الفصل السابع والأربعون

طرق التعرف الجزيئية

MOLECULAR IDENTIFICATION PROCEDURES

دارال ج. جاكوود، ومارك و. جاكوود

Daral J. Jackwood and Mark W. Jackwood

الملخص Summary

استخدمت التقنية الحيوية لتطوير اختبارات تشخيصية جديدة لأمراض الطيور. يعتمد التعرف الجزيئي لمرضات الطيور على اكتشاف الحامض النووي (إما آر إن إيه أو دي إن إيه) الفريد لذلك المرض. بالإضافة إلى استخدام الحامض النووي للتعرف على النوع وتحت النوع والنمط والنوع المصلي والنوع المرضي وفي بعض الحالات العترات الفردية للعامل المسبب للمرض. تبنى الاختبارات التشخيصية الجزيئية على تقنيات جزيئية مثل التباين القصري لطول القطعة restriction fragment length polymorphism (RFLP)، والتهجين مع مسابير الحمض النووي hybridization with nucleic acid probe، وتفاعل البلمرة المتسلسل (PCR)، وتباين الحمض النووي دي إن إيه المعظم العشوائي random amplified polymorphic DNA، وتتابع الحمض النووي nucleic acid sequencing. إن معرفة هذه التقنيات ضرورية لفهم وتقييم نتائج الاختبارات الجزيئية التشخيصية التي تبنى على هذه التقنية.

المقدمة Introduction

يتكون الحمض النووي دي إن إيه من قواعد بيورين أدينين [A] وجوانين [G] وبيرميدين سيتوزين [C] وثيمين [T] و يُكَوِّن تنظيمها الشفرة الوراثية. ترتبط القواعد معاً بواسطة سكر ديوكسي ريبوزي وروابط فوسفات التي تكون تركيب الشريط المفرد للحمض النووي دي إن إيه، وتمسك روابط الهيدروجين بين القواعد (أزواج A مع T وأزواج G مع C) بشريطي الحمض النووي دي إن إيه معاً (4).

مثل الحمض النووي دي إن إيه، يحتوي الحمض النووي آر إن إيه على قواعد باستثناء أنه بدلاً من T يحتوي على يوراسيل (U). الحمض النووي الريبوزي آر إن إيه عادة مفرد الشريط وليس ثابتاً مثل دي إن إيه. يحتوي

آر ان ايه على السكر الريبوزي وروابط فوسفات بينما دي إن إيه يستخدم سكر ديوكسي ريبوزي. يعمل حمض آر إن إيه المرسول كحامل للمعلومات الوراثية من الحمض دي إن إيه لتخليق البروتينات (4).

الشفرة الوراثية أو التتابع الفعلي للقواعد في مجين الكائنات فريدة من نوعها لكل الكائنات الحية. لذلك مجرد أن تتحدد الشفرة الوراثية ، يمكن أن تستعمل المعلومات للتعرف نوعياً على ممرضات الطيور بوجود المجين الخاص بها.

تعدد طول القطعة القصري

Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP)

تستخدم هذه التقنية إنزيمات القصر لتحديد إذا ما تشابهت قطع الحمض النووي دي إن إيه. تقطع الإنزيمات الهاضمة الحمض النووي دي إن إيه مزدوج الشريط عند تتابعات معينة تسمى مواقع الإدراك. يهضم (يقطع) الحمض النووي بإنزيم خاص وتفصل الأشرطة الناتجة بالتحليل الكهربائي تبعاً لوزنها الجزيئي. في حالة عدم تماثل أحجام أشرطة الحمض النووي دي إن إيه ، سوف لا يتضاهى أو يتشابه شكل الأحزمة على الهلام ويمكن استخلاص أن تتابعات شريطي الحمض النووي دي إن إيه مختلفة عند مواقع الإدراك. إذا تضاهت أشكال الأحزمة ، تعتبر التتابعات متشابهة لكن تحتاج إلى اختبار إضافي لتوضيح أن قطعتي دي إن إيه متشابهتين لأن الإنزيمات الهاضمة تدرك فقط تتابعات النيوكليوتيدات القصيرة نسبياً.

يمكن أن يستخدم مجين الحمض دي إن إيه المعزول من عامل مسبب للمرض مجهول للتعرف على البكتيريا النوعية أو ميكوبلازما أو فيروس بمقارنة شكل القطع مع المقاييس المرجعية. إذا كان العامل مسبب المرض المراد اكتشافه يحتوي على مجين آر إن إيه مثل العديد من الفيروسات فإنه يمكن أن يتحول آر إن إيه إلى دي إن إيه باستخدام تقنية النسخ العكسي (RT). وعندما يعقب ذلك تكبير دي إن إيه بواسطة تفاعل البلمرة المتسلسل فإنه يمكن الحصول على دي إن إيه كافي لإنتاج بيانات تعدد طول القطعة القصري (انظر فقرة تفاعل البلمرة المتسلسل). تعرف هذه التقنية عامة أنها RT/PCR-RFLP.

في بعض الحالات يكون التعرف على العامل مسبب المرض محتملاً بالنظر ببساطة إلى وجود أو غياب مواقع إدراك القصر الإنزيمي أو اتحاد مواقع إدراك القصر الإنزيمي restriction endonuclease recognition sites. يجرى الاختبار مثل تعدد طول القطعة القصري (RFLP) تماماً فيما عدا أن حجم قطع دي إن إيه الناتج تكون غير مهمة. تكون النتائج إيجابية إذا قطع دي إن إيه عند أي موضع. لذلك أي تناقص في حجم الجزيء الأصلي لحمض دي إن إيه يكون دالاً على وجود موقع إدراك للقصر الإنزيمي. تجرى التقنية عادة على قطع قصيرة من دي إن إيه التي نتجت باستعمال RT/PCR وتسمى عامة RT/PCR-RE.

التهجين ومسابير الحمض النووي Hybridization and Nucleic Acid Probes

الكيفية الأساسية خلف الاختبار التشخيصى المبني على مسبار الحمض النووي هي التزاوج أو التهجين، وتشمل ازدواج القاعدة (الرابط الهيدروجيني) للتتابعات المتممة (G مع C و A مع T أو U) للحمض النووي دي إن إيه أو آر إن إيه (2).

في اختبار التهجين ، يجب أن يكون الحمض النووي مفرد الشريط. يتم دنترة الحمض النووي denaturation إلى أشرطة مفردة وعادة تتم بواسطة الحرارة أو المعاملة الكيميائية للعينة. عندئذ يرتبط الحمض النووي (دنترة) إلى دعامة صلبة (النيتروسيلليلوز أو مرشح النايلون). بعد ذلك، يخلط مسبار الحمض النووي مفرد الشريط مع الحمض النووي المتحد مع المرشح، في وجود الظروف التي تشجع التهجين (2). الظروف التي يمكن أن تؤثر على إمكانية تزاوج شريطي الحمض النووي من عدمه تعرف بالجدية (2). تتطلب الظروف عالية الجدية أن يتوافق ازدواج القواعد بين التتابعات المتممة تماماً. سوف تسمح الظروف منخفضة الجدية ببعض عدم التوافق لزوج القاعدة بين تتابعات الحمض النووي. شروط التفاعل التي تؤثر على التهجين هي نوع الحمض النووي (ازدواج القاعدة بين شريطي دي إن إيه ليس قوياً مثل ازدواج قاعدة دي إن إيه — آر إن إيه)، وطول تتابع الحمض النووي (العدد الأكبر لأزواج القاعدة المتمم يتزاوج أكثر قوة من العدد الأقل)، وتركيب القاعدة للأحماض النووية (ازدواج قاعدة G-C يكون أقوى من A-T أو A-U). درجة حرارة مخلوط التفاعل والقوة الأيونية لمحلول التهجين (تؤثر على كلٍّ من روابط الهيدروجين بين القواعد) أيضاً تؤثر على التهجين.

توجد مسابير الحمض النووي لمعظم الممرضات المهمة في الطب البيطري وتستخدم كوسائل تجريبية إذا كانت متوافرة من معامل أبحاث أو تتوافر من مصادر تجارية. في بعض الحالات هذه المصادرالتجارية توجه المسابير إلى اختبارات تشخيصية. مسبار الحمض النووي هو قطعة مفردة الشريط للحمض دي إن إيه أو آر إن إيه التي تم تعليمها مسبقاً، ومن ثَم يمكن اكتشافها عقب تفاعل التهجين. لأن المناطق الفريدة توجد في تتابع قواعد في كل الكائنات، يمكن تجهيز مسبار حمض نووي متمم مثل ذلك الذي يتزاوج فقط إلى منطقة فريدة ويكتشف نوعياً العامل مسبب المرض (5). توجد عدة طرق للحصول على وتعليم مسابير الحمض النووي (2). نموذجياً يجب أن يعزل الجين من الكائن المراد اكتشافه، ثم يعلم بإما النظائر المشعة أو مواد غير مشعة. المعلمات غير المشعة هي الأكثر جاذبية عن النظائر المشعة للاستخدام في الاختبارات التشخيصية لأنها ليست خطرة للتداول ويمكن أن تخزن لفترة زمنية طويلة. اثنان من المعلمات الأكثر استعمالاً هما بيوتين وديجوكسيجنين — المسابير المعلمة بالبيوتين تكتشف بإنزيم ستربت أفيدين القاعدي الفوسفاتي (أو إنزيم آخر) المقترن ومادة مناسبة لإحداث تفاعل لوني مشابه للإليزا. في حالة المسابير المعلمة بالدجسوكسيجنين يضاف الجسم المضاد لديجوكسيجنين المقترن مع إنزيمات مختلفة يمكن أن تستخدم مع مادة مناسبة لإحداث تفاعل اللون. عندما يقرن مضاد الديجوكسيجنين مع الإنزيمات مثل الفوسفاتيز

القاعدي ، يمكن أن تستخدم مادة مضيئة كيميائية والتي تبعث ضوءاً عندما تعرض لفيلم أشعة إكس معطية طريقة كشف حساسة جداً.

الأوليجونيكليوتايدات هي قصيرة (عادة ٣٠ - ٤٠ قاعدة نيوكلوتيدية في الطول) تصنع تخليقياً قطع دي إن إيه مفرد الشريط ، ويمكن أن تعلم وتستخدم كمسابير. يمكن أن يعلم أيضاً ويستخدم كمسبار الحمض النووي آر إن إيه.

تفاعل البلمرة المتسلسل Polymerase Chain Reaction (PCR)

أحد أهم التطورات في البيولوجيا الجزيئية ، والأساس لاختبارات تشخيصية عديدة للعوامل المسببة للمرض في الدواجن هو تفاعل البلمرة المتسلسل. يعظم تفاعل البلمرة المتسلسل كميات صغيرة جداً من دي إن إيه إلى مستويات قابلة للكشف (1). يستخدم التفاعل تاك بولي ميريز دي إن إيه بولي ميريز الذي هو ثابت عند درجة حرارة عالية ليعظم أو يكبر المجين لعامل المرض. دي إن إيه بولي ميريز هو الإنزيم الذي يخلق أشرطة جديدة للحمض دي إن إيه. من المهم جداً أن يقاوم دراجات الحرارة العالية لأن الخطوة الأولى للتفاعل هي تسخين التفاعل حتى ٩٥ْ م. مثالياً هناك ثلاثة خطوات في تفاعل البلمرة المتسلسل والتي تتكرر من ٣٠ – ٤٠ مرة. هذه الخطوات هي الدنترة عند ٩٥ْ م denaturation ، والتزاوج مع البادئ عند ٣٧ - ٥٦ْ م primer hybridization ، والبلمرة عند ٧٢ْ م polymerization. يمكن برمجة صندوق تحكم حراري بالكمبيوتر بالدورات المتكررة بين هذه الدرجات الحرارية المختلفة مؤدياً إلى ميكنة تفاعل البلمرة.

عامة ، ليتزايد الحمض دي إن إيه فإنه يتراكب بواسطة زوج من البادئات المخلقة (قطع قصيرة من دي إن إيه) وتكون نوعية (متممة) للحمض النووي المراد تكبيره. يعامل الحمض دي إن إيه الهدف حرارياً ويترك البادئ ليتزاوج على الحمض النووي دي إن إيه بتخفيض الحرارة. عندما تتم خطوة البلمرة ينسخ التتابع بين البادئات منتجاً مرتين من الحمض دي إن إيه الأصلي الموجود في العينة. بتكرار الخطوات الثلاثة الدنترة والتهجين والبلمرة عدة مرات تتكون كمية كبيرة من الحمض النووي الهدف. عند استخدام الإنزيم الناسخ العكسي الذي يُخَلِّق دي إن إيه من القالب آر إن إيه في الخطوة الأولى للتفاعل يمكن أيضاً تكبير آر إن إيه المرسول وآر إن إيه الريبوزومي ومجين الفيروسات الريبوزية.

تتطلب الاختبارات التشخيصية تفاعل البلمرة لتكبير الحمض النووي للعوامل المسببة للمرض والموجودة في أعداد صغيرة ومن ثَم تزيد من حساسية الاختبار. يمكن عند ذلك أن يدرس الحمض دي إن إيه المُعَظَّم أكثر بمسبار حمض نووي نوعي أو بتحليل القصر الإنزيمي وتحليل تعداد طول القطعة القصري أو تتابع دي إن إيه.

الحمض النووي دي إن إيه العشوائي المكبر متعدد الأشكال (رابد)

Random Amplified Polymorphic DNA Analysis (RAPD)

تقنية رابد تعرف أيضاً بتفاعل البلمرة المتسلسل البادئ اعتباطاً arbitrarily primmed PCR (AP-PCR) قد تطورت بواسطة Williams *et al.* (8) و Welsh and McClelland (6). تستخدم هذه التقنية بوادئ قصيرة لها تتابع اعتباطي لتكبير مناطق عشوائية من الحمض دي إن إيه. تفصل هذه القطع بالتحليل الكهربائي وتكون الأشكال الناتجة دلائل لمناطق من الحمض الديوكسي ريبوزي المستهدف. لإجراء تقنية رابد، يعظم دي إن إيه المجيني المستهدف باستعمال بادئ له تتابع اعتباطي. هذا البادئ يكون عادة ١٠ – ١٢ قاعدة في الطول، لكن البادئات الأطول قد استخدمت. تفاعل البلمرة المستخدم لتحليل رابد يجرى تحت ظروف مثالية. نواتج التفاعل الخاص بالبلمرة المتسلل تعتمد على تتابع البادئ وطول البادئ وظروف التفاعل للإليزا. عند ثبات ظروف التفاعل والبادئ تكون دلائل رابد تناسخية جداً ومميزة لحمض دي إن إيه المستهدف.

تنقية رابد استخدمت أساساً لتوليد المواد المعلمة للخريطة الوراثية الكمية والتشخيص الجيني في النبات والحيوان (7). وحديثاً المواد المعلمة في تقنية رابد تستخدم للتعرف على أمراض الدواجن. هذه التقنية لها دور عظيم في التعرف على أمراض الدواجن المعقدة جينوم دي إن إيه لأنها لا تحتاج إلى معلومات عن تتبع هدف دي إن إيه (8, 7. وتم نشر مراجعة شاملة عن تحليل رابد (7).

تتابع الحمض النووي Nucleic Acid Sequencing

هي طريقة لتحديد ترتيب القواعد النيوكليوتيدية (A و C و G و T) في قطعة حمض نووي. تتابع نهاية سلسلة داي ديوكسي نيوكليوتيد سانجر هي طريقة تتابع قياسية تستخدم في معظم المعامل (3). حديثاً، تم ميكنة تتابع الحمض النووي. بالرغم أن الأدوات مكلفة وتتطلب مستوًى معيناً من الخبرة، إلا أن تتابع الحمض النووي يتوافر خلال عديد من شركات التقنية الحيوية التجارية (Lark Sequencing Technologies, Inc., Houston, Tex.) يعطي التتابع طريقة للتعرف النوعي للميكروبات اعتماداً على التتابع الفعلي للمجين الخاص بها. تضافر تتابع الحمض النووي مع تفاعل البلمرة يمكن أن يكون حساساً جداً كما أنه تقنية تشخيصية نوعية.

المراجع References

1. Erlich, H. PCR technology. Stockton Press, New York, N.Y. 1989.
2. Sambrook, J., E. F. Fritsch, and T. Maniatis. Molecular cloning a laboratory manual, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, N.Y. 1989.
3. Sanger, F., S. Nicklen, and A. R. Coulson. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. Proc. Natl. Acad. Sci. 74:5463-5467. 1977.
4. Stryer, L. Biochemistry, 2nd ed. W. H. Freeman and Co., San Francisco, Calif. 1981.

obeikandl.com

5. Tenover, F. C. Diagnostic deoxyribonucleic acid probes for infectious diseases. Clin. Microbiol. Rev. 1:82-101. 1988.
6. Welsh, J., and M. McClelland. Genomic fingerprinting using arbitrarily primed PCR and a matrix of pairwise combinations of primers. Nucleic Acids Res. 19:5275-5279. 1991.
7. Williams, J. G. K., M. K. Hanafey, J. A. Rafalski, and S. V. Tingey. Genetic analysis using random amplified polymorphic DNA markers. Methods Enzymol. 218:704-740. 1993.
8. Williams, J. G. K., A. R. Kubelik, K. J. Livak, J. A. Rafaiski, and S. V. Tingey. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. Nucleic Acids Res. 18:6531-6535. 1990.

obeikandl.com