**نواقل الاستنسال : Cloning vectores**

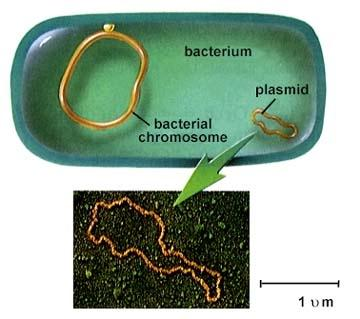
الاستنسال يعني إدخال قطعة الدنا الغريبة الى مضيف لايحتوي أصلا على مثل هذه القطعة بحيث يمكن ان تتضاعف وتتوارث بين الاجيال المتعاقبة .

تقسم نواقل الاستنسال المستخدمة في البكتريا الى اربعة انواع وهي :

1. البلازميدات .
2. الفيروس لامدا .
3. الفيروسات ذات خيط الـ DNA المفرد .
4. الكوزميدات .

**البلازميدات :**

عبارة عن قطعة دنا دائرية لها القابلية على التكرار المستقل عن كروموسوم المضيف وهي تتوارث بثبات على شكل قطع منفصلة عن الكروموسوم ,تنتشر البلازميدات بشكل واسع في البكتريا وهي تختلف في احجامها فمنها مايكون بحجم اقل من 1×10 دالتون في حين يزيد حجم البعض منها على 200×10 دالتون ,وهي غير ضرورية عادة لحياة المضيف الا ان وجودها قد يعطي صفات اضافية تمكنه من العيش تحت ظروف استثنائية .



تستخدم البلازميدات في الوقت الحاضر كنواقل استنسال ولكي يكون البلازميد ناقل نموذجي يجب ان تتوفر فيه الخصائص التالية :

1. ان يكون صغير الحجم ( اي ذا وزن جزيئي قليل )ىولهذه الخاصية فوائد عديدة هي :

ا-سهولة التعامل معه حيث تكون البلازميدا ت الصغيرة اكثر مقاومة للآضرار الناتجة عن عوامل التجزئة اثناء تحضيرها.

ب-تتواجد البلازميدات الصغيرة عادة بشكل متعدد النسخ مما يزيد من كفاءة عزلها كما يزيد من عدد نسخ الجين المستنسل فيها .

ج- تكون البلازميدات الصغيرة اكثر كفاءة بالدخول الى خلايا البكتريا ممايزيد من كفاءة الاستنسال .

1. يجب ان تكون خصائصه معروفة بشكل جيد بالنسبة لمواقع الجينات والمواقع الحساسة لأنزيمات القطع .
2. له القابلية على التكاثر السريع في المضيف المرغوب بحيث يمكن الحصول يمكن الحصول على كميات كبيرة وبسهولة من ناقل الاستنسال او الجزيئات المعاد دمجها .
3. إن يحتوي على صفة انتقائية يمكن على اساسها انتقاء الخلايا المتحولة مثل صفة مقومة المضادات الحياتية .

وتتميز البلازميدات عن غيرها من النواقل بعدد من الخصائص التي تجعلها ذات اهمية خاصة في نقل الجينات تتمثل في الاتي :

1. توجد بنسخ وحيدة او عديدة في البكتريا .
2. تتضاعف بشكل مستقل عن الكروموسوم البكتيري .
3. سهولة دراسة تركيب وتتابع النيوكلوتيدات في البلازميد .

**الفيروس لامدا:**

يعد الفيروس لامدا من اكثر فيروسات E.coli المدروسة من الناحية الوراثية لذلك ككان من الطبيعي ان تتجه الانظار نحوه لاستخدامه في تطوير نواقل استنسال ويمكن تقسيم النواقل المشتقة من فيروس لامدا الى نوعين رئيسين :

**نواقل الغرس : Insertion vectores**

والتي اشتقت عن طريق حذف قطعة كبيرة من المنطقة الوسطى للفيروس لامدا ومن ثم ربط الطرفين الايمن والايسر للـ DNA مع بعضهما .ويعتمد حجم قطع الدنا على حجم القطعة المحذوفة من كروموسوم الفيروس .

**نواقل الاستبدال:Replacement vectors**

والتي تحتوي على موقعين حساسين لانزيم قاطع معين يحيطان بقطعة دنا يمكن استبدالها خلال الاستنسال وتتميز هذه النواقل بقدرتها على استيعاب قطع كبيرة من الدنا مقارنة بالنوع اعلاه.

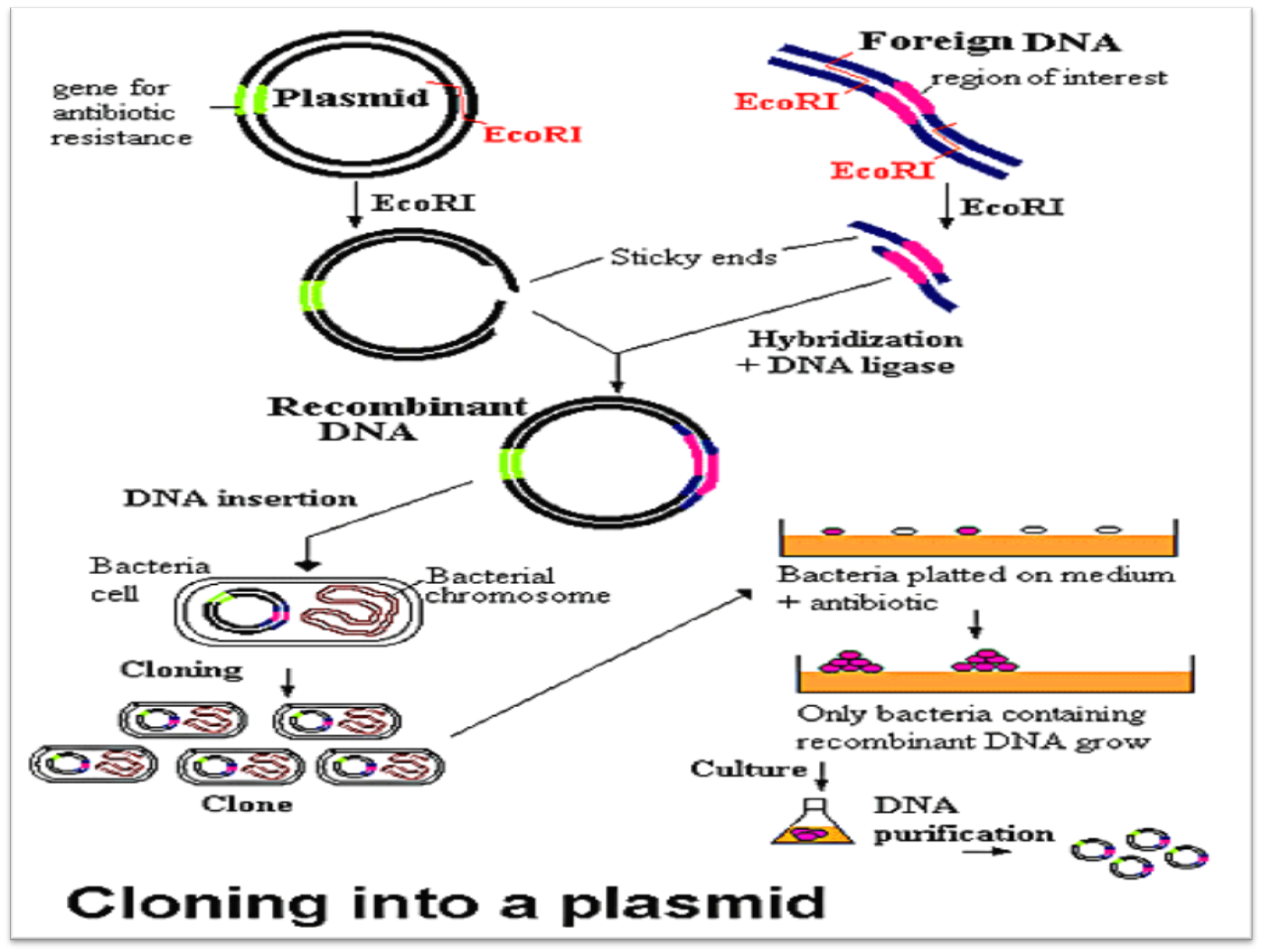
**الكوزميدات :**

وهي عبارة عن جزيئة هجينة مكونة من بلازميد يحتوي على موقع COS مشتق من الفيروس لامدا .وتستوعب هذه النواقل قطع كبيرة من الدنا تصل الى 40 كيلو زوج قاعدي .

**ادخال الـ DNA الى داخل بكتريا الـ E.coli بواسطة التحول Transformation :**

لوحظ في بداية السبعينيات ان خلايا الـ E.coli الموجودة في محلول ملحي مبرد اكثر كفاءة في اخذ الدنا مقارنة بغيرها .يتم تحضير محاليل كلوريد الكالسيوم بتركيز 50 ملي مولار بشكل تقليدي ويمكن استخدام محلول كلوريد الربديوم .

ان ميكانيكية الملح غير معروفة تماما ولكن من الممكن ان يسبب الملح (كلوريد الكالسيوم ) ترسيب جزيئات الـDNA خارج الخلية ومن المحتمل ان يسبب بعض التغيرات في الجدار الخلوي مما يشجع ارتباط الدنا معه .



**الاستنسال في الخمائر :**

لوحظ احتواء بعض سلالات الخميرة مثل Sacchromyces cerevisie على بلازميد طبيعي لاتعرف وظيفته على وجه التحديد ويبلغ طوله 2 ميكروميتر لذلك اطلق عليه 2µm plasmid وكان لاكتشافه اثرا في تطوير نواقل استنسال الخمائر.ان الطريقة المتبعة في تحويل خلايا الخمائر تعتمد على ازالة جدران الخلايا بواسطة انزيمات معينة لتكوين السفيروبلاست Spheroplast ( خلايا فاقدة لجدرانها بصورة غير كاملة ) حيث تتميز بقابليتها على اخذ قطع الدنا المضافة بمساعدة مادتي البولي ايثيلين كلايكول وكلوريد الكالسيوم وبعد دخول الدنا يتم اعادة تكوين بناء الجدار للخلايا من خلال تنمية السفيروبلاست في وسط زرعي خاص للحصول على خلايا متحولة طبيعية .

