتيدات الى الطرف 3-OH الذي يتوفر في نهاية البادئ وبالتالي بناء شريط مكمل بالاتجاه ‾3‹—‾5 ويسمى هذا الشريط بالشريط القائد Leading (Strand).
8. بالنسبة للشريط الاخر يقوم إنزيم RNAprimase بتخليق خيط قصير من الرنا ذو تتابع مكمل لبداية خيط الدنا الأبوي فيتم بناء قطع الدنا تسمى قطع اوكازاكي (Okazaki fragments) يبلغ طولها 1000 نيوكليوتيدة على طول الشريط.
9. ازالة البادئ من قطع اوكازاكي بواسطة إنزيم Nuclase .
10. تملا الفراغات التي تركها البادئ بواســطة الإنزيم DNA polymerase I وبذلك تلتحم القطع المتجاورة من الدنا لتكوين الشريط الذي يسمى بالشريط المتلكأ (Lagging strand).

11.تتكون بادئات جديدة كلما تقدمت شـــوكة التكرار كما تلتحم قطع الدنا المتكون للربلكونات المتجأورة لتكوين شريطي الدنا الابوي والبنوي الجديد المزدوج.

محاضرة :التحـول الوراثـي في النبـات

Genetic Transformation in Plant

التحول الوراثي للنباتات يعرف بأنه اكتساب النباتات لجينات جديدة بإستعمال تقانات الهندسة الوراثية. وتتضمن عمليات التحول في النبات كلونة الجينات المرغوبة ونقلها بطرائق مختلفة وإدخالها في مجينها بغية الحصول على النباتات المتحولة أو المعدلة وراثيا (Genetic Modified Plants) وإختصاراً GMPs أو (Transgenic plants)وإنتاج سلالات نباتية جديدة تتمتع بالمواصفات المرغوبة بزيادة إنتاجها أو زيادة تأقلمها مع الظروف البيئية المحيطة بها وبالتالي زيادة إنتاج الغذاء لسد حاجة الانسان. وتواجه الكلونة في النبات بعض الصعوبات وتحتاج الى وجود نواقل كلونة مناسبة وايجاد طرائق كفوءة لإدخال تلك النواقل داخل النبات خاصة ان عملية التحول في النبات اكثر تعقيداً وصعوبة من الخلايا الحيوانية لوجود الجدار الخلوي الصلب المحيط بالغشاء البلازمي وان هذا الجدار الصلب يقف حاجزاً لدخول الدنا الغريبة الى الخلية النباتية. وفرت عملية نقل الجين في النبات لتغيير صفاته مزايا عديدة منها:

1. يتم نقل الجينات للنبات من أنواع لايمكن للنبات ان يتوافق معه بالتلقيح والتهجين أو بطرائق لتربية التقليدية اي تجاوز حاجز النوع.
2. يمكن ادخال جينات مصنعة كلياً الى النبات.
3. يمكن إضافة صفة جديدة تماماً الى للنبات أو تغيير تعبير جينات موجودة اصلاً في النبات.
4. يمكن إضافة جينات معينة للطراز الوراثي للنبات بدون تغيير الصفات الاخرى له والتي تظهر عادة عند اجراء التضريبات بين الأنواع.

الخطوات الرئيسة للتحول الوراثي للنبات

هناك ثلاث خطوات رئيسة للتحول الوراثي في النبات:

1.نقل الدنا المرغوب الى خلية نباتية مفردة
2.تضمين الدنا المرغوب في مجين الخلية النباتية
3.تحويل الخلية المحولة الى نبات كامل

طرائق التحول في النبات

يوجد بشكل عام نوعان رئيسان من التحول في النبات:

1. التحول المباشر (Direct transformation)
2. التحول غير المباشر (Indirect transformation)

طرائق التحول غير المباشر في النبات **Indirect transformation**

يتم في هذه الطرائق نقل الجينات الى النبات بإستعمال نواقل كلونة مناسبة ودمجها في النبات وتغيير صفاته وحسب نوع ناقل الكلونة هناك نوعان من هذه الطرائق:

1. التحول بوساطة بكتريا *Agrobacterium tumfaciens*.
2. التحول بوساطة الفيروسات النباتية.

أولاً: التحول بوساطة بكتريا الأجروبكتريوم

Agrobacterium –mediated transformation

أوضحنا سابقاً ان هذه البكتريا السالبة لصبغة كرام تعيش في التربة وتصيب نباتات ثنائية الفلقة وعاريات البذور خاصة وتسبب لها مرض التورم التاجي Crown gall الذي وجد انه يحدث بسبب البلازميدات الخاصة بالبكتريا ولذلك سمي البلازميد Ti (Tumor-inducing plasmid) . ويمكن لهذا البلازميد ان يتضاعف بشكل ذاتي (Autonomous) بمعزل عن مجين البكتريا وقد تم شرح طريقة الأصابة وتكون الأورام لأول مرة في النبات من قبل Armin Braun عام 1947 وذلك بانتقال جزء ما من البكتريا وتكاثره في مجين النبات. وتتميز البلازميدات Ti بصفة غريبة وهي قابليتها على الإندماج مع احد كروموسومات النبات المصاب بالبكتريا الحاوية على هذا البلازميد. ويكون الإندماج عشوائياً وغير متخصص بكروموسوم معين أو بموقع معين على الكروموسوم. ويطلق على القطعة من البلازميد التي تندمج مع كروموسوم النبات اسم الدنا T- T) (DNA اي الدنا المتنقلة (Transferred DNA) ويتراوح طولها بين 10-30 زوج قاعدي حسب نوع البلازميد Ti اي تمثل هذه القطعة اقل من 10% من حجم البلازميد Ti. تحتوي قطعة الدنا T على عدد من الجينات القادرة على التعبير في الخلايا النبات بعد إندماجها في الكروموسوم وان قسماً من هذه الجينات يكون مسؤولاً عن احداث التورم السرطاني في حين يقوم القسم الآخر بتوجيه النبات لإنتاج مواد غريبة لاينتجها النبات اصلا تدعى الأوبينات (Opines) وهي عبارة عن مواد غذائية بروتينية تحتاجها البكتريا للنمو ولكنها لاتستطيع تخليقها بنفسها لذا فإنها توجه النبات لإنتاج هذه المواد وهي ثلاث أنواع هي الأوكتبين (Octopine) والنوبالين (Nopaline) والاجروبين (Agropine).

يتم تنظيم عملية نقل T-DNA من البكتريا *Agrobacterium* الى الخلايا النباتية من خلال نشاط مجموعة من الجينات حجمها 30 كيلو زوج قاعدي موجود على البلازميد Ti تعرف باسم جينات الضراوة (Virulence genes) وإختصاراً (*vir*). ويتم تحفيز جينات الضراوة هذه بوساطة المركبات الفينولية مثل مركب Acetosyringone ومركبات اخرى مشابهة لها، والتي تتشكل عند حدوث جروح في الخلايا النبات.

خطوات التحول بإستعمال بكتريا الأجروبكتريوم

ان عملية التحول بإستعمال بكتريا *A. tumefaciens* تتم كما يلي :

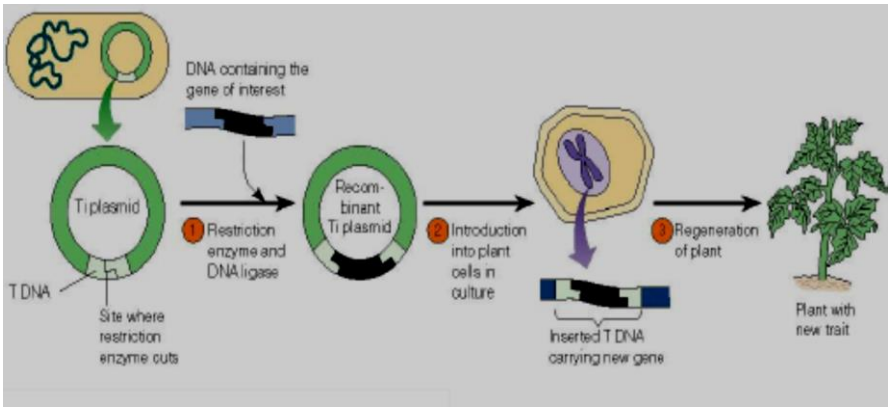
1- تصميم ناقل الكلونة المناسب من بلازميد Ti:

2. نقل الجين المرغوب الى الخلايا البكتيرية :

لما كان البلازميد الحامل لقطعة الدنا T صغيراً فان احتمالية وجود موضع حساس مفرد لاحد إنزيمات التقييد تكون عالية وبهذا يمكن غرس الجين الغريب في منطقة الدنا T. ويمكن الحصول على الجين المرغوب نقله من النبات المصدر بطرائق عديدة. وتعد طريقة المكتبات المجينة أو بنك الجينات من أكثر الطرائق اتباعاً في كلونة الجينات النباتية ونعني ببنك الجينات تكوين مجموعة من الكلونات الهجينة (مستعمرات أو بقع عاثيات هجينة) تحتوي بمجموعها على كل أو معظم الجينات الموجودة في كائن معين وتبنى بنوك الجينات عادة بإستخلاص الدنا الكلي وهضمه هضماً جزئياً بأحد إنزيمات التقييد ومن ثم غرس القطع الناتجة في ناقل كلونة مناسب. بعد الحصول على بنك الجينات يمكن انتقاء الجين المرغوب عن طريق مسح المستعمرات الممثلة للبنك لتحديد المستعمرة الحاوية على الجين المرغوب وتتم عملية المسح باستعمال صفة انتقائية وهي اما ان تكون المقاومة للمضادات الأحيائية أو الحاجة أو عدم الحاجة لعامل من عوامل النمو الأساسية. أو بإستعمال تقانة تهجين الاحماض النووية (Nucleic acid hybridization) وبعد الحصول على الجين المرغوب الموجود في قطع الدنا التابعة للمجين المهضوم يتم تقطيعه بأحد إنزيمات التقييد كما يتم تقطيع بلازميد بكتريا *A. tumefaciens* جزئياً بإنزيم تقييد ينتج نهايات متممة لنهايات قطع الدنا الحاوي على الجين المرغوب ثم يتم ربطهما معاً بإستعمال الإنزيم اللاحم DNA ligase. ويتم إدخال البلازميد الهجين الى البكتريا بطرائق عديدة أهمها طريقة التثقيب الكهربائي (Electroporation) اذ توضع المستعمرات الخاصة بالبكتريا والبلازميدات الحاوية على الجين المرغوب في وعاء واحد وتسليط نبضات كهربائية بفرق جهد معين مما يؤدي الى دخول قطع الدنا ضمن بلازميدات البكتريا وبهذا تكون البكتريا جاهزة للعمل.

3. الزراعة المشتركة مع الاجزاء النباتية **Co cultivation**

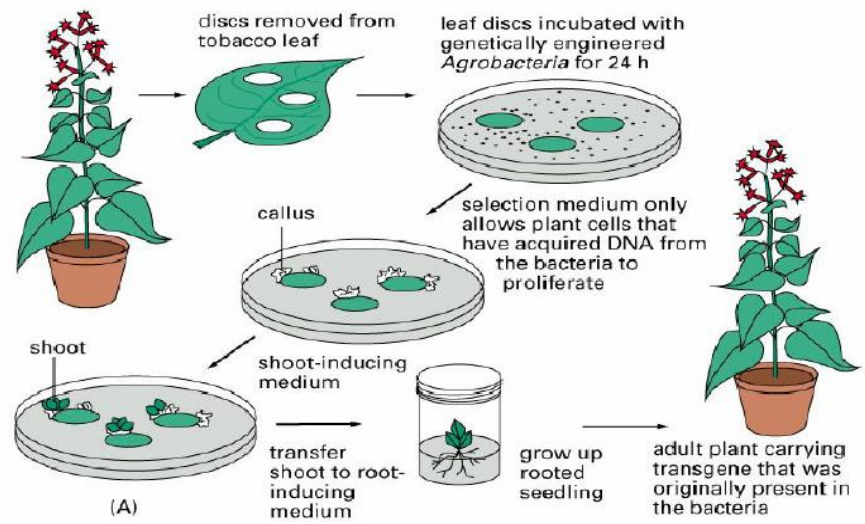
يتم في هذه المرحلة زراعة البكتريا *A. tumefaciense* الحاوية في بلازميدها على الجين المرغوب نقله بشكل مشترك مع الجزء النباتي المناسب في الوسط الغذائي لمدة معينة من الوقت. لقد وفرت زراعة الأنسجة النباتية إمكانية الحصول على خلايا نباتية مفردة أو أجزاء صغيرة من النبات ونقل الجينات اليها ثم إخلافها أو توالدها الى نباتات كاملة محورة وراثيا. وأهم الأجزاء النباتية المستعملة في هذا المجال هي البروتوبلاست اذ تزال الجدران الخلوية التي تشكل عائقاً امام دخول جزيئات الدنا ويعرض البروتوبلاست بعد ذلك الى بكتريا *A. tumfaciens* مهندسة وراثيا تعمل بعد دخولها على دمج الدنا T وبضمنها الجين الغريب في مجين هذه الخلايا وذلك بمساعدة جينات الشراسة (*vir* genes) ثم تزرع بعد ذلك البروتوبلاست في وسط زرعي خاص يعمل على انتقاء الخلايا المتحولة ويوفر بنفس الوقت كل الظروف المطلوبة لإعادة بناء الجدران الخلوية البروتوبلاست للحصول على خلايا نباتية متحولة حاوية على الجين المرغوب ويجري بعد ذلك إستعمال زراعة الأنسجة في إخلاف النباتات من هذه الخلايا المتحولة (شكل11-6).



شكل 11-6: مراحل التحول بإستعمال بكتريا *A. tumefaciens* وإنتاج النباتات المحورة وراثياً.

كذلك تستعمل الأقراص الورقية (Leaf disk transformation) كبديل للبروتوبلاست من اجل تجاوز الصعوبات المتعلقة بإنتاج البروتوبلاست اذ تقطع هذه الاقراص من الأوراق بوساطة آلة خاصة بعد تعقيمها سطحياً بعدها تلوث بالبكتريا ثم تنقل القطع الى وسط غذائي يعمل على إنتخاب الخلايا النباتية المتحولة ونشوء نسيج الكالس منها وتمايزه الى افرع أو نشوء الافرع مباشرة من أنسجة الكالس وبذلك يمكن الحصول على نباتات متحولة (Transgenic plants) كما موضح في الشكل (11-7). ويمكن إستعمال اجزاء نباتية اخرى مثل الأجنة والفلق.

4. غربلة النباتات المتوالدة بالاعتماد على تعبير الجين القابل للقياس ويسمى الجين المسجل (Reporter gene) والمنقول ضمن قطعة الدنا T ويستعمل اثنان من الجينات في الوقت الحاضر هما جين *GUS* الذي يشفر لإنتاج مادة Glucoronides التي يتم تقديرها بوساطة التحليل الكيميائي للأنسجة أو جين *LUC* (Luciferase) الذي يتم الكشف عن نواتج تعبيره بالتعريض لأشعة X.
5. بعد الكشف عن النباتات المتحولة يتم تجذير الأفرع لتكوين نباتات كاملة.
6. إختبار النباتات للكشف عن قدرة الجين المنقول على التعبير في النباتات المتحولة بالمختبر اذا كانت الصفة المنقولة مختبرية أو بالحقل الخارجي اذا كانت الصفة المنقولة حقلية.
7. إنتاج النسل (Progeny) من هذه النباتات المتحولة ودراسة توارث الصفة المنقولة وثبوتيتها.



شكل 11-7: التحول الوراثي في النبات ببكتريا *A. tumefaciens* بإستعمال الأقراص الورقية.

طرائق نقـل الجيـن المبـاشر في النبات

Direct Gene Transfer in Plant

أن احد المشاكل الأساسية التي تعيق تطور الكلونة في النباتات هي عدم إمكانية إستعمال النواقل المشتقة من بلازميد Ti أو فيروس القرنابيط ألفسيفسائي للحصول على نباتات المحاصيل المهمة اقتصادياً والعائدة لذوات الفلقة الواحدة (Monocotyledon) ويعود السبب في ذلك الى عدم قدرة البكتريا *Agrobaterium tumefaciens* أو الفيروس على إصابة هذه النباتات . ولكون تحسين المحاصيل الاقتصادية هي من الأمور المهمة في توفير الغذاء لذلك جرت العديد من المحاولات لنقل الجينات المحمولة في البلازميدات أو الفيروسات مباشرةً الى البروتوبلاست النباتي أو الأجزاء الأخرى من النبات وبطرائق مختلفة وتبعاً لنوع الأنسجة النباتية المستعملة تقسم طرائق نقل الجين الى:

أولاً: نقل الجين الى البروتوبلاست:

ان النقل المباشر لجزيئات الدنا الى البروتوبلاست النباتي بإستعمال الطرائق الفيزيائية مثل إستعمال التثقيب الكهربائي أو الحقن المجهري أو الطرائق الكيميائية مثل إستعمال البولي اثلين كلايكول (PEG)، قد تم تطويرها لتمكين الدنا من الانتقال خلال جدار الخلية أو الغشاء البلازمي الى داخل السايتوبلازم أو النواة. وتعتمد استجابة البروتوبلاست لنقل الجين المباشر له على النوع النباتي اذ ان توالد النباتات من هذا البروتوبلاست هي ليست صفة عامة في جميع الأنواع النباتية ولذلك فان إنتاج نباتات خصبة متحولة وراثياً بقي صعباً على الرغم من نجاح هذه الطريقة في إنتاج نباتات متحولة وراثياً في محاصيل البنجر السكري والرز والشعير ومن الطرائق المستعملة في نقل الجين المباشر في البروتوبلاست النباتي هي:

1. طريقة التثقيب الكهربائي

Electroporation mediated gene transfer

تعتمد هذه الطريقة على إستعمال نبضات كهربائية قصيرة في مجال كهربائي ذو فرق جهد عالي . وهذا يسبب دخول الدنا الى داخل البروتوبلاست عن طريق خاصية النفاذية المؤقتة للغشاء البلازمي لجزيئات الدنا. توضع البروتوبلاست والدنا الغريبة في محلول دارئ (Buffer) بين قطبين ويمرر تيار ذو شدة عالية في هذا المجال اذ يسبب هذا الجهد تضرر الجدار في بعض نقاطه وحدوث ثقوب فيه وبالتالي فان جزيئات الدنا تنفذ بسرعة خلال تلك الثقوب الى داخل البروتوبلاست وتستمر العملية مادام الجهد الكهربائي موجود الى حين زوال الجهد وإعادة انغلاق الثقوب (شكل 12-1). ويمكن تحسين هذه التقانة باختيار قوة المجال الكهربائي المناسبة التي تعتمد على عدة عوامل ومنها:

1. مدة النبضة للتيار الكهربائي.
2. تركيب المحلول الدارئ ودرجة حرارته.
3. تركيز الدنا الغريبة في المحلول.
4. كثافة البروتوبلاست.
5. حجم البروتوبلاست.

ان كفاءة التحول الوراثي (Transformation efficiency) بإستعمال هذه الطريقة قد سجلت في التبغ 0.2% في حين انها لم تتعدى 0.002% في محاصيل الحبوب.

محاضرة : التفاعل التضاعفي لسلسلة الدنا وتطبيقاته

Polymerase Chain Reaction (PCR)

المقدمة

وصف التفاعل التضاعفي لسلسلة الدنا (Polymerase chain reaction) وإختصاراً PCR لأول مرة من قبل الباحث Kary Mullis في عام 1985 على أساس أن عمل هذه التقانة هو مضاعفة قطعة معينة من الدنا المنتجة من المجين الكلي إنزيمياً وخارج الجسم الحي *In vitro* بوجود البادئات Primers والتي تربط بالتتابع المكمل لها على شريط الدنا القالب (Template DNA) وتعد هذه العملية محاكاة لما يحدث في الطبيعة في جميع الكائنات الحية والتي تتضاعف مادتها الوراثية أثناء الانقسام فالتفاعل بسيط ومحتوياته موجودة منذ قدم الحياة قبل ان ينفذها Mullis خارج الجسم الحي وقد توصل الى ذلك بالصدفة عندما كان يبحث عن طريقة لتشخيص الطفرة الوراثية التي تسبب مرض فقر الدم ألمنجلي (Sickle cell anemia) فتوصل الى طريقة لتضاعف قطعة من الدنا موجودة بكميات قليلة جداً لإجراء الدراسات اللازمة عليها وان هذا الاكتشاف احدث ثورة في عالم البيولوجيا الجزيئية تضاهي الثورة التي أحدثها اكتشاف التركيب المزدوج للدنا من قبل Watson و Crik (1953)، وعلى الرغم من عدم اهتمام الكثيرين به في البداية لكن اليوم تعد PCR التقانة الأكثر رواجاً في مختبرات الوراثة الجزيئية في جميع أنحاء العالم والأساس الذي تعتمد عليه الكثير من الدراسات على مستوى الدنا وبهذا استحق عليها Mullis جائزة نوبل عام 1993 اذ جعلت إمكانية إستعمال قطرة دم أو شعرة أو حتى خلية واحدة لإجراء عمليات PCR عليها.

متطلبات التفاعل التضاعفي لسلسلة الدنا

إن أهم متطلبات PCR هي إنزيم بلمرة الدنا *Taq* DNA Polymerase والبادئات (Primers) والنيوكليوسيدات منقوصة الأوكسجين الثلاثية الفسفور (Deoxynucleosid triphosphates) والمحلول الدارئ (PCR buffer) الحاوي على أيونات المغنيسيوم (Mg^{++}) وقالب الدنا (DNA Template) فضلاً عن جهاز المبلمر الحراري (Thermocycler) ومكونات أخرى سيتم التطرق اليها لاحقاً، وفيما يلي توضيح لهذه المتطلبات:

أ - إنزيم البلمرة **DNA Polymerase:**

يعد إنزيم بلمرة الدنا واحداً من المكونات الأساسية والرئيسة في تفاعلات PCR، اذ تعتمد هذه التفاعلات على قابلية هذا الإنزيم على البناء وبالتالي مضاعفة تتابعات محدده من الدنا القالب المكملة لتتابعات البادئ لذا فان الاهتمام في تطوير نوعية وكفاءة هذا الإنزيم حظي باهتمام الكثير من الباحثين و المختصين بهذا المجال. استهل العمل بهذه التقانة مع إنزيم البلمرة (Klenow fragment) المستخلص من بكتريا القولون *E. coli* وهو من نوع DNA Polymerase I إلا أن هذا الإنزيم يفقد القدرة على البناء عند تعرضه الى الحرارة العالية المطلوبة لمسخ خيوط الدنا القالب مما يجعل عمله يتوقف إلا بإضافة كميات أخرى منه في كل دورة مما جعل الباحثين يتجهون إلى إستنباط نوع جديد هو *Taq*

Polymerase الثابت حرارياً والمعزول من البكتريا المحبة للحرارة (Thermophallic Eubacterium) وتدعى *Thermus aqueticus* إذ أن له القدرة على الإستمرار بنشاطه وبدرجة 95 مْ وبناء قطع اطول من الإنزيم السابق، إذ تتراوح افضل درجات فعاليته+ في البناء بين 70 – 80مْ وله نشاط خاص في البناء يتراوح بين 35 – 100 نيوكليوتيدة في الثانية لكل جزيئه إنزيم إذ يضيف القواعد عند النهاية $OH^{-}3$. دفع النجاح الذي حققه هذا الإنزيم الباحثين والشركات المختصة الى كلونة الجين المسؤول عن إنتاجه ونقله الى داخل بكتريا *E. coli* لينتج على نطاق تجاري.

ب- البادئ **Primer:**

يعرف البادئ بكونه قطعة قصيرة من الدنا أو الرنا ترتبط بقالب شريط الدنا المفرد الشريط عند النهاية 3- المحتوية على مجموعة الهيدروكسيل OH الضرورية لبدأ عمل إنزيم بلمرة الدنا. هناك عدة أنوع من البادئات تختلف في طبيعتها باختلاف نوع المؤشرات فقد تكون ذات تتابعات عامة (Universal) ويمكن إستعمالها مع مجين كل الكائنات، وقد تكون تلك البادئات مصممة بشكل خاص ليتعرف على موقع متخصص متوزع بشكل عشوائي داخل المجين، وقد يصمم البادئ بوجود تسلسل معين في تركيبه.

جـ - المحلول المنظم أو الدارئ **PCR buffer:**

المحلول المنظم هو المحلول الذي يحافظ على قيمة أسه الهيدروجيني من التغيرات عند إضافة حامض أو قاعدة إليه أو عند تخفيف المحلول، ويقوم هذا المحلول بعملية تنظيم عمل إنزيم البلمرة والمحافظة على نشاطه لذا أصبح هناك العديد منها وفقاً لنوع الإنزيم المستخدم. وتختلف هذه المحاليل المنظمة من حيث تركيز مكوناتها والرقم الهيدروجيني لها، إلا أن القياسية منها تحتوي على المكونات الرئيسة مثل كلوريد المغنيسيوم $MgCl_2$ بتركيز 50 مللي مولر وكلوريد البوتاسيوم KCl بتركيز 1.5 مللي مولر والترس الحامضي Tri-HCl بتركيز 100 مللي مولر ذي رقم هيدروجيني 8.3 فضلاً عن 0.1% حجم/وزن من الجيلاتين ليصبح المحلول بقوة 10X ويتم تخفيفه اثناء تحضير التفاعل ليصبح 1X.

د- النيوكليوسيدات منقوصة الأوكسجين الثلاثية الفوسفات :

Deoxynucleoside triphosphate (dNTPs)

وهي عبارة عن القواعد النتروجينية الاربع مع سكر منقوص الأوكسجين وثلاث مجاميع من الفوسفات والتي تشكل مادة بناء شريط الدنا والذي يقوم إنزيم بلمرة الدنا باضافته الى النهاية OH بدأً من نقطة ارتباط البادئ بالقالب وبطول يختلف حسب نوع المؤشرات المستعملة وهي:

Deoxy Adenosine Triphosphate (dATP)

Deoxy Thymosine Triphosphate (dTTP)

Deoxy Guanosine Triphosphate (dGTP)

Deoxy Cytosine Triphosphate (dCTP)

وتضاف هذه المكونات الأربعة بتراكيز متساوية ومناسبة لإجراء التفاعل ويعتمد ذلك التركيز على تركيز Mg^{++} وذلك لأن زيادة تركيز dNTPs يؤدي الى قلة Mg^{++} الجاهز لفعالية إنزيم بلمرة الدنا وكذلك يتاثر تركيز dNTPs بتركيز البادئات المستعملة وطول القطع المتضاعفة وعدد دورات PCR

ويمكن الوصـــول الى التركيز المنـاســـب تجريبيـاً.

هـ - قالب ألدنا **DNA template**:

إن التطور في تقانات PCR وفرت طريقة سريعة وكفوءة للكشف عن وجود أو غياب تتابع معين من قواعد الدنا في نموذج ما مما جعل بالإمكان تحليل مئات النماذج مرة واحدة وخاصة عند توفير قالب الدنا الملائم الذي يمكن الحصـول عليه من مصـادر عديدة كالمكتبات المجينية (Genomic libraries) كما ويمكن الحصول على دنا الحيوانات والنباتات المختلفة وبشكل تجاري ومن مختلف الأنسجة والخلايا.

و- جهاز المبلمر الحراري **Thermocycler**:

ان اكتشاف جهاز المبلمر الحراري ادى الى تجاوز الكثير من المحددات المهمة لتقانة PCR عند بداية اكتشـافها إذ كانت تسـتعمل طريقة النقل اليدوي للنماذج بين الحمامات المائية للحصـول على الدرجات الحرارية المطلوبة لكل دورة من دورات PCR، ويعد هذا الجهاز من أهم متطلبات تفاعل PCR ولقد تم تطوير هذه الأجهزة من ناحية اسـتيعابها لعدد اكبر من العينات تصـل الى حوالي 96 حفرة بدلاً من الأنابيب وهذا يسـرع في عملية تحضـير النماذج وكذلك الكشـف عن النواتج وعلى العموم يؤثر الجهاز المستعمل في نتائج التفاعل والمدة المستغرقة في كل دورة وعدد الدورات والوقت المستغرق بين دورة وأخرى (Ramp time) والذي يفضـل ان يكون اقصـر ما يمكن وذلك ليمنع استطالة البادئات المرتبطة بالمواقع الخطأ.

مراحل التفاعل التضاعفي لسلسلة الدنا **PCR stages**:

تم تحديد تفاعل PCR بثلاث مراحل أو خطوات أساسية تتكرر في كل دورة من دورات التضـاعف ولمدة زمنية محددة ، وهذه المراحل هي:

1. المسخ Denaturation:

تعد هذه المرحلة الأولى والأسـاس في تحضـير دنا القالب مزدوج السـلسـلة للعمليات اللاحقة ومن المعروف إن تلك العملية تحدث في الخلية (*In vivo*) أثناء الطور البيني من الانقسام الخلوي وبواسطة إنزيمي DNA Helicase و Topoisomerase ولأن ارتباط الشـريطين يكون عن طريق الأواصـر الهيدروجينية فقد وجد بان الحرارة العالية أيضـا تؤدي الى فتح الشريطين وقد استثمرت هذه الظاهرة في تحقيق المرحلـة الأولى من PCR وذلك برفع درجـة الحرارة لمحلول التفـاعل والـذي يحتوي على قـالـب الدنا إلى 92–95 مْ ولوقت يتراوح بين 3–5 دقائق للحصـول على شريط مفرد ليعمل كقالب لبناء القطعة المكملـة لهـا وتعتمـد عمليـة المســخ على عدد من العوامل كنوعيـة دنـا القـالب ومصـــدره ونوع الإنزيم المستخدم.

2. مرحلة ارتباط البادئ Primer annealing:

وهي المرحلة التي تأتي بعد مرحلة المسخ مباشـرة إذ يتم فيها ارتباط البادئات مع التتابعات من القواعد النتروجينيـة المكملـة لهـا في الشـــريط المفرد من ألدنا القالب وذلك ببناء الأواصـــر الهيدروجينية بينهما وتعتمد درجـة الحرارة وطول الفترة الزمنيـة اللازمـة لهذه المرحلـة على العديد من العوامل التي تحـدد كفاءتها، ومنها تركيز وطول البادئ ونســبة احتوائه على قواعد G+C ويتم احتســاب درجة الحرارة اللازمـة للارتباط من خلال تطبيق احدى المعادلات الحســابية الملائمة لطول البادئ وذلك لاســتخراج

الدرجة الحرارية الحقيقية لتفكك 50% منه والتي تسمى Melting temperature (Tm) والتي يمكن حسابها على وفق المعادلة الأتية:

Tm = (عدد قواعد T+A) × 2 مº + (عدد قواعد C+G) × 4 مº

3- مرحلة الاستطالة **Extension stage:**

وهي المرحلة الاخيرة من تفاعل PCR وتتضمن عملية إضافة dNTPs الى النهاية OH للبادئ عند منطقة ارتباطه بقالب الدنا لتكوين شـريط دنا مكمل لذلك القالب من قبل إنزيم البلمرة، و ان افضـل درجة حرارية تتم فيها عملية الاسـتطالة وهي الدرجة الملائمة لاعطاء أعلى فعالية للإنزيم وهي 72 **مº**. أما المدة اللازمة لذلك فتختلف حسب نوع المؤشرات المستعملة والمؤشرات التي تعطي نواتج تضاعف كبيرة الحجم تحتاج الى وقت اطول من تلك التي تعطي نواتج تضـاعف قصـيرة وذلك لقدرة إنزيم البلمرة المسـتخدم *Taq* DNA polymerase على بناء 35 – 100 نيوكليوتيدة في الثانية وعلى العموم تكون الفترة اللازمة للاسـتطالة أطول (10 دقائق) في الدورة الأخيرة لتفاعلات PCR وذلك لضـمان اسـتطالة جميع نواتج التفاعل. تجدر الاشـارة الى ان عدد الدورات المسـتعملة في تفاعلات PCR وهي 40 دورة كافية للحصـول على عدد نسخ ملائمة للدنا الهدف بحيث يمكن رؤيتها عند الكشـف عنها بإسـتعمال هلام الاكـاروز كمـا ان فعالية الإنزيم تقل بعد ذلك العدد من الدورات. اما الكشـــف عن نواتج PCR فيتم بعدة طرائق أكثرها شيوعاً الهجرة الكهربائية باستعمال هلام الاكاروز والتصـبيغ بإستعمال بروميد الايثيديوم والكشـف بإسـتعمال الاشـعة فوق البنفسـجية أو بإسـتعمال هلام متعدد الاكريل امايد والتصـبيغ بإسـتعمال نترات الفضة مع الكشف المباشر بالعين المجردة وتستغرق هاتان الطريقتان عدة ساعات.

.