

الفصل الثاني عشر

تكنولوجيا د. ن. أ المعاد صياغته

Recombinant DNA Technology

شهد النصف الثاني من خمسينيات القرن العشرين 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 المسؤولة عن الصفات المختلفة للكائن فى تتابع القواعد النيتروجينية الموجودة على شريط د. ن. أ فى النواة. أعقب ذلك تطورات متلاحقة فى الستينات للتعرف على الأساس الجزيئ 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 يسأتى بجديد.

تكنولوجيا الجين المعاد صياغته:

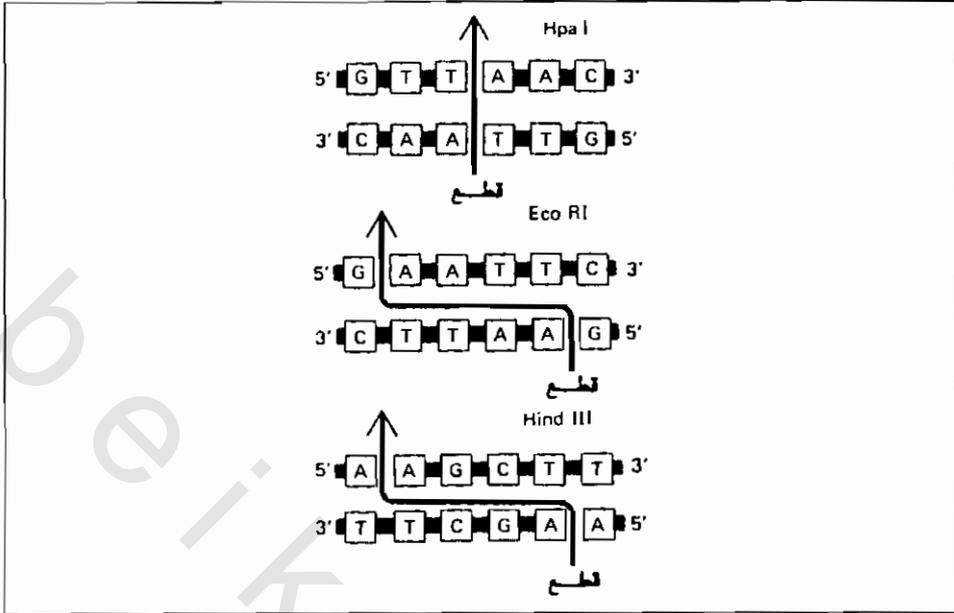
Recombinant DNA Technology :

شهد منتصف السبعينات ميلاد Recombinant DNA Technology أو تقنية الجين Gene Technology. وفيما يلي شرح مختصر لبعض العناصر الرئيسية المستخدمة في هذه التقنية.

انزيمات القطع المحددة Restriction Endonucleases:

توجد بعض انزيمات القطع الداخلي Endonucleases وهي تلك الانزيمات التي تقوم بقطع جزيء د. ن. أ عند تتابعات محددة من أزواج القواعد الداخلية يطلق عليها تتابعات التعرف Recognition Sequences والتي يوجد بداخلها موقع معين يعرف بموقع القطع Cleavage Site.

وتعتبر إنزيمات القطع الداخلي الأداة الرئيسية في بحوث د. ن. أ المعاد صياغته Recombinant DNA. وقد جاءت تسمية هذه الانزيمات في الأصل بالانزيمات المحددة Restriction Enzymes نتيجة لأن وجودها في خلية بكتيرية معينة يحد أو يمنع نمو البكتريوفاج بها. تقوم انزيمات القطع الداخلي بقطع د. ن. أ الى قطع صغيرة عند تتابع نوعي متخصص محدد. وعلى العكس من معظم التفاعلات الانزيمية أو الكيماوية أو الفيزيائية التي تحدث قطعاً عشوائياً في جزيء د. ن. أ فإن هذه الإنزيمات المحددة والتي يبلغ عددها حوالي ٢٠٠ انزيم تتعرف على تتابعات نوعية قصيرة مكونة من ٤-٦ أزواج من القواعد وتُحدث كسر نوعي فيها كما في الشكل (١٢-١).



الشكل (١٢-١): تتابعات النيوكليوتيدات في د ن أ التي يتم التعرف على كل منها بواسطة ثلاثة إنزيمات قطع محددة شائعة الاستخدام و يتكون التتابع عادة من ستة أزواج من القواعد

ويوجد إلى جانب هذه الانزيمات في الخلية البكتيرية مجموعة مصاحبة من انزيمات الميثلة DNAmethylases التي تقوم باضافة مجموعات ميثيل إلى جزئ د. ن. أ البكتيري حتى تحمية من أن يستخدم كمادة تفاعل فتقوم انزيمات القطع المحددة لنفس البكتريا بتكسيره وهضمة ذاتياً. وعلى ذلك فإن انزيمات ميثلة د. ن. أ النوعية الموقع تكون ملازمة دائماً لانزيمات القطع المحددة في البكتريا. تسمى انزيمات القطع حسب نوع البكتريا التي تستخلص منها هذه الانزيمات كما في الجدول (١٢-١).

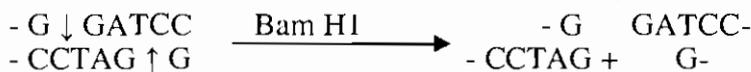
الجدول (١٢-١): بعض الانزيمات محددة القطع الداخلي والتتابعات النوعية التي تتعرف عليها وموقع القطع لكل منها (↓).

المصدر البكتيري	التتابع المميز	الانزيم
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> H.	G ↓ GATCC CCTAG ↑ G	Bam HI
<i>Bacillus globigi</i>	A ↓ GATCT TCTAG ↑ A	Bg I II
<i>E. coli</i> RY13	G ↓ AATTC CTTAA ↑ G	Eco RI
<i>E. coli</i> R245	↓ CCTGG GGACC ↑	Eco RII
<i>Haemophilus influenzae</i> Rd	A ↓ AGCTT TTCGA ↑ A	Hind III
<i>Haemophilus haemolyticus</i>	GCG ↓ C C ↑ GCG	Hha I
<i>Haemophilus parainfluenza</i>	GTT ↓ AAC CAA ↑ TTG	Hpa I
<i>Microcoleus</i> strain	CC ↓ TNAGG GGANT ↑ CC	Mst II
<i>Providencia stuartii</i> 164	CTGCA ↓ G G ↑ ACGTC	Past I
<i>Thermus aquaticus</i> YTI	T ↓ CGA AGC ↑ T	Taq I

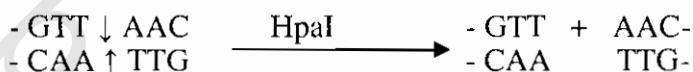
* N= أي نوع من النيوكليوتيدات الأربعة.

فمثلاً انزيم Eco RI يستخلص من بكتريا القولون *E. coli* وهكذا. تكون أول ثلاث حروف من اسم الانزيم مشتقة من أول حرف في الجنس البكتيري الذي يستخلص منه (E) والحرفين الأولين في النوع البكتيري (co)، وقد يتبع ذلك اسم السلالة النوعية التي استخدمت في الاستخلاص (R) ورقم لاتيني (I) يحدد أسبقية اكتشاف الانزيم. يتعرف كل انزيم على تتابع نوعي من أزواج القواعد في جزئ د. ن. أ مكونا من ٤-٧ من أزواج القواعد. ويحدث كسراً محدداً به [وتبين الأسهم في الجدول (١٢-١) مكان القطع بين القواعد لكل

انزيم] وقد ينتج عن القطع نهايات مزدوجة السلسلة blunt ends كما فى حالة انزيم (Hpa I) أو نهايات وحيدة السلسلة sticky ends (لزجه) كما فى حالة انزيم Bam HI كما فى الشكل التالى :



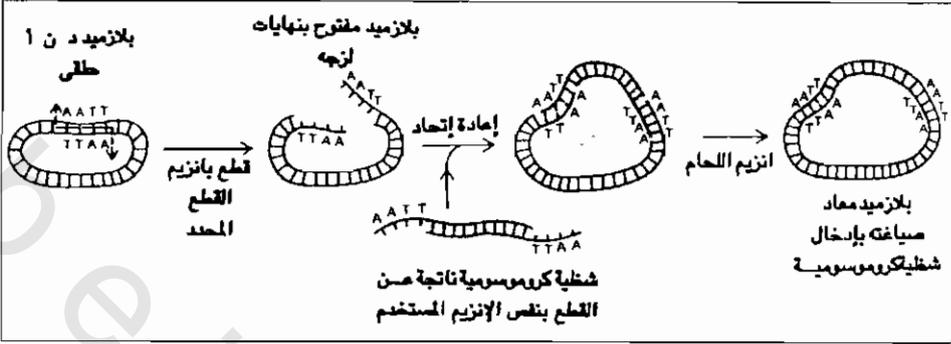
نهاية لزجة



نهاية مزدوجة .

ويرجع ذلك إلى الميكانيكية التى يستخدمها الانزيم. وتعد النهايات اللزجة ذات فائدة عملية كبيرة فى تكوين جزئ د. ن. أ هجينى معاد صياغته (الشكل ١٢-٢) يمكن فى حالة عدم الحصول على نهايات فردية لزجة Sticky Ends، استخدام انزيم Terminal Transferase للحصول على ذيل فردى فى نهاية القطع المحددة وفى وجود عدد معين من نيوكليوتيدات dATP لانتاج ذيل من عديد الادينين Poly A Tail (طوله حوالى ١٠٠ نيوكليوتيدة) على النهاية (3') على د.ن.أ البلازميد بينما يمكن اضافته إلى ذيل من عديد الشايمين Poly T بنفس الطول على نهاية د. ن. أ المرغوب اضافته إلى البلازميد. ويتم بعد ذلك التقاء القطع عند الذبول المتكاملة بخاصية تزاوج القواعد Base Pairing ويتكون بينها روابط هيدروجينية وتستكمل عملية الالتحام بمساعدة انزيمات Polymerase I وLigase كما سبق الذكر (أنظر الشكل ١٢-٢). وإذا افترضنا أن النيوكليوتيدات تكون موزعة بنتابع 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) في حين أن الانزيم الذي يتعرف على ٦ أزواج من القواعد سيقوم بالقطع كل ٤٠٩٦ زوج نيوكليدي (٤).



الشكل (١٢-٢): تمكن النهايات اللزجة الناتجة من بعض أنواع إنزيمات القطع المحددة من إتحد قطع من د ن أ ببعضها حسب قانون تزاوج القواعد المكتملة. شظايا د ن أ المتصلة بهذه الكيفية يمكنها تكوين روابط تساهمية قوية بمساعدة إنزيم الليجيز ويبدو في الشكل بلازميد معاد صياغته بإضافة د ن أ كروموسومي إليه

ونتيجة لذلك فإن قطعة ما من د. ن. أ ستحتوى على مواقع خطية مختلفة ومميزة للأنزيمات المختلفة وبالتالي يمكن رسم خرائط القطع المحدد Restriction Maps. وعند هضم د. ن. أ بأنزيم قطع معين فإن نهايات جميع القطع الناتجة ستكون محتوية على نفس التتابع النيوكليدي ويمكن عزل القطع الناتجة باستخدام تقنية التفريد الكهربى باستخدام جيل الأجاروز Agarose كما سيأتى بعد. وتعد هذه الخطوة أساسية فى الكلونة Cloning كما تعتبر أحد الاستخدامات الرئيسية لهذه الانزيمات. ويمكن بالاستخدام الصحيح لهذه الانزيمات واختيار الانزيم المناسب الحصول على شظايا قصيرة نسبياً من د. ن. أ تحتوى على جين معين ويمكن فصل هذه الشظية عن بقية الشظايا غير المرغوبة بطريقة التفريد الكهربى.

بالإضافة إلى هذه المجموعة من انزيمات القطع المحدد توجد عدة انزيمات تقوم بأدوار رئيسية في مجال الهندسة الوراثية، ويخلص الجدول (١٢-٢) دور هذه الانزيمات في بحوث د. ن. أ المعاد صياغته .Recombinant DNA

الجدول (١٢-٢) بعض الانزيمات الهامة في بحوث د ن أ المعاد صياغته

الدور الأساسي	التفاعل	الانزيم
التخلص من مجاميع 5'-P04 قبل التعلیم بالكينيز لمنع الالتحام الذاتي self-ligation	نزع مجموعة الفوسفات من النهاية 5' من ر. ن. أ أو د.ن. أ	١- أنزيم الفوسفاتيز القاعدي Alkaline phosphatase
تقصير مضطرد في جزئ د.ن. أ	تحليل كل من النهايتين 5', 3' في جزئ د. ن. أ	٢- BAL 31 nuclease
توصيل جزيئات د. ن. أ ببعضها	يساعد في الربط بين جزيئات د. ن. أ	٣- أنزيم لحام د. ن. أ DNA ligase
بناء د.ن.أ المزدوج السلسلة وعمل ثغرة للترجمة -nick translation	بناء د.ن.أ مزدوج السلسلة من د.ن.أ أحادي السلسلة	٤- DNA Pol I
ثغرة الترجمة - وعمل خريطة لمواقع التتابعات فائقة الحساسية.	تحت الظروف المناسبة ينتج قطع وحيدة السلسلة في د.ن.أ	٥- DNase I
دراسة تتابعات قواعد د.ن.أ وعمل خريطة التفاعل بين د.ن.أ والبروتين	نزع نيوكلييدات من النهاية 3' لجزئ د.ن.أ	٦- Exonuclease III
دراسة تتابعات قواعد د.ن.أ DNA sequencing	نزع نيوكلييدات من النهاية 5' لجزئ د. ن. أ	٧- λ Exonuclease

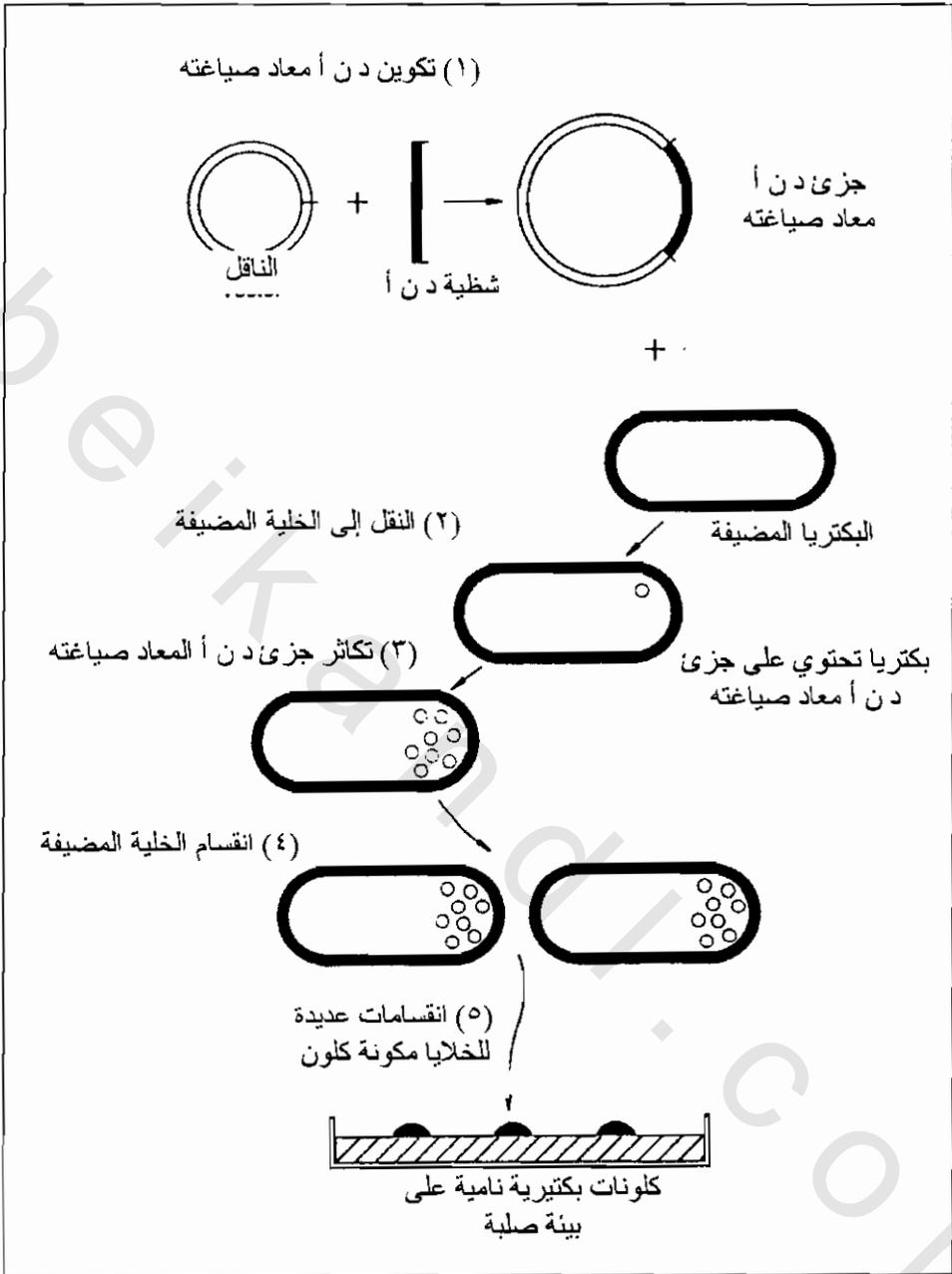
تعلـيم RNA أو DNA بالفوسفور المشع P^{32} .	نقل الفوسفات الطرفية (موقع γ) من ATP الى مجموعات 5'-OH فى دن.أ أو ر.ن.أ	Polynucleotide kinase -8
بناء cDNA من mRNA وفى دراسة خريطة النهاية 5' من RNA	بناء DNA على قالب RNA	9- انزيم النسخ العكسى Reverse Transcriptase
ازالة عروة دبوس الشعر Hairpin فى عملية بناء cDNA وفى دراسة خريطة mRNA (من كلا النهايتين 5', 3')	هدم دن.أ وحيد السلسلة	10- S I nuclease
اضافة ذيل متعدد متجانس Homopolymer (أى مكون من قاعدة واحدة متكررة مثل Poly A) لتكوين نهايات لزجة.	اضافة نيوكليوتيدات إلى النهاية 3' من جزئ دن.أ بدون الحاجة إلى قالب دن.أ	11- Terminal Transferase

الكلونة Cloning:

يمكن تعريف الكلون بأنه عدد كبير من الجزيئات أو الخلايا المتطابقة التي تنشأ من أصل واحد. يمكن عن طريق الكلونة انتاج أعداد كبيرة من جزيئات دن.أ المتماثلة التي يمكن تعريفها وتمييزها أو استخدامها فى أغراض اخرى. تعتمد هذه التقنية على حقيقة أن جزيئات دن.أ الهجينية "الكيميرى" يمكن ادخالها فى ناقلات الكلونة Cloning Vectors التي تكون عادة أما بلازميد بكتيرى أو فاج أو كوزميد Cosmid والذي 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. وتتلخص الخطوات الأساسية لكلونة الجين Gene Cloning (الشكل ١٢-٣) في الآتي:

- ١- إدخال قطعة أو شظية من د.ن.أ محتوية على الجين المطلوب كلونته في ناقل الكلونة Cloning Vector لا نتاج د.ن.أ معاد صياغته (كيميائي) Recombinant DNA.
- ٢- يلعب الناقل دور وسيلة الانتقال لإدخال الجين إلى الخلية المضيفة والتي تكون عادة بكتريا على الرغم من أنه يمكن استخدام خلايا حيية أخرى لاستضافة الجين.
- ٣- يتكاثر الناقل داخل الخلية المضيفة منتجا أعداد كبيرة جداً من النسخ المتطابقة بما في ذلك نسخ من الجين المكون.
- ٤- عندما تنقسم الخلية المضيفة فإن نسخ من جزيئات د.ن.أ المعاد صياغته Recombinant DNA تمر إلى خلايا النسل حيث يحدث بها تضاعف جديد للناقل.
- ٥- بعد عدد كبير من انقسامات الخلية المضيفة نحصل على كلون Clone (مستعمره) من الخلايا المضيفة المتطابقة وتحتوي كل خلية في هذا الكلون على نسخة أو أكثر من د.ن.أ المعاد صياغته. ويقال للجين المحمول في الجزيء المعاد صياغته أنه قد تكلون Cloned.



الشكل (١٢-٣): الخطوات الأساسية في عملية كلونة الجين

أنواع ناقلات الكلونة Cloning Vectors:

البلازميدات:

تكون البلازميدات البكتيرية عادة مكونة من جزئ صغير حلقي مزدوج من د.ن.أ والذي تكون وظيفته الطبيعية هي إكساب الخلية المضيفة لصفة المناعة ضد بعض المضادات الحيوية. وللبلازميدات عدة خواص تجعلها مفيدة جدا كناقلات الكلونة. إذ انها توجد كنسخة وحيدة أو عدة نسخ في البكتريا، وتتناسخ مستقلة عن د. ن. أ البكتيري كما أن تتابع القواعد فى جزئ د.ن.أ البلازميد معروف بالكامل مما يتيح معرفة المكان الدقيق لنشاط القطع للانزيم والذي يتم فيه إدخال د.ن.أ المراد اضافته. ويكون 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 (الاجنبى) فى عدة مواقع للقطع الانزيمى المحدد. ويتم تجميع د. ن. أ الهجينى (الكيميرى) بعد أن يستكمل الفاج دورة التحلل للبكتريا Lytic Cycle وينتج وحدات فاج ناضجة معدية، والميزة الرئيسية للناقلات من نوع الفاج هي أنه بينما يمكن للبلازميد استقبال أو ادخال شظية د. ن. أ بطول حوالى 1-10 كيلو قاعدة، فإن الفاج يمكنه استقبال شظايا د ن أ. بطول يتراوح بين 10-20 كيلو قاعدة ويرجع ذلك إلى أن ما يمكن لحجم رأس الفاج أن تستوعبه يكون محدوداً.

الكوزميد Cosmid:

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

والكوزميد عبارة عن بلازميد يحتوى على تتابع د.ن.أ تسمى مواقع (Cos Sites) المطلوبة لتعبئة د.ن.أ لامتداداً في حبيبة الفاج. وتتمو هذه الناقلات في صورة بلازميد في البكتيريا، ولكن حيث أن معظم د.ن.أ اللامبدا يتم استبعاده فإنه يمكن إدخال قطع أكبر من د.ن.أ الكيميري في رأس الحبيبة الفيروسيّة. ويمكن للكوزميد أن يستوعب قطع د.ن.أ بطول من ٣٥ إلى ٥٠ كيلو قاعدة.

وقد استنبطت مؤخراً ناقلات كلونة Cloning vectors لديها القدرة على استيعاب شظايا د.ن.أ ذات احجام أكبر . ومن أهم هذه الناقلات:

الكروموسوم البكتيري الصناعي:

Bacterial Artificial Chromosomes BAC's:

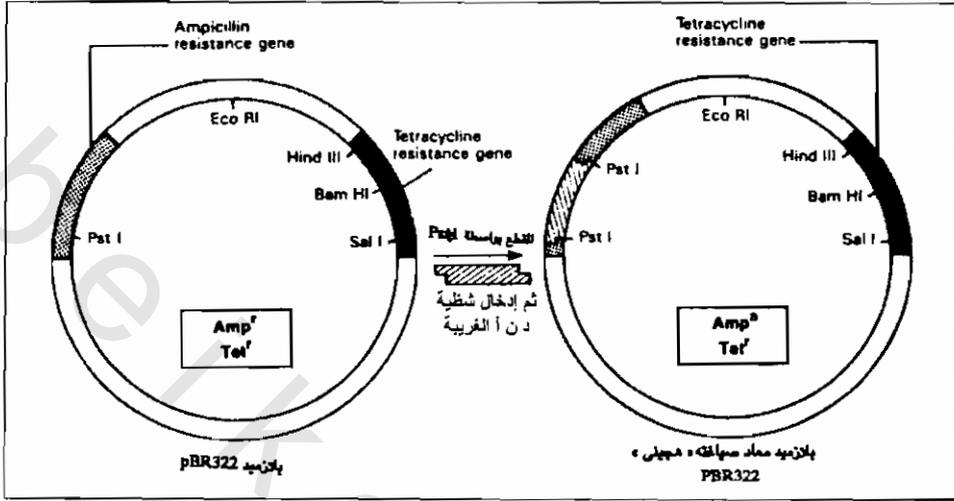
المشتق من بلازميد F. ويمكن لهذا الناقل أخذ شظية د.ن.أ بطول ٣٠٠-٦٠٠ ك قاعدة مما يؤدي إلى خفض عدد كلونات مكتبة الجينوم البشري إلى ٣٠٠٠٠ كلون فقط. كما استنبطت ناقلات تجمع بين مزايا بكتريوفاج P1 وBAC's ويطلق عليها PAC's PI-Derived Artificial Chromosomes وتصل سعة هذا الناقل الى ٣٠٠ ك قاعدة. ومن جهة أخرى امكن تكوين ناقل ذو سعة كبيرة تصل من ٦٠٠-١٢٠٠ ك قاعدة ويطلق عليه Yeast Artificial Chromosome YAC's وهو مشتق من بلازميد بكتريا القولون PBR322 مع إضافة عدد من جينات الخميرة اليه. ويبين الجدول (١٢-٣) مقارنة بين سعة هذه الناقلات.

الجدول (١٢-٣) بعض الناقلات الشائعة الاستخدام في الكلونة

حجم د.ن.أ الذي يمكن ادخاله (kb)	الناقل vector
١٠ - ٠,١	Plasmid pBR 322
٢٠ - ١٠	Lambda Phage 4 A
٥٠ - ٣٥	Cosmids
٦٠٠ - ٣٠٠	BAC's
١٢٠٠ - ٦٠٠	YAC's
٣٠٠	PAC's

يمكن أثناء عملية إدخال د.ن.أ إلى منطقة فعالة للناقل Vector أن يحدث تداخل مع عمل أو نشاط هذه المنطقة. ولذلك يجب الحذر من الاخلال بأحد الوظائف الضرورية للناقل. إلا أن هذا المفهوم يمكن استغلاله أيضا للتوصل إلى تقنية انتخابية. إذ يحتوى البلازميد pBR322 مثلا على جين المناعة ضد المضاد الحيوى (tet^R) Tetracyclin، وكذلك الجين الخاص بالمناعة ضد Ampicillin (amp^R) ويستخدم عادة موقع واحد للانزيم Pst1 داخل جين المقاومة للامبسلين (amp^R) كموقع إدخال لقطعة من د.ن.أ الغريب. وبالإضافة إلى أن هذا الموقع يحتوى على نهاية لزجة، فإن د.ن.أ المضاف في هذا الموقع سيحدث خلافا في جين المقاومة للامبسلين مما يؤدي إلى أن تكون الخلية البكتيرية الحاملة لهذا البلازميد حساسة للامبسلين كما في الشكل (١٢-٤) وبالتالي يمكن التمييز بين البلازميد الأصلي والبلازميد الهجينى بفقد الأخير لصفة المقاومة للامبسلين مع احتفاظه بالمقاومة للتراسيكلين. ويمكن التأكد من حدوث الإدخال عن طريق معرفة الفرق في الحجم بين البلازميد الأصلي والبلازميد الهجينى بطريقة التفريد الكهربى، حيث يكون البلازميد الأخير أكبر حجما عن الناقل الأصلي.

وستعرض فيما بعد للطرق المختلفة لاختيار الكلون المحتوى على الجين محل الدراسة.



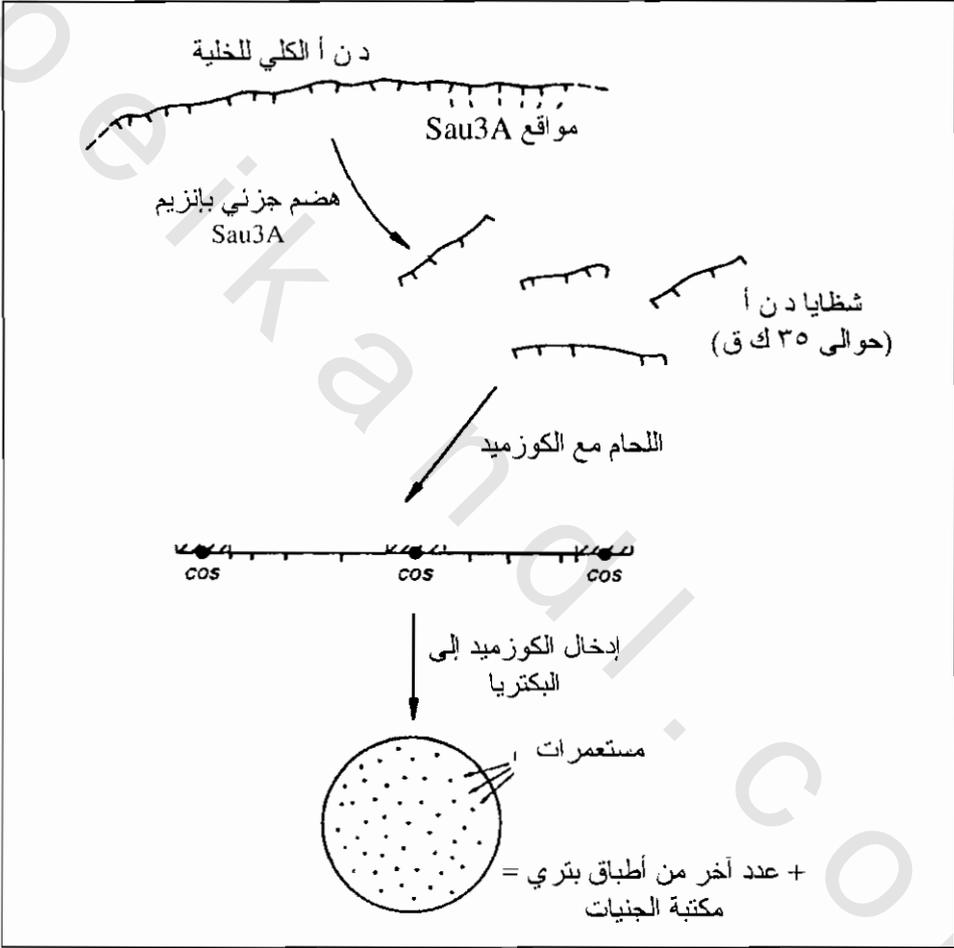
الشكل (١٢-٤): يتم التعرف على البلازميد المعاد صياغته بإدخال شظية د ن أ المرغوبة باستخدام إنزيم PstI مما يحدث دخلا في الجين المسنول عن المقاومة للأمبسلين مما يفقده القدرة على المقاومة لهذا المضاد الحيوى عند تنمية البكتريا في بيئة محتوية على الأمبسلين

مكتبة د.ن.أ (بنك الجينات) Gene library:

أ- المكتبة الجينومية:

يمكن باستخدام انزيمات القطع المحددة والأنواع المختلفة لناقلات الكلونة تعبئة الجينوم الكامل لكائن ما في ناقلات. يطلق على المجموعة المكونة من هذه الكلونات المعاد صياغتها اسم المكتبة الجينومية. يمكن تكوين مكتبة جينوم من جميع قطع د.ن.أ. المأخوذة من خط خلايا أو نسيج معين بحيث تكون هناك فرصة لاحتواءها على جميع الجينات الخاصة بهذا الكائن المأخوذة منه.

يتم انتاج مكتبة الجينوم بعزل وتنقية محتوى الخلية من د.ن.أ. بإجراء عملية هضم جزئي لـ د.ن.أ. بإنزيم قطع يتميز بارتفاع معدل نشاطه القطعي مثل Sau3A. والغرض من ذلك هو الحصول على شظايا د.ن.أ. طويلة نسبيا مما يضمن أن معظم الجينات ستكون سليمة ولم يحدث لآى منها أى تجزئة نتيجة القطع (الشكل ١٢-٥).



الشكل (١٢-٥): تكوين مكتبة جينات فى ناقل الكوزميد

ويمكن استخدام الفاج كناقل في مثل هذه المكتبات أو الكوزميد أو YAC أو BAC لأنها تسمح بإدخال شظايا د.ن.أ كبيرة نسبياً (جدول ١٢-٣) وحيث أن الهدف هو الحصول على مكتبة كاملة فإن عدد الشظايا المطلوب يكون متناسباً عكسياً مع حجم الشظية وطردياً مع حجم الجينوم كما في الجدول (١٢-٤).

الجدول (١٢-٤) عدد الكلونات Clones اللازمة لتكوين المكتبة الجينومية لمجموعة من الكائنات

النوع Species	حجم الجينوم (bp)	عدد الكلونات اللازمة		
		شظايا ١٧ ك قاعدة (١)	شظايا ٣٥ ك قاعدة (٢)	شظايا ٣٠٠ ك قاعدة (٣)
بكتريا القولون	$٤,٦ \times ١٠^6$	٨٢٠	٤١٠	٤١
خميرة الخباز	$١,٨ \times ١٠^٧$	٣٢٢٥	١٥٠٠	١٥٠
حشرة الدروسفلا	$١,٢ \times ١٠^٨$	٢١٥٠٠	١٠٠٠٠	١٠٠٠
الانسان	$٣,٢ \times ١٠^٩$	٥٦٤٠٠٠	٢٧٤٠٠٠	٣٠٠٠٠
الضفدع	$٢,٣ \times ١٠^{١٠}$	٤٠٥٣٠٠٠	١٩٦٩٠٠٠	١٩٦٩٠٠
الأرز	$٥,٧ \times ١٠^٨$	١٠٠٠٠٠	٤٩٠٠٠	٤٩٠٠

* محسوبة على أساس احتمال $P=95\%$ أن أي جين معين سيكون موجود في المكتبة. (١) باستخدام λ فاج كناقل للكلونه. (٢) باستخدام الكوزميد كناقل للكلونه. (٣) باستخدام BAC's كناقل للكلونه.

تمثل الأعداد المذكورة في الجدول عدد شظايا د.ن.أ (كلونات مستقلة) اللازمة للوصول إلى احتمال 95% لإمكان الحصول على تتابع معين من د.ن.أ في مكتبة د.ن.أ المعاد صياغته بمتوسط طول الشظية المدخلة $١,٠ \times ٢$ نيوكليدية. يرجع الاختلاف في العدد إلى اختلاف عدد الجينات التي يحملها كل كائن ممثل في 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 الإنسان المذكورة فى الجدول أعلاه، وعلى اعتبار أن هناك 3×10^9 نيوكلييدة فى الجينوم الاحادى فتكون :

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

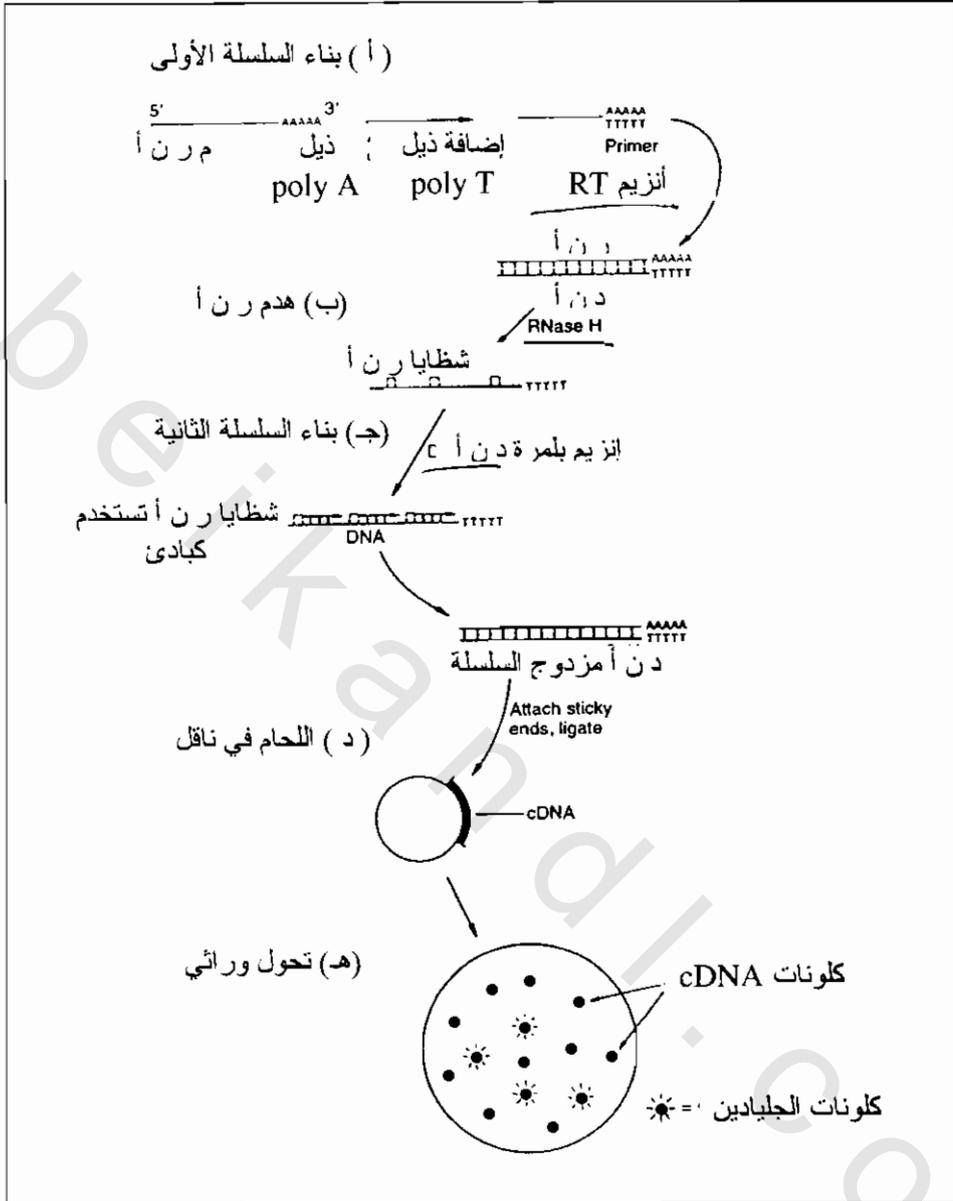
وميزة تكوين مكتبة مكونة من شظايا د.ن.أ طويلة نسبياً تبدو واضحة اذا قورنت بنتائج المعادلة أعلاه فيما إذا كان حجم شظايا د.ن.أ بحجم أقل أى 2×10^4 بدلاً من 2×10^5 .

وعلى ذلك فإن مكتبة الجينوم البشرى المحتوى على 10^6 شظية د.ن.أ معاد صياغتها بطول كبير نسبياً (2×10^4) ستصل فرصة الحصول عليها كاملة الى 99% وبالتالى فإن احتمال الحصول على جين وحيد النسخة سيكون مرتفعاً.

يطلق على هذه الطريقة اسم طريقة Shotgun أى أننا فى قطع جميع الجينوم بحثاً عن الجينات المرغوبة كمن يصوب بالبندقية على هدف غير معلوم. كما أن هذه التقنية تستغرق وقتاً طويلاً وعملاً متصلاً والنتيجة قد لا تكون مضمونة اذ قد نحصل على شظايا لا شفرية كثيرة ضمن الأعداد الهائلة من الشظايا الموجودة فى مكتبة الجينوم.

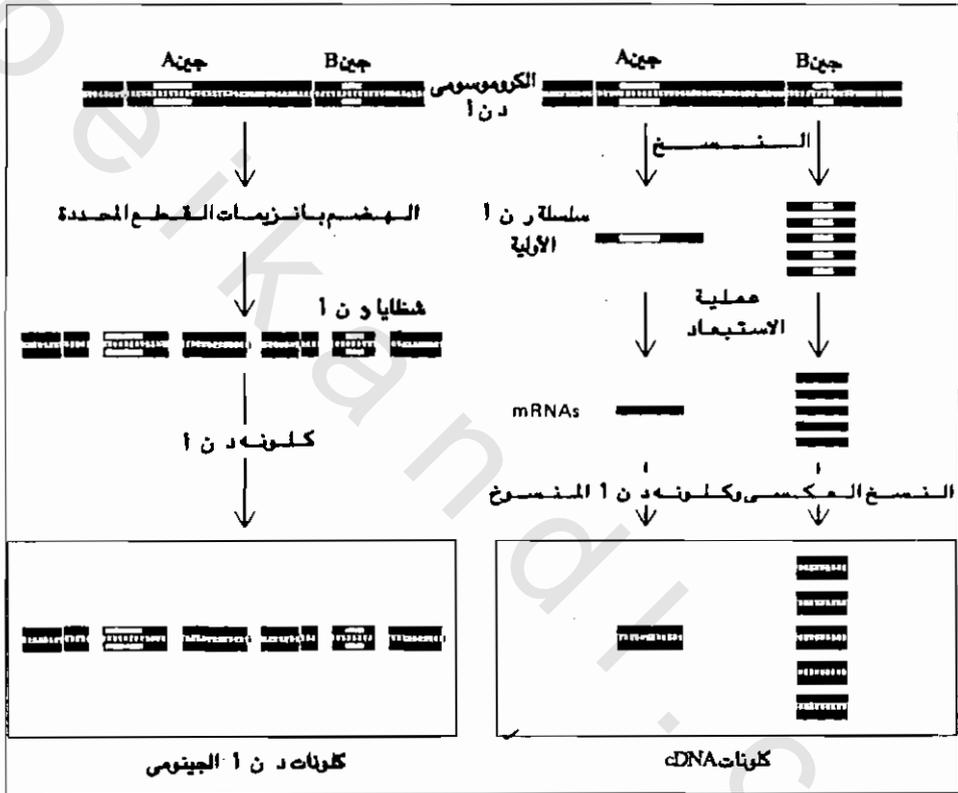
ب- مكتبة cDNA:

وتعتمد على تقنية متخصصة تعتمد على كلونة د.ن.أ المنسوخ cDNA. حيث يقتصر الاختيار على تلك التتابعات من د.ن.أ التي يمكن نسخها إلى ر.ن.أ والتي يفترض أنها تمثل جينات معينة. ويحدث ذلك عن طريق استخلاص mRNA من الخلايا المتخصصة في إنتاج بروتين معين بكميات كبيرة حيث تزداد نسبة mRNA النوعي الذي يشفر لهذا البروتين (راجع gene-in site و gene-in time في الفصل الحادي عشر). ثم يتم إنتاج نسخ من د.ن.أ المنسوخ Complementary DNA (cDNA) على قالب من ر.ن.أ المراسل mRNA باستخدام انزيم النسخ العكسي 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 إلى البلازميد ثم تجرى عملية الكلونة كما في الشكل (١٢-٦).



الشكل (١٢-٦): إحدى الطرق الممكنة لكلونة cDNA
 Poly A = ادينوسين متعدد ، أولجو d.T = متعدد الثايميدين

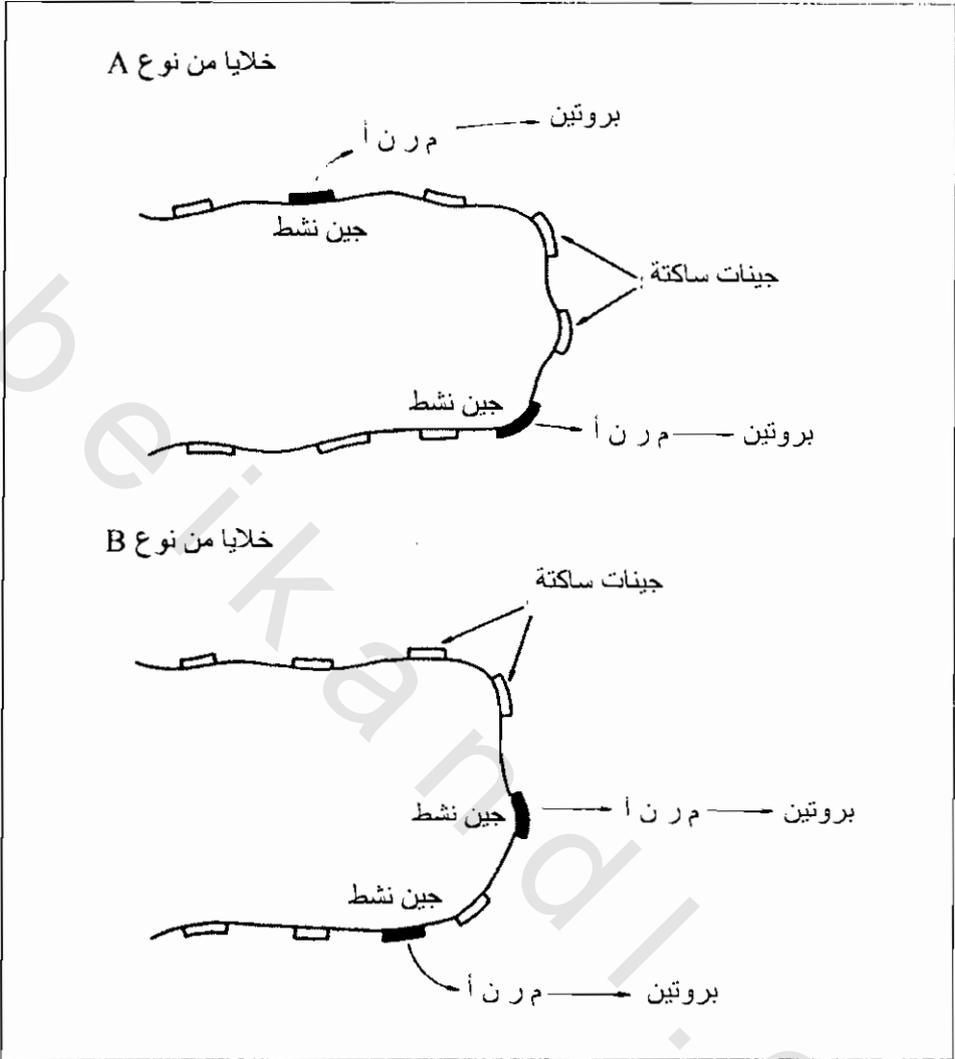
يسمى كل كلون متحصل عليه بهذه الطريقة كلون د.ن.أ المنسوخ
 cDNA، في حين تسمى المجموعة الكاملة للكلونات المشتقة من تحضير أحد
 أنواع mRNA مكتبة د.ن.أ المنسوخ cDNA Library. وهناك فرق هام بين
 كلونات د.ن.أ الجينوم وكلونات د.ن.أ المنسوخ كما هو موضح فى الشكل
 (٧-١٢).



الشكل (٧-١٢): شكل تخطيطى للفروق بين كلونات د ن أ المنسوخ cDNA وكلونات
 د ن أ الجينومى. يتم نسخ الجين A بتكرار منخفض فى حين يتم نسخ الجين B بتكرار مرتفع

إذ نجد أن كلونات الجينوم تمثل عينة عشوائية من جميع تتابعات د.ن.أ. في كائن ما، وفيما عدا حالات استثنائية نادرة، ستكون متشابهة بصرف النظر عن طراز الخلية المستخدم في استخلاصها، بعكس الحال في 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 أنواع ووظائف الخلايا المستخدمة لتحضير المكتبة (الشكل ١٢-٨).

توجد عدة مميزات لاستخدام مكتبة د.ن.أ. المنسوخ cDNA لكلونة الجينات. أولاً: أن كثير من البروتينات يتم انتاجها بكميات كبيرة جداً بواسطة الخلايا المتخصصة، مما يعنى أن mRNA الذى تنتج هذه الخلايا للترجمة لهذه البروتينات سيكون وفيراً لدرجة أن مكتبة cDNA المحضرة من الخلايا ستكون غنية جداً فى جزيئات د.ن.أ. المنسوخ cDNA الذى يشفر للبروتينات النوعية كما فى الشكل (١٢-٧). أن وفرة cDNA المرغوب فيه فى المكتبة يقلل بشكل كبير مشكلة التعرف على الكلون المرغوب فى المكتبة. فعلى سبيل المثال نجد أن الهيموجلوبين ينتج بكميات كبيرة فى خلايا الدم الحمراء ولهذا السبب فإن جينات الجلوبيين كانت من بين أول الجينات التى تمت كلونتها.



الشكل (١٢-٨): إختلاف تعبير الجينات بإختلاف نوعيات الخلايا

والميزة الثانية لكلونات cDNA أنها تحتوى على التتابعات الشفرية فقط Exons بدون الانترونات، وعلى ذلك فإذا كان الهدف من الكلونة هو التوصل

الى تتابع الاحماض الأمينية للبروتين من تتابع القواعد فى دن.أ الموازى أو لانتاج البروتين بكميات كبيرة عن طريق دفع الجين 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 (cDNA) مصادر هامة للاستخدام فى البحوث ويتوفر العديد منها حالياً من مصادر تجارية.

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

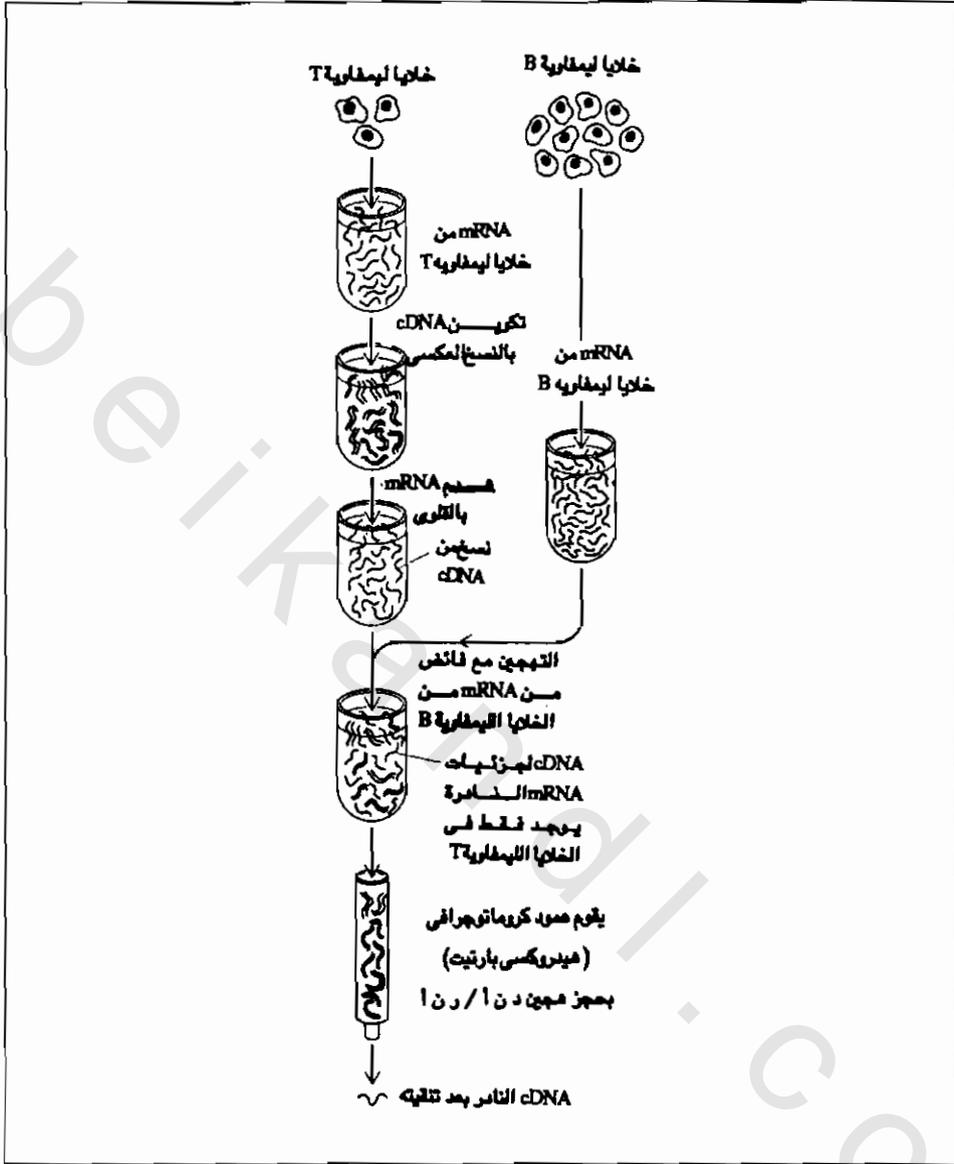
عندما يتم تحضير cDNA من خلايا يكون فيها تعبير الجين المرغوب عالياً جداً فإن غالبية كلونات cDNA يتوقع أن تحتوى على تتابع الجين المرغوب هذا، مما يعطى فرصة للحصول عليه بإقل جهد ممكن وبدرجة عالية من الكفاءة. أما فى حالة الجينات الأقل درجة فى معدل النسخ فتوجد عدة طرق يمكن استخدامها للأكثر من جزيئات mRNA النوعى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

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

وهناك طريقة بديلة أعلى كفاءة لإكثار أى تتابع نيوكليدي معين قبل إنتاج كنوانات cDNA ويسمى التهجين الطرحى، Subtractive Hybridization يمكن استخدام هذه الطريقة إذا 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 أيضاً فى الخلية التى يتم فيها تعبير اليل إلى بروتين.

فى حين لا يحدث 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.

يتم 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 معينة والتى تتضمن فصل الأحماض النووية وحيدة السلسلة عن مزدوجة السلسلة كما فى الشكل (١٢-٩).

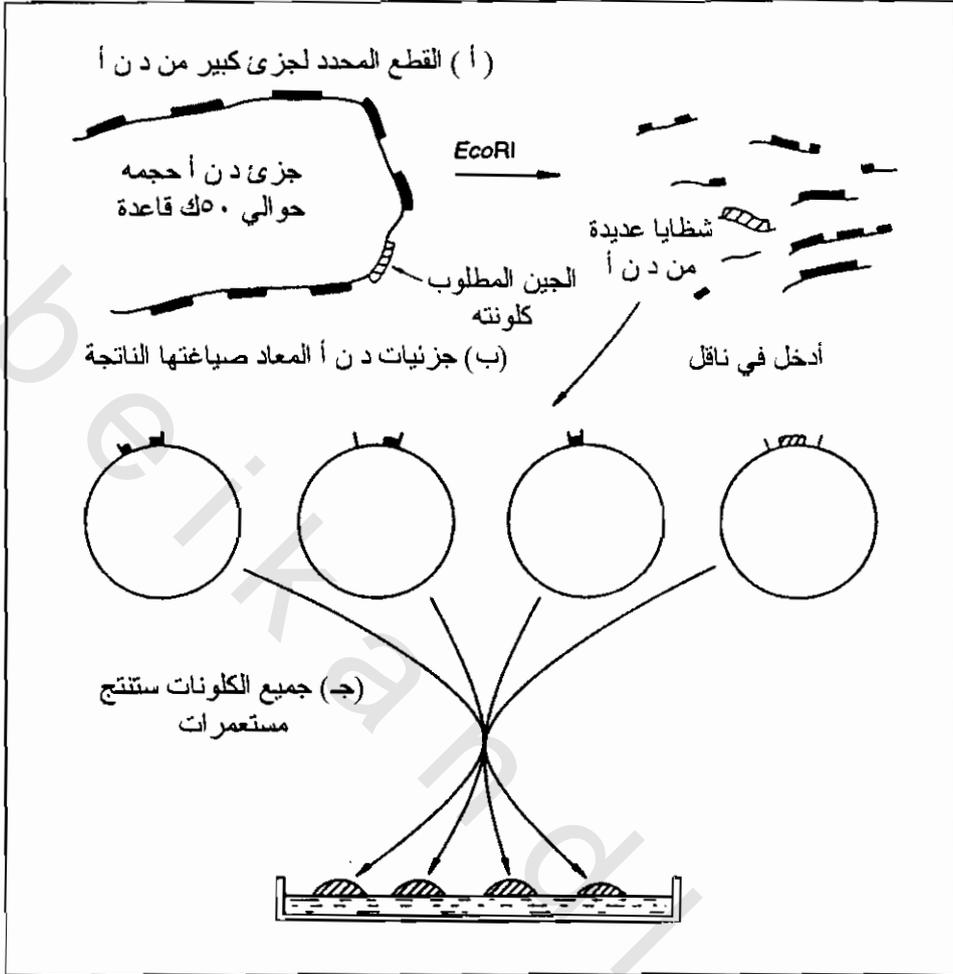


الشكل (١٢-٩): استخدام طريقة التهجين الطرحى لتفقيه الكولونات النادرة من cDNA التي يوجد لها mRNA فى الخلايا الليفغورية من النوع T و لكن ليس من النوع B

للتعرف على الكلون المحتوى على الجين المرغوب يتم نقل Blotting أطباق المزرعة المحتوية على المستعمرات البكتيرية النامية على قطعة من ورق الترشيح التي تلتصق بها بعض المستعمرات البكتيرية. يتم معاملة المستعمرات الملتصقة والتي تعرف بالنسخ المطابقة Replicas.

طرق الحصول على كلون مرغوب من مكتبة الجينات:

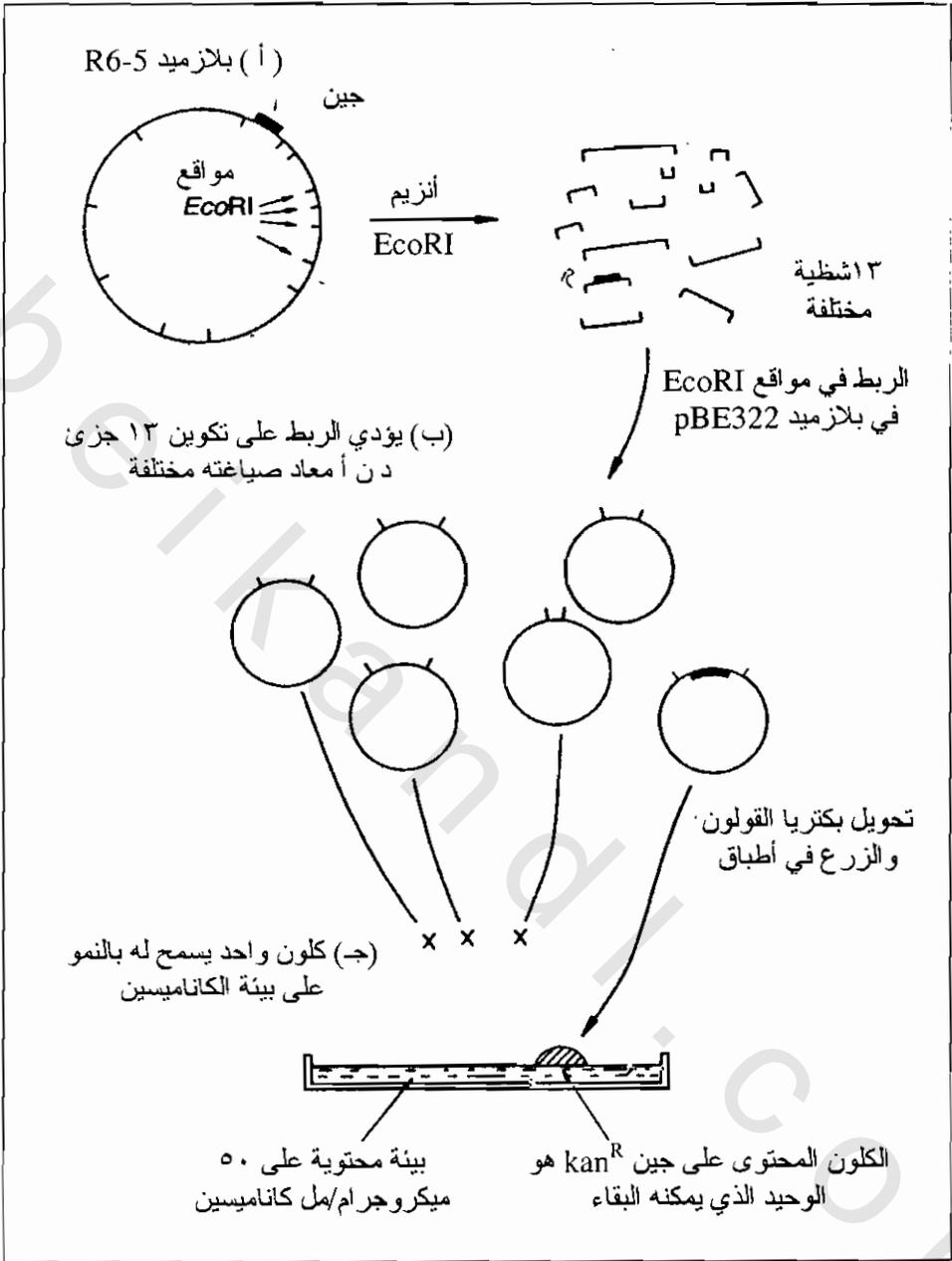
أن أهم مشكلة في عملية كلونة الجين تتركز في التعرف على المجموعات النادرة من الكلونات التي تحتوى على شظية دن.أ المحتوى على الجين المرغوب (الشكل ١٢-١٠) وتكون هذه المشكلة أشد صعوبة بصفة خاصة فى مكتبة الجينوم حيث قد يقتضى الأمر ضرورة التعرف على خلية واحدة بكتيرية من بين مليون خلية بحيث تكون محتوية على جين بشرى معين.



الشكل (١٠-١٢): مشكلة الإنتخاب

وتوجد طريقتين أساسيتين للحصول على الكلون المرغوب:

- ١- الانتخاب المباشر للجين المرغوب direct selection بمعنى أنه يتم تصميم التجربة بحيث تكون الكلونات المتحصل عليها هي فقط المحتوية على الجين المطلوب كما في الشكل (١١-١٢).

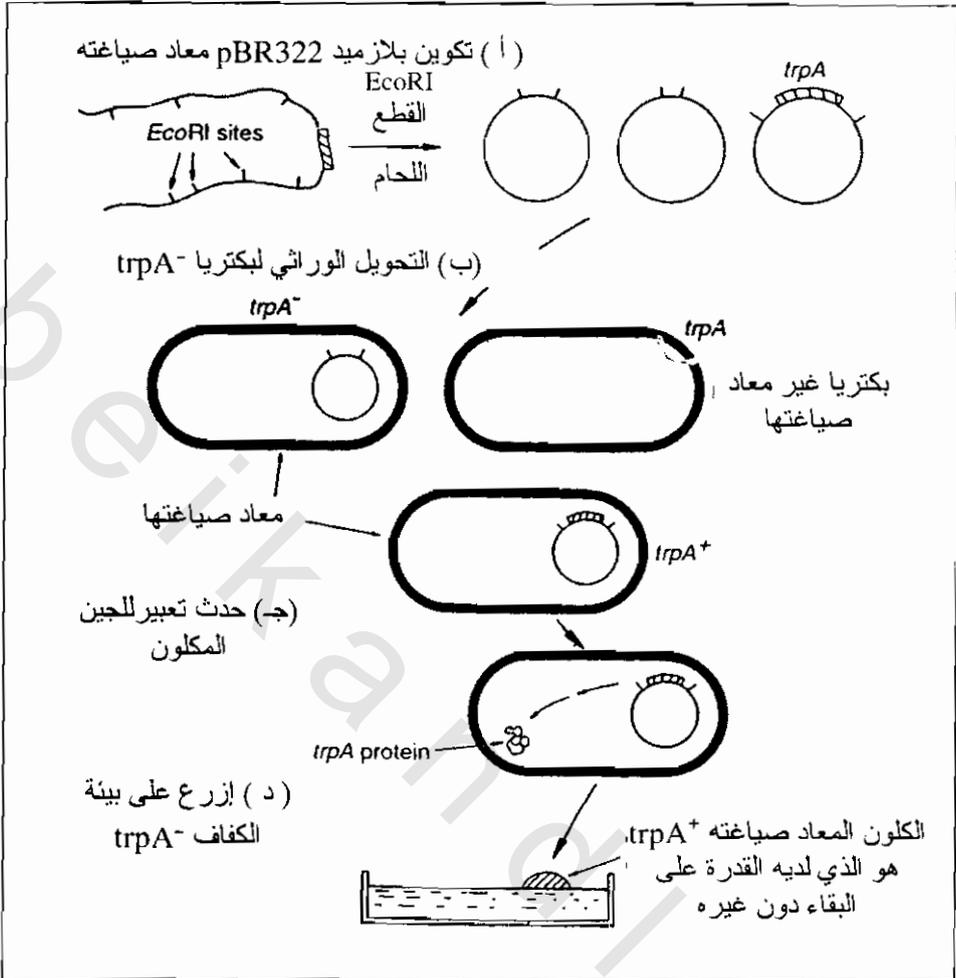


الشكل (١٢-١١): الإختخاب المباشر لكلونة جين المقاومة للكاناميسين (Kan^R) في بلازميد R6-5

حيث يتم الانتخاب للكلون المحتوى على جين المقاومة للكاناميسين فقط وذلك بتميمته على بيئة أجار تحتوى على هذا المضاد الحيوى. إلا أن هذا الطريقة تقتصر على الانتخاب لجينات المقاومة للمضادات الحيوية.

٢- استخدام طريقة معدلة فيما يسمى بطريقة Marker-Rescue للانتخاب لأحد الجينات المسئولة عن كثير من انزيمات البناء الحيوى Biosynthetic Enzymes. مثل تحديد الكلون المحتوى على جين $trpA$ (الشكل ١٢-١٢) إلا أن هناك بعض المحددات لهذه الطريقة حيث تتطلب وجود سلالة بكتيرية طافرة للجين المطلوب الكشف عنه ($TrpA^-$) بالإضافة إلى ضرورة توافر بيئة الكفاف التى يمكن للطراز الوحشى لهذا الجين فقط أن ينمو عليها.

إلا أن هاتين الطريقتين تصلحان فقط للتعرف على كلونات الجينومات الصغيرة لغير مميزة النواة مثل بكتريا القولون ولكنها تكون قاصرة عن أداء هذا الدور فى حالة الكائنات الراقية مميزة النواة والتي يكون جينومها موزعاً فى عشرات الالاف من الكلونات.



الشكل (١٢-١٢): الإختخاب المباشر لجين *trpA* المكلون في بكتريا القولون الطافرة للزيتوفان (*trpA*⁻)

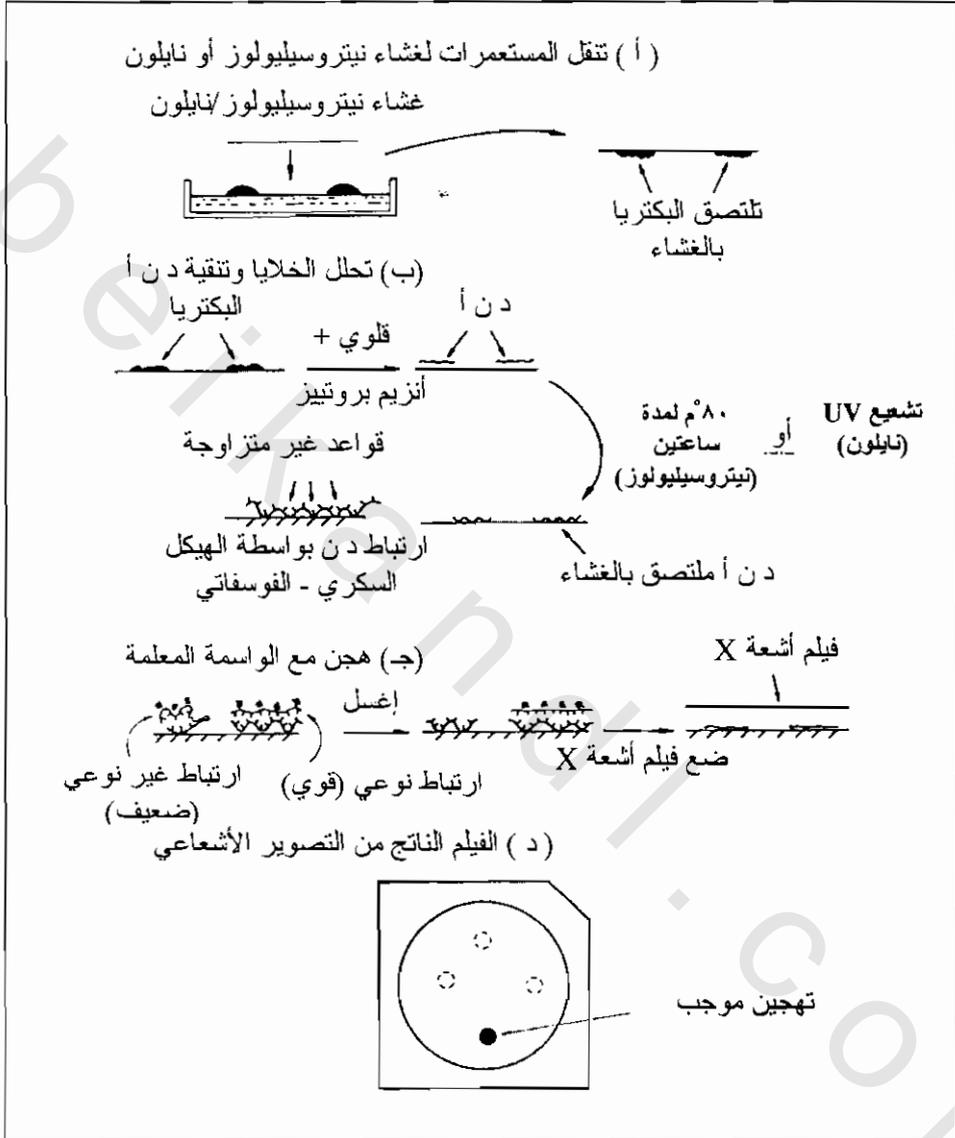
تحديد وعزل كلون من مكتبة الجينات:

Identification of a Clone From a Gene Library :

تستخدم تقنية التهجين بالواسمات (المشعة) Hybridization Probing بحيث

يمكن بهذه التقنية التعرف على الكلونات الهجينية في المستعمرات البكتيرية

لمكتبة الجينات مباشرة بطريقة *In Situ Probing* أى التققيب فى الموقع كما فى الشكل (١٢-١٣).

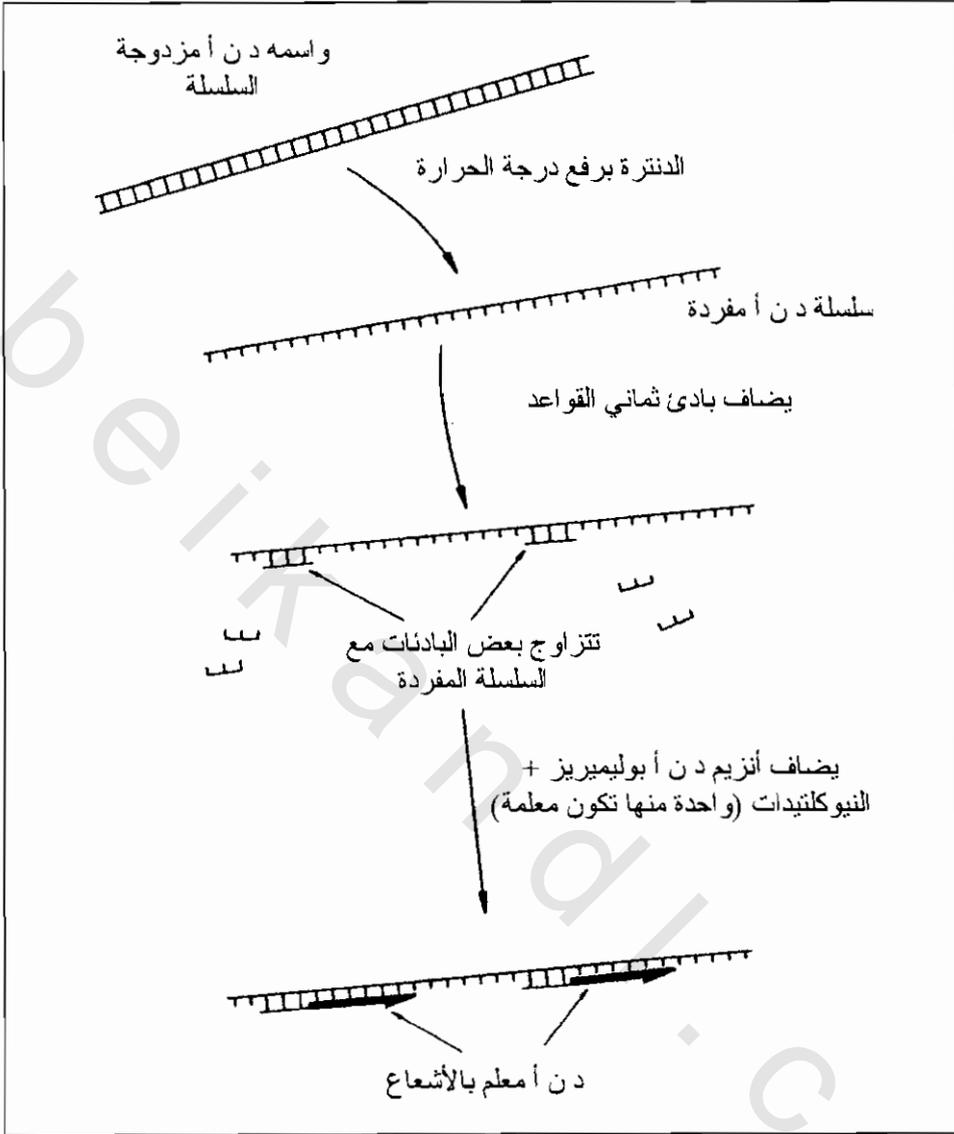


الشكل (١٢-١٣): تهجين المستعمرات بالواسمة المعلمة بالإشعاع

ويتم ذلك بأن تنقل أولاً المستعمرات البكتيرية إلى غشاء من النيتروسيليلوز أو النايلون ثم يعامل الغشاء بانزيم Protease ومحلول قلوى للتخلص من المكونات غير النووية وتؤدي هذه المعاملات أيضا إلى دنتره دن.أ وكسر الروابط الهيدروجينية بين سلسلتى دن.أ ويبقى دن.أ وحيد السلسلة فقط على الغشاء والذي تتم معاملته حراريا، فى حالة غشاء النيتروسيليلوز على درجة ٨٠ م لمدة ساعتين أو بالتعريض للأشعة فوق البنفسجية UV فى حالة غشاء النايلون. والغرض من ذلك تثبيت دن.أ على الغشاء ، بحيث يكون دن. ن.أ ملتصقا بالغشاء عن طريق الهيكل السكرى الفوسفاتى فى حين تكون القواعد حرة لى تتزاوج مع الواسمات المشعة وهذه الاخيرة تتم دنترتها وتضاف إلى الغشاء فى محلول كيمائى يساعد على التهجين بين قواعد الواسمه والقواعد المكملة فقط فى دن.أ المثبت. وبعد فترة يغسل الغشاء للتخلص من الواسمات غير المرتبطة ويتم تحديد مكان الواسمه المرتبطة بالتصوير بالأشعاع الذاتى Autoradiography.

الواسمات Probes:

هى عبارة عن جزيئات أوليجو دن.أ مكونه من عدد محدود من النيوكليوتيدات (١٨-٢٠ نيوكليوتيدة) ذات تتابعات نوعية Specific مكملة لتتابع محفوظ فى جين معين بحيث يتم التجاذب بينهما فقط. ويتم تعليم Labeling هذه الواسمات أما بالأشعاع بإضافة الفوسفور المشع ^{32}P (الشكل ١٢-١٤) إلا أن الباحثين اتجهوا مؤخرا إلى استخدام طرق تعليم Labelling لا تستخدم المواد المشعة تلافيا للأخطار التى قد تنجم من استعمالها ومشاكل التخلص من النفايات المشعة لذلك استخدمت لهذا الغرض طريقتين كما فى الشكل (١٢-١٥).



الشكل (١٢-١٤): تعليم دن أبالإشعاع بطريقة البادئ Priming ثماني القاعدة العشوائى. يكون مخلوط البادئ العشوائى معقد بحيث يحتوى على بعض الجزينات التى يمكنها أن تتزاوج مع الواسمة

وتعتمد الطريقة الأولى على استخدام نيوكليوتيدات ثلاثي فوسفات ديوكسي يوريدين (dUTP) والتي يتم ارتباطها بالتفاعل مع البيوتين Biotin وهو جزيء يتفاعل بقوة مع بروتين الأفيدين Avidin. وبعد التهجين في الموضع يمكن تحديد مواقع الواسمة المرتبطة بإضافة الأفيدين المتفاعل مع كاشف فلورسنت.

أما الطريقة الثانية فتعتمد على تكوين معقد من الواسمة وأنزيم البيروكسيداز Horseradish Peroxidase ثم يتم الكشف عن موقع تهجين الواسمة مع الجين عن طريق قابلية الانزيم لتحليل مادة لومينول Luminal بحيث تنطلق اشعاعات Chemiluminescence.

ويمكن تسجيل الاشارات المنبعثة على فيلم تصوير عادي بطريقة مشابهة للتصوير بالاشعاع الذاتى Autoradiography.

تصميم الواسمات : Design of Probes

وكما سبق القول فإن تتابع الواسمة لابد أن يكون مكماً للتتابع المحفوظ لجزء من الجين المكلون حتى يمكن أن يحدث Hybridisation Probing. ولكن يحدث أحيانا كثيرة أن الجين نفسه غير معروف أو غير متوفر وخاصة إذا كان الهدف من التجربة هو ايجاد كلون له.

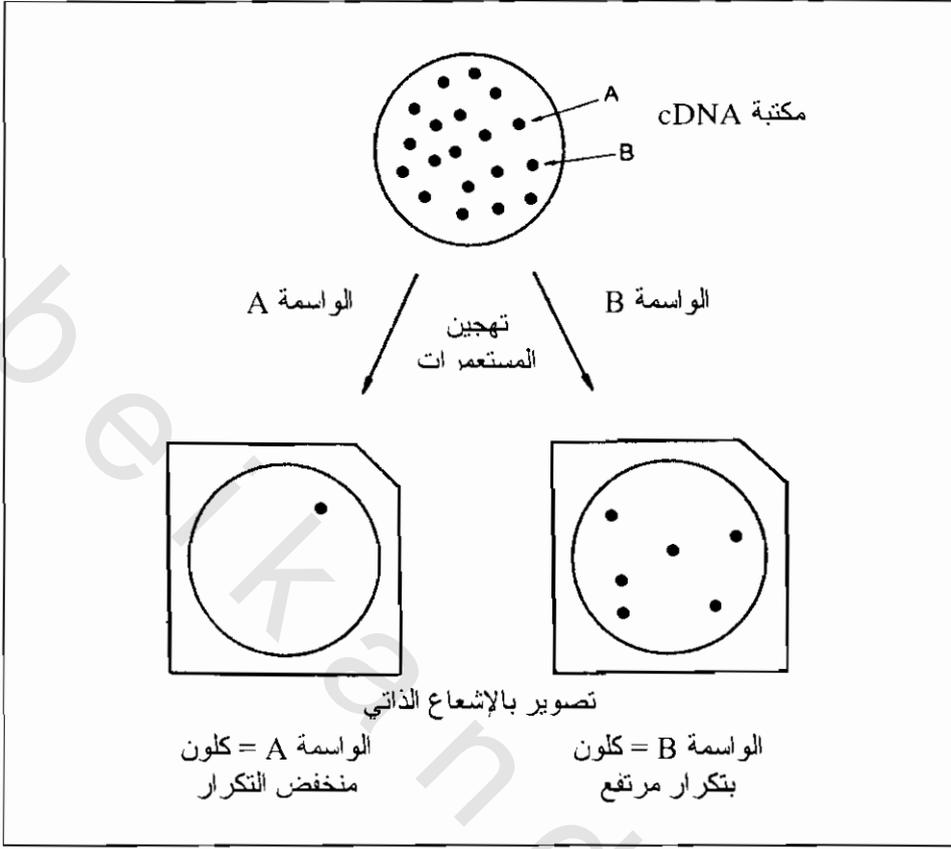
ويعتمد استنباط الواسمات على حسب المعلومات المتوفرة عن الجين المرغوب وهناك ثلاث احتمالات :

١- عندما يعطى الجين تعبيراً قوياً في نوع معين من الخلايا فيتم تكوين مكتبة cDNA.

- ٢- عندما يكون تتابع الأحماض الأمينية في سلسلة متعدد الببتيد التي يشفر لها الجين معروفاً كلياً أو جزئياً.
- ٣- عندما يكون الجين ضمن مجموعة جينات متقاربة الوظيفة Multigene Family.

أولاً: استنباط الواسمات بالاستعانة بمكتبة cDNA:

تعتمد هذه الطريقة على مبدأ الوفرة ضد الندرة . Abundancy VS Scarcity فعند تكوين مكتبة cDNA من حبوب القمح مثلاً فإنه نظراً لأن البروتين الرئيسي الموجود اثناء نمو الجنين في حبه القمح سيكون من نوع بروتين الجليادين gliadin فإننا نتوقع الحصول على نسبة عالية من نسخ ر.ن.أ الجليادين. ويتم التعرف على كلونات جين الجليادين باستخدام جميع كلونات cDNA من المكتبة كل على حدة كواسمة لجميع أفراد الكلونات الأخرى فى المكتبة (الشكل ١٢-١٦). يتم اختيار كلون بطريقة عشوائية ويتم تنقية د.ن.أ المعاد صياغته فى هذا الكلون (Insert) ويعلم Labelled ويستخدم كواسمة لبقية الكلونات فى المكتبة ويكرر ذلك باستخدام كلونات اخرى كواسمات إلى أن نحصل على الكلون الذى يتجهن مع نسبة كبيرة من كلونات المكتبة. ويعد هذا الكلون الوفير من Abundant cDNA Clone بمثابة Clone محتمل للجليادين ويجرى تحليله بالتفصيل (عن طريق تحليلات تتابعات د.ن.أ وعزل نواتج الترجمة) حتى يمكن التأكد من هويته.



الشكل (١٢-١٦): البحث بالتهجين في مكتبة جينات (cDNA) للتعرف على كلون متوفر في المكتبة بتكرار عال

ثانياً: استنباط الواسمات عندما تكون تتابعات الاحماض الامينية للبروتين الذي يشفر له الجين معروفة كلياً أو جزئياً:

وفي هذه الحالة يمكن استخدام قاموس الشفرة الوراثية Genetic Code للتنبؤ بالتتابع النيوكليتيدي للجين المقابل. ويعد هذا التنبؤ تقريبي نظراً لانه، فيما عدا الميثيونين والتربتوفان اللذين يمثل كل منهما بكودون واحد فقط ، نجد

أن جميع الأحماض الأمينية الأخرى يشفر لكل منها إثنين أو أكثر من الكودونات، فمثلاً حامض الالانين يشفر له بأربعة كودونات وهى GCA, GCT, GCG, GCC، بحيث تكون نيوكليتين GC مشتركة فى الكودونات الأربعة.

وكمثال لتوضيح كيفية إجراء هذه التنبؤات، سنأخذ بروتين السييتوكروم Cytochrome C الذى يلعب دوراً هاماً فى السلسلة التنفسية Respiratory Chain لجميع الكائنات الهوائية التنفس Aerobic، ويبين الشكل (١٢-١٧) تتابع الأحماض الأمينية لبروتين السييتوكروم فى الخميرة. ويحتوى هذا التتابع على منطقة تبدأ من الحامض الأمينى رقم ٥٩ التى تتكون من Trp- Asp- Glu- Asn- Met Asn- ويعلمونى قاموس الشفرة الوراثية نجد أن هذه الببتيدية السادسة يشفر لها بالآتى:

TGG - GAC^TC - GAC^AC - GAAC^TC - ATG

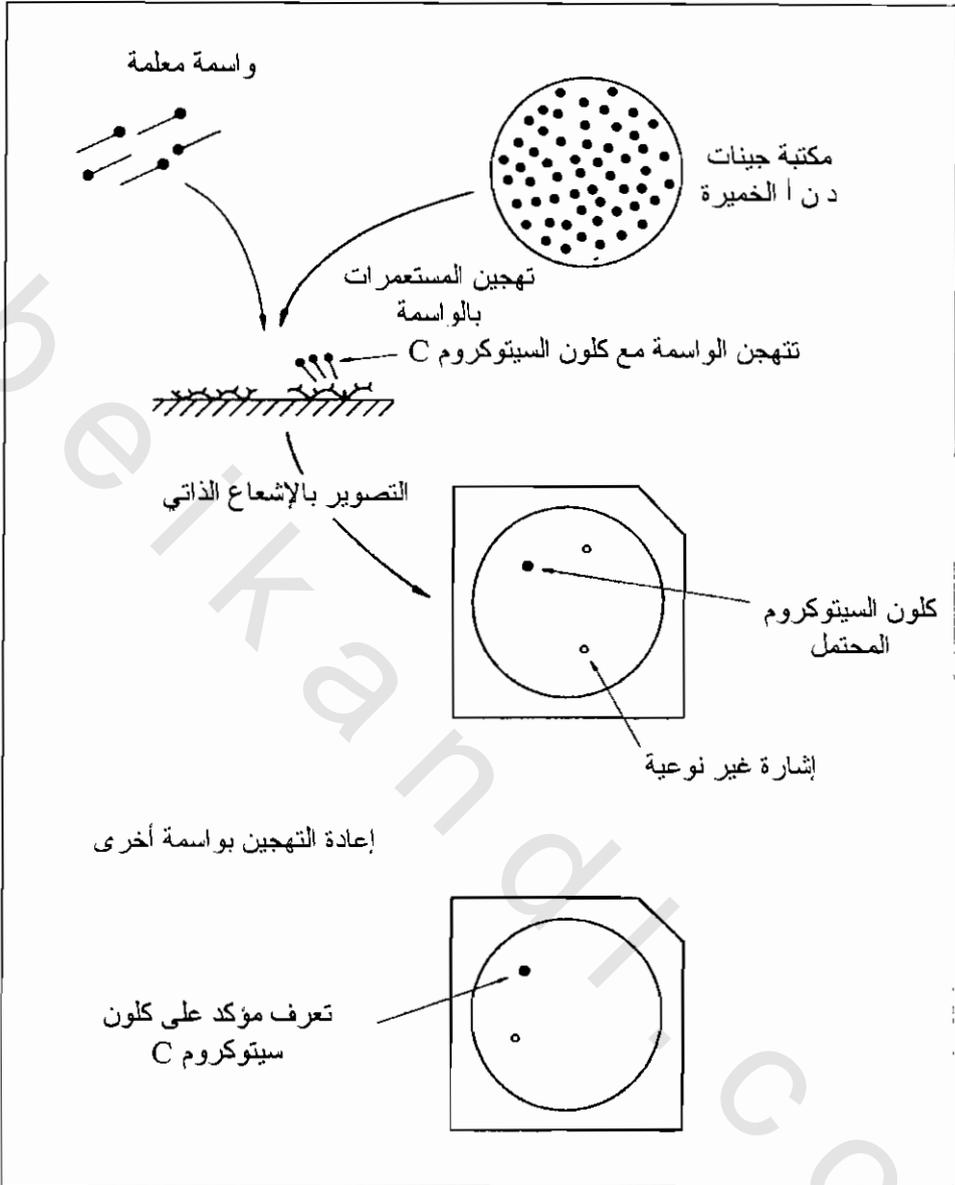
15
GLY-SER-ALA-LYS-LYS-GLY-ALA-THR-LEU-PHE-LYS-THR-ARG-CYS-GLU-
30
LEU-CYS-HIS-THR-VAL-GLU-LYS-GLY-GLY-PRO-HIS-LYS-VAL-GLY-PRO-
45
ASN-LEU-HIS-GLY-ILE-PHE-GLY-ARG-HIS-SER-GLY-GLN-ALA-GLN-GLY-
60
TYR-SER-TYR-THR-ASP-ALA-ASN-ILE-LYS-LYS-ASN-VAL-LEU-TRP-ASP-
75
GLU-ASN-ASN-MET-SER-GLU-TYR-LEU-THR-ASN-PRO-LYS-LYS-TYR-ILE-
90
PRO-GLY-THR-LYS-MET-ALA-PHE-GLY-GLY-LEU-LYS-LYS-GLU-LYS-ASP-
103
ARG-ASN-ASP-LEU-ILE-THR-TYR-LEU-LYS-LYS-ALA-CYS-GLU

الشكل (١٢-١٧): تتابع الأحماض الأمينية لبروتين سييتوكروم C فى الخميرة وتمثل الببتيدية السادسة (التي تحتها خط) كيف يمكن التنبؤ بالتتابع النيوكليدى من تتابع الأحماض الأمينية المقابلة

وبالرغم من أن هذا التتابع يمثل ١٦ تتابعا محتملا ، فإن ١٤ من ١٨ نيوكليدية يمكن التنبؤ بها بالتأكيد، وبذلك يمكن بناء واسمة أوليجونيوكليدية

باستخدام هذه التنبؤات وقد يكون فى امكان هذه الواسمة التعرف على الجين المشفر لبروتين السيوكروم.

وفى هذه الحالة يتم بناء عدد ١٦ أوليجونيوكلتيد واسمه مختلفه و المشفره لتتابع الاحماض الامينية اعلاه. ويمكن استخدامها لاستكشاف مكتبة cDNA الخميرة وسوف تتعرف واحده من هذه الواسمات على التتابع الصحيح لهذه المنطقة من Cytochrome C. وستلنا اشارة التهجين فى الموضع على الكلونات التى تحتوى على هذا الجين (الشكل ١٢-١٨).



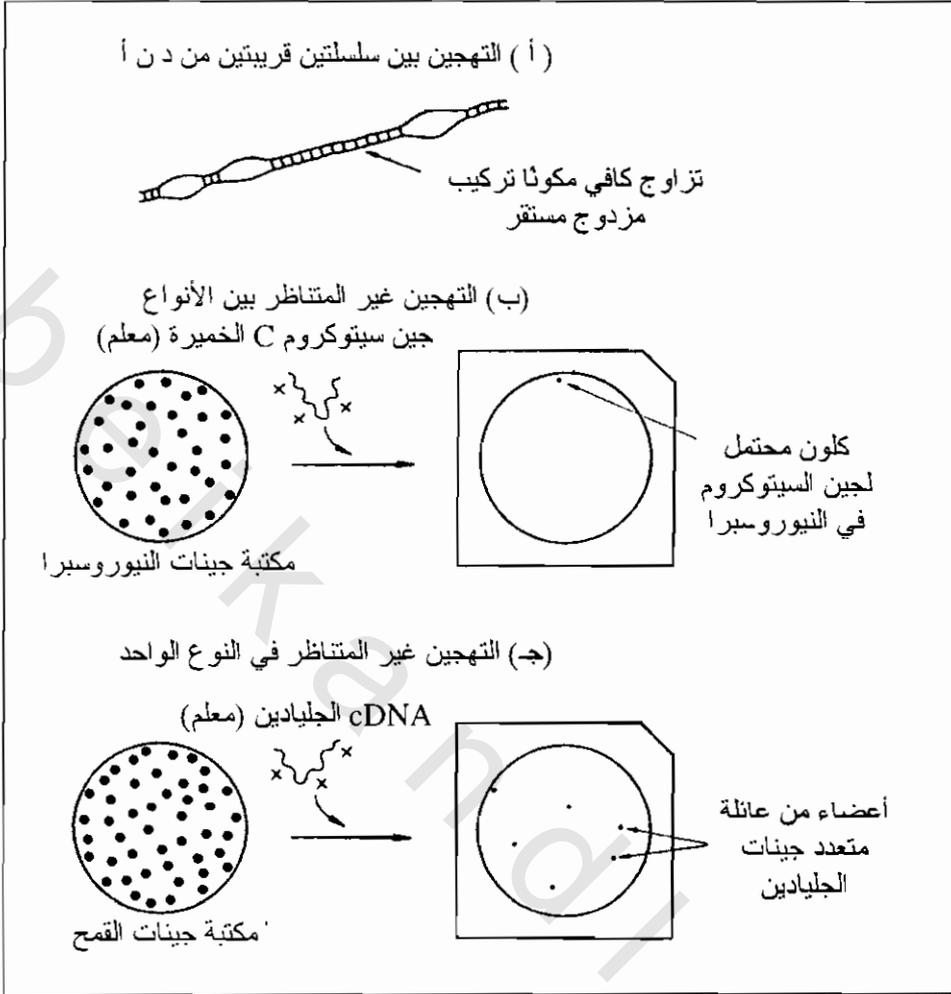
الشكل (١٢-١٨): استخدام أوليجو نيوكليوتيد تركيبى معلم النهائية للتعرف على كلون السيتوكروم في الخميرة

ثالثاً: استنباط الواسمات عندما ينتمى الجين لمجموعة جينات متقاربة
:Multigene Family

يمكن التعرف على تتابعات متشابهة بنسبة عالية عند مقارنة جينين يشفران لنفس البروتين ولكنهما ينتميان لكائنات مختلفة مما يعنى المحافظة على تركيب الجين اثناء عملية التطور. وغالبا ما يتشابه بدرجة عالية جينان من كائنات قريبة بحيث أن واسمه مفردة السلسلة من احد هذين الجينين يمكنها تكوين هجين مستقر وثابت مع الجين الآخر وعلى الرغم من أن الجزيئين ليسا متكاملين تماما، إلا أنه يحدث تزاوج للقواعد بينهما بدرجة كافية لتكوين تركيب هجينى مستقر (الشكل ١٢-١٩).

ويستخدم التنقيب غير المتجانس Heterologous Probing فى التهجين بين تتابعات متقاربة للتعرف على الكلونات المرغوبة. فمثلا يمكن استخدام واسمه Cytochrome C والسابق الاشارة اليها، فى التنقيب عن هذا الجين فى كائن اخر (يتبع جنس آخر) مثل النيوروسيرا *Neurospora Crassa* بحيث نحصل على تزاوج قواعد يكون كافيا لاعطاء اشارة للاستدلال على Clone السيتوكروم C فى مكتبة النيوروسيرا (الشكل ١٢-١٩ ب).

ومن جهة أخرى، يمكن استخدام التنقيب غير المتجانس للتعرف على جينات فى نفس الكائن كالقمح مثلا ولكن فى اصناف مختلفة كما يحدث فى حالة واسمة جين الجليادين السابق الاشارة اليها (الشكل ١٢-١٩ ج).



الشكل (١٢-١٩): التهجين غير المتناظر Heterologous Probing

تفاعل إنزيم البلمرة المتسلسل:

Polymerase Chain Reaction (PCR):

بعد توصل Mullis عام ١٩٨٥ الى مفهوم الكلونة في الانبوب *In Vitro* Cloning وتقديمة لتقنية PCR من أهم وأعظم الاكتشافات التي حدثت في الثلث

الآخير من القرن العشرين ، حيث احدثت طفرة هائلة في مجال التقنيات الحديثة المستخدمة في البيولوجيا الجزيئية مما ساعد الباحثون على تطوير ابحاثهم بطريقة غير مسبوقه نظراً لما لهذه التقنية، والتي تتميز بالسهولة والدقة، من تطبيقات متعددة في المجالات البيولوجية المختلفة.

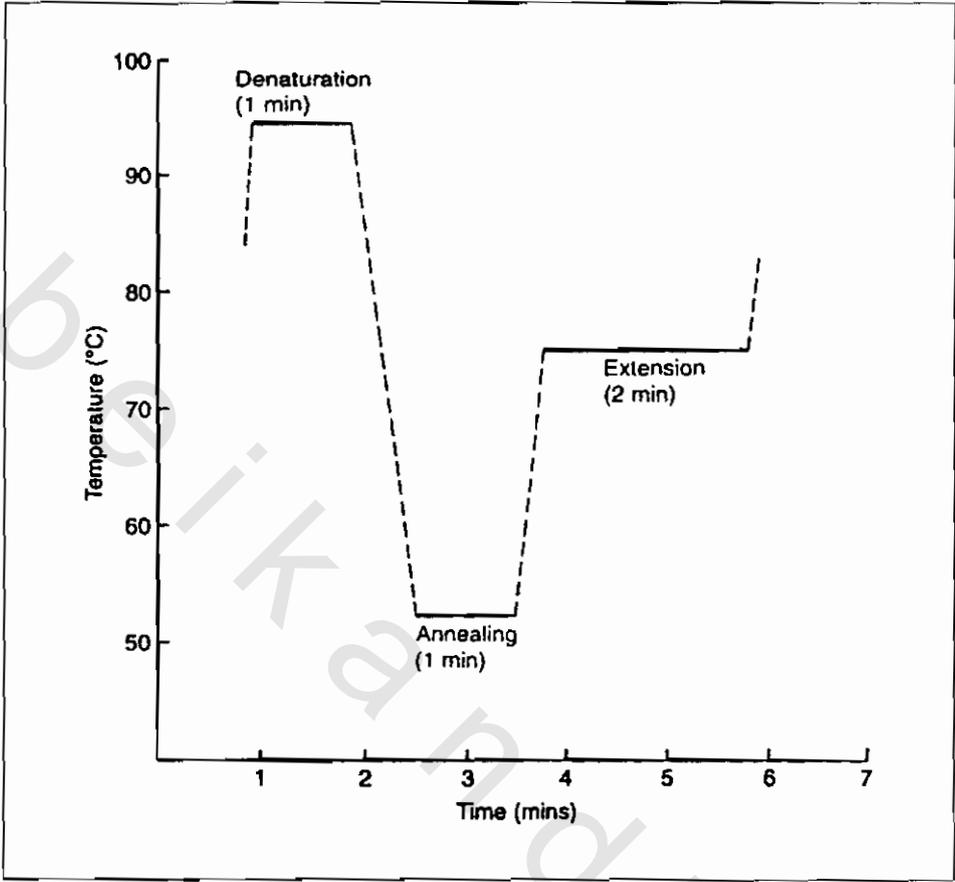
ويؤدي PCR إلى اكنثار منتخب Selective Amplification لمنطقة مختاره من جزئ د.ن.أ. ويمكن اختبار أى منطقة من أى جزئ د.ن.أ. للأكنثار بشرط معرفة التتابعات النيوكليديية عند حدى هذه المنطقة، حيث يؤدي ذلك إلى امكن تكوين زوج من البادئ Pair of Primers مكون من عدد محدود من النيوكليدييات لا يقل عن ١٠ ولا يزيد عن ٣٠ نيوكليدييه بحيث تكون تتابعات النيوكليدييات فى احد بادئى الزوجين مكمله لتلك الموجودة على احد حدى المنطقة المراد مضاعفتها (اكنثارها) فى حين يكون البادئ الآخر مكمل للحد الآخر المحيط بهذه المنطقة وبذلك عند اجراء تجربة PCR يتم التهجين بين البادئ وهذه الحدود يحدث تضاعف Amplificution للمنطقة بينهما بطريقة دقيقة وسريعة بمساعدة انزيم بلمرة د.ن.أ. متخصص لا يتأثر بدرجات الحرارة العالية وهو Taq Polymerase I.

ولبدء تجربة PCR يوضع فى الانبوبة د.ن.أ. القالب مضاف اليه زوج البادئ المتخصص ومخلوط من النيوكليدييات الأربعة A,T, C,G ومحلول كلوريد المغنسيوم بتركيز معين (٣-٧ ميكروجرام / لتر) وانزيم Taq Polymerase ويتم تحضينة فى جهاز PCR، ويختار البرنامج المناسب والذي يبدأ برفع درجة الحرارة إلى ٩٤° م لدنترة د.ن.أ. وفصل سلسلتى د.ن.أ. القالب، يليها خفض

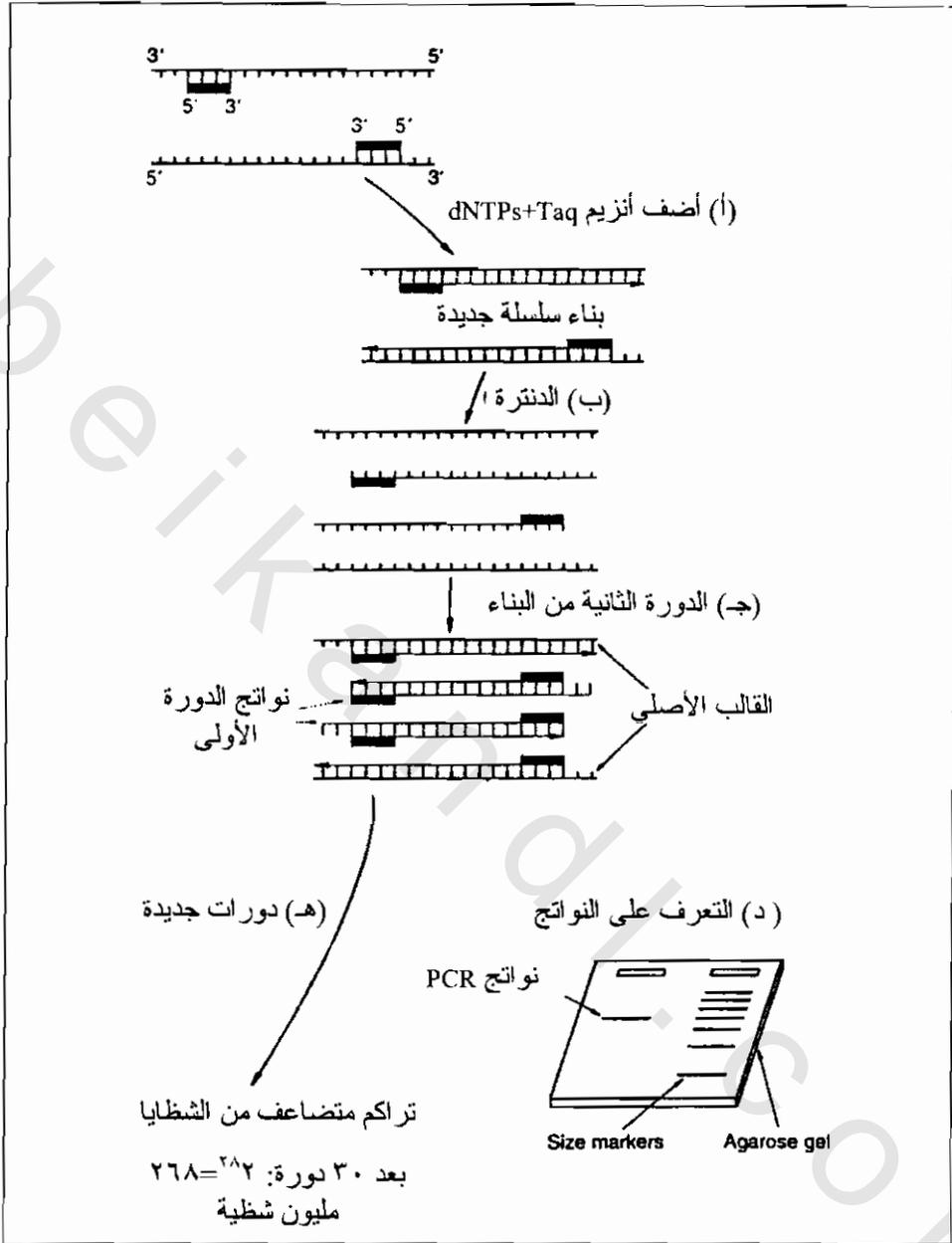
تدرجى للحرارة الى ٥٠-٦٠ م درجة ليتم التهجين والتزاوج بين تتابعات البادئ مع حدود المنطقة المراد تضاعفها.

ثم يتم رفع درجة الحرارة إلى ٧٢ م للمساعدة في بدء نشاط انزيم Taq لبناء سلسلة جديدة على المنطقة المرغوبة. ويبين الشكل (١٢-٢٠) منحنى التدرج الحرارى فى PCR. وهكذا تستمر هذه العملية ٢٥-٣٦ دورة مما يؤدي إلى بناء عدة ملايين نسخة من قطعة دن.أ. وبعد الانتهاء من التجربة يتم تحليل نواتج التضاعف Amplification بالتفريد الكهربى على جيل الأجاروز والصبغ بمادة ايثيديم بروميد Ehtidium Bromide (الشكل ١٢-٢١).

كما يمكن لنواتج التضاعف أن تكون فى بلازميد ناقل ويتم فحصها بالتقنيات القياسية مثل تحليل تتابعات دن.أ.



الشكل (٢٠-١٢): منحنى البرنامج الحرارى فى PCR



الشكل (١٢-٢١): تفاعل البلمرة المتسلسل (PCR)

الشروط الواجب توافرها في تجارب PCR:

لكي يتم الحصول على نواتج تضاعف PCR دقيقة وصحيحة للمنطقة المراد اكثارها، لابد من مراعاة ما يأتي :

١- أن يكون تصميم البادئ دقيقاً وصحيحاً بحيث يتجه فقط إلى المناطق المستهدفة في القالب لضمان الحصول على نواتج التضاعف المطلوبة فقط.

٢- أن يكون طول البادئ مناسباً بحيث لا يقل عن ١٠ نيوكليوتيدات ولا يزيد عن ٣٠ نيوكليوتيد حتى لا نحصل على نواتج تضاعف غير مرغوبة في حالة البادئ القصير جداً أو خفض شديد في نواتج التضاعف في حالة البادئ الطويل جداً .

٣- مراعاة التطبيق الدقيق لمنحنى درجات الحرارة حسب البرنامج المختار في PCR إذ لو ارتفعت حرارة التهجين Annealing عن الحرارة المثلى فلن يحدث تهجين بين البادئ والقالب وبالتالي لا نحصل على اية نواتج تضاعف ، والعكس صحيح إذا انخفضت كثيراً درجة الحرارة عن الدرجة المطلوبة فسينتج عن ذلك تهجين خاطئ في مواقع غير صحيحة للبادئ على القالب Mismatched hybrid ونحصل على نواتج PCR غير صحيحة.

طرق تحليل نواتج:

Analysis of PCR Amplification Products PCR:

- ١- التفريد الكهربى.
- ٢- الكلونة.
- ٣- تحليل التتابعات النيوكليوتيدية.

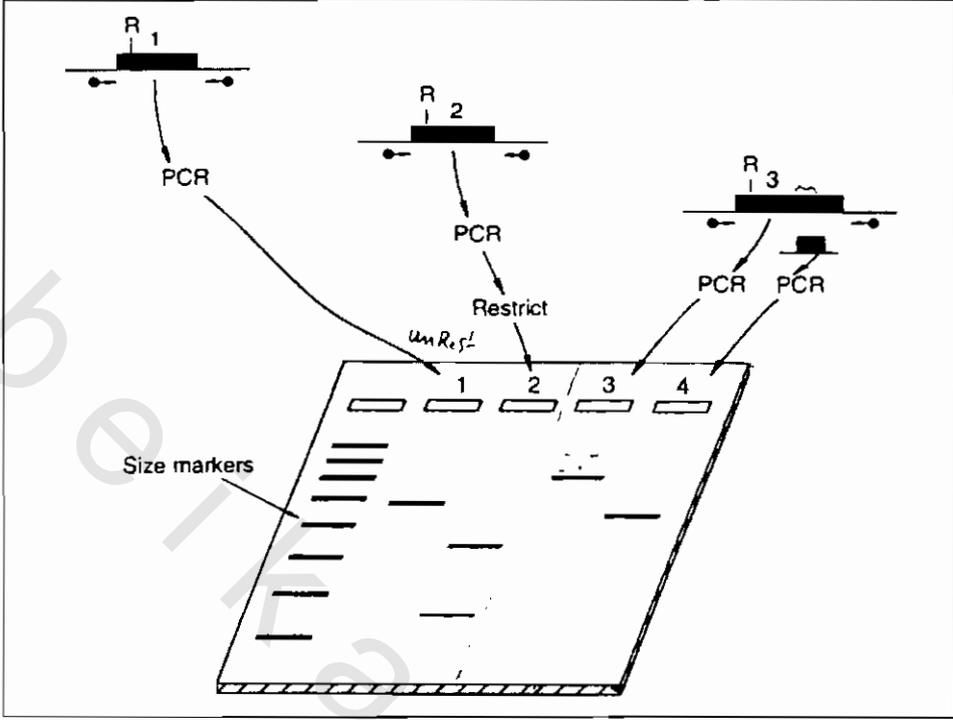
أولاً: التفريد الكهربى لنواتج PCR:

كما سبق الإشارة فإن نواتج التضاعف يتم اختبار أولى لها بأخذ جزء من ناتج التفاعل وتفريده على جيل اجاروز بالتفريد الكهربى. ويدل ظهور حزمة واحدة تمثل الناتج المتضاعف على نجاح التجربة. أما إذا ظهرت أكثر من حزمة أو لم تظهر حزمة بالمرّة فإن ذلك يدل على حدوث اخطاء فى التجربة ولا بد من اعادةها.

بالاضافة إلى ذلك فإن هناك حالات يستخدم فيها التفريد الكهربى لجيل الاجاروز للحصول على معلومات أكثر عن نواتج PCR منها:

أ - يمكن التحقق من وجود مواقع قطع محددة Restriction Sites من عدمة فى المنطقة المتضاعفة بمعاملة ناتج PCR بإنزيم قطع محدد Restriction Endonuclease قبل جريان العينة بالتفريد الكهربى (الشكل ١٢-٢٢) ويطلق على هذه التقنية PCR-Based RFLP (PBR) وتعد من البدائل السهلة والسريعة لتقنية RFLP حيث تحتاج إلى كمية صغيرة من د.ن.أ. ولا تحتاج إلى استخدام النقل Southern Blotting. وتستخدم هذه الطريقة فى استنباط الخرائط الحينومية وفى دراسة الامراض الوراثية كما سيأتى بعد .

الأساس لعملية DNA Profiling وهى من التقنيات المحورية فى علم الطب الشرعى (العدلى) كما سيأتى بعد.



الشكل (١٢-٢٢): يعطى التفريد الكهربى لنواتج PCR معلومات عن جزئى دن أ القالب

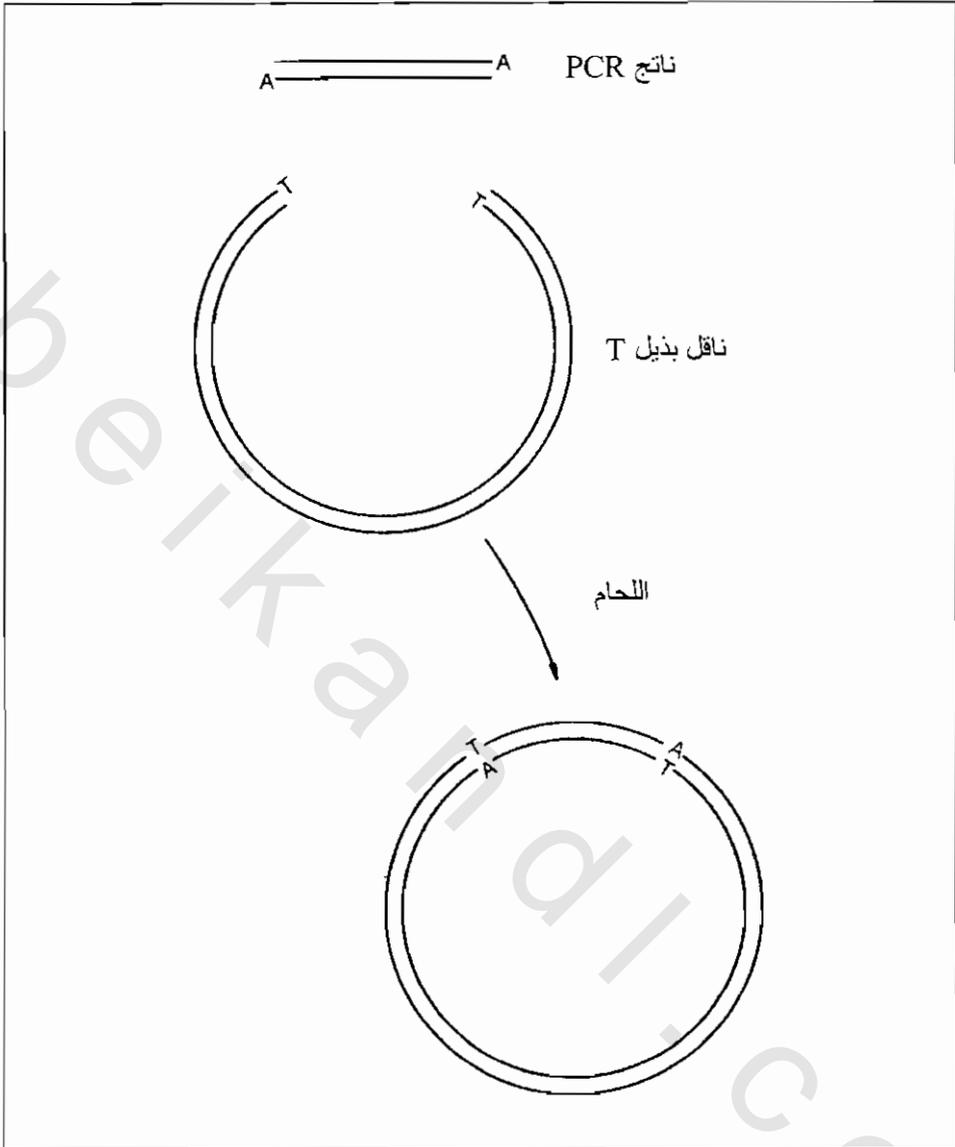
- المضمار ١ و ٢ يبين على التوالى ناتج PCR غير محدد القطع بالإنزيم الذى يقطع عند الموقع R.
- يبين المضمار ٣ النتيجة عندما يكون دن أ القالب محتويا على إضافة Insertion فى المنطقة المتكاثرة Amplified.
- يبين المضمار ٤ النتيجة عندما يكون دن أ القالب قد فقد جزء فى المنطقة المتكاثرة.

ب- الكشف عن وجود طفرات اضافة Insertion أو حذف Deletion فى جزئى دن. أ فيها يطلق عليه "طفرة الطول" Length Mutation والتي تكون

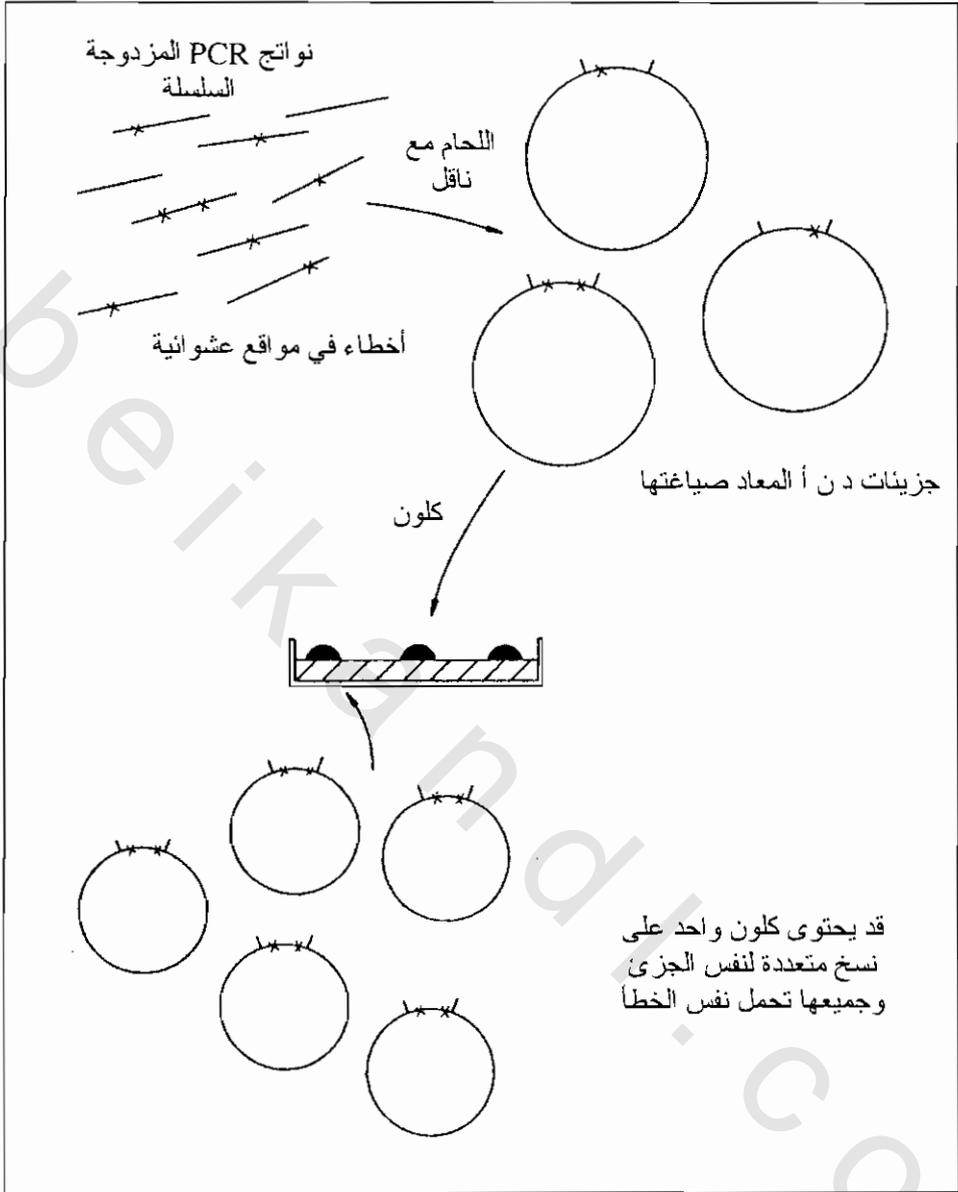
ثانياً: كلونة نواتج PCR:

يمكن من الناحية النظرية كلونة نواتج PCR فى بلازميدات لتكوين مكتبة جينات إلا أنه من الناحية العملية توجد بعض الصعوبات منها أن نواتج البلمرة

بانزيم TaqI تكون نهايتها مرتبطة بنيوكلتيده اضافة من الاديوسين مكونة Overhang مما يعيق عملية الكلونة. ويمكن التغلب على هذه الصعوبة باستخدام ناقل Vector خاص يحتوى على ذيل من نيوكلتيديّة T واحدة كما فى الشكل (١٢-٢٣) ومن جهة أخرى تبين أن Taq Polymerase يعمل اخطاء أثناء بناء د.ن.أ ، إذ أحيانا ما يضع نيوكلتيده خطأ فى السلسلة النامية مما يؤدي إلى تراكم الاخطاء بمعدل خطأ واحد لكل ٩٠٠٠ نيوكلتيده يتم بناؤها مما يقتضى الحذر عند كلونة هذه النواتج (الشكل ١٢-٢٤) وقد تم انتاج Taq Polymerase محتويا على خاصية تصحيح الاخطاء Proofreading بحيث يمكن تلافى مثل هذه الاخطاء.



الشكل (١٢-٢٣): استخدام ناقل خاص يحتوى على ذيل T لكتونة ناتج PCR



الشكل (١٢-٢٤): يؤدي التكرار العالي لحدوث أخطاء و الناتج من إنزيم Taq إلى بعض الصعوبات عند كلونة نواتج PCR

دراسة موقع وتركيب الجين فى جزئ د.ن.أ:

أولاً: تحديد موقع الجين Gene Location:

توجد تقنيات متعددة لتحديد موقع جين معين فى جزئ د.ن.أ وتتحدد طبيعة الطريقة المستخدمة حسب حجم جزئ د.ن.أ بحيث تختلف الطريقة فى حالة الجزيئات الصغيرة مثل تلك الخاصة بالبلازميدات وكروموسومات الفاج عن تلك المستخدمة لتحديد موقع الجين على جزئ د.ن.أ كبير الحجم كما فى كروموسومات مميزة النواة.

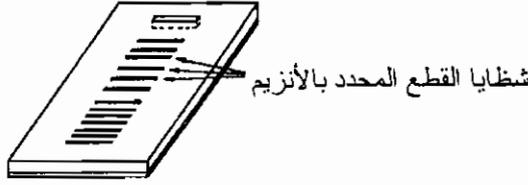
أ - تحديد موقع الجين فى جزئ صغير الحجم:

فى حالة جزيئات د.ن.أ صغيرة الحجم مثل البلازميد البكتيرى PBR 322 أمكن بالانتخاب المباشر التوصل الى أن الجين المشفر للمقاومة للمضاد الحيوى كاناميسين Kanamycin موجود ضمن كلونات القطعة R6-5 الناتجة عن القطع بإنزيم القطع المحدد EcoR1 والتي أنتجت ١٣ شظية. ولكى نعرف بالتحديد على أى من هذه الشظايا يقع جين الـ Kan^R حتى يمكن أن نضعه على خريطة القطع المحددة للشظية (R6-5)، ولكى يتم ذلك لابد أولاً أن يتم تفريد كهربى على جيل الاجاروز لنواتج القطع المحدد للمنطقة R6-5 (الشكل ١٢-٢٥ ب). وبلى ذلك عملية نقل بطريقة Southern Blotting (الشكل ١٢-٢٥ ب) متبوعة بعملية التفتيب بالتهجين بالتهجين hybridization Probing (الشكل ١٢-٢٥ ج) حيث تعطى صورة Autoradiography الاشارة الموجبة الدالة على ترتيب الشظية المحتوية على جين Kan^R بالنسبة للشظايا الأخرى.

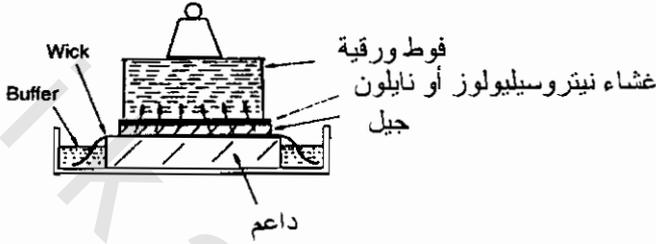
وأخيراً وباستخدام خريطة القطع المحددة للقطعة R6-5 يمكن وضع هذه الشظية فى موقعها على تلك الخريطة (الشكل ١٢-٢٥ د).

ومن جهة أخرى، يمكن استخدام تقنية النقل Southern لتحديد مكان جين معين مكلون ضمن جزئ كبير الحجم نسبياً من د.ن.أ المعاد صياغته Recombinant DNA كما في الشكل (١٢-٢٦) إلا أن استخدام Restriction Mapping و Southern يكون قاصراً عن تحديد موقع الجين إذا زاد حجم جزئ د.ن.أ عن ٢٥٠ ك قاعدة.

(أ) التفريد الكهربى لبلازمين R6-5 المقطوع بأنزيم EcoRI



(ب) النقل بـ Southern



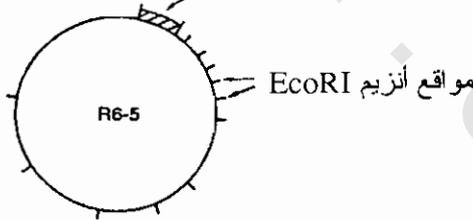
(ج) نتيجة التهجين بالواسمة



أشارة موجبة (الشظية رقم ٦)

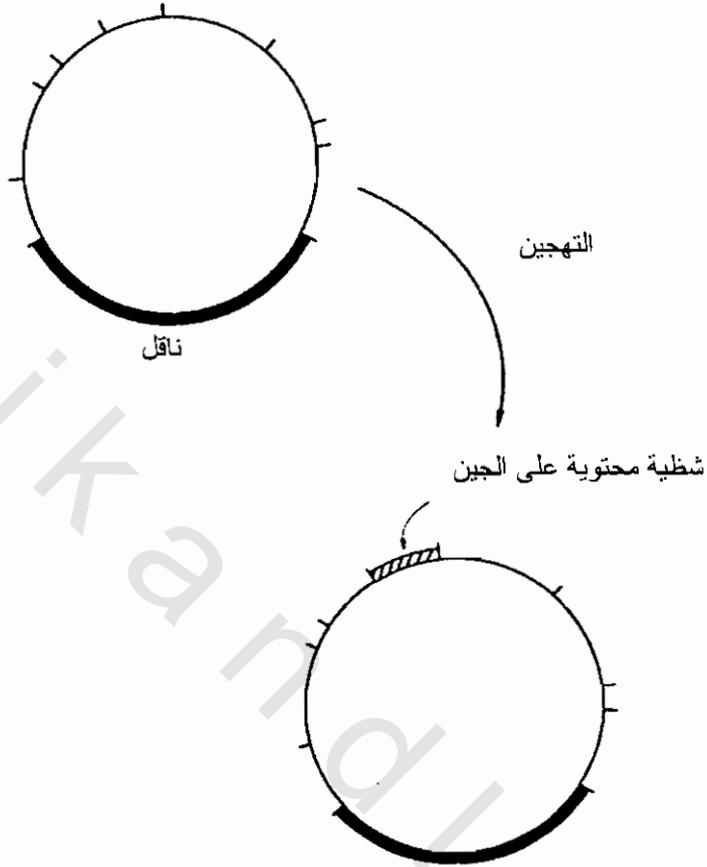
(د) يحدد مكان الشظية على خريطة القطع المحدد للبلازميد

الشظية ٦ = موقع جين Kan^R



الشكل (١٢-٢٥): النقل بطريقة Southern

جزئ دن أ معاد صياغته - أين يقع الجين؟



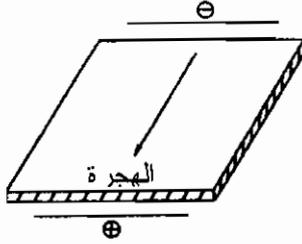
الشكل (١٢-٢٦): يمكن استخدام التهجين بطريقة Southern لتحديد موقع جين مكون من جزئ دن أ (كبير الحجم نسبيا) المعاد صياغته

ب- فصل الكروموسومات في مميزة النواة الصغيرة (البداية):

Separating Chromosomes of Lower Eukaryote By Gel Electrophoresis:

ثبت أن طرق التفريد الكهربى العادية على جيل الاجاروز لا يمكنها فصل الحزم الخاصة بشظايا د.ن.أ إذا زاد حجمها عن ٥٠ ك قاعدة كما فى الشكل (١٢-٢٧) ولذلك لا يمكن الاعتماد عليها فى فصل الجزيئات (أو الكروموسومات) الكبيرة الحجم نسبياً. وقد امكن التغلب على هذه الصعوبة باستخدام ما يسمى Pulsed Field Electrophoresis (PFE) وهو من عدة أنواع وأشهرها Orthogonal Field Alternative Gel Electrophoresis (OFAGE) وفيه يحدث للمجال الكهربى تغيير فى المسار بين زوجين من الاقطاب Electrodes ويقع كل زوج من هذه الاقطاب بزاوية 45° بالنسبة للمحور الطولى للجيل (الشكل ١٢-٢٨). وينتج عن ذلك مجال نبضى Pulsed Field مما يجبر جزيئات د.ن.أ على تغير اتجاهها باستمرار تبعاً للنبضات. وعندما يحدث تبادل للمجالين بطريقة منتظمة، فإن محصلة الحركة لجزيئات د.ن.أ فى الجيل ستستمر من احدى النهايتين إلى النهاية الاخرى فى خط مستقيم تقريباً إلا أنه مع كل تغيير يحدث فى اتجاه المجال فإن على كل جزئ د.ن.أ أن يعيد استقامة حركته Realign بزاوية ٩٠° قبل أن يستمر فى الهجرة. ويعد ذلك اهم نقطة فى هذا النظام حيث يكون باستطاعة الجزيئات الصغيرة نسبياً (القصيرة) أن تعمل Realigning أسرع من الجزيئات الأطول مما يسمح للجزيئات القصيرة بالحركة والتقدم بسرعة أكبر إلى نهاية الجيل. وقد أمكن بهذه التقنية الوصول إلى زيادة هائلة فى قدرة الجيل على فصل جزيئات قد يصل طولها إلى عدة الاف ك قاعدة. ويبين الشكل (١٢-٢٨ ب) فصل كروموسومات الخميرة بهذه التقنية.

(أ) جيل التفريد الكهربى التقليدى

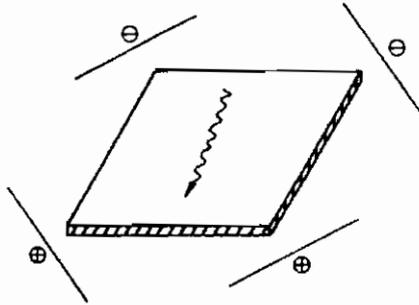


(ب) تأثير حجم دن أ على معدل التفريد

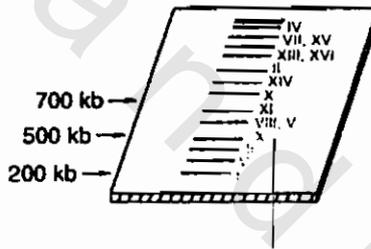


الشكل (١٢-٢٧): محددات جيل التفريد الكهربى التقليدى

(أ) جهاز OFAGE



(ب) فصل كروموسومات الخميرة بجهاز OFAGE



أرقام الكروموسومات

الشكل (١٢ - ٢٨): التفريد الكهربى بجهاز أورثوجونال التبادلى (OFAGE)

ويمكن الاستفادة من هذه التقنية أيضا فى عزل وتنقية د.ن.أ من كل كروموسوم على حدة وتكوين مكتبات جينية كروموسومية وبالطبع تكون هذه المكتبات اصغر بكثير فى عدد الكلونات الخاصة بها عما فى المكتبة الجينومية مما يجعل من السهل التعامل معها. بالاضافة إلى ذلك، فإنه يمكن نقل Southern

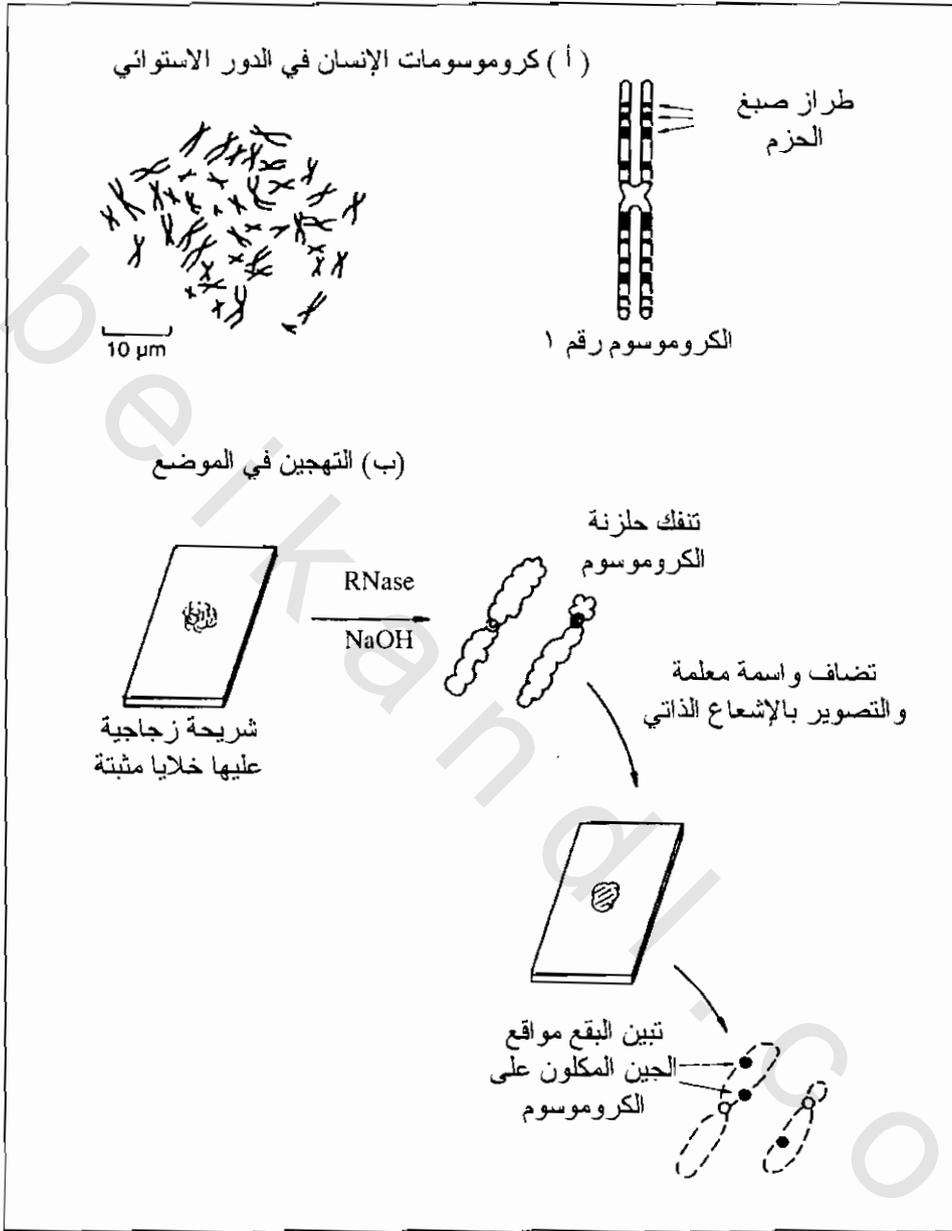
لحزئيات د.ن.أ على غشاء نيتروسيليز أو نايلون واجراء تعريف للجينات المكلونة بطرق التحليل القياسية.

ج- تحديد موقع الجين على كروموسومات مميزة النواة بطريقة التهجين فى
الموضع *In Situ Hybridization*:

فى حالة كروموسومات مميزة النواة الراقية حيث يزيد طول جزئيات د.ن.أ فيها عن ٥٠ الف كيلو قاعدة كما فى الثدييات والنباتات الراقية، نجد أن PFE لا يمكنه فصل مثل تلك الكروموسومات الكبيرة الحجم. لذلك يمكن تحديد موقع الجين فى هذه الحالة بتقنية التهجين فى الموضع *In Situ Hybridization*.

حيث يمكن بها تحديد على أى كروموسوم يقع الجين بالإضافة إلى موقع الجين على الكروموسوم نفسه.

وتتلخص الطريقة فى تفريد كروموسومات الدور الاستوائى الميتوزى على شريحة ميكروسكوبية ومعاملتها بانزيم الريبونوكليز ومحلول هيدروكسيد الصوديوم لهدم ر.ن.أ وذنطرة جزئيات د.ن.أ ويضاف الى التحضير الكروموسومى واسمة مشعة للجين المطلوب تحديد موقعة حيث يحدث تهجين بين الواسمة والجين على الكروموسوم والذى يتم الكشف عنه بالتصوير بالاشعاع الذاتى Autoradiography (الشكل ١٢-٢٩).



الشكل (١٢-٢٩): التهجين في الموضع In Situ Hybridization

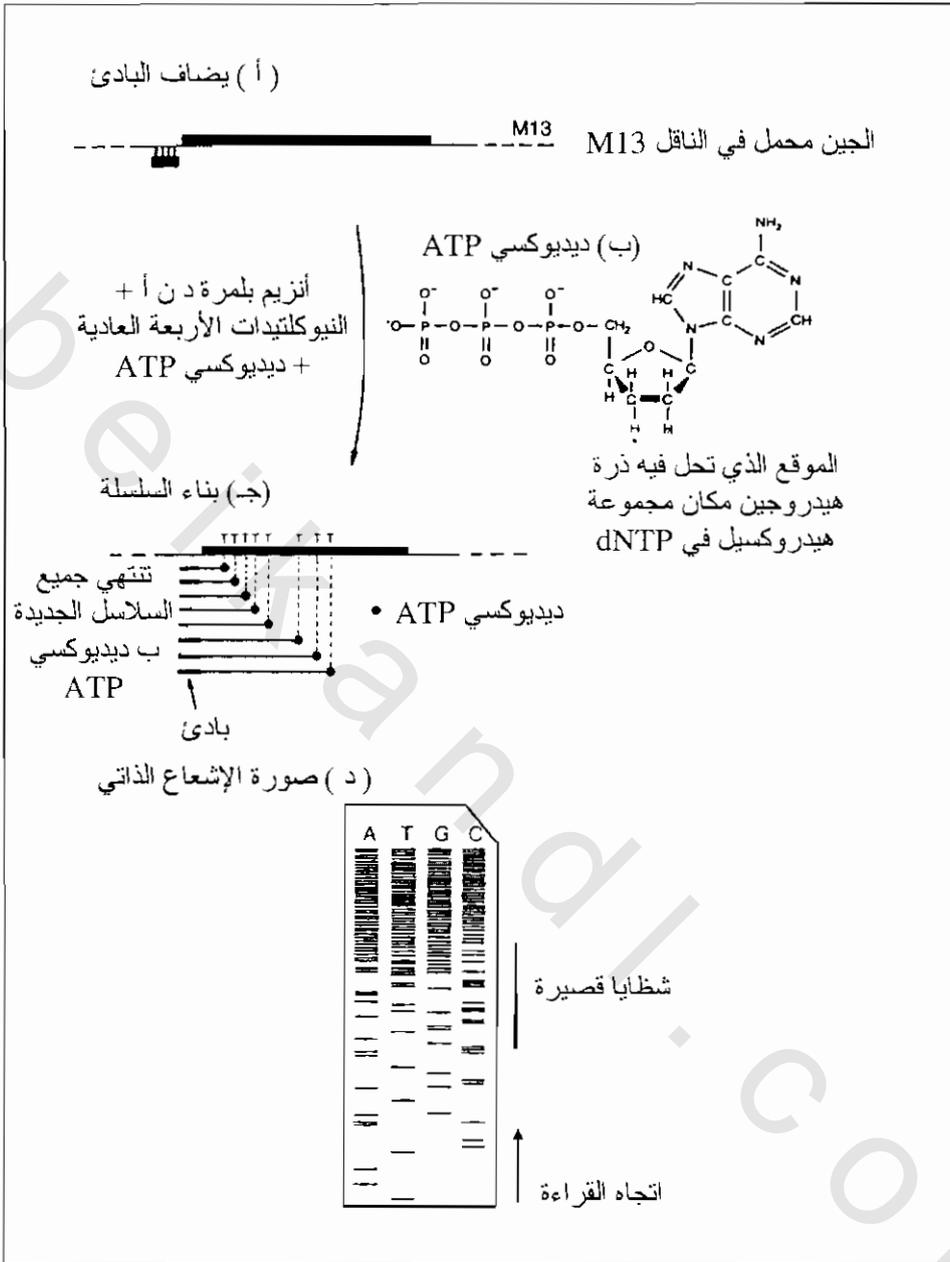
ويمكن الاستعاضة عن الواسمة المشعة باستخدام كاشف فلورسنتى مرتبط بلواسمة بحيث يمكن التعرف على التهجين مباشرة باستخدام ميكروسكوب فلورسنتى Fluorescet Microscope وإذا استخدمت فلورسنت بالوان مختلفة Fluorochromes فإنه يمكن التعرف على أكثر من جين واحد فى نفس الوقت حيث سيعطى كل نوع من الفلورسنت اشارات لونية مميزة ويطلق على هذه التقنية (FISH) Fluorescent *In Situ* Hybridration.

تحليل التتابعات النيوكليدية فى جزئ د.ن.أ DNA sequencing:

تعد طرق تحليل تتابعات الاحماض النووية من أهم التقنيات المستخدمة فى مجال البيولوجيا الجزيئية والتي يمكن بها التحديد الدقيق لترتيب النيوكلييدات فى تتابعات مستمرة فى قطعة من د.ن.أ. وعلى الرغم من أن طرق تحليل التتابعات بدأت منذ بداية الستينات من القرن الماضى إلا أن أواخر السبعينات شهدت ظهور تقنيات سريعة وفعالة لتحليل تتابعات د.ن.أ.

أ - طريقة إنهاء بناء السلسلة Chain Termination Method:

وقد استتبها Sanger and Coulson وتتطلب الطريقة استخدام سلسلة د.ن.أ مفردة للبناء عليها ولذلك تتم كلونة مثل هذه السلسلة فى ناقل M13 وحيد السلسلة بحيث يتم بناء سلسلة د.ن.أ المكملة عليها بانزيم DNA Pol 1 أو أنزيم Sequenase. ويحتاج الامر إلى وجود بادئ Primer لكى يستطيع الانزيم بدء البناء (الشكل ١٢-٣٠) ويتكون مخلوط التفاعل من العناصر الاساسية المعروفة لبناء د.ن.أ بحيث يتوفر فيها النيوكلييدات الاربعة العادية A,C,G,T dNTP's مع مراعاة أن تكون إحدى هذه النيوكلييدات معلمه بالاشعاع مع توزيع هذا المخلوط فى أربعة انابيب وتعطى الحروف : T,G,C,A.



الشكل (١٢-٣٠): طريقة ساتجروكولسون لتحليل تتابعات دن أ بإنهاء سلسلة دن أ

وبالإضافة إلى مخلوط النيوكليوتيدات الأربعة فى كل انبوبة يضاف نيوكليتيده واحدة معدله منزوع منها مجموعة $3'OH$ وتسمى Dideoxy Nucleotide والتي تتوقف عندها عملية استطالة سلسلة د.ن.أ الجديدة نظراً لعدم وجود مجموعة $3'OH$ حرة بها والتي تحتاجها عملية البناء لإضافة النيوكليتيده التالية. أى أن انهاء السلسلة يحدث إنما يتم الاضافة الانزيمية لهذه النيوكليتيده المعدلة. وإذا احتوى المخلوط فى الانبوبة A على Dideoxy ATP فإن الانهاء سيحدث عندما تتقابل مع النيوكليتيده T على طول تتابعات السلسلة القالب، وتكون النتيجة هى الحصول على مجموعة من السلاسل الجديدة المختلفة الأطوال ولكنها تشترك فى أن كل منها ينتهى بالنيوكليتيده المعدلة Dideoxy A. نفس الشئ سيحدث فى الانبوبة C ولكن باضافة Dideoxy C والانبوبة G بأضافة Dideoxy G والانبوبة T بأضافة Dideoxy T.

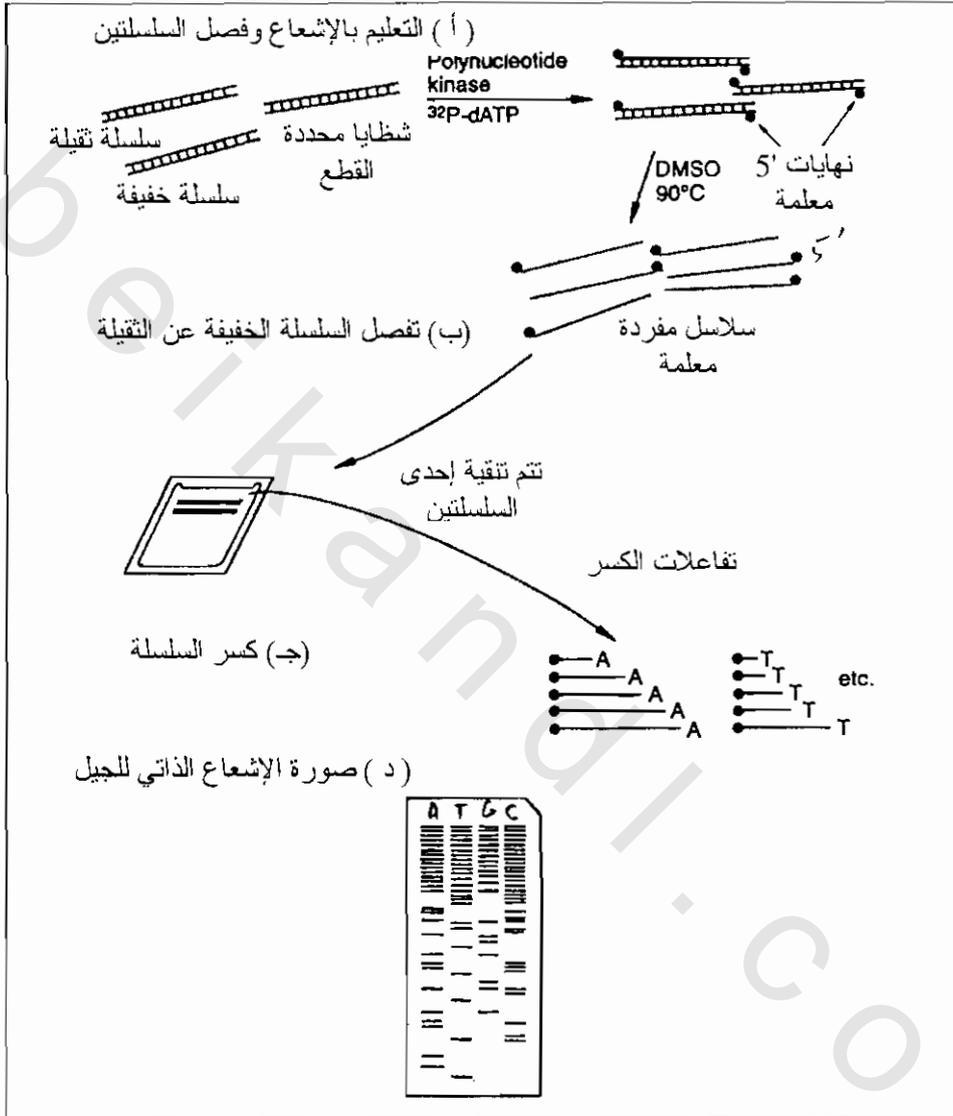
يلى ذلك التفريد الكهربى لمحتويات الانابيب الأربعة من مجموعة سلاسل د.ن.أ Oligo جنباً إلى جنب. ويمكن باستخدام التصوير بالأشعاع الذاتى، التعرف على التتابعات حيث تتم قرائتها من اسفل الجيل إلى أعلى كالاتى (الشكل ١٢-٣١).

ويكون التتابع عند هذه النقطة هو AT. وتستمر عملية القراءة من أسفل الى أعلى حتى نصل إلى نقطة تكون فيها السلاسل متداخلة ويصعب قراءتها وعموماً فإن هذه الطريقة تنتج قراءة تتابعات لحوالي ٤٠٠ نيوكلييدة من صوره اشعاع ذاتى واحده Autoradiograph

ب- طريقة الهدم الكيماوى **Chemical degradation of DNA**:

استنبط هذه الطريقة Maxam and Gilbert وتحتاج هذه الطريقة إلى استخدام قطع دن.أ مزدوجة السلسلة وبذلك لا تحتاج الى الكلونة فى الناقل M13 ولا إلى بادئ نظرا لأن الأساس فى هذه الطريقة ليس البناء ولكن هدم جزئ دن.أ ثنائى السلسلة الموجود بالفعل باستخدام محاليل كيماوية موجهة ليتسنى قطعه عند نيوكلييدة نوعية معينة. ويتم أولاً التعلیم Labeling بالفوسفور المشع ^{32}P عند النهاية 5' لقطعة دن.أ مزدوجة السلسلة المراد تحليل تتابعها، ثم يضاف Dimethylsulphoxide (DMSO) ويتم التسخين على درجة ٩٠ م° ويؤدى ذلك إلى تفكيك الحلزون المزدوج وندثرة جزئ دن.أ. يلى ذلك فصل السلسلتين بالتفريد الكهربى على اساس أن احدى السلسلتين تكون اثقل قليلا من الاخرى على اعتبار احتوائها على نسبة أعلى من البيورينات. ويتم فصل وتنقية احدى السلسلتين ثم يتم تقسيمها إلى أربع عينات وتعامل كل عينة بإحدى محاليل كاشفات القطع. وفى الحقيقة فإن أول مجموعة من الكاشفات تحدث تعديل فى تركيب النيوكلييدة المتخصصة لها بحيث تجعلها معرضة للقطع عند هذه النيوكلييدة عند اضافة مادة البيبريدين Piperidine. وتتم عملية التعديل Modification وتفاعل القطع Cleavage Reaction تحت ظروف قياسية تؤدي إلى احداث قطع واحد فى السلسلة. وتحتفظ بعض الشظايا المقطوعة بالفوسفور المشع ^{32}P 5'. وبعد التفريد الكهربى ، يمكن التعرف على تتابعات النيوكلييدات

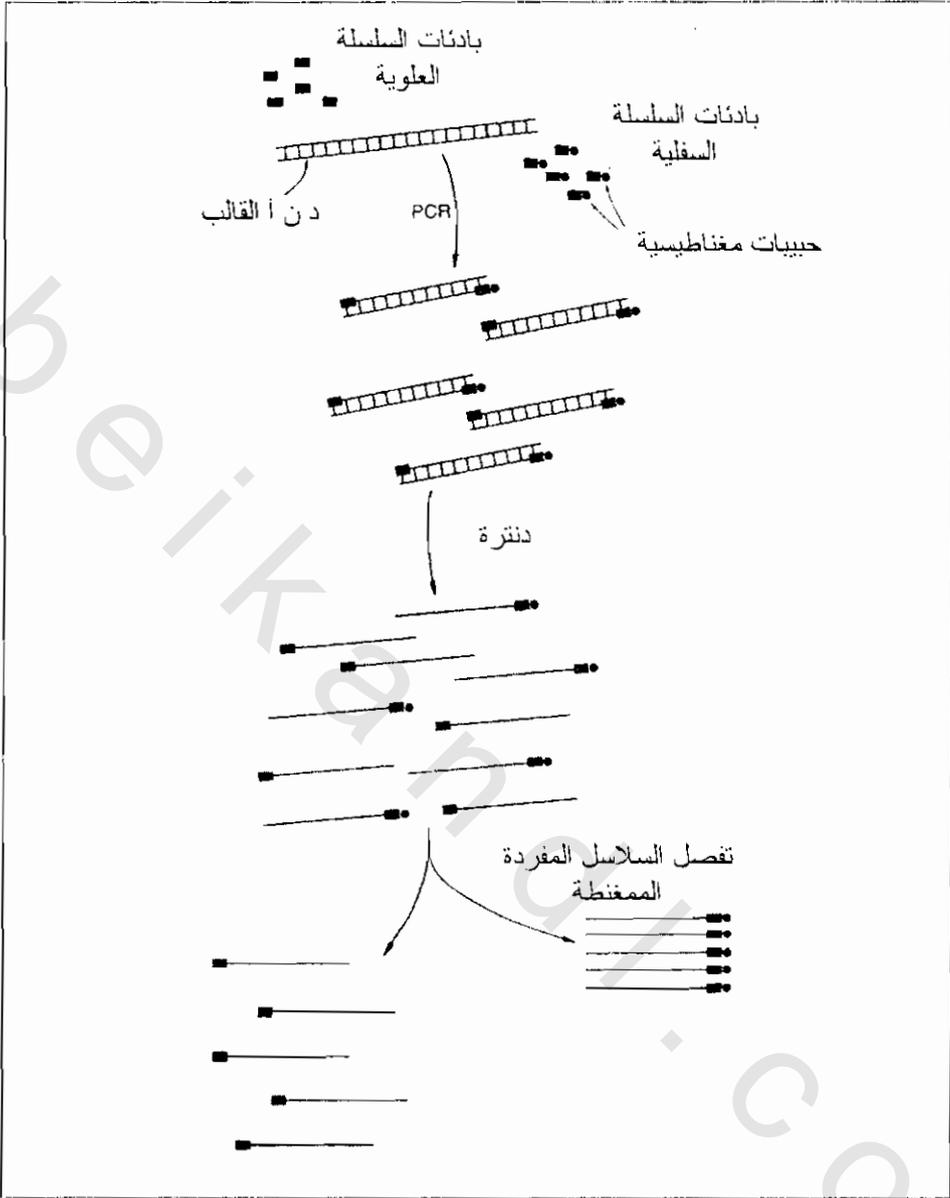
بالتصوير الذاتي الإشعاعي Autoradiography وتتم قراءة النتائج من اسفل إلى أعلى كما سبق الشرح في طريقة انهاء البناء (الشكل ١٢-٣٢).



الشكل (١٢-٣٢): طريقة ماكسام وجيلبرت لتحليل نتاجات دن أ بالهدم الكيماوى

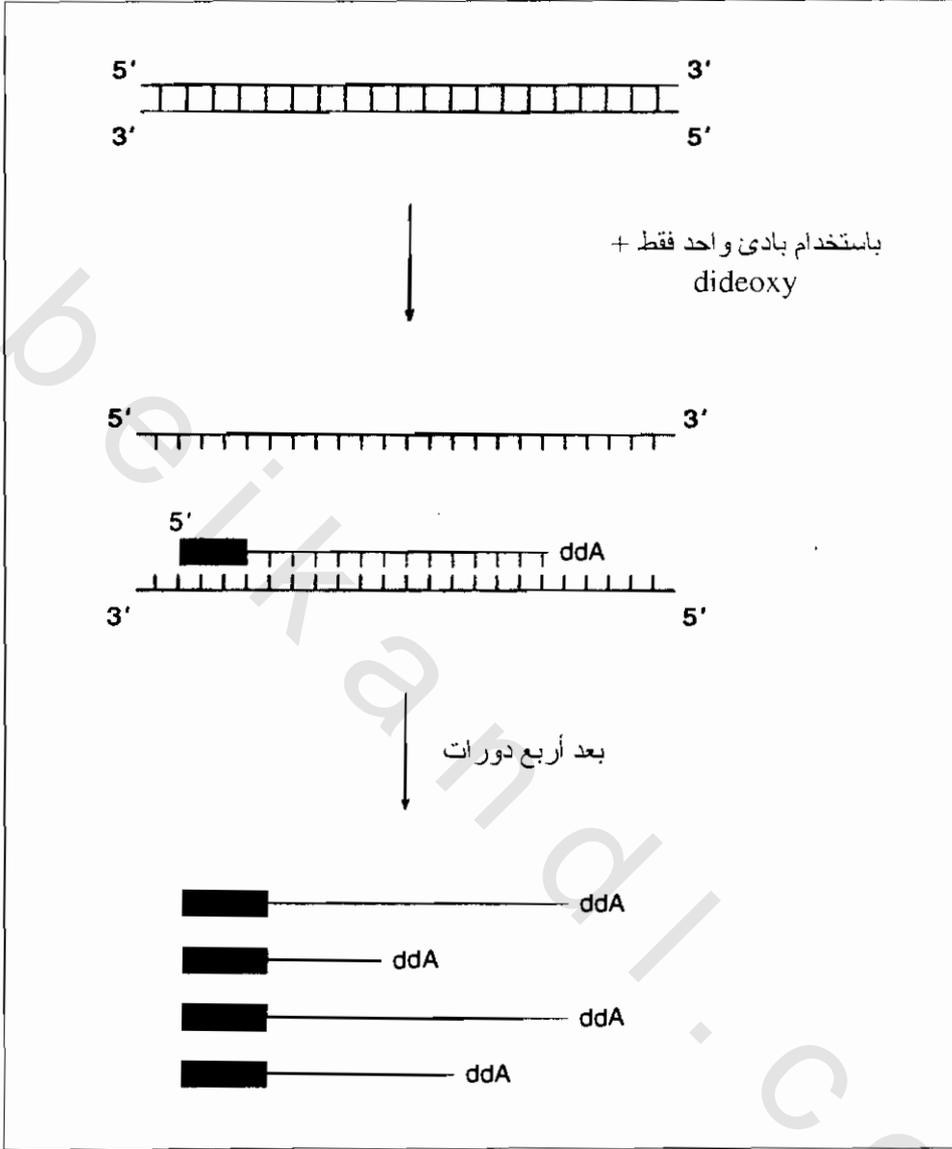
تحليل تتابعات نواتج PCR Sequencing PCR Products:

يحتاج الامر في اغلب الأحيان إلى تحديد تتابعات الشظايا الناتجة من PCR ويمكن نظرياً اجراء ذلك عن طريق كلونة هذه الشظايا مع استخدام تقنية انهاء السلسلة السابق الاشارة اليها. إلا أنه نظراً للمشاكل الخاصة بكلونة هذه الشظايا فإنه من الأفضل أن يتم تحليل تتابعاتها مباشرة Direct بدون كلونة باستخدام تقنية إنهاء السلسلة Chain Termination وحيث أن هذه التقنية تتطلب استخدام سلسلة مفردة من د.ن.أ، فإنه يمكن عمل تعديل في البادئ المستخدم بحيث يكون احد الزوجين مرتبط بقطعة من المغناطيس والآخر عادى. ثم يتم الاكثار فى جهاز PCR وبذلك يمكن فصل السلسلتين بعد نهاية برنامج PCR كما فى الشكل (١٢-٣٣) ويتم بعد ذلك اجراء تحليل التتابعات بطريقة انهاء السلسلة.



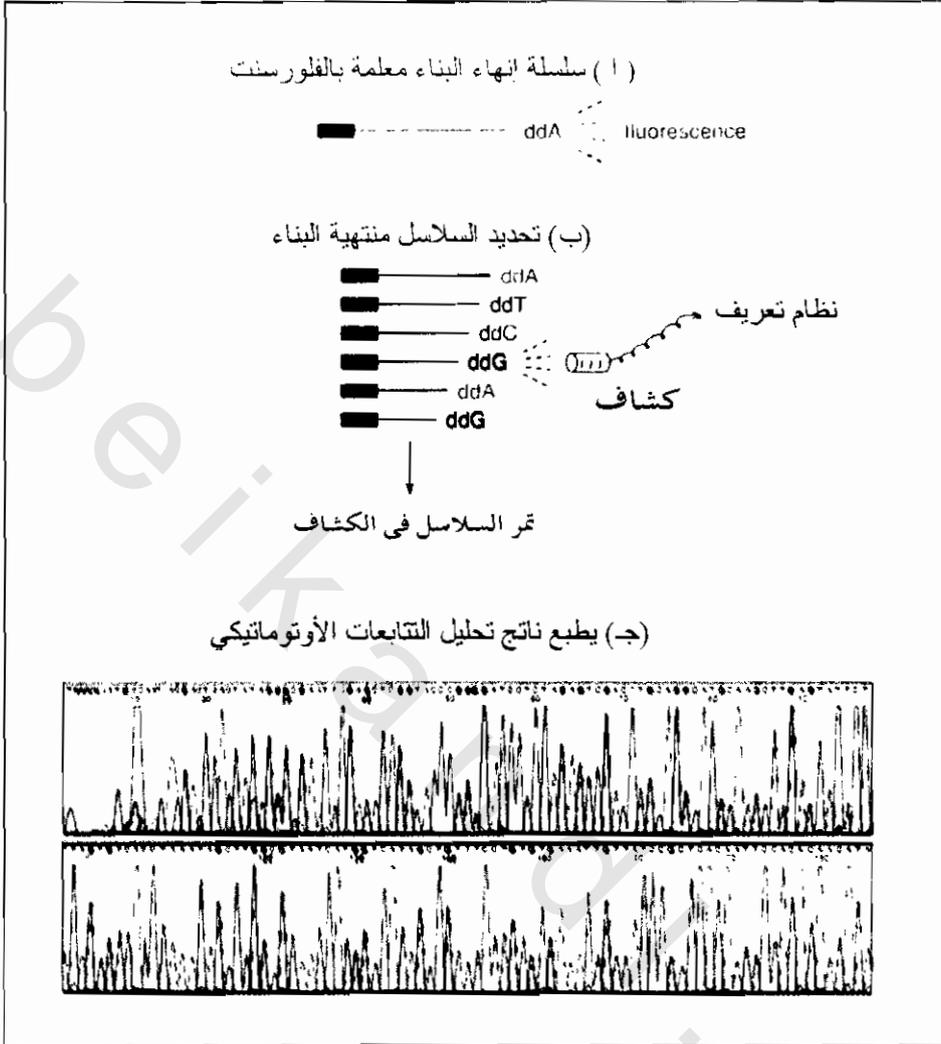
الشكل (١٢-٣٣): طريقة للحصول على عينة نقية من سلسلة مفردة من د ن أ من ناتج PCR مزدوج السلسلة. يتم تعليم احد البادئين بحبيبات ممغنطة وبعد إنتهاء دورات PCR تتم دنترة ناتج PCR مزدوجة السلسلة و تفصل السلاسل الممغنطة من تلك غير الممغنطة

وتوجد تقنية بسيطة وسهلة لتحليل تتابعات نواتج PCR ويطلق عليها Thermal Cycle Sequencing وتتضمن الجمع بين PCR وتحليل تتابعات النواتج فى تفاعل واحد. وفى هذه التقنية يستخدم مخلوط للتفاعل مشابه لمخلوط PCR مع اختلافين هامين أولهما استخدام بادئ واحد Single Primer فقط (وليس زوج) ومعنى ذلك أن عملية الاكثار المميزة لتقنية PCR لا يمكن أن تحدث ولكن كل ما يحدث هو أن سلسلة واحدة من د.ن.أ القالب هي التي سيتم أكتاؤها الى نسخ عديدة. ولا بد من استمرار هذا الاكثار نظراً لأن التفاعل يكون متسلسل حرارياً Thermally Cycled تماماً مثل ما يحدث فى PCR، والفرق أو الاختلاف الثانى هو أن هذا التفاعل المعدل يجرى اربع مرات على التوازي وفى كل مرة مع نيوكليتيده معدلة Dideoxy مختلفة (G, C, T, A) مما يؤدي إلى انتهاء بناء الشطايا الجديدة عند كل من هذه النيوكليتيديات المعدلة (الشكل ١٢-٣٤). يلى ذلك التفريد الكهربى للنواتج كما فى حالة تقنية انتهاء السلسلة.



الشكل (١٢-٣٤): الأساس في تحليل تتابعات د ن أ بطريقة Thermal Cycle Sequencing. يتم تحضير PCR مع إضافة بادئ واحد فقط (وليس زوج من البادئات) واحد داي ديوكس نيوكليتيده Dideoxy NTP حيث يحدث بناء لأحد سلاسل القالب إلى العديد من سلاسل إنهاء البناء (بطريقة سانجر - كولسون)

وقد تم تطوير عملية تحليل التتابعات بجعلها Automated وبدلاً من استخدام التعليم بالأشعاع استعويض عنه بالتعليم الفلورسنتى والذي يتم برربط فلورسنت بلون مختلف Different Fluorochrome مميز لكل قاعدة Dideoxy (مثلاً أحمر مع A وأزرق مع T وأصفر مع G وأخضر مع C) وتستم متابعة اشارات الفلورسنت بنوع خاص من Imaging System يتضمن استخدام كمبيوتر لفراءة تتابعات د.ن.أ بدلاً من الاعتماد على نظر الباحث. ويتم وضع نواتج التفاعل فى انبوبة شعيرية واحدة لنظام التفريد الكهربى وامرارها على كشاف فورسنتى Fluorescent Detector الذى يحدد نوع الاشارة الفلورسنت المنبعثة من كل حزمة ويغذى النتائج للكمبيوتر الذى يقوم بتحويل المعلومات إلى تتابعات د.ن.أ المقابلة. ويمكن طبع التتابعات لفحصها أو تخزين فى الكمبيوتر للقيام بتحليلات أكثر (الشكل ١٢-٣٥).



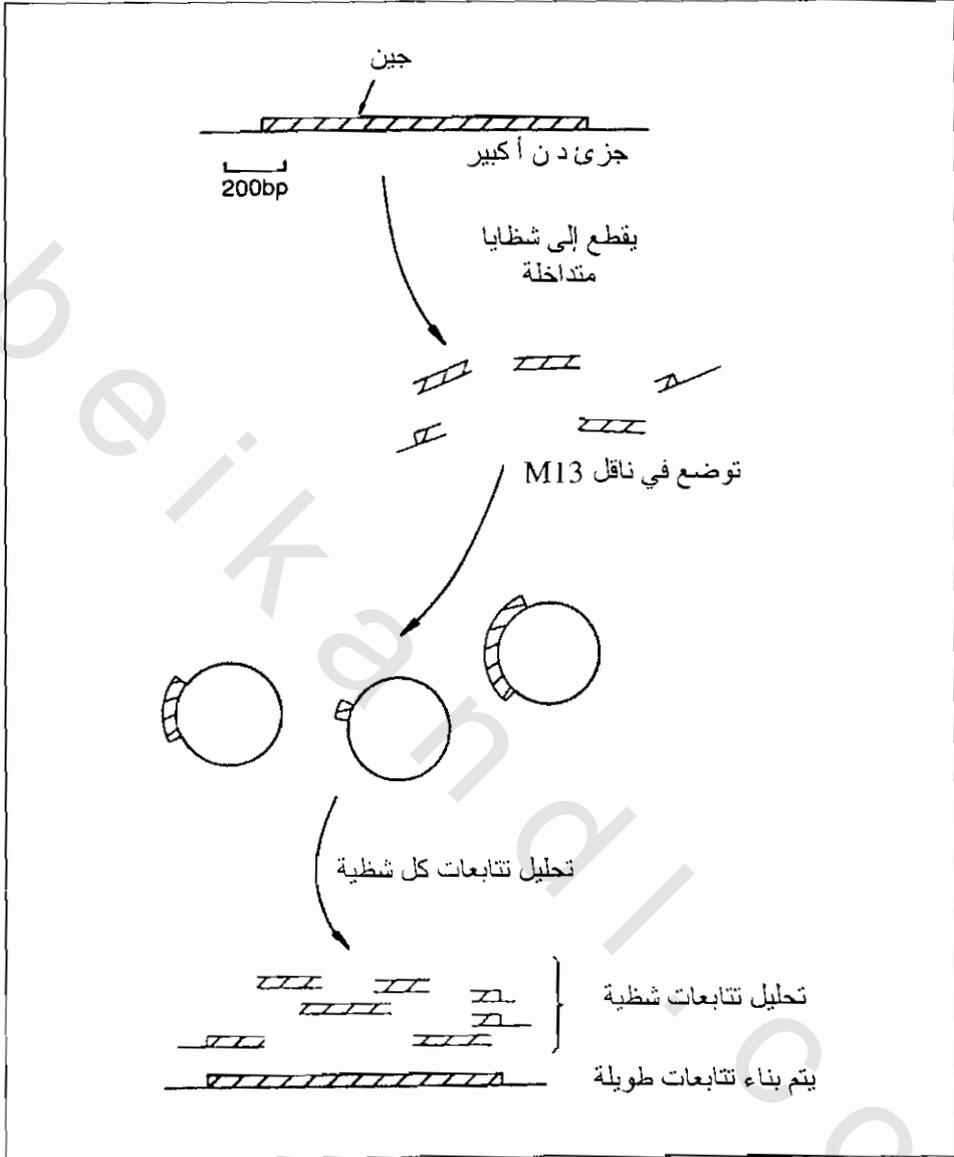
الشكل (١٢-٣٥): تحليل تتابعات د ن أ أوتوماتيكيا:

- أ - يتم تعويم كل من Dideoxy NTP بكشاف فلورسنتي.
- ب - يتم تعويم كل من Dideoxy NTP بكشاف فلورسنتي مختلف اللون بحيث يمكن تمييز السلاسل المنتهية البناء أثناء مرورها على الكشاف Detector.
- ج - مثال لتتابعات د ن أ مطبوعة من الكمبيوتر.

ويمكن لجهاز تحليل التتابعات الأوتوماتيكي Automated Sequencer أن يقرأ حتى ٩٦ تتابع مختلف في ساعتين وبذلك يعطى بيانات أكثر وبسرعة أكبر عما هو ممكن بالتحليل اليدوي، حيث يعطى الشوط الواحد للتحليل تتابع ٧٥٠ نيوكلييدة مقابل ٤٠٠ نيوكلييدة فقط بالتحليل اليدوي ويمكن بالتحليل الاتوماتيكي واستخدام Robotic Systems وبنظام مشابه للمصنع حيث يوجد ٩٦ مسار أو خط تحليل تتابع اوتوماتيكي تعمل معا بالتوازي الحصول على تتابعات ٥٠ مليون نيوكلييدة على مدى يومين من التشغيل المتواصل للنظام مما يعد قفزة هائلة في مجال تحليل التتابعات.

تكوين تتابعات طويلة من د.ن.أ.:

ويتم ذلك من خلال اجراء تجارب تحليل تتابعات د.ن.أ لعدد كبير من الشظايا المكلونة أو لنواتج PCR بحيث تكون جميعها مشتقة من جزئ د.ن.أ واحد أكبر الشكل (١٢-٣٦) ولا بد أن تكون هذه الشظايا متداخلة Overlapping حتى تكون التتابعات نفسها متداخلة. ويمكن التعرف على مواقع التداخلات إما بالعين المجردة أو باستخدام الكمبيوتر. ويتم تكوين التتابع الرئيسي Master Sequence أو Contig بالتدرج. وتوجد عدة طرق لانتاج الشظايا المتداخلة. إذ يمكن قبل الكلونة تقطيع جزئ د.ن.أ بأربع أو خمسة انزيمات قطع محددة. وهناك طريقة اخرى لتكسير جزئ د.ن.أ وهي تسليط ذبذبات قوية Sonication مما يؤدي إلى تقطيع جزئ د.ن.أ بطريقة عشوائية أكثر مما يؤدي إلى زيادة احتمالات الحصول على شظايا متداخلة يمكن وضعها في التتابع الرئيسي Contiguous Master Sequence.



الشكل (١٢-٣٦): بناء تتابعات دن أطويلة من مجموعة تتابعات متداخلة قصيرة

وقد تحققت نجاحات هامة في مجال تحليل التتابعات النيوكليدية في عدد من الجينومات وكان أول كائن تم تحليل تتابعاته هو بكتريوفاج $\phi X 174$ وتلاه تحليل فيروس SV 40 والبلازميد PBR 322. وبعد ذلك توالت تحليلات تتابعات جينومات أكبر مثل جينوم الميتوكوندريا البشرية وبكتريوفاج λ وقد تم مؤخراً تحليل التتابعات الكاملة لجينومات الخميرة والدروسفلا والنيماطودا ونبات الاربيدوس ونبات الارز وتوجت بالانتهاء من تحليل التتابعات الكاملة للجينوم البشرى.

ويبين الشكل (١٢-٣٧) التقدم الهائل الذى حدث فى كفاءة تحليلات تتابعات الجينوم المختلفة وبعض الانجازات التى تمت فى هذا المجال.

انجازات هامة فى تحليل تتابعات د.ن.أ.		
اكتشف Miescher د.ن.أ.	١٨٦٨	
اثبت Avery أن د.ن.أ هو مادة الوراثة.	١٩٤٤	درجة الكفاءة القاعدة / الفرد / السنة
اعلن Watcon & Crick الحلزون المزدوج لـ د.ن.أ.	١٩٥٣	
تحليل تتابعات rRNA ^{١٦} للخميرة بواسطة Holley	١٩٦٥	١

البيولوجيا الجزيئية للجينوم

تحليل تنابعات بكتريوفاج λ بواسطة wu	١٩٧٠	١٥
		١٥٠
استنبط Sanger طريقة انهاء السلسلة لتحليل التنابعات واستنبط Glibert طريقة الهدم الكيماوى لتحليل التنابعات	١٩٧٧	١٥٠٠
استنبط Messing ناقل الكلونة M13	١٩٨٠	١٥٠٠٠
استنبط Hood نظام تحليل تنابعات اوتوماتيكي جزئى	١٩٨٦	٢٥٠٠٠
		١٠٠٠٠٠
اعلن Venter تحليل تنابعات اول جينوم بكتيرى واستخدم فيها اجهزة اوتوماتيكية بالفلورسنت تدار بالانسان الاتى robot وقدم مفهوم تحليل التنابعات بجهاز PCR	١٩٩٥	١,٠٠٠,٠٠٠
المجموعة الدولية للعلماء اعلنت تحليل التنابعات الخاصة بجينوم الخميرة	١٩٩٦	الكفاءة / قاعدة/ الماكينة/السنة
شركة Perkin- Elmer اخترعت جهاز تحليل تنابعات يحتوى على ٩٦ انبوبة شعرية يتم تشغيله اوتوماتيكياً بالكامل	١٩٩٨	١٥٠,٠٠٠,٠٠٠
تحليل التنابع الكامل لجينوم دودة النماتودا	١٩٩٨	

تحليل التتابع الكامل لمناطق اليوكروماتين في جينوم الدروسفلا وكذلك تحليل التتابع الكامل لجينوم نبات الارادبيدوبس	٢٠٠٠
نشر العلماء القائمون على HGP وشركة Celera أول مسودة للتتابعات الجينوم البشرى.	٢٠٠١
نشر أول مسودة لتتابعات جينوم الازر	٢٠٠٢

الشكل (١٢-٣٧): بعض الاجازات الهامة فى تحليل تتابعات د. ن. أ