Sohag University
Faculty of Agriculture
Department of Genetics

جامعة سوهـــــاج
كليــة الزراعـــــــــة
قسم الوراثـــــــة

المحاضرة الثامنة

الوراثة الحيوانية

المستوي الثاني برنامج الانتاج الحيواني والدواجن

اعداد

الأستاذالدكتور/ جلال الشربيني

استاذ الوراثة ورئيس قسم الوراثة – كلية الزراعة – جامعة سوهاج

تقنيات الهندسة الوراثية في الحيوان
Applied Genetic Engineering In Animal

تؤكد تنبؤات العلماء أن هذا العصر هو عصر النهضة الوراثية أو عصر الهندسة الوراثية Genetic engineering ومن يملك أسرار الهندسة الوراثية سوف يتحكم فى مصير العالم باعتباره الثورة العلمية التى تحدد مستقبل البشرية ولقد تمكن العديد من العلماء فى دول العالم المختلفة من الحصول على نتائج مبهرة تمثل الوجه المضئ لهذه التقنيات فى العديد من المجالات المختلفة اعتمادا على ماتحمله من آفاق مذهلة.

تعريف الهندسة الوراثية:

هى أحد التقنيات البيولوجية التى تسمى Gene technology والتى تهتم بنقل جينات محددة من كائن حى إلى الهيئة الكروموسومية لكائن آخر أو هى عملية قص جينات محددة من كائن حى ولصقها فى الهيئة الكروموسومية لكائن حى آخر مستخدما فى ذلك إنزيمات القطع Restriction enzymes وأنزيمات اللحمDNA ligases على الترتيب.

وتستخدم تقنيات الهندسة الوراثية فى حل المشكلات التى لا يمكن حلها بالطرق الوراثية التقليدية (التربية) مثل نقل الجينات بين الكائنات بعيدة الصلة أو القرابة والتى لا يمكن أن يتم التزاوج الطبيعى بينهما وإنتاج نسل خصب. وبناء على ذلك فإن الهندسة الوراثية لا تعتبر بدعه ولكنها تطور وتقدم طبيعى لعلم الوراثة بفروعه المختلفة.

تطور الهندسة الوراثية:

- يعتبر العالم السويسرى Miescher سنة ١٨٦٩أول من فصل الحامض النووى الـDNA من أنوية الخلايا.
- أثبت Avery ومعاونوه سنة ١٩٤٤ أن الحامض النووى الـDNA هو المادة الوراثية وليس البروتينات وذلك من خلال دراسة ظاهرة التحول الوراثى Genetic transformation فى بكتريا الالتهاب الرئوى التى تصيب الفئران.

- عزز Lederberg Zeinder سنة ١٩٥٢ إثبات أن الحامض النووى الـDNA هو الحامل للمادة الوراثية وذلك من خلال دراسة ظاهرة الاستقطاع الوراثى Genetic Transduction.
- استطاع Crick&Watson سنة ١٩٥٣ من تصميم نموذج للتركيب البنائى والكيماوى لجزئ الـ DNA.
- اكتشف Arber سنة ١٩٦٢ إنزيمات تقطع سلاسل الـ DNA فى أماكن محددة تسمى بالإنزيمات القاطعة Restriction endonucleases كما تمكن Gellert من فصل إنزيمات تقوم بربط قطع الـ DNA تسمى بالإنزيمات اللاحمة DNA ligases.
- تمكن Chang فى الفترة من ١٩٧١ حتى ١٩٧٣ من مضاعفة قطعة من الـ DNA من بكتريا Staphylococcus داخل خلايا *E.coli* بواسطة الإنزيمات القاطعة واللاحمة.

- فى العشرين سنة الأخيرة و حتى يومنا هذا تتطورت الهندسة الوراثية تتطور مذهل مع الانتهاء من التعرف على كل تتابعات القواعد النيتروجينية فيما يسمى بالـ DNA Sequencing فى الإنسان Human و بعض النباتات مثل الذرة الشامية Maize والعرابيدوبسس Arabidopsis والذى ساعد فى التعرف على وظائف معظم الجينات المختلفة وسلوكها داخل الكائن الحى.

إنزيمات القطع:Restriction Enzymes

توجد بعض إنزيمات القطع الداخلى Endonucleases وهى تلك الإنزيمات التى تقوم بقطع جزئ الـ DNA عند تتابعات محددة من أزواج القواعد داخل الجزئ والتى عملها يكون بعكس إنزيمات القطع الخارجى Exonucleases التى تقوم بقطع تتابعات طرفية فى نهايات جزئ الـDNA.

وتعتبر إنزيمات القطع الداخلى الأداة الرئيسية فى بحوث الـDNA المعاد صياغته Recombinant DNA، وقد جاءت تسمية هذه الإنزيمات فى الأصل بالإنزيمات المحددة Restriction Enzyme نتيجة لأن وجودها فى خلية بكترية معينة يحدد أو يمنع نمو البكتريوفاج به

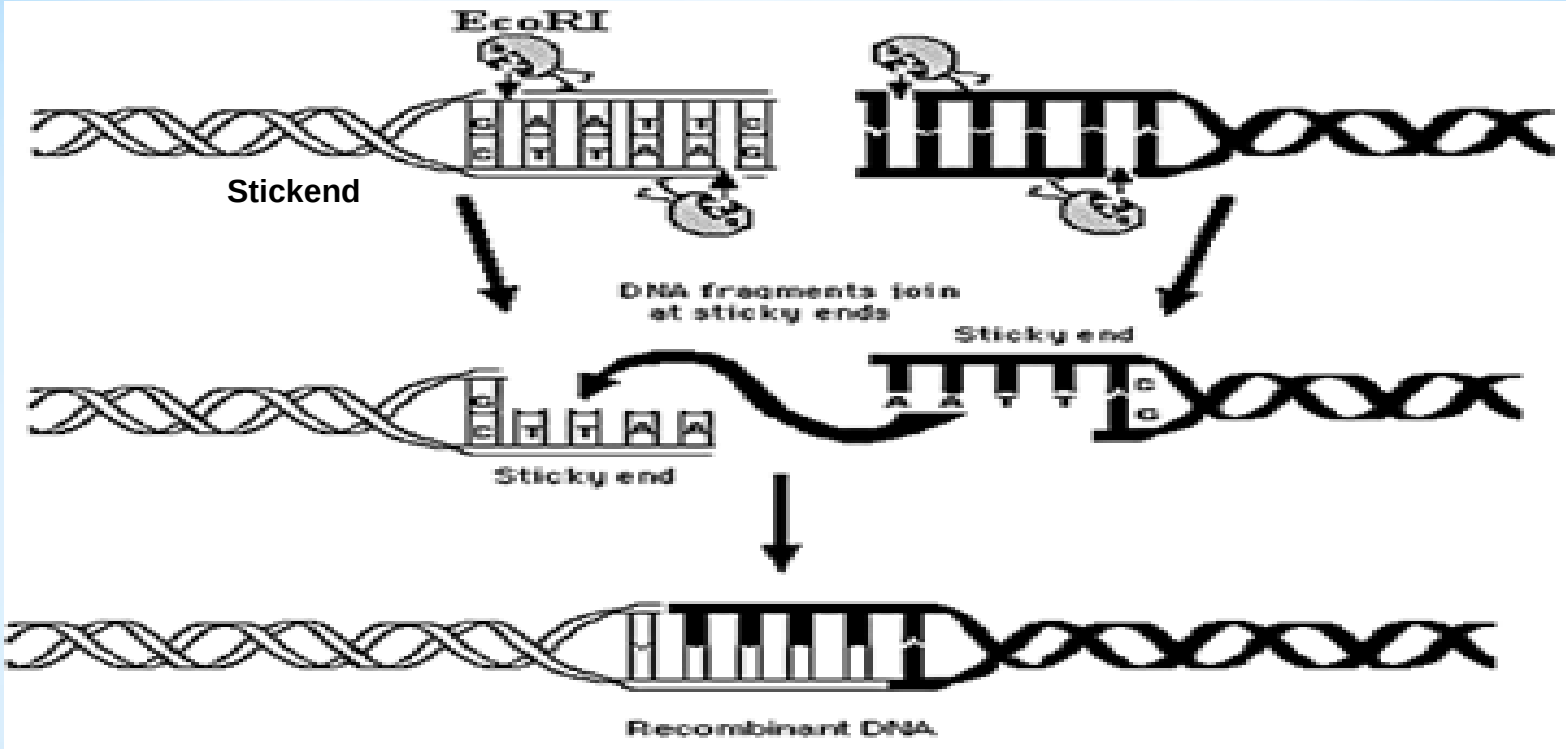
وتعتبر إنزيمات القطع الداخلى الأداة الرئيسية فى بحوث الـDNA المعاد صياغته Recombinant DNA، وقد جاءت تسمية هذه الإنزيمات فى الأصل بالإنزيمات المحددة Restriction Enzyme نتيجة لأن وجودها فى خلية بكترية معينة يحدد أو يمنع نمو البكتريوفاج بها. و تقوم إنزيمات القطع الداخلى بقطع الـDNA إلى قطع صغيرة فى تتابع نوعى متخصص محدد وعلى العكس من معظم التفاعلات الإنزيمية أو الكيميائية أو الفيزيائية التى تحدث قطعاً عشوائياً فى جزئ الـ DNA فأن هذه الإنزيمات المحددة والتى يزيد عددها على ٢٠٠ إنزيم تتعرف على تتابعات نوعية قصيرة مكونة من ٤-٦ أزواج من القواعد ويحدث كسر نوعى فيها.

ويوجد إلى جانب هذه الإنزيمات فى الخلية البكتيرية مجموعة مصاحبة من إنزيمات المثيلة DNA methylases التى تقوم بإضافة مجموعات ميثيل (CH_3) إلى جزئالـ DNAالبكتيرى حتى تحميه من أن يستخدم كمادة تفاعل فتقوم إنزيمات القطع المحددة لنفس البكتريا بتكسيره وهضمه ذاتياً. وعلى ذلك فإن إنزيمات ميثيلة الـ DNA النوعية الموقع تكون ملازمة دائماً لإنزيمات القطع المحددة فى البكتريا. و تسمى إنزيمات القطع حسب نوع البكتريا التى تستخلص منها هذه الإنزيمات كما فى الجدول التالى:

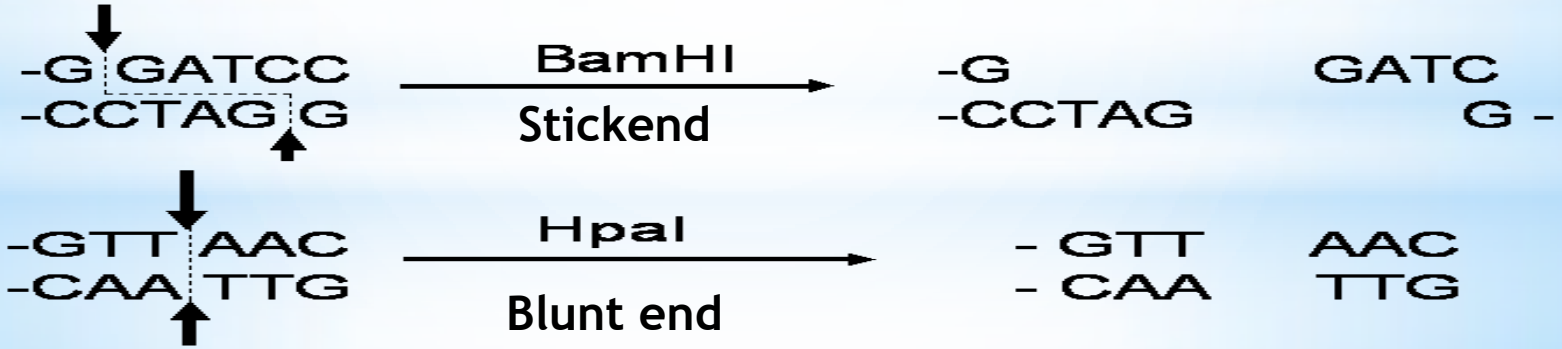
بعض إنزيمات القطع الداخلى والتتابعات النوعية التى تتعرف عليها:

ENZYME	BACTERIAL RESOURCE	SEQUENCES
BamHI	*Bucillus amyloliquefaciens H*	*G↓GATCC* *CCTAG↑G*
Bg1H	*Bacillus globigi*	A↓GATCT TCTAG↑A
Eco RII	*E. coli RY13*	G↓AATTC CTTAA↑G
Eco RIII	*E. coli R245*	↓CCTGG ↑GGACC
Hind III	Hoemophillus influenzae Rd	A↓AGCTT TTCGA↑A
Hha I	*Haemophillus haemolyticus*	GCG↓C C↑GCG
Hpa I	*Haemophilus parainfluenza*	GTT↓AAC CAA↑TTG
Mst II	Microcoleus strain	CC↓TNAGG GGANT↑CC

فمثلاً إنزيم Eco RI يستخلص من بكتريا القولون E. coli وهكذا. وتكون أول ثلاث حروف من اسم الإنزيم مشتقة من أول حرف من الجنس البكتيرى الذى يستخلص منه (E) والحرفين الأولين فى النوع البكتيرى (co) ، وقد يتبع ذلك اسم السلالة النوعية التى استخدمت فى الاستخلاص (R) ورقم لاتينى (I) يحدد أسبقية اكتشاف الإنزيم يتعرف كل إنزيم على تتابع نوعى من أزواج القواعد فى جزئ الـ DNA مكوناً من (٤ إلى ٧) من أزواج القواعد. ويحدث كسراً محدداً به وقد ينتج عن القطع نهايات مزدوجة السلسلة blunt ends كما فى حالة إنزيم *HpaI* أو نهايات متداخلة وحيدة السلسلة Sticky ends كما فى حالة إنزيم *EcoRI* و*BamHI* (شكل ١).


EcoRI
Stickend
DNA fragments join
at sticky ends
Sticky end
Sticky end
Recombinant DNA

(شكل ١)


-G GATCC
-CCTAG G
BamHI
Stickend
-G
-CCTAG
GATC
G -
-GTT AAC
-CAA TTG
HpaI
Blunt end
- GTT
- CAA
AAC
TTG

ويرجع ذلك إلى الميكانيكية التى يستخدمها الإنزيم . وتعد النهايات اللزجة ذات فائدة كبيرة فى تكوين جزئ DNA هجينى معاد صياغته. و يمكن فى حالة عدم الحصول على نهايات فردية لزجة staggered ends ، يمكن استخدام إنزيم Terminal transferase للحصول على ذيل فردى فى نهاية القطع المحددة وفى وجود عدد معين من نيوكلتيدات dATP على ذيل من عديد الأدينين Poly A tail (طوله حوالى ١٠٠ نيوكلتيدة) على النهاية (3`) على DNAالبلازميد بينما يمكن إضافة ذيل من عديد الثايمين Poly T بنفس الطول على نهاية DNA المرغوب إضافته إلى البلازميد ، ويتم بعد ذلك التقاء القطع عند الذيول المتكاملة بخاصية تزاوج القواعد base pairing ويتكون بينها روابط هيدروجينية وتستكمل عملية الالتحام بمساعدة إنزيمات الـ Ligase و Polymerase كما سبق الذكر ، وإذا افترضنا أن النيوكلتيدات تكون موزعة بتتابع عشوائى فى جزئ ما من الـDNA فإنه من الممكن حساب معدل تكرار القطع الذى يحدثه إنزيم معين فى طول معين من DNA، إذ أنه لكل موقع فى جزئ الـDNAيكون هناك ٤ أزواج من القواعد سيحدث قطع (فى المتوسط٩ مرة كل ٢٥٦ زوج من القواعد (4^4) . فى حين أن الإنزيم الذى يتعرف على ٦ أزواج من القواعد سيقوم بالقطع كل ٤٠٩٦ زوج نيوكلتيدى (4^6) .

ونتيجة لذلك فإن قطعة من الـ DNAستحتوى على مواقع خطية مختلفة ومميزة للإنزيمات المختلفة. وبالتالى يمكن رسم خرائط القطع المحددة Restriction maps ، وعند هضم الـ DNA بإنزيم قطع معين فإن نهايات جميع القطع الناتجة ستكون محتوية على نفس التتابع النيوكلتيدى، ويمكن عزل القطع الناتجة باستخدام تقنية التفريد الكهربى باستخدام جيل الأجاروز Agarose.

وتعد هذه الخطوة أساسية فى الـCloning DNA كما تعتبر أحد الاستخدامات الرئيسية لهذه الإنزيمات. و يمكن بالاستخدام الصحيح لهذه الإنزيمات واختيار الإنزيم المناسب للحصول على شظايا قصيرة نسبياً منالـ DNA تحتوى على جين معين ويمكن فصل هذه الشظية عن بقية الشظايا غير المرغوبة بطريقة التفريد الكهربى.

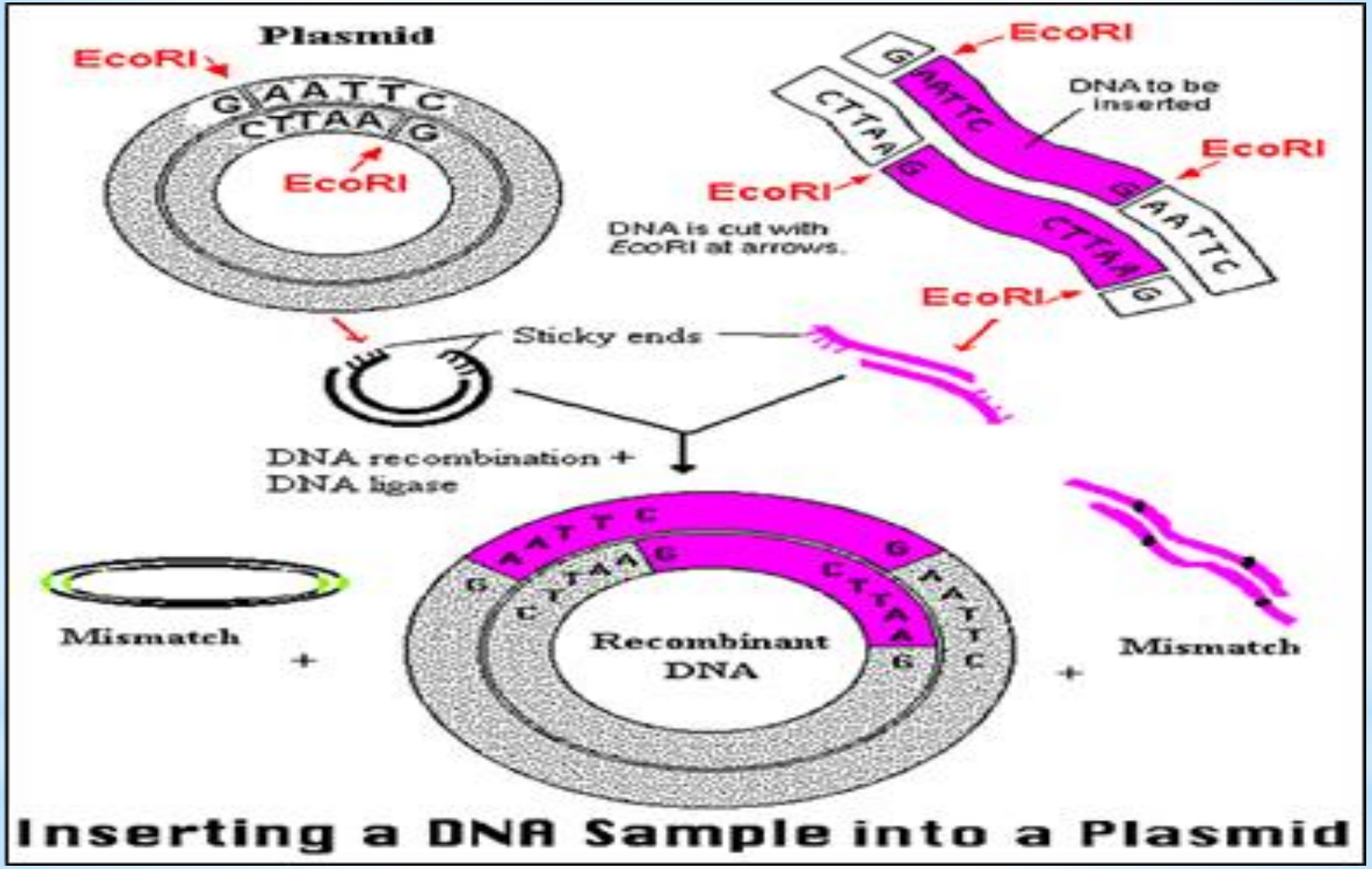
الاستنساخ Cloning

يمكن تعريف الاستنساخ بأنه الحصول على عدد كبير من الجزيئات أو الخلايا المتطابقة التى تنشأ من أصل واحد يمكن عن طريق الاستنساخ إنتاج أعداد كبيرة من جزيئاتالـDNA المتماثلة التى يمكن تعريفها وتمييزها أو استخدامها فى أغراض أخرى. تعتمد هذه التقنية على حقيقة أن جزيئات الـ DNA الهجينيى Chimerical DNA يمكن تكوينها فى ناقلات الـcloning vector ، التى تكون عادة إما بلازميد بكتيرى أو فاج أو كوزميد Cosmid أو حديثا تم أكشاف ما يسمى بالـ Bacterial Artificial (BAC) Chromosome. تستمر هذة الأدوات فى التناسخ فى خلية مضيفة host cell ولكن تحت تاثير نظم التحكم الخاصة بهم. وبهذه الطريقة يمكن الحصول على أعداد هائلة من نسخ الجين.

أنواع الناقلات Cloning Vectors

١- البلازميد Plasmid

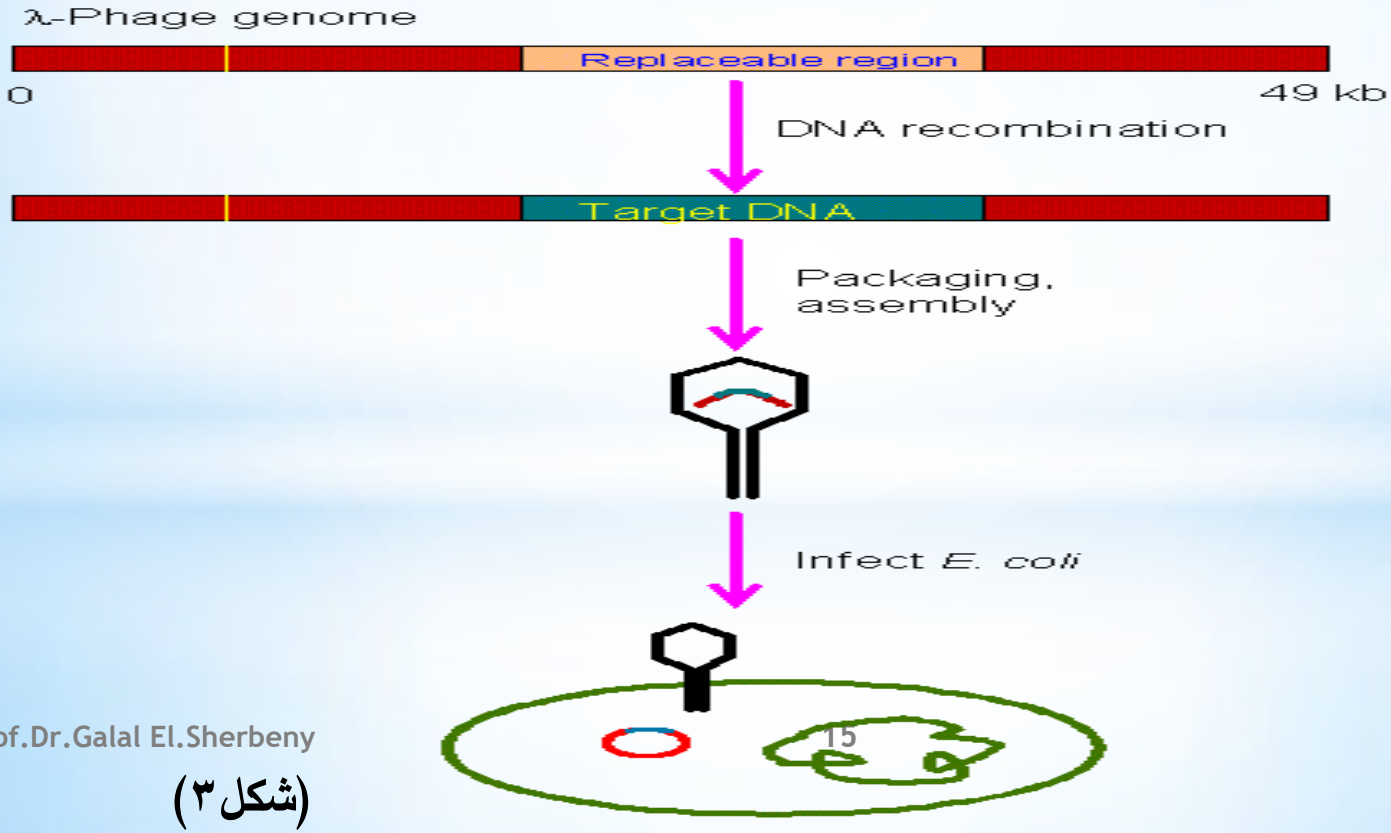
تكون البلازميدات البكتيرية عادة مكونة من جزئ صغير حلقى مزدوج من الـDNA (شكل ٢) والذى تكون وظيفته الطبيعية هى إكساب الخلية المضيفة لصفة المناعة ضد بعض المضادات الحيوية لانها تحتوى على جين للمقاومة. وللبلازميدات عدة خواص مفيدة جداً كناقلات النسخ إذ أنها توجد كنسخة وحيدة أو عدة نسخ فى البكتريا. وتتناسخ مستقلة عن DNAالبكتيرى كما أن تتابع القواعد فى جزىء DNA البلازميد معروف بالكامل مما يتيح معرفة المكان المضبوط لنشاط القطع الانزيمى والذى يتم فيه إدخال الـDNA المراد إضافته و يكون البلازميد أصغر بكثير من كروموسوم الخلية المضيفة مما يجعل من السهل عزله منها.


Plasmid
EcoRI
G AATTC
CTTAA G
EcoRI
EcoRI
DNA to be inserted
EcoRI
EcoRI
DNA is cut with EcoRI at arrows.
EcoRI
Sticky ends
DNA recombination +
DNA ligase
Mismatch
+
Recombinant DNA
+
Mismatch
Inserting a DNA Sample into a Plasmid

(شكل ٢)

٢- الفاج Phage

يتكون DNA الفاج (شكل٣) من جزئ خطى من الـ DNAالذى يمكن فيه ادخال القطع المرغوبة من DNAالجديد Recombinant DNA فى عدة مواقع للقطع الانزيمى المحدد. يجمع DNAالهجينى بعد أن يستكمل الفاج دورة التحليل للبكتيريا Lytic cycle وينتج وحدات فاج ناضجة معدية. والميزة للناقلات من نوع الفاج هى أنهيمكنه استيعاب شظايا DNA الأجنبى بطول يتراوح من ١٠-٢٠ كيلو قاعدة عكس البلازميد الذى يمكنة أستيعاب شظية من الـ DNA بطول حوالى ٦-١٠ كيلو قاعدة فقط.

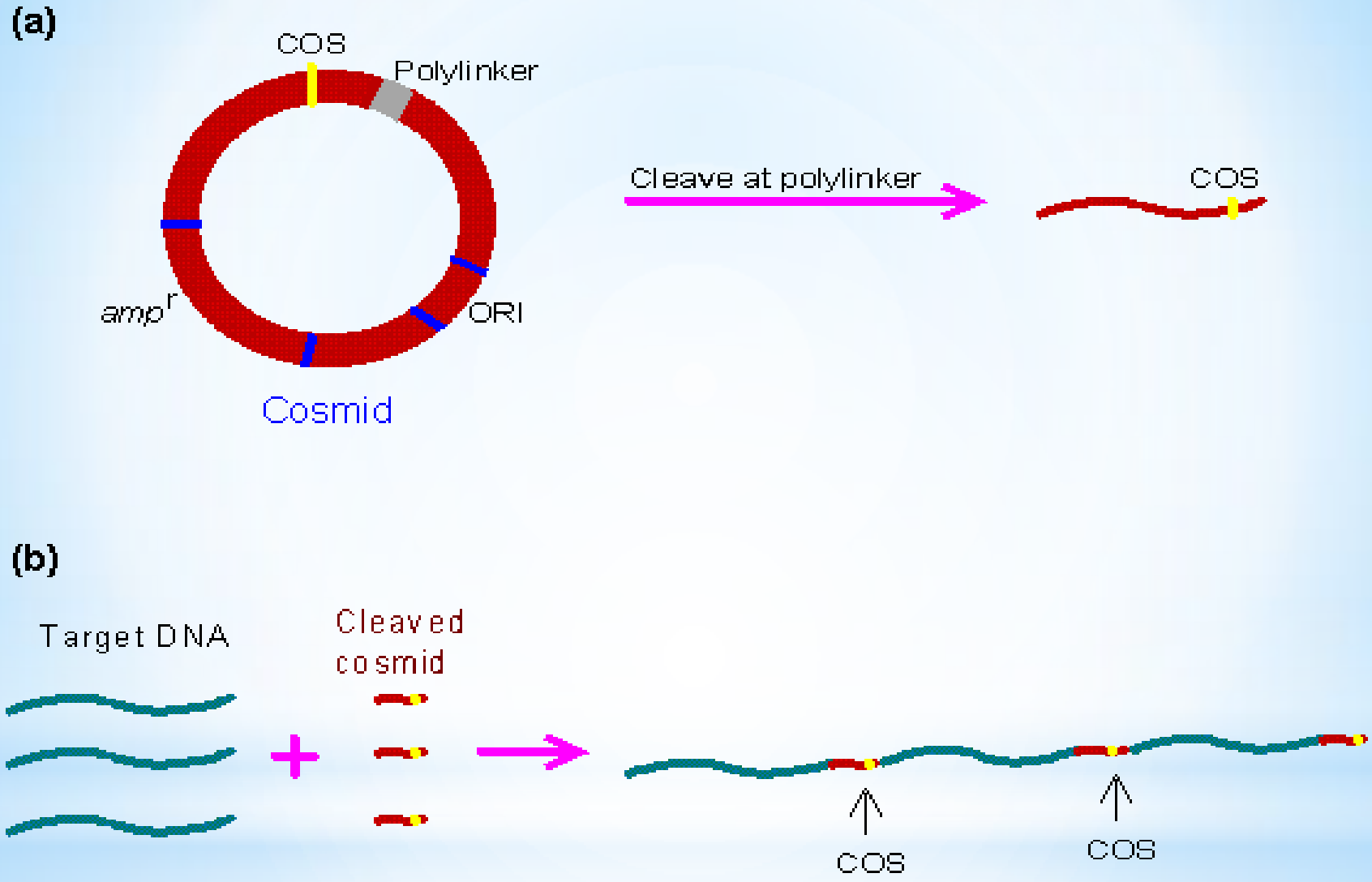


(شكل٣)

٣- الكوزميدCosmid

وهى مجموعة من الناقلات (شكل٤) يمكنها أن تستقبل شظايا أطول من DNA وهى تجمع بين أفضل مميزات البلازميد والفاج معا .

والكوزميد عبارة عن بلازميد يحتوى على تتابع من الـDNA المسمى مواقع Cos sitesالمطلوبة لتعبئة λ DNA lambda فى حبيبة الفاج . وتنمو هذه الناقلات فى صورة بلازميد فى البكتريا، ولكن حيث أن كثير من λ DNA قد يتم استبعاده فإنه يمكن إدخال قطع أكبر من Chimerical DNA فى رأس الحبيبة الفيروسية. حيث يمكن لة أن يستوعب قطع من DNAبطول ٣٥ إلى ٥٠ كيلو قاعدة


(a)
COS
Polylinker
amp^r
ORI
Cosmid
Cleave at polylinker
COS
(b)
Target DNA
Cleaved cosmid
COS
COS

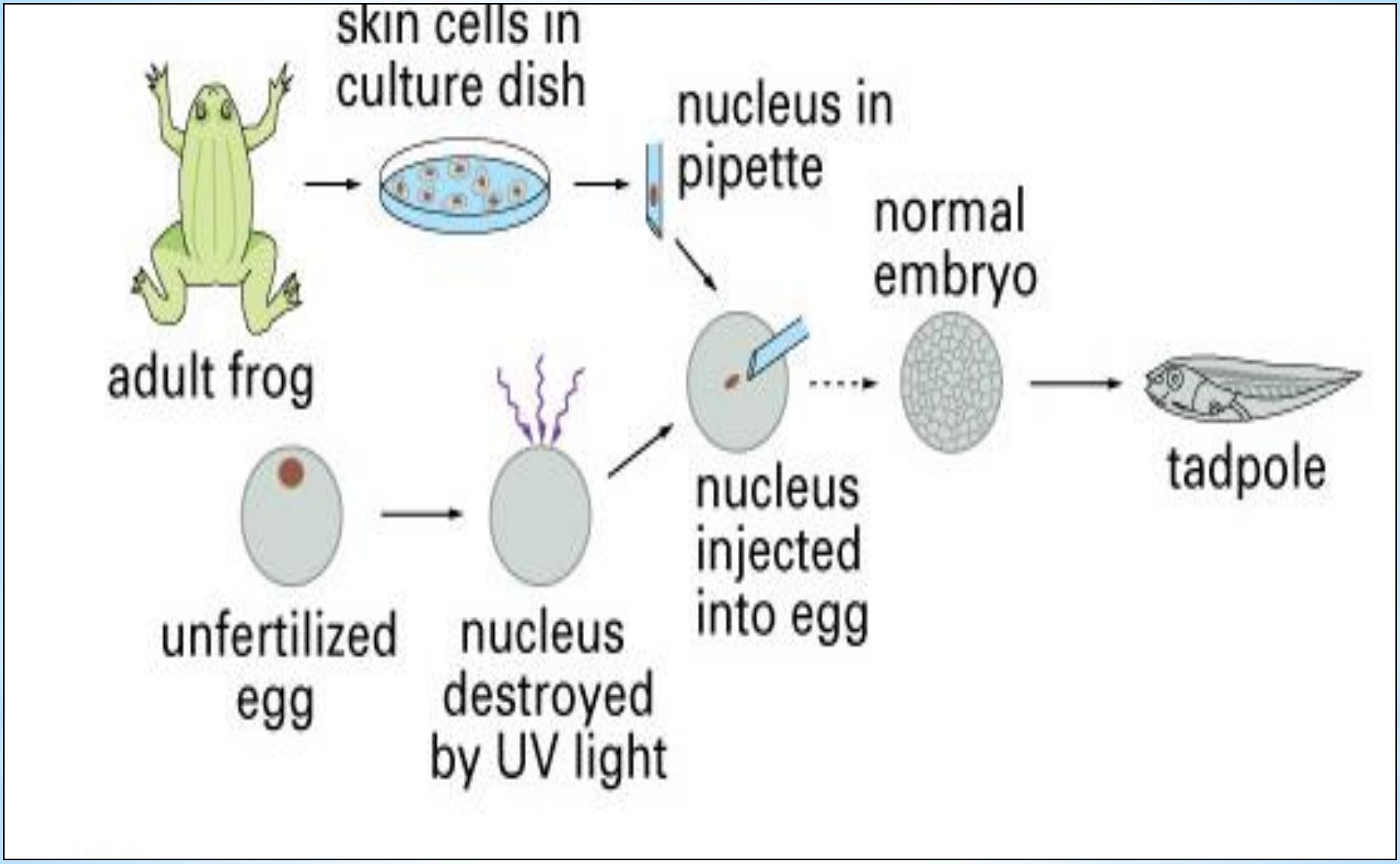
(شكل ٤)

الأستنساخ فى الحيوان Animal cloning

لقد أمكن الحصول على حيوانات متشابهة عن طريق الاستنساخCloningبواسطة العالم الاسكتلندى Ian Wilmut (المولود فى انجلترا) ومعاونوة سنة ١٩٩٦ وذلك عندما أعلنوا عن استنساخ النعجة الشهيرة دولى Doly من محتويات النعجة الأم. (جدول ١ يوضح بعض أنواع الحيوانات التى تم استنساخها cloned وشكل ٥ يوضح كيفية استنساخ الضفدع)

(جدول ١)

Species	First reported birth	Estimate number of live clones born
Sheep	1997	~ 500
Bovine	1998	~ 3000
Goat	1998	~ 500
Pig	2000	~ 600
Rabbit	2001	~ 30
Horse	2001	10
Deer	2003	10


skin cells in culture dish
nucleus in pipette
normal embryo
adult frog
tadpole
nucleus injected into egg
unfertilized egg
nucleus destroyed by UV light

شكل ٥

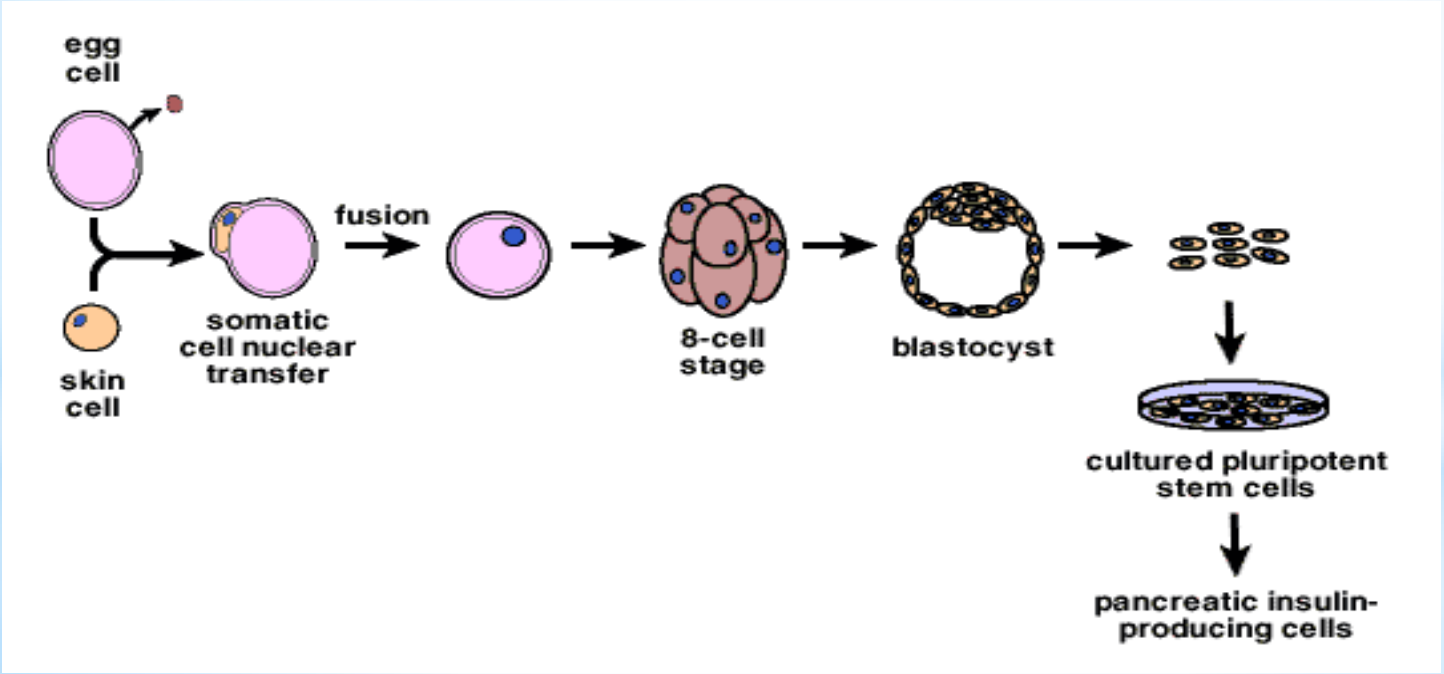
النعجة دولى هى أول حيوان ثديى يتم استنساخه بنجاح من خلية جسمية. والتى تم استنساخها فى مؤسسة أدنبره بأسكتلندا بالمملكة المتحدة. النعجة دولى ولدت عام ١٩٩٦ . وقد أصبحت دولى أشهر نعجة وأول حيوان ثديى يولد من استنساخ خلايا حيوان آخر وولدت فى الخامس من يوليو عام ١٩٩٦.دولى ولدت أربع مرات خلال حياتهاوقد كشف النقاب عن وجودها بعد تخليقها بأكثر من نصف سنة كاملة عام ١٩٩٧.

وكان الإعلان عن مولد النعجة دولى بعد سبعة أشهر من مولدها بداية لخلاف عالمى، رغم اعتباره أحد أهم الإنجازات العلمية الضخمة خلال عقد التسعينيات.

ولكن الإنجاز أثار أيضا جدالا يستمر حتى اليوم حول أخلاقيات الاستنساخ، خصوصا مع تطوير الأساليب وبدء تطبيقها على البشر.وقد ولدت دولى حملا عام ١٩٩٨ ثم تبعته بثلاثة عام ١٩٩٩. ولكن فى شهر يناير تدهورت حالتها الصحية بعد تشخيص إصابتها بمرض الروماتزم.وهذا المرض عادة ما يصيب النعاج المتقدمة في العمر ، وبعدها بدأ جدال آخر حول كيفية قياس العمر الحقيقى للنعجة، ومخاطر الإصابة بالشيخوخة المبكرة لدى الكائنات

وقال العالم Ian Wilmut الذى قاد فريق الاستنساخ، إن ثمة قصورا في أساليب الاستنساخ وتحتاج لمزيد من التطوير.

يقول الدكتور Patrick Dixon ، وهو كاتب فى أخلاقيات الاستنساخ البشرى، إن طبيعة نفوق النعجة دولى قد تكون لها ردود فعل كبيرة على إمكانية استنساخ طفل آدمى.وقال إن الموضوع الرئيسى هو سبب موت دولى، وهل الأمر متعلق بالشيخوخة المبكرة، فهى لم تكن متقدمة فى العمر، بمقاييس النعاج، ليضطر الأطباء إلى إنهاء حياتها.



(شكل ٦)

خطوات الحصول على النعجة دولى:

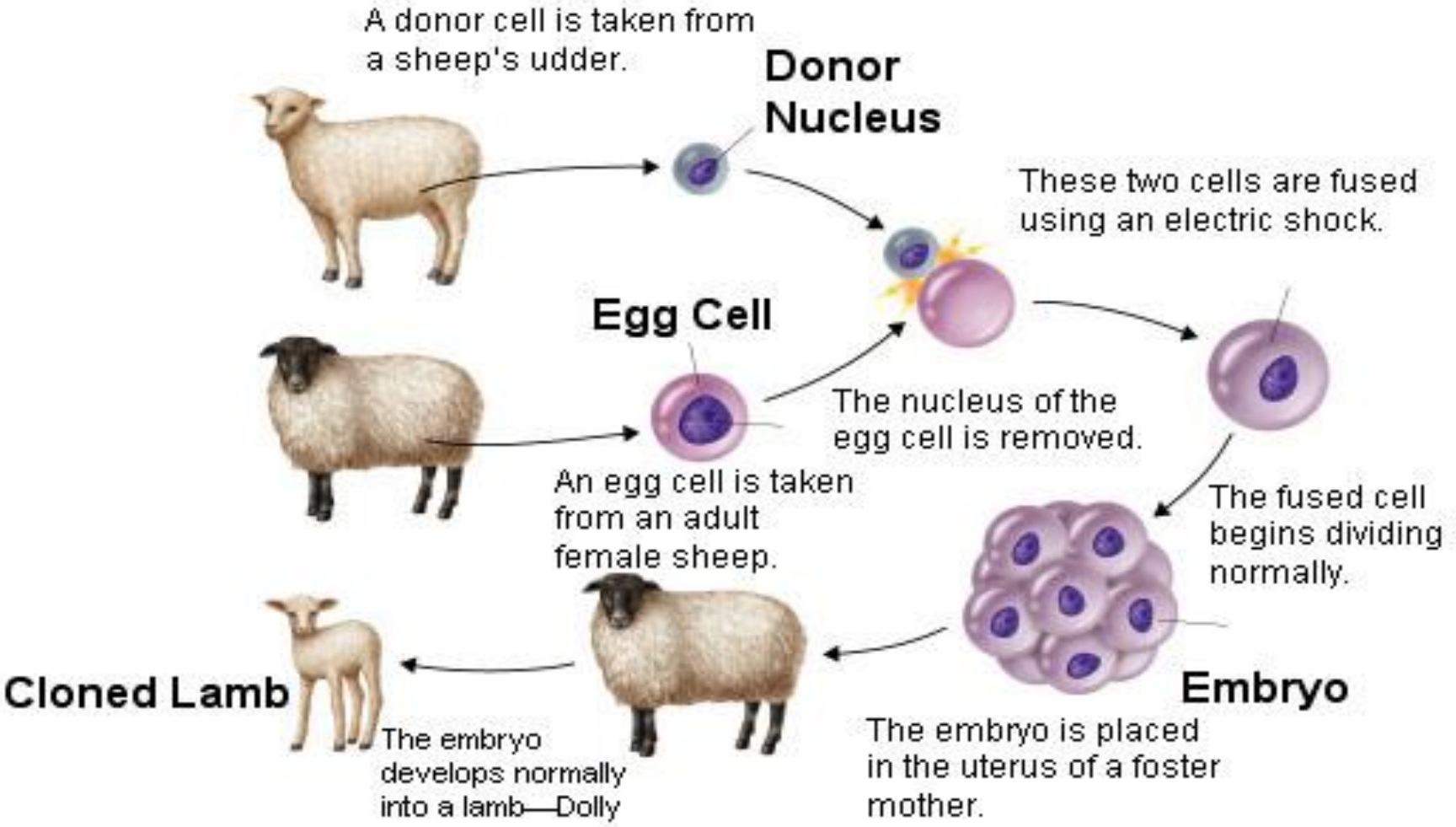
١- تم الحصول على نواة نشطة لديهاالقدرة على الانقسام من أحد الخلايا النشطة من خلايا ضرع النعجة دوللى.

٢- تم تنشيط جميع الجينات الموجودة فى خلية الضرع المتخصصة.

٣- تمت أزالة نواة بيضة غير مخصبة Oocyte من الكائن المستقبل.

٣- تم إدخال النواة المأخوذة من النعجة دوللى داخل البويضة المستقبلة بواسطة ماصة دقيقة جدا وعن طريق صدمة كهربائية تم دمج النواة داخل السيتوبلازم.

٤- ثم أدخلت البويضة داخل رحم الأم المستقبلة ليتكون جنين النعجة وكان النسل الناتج مشابة للام تماما (النعجة دوللى) (شكل ٧).



by Chris Wong, Tylor Tidwell, Christopher Bronner

(شكل ٧)