الفصل الثاني عشر

تكنولوجيا د. ن. أ المعاد صياغته
Recombinant DNA Technology

شهد النصف الثانى من خمسينيات القرن العشرين مولد الوراثة الجزيئية Molecular Genetics مع إعلان نموذج الحلزون المزدوج DNA Double Helix الذى أعلنه واتسون وكريك Watson and Crick عام ١٩٥٣ لتفسير تركيب جزئ د. ن. أ على اعتبار أنه مادة الوراثة، حيث تكمن العوامل الوراثية المسئولة عن الصفات المختلفة للكائن فى تتابع القواعد النيتروجينية الموجودة على شريط د. ن. أ فى النواة. أعقب ذلك تطورات متلاحقة فى الستينات للتعرف على الأساس الجزيئ لعملية تضاعف وتناسخ جزئ د. ن. أ والتركيب الدقيق للجين والنظم الوراثية والبيوكيماوية المسيطرة على معدل التعبير الجينى مثل نظم الأوبرون Operon System. واستمرت مراكز البحوث منذ السبعينات وحتى الآن فى نشر نتائج البحوث فى هذا المجال بحيث أصبح كل يوم يأتى بجديد.

تكنولوجيا الجين المعاد صياغته:

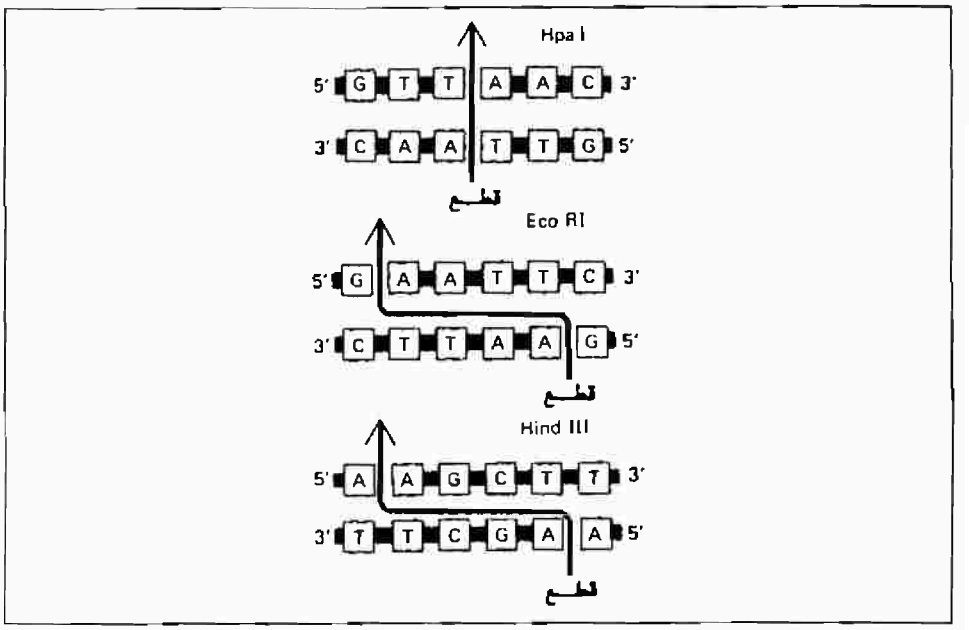
Recombinant DNA Technology :

شهد منتصف السبعينات ميلاد Recombinant DNA Technology أو تقنية الجين Gene Technology. وفيما يلى شرح مختصر لبعض العناصر الرئيسية المستخدمة فى هذة التقنية.

انزيمات القطع المحددة Restriction Endonucleases:

توجد بعض انزيمات القطع الداخلى Endonucleases وهى تلك الانزيمات التى تقوم بقطع جزئ د. ن. أ عند تتابعات محددة من أزواج القواعد الداخلية يطلق عليها تتابعات التعرف Recognation Sequnces والتى يوجد بداخلها موقع معين يعرف بموقع القطع Cleavage Site.

وتعتبر إنزيمات القطع الداخلى الأداة الرئيسية فى بحوث د. ن. أ المعاد صياغته Recombinant DNA . وقد جاءت تسمية هذه الانزيمات فى الأصل بالانزيمات المحددة Restriction Enzymes نتيجة لأن وجودها فى خلية بكتيرية معينة يحد أو يمنع نمو البكتريوفاج بها. تقوم انزيمات القطع الداخلى بقطع د. ن. أ الى قطع صغيرة عند تتابع نوعى متخصص محدد. وعلى العكس من معظم التفاعلات الانزيمية أو الكيماوية أو الفيزيائية التى تحدث قطعاً عشوائياً فى جزئ د. ن. أ فإن هذه الإنزيمات المحددة والتى يبلغ عددها حوالى ٢٠٠ انزيم تتعرف على تتابعات نوعية قصيرة مكونة من ٤-٦ أزواج من القواعد وتُحدث كسر نوعى فيها كما فى الشكل (١٢-١).



الشكل (١٢-١): تتابعات النيوكلتيدات فى د ن أ التى يتم التعرف على كل منها بواسطة ثلاثة إنزيمات قطع محددة شائعة الإستخدام و يتكون التتابع عادة من ستة أزواج من القواعد

ويوجد إلى جانب هذه الانزيمات فى الخلية البكتيرية مجموعة مصاحبة من انزيمات الميثلة DNAmethylases التى تقوم باضافة مجموعات ميثيل إلى جزئ د. ن. أ البكتيرى حتى تحمية من أن يستخدم كمادة تفاعل فتقوم انزيمات القطع المحددة لنفس البكتريا بتكسيرة وهضمة ذاتياً. وعلى ذلك فإن انزيمات ميثلة د. ن. أ النوعية الموقع تكون ملازمة دائماً لانزيمات القطع المحددة فى البكتريا. تسمى انزيمات القطع حسب نوع البكتريا التى تستخلص منها هذه الانزيمات كما فى الجدول (١٢-١).

الجدول (١٢-١): بعض الانزيمات محددة القطع الداخلى والتتابعات النوعية التى تتعرف عليها وموقع القطع لكل منها (↓).

الانزيم	التتابع المميز	المصدر البكتيرى
Bam HI	G ↓ GATCC CCTAG ↑ G	*Bacillus amyloliquef aciens H.*
Bg 1 II	A ↓ GATCT TCTAG ↑ A	*Bacillus globigi*
Eco RI	G ↓ AATTC CTTAA ↑ G	*E. coli* RY13
Eco RII	↓ CCTGG GGACC ↑	*E. coli* R245
Hind III	A ↓ AGCTT TTCGA ↑ A	*Haemophillus influenzae Rd*
Hha I	GCG ↓ C C ↑ GCG	*Heamophillus haemolyticus*
Hpa I	GTT ↓ AAC CAA ↑ TTG	*Haemophilus parainfluenza*
Mst II	CC ↓ TNAGG GGANT ↑ CC	*Microcoleus strain*
Past I	CTGCA ↓ G G ↑ ACGTC	*Providencia stuartil 164*
Taq I	T ↓ CGA AGC ↑ T	*Thermus aquaticus YTI*

• N= أى نوع من النيوكليتدات الأربعة.

فمثلاً انزيم Eco RI يستخلص من بكتريا القولون *E. coli* وهكذا. تكون أول ثلاث حروف من اسم الانزيم مشتقة من أول حرف فى الجنس البكتيرى الذى يستخلص منه (E) والحرفين الأولين فى النوع البكتيرى (co)، وقد يتبع ذلك اسم السلالة النوعية التى استخدمت فى الاستخلاص (R) ورقم لاتينى (I) يحدد أسبقية اكتشاف الانزيم. يتعرف كل انزيم على تتابع نوعى من أزواج القواعد فى جزئ د. ن. أ مكونا من ٤-٧ من أزواج القواعد. ويحدث كسراً محدداً به [وتبين الأسهم فى الجدول (١٢-١) مكان القطع بين القواعد لكل

انزيم] وقد ينتج عن القطع نهايات مزدوجة السلسلة blunt ends كما في حالة انزيم (Hpa I) أو نهايات وحيدة السلسلة sticky ends (لزجه) كما فى حالة انزيم Bam HI كما فى الشكل التالى :

```
- G ↓ GATCC      Bam H1           - G     GATCC-
- CCTAG ↑ G    ---------->   - CCTAG +     G-
```

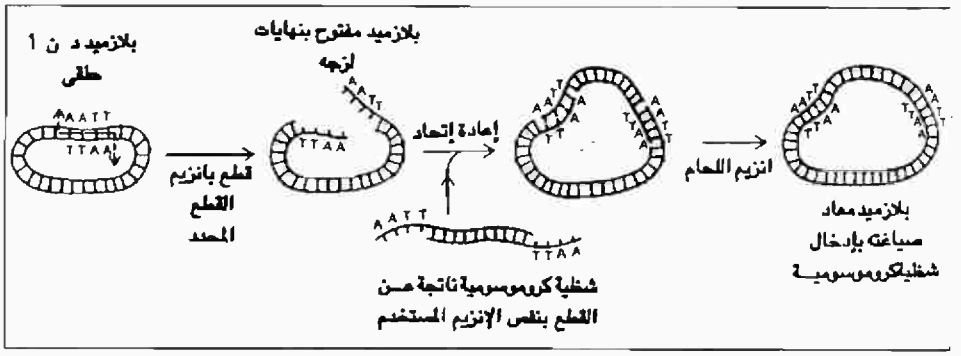
نهاية لزجة

```
- GTT ↓ AAC       HpaI        - GTT  +  AAC-
- CAA ↑ TTG    ---------->   - CAA      TTG-
```

نهاية مزدوجة .

ويرجع ذلك إلى الميكانيكية التى يستخدمها الانزيم. وتعد النهايات اللزجة ذات فائدة عملية كبيرة فى تكوين جزئ د. ن. أ هجينى معاد صياغته (الشكل ١٢-٢) يمكن فى حالة عدم الحصول على نهايات فردية لزجة Sticky Ends، استخدام انزيم Terminal Transferase للحصول على ذيل فردى فى نهاية القطع المحددة وفى وجود عدد معين من نيوكلتيدات dATP لانتاج ذيل من عديد الادينين Poly A Tail (طوله حوالى ١٠٠ نيوكلتيدة) على النهاية (3') على د.ن.أ البلازميد بينما يمكن اضافته إلى ذيل من عديد الثايمين Poly T بنفس الطول على نهاية د. ن. أ المرغوب اضافته إلى البلازميد. ويتم بعد ذلك التقاء القطع عند الذيول المتكاملة بخاصية تزاوج القواعد Base Pairing ويتكون بينها روابط هيدروجينية وتستكمل عملية الالتحام بمساعدة انزيمات Polymerase I و Ligase كما سبق الذكر (أنظر الشكل ١٢-٢). وإذا افترضنا أن النيوكلتيدات تكون موزعة بتتابع عشوائى فى جزئ ما من د. ن. أ فإنه من الممكن حساب معدل تكرار القطع الذى يحدثه انزيم معين فى طول معين من د.ن. أ. إذ أنه لكل موقع فى جزئ د. ن. أ يكون هناك ٤ احتمالات: (T, G, C, A) وعلى ذلك فإن انزيم القطع الذى يتعرف على ٤ أزواج من القواعد سيحدث قطع (فى

المتوسط) مرة كل ٢٥٦ زوج من القواعد (4^4) فى حين أن الانزيم الذى يتعرف على ٦ أزواج من القواعد سيقوم بالقطع كل ٤٠٩٦ زوج نيوكلتيدى (4^6).



الشكل (١٢-٢): تمكن النهايات اللزجة الناتجة من بعض أنواع إنزيمات القطع المحددة من إلتحام قطع من د ن أ ببعضها حسب قانون تزاوج القواعد المكملة. شظايا د ن أ المتصلة بهذه الكيفية يمكنها تكوين روابط تساهمية قوية بمساعدة إنزيم الليجيز ويبدو فى الشكل بلازميد معاد صياغته بإضافة د ن أ كروموسومى إليه

ونتيجة لذلك فإن قطعة ما من د. ن. أ ستحتوى على مواقع خطية مختلفة ومميزة للأنزيمات المختلفة وبالتالى يمكن رسم خرائط القطع المحدد Restriction Maps. وعند هضم د. ن. أ بأنزيم قطع معين فإن نهايات جميع القطع الناتجة ستكون محتوية على نفس التتابع النيوكلتيدى ويمكن عزل القطع الناتجة باستخدام تقنية التفريد الكهربى باستخدام جيل الاجاروز Agarose كما سيأتى بعد. وتعد هذه الخطوة اساسية فى الكلونة Cloning كما تعتبر أحد الاستخدامات الرئيسية لهذه الانزيمات. ويمكن بالاستخدام الصحيح لهذه الانزيمات واختيار الانزيم المناسب الحصول على شظايا قصيرة نسبياً من د. ن. أ تحتوى على جين معين ويمكن فصل هذه الشظية عن بقية الشظايا غير المرغوبة بطريقة التفريد الكهربى.

بالاضافة إلى هذه المجموعة من انزيمات القطع المحدد توجد عدة انزيمات تقوم بأدوار رئيسية في مجال الهندسة الوراثية، ويلخص الجدول (١٢-٢) دور هذه الانزيمات في بحوث د. ن. أ المعاد صياغته Recombinant DNA.

الجدول (٢-١٢) بعض الانزيمات الهامة في بحوث د ن أ المعاد صياغته

الانزيم	التفاعل	الدور الأساسى
١- أنزيم الفوسفاتيز القاعدى Alkaline phophatase	نزع مجموعة الفوسفات من النهاية '5 من ر. ن. أ أو د.ن.أ	التخلص من مجاميع 5'-P04 قبل التعليم بالكينيز لمنع الالتحام الذاتى self- ligation
٢- BAL 31 nuclease	تحليل كل من النهايتين 5', 3' فى جزئ د. ن. أ	تقصير مضطرد فى جزئ د.ن. أ
٣- أنزيم لحام د. ن. أ DNA ligase	يساعد فى الربط بين جزيئات د. ن. أ	توصيل جزيئات د. ن. أ ببعضها
٤- DNA Pol I	بناء د.ن.أ مزدوج السلسلة من د.ن.أ أحادى السلسلة	بناء د.ن.أ المزدوج السلسلة وعمل ثغرة للترجمة nick-translation
٥- DNase I	تحت الظروف المناسبة ينتج قطع وحيدة السلسلة فى د.ن.أ	ثغرة الترجمة - وعمل خريطة لمواقع التتابعات فائقة الحساسية.
٦- Exonuclease III	نزع نيوكلتيدات من النهاية 3' لجزئ د.ن.أ	دراسة تتابعات قواعد د.ن.أ وعمل خريطة التفاعل بين د.ن.أ والبروتين
٧- λ Exonuclease	نزع نيوكلتيدات من النهاية 5' لجزئ د. ن. أ	دراسة تتابعات قواعد د.ن.أ DNA sequencing

٨- Polynucleotide kinase	نقل الفوسفات الطرفية (موقع γ) من ATP الى مجموعات 5'-OH فى د.ن.أ أو ر.ن.أ	تعليم DNA أو RNA بالفوسفور المشع P^{32} .
٩- انزيم النسخ العكسى Reverse Transcriptase	بناء DNA على قالب RNA	بناء cNDA من mRNA وفى دراسة خريطة النهاية '5 من RNA
١٠- S I nuclease	هدم د.ن.أ وحيد السلسلة	ازالة عروة دبوس الشعر Hairpin فى عملية بناء cDNA وفى دراسة خريطة mRNA (من كلا النهايتين ,'5 '3)
١١- Terminal Transferase	اضافة نيوكلتيدات إلى النهاية '3 من جزئ د.ن.أ بدون الحاجة إلى قالب د.ن.أ	اضافة ذيل متعدد متجانس Homopolymer(أى مكون من قاعدة واحدة متكررة مثل Poly A) لتكوين نهايات لزجة.

الكلونة Cloning:

يمكن تعريف الكلون بأنه عدد كبير من الجزيئات أو الخلايا المتطابقة التى تنشأ من أصل واحد. يمكن عن طريق الكلونة انتاج أعداد كبيرة من جزيئات د.ن.أ المتماثلة التى يمكن تعريفها وتمييزها أو استخدامها فى أغراض اخرى. تعتمد هذه التقنية على حقيقة أن جزئيات د.ن.أ الهجينية "الكيميرى" يمكن ادخالها فى ناقلات الكلونة Cloning Vectors التى تكون عادة أما بلازميد بكتيرى أو فاج أو كوزميد Cosmid والذى يستمر بعد ذلك فى التناسخ فى خلية مضيفة Host Cell ولكن تحت تأثير نظم التحكم الخاصة بهم. وبهذه الطريقة يمكن

الحصول على أعداد هائلة من نسخ الجين.وتتلخص الخطوات الاساسية لكلونة الجين Gene Cloniag (الشكل ١٢-٣) فى الاتى:

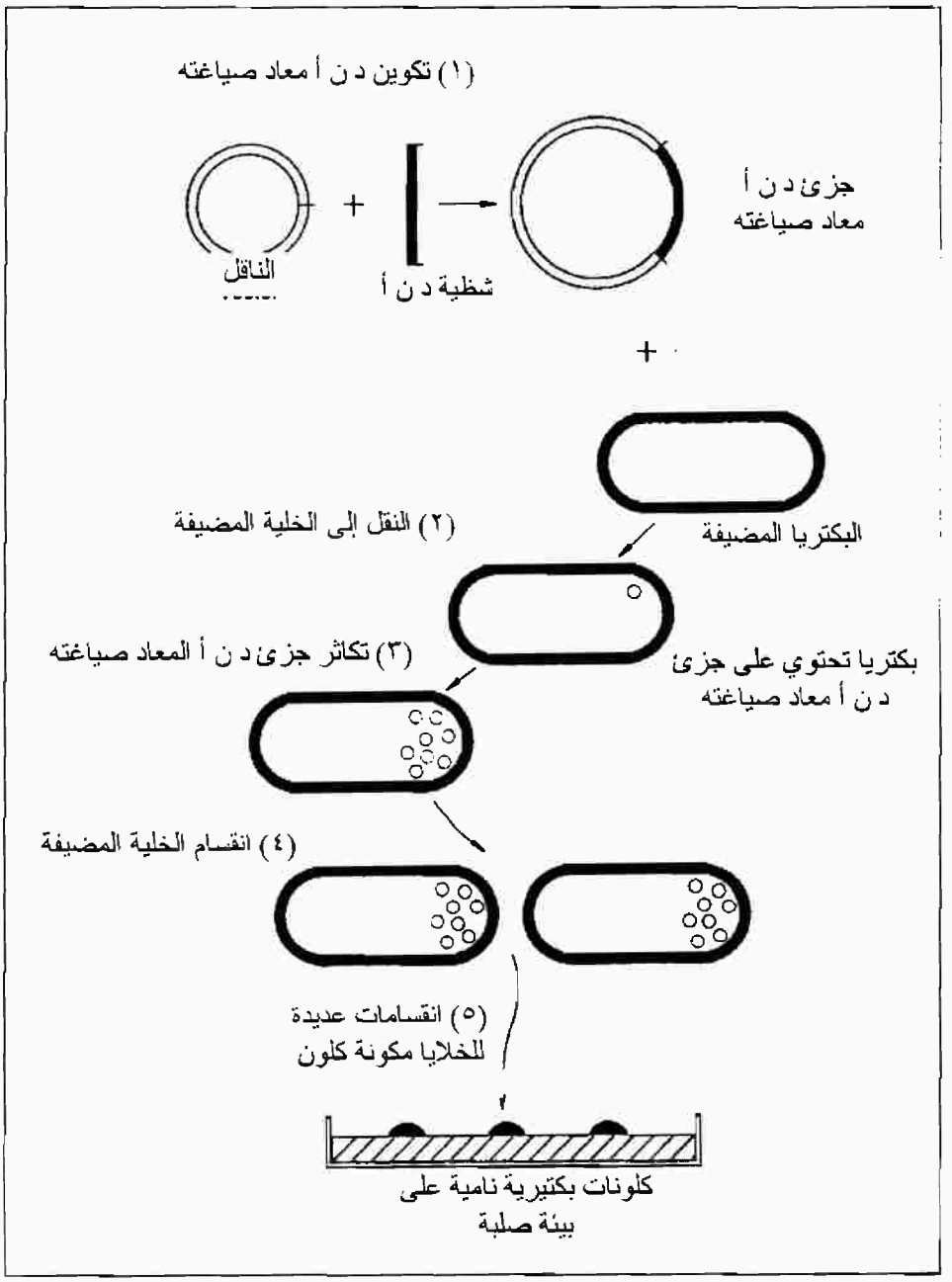
١- ادخال قطعة أو شظية من د.ن.أ محتوية على الجين المطلوب كلونته فى ناقل الكلونة Cloning Vector لا نتاج د.ن.أ معاد صياغتة (كيميرى) Recanbinat DNA.

٢- يلعب الناقل دور وسيلة الانتقال لادخال الجين الى الخلية المضيفة والتى تكون عادة بكتريا على الرغم من أنه يمكن استخدام خلايا حيه أخرى لاستضافة الجين.

٣- يتكاثر الناقل داخل الخلية المضيفة منتجا اعداد كبيرة جداً من النسخ المتطابقة بما فى ذلك نسخ من الجين المكلون.

٤- عندما تنقسم الخلية المضيفة فإن نسخ من جزيئات د.ن.أ المعاد صياغته Recombinant DNA تمر إلى خلايا النسل حيث يحدث بها تضاعف جديد للناقل.

٥- يعد عدد كبير من انقسامات الخلية المضيفة نحصل على كلون Clone (مستعمره) من الخلايا المضيفة المتطابقة وتحتوى كل خلية فى هذا الكلون على نسخة أو أكثر من د.ن.أ المعاد صياغته. ويقال للجين المحمول فى الجزئ المعاد صياغته انه قد تكلون Cloned.



الشكل (١٢-٣): الخطوات الأساسية فى عملية كلونة الجين

أنواع ناقلات الكلونة Cloning Vectors:

البلازميدات:

تكون البلازميدات البكتيرية عادة مكونة من جزئ صغير حلقى مزدوج من د.ن.أ والذى تكون وظيفته الطبيعية هى إكساب الخلية المضيفة لصفة المناعة ضد بعض المضادات الحيوية. وللبلازميدات عدة خواص تجعلها مفيدة جدا كناقلات الكلونة. إذ انها توجد كنسخة وحيدة أو عدة نسخ فى البكتريا، وتتناسخ مستقلة عن د. ن. أ البكتيرى كما أن تتابع القواعد فى جزئ د.ن.أ البلازميد معروف بالكامل مما يتيح معرفة المكان الدقيق لنشاط القطع للانزيم والذى يتم فيه إدخال د.ن.أ المراد اضافته. ويكون البلازميد أصغر بكثير من كروموسوم الخلية المضيفة مما يجعل من السهل عزله منها.

الفاج:

يتكون د. ن. أ الفاج من جزئ خطى من د. ن. أ الذى يمكن فيه ادخال القطع المرغوبة من د. ن. أ الجديد (الاجنبى) فى عدة مواقع للقطع الانزيمى المحدد. ويتم تجميع د. ن. أ الهجينى (الكيميرى) بعد أن يستكمل الفاج دورة التحلل للبكتريا Lytic Cycle وينتج وحدات فاج ناضجة معدية، والميزة الرئيسية للناقلات من نوع الفاج هى أنه بينما يمكن للبلازميد استقبال أو ادخال شظية د. ن. أ بطول حوالى ١-١٠ كيلو قاعدة، فإن الفاج يمكنه استيعاب شظايا د ن أ. بطول يتراوح بين ١٠-٢٠ كيلو قاعدة ويرجع ذلك إلى أن ما يمكن لحجم رأس الفاج أن تستوعبة يكون محدوداً.

الكوزميد Cosmid:

وهى مجموعة من الناقلات يمكنها أن تستقبل شظايا أطول من د. ن. أ وهى تجمع بين أفضل مميزات البلازميد والفاج معاً.

والكوزميد عبارة عن بلازميد يحتوى على تتابع د.ن.أ تسمى مواقع Cos (Cos Sites) المطلوبة لتعبئة د.ن.أ لامبدأ فى حبيبة الفاج. وتنمو هذه الناقلات فى صورة بلازميد فى البكتريا، ولكن حيث أن معظم د.ن.أ اللامبدا يتم استبعاده فإنه يمكن إدخال قطع أكبر من د.ن.أ الكيميرى فى رأس الحبيبة الفيروسية. ويمكن للكوزميد أن يستوعب قطع د.ن.أ بطول من ٣٥ إلى ٥٠ كيلو قاعدة.

وقد أستنبطت مؤخرا ناقلات كلونة Cloning vectors لديها القدرة على استيعاب شظايا د.ن.أ ذات احجام أكبر . ومن أهم هذه الناقلات:

الكروموسوم البكتيري الصناعي:

Bacterial Artificial Chromosomes BAC's:

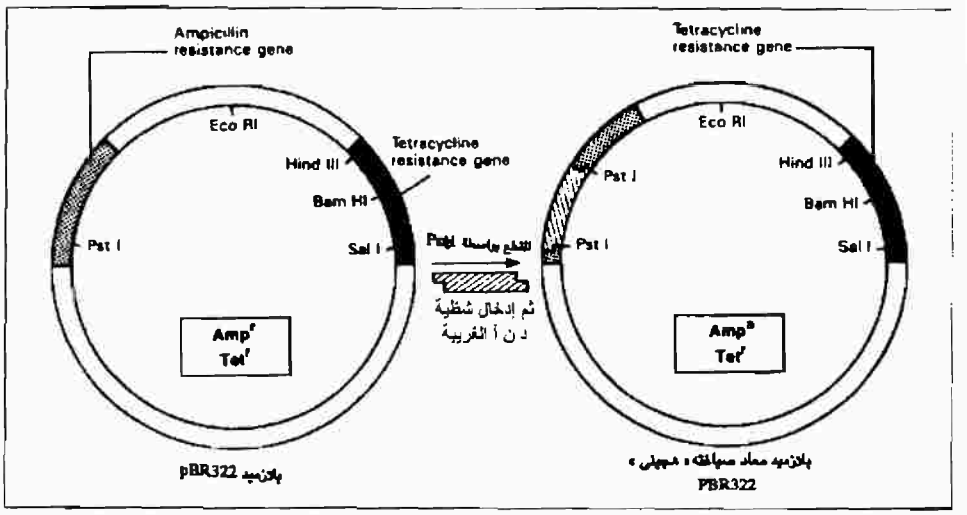
المشتق من بلازميد F. ويمكن لهذا الناقل أخذ شظية د.ن.أ بطول ٣٠٠-٦٠٠ك قاعدة مما يؤدى إلى خفض عدد كلونات مكتبة الجينوم البشرى إلى ٣٠٠٠٠ كلون فقط. كما استنبطت نافلات تجمع بين مزايا بكتريوفاج P1 وBAC's ويطلق عليها P1-Derived Artificial Chromosomes PAC's وتصل سعة هذا الناقل الى ٣٠٠ك قاعدة. ومن جهة أخرى امكن تكوين ناقل ذو سعة كبيرة تصل من ٦٠٠-١٢٠٠ك قاعدة ويطلق عليه Yeast Artifical Chromosome YAC's وهو مشتق من بلازميد بكتريا الفولون PBR322 مع إضافة عدد من جينات الخميرة اليه. ويبين الجدول (١٢-٣) مقارنة بين سعة هذه الناقلات.

الجدول (١٢-٣) بعض الناقلات الشائعة الاستخدام فى الكلونة

الناقل vector	حجم د.ن.أ الذى يمكن ادخاله (kb)
Plasmid pBR 322	١٠ -٠,١
Lambda Phage 4 A	٢٠ - ١٠
Cosmids	٥٠ - ٣٥
BAC's	٦٠٠-٣٠٠
YAC's	١٢٠٠-٦٠٠
PAC's	٣٠٠

يمكن أثناء عملية أدخال د.ن.أ إلى منطقة فعالة للناقل Vector أن يحدث تداخل مع عمل أو نشاط هذه المنطقة. ولذلك يجب الحذر من الاخلال بأحد الوظائف الضرورية للناقل. إلا أن هذا المفهوم يمكن استغلاله ايضا للتوصل إلى تقنية انتخابية. إذ يحتوى البلازميد pBR322 مثلا على جين المناعة ضد المضاد الحيوى Tetracyclin (tet^R)، وكذلك الجين الخاص بالمناعة ضد Ampicillin (amp^R) ويستخدم عادة موقع واحد للانزيم Pst1 داخل جين المقاومة للامبسلين (amp^R) كموقع إدخال لقطعة من د.ن.أ الغريب. وبالاضافة إلى أن هذا الموقع يحتوى على نهاية لزجة، فإن د.ن.أ المضاف فى هذا الموقع سيحدث خللا فى جين المقاومة للأمبسلين مما يؤدى إلى أن تكون الخلية البكتيرية الحاملة لهذا البلازميد حساسة للامبسلين كما فى الشكل (١٢-٤) وبالتالى يمكن التمييز بين البلازميد الأصلى والبلازميد الهجينى بفقد الأخير لصفة المقاومة للأمبسلين مع احتفاظة بالمقاومة للتراسيكلين. ويمكن التأكد من حدوث الادخال عن طريق معرفة الفرق فى الحجم بين البلازميد الأصلى والبلازميد الهجينى بطريقة التفريد الكهربى، حيث يكون البلازميد الأخير أكبر حجما عن الناقل الأصلى.

وسنتعرض فيما بعد للطرق المختلفة لاختيار الكلون المحتوى على الجين محل الدراسة.



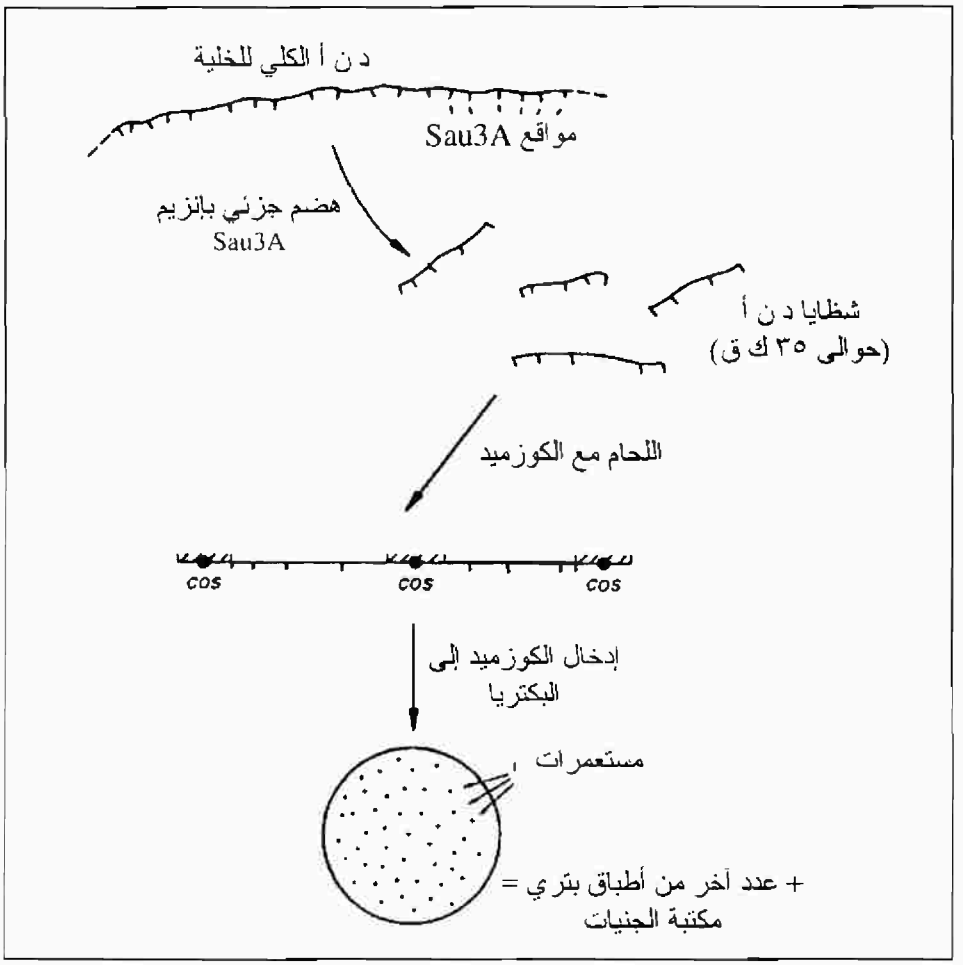
الشكل (١٢-٤): يتم التعرف على البلازميد المعاد صياغته بإدخال شظية د ن أ المرغوبة باستخدام إنزيم PSt1 مما يحدث خللا فى الجين المسئول عن المقاومة للأمبسيلين مما يفقده القدرة على المقاومة لهذا المضاد الحيوى عند تنمية البكتريا فى بيئة محتوية على الأمبسلين

مكتبة د.ن.أ (بنك الجينات) Gene library:

أ- المكتبة الجينومية:

يمكن باستخدام انزيمات القطع المحددة والأنواع المختلفة لناقلات الكلونة تعبئة الجينوم الكامل لكائن ما فى ناقلات. يطلق على المجموعة المكونة من هذه الكلونات المعاد صياغتها اسم المكتبة الجينومية. يمكن تكوين مكتبة جينوم من جميع قطع د.ن.أ المأخوذة من خط خلايا أو نسيج معين بحيث تكون هناك فرصة لاحتواءها على جميع الجينات الخاصة بهذا الكائن المأخوذة منه.

يتم انتاج مكتبة الجينوم بعزل وتنقية محتوى الخلية من د.ن.أ بإجراء عملية هضم جزئى لـ د.ن.أ بإنزيم قطع يتميز بارتفاع معدل نشاطة القطعى مثل SauIIIA. والغرض من ذلك هو الحصول على شظايا د.ن.أ طويلة نسبيا مما يضمن أن معظم الجينات ستكون سليمة ولم يحدث لأى منها أى تجزئة نتيجة القطع (الشكل ١٢-٥).



الشكل (١٢-٥): تكوين مكتبة جينات فى ناقل الكوزميد

ويمكن استخدام الفاج كناقل فى مثل هذه المكتبات أو الكوزميد أو YAC أوBAC لأنها تسمح بإدخال شظايا د.ن.أ كبيرة نسبياً (جدول ١٢-٣) وحيث أن الهدف هو الحصول على مكتبة كاملة فإن عدد الشظايا المطلوب يكون متناسباً عكسياً مع حجم الشظية وطردياً مع حجم الجينوم كما فى الجدول (١٢-٤).

الجدول (١٢-٤) عدد الكلونات Clones اللازمة لتكوين المكتبة الجينومية لمجموعة من الكائنات

النوع Species	حجم الجينوم (bp)	عدد الكلونات اللازمة		
		شظايا١٧ك قاعدة(١)	شظايا٣٥ك قاعدة (٢)	شظايا٣٠٠ك قاعدة (٣)
بكتريا القولون	$٤,٦ \times ١٠^{٦}$	٨٢٠	٤١٠	٤١
خميرة الخباز	$١,٨ \times ١٠^{٧}$	٣٢٢٥	١٥٠٠	١٥٠
حشرة الدروسفلا	$١,٢ \times ١٠^{٨}$	٢١٥٠٠	١٠٠٠٠	١٠٠٠
الانسان	$٣,٢ \times ١٠^{٩}$	٥٦٤٠٠٠	٢٧٤٠٠٠	٣٠٠٠٠
الضفدع	$٢,٣ \times ١٠^{١٠}$	٤٠٥٣٠٠٠	١٩٦٩٠٠٠	١٩٦٩٠٠
الأرز	$٥,٧ \times ١٠^{٨}$	١٠٠٠٠٠	٤٩٠٠٠	٤٩٠٠

*محسوبة على أساس احتمال (P)=٩٥% أن أى جين معين سيكون موجود فى المكتبة. (١)باستخدام λ فاج كناقل للكلونه. (٢)باستخدام الكوزميد كناقل للكلونه. (٣)باستخدام BAC's كناقل للكلونه.

تمثل الأعداد المذكورة فى الجدول عدد شظايا د.ن.أ (كلونات مستقلة) اللازمة للوصول إلى احتمال ٩٥% لإمكان الحصول على تتابع معين من د.ن.أ فى مكتبة د.ن.أ المعاد صياغته بمتوسط طول الشظية المدخلة ٢×١٠^{٤} نيوكلتيدة. يرجع الاختلاف فى العدد إلى اختلاف عدد الجينات التى يحملها كل كائن ممثل فى الجدول وتحسب عدد الكلونات اللازمة من المعادلة:

$$N = \frac{Ln(1-P)}{Ln(1-f)}$$

حيث P تمثل الاحتمال المطلوب و f تمثل الجزء من الجينوم الكامل فى الكلون الواحد؛ وعلى سبيل المثال فى حالة مكتبة جينوم الإنسان المذكورة فى الجدول أعلاه، وعلى اعتبار أن هناك ٣×١٠^{٩} نيوكلتيدة فى الجينوم الاحادى فتكون :

$$N = \frac{Ln(1-0.99)}{Ln\left\langle 1-\left(\frac{2\times10^{4}}{3\times10^{9}}\right)\right\rangle}$$

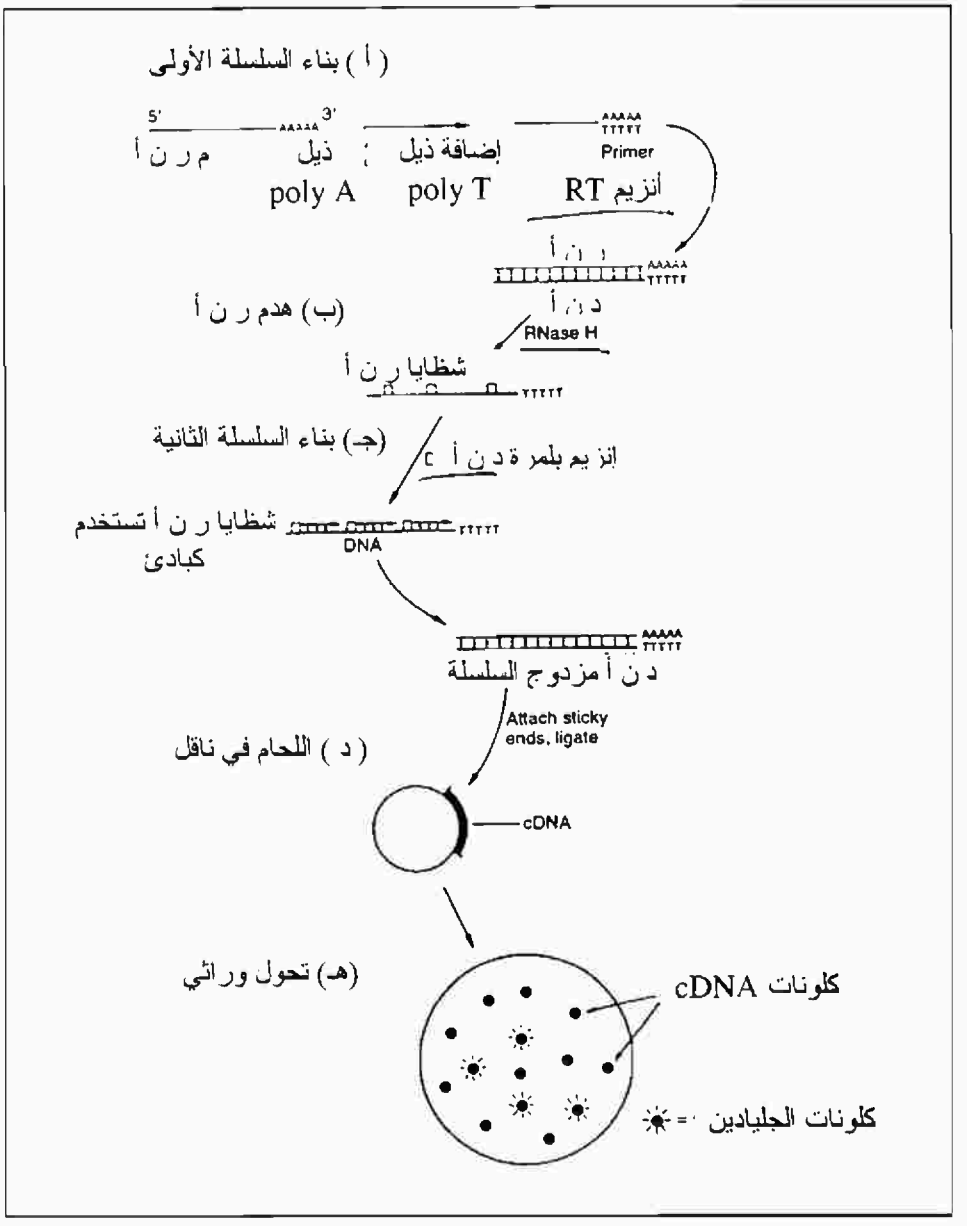
وميزة تكوين مكتبة مكونة من شظايا د.ن.أ طويلة نسبياً تبدو واضحة اذا قورنت بنتائج المعادلة أعلاه فيما إذا كان حجم شظايا د.ن.أ بحجم أقل أى ٥×١٠^{٣} بدلا من ٢×١٠^{٤}.

وعلى ذلك فإن مكتبة الجينوم البشرى المحتوى على ١٠^{٦} شظية د.ن.أ معاد صياغتها بطول كبير نسبياً (٢×١٠^{٤}) ستصل فرصة الحصول عليها كاملة الى ٩٩% وبالتالى فإن احتمال الحصول على جين وحيد النسخة سيكون مرتفعاً.

يطلق على هذه الطريقة اسم طريقة Shotgun أى أننا فى قطع جميع الجينوم بحثا عن الجينات المرغوبة كمن يصوب بالبندقية على هدف غير معلوم. كما أن هذه التقنية تستغرق وقتا طويلاً وعملاً متصلا والنتيجة قد لا تكون مضمونة اذ قد نحصل على شظايا لا شفرية كثيرة ضمن الأعداد الهائلة من الشظايا الموجودة فى مكتبة الجينوم.

ب- مكتبة cDNA:

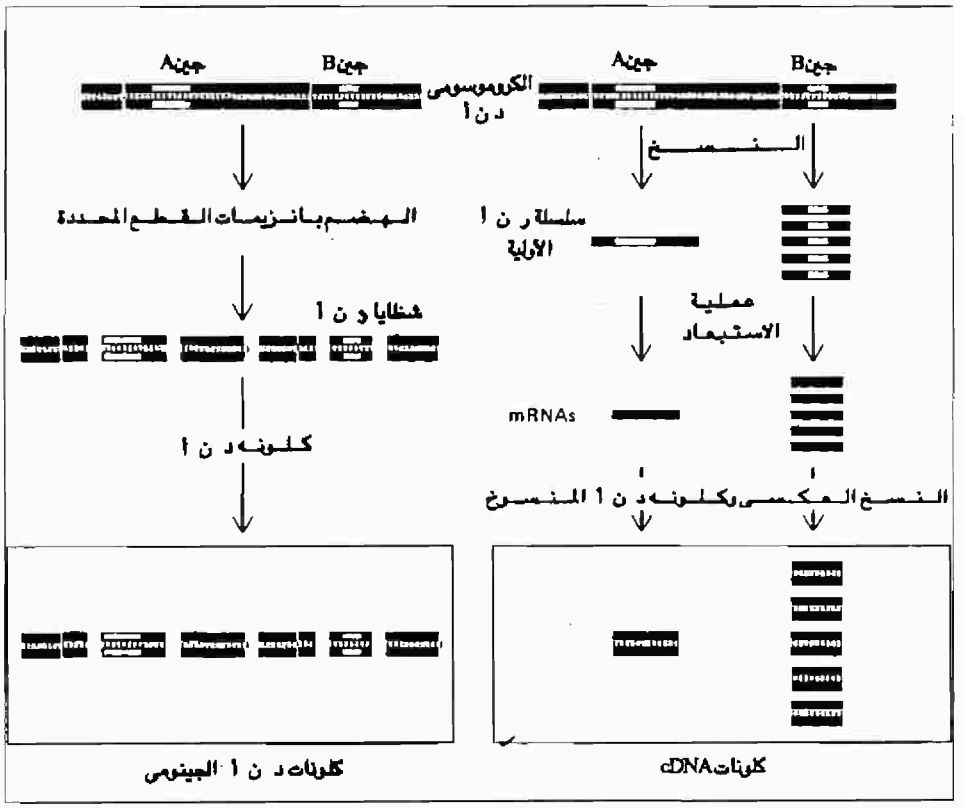
وتعتمد على تقنية متخصصة تعتمد على كلونة د.ن.أ المنسوخ cDNA. حيث يقتصر الاختيار على تلك التتابعات من د.ن.أ التى يمكن نسخها إلى ر.ن.أ والتى يفترض أنها تمثل جينات معينة. ويحدث ذلك عن طريق استخلاص mRNA من الخلايا المتخصصة فى انتاج بروتين معين بكميات كبيرة حيث تزداد نسبة mRNA النوعى الذى يشفر لهذا البروتين (راجع gene-in site و gene-in time فى الفصل الحادى عشر). ثم يتم انتاج نسخ من د.ن.أ المنسوخ Complementary DNA (cDNA) على قالب من ر.ن.أ المراسل mRNA باستخدام انزيم النسخ العكسى Reverse Transcriptase. ويتم تحويل جزيئات د.ن.أ الوحيدة السلسلة الناتجة الى جزيئات مزدوجة بفعل انزيم بلمرة د.ن.أ، DNA Poly I. ثم يتم بعد ذلك ادخال هذه الجزيئات إلى البلازميد ثم تجرى عملية الكلونة كما فى الشكل (١٢-٦).



الشكل (١٢-٦): إحدى الطرق الممكنة لكلونة cDNA

Poly A = ادينوسين متعدد ، أوليجو d.T = متعدد الثايميدين

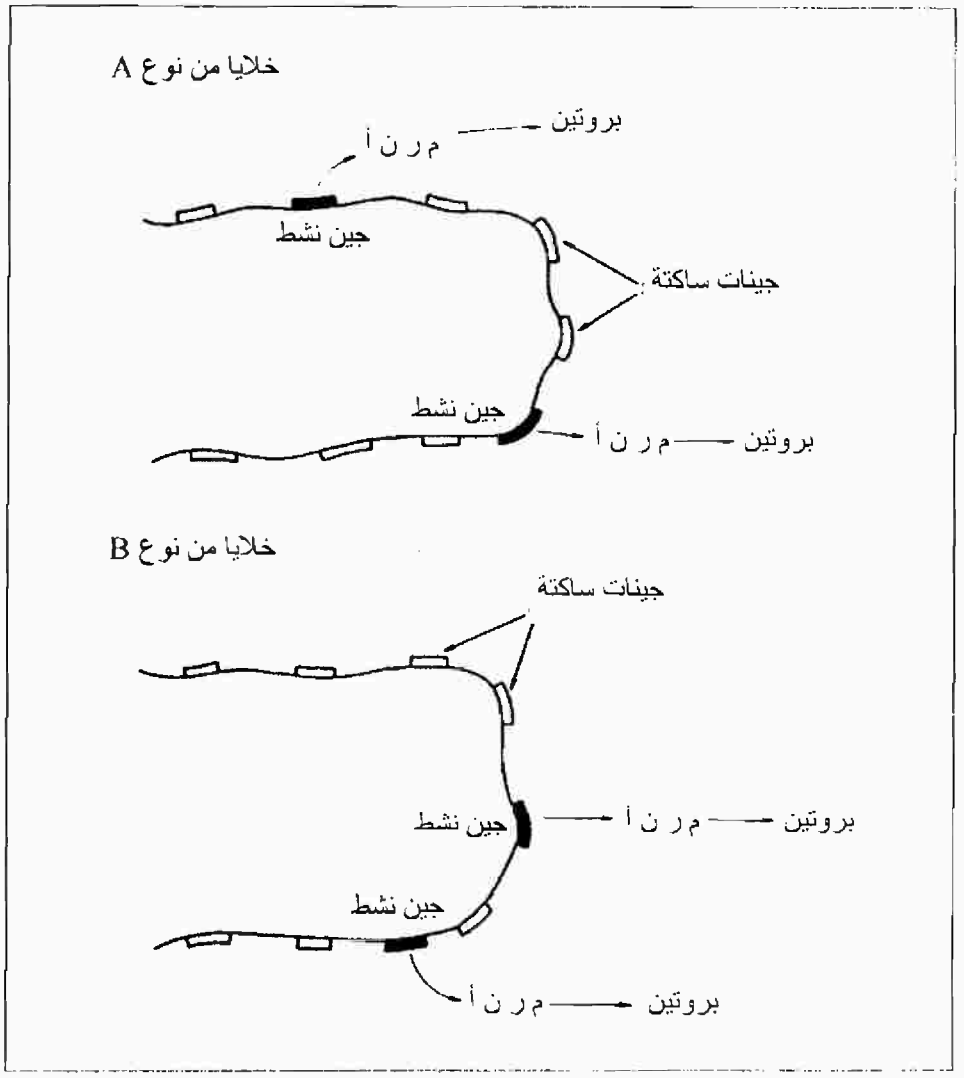
يسمى كل كلون متحصل عليه بهذه الطريقة كلون د.ن.أ المنسوخ cDNA، فى حين تسمى المجموعة الكاملة للكلونات المشتقة من تحضير أحد أنواع mRNA مكتبة د.ن.أ المنسوخ cDNA Library. وهناك فرق هام بين كلونات د.ن.أ الجينوم وكلونات د.ن.أ المنسوخ كما هو موضح فى الشكل (٧-١٢).



الشكل (١٢-٧): شكل تخطيطى للفروق بين كلونات د ن أ المنسوخ cDNA وكلونات د ن أ الجينومى. يتم نسخ الجين A بتكرار منخفض فى حين يتم نسخ الجين B بتكرار مرتفع

إذ نجد أن كلونات الجينوم تمثل عينة عشوائية من جميع تتابعات د.ن.أ في كائن ما، وفيما عدا حالات استثنائية نادرة، ستكون متشابهة بصرف النظر عن طراز الخلية المستخدم في استخلاصها، بعكس الحال في كلونات د.ن.أ المنسوخ cDNA إذ انها ستحتوى فقط على تلك المناطق من الجينوم التي تم نسخها الى mRNA وحيث أن خلايا الأنسجة المختلفة تكون عادة متخصصة لانتاج أنواع معينة من جزيئات mRNA النوعى فإن مكتبة د.ن.أ المنسوخ ستختلف بالطبع حسب أنواع ووظائف الخلايا المستخدمة لتحضير المكتبة (الشكل ١٢-٨).

توجد عدة مميزات لاستخدام مكتبة د.ن.أ المنسوخ cDNA لكلونة الجينات. أولاً: أن كثير من البروتينات يتم انتاجها بكميات كبيرة جداً بواسطة الخلايا المتخصصة، مما يعنى أن mRNA الذى تنتجة هذه الخلايا للترجمة لهذه البروتينات سيكون وفيرا لدرجة أن مكتبة cDNA المحضرة من الخلايا ستكون غنية جداً في جزيئات د.ن.أ المنسوخ cDNA الذى يشفر للبروتينات النوعية كما في الشكل (١٢-٧). أن وفرة cDNA المرغوب فيه في المكتبة يقلل بشكل كبير مشكلة التعرف على الكلون المرغوب في المكتبة. فعلى سبيل المثال نجد أن الهيموجلوبين ينتج بكميات كبيرة في خلايا الدم الحمراء ولهذا السبب فإن جينات الجلوبين كانت من بين أول الجينات التي تمت كلونتها.



الشكل (١٢-٨): إختلاف تعبير الجينات بإختلاف نوعيات الخلايا

والميزة الثانية لكلونات cDNA أنها تحتوى على التتابعات الشفرية فقط Exons بدون الانترونات، وعلى ذلك فإذا كان الهدف من الكلونة هو التوصل

الى تتابع الاحماض الأمينية للبروتين من تتابع القواعد فى د.ن.أ الموازى أو لانتاج البروتين بكميات كبيرة عن طريق دفع الجين المكلون إلى التعبير فى خلية البكتريا أو الخميرة، فإنه من الأفضل أن نبدأ باستخدام cDNA لأن البكتريا أو الخميرة ليس باستطاعتها اجراء عملية استبعاد الانترونات مما يسبب مشكلة عند استخدام الكلون الجينومى.

تعتبر مكتبات الجينوم ومكتبات د. ن. أ المنسوخ (cDNA) مصادر هامة للاستخدام فى البحوث ويتوفر العديد منها حالياً من مصادر تجارية.

تكوين مكتبة د. ن .أ المنسوخ من جزيئات منتخبة من mRNA:

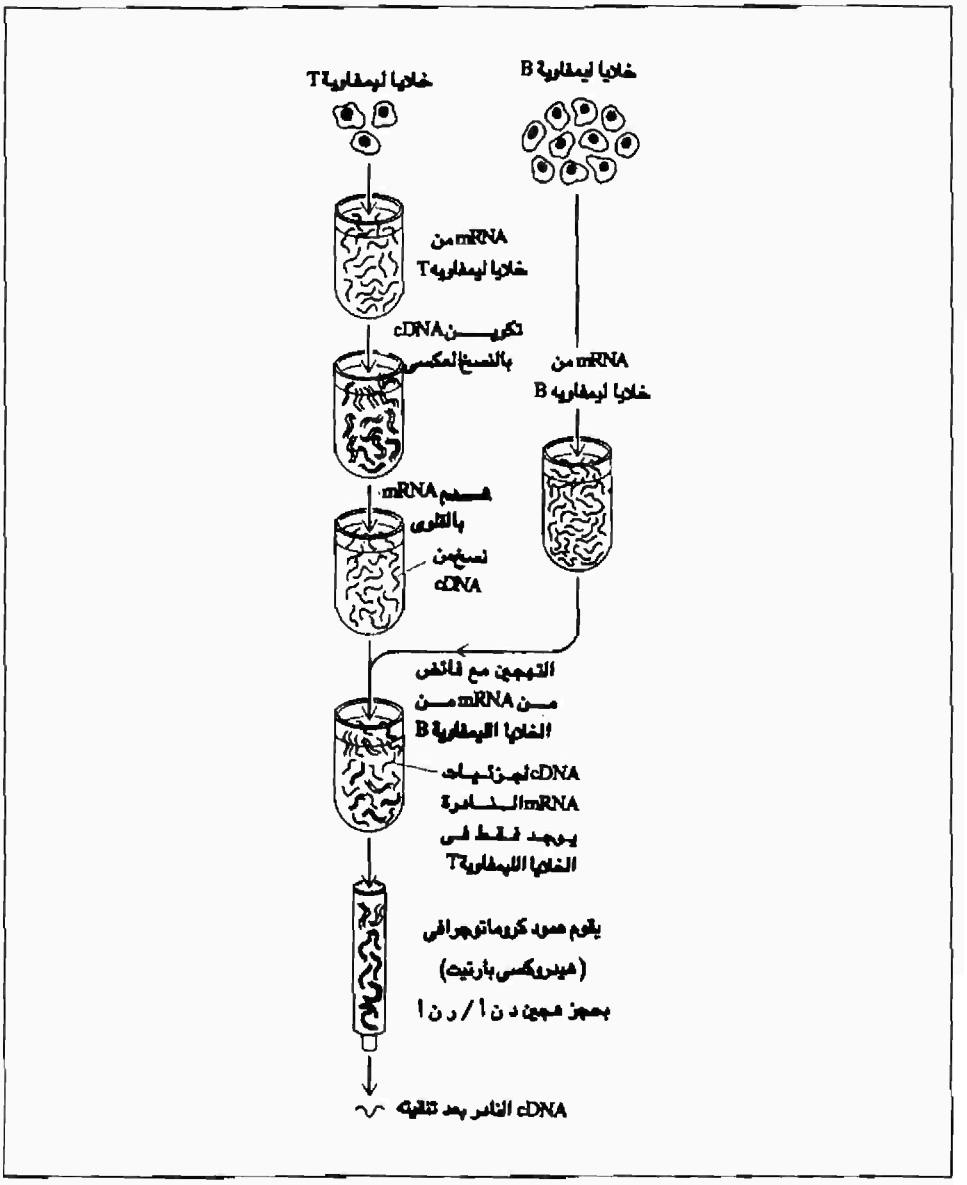
عندما يتم تحضير cDNA من خلايا يكون فيها تعبير الجين المرغوب عالياً جداً فإن غالبية كلونات cDNA يتوقع أن تحتوى على تتابع الجين المرغوب هذا، مما يعطى فرصة للحصول عليه بإقل جهد ممكن وبدرجة عالية من الكفاءة. أما فى حالة الجينات الأقل درجة فى معدل النسخ فتوجد عدة طرق يمكن استخدامها للأكثار من جزيئات mRNA النوعى قبل تكوين مكتبة cDNA فعلى سبيل المثال إذا توفر جسم مضاد للبروتين المستهدف فإنه يمكن استخدامه للترسيب الموجه لتلك البوليريبوسومات المحتوية على سلاسل متعدد الببتيد المرغوبة.

وحيث أن تلك البوليسومات ستحتوى أيضاً على mRNA الذى يشفر لذلك البروتين فإنه يمكن أكثار جزيئات mRNA المرغوبة إلى أكثر من الف ضعف.

وهناك طريقة بديلة أعلى كفاءة لإكثار أى تتابع نيوكلتيدى معين قبل انتاج كلونات cDNA ويسمى التهجين الطرحى Subtractive Hybridization, يمكن استخدام هذه الطريقة إذا توفر نوعان متقاربان بشدة من طرز الخلايا من نفس الكائن ولكن أحد الطرازين فقط ينتج البروتين المرغوب. وقد استخدمت هذه الطريقة لأول مرة لمعرفة بروتينات مستقبلات سطح الخلية الموجودة على الخلايا T الليمفاوية (ليمفوسايت) T-Lymphocytes وليست تلك الموجودة على B-Lymphocytes ويمكن استخدامها ايضاً فى الخلية التى يتم فيها تعبير اليل إلى بروتين.

فى حين لا يحدث أى تعبير للأليل الطافر فى نفس الخلية، وتكون أول خطوة هى بناء cDNA باستخدام mRNA من طراز الخلية الذى ينتج البروتين المرغوب. ثم يتم تهجين هذه الجزيئات من cDNA مع كمية وفيرة من جزيئات mRNA المستخلصة من الطراز الخلوى الآخر.

يتم التعرف على تلك التتابعات من cDNA النادرة التى تفشل فى العثور على جزيئات مكملة من mRNA للتزاوج معها والتى تمثل فى الغالب تتابعات mRNA الموجودة فقط فى الطراز الأول من الخلايا. يتم فصل هذه التتابعات غير المتزاوجة وتنقيتها بطرق بيوكيماوية معينة والتى تتضمن فصل الأحماض النووية وحيدة السلسلة عن مزدوجة السلسلة كما فى الشكل (١٢-٩).

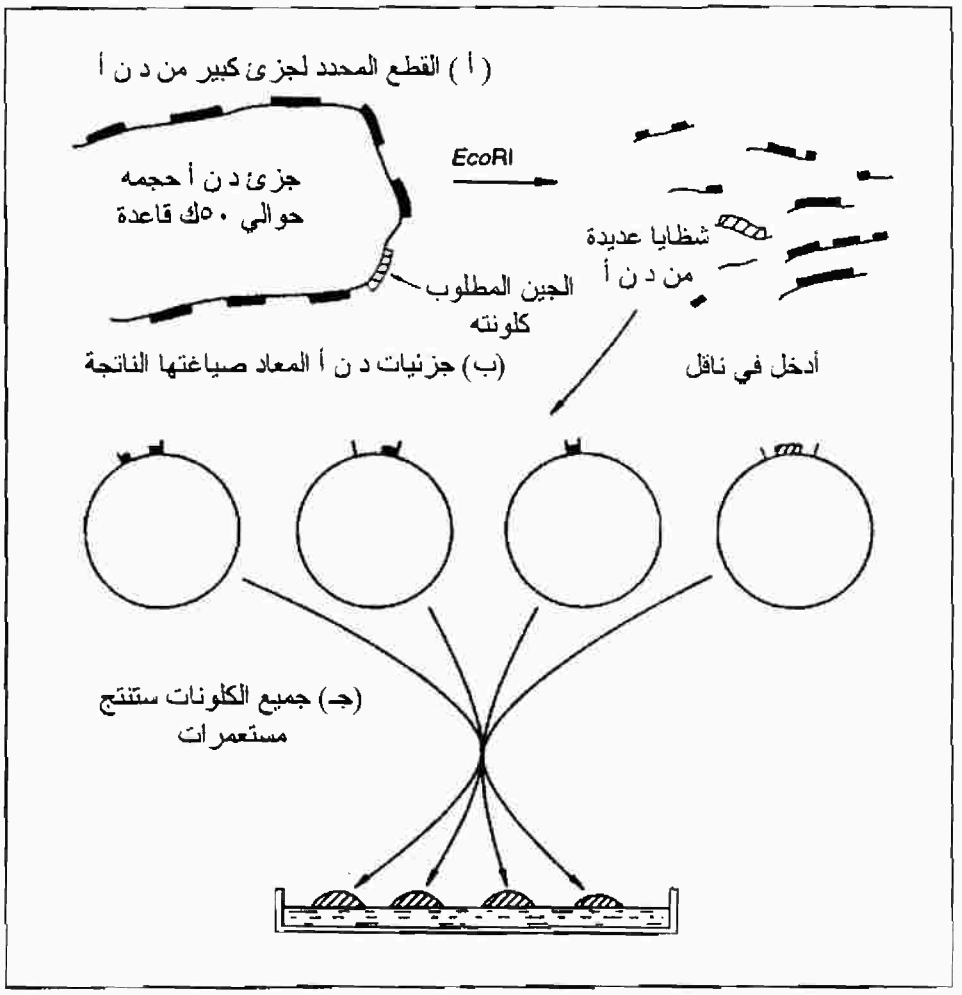


الشكل (١٢-٩): إستخدام طريقة التهجين الطرحى لتنقية الكلونات النادرة من cDNA التى يوجد لها mRNA فى الخلايا الليمفاوية من النوع T و لكن ليس من النوع B

للتعرف على الكلون المحتوى على الجين المرغوب يتم نقل Blotting أطباق المزرعة المحتوية على المستعمرات البكتيرية النامية على قطعة من ورق الترشيح التى تلتصق بها بعض المستعمرات البكتيرية. يتم معاملة المستعمرات الملتصقة والتى تعرف بالنسخ المطابقة Replicas.

طرق الحصول على كلون مرغوب من مكتبة الجينات:

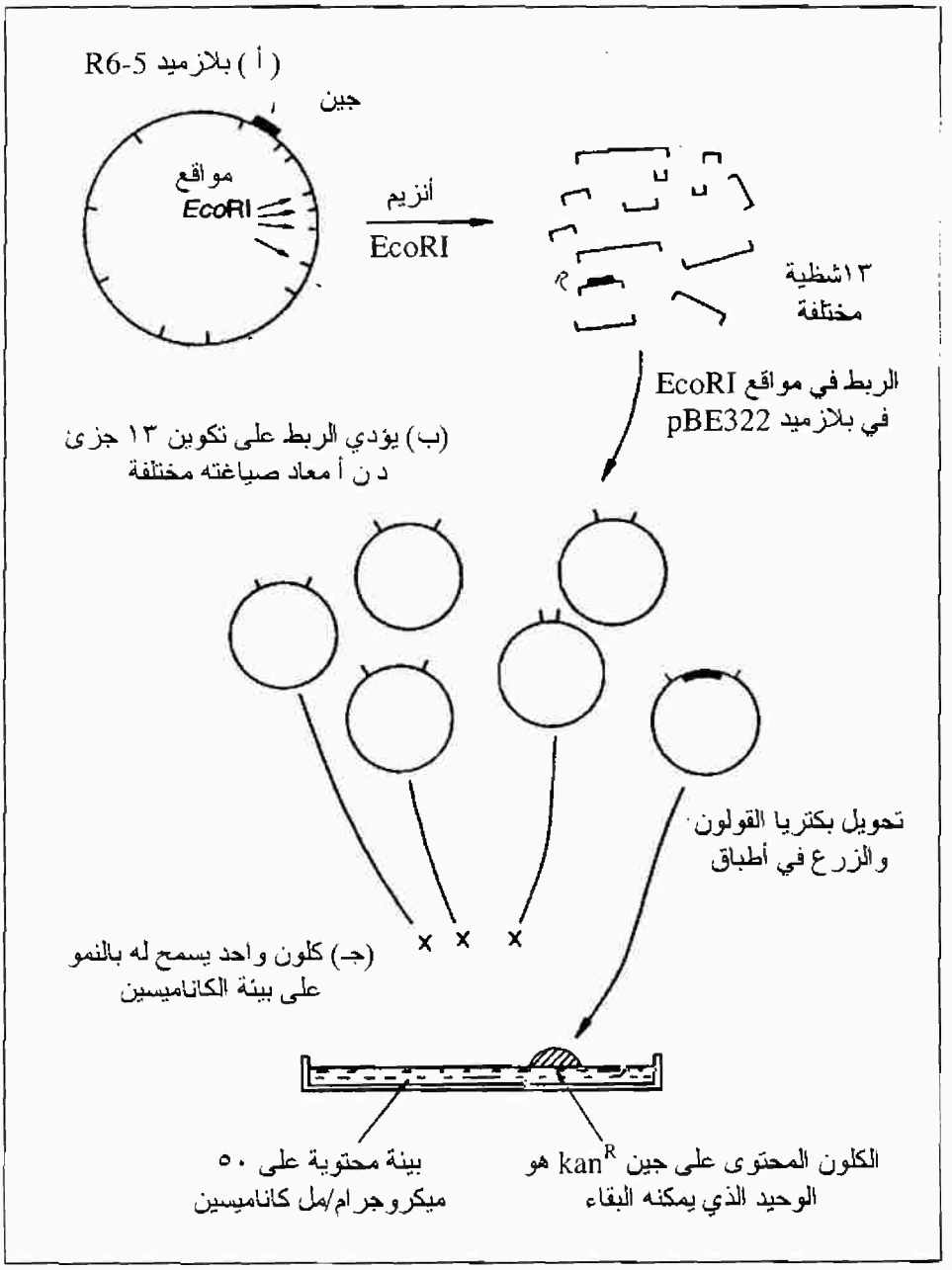
أن أهم مشكلة فى عملية كلونة الجين تتركز فى التعرف على المجموعات النادرة من الكلونات التى تحتوى على شظية د.ن.أ المحتوى على الجين المرغوب (الشكل ١٢-١٠) وتكون هذه المشكلة أشد صعوبة بصفة خاصة فى مكتبة الجينوم حيث قد يقتضى الأمر ضرورة التعرف على خلية واحدة بكتيرية من بين مليون خلية بحيث تكون محتوية على جين بشرى معين.



الشكل (١٢-١٠): مشكلة الإنتخاب

وتوجد طريقتين اساسيتين للحصول على الكلون المرغوب:

١- الانتخاب المباشر للجين المرغوب direct selection بمعنى أنه يتم تصميم التجربة بحيث تكون الكلونات المتحصل عليها هى فقط المحتوية على الجين المطلوب كما فى الشكل (١٢-١١).

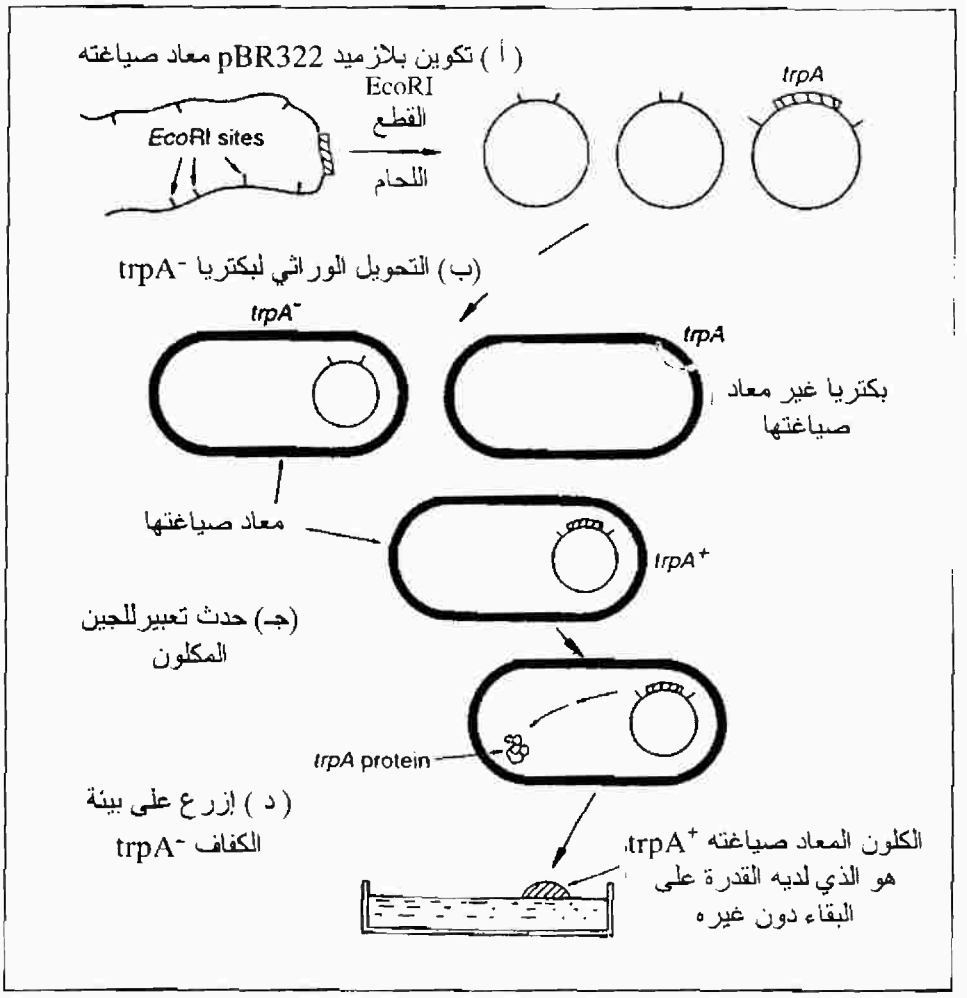


الشكل (١٢-١١): الإنتخاب المباشر لكلونة جين المقاومة للكاناميسين (KanR) فى بلازميد R6-5

حيث يتم الانتخاب للكلون المحتوى على جين المقاومة للكاناميسين فقط وذلك بتنميته على بيئة أجار تحتوى على هذا المضاد الحيوى. إلا أن هذا الطريقة تقتصر على الانتخاب لجينات المقاومة للمضادات الحيوية.

٢- استخدام طريقة معدلة فيما يسمى بطريقة Marker-Rescue للانتخاب لأحد الجينات المسئولة عن كثير من انزيمات البناء الحيوى Biosynthetic Enzymes. مثل تحديد الكلون المحتوى على جين trpA (الشكل ١٢-١٢) إلا أن هناك بعض المحددات لهذه الطريقة حيث تتطلب وجود سلالة بكتيرية طافرة للجين المطلوب الكشف عنه ($TrpA^-$) بألاضافة إلى ضرورة توافر بيئة الكفاف التى يمكن للطراز الوحشى لهذا الجين فقط أن ينمو عليها.

إلا أن هاتين الطريقتين تصلحان فقط للتعرف على كلونات الجينومات الصغيرة لغير مميزة النواة مثل بكتريا القولون ولكنها تكون قاصرة عن أداء هذا الدور فى حالة الكائنات الراقية مميزة النواة والتى يكون جينومها موزعاً فى عشرات الالاف من الكلونات.



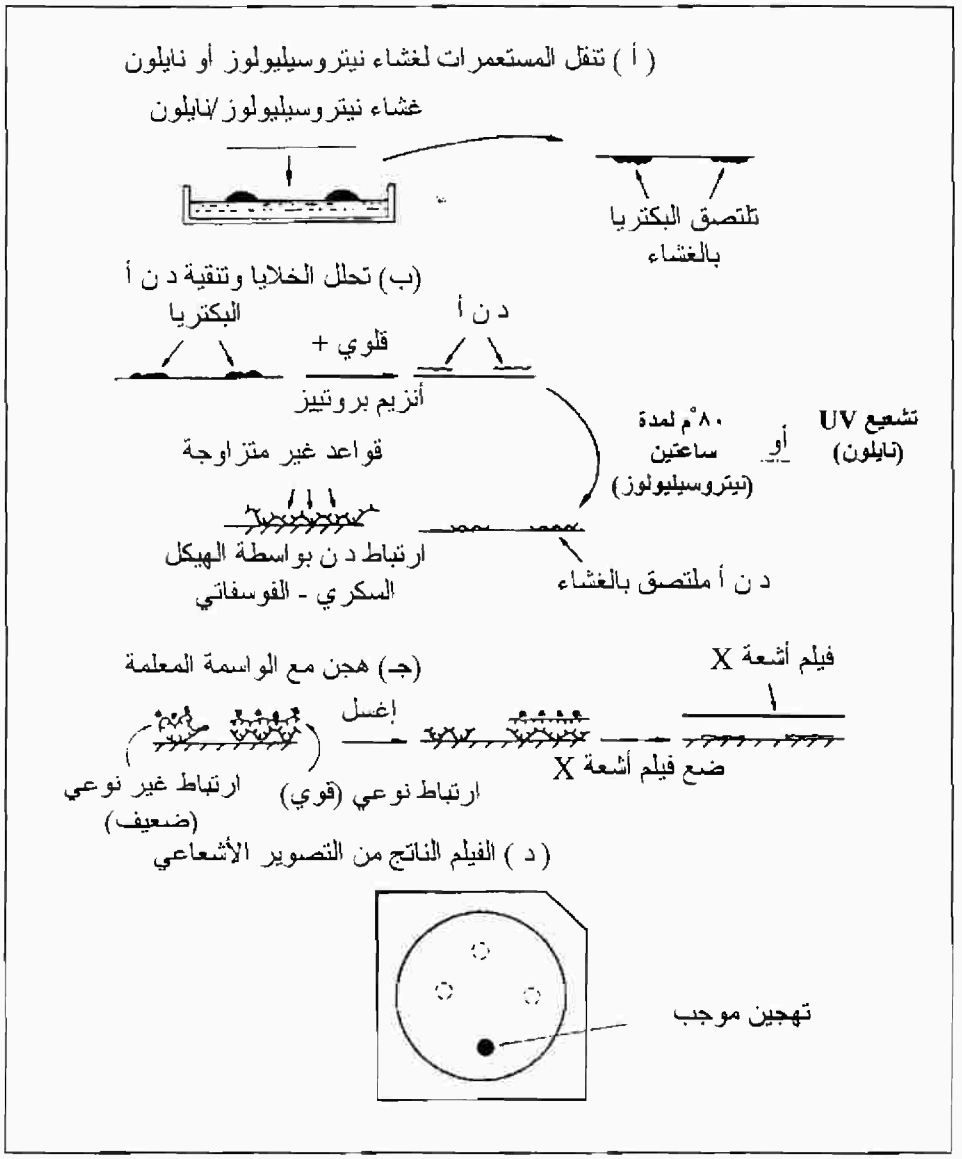
الشكل (١٢-١٢): الإنتخاب المباشر لجين trp^{A} المكلون فى بكتريا القولون الطافرة للزيتوفان (trp^{A-})

تحديد وعزل كلون من مكتبة الجينات:

Identification of a Colne From a Gene Library :

تستخدم تقنية التهجين بالواسمات (المشعة) Hybridization Probing بحيث يمكن بهذه التقنية التعرف على الكلونات الهجينية فى المستعمرات البكتيرية

لمكتبة الجينات مباشرة بطريقة *In Situ* Probing أى التنقيب فى الموقع كما فـــى الشكل(١٢-١٣).

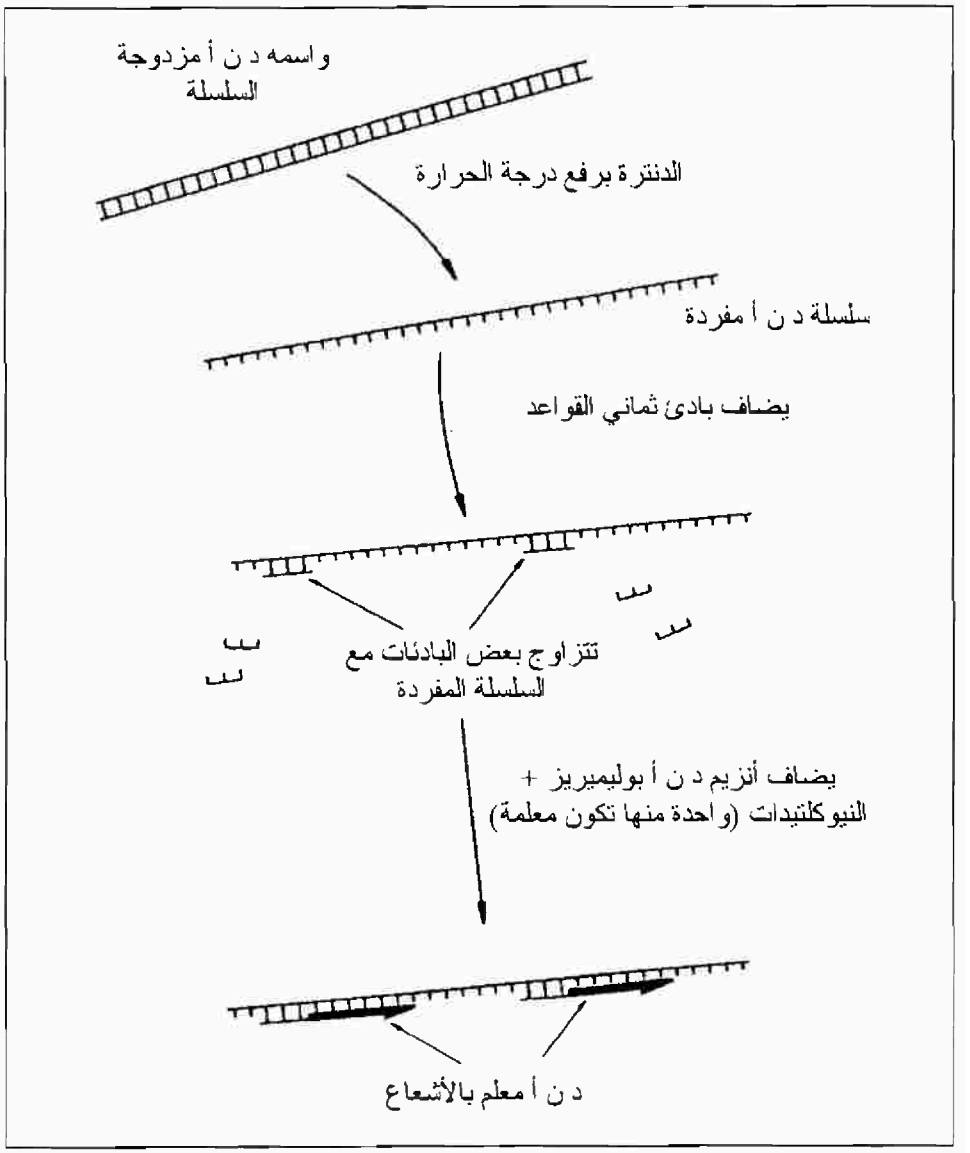


الشكل (١٢-١٣): تهجين المستعمرات بالواسمة المعلمة بالإشعاع

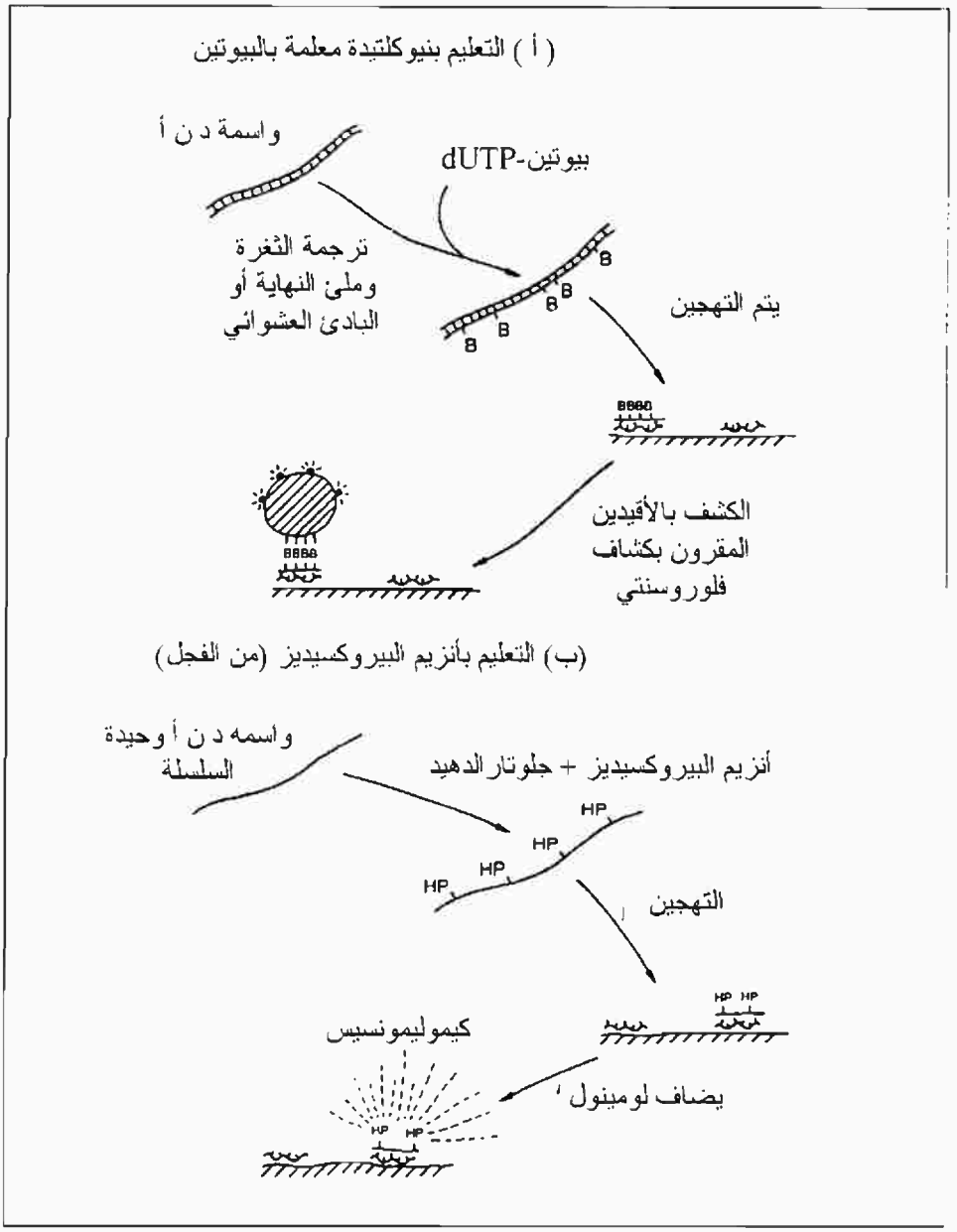
ويتم ذلك بأن تنقل أولاً المستعمرات البكتيرية إلى غشاء من النتروسيليلوز أو النايلون ثم يعامل الغشاء بانزيم Protease ومحلول قلوى للتخلص من المكونات غير النووية وتؤدى هذه المعاملات ايضا إلى دنترة د.ن.أ وكسر الروابط الهيدروجينية بين سلسلتى د.ن.أ ويبقى د.ن.أ وحيد السلسلة فقط على الغشاء والذى تتم معاملته حراريا، فى حالة غشاء النيتروسيليلوز على درجة ٨٠ م لمدة ساعتين أو بالتعريض للاشعة فوق البنفسجية UV فى حالة غشاء النايلون. والغرض من ذلك تثبيت د.ن.أ على الغشاء ، بحيث يكون د. ن. أ ملتصقا بالغشاء عن طريق الهيكل السكرى الفوسفاتى فى حين تكون القواعد حرة لكى تتزاوج مع الواسمات المشعة وهذه الاخيرة تتم دنترتها وتضاف إلى الغشاء فى محلول كيماوى يساعد على التهجين بين قواعد الواسمه والقواعد المكملة فقط فى د.ن.أ المثبت. وبعد فترة يغسل الغشاء للتخلص من الواسمات غير المرتبطة ويتم تحديد مكان الواسمه المرتبطه بالتصوير بالاشعاع الذاتى Autoradiography.

الواسمات Probes:

هى عبارة عن جزيئات أوليجو د.ن.أ مكونه من عدد محدود من النيوكلتيدات (١٨-٢٠ نيوكلتيدة) ذات تتابعات نوعية Specific مكملة لتتابع محفوظ فى جين معين بحيث يتم التجاذب بينهما فقط. ويتم تعليم Labeling هذه الواسمات أما بالاشعاع بإضافة الفوسفور المشع ^{32}P (الشكل ١٢-١٤) إلا أن الباحثين اتجهوا مؤخرا إلى استخدام طرق تعليم Labelling لا تستخدم المواد المشعة تلافيا للأخطار التى قد تنجم من استعمالها ومشاكل التخلص من النفايات المشعة لذللك استخدمت لهذا الغرض طريقتين كما فى الشكل (١٢-١٥).



الشكل (١٢-١٤): تعليم د ن أ بالإشعاع بطريقة البادئ Priming ثماني القاعدة العشوائي. يكون مخلوط البادئ العشوائي معقد بحيث يحتوي على بعض الجزيئات التي يمكنها أن تتزاوج مع الواسمة



الشكل (١٢-١٥): طريقتان لتعليم الواسمات بدون إشعاع

وتعتمد الطريقة الأولى على استخدام نيوكلتيدات ثلاثى فوسفات ديوكسى يوريدين (dUTP) والتى يتم ارتباطها بالتفاعل مع البيوتين Biotin وهو جزئ يتفاعل بقوة مع بروتين الافيدين Avidin. وبعد التهجين فى الموضع يمكن تحديد مواقع الواسمة المرتبطة بإضافة الافيدين المتفاعل مع كاشف فلورسنت.

أما الطريقه الثانية فتعتمد على تكوين معقد من الواسمة وأنزيم البيروكسيديز Horseradish Peroxidase ثم يتم الكشف عن موقع تهجين الواسمة مع الجين عن طريق قابلية الانزيم لتحليل مادة لومينول Luminal بحيث تنطلق اشعاعات Chemiluminescence.

ويمكن تسجيل الاشارات المنبعثة على فيلم تصوير عادى بطريقة مشابهة للتصوير بالاشعاع الذاتى Autoradiography.

تصميم الواسمات Design of Probes :

وكما سبق القول فإن تتابع الواسمة لابد أن يكون مكملاً للتتابع المحفوظ لجزء من الجين المكلون حتى يمكن أن يحدث Hybridiration Probing. ولكن يحدث أحيانا كثيرة أن الجين نفسه غير معروف أو غير متوفر وخاصة إذا كان الهدف من التجربة هو ايجاد كلون له.

ويعتمد استنباط الواسمات على حسب المعلومات المتوفرة عن الجين المرغوب وهناك ثلاث احتمالات :

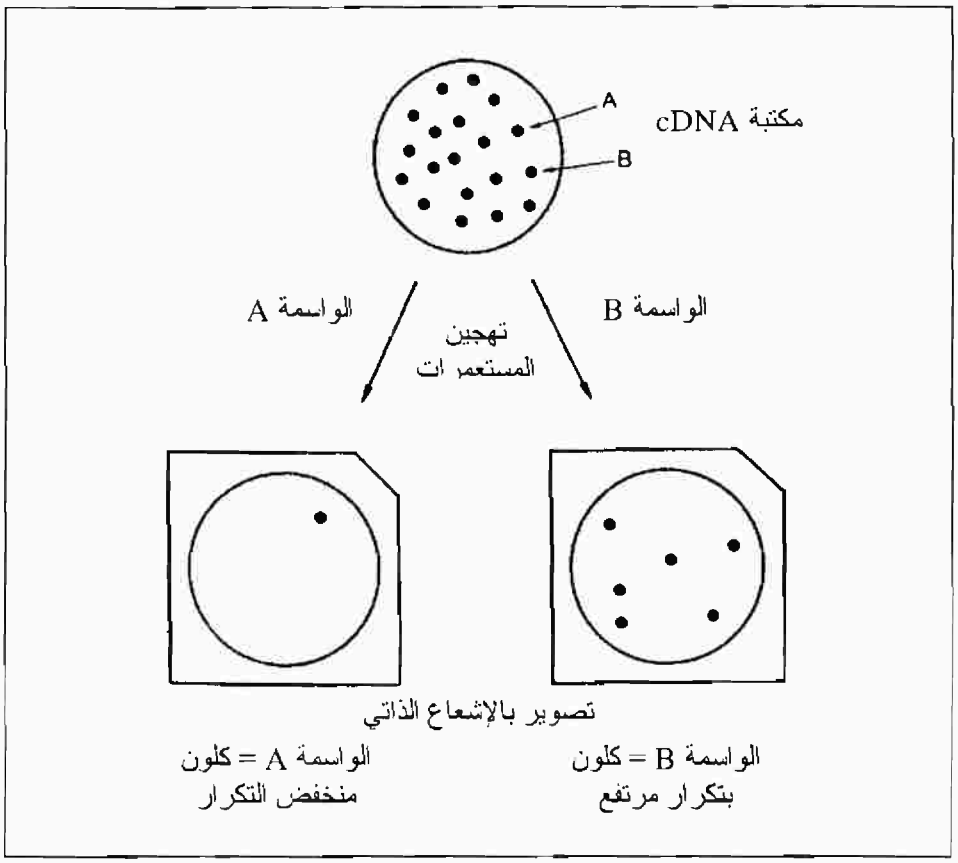
١- عندما يعطى الجين تعبيراً قوياً فى نوع معين من الخلايا فيتم تكوين مكتبة cDNA.

٢- عندما يكون تتابع الاحماض الامينية فى سلسلة متعدد الببتيد التى يشفر لها الجين معروفاً كلياً أو جزئياً.

٣- عندما يكون الجين ضمن مجموعة جينات متقاربة الوظيفة Multigene Family.

أولاً: استنباط الواسمات بالاستعانة بمكتبة cDNA:

تعتمد هذه الطريقة على مبدأ الوفرة ضد الندرة . Abundancy VS Scarecity فعند تكوين مكتبة cDNA من حبوب القمح مثلا فإنه نظراً لان البروتين الرئيسى الموجود اثناء نمو الجنين فى حبه القمح سيكون من نوع بروتين الجليادين gliadin فإننا نتوقع الحصول على نسبة عالية من نسخ ر.ن.أ الجليادين. ويتم التعرف على كلونات جين الجليادين باستخدام جميع كلونات cDNA من المكتبة كل على حدة كواسمة لجميع أفراد الكلونات الأخرى فى المكتبة (الشكل ١٢-١٦). يتم اختيار كلون بطريقة عشوائية ويتم تنقية د.ن.أ المعاد صياغته فى هذا الكلون (Insert) ويعلم Labelled ويستخدم كواسمة لبقية الكلونات فى المكتبة ويكرر ذلك باستخدام كلونات اخرى كواسمات إلى أن نحصل على الكلون الذى يتهجن مع نسبة كبيرة من كلونات المكتبة. ويعد هذا الكلون الوفير من Abundant cDNA Clone بمثابة Clone محتمل للجليادين ويجرى تحليلة بالتفصيل (عن طريق تحليلات تتابعات د.ن.أ وعزل نواتج الترجمة) حتى يمكن التأكد من هويته.



الشكل (١٢-١٦): البحث بالتهجين فى مكتبة جينات (cDNA) للتعرف على كلون متوفر فى المكتبة بتكرار عال

ثانيًا: استنباط الواسمات عندما تكون تتابعات الاحماض الامينية للبروتين الذى يشفر له الجين معروفة كلياً أو جزئياً:

وفى هذه الحالة يمكن استخدام قاموس الشفرة الوراثية Genetic Code للتنبوء بالتتابع النيوكلتيدى للجين المقابل. ويعد هذا التنبوء تقريبى نظراً لانه، فيما عدا الميثيونين والتربتوفان اللذين يمثل كل منهما بكودون واحد فقط ، نجد

أن جميع الاحماض الامينية الاخرى يشفر لكل منها إثنين أو أكثر من الكودونات، فمثلا حامض الالانين يشفر له بأربعة كودونات وهى GCA, GCT, GCG, GCC، بحيث تكون نيوكلتيدين GC مشتركة فى الكودونات الاربعة.

وكمثال لتوضيح كيفية اجراء هذه التنبؤات، سنأخذ بروتين السيتوكروم Cytochrome C الذى يلعب دوراً هاماً فى السلسلة التنفسية Respiratory Chain لجميع الكائنات الهوائية التنفس Aerobic، ويبين الشكل (١٢-١٧) تتابع الاحماض الامينية لبروتين السيتوكروم فى الخميرة. ويحتوى هذا التتابع على منطقة تبدأ من الحامض الامينى رقم ٥٩ التى تتكون من Trp- Asp- Glu- Asn- Asn- Met وبمعلومية قاموس الشفرة الوراثية نجد أن هذه الببتيدية السداسية يشفر لها بالاتى:

$TGG - GAC^{T}C - GAC^{A}C - GAAC^{T}C - ATG$

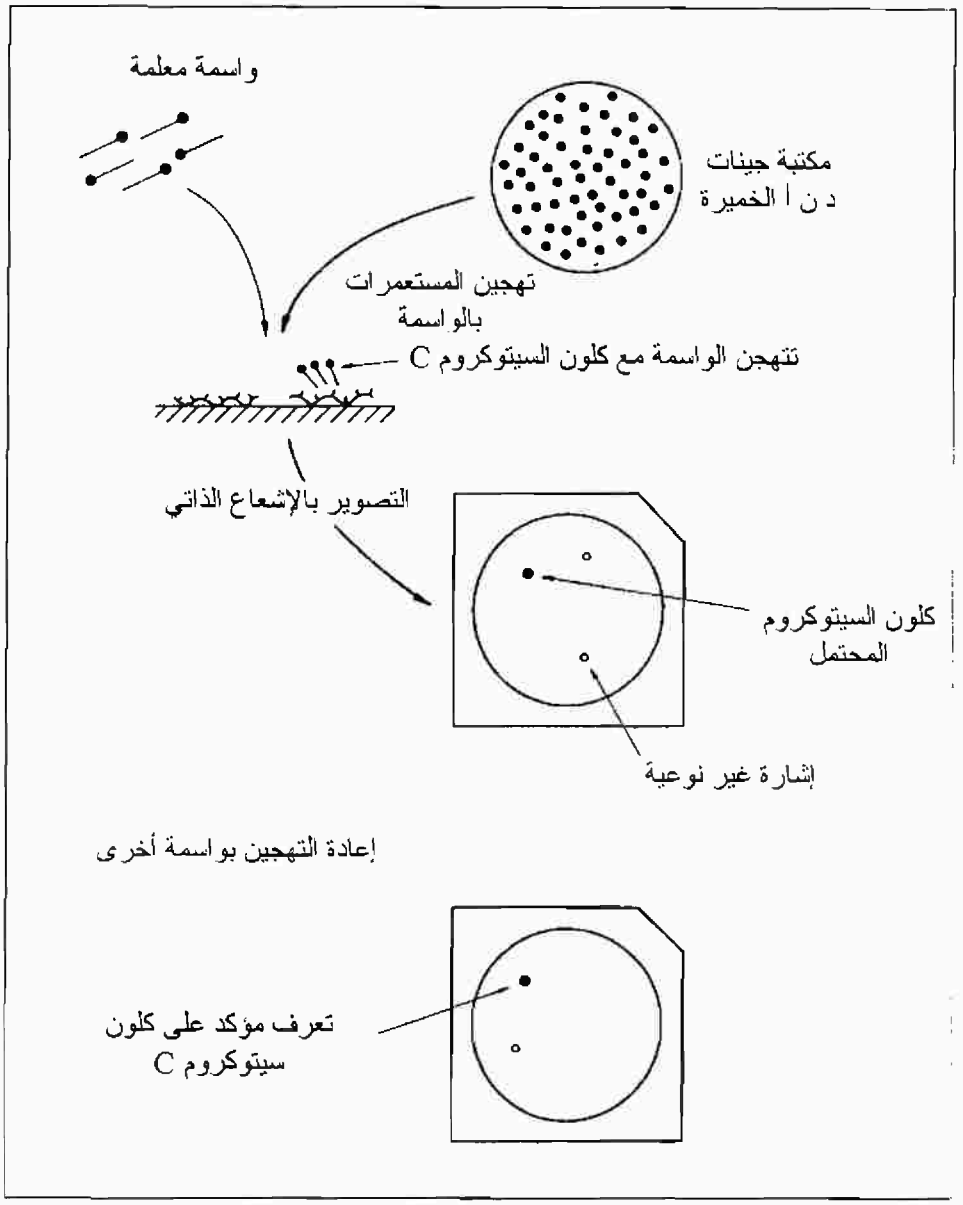
GLY-SER-ALA-LYS-LYS-GLY-ALA-THR-LEU-PHE-LYS-THR-ARG-CYS-GLU-
LEU-CYS-HIS-THR-VAL-GLU-LYS-GLY-GLY-PRO-HIS-LYS-VAL-GLY-PRO-
ASN-LEU-HIS-GLY-ILE-PHE-GLY-ARG-HIS-SER-GLY-GLN-ALA-GLN-GLY-
TYR-SER-TYR-THR-ASP-ALA-ASN-ILE-LYS-LYS-ASN-VAL-LEU-TRP-ASP-
GLU-ASN-ASN-MET-SER-GLU-TYR-LEU-THR-ASN-PRO-LYS-LYS-TYR-ILE-
PRO-GLY-THR-LYS-MET-ALA-PHE-GLY-GLY-LEU-LYS-LYS-GLU-LYS-ASP-
ARG-ASN-ASP-LEU-ILE-THR-TYR-LEU-LYS-LYS-ALA-CYS-GLU

الشكل (١٢-١٧): تتابع الأحماض الأمينية لبروتين سيتوكروم C فى الخميرة وتمثل الببتيدة السداسية (التي تحتها خط) كيف يمكن التنبؤء بالتتابع النيوكلتيدى من تتابع الأحماض الأمينية المقابلة

وبالرغم من أن هذا التتابع يمثل ١٦ تتابعا محتملا ، فإن ١٤ من ١٨ نيوكلتيدة يمكن التنبوء بها بالتأكيد، وبذلك يمكن بناء واسمة أوليجونيوكلتيدية

باستخدام هذه التنبؤات وقد يكون فى امكان هذه الواسمة التعرف على الجين المشفر لبروتين السيتوكروم.

وفى هذه الحالة يتم بناء عدد ١٦ أوليجونيوكلتيد واسمه مختلفه و المشفره لتتابع الاحماض الامينية اعلاه. ويمكن استخدامها لاستكشاف مكتبة cDNA الخميرة وسوف تتعرف واحده من هذه الواسمات على التتابع الصحيح لهذه المنطقة من Cytocluome C . وستدلنا اشارة التهجين فى الموضع على الكلونات التى تحتوى على هذا الجين (الشكل ١٢-١٨).



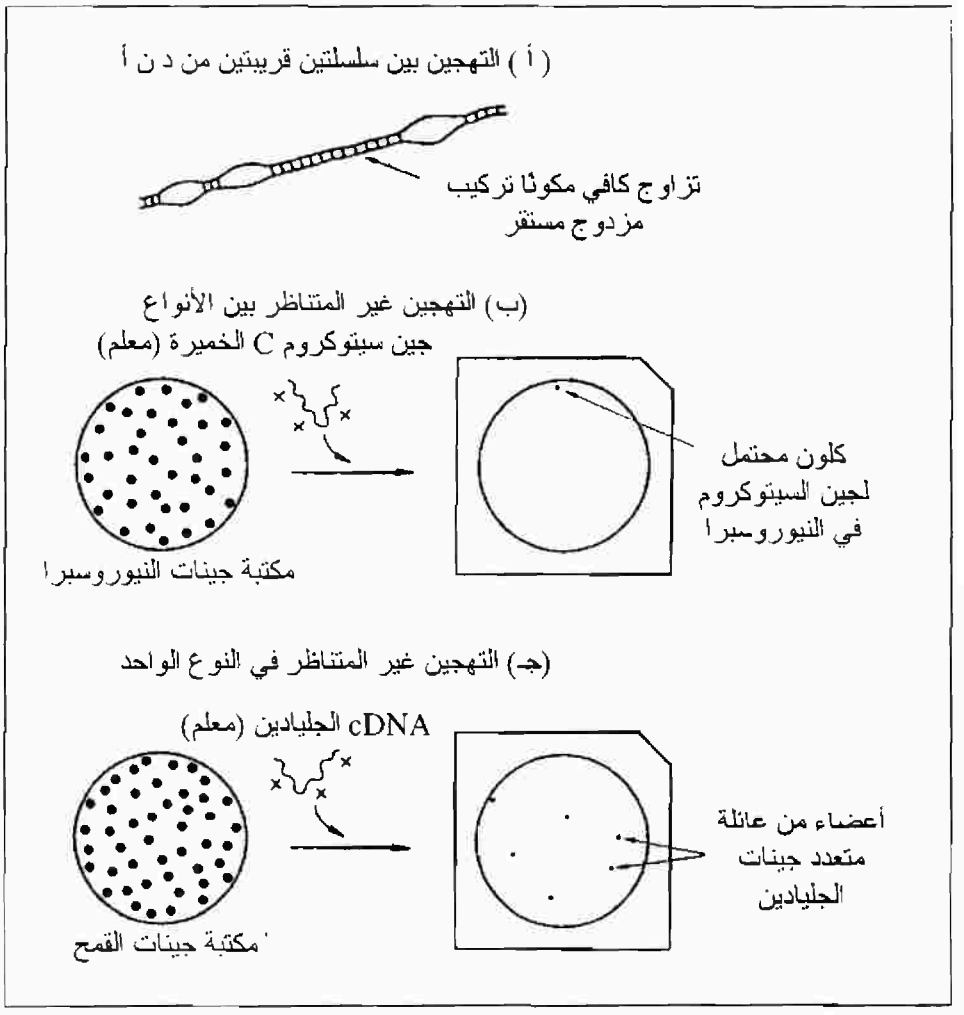
الشكل (١٢-١٨): إستخدام أوليجو نيوكليوتيد تركيبى معلم النهاية للتعرف على كلون السيتوكروم فى الخميرة

ثالثاً: استنباط الواسمات عندما ينتمي الجين لمجموعة جينات متقاربة Multigene Family:

يمكن التعرف على تتابعات متشابهة بنسبة عالية عند مقارنة جينين يشفران لنفس البروتين ولكنهما ينتميان لكائنات مختلفة مما يعنى المحافظة على تركيب الجين اثناء عملية التطور. وغالبا ما يتشابة بدرجة عالية جينان من كائنات قريبة بحيث أن واسمه مفردة السلسلة من احد هذين الجينين يمكنها تكوين هجين مستقر وثابت مع الجين الآخر وعلى الرغم من أن الجزيئين ليسا متكاملين تماما، إلا أنه يحدث تزاوج للقواعد بينهما بدرجة كافية لتكوين تركيب هجينى مستقر (الشكل ١٢-١٩).

ويستخدم التنقيب غير المتجانس Heterologous Probing فى التهجين بين تتابعات متقاربة للتعرف على الكلونات المرغوبة. فمثلا يمكن استخدام واسمه Cytochrme C والسابق الاشارة اليها، فى التنقيب عن هذا الجين فى كائن اخر (يتبع جنس آخر) مثل النيوروسيرا *Neurospora Crassa* بحيث نحصل على تزاوج قواعد يكون كافيا لاعطاء اشارة للاستدلال على Clone السيتوكروم C فى مكتبة النيوروسبرا (الشكل ١٢-١٩-ب).

ومن جهة أخرى، يمكن استخدام التنقيب غير المتجانس للتعرف على جينات فى نفس الكائن كالقمح مثلا ولكن فى اصناف مختلفة كما يحدث فى حالة واسمة جين الجلياداين السابق الاشارة اليها (الشكل ١٢-١٩-ج).



الشكل (١٢-١٩): التهجين غير المتناظر Heterologous Probing

تفاعل إنزيم البلمرة المتسلسل:

Polymerase Chain Reaction (PCR):

يعد توصل Mullis عام ١٩٨٥ الى مفهوم الكلونة فى الانبوب *In Vitro* Cloning وتقديمة لتقنية PCR من أهم وأعظم الاكتشافات التى حدثت فى الثلـــث

الاخير من القرن العشرين ، حيث احدثت طفرة هائلة فى مجال التقنيات الحديثة المستخدمة فى البيولوجيا الجزيئية مما ساعد الباحثون على تطوير ابحاثهم بطريقة غير مسبوقة نظراً لما لهذه التقنية، والتى تتميز بالسهولة والدقة، من تطبيقات متعدده فى المجالات البيولوجية المختلفة.

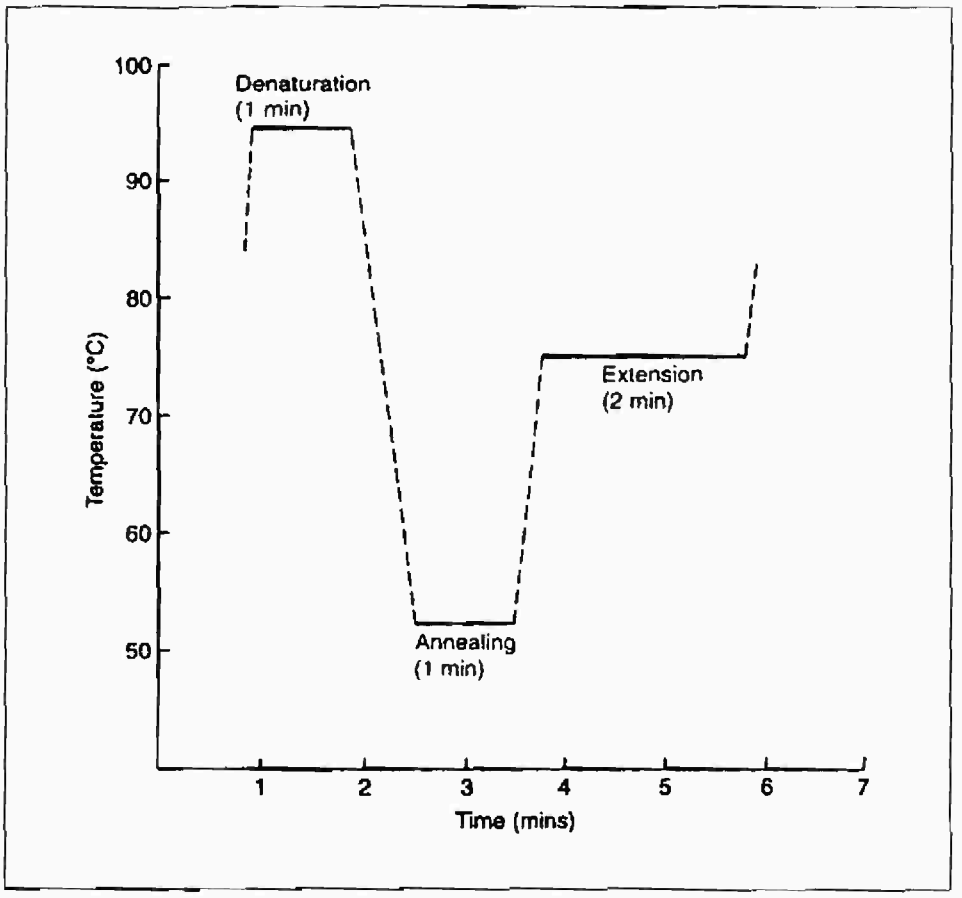
ويؤدى PCR إلى اكثار منتخب Selective Amplification لمنطقة مختاره من جزئ د.ن.أ. ويمكن اختبار أى منطقة من أى جزئ د.ن.أ للأكثار بشرط معرفة التتابعات النيوكلتيدية عند حدى هذه المنطقة، حيث يؤدى ذلك إلى امكان تكوين زوج من البادئ Pair of Primers مكون من عدد محدود من النيوكلتيدات لا يقل عن ١٠ ولا يزيد عن ٣٠ نيوكلتيده بحيث تكون تتابعات النيوكلتيدات فى احد بادئى الزوجين مكملة لتلك الموجودة على احد حدى المنطقة المراد مضاعفتها (اكثارها) فى حين يكون البادئ الاخر مكمل للحد الاخر المحيط بهذه المنطقة وبذلك عند اجراء تجربة PCR يتم التهجين بين البادئ وهذه الحدود يحدث تضاعف Amplificution للمنطقة بينهما بطريقة دقيقة وسريعة بمساعدة انزيم بلمرة د.ن.أ متخصص لا يتأثر بدرجات الحرارة العالية وهو Taq Polymerase I.

ولبدء تجربة PCR يوضع فى الانبوبة د.ن.أ القالب مضاف اليه زوج البادئ المتخصص ومخلوط من النيوكلتيدات الأربعة A,T, C,G ومحلول كلوريد المغنسيوم بتركيز معين (٣-٧ ميكروجرام / لتر) وانزيم Taq Polymerase ويتم تحضينة فى جهاز PCR، ويختار البرنامج المناسب والذى يبدأ برفع درجة الحرارة إلى ٩٤° م لدنترة د.ن.أ وفصل سلسلتى د.ن.أ القالب، يليها خفض

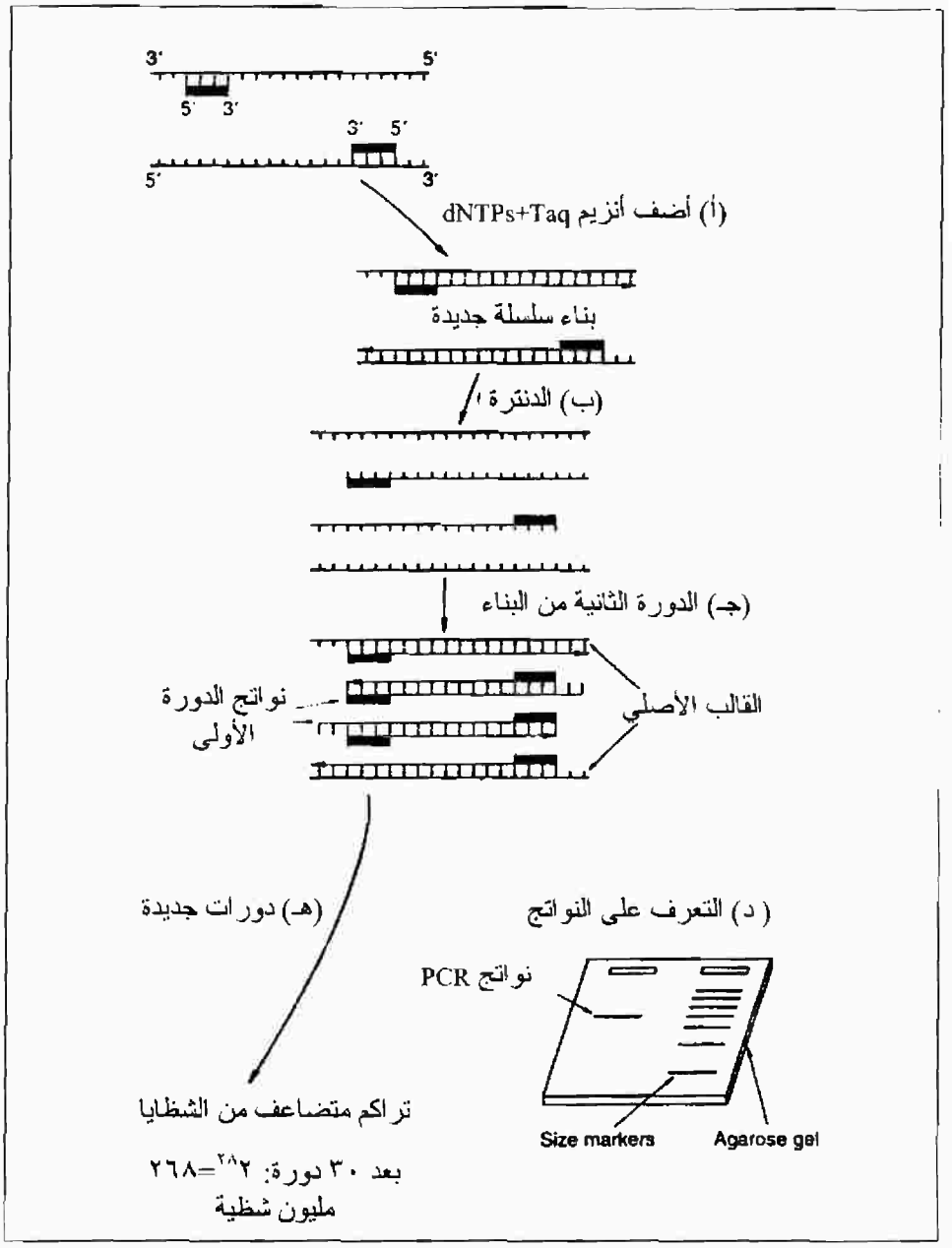
تدريجى للحرارة الى ٥٠-٦٠ °م درجة ليتم التهجين والتزاوج بين تتابعات البادئ مع حدود المنطقة المراد تضاعفها.

ثم يتم رفع درجة الحرارة إلى ٧٢°م للمساعدة فى بدء نشاط انزيم Taq لبناء سلسلة جديدة على المنطقة المرغوبة. ويبين الشكل (١٢-٢٠) منحنى التدرج الحرارى فى PCR. وهكذا تستمر هذه العملية ٢٥-٣٦ دورة مما يؤدى إلى بناء عدة ملايين نسخة من قطعة د.ن.أ. وبعد الانتهاء من التجربة يتم تحليل نواتج التضاعف Amplificantion بالتفريد الكهربى على جيل الأجاروز والصبغ بمادة ايثديم بروميد Ehtidium Bromide (الشكل ١٢-٢١).

كما يمكن لنواتج التضاعف أن تكلون فى بلازميد ناقل ويتم فحصها بالتقنيات القياسية مثل تحليل تتابعات د.ن.أ.



الشكل (١٢-٢٠): منحنى البرنامج الحرارى فى PCR



الشكل (١٢-٢١): تفاعل البلمرة المتسلسل (PCR)

الشروط الواجب توافرها فى تجارب PCR:

لكى يتم الحصول على نواتج تضاعف PCR دقيقة وصحيحة للمنطقة المراد اكثارها، لابد من مراعاة ما يأتى :

١- أن يكون تصميم البادئ دقيقا وصحيحاً بحيث يتجه فقط إلى المناطق المستهدفه فى القالب لضمان الحصول على نواتج التضاعف المطلوبة فقط.

٢- أن يكون طول البادئ مناسباً بحيث لا يقل عن ١٠ نيوكلتيدات ولا يزيد عن ٣٠ نيوكلتيده حتى لا نحصل على نواتج تضاعف غير مرغوبة فى حالة البادئ القصير جداً أو خفض شديد فى نواتج التضاعف فى حالة البادئ الطويل جداً .

٣- مراعاة التطبيق الدقيق لمنحنى درجات الحرارة حسب البرنامج المختار فى PCR إذ لو ارتفعت حرارة التهجين Annealing عن الحرارة المثلى فلن يحدث تهجين بين البادئ والقالب وبالتالى لا نحصل على ايه نواتج تضاعف ، والعكس صحيح إذا انخفضت كثيراً درجة الحرارة عن الدرجة المطلوبة فسينتج عن ذلك تهجين خاطئ فى مواقع غير صحيحة للبادئ على القالب Mismatched hybrid ونحصل على نواتج PCR غير صحيحة.

طرق تحليل نواتج:

Analysis of PCR Amplification Products PCR:

١- التفريد الكهربى.

٢- الكلونة.

٣- تحليل التتابعات النيوكلتيدية.

أولاً: التفريد الكهربى لنواتج PCR:

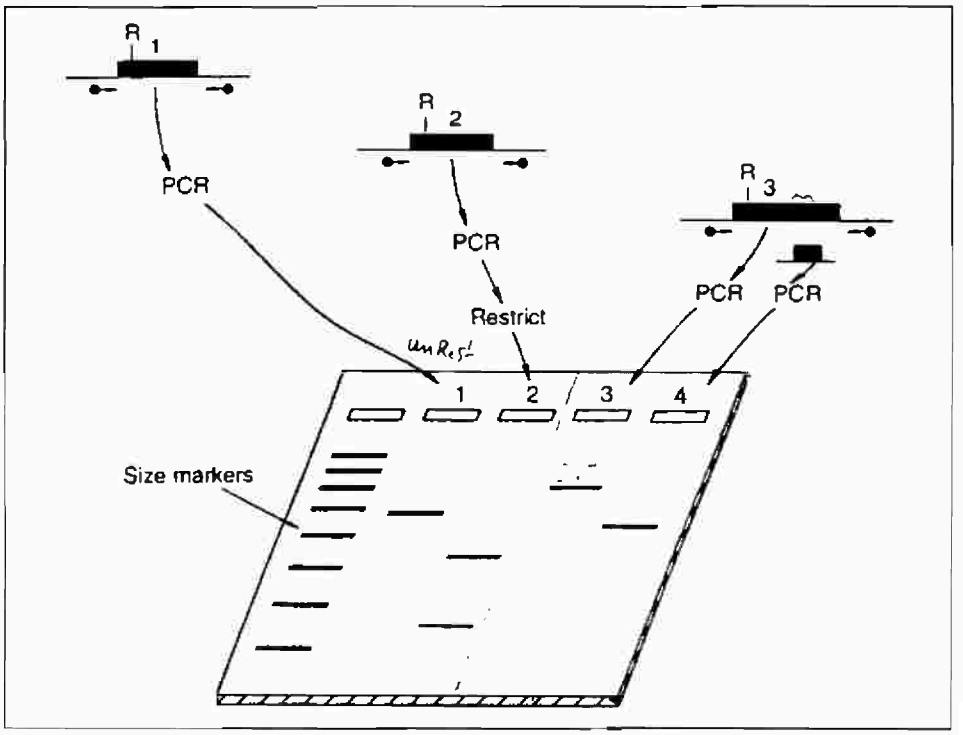
كما سبق الاشارة فإن نواتج التضاعف يتم اختبار أولى لها بأخذ جزء من ناتج التفاعل وتفريده على جيل اجاروز بالتفريد الكهربى. ويدل ظهور حزمة واحدة تمثل الناتج المتضاعف على نجاح التجربة. أما إذا ظهرت اكثر من حزمة أو لم تظهر حزمة بالمرة فإن ذلك يدل على حدوث اخطاء فى التجربة ولابد من اعادتها.

بالاضافة إلى ذلك فإن هناك حالات يستخدم فيها التفريد الكهربى لجيل الاجاروز للحصول على معلومات أكثر عن نواتج PCR منها:

أ - يمكن التحقق من وجود مواقع قطع محددة Restriction Sites من عدمة فى المنطقة المتضاعفة بمعاملة ناتج PCR بإنزيم قطع محدد Restriction Endonuclase قبل جريان العينة بالتفريد الكهربى (الشكل ١٢-٢٢) ويطلق على هذه التقنية PCR-Based RFLP (PBR) وتعد من البدائل السهلة والسريعة لتقنية RFLP حيث تحتاج إلى كمية صغيرة من د.ن.أ ولا تحتاج إلى استخدام النقل Southern Blotting.

وتستخدم هذه الطريقة فى استنباط الخرائط الجينومية وفى دراسة الامراض الوراثية كما سيأتى بعد .

الأساس لعملية DNA Profiling وهى من التقنيات المحورية فى علم الطب الشرعى (العدلى) كما سيأتى بعد.



الشكل (١٢-٢٢): يعطى التفريد الكهربى لنواتج PCR معلومات عن جزئ د ن أ القالب

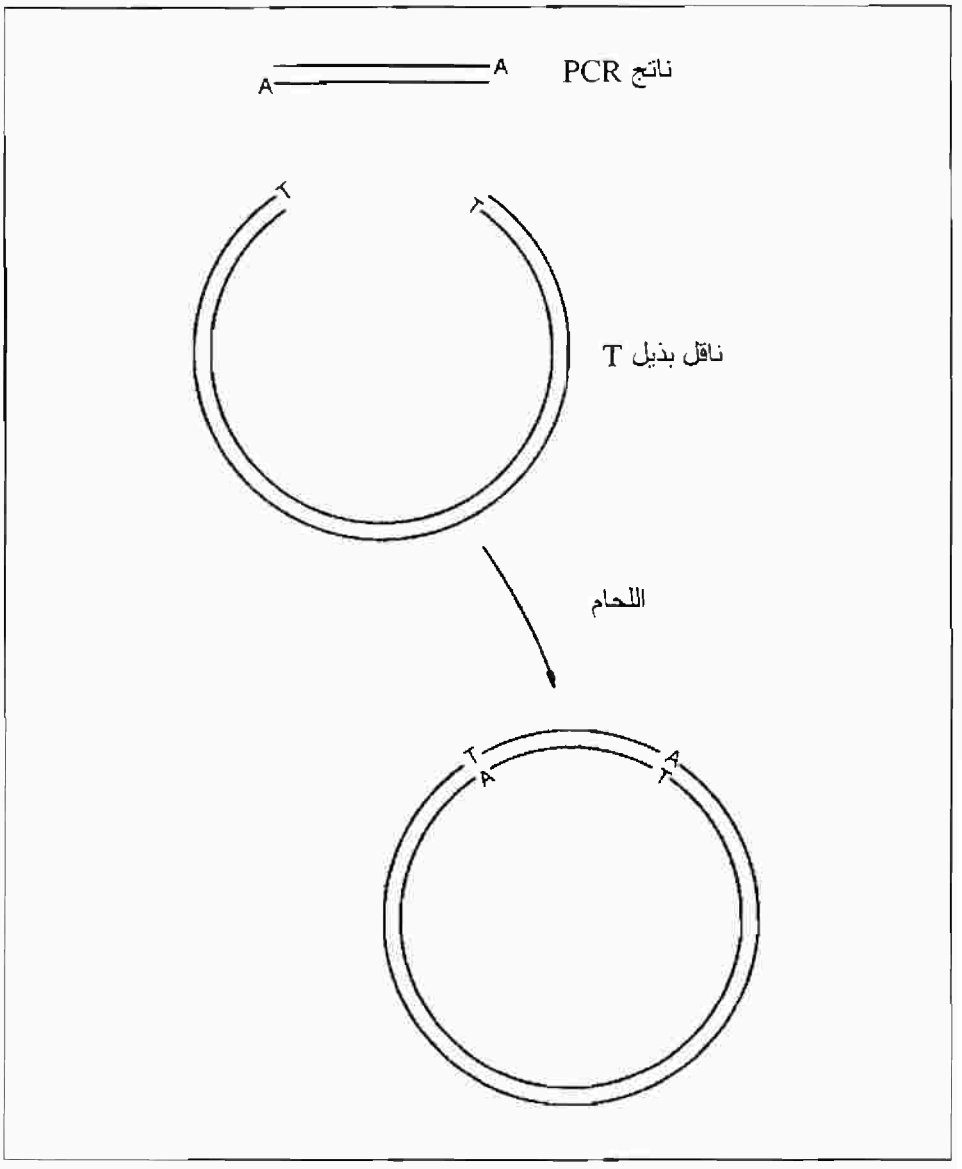
- المضمار ١ و٢ يبين على التوالى ناتج PCR غير محدد القطع بالإنزيم الذى يقطع عند الموقع R.
- يبين المضمار ٣ النتيجة عندما يكون د ن أ القالب محتويا على إضافة Insertion فى المنطقة المتكاثرة Amplified.
- يبين المضمار ٤ النتيجة عندما يكون د ن أ القالب قد فقد جزء فى المنطقة المتكاثرة.

ب- الكشف عن وجود طفرات اضافة Insertion أو حذف Deletion فى جزئ د.ن.أ فيها يطلق عليه "طفرة الطول" Length Mutation والتى تكون

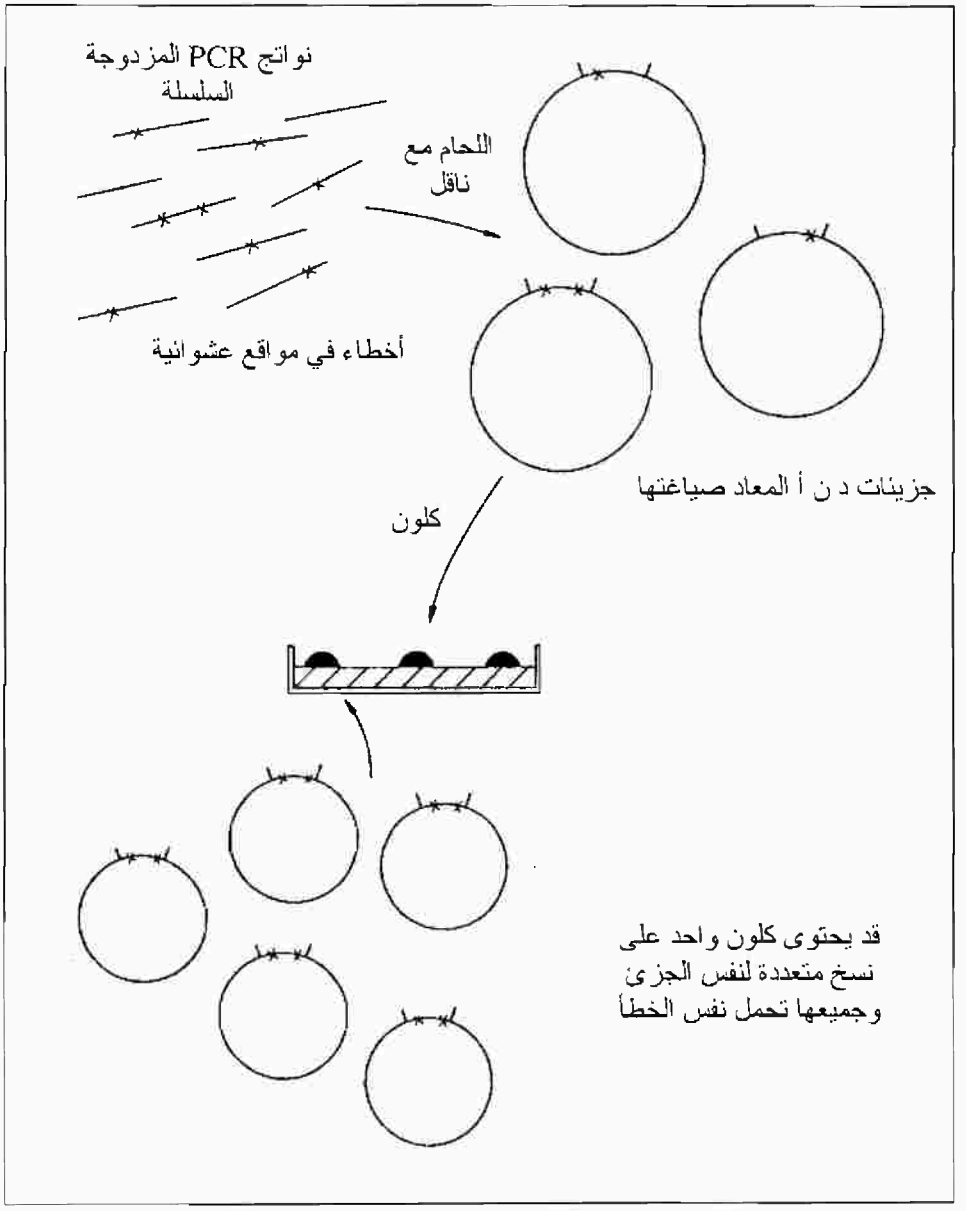
ثانياً: كلونة نواتج PCR:

يمكن من الناحية النظرية كلونة نواتج PCR فى بلازميدات لتكوين مكتبة جينات إلا أنه من الناحية العملية توجد بعض الصعوبات منها أن نواتج البلمرة

بانزيم Taq1 تكون نهايتها مرتبطة بنيوكلتيدة اضافية من الادينوسين مكونة Overhang مما يعيق عملية الكلونة. ويمكن التغلب على هذه الصعوبة بإستخدام ناقل Vector خاص يحتوى على ذيل من نيوكلتيدية T واحدة كما فى الشكل (١٢-٢٣) ومن جهة أخرى تبين أن Taq Polymerase يعمل اخطاء أثناء بناء د.ن.أ ، إذ أحيانا ما يضع نيوكلتيدة خطأ فى السلسلة النامية مما يؤدى إلى تراكم الاخطاء بمعدل خطأ واحد لكل ٩٠٠٠ نيوكلتيدة يتم بناؤها مما يقتضى الحذر عند كلونة هذه النواتج (الشكل ١٢-٢٤) وقد تم انتاج Taq Polymerase محتويا على خاصية تصحيح الاخطاء Proofreeding بحيث يمكن تلافى مثل هذه الاخطاء.



الشكل (١٢-٢٣): إستخدام ناقل خاص يحتوى على ذيل T لكلونة ناتج PCR



الشكل (١٢-٢٤): يؤدى التكرار العالى لحدوث أخطاء و الناتج من إنزيم Taq إلى بعض الصعوبات عند كلونة نواتج PCR

دراسة موقع وتركيب الجين فى جزئ د.ن.أ:

أولاً: تحديد موقع الجين Gene Location:

توجد تقنيات متعدده لتحديد موقع جين معين فى جزئ د.ن.أ وتتحدد طبيعة الطريقة المستخدمة حسب حجم جزئ د.ن.أ بحيث تختلف الطريقة فى حالة الجزيئات الصغيرة مثل تلك الخاصة بالبلازميدات وكروموسومات الفاج عن تلك المستخدمة لتحديد موقع الجين على جزئ د.ن.أ كبير الحجم كما فى كروموسومات مميزة النواة.

أ - تحديد موقع الجين فى جزئ صغير الحجم:

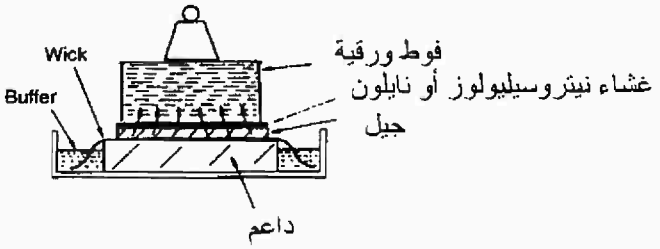
فى حالة جزيئات د.ن.أ صغيرة الحجم مثل البلازميد البكتيرى PBR 322 أمكن بالانتخاب المباشر التوصل الى أن الجين المشفر للمقاومة للمضاد الحيوى كانامايسين Kanamycin موجود ضمن كلونات القطعة R6-5 الناتجة عن القطع بإنزيم القطع المحدد EcoR1 والتى أنتجت ١٣ شظية. ولكى نعرف بالتحديد على أى من هذه الشظايا يقع جين الـ Kan^R حتى يمكن أن نضعه على خريطة القطع المحددة للشظية (R6-5)، ولكى يتم ذلك لابد أولاً أن يتم تفريد كهربى على جيل الاجاروز لنواتج القطع المحدد للمنطقة R6-5 الشكل ١٢-٢٥ ب). ويلى ذلك عملية نقل بطريقة Southern Blotting (الشكل ١٢-٢٥-ب) متبوعة بعملية التنقيب بالتهجين hybridization Probing (الشكل ١٢-٢٥-جـ) حيث تعطى صورة Autoradiography الاشارة الموجبة الدالة على ترتيب الشظية المحتوية على جين Kan^R بالنسبة للشظايا الآخرى.

وأخيراً وباستخدام خريطة القطع المحدده للقطعة R6-5 يمكن وضع هذه الشظية فى موقعها على تلك الخريطة (الشكل ١٢-٢٥-د).

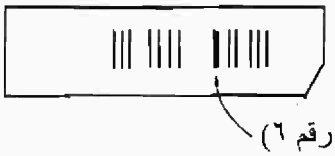
ومن جهة أخرى، يمكن استخدام تقنية النقل Southern لتحديد مكان جين معين مكلون ضمن جزئ كبير الحجم نسبيا من د.ن.أ المعاد صياغته Reconbinant DNA كما فى الشكل (١٢-٢٦) إلا أن استخدام Resriction Maping و Southern يكون قاصراً عن تحديد موقع الجين إذا زاد حجم جزئ د.ن.أ عن ٢٥٠ك قاعدة.

(أ) التفريد الكهربي لبلازمين R6-5 المقطوع بأنزيم EcoRI

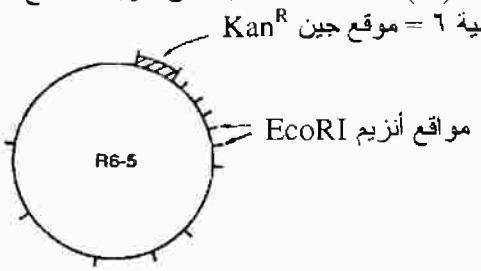
(ب) النقل بـ Sothern



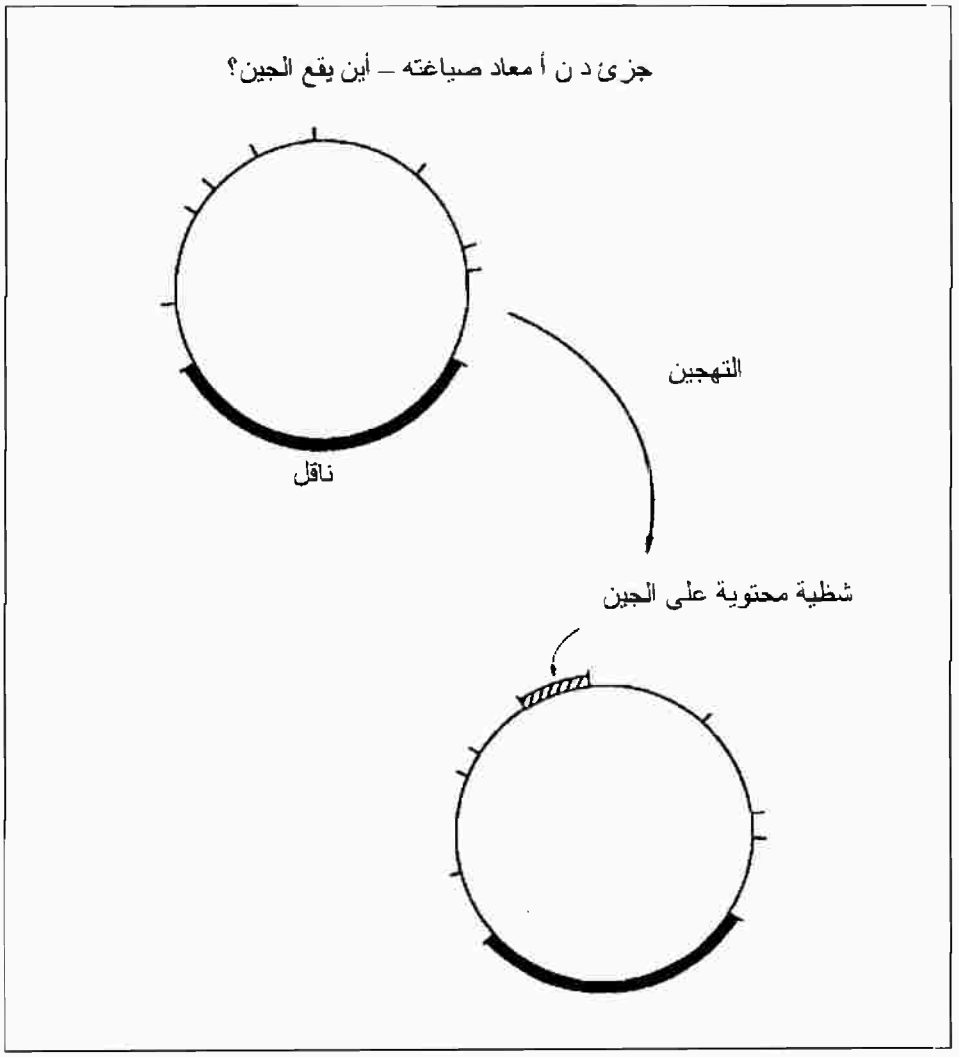
(جـ) نتيجة التهجين بالواسمة



(د) يحدد مكان الشظية على خريطة القطع المحدد للبلازميد



الشكل (١٢-٢٥): النقل بطريقة Southern

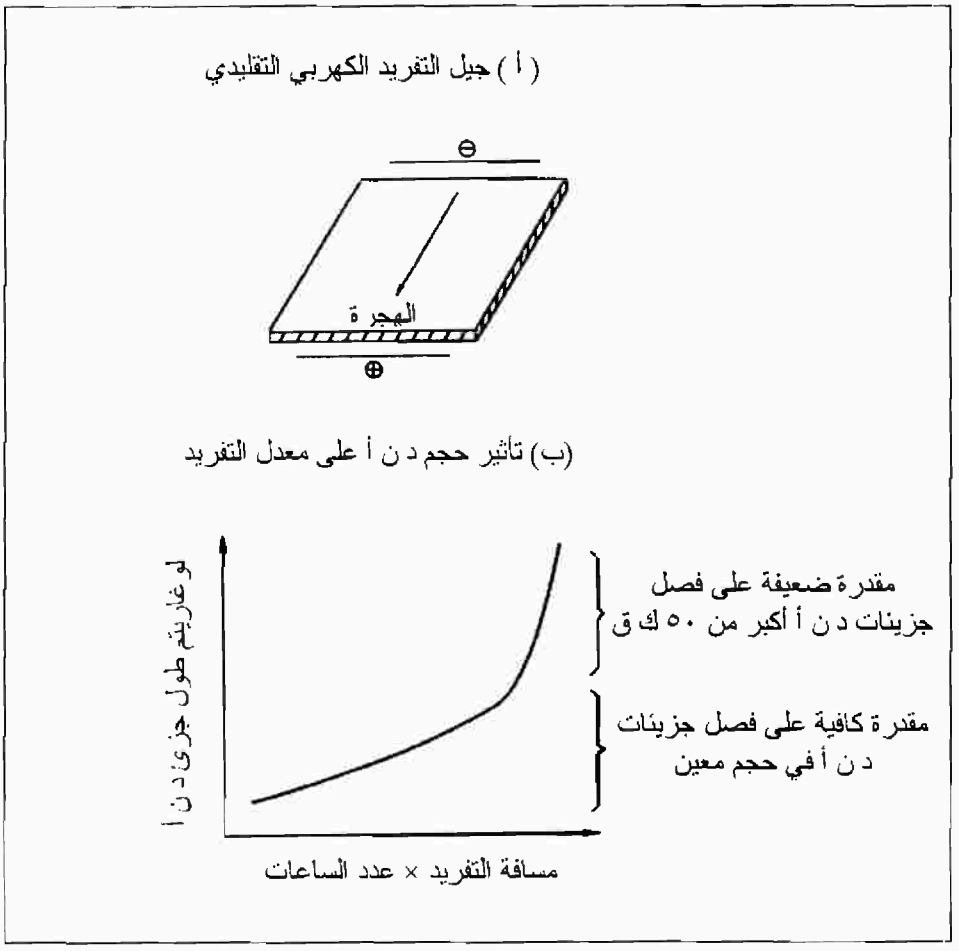


الشكل (١٢-٢٦): يمكن إستخدام التهجين بطريقة Southern لتحديد موقع جين مكلون من جزئ د ن أ (كبير الحجم نسبيا) المعاد صياغته

ب- فصل الكروموسومات فى مميزة النواة الصغيرة (البدائية):

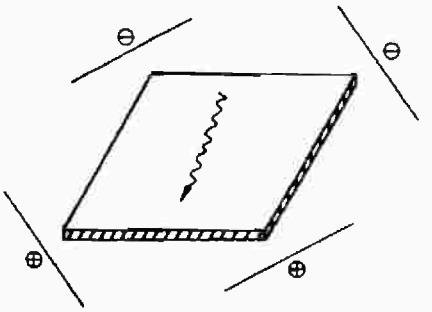
Separting Chromosomes of Lower Eukaryote By Gel Electrophoresis:

ثبت أن طرق التفريد الكهربى العادية على جيل الاجاروز لا يمكنها فصل الحزم الخاصة بشظايا د.ن.أ إذا زاد حجمها عن ٥٠ك قاعدة كما فى الشكل (١٢-٢٧) ولذلك لا يمكن الاعتماد عليها فى فصل الجزيئات (أو الكروموسومات) الكبيرة الحجم نسبياً. وقد امكن التغلب على هذه الصعوبة باستخدام ما يسمى Pulsed Field Electrophoresis (PFE) وهو من عدة أنواع وأشهرها Orthogonal Field Alternative Gel Electrophoresis (OFAGE) وفيه يحدث للمجال الكهربى تغيير فى المسار بين زوجين من الاقطاب Electrodes ويقع كل زوج من هذه الاقطاب بزاوية 45° بالنسبة للمحور الطولى للجيل (الشكل ١٢-٢٨). وينتج عن ذلك مجال نبضى Pulsed Field مما يجبر جزيئات د.ن.أ على تغير اتجاهها باستمرار تبعاً للنبضات. وعندما يحدث تبادل للمجالين بطريقة منتظمة، فإن محصلة الحركة لجزيئات د.ن.أ فى الجيل ستستمر من احدى النهايتين إلى النهاية الاخرى فى خط مستقيم تقريباً إلا أنه مع كل تغيير يحدث فى اتجاه المجال فإن على كل جزئ د.ن.أ أن يعيد استقامة حركته Realign بزاوية 90° قبل أن يستمر فى الهجرة. ويعد ذلك اهم نقطة فى هذا النظام حيث يكون باستطاعة الجزيئات الصغيرة نسبياً (القصيرة) أن تعمل Realingnment أسرع من الجزيئات الأطول مما يسمح للجزيئات القصيرة بالحركة والتقدم بسرعة أكبر إلى نهاية الجيل. وقد أمكن بهذه التقنية الوصول إلى زيادة هائلة فى قدرة الجيل على فصل جزيئات قد يصل طولها إلى عدة الاف ك قاعدة. ويبين الشكل (١٢-٢٨-ب) فصل كروموسومات الخميرة بهذه التقنية.

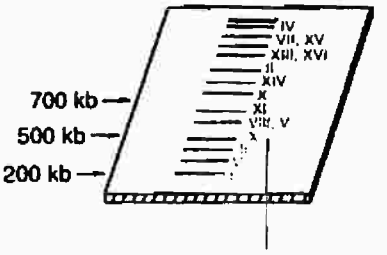


الشكل (١٢-٢٧): محددات جيل التفريد الكهربى التقليدى

(أ) جهاز OFAGE



(ب) فصل كروموسومات الخميرة بجهاز OFAGE



الشكل (١٢- ٢٨): التفريد الكهربى بجهاز أورثوجونال التبادلى (OFAGE)

ويمكن الاستفادة من هذه التقنية ايضا فى عزل وتنقية د.ن.أ من كل كروموسوم على حدة وتكوين مكتبات جينية كروموسومية وبالطبع تكون هذه المكتبات اصغر بكثير فى عدد الكلونات الخاصة بها عما فى المكتبة الجينومية مما يجعل من السهل التعامل معها. بالاضافة إلى ذلك، فإنه يمكن نقل Southern

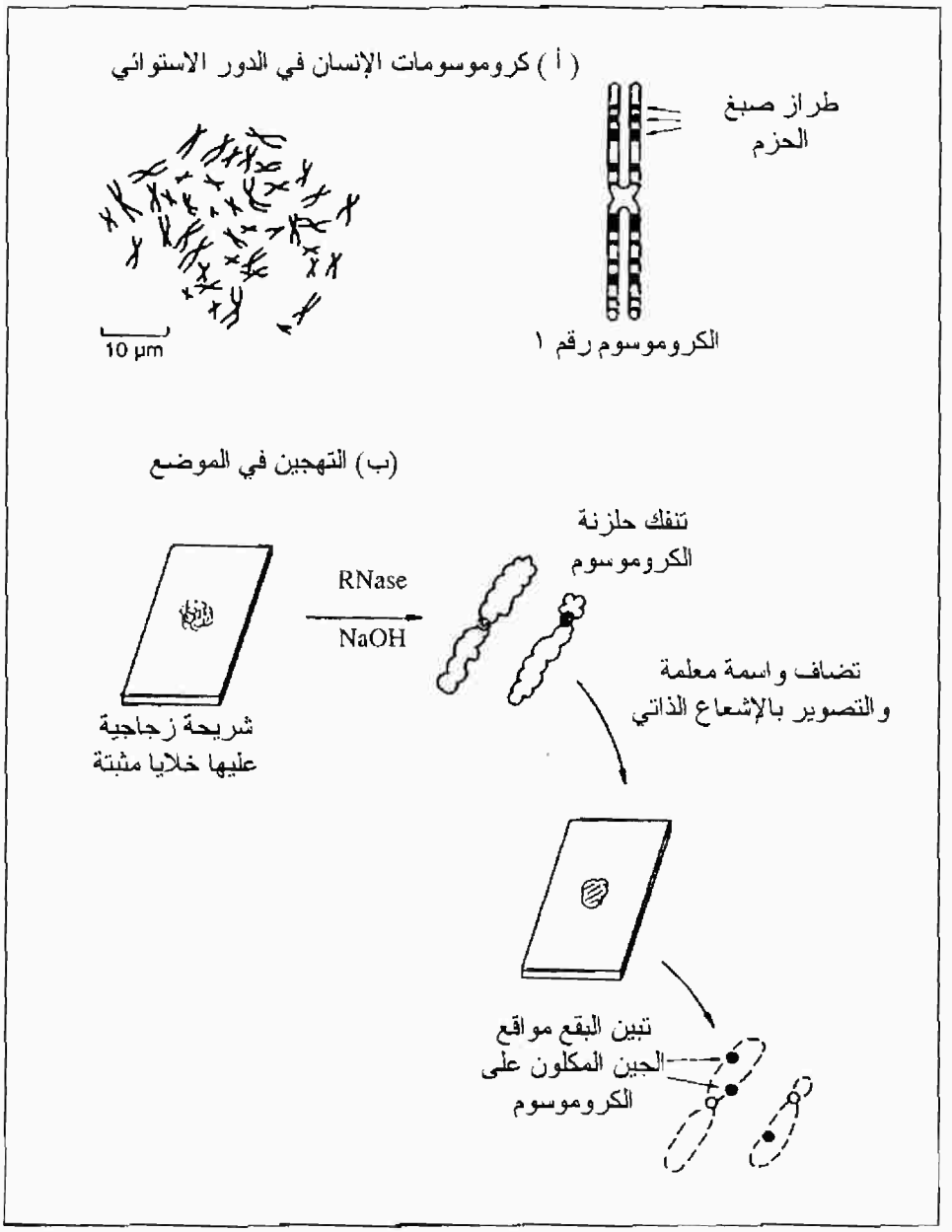
لحزيئات د.ن.أ على غشاء نيتروسيليوز أو نايلون واجراء تعريف للجينات المكلونة بطرق التحليل القياسية.

ج- تحديد موقع الجين على كروموسومات مميزة النواة بطريقة التهجين فى الموضع In Situ Hybridization:

فى حالة كروموسومات مميزة النواة الراقية حيث يزيد طول جزيئات د. ن. أ فيهاعن ٥٠ الف كيلو قاعدة كما فى الثدييات والنباتات الراقية، نجد أن PFE لا يمكنه فصل مثل تلك الكروموسومات الكبيرة الحجم. لذلك يمكن تحديد موقع الجين فى هذه الحالة بتقنية التهجين فى الموضع *In Situ* Hybridization.

حيث يمكن بها تحديد على أى كروموسوم يقع الجين بالاضافة إلى موقع الجين على الكروموسوم نفسه.

وتتلخص الطريقة فى تفريد كروموسومات الدور الاستوائى الميتوزى على شريحة ميكروسكوبية ومعاملتها بانزيم الريبونيوكليز ومحلول هيدروكسيد الصوديوم لهدم ر.ن.أ ودنترة جزيئات د.ن.أ ويضاف الى التحضير الكروموسومى واسمة مشعة للجين المطلوب تحديد موقعة حيث يحدث تهجين بين الواسمة والجين على الكروموسوم والذى يتم الكشف عنه بالتصوير بالاشعاع الذاتى Autoradiography (الشكل ١٢-٢٩).



الشكل (١٢-٢٩): التهجين فى الموضع In Situ Hybridization

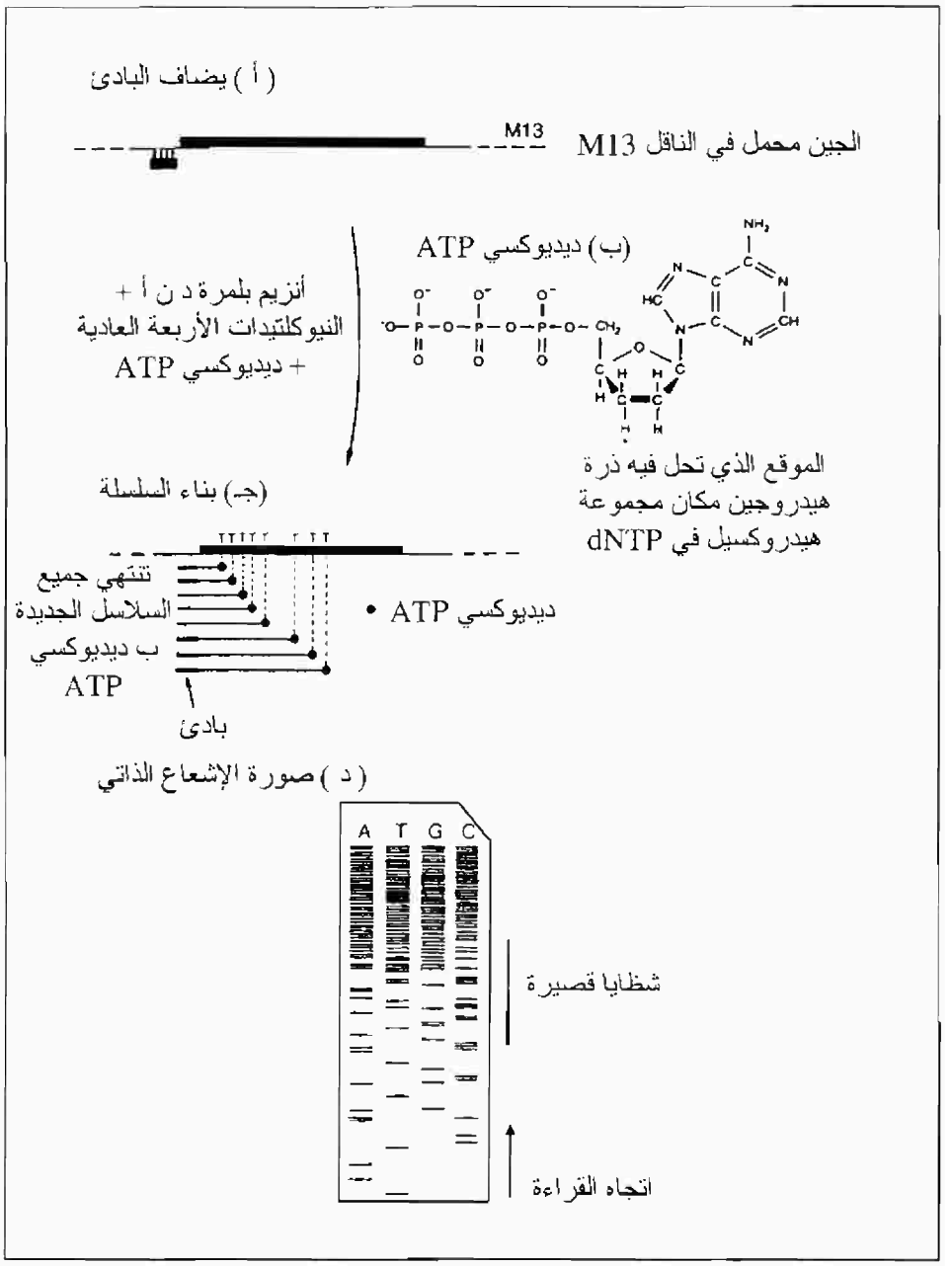
ويمكن الاستعاضة عن الواسمة المشعة باستخدام كاشف فلورسنتى مرتبط بلواسمة بحيث يمكن التعرف على التهجين مباشرة باستخدام ميكروسكوب فلورسنتى Fluorescet Microscope وإذا استخدمت فلورسنت بالوان مختلفة Fluorochromes فإنه يمكن التعرف على أكثر من جين واحد فى نفس الوقت حيث سيعطى كل نوع من الفلورسنت اشارات لونية مميزة ويطلق على هذه التقنية Fluorescent *In Situ* Hybridration (FISH).

تحليل التتابعات النيوكلتيدية فى جزئ د.ن.أ DNA sequencing:

تعد طرق تحليل تتابعات الاحماض النووية من أهم التقنيات المستخدمة فى مجال البيولوجيا الجزيئية والتى يمكن بها التحديد الدقيق لترتيب النيوكلتيدات فى تتابعات مستمرة فى قطعة من د.ن.أ. وعلى الرغم من أن طرق تحليل التتابعات بدأت منذ بداية الستينات من القرن الماضى إلا أن أوخر السبعينات شهدت ظهور تقنيات سريعة وفعالة لتحليل تتابعات د.ن.أ.

أ – طريقة أنهاء بناء السلسلة Chain Termination Method:

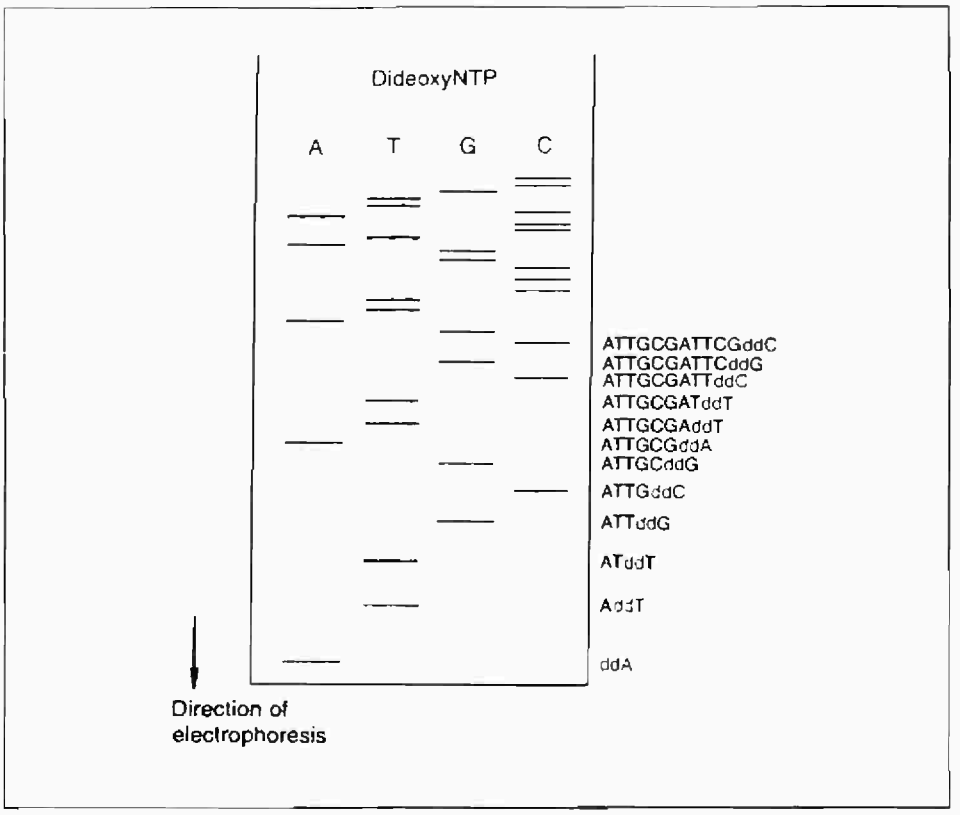
وقد استنبطها Sanger and Coulson وتتطلب الطريقة استخدام سلسلة د.ن.أ مفردة للبناء عليها ولذلك تتم كلونة مثل هذه السلسلة فى ناقل M13 وحيد السلسلة بحيث يتم بناء سلسلة د.ن.أ المكملة عليها بانزيم DNA Pol I أو أنزيم Sequenase. ويحتاج الامر إلى وجود بادئ Primer لكى يستطيع الانزيم بدء البناء (الشكل١٢-٣٠) ويتكون مخلوط التفاعل من العناصر الاساسية المعروفة لبناء د.ن.أ بحيث يتوفر فيها النيوكلتيدات الاربعة العادية dNTP's A,C,G,T مع مراعاة أن تكون إحدى هذه النيوكلتيدات معلمه بالاشعاع مع توزيع هذا المخلوط فى أربعة انابيب وتعطى الحروف : T,G,C,A.



الشكل (١٢-٣٠): طريقة سانجروكولسون لتحليل تتابعات د ن أ بإنهاء سلسلة د ن أ

وبالاضافة إلى مخلوط النيوكلتيدات الاربعة فى كل انبوبة يضاف نيوكلتيدة واحدة معدله منزوع منها مجموعة 3'OH وتسمى Dideoxy Nucleotide والتى تتوقف عندها عملية استطالة سلسلة د.ن.أ الجديدة نظراً لعدم وجود مجموعة 3'OH حرة بها والتى تحتاجها عملية البناء لاضافة النيوكلتيدة التالية. أى أن انهاء السلسلة يحدث اينما يتم الاضافة الانزيمية لهذه النيوكلتيدة المعدلة. وإذا احتوى المخلوط فى الانبوبة A على Dideoxy ATP فإن الانهاء سيحدث عندما تتقابل مع النيوكلتيده T على طول تتابعات السلسلة القالب، وتكون النتيجة هى الحصول على مجموعة من السلاسل الجديدة المختلفة الأطوال ولكنها تشترك فى أن كل منها ينتهى بالنيوكلتيدة المعدلة Dideoxy A. نفس الشئ سيحدث فى الانبوبة C ولكن باضافة Dideoxy C والانبوبة G بأضافة Dideoxy G والانبوبة T بأضافة Dideoxy T.

يلى ذلك التفريد الكهربى لمحتويات الانابيب الاربعه من مجموعة سلاسل د.ن.أ Oligo جنباً إلى جنب. ويمكن باستخدام التصوير بالاشعاع الذاتى، التعرف على التتابعات حيث تتم قرائتها من اسفل الجيل إلى أعلى كالاتى (الشكل ١٢-٣١).



الشكل (١٢-٣١): كيفية قراءة صورة الإشعاع الذاتى للجيل الناتج من طريقة إنهاء السلسلة.
يحتوى كل مضمار على الشظايا الناتجة عن بناء السلسلة فى وجود واحدة من الأربعة ديوكسى ريبونيوكلتيد. تتم قراءة التتابع بتحديد المضمار الذى تتكون فيه كل شظية مبتدأ من أسفل بأصغر شظية فى الحجم وصاعدا بالتدريج فى صورة الجيل

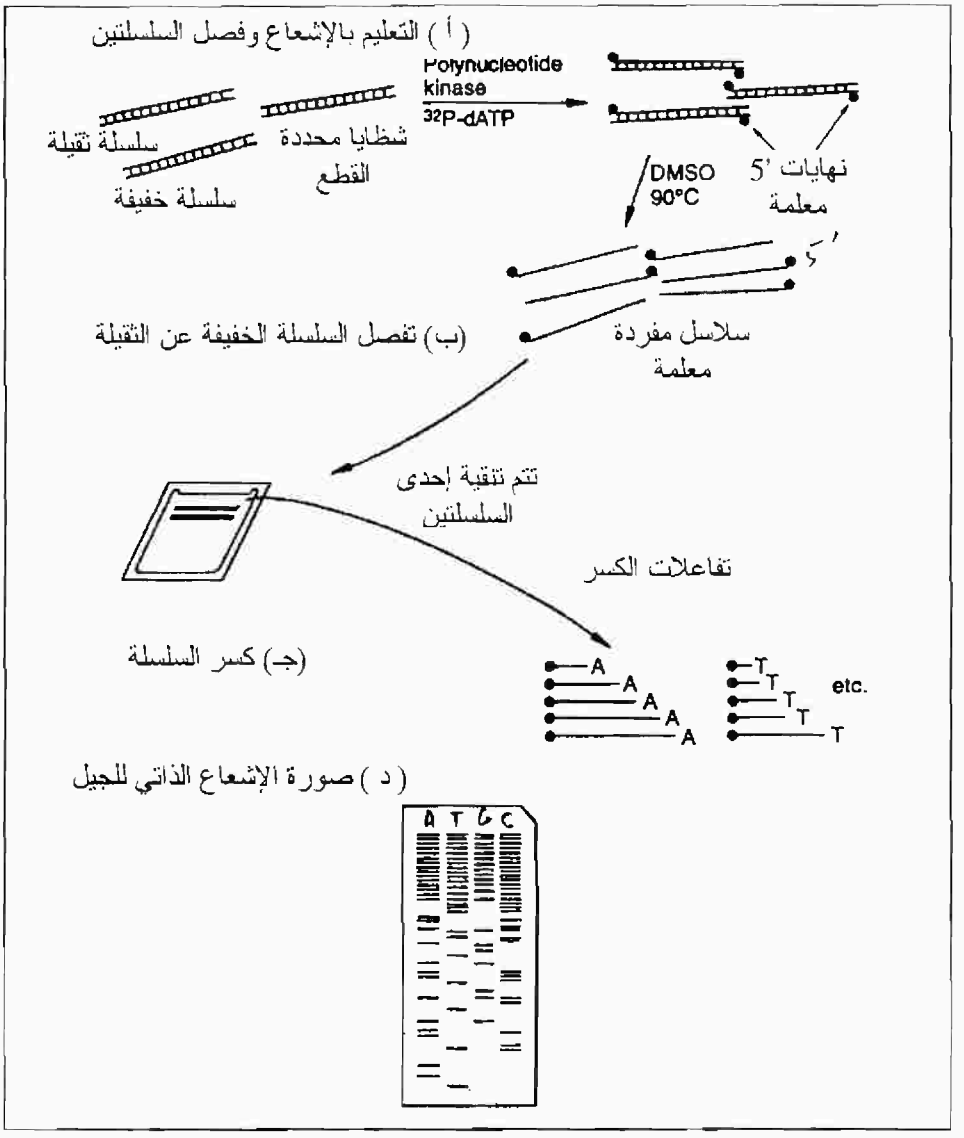
تحدد أولاً أخف حزمة بين نواتج مخاليط الأنابيب الأربعة والتى تمثل اصغر شظيه من د.ن.أ التى تم انهاء السلسلة عندها وليكن ذلك عند A بمعنى أنه فى المسار A تكون أول نيوكلتيدة فى التتابع هى A . ثم نبحث عن ثانى اسرع شظيه فى التحرك والتى يزيد طولها بمعدل نيوكلتيدة واحدة فقط عن سابقتها فنجد أنها فى المسار T وبذلك تكون النيوكلتيدة الثانية فى التتابع هى T

ويكون التتابع عند هذه النقطة هو AT. وتستمر عملية القراءة من اسفل الى أعلى حتى نصل إلى نقطة تكون فيها السلاسل متداخلة ويصعب قراءتها وعموماً فإن هذه الطريقة تنتج قراءة تتابعات لحوالى ٤٠٠ نيوكلتيدة من صوره اشعاع ذاتى واحده Autoradiograph

ب- طريقة الهدم الكيماوى Chemical degradation of DNA:

استنبط هذه الطريقة Maxam and Gilbert وتحتاج هذه الطريقة إلى استخدام قطع د.ن.أ مزدوجة السلسلة وبذلك لا تحتاج الى الكلونة فى الناقل M13 ولا إلى بادئ نظرا لأن الأساس فى هذه الطريقة ليس البناء ولكن هدم جزئ د.ن.أ ثنائى السلسلة الموجود بالفعل باستخدام محاليل كيماوية موجهة ليتسنى قطعه عند نيوكلتيدة نوعية معينة. ويتم اولاً التعليم Labeling بالفوسفور المشع ^{32}P عند النهاية $5^{\backslash}$ لقطعة د.ن.أ مزدوجه السلسلة المراد تحليل تتابعها، ثم يضاف Dimethylsulphoxide (DMSO) ويتم التسخين على درجة ٩٠ م ويؤدى ذلك إلى تفكيك الحلزون المزدوج ودنترة جزئ د.ن.أ. يلى ذلك فصل السلسلتين بالتفريد الكهربى على اساس أن احدى السلسلتين تكون اثقل قليلا من الاخرى على اعتبار احتوائها على نسبة أعلى من البيورينات. ويتم فصل وتنقية احدى السلسلتين ثم يتم تقسيمها إلى أربع عينات وتعامل كل عينة بإحدى محاليل كاشفات القطع. وفى الحقيقة فإن أول مجموعة من الكاشفات تحدث تعديل فى تركيب النيوكلتيدة المتخصصة لها بحيث تجعلها معرضة للقطع عند هذه النيوكلتيدة عند اضافة مادة البيبريدين Piperidine. وتتم عملية التعديل Modification وتفاعل القطع Cleavage Reaction تحت ظروف قياسية تؤدى إلى احداث قطع واحد فى السلسلة. وتحتفظ بعض الشظايا المقطوعة بالفوسفور المشع ^{32}P $5^{\backslash}$. وبعد التفريد الكهربى ، يمكن التعرف على تتابعات النيوكلتيدات

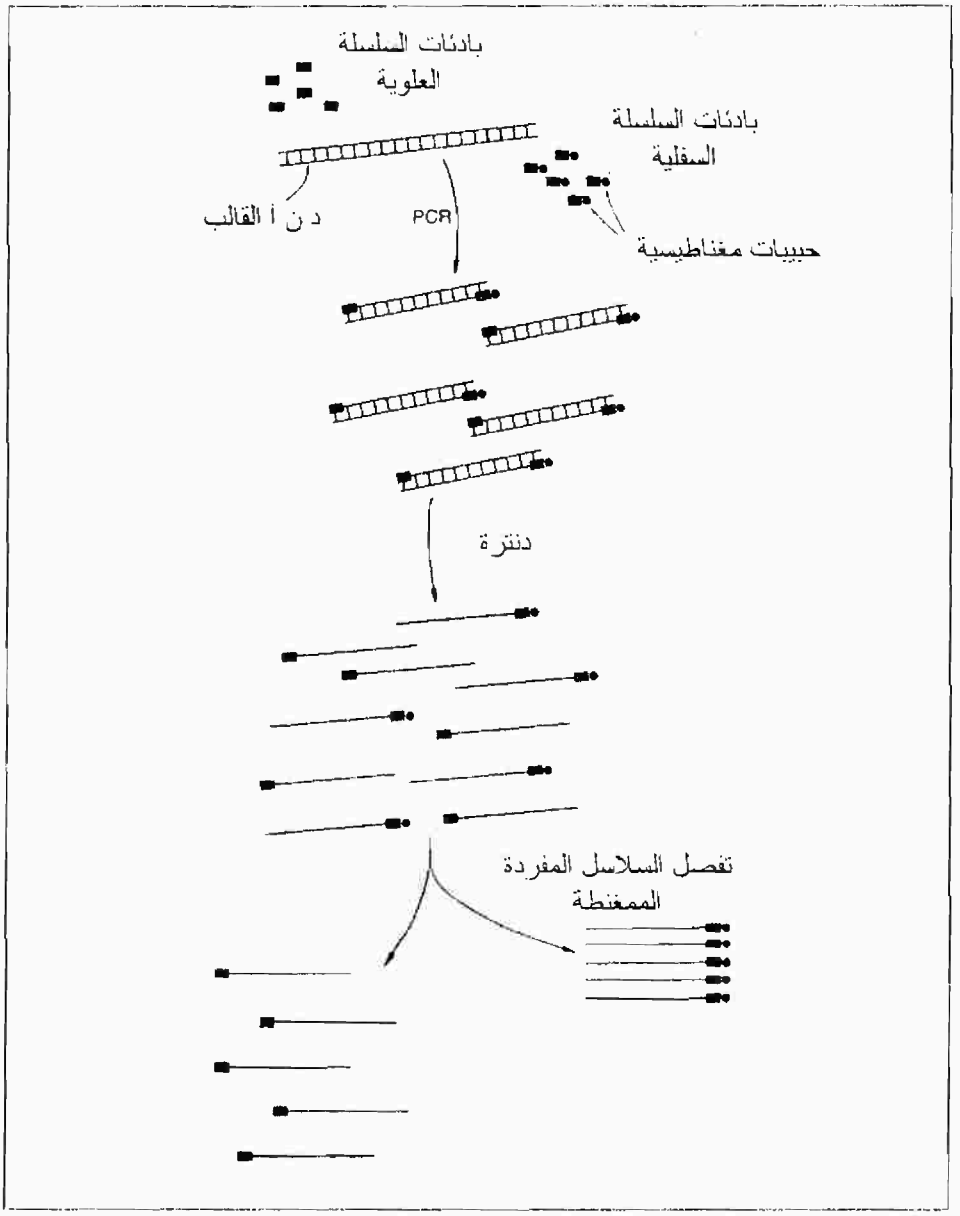
بالتصوير الذاتى الاشعاعى Autoradiograply وتتم قراءة التتابع من اسفل إلـــى اعلى كما سبق الشرح فى طريقة انهاء البناء (الشكل ١٢-٣٢).



الشكل (١٢-٣٢): طريقة ماكسام وجلبرت لتحليل تتابعات د ن أ بالهدم الكيماوى

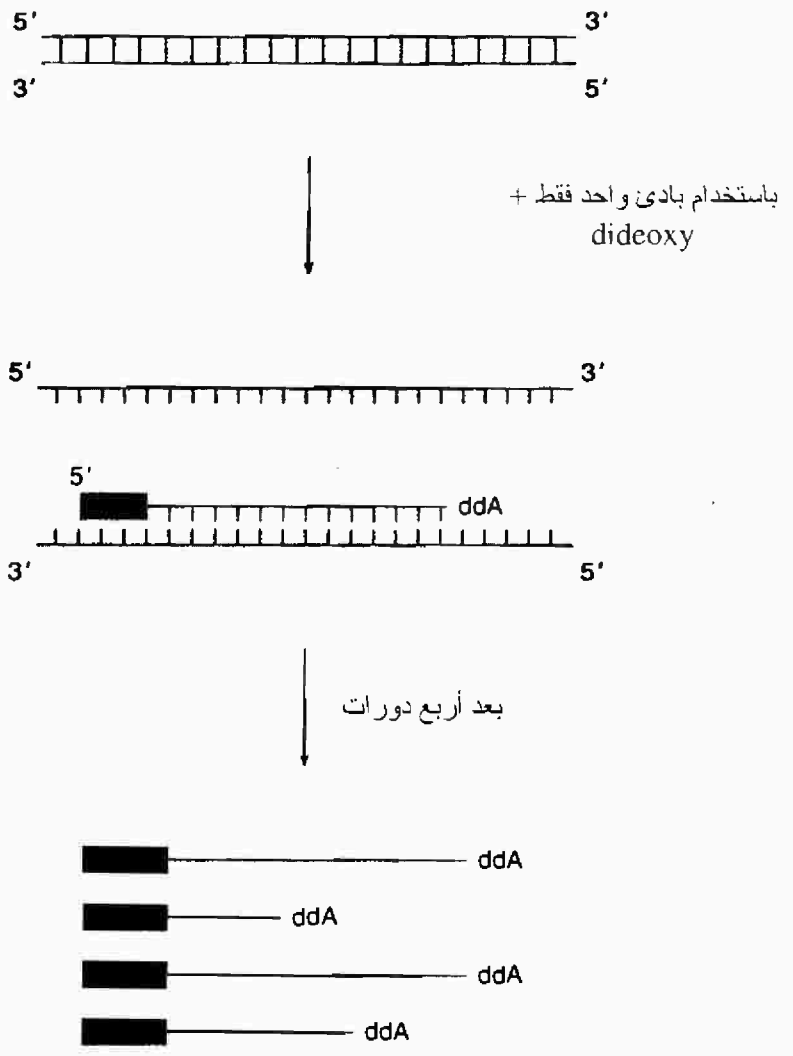
تحليل تتابعات نواتج Sequencing PCR Products PCR:

يحتاج الامر فى اغلب الأحيان إلى تحديد تتابعات الشظايا الناتجة من PCR ويمكن نظرياً اجراء ذلك عن طريق كلونة هذه الشظايا مع استخدام تقنية انهاء السلسلة السابق الاشارة اليها. إلا أنه نظراً للمشاكل الخاصة بكلونة هذه الشظايا فإنه من الأفضل أن يتم تحليل تتابعاتها مباشرة Direct بدون كلونة باستخدام تقنية أنهاء السلسلة Chain Termination وحيث أن هذه التقنية تتطلب استخدام سلسلة مفردة من د.ن.أ، فإنه يمكن عمل تعديل فى البادئ المستخدم بحيث يكون احد الزوجين مرتبط بقطعة من المغناطيس والاخر عادى. ثم يتم الاكثار فى جهاز PCR وبذلك يمكن فصل السلسلتين بعد نهاية برنامج PCR كما فى الشكل (١٢-٣٣)ويتم بعد ذلك اجراء تحليل التتابعات بطريقة انهاء السلسلة.



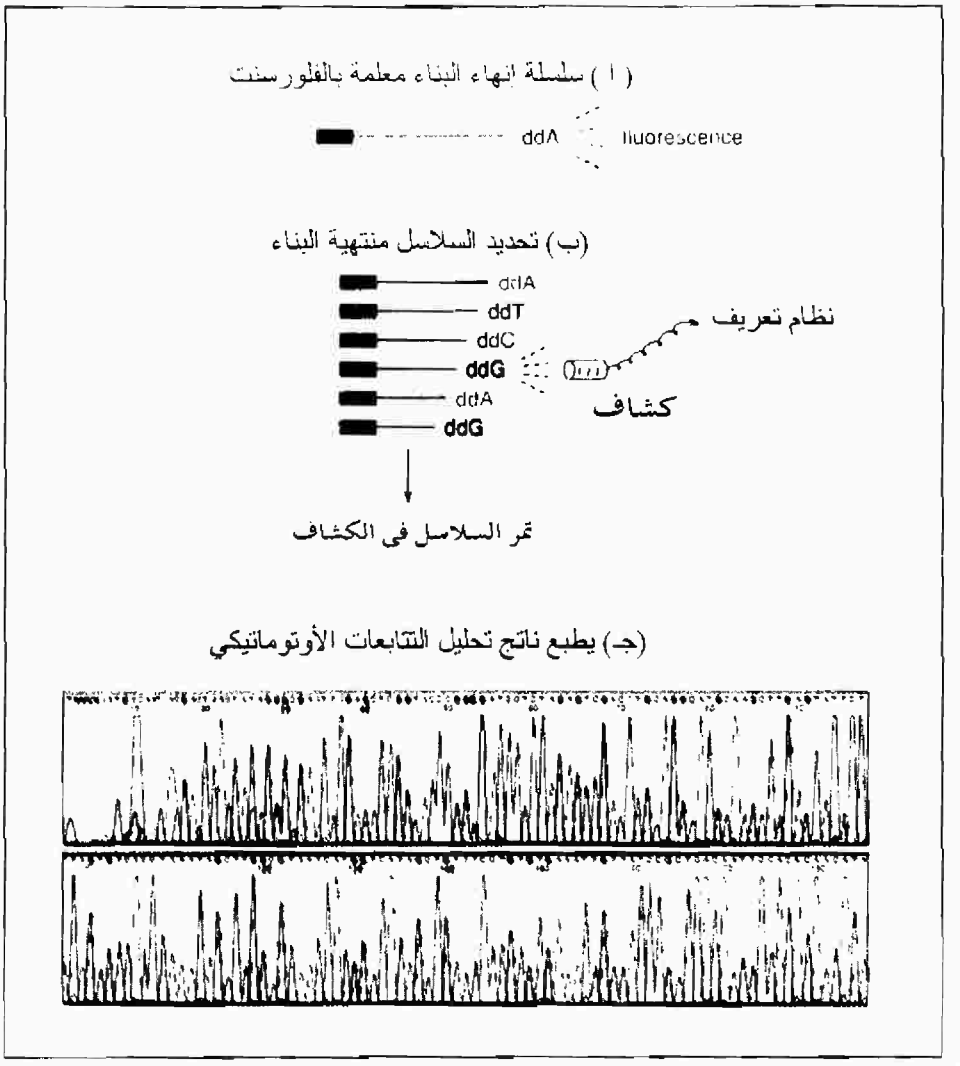
الشكل (١٢-٣٣): طريقة للحصول على عينة نقية من سلسلة مفردة من د ن أ من ناتج PCR مزدوج السلسلة. يتم تعليم احد البادئين بحبيبات ممغنطة وبعد إنتهاء دوراتPCR تتم دنترة نواتج PCR مزدوجة السلسلة و تفصل السلاسل الممغنطة من تلك غير الممغنطة

وتوجد تقنية بسيطة وسهلة لتحليل تتابعات نواتج PCR ويطلق عليها Thermal Cycle Sequencing وتتضمن الجمع بين PCR وتحليل تتابعات النواتج فى تفاعل واحد. وفى هذه التقنية يستخدم مخلوط للتفاعل مشابة لمخلوط PCR مع اختلافين هامين أولهما استخدام بادئ واحد Single Primer فقط (وليس زوج) ومعنى ذلك أن عملية الاكثار المميزة لتقنية PCR لا يمكن أن تحدث ولكن كل ما يحدث هو أن سلسلة واحدة من د.ن.أ القالب هى التى سيتم أكثارها الى نسخ عديدة. ولابد من استمرار هذا الاكثار نظراً لأن التفاعل يكون متسلسل حرارياً Thermally Cycled تماماً مثل ما يحدث فى PCR، والفرق أو الاختلاف الثانى هو أن هذا التفاعل المعدل يجرى اربع مرات على التوازى وفى كل مرة مع نيوكلتيدة معدلة Dideoxy مختلفة (G, C, T, A) مما يؤدى إلى انهاء بناء الشظايا الجديدة عند كل من هذه النيوكلتيدات المعدلة (الشكل ١٢-٣٤). يلى ذلك التفريد الكهربى للنواتج كما فى حالة تقنية انهاء السلسلة.



الشكل (١٢-٣٤): الأساس فى تحليل تتابعات د ن أ بطريقة Thermal Cycle Sequencing. يتم تحضير PCR مع إضافة بادئ واحد فقط (وليس زوج من البادئات) واحد داى ديوكس نيوكلتيدة Dideoxy NTP حيث يحدث بناء لأحد سلاسل القالب إلى العديد من سلاسل إنهاء البناء (بطريقة ساتجر ــ كولسون)

وقد تم تطوير عملية تحليل التتابعات بجعلها Automated وبدلا من استخدام التعليم بالاشعاع استعيض عنه بالتعليم الفلورسنتى والذى يتم بربط فلورسنت بلون مختلف Different Fluorochrome مميز لكل قاعدة Dideoxy (مثلا أحمر مع A وأزرق مع T وأصفر مع G وأخضر مع C) وتتم متابعة اشارات الفلورسنت بنوع خاص من Imaging System يتضمن استخدام كمبيوتر لقراءة تتابعات د.ن.أ بدلا من الاعتماد على نظر الباحث. ويتم وضع نواتج التفاعل فى انبوبة شعرية واحدة لنظام التفريد الكهربى وامرارها على كشاف فورسنتى Fluorescent Detector الذى يحدد نوع الاشارة الفلورسنت المنبعثة من كل حزمة ويغذى النتائج للكمبيوتر الذى يقوم بتحويل المعلومات إلى تتابعات د.ن.أ المقابلة. ويمكن طبع التتابعات لفحصها أو تخزن فى الكمبيوتر للقيام بتحليلات أكثر (الشكل ١٢-٣٥).



الشكل (١٢-٣٥): تحليل تتابعات د ن أ أوتوماتيكيا:

أ - يتم تعليم كل من Dideoxy NTP بكشاف فلورسنتى.

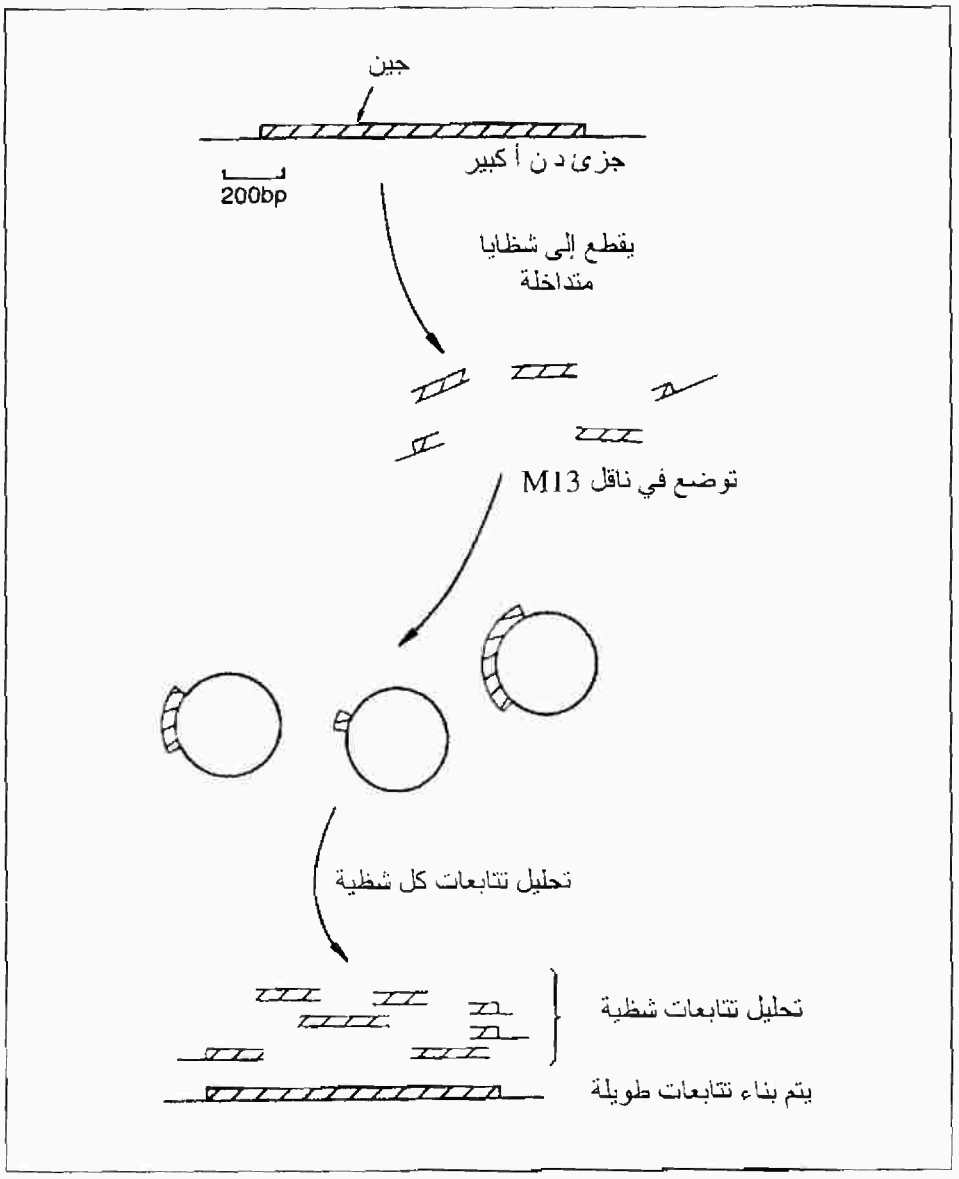
ب- يتم تعليم كل من Dideoxy NTP بكشاف فلورسنتى مختلف اللون بحيث يمكن تمييز السلاسل المنتهية البناء أثناء مرورها على الكشاف Detector.

ج- مثال لتتابعات د ن أ مطبوعة من الكمبيوتر.

ويمكن لجهاز تحليل التتابعات الأوتوماتيكى Automated Sequencer أن يقرأ حتى ٩٦ تتابع مختلف فى ساعتين وبذلك يعطى بيانات أكثر وبسرعة أكبر عما هو ممكن بالتحليل اليدوى، حيث يعطى الشوط الواحد للتحليل تتابع ٧٥٠ نيوكلتيدة مقابل ٤٠٠ نيوكلتيدة فقط بالتحليل اليدوى ويمكن بالتحليل الاتوماتيكى واستخدام Robotic Systems وبنظام مشابة للمصنع حيث يوجد ٩٦ مسار أو خط تحليل تتابع اوتوماتيكى تعمل معا بالتوازى الحصول على تتابعات ٥٠ مليون نيوكلتيدة على مدى يومين من التشغيل المتواصل للنظام مما يعد قفزة هائلة فى مجال تحليل التتابعات.

تكوين تتابعات طويلة من د.ن.أ.:

ويتم ذلك من خلال اجراء تجارب تحليل تتابعات د.ن.أ لعدد كبير من الشظايا المكلونة أو لنواتج PCR بحيث تكون جميعها مشتقة من جزئ د.ن.أ واحد أكبر الشكل (١٢-٣٦) ولابد أن تكون هذه الشظايا متداخلة Overlapping حتى تكون التتابعات نفسها متداخلة. ويمكن التعرف على مواقع التداخلات إما بالعين المجردة أو باستخدام الكمبيوتر. ويتم تكوين التتابع الرئيسى Master Sequence أو Contig بالتدريج. وتوجد عدة طرق لانتاج الشظايا المتداخلة. إذ يمكن قبل الكلونة تقطيع جزئ د.ن.أ بأربع أو خمسة انزيمات قطع محددة. وهناك طريقه اخرى لتكسير جزئ د.ن.أ وهى تسليط ذبذبات قوية Sonication مما يؤدى إلى تقطيع جزئ د.ن.أ بطريقة عشوائية أكثر مما يؤدى الى زيادة احتمالات الحصول على شظايا متداخلة يمكن وضعها فى التتابع الرئيسى Contiguous Master Sequence.



الشكل (١٢-٣٦): بناء تتابعات د ن أ طويلة من مجموعة تتابعات متداخلة قصيرة

وقد تحققت نجاحات هامة فى مجال تحليل التتابعات النيوكلتيدة فى عدد من الجينومات وكان أول كائن تم تحليل تتابعاته هو بكتريوفاج 174 ϕX وتلاه تحليل فيروس SV 40 والبلازميد PBR 322. وبعد ذلك توالت تحليلات تتابعات جينومات أكبر مثل جينوم الميتوكوندريا البشرية وبكتريوفاج λ وقد تم مؤخراً تحليل التتابعات الكاملة لجينومات الخميرة والدروسفلا والنيماتودا ونبات الارابيدوبس ونبات الارز وتوجت بالانتهاء من تحليل التتابعات الكاملة للجينوم البشرى.

ويبين الشكل (١٢-٣٧) التقدم الهائل الذى حدث فى كفاءة تحليلات تتابعات الجينوم المختلفة وبعض الانجازات التى تمت فى هذا المجال.

درجة الكفاءة القاعدة / الفرد / السنه	انجازات هامة فى تحليل تتابعات د.ن.أ	
	١٨٦٨	اكتشف Miescher د.ن.أ
	١٩٤٤	اثبت Avery أن د.ن.أ هو مادة الوراثة.
	١٩٥٣	اعلن Watcon & Crick الطزون المزدوج لـ د.ن.أ
١	١٩٦٥	تحليل تتابعات $tRNA^{ala}$ للخميرة بواسطة Holley

الكفاءة / قاعدة/ الماكينة/السنه		
١٥	١٩٧٠	تحليل تتابعات بكتريوفاج λ بواسطة wu
١٥٠		
١٥٠٠	١٩٧٧	استنبط Sanger طريقة انهاء السلسلة لتحليل التتابعات واستنبط Glibert طريقة الهدم الكيماوى لتحليل التتابعات
١٥٠٠٠	١٩٨٠	استنبط Messing ناقل الكلونة M13
٢٥٠٠٠	١٩٨٦	استنبط Hood نظام تحليل تتابعات اوتوماتيكى جزئى
١٠٠٠٠٠		
١,٠٠٠,٠٠٠	١٩٩٥	اعلن Venter تحليل تتابعات أول جينوم بكتيرى واستخدم فيها اجهزة اوتوماتيكية بالفلورسنت تدار بالانسان الاتى robot وقدم مفهوم تحليل التتابعات بجهاز PCR
..	١٩٩٦	المجموعة الدولية للعلماء اعلنت تحليل التتابعات الخاصة بجينوم الخميرة
١٥٠,٠٠٠,٠٠٠	١٩٩٨	شركة Perkin- Elmer اخترعت جهاز تحليل تتابعات يحتوى على ٩٦ انبوبة شعرية يتم تشغيلة اوتوماتيكياً بالكامل
	١٩٩٨	تحليل التتابع الكامل لجينوم دودة النماتودا

٢٠٠٠	تحليل التتابع الكامل لمناطق اليوكروماتين فى جينوم الدروسفلا وكذلك تحليل التتابع الكامل لجينوم نبات الارادبيدوبس
٢٠٠١	نشر العلماء القائمون على HGP وشركة Celera أول مسودة للتتابعات الجينوم البشرى.
٢٠٠٢	نشر أول مسودة لتتابعات جينوم الازر

الشكل (١٢-٣٧): بعض الانجازات الهامة فى تحليل تتابعات د. ن. أ