تحديد تتابع نيوكليوتيدات الدنا DNA- Sequencing

تعد تقنية تحديد تتابعات الدنا واحدة من اهم تقنيات الهندسة الوراثية فمن خلالها اصبح ممكناً التعرف على تتابع النيوكليوتيدات لقطعة دنا معينة بدقة بالغة، ومما لاشك فيه ان هذه التقنية اضفت بعدا جديدا لعلم البايولوجي الجزيئي وكشفت الكثير من الاسرار التي تحيط بجزيئة الدنا، كما امكن من خلالها التعرف على طبيعة العدبد من الجينات المكلونة وخواصها.

هناك طريقتان رئيسيتان لتحديد تتابع النيوكليوتيدات، طور الاولى سنجر و كولسون Sanger and Coulson وتدعى طريقة ايقاف السلسلة chain termination، اما الثانية فقد طورها ماكسام وجلبرت Maxam and Gilbert ويطلق عليها اسم طريقة التحلل الكيمياوي chemical degradation. تشترط الاولى كلونة الدنا المرغوبة في احد النواقل المشتقة من العاثي M13 للحصول عليها بشكل خيط مفرد، وهي اكثر استخداماً من الطريقة الثانية، اما الطرق الحديثة التي ابتكرت في العقد الاخير المعتمدة كليا على اجهزه متطورة جدا وذات مواصفات خاصة الا ان اساسها لا يزال يعتمد على هاتين الطريقتين.

اولا: طريقة سنجر و كولسون (ايقاف السلسلة):

Sanger and Coulson (chain termination):

تشترط هذه الطريقة ان تكون قطعة الدنا المرغوب تحديد تتابعاتها على شكل خيط مفرد لكي تستخدم بمثابة قالب لبناء الخيط الثاني بواسطة انزيم *DNA Polymerase* ، لذا تكلون قطع الدنا الهدف في احد نواقل العاثي M13 للحصول عليها بشكل خيط مفرد ملائم لاجراء هذه العملية.

وتعتمد هذه الطريقة على استثمار خاصيتين من خصائص انزيم *DNA Polymerase* الاولى هي قابليته على بناء خيط جديد مكمل للخيط المكلون (القالب) عن طريق اضافته للنيوكليوتيدات الجديدة واحدة تلو الاخرى حسب قاعدة واطسن وكريك، اما الخاصية الثانية فهي قابليته على استعمال الداى دى أوكسى نيوكليوتيداتdideoxy nucleotides 2,3 كمادة اساس في بناء الخيط الجديد، وهي :

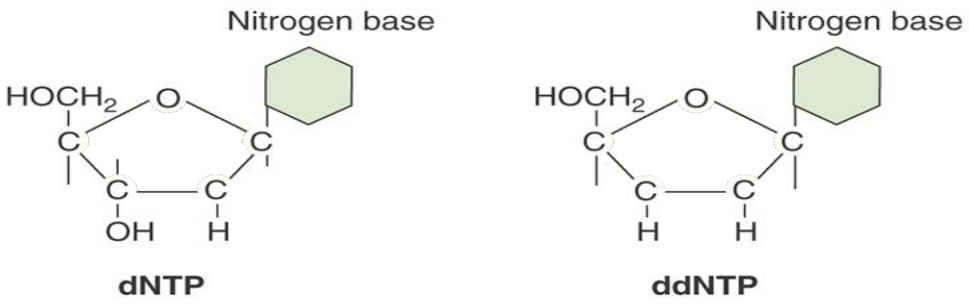
Dideoxy thymidine triphosphate (ddTTP)

Dideoxy cytidine triphosphate (ddCTP)

Dideoxy adenosine triphosphate (ddATP)

Dideoxy guanosine triphosphate (ddGTP)

ان هذه المادة هي من مشابهات مولدات النيكليوتيدات دى أوكسى نيوكليوتيدات dideoxy nucleotides التي يستخدمها الانزيم عادة في بناء الخيط الجديد وبما انها تفتقر الى مجموعة الهيدروكسيل في الموقع 3 للسكر الخماسي فإذا ما ارتبط أى من هذه الجزيئات فى شريط DNA فإنه يتعذر بعد ذلك أرتباط أي دى أوكسى نيوكليوتيدات لاحق، وبذلك تقف عملية نمو الشريط DNA عند هذا الحد. (الشكل 1).



الشكل (1): مولدات نيوكلوتيدات من النوعين dNTP, ddNTP

الخطوات الأساسية للكشف عن تتابع الجزيئات المكونه للمادة الوراثية بطريقة سنجر و كولسون:

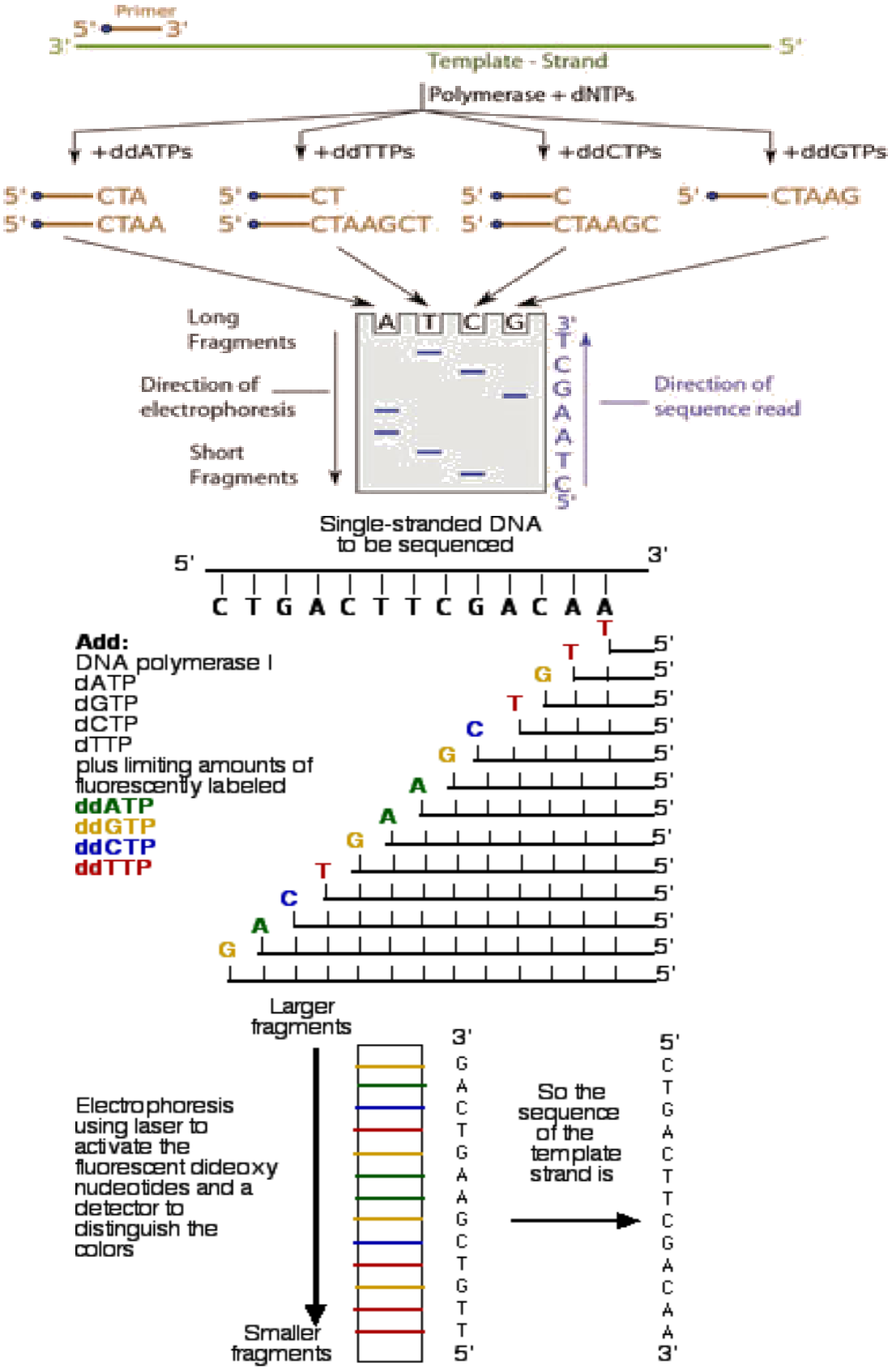
1. اضافة قطعة الدنا القالب DNA template والواجب ان تكون مفردة الخيط single strand .
2. اضافة بادئ Primer ذي نهاية حرة من نوع 3–OH مخلق كيماويا ومكمل للتابع المجاور لقطعة الدنا المكلونه في الناقل (يمكن الحصول عليه تجاريا حيث تتوفر ازواع مختلفة ملائمة للاستعمال مع النواقل M13 المختلفة). (الشكل 2).
3. اضافة النيوكليوتيدات من نوع الدى أوكسى نيوكليوتيدات الأربعة dNTPs معلمة اشعاعياً.
4. أضافة انزيم بلمرة الدنا نوع Klenow fragment الذي يتألف من وحدتين الاولى الامامية مسؤولة عن بناء خيوط الدنا اما الجزء الاخير فيكون مسؤولا عن تحطيم الدنا، اي لهذا الانزيم نشاطين بنائيpolymerase بأتجاه من 5– الى 3– ونشاط انزيمي exonuclease من 3– الى 5–.
5. يقسم خليط التفاعل الى اربعة انابيب متساوية الكميات والتراكيز.
6. اضافة النيوكليوتيدات الداى دى أوكسى نيوكليوتيدات ddNTP كل نوع الى انبوبة معينة وليكنddATP الى الانبوبة الاولى و ddTTP الى الانبوبة الثانية و ddCTP الى الثالثة و ddGTP الى الانبوبة الاخيرة.
7. من الجدير بالذكر أن البادئ سيحتوي على مجموعة (OH) عند ذرة الكربون رقم (3) لجزئى السكر مما يساعد على أرتباط أحد جزيئات النيوكليوتيدات المزود بها التفاعل– وبذلك سيبدأ تخليق شريط جديد أمام كل شريط قديم وسيتوالى ترتيب النيوكليوتيدات الجديدة فى بناء الأشرطة الجديدة ولكن عملية بناء أى شريط ستتوقف إذا أخذ جزئ داى أوكسى نيوكليوتيد فى بناء الشريط الجديد وحدوث هذا الاحتمال الأخير يتم عشوائيا ويؤدى ذلك إلى أن القطع الجديدة ستكون مشعة ومتفاوتة فى أطوالها ولكن كل منها ينتهى بالداى دى أوكسى نيوكليوتيد في الطرف 3–. وبها وبعد انتهاء التفاعل في الانابيب الاربعة سنحصل على خليط من الدنا الجديدة المختلفة الاطوال

التي تحتوي جميعاً على نفس النيوكيوتيد في الطرف –5 ولكنها تختلف في الطرف –3، حيث تنتهي قسم منها بـ ddATP وقسم اخر بـ ddTTP وهكذا.

8. تؤخذ قطع الـ DNA الناتجة عن عمليات المضاعفة الأربع ويجرى لها فصل كهربائى باستخدام ألواح الجيلاتين نوع بولي اكريلامايد، وهذا يتم بعمل أربع حفر wells متجاورة فى لوح الجيلاتين – ليوضع فى كل حفرة قطع DNA التى تنتهى شرائطها بأحد الداى دى أوكسى نيوكليوتيدات ويحضر بطريقة تسمح بفصل حزم الدنا حتى لو كانت مختلفة بمقدار نيوكليوتيد واحد في الطول، وغالبا ما يستعمل لهذا الغرض هلام رقيق جدا (اقل من 0.5 ملم) كما يضاف للهلام المستعمل مادة اليوريا التي تعمل على مسخ الدنا وفصل الخيوط الجديدة عن القالب المكلون في الناقل.ولأجل منع الخيوط الممسوخة من الارتباط مع بعضها مرة اخرى يجب رفع درجة حرارة الهلام الى 60 م° او اكثر ويتم لك عن طريق اجراء الترحيل الكهربائي بااستخدام فولتية عالية. ثم يتم تصوير الهلام بطريقة الاشعاعي الاتي Autoradiography.

9. تتسم قراءة الهلام او صورة الهلام لتحديد تتابع النيوكليوتيدات بسهولة حيث يتم اولا تحديد الحزمة المهاجرة لأطول مسافة وهي تمثل اصغر قطعة دنا مخلقة في الخليط، وهذا يعني ان نمو هذه القطعة قد توقف عند النيوكلوتيد الاول للقالب (أي ان شبيه المولد قد اضيف مقابل النيوكلوتيد الأول للقالب).

10. اذا اخدنا الشكل ادناه كمثال على هذه الحالة نلاحظ ان اصغر حزمة تقع في المجال C الذي يحتوي على ddCTP مما يعني ان النيوكلوتيد الاول في الخيط الجديد هو من نوع C. الخطوة الثانية هي تحديد موقع الحزمة المهاجرة بمسافة اقل من الاولى وتعيين المجال الذي تحركت فيه والتي تكون اطول من الحزمة الاولى بمقدار نيوكلوتيد واحد فقط. كما يلاحظ من الشكل ادناه موقع هذه الحزمة في المجال T ايضا مما يشير الى ان النيوكلوتيد الثاني في الخليط الجديدهو من النوع T. اما الحزمة الثالثة من ناحية مسافة الهجرة فتقع في المجال A (الذي يحتوي على ddATP) وبهذا سيكون النيوكلوتيد الثالث من نوع A وهكذا تستمر القراءة لتحديد مواقع الحزم ومجال حركتها لمعرفة تتابع النيوكلوتيدات بالكامل.



الشكل (2): مخطط لطريقة سنجر وكولسون لتحديد تتابع نيوكليوتيدات قطعة دنا.

طريقة ماكسام وجلبرت (طريقة التحلل الكيمياوي):

على الرغم من ان هذه الطريقة لاتستوجب استعمال نواقل الكلونة المشتقة من العاثي (**M13**) الا اننا سنتطرق لها لاستكمال الصورة حول تقنيات تحديد تتابع النيوكلوتيدات و ليمكن القارئ من ان يقارن بينها وبين طريقة سنجر و كولسون.

تختلف هذه الطريثة عن سابقتها اختلافا جوهريا في كيفية تحديد التتابعات فهي تعتمد على تكسير خيط الدنا بشكل مدروس بدلا عن بناء خيط جديد كما هي الحال في الطريقة الاولى.

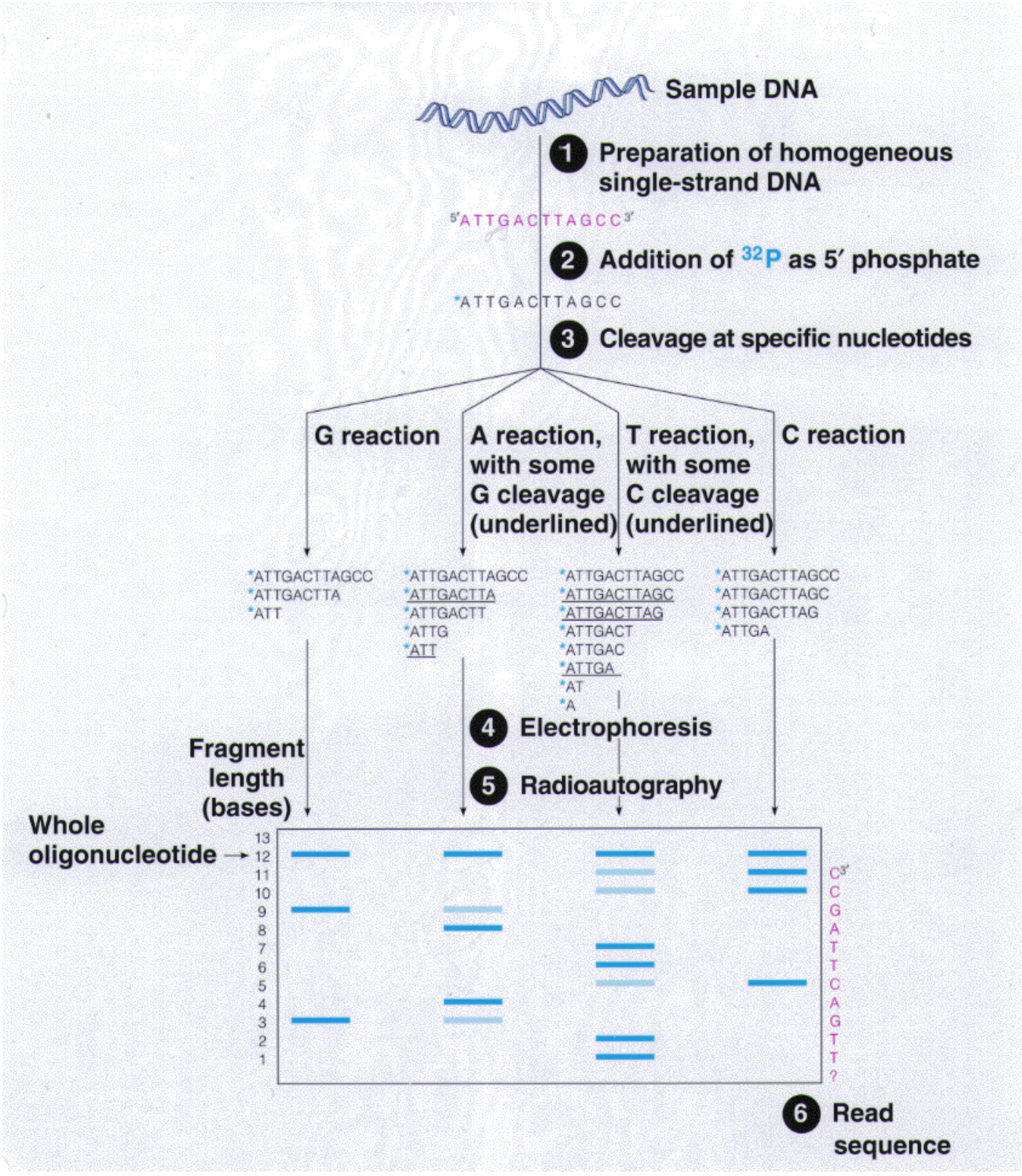
تتم عملية تكسير الخيوط باستخدام مواد كيماوية معينه تعمل بصورة متخصصة على القواعد النتروجينية المختلفة. فكل مجموعة من هذه المواد الكيماوية تعمل على تكسير خيط الدنا عند نوع معين من القواعد النتروجينة منتجة بذلك خليطا من الخيوط التي تختلف بأطوالها بمقدار نيوكلوتيد واحد وبعد فصل هذه الخيوط على هلام البولي اكريلامايد يمكن تحديد تتابع النيوكلوتيدات بصورة دقيقة. تجري عملية القطع بمرحلتين حيث تضاف في المرحلة الاولى مواد كيمياوية تعمل على تحوير نوع معين من القواعد النتروجينية وعند اضافة مادة كيمياوية ثانية ستعمل على قطع خيوط الدنا في مواقع تلك القواعد المحورة، تعمل مادة السلفات ثنائية المثيل Dimethyl sulfate مثلا على تحوير القاعدة **G** عن طريق اضافة مجموعة مثيل الى الموضع **N7** من هذه القاعدة وبهذا سيكون خيط الدنا قابلا للكسر عند هذه القاعدة بعد اضافة مادة ثانية مثل الببريدين **Piperidine**, وهكذا لبقية انواع القواعد النتروجينية.

الخطوط العريضة لهذه التقنية هي ان تعلم اولا قطعة الدنا مزدوجة الخيط قيد الدرس بإضافة مجموعة فوسفات معلمة بـ P^{32} الى الطرف 5 لكل خيط من خيطي الحلزون، الخطوة الثانية هي فصل خيطي الحلزون عن بعضها باضافة Dimethyl sulphoxide (DMSO) وتسخين الخليط

الى 90 م° حيث تودي هذه المعاملة الى تكسير الاواصر الهيدروجينة التي تربط خيطي الحلزون. يستخدم بعد ذلك الترحيل الكهربائي في هلام البولي اكريلامايد لفصل خيطي الحلزون والحصول على احدهما بصورة نقية. وعلى الرغم من ان خيطي الحلزون متماثلان بالطول الا انهما يختلاف في الثقل وذلك لان احدهما سيكون غنيا بالبيورينات A,G فيما يكون الاخر غنيا بالبرميدينات C,T وبما ان البيورينات هي اثقل من البرميدينات فان الخيط الاول سيكون اثقل من الثاني وبالتالي سيتحرك الى مسافة اقل على الهلام. تستخلص حزمة الخيط الثقيل (المعلم اشعاعيا في الطرف 5) من الهلام وتقسم الى 4 اجزاء، يستعمل كل واحد منها لتعيين مواقع نوع معين من القواعد النتروجينية فيستعمل الجزء الاول على سبيل المثال لتحديد موقع كل **G** وذلك باضافة مواد كيمياوية تعمل على تحوير هذه القاعدة ومن ثم كسر الخيط عند الموضع المحور، علما ان ظروف التفاعل يجب ان تضبط بحيث لا يزيد عدد الكسور في الخيط على واحد او

اثنين، سينتج عن عملية التكسير مجموعة من الخيوط المختلفة الاطوال تنتهي جميعا بالقاعدة **G** في الطرف 3، تكرر العملية مع الاجزاء الثلاثة الاخرى باستعمال مواد كيمياوية خاصة لكل قاعدة نتروجينية بحيث تقطع خيوط الدنا في كل جزء عند مواضع قاعدة نتروجينة معينة. بعد انتهاء التفاعل للاجزاء الاربعة ستتكون مجموعة من خيوط الدنا المختلفة الاطوال التي تشترك جميعا بنفس النيوكلوتيد في الطرف 5 (المعلم اشعاعيا) ولكنها تختلف في الطرف 3, فقسم منها ينتهي بالقاعدة **G** وقسم اخر بالـ **A** .... الخ.

تفصل الخيوط المفردة لكل تفاعل حسب اطوالها على هلام البولي اكريلامايد وتحدد مواقع الحزم المشعة بواسطة التصوير الاشعاعي الذاتي الذي يقرأ فيما بعد لتحديد تتابع النيوكلوتيدات وبنفس الاسلوب المتبع في طريقة سنجر وكولسون (الشكل 3) .



الشكل (3): مخطط لطريقة ماكسام وجلبرت لتحديد تتابع نيوكليوتيدات قطعة دنا.