ما هو تفاعل البلمرة المتسلسل؟

كثيراً ما يتقضى الأمر دراسة جزء معين من جزئ حمض DNA) المادة الوراثية) ولكن صعوبة التعامل مع عدد محدود من جزيئات هذا الحمض تحول دون ذلك ، لذا يستلزم الأمر مضاعفة هذا الجزء المطلوب دراسته مرات عديدة خارج الجسم حتى يسهل استخدامه بعد ذلك فى الدراسة المطلوبة ، وتسمى عملية المضاعفة هذه باسم (إكثار حمض DNA amplification) ولإجراء عملية مضاعفة الجزئ يلزم فك شريطى الجزئ عن بعضهما البعض ، ثم تكوين شريط جديد أمام كل شريط قديم باستخدام أنزيم البلمرة DNA- polymeraseحيث يرتبط كل شريط جديد مع الشريط القديم وبذلك يصبح لدينا جزئيان من الحمض بدلا من جزئ واحد وبتكرار هذا الإجراء عدة مرات يتكون لدينا بمتوالية هندسية عدد كبير من جزيئات الحمض تشبه كلها الجزئ الأصلى الذى بدأنا به.

اكتشاف تفاعل البلمرة المتسلسلPCR

ويرجع الفضل فى هذه التقنية التى تسمى تفاعل البلمرة المتسلسل "polymerase chain reaction" إلى العالمين (مولس kary Mullis (وفالونا Fred faloona (فى شركة Cetus Corporation فى كاليفورنيا – حيث قاما بنشرها فى عام 1985 ، وهى تعتمد على استخدام أنزيم بلمرة مأخوذ من بكتريا (اشيرشيا كولاى Escherichia coli (وإجراء عمليات المضاعفة فى أنبوبة. in vitro amplification

وفى العام نفسه نشر سبعة باحثين منهم (ساكى Ronald saik (وفالونا Fred falonna ومولس Kary Mullisبحثا عن توظيف هذه الطريقة فى تشخيص مرض الأنيميا المنجلية Sickle Cellanaemia وفى الواقع فإن تقنية PCR استخدمت على مدى السنوات اللاحقة فى تشخيص الأمراض الوراثية والأمراض الطفيلية

متطلبات تفاعل البلمرة المتسلسل PCR وطريقته

بما أن عملية فك شريطى جزئى عن بعضهما تستلزم درجة حرارة تصل إلى 90م ، فإم إنزيم البلمرة المستخدم كان يتعرض للتلف مع كل دورة تضاعف ولا شك أن ذلك كان يشكل عبئا على من يقوم بالعمل.
وكان حل هذه المشكلة فى عام 1988 ، عندما قام ثمانية من العلماء بقيادة (ساكى Ronald saiki (، وكان من بينهم (مولس Kary mullis (باستخدام إنزيم بلمرة من بكتيريا تعرف باسمthermos aquaticus تعيش فى الينابيع الحارة ، فمن المفترض أن إنزيم البلمرة فى هذه البكتيريا على وجه الخصوص يعمل فى درجة حرارة عالية وقد أطلق على هذا الإنزيم اسم Taq polymerase ومن الواضح أن حروفTaq مأخوذة من الأحرف الأولى لاسم الجنس واسم النوع الخاص بهذه البكيتريا ومنذ ذلك الحين أمكن للدارسين إكثار حمض DNAفى الأنابيب فى المعمل بإضافة انزيم Taq polymerase لمرة واحدة دون أن يصاب الإنزيم بالتلف رغم تعرضه إلى درجة حرارة تصل إلى 90 º م فى كل دورة تضاعف وتجدر الإشارة إلى أن بعض المعامل تستخدم فى السنوات الأخيرة انزيم يسمى Pfu Polymerase مأخوذ من بكيتريا PyroCoccus Furious ويستطيع أن يعمل فى درجة حرارة 100ºم دون أن يتلف.
وقد تعاونت شركة Cetus مع شركة Perkin- Elmer فى أمريكا لإنتاج جهاز ذاتى التشغيل يقوم بمضاعفة جزيئات حمض DNA ويطلق على الجهاز اسم Automated thermal cycler وهو يستخدم الأن على نطاق واسع فى معامل البحوث وفى هذا الجهاز ترتفع درجة الحرارة أليا لإتمام عملية فك الشريطان ثم تنخفض اليا لإتمام عملية بناء الشريط الجديد مرتبطا مع الشريط القديم ووفقا له ، وهكذا فإذا بدأنا بمئة جزئ

مثلا فإن عدد الجزيئات يرتفع إلى 200 ثم 400 ثم 800 ثم 1600 ثم 3200 ثم 6400 وهكذا وقد قدر أنه فى مدى 20 دورة يتم التضاعف بمقدار بليون وتتميز هذه الطريقة بسرعة الإنجاز.

يلاحظ أن تخليق شريط جديد من حمض DNA أمام شريط قديم فى أنبوبة يقتضى أن تزود التفاعل بجزء من الشريط الجديد ليرتبط مع جزء مقابل من الشريط القديم وعندئذ فقط يبدأ استكمال الشريط الجديد فى التكوين عقب الجزء الذى أضفناه نحن ويسمى الجزء من شريط حمض DNA الذى نضيفه لهذا الغرض باسم بادئ (Primer)وعلى هذا فعلينا أن نعرف تتابع القواعد النيتروجينيه فى المنطقة المجاورة للجزء المطلوب مضاعفته حتى نختار له (البادئ) المناسب كذلك فإن الطرف أو النهاية الأخرى للجزء المراد مضاعفته تحتاج إلى بادئ أخر وبذلك يتركز التضاعف فى المنطقة من جزئى DNA الواقعة بين (البادءين. (ومن هنا فإن تفاعل PCR كما ذكرنا سابق يضاعف جزء من جزئ DNA يقع بين منطقتين من الجزئ معروف فيهما تتابع القواعد النيتروجينية حتى نختار لكل منهما (البادئ المناسب) ومن الجدير بالذكر أن نمو تكوين شريط DNA جديد يتم بالنسبة له من الاتجاه (3’) إلى الاتجاه (5’) وهو عكس اتجاه الشريط القديم الذى يتكون وفقاً له هذا الشريط الجديد.
(3ومن المفترض أننا نوفر فى الأنبوبة التى تجرى فيها عملية التضاعف كل من الدى أوكسى نيوكليوتيدات الأربعة التى ستبنى منها الأشرطة الجديدة وهى:
Deoxy thymidine triphosphate (dTTP)
Deoxy cytidine triphosphate (dCTP)
Deoxy adenosine triphosphate (dATP)
Deoxy guanosine triphosphate (dGTP)

ويتم إدخال كل من هذه الدى أوكسى نيوكليوتيدات فى بناء الشريط الجديد النامى لحمض DNA بعد فصل مجموعتى فوسفات من كل منها والإبقاء على مجموعة فوسفات واحدة ومع استمرار تكرار عملية التضاعف سنجد أن الجزء المطلوب مضاعفته قد تضاعف كثيرا وذلك دون باقى أجزاء الحمض.

استخدامات تفاعل البلمرة المتسلسلPCR
•إن مضاعفة المادة الوراثية بهدف دراستها تتعاظم الحاجه إليه فى مواقف عديدة منها الشخيص الطبى عن تواجد ميكروبات معينه وهنا يجرى إكثار للمادة الوراثية للميكروب وقد تكون المادة الوراثية للميكروب هى حمض RNA وليس حمض DNA كما فى حالة فيروس الإيدز – وعندئذ يجرى فى المعمل بناء شريط حمض DNA أمام شريط المادة الوراثية للفيروس – ثم يتم بناء شريط حمض DNA أمام شريط DNA الأول ثم تجرى تقنية PCR لجزئ DNA.
•ويحتاج بناء شريط من حمض RNA أمام شريط من حمض DNA إلى إنزيم يسمى (إنزيم النسخ العكسى Reverse Transcriptase (وكان العلماء الأمريكيين الثلاثة (بالتيمور – دلبيكو – تيمن ,Baltimore (Dulbecco, Temenقد اكتشفوا هذا الإنزيم فى عام 1970 وحصلوا على جائزة نوبل فى عام 1970 تقديرا لذلك.
•وكما سبق القول فإن هذه التقنية تستخدم فى تشخيص الأمراض الوراثية ، حيث أن سبب هذه الأمراض يرجع إلى تغيرات فى حمض DNA كما فى حالة مرض الثالثميا B- thalassemia كما تستخدم هذه التقنية فى مجال الطب الشرعى حيث أنها ضرورية فى طرق الكشف عن مرتكبى الجرائم أو فى تحديد البنوة ، حيث أنها تسمح بمضاعفة أقل كمية من المادة الوراثية حتى لو كانت مستمدة من خلية واحدة . كما تساعد هذه التقنية فى الكشف عن وجود الجينات المسرطنة Oncogenes وقد تم تطبيق هذه التقنية أيضا فى دراسة حمض DNA الخاص بالميتوكوندريا وتستخدم هذه التقنية على نطاق واسع فى تشخيص مرض الإيدز.

(1استخدام تقنية PCR فى الكشف عن وجود فيروس معين فى الدم مثل فيروس مرض الإيدز
•تؤخذ قطرات من الدم ويجرى لها طرد مركزى لفصل الخلايا عن البلازما ويتم الاستغناء عن خلايا الدم.
•فلو افترضنا أن الشخص مريض يجرى فصل لحمض RNA من مصل الدم الذى يكون المادة الوراثية لفيروس الإيدز ثم يجرى الحصول على حمض DNA من حمض RNA باستخدام إنزيم النسخ العكسىReverse transcriptase
•يتم اكثار حمض DNA باستخدام تقنية PCR ثم يجرى للحمض النووى فصل كهربى جيلاتينى Gel electrophoresisحيث يتم التعرف على شريط المادة الوراثية فى لوح الجيلاتين لاحظ أن اكثار المادة الوراثية يستلزم هنا توافر بادئ Primer مناسب للفيروس المراد البحث عنه.

ومن الجدير بالذكر أن الخبير بابو (Paabo) استخدم هذه التقنيه فى إحدى الدراسات مع حمض DNA المأخوذ من أمخاخ مومياوات قدماء المصريين. Egyptian Mummies
ومن المهم أن ندرك أن مضاعفة المادة الوراثية عن طريق تقنيه PCR وسيلة لها ما بعدها فهى ليست هدفا فى حد ذاتها.

طريقة الكشف عن تتابع الجزيئات المكونه لمادة الوراثيةDNA

سبق أن أوضحنا أن حمض DNA هو مادة الوراثة وأن هذا الحمض يتكون الجزئ فيه من سلسلتين من جزيئات النيوكليوتيدات – Nucleotides وأنه من المفترض أن كل جين عبارة عن عدد معين من تتابعات هذه النيوكليوتيدات.
وعلى هذا فإن التعرف على تتابع النيوكليوتيدات فى جزيئات حمض DNA لكائن ما يعنى الكشف عن خصوصية المادة الوراثية لهذا الكائن ويترتب على هذه المعرفة إمكانية غير مسبوقة فى التحكم فى الصفات المورثة للكائنات.
ويعتبر الكشف عن تتابعات النيوكليوتيدات فى المادة الوراثية لكائن ما عملاً علميا رفيعا وتعرف الأن عدة طرق لكشف تتابع النيوكليوتيدات فى حمض DNA تذكر منها طريقة العالم الشهير (فريدرك سانجر (Frederick sangerمن جامعة كمبروج وكان (سانجر) قد حصل على جائزة نوبل فى الكيمياء مرتين ، الأولى فى عام 1958 عندما استطاع فى عام 1953 كشف ترتيب الأحماض الأمينية المكونة للإنسولين والثانية حصل عليها فى عام 1980 لابتكاره مع زملاء له طريقة لكشف تتابع الجزيئات المكونة لحمض DNAوالتى سنستعرضها هنا وقد نشر ذلك فى سلسلة من البحوث أذكر منها ما ورد فى العدد (94) لعام 1975 من مجلة J . MOI-BioI ، وفى العدد (74) لعام 1977 من مجلة Proc.NationalACad.Sci ، وفى العدد (214) لعام 1981 من مجلة Science وقبل أن نتناول طريقة (سانجر) للكشف عن تتابع النيوكليوتيدات فى حمض DNA أود أن أشير إلى نقطتين فقد علمنا من قبل فى موضوع تفاعل البلمرة المتسلسل (PCR) أن تضاعف حمض DNA يحتاج إلى وجود إنزيم DNA- polymerase وإلى بادئ Primerوإلى طرز (دى أوكسى نيوكليوتيدات deoxy nucleotides (الأربعة لتستخدم فى بناء شريط DNA .
كما أود التذكرة بما سبق أن أوضحته عند الحديث عن تكوين شريط جديد أمام الشريط القديم لجزئى DNA من أن إرتباط كل دى أوكسى نيوكليوتيد جديد مع الدى أوكسى نيوكليوتيد السابق عليه فى السلسة الجديدة مشروط على وجود مجموعة (OH) متصلة مع ذرة الكربون رقم (3) فى جزئ السكر الداخل فى تكوين الدى أوكسى نيكليوتيد السابق فوجود مجموعة (OH) فى الجزئ السابق ضرورى لإضافة دى أوكسى نيوكليوتيد جديد.

طريقة العالم الشهير (فريدرك سانجر) لتضاعف المادة الوراثية

تعتمد طريقة (سانجر) على إجراء تضاعف للمادة الوراثية بتوفير إنزيم DNA Polymerase وبادئ مشع Labelled primerوطرز الدى أوكسى نيوكليوتيدات Deoxy nucleotide triphosphate الأربعة ويشترط أن يكون أى من البادئ أو الدى أوكسى نيوكليوتيدات مشعة حتى يمكن متابعة الجزيئات كما سنرى فيما بعد . وحجر الزاوية فى هذه التقنية هو أن يضاف قدراً ضئيلاً من مركبات الداى دى أوكسى نيوكليوتيدات 2,3 dideoxy nucleotides -وهى:

Dideoxy thy midline triphosphate (ddTTP)
Didexoy cytidine triphosphate (ddCTP)
Didexy adenosine triphosphate (ddATP)
Dideoxy guanosine triphosphate (ddGTP)

وميزة هذه المركبات هى عدم وجود مجموعة (OH) فى ذرة الكربون رقم (3) فى جزئ السكر الخاص بها فإذا ما ارتبط أى من هذه الجزيئات فى شريط DNA فإنه يتعذر بعد ذلك أرتباط أى دلى دى أوكسى نيوكليوتيدات لاحق ، وبذلك تقف عملية نمو الشريط DNA عند هذا الحد.
وغنى عن القول ان هذه المركبات الأربعة الموضح أسمائها فيما سبق يتم إدخال أى منها فى الشريط الجديد النامى لحمض DNA بعد فصل مجموعتى فوسفات من كل منها كما فى الحالة العادية.

*وفيما يلى موجز بالخطوات الأساسية للكشف عن تتابع الجزيئات المكونه للمادة الوراثية بطريقة سانجر DNA- Sequencing :

.باستخدام أحد إنزيمات القصر A restriction enzyme يتم تقطيع جزئى DNA إلى قطع Fragmentsتتميز بأن طرف واحد لها جميعا يحمل ففى تتابعات الدى أوكسى نيوكليوتيدات ولكن هذه القطع غير متساوية الطول بالطبع.
.2تفصل هذه القطع بعضها عن بعض حسب طول كل منها عن طريق الفصل الكهربائى باستخدام ألواح الجيلاتين.
.3تستخلص قطع حمض DNA من شرائط الجيلاتين. DNA- elution
.4تجرى مضاعفة amplification كل مجموعة من قطع DNA على حدة باستخدام تقنية تفاعل البلمرة المتسلسل (PCR) وذلك فى وجود بادئ Primer والدى أوكسى نيوكليوتيدات الأربعة وكمية قليلة من أحد الداى دى أوكسى نيوكليوتيدات (وليكن. (ddATP
.5ومن الجدير بالذكر أن البادئ سيحتوى على مجموع (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 ستقف إذا أخذ جزئ (داى نيوكليوتيد) فى بناء الشريط الجديد وحدوث هذا الاحتمال الأخير يتم عشوائيا ويؤدى ذلك إلى أن الجزيئات الجديدة ستكون متفاوتة فى أطوالها ولكن كل منها ينتهى بالداى دى أوكسى نيوكليوتيد (ddATP) ويبدأ عند الموقع نفسه.
.6تكرر الخطوة الأخيرة ولكن بوضع كمية قليلة من داى دى أوكسى نيوكليوتيد أخر وليكن (ddTTP) وعندئذ فإن الأشرطة الجديدة ستتفاوت أطوالها أيضا وينتهى كل منها بالداى دى أوكسى نيوكليوتيد (ddTTP) .
.7تكرر مرة ثالثة ورابعة باستخدام الداى دى أوكسى نيوكليوتيد ddCTP ثم الداى أوكسى نيوكليوتيد ddGTP .
.8تؤخذ قطع الـ DNA الناتجة عن عمليات المضاعفة الأربع ويجرى لها فصل كهربائى باستخدام ألواح

الجيلاتين ، وهذا يتم بعمل أربع حفر wells متجاورة فى لوح الجيلاتين – ليوضع فى كل حفرة قطع DNA التى تنتهى شرائطها بأحد الداى دى أوكسى نيوكليوتيدات .. ويمثل الجلاتين الممتد أمام كل حفرة ما يسمى حارة. Lane
يؤدى الفصل الكهربى إلى انفصال قطع الحمض النووى فى شرائط فى كل حارة فى الجيلاتين حسب أطوالها وتعبر شرائط كل حارة عن تواجد أحد النيوكليوتيدات ويمكن عن طريق تتبع النيوكليوتيدات فى الحارات الأربع للجيلاتين معرفة (قراءة) بترتيب النيوكليوتيدات المكونه للقطعة من جزئ DNA المستخدمة.
وتجدر الإشارة إلى أن ماكسام وجلبرت A. Maxam &W. Gilbert من جامعة هارفارد كانا قد ابتكرا طريقة أخرى للكشف عن تتابع النيولكيوتيدات فى الحمض النووى DNA ونشرا بحثهما فى العدد 74 لعام 1977 من مجلة Proc National Acad Sci وبصفة عامة تعتبر الطريقتان سالفتا الذكر مجهدتان وتستغرقان وقتا طويلاً . وقد استطاعت الشركات العلمية المتخصصة ابتكار أجهزة تقوم آليا Automated بكشف التتابعات فى حمض DNA بكفاءة وسرعة وقد تم استخدام هذا الأسلوب مرة فى عام 1986 وقد ابتكر حديثا جهاز يعرف باسم (-MALDI Matrix – Assisted – laser desorption – lionization time – of – flight mass spectrometryيقوم بتبخير قطع DNA ، وعلى أساس الوقت الذى تستغرقه مكوناتها إلى موقع كشاف detector ملحق بالجهاز – وهذا يعتمد على كتلة كل منها – يمكن تحديد التتابعات وتعمل شركة Sequenom فى (سان ديجو) على توظيف هذا الجهاز فى تشخيص الأمراض الوراثية.
–وقد حمل لنا عدد 16 تشرين الأول (1998) من مجلة Science استشرافا للمستقبل فى ابتكار وسيلة لتصغير miniaturization مستلزمات تقنية طريقة الكشف عن تتابع الجزيئات فى المادة الوراثية ليصبح فى الإمكان استخدام رقائق Chips تحوى السوائل اللازمة بقدر ضئيل جداً micro fluides ولن يزيد حجم الرقاقة التى تقوم بمقام معمل كامل – عن حجم راحة اليد.
–ومن الجدير بالذكر أن العالم البيولوجى (هود Leroy Hood (وزملائه فى معهد كاليفورنيا للتكنولوجيا (Caltech)كانوا قد ابتكروا تكنولوجيا تعيين تتابعات الجزيئات فى حمض DNA أليا وذلك فى الثمانينيات وفى هذه الماكينة تعطى كل من الدى أوكسى نيوكليوتيدات الأربعة لونا يميزها وقد قامت مؤسسة PE Corp فيما بعد بصناعة الماكينة وتسويقها – وتتعاون هذه المؤسسة – ورئيسها هنابلر Michael Hunapiller مع مؤسسة سيلير Celera ورئيسها كريج فنتر craig venter معاً من أجل كشف تتابعات الجينوم البشرى وعدد أخر من الكائنات.

تطبيقات تفاعل البلمرة المتسلسل(PCR)

البصمة الوراثية

قبل ان نتناول بالشرح هذه التقنية أود أن أذكر أن مادة DNA تتكون من جزيئات متتابعة تسمى دى أوكسى نيوكليوتيدات ويتكون كل جين يحمل صفه وراثية من عدد من هذه الوحدات.
–وقد اتضح للعلماء فى عام 1977 أن الجينات فى الكائنات حقيقيات النواة Eukaryotes ليست متصلة فى استمرارية ، فليست كل المناطق يرمز فيها تتابع الدى أوكسى نيوكليوتيدات إلى صفات وراثية معينة ، وهذه المناطق البيئية من جزئ DNA غير معلومة الوظيفة.
وما يهمنا هنا أن هناك أجزاء من تلك المناطق غير معلومة الوظيفة تكون تسلسل معين من جزيئات الدى أوكسى نيوكليوتيدات التى يتراوح عددها عادة بين 7-100 ويطلق على هذا التسلسل اسم التابع الصغير "minisatellite" ويتكرر هذا التسلسل ليكون قطع مختلفة الأطوال تكرر فى المادة الوراثية "الجينوم" للفرد ومن المهم أن أذكر أيضا أن أطوال هذه القطع وعدد مرات تكرارها يختلف من فرد لأخر ، ولذلك توصف التوابع الصغيرة minisatellite بأنها تكرارات متتابعة متنوعة الأعداد variable number of tandem repeat(VNTR)

وهذه الخاصية هى التى تعتمد عليها تقنية البصمة الوراثية التى تميز كل فرد وقد قدر أن الجينوم البشرى يحتوى على 100.000 من هذه المواقع وتعتمد أسس تقنية البصمة الوراثية على إنجازات معينة فى مجال البيولوجيا الجزيئية هى:

1- أنه يمكن قطع المادة الوراثية إلى أجزاء صغيرة ، وأن مواقع القطع تعتمد على نوع الإنزيم المستخدم فى القطع فهناك إنزيمات تسمى " إنزيمات القصر " لكل منها موقع معين يقوم عنده بعملية تقطيع المادة الوراثية .

2- توصلوا العلماء إلى تقنية معملية تسمى اختصاراً PCR يمكن بها مضاعفة المادة الوراثية لإجراء التجارب عليها ويمكن اقتصار عملية التضاعف على أجزاء محددة من المادة الوراثية وفقا لما يضيفه الباحث من مادة يطلق عليها البادئ Primer تتجانس مع الأجزاء المراد مضاعفتها.

3- أن أجزاء المادة الوراثية إذا ما وضعت على لوح جيلاتينى خاص – متصل بالكهرباء من ناحيتين وذلك عند القطب السالب فإن قطع المادة الوراثية ستتحرك داخل اللوح الجيلاتينى من عند القطب السالب فى اتجاه القطب الموجب ، وتختلف المسافة التى يقطعها كل جزء من المادة الوراثية حسب حجم . فالقطعة الأكبر حجما تقطع مسافه أقل ، بينما القطعة الأصغر حجما تجرى فى الجيلاتين مسافة أطول والمهم هنا أن قطع المادة الوراثية ستنفصل بعضها عن بعض داخل لوح الجيلاتين وتعرف هذه التقنية باسم الفصل الكهربى الجيلاتينى Gel electrophoresis

ويتلخص إجراء عمل البصمة الوراثية فى الخطوات الأتية

- تقطع جزيئات حمض DNA بإنزيم قصر. Restriction enzyme
- تجرى عملية مضاعفة amplification للقطع من جزئى DNA المكونة من توابع صغيرة minisatellites بإجراء تقنية PCR باستخدام بوادئ تناسب التتابعات التى تحد التوابع الصغيرة Flanking – Sequence Primers، وبهذا يصبح لدينا كمية كبيرة من كل من هذه التوابع المميزة من المادة الوراثية.
- يجرى فصل كهربى جيلاتينى لقطع المادة الوراثية DNA التى تم مضاعفتها فى الخطوة السابقة ، وهى بالطبع قاصرة على قطع التوابع الصغيرة ، والفصل الكهربى سيعمل على فصل هذه القطع بعضها عن بعض فى الجيلاتين على حسب أطوالها – وسيكون نمط توزيعها خاص ومميز للفرد.

وتستخدم طريقة "التقاط سزرن Southern blotting" "فى تنفيذ تقنية "البصمة الوراثية"

ويمكن تلخيص خطوات العمل كما يلى:

- تقطع جزيئات حمض DNA باستخدام إنزيم قصر وتجرى مضاعفة لقطع DNA الناتجة باستخدام تقنية PCR وبالطبع فإن minisatellites ستوجد فقط فى بعض قطع الـ DNA.
- يجرى فصل كهربائى بالجيلاتين لقطع حمض DNA فتتوزع هذه القطع فى الجيلاتين حسب أطوالها.
- يتم فصل شريطى جزئ حمض DNA عن بعضهما فى لوح الجيلاتين وذلك باستخدام مادة قلوية.
- باستخدام لوح من نيترات السليلوز Cellulose nitrate filter التقاط blotting شرائط حمض DNA من على لوح الجيلاتين وذلك بطريقة (سزرن) ويشبه ذلك بما تلتقطه قطعة ورق النشاف من الحبر من على الورق.
- تعامل شرائط حمض DNA بمجسات DNA مشعة labelled DNA probes تحمل القواعد المكملة لشرائط حمض DNA الخاصة بـ minisatellites الموجودة على لوح نيترات السليلوز وبالطبع فإن هذه المجسات لن ترتبط بكل قطع حمض DNA ولكنها سترتبط فقط بشرائط الـ minisatellites وبذلك تصبح

مواقع هذه الـ minisatellites مشعة ويمكن تحديد مواقعها بأفلام التصوير الحساسة لأشعة(X)
و من الجدير بالذكر أن البصمة الوراثية تستخدم في قضايا النسب الشرعية

مكتبة الجينوم(Genomic library)

يقصد بمكتبة الجينوم تقطيع الجينوم (أى حمض DNA فى الكروموسومات) إلى أجزاء تم تحميلها على فيروس أو بلازميد أو كروموسوم اصطناعى للخميرة حتى يمكن اللجوء إلى أى من هذه القطع عند القيام بالبحوث ويلاحظ هذا أن المكتبات التى يتم الحصول عليها من الخلايا المختلفة بالجسم تكون متماثلة بالطبع ويتم تقطيع الجينوم باستخدام أحد إنزيمات القصر ، وإذا أريد الحصول على قطع صغيرة الحجم استخدم أحد إنزيمات القصر التى تقوم بالقطع عند نيوكليوتيدات أربعة معينة Tetranucteotide مثل الإنزيم Haelll الذى يقوم بالتقطيع عند التتابع GGCC أو الإنزيم Sau3A الذى يقوم بالتقطيع عند التتابع GATC تفصل بعد ذلك قطع الجينوم بعضها عن بعض باستخدام الفصل الكهربى الجيلاتينى gel electrophrosis ثم تحمل القطع على فيروس لامدا Lambda virus وفى حالة الجينوم البشرى (3 × 610 كيلو بيز – تقطع إلى حوالى 200.000 جزء) يستخدم حوالى نصف مليون فيروس لضمان تحميل جميع أجزاء الجينوم وعند الاحتياج إلى جزء من الجينوم يتم كلونة الجينوم عن طريق إكثار الفيروس ثم استخدام مجس Probe للحصول من الجينوم على الجزء المطلوب التعامل معه.
ويلاحظ أن الفيروس أو البلازميد يمكن أن يحمل قطعة من الجينوم طولها يزيد عن 20 – 25 كيلو بيز ، ولذا فإن كروموسوم الخميرة الاصطناعى Yeast Artificial chromosome (YAC) يستخدم مع القطع الكبيرة حيث يمكنه حمل قطع يتراوح حجمها من 100 – 1000 كيلو بيز (مليون من أزواج القواعد) وفى هذه الحالة يستخدم إنزيم قصر يقوم بالقطع عند تتابعات يصل عددها إلى ثمانية مثل إنزيم Not I الذى يقطع عند التتابعاتGCGGCCGC

مكتبة حمض DNA المكمل(cDNA Library)

“Complementary DNA Library “
الغرض من تجهيز هذه المكتبة بصفة عامة هو نفس الهدف الذى من أجله تعد مكتبة الجينوم ، ولكن مكتبة حمض (cDNA) تجهيز بطريقة مختلفة عنها فى اعتبارات معينة.
وتبدأ طريقة العمل هنا باستخلاص حمض m-RNA ناضج أى بدون إنترونات introns من خلايا معينة فى النسيج ، ثم يتم بناء شريط DNA أمام شريط m-RNA باستخدام إنزيم النسخ العكسى reverse transcriptaseوذلك باستخدام بادئ يتكون من عدد من القاعدة (T) ليتقابل مع طرف جزئى m-RNA الذى يتميز باحتوائه على ذيل من القواعد (A) وهى المنطقة المعروفة باسم poly aden ylic tail ، ويلاحظ أن الطرف (3′) لجزئى c DNA المخلق أمام m- RNA يكون أنشوطه (بنسبه شعر hairpin (loopويعمل هذا الجزء كبادئ primer لبناء شريط DNA مقابل ثم يتم التخلص من هذه الأنشوطه باستخدام إنزيم – وبذا يصل بناء cDNA إلى صورته النهائية ليستخدم فى بناء مكتبة cDNA عن طريق التحميل والكلونه كما فى حالة مكتبة الجينوم.
وتتميز هذه المكتبة عن مكتبة الجينوم بما يلى:
–أن المكتبة تحتوى على إكسونات exons فقط وهى الأجزاء المكونة للجينات وبالتالى فالجين يوجد بطريقة غير متقطعة ، وبالتالى فإن حجم المكتبه هنا يكون أقل ولكن ذو فعالية أكبر.
–أن المكتبة هنا خاصة بنشاط الخلايا التى أخذ منها (m- RNA) فهى لا تحمل الجينوم كله ، وذلك يسهل الدراسات الخاصة بهذا الطراز من الخلايا – ويفيد ذلك فى دراسة تعبير الجينات فى الأمراض الوراثية

بخلايا معينة.
–فى هذه الطريقة تجهيز مكتبة لكل طراز من الخلايا.
–ان هذه المكتبة تسمح بتتبع أنشطة طراز معين من الخلايا عبر مراحل تكوينية مختلفة والتى تمر بها هذه الخلايا.
–يمكن استخدام أجزاء من مكتبة c- DNA لإنتاج بروتين معين عن طريق نقلها الى البكتريا أما نقل أجزاء من مكتبة الجينوم إلى البكتريا لهذا الغرض فهو عديم الجدوى حيث أن البكتريا تفتقد الى ألية فصل الإنترونات وربط الإكسونات

مميزات و عيوب تفاعل البلمرة المتسلسل(PCR)
إن تفاعل البلمرة المتسلسل يشمل العديد من التطبيقات واسعة المجال و التى تعتمد اساسا على ثلاث ميزات أساسيه له وهى-:
1.سرعة وسهولة إستخدامه-:
فإستنساخ ال(DNA) بواسطة تفاعل البلمرة المتسلسل يطبق خلال ساعات قليلة فهو يتكون من 30 دوره تتضمن تفكيك و تكوين وإعادة تركيب شريط جديد من(DNA) فى خلال دوره واحده مدتها من 3 إلى 5 دقائق.
2.حساسيته-:
تفاعل البلمره المتسلسل قادر على مضاعفة التتابعات من كميات صغيرة من ال (DNA)المستهدف مما له تطبيقات عديده كما فى الطب الشرعى عندما تحتوى العينه على كميه ضئيله من الخلايا.
3.قوته-:
تفاعل البلمرة المتسلسل يسمح بمضاعفة تتابع بعينه من (DNA) والذى يمكن إحضاره من وسط يصعب فيه عزل ال(DNA)التوليدى.
•عيوبه
1.الحاجة إلى معرفة تتابع الجين المستهدف
2.محدودية الكميات المنتجة من ال.(DNA)
3.عدم دقة النسخ
حيث أن إنزيم(Taq polymerase) ليس له القدرة على تصحيح الاخطاء.(proof reading)