SVT SAFI HASSAN

الهندسة الوراثية

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.

I – مفهوم التغيير الوراثي ؟

① الانتقال الطبيعي لمورثات البكتيريا At إلى نبات:

أ – معطيات تجريبية : أنظر نشاط 1، لوحة1.

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 Agrobacterium tumefaciens = At (الوثيقة 2). وبعد ذلك تم زرع هذه البكتريا 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 معدنية. فلاحظ أن خلايا النسيج تتكاثر بصورة فوضوية عكس الخلايا العادية التي تتكاثر ببطء متطلبة وجود الهرمونات النباتية.

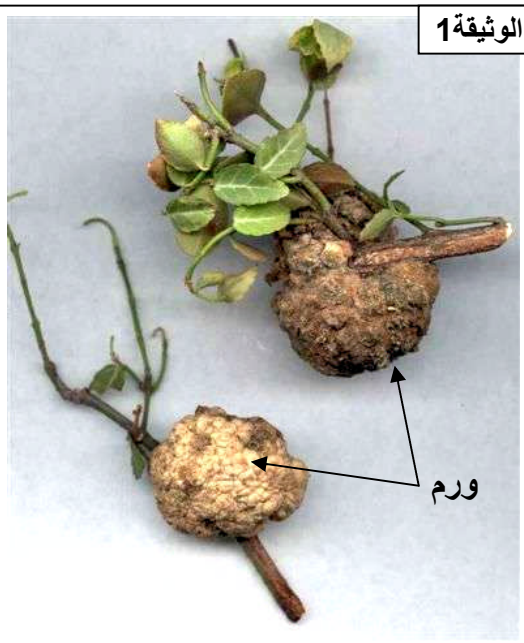
2) ما التغيير الذي حدث لخلايا السنخ بوجود البكتيريا A.Tumefaciens؟

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

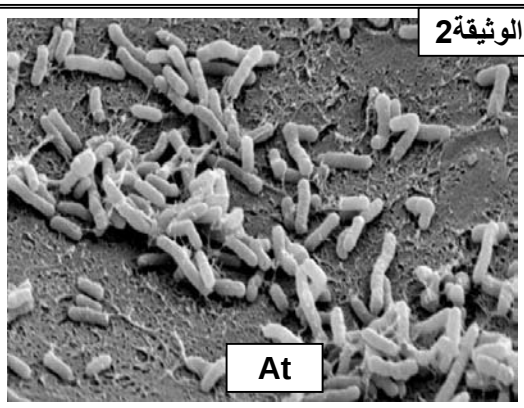
اكتشفت مجموعة من الباحثين وجود نمطين من بكتيريات Agrobacterium tumefaciens : A و B .وهذان النمطان يسببان المرض (يؤديان إلى تكون ورم). حيث يؤدي النمط A إلى تكون ورم تركب خلاياه النوبالين Nopaline بينما يؤدي النمط B إلى تكون ورم تركب خلاياه الأكتوبين Octopine (النوبالين و الأكتوبين عبارة عن مشتقات من مستقلبات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

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

الوثيقة1



الوثيقة2



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 أصلا عن نمو خلايا السنخ.
3) الفرضية: نقلت الباكتيريا 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.

التجربة الثالثة:

تمكن باحثون من عزل البكتيريا Agrobacterium tumefaciens ، وبعد دراسة مكوناتها وجدوا ADN حلقية تدعى البلاسميد Ti . نزرع في درجة حرارة 37 ° C أصل ذرية ل 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 الوثيقة4، لوحة2).

6) ما التفسير الذي تقترحه بالنسبة لنتيجة هذه التجربة؟

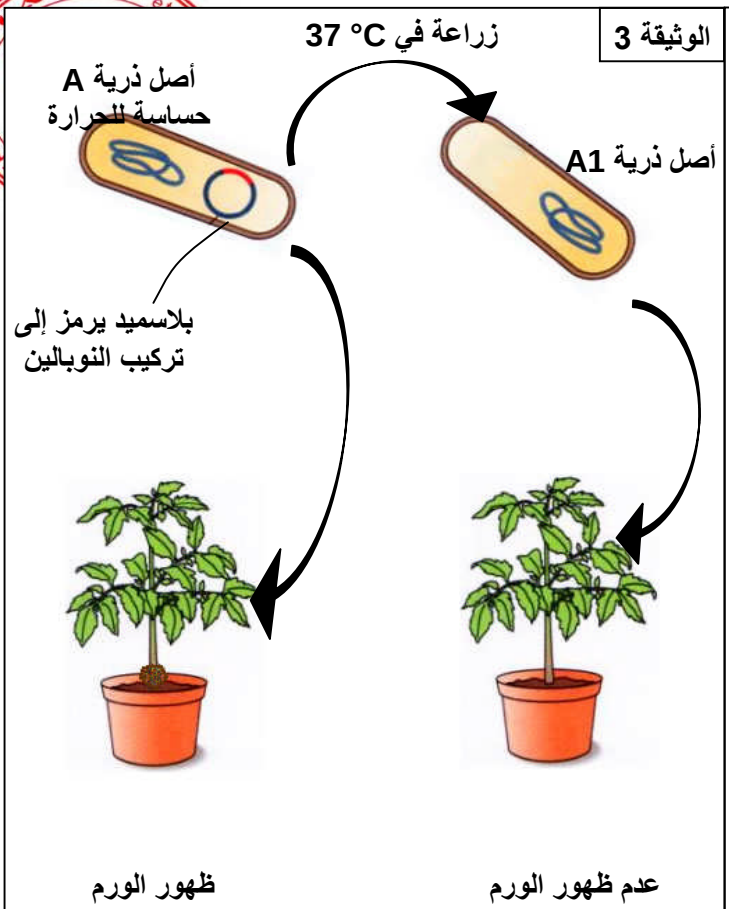
نسحق الورم ونبسطه فوق وسط زرع يحتوي على مضادات حيوية: نتائج التجربة ممثلة في الجزء الأسفل من الوثيقة 4، لوحة2.

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

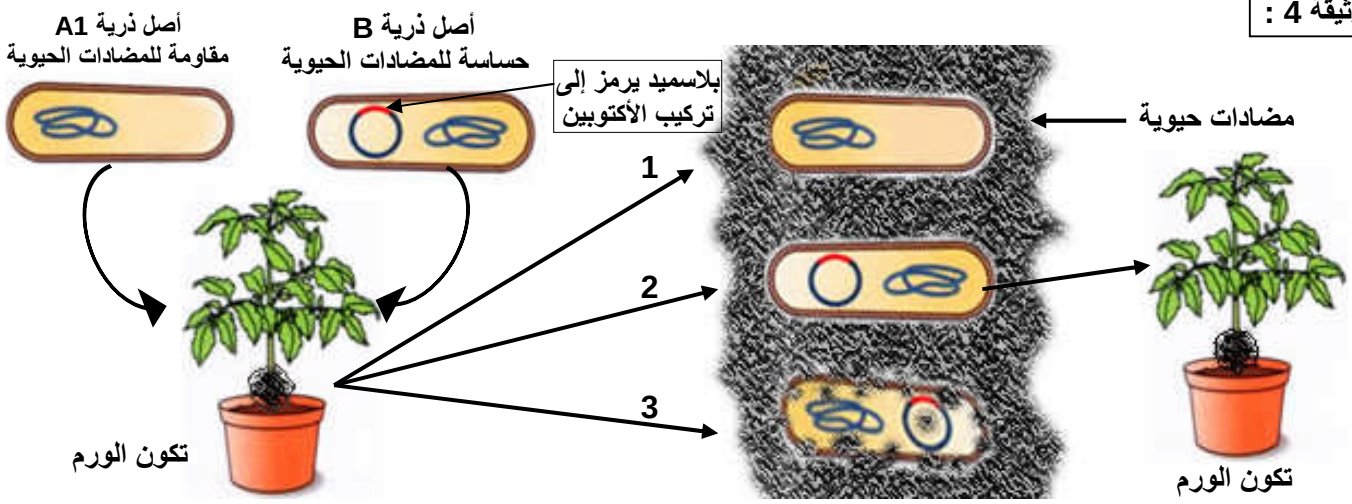
8) هل يمكنك تحديد دور البلاسميد؟

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

الوثيقة 3



الوثيقة 4 :



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

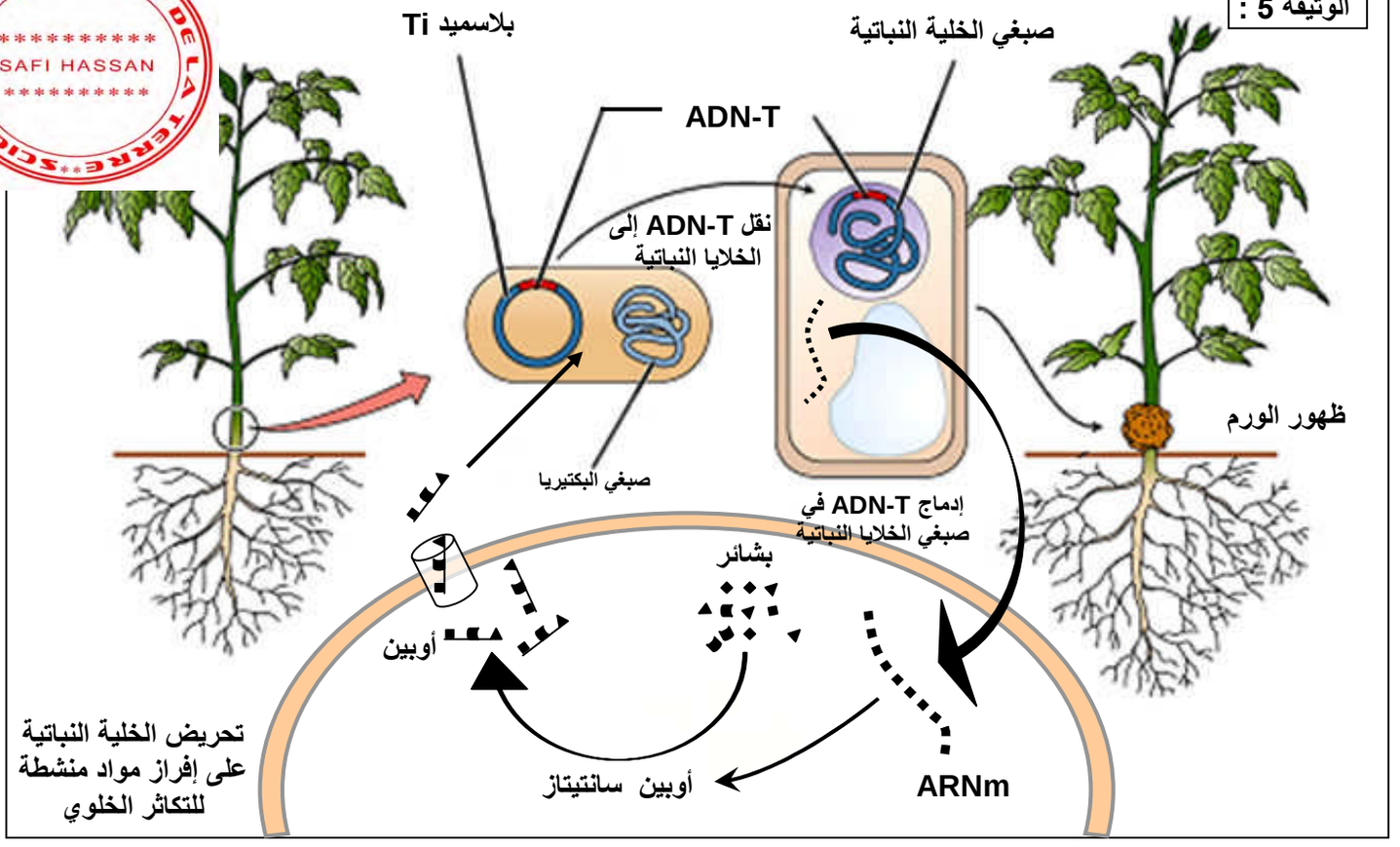
6) إن البكتيريا A1 فقدت قدرتها الممرضة لغياب البلاسميد. لذا يمكن تصور أن البكتيريا B المتوفرة على البلاسميد المسؤول عن تركيب الأكتوبين هي التي تؤدي إلى ظهور الورم عند النبتة.

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.

SAFI HASSAN

الوثيقة 5 :



9) يظهر جرب السنخ على مراحل هي:

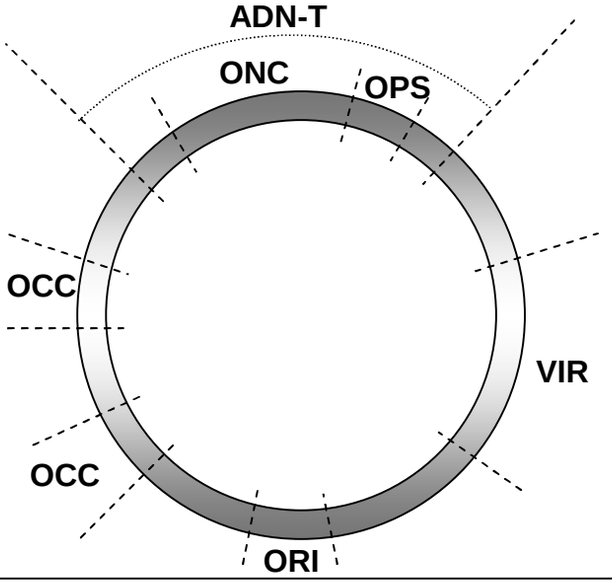
- المرحلة الأولى: تنفذ البكتيريا في جرح يكون قريبا من سنخ النبات، فتقوم بحقن بلاسميدها Ti في الخلية النباتية. هذا البلاسميد يحتوي على قطعة من ADN تدعى ADN-T.
- المرحلة الثانية: تدمج المورثات ADN-T ضمن ADN الخلية النباتية العائلة، لتدخل تلك القطعة ضمن ذخيرتها الوراثية.
- المرحلة الثالثة: تستنسخ ARNm من مورثات ADN-T، وتترجم إلى بروتين في سيتوبلازم 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 السنخ 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.

الوثيقة 6 :

الخريطة الوراثية للبلاسميد Ti عند البكتيريا At



يرمز لهذا البلاسميد بـ Ti ، نسبة لـ Tumor inducing أي محرض للورم.

- Transferred ADN = ADN-T 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.

SCIENCES DE LA VIE et de la TERRE
SAFI HASSAN

II – آليات الهندسة الوراثية.

① الوسائل المستعملة في الهندسة الوراثية:

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

② نشاط 2: آليات الهندسة الوراثية.

الوسائل المستعملة في الهندسة الوراثية:

الوثيقة 1: أهمية اختيار بكتيريا Eschérichia-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.

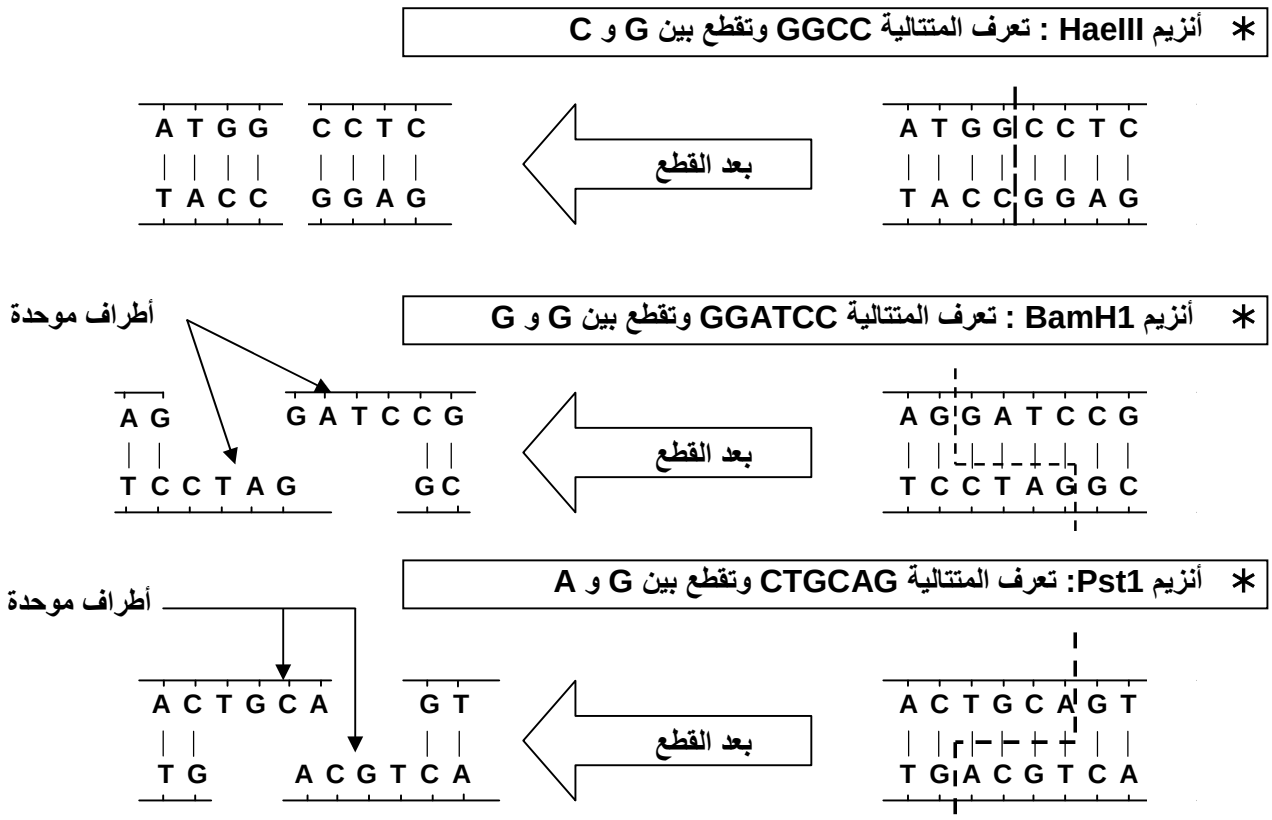
b - أنزيمات الربط Les ligases

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

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

هو أنزيم يستطيع تركيب جزيئة ADN انطلاقا من جزيئة ARNm.

الوثيقة 2: أنزيمات الفصل و أنزيمات الربط. Les enzymes de restriction et les Ligases .

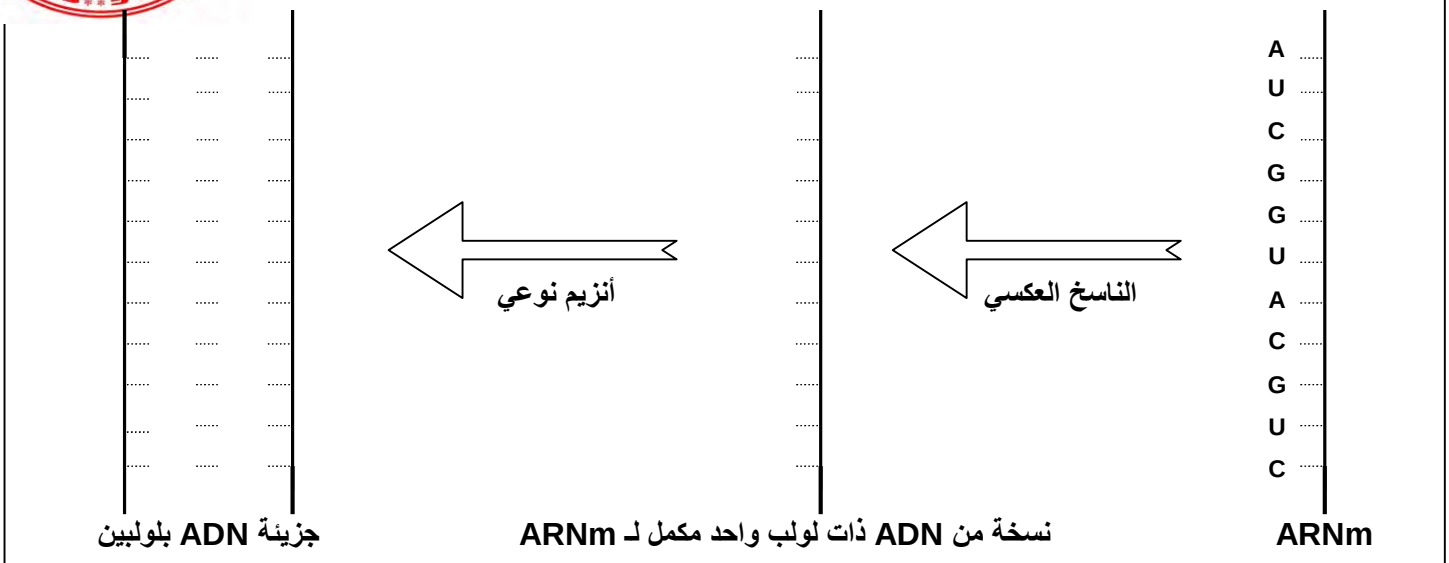


SCIENCES DE LA VIE et DE LA TERRE
SAFI HASSAN

✪ الوثيقة 3: الناسخ 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 خييط ADN المنفرد الناتج عن النسخ العكسي، ثم حدد جزيئة ADN المزدوجة والتي تمثل المورثة المرغوبة.



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

يتطلب نقل مورثة إلى بكتيريا معينة المرور من المراحل التالية:

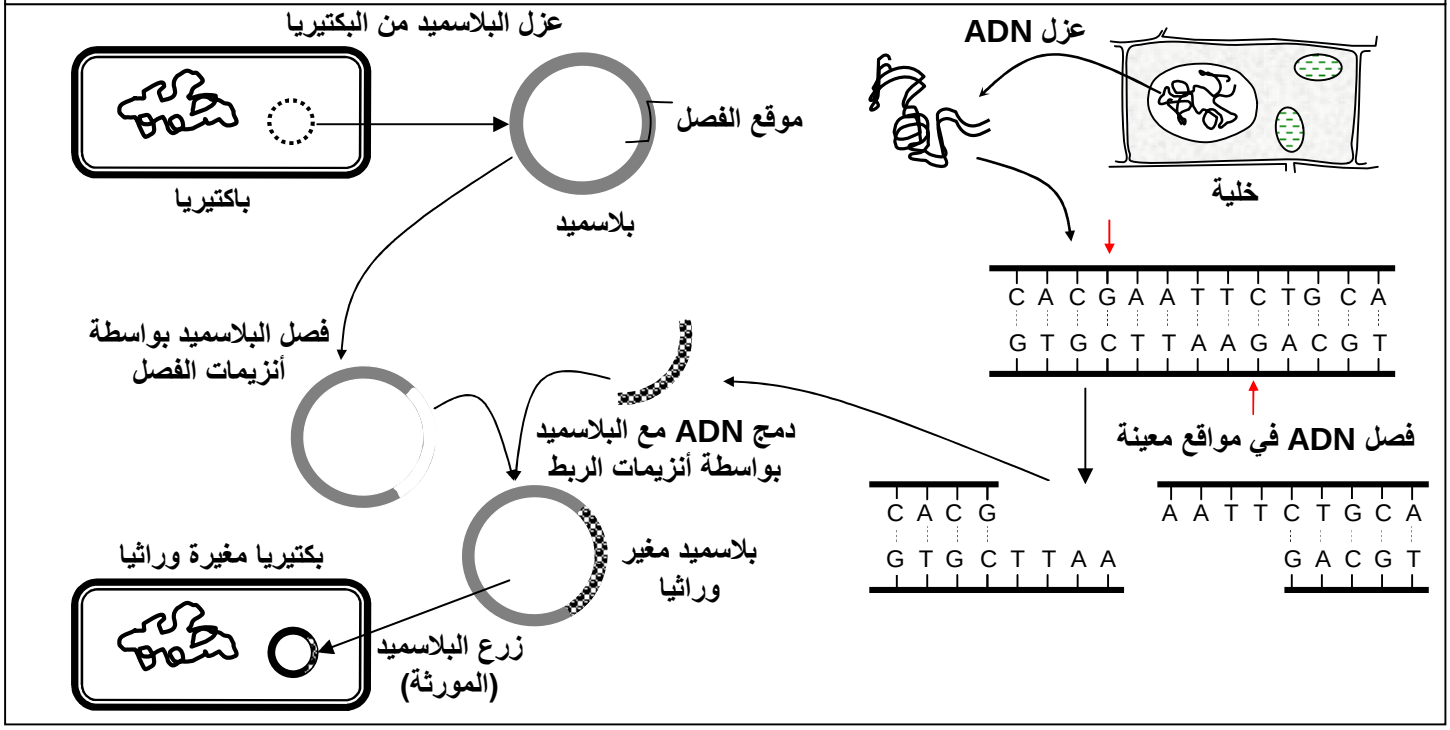
أ – عزل المورثة (جزء من ADN)

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.

✪ الوثيقة 1: نقل المورثة من خلية إلى بكتيريا

← مراحل نقل مورثة إلى بكتيريا Echérichia-Coli.



SCIENCES DE LA VIE et TERRE
SAFI HASSAN

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 اللمات إلى علب جديدة، فنحصل بذلك على عدة لمات بعضها يحتوي على البكتيريا المغيرة وراثيا.

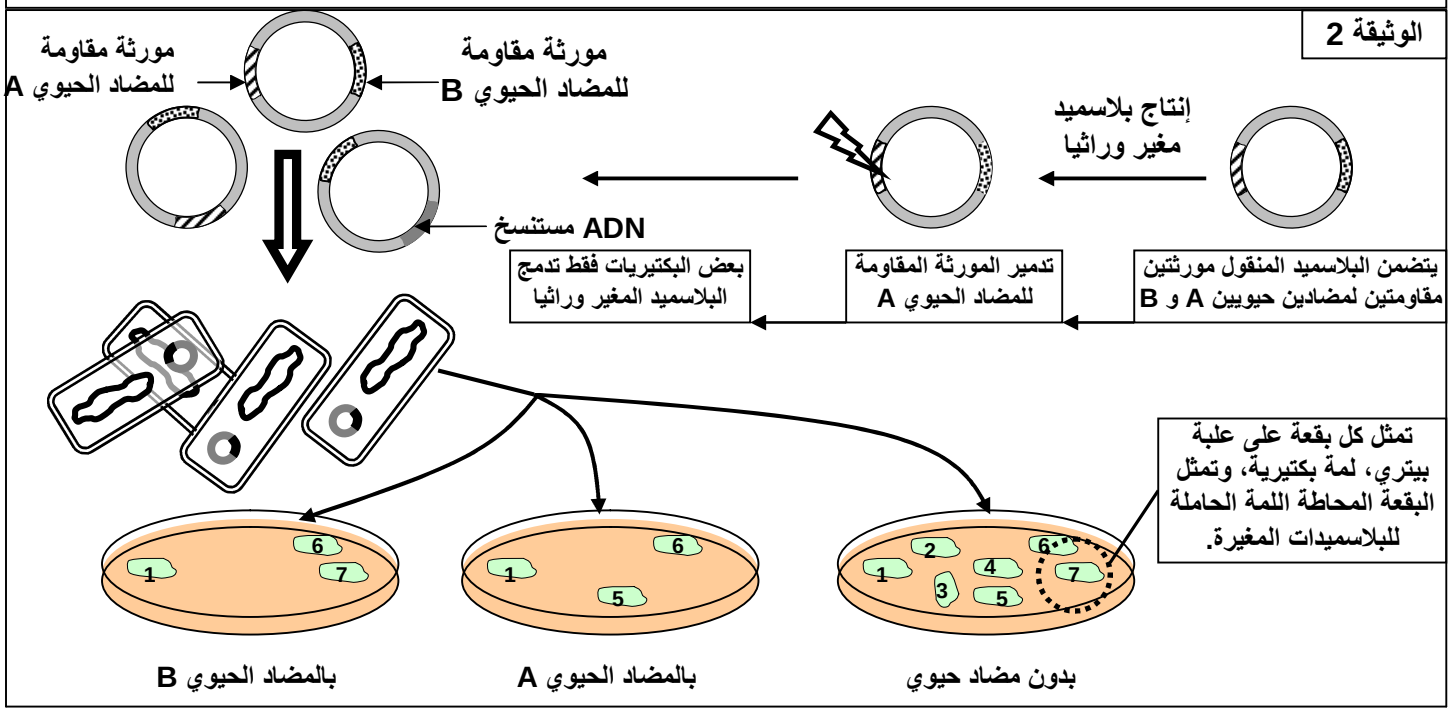
د – رصد البكتيريات المغيرة وراثيا. أنظر الوثيقة 2، لوحة 4.

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

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 ومقاومة للمضاد الحيوي B . وهكذا يتم رصدها باستعمال هذه المضادات الحيوية.

✪ الوثيقة 2: رصد البكتيريات المغيرة وراثيا



ه – 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 هجينة لم تكن موجودة من قبل في الطبيعة، قادرة على إنتاج بروتينات معينة مطلوبة.

III – أمثلة لتطبيقات الهندسة الوراثية.

① الإنتاج الصناعي للأنسولين Insuline أنظر نشاط 3 وثيقة 1، لوحة 4.

③ نشاط 3: أمثلة لتطبيقات الهندسة الوراثية.

✪ الوثيقة 1: 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 انطلاقا 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.
انطلاقا 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 :

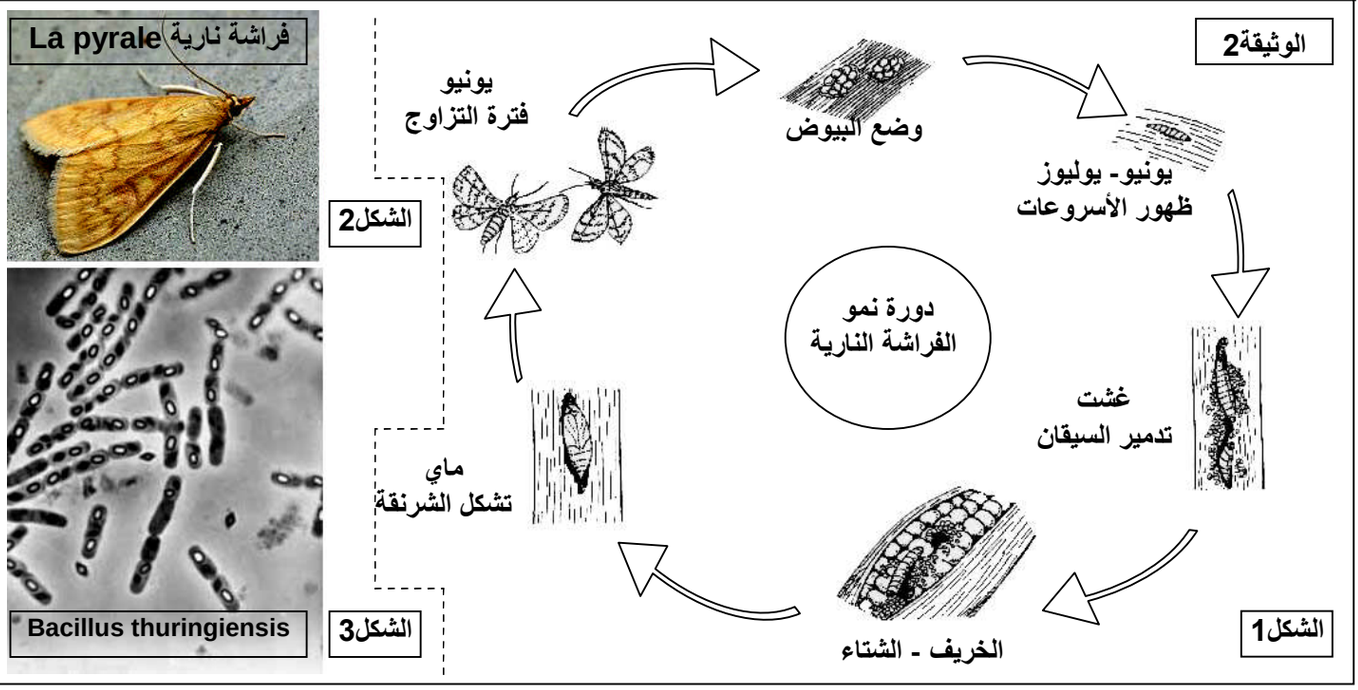
+ عزل الصبغي المتضمن للمورثة المعنية.
+ قطع ADN المراد استعماله بواسطة أنزيم الفصل.(تظهر على ADN المقطوع أطرافا موحدة).
+ استخراج البلاسميد (ناقل) من بكتيريا
+ قطع ADN البلاسميد بواسطة أنزيم الفصل. (يملك ADN البلاسميد المقطوع أطرافا موحدة، والتي تتكامل مع أطراف ADN البشري المعزول).
+ دمج المورثة على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

SCIENCES DE LA VIE et DE LA TERRE
SAFI HASSAN

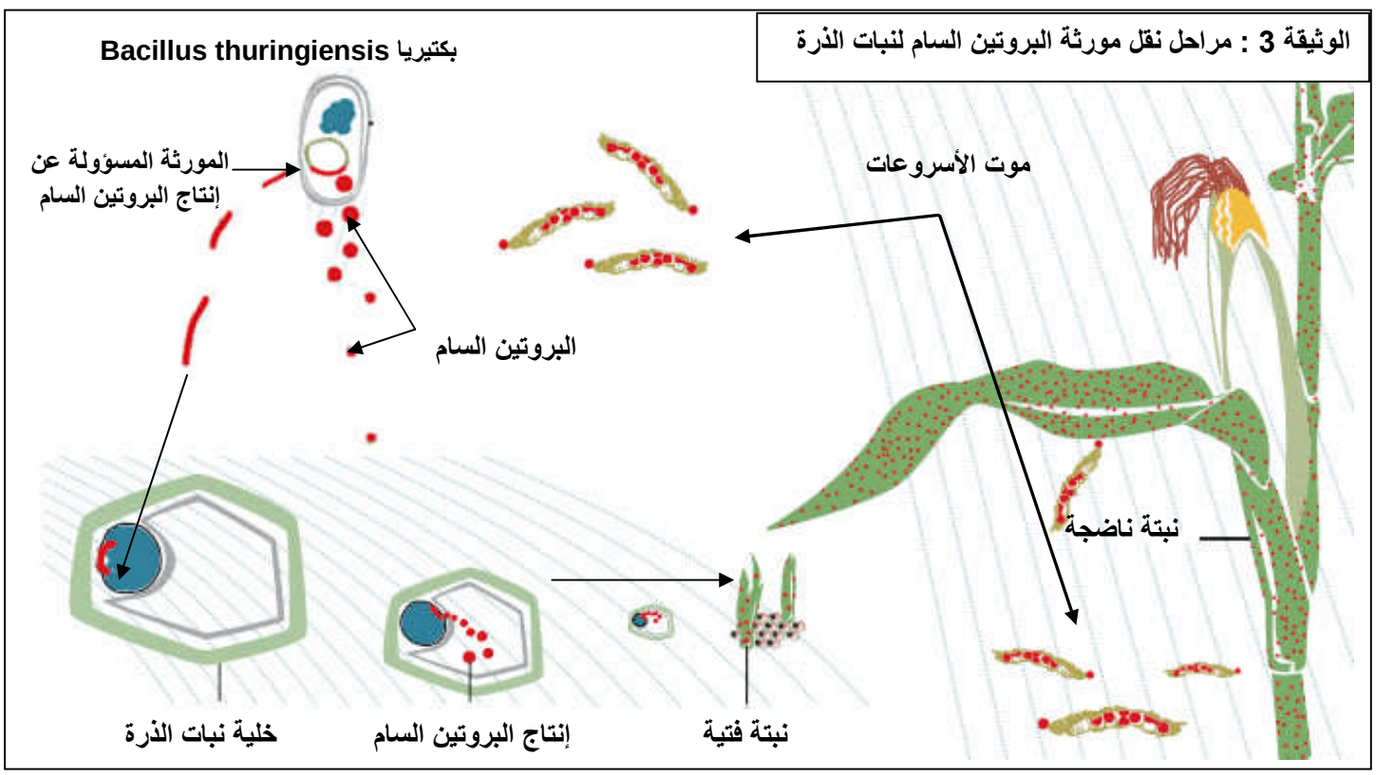
② نقل القدرة على محاربة الحشرات الضارة أنظر وثيقة 2، لوحة 5.

✪ الوثيقة 2: نقل القدرة على محاربة الحشرات الضارة.

تعتبر أسروعات الفراشات النارية (*Ostrinia nubilalis*) La pyrale du maïs ، 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 البكتيريات تدعى Bacillus thuringiensis تستطيع تركيب بروتين سام بالنسبة للأسروعات، وغير ضار بالنسبة للفقريات.



لمقاومة أسروعات 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 للأسروعات، ودمجه مع جينوم خلايا النبتة، فتصبح بذلك مقاومة للأسروعات.
تعطي الوثيقة 3 لوحة 6، مراحل نقل مورثة البروتين السام لنبات الذرة:



+ 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 نبتات مغيرة وراثيا.