الفصل الثالث
تقنيـات بيولوجيـة

يعتمد تقدم العلوم إلى حد كبير على ابتكار تقنيات جديدة يمكن بها الكشف عن حقائق لم نكن نعرفها من قبل أو يمكن تسخيرها من أجل تحقيـق منـافع ذات قيمـة أكاديميـة أو تطبيقيـة. وقـد اعتمد تقدم علم بيولوجيا الخلية وعلـم البيولوجيـا الجزيئيـة إلى حـد كبـير علـى ابتكـار عـدد مـن التقنيات. وسوف نستعرض هنا باختصار عددًا من هذه التقنيات ذات العلاقة بالعلاج بالجينات.

استخدام إنزيمات القصر:

كان لاكتشاف إنزيمات القصر Restriction enzymes دور هـام فـيُ فتـح آفـاق متعـددة أمـام العلماء فى مجال تفهم آلية نقل الصفات الوراثية وتفهم آليات عمل الجينات، ومن ثم نشأ ما يسمى بالهندسة الوراثية وغير ذلك من تقنيات أحدثت ثورة فى مجال العلوم البيولوجية.

ففى عام ١٩٧٠ استطاع العالم الأمريكى سميث Hamilton O. Smith فصل إنزيما من بكتيريا اسمها العلمى هيموفيلاس إنفلونزى *Hemophilus influenzae* مـن السـلالة (d) يمكنـه أن يقطـع جزىء DNA عن تتابع معين من ستة نيوكليوتيدات، وقـد سمـى هـذا الإنزيـم *Hin*d III، كما نجح العالم هربرت بويـر Herbert Boyer فـى فصـل إنزيـم قصـر مـن بكتيريـا إشيرشـياكولاى *Escherichia coli*. وقد توالى فيما بعد اكتشاف ما يزيد على ٣٠٠ إنزيم فـى أنـواع مختلفـة مـن البكتيريا حيث يقوم كل إنزيم منها بقطع جزىء DNA بطريقة معينة وعند تتابعات معينة مـن النيوكليوتيدات. وقد عرفت هذه الإنزيمات باسـم (إنزيمات القصر) Restriction Enzymes. وقـد فتح استخدام إنزيمات القصر آفاقا واسعة أمام تكنولوجيا توظيـف المـادة الوراثيـة. وقـد حصـل العالم (سميث) على جائزة نوبل فى الطب أو الفسيولوجيا فى عام ١٩٧٨ تقديرًا لاكتشافه.

وتختلف طريقة قطع إنزيم القصر لجزىء حمض DNA، فقد يكـون القطـع مسـتقيما فيكـون طرفى القطع كليلين (blunt or flush ends)، وقد يكون القطع مورويـا staggered حيـث يكـون طرفى القطع مائلين dangling (شكل ٢٦ ملون). وقـد لوحـظ أن التحـام أطـراف حمـض DNA المورويـة يكون أسـهل مما دعا إلى وصـف طرفـى القطـع بأنـهما (نـهايات لاصقـة) Sticky ends. وتجدر الإشـارة إلى أن ترتيب النيوكليوتيدات السائبة فى أحد الشريطين هـو نفسـه فـى الشـريط الآخر ولكن فى الاتجاه المعاكس، ولذا فإن ترتيب النيوكليوتيدات علـى جـانبى القطـع يوصـف بأنه (مقروء الاتجاهين) Palindromic.

ويكتسب أى إنزيم قصر اسمه من اسم البكتيريا التى تم عزلـه منـها. وتفصيـل الأمـر أن أول حرف من اسم الإنزيم يمثل أول حرف من اسـم جنس البكتيريا (ويكتب بـالطبع كابيتـال مـائلا

بالطريقة الإيتالية italic)، ويمثل الحرفان الثانى والثالث اسم نوع البكتيريا (ويكتب الحرفان بالطبع بحروف صغيرة ومائلة بالطريقة الإيتالية)، ويمثل الحرف الرابع سلالة البكتيريا، ويكتب بحروف عادية كابيتال أو صغيرة حسب الأحوال. وأخيرًا يوضع رقم رومانى يمثل ترتيب اكتشافه بالنسبة لإنزيمات القصر الأخرى التى تم عزلها من هذه السلالة من البكتيريا.

ويوضح الجدول الآتى أسماء بعض إنزيمات القصر وأسماء الكائنات الدقيقة التى عزلت هذه الإنزيمات منها، كما توضح الأسهم على شريطى الحمض النووى الموقع الذى يقوم عنده إنزيم القصر بقطع جزىء الحمض النووى DNA.

ENZYME	MICROBIAL SOURCE	SEQUENCE
*Alu*I	*Arthrobacter luteus*	5'-A-G↓C-T-3' 3'-T-C↑G-A-5'
*Bam*HI	*Bacillus amyloliquefaciens* H	5'-G↓G-A-T-C-C-3' 3'-C-C-T-A-G↑G-5'
*Eco*RI	*Escherichia coli*	5'-G↓A-A-T-T-C-3' 3'-C-T-T-A-A↑G-5'
*Eco*RII	*Escherichia coli*	5'↓C-C-T-G-G-3' 3'-G-G-A-C-C↑-5'
*Hae*III	*Haemophilus aegyptius*	5'-G-G↓C-C-3' 3'-C-C↑G-G-5'
*Hin*dIII	*Haemophilus influenzae* b	5'-A-A-G-C-T-T-3' 3'-T-T-C-G-A↑A-5'
*Pst*I	*Providencia stuartii*	5'-C-T-G-C-A↓G-3' 3'-G-A-C-G-T↑C-5'
*Sal*I	*Streptomyces albus*	5'-G↓T-C-G-A-C-3' 3'-C-A-G-C-T↑G-5'

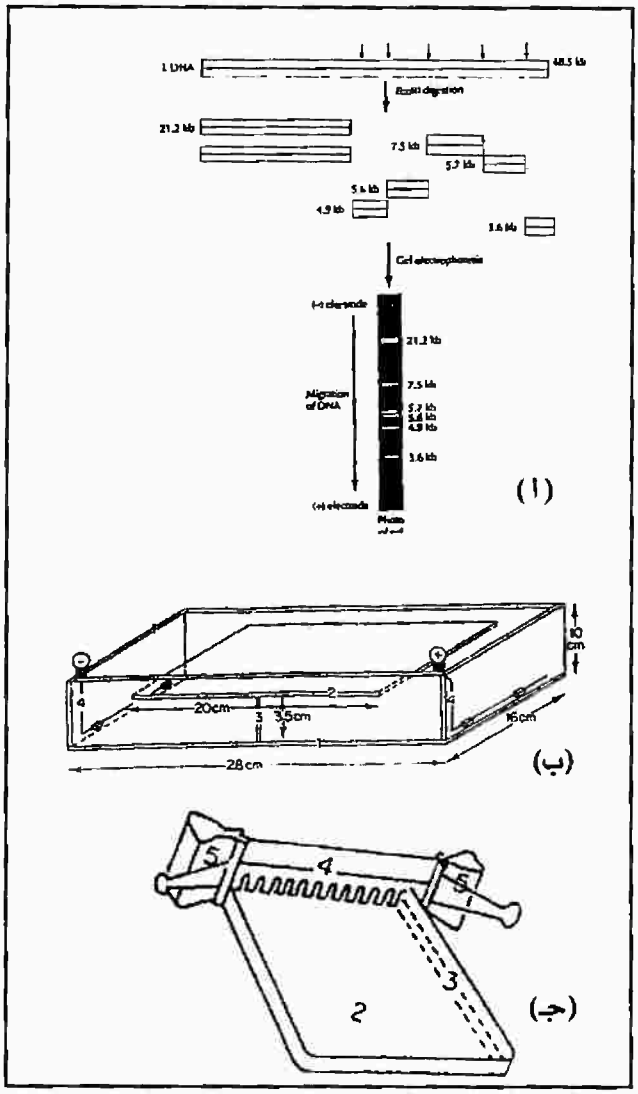
الفصل الكهربائى فى الجيلاتين Gel Electrophoresis

يوصف تقطيع المادة الوراثية بإنزيمات القصر بأنه (هضم) Digestion. ويوضح (شكل ٢٧) قيام إنزيم القصر *Eco*RI بتقطيع جزىء DNA فى خمسة مواقع لينتج ست قطع من DNA مختلفة الأحجام ويمكن فصل هذه القطع بعضها عن بعض باستخدام تقنية تعرف باسم (الفصل الكهربائى فى الجيلاتين) Gel electrophoresis. وفى هذا المثال يستخدم لوح رقيق خاص من الجيلاتين يوضع فى حوض مسطح يتصل من ناحية بقطب كهربى موجب، ومن ناحية أخرى بقطب كهربى سالب. ويغمر لوح الجيلاتين فى الحوض المملوء بسائل معين. ويجهز فى الجيلاتين عند الطرف السالب للحوض حفرة صغيرة well or slot لتوضع فيها المادة الوراثية – المقطعة بالإنزيم – المطلوب فصل قطعها بعضها عن بعض حسب أطوالها. ويمثل الخط الممتد فى الجيلاتين أمام الحفرة ما يسمى حارة Lane.

وإذا كان لدينا منذ البداية عينات عديدة من حمض DNA تم هضم كل منها بإنزيم قصر ويرجى فصل القطع الناتجة عن كل منها عن طريق الفصل الكهربائى فى الجيلاتين – فإننا نعد فى هذه الحالة عددا من الحفر wells or slots فى لوح الجيلاتين باستخدام مشط خاص comb (شكل ٢٧). وتوضع كل عينة فى إحدى هذه الحفر.

وكان (شارب) Sharp وزملاؤه قد ابتكروا فى عام ١٩٧٣ تقنية يضاف فيها إلى الجيلاتين صبغ خاص يعرف باسم (بروميد الإثيديام) Ethidium bromide ، وميزة استخدام هذا الصبغ أنه يشع ضوءًا فلورسنتيا florescent برتقاليا لامعا إذا ما ارتبط بجزيئات حمض DNA وفحص فى ضوء فوق بنفسجى. ويختلف اختيار نوع مادة لوح الجيلاتين حسب أحجام قطع حمض DNA المطلوب فصلها، فإذا كان حجم القطع صغيرًا يفضل استخدام جيلاتين يعرف باسم بولى أكريلاميد polyacrylamide gel ، وإذا كان حجم القطع كبيرًا ينصح باستخدام جيلاتين يعرف باسم (أجاروز) Agarose gel ، ويطلق على التقنية فى الحالة الأولى اسم Polyacrylamide Gel Electrophoresis (PAGE).

وتتلخص خطوات العمل فى تشغيل الكهرباء المتصلة بالحوض فتتحرك قطع حمض DNA – التى كانت وضعت فى حفرة الجيلاتين عبر المساحات الدقيقة جدا فى مادة لوح الجيلاتين – من القطب السالب إلى القطب الموجب، حيث إن حمض DNA بطبيعته سالب الشحنة (شكل ملون ٣٦). ويعتمد طول المسافة التى تجريها قطع حمض DNA على حجمها. فالقطعة الصغيرة



شكل (٢٧) : (أ) شكل تخطيطى يوضح (هضم) جزىء حمض DNA باستخدام إنزيم القصر *Eco*RI ثم فصل القطع الناتجة عن طريق الفصل الكهربى الجيلاتينى gel electrophoresis فتجرى كل قطعة فى الجيلاتين من أعلى (حيث القطب السالب) إلى أسفل (حيث القطب الموجب) وذلك لمسافة قدرها يتناسب عكسيا مع طول قطعة حمض DNA.

(ب) طبق الفصل الكهربى الجيلاتينى يحتوى على لوح الجيلاتين ومتصل بقطب كهربى موجب وآخر سالب وهو هنا يستخدم للفصل الأفقى.

(جـ) قضيب مسنن (مشط) يستخدم لعمل حفر slots فى لوح الجيلاتين، توضع العينات فى الحفر الناتجة. يوضع لوح الجيلاتين فى الطبق (شكل ب) بحيث تكون الحفر ناحية القطب السالب.

تجرى مسافة طويلة داخل لوح الجيلاتين أما القطعة الكبيرة فتجرى مسافة قصيرة. وهكذا بعد مرور وقت مناسب يتم فصل قطع DNA بعضها عن بعض حسب أحجامها. وبتسليط ضوء فوق بنفسجي على لوح الجيلاتين يمكن مشاهدة قطع DNA وقد احتل كل منها موقعا معينا، ويبدو كل منها يشع ضوءًا برتقاليا مما يمكن معه تصويرها. ويلاحظ من الشكل الذى سبق الإشارة إليه (شكل ٢٧) وجود ستة شرائط كل منها يخص قطعة من قطع DNA الذى سبق هضمه بإنزيم القصر *Eco*RI.

وهناك تقنية تعرف باسم Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE) وهى تستخدم مجالا كهربيا متغيرا Oscillating electric fields يعمل فى اتجاهات مختلفة متعددة مما يؤهل هذه الطريقة لفصل قطع كبيرة من الحمض النووى قد يصل كل منها إلى كروموسوم كامل. وفى نهاية العمل بهذه الطريقة يقطع الجل الحامل للكروموسوم المطلوب ويستخلص eluted من الجيلاتين.

حمض DNA معاد الاتحاد Recombinant DNA

يقصد بذلك إجراء إلتحام أو ربط اصطناعى لحمض DNA من مصدرين مختلفين، ولكى يتم ربط جزيئين من حمض DNA معا، لابد أن يتم قطع (أو هضم digesting) كل منهما باستخدام إنزيم القصر نفسه حتى تتوالف منطقة قطع أحدهما مع منطقة قطع الجزىء الآخر. ويقصد بالتوالف هنا أن يتوافق ارتباط القواعد النيتروجينية، ويمكن بهذه الطريقة ربط المادة الوراثية لأنواع مختلفة من الكائنات البعيدة عن بعضها من الناحية التصنيفية. ويلزم إنزيم (ليجيز Ligase) لتحقيق هذا الربط وتعرف هذه التقنية بصفة عامة باسم (تقنية القص واللزق) أو تقنية اللحام Welding.

شكل (٢٨) : العالم (بول برج) أول من حصل على DNA معاد الاتحاد. برج حصل على جائزة نوبل عام ١٩٨٠.

وكان أول من نجح فى الحصول على DNA معاد الاتحاد هو العالم الأمريكى (بول برج) Paul Berg. (شكل ٢٨) من جامعة ستانفورد، حيث استطاع فى عام ١٩٧٠ عزل كروموسوم بكتيريا اشيرشيا كولاى *Escherichia coli* – وهو حلقى الشكل – تم فتحه بإنزيم قصر وربطه بحمض DNA من فيروس. وكان الأمر غاية فى الصعوبة نظرًا لأن الأطراف المقطوعة لحمض DNA كانت كلية (مستوية) ولم تكن موروبة (متدلية)، وقد حصل (برج) على جائزة نوبل فى عام ١٩٨٠ تقديرا لذلك. ومن الجدير بالذكر أن تضمين حمض نووى فيروسى مع المادة الوراثية للبكتيريا هو عمل يحدث فى الطبيعة.

وقد أدت تطبيقات تقنية حمض DNA معاد الاتحاد فى اتجاهات متعددة إلى نشأة تيار جديد من الدراسات التى عرفت باسم (الهندسة الوراثية Genetic engineering).وقد تمكن العلماء من خلال ذلك من الحصول على كائنات معدلة جينيا Genetically-modified Creatures فأصبح لدينا بكتيريا معدلة الجينات، ونباتات معدلة الجينات، وحيوانات معدلة الجينات، فاكتسبت هذه الكائنات بذلك خصائص وصفات لم تكن لها، واستطاع الإنسان أن يوظف ذلك لصالحه.

وفى عام ١٩٧٦ أنشئت أول شركة للهندسة الوراثية تحت اسم Genentech.

وقد أنشئت شركات عالمية لاستثمار الهندسة الوراثية وأنفقت بلايين الدولارات فى هذا المجال. ومن هذه الشركات:

Dow Chemical, Du Pont, Monsanto, Novartis, Pioneer Hi-Bred, Egr Evo.

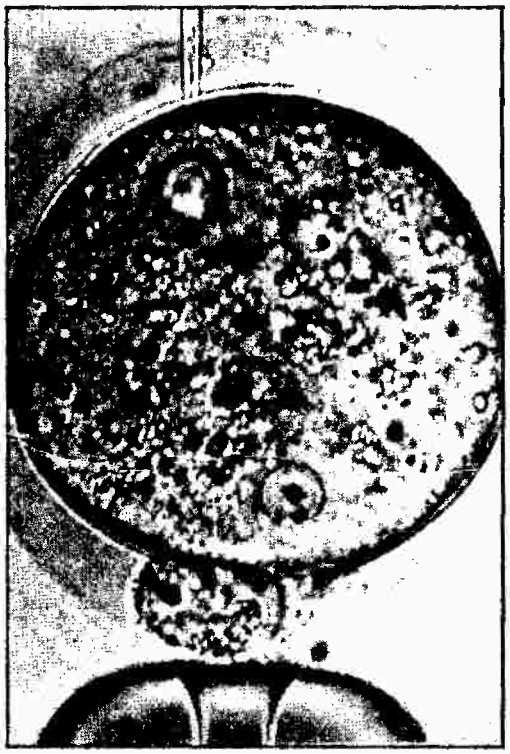
آلية إدخال الجين إلى الخلية

من التجارب الشهيرة فى مجال نقل جين إلى البكتيريا بغرض توطينه بها لأغراض علمية متعددة ما استخدمت فيه الفيروسات والبلازميدات كنواقل Vectors لهذا الجين حيث يتم ربط الجين المطلوب مع المادة الوراثية للفيروس أو البلازميد.

وفى كثير من التجارب يجرى إدخال الناقل Vector الحامل للجين المطلوب إلى داخل البكتيريا، وتسمى هذه الخطوة Transformation ويتم ذلك بمعاملة البكتيريا بمحلول كلوريد كالسيوم أو بإخضاعها لتيار كهربائى تحت ظروف خاصة فيما يعرف باسم electroporation ويسمى الجهاز المستعمل electroporator وتوصف البكتيريا المعدة - بهذه المعاملات - لدخول الناقل بأنها Competent bacteria (وفى حالة نقل الجين إلى كائن حى من حقيقات النواة Eukaryotes يطلق لفظ Transfection على عملية إدخال الجين). وبإكثار البكتيريا يتم إكثار الجين أى نسخه Cloning.

حقن جين فى نواة بويضة مخصبة Microinjection

يستخدم لحقن الجين جهاز معين يعتمد على ماصتين دقيقتين Micropipettes، ويتم التحكم فى ضبط عملية الحقن من خلال عدسات مكبرة. وتعمل إحدى الماصتين كماصة شفط Suction تثبت الخلية المراد حقنها فى مكانها، أما الماصة الثانية فهى دقيقة الطرف وسمكها لا يتعدى $\frac{١}{١٠٠}$ من سمك شعرة الإنسان، وهى تستخدم فى حقن الجينات المراد إدخالها إلى الخلية (شكل ٢٩).



شكل (٢٩) : الحقن الدقيق microinjection للحمض النووى DNA داخل نواه بويضة فأر عقب إخصابها مباشرة. ماصة شفط suction pipette تعمل على تثبيت البويضة من جانب بينما ماصة الحقن injection pipette تخترق البويضة من الجانب الآخر.

ويعيب هذه الطريقة تكلفتها العالية وبطؤها وانخفاض معدل نجاحها.

إدخال الجينات إلى الخلايا الجسمية:

ابتكر العلماء طرقا أخرى عديدة تحقق معدلات أعلى من النجاح وتحقق هدفها بمعدل أسرع. وتستخدم بعض هذه الطرق فى إدخال الجينات إلى الخلايا الجسمية والخلايا النباتية. وقد ابتكر علماء جامعة كورنيلCornell University طريقة اعتمدت على قذف الخلايا بكرات ميكروسكوبية من التنجستين المغلفة بالحمض النووى DNA-Coated tungsten microscopical spheres لإطلاق الجينات genetic shotgun تعرف باسم biolistic، وهو اسم مشتق من الكلمتين biological ballistic، وفى طريقة أخرى تعرف باسم electroporation تستخدم كرات ميكروسكوبية من الذهب beads of gold، ويعتمد الجهاز المستخدم على الاستعانة بنبضات كهربية تدفع بالكرات إلى داخل الخلايا.

تفاعل البلمرة المتسلسل Polymerase Chain Reaction (PCR)

كثيرا ما يقتضى الأمر دراسة جزء معين من جزىء حمض DNA (المادة الوراثية)، ولكن صعوبة التعامل مع عدد محدود من جزيئات هذا الحمض تحول دون ذلك، لذا يستلزم الأمر مضاعفة هذا الجزء المطلوب دراسته مرات عديدة خارج الجسم حتى يسهل استخدامه بعد ذلك فى الدراسة المطلوبة، وتسمى عملية المضاعفة هذه باسم (إكثار حمض DNA) DNA amplification. ولإجراء عملية مضاعفة الجزىء يلزم فك شريطى الجزىء عن بعضها البعض، ثم تكوين شريط جديد أمام كل شريط قديم باستخدام إنزيم البلمرة DNA-polymerase حيث يرتبط كل شريط جديد مع الشريط القديم - وبذلك يصبح لدينا جزيئان من الحمض بدلا من جزىء واحد. وبتكرار هذا الإجراء عدة مرات يتكون لدينا بمتوالية هندسية عدد كبير من جزيئات الحمض - تشبه كلها الجزىء الأصلى الذى بدأنا به.

وقد تعاونت شركة Cetus مع شركة Perkin-Elmer فى أمريكا لإنتاج جهاز ذاتى التشغيل يقوم بمضاعفة جزيئات حمض DNA ويطلق على الجهاز اسم Automated Thermal Cycler، وهو يستخدم الآن على نطاق واسع فى معامل البحوث. وفى هذا الجهاز ترتفع درجة الحرارة آليا لإتمام عملية فك الشريطان. ثم تنخفض آليا لإتمام عملية بناء الشريط الجديد مرتبطا مع الشريط القديم ووفقا له، وهكذا. فإذا بدأنا بمائة جزىء مثلا فإن عدد الجزيئات يرتفع إلى ٢٠٠ ثم ٤٠٠ ثم ٨٠٠ ثم ١٦٠٠ ثم ٣٢٠٠ ثم ٦٤٠٠ وهكذا. وقد قدر أنه فى مدى ٢٠ دورة يتم التضاعف بمقدار بليون. وتتميز هذه الطريقة بسرعة الإنجاز.

ويستخدم إنزيم بلمرة DNA-polymerase لبناء الشرائط الجديدة من حمض DNA، وهذا الإنزيم من بكتيريا تعرف باسم *Thermus aquaticus* تعيش فى الينابيع الحارة، فمن المفترض أن إنزيم البلمرة فى هذه البكتيريا على وجه الخصوص يعمل فى درجة حرارة عالية. ومن هنا فإنه يناسب هذه التقنية التى يتعرض فيها الإنزيم لدرجة حرارة عالية (حوالى ٩٠م°) تقتضيها عملية فك شريطى الجزىء عن بعضهما فى كل دورة.

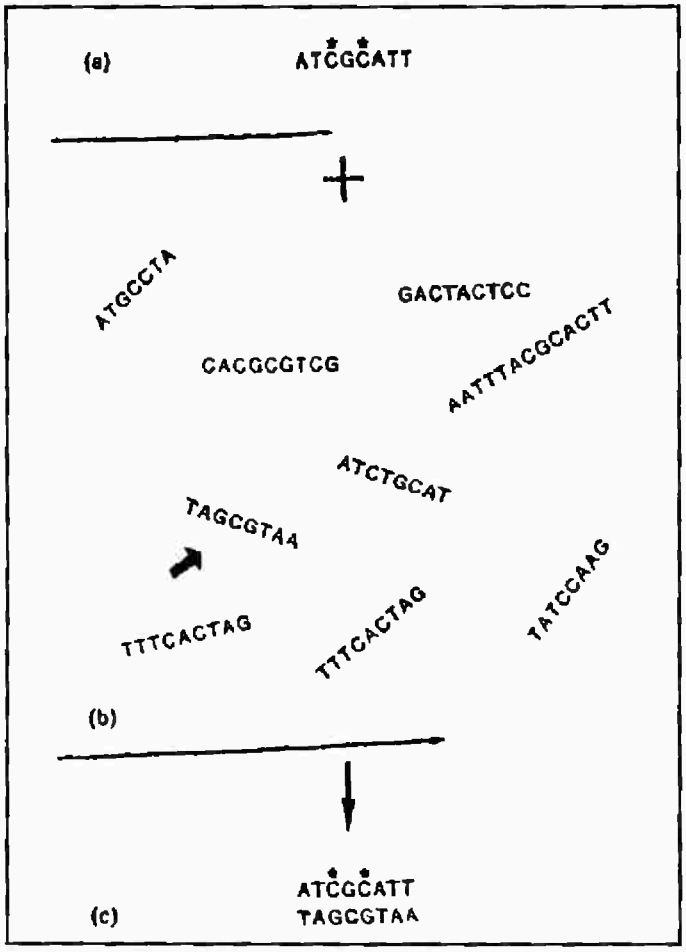
وتجدر الإشارة إلى أن تخليق شريط جديد من حمض DNA أمام شريط قديم فى أنبوبة يقتضى أن نزود التفاعل بجزء من الشريط الجديد ليرتبط مع جزء مقابل من الشريط القديم - وعندئذ فقط يبدأ استكمال الشريط الجديد فى التكوين عقب الجزء الذى أضفناه نحن، ويسمى الجزء من شريط حمض DNA الذى نضيفه لهذا الغرض باسم (بادئ Primer).

مجسات حمض DNA (DNA Probes)

هى قطع من شريط واحد من حمض DNA، يتكون كل منها من تتابع معين من النيوكليوتيدات تحمل النظير المشع (^{32}P) Isotope، وتجهز هذه المجسات للارتباط (أو للتهجين hybridize) مع

شريط حمض DNA ذى تتابعات نيوكليوتيدات متممة Complementary Sequence بـهدف عزلـه وإكثاره. ويترواح عدد النيوكليوتيدات فى المجس بين ١٠ و ١٠,٠٠٠.

وتعامل قطع DNA المطلوب عمل مسح لهـا معاملـة تـؤدى إلى فصـل شـريطى الجـزىء عـن بعضهما البعض حتى يستطيع المجس القيام بدوره. ويمكن فصل الشريطين عن بعضهما باستخدام درجة حرارة أعلى من ٩٠°م أو تعريض الحمض النووى إلى درجة أس هيدروجينى pH أعلى من ١٠,٥ أو باستخدام مركبات عضوية مثل اليوريا أو الفومالدهيد. ويطلق على فصل شريطى جزىء الحمض النووى عن بعضهما اسم Denaturation. ويؤدى زوال هذه العوامل إلى التحام الشريطين. ويوضح شكل (٣٠) عند أعلاه شريط المجس محتويا النظير المشع الذى يرمز



شكل (٣٠) : استخدام مجس DNA probe فى التعرف على تتابع معين من حمض DNA. المجس يرى فى الجزء (a) من الرسم. السهم فى الجزء (b) يشير إلى قطعة DNA التى تتكامل مع المجس. الجزء (c) يوضح اتحاد المجس مع قطعة DNA المطلوبة. النجوم فى الرسم ترمز إلى أن المجس مشع.

له بالنجوم. ويوضح الشكل أيضا قطع من شريط حمض DNA المطلوب البحث عند أحدها. وفى أسفل الشكل نجد المجس قد تهجن مع قطعة معينة - دون بقية القطع - وهى القطعة التى تحتوى على تتابع نيوكليوتيدات متممة لتلك التى يحملها المجس. ويتم التعرف على القطعة المطلوبة والمجس المرتبط بها عن طريق تقنية خاصة يتم بها الكشف عن المواد المشعة تعرف باسم (التشعيع الذاتى) Autoradiography.

وقد ابتكرت شركة Affymetrix شريحة صغيرة تبلغ مساحتها ٢ × ٢سم تحتوى على ما يزيد على ٦٥,٠٠٠ مجس!! يضخ فيها حمض DNA المجهول على صورة قطع صغيرة تم ربط كل منها بمادة فلوروسنتية، فتحدث ارتباطات بين هذه القطع والمجسات. ويستعان بعد ذلك بشعاع ليزر وجهاز كمبيوتر لتحديد أماكن الارتباطات ومن ثم يمكن إدراك تتابعات قطع DNA. وتعرف هذه الشريحة المبتكرة باسم DNA microarray GenChip probe array.

اختيار جين وكلونته Gene Selection and Claning (شكل ٣١ ملون)

يمكن تلخيص خطوات التوصل إلى جين معين وكلونته أى الحصول على نسخ عديدة منه فى الخطوات الآتية:

- يستخدم إنزيم قصر فى قطع الجينوم إلى أجزاء، ويستخرج حمض DNA الخاص بفيروس بكتيرى ويتم تقطيعه أيضا، ثم يجرى ربط أجزاء الجينوم الخلوى مع أجزاء المادة الوراثية للفيروس باستخدام إنزيم ligase، وبناء فيروسات تحمل الحمض النووى المهجن لينتج فيروسات مهجنة hybrid phages.
- إعداد مزارع بكتيرية (مروج lawns) كل منها ينشأ من خلية بكتيرية تحتوى جينا خلويا تم كلونته.

وتستهدف الخطوات الآتية تحديد جين مطلوب وتعظيم كلونته (وهو فى شكل ٣١ يتخذ لونا أزرقَ داكنا على عكس بقية الجينات التى تتخذ لونا أزرقَ فاتحا).

- تنقل نسخة من المزارع على لوح نيتروسليولوز nitrocellulose filter.
- إذابة البروتين الفيروسى، ثم فك شريطى الحمض النووى عن بعضهما Denaturation.
- تعريض اللوح النيتروسليولوزى إلى مجس probe للجين المطلوب اختياره، وبذا يتم اتحاد hybridization بين المجلس وشريط DNA الخاص بالجين المطلوب. يكشف عن موقع هذا الارتباط على لوح النيتروسليولوز باستخدام تقنية (تصوير الإشعاع الذاتى Autoradiography) ذلك أن المجس مشعع labelled كما سبق القول.

- بإدراك موقع الاتحاد على لوح النيتروسليولوز يمكن تحديد موقع المزرعة المحتوية على الجين فى الطبق المحتوى على المزارع.
- تؤخذ هذه المزرعة منفردة ويجرى تنميتها فى محلول حضن لمزيد من إكثار الجين المطلوب.

طريقة الكشف عن تتابع الجزيئات المكونة لمادة الوراثة DNA

يعتبر الكشف عن تتابعات النيوكليوتيدات فى المادة الوراثية لكائن ما عملاً علميا رفيعا وتعرف الآن عدة طرق لكشف تتابع النيوكليوتيدات فى حمض DNA نذكر منها طريقة العالم الشهير (فريدرك سانجر) Frederick Sanger من جامعة كمبردج. وكان (سانجر) قد حصل على جائزة نوبل فى الكيمياء مرتين، الأولى فى عام ١٩٥٨ عندما استطاع فى عام ١٩٥٣ كشف ترتيب الأحماض الأمينية المكونة للإنسولين، والثانية حصل عليها فى عام ١٩٨٠ لابتكاره مع زملاء له طريقة لكشف تتابع الجزيئات المكونة لحمض DNA.

وتجدر الإشارة إلى أن ماكسام وجلبرت A. Maxam and W. Gilbert من جامعة هارفارد كانا قد ابتكرا طريقة أخرى للكشف عن تتابع النيوكليوتيدات فى الحمض النووى DNA.

وبصفة عامة تعتبر الطريقتان سالفتا الذكر مجهدتين وتستغرقان وقتا طويلا. وقد استطاعت الشركات العلمية المتخصصة ابتكار أجهزة تقوم آليا Automated بكشف التتابعات فى حمض DNA بكفاءة وسرعة. وقد تم استخدام هذا الأسلوب لأول مرة فى عام ١٩٨٦.

ويمكن التعرف على تفاصيل طريقة (سانجر) وطرق أخرى فى مجال البيولوجيا الجزيئية فى كتاب للمؤلف بعنوان (نحن والعلوم البيولوجية فى مطلع القرن الحادى والعشرين) إصدار دار المعارف.

زراعة الخلايا الحيوانية Animal Cell Culture

اتجه العلماء إلى حفظ الخلايا حية فى أطباق فى كثير من دراساتهم. وقد نجح العلماء فى تربية خلايا البكتيريا والخميرة بينما بدا الأمر بالنسبة للخلايا الحيوانية صعبا. ولعل توفير مستلزمات النمو والتكاثر لهذه الخلايا فى الوسط المحيط هو حجر الزاوية فى تنمية مزارع الخلايا الحيوانية. وفى عام ١٩٥٥ نشر العالم الأمريكى (هارى إيجل) Harry Eagel بحثا فى العدد (١٢٢) من مجلة Science عن المكونات المثلى للوسط medium الذى تربى فيه خلايا HeLa والخلايا الليفية للفأر mouse fibroblasts. وقد ثبت أن قائمة المكونات التى قال بها (إيجل) تصلح لزراعة العديد من طرز الخلايا الحيوانية، وظلت هذه القائمة هى المرجع الأساسى لكل من يريد زراعة خلايا حيوانية فى أطباق هى *in vitro* (انظر القائمة).

وتفيد زراعة الخلايا فى دراسة نمو الخلايا الحيوانية وتميزها differentiation وسلوكها تحت تأثير الظروف المختلفة.

Basal media for cultivation of the HeLa cells and mouse fibroblasts :

L-Amino acids* (m*M*)		Vitamins (m*M*)		Miscellaneous	
Arginine	0.1	Biotin	10^{-3}	Glucose	5m*M*
Cystine	0.05 (0.02)†	Choline	10^{-3}	Penicillin	0.005%#
Glutamine	2.0 (1.0) //	Folic acid	10^{-3}	Streptomycin	0.005%#
Histidine	0.05 (0.02)†	Nicotinamide	10^{-3}	Phenol red	0.0005%#
Isoleucine	0.2	Pantothenic acid	10^{-3}		
Leucine	0.2 (0.1)†	Pyridoxal	10^{-3}	For studies of cell nutrition	
Lysine	0.2 (0.1)†	Thiamine	10^{-3}	Dialyzed horse serum, 1%†	
Methionine	0.05	Riboflavin	10^{-4}	Dialyzed human serum, 5%	
Phenylalanine	0.1 (0.05)†				
Threonine	0.2 (0.1)†	**Salts'§ (m*M*)**		For stock cultures	
Tryptophan	0.02 (0.01)†			Whole horse serum, 5%†	
Tyrosine	0.1			Whole human serum, 10%	
Valine	0.2 (0.1)†	NaCl	100		
		KCl	5		
		NaH_2PO_4 H_2O	1		
		$NaHCO_3$	20		
		$CaCl_2$	1		
		$MgCl_2$	0.5		

* Conveniently stored in the refrigerator as a single stock solution containing 20 times the indicated concentration of each amino acid.

† For mouse fibroblast.

‡ Conveniently stored as a single stock containing 100 or 1000 times the indicated concentration of each vitamin; kept frozen.

§ Conveniently stored in the refrigerator in two stock solutions, one containing NaCl, KCl, NaH_2PO_4 $NaHCO_3$ and glucose at 10 times the indicated concentraion of each, and the second containing $CaCl_2$ and $MgCl_2$ at 20 times the indicated conentration.

// Conveniently stored as a 100m*M* stock solution; frozen when not in use.

Conveniently stored as a single stock solution conaining 100 times the indicated concentrations of penicillin, streptomycin, and phenol red.