

الفصل الثالث:

الهندسة الوراثية : مبادئها وتقنياتها

تمهيد : تمكن علماء الوراثة منذ السبعينيات من نقل وتوظيف مورثات متعددة 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 حقيقة تعتمد على التغيير الوراثي للخلايا الحية بواسطة نقل المورثات. تسمى التقنيات المعتمدة في هذا التغيير الوراثي: الهندسة الوراثية.

I - مفهوم التغيير الوراثي ؟

① الانتقال الطبيعي لمورثات البكتيريا At إلى نبات:

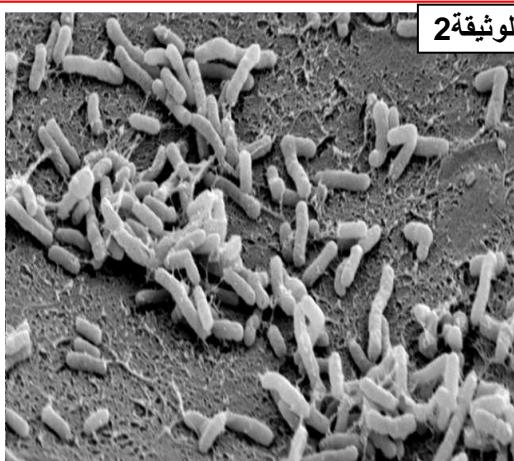
أ - معطيات تجريبية : أنظر نشاط 1 ، لوحة 1.

اللوحة 1

الوثيقة 1



الوثيقة 2



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) ، ونظراً لأنّه الحاسم على الاقتصاد فقد كان موضوع عدّة أبحاث وتجارب.

← التجربة الأولى : (E . Smith et C . Townsend en 1907) عزل الباحثان من ورم سرطاني في جذور نبات بكتيريا تدعى *At = Agrobacterium tumefaciens* زرع هذه البكتيريا في فتحة حديثة (أقل من يومين) أنجزت على نبات سليم، فلوحظ 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 السكروز وأملاح معدية. فلاحظ أن خلايا النسيج تتکاثر بصورة فوضوية عكس الخلايا العاديّة التي تتکاثر ببطء متطلبة 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 بكتيريات *Agrobacterium tumefaciens* A و B . وهذان النمطان يسببان المرض (يؤديان إلى تكون ورم) . حيث يؤدي النمط A إلى تكون ورم ترکب خلاياه التوباليين Nopaline بينما يؤدي النمط B إلى تكون ورم ترکب خلاياه الأكتوبين Octopine (التوباليين والأكتوبين عبارة عن مشتقات من مستقبلات مشتركة تتكون في معظمها من أحماض أمينية وأحماض سيتونية مختلفة أو سكريات) .

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

B - تحليل المعطيات التجريبية :

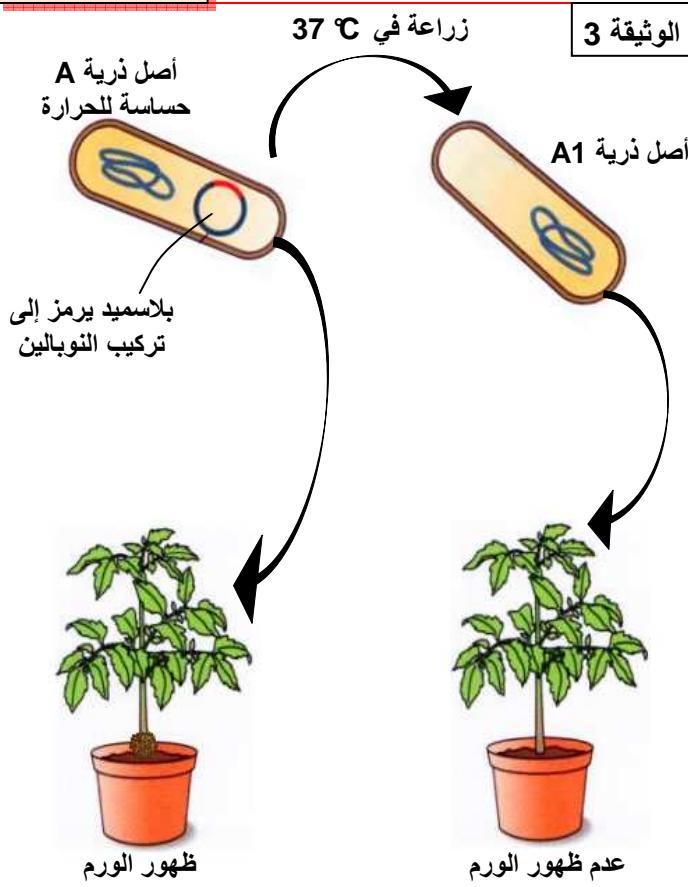
1) نستنتج من هذه التجربة أن البكتيريا At هي المسؤولة عن ظهور الورم السرطاني عند النباتات السليمة.

2) التغيرات التي ظرأت على خلايا السنخ بواسطة البكتيريا **At** هي التكاثر العشوائي والسريع غير المنتظم لخلايا النبتة دونما حاجة إلى الهرمونات النباتية المسئولة 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 تحكم في تركيب النوباليين والأكتوبين.

اللوحة 1



التجربة الثالثة:

تمكن باحثون من عزل البكتيريا **Agrobacterium tumefaciens** ، وبعد دراسة مكوناتها وجدوا حلقية **ADN** تدعى **Ti** . نزرع في درجة حرارة 37°C أصل ذرية A من النمط **Agrobacterium tumefaciens** حساسة للحرارة، فحصل على أصل ذرية A1. تبين الوثيقة 3 بقية التجربة .

5) فسر النتائج المحصل عليها.

التجربة الرابعة:

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

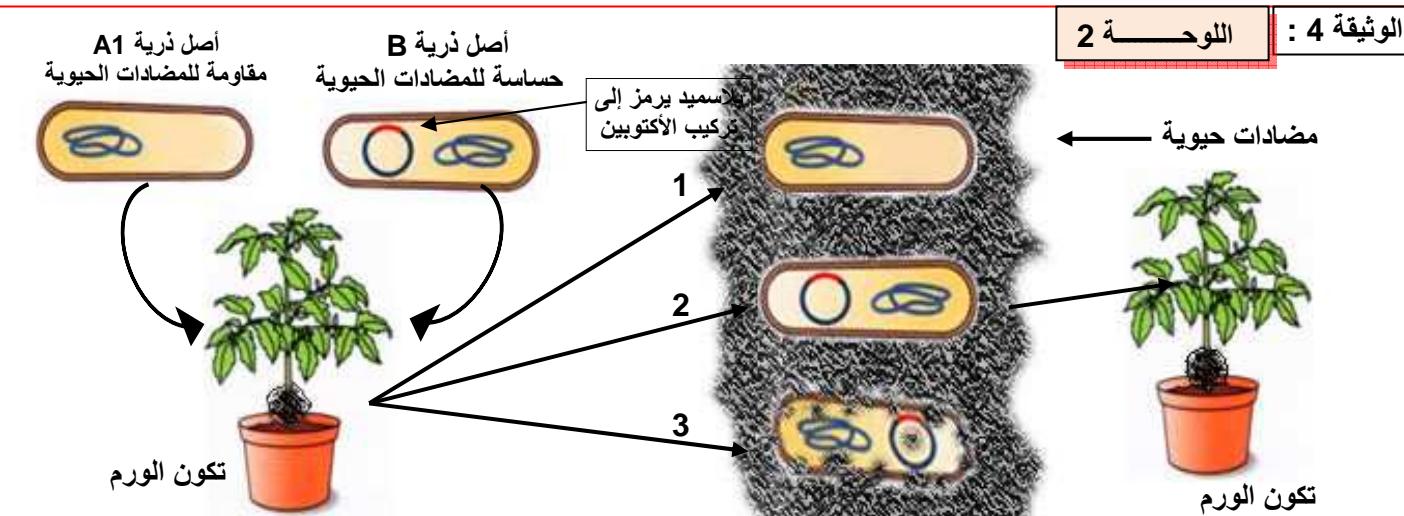
6) ما التفسير الذي تفترضه بالنسبة لنتيجة هذه التجربة؟
نسحق الورم ونبسطه فوق وسط زرع يحتوي على مضادات حيوية: نتائج التجربة مماثلة في الجزء الأسفل من الوثيقة 4، لوحة 2.

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

8) هل يمكنك تحديد دور البلاسميد؟

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

اللوحة 4 :

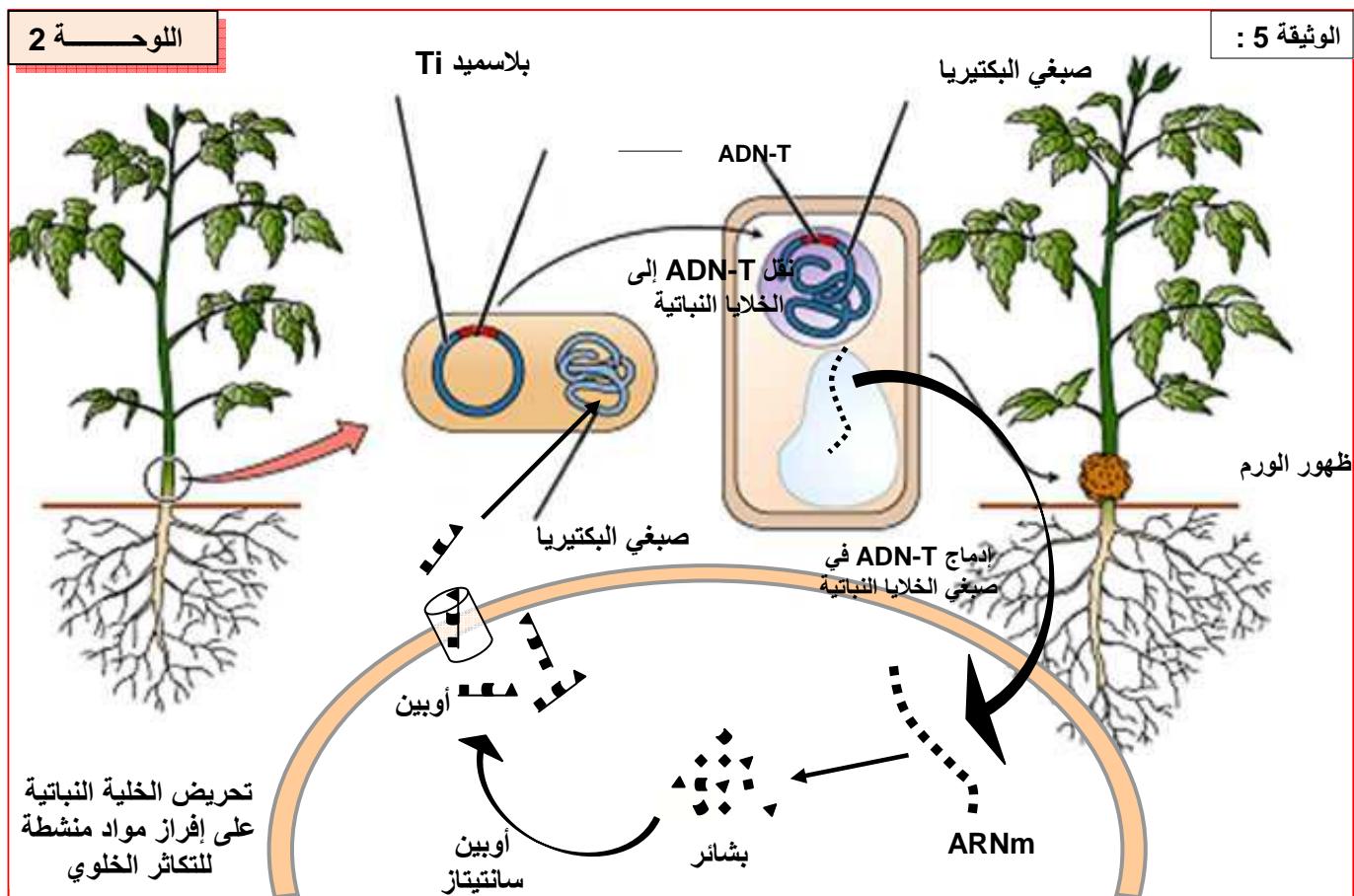


5) نلاحظ أنه تحت تأثير الحرارة، يتم تفكك البلاسميد المسؤول عن تركيب النوباليين، وينتج عن هذا التفكك عدم إصابة النبتة بالورم، فالبلاسميد **Adn** هو المسئول عن القدرة الممرضة للبكتيريا.

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 محدثاً تغيراً في الصفات، ومن هذا فإن البلاسميد مسؤول عن تغيير الخبر الوراثي.

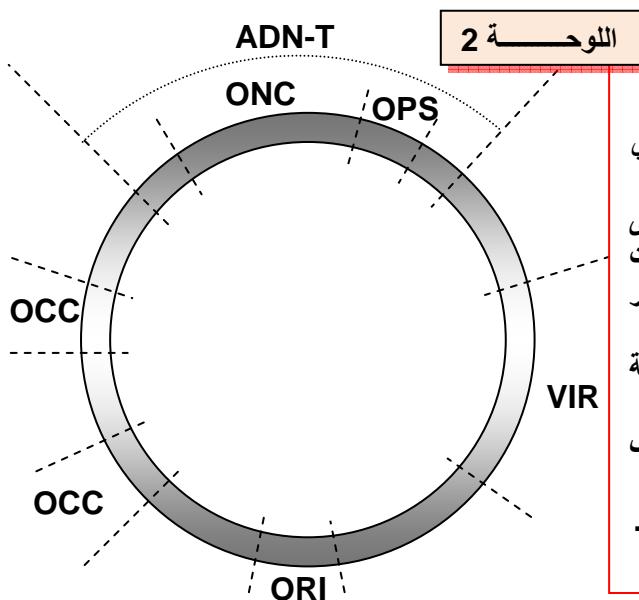


9) يظهر جرب السنخ على مراحل هي:

- المرحلة الأولى: تندد البكتيريا في جرح يكون قريباً من سنخ النبات، فتقوم بحقن بلاسميدها Ti في الخلية النباتية. هذا البلاسميد يحتوي على قطعة من ADN تدعى ADN-T.
- المرحلة الثانية: تدمج المرثات ADN-T ضمن ADN الخلية النباتية العائلة، لتدخل تلك القطعة ضمن ذخيرتها الوراثية.
- المرحلة الثالثة: تستنسخ ARNm من مرثات 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 بإيقاع مرتفع، مما ينتج عنه ورم. كما أن الأوبين المفرز خارج الخلية يؤدي إلى تكاثر البكتيريا At.

② خلاصة:

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



الخريطة الوراثية للبلاسميد Ti عند البكتيريا At

- يرمز لهذا البلاسميد بـ Ti ، نسبة لـ **Tumor inducing** أي مرض للورم.
- Transferred ADN = ADN-T** الجزء الذي ينتقل إلى الخلايا النباتية ويندمج مع ذخيرتها الوراثية. ويرمز للمورثات المسئولة 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 النبطة.
- الوظيفة **ORI** مسؤولة عن النسخ الذي يمكن البلاسميد من التكاثر.

II - آليات الهندسة الوراثية.

① الوسائل المستعملة في الهندسة الوراثية:

اللوحة 3

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

تعتبر العصبة 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)، وكذلك لتوفره بالإضافة للصبغي الأساسي على عدة بلاسميدات يمكن استغلالها كنافلات للمورثات، كما أن سينوبلازم هذه البكتيريا غني بالجسيمات الريبية والعناصر الضرورية لتركيب البروتينات.

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

a - **enzymes de restriction**

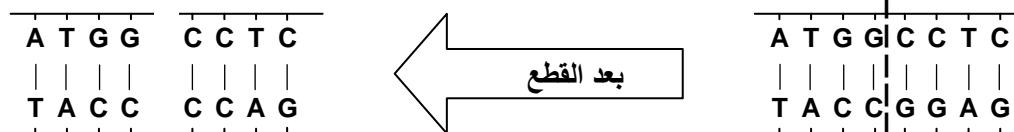
إنها أنزيمات نوعية قادرة على التعرف في مستوى جزيئة ADN على تسلسلات دقيقة من القواعد الأزوتية، وقطع الجزيئية على مستواها. ويحمل كل أنزيم فصل اسم النوع البكتيري الذي استخلص منه.

b - **enzymes de ligation**

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

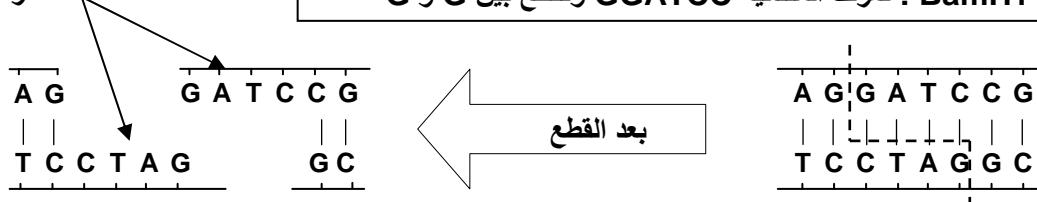
اللوحة 3

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



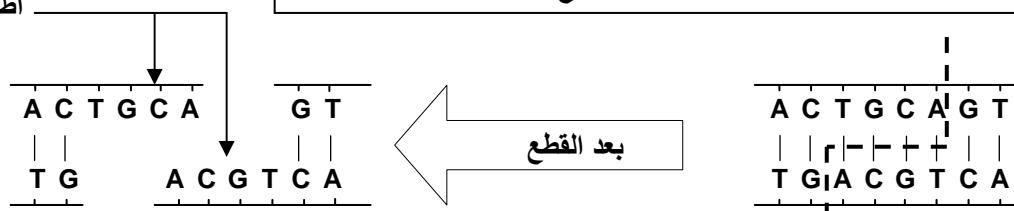
أطراف موحدة

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



أطراف موحدة

* إنزيم PstI: تعرف المتتالية CTGCAG وتقطع بين G و A



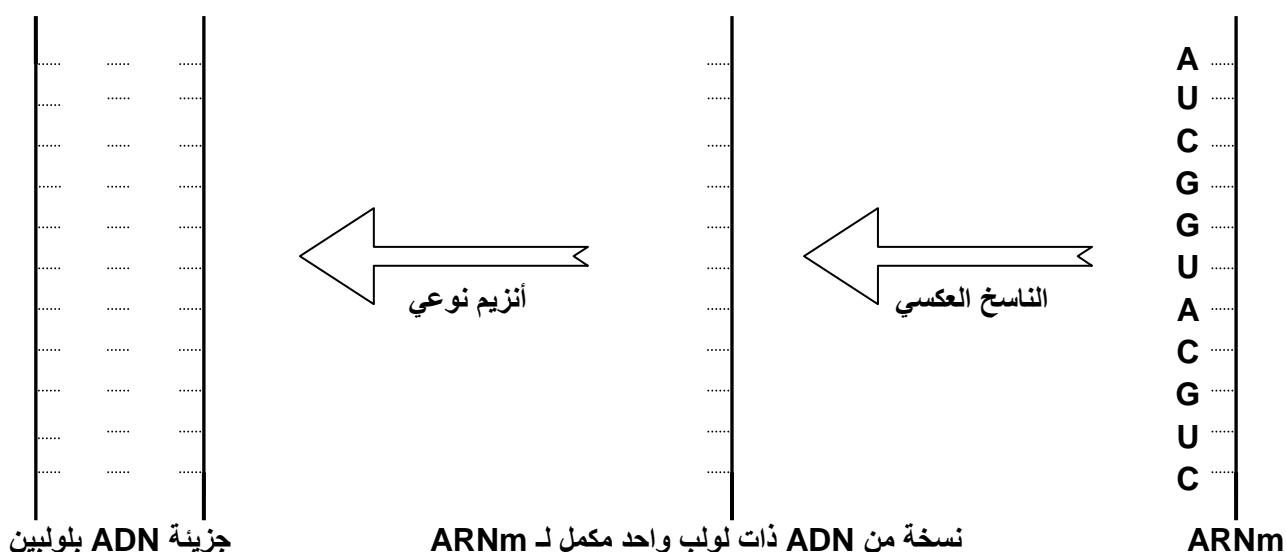
ج - الناسخ العكسي : انظر الوثيقة 3، لوحة 3.

هو إنزيم يستطيع تركيب جزيئة ADN انطلاقاً من جزيئة ARNm

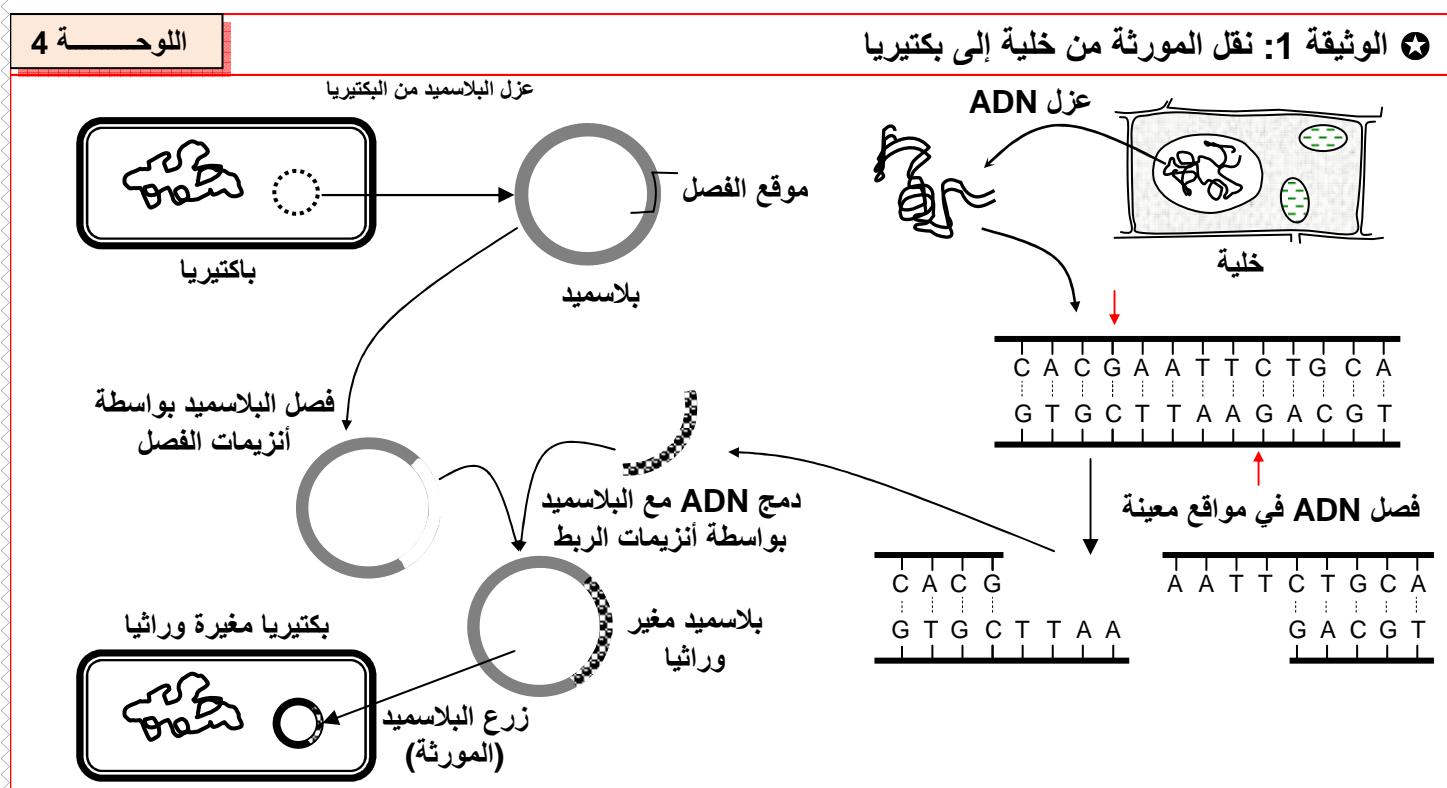
اللوحة 3

★ الوثيقة 3: الناسخ العكسي Transcriptase inverse

الناسخ العكسي هو إنزيم يعمل على تركيب جزيئة ADN انطلاقاً من جزيئة ARNm، وهكذا يمكن تركيب المورثة التي ترمز لبروتين معين انطلاقاً من ARNm الذي يرمز له. انطلاقاً من جزيئة ARNm التالية، حدد خيط ADN المنفرد الناتج عن الناسخ العكسي، ثم حدد جزيئة ADN المزدوجة والتي تمثل المورثة المرغوبة.



② مراحل نقل مورثة إلى بكتيريا : انظر الوثيقة 1 ، لوحه 4.

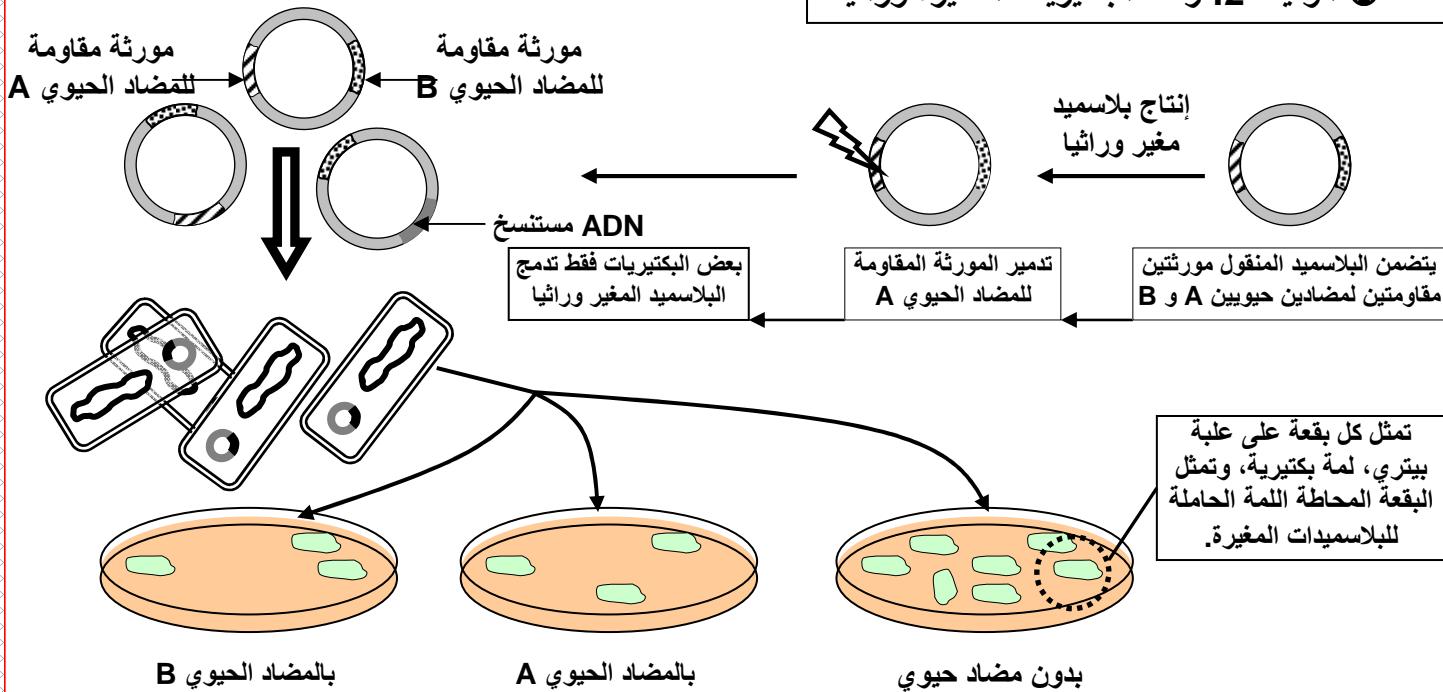


نلاحظ أن البلاسميد المستعمل في هذه الحالة يتميز بوجود مورثتين: المورثة A (مقاومة المضاد الحيوي A) والمورثة B (مقاومة المضاد الحيوي B).

بعد دمجه للمورثة الجديدة، فقد البلاسميد المورثة A دون أن يفقد المورثة B . ادن البكتيريا الحاملة للبلاسميد المغير ستكون حساسة للمضاد الحيوي A و مقاومة للمضاد الحيوي B . وهكذا يتم رصدها باستعمال هذه المضادات الحيوية.

اللوحة 4

الوثيقة 2: رصد البكتيريات المغيرة وراثيا



٥ - تعبير المورثة.

بعد الحصول على اللمات التي تحتوي على المورثة المطلوبة، يتم زرع هذه الخلايا المغيرة في مخمرات صناعية لتتكاثر وتنتج أكبر كمية من المادة الناتجة عن ترجمة المورثة المدمجة في البلاسميد.

لكي تقوم البكتيريا بإنتاج بروتينات لا تحتاجها، تضاف إلى المورثة المرغوبة وحدات وظيفية منظمة.

③ خلاصة : تعريف الهندسة الوراثية

الهندسة الوراثية هي استخلاص جزء من ADN حامل لمورثة مطلوبة، وزرعها في خلايا أخرى (بكتيريا أو خلايا الخميرة ...). وهكذا يتم الحصول اصطناعيا على خلايا هجينية لم تكن موجودة من قبل في الطبيعة، قادرة على إنتاج بروتينات معينة مطلوبة.

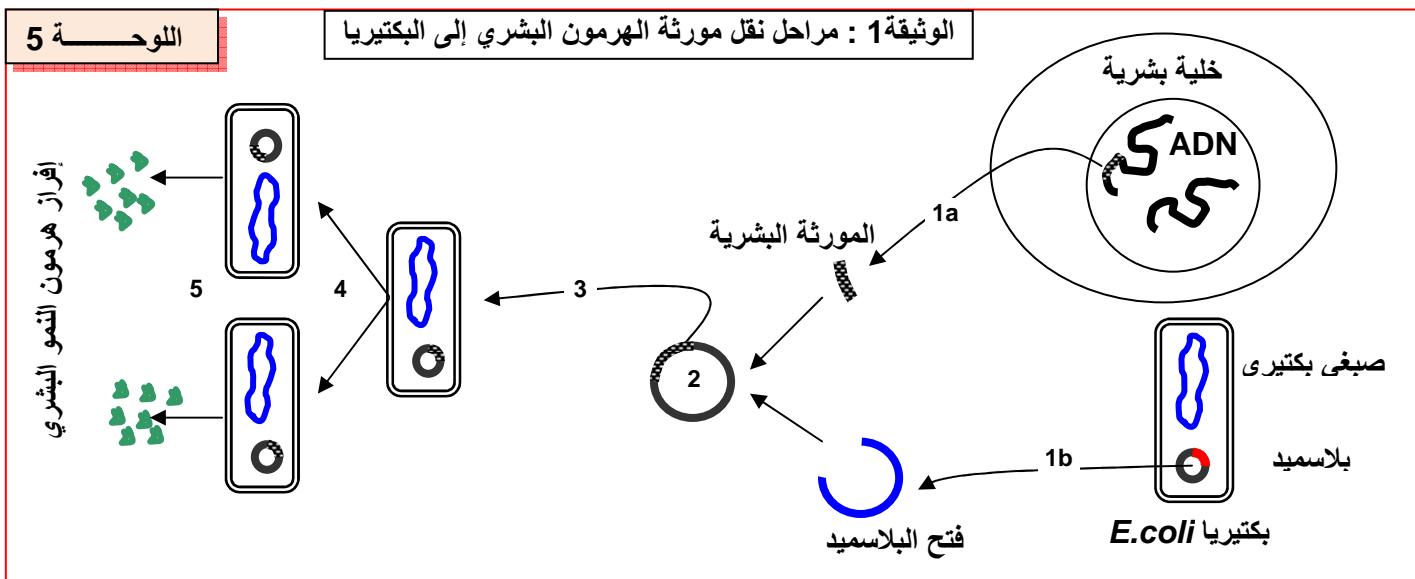
III - أمثلة لتطبيقات الهندسة الوراثية.

① الإنتاج الصناعي لهرمون النمو البشري

اللوحة 4

الوثيقة 1: الإنتاج الصناعي لهرمون النمو HGH (Human growth hormone)

هرمون النمو البشري HGH يفرز من طرف الغدة النخامية، ويكون من سلسلة بروتينية تتالف من 191 حمض أميني وهو المسؤول عن نمو القامة، إذ يؤدي كل نقصان في إفرازه إلى تأخير في النمو. لتعويض هذا النقص، استغل هرمون النمو لدى الأبقار منذ 1944 لكن المحاولة كانت غير موفقة لاختلاف التركيب الكيميائي، كما استغلت كذلك مستخلصات نخامية من جثث بشرية. وهي كذلك غير كافية. لكن بفضل الهندسة الوراثية يتم حاليا إنتاج هرمون النمو بشكل وافر. بالاعتماد على معلوماتك حول تقييمات الهندسة الوراثية، وعلى الوثيقة 1 لوحدة 5، بين كيف يمكن إنتاج هرمون النمو.

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

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

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

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

+ إدخال البلasmيد المركب (المغير) في البكتيريا قصد التكاثر (يمكن الإشارة هنا إلى أهمية Ca++ في امتصاص الخلية للبلasmيد المركب).

b - رصد البكتيريا المغيرة وراثياً:

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

c - زرع البكتيريا المركبة:

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

d - استخلاص المنتوج (هرمون النمو):

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

② الإنتاج الصناعي للأنسولين Insuline

اللوحة 5

• الوثيقة 2: الإنتاج الصناعي للأنسولين Insuline

الأنسولين هرمون مخضن لنسبة السكر في الدم، ويتم إنتاجه من طرف خلايا β لجزيرات البنكرياسية Langerhans . 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 متغيرات 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 إنزيم الفصل.(تظهر على ADN المقطوع أطراfa موحدة).
- + استخراج البلاسميد (ناقل) من بكتيريا
- + قطع ADN البلاسميد بواسطة إنزيم الفصل. (يملك ADN البلاسميد المقطوع أطراfa موحدة، والتي تتكامل مع أطراf ADN البشري المعزول).
- + دمج المورثة على البلاسميد بواسطة إنزيم الربط.
- + نقل البلاسميد إلى داخل البكتيريا.
- + رصد البكتيريات المغيرة وراثيا.
- + تلقييم البكتيريات للحصول على لمات تتتوفر على المورثة المراد نقلها.
- + حد البكتيريات المغيرة وراثيا على إنتاج الأنسولين.

③ نقل القدرة على محاربة الحشرات الضارة

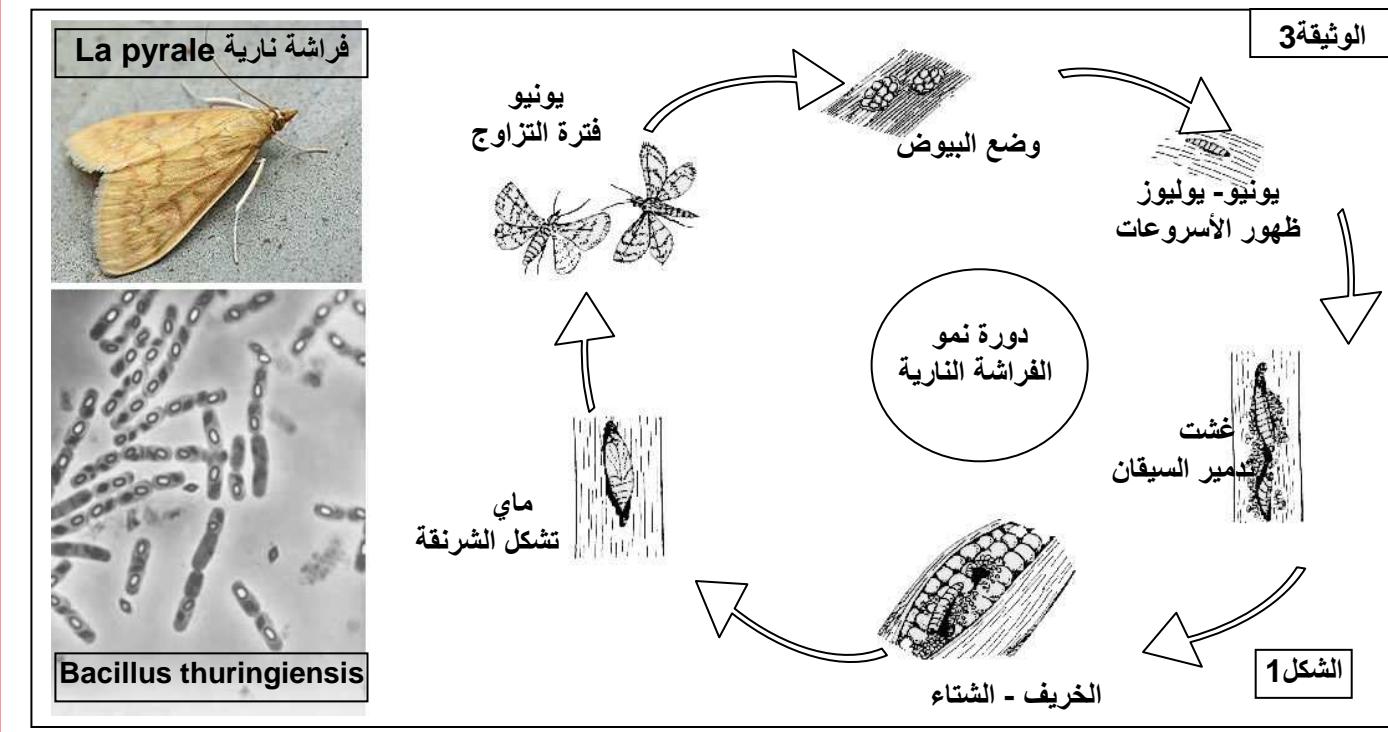
للمقاومة أسرروعات الفراشات النارية، استعمل المزارعون المبيدات الحشرية، إلا أنها أعطت نتائج جد محدودة. لهذا لجأ الباحثون إلى الهندسة الوراثية لنقل المورثة المسئولة عن إنتاج بروتين سام بالنسبة للأسرروعات، ودمجه مع جينوم خلايا النبتة، فتصبح بذلك مقاومة للأسرروعات.

اللوحة 5

★ الوثيقة 3: نقل القدرة على محاكاة الحشرات الضارة.

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

لمقاومة أسروغات الفراشات النارية، اكتشف بعض العلماء نوعا من البكتيريات تدعى *Bacillus thuringiensis* تستطيع تركيب بروتين سام بالنسبة للأسروغات، وغير ضار بالنسبة للفقريات.

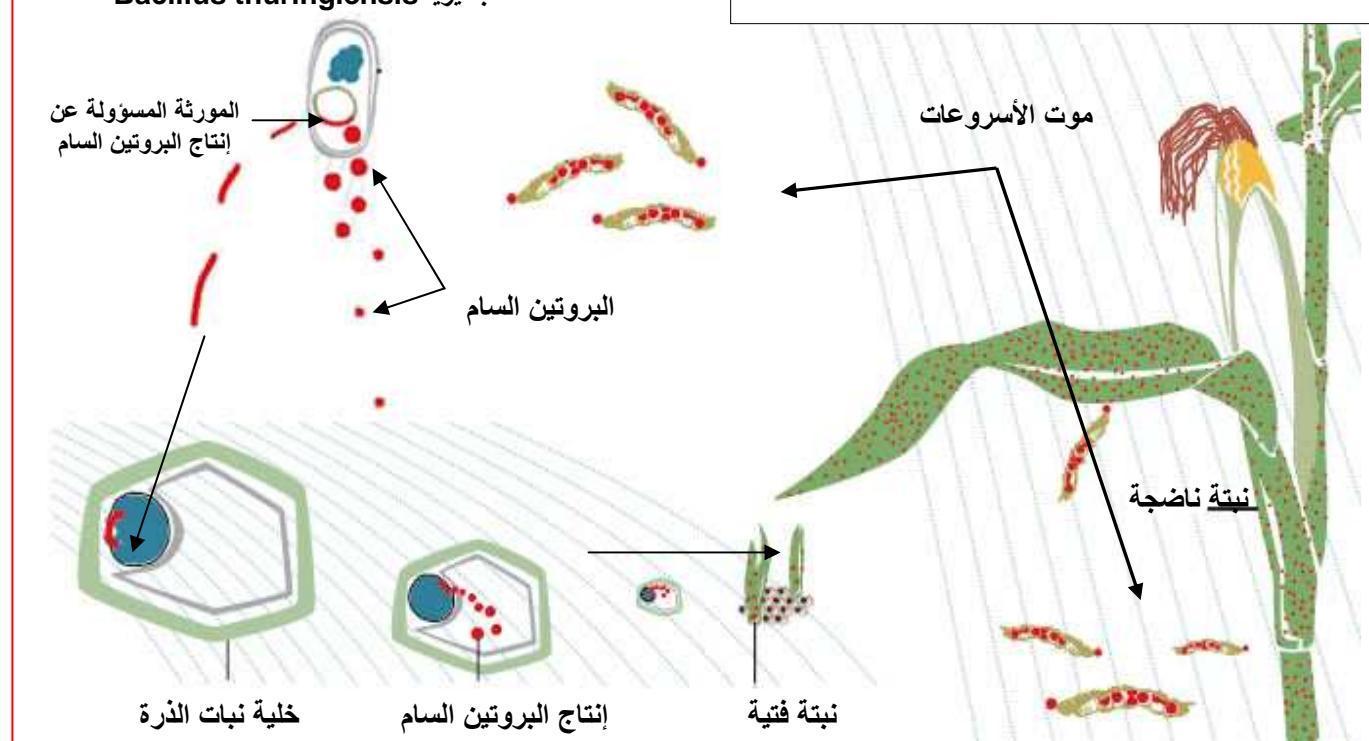


اللوحة 6

تعطي الوثيقة 4 لوحة 6، مراحل نقل مورثة البروتين السام لنبات الذرة.

بكتيريا *Bacillus thuringiensis*

الوثيقة 4 : مراحل نقل مورثة البروتين السام لنبات الذرة



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

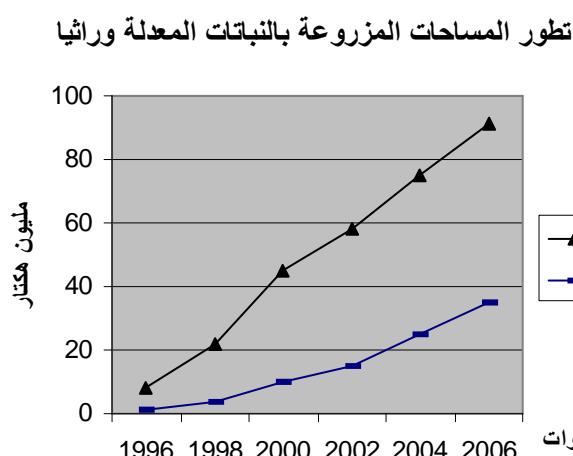
④ الرفع من المردود الزراعي انظر وثيقة 5، لوحة 6.

اللوحة 6

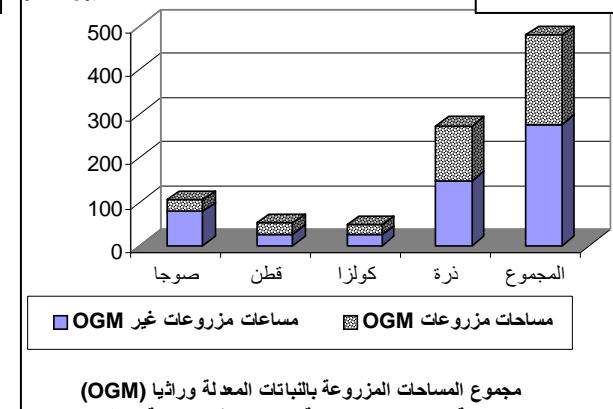
الوثيقة 5: الرفع من المردود الزراعي بواسطة المتعضيات المعدلة وراثيا (OGM)

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

الشكل 2



الشكل 1



الشكل 4

النسبة المئوية المئوية	المساحة العالمية المزروعة بـ مليون هكتار	نوع الزراعات	
		النوع	النوع
% 60	48.4	صوغا متحملة لمبيد العشب	Bt الذرة
% 14	11.2	Bt الذرة	الكتولا متحمل لمبيد العشب
% 5	4.3	كتولا متتحمل لمبيد العشب	قطن متتحمل لمبيد العشب
% 2	1.5	قطن متتحمل لمبيد العشب	ذرة متتحملة لمبيد العشب
% 5	4.3	ذرة متتحملة لمبيد العشب	Bt قطن
% 6	4.5	Bt قطن	قطن Bt متتحمل لمبيد العشب
% 4	3	قطن Bt متتحمل لمبيد العشب	
%100	81		المجموع

الشكل 3

خاصيات بعض أنواع المتعضيات المعدلة وراثيا

صوغا	ذرة	قطن	بطاطس
- تحمل المبيدات العشبية.	- مقاومة الحشرات الضارة.	- تحمل المبيدات العشبية.	- تحمل المبيدات العشبية.
- تغيير في تركيب الزيت.	- مقاومة الأمراض.	- تغيير نسبة البروتينات.	- تغيير في تركيب الزيت.
والبروتينات.	تغيير نسبة النشا.	تغيير نسبة البروتينات.	والبروتينات.
نوعية الأنزيمات.			نوعية الأنزيمات.

مكنت 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 المسئولة عن تثبيت أزوٰت الهواء إلى النباتات وجعلها قادرة على امتصاص الأزوٰت، مما يسمح بعدم استعمال الأسمدة الأزوٰتية.
- + رفع القدرة على إنتاج بروتينات يحتاجها الإنسان في تغذيته.
- وبهذا يتم الرفع من مردودية الإنتاج، والتقليل من كلفة الإنتاج.