طرق إنتقال المادة الوراثية

Methodology of genetic transfer

طرق إنتقال المادة الوراثية فى البكتيريا (يعرف بالعبور الوراثى)

وهناك ثلاث طرق لإنتقال المادة الوراثية والعبور الوراثى فى البكتريا هما :

Transformation , Conjugation, Transduction

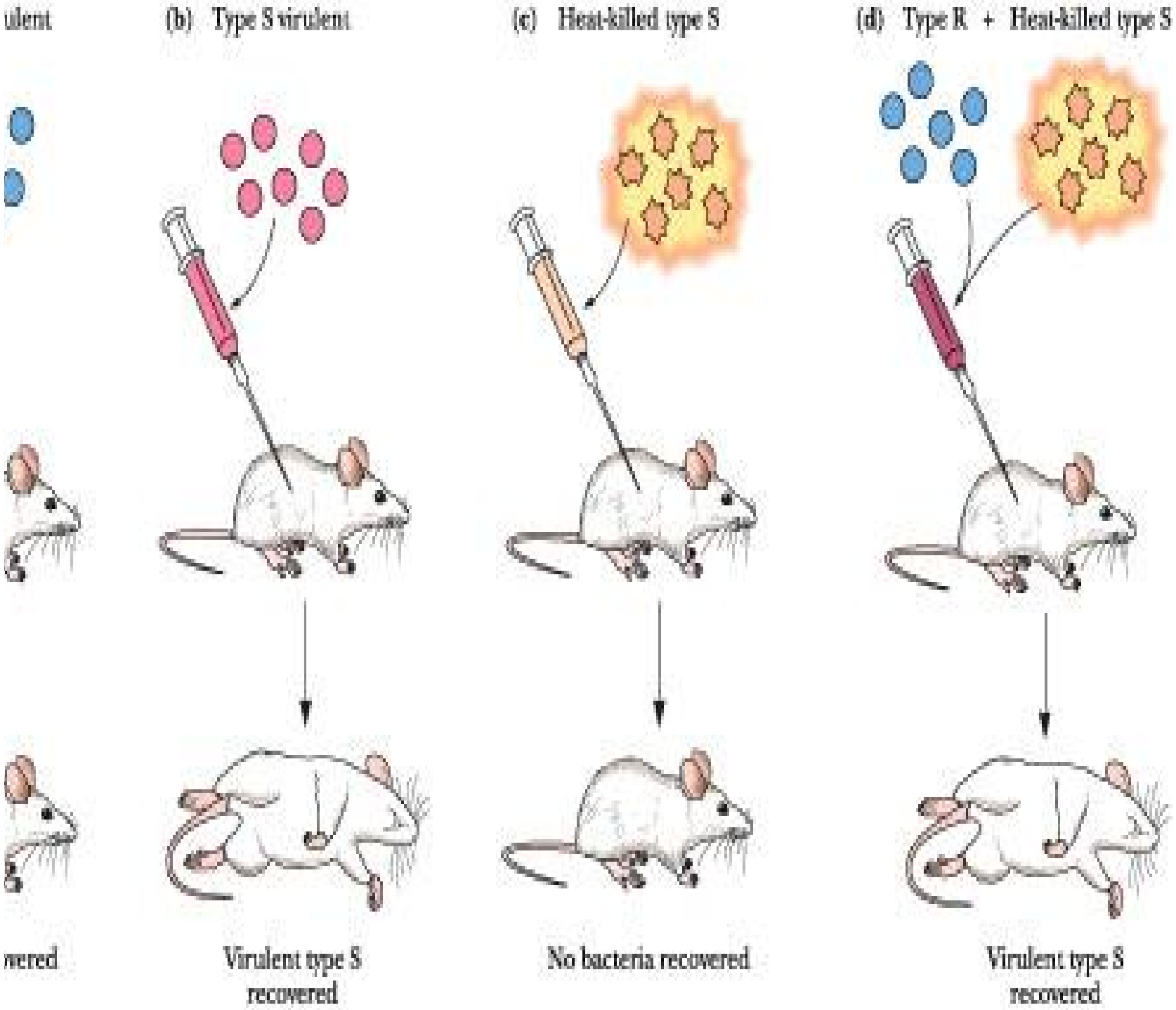
١- Transformation

تفكير العلماء فى أوائل الأربعينات من القرن العشرين كان يتجه إلى أن البروتينات هى التى تقوم بدور المادة الوراثية للأسباب التى تم توضيحها سابقا .

عام ١٩٤٤ تم فيه إثبات أن الـــDNA أو الأحماض النووية هـــى المادة الوراثية وتبين خطأ فكرة أن البروتين هو المـــادة الوراثيـــة وذلك عندما نشر العلماء الثلاثـــة T. Avery ومســـاعدوه نتـــائج تجاربهم على بكتريـــا *Streptococcus Sp.* . الســـلالة المعديـــة ملساء لها كبسولة لزجـــة مـــن polysaccharids تحميهـــا مـــن المضـــادات الحيويـــة والأخـــرى خشـــنة غيـــر ممرضـــة

■ العالم Griffith عام ١٩٢٨ كان يعمل على هذه البكتيريا فوجد أنه عند حقن البكتيريا الملساء فى أجسام الفئـــران فإنهـــا تحـــدث العـــدوى وتســـبب مـــوت هـــذه الحيوانـــات .

■ عند حقن السلالات الغير ملساء أو الخشـــنة Rough فإنهـــا لا تســـبب أى عـــدوى فـــى حيوانـــات التجـــارب .


ulent
(b) Type S virulent
(c) Heat-killed type S
(d) Type R + Heat-killed type S
wered
Virulent type S recovered
No bacteria recovered
Virulent type S recovered

٢-Conjugation

■ المقصود بإصطلاح Conjugation فى البكتيريا هو حدوث التزاوج الجنسى بين الخلايا البكتيرية وهو عبارة عن حدوث إلتصاق طبيعى Physical contact بين خليتين بكتيريتين مختلفتين وراثياً وكذلك تكوين وظهور أنبوبة التزاوج بينهما Conjugation tub

■ يحدث التزاوج الجنسى بين خلايا مذكرة معطية Male or donor strains وخلايا مؤنثة أو مستقبلة حيث تحتوى الخلايا المعطية على وحدة وراثية إضافية هى F factor, (sex factor) or fertility factor .

■ التزاوج الجنسى فى البكتريا هو عبارة عن إنتقال جزء من المادة الوراثية من خلية إلى أخرى والخلايا التى تحتوى على عامل الجنس يرمز لها بالرمز F^+ والخلايا التى لا تحتوى على هذا العامل تسمى خلايا مستقبلة يرمز لها بالـ F^-

- التزاوج الجنسى فى البكتريا هو عبارة عن إنتقال جزء من المادة الوراثية من خلية إلى أخرى والخلايا التى تحتوى على عامل الجنس يرمز لها بالرمز F^+ والخلايا التى لا تحتوى على هذا العامل تسمى خلايا مستقبلة يرمز لها بالـ F^-

- $F^+ \times F^-$

عندما يتم خلط الخلايا F+ مــع F- فإنه يتكون بينها Cytoplasmic bridge (conjugation tube) .

- ثم يحدث إنتقال لعامل الجنس خلال أنبوبة التزاوج من الخلايا F^+ إلى F- فيؤدى ذلك إلى تحويل F^- إلى خلايا معطية F^+ .
- تحت هذه الظروف يتضاعف عامل الجنس مستقلا وسريعاً عن الكروموسوم الرئيسى للخلية ، ويكون إنتقال عامل الجنس سريعاً فى هذا التزاوج من F^+ إلى F- بينما معدل إنتقال المادة الوراثية يتم بمعدل منخفض وهو ١/ مليون إلى ١/ ١٠ مليون

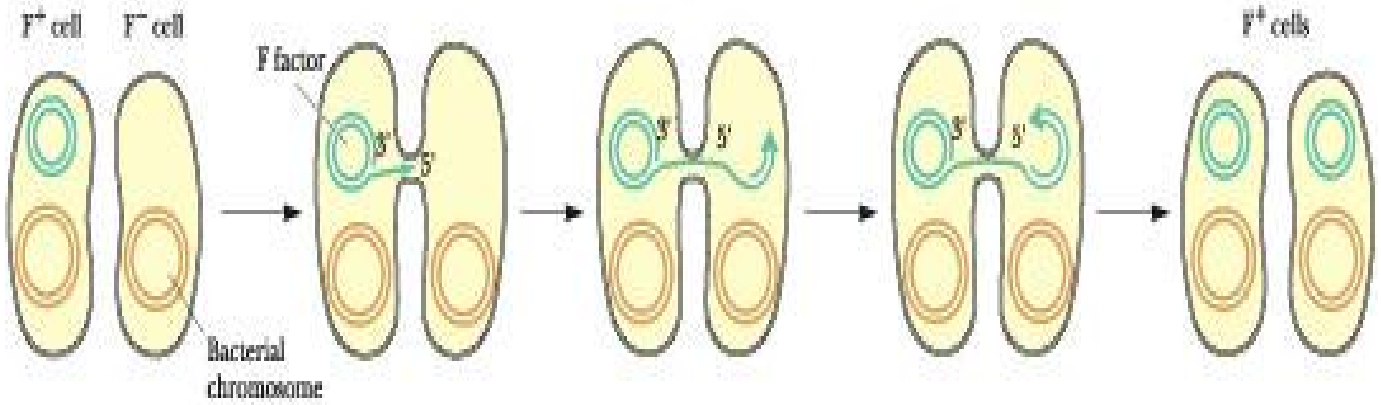


Diagram showing the transfer of F factor from an *F*+ to an *F*- cell. A single strand of the F factor is nicked and transferred into the recipient *F*- cell. The complementary strand is then synthesized within the recipient *F*- cell to create a new double-stranded F factor, transforming the *F*- cell into an *F*+ one.

www.hamak.org

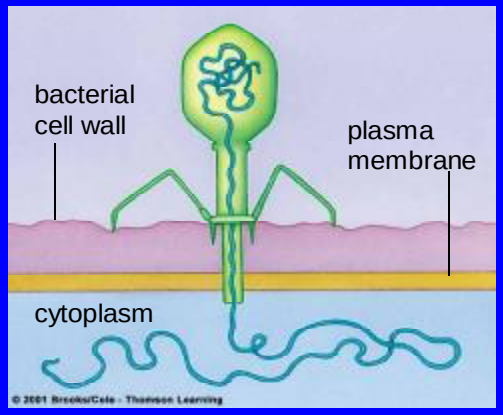
- وقد يحدث عبور فردى بين العامل F والكروموسوم البكتيرى فيندمج معه العامل F وتعرف السلالة بـHfr وهى سلالة غير ثابتة فقد ينفصل عامل الجنس عن الكروموسوم البكتيرى.
- Hfr X F-
- ويحدث الإقتران كما هو سابقا ولكن تنتقل جزء من الـDNA البكتيرى الى السلالة F-

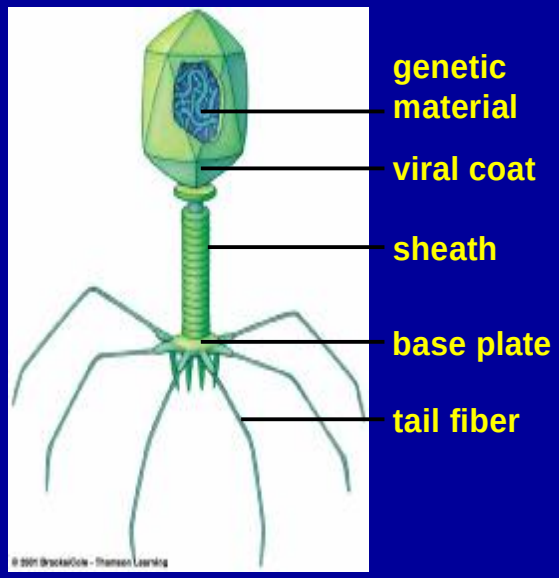
٣ - Transduction
فيروسات البكتيريا
(Bacteriophages)

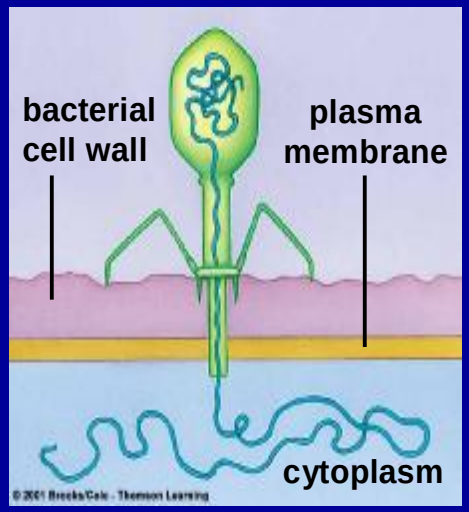
- تتركب معظم الفيروسات من أحماض نووية وغلاف بروتينى وقد تتكون الأحماض النووية فى بعض الفيروسات من الحامض **RNA** وبعضها الآخر من **DNA** .
- من ناحية علم الوراثة فإن الفيروسات التى تصيب البكتيريا هى التى يهمنا أمرها ويعرف هذا النوع من الفيروسات بالبكتريوفاج وإختصاراً كثيراً ماتسمى بالفاج **Phage** وهذه الفيروسات تعتبر طفيليات إجبارية على البكتيريا.

Bacteriophages

- Viruses that infect bacteria
- Consist of protein and DNA
- Inject their hereditary material into bacteria

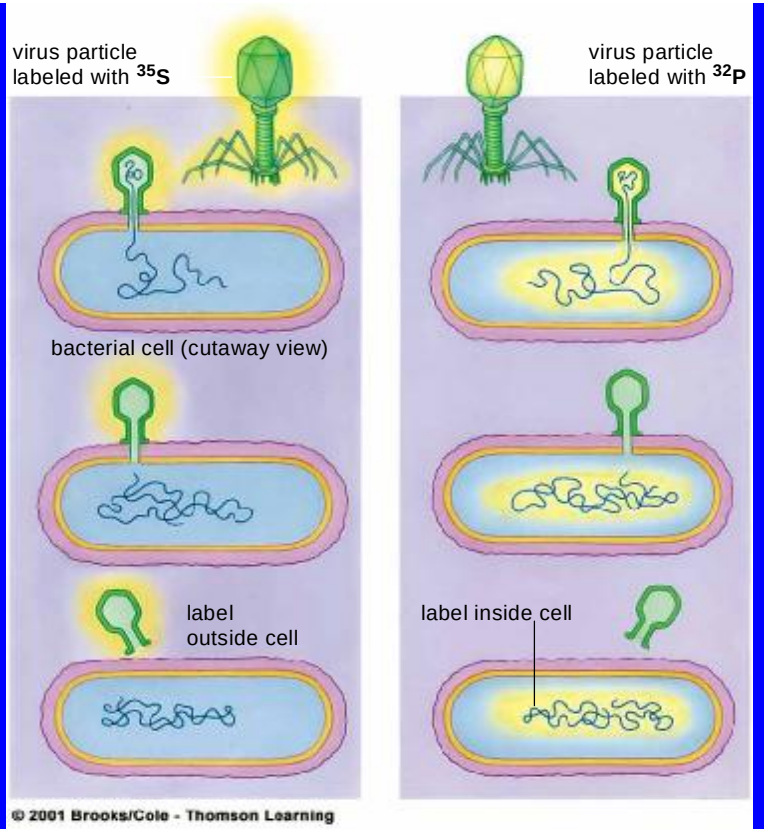






www.futura-sciences.com

Hershey and Chase Results



www.mun.ca

الأمر الأول وهو الحالة العدائية Lytic cycle (Virulent stage)

■ تعرف هذه الحالة بدورة التحلل Lytic cycle والتى تحدث إجبارياً للخلية بسبب الحالة العدائية للفاج.

■ تبدأ هذه الحالة من اللحظة التى يدخل فيها DNA الفاج حيث يقوم مباشرة بهدم جميع إنزيمات الخلية البكتيرية وتحليل DNA الخلية البكتيرية نفسها وإستخدامه فى عمل نسخ عديدة وكل نسخة بدورها تقوم بالعمل كشفرة وراثية Code فى بناء غلاف بروتينى جديد يغلف كل DNA جديد قد تكون .

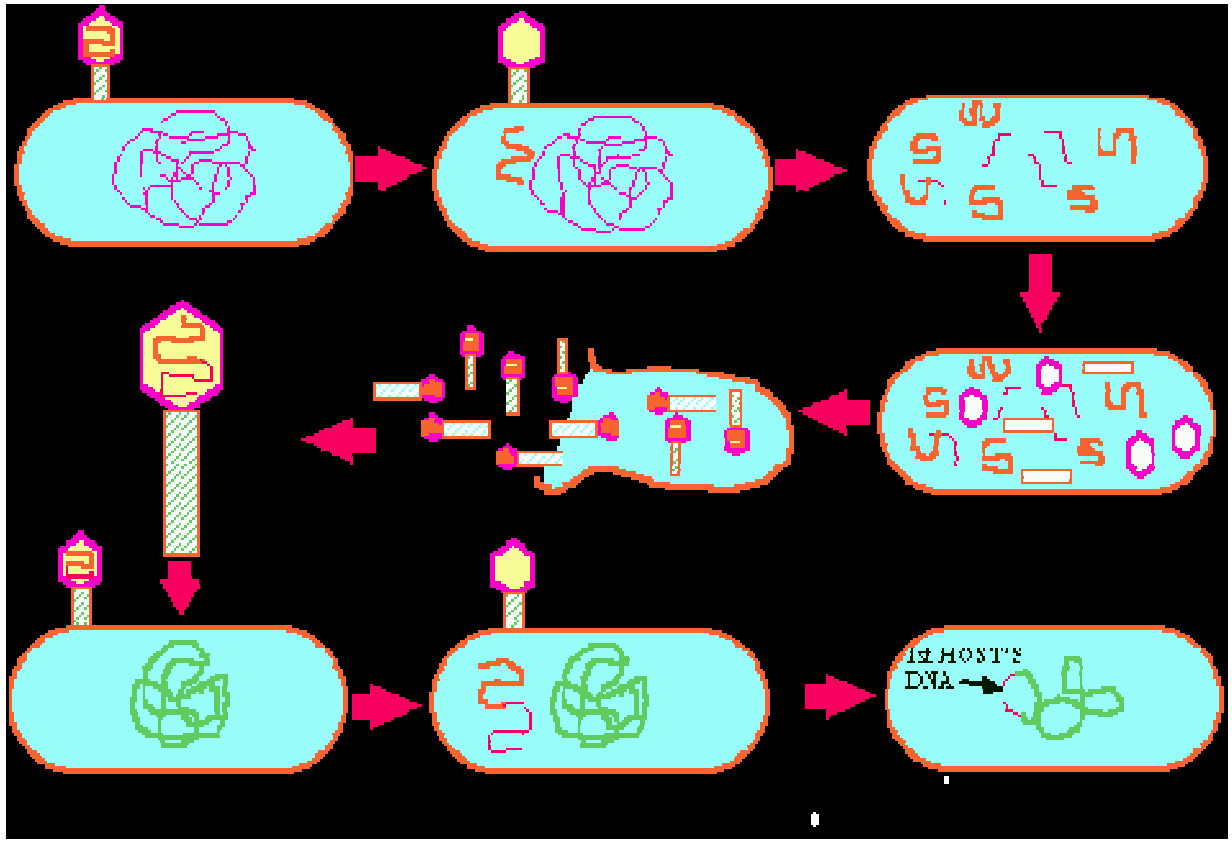
■ بذلك تتكون العديد من الفاجات داخل الخلية البكتيرية تتراوح أعدادها من بضعة مئات إلى بضعة آلاف وبمجرد إكتمال تكوين الفاجات الجديدة فإنها تقوم بإفراز إنزيم Lysozyme الذى يقوم بتحليل جدار الخلية البكتيرية حيث تنطلق منها العديد من الفاجات الكاملة والتى تكون قادرة على إصابة خلايا بكتيرية أخرى .

- **الأمر الثانى وهو الحالة المعتدلة Temperate stage :**
- **جزىء الحامض النووى DNA الخاص بالفاج يلتصق بالحامض النووى DNA الخاص بالخلية البكتيرية ويظل فى هذا الوضع بصورة دائمة ويتكاثر بنفس معدل تكاثر الخلية البكتيرية ويعرف الفاج فى هذه الحالة بإسم الفاج الأولى Prophage**
- **قد يستمر هذا الحال لفترة قد تصل إلى مئات الأجيال المتتابعة وخلال هذه الفترة لا يتسبب عن وجود الفاج أى ضرر يذكر للخلية البكتيرية .**
- **ولكن عاجلاً أو أجلا ينفصل DNA الخاص بالفاج عن DNA الخاص بالخلية البكتيرية ويتحول إلى الحالة العدائية ويتسبب فى موتها وخروج العديد من الفاجات الجديدة التى تصيب خلايا بكتيرية أخرى وتعرف الخلايا البكتيرية المحتوية على الفاج بإسم الخلايا الليسوجينية Lysogenic cells**

Virulent and Temprate stages)

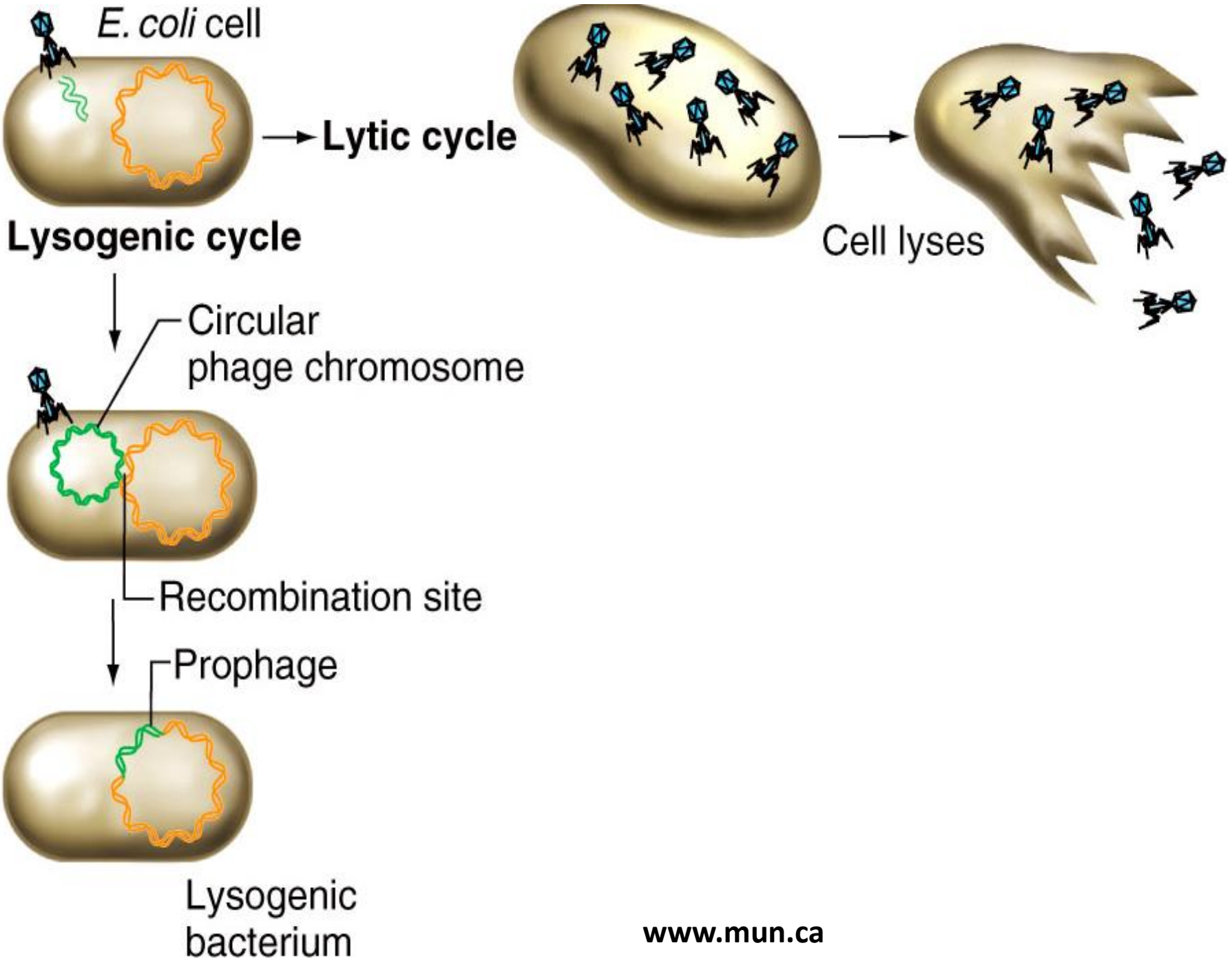
الحالة العدائية و الحالة المعتدلة

p1



www.mun.ca

p1 pc123; 01/05/2007


E. coli cell
Lytic cycle
Lysogenic cycle
Cell lyses
Circular
phage chromosome
Recombination site
Prophage
Lysogenic
bacterium

www.mun.ca

- **تبادل البكتيريا بالإستقطاع Bacterial transduction :**

كما سبق وذكرنا فإن الإستقطاع يعنى إنتقال جزء من المادة الوراثية المعروفة بالحامض النووى DNA من خلية بكتيرية إلى خلية بكتيرية أخرى عن طريق وسيط وهو الفاج

- **لاحظ العالمان Zinder & Lederberg بأنه عندما ينفصل الفاج الأولى Prophage عن كروموسوم الخلية البكتيرية أثناء تحوله من الحالة المعتدلة ليصبح فى حالة عدائية قد يحمل معه Fragment من DNA الخلية البكتيرية بعد إلتحامها بـــ DNA الفاج نفسه وبذلك فإنها تصبح جزء من تكوين DNA الخاص به .**

- عند خروج الفاج بعد تحلل الخلية يصبح حاملاً لهذه القطعة الزائدة
- عندما يصيب هذا الفاج خلية بكتيرية أخرى فإن القطعة المنقولة تدخل فى كروموسوم الخلية البكتيرية وتصبح جزءاً منه بواسطة عبور وراثى Crossing over أو أثناء تكاثر الخلية البكتيرية نفسها .
- بإندماج القطعة المنقولة فى DNA الخلية البكتيرية تكتسب الأخيرة صفة البكتيريا التى نقلت منها هذه القطعة عن طريق الفاج الذى قام بإستقطاعها ونقلها من خلية بكتيرية إلى أخرى .
- حالات التحول والإستقطاع فى البكتريا تقدم أحسن دليل على أن الحامض النووى هو الحامل للمادة الوراثية فى الخلية.

ثانياً: أهمية الهندسة الوراثية

- يهتم علم الهندسة الوراثية بفصل الجينات من خلايا الكائنات الراقية ونقلها إلى خلايا الكائنات الدقيقة **Microorganisms** بغرض إنتاج منتجاتها البروتينية بصورة إقتصادية وكذلك نقل الجينات إلى النباتات والحيوانات لتحسين صفاتها الإقتصادية علاوة على إستخدام الطرق الحديثة لهذا العلم فى تشخيص الأمراض الوراثية للإنسان ومحاولة علاجها ٠
- فى العشرون عاما الماضية حدث تطور هائل فى تطبيقات الهندسة الوراثية والتى أمكن بواسطتها إنتاج الإنسولين البشرى ، هرمونات النمو واللقاحات المضادة للفيروسات **Vaccines** بواسطة بكتريا الأمعاء *Escherichia coli* وخلايا الخميرة ٠
- هذا التطور الغير متوقع أدى إلى نشأة فرع علمى جديد يسمى الهندسة الوراثية

ماهى الإحتياجات اللازمة للنقل الجينى فى الكائنات الراقية؟

- ١- إنزيمات القطع: Restriction enzyme
- ٢- الناقلات: Vectors (البلازميدات – الفاج – الكوزميد)
- ٣- عمل المكتبات الجينية
- (Genomic library and/or c-DNA liberary)
- ومن طرق النقل الجينى: Transgenic
- الطريقة الغير مباشرة (بإستخدام الوسيط Vectors)
- الطريقة المباشرة وهذه بإستخدام الـ Gene gun

- كل إنزيم من إنزيمات القطع يتعرف على تتابع محدد من ٤ أو ٦ نيوكليوتيدات حيث يقطع الـ DNA عند هذا التتابع فنجد أن إنزيم EcoRI وهو أحد هذه الإنزيمات المحددة يقوم بقطع سلاسل جزىء الـ DNA فقط عند المواقع التى تحتوى على تتابع من ٦ نيوكليوتيدات .
- تمكن Gellert من فصل إنزيمات تسمى الإنزيمات اللاحمة DNA ligases والتى تلحم قطع الـــ DNA مع بعضها .
- فى هذه الفترة الزمنية تطورت طرق فصل الـــ DNA من الكائنات المختلفة وقد أمكن فصل جزىء DNA البلازميدى من بعض الأنواع البكتيرية ومنها *E. coli* .
- البلازميد مكون من سلسلة صغيرة مزدوجة حلقية من DNA حيث يتواجد بجانب الـــ DNA الكروموسومى داخل البكتريا ويتضاعف Duplication مستقلا عن الـــ DNA الكروموسومى ، ويتراوح عدد البلازميدات داخل الخلية البكتيرية الواحدة بين ١-٢٠ بلازميد وقد أمكن تصميم بعض البلازميدات وإستخدامها كناقل للجينات Vectors بين الكائنات الحية.

Restriction Endonucleases

Hind3 Restriction Enzyme	EcoR2 Restriction Enzyme
5' - AAGCTT - 3‘ 3' - TTCGAA - 5' 5' - A | AGCTT - 3‘ 3' - TTCGA | A - 5' 5' - A AGCTT - 3' 3'- TTCGA A - 5'	5' - GAATTC - 3' 3' - CTTAAG - 5' 5' - G | AATTC - 3' 3' - CTTAA | G - 5' 5' - G AATTC - 3' 3' - CTTAA G - 5'

Restriction Enzymes

- **cut DNA at very specific sequences**
- **staggered cuts produce sticky ends**

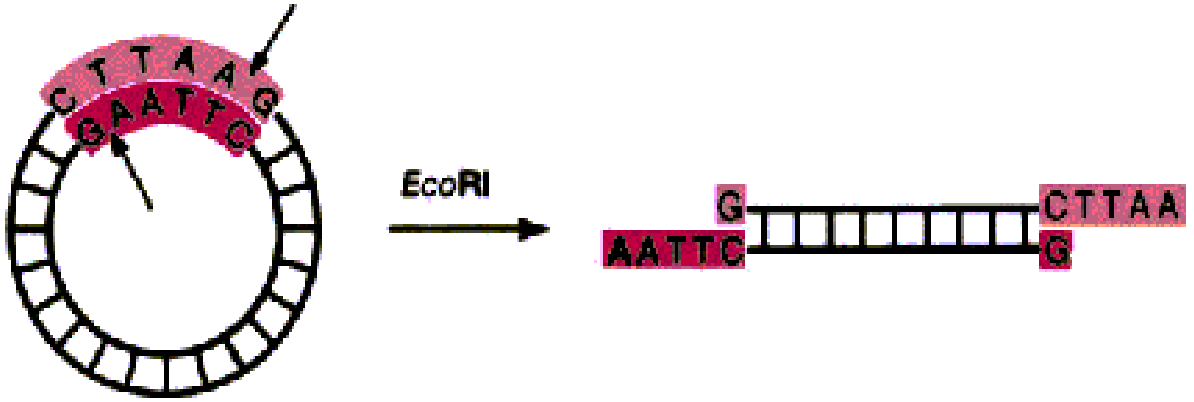
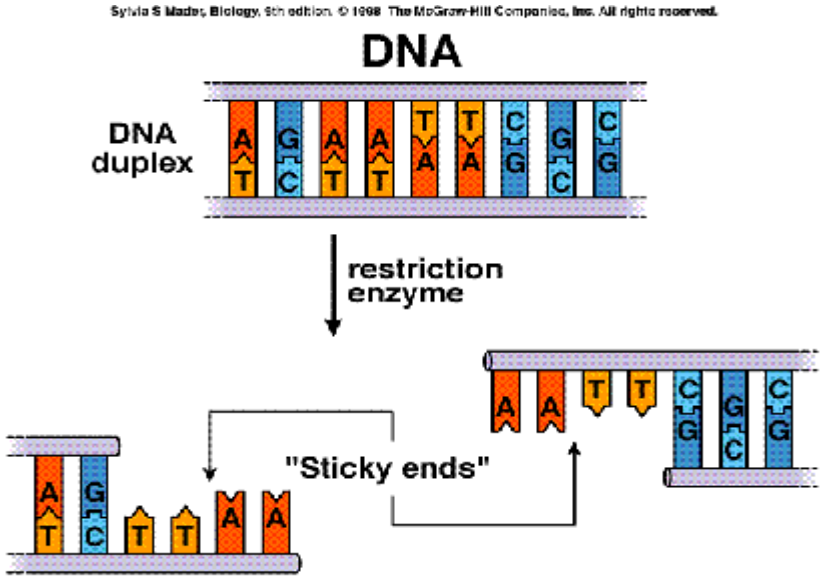


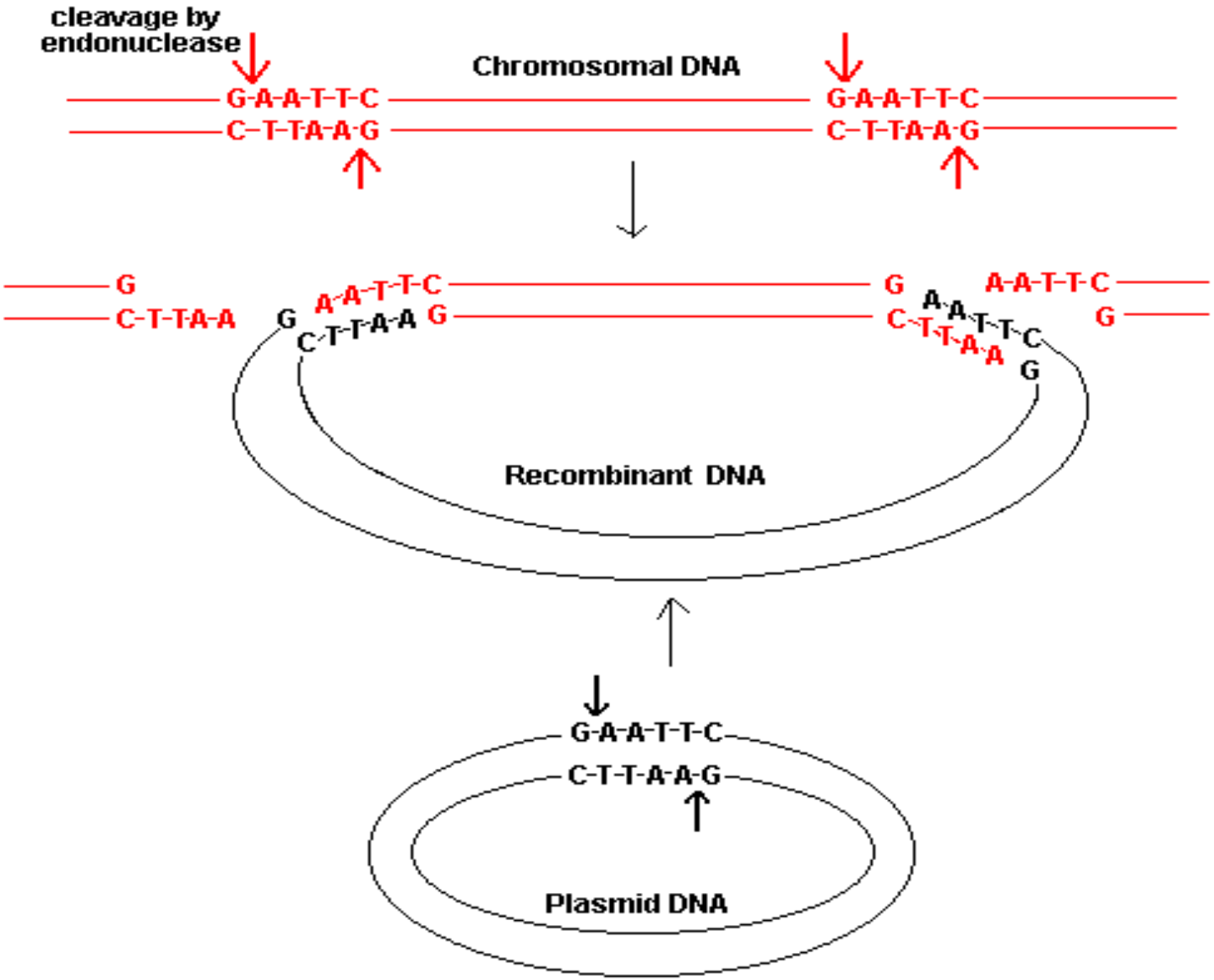
fig.cox.miami.edu

- produce population of fragments of different size from foreign DNA of interest
- allows for splicing together of non-homologous sequences



Cutting with restriction enzymes produces restriction fragments with "sticky ends."

www.britannica.com



www.bass.bio.uci.edu

DNA Cloning and gene bank

- تعرف الكلونة بأنها عمل نسخ عديدة من الجينات المستهدفة.
- ولكى يتم الإحتفاظ بهذه الجينات تم عمل بنك الجينات

وبالتالى جاءت فكرة عمل مكتبة الجينات ومنها نوعين

الأولى: Genomic Library وهذه تشمل الجينوم

الثانية: c-DNA Library وهذه تشمل الـm-RNA

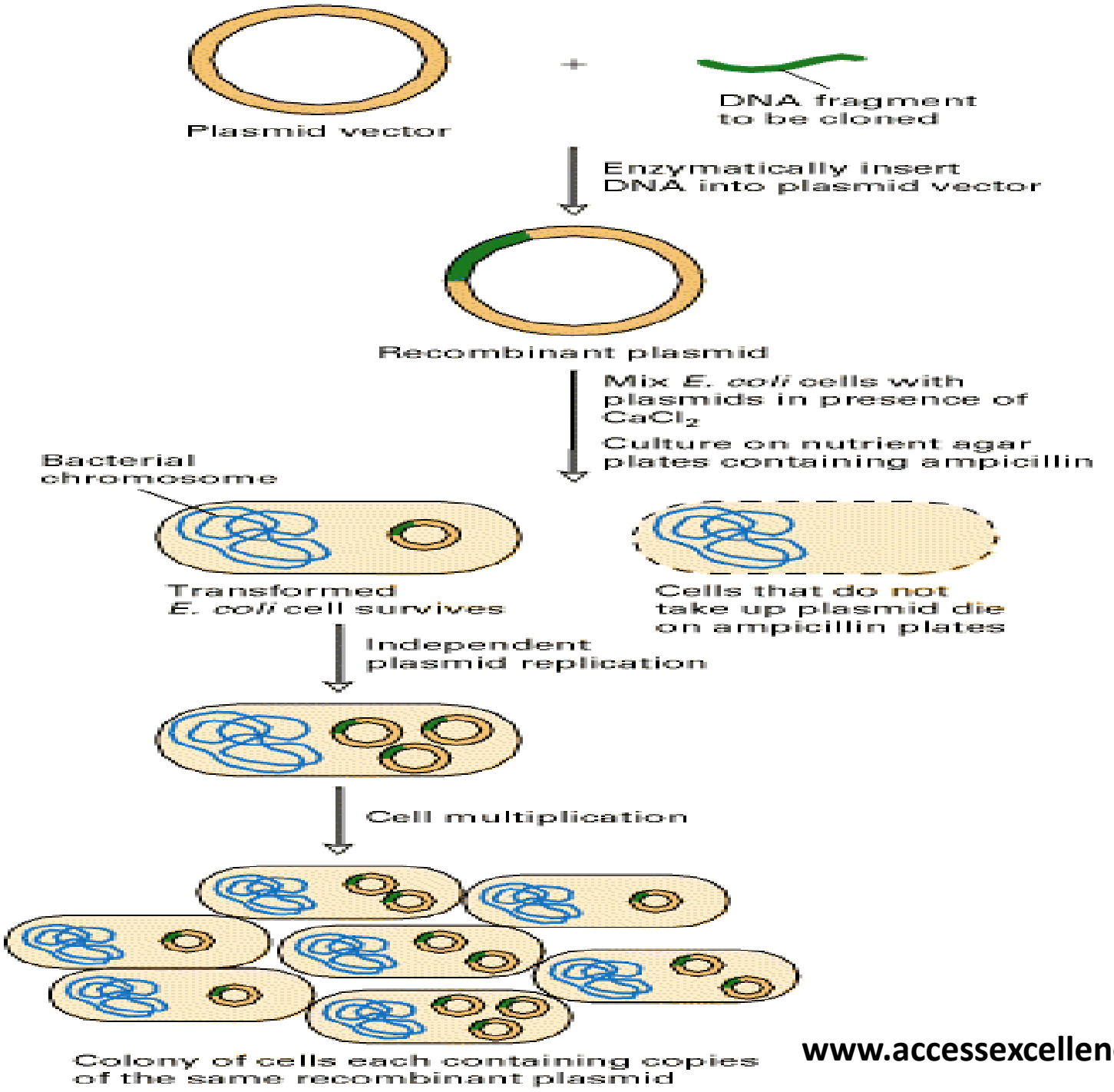
وتتم عملية الكلونة بطريقتين:

١- إستخدام البلازميدات وتضاعفها داخل الخلية البكتيرية

٢- ميكانيكيا بإستخدام جهاز الـ PCR

polymerase chain reaction

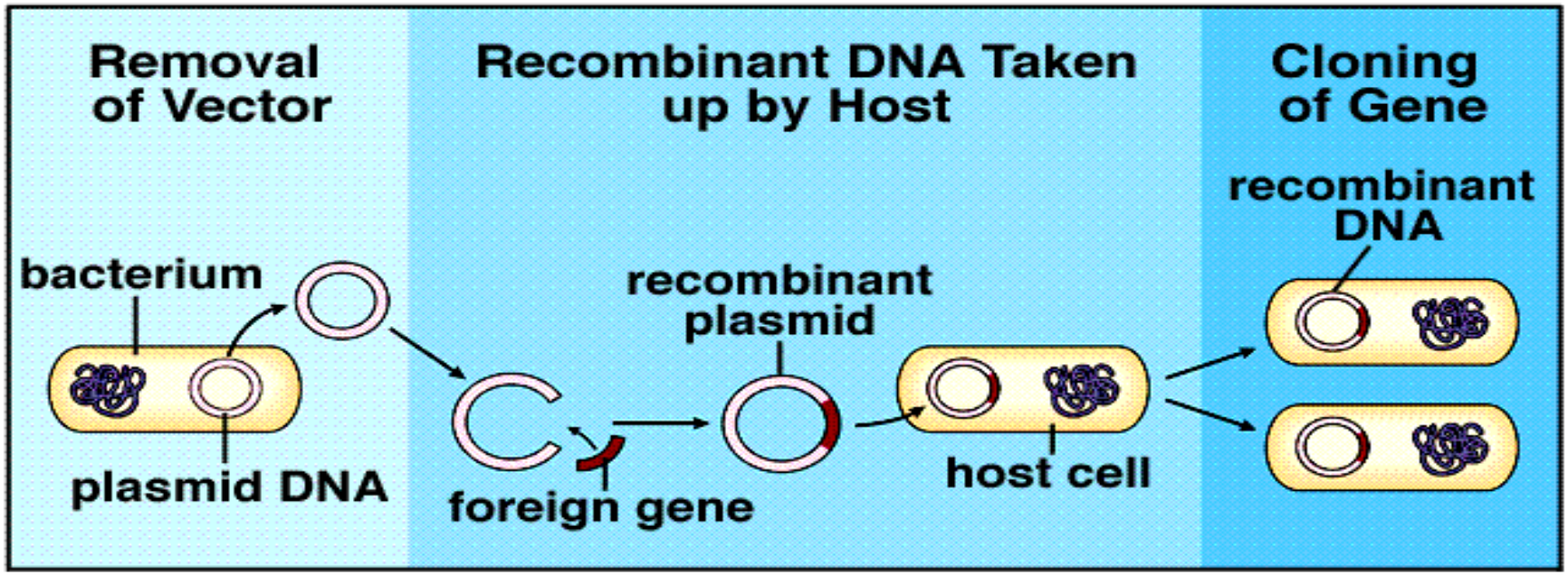
- **DNA Cloning**
- وتتلخص خطوات هذه الطريقة فيما يلى:-
- - قطع **DNA** البلازميدى بواسطة أحد الإنزيمات القاطعة.
- - قطع الـ**DNA** الكروموسومى المستهدف بواسطة نفس الإنزيم القاطع وفصل قطعة الـ **DNA** المراد نقلها ومضاعفتها
- .- لحم أو ربط قطعة الـ**DNA** المفصولة مع البلازميد بواسطة الإنزيم اللاحم **DNA ligase** وبالتالى يتكون بلازميد هجين **Recombinant plasmid**.
- - يتم إدخال هذا البلازميد الهجين داخل الخلية البكتيرية(بكتريا*E. coli*)
- - تترك الخلايا البكتيرية المتحولة والمحتواه على البلازميد الهجين تتكاثر داخل بيئة غذائية.
- - فصل البلازميد الهجين من هذه الخلايا الناتجة.
- بهذه الطريقة والمسماه **DNA cloning** يمكن مضاعفة قطعة **DNA** من كائن حى عدة ملايين من المرات داخل البكتريا .



www.accessexcellence.org

Sylvia S Mader, Biology, 6th edition. © 1998 The McGraw-Hill Companies, Inc. All rights reserved.

Genomic Library (1)

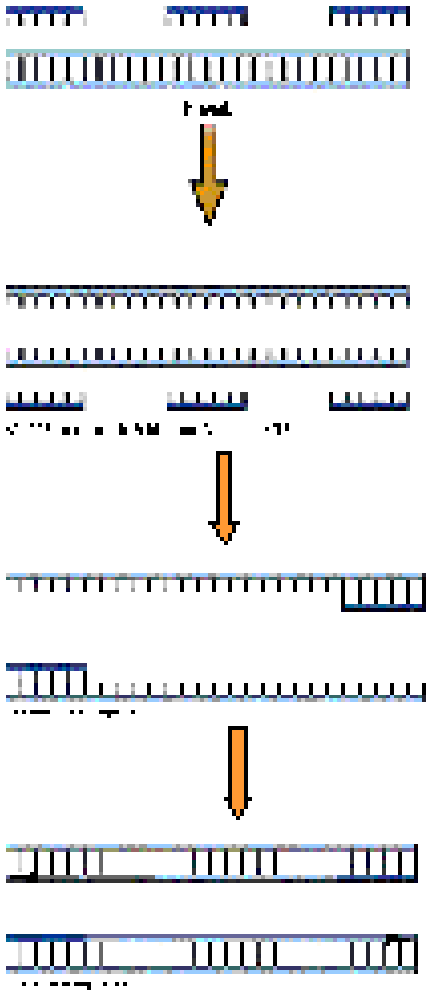


www.lcusd.net

D. PCR (Polymerase Chain Reaction)

1. Procedure used to make many copies of DNA from a small sample. (amplify)

2. Uses a special heat-stable DNA polymerase



www.bioron.net

من بين التطبيقات المختلفة للهندسة الوراثية ما يلى :-

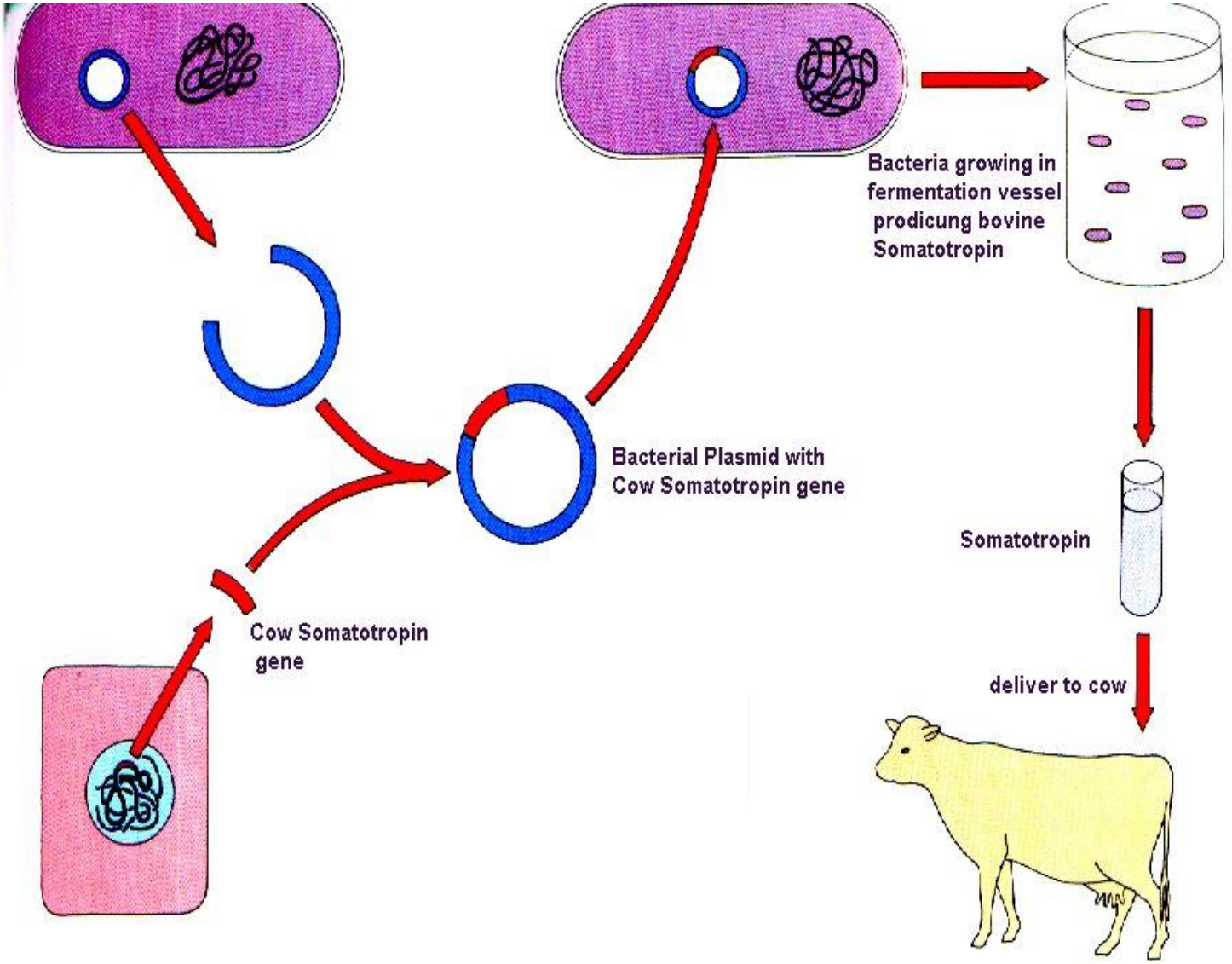
١- إنتاج الهرمونات والإنزيمات وغيرها من البروتينات الحيوية داخل الكائنات الدقيقة بطريقة إقتصادية .

٢- إنتاج عديد من العقاقير مثل عامل تجلط الدم Blood clotting factor VIII الذى يفتقده مرضى سيولة الدم نتيجة لأن تركيبهم الوراثى يحتوى على جين طافر لهذا العامل "تجلط الدم" والذى لا ينتج هذا البروتين.

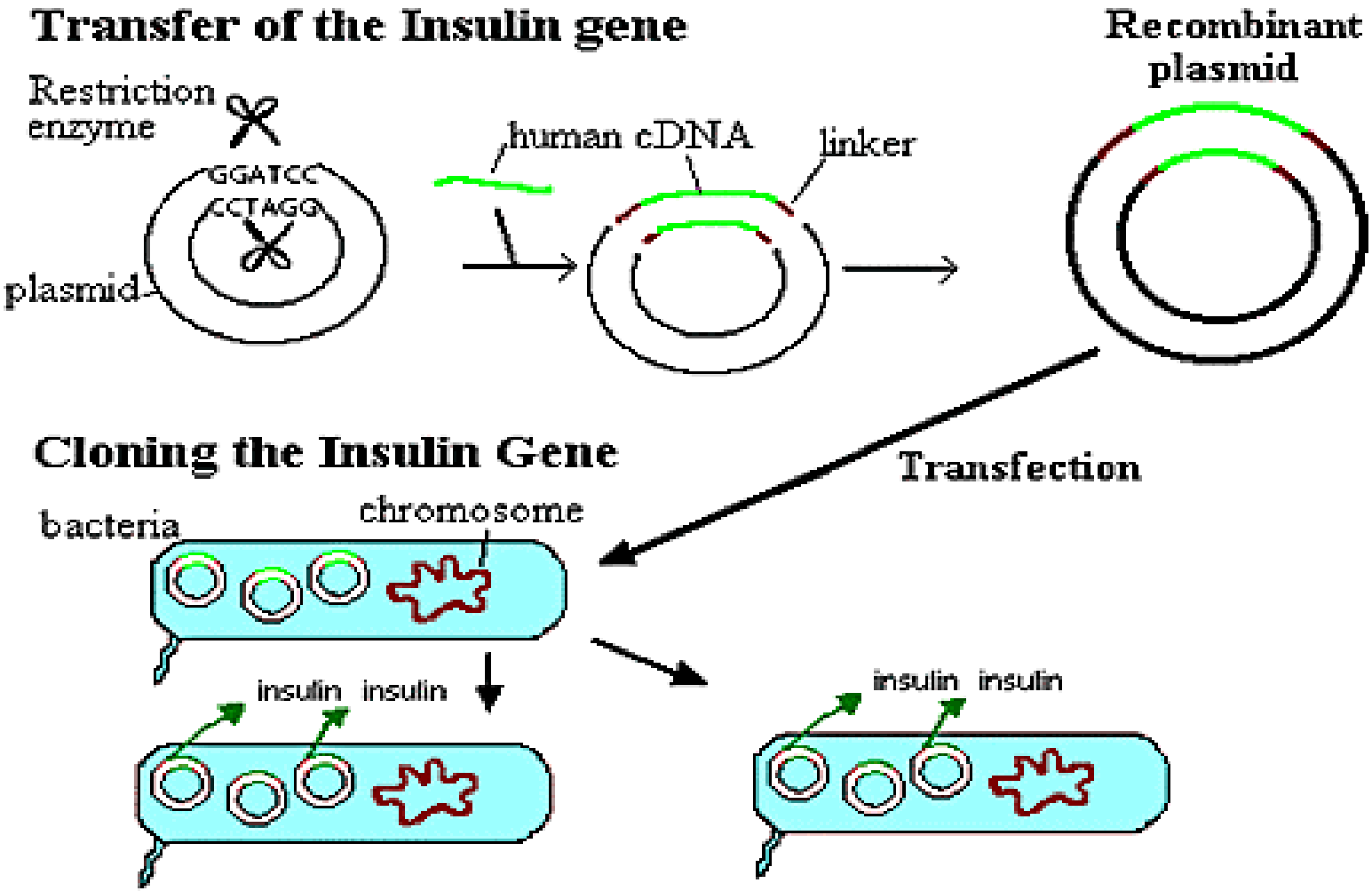
٣- إنتاج Interferon كمضاد للفيروسات وبالتالى إستعماله لتنشيط الجهاز المناعى.

٤- إنتاج هرمون النمو Growth hormone وإستخدامه لزيادة إنتاج اللحم فى الأبقار.

٥- إنتاج اللقاحات Vaccines ضد بعض الفيروسات مثل لقاح ضد فيروس إلتهاب الكبد الوبائى والذى أمكن إنتاجه داخل خلايا الخميرة.

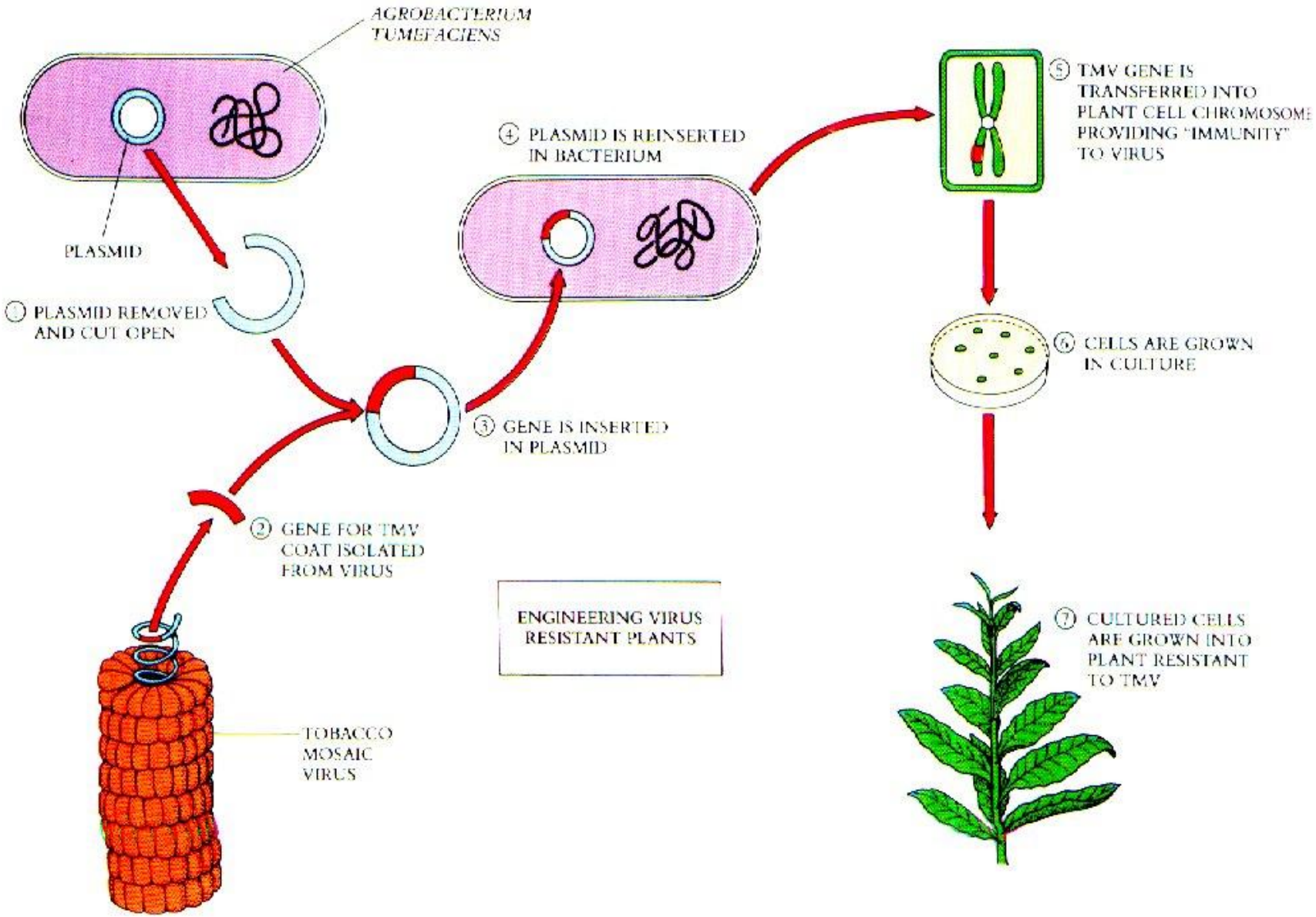


www.abayfor.de



Transfer and cloning of the Insulin gene

www.faculty.ircc.edu



www.michael.ozanon.free.fr

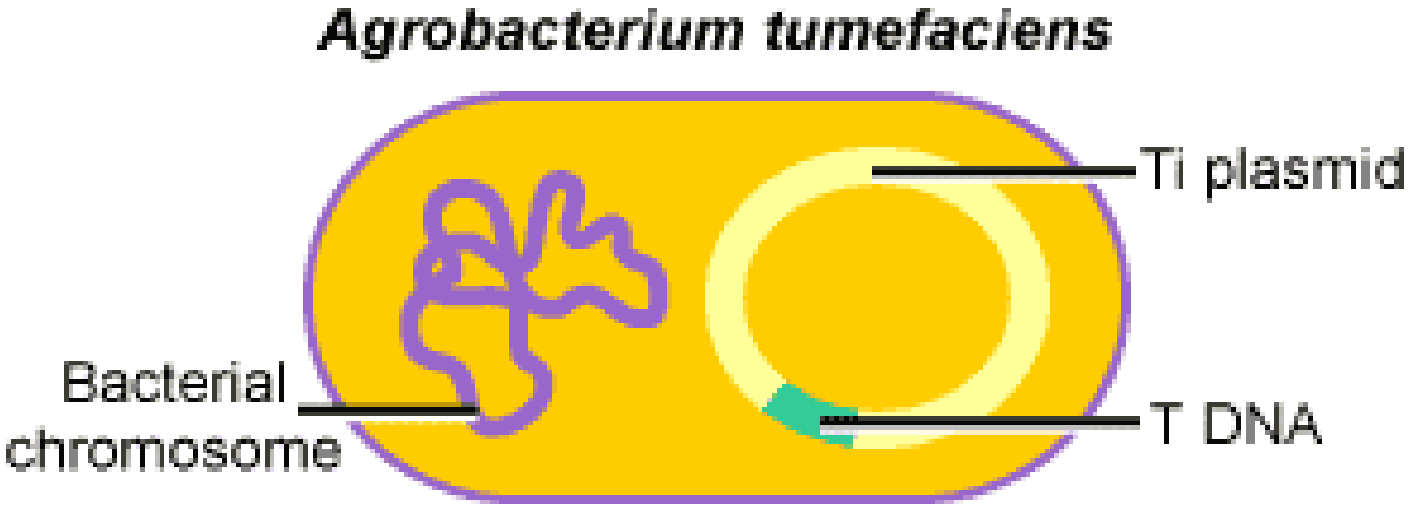
نقل الجينات إلى النباتات Transgenic plants :

■ فى ٤٠ سنه الماضية تطورت طرق زراعة الأنسجة Tissue culture بكتريا التربة *Agrobacterium tumefaciens* والتى تصيب عديد من نباتات ذوات الفلقتين وتسبب تورمات فى مكان الإصابة٠

هذه البكتريا تحتوى بجانب DNA الكروموسومى على بلازميد يسمى Ti-plasmid وعند إصابة البكتريا للخلايا النباتية فإن جزء صغير من Ti-plasmid ينفصل ويلتحم بالكروموسومات النباتية٠ هذا الجزء من البلازميد والذى يلتحم بالكروموسومات النباتية يسمى T-DNA و T-DNA يحتوى على جينات تحفز على زيادة معدل إنقسام الخلايا النباتية مع عدم قدرة هذه الخلايا النباتية على التشكل مما يؤدى إلى تكوين ورم والمسمى بالتدرن التاجى٠

نقل الجينات إلى النباتات

Transgenic plant



www.cals.ncsu.edu

- إستخدم Ti-plasmid كناقل للجينات Vector إلى الخلايا النباتية نظراً لتميزه بالخاصتين التاليتين :-

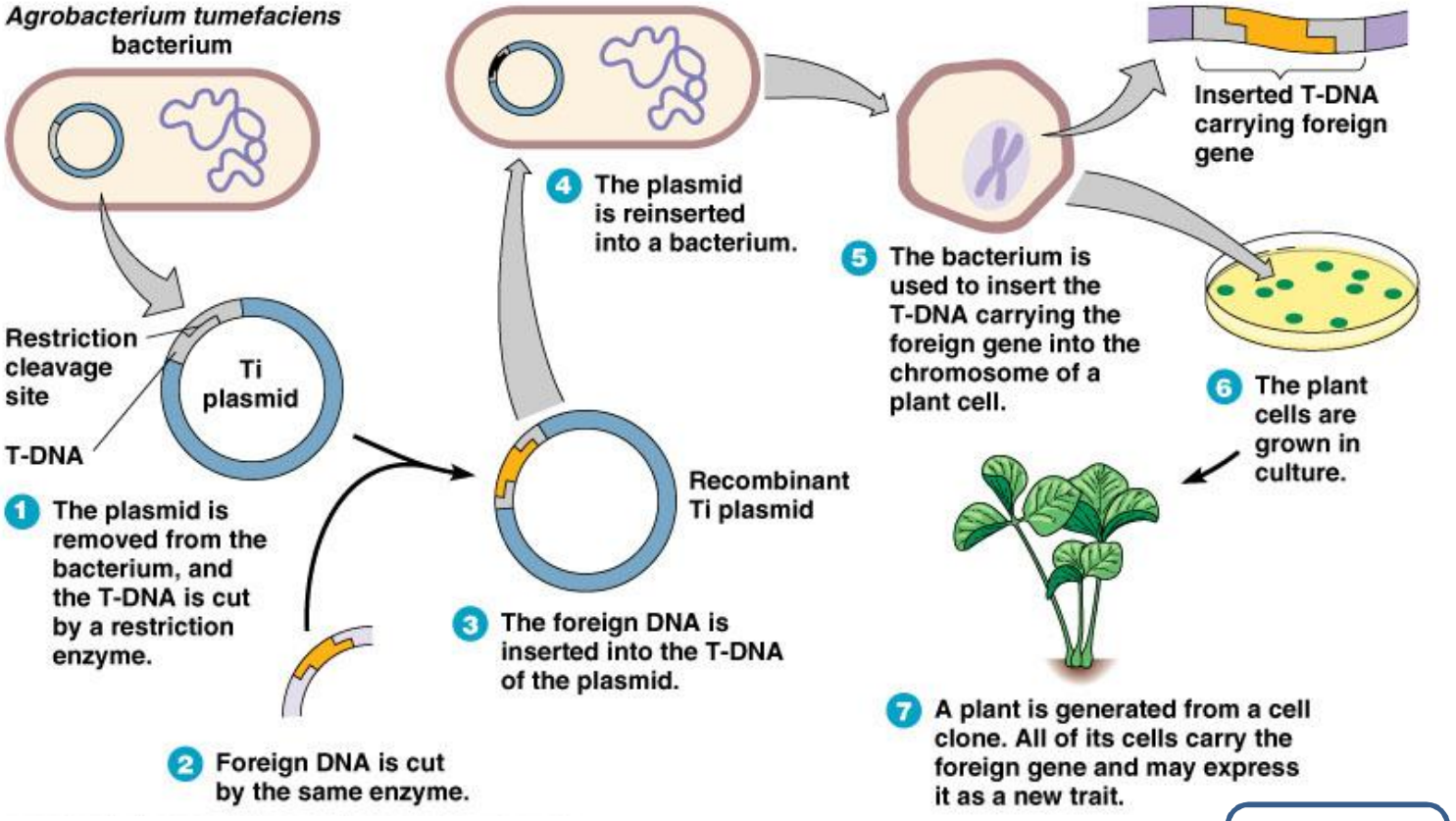
١- بكتريا الـ Agrobacterium الحاملة لهذا البلازميد تستطيع أن تصيب مدى واسع من الأنواع النباتية من ذوات الفلقتين.

٢- مقدرة قطعة الـ T-DNA والموجودة فى الـ Ti-plasmid على الإلتحام داخل كروموسومات النبات وتضاعفها مع تضاعف الكروموسومات النباتية وبالتالى إنتقال هذا الـ T-DNA إلى الأجيال التالية أى يسلك سلوك الوراثة المندلية.

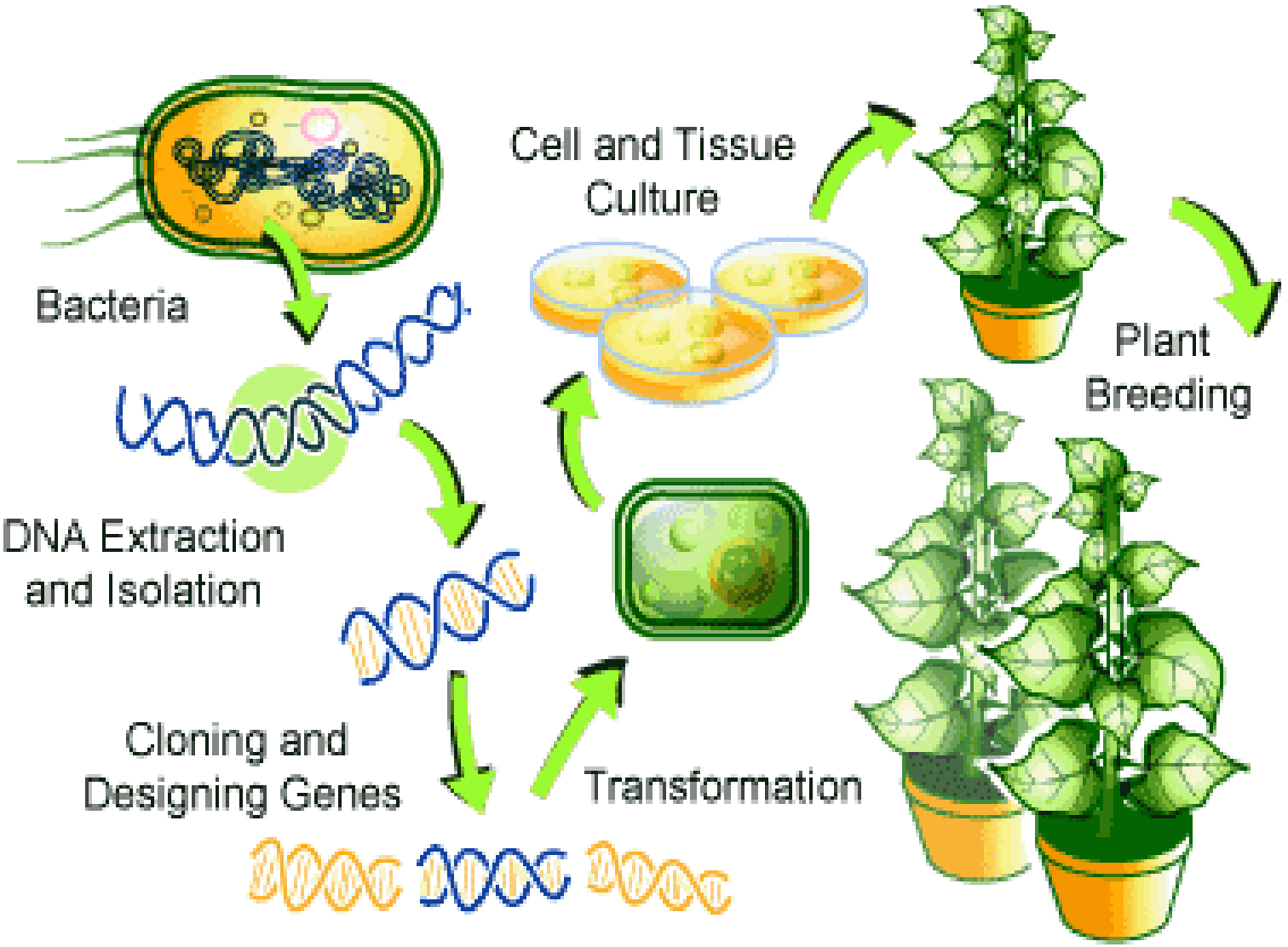
وعلى ذلك فإذا لحم جين من بكتريا أو أى نبات داخل قطعة الـ T-DNA فإنه عند إلتحام هذه القطعة داخل الكروموسِوم النباتى فإنه ينقل معه الجين الغريب وبالتالى يستطيع هذا الجين الغريب أن يشفر منتجا البروتين داخل الخلايا النباتية.

وتتلخص طرق نقل الجينات بهذه الطريقة فيما يلى :-

Genetic Engineering Using *Agrobacterium*



Copyright © 2004 Pearson Education, Inc., publishing as Benjamin Cummings



www.plantandsoil.unl.edu

The
End