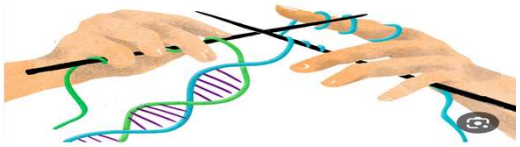
جامعة حماة
كلية الصيدلة
السنة الخامسة

ما هي الهندسة الوراثية، وما هي مجالات استعمالها؟ (3)

What is Genetic Engineering and What is used for?



المحاضرة الخامسه
الدكتورة ظلال محمد قطان

ثامناً- تقانة مصفوفة الـ DNA:

DNA array technology

وهي تقانة ذات قدرة عالية تمكننا من فحص مستوى التعبير الجيني لكل مورثات الخلية البكتيرية في وقت واحد من خلال تجربة مخبرية واحدة.

لقد شَكلت تقانة مصفوفة DNA (DNA array) ثورة حقيقية في مجال التعبير الجيني ورؤيته الإجمالية.

الطريقة: يساعد التصنيع المجهري الدقيق (Microfabrication) بإلصاق مسبارات بكثافة عالية لجينات محددة على سطح زجاجي أو سليكوني يُشكل المصفوفة (Array) أو الرقاقة (Chip).

هناك نوعان من المسبارات يمكن استعمالها في هذه التقانة:

- إما أن تكون منتج PCR يحتوي على الجين كاملاً أو على بعض أجزائه، مثل "إطار القراءة المفتوح" (ORFmer).

- وإما أن تكون سلاسل قصيرة من نيوكليوتيد (أوليغونيوكليوتيد) يتراوح طولها بين 20 و70 وحدة.

وفي معظم الحالات تُصنَّع جزيئات المسبار أولاً، ثم بعد ذلك يتم لطخها على المصفوفة باستعمال طابعة آلية (Robotic printer).

وفي طريقة أحدث، تُستعمل تفاعلات بالرسم الضوئي (Photolithography) لتصنيع أوليغونيوكليوتيد المسبار في الموقع (in situ) الذي يُلصق به

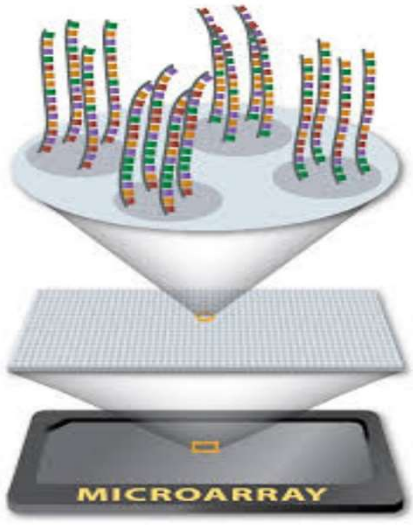
تكون كثافة المسبار بين 10000 إلى 500000 لطخة في المصفوفة الواحدة حسب ميكانيكية الطبع المستخدمة. في هذه التقانة يتم وسم الحمض النووي المُستهدف (Target nucleic acid) (في حين أن المسبار على المصفوفة غير موسوم).

غالباً ما يكون الوسم بصبغة فلوريسينية (Fluorescent dye) خلال عملية النسخ العكسي (Reverse transcription) للـ mRNA (RNA رسول)، يُنتج ذلك DNA مُكمّلاً موسوماً مقابلا كل mRNA. إنَّ استخدام صبغتين مكملتين لبعضهما البعض Cy3 (ذات لون أخضر) وCy5 (ذات لون أحمر) يُسّهل عملية المقارنة المباشرة بين ومضات اللون الناتجة من مصدرين مختلفين من المسبار في مصفوفة واحدة.

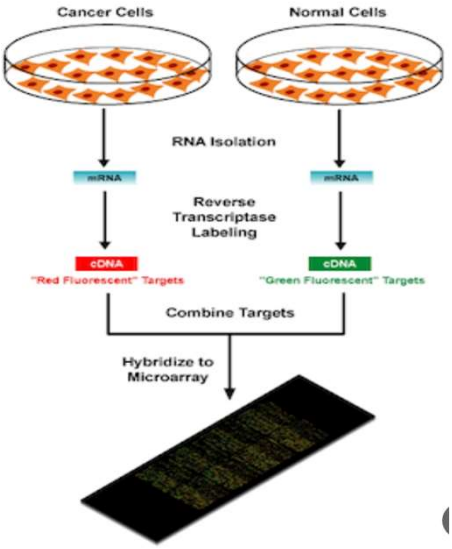
ويـتم قيـاس كميـة الضـوء باسـتعمال جهـاز (Laser-Scanning Fluorimeter) لقياس ومسح اللون الضوئي باستعمال أشعة الليزر.

تُحفَّز الصبغة Cy3 بتعريضها لموجة ضوئية بطول 532 نـانومتراً وتشع الضوء على موجة بين 557 و592 نانومتراً.

بينما يُحفَّز Cy5 بموجة 635 نانومتراً وتشع على موجة بطول 650 إلى 690 نانومتراً.

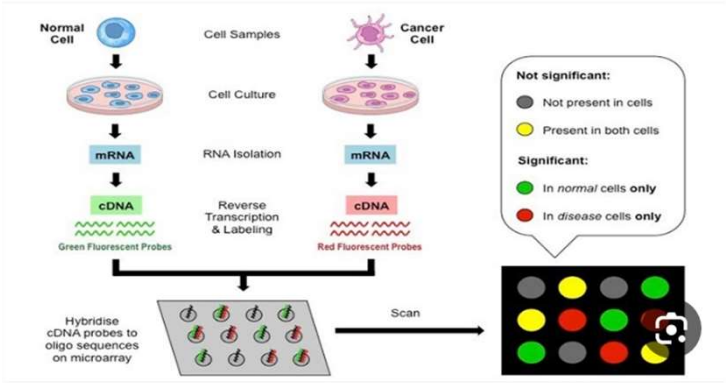


الشكل 23: تقانة DNA Microarray



الشكل 24: DNA Microarray Definition، Analysis، Gene Expression

7 الدكتورة ظلال محمد قطان الفصل الأول 2023-2024



الشكل 25: DNA Microarray، Principle

8 الدكتورة ظلال محمد قطان الفصل الأول 2023-2024

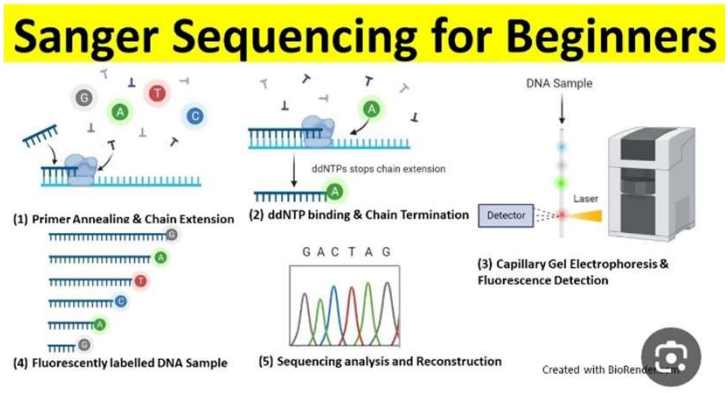
تاسعاً- سَلسَلة DNA:

DNA Sequencing

تسمح تقانة سَلسَلة DNA بالكشف عن ترتيب القواعد في الجدلة. إنها أكثر التقانات مقدرة على تحليل الـ DNA والتلاعب فيه بشكل مُحكم. إن معرفة تسلسل القواعد في DNA المستهدف وDNA الناقل تُشكل ضرورة للتمكن من تصميم أنظمة بكتيرية متطورة لإنتاج بروتين محدد. وهي ضرورية أيضاً لتصميم مسبارات مختلفة وبادئات تفاعل مختلفة، وهي مهمة أيضاً لرسم خرائط حصرية (Restriction maps) وخرائط نسخية (Transcriptional maps) بمساعدة برامج الحاسوب التي تُحلل التسلسل الناتج.

تعتمد طريقة "ماكسام" و"جلبرت Maxam وGihbert في تحديد تسلسل القواعد في جزيء DNA ما على استعمال مواد كيميائية تتفاعل مع قواعد DNA بخصوصية تُؤدي إلى قطع الجدلة بناءً على طبيعة القاعدة النيوكليوتيدية (Base-Specific Cleavage) أي أنه ليس قطعاً عشوائياً. بالرغم من أن هذه التقانة لا زالت تُستعمل في بعض التطبيقات، فقد أخذت مكانها تقانة حاذقة طُوّرت من سانغر "Sanger" وزملائه، وتعتمد على إيقاف عملية البلمرة. في هذه التقانة يُعتمد على قدرة أنزيم بلمرة DNA المستخلص من بكتريا E.coli و المعروفة باسم قطعة كلينوف Klenw Fragment من تصنيع جدلة مكملة لـ DNA قالب مكوّن من جدلة واحدة.

كما يستطيع هذا الأنزيم على استعمال قواعد نيوكليوتيدية اعتيادية (نيوكليوتايد منقوصة الأكسجين على الكربون الثاني -2 dNTP- Deoxynucleotide) إضافة إلى نيوكليوتايد منقوص ذرتين أوكسجين من الكربون الثاني والثالث. بما أن هذا الأخير يفتقد مجموعة هيدروكسيل في الموقع `3 فإن اندماجه في السلسلة يؤدي إلى توقف عملية البلمرة و استحالة إضافة نيوكليوتيد آخر فتتوقف عملية تطويل السلسلة (Chain elongation).



الشكل 25

<u>احتياجات التفاعل وطريقة العمل:</u>

1- <u>بادئ تفاعل محدد</u> يُمثل نقطة بداية التفاعل في كل الجزيئات التي تُبلمر. يتم تطويل بادئ التفاعل من خلال البلمرة، وبالتالي يكون بادئ التفاعل هو نفسه في كل الجزيئات المُصنعة في التفاعل.

2- <u>DNA المراد اكتشاف سلسلته</u>، ولا بد أن يكون ذا جدلة واحدة كي يتسنى استعماله كقالب.

3- <u>النيوكليوتيدات الأربع</u>، (dATP، dTTP، dGTP، dCTP) وهي المواد الأولية للبلمرة. تكون إحدى تلك الجزيئات الأربعة موسومة بعنصر مُشع مثل (dATP- α-S^{35}).

4- <u>يتم إجراء نفس التفاعل في أربعة أنابيب</u> تحتوي على نفس المواد المواد و الأنزيم.

5- <u>كل أنبوب يُضاف عليه نوع من الأنواع الأربعة من ddNTP</u> النيوكليوتيدات المنقوصة الأكسجين ثنائياً (وهي ddATP، ddTTP، ddGTP، ddCTP) وذلك بتركيز قليل مقارنة بنيوكليوتيد العادي.

عندما تكون نسبة تركيز dNTP وddNTP صحيحة فإن تفاعل البلمرة يتوقف على كل مواضع السلسلة (نتيجة اندماج ddNTP) مُنتجاً جدلات لها نفس الطرف َ5 (بادئ التفاعل) بينما تختلف في الطرف َ3 حيث توقف البلمرة بموقع عشوائي تحل فيه القاعدة من نوع ddNTP.

6- يتم بعد ذلك فصل الجدلات ذات الأطوال المختلفة (في كل واحد من الأنابيب الأربعة) بواسطة الرحلان الكهربائي في هلام الأكريلاميد.

7- يتم التصوير الشعاعي الذاتي للهلام (Autoradiography) لإظهار النتيجة لعملية السَلسَلة، بعرضه على فلم أشعة فنحصل على شرائط (Band) تُمثل كل واحدة منها قطعة DNA مختلفة بطولها عن الأخرى.

إن الحاجة الماسة لمشاريع سَلسَلة DNA على نطاق واسع دفعت العلماء إلى تطوير آلية أتمتة سريعة للسَلسَلة (Automation of DNA Sequencing).

15

تم التوصل إلى ذلك من خلال تغيير الشكل أو الوسيلة التي يتم فيها إيقاف البلمرة بحيث يمكننا الكشف عن القطع الناتجة من تفاعل السَلسَلة في الوقت الحقيقي (Real time) حيث أصبح من الممكن قراءة النتائج مباشرة في جهاز شعري (Capillary) للرحلان الكهربائي، بدلاً من استعمال الهلام والتصوير الشعاعي الذاتي.

تتم القراءة المباشرة بفضل وَسم قطع DNA بألوان فلوريسية (Fluorescent dye). بهذه الطريقة أصبح بالإمكان تحديد تتابع القواعد في سلسلة لا يقل طولها عن ألف قاعدة في تفاعل واحد، وتظهر النتائج على الحاسوب مباشرةً في صيغتها الالكترونية.

16

عاشراً- الطفرة الموجهة للموقع:

Site-directed mutagenesis

"الطفرة الموجهة لموقع" هي عبارة عن تغيير خاص في تسلسل النيوكليوتيد في موقع محدد من DNA، يكون القصد من الطفرة تحليل وتحديد فعالية جين معين أو ناتجه. على سبيل المثال: يتم استعمال الطفرة الموجهة لموقع، لاستبدال بعض من الأحماض الأمينية في أنزيمات صناعية بهدف تحسين مميزاتها وخصائصها.

يتم إجراء الطفرات على DNA بتقانات في الزجاج (*In vitro*)، ثم بعد ذلك يُعاد DNA حامل الطفرة إلى داخل البكتريا لمعرفة التغيرات الناتجة في الصفات الشكلية (Phenotypes).

تُعتبر تقانة "الطفرة الموجهة لموقع" باستعمال أوليغونيوكليوتيد الأكثر أهمية للوصول إلى ذلك الهدف، وذلك لأنها تؤدي إلى تغيير محدد ودقيق على سلسلة DNA المستهدفة.

بالرغم من تطوير عدة طرق لتنفيذ "الطفرة الموجهة لموقع" إلا أن المبدأ يتشابه كثيراً.

1- يتم انتساخ DNA (Cloning) المستهدف في بلازميد ذي قدرة على البقاء بشكل أحادي الجدلة خلال عملية المضاعفة. إضافة إلى DNA المستهدف يحتوي الناقل على مورثين واسمين (Markers) مسؤولين عن مقاومة المضادات الحيوية.

2- يُعطل أحد هذين المورثين باستبدال قاعدة نيوكليوتيدية واحدة.

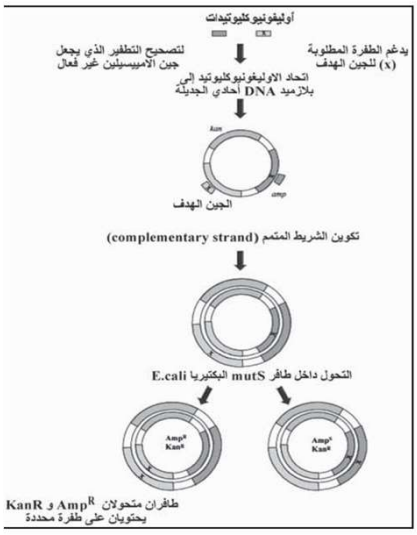
3- يتم التحام البلازميد أحادي الجدلة مع اثنين من أوليغونيوكليوتيد بادئ التفاعل، الأول يلتحم مع الجين المستهدف في الموقع المراد (إلا في موقع القاعدة قيد التحويل أو الاستبدال)، بينما يلتحم الثاني مع الموقع المكمّل المعطل (موقع الطفرة) في مورث مقاومة الأمبيسلين بحيث يتم استبدال القاعدة غير الصحيحة بأخرى صحيحة تؤدي إلى استعادة وظيفة مقاومة الأمبيسيلين للمورث الطبيعي.

4- إضافة أنزيم DNA Polymerase للمورث الطبيعي وأنزيم DNA Ligase يؤدي إلى تصنيع الجدلة المكمّلة. يحتوي البلازميد الناتج قصداً على نقطتين من عدم التكامل (Mismatch).

الأولى في مورث مقاومة الأمبيسلين (وستقوم بإصلاح طفرته الموجودة سابقاً) والثانية في الجين المستهدف (وستؤدي إلى إدخال الطفرة المطلوبة في الموقع المحدد).

5- يُنقل البلازميد (حامل نقطتين من عدم التكامل) إلى بكتريا مضيفة E.coli ذات مورث mutS غير فعال، بسبب طفرة، وهذا المورث يدخل في نظام إصلاح الجدلات غير المتكاملة في DNA (Mismatch repair system). بالتالي تتم مضاعفة البلازميد الحامل لنقطتي عدم التكامل، وينتج من ذلك جزيئين من البلازميد بدون أي نقص في التكامل، أحد هذين الجزيئين يحمل الطفرات المطلوبة (التي تم إدخالها بواسطة بادئي التفاعل، أي الأوليغوتيوكليوتيد) و الآخر مطابق للبلازميد الأساسي.

عنـد انقسـام الخليـة تحصـل الخليـة البنـت علـى أحـد هـذين الجـزئين مـن البلازميد، ثم يتم انتقاء الخلايا التي تحتوي على الطفرة المنشودة من خلال إضـافة الأمبيسـلين إلـى الوسـط الغـذائي، إذ أن حـدوث الطفـرة يـؤدي إلـى استعادة نشاط مورث مقاومة الأمبيسلين.



الشكل 26: الطفرة الموجهة لموقع