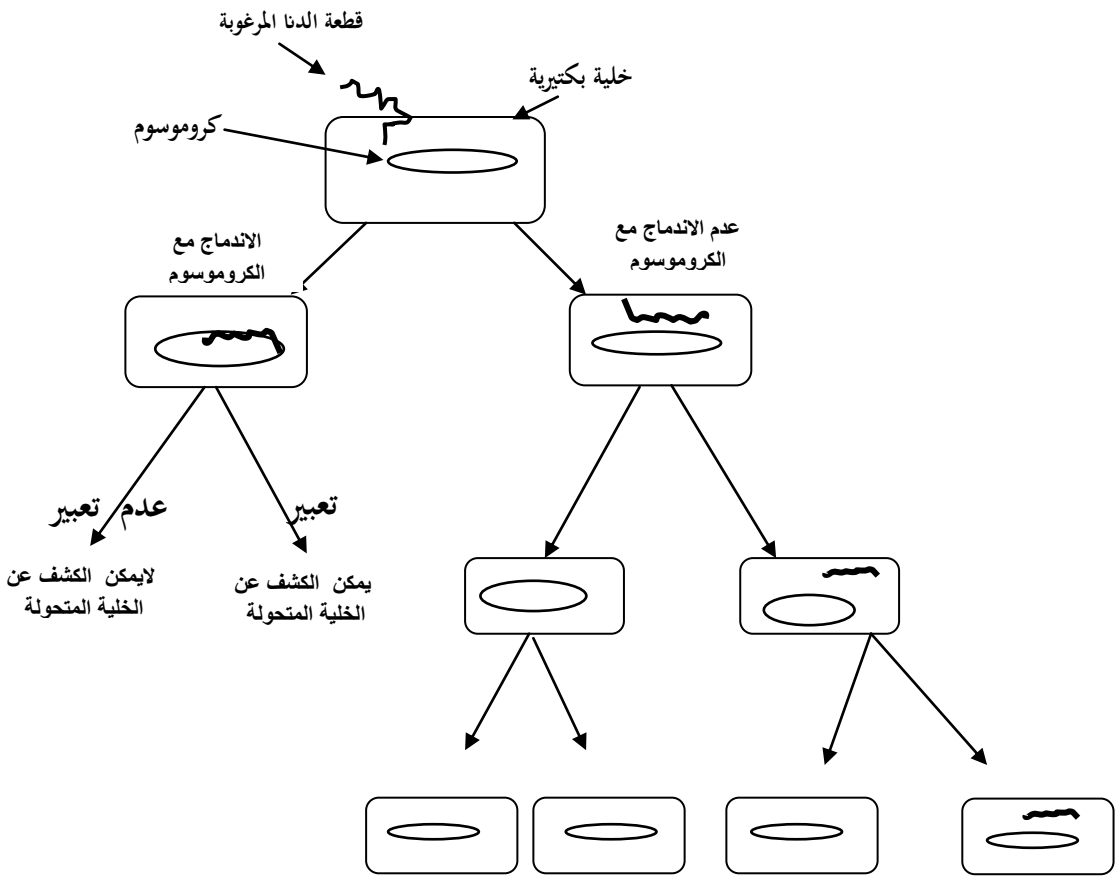
نواقل الكلونة Cloning Vectors:

ان الكلونة تعني ادخال قطعة دنا غريبة الى مضيف لا يحتوي اصلاً على مثل هذه القطعة بحيث يمكن لها ان تديم نفسها في المضيف الجديد وان تتوارث بين الاجيال المتعاقبة. كانت فكرة ادخال قطع دنا غريبة الى مضيف جديد تراود الباحثين ولفترة طويلة قبل تطور تقنيات الهندسة الوراثية.

وقد اجريت بالفعل الكثير من المحاولات لادخال قطع دنا غريبة الى خلايا حقيقية وبدائية النواة بواسطة التحول، الا ان معظم المحاولات كانت فاشلة اما سبب عدم ديمومتها في خلاي المضيف لعدم احتوائها على منشأ للتكرار، خاصة وان كروموسوم البكتريا و الفيروسات يحتوي على منشأ تكرار واحد. ان غياب منشأ التكرار يعني عدم تكرار قطعة الدنا الغريبة وبالتالي فقدانها خلال الانقسامات المتتالية لخلية المضيف، وحتى في حالة احتواء الدنا الغريبة على متشأ تكرار فقد لا يكون فعالاً في المضيف الجديد.



الشكل 1: الاحتمالات الناتجة عن دخول قطعة دنا غريبة الى خلايا البكتريا.

من الجدير بالذكر ان قطعة الدنا الغريبة الداخلة يمكن ان تديم نفسها احياناً في المضيف الجديد من خلال اندماجها في كروموسوم المضيف لتصبح جزءاً منه وتتكرر معه منتقلة من جيل الى آخر (الشكل

من كتاب مبادئ الهندسة الوراثية للمؤلف أ.د.غالب حمزة البكري- 1991

1). سيكون الكشف عن حدوث الاندماج في هذه الحالة معتمداً على قابلية الجين المرغوب على التعبير expression في الخلايا المتحولة واكسابها صفة جديدة، الا ان الجينات الغريبة غالبا ما تفشل في التعبير في مضايفها الجديدة بسبب خلل في عملية الاستنساخ او الترجمة، وحتى في حالة نجاحها في التعبير فأن موقع اندماجها في الكروموسوم سيكون مبهما.

ان عدم ديمومة الدنا الغريبة داخل المضيف كانت تمثل احد معوقات نجاح الكلونة، ولاجل التغلب على هذه المشكلة اتجه التفكير الى ربط الدنا الغريبة الى مكرر replicon مناسب قبل ادخالها الى المضيف، بحيث يمكنها التكرار والتوارث مع هذا المكرر خلال الاجيال المتعاقبة.

كان من البديهي ان تتجه الانظار ومنذ البداية نحو البلازميدات وبعض العاثيات لاستعمالها لهذا الغرض، لما هو معروف عن البلازميدات وبعض العاثيات مثل لامدا λ lambda قابليتها على التكرار المستقل عن كوموسوم البكتريا لاحتوائها على منشأ تكرار خاص بها.

تركز البحث ومنذ البداية على هذين النوعين من المكررات لاستعمالها كنواقل كلونة، ونتيجة لتطور تقنيات الهندسة الوراثية وتشعب البحوث في هذا المجال فقد اصبحت الحاجة ملحة لتطوير عدد كبير من النواقل لاختيار الناقل المناسب اعتمادا على نوع الكائن المضيف والغرض المطلوب من عملية الكلونة.

تقسم نواقل الكلونة المستخدمة حالياً للكلونة في البكتريا الى اربعة انواع هي:

1. البلازميدات .
2. العاثي لامدا.
3. الكوزميدات.
4. العاثيات ذات الخيط المفرد.

البلازميدات كنواقل كلونة Plasmids:

وهي عبارة عن قطع دنا دائرية لها القابلية على التكرار المستقل عن الكروموسوم المضيف وهي تتوارث بثبات على شكل قطع منفصلة عن الكروموسوم. تنتشر البلازميدات في خلايا البكتريا وهي تختلف في احجامها، فمنها ما يكون حجمه اقل من $1x10^6$ دالتون في حين يزيد حجم البعض منها على

$200x10^6$ دالتون. وهي غير ضرورية عادة لحياة المضيف الا ان وجودها قد يعطي المضيف صفات اضافية تمكنه من العيش تحت ظروف استثنائية، ومن اهم الصفات المحمولة على البلازميدات هي المقاومة للمضادات الحياتية وانتاج الهيمولايسن وتخمير السكريات ومقاومة المعادن الثقيلة وتكوين السرطانات في النباتات وغيرها من الصفات، علماً ان هناك الكثير من البلازميدات التي لا يعرف لها صفات مظهرية لحد الان، ولهذا يطلق على مثل هذه البلازميدات اسم البلازميدات الخفية cryptic plasmids.

بالنظر لوجود اعداد كبيرة من البلازميدات المختلفة، واستمرار اكتشاف بلازميدات جديدة فقد وضعت عدة تقسيمات من اجل تسهيل دراستها. تقسم البلازميدات اعتمادا على احد هذه النظم الى نوعين رئيسيين هما:

1. البلازميدات الاقترانية التي تحتوي على مجموعة من الجينات الناقلة transfere genes التي تسمى tra المحفزة لعملية الاقتران في البكتريا.
2. البلازميدات غير الاقترانية التي لا تحتوي على جينات tra وبهذا تكون البكتريا الحاوية عليها غير قادرة على بدء الاقتران.

وهناك نظام تقسيم يعتمد على عدد نسخ البلازميد الموجود في المضيف وبهذا تقسم الى :

1. البلازميدات المسترخية التي توجد في الخلية بعدد كبير من النسخ.
2. البلازميدات المتشددة وهي التي توجد بعدد محدد من النسخ.

وبصورة عامة لوحظ ان البلازميدات الاقترانية تكون ذات اوزان جزيئية كبيرة وتوجد بعدد محدود من النسخ، في حين تكون البلازميدات غير الاقترانية ذات اوزان جزيئية واطئة ولكنها بعدد كبير من النسخ في الخلية الواحدة. تستخدم البلازميدات في الوقت الحاضر بشكل واسع كنواقل كلونة حيث طورت انواع مختلفة منها لتكون ملائمة في تجارب الكلونة المختلفة. ولكي يكون البلازميد ناقل كلونة نموذجياً يجب ان تتوفر فيه الخصائص التالية:

1- ان يكون صغير الحجم (اي ذو وزن جزيئي قليل)، ولهذه الخاصية فوائد عديدة، اولها سهولة التعامل معه حيث تكون الصغيرة اكثر مقاومة للاضرار الناتجة عن عوامل التجزئة اثناء تحضيرها مقارنة مع الكبيرة الحجم مما يسهل عملية تحضيرها من خلايا المضيف، ثانيا توجد البلازميدات الصغيرة عادة بشكل مسترخي (اي متعدد النسخ) مما يزيد كفاءة عزلها كما يزيد من عدد نسخ الجين المكلون فيها، ثالثا تكون البلازميدات الصغيرة الحجم اكثر كفاءة في تحويل خلايا البكتريا مما يزيد كفاءة تجارب الكلونة، واخيرا فان صغر الحجم يقلل فرص وجود مواضع حساسة متعددة لانزيم التقييد الواحد.

2- ان تكون خصائصه معروفة بشكل جيد بالنسبة لمواقع الجينات ومواقع المواضع الحساسة لانزيمات التقييد، ومن المفضل ان يكون تتابع نيوكليوتيداته معروفاً.

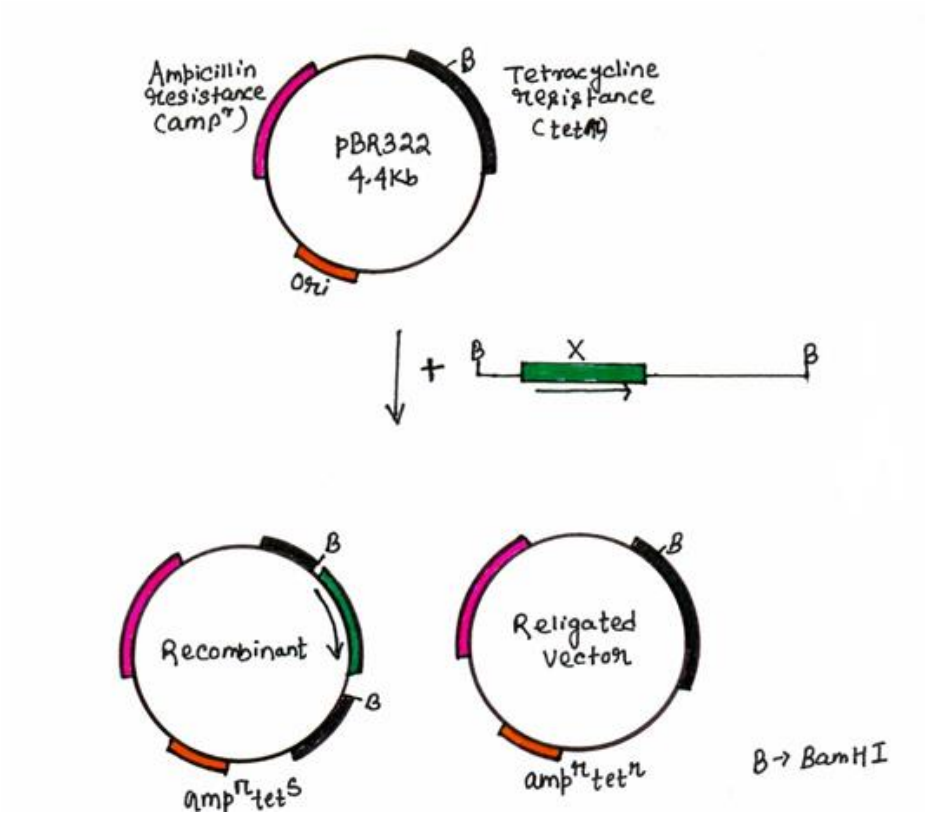
3- ان يكون له القابلية على التكاثر السريع في المضيف المرغوب بحيث يمكن الحصول وبسهولة على كميات كبيرة من الناقل المكلون او الجزيئات الهجينة الناتجة من عملية الكلونة.

4- ان يحتوي على صفة انتقائية يمكن على اساسها انتقاءالخلايا المتحولة، وهذه خاصية مهمة حيث يمكن من خلالها انتقاء الخلايا القليلة المستلمة للجزيئة الهجينة (ناقل الكلونة مع الجين الغريب) وتمييزها عن العدد الهائل من بقية خلايا المزرعة التي لم تستلم مثل هذه الجزئية. فاذا كان ناقل الكلونة يحمل صفة المقاومة لاحد المضادات الحياتية مثلا فسيكون سهلا في هذه الحالة انتقاء الخلايا المتحولة عن طريق زرعها على وسط يحتوي على المضاد الحياتي الذي يمنع نمو كل خلايا المزرعة عدا التي تحتوي على الجزيئات الهجينة.

5- ان يحتوي على صفة انتقائية ثانية يمكن تثبيط فعاليتهاعن طريق غرس قطعة الدنا المكلونة في وسط الجين المسؤول عن هذه الصفة، وتسمى العملية التثبيط بالغرس insertional inactvation (الشكل 2)، حيث يحتوي البلازميد الناقل على صفتين مظهريتين هما المقاومة للتتراسايكلين (TC)

من كتاب مبادئ الهندسة الوراثية للمؤلف أ.د.غالب حمزة البكري- 1991

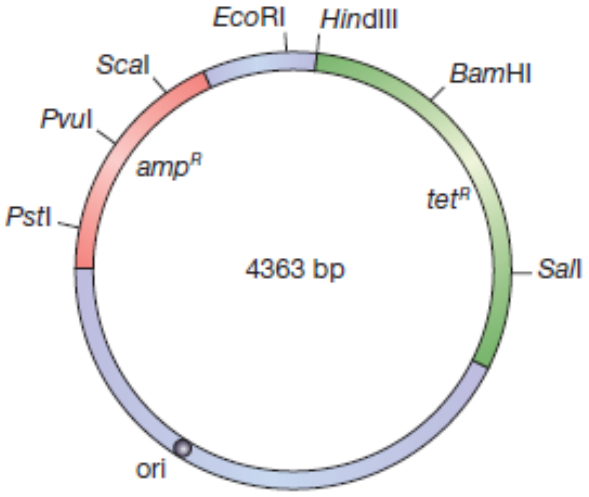
وللامبسيلين (Ap) كما يحتوي على موضع حساس مفرد لانزيم BamHI ثم تخلط القطع مع بعضها بوجود انزيم لايجيز الدنا لاتمام عملية اللصق.



الشكل 2: عملية التثبيط بالغرس

ان الجزيئات الناتجة يمكن ان تكون على شكلين، الاول هو تكوين بلازميدات هجينة ناتجة عن غرس الدنا في وسط جين المقاومة للتتراسايكلين مما سيؤدي الى تثبيط فعالية هذا الجين اي ستصبح البلازميدات حساسة للتتراسايكلين ومقاومة للامبسيلين. اما الشكل الثاني فهو تدوير البلازميد المقطوع بدون ارتباطه بالدنا الغريبة مما يعيد تكوين جين المقاومة للتتراسايكلين ويصبح البلازميد مقاوما للامبسيلين و للتتراسايكلين، وبذلك يصبح من السهل تفريق الخلايا المستقبلة للبلازميدات الهجينة عن الخلايا المستلمة للبلازميدات المتدورة.

6- ان يحتوي على مواضع حساسة مفردة لعدد كبير من انزيمات التقييد (الشكل 3) مما يوفر حرية كبيرة في كلونة انواع مختلفة من جزيئات الدنا المقطوعة بانزيمات تقييد مختلفة، ومن المفضل ان تكون بعض هذه المواضع الحساسة المفردة واقعة في تتابع الجينات المسؤولة عن الصفات الانتقائية لكي يمكن اجراء عملية التثبيط بالغرس.



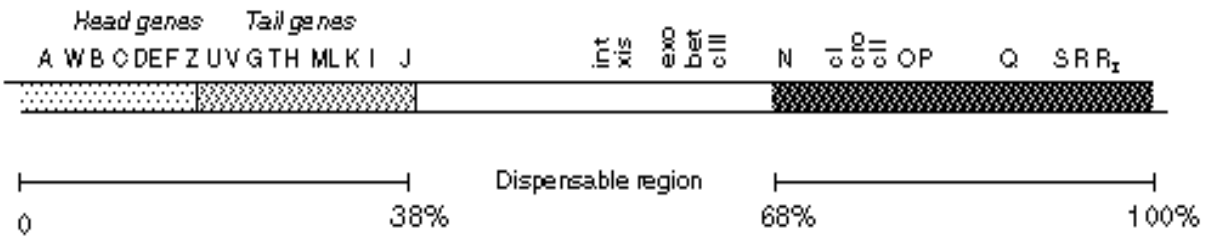
الشكل 3: المواضع الحساسة لانزيمات التقييد.

تشتق معظم نواقل الكلونة البلازميدية المستخدمة في الوقت الحاضر من بلازميدات E.coli اي ان لها القابيلة على التكرار في هذه البكتريا. ولاجل استخدامها في مختلف اهداف الكلونة لابد من تطوير عدد من النواقل لتسهيل عملية الكلونة وزيادة كفاءتها. وقد تم بالفعل وخلال السنين المتلاحقة تطوير عدد كبير من نواقل الكلونة التي تتميز باحتوائها على كل الصفات الواجب توفرها في ناقل الكلونة الجيد.

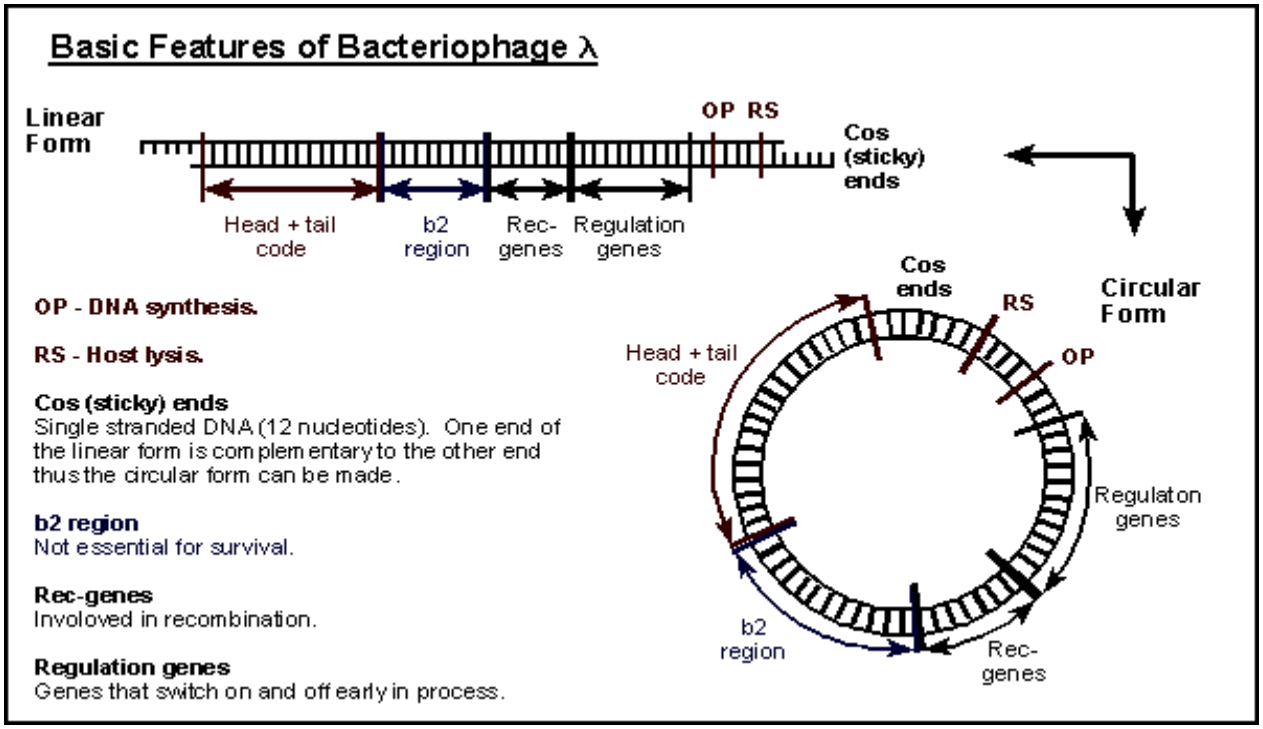
العاثي لامدا كناقل كلونة لبكتريا E.coli:

يعد العاثي لامدا من اكثر عاثيات E.coli المدروسة من الناحية الوراثية مما ادى الى تراكم معلومات وفيرة عنه وخاصة على المستوى الجزيئي، لذا كان من الطبيعي ان تتجه الانظار نحوه لاستخدامه في تطوير نواقل كلونة لبكتريا E.coli.

ان دنا العاثي لامدا بشكلها الطبيعي عبارة عن جزيئة مزدوجة الخيط يبلغ طولها حوالي 48.5 كيلو زوج قاعدي، وقد حددت تتابع قواعده بالكامل وتتصف باحتوائها على نهايات لاصقة، حيث يوجد في كل نهاية نتوء قصير لاحد الخيطين مكون من 12 نيوكليوتيد وان تسلسل القواعد النتروجينية لهذين النتوئين مكملان لبعضهما وعند دخول دنا العاثي الى خلية المضيف ترتبط النهايات اللاصقتان ببعضهما لتكوين ما يعرف بموضع اللصق او موضع كوس cohesive (cos)site مما يجعل جزيئة الدنا الخطية تأخذ الشكل الدائري داخل المضيف. يوضح (الشكل 4) الخارطة الكروموسومية للعاثي لامدا حيث يلاحظ تجمع الجينات المرتبطة وظيفيا في مواقع معينة من الخارطة وان الجينات الموجودة على يسار الخارطة تشفر لبروتينات الرأس والذيل لجزيئة العاثي، اما الجينات الواقعة في وسط الخارطة فتكون مسؤولة عن عملية اعادة الارتباط recombination وعملية التحلحل lysogenization التي تنغرس خلالها دنا العاثي الدائرية في كروموسوم المضيف وتتكرر معه على شكل عاثي اولي prophage اما الجينات المتجمعة في يمين الخارطة فتكون مسؤولة عن تنظيم عمل الجينات gene regulation ومناعة العاثي الاولي للاصابة الفوقية super infecation وتخليق الدنا وتنظيم الوظائف المتأخرة late fuction regulation وكذلك تحليل خلية المضيف. اظهرت الدراسات ان معظم المنطقة الوسطى للخارطة الكروموسومية لا تكون ضرورية لنمو العاثي، وبهذا فان ازالتها او استبدالها بقطعة اخرى لا يؤثر كثيرا على قابليته للاصابة والنمو.



!Error



الشكل 4: الخارطة الكروموسومية للعاثي لامدا

ان الدنا الطبيعية للعاثي لامدا لا تصلح بحد ذاتها ان تكون ناقل كلونة مناسب لوجود مشكلتين اساسيتين كان لابد من تجاوزها قبل ان يمكن استخدامها وهما:

1- صغر حجم الدنا التي يمكن كلونتها في العاثي الطبيعي:

اوضحت الدراسات انه بالامكان زيادة طول دنا العاثي الطبيعية بمقدار 3 كيلو زوج قاعدي فقط الى طولها الاصلي البالغ 49 كيلو زوج قاعدي اذا اريد لها ان تعبأ بكفاءة في رأس العاثي. وتمثل هذه زيادة حوالي 5% من طول الدنا الطبيعية، وبعبارة اخرى ان اقصى طول قابل للتعبئة في رأس العاثي 52% كيلو زوج قاعدي مما يعني تحديد طول الدنا المكلونة لا يزيد عن 3 كيلو زوج قاعدي.

من كتاب مبادئ الهندسة الوراثية للمؤلف أ.د.غالب حمزة البكري- 1991

2- وجود مواضع حساسة متعددة لانزيمات التقييد الشائعة:

تحتوي دنا العاثي لامدا على مواضع حساسة متعددة لمعظم انزيمات التقييد الشائعة الاستعمال، وهذا يعني ان معاملتها بأي من هذه الانزيمات سيؤدي الى تقطيعها الى قطع صغيرة يصعب ربطها معا مرة اخرى وبنفس الترتيب عند اضافة لايجيز الدنا مما يعني عدم امكانية استعمال هذه الانزيمات في كلونة الدنا الغريبة.

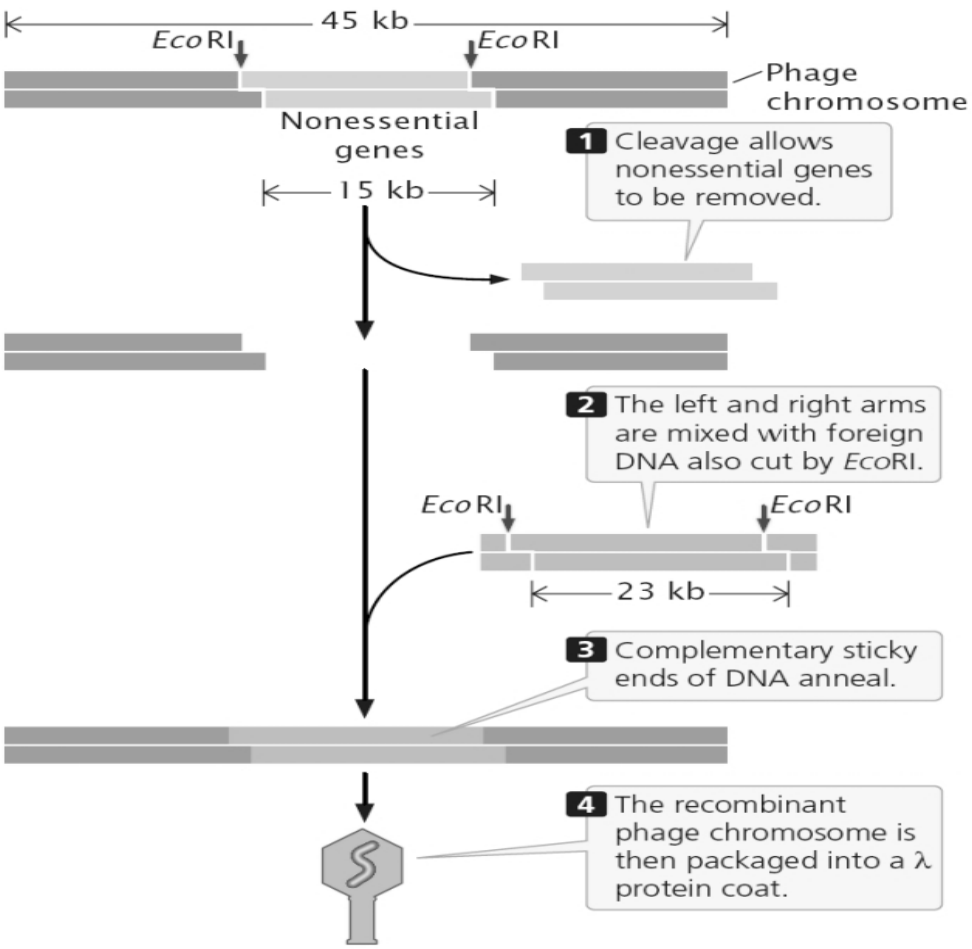
فلابد من تجاوز هذه المشاكل ليصبح بالامكان استخدامه كناقل للكلونة، وقد تم تجاوز المشكلة الاولى باستغلال المعلومات المتوفرة عن الطبيعة الجزيئية لهذا العاثي، وكما ذكر انفا ان حذف المنطقة الوسطى من الخارطة الكروموسومية لا يؤثر على فعاليته في الاصابة والنمو وبهذا سيؤدي حذف هذه المنطقة الى اختزال حجمه بحوالي 15 كيلو زوج قاعديمما يعني امكانية كلونة دنا غريبة يصل طولها الى حوالي 18 كيلو زوج قاعدي دون ان يزداد طول الدنا عن الحد المسموح به لعملية التعبئة، علاوة على ذلك فأن جينات المنطقة الوسطى هي المسؤولة عن عملية التحلحل وان حذفها سيجعل العاثي غير قادر على الاندماج مع كروموسوم البكتريا مما يعني دخوله الدورة التحللية فقط. وهذا بحد ذاته صفة مرغوبة في الناقل حيث تنتفي الحاجة في هذه الحالة لأتباع وسائل خاصة لحث induction العاثي الاولي على الخروج من الكروموسوم والدخول في الدورة التحللية.

اما بالنسبة لتعدد المواضع الحساسة لانزيمات التقييد فقد اتبعت عدة وسائل للحصول عل عاثيات طافرة فاقدة لبعض هذه المواضع بحيث تصبح ملائمة لعملية الكلونة، فقد استخدمت طريقة الانتخاب الطبيعي للحصول على لامدا طافرة فاقدة لمواضع E.coRI غير المرغوبة. تحتوي دنا لامدا الطبيعية على خمسة مواضع حساسة لانزيم E.coRI ولاجل اختزال عدد هذه المواضع استخدم العاثي الطبيعي في اصابة سلالة E.coli تحتوي على الانزيم E.coRI مما ادى الى تحطم الغالبية العظمى من دنا العاثيات الداخلة بواسطة هذا الانزيم، الا ان عدداً قليلاً من هذه العاثيات قد نجح في مقاومة الانزيم

وأكملت الدورة بتحليل المضيف. ان مثل هذه العاثيات ستكون عاثيات طافرة فاقدة لواحد او اكثر من مواضع E.coRI وفي حالة استعمال هذه العاثيات الطافرة لاصابة نفس المضيف مرة بعد اخرى سنحصل في النهاية على عاثي لكل او معظم المواضع الحساسة لهذا الانزيم. يمكن تقسيم نواقل الكلونة المشتقة من العاثي لامدا الى صنفين رئيسيين هما:

1- نواقل الغرس Insertion vectors:

اشتقت هذه النواقل عن طريق حذف قطعة كبيرة من المنطقة الوسطى لدنا العاثي لامدا، ومن ثم اعادة ربط الطرفين الايمن والايسر للدنا مع بعضهما. تحتوي هذه النواقل على موضع حساس مفرد لانزيم تقييد واحد على الاقل يمكن غرس الدنا الغريبة فيه، ويعتمد حجم قطع الدنا المكلونة في هذه النواقل على حجم قطعة الدنا المحذوفة من كروموسوم العاثي (الشكل 5).



الشكل 5: نواقل الغرس المشتقة من العاثي لامدا

2- نواقل الاستبدال replacement vectors:

يحتوي هذا النوع من النواقل على موضعين حساسين لانزيم تقييد معين يحيطان قطعة دنا يمكن استبدالها اثناء الكلونة بقطعة الدنا الغريبة، وغالبا ما تحتوي القطعة القابلة للاستبدال على مواضع حساسة لانزيم تقييد آخر بحيث يمكن تقطيعها اثناء عملية الكلونة الى عدة قطع صغيرة وذلك لمنع غرسها مرة اخرى اثناء عمليات الربط بانزيم لايجيز الدنا. تتميز نواقل بقدرتها على استيعاب قطع كبيرة من الدنا المكلونة مقارنة بنواقل الغرس، ويتم انتقاء النواقل الهجينة على اساس حجم جزيئات الدنا الناتجة من عملية الربط. فالنواقل غير الهجينة (التي لاتحتوي على دنا غريبة) ستكون اصغر حجما من الحد الادنى المطلوب

لاتمام عملية التعبئة في رأس العاثي، وهذا يعني ان جميع الاصابات المتكونة تكون ناتجة عن جزيئات العاثي الهجينة.

الكوزميدات cosmids كناقل كلونة:

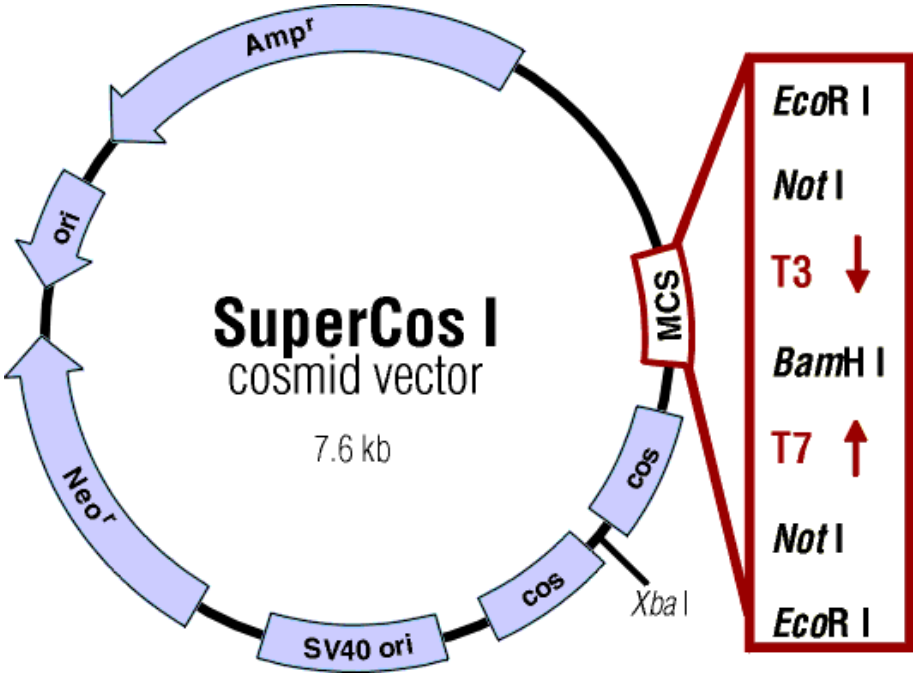
تتميز نواقل الكلونة المشتقة من العاثي لامدا بقابليتها على استيعاب دنا غريبة كبيرة الحجم قد يصل طولها مثلا الى 23 كيلو زوج قاعدي، في حين يبلغ معدل الطول المكلون في البلازميدات 5 كيلو زوج قاعدي اما النواقل المشتقة من العاثي M13 فيبلغ معدل طول الدنا التي يمكن استيعابها حوالي 3 كيلو زوج قاعدي (الجدول 1).

الجدول 1: اطوال القطع الممكن كلونتها مع نواقل الكلونة المختلفة

Vector	Targeting Fragment Length
Plasmid	0~10 kb
Replacement λ vector	9~23 kb
Insertion λ vector	0~10 kb
Cosmid	33~44 kb
P1 phage	70~100 kb
YAC	0.2~2.0 Mb

ان قابلية النواقل المشتقة من لامدا على استيعاب قطع دنا كبيرة جعلها مفضلة في عملية بناء بنوك الجينات (مكتبات) الجينات gene bank وخاصة من الكائنات حقيقية النواة، فكلما زاد حجم الدنا المكلون في الناقل قل عدد الكلونات clones المطلوبة لبناء بنك الجينات.

الكوزميد جزيئة هجينة مكونة من بلازميد يحتوي على موضع كوس cos المشتق من العاثي لامدا ومن هنا جاء الاسم كوزميد لها القدرة على نقل قطع اكبر من 23 كيلو زوج قاعدي، ويحتوي تتابعه على صفة مظهرية واحدة على الاقل علاوة على منشأ التكرار ومواضع حساسة لعدد من انزيمات التقييد (الشكل 6).



الشكل 6: الخارطة العامة للكوزميد

استناداً الى ما جاء اعلاه فان نجاح الكلونة في الكوزميدات يتطلب غرس قطع دنا كبيرة الحجم بحيث تصبح المسافة الفاصلة بين موضعي كوس للجزيئة الهجينة ضمن الحد المسموح به للتعبئة 37–52 كيلو زوج قاعدي، وهذا يعني ان الكوزميدات هي نواقل كلونة متخصصة باستيعاب قطع دنا مرغوبة كبيرة الحجم قد يصل طولها الى 40 كيلو زوج قاعدي مما يجعلها اكثر ملائمة من نواقل لامدا لبناء بنوك الجينات.

<u>العاثي M13 ناقل للكلونة:</u>

تتطلب بعض تقنيات الهندسة الوراثية مثل تحديد تتابع النيوكليوتيدات DNA sequencing لقطع الدنا المكلونة او تطفير خارج الخلايا in–vitro mutagenesis ، ان تكون الدنا المكلونة على شكل خيط مفرد وليس حلزوناً مزدوجاً. ولاجل استخدام الدنا المكلونة في البلازميدات او النواقل المشتقة من دنا لامدا لابد من معاملتها بمعاملات خاصة ومعقدة لتحويلها الى خيوط مفردة ملائمة لمثل هذه التقنيات، لذلك

من كتاب مبادئ الهندسة الوراثية للمؤلف أ.د.غالب حمزة البكري- 1991

عمد الباحثون الى ايجاد نواقل كلونة اكثر ملائمة من تلك السابقة واتجهت الانظار نحو مجموعة من العاثيات المتشابهه وهي عاثيات القولون الخيطية filamentous coliphages التي تتألف من العاثيات M13, fd, f1 .

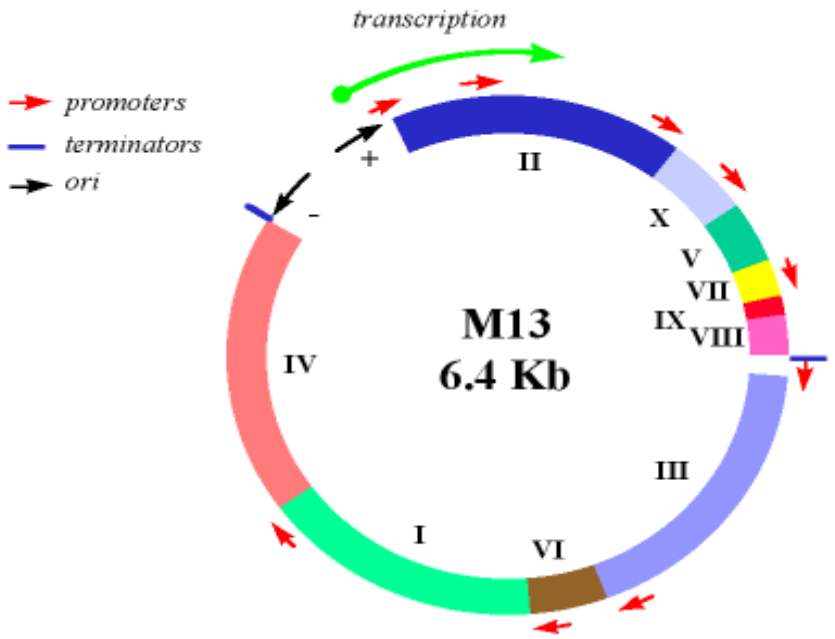
تتصف هذه المجموعة بعدد من الصفات المرغوب فيها التي لا تتوفر في النواقل الاخرى وهي:

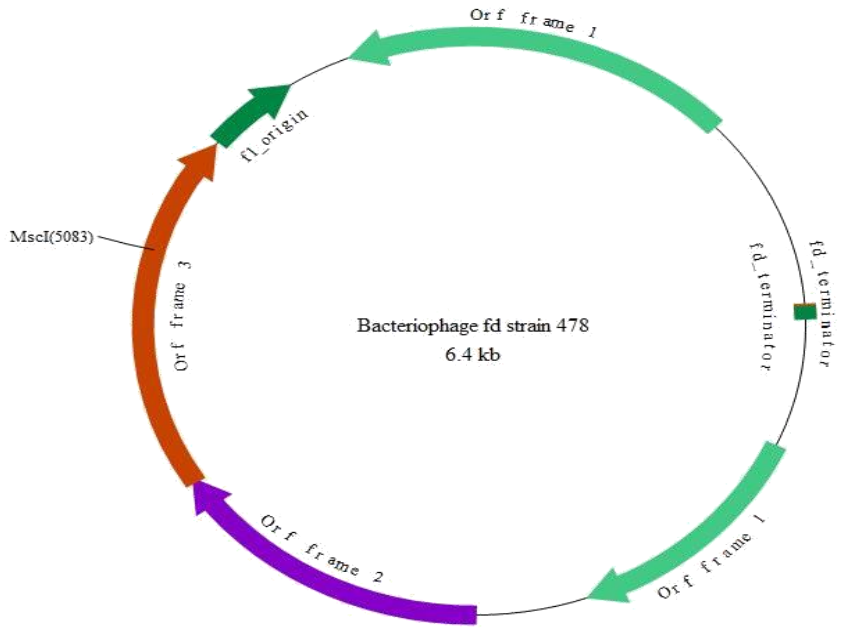
1- تحتوي هذه العاثيات على جزيئة دنا دائرية مفردة الخيط وصغيرة الحجم يبلغ طولها 6.4 كيلو زوج قاعدي، وقد اظهر تحديد التتابع النيوكليوتيدي لدنا العاثيين M13 و fd انهما متماثلان تقريباً حيث بلغت نسبة التشابه بينهما 97% كم ظهر ان العاثي f1 متشابه جدا للعاثيين M13 و fd.

2- توجد دنا هذه العاثيات على شكلين اعتمادا على الظروف المحيطة، فتكون في الشكل الاول عبارة عن خيط مفرد داخل بروتين العاثي، اما الشكل الثانيفهو ثنائي الخيط ويطلق عليه اسم الشكل المتكرر replicative form (RF) ويظهر عند دخول العاثي الى خلية المضيف، تتصرف دنا العاثي بشكلها المتكرر مثل البلازميد تماما ويمكن عزلها بسهولة من الخلايا المصابة واستعمالها كناقل وكأنها بلازميد. وتدخل جزيئاتها الهجينة الى خلايا المضيف بطريقة التحول بالعاثي.

3- يمكن استخدام الخيط المفرد لدنا العاثي كناقل كلونة، وفي هذه الحالة يتم الحصول على الجينات المكلونة بشكل خيط مفرد مما يجعلها مناسبة للاستعمال مباشرة لاغراض تحديد تتابع النيوكليوتيدات او التطفير خارج الخلايا.

4- على عكس العاثي لامبدا، لا يوجد حد اعلى لطول جزيئة الدنا الممكن تعبئتها في الغلاف البروتيني للعاثي. وقد تمكن بعض الباحثين من تعبئة جزيئة الدنا يبلغ طولها ستة اضعاف طول دنا العاثي M13 .





من كتاب مبادئ الهندسة الوراثية للمؤلف أ.د.غالب حمزة البكري- 1991