الفصل الثانى

هندسة الجينات

obeikandi.com

obeikandl.com

ترجع الصعوبات في عملية دراسة وتحليل الجينات إلى توحد طبيعة جزئيات الحامض النووى DNA ، واشتراكه فى صفات عديدة فى مختلف الكائنات. فمثلا يبلغ الـ DNA فى خلايا الإنسان حوالى 6.4×10^9bp (**قاعدة نيتروجينية مزدوجة**) ، ويتكون من أربع نيوكليتيدات مختلفة ، وكذلك فى الكائنات الراقية الأخرى يتركب أساس الحامض النووى فى الخلايا من نفس الأربع نيوكليتيدات. وحتى عام 1970 لم يستطع العلماء التوصل إلى طريقه يتم بها قطع الحامض النووى فى أماكن محددة ، وعملية قطع وهندسة الـ DNA فى أماكن محددة هى أساس البيولوجية الجزيئية (Molecular Biology).

وقد توصل كل من أربر وناتنز وسميث (Werner Arber, Daniel Nathans and Hamilton smith) إلى اكتشاف إنزيمات القطع لشريط الـ DNA (restriction enzyme) وحصلوا على جائزة نوبل عام 1978. باستخدام إنزيمات القطع لبكتريا *E. coli* حيث يتم نقل أجزاء معينة من الحامض النووى من كائن إلى كائن وتم دراسة وتعريف أجزاء الـ DNA المختلفة فى كثير من الكائنات بعد ذلك التوسع فى مقارنة المحتوى الجينى بين الكائنات ...الخ.

إنزيمات القطع: Restriction Enzymes

تقع إنزيمات القطع ضمن مجموعة أو نظام التحور والقطع البكتيرى **ويتكون هذا النظام من مكونين أساسيين هما:** الأول هو إنزيمات القطع (restriction enzymes) أو تسمى إنزيمات تكسير الحامض النووى DNA (endonucleases) وهى الإنزيمات التى تقطع الـ DNA فى أماكن محددة.

واكتشف أول إنزيمات القطع فى بكتيريا القولون *E. coli* K عام 1968 ، ولكن لم يتم معرفة ميكانيكيتة. والثانى هو أماكن القطع (Meselson & Yuen, 1968) ، ففى عام 1970 قام سميث وفريقه بعزل إنزيمات القطع من بكتيريا *Haemophilus influenzae* Rd وتم تحديد أماكن القطع التى تحدثها هذه الإنزيمات فى شريط الحامض النووى المزدوج (DNA). فعلى سبيل المثال إنزيم Hind II يتعرف على ستة قواعد نيتروجينية فى ترتيب ثابت ويكسر فى مركز **هذه القواعد الستة التى تأخذ الترتيب التالى**:

5'........ GT(T/C) ¦ (GA) AC......... 3'

3'....... CA (AG) ¦ (CT) TG.......... 5'

وقد وجد سميث أن هذا الإنزيم يقوم بتكسير الحامض النووى DNA فى البكتريوفاج phage R7 فى حوالى 40 موضع بطول شريط الـ DNA. فإنزيم الـ Hind II يتعرف على الترتيب السابق ويكسر الشريط المزدوج فى مركز هذه القواعد الستة.

ويعرف هذا المكان بمكان التعريف (recognition site) وهو المكان المعرف بواسطة إنزيم Hind II ، وقد توصل سميث إلى عزل نوعين من إنزيمات القطع فى بكتيريا *H. influenzae* وهم Hind II و Hind III.

ويتعرف إنزيم القطع على ترتيب خاص من القواعد النيتروجينية يقطع عندها. توالت عملية فصل وتعريف إنزيمات كثيرة من إنزيمات القطع. أكثر من 900 نوع من إنزيمات القطع تم عزلها من حوالى 230 نوع من البكتريا ، وتسمى

الإنزيمات القاطعة نسبة إلى الكائن المنتج لهذه الإنزيمات الحرف الأول يؤخذ من اسم الجنس ويؤخذ الحرف الثانى والثالث من أول اسم النوع (Roberts *et al.,* 2003) ، أما الأرقام التى توضع بعد الإسم فتأتى نتيجة لتتابع فصل الإنزيم فمثلا إنزيم Hind I تم فصله قبل إنزيم Hind II وهكذا.

وقد أوضح سميث أن إنزيم Hind II يهاجم الحامض النووى DNA للبكتريوفاج ويكسر فى أماكن التعريف السابق ذكرها ولكنه لا يهاجم الـ DNA فى البكتريا *H. influenzae* المعزول منها حتى ولو أنها تحتوى على مناطق التعريف الخاصة بالإنزيم. والتفسير لهذه الظاهرة هو وجود نظام التحور الذى يتم فى هذه الإنزيمات حيث أن الإنزيم لا يوجد حر فى هذه الخلايا المستخلص منها ولكن يوجد بصورة محورة تفقده وظيفته.

ارتباط جزيئات الحامض النووى: Joining DNA Molecules

باكتشاف إنزيمات القطع أمكن قطع الحامض النووى إلى قطع يمكن التعامل معها. والمشكلة التى ترتبت على ذلك هى إلتحام الحامض النووى مرة أخرى ، وبواسطة إنزيمات الإلتحام DNA ligase أمكن دراسة عملية إلتحام الـ DNA. وهذه الإنزيمات تعمل على تكوين الرابطة بين سكر الديؤكسى ريبوز والفوسفات (Zimmerman *et al.,* 1967) لكى تعمل إنزيمات الإلتحام DNA ligases لابد من وجود مجموعة الهيدروكسيل (-HO) فى الطرف '3 ومجموعة الفوسفات فى الطرف الآخر '5 ، والارتباط بين مجموعة الـ -HO والفوسفات يحتاج إلى طاقة. وفى خلايا الحيوان والبكتريوفاج يكون مصدر الطاقة هو ATP

obeikandl.com

أما فى بكتريا *E. coli* وباقى البكتريا تكون NAD^+ هى مصدر الطاقة. وإنزيمات الإلتحام ligase هى الوحيدة القادرة على إلتحام الـ DNA المزدوج ولكن لا تستطيع إحداث إلتحام للشرائط الفردية من الـ DNA.

ويتضح دور إنزيمات الإلتحام في عملية التضاعف للـ DNA حيث أنها تعمل على إلتحام شريطى الـ DNA حتى يصبح شريطا مزدوجا. وميكانيكية الإلتصاق درست عام 2000 بواسطة طومسون وفريقة (Timson *et al*., 2000). تتفاعل كلا من جزئيات ATP و NAD^+ مع إنزيم الإلتحام لتعطيه المزيد من الطاقة.

أسس إكثار الحامض النووى DNA : The Basics of Cloning

أول عملية لقطع الـ DNA وإعادة إدماجه داخل جينوم أخر تمت بنجاح عام (1970) بواسطة جاكسون وفريقه (Jackson *et al*., 1972). أشهر عمليات إندماج الحامض النووى تتم فى بلازميد بكتيريا *E. coli* ويسمى البلازميد البكتيرى بالفيكتور (Vector). والفيكتور عبارة عن DNA مزدوج حلقى من بلازميد الخلايا البكتيرية ويتم استخدامه فى حمل أجزاء من DNA منقولة من كائن أخر أو صناعية. وإذا أردنا إدماج DNA داخل الفيكتور فإنه لابد من قطع الفيتكور أولا ثم إدخال الـ DNA الشريطى ثم باستخدام إنزيمات الإلتحام نقوم بلحم هذا الجزء وغلق الفيكتور مرة أخرى.

معظم عمليات نقل جزئيات الـ DNA باستخدام الفيكتور تكون باستخدام بكتريا القولون *Escherichia coli*. ويمكن استخدام أنواع أخرى

من البكتريا ولكن هناك مزايا عديدة لاستخدام الـ *E. coli*. سميت بكتريا *E. coli* نسبة إلى العالم الفيزيقى الألمانى(1827-1911) Theodor Esherich وهى بكتريا سالبة الجرام وعصوية الشكل تتحرك بواسطة أسواط طرفية (شكل 19). وهى واحدة من الفلورا الميكروبية للإنسان حيث أنها توجد فى الفم وفى الأمعاء الدقيقة تساعد على هضم بعض المواد الغذائية وتنتج بعض الفيتامينات مثل K, B_{12} وتوجد هذه البكتريا أيضا فى التربة والماء وهى واسعة الاستخدام فى المعامل البحثية **ومن أهم مزايا هذه البكتريا**:

١- سهولة نموها فى الأوساط الغذائية الرخيصة.

٢- تأخذ حوالى من 30:20 دقيقة حتى تصل لأعلى نمو لها، وقد تحتاج أقل من ساعتان لإكمال دورة حياتها.

٣- المحتوى الجينى لها تم دراسته بالتفصيل بواسطة الكثير من المراكز البحثية.

٤- غير ممرضة والتعامل معها آمن وإلى الآن تطفرها لا يمنعها من النمو فى ظروف المعمل.

٥- هناك خريطة كاملة للتركيب الجينى لها.

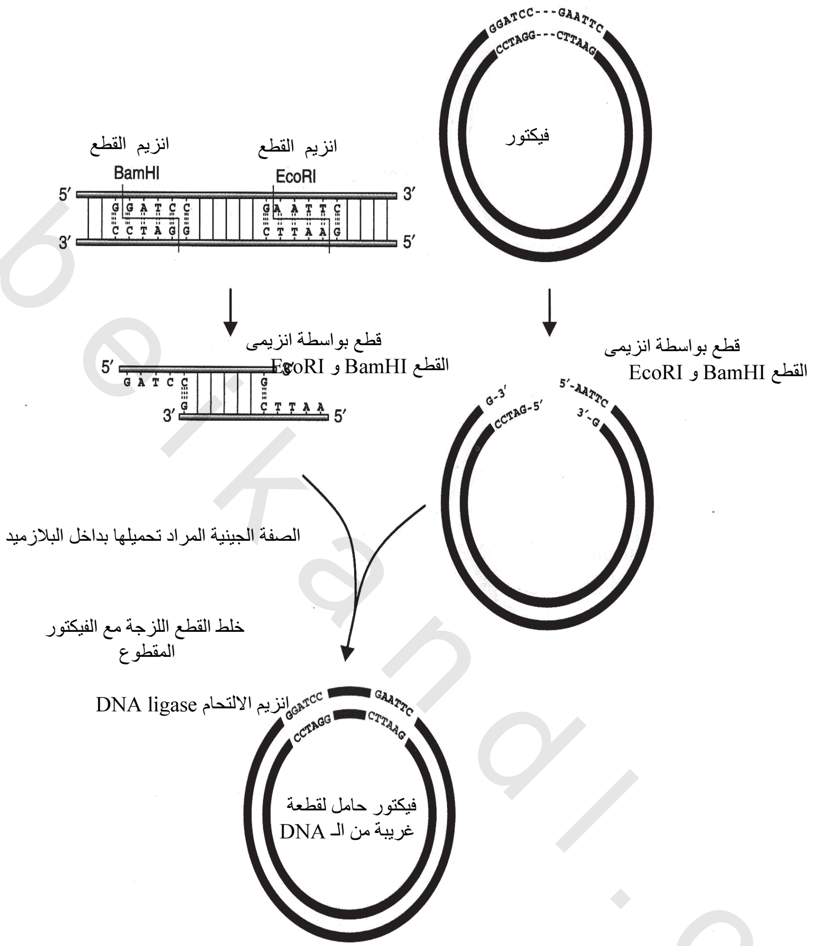
٦- يمكنها استقبال البلازميدات وجزيئات الحامض النووى من البكتريوفاج ولذلك يسهل نقل الصفات الوراثية إليها .

شكل (19): يوضح التركيب الداخلى لبكتريا القولون *Escherichia coli*.

والفيكتور يستطيع التضاعف غير معتمدا على كرموسوم الخلية البكتيرية. والفيكتور المستخدم عادة فى عملية نقل DNA الغريب قد يكون البلازميد والبكتريوفاج لمدا (lamada λ) ولابد من توافر عدة مميزات فى الفيكتور حتى يفيد فى عملية إكثار الحامض النووى DNA:

١- له القدرة على التضاعف.

٢- يميز الخلايا التى ينتقل إليها حيث يتم معرفة الخلايا التى بها الفيكتور من التى ليس بها.



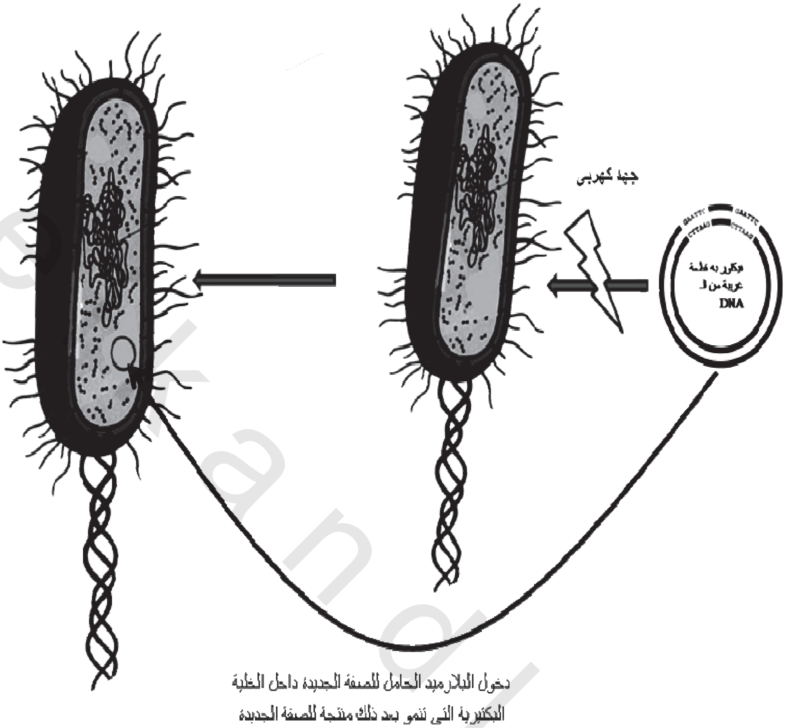
شكل (**20**): كسر الفيكتور وإضافة جزء من الـ DNA الغريبة وربطها بإنزيمات الإلتحام (ligase) (Reece, 2004).

obeikandi.com

مثلا قطع كلا من الفيكتور وأجزاء الـ DNA بواسطة BamHI & EcoRI **ينتج نوعين من القطع** (Two fragments) **واحدة كبيرة.** وهى عبارة عن الفيكتور مفتوح **والثانية صغيرة** وتمثل الـ DNA المراد إدخاله فى الفيكتور فى منطقة القطع. والحامض النووى DNA المراد أخذ جزء منه لإدخاله فى الفيكتور يتم هضمه بواسطة إنزيمات القطع ليعطى ثلاث قطع مختلفة. **قطعة واحدة** منهم التى لها نهاية قطعت بواسطة EcoRI **والنهاية الأخرى** قطعت بواسطة BamHI. أما باقى قطاع الـ DNA لا تستطيع الإندماج داخل الفيكتور حتى فى وجود إنزيمات الإلتحام DNA ligase. ويحدث الارتباط بروابط هيدروجينية بين الفيكتور والجزء المراد إدخاله حيث أن القواعد النيتروجينية فى هذا الجزء متوافقة مع النهايات اللزجة الموجودة فى الفيكتور. وتعمل إنزيمات الإلتحام DNA ligase على إلتحام وحدات السكر بالفوسفات فى كلا الطرفين 3', 5' وبذلك يكتمل تكوين الفيكتور حاملا معه الجزء الغريب من DNA.

وفي المثال السابق (**شكل** 20) تم قطع جزء الـ DNA المراد إدخاله فى الفيكتور بواسطة إنزيمين مختلفين BamHI, EcoRI لذلك يكون طرفى هذه القطعة مختلفين وغير متكاملين ويسهل نقلهم إلى الفيكتور وإلتحامهم بواسطة إنزيمات الإلتحام .

obeikandl.com



شكل (٢١): عملية إدخال البلازميد الحامل للصفة الجديدة داخل الخلية البكتيرية وتحت تأثير جهد كهربى.

وهناك أسباب كثيرة توضح صعوبة دخول البلازميد (الحامض النووى DNA) إلى الخلايا البكتيرية:

obeikandi.com

١- الحامض النووى عالى الشحنة السالبة ولذلك ليس من السهل إدخاله إلى البكتيريا مارا بالغشاء البلازمى.

٢- عند دخول الـ DNA الغريب إلى داخل الخلية البكتيرية فإنه إما أن يحدث له إدخال فى كروموسوم الخلية ، وبالتالى يتم تضاعفه معتمدا على كروموسوم الخلية وينتقل من الخلية الأم إلى الأجيال الناتجة. وأما أن يتضاعف بذاته غير معتمدا على كروموسوم البكتريا. وهذا الأخير غير واضح ونادر الحدوث. ولكن فى حالة عدم إندماج الحامض النووى الغريب فى كروموسوم الخلية فإنه قد يتلاشى ويفقد أو يخرج من الخلية ، ولكى يتضاعف الـ DNA الغريب لابد من وضعه ضمن أجزاء قابلة للتضاعف وهو البلازميد وعند ذلك يسمى بالفيكتور Vector أو cloning vehicles (**أى حامل الـ DNA الغريب**). والفيكتور هذا قابل للتضاعف وليس بالضرورة أن يحدث له إندماج مع كروموسوم الخلية البكتيرية. وبذلك يمكن استخدام كلا من لاقمات البكتريا والفيكتور فى نقل الـ DNA الغريب داخل الخلية البكتيرية.

٣- **تميز أجزاء الـ DNA المنقولة إلى البكتيريا**: إن أجزاء الـ DNA الغريبة التى يمكن دمجها فى كروموسوم الخلية البكتيرية أو فى البلازميد قد يختلف تعبيرها الجينى من جينات البكتيريا. ولكن قد يتشابه مع جينات البكتريا ولكى نميز ونتأكد من إندماج الـ DNA الغريب داخل الخلية البكتيرية

لابد من إدماج أجزاء تعتبر كدليل على دخول الـ DNA الغريب المراد إدخاله وتسمى دليل (Marker) وهى فى الغالب جينات خاصة بمقاومة البكتيريا للمضادات الحيوية فعندما تتحول البكتيريا من بكتيريا غير مقاومة لمضاد حيوى معين إلى بكتيريا مقاومة لهذا المضاد الحيوى يعنى هذا إندماج لجين المقاومة والأجزاء الغريبة من DNA المصاحبة لهذا الجين.

وسائل تسهيل إدخال البلازميد والحامض النووى إلى داخل الخلية البكتيرية:

أ- **النقل الكهربى** Electrical Transformationستخدام الطاقة الكهربية لمساعدة البلازميد (**الحامض النووى الحلقى**)على الدخول بسهولة إلى الخلايا البكتيرية. وذلك عند وضع الخلايا البكتيرية تحت فرق جهد عالى وتسمى هذه العملية بالتثقب الكهربى (electroportion). وعندما يدخل الحامض النووى DNA الخلية البكتيرية يتضاعف مرات عديدة ليعطى جزيئات عديدة متشابهة تماما معه.

ب- **النقل الكيميائى**: Chemical Transformation

فى عام 1970 وجد أن أجزاء الـ DNA المستخلصة من البكتريوفاج تستطيع دخول البكتيريا *E.coli* بسهولة فى حالة معالجتها بكلوريد الكالسيوم وهذه المعاملة الكيميائية بواسطة $CaCl_2$ تساعد أيضا على دخول البلازميد إلى الخلية البكتيرية. وعملية المعالجة باستخدام كلوريد الكالسيوم تتم بتجميع البكتيريا *E. coli* فى مرحلة النمو النشطة لها ووضعها فى محلول من كلوريد الكالسيوم ويوضع معها البلازميد الحامل للـ DNA المراد إدخاله فى البكتيريا.

توضع الأنبوبة التى بها الخليط فى الثلج ثم تعرض إلى صدمة حرارية عند درجة 37°C :45°C لمدة 30 ثانية. يضاف بعد ذلك الوسط المغذى للبكتيريا (nutrient medium) ويسمح لها بالنمو لمدة 24 ساعة. وخلالها تنمو البكتيريا ويتضاعف البلازميد ويتم التعبير الجينى وعن طريق الطرز المظهرية للبكتيريا نستطيع معرفة البكتيريا التى حملت البلازميد الحامل للـ DNA الغريب. ويتم عزلها وتنميتها فى أوساط غذائية أخرى. ودور كلوريد الكالسيوم غير معروف وغير واضح قد يكون من خلال تأثيره على الجدار الخلوى وقد يكون هو المسئول عن إلتصاق الـ DNA بجدار البكتيريا.

وعملية نقل البلازميد إلى داخل الخلية تتوقف على عدة عوامل منها تخصصية العائل ونعنى تخصص البكتريا لهذا البلازميد ، وعوامل فيزيقية أخرى وعادة تزداد عملية إدخال البلازميد إلى داخل الخلية البكتيرية بواسطة:

١- نقص إنزيمات القطع (Restriction enzymes) فى البكتيريا (العائل) حتى لا تكسر البلازميد وتحلله.

٢- معالجة الخلايا البكتيرية ليس فقط بكلوريد الكالسيوم بل أيضا ببعض الأيونات الموجبة مثل الريبديوم والمنجنيز (Hanahan, 1983).

تتم عملية نقل البلازميد وتنجح مع سلالات *E. coli* K12 ونحصل على 10^7-10^9 خلية بكتيرية حاملة للفيكتور (vector) عند استخدام ميكروجرام من DNA الغريب وهذه النسبة تعتمد على نوع السلالة:

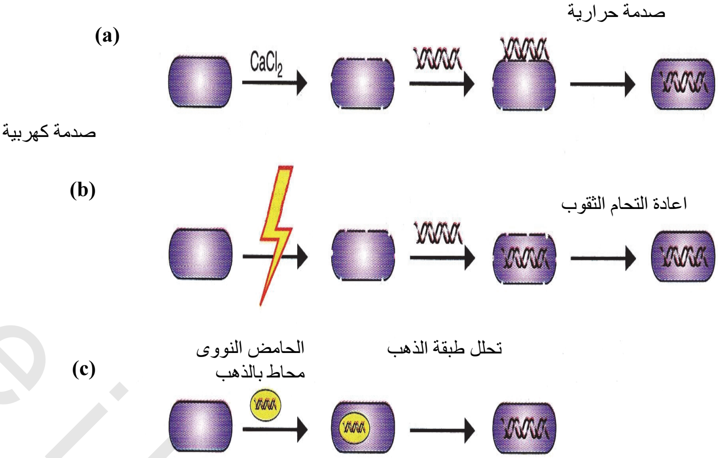
(Liu & Rashidbaigi, 1990)

obeikandi.com

جـ - **المسدس الجينى:Gene Gun**

تمثل الطريقة الثالثة التى تسهل عملية دخول أجزاء الـ DNA الحاملة للصفات المراد نقلها مع البلازميد إلى الخلايا البكتيرية هى تحميل أجزاء الـ DNA على حامل يسمى بالمسدس الجينى (gene gun). هو جهاز صغير يحمل الحامض النووى ويقذفه بداخل الخلايا(Johnston & Tang, 1994) يتم تغطية الحامض النووى DNA بواسطة الذهب أو التنجستين ليأخذ شكل حبة الخرز ثم تتصل هذه الحبة بواسطة رصاصة بلاستيك وتوضع فى جهاز قاذف مثل المسدس ثم تنطلق قوة دافعة للرصاصة ناحية الخلية مارة بماسورة المسدس وعندما تصل الرصاصة البلاستيكية إلى الماسورة تتوقف ويندفع الـ DNA محمولا فى الحبة المغطاة بالذهب إلى الخلية. تخترق بعض الحبات الحاملة للـ DNA الجدار الخلوى وتندفع فى داخل السيتوبلازم ، ويحدث تحلل للطبقة التى تغطى الـ DNA ثم يحدث إندماج الـ DNA الغريب داخل المحتوى الجينى للخلية (**شكل ٢٢**). وتستخدم هذه الطريقة مع الخلايا التى يصعب عليها استخدام الطرق الأخرى مثل خلايا النبات والحيوان. كما تستخدم هذه الطريقة فى إنتاج الفاكسين Vaccine حيث يتم حقن الجين المسئول عن إنتاج الفاكسين بهذه الطريقة داخل خلايا الحيوان ومن أمثلة هذه الجينات الجين المسئول عن فاكسين مقاومة أمراض القدم وأمراض الفم الناتجة عن بعض الفيروسات (Benvenisti *et al.,* 2001).

Obeikandi.com



شكل (٢٢): ثلاث طرق لادخال البلازميد أوالحامض النووى إلى داخل الخلية البكتيرية (a) استخدام كلوريد الكالسيوم ، (b) استخدام المجال الكهربى لاستمالة تكوين الثقوب فى جدار الخلية البكتيرية ، (c) حقن الحامض النووى المغطى بالذهب داخل الخلية البكتيرية باستخدام المسدس الجينى (Reece, 2004).

التفاعلات التسلسلية لإنزيم البلمرة :

Polymerase chain Reactions (PCR)

ونعنى مضاعفة الحامض النووى DNA خارج الخلية (**معمليا**) ، ويمكن تعريف التفاعلات التسلسلية لإنزيم البوليميريز (PCR) على أنها نسخ ومضاعفة جزء من الـ DNA معمليا للحصول على كميات هائلة منه فى زمن قليل وقد حصل العالم كارى مولى عام 1993 على جائزة نوبل فى الكيمياء لوضعه الطريقة المثلى لتفاعلات الـ PCR.

وتحتـــاج التفـــاعلات التسلســـلية للـــPCR إلى وجـــود قطعـــتين مـــن النيوكليتيدات يسميان بالبادئ (primers) وعادة يكون طول كلا منهما من 17 إلى 30 قاعدة نيتروجينية وهاتان القطعتان ترتبطان بالـ DNA المراد نسخه ، ومن عنـدهما تبـدأ عمليـة النسـخ ، وهـذان البادئـان لهمـا نفـس ترتيـب القواعـد النيتروجينية لأجزاء موجودة على شريط الـ DNA المراد نسخه. فيرتبط كل بادئ مع الترتيب المكمل له على الشريط الفردى لـلـ DNA (شكل ٢٣) وتحدث تفاعلات الـ PCR **في ثلاث مراحل منفصلة وهى:**

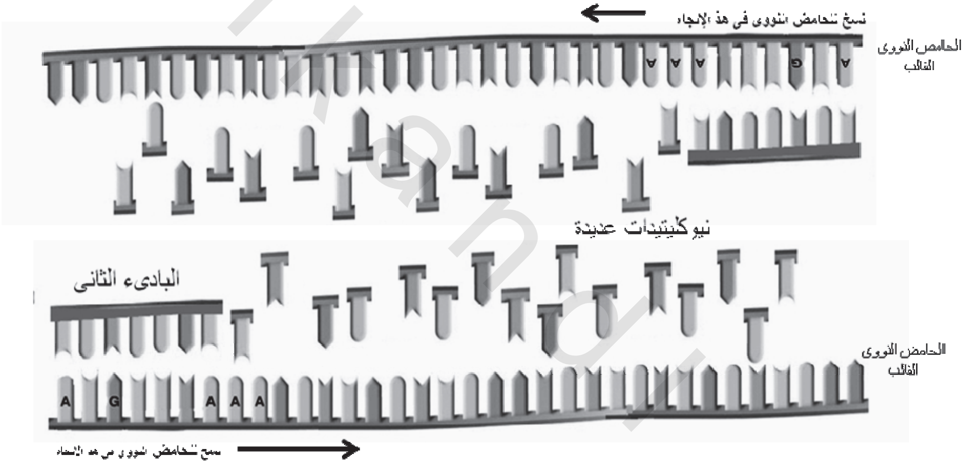
١- **فصـــل شـــريطى** الــ DNA عـن بعضـهما وتغـير طبيعتهمـا المزدوجـة Denaturation وفى هذه الخطوة يتم فصل شريطى الـ DNA إلى شريطين فـرديين عـن طريـق كسـر الـروابط الهيدروجينيـة الموجـودة بـين القواعـد النيتروجينية باستخدام الحرارة العالية وهى غالبا تكون 94°C.

٢- **إلتحـام البـادئ** (primer) بشريط الـ DNA: يتم فى هذه الخطوة تبريد الـ DNA فى وجود البادئـات (primers) يقـوم كـل بـادئ بـالتعرف علـى منطقة اتصاله بالـ DNA ويتصل بها فى درجة حرارة منخفضة تعتمد هذه الدرجة على طول وترتيب القواعد النيتروجينية للبادئ (primer) وكذلك التخصصية لتفاعل PCR وعادة تكون درجة الحرارة للإلتحام ما بين 45°C, 60°C.

٣- **الاسـتطالة** : وفى هذه المرحلة يرتبط انزيم البوليميريز الخاص ببناء الـ DNA بمنطقـة اتصـال البـادئ (primer) بشـريط الــ DNA ومسـتخدما النيوكليتيـدات العديـدة dNTPs الموجـودة فـى الوسـط فـى بنـاء شـريط الــ

DNA المكمل للشريط القالب (الأصلى) آخذا الاتجاه ′3 إلى ′5 بالنسبة للشريط القالب. وبهذه الطريقة يتحول شريط الـ DNA الفردى إلى شريط مزدوج.

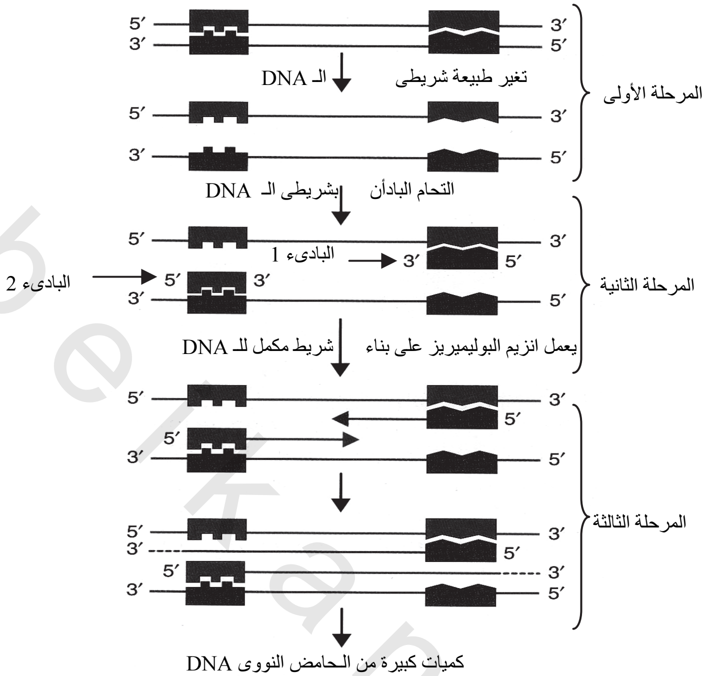
ويتم عزل انزيم البوليميريز من بكتريا *Thermus aquaticus* الحرارية التى تفضل النمو تحت درجات الحرارة العالية (Lawyer *et al.*, 1989) ويسمى الانزيم Taq DNA polymerase ، وهذا الانزيم يقاوم التكسر عند درجات الحرارة العالية فهو لا ينكسر فى المرحلة الأولى عند رفع درجة الحرارة إلى 94°C ولذلك يمكن وضع الانزيم عند بداية التفاعل فى الخطوة الأولى.



أحد أشرطة الحامض النووى أثناء عمل نسخ عديدة منه

شكل (22): يوضح إلتحام البادىء بشريط الحامض النووى ثم إضافة باقى نيوكليتيدات طبقا للشريط القالب.

obeikandl.com



شكل (٢٣): مراحل تفاعلات التضاعف التسلسلية (PCR) كاملة. أحد أشرطة الـ DNA يأخذ اللون الأحمر والآخر يأخذ اللون الأزرق ، بعد انفصال شريطى الـ DNA يرتبط البادأن بالقواعد النيتروجينة المكملة لهم فى كلا الشريطين ويعمل انزيم البوليميريز على بناء شريط مكمل للـ DNA القالب ، وتتكرر هذه المراحل لإنتاج نسخ عديدة من الـ DNA (Reece, 2004)

وانـزيم البلمـرة Taq لـه درجـة حـرارة مثلـى يعمـل عنـدها بـأعلى نشـاط وهى 72°C ، ولـذلك يفضل جعـل مرحلـة الاسـتطالة extension عنـد هـذه الدرجـة (72°C). بعـد دورة كاملـة يـتم عمـل نسـخة واحـدة مـن DNA وعنـد بدايـة الـدورة التاليـة تقـف مرحلـة الاسـتطالة وينشـق الـ DNA المزدوج (المتكـون فـى الخطـوة السـابقة) إلى شـريطين مـن DNA الفـردى ثـم تـأتى مرحلـة الإلتحـام واتصـال

obeikandi.com

البادآت بالشريط الفردى ثم مرحلة الاستطالة وهكذا إلى أن نحصل على أعداد هائلة من شريطى الـ DNA المتضاعفه.

وبعد حوالى 25 دورة يمكن الحصول على أكثر من 30 مليون نسخة من الـ DNA. جميع تفاعلات PCR تكون محتويه على أجزاء من DNA وكميات صغيرة من DNA غير صحيحة التضاعف ولكن كميات هذه الأجزاء تكون غير ذات أهمية لقلة نسبتها.

وهناك الكثير من العوامل التى تتحكم في حدوث تفاعل PCR وتشمل:

- انزيم البوليميريزا المستخدم.
- تركيب البادئ Primer.
- ظروف التفاعل مثل درجة الحرارة والمحاليل المنظمة ، وغيرها.
- مكونات التفاعل.

ويتراوح حجم المحلول في تفاعل PCR من 50 µL ميكرولتر إلى 100 µL ميكرولتر محتويا على المواد الآتية:

أ- الحامض النووى المراد مضاعفته.

ب-البادئ الأول.

جـ- البادئ الثانى.

د- المحلول المنظم

هـ- كلوريد الماغنسيوم

و- كلوريد البوتاسيوم.

ز- خليط من النيوكليتيدات التى تدخل فى تركيب الحامض النووى DNA.

ح- انزيم البوليميريز DNA Polymerease (وحدتين).

كما أن تركيز أيونات الماغنسيوم يلعب دورا هاما في نجاح عملية تفاعلات المضاعفة (PCR)، فالماغنسيوم ضرورى لزيادة نشاط انزيم البوليميريز وكذلك عملية التضاعف نفسها تتوقف على تركيز أيونات الماغنسيوم فى الوسط. فعند التركيز المنخفض للماغنسيوم يقل نشاط الإنزيم، فى حين التركيز العالى للماغنسيوم يقل من التخصصية لعملية التضاعف وبالتالى يحدث تلوث بأجزاء للـ DNA غير مرغوب فيها. ولابد من وضع تركيز مناسب من أيونات الماغنسيوم فى المخلوط يتراوح بين (1-5mM). أما كلوريد البوتاسيوم يستخدم كمنشط لإنزيم البوليميريز والمحلول المنظم (Tris-HCl) لتنظيم درجة الـ pH فى الوسط (Foord and Rose, 1994).

قبل بداية تفاعل التضاعف PCR يتم وضع بعض قطرات من الزيت لمنع عملية التبخر وتغير التركيز، ومن ناحية أخرى يتم تسخين غطاء جهاز الـ PCR لمنع عملية التبخير أيضا، **ويتم تلخيص ظروف التفاعل لعملية التضاعف** PCR **كالآتى:**

- عملية فصل الشريطين (denaturation) عند 94°C لمدة 30 ثانية.
- عملية إلتحام البادئ (annealing) عند 60°C لمدة 30 ثانية.
- عملية الاستطالة (extension) عند 72°C لمدة دقيقة.

obeikandi.com

معظم انزيمات البوليميريز التى تستخدم فى تفاعلات التضاعف PCR فى المعمل تنتج عدد قواعد نيتروجينية متصله فى شريط الـ DNA المكمل بعدد (500 إلى 1000) قاعدة نيتروجينة فى الدقيقة.

استخدامات الـ PCR:

١- تشخيص المرض الوراثى: Diagnosis of Genetic disease

تستخدم تفاعلات التضاعف PCR كأداة لكشف الخطأ الوراثى سواء كان طفرة أو عيبا وراثيا، ولكن لابد من وجود معلومات كاملة وكافية عن ترتيب الـ DNA قبل استخدام PCR للكشف عن التغير. من أهم مزايا استخدام الـ PCR أننا نستطيع إجراء التفاعل التضاعفى PCR باستخدام كمية صغيرة جدا من الـ DNA القالب. فعينات بسيطة من الدم أو بعض الخلايا الممزقة كافية لإجراء عملية التشخيص باستخدام PCR، فتستخدم الـ PCR فى الكشف عن الطفرات والتغيير الجينى. كما فى مرض البرص Waardenburg syndrome وهو مرض وراثى يحدث من اتحاد الصبغة غير الطبيعية التى تنتج من التغير الوراثى والمرضى، وهو المسؤل عن 2% من حالات التشوهه للوجه، حيث يصاب المريض ببياض فى الجبهة وبياض الجفون والشعر، بعض أنواع هذا المرض ناتجه عن طفرات فى جين PAX-3. وأول طفرة ظهرت فى هذا الجين كانت عن طريق إزالة جزء من النيوكليتيدات قدره 18 نيوكليتيده (Tassabehji *et al.*, 1992) ويمكن الاستدلال عن نقص هذا الجزء بواسطة تفاعلات التضاعف PCR. حيث نستخدام

الـ DNA لشخص سليم ليس به طفرات ويسمى الـ DNA الطبيعى . البرى- ليعطى تركيب 156 قاعدة نيتروجينية أما الذى به طفرة يكون أقل وذلك لنزع 18 نيوكليتيده منه. ويمكن فصل الـ DNA المختلف فى الوزن الجزيئى عن طريق الفصل الكهربى فى الجيل ، ونزع الـ 18 نيوكليتيده يغير من تركيب البروتين الذى سوف يتم إنتاجه بل ويتغير عدد الأحماض الأمينية التى يتم إنتاجها أيضا.

تطبيقات الـ CRApplication of PCR

هى تفاعلات الـ PCR ذات أهمية ودور كبير عند التعامل مع كميات ضئيلة جدا من الأحماض النووية ومهم فى التأكد من حدوث الطفرات والخلل الجينى ، **ومن أهم المجالات التطبيقية لـ PCR هى**:

- الإكثار الجزيئى والتحميل للجينات Molecular cloning
- معرفة تتابع النيوكليتيدات فى الـ DNA sequencing DNA
- فى علم الآثار القديمة rchaeology
- فى الطب الشرعى Forensics
- مضاعفة جزء من النيوكليتيدات غير المعروفه Amplification of unknown sequence
- فى علم الأمراض الاكلينيكية Clinical pathology
- التشخيص الوراثى للأمراض Genetic diagnosis
- معرفة الطفرات Mutation detection
- مقارنة بين المادة الوراثية بين أفراد أو أجناس مختلفة (البصمة الوراثية)

obeikandl.com

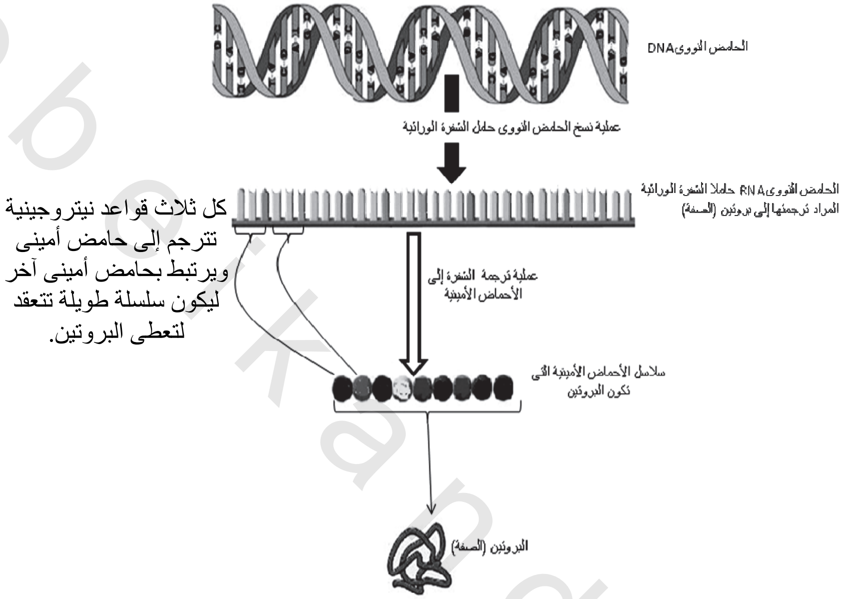
- Fingerprinting population analysis.
- التحليل الجينى Genome analysis
- التقدير الكمى للـ DNA والـ RNA Quantitative PCR of RNA, DNA

الطفرات Mutations

ترتيب القواعد النيتروجينية فى الجين يدل على البروتين الذى سوف يتم التعبير عنه ، وأى تغير فى تركيب الـ DNA يؤدى إلى تغير الحامض الأمينى وقد يؤدى إلى تغير البروتين كله. والتغير فى تركيب الـ DNA يسمى بالطفرة والطفرة قد تؤدى إلى تغير فى نشاط البروتين وسلوكه كإنزيم. وحدوث الطفرة طبيعيا بدون مؤثر خارجى على الـ DNA يكون بمعدل بطئ جدا وتنشأ من تتابع وتكرار تضاعف الـ DNA. وقد تحدث نتيجة تغير فى قاعدة نيتروجينية واحدة بطول الـ DNA كل 10^6-10^8 قاعدة نيتروجينية. وهناك من المؤثرات والعوامل الخارجية الكثير من مسببات الطفرات مثل أشعة X ، والأشعة فوق البنفسجية وبعض المواد الكيميائية مثل (Ethyl Methane Sulphonate) (EMS) وهذه المؤثرات تغير من ترتيب القواعد النيتروجينية فى جينوم الخلايا الأولية والراقية. وبمجرد حدوث هذا التغير يمكن أن ينتقل إلى الأبناء ويورث. وحدوث الطفرة يؤكده التغير فى السلوك الفسيولوجى داخل الخلية وتغير دور الإنزيمات فى التفاعلات البنائية أو الهدمية. وحدوث طفرة فى جين واحد لا يعطى تغيرا

obeikandl.com

واضحا في الطرز المظهرية للكائن. ولحدوث تغير في الصفات المظهرية (Phenotypes) لابد من حدوث العديد من الطفرات.



شكل (٢٤): تخطيط يوضح ترجمة الشفرة الوراثية إلى بروتينات ونعنى الصفات الوراثية التى تظهر على الفرد.

أنواع الطفرات طبقا لكيفية حدوثها:

١- تغير قاعدة نيتروجينية داخل نيوكليتيدة.

٢- إضافة أو إزالة قاعدة نيتروجينية.

ومـن المعـروف أن الشـفرة الوراثيـة تكـون ثلاثيـة القواعـد النيتروجينيـة وكـل ثـلاث قواعـد تعبر عـن حـامض أمينـى فـى شـريط الـ mRNA وعنـد إزالـة أو إضافة قاعدة تغير من تركيب الشفرات الثلاثية ، وبالتالى تغير من الأحماض الأمينية ، ومن ثم البروتين المتكون.

فمثلا عند تغير حرف فى الجمل الإنجليزية التالية تؤدى إلى عدم فهمها.

THE FAT CAT ATE THE RAT

ومعناها أن القط السمين أكل الفأر. وإذا تم إزالة الحرف A من كلمة القط نجد أن الجملة فى ثلاثيات لا تفهم.

THE FAT CTA TET HER AT.

ولكن عندما يتم فقد أو إضافة ثلاثة حروف متتالية فإننا يمكن أن نفهم ولو جزء من الجملة كما يلى:

THE FAT CAT ATE THE RAT

↓ عند نزع FAT

THE CAT ATE THE RAT…..

وكذلك عندما يحدث هذا فى شفرة طويلة بإضافة شفرة ثلاثية أو إزالـه شفرة ثلاثية يحدث إزالة لحامض أمينى أو إضافة لحامض أمينى ويمكن ألا يتغير البروتين كلية.

ومن أهم استخدامات إحداث الطفرات تكون في الحصول على بروتينات متغيرة عن البروتين الأصلى للحصول على وظيفة مختلفة. فمثلا يمكن تغير تخصصية بعض الإنزيمات من طريق الطفرات. فعند حدوث طفرة واحدة فى جين

obeikandi.com

نـزع الهيـدروجين الكحـولى فـى الخميـرة Yeast alcohol dehydrogenase يحـول حـامض الأسـبرتك إلى جلايسـين فـيغير الـبروتين ونجـد أنـه يسـتخدم كـلا NAD^+ و $NADP^+$ كعوامل مساعدة فى تفاعله الإختـزالى لتحويل الاسيتالدهيد إلى كحـول إثيلى علما بأنه قبل حدوث الطفرة يستخدم فقط NAD^+ كعامل مساعد:

(Fan *et al.*, 1991)

كـذلك بطفـرة صـغيرة فـى إنـزيم نـازع الهيـدروجين اللاكتيكـى Lactate dehydrogenase المعزول مـن بكتريـا *Bacillus stearothermophilus* يتم تحويله إلى Malate dehydrogenase (Wilks *et al.,* 1988). وتظل وظيفة الإنـزيم اختزالية ولكن بعد حدوث الطفرة تغيرت مادة التفاعل وأصبحت أملاح حامض الماليك (Maltate).

وعند إحداث أكثر من طفرة متتالية ليست فى زمن واحد لجين خاص بإنتـاج إنـزيم معين فـإن ذلـك يغير مـن تخصصية الإنـزيم وتسـمى هـذه العملية بالتحـديث الموجهـة directed evolution وعـن طريـق هـذه العمليـة تـتغير وظيفـة البروتين كلية. فعملية إحداث الطفرات المتكررة فى جين بـروتين (إنـزيم) البروتييـز يغير من مادة التفاعل الخاصة به(Olsen *et al.,* 2000).

وبصفة عامة فإن التغير فى جينات الإنزيمات يؤدى إلى تغير فى طبيعة الإنـزيم إما عن طريق التغير فى التركيب البروتينى للإنزيم أو عن طريق التغير فى خواص الإنـزيم من حيث الثبات الحرارى ، ودرجة الحموضة (pH) المثلى

للإنزيم ، والصفات الحركية وطاقة الإنزيم ، وعوامل التفاعل المساعدة ، وتخصصية الإنزيم ومقاومة الإنزيم للتكسر بإنزيمات التحلل البروتينى Proteases.

أدرك العلماء وبسرعة أن الطفرات فى أى جين تحدث نادرا وعشوائيا وعندما تحدث الطفرة فإنها غالبا ما تكون متنحية أمام الصفة التى يتحلى بها الكائن طبيعيا.. إن كل الصفات الطافرة تقريبا فى كل الكائنات صفات ضارة لحد ما والكثير منها مميت ، ورغم ذلك فلولا طفرة لما أمكن أن نعرف وحدة الصفة أو أن نفتح وراثتها للتحليل أو جينها للخرطنة ، من البداية إذن كانت الخريطة الوراثية لأى نوع ـ فطرا كان أو ذبابة ، أو إنسانا ـ هى فى الأصل خريطة أخطاء. (كيفلس ،1997).

لكن ما الذى يسبب الطفرات؟ وماذا تغير الطفرة في الكائن الحى؟

إن الإجابة عن هذين السؤالين تأتى من معرفة العلاقة بين الطفرات والجينات وكذا إمكانية التطفر وفى أية ظروف كما سبق أن أشرنا.

لقد تصور العلماء الجين جسيما له بالضرورة رغم دقته البالغة ، بنية مركبة من أجزاء عديدة له وظيفة ثنائية من وجهة نظر علماء الوراثة ، الأولى قدرته على توجيه الكائن الحى لينتج مادة بعينها - إنزيما كانت أو جسما مضادا أو صبغة ، أو غير ذلك ـ مادة تختلف عن مادة الجين ذاته ، الثانية قدرته على أن يشكل من ذاته نسخة أمينة ، وهذه القدرة على التضاعف الذاتى عملية جوهرية فى الجين ، هى شئ أكثر روعة مما كان يدركه البيولوجيون. ذلك أنه إذا ما طفرت صفة فإن الجين الطافر هو أيضا يتضاعف بعد ذلك بأمانة.