الهندسة الوراثية

Genetic Engineering

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

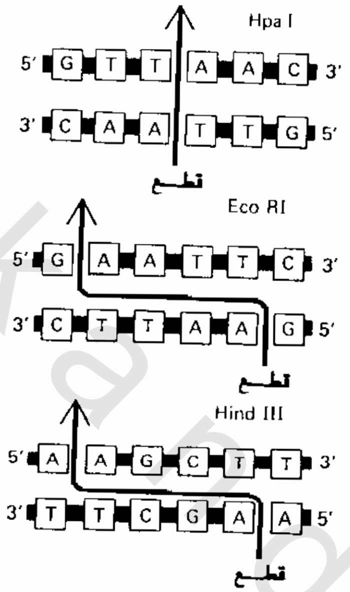
شهد منتصف السبعينيات ميلاد الهندسة الوراثية Genetic engineering أو تقنية الجين Gene Technology .

انزيمات القطع المحددة Restriction endonucleases :

توجد بعض انزيمات القطع الداخلى Endonucleases وهى تلك الانزيمات التى تقوم بقطع جزئ د ن أ عند تتابعات محددة من أزواج القواعد داخل الجزئ (بعكس انزيمات القطع الخارجى Exonuclease التى تقوم بقطع تتابعات طرفية من نهايات جزئ د ن أ).

وتعتبر إنزيمات القطع الداخلى الأداة الرئيسية فى بحوث د ن أ المعاد صياغته Recombinant DNA . وقد جاءت تسمية هذه الانزيمات فى الأصل بالانزيمات المحددة

Restriction Enzyme نتيجة لأن وجودها فى خلية معينة يحدد أو يمنع نمو البكتريوفاج بها . تقوم انزيمات القطع الداخلى بقطع د ن أ الى قطع صغيرة فى تتابع نوعى متخصص محدد وعلى العكس من معظم التفاعلات الانزيمية أو الكيماوية أو الفيزيائية التى تحدث قطعا عشوائيا فى جزئ د ن أ فإن هذه الإنزيمات المحددة والتى يبلغ عددها حوالى 200 انزيم تتعرف على تتابعات نوعية قصيرة مكونة من ٤-٦ أزواج من القواعد ويحدث كسر نوعى فيها كما فى الشكل (١١-١) .



الشكل (١١-١):

تتابعات النيوكلتيدات فى د ن أ التى يتم التعرف عليها بواسطة ثلاثة انزيمات قطع محددة شائعة الاستخدام وهى تتكون عادة من ست أزواج من القواعد كما أنها متماثلة Pallindromic .

ويوجد الى جانب هذه الانزيمات فى الخلية البكتيرية مجموعة مصاحبة من انزيمات المثيلة DNA methylases التى تقوم باضافة مجموعات ميثيل الى جزئ د ن أ البكتيرى حتى تحميه من أن يستخدم كمادة تفاعل فتقوم انزيمات القطع المحددة لنفس البكتريا بتكسيره وهضمه ذاتيا . وعلى ذلك فإن انزيمات ميثيلة د ن أ النوعية الموقع تكون ملازمة دائما لانزيمات القطع المحددة فى البكتريا . تسمى انزيمات القطع حسب نوع البكتريا التى تستخلص منها هذه الانزيمات كما فى الجدول (١١-١) .

Obeikandl.com

الجدول (١١-١) : بعض الانزيمات محددة القطع الداخلى والتتابعات النوعية التى تتعرف عليها وموقع القطع لكل منها .

الانزيم	التتابع المميز	المصدر البكتيرى
Bam H1	G↓GATCC CCTAG↑G	*Bacillus amyloliquef aciens H.*
Bg1 II	A↓GATCT TCTAG↑A	*Bacillus globigi*
Eco RI	G↓AATTC CTTAA↑G	*E. coli RY13*
Eco RII	↓CCTGG GGACC↑	*E. coli R245*
Hind III	A↓AGCTT TTCGA↑A	*Haemophillus influenzae Rd*
Hha I	GCG↓C C↑GCG	*Haemophillus haemolyticus*
Hpa I	GTT↓AAC CAA↑TTG	*Haemophilus parainfluenza*
Mst II	CC↓TNAGG GGANT↑CC	*Microcoleus strain*
Pst I	CTGCA↓G G↑ACGTC	*Providencia stuartil 164*
Taq I	T↓CGA AGC↑T	*Thermus aquaticus YT1*

* N= اى نوع من النيوكليتدات الأربعه

obeikandi.com

فمثلا انزيم Eco R1 يستخلص من بكتريا القولون *E. coli* وهكذا . تكون أول ثلاث حروف من اسم الانزيم مشتقة من أول حرف فى الجنس البكتيرى الذى يستخلص منه (E) والحرفين الأولين فى النوع البكتيرى (co) ، وقد يتبع ذلك اسم السلالة النوعية التى استخدمت فى الاستخلاص (R) ورقم لاتينى (I) يحدد أسبقية اكتشاف الانزيم . يتعرف كل انزيم على تتابع نوعى من أزواج القواعد فى جزئ د ن أ مكونا من ٤ – ٧ من أزواج القواعد . ويحدث كسرا محددا به (وتبين الأسهم فى الجدول (١١ – ١) مكان القطع بين القواعد لكل انزيم) وقد ينتج عن القطع نهايات مزدوجة السلسلة blunt ends كما فى حالة انزيم (Hpa1) أو نهايات متداخلة وحيدة السلسلة Sticky ends كما فى حالة انزيم BamH1 كما فى الشكل التالى :

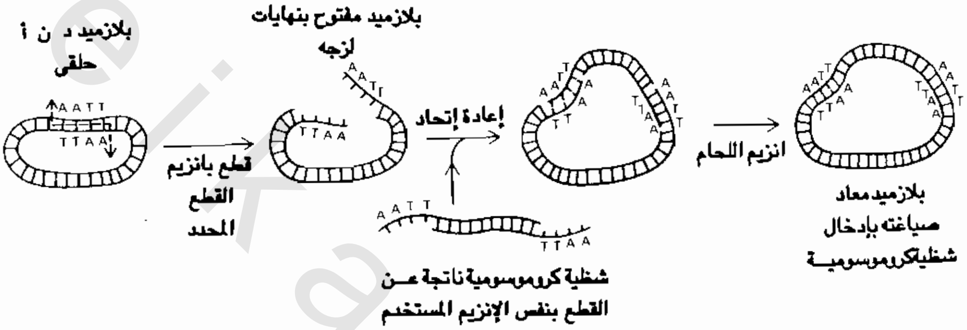
```
- G↓GATCC                       - G        GATCC-
             ——Bam H1——→                +
- CCTAG↑G                       - CCTAG        G-
                                   نهاية لزجة

- GTT↓AAC                       - GTT   +   AAC-
             ——Hpal——→
- CAA↑TTG                       - CAA       TTG-
                                   نهاية مزدوجة
```

ويرجع ذلك الى الميكانيكية التى يستخدمها الانزيم . وتعد النهايات اللزجة ذات فائدة كبيرة فى تكوين جزئ د ن أ هجينى معاد صياغته (الشكل ١١–٢) . يمكن فى حالة عدم الحصول على نهايات فردية لزجة staggered ends ، استخدام انزيم Terminal transfe-rase للحصول على ذيل فردى فى نهاية القطع المحددة وفى وجود عددمعين من نيوكلتيدات dATP لانتاج ذيل من عديد الادينين Poly A tail (طوله حوالى ١٠٠ نيوكلتيدة) على النهاية (´3) على د ن أ البلازميد بينما يمكن اضافة ذيل من عديد الثايمين Poly T بنفس الطول على نهاية د ن أ المرغوب اضافته الى البلازميد . ويتم بعد ذلك التقاء القطع عند الذيول المتكاملة بخاصية تزاوج القواعد base pairing ويتكون بينها روابط هيدروجينية

Obeikandi.com

وتستكمل عملية الالتحام بمساعدة انزيمات Polymerase و Ligase كما سبق الذكر (أنظر الشكل ١١-٢) . واذا افترضنا أن النيوكلتيدات تكون موزعة بتتابع عشوائى فى جزئ ما من د ن أ فإنه من الممكن حساب معدل تكرار القطع الذى يحدثه انزيم معين فى طول معين من د ن أ ، إذ أنه لكل موقع فى جزئ د ن أ يكون هناك ٤ احتمالات : (T , G , C , A) وعلى ذلك فإن انزيم القطع الذى يتعرف على ٤ أزواج من القواعد سيحدث قطع (فى المتوسط) مرة كل ٢٥٦ زوج من القواعد (٤ ^٤^) . فى حين أن الانزيم الذى يتعرف على ٦ أزواج من القواعد سيقوم بالقطع كل ٤٠٩٦ زوج نيوكلتيدى (٤ ^٦^) .



الشكل (١١-٢):

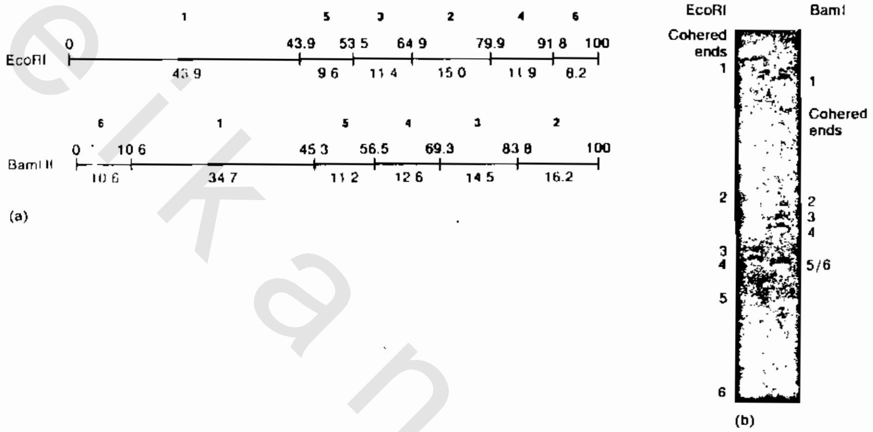
تمكن النهايات اللزجة الناتجة من بعض أنواع انزيمات القطع المحددة من التحام قطع من د ن أ ببعضها حسب قانون تزاوج القواعد المكملة . شظايا د ن أ المتصلة بهذه الكيفية يمكنها أن تكون روابط تساهمية قوية بمساعدة انزيم الليجيز . ويبدو فى الشكل تكوين بلازميد معاد صياغته باضافة د ن أ كروموسومى اليه .

ونتيجة لذلك فإن قطعة ما من د ن أ ستحتوى على مواقع خطية مختلفة ومميزة للأنزيمات المختلفة . وبالتالى يمكن رسم خرائط القطع المحدد Restriction maps كما فى الشكل (١١-٣) . وعند هضم د ن أ بانزيم قطع معين فإن نهايات جميع القطع الناتجة ستكون محتوية على نفس التتابع النيوكلتيدى . ويمكن عزل القطع الناتجة باستخدام تقنية التفريد الكهربى باستخدام جيل الاجاروز Agarose كما سيأتى بعد . وتعد هذه الخطوة أساسية فى الكلونة كما تعتبر أحد الاستخدامات الرئيسية لهذه الانزيمات .

يمكن بالاستخدام الصحيح لهذه الانزيمات واختيار الانزيم المناسب الحصول على شظايا

opeikandi.com

قصيرة نسبيا من د ن أ تحتوى على جين معين ويمكن فصل هذه الشظية عن بقية الشظايا غير المرغوبة بطريقة التفريد الكهربى .



الشكل (١١-٣):

(أ) خرائط القطع المحددة الناتجة عن انزيمى القطع المحدد Eco RI و Bam HI . تبين الخطوط الرأسية مواقع القطع كماتدل الأرقام الداكنة على النسبة من الطول الكلى لجزئ د ن أ مقاسه من النهاية اليسرى (5') وتدل الأرقام الباهتة على طول كل شظية معبرا عنها كنسبة من الطول الكلى .

(ب) صورة التفريد الكهربى لجيل الشظايا الناتجة من الهضم بإنزيمى Eco RI و Bam HI لجزئ د ن أ، تدل الأرقام على الشظايا حسب طولها بحيث تكون رقم 1 أطولها ورقم ٦ أقصرها . وتدل هذه الأرقام تدل على الأرقام الموجودة على الخريطة فى أ .

بالاضافة ال هذه المجموعة من انزيمات القطع المحدد توجد عدة انزيمات تقوم بأدوار رئيسية فى مجال الهندسة الوراثية ؛ ويلخص الجدول (١١-٢) دور هذه الانزيمات فى بحوث د ن أ المعاد صياغته Recombinant DNA .

الانزيم	التفاعل	الدور الأساسي
١. انزيم الفوسفاتيز القاعدى Alkaline phosphatase	نزع مجموعة الفوسفات من النهاية 5' من ر ن أ أو د ن أ	التخلص من مجاميع P04 - ´5 قبل التعليم بالكينيز لمنع الالتحام الذاتى Self-ligation
٢. BAL 31 nuclease	تحليل كل من النهايتين ´3 ، ´5 فى جزئ د ن أ	تقصير مضطرد فى جزئ د ن أ
٣. انزيم لحام د ن أ DNA ligase	يساعد فى الربط بين جزيئات د ن أ	توصيل جزيئات د ن أ ببعضها
٤. DNA Pol I	بناء د ن أ مزدوج السلسلة من د ن أ أحادى السلسلة	بناء د ن أ المزدوج السلسلة وعمل ثغرة للترجمة nick-translation
٥. DNase I	تحت الظروف المناسبة ينتج قطع وحيدة السلسلة في د ن أ	ثغرة الترجمة - وعمل خريطة لمواقع التتابعات فائقة الحساسية
٦. Exonuclease III	نزع نيوكلتيدات من النهاية ´3 لجزئ د ن أ	دراسة تتابعات قواعد د ن أ وعمل خريطة التفاعل بين د ن أ والبروتين
٧. λ Exonuclease	نزع نيوكلتيدات من النهاية ´5 لجزئ د ن أ	دراسة تتابعات قواعد د ن أ DNA sequencing
٨. Polynucleotide kinase	نقل الفوسفات الطرفية (موقع γ) من ATP الى مجموعات 5´-OH فى د ن أ أو ر ن أ	تعليم DNA أو RNA بالفوسفور المشع P^{32} .
٩. انزيم النسخ العكسى Reverse Transcriptase	بناء DNA على قالب RNA	بناء cDNA من mRNA وفى دراسة خريطة النهاية ´5 من RNA
١٠. S1 nuclease	هدم د ن أ وحيد السلسلة	ازالة عروة دبوس الشعر Hairpin فى عملية بناء cDNA . وفى دراسة خريطة mRNA (من كلا النهايتين ´5 ، ´3).
١١. Terminal transferase	اضافة نيوكلتيدات الى النهاية ´3 من جزئ د ن أ	اضافة ذيل متعدد متجانس Homopolymer (أى مكون من قاعدة واحدة متكررة مثل Poly A)

opeikanda.com

الكلونة Cloning

يمكن تعريف الكلون بأنه عدد كبير من الجزيئات أو الخلايا المتطابقة التى تنشأ من أصل واحد يمكن عن طريق الكلونة انتاج أعداد كبيرة من جزيئات د ن أ المتماثلة التى يمكن تعريفها وتمييزها أو استخدامها فى أغراض أخرى. تعتمد هذه التقنية على حقيقة أن جزيئات د ن أ الهجينية « الكيميرى » يمكن تكوينها فى ناقلات الكلونة cloning vector ، التى تكون عادة أما بلازميد بكتيرى أو فاج أو كوزميد Cosmid الذى يستمر بعد ذلك فى التناسخ فى خلية مضيفة host cell ولكن تحت تأثير نظم التحكم الخاصة بهم . وبهذه الطريقة يمكن الحصول على أعداد هائلة من نسخ الجين .

أنواع ناقلات الكلونه Cloning Vectors

البلازميدات:

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

الفاج:

يتكون د ن أ الفاج من جزئ خطى من د ن أ الذى يمكن فيه ادخال القطع المرغوبة من د ن أ الجديد (الأجنبى) فى عدة مواقع للقطع الانزيمى المحدد . يجمـع د ن أ الهجينـى (الكيميرى) بعد أن يستكمل الفاج دورة التحلل للبكتريا Lytic cycle وينتج وحدات فاج ناضجة معدية . والميزة الرئيسية للناقلات من نوع الفاج هى أنه بينما يمكن للبلازميد استقبال أو ادخال شظية د ن أ بطول حوالى ٦ - ١٠ كيلو قاعدة ، فإن الفاج يمكنه استيعاب شظايا د ن أ الأجنبى بطول يتراوح من ١٠- ٢٠ كيلو قاعدة ، ويرجع ذلك الى أن ما يمكن لحجم رأس الفاج أن تستوعبه يكون محدودا .

: Cosmid

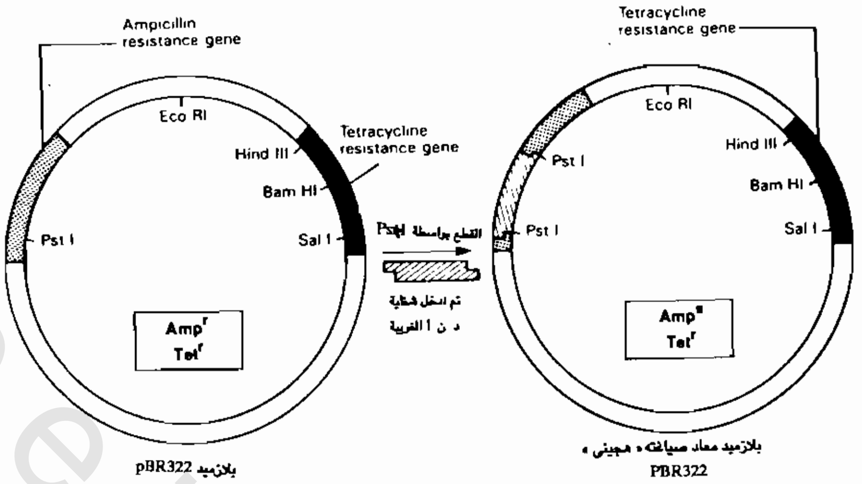
وهى مجموعة من الناقلات يمكنها أن تستقبل شظايا أطول من د ن أ وهى تجمع بين أفضل مميزات البلازميد والفاج معا .

والكوزميد عبارة عن بلازميد يحتوى على تتابع د.ن.أ. المسمى مواقع Cos (Cos sites) المطلوبة لتعبئة د ن أ لامبدا فى حبيبة الفاج . وتنمو هذه الناقلات فى صورة بلازميد فى البكتريا ، . ولكن حيث أن كثيرا من د ن أ اللامبدا قد يتم استبعاده فإنه يمكن ادخال قطع أكبر من د ن أ الكيميرى فى رأس الحبيبة الفيرسية . ويمكـن للكوزمـيد أن يستـوعب قطـع د ن أ بطول من ٣٥ إلى ٥٠ كيلو قاعدة . ويبين الجدول (١١-٣) مقارنة بين هذه الناقلات :

جدول (١١-٣) بعض الناقلات الشائعة الاستخدام فى الكلونة .

الناقل	حجم د.ن.أ. الذى يمكن ادخاله (Kb)
Plasmid pBR 322	١٠ - ,٠١
Lambda Charon 4 A	٢٠ - ١٠
Cosmids	٥٠ - ٣٥

يمكن أثناء عملية ادخال د.ن أ الى منطقة فعالة للناقل أن يحدث تداخل مع عمل أو نشاط هذه المنطقة ولذلك يجب الحذر من الاخلال بأحد الوظائف الضرورية للناقل . الا أن هذا المفهوم يمكن استغلاله أيضا للتوصل الى تقنية إنتخابية . اذ يحتوى البلازميد pBR322 على جين المناعة ضد المضاد الحيوى Tetracyclin (tet) ، وكذلك الجين الخاص بالمناعة ضد Ampicillin (amp). ويستخدم عادة موقع واحد للانزيم Pst 1 داخل جين المقاومة للامبسلين (amp) كموقع إدخال لقطعة من د ن أ الغريب . وبالاضافة الى أن هذا الموقع يحتوى على نهاية لزجة ، فإن د ن أ المضاف فى هذا الموقع سيحدث خللا فى جين المقاومة للأمبسلين مما يؤدى الى أن تكون الخلية البكتيرية الحاملة لهذا البلازميد حساسة للامبسلين كما فى الشكل (١١-٤) . وبالتالى يمكن التمييز بين البلازميد الأصلى والبلازميد الهجينى بفقد الأخير لصفة المقاومة للأمبسلين مع احتفاظه بالمقاومة للتتراسيكلين . ويمكن التأكد من حدوث الادخال عن طريق معرفة الفرق فى الحجم بين البلازميد الأصلى والبلازميد الهجينى بطريقة التفريد الكهربى حيث يكون البلازميد الأخير أكبر حجما عن الناقل الأصلى .

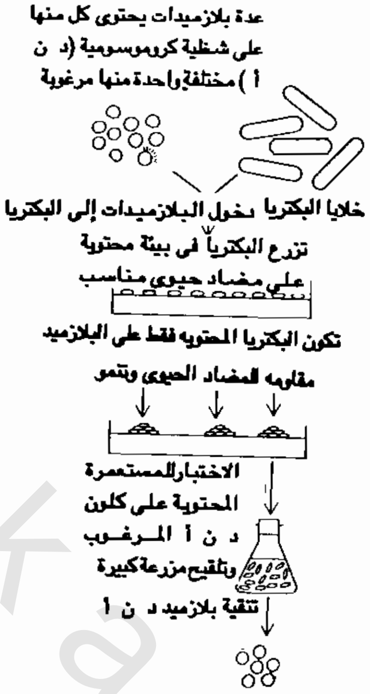


الشكل (١١-٤):

طريقة التعرف على البلازميد المعاد صياغته بإدخال شظية د ن أ باستخدام انزيم القطع Pst 1 يحدث خلل فى الجين الخاص بالمقاومة للامبسلين مما يفقده المقاومة لهذا المضاد الحيوى عند تنمية البكتريا فى بيئة محتوية على الأساس .

وبمجرد الحصول على البلازميد المحتوى على قطعة د ن أ المضافة والتى قد تكون أحد الجينات البشرية ، والتى يطلق عليها فى هذه الحالة د ن أ المعاد صياغته Recombinant DNA يتم ادخاله الى خلية بكتيرية (بطريقة العدوى infection) حيث تحدث دورات انقسام للخلية البكتيرية ومعها دورات متعددة مستقلة من النمو والانقسام للبلازميد بحيث يمكن لميكانيكية التناسخ للبلازميد أو الفاج انتاج $١٠^{١٢}$ جزئ د ن أ معاد صياغته مماثل للجزئ الذى بدأنا به فى فترة أقل من يوم واحد مما يزيد عدد وحدات الجين البشرى المهجن مع البلازميد بنفس المعدل كما فى الشكل (١١-٥) .

obeikandl.com



الشكل (١١-٥):

تنقية واكثار تتابع نوعى من د ن أ بعملية الكلونة Cloning فى البكتريا .

مكتبة د ن أ (بنك الجينات) :

يمكن باستخدام انزيمات القطع المحددة والأنواع المختلفة لناقلات الكلونة تعبئة الجينوم القابل لكائن ما فى ناقلات . يطلق على المجموعة المكونة من هذه الكلونات المعاد صياغتها اسم المكتبة . يمكن تكوين مكتبة جينوم من جميع قطع د.ن.أ. المأخوذة من خط خلايا أو نسيج معين . فى حين تمثل مكتبة cDNA، د ن أ المنسوخ على mRNA .

يمكن انتاج مكتبة الجينوم باجراء عملية هضم جزئى لـ د ن أ بانزيم قطع يتميز بارتفاع معدل نشاطه القطعى مثل Sau III A . والغرض من ذلك هو الحصول على شظايا د ن أ طويلة نسبيا مما يضمن أن معظم الجينات ستكون سليمة ولم يحدث لأى منها أى تجزئة

نتيجة القطع .

يفضل استخدام الفاج كناقل فى مثل هذه المكتبات لأنها تسمح بادخال شظايا د ن أ كبيرة نسبيا (حوالى ٢٠ كيلو قاعدة) وحيث أن الهدف هو الحصول على مكتبة كاملة فإن عدد الشظايا المطلوبة يكون متناسبا عكسيا مع حجم الشظية وطرديا مع حجم الجينوم كما فى الجدول (١١-٤) .

جدول (١١-٤) : تكوين مكتبة جينوم كاملة* .

المصدر	عدد شظايا د ن أ فى المكتبة الكاملة
بكتريا القولون *E. coli*	١٥٠٠ شظية
الخميرة *Yeast*	٤٥٠٠ شظية
الدروسفلا *Drosophila*	٥٠٠٠٠ شظية
الثدييات *Mammals*	٨٠٠٠٠٠ شظية

تمثل الأعداد المذكورة فى الجدول عدد شظايا د ن أ (كلونات مستقلة) اللازمة للوصول الى احتمال ٩٩ ٪ لإمكان الحصول على تتابع معين من د ن أ فى مكتبة د ن أ المعاد صياغته بمتوسط طول الشظية المدخلة ٢ × ١٠ ^٤^ نيوكلتيدة . يرجع الاختلاف فى العدد الى اختلاف عدد الجينات التى يحملها كل كائن ممثل فى الجدول وتحسب عدد الكلونات اللازمة من المعادلة :

$$N = \frac{\ln(1-p)}{\ln(1-f)}$$

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

$$N = \frac{\ln(1-0.99)}{\ln\left(1-\left[\frac{2 \times 10^{4}}{3 \times 10^{9}}\right]\right)}$$

وميزة تكوين مكتبة مكونة من شظايا د ن أ طويلة نسبيا تبدو واضحة اذا كانت المعادلة أعلاه تحتوى على شظايا بحجم أقل أى ٥ × ١٠ ^٣^ بدلا من ٢ × ١٠ ^٤^ .

وعلى ذلك فإن مكتبة الجينوم البشرى المحتوى على 10^{6} شظية د ن أ معاد صياغتها بطول كبير نسبيا (2×10^{4}) ستصل فرصة الحصول عليها كاملة الى ٩٩ ٪ وبالتالى فان احتمال الحصول على جين وحيد النسخة سيكون مرتفعا .

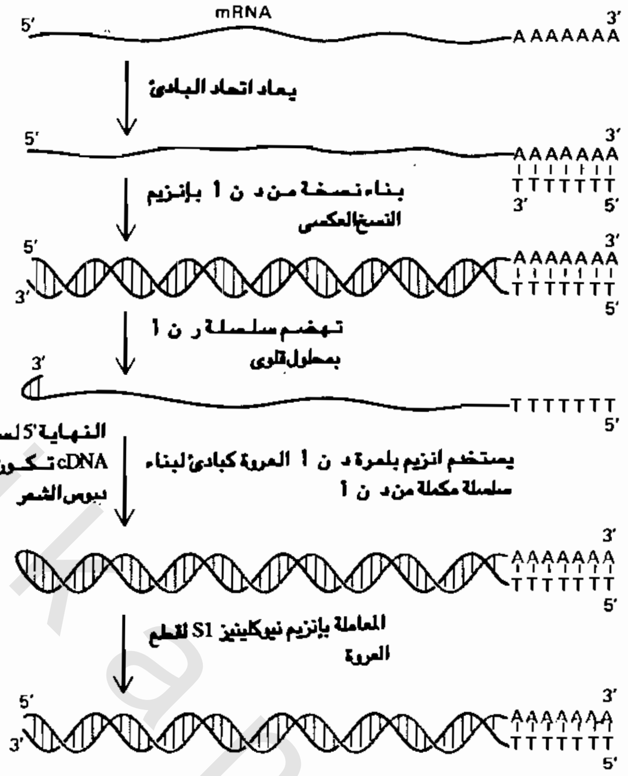
يطلق على هذه الطريقة اسم طريقة Shot gun أى أننا فى قطع جميع الجينوم بحثا عن الجينات المرغوبة كمن يصوب بالبندقية على هدف غير معلوم . كما أن هذه التقنية تستغرق وقتا طويلا وعملا متصلا والنتيجة قد لاتكون مضمونة اذ قد نحصل على شظايا لاشفرية كثيرة ضمن الأعداد الهائلة من الشظايا الموجودة فى مكتبة الجينوم .

مكتبة cDNA :

اقترحت تقنية بديلة للتقنية السابقة تعتمد على كلونة د ن أ المنسوخ cDNA . حيث يقتصر الاختيار على تلك التتابعات من د ن أ التى يمكن نسخها الى ر.ن.أ. والتى يفترض أنها تمثل جينات معينة . ويحدث ذلك عن طريق استخلاص mRNA من الخلايا المتخصصة فى انتاج بروتين معين بكميات كبيرة حيث تزداد نسبة mRNA النوعى الذى يشفر لهذا البروتين . ثم يتم انتاج نسخ من د ن أ المنسوخ Complementary DNA (cDNA) على قالب من ر ن أ المراسل mRNA باستخدام انزيم النسخ العكسى Reverse transcriptase . ويتم تحويل جزيئات د ن أ الوحيدة السلسلة الناتجة الى جزيئات مزدوجة بفعل انزيم بلمرة د ن أ. DNA Poly I ثم يتم بعد ذلك ادخال هذه الجزيئات الى البلازميد ثم تجرى عملية الكلونة كما فى الشكل (١١-٦) .

يسمى كل كلون متحصل عليه بهذه الطريقة كلون د ن أ المنسوخ cDNA فى حين تسمى المجموعة الكاملة للكلونات المشتقة من تحضير واحد من mRNA . مكتبة د ن أ. المنسوخ cDNA Library . وهناك فرق هام بين كلونات د ن أ الجينوم وكلونات د ن أ. المنسوخ كما هو موضح فى الشكل (١١-٧) .

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



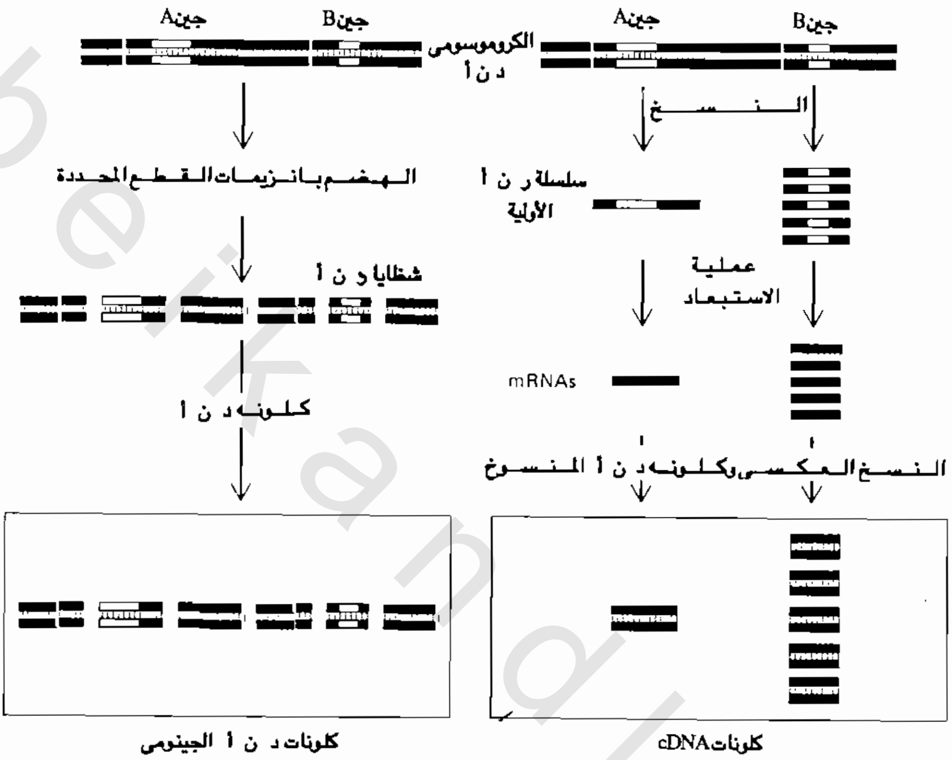
الشكل (١١-٦): حلزون مزدوج من cDNA كنسخة من mRNA القالب الأصلي

بناء د ن أ المنسوخ cDNA . حيث يتم تكوين نسخة من cDNA على قالب من ر ن أ باستخدام انزيم النسخ العكسي بحيث يتكون هجين د ن أ / ر ن أ ثم يعامل الهجين بمحلول قلوى للتخلص من سلسلة ر ن أ ثم يتم بناء نسخة د ن أ المكملة لسلسلة ر ن أ باستخدام انزيم بلمرة د ن.أ. ويلاحظ أن كلا من الانزيمين يحتاج الى بادئ لبدء البناء .

توجد عدة مميزات لاستخدام مكتبة د ن أ المنسوخ cDNA لكلونة الجينات . أولا : أن كثير من البروتينات يتم انتاجها بكميات كبيرة جدا بواسطة الخلايا المتخصصة ، مما يعنى أن mRNA الذى تنتجه هذه الخلايا للترجمة لهذه البروتينات سيكون وفيرا لدرجة أن مكتبة cDNA المحضرة من الخلايا ستكون غنية جدا فى جزيئات د ن أ المنسوخ cDNA الذى يشفر للبروتينات النوعية كما فى الشكل أعلاه . أن وفرة cDNA المرغوب فيه فى المكتبة يقلل

obeikandl.com

بشكل كبير مشكلة التعرف على الكلون المرغوب فى المكتبة . فعلى سبيل المثال نجد أن الهيموجلوبين ينتج بكميات كبيرة فى خلايا الدم الحمراء النامية ولهذا السبب فإن جينات الجلوبين كانت من بين أول الجينات التى تم كلونتها .



الشكل (١١-٧):

شكل تخطيطى للفروق بين كلونات د ن أ المنسوخ cDNA وكلونات د ن أ الجينومى . فى هذا المثال يتم نسخ الجين A بتكرار منخفض فى حين يتم نسخ الجين B بتكرار مرتفع . وتتم عملية الربط Splicing من كلا النوعين من سلاسل ر ن أ الأولية الناتجة لازالة انترون واحد لتكوين ر ن أ الناضج mRNA .

والميزة الثانية لكلونات cDNA أنها تحتوى على التتابعات الشفرية فقط Exons بدون الانترونات ، وعلى ذلك فإذا كان الهدف من الكلونة هو التوصل الى تتابع الأحماض الأمينية للبروتين من تتابع القواعد فى د ن أ الموازى أو لانتاج البروتين بكميات كبيرة بدفع الجين

obeikandl.com

المكلون إلى التعبير فى خلية البكتريا أو الخميرة ، فإنه من الأفضل أن نبدأ باستخدام cDNA لأن البكتريا أو الخميرة ليس باستطاعتها اجراء عملية استبعاد الانترونات مما يسبب مشكلة عند استخدام الكلون الجينومى .

تعتبر مكتبات الجينوم ومكتبات د ن أ المنسوخ مصادر لاحد لها للاستخدام فى البحوث ويتوفر العديد منها حالياً من مصادر تجارية .

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

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

وحيث أن تلك البوليسومات ستحتوى أيضا على mRNA الذى يشفر لذلك البروتين فإنه يمكن اكثار جزيئات mRNA المرغوبة الى أكثر من الف ضعف .

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

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

يجرى التعرف على تلك التتابعات من cDNA النادرة التى تفشل فى العثور على جزيئات مكملة من mRNA للتزاوج معها والتى تمثل فى الغالب تتابعات mRNA الموجودة فقط فى الطراز الأول من الخلايا . يتم فصل هذه التتابعات غير المتزاوجة وتنقيتها بطرق بيوكيماوية سهلة والتى تتضمن فصل الأحماض النووية وحيدة السلسلة عن مزدوجة السلسلة كما فى الشكل (١١-٨) .

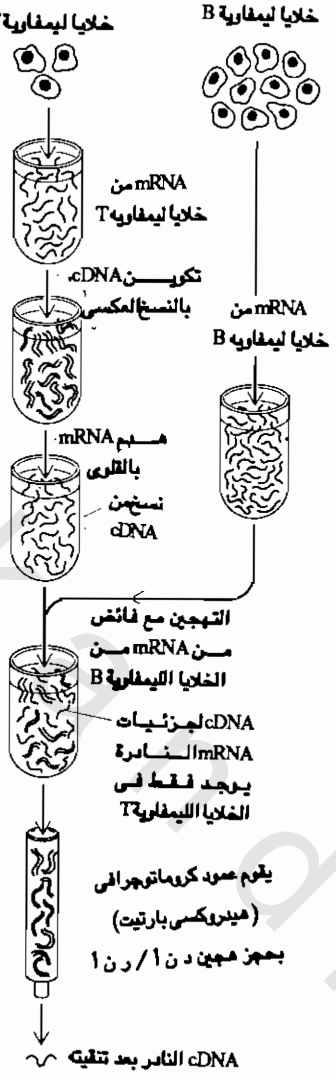
التهجين مع منقب معلم بالاشعاع Radioactive Probe للتعرف على الكلونات المرغوبة فى مكتبة الجينات:

أن أهم مشكلة فى عملية كلونة الجين تتركز فى التعرف على المجموعات النادرة من الكلونات التى تحتوى على شظية د ن أ المرغوبة . وتكون هذه المشكلة أشد صعوبة بصفة خاصة فى مكتبة الجينوم حيث قد يتطلب الأمر ضرورة التعرف على خلية واحدة بكتيرية من مليون خلية تحتوى على جين بشرى مكلون مرغوب .

والتقنية الشائعة الاستخدام عبارة عن نوع من التهجين فى الموضع *In situ* hybridiza-tion الذى يعتمد على خاصية تزاوج القواعد المكملة فى جزيئات الأحماض النووية ويستخدم فى هذه التقنية منقب معلم بالاشعاع .

المنقبات Probes :

هى عبارة عن مجموعة من الجزيئات التى يمكن استخدامها لاستكشاف « Probing » المكتبات الوراثية بحثا عن جين نوعى أو جزئ cDNA أو للتعريف والتقدير الكمى لتتابعات من د ن أ أو ر ن أ التى يتم فصلها بطرق التفريد الكهربى على جيل من الاجاروز . والمنقب عبارة عن شظية من DNA أو RNA معلمة بالفوسفور المشع (^{32}P) ولكى يكون المنقب فعالا يجب أن يتعرف على تتابع مكمل . يمكن استخدام cDNA الذى تم بناؤه على قالب نوعى من mRNA لمسح مكتبة cDNA بحثا عن قطع أكبر من cDNA أو لمسح مكتبة جينوم لاستكشاف والتعرف على تتابع مكمل فى المنطقة الشفرية للجين .

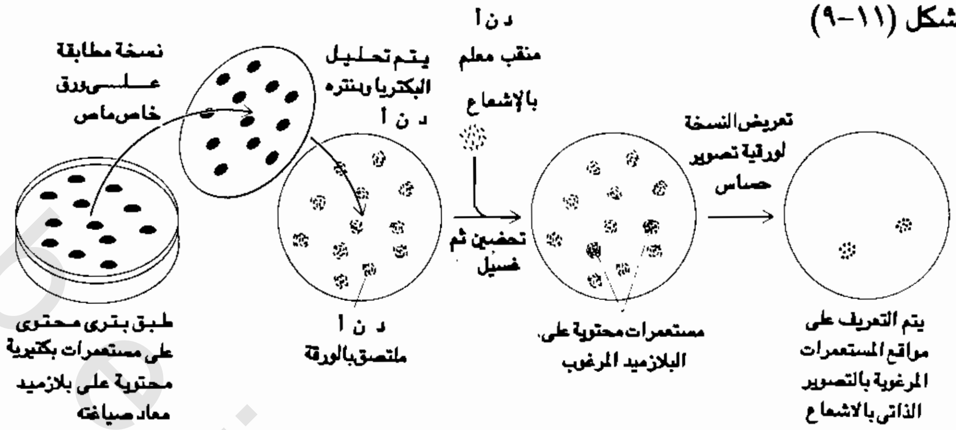


الشكل (١١- ٨):

استخدام طريقة التهجين الطرحى لتنقية الكلونات النادرة من cDNA التى يوجد لها mRNA فى الخلايا الليمفاوية من النوع T ولكن ليس فى النوع B .

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

بالقلوى ثم يتم تحضينها مع منقب مشع يحتوى على جزء من تتابع الجين المستهدف كما فى الشكل (١١-٩)



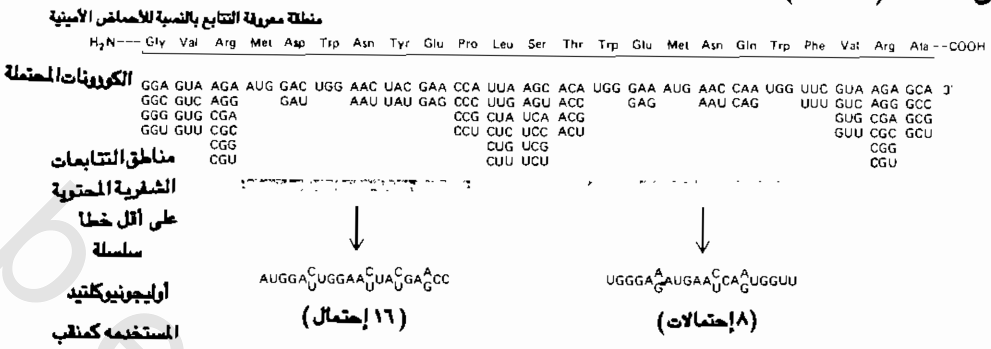
الشكل (١١-٩):

طريقة نقل النسخة المطابقة Replica plating للتعرف على عزل مستعمرة بكتيرية تحتوى على كلون د ن أ. مرغوب حيث تنمو كل بكترية محتوية على بلازميد معاد صياغته الى مستعمرة بخلايا متطابقة تظهر كبقع بيضاء فى البيئة . تعمل نسخة مطابقة بضغط ورقة ترشيح ماصة على سطح البيئة ثم تعامل النسخة المطابقة بالقلوى (لتفكيك وتحليل الخلايا وفتحها وبنترة د ن أ البلازميد) ثم التهجين مع منقب من د ن أ عالى الاشعاع ويتم تحديد المستعمرات التى استجات للتهجين بالتصوير بالاشعاع الذاتى .

وإذا استدعت الضرورة ، يمكن اجراء مسح لملايين المستعمرات البكتيرية بهذه الطريقة للتوصل إلى الكلون الذى يعمل هجين مع المنقب .

وتعتمد الطريقة التي يتم انتاج المنقب بها على المعلومات المتاحة عن الجين المطلوب كلونته. وفى كثير من الأحيان يكون البروتين المستهدف قد تم تمييزه بالطرق البيوكيماوية وجرى تنقيته بكميات صغيرة . وحتى لو تم الحصول على ميكروجرامات قليلة من البروتين النقى فإنها ستكفى لتحديد تتابع الثلاثين حامض أمينى الأول فى سلسلة متعدد الببتيد . وبمعلومية هذا التتابع يمكن معرفة التتابع الموازى للقواعد النتروجينية باستخدام معلومات الشفرة الوراثية . يتم بعد ذلك بناء مجموعتين من سلاسل د ن أ الأوليجو (القصيرة الطول) والتى يتكون كل منها من حوالى ٢٠ نيوكلتيده . ويتم البناء بالطرق الكيماوية ويتم تعليمها بالاشعاع (^{32}P) .

وتختار مجموعتى د ن أ المنقب لتتزاوج مع أجزاء مختلفة من التتابعات الجينية المتنبأ بها كما فى الشكل (١١–١٠) .



الشكل (١١-١٠):

اختيار مناطق معروف فيها تتابع الأحماض الأمينية لتكوين منقب تركيبى قصير السلسلة النيوكلتيـدية (أوليجو) . وسوف تشفر سلسلة قصيرة واحدة للبروتين ؛ إلا أن ترادفيه الشفرة الوراثية ستجعل التتابعات المختلفة تعطى نفس تتابع الأحماض الأمينية . وسوف يكون من المستحيل مقدما معرفة ايهما هو التتابع الصحيح ، ولذلك تختار التتابعات المحتوية على أقل احتمالات خطأ كما هو مبين ، وبعد انتاج السلاسل الأوليجو يتم تعليمها بالاشعاع لاستخدامها كمنقب فيما بعد .

والمستعمرات التى يمكنها تكوين هجين مع كلا المجموعتين من منقبات د ن أ تكون لديها فرصة أكبر لأن تحتوى على الجين المرغوب ويتم الاحتفاظ بها لتعريفها واستخدامها كما سيأتى بعد .

المشى على الكروموسوم «Chromosome walking» :

يسمح استخدام كلونات د ن أ المتداخلة overlapping بامكان المشى على الكروموسوم الى أن نصل الى الجين المرغوب فى منطقة مجاورة . إذ أن معظم الجينات المرغوبة مثل تلك التى تتحكم فى التكوين والتمايز قد تم التعرف عليها فقط عن طريق التحليلات الوراثية للطافرات فى بعض الكائنات مثل الدروسفلا والنماتودا *C. elegans* . إلا أن النواتج البروتينية لهذه الجينات لم يتم التعرف عليها بعد ، وقد تكون موجودة بكميات ضئيلة جدا فى عدد قليل من

الخلايا أو تنتج فقط عند مرحلة ما من التمايز .

إلا أنه يمكن استخدام نتائج الارتباط الوراثي بين الطفرات المختلفة لرسم خريطة للكروموسوم التي تعطى المواقع النسبية للجينات . وعندما تتم كلونة چين معروف مكانه على الخريطة الكروموسومية ، فإن الكلونات فى مكتبة الجينوم التى تخص الجينات المجاورة يمكن التعرف عليها وتمييزها باستخدام تقنية تسمى المشى على الكروموسوم Chromosome walking . وفى هذه التقنية يمكن استخدام مكتبتين جينوميتين مختلفتين لـ د ن أ تم تحضير كل منهما بتقطيع نفس د ن أ بانزيمات قطع محددة مختلفة (خرائط القطع المحددة Re-striction maps) ، ويوضح الشكل (١١-١١) . كيف يمكن استخدام كلون فى احدى المكتبين كمنقب لتمييز كلون متداخل فى المكتبة الأخرى . ويستخدم هذا الكلون المتعرف عليه بالتالى فى تحضير منقب د ن أ الذى يستخدم بدوره فى التعرف على كلون آخر متداخل فى المكتبة الأولى وهكذا . وبهذه الطريقة يمكن المشى على الكروموسوم بمعدل كلون فى كل مرة فى خطوات بطول ٣٠٠٠٠ زوج من القواعد أو أكثر . ولكن كيف يتسنى معرفة أن الجين المستهدف (الذى عرف أصلا بطفرة ضارة) قد تم التوصل إليه ؟ ان الطريقة القياسية هى المقارنة المستمرة بين حجم شظايا القطع المحددة Restriction fragments المنتجة من الكروموسوم الطافر وتلك المنتجة من الكروموسوم الطبيعى بتقنية Southern blot مستخدما كل كلون جديد كمنقب كلما استمر المشى . قد تحدث بعض الطفرات نتيجة لنقص أو حذف أو ادخال صغير فى تتابعات د ن أ فى الجين محل الدراسة والتى يمكن التعرف عليها بسهولة . وعندما يتم تحليل طفرة ضارة فى جين بشرى فإنه من بين كل عشرة طفرات تكون طفرة واحدة عادة ناتجة عن الحذف الذى يمكن التعرف عليها بسهولة بتقنية Southern blotting . ويجرى حاليا التعرف على الأساس الجزيئى لبعض الأمراض الوراثية البشرية بهذه التقنية .

الشكل (١١-١١) :

تقنية المشى على الكروموسوم باستخدام كلونات د ن أ المتداخلة للتعرف على جين جديد . ولاسراع عملية المشى تستخدم أعداد كبيرة من كلونات د ن أ الجينومية . للتنقيب عن الكلون التالى فى عملية المشى يستخدم شظية د ن أ قصيرة معلمة بالاشعاع من احدى نهايتى الكلون الذى تم تعريفه فى الخطوة السابقة . اذا استخدمت نهاية يمنى فإن المشى سيكون فى الاتجاه الى اليمين كما يبدو فى هذا المثال . وميزة استخدام شظية قصيرة من د ن أ كمنقب هو تقليل فرصة وجود تتابعات متكررة فى المنقب القصير مما يسهل عملية المشى .

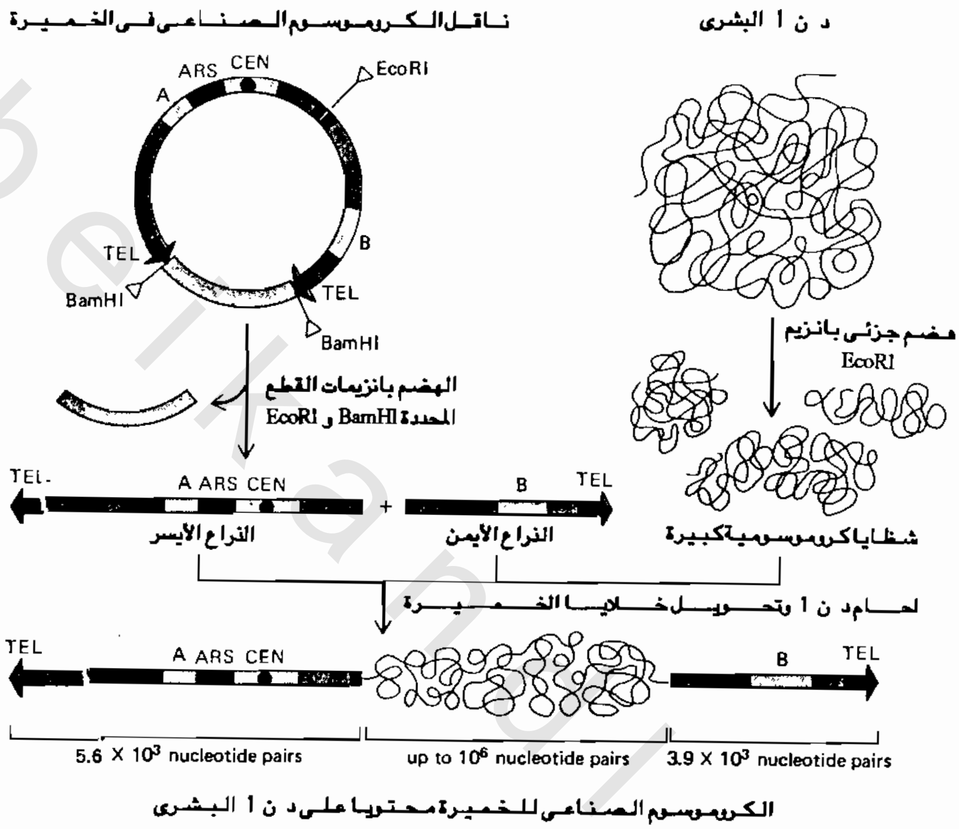
obeikandl.com

وباستخدام طرق مشابهة أمكن رسم خريطة جزيئية لمجموعة شبه كاملة لكلونات كبيرة جينومية على طول الكروموسومات للنيماتودا *C. elegans* . مثل هذه الكلونات الكبيرة ، والتى يبلغ طول كل منها حوالى ٣٠٠٠٠ زوج من القواعد ، ويتم تحضيرها باستخدام الكوزميدات Cosmids . ويتطلب الأمر استخدام عدة آلاف من كلونات الكوزميد لتغطية جينوم كامل لكائن مثل النيماتودا أو الدروسفلا . ولكى يمكن عمل خريطة جزيئية للجينوم البشرى بالكامل بهذه الطريقة ، فإن ذلك يقتضى استخدام أكثر من ١٠٠٠٠٠ كلون كوزميد ، والذى يستغرق وقتا طويلا إلا أنه ممكن تقنيا . بالاضافة الى ذلك فإن شظايا د ن.أ. البشرية التى تزيد فى الطول عن عشرة أضعاف طول كلون الكوزميد (٣٠٠٠٠٠ زوج نيوكلتيدى) يمكن كلونتها ككروموسومات مصطنعة Artificial chromosomes فى خلايا الخميرة . ويمكن عمل خريطة للجينوم البشرى بهذه الطريقة فى ١٠٠٠٠ كلون من هذا النوع كما فى الشكل (١١-١٢) .

ويعتقد أنه فى القريب العاجل ستتوفر كلونات جينومية معرفة فى مكتبات مركزية لـ د ن أ وذلك لاستخدامها بواسطة الباحثين . وستتوفر مكتبة كاملة لكل من الكائنات الشائعة وكذلك الخرائط الجزيئية لمعظم الجينات ومنها الجينات البشرية ، بحيث يمكن التعرف جزيئيا على الطفرات الضارة التى تسبب أمراض وراثية فى الانسان مما يفتح المجال لتقنية علاج الجينات Gene Therapy .

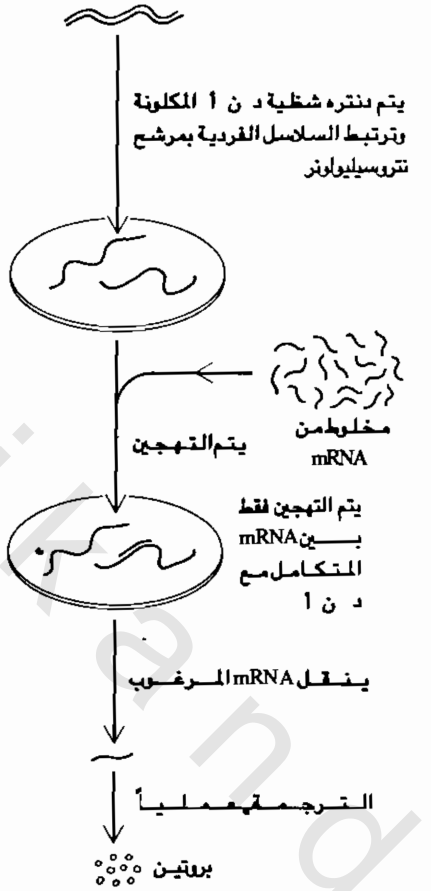
استخدام الترجمة المعملية In Vitro Translation لتسهيل التعرف على كلون د ن أ:

على الرغم من فعالية طرق التهجين فى الموضع فى التوصل الى كلونات نوعية من cDNA أو الكلونات الجينومية من مكتبة د ن أ إلا أنها عادة تتعرف على الكثير من الكلونات الخاطئة « False positive » على أنها صحيحة . لذلك كان لابد من استنباط طرق أدق للتمييز بين هذه الكلونات غير الصحيحة وبين تلك الصحيحة بالفعل . ويكون هذا العمل أكثر سهولة عندما يكون الكلون المرغوب يشفر لبروتين قد تم التعرف عليه بالفعل بطرق أخرى . فى هذه الحالة تكون كل شظية مكونة من د ن أ مرشحة للاستخدام فى تنقية جزيئات mRNA المكملة لها من مخلوط من mRNA الخلوى بعملية تسمى انتخاب الهجين Hybrid selection . وفى هذه التقنية يتم فصل كمية وفيرة من شظايا د ن أ الى سلاسل مفردة وتثبت على مرشح النيتروسيليولوز الذى يستخدم لاختيار جزيئات mRNA المكملة بتهجين RNA - DNA كما فى الشكل (١١-١٣) .



الشكل ١١-١٢:

يسمح استخدام ناقل الكروموسوم الصناعي في الخميرة (YAC) بكلونة جزيئات كبيرة جدا من د ن أ تمثل التتابعات TEL و CEN ، ARS مناطق التلومير والسنترومير ومنشأ النسخ في جزئ د ن أ على التوالى . يسمح منشأ التناسخ للبلازميد بالتناسخ مستقلا عن كروموسوم الخلية المضيفة . تمثل التتابعات B ، A مناطق التشفير لإنزيمات كشافة للتعرف بسهولة على خلايا الخميرة المحولة المحتوية على الكروموسوم الصناعي.



الشكل (١١-١٣):

تقنية انتخاب الهجين ، حيث يتم نقل جزيئات mRNA النقية من على ورقة الترشيح بتعريضها لظروف تؤدى الى انفصال سلسلتى الهجين فى الحلزون (د ن أ / ر ن أ) .

ويستخدم mRNA الذى تمت تنقيته بهذه الطريقة لتوجيه بناء البروتين فى انبوبة الاختبار خارج الخلية باستخدام أحماض أمينية مشعة . ثم يتم التعرف على البروتين الناتج المعلم بالاشعاع ويقارن بالبروتين المتوقع انتاجه بواسطة هذا الكلون . ويعتبر اختبار المطابقة فى هذا الاختبار أساس لاستنتاج أن شظية ما من د ن أ تشفر لبروتين معين .

obeikandi.com

ناقلات التعبير Expression vectors :

يؤدى الدور الذى تقوم به ناقلات التعبير الى السماح باستخدام كلونات cDNA فى عملية الإنتاج الغزير البروتينات ؛ اذ أنه فى كثير من الأحيان لاتتوفر معلومات بيوكيماوية عن البروتين المشفر بواسطة شظية د ن أ.

ويتضح ذلك على سبيل المثال عندما يكون الكلون قد تم التعرف عليه بطريقة التهجين الطرحى أو بالمشى على الكروموسوم على أنه جين طافر . وفى هذه الحالات نجد أن البروتين المستهدف يكون موجودا عادة بكميات ضئيلة وفى عدد محدود من الخلايا بحيث لايمكن اجراء طريقة انتخاب الهجين لـ mRNA المكمل . لذلك كان لابد من استنباط طرق أخرى لتمييز النواتج البروتينية للجين المكلون .

وأحد هذه الطرق تعتمد على بناء شظية بروتينية قصيرة (أوليجوببتيد) موازية لتتابع الأحماض الأمينية المتوقع الحصول عليه من تتابع cDNA ، ثم استخدام أجسام مضادة للأوليجو ببتيد . وفى كثير من الحالات ستتعرف الأجسام المضادة على نفس تتابع الأحماض الأمينية عندما توجد كجزء من جزئ البروتين الطبيعى مما يهيئ الفرصة لمتابعة وتحديد وتنقية البروتين المشفر بكلون cDNA الأصلى . وباستخدام تقنية التهجين الطرحى مع هذه الطريقة المناعية فإنه يمكن التعرف على البروتينات الخلوية النوعية ومتابعة تمايز وخواص ووظائف كل طراز خلوى فى الكائنات متعددة الخلايا .

إن أفضل الطرق المباشرة لانتاج البروتين النوعى المشفر بواسطة cDNA المكلون هى أن يسمح لجزئ cDNA نفسه بأن يقوم بتوجيه عملية بناء البروتين فى خلية مضيفة . ويطلق على البلازميد أو الفيرس المستخدم لهذا الغرض اسم ناقلات التعبير Expression vectors ويتم تكوينها بحيث يكون كلون cDNA متصل مباشرة بتتابع د ن أ يعمل كبروموتور قوى لنسخ د ن أ يوجد عدد من ناقلات التعبير والتى تم تكوين كل منهما لكى تعمل فى طراز الخلية الذى سيتم فيها بناء البروتين . وبهذه الوسيلة من الهندسة الوراثية يمكن حث خلايا البكتريا أو الخميرة أو الثدييات لانتاج كميات هائلة من البروتينات المرغوبة مثل هرمون النمو البشرى المعروف بالانترفيرون Interferon والانتيجينات الفيروسية للأمصال . وتصبح الخلايا البكتيرية المحتوية على مثل هذه الناقلات ذات قدرات فائقة على انتاج البروتين ، لدرجة أنه من الممكن

أن يمثل انتاج الجين فى هذه الحالة أكثر من ١٠ ٪ من إجمالى البروتين الكلى للخلية المضيفة . ونظرا لأن انتاج مثل هذه الكميات الكبيرة من البروتين الواحد يؤدى غالبا الى قتل الخلية فقد أمكن تكوين بروموتورز خاصة قابلة للاستحثاث « Inducible » مصممة للسماح بتأخير نسخ الجين لعدة ساعات لكى يمكن جمع الخلايا وفصل البروتين المرغوب منها . وعلى سبيل المثال تحتوى بعض ناقلات التعبير من البلازميدات على بروموتورز للامبدا فاج الذى يظل صامتا بواسطة بروتين مثبط حساس للحرارة بحيث يمكن تنشيط البروموتور فى الوقت المناسب عن طريق رفع درجة الحرارة للبكتريا الى ٤٢° م مما يؤدى الى الانتاج المفاجئ لكميات كبيرة من البروتينات .

واذا أمكان تزويد المجموعة الكاملة لمكتبة cDNA بناقلات التعبير فإن كل كلون بصفة عامة سيقوم بإنتاج بروتين نوعى مختلف وبالتالى يمكن التعرف على الكلون المرغوب عن طريق ناتجه من البروتين بدلا من تتابع نيوكلتيداته . ويتم ذلك عادة باستكشاف الكلونات بمنقبات مكونة من الأجسام مضادة المعلمة بالاشعاع . والطريقة البديلة أن يتم الاختبار المباشر للنشاط البيولوجى للبروتين الناتج (الناتج النهائى للجين) . وهذه الطريقة الأخيرة بصفة خاصة تعتبر طريقة فعالة للتعرف على جينات مميزة النواة التى تشفر لافراز عوامل النمو . فعلى سبيل المثال يمكن ادخال كلون cDNA لخلايا منتجة لعامل نمو فى ناقل تعبير الذى يتناسخ فى الخلايا الثديية . ويتم تنمية مخلوط من خلايا معدية Transfected تحتوى على عدد كبير من الكلونات المختلفة فى طبق صغير ، حيث يتوقع أن تفرز أى خلية تحتوى على الجين المسئول عن عامل نمو معين هذا العامل فى الطبق . ويمكن أخذ عينات من البيئة واختبارها لوجود عامل النمو عن طريق اضافة العينة إلى مزارع خلايا أخرى معروف عنها أنها تستجيب نوعياً لعامل النمو هذا . ويكون الاختبار حساسا جدا لدرجة أن سيكون ايجابيا حتى فى حالة وجود خلية واحدة من الف خلية فى البيئة الأصلية محتوية على الجين المشفر لعامل النمو . وبتكرار دورات الاختبار يمكن تضييق مجال البحث للوصول الى الكلون المسئول عن انتاج عامل النمو المستهدف . وتعتبر هذه طريقة أكثر كفاءة وأسرع بكثير من الطرق البيوكيماوية العادية التى تستغرق وقتا طويلا وتعطى نتائج أقل كفاءة .

يمكن اعادة تصميم الجينات لانتاج بروتينات بتتابعات مرغوبة :

يمكن اعادة ترتيب أو تصميم التتابعات الشفرية وكذلك المناطق المنظمة الخاصة بها لتغيير

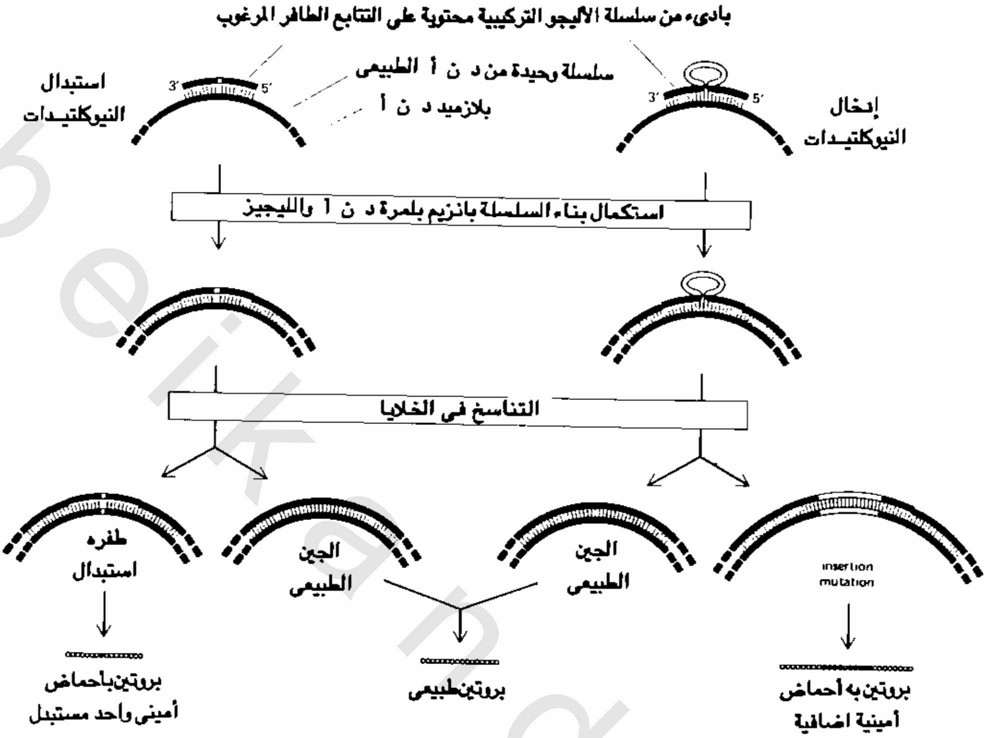
الخواص الوظيفية للبروتين الناتج أو كمية البروتين التى يتم بناؤها أو طراز الخلية التى تنتج هذا البروتين . يمكن احداث تغيير كبير فى التتابعات الشفرية للجين مثلا عن طريق ادخال أو دمج جزء منه الى تتابعات شفرية خاصة بجين آخر مما يؤدى إلى انتاج جين هجينى جديد يشفر للبروتين الاندماجى fusion protein . وتستخدم مثل هذه البروتينات بكثرة لاختبار وظيفة النطاقات أو المجالات Domains المختلفة لجزئ البروتين . فمثلا تحتوى معظم البروتينات النووية على تتابع قصير نوعى من الأحماض الأمينية التى يتم التعرف عليها كإشارات لمرورها المباشر الى نواة الخلية . أمكن باستحداث اضافة لأجزاء مختلفة من هذه البروتينات النووية الى بروتين سيتوبلازمى باستخدام تقنية الدمج الجينى ، التعرف بالتحديد على « ببتيدات الاشارة » Signal peptides المسئولة عن مرور البروتينات النووية الى النواة .

يتطلب إحداث التغيير الدقيق للجين استخدام تقنيات خاصة بحيث يكون البروتين الناتج مختلف عن البروتين الأصلى فى عدد قليل جدا من الأحماض الأمينية . والخطوة الأولى فى هذه التقنية عبارة عن البناء الكيماوى لجزئ قصير من د ن أ المحتوى على التتابع النيوكلتيدى المسئول عن الاختلاف فى البروتين الناتج . ثم يتم التهجين بين التتابع الأوليجى لجزئ د ن أ مع بلازميد د ن أ أحادى السلسلة محتويا على تتابع د ن.أ. المراد تغييره ، مع توفير الظروف التى تسمح بتزاوج جزيئات د ن أ ذات التناظر غير الكامل كما فى الشكل (١١-١٤) .

تعمل سلسلة د ن أ القصيرة كبادئ لبناء د ن أ بواسطة انزيم بلمرة د ن أ مما يؤدى الى تكوين جزئ د ن أ مزدوج السلسلة مشتملا على التتابع المتغير فى الجين . ويتم ادخال الجين المحور أو المعدل فى ناقل التعبير expression vector حتى يمكن انتاج كميات كبيرة من البروتين المستحدث . وبتغيير أحماض أمينية معينة فى البروتين بهذه الطريقة ، فإنه يمكن تحديد أى جزء من سلسلة متعدد الببتيد أكثر أهمية بالنسبة لتركيب ووظيفة جزئ البروتين محل الدراسة .

ولتحديد الأجزاء من الجين التى تكون مسئولة عن تنظيم التعبير فى مميزة النواة ، فإنه يمكن ادخال تتابعات د ن أ التى يفترض اشتراكها فى هذا التنظيم مع التتابعات الشفرية لجين ينتج أحد الأنزيمات الكشافة التى يسهل التعرف عليها ، والتى لاتكون عادة موجودة فى الخلية مميزة النواة . ومن أكثر الأنزيمات الكشافة استخداما فى هذا الشأن البروتين البكتيرى كلورمفينيكول اسيتيل ترانسفيريز (CAT) Chloramphenicol acetyl transferase . ويعد

تكوين د ن أ المعاد صياغته هذا يتم ادخاله الى خلية مميزة النواة لاختبار ما اذا كان التتابع المنظم محل الدراسة يقوم بالفعل بتنشيط أو حفز تعبير الجين CAT .



الشكل (١١-١٤)،

استخدام سلاسل النيوكلتيد الأوليجو التركيبية لتعديل مناطق تشفير البروتين فى الجينات . يمكن بهذه الطريقة وباستخدام السلسلة الأوليجو المناسبة احداث استبدال لأكثر من حامض أمينى فى نفس الوقت أو يمكن حذف حامض أمينى أو أكثر فى سلسلة متعدد الببتيد الناتج . يلاحظ أن التغير يحدث على مستوى احدى سلسلتى د ن أ فى البلازميد الأصلى المعاد صياغته مما يعنى أن نصف الخلايا الناتجة فقط ستحتوى على البلازميد الطافر .

ويتم ذلك عادة بإحداث عدوى للخلايا فى مزرعة والكشف لوجود نشاط انزيم CAT بعد فترة تحضين مدتها ١٢ ساعة . وعلى الرغم من أن العديد من الخلايا المعدية ستعطى تعبير الجين الغريب بصفة أولية ولمدة قصيرة فإن عدد قليل جدا من هذه الخلايا سيظل محتفظا

بالجين بصفة مستديمة . والحصول على خلايا محولة دائمة permanent transformants ، فإنه من الضرورى انتخاب المستعمرات النادرة من الخلايا التى تحتوى على جزئ د ن أ المعاد صياغته فى صورة مستقرة كجزء من الكروموسوم .

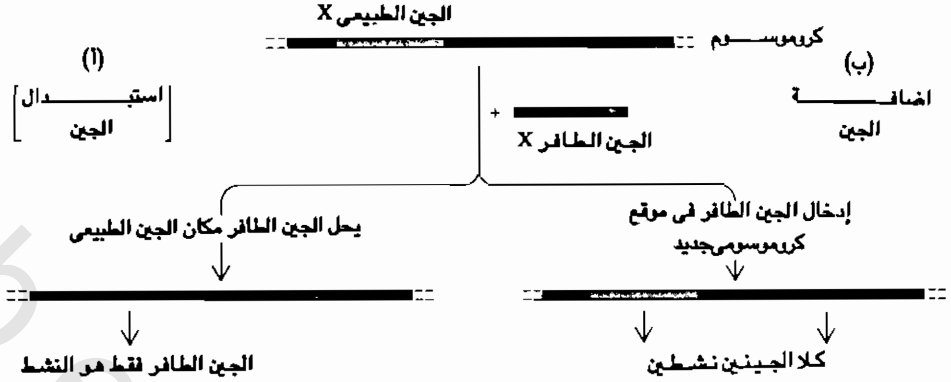
وبإجراء عدوى لطرز مختلفة من الخلايا بمثل هذا الـ د ن أ المعاد صياغته ، أمكن معرفة تتابعات د ن أ المنظمة التى تمكن الجين من أن يقوم بوظيفته ويتم تعبيره فى طراز نوعى من الخلايا دون آخر كما سبق الذكر عندمناقشة تنظيم التعبير الجينى فى مميزة النواة .

انتاج كائنات محولة وراثيا Transgenic Animals :

إن المحك النهائى لاختبار أى جين تم تغييره هو معرفة تأثيره اذا تم ادخاله فى كائن ما . ومن المفضل أن يكون من الممكن استبدال الجين الطبيعى بالجين المتغير حتى يمكن معرفة وظيفة البروتين الطافر فى غياب البروتين الطبيعى . والكائن مميز النواة الوحيد الذى يسهل اجراء ذلك فيه هو الخميرة . حيث يتم ادخال شظايا كروموسومية فى صورة نسخ وحيدة فى المواقع الكروموسومية المتناظرة بطرق الاتحادات الجديدة بحيث يتم ادخال جين معاد تصميمه مكان النسخة الأصلية للجين . ويعطى ذلك طريقة فعالة لدراسة وظائف جينات الخميرة ، الشكل (١١-١٥) .

ولكن عند نقل د ن أ الى خلايا ثديية فإنه على العكس من ذلك لاتوجد طريقة حتى الآن للتحكم فى الكيفية أو فى الموقع الذى يمكن أن يتم ادخاله فى الكروموسومات . ومن كل ألف محاولة تنجح محاولة واحدة للاحلال الجينى . وبدلا من الادخال المتوقع نجد أنه يحدث أن شظايا د ن أ المتجاورة الخطية تلتحم انزيميا ببعضها عند نهاياتها لتكوين مجاميع مترادفة فى الخلية ، بحيث ينتهى بها المطاف الى الدخول ضمن أحد الكروموسومات عند مواقع عشوائية . وتسلك البيضة المخصبة للثدييات نفس طريقة الخلايا الثديية الأخرى فى هذا الشأن .

فإذا حقنت بيضة فأر بمائتى نسخة من د ن أ الخطى ، فسينتهى بها الأمر الى تكوين فأر محتويا على مجاميع مترادفة من نسخ الجين المحقونة والتى تدخل فى موقع عشوائى على أحد الكروموسومات كما فى الشكل (١١-١٦) .

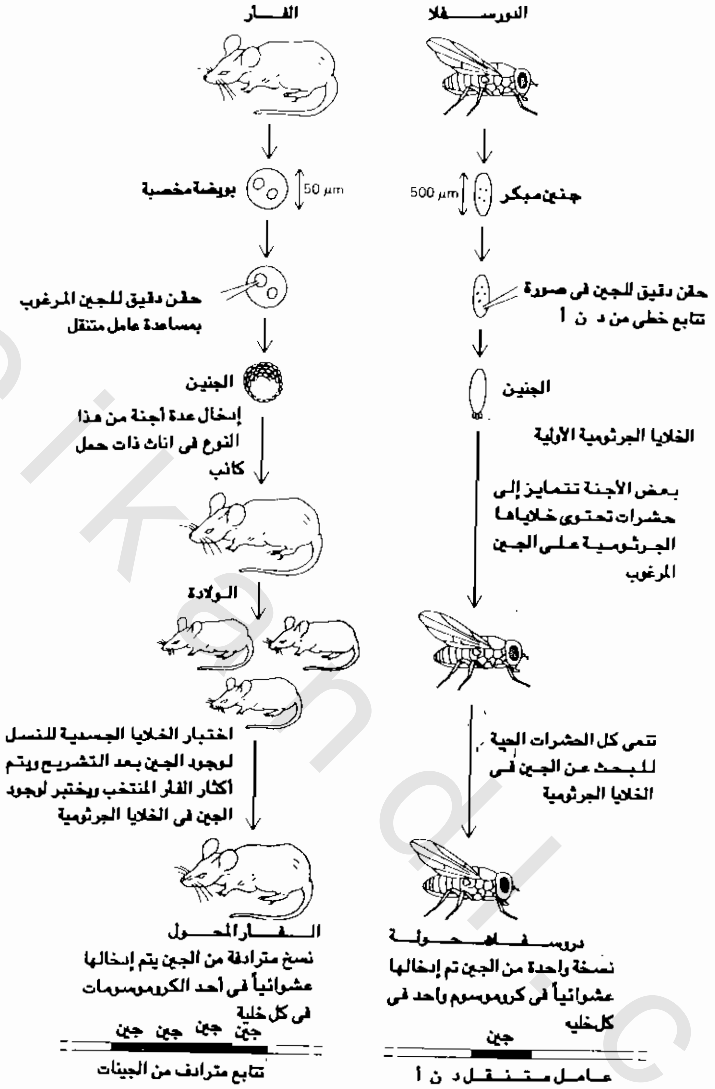


الشكل (١١-١٥):

طريقة ادخال جين بعد احداث تغيير فى تتابع نيوكلتيداته الى كروموسوم الكائن مرة أخرى . فى البكتريا والخميرة يمكن الانتخاب لطافرات حدث بها استبدال جينى (أ) ويتم ادخال الجين الطافر محل الطبيعى بطرق الاتحادات الجديدة بحيث لايبقى فى الخلية إلا الجين الطافر . أما فى مميزة النواة (ب) يحدث اضافة الجين بدلا من الاستبدال بحيث تحتوى الخلية أو الكائن المحول على الجين الطافر بالاضافة الى الجين العادى . ويندر حدوث استبدال جينى فى الكائنات المحتوية على كميات كبيرة من د ن أ نظرا لأن الجين الطافر لابد أن يتزاوج مع الجين الطبيعى ويحل محله بطرق الاتحادات الجديدة على الرغم من وجود وفرة كبيرة من تتابعات د ن أ. الأخرى .

وإذا كان الكروموسوم المتحور موجودا أيضا فى خط الخلايا الجرثومية (البيضة أو الحيوان المنوى) فإن الفأر سيورث الجينات التى اكتسبها لنسله . يطلق على الحيوانات التى يتم تغييرها وراثيا بصفة دائمة بهذه الطريقة بالحيوانات المحولة Transgenic ، ونظرا لأن الجين الطبيعى يظل عادة موجودا فإن معظم الحيوانات المحولة لايمكن استخدامها بنفس الكفاءة التى تستخدم بها الخميرة لاختبار تأثير الجينات المحورة . إلا أنها تلقى بعض الضوء على كيفية تنظيم الجينات فى الثدييات وكذلك عن كيفية تحول بعض الجينات الى جينات مسرطنة نشطة مسببة للسرطان .

obeikandl.com



الشكل (١١-١٦):

مقارنة بين الطرق القياسية للحصول على فئران محولة ودروسفلا محولة . فى هذه الأمثلة يؤدى حقن الجين فى بويضة الفأر الى تغيير فى لون الفراء ، فى حين أن حقن الجين فى جنين الحشرة يسبب تغيير لون العين . وفى كلا الحالتين تم الحصول على كائنات محولة حدث بها ادخال لـ د ن أ فى أكثر من موقع كروموسومى .

obeikandi.com

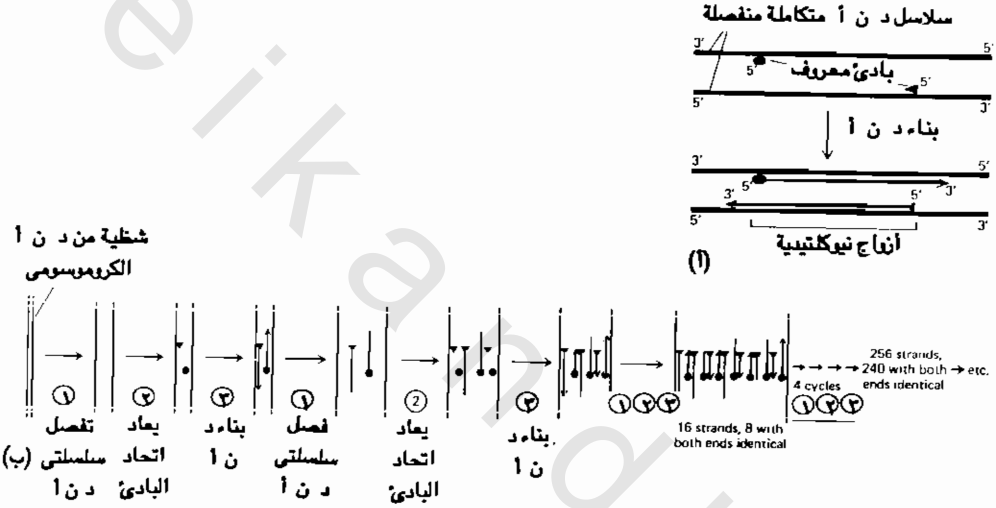
يمكن الحصول على حشرات دروسفلا محورة وراثيا باستخدام تقنية يتم فيها ادخال نسخة واحدة من الجين عشوائيا فى جينوم الحشرة . وتزداد درجة النجاح عندما يتم أولا ادخال الشظية المحتوية على الجين بين التتابعات الطرفية لأحد العناصر المتنقلة النوعية فى الدروسفلا transposable elements والتى تسمى العنصر (p) فيحدث الإدخال الى كروموسومات الدروسفلا فى وجود الانزيم Transposase المسئول عن هذا النشاط . لتكوين حشرة متحولة بعد ذلك فإنه يتم حقن شظية د ن أ المتحورة فى جنين مبكر للحشرة ويحقن معها بلازميد مستقل محتويا على الجين الذى يشفر لانزيم Transposase . وغالبا ما يحدث ادخال للجين المحقون فى جينوم الحشرة فى صورة نسخة وحيدة كنتيجة لحدث انتقالى transposion event كما فى الشكل (١١-١٦) .

الكلونة السريعة للجين فى أنبوبة الاختبار:

إن امكان الحصول على انزيمات بلمرة د ن أ النقية وكذلك امكان بناء د ن أ بالطرق الكيماوية ، حيث يستخدم جهاز خاص لانتاج سلاسل أوليجو نيوكلتيدى قصيرة بتتابع نوعى محدد يتكون من حوالى ٨٠ نيوكلتيدة ، قد ساعدا على كلونة تتابعات نوعية من د ن أ بسرعة بدون الحاجة الى خلية حية . يطلق على هذه التقنية اسم سلسلة تفاعل انزيم البلمرة Polymerase Chain Reaction (PCR) . وهى تسمح لأى جزء من د ن أ مرغوب من الجينوم بالتزايد العددى Amplification الى حوالى مليون ضعف على شرط أن يكون جزء على الأقل من التتابع النيوكلتيدى معروف بالفعل . تستخدم بعض التتابعات المحيطة بالمنطقة المراد اكثارها لتصميم سلسلتى بادئ من أوليجو نيوكلتيدات تركيبية بحيث تكون كل واحدة منها مكملة للقواعد النيوكلتيدية الطرفية لكل من سلسلتى د ن أ فى الحلزون المزدوج . تستخدم سلاسل الأوليجو هذه كبادئات لبناء د ن أ فى المعمل *in vitro* بمساعدة انزيم بلمرة د ن أ عالى الكفاءة Taq DNA polymerase (محب للحرارة) وهى تحدد نهايات شظية د ن أ النهائية المتحصل عليها كما فى الشكل (١١-١٧- أ) . ويلخص الشكل (١١-١٧- ب) فكرة هذه التقنية .

وتحتاج كل دورة تفاعل الى معاملة حرارية لفترة وجيزة لفصل سلسلتى الحلزون المزدوج لجزئ د ن أ (الخطوة الأولى) . يلى ذلك تبريد بطيئ لجزئ د ن أ فى وجود فائض من سلسلتى الأوليجو د ن أ مما يعطى فرصة للتهجين النوعى لهما مع التتابعات المكملة على سلسلتى د ن أ (الخطوة الثانية) . ثم يتم تحضين المخلوط المعاد اتحاده Annealed مع انزيم

بلمرة د ن أ فى وجود وفرة من النيوكلتيدات الأربعة : dC , dT , dG , dA ثلاثية الفوسفات بحيث يتم البناء النوعى لمناطق د ن أ التى تلى منطقة البادئ (الخطوة الثالثة) . ولكى يتم الحصول على عدد كبير من د ن أ فإن الأمر يتطلب إجراء ٢٠ الى ٣٠ دورة تفاعل . وتؤدى كل دورة إلى مضاعفة كمية د ن أ المبنية فى الدورة السابقة لها . وتحتاج كل دورة الى حوالى خمس دقائق ، وتسمح الطرق الأوتوماتية automated بكلونة د ن أ خارج الخلية cell free cloning لشظية من د ن أ فى ساعات قليلة بالمقارنة بما تستغرقه الطرق القياسية من عدة أيام .



الشكل (١١-١٧):

طريقة سلسلة تفاعل انزيم البلمرة (PCR) فى الاكثار من تتابع نيوكلتيدى نوعى معمليا :

(أ) يتم تسخين د ن أ المعزول من الخلايا لفصل السلاسل المتكاملة ثم يعاد إتحاد السلاسل فى وفرة من سلاسل الأوليجو (بطول ١٥-٢٠ نيوكلتيدة) التى تم بناؤها كيماويا ليطابق التتابع المعزول بنيوكلتيدات X (حيث يكون طول X بين ٥٠ الى ٢٠٠٠ نيوكلتيدة) وتعمل سلاسل الأوليجو كبادئ لبناء د ن أ معمليا بمساعدة انزيم بلمرة د ن أ Taq الذى ينسخ د ن أ بين التتابعات الواقعة بين سلاسل الأوليجو .

(ب) بعد عدة دورات تفاعل يتم الحصول على كميات كبيرة من الشظايا الفردية من د ن أ بطول X نيوكلتيد بشرط أن تكون العينة الأصلية من د ن أ محتوية على تتابع د ن أ المتوقعة عند تصميم سلاسل الأوليجو .

وتعد طريقة PCR حساسة جدا : إذ يمكنها التعرف على جزئ د ن أ المرغوب فى العينة . ويمكن تحليل كميات قليلة جدا من ر ن أ بطريقة مشابهة بعد تحويلها الى cDNA بواسطة انزيم النسخ العكسى . وقد أخذت طريقة PCR تحل بسرعة محل Southern blotting فى التشخيص قبل الولادة Prenatal diagnosis للأمراض الوراثية وللتعرف على المستويات المنخفضة من العدوى الفيروسية . كما أنها تبشر بالأمل فى مجال الطب الشرعى (نظرا لأنها تسمح بالتعرف الدقيق على مصدر د ن أ لخلية واحدة) .

استخدام د ن أ المعاد صياغته فى رسم الخرائط الجزيئية للجينوم:

أمكن باستخدام الطرق الجزيئيه المستنبطة حديثا تكوين خرائط تفصيلية للجينومات الكبيرة جدا . ويوجد نوعين من الخرائط :

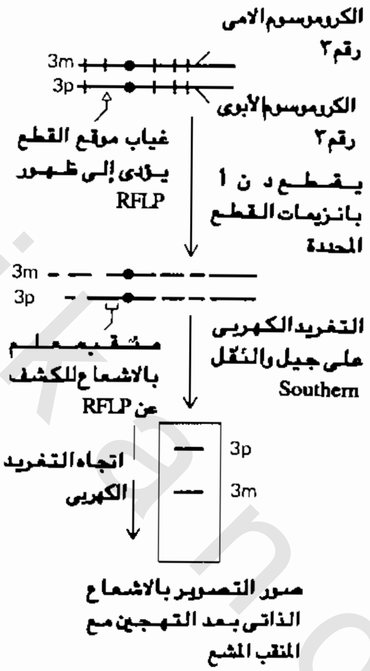
(١) الخرائط المادية Physical maps : وتعتمد على جزيئات د ن أ المكونة لكل كروموسوم . وهى تتضمن خرائط القطع المحددة Restriction maps ومكتبات كلونات د ن أ للجينوم.

(٢) خرائط الارتباط الوراثى : والتى تعتمد على معدل تكرار التوريث المتلازم Coinheritance لصفتين أو أكثر والتى تستخدم ككشافات وراثية بحيث تكون كل منها مختلفة فى الأم عن الأب وتكون مواقعها معروفة على الكروموسوم . والمعتاد أن هذه الجينات الكشافة يتم التعرف على تعبيرها عن طريق ما تحدثه من تأثير فى الكائن (كما فى حالة الجينات التى تسبب المرض الوراثى المعروف باسم ضمور العضلات Muscular dystrophy).

وقد أمكن حديثا باستخدام تقنية د ن أ المعاد صياغته ، استعمال بعض التتابعات القصيرة من د ن.أ. ككشافات وراثية . حيث تحتوى هذه الكشافات على مواقع قطع نوعية والتى تختلف من فرد الى فرد آخر . وتعد هذه المواقع ذات فائدة لعمل الخرائط الوراثية بصفة خاصة ، نظرا لأنها تكون شظايا متعددة المظاهر بالنسبة للطول Restriction fragment length polymorphism (RFLP) والتى يمكن التعرف عليها بسهولة بتقنية Southern blotting باستخدام منقب مناسب من د ن أ كما فى الشكل (١١-١٨) .

واذا وقع كشافين وراثيين على كروموسومين مختلفين فإن توارثهما سيكون مستقلا . أى يكونان غير مرتبطين ، بمعنى أنها ستكون عندها فرصة ٥٠ : ٥٠ بأن يتم توريثهما معا. ونحصل على نفس الفرصة اذا وقع الجينان الكشافان على طرفى نفس الكروموسوم أى على

مسافات بعيدة من بعضهما حيث سيرتفع احتمال أن ينفصلا أثناء العبور الوراثي الذي يحدث أثناء الميوزى . وكلما اقتربت مواقع جينان كشافان من بعضهما على نفس الكروموسوم ، كلما زادت فرصة عدم انفصالهما بالعبور الوراثي ، وبالتالي سيتم توريثهما معا مرتبطين ارتباطا شبه تام .

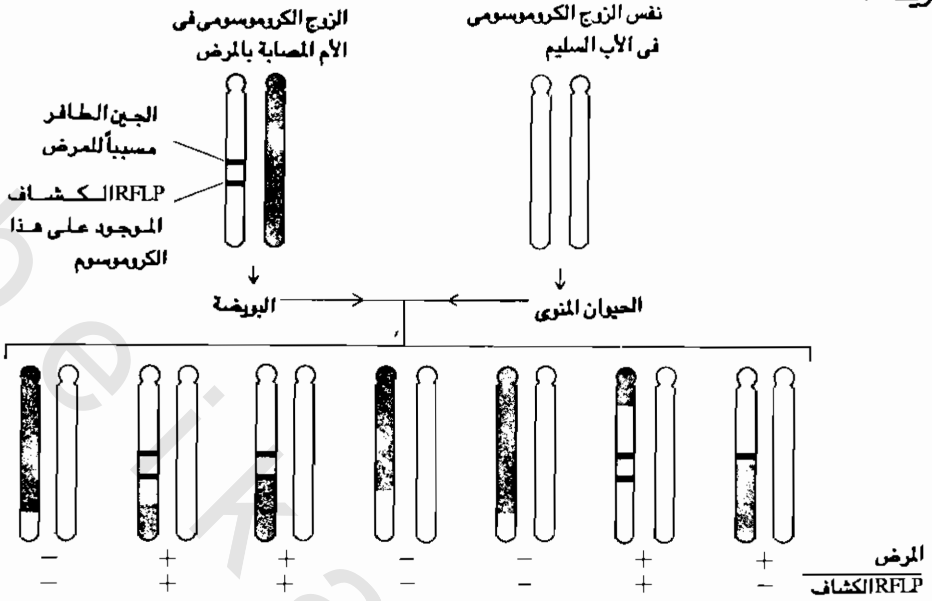


الشكل (١١-١٨):

طريقة Southern blotting للتعرف على شظايا د ن أ المحددة القطع (RFLP) . وللتبسيط يظهر الكروموسوم محتويا على عدد قليل من مواقع القطع المحددة في حين أنه يحتوى في الحقيقة على اعداد هائلة من هذه المواقع .

وبإجراء مسح لمجموعات كبيرة من العائلات للتوارث المتلازم للجين تحت الدراسة (مثل أن يكون الجين ذو علاقة بمرض وراثي) وبين عدد كبير من شظايا RFLP ، فإن عدد قليل من RFLP الكشافة يمكن التعرف عليها وتحديد مكانها محيطة بالجين ، ويمكن في النهاية تحديد د ن أ الخاص بهذا الجين نفسه كما في الشكل (١١-١٩) .

ويتم حاليا تحديد مواقع عدد من الجينات التى تسبب بعض الأمراض البشرية بهذه الطريقة .



النتيجة : يتم توارث الجين المسبب للمرض مرتبطاً مع RFLP الكشاف للأم المصابة فى ٧٥ ٪ من النسل وإذا تم التوصل إلى نفس النتيجة فى عائلات أخرى يمكن رسم الخريطة الوراثية لهذا الجين المسبب للمرض على هذا الكروموسوم بالقرب من موقع RFLP الكشافة .

الشكل (١١-١٩) :

يؤدى تحليل خرائط الارتباط الوراثية الى الربط بين التوارث المتلازم للجين المسبب لظهور شكل مظهرى معين فى الانسان (ممثل هنا بمرض) وكشاف RFLP . وقد أمكن بهذه الطريقة كلونة عدد كبير من الجينات البشرية وتحليل نواتجها .

تطبيقات الهندسة الوراثية :

تضمنت استخدامات الهندسة الوراثية مجالات عديدة شملت انتاج الأدوية والأمصال وتشخيص وعلاج الأمراض الوراثية البشرية وتقليل تلوث البيئة وزيادة الانتاج النباتى والحيوانى وسنورد هنا بعض الأمثلة على هذه الاستخدامات :

١. انتاج الأنسولين البكتيرى بدلا من الأنسولين التقليدى المستخلص من الخنازير والأبقار ، خاصة وأن كثير من مرضى البول السكرى يعانون من الحساسية وبعض الآثار الجانبية من استخدام الأنسولين العادى .

obeikandl.com

٢. انتاج بروتينات هامة بكميات كبيرة وتكلفة أقل باستخدام ما يسمى الناقل المكوكى Shuttle vector بمعنى أن الكلونة تتم فى *E. coli* فى حين يتم إنتاج البروتينات فى الخميرة Yeast للتغلب على مشكلة عدم امكان ترجمة الشفرات الخاصة بالجين البشرى فى البكتريا بينما يمكن ترجمتها (قراءتها) وانتاج البروتين المقابل فى الخميرة .

٣. انتاج بروتينات عالية القيمة الحيوية كغذاء للماشية والدواجن ، وذلك من الخميرة والبكتريا عن طريق ادخال جينات نشطة للسيطرة على بناء البروتين فيها مما يجعلها بمثابة مصانع بيولوجية لانتاج كميات هائلة من هذه البروتينات المسماة بروتينات الخلايا المفردة Single cell protein .

٤. انتاج كيماويات دوائية ومضادات حيوية antibiotics بتكلفة أقل وبمعدل انتاج عالى .

٥. انتاج أمصال تركيبية synthetic vaccins خاصة تلك التى تنطوى عملية انتاجها بالطرق التقليدية على مخاطر مثل مصل فيرس التهاب الكبد الوبائى Hepatitis B Virus وكذلك للانفلونزا .

٦. انتاج بروتين الانترفيرون البشرى human interferon وهو عبارة عن جليكوبروتين فعال ضد الأمراض الفيروسية ، ويفيد فى السيطرة على مرض السرطان حيث يثبط نمو الخلايا السرطانية ويحفز الجهاز المناعى لاحتواء الخلايا السرطانية ومنع انتشارها . يؤدى الطرق التقليدية الى انتاج كميات ضئيلة جدا (يوجد معمل واحد فى فنلندا يقوم بإعداد كميات ضئيلة من هذه المادة لأماكن مختلفة من العالم بقدر ضئيل) . ويرجع ذلك الى أن الانترفيرون البشرى تخصصى مما يعنى أنه لابد أن يستخلص من خلايا بشرية، مما يسبب تعقيدات وندرة فى انتاجه . أمكن باستخدام الهندسة الوراثية ربط جين بشرى للانترفيرون فى بلازميد وكلونته فى البكتريا بحيث أمكن انتاج كميات لابأس بها من الانترفيرون البشرى .

٧. انتاج هرمون النمو Somatostatin لمعالجة التقزم البشرى وبطء النمو . والمعروف أن الطرق الحالية المعتمدة على الاستخلاص من الحيوان يكون الانتاج فيها صعب جدا: فمثلا يستخلص من حوالى ١/٢ مليون مخ من الماشية حوالى 005g. فقط من هذا الهرمون . ولكن باستخدام تقنية الهندسة الوراثية يمكن الآن الحصول على نفس الكمية من الهرمون من تنمية ٩ لتر فقط من المعلق البكتيرى المكلون ويمكن زيادته فى المستقبل

٨. انتاج هرمون انتاج اللبن فى الماشية لزيادة انتاج الحليب .

٩. التشخيص المبكر prenatal diagnosis لبعض الأمراض الوراثية مثل الأنيميا المنجلية (Hbs) والبول الفينولى (PKU) وذلك بأخذ عينة صغيرة من السائل الأمنيوتى amni-otic fluid المحيط بالجنين واستخلاص DNA من الخلايا وتقطيعها بانزيمات القطع المناسبة ثم الكشف عن وجود اختلال فى تتابع القواعد فى DNA نتيجة للطفرة باستخدام منقب من mRNA المشع لجلوبين الهيموجلوبين الطبيعى HbA فلايحدث تكامل بينه وبين القطع المعيبة من د ن أ نتيجة لأنه يفترض أن موقع القطع الأنزيمى R.S. قد تغير نتيجة لتغير القواعد فى طفرة Hbs مثلا فتكون خريطة القطع للجين المعيب كلها مختلفة فلا يجد mRNA المنقب قطع DNA يتكامل معها .

١٠. المعالجة بالجينات Gene therapy مثل اضافة جين انتاج الأنسولين فى الكروموسوم البشرى مما يؤدى الى امكان شفاء الانسان المريض بمرض البول السكرى شفاء دائما وكذلك علاج بعض أمراض نقص المناعة .

١١. انتاج بكتريا بحرية marine bacteria معاد صياغتها قادرة على القضاء على التلوث الناشئ من بقع البترول الكبيرة المتسربة فى البحار والمحيطات ، حيث تقوم بتحليلها إلى مركبات بسيطة وهضمها ، وبذلك يتم التخلص منها .

١٢. انتاج ميكروبات تقوم بمعالجة مياه الصرف الصحى والتخلص من المواد الضارة والروائح وجعلها صالحة لأغراض مختلفة .

١٣. انتاج نباتات قطن مقاومة لدودة ورق القطن وذلك باعادة صياغة وكلونة جين BT المستخلص من البكتريا *Bacillus thuriengis* المسئول عن إفراز مادة سامة وقاتلة للدودة ، ويتم ادخاله الى جينوم نباتات القطن أو الطماطم مما يجعل عصارة أوراق النبات سامة بالنسبة للدودة فتقضى عليها وتكتسب النباتات صفة المقاومة بدون الحاجة الى رش المبيدات المكلفة ، وفى نفس الوقت يؤدى ذلك الى تقليل تلوث البيئة .

١٤. نقل صفة المقاومة لمبيدات الحشائش herbicides الى النباتات الاقتصادية خاصة وأن استخدام المبيدات الانتقائية selective herbicides أصبح له محاذير ، نظراً للتأثير السام المتبقى وأثره الضار بصحة الانسان والحيوان . فيتم نقل جين - Glyphosate Resistance (G.R.) الذى يجعل النبات المرغوب مقاوم للمبيدات ذات المدى الواسع بينما تكون الحشائش حساسة لهذا المبيد فتهلك .

١٥. نقل جينات تثبيت النتروجين الجوى والمعروفة باسم جينات nif الى النباتات النجيلية مثل القمح والشعير والذرة بحيث يجعلها قادرة على تكوين عقد بكتيرية وتحصل على احتياجاتها من النيتروچين من الجو بدلا من الاعتماد على الأسمدة النتروجينية مما يقلل تكلفة الانتاج .

١٦. انتاج سلالات من الخميرة وميكروبات التخمر المعاد صياغتها التى يكون باستطاعتها انتاج كميات هائلة من الكحولات والمركبات العضوية بطرق غير تقليدية وبأسعار رخيصة .

١٧. نقل صفة المناعة ضد بعض الأمراض الفيروسية الى الدواجن .

١٨. انتاج بعض البروتينات البشرية الهامة ذات القيمة الطبية مثل عوامل تجلط الدم فى البان الماشية والأغنام المحولة وراثيا .

المخاطر المحتملة لتطبيقات الهندسة الوراثية :

اعتبر فريق من العلماء المعارضين ، وكذلك بعض رجال الدين والاجتماع والمدافعين عن البيئة وبعض رجال القانون ، أن هذه التقنية ستؤدى الى عواقب وخيمة حيث قد تؤدى الى هدم العقد الاجتماعى والاخلال بالتوازن البيولوجى وامكان انتاج مسخ بيولوجية مختلفة أو ميكروبات قاتلة لايمكن السيطرة عليها بأى مضاد حيوى معروف . فقد تتسرب هذه الميكروبات المعاد صياغتها بدون قصد (أو حتى عن عمد) من بعض المختبرات وتكون خطرا دائما على الأنسان وغيره من الكائنات . كما قد يؤدى التوسع فى استخدام هذه التقنية الى احداث خلل فى التوازن البيولوجى وزيادة تلوث البيئة ، كما قد تؤدى الى انتاج Superman أو انسان مشوه وغيرها من الاعتراضات مما يؤدى فى النهاية الى هدم القيم الدينية والاجتماعية المتوارثة ونادوا بوقف بحوث تقنية الجين تماما .

ومن جهة أخرى تصدى فريق العلماء المؤيد لتقنية الهندسة الوراثية لهذه الانتقادات والمخاوف وفندوها على الأسس التالية :

١. أن مختبرات الهندسة الوراثية تخضع بالفعل لاحتياطات مشددة وتم وضع مواصفات متشددة لمنع احتمال تسرب أى ميكروب مختبرى (وقد وضعت مواصفات عزل المعامل

ومستوياتها من قبل NIH) . ويتم التفتيش الدورى على المختبرات للتاكد من مطابقتها للمواصفات المطلوبة .

٢. أنه حتى لو حدث تسرب للميكروب المعاد صياغته فإن احتمال بقائه حيا خارج المختبر يقل عن ١ × ١٠ ^-٨^ .

٣. أن عملية اعادة صياغة DNA وحدوث تراكب جديدة والتى تتم فى المختبر تحت ظروف محكمة قد حدثت وتحدث فى الطبيعة عشوائيا بلايين المرات ومنذ آلاف السنين ، إلا أنها لم تؤد الى انتاج تراكيب خطرة . وأن عملية انتاج Rec DNA ليست إلا محاكاة لما يحدث فى الطبيعة ولكن تحت ظروف محكمة وسيطرة تامة وأن الميكروبات المستخدمة تكون ضعيفة وطافرة بحيث تكون حساسة جدا لأى مؤثرات خارجية بحيث لو تسربت لن تستطيع مواجهة الظروف الطبيعية المعاكسة فتهلك .

٤. أنه بالمقارنة بين الأخطار المحتملة والتى أمكن تنفيذها والمكاسب التى تحققت بالفعل والتى يمكن أن تتحقق فى المستقبل من هذه التقنية نجد انجازات الهندسة الوراثية فى المجالات المختلفة التى سبق الاشارة اليها تعطى آمالا عريضة للبشرية طالما اتخذت الاحتياطات المناسبة فى ادارة المختبرات التى تجرى فيها هذه التقنية .

بعض التقنيات المستخدمة فى الهندسة الوراثية

١- التفريد الكهربى للأحماض النووية :

تتشابه طريقة التفريد الكهربى للأحماض النووية مع تلك المستخدمة فى فصل الحزم البروتينية ، بل قد تعد أسهل ، منها نظرا لأن النيوكلتيدات تكون مشحونة بشحنات سالبة مما يسهل عملية التفريد الكهربى بدون الحاجة الى اللجوء الى استخدام SDS . وفى حالة شظايا د ن أ التى تقل فى الطول عن ٥٠٠ نيوكلتيدة ، فيمكن باستخدام جيل البولى اكريلاميد Polyacrylamide المناسب ، فصل الشظايا التى تختلف عن بعضها فى الطول حتى ولو بفارق نيوكلتيدة واحدة كما فى الشكل (١١-٢٠- أ) .

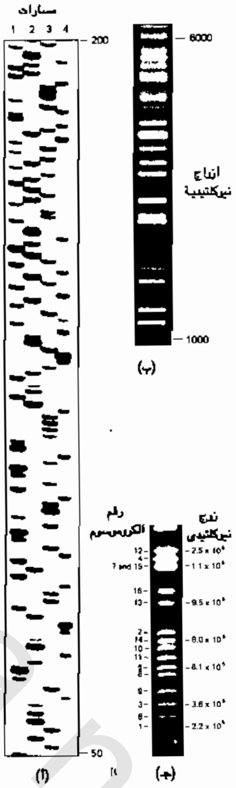
وفى حالة شظاياد د ن أ الأكبر حجما (طولاً) فيستخدم جيل الأجاروز الذى تسمح مسامه الأوسع بمرور مثل تلك الشظايا كما فى الشكل (١١-٢٠- ب) . وتستخدم هاتين الطريقتين على نطاق واسع لتحليل د ن أ.

وتوجد طريقة حديثة للتفريد الكهربى تسمى طريقة التفريد الكهربى بالجيل نو المجال النبضى Pulsed - field gel electrophoresis والتى تسمح بفصل جزيئات د ن أ الأكبر حجما والتى لايمكن فصلها بالطرق العادية نظرا لانفصالها فى صورة خيط متصل ثعبانى الشكل بحيث تتحرك النهايات أولا على الجيل بصرف النظر عن طولها . وللتغلب على هذه الصعوبة يتم أحداث تغيير فى المجال الكهربى على فترات دورية متقاربة مما يؤدى الى دفع الجزيئات لتصويب أو تعديل اتجاهها حتى يمكنها الحركة . وهى عملية تحتاج الى وقت أطول فى حالة الجزيئات الكبيرة . وجد أن الكروموسوم الكامل للبكتيريا أو الخميرة يظهر كحزمة منفصلة على مثل هذا الجيل (الشكل ١١-٢٠-جـ) .

وقد أدى ذلك إلى إمكان التعرف مباشرة على التغيرات الكروموسومية . وفضلا عن ذلك يمكن تحديد الخريطة الوراثية للجينات على أحد الكروموسومات فى الخميرة عن طريق التهجين مع منقبات كلونات جزيئات د ن.أ. الخاصة بجين ما للتعرف على التتابع المكمل لجزئ د ن أ على الجيل (كما سيأتى بعد) .

ومن الطبيعى أنه لكى يمكن التعرف على حزم د ن أ على الجيل ، أن يتم صبغها بالصبغة المناسبة أو تعليمها بالاشعاع ، ومن أفضل الصبغات المستخدمة فى هذا الشأن صبغة إيثيم بروميد Ethedium bromide التى يعطى لونا فلورسنتى تحت الأشعة فوق البنفسجى عندما ترتبط بـ د ن أ كما فى الشكل (١١-٢٠- ب ، جـ) .

وهناك طريقة أكثر حساسية للتعرف على حزم د.ن.أ. المفصولة بالتفريد الكهربى تعتمد على تعليم د ن أ بأحد النظائر المشعة (^{32}P) قبل بدء التفريد الكهربى . ويمكن باستخدام التصوير بالاشعاع الذاتى Autoradiography التعرف على حزم د ن أ على الجيل (الشكل ١١-٢٠- أ) .



الشكل (١١-٢٠) :

استخدام طريقة التفريد الكهربي لفصل جزيئات د ن أ حسب حجمها ، ويجب ملاحظة أنه فى الأشكال الثلاثة يكون اتجاه الهجرة الكهربية من أعلى الى أسفل بحيث تكون أكبر الجزيئات حجما بالقرب من القمة . فى (أ) يستخدم جيل بثقوب ضيقة لتحليل سلاسل مفردة من د ن أ بحجم يتراوح بين ١٠ – ٥٠٠ نيوكلتيدة . ويمكن فصل جزيئات د ن أ التى تختلف عن بعضها فى الطول بنيوكلتيدة واحدة . وفى هذا المثال تمثل المسارات من ١ الى ٤ نواتج تحليل تتابعات د ن أ لأربعة جزيئات مختلفة بحيث تشتمل نهاية السلسلة على G أو A أو T أو C على الترتيب . وحيث أن جزيئات د ن أ هنا تكون معلمة بالاشعاع ، فإنه يمكن تحديد أماكنها بالتصوير بالاشعاع الذاتى كما هو مبين . فى (ب) يستخدم جيل من الأجاروز بثقوب متوسطة القطر لفصل جزيئات د ن أ المزدوج السلسلة . وتفضل هذه الطريقة فى حالة سلاسل بأحجام من ٣٠٠ – ١٠٠٠٠ زوج نيوكلتيدى وهى التى يتم الحصول عليها بطرق القطع المحددة من جينوم بكتيرى أو فيروس ويمكن التعرف عليها بالضوء الفلورسنس عند صبغها بصبغة بروميد الايثيديوم . فى (ج) استخدام تقنية التفريد الكهربى بجيل الأجاروز ذو المجال النبضى لفصل ١٦ كروموسوم مختلفا من سلالات الخميرة (*S. cerevisiae*) التى تتراوح فى الحجم بين ٢٢٠٠٠٠ إلى ٢٫٥٠٠٫٠٠٠ زوج نيوكلتيدى ، يمكن بهذه الطريقة فصل جزيئات د.ن.أ. بطول قد يصل إلى $١٠^{٧}$ زوج نيوكلتيدى .

تعليم د ن أ معمليا بالاشعاع:

توجد طريقتان شائعتا الاستخدام لتعليم جزيئات د ن أ المستخلصة والمنقاة بالاشعاع . تستخدم الطريقة الأولى انزيم DNA Poly I المستخلص من بكتريا القولون لادخال عدد كبير من النيوكلتيدات المعلمة بالاشعاع (^{32}P) فى كل جزئ د ن أ كما فى الشكل (١١-٢١-أ) . مما يؤدى الى الحصول على منقب مشع جدا من د ن أ الذى يستخدم فى تقنية تهجين الأحماض النووية كما سيأتى بعد .

وتعتمد الطريقة الثانية على استخدام انزيم Polynucleotide kinase المستخلص من الفاج لنقل مجموعة فوسفات واحدة مشعة ^{32}P من جزئ ATP الى النهاية ´5 فى كل سلسلة من د ن أ (الشكل ١١-٢١- ب) .

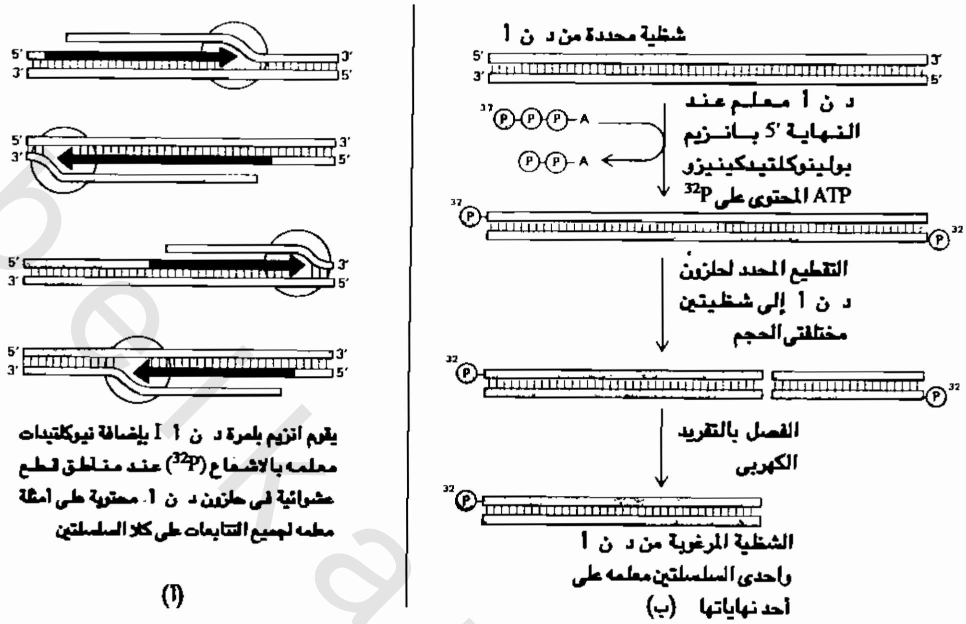
ونظرا لأن ذرة فوسفور مشعة واحدة ^{32}P تضاف بواسطة انزيم الكينيز إلى كل سلسلة من د ن أ ، فإن جزيئات د ن أ الناتجة فى هذه الحالة لاتصلح عادة للاستخدام كمنقبات نظرا لعدم احتوائها على قدر كاف من الاشعاع . ولكن من جهة أخرى ، ونظرا لأنها معلمة بالاشعاع عند نهاية واحدة فقط ، فإنها تكون مفيدة جدا فى تحديد تتابعات قواعد د ن أ وفى عمل بصمة القدم Foot printing كما سيأتى بعد .

تحديد تتابعات القواعد فى د ن أ DNA Sequencing :

أمكن فى أواخر السبعينات استنباط تقنيات لتحديد تتابعات النيوكلتيدات لأى شظية مستخلصة ومنقاة من د ن أ بطريقة بسيطة وسريعة . ونتيجة لذلك فقد أمكن التعرف على التتابعات الكاملة لمئات الجينات فى الثدييات بما فيها الجينات المشفرة للأنسولين والهيموجلوبين والانترفيرون وسيتوكروم C . وقد تزايد حجم المعلومات الخاصة بتتابعات النيوكلتيدات فى جزيئات د ن.أ. بحيث تحتم تخزينها وتحليلها فى الحاسب الآلى .

وتوجد طريقتين رئيسيتين لدراسة تتابعات النيوكلتيدات فى د ن أ وتسمى الطريقة الأولى الطريقة الكيماوية Chemical method ويوضح الشكل (١١-٢٢) والشكل (١١-٢٣)

الأساس المبنى عليه هذه الطريقة فى حين يشرح الشكل (١١-٢٤) الطريقة الانزيمية Enzymatic methad.



الشكل (١١-٢١):

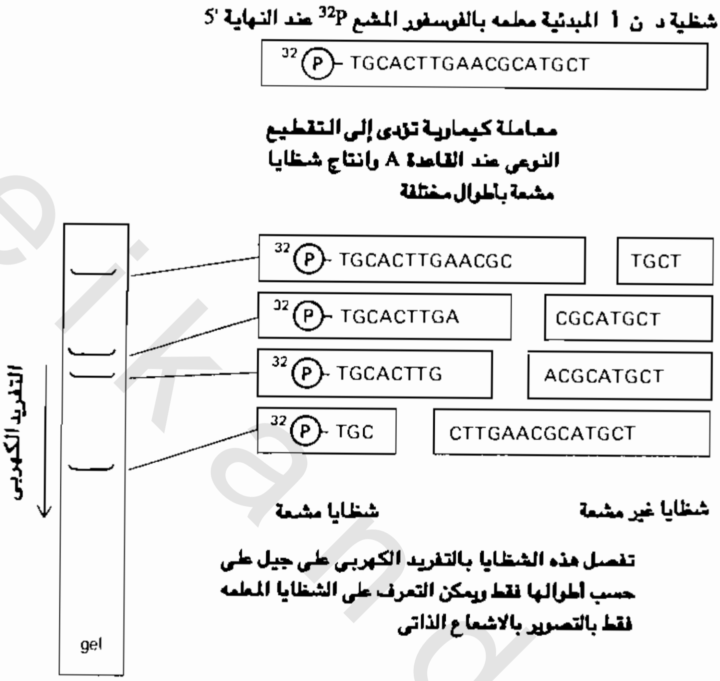
استخدام طريقتين انزيمتين لتشميع جزيئات د ن أ:

(أ) يقوم انزيم بلمرة د ن أ I بتعليم جميع النيوكلتيدات فى جزئ د ن أ وبذلك تنتج منقبات من د ن أ عالية الاشعاع .

(ب) يقوم انزيم بولينيوكلتيد كينيز بتعليم النهايات ´5 فقط من سلاسل د ن أ ، وبذلك فعندما يكون التعليم متبوعا بالقطع المحدد بانزيمات القطع فإنه يمكن الحصول بسهولة على جزيئات د ن أ محتوية على النهاية ´5 معلمة .

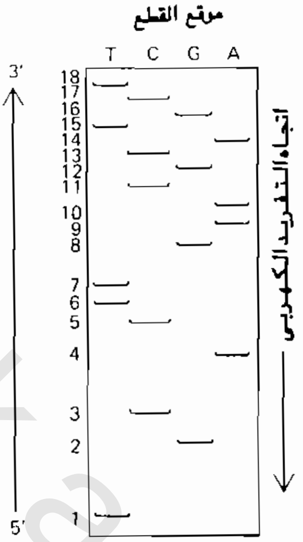
وتعد هاتين الطريقتين سريعتين ودقيقتين لدرجة أنها أصبحت الطرق الأسهل والأدق لتحديد تتابعات الأحماض الأمينية عن طريق تحليل التتابعات الموازية للنيوكلتيدات فى الجين المسئول عن ذلك البروتين . حيث يتم تكوين cDNA بالنسخ العكسى على قالب mRNA باستخدام انزيم النسخ العكسى Reverse transcriptase ، ثم يتم تحديد تتابعات القواعد

على جزئ د ن أ المنسوخ cDNA وباستخدام الشفرات الوراثية يتم التعرف على التتابعات المقابلة للكوبونات وتحويلها الى ما يوازيها من تتابعات الأحماض الأمينية .



الشكل (١١-٢٢):

استنباط مجموعة من شظايا د ن أ بالقطع العشوائى لسلاسل د ن أ ذات النهايات ´5 المعلمة عند نوع محدد من النيوكلتيدات (عند نهاية A فى هذه الحالة) . يتم الحصول على سلسلة د ن أ المراد تحليلها عن طريق دنترة جزئ مزدوج من د ن أ الذى يتم الحصول عليه بالطريقة المبينة فى الشكل (١١-٢١- ب) ، يتم تقطيع السلسلة بمعاملة كيماوية مخففة تؤدى الى ازالة نيوكلتيدة واحدة من السلسلة مع الابقاء على معظم النيوكلتيدات المشابهة للنيوكلتيدة المزالة . وحيث أن الشظية التى على اليسار هى فقط التى تحتوى على نهاية ´5 معلمة بالفوسفور المشعة ^{32}P فإنها يمكن التعرف عليها فقط بالتصوير بالاشعاع الذاتى للجيل . وتتيح هذه الطريقة امكان استخدام الطريقة الكيماوية لتحليل تتابعات د ن أ كما فى الشكل ١١-٢٣ .



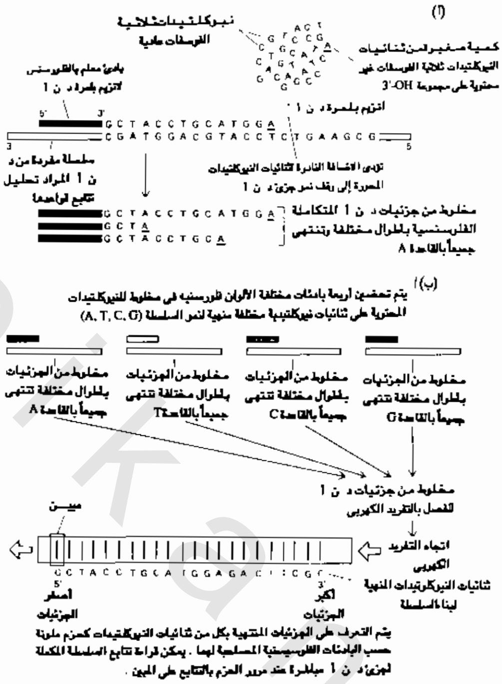
تتابع د ن أ بالقراءة المباشرة
مبتدئاً من قاع الجيل متجهاً إلى أعلى

TGCACTTGAACGCATGCT

الشكل (١١-٢٣):

الطريقة الكيماوية لتحليل تتابعات د ن أ تتبع الطريقة الموصوفة فى الشكل ١١ – ٢٢ فى نفس الوقت على أربعة عينات مختلفة لنفس النهاية '5 المعلمة لجزيئات د ن أ باستخدام معاملات كيماوية تقوم بتقطيع سلسلة د ن أ تفصيلياً عند T فى العينة الأولى وعند C فى الثانية وعند G فى الثالثة وعند A فى الرابعة . يتم تفريد الشظايا الناتجة فى مسارات متوازية لجيل مشابه كما فى الشكل ١١–٢٠–أ . فنحصل على طراز من حزم د ن أ المشعة التى تستخدم لقراءة تتابعات د ن أ ويتم تحديد نوع النيوكلتيدة الأقرب للنهاية ´5 فى التتابع بالفحص المستعرض للجيل عند المستوى ١ (عند قاع الجيل) وتحديد على أى من المسارات تظهر حزمته (T) . وتكرر نفس الطريقة بالنسبة للمستوى ٢ ثم المستوى ٣ . وهكذا ، وبذلك يتم الحصول على التتابع النيوكلتيدى الصحيح .

obeikandl.com



الشكل (١١-٢٤):

طريقة لتحليل تتابع النيوكلتيدات فى د ن أ بالاضافة الانزيمية لنيوكلتيدات انهاء السلسلة . الأساس فى هذه الطريقة هو استخدام نيوكلتيدات لاتحتوى على مجموعة 3´.OH بحيث يؤدى اضافتها الى سلسلة د ن أ الى وقف اضافة النيوكلتيدة التالية : (أ) بناء د ن أ معمليا فى وجود نسبة ضئيلة من هذه النيوكلتيدات يعطى شظايا سلمية د ن.أ. كما سبق الذكر فى الشكل ١١-٢٢ . واذا استخدم د ن أ المشبع لانتاج هذه الشظايا السلمية مع استخدام أربع تفاعلات مختلفة للبناء يشتمل كل منها على نيوكلتيدة مختلفة لانهاء السلسلة ثم اجرى التحليل بالهجرة الكهربية فى أربعة مسارات متوازية الجيل فإنه يمكن التعرف على تتابعات القواعد فى د ن أ كما فى الشكل ١١-٢٣ . إلا أن ما يظهر هنا عبارة عن طريقة حديثة أوتوماتيكية يتم فيها تحليل المجاميع الأربعة المختلفة للشظايا المعلمة عن طريق الخاصية الفلورسينية أثناء تحركها على مسار معين على الجيل (ب) . يتم التعرف على الجزئيات المنهية بكل من ثنائيات النيوكلتيدات كحزم ملونة حسب البادئات الفلوسيسنية المصاحبة لها . يمكن قراءة تتابع السلسلة المكملة لجزئ د ن أ مباشرة عند مرور الحزم بالتتابع على المبين .

obeikandl.com

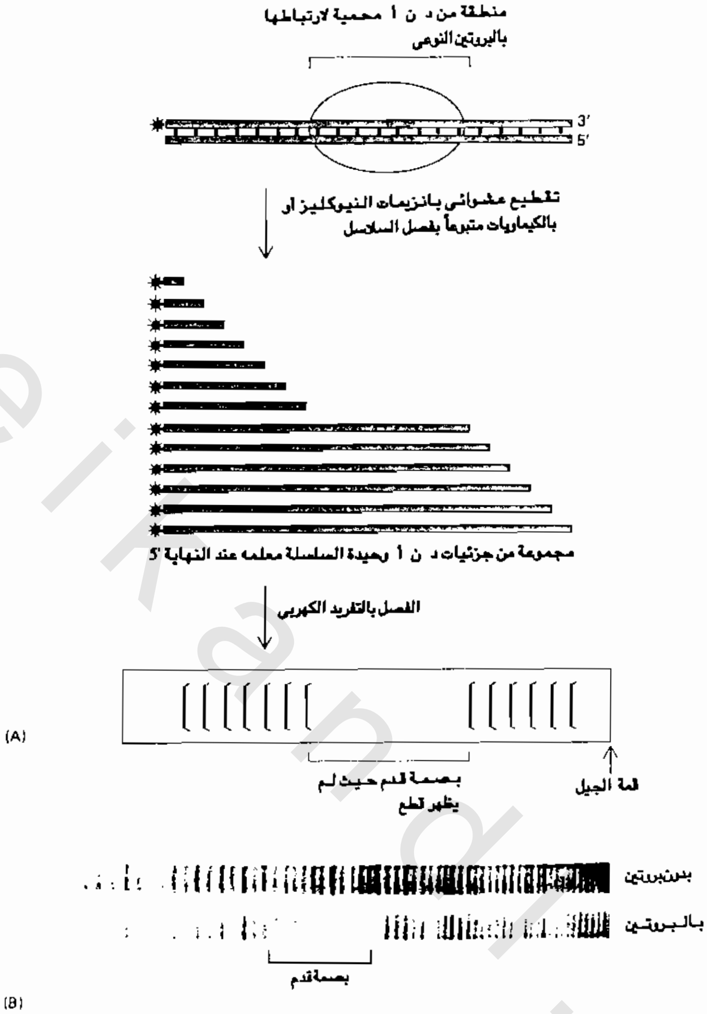
بصمة القدم على د ن أ DNA footprinting :

وهى طريقة معدلة من الطريقتين السابقتين حيث تعتمد على استخدام أحد البروتينات المنظمة regulatory proteins التى تتعرف على تتابعات نوعية على جزئ د ن أ التى تقع عادة خارج منطقة التشفير فى الجين . وتستخدم هذه الطريقة لدراسة كيفية عمل مثل هذه البروتينات المنظمة عن طريق معرفة التتابعات النوعية التى ترتبط بها على جزئ د ن أ.

وتتلخص هذه الطريقة فى الحصول أولا على شظية نقية من د ن أ وتعليمها بالفوسفور المشع ^{32}P عند احدى نهايتيها ثم تكسيرها بأحد انزيمات النيوكلييز Nuclease أو بأحد المواد الكيماوية التى تحدث كسور عشوائية فى الرابطة الفوسفودايستر فى الحلزون المزدوج . ثم يتم فصل القطع المكسورة المعلمة بطريقة التفريد الكهربى ويتم التعرف عليها بالتصوير بالاشعاع الذاتى بحيث تتم مقارنة طرز حزم د ن أ للقطع المكسورة فى وجود البروتين المرتبط بـ د ن أ بتلك الناتجة من قطع د ن أ المكسورة فى غياب ذلك البروتين . فى حالة وجود البروتين فإن ارتباطه يؤدى الى تغطية التتابعات النيوكلتيدية عند موقع ارتباطها النوعى مما يؤدى الى حماية الروابط الفوسفودايستر من الكسر . ونتيجة لذلك فإن الشظية المعلمة المحتوية على موقع الارتباط ستكون غير موجودة بحيث تترك فراغا فى طراز التفريد الكهربى للجيل ويطلق على هذا الفراغ أو الفجوة اسم « بصمة القدم » « footprint » كما فى الشكل (١١-٢٥- أ) ويظهر فى الشكل (١١-٢٥- ب) . بصمة قدم البروتين المنشط للنسخ فى أحد جينات مميزة النواة .

تهجين الأحماض النووية Nucleic Acid Hybridization :

تعتبر هذه التقنية طريقة حساسة للتعرف على تتابعات نوعية من النيوكلتيدات . وتعتمد على خاصية تفكك DNA denaturation سلسلتى الحلزون المزدوج عند تعريضه لدرجة حرارة مرتفعة نسبيا (١٠٠° م) أو بالمعاملة بمحلول ذو درجة تركيز أس الهيدروجين عالى ($pH \geq 13$) . وقد تبين أن هذا التفكك يكون عكسيا بمعنى أن السلاسل المكملة من د ن أ يمكن اعادة اتحادها Annealing لتكوين حلزون مزدوج (فيما يعرف بعملية اعادة الاتحاد Renaturation أو التهجين Hybridization) وذلك عند التبريد البطئ إلى درجة حرارة ٦٥°م .



الشكل (١١- ٢٥):

تقنية بصمة القدم footprinting فى د ن أ :

(أ) يرتبط البروتين بشدة بتتابع نوعي من د ن أ طوله ٨ نيوكلتيدات بحيث يحميه من عوامل الهدم أو التكسير واذا حدث نفس التفاعل بدون ربط هذا البروتين فإن سلما كاملا من الحزم سيظهر على الجيل (لم يمثل فى الشكل) .

(ب) استخدام بصمة قدم فعلية لتحديد موقع الارتباط لبروتين بشرى الذى يحفز نسخ جين نوعى مميز النواة . تحدد هذه النتائج موضع الارتباط على بعد ٦٠ نيوكلتيدة قبل موقع بدء بناء ر ن أ .

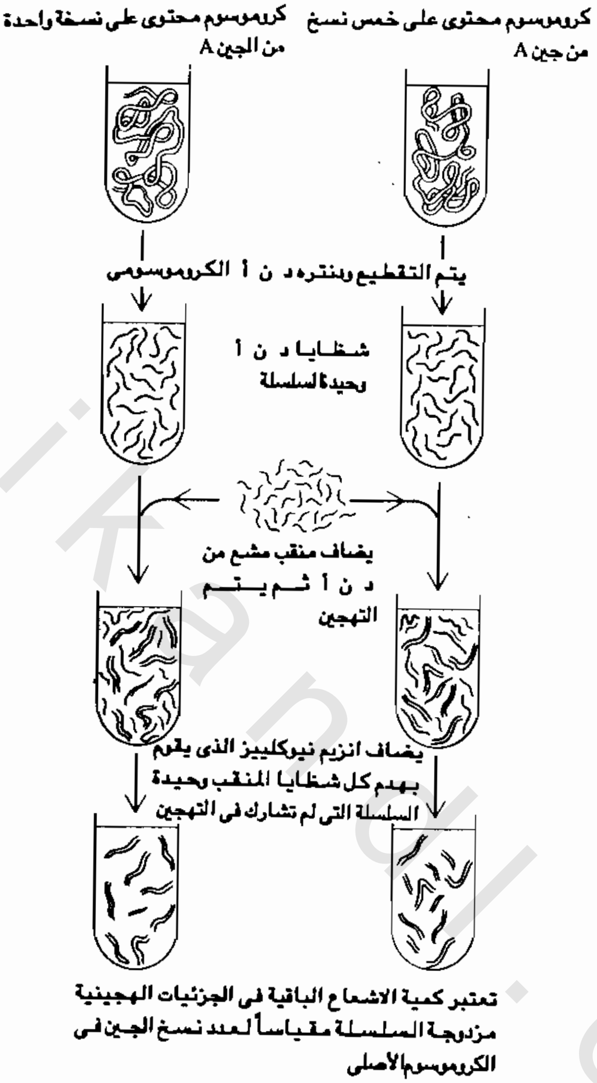
obeikandi.com

وبنفس الطريقة يمكن الحصول على هجين بين أى سلسلتين مفردتين من الأحماض النووية (DNA/DNA ، RNA : RNA ، RNA/DNA) طالما احتوت السلاسل المفردة على تتابعات مكملة حتى يحدث التزاوج بينها . يتحدد معدل أو سرعة تكوين حلزون مزدوج أثناء تفاعل التهجين بالمعدل أو السرعة التى يتم بها الاصطدام العشوائى بين السلاسل المكملة والذى يعتمد بدوره على تركيزها فى محلول التفاعل . ويمكن استخدام معدلات التهجين لتحديد تركيز أى تتابع مرغوب من د ن أ أو ر ن أ فى مخلوط من تتابعات مختلفة . تحتاج هذه التقنية الى سلاسل مفردة نقية من شظايا د ن أ التى تكون فيها التتابعات مكملة لتلك الموجودة فى الحامض النووى (د ن أ أو ر ن أ) التى يراد التعرف عليها . يتم تعليم هذه الشظايا بالاشعاع لاستخدامها كمنقبات لمتابعة أماكن ارتباطها أثناء تفاعل التهجين بالسلاسل المكملة فى الحامض النووى تحت الدراسة .

ويكون التفاعل هنا حساسا لدرجة أنه يمكن التعرف على جزئ واحد ذو تتابع نوعى مكمل من جينوم الخلية بأكمله كما فى الشكل (١١-٢٦) .

وبذلك يكون بمقدورنا معرفة عدد النسخ الخاصة بتتابع د ن أ معين (الموجودة فى المنقب) الموجودة فى جينوم الخلية . ويمكن استخدام نفس التقنية للتعرف على جينات متشابهة ولكنها ليست متطابقة .

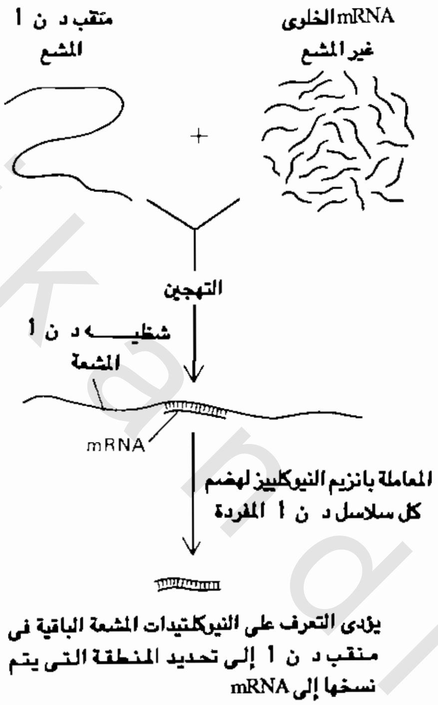
كما يمكن استخدام منقبات د ن أ فى تفاعلات التهجين مع ر ن أ لمعرفة ما اذا كانت خلية معينة يتم بها تعبير جين نوعى معين . فى هذه الحالة يتم تهجين د ن أ المنقب المحتوى على جزء من تتابع الجين مع mRNA النقى والمستخلص من الخلية تحت الدراسة لمعرفة ما اذا كان mRNA يحتوى على تتابع قواعد مكملة لتتابعات المنقب وبأى كمية . وبعد التهجين يتم معاملة المخلوط بأحد انزيمات النيوكليز النوعية للتخلص من شظايا د ن أ المنقب الزائدة والتى لم تتزاوج مع ر ن أ (وجود الأحماض النووية فى صورة حلزون مزوج يحميها من التحلل الانزيمى بالنيوكلييز) . وبذلك يمكن تحديد المناطق التى تزاوج فيها المنقب مع جزيئات ر ن أ الخلوى وبذلك يمكن تحديد مواقع البدء والإنهاء لعملية نسخ ر ن أ كما فى الشكل (١١-٢٧).



الشكل (١١-٢٦):

قياس عدد النسخ من جين نوعى فى عينة من د ن أ بتقنية تهجين د ن أ يطلق علي الشظية المعلمة بالاشعاع والمكونة من سلسلة مفردة من د ن أ والمستخدمة فى هذه التجارب « منقب د ن أ » لايكون د ن أ الكروموسومى معلما بالاشعاع فى هذه الحالة .

كما يمكن تحديد مناطق الانترونات فى الجين . كما يمكن متابعة درجة نشاط الجين فى فترات النمو والتمايز المختلفة للكائن . كما تساعد هذه التقنية فى تحديد مستوى التحكم فى تنظيم التعبير الجينى أى ما اذا كان على مستوى عملية النسخ أو تجهيز ر ن أ أو على مستوى الترجمة الى بروتين .



الشكل (١١-٢٧):

استخدام تقنية تهجين الأحماض الأمينية لتحديد المنطقة فى شظية د ن أ المكلون التى تنسخ الى mRNA . تحتاج هذه التقنية أنزيم إلى نيوكلييز الذى يقوم بقطع سلسلة د ن أ نوعيا فى النقط التى لاتتزاوج فيها القواعد بينه وبين سلسلة ر ن أ المكملة . يمكن رسم خريطة بدء ونهاية جزئ ر ن أ بدقة بهذه الطريقة ، وفضلا عن ذلك يمكن تحديد ورسم خريطة الانترونات الموجودة فى جين مميزة النواة بطريقة مشابهة .

تقنيات نقل الجيل Blot transfer techniques:

تستخدم هذه التقنيات لتسهيل التهجين مع حزم من د ن أ سبق فصلها بالتفريد الكهربى . وتستخدم عادة منقبات د ن أ مع تقنية التفريد الكهربى لمعرفة جزيئات الأحماض النووية المحتوية على تتابعات مكملة لكل أو جزء من تتابعات المنقب المستخدم . ويتم فصل حزم جزيئات د ن أ أو ر ن أ بالتفريد الكهربى حسب حجم الشظايا ثم يجرى تفاعل التهجين فإذا ارتبطت جزيئات د ن أ بمنقب واحد أو بعدد قليل من الجزيئات المنقبة بأحجام مختلفة كان ذلك دليلا على أن التهجين كان بالفعل نوعيا أو تخصصيا . كما أن حجم القطع المهجنة يكون ذو أهمية كبيرة كما يتضح من المثال التالى :

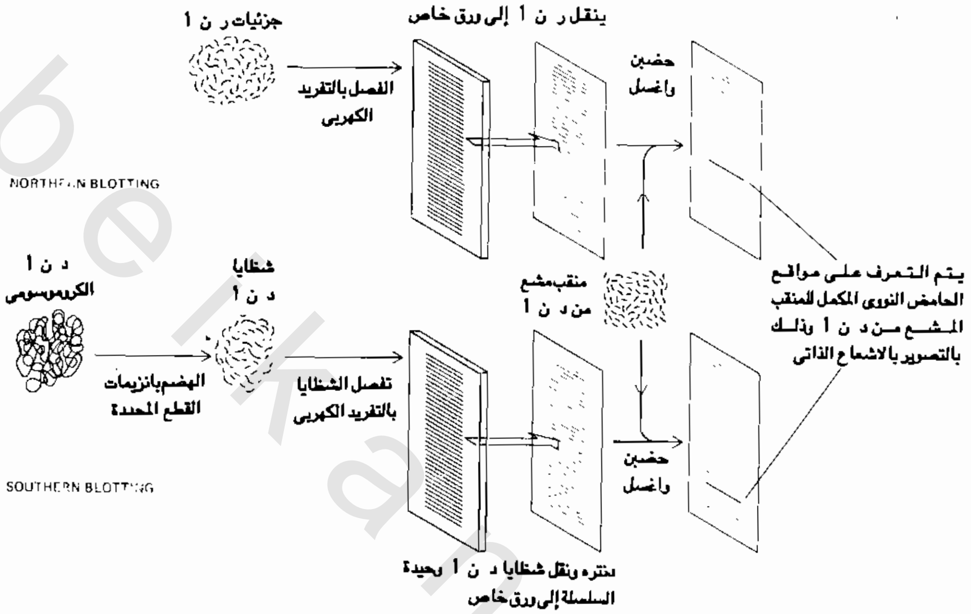
لنفرض أننا نرغب فى معرفة طبيعة الخلل فى فئران طافرة تنتج كميات منخفضة جدا من الالبيومين الذى تنتجه خلايا الكبد عادة بكميات كبيرة ويفرز فى الدم . الخطوة الأولى تتلخص فى استخلاص عينات متماثلة من الألبيومن من أنسجة الكبد من كل من الفئران الطافرة والسليمة ثم يتم فصل د ن أ و ر ن أ من بقية مكونات الخلية ثم يتم فصل د ن أ عن ر ن أ بالطرق المناسبة ، مثل Northern blotting و Southern blotting و Western blotting .

Northern blotting :

لتحليل ر ن أ المشفر للألبيومين بمنقب من د ن أ تستخدم تقنية تسمى Northern blotting. ويبدأ ذلك بفصل جزيئات ر ن أ الطافرة والوحشية بتقنية التفريد الكهربى الى سلسلة من الحزم . ولكى نجعل حزم ر ن أ معرضة للارتباط بمنقب د ن أ يتم عمل نسخة مطابقة للجيل Replica بنقل (blotting) حزم ر ن أ على غشاء من النتروسيليولوز أو ورق النايلون . وبذلك يمكن التعرف على جزيئات (حزم) ر ن أ التى تهجن بالمنقب المشع (لأنها تحتوى على جزء من تتابع الجين الطبيعى للألبيومين) عن طريق تحضين غشاء النتروسيليولوز فى محلول محتوى على المنقب ثم يتم تحديد مكان ارتباط المنقب بحزمه ر.ن.أ. النوعية بالتصوير بالاشعاع الذاتى كما فى الشكل (١١-٢٨-أ) .

يمكن معرفة حجم جزئ mRNA محل الدراسة بمقارنة طراز التفريد الكهربى له مع طراز ر ن أ بأحجام معروفة من ر ن أ القياسية . وبهذه الطريقة يمكن معرفة ما اذا كانت خلايا الكبد الطافرة تنتج ر ن أ الألبيومين بكميات طبيعية وبأحجام طبيعية أو اذا كان ر ن أ

المنتج طبيعي ولكن بكميات ضئيلة . والاحتمال الآخر هو أن ر ن أ الناتج ربما يكون قصير بشكل غير عادى وبالتالي يهاجر بسرعة فى الجيل مما يمكن معه اجراء اختبارات تالية لتحديد أى جزء من ر ن أ القصير هو الذى فقد .



الشكل (١١-٢٨):

طرق التحليل بـ Southern blotting و Northern . بعد تفريد جزيئات ر ن أ أو د ن أ بالهجرة الكهربية فى جيل الأجاروز يتم نقل الجزيئات المتعددة (الحزم) من ر ن أ أو د ن أ الى غشاء نيتروسيليولوز أو نيلون بعملية التشرب blotting . ثم يعرض الغشاء لمنقب مشع من د ن أ لفترة طويلة تحت ظروف التهجين ثم تغسل الورقة جيدا بعد ذلك بحيث تبقى فقط تلك الجزيئات من ر ن أ أو د ن أ التى يتم تثبيتها نتيجة لتهجينها بالمنقب وتصبح معلمة بالاشعاع وتظهر كحزم فى صور الاشعاع الذاتى .

Southern bltting :

لتحديد تركيب جين الألبيومين الطافر تستخدم طريقة تسمى Southern blooting التى تهتم بتحليل د ن أ بدلا من ر ن أ يتم تقطيع د ن أ المستخلص الى شظايا قصيرة نسبيا

obeikandl.com

باستخدام انزيمات القطع المحددة المناسبة . ثم يتم فصل الشظايا حسب حجمها على جيل التفريد الكهربى وتجرى عملية تحديد الشظايا المكملة لمنقب الألبيومين د ن أ المشع بالنقل على ورق النتروسيليولوز والتهجين كما سبق القول فى حالة ر ن أ (الشكل ١١-٢٨-ب) .

وبتكرار هذه التقنية مع استخدام انزيمات قطع محدد مختلفة فى كل مرة يمكن رسم خريطة قطع محددة تفصيلية للجينوم فى منطقة جين الألبيومين . ويمكن من هذه الخريطة تحديد ما اذا كان جين الألبيومين قد حدثت به عملية اعادة ترتيب فى الفأر الطافر كأن يكون قد حدثت به طفرة حذف أو ادخال لتتابع قصير من د ن أ.

Western blotting :

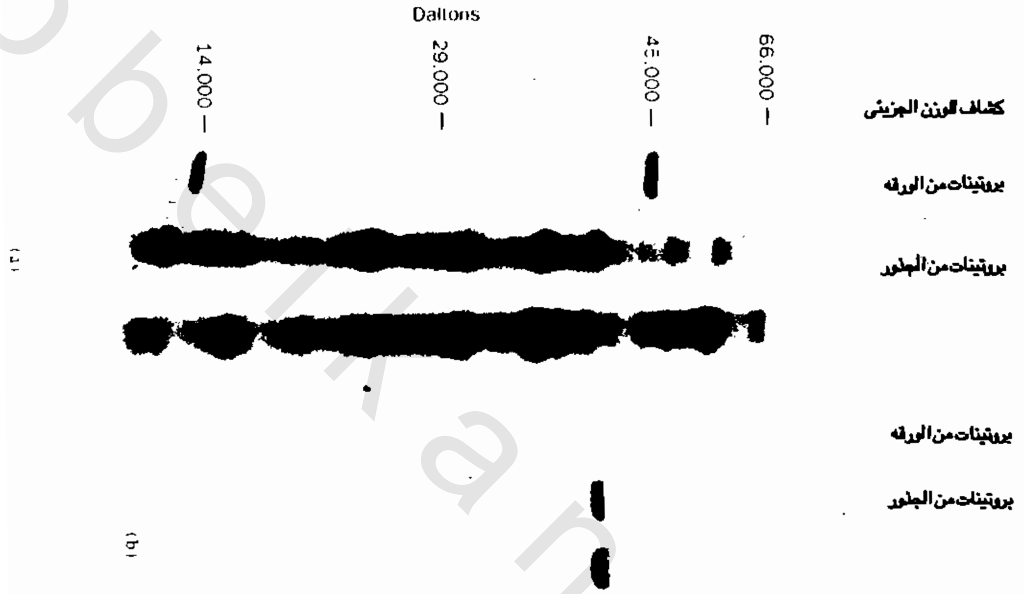
حيث يتم التفريد الكهربى للبروتين (المنتج النهائى للجين) ثم يتم النقل على غشاء النيتروسيليولوز ويتم استكشاف الحزمة البروتينية المرغوبة بمنقب مشع من بروتين الجسم المضاد أو بأى جزئ منقب آخر حسب الغرض من الدراسة حيث يمكن التعرف على حجم جزئ البروتين وتقديره كميا بهذه الطريقة كما فى الشكل (١١-٢٩) .

التهجين فى الموضع *In situ* hybridization :

نظرا لأن الأحماض النووية تحتل عادة أماكن محددة فى الخلايا والأنسجة فإن الكثير من المعلومات قد تفقد أثناء عملية الاستخلاص والتنقية لهذه الأحماض النووية . ولتفادى ذلك أمكن استنباط تقنيات يتم فيها استخدام منقبات متخصصة لتحديد مكان تتابعات نوعية من الأحماض النووية فى الموضع الأصلى لها *In Situ* ويطلق عليها تقنية التهجين فى الموضع *in situ* hybridization .

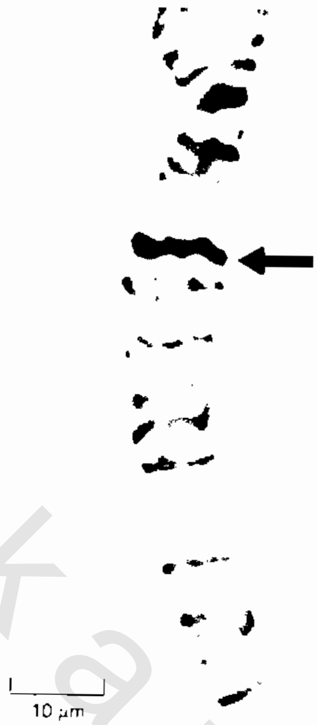
ويمكن اجراء ذلك بالنسبة لتتابعات د ن أ فى الكروموسوم أو ر ن أ فى سيتوبلازم الخلية . يمكن تهجين المنقبات المعلمة بوفرة من الاشعاع مع الكروموسومات التى سبق تعريضها لفترة وجيزة بمعاملة من pH المرتفع ($pH \geq 13$) لاحداث انفكاك للروابط الهيدروجينية بين قواعد د ن أ denaturation . ويتم تحديد المناطق الكروموسومية التى ارتبطت بها المنقب المشع بتقنية التصوير بالاشعاع الذاتى ويمكن زيادة فعالية المنقب بتعليمه كيماويا (بالبيوتين) بدلا من الاشعاع ، ويتم فى هذه الحالة الكشف عن مواقع التهجين بصبغة ستربتافيدين Streptavidin مع استخدام بعض الجزيئات الكشافة كما فى الشكل (١١-٣٠) .

obeikandl.com



الشكل ١١-٢٩ :

استخدام طريقة Western blotting لتحديد بروتينات نوعية بعد الفصل بالتفريد الكهربى بجيل الاكريلاميد : (أ) طراز حزم البروتينات الكلية فى جذور وأوراق نبات الذرة على الترتيب . (ب) تحديد متعدد الببتيد لإنزيم جلوتامين سينثينيز الكلوروبلاستى بتحليل western blot للجيل (p) استخدم منقب عبارة عن بروتين جسم مضاد عالى التخصص monoclonal لنفس الإنزيم . يؤدى التفاعل بين حزمه البروتين فى الجيل والجسم المعتاد النوعى فى وجود عامل مساعد إلى ظهور الحزمة النوعية الداكنة المبينة فى الـ Western blot .



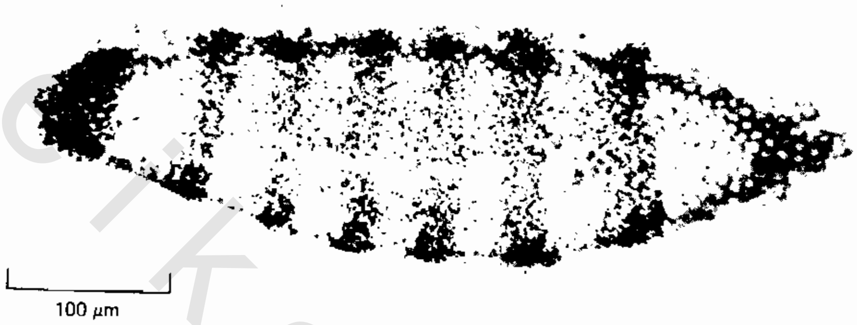
الشكل (١١-٣٠) :

تحديد موقع جين فى الدروسفلا بطريقة التهجين فى الموقع بين منقب من د ن أ المعلم بالبيوتين مع الكروموسومات البوليتينية للدروسفلا . تمت عملية دنترة جزئية لـ د ن أ فى هذا الكروموسوم العملاق بحيث يمكن للمنقب أن يتهجن معه . وبعد التهجين والغسيل ، يمكن تحديد موقع المنقب المرتبط بمعاملة الكروموسوم بانزيم البيروكسيديز المرتبط بمادة ستربتافيدين الذى يعطى رواسب داكنة (السهم) عند تحضين الكروموسوم المعامل مع ماء الهيدروجين (هيدروجين بيروكسيد) وصبغة مناسبة نشطة .

كما تستخدم هذه التقنية أيضا لدراسة توزيع الجزيئات النوعية من ر ن أ فى الخلايا المكونة للنسيج . وفى هذه الحالة لاتعرض الأنسجة لـ pH مرتفع بحيث يبقى د ن أ فى صورة حلزون مزدوج وبذلك لاتستطيع الارتباط بالمنقب . ويتم تثبيت النسيج بلطف بحيث تتم المحافظة على محتواه من ر ن أ بشكل يجعله معرضا للتهجين مع د ن أ المنقب المكمل خلال فترة التحضين المناسبة . وقد أمكن بهذه الطريقة الحصول على طرز متميزة للتعبير الجينى المتغاير

حسب مراحل نمو وتمايز الجنين فى حشرة الدروسفلا كما فى الشكل (١١-٣١) .

وقد ساعدت هذه الطرز على معرفة الميكانيكيات التى تلعب دوراً فى عملية التمايز بين الخلايا الموجودة فى أماكن مختلفة أثناء التمايز والتكوين .



الشكل (١١-٣١):

صورة بالاشعاع الذاتى لمقطع فى جنين صغير جدا للدروسفلا تم تعريضه لعملية التهجين فى الموقع باستخدام منقب مشع من د ن أ مكمل لجين يدخل فى تمايز وتكوين العقد (القطع) Segments . تم تهجين المنقب مع ر ن أ فى الجنين ، ويبين طراز حبيبات الفضة المعرضة أن ر ن أ المتكون بين الجين (ويسمى Ftz) يترتب فى حزم متبادلة يتكون كل منها من ٣-٤ خلايا على طول الجنين . وعند هذه المرحلة من التكوين (المسماة بلاستوديرم) يحتوى الجنين على حوالى ٦٠٠٠ خلية .

استعمال ر ن أ ، مضاد المعنى ، لتنظيم تعبير الجين:

Anti-Sense RNA and Regulation of Gene Expression :

تعتمد هذه الطريقة على بناء جزيئات من ر ن أ متكاملة مع ر ن أ المراسل mRNA الناتج من نسخ جين معين . ويطلق على هذا الأخير اسم ر ن أ ذو معنى Sense RNA نظرا لأنه يحمل الكودونات التى تتم قراءتها أثناء عملية الترجمة لانتاج بروتين فعال يحتوى على

تتابع نوعى من الأحماض الأمينية . ومن جهة أخرى يطلق على النسخة المكملة من ر ن أ « مضاد المعنى » Anti sense نظرا لأن تتابع النيوكلتيدات بها يكون معكوس بالنسبة للتتابع على النسخة الأصلية مما يترتب عليه عدم امكان قراءة كودونات شفرية صحيحة وذات معنى بل تقرأ على أنها كودونات انهاء الترجمة فى أى اطار قراءة من الاطارات الثلاثة لها .

يؤدى توافر ر ن أ مضاد المعنى مع ر ن أ المراسل الطبيعى لنفس الجين فى سيتوسول الخلية الى حدوث تجانب نوعى بينهما بحيث ينتج جزئ مزدوج هجين من ر ن أ وبديهى أنه لايمكن ترجمة مثل هذا الجزئ المزدوج مما يعنى عدم الحصول على الناتج النهائى لتعبير هذا الجين (البروتين) وبالتالى يكون بمقدورنا تحديد وظيفة هذا الجين .

وتتلخص طريقة انتاج ر ن أ مضاد المعنى لجين ما فى الخلية فى الآتى :

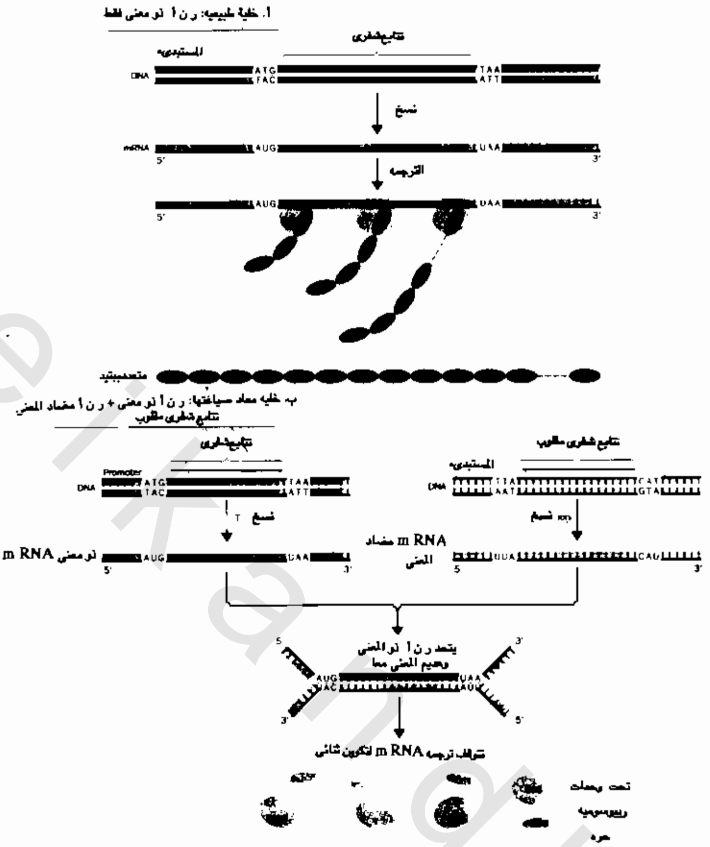
١. كلونة الجين المطلوب دراسته .

٢. فصل التتابع الشفرى للجين عن منطقة البروموتور الخاص به باستخدام انزيمات القطع المحددة المناسبة .

٣. اعادة اتحاد التتابع الشفرى للجين مع نفس البروموتور ولكن فى اتجاه معكوس التتابع .

٤. إعادة ادخال هذا التتابع المعكوس المتحد بالبروموتور؛ أى الجين المضاد المعنى، الى الخلية المضيفة باحدى طرق التحول الوراثى .

ويبين الشكل (١١-٣٢) خطوات هذه العملية ونتائجها . وتكون المحصله النهائية لهذه العملية هى أن الجين المعكوس التتابع سيتم نسخه الى نسخ من ر ن أ مضاد المعنى وهذه بدورها عند اصطدامها بالنسخ الطبيعية لـ ر ن أ المراسل لنفس الجين « ذو المعنى » تتزاوج معها مكونة جزئ ر ن أ مزدوج لايمكن ترجمته مما يؤدى الى توقف انتاج البروتين الذى يشفر له هذا الجين .



الشكل (١١-٣٢):

رسم تخطيطى لاستخدام « تقنية ر ن أ » مضاد المعنى لايقاف التعبير الجينى .

(الى أعلى) : خلية طبيعية يتم بها انتاج سلسلة متعدد الببتيد (الناتج النهائى) من خلال عمليتى النسخ والترجمة .

(الى أسفل) : خلية محتوية على «جين مضاد المعنى» جنبا الى جنب مع الجين الطبيعى «ذو المعنى» . ويتم انتاج الجين المضاد للمعنى باستئصال التتابع الشفرى (باستخدام احد انزيمات القطع المحددة النوعية) واعادة اتحادها معكوسة التتابع مع البروموتور . يؤدى وجود ر ن أ الأصلى «ذو المعنى» مع النسخة المضادة المعنى الى تكوين جزئ مزدوج من ر ن أ لايمكن ترجمته بواسطة الريبوسومات وبالتالى لاتنتج سلسلة متعدد الببتيد لهذا الجين .

obeikandl.com

وقد تم استخدام ر ن أ مضاد المعنى فى ايقاف تعبير عدد كبير من الجينات فى كل من غير مميزة النواة ومميزة النواة . وبالاضافة الى استخدامه فى ايقاف تعبير الجينات معروفة الوظيفة فإنه يمكن استخدامه أيضا فى التعرف على وظيفة الجينات المجهولة الوظيفة . اذ يمكن استخدام ر ن أ مضاد المعنى فى انتاج طفرات وظيفية بحيث يعطى الشكل المظهرى الطافر للكائن الذى حدثت به هذه العملية معلومات هامة عن وظيفة الجين فى الخلية المتأثرة .

ولكى نضمن الحصول على ايقاف تام للتعبير الجينى فإنه إما أن يستخدم بروموتور قوى جدا لدفع عملية نسخ التتابع الشفرى المعكوس أو أن يتم إدخال عدد كبير من نسخ ر ن أ مضاد المعنى الى الخلية المضيفة .