

## الفصل الثالث

### تقنيات بيولوجية

يعتمد تقدم العلوم إلى حد كبير على ابتكار تقنيات جديدة يمكن بها الكشف عن حقائق لم تكن نعرفها من قبل أو يمكن تسخيرها من أجل تحقيق منافع ذات قيمة أكاديمية أو تطبيقية. وقد اعتمد تقدم علم بيولوجيا الخلية وعلم البيولوجيا الجزيئية إلى حد كبير على ابتكار عدد من التقنيات. وسوف نستعرض هنا باختصار عدداً من هذه التقنيات ذات العلاقة بالعلاج بالجينات.

#### استخدام إنزيمات القصر:

كان لاكتشاف إنزيمات القصر Restriction enzymes دور هام في فتح آفاق متعددة أمام العلماء في مجال تفهم آلية نقل الصفات الوراثية وتفهم آليات عمل الجينات، ومن ثم نشأ ما يسمى بالهندسة الوراثية وغير ذلك من تقنيات أحدثت ثورة في مجال العلوم البيولوجية. ففي عام ١٩٧٠ استطاع العالم الأمريكي سميث Hamilton O. Smith فصل إنزيما من بكتيريا اسمها العلمي هييموفيلاس إنفلونزى *Hemophilus influenzae* من السلالة (d) يمكنه أن يقطع جزيء DNA عن تتابع معين من ستة نيوكليوتيدات، وقد سمي هذا الإنزيم *Hind III*، كما نجح العالم هربرت بوير Herbert Boyer في فصل إنزيم قصر من بكتيريا إشيرشياكولاي *Escherichia coli*. وقد توالى فيما بعد اكتشاف ما يزيد على ٣٠٠ إنزيم في أنواع مختلفة من البكتيريا حيث يقوم كل إنزيم منها بقطع جزيء DNA بطريقة معينة وعند تتابعات معينة من النيوكليوتيدات. وقد عرفت هذه الإنزيمات باسم (إنزيمات القصر) Restriction Enzymes. وقد فتح استخدام إنزيمات القصر آفاقاً واسعة أمام تكنولوجيا توظيف المادة الوراثية. وقد حصل العالم (سميث) على جائزة نوبل في الطب أو الفسيولوجيا في عام ١٩٧٨ تقديراً لاكتشافه. وتختلف طريقة قطع إنزيم القصر لجزيء حمض DNA، فقد يكون القطع مستقيماً فيكون طرفى القطع كليلين (blunt or flush ends)، وقد يكون القطع مورباً staggered حيث يكون طرفى القطع مانلين dangling (شكل ٢٦ ملون). وقد لوحظ أن التحام أطراف حمض DNA الموربة يكون أسهل مما دعا إلى وصف طرفى القطع بأنها (نهايات لاصقة) Sticky ends. وتجدر الإشارة إلى أن ترتيب النيوكليوتيدات السائبة في أحد الشريطين هو نفسه في الشريط الآخر ولكن في الاتجاه المعاكس، ولذا فإن ترتيب النيوكليوتيدات على جانبي القطع يوصف بأنه (مقروء الاتجاهين) Palindromic.

ويكتسب أى إنزيم قصر اسمه من اسم البكتيريا التي تم عزله منها. وتفصيل الأمر أن أول حرف من اسم الإنزيم يمثل أول حرف من اسم جنس البكتيريا (ويكتب بالطبع كابيتال مائلاً

بالطريقة الإيطالية (*italic*)، ويمثل الحرفان الثاني والثالث اسم نوع البكتيريا (ويكتب الحرفان بالطبع بحروف صغيرة ومائلة بالطريقة الإيطالية)، ويمثل الحرف الرابع سلالة البكتيريا، ويكتب بحروف عادية كإيتال أو صغيرة حسب الأحوال. وأخيراً يوضع رقم روماني يمثل ترتيب اكتشافه بالنسبة لإنزيمات القصر الأخرى التي تم عزلها من هذه السلالة من البكتيريا. ويوضح الجدول الآتي أسماء بعض إنزيمات القصر وأسماء الكائنات الدقيقة التي عزلت هذه الإنزيمات منها، كما توضح الأسهم على شريطي الحمض النووي الموقع الذي يقوم عنده إنزيم القصر بقطع جزيء الحمض النووي DNA.

ENZYME	MICROBIAL SOURCE	SEQUENCE
<i>AluI</i>	<i>Arthrobacter luteus</i>	5'-A-G-C-T-3' 3'-T-C-G-A-5' ↓ ↑
<i>BamHI</i>	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> H	5'-G-G-A-T-C-C-3' 3'-C-C-T-A-G-G-5' ↓ ↑
<i>EcoRI</i>	<i>Escherichia coli</i>	5'-G-A-A-T-T-C-3' 3'-C-T-T-A-A-G-5' ↓ ↑
<i>EcoRII</i>	<i>Escherichia coli</i>	5'-C-C-T-G-G-3' 3'-G-G-A-C-C-5' ↓ ↑
<i>HaeIII</i>	<i>Haemophilus aegyptius</i>	5'-G-G-C-C-3' 3'-C-C-G-G-5' ↓ ↑
<i>HindIII</i>	<i>Haemophilus influenzae</i> b	5'-A-A-G-C-T-T-3' 3'-T-T-C-G-A-A-5' ↓ ↑
<i>PstI</i>	<i>Providencia stuartii</i>	5'-C-T-G-C-A-G-3' 3'-G-A-C-G-T-C-5' ↓ ↑
<i>SalI</i>	<i>Streptomyces albus</i>	5'-G-T-C-G-A-C-3' 3'-C-A-G-C-T-G-5' ↓ ↑

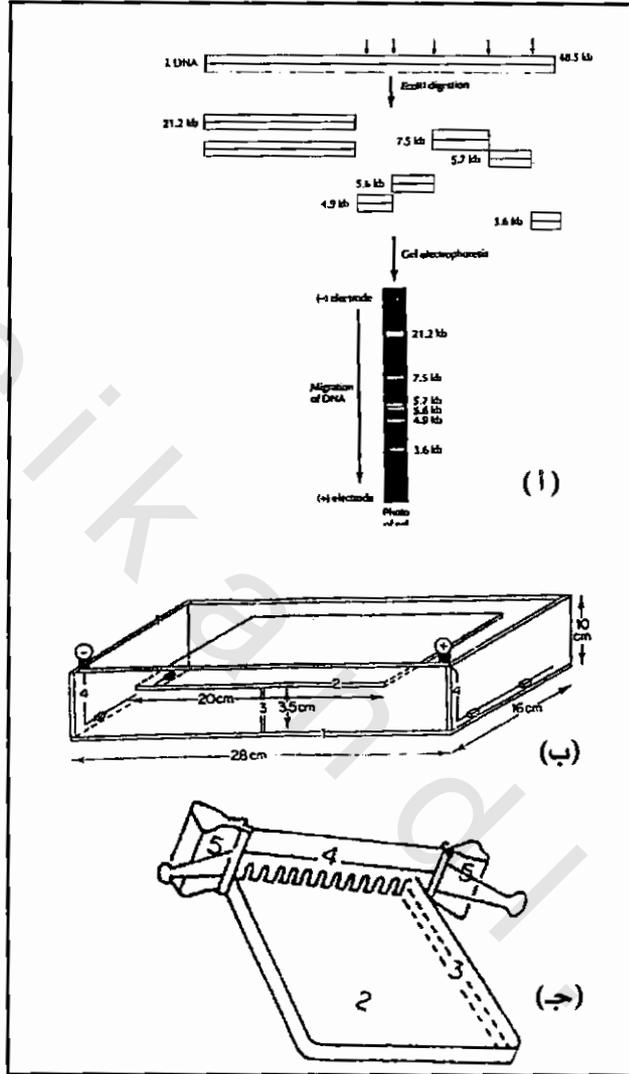
## الفصل الكهربائي فى الجيلاتين Gel Electrophoresis

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

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

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

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



شكل (٢٧) : (أ) شكل تخطيطي يوضح (هضم) جزئى حمض DNA باستخدام إنزيم القصر *EcoRI* ثم فصل القطع الناتجة عن طريق الفصل الكهربى الجيلاتينى gel electrophoresis فتجرى كل قطعة فى الجيلاتين من أعلى (حيث القطب السالب) إلى أسفل (حيث القطب الموجب) وذلك لمسافة قدرها يتناسب عكسيا مع طول قطعة حمض DNA. (ب) طبق الفصل الكهربى الجيلاتينى يحتوى على لوح الجيلاتين ومتصل بقطب كهربى موجب وآخر سالب وهو هنا يستخدم للفصل الأفقى. (ج) قضيب مسنن (مشط) يستخدم لعمل حفر slots فى لوح الجيلاتين، توضع العينات فى الحفر الناتجة. يوضع لوح الجيلاتين فى الطبق (شكل ب) بحيث تكون الحفر ناحية القطب السالب.

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

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

### حمض DNA معاد الاتحاد Recombinant DNA

يقصد بذلك إجراء إلتحام أو ربط اصطناعى لحمض DNA من مصدرين مختلفين ، ولكى يتم ربط



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

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

وكان أول من نجح فى الحصول على DNA معاد الاتحاد هو العالم الأمريكى (بول برج) Paul Berg. (شكل ٢٨) من جامعة ستانفورد، حيث استطاع فى عام ١٩٧٠ عزل كروموسوم بكتيريا اشيرشيا كولاي *Escherichia coli*

- وهو حلقي الشكل - تم فتحه بإنزيم قصر وربطه بحمض DNA من فيروس. وكان الأمر غاية فى الصعوبة نظراً لأن الأطراف المقطوعة لحمض DNA كانت كلية (مستوية) ولم تكن موروبة (متدلّية)، وقد حصل (برج) على جائزة نوبل فى عام ١٩٨٠ تقديراً لذلك. ومن الجدير بالذكر أن تضمين حمض نووى فيروسى مع المادة الوراثية للبكتيريا هو عمل يحدث فى الطبيعة.

وقد أدت تطبيقات تقنية حمض DNA معاد الاتحاد في اتجاهات متعددة إلى نشأة تيار جديد من الدراسات التي عرفت باسم (الهندسة الوراثية Genetic engineering). وقد تمكن العلماء من خلال ذلك من الحصول على كائنات معدلة جينياً Genetically-modified Creatures فأصبح لدينا بكتيريا معدلة الجينات، ونباتات معدلة الجينات، وحيوانات معدلة الجينات، فاكتملت هذه الكائنات بذلك خصائص وصفات لم تكن لها، واستطاع الإنسان أن يوظف ذلك لصالحه. وفي عام ١٩٧٦ أنشئت أول شركة للهندسة الوراثية تحت اسم Genentech. وقد أنشئت شركات عالمية لاستثمار الهندسة الوراثية وأنفقت بلايين الدولارات في هذا المجال. ومن هذه الشركات:

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

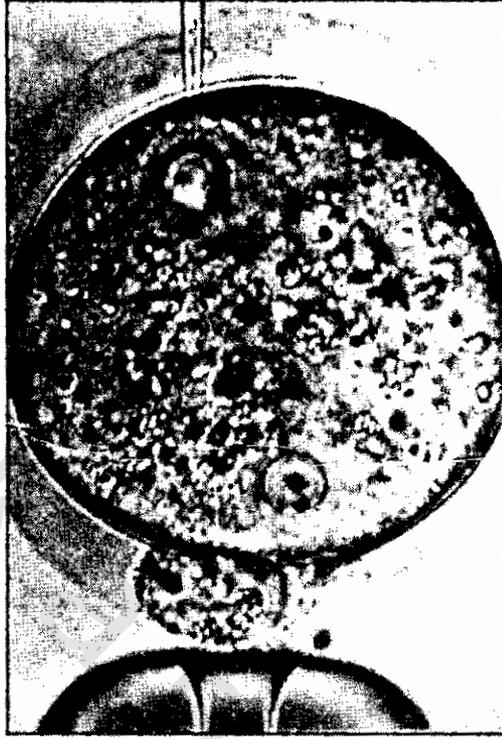
### آلية إدخال الجين إلى الخلية

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

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

### حقن جين في نواة بويضة مخصبة Microinjection

يستخدم لحقن الجين جهاز معين يعتمد على ماصتين دقيقتين Micropipettes، ويتم التحكم في ضبط عملية الحقن من خلال عدسات مكبرة. وتعمل إحدى الماصتين كماءة شفط Suction تثبت الخلية المراد حقنها في مكانها، أما الماصة الثانية فهي دقيقة الطرف وسمكها لا يتعدى  $\frac{1}{100}$  من سمك شعرة الإنسان، وهي تستخدم في حقن الجينات المراد إدخالها إلى الخلية (شكل ٢٩).



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

ويعيب هذه الطريقة تكلفتها العالية وبطؤها وانخفاض معدل نجاحها.

#### إدخال الجينات إلى الخلايا الجسمية:

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

## تفاعل البلمرة المتسلسل (PCR) Polymerase Chain Reaction

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

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

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

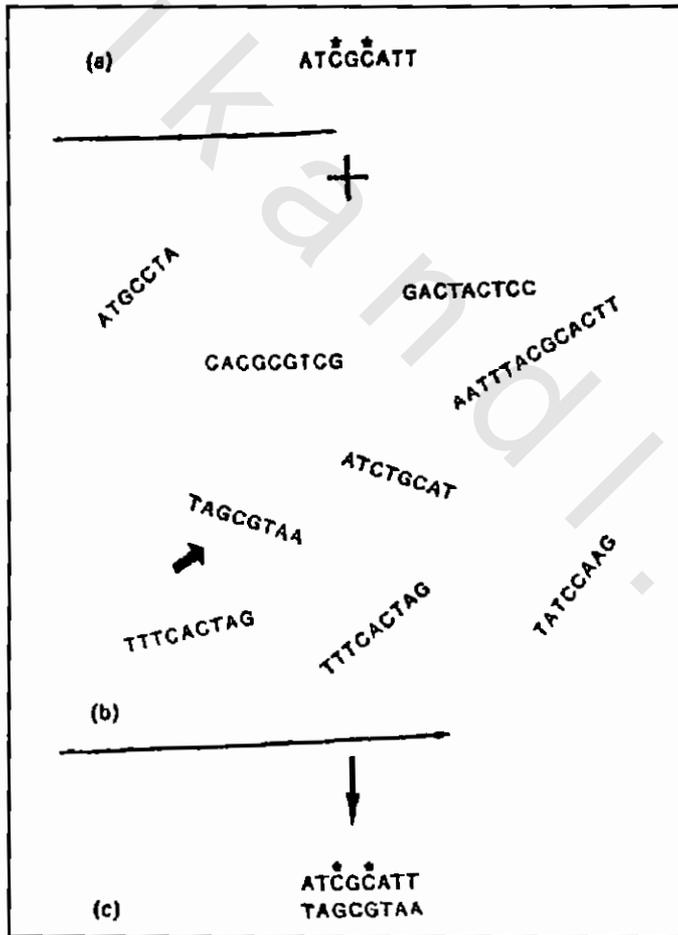
وتجدر الإشارة إلى أن تخليق شريط جديد من حمض DNA أمام شريط قديم فى أنبوبة يقتضى أن نزود التفاعل بجزء من الشريط الجديد ليرتبط مع جزء مقابل من الشريط القديم - وعندئذ فقط يبدأ استكمال الشريط الجديد فى التكوين عقب الجزء الذى أضفناه نحن، ويسمى الجزء من شريط حمض DNA الذى نضيفه لهذا الغرض باسم (بادئ Primer).

### مجسات حمض DNA (DNA Probes)

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

شريط حمض DNA ذى تتابعات نيوكليوتيدات متممة Complementary Sequence بهدف عزله وإكثاره. ويتراوح عدد النيوكليوتيدات فى المجس بين ١٠ و ١٠,٠٠٠.

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



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

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

وقد ابتكرت شركة Affymetrix شريحة صغيرة تبلغ مساحتها  $2 \times 2$  سم تحتوى على ما يزيد على ٦٥,٠٠٠ مجس!! يضح فيها حمض DNA المجهول على صورة قطع صغيرة تم ربط كل منها بمادة فلوروسنتية، فتحدث ارتباطات بين هذه القطع والمجسات. ويستعان بعد ذلك بشعاع ليزر وجهاز كمبيوتر لتحديد أماكن الارتباطات ومن ثم يمكن إدراك تتابعات قطع DNA. وتعرف هذه الشريحة المبتكرة باسم DNA microarray GenChip probe array.

### اختيار جين وکلونته Gene Selection and Cloning (شكل ٣١ ملون)

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

- يستخدم إنزيم قصر فى قطع الجينوم إلى أجزاء، ويستخرج حمض DNA الخاص بفيروس بكتيرى ويتم تقطيعه أيضا، ثم يجرى ربط أجزاء الجينوم الخلوى مع أجزاء المادة الوراثية للفيروس باستخدام إنزيم ligase، وبناء فيروسات تحمل الحمض النووى المهجن لينتج فيروسات مهجنة hybrid phages.
- إعداد مزارع بكتيرية (مروج lawns) كل منها ينشأ من خلية بكتيرية تحتوى جينا خلويا تم کلونته.
- وتستهدف الخطوات الآتية تحديد جين مطلوب وتعظيم کلونته (وهو فى شكل ٣١ يتخذ لونا أزرق داكنا على عكس بقية الجينات التى تتخذ لونا أزرق فاتحا).
- تنقل نسخة من المزارع على لوح نيتروسيلولوز nitrocellulose filter.
- إذابة البروتين الفيروسي، ثم فك شريطى الحمض النووى عن بعضهما Denaturation.
- تعريض اللوح النيتروسيلولوزى إلى مجس probe للجين المطلوب اختياره، وبذا يتم اتحاد hybridization بين المجس وشريط DNA الخاص بالجين المطلوب. يكشف عن موقع هذا الارتباط على لوح النيتروسيلولوز باستخدام تقنية (تصوير الإشعاع الذاتى Autoradiography) ذلك أن المجس مشع labelled كما سبق القول.

● بإدراك موقع الاتحاد على لوح النيتروسليولوز يمكن تحديد موقع المزرعة المحتوية على الجين في الطبق المحتوى على المزارع.

● تؤخذ هذه المزرعة منفردة ويجرى تنميتها في محلول حضان لمزيد من إكثار الجين المطلوب.

### طريقة الكشف عن تتابع الجزيئات المكونة لمادة الوراثة DNA

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

وتجدر الإشارة إلى أن ماكسام وجلبيرت A. Maxam and W. Gilbert من جامعة هارفارد كانوا قد ابتكروا طريقة أخرى للكشف عن تتابع النيوكليوتيدات فى الحمض النووى DNA. وبصفة عامة تعتبر الطريقتان سالفتا الذكر مجهدين وتستغرقان وقتاً طويلاً. وقد استطاعت الشركات العلمية المتخصصة ابتكار أجهزة تقوم آلياً Automated بكشف التتابعات فى حمض DNA بكفاءة وسرعة. وقد تم استخدام هذا الأسلوب لأول مرة فى عام ١٩٨٦. ويمكن التعرف على تفاصيل طريقة (سانجر) وطرق أخرى فى مجال البيولوجيا الجزيئية فى كتاب للمؤلف بعنوان (نحن والعلوم البيولوجية فى مطلع القرن الحادى والعشرين) إصدار دار المعارف.

### زراعة الخلايا الحيوانية Animal Cell Culture

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

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

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

L-Amino acids*		Vitamins		Miscellaneous	
(mM)		(mM)			
Arginine	0.1	Biotin	10 <sup>-3</sup>	Glucose	5mM
Cystine	0.05 (0.02)†	Choline	10 <sup>-3</sup>	Penicillin	0.005%#
Glutamine	2.0 (1.0) //	Folic acid	10 <sup>-3</sup>	Streptomycin	0.005%#
Histidine	0.05 (0.02)†	Nicotinamide	10 <sup>-3</sup>	Phenol red	0.0005%#
Isoleucine	0.2	Pantothenic acid	10 <sup>-3</sup>		
Leucine	0.2 (0.1)†	Pyridoxal	10 <sup>-3</sup>	For studies of cell nutrition	
Lysine	0.2 (0.1)†	Thiamine	10 <sup>-3</sup>	Dialyzed horse serum, 1%†	
Methionine	0.05	Riboflavin	10 <sup>-4</sup>	Dialyzed human serum, 5%	
Phenylalanine	0.1 (0.05)†				
Threonine	0.2 (0.1)†	<b>Salts'§</b>		For stock cultures	
Tryptophan	0.02 (0.01)†	<b>(mM)</b>		Whole horse serum, 5%†	
Tyrosine	0.1			Whole human serum, 10%	
Valine	0.2 (0.1)†	NaCl	100		
		KCl	5		
		NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> H <sub>2</sub> O	1		
		NaHCO <sub>3</sub>	20		
		CaCl <sub>2</sub>	1		
		MgCl <sub>2</sub>	0.5		

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

† For mouse fibroblast.

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

§ Conveniently stored in the refrigerator in two stock solutions, one containing NaCl, KCl, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> NaHCO<sub>3</sub> and glucose at 10 times the indicated concentration of each, and the second containing CaCl<sub>2</sub> and MgCl<sub>2</sub> at 20 times the indicated concentration.

// Conveniently stored as a 100mM stock solution; frozen when not in use.

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