الفصل الأول:

جولات مع التفاعل المتسلسل للبوليميريز PCR وتطبيقاته

الجولة الأولى:

جولة مع ... التفاعل المتسلسل للبوليميريز (PCR) واستخداماته:

تمهيد:

تفاعل الـ PCR هو تقنية بيولوجية للتكاثر الجزيئى لاستنساخ الجينات، وهو يعتمد على استغلال ظاهرة التكامل بين القواعد النيتروجينية على جديلتى الدنا الوراثى ويستفاد منها فى مجالات عديدة وبخاصة فى:

١ـ فى مجال البصمة الوراثية: وللتعرف على المجرمين وعلى الجثث المشوهة للقتلى فى الحوادث والحروب والزلازل. وسيكون لنا معها لقاء.

٢ـ فى مجال عمل اللقاحات والتطعيمات الجينية ضد الأمراض المعدية: وسنعرض أمثلة موضحة لذلك فيما بعد.

٣ـ فى مجالى الفحوص الوراثية والكشف عن الأمراض المعدية:

حيث ثبت نجاحه فى سنة ١٩٩٤م فى اختبارات للكشف عن العديد من الأمراض سواء وراثية... أو عن الأورام ـ بل وقطع باب الشك باليقين بها. وفى مجال الأمراض المعدية مثل استخدامه كتحليل ضرورى لاكتشاف الفيروسات ومعرفة نوع سلالة الفيروس مثل الفيروس {C}، وفيروس {الإيدز}... وذلك فى وقت مبكر.. وبالنسبة لفيروس الإيدز فإنه يستخدم هذا الاختبار للكشف عن الفيروس مباشرة من عينة مأخوذة من دماء الأشخاص الذين أُصيبوا بالعدوى ولم تظهر عليهم الأعراض بعد (أو للتأكد من عدم حدوث عدوى لديهم). وبالتالى يفيد فى سرعة تقديم العلاج وتحسن حالة المرضى لحد كبير.

وفى مصر:

يُذكر أن هذا الاختبار يستعمل منذ فترة ليست بالقصيرة.. ومن بين مَنْ أبرزوا أهميته د. «ألفت جميل شاكر» [أستاذ مساعد الكيمياء الحيوية بطب قصر العيني] والتى نالت جائزة الدولة التشجيعية لتقدمها بأربعة أبحاث عن استخدام اختبار PCR فى مجال الأمراض المعدية مثل الالتهاب الكبدى الوبائى C، والدرن، والزوائد الورمية الموجودة فى رحم بعض السيدات، وأمكن استخدامه فى تشخيص بعض الأورام السرطانية ونقص بعض الجينات وثبت نجاحه ودقته.

وأكد الكثير من أطبائنا على ضرورة الكشف عن إنزيمات الكبد وعمل تحاليل PCR الكمى فى حالة الإصابة بمرض الفيروس الكبدى الوبائى - (بعدما ثبت نجاحه)؛ وهذا الفيروس يُعد من أخطر الفيروسات التى تصيب الكبد وينتج عنها تلف خلايا الكبد إذا أُهمل علاجه، وينتقل عن طريق الدم وأمواس الحلاقة وأدوات علاج الأسنان غير المعقمة جيداً أو أثناء العمليات الجراحية. وباستخدام اختبار PCR يتم ملاحظة الفيروس وتمييز وتشخيص نوع السلالة بدقة والكشف عن كم الفيروس فى الدم ومدى قدرته على التكاثر، وبذلك يمكن التحكم فيه ومتابعة حالة المريض منذ البداية وتحديد العلاج المناسب ... وتم فى المركز القومى للبحوث فى مصر العمل على تصميم وسائل تشخيصية صناعية لهذا الفيروس تصلح لعمليات المسح التشخيصى السريع فى بنوك الدم والمعسكرات وبذلك تقل نسبة حدوث العدوى عن طريق الدم.. وبالنسبة للفيروس "C" يُذكر أنه تم التوصل لمعرفة خمس سلالات وفى مصر نجد أشهرها Type 4 وعن طريق اختبار PCR يتم التمكن من معرفة أى سلالة فيروسية أو نمط من هذه السلالات الخمسة هو الذى أُصيب به المريض.

وللعلم فإنه عند عدم معرفة السلالة الفيروسية وتحديدها بدقة وإعطاء العلاج المناسب؛ نجد أنه لا يصلح ولا يؤثر فى الفيروس أى علاج آخر وسيظل المريض يعانى من شدة الآلام وفتك الفيروس به لدرجة تصل لوفاة الكثيرين متأثرين بذلك لذا فبمعرفتنا والتشخيص الدقيق للسلالة المصاب بها المريض عن طريق اختبار PCR فإنه يؤدى لإعطاء علاج مناسب يقضى على المرض فوراً بإذن الله.

لم تنته بعد المجالات التى يستخدم فيها تفاعل (PCR). فهناك المزيد مثل استخدامه لمقارنة الدنا الوراثى للحيوانات وفى مجال التصنيف النباتى وغيرها...

مع كل ما سبق وعن قصة ابتكار تفاعل الـ PCR وفكرة عمله وعمل المجس المناسب وكيفية إجراء هذا التفاعل وتطبيقات متنوعة لاستخدام هذا التفاعل والبصمة الوراثية... مع كل ذلك سنقضى وقتنا فى هذه الجولة فمعنا ... عزيزنا القارئ

أولاً: المقصود باختبار الـ "PCR":

الـ PCR هى اختصار الجملة "Polymerase chain reaction" وهى تعنى: التفاعل المتسلسل للبوليميريز.. أو تفاعل البلمرة المتسلسل.. أو تفاعلات إنزيم البلمرة المتسلسل.

وتقنية (تفاعل) الـ PCR فى غاية الحساسية وتؤدى إلى إنتاج (تصنيع) الدنا معملياً، ويسمى بتفاعل البلمرة لاحتوائه أساساً على إنزيم بلمرة. ويتم فى هذه التقنية استغلال ظاهرة التكامل بين القواعد النيتروجينية على جديلتى الدنا الوراثى، ويُستفاد منها لتكبير وتطويل بادئ من جزء صغير من الدنا، ولإنتاج (أو لاستنساخ أو لإكثار) عدد هائل يبلغ الملايين ـ بل البلايين من نسخ تتابع دناوى أو جين «يهمنا، أو مطلوب» ـ خارج الجسم الحى ـ (أى دون اللجوء إلى الكلونة Clonning باستخدام خلية حية وذلك فى غضون ساعات قليلة لا تتجاوز ٣ ـ ٤ ساعات، حتى أن عشرين دورة من التسخين والتبريد أثناء التفاعل تنتج أكثر من مليون نسخة من الجين.

وفى حالة إكثار التتابع الدناوى (المطلوب) فإن تفاعل الـ PCR يمكنه ذلك من عينات غاية فى الضآلة من چينوم أى كائن حى.

ثانياً: قصة هذا الابتكار:

فى إبريل من عام ١٩٨٣م كان كارى ماليس "Kary Mallis" فى نزهة فى ليلة قمرية فى كاليفورنيا وتساءل : لماذا لا يتم تصنيع الحامض النووى DNA فى المعمل مثل باقى المركبات والجزيئات البيوكيميائية، وفى هذه الليلة تخيل تفاعل البلمرة

المتسلسل (PCR)، وفى اليوم التالى قام بتغيير منهج البيولوچيا الجزيئية الذى يقوم بتدريسه.

وفكرة تضاعف الـ DNA فى المعمل باستخدام PCR سهلة ولكنها متداخلة وغير عادية، وفى عام ١٩٨٥م [وهناك مراجع تذكر أنه عام ١٩٨٦م]، تم نشر أول بحث عن هذا التفاعل على يد كارى ماليس (أو ماليست) وآخرين "Malliset'al," [فى شركة تسيتوس ببيركلى - كاليفورنيا]. ومن بعدها والبحوث فى زيادة مستمرة، وفى عام ١٩٨٩م اختارت مجلة ساينس "Science" تفاعل الـ PCR كأكبر حدث علمى واختارت «إنزيم Taq Polymerase" كجزىء العام، وفى عام ١٩٩٣م حصل {Karry} على جائزة نوبل فى الكيمياء تقديراً لأهمية هذا الاكتشاف فى خدمة البشرية. ومن خلال تعليق بعضهم على هذا الحدث.. فلقد ورد على لسانه:

"It is diffcult to think of life without it" وعموماً فإن تفاعل الـ PCR هو طريقة معملية لتكبير (تضاعف - إكثار) جزىء معين من الحامض النووى DNA دون اللجوء إلى استخدام البكتيريا كما فى إكثار الچين سابقاً.

ثالثاً: فكرة عمله (فى حالة الشك بالإصابة بأمراض مُعدية):

نجد أن الباحث بعد تمكنه من أخذ عينة من المريض فى بداية المرض - [ويكفى أن تكون هذه العينة نقطة دم على سن إبرة أو مسحة لعاب]. وبدخول هذه العينة للجهاز الخاص باختبار PCR وبضغطة زر يتم الكشف عن أى كمية من الفيروس حتى إذا كانت كمية الميكروب غاية فى الضآلة. وللعلم فلم يكن بالإمكان من قبل مهما تم الاستعانة باختبارات سابقة أن يتم الكشف عن الفيروس أو البكتيريا الممرضة أو الطفيل المتسبب فى المرض ومن عينة ضئيلة للغاية ومن خلال الاختبار يتم مضاعفة المادة الوراثية للميكروب حتى يصل إلى ٣٠ جيل من المادة الوراثية خلال ٣ ساعات مما يسهل من عملية التعرف بسهولة، ويتم إجراء عملية تكبير ونسخ لهذا التسلسل للمادة الوراثية. ويتم تفريق شريطى الدنا الوراثى فى منطقة الچين ثم تعريضها للمسبار.

رابعاً ـ أهمية عمل المسبار أو المجس الوراثى المناسب [للكشف عن الميكروب فى تفاعل الـ PCR]:

يمكن للباحثين من خلال معرفتهم للتركيب الجينى للميكروب أن يصنعوا «مجسات» وهى تحتوى على جزيئات غير كاملة من الحمض النووى للميكروب المطلوب البحث عنه وتشخيصه سواء أكانت مادة الميكروب الوراثية من الرنا الوراثى أو الدنا الوراثى.. ثم يتم تعريض هذا المسبار (المجس) للدنا الوراثى الموجود بالعينة.. وإذا تلامس هذا المجس مع شريط الدنا المفرد الموجود بالعينة المراد فحصها [ولو كانت تحتوى على الميكروب مثل فيروس مُعْدٍ] ـ فإن الحامض النووى للفيروس الموجود بعينة المريض سوف يتكامل مع جزيئات [القواعد الآزوتية] للحامض النووى للمجس ـ [بعد أن تم تكبيره كما سنعرف عما قليل] ـ فإننا نجد أن طرفى الشريط الوراثى يتكاملان ويتعلق الشريط كالسوستة وهو دليل على وجود الميكروب المعنى، ويمكن وسمه بمادة مشعة أو مضيئة.

ويتم الكشف عن الترابط بين القواعد الآزوتية للمسبر والقواعد الآزوتية من خلال التصوير الإشعاعى والذى يُظهر هذه الترابطات فى صورة فقط غامقة. وبالتالى كان هذا دليلاً على أن الشخص مصاب بالميكروب.

خامساً: عمل مجسات وراثية للكشف عن الأمراض الوراثية:

تطور الأمر كثيراً بعد عمل مجس وراثى للكشف عن مرض هنتنجتون لتتزايد المجسات الدناوية للكشف عن أمراض وراثية أخرى بعد أن عرفت مواقع چيناتها على الكروموسومات، وعرفت تتابعاتها؛ من بينها مرض التليف الكيسى، ومتلازمة ليش نيهان، ومرض تاى ساكس، ومتلازمة س الهش. ونتوقع أن يستمر العمل لمعرفة وظيفة كل چين ، والجدير بالذكر أن عدد الچينات يبلغ حوالى ٢٢ ألف چين فقط يحمل جنس الإنسان منها ما يقرب من سبعة آلاف چين؛ أى ثلث چيناتنا يمكن أن يسبب أمراضًا وراثية!! أصبح من الممكن الآن للمرأة التى تشك فى احتمال أن يكون الجنين الذى تحمله مصاباً بهذا المرض الوراثى أو ذاك؛ فى أن تختبر دنا الجنين بالمجس الملائم فتعرف . والمجس الدناوى لا يتطلب إلا قدراً ضئيلاً للغاية من دنا

الجنين. وهناك الآن تقنية تؤخذ فيها خميلة واحدة من الخمائل المشيمية ـ بروز واحد من البروزات الإصبعية الشكل الناتئة من الأنسجة الجنينية التى تتخلل رحم الأم وتكون المشيمة ـ وذلك بعملية يمكن أن تتم فى عشر دقائق لا أكثر دون تخدير. والجنين عمره لا يتجاوز الأسبوع. توفر مثل هذه الخميلة من دنا الجنين ما يكفى لاستخدام المجسات الوراثية لكشف ما قد يوجد به من جينات معيبة. ومعنى هذا أنه قد أصبح فى مقدور المرأة أن تعرف فى المراحل الأولى من الحمل إن كان الجنين مصاباً بالمرض الوراثى الذى تخشاه أم لا.

سادساً: فكرة تقنية الـ PCR [الطريقة التى تعمل بها]:

تعتمد على حقيقة أننا إذا سخَّنا محلولاً من الدنا، انفصلت جديلتا اللولب المزدوج إذ لا يربطهما سوى روابط هيدروجينية بين القواعد المكملة على السلسلتين، [مما يمكننا من استغلال الجدائل المفردة التى تنتج عند تسخين الدنا المزدوج الجديلة كقوالب لتمثيل جدائل جديدة] وإذا ما بُرِّد المحلول شكل الدنا ثانية لوالب مزدوجة والتتابعات المكملة تجد بعضها بطريقة غاية فى الدقة. مع العلم بأن كل ذلك يتم فى وجود إنزيم بوليميريز مناسب.

ويتطلب إجراء التفاعل أن يتم توفير ظروف مماثلة تماماً لعملية نسخ وتضاعف الـ DNA داخل الخلية فيجب إضافة مكونات التفاعل الأساسية وهى:

(أ) عينة من الدنا:

حيث يبدأ تفاعل البوليميريز المتسلسل بعينة من الدنا، من أى طول، نعرف أنها تحمل فى مكان ما الجزء الوراثى الهدف (المطلوب).

(ب) طليعتان Primers (المسبران):

لو كان الهدف من التفاعل هو لإكثار الجين فيتطلب الأمر تصنيع جديلتين قصيرتين من الدنا ويتراوح طول هذين التتابعين القصيرين ما بين عشر وثلاثين نيوكليوتيدة، وكل واحدة من هاتين الطليعتين تكمل تتابعاً نعرف أنه موجود على إحدى السلسلتين، فى مكان ما على يسار المقطع الهدف، والأخرى تكمل تتابعاً على

السلسلة الأخرى إلى اليمين. (بمعنى أن الطليعتين يحدان الجين أو التتابع المطلوب تكثيره من الجانبين). ويوضع هذان المسبران (الطليعتان)، واللذان يُطلق على أى منهما اسم الطليعة Primer – فى محلول مناسب ومعهما عينة الدنا، ويجرى تحضير أعداد وفيرة منها .. (من الطليعتين) ـ بجهاز مخلق الدنا DNA synthesizer، أما فى حالة تكبير الدنا فيستخدم بادئ (شريط مفرد من الـ DNA) معروف تتابع قواعده ولا يزيد طوله عن ٢٠ نيوكليوتيدة بدلاً من الطليعتين.

٣ـ قدر وافر (كبير) من النيوكليوتيدات (DNTD).

٤ـ إنزيم بلمرة دنا (بوليميريز دنا DNA Polymerase):

حيث يقوم بتحفيز عملية نسخ الدنا، بأن يقوم بتجميع النيوتيدات على قالب الدنا template، ويلزم أن يكون مقاوماً للحرارة (يتحمل الحرارة)، لذا يُفضل استخدام إنزيم بوليميريزتاك "taq" Polymerase المأخوذ من بكتيريا ثرموس أكواتيكس Thermus aquaticus وهى بكتيريا مائية محبة للحرارة، وحتى يقوم هذا الإنزيم بدوره فى إضافة القواعد النيتروجينية وربطها معاً حتى يتكون الخيط المكمل، فإن هذه العملية تتم عند درجة حرارة ٧٢°م وهى الدرجة المثلى للحصول على أعلى كفاءة لإنزيم البوليميريز وتُعرف بدرجة حرارة التمديد "extension temperature" وهى لا خلاف عليها ولكن الاختلاف هو فى زمن فترة التمديد، حيث يستطيع هذا الإنزيم إضافة ٦٠ قاعدة فى الثانية عند درجة ٧٢° م وبالتالى فعند استخدام تفاعل PCR فى عملية تكبير أجزاء الدنا الوراثى يلزم معرفة أو توقع نواتج التكبير إذا كانت ذات حجم كبير (1.2kb) فإن الزمن المثالى هو ٤٠ ثانية، وإذا كانت أقل من (500bp) فإن ٣٠ ثانية هو وقت كاف.

٥ـ محلول مناسب:

[وهو محلول منظم مناسب لعمل الإنزيم «lox buffer» ويبدأ فيه التفاعل ليحوى الدنا الذى يحمل الجين المراد تكثيره، وبه وفرة من الطليعتين ومن القواعد النيتروجينية الأربعة [أ، ث، س، ج]، وإنزيم Taq polymerase 1، وتتوفر به درجة الحامضية والقاعدية المناسبتان لعمل الإنزيم.

٦. توفير درجات الحرارة المناسبة وجهاز "PCR":

ويتم توفيرها من خلال تحضين أنابيب التفاعل في جهاز "PCR". وهو جهاز يشبه إلى حد كبير الحمام المائي حيث يقوم برفع درجة الحرارة حتى ١٠٠ْم في وقت قصير ثم يستطيع التبريد وخفض درجة الحرارة حتى صفر درجة مئوية وذلك حسب البرنامج المخزن مسبقاً في الجهاز.

ويتأثر تفاعل البلمرة المتسلسل بعدة عوامل منها [نذكر منها خمسة عوامل] وهي:

١. نوع الجهاز {PCR}:

فالنوع الجيد من أجهزة الـ PCR يجب أن تتميز بسرعة الوصول إلى درجة الحرارة المطلوبة في أقل وقت ممكن بمعنى عندما تكون درجة حرارة الجهاز ٩٢ْم "denaturing"، والخطوة التالية هي "annealing" [٣٥ْم] فإن هبوط درجة الحرارة من ٩٢ْم وحتى ٣٥ْم يجب أن يتم بأسرع ما يمكن والعكس وتعرف هذه الخاصة {ramp}، ويجب تزويد الجهاز بغطاء متصل بالحامل الذي تحضن فيها أنابيب التفاعل block أو بديل وهو نقطة من زيت معدني "minearal oil".

٢. درجة حرارة التفكيك أو التكسير denaturing temperature:

فلأنه من المهم أن يتحول خيط الـ DNA المزدوج إلى خيوط مفردة وذلك بتكسير الروابط الهيدروجينية ويحدث ذلك عند درجة ٩٢ْم وهي التي تعرف بدرجة حرارة التفكيك denaturing temperature، وهناك من الباحثين من يفضل تحضين الـ DNA {Template DNA} على درجة ٩٥ْم لمدة عدة دقائق للتأكد من أن كل الخيوط قد تحولت إلى خيوط مفردة.

٣. تعرف البادئ على التتابع المكمل له على خيط الـ DNA المفرد {Primer annealing}:

فعند خفض درجة الحرارة إلى ٣٥ْم {annealing temperture} فإن البادئ يتعرف على التتابع المكمل لتتابع نيوكليوتيداته على أشرطة الـ DNA المفردة ويرتبط بها [تتكون الروابط الهيدروجينية مرة أخرى] وإذا خفضت درجة الحرارة أكثر من

٣٠ْم ففي هذه الحالة يحدث ارتباط بين البادئ وأى جزء من خيط الـ DNA المفرد والذى ليس بالضرورة أن يكون مكملاً لتتابع البادئ بنسبة ١٠٠٪. ومن المعلوم أن اختيار درجة حرارة {annealing temp} يعتمد على نوع البادئ والغرض من تفاعل البلمرة.

٤ـ تطويل البادئ Primer extension:

وهى هامة فى حالة استخدام التفاعل فى تكبير أجزاء من الحامض النووى (RAPD)، فبعد أن يرتبط البادئ بالتتابع المكمل له على شريط الـ DNA المفرد فإن هذه المنطقة تُعرف بمنشأ التضاعف "Origin of replication" ويبرز هنا دور إنزيم البوليميريز الذى يقوم بإضافة القواعد النيتروجينية وربطها معاً حتى يتكون الخيط المكمل ونكون فى النهاية قد أتممنا تصنيع خيط مزدوج وتتم هذه العملية عند درجة حرارة هى ٧٢ْم وهى الدرجة المثلى للحصول على أعلى كفاءة للإنزيم. وتعرف بدرجة حرارة التمديد "extension temperature".

٥ـ تركيز إنزيم البوليميريز، والقواعد والبادئ وحامض الـ DNA الهدف:

ملخص طريقة العمل:

يتم تسخين المحلول أولاً إلى درجة ٩٥ْم ويبقى هكذا لمدة دقيقتين ثم يتم تبريده إلى ٣٠ْم ويضاف إنزيم البلمرة. وبعد دقيقتين تكرر دورة التسخين والتبريد. فى كل مرة يُسَخَّن المحلول تتفسخ اللوالب المزدوجة (تنفصل جديلتا الدنا)، فإذا ما برد بردت ـ عندئذ يلتصق مسبرا الدنا (الطليعتان) بجدائلهما المكملة، يبدأ إنزيم البلمرة فى العمل (بعد التبريد) فيقوم بنسخ منطقة الدنا بين المسبرين (الطليعتين) وفيها المقطع الهدف، وتعمل كل من جديلتى الدنا حديثى التخليق بعد ذلك كقالب لجديلة أخرى، وعند التسخين والتبريد مرة ثانية يتفسخ كل شىء مرة أخرى ـ لكن المحلول عند التبريد هذه المرة سيحمل ضعف عدد النسخ من الدنا ذى المسابر، وبذلك يتضاعف عدد الجدائل مع كل دورة. وبعد عشرين دورة مثلاً سيكون مقطع الدنا الذى يحمل الهدف قد تضاعف مليون مرة.

ولقد اعتبر تفاعل PCR المتسلسل هو أكثر التقنيات الجديدة ثورية فى

البيولوجيا الجزيئية في عقد الثمانينات لما يتميز به كإجراء مباشر وسريع للكلونة دون خلايا.

ولقد قامت شركة سيتوس بتسجيل براءة العملية، ثم باعت البراءة في صيف ١٩٩١م إلى شركة هوفمان ـ لاروس بمبلغ ٣٠٠ مليون دولار.

استخدامات متعددة للـ PCR

١ـ يستخدم فى الكشف عن وجود تتابع محدد فى عينة دنا.

٢ـ فى التكبير العشوائى للحامض النووى - Rondomly Amplified play morphic DNA {RAPD}:

حيث يعتبر التكبير العشوائي لأجزاء من الحامض النووى DNA وهو يعرف بـ RAPD أحد أهم التطبيقات المباشرة لتفاعل البلمرة.

وعن كيفية حدوث عملية التكبير العشوائى فإننا نجد أن الباحث يتبع الآتى:

(أ) يتم مراعاة توفير ظروف مماثلة تقريباً لنفس ظروف عملية نسخ وتضاعف DNA والسابق عرضها منذ قليل من إنزيم بوليميريز، ووفرة من القواعد النيتروجينية، ... إلخ إلا أننا نضع مع هذه المكونات بادئ (شريط مفرد من الـ DNA معروف تتابع قواعده وقصير لا يزيد طوله عن ٢٠ نيوتيدة) «ولا نضع الطليعتين السابق الحديث عنهما فى تفاعل PCR ويراعى فى هذا الإجراء ما يلى:

من المهم جداً أن يتحول خيط الـ DNA المزدوج إلى خيوط مفردة وذلك بتكسير الروابط الهيدروجينية وهو يحدث عند ٩٢ْم وتعرف بدرجة حرارة التفكيك، والتحول غير الكامل لشريط الـ DNA إلى خيوط مفردة سوف يترتب عليه وجود عدد من الأشرطة غير المفردة وبالتالى لا يستطيع البادئ التعرف عليه والارتباط فى الخطوة التالية (annealing) وبالتالى فإن ناتج تفاعل البلمرة سيكون قليلاً وغير حقيقى ولذلك فإن معظم الباحثين يفضلون تحضين الـ DNA المراد تكبيره على درجة ٩٥ْم لمدة عدة دقائق للتأكد من أن كل الخيوط قد تحولت إلى خيوط مفردة.

(ب) تعرف البادئ على التتابع المكمل له على خيط الـ DNA المفرد:

فعنـد خفض درجة الحـرارة إلى ٣٥ْم (annealing temperature) فإن البـادئ يتعرف على التتابع المكمل لتتابع النوتيدات على أشرطة الـ DNA المفردة ويرتبط بها (تتكون الروابط النيتروچينية مرة أخرى).

(جـ) تطويل البادئ Primer extension:

بعد أن يرتبط البـادئ بالتتابع المكـمل له على شريط الـ DNA المفـرد فـإن هذه المنطقـة تُعـرف بمنشأ التضـاعف Origin of replication، ويـأتـي دور إنـزيم taq polymerase الذى يقوم بإضافة القواعد النيتـروچينية وربطها معاً حتى يتكون الخيط المكمل وبذلك يكون قـد تم تخليق خيط مـزدوج وتتم هذه العمليـة عند درجة ٧٢ْم وتُعرف بدرجـة حرارة التمديد وهى لا خـلاف عليها ولكن الاختـلاف دائماً هو فى زمن فتـرة التمديد فمن المعـروف أن إنزيم البوليميـريز يستطيع إضافة ٦٠ قـاعدة فى الثانية عند درجة ٧٢ْم ، وبـالتالى فمن المهم معرفة أو توقع نواتج التكبير فإذا كانت ذات حجم كبير (1.2kb) فإن الزمن المثالى هو ٤٠ ثانية وإذا كانت أقل من (500bp) فإن ٢٠ ثانية هو وقت كاف.

وفى حالة استبدال البوادئ المتخصصة والمكملة لتتابع معين (محـدد) ببادئ عشوائى (عـبارة عن عشرة أو عشـرين نيوكليوتيدة). سوف يرتبط البـادئ العشوائى بشريط الحامض النووى المفرد إذا تصادف وجود تتابع مكمل له على شريط الحامض النووى، وحيث إن البادئ العشوائى قـصـير وشـريط الحامض النووى طويل جـداً واحتـمالية تواجـد عشرة نيـوكليوتيـدات على شريط الحامض النووى المـفرد مكملة لتتـابع نيوكليوتيدات البـادئ عالية فـإن إمكانية ارتباط البـادئ العشوائى أيضاً عـالية وبالتالى إمكانية تكبير مقاطع معـينة من الحامض النووى باستخدام بوادئ عـشوائية قائمة وهذا بالضبط ما يحدث فى تفاعل التكبير العشوائى "RAPD".

وفى عـام ١٩٩٥م تمكن «وليم وآخرون» من اسـتـخدام بادئ عشوائى قـصيـر يحتوى علـى القواعد"G-C" بنسـبة ما بين ٥٠ ـ ٨٠٪ من تكبير مـقاطع من جزىء الحامض النووى DNA وذلك باستخدام درجة تمديد "annealing" منخفضـة نسبياً وبتـحليل نواتج التكبـير العشـوائى باسـتخـدام طريقـة التفـريد الكهـربى RAPD}

{Profiles لعينات حامض نووى من مصادر مختلفة، وجدوا أن هذا الأسلوب مفيد فى الكشف عن الاختلافات الوراثية.

٣ـ استخدام الـ PCR فى إكثار قطعة محددة من الجين:

مثال توضيحي يبين كيفية استخدام تفاعل الـ PCR فى إكثار (قطعة محددة لجين):

١ـ يراعى توفير كافة الظروف المناسبة لإجراء التفاعل والسابق عرضها مع العلم بأننا لا نستخدم بادئًا ولكن طليعتين يجرى تحضير أعداد وفيرة منهما بجهاز مخلق الدنا DNA synthesizer.

٢ـ سنفرض أن الجين الذى نود (إكثاره أو إنتاج كميات منه أو استنساخه) يحده على جانبيه (الطليعتان) الموضحتان كما سيلى، (وسنعتبر أن البادئ مُكوَّن من ٣ قواعد فقط):

الجديلة (١)	٥َ.... ـــ	ث ث س ـــ	ج ج أ ـــ ... ٣َ	
من اللولب المزدوج	بقية مقطع الدنا الذى نريد التخلص منها للحصول على الجين وحده	جديلتا الجين المطلوب تكثيره	بقية مقطع الدنا التى نريد التخلص منها للحصول على الجين وحده	
الجديلة (٢)	٣َ.... ـــ	أ أ ج ـــ	س س ث ـــ ..... ٥َ	

الطليعة (١) على الجديلة (١) من اللولب المزدوج هى ٥َ ـ ث ث س ـ ٣َ (وقد كتبت ببنط أسود) والطليعة (٢) على الجديلة (٢) هو ٣َ ـ س س ث ـ ٥َ.

٣ـ بتسخين المحلول لدرجة ٩٥ْم [كما سبق وذكرنا أو لدرجة ٩٤ْم كما ذكرت بعض المراجع الأخرى].

٤ـ يبرد المحلول بعد ٥ دقائق إلى ٣٠ ـ ٧٢ْم فتلتحم الطليعتان كل بالتتابع المكمل، وتشرع كلٌ بدءًا من تتابعها فى بناء جديلة مكملة للقديمة التى التصقت بها.

الجديلة (١) القديمة ٥َ ... ـــ ث ث س ـــ ج ج أ ـــ ... ٣َ

الجديلة (١ ـ أ) ٣َ... ـــ أ أ ج ـــ س س ث ٥َ لولب مزدوج ناشئ عن الجديلة(١)

الجديلة (٢) القديمة ٣َ ... ـــ أ أ ج ـــ س س ث ـــ ... ٥َ

الجديلة (٢ـ أ) الجديدة ... ٥َ ث ث س ـــ ج ج أ ـــ ... ٣ لولب مزدوج ناشئ عن الجديلة.

ملحوظة:

من خلال تتبعك عزيزى القارئ للخطوة السابقة سنجد أن الجديلة الجديدة (١ـ أ) تبدأ بالطليعة [٣َ س س ث ـ ٥] وأنها لا تحمل كل ما كان من قواعد بالجهة اليسرى (وهو يحدث بشكل طبيعى دون تدخُّل من الباحث أى أن النيوكليوتيدات التى بها القواعد النيتروجينية جهة اليسار لم تتكون). وبنفس الشكل مع الفرق حدث مع الجديلة (٢ ـ أ) فالجديلة الجديدة (٢ ـ أ) تبدأ بالطليعة ٥َ ـ ث ث س ـ ٣َ (ولا شىء إلى يمينها) وتمتد حتى نهاية المقطع المكمل إلى اليسار، عند تسخين المحلول مرة ثانية لدرجة الحرارة المثلى ينفصل اللولبان المزدوجان كلّ إلى جديلتيه، وسنهتم هنا فقط بالجديلة (١ ـ أ)، الجديلة (٢ ـ أ)، وعندما يبرد المحلول تلتحم الطليعتان كلٌ بالتتابع المكمل:

الجديلة (١ ـ أ) ٣َ .. ـــ أ أ ج ـــ س س ث ٥َ لولب مزدوج ناشئ من الجديلة (١ ـ أ)

الجديلة (١ـ ب) ٥َ ث ث س ـــ ج ج أ ٣َ

الجديلة (٢ ـ أ) ٥َ ث ث س ـــ ج ج أ ٣َ

الجديلة (٢ ـ ب) ٣َ أ أ ح ـــ س س ث ٥َ لولب مزدوج ناشئ عن الجديلة (٢ ـ ث)

ولعلك تلاحظ عزيزى القارئ أن الجديلة (١ ـ ب) لا تحمل من الجديلة الأصلية (١) إلا منطقة الجين ومعها الطليعة (١) والقواعد المكملة للطليعة (٢)، وأن الجديلة (٢ ـ ب) لا تحمل أيضاً من الجديلة (٢) الأصلية إلا منطقة الجين والطليعة (٢) والقواعد المكملة للطليعة (١) بتكرار التسخين والتبريد يتضاعف تكرار (١ـ ب)، (٢ ـ ب) أُسيا exponentially عشرين دورة كهذه لتنتج أكثر من مليون نسخة من الجين فى المحلول [اللولب المزدوج المكون من الجديلتين (١ ـ ب) و (٢ ـ ب) هو الجين].

وتلاحظ عزيزى القارئ أن هذه التقنية وكأنها تبحث عن منطقة الجين أو التتابع المطلوب بنفسها؛ ثم تنتج منه الأعداد الكثيرة التى ذكرناها، ولا يحتاج الأمر من الباحث سوى أن يفصله عن بقية الجينوم فى آخر التفاعل، بمعنى أننا نستطيع أن نستخدم الجينوم الكامل للكائن الحى، ثم نترك للتقنية أمر اقتناص الجين ونَسْخه ملايين المرات دون تدخُّل منا!!. يكفى فقط أن تعرف ترتيب القواعد فى الطليعتين اللتين يحدان الجين المطلوب.

التنقية:

يتبقى في المزيج (المحلول) بجانب الجينات التى تم إنتاجها، كمية من القواعد النيتروجينية ونُسخ من الطليعتين والبوليميريز وأطوال أخرى من الدنا غير مطلوبة، ولذا نستخلص الجينات المطلوبة فقط ويتم ذلك عن طريق (التفريد الكهربى بالچيل) الذى يفصل الجين عن كل الشوائب، حيث يتخذ موقعاً معيناً فى صورة شريط على الچيل، يمكن أن يُقطع، وقد يكرر التفريد مرة أخرى لضمان النقاء.

الجولة الثانية

جولة مع التطبيقات المتنوعة
للاستفادة من تفاعل PCR

أولاً: بعض التطبيقات للاستفادة من تفاعل PCR فى الكشف عن القابلية للإصابة بالأمراض المختلفة، وتشمل:

١ـ الاستفادة من التفاعل PCR فى كشف الطفرات بالچينات {Oncogenes} وتتضمن أربعة تطبيقات هى:

التطبيق الأول:

فى التحقق من وفاة نائب الرئيس نيكسون متأثراً بسرطان المثانة (بعد وفاته بسنوات عديدة!!):

كانت هناك قائمة طويلة بأمراض عديدة مُحيرة تحول أدوات الطبيب والإمكانات المتاحة لديه دون تمكنه الدقيق من تشخيص المرض وعلاجه على الوجه الأكمل والمطلوب ولم يعد مجرد شكوى المريض فى مكان محدد ووسائل التحاليل المعهودة أو أخذ عينات من الأنسجة لفحصها تحت الميكروسكوب وعمل الأشعة؛ بكاف لتشخيص المرض فى بدايته وعلاجه والقضاء على المرض وما يسببه من معاناة للمريض وكثيراً ما أدى ذلك لتأخر حالة المريض ووقوعه تحت براثن مضاعفات المرض بل والوفاة متأثراً بذلك .

ولنذكر لكم هنا واقعة شهيرة حدثت فى سنة ١٩٦٧م بالولايات المتحدة الأمريكية.. وقتها كان للرئيس الأمريكى نيكسون نائب هو [هيوبرت H همفرى] وكان هذا النائب قد لاحظ نزول دم مع البول وبعمل الفحوص المتاحة وقتها وأخذ آراء الأطباء لم يتمكن الطب من تشخيص الحالة وظل هذا النائب يعانى حتى عام ١٩٧٦ حيث تقدمت الفحوص الطبية وظهرت مضاعفات مرضية عديدة لنائب الرئيس وتمكن الباحثون من تشخيص الحالة بأنه مصاب بسرطان المثانة أى تأخر

التشخيص ٩ سنوات ورغم أنواع العلاج التى تلقاها (هيوبرت H همفرى) لكنه توفى متأثراً بالسرطان .

وبعد وفاته بـ ٢٧ عامًا وابتكار طرق واختبارات جزيئية جديدة منها اختبار PCR تم استئذان زوجة النائب وأخذ عينة بول كان مُحتفظًا بها منذ عام ١٩٦٧ ومقاطع سرطان مثانة همفرى منذ ١٩٧٦م. كان محتفظًا بها أيضاً وإجراء التحاليل بطرق حديثة أوضحت وجود طفرة فى الجين {P_{53}} فى المادة الوراثية الخاصة بالنائب ومن عينة البول المأخوذة منذ سنة ١٩٦٧م مما يدل على إصابة النائب بالورم منذ ذلك الوقت.

وهكذا أدى عدم التشخيص المبكر للورم إلى أن يعانى الرجل ٩ سنوات حتى ظهرت عليه أعراض الورم وتأخر العلاج وتدهورت حالته الصحية ثم الوفاة. كان المثال السابق موضحًا لمأساة آلاف الحالات التى تؤكد مدى دور التقدم السريع الذى حدث فى مجالات البيوتكنولوجيا والاستفادة من الأدوات والأجهزة التكنولوجية الحديثة وفروع للعلوم الأخرى.

لقد أدى ازدياد قدرة الباحثين على فهم أسرار المادة الوراثية وتحكمهم فيها. وتحاليل الدنا الوراثى يمكن استخدامها الآن فى مجال الكشف عن أورام سرطانية بعينها عن طريق أخذ عينات من الرئة أو البول أو البراز أو الدم ... إلخ تحوى خلايا مشكوكًا فيها لتحليلها حيث يمكن أن تكتشف مجموعات صغيرة جداً من الخلايا الطافرة المنفصلة من عضو حديث التسرطن.. وهذه العينة يمكن أخذها من بول المريض أو القشع أو حتى السوائل المُفْرزة من حلمات الثدى... إلخ ... والحمض النووى بالعينة هو عبارة عن سلم حلزونى مزدوج يتم تكبيره باختبار PCR ثم يُفرق الشريطان المعروفان لحلزون الدنا الوراثى من منتصفه Hybridization، ثم يُعرَّضان لمجسات أو مسابير وراثية Genetic Probes.

[سبق الحديث عنها] وهى مؤلفة من شريط واحد من الدنا يحوى طفرة معينة، وهذه الطفرة هى التى توجد عادة على المادة الوراثية بالخلية السرطانية المتسببة فى حدوث الورم. ومن منطلق أنه إذا كان لدينا دنا وراثى موجود فى العينة المأخوذة من

المريض يحوى الطفـرة نفسها وكـانت هذه الطفرة هى نفس الطفرة الچينـية الموجودة على الدنا الوراثى المفرد بالمجس الوراثى فسنجد أن شريط الدنا الطافر بالعينة سيتحد مع المجس ويعـود الشـريطان المهـجنان من الحمـض النووى ليتـكاملا مـعـاً، وتنغلق السوسـتـة ويصبح دنا حلزونيًا مزدوجًا لكـن هجين والذى يمكن وسمه بصبغـة تألقية (فلورستية Fluorescent dye) أو أي مادة مشعة radioactive وعند إعطاء تحليل إيجابي بالصبغة دل ذلك على وجـود الچين المتسبب فى الطفرة وبإعطاء تحليل سلبى بالصبغة دل على عدم وجوده.

التطبيق الثانى:

(ب) مع الچين «راس»:

ومن هذه الچينات نذكر الچين [راس ras]، ومن المعروف أن الطفرات فى هذا الچين تحدث فى الكثيـر من أنواع السرطانات البشرية ولقد بينت الفـحوص السريعة المستخدمـة لتفاعل الـ PCR والتى تم فيها أخذ عـينات حمض نووى لخلايا سرطانية مأخوذة من مرضـى السرطان اللمفاوى الخبيث؛ إن الصـور المختلفة من المرضى تنتج عن طفرات مختلفة فى چين [راس]. والجدير بالذكر أنه قـد استخدمت طريقة المسبر كأداة تشـخيـصيـة جزيئية للكشف عن هذا الچين الطافـر من خلال المثـقـب المصنَّع خصيصاً له وكذلك الچين الطافر P_{53}.

التطبيق الثالث:

ومنها أيضاً مرض الليمفوما الحويصلية Folliculariyphoma:

الذى ينشـأ عن انتقـال يحدث مـا بين الكروموزومين ١٤، ١٨ فى الإنـسان، إذ يرحل جزء مـحدد من الموقع الدناوى (أ) المشفِّـر للسلسلة الثقيلة لجلوبيـولين المناعة Grmmunoglobulin على الكرومـوزوم ١٤، إلى مـوقع (ب) چين سـرطنة الثـدى BCL_2 على الكرومـوزوم ١٨ من الممكن تصـمـيم طليـعـتين واحـدة للطرف ٣َ من الموقع (أ) والأخرى للطرف (٥َ) من الموقع ب. فإذا مـا عُرِّض الدنا للتفاعل (PCR) فإنه يضاعف مقطعاً دناوياً (طوله ٣٠٠ زق) إذا كان هناك بالفـعل انتقال، ليشير ذلك إلى وجود المرض، وإلا التحم المقطعان كلٌّ بمنـطقته المكملة على الكروموزوم ١٨ أو ١٤، ولـم يظهر هذا المقطع القصير، أيضاً فى أمراض سرطان القولون، الثدى.

التطبيق الرابع

الكشف عن الجين P_{53}

فى عـام ١٩٩٣م تمكَّن فـريق بحـثى من جونز هوبكنز من عـمل مـجس چينى للـچين P_{53}، وهذا الـچين من مجموعة الچينات الهـامة التى تسمى مثبطات الورم، وعند وجود خلايا سـرطانية شاذة بالجسم فإن هذا الچين يعطى لهـا الأمر بأن تفرمل [أى تتوقف عن الانقسام العشـوائى الشاذ بل ويأمرها بأن تنتحر Apoptosis .. لكن عند حدوث طفرة فى الچين نجد أنه لن تحدث هذه الفرملة التى تمنع الخلايا السرطانية من الانقسام العشوائى .. فتستمـر مأساة هذه الخلايا فى الانقسام العشوائى ليتكون الورم السرطانى.

وبعد تمكُّن البـاحثين من اكتشاف الطفـرة التى تحدث فى الچين P_{53} وعـــمل المجس الوراثى اللازم والاستـعانة بتفاعل PCR ويتم استـخدامهـا مع المرضى الذين سبق استئصال أورام سرطانية فى المستقبل حيث يتم فحص الخلايا والغدد الليمفاوية التى كانت مـحيطة بالأورام المستـأصلة للبحـث عن الچين P_{53} بهـا. وبمتابعـة هؤلاء المرضى تبين أن الذين عاد لهم الورم مرة أخرى هم الذين كان فحص الچين P_{53} بعد اختبارهم [إيجابى] وأن الورم عاد فى نفس الأمـاكن التى تم أخذ العينات منها. بينما الأشخاص الذين كان لديهم هذا الفحص [سلبياً] لم يعد إليهم الورم مرة أخرى.

والعـلاج الكيمـاوى الذى يتلقاه هـؤلاء المرضى بعد إزالة الورم .. الهـدف منه تدمير نواة الخلية السرطانية... وطالما أن الچين P_{53} تالف ولا يعمل إذن لا طائل من العـلاج الكيمـيائى لأن الچين تالف ولن يـوقظ أو ينتهى ليـأمر أى خـلايا سرطانيـة بالانتحار ... لذا يجب إجراء الاختبار الوراثى للتأكد من وجود الچين P_{53}.

وتجدر بنـا الإشارة إلى أن هناك أنواعًـا أخرى من الاخـتبارات لا تـعتمـد على المجسِّ الوراثى فى الكشف عـن الأورام السرطانيـة، ولا تعـتمـد على فـحص الچين P_{53}، ومن هذه الاختبارات نذكر:

١ـ اختبار PSA: ظهر هذا الاختبـار فى أواخر الثمانينات وتم استعـماله لقدرته

على التحذير من الإصابة بسرطان البروستاتا، وهو ما لم يكُنْ بالاستطاعة اكتشافه من قبل، ويتم فى هذا الاختبار قياس كمية البروتين المسمى (Phostate Specific Antigen) بمعنى المستضد البروستاتي النوعى {P. S. A} وهو يفيد فى الكشف عن أي ورم بالبروستاتا فى بدايته بالرجال قبل ظهور أعراض أخرى بخمس سنوات أو أكثر.

ويُقدر أن أكثر من ٤٠ ألف رجل ماتوا بسبب سرطان البروستاتا سنة ١٩٩٦م فى الولايات المتحدة الأمريكية.

٢. تطبيقات متنوعة للاستفادة من تفاعل الـ "PCR" فى الكشف عن الأمراض المرتبطة بالجنس فى الأجنة، ولبيان مدى قابلية الإنسان بالأمراض المختلفة:

(أ) هناك أمراض مرتبطة بالجنس متنحية ، تقع چيناتها على الكروموسومX، وتظهر فى الذكور فقط فى الچينوم يحملها تتجنب النسوة (ذوات التركيب الخليط للچين أن يحملن ذكراً إذا قررن أن يتم الإخصاب خارج الرحم ليُنقل الجنين إلى أرحامهن. من الممكن هنا أن تُؤخذ خلية واحدة لا أكثر من كل جنين يتم إنتاجه فى المعمل (عندما يكون عدد خلايا الجنين عشرة). تفحص الخلية بالتفاعل المتسلسل لوجود بعض من تتابع يسمى "DYZ_1". هذا التتابع لا يوجد إلا على الكروموسوم {Y} وطوله {٣٥٠٠ زق} ومنه على هذا الكروموسوم نحو ٥٠٠٠ نسخة، يستعمل التفاعل المتسلسل فى تكثير مقطع منه طوله ١٤٩ زقًا لا يظهر بالطبع إذا كان الجنين أنثى.

(ب) أمثلة للأمراض المتنحية المرتبطة بالكروموسوم (س) والكشف عنها:

من بين الأمراض المشفَّرة على كروموسوم س مرض حَثَل دوتشين العضلى ؛ ومرض نقص الأورنيثين ترانسكارباميلير ، ومرض نقص العامل ٨، العامل ٩، ومتلازمة ليش نيهان، متلازمة س الهش.

وأمكن للباحثين باستخدام طرق الدنا المطعم التغلب على مشكلة الطفرات المتغيرة لحثل دوتشين العضلى، ومتلازمة ليش ـ نيهان ـ ونقص الأورينثين ترانسكا رباميليز. وتمكّنوا باستخدامهم تفاعل PCR من كشف فعال للطفرات به إمكانية للأتمتة .

المثال الأول:

مع جين حثل دوتشين:

حيث يتم فحص العينات بحثاً عن الاقتضابات فى هذا الجين عن طريق تفاعل PCR مضاعف يكشف ٨١٪ من الاقتضابات بهذا الجين (٤٦٪ من كل الطفرات). ولا يستغرق إجراء هذا التفاعل سوى بضع ساعات والتحليل السابق عليه كان يتطلب إجراؤه بضعة أيام.

المثال الثانى:

البحث فى جين "HPRT" الذى يسبب متلازمة ليش-نيهان:

يماثل ما سبق ولكن التقدير لا يوفر التشخيص إلا لـ ١٥٪ من الطفرات.

المثال الثالث:

النقص فى إنزيم ترانسكار باميليز (أ ت ك):

يستخدم تفاعل PCR فى توليد دنا وحيد الجديلة من عينات طبيعية ومن أخرى من المرضى. فإذا ما هُجِّن نوعا الجدائل، فسنجد أن مواقع اللاتوافق (الطفرات) بين الجديلتين تكون عرضة للانشقاق الكيماوى، فى حين لا يظهر مثل هذا الانشقاق عند تهجين جديلتين من جين (أ ت ك الطبيعى). وبهذه الطريقة يمكن معرفة ما إذا كان أعضاء العائلة يحملون الطفرة أم لا، بعدما يكون قد أمكن تحديد هوية الطفرة فى المريض الأصلى (الحالة المرجع).

وللعلم عزيزى القارئ، فإن (الحالة المرجع) نعنى بها أول حالة من المرض تُكشف فى عائلة معينة، وتشير إلى احتمال أن يحمل الجين المعيب آخرون من العائلة أو من النسل القادم.

أيضاً لبيان مدى قابلية الإنسان بالأمراض المختلفة فى مراحل العمر المختلفة، مثل أمراض الزهايمر، وأمراض القلب، وتصلب الشرايين، وغير ذلك مما تبين أن لها علاقة وثيقة بحدوث طفرات فى جينات معينة، وبدونها [أى هذه الطفرات] لم تكن تحدث هذه الأمراض، ورغم مدى أهمية هذه الفحوص وآثارها الجانبية إلا أن هناك وجهًا سلبيًا لهذه الفحوصات وسبق لنا مناقشته فى كتابنا الأول وهو ما يخشاه

الأطباء من أن يؤدى الإعلان عن الفحوص الخاصة بالأشخاص إلى حدوث تفرقة فى المعاملة، فعلى الفرض أننا وجدنا چينات بالشخص يمكن أن تؤدى إلى إصابته بالسمنة بنسبة ٦٠٪، أو الإصابة بأمراض القلب بنسبة ٥٥٪، فهل نعتبر هذا الشخص مريضاً، أم نعتبره سليماً ونعامله على هذا الأساس؟ وهل ستعامله شركات التأمين على أن عنده حالة مرضية سابقة وبالتالى تزداد وترفع من مطالبها المالية ومبالغ التأمين من قِبَل هؤلاء الأشخاص؟!!

ومن خلال نتائج الأبحاث التى توصل إليها الباحثون يُذكر أن الأمراض التى لها علاقة بالچينات، ٣٪ منها فقط هى التى تسببها طفرة فى چين واحد، ومعظمها ليست قاتلة، ولكى تحدث وتظهر هذه الأمراض فإنها تعتمد على حدوث طفرة فى أكثر من عدد من الچينات مع وجود ظروف بيئية ونفسية وعضوية معينة بل ويتدخل الغذاء أيضاً وفترة التعرض لهذه العوامل المختلفة، وهناك أمراض لا تظهر إلا مع كِبَر السن. وقد يتوفى الشخص قبل ظهور أعراض المرض عليه!!، ولعل الكثير منا لا يعلم أن كلاً منا من الذين يعتبرون أنفسهم من الأصحاء تماماً، يوجد لدينا ما يقرب من أكثر من عشرة (١٠) چينات معيبة يمكن أن تسبب لنا أمراضاً إذا توافرت لها ظروف بيئية مناسبة تدعم ظهور المرض لدينا.

المثال الرابع: تفاعل الـ "PCR" والاستفادة منه فى إجراء تحليل للارتباط بين چينين:

ويكون ذلك باستعمال حيوانات منوية؛ تحدث أثناء عملية الانقسام الميوزى أن تتبادل الكروموسومات بعض المقاطع فيما يسمى «العبور» Crossing over فتخرج كرموزومات مؤشبة تتوقف نسبتها على البعد بين الچينين. فإذا أخذنا عدداً كبيراً من الحيوانات المنوية من شخص خليط فى كل من موقعين، وعرضنا دناها واحداً واحداً لتفاعل "PCR" يستعمل فيه فى نفس الوقت طليعتين لكل چين، ثم اختبرت النتائج من كل واحد من الحيوانات المنوية بمسابر للأليلات الأربعة، أمكننا أن نعرف نسبة التأشيب ونحدد المسافة بين الچينين.

٣. تطبيقات توضح الاستفادة من البصمة الجينية وتفاعل الـ PCR في تشخيص الأمراض المعدية:

تمهيد:

حيث يُستفاد مما تم التوصل إليه عن خصائص الحمض النووي وأنه بصمة لا تتكرر من شخص إلى آخر إلا في حالة التوأم السيامي مثل حسام حسن وإبراهيم حسن نتيجة طبيعة تسلسل الحمض النووي الفريدة والمختلفة من كائن لآخر، وذلك في الكشف عن الحمض النووي للميكروب المسبب للأمراض المعدية.. سواء كان بكتريا أو فيروسًا أو طفيلاً أو فطرًا، ونجد هنا أن العلماء استطاعوا من خلال معرفتهم بالتركيب الجيني للحمض النووي للميكروب من صنع مجس {Probe} يحتوي على جزيئات غير كاملة من الحمض النووي للميكروب المراد البحث عنه، أو تشخيصه، سواء كان (DNA) أو (RNA) بحيث إذا تلامس هذا المجس مع عينة الدم المراد فحصها والتي في حالة احتوائها (منذ البداية على الفيروس) فإن الحامض النووي الفيروسي الموجود في خلايا الدم سوف يكمل جزيئات الحامض النووي الموجود على المجس Probe (وذلك بالطبع بعد تكبيره وتضخيمه)، حيث يأخذ الباحث عينة من الدم للشخص المريض وهذه العينة تحتوي على كمية ضئيلة من الحامض النووي، والتي قد تصل لنقطة دم في سن إبرة ـ حيث يجرون عملية تكبير ونسخ لهذا التسلسل من الحامض النووي الذي تحتويه وهي تسمى عملية amplification، من خلال تكتيك {PCR} ويستمر النسخ ليصل عدد الأجيال المنتجة إلى ثلاثين جيلاً من الحامض النووي ويُقدَّر بها الدنا المُستنسخ بأنه أكثر من مليار مرة (عما بدىء في أول التفاعل) وكل ذلك خلال ثلاث ساعات.

(١) مثال:

تطوير فحص يعتمد على شفرة المادة الوراثية للجرثومة المؤذية:

أعلن الباحثون في ولاية كاليفورنيا الأمريكية منذ وقت قريب عن تطوير فحص معملي جديد يقصر الوقت اللازم للكشف عن سلالة بكتيريا السالمونيلا التي تعتبر

مصدراً شائعاً للتسمم الغذائي والتي توجد أساساً في البيض ، وقال الباحثون إن جهاز الفحص الجديد لا يسهل الكشف عن السالمونيلا فقط وإنما قد يساعد أيضاً في حال وافقت عليه إدارة الأغذية والعقاقير الأمريكية، في الوقاية من المرض بتعريف مصادره، موضحين أن سلالة السالمونيلا المرتبطة بالتسمم الغذائي التي تُعرف باسمها العلمي «سالمونيلا أنتريتيديس» تصيب الجهاز الهضمي وتسبب القيء والإسهال والحمى، وقد استطاع علماء كاليفورنيا تطوير فحص يعتمد على شفرة المادة الوراثية للجرثومة المؤذية، وهي عبارة عن سلسلة فريدة من الحمض النووي موجودة في سلالة (سالمونيلا أنتريتيديس» فقط والفحص الجديد يمكنه الكشف عن البكتيريا في ساعات قليلة، ويمكن استعمال هذا الفحص في المجازر والمزارع لمنع انتشار وباء المرض حيث يمكنه التحقق من سلامة الماء والطعام المخصص للدواجن.

ولقد سبق وذكرنا في بداية الفصل أهمية هذا التفاعل في الكشف عن الفيروسات الكبدية وفيروس الإيدز... إلخ

(٢) مثال:

عمل لقاحات جينية من المادة الوراثية للميكروب أو الطفيل:

فمن خلال معرفتنا بالبصمة الوراثية للميكروب واستخدام تقنية PCR يمكن عمل لقاحات وأمصال تحتوي على نفس تسلسل من الدنا الوراثي للجزيء المعدي للفيروس أو البكتيريا أو الطفيل والحقن بها. والجزء الذي يشعر به الجهاز المناعي للإنسان ويتحفز ضده يسمى «أنتجين» ونتمكن من خلالها بمنع الأمراض المعدية مثل الملاريا والإيدز والالتهاب الكبدي الوبائي وبالتالي بالجسم بدلاً من حقن الإنسان بالميكروب المسبِّب للمرض سواء مُضعف أو ميت أو أجزاء منه حيث كان هناك خوف من خطر حدوث مضاعفات التطعيم، وسيؤهل اللقاح الجيني الجديد جهاز المناعة لمهاجمة الميكروب المعدي لأنها تحفز جهاز المناعة لإنتاج خلايا (B), (T) القاتلة والمساعدة وإنتاج الأجسام المضادة وهذه الأجسام المناعية لديها القدرة على التصدي لكل أنواع الأمراض والأورام السرطانية وأشهرها التطعيم ضد فيروس الالتهاب الكبدي الوبائي.

٤ ـ تطبيقات متنوعة للاستفادة من البصمة الوراثية وتفاعل (PCR) في مجالي النبات والحيوان:

(أ) في تصنيف وتعريف النباتات المُجهلة:

ومثال لها كما في بعض أنواع النخيل حيث استخدم «صقر وآخرون» منه البصمات الوراثية في تعريف أصناف النخيل المصري وأفادت في تعريف ٥ أصناف نخيل مختلفة هي : السماني ـ السيوي ـ الأمهات ـ الحياني ـ الزغلول. ويبرز هنا دور عالمنا المصري د. (صقر) مع زملائه في تعريف صنف النخيل وجنسه بعدما كان يستحيل ذلك قبل الإثمار، أيضاً يمكن الاستفادة من هذا التكنيك في الكشف عن التغيرات الوراثية في النباتات الناتجة من مزارع الأنسجة والهندسة الوراثية والتأكد من مطابقتها للأمهات Quality Control Test، وفي تعريف الجنس كما في النخيل والباباظ والإسبرجس، أيضاً يُستفاد به في فحص البذور والنباتات المستوردة للتأكد من خلوها من الأمراض (الحجر الصحي).

(ب) في تحديد أصل المواد النباتية ومنها النباتات المخدرة Determination of the Drug Origin.

(ج) أيضاً يُستفاد من البصمة الوراثية في تحديد سلالات الحيوانات ومنها الخيول التي لها تاريخ عريق لحفظ الحيوانات النادرة في العالم.

(د) يُستخدم PCR لمقارنة الدنا الوراثي للحيوانات المنقرضة بالدنا الوراثي لحيوانات حية الآن، وهي تنتمي لنفس الفصيلة الحيوانية.

ثالثاً: الاستفادة من تفاعل الـ PCR في إكثار البصمة الوراثية DNA Fingerprinting المستخدمة في الطب الشرعي والجرائم:

عندما ظهرت هذه التكنولوجيا المحسَّنة للوجود كوسيلة قوية لتكبير وإكثار الدنا خارج الجسم الحي، امتدحها كثير من الباحثين باعتبارها ستمكنهم من تصنيف الدنا الوراثي؛ بعدما توصلوا لتلك المعلومات القيمة عن التفرد في البصمة الوراثية والذي يميز كل إنسان عن الآخر والموجود على الحامض النووي وبالتالي معرفتهم بصورة أكثر دقة عما سبق عن مدى التقارب بين الآباء والأمهات وأبنائهم (وإمكانية

التحـقق من ذلك بصدق كـبير)، والتـقائهم في مـواضع معينة على الـشريط الوراثى (للأبناء)، بحيث يصبح بالإمكان التأكـيد أو نفى ما إذا كان هذا الابن من ذلك الأب أم لا، فيتم إثبات البنوة فى الطب الشرعى.

بل وكشف القاتل فى الجرائم المختلفة، وإدانة المغتصب بتحليل الحامض النووى للسائل المنوى الموجود فى مـهبل المرأة التى تم اغتصابها، ومقـارنته بالحامض النووى الموجود فى دم الشـخص المتهم بالاغتصـاب، أو المشتبه فيـه فيتم إثبات أو نفـى تهمة الاغتصاب وإصدار الحكم عليه. ومعرفة القاتل فى جرائم القتل المختلفة.

وتأتى حسن الاستفادة من تفاعل الـ PCR :

هنا عن طريق إتاحة الإمكانية لاستخدام عينات وكـميات صغيرة جداً مثل نقطة دم فى سن إبرة، أو ظفر أو قطعة من جلد المجنى عليـه أو الجانى (من موقع الحادث)، أو نقطة جافـة من السائل المنوى، أو بصـقة منديل، أو حـتى شعرة، أو غـير ذلك من الأدلة التى يمكن أن تكون جفَّت بعد حدوث الجريمة بوقت طويل.

ثم استخـدام تفاعل الـ "PCR" لتكبير وإكثار المادة الوراثية [بهذه العينة] ملايين المرات، وبعد الحصول على هذا القدر الوافر من المادة الوراثية [للعينة] يتم تقطيع هذه المادة الوراثية إلى أجزاء صغيرة باستـخدام إنزيمات القطع والتحديد، والتى تُقطع عند مواضع معـينة تسمى أماكن الانقـسام، وبقطع الشريط الوراثى يصبح لدينا رفـليات كثيرة، وبما أن هذه الرفليات كما سبق وذكرنا تختلف من شخص إلى آخر من حيث طول القطع الرفليـبية، وعدد تكرار وحـدات بناء الحامض النووى فى كل منهـا، فإنه يمكن بعد ذلك، من خلال استخدام الباحث لمجس يحمل تركيب وتكوين هذه القطع من الحامض النووى الذى تم تقطيـعه، أن يقارنه بحمض نووى آخر يريد مـقارنته به [من خلال تكنيك خاص].