المرحلة الثالثة – التقانات الاحيائية

نقل الجين الى الجينوم Transformation

هناك طرق عديدة لنقل الجين المعزول وادخالها في جينوم الكائن المرغوب هندسته نوجزها في التالي :

ا- النقل بواسطة بكتيريا *Agrobacterium tumefaciens*

اول نظام لهندسة النباتات وراثيا وهو الاوسع استخداما هو نقل الجين المرغوب الى النبات باستخدام قدرة البكتيريا *Agrobacterium tumefaciens* الممرضة في نقل جزء من DNA الى خلايا النبات وتقوم البكتيريا بنقل جزء من DNA لديها (او الخاص بها) تسمى Transferred DNA(tDNA) بالاندماج بكروموسومات النبات المصاب لتدفعه الى انتاج الهرمونات النباتية لترفع مستواها في تلك الخلايا الى المستوى الذي يؤدي الى سرعة تكاثر الخلايا وتكوين كتل من الخلايا والتي تعرف بالتورد القمي Grown Gall (شكل ٢) .

ليصبح هذا التورد مكان صالحا وبيئة ملائمة ومصدر غذائي لتلك البكتيريا فيما يعرف بمرض التورد القمي ولكي تكون تلك البكتيريا فعالة كأداة للنقل الجيني لابد من استئصال جيناتها المسببة للمرض بمعنى نزع سلاحها disarming . ولقد نجح Mary Dell Chilton سنة ١٩٨٣ واخرون من شركة مونسانتو وجامعة واشنطن من استئصال الجينات الممرضة دون المساس بالية نقل DNA وبالرغم من بساطة الطريقة ودقتها الا ان كثير من المحاصيل من بينها محاصيل الحبوب مثل الارز والقمح والذرة ليست من عوائل الاجروبكتريوم لذلك تم البحث عن نظم بديلة .

ب- دمج الجينات الى خلايا البروتوبلاست Competent Cells Technique

في هذه التقنية يزال جدار الخلايا لان ثقوب الخلية الموجودة بجدار الخلية اصغر من ان تسمح لـ DNA بان تمر بسهولة اما عندما يزال الجدار فلن يعيق نقل DNA سوى الغشاء البلازمي والذي يمكن لمركب عضوي مثل البولي اثيلين جليكول (PEG) من تسهيل اختراق DNA للغشاء البلازمي ومن اكثر العوامل المساعدة شيوعا في اداء هذا العمل كما يمكن دمج DNA في خلايا البروتوبلاست بواسطة الثقب الكهربي Electroporation وفي هذه الطريقة تقوم النبضات كهربائية قصيرة بأحداث ثقوب سريعة الزوال في غشاء الخلية العارية يمكن ان تمر جزئيات DNA من خلالها لكم تلك التقنية اي عزل البروتوبلاست وجد انها تقنية صعبة في كثير من الحبوب وينتج عنها نباتات عقيمة .

ج- طريقة الحقن المجهري Microinjection Technique

تتم هذه الطريقة باستخدام ابر خاصة لحقن المادة الوراثية داخل نواة الخلية تحت مايكروسكوب خاص يسمى Micro manipulator واستخدمت تلك الوسيلة في نقل DNA ولكن وجد انها تقنية غير عملية لأسباب عدة منها ان طرف الابرة المستخدمة عادة ما ينسد او ينكسر كما ان ادخال DNA للخلايا عملية مجهدة ولا تلائم العمل التجاري ولأيمكن بها ضمان التحام الجين المنقول الى جينوم الخلية (شكل ٣) .

شكل: الحقن المجهري

د- تقنية المسدس الجيني Gene Gun Technique

وهي طريقة لقذف الخلايا النباتية بالمادة الوراثية المنقولة بعد تغليفها لجسيمات معدنية فلزية ذات اقطار ١-٢ ميكرون مثل كريات الذهب . يتم قذف تلك الجسيمات بسرعة عالية باستخدام المسدس الجيني لتخترق طلاقاته جدار الخلايا وتنقل الجين المرغوب (شكل ٤) .

شكل ٤: تقنية قاذفات الجسيمات الدناوية DNA

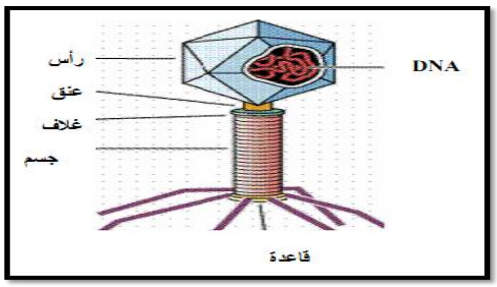
ونظرا لان الثقوب التي يحدثها القذف السريع صغيرة للغاية فهذه الثقوب تكون مؤقتة ولا تعرض سلامة الخلايا للخطر ويتكون المسدس الجيني من قاذف خرطوشي عيار ٠.٢٢ مم كقوة دافعة يحتوي على بارود

هـ - النقل بالفاج Phage Transportation

سميت ظاهرة انتقال صفة وراثية من خلية بكتيرية الى خلية بكتيرية اخرى بواسطة الفاج باسم النقل بالفاج Transudation حيث تندمج قطعة من كروموسوم بكتيري داخل جسم الفاج وعندما يغزو الفيروس خلية عائل جديد فان الخلية المستقبلة تنقل على كروموسومها القطعة التي في حوزة الفيروس ومن اشهرها Lambda phage (شكل ٥) .

فعند مهاجمة هذا الفيروس لبكتيريا القولون فان الخلايا تظل فترة وهي في طور القدرة الكامنة للتحلل Lysogenic حيث تحتوي على نسخة من DNA الفيروس المندمج مع كروموسوم الخلية فاذا ما عرضت الخلايا الى الحث Induction فان الفيروس قد ينفصل عن كروموسوم الخلية من نفس النقطة التي اتصل بها بالكروموسوم بعملية عكس عملية الاندماج ليبدا في مضاعفة نفسه وتكوين الفيريونات الكاملة .

قد تنفجر ولكن في حالات اخرى لا ينفصل الفاج الاولى من نفس نقطة الاتصال بل من اماكن اخرى لذا تحتوي حلقته على DNA الفيروس مضافا الية قطعة من كروموسوم الخلية فاذا احتوى الفيروس على الجين الكلاكتوز سمى الفيروس باسم فاج لامبدا الكلاكتوز حيث ان كمية DNA التي يمكن تعبئتها في الغطاء البروتيني للفاج ثابتة ومحددة فان اضافة موروث الكلاكتوز تعنى بالضرورة استبعاد جزء من مورثات إلفاج لامبدا من ناحية اخرى مما يؤدي الى نقصها لصفات وراثية وهو يفسر عدم القدرة على الحصول على فاج يحتوي على اكثر من موروث او جين واحد .



شكل ٥: النقل بالفاج لامبدا

مبادئ تقنية تضاعف البلمرة المتسلسل

Principle of Polymerase Chain Reaction (PCR) Technique

تحفظ المعلومات الوراثية وانتاج المواد لصنع الخلايا والحفاظ عليها في داخل الحمض النووي (DNA). و تقوم الخلية بمضاعفة كمية الحمض النووي وقت انقسام الخلية بشكل تلقائي وبشكل سريع مع وجود نظام تصحيح للأخطاء خلال النسخ. و تبلغ سرعة النسخ والمضاعفة إلى ١٠٠٠ قاعدة نيتروجينية بالثانية (داخل النظام الحيوي) وهي كما ذكرنا تحدث في الخلية في وقت التكاثر والانقسام فقط .

ان الانجاز الذي قام به Karry B. Mullis في منتصف الثمانينات (1980s) حل كثير من المشاكل والصعوبات التي كان يعانيها الباحثون في مجال البايولوجي الجزيئي فيمكن باستخدام هذا التفاعل انتاج نسخ من الدنا الهدف خارج الخلية In Vitro وخلال ساعات وبكميات كبيرة والتي قد تستغرق اياما او اسابيع لانتاجها باستخدام التقنيات الاخرى مثل الكلونة للجين Gene cloning فمثلا خلال ٢٥ دورة في PCR يمكن مضاعفة الدنا الهدف ثمانية ملايين مرة وخلال ساعات قليلة يمكن عمل بلايين النسخ منه. واهم ميزة للPCR هو إن التتابع من الدنا المراد دراسته (Target) لا يحتاج إلى عزله من باقي الجينومِ Genome لكن يمكن عزله بعد إجراء تفاعل PCR وذلك بترحيل الناتج على هلام الاكاروز وكذلك فان كمية الدنا اللازمة لإجراء التفاعل ممكن أنْ تكون قليلة جدا بقدر كمية الدنا في خلية واحدة .

يمكن تعريف PCR بأنه عبارة عن تفاعل إنزيمي خارج خلوي يتم من خلاله مضاعفة قطعة صغيرة من الدنا (نانوغرامات) الى ملايين النسخ خلال ساعات قليلة وبإستخدام جهاز المبلمر الحراري Thermocycler الذي يوفر درجات الحرارة اللازمة لكل مرحلة من التفاعل فضلاً عن إنزيم بلمرة الدنا *Taq DNA Pplymerase* الثابت في درجات الحرارة العالية والقواعد النتروجينية الأربعة dNTPs وكذلك المحلول المنظم الحاوي على $MgCl_2$ اللازم لعمل إنزيم البلمرة.

ما هي متطلبات ال PCR :

لتقوم بإنتاج الحمض النووي (DNA) بواسطة PCR يتتطلب عليك توفير :

١. جهاز للتحكم بدرجات حرارة التفاعل بشمل دقيق و متتالي (الدورة الحرارية Thermocycle) : ويقوم هذا الجهاز بتغير درجة الحرارة بشكل سريع ، لآن تغير درجة الحرارة هو الأساس الذي تقوم عليه فكرة هذه التقنية .
٢. البليمريز : وهو الإنزيم الذي يقوم ببناء وترتيب القواعد النيتروجينية (حدات الحمض النووي (DNA)) ، ويجب أن يكون هذا الإنزيم مقاوم للحرارة العالية ليتمكن من العمل . و قد اكتشف انزيم مقاوم للحرارة و اسمه Tag.
٣. مجموعة متفرقة من القواعد النيتروجينية:(A T C G) ليتمكن الإنزيم من ترتيبها في مواقعها أثناء عملية نسخ الحمض النووي (DNA).
٤. بادئ Primer: وهو قطعة صغيرة من الحمض النووي (DNA) ليتمكن الإنزيم من بداء البناء و النسخ عليها .
٥. والشيء الأهم هو وجود نسخة من الحمض النووي (DNA) المراد نسخه .
٦. بالإضافة إلى محلول أو وسط ليتم به التفاعل : وهذا المحلول يختلف بين تفاعل وأخر .

مراحل ال PCR

تشمل عملية البلمرة ثلاث مراحل :-

١- المسخ Denaturation

وهي اول مرحلة من مراحل التفاعل ويتم خلالها تحويل شريط الدنا من شريط مزودج Double- Stranded DNA الى شريط مفرد Single- Strandrd DNA وذلك بتعريضه الى درجة حرارة عالية تصل الى (94^0C) ولفترة (٥) دقائق تقريبا لضمان تكسير الاواصر الهيدروجينية التي تربط شريطي الدنا ليسهل انجاز الخطوة اللاحقة ليسلك كل شريط قالبا Template يتم بناء قطعة مكملة له.

٢. ارتباط البادئ Primer Annealing

يتم خفض درجة حرارة خليط التفاعل وذلك للسماح للبادئ بالارتباط بالموقع المكمل له على شريط الدنا المفرد ssDNA وبناء الاواصر الهيدروجينية ويتم اختيار هذه الدرجة بالاعتماد على طول البادئ المستخدم ونوعه ونسبة احتوائه على القاعدتين (G + C) ويمكن حساب درجة الحرارة الملائمة لارتباط البادئ من خلال استخدام نوع من المعادلات الحسابية وذلك بحساب درجة حرارة الذوبان Melting Tempreture (Tm) .

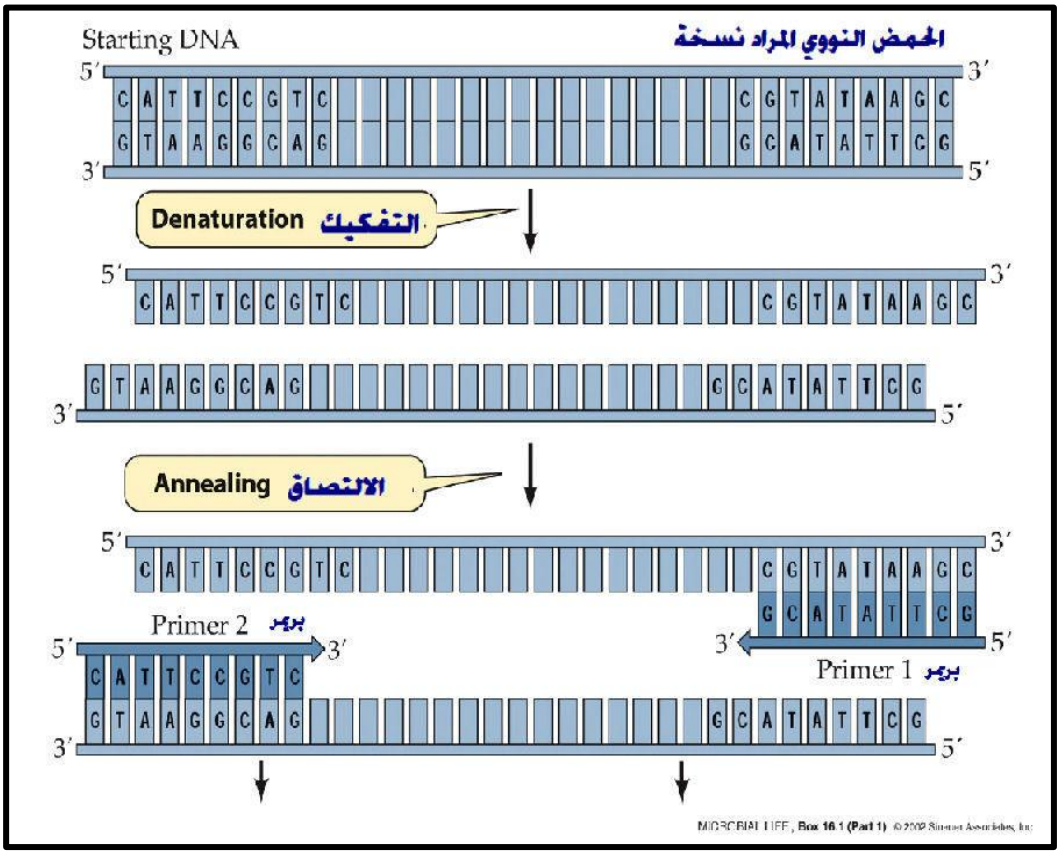
Tm= {(A + T)عدد قواعد } × 2 + {(G + C)عدد قواعد } × 4

هذه المعادلة تستخدم للبادئات القصيرة اقل من ٢٠ قاعدة ويتم في كثير من المختبرات طرح (3-5) ^{0}C من الناتج لبدء تفاعلات ال PCR وبعض المختبرات تستخدم المعادلة الاتية لحساب الدرجة الحرارية المثلى للالتحام (Tp).

Tp = 22 + 1.46 (Ln)

Ln = {(G + C) عدد قواعد } × 2 + {(T + A) عدد قواعد}

وهذه المعادلة ملائمة للبادئات التي تتكون من (20-30) قاعدة .



الشكل (١): خطوات عمل تقنية الPCR

٣. ا الاستطالة Extension

وهي المرحلة التي يتم فيها اضافة القواعد النتروجينية dNTPs عند منطقة ارتباط البادئ بقالب الدنا ليتم بناء شريط دنا مكمل للقالب بواسطة انزيم البلمرة ويتم في هذه المرحلة رفع درجة حرارة التفاعل الىC ٧٢° وهي الدرجة الحرارية المثلى لعمل انزيم البلمرة لكي يعمل بأعلى كفاءة وبانتهاء هذه المرحلة تنتهي اول دورة لتفاعلات PCR و ناتج هذه الدورة سوف يستخدم كقالب للدورات اللاحقة فبعد اجراء (٣٠) دورة يتم الحصول على ملايين النسخ من قطعة الدنا المراد مضاعفتها. اما تطبيقات تقنية الـ PCR فهي واسعة وفي مجالات عدة منها؛ استخدمت في مجال الطب وتشخيص الاحياء المجهرية الممرضة وفي مجال تربية وتحسين الحيوانات، اما في مجال النبات فقد استخدمت في العديد من التطبيقات منها التوصيف الجزيئي، وايجاد البصمة والعلاقة الوراثية.

المكونات الرئيسية لتفاعلات ال PCR

١. إنزيم البلمرة *Taq DNA Polymerase*

هو عبارة عن إنزيم ثابت حراريا Thermostable يتم عزله من نوع من البكتريا *Thermus aquaticus* والتي تعيش في الينابيع الحارة يتميز هذا الانزيم بان له القدرة على بناء سلسلة جديدة من الدنا باستخدام سلسلة الدنا المفردة كقالب وذلك بإضافة القواعد النتروجينية dNTPs وتتراوح درجة الحرارة المثلى لعمله C° (70-80) ويبقى ثابتاً في درجات الحرارة العالية التي قد تصلC° (٩٦) .

وهذا الإنزيم عبارة عن متعدد ببتيد يتكون من سلسلة مفردة ذات وزن جزيئي يصل إلى (٩٥) كيلو دالتون وتعرف الوحدة الواحدة من انزيم بلمرة الدنا على أنها كمية الانزيم اللازمة لبناء نانومول من التركيز الكلي للنيوكليوتيدات في خليط التفاعل وتكوين شريط من الدنا خلال وقت قدره (٣٠) دقيقة وبدرجة حرارة C° (٧٥) وتحت ظروف التفاعل المثلى.

٢. القواعد النتروجينية المفسفرة Deoxy Ribonucleoside Triphosphate (dNTPs)

وهي القواعد النتروجينية الاربعة منقوصة الاوكسجين والتي تستخدم لبناء أي قطعة من الدنا (deoxyadenosine triphosphate dATP) و(deoxycytidine triphosphate dCTP) و(deoxyguanosine triphosphate dGTP) و (deoxythymidine triphosphate dTTP) هذه القواعد (dNTPs) ترتبط بالنهاية الحرة لمجموعة الهيدروكسيل 3'-hydroxyl group للبادئ بوجود إنزيم البلمرة لتكوين الشريط المكمل للشريط القالب .

يتم تصنيعها وبنقاوة عالية منفردة وتجهز إما منفردة أو مجتمعة على شكل مزيج وان التركيز المثالي لها لإجراء تفاعلات PCR يعتمد على عدة عوامل منها تركيز $MgCl_2$ وتركيز البادئ وعلى عدد دورات PCR

٣. المحلول المنظم PCR Buffer

وهو المحلول الذي يعمل على مقاومة التغيير في الرقم الهيدروجيني (pH) عند إضافة حامض او قاعدة والمحلول المنظم المستخدم للحفاظ على الرقم الهيدروجيني اللازم لفعالية انزيم البلمرة إن احد مكونات هذا المحلول هو $Mgcl_2$ والذي يكون ضروريا لإجراء التفاعل وذلك لأن ايونات Mg^{+2} المغنيسيوم ضرورية لعمل انزيم البلمرة فهي تزيد من فعاليته كذلك فان هذه الايونات تكون معقداً ذائباً مع القواعد النتروجينية (dNTPs) يتم بعدها إضافتها إلى شريط الدنا.

٤. البادئ Primer

البادئ عبارة عن شريط مفرد قصير من الدنا يكون ذا تتابع مكمل لقطعة الدنا المراد مضاعفتها وبصورة عامة البادئات المستخدمة في تفاعلات الPCR تتكون من (20-30) قاعدة نتروجينية وتزداد كفاءتها كلما زاد طولها عن ٣٠ قاعدة نتروجينية حيث يرتبط به إنزيم البلمرة ليكون نقطة بداية التفاعل (Initiation point) لبناء شريط جديد من الدنا وعادة تصمم البادئات بحيث تحتوي على القواعد (G + C) بنسبة (60-70)% .

تكون البادئات إما ذات تتابع عشوائي والتي بإمكانها الارتباط على أي قطعة من الدنا مكملة لها أو متخصصة لجين معين أو شبه متخصصة حسب نوع التفاعل.

نظرا لما تمتاز به تفاعلات PCR من سرعة وسهولة ودقة في النتائج لذلك اعتمد عليها في كثير من البحوث الوراثية لذلك تم تطوير هذه التقنية وإيجاد أنواع عديدة من مؤشرات الدنا بالاعتماد على هذه التقنية ونوعية البادئ المستخدم.

تطبيقات PCR : لتقنية PCR تطبيقات كثيرة في مجال أبحاث الحمض النووي (DNA) و الوراثة ومنها :

١. الكشف عن الطفرات الوراثية : وذلك عن طريق وضع بريمر خاص للطفرة لتكثير الجين الخاص بها . ومنه نقوم بمعرفة المرض إذا كان على زوجين الكروموسومات أو على احدهما (allele) .
٢. تعين البصمة الوراثية .
٣. الكشف عن الفيروسات : وهذه الطريق هي الأدق في تحديد نوع وجنس الفيروس وكميته.
٤. هو العنصر الأهم في عملية التجميع الجيني (Recombinant الحمض النووي (DNA)) : حيث نقوم بتكثير الجين المراد إدخاله على البلازمد أو الحمض النووي (DNA) المضيف .
٥. استخدامه في تغير نهايات الجين لتصبح متوافقة مع إنزيمات القطع (Restriction enzyme).
٦. هو العملية الأساس في تحديد تتابع القواعد النيتروجينية في الحمض النووي (DNA) (الحمض النووي Sequencer (DNA)) .
٧. معرفة طول الحمض النووي (DNA) .
٨. تقنية الحمض النووي (DNA) المكمل (cالحمض النووي (DNA)) .
٩. تحديد الجين المطلوب من خليط من الجينات .
١٠. يستخدم في تقنية (microarrays).
١١. في مشروع الخارطة الجينية البشرية (human genome project) .
١٢. الساوثرين بلوت (southern plot) .
١٣. تقنية ارتباط الحمض النووي (DNA) – بروتين (الحمض النووي Protein Interaction- (DNA).
١٤. في مجال الطب الشرعي (اختبار الأمومة ، حالات الاغتصاب ، تحديد الهوية ... الخ) وغيرها من التطبيقات المخبرية والبحثية .

أنواع PCR : هناك نوعان من PCR :

١. PCR العادي **:** وهو ما تم شرحه والتطرق اليه في الخطوات السابقة .
٢. RT- PCR : وهو اختصار لـ (Real Time PCR) : وهذا النوع يقوم على نفس المبدأ ولكن الخلاف الوحيد يكون مربتط الجهاز بكمبيوتر لتحديد الوقت الحقيقي لبدا التفاعل ومن ثم الكمية الحقيقية لعدد نسخ الحمض النووي (DNA) ويعتمد ذلك على وجود قواعد نيتروجينية حرة مشعة لتحديد ذلك . مما يسهل على الباحثين الوقت لتحدد وجود الجين المطلوب أو لا ، وكمية الجين بدون الوصول إلى نهاية الدورات الحرارية المحددة .