تقانــة ال DNA وعلــم الجينات (1)

مقدمة:

لقد تمثلت إحدى أعظم انجازات العلم الحديث في سَلْسَلة تتاليات Sequencing الجينوم البشري الذي استكمل إلى حد كبير بحلول عام 2003. ويشار إلى أن سلسلة تتاليات أحد البكتيريات كانت قد تمت قبل ذلك بثمانية أعوام. وقد سرع الباحثون وتيرة سلسلة تتاليات الDNA البشري في هذه السنوات بالإضافة إلى عملهم على جينومات أخرى عبر ما توفر من عون قدمه تطور آلات سلسلة التتاليات بشكل مطرد.

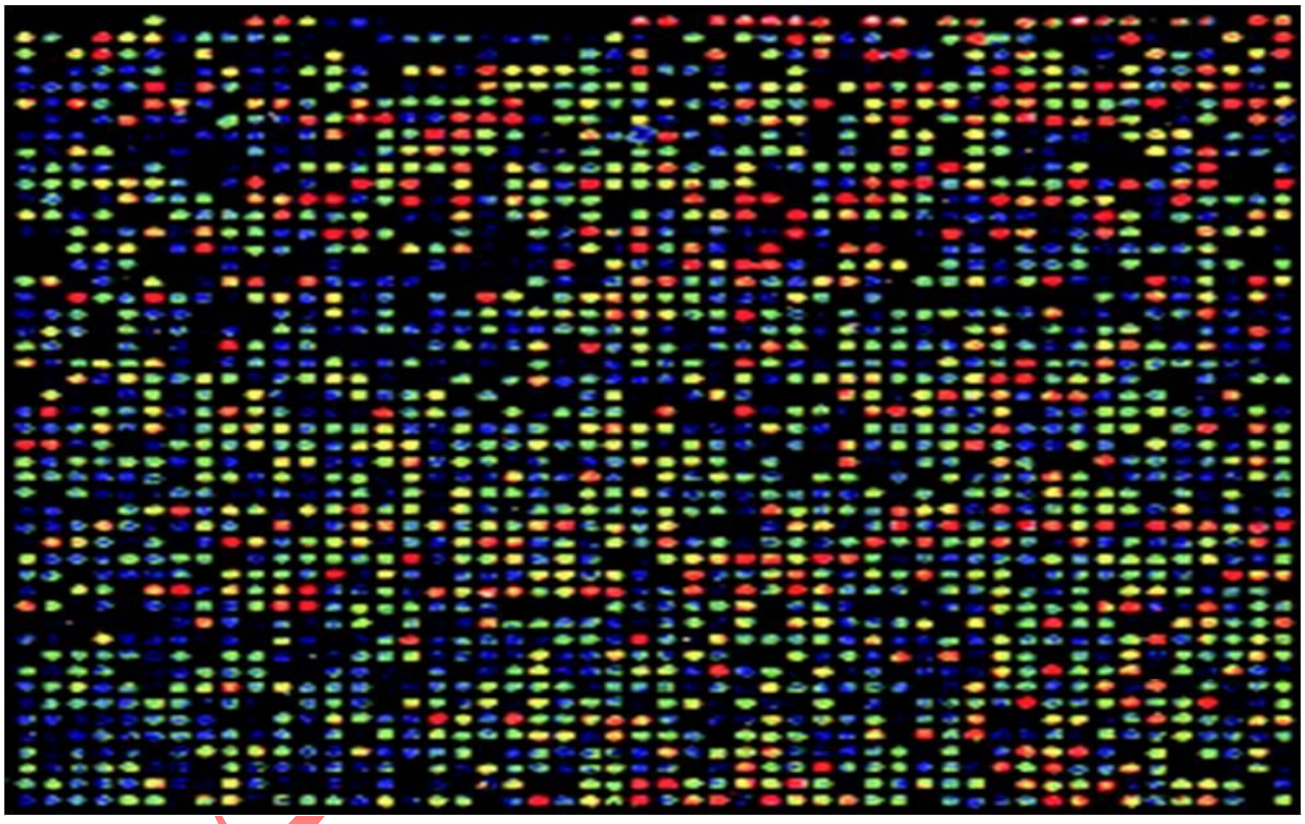
ولا يخفى أن جميع منجزات سلسلة التتاليات هذه قد اعتمدت على ما حققته تقانة ال DNA من تقدم بدءاً من ابتكار طرائق لعمل ال DNA المأشوب recombinant DNA، وهوDNA تندمج فيه تتاليات نكليوتيدية من مصدرين مختلفين (غالبا ما يكونان نوعين من الأحياء مختلفين) في جزيئة **DNA** واحدة وذلك في أنبوب الاختبار.

إن طرائق صنع ال **DNA** المأشوب أمر أساسي في الهندسة الوراثية التي تمثل التدأو ل manipulation المباشر للجينات لأغراض علمية. وتتضمن تطبيقات الهندسة الوراثية صنع مئات من المنتجات البروتينية قبل الهرمونات والعوامل المخثرة للدم. ويستطيع العلماء عبر استخدام تقانة ال **DNA** صنع ال **DNA** المأشوب ومن ثم إدخاله في خلايا مستنبتة cultured cells تقوم بتنسخ replicate ال **DNA** وتعبير express جيناته لتعطي البروتين المرغوب به.

لقد استهلت تقانة ال **DNA** ثورة في مجال التقانة الحيوية biotechnology التي تمثل تداول الكائنات الحية أو مكوناتها لغرض صنع منتجات نافعة. وما الممارسات التي تعود إلى قرون خلت، من أمثال استخدام الميكروبات لصنع الخمور والأجبان والاستيلاد الاصطفائي للأنعام كالمواشي والتي تستغل طفرات طبيعية الحدوث مثلما تستغل التأشيب الجيني، إلا أشكال من التقانة الحيوية.

ويشار هنا إلى التقانة الحيوية المبنية على تداول ال **DNA** في أنبوب الاختبار تختلف عن الممارسات الأقدم منها بكونها تمكن العلماء من تحوير جينات نوعية ونقلها بين كائنات متميزة مثل البكتيريا والنباتات والحيوانات. يجري في هذه الأيام تطبيق تقانة ال **DNA** في مجالات متفاوتة تمتد من الزراعة حتى القانون الجنائي.

وما هو أكثر أهمية أن استخدامها يسمح للعلماء في مجالات البيولوجيا فعليا بمقاربة مسائل قديمة بأسلوب أكثر رشدا. فعلى سبيل المثال، يمكن اليوم قياس مستوى تعبير آلاف من الجينات المختلفة في وقت واحد حسبما يظهر في الشكل (1) بخصوص التصفيف الميكروي microarray.



الشكل (1): مصفوفة من ال DNA تكشف مستويات تعبير 2400 جينة بشرية (صورة مكبرة).

ففي التصوير الضوئي (الفوتوغرافي) يمثل لون كل بقعة التعبير النسبي لواحدة من 2400 جينة بشرية في نسيج معين. ويستطيع العلماء باستخدام هذه التقنية مقارنة التعبير الجيني في نسج معينة أو تحت شروط مختلفة، مع العلم بأن المعارف المكتسبة من مثل دراسات التعبير الشامل هذه لم تكن متاحة إلى حد كبير منذ عهود مضت.

يسمح تنسيل ال DNA (DNA Cloning) بإنتاج نسخ متعددة لجينة نوعية أو لقطعة DNA أخرى:

يواجه علماء البيولوجيا الجزيئية الذين يدرسون جينة معينة بعض التحديات أهمها:

أ- أن جزيئات ال DNA الموجودة طبيعيا تكون طويلة جدا وتحمل الجزيئة الواحدة في العادة جينات عديدة.

ب- علاوة على ذلك، فقد لا تشغل الجينات إلا جزءا صغير من DNA الصبغي في حين يكون الباقي تتاليات نكليوتيدية غير مرمزة noncoding. ونسوق على ذلك مثلا، أن جينة بشرية واحدة يمكن ألا تؤلف أكثر من 100000/1 من جزيئة ال DNA الصبغية.

ت- زيادة في التعقيد فان الفوارق بين الجينة وال DNA المحيط بها تكون دقيقة بحيث لا تتعدى فوارق في تتالية نكليوتيدية.

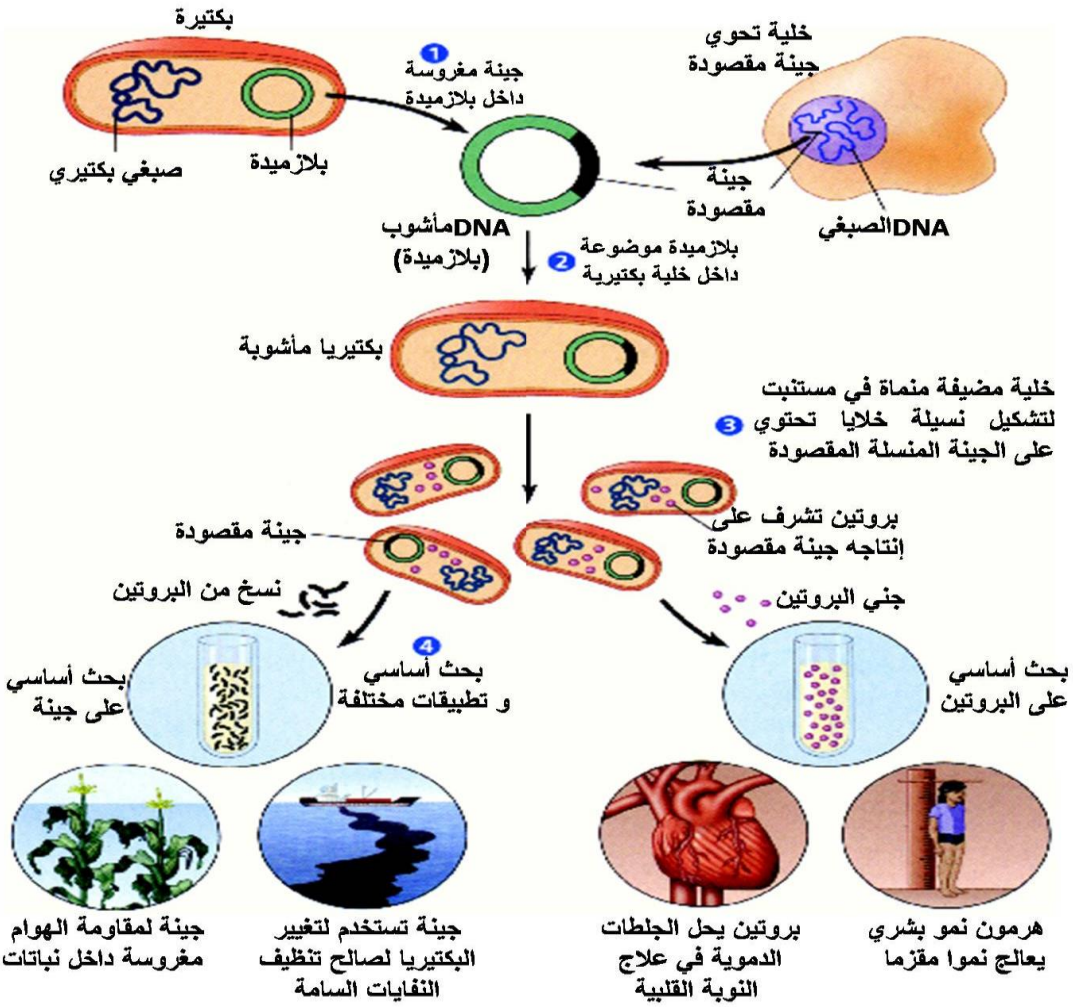
ومن أجل العمل المباشر على جينات نوعية طور العلماء طرائق لتحضير قطع جينية جيدة الحجم والتحديد من ال DNA بشكل نسخ متعددة متماثلة وهي عملية تدعى التنسيل cloning.

1- تنسيل ال DNA وتطبيقاته: نظرة أو لية:

تتشارك معظم طرائق تنسيل ال DNA بنقاط عامة. وتستخدم إحدى المقاربات الشائعة بكتيريا (هي على الأغلب الآيشيرشيا القولونية) وبلازميدات تابعة لها. والبلازميدات البكتيرية هي جزيئات من ال DNA دائرية وصغيرة تتنسخ منفصلة عن صبغي بكتيري.

ومن أجل تنسيل جينات أو قطع أخرى من ال DNA في المختبر، يتم عزل بلازميدة من خلية بكتيرية ثم تغرس فيها قطعة ال DNA الغريبة (الشكل2). فتكون البلازميدة الحاصلة الآن جزيئة من ال DNA المأشوب تجمع DNA من مصدرين اثنين.

وهنا تعاد البلازميدة إلى الخلية البكتيرية فتولد بكتيرية مأشوبة recombinant bacterium تتكاثر بدورها لتشكل نسيلة خلايا متماثلة. وبما أن البكتيريا المتقسمة تنسخ البلازميدة المأشوبة وتمررها إلى ذريتها، فإن الجينة الأجنبية تتنسل في الوقت نفسه، بمعنى أن نسيلة الخلايا تحتوي على نسخ متعددة من هذه الجينة.



الشكل (2): نظرة شاملة على التنسيل الجيني باستخدام بلازميدة بكتيرية، تبين الاستخدامات المختلفة للجينات المنسلة. في هذا الرسم التخطيطي للتنسيل الجيني في المختبر، نبدأ ببلازميدة معزولة من خلية بكتيرية وجينة مقصودة تؤخذ من كائن حي آخر. ولا تظهر إلا نسخة واحدة من البلازميدة ونسخة واحدة من الجينة المقصودة في أعلى هذا الشكل، ولكن مواد البداية يمكن أن تتضمن عدة نسخ لكل منهما.

تفيد الجينات المنسلة cloned لغرضين أساسيين:

أ- صنع نسخ عديدة من جينة معينة بغية إعطاء منتج بروتيني معين. يستطيع الباحثون عزل نسخ من جينة منسلة من البكتيريا من أجل الاستخدام في الأبحاث الأساسية أو من أجل منح

كائن حي ما مقدرة استقلابية جديدة مثل مقاومة الهوام pest resistance . فعلى سبيل المثال يمكن تنسيل جينة مقاومة موجودة لدى أحد أنواع المحاصيل ثم نقلها إلى نباتات نوع حي آخر. ويمكن في خيار آخر، جني بروتين ما ذي استخدامات طبية (مثل هرمون النمو البشري) بكميات كبيرة من مستنبتات بكتيرية تحمل جينة منسلة تخص هذا البروتين.

توجد معظم الجينات المرمزة للبروتينات في نسخة واحدة فقط لكل جينوم، أي بمرتبة جزء واحد لكل مليون جزء من ال DNA. وبذلك فان المقدرة على تنسيل مثل هذه القطع من ال DNA النادرة يعد أمرا في غاية الأهمية.

2- استخدام أنزيمات الاقتطاع في صنع ال DNA المأشوب:

لقد أصبح التنسيل الجيني والهندسة الوراثية ممكنين بفضل اكتشاف أنزيمات تقطع جزيئات ال DNA عند عدد محدد من مواضع نوعية. ويطلق على هذه الأنزيمات اسم أندونكليازات الاقتطاع أو أنزيمات الاقتطاع restriction enzymes، مع الاشارة الى أنها كانت قد اكتشفت في أو اخر ستينيات القرن المنصرم على يد باحثين يدرسون البكتيريا. وفي الطبيعة، تقي هذه الأنزيمات الخلية البكتيرية من ال DNA الدخيلة الآتية من كائنات حية أخرى مثل البلعميات phages أو أنواع أخرى من البكتيريا. أما آلية عملها فتكون عبر قص ال DNA الأجنبي في عملية تدعى الاقتطاع restriction.

لقد أمكن تحديد وعزل مئات من أنزيمات الاقتطاع. ويكون كل من هذه الأنزيمات في غاية النوعية بحيث يتعرف إلى تتالية DNA قصيرة معينة (أو ما يسمى موضع الاقتطاع) ويقطع كلا طاقي ال DNA عند نقاط نوعية داخا موضع التقييد هذا. ويشار إلى أن DNA الخلية البكتيرية تجري وقايتها من أنزيمات الاقتطاع الخاصة بها عن طريق إضافة مجموعات (CH_3^-) إلى أدينينات adenines أو سيتوزينات cytosins داخل التتاليات التي تتعرف إليها هذه الأنزيمات.

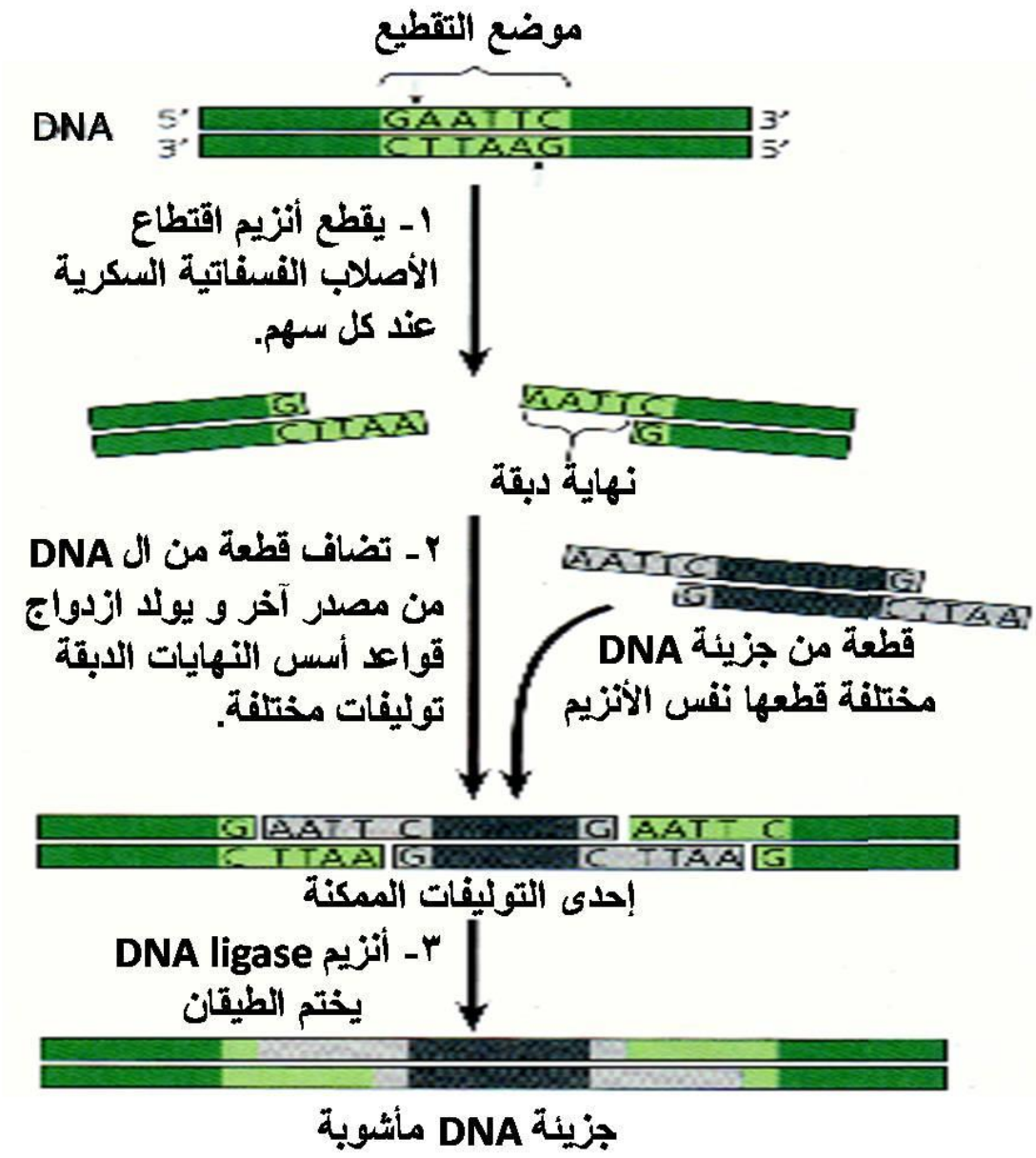
يوضح أعلى الشكل (3) موضع اقتطاع يتعرف اليه أنزيم اقتطاع معين مأخوذ من الايشيرشيا القولونية. وحسبما يظهر في هذا المثال، فان معظم مواضع الاقتطاع تكون متناظرة symmetrical ، بمعنى أن تتالية النكليوتيدات تكون نفسها على الطاقين حينما تقرأ في الاتجاه من 5′ الى 3′. هذا وتتعرف أنزيمات الاقتطاع إلى التتاليات الحأو ية على ما مقداره أربع إلى ثماني نكليوتيدات.

ولما كانت أية تتالية بهذا القدر من القصر توجد (بالصدفة) عدة مرات في جزيئة ال DNA الطويلة، بحيث يعطي مجموعة من شدف (قطع) الاقتطاع. وتعطي على الدوام نسخ جزيئة DNA معينة ما نفس مجموعة شدف الاقتطاع حينما تتعرض إلى أنزيم الاقتطاع نفسه. وبكلمات أخرى يقطع أنزيم الاقتطاع جزيئة ال DNA بطريقة متناتجة (تتكرر نفس النتيجة دائما reproducible).

يشطر أنفع أنزيمات الاقتطاع الأصلاب backbones الفسفاتية السكرية في كلا طاقي ال DNA بطريقة متعاقبة الترتيب مثلما يشير الشكل (3).

وتمتلك شدف الاقتطاع الحاصلة ما لا يقل عن نهاية واحدة وحيدة الطاق تسمى النهاية الدبقة sticky end. وتستطيع هذه الامتدادات القصيرة أن تشكل أزواجا من الأسس المترابطة هدروجينيا ذات نهايات دبقة تتميمية complementaery على أية جزيئات أخرى من ال DNA مقطعة بالأنزيم نفسه.

د. حسان حسن



الشكل (3): استخدام أنزيم اقتطاع وأنزيم DNA ligase لصنع DNA مأشوب. يتعرف أنزيم الاقتطاع في هذا المثال (يدعى EcoRi) إلى تتالية نوعية من ستة أزواج من القواعد (هي موضع اقتطاع) ويصنع تقطيعات مترنحة في الأصلاب الفسفاتية السكرية داخل هذه التتالية، بحيث ينتج شدفا ذات نهايات دبقة. وتستطيع قواعد أي من الشدف ذات النهايات الدبقة التتامية أن تزدوج. فإذا أتت من جزيئات مختلفة من ال DNA يكون الناتج DNA مأشوب.

صحيح أن التوليفات associations المتشكلة بهذه الطريقة تكون مؤقتة فقط، ولكن التوليفات بين الشدف يمكن جعلها مستديمة بواسطة أنزيم ليغاز ال DNA ligase DNA ويحفز هذا الأنزيم تشكيل

روابط تساهمية covalent تغلق close up الأصلاب الفوسفاتية السكرية. وحسبما ترى في أسفل الشكل (3) فإن الربط المحفز بليغا زال DNA من مصدرين مختلفين يولد جزيئة DNA مأشوبة مستقرة.

ان البلازميدة الأصلية التي تدعى موجهة التنسيل cloning vector تعرف بأنها جزيئة DNA تستطيع نقل DNA أجنبية إلى داخل خلية ما والتنسخ هناك. وتستخدم البلازميدات البكتيرية بكثرة كموجهات تنسيل لبضعة أسباب هي:

- سهلة العزل من البكتيريا.
- يمكن مداولتها لتشكيل بلازميدات مأشوبة عبر إدخال DNA أجنبية في أنبوب الاختبار، ومن ثم إعادة إدخالها في الخلايا البكتيرية.
- علاوة على ذلك تتكاثر الخلايا البكتيرية بسرعة وتتضاعف كل DNA أجنبية تحملها تلك الخلايا في هذه العملية.

3- إنتاج نسائل من الخلايا:

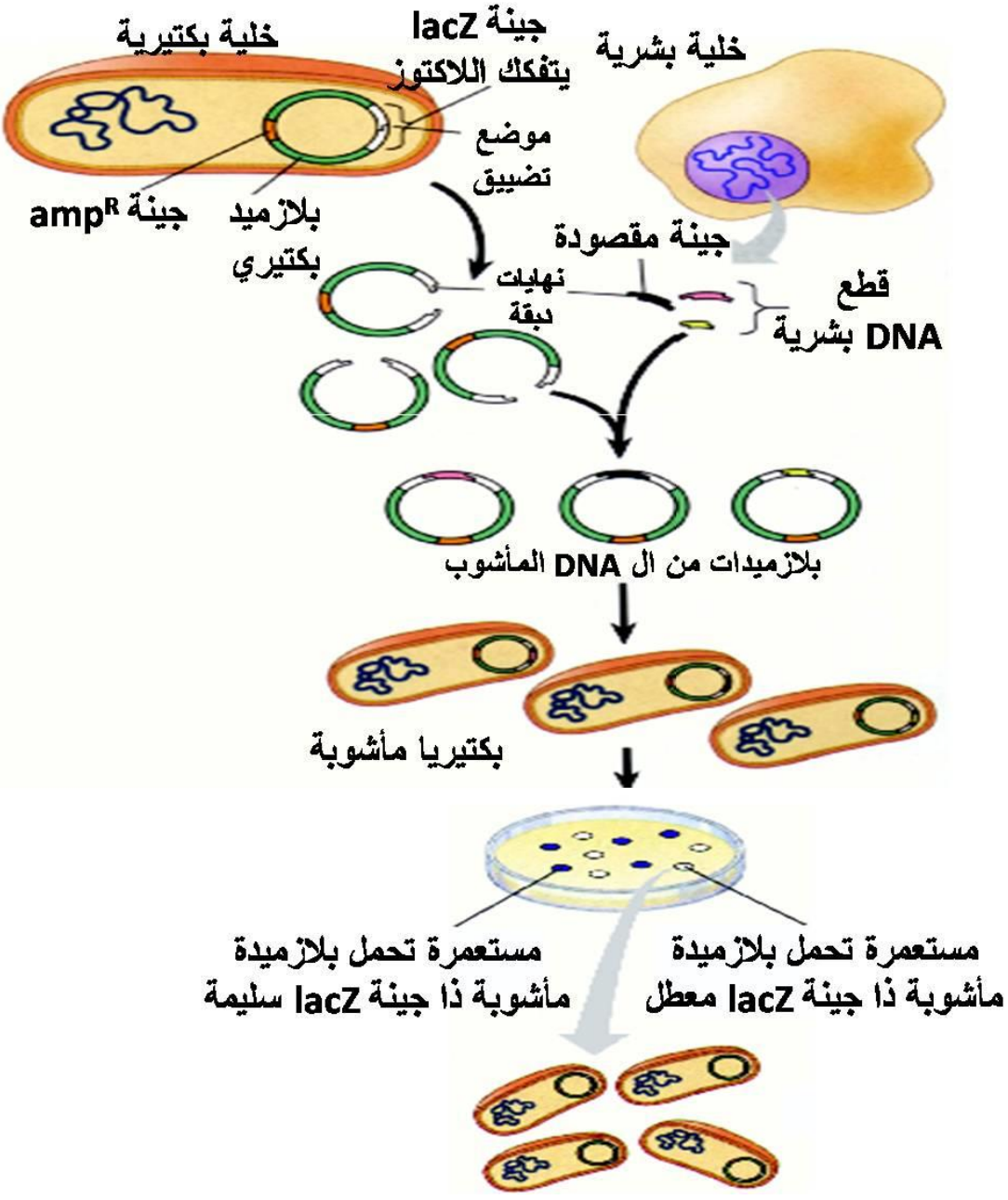
يفصل الشكل (4) إحدى طرائق تنسيل جينة معينة من بشر أو نوع آخر حقيقي النوى وذلك باستخدام بلازميدة بكتيرية كموجهة تنسيل. وتقابل أرقام الخطوات الواردة في النص التالي نظيراتها في هذا الشكل.

1- نبدأ أولا بعزل البلازميدة البكتيرية من خلايا الايشيريشيا القولونية وعزل ال DNA الحاوية على الجينة المعنية من خلايا بشرية تم إعدادها في مستنبت مخبري. وكانت البلازميدة قد تمت هندستها بحيث تحمل جينتين سيثبت نفعهما لاحقا هما:

أ- amp^R (التي تجعل خلايا الايشيرشيا القولونية مقاومة للمضاد الحيوي المسمى الأمبيسللين ampicillin)

ب- lacZ (التي ترمز الأنزيم المسمى بيتا غالاكتوزيداز). فهذا الأخير يحمله hydrolyzes سكر اللاكتوز ومعه مقلد جزيئي تركيبي يدعى (X-gal).

ونشير إلى أن الجينة (lacZ) يوجد بداخلها نسخة واحدة من موضع اقتطاع يتعرف إليه أنزيم الاقتطاع المستخدم في الخطوة القادمة.



الشكل (4): تنسيل جينة بشرية في بلازميدة بشرية.

2- يجري هضم كلا البلازميدة وال DNA البشرية بنفس أنزيم الاقتطاع الذي هو الأنزيم الذي يولد النهايات الدبقة stichy ends. وهنا يقطع الأنزيم DNA البلازميدة عند موضع اقتطاعها الوحيد داخل الجينة lacZ، ولكنه يقطع ال DNA البشرية عند مواضع متعددة، بحيث يولد عدة آلاف من الشدف. وتحمل الجينة إحدى شدف الDNA البشرية الجينة المعنية.

3- بعد ذلك نمزج شدف ال DNA البشرية مع البلازميدات المقطوعة بحيث نسمح ازدواج Pairing القواعد بين نهاياتها الدبقة المتممة. ومن ثم نضيف Ligas DNA الذي يربط على نحومستديم كل بلازميدة مزدوجة القواعد مع شدفة من ال DNA البشرية. وتحوي بعض البلازميدات المأشوبة الحاصلة شدفا من ال DNA البشرية مثل الثلاثة الظاهرة في الشكل (4). ويمكن لهذه الخطوة كذلك أن تولد منتجات أخرى (مثل بلازميدة تحتوي على بضعة شدف من ال DNA البشرية، أو تركيبة من البلازميدتين، أو نسخة من البلازميدة الأصلية غير مأشوبة ومعادة الوصل.

4- تمزج ال DNA المحضرة في الخطوة السابقة مع بكتيريا ذات طفرة في جينتها lacZ بحيث تجعل تلك البكتيريا غير قادرة على حلمهة اللاكتوز. وفي شروط تجريبية مناسبة تأخذ هذه الخلايا ال DNA الأجنبي عبر التحويل (transformation). وتكتسب بعض الخلايا بلازميدة مأشوبة تحمل الجينة المعنية. أما العديد من الخلايا الأخرى فيأخذ بلازميدة مأشوبة تحمل جينة مختلفة أو بلازميدة غير مأشوبة أو شدفة من ال DNA البشرية. وسيتم إقصاء هذه الإمكانيات الثلاثة لاحقا.

5- وفي خطوة التنسيل الفعلية يجري فرش البكتيريا على وسط مغذ صلب (آغار) يحتوي على أمبيسللين وX-gal الذي هو مقلد جزيئي لسكر اللاكتوز. ويتيح لنا استخدام هذا الوسط تحديد هوية الخلايا نسائل الخلايا المحولة transformed ذات البلازميدة المأشوبة.

4- كيف نتعرف الى نسائل الخلايا التي تحمل بلازميدات مأشوبة؟

أو لا: لا تتكاثر سوى الخلايا ذات البلازميدة لأنها وحدها التي تمتلك جينة amp^R التي تمنح المقاومة للأمبيسللين في الوسط. وتشكل كل بكتيرة متكاثرة نسيلة تخصها عبر الانقسامات الخلوية المتكررة بحيث تولد مجموعة كبيرة من الخلايا تحدرت من الخلية الوالدية. وما إن تحتوي النسيلة على 10^5 خلايا حتى ترى على شكل كتلة أو مستعمرة colony على سطح الآغار. وبينما تتكاثر الخلايا يجري كذلك نسخ أو تنسيل كل الجينات الأجنبية المحمولة بواسطة البلازميدات المأشوبة.

ثانيا: يسمح لنا لون المستعمرات أن نميز مستعمرات البكتيريا ذات البلازميدات المأشوبة عن مستعمرات البكتيريا ذات البلازميدات غير المأشوبة. فالمستعمرات التي تحتوي بلازميدات غير مأشوبة ذات جينة lacZ سليمة تكون زرقاء اللون لأنها تولد الغالاكتوزيداز – B الوظيفي الذي يحلمه ال –X gal في الوسط مشكلا منتجا أزرق اللون، وعلى نقيض ذلك لا يتولد الغالاكتوزيداز – B الوظيفي في المستعمرات التي تحتوي على بلازميدات مأشوبة ذات DNA أجنبي مغروس داخل جينة ال lacZ وبذلك ستكون هذه المستعمرات بيضاء.

وإلى حد هذه النقطة تكون العملية قد نسلت عدة شدف (قطع) مختلفة من ال DNA البشرية، وليس فقط الشدفة الواحدة التي يهمنا أمرها. وهنا يتمثل الجزء الأخير والأصعب من تنسيل جينة معينة في تحديد هوية المستعمرة التي تحتوي على تلك الجينة التي تعنينا من بين الآلاف العديدة من المستعمرات التي تحمل القطع الأخرى من ال DNA البشرية.

❖ **طريقة بحث: تنسيل جينة بشرية في بلازميدة بكتيرية** (الشكل 4).

❖ **التطبيق:** يستخدم التنسيل لتحضير عدة نسخ من جينة مقصودة من أجل الاستخدام في سلسلة الجينة لغرض إنتاج البروتين الذي ترمزه وللعلاج الجيني وللبحوث الأساسية.

❖ **التقنية:** في هذا المثال يجري إدخال جينة بشرية مأخوذة من الايشيريشيا القولونية. وتحتوي البلازميدة على الجينة (amp^R) التي تجعل خلايا الايشيريشيا القولونية مقاومة للمضاد الحيوي (أمبسيللين)، ويحتوي كذلك على الجينة (lacZ) التي ترمز الغالاكتوزيداز – بيتا، ويحلمه هذا

الأنزيم الأخير محاكيا جزيئيا للاكتوز هو(X-gal) لشكل منتجا أزرق اللون. ويظهر في هذا الشكل ثلاثة بلازميدات وثلاث شدف من ال DNA البشرية فقط، ولكن قد توجد ملايين النسخ ومزيج من ملايين الشدف من ال DNA البشرية المختلفة في العينات.

1-اعزل بلازميدة من ال DNA من خلايا بكتيرية وDNA من خلايا بشرية حاوية على الجينة المقصودة.

2-قطع كلتا العينتين من ال DNA باستخدام الاقتطاع ذاته، ذلك الأنزيم الذي يعمل قطعا واحدا داخل (lacZ) وعدة قطوع داخل ال DNA البشرية.

3-امزج البلازميدات المقطوعة وشدف ال DNA. بعضها يترابط بواسطة ازدواج القواعد. أضف أنزيم DNA ligase لربطها بعضها مع بعض. تكون النواتج بلازميدات مأشوبة وعدة بلازميدات غير مأشوبة.

4-أدخل في الخلايا البكتيرية التي تملك طفرة في الجينة (lacZ) الخاصة بها. تحت شروط مناسبة سوف تتلقف بعض الخلايا بلازميدة مأشوبة أو جزيئة DNA أخرى عبر الاستحالة transformation.

5-افرش البكتيريا على آغار agar يحتوي على أمبسيللين (X-gal)، ثم احضنها إلى أن تتشكل مستعمرات.

❖ **النتائج:** فقط وحدها الخلية التي التقطت البلازميدة الحاوية على الجينة (amp^R) سوف تكون مستعمرة، إن المستعمرات ذات البلازميدات غير المأشوبة ستكون زرقاء اللون لأنها تستطيع حلمهة ال (X-gal). أما المستعمرات ذات البلازميدة المأشوبة والتي تكون فيها الجينة (lacZ) معطلة ستكون بيضاء لأنها لا تستطيع حلمهة (X-gal). وعن طريق استقصاء المستعمرات البيضاء بمسبار حموض نووية يستطيع الباحثون تحديد نسائل الخلايا البكتيرية الحاملة للجينة المقصودة.

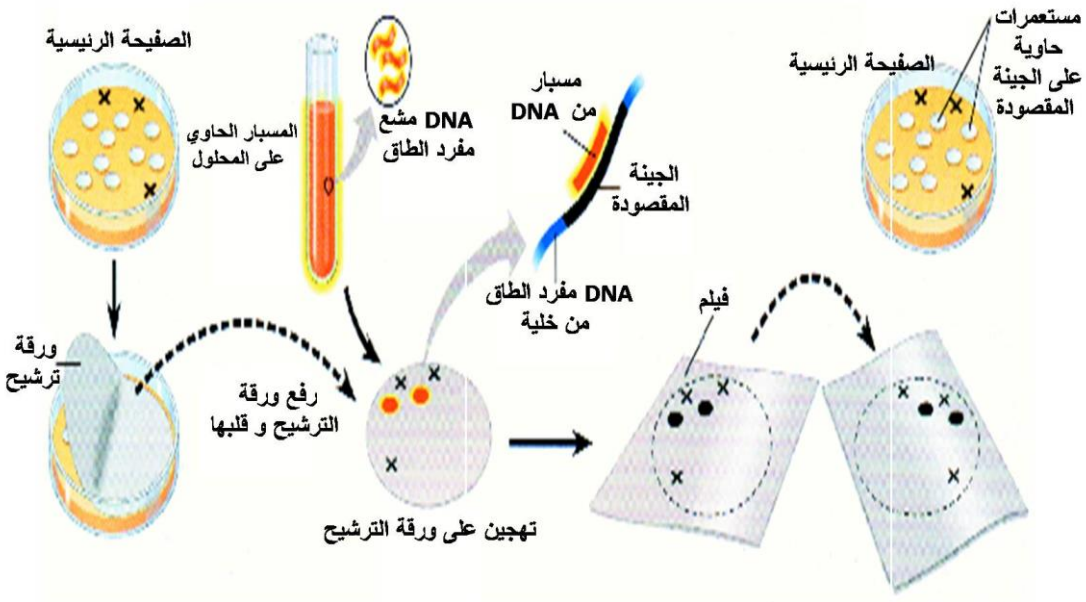
5-تحديد النسائل التي تحمل جينة معنية ما:

من أجل استعراض جميع المستعمرات ذات البلازميدات المأشوبة (أي المستعمرات البيضاء في الطريقة المذكورة أعلاه) بالنسبة لنسيلة خلايا تحتوي على جينة ما معينة، فإننا نستطيع البحث إما عن هذه الجينة نفسها أو عن منتوجها البروتيني. ففي المقاربة الأولى التي نصفها هنا يجري اكتشاف DNA هذه الجينة عبر مقدرتها على مزاوجة القواعد مع تتالية متممة على جزيئة حمض نووي آخر، وهي عملية تدعى تهجين الحمض النووي nucleic acid hybridization.

ونشير هنا إلى أن الجزيئة المتممة هي حمض نووي قصير وحيد الطاق يمكن أن يكون من ال RNA أو ال DNA وتدعى مسبار الحمض النووي nucleic acid probe. فإذا عرفنا جزءاً من تتالية نكليوتيدات الجينة المعنية (ربما من خلال معرفة البروتين الذي ترمزه تلك الجينة أو تتاليتها في جينوم نوع حي وثيق القرابة) فإننا نستطيع اصطناع مسبار متمم لها.

فعلى سبيل المثال، إذا كان جزء من التتالية الكائنة على طاق واحد من الجينة المرغوب بها هو: 5′ GGCTAACTTAGC 3′ فإننا نعمد هنا إلى اصطناع المسبار التالي: 3′ CCGATTGAATCG 5′. ويشار على أن كل جزيئة مسبار تناسب رابطة هيدروجينية لطاق متمم في الجينة المرغوب بها بشكل نوعي ويتم وسمها بنظير مشع أو واصم متفلور بحيث نستطيع تتبعه.

وعلى سبيل المثال، نستطيع نقل قلة من الخلايا من كل مستعمرة بيضاء في الشكل (4- الخطوة 5) على بقعة على صفيحة آغار جديدة والسماح لكل منها بالنمو إلى مستعمرة جديدة. ويبدي الشكل (5) كيف يمكن استقصاء عدد من مستعمرات بكتيرية كهذه في آن واحد بحثا عن وجود DNA متمم ل DNA مسبار. وتتمثل الخطوة الأساسية في هذه الطريقة بما يسمى مسخ DNA denaturation الخلايا بمعنى فصل طاقيه.



الشكل (5): تهجين مسبار حمضي نووي.

وعلى غرار مسخ البروتين يتحقق مسخ ال DNA روتينيا باستخدام مواد كيميائية أو بالحرارة. وما إن نحدد موقع المستعمرة التي تحمل الجينة المرغوب بها، حتى نستطيع إنماء بعض الخلايا من تلك المستعمرة في مستنبت سائلي في وعاء كبير ومن ثم عزل كميات كبيرة من الجينة. وكذلك نستطيع استخدام الجينة المنسلة نفسها كمسبار لتحديد جينات مشابهة أو مماثلة في DNA من مصادر أخرى (مثل أنواع حية أخرى).

❖ **طريقة بحث:** تهجين مسبار حمضي نووي (الشكل 5).

❖ **التطبيق:** يكشف التهجين مع مسبار نووي متمم عن DNA نوعي ما داخل مزيج من جزيئات ال DNA. وفي هذا المثال يجري تقصي مجموعة من النسائل البكتيرية (على شكل مستعمرات) بهدف تحديد النسائل الحاملة لبلازميدة ذات جينة مقصودة.

❖ التقنية: يجري نقل خلايا من كل مستعمرة يعرف أنها تحتوي على بلازميدة مأشوبة (بمعنى المستعمرات البيضاء في الشكل 4) إلى مواقع منفصلة على صفيحة آغار ويسمح لها بالنمولتعطي مستعمرات مرئية. وتمثل هذه المجموعة من المستعمرات البكتيرية الصفيحة الرئيسية.

1-تكبس ورقة ترشيح على الصفيحة الرئيسية بحيث تنقل الخلايا إلى الجانب السفلي من ورقة الترشيح. وتوضع العلامات (Xs) على ورقة الترشيح والآغار لتثبيت موقع كل مستعمرة فردية بالرجوع إلى العلامات.

2-تعامل ورقة الترشيح بهدف تفريق الخلايا وتمسيخ ال DNA الخاص بها. ثم تعامل جزيئات ال DNA الحاصلة ذات الطاق المزدوج على نحو يلصقها بورقة الترشيح. ثم تحضن جزيئات المسبار المشع المتممة لجزء الجينة المقصودة مع ورقة الترشيح. ثم تشطف أزواج القواعد المسبارية probe base-pairs ذات مفردة الطاق مع أية جزيئة DNA متممة على ورقة الترشيح أي فائض في ال DNA (تشاهد في الشكل 5 مستعمرات ذات هجائن مسبارية مشعة من ال DNA بلون برتقالي ولكن قبل أن تصبح مرئية).

3-توضع ورقة الترشيح تحت فيلم فوتوغرافي على نحو يسمح لأية منطقة مشعة بمواجهة الفيلم (تصوير شعاعي ذاتي). إن البقع السوداء الموجودة على الفيلم توافق مواقع ال DNA على ورقة الترشيح وهي المواقع التي تهجنت مع المسبار.

د. حسان حسن

4- وبعد أن يقلب الفيلم المظهر يجري رصف العلامات المرجعية الموجودة على الفيلم والصفحة الرئيسية بحيث يستطاع تحديد مواقع المستعمرات الحاملة للجينة المقصودة.

❖ **النتائج:** لقد تم تحديد مستعمرات الخلايا الحاوية على الجينة المقصودة عن طريق تهجين الحمض النووي ويمكن إنماء الخلايا المأخوذة من المستعمرات الموسومة tagged بالمسبار في حاويات كبيرة ذات وسط نمو سائلي. إن الكميات الكبيرة من ال DNA الحاوية على الجينة المقصودة يمكن عزلها من هذه المستنبتات. وباستخدام مسابر ذات تتاليات نكليوتيدية مختلفة يستطاع تقصي مجموعة النسائل البكتيرية بحثا عن الجينات المختلفة.

6-خزن الجينات المنسلة ضمن مكتبات لل DNA:

تدعى عملية التنسيل الواردة في الشكل (4)، والتي تبدأ بمزج شدف من الجينوم الكامل لكائن حي ما، باسم مقاربة الدفعة الواحدة shotgun approach، حيث لا توجد جينة واحدة يستهدفها التنسيل. هناك آلاف من البلازميدات المأشوبة المختلفة يتم إنتاجها في الخطوة (3)، وتنتهي نسيلة كل منها كمستعمرة (بيضاء) في الخطوة (5). ويشار للمجموعة الكاملة من النسائل البلازميدية التي يكون كل منها حاملا نسخا من قطعة معينة من الجينوم الأولي باسم مكتبة جينومية genomic library (الشكل 6 .أ). وغالبا ما يحصل العلماء على مثل هذه المكتبات (أو حتى جينات منسلة معينة) من باحث آخر أو من مصدر تجاري (يشار له أحيانا باسم "التنسيل بواسطة الهاتف" cloning by phone).

وكذلك تعد عاثيات بكتيرية becteriophages معينة موجهات تنسيل شائعة لصنع مكتبات جينومية، إذ يمكن تضفير splice شدف من ال DNA الأجنبية داخل جينوم عاثية بكتيرية ما، مثلما هي الحال داخل بلازميدة ما، وذلك باستخدام أنزيم اقتطاع وليغاز DNA ligase. وتتمثل ميزة استخدام العاثيات كموجهات vectors في استطاعة العاثية أن تحمل قطعة دخيلة من ال DNA (DNA insert) أكبر من البلازميدة البكتيرية.

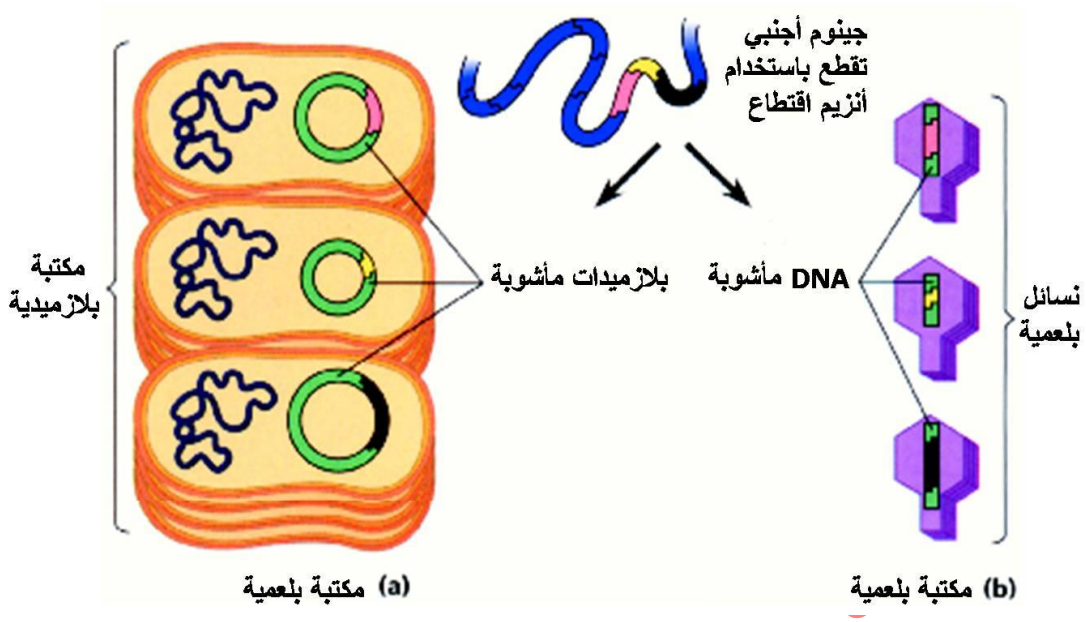
ويجري رزم DNA العاثية المأشوبة داخل قفيصات capsids في أنبوب الاختبار وإدخاله في خلية بكتيرية خلال عملية عدوى infection عادية. وهنا يتنسخ DNA العاثية ويولد جسيمات عاثية جديدة يحمل كل منها ال DNA الأجنبي.

ويجري اختزان المكتبة الجينومية المصنوعة باستخدام العاثية كمجموعة نسائل من العاثيات (الشكل 6 .ب). وبما أن أنزيمات الاقتطاع لا تتعرف على حدود الجينة، فإن بعض الجينات في أي من أنماط المكتبة الجينومية سيتعرض للتقطيع والتوزع بين نسيلتين أو أكثر.

هذا ويستطيع الباحثون صنع نوع آخر من مكتبة ال DNA عبر البدء ب RNA مرسال مستخلص من خلايا. ويستخدم إنزيم النسخ العكسي (ترنسكربتاز) الذي يتم الحصول عليه من الفيروسات القهقرية retroviruses في أنبوب اختبار لصنع نواسيخ من ال DNA وحيدة الطاق من جزيئات ال RNA المرسال. وبعد التدرك الأنزيمي لل RNA المرسال يصنع إنزيم DNA polymerase طاقا ثانيا من ال DNA يتمم الطاق الأول.

ومن ثم يجري تحوير هذا ال DNA والطاق المزدوج الذي يدعى باسم " ال DNA المتمم complimentary DNA (cDNA) عبر إضافة تتاليات تتعرف الى إنزيم الاقتطاع عند كل نهاية. وأخيرا يجري إدخال ال DNA المتمم (cDNA) ضمن DNA موجه (vector DNA) بطريقة تشبه إدخال قطع ال DNA الجينومية.

د. حسان حسن



الشكل (6): مكتبات جينومية. تمثل المكتبة الجينومية مجموعة من عدة نسائل بكتيرية أو بلعمية تحتوي كل منها على نسخ من قطع DNA معينة مأخوذة من جينوم أجنبي. وتغطي قطع ال DNA الأجنبية في المكتبة الجينومية الكاملة الجينوم الكلي لكائن حي ما. (a): تظهر في الشكل ثلاثة من آلاف الكتب في مكتبة بلازميدية ما. ويمثل كل كتاب نسيلة خلايا بكتيرية يحتوي على نسخ من شدفة جينومية أجنبية (القطع الوردية والصفراء والسوداء) في البلازميدة التابعة لها. (b): تظهر نفس القطع الجينومية الأجنبية الثلاثة في ثلاثة كتبمن مكتبة بلعمية phage library.

وبالمناسبة فقد كان ال RNA المرسال مزيجا من جميع جزيئات ال RNA المرسال في الخلايا المستخدمة التي جرى انتساخها من جينات مختلفة عديدة. ولذلك، تؤلف قطع ال DNA المتممة المنسلة مكتبة تحتوي على مجموعة من الجينات. ولكن مكتبة ال DNA المتممة (c DNA library) لا تمثل إلا جزءا من الجينوم (وهو فقط طاقم الجينات التي جرى انتساخها إلى RNA مرسال في الخلايا الأصلية.

لكل من المكتبة الجينومية ومكتبة ال DNA المتممة ميزاتها وذلك حسب موضوع الدراسة. فإذا أردنا تنسيل جينة ولكن لسنا متأكدين من نمط الخلية التي تعبر فيه تلك الجينة عن نفسها، أو أننا غير قادرين على الحصول على ذلك النمط الخلوي، فإن المكتبة الجينومية تحتوي بالتأكيد على تلك الجينة.

وكذلك، إذا كنت مهتما بالتتاليات التنظيمية regulatory sequences أو الأنترونات المرافقة لجينة ما، فإن المكتبة الجينومية تكون مطلوبة لأن هذه التتاليات تغيب من قطع ال RNA المرسال الكاملة المعالجة التي تستخدم في صنع مكتبة ال DNA المتممة. ولهذا السبب بالذات، فإنك إذا كنت مهتما بالتتالية المرمِّزة لإحدى الجينات فحسب، يمكنك الحصول على نسخة مجردة stripped –down لهذه الجينة من مكتبة ال DNA المتممة.

وكذلك تفيد هذه الأخيرة في دراسة الجينات المسئولة عن الوظائف المتخصصة لنمط خلوي معين مثل خلايا الدماغ أو خلايا الكبد. وأخيرا يمكن تتبع التغيرات في نماذج التعبير الجيني أثناء التشكل والنماء development وذلك عن طريق صنع ال DNA المتمم من خلايا النمط ذاته في أزمنة مختلفة لحياة كائن حي ما.

د. حسان حسن