الفصل الخامس

الطرق المعملية الحديثة ذات العلاقة بالكشف عن التغيرات فى المادة الوراثية

يشكل الفحص الظاهرى (الإكلينيكى) عنصرًا أساسيا فى تشخيص الكثير من الأمراض الوراثية، فسمات ملامح الوجه التى أشرنا إليها فى الفصل الثانى، والحالة العقلية للفرد وخصائص الجلد وتغضنات *Creases* راحة اليد وأسفل القدم وطرز البصمات *Dermatoglyphic Pattern* وصفات أجزاء الجسم الأخرى – والتى سنشير إلى بعضها فى الفصل السادس – تعتبر من العناصر الأساسية التى يعتمد عليها الطبيب فى تشخيص المرض الوراثى، وذلك فضلا على فحوص وتحاليل الدم وتحاليل البول التى تعتبر هامة فى بعض الحالات، وكذلك فحص الأجنة بالموجات فوق الصوتية *ultrasonography*، والتحليل البيوكيميائى للسائل الأمنيوتى *amniotic fluid* (الذى يحيط بالجنين).

إلاَّ أن التشخيص لا يكتمل بحق إلا بعد إجراء الفحوص العلمية المعملية التى أبدعها العلم الحديث منذ ستينات القرن العشرين. وسنورد فيما يلى موجزا لبعض الطرق المعملية التى تساعد على تشخيص الأمراض الوراثية.

أولا : الطرق المعتمدة على الكروموسومات :

١ - صباغة جسم بار :

أشرنا فى الفصل الأول من هذا الكتاب إلى جسم بار *Barr body* وكيف أنه يمثل أحد الكروموسومين *X* فى الإناث حيث يعتريه التكثف فيما يعرف باسم *Lyonization* أما الكروموسوم *X* الآخر فيظل فى صورة ممتدة *extended* وبالتالى تكون جيناته فى حالة نشطة. وفى الذكور حيث لا يوجد سوى كروموسوم (*X*) واحد وهو فى حالة ممتدة بالضرورة وبالتالى فلا يوجد فى خلايا الذكور جسم بار. وكما سنرى فى الفصل السادس فإن هناك حالة مرضية فى الإناث يكون غائبا فيها أحد الكروموسومين *X* (*XO*) وبالتالى لايوجد فى خلاياهن جسم بار، كما أن هناك حالة مرضية فى الذكور يكون لديهم كروموسومان *X* أى (*XXY*)، وبالتالى يكون فى خلاياهم جسم بار.

وعادة يتم الكشف عن جسم بار فى الخلايا الطلائية لبطانة الفم أو فى أحد طرز خلايا الدم البيضاء المعروف باسم *polymorphounclear leucocytes* (انظر الفصل الأول)، وبذا يمكن مشاهدة جسم بار فى تحضيرات سحبات الدم المصبوغة كما يمكن مشاهدة «جسم بار» فى القطاعات الميكروسكوبية المصبوغة لأعضاء الجسم المختلفة.

وبالنسبة لعينات بطانة الفم يتطلب الأمر عمل كشط *scrape* لبطانة الفم وتأمين التصاق العينة على سطح شريحة زجاجية ثم إجراء تثبيت للخلايا باستخدام الإثير والكحول (كميات متساوية) لمدة عدة ساعات ثم تجرى الصباغة باستخدام *cresyl fast violet* أو باستخدام صبغ أورسين *orcein* مذابا فى حمض خليك *acetic acid* ساخن.

وفى جميع الحالات لابد من فحص عدد من التحضيرات لا يقل عن (٤)، كما لابد من القيام بعد مئات الخلايا فى كل تحضير للحكم على وجود حالة مرضية.

٢ - تحضيرات الكروموسومات

سبق أن تناولنا باختصار فى الفصل الأول طريقة إعداد تحضير للكروموسومات.

ويمكن للتعرف على الطرق المستخدمة فى هذا الصدد الرجوع إلى كتاب بعنوان «التقنية المجهرية» إصدار دار المعارف وتأليف الدكتور محمود البنهاوى والدكتور منير الجنزورى.

٣ - قياس محتوى الكروموسوم من حمض *DNA* باستخدام *Flow Cytometry*

فى هذه التقنية تصبغ الكروموسومات بصبغ فلوريسنتى (*ethidium bromide* عادة) ثم تدفع مع سائل إلى جهاز يعرف باسم *Flow Cytometer* (شكل ملون ٧٩) حيث يسلط على الكروموسومات شعاع ليزر *laser beam* فيصدر عن كل كروموسوم وميض *a flash of fluorescence* يُسَّلط إلى وحدة بالجهاز تعرف باسم *photomultiplier tube* تقوم بإرسال إشارات كهربية إلى وحدة تحليل *analyzer* أو كمبيوتر يقوم بعمل رسم خاص يعرف باسم *flow karyotype*. وبدراسة هذه الرسومات يمكن تقدير كميات حمض *DNA* فى كل كروموسوم. ولا تستغرق دراسة آلاف الكروموسومات بهذا الجهاز سوى بضع دقائق. ويمكن بهذا الجهاز أيضا قياس كمية الحمض النووى *DNA* فى الخلايا. ويرجع الفضل فى ابتكار هذا الجهاز إلى العالمين *M.J.Fulwyler and L.A. Herzenberg*.

ثانيا : طرق البيولوجيا الجزيئية *Methods of Molecular Biology*

فصل الحمض النووى *DNA* من الخلايا:

لفصل الحمض النووى *DNA* من الخلايا يعامل المعلق الخلوى بمركب (*SDS*) *sodium dodecyl sulphate* لتكسير الخلايا *lysis* ثم تحضن *incubated* مع إنزيم *proteinase K* لتكسير جزيئات البروتين، ثم يضاف *phenol* ليستخلص به البروتينات، ويستبقى الحمض النووى فى الوسط المائى. ويجرى ترسيب للحمض النووى *DNA* باستخدام كحول إثيلى *ethanol*. ويمكن فصل الحمض النووى من الدم (١٠سم^{٣} تعطى حوالى ٢٥٠ ميكروجرام من الحمض النووى *DNA*).

إنزيمات القصر :

لقد فتح اكتشاف إنزيمات القصر *restriction enzymes* وتفاعل البلمرة المتسلسل (*polymerase chain reaction (PCR* الباب أمام تطور العديد من تقنيات البيولوجيا الجزيئية الأخرى. وسنعرض هنا باختصار أسس استخدام هاتين التقنيتين وعدد من التقنيات الأخرى التى تتضافر معا عندما يراد الكشف عن التغيرات غير السوية فى المادة الوراثية.

كان لاكتشاف إنزيمات القصر *restriction enzymes* دور هام فى فتح آفاق متعددة أمام 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.

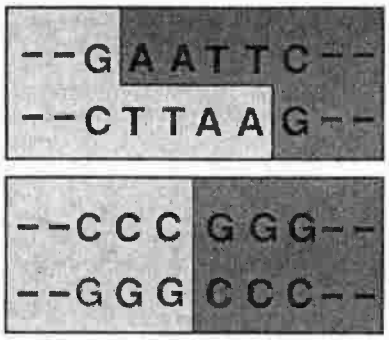
ففى عام ١٩٧٠ استطاع العالم الأمريكى سميث *Hamilton O.Smith* فصل إنزيم من بكتيريا اسمها العلمى هيموفيلاس إنفلونزى *Hemophilus influenzae* من السلالة (*d*) يمكنه أن يقطع جزىء *DNA* عند تتابع معين من ستة نيوكليوتيدات، وقد سمى هذا الإنزيم *HindIII* (حروف الاسم مصدرها الكلمات التى تحدد جنس ونوع وسلالة البكتيريا). وقد نشر (سميث) وزملاء له نتائج الدراسة فى مقالين فى العدد رقم (٥١) لعام ١٩٧٠ فى مجلة *J.Mol.Biol*. وقد توالى فيما بعد اكتشاف ما يزيد على ٣٠٠ إنزيم فى أنواع مختلفة من البكتيريا حيث يقوم كل إنزيم منها بقطع جزىء *DNA* بطريقة معينة وعند تتابعات معينة من النيوكليوتيدات. وقد عرفت هذه الإنزيمات باسم (إنزيم القص) *Restriction enzymes*. وقد فتح استخدام إنزيمات القص آفاقا واسعة أمام تكنولوجيا توظيف المادة الوراثية. وقد حصل العالم (سميث) على جائزة نوبل فى الطب أو الفسيولوجيا فى عام ١٩٧٨ تقديرًا لذلك.

وحقيقة الأمر أن البكتيريا تستخدم إنزيمات القص لتفتيت المادة الوراثية *DNA* للفيروسات التى تغزوها، وبذلك تحد البكتيريا من قدرة الفيروسات على التزايد داخلها وتقصر *restrict* من فعاليتها. ومن ثم سميت هذه الإنزيمات باسم إنزيمات القص. وقد يتساءل المرء: أليس واردًا أن تؤثر هذه الإنزيمات على المادة الوراثية للبكتيريا ذاتها؟ والرد هو أن ذلك غير وارد حيث إن البكتيريا

تغـير من طبيعة التركيب الكيميائى للمواقع فـى مادتها الوراثية التى يمكن للإنزيم أن يؤثر فيها وذلك بإضافة مجموعة المثيل *Methylation* إليها، وبذلك يصبح حمض *DNA* الخاص بالبكتيريا غير قابل للتأثر بهذه الإنزيمات.

وتختلـف طريقة قطع إنزيم القصر لجزىء حمض *DNA* فقد يكون القطع مسـتقيما فيكـون طرفا القطع كليلـين (*blunt or flush ends*)، وقد يكون القطع موروبا *staggered* حيث يكون طرفا القطع مائلين أى متدليين *dangling* (شكل ٨٠). وقد لوحظ أن التحام أطـراف حمـض *DNA* الموروبة يكون أسـهل، مما دعا إلى وصف طرفـى القطع بأنها (نهايات لاصقة) *Sticky ends*. وتجدر الإشارة إلى أن ترتيب النيوكليوتيدات السائبة فى أحد الشريطين هو نفسه فى الشريط الآخر ولكن فى الاتجاه المعاكس، ولذا فإن ترتيب النيوكليوتيدات على جانبى القطع يوصف بأنه (مقروء الاتجاهين) *Palindromic*.

ويوضح الجدولى الآتى أسماء بعض إنزيمات القصر وتتابع النيوكليوتيدات على شريط واحد من حمض *DNA* واسم البكتيريا التى تنتجه. وقد وضع الحرف *N* مكان النيوكليوتيد الذى لا يهم طرازه فى التتابع.



(شكل ٨٠)
طريقتان تقطع بأيهما
إنزيمات القصر جزئ *DNA*
أعلا: القطع موروب
أسفل : القطع مستقيم

Recognition Sites of Representative Restriction Endonucleses

Recognition site[b]	*Source*	*Enzyme*[a]
GGATCC	*Bacillus amyloliquefaciens H*	*BamHI*
GAATTC	*Escherichia coli RY 13*	*EcoRI*
GGCC	*Haemophilus aegyptius*	*HaeIII*
AAGCTT	*Haemophilus influenzae Rd*	*HindIII*
GTTAAC	*Haemophilus parainfluenzae*	*HpaI*
CCGG	*Haemophilus parainfluenzae*	*HpaII*
GATC	*Moraxella bovis*	*MboI*
GCGGCCGC	*Nocardia otitidis-caviarum*	*NotI*
GGCCNNNNNGGCC	*Streptomyces fumbriatus*	*SfiI*
TCGA	*Thermus aquaticus*	*TaqI*

[a] *Enzymes are named according to their species of isolation, followed by a number to distinguish different enzymes isolated from the same organism (e.g., HpaI and HpaII).*

[b] *Recognition sites show the sequence of only one strand of double-stranded DNA. «N» represents any base.*

ويوصـف تقطيـع المادة الوراثية بإنزيمات القصر بأنه (هضم) *Digestion*. ويمكن فصل هذه القطع بعضها عن بعض باسـتخدام تقنية تعرف باسـم (الفصل الكهربائى فى الجيلاتين) *Gel electrophoresis*. وفيها يسـتخدم لوح رقيق خاص من الجيلاتين يوضع فى حوض مسـطح يتصل من ناحية بقطب كهربى موجب، ومن ناحية أخرى بقطب كهربى سـالب. ويغمر لوح الجيلاتين فى الحوض المملوء بسـائل معين. ويجهز فى الجيلاتين عند الطرف السـالب 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 مايسمى حارة *Lane*.

تفاعل البلمرة المتسلسل *Polymerase Chain Reaction (PCR)*

كثيرا ما يقتضى الأمر دراسـة جزء معين من جزىء حمض *DNA* (المادة الوراثية)، ولكن صعوبة التعامل مع عدد محدود من جزيئات هذا الحمض تحول دون ذلك، لذا يسـتلزم الأمر مضاعفة هذا الجزء المطلوب دراسـته مرات عديدة خارج الجسـم 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 بعضهما، 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.

ويرجع الفضل فى هذه التقنية – التى تسمى تفاعل البلمرة المتسلسل *Polymerase Chain Reaction (PCR)* إلى العالمين (مولس) *Kary Mullis* وفالونا *Fred Faloona* فى شركة *Cetus Corporation* فى كاليفورنيا – حيث قاما بنشرها فى عام ١٩٨٥، وهى تعتمد على استخدام إنزيم بلمرة مأخوذ من بكتيريا (إشيرشياكولاى) *Escherichia coli* وإجراء عمليات المضاعفة فى أنبوبة *in vitro amplification*.

وفى العام نفسه نشر سبعة باحثين منهم (ساكى) *Ronald Saiki* وفالونا *Fred Faloona* ومولس *Kary Mullis* بحثا عن توظيف هذه الطريقة فى تشخيص مرض الأنيميا المنجلية *Sickle Cell anaemia*. وفى الواقع فإن تقنية *PCR* استخدمت على مدى السنوات اللاحقة فى تشخيص الأمراض الوراثية والأمراض الطفيلية.

وبما أن عملية فك شريطى جزىء *DNA* عن بعضهما تستلزم درجة حرارة تصل إلى ٩٠° م فإن إنزيم البلمرة المستخدم كان يتعرض للتلف مع كل دورة تضاعف. ولا شك أن ذلك كان يشكل عبئا على من يقوم بالعمل.

وكان حل هذه المشكلة فى عام ١٩٨٨، عندما قام ثمانية من العلماء بقيادة (ساكى) *Ronald Saiki*، وكان من بينهم (مولس) *Kary Mullis* باستخدام إنزيم بلمرة 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. وقد أطلق على هذا الإنزيم اسم *Taq polymerase* ومن الواضح أن حروف *Taq* مأخوذة من الأحروف الأولى لاسم الجنس واسم النوع الخاص بهذه البكتيريا. ومنذ ذلك الحين أمكن للدارسين إكثار حمض *DNA* فى الأنابيب فى المعمل بإضافة إنزيم *Taq polymerase* لمرة واحدة دون أن يصاب الإنزيم بالتلف رغم تعرضه إلى درجة حرارة تصل إلى ٩٠°م فى كل دورة تضاعف. وتجدر الإشارة إلى أن بعض المعامل تستخدم فى السنوات الأخيرة إنزيما يسمى *Pfu polymerase* مأخوذا من بكتيريا *Pyrococcus furiosus* ويستطيع أن يعمل فى درجة حرارة ١٠٠°م دون أن يتلف.

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* (شكل ملون رقم٢٢)، وهو يستخدم الآن على نطاق واسع فى معامل البحوث. وفى هذا الجهاز ترتفع درجة الحرارة آليا لإتمام عملية فك الشريطين. 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.

ويوضح شكل ملون (٨١) 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*) – وعلى هذا فعلينا أن نعرف تتابع القواعد النيتروجينية فى المنطقة المجاورة للجزء المطلوب مضاعفته حتى نختار له (البادئ) المناسب. كذلك فإن الطرف أوالنهاية الأخرى للجزء المراد مضاعفته تحتاج إلى بادىء آخر. وبذلك يتركز التضاعف فى المنطقة من جزىء *DNA* الواقعة بين (البادءين).

ومن هنا فإن تفاعل *PCR* – كما ذكرنا سابقا – يضاعف جزءا من جزىء *DNA* يقع بين منطقتين من الجزىء معروف فيهما تتابع القواعد النيتروجينية حتى نختار لكل منهما (البادئ المناسب).

ومن الجدير بالذكر أن نمو تكوين شريط *DNA* جديد يتم بالنسبة له من الاتجاه (3') إلى الاتجاه (5') – وهو عكس اتجاه الشريط القديم الذى يتكون وفقا له هذا الشريط الجديد.

ومن المفترض أننا نوفر فى الأنبوبة التى تجرى فيها عملية التضاعف كل من الدى أوكسى نيو كليوتيدات الأربعة التى ستبنى منها الأشرطة الجديدة، وهى:

deoxythymidine triphosphate (dTTP)

deoxycytidine triphosphate (dCTP)

deoxyadenosine triphosphate (dATP)

deoxyguanosine triphosphate (dGTP)

ويتم إدخال كل من هذه الدى أوكسى نيوكليوتيدات فى بناء الشريط الجديد النامى لحمض *DNA* بعد فصل مجموعتى فوسفات من كل منها والإبقاء على مجموعة فوسفات واحدة. ومع استمرار تكرار عملية التضاعف سنجد أن الجزء المطلوب مضاعفته قد تضاعف كثيرا وذلك دون باقى أجزاء الحمض.

إن مضاعفة المادة الوراثية بهدف دراستها تتعاظم الحاجة إليه فى مواقف عديدة منها التشخيص الطبى عن تواجد ميكروبات معينة – وهنا يجرى إكثار للمادة الوراثية للميكروب. وقد تكون المادة الوراثية للميكروب هى حمض *RNA* وليس حمض *DNA* – كما فى حالة فيروس الإيدز – وعندئذ يجرى فى المعمل بناء شريط حمض *DNA* أمام شريط المادة الوراثية للفيروس – ثم يتم بناء شريط حمض *DNA* أمام شريط *DNA* الأول. ثم تجرى تقنية *PCR* لجزىء *DNA*.

ويحتاج بناء شريط من حمض *DNA* أمام شريط من حمض *RNA* إلى إنزيم يسمى (إنزيم النسخ العكسى) *Reverse Transcriptase* وكان العلماء الأمريكيون الثلاثة (بالتيمور – دلبيكو – تيمن) *Baltimore, Dulbecco, Temen* قد اكتشفوا هذا الإنزيم فى عام ١٩٧٠ وحصلوا على جائزة نوبل فى عام ١٩٧٠ تقديرا لذلك.

وكما سبق القول فإن هذه التقنية تستخدم فى تشخيص الأمراض الوراثية، حيث إن سبب هذه الأمراض يرجع إلى تغيرات فى حمض *DNA* كما فى حالة مرض الثالثميا *B-thalassemia* كما تستخدم هذه التقنية فى مجال الطب الشرعى حيث إنها ضرورية فى طرق الكشف عن مرتكبى الجرائم أو فى تحديد البنوة، حيث إنها تسمح بمضاعفة أقل كمية من المادة الوراثية حتى لو كانت مستمدة من خلية واحدة. كما تساعد هذه التقنية فى الكشف عن وجود الجينات المسرطنة *oncogenes*. وقد تم تطبيق هذه التقنية أيضا فى دراسة حمض *DNA* الخاص بالميتوكوندريا. وتستخدم هذه التقنية على نطاق واسع فى تشخيص مرض الإيدز.

ويوضح الشكل الملون (٨٢) تضافر معارف البيولوجيا الجزيئية سالفة الذكر فى كشف ما إذا كان جنين لم يولد بعد مريضا بمرض الأنيميا المنجلية *Sickle Cell Anaemia* وذلك فى عائلة يشيع فيها جين هذا المرض. ويوضح الجزء (*a*) من الرسم منطقة من حمض *DNA* حجمها *500bp* تحتوى على التتابع السليم من النيوكليوتيدات. ويمكن لإنزيم القصر *MstII* أن يقطعها (يهضمها) عند التتابع المدون إلى قطعتين أحدهما حجمها *200bp* والأخرى حجمها *300bp*. كما يوضح الجزء نفسه من الرسم المنطقة نفسها من حمض *DNA* ولكن أصابتها طفرة نقطية *point mutation* هى السبب فى حدوث مرض الأنيميا المنجلية (باللون الأحمر فى تتابع النيوكليوتيدات). وبسبب حدوث هذا التغير فى التتابع فإن إنزيم القصر *MstII* لايمكنه قطع الحمض النووى *DNA* فى هذه المنطقة.

وتتحدد خطوات العمل فيما يلى:

– استخدام بادئين *2 primers* يعملان عند طرفى الجزء المطلوب من حمض *DNA* وإجراء تقنية تفاعل البلمرة المتسلسل *polymerase chain reaction*.

– استخدام إنزيم القصر *MstII*، فإذا كان الحمض النووى لم يصب بالطفرة فإن الجزء الذى تمت مضاعفته بتقنية تفاعل البلمرة المتسلسل يهضم بالإنزيم إلى جزأين أحدهما حجمه *200bp* والآخر حجمه *300bp*. وإذا كان هذا الجزء أصيب بالطفرة فإنه لن يهضم وسيظل حجمه على حالة *500bp*.

– يجرى بعد ذلك لقطع حمض *DNA* فصل كهربى باستخدام ألواح الجيلاتين، ويتم هذا باستخدام جهاز خاص (شكل ملون ٨٣) وهو عبارة عن طبق يحتوى على محلول معين ويتصل بالتيار الكهربى، ويوضع فى الطبق لوح جيلاتين تعمل فيه حفر تعرف باسم *wells* فى ناحية القطب السالب حيث يوضع فى كل حفرة إحدى عينات الحمض النووى *DNA* موضوع الدراسة. وبتشغيل الكهرباء تتحرك *migrate* هذه القطع فى داخل لوح الجيلاتين. فى اتجاه القطب الموجب لمسافة تتناسب عكسيا مع حجمها، فالقطع الصغيرة تتحرك لمسافة طويلة، والقطع الكبيرة تتحرك لمسافة قصيرة. يتم بعد ذلك صباغة لوح الجيلاتين بصبغ *Ethidium bromide* حتى يمكن مشاهدة مواقع قطع *DNA* على شكل شرائط *bands*، ويمثل الجيلاتين الممتد أمام كل حفرة ما يسمى باسم حارة *Lane*.

ويوضح الجزء (*b*) من الشكل الملون (٨٢) إحدى الأسر فيها كل من الأب والأم حامل لجين المرض (*S*) بصورة خليطة (*AS*)، والجين (*S*) متنحٍّ، وأنجبا ابنا تجمع فيه جينا المرض مما أدى إلى ظهور أعراض المرض عليه. ثم جاء الحمل الثانى وهو الجنين موضوع البحث ومثار القلق حيث يواجه هذا الجنين الاحتمالات كافة بعد أن جاءت مفاجأة الابن الأول. فالجنين هذا إما يرث من الأب والأم جينين سليمين (*AA*)، وإما أن يرث جينا سليما وآخر للمرض (*AS*)، أو يرث جينى المرض (*SS*) – مثلما حدث فى حالة الوليد الأول – وبذا تظهر عليه الحالة المرضية.

فى هذا المثال أخذت خلايا من هذا الجنين ومن الأب والأم والوليد الأول وأجريت على حمضها النووى *DNA* الخطوات سالفة الذكر وهى :

– تفاعل البلمرة المتسلسل.

– إخضاع الجزء المضاعف إلى إنزيم القصر *MstII*.

– إجراء عملية الفصل الكهربى.

وتوضح مواقع الشرائط *bands* فى لوح الجيلاتين المبين فى الجزء (*b*) من الرسم ما يلى :

١ – أن كلا من الأب والأم له ٣ شرائط، الأقرب منها هو للجين هو الذى حدثت به طفرة وبالتالى لم يتأثر بإنزيم القصر وحجمه *500bp*. أما الشريطان البعيدان فهما يخصان الجين الذى لم تحدث به طفرة وبالتالى تأثر بإنزيم القصر وانقطع إلى جزأين حجمهما *200bp&300bp*. ومن ذلك يتضح أن كلا من الأب والأم خليطان (*AS*) وبالتالى لا تظهر عليهما الصفة المرضية.

٢ – المولود الأول له شريط واحد وهو قريب فى لوح الجيلاتين وحجمه *500bp* وهو بالتالى للمادة الوراثية التى لم تتقطع بإنزيم القصر بسبب حدوث طفرة مزدوجة، فالمولود إذن نقى فى صفة المرض حيث تحركت المادة الوراثية للجنين (*SS*) فى لوح الجيلاتين إلى الموقع نفسه ليكونا معا شريطا واحدا.

٣ – أما الجنين – موضوع البحث والمطلوب اتخاذ قرار بشأنه – فله شريطان بعيدان حجمهما *200bp&300bp*، وهذا يعنى أن المادة الوراثية للجينين قد تقطعت بإنزيم القصر لأنه لم تحدث فى أى من الجينين طفرة، أى إن المادة الوراثية لكل جين قد تقطعت إلى جزأين حجمهما *200bp&300bp*. إذن فالجنين محظوظ حيث إنه أخذ جينا سليما من الأب وجينا سليما من الأم، وبذلك فهو سليم بصورة نقية (*AA*) وبالتالى يكون القرار هو الإبقاء على هذا الحمل حتى تتم الولادة.

وسنرى فى الفصل السابع من الكتاب مثالا آخر يخص مرض التليف الحوصلى *Cystic Fibrosis* وكيفية تشخيصه فى الأجنة بالطرق المعملية للبيولوجيا الجزيئية.

طريقة الكشف عن تتابع الجزيئات فى المادة الوراثية *DNA*

تكشف هذه الطريقة عن الطفرات الحادثة فى القواعد النيتروجينية المكونة للشفرات الوراثية، كما أنها تستخدم للكشف عن الجينوم.

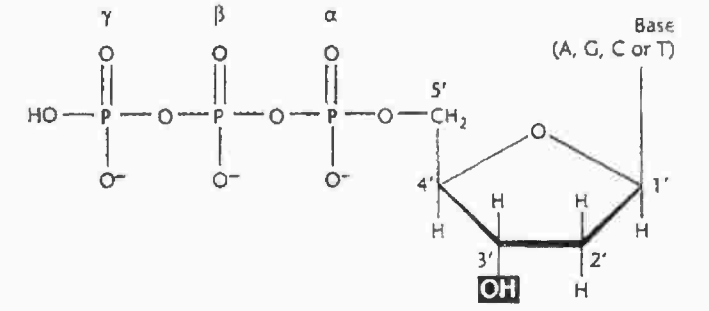
وقد سبق أن أوضحنا أن حمض *DNA* هو مادة الوراثة وأن هذا الحمض يتكون الجزىء فيه من سلسلتين من جزيئات النيوكليوتيدات *Nucleotides* – وأنه من المفترض أن كل جين عبارة عن عدد معين من تتابعات هذه النيوكليوتيدات.

وعلى هذا فإن التعرف على تتابعات النيوكليوتيدات فى جزيئات حمض *DNA* لكائن ما يعنى الكشف عن خصوصية المادة الوراثية لهذا الكائن. ويترتب على هذه المعرفة إمكانية غير مسبوقة فى التحكم فى الصفات الموروثة للكائنات.

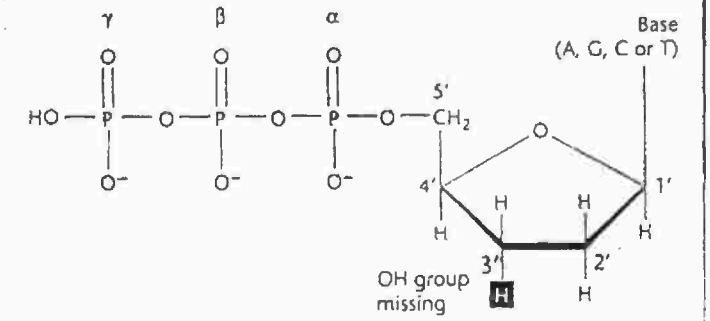
طريقة سانجر *Sanger Method* :

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* والتى سنستعرضها هنا. وقد نشر ذلك فى سلسلة من البحوث أذكر منها ما ورد فى العدد (٩٤) لعام ١٩٧٥ من مجلة *J. Mol. Biol.*، وفى العدد (٧٤) عام ١٩٧٧ من مجلة *Proc. Nat. Acad. Sci.*، وفى العدد (٢١٤) لعام ١٩٨١ من مجلة *Science*. وقبل أن نتناول طريقة (سانجر) للكشف عن تتابع النيوكليوتيدات فى حمض *DNA* أود أن أشير إلى نقطتين. فقد علمنا من قبل فى موضوع تفاعل البلمرة المتسلسل (*PCR*) أن تضاعف حمض *DNA* يحتاج إلى وجود إنزيم *DNA-polymerase* وإلى بادئ *Primer* وإلى طرز (دى أوكسى نيوكليوتيدات) *deoxynucleotides* الأربعة لتستخدم فى بناء شريط *DNA*.

ومن الجدير بالذكر أن ارتباط كل دى أوكسى نيوكليوتيد جديد مع الدى أوكسى نيوكليوتيد السابق عليه فى السلسلة الجديدة مشروط على وجود (*OH*) متصلة مع ذرة الكربون رقم (3) فى جزىء السكر الداخل فى تكوين الدى أوكسى نيوكليوتيد السابق، فوجود مجموعة (*OH*) فى الجزىء السابق ضرورى لإضافة دى أوكسى نيوكليوتيد جديد (شكل ٨٤).



Normal deoxynucleoside triphosphate (i.e. 2′ deoxynucleotide)



Dideoxynucleoside triphosphate (i.e. 2′,3′ dideoxynucleotide)

(شكل ٨٤)
الرسم العلوى للجزىء ذو التركيب الطبيعى
deoxynucleoside triphosphate
الرسم السفلى للجزىء الذى يستخدم لإنهاء بناء سلسلة الحمض النووى *chain terminator* ويتم الحصول عليه بحذف مجموعة *OH* من عند الموقع (3) ولذا يعرف باسم *dideoxynucleoside triphosphate*

وتعتمد طريقة (سانجر) على إجراء تضاعف المادة الوراثية بتوفير إنزيم *DNA polymerase* وبادئ مشع *Labelled Primer* وطرز الدى أوكسى نيوكليوتيدات *Deoxynucleotide triphosphate* الأربعة. ويشترط أن يكون أى من البادىء أو الدى أوكسى نيوكليوتيدات مشعة حتى يمكن متابعة الجزيئات كما سنرى فيما بعد. وحجر الزاوية فى هذه التقنية هو أن يضاف قدر ضئيل من أحد مركبات الداى دى أوكسى نيوكليوتيدات *dideoxynucleotides* – $\bar{2}$ ، $\bar{3}$ الأربعة – وهى :

dideoxythymidine triphosphate (dd TTP)
dideoxycytidine triphosphate (dd CTP)
didcoxyadenosine triphosphate (dd ATP)
dideoxyguanosine triphosphate (dd GTP)

وميزة هذه المركبات هى عدم وجود مجموعة (*OH*) فى ذرة الكربون رقم ($\bar{3}$) فى جزىء السكر الخاص بها. فإذا ما ارتبط أى من هذه الجزيئات فى شريط *DNA* فإنه يتعذر بعد ذلك ارتباط أى *deoxynucleotide* لاحق، وبذلك تقف عملية نمو الشريط *DNA* عند هذا الحد.

وغنى عن القول أن هذه المركبات الأربعة الموضح أسماؤها فيما سبق يتم إدخال أى منها فى الشريط الجديد النامى لحمض *DNA* بعد فصل مجموعتى فوسفات من كل منها كما فى الحالة العادية.

وفيما يلى موجز بالخطوات الأساسية للكشف عن تتابع الجزيئات المكونة للمادة الوراثية بطريقة سانجر *DNA-Sequencing*: (شكل ٨٥ أ ملون).

• باستخدام أحد إنزيمات القصر *A restriction enzyme* يتم تقطيع جزىء *DNA* إلى قطع *fragments* تتميز بأن لكل منها طرف يحمل نفس تتابعات الدى أوكسى نيوكليوتيدات، ولكن هذه القطع غير متساوية الطول بالطبع.

• تفصل هذه القطع عن بعضها حسب طول كل منها عن طريق الفصل الكهربائى باستخدام ألواح الجيلاتين.

• تستخلص قطع حمض *DNA* من شرائط الجيلاتين *DNA-elution*.

• تجرى مضاعفة *amplification* لكل مجموعة من قطع *DNA* على حدة باستخدام تقنية تفاعل البلمرة المتسلسل (*PCR*) وذلك فى وجود بادىء *primer* والدى أوكسى نيوكليوتيدات الأربعة وكمية قليلة من أحد الداى دى أوكسى نيوكليوتيدات (وليكن *ddATP*).

• ومن الجدير بالذكر أن البادىء سيحتوى على مجموعة (*OH*) عند ذرة الكربون رقم ($\bar{3}$) لجزىء السكر مما يساعد على ارتباط أحد جزيئات النيوكليوتيدات المزود بها التفاعل.

وبذلك سيبدأ تخليق شريط جديد أمام كل شريط قديم – وسيتوالى ترتيب النيوكليوتيدات الجديدة فى بناء الأشرطة الجديدة – ولكن عملية بناء أى شريط ستقف إذا أخذ جزىء (داى دى أوكسى نيوكليوتيد) فى بناء الشريط الجديد. وحدوث هذا الاحتمال الأخير يتم عشوائيا ويؤدى ذلك إلى أن الجزيئات الجديدة ستكون متفاوتة فى أطوالها ولكن كل منها ينتهى بالداى دى أوكسى نيوكليوتيد *dd ATP* ويبدأ عند الموقع نفسه.

• تكرر الخطوة الأخيرة مع كمية أخرى من نفس قطع *DNA* ولكن يضاف إليها كمية قليلة من داى دى أوكسى نيوكليوتيد آخر (وليكن *dd TTP*) وعندئذ فإن الأشرطة الجديدة ستتفاوت أطوالها أيضا وينتهى كل منها بالداى دى أوكسى نيوكليوتيد *dd TTP*.

• نكرر مرة ثالثة ثم رابعة باستخدام الداى دى أوكسى نيوكليوتيد *dd CTP* ثم الداى دى أوكسى نيوكليوتيد *dd GTP*.

• تؤخذ قطع الـ *DNA* الناتجة عن العمليات المضاعفة الأربع ويجرى لها فصل كهربائى باستخدام ألواح الجيلاتين، وهذا يتم بعمل أربع حفر *wells* متجاورة فى لوح الجيلاتين، ليوضع فى كل حفرة قطع *DNA* (الشكل الملون ٨٣) التى تنتهى شرائطها بأحد الداى دى أوكسى نيوكليوتيدات.. ويمثل الجيلاتين، الممتد أمام كل حفرة ما يسمى حارة *Lane*. يؤدى الفصل الكهربائى إلى انفصال قطع الحمض النووى فى شرائط فى كل حارة فى الجيلاتين حسب أطوالها. وتعبر شرائط كل حارة عن تواجد أحد النيوكليوتيدات. ويمكن عن طريق تتبع النيوكليوتيدات فى الحارات الأربع للجيلاتين معرفة (قراءة) ترتيب النيوكليوتيدات المكونة للقطعة من جزئ *DNA* المستخدمة.

طريقة ماكسام وجلبرت *Maxam and Gilbert Method*

تجدر الإشـارة إلى أن ماكسـام وجلبرت *A. Maxam and W. Gilbert* من جامعة هارفارد كانا قد ابتكرا طريقة أخرى للكشف عن تتابع النيوكليوتيدات في الحمض النووى *DNA* ونشرا بحثهما فى العدد ٧٤ لعام ١٩٧٧ من مجلة *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*.

وتتحدد طريقة «ماكسام وجلبرت» في الخطوات الآتية (شكل ٨٥ ب ملون):

١ – إكثار الجزء من الحمض النووى *DNA* المراد معرفة تتابعاته.

٢ – وسم *labelling* أحد طرفى قطع الحمض النووى بعنصر مشع وليكن ^{32}P.

٣ – تقسيم أجزاء الحمض النووى إلى أربع مجموعات.

٤ – استخدام مواد كيميائية معينة تخضع أجزاء الحمض النووى إلى تحلل كيميائى *Chemical degradation* وفق ضوابط معينة كما يلى:

- إخضاع المجموعة الأولى من قطع الحمض النووى *DNA fragments* إلى تحلل كيميائى يؤدى إلى كسـر هذه القطع عشـوائيا قبل القاعدة النيتروجينية *G*. سـينتج عن ذلك قطع *DNA* متفاوتة الأطوال وذلك على حسـب موقع القاعدة *G* التى انكسرت قبلها قطعة الحمض النووى.
- إخضاع المجموعة الثانية من قطع الحمض النووى لتحلل كيميائى يؤدى إلى كسر هذه القطع عشوائيا قبل أى من القاعدتين *A+G* سـينتج عن ذلك قطع *DNA* متفاوتة الأطوال وذلك على حسـب موقع القاعدة *G* أو القاعدة *A* التى انكسـرت قبل أى منهما قطعة الحمض النووى.
- إخضاع المجموعة الثالثة من قطع الحمض النووى لتحلل كيميائى إلى كسر هذه القطع عشوائيا قبل القاعدة النيتروجينية *C*. سينتج عن ذلك قطع *DNA* متفاوتة الأطوال وذلك حسب موقع القاعدة *C* التى انكسرت قبلها قطعة الحمض النووى.
- إخضاع المجموعة الرابعة من قطع الحمض النووى لتحلل كيميائى يؤدى إلى كسر هذه القطع عشوائيا قبل أى من القاعدتين *C+T* سـينتج عن ذلك قطع *DNA* متفاوتة الأطوال وذلك على حسـب موقع القاعدة *C* أو القاعدة *T* التى انكسـرت قبل أى منهما قطعة الحمض النووى.

ويلاحظ أنه فى جميع الحالات يتم كسر كل قطعة *DNA* فى موقع واحد فقط. وأن كل جزء ناتج يمتد من الطرف المشع حتى القاعدة النيتروجينية التى تسبق مباشرة القاعدة التى دمرت فى عملية التحلل الكيميائى.

٥ – يجـرى تفريـد كهربى على لوح جيلاتينى *gel electrophoresis* للمجموعـات الأربع من قطع الحمض النووى *DNA* بعد تمام إجراء التحلل الكيميائى.

سوف تنفصل قطع كل مجموعة عن بعضها حسب أطوالها لتكون شرائط *bands* يمكن مشاهدتها بتطبيق تقنية الإشعاع الذاتى *autoradiography* حيث إن قطع الحمض النووى مشعة كما سبق القول. ومن المتوقع بالطبع أن كل الشرائط *bands* التى سنشاهدها فى الحارة *G* سـتكون موجودة فى الحارة *A+G*، كما أن كل باندات الحارة *C* سـتكون موجودة فى الحارة *C+T*.

ويمكن بذلك قراءة تتابع النيوكليوتيدات برصد مواقع الباندات فى الحارات الأربع على لوح الجيلاتين.

ملحوظة: القاعدة النيتروجينية المرتبطة بالعنصر المشـع يتعذر إدراك طبيعتها بهذه التقنية لأن تحلل قطعة الحمض النووى قبل هذه القاعدة سيؤدى إلى عدم وجود مادة وراثية مرتبطة بالعنصر المشع وبالتالى عدم وجود شريط على لوح الجيلاتين.

استخدام مجسات الحمض النووى (*DNA Probes*) للكشف عن تسلسل معين من الجزيئات:

هـى قطع من شـريط واحـد من حمض *DNA*، يتكـون كل منها مـن تتابع معين مـن النيوكليوتيدات تحمل النظير المشـع (^{32}P *Isotope*)، وتجهـز هذه المجسـات للارتباط (أو للتهجين *hybridize*) مع شـريط *DNA* ذى تتابعـات نيوكليوتيدات متممة *Complementary Sequence* يسـتهدف التحقق من وجوده. ويوضح الشـكل الملون (٨٦) عند أعلاه شـريط المجس محتويا النظير

المشع. ويوضح الشكل أيضا قطعًا من شريط حمض *DNA* التي يطلب 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 الذاتي) *Autoradiography*. وغنى عن البيان أنه كلما كان المجس يحتوى على عدد أكبر من التتابعات كانت قدرته أكبر على الارتباط (فقط) بالشريط المطلوب.

وتعرف ثلاثة طرز من مجسات *DNA* :

(أ) حمض *DNA* المتمم *Complementary DNA (cDNA)* :

وهى أجزاء من حمض *c-DNA* تم الحصول عليها باستخدام إنزيم النسخ العكسى *Reverse Transcriptase* أمام شريط *m-RNA*، وعلى ذلك فالمجس يتكون من تتابعات حمض *DNA* الموجودة فى المناطق المعروفة باسم إسكونات *exons* فقط، ويتراوح طول المجس من بضعة مئات إلى عدة آلاف من النيوكليوتيدات.

(ب) مجسات جينومية *Genomic Probes* :

وهى قطع من حمض *DNA* تحوى اكسونات *exons* أو إنترونات *introns* وقد لا تحتوى جينات محددة. ويتراوح طول المجس من بضعة مئات إلى عدة آلاف من النيوكليوتيدات.

(جـ) مجسات قليلة النيوكليوتيدات *Oligonucleotide Probes* :

وهى تتكون من عدد يتراوح بين ٢٠ – ٣٠ نيوكليوتيد.

ويوضح الشكل الملون (٨٧) استخدام مجس لمنطقة من حمض *DNA* مصابة بطفرة جين مرض الأنيميا المنجلية *Sickle Cell Anaemia* ومجس آخر للمنطقة نفسها من الحمض النووى غير الطافر (الطبيعى)، وذلك للتهجين مع نفس المنطقة من الحمض النووى فى المادة الوراثية لثلاثة أشخاص. وبالطبع فإن المجس الذى يحمل الطفرة سيتهجن مع الجين المصاب بالطفرة، أما المجس الذى لا يحمل الطفرة فإنه سيتهجن مع الجين السوى.

ويوضح الرسم لوح جيلاتين استخدم للفصل الكهربى للعينات – من الأفراد الثلاثة – التى هجنت مع المجس الطبيعى، ولوح جيلاتين آخر استخدم للفصل الكهربى للعينات – من نفس الأفراد الثلاثة – هجنت مع المجس الذى يحمل طفرة الأنيميا المنجلية.

وتوضح دراسة لوحى الجيلاتين أن :

• الفرد رقم (١) يحمل جينين طبيعيين حيث إنه لم يظهر له شريط فى لوح الجيلاتين الخاص بالفصل الكهربى للعينات التى تم تهجينها مع مجس يحمل الطفرة، بينما ظهر له شريط فى لوح الجيلاتين الخاص بالفصل الكهربى للعينات التى هجنت مع مجس سوى (للجين الطبيعى).

• الفرد رقم (٢) يحمل جينين لمرض الأنيميا المنجلية حيث لم يظهر له شريط فى لوح الجيلاتين الخاص بالفصل الكهربى للعينات التى هجنت مع مجس سوى، بيما ظهر له شريط فى لوح الجيلاتين الخاص بالفصل الكهربى للعينات التى هجنت مع مجس سوى (للجين الطبيعى).

• الفرد رقم (٣) يحمل جينا طبيعيا وجينا للأنيميا المنجلية حيث ظهر له شريط فى كل من لوحى الجيلاتين.

طريقة سزرن لالتقاط حمض *Southern Blotting (DNA)* :

تهدف هذه الطريقة إلى التعرف على جزء معين من حمض *DNA* يحمل تتابعات معينة فى تحضير دائم. وقد ابتكر هذه الطريقة الباحث إدوارد سزرن *Edward Southern* من قسم علم الحيوان فى جامعة إدنبرة فى سكوتلندة ونشرها فى مجلة *J.Mol. Biol.* عام ١٩٧٥. وفيما يلى خطوات عمل هذه الطريقة : (شكل ملون ٨٨)

• يجرى هضم المادة الوراثية بواسطة إنزيم قصر *Restriction enzyme* وبذلك يتم تكسيرها إلى قطع صغيرة منها القطعة المطلوب تحديدها.

• يجـرى فصــل كهربائى جيلاتينى *get electrophoresis* لهذه القطع فتكون شــرائط على لوح الجيلاتين *gel* يحتل كل منها موقعه حسب طوله.

• تؤخذ صورة للوح الجيلاتين وعليه شرائط حمض *DNA*.

• يغمر لوح الجيلاتين فى محلول قلوى (أيدروكســيد صوديوم) ويعمل ذلك على فصل الشــريطين المكونين لقطع حمض *DNA* عن بعضهما، ويعرف ذلك باسم *Denaturation*، حيث تصبح المادة الوراثية على شكل شرائط *Strands*.

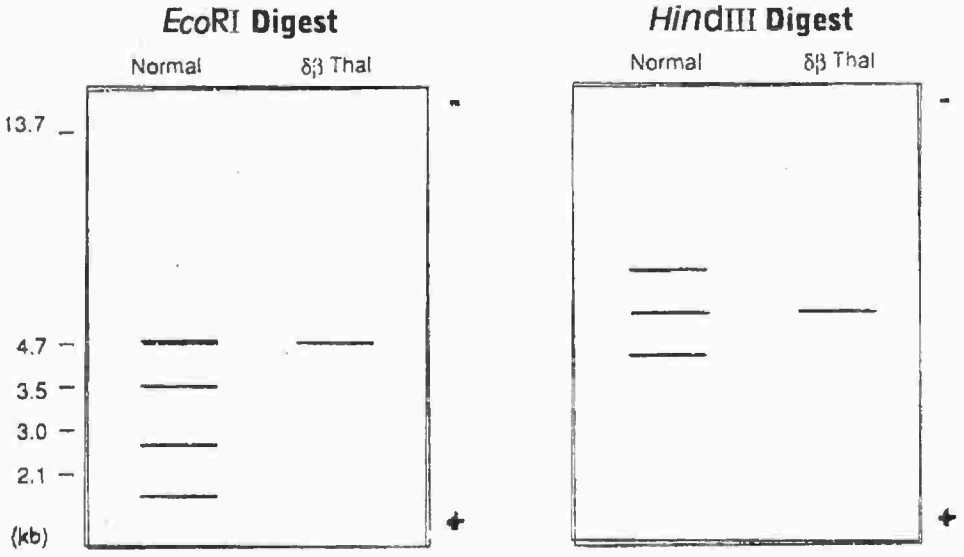
• يتم التقاط شرائط حمض *DNA* أى نقلها من لوح الجيلاتين إلى لوح من نيترات السليولوز *Cellulose nitrate filter* فيما يعرف باسم (إلتقاط سزرن) *Southern blotting*، وفى هذه الطريقة تغمس أطراف ورقة ترشيح ماص فى صينية تحتوى على سائل معين، ثم يوضع فوقه لوح الجيلاتين الذى تقع عليه شرائط حمض *DNA*، ويوضع لوح نيترات السليولوز فوق لوح الجيلاتين. ثم يوضع فوق لوح الســليولوز رزمة من ورق الترشــيح الماص يعلوها ثقلا زنته حوالى كيلو جرام واحد، فتنتقل بذلك شرائط حمض *DNA* إلى لوح نيترات السليلولوز تحت تأثير الحركة الصاعدة للمحلول من خلال ورق الترشيح.

• تعمل شرائط حمض *DNA* على لوح نيترات السليولوز بمجس *probe* من شريط *DNA* الموسوم بالفوسفور المشع والذى يحمل التتابعــات المكملة لأحد شــريطى جزىء *DNA* المراد البحث عنه، وبذلك يتم تهجينــه *hybridization* أى اتحاده معه إن وجد. يغســل لوح السليولوز لإزالة المجســات غير المرتبطة. يستطيع الباحث مشاهدة موقع الجزىء المهجن وذلك باستخدام الضوء فوق البنفسجى. كما يمكن تصويره بفيلم أشعة إكس.

وفى النهاية تجرى مشاهدة موقع هذا الجزىء مع شرائط *DNA* التى سبق التقاط صورة لها وهى على لوح الجيلاتين.

ولعل القارئ يلاحظ أن اسم العالم الذى ابتكر هذه الطريقة *Southern* يعنى (الجنوبى). ومن الطريف أن تسمية بعض التقنيات الأخرى ارتبطت باسم هذه التقنية، فهناك تقنية سميت (الالتقاط الشمالى) *Northern blotting* وهى خاصة بحمض *RNA*، كما أن هناك تقنية تعرف باسم (الالتقاط الغربى) *Western blotting* وهى خاصة بالبروتينات. وتجدر الإشارة إلى أن اسمى هاتين التقنيتين هما تعبيران رمزيان شاعا فى المعامل *Laboratory Jargon*، وليس هنا ضرورة لشرح تفصيلات هاتين التقنيتين.

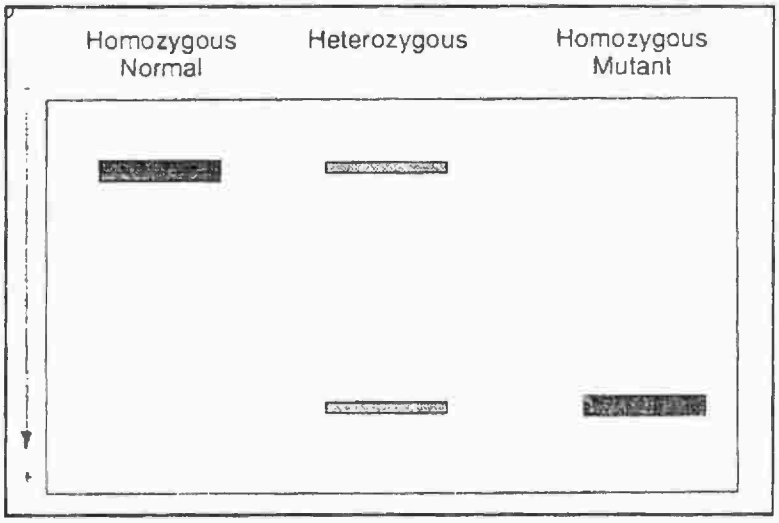
ويوضح شكل ٨٩ تجربتين أجريتا على الجلوبين السوى والجلوبين المصاب بالثالاسيميا (دلتا وبيتا) فى كل تجربة، حيث تم إخضاع الجلوبين فى التجربة الأولى لإنزيم القصر *EcoRI* وفى التجربة الثانية لإنزيم القصر *HindIII*. وفى كل تجربة اختلف نظام الشرائط *DNA* فى الحالة السوية عن الحالة المرضية.



(شكل ٨٩)
إخضاع حمض *DNA* من فرد مصاب بالثالاسيميا (دلتا وبيتا)، وحمض *DNA* من شخص سوى مرة للهضم بإنزيم *EcoRI* ومرة أخرى بإنزيم *HindIII*. نظام الشرائط يختلف باختلاف إنزيم القصر المستخدم

وفى كل تجربة تم استخدام إنزيم القصر ثم الفصل الكهربى على ألواح الجيلاتين ثم إجراء التقاط سيزرن على ألواح نيترات سليلوز تعرض فى خطوة تالية لمحلول قلوى لفك شريطى أجزاء الحمض النووى *DNA* عن بعضهما البعض. وفى خطوة تالية استخدم مجس (مشع) مكمل لجين الجلوبين، ويوضح تصوير هذه الألواح الشرائط التى تهجنت مع المجس فى كل حالة.

ومن الجدير بالذكر أن أول حالة يتم تشخيصها لمرض وراثى أصاب جنينا بشريا عن طريق تحديد الجين الطافر كانت لمرض ألفا ثالاسميا. وكان ذلك فى عام ١٩٧٦ على يد العالم *Kan* وزملائه. ثم أجروها بعد ذلك على جنين مصاب بالأنيميا المنجلية فى عام ١٩٧٨.



(شكل ٩٠)
الفصل فى الجيلاتين يعطى شرائط *bands* يمكن التمييز عن طريقها بين الأفراد الذين يحملون الجين السوى بصورة مزدوجة (نقية). والأفراد الذين يحملون جين المرض بصورة مجينة (خليطة). والأفراد الذين يحملون جين المرض بصورة نقية.

ويوضح شكل ٩٠ إمكانية التفرقة بين وجود جين طبيعى (سوى) بصورة مزدوجة (نقى)، ووجوده بصورة خليطة (سوى/طافر)، ووجوده بصورة نقية طافرة وذلك فى حالة أن طفور الجين يرجع إلى طفرة نقطية.

تقنية (تعدد أطوال قطع القصر) *Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP)*

تعرف هذه التقنية اختصارًا بكلمة (رفلب)، وهى تعتمد على وجود اختلاف بين الأفراد من حيث المواقع التى تعمل عندها إنزيمات القصر فى المادة الوراثية مما يترتب عليه اختلاف أطوال قطع حمض *DNA* الناتجة عن المعاملة الإنزيمية. وينشأ اختلاف مواقع القطع التى يعمل عندها الإنزيم فى الأفراد نتيجة حدوث طفرات فى طرز النيوكليوتيدات فى مواقع معينة. بعد ذلك يجرى فصل لقطع *DNA* باستخدام الفصل الكهربى على ألواح الجيلاتين *gel electrophoresis*، ثم يتم التقاط شرائط حمض *DNA* من لوح الجيلاتين إلى لوح نيتروسليولوزى *nitrocellulose filter* وهى التقنية المعروفة باسم (إلتقاط سزرن *Southern blotting*)، ثم يعامل لوح النيتروسليولوز بواسطة مجس *probe* وسيترتب على ذلك تهجن *hybridization* المجس مع أطوال مختلفة من قطع *DNA* فى العينات المختلفة، ويظهر ذلك فى صور لوح النيتروسليولوز التى تلتقط بأفلام أشعة (*X*)، وبالطبع يستدل على اختلاف أطوال قطع *DNA* عن طريق اختلاف مواقع الشرائط.

ويوضح (شكل ملون ٩١) قطعتين متناظرتين من حمض *DNA* كل منهما من فرد مختلف وطول كل منهما (٩) كيلوبيز (الكيلو بيز يساوى ألفا من أزواج النيوكليوتيدات)، حيث يقوم إنزيم القصر *BamHI* بقطع الجزىء رقم (*I*) عند ثلاثة مواقع فى التتابع *GGATCC*، فينتج لدينا قطعتان الأولى طولها (٤) كليوبيز، والثانية طولها (٥) كليوبيز. أما الجزئ رقم (*II*) فقد حدثت به طفرة فى الموقع الأوسط غيرت التتابع عنده إلى *GGGTCC* مما جعل إنزيم القطع *BamHI* لا يعمل عند هذا الموقع، وبالتالى سينتج عندها قطعة واحدة طولها ٩ كيلوبيز.

وعند استخدام المجس على لوح النيتروسليولوز فإنه فى الجزىء رقم (*I*) سيرتبط مع قطعة من جزىء *DNA* طولها ٤كيلوبيز، ولكنه فى الجزىء رقم (*II*) سيرتبط مع قطعة من جزىء *DNA* طولها ٩ كيلوبيز. وبالطبع فإن كل قطعة سيكون لها موقع مختلف على لوح النيتروسليولوز، وبهذا تستخدم هذه التقنية فى التمييز بين الفردين. وتجرى هذه التقنية عادة باستخدام عدد من إنزيمات القصر لتزداد فعاليتها.

ويوضح شكل ٩٢ (ملون) جين حالة مرضية أعطى الرمز (*D*) وهو جين سائد على الجين الطبيعى (*Wild Type (WT*) وفى هذا المثال نجد الجين (*D*) مرتبطا *linked* بحدوث *RFLP*. ومن هنا فالشخص الخليط فى الحالة المرضية سيعطى شريطا يمثل الجزء الكامل من المادة الوراثية A_2 وشريطا آخر للقطعة A_1 من المادة الوراثية للجين الثانى التى تحمل الجين المريض. أما الشخص السوى ففيه الجينان الطبيعيان يغيب عنهما تأثير *RFLP* وبالتالى سيعطينا شريطا واحدا.

وتشتمل خطوات العمل على إجراء التقاط سزرن *Southern blotting* لتحميل المادة الوراثية على لوح *filter*، ثم إجراء تهجين *hybridization* مع مجس مشع، ثم يتم تصوير اللوح *filter* بأشعة إكس لتظهر الشرائط على الفيلم.

❑❑❑