المحاضرة الثانية والمحاضرة الثالثة:

مفهوم التقانة الحيوية

لكل علم من العلوم مراحل تطور متتالية عبر العصور، ولعل الذي يثير الجدل من العلوم علم التقانة الحيوية Biotechnology والاسم الشائع له التكنولوجيا الحيوية.

يظن الكثير بأنه علم حديث إلا أنه يرجع إلى العصور القديمة حيث استخدمه المصريون القدماء منذ حوالي 4000 سنه قبل الميلاد عندما استخدموا الخميرة في انتاج العجين.

تحويل الحليب إلى اللبن بواسطة جراثيم التخثر (اللبنية) إلا تقانه حيوية وكذلك تحويل الخضروات إلى مخللات بواسطة جراثيم الخلّية.

ومع ذلك ظهر مصطلح التقانه الحيوية لأول مرة عام 1919 م بواسطة العالم Karl Ekry والذي يشير إلى إنتاج المنتجات (غذاء، مشروبات، مواد كيميائية) من المواد الخام بمساعدة الكائنات الدقيقة وهوما يشار اليه بالتقانه الحيوية التقليدية.

إضافة إلى اكتشاف العالم الفرنسي لويس باستور بكتيريا Lactic Acid Bactria حيث أثبت أن التغيرات الكيميائية الحاصلة نتيجة عملية التخمر أثناء صناعة الأطعمة تقوم بها الكائنات الحية.

ومن المحطات المضيئة في تطور التقانه الحيوية عبر التاريخ هو اكتشاف العالم الكسندر فلمنغ 1928 م فطر البنسليوم والحصول على البنسلّين.

وحصل التطور الكبير في مفهوم التقانة الحيوية في الستينات القرن الماضي نتيجة اكتشاف المادة الوراثية DNA بتفاصيلها الدقيقة (الصبغيات، المورثات، القواعد النتروجينية) وكيفية ترميز المورثات للبروتينات .

وأما المحطة الأكثر أهمية للتقانة الحيوية بدأت مع تطور تقانات التعامل مع الـDNA ودخول العلوم الحيوية عصر التقانة الـDNA المؤشب recombinant DNA.

وإن تطور التقانات الحيوية الحديثة جاء نتيجة الأبحاث العلمية واكتشاف أنزيمات البلمرة وأنزيمات القطع المتخصصة وأنزيمات النسخ العكسي.

مما ساعد علماء الوراثة بوضع المادة الوراثية على مائدة العمليات لتصبح قابلة للتغيير كماً ونوعاً بحيث تحذف منها مقاطع أو يضاف إليها ويعاد صياغتها بحيث تصبح قادرة عن التعبير عن ذاتها بطريقة جديدة.

مصطلح **Biotechnology** مشتق من Bios و تعني الحياة بينما technology تعني طريقة منظمة لعمل الأشياء وبالتالي تكون تطبيق تقاني يستخدم الكائنات (جراثيم، فطريات، خمائر، نباتات، حيوانات) أو أنظمة الحية (خلايا أو أنسجة) أو الجزيئات البيولوجيا

(أضداد، أنزيمات) لصنع منتجات جديدة او تحويرها أو تطوير منتجات أو من أجل استخدامات مُعينة مما تعود بالفائدة للإنسان.

مجالات التقانة الحيوية:

تتنوع المجالات البحثية للتقانه الحيوية لتشمل كائنات مختلفة أو أجزاء منها بهدف تطويعها لخدمة الإنسان فهناك مجالات عديدة للتقانة الحيوية منها:

1. مجال الانتاج النباتي والحيواني.
2. مجال الانتاج الصناعي.
3. في المجال البيئة.
4. مجال الطب والرعاية الصحية.
5. المجال الجزيئي.

وغيرها مما قد يستجد من مجالات بحثية بهدف تحسين وتطويع إمكانات الكائنات الحية من أجل خدمة الإنسان.

أولاً _في المجال الجزيئي:

- استخلاص الـDNA.
- PCR.
- التتابع النكليوتيدي للـDNA.
- تقطيع الـ DNA.
- نقل المورثات.

ثانياً_ في المجال الصناعي:

- صناعة الأدوية من المواد الكيميائية النباتية المصدر.
- استخدام الكائنات الدقيقة في تحسين خواص البترول ومشتقاته الكيميائية.
- انتاج المحفزات الحيوية

ثالثاً- في مجال الحفاظ على البيئة:

- التخلص من مخلفات الصناعة.
- الاستفادة من المخلفات العضوية.
- تدوير استخدام المياه.
- الحد من التلوث.

رابعاً -في مجال الطب والرعاية الصحية:

- علاج العقم عند الإنسان عن طريق الإخصاب الخارجي(طفل أنابيب).
- استخدام الخلايا الجذعية في العلاج الجيني.
- انتاج اللقاحات وتشخيص الأمراض.

خامساً- في مجال الانتاج الحيواني:

- انتاج حيوانات معدلة وراثياً ذات قدرة عالية على مقاومة الأمراض وخاصة الفيروسية مثل الأبقار والأغنام والدجاج والأسماك، وبالتالي القليل من استخدام الأدوية والحد منها واستخدام التربية الحيوانية أو ما يسمى بالأمن الحيواني في حقول الحيوان.
- المعالجة الجينية للحيوانات لزيادة سرعة نموها وذلك من خلال تزويدها بالمورثة الخاصة بهرمون النمو السريع، وكذلك لزيادة قدرتها على انتاج اللحم وتحسين خواصه كما في التطور الحاصل في انتاج الفروج وزيادة القدرة على ادرار الحليب كما في الإبقار.
- انتاج أغنام ذات صوف عالي الجودة.
- زيادة الناتج من الثروة الحيوانية من خلال تقسيم جنين الماشية والحصول على توائم ثنائية وثلاثية ورباعية.
- انتاج أدوية مناسبة لعلاج الحيوانات خاصة المستخدمة كمواد غذائية للشعوب.

أساليب التقانة الحيوية:

- **التقانة الحيوية التقليدية:**

تضم مجموعة واسعة من العمليات زراعة الخلايا والأنسجة.

- **التقانة الحيوية الحديثة:**

تضم أساليب التعامل المباشر مع المادة الوراثية مثل التحكم بالمورثات والمادة الوراثية .

- **التقانات الحيوية الخلوية:**

مثل الإخصاب المساعد والاستنساخ الخلوي.

التقنيات الجزيئية الأساسية

نحتاج في دراسة المؤشرات الجزيئية إلى عدد من التقينات الجزيئية والتي تتضمن عزل الـ DNA، هضم الـDNA بواسطة أنزيمات القطع، الرحلان الكهربائي، والتلوين الأغاروز وبولي الأكريلاميد، التفاعل السلسلي البوليميراز، وأنواعه الـ DNA، وسلسلة الـDNA وغيرها من التقنيات الجزيئية.

- **تقانة استخلاص الحمض النووي:**

تمكن علماء البيولوجيا الجزيئية تقريباً من جمع الحمض النووي ال DNA من الكائن الذي هو تحت الدراسة، كانت عملية عزل الـ DNA في بادئ الأمر عملية طويلة وصعبة جداً على اعتبار أن الكمية المراد تجميعها آنذاك كانت كبيرة مقارنة بالكمية المستخدمة في وقتنا الحالي، ويعزى ذلك إلى استخدام تقنية متطورة جداً سمحت بتقليص كمية ال DNA المُستخدمة في الدراسات الجزيئية.

والخطوة الأولى لعزل الحمض النووي هي تكسير الخلايا بطرق ميكانيكية أو انزيمية، وذلك بهدف إخراج المحتوى الذي يتضمن الأحماض النووية. والخطوة الثانية فصل الأحماض النووية عن المكونات الأخرى في الخلية كالكربوهيدرات المعقدة والبروتينات للحصول على أحماض نووية ذات نقاوة مناسبة وتختلف كمية الملوثات الموجودة في خلايا الأنواع المختلفة تبعاً للنوع.

ويتم ذلك وفق الخطوات التالية:

1- تحطيم النسج: أبسط طريقة لتحطيم النسج هي وضعها في الآزوت السائل الذي يجعل منها كتلة متجمدة ثم هرسها وطحنها.

2- التخلص من أغلفة وأغشية الخلايا: تختلف طرق التخلص من أغلفة الخلايا تبعاً لنوع الخلية (نباتية – حيوانية – بدائية) إذ توجد طرق كثيرة للتخلص من أغلفة الخلايا منها:

a) تفجير الخلايا بوضعها في محاليل ملحية مختلفة التركيز.

b) حل الأغلفة والأغشية الخلوية باستخدام الأنزيمات والليزوزيم الذي يهضم المركبات المبلمرة ومما يؤدي إلى تحطيم الجدر والأغلفة الخلوية.

c) حل الأغلفة والأغشية باستخدام مواد كيميائية كـEDTA وSDS.

3- التخلص من الليبيدات (الدهون): تستخدم المواد التالية:

a) الـ EDTA الذي يساهم في حل الجدر الخلوية باتحاده مع الشوارد المعدنية (Ca^{+2}) والـ (Mg^{+2}) اللازمة لثبات بنية الغشاء البلازمي فيها مما يضعف الارتباط في الأغلفة الخلية وتساعد في الحفاظ على الـ DNAوذلك بتثبيطها لعمل الإنزيمات التي تخرب الـ DNA (تثبط عمل الأنزيم DNase الذي يحتاج لشواردMg^{+2} وتمنع بالتالي تحلل الـDNA).

b) الإيتر: الذي يقوم بحل المواد الدسمة.

c) الـ SDS (Sudium dodecyl sulphate) (من المواد الفعّالة على السطوح فهي تساعد على حل الخلية بإزالة الليبيدات من الأغشية الخلوية).

ويتم التخلص من الأجزاء الخلوية عن طريق عمليات التثقيل وسحب السائل الطافي الحاوي على الـ DNA والـ RNA وبعض البروتينات ونقله إلى أنبوب آخر.

4- للتخلص من البروتينات يستخدم:

a) أنزيم بروتيناز ك Protenas K لحل البروتينات الخلوية والبروتينات المرتبطة مع الـ DNA

b) الفينول لإذابة البروتينات.

c) محلول ملح كلور الصوديوم فالوسط الشاردي لهذا الملح يؤثر على الخصائص الفيزيائية للبروتينات ويحولها من الشكل المنحل إلى الشكل غير منحل مما يسهل تجميعها وترسيبها بعملية التثقيل

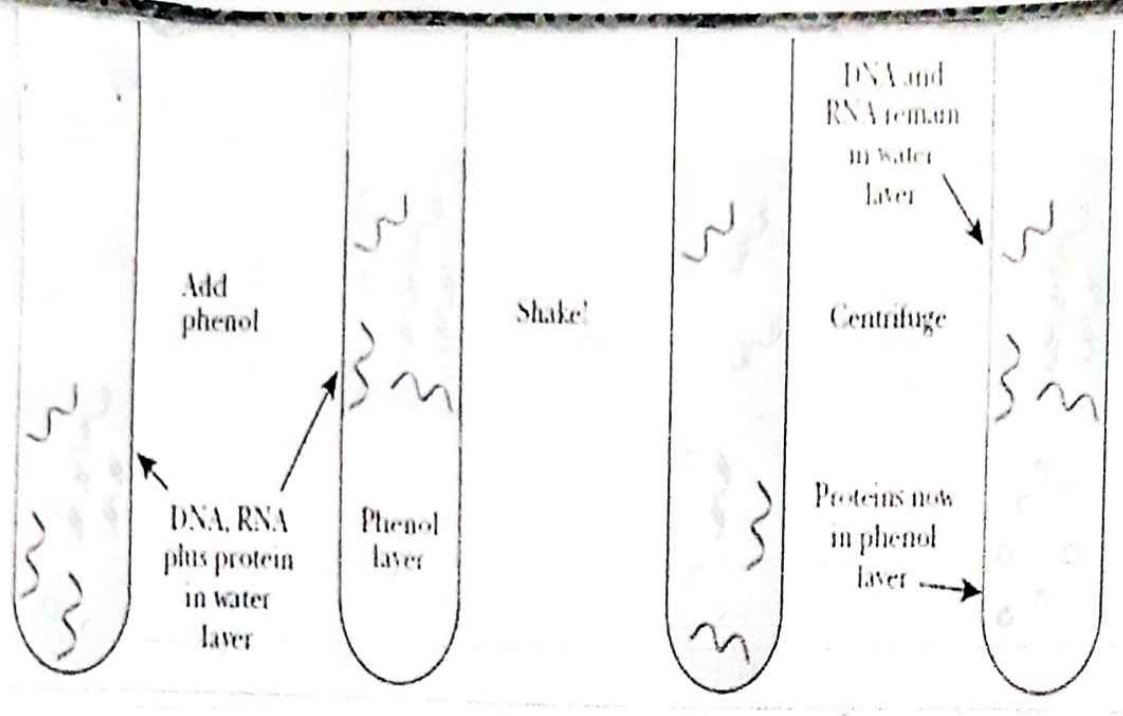
تنقية الـDNA:

يتم تنقية الحمض النووي إما بالطرد المركزي أو الاستخلاص الكيميائي.

تعتمد الطريقة الأولى على تدوير العينة على سرعات مختلفة مما يولد قوة نابذة تجمع المكونات مع بعضها لتترسب إلى قاع الأنبوب

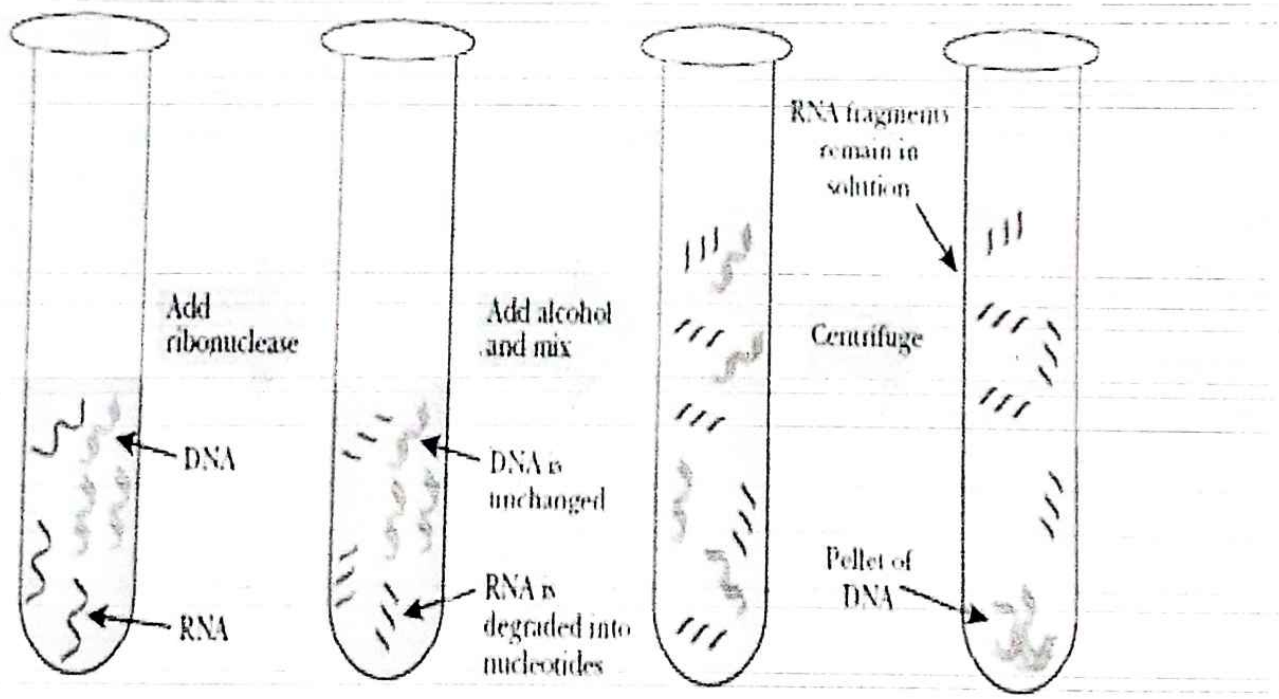
وعندما يستخدم الليزوزيم والعوامل الفعالة على السطوح تؤدي في النهاية إلى تفتيت الجدار الخلوي وتساعد على خروج المكونات الخلوية إلى المحلول وبذلك تكون هذه القطع أصغر في الوزن الجزيئي مقارنة مع الحمض النووي والتي ترسب وفصل بعملية التثقيل إذ تبقى عالقة في السائل الطافي لتطرح خارج الأنبوب.

ولكن يبقى الحمض النووي ملوثاً بالـRNA والعديد من البروتينات التي يتم بطرق كيميائية عديدة منها تنقية الحمض النووي بالاستخلاص الفينولي، إذ يقوم الفينول بإذابة البروتينات وعندما تتم إضافة الفينول إلى الماء، يبقى كلا السائلين منفصلين عن بعضهما (الفينول في الطبقة السفلى)، وعند الرج (الهز) لفترة قصيرة فإن كلتا الطبقتين تمتزجان مما يسمح للفينول بأن يذوب البروتينات التي امتزجت معه وعند إيقاف الهز نجد أن المحلول يعود وينفصل إلى طبقتين منفصلتين عن بعضهما، ويجب القيام بالتثقيل لمدة قصيرة للتأكد من التخلص من البروتينات.



- **التخلص من الـ RNA:**

تستخدم انزيمات نوعية خاصة تعمل على إزالة الـ RNA الملوثة للعينة ومنها أنزيم الرايبونكلياز والذي يقوم بتمسيخ الـ RNA إلى أوليغونكليوتيدات دون أن يؤثر على الـDNA، ثم يتم إضافة الكحول



الذي يعمل على تجميع وتكثيف الـDNA.ثم يتم الترسيب بالطرد المركزي ومن ثم يرمى السائل الطافي المتشكل من عملية التثقيل للتخلص من قطع الـ RNA. لنحصل على كرية صغيرة تحتوي على البلايين من قطع الـDNA.

وبعد عزل الحمض النووي تتم إذابته في محلول الوقاء (Buffer) أو في وقاء TE تكمن أهميته

- يؤمن وسط PH شاردي مناسب لـ DNA

- يحمي الـ DNA من تأثير أنزيم DNase الذي يفكك الـ DNA وذلك لارتباطه مع شوارد +Mg التي تعمل كمتتم أنزيمي لانزيم DNase.
- **الرحلان الكهربائي على الهلام:**

تعطي جزيئات الفوسفور شحنة سالبة قوية، وعليه فإن الشحنة السالبة لقطعة الصغيرة لـ DNA تكون أقل من الشحنة السالبة لقطعة لـDNA الكبيرة لأنها تحوي عدداً أكبر من وحدات الفوسفات.

من جهة أخرى تكون الشحنة الكهربائية هي نفسها لكل وحدة طول من شريط الـ DNA، يعود سبب ذلك أن وحدات الفوسفات تتوزع بشكل متماثل على طول شريط DNA طال أم قصر لذلك عند تطبيق تيار كهربائي على عينة فيها مزيج من قطع الـDNA مختلفة الأطوال في المحلول ستتجه كلها نحو الشحنة الموجبة بنفس السرعة بسبب إهمال الإعاقة.

بناء على ما سبق يمكن فصل قطع الـDNA المختلفة الأطوال من خلال زيادة مقدار الإعاقة الناتجة من الاحتكاك بحيث تتحرك القطع الصغيرة بسرعة أكبر إلى القطب الموجب، ومن هنا تأتي وظيفة الهلام لفصل جزئيات الـDNA بحسب أطوالها. وسيتم دراسة الرحلان الكهربائي على هلام الآغاروز والبولي أكريلاميد.

- الرحلان الكهربائي للـ DNA باستخدام هلامة البولي أكريلاميد(Polyacrylamide gel electrophoresis):

تم استخدام هذه التقنية في البدء كأسلوب لفصل البروتينات، ولكنها استخدمت أيضاً لفصل الحموض النووية.

يمكن التحكم باتساع مسامات هذا الهلام من خلال تغيير نسبة البولي أكريلاميد الداخلة في تركيب الهلام(30-3)% ، ويمكن بهذه التقنية فصل جزيئات الـDNA بكفاءة عالية التي يمكن أن تختلف أطوالها بنكليوتيد واحد فقط، وهذا ما يجعل أهمية هذه التقنية الحل الأمثل لتحليل تسلسل النكليوتيدات.

يحد من فائدة هذه التقنية أنها تفصل فقط قطع الـ DNA ذات الأطوال القليلة نسبياً (أقل من ألف نكليوتيد). لذلك تم استخدام هلام الأغاروز.

- الرحلان الكهربائي للـ DNA باستخدام هلامة الاغاروز (Agarose gel electrophoresis):

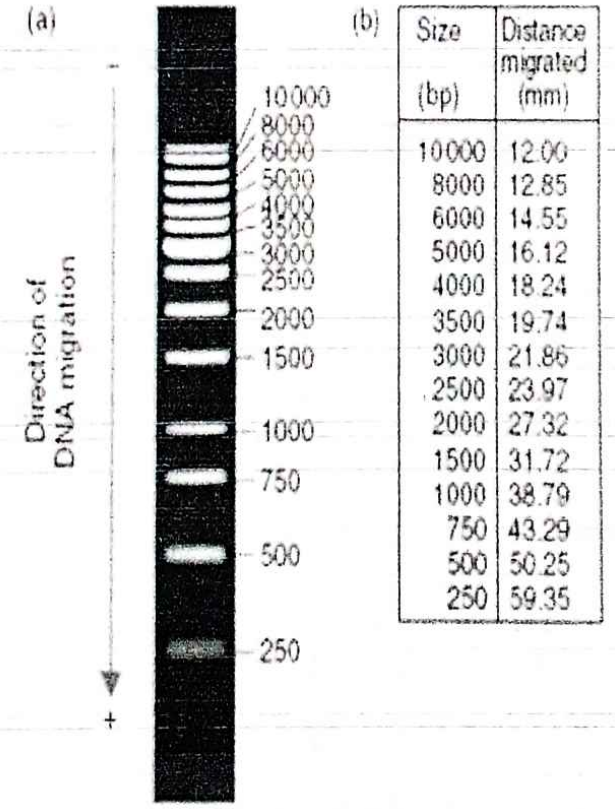
يتم الحصول على الأغاروز من الأعشاب البحرية (مؤلف من عديد سكاريد خطي)، هناك عاملان أساسيان يتحكمان بسرعة هجرة قطع الـ DNA عبر هلام الأغاروز عند تطبيق تيار كهربائي ثابت وهما الكتلة الجزيئية لقطعة الـ DNA وشكلها، تهاجر قطع الـ DNA الصغيرة بسرعة أكبر من

القطع الكبيرة ولكن العلاقة بين طول قطع الـ DNA والمسافة التي تقطعها على الهلام ليست علاقة تناسب عكسي مباشر، بل تكون متناسبة عكسياً مع اللوغاريتم العشري لطول هذه القطعة.

العامل الثاني المهم في هجرة قطع الـDNA من خلال شكل القطع، فمثلاً يكون البلاسميد المعزول من الايشرشيا كولي حلقي مغلق وملتف بشكل فائق لذلك تكون هجرته سريعة نسبياً، أما في حال حدوث قطع في إحدى سلسلتي الـDNA فإنه يفقد تراصه ويصبح ذو بنية متراخية ويهاجر بسرعة أقل خلال الهلام.

وإذ قمنا بقطع كلا الشريطين فإنه سوف يتحول إلى بنية خطية وتكون سرعته متوسطة مع أنه لم يتغير في كتلته الجزيئية في حالة من الحالات السابقة.

في الأحوال كلها يتم نرحيل العينات على الهلام بوجود شاهد يحوي قطع معلومة الطول كي تكون مرجعاً يشير إلى طول القطع الهاجرة من العينة، ويسمى هذا المحلول بالسلم الدنا DNA Ladder.



- **التفاعل السلسلي البوليميرازي Polymerase Chain Reaction (PCR):**

تعد تقانة الـ PCR من أبرز التقانات الحيوية التي أسست ونشرت في الثمانينات من القرن الماضي، قام العالم (Kary Mullis) عام 1985 م بنشر تقانة PCR للأوساط العلمية، وقد أحدثت هذه التقنية ثورة في مجال البيولوجيا الجزيئية تتمثل في قدرتها على صنع ملايين النسخ من تسلسل معين من الحمض النووي الريبي منقوص الأوكسجين (DNA)، وتكريماً لهذا العالم فقد أعطي جائزة نوبل في الكيمياء عام 1993 م .

كان تطوير تقانة الـ PCR من أهم الإنجازات على مستوى البيولوجية الجزيئية فبفضل هذه التقانة تم تطوير تقانات حيوية أخرى مما فتح المجال أمام العلماء لمحاولة رسم الخارطة الوراثية للعديد من الكائنات الحية وتحديد المورثات الوراثية لكثير من الأنواع .

تهدف تقانة الـ PCR إلى تضخيم قطعة من الـ DNA بعد استخلاصه من خلايا الجسم والحصول على كميات كبيرة منه ويمكن بعد ذلك إجراء التحليل عليه.

يعتمد مبدأ تفاعل الـ PCR على عمل إنزيم النسخ الذي يعرف باسمPolymerase DNA، حيث يقوم هذا الأنزيم بتركيب جزيئة مضاعفة من الـ DNA من القالب أو النسخة الأصل من الـ DNA في الدورة الأولى من عملية المضاعفة في جهاز الدوار الحراري وتصبح الجزيئات القديمة والجديدة القالب الثاني لدورة أخرى من النسخ وهكذا تتم عملية تكرار النسخ في كل دورة بزيادة أسية وبذلك يمكن أن نحصل من جزيئة DNA مفردة على ملايين النسخ من الـ DNA المراد مضاعفته بوساطة هذا التفاعل (PCR) خلال عدة ساعات فقط .

يتطلب تفاعل الـ PCR توفر العناصر الآتية:

1-DNA القالب (DNA templet): تعتمد دقة نتائج الـ PCR على مدى نقاوة وجودة و سلامة الـ DNA القالب المستخلص من العينات المدروسة، فكلما كانت عينة الـ DNA نقية وسليمة وكثيرة كلما كانت النتائج أكثر جودة ودقة.

2- البوادئ Primers: وهي عبارة عن تسلسل قليل من نكليوتيدات Oligonucleotides(5-25 نيوكليوتيداً) قادرة على الارتباط مع الأسس النيوكليوتيدات للحمض النووي المراد تضخيمه، وذلك في منطقة ذات ترتيب مميز ونوعي من الحمض النووي.

شروط تصنيع البوادئ:

- يجب تصميم البادئات بحيث لا تحتوي على تسلسل نكليوتيدي واحد
- يجب أن لاتكون ذات تتابع نكليوتيدي معكوس بحيث تشكل منتجات ثانوية (مثل بنية الدبوس) قبل أن ترتبط مع الـ DNA
- يجب مراعاة ان لا تكون النكليوتيات في أحدى البادئات مكملة لتتالي النكليوتيدات في البادئة الآخر مما يؤدي إلى ارتباطهما مع بعض دون الارتباط مع الـ DNA.

حفظ البوادئ:

تحفظ على شكل بودرة جافة لعدة سنوات ولكن عند حلها في الماء يمكن ان تتعرض للتخريب بواسطة أنزيم النكليواز RNase لذلك يب أن تحفظ في وسط منزوع الشوارد ويحوي على EDTA عند درجة حرارة -20 م°.

3- المحاليل الدارئة (الوقاء) (Buffers) المستخدمة في الـ PCR: يؤمن الوقاء وسط ذو قوة شاردية ثابتة أثناء عملية التضخيم، ويعتمد تركيب الوقاء المستخدم على نوع وميزات الإنزيم المستخدم في عملية التضخيم ونوع البادئ وعادة ما يحضر على شكل محلول منظمbuffers 10x و المكون من (10mM tris, 10mM Kcl, 2.5mM $MgCl_2$)

4- شوارد المغنيزيوم Mg^{+2}: تعمل شوارد المغنيزيوم كمتمم إنزيمي (Co-factor) لإنزيم DNA – polymerase ولها تأثير هام على نوعية نتائج ال PCR، وتشكل معقدات ذوابة مع الـ dNTPs يسهل التعرف عليها من قبل إنزيم النسخ (Polymerase) الذي يقوم برصفها وفق ما يقابلها من نيوكليوتيدات مناسبة على الـDNA القالب ، كما تزيد من نشاط انزيم النسخ DNA – polymerase، وتزيد من درجة حرارة ذوبان البوادئ و الـ DNA الهدف مما يجعل السلاسل المضاعفة الناتجة أكثر استقراراً.

5- النيوكليوزيدات ثلاثية الفوسفات منقوصة الأوكسجين:

يتطلب كميات كافية من dNTPs (Deoxynuleoside triphosphates) (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) للمشاركة في تشكيل قطع الـ DNA المستنسخة.

يختلف تركيز الـ (dNTPs) في مزيج تفاعل الـ PCR بحسب حجم الـ DNA المراد تضخيمه، وتركيز شوارد الـMg^{+2}.

6- **أنزيم نسخ الـ DNA (DNA Polymerase) مقاوم للحرارة المرتفعة لتشكيل قطع الـ DNA الجديدة ، كأنزيم Taq Polymerase** الذي تم استخلاصه من أحد الأنواع البكتيرية التي تعيش في الينابيع الحارة لذلك يتحمل هذا الإنزيم درجات الحرارة المرتفعة ويبقى محافظاً على استقراره و نشاطه في الدرجات المرتفعة من الحرارة أثناء تفاعل الـ (PCR)

استخدم في البدايات الأولى للـ PCR إنزيم نسخ غير ثابت حرارياً ولكن التطور الحقيقي لهذه التقانة حصل عندما تم التمكن من إنتاج وتنقية إنزيم نسخ ثابت حراريا سمي بـ Taq Polymerase، ويمكن مضاعفة جزء محدد من الـ DNA عن طريق البوادئ Primers، حيث يرتبط البادئ بالتتابع المكمل له في الموقع الهدف من الـ DNA ويتم بدءاً من نقطة الارتباط مضاعفة أو تضخيم قطعة الـ DNA الهدف بوساطة إنزيم النسخ Taq Polymerase وبذلك يتم تركيب شريطي الـ DNA باتجاهين متعاكسين (دائماً يتم التركيب من 5َ إلى 3َ بدءاً من نقطة تتابع البادئ) حيث يسمح هذا التفاعل بمضاعفة (نسخ) قطعة الـ DNA يتراوح طولها ما بين 100 شفعاً نكليوتيدياً (100 base pairs) إلى عدة آلاف من الأشفاع النكليوتيدية.

لكي تتم مضاعفة قطعة محددة من الـ DNA لابد من اختيار تتابع نيكليوتيدي محدد من النكليوتيدات كبادئ عند كل من طرفي المنطقة الهدف لذلك يجب أن يكون التتابع النيكليوتيدي لهذه القطعة معروفاً أو على الأقل يجب معرفة التتابع النكليوتيدي لأطراف هذه القطع حيث يتم تصميم بوادئ متخصصة من أجل مضاعفة هذه القطعة المحددة اعتماداً على التتابع النيكليوتيدي للقطعة الهدف، ويمكن إجراء التفاعل السلسلي البوليميرازي باستخدام بوادئ عشوائية (لم تصمم بالاعتماد على التتابع الطرفي المعروف للقطع الهدف) وفي هذه الحالة يمكن لعملية النسخ أن تحدث عندما يجد البادئ التتابع المكمل له على كامل المورثة، يمكن الحصول على البوادئ أو تصنيعها من قبل شركات

متخصصة، كما يمكن استخدام بوادئ مصممة في تفاعل الـ PCR بالاعتماد على تتابع هدف معروف ومتكرر خلال المورثات.

- **المراحل الأساسية لتفاعل الـPCR:**

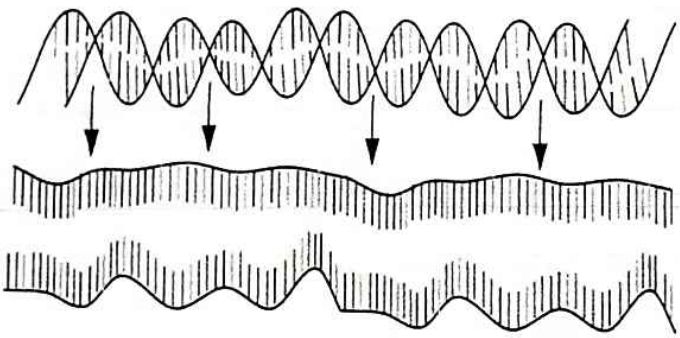
يتم التفاعل السلسلي البوليمرازي في جهاز التدوير الحراري أو الـ PCR حيث يعمل هذا الجهاز على مضاعفة قطعة الـ DNA ملايين المرات خلال فترة قصيرة.

وبعد وضع مزيج التضخيم في أنبوب ابندروف (Eppendrof) ونقله إلى جهاز الـ PCR يقوم هذا الجهاز بالمراحل الآتية:

1- مرحلة الانشطار :

بعد وضع مكونات تفاعل الـ PCR في جهاز الدوار الحراري وضبط البرنامج المناسب لتفاعل الـ PCR فإن هذا الجهاز يقوم برفع درجة الحرارة إلى الدرجة 94 مْ مما يؤدي فصل شريط الـ DNA المضاعف إلى سلسلتين مفردتين.

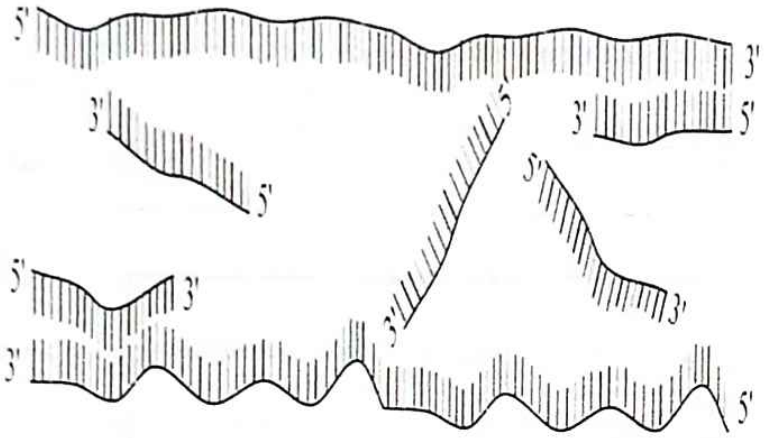
من 30 - 40 دورة
تتألف كل دورة من ثلاث مراحل



المرحلة الأولى: (مرحلة الانشطار)
درجة الحرارة 94 مْ، الزمن دقيقة

2- مرحلة ارتباط البادئ:

يخفض الجهاز درجة الحرارة بسرعة إلى الدرجة (40-60) مْ حسب نوع البادئ المستخدم (إذ لكل بادئ درجة حرارة مثلى لارتباطه على شريط الـ DNA المفرد) حيث تتم عملية ارتباط (تزاوج) البادئ دائماً على الموقع المناسب بالاتجاه 5´ ← 3´ لها وذلك تبعاً لتطابق الأسس المكونة لها مع السلسلة المفردة لشريط الـ DNA

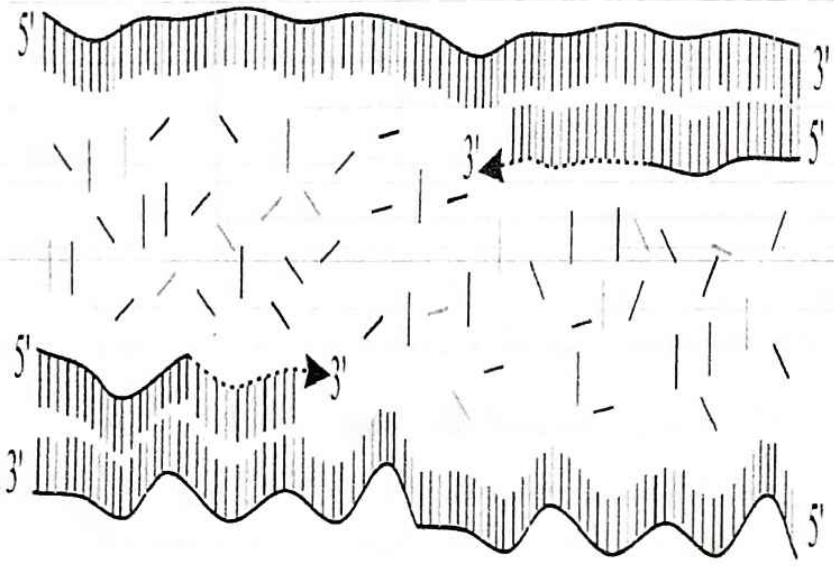


المرحلة الثانية: (مرحلة ارتباط البادئة)

درجة الحرارة 54 مْ، الزمن 45 ثانية

3- مرحلة النسخ:

يرفع الجهاز درجة الحرارة بعد ذلك إلى الدرجة 72 مْ (الدرجة المثلى لعمل إنزيم النسخ Tag Polymerase) حيث يقوم إنزيم Tag Polymerase بنسخ سلسلة متممة لسلسلة الـ DNA المفردة وذلك بإضافة النكليوتيدات (dNTP's) من الطرف 5´ ← 3´ للبادئ قارئاً من القالب (سلسلة الـ DNA المراد نسخها) من 3´ ← 5´ وهكذا.



المرحلة الثالثة: (مرحلة النسخ)

درجة الحرارة 72 مْ، الزمن دقيقتين

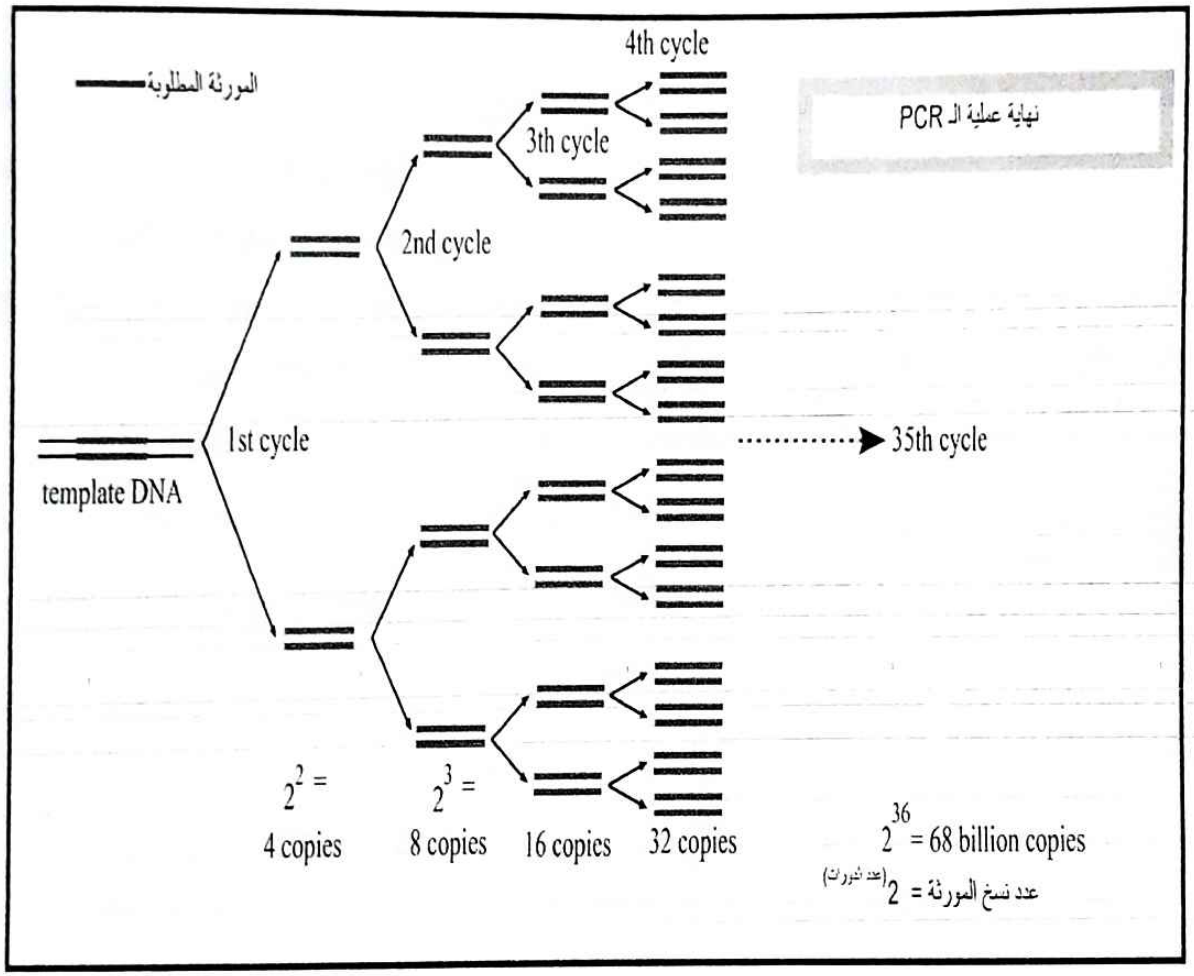
إضافة فقط dNTP's

وتُعاد المراحل السابقة في الدورة الثانية حيث يرفع الجهاز درجة الحرارة إلى 94 مْ مما يؤدي فصل شريط الـ DNA المضاعف إلى سلسلتين مفردتين (تصبح كل سلسلة قالب أو مرصاف ينسخ

منها سلسلة متممة) ثم يخفض درجة الحرارة إلى الدرجة (40-60) مْ حيث تتم عملية ارتباط البادئ على السلسلة المفردة من الـ DNA ثم يرفع درجة الحرارة إلى الدرجة 72 مْ حيث يقوم إنزيم Tag Polymerase بنسخ سلسلة متممة لسلسلة الـ DNA المفردة.

وهكذا تتم عملية النسخ على شكل دورات متكررة لنحصل على ملايين النسخ من قطعة الـ DNA الهدف.

العدد النهائي للنسخ الناتجة يعبر عنها بالعلاقة $X(2n _ 2^n)$ حيث n عدد الدورات، x عدد نسخ الحمض النووي.



وتوجد مرحة قبل هذه المراحل الثلاثة تسمى مرحلة البدء وتكون درجة الحرارة فيها 94 مْ لفترة زمنية ما بين 5 -10 دقائق، الهدف منها فصل سلسلتي الـ DNA عن بعضهما بشكل كامل.

كما توجد مرحلة بعد المراحل الثلاث السابقة تسمى مرحلة اتمام النسخ، تكون درجة الحرارة فيها 72 مْ وتستمر لمدة (5-10) دقائق، الهدف منها اتمام نسخ سلاسل الـ DNA المتممة جميعها.

حالة الاستواء تعني الوصول إلى ناتج تضخيم الـ DNA نهائي في تفاعل الـ PCR بحيث لو زدنا عدد الدورات لاتزداد معه كمية الـ DNA .

- **أنواع تفاعلات الـ PCR:**

توجد عدة أنواع لتفاعل الـ PCR نلخص منها الأنواع المستخدمة في هذا البحث

1- تفاعل الـ PCR التقليدي Conventional PCR:

يعتمد هذا التفاعل على استخدام بادئين متخصصين لقطعة الـ DNA الهدف المراد تضخيمها وتتم مراحلة وفق ما ذكر سابقاً.

2-تفاعل الـ PCR المعشش (الشبكي) (Nested PCR)

يستخدم في هذا التفاعل نوعين من البوادئ (Primers) لكل منهما درجة حرارة مناسبة للارتباط مع قالب الـ DNA وعدد خاص من الدورات حيث يتم تفاعل الـ PCR المعشش على مرحلتين:

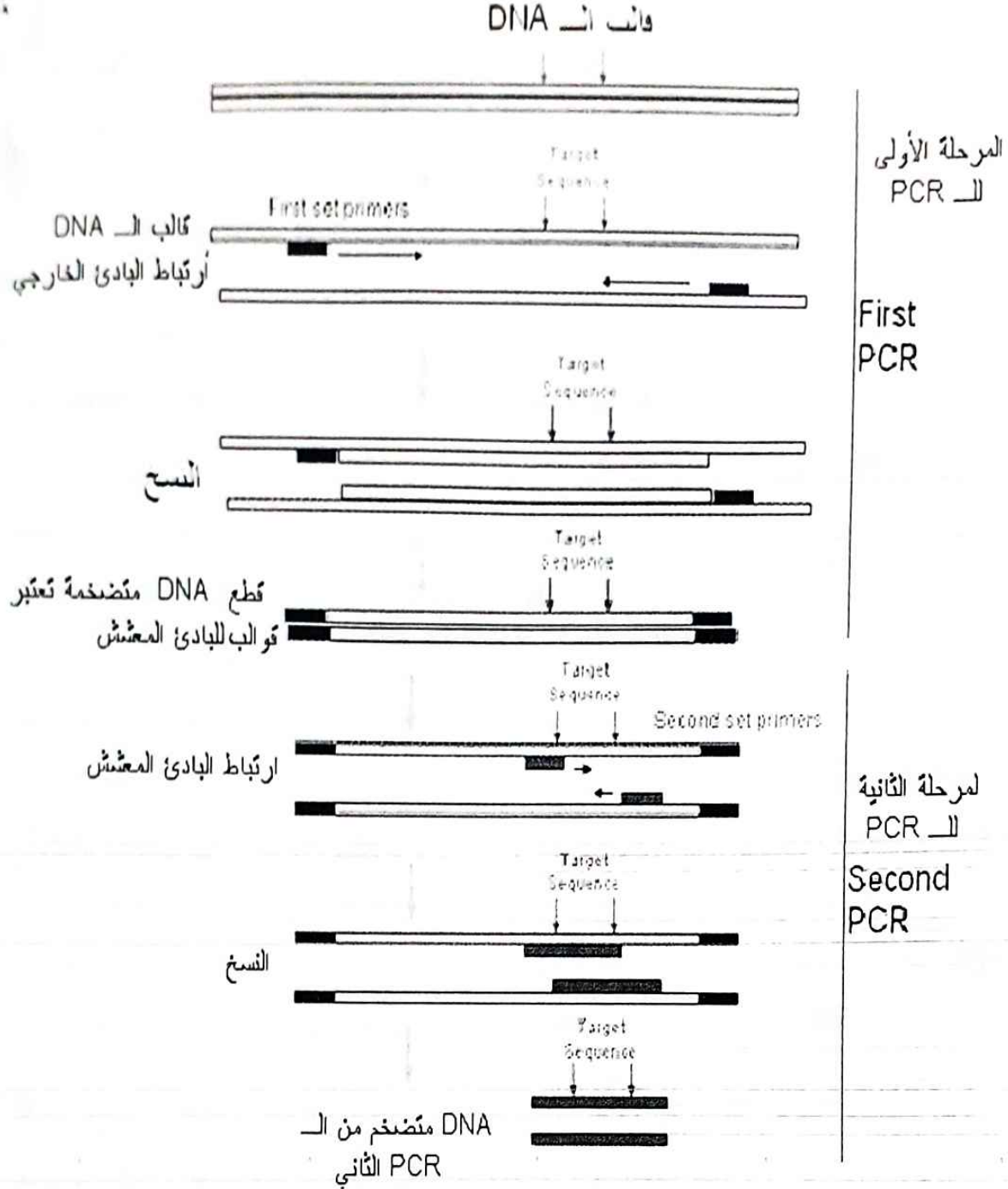
1- المرحلة الأولى: يستخدم في هذه المرحلة بوادئ يطلق عليها اسم البوادئ الخارجية، تقوم هذه البوادئ بحصر وتضخيم (مضاعفة) قطعة كبيرة من الـ DAN، ويتم في هذه المرحلة مضاعفة قطعة الـ DNA الهدف ملايين المرات وتستخدم هذه القطع كقوالب لعملية النسخ في المرحلة الثانية.

2- المرحلة الثانية: يستخدم في هذه المرحلة بوادئ تقع مواقع ارتباطها داخل القطع التي تم تضخيمها في المرحلة الأولى، تسمى بالبوادئ المعششة (الشبكية) Nested Primer .

يؤمن الـ PCR المعشش النوعية والكفاءة العاليتين في عملية نسخ الـ DNA القالب، نتيجة وجود عدد هائل من قوالب الـ DNA ناتجة من المرحلة الأولى للـ PCR المعشش.

أهمية تفاعل الـ PCRالمعشش:

- يؤمن النوعية العالية في عملية نسخ الـDNA القالب
- الكفاءة العالية نتيجة وجود عدد كبير من قوالب الـDNA الناتجة من المرحلة الأولى لهذا التفاعل
- تكون الأخطاء قليلة لأن أي خطأ قد يحث في عملية النسخ الـ DNA في المرحلة الأولى يمكن تصحيحه في المرحلة الثانية من قبل البوادئ المعشعشة في المرحلة الثانية



3- تفاعل الـ PCR المتعدد Multiple PCR:

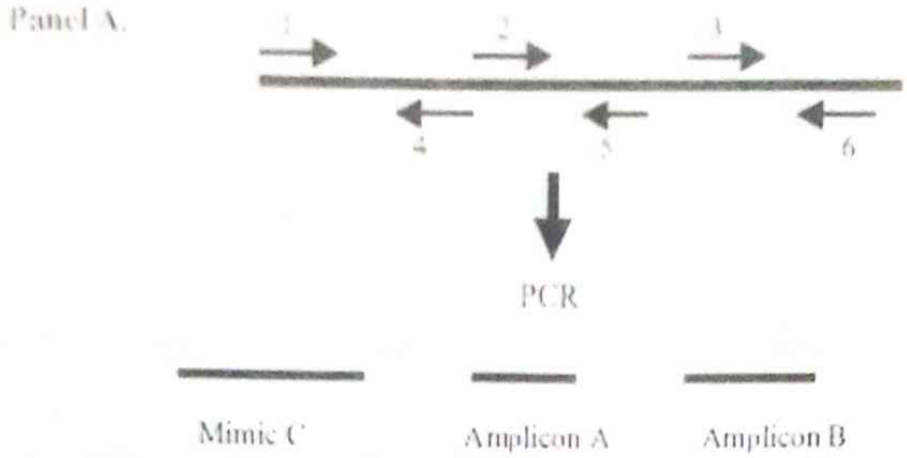
يتم في هذا التفاعل تضخيم عدة قوالب مختلفة من الـ DNA في الوقت نفسه حيث لا يوجد تداخل بين هذه القوالب وباستخدام بوادئ مختلفة، اذ يكون لكل قالب DNA

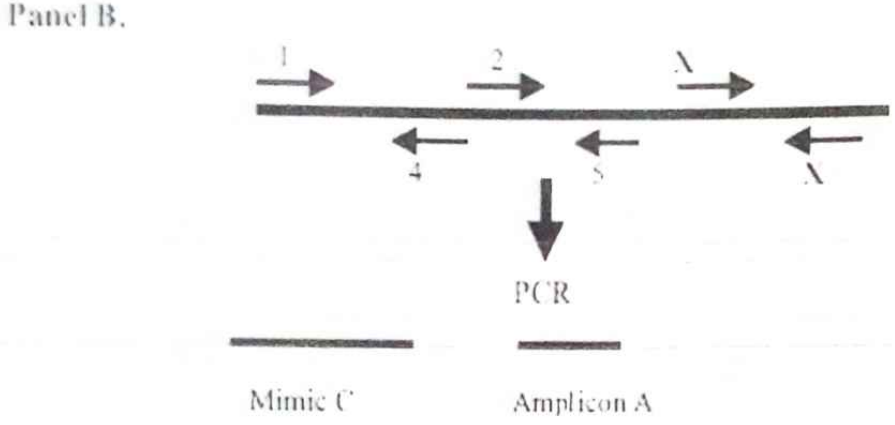
- تسلسله الخاص والنوعي
- بوادئ نوعية خاصة

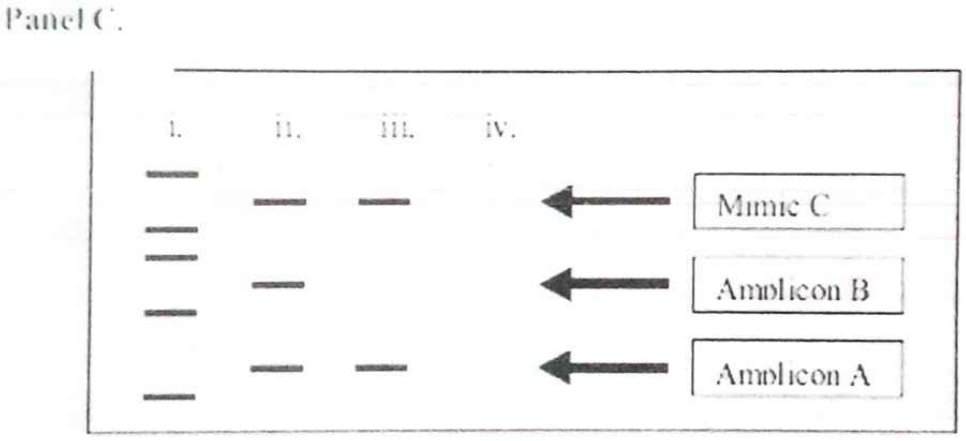
بشرط أن يكون لها نفس درجة حرارة الارتباط مع الـ DNA القالب ويمكن فصل السلاسل الناتجة عن بعضها، ويمكن بهذه التقانة

- الكشف عن عدة مورثات في الوقت نفسه أو عدة مواقع من المورثة الواحدة

- كما أنها تختصر الوقت والكلفة الناتجة عن إجراء تفاعل خاص بكل عينة بشكل منفصل.







4-تقانة الـ PCR في الزمن الحقيقي (Real time):

تعتمد هذه التقانه على قياس كمية المادة المتألقة الناتجة عن البوادئ في كل دورة حرارية من دورات الـ PCR و يتناسب مقدار تألقها طرداً مع كمية الـDNA المتضخم في كل دورة حرارية يمر بها التفاعل حيث يزداد التألق مع زيادة عدد النسخ في كل دورة حرارية نذكر من هذه التقانات:

تقانه الـ PCR-Q_RT باستخدام مسابر (Probs) من النوع Taq Man:

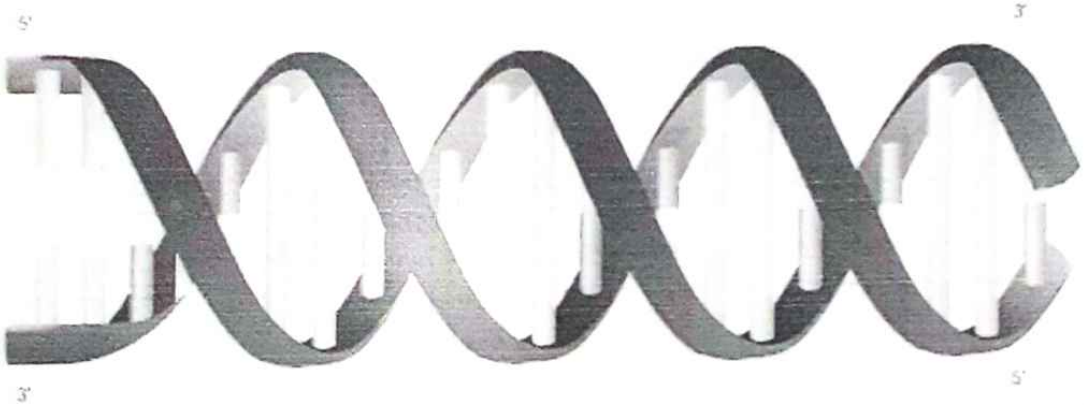
مسبار الـTaq Man عبارة عن سلاسل نكليوتيدية قصيرة يتراوح طولها ما بين 18-22 نكليوتيد مصممة لترتبط بشكل نوعي مع إحدى سلاسل الـ DNA المراد تضخيمها أثناء عملية ارتباط البوادئ:

تحمل نهايتي المسبار على مادتين هما:

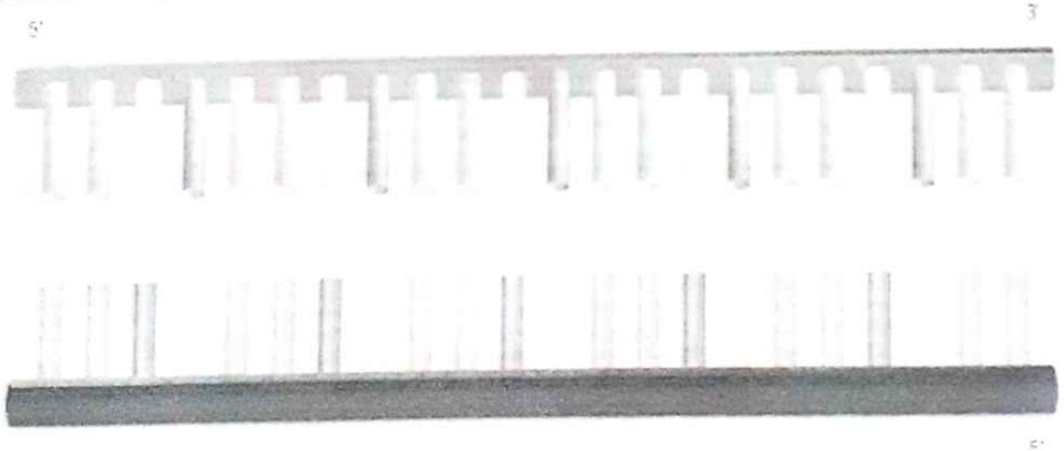
المادة المتألقة (R(Reporter على النهاية 5´ للمسبر

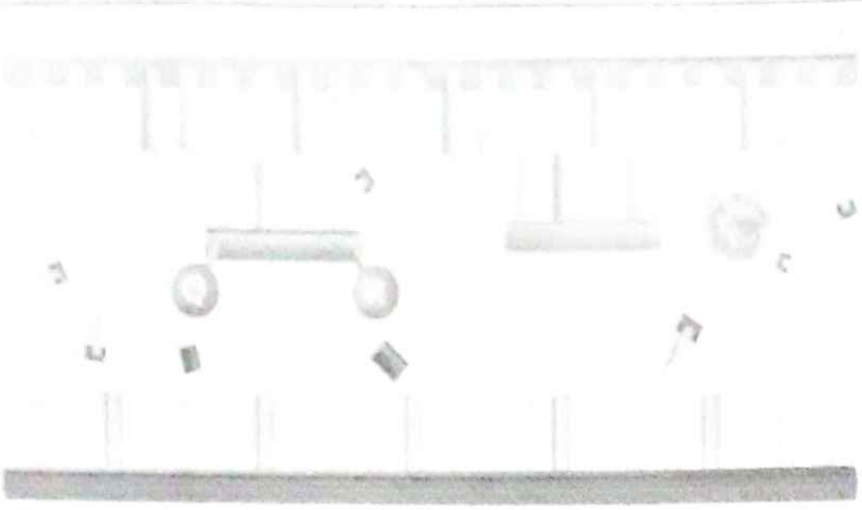
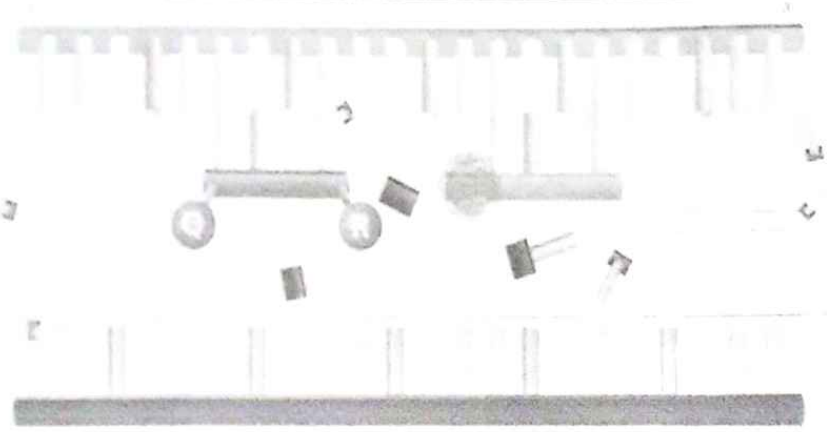
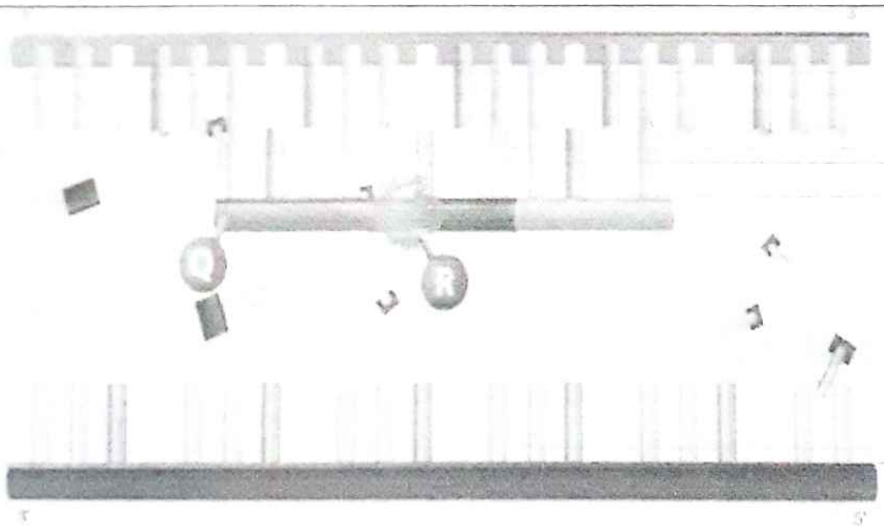
المادة المخمدة للتألق (Q) Quancher على النهاية 3´ للمسبر

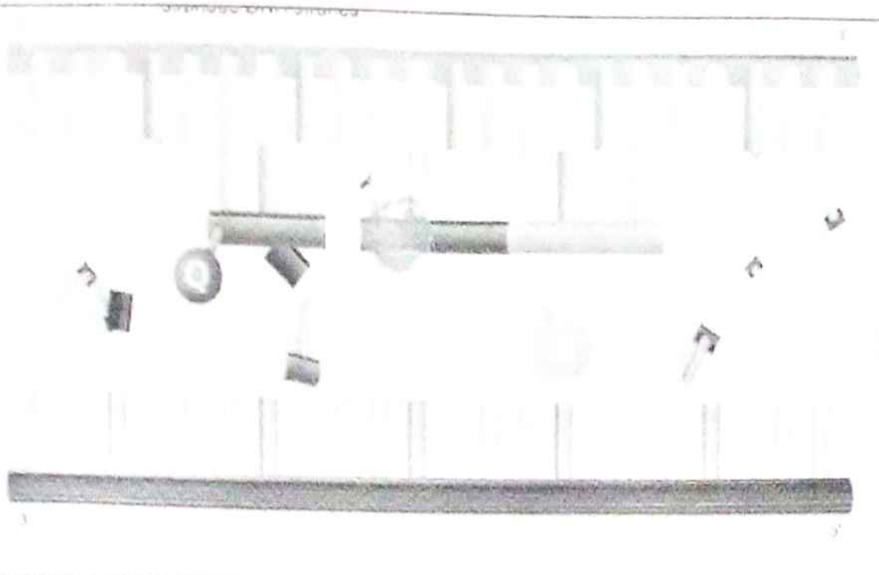
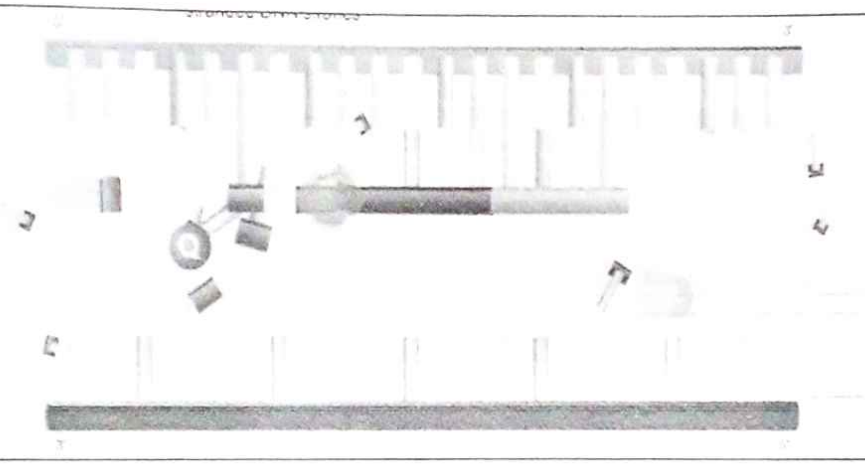
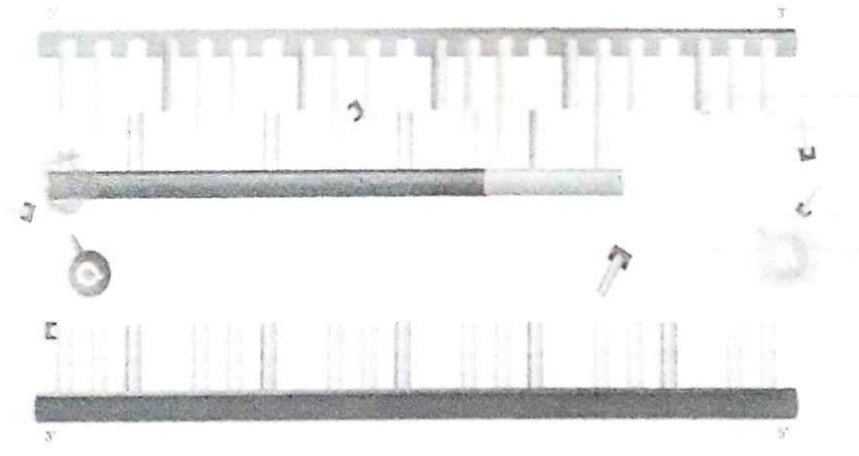
لسلة مزدوجة



فصال السلسلتين



ارتباط البادئ والمسبار	
نسخ سلسلة متممة للـDNA	
انفصال المادة المتألألقة من المسبار بفضل أنزيم Taq polymerase	

تحر المادة المتألفة وتتهيج	
يكمل DNA Polymerase حذف نيكليوتيدات المسبار ويقوم بإزالة المادة المخمدة لمتألق عن الوصول إليه	
يكمل DNA Polymerase عملية النسخ حتى نهايتها	

- عندما يرتبط المسبر على الـ DNA القالب في المنطقة الخاصة به فإنه لا يحدث تألق في المادة المتألقة (R) نتيجة قربها من المادة المخمدة للتألق (Q).

- خلال عملية الاستطالة التي يقوم بها أنزيم الـ Taq –polymerase باقتلاع المسبر المرتبط بالـ DNA القالب نكليوتيد تلو الآخر فتتحرر المادة المتألقة (R) من المسبر ومن سيطرة المادة المخمدة للتألق (Q) وتصبح حرة في وسط التفاعل.
- وعند تعريض وسط التفاعل إلى أشعة الليزر أو أشعة UV تتهيج المادة المتألقة R وتقوم بإصدار ضوء ذو طول موجة محدد وتقوم مجموعة من الحساسات الموجودة في جهاز الـ Real time PCR بالتقاطه وتسجيله
- تتم عملية الكشف عن التألق في طور الاستطاله.

5-تفاعلات النسخ العكسي Reverse Transcribed (RT-PCR):

تمتلك بعض الفيروسات (فيروس الإيدز) مادة وراثية RNA عوضاً عن DNA وعند دراسة هذا النوع من المادة الوراثية نقوم بقلب سلسلة RNA إلى سلسلة DNA مفردة تسمى الـDNA المتتم (cDNA) ثم تتم بعد ذلك عملية التضخيم بتفاعل الـ PCR التقليدي.

توجد أنزيمات تقوم بنسخ الـ DNAإلى الـ RNA أنزيمات خاصة تدعى أنزيمات الرجعية أو أنزيمات النسخ العكسي Reverse transcriptase.

الأنزيمات الرجعية (RT-Enzyme):

عبارة عن أنزيمات DNA polymerase ولكنها تتعرف على سلسلة القالب من الـ RNA ترتبط بها لتنسخ سلسلة مفردة من الـ DNA تسمى cDNA ، توجد هذه الأنزيمات في الفيروسات الـ RNA وتدعى Retrovirus .

وظائف الأنزيمات الرجعية:

1) اصطناع سلسلة الـDNA مفردة بدء من سلسلة RNA قالب
2) إزالة سلسلة RNA الأصلية من خلال فعالية RNase التي تتميز بها هذ الأنزيمات
3) اصطناع سلسلة الـDNA أخرى مقابلة لسلسلة DNA

تطبيقات تقانة (RT-PCR):

تستخدم هذه التقانه في جميع مخابر البيولوجيا الجزيئية والتقانه الحيوية لانها تقانه سهلة، سريعة وقليلة التكلفة ومن أهم تطبيقاتها:

1) الكشف عن وجود الـ RNA رسول نوعي في خلايا أو نسيج ما، حتى وإن كان بكميات ضئيلة، تتم معايرته.
2) تعتبر طريقة ممتازة لمقارنة مستويات التعبير المورثي، قديماً استخدمت تقانة نورثن (تقانة لطاخة الـ RNA) لقياس مستويات التعبير المورثي فالخلايا أو النسج،لكنها تحتاج إلى كميات كبيرة من الـ mRNA مقارنة مع تقانه (RT-PCR).

العوامل المؤثرة في نجاح الـRT-PCR:

- يعتبر قالب الـ RNA ضعيفاً يمكن أن يتحطم بسهولة بالغة بواسطة أنزيم RNase exonuclease
- أنزيم RNase exonuclease موجود في كل مكان تقريباً وهو من الأنزيمات الثابتة حرارياً ولا يمكن التخلص منه بسهولة لذلك يجب عند التعامل مع قوالب الـ RNA أن نستخدم مادة DEPC التي تقوم بتحطيم أنزيم RNase exonuclease.

أنواع البوادئ المستخدمة في تفاعلات RT-PCR:

Oligo(dt) 12-25:

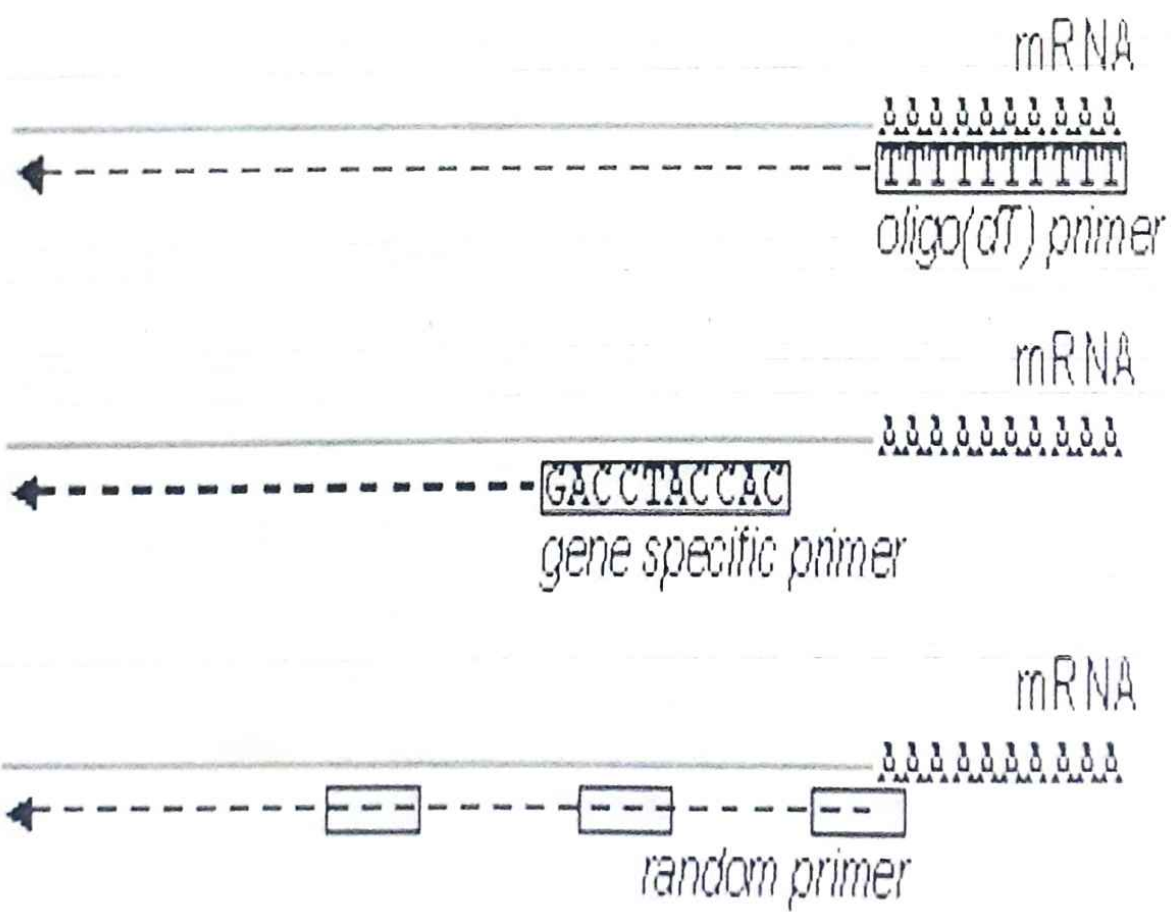
- يعتبرهذا البادئ عبارة سلسلة قصيرة من التايمين يتراوح طولها مابين 12-25 نكليوتيد وقد صمم كي يرتبط مع الذيل (Poly A) الموجودة على النهاية 3´ للـmRNA

البوادئ النوعية:

- صممت كي ترتبط مع مناطق نوعية ومحددة على سلسلة الـmRNA القالب.

بوادئ السداسية العشوائية:

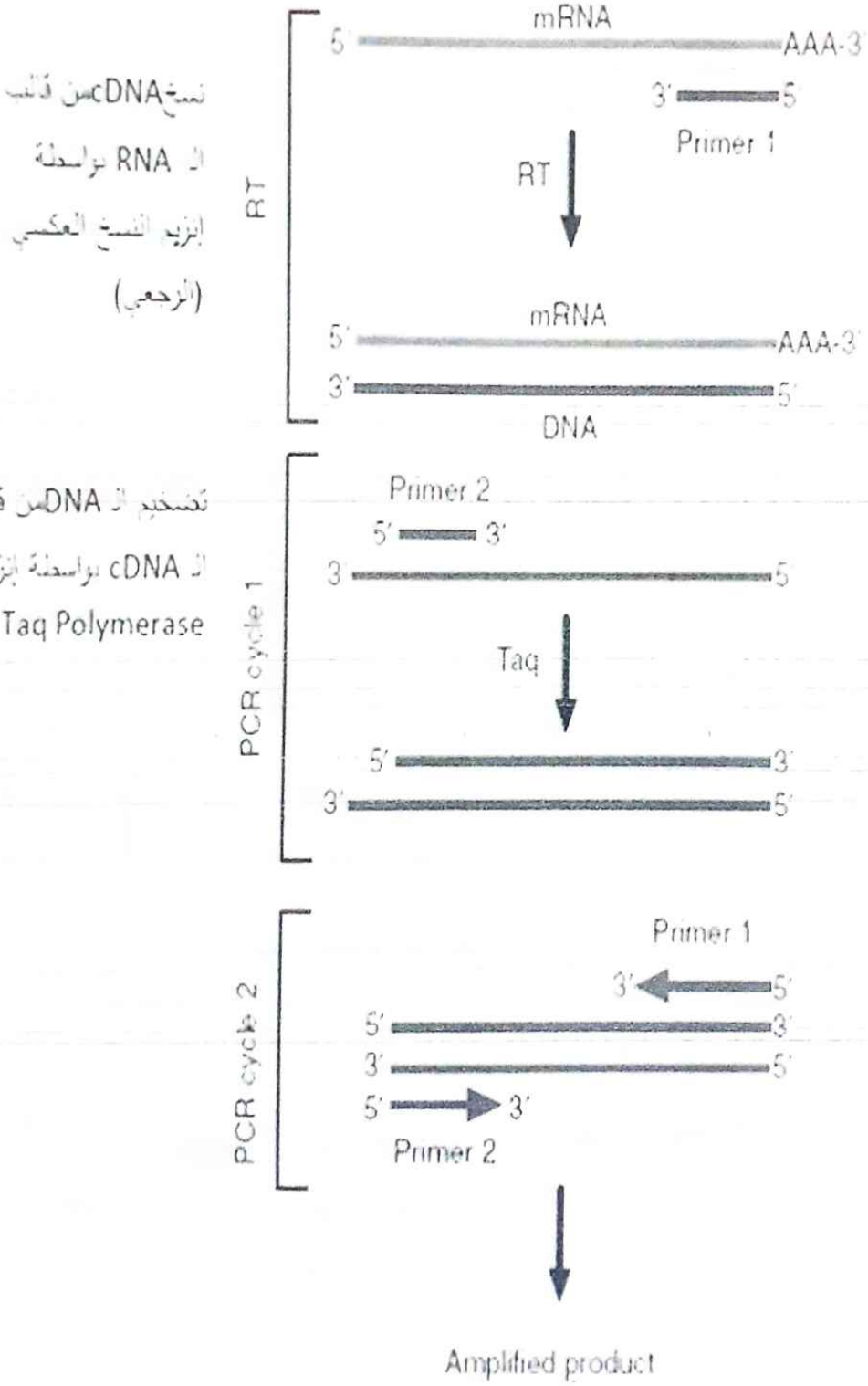
- تتألف من 6 نكليوتيدات فقط ويتم وضع النكليوتيدات بشكل عشوائي وتستخدم عند عدم معرفة تسلسل لـmRNA.



يتم تفاعل النسخ العكسي على مرحلتين

المرحلة الأولى: نسخ cDNA من RNA باستخدام الأنزيمات الرجعية

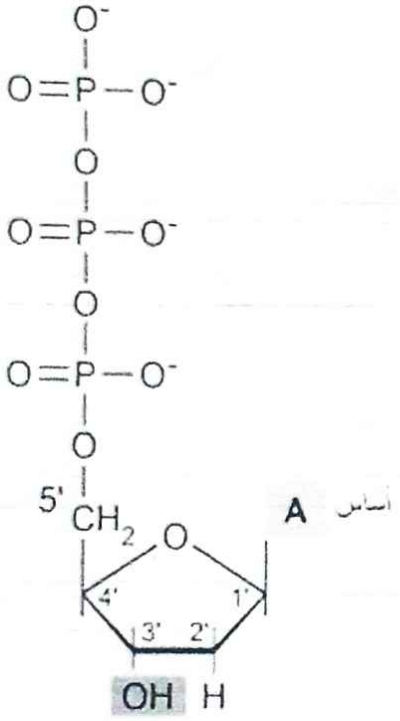
المرحلة الثانية: تضخيم cDNA الناتج بواسطة أنزيم Taq Polymerase يمكن إجراء كلا التفاعلين في أنبوب واحد توضع فيه كل مكونات التفاعل من RNA + Taq Polymerase +PCR Buffer +dNTPs + Primer RT-enzyme + Mg2+ إذ نجري عملية تحويل RNA إلى cDNA وفي نفس الأنبوب نتابع عملية التضخيم للـ cDNA.



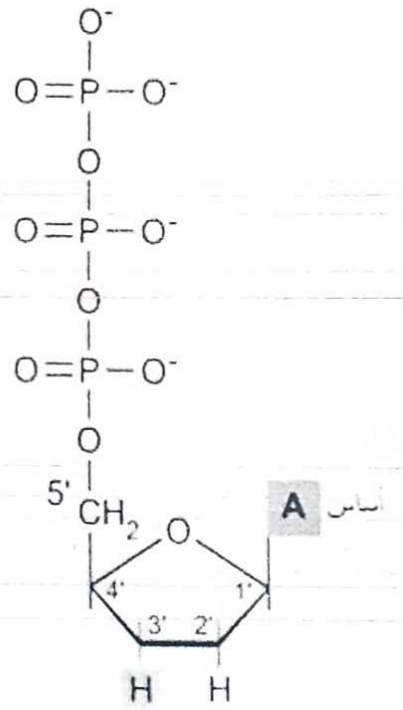
5-السَلسَلة الآلية (التتابع النكليوتيدي) Automation Sequencing:

إن الحاجة الماسة لمشاريع سَلسَلة الـDNA على نطاق واسع دفعت العلماء إلى تطوير تقانة آلية وسريعة للسَلسَلة DNA (Automation Sequencing). تم التوصل إلى ذلك من خلال تغيير الشكل أو الوسيلة التي يتم فيها إيقاف الاستطالة (النسخ)، ولهذا الغرض تم تطوير مجموعة من النكليوتيدات الديديوكسي ddNTPs المرتبطة بالأصبغة المتألقة (نكليوتيدات معلمة بالفلور على جذر الفوسفات) بحيث يكون لكل واحد من هذه المكونات المتألقة (ddATP، ddTTP، ddCTP، ddGTP) طيف إصدار مميز وخاص به، أي أن كل مجموعة من قطع الـ DNA التي تنتهي بأحد نكليوتيدات الديديوكسي سوف تتألق عند طول موجة مختلف، وتختلف النيوكلوتيدات (ddNTps) عن النكليوتيد الطبيعي (dNTPs) بأنه لا يحتوي على الزمرة الهيدروكسيلية (OH) على الكربون الثالث لسكر الريبوز المنقوص الاكسجين وعوضاً عنها يحتوي يحتوي الكربون الثالث على ذرة هيدروجين

deoxynucleotide



نيوكليوتيد ثلاثي الفوسفات منقوص الأوكسجين



Dideoxynucleotide

نيوكليوتيد ثلاثي الفوسفات منقوص ذرتي أوكسجين

وعندما ترتبط(ddNTPs) بأحد أنواعها الأربعة المختلفة (ddGTP،ddATP، ddCTP، ddTTP) إلى أخر نكليوتيد يحمل الوظيفة الهيدروكسيلية تتوقف عملية االنسخ (الاستطالة) إذ لا ترتبط بهذه النكليوتيدات نيوكليوتيدات أخرى لعدم احتوائها على الوظيفة الهيدروكسيلية على ذرة الكربون الثالثة الضرورية لربط النكليوتيد ثلاثي الفوسفات الذي يحمل وظيفة فوسفاتية على ذرة الكربون الخامسة، لهذا السبب تعمل هذه النكيوتيدات النوعية على وقف استطالة سلسلة الـ DNA في مواقع معينة تختلف حسب

نوع الـ ddNTPs المرتبط، حيث أصبح من الممكن قراءة النتائج مباشرة في جهاز شعري (Capillary) للرحلان الكهربائي تتم القراءة المباشرة بفضل وسم قطع الحمض النووي الـ DNA بألوان مفلورة (Fluorescent dye). وبهذه الطريقة أصبح بالإمكان تحديد تتابع القواعد في سلسلة لا يقل طولها عن ألف قاعدة في تفاعل واحد، وتظهر النتائج على الحاسوب مباشرة في صيغتها الإلكترونية.

مراحل تقانة السَلسَلة الآلية

1-الحصول على الـDNA الهدف

- استخلاص الـ DNA الهدف
- تضخيم المورثة المراد تحديد تسلسلها النيوكليدي باستخدام تقانه الـPCR

2-تنقية نواتج الـ PCR

تتم تنقية العينة من البرايميرات والنكليوتيدات بطريقة أنزيمية للتخلص من جميع المواد الفائضة ما عدا سلسلة الـDNA

3-تحضير مزيج الـ PCR السَلسَلة من أجل السَلسَلة

يتم تحضير مزيج الـ PCR السَلسَلة الذي يتألف من عينة الـDNA المضخم و بادئة واحدة +مزيج السَلسَلة (BDT)

يتألف مزيج السَلسَلة من انزيم Taq polymeras و PCRالـBuffer و نكليوتيدات (ddNTPs و dNTPs)

يتم إدخال بادئة واحدة فقط أثناء تفاعل الـPCR السَلسَلة وذلك كي لا يتم تداخل بين نتائج البادئة الأولى مع نتائج البادئة الثانية

يجب أن تكون كمية ddNTPsو dNTPs بنسب محدودة تقريباً تكون كمية ddNTPs عشر كمية dNTPs ويعود السبب إذا كانت كمية ddNTPs عالية يؤدي إلى تألقات كبيرة وتكون أغلب القطع الناتجة عن تفاعل الـPCR صغيرة والعكس صحيح فإذا كانت كمية ddNTPs صغيرة جداً يؤدي ذلك إلى تألقات صغيرة و نكون أغلب القطع الناتجة عن تفاعل الـPCR كبيرة.

4-تفاعل الـPCR سَلسَلة Sequencing Cycle

يمر تفاعل الـ PCR الخاص بالـ Sequencing بثلاث مراحل هي:

1- المرحلة الأولى (فصل سلسلتي الـ DNA) يتم فيها فصل سلسلتي الـ DNA عن بعضهما وذلك برفع درجة الحرارة إلى درجة الحرارة إلى الدرجة 94°م

2- المرحلة الثانية (ارتباط البادئة) يستخدم فيها بادئة واحدة فقط (إما بادئة يمنى أو يسرى) وبالتالي يتم تركيب السلسلة المتمة لأحد شريطي الـDNA وذلك بخفض درجة الحرارة إلى الدرجة 50-55م°مما يؤدي إلى ارتباط البادئة إلى شريط الـ DNA المفرد.

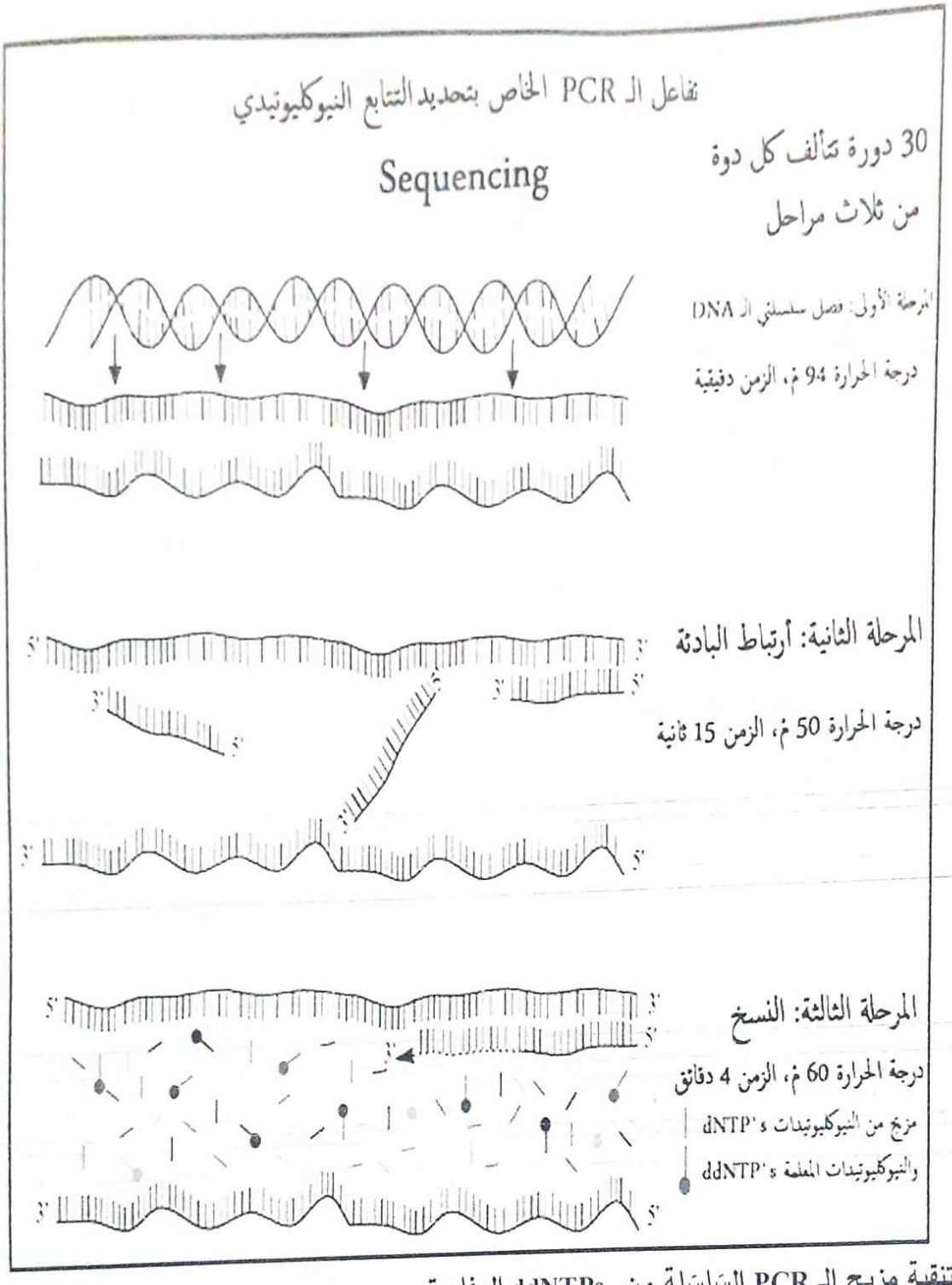
3- المرحلة الثالثة (النسخ) يتم فيها إعادة تركيب السلسلة الجديدة (المتممة) لقطعة الـ DNA الأصلية.

تختلف هذه المرحلة في تفاعل الـ PCR الخاص بالـ sequencing عن تفاعل الـ PCR العادي بما يلي

- تتم عملية النسخ باستخدام نكليوتيدات خاصة معلمة بالفلور تسمى ddNTPs بالإضافة إلى النكليوتيدات الطبيعية (غير المفلورة) في تفاعل الـ PCR
- تطبق في عملية النسخ درجة حرارة أخفض (60° م عوضاً عن 72°م) وبالتالي تحتاج فترة زمنية أطول ليتم تركيب كامل القطعة المكملة لقطعة الـ DNA الأصل

تتم عملية ارتباط النكليوتيدات المتتمة (سواءاً كانت dNTPsأو ddNTPs) عشوائياً إلى البادئة من النهاية 3´ قارئة من القالب من النهاية 3´ غلى 5´ وهكذا تتم إضافة الاسس النكليوتيدية بشكل متمم للنسخة الأصلية

تتوقف تركيب السلسلة المكملة للنسخة الأصلية عندما يتم ارتباط إحدى (النكليوتيدات المفلور) (ddNTPs) وسبب ذلك أن ddNTPs تحتوي على ذرة هيدروجين على ذرة الكربون الثالثة من جزيئة السكر بدلاً من شاردة الهيدروكسيل (OH) الموجودة عند الـ dNTPs، وبما أن ddNTPs معلمة بالفلور أو الفوسفور قيمكن تحديد آخر نكليوتيد (أساس أزوتي) من القطعة المضاعفة بواسطة جهاز خاص



4-تنقية مزيج الـ PCR السَلسَلة من ddNTPs المفلورة

تتم في هذه المرحلة تنقية المزيج للتخلص من ddNTPs المفلورة بوجود مادة Dye Ex تحتوي مادة Dye Ex على حبيبات جل تلتقط المادة المفلورة تعمل على ادمصاص النكليوتيدات المفلورة

5-الكشف على جهاز Automated Sequencer:

عند إجراء الرحلان الكهربائي لكل هذه القطع في آن واحد في مسار واحد (ضمن أتبوب شعري يضمن فصل النكليوتيدات المفلورة بشكل دقيق) مملوء بهلام البولي أكريل أميد الذي يفصل قطع الـDNA التي تختلف بأطوالها حتى بنكليوتيد واحد، يتم قياس الإصدار التألقي لكل قطعة من قطع الـ

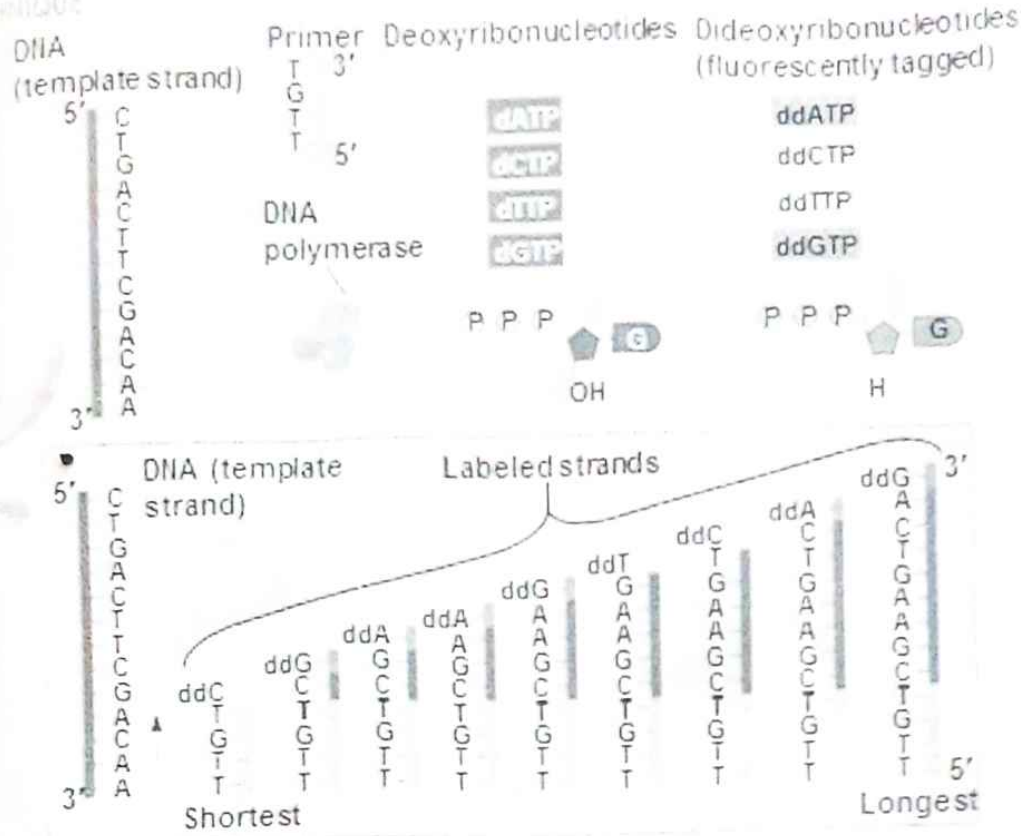
DNA المفصولة بمجرد مرورها من مصدر ليزري وكاشف التألق، يتم إيصال هذه المعلومات بشكل آلي إلى كومبيوتر

لقوم برمجيات (Software) بقراءة البيانات على مرحلتين

- المرحلة الأولى هي التحكم بالجهاز وتجميع البيانات فقط
- المرحلة الثانية هي ترجمة وقراءة البيانات وتحديد معناها وتحويلها إلى نكليوتب=يدات يمكن قراءتها على برنامج NBCI

وفي السنوات الماضية القليلة أصبح سلَسلَة الـ DNA قاعدة راسخة لأبحاث عديدة ومتنوعة مثل التصنيف والتحليل الوراثي والدراسات البيئية والتصنيفية، وتسمح تقانة سلَسلَة الـDNA في الكشف عن ترتيب القواعد النكليوتيدية في جزيئات الـDNA، وتعتبر خطوة أساسية في تقييم التسلسل التنظمي ومناطق مشفرة وغير مشفرة .

وتعتبر من أكثر التقانات فائدةً في تحليل الحمض النووي DNA والتلاعب به بشكل مُحكم. وتكمن أهميتها في الهندسة الوراثية حيث إن يعتبر معرفة تسلسل القواعد في الـDNA المستهدف وفي الـDNA الناقل ضرورياً من أجل تصميم أنظمة بكتيرية متطورة لإنتاج بروتين محدد. وهي أيضاً تعتبر هامة من أجل تصميم مسابير مختلفة بوادئ تفاعل مختلفة، ومن أجل رسم خرائط حصرية (Restriction map) وخرائط نسخية (Transcriptional map) بمساعدة برامج الحاسوب التي تحلل التسلسل الناتج.



NIQUE

SULTS

Pearson Education, Inc.