مختبر ١٢

التحويل الوراثي Transformatio

يعني بالتغير الوراثي أن تكتسب الخلايا صفات وراثية جديدة عن طريق الحصول على جينات من خلايا بكتيرية أخرى ويكون ذلك بعدة طرق احدى هذه الطرق هي التحويل الوراثي transformation وهي عملية تحدث في الطبيعة بين الخلايا البكتيرية التي يكون بينها تطابق من حيث الوضع التصنيفي.

تتم عملية التحويل عندما تموت الخلايا و تتحلل ، ينتج عن ذلك خروج المكونات الخلوية و منها المادة الوراثية البكتيرية Bacterial genome عند تحرر DNA البكتيري يتم تجزأه الى عدة قطع ، كل قطعة تحتوي عدد من الجينات ، تحت ظروف معينة يمكن للخلايا الحية الموجودة في نفس الوسط البيئي ان تكتسب هذه القطع المتحرره من DNA الخلية الميتة و محاولة دمجها في مادتها الوراثية و بالتالي تكتسب صفات وراثية جديدة عند دخول قطع DNA المتحررة داخل الخلية المستقبلة ليس بالضرورة ان تندمج هذه القطعة بالمادة الوراثية للخلية المستقبلة في هذه الحالة تكون عملية التحويل غير ناجحة unsuccessful transformation، اما اذا كانت عملية التحويل ناجحه Successful transformation فيتم اندماج كامل القطعة مع المادة الوراثية للخلية المستقبلة و في بعض الاحيان يتم اندماج جين واحدة او اثنتين فقط و يتم تحلل بقية الجينات التي لم ترتبط مع DNA الخلية المستقبلة . تم التعرف على عملية التحويل من خلال التجارب التي قام بها العالم Griffith باستخدام سلالات من Streptococcus pneumoniae .

تجارب فريدريك جريفث Frederick Griffhth Experiments

درس الطبيب البريطاني جريفث عام ١٩٢٨م نوعا من البكتيريا *Streptococcus Pneumonia* التي تسبب مرض الالتهاب الرئوي Pneumonia للثديات حيث نمّى مستعمرات تلك البكتيريا في أطباق بتري، واستطاع التمييز بين سلالتين، تنتج إحداهما مستعمرات ملساء Smooth(S)، محاطة بغلاف أملس من السكريات المتعددة Polysaccharide capsule، وتنتج الأخرى مستعمرات خشنة Rough(R)، غير محاطة بغلاف، وهذه الطرز الظاهرية تورث. فعندما حقن جريفث سلالة البكتيريا (S) الحية في الفئران وجد أنها هي المعدية Pathogenic والمسببة لمرض الالتهاب الرئوي حيث ماتت الفئران، لكن السكريات المتعددة المكونة للمحفظة ليست هي سبب الالتهاب الرئوي. وعندما حقن الفئران بخلايا R الحية لم تمت الفئران. وعندما عاود جريفث حقن الفئران بخلايا S المقتولة بالحرارة لم تمت الفئران وعندما حقن جريفث الفئران بخليط من خلايا S التي قتلت بالحرارة مع خلايا R الحية (علماً أن كلاً منهما على حدة غير مميت للفئران) ماتت الفئران بالالتهاب الرئوي نتيجة الحقن بهذا الخليط. والغريب في الأمر أن جريفث وجد خلايا S حية في عينات دم الفئران الميتة، بالرغم من أن خلايا S الميتة هي التي حقنت في الفئران. وهذا يعني أن بعض خلايا R اكتسبت القدرة من خلايا S الميتة لعمل محافظ من السكريات المتعددة، وقد وجد أيضا أن هذه القدرة تورث، فعندما زرع جريفث خلايا S التي أخذها من الفئران الميتة، انقسمت وأنتجت خلايا ذات أغلفة، وتسمى هذه الظاهرة التي اكتشفها جريفث بظاهرة التحول البكتيري Transformation. وبالرغم من أن جريفث لم يعرف الطبيعة الكيميائية للمادة المتحولة، إلا أن ملاحظاته شجعت العلماء للبحث عن المادة الوراثية علماً أن استعماله للحرارة للقضاء على نشاط خلايا S أكد أن البروتين ليس المادة الوراثية؛ لأن الحرارة تتلف معظم البروتينات، كما أن المادة الوراثية لخلايا S المقتولة بالحرارة هي المسؤولة بطريقة ما عن تحويل خلايا R الحية إلى خلايا S الحية المميته.

تجارب آفري Avery وزميلاه:

تابع العلماء ما بدأه جريفث حول ظاهرة التحول فقد قام عالم البكتيريا الأمريكي أوسوالد آفري Oswald Avery وزميلاه ماكلين مكارتي Maclyn McCarty وكولن ماكلويد Colin Macleod عام ١٩٤٤م بتحديد مادة التحول في تجربة جريفث، حيث أعاد هؤلاء العلماء تجربة جريفث، فبعد قتل خلايا S بالحرارة، تخلصوا من البروتينات في هذه الخلايا بهضمها بإنزيمات محللة للبروتينات Protease، وكذلك تخلصوا من الرنا بهضمه بواسطة إنزيم Ribonuclease، ثم حقنوا الفئران بمزيج من الدنا المستخلص من خلايا S مع خلايا R الحيه، فوجدوا أن الفئران قد ماتت، وبذلك تأكد لديهم أن إزالة البروتين والرنا، لم تؤثر في عمليه التحويل البكتيري، وهذا يثبت أن المادة الوراثية في هذه الخلايا ليست بروتينا، ولا رنا، وإنما هي الدنا.

تجارب هيرشي وتشيس Hershy and Chase experiments

إن دنا الفيروس يستطيع برمجة الخلايا، فالفيروسات التي تصيب البكتيريا أو ما يسمى بآكلات البكتيريا(بكتيريوفاج) Bacteriophages أو الفاجات Phages محاطة بغلاف بروتينى وتستغل الأنظمة الحيوية للخلية البكتيرية لصالحها. ولقد أثبت العالمان آلفريد هيرشي Alfred Hershy ومارثا تشيس Martha Chase عام ١٩٥٢م أن الدنا هو المادة الوراثية للفاج T2، وهو أحد الفيروسات التي تصيب البكتيريا (*E.coli*)، حيث يلتصق T2 بواسطة أليافه الذيلية بالسطح الخارجي للخلية البكتيرية، ثم يحقن مادة الوراثية داخل خلية البكتيريا، التي لا تلبث أن تتضاعف وتنتج آلاف النسخ مما يؤدي إلى انفجار خلية البكتيريا وانحلالها، لتنطلق أعداد كبيرة من نسل T2 الجديدة. وبما أن T2 يتكون من غلاف بروتيني يحتوي على الكبريت دون الفسفور، ويحيط هذا الغلاف بالدنا الذي يحتوي الفسفور دون الكبريت، فإنه يمكن التفريق بين المادتين باستعمال النظائر المشعة Radioactive isotopes للفسفور والكبريت. فلقد قام العالمان بتنمية T2 على غذاء يحتوي نظير مشع للكبريت ^{35}S كعلامة مميزة للبروتين، والنظير الآخر للفسفور^{32}P كعلامة مميزة للدنا. وبهذا سيظهر الإشعاع الخاص بنظير الكبريت^{35}S مرتبطا بالبروتين فقط(الغلاف)، بينما يظهر نظير الفسفور ^{32}P في تركيب الدنا الجديد لـ T2 وليس في غلافه البروتيني. ثم سمحا للـ T2 بمهاجمة خلايا *E.coli*، وبعد فترة يلتصق T2 بجدار خلايا البكتيريا، ويحقن مادته الوراثية فيها، ثم قاما برج المزيج وفصل T2 عن جدار خلايا البكتيريا، وبعد ذلك تم فصل خلايا البكتيريا T2 بواسطة الطرد المركزي. وعند فحص الشعاع في خلايا البكتيريا المترسبة في الأنبوب، وجداها غنية بالإشعاعات الخاصة بالدنا (^{32}P) وعند فحص الإشعاع في المعلق وجدا أنها خاصة بالغلاف(^{35}S)، وهذا يدل على أن ما دخل من T2 إلى داخل خلية البكتيريا هو الدنا بينما بقي الغلاف خارج الخلية، وبهذا أثبت العالمان أن الدنا هي المادة الوراثة.

طريقة العمل:

<u>خطوة أ : إضافة الـ DNA البلازميدي للخلايا المؤهلة</u> **Step A**

١. **<u>تحضير الخلايا المؤهلة للقيام بعملية التحويل :</u>**

في داخل سلة الثلج يوجد أنبوب اختيار وبه خلايا مؤهلة (علم بالحرف C). افحص بأن السائل داخل أنبوب الاختبار قد صهر. إذا لم يصهر، اخرج أنبوب الاختبار من سلة الثلج لمدة قصيرة جداً قدر الإمكان.

٢. **تحضير أنابيب الاختبار :** تحت تصرفك أنبوبي اختبار يحتويان على DNA بلازميدي:
أنبوب الاختبار الأول الذي تم ترقيمه بـ DNAI والذي تم تحضيره في القسم الأول من التجربة.

أنبوب الاختبار الثاني الذي تم ترقيمه بـ + . أنبوب الاختبار هذا يحتوي على DNA بلازميدي مشابه للذي تم استخلاصه في القسم الأول من التجربة والذي تم شراءه من شركة تجارية.

إن الأنابيب موجودة داخل سلة الثلج. انقلها إلى حامل الأنابيب.

٣. **تحضير أنبوب اختبار بدون DNA (٠)**
- قم بترقيم أنبوب اختبار افيندورف إضافي بـ٠ وضعه في حامل الأنابيب. هذا الأنبوب سوف يمر بعملية مشابهة لأنبوبين الاختبار DNAI و+ ولكن بدون DNA.

٤. **إضافة محلول منظم ماء DDW:**
- أضف إلى أنبوب الاختبار المعلم بـ 0، 15 ميكروليتر من محلول ماء مقطر DDW.
- أضف إلى أنبوب الاختبار المعلم بـ + ،10 ميكروليتر من محلول ماء مقطر DDW .
- أضف إلى أنبوب الاختبار المعلم بـ DNAI، 5 ميكروليتر من محلول محلول منظم TE.

ملاحظة :كمية المحلول المنظم غير متساوية في أنابيب الاختبار الثلاثة والسبب في ذلك هو إن الحجم النهائي لكل محلول يجب أن يكون متساويا (٢٠ميكروليتر) وكمية الـDNA المضافة لكل أنبوب مختلفة .

السبب في الاختلاف في كميات الـDNA التي نضيفها إلى الأنابيب + وDNAI هو تركيز الـDNA. إن الـDNA الذي تم شراءه اكثر تركيزا من الـDNA الذي نستخلصه لذلك فإننا نخفف تركيزه باستخدام المحلول ماءDDW .

٥. **إضافة الخلايا إلى الـDNA :**
- ضع بطريقة معقمة لكل واحد من الأنابيب الثلاثة (٠ ,+, DNAI) 60 ميكروليتر من الخلايا المؤهلة (Competent cells).
- إخلط الأنابيب الثلاثة بلطف عن طريق نقرها بالإصبع. احذر من تكون فقاعات او انتشار الخليط على جدران الأنابيب.

خطوة ب:إدخال الـDNA للخلايا **Step B**

٦. **حضانة الخلايا في الثلج**
- ضع الأنابيب في حاملة دائرية تشبه القارب، وضع الأنابيب في الثلج لمدة 20 دقيقة.

في فترة الحضانة استمر قدر الإمكان في تنفيذ القسم ٢- تحضير عينات من اجل ترحيلها على الجل.

٧. **صدمة حرارية (Heat Shock)**:
- قرب سلة الثلج التي تحتوي على أنابيب الاختبار إلى حمام مائي بدرجة $42\ C^{\circ}$ درجة مئوية، وادخل أنابيب الاختبار إلى الحمام لمدة ٩٠ ثانية بالضبط.

٨. **تبريد (Cold Shock) :**

انقل حالا القارب الذي يحتوي على الأنابيب إلى الثلج وابقها لمدة ٦٠ ثانية بالضبط.

٩. **تعليق الخلايا في وسط النمو**

- أضف بصورة معقمة بجانب النار، 400 ميكروليتر من وسط نمو LB لكل أنابيب الاختبار.
- اخلط بلطف بواسطة النقر بالإصبع على جدار أنبوب الاختبار.

١٠. **نشاط الجين الذي يمنح صفة المقاومة ضد المضاد الحيوي امبسلين:**

- ادخل أنابيب الاختبار إلى "قارب". ثبت القارب بداخل لاقط دورق في حمام بدرجة 37°C درجة مئوية.
- ابقها بالداخل هز بسيط لمدة 15-30 دقيقة.