

الفصل الثالث:

الهندسة الوراثية : مبادئها وتقنياتها

تمهيد : تمكن علماء الوراثة منذ السبعينات من نقل وتوظيف مورثات متنوعة ضمن خلايا أخرى أجنبية، الشيء الذي يعطي خلايا هجينة لم تكن موجودة من قبل في الطبيعة. بعد ذلك تم الانتقال من التجارب المخبرية إلى المجال الصناعي، حيث تأسست صناعة حقيقية تعتمد على التغيير الوراثي للخلايا الحية بواسطة نقل المورثات. تسمى التقنيات المعتمدة في هذا التغيير الوراثي: الهندسة الوراثية.

أ - مفهوم التغيير الوراثي ؟

① الانتقال الطبيعي لمورثات البكتيريا At إلى نبات:

أ - معطيات تجريبية : أنظر نشاط 1، لوحة 1.

اللوحة 1



الوثيقة 1

① نشاط 1: مفهوم التغيير الوراثي:

دراسة حالة: مرض جرب السنخ La galle du collet ، عبارة عن ورم سرطاني ضخم يظهر عند بعض النباتات على مستوى السنخ، وهي منطقة التقاء الساق والجذر (الوثيقة 1) ، ونظرا لأثره الحاسم على الاقتصاد فقد كان موضوع عدة أبحاث وتجارب.

← التجربة الأولى : (E . Smith et C . Townsend en 1907)
عزل الباحثان من ورم سرطاني في جذر نبات بكتيريا تدعى *At = Agrobacterium tumefaciens* (الوثيقة 2). وبعد ذلك تم زرع هذه البكتيريا في فتحة حديثة (أقل من يومين) أنجرت على نبات سليم، فلاحظ ظهور الورم السرطاني في النبتة.
(1) ماذا يمكنك استنتاجه من هذه التجربة؟

← التجربة الثانية: (A. Braun 1972) .
لقد استطاع هذا الباحث أن يزرع نسيج جرب السنخ لا يحتوي على بكتيريا في وسط معين بدقة، يتكون فقط من السكرز وأملاح معدنية. فلاحظ أن خلايا النسيج تتكاثر بصورة فوضوية عكس الخلايا العادية التي تتكاثر ببطء مطلوبة وجود الهرمونات النباتية.

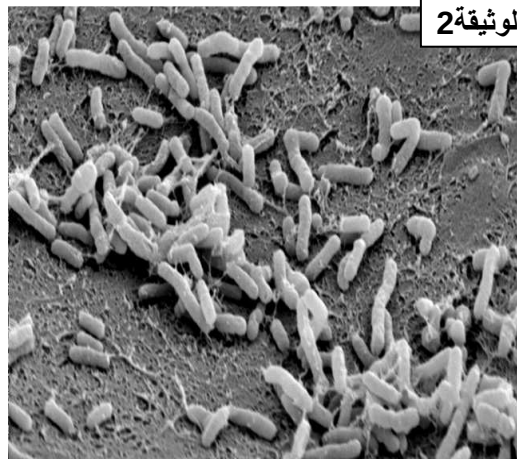
(2) ما التغيير الذي حدث لخلايا السنخ بوجود البكتيريا

A. Tumefaciens ؟

(3) ما الفرضية التي يمكنك إعطاؤها حول التغيير الذي أصاب سلوك الخلايا النباتية؟

اكتشفت مجموعة من الباحثين وجود نمطين من بكتيريا *Agrobacterium tumefaciens* : A و B . وهذان النمطان يسببان المرض (يؤديان إلى تكون ورم) . حيث يؤدي النمط A إلى تكون ورم تركيب خلاياه النوبالين Nopaline بينما يؤدي النمط B إلى تكون ورم تركيب خلاياه الأكتوبين Octopine (النوبالين و الأكتوبين عبارة عن مشتقات من مستقلبات مشتركة تتكون في معظمها من أحماض أمينية وأحماض سيتونية مختلفة أو سكريات) .

(4) ما مكمّل الفرضية الذي يمكنك إعطاؤه حول التغيير الذي أصاب سلوك هذه الخلايا؟



الوثيقة 2

ب - تحليل المعطيات التجريبية :

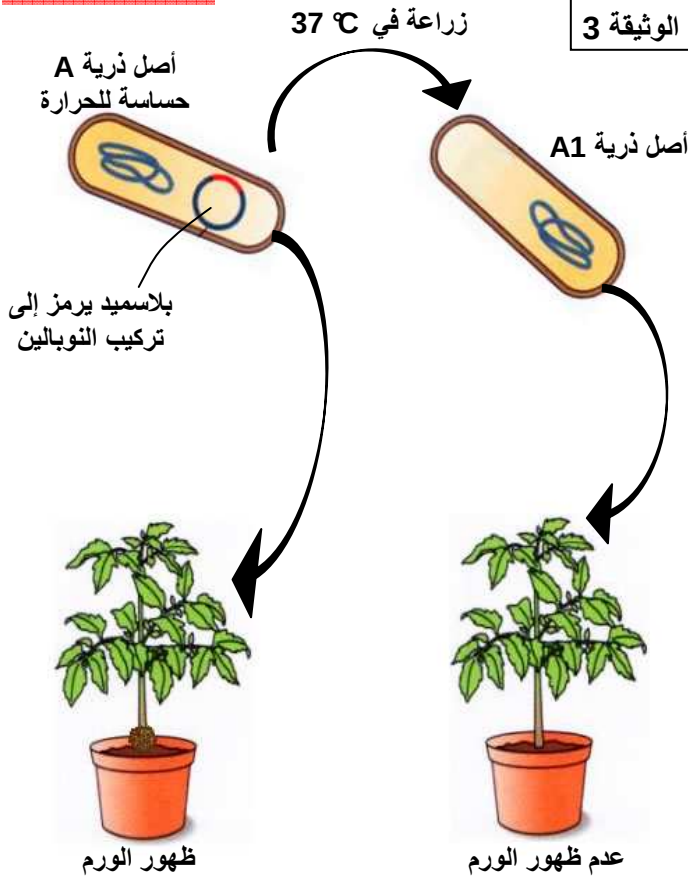
(1) نستنتج من هذه التجربة أن البكتيريا *At* هي المسؤولة عن ظهور الورم السرطاني عند النباتات السليمة.

(2) التغيرات التي تطرأ على خلايا السنخ بواسطة البكتيريا *At* هي التكاثر العشوائي والسريع غير المنتظم لخلايا النبتة دونما حاجة إلى الهرمونات النباتية المسؤولة أصلاً عن نمو خلايا السنخ.

(3) الفرضية: نقلت البكتيريا *At* إلى الخلايا النباتية مادة ما أدت إلى تغيير على مستوى الخبر الوراثي وبالتالي اكتساب الخلايا النباتية صفة التكاثر العشوائي.

(4) ربما أن التغير في جينوم الخلايا النباتية ناتج عن إدخال مورثات بكتيرية إلى الخلايا النباتية، هذه المورثات هي التي تتحكم في تركيب النوبالين والأكتوبين.

اللوحة 1



التجربة الثالثة:

تمكن باحثون من عزل البكتيريا *Agrobacterium tumefaciens* ، وبعد دراسة مكوناتها وجدوا ADN حلقية تدعى البلاسميد *Ti* . نزرع في درجة حرارة $37^{\circ}C$ أصل ذرية لـ *Agrobacterium tumefaciens* من النمط A حساسة للحرارة، فنحصل على أصل ذرية A1. تبين الوثيقة 3 بقية التجربة .

(5) فسر النتائج المحصل عليها.

التجربة الرابعة:

لتوضيح دور البلاسميد (حلقة صغيرة من ADN تحمل مورثات إضافية) ننجز التجربة التالية: ندخل في نبات سليم بكتيريات A1 لا تسبب المرض ومقاومة للمضادات الحيوية، وبكتيريات B مسببة للمرض وحساسة للمضادات الحيوية فيتكون ورم (أنظر الوثيقة 4، لوحة 2) .

(6) ما التفسير الذي تقترحه بالنسبة لنتيجة هذه التجربة؟ نسحق الورم ونبسطة فوق وسط زرع يحتوي على مضادات حيوية: نتائج التجربة ممثلة في الجزء الأسفل من الوثيقة 4، لوحة 2.

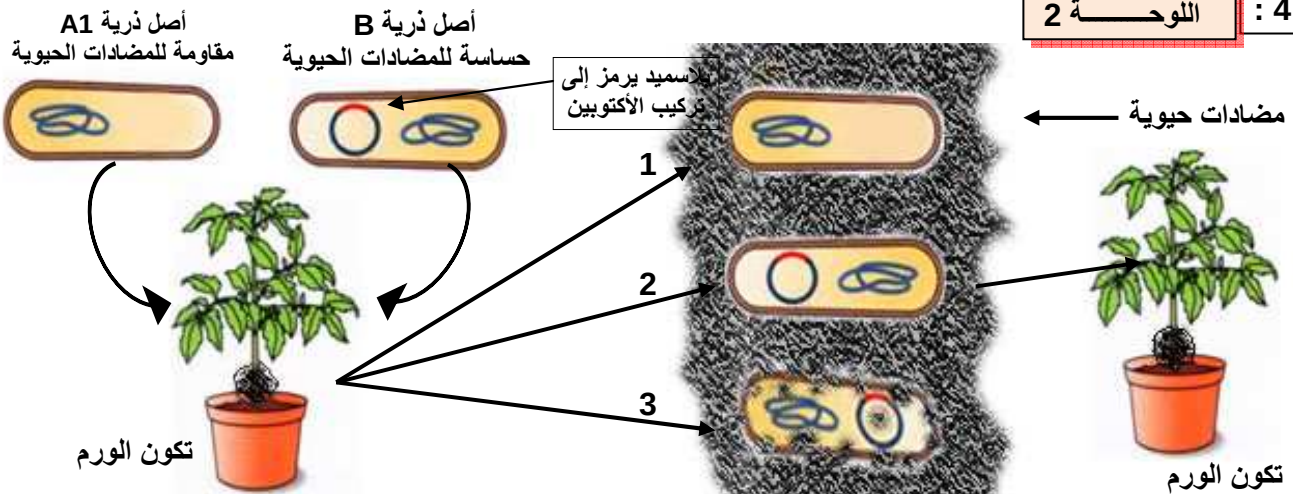
(7) تعرف على البكتيريات 1 و 2 و 3 المحصل عليها.

(8) هل يمكنك تحديد دور البلاسميد؟

(9) انطلاقاً من نتائج التجارب السابقة وبعتمادك على الوثيقة 5 لوحة 2 ، اشرح كيفية تكون الورم في مستوى السنخ عند النبات.

اللوحة 2

الوثيقة 4 :

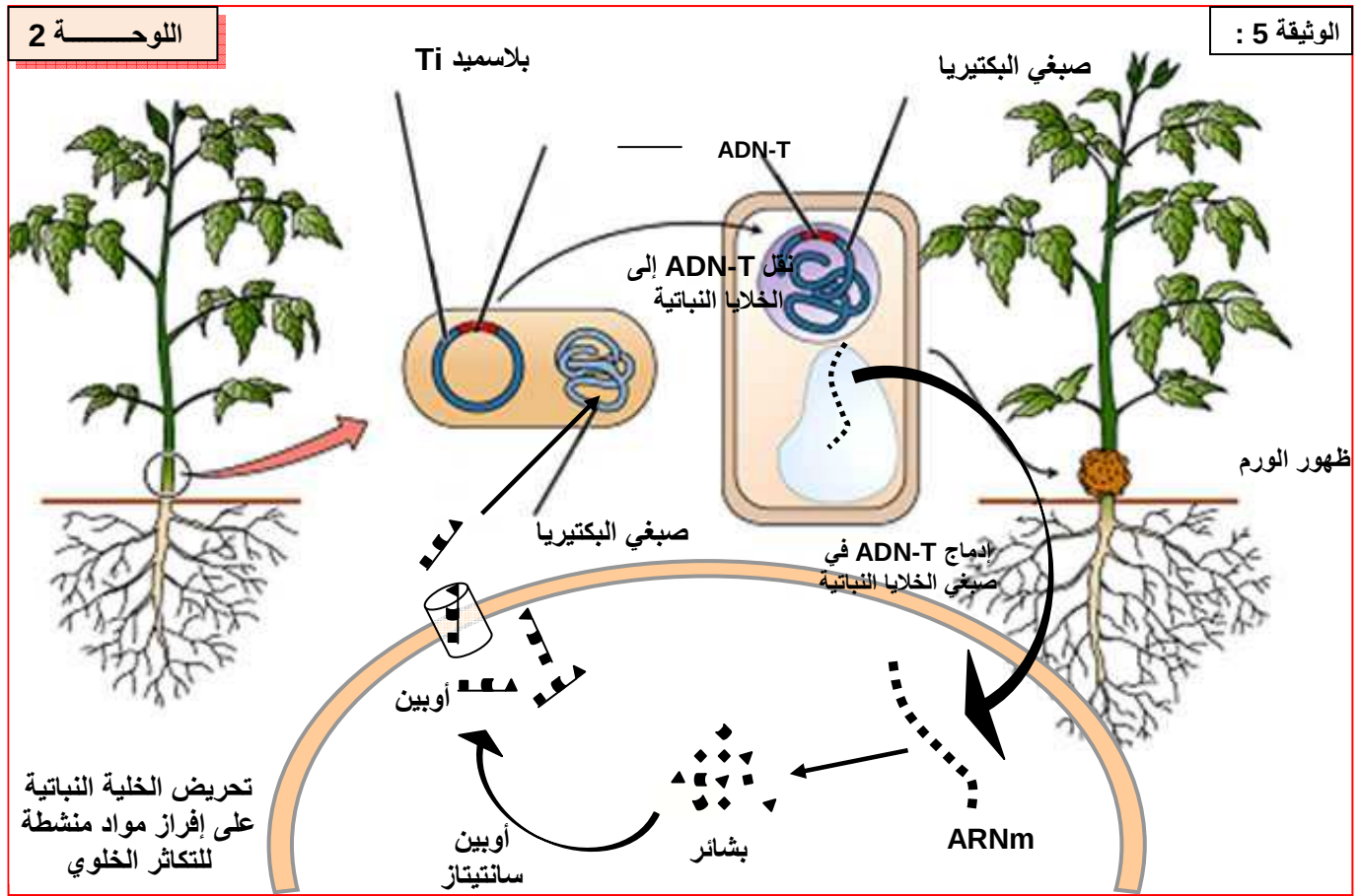


(5) نلاحظ أنه تحت تأثير الحرارة، يتم تفكيك البلاسميد المسؤول عن تركيب النوبالين، وينتج عن هذا التفكك عدم إصابة النبتة بالورم، فالبلاسميد اذن هو المسؤول عن القدرة الممرضة للبكتيريا.

(6) إن البكتيريا A1 فقدت قدرتها الممرضة لغياب البلاسميد. لذا يمكن تصور أن البكتيريا B المتوفرة على البلاسميد المسؤول عن تركيب الأكتوبين هي التي تؤدي إلى ظهور الورم عند النبتة.

(7) البكتيريا 1 غير ممرضة ومقاومة للمضادات الحيوية، ادن هي البكتيريا A1. البكتيريا 2 تحتوي على بلاسميد ومقاومة للمضادات، ادن هي نمط هجين يحمل صفات A1 و B. البكتيريا 3 هي حساسة للمضادات الحيوية، ادن هي بكتيريا B.

(8) لقد ظهرت بكتيريا جديدة تشبه A1 وتملك بلاسميد البكتيريا B، وتحدث المرض، نستنتج من هذا أن البلاسميد يستطيع الانتقال من خلية بكتيرية إلى أخرى محدثا تغيرا في الصفات، ومن هذا فان البلاسميد مسؤول عن تغيير الخبر الوراثي.

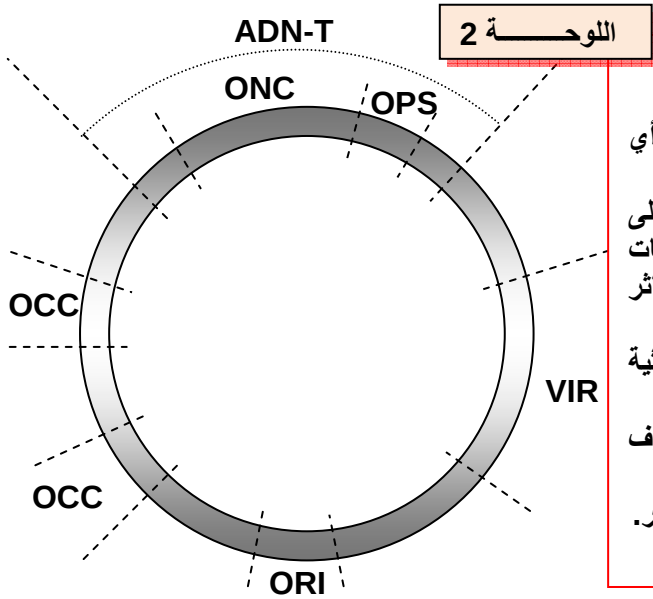


(9) يظهر جرب السنخ على مراحل هي:

- المرحلة الأولى: تنفذ البكتيريا في جرح يكون قريبا من سنخ النبات، فتقوم بحقن بلاسميدها Ti في الخلية النباتية. هذا البلاسميد يحتوي على قطعة من ADN تدعى ADN-T.
- المرحلة الثانية: تدمج المراتب ADN-T ضمن ADN الخلية النباتية العائلة، لتدخل تلك القطعة ضمن ذخيرتها الوراثية.
- المرحلة الثالثة: تستنسخ ARNm من مورثات ADN-T، وتترجم إلى بروتين في سيتوب لازم الخلية النباتية. هذا البروتين هو أنزيم يحفز تفاعل تركيب الأوبين من طرف الخلية.
- المرحلة الرابعة: يؤدي الأوبين المركب إلى تكاثر الخلايا النباتية بايقاع مرتفع، مما ينتج عنه ورم. كما أن الأوبين المفرز خارج الخلية يؤدي إلى تكاثر البكتيريا At.

② خلاصة:

إن جرب السنج ناتج عن تغير وراثي لخلايا النبتة. هاته الصفة أصبحت وراثية، ويعتبر بلاسميد البكتيريا عامل نقل المورثة من البكتيريا إلى الخلية النباتية. ولقد مكنت دراسة هذه الظاهرة من وضع الخريطة الوراثية للبلاسميد Ti عند البكتيريا At. أنظر الوثيقة 6 لوحة 2.



اللوحة 2

الخريطة الوراثية للبلاسميد Ti عند البكتيريا At

- يرمز لهذا البلاسميد بـ Ti ، نسبة لـ Tumor inducing أي محرض للورم.
- **ADN-T = Transferred ADN** الجزء الذي ينتقل إلى الخلايا النباتية ويندمج مع ذخيرتها الوراثية. ويرمز للمورثات المسؤولة عن تركيب الأوبينات (OPS)، والمسؤولة عن التكاثر العشوائي (ONC)
- الوظيفة VIR مسؤولة عن إدماج ADN-T في المادة الوراثية للخلية النباتية.
- الوظيفة OCC مسؤولة عن هدم الأوبينات المحررة من طرف النبتة.
- الوظيفة ORI مسؤولة عن النسخ الذي يمكن البلاسميد من التكاثر.

II - آليات الهندسة الوراثية.

① الوسائل المستعملة في الهندسة الوراثية:

أ - بكتيريا *Escherichia coli*: أنظر الوثيقة 1، لوحة 3.

اللوحة 3

☆ الوثيقة 1: أهمية اختيار بكتيريا *Escherichia coli* في الهندسة الوراثية.

تعتبر العصية الكولونية *La Colibacille E.coli* ، الكائن المفضل عند العلماء المهتمين بميدان الهندسة الوراثية وذلك لعدة اعتبارات، أهمها القدرة الكبيرة لهذا الكائن على التكاثر (تنقسم كل 20 دقيقة)، و كذلك لتوفره بالإضافة للصبغي الأساسي على عدة بلاسميدات يمكن استغلالها كناقلات للمورثات، كما أن سيتوبلازم هذه البكتيريا غني بالجسيمات الريبية والعناصر الضرورية لتركيب البروتينات.

ب - أنزيمات الفصل وأنزيمات الربط : أنظر الوثيقة 2، لوحة 3.

a - أنزيمات الفصل les enzymes de restriction

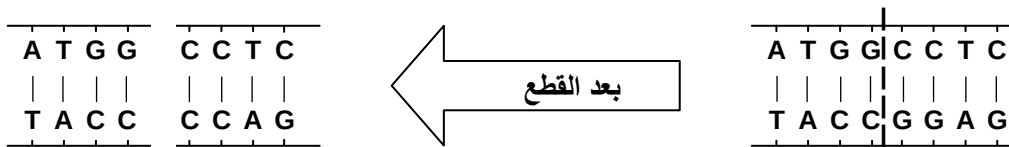
إنها أنزيمات نوعية قادرة على التعرف في مستوى جزيئة ADN على تسلسلات دقيقة من القواعد الازوتية، وقطع الجزيئة على مستواها. ويحمل كل أنزيم فصل اسم النوع البكتيري الذي استخلص منه.

b - أنزيمات الربط Les ligases

هي أنزيمات نوعية قادرة على ربط أجزاء ADN مقطوعة، وذلك بربط الأطراف الموحدة مع بعضها حسب مبدأ تكاملية القواعد الازوتية.

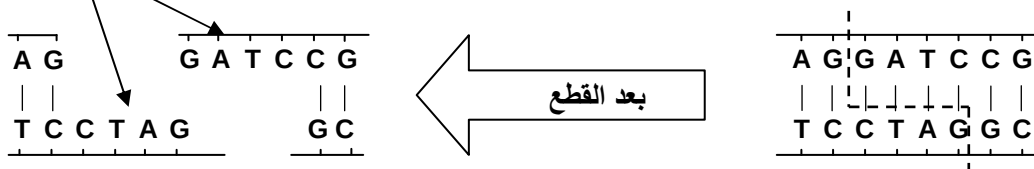
اللوحة 3

* أنزيم HaeIII : تعرف المتتالية GGCC وتقطع بين G و C



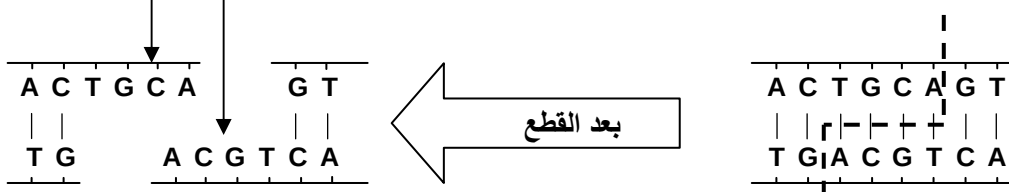
أطراف موحدة

* أنزيم BamH1 : تعرف المتتالية GGATCC وتقطع بين G و G



أطراف موحدة

* أنزيم Pst1: تعرف المتتالية CTGCAG وتقطع بين G و A



ج - الناسخ العكسي : أنظر الوثيقة 3، لوحة 3.

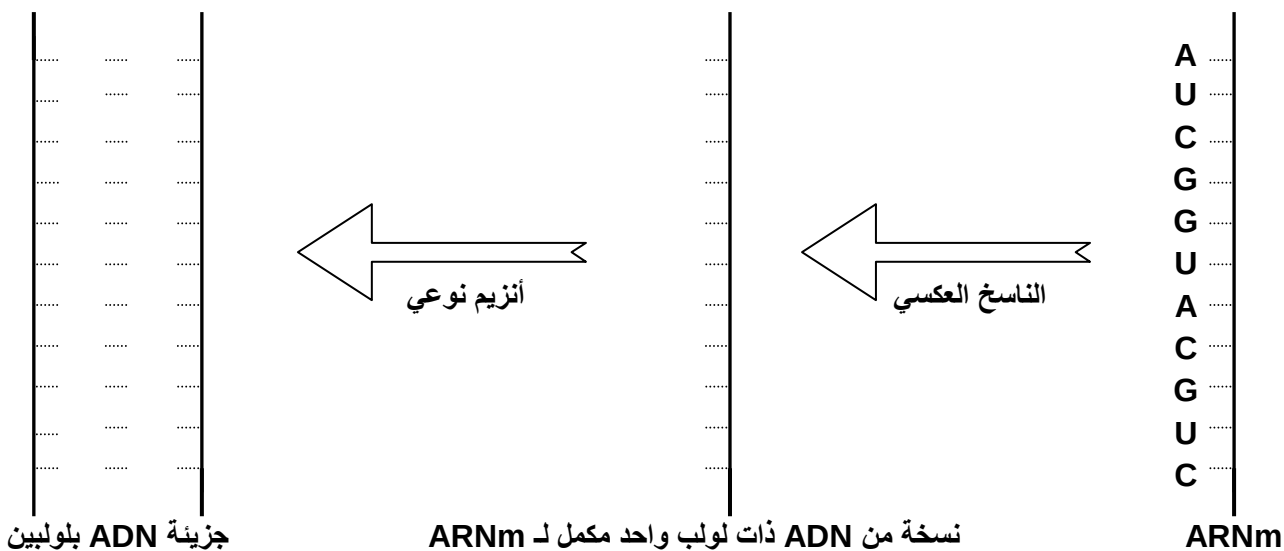
هو أنزيم يستطيع تركيب جزيئة ADN انطلاقا من جزيئة ARNm.

اللوحة 3

★ الوثيقة 3: النسخ العكسي Transcriptase inverse.

الناسخ العكسي هو أنزيم يعمل على تركيب جزيئة ADN انطلاقا من جزيئة ARNm، وهكذا يمكن تركيب المورثة التي ترمز لبروتين معين انطلاقا من ARNm الذي يرمز له.

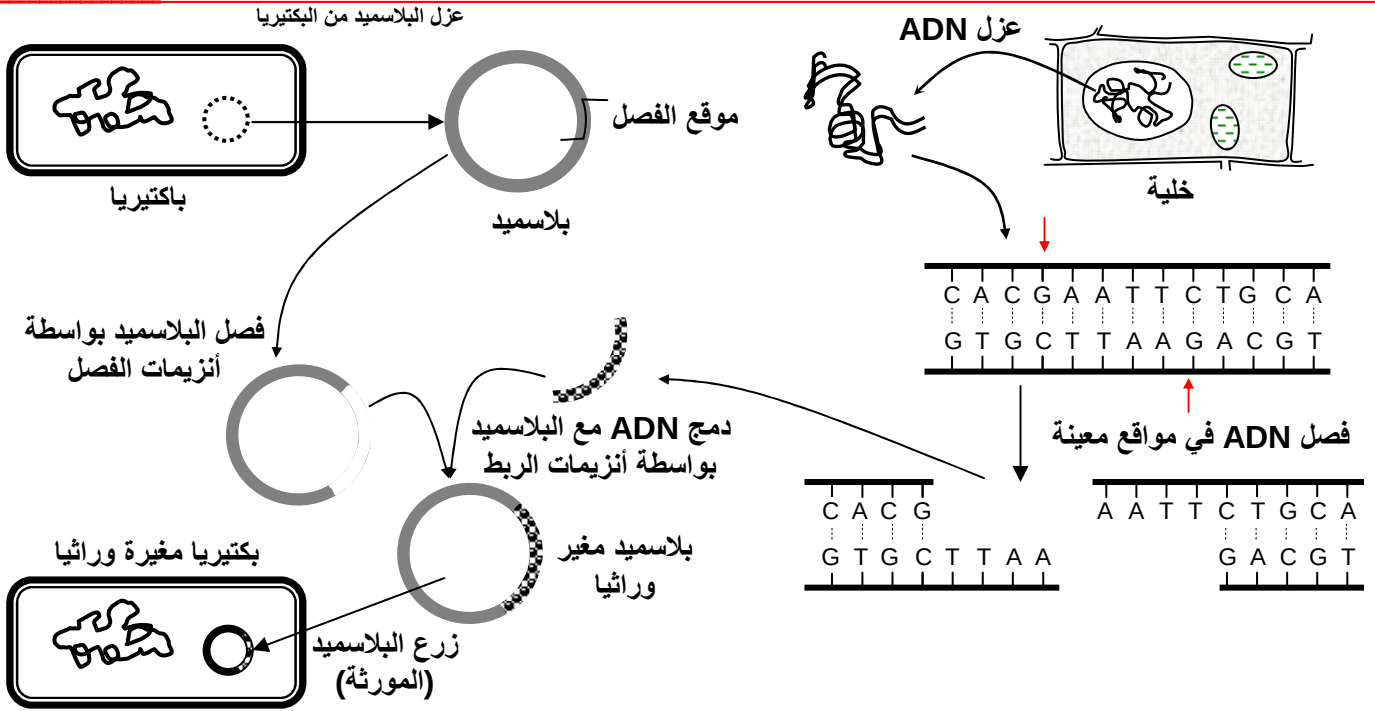
انطلاقا من جزيئة ARNm التالية، حدد خبيط ADN المفرد الناتج عن النسخ العكسي، ثم حدد جزيئة ADN المزدوجة والتي تمثل المورثة المرغوبة.



② مراحل نقل مورثة إلى بكتيريا : أنظر الوثيقة 1، لوحة 4.

اللوحة 4

الوثيقة 1: نقل المورثة من خلية إلى بكتيريا



يتطلب نقل مورثة إلى بكتيريا معينة المرور من المراحل التالية:

أ - عزل المورثة (جزء من ADN)

بعد تحديد الصفة المرغوبة، يتم عزل المورثة التي ترمز لها، وذلك بطريقتين:

- عزل ADN الخلية التي تحتوي على المورثة المراد نقلها، ثم يتم تقطيع جزيئة ADN بواسطة أنزيمات الفصل.
- استخلاص ARNm من الخلية التي تحتوي على المورثة المراد نقلها، وبواسطة الناسخ العكسي يتم تركيب ADNc الذي يكون حاملا للمورثة المرغوبة، ثم تضاف لـ ADNc أطراف موحدة.

ب - إدماج المورثة داخل متعضي ناقل.

نستخرج من خلية E.coli ناقل معزول (= بلاسميد). يتم قطع البلاسميد بواسطة أنزيم الفصل. ثم يتم ربط ADN البلاسميد بالجزء من ADN المراد نقله بواسطة أنزيم الربط. فنحصل بذلك على بلاسميد مغير يتم إدخاله داخل متعضي ناقل (خلية E.coli).

ج - نقل وتلميم المورثة.

داخل علبة بيتري، يتم زرع البكتيريا المحتوية على ADN المغير، فتتكون لمات، يتم نقل هذه اللامات إلى علبة جديدة، فنحصل بذلك على عدة لمات بعضها يحتوي على البكتيريا المغيرة وراثيا.

د - رصد البكتيريات المغيرة وراثيا.

قبل زرع الخلايا لابد من التأكد من كونها تحتوي فعلا على البلاسميد المغير، نستغل لهذا الغرض خصائص البلاسميد، كخاصية المقاومة للمضادات الحيوية.

اللوحة 4

مورثة مقاومة للمضاد الحيوي A

مورثة مقاومة للمضاد الحيوي B

ADN مستنسخ

إنتاج بلاسميد مغير وراثيا

يتضمن البلاسميد المنقول مورثتين مقاومتين لمضادين حيويين A و B

تدمير المورثة المقاومة للمضاد الحيوي A

بعض البكتيريا فقط تدمج البلاسميد المغير وراثيا

تمثل كل بقعة على عتبة بيترى، لمة بكتيرية، وتمثل البقعة المحاطة اللمة الحاملة للبلاسميدات المغيرة.

بدون مضاد حيوي

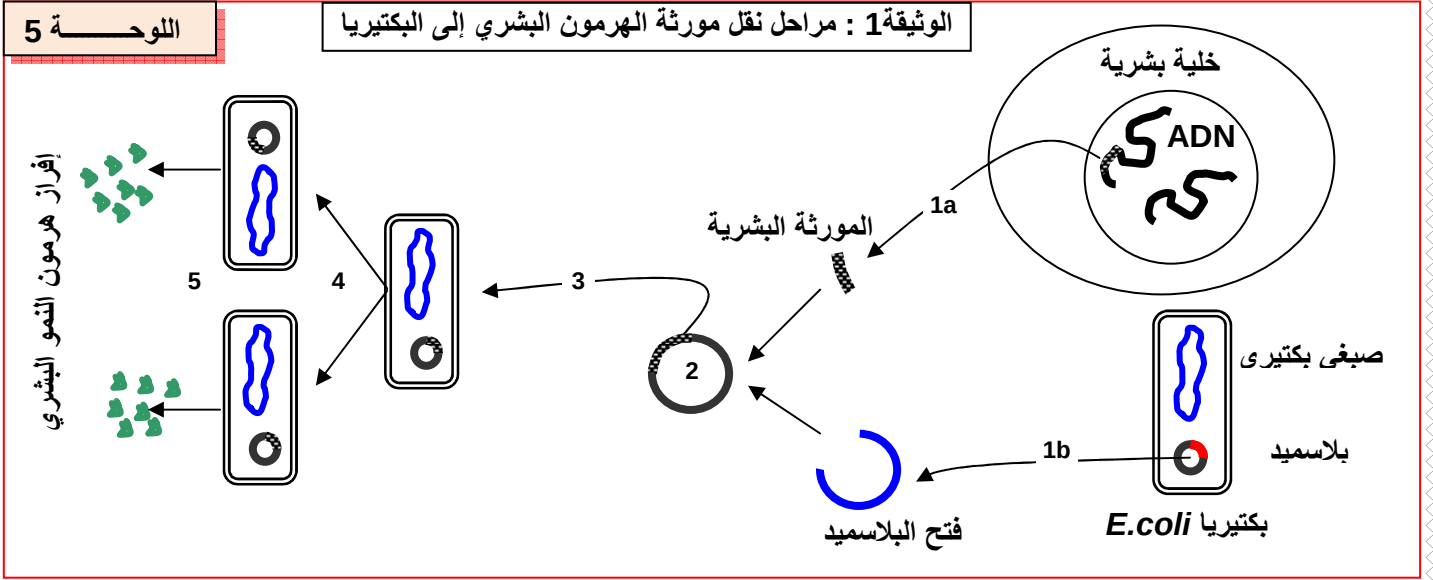
بالمضاد الحيوي A

بالمضاد الحيوي B

اللوحة 4

الأستاذ : يوسف الأندلسي

a - نقل المورثة: أنظر الوثيقة 1، لوحة 5.



+ عزل المورثة المرغوب فيها: يمكن الحصول عليها إما بعزل ADN البشري وتجزئته باستعمال أنزيمات الفصل. أو انطلاقاً من ARNm المستخلص مباشرة من خلايا الغدة النخامية البشرية والذي يخضع بعد ذلك لعملية النسخ العكسي ثم بلمرة الشريط الآخر بفضل أنزيم البلمرة (ADN polymerase).

+ رصد الجزء المرغوب فيه ضمن أجزاء ADN المحصل عليها بعد تجزيته. تذكر أننا نتوفر على معلومات كافية حول الجزء المبحوث عنه ضمن الأجزاء الناتجة عن تجزيء ADN. في البداية لابد من فصل الأجزاء فيما بينها: نستعمل تقنية الهجرة الكهربائية Eléctrophorèse. بعد ذلك نسلط عليها ARN مجس (يكون مشعاً وله القدرة على الارتباط بجزء ADN المبحوث عنه).

+ إدماج المورثة المحصل عليها في الوسيلة الناقلة: الوسيلة المستعملة هنا هي البلاسميد. هذه المرحلة تتطلب استعمال أنزيم الفصل لفتح البلاسميد ثم أنزيم الربط لدمج المورثة.

+ إدخال البلاسميد المركب (المغير) في البكتيرية قصد التكاثر (يمكن الإشارة هنا إلى أهمية Ca^{++} في امتصاص الخلية للبلاسميد المركب).

b - رصد البكتيريا المغيرة وراثياً:

تهدف هذه المرحلة إلى تحديد البكتيريا التي تتوفر بداخلها على البلاسميد المركب، والتي ستكون قادرة على إنتاج هرمون النمو (يمكن الإشارة إلى أهمية معرفة خصائص البلاسميد المستعمل قبل دمجه للمورثة الدخيلة كمقاومتها لبعض المضادات الحيوية).

c - زرع البكتيريا المركبة:

تزرع البكتيريا المركبة في مخمرات صناعية حيث جميع الظروف المناسبة في قيمتها المثلى قصد تسخيرها لإنتاج هرمون النمو بكمية وافرة.

d - استخلاص المنتج (هرمون النمو):

تغمر البكتيريا في محلول سكري جد مركز (مفرط التوتر)، ثم يعاد غمرها في محلول جد مخف، فتتملى الخلايا وتطرد الهرمون إلى الوسط الخارجي عبر ثقب المحفظة.

② الإنتاج الصناعي للأنسولين Insuline أنظر وثيقة 2، لوحة 5.

اللوحة 5

☆ الوثيقة 2: الإنتاج الصناعي للأنسولين Insuline

الأنسولين هرمون مخفض لنسبة السكر في الدم، ويتم إنتاجه من طرف خلايا β لجزيرات Langerhans البنكرياسية . وكل نقص في هذا الهرمون يؤدي إلى مرض السكري. الذي يعالج في هذه الحالة بحقن الشخص بالأنسولين الحيواني، إلا أن استعماله في هذه الحالة يؤدي إلى ظهور حالات أرجية، بحكم اختلاف التركيب الكيميائي بين أنسولين الحيوانات والأنسولين البشري. بفضل تقنيات الهندسة الوراثية تم إنتاج الأنسولين البشري بكميات صناعية إذ تم تركيب المورثة انطلاقاً من ARNm المسئول عن إفراز هذا الهرمون . ثم بعد ذلك نقلت هذه المورثة إلى متعضيات مجهرية كخميرة البيرة وبعض العصيات التي تقوم بعد ذلك بإنتاج هذا الهرمون وطرحه في الوسط الخارجي مباشرة.

انطلاقاً من المعطيات السابقة ومن معارفك حول آليات الهندسة الوراثية:

(1) بين أهمية اللجوء إلى الهندسة الوراثية لإنتاج الأنسولين البشري

(2) أعط مراحل تطبيق الهندسة الوراثية لإنتاج الأنسولين البشري.

(1) للأنسولين نفس الدور عند مختلف الثدييات، إلا أنه يظهر بعض الاختلافات في التركيب الكيميائي. ولذلك فاستعمال الأنسولين الحيواني عند الإنسان، يؤدي إلى ظهور حالات أرجية. ومن هنا تظهر أهمية اللجوء إلى الهندسة الوراثية لإنتاج أنسولين مطابق للأنسولين البشري. كما أن هذا الأنسولين يكون بكميات وافرة، وبكلفة أقل.

(2) مراحل تطبيق الهندسة الوراثية لإنتاج الأنسولين البشري :

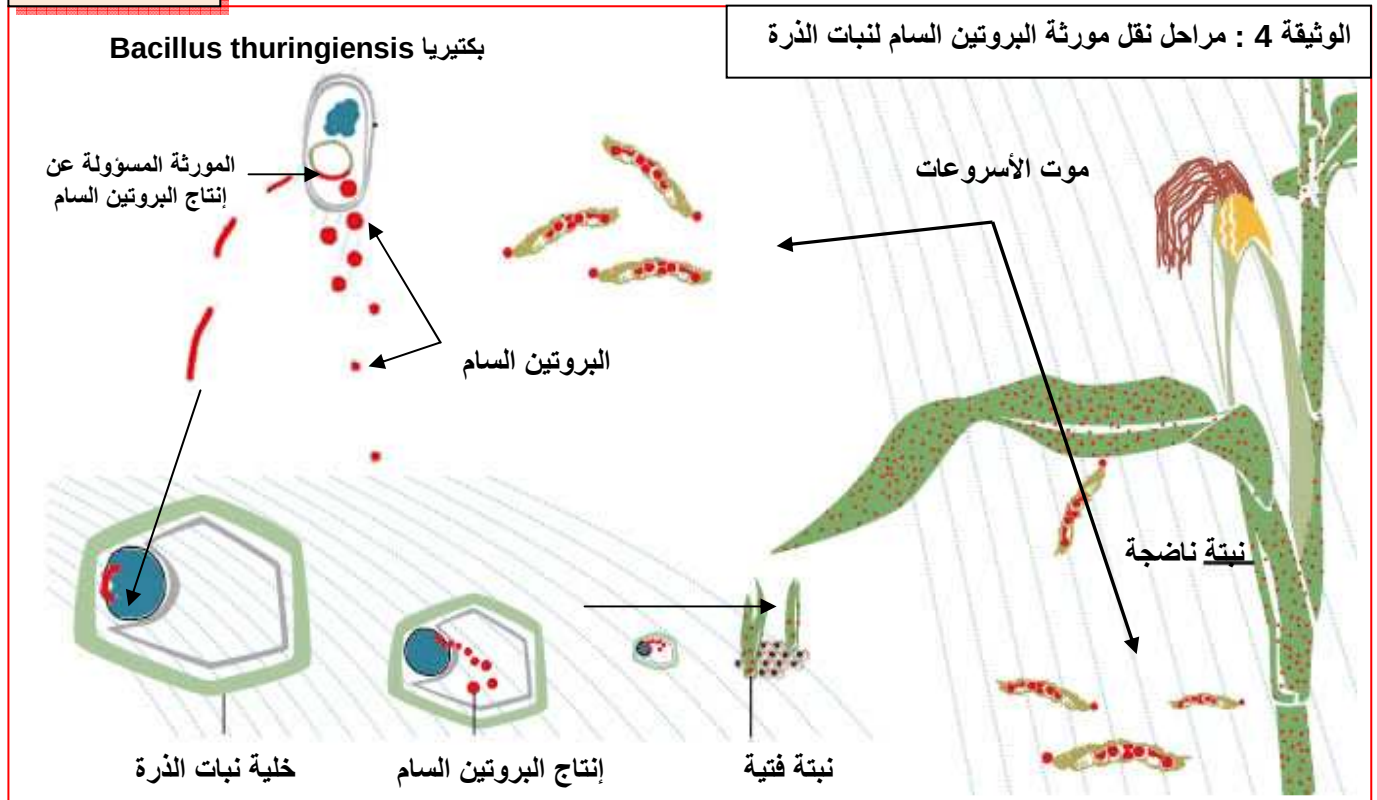
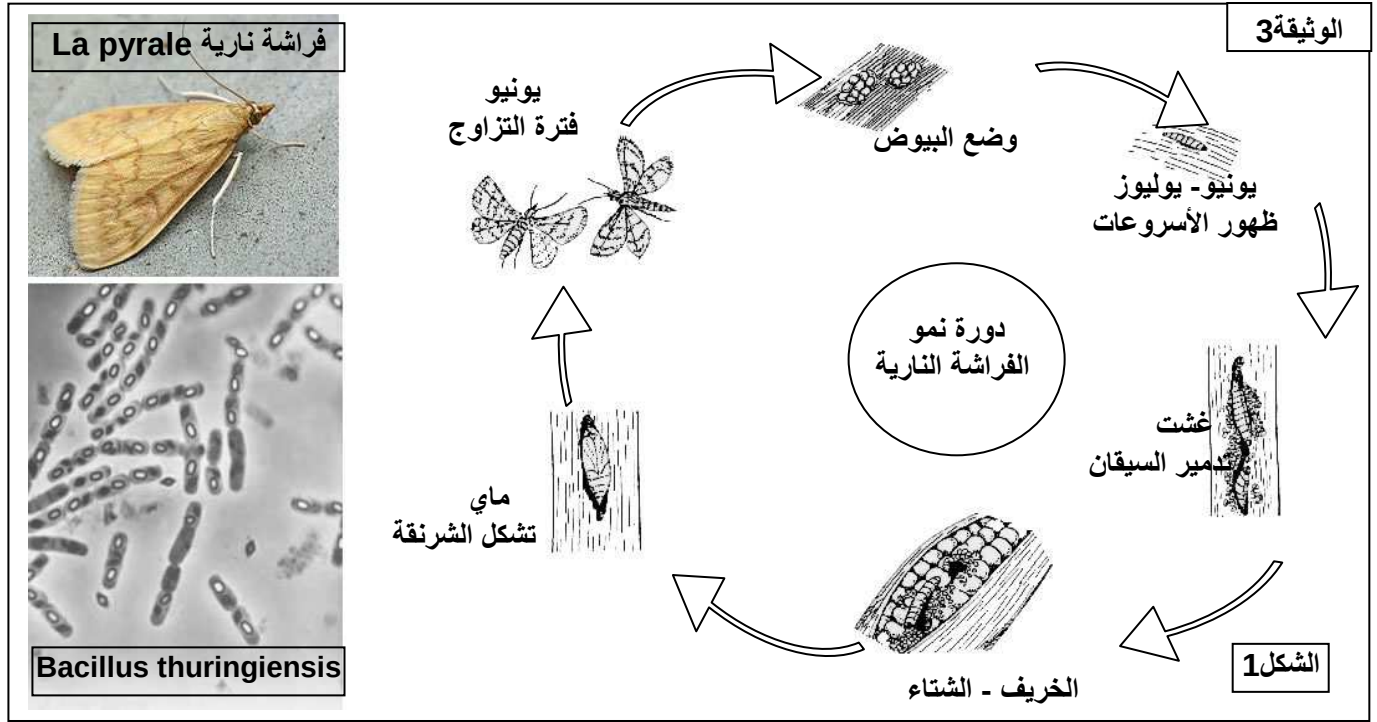
- + عزل الصبغي المتضمن للمورثة المعنية.
- + قطع ADN المراد استعماله بواسطة أنزيم الفصل. (تظهر على ADN المقطوع أطرافاً موحدة).
- + استخراج البلاسميد (ناقل) من بكتيريا
- + قطع ADN البلاسميد بواسطة أنزيم الفصل. (يملك ADN البلاسميد المقطوع أطرافاً موحدة، والتي تتكامل مع أطراف ADN البشري المعزول).
- + دمج المورثة على البلاسميد بواسطة أنزيم الربط.
- + نقل البلاسميد إلى داخل البكتيريا.
- + رصد البكتيريات المغيرة وراثياً.
- + تلميم البكتيريات للحصول على لمات تتوفر على المورثة المراد نقلها.
- + حث البكتيريات المغيرة وراثياً على إنتاج الأنسولين.

③ نقل القدرة على محاربة الحشرات الضارة أنظر وثيقة 3، لوحة 5.

لمقاومة أسروغات الفراشات النارية، استعمل المزارعون المبيدات الحشرية، إلا أنها أعطت نتائج جد محدودة. لهذا لجأ الباحثون إلى الهندسة الوراثية لنقل المورثة المسؤولة عن إنتاج بروتين سام بالنسبة للأسروغات، ودمجه مع جينوم خلايا النبتة، فتصبح بذلك مقاومة للأسروغات.

تعتبر أسروعات الفراشات النارية *La pyrale du maïs (Ostrinia nubilalis)* ، أكبر متلف لنبات الذرة، إذ تتوغل الأسروعات داخل ساق النبتة لتتغذى على أنسجتها، كما تحدث أضرارا على مستوى السنابل والبذور، فيصبح النبات المصاب ضعيف النمو.

لمقاومة أسروعات الفراشات النارية، اكتشف بعض العلماء نوعا من البكتيريا تدعى *Bacillus thuringiensis* تستطيع تركيب بروتين سام بالنسبة للأسروعات، وغير ضار بالنسبة للفقريات.



- + تعرف المورثة ذات النفع عند المتعضي المعطي (بكتيريا Agrobacterium turingiensis).
- + عزل المورثة ذات النفع.
- + دمج المورثة ذات النفع داخل بلاسميد ناقل.
- + تلميم البلاسميد المغير وراثيا.
- + رصد الخلايا المغيرة وراثيا.
- + إنبات نباتات مغيرة وراثيا.

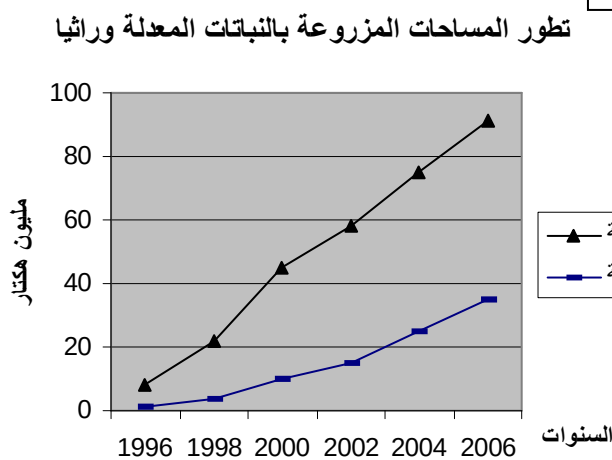
④ الرفع من المردود الزراعي أنظر وثيقة 5، لوحة 6.

اللوحة 6

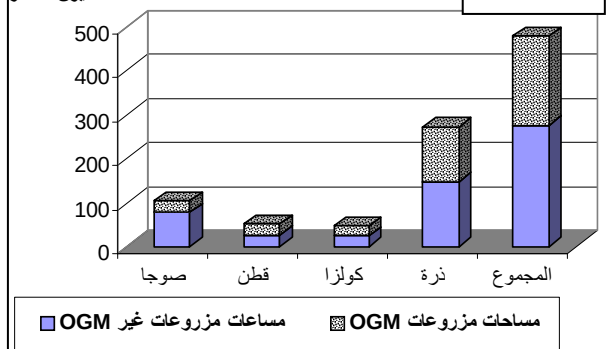
الوثيقة 5: الرفع من المردود الزراعي بواسطة المتعضيات المعدلة وراثيا (OGM)

انطلاقا من المعطيات التالية استخرج خاصيات المتعضيات المعدلة وراثيا واستنتج انعكاساتها على مردودية الإنتاج.

الشكل 2



الشكل 1



مجموع المساحات المزروعة بالنباتات المعدلة وراثيا (OGM)
مقارنة بالمساحات المزروعة بالنباتات غير المعدلة وراثيا

الشكل 4

النسبة المئوية	المساحة العالمية المزروعة بمليون هكتار	نوع الزراعات
60 %	48.4	صوجا متحملة لمبيد العشب
14 %	11.2	الذرة Bt
5 %	4.3	الكولزا متحمل لمبيد العشب
2 %	1.5	قطن متحمل لمبيد العشب
5 %	4.3	ذرة متحملة لمبيد العشب
6 %	4.5	قطن Bt
4 %	3	قطن Bt متحمل لمبيد العشب
100 %	81	المجموع

الشكل 3

خاصيات بعض أنواع المتعضيات المعدلة وراثيا

صوجا	ذرة	قمح	بطاطس
- تحمل المبيدات العشبية.	- مقاومة الحشرات الضارة	- تحمل المبيدات العشبية	- تحمل المبيدات العشبية
- تغيير في تركيب الزيت والبروتينات	- تحمل المبيدات العشبية	- مقاومة الأمراض	- مقاومة الأمراض
- إنتاج جزيئات نوعية كالأنزيمات.	- مقاومة الأمراض	- تغيير نسبة النشا.	- تغيير نسبة النشا.

مكنك الهندسة الوراثية من الحصول على نباتات معدلة وراثيا، بحيث ساهمت هذه التقنية في:

- + جعل بعض النباتات مقاومة للحشرات (كالذرة والقطن).
- + جعل بعض النباتات مقاومة للمبيدات التي تستعمل في قتل الحشرات الضارة والأعشاب الطفيلية.
- نقل المورثات البكتيرية المسؤولة عن تثبيت أزوت الهواء إلى النباتات وجعلها قادرة على امتصاص الأزوت، مما يسمح بعدم استعمال الأسمدة الأزوتية.
- + رفع القدرة على إنتاج بروتينات يحتاجها الإنسان في تغذيته.
- وبهذا يتم الرفع من مردودية الإنتاج، والتقليص من كلفة الإنتاج.