

الفصل الخامس

الطرق العملية الحديثة ذات العلاقة بالكشف عن التغيرات فى المادة الوراثية

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

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

أولاً : الطرق المعتمدة على الكروموسومات :

١ - صباغة جسم بار :

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

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

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

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

٢ - تحضيرات الكروموسومات

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

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

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

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

ثانيا : طرق البيولوجيا الجزيئية *Methods of Molecular Biology*

فصل الحمض النووى DNA من الخلايا:

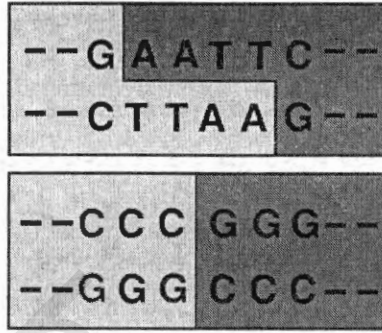
لفصل الحمض النووى DNA من الخلايا يعامل المعلق الخلوى بمركب *sodium dodecyl sulphate (SDS)* لتكسير الخلايا *Lysis* ثم تحضن *incubated* مع إنزيم *proteinase K* لتكسير جزيئات البروتين، ثم يضاف *phenol* ليستخلص به البروتينات، ويستبقى الحمض النووى فى الوسط المائى. ويجرى ترسيب للحمض النووى DNA باستخدام كحول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

إنزيمات القصر :

لقد فتح اكتشاف إنزيمات القصر *restriction enzymes* وتفاعل البلمرة المتسلسل (*PCR polymerase chain reaction*) الباب أمام تطور العديد من تقنيات البيولوجيا الجزيئية الأخرى. وسنعرض هنا باختصار أسس استخدام هاتين التقنيتين وعدد من التقنيات الأخرى التى تتضافر معا عندما يراد الكشف عن التغيرات غير السوية فى المادة الوراثية. كان لاكتشاف إنزيمات القصر *restriction enzymes* دور هام فى فتح آفاق متعددة أمام العلماء فى مجال تفهم آلية نقل الصفات الوراثية وتفهم آليات عمل الجينات، ومن ثم نشأ ما يسمى بالهندسة الوراثية وغير ذلك من تقنيات أحدثت ثورة فى مجال العلوم البيولوجية.

ففى عام ١٩٧٠ استطاع العالم الأمريكى سميث *Hamilton O. Smith* فصل إنزيم من بكتيريا اسمها العلمى هيموفيلاس إنفلونزى *Hemophilus influenzae* من السلالة (٥) يمكنه أن يقطع جزيء DNA عند تتابع معين من ستة نيوكليوتيدات، وقد سمي هذا الإنزيم *HindIII* (حروف الاسم مصدرها الكلمات التى تحدد جنس ونوع وسلالة البكتيريا). وقد نشر (سميث) وزملاء له نتائج الدراسة فى مقالين فى العدد رقم (٥١) لعام ١٩٧٠ فى مجلة *J.Mol.Biol.* وقد توالى فيما بعد اكتشاف ما يزيد على ٣٠٠ إنزيم فى أنواع مختلفة من البكتيريا حيث يقوم كل إنزيم منها بقطع جزيء DNA بطريقة معينة وعند تتابعات معينة من النيوكليوتيدات. وقد عرفت هذه الإنزيمات باسم (إنزيم القصر) *Restriction enzymes*. وقد فتح استخدام إنزيمات القصر آفاقا واسعة أمام تكنولوجيا توظيف المادة الوراثية. وقد حصل العالم (سميث) على جائزة نوبل فى الطب أو الفسيولوجيا فى عام ١٩٧٨ تقديرا لذلك.

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



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

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

وتختلف طريقة قطع إنزيم القصر لجزء حمض *DNA* فقد يكون القطع مستقيماً فيكون طرفا القطع كليين (*blunt or flush ends*)، وقد يكون القطع موروباً (*staggered*) حيث يكون طرفا القطع مائلين أى متدليين (*dangling* شكل ٨٠). وقد لوحظ أن التحام أطراف حمض *DNA* الموروبة يكون أسهل، مما دعا إلى وصف طرفى القطع بأنها (نهايات لاصقة) *Sticky ends*. وتجدر الإشارة إلى أن ترتيب النيوكليوتيدات السائبة فى أحد الشريطين هو نفسه فى الشريط الآخر ولكن فى الاتجاه المعاكس، ولذا فإن ترتيب النيوكليوتيدات على جانبي القطع يوصف بأنه (مقروء الاتجاهين) *Palindromic*. ويوضح الجدول الآتى أسماء بعض إنزيمات القصر وتتابع النيوكليوتيدات على شريط واحد من حمض *DNA* واسم البكتيريا التى تنتجها. وقد وضع الحرف *N* مكان النيوكليوتيد الذى لا يهم طرازه فى التتابع.

Recognition Sites of Representative Restriction Endonucleases

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

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

^bRecognition sites show the sequence of only one strand of double-stranded DNA. «N» represents any base.

ويوصف تقطيع المادة الوراثية بإنزيمات القصر بأنه (هضم) *Digestion*. ويمكن فصل هذه القطع بعضها عن بعض باستخدام تقنية تعرف باسم (الفصل الكهربائى فى الجيلاتين) *Gel electrophoresis*. وفيها 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*.

تفاعل البلمرة المتسلسل (*Polymerase Chain Reaction (PCR)*)

كثيراً ما يقتضى الأمر دراسة جزء معين من جزئ 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 في الدراسة المطلوبة، وتسمى عملية المضاعفة هذه باسم إكثار حمض *DNA* (*DNA amplification*) وإجراء عملية مضاعفة الجزيء يلزم فك شريطى الجزيء عن بعضهما، ثم تكوين شريط جديد أمام كل شريط قديم باستخدام إنزيم البلمرة *DNA-polymerase* حيث يرتبط كل شريط جديد مع الشريط القديم - وبذلك يصبح لدينا جزيئان من الحمض بدلا من جزيء واحد. وبتكرار هذا الإجراء عدة مرات يتكون لدينا بمتواليه هندسية عدد كبير من جزيئات الحمض - تشبه كلها الجزيء الأصلي الذى بدأنا به.

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

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

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

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

وقد تعاونت شركة *Cetus* مع شركة *Perkin-Elmer* فى أمريكا لإنتاج جهاز ذاتى التشغيل يقوم بمضاعفة جزيئات حمض *DNA* ويطلق على الجهاز اسم *Automated Thermal Cycler* (شكل ملون رقم ٢٢)، وهو يستخدم الآن على نطاق واسع فى معامل البحوث. وفى هذا الجهاز ترتفع درجة الحرارة آليا لإتمام عملية فك الشريطين. ثم تنخفض آليا لإتمام عملية بناء الشريط الجديد مرتبطا مع الشريط القديم ووفقا له، وهكذا فإذا بدأنا بمائة 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.

ويوضح شكل ملون (٨١) أن تخليق شريط جديد من حمض *DNA* أمام شريط قديم فى أنبوبة يقتضى أن نزود التفاعل بجزء من الشريط الجديد ليرتبط مع جزء مقابل من الشريط القديم - وعندئذ فقط يبدأ استكمال الشريط الجديد فى التكوين عقب الجزء الذى أضفناه نحن.

ويسمى الجزء من شريط حمض *DNA* الذى نضيفه لهذا الغرض باسم (بادئ *Primer*) - وعلى هذا فعلى أن نعرف تتابع القواعد النيتروجينية فى المنطقة المجاورة للجزء المطلوب مضاعفته حتى نختار له (البادئ) المناسب. كذلك فإن الطرف أوالنهاية الأخرى للجزء المراد مضاعفته تحتاج إلى بادئ آخر. وبذلك يتركز التضاعف فى المنطقة من جزيء *DNA* الواقعة بين (البادئين).

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

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

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

deoxythymidine triphosphate (dTTP)

deoxycytidine triphosphate (dCTP)

deoxyadenosine triphosphate (dATP)

deoxyguanosine triphosphate (dGTP)

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

- تفاعل البلمرة المتسلسل.

- إخضاع الجزء المضاعف إلى إنزيم القصر *MstII*.

- إجراء عملية الفصل الكهربى.

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

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

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

٣ - أما الجنين - موضوع البحث والمطلوب اتخاذ قرار بشأنه - فله شريطان بعيدان حجمهما *200bp* و *300bp*، وهذا يعنى أن المادة الوراثية للجنين قد تقطعت بإنزيم القصر لأنه لم تحدث فى أى من الجينين طفرة، أى إن المادة الوراثية لكل جين قد تقطعت إلى جزأين حجمهما *200bp* و *300bp*. إذن فالجنين محظوظ حيث إنه أخذ جينا سليما من الأب وجينا سليما من الأم، وبذلك فهو سليم بصورة نقية (AA) وبالتالي يكون القرار هو الإبقاء على هذا الحمل حتى تتم الولادة. وسنرى فى الفصل السابع من الكتاب مثالا آخر يخص مرض التليف الحوصلى *Cystic Fibrosis* وكيفية تشخيصه فى الأجنة بالطرق المعملية للبيولوجيا الجزيئية.

طريقة الكشف عن تتابع الجزيئات فى المادة الوراثية *DNA*

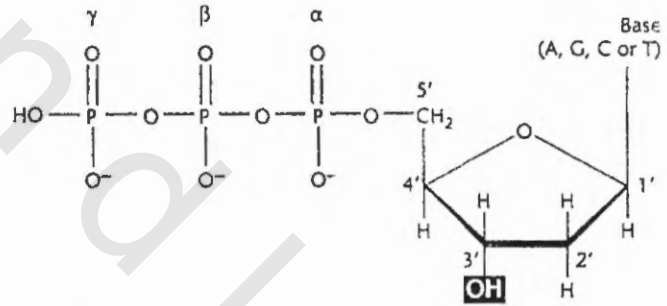
تكشف هذه الطريقة عن الطفرات الحادثة فى القواعد النيتروجينية المكونة للشفرات الوراثية، كما أنها تستخدم للكشف عن الجينوم.

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

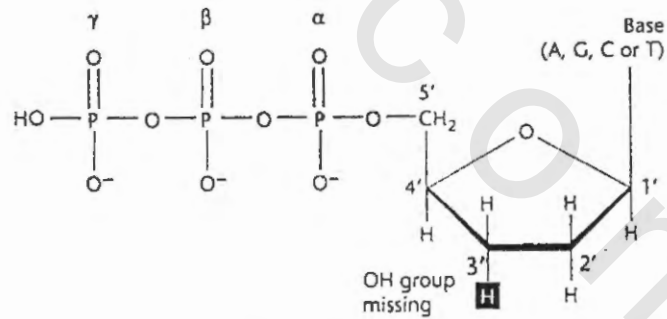
وعلى هذا فإن التعرف على تتابعات النيوكليوتيدات في جزيئات حمض *DNA* لكائن ما يعنى الكشف عن خصوصية المادة الوراثية لهذا الكائن. ويترتب على هذه المعرفة إمكانية غير مسبقة في التحكم في الصفات الموروثة للكائنات.

طريقة سانجر *Sanger Method*:

يعتبر الكشف عن تتابعات النيوكليوتيدات في المادة الوراثية لكائن ما عملاً علمياً رفيعاً. وتعرف الآن عدة طرق لكشف تتابع النيوكليوتيدات في حمض *DNA* نذكر منها طريقة العالم الشهير (فريدرك سانجر) *Frederick Sanger* من جامعة كمبردج. وكان (سانجر) قد حصل على جائزة نوبل في الكيمياء مرتين، الأولى في عام ١٩٥٨ عندما استطاع في عام ١٩٥٣ كشف ترتيب الأحماض الأمينية المكونة للإنسولين، والثانية حصل عليها في عام ١٩٨٠ لابتكاره مع زملاء له طريقة لكشف تتابع الجزيئات المكونة لحمض *DNA* والتي سنستعرضها هنا. وقد نشر ذلك في سلسلة من البحوث أذكر منها ما ورد في العدد (٩٤) لعام ١٩٧٥ من مجلة *J. Mol. Biol.*، وفي العدد (٧٤) عام ١٩٧٧ من مجلة *Proc. Nat. Acad. Sci.*، وفي العدد (٢١٤) لعام ١٩٨١ من مجلة *Science*. وقبل أن نتناول طريقة (سانجر) للكشف عن تتابع النيوكليوتيدات في حمض *DNA* أود أن أشير إلى نقطتين. فقد علمنا من قبل في موضوع تفاعل البلمرة المتسلسل (*PCR*) أن تضاعف حمض *DNA* يحتاج إلى وجود إنزيم *DNA-polymerase* وإلى بادئ *Primer* وإلى طرز (دى أوكسى نيوكليوتيدات) *deoxynucleotides* الأربعة لتستخدم في بناء شريط *DNA*. ومن الجدير بالذكر أن ارتباط كل دى أوكسى نيوكليوتيد جديد مع الدى أوكسى نيوكليوتيد السابق عليه في السلسلة الجديدة مشروط على وجود (*OH*) متصلة مع ذرة الكربون رقم (٣') في جزيء السكر الداخل في تكوين الدى أوكسى نيوكليوتيد السابق، فوجود مجموعة (*OH*) في الجزيء السابق ضروري لإضافة دى أوكسى نيوكليوتيد جديد (شكل ٨٤).



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



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

(شكل ٨٤)

الرسم العلوي للجزيء ذو التركيب الطبيعي
deoxynucleoside triphosphate

الرسم السفلي للجزيء الذي يستخدم لإنهاء بناء سلسلة الحمض النووي *chain terminator* ويتم الحصول عليه بحذف مجموعة *OH* من عند الموقع (٣') ولذا يعرف باسم *dideoxynucleoside triphosphate*

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

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

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

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

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

- باستخدام أحد إنزيمات القصر *A restriction enzyme* يتم تقطيع جزيء *DNA* إلى قطع *fragments* تتميز بأن لكل منها طرف يحمل نفس تتابعات الدى أوكسى نيوكليوتيدات، ولكن هذه القطع غير متساوية الطول بالطبع.
- تفصل هذه القطع عن بعضها حسب طول كل منها عن طريق الفصل الكهربائى باستخدام ألواح الجيلاتين.
- تستخلص قطع حمض *DNA* من شرائط الجيلاتين *DNA-elution*.
- تجرى مضاعفة *amplification* لكل مجموعة من قطع *DNA* على حدة باستخدام تقنية تفاعل البلمرة المتسلسل (*PCR*) وذلك فى وجود بادىء *primer* والذى أوكسى نيوكليوتيدات الأربعة وكمية قليلة من أحد الداى دى أوكسى نيوكليوتيدات (وليكن *ddATP*).
- ومن الجدير بالذكر أن البادىء سيحتوى على مجموعة (*OH*) عند ذرة الكربون رقم (3) لجزيء السكر مما يساعد على ارتباط أحد جزيئات النيوكليوتيدات المزود بها التفاعل.

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

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

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

طريقة ماكسام وجلبيرت *Maxam and Gilbert Method*

تجدر الإشارة إلى أن ماكسام وجلبيرت *A. Maxam and W. Gilbert* من جامعة هارفارد كانا قد ابتكرا طريقة أخرى للكشف عن تتابع النيوكليوتيدات في الحمض النووي *DNA* ونشرا بحثهما في العدد ٧٤ لعام ١٩٧٧ من مجلة *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. وتتحدد طريقة «ماكسام وجلبيرت» في الخطوات الآتية (شكل ٨٥ ب ملون):

- ١ - إكثار الجزء من الحمض النووي *DNA* المراد معرفة تتابعاته.
- ٢ - وسم *labelling* أحد طرفي قطع الحمض النووي بعنصر مشع وليكن ^{32}P .
- ٣ - تقسيم أجزاء الحمض النووي إلى أربع مجموعات.
- ٤ - استخدام مواد كيميائية معينة تخضع أجزاء الحمض النووي إلى تحليل كيميائي *Chemical degradation* وفق ضوابط معينة كما يلي:

- إخضاع المجموعة الأولى من قطع الحمض النووي *DNA fragments* إلى تحليل كيميائي يؤدي إلى كسر هذه القطع عشوائيا قبل القاعدة النيتروجينية *G*. سينتج عن ذلك قطع *DNA* متفاوتة الأطوال وذلك على حسب موقع القاعدة *G* التي انكسرت قبلها قطعة الحمض النووي.
 - إخضاع المجموعة الثانية من قطع الحمض النووي لتحلل كيميائي يؤدي إلى كسر هذه القطع عشوائيا قبل أى من القاعدتين *A+G* سينتج عن ذلك قطع *DNA* متفاوتة الأطوال وذلك على حسب موقع القاعدة *G* أو القاعدة *A* التي انكسرت قبل أى منهما قطعة الحمض النووي.
 - إخضاع المجموعة الثالثة من قطع الحمض النووي لتحلل كيميائي يؤدي إلى كسر هذه القطع عشوائيا قبل القاعدة النيتروجينية *C*. سينتج عن ذلك قطع *DNA* متفاوتة الأطوال وذلك على حسب موقع القاعدة *C* التي انكسرت قبلها قطعة الحمض النووي.
 - إخضاع المجموعة الرابعة من قطع الحمض النووي لتحلل كيميائي يؤدي إلى كسر هذه القطع عشوائيا قبل أى من القاعدتين *C+T* سينتج عن ذلك قطع *DNA* متفاوتة الأطوال وذلك على حسب موقع القاعدة *C* أو القاعدة *T* التي انكسرت قبل أى منهما قطعة الحمض النووي.
- ويلاحظ أنه في جميع الحالات يتم كسر كل قطعة *DNA* في موقع واحد فقط. وأن كل جزء ناتج يمتد من الطرف المشع حتى القاعدة النيتروجينية التي تسبق مباشرة القاعدة التي دمرت في عملية التحلل الكيميائي.
- ٥ - يجرى تفريد كهربى على لوح جيلاتيني *gel electrophoresis* للمجموعات الأربع من قطع الحمض النووي *DNA* بعد تمام إجراء التحلل الكيميائي.

سوف تنفصل قطع كل مجموعة عن بعضها حسب أطوالها لتكون شرائط *bands* يمكن مشاهدتها بتطبيق تقنية الإشعاع الذاتي *autoradiography* حيث إن قطع الحمض النووي مشعة كما سبق القول. ومن المتوقع بالطبع أن كل الشرائط *bands* التي سنشاهدها في الحارة *G* ستكون موجودة في الحارة *A+G*، كما أن كل باندات الحارة *C* ستكون موجودة في الحارة *C+T*. ويمكن بذلك قراءة تتابع النيوكليوتيدات برصد مواقع الباندات في الحارات الأربع على لوح الجيلاتين.

ملحوظة: القاعدة النيتروجينية المرتبطة بالعنصر المشع يتعذر إدراك طبيعتها بهذه التقنية لأن تحليل قطعة الحمض النووي قبل هذه القاعدة سيؤدي إلى عدم وجود مادة وراثية مرتبطة بالعنصر المشع وبالتالي عدم وجود شريط على لوح الجيلاتين.

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

هي قطع من شريط واحد من حمض *DNA*، يتكون كل منها من تتابع معين من النيوكليوتيدات تحمل النظير المشع (^{32}P Isotope)، وتجهز هذه المجسات للارتباط (أو للتهجين *hybridize*) مع شريط *DNA* ذي تتابعات نيوكليوتيدات متممة *Complementary Sequence* يستهدف التحقق من وجوده. ويوضح الشكل الملون (٨٦) عند أعلاه شريط المجس محقويا للنظير

المشع. ويوضح الشكل أيضا قطعًا من شريط حمض *DNA* التي يطلب البحث عند أحدها. وفي أسفل الشكل نجد المجس قد تهجن مع قطعة معينة - دون بقية القطع - وهي القطعة التي تحتوى على تتابع نيوكليوتيدات متممة لتلك التي يحملها المجس. ويتم التعرف على القطعة المطلوبة والمجس المرتبط بها عن طريق تقنية خاصة يتم بها الكشف عن المواد المشعة تعرف باسم (التشعيع الذاتي) *Autoradiography*. وغنى عن البيان أنه كلما كان المجس يحتوى على عدد أكبر من التتابعات كانت قدرته أكبر على الارتباط (فقط) بالشريط المطلوب.

وتعرف ثلاثة طرز من مجسات *DNA* :

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

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

(ب) مجسات جينومية (*Genomic Probes* :

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

(ج) مجسات قليلة النيوكليوتيدات (*Oligonucleotide Probes* :

وهي تتكون من عدد يتراوح بين ٢٠ - ٣٠ نيوكليوتيد.

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

ويوضح الرسم لوح جيلاتين استخدم للفصل الكهربى للعينات - من الأفراد الثلاثة - التى هجنت مع المجس الطبيعى، ولوح جيلاتين آخر استخدم للفصل الكهربى للعينات - من نفس الأفراد الثلاثة - هجنت مع المجس الذى يحمل طفرة الأنيميا المنجلية. وتوضح دراسة لوحى الجيلاتين أن :

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

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

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

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

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

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

• يجرى فصل كهربائى جيلاتينى *gel electrophoresis* لهذه القطع فتكون شرائط على لوح الجيلاتين *gel* يحتل كل منها موقعه حسب طوله.

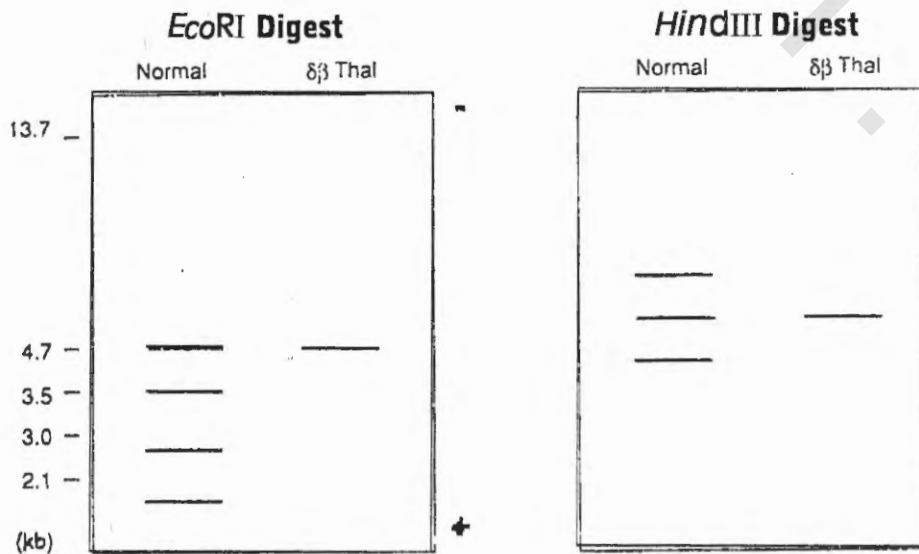
• تؤخذ صورة للوح الجيلاتين وعليه شرائط حمض *DNA*.

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

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

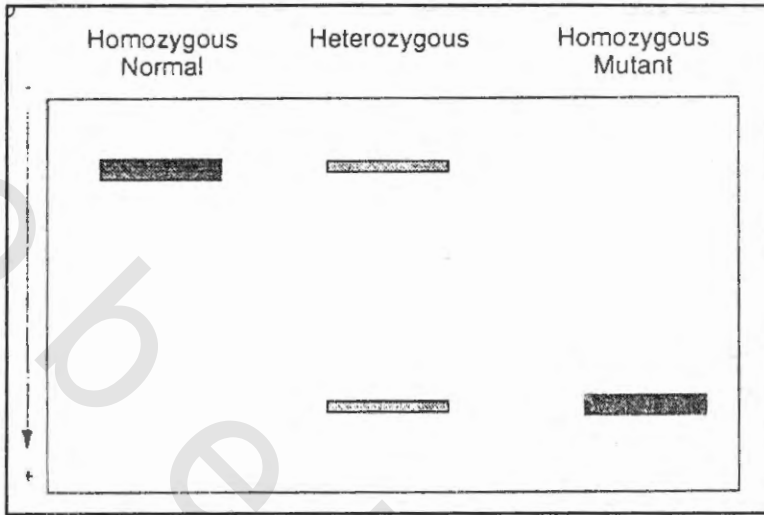
• تعمل شرائط حمض *DNA* على لوح نيترات السليولوز بمجس *probe* من شريط *DNA* الموسوم بالفوسفور المشع والذى يحمل التتابعات الكاملة لأحد شريطى جزيء *DNA* المراد البحث عنه، وبذلك يتم تهجينه *hybridization* أى اتحاده معه إن وجد. يغسل لوح السليولوز لإزالة المجسات غير المرتبطة. يستطيع الباحث مشاهدة موقع الجزيء المهجن وذلك باستخدام الضوء فوق البنفسجى. كما يمكن تصويره بفيلم أشعة إكس.

وفى النهاية تجرى مشاهدة موقع هذا الجزيء مع شرائط *DNA* التى سبق التقاط صورة لها وهى على لوح الجيلاتين. ولعل القارئ يلاحظ أن اسم العالم الذى ابتكر هذه الطريقة *Southern* يعنى (الجنوبى). ومن الطريف أن تسمية بعض التقنيات الأخرى ارتبطت باسم هذه التقنية، فهناك تقنية سميت (الالتقاط الشمالى) *Northern blotting* وهى خاصة بحمض *RNA*، كما أن هناك تقنية تعرف باسم (الالتقاط الغربى) *Western blotting* وهى خاصة بالبروتينات. وتجدر الإشارة إلى أن اسمى هاتين التقنيتين هما تعبيران رمزيان شاعا فى المعامل *Laboratory Jargon*، وليس هنا ضرورة لشرح تفصيلات هاتين التقنيتين. ويوضح شكل ٨٩ تجربتين أجريتا على الجلوبيين السوى والجلوبيين المصاب بالثلاسيميا (دلتا وبيتا) فى كل تجربة، حيث تم إخضاع الجلوبيين فى التجربة الأولى لإنزيم القصر *EcoRI* وفى التجربة الثانية لإنزيم القصر *HindIII*. وفى كل تجربة اختلف نظام الشرائط *DNA* فى الحالة السوية عن الحالة المرضية.



(شكل ٨٩)

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



(شكل ٩٠)

الفصل في الجيلاتين يعطى شرائط *bands* يمكن التمييز عن طريقها بين الأفراد الذين يحملون الجين السوي بصورة مزدوجة (نقية)، والأفراد الذين يحملون جين المرض بصورة هجينة (خليطة). والأفراد الذين يحملون جين المرض بصورة نقية.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

