الفصل الثالث عشر

التحليلات الجينومية
Genomic Analysis

منذ أكثر من سبعين عاماً دأب الوراثيون على استخدام مصطلح الجينوم Genome للدلالة على نسخة كاملة من المعلومات الوراثية أو مجموعة كامله من الكروموسومات (الاحادية) للكائن. وعلى العكس من ذلك نجد أن مصطلح جينوميا Genomics من المصطلحات الحديثة جداً. وقد كان Thomas Roderick أول من اطلق هذا المصطلح عام ١٩٨٦ للإشارة إلى أحد المجالات الوراثية التى تهتم برسم الخرائط Mapping وتحليل التتابعات وتحليل وظائف الجينومات بالكامل. وقد اتخذ هذا المصطلح ايضا لتسمية مجلة علمية جديدة باسم Genomics مختصة بنشر الابحاث الخاصة بهذا المجال الحديث.

ونتيجة للتقدم الهائل فى هذا المجال والذى أدى إلى التوصل الى رسم خرائط مفصلة وتتابعات للجينومات المختلفة، فقد تم تقسيم مجال الجينوميا إلى: جينوميا تركيبية Structural Genomics وتختص بدراسة تركيب الجينوم، وجينوميا وظيفة Functional Genomics وتختص بدراسة وظائف جينات الجينوم والتى تشمل التحليلات النسخية Tranciptome أى المجموعة الكاملة من ر.ن.أ المنسوخة من الجينوم، والتحليلات البروتينية Proteome أى المجموعة الكاملة من البروتينات المشفرة من الجينوم.

وقد تفرعت الجينوميا الوظيفية الى مجال جديد وهو Proteomics والذى يختص بتقدير تركيب ووظائف جميع البروتينات فى الكائن الحى.

وبينما نجد أن الجينوميا التركيبية متقدمة بشكل جيد نتيجة لتوفر التتابعات النيوكلتيدية الكاملة لعدد كبير من الكائنات ، فإن الجينوميا الوظيفية تبدو على اعتاب مرحلة نمو هائلة. وقد ساعد على ذلك استنباط تقنيات حديثة مثل Gene Chips, Microarray مما ساعد العلماء على متابعة وتحليل تعبير جينومات كاملة (أى جميع الجينات فى كائن ما) فى المراحل المختلفة من النمو والتمايز أو استجابة للتغيرات البيئية التى يتعرض لها الكائن مثل الاجهادات الحرارية أو نقص بعض المغذيات. والأمل كبير ان تقدم هذه التقينات معلومات هامة عن وظائف الجينات وكيفية تفاعلها مع بعضها وكذلك تفاعلها مع البيئة المحيطة بها.

ولدراسة الجينوم يجب اجراء ثلاثة تحليلات هامة وهى:

١- الجينوميا Genomics وتتمثل فى الحصول على بيانات تحليل تتابعات د.ن.أ فى صورة اعداد هائلة من التتابعات الفردية بطول ٥٠٠-٨٠٠ قاعدة والتى يجب تجميعها فى تتابعات جينومية متجاورة Contiguous ولذلك لابد من وجود استراتيجية يتم على اساسها التجميع الصحيح لهذه التتابعات بدون أخطاء أو فجوات.

٢- ما بعد الجينوميا Post-Genomics أو الجينوميا الوظيفية Functional Genomics ويتم فيها تحليل التتابعات لتحديد مواقع الجينات ، والتتابعات التنظيمية Control Sequence وغيرها من العوامل الهامة. ويتبع ذلك سلسلة من التجارب لتحديد وظائف أى جينات جديدة غير معلومة الوظائف Candidate Genes أو Orphans.

٣- المعلوماتيه الحيوية Bioinformatics وتتضمن استخدام الكمبيوتر للمساعدة فى دراسات ما بعد الجينوميا وتشمل تجميع التتابعات المتجاورة Contigs بالكمبيوتر (باستخدام برامج متخصصة) ودراسة التتابعات للكشف عن وجود الجينات والتنبؤ بوظائف بعض الجينات الجديدة وتخزين الكميات الهائلة من البيانات والمعلومات التى يتم الحصول عليها خلال مراحل تنفيذ المشروعات الجينومية. ويطلق على المعلوماتية الحيوية Molecular Biology *in Silico* فى اشارة الى اهمية الكمبيوتر فى هذا الشأن.

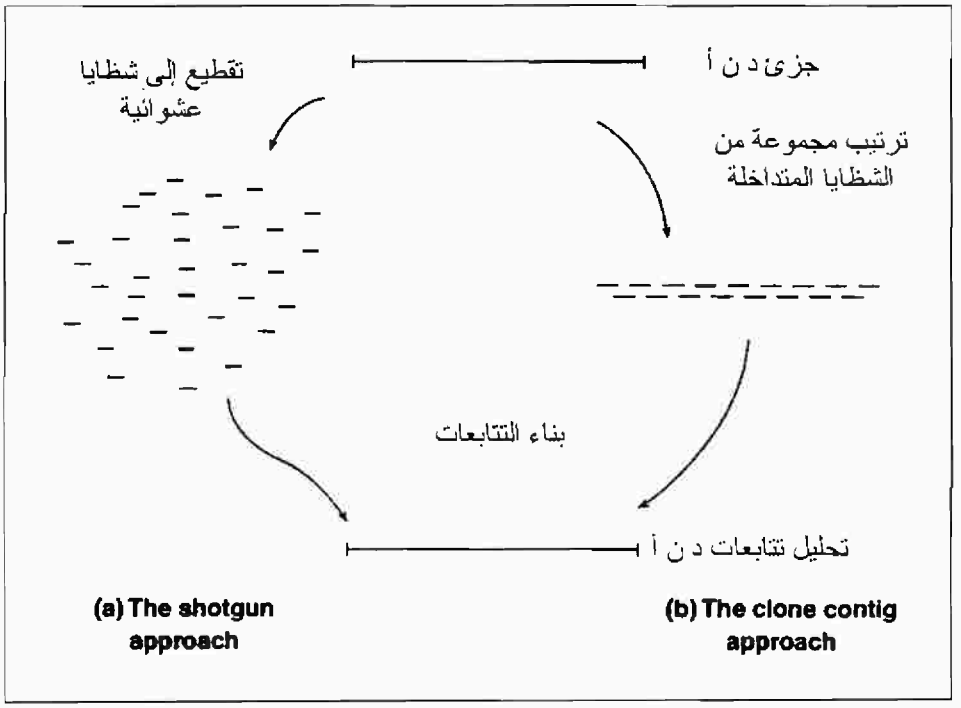
طرق تكوين التتابعات المتجاورة Assenbly of Contigs:

لقد اصبح الحصول على بيانات تتابعات د.ن.أ عملية روتينية فى المشاريع الجينومية وخاصة بعد استخدام الطرق الاوتوماتيكية فى هذا المجال كما سبق القول. ولكن المشكلة الأولى والحقيقية تتمثل فى الحاجة إلى تجميع أو اصطفاف assemble الالاف وحتى الملايين من شظايا التتابعات بطول ٧٥٠ قاعدة، فى شكل تتابع جينومى متجاور (متراص). ويتم استخدام استراتيجيتين لهذا الغرض (الشكل١٣-١):

١- طريقة Shotgun Approach والتى يتم فيها تقطيع أو كسر الجينوم عشوائياً إلى شظايا قصيرة ويتم فحص التتابعات الناتجة للتعرف على التداخلات بينها Overlaps وتستخدم هذه التداخلات فى المساعدة على بناء التتابعات المتجاورة للجينوم.

٢- طريقة الكلونات المتجاورة Clone Contig Approach وتتضمن خطوة مبدئية يتم فيها تحديد الكلونات المتداخلة Overlapping ثم يلى ذلك تحليل تتابعات قطع د.ن.أ المكلونة وتوضع هذه القطع فى اماكنها الصحيحة

على خريطة الـ Contig توطئة للبناء التدريجى للتتابعات المتداخلة للجينوم.



الشكل (١٣-١)

(أ) طريقة Shotgun و(ب) Clone Contig لترتيب التتابعات الجينومية

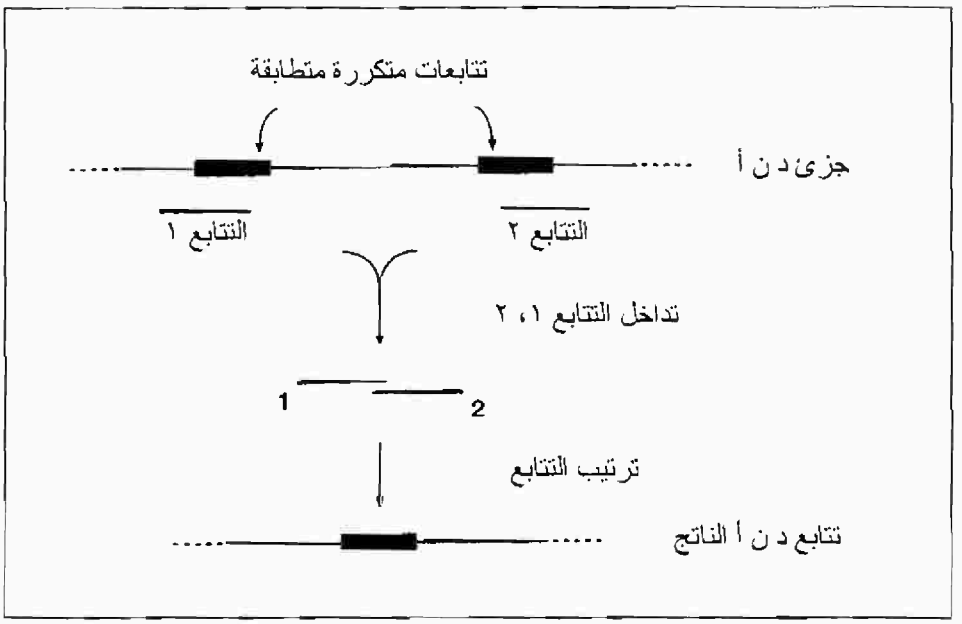
أولاً: طريقة Shotgun لبناء تتابعات الجينوم:

The Shotgun Approach To Genome Sequencing:

أن أهم عامل فى نجاح هذه الطريقة هو التعرف على التداخلات الصحيحة بين جميع تتابعات الشظايا التى تم انتاجها بهذه الطريقة (Sonication). ويجب أن تكون عملية تحديد هذه التداخلات دقيقة تماماً حتى يمكن الحصول على التتابعات الصحيحة للجينوم إذ أن أى خطأ فى تعريف زوج من تتابعات الشظايا

المتداخلة يؤدى إلى حدوث سلسلة من الاخطاء مما يجعل العملية غير مجدية ولا يعتد بنتائجها. وتزداد احتمالات الوقوع فى اخطاء فى الجينومات الكبيرة الحجم. لذلك يفضل استخدام هذه الطريقة فى تحليل تتابعات الجينومات البكتيرية الصغيرة.

وتنشأ المشاكل عند استخدام هذه الطريقة فى الجينومات الكبيرة الحجم نتيجة لاحتوائها على تتابعات متكررة من د.ن.أ Repetitive DNA Sequences كما فى مميزة النواة. أذ انه عند تجميع التتابعات المتجاورة فإن تلك التتابعات التى تقع جزئياً أو كلياً داخل وحدة متكررة من د.ن.أ يمكن بالخطأ اعتبارها متداخلة مع التتابع المتكرر المتماثل فى وحدة متكررة أخرى (الشكل ١٣-٢).



الشكل (١٣-٢): مشكلة وجود تتابعات متكررة عند تحليل تتابعات د ن أ بطريقة Shotgun. قد ينتج عن ذلك غياب قطعة من جزئ د ن أ من تتابع د ن أ الكلى

وقد يؤدى ذلك إلى وضع اجزاء من تتابعات الجينوم فى غير اماكنها الصحيحة أو فقدها تماماً. وقد امكن التغلب على هذه المشكلة بالاستعانة بالخرائط الوراثية والفيزيائية لتوجيه تجميع (رص) التتابعات المتحصل عليها بهذه الطريقة كما سيأتى بعد.

ثانيًا: طريقة Clone Contig Approuch:

ولا تعانى هذه الطريقة من مشاكل وجود التتابعات المتكررة في جزئ د.ن.أ فى الجينومات الكبيرة، إلا أنها تتطلب بذل عمل أكثر لذلك تأخذ وقتا طويلاً وتكلفة أكثر، ويتطلب تكوين سلاسل كلونات د.ن.أ المتداخلة هذا الوقت والجهد الاضافى وبمجرد الانتهاء من هذه العملية تجرى عملية تحليل تتابعات كل قطعة بطريقة Shotgun ويتم بناء تتابعات الجينوم خطوة خطوة كما فى الشكل اعلاه.

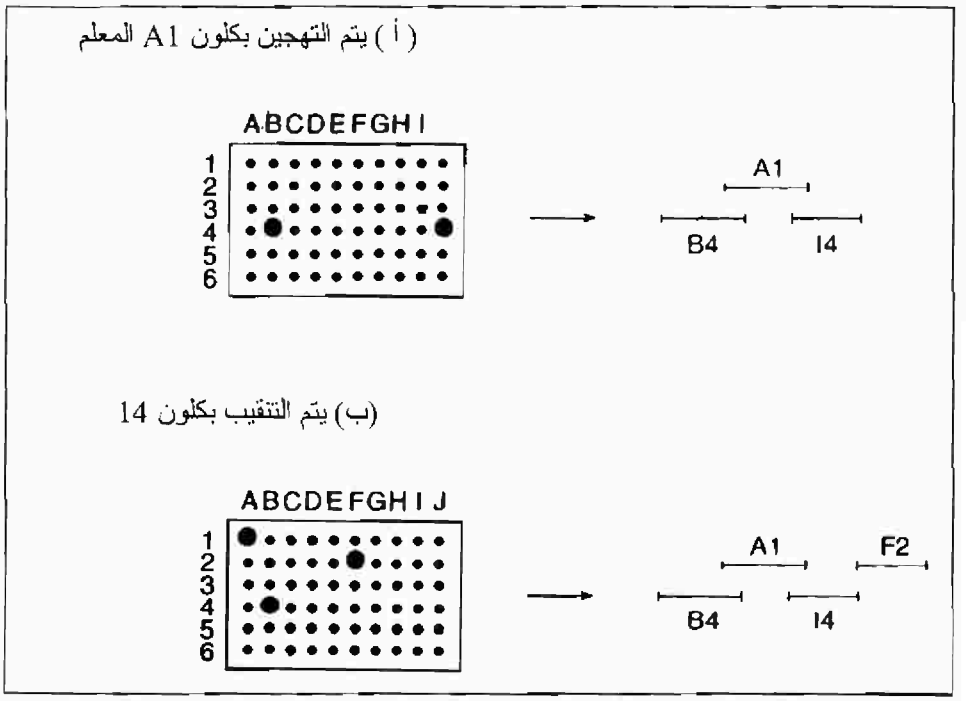
ويجب أن تكون الشظايا طويلة بقدر الامكان لتقليل العدد الكلى من الكلونات المطلوبة لتغطية الجينوم بأكمله. ولذلك يحتاج الأمر إلى استخدام ناقلات كلونة ذات سعة كبيرة مثل BAC's.

وتوجد طريقتين لبناء Clone Contig وهما:

١- طريقة المشى على الكروموسوم Chromosome Walking:

وتبدأ هذه العملية باختيار كلون عشوائياً من المكتبة ويتم تعليمة Labelled ويستخدم كواسمة تهجينية مقابل جميع الكلونات الاخرى فى المكتبة (الشكل ١٣-٣-أ). وتكون الكلونات التى تعطى اشارة تهجين مع الكلون الواسم هى التى تتداخل معه. ويلى ذلك استخدام احد هذه الكلونات المتداخلة كواسمة (ويتم تعليمها) وتبدأ دورة جديدة من التنقيب عن التداخلات، وهكذا حتى يتم الكشف

عن جميع التداخلات الممكنة بين الكلونات فى المكتبة (الشكل١٣-٣-ب) وبذلك يتم بناء Clone Contig خطوة خطوة. إلا أن هذه الطريقة تعتبر مجهده وشاقة ويستعان بها فقط فى الكروموسومات القصيرة التى تحتوى على عدد قليل نسبياً من الكلونات أو عندما يكون الغرض منها ملئ الفجوات الصغيرة بين إلى Contigs والتى تم بناؤها بطرق اخرى سريعة.

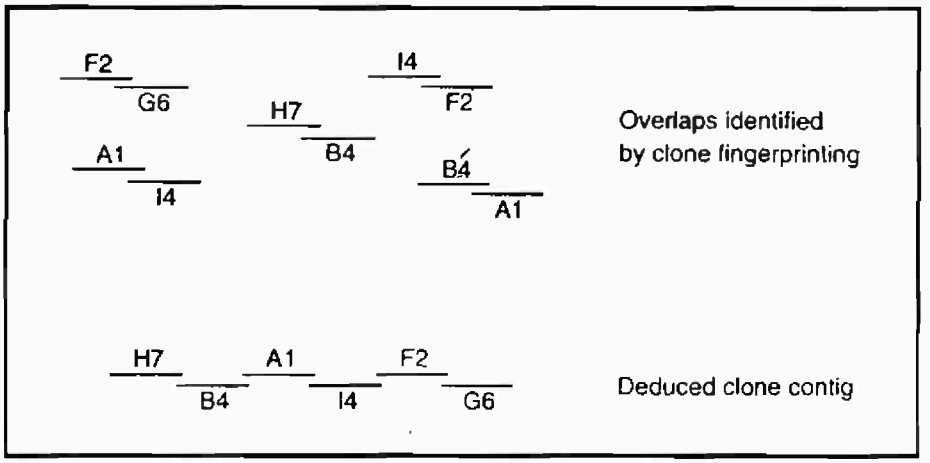


الشكل (١٣-٣): المشى على الكروموسوم Chromosome Walking

٢- *طريقة القفز على الكروموسوم Chromosome Jumping:*

وهى طريقة اسرع بكثير من المشى على الكروموسوم حيث يتطلب المشى أن يتم ذلك خطوة خطوة ببطء من نقطة بداية محدده Fixed وخاصة عندما تكون المسافات كبيرة بين الكشافات الجزيئية الاقرب للجين المرغوب.

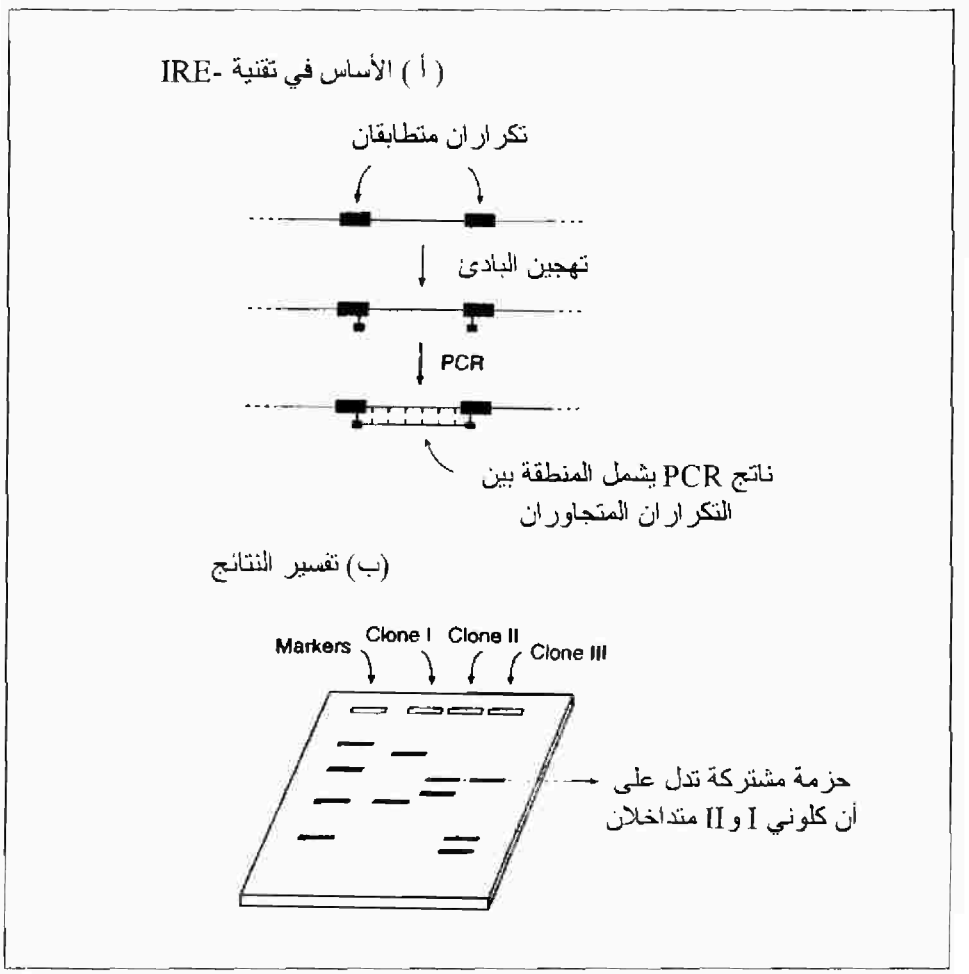
بينما فى طريقة القفز على الكروموسوم لا يحتاج الامر أن يبدأ بنـــاءه Conting من نقطة بداية محدده ولكن يكون الغرض هو التعرف على ازواج من الكلونات المتداخلة Pairs of Overlapping Clones وعندما نحصل على عدد كـــافي مـــن أزواج الكلونات المتداخلة، فإن بناء الـــ Conting سيكون سهلا وتعرف هـــذه الطريقة ببصمة الكلون Clone Fingerprinting (الشكل ١٣-٤).



الشكل (١٣-٤): تكوين Clone Contig بتقنية بصمة الكلون Clone Fingerprinting

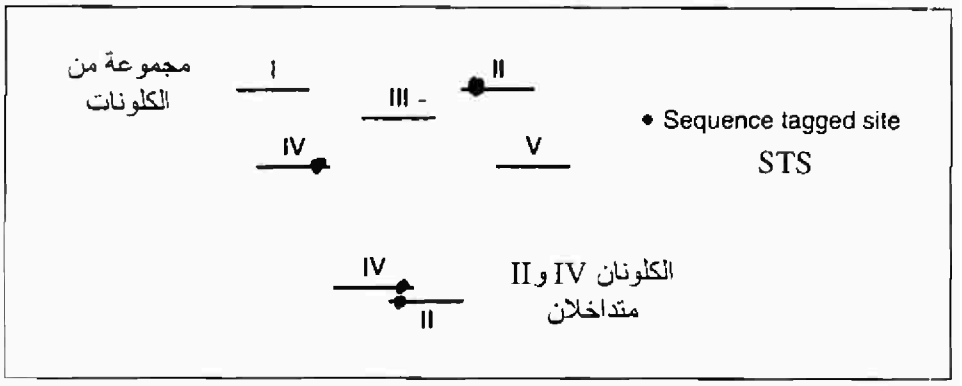
ومن الطرق المستخدمة طريقة Repetitive DNA PCR والمعروفة ايـــضا بأسم Interspersed Repeat Element PCR (IRE-PCR) ويستخدم هذا النوع من PCR بادئات يتم تصميمها بحيـــث تتـــزاوج مـــع تتابعـــات د.ن.أ المتكـــررة Repetitive مما يدفعها إلى توجيه الاكثار Amplification لجـــزئ د.ن.أ فـــى المنطقة المحصورة بين منطقتـــين متكـــررتين متجـــاورتين (الـــشكل ١٣-٥). وتنتشر التتابعات المتكررة النوعية بطـــرز خاصـــة بطريقـــة عـــشوائية فـــى جينوم مميزة النواة وعلى مسافات مختلفة فيما بينها مما يؤدى إلـــى الحـــصول

على اطوال (احجام) مختلفة من نواتج PCR عند استخدام هذه البادئات لعمل بصمات لكلونات د.ن.أ فى مميزة النواة. وإذا حصلنا على زوج من الكلونات يعطى نفس الحجم من نواتج PCR فلا بد انهما يحتويان على تكرارات على ابعاد متساوية نتيجة لان شظايا د.ن.أ المكلونة فى هذه الحاله تكون متداخلة.



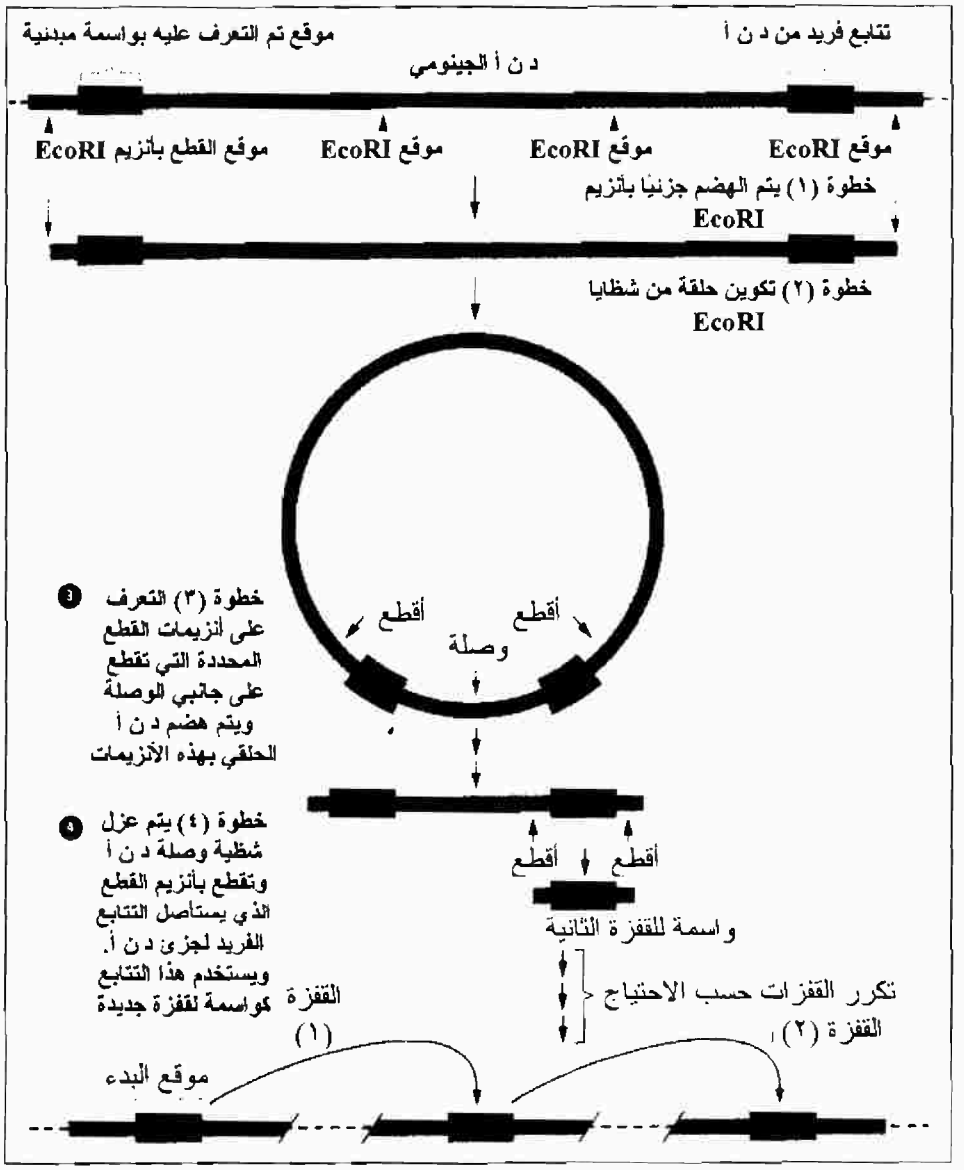
الشكل (١٣-٥): تقنية PCR للتتابعات المتداخلة(IRE - PCR)

وتوجد طريقة آخرى لبنـــاء Contig وتعتمـــد علـــى Sequence (STS) Tagged Sites وهى عبارة عن تتابع جزئى للجين وتتميز بأنها تقع فـــى مكـــان فريد فى الجينوم، وتستخدم مع جهاز PCR كبادئات لعمل البـــصمة للكلونـــات كما فى الشكل (١٣-٦).



الشكل (١٣-٦): تقنية محتوى STS لرسم الخريطة

وفى حالة القفز على الكروموسوم قد تتسع القفزة الواحدة بحيـــث نعطـــى مسافة ١٠٠ كيلو قاعدة أو أكثر كما فى الشكل(١٣-٧). وتتميز طريقـــة القفـــز على الكروموسوم بإمكان القفز فوق تتابعات د ن أ المتكررة والتى تعيق عمليـــة المشى.



الشكل (١٣-٧): القفز على الكروموسوم Chromosome Jumping كطريقة مختصرة وسريعة عن المشى على الكروموسومات الطويلة. ويمكن إستخدام هذه الطريقة للقفز فوق التتابعات المتكررة من د ن أ التى توقف عملية المشى على الكروموسوم

استخدام الخرائط الوراثية والمادية للمساعدة فى بناء تتابعات الجينوم

Using Maps to Aid Sequence Assembly

تستخدم الخرائط الوراثية والسيتولوجية والمادية للتحقق من صحة وضع Clone Conting فى مكانة الصحيح فى التتابعات الجينومية.

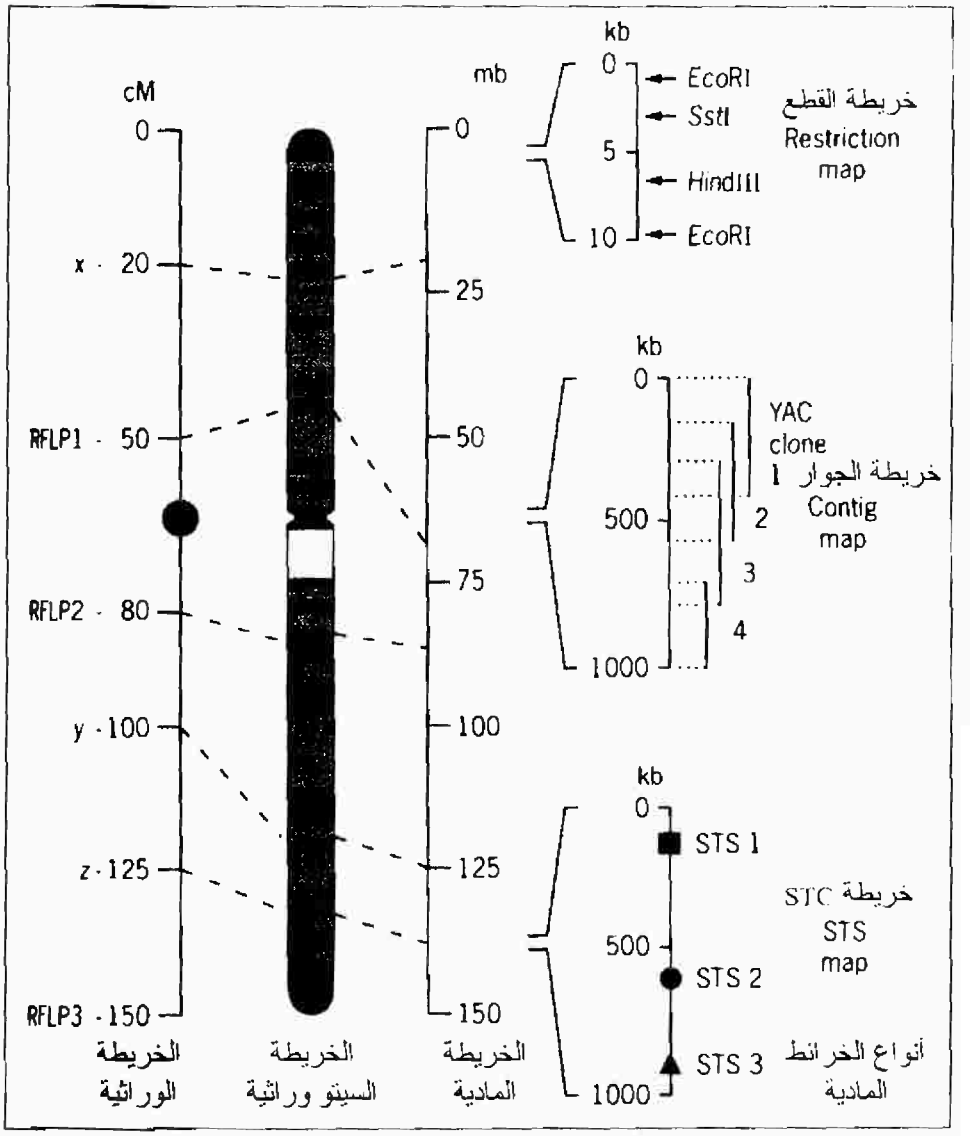
وقد تبين أن الخرائط المبنية على اساس STS ذات أهمية خاصة إذ انها يتم تحديدها بكل من التخريط الوراثى والمادي معا مما يعنى انه يمكن استخدامها لتثبيت Anchor Clone Contig على خريطة الجينوم مما يساعد على تحديد مكان الـ Contig على الكروموسوم.

ويمكن الحصول على الخرائط الوراثية Genetic Map بتحديد المسافات الوراثية من نسب العبور الوراثى فى النسل الناتج من التهجين بين آباء متفارقة فى صفة ما، او فى حالة الانسان عن طريق تحليل شجرة النسب Pedigree Analysis أو بإستنباط كشافات جزيئية DNA Markers مثل RFLP أو SSR أو SNP.

أما الخرائط المادية Physical Map فيتم استنباطها من خلال تحديد مكان تتابع معين مثل (EST) على جزئ د.ن.أ الكروموسومى بطريقة FISH السابق شرحها.

وعندما يتم رسم الخريطة المادية لكروموسوم ما فإنه يجب ربطها بالخرائط الوراثية والسيتووراثية Cytogenetic. ويتم تحديد التلازم بين الخرائط

الوراثية والمادية بتعيين موضع الكلونات على الخريطة المادية لجينات سبق معرفة موقعها على الخريطة الوراثية (الشكل ١٣-٨).



الشكل (١٣-٨): التلازم بين الخرائط الوراثية والسيتووراثية والمادية للكروموسوم

ويطلق على الجينات المشتركة فى مواقعها بين الخرائط الوراثية والخرائط المادية اسم جينات "وتدية" Anchor لأنها تثبت أو تربط الخريطة المادية بالخريطة الوراثية والعكس صحيح. وكما سبقت الاشارة اعلاه فإن خرائط STS تكون اكثر الخرائط المادية والوراثية التى يمكن أن توفى بهذا الغرض.

وترجع أهمية اللجوء إلى هذه الخرائط للمساعدة فى بناء تتابعات د.ن.أ للجينوم وخاصة فى الجينومات الكبيرة الحجم مثل تلك الموجودة فى الكائنات مميزة النواة لأنها تستخدم كدليل Guide لمراجعة عملية تجميع التتابعات والتأكد من أن هذه العملية قد تمت بطريقة صحيحة من خلال تجميع الاعداد الكبيرة من التتابعات القصيرة الناتجة من جهاز تحليل التتابعات الاوتوماتيكى (بطول حوالى ٧٠٠ نيوكلتيدة لكل تتابع قصير). وإذا حدث أن كشاف ما Marker تم استنباطة بالخرائط الوراثية أو المادية وظهر فى التتابع الجينومى فى موقع غير متوقع فإن ذلك يعنى أنه قد حدث خطأ فى تجميع التتابعات بحيث يجب أن يعاد النظر فى مثل هذه الحالة لتصحيح هذا الخطأ.

دراسة ما بعد الجينوميا Post-Genomics:

إن استكمال عملية تحليل تتابعات الجينوم ما هى إلا بداية، إذ انه يتعين تحديد مواقع الجينات والتعرف على وظيفة كل جين وهى عملية ليست سهلة وذلك حتى فى حالة الجينومات التى تمت دراستها باستفاضة بطرق التحليلات الوراثية وتقنيات كلونة الجينات.

فعلى سبيل المثال، فقد أظهر تحليل تتابعات فطر الخميرة *S.cervisiae* والتى تعد من افضل الكائنات التى تمت دراستها، أن هذا الجينوم يحتوى على حوالى ٦٠٠٠ جين منها ٣٦٠٠ جين فقط هى التى تم تحديد وظائف لكل منهاإما على اساس دراسات سابقة تمت على الخميرة او لوجود جينات فى الخميرة متطابقة فى تتابعاتها مع كائنات آخرى. ومعنى ذلك أن هناك ٢٤٠٠ جين لم يتحدد لها وظيفة حتى الان ويطلق على مثل هذه الجينات Orphans "يتامى".

وهنا يأتى الدور الهام للمعلوماتية الحيوية Bioinformatics والتى يطلق عليها احيانا Molecnler Biology *In Silico* بحيث تساعد فى تعيين وظائف ممكنة لكثير من هذه الجينات.

تحديد موقع الجين فى تتابعات الجينوم:

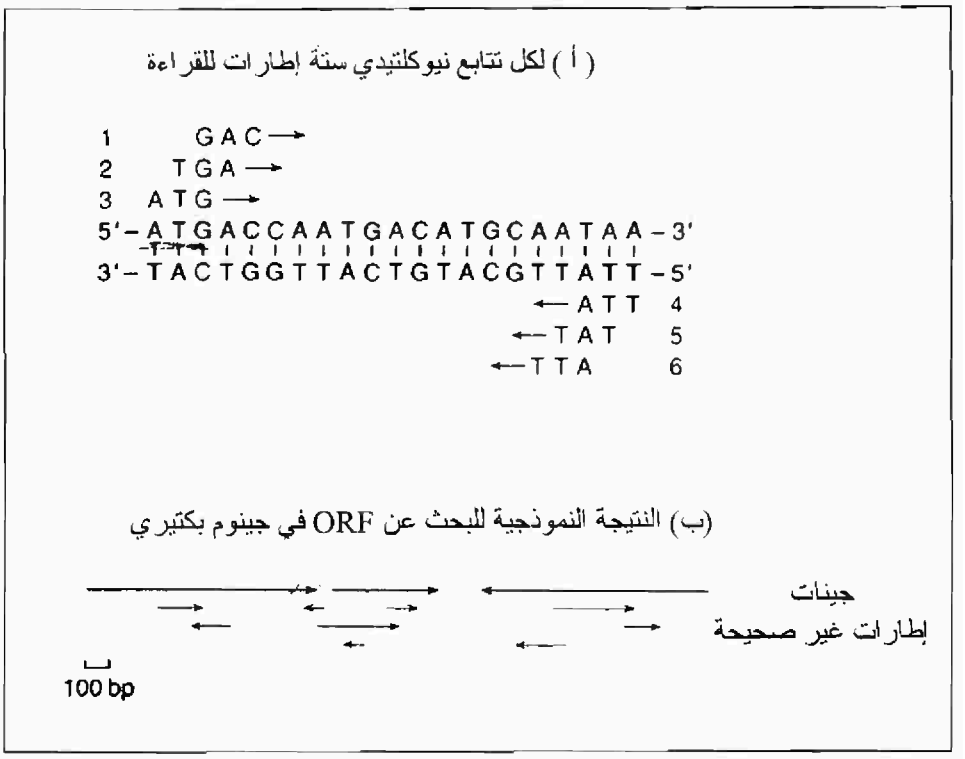
يمكن بسهولة معرفة موقع الجين إذا كانت تتابعات الاحماض الامينية للبروتين الناتج من هذا الجين معروفة مما يسمح بالتنبؤ بالتتابعات النيوكلتيدية لهذا الجين أو إذا كان قد سبق تحليل تتابعات cDNA أو EST لهذا الجين.

إلا أنه فى كثير من الأحيان لا توجد معلومات مسبقة عن كثير من الجينات بحيث يمكن منها التعرف على التتابع الصحيح لهذه الجينات، وفى هذه الحالات فإن تحديد موقع الجين يكون صعباً حتى لو توفرت الخريطة التى يقع عليها. إن معظم الخرائط تتميز بدقة محدودة ويمكنها فقط التكهن بالموقع التقريبى للجين تاركه مئات من كيلو قاعدة أو أكثر للبحث عنها، وكثير من الجينات لا تظهر على الخرائط نظراً لأن وجودها ذاته غير متوقع، فكيف يمكن تحديد مثل هذه الجينات فى تتابعات الجينوم؟

البحث عن اطار قراءة مفتوح:

Searching For Open Reading Frame (ORF):

أن تتابع د.ن.أ للجين عبارة عن ORF أى مكون من سلسلة من الكودونات الثلاثية تبدأ بكودون البدء (ATG) وينتهى بكودون الانهاء (TAA أو TAG أو TGA). يتم البحث عن ORF فى التتابعات الجينومية عادة بالكمبيوتر، ويعتبر ذلك أول خطوة فى تحديد موقع الجين. ومن المهم أن يتم بحث جميع الاطارات الستة المحتملة لأن الجين يمكن ان يتجه فى أى من الاتجاهين على طول جزئ د.ن.أ ثنائى السلسلة (الشكل ١٣-٩-أ) وفى حالة الجينوم البكتيرى فإن النتيجة ستكون التعرف على ORF طويل نسبيا الذى يتكون غالباً من الجينات، مع وجود بعض ORF's القصيرة الموجودة جزئياً أو كلياً داخل الجينات ولكنها تقع فى ORF مختلفة (الشكل ١٣-٩-ب) وهذه التتابعات القصيرة تمثل بالتأكيد تباديل نيوكلتيدية تكونت بالصدفة ولكنها لا تمثل جينات حقيقية.



الشكل (١٣-٩): البحث عن إطارات قراءة مفتوحة (ORF)

(أ) يوجد ستة ORF لكل تتابع من دن أ وقد يحتوى أى منها على جين.

(ب) نتيجة البحث عن ORF فى جينوم البكتريا.

تبين الأسهم إتجاه الجينات و التتابعات ORF غير الصحيحة.

تعد عملية تحديد موقع الجين فى مميزة النواة أصعب بكثير، إذ أن جينومات مميزة النواة تحتوى على قدر كبير جداً من د.ن.أ المتكرر Repetitive وكذلك على أعداد كبيرة من الانترونات متخللة للجينات. ويؤدى ذلك إلى أنه عند فحص التتابعات سنجد الكثير من ORF's القصيرة التى لا يمكن اهمالها فقد امكن فى جينوم الخميرة مثلا التعرف على اكثر من ٤٠٠ ORF's قصيرة والتى

اعتبرت تمثل جينات حقيقية ومن المحتمل أن تمثل بعض هذه ORF القصيرة جينات إلا أن الغالبية منها ليست جينات حقيقية.

التمييز بين الجينات الحقيقة وORF العشوائية:

تحتوى بعض الجينومات وخاصة الجينوم البشرى وغيره من الفقاريات على بعض الادلة التي تساعد على التعرف على ORF الخاص بجين فعلى وتمييزه عن ذلك الذى يمثل ORF عشوائى ويتم استبعاده ومن هذه الأدلة ما يلى:

١- CpG Islands: حيث وجد فى الجينوم البشرى أن حوالى ٥٠-٦٠% من الجينات تحتوى على منطقة غنية فى تتابعات G.C ويطلق عليها جزر CpG Island وغالباً ما تمثل نقطة بداية الجين.

٢- تحيز الكودون Codon bias: يمكن استخدام ظاهرة تحيز الكودون كوسيلة مفيدة للتعرف على الجين. إذ أن المعروف أن جميع الاحماض الامينية ماعدا الميثيونين والتريتوفان يشفر لها بكودونين أو أكثر، فعلى سبيل المثال نجد أن الحامض الامينى الانين Alanine يتم تشفيره بأربعة كودونات: GCA, GCC, GCG, GCT وفى معظم الجينومات لايتم استخدام جميع الكودونات الأربعة بنفس المعدل، ففى الانسان مثلا، تبين وجود تحيز نحو استخدام الكودون GCC بمعدل يزيد أربعة اضعاف عن GCG، وعلى ذلك إذا حصلنا على ORF يحتوى على تكرار عالى High Frequency من الكودونات النادرة فإن الاحتمال الاقوى هو انه لايمثل جين بشرى فيتم استبعاده.

٣- البحث عن درجة التطابق Homology Search: فى خطوة تالية للتعرف المبدئى على جين ما يتم البحث عن مدى التطابق بين تتابعات هذا الجين

المبدئى (ORF) مقارنة مع جميع التتابعات الجينية المتوفرة فى قاعدة بيانات د.ن.أ العالمية باستخدام برامج كمبيوتر متخصصة وتشمل المقارنة ليس فقط الجينات المعروفة للكائن تحت الدراسة ولكن جينات اخرى من جميع الانواع الاخرى.

ويقصد بذلك انه إذا تشابة جينان من كائنين مختلفين فى تتابعات النيوكلتيدات فقد يتشابهان ايضا فى الوظيفة مما يعكس تاريخهما التطورى المشترك.

ولإجراء اختبار التطابق يتم عادة ترجمة تتابعات النيوكلتيدات للجين المبدئى إلى ما يقابلها من الاحماض الامينية باستخدام قاموس الشفرة الوراثية حيث أن ذلك يؤدى إلى زيادة كفاءة البحث عن التطابق نظراً لاننا نتعامل هنا مع ٢٠ حامض امينى فى حين انه فى حالة التتابعات النيوكلتيدية سيكون التعامل مع ٤ قواعد فقط أى أن فرصة حدوث خطأ فى تتابع حامضين أمينين ستكون (١/٢٠) أى ٥% فى حين يرتفع هذا الاحتمال الخاطئ ليصل إلى (١/٤) أى ٢٥% فى حالة استخدام التتابعات النيوكلتيدية.

وتتم هذه التحليلات من خلال شبكة الانترنت بالاتصال بموقع لاحدى الشبكات الدولية الخاصة بقواعد بيانات د.ن.أ واستخدام برنامج بحث متخصص مثل BLAST (Basic Local Alingnment Search Tool) وأذا اعطت النتيجة تتابعات لإكثر من ٢٠٠ حامض أمينى فى الطول ونسبة تشابة Identity ٣٠% أو أكثر مع تتابع ما فى قاعدة المعلومات (بمعنى أن ٣٠ من كل ١٠٠ موقع يوجد بها نفس الحامض الامينى فى كلا التتابعين) ، فإن التتابعين غالبا ما يكونا متطابقين وبالتالى يكون ORF تحت الدراسة قد تم التحقق من أنه جين حقيقى.

ولزيادة التحقق يمكن اجراء اختبارات النسخ والترجمة المعملية *In Vitro* للتأكد من أن الجين سيتم نسخة إلى RNA وبروتين على التوالى.

تحديد وظيفة جين غير معروف:

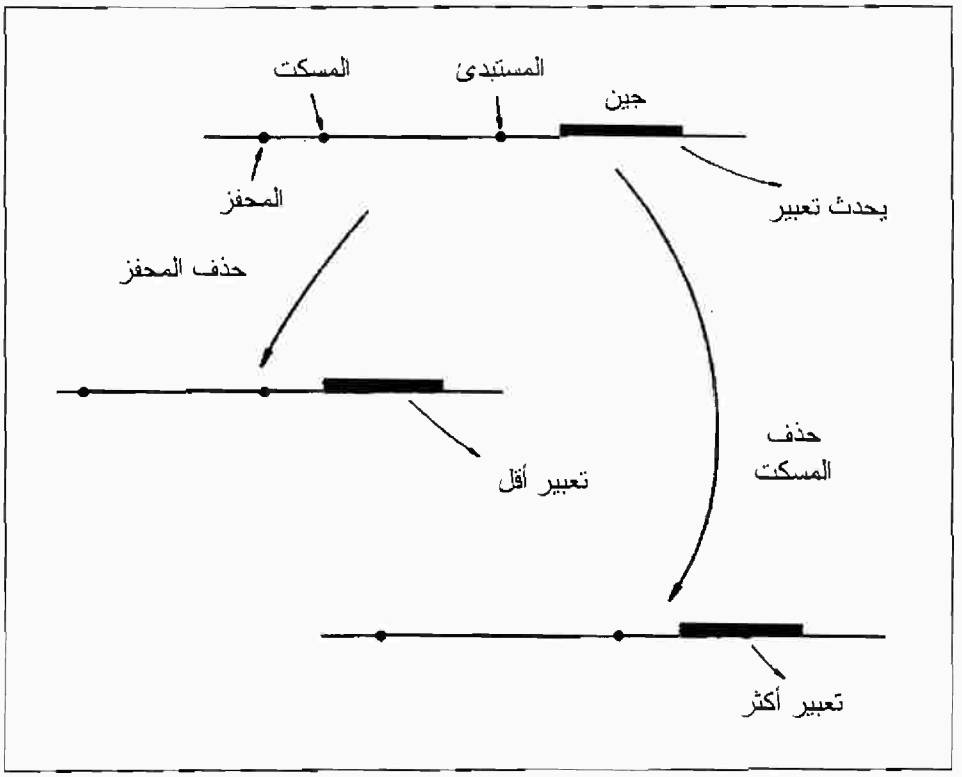
Determining The Function of an Unknown Gene

هناك احتمالات كبيرة فى أن يتم من خلال المعلوماتية الحيوية Bioinfomatics و Homolgy Search التوصل إلى تحديد وظيفة للجين غير المعروف وظيفته (orphan) خاصة عندما تتوفر معلومات عن العلاقة بين تركيب البروتين ووظيفته. وعموماً يوجد حتى الان طرق عديدة لدراسة وظيفة الجين.

تحديد التتابعات التنظيمية للجين بتحليلات الحذف:

Idintifying Control Sequences by Deletion Analysis:

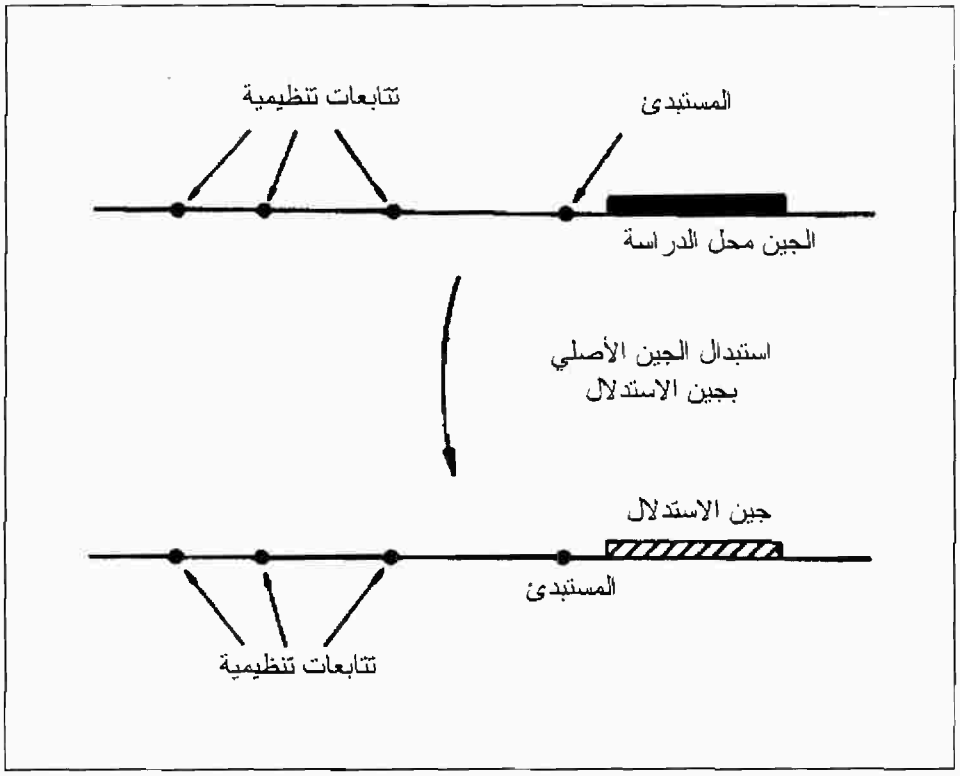
يمكن بتحليلات الحذف التعرف على كل من مواقع ووظائف التتابعات النيوكلتيدة التى تتحكم فى تعبير الجين. وتعتمد هذه التقنية على افتراض أن حذف التتابع التنظيمى المتحكم في تعبير الجين سيؤدى إلى تغيير فى الطريقة التى يحدث بها تنظيم تعبير جين مكلون يتحكم فيه هذا التتابع التنظيمى (الشكل ١٣-١٠). فمثلا إذا تم حذف تتابع مثبط للتعبير فى جين ما، فإن ذلك سيؤدى إلى ارتفاع معدل تعبير هذا الجين. ومن جهة اخرى يمكن التعرف على التتابعات التنظيمية النوعية والمتخصصة فى تغيير التعبير الجينى فى نسيج معين Tissue-Specific حيث أن حذفها سيؤدى إلى أن الجين المستهدف سيتم تعبيره فى انسجة اخرى غير النسيج المتخصص النوعى.



الشكل (١٣-١٠): الأساس فى تحليلات الحذف

وتستخدم تقنية جين الإستدلال Reporter Gene فى تحديد التتابعات التنظيمية التى يتم حذفها ومتابعة تأثير غيابها على تعبير الجين المكلون. والغرض من استخدام Reporter gene هو سهولة متابعة التغير الحادث فى طراز التعبير للجين المكلون وتمييزة عن الطراز الطبيعى للتعبير للنسخة الاصلية للجين قبل الحذف. وجين الإستدلال Reporter Gene عبارة عن جين اختبارى يرتبط بالمنطقة القبلية Upstream Region للجين المكلون (الشكل ١٣-١١) بحيث يحل محل الجين نفسه. وعند ادخاله إلى الكائن المضيف فإن طراز تعبير الجين التقريرى سيقلد بالضبط تعبير الجين الاصلى نظرا

لأن الجين التقريرى يكون تحت تأثير نفس التتابعات التنظيمية مثل الجين الاصلى.



الشكل (١٣-١١): جين الإستدلال Reporter gene

ويجب اختيار الجين التقريرى بعناية بحيث يستوفى بعض الشروط الاساسية التالية:

١- أن يشفر هذا الجين لطراز مظهرى مختلف ولا يوجد مثيل له فى الكائن المضيف.

٢- أن يتم التعرف بسهولة على الطراز المظهرى الجديد فى الكائن المضيف.

٣- يفضل أن يكون فى الامكان تقدير هذا الطراز المظهرى كميا.

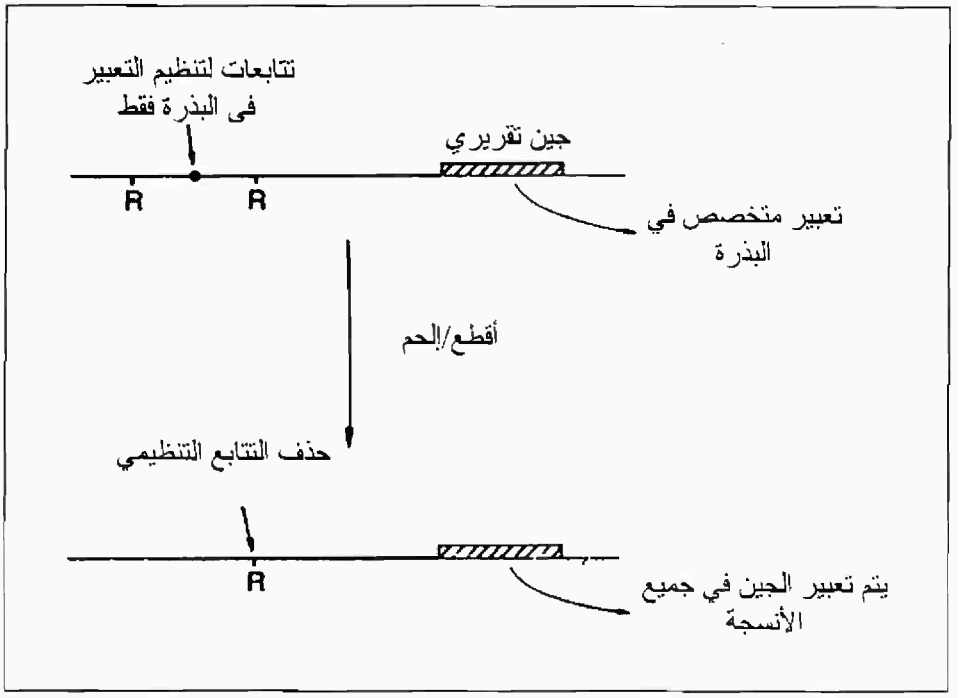
وقد أمكن تحديد عدد من الجينات التقريرية لدراسة التنظيم الجينى الجدول (١).

الجدول (١) بعض نماذج للجينات التقريرية المستخدمة فى دراسة التنظيم الجينى فى الكائنات الراقية

الجين	نواتج الجين	التحليل assay
LacZ	ß- galactosidase	اختبار كيماوى هستولوجى
Neo	Neomycin phosphotranseferase	مقاومة المضاد الحيوى كانامبسين
cat	Chloramphenicol acetyltransferase	مقاومة المضاد الحيوى كلورامفينيكول
Lux	Lucifenase	انبعاث ضوئى حيوى Bioluminoscence
urid A	ß- glucouronidase (GUS)	اختبار كيماوى هستولوجى

اجراء اختبار الحذف:

بعد اختيار الجين التقريرى وانتاج التركيب المعاد صياغته، يمكن اجراء الحذف فى المنطقة القبلية Upstream لهذا التركيب باحدى طرق الحذف كما فى الشكل (١٣-١٢).



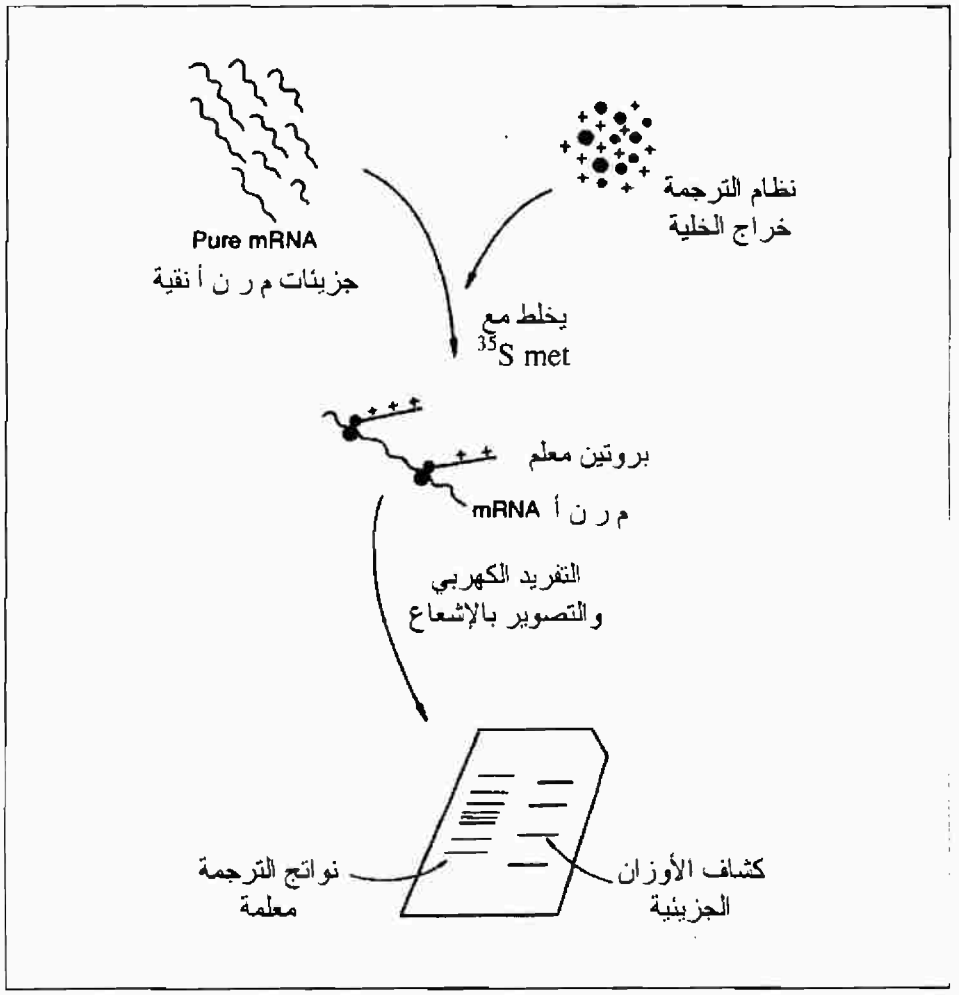
الشكل (١٣-١٢): تحليلات الحذف: يتم ربط جين الإستدلال Reporter Gene (التقريري) بالمنطقة السابقة Upstream لجين متخصص يشفر لأحد بروتينات البذرة فى النبات. أدت إزالة الشظية المحصورة بين موقعى R إلى حذف التتابع التنظيمى الذى يحدد تعبير الجين فى البذرة بحيث يحدث تعبير لجين الإستدلال فى أنسجة النبات المختلفة

يلى ذلك دراسة تأثير الحذف بعد إدخال التركيب فى الكائن المضيف وتقدير طراز ومعدل تعبير الجين التقريرى فإذا حدثت زيادة فى التعبير فإن ذلك يعنى أنه قد حدثت إزالة لتتابع مثبط أو مسكت Silencing، فى حين أن حدوث انخفاض فى معدل التعبير يعنى حذف منطقة منشط أو محفز. أما إذ نتج عن الحذف تغيير فى التخصص النسيجى Tissue Specificity فإنه يشير إلى أن المنطقة المستهدفة بالحذف تمثل تتابعاً تنظيمياً متخصص فى الاستجابة فى نسيج نوعى Tissue- Responsive.

تحديد نواتج ترجمة جين مكلون:
Identifying The Translation Product of a Cloned Gene:

توجد تقنيتين رئيسيتين للتعرف على نواتج ترجمة الجين المكلون وهما hybrid-release translation (HRT) أى ترجمة ر.ن.أ المحرر من الهجين و hybrid-arrest translation (HART) أى ترجمة ر.ن.أ المرتبط بالهجين وكلا التقنيتين تعتمدان على قدرة من م. ر.ن.أ النقى على إدارة بناء البروتين فى نظام ترجمة بدون خلية Cell-Free System أى فى انبوبة الاختبار *In Vitro* وفى وجود تحضير يحتوى على جميع العناصر والمكونات اللازمة لإجراء هذة الترجمة مثل tRNA والريبوسمات وغيرها من المكونات . ويمكن الحصول على المكونات اللازمة للترجمة المعملية هذه من حبوب القمح أثناء انباتها أو من خلايا الأرنب Reticulocytes والتى تكون نشطة بدرجة عالية فى عملية بناء البروتين .وتتم عملية الترجمه خارج الخلية عند اضافة عينة من م. ر.ن.ا. الى نظام الترجمة خارج الخلية هذا مع مخلوط من ٢٠ حامض أمينى بحيث يكون حامض الميثيونين معلم بالكبريت المشع (^{35}S).

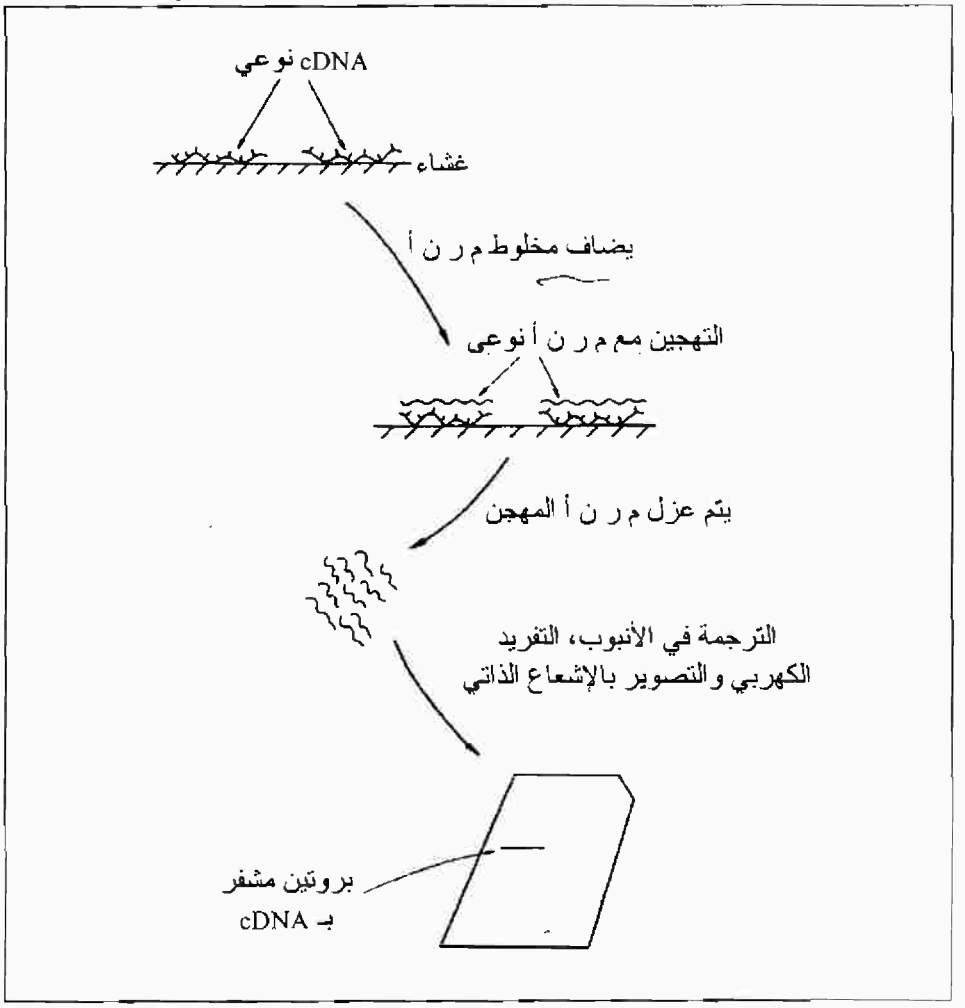
وتتم ترجمة جزيئات م. ر. ن. أ إلى مخلوط من البروتينات المشعة (الشكل ١٣-١٣) والتى يمكن فصلها بالتفريد الكهربى وفحصها بالتصوير الاشعاعى الذاتى. وتكون كل حزمة ممثلة لبروتين معين مشفر بواسطة احد جزيئات م. ر.ن.أ الموجوده فى العينة .



الشكل (١٣-١٣): الترجمة خارج الخلية (فى الأنبوب *In Vitro*)

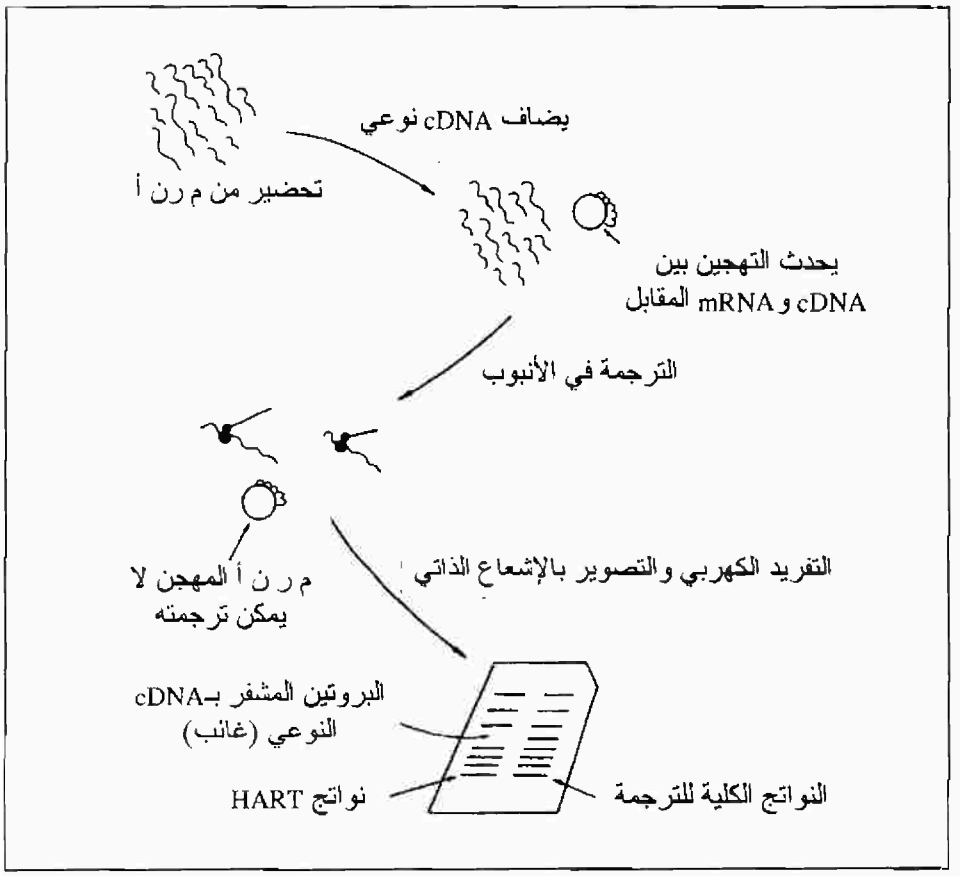
ويستخدم فى كلا التقنيتين كلون cDNA محضر مباشرة من عينة م.ر.ن.أ تحت الدراسة ويستخدم كواسمة قابضة Catching Probe. وفى تقنية HRT تتم دنترة cDNA ويثبت على غشاء نيترو سيليولوز أونايلون ويحضن مع عينه م.ر.ن.أ المراد اختبارها (الشكل ١٣-١٤). وفى هذه الاثناء يحدث التهجين بين

م.ر.ن.أ مع مقابلة من cDNA ويبقى ملتصقا بالغشاء. وبعد إزالة الجزيئات الحره يتم استعادة م.ر.ن.أ المهجن وتتم ترجمته فى نظام خارج الخلية وينتج عن هذه الترجمة عينة وحيدة نقية من البروتين فى صورة الاشعاع الذاتى.



الشكل (١٣-١٤): الترجمة بتقنية تحرير الهجين Hybrid Release (HRT)

أما فى تقنية (HART) فيكمن الفرق فـى أن cDNA المـدنتر يـضاف مباشرة إلى عينة م.ر.ن.أ (الشكل ١٣-١٥) ويحدث التهجين هنا ايـضا بـين cDNA ومقابلة من م.ر.ن.أ إلا انه فى هذه الحالة لا تتم إزالـة م.ر.ن.أ غيـر المرتبط (الحر).



الشكل (١٣-١٥): الترجمة بتقنية تقييد الهجين Hybrid arrest (HART)

وبدلاً من ذلك تتم ترجمة العينة بأكملها فى نظام خـارج الخليـة وهنـا لا يستطيع م.ر.ن.أ المرتبط بالتهجين أن يدير عملية الترجمة مما يـؤدى إلـى

ترجمة جميع أنواع م ر ن أ فى العينة إلى بروتينات ماعدا البروتين المشفر بالجين المكلون. أى يتم تحديد بروتين الجين المكلون بأنه ذلك البروتين الذى تغيب حزمته من صورة الاشعاع الذاتى.

تحليل البروتينات باستخدام الطفرات فى الأنبوب (معمليا):
Analysis of Proteins by *In Vitro* Mutagenesis

على الرغم من أن كلا من HART, HRT يمكنها التعرف على نواتج الترجمة للجين المكلون، إلا أنها تكون قاصرة عن اعطاء معلومات عن البروتين نفسه. ومن الامور الهامة معرفة العلاقة بين تركيب البروتين ووظيفتة. ويمكن دراسة هذه العلاقة باستحداث طفرات فى الجين المشفر لهذا البروتين ثم متابعة تأثير تغيير تتابعات الاحماض الامينية على خواص ونشاط الناتج البروتينى. وتوجد تقنيات مختلفة لاستحداث الطفرات إلا أن طريقة الطفرة الموجهة للموقع Site-Directed Mutagenesis هى التقنية المفضلة للحصول على طفرة فى أى موقع محدد على الجين لاحداث طفرة القاعدة الواحدة Point Mutation.

وفى هذه الطريقة تتم كلونة الجين المستهدف فى صورة سلسلة مفردة فى ناقل الكلونة M13.

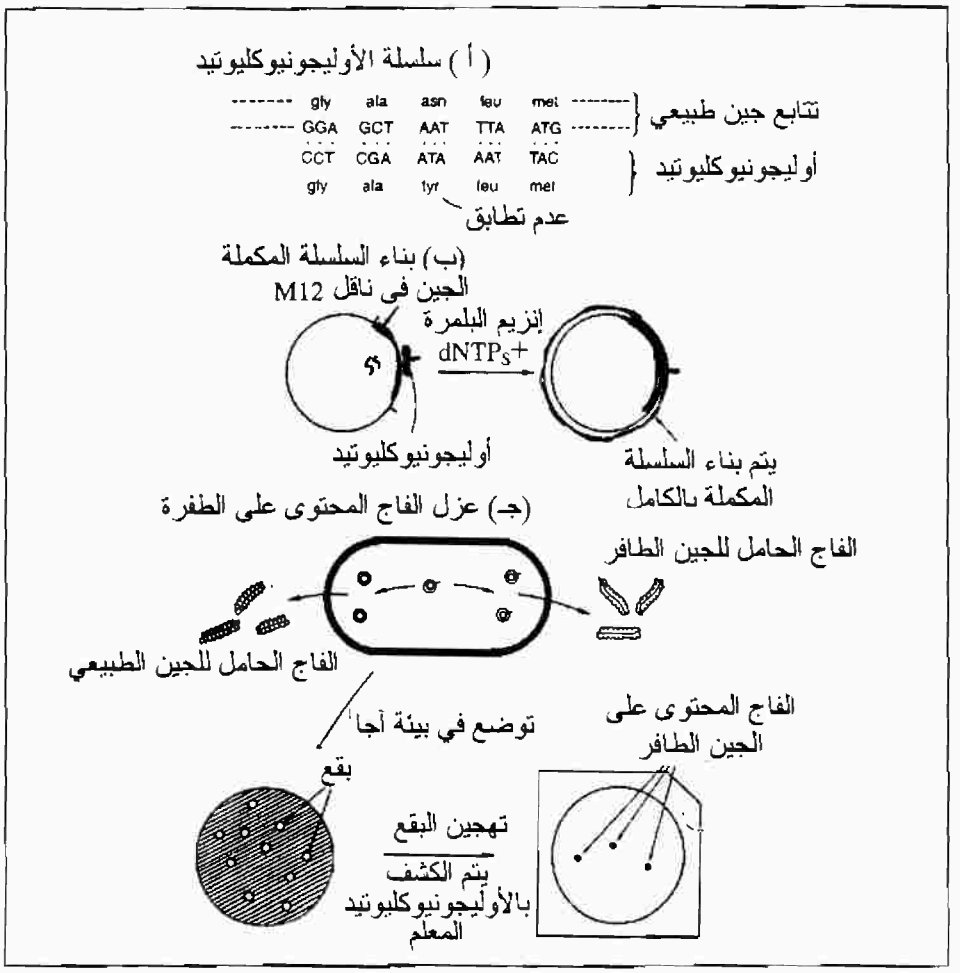
وتكون الخطوة الأولى هى عزل وتنقية سلسلة د.ن.أ مفرده للجين والتعرف على تتابعات المنطقة المطلوب استحداث طفرة فيها.

ثم يتم بناء سلسلة قصيرة من أوليجونيوكلتيد مكملة لتتابعات للمنطقة المستهدفة إلا انها تحتوى على النيوكلتيدة المغايرة المرغوبة (الشكل ١٣-١٦-أ).

وبالرغم من وجود درجة من عدم التطابق، فإن شظية الأوليجو ستتهجن مع د.ن.أ. وحيد السلسلة وتعمل كبادئ Primer لبناء سلسلة مكملة باستخدام شظية كلينو من انزيم DNA Pol I (الشكل ١٣-١٦-ب). ويستمر هذا التفاعل البنائى إلى أن يتم بناء سلسلة جديدة كاملة ويصبح الجزئ المعاد صياغته ثنائى السلسلة تماماً.

يجرى بعد ذلك إدخال لجزئ د.ن.أ الناتج فى خلايا بكتريا القولون حيث يؤدى تناسخة إلى انتاج نسخ عديدة من جزئ د.ن.أ المعاد صياغته. وطبقاً لنظريقة شبة المحافظة لتناسخ د.ن.أ فإن نصف عدد جزيئات د.ن.أ الثنائية السلسلة الناتجة تكون غير طافرة فى كلا من السلسلتين بينما النصف الاخر سيكون طافرا وبذلك يكون نصف نسل الفاج يحمل نسخا من الجزيئات غير الطافرة والنصف الاخر يحمل جزيئات طافرة. وتزرع الفاج الناتج من خلايا بكتريا القولون على بيئة اجار صلبة لانتاج بقع plaques ويكون نصف عدد البقع Plaques محتوية على جزئ د.ن.أ المعاد صياغته الاصلى بينما النصف الاخر يكون محتويا على النسخ الطافرة. ويتم التعرف على البقع المحتوية على الجزئ الطافر باستخدام واسمة معلمة من الاوليجو الذى سبق استخدامه اعلاه (الشكل ١٣-١٦-جـ).

ومن خصائص الخلايا المحتوية على M13 انها لا يحدث لها تحلل Lyse وإنما تستمر فى الانقسام، وبذلك يمكن للجين الطافر أن يتم تعبيره فى خلايا بكتريا القولون المضيفة للحصول على بروتين معاد صياغته. ويمكن تنقية هذا البروتين من الخلايا ودراسة خواصة. ويمكن بهذه التقنية معرفة تأثير استحداث طفرة القاعدة الواحدة على معدل نشاط البروتين.



الشكل (١٣- ١٦): تقنية الطفرة الموجهة للموقع (Site -Directed)

هندسة البروتين Protein Engineering:

لقد قدمت تقنية الطفرة الموجهة الموقع Site-Directed Mutagenesis امكانات هائلة سواء فى مجال البحوث الاساسية أو فى البحوث التطبيقية. فمثلا يمكن الآن دراسة كيف يؤثر تركيب البروتين على فعل الانزيم

Enzyme Action. وفى الماضى كان هذا ممكنا من خلال تحليلات بيوكيماوية مطولة وشاقة للتوصل إلى معلومات عن تحديد الاحماض الامينية التى تلعب دوراً فى تحديد الارتباط بمادة التفاعل والوظائف الحفزية فى جزئ الانزيم. والآن ومن خلال تقنية الطفور الموجه يمكن تحديد دور كل حامض أمينى على حده فى نشاط الانزيم.وذلك عن طريق استبداله بحامض أمينى آخر ودراسة تأثير ذلك على نشاط الانزيم. وقد أدى ذلك إلى إحداث تقدم هائل فى طريقة فهم الحفز البيولوجى Biological Catalysis وادى إلى نشأة مجال جديد يسمى هندسة البروتين Protein Engineering والتى تستخدم فيه تقنيات الطفور الموجه لاستنباط انزيمات جديده لاغراض بيوتكنولوجية. فعلى سبيل المثال ، إدى تبديل تتابعات الاحماض الامينية عند النيوكلتيدة رقم ٢٢٢ فى الجين المشفر لانزيم Subtilisin (الموجود فى المنظفات الصناعية لغسيل الملابس) إلى إحلال حامض الالانين محل حامض الميثونين بعد أن تبين أن الاخير يتأكسد عند استخدام الماء الساخن كما يتأثر باستخدام المبيضات مثل Chlorax وقد أدى هذا الاحلال الى انتاج انزيم Subtilisin مهندس وراثياً ويتحمل الحرارة العالية ولايتأثر كثيراً بالكلوراكس.

دراسة تفاعلات البروتينات:

Studying Protein-Protein interactions:

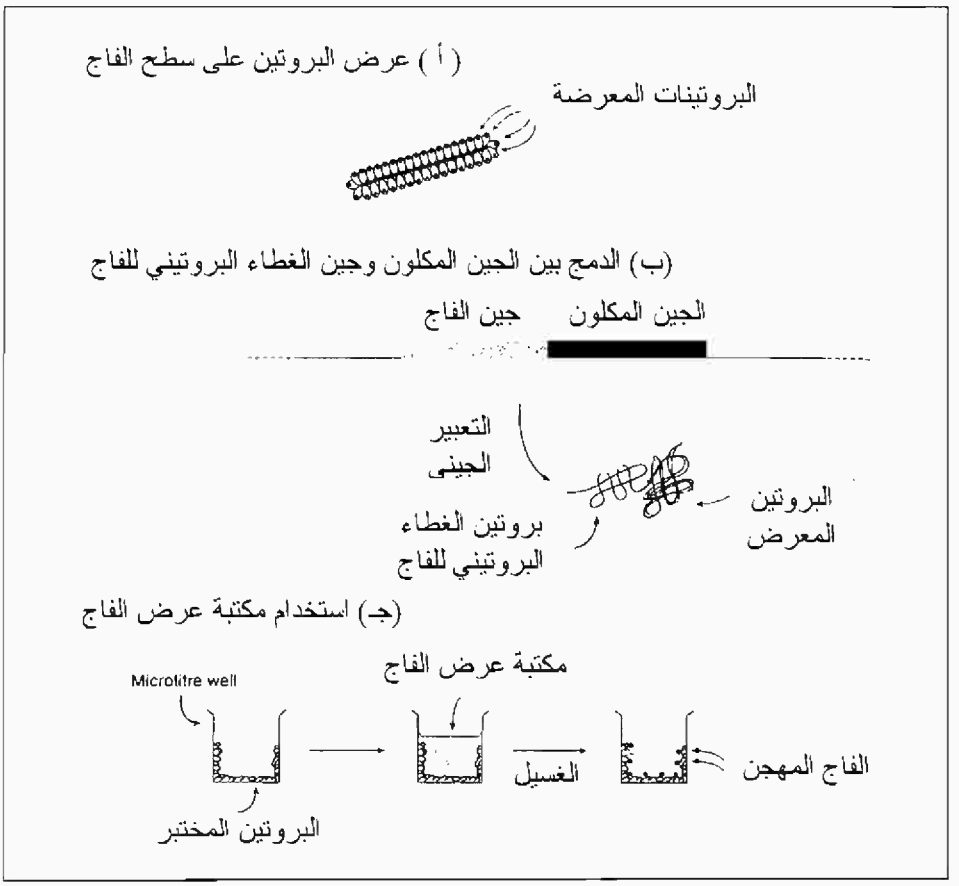
وجد فى الخلايا الحية أن قليل جداً من البروتينات يمكن ان تقوم بوظائفها فى عزله تامة عن بقية البروتينات، ولكن معظمها يعمل معا فى المسارات البيوكيماوية وفى المعقدات البروتينية الكبيرة. ويمكن معرفة وظيفة بروتين ما لم تسبق دراسته وذلك عن طريق تحديد أى بروتينات أخرى يعمل معها فى الخلية. وتستخدم تقنيتين هامتين للوصول إلى ذلك وهما:

- استعراض الفاج Phage Display.
- ونظام الهجينين فى الخميرة Yeast-Two Hybrid System.

أولاً: استعراض الفاج Phage Display:

وقد سميت هذه التقنية بهذا الاسم لأن البروتين يتم عرضه على سطح البكتريوفاج M13 (الشكل ١٣-١٧-أ) ويحدث ذلك بكلونة الجين المشفر لهذا البروتين فى الناقل M13 بحيث يحدث اندماج بين الجين المكلون مع جين الفاج الخاص ببروتين الغطاء Coat Protein (الشكل ١٣-١٧-ب) وبعد ادخال الجين المكلون فى خلايا بكتريا القولون يقوم الجين المندمج Fused Gene بإدارة عملية بناء بروتين هجينى مكون جزئيا من بروتين الغطاء وجزيئاً من البروتين المكلون ويبرز البروتين الهجينى من غطاء الفاج بحيث يصبح البروتين المكلون معرضا على سطح الفاج مما يعطى الفرصة لدراسته.

وتجرى هذه التقنية عادة مع مكتبة عرض الفاج Phage Display Library مكونة من عدد كبير من الفاج المعاد صياغته وكل منه يعرض بروتين مختلف. ويمكن تحضير مكتبات كبيرة مكونة من كلونات من مخلوط من cDNA من نسيج معين أو حتى بكلونة شظايا د.ن.أ الجينومية. وتتكون المكتبة من فاج عارضا مدى واسع من البروتينات المختلفة والتى تستخدم للتعرف على تلك البروتينات التى تتفاعل مع البروتين المختبر. ويتم تثبيت البروتين فى Wells of a Microtitre Tray أو على حبيبات يمكن استخدامها فى عمود كروماتوجراف يتم خلطها بمكتبة عرض الفاج (الشكل ١٣-١٧-ج) ويمثل الفاج الذى يظل ملتصقا بالميكروتيتر تراى بعد سلسلة من الغسيل هو الفاج الذى يعرض البروتين الذى يتفاعل مع البروتين المختبر المثبت فى جوانب الوعاء Tray.



الشكل (١٣-١٧): عرض الفاج Phage Display

أ - عرض البروتينات على سطح فاج خيطى معاد صياغته.

ب- الاندماج الجينى المستخدم فى عرض البروتين.

ج- طريقة الكشف عن التفاعل بين البروتين المختبر و مكتبة عرض الفاج.

ثانياً: نظام الهجينين فى الخميرة Yeast-Two Hybrid System:

تعتمد هذه التقنية على اكتشاف أن التعبير الجينى فى فطر الخميرة يعتمد على التفاعل بين ازواج من عوامل النسخ (الشكل ١٣-١٨-أ) وفى هذا النظام يتم تبديل زوج من عوامل النسخ مسئوله عن تعبير جين معين فى الخميرة

ويحل محله بروتينات مندمجة Fusion Proteins وبحيث يكون كل بروتين مكون جزيئاً من أحد عاملى النسخ وجزيئاً من البروتين المختبر وتقاس قدره زوج البروتينات المندمجة هذه على إدارة تعبير الجين المستهدف فى الخميرة.

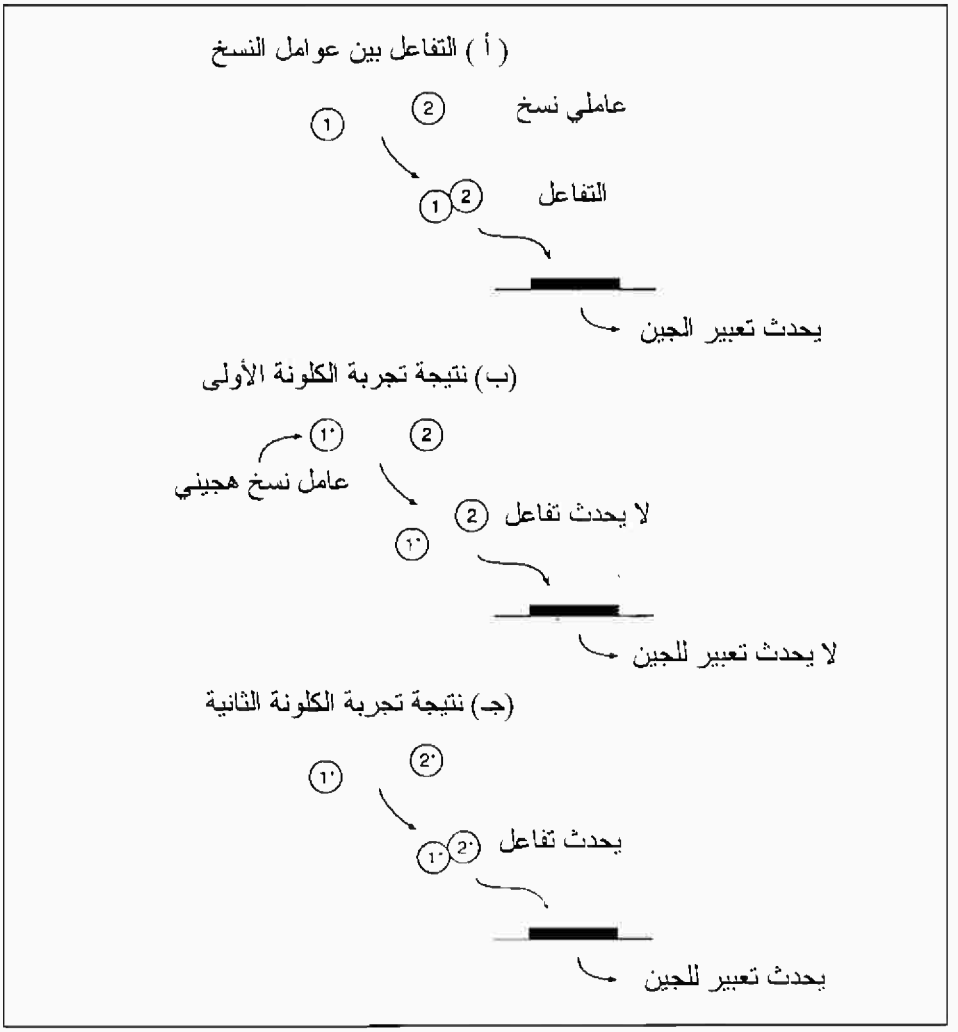
ولاجراء هذا الاختبار، لابد من اجراء تجربتى كلونة فى الخميرة وتشتمل التجربة الأولى على الجين المشفر للبروتين المراد اختباره ويتم دمج هذا الجين مع الجين الخاص بإحد زوجى عوامل النسخ ويلحق هذا التركيب بكلون الخميرة.

ولا تستطيع الخميرة المعاد صياغتها هنا أن يتم فيها تعبير الجين المستهدف نظراً لأن عامل النسخ المعدل هنا لايمكنه التفاعل مع قرينه (الشكل ١٣-١٨-ب)

وفى تجربة الكلونة الثانية يتم تكوين نسخة هجينية لعامل النسخ الآخر (القرين) ويكلون فى الخميرة.

ويدل استعادة تعبير الجين المستهدف على أن عاملى النسخ الهجينين يمكنها التفاعل مع بعضها البعض.

ويجب أن يتم الإتصال بين الجين المستهدف وعاملى النسخ بطريقة معينة بحيث أن هذا التفاعل يتم بين مكونات البروتينات المختبره فى الهجن البروتينيه وليس بين قطع بروتينات عوامل النسخ (الشكل ١٣-١٨-جـ). وبعد ذلك يتم تعريف ازواج البروتينات المتفاعلة.



الشكل (١٣-١٨): نظام الهجينان فى الخميرة Yeast-Two Hybrid System

أ - زوج من عوامل النسخ التى يجب أن تتداخل حتى يمكن حدوث التعبير الجينى.

ب- إستبدال عامل النسخ (١) ببروتين هجينى *١ يؤدى إلى منع التعبير الجينى لأن *١ لا يمكنه التفاعل مع العامل (٢).

ج- إستبدال العامل (٢) بالبروتين الهجينى *٢ مما يؤدى إلى إستعادة التعبير الجينى إذا تمكن الجزء الهجينى من *١ و*٢ من التفاعل.

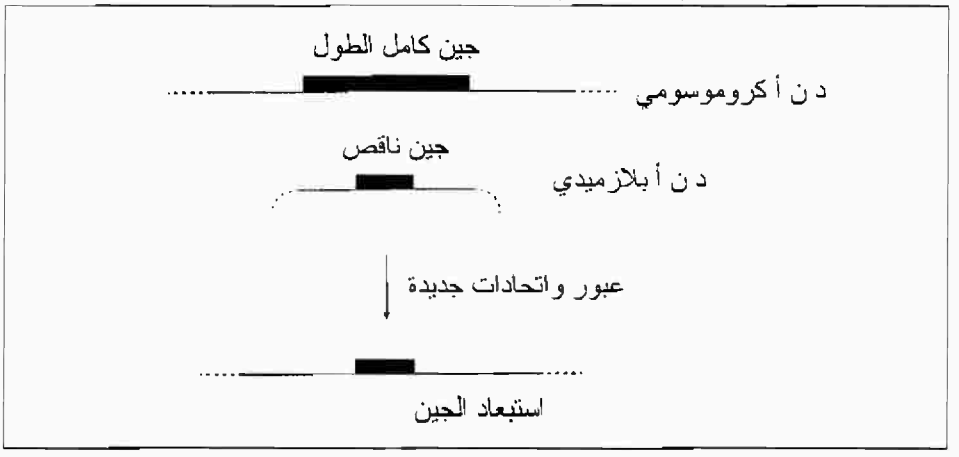
ويمكن أن تشتمل تجربة الكلونة الثانية على مكتبة من الجينات المعدله تمثل بروتينات مختلفة بحث يمكن اختبار أحد البروتينات مقابل بروتينات أخرى كثيرة فى هذا النظام.

ثالثا : تقنيات اسكات التعبير الجيني Gene Silencing:

١- *Gene Knockout:*

ويتم فى هذه التقنية استخدام نسخة منقوصة Deleted للجين "للتخلص Knockout من النسخة الفعاله الموجودة فى كروموسوم الكائن وبذلك يتم الحكم على وظيفة هذا الجين نتيجة لغياب هذه الوظيفة بعد هذه الازالة للنسخة الفعالة له.

اذ يحدث نتيجة للاتحادات الجديدة Recombination بين الجين المنقوص والنسخة الكاملة الكروموسومية أن يحل الأول محل الثانى (الشكل ١٣-١٩) ويتم بعد ذلك تقييم تاثير هذا التخريب على الطراز المظهرى Phenotype للكائن لمعرفة الوظيفة(الغائبة هنا).



الشكل (١٣-١٩): حذف الجين (Knockout) باتحادات جديدة بين نسخة كروموسومية للجين ونسخ ناقصة (Deleted) فى بلازميد الكلونة

ويستخدم Knockout الفأر للاستدلال على ما يقابلها فى الجينات البشرية حيث يحتوى الفأر على نسخة ناقصة للجين وقد ساعدت هذه التقنية على تحديد وظائف لعدد من الجينات إلا أن هناك بعض المشاكل التى قد تنشأ فى هذا الشأن فمثلا بعض عمليات الاستبعاد Knockout قد لا يكون لها تأثير واضح على الطراز المظهرى للكائن ويكون ذلك إما نتيجة لأن هذا الجين يمكن الاستغناء عنه بمعنى أنه حتى بعد أيقاف نشاطه يمكن لجينات آخرى تعويض غيابه، أو أن التغير المظهرى ضعيف وغير محسوس لدرجة أنه لايمكن التعرف عليه.

٢ - إيقاف تعبير نسخ m RNA بتقنية siRNA and Gene Knockdown:

وهى من أحدث التقنيات لدراسة وظيفة الجين Gene Function وتعتمد هذه التقنية على إدخال سلسلة تركيبية Synthetic مزدوجة قصيرة من ر.ن.أ يتراوح طولها بين ٢١-٢٣ نيوكليوتيد بحيث يكون تتابع النيوكلتيدات فيها مكملاً لنسخة mRNA المراد إيقاف تعبيرها ولذلك يطلق على هذه التقنية Post Transcriptional Gene Silencing (PTGS) أى تثبيط تعبير الجين بعد النسخ حيث تستخدم إحدى سلسلتى siRNA فى توجيه RISC إلى mRNA المستهدف بحيث يتم تدميره بإنزيمات ريبونيوكليز. ويتكون RISC من معقد ريبونيوكليزى كبير يطلق عليه RNA Induced Silencing Complex ويتحد مع هذه المعقد جزئ siRNA. ويحتوى RISC على نشاط إنزيم RNase III وإنزيم Helicase الذى يقوم بفصل سلسلتى siRNA. وقد أدى إستنباط هذه التقنية إلى سهولة دراسة وظيفة الجين Gene Function بطريقة سريعة ودقيقة وغير مكلفة. وتتميز هذه التقنية بإمكان الكشف عن وظيفة أى جين الذى يتم تعبيره سواء فى طراز نوعى من الخلايا أو فى مسار أيضى نوعى. فقد أمكن مثلا بهذه التقنية

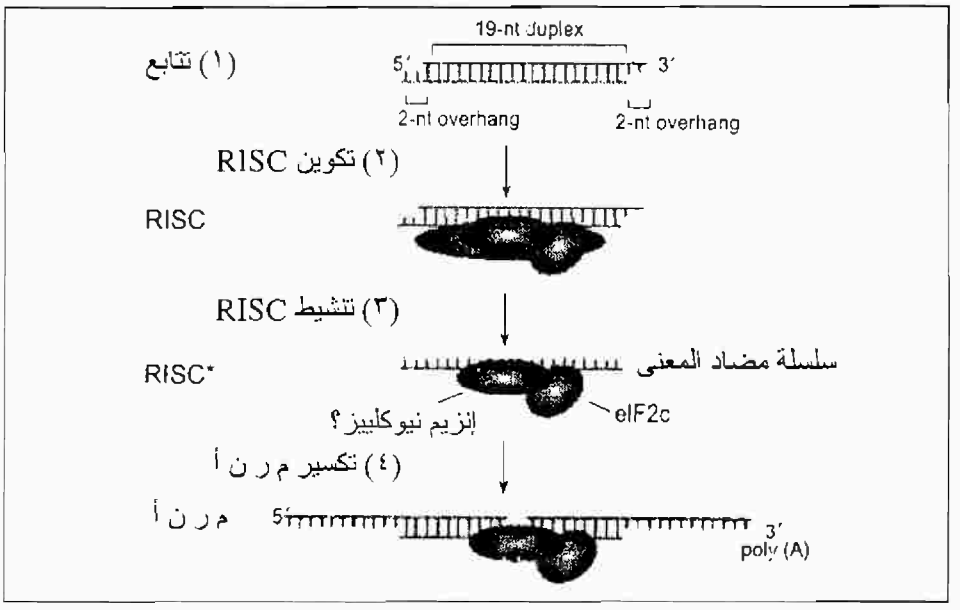
تحديد وظائف معظم الجينات فى جينوم C.Elegance وعددها ١٩ ألف جين. ويبين الشكل (١٣-٢٠) ميكانيكية هذه التقنية ويتطلب نجاح هذه التقنية مراعاة المتطلبات التالية:

١- دقة إختيار تتابع siRNA المكملة لنسخة mRNA المستهدفة.

٢- بناء siRNA أو تكوين بلازميدات معاد صياغتها تحتوى على تتابع د.ن.أ المشفر لجزئ siRNA.

٣- إختيار الطريقة المثلى لإنتقال Transfection جزئ siRNA أو البلازميد المشفر له فى الخلايا المستهدفة.

٤- متابعة Monitering فعالية إسكات تعبير الجين Gene Silencing.



الشكل (١٣-٢٠): إزالة تعبير الجين (Knockdown) بتقنية SiRNA

١- إدخال جزئ siRNA. ٢- تكوين المعقد RISC.

٣- إنفصال سلسلتى siRNA بإنزيم هيليكيز و تنشيط RISC.

٤- تقوم إحدى سلسلتى siRNA بتوجيه RISC إلى م ر ن أ المستهدف لتدميره.

أولاً: إختيار التتابع الصحيح لجزئ siRNA:

تبين أن هناك شروط يجب استيفاءها لإختيار جزئ siRNA أهمها:

١- إختيار التتابع المكمل لجزئ mRNA بحيث يكون على بعد Downstream من ٥٠-١٠٠ نيوكلتيدة من كودون بدء الترجمة.

٢- يجب أن لا يشمل هذا التتابع المناطق غير الشفرية سواء على النهاية 5'UTR او 3'UTR.

٤- أن يكون محتوى جزئ siRNAمن GC يتراوح بين ٣٠-٧٠%.

٥- الطول الأمثل لجزئ siRNA هو ٢١ نيوكلتيدة بحيث تكون أحدى السلسلتين فيه محتوى على تتابع AA(N)19TT بحيث تمثل N أى نيوكلتيدة حسب التتابع المكمل فى mRNA المراد إبطال تعبيره فى حين تكون نيوكلتيدين على الجانبين من نوع Uridines مفردتين ومكونة Overhang كما يجب أن تحتوى النهايتين على مجموعة 5'phosphate ، 3'oH.

ثانيًا: إختيار أنسب ناقل تعبير Expression Vector:

وجد أن أفضل ناقل للتعبير يستخدم فيه الوحدات التنظيمية لإنزيم بلمرة ر.ن.أ. RNA pol III والتى تسمح بتعبير siRNA فى جميع الانسجة. ويستخدم ناقل التعبير PDECAP بنجاح فى كثير من الكائنات مميزة النواة.

ثالثًا: إختيار الطريقة المثلى لنقل جزئ siRNA إلى الخلايا المستهدفة (العدوى) Transfection:

توجد وسائل عديدة لإحداث عملية النقل Transfection بنجاح منها إستخدام الحبيبات الليبوسومية Liposomes لتغليف جزئ siRNA أو البلازميد

الخاص به أو بإجراء عملية Electroporation "الإختراق الكهربى" أو بإستخدام قاذفة الجينات Biolistic Gun فى حالة الخلايا النباتية.

رابعًا: متابعة تأثير siRNA على إبطال تعبير mRNA:

يتم التحقق من نجاح siRNA فى تثبيط (Knockout) تعبير جين معين بإستخدام تقنية النقل الغربى Western Blot و Immunofluorescence بإستخدام الإجسام المضادة النوعية Specific Antibody للبروتين المستهدف كما يمكن متابعة ذلك من غياب الطراز المظهرى phenotype للصفة وكذلك من تحليلات النقل الشمالى Northern Blot حيث تغيب حزمة م.ر.ن.أ المستهدفة.

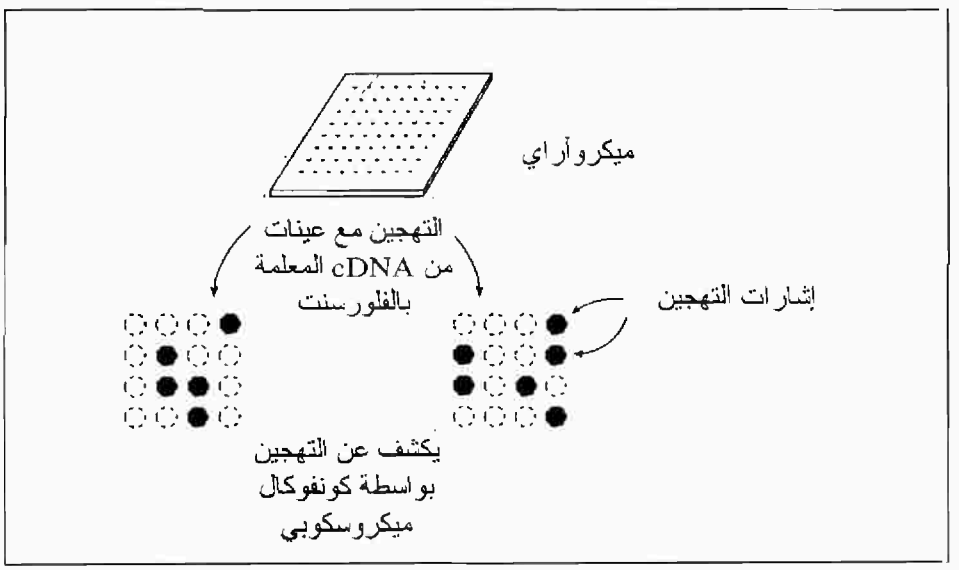
دراسة المحتوى النسخى والمحتوى البروتينى للجينوم:
Transcriptome and Proteome:

كما سبق القول يمكن تعريف المحتوى النسخى Transcriptome بأنه محتوى الخلية من جزئيات ر.ن.أ والذى يعكس الطراز العام للتعبير الجينى فى هذه الخلية.

فى حين يعرف المحتوى البروتينى Proteome بأنه محتوى الخلية من البروتينات والذى يعبر عن قدراتها البيوكيماوية.

وقد نشأت تقنية دراسة المحتوى البروتينى Transcriptome بداية كجزء من المشروع البحثى لدراسة ما بعد الجينوميا فى فطر الخميرة. وفى هذه التقنية يتم اجراء نوع متطور Sophisticated من تحليلات التهجين وفى هذه الدراسة وضعت عينات من الكلونات الفردية لكل من الجينات الخاصة بالخميرة وعددها ٦٠٠٠ جين مكلون على شريحة زجاجية فى مصفوفات رأسية وأفقية ٨٠×٨٠

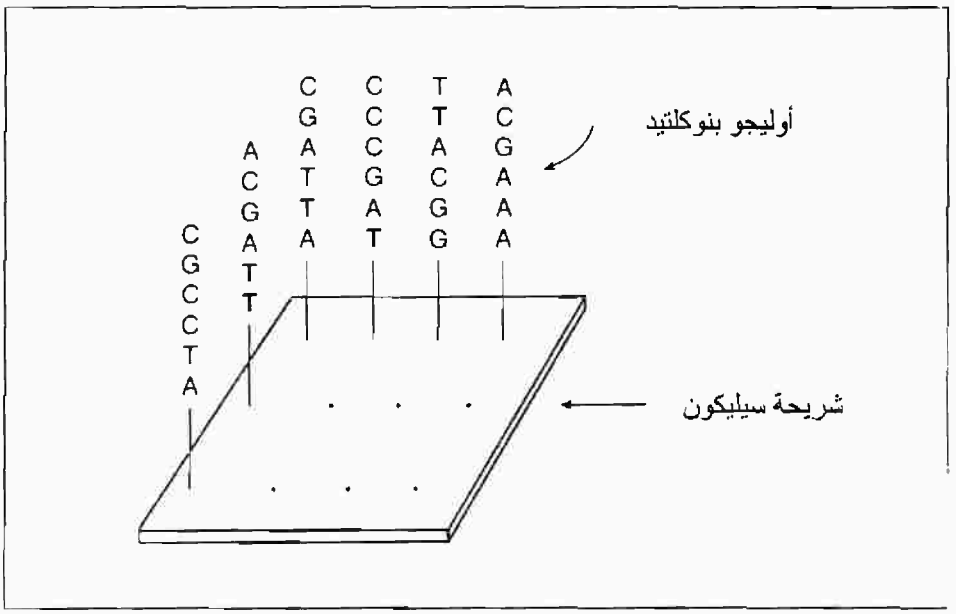
ويسمى هذا التحضير Microarray. ولتحديد أى من هذه الجينات يكون نشطًا فى خلايا الخميرة نامية تحت ظروف إجهاد معينة (جفاف أو حرارة أو نقص مغذيات الخ)، يستخلص م.ر.ن.أ من هذه الخلايا المعرضة لهذا الاجهاد ويحول هذا م. ر.ن.أ إلى cDNA الذى يعلم بالفلورسنت ويهجن مع عينات الجينات المكلونة فى الـ Microarray (الشكل ١٣-٢١) ويتم تحديد أين حدث التهجين حسب اشارات الفلورسنت التى يتم التعرف عليها باستخدام Confocal Microscope. والكلونات التى تعطى اشارات تدل على أن هذه الجينات بالذات هى التى كانت نشطة تحت ظروف الاجهاد محل الدراسة ويمكن تكرار التجربة مع cDNA اخر مستخلص تحت ظروف اجهاد اخرى.



الشكل (١٣-٢١): تحليلات الميكرو أراى Microarray. فى هذا المثال حدث تهجين بين الميكروأراى مع تحضيرين مختلفين من cDNA بحيث يكون كل منهما معلم بكشاف فلورسنتى مختلف اللون .ويتم تحديد الكلونات التى تتهجن مع cDNA بالفحص المجهرى Confocal Microscopy

تستخدم Microarray حالياً للتعرف على التغيرات التى تحدث فى المحتوى النسخى لعدد كبير من الكائنات وفى بعض الحالات تستخدم نفس الاستراتيجية المستخدمة فى الخميرة، إلا أن ذلك يكون ممكنا فقط فى حالة الكائنات المحتوية على عدد قليل نسبياً من الجينات. يمكن استخدام Microarray لمسح جميع الجينات البشرية بحيث يمكن القيام بها على ١٠ شرائح ١٨×١٨ ملمتر إلا أن تحضير كلونات لكل من ٣٠-٤٠ الف جين سيكون عملا شاقاً. ومن حسن الحظ أن ذلك قد لايكون ضرورياً. فمثلاً لدراسة التغيرات فى المحتوى النسخى الذى يحدث كنتيجة للسرطان، يمكن تحضير Microarray باستخدام مكتبة cDNA من نسيج طبيعى. وعند التهجين مع cDNA معلم مستخلص من النسيج السرطانى يمكن معرفة اى من الجينات حدث لها زيادة فى النشاط Up-Regulation وأى منها حدث لها انخفاض فى النشاط Down– Regulation استجابة للاصابة بالسرطان.

وإلى جانب الـ Microarray تم استحداث تقنية ذات امكانيات واسعة اكبر بكثير يطلق عليها DNA Chips وهى عبارة عن رقائق من السليكون تحمل اعداد كبيرة جداً من نيوكلتيدات الاوليجو (بطول ٢٠-٣٠ نيوكلتيدة) والتى يتم بناؤها مباشرة على سطح الرقائق والتى يمكن تحضيرها بكثافة تصل إلى مليون أوليجو لكل سنتيمتر مربع وهى كثافة أعلى بكثير مما فى Microaarray العادية (الشكل ١٣-٢٢) ويتم تحديد مواقع التهجين بين الـ Oligonucleotide والواسمات (cDNA المعلم) الكترونياً. وحيث أنه يتم تحضير أوليجونيوكلتيدات على الرقائق *de novo* باستخدام طريقة أوتوماتيكية خاصة (Robot) فإنه يمكن عمل Chips لكل جين بشرى أو أى كائن أخر بسهولة نسبية.



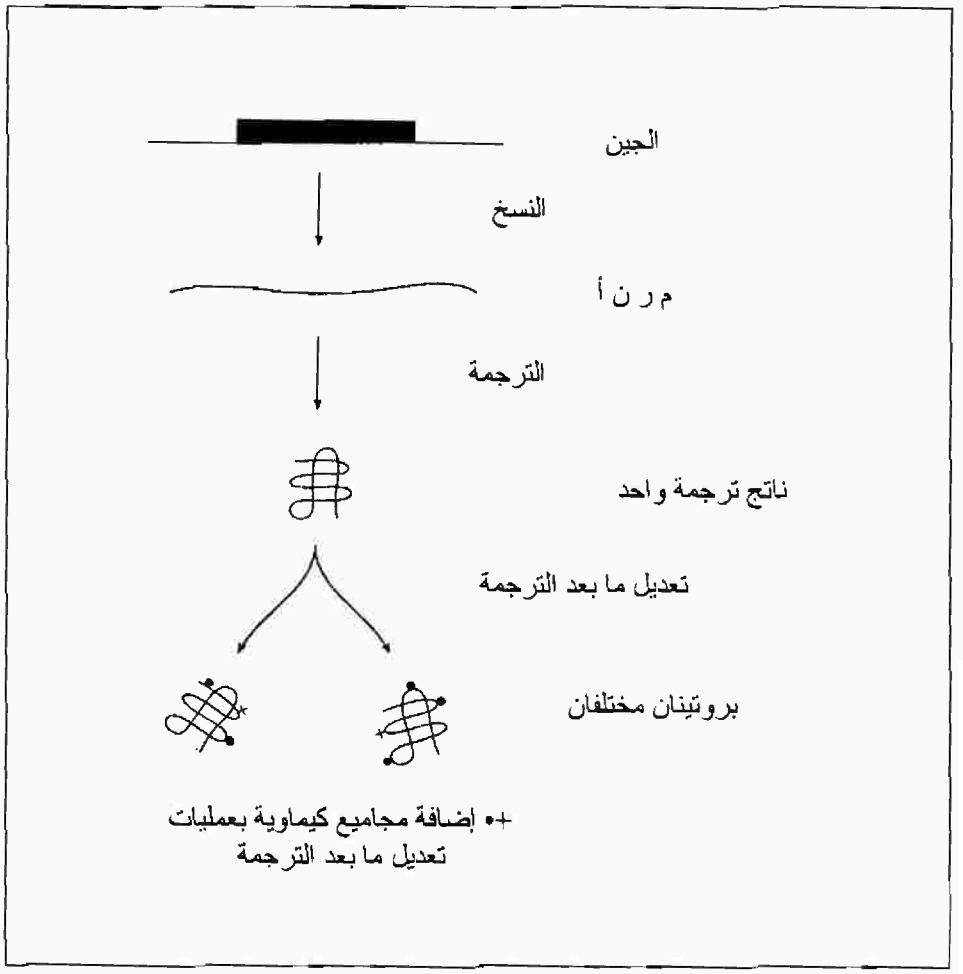
الشكل (١٣-٢٢): شريحة د ن أ DNA Chip يمكن للشريحة الحقيقية حمل عدد أكثر بكثير من الأوليجونيوكلتيد عن المبين و يبلغ طول كل أوليجو حوالى ٢٠-٣٠ نيوكلتيدة

دراسة المحتوى البروتينى للخلية Proteome:

تؤدى دراسة المحتوى البروتينى للخلية إلى امدادنا بمعلومات اضافية عن وظائف الجينات و التى لا يمكن الحصول عليها من دراسة الـ Transoriptome فقط ، نظراً لان جزئ م.ر.ن.أ واحد يمكنه أن يعطى أكثر من نوع واحد من البروتين المتغاير نتيجة لتعديلات لاحقة للترجمة Post-Translational Processing (الشكل ١٣-٢٣).

ففى مميزة النواة نجد أن معظم البروتينات الناتجة من ترجمة م.ر.ن.أ معين قد يحدث لها عمليات تعديل لاحقة بإضافة مجموعات كيماوية مثل عمليات

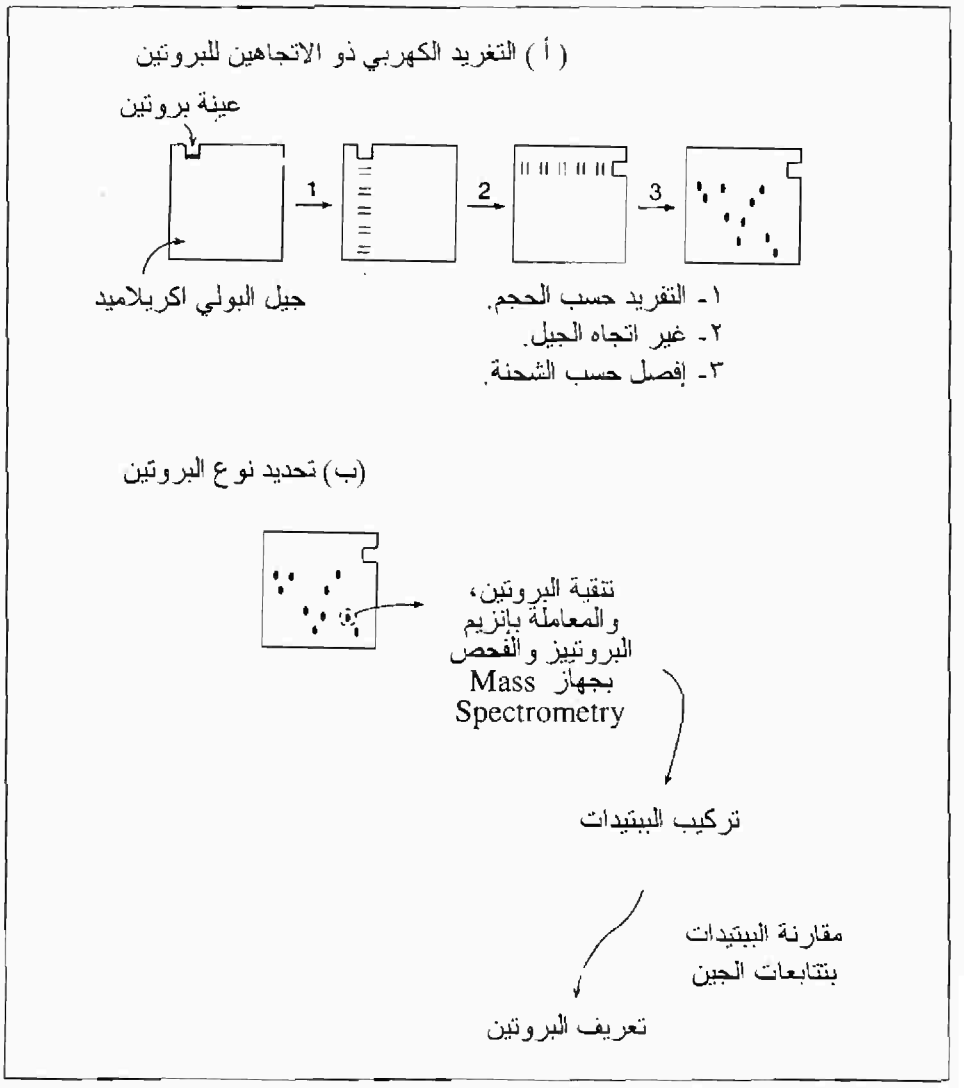
الفسفرة Phosphorylation أو اضافة سكريات Glycosylation أو كبرته Sulphanation .. الخ. وذلك لكى تنشط هذه البروتينات وتتخصص فى أداء وظيفة معينة.



الشكل (١٣-٢٣): يمكن للجين الواحد أن يشفر لبروتينين مختلفين بوظائف مختلفة، إذا حدث تعديل للنسخة الأولية للبروتين بطريقتين مختلفتين من عمليات التجهيز بعد الترجمة

ولدراسة البروتيوم يتم أولاً فصل المحتوى البروتينى الكامل للخلية أو النسيج وذلك باستخدام تقنية التفريد الكهربى ذو الاتجاهين Two-Dimensional Electrophoresis وفى هذه التقنية يوضع البروتين فى مجرى Well فى احد جانبى جيل الاكرلاميد للتفريد الكهربى. يتم تفريدها فى هذا الاتجاه حسب اوزانها الجزيئية، ثم يدار الجيل بعد ذلك بزاوية ٩٠° ويجرى تفريد كهربى ثان وفى هذه الحالة يتم فصل حزم البروتينات حسب الشحنات الموجودة عليها. وتكون النتيجة هى الحصول على طراز تفريد كهربى ذو اتجاهين باحجام وأشكال وكثافات مختلفة، وتمثل كل بقعة بروتين مختلفة أو مجموعة متقاربة من البروتينات (الشكل١٣-٢٤-أ)، وتقدر الاختلافات بين البقع البروتينية عند مقارنة جيلين مختلفين.

ولتعريف البروتين الناتج فى بقعة معينة، يتم تنقية عينه منها من الجيل وتعامل بإنزيم Protease (Restriction Endoprotease) الذى يقطع سلسلة متعدد الببتيد عند تتابع معين للاحماض الأمينية (يشبه إلى حد كبير ما يحدث مع انزيمات القطع المحدده التى تقطع جزئ د.ن.أ عند تتابع معين) ويتم تحليل الببتيدات الناتجة عن التقطيع متبقية Mass Spectrometry (الشكل١٣-٢٤-ب) الذى يحدد تركيب الاحماض الامينية فى كل ببتيدة. وتكون هذه المعلومات كافية عادة لإمكان التعرف على الجين المشفر لهذا البروتين بالرجوع إلى تتابعات النيوكلتيدات فى الجينوم وباستخدام قاموس الشفرة الوراثية.



الشكل (١٣-٢٤): تحليلات البروتيوم Proteome analysis

أ - جيل الأكريلاميد للتفريد الكهربائى للبروتين فى الإتجاهين Two-Dimensional.

ب- تحديد البروتين الموجود فى بقعة وحيدة بالمعاملة بإنزيم البروتييز يليه إستخدام تقنية Mass Spectrometry للببتيدات الناتجة.

وتسمى هذه الطريقة Peptide Mass Fingerprinting (PMF). وللتدليل على أهمية الطريقة فى التعرف على وظيفة الجين قام بعض العلماء بتطبيقها على بكتريا *Mycoplasma Genitalium* والذى يعتبر أصغر جينوم بكتيرى (٠,٥٨ mb) فى محاولة للتعرف على الحد الادنى من التفاعلات البيوكيماوية والأيضية التى يتطلبها النظام الحيوى. وباستخدام التفريد الكهربى ذو الاتجاهين 2D.Elecphophoresis أمكن التعرف على ٤٢٧ بقعة بروتينية على الجيل فى طور Exponential Phase. وقد تم تحليل ٢٠١ بروتين منها والتعرف عليها بطريقة (PMF) ومقارنتها ببروتينات معروفة. وقد تم التعرف من هذه التحليلات على ١٥٨ بروتين معروف (٣٣% من المحتوى البروتينى) فى حين ظل ١٧ بروتين غير معروف. واشتملت البقع الباقية على شظايا مشتقه من بروتينات أكبر أو صور مختلفة من نفس البروتين (مشابهات البروتين) ونواتج معدله لاحقة للترجمة. وقد تضمنت البروتينات التى تم تحديدها: انزيمات خاصة بالتفاعلات الايضية للطاقة وتناسخ د.ن.أ ونسخه وترجمته وكذلك الانزيمات الخاصة بنقل المواد خلال الغشاء البلازمى. وعندما تحولت الخلية البكتيرية إلى الطول Stationary Phase حدث انخفاض بنسبة ٤٢% فى المواد البروتينية التى تم بناؤها.

كما ظهرت بروتينات جديدة، فى حين حدثت تغيرات فى نسب بروتينات اخرى كثيرة. ويبدو أن هذه التغيرات نتجت عن نقص فى بعض المغذيات وارتفاع الحموضة فى بيئة النمو والتأقلم مع بعض التغيرات البيئية. وقد ساعدت هذه النتائج على تحديد الحد الأدنى من التعبير الجينى الذى يكون ضرورياً للمعيشة المستقلة للكائن والتغيرات التى تحدث فى التغيير الجينى التى تصاحب التحول من طور Exponential إلى طور Postexponential. كما أظهرت النتائج

انه من غير المحتمل وجود ظروف يمكن أن يتم فيها تعبير جميع المحتوى البروتينى للخلية دفعة واحدة. حيث وجد أن ٣٣% فقط من هذا المحتوى تم تعبيره تحت الظروف المثلى لأقصى نمو.

ومن المحتمل أن ٦٧% الباقية عبارة عن بروتينات يمكن أن يتم تعبيرها تحت ظروف بيئية مختلفة.

وعموماً فإن تحليلات المحتوى البروتينى تقدم معلومات واسعة المدى عن التعبير الجينى والتى لايمكن الحصول عليها من التحليلات الجينومية فقط.

بعض المفاهيم الجديدة الناتجة عن التحليلات الجينومية:

Some New Concepts of Post-Genomics

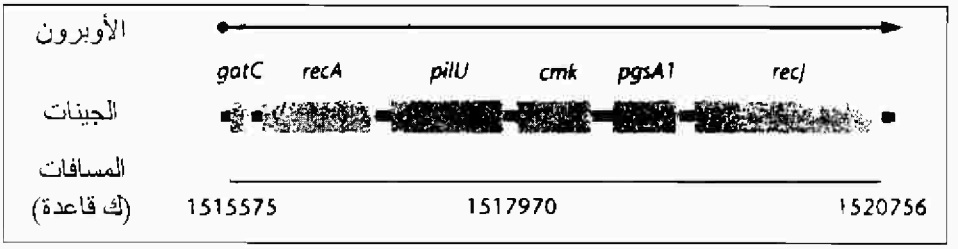
أولاً: جينومات البكتريا الحقيقية Genomes of Eubacteria:

وجد فى بكتريا القولون ثلاث جينات متداخلة Overlapping Genes بين وحدات النسخ (الأوبرونات) وهى حالة نادرة إذ أن ذلك شائع فقط فى جينومات الفيروس.

وجد فى بكتريا القولون أن حوالى ٢٧% من وحدات النسخ تكون فى صورة أوبرونات (حوالى ٦٠٠ أوبرون).

وجد فى بكتريا *Aguifex aeolicus* أن معظم الجينات تكون فى صورة وحدات نسخ متعددة السسترونات Polycistronic والتى درجنا على تسميتها بالاوبرون، إلا أن التعبير السائد بأن الاوبرون يحتوى على جينات تركيبية مرتبطة بعلاقات وظيفية متقاربة وتتحكم فى مسار بيوكيماوى واحد لا ينطبق على هذا الكائن. فقد وجد أن احد الأوبرونات يحتوى على سته جينات تركيبية

لايربط بينها أى علاقة وظيفية إذ نجد أن جينين مختصين بإعادة اتحاد د.ن.أ DNA Recombination وجين واحد لبناء الليبيدات، وآخر لبناء الاحماض النووية وواحد لبناء البروتين وجين لحركة الخلية Motility كما فى الشكل (١٣-٢٥).



الشكل (١٣-٢٥): أوبرون فى جينيوم بكتريا Aquifex Aeolicus. يحتوى هذا الابرون على جينات: لبناء البروتين (gatC) والإتحادات الجديدة فى جزئ د ن أ (recA) وrecJ) ولحركة البروتين(pilU) وللبناء الحيوى للنيوكلتيدات (pgsA1). ويختلف هذا التنظيم عن الفكرة التقليدية بأن الجينات فى الاوبرون تشفر لبروتينات تتحكم فى مسار بيوكيماوى مشترك

من المعروف أن معظم جينومات غير مميزة النواة تحتوى على كروموسوم واحد حلقى إلا أنه اكتشفت حالات يكون فيها الكروموسوم البكتيرى خطى Linear كما فى بكتيريا *Borrelia Burgdorferi* بالاضافة إلى بعض الانواع من Streptomyces.

لا شك أن الاهم أن الاكتشافات الخاصة بالبلازميدات تجعلنا نعيد النظر فى تعريف الجينوم البكتيرى بأنه يتكون من جزئ حلقى واحد من د.ن.أ.

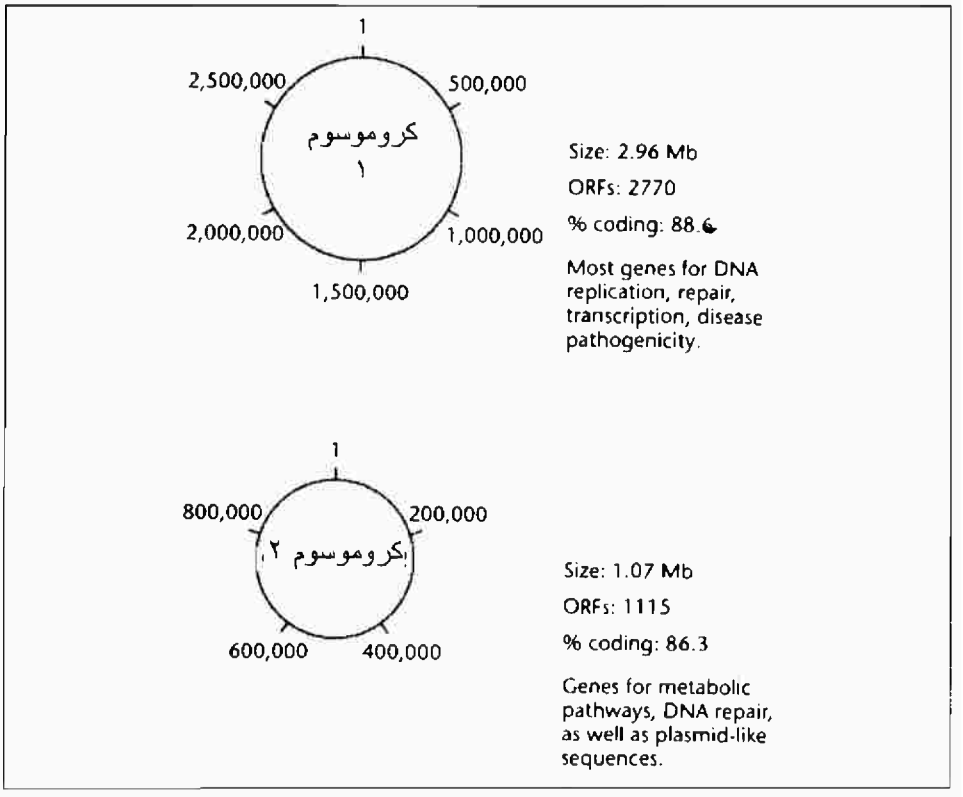
إذ أنه من الشائع أن معظم البلازميدات تحمل جينات غير ضرورية ويمكن نقلها من خلية إلى اخرى، كما أن نفس البلازميد يكون موجود غالباً فى بكتريا تنتمى إلى أنواع مختلفة مما أدى إلى الاعتقاد بأن جينات البلازميدات

لايجب اعتبارها ضمن الجينوم البكتيرى إلا أنه تبين أن بكتريا *B. Bursdorferi* تحتوى على حوالى ١٧ بلازميد والتى تحتوى على ٤٣٠ جين على الاقل ويبدو أن بعضها ضرورى حيث تشمل الجينات الخاصة ببناء البيورينات وبروتينات الغشاء البلازمى.

وقد تبين مؤخراً من تحليل تتابعات جينوم *Vibrio cholerae* المسبب لمرض الكوليرا، وجود كروموسومين حلقيين فى نفس الخلية البكتيرية (الشكل ١٣-٢٦) وتبين أن الكروموسوم رقم ١(2.96 Mb) يحتوى على ٢٧٧٠ إطار قراءة مفتوح (ORF) وان الكروموسوم رقم ٢ (1.07 Mb) يحتوى على ١١١٥ إطار (ORF) وبعضها يشفر لجينات ضرورية مثل البروتينات الريبوسومية ويبدو أن الكروموسوم ٢ مشتق من بلازميد اكتسبه نوع ابوى قديم Ancestral Species حيث تبين وجود كروموسومين فى أنواع اخرى من Vibrio.

إن إكتشاف وجود جينومات غير مميزة النواة ذات كروموسومات متعددة Multichromosomal بحيث يكون احد الكروموسومات مشتق من بلازميد يؤدى إلى عدة تساؤلات هامة:
فمثلاً متى يمكن اعتبار البلازميد كروموسوم، وما هى ميكانيكيات التنظيم التى تتحكم فى التغيير الجينى والمسارات الأيضية فى مثل هذه النظم البكتيرية متعددة الكروموسومات؟

إن الإجابة على هذه الاسئلة قد تؤدى إلى إعادة النظر فى كثير من المفاهيم الخاصة بجينومات غير مميزة النواة وقد تفتح المجال لمعرفة تطور الكروموسومات المتعددة فى جينومات مميزة النواة.



الشكل (١٣-٢٦): يتكون جينوم بكتريا الكوليرا من كرموسومين ويحتوى الكروموسوم الأكبر (١) على معظم الجينات المسؤلة عن الوظائف الضرورية للخلية ولإحداث العدوى. بينما تكون معظم الجينات فى الكروموسوم (٢) لم يعرف لها وظيفة.

وقد يدل التحيز فى المحتوى الجينى ووجود تتابعات مشابهة للبلازميد على الكروموسوم ٢على أن هذا الكروموسوم كان فى الأصل بلازميد ضخم تم إحتوائه بواسطة نوع Vibrio قديم

ثانيًا: جينومات Archaea:

وهى أحدى ثلاث أقسام رئيسية فى الكائنات الحية (وكانت تسمى سابقا Archaebacteria) والقسمان الآخران هما Eubacteria (البكتريا الحقيقية والتى

لايوجد لها نواة محاطة بغلاف نووى مثل *Haemophilus* و *Mycoplasma*) والقسم الاخر هو Eukaria (وتحتوى على نواة محاطة بغلاف نووى حقيقى).

وكلا من Eubacteria وArchaebacteria تتبعان غير مميزة النواة Prokaryotes أى انها لا تمتلك نواه وقد اعتبرت Archraebacteria حديثاً كمملكة منفصلة اعتمادا على تحليل تتابعات د.ن.أ المشفر لـ ر.ن.أ الريبوسومى (rDNA) كما تم تأكيد ذلك مؤخراً بتحليل تتابعات البروتينات وتحليلات المسارات الايضية.

ومن جهة اخرى وجد أن جينات Archaea تتشابة كثيراً مع جينات مميزة النواة. فمثلاً وجد أن الجينات المشفرة لبناء ر.ن.أ، وبناء البروتين وبناء د.ن.أ تتشابة بدرجة كبيرة مع تلك الموجودة فى مميزة النواة .. والمدهش هو أن هذه البكتريا وجد بها بروتينات الهستونات الكروموسومية. وهناك بعض الأدلة على أن د.ن.أ الكروموسومى ينتظم فى كروماتين. كما أنه على الرغم من عدم وجود انترونات فى الجينات المشفرة للبروتين إلا أنه وجدت انترونات فى جينات tRNA مشابهة لتلك الموجوده فى مميزة النواة.

تبين أنه بكتريا *Methunococcus jannasckii* والتى تعيش فى أعماق البحار وتحت درجة الحرارة العالية والتى تصل إلى ٩٤ م ويتكون جينومها من ثلاثة كروموسومات: كروموسوم حلقى (1.66 Mb) وكروموسومين حلقيين صغيرين مكونين من 58.4Kb و 16.5 Kb.وقد وجد أن ٥٨% من جينات هذا الكائن لاتتشابه مع أى جينات معروفة. وتقوم معظم الجينات بوظائف معينة مثل انتاج الطاقة وانقسام الخلية والمسارات الايضية العامة بحيث تتشابه مع

ما يحدث فى *Eubacteria* كما أنها تشبه *Eubacteria* فى التنظيم العام وتحتوى لى أوبرونات ولا تحتوى على إنترونات.

ثالثًا: جينومات مميزة النواة Eucaryotic Genames:

يقسم عادة الجينوم النووى لمميزة النواة إلى سلسلة من جزيئات د.ن.أ الخطية بحيث يكون كل كروموسوم محتوى على جزئ واحد من د.ن.أ بالاضافة إلى ذلك يوجد جينوم أخر صغير فى مميزة النواة وهو جينوم الميتوكوندريا فى صورة جزئ حلقى من د.ن.أ، وفى النبات يوجد جينوم ثالث فى صورة د.ن.أ. حلقى وهو جينوم الكلوروبلاست. وسنقتصر هنا على تلخيص لبعض خصائص الجينوم النووى فى مميزة النواة. وكما سبق الذكر فإنه توجد اختلافات كبيرة فى احجام جينومات مميزة النواه المختلفة.

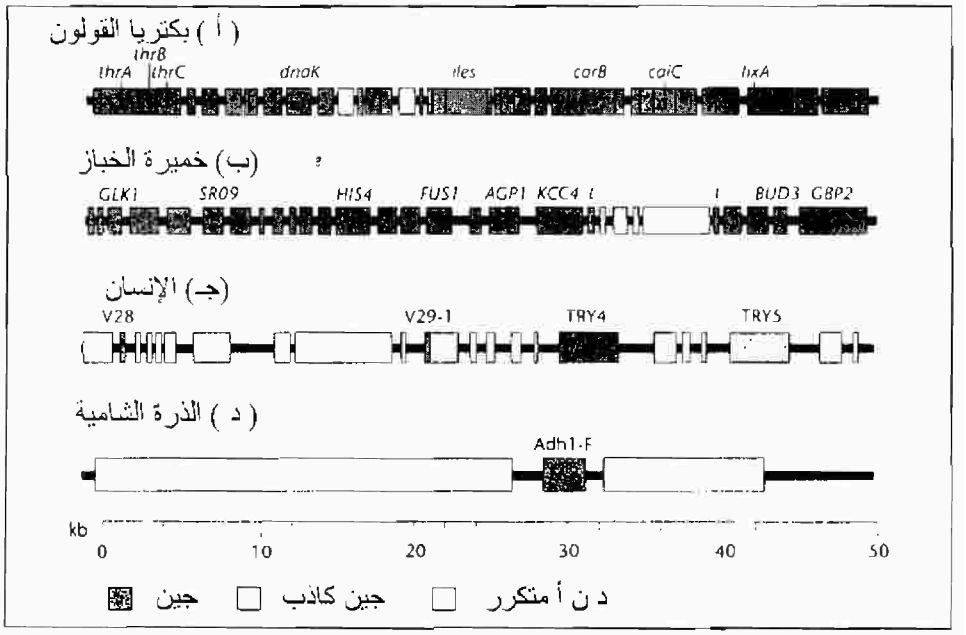
وبالمقارنة بغير مميزة النواة نجد أن مميزة النواة تتميز بكثافة جينية منخفضة Low Gene Density (الشكل١٣-٢٧). وعموما فكلما زاد حجم الجينوم كلما قلت به الكثافة الجينية فلو قارنا بين منطقة من فطر الخميرة (Lower Eukaryote) على الكروموسوم III ومنطقة من الجينوم البشرى على الكروموسوم 7 نجد الاختلافات التالية:

١- **الكثافة الجينية**: تحتوى منطقة الخميرة بطول ٥٠ك قاعدة على أكثر من ٢٠ جين بينما تحتوى منطقة الجينوم البشرى بنفس الطول على ٦ جينات فقط.

٢- **الإنترونات**: لاتحتوى الخميرة على أى انترونات ولكن كل جين بشرى يحتوى على انترونات عديدة وفى الحقيقة فإن جينوم الخميرة بأكملة

يحتوى على ٢٣٩ انترون فى حين أن بعض الجينات البشرية يحتوى كل منها على أكثر من ١٠٠ انترون.

٣- **التتابعات المتكررة Repetitive Sequences**: يعتبر وجود الانترونات والتتابعات المتكررة من الاسباب الرئيسية للتباين الكبير فى احجام الجينومات فى مميزة النواة. ففى بعض النباتات مثل الذرة الشامية ، وجد أن التتابعات المتكررة هى السمة الغالبة للجينوم حيث أن حجم جينوم الذرة الشامية هو 2500. Mb إلا أن ٨٠% منها مكون من د.ن.أ متكرر مما يؤدى إلى انخفاض حاد فى الكثافة الجينيه فى هذا الجينوم.



الشكل (١٣-٢٧): مقارنة الكثافة الجينية (Gene Density) بين أربعة كائنات

أ - منطقة طولها ٥٠ كيلو قاعدة فى بداية جينيوم بكتريا القولون.

ب- منطقة من كروموسوم الخميرة رقم III.

جـ- منطقة طولها ٥٠ كيلو قاعدة من مكروموسوم ٧ البشري تشفر للمستقبلات السطحية للخلية.

د - منطقة من جينوم الذرة الشامية تحيط بجين Adh 1-F

وبعكس ما هو شائع من أن مناطق الهيتيروكروماتين لا تحتوى على أى جينات، تبين وجود ٥٠ جين فى منطقة الهيتيروكروماتين فى حشرة الدروسفلا.

أثبتت نتائج مشروع الجينوم البشرى أن عدد الجينات البشرية يتراوح من ٣٠-٤٠ الف جين وهو يقل كثيرا عن العدد الذى كان مقدراً فى السابق بين ٨٠-١٠٠ الف جين.