تكنيكات البيولوجيا الجزيئية

فى عام ١٩٦٥ حملت إلينا مجلة «لانست»، المجلة الطبية التى يُنظر إليها بإحترام كبير، مقالا كتبه سير ماكفرلين بيرنت عالم المناعة الحائز على جائزة نوبل، وهو يصر فى مقاله هذا على أنه لا توجد وسيلة يمكن تصورها ونستطيع بها تطبيق ماتعلمناه عن تخليق البروتين والشفرة الوراثية تطبيقا يفيد البشرية. ويحاج بيرنت بأن علم البيولوجيا الجزيئية مهما كان خالبا للّب كإنجاز أكاديمى، إلا أنه لم ينتج عنه أى شئ ذى قيمة عملية، ومن أقل المحتمل أنه سوف يؤدى مستقبلا إلى شئ من ذلك. وهذه التعليقات أصبحت الآن بالفعل جديرة بأن يلقى بها فى أضابير المحفوظات بجانب ملاحظات شهيرة أخرى مثل مقولة لورد روذرفورد المزعومة بأنه ليس من نتائج عملية يمكن توقعها من إنقسام الذرة، أو مقولة أحد علماء المرصد الفلكى الملكى السابقين من أن الحديث عن السفر فى الفضاء هو «هراء». والحقيقة أن البيولوجيا الجزيئية أخذت خلال السنوات الخمس والعشرين الماضية تنتج تطبيقات تتأسس على ما اكتشفناه حديثا من قدرتنا على أخذ قطعة من حامض دنا من أحد الكائنات لضمها اصطناعيا إلى قطعة دنا من كائن آخر، لينتج حامض دنا المولّف recombi-nant DNA. والتحوير الوراثى هو الحرفة التى تسخّر هذا النوع من البحث.

والتحوير الوراثى بدوره قد أمد بالوقود اللازم لما حدث من اندفاع فى التكنولوجيا الحيوية خلال العقدين الأخيرين ـ أى الإندفاع لإستغلال الميكروبات والأنواع الأخرى من الخلية لإنتاج مواد مفيدة ولتسهيل العمليات الصناعية. والتكنولوجيا

الحيوية هى نفسها ليست بالجديدة. وبمعنى ما فإنها قد بدأت مع حرفة قديمة هى تخمير السكر لصنع المشروبات الكحولية، كما أنها قد أدت إلى أول إنتاج للمضادات الحيوية فيما سبق من قرننا هذا. ولكن هذه النشاطات الإجتماعية والصناعية كانت كلها تعتمد على الكائنات الحية كما هى موجودة فى الطبيعة. وكانت أدوات المساعدة العلمية الوحيدة فى ذلك هى التكنيكات اللازمة لتعيين وإنتخاب السلالات الفعّالة على وجه الخصوص. أما دنا المولّف فقد أدى وفوده إلى توسيع سلطان التكنولوجيا الحيوية، وزيادة خصوصيتها ومداها وذلك بالنسبة لقدرتها على هندسة كائنات حية مستحدثة.

قَطعْ دنا وتطعيمه:

فى السنوات الأولى من السبعينيات تم وقوع تلك الإكتشافات التى أدت إلى الإمكانات الحالية للتحوير الوراثى للميكروبات والنباتات. وكان ذلك عندما اكتشف هربرت بوير أثناء عمله فى مركز علم الصحة بجامعة كاليفورنيا هو وستانلى كوهن بجامعة ستانفورد أن من المكن أن نولج داخل البكتريا جينات قد انتزعت من بكتريا أخرى (وبالتالى فإن من الممكن أيضا إيلاج جينات قد انتزعت من خلايا حيوان أو نبات بعيد الصلة تماما). وكما سيُذكر بتفصيل أكبر فيما بعد، فإنهما تعلما أولا حيلة تكسير دنا الكائن المُعطى إلى شظايا طيعّة للإستخدام. وقد وصلا إلى ذلك بإستخدام «إنزيمات الأندونيوكلييز التحديدية»، وهى نوع من إنزيمات البكتريا تم إكتشافه بواسطة ويرنر أربر وهاملتون سميث ودانيال ناثانز. وثانيا، فإنهما اكتشفا كيف يضعان هذه الجينات من داخل «ناقل» ـ هو غالبا بكتر يوفاج أو بلازميد. ثم أمكنهما بعدها إستخدام الناقل لنقل الشظية المنتخبة من دنا إلى الداخل من خلية البكتريا المتلقية. وما إن يصل الجين المنقول لداخل مضيفه الجديد حتى ينقسم مع إنقسام الخلية، بما يؤدى إلى ظهور «نسخ خضرية» Clone من الخلايا يحوى كل منها نسخا دقيقة للجين. وأصبح هذا التكنيك يعرف بالنسخ الخضرى

للجين، وتبع ذلك إنتخاب الخلايا الملقية التى ستحوى الجين المطلوب. وأحد الأنواع الأخرى من التحوير الجينى هو حذف الجينات. وثمة نوع ثالث هو التحوير المباشر لأحد الجينات لتعديل البروتين الذى ينتجه.

والإنزيمات المستعملة لتقطيع دنا إلى أجزاء هى بالغة الخصوصية فى مفعولها. وبالتالى فإنه يمكن نزع الجينات ونقلها من أحد الكائنات الحية إلى الآخر بدقة خارقة. وهذه الأنواع من التناول تتباين تبايناً شديداً مع الطريقة التى يحدث بها انتقال الجينات فى الطبيعة أو انتقال الجينات الذى ينشأ عن تربية الحيوانات لأغراض الزراعة أو العرض فى المعارض، فهذه الإنتقالات الأخيرة هى مما يصعب كثيراً احتمال التنبؤ بما سيحدث فيها. وفوق ذلك، فإن هذه الأنواع من التناول تعطينا القدرة على أن نطعّم معاً جينات هى مما يقل احتمال اتحادها معاً بالطبيعة. وبتحريك قطع من دنا على هذا النحو (بما فى ذلك تحريك نسخ للجينات البشرية) يصل الآن مهندسو الوراثيات إلى أن يصنعوا وراثيا مهكروبات متحورة تستخدم فى مدى واسع من التطبيقات فى الصناعة والطب والزراعة. وأحد أول المنتجات التجارية التى تم إنتاجها بالبكتريا المحوّرة وراثيا، الأنسولين البشرى الذى يطابق الأنسولين المصنوع فى البنكرياس البشرى. ويتم تصنيع مثل هذه المواد بتنمية مزارع من الميكروب المحور على مستنبت مغذى داخل مفاعل حيوى (وهو أحيانا يسمى بالمخمّر وهى تسمية غير دقيقة).

وقد نشأت عن نفس هذه الإكتشافات التى أتاحت العهد الجديد للتحوير الوراثى طرائق أخرى بالغة الدقة لدراسة وتعيين هوية مقاطع من دنا. وأحيانا تجمع التكنيكات اللازمة لذلك معا تحت عنوان فضفاض هو تكنيكات دنا المولّف. وهى تكنيكات تعتمد على نفس الإنزيمات المستخدمة فى قص جينات بعينها. وقد انتشر بالذات استخدام ما يسمى «مجسات» دنا، وهى قطع صغيرة من دنا المرقّم إشعاعيا تلتصق بخصوصية بالغة مع قطع أخرى من دنا هى القطع التكميلية لها. وهكذا فإنها تمدنا بوسيلة للتعرف على هذه القطع التكميلية دون أى لبس.

والكائن الحى الذى يغلب استخدامه فى هذه الدراسات هو بكتريا إشيريشيا كولاى. وهذه البكتريا موجودة بكميات هائلة فى أمعاء الإنسان والحيوانات الأخرى، وهى فى الأحوال العادية غير ضارة بالمرة (هذا رغم أن هناك سلالات معينة منها لها القدرة على إنتاج السموم وتستطيع أن تسبب الإسهال) . و إ. كولاى التى تستخدم فى التجارب المعملية تفقد قدرتها على إستعمار الأحشاء، وذلك كنتيجة لزرعها فى مستنبتات إصطناعية لسنوات كثيرة. وفى بعض الأحيان يمكن إدخال جينات معدلة وأجنبية ليس فقط فى البكتريا الأخرى، وإنما أيضا فى الخمائر، والفطريات، وذباب الفاكهة، والبويضات المخصبة، وخلايا الثدييات المستزرعة، وبعض النباتات.

ضغط زر تشغيل الجينات:

حيث أن هناك جينات معينة تنظم إنتاج البروتينات التى تشفر لها التتابعات الجينية الأخرى، فإنه ليس مما يكفى عادة أن نولج فحسب دنا المسئول عن نتاج معين (أى جين البناء) للداخل من دنا كائن حى آخر. وإنما يجب أيضا أن يتم التعبير عن هذا الجين ـ أى يجب أن يتم «تشغيله» بواسطة عناصر التنظيم المصاحبة له فى دنا. وهكذا فإن علماء التكنولوجيا الحيوية يستخدمون إذن كلا من جينات البناء وجينات التحكم. وهم ينقلون الجينات الأولى (لإعطاء الكائن الحى القدرة على صنع منتجات جديدة) ومعها الجينات الأخرى (التى تقوم بتشغيل جينات البناء المناظرة لها، وذلك فى الغالب حتى ترفع مستوى عملية تخليق البروتين بدرجة تفوق كثيراً مستواها الطبيعى) .

وكثيراً ما يحدث فى الصناعة أن يقوم مصممو مؤسسات التصنيع بوضع نظام يتم فيه إنتاج إحدى المواد كإستجابة لإشارة مناسبة ـ والمثل النموذجى لذلك هو أن يكون هناك عنصر تغذية معين موجود فى مستنبت الزرع. وإحدى الطرائق لتناول ذلك هى بإستخدام أوبرون اللاكتوز. وهذا الأوبرون هو إمتداد من دنا يشفر

لإنزيمات تستخدمها أنواع معينة من البكتريا لهضم اللاكتوز ويشفر أيضا للمشغّل الذى يقوم بتشغيل هذه الجينات عندما يوجد هذا السكر. وأوبرون اللاكتوز يمكن تطعيمه فى داخل أحد البلازميدات بحيث يوجد دنا الأجنبى بجواره مباشرة. وعندما تتعرض إحدى الخلايا البكتيرية الحاملة لبلازميد كهذا لسكر اللاكتوز فإنها تبدأ فى صنع الإنزيمات اللازمة لاستخدام السكر، وهى لا تصنع هذه فحسب وإنما تصنع أيضا البروتين الذى يشفر له دنا الأجنبى.

تفسيخ دنا:

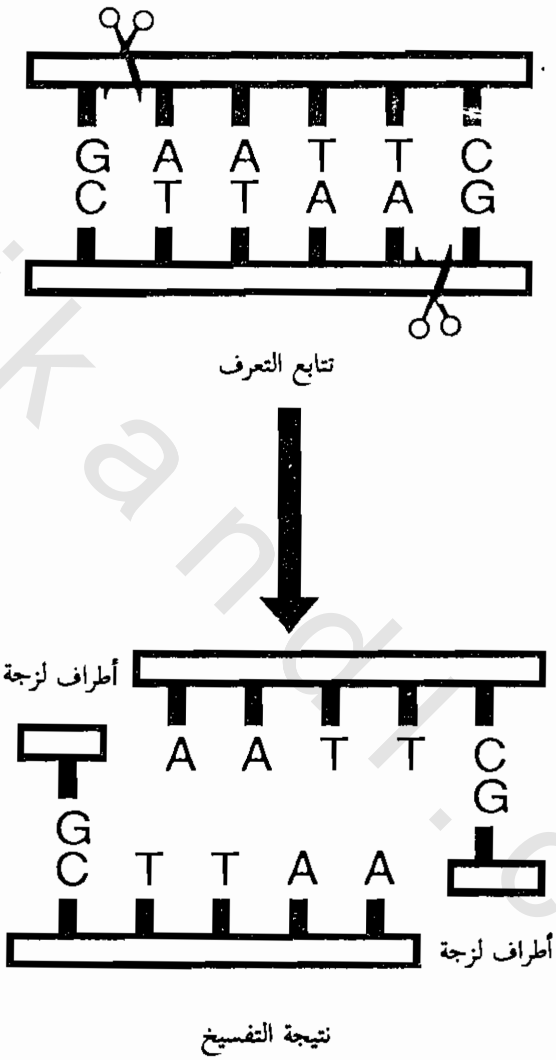
إذا كنا قد شرحنا سريعاً الفكرة الرئيسية لنقل الجينات بين الخلايا، فإن التطبيق الفعلى لها أمر أشد تعقيداً. ويمكن إدراك حجم المشكلة من الأرقام الفلكية التى تسهم فيها. فالطاقم الوراثى لإ. كولاى مثلا يحوى ٤,٨٠٠,٠٠٠ زوجا من القواعد، بينما يتكون الطاقم الوراثى للإنسان من ثلاثة آلاف مليون (٣ بلايين) من أزواج القواعد. بل إن الكروموزوم البشرى الواحد يحمل ملايين كثيرة من أزواج القواعد. كيف إذن يمكن للمرء أن يحدد موقع جين بعينه ثم يفصله عن الآخرين حتى يزرعه فى مكان آخر؟ والإجابة هى أن من المستحيل فعل ذلك فى خطوة بسيطة واحدة أو فى خطوتين بسيطتين، تشبه ما قد يحدث عند قص قطعة من متن إحدى المقالات لنقلها إلى مكان آخر، سواء على الورق أو على شاشة منسق للكلمات. فدنا يحمل كمّا هائلا من المعلومات، ومعناها لا يمكن تفحصه فى نظرة عاجلة، بنفس السهولة التى يستطيع بها المرء قراءة صفحات أحد الكتب. وإنما ينبغى أن ننشئ لذلك إستراتيجية أبرع من هذا.

وأول خطوة فى هذه الإستراتيجية هى قص دنا إلى قطع أصغر، تحوى كل منها جينا واحداً أو جينات معدودة فحسب. ويتم التوصل لذلك بإستخدام إنزيمات الأندونيوكليز التحديدية؛ وهى إنزيمات تقطع دنا بطريقة غاية فى الدقة. وهى تفعل ذلك بأن تتعرف على إمتدادات معينة من القواعد (عادة من أربعة إلى ستة أزواج،

تسمى تتابعات التعرف) ثم تقص كل جديلة من اللولب المزدوج عند مكان معين (انظر شكل ١ ، ٤). وكلما ظهر تتابع التعرف فى سلسلة دنا الطويلة، يحدث أحد إنزيمات الإندونيوكلييز قطعا عنده. وكلما استخدمت نفس الإنزيمات لتكسير قطعة معينة من دنا، فإنها دائما تنتج نفس المجموعة من الشظايا. ويحدث القَطع بطريقةينتج عنها قِطع من اللولب المزدوج بها عند كل طرف إمتداد قصير من جديلة مفردة من دنا. وتعرف هذه بأنها الأطراف اللزجة. وكما يحدث فى عملية نسخ دنا الطبيعية، فإن القواعد لها نزعة تلازمها (فى الظروف الكيميائية الملائمة) لأن يتحد كل منها مع قرينه ـ ا مع ث، و ج مع س. والأمر هكذا أيضا بالنسبة للأطراف اللزجة. وكمثل، فإن تتابع ث ـ ث ـ ا ـ ا ينزع إلى أن يعيد الإنضمام إلى ـ ا ـ ا ـ ث ـ ث. ويستخدم علماء الوراثة نوعا آخر من الإنزيمات هو «إنزيم وصل دنا» أو ليجيز دنا، لجعل هذا الإتحاد مستمرا.

وهذه هى القاعدة المفتاحية لتطعيم الجينات ـ أى استخدام نوعين من الإنزيمات لتقطيع قطعة من دنا ثم وصلها بقطعة أخرى. وقد تم الآن التعرف على مئات عديدة من إنزيمات الإندونيوكلييز التحديدية المختلفة وأصبحت كلها أجزاء من ضمن صندوق عدّة عالم الوراثيات. وكل واحد منها هو آلة دقيقة لتشظية دنا بطريقة معينة. وبعضها يتعرف على تتابعات مختلفة للقواعد؛ وبعضها الآخر يتعرف على نفس التتابع ولكنه يقوم بالقص عند نقطة مختلفة داخل التتابع أو تالية له.

وما إن يُقطّع جزء من دنا إلى خليط من شظايا مختلفة، فإن هذه الشظايا يمكن فصلها بالتفريد الكهربى على مادة تشبه الجيلى تسمى جيل الأجاروز. وتتحرك الشظايا الأكبر فى مسار السباق بسرعة أبطأ من الشظايا الأصغر. وينتج عن ذلك نمط، حيث القطع الأصغر أكثر بعدا عن نقطة البداية. بل إن شظايا دنا التى بطول محدد يمكن أيضا أن تؤخذ من الجيل وتعرّض لإنزيم تحديد آخر، حتى تعطى قطعا أصغر.



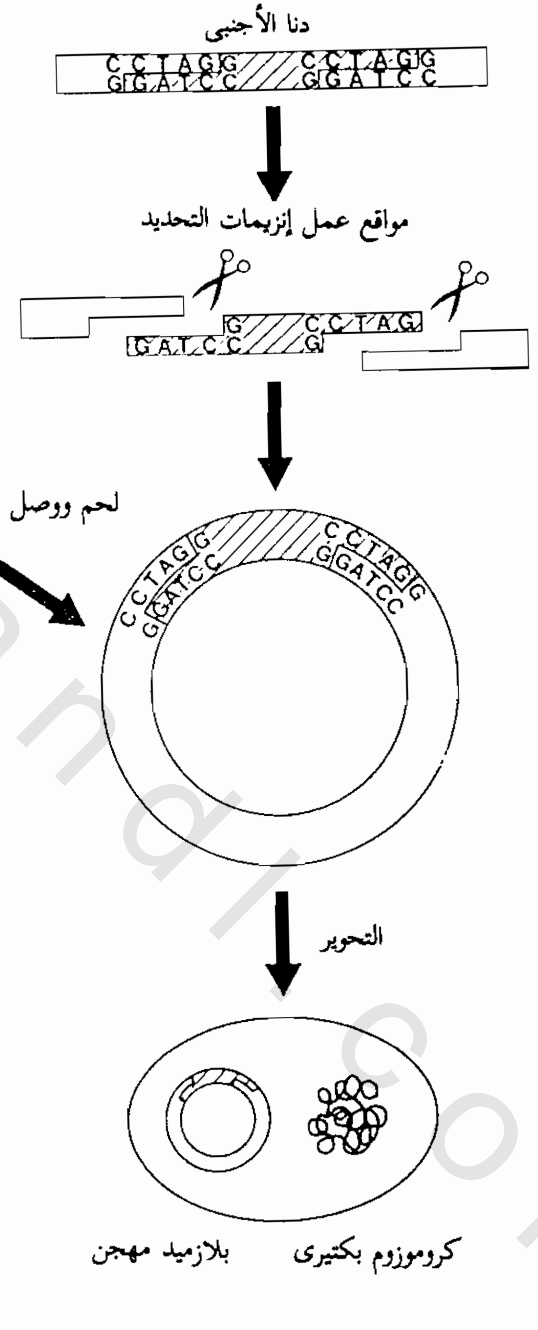
شكل (١ ، ٤) تفسيخ دنا بإستخدام إنزيم التحديد الإندونيوكلييز.

obeikandi.com

نقل الجين إلى داخل خلية البكتريا:

المرحلة التالية هى إيلاج دنا الأجنبى داخل ناقل هو عادة أحد البلازميدات أو فيروس بكتريوفاج. والنواقل تستخدم لنقل الجينات المطلوبة للداخل من الكائن الحى المطلوب هندسته. وكانت البلازميدات هى التى جذبت الإهتمام أولا بالنسبة لإمكان استخدامها كنواقل، لأن هذه القطع الدائرية من دنا التى تنسخ نفسها ذاتيا، يمكن أن تجعل مدموجة فى نواة البكتريا ثم تنفصل بعد ذلك عنها حاملة الجينات معها. ويبدو أن هذه البلازميدات قد تطورت كآلية طبيعية لتحريك الجينات فيما بين البكتريا. والأمر كذلك بالنسبة للبكتريوفاجات. فكما أنها تغزو الخلايا البكتيرية وتحدث فى التو إنتاج جسيمات فاج جديدة، فإنها أيضا تستطيع أن تصبح مدموجة فى كروموزوم البكتريا وتحمل الجينات بعيدا عندما تخلص نفسها بعد ذلك فى وقت ما (وهذه عملية يمكن إستثارتها اصطناعيا).

وحتى يولج عالم الوراثة دنا الأجنبى داخل أحد النواقل فإنه يقوم أولا بتمزيق البلازميد أو الفاج لينفتح، وذلك بإضافة نفس إنزيم الإندونيوكلييز الذى يستخدم فى تقطيع دنا الكائن الحى المعطى إلى شظايا قصيرة (انظر شكل ٢ ، ٤). وهذا يخلق أطرافا لزجة مكملة للأطراف اللزجة التى على شظايا دنا الأجنبى الذى سيتم زرعه. وهكذا تتطابق إحدى الشظايا تطابقاً دقيقاً مع الثغرة التى فى دنا الناقل، حيث يتم لحمها به لحما محكما بواسطة إنزيم وصل دنا (الليجيز). والهدف إذن هو أن ندمج جينا أجنبيا هو وتتابعاته المنظِّمة فى داخل الناقل (وفى هذه العملية العشوائية، قد يحدث بالطبع أن بعض الأطراف اللزجة للناقل سيعثر أحدها على الآخر ليحدث ببساطة أنها تتحد ثانية وتعيد التكوين الأصلى. وكذلك أيضا، فإن هناك شظايا من دنا لا تحوى الجين الأجنبى المعين ويتم إدماجها). وفى الخطوة التالية، يتاح للبلازميد أو الفاج أن يعدى خلية البكتريا (وهى فى الغالب إ. كولاى) التى يمكنه أن يتناسخ من داخلها. والعدوى بالفاج لها كفاءة عالية، أما طريقة التناول البديل لذلك، أى



شكل (٢ ، ٤) دنا أجنبى للداخل من خلية بكتريا.

obeikandl.com

التحوير بواسطة بلازميدات تمر من خلال سطح الخلية فربما يلزم تسهيلها بمعالجة كيماوية. وبمجرد أن يتم الدخول إلى الخلية، فإن الناقل وبالتالى دنا الأجنبى يتناسخان كلما انقسمت الخلية. وهذه العملية من الإستنساخ الخضرى للجينات هى عملية متمايزة تماما عن الإستنساخ الخضرى للحيوانات مثل الضفادع والماشية حيث يتم تحوير خلايا بويضاتها. ولما كانت بكتريا إ. كولاى تنقسم تقريبا مرة كل عشرين دقيقة، فإن الإستنساخ الخضرى للجين يمكن أن يؤدى خلال عشر ساعات أو ما يقرب إلى زيادة من بليون مثل لعدد نسخ جين بعينه. ولما كانت الشفرة الجينية شفرة معممة، فإن الجين يمكن أن يؤتى به عمليا من أى مصدر كان، سواء كان ذلك خلية بكتريا أخرى، أو فيروس، أو حيوان، أو نبات. فخلية البكتريا سوف تتناوله ببساطة وتنسخه كجزء من دنا الخاص بها. وأحياناً تستخدم الخميرة للتكاثر الخضرى، وكذلك أيضا خلايا الحيوان.

التخلص من الخلايا غير المطلوبة:

عند إضافة الناقل لا يحدث أن تُعدى به كل خلايا مزرعة البكتريا التى لا حصر لها. كيف يمكننا أن نميز تلك الخلايا التى لا تحوى الناقل؟ من الحيل التى يشيع استخدامها لذلك هى أن يدمج فى الناقل جين يضفى القدرة على مقاومة مضاد حيوى بعينه. وعندما تزرع البكتريا فيما بعد، أثناء عملية الإستنساخ الخضرى، يُضمّن هذا المضاد الحيوى فى المستنبت المغذى ليكبح أى جراثيم لا تقاومه. ولن تتمكن من النمو إلا البكتريا التى دخلها الناقل (وبالتالى دخلها جين المقاومة).

على أن هذه ليست المشكلة الوحيدة. فبعض البكتريا ستحوى ناقلا غير معدل، ينقصه دنا الأجنبى. والأمر يتطلب حيلة أخرى للتعرف على البكتريا التى تحمل الناقل مضافا إليه دنا الجديد. وإحدى وسائل ذلك هى استخدام بلازميد يحوى جينا يشفر لإنزيم معين. والبكتريا التى تحمل هذا البلازميد، وبالتالى تصنع هذا الإنزيم. تتحول إلى اللون الأزرق عندما تتعرض لكشّاف معين لا لون له. وعندما يتم إيلاج دنا

الأجنبى داخل البلازميد، فإنه يوضع عند موقع تحديد داخل الجين الذى يشفر للإنزيم. وهذا فيه إقحام لتتابع جديد، ويفسد من عملية الترجمة، ويؤدى إلى إنتاج إنزيم شاذ لا يحوّل الكشاف إلى اللون الأزرق. ويمكن بذلك التعرف على البكتريا التى تحوز دنا الأجنبى لأنها ستظل بيضاء بينما تلك التى تحوى الناقل غير المعدل ستصبح زرقاء.

تحديد موقع الجين المعين المطلوب:

ولكن كيف يحدد علماء الوراثة موقع تلك البكتريا الخاصة التى تحوى الجين الأجنبى المعين وليس فحسب أى دنا أجنبى؟ هناك طريقتا تناول رئيسيتان. وفى كلا الحالين، تُنّمى البكتريا التى أُعديت بالناقل على مستنبت مغذى، حيث كل خلية مفردة تستطيع أن تفرخ عليه ملايين من ذريتها وبهذا فإنها تظهر كمستعمرة مرئية. والتكنيك الأول يعتمد على معرفة تتابع الأحماض الأمينية (أو على الأقل معرفة تتابع طوله خمسة أحماض أمينية) فى البروتين الذى يشفر الجين له. وبإتباع الشفرة الجينية، نستطيع الآن أن تخلّق كيماويا ما يناظرها من إمتداد لرنا أو جديلة مفردة من دنا. وحيث أن هناك كودونات مختلفة يمكن أن تعين أى حمض أمينى واحد، فإنه يجب تغطية كل الخيارات. وأثناء التخليق، تدمج ذرات مشعة فى الحمض النووى، بحيث يمكن فيما بعد الكشف عن أماكن تواجده. ولهذا السبب، ولأن الحمض النووى له نزعته المميزة لأن يرتبط بجديلة مكملة فإن هذا يعرف بمجس الجين أو مجس دنا.

والخطوة التالية هى أن تصنع على ورقة ترشيح نيتروسليولوزية نسخة مطابقة من الطبق بما عليه من مستعمرات البكتريا المستنسخة خضريا. وبمعاملة المستعمرات بالصودا الكاوية تنفجر البكتريا مفتوحة وتطلق ما فيها من دنا، الذى يتكسر فى نفس الوقت إلى جدائل مفردة تلتصق بورق الترشيح. ويضاف الآن مجس الجين. فإذا كان التتابع الملائم موجوداً، يقترن المجس معه متشبثا به. ويغسل الآن ورق الترشيح لإزالة

أى مجس غير متحد، ويوضع فوق قطعة من فيلم لأشعة إكس (فى غرفة مظلمة). وعند تحميض الفيلم، سوف يكشف عن موقع النشاط الإشعاعى كنقطة سوداء. وبهذا فإن المستعمرة المناظرة على الطبق الأصلى هى التى تحوى البكتريا الحاملة للجين المطلوب.

وهناك طريقة بديلة لتحديد موضع مستعمرة الجراثيم التى تحمل الجين المطعم، وذلك أيضا من خلال البروتين الذى ينتجه ذلك الجين، وإن كانت الطريقة هنا أكثر مباشرة. ويستفاد فى هذا التكنيك من قدرة الأجسام المضادة على الإتحاد وثيقا اتحاداً تخصصيا مع الأنتيجينات البروتينية المناظرة لها. وفى هذه الحالة فإن كل شظايا دنا التى تحملها إحدى عشائر البكتريا يتم تنشيطها لإنتاج البروتينات المناظرة لها. ومرة أخرى تصنع نسخة طبق الأصل من الطبق، ولكن ورق الترشيح هذه المرة يعامل بحيث تنفجر البكتريا مفتوحة وتطلق البروتينات التى تظل ملتصقة بورق الترشيح. وبعدها يضاف جسم مضاد موسوم بحيث يكون مشعا. وكما فى الطريقة الأولى، تغسل النسخة المطابقة لإزالة أى مادة غير متحدة ويستخدم فيلم لأشعة إكس لتحديد موقع المستعمرة التى أنتجت البروتين المتحد مع الجسم المضاد المشع. وتكون البكتريا التى فى هذه المستعمرة هى التى تحوى الجين المطعم.

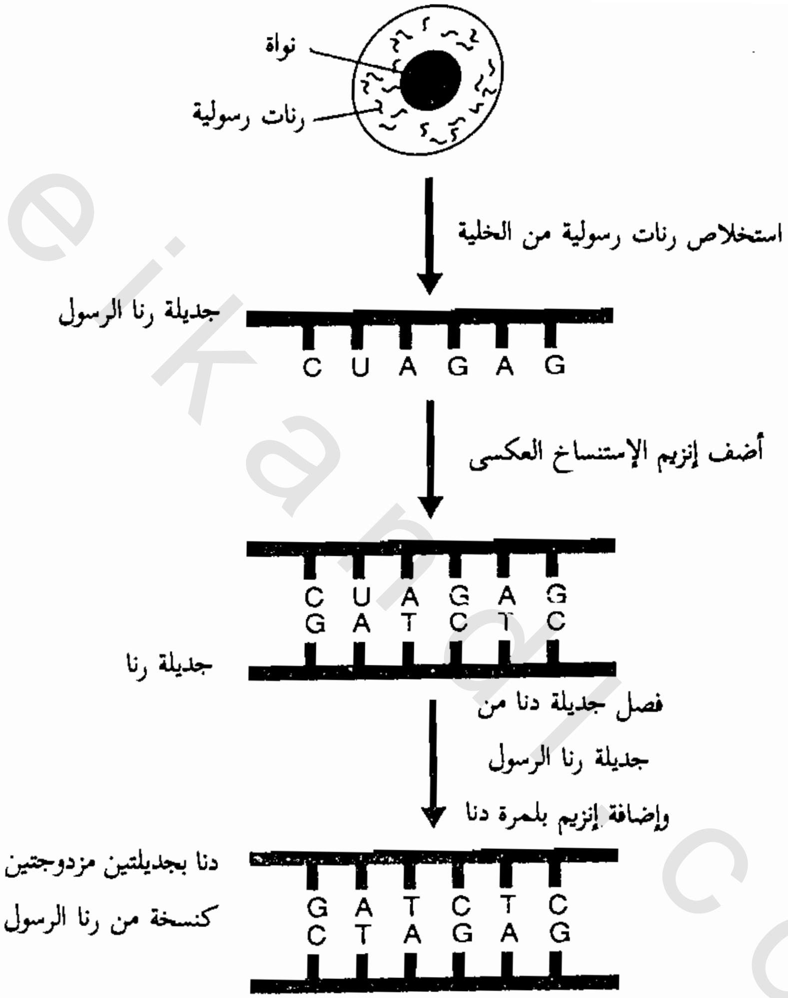
صنع مكتبة من دنا:

باستخدام أنواع مختلفة من إنزيم الإندونيوكلييز لتقطيع دنا إلى أجزاء طيعة للاستخدام، ثم بنسخ هذه التتابعات نسخا خضريا، يمكن تخليق مكتبة من دنا ـ أى مجموعة من التتابعات تحمل كل المعلومات الوراثية التى فى كائن حى معين. ومن الواضح أن حجم المكتبة يعتمد على حجم الطاقم الوراثى الأصلى، وعلى متوسط قدر التتابع الذى يتم إيلاجه فى الناقل. ويتطلب الأمر على الأقل ٥٠٠,٠٠٠ نسخة خضرية من البلازميدات لتغطية طاقم وراثى لأحد الثدييات يحوى ما يقرب من ثلاثة بلايين (ثلاثة آلاف مليون) من أزواج القواعد. وللتأكد

من أنه لم يحدث أثناء النسخ الخضرى أى حذف لقطع مهمة من دنا، فإن من المعتقد عادة أن المكتبات تتطلب هكذا عدداً من النسخ الخضرية يبلغ عدة أمثال للعدد الذى يحسب نظريا أنه العدد الضرورى.

إن ما ناقشنا أمره هنا هو مكتبة لدنا الطاقم الوراثى. ولكن الكثير من هذه المعلومات لا يتم التعبير عنها فى أى لحظة معينة. والعلماء غالباً يهتمون فحسب بالجينات التى تعمل بالفعل فى وقت معين ـ كأن يهتموا مثلا بالجينات المسئولة عن إنتاج الإنسولين فى خلايا البنكرياس. والحامض النووى الذى يشفر للرسائل الوراثية التى تعيّن ما يجرى من نشاطات من هذا النوع كميته أقل كثيرا من المقدار الكلى لدنا الذى فى الخلية. وهذه المعلومات هى مما يعثر عليه فى رنا الرسول، حيث أن له ميزة إضافية فى أنه قد تخلص من الأنترونات غير المشفرة. كيف يمكننا استخلاص هذا الصنف من المعلومات وحده؟ والإجابة هى بتنقية رنا الرسول ثم ترجمة رسائله إلى دنا باستخدام إنزيم الإستنساخ العكسى (انظر شكل ٣ ، ٤).

وهذا الدنا التكميلى يمكن بعدها إستنساخه خضريا داخل بكتريا، كما يحدث بالضبط مع دنا الطاقم الوراثى. وتكون نتيجة ذلك هى مكتبة أصغر كثيرا من المقدار الكلى لدنا الطاقم الوراثى فى الخلية، وهى أيضا مكتبة تحوى على وجه مؤكد لامعلومات المطلوبة.



شكل (٣ ، ٤) تخليق دنا التكميلى من رنا الرسول.

الماكينات الجينية:

يمكننا الآن استخدام ماكينات جينية لصنع تتابعات دنا التى تستخدم كمجسات للجين ولأغراض أخرى. وهذه الماكينات هى مخلقات أتوماتية توصل معا تتابعات من القواعد لتصنع جديلة واحدة من دنا. وماكينة الجين هى فى الحقيقة طاقم كيماوى محكوم بالكمبيوتر، يعمل على ضم القواعد معا، إذ يجمع سلسلة متنامية من دنا فى غرفة تفاعل. ويمكن برمجة الماكينات لإنتاج أى جين طبيعى يكون تتابعه معروفا ـ أو بالطبع برمجتها لنصنع أى جين يمكن إستنباطه من خلال الشفرة الجينية لتتابع من الأحماض الأمينية فى البروتين المناظر له. وقطع دنا هذه يمكن إيلاجها فى كائنات حية بإستخدام تكنيكات التحوير الوراثى، سواء كانت هذه القطع تمثل جينات موجودة طبيعيا أو تتابعات من دنا هى إصطناعية بالكامل ولا يعرف أنها موجودة فى الطبيعة.

عمل خريطة للجينات المختلة وظيفيا:

أحد التطبيقات الهامة الأخرى للبيولوجيا الجزيئية هو عمل خريطة للمرضى على المستوى الجينى. وقد رأينا من قبل كيف أن الطفرات الوراثية المسئولة عن حالات مثل أنيميا الخلية المنجلية تنتج بروتينات فيها خطأ فى التتابع السوى للأحماض الأمينية. والتكنيكات التى كانت تستخدم أصلا للتحديد الدقيق لموضع الأخطاء التى من هذا النوع كانت تكنيكات تقتضى جهداً بالغا. على أنه يمكن الآن إحلالها وتوسيع مداها باستخدام مجسات للجين مثل تلك التى استخدمت للتعرف على الخلايا المتحورة وراثياً.

وهناك اختبار بسيط له القدرة على تشخيص أنيميا الخلية المنجلية وحالات أخرى كثيرة ذات أساس وراثى، وهو اختبار يسمى نشاف ساذرن .(على إسم مبتكره إد ساذرن) . وأول خطوة هى أن يستخلص دنا من إحدى الخلايا من المريض. ثم يعرض هذا لإنزيم الإندونيوكلييز التحديدى الذى يتعرف على الموقع الذى يشفر لحمض

الجلوماتيك الموجود فى الهيموجلوبين السوى، والذى يحل محله الفالين فى هيموجلوبين الخلية المنجلية. ويوضع ما ينتج عن ذلك من خليط شظايا دنا على چيل للتفريد الكهربى، وذلك لفصل الشظايا ذات الحجم المختلف، والتى سبق علاجها بمجس مرقوم إشعاعيا للجس عن الجين السوى. فإذا كان هيموجلوبين الحالة من النوع السوى، فسوف يقطعه الإندونيوكلييز إلى شظيتين، كل منهما تحوى جزء من الجين. ويتحد دنا المجس بكل شظية من هاتين. وعند أخذ صورة بالأشعة يكون هناك إذن شريطان قاتمان مختلفان على الفيلم. أما إذا كان الهيموجلوبين من نوع الخلية المنجلية، فإنه لا يتأثر بالأندونيوكلييز، ولا يظهر إلا شريط أسود واحد. وسوف نعود فى الفصل الثامن إلى المزيد من التفاصيل العملية فيما يختص بتطبيقات لطرائق من هذا النوع.

البصمة الجينية:

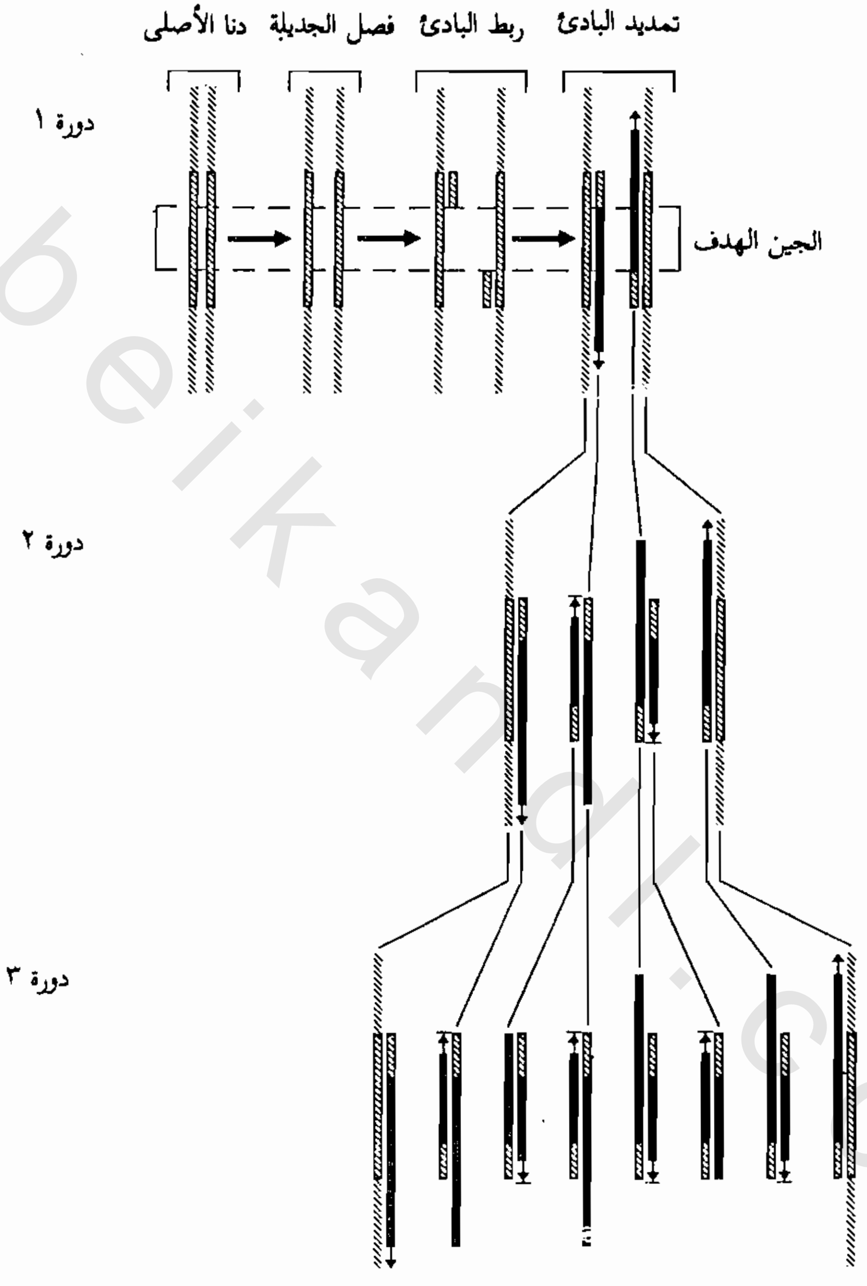
أدت البيولوجيا الجزيئية إلى تطبيق عملى مهم آخر فى السنوات الأخيرة ـ وهو إنتاج المعادل الوراثى لبصمات الأصابع. وهذه الطريقة التى ابتكرها أليك جفريز بجامعة ليستر، تطرح وسيلة للكشف عن أنماط متفردة فى مناطق معينة من دنا الذى يحوزه أحد الأفراد، وهى بهذا لها استخدامات لتحديد الهوية فى الطب الشرعى واستخدامات غير ذلك. وقد درس جفريز تتابعات معينة للجينات البشرية تتكرر مئات المرات أو آلاف المرات عند مواضع مختلفة فى دنا (وذلك بخلاف الجينات التى تشفر للبروتينات، فهى لا توجد إلا مرة واحدة أو مرات معدودة فحسب). وكنتيجة لهذا التكرار فإن المجس المشع لتتابع كهذا ينتج عنه أشرطة كثيرة مختلفة على نشاف ساذرن. وهذا يعطى نمطا يشابه شفرة القضبان المستخدمة لتسجيل الأسعار على بضائع السوبر ماركت. ويكون للتتابعات المتكررة أطوال ومواقع متفردة بالنسبة لكل شخص واحد ـ والإستثناء الوحيد لذلك هو التوائم المتطابقة.

نسخ الجين بسرعة عالية ـ تفاعل البوليميريز المتسلسل:

عندما يُنسخ جين نسخا خضريا فى البكتريا، كما سبق وصفه، فإن العملية كلها

يمكن أن تستغرق عدة أيام. وهناك طريقة لنسخ الجين هى أسرع بما له اعتباره، وقد ثوّرت هذه الطريقة البيولوجيا الجزيئية من أوجه عديدة منذ إدخالها من سنين معدودة لاغير، وهذه الطريقة هى «تفاعل البوليميريز المتسلسل» Polymerase chain reaction (PCR). وطريقة بى. سى. آر. التى اخترعت أصلا بواسطة باحثين فى شركة سيتوس بكاليفورنيا، هى طريقة لنسخ دنا كمياويا فى أنبوبة اختبار خلال ساعات معدودة لاغير. ورغم أنها لا تستخدم خلايا حية، إلا أن هذه الطريقة لها القدرة على تنمية دنا بمتضاعفة هندسية لأنها تتم فى خطوات متعاقبة، كل منها تضاعف مقدار دنا.

ومفتاح هذا التكنيك هو أن المرء ينبغى أن يعرف تتابعات لإمتدادات قصيرة من دنا على كل جانب من جانبى الجين الذى سيتم نسخه. وتستخدم ماكينة جينية فى صنع بادئين اثنين ـ أى جدائل مفردة من دنا إحداها مكملة للتتابعات التى فى أحد الجناحين، والأخرى مكملة لتتابعات الجناح الآخر. ثم يفك التفاف لولب دنا المزدوج الذى يحوى الجين وتفصل الجديلتان. وعند إضافة البادئين الإثنين، يرتبط كل منهما بتتابع الجناح المكمل له. والخطوة التالية هى أن يضاف إنزيم بوليميريز دنا. وهذا يقوم فى التو بتمديد البادئات، وليس هذا فحسب وإنما يمدد أيضا من الجين الهدف. وهذه السلسلة من الخطوات الثلاث التى تتطلب كل منها حرارة مختلفة، تؤلف دورة واحدة من تفاعل بى سى آر. وباستخدام تعاقب ملائم من تغيرات درجة الحرارة، فإن دورات قليلة العدد بما يصل إلى العشرين دورة يمكنها أن تولّد ما يقرب من مليون مثل من مقدار التتابع الأصلى للهدف (انظر شكل ٤،٤).



شكل (٤ ، ٤) تفاعل البوليميريز المتسلسل لصنع نسخ متضاعفة لأحد الجينات

وقد انبثق عن تفاعل بى. سى آر. تطبيقات كثيرة خارج نطاق الوراثيات. وكمثل، فقد استخدمه علماء الولايات المتحدة فى عام ١٩٩٠ لإستقصاء أسباب مرض لايم، وهو مرض معد لم يتم التعرف عليه كمرض متميز إلا فى أواسط السبعينيات. ومرض لايم يحمله أحد أنواع القراد، الذى يمرر جرثومة العدوى إلى البشر، وهى سبيروكيت (*) يسمى بوريليا بيرجدورفرى. وبفحص عينات من القراد فى شتى المجموعات التى بالمتاحف، أمكن للباحثين أن يبرهنوا على أن دنا الخاص بهذا السبيروكيت ـ وبالتالى الجرثومة الطفيلية نفسها كما يفترض ـ قد وجد منذ زمن مبكر يصل إلى الأربعينيات، وذلك قبل أن يتم التعرف رسميا على هذا المرض المعدى بزمن طويل. وبتطبيق تفاعل بى سى آر على الأنسجة المخزونة التى أُخذت من مرضى فى وقت مبكر من هذا القرن، فإن توظيفه هكذا قد أدى أيضا إلى إثبات أن فيروس الإيدز قد وجد منذ عدة عقود قبل بزوغه الظاهرى لأول مرة فى الولايات المتحدة فى أوائل الثمانينيات.

التحوير بالبروتينات:

التحوير الوراثى كما ناقشنا من قبل فى هذا الفصل يتطلب نقل الجينات من كائن حى للآخر. وثمة تناول أكثر بدائية، وهو مجرد حذف الجين الذى يشفر لبروتين غير مطلوب. وهناك تنويع ثالث لهذا المبحث، وهو التحوير المباشر لأحد الجينات ليصنع ما يناظر ذلك من بروتين معدّل. ويسمى هذا بهندسة البروتينات. وأحد تطبيقاته هو تعديل تتابع الأحماض الأمينية فى الإنزيمات، بحيث يتم إنتاج جزيئات أقل حساسية للحرارة أو لها قدرة أكبر على الحفز. ويمكن التوصل إلى ذلك عن طريق «إطفار» يوجه إلى موقع بعينه ـ وهى طريقة لتعديل الجين عند نقطة بالغة التحدد.

(*) السبيروكيتات نوع من البكتريا الملوية (ملويّات) تسبب عدة أمراض منها الزهرى والحمى الراجعة. (المترجم).

وأول خطوة فى هذه العملية هى فصل جديلتى دنا. ثم تستخدم ماكينة جينية لصنع تتابع من القواعد متكامل مع الجديلة التى تشفر لذلك الجزء من البروتين المطلوب تعديله. ويكون تلاؤم الإثنين كاملا فيما عدا خطأ واحد ـ وربما يكون ذلك أن تحل قاعدة ج محل ث التى تقترن عادة مع ا. وحيث أن معظم القواعد تتكامل معا، فإن الجديلتين سوف تترابطان معا. والجزء الباقى من تتابع الجين (وهو بالطبع ذو بنية سوية) يتم بناؤه بعد ذلك بالطريقة المعتادة على أساس المعلومات المشفرة فى الجديلة الأخرى. والخطوة التالية هى إيلاج قطعة دنا المزدوجة الجديلة كلها داخل خلية بكتريا. وعندما تأخذ الجرثومة فى النمو فإنها تجمّع جينا مزدوج الجديلة قد صنع من كلتا الجديلتين. وإذ تنقسم خلية البكتريا فإن إحدى الخليتين الإبنتين تتلقى جينا منسوخا عن الجديلة السوية. وتتلقى الخلية الأخرى جينا منسوخا عن الجين الشاذ. وبهذا فإنها تنتج بروتينا «طافرا»، قد تعدل تركيبه حسب التعليمات التى فى الشظية التى صنعتها الماكينة الجينية.

والإطفار الموجه إلى موقع معين يُستخدم ـ فى أنبوبة الإختبار ـ لإصلاح العيب الموجود فى الجين المسئول عن أنيميا الثاليسيمبا (*). وهذه الأنيميا مرض فى الدم تسببه طفرة وحيدة فى جين الجلوبين. فهناك كودون «وقف» يحل مكان كودون أحد الأحماض الأمينية. وهكذا فإن ماكينات تخليق البروتين تنتج شكلا مبتورا من الجلوبين، يفشل فى أداء دوره السوى فى حمل الأوكسجين لسائر الجسد. وعندما يتم إيلاج الكودون الصحيح، ينتج الجين المطفر جلوبينا سويا.

ولتنظيم إحداث تغييرات فى البروتين تتناول ما هو أكثر من حامض أمينى واحد، يستخدم مهندسو البروتين تكنيك سلسلة الإطفار. وفى هذه الحالة يتم بالقص نزع فقرة من دنا فيها من عشرين إلى ثلاثين قاعدة، ويوضع مكانها التتابع المطلوب الذى تم صنعه فى ماكينة جينية.

(*) نوع من أنيميا وراثية تنتشر فى البحر المتوسط وتسمى أحيانا أنيميا البحر المتوسط. (المترجم).

obeikandi.com

وتكنيكات تحوير البروتينات تطبق الآن على الأجسام المضادة، أى البروتينات الواقية التى يصنعها الجسم كإستجابة لإستثارة أنتيجينية من الكائنات الدقيقة التى تغزوه. وهذه التطبيقات، التى تتأسس على إنتاج مقادير كبيرة من أجسام مضادة نقية نقاوة عالية، سوف تناقش فى الفصل السابع.

obeikandl.com