الفصل الثاني

مصادر معلومات المعلوماتية الحيوية

١. مشاريع سلسلة الجينوم (مثال مشروع الجينوم البشرى).

٢. نتائج تجارب المصفوفة الدقيقة.

٣. العناصر المتنقلة في الجينومات المعقدة (تركيبها وتطورها).

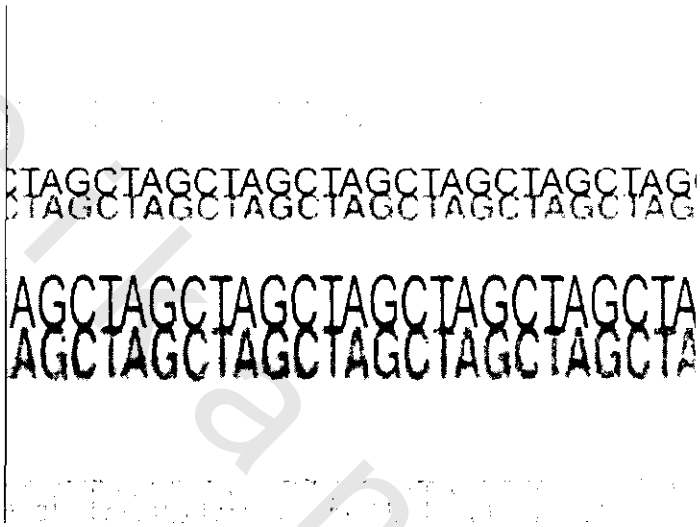
٤. نتائج التجارب البيولوجية (مثال الـ PCR).

obeikandl.com

دراسة الجينوم البشري والمعلوماتية الحيوية

مقدمة

إن دراسة المجموع الكلي للجينات البشرية أو(مايطلق علية الجينوم البشرى) هو في الحقيقة دراسة لتفاصيل هامة عن انفسنا. يتكون الجينوم البشري من ثلاثة بلايين قاعدة مكونة من أربع أنواع فقط من الحروف الابجدية للـ DNA (المادة الوراثية).

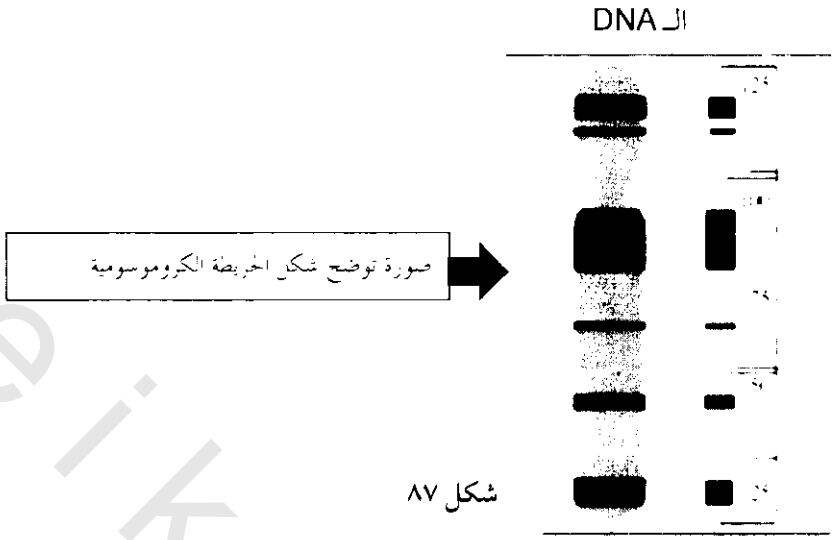


شكل ٨٦: يوضح ثلاثة بلايين قاعدة مكونة من أربع أنواع فقط من الحروف الابجدية للـ DNA (المادة الوراثية).

وينتظم الـ DNA الكلي داخل خلية الانسان في ما يسمي بالكرموسومات عددها ٢٣كرموسوم والتي توجد في كل خلية من بلايين الخلايا في اجسادنا. في سنة ٢٠٠٣ قدم مشروع الجينوم البشري مجموعة كاملة من التتابعات الممثلة لجينوم الانسان. وبالطبع ولآن البشر غير متطابقين فان هناك اختلافات جزئية بين الافراد. ولذلك فانة حاليا يوجد العديد من المشاريع البحثية الجديدة التي تدرس الاختلافات بين الافراد والجماعات البشرية. الجينوم الذى تمت سلسلته فى مشروع الجينوم البشرى والممثل لجينوم الانسان الحالي هو في الحقيقة عبارة عن تجميع من عدد (١٠٠فرد) تبرعوا بعينات من دمائهم للمشروع الاول.

كل شخص تبرع للمشروع بعينة من دمه قد وافق مسبقا علي ان يتم دراسة الـ DNA الخاص بة مع عدم وضع اي اسماء علي العينات ، وقد قام العلماء في النهاية باختيار بعض العينات للدراسة فقط .وبذلك لم يتمكن احد من معرفة اي العينات قد تم استخدامها. الهدف الاساسي من مشروع الجينوم البشري هو قراءة الثلاث بلايين

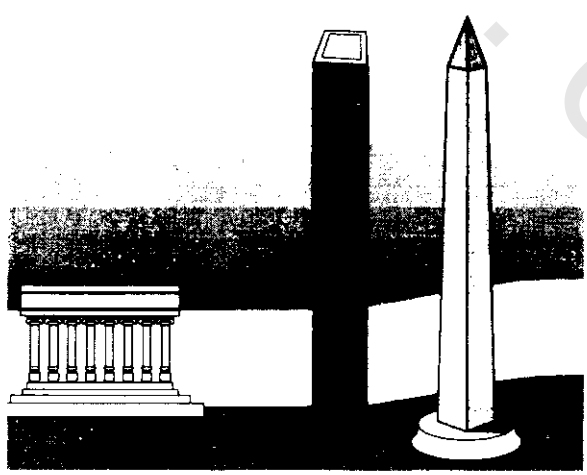
حرف من الجينوم البشري. وجدير بالذكر أنه قبل البدء في سلسلة الجينوم البشري، قام العلماء ببناء ما يسمي بالخرائط الكروموسومية وتطوير طرق استخلاصها وتحليل



شكل ٨٧

وعندما توفرت كل الادوات المناسبة ، قام العلماء بقراءة التتابعات (large scale sequencing) سنة ١٩٩١. وفي عام واحد فقط كان لديهم معلومات اولية تغطي حالي ٨٠٪ من الجينوم.

ولكى يمكننا تخيل حجم الجينوم البشرى داخل الخلية الواحد فيجب أن نتصور بأنه لوقام العلماء بكتابة حروف الجينوم البشري (٣ بليون حرف) الموجودة داخل خلية الانسان في كتاب بحجم دليل التليفونات مثلاً سوف نحتاج الي عدد من الكتب بطول مسلة واشنطن والتى يصل طولها الى حوالي ١٦٩ متر كما يوضح الشكل التالى:



شكل ٨٨: يوضح عدد من الكتب التى تحتوى على حروف الجينوم البشري (٣ بليون حرف) الموجودة داخل خلية الانسان بطول مسلة واشنطن حوالي ١٦٩ متر

obeikandl.com

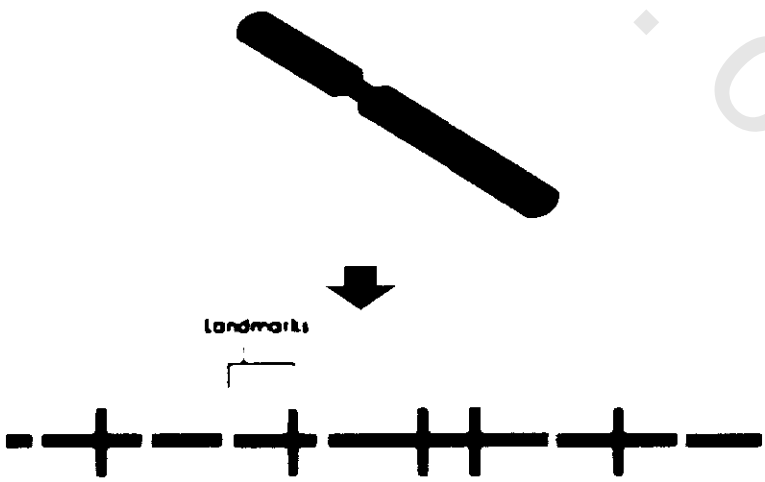
وحتي يتم معرفة التتابع بدقة لكل قاعدة في الجينوم ، قام العلماء بقراءة الثلاثة بلايين قاعدة من ٦ لي عشرة مرات علي الاقل. مع العلم بأن ان تجربة السلسلة المفردة تظهر فقط حوالي عدة مئات من القواعد في المرة الواحدة والتي تساوي جزء من صفحة واحدة من الكتاب.

ذلك يعني انة اذا اردنا ان نحصل علي التتابع الكلي لجينوم يجب عمل سلسلة لعدة الاف من التتابعات المتداخلة ويطلق علي هذة العملية (تجميع التتابعات).

شكل ٨٩: يوضح حوالي ان تجربة السلسلة المفردة تظهر عدة مئات من القواعد في المرة الواحدة والتي تساوي جزء من صفحة واحدة من الكتاب

أولاً: عملية الخرطنة (MAPPING):

حتي يبدأ المشروع قام العلماء ببناء خرائط للجينوم البشري فقاموا بتحديد الاف المحددات (LANDMARKS)علي طول كل كرموسوم والتي ساعدتهم علي دراسة الاجزاء المختلفة لكل كرموسوم.

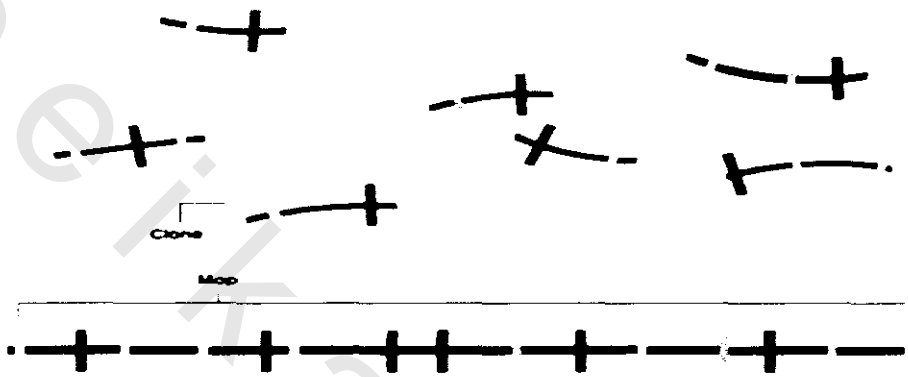


شكل ٩٠: صورة توضح عمل المحددات landmarks على الكرموسومات المدروسة

obeikandi.com

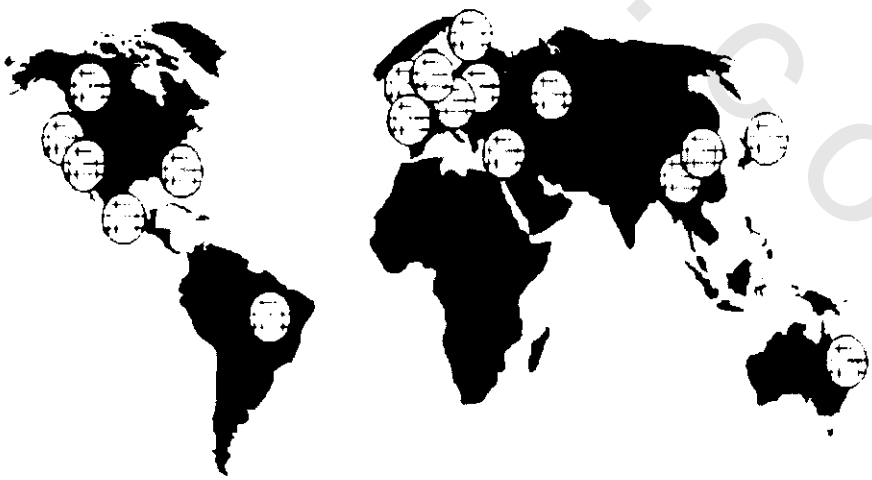
عمل هذة المحددات الكروموسومية كان ضرورياً للتحضير لعملية سلسلة الـDNA. كما ساعدت هذة الخرائط علي تحديد اماكن جينات الامراض.

ومع توفرعدد كافي من المحددات قام العلماء بعمل مكتبات من نسخ (كلون) اجزاء الجينوم وكل كلون (نسخة) تحتوي علي جزء صغير من الـ DNAوالتي يتم حفظها في البكتريا.



شكل ٩١: صورة توضح نسخ (كلون) الـ DNA (clone)

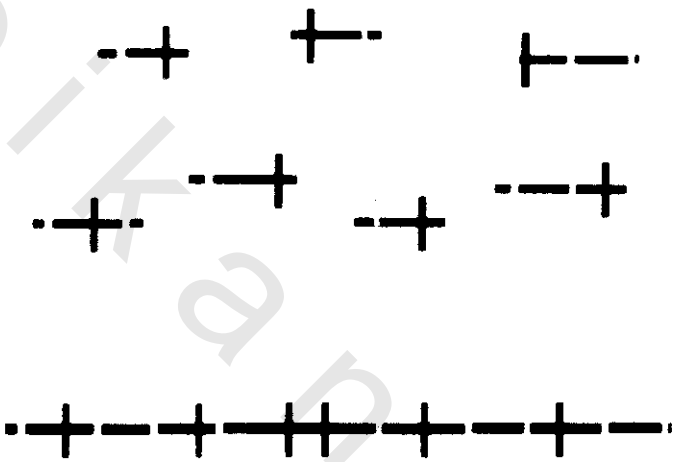
استخدام العلماء هذة المحددات لتوضيح الاماكن التي جاءت منها كل قطعة (DNA) من الجينوم الاصلي. وبهذة الطريقة تم التأكد من مصدر كل قطعة DNA تمت دراستها وموقعها في الجينوم. كما ساعدت علي توزيع وتنسيق العمل والتعاون بين المعامل المختلفة علي مستوي العالم حيث ان كل معمل تخصص في دراسة مجموعة محددة.



شكل ٩٢: صورة توضح توزيع وتنسيق العمل والتعاون بين المعامل المختلفة علي مستوي العالم

ثانيا :بناء المكتبات الجينومية:

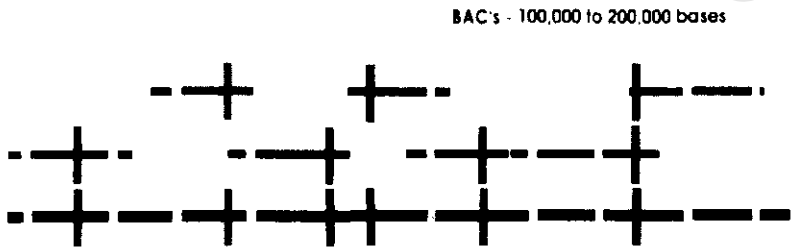
ان المكتبات الجينومية تعطي نفس المميزات المكتبات الحقيقية وهي الحصول علي المعلومات بشكل منتظم. في معظم المكتبات الجينومية يتم تخزين اجزاء الـ DNA(المادة الوراثية) في بكتريا الايكولاي (E.coli) (بكتريا تعيش في الامعاء). يتم تخزين قطعة صغيرة منفردة من الجينوم البشري فى كل خلية بكترية وبذلك تمثل كتاب صغير في المكتبة. المكتبات الجينومية تتيح سهولة تتبع كل قطعة جينومية وسهولة نسخها.



شكل ٩٣: يوضح تخزين قطع الـ DNA داخل خلايا الـ E.coli

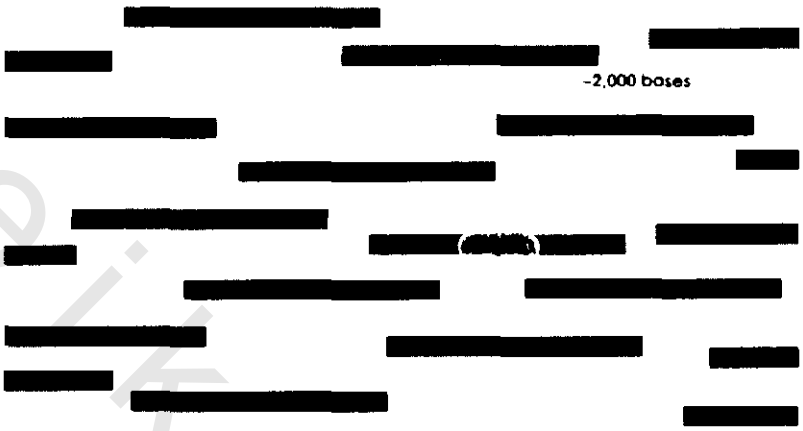
ثالثا المكتبات الجينومية الصغيرة (Subclones):

يتم عمل المكتبات الجينومية باستخدام كرموسوم البكتريا الصناعي (BAC) بحيث يحتوى كل كرموسوم بكتري يحتوي علي ١٠٠ الي ٢٠٠ الف قاعدة.



شكل ٩٤: كل كرموسوم بكتيري يحتوي علي قطعة من الـ DNA بطول ١٠٠ الي ٢٠٠ الف قاعدة

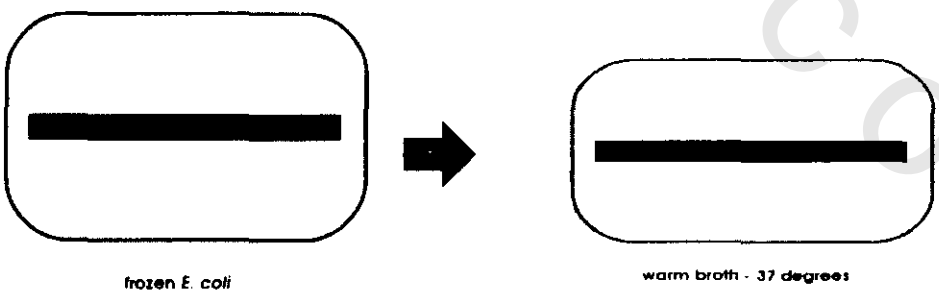
هذة المكتبات الكبيرة البكتيرية يتم عملها للحفاظ علي الترتيب الكروموسومى للتتابعات والتي يتم تقسيمها الي مكتبات فيروسية اصغر (اجزاء جينومية اصغر) والتي تصل الي حوالي ٢٠٠٠قاعدة والتي يتم تخزينها في فيروسات تسمي فاج والتي يمكنها عدوي واختراق بكتريا الـ E.coli



شكل ٩٥: مكتبات فيروسية اصغر تحتوى على اجزاء جينومية اصغر والتي تصل الي حوالي ٢٠٠٠قاعدة

رابعا التخزين داخل بكتريا الـ E.coli:

يمكن تخزين على اجزاء جينومية ببكتريا الـ E.coli لكى تحتوي علي اجزاء من جينوم الانسان او اي جينوم اخر تحت التبريد الشديد لفترات طويلة. وعندما يرغب العلماء في استعادة اي قطع الـ DNA من المكتبة الجينومية يمكنهم ببساطة ان يعيدوا حيوية البكتريا التي تحتوي علي الـDNAعن طريق رفع درجة حرارتها الي ٣٧درجة مئوية في بيئة نمو البكتريا.



شكل ٩٦: البكتريا التي تحتوي علي الـDNAعن طريق رفع درجة حرارتها الي ٣٧درجة مئوية

تنمو البكتريا علي ٣٧ درجة مئوية في بيئة النمو الخاصة بها وتقوم بنسخ قطعة الـ DNAالجينومية في كل خلية جديدة.

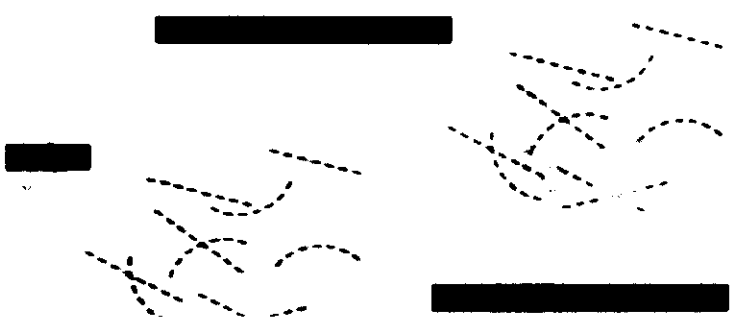
للاعداد لسلسلة الـ DNA يجب اولا نمو مجموعة من الخلايا التي تحتوي علي نفس قطعة الDNA في بيئة نمو البكتريا مع الاهتزاز الدوراني بقوة والذي يعمل علي امداد بيئة النمو بالهواء الذي يساعد علي سرعة نمو البكتريا وانقسامها وتضاعفها بمعدل مرة كل نصف ساعة.

بعد التحضين لمدة ليلة واحدة سنجد ان ثلث معلقة شاي من بيئة النمو تحتوي علي بلايين من خلايا ال E.coli وبالتالي بلايين النسخ من قطع الـDNA التي تحتويها كما يوضح الشكل التالي:

شكل ٩٧: صورة توضح بلايين الخلايا واحتواءهم علي بلايين من نسخ الـDNA

خامسا تحضير الـDNA لتفاعل السلسلة:

يتم استخلاص الDNAمن البكتريا بعد فتحها في اليوم التالي ثم يتم تنقية واستخلاص الـ DNA البشري من البقايا الخلوية الاخري.



شكل ٩٨: تنقية واستخلاص الـ DNA البشري من البقايا الخلوية الاخري

وبذلك تكون قد حصلنا علي عدد كافي من النسخ من قطعة الDNAلعمل تفاعل السلسلة.

3'-CATGGTAAGCCGTTTAGTTAGCGAGCTCTT-5'

شكل ٩٩: صورة توضح الحصول علي الـ DNAمن البكتريا لعمل تفاعل السلسلة

سادسا: تفاعل السلسلة:

يحتوي تفاعل السلسلة علي اربع مكونات رئيسية:

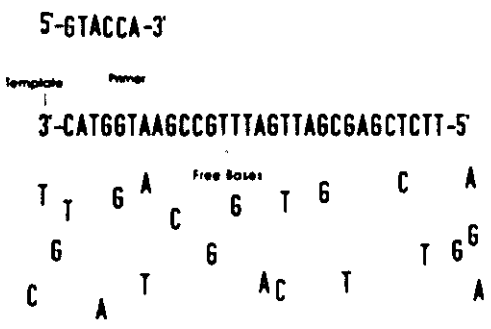
١- الدنا القالب الذي تم نسخة عن طريق الـ E.coil.

٢- القواعد الحرة وهي حجر البناء للـ DNA وهي اربع انواع A،T،G،C.

٣- قطع صغيرة من الدنا (بوادئ).

٤- انزيم البلمرة وهو الانزيم الذي يعمل على نسخ الـ DNA .

التفاعل الكيميائي الذي يتم لنسخ الـDNA في انبوبة الاختبار يشبة ما يحدث في الخلية الحية فكلاهما يعتمد علي انزيم البلمرة وايضا في كلتا الحالتين نجد ان خيطين الـ DNA يحتوي علي نهاية راسية تسمي نهاية طرفية(5) ونهاية ذليلية تسمي (3) وينمو الـ DNA من الطرف (3) في اتجاه (5)



شكل ١٠٠: صورة توضح مكونات تفاعل السلسلة

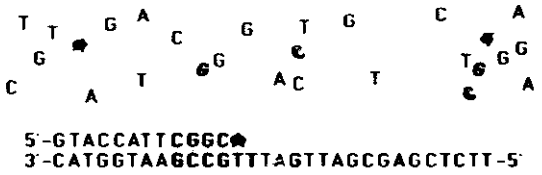
obeikandl.com

ويعتمد تكوين الDNAالجديد في كلتا الحالتيان ايضا عن تكامل القواعد حيث ان القواعد المختلفة في كلا الخيطين تتكامل بشكل خاص فمثلا الـ C تتكامل مع Gوالـ A تتكامل مع T

ويتكامل تتابع البوادئ مع التتابع المكمل لة علي الخيط القالب(Template DNA) بحيث أن القواعد الحرة تتكامل مع القواعد المكملة لها في الطرف(3). بعض هذة القواعد الحرة تحتوي علي صبغات فلورسنتية. فعندما تتصل احدي هذة القواعد الفلورسنتية بالخيط النامي توقف الخيط عن النمو. ويوجد لون مميز لكل نوع من الانواع الاربعة للقواعد.

شكل ١٠١

صورة توضح الصبغات الفلورسنتية للقواعد



صورة توضح كيفية تكوين الخيط الجديد واتصال احد القواعد الفلورسنتية

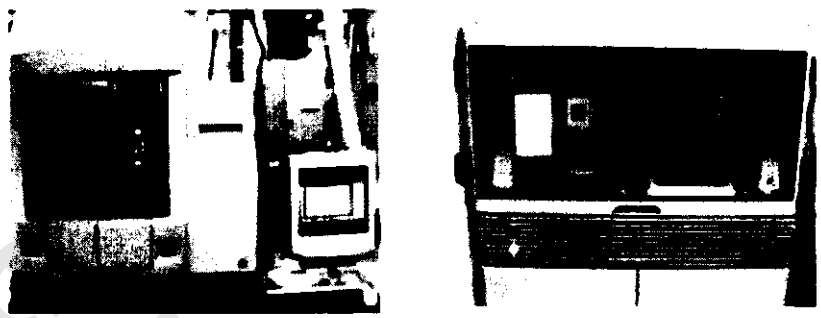
سابعا :منتجات تفاعل السلسة:

بعد انتهاء تفاعل السلسلة ينتج مصفوفة من قطع الـ DNA الملونة . اقصر قطعة تمثل طول البادئ بالاضافة قاعدة واحدة ملونة اما اطول قطعة فهي تمثل حوالي من ٥٠٠ الي ٨٠٠ قاعدة اعتمادا علي قدرة تفاعل السلسلة علي الاستمرار.

شكل ١٠٢: صورة توضح نواتج تفاعل السلسلة

obeikandl.com

يتم خروج مخرجات تفاعل السلسلة في جهاز السلسلة الاتوماتيكي وهذة الاجهزة تطورت كثيرا في العقد الاخير بحيث يمكنها معالجة عدد اكبر من العينات وبسرعة اكبر وبسهولة في التفاعل والتشغيل.



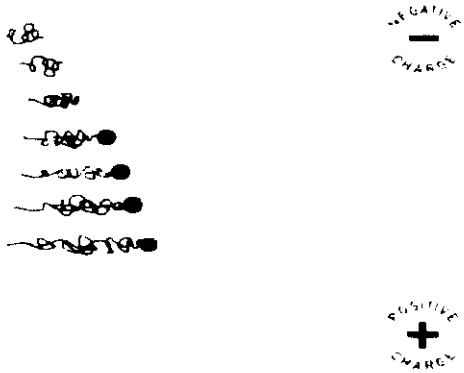
شكل ١٠٣: صور لاشكال جهاز السلسلة الاتوماتيكي

ثامنا :فصل منتجات تفاعل السلسلة:

١. يتم فصل قطع الـDNA الناتجة من تفاعل السلسلة عن طريق عملية التفريد الكهربي.

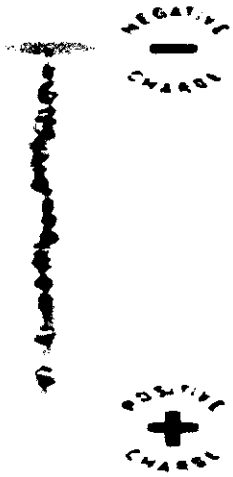
شكل ١٠٤: فصل قطع عن طريق عملية التفريد الكهربي

٢. ان قطع الـ DNAسالب الشحنة وبالتالي فهي تتحرك داخل ثقوب الجيل في اتجاة الشحنة الموجبة.



شكل ١٠٥: قطع تتحرك فى اتجاة الشحنة الموجبة.

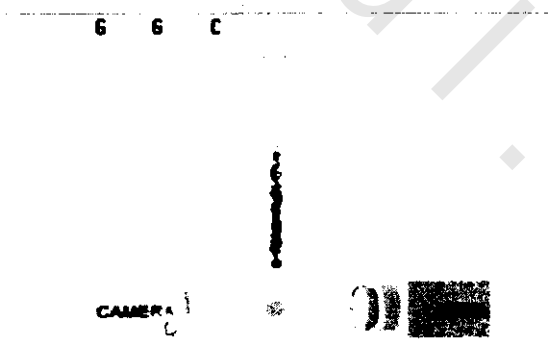
٣. تعمل ثقوب الجيل مثل الغربال حيث ان قطع الـ DNA القصيرة تتحرك سريعا في حين ان القطع الاطول تتحرك ابطأ.



شكل ١٠٦ : قطع الـ DNA القصيرة تتحرك أسرع في حين ان القطع الاطول تتحرك ابطأ

تاسعا : قراءة منتجات تفاعل السلسلة:

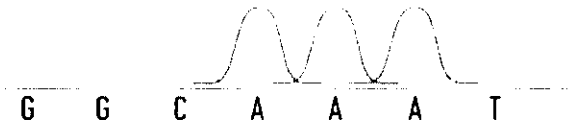
١- رد وصول قطعة الـ DNAالي نهاية الجيل يتم تنشيط الصبغة الفلورسنتة عن طريق شعاع الليزر.



شكل ١٠٧ : صورة توضح قراءة منتجات التفاعل بواسطة الليزر

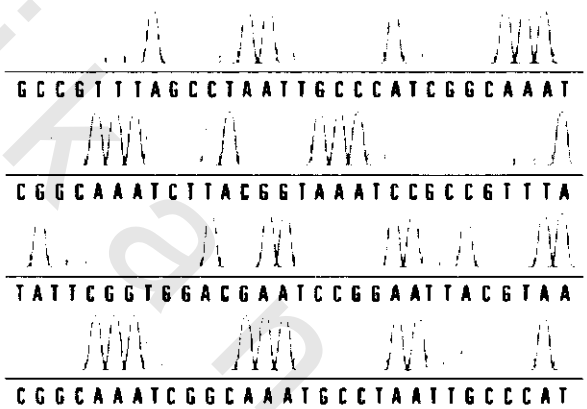
٢- تقوم الكاميرا الملحقة بالتعرف علي اللون الفلورسنتي ثم ترسل هذة المعلومات الي الكمبيوتر واحدة تلو الاخري،وبالتالي تسجل الالة الوان قواعد الـ DNA التي تمر عبر الجيل.

obeikandi.com



شكل ١٠٨ : صورة توضح تسجيل الالة الوان قواعد الـ DNA

٣- وبالتالي يمكن التعرف علي عدة مئات من القواعد عن طريق تفاعل سلسلة واحد.

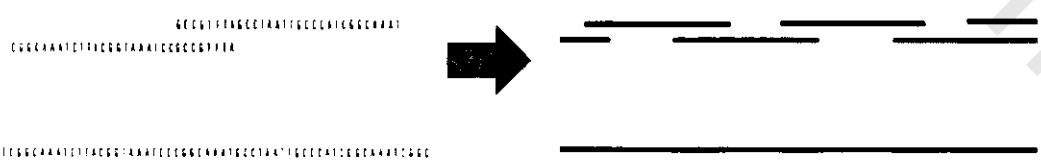


شكل ١٠٩ : عدة مئات من القواعد نتجت من تفاعل سلسلة واحد

عاشراً: تجميع النتائج:

١- تبدأ برامج الحاسب في تجميع ودمج التتابعات الناتجة من تفاعل السلسلة.

٢- تعمل هذة البرامج عن طريق تحديد اماكن تداخل (Over lap)التتابعات وبالتالي تساعد علي ترتيب وتجميع التتابع النهائي لخيط الـ DNA الذي تمت سلسلتة وتحديد مكانة الاصلي علي الكرموسوم.



شكل ١١٠ : أماكن تداخل تساعد علي ترتيب وتجميع التتابع النهائي علي الكرموسوم

٣- خلال مشروع الجينوم البشري تمت قراءة (سلسلة) كل قاعدة ما يقرب مع ٩ مرات في المتوسط.

٤- وهناك مناطق من الـ DNA كانت من السهل في قرائتها (سلسلتها) وبالتالي تمت قرائتها عدد اقل من المرات بينما هناك مناطق اخري كانت اصعب في قرائتها وبالتالي تمت قرأتها عدد اكبر من المرات.

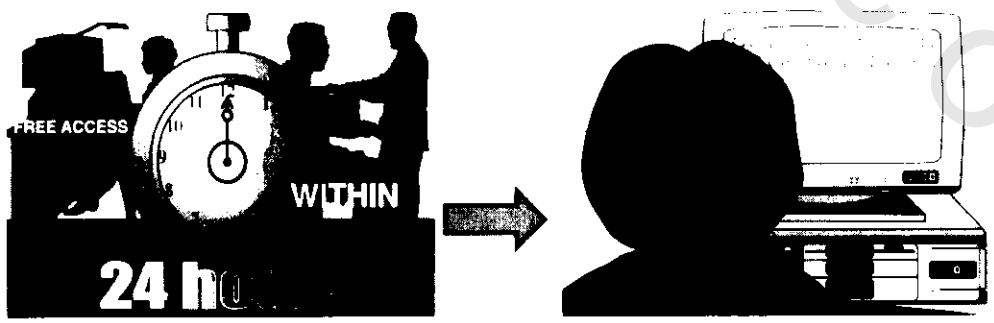
٥- خلال مشروع الجينوم البشري ،قام العلماء باجراء مايقرب من ٥٠مليون تجربة تتابع سلسلة.

٦- وشارك حوالي ٢٠٠٠عالم من مايقرب من ٢٤معمل علي مستوي العالم شارك في المشروع العملاق.

شكل ١١١: صورة توضح مشاركة أكثر من ٢٤معمل علي مستوي العالم فى المشروع

الحادي عشر: النسخة الاولية:

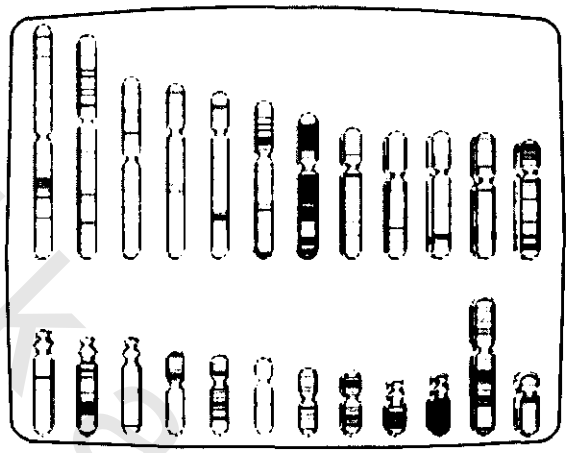
١. بمجرد تجميع اي قطعة الـ DNA بطول ٢٠٠٠قاعدة، يتم نشرها ووصفها غلي قاعدة بيانات عامة في خلال ٢٤ ساعة .



شكل ١١٢: شكل يوضح قدرة اي شخص لة قدرة الاتصال والتجوال علي الانترنت بمعرفة التتابعات

٢. وبأمكان اي شخص لة قدرة الاتصال والتجوال علي الانترنت مع رؤية وتحليل التتابعات.

٣. بعد ان تمت سلسلة وقراءة الجينوم البشري المكون من (ثلاثة بليون قاعدة)حوالي تسع مرات في المتوسط، قام مشروع الجينوم البشري بنشر النسخة الاولية من النتاءج والتي تغطي٩٩٪ من الجينوم وبدقة حوالي ٩٩,٩٩٪



شكل ١١٣: قيام مشروع الجينوم البشري بنشر النسخة الاولية من النتائج والتي تغطي٩٩٪

٤. وبذلك يكون المشروع قد قام بالانتهاء من كل اهدافة قبل الميعاد المحدد وبيميزانية اقل من المتوقع.

obeikandl.com

الخاتمة

١. من خلال مشروع الجينوم البشري تم التعرف علي جينومات اخري مثل الحصول علي نسخة متقدمة من جينوم الفأر المنزلي (Mouse) ونسخة اولية من الفأر الحقلي (Rate).

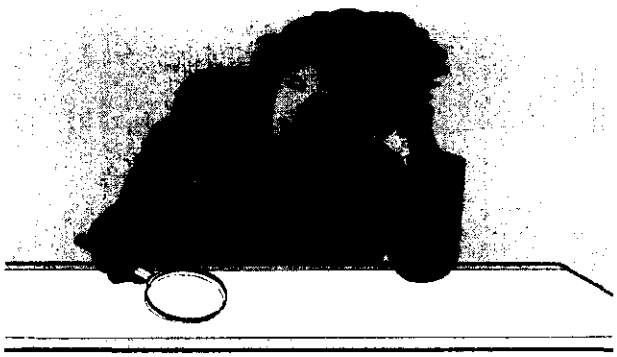
٢. وعلي الفور قام الباحثين الطبيين باستخدام المعلومات الناتجة ودراستها علي الفور.

٣. فعند بداية المشروع سنة ١٩٩٠كان هناك اقل من ١٠٠جين معروف مسبب للامراض ومع انتهاء المشروع سنة ٢٠٠٣ارتفع عدد الجينات المعروفة المسببة للامراض الي ١٤٠٠جين.

شكل ١١٤: قام الباحثين الطبيين باستخدام المعلومات الناتجة ودراستها علي الفور عن طريق برامج المعلوماتية الحيوية

٤. ان مشروع الجينوم البشري اعتمد علي معرفة التتابع الجينومي لفرد واحد وبالتالي كانت الخطوة التالية هي معرفة التتابعات المختلفة من عشائر بشرية مختلفة وعمل كتالوج للاختلافات البشرية والذي اطلق علية(هاب ماب) والذي انتهي العمل به سنة (٢٠٠٥)

٥. اعتمد مشروع الـ(هاب ماب)علي معرفة اختلافات البشر علي مستوي القواعد المفردة (SNPs) داخل مناطق كبيرة مرتبطة وراثيا وتنتقل معا كقطعة واحدة تسمي Haplo typeهابلوتيب.



شكل ١١٥: صورة توضح معرفة اختلافات البشر علي مستوي القواعد المفردة (SNPs) داخل مناطق كبيرة مرتبطة وراثيا

٦. فمثلا تمت مقارنة هذة القطع الكبيرةHaplo type بين الاشخاص المصابين بالمرض والاشخاص الخاليين من المرض لمعرفة القواعد المختلفة التي قد تكون مرتبطة بالمرض.

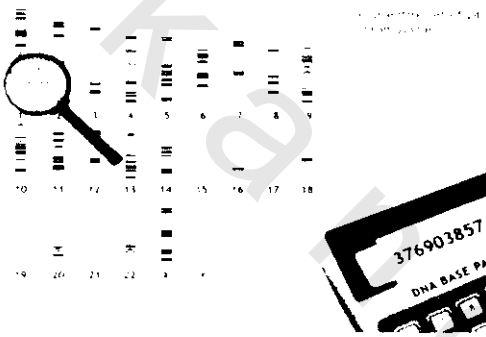
شكل ١١٦: صورة رمزية توضح البحث عن القواعد المختلفة التي قد تكون مرتبطة بالمرض.

٧. وقد تم استخدام هذا التكنيك للتعرف علي اماكن وجينات بعض الامراض ومن المتوقع ان يستخدم هذا التكنيك لمعرفة المزيد من جينات الامراض المنتقلة.

ملخص سلسلة الجينوم

كيف تمت سلسلة الجينوم البشري

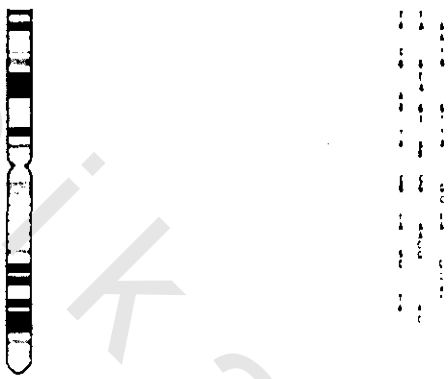
- كل فرد من البشر يحمل نسخة مختلفة قليلا من الجينوم البشري
- جميع خلايا الانسان تقريبا تحمل جميع المعلومات والتعليمات اللازمة لبناء الجسم وهوفيما يسمي بالجينوم.
- جميع هذة المعلومات مشفرة علي خيط طويل مع مادة كيميائية تسمي الDNAوالتي تتحلزن في تركيب يسمي الكرموسوم.
- توجد جميع المعلومات في تتابع من القواعد الكيميائية بطول خيط الـDNAوتوجد اربع انواع فقط التي تكون الـDNA وهي قواعد C-A-T-G بحيث (A-T) والـ (G-C) ويوضح ذلك في الشكل رقم (١١٧).



الشكل رقم (١١٧)

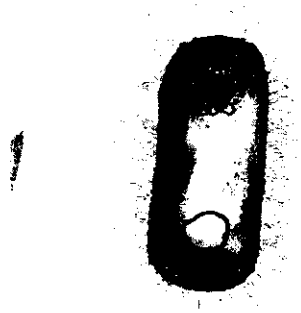
- توجد في كل خلية نسختين من الجينوم نسخة ابية من الاب ونسخة امية من الام
- وعند النظر في نسخة واحدة من الجينوم فنجد ان كل كرموسوم يحمل كم كبير من المعلومات.
- وتحتوي المجموعة الكاملة لكرموسومات الانسان في الخلية الواحدة علي٢٤ كرموسوم بطول ثلاث بليون قاعدة
- ان مشروع الجينوم البشري مجهود وتعاون دولي لفك شفرة كل حروف الـ DNA الموجود في جينوم الانسان.
- قام مركز سانجر بسلسلة جميع اجزاء الكروموسومات ١-٦-٩-١٠-٢٠-X-٢٢
- استخدام مشروع الجينوم البشري طريقة (TOP-down) (اعلي – اسفل) وهي تعتمد علي عمل خريطة كاملة للجينوم ثم تقسيم مهام سلسلة الكروموسومات علي المراكز المشتركة في المشروع.

- قامت المراكز المختلفة بتقسيم كل كروموسوم الي اجزاء نظرا لان اجهزة السلسلة المتوفرة في ذلك الوقت تستطيع فقط قراءة عدة مئات من حروف الDNAفي التفاعل الواحد.
- بعد تقسيم الكرموسوم الواحد الي مناطق محدودة ثم تقسيم هذة المناطق الي اجزاء ثم تقسيم هذة الاجزاء الي اجزاء اصغر ثم سلسلتها بعد ذلك تم تجميع نتائج السلسلة لمعرفة تتابعات الاجزاء الصغيرة كما في الشكل رقم (١١٨).



شكل رقم (١١٨)

- ثم تجميع الاجزاء الصغيرة لبناء الاجزاء الاكبر وهكذا حتي تم معرفة تتابعات الكروموسوم بالكامل.
- قد تم الحصول علي الـ DNAالمستخدم في مشروع الجينوم البشري من افراد مجهولين بشكل سري بعد موافقتهم علي ذلك
- اعطي كل فرد عينة من دمة والتي استخدمت لاستخلاص الـ DNA منها والذي تم تكسيرة الي اجزاء.
- تم دمج هذة الاجزاء مع بلازميدات بكترية معدلة وراثيا حيث تم تضاعفها ثم تم تخزينها في خلايا بكترية والشكل رقم (١١٩) يوضح ذلك.

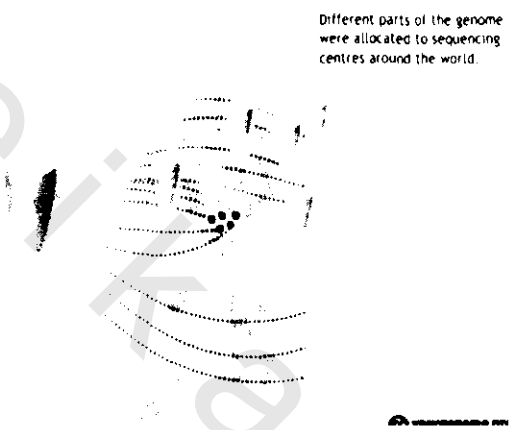


شكل رقم (١١٩)

obeikandl.com

- ونظر للحجم الهائل للعمل الذي تطلبة هذا المشروع تم تقسيم العمل بين عدد من المراكز العلمية حول العالم

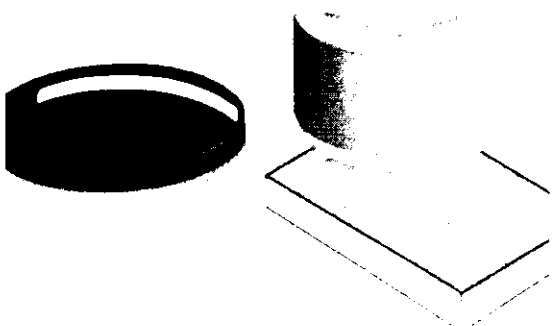
- في كل مركز من هذة المراكز تم تقسيم قطع الـ DNAالمخصصة لها والبالغ طولها حوالي مئات الالاف من القواعد الي قطع اصغر بطول عدة الاف وتم وضعها في بلازميدات بكترية شكل رقم (١٢٠).



شكل رقم (١٢٠)

- ثم تم وضع هذة البلازميدات ايضا في البكتريا ،حيث تم نسخ قطع الـ DNAالاصلي بواسطة نمو وانقسام البكتريا علي اطباق النمو.

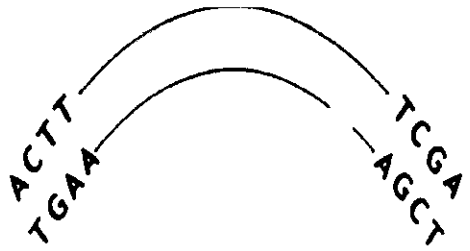
- تلي ذلك قيام بشر او الات بنقل كل مستعمرة بكترية والتي تحتوي قطع الـ DNAخاصة الي انابيب منفصلة للقيام بعملية السلسلة كما في الشكل رقم (١٢١) الذي يوضح نقل مستعمرات بكتيرية بالماكينة.



الشكل رقم (١٢١)

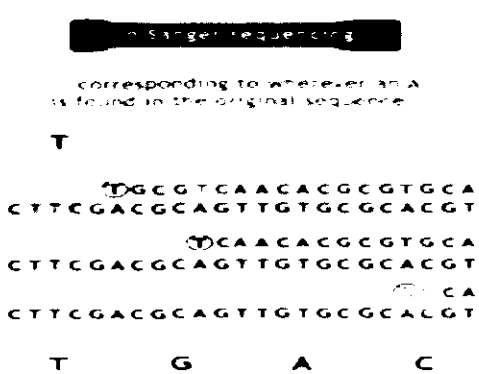
- عزل البكتريا وفصل الـ DNAالبشري من البلازميد البكتري هو جزء اصيل من عملية التحضير للسلسلة.

- يكون تتابع البلازميد معروف فى حين أن تتابع قطعة الDNAالبشري الداخلة غير معروفة الشكل رقم (١٢٢)



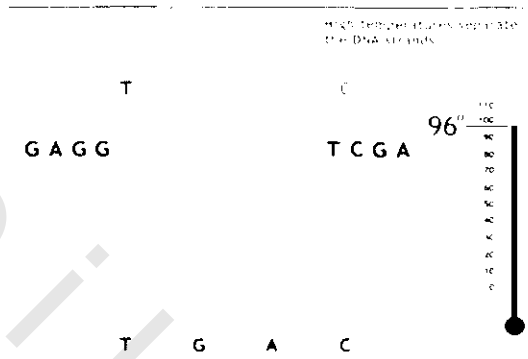
الشكل رقم (١٢٢)

- تمت السلسلة باستخدام طريقة(Sanger)سانجر المتطورة سنة ١٩٧٠.
- تعتمد طريقة سانجر علي فكرة عملية التكرار Replication في الخلية الحية.
- فمثلا لتكرار قطعة من ال DNA تم فصل خيطي الـ DNAعن بعضها بواسطة بعض الانزيمات الخاصة بذلك قبل ان يتحرك انزيم البلمرة علي احد الخيطين لاضافة القواعد الحرة من النيوكليوتيدات C-G-A-T لعمل الخيط المكمل لكل خيط قالب.
- في طريقة سانجر ، يتم اضافة بعض قواعد C-A-T-G المعدلة(المعلمة فلورسنتيا) الي خليط التفاعل.
- هذة القواعد المعدلة (داي ديوكسي) والتي تعمل علي انهاء التفاعل وهي معلمة بصبغات فلورسنتية.
- ويبدا التفاعل كما في الطريقة السابقة، يتم فصل خيطي الـ DNAعن بعضهم ثم تبدأ انزيمات البلمرة في اضافة قواعد T-A-C-Gولكن عند اضافة احد القواعد المعلمة الفلورسنتية يتوقف التفاعل.
- فمثلا اذا اخذنا قاعدة ال(T) كمثال سنجد اننا قد نحصل علي قطع كثيرة تنتهي بالقاعدة (T) تمثل مواضع وجود القاعدة (A)في التتابع الاصلي.والشكل رقم (١٢٣)يوضح تفاعل سانجر.



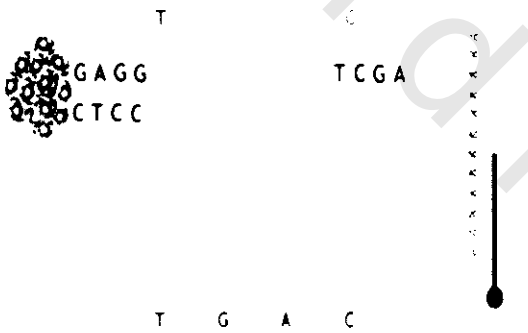
شكل رقم (١٢٣)

- لنري كيف يعمل ذلك مع الحروف الاخري في تتابع مجهول:-
- يعتمد التفاعل علي درجة الحرارة
- تعمل درجة الحرارة المرتفعة علي فصل خيطي الDNAعند درجة (٩٦درجة مئوية)والشكل رقم (١٢٤) يوضح ذلك



شكل رقم(١٢٤)

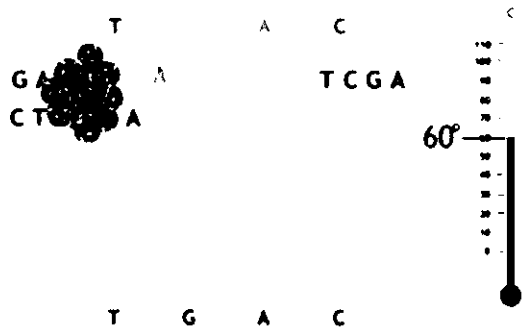
- عند درجة حرارة اقل (تعتمد على تركيب البادئ) يتم اتصال البوادئ (Primer) مع التتابع البلازميدي والتحام انزيم البلمرة علي درجة(٥٠درجة مئوية) الشكل رقم (١٢٥) يوضح ذلك



شكل رقم (١٢٥)

- وعند درجة حرارة اعلي قليلا من الدرجة السابقة (حوالي ٦٠درجة مئوية)يبدأ انزيم البلمرة في اضافة قواعد C-A-T-Gفي الخيط الجديد.الشكل رقم (١٢٦) يوضح ذلك.

obeikandl.com

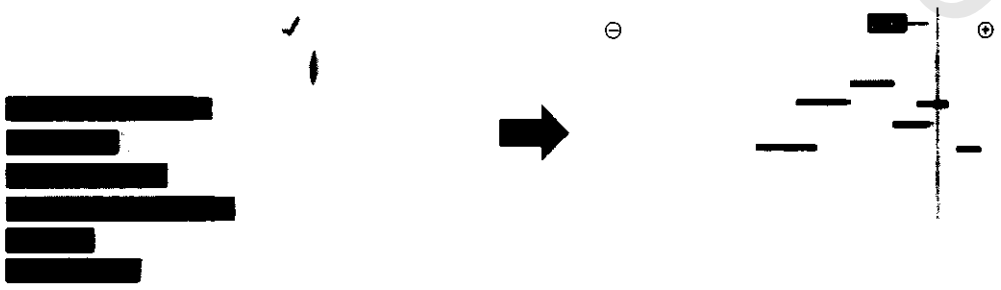


الشكل رقم (١٢٦)

- بعد عدة دورات ستكون هناك قطع من الـ DNAمعلمة بالقواعد الفلورسنتية من T-G-C-Aوالتي تمثل كل قاعدة في التتابع الاصلي. الشكل رقم (١٢٧) يوضح ذلك.

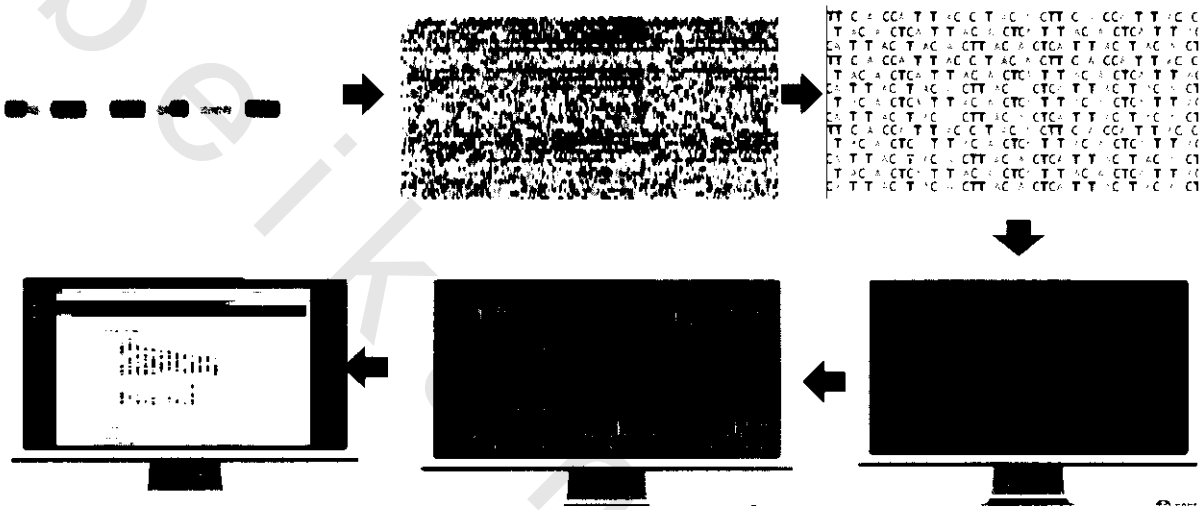
شكل رقم (١٢٧)

- وبالتالي فان الخطوة التالية ستكون وضع هذة القطع في ترتيبها حسب الحجم.
- سيتم تحميل العينة في الجيل الدقيق الخاص بالسلسلة وسيعمل الفصل الكهربائي علي تفريد قطع الـ DNAذات الشحنة السالبة الي اتجاة القطب الموجب.
- يعمل شعاع الليزر علي التعرف علي اللون الفلورسنتي في نهاية كل قطعة ويتم تخزين هذة المعلومات علي صورة منحنيات ملونة.كما في الشكل رقم (١٢٨).



شكل رقم (١٢٨)

- وبالنظر الي مخرجات اجهزة السلسلة المستخدمة لسلسلة الجينومات الكبيرة ،سوف تظهر بالشكل كما في الصورة رقم (١٢٩) كل صف يمثل تتابع مختلف وكل لون مفرد يمثل قاعدة او نيكلوتيدة محددة في التتابع.
- ولبناء الجينوم الكامل يتم تجميع كل التتابعات والبحث فيها عن مناطق تتداخل.
- تم وضع كل المعلومات الاولية والتتابعات المجمعة مجانا علي الانترنت للدراسة ولكل الباحثين.



شكل رقم (١٢٩)

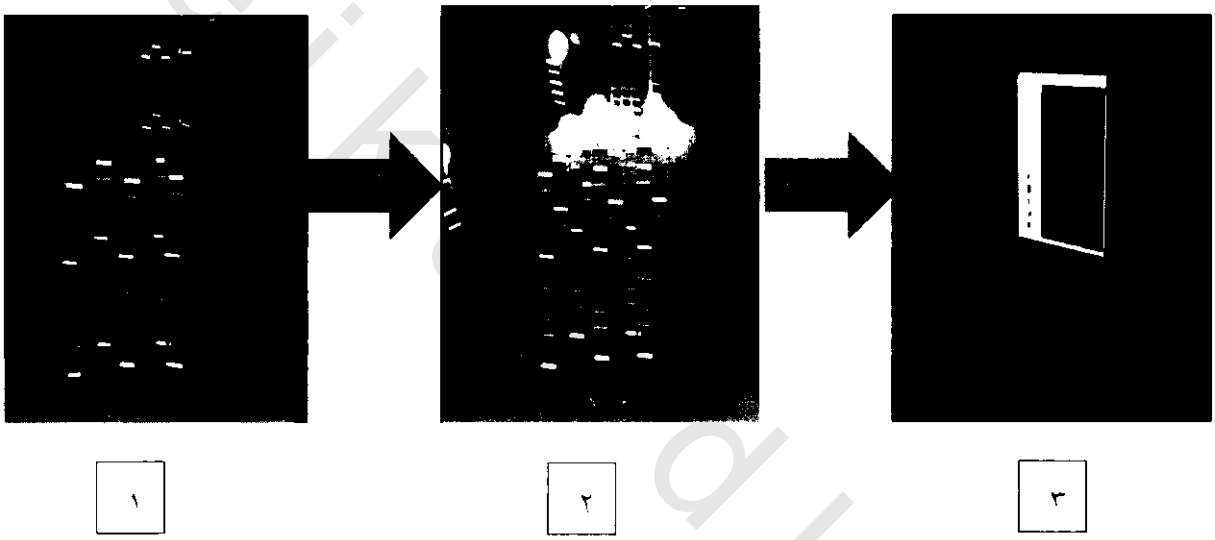
أستخدام المصفوفة الدقيقة

المصفوفة الدقيقة للـ DNA

١. تمثل كل نقطة علي شريحة المصفوفة الدقيقة قطعة محددة من الـDNAوتحتوي كل شريحة علي المجموع الكلي للجينوم الكائن.

٢. يضاف الي كل نقطة مجموعة قطع الـcDNA المعلمة.

٣. يتم قراءة وتحليل شريحة المصفوفة الدقيقة عن طريق برامج خاصة علي اجهزة الكمبيوتر.



شكل ١٣٠: يوضح خطوات قراءة المصفوفة الدقيقة.

هناك عدة تطبيقات لتكنولوجيا المصفوفة الدقيقة:

١- دراسة التعبير الجيني Gene Exprression profiling

٢- المصفوفة الدقيقة للبروتين Protein microarrays

٣- التهجين الجينومي المقارن CGH microarrays

أولا: دراسة التعبير الجيني:

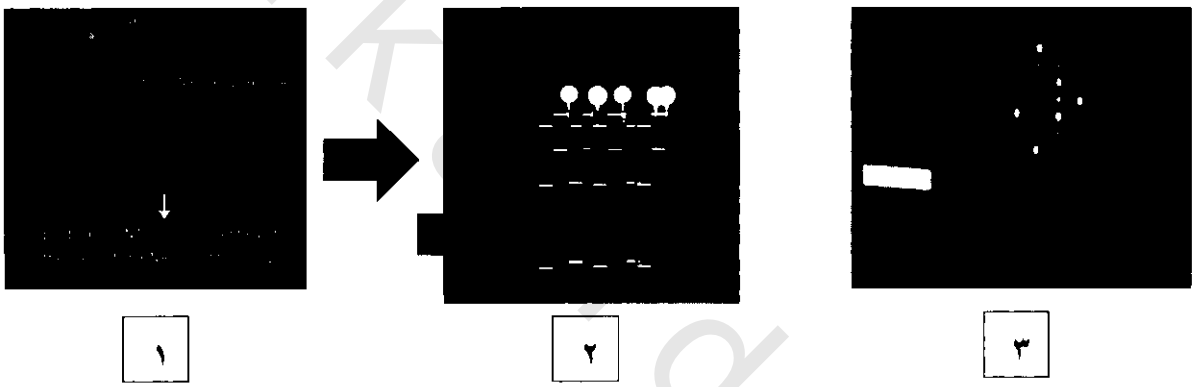
مثال : دراسة التعبير الجيني في نسيج الكبد

١- عزل جزيئات الرنا الرسول(mRNA) المنتجة في نسيج الكبد والشكل رقم (١) يوضح ذلك.

٢- انتاج الدنا المكمل (cDNA)من مجموعة جزيئات الـmRNA في العينة المدروسة الشكل رقم (٢) ذلك.

٣- وضع قطع الدنا المكمل المعلمة علي شريحة المصفوفة الدقيقة للجينوم الكامل الشكل رقم (٣) يوضح ذلك.

٤- تحديد اية من الجينات ثم التعبير عنها في هذة العينة المحددة عن طريق ملاحظة اي القطع الدنا المكمل اعطت نتيجة ايجابية علي نقط شريحة المصفوفة الدقيقة.



شكل ١٣١ : يوضح خطوات دراسة التعبير الجينى عن طريق شريحة المصفوفة الدقيقة.

ثانيا: المصفوفة الدقيقة للبروتين:

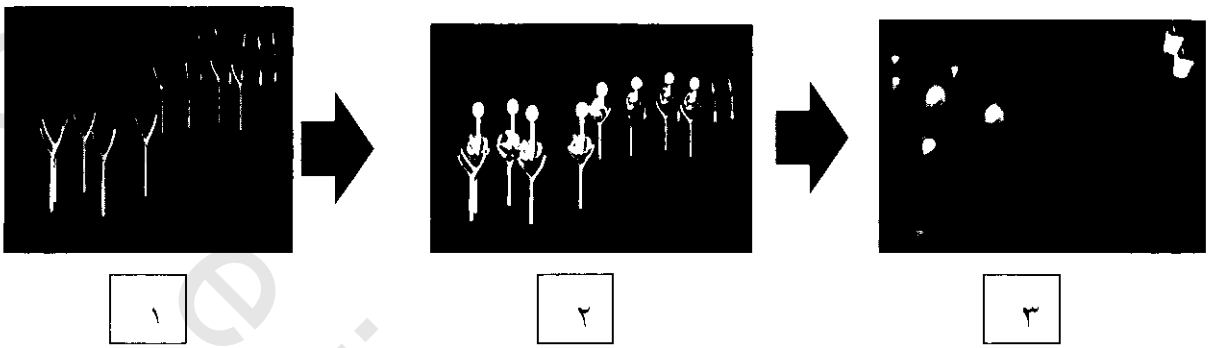
الغرض منها:

تحديد اي من البروتينات يتم ترجمتها في عينة محددة.

١- يتم عمل شريحة المصفوفة الدقيقة للاجسام المضادةالكاملة للكائن الخاصة لبروتينات محددة الشكل رقم (١) يوضح ذلك.

٢- ترتبط البروتينات باجسام مضادة محددة وتظهر نتيجة ايجابيةعلي الشريح الكلية الشكل رقم (٢) يوضح ذلك.

٣- ويمكن تحديد اي البروتينات تعمل سوياعن طريق وضع البروتينات الكلية المعلمة المعزولة من نسيج محدد علي الشريحةوملاحظة اي من البروتينات اعطت نتيجة ايجابية علي نقط شريحة المصفوفة الدقيقة الشكل رقم (٣) يوضح ذلك



شكل ١٣٢

ثالثا: المصفوفة الدقيقة للتهجين الجينومي المقارن (CGH):

الغرض منه، شكل (١٣٣):

المقارنة بين المجموع الكلي لجينات جينومين مختلفين.

١- يتم عمل شريحة المصفوفة الدقيقة لجينوم الكائن تحت الدراسة الشكل رقم رقم (١) يوضح ذلك.

٢- خلط عينات الـ cDNA المكمل المعلمة من الجينومين الشكل رقم (٢) يوضح ذلك.

٣- مقارنة نتيجة التهجين بين العينة الدروسة والعينة المقارنة الشكل رقم (٣) يوضح ذلك.

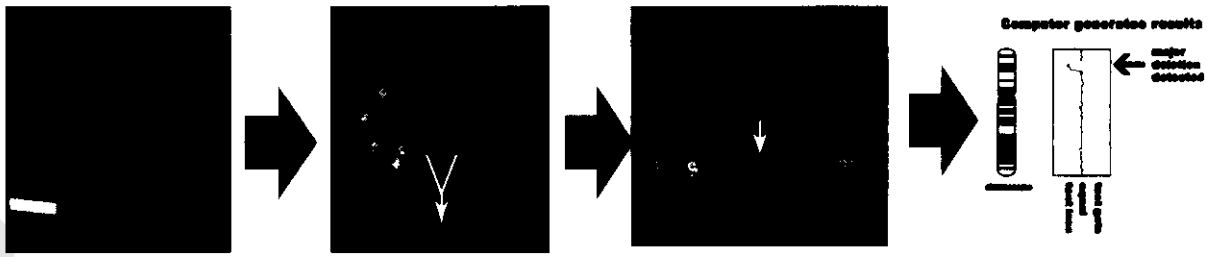
٤- تحليل النتائج عن طريق الكمبيوتر ومقارنة الاختلافات الشكل رقم (٤) يوضح ذلك.

يتم استخدام هذة التكنيك في عدة تطبيقات:

١- مقارنة جينومات الخلايا السرطانية والطبيعية.

٢- مقارنة جينومات خلايا الافراد والاباء الطبيعية.

٣- معرفة اصابة الفرد بالضمور العقلي.



شكل ١٣٣

الخطوات العملية لعمل المصفوفة الدقيقة، (شكل ١٣٤):

نظرة عامة:

١- استخلاص الرنا الرسول(mRNA)من العينات المدروسة ويوضح الشكل رقم (١) ذلك.

٢- بناء الدنا المكمل المعلم من خلال عملية النسخ العكسي يوضح الشكل رقم (٢) ذلك.

٣- خلط العينات وتهجين الدنا DNAالمكمل للcDNA للمصفوفة الدقيقة ويوضح الشكل رقم (٣) ذلك.

٤- خطوة الغسيل وتعني ازالة قطع الDNAغير المهجنة.

٥- الطرد المركزي.

٦- المسح والفحص، ويوضح الشكل رقم (٤) ورقم (٥) ذلك.

(١) استخلاص الmRNAمن العينات :-

يتم استخلاص RNA عالي الجودة من العينات الاختبارية وعينات المقارنة.

(٢) بناء الدنا المكمل المعلم من خلال عملية النسخ العكسي:-

يتم تحضين جزء من الRNAم انزيم النسخ العكسي لمدة ساعتين في وجود النيوكليوتيدات وصبغة cy(cy3&cy5) وقواعد (anct).

(٣) خلط العينات وتهجينها مع الدنا DNAالمكمل cDNA:-

أ- يتم خلط مجموعتين من الدنا المكمل في انبوبة واحدة.

ب-بعد الخلط يتم وضع الدنا المكمل علي شريحة المصفوفة الدقيقة وتركها للتهجين لليوم التالي.

(٤) خطوة الغسيل لازالة قطع الDNAالزائدة الغير مهجنة:-

يتم غسل شرائح المصفوفة الدقيقة ثلاث مرات متتالية بمحلول مركب من(xssc,1 و%sDs,1) علي درجة ٥٠مئوية لازالة قطع الDNA الزائدة الغير مهجنة.

(٥) عملية الطرد المركزي :-

تتم عملية الطرد المركزي لحامل الشرائح للتجفيف.

(٦) المسح والفحص:-

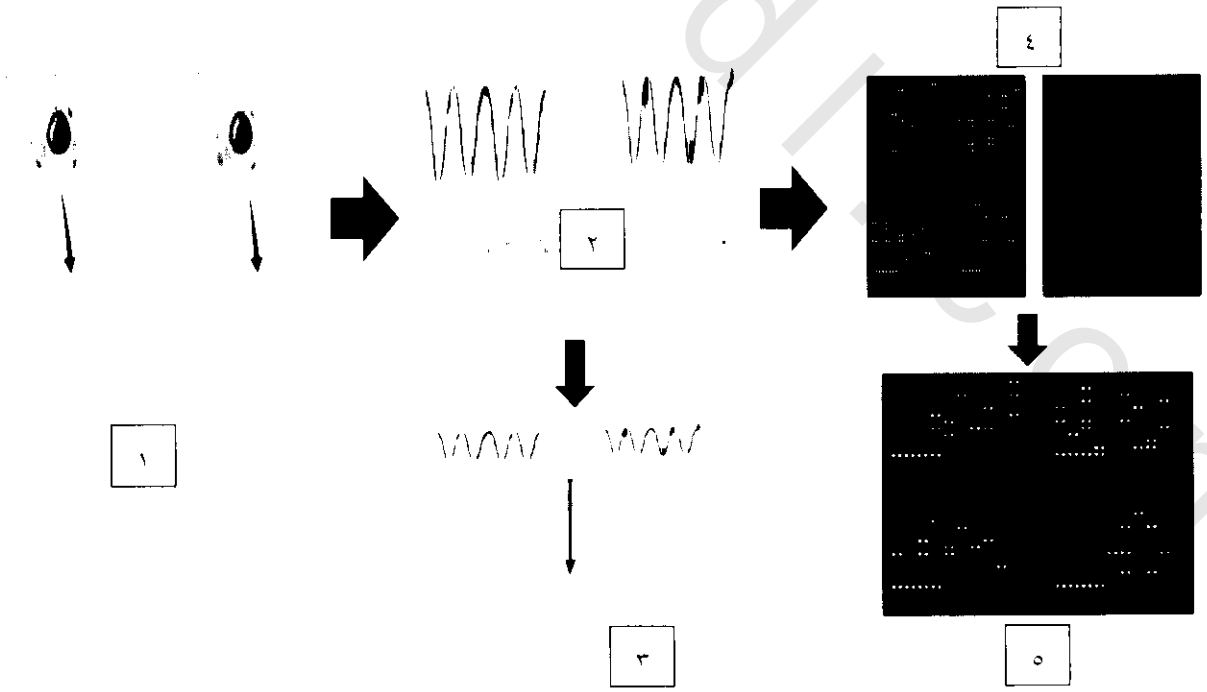
أ- يتم وضعالشريحة في ماسح ضوئي

ب- يتم مرور (شعاع الليزر) عبر الشريحة لقراءة كثافة الضوء المنبعث بكثافة ١٦ نقطة للون الرمادي.

ت- يتم مرور (شعاع الليزر) عبر الشريحة لقراءة كثافة الضوء المنبعث بكثافة ١٦ نقطة للون الرمادي مرة اخري.

ث- تطبيق لونين بناءعلي كثافة اللون الرمادي في الصورتين وهما اللون الاحمر واللون الاخضر اعتمادة علي درجة الحرارة.

ج- دمج الصورتين معا ينتج صورة ملونة تمثل اختلاف التعبير الجيني بين العينتين ويوضح الشكل رقم (٤و٥) ذلك.



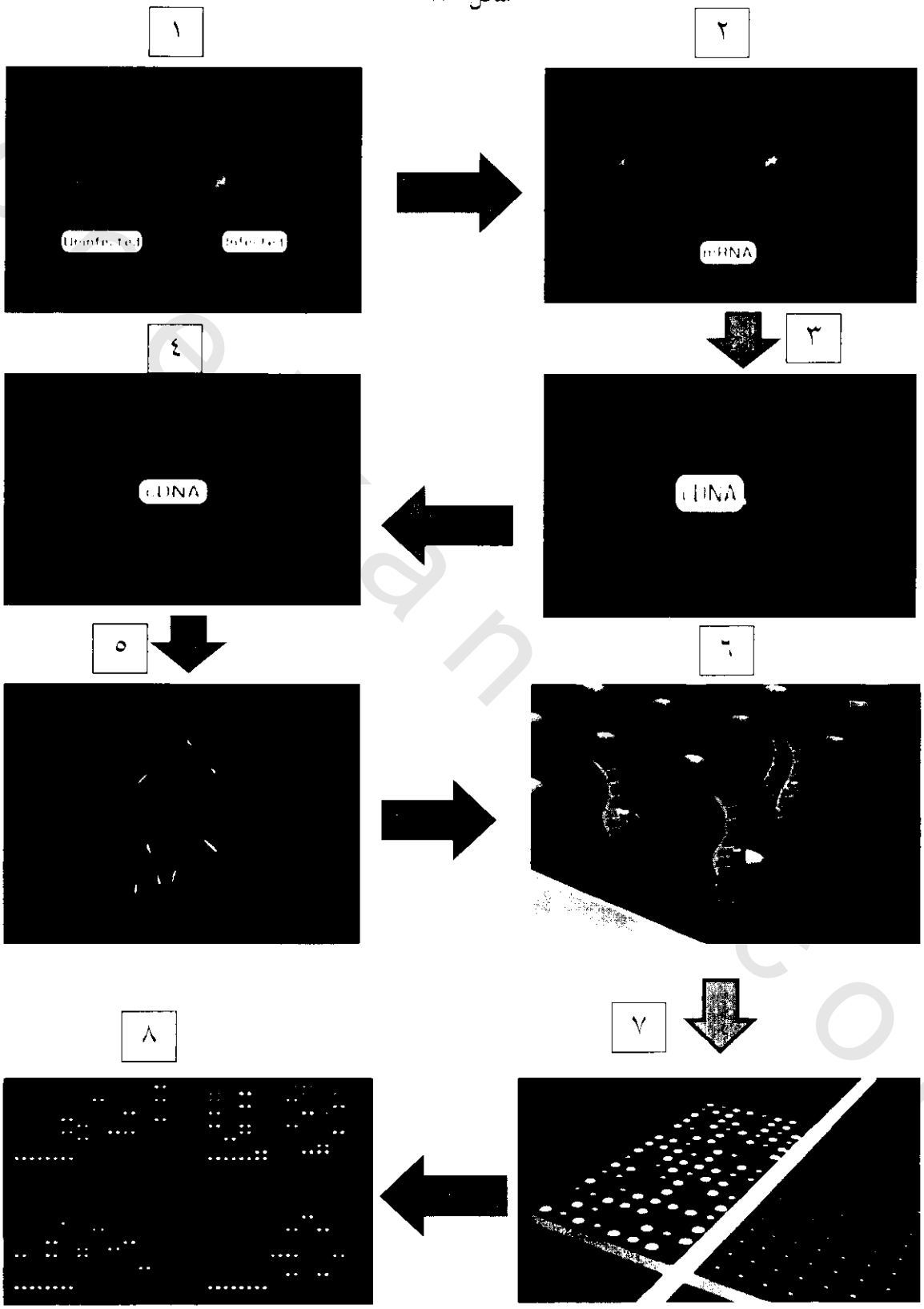
شكل ١٣٤

استخدام تكنيك المصفوفة الدقيقة للمقارنة بين الخلايا المصابة والسليمة، (شكل ١٣٥)

١. يقوم الباحث بالحصول علي عينات النباتات المصابة وغير المصابة والشكل رقم (١) يوضح ذلك.
٢. يتم عزل الـ mRNA (الرنا الرسول) من كلا العينتين الشكل رقم (٢) يوضح ذلك.
٣. يتم تحويل الـmRNA الي (cDNA) المكمل حيث انة اكثر ثبات ويوضح الشكل رقم (٣) ذلك.
٤. يتم تعليم الـ cDNA المكمل من العينة المصابة باللون الفلورسنتي الأحمر وتعليم cDNAالمكمل من العينة غير المصابة باللون الفلورسنتي الأخضر والشكل رقم (٤) يوضح ذلك.
٥. يتم خلط العينتين معا في هذة المرحلة ثم يتم وضعهما علي شريحة المصفوفة الدقيقة والشكل رقم (٥)يوضح ذلك.
٦. يتحد الـcDNA المكمل من العينات مع ال DNAالمتكامل معة في نقاط المصفوفة الدقيقة والشكل رقم (٦) ذلك.
٧. ثم يتم التخلص من قطع الـ cDNA المكمل الزائدة والغير مرتبطة علي شريحة المصفوفة الدقيقة والشكل رقم (٧) يوضح ذلك.
٨. ثم يتم مسح الشريحة عن طريق شعاع الليزر المرتبط بالجهاز والذي ينشط الصبغة الفلورسنتية المرتبطة بقطع الـ cDNAالمكمل والشكل رقم (٧) يوضح ذلك.
٩. يبدأ الحاسب في تجميع هذة المعلومات وحساب نسب اللون الاخضر والاحمر في كل نقطة والتي تعبر عن الجينات ثم التعبير عنها في العينة النباتية المصابة وغير المصابة والشكل رقم (٨) يوضح ذلك.

openkanar.com

شكل ١٣٥

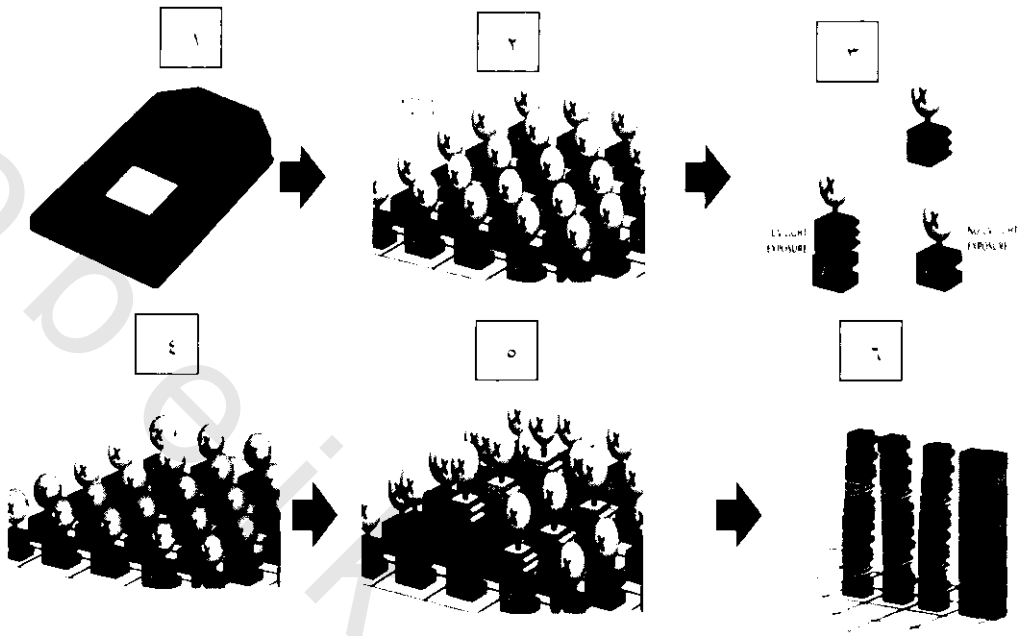


شرائح المصفوفة الدقيقة

شرائح المصفوفة الدقيقة، (شكل ١٣٦):

طور العالم ستيفن فودور تقنية تسمي بتقنية المصفوفة المعلمة لشريحة الجين Gene chip{R} Prob array) حيث قام ببناء تتابعات التي يريد ان يقوم بدراستها علي شريحة زجاجية من نوع معين.

- يتم بناء الDNAباستخدام التخليق الكيميائي الموجة ضوئيا.
- اولا توضح مادة مثبتة مع احدي النيوكليوتيدات علي الشريحة في وضع معين (شكل ١).
- النيوكليوتيدة تحتوي علي مجموعة حماية تسمي(x)والتي تمنع حدوث تفاعل بلمرة و مجموعة الحماية(x)حساسة للضوءويمكن التخلص منها عند التعرض للاشعة فوق البنفسيجية (شكل ٢).
- وبعد التخلص من مجموعة الحماية (x) تتم عملية البلمرة وبناء السلسلة النيوكليوتيدية (شكل ٣).
- يتم اضافة فلتر مصمم بشكل خاص بحيث يتم تعرض نيوكليوتيدات معينة للضوء وليتم استكمال البناء عليها واضافة نيكلوتيدات التالية عليها(شكل ٤).
- وعن طريق تغير وضع الفلتر تمكن العالم فودور من بناء شريحة الجين والتي تحمل مصفوفة من التتابعات بطول ٢٠ نيوكليوتيدات لكل تتابع (شكل ٥).
- وباضافة الدنا المكمل المعلم علي الشريحة يمكن اختبار عشرات الالاف من التتابعات المختلفة في نفس الوقت (شكل ٦).
- وتتم هذة المقارنات عن طريق الكمبيوتر الذي يقوم بفحص وتخزين التتابعات المدروسة والمتطابقة علي قاعدة البيانات.



شكل ١٣٦

بناء شريحة المصفوفة الدقيقة، (شكل ١٣٧):

١. شريحة المصفوفة الدقيقة هي مصفوفة فراغية من واسمات نيوكليوتيدية مرتبة علي سطح زجاجي داعم والشكل رقم (١) يوضح ذلك.

٢. الواسمات النيوكليوتيدية تمثل التتابعات النيوكليوتيدية في جينات معروفة ويتم بناء هذة الواسمات علي سطح صلب بطريقة معينة بحيث يكون كلا من موقع وتركيب التتابعات لهذة الواسمات معروفة.

٣. عن طريق المصفوفة الدقيقة يمكن التعرف علي كائنات او جينات محددة بواسطة التهجين للدنا DNAمن الكائن مع الواسمات النيوكليوتيدية علي شرائح المصفوفة.

٤. هناك عدة طرق لعمل شريحة المصفوفة الدقيقة والطريقة التي سوف يتم شرحها مأخوذة عن طريقة عمل شريحة الكمبيوتر.

٥. شريحة المصفوفة الدقيقة تتكون من قطعة من الزجاج مربعة بطول١,٥سنتيمتر وعرض١,٥ سنتيمتر ومغطاة بطبقة مثقوبة عند المناطق المرغوب وضع نيوكليوتيدات بها والشكل رقم (٢) يوضح شريحة المصفوفة.

٦. يتم وضع اول نيكلوتيدة وتثبيتها عن الشريحة بواسطة تفاعل التنشيط الضوئي ،ثم يتم غير الفلتر بواحد اخر والذي يظهر مواقع معينة لاضافة قواعد اخري ويتم تكرر هذة العملية حتي يتم تخليق وبناء السلاسل النيوكليوتيدية علي الشريحة في مواقع وتتابعات محددة ومعروفة.

٧. غالبا ما تكون طول السلسلة التي يتم بنائها علي الشريحة من ١٥ الي٢٥ قاعدة.

٨. يتم عزل الـ DNAمن الكائن وتجزئتة وتعليمة بصبغة فلورسنتية ثم يتم وضع القطع المعلمة علي الشريحة كما في الشكل رقم (٤).

٩. تتحد قطع الـDNAالجينومي المشابة المعلمة مع سلاسل نيوكليوتيدية مخلقة علي الشريحة اذاكانت متكاملة معها ويتم التخلص من القطع الاخري كما في الشكل رقم (٥).

١٠. يتم مسح سطح الشريحة عن طريق اشعة الليزر وتظهر النتائج علي شكل صورة مرئية كما في الشكل رقم (٦).

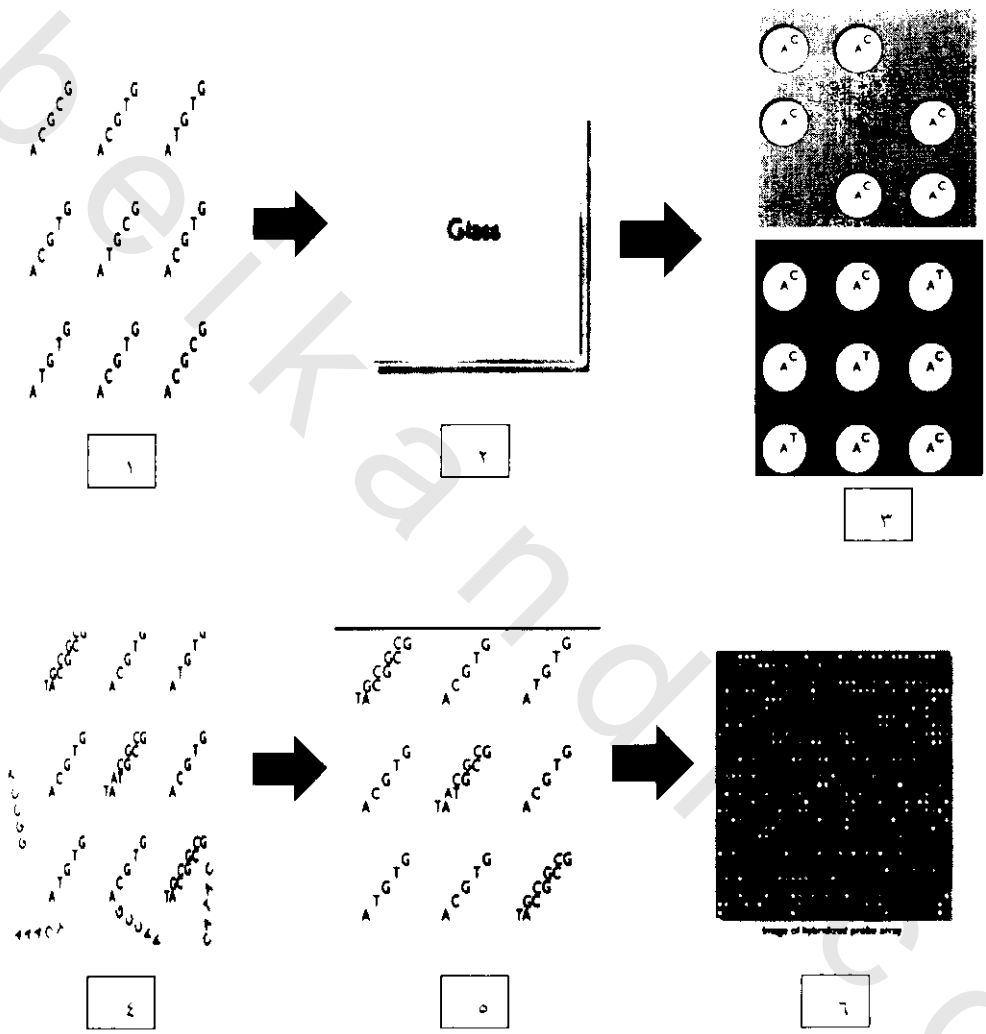
١١. تمثل كثافة اللون درجة الارتباط والتهجين بين الواسمات المختلفة.

١٢. يمكن عمل ما يقرب من مائتي الف واسم اوتتابع علي شريحة واحدة.

١٣. باستخدام هذة التكنولوجيا يمكن بناء اي تتابع مرغوب من النيوكلوتيدات لبناء واسم الشريحة.

علي سبيل المثال:-

يمكن التعرف علي وجود الجينات المقاومة للمضاد الحيوي وجينات اخري ببساطة كما يمكن معرفة مستوي التعبير الجيني عن طريق تهجين الدنا DNA المكمل الناتج من الـRNAالرسول.



شكل ١٣٧

العناصر المتنقلة في الجينومات المعقدة
(تركيبها وتطورها)

موجز: تحتوى جينومات الكائنات حقيقية النواة على مناطق كبيرة من الدنا المتكرر والتي نشأت عن العناصر المتنقلة، وقد نتج عن السلسلة المتكامله لهذه الجينومات معلومات كبيرة غير مسبوقة عن أصل وطبيعة وتباين هذه العناصر داخل هذه المناطق الجينومية والتي كان من المعتقد فى السابق عدم نشاطها. وقد ساعدت سلسلة الجينوم على التعرف على نوعين جديدين من العناصر الجينومية المتنقلة والمعروفة باسم الـ (Polintons) والـ (Helitrons) إلى جانب عدد كبير من عائلات ومجموعات جديدة من العناصر المتنقلة. ومن الجدير بالذكر أن العناصر المتنقلة هي الأصل التطوري لكثير من الجينات مثل جين RAG1 والذي يلعب دور كبير في جهاز المناعة كما أنها القوى المحركة للتطور والاستقرار الجينومي على المدى الطويل.

المقدمة: إن بقايا العناصر المتنقلة في الأجناس المختلفة ودرجة تشابها أو اختلافها تزيد من فهمنا وإدراكنا لحقائق القرابة والتنوع. وقد ظهر مفهوم ديناميكية الجينوم (Genome Dynamics) مع اكتشاف العناصر المتنقلة بواسطة العالمه الآمريكيه (باربراماكلنتوك). وقد كانت محاضرتها التي ألقتها عند حصولها على جائزة نوبل تمثل تحدي للبيولوجيين في هذا المجال. وقد كتبت باربراماكلنتوك ما يلي[1]:

"نحن نعلم الأن الكثير عن المكونات والعناصر الجينومية التي تغيير من بنية الجينوم ولكن لا نعلم شيئاً عن كيفية إحساس الخلية بالخطر و أتخاذها الدفاعات الداخلية ضده وهذاً سيكون أمرا عظيماً".

بعد ما يقرب من خمسين عاماً من الدراسات الجينوميه مازلنا نجهل العديد من ميكانيكيات إعادة البنية الجينومية والتى يتخذها الكائن استجابة للتغييرات والتحديات البيئية. هناك عديد من الدراسات التي انتهت إلى وجود علاقة وثيقة بين ظروف نمو النباتات وبين أحجام جينوماتها (Genome Size)، فنجد فى كثير من أنواع النباتات تباين كبير في حجم الجينوم بين العشائر والأفراد داخل العشيره الواحده ، فمثلاً نجد أن يوجد حوالى (50٪) من التباين الوراثي في نبات عباد الشمس وحوالي (1.15) مرة تباين وراثى في عشائر فول الصويا و(1.29) مرة تباين وراثى بين نباتات الفاصوليا وهكذا، وعلى الرغم من وجود هذه الاختلافات

والتباينات في أحجام الجينومات و ارتباط ذلك مع الاختلافات البيئية وظروف النمو المختلفة ، لم يتم رصد ودراسة هذه الاختلافات والتغيرات في المحتوى الجينومي (Genomic content).

في سنة 2000 نشر الدكتور كالندار[1] وآخرون ، مثالا على الاختلافات الجينومية في عشائر الشعير البري. وقد أظهر هذا البحث أن أحد العناصر الجينونية الأرتجاعية المتنقلة والتي تسمى (BARE1)،والمعروفة في الشعير بنشاطها وكثرتها، تتباين في عددها وتكرارها بين الأصناف المختلفة بمعدل ثلاثة أضعاف. وقد أظهرت الدراسة لأول مرة وجود علاقة بين عدد نسخ (BARE1) وحجم الجينوم وظروف البيئة المحلية المحيطة مما يوحي بوجود ميكانيكية جزيئية يمكن قياسها بين موطن النمو ونشاط العناصر المتنقلة في العشائر الطبيعية[1].

التتابعات المتكررة في الجينوم:

إن مصطلح "التتابعات المتكررة"(Repetitive Sequences) يشير إلى مقاطع متشابهة من الـ DNA والتي توجد على شكل نسخ متعددة في الجينوم. وقد تم اكتشاف هذه المناطق عند دراسة مناطق الاتصال والانفصال بين الكروموسومات أثناء الأنقسام الخلوي[2] وقد قسمت إلى مناطق عالية التكرار ومناطق متوسطة التكرار والتي تشير غالباً إلى المناطق المتكررة المتتالية (Tandem repeats) والمناطق المتكررة غير المتتالية (Interspersed repeats) بالإضافة إلى ذلك توجد بعض المناطق منخفضة التكرار في الجينوم والتي تمثل مجموعة مختلفة Low Copy Repeats (LCRs). وتقسم المناطق المتكررة إلى عائلات مختلفة ذات تتابعات مشتركة أو أصل مشترك وذلك بخلاف العائلات الجينية والتي تعرف وتقسم على حسب الوظيفة البيولوجية المشتركة بغض النظر عن التتابعات المشتركة. وبطبيعة الحال فقد نجد عناصر داخل المناطق المتكررة تتشابه في تتابعاتها وتختلف في أدوارها البيولوجية.

وبدراسة الفروق التركيبية بين النوعين الأول والثاني نجد أن التتابعات غير المتتالية عبارة عن مناطق من الـ DNA بحد أقصى ٢٠-٣٠ كليو قاعدة موجودة داخل الجينوم بشكل عشوائي. وعلى العكس من ذلك نجد أن التكرارات المتتالية تمثل مصفوفات من مقاطع الـ DNA والتي تتراص بشكل متوالي من الرأس إلى الذيل. وقد أظهرت الدراسات الحديثة أن التتابعات غير المتتالية تتكون في معظمها من عناصر متنقلة غير نشطة أو غير كاملة مندمجة داخل الجينوم. وبالتالي يمكن تعريف العناصر المتنقلة على أنها مقاطع من الـ DNA أو RNA يمكنها التكاثر والاندماج جينوم العائل. في نفس الوقت تقوم الجينومات بالحفاظ على تركيبها عن طريق

ميكانيكيات للتغلب على ذلك الاندماج. لذلك فإن كل من الجينوم والعناصر المتنقلة في صراع تنافسي متضاد معظم الوقت. وتقوم معظم العوائل في الكائنات حقيقة النواة بالتثبيط المستمر لنشاط العناصر المتنقلة للحد من آثارهاوأنتشارها ولكن على الرغم من ذلك تستطيع العناصر المتنقلة المقاومة والانتشار المحدود داخل عوائلها.

وقد أظهرت نتائج سلسلة الجينومات المختلفة أن العناصر المتنقلة توجد في جميعها ماعدا جينوم Plasmodium flaciparum[illegible].

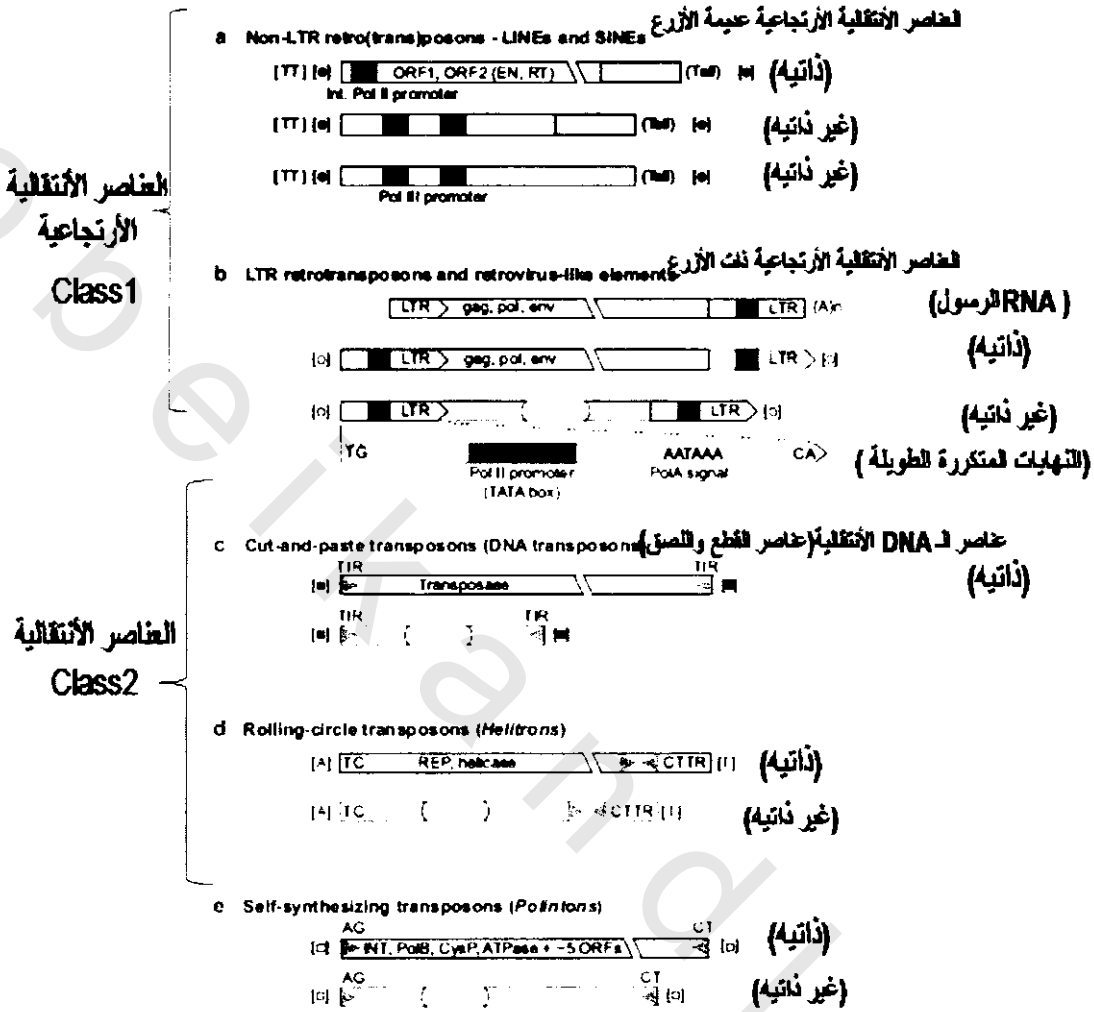
ولكن يبقى السؤال، لماذا توجد هذه العناصر على الرغم من تضاد نشاطها مع جينومات العوائل المختلفة؟

ببساطة لا يستطيع الجينوم التخلص من هذه العناصر كما لا يستطيع التخلص من الطفيليات. إذا كانت العناصر المتنقلة تكسب عوائلها مميزات تطورية تزيد من فرص وجودها ومقاومتها للأجهادات البيئية. إن المفهوم القائل بأهمية العناصر المتنقلة في تطور عوائلها ليس حديثاً ولكن التقدم الحادث في المجال وضع هذا المفهوم في مقدمة الجدل القائم عن تطور حقيقات النواة[(٤٦)(٧)(٤٨)].

تركيب وأنظمة العناصر المتنقلة:

يظهر الشكل في الصورة (١٣٨) شكل تخطيطي للتراكيب المختلفة للعناصر المتنقلة.

obeikandl.com



شكل ١٣٨

العناصر المتنقلة الارتجاعية ذات النهايات المتكررة الطويلة
(LTR-retrotransposon):

إن العناصر المتنقلة الارتجاعية ذات النهايات المتكررة الطويلة والمعروفة باسم (LTR-retrotransposon) هي من ضمن عائلات الطراز الأول من العناصر المتنقلة والتي تتضمن أيضاً الفيروسات الارتجاعية (Retrovirases) والعناصر الجينومية الطويلة مستمرة Long interspersed nuclear elements (LINE) والعناصر الجينومية القصيرة المنتشرة Short interspersed nuclear elements (SINE) وتتميز (LTR-retrotransposon) من وجود نهايات متكررة طرفية تحيط بمجموعة الجينات الخاصة بعملية التنقل والتي تسمى بروتينات الغلاف (Capsid)

والمعروفة باسم (Gag) وإنزيم البروتيز وإنزيم الاندماج (Integrase) وإنزيم النسخ العكسي وإنزيم (RNase H). ومن الجدير بالذكر بأن جميع عناصر عائلة الطراز الأول من العناصر المتنقلة لا تقوم بالانتقال بنفسها ولكن عن طريق عمل نسخة وسيطة منها من الـ (mRNA). هذا النسخ والانتشار يحدث بشكل طبيعي أثناء النمو ولكنه يستحث بالزيادة بوجود ضغوط حيوية أو غير حيوية مثل زراعة الأنسجة والجفاف والإصابات المرضية وغيرها[9][10]. وقد ثبت أن في بعض العناصر زيادة النسخ مرتبطة بزيادة العدد والانتشار في الجينوم مثل عناصر (Tnt1) في نبات الدخان وعنصر Tos17 في الأرز[11][12].

ومن الجدير بالذكر أن (LTR-retrotranposon) هي أكثر العناصر المتنقلة شيوعاً في جينومات نباتات العائلة النجيلية. ومن الملاحظ أن النسبة التي تشغلها هذه العناصر تزداد بزيادة حجم الجينوم ابتداء من نبات الأرز أصغر جينومات العائلة النجيلية حيث تشمل حوالي ١٤٪[13] مروراً بنبات الذرة حيث تمثل هذه العناصر (٥٠-٨٠٪)[14] وصولاً إلى الشعير حيث تمثل حوالي (٧٠٪) من حجم الجينوم[15].

وقد أثبت العالم سان مجويل[13] أن معظم عمليات الاندماج التي حدثت في العناصر المتنقلة الارتجاعية قد تمت في خلال ٢-٦ مليون عام الأخيرة.

العناصر الارتجاعية الجينومية الطويلة المنتشرة (LINE):

إن العناصر الارتجاعية الذاتية المنتشرة والتي لا تحتوي على تكرارات طرفية طويلة متكررة (LINE) تتركب من إطار أو إطارين في أطر القراءة الجينية (Open reading frame) (ORFs). تحتوي هذه العناصر أيضاً على محفز داخلي (Internal Promoter) في منطقة النهاية الطرفية `5 والتي تتحكم في عملية النسخ لها داخل جينوم العائل.

إن ميكانيكيات الانتقال والاندماج لهذه العناصر داخل جينوم العائل مدروسة جيداً وقد تم وصف هاتين العمليتين باسم (النسخ العكسي للهدف المعلم) Target-primed reverse transcription (TPR).

وقد تم تطوير هذا النموذج باكتشاف أن بداية النسخ العكسي لهذه العناصر لا يتطلب تزاوج القواعد بين البادئ والتتابع القالب[16] بالإضافة إلى أن كلا من نطاق إنزيم النسخ العكسي (RT) ونطاق إنزيم الاندماج (EN) في هذه العناصر يتم تشفيرهم بنفس إطار القراءة الجينية. أي أنه يتم نسخ جزئ واحد من الـ RNA

الرسول يحتوي على هذه المعلومات ويستعمل كقالب لإنزيم النسخ العكسي لإنتاج (دنامكل) (cDNA) للاندماج داخل الجينوم مرة أخرى.

وبناء على الخواص التركيبية لهذه العناصر ومدى التشابه في نطاق النسخ العكسي (RT) تم تقسيم هذه العناصر إلى خمس مجموعات وهي Jockey, I, RIE, L1, R2 وقد قسمت هذه العناصر بدورها إلى خمسة عشر مجموعة تحتية[١٠].

ويعتقد أن مجموعة الـ R2 تتكون من أقدم العناصر الارتجاعية عديمة النهايات الطرفية (Non-LTR retrotransposon) وهم R4, R2, NeSL, CRE وتتميز جميعها بوجود إطار قراءة واحد (ORF) لإنزيم النسخ العكسي والنهاية الطرفية (C) لإنزيم الاندماج. ومن الملاحظ أن إنزيم الاندماج (EN) في مجموعة R2 مشابهة لإنزيمات القصر المختلفة ويتم اندماج جميع العناصر المتنقلة من مجموعة الـ R2 في مواضع وأهداف محددة ومتخصصة. أما أفراد بقية المجموعات الأربع يشفر جينومها إلى إنزيم القصر Aparinic-apyrimidinic endonuclease (APE) والذي يتميز دائماً بوجود النهاية (N) في اتجاه إنزيم النسخ العكسي (RT).

العناصر الارتجاعية المنتشرة القصيرة
Short interspersed elements (SINE):

عادة يكون تركيب هذه العناصر تركيب موازيكى مختلط من RNA الناقل (tRNA) أو الـ RNA الريبوسومى (5S) أو (7SL) ويحتوي على تتابع محفز داخلي لإنزيم البلمرة الثالث Pol III عند النهاية (`5) الطرفية.

بالنسبة للنهاية (`3) الطرفية إما أن تكون مشتقة من عناصر الـ (LINE) أو تحتوي على ذيل متكرر من (A) أدنين مثل المتواجد في عناصر (L1).

ويتم انتقال هذه العناصر عن طريق كلاً من إنزيم النسخ العكسي وإنزيم الاندماج RT/EN الذي يتم تشفيرهم عن طريق العناصر الارتجاعية الذاتية عديمة الأذرع Autonomous non – LTR retrotransposon.

ومن الجدير بالذكر أن جميع العناصر الارتجاعية عديمة الأذرع Non-LTR retrotransposon يتم انتقالها رأسياً (من الأباء إلى النسل) مع بعض الاستثناءات[١١].

العناصر الارتجاعية ذات الأذرع الطويلة LTR-retrotransposon:

يتكون إطار القراءة وORF في العناصر الارتجاعية ذات الأذرع الطويلة (LTR-retrotransposon) من تتابعات جينية تشعر لكل من بروتينات الغلاف الروتيني (gag) والـ (cnv) والـ (Pol). ويتكون الـ (Pol) في إنزيم النسخ العكسي (RT) والاندماج (EN) ونطاق إنزيم اسباراتيل بروتيز (Aspartyl-protease) غالباً ما يسمى نطاق الاندماج (EN) في هذه العناصر باسم (INT) ويمكن لهذه العناصر الانتقال أفقياً (c1) على الرغم من أن عملية الانتقال كاملة الوضوح.

العناصر الارتجاعية الخليطة (بنى لوب) (Penelop):

تحتوي العناصر الارتجاعية الخليطة (بنى لوب) على إطار قراءة مفرد مكون من نطاقي إنزيم النسخ العكسي وإنزيم الاندماج.

ويشبه نطاق إنزيم الاندماج الأنترون المكود لإنزيم الاندماج والمعروف باسم GIY-YIE وقد سمي بذلك لاحتوائه على مجموعة الأحماض الأمينية (جليسين – أيزوليوسين – تيروزين – Xn – تيروزين – أيزوليوسين – جليسين)، ومن الواضح أن نطاق إنزيم النسخ العكسي في عناصر (البنى لوب) مشابه لإنزيم التلوميراز (Telomerases) وإنزيم النسخ العكسي البكتيري أكثر من إنزيم النسخ العكسي للعناصر الانتقالية الارتجاعية الأخرى.

ومن المحتمل أن يكون انتقال هذه العناصر مشابه لموديل (النسخ العكسي للهدف المعلم "TPRT") والذي تتبعه العناصر الأخرى.

على الرغم من ذلك تتميز عناصر البنى لوب بوجود يشابه الأذرع المتكررة الطرفية أو النهايات المتكررة المعكوسة (Terminal inverted repeats) (TIR) والتي لا توجد عادة للعناصر الارتجاعية عديمة الأذرع، بالإضافة إلى أن بعض هذه العناصر في أجناس مختلفة تختلط بأنترونات أثناء انتقالها.

وبناء على الناحية التركيبية والقرابات الوراثية تعتبر عناصر البنى لوب نوع مميز ومختلف من العناصر الانتقالية الارتجاعية ولكن بالنظر إلى الاختلافات الواسعة في إنزيم النسخ العكسي (RTs) لهذه العناصر يعتقد أن هذه العناصر من أقدم العناصر الارتجاعية عديمة الأذرع.

obeikandi.com

العناصر الانتقالية الارتجاعية متوسطة التكرار

The Dictyastelium Intermediate Repeat Sequence:

إن العناصر الانتقالية الارتجاعية متوسطة التكرار (DIRS) تشفر لإنزيم للنسخ العكسي (RTs) أكثر شبهاً وقرابة إلى إنزيم النسخ العكسي الموجود في العناصر الانتقالية الارتجاعية ذات الأذرع الطويلة (LTR-retratransposon) منه إلى إنزيم النسخ العكسي الموجود في العناصر الانتقالية الارتجاعية عديمة الأذرع (Non-LTR retrotransposon)[٢٩].

وحتى وقت حديث كان ينظر إلى عناصر الـ (DIRS) على أنها ارتجاعية مبهمة وغامضة لخلوها من إنزيم الاندماج (INT) وتركيب الأذرع الطرفية الغير عادي[٣٠،٣١].

وعلى الرغم من ذلك فقد اكتشف بعد ذلك أن هذه العناصر تشفر إلى بروتين ينتمي عائلة بروتينات الاندماج وتسمى (إنزيم اندماج التيروسين) (Tyrosine INT). تلك الملاحظات بالإضافة إلى التركيب الفريد للنهايات الطرفية لهذه العناصر أدت إلى تقسيم هذه العناصر كمجموعة منفصلة من العناصر الانتقالية الارتجاعية ذات الأذرع الطويلة المتكررة[٣٠،٣٢].

وبالنظر إلى تنوع وتوزيع هذه العناصر في الكائنات حقيقيات النواة يتضح أن هذه العناصر توازى العناصر الانتقالية الارتجاعية في القدم داخل الجينومات المختلفة. بالإضافة إلى ذلك فإن إنزيم النسخ العكسي في هذه العناصر أكثر قرابة إلى عناصر (Gypsy) والتي ينظر إليهما على أنهما أقدم العناصر الانتقالية الارتجاعية ذات الأذرع[٣٣،٣٤] ولذلك فإن أكثر السيناريوهات أصالة عن نشأة هذه العناصر أنها نشأت عن عناصر شبيهه بعناصر (Gypsy) الانتقالية الارتجاعية بعدما استخدمت إنزيم اندماج التيروسين بدلاً من إنزيم الاندماج الموجود في هذه العناصر (DDE INT).

ويتوافق هذا السيناريو مع وجود إنزيم الاندماج والتركيب (Recombinase / INT) والذي تشفر له عناصر انتقالية جينومية في بعض الفطريات (Crypton Transposon)[٣٥].

وبناء على ذلك الاقتراح فإن من المعتقد أنه قد حدث اندماج بين أحد العناصر الارتجاعية من النوع الأولي (Gypsy) والتي نشأت عنه عناصر (DIRS).

وكما في عناصر البنى لوب فإن بعض عناصر الـ DIRS تحتوي على انترونات (Introns) (مناطق غير مشفرة) في جينوماتها. وهذه الانترونات قد تكون ذات أهمية

في الانتقال الارتجاعي داخل الجينوم لكلا العنصرين. فعلى سبيل المثال فإن RNA الرسول الغير مجزئ (non-spliced) الموجود داخل النواة لكلا العنصرين يمكنه الانتقال الارتجاعي أكثر كفاءة من المجزئ (Spliced).

العناصر الـ DNA الانتقالية (عناصر القطع اللصق):

تقوم هذه العناصر بقطع نفسها من موضعها الأصلي في الجينوم ثم الاندماج في موضع جينومي جديد[٢٢]. كلتا العمليتين (القطع واللصق) تتم عن طريق إنزيم الانتقال (Transposase) الذي يتصل بالنهايات الطرفية لهذه العناصر والأماكن التي سوف يتم الانتقال إليها مكوناً ما يسمى بأعناق الـ DNA (DNA-nicls).

ومعظم عناصر الـ DNA الانتقالية تحتوي على نهايات طرفية معكوسة (TIR) عند الأطراف. وعلى الرغم من ذلك فإن بعض عناصر الـ DNA الانتقالية النشطة تحتوي على نهايات غير كاملة أو غائبة مثل عناصر (MuDR) في نبات (الأرابيدوبسس).

وتنقسم هذه العناصر في حقيقيات النواة إلى ثلاثة عقد عائلة كبيرة كما يظهرها الجدول رقم (١). وكل عائلة تحتوي على عدة عائلات صغيرة مختلفة مكونة من عناصر ذاتية (Autonomous) وغير ذاتية) (Non-autonomous) والتي تنتقل عن طريق إنزيم انتقال خاص (Super family-specific transpasase) بكل عائلة. ومختلف إنزيمات الانتقال في كل عائلة كبيرة عن الأخرى وبالإضافة إلى ذلك فإنها تختلف في تكرارها في الأماكن المستهدفة TSDs (Target site duplications). وذلك على الرغم من تشابه بعض العناصر فيها مثل Harbinger وEn/Spm. وتشفر معظم العائلات الكبيرة بروتين واحد فقط وهو إنزيم الانتقال وذلك يتضمن عناصر Rebavkas, Novosib, Transib, Merlin, Mirge, IS4EU, Mariner, bAT, P, PiggBac، أما العناصر الانتقالية مثل MuDR, Harbinger, En/Spm فهي تشفر إلى كل من إنزيم الانتقال وبروتينات ربط الـ DNA.

إن عائلة العناصر المعروفة باسم (Harbinger) كانت أول عائلة من العناصر المتنقلة المكتشفة اعتماداً على دراسات حوستبيه[٣٤]. إن هذه العناصر الذاتية تشفر إلى اثنين من البروتينات وهما بروتين الانتقال (حوالي ٤٠٠ حمض أميني) وبروتين ربط الـ DNA (حوالي ٢٠٠ حمض أميني). ومن الجدير بالذكر أن بروتين الانتقال في هذه العناصر قريب الصلة بعناصر IS5 البكتيرية والتي تتضمن مجموعات IS5 وIS112

obeikandi.com

والـ ISL2. وتحاط هذه العناصر غالباً بمناطق طرفية TSD حوالي (٣ قواعد هيدروجينية) عادة ما تكون TAA أو TTA ولكن بعض العناصر في جينوم أسماك الزيبرا (Zebra fish) تحتوي على مناطق طرفية مكونة من ١٧ قاعدة وهي (AAAACACCWG-GTCTTTT) أكثر طولاً من أي عائلات العناصر الانتقالية[٣٢].

عناصر الهليترونات (Helitrons):

الهليترونات من عناصر الـ DNA المنتقلة والتي تنتقل عن طريق تكنيك الحلقة المستديرة (Rolling-circle). وتوجد هذه العناصر في جينومات النباتات والفطريات والحشرات والنيماتودا والفقاريات[٣٣].

وفي بعض الكائنات مثل نبات الأرابيدروبيسس والدودة الشريطية تمثل هذه العناصر حوالي ٢٪ من حجم الجينوم. إن عناصر الهليرونات الذاتية تشفر إلى بروتين بحجم (١٥٠٠ حمض أميني) ويسمى (Rop/HCl) ويتكون نطاق محفز للتضاعف والتكرار (Rep) وإنزيم الحلزنة (HCl) (Helicase).

يتكون نطاق التضاعف من حوالي (١٦٠ حمض أميني) يتكون من منطقتين. المنطقة الأولى تسمى (Two-His) وتتركب من الأحماض الأمينية (E-FYW-O-K-R-G-LAV-PVH-X-H) والمنطقة الثانية (KYK) وتتكون من الأحماض الأمينية (yg-LYW-FAT-Kg-Y-X-X-K) مفصول بين المنطقتين بحوالي ١٣٠ حمض أميني وهذه النطاقات هي نفس الموجودة في البلازميدات وخيوط الـ DNA الفيروسي الذي تتضاعف بنفس ميكانيكية الانتقال.

إن بروتينات التكرار (Rep-proteins) تقوم بأداء عمليتي القطع والربط للـ DNA أثناء التكرار بطريقة الدائرة الملتفة (Rolling Circle) وكذلك أثناء الانتقال. إن الهلبرونات هي النوع الوحيد من العناصر المنتقلة في حقيقيات النواة التي تندمج في الجينوم بدون وضع مناطق (TSDs) وغالباً ما يحدث اندماج عناصر الهليترونات بين نيكليوتيدات (T) و (A) في العائل. ولا تحتوي الهليترونات على المناطق المتكررة المعكوسة (TIRs) التي توجد غالباً في عناصر الـ DNA المتنقلة الأخرى. وعوضاً عن ذلك تحتوي الهليترونات على نهايات 5`-TC و CTRR-3`.

كما تحتوي أيضاً على مناطق (Hairpin) بطول حوالي ١٨ قاعدة مزدوجة ومفصولة عن بعضها بمناطق تتراوح أطوالها من ١٠-١٢ قاعدة عن النهاية 3`. ومن

المعتقد أن هذه المناطق تعمل على وقف التكرار بطريقة الدائرة الملتفة والتي من المعتقد أيضاً أن تكون هذه الطريقة التي تنتقل بها هذه العناصر. وحتى الآن لم توجد أي هليترونات بدون مناطق (Hairpin) إلا في الهلترونات الموجودة في فطر الإسبارإجلس[36].

وعلى الرغم من أنه لم يكتشف معملياً حتى الآن أي هليترونات نشطة إلا أنه يمكن توقع نشاطها وكيفية انتقالية اعتماداً على تركيبها. ويبدأ انتقال الهليترونات من الموقع المخصص لإنزيم التكرار على الخيط الموجب للعنصر. ثم تقوم النهاية الطرفية (3`-OH) لهذا الخيط بالعمل كبادئ للخيط القائد لكي يبدأ عملية التخليق مستخدماً بروتينات وإنزيمات العائل للتكرار. إن الخيط القائد المخلق حديثاً يبقى مرتبطاً بالنهاية (3`-OH). وتستمر عملية البناء حتى يتم بناء عنصر هليترون جديد مكون من الخيط الأبوي الموجب والخيط الجديد المخلق[36].

ومن الصفات الهامة للهليترونات هي قدرتها على التداخل مع جينات العائل. فعلى سبيل المثال نجد أن هليترونات النبات تشفر بروتينات مشابهة لبروتينات (RPA) والمشتقة من الجينات المكودة للـ (RPA) في جينوم العائل في الأصل (36). وبالنظر إلى تركيب الـ RPA في الهليتونات يمكن الجزم بأن هذا البروتين يشترك في عملية الانتقال كإنزيم ربط خيوط الـ DNA المفردة.

والهليتونات الموجودة في نبات شقائق النعمان أو قنفد البحر أو الأسماك والضفادع تحمل إنزيم اندماج (EN) مشتق من الإنزيم الموجود في العناصر الارتجاعية عديمة الأذرع CR1[38,39].

وتجدر الإشارة إلى أن عدم التباين في إنزيم الاندماج بين الهليترونات المختلفة في الأنواع المتباعدة يدل على أهميتها في دورة الحياة لهذه العناصر.

وأخيراً، اكتشفت أن الهليترونات الغير ذاتية الموجودة في جينوم الذرة تحتوي على مناطق مشفرة (أكسونات / أنترونات) في العديد من جينات العائل.

ولذلك فإن الهليترونات قد تلعب دوراً هاماً كأداة مهمة في التطور البيولوجي للأنواع عن طريق قيامها كوسيط لتضاعف وخلط وتوظيف جينات العائل.

عناصر البولينتون (Polintons):

تتبع البولينتونات الطراز الثالث من عناصر الـ DNA الانتقالية وهي تشبه الهليترونات في أن كلاهما تم اكتشافها عن طريق دراسات كمبيوترية. ويتراوح طول هذه العناصر حوالي ١٥-٢٠ ألف قاعدة وتحتوي على حوالي ٦ قواعد (TSDs) وحوالي من ١٠٠-١٠٠٠ قاعدة من النهايات الطرفية المعكوسة في كلاً الطرفية. وتعتبر هذه العناصر من أعقد العناصر الانتقالية في جينومات حقيقية النواة المعروفة حتى الآن. وتشفر البولينتونات لحوالي عشرة بروتينات مختلفة بما في ذلك إنزيم البلمرة (PolB) وإنزيم الاندماج وإنزيم الانتقال وغيرها من البروتينات الهامة لاستكمال دورة حياته. وتعتبر الإنزيمات السابق ذكرها هامة لكل أنواع البولينترنات التي تم اكتشافها في الحيوان أو الفطريات أو الكائنات الأولية.

وينتمي إنزيم البلمرة (PLOB) إلى مجموعة إنزيمات البلمرة الموجودة في جينومات البكترويوفاج والأدينوفيروس والبلازميدات الخطية في كل من النباتات والفطريات. إن النواحي والخواص التركيبية والوظيفية لهذا الإنزيم مدروسة جيداً . وتجدر الإشارة إلى أن المحافظة على الخواص المختلفة لهذه الإنزيم بين العناصر في الكائنات المتباعدة وراثياً تدل على أن هذه الإنزيم ضروري لعملية انتقال البولينتونات.

إن النهايات الطرفية للبولينتونات تتركب من (١-٣ قاعدة) تكرارات طرفية متتالية والتي تكون هامة لحدوث ميكانيكية الإنزلاق (Slide-back mechanism) أثناء تخليق الـ DNA المعلم بالبروتين في البكتريوفاج. واعتماداً على هذه الملاحظات تم اقتراح بأن البولينتونات تتكاثر عن طريق تكنيك التخليق الذاتي للبروتين المعلم بواسطة إنزيم (POLB).

أولاً يقوم إنزيم الاندماج بقطع البولينتون من جينوم العائل أثناء عملية التكرار والتضاعف للـ DNA ويؤدي ذلك إلى التوصل بولينتون وحيد الخيط (Single-Strand) والذي يكون شكلاً مشابهاً لمضرب الكرة خارج الكروموسومات. ثانياً يقوم إنزيم الـ POLBبتكرار البولينتون الناتج مكوناً بولينتون ثنائي الخيط. وأخيراً بعد تخليق البولينتون ثنائي الخيط يتم ارتباط إنزيم الاندماج بالنهايات الطرفية له ويعمل على اندماجه في جينوم العائل (من العناصر المنتقلة إلى الجينات).

أول الأمثلة الواضحة لأحد الجينات الوظيفية التي نشأت عن طريق عنصر متنقل هو الجين المشفر لبروتين السنترومين B(CENP-B)[٤٧،٤٨].

هذا الجين محفوظ في الثدييات ومحدد موقعه ولكن وظيفته الكاملة غير واضحة. وبناء على دراسات التنشيط الجيني اتضح أن هذا الجين يشترط في عمليات التكاثر وليس في الأنشطة والعمليات المتعلقة بالسنترومير[٤٩،٥٠].

ولقد تم اكتشاف جينات مشابهة لهذا الجين في الخميرة ولكن يعتقد أن هذه الجينات قد تطورت داخل جينوم الخميرة من العناصر المتنقلة Marino/Pogo مستقلة عن الجين المشابهة في الثدييات.

وذلك على الرغم من التشابه التركيبي بين هذا الجين في الثدييات والنباتات والفطريات الأخرى.

ويوجد ما يقرب من ٥٠ إلى ١٠٠ جين وظيفي في جينوم الثدييات نشأ عن عناصر DNA متنقلة وعناصر ارتجاعية متنقلة[٣٥،٥١،٥٢،٥٣،٥٤،٥٥،٥٦]، ومعظم هذه الجينات نشأت عن الإنزيمات الناقلة الخاصة بالعناصر (Mariner / Pogo, bAT, Piggy Bac, P, Harbinger, and Transib) ويمثل بروتين RAG1 أقدم بروتينات العائل التي نشأت من عناصر متنقلة[٣٥،٣٩].

وقد نشأ جين RAG1 منذ ما يقرب من ٥٠٠ مليون عام مضى من أصل مشترك في الفقاريات من العنصر المتنقل (Transib)[٣٩]. وهذا الجين أيضاً هو الجين الوحيد في جينوم العائل المشتق عن عنصر متنقل والذي يظهر أنشطة شبيهة بالقطع والنقل في العناصر المتنقلة.

أما الخواص البيولوجية لبقية الجينات التي نشأت عن عناصر متنقلة فهي غير معروفة أو مرتبطة بربط جزيئات الـ DNA أو RNA (57) ,(58) ,(59).

إن نظام المناعة المبنى على جين RAG1 هو المثال الوحيد على تطور ميكانيكية المعقدة من عناصر انتقالية[٣٥]. وهناك أمثلة أخرى لجينات تعمل أيضاً على إعادة ترتيب الـ DNA حيث أنها تشفر لبروتينات إنزيمات انتقال تشترك في وجود أحماض أمينية تحليلية مشابهة في إنزيمات الانتقال الأخرى. ويعتبر جين HARB11 والذي نشأ عن إنزيم الانتقال الخاص بعنصر (Harbinger) مثال على ذلك في الأصل التطوري المشترك في الأسماك والطيور والضفادع والثدييات[٦٠].

وتعتبر العناصر الانتقالية الارتجاعية ذات الأذرع هي مصدراً آخراً للجينات المكودة للبروتينات. فعلى سبيل المثال هناك الكثير من الجينات المشتركة بين جينومات

الفأر والإنسان تطورت من بروتين الغلاف gag المكود له بواسطة عناصر Gypsy ذات الأذرع الطويلة[illegible].

أحد الجينات التي نشأت عن عناصر الـ Gypsy تسمى PEG10 أو KIAA1051 وهي تشمل نطاق الـ gag وبروتين البروتيز واللذان اندمجا معاً ليكونا إطاراً جديداً مثل الموجود في عناصر الـ Gypsy[illegible].

على الرغم من وجود أكثر من ٣٠ مثال على جينات نشأت من إنزيم الانتقال في العناصر المتنقلة، هناك مثال واحد فقط على استخدام إنزيم لنسخ العكس (RT) في العناصر المتنقلة لنشأة أحد الجينات. هذا الجين هو جين Rt11 أو PEG11 والذي نشأ عن إنزيم RT وبروتين الـ gag في عناصر الـ Gypsy[illegible].

ومن المثير للدهشة أن كلاً الجينات PEG10, PEG11 جينات معبرة أبوية وتجدر الإشارة أن حوالي ٥٠٪ من جميع الجينات التي نشأت من بروتين (gag) توجد على كروموسوم (X).

وتبدو أن جينات الـ RNA الصغير (Micro RNA) قد نشأت عن عناصر متنقلة فقد لوحظ أن قدرتها على التحكم في الجينات قد نشأت عن العلاقة المتضادة بين العناصر المتنقلة وجينوم العائل. إن تعبير العناصر المتنقلة وتخليق تتابعات متكررة في الـ DNA يواجه تكسير للـ RNA وميثلة الـ DNA[illegible]، وذلك عن طريق RNA الصغير المنشأ عن طريق المناطق المتكررة المستهدفة. وهناك عمليات مناظرة تشتمل على تغير تركيب الكروماتين والتحكم في التعبير الجيني[47, 66, 71, 72].

وكثير من هذه العمليات تتم بواسطة الـ RNA الصغير الناتج عن أصول تطورية ثابتة[illegible]. ومما يبدو أن التحكم الغير وراثي في الجينات الوراثية في الإرابيدوبيسيس قد تطور عن ميكانيكيات تثبيط العناصر المتنقلة[illegible]. ويبدو أيضاً أن بعض الأصول التطورية للـ RNA الصغير قد نشأت عن عناصر ارتجاعية قديمة مثل MIR (SINE) أو L2 (LINE)[illegible]، أو عناصر حديثة مثل Alu (SINE) أو جينات كاذبة متحورة (Pseudogenes)[illegible].وأكد هذه النظرية حديثاً اكتشاف أن الطرف العناصر المتنقلة (5` Alus) يمكن أن يعمل كتتابع محفز للـ RNA الصغير مما يؤكد أن العناصر المتنقلة في الأصل التطوري للـ RNA الصغير الذي يتحكم في تنظيم التعبير الجيني في الثدييات[illegible].

obeikandi.com

العناصر المتنقلة العتيقة

إن دراسات المقارنة الجينومية الحديثة أظهرت وجود مناطق وتتابعات جينومية غير مشفرة لبروتينات متشابهة في عدة أنواع[78]. وهذه المناطق تشتمل على عناصر انتقالية مثل (LF-SINE)[79] وMER121[80] وAMN SINE وSINE3-19[81، 82]، وهذه العناصر السابقة تتبع عناصر الـ (SINE) (العناصر الانتقالية الارتجاعية ذات الأذرع القصيرة) أو شبيهة بها وهذه العناصر متشابهة تماماً في الفقاريات المختلفة ابتداء من الزواحف حتى الثدييات. وقد تم اكتشاف ٨٣ عائلة إضافية حديثاً من العناصر القليلة ومتوسطة التكرار وقد تم إضافتهم إلى قاعدة البيانات الخاصة بهم (Replace)[83، 84].

obeikandl.com

References المراجع العلمية

(1) McClintock B. 1984. The significance of responses of the genome to challenge. *Science* 226:792–801.

(2) Kalendar, R., Tanskanen, J., Immonen, S., Nevo, E. & Schulman, A. H. (2000) Genome evolution of wild barley (Hordeum spontaneum) by BARE-1 retrotransposon dynamics in response to sharp microclimatic divergenceProc. Natl. Acad. Sci USA 97, 6603–6607.

(3) Jonathan F. Wendel* and Susan R. Wessler (2000). Retrotransposon-mediated genome evolution on a local ecological scale. PNAS. 97(12):6250–6252.

(4) (Britten RJ, Kohne DE. 1968. Repeated sequences in DNA. Hundreds of thousands of copies of DNA sequences have been incorporated into the genomes of higher organisms. Science 161:529–40.

(5) Sharp AJ, Cheng Z, Eichler EE. 2006. Structural variation of the human genome. Annu. Rev. Genom. Hum. Genet. 7:407–42.

(6) Gardner MJ, Hall N, Fung E, White O, Berriman M, et al. 2002. Genome sequence of the human malaria parasite Plasmodium falciparum. Nature 419:498–511.

(7) Brosius J. 1991. Retroposons–seeds of evolution. Science 251:753.

(8) Hartl DL, Dykhuizen DE, Miller RD, Green L, de Framond J. 1983. Transposable element IS50 improves growth rate of E. coli cells without transposition. *Cell* 35:503–10

(9) Kidwell MG, Lisch DR. 2001. Perspective: transposable elements, parasitic DNA, and genome evolution. *Evol. Int. J. Org. Evol.* 55:1–24

(10) Wessler, S. R. 1996. Plant retrotransposons: turned on by stress.Curr. Biol. 6, 959–961.

(11) Grandbastien, M.-A. (1998). Activation of plant retrotransposons under stress conditions. Trends Plant Sci. 3:, 181–187.

(12) Hirochika, H. (1993). Activation of tobacco retrotransposons during tissue culture. EMBO J.12, 2521–2528.

(13) Hirochika, H., Sugimoto, K., Otsuki, Y., Tsugawa, H., and Kanda, M. (1996). Retrotransposons of rice involved in mutations induced by tissue culture. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **93:**, 7783–7788.

(14) Tarchini, R., Biddle, P., Wineland, R., Tingey, S., and Rafalski, A. (2000). The complete sequence of 340 kb of DNA around the rice *Adh1-Adh2* region reveals interrupted colinearity with maize chromosome 4. Plant Cell **12:** 381–391.

(15) SanMiguel , P., A. Tikhonov , Y.-K. Jin, N. Motchoulskaia , D. Zakharov , A. Melake-Berhan , P. S. Springer, K. J. Edwards, M. Lee, Z. Avramova , and **J. L. Bennetzen** (**1996**) Nested retrotransposons in the intergenic regions of the maize genome. *Science* 274:765-768.

(16) Vicient, C. M., Suoniemi, A.,Anamthawat-Jo´nsson, K.,Tanskanen, J., Behavav, A., Nevo, E. & Schulman, A. H. (1999)Retrotransposon BARE-1 and Its Role in Genome Evolution in the Genus Hordeum. Plant Cell 11, 1769–1784.

(17) Kulpa DA, Moran JV. 2006. Cis-preferential LINE-1 reverse transcriptase activity in ribonucleoprotein particles. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 13:655–60.

(18) Eickbush TH, Malik HS. 2002. Origins and evolution of retrotransposons. In *MobileDNA* , ed. NL Craig, R Craigie,MGellert,AMLambowitz, pp. 1111–144.Washington, DC: ASM Press.

(19) Kojima KK, Fujiwara H. 2004. Cross-genome screening of novel sequence-specific non- LTR retrotransposons: various multicopy RNA genes and microsatellites are selected as targets. *Mol. Biol. Evol.* 21:207–17.

(20) Kordis D, Gubensek F. 1997. Bov-B long interspersed repeated DNA (LINE) sequences are present in Vipera ammodytes phospholipase A2 genes and in genomes of Viperidae snakes. *Eur. J. Biochem.* 246:772–79.

(21) Jordan IK, Matyunina LV, McDonald JF. 1999. Evidence for the recent horizontal transfer of long terminal repeat retrotransposon. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96:12621–25.

(22) Lyozin GT, Makarova KS, Velikodvorskaja VV, Zelentsova HS, Khechumian RR, et al. 2001. The structure and evolution of Penelope in the virilis species group of *Drosophila*: an ancient lineage of retroelements. *J. Mol. Evol.* 52:445–56.

(23) Volff JN, Hornung U, Schartl M. 2001. Fish retroposons related to the Penelope element of *Drosophila* virilis define a new group of retrotransposable elements. *Mol. Genet. Genom.* 265:711–20.

(24) Eickbush TH, Malik HS. 2002. Origins and evolution of retrotransposons. In *MobileDNA II*, ed. NL Craig, R Craigie,MGellert,AMLambowitz, pp. 1111–144.Washington, DC: ASM Press.

(25) Evgen'ev MB, Arkhipova IR. 2005. Penelope-like elements—a new class of retroelements: distribution, function and possible evolutionary significance. *Cytogenet. Genome Res.* 110:510–21.

(26) Arkhipova IR, Pyatkov KI, Meselson M, Evgen'ev MB. 2003. Retroelements containing introns in diverse invertebrate taxa. *Nat. Genet.* 33:123–24.

(27) Cappello J, Handelsman K, Lodish HF. 1985. Sequence of Dictyostelium DIRS-1: an apparent retrotransposon with inverted terminal repeats and an internal circle junction sequence. *Cell* 43:105–15.

(28) Goodwin TJ, Poulter RT. 2001. The DIRS1 group of retrotransposons. *Mol. Biol. Evol.* 18:2067–82.

(29) Duncan L, Bouckaert K, Yeh F, Kirk DL. 2002. Kangaroo, a mobile element from Volvox carteri, is a member of a newly recognized third class of retrotransposons. *Genetics* 162:1617–30.

(30) Goodwin TJ, Poulter RT. 2004. A new group of tyrosine recombinase-encoding retrotransposons. *Mol. Biol. Evol.* 21:746–59.

(31) Poulter RT, Goodwin TJ. 2005. DIRS-1 and the other tyrosine recombinase retrotransposons. *Cytogenet. Genome Res.* 110:575–88.

(32) Goodwin TJ, Butler MI, Poulter RT. 2003. Cryptons: a group of tyrosine-recombinaseencoding DNA transposons from pathogenic fungi. *Microbiology* 149:3099–109.

(33) Craig NL. 1995. Unity in transposition reactions. *Science* 270:253–54.

(34) Kapitonov VV, Jurka J. 1999. Molecular paleontology of transposable elements from *Arabidopsis thaliana*. *Genetica* 107:27–37.

(35) Kapitonov VV, Jurka J. 2004. Harbinger transposons and an ancient *HARBI1* gene derived from a transposase. *DNA Cell Biol.* 23:311–24.

(36) Kapitonov VV, Jurka J. 2001. Rolling-circle transposons in eukaryotes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98:8714–19.

(37) Galagan JE, Calvo SE, Cuomo C, Ma LJ, Wortman JR, et al. 2005. Sequencing of *Aspergillus nidulans* and comparative analysis with *A. fumigatus* and A. oryzae. *Nature* 438:1105–15.

(38) Poulter RT, Goodwin TJ. 2005. DIRS-1 and the other tyrosine recombinase retrotransposons. *Cytogenet. Genome Res.* 110:575–88.

(39) Kapitonov VV, Jurka J. 2005. Helitron-1 SP, a family of autonomous Helitrons in the sea urchin genome. *Repbase Rep.* 5:393.

(40) Lai J, Li Y, Messing J, Dooner HK. 2005. Gene movement by Helitron transposons contributes to the haplotype variability of maize. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102:9068–73.

(41) Morgante M, Brunner S, Pea G, Fengler K, Zuccolo A, Rafalski A. 2005. Gene duplication and exon shuffling by helitron-like transposons generate intraspecies diversity in maize. *Nat. Genet.* 37:997–1002.

(42) Kapitonov VV, Jurka J. 2006. Self-synthesizing DNA transposons in eukaryotes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 103:4540–45.

obeikandl.com

"إستخدام التكنيكات الجزيئية
فى حفظ ودراسة الأختلافات الوراثية"

obeikandl.com

مقدمة

إن التنوع الوراثى والإختلافات الوراثية الناجمة عن التطور البيولوجى عبر ملايين السنين فى المناطق الجغرافية المختلفة إنما هو كنز وراثى يجب التعرف والحفاظ عليه وإستغلاله بقدر الإمكان. وقد تمكن مربو النبات وعلماء وراثة العشائر التعرف على هذا الكنز وتقدير أهميته وإستغلاله إلى حد بعيد. وتكمن أهمية التنوع الوراثى بالنسبة إلى مربى النبات فى إمكانية إستغلال هذا التنوع لإنتاج أصناف جديدة غير تقليدية متوائمة مع ظروف البيئة المحيطة وذات أهمية اقتصادية. لذلك فإن التعرف على هذا التنوع وإمكانية حصره أصبح الشغل الشاغل لعلماء وراثة العشائر لسنوات طويلة. كما أن الحفاظ على هذا الإرث البيولوجى أصبح ضرورة ملحة وقضية هامة لا يمكن الاستهانة بها. ومع التقدم المذهل في تقنيات الوراثة الجزئية فى نهاية القرن العشرين، أصبح من الممكن التعرف على هذه الاختلافات الوراثية وحصرها وتقديرها على المستوى الجزيئى وعمل بصمة وراثية للأنواع المختلفة حتى يمكننا الحفاظ عليها.

الوراثة المحافظة (Conservation Genetics):

إن الإهتمام بالحفاظ على التنوع الحيوى (Biodiversity) هو الهدف الرئيسى لعلماء البيولوجيا والوراثة المحافظة (Conservation Biology and Genetics) وكما هو معروف فإن هذا التنوع تم تنظيمه ودراسته بدآ من الوحدات عائلية (Family units) والقرابات الممتدة (Extended kinships) والتراكيب الوراثية المختلفة للعشائر داخل النوع الواحد وصولا إلى عمل مقاييس مدرجة للتباين الوراثى فى القدرة على التكاثر والبقاء للأنواع المختلفة التى انحدرت عبر التاريخ التطورى.

وكما نعلم فإن المظهر الخارجي للكائنات لايعبر عن الإختلافات الحقيقية للتراكيب الوراثية. ومن الغريب أنه فى الوقت الذي تطورت فيه الأدوات والتقنيات اللازمة لمعرفة وتقدير التباين الوراثى، هو أكثر وأسرع المراحل التطورية فى فقد هذا التنوع على مر التاريخ البيولوجى، وبالتالى فإن أحد أهداف الوراثة المحافظة هو الحفاظ على هذا التباين الوراثى، ولكنه لا يكفى، وأنما يجب أيضا أن يكون الحفاظ على استمرار العمليات التطورية نفسها هدفا آخر يجب الإهتمام به.

إن عمليات التهجين بين الأنواع المختلفة، وظهور الأنواع الجديده وغيرها من العمليات الديناميكية للتطور والتي أثرت تأثيرا كبيرا على كيفية تنظيم العمليات التطورية المختلفة، لا ينظر إليها بالإهتمام الكافى، بل على العكس ينظر إليها على أنها

نوع من أنواع العمليات البدائية التي يمكن تجاهلها أو التعامل معها بقدر قليل من الإهتمام.

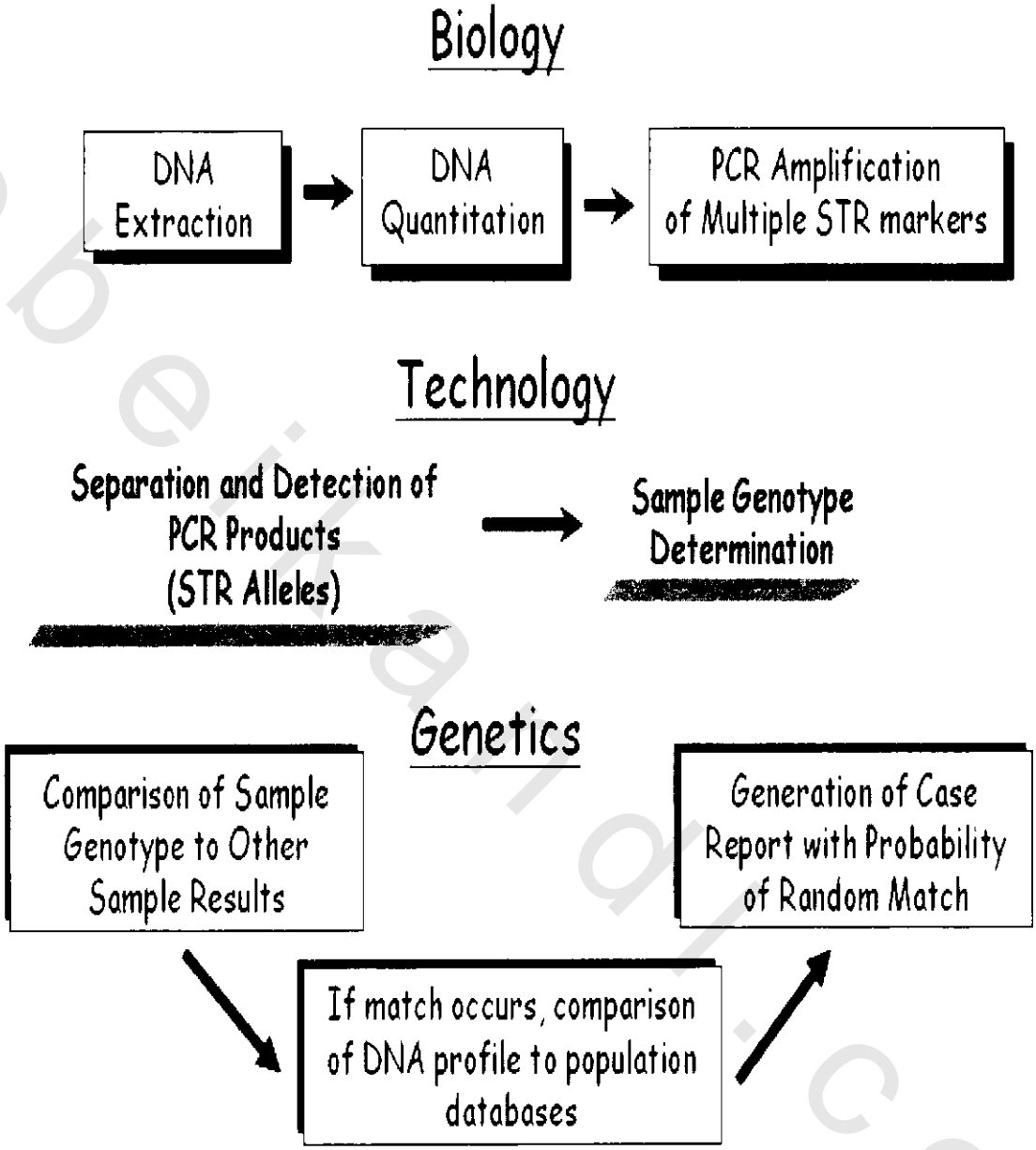
يجب القول بأنه ليس فقط على المجتمعات البشرية المختلفة الحفاظ على لتباين الوراثى الموجود، خاصة الأنواع المهددة بالانقراض، بل يجب عليهم أن يجدوا الوسيلة اللازمة للحفاظ على استمرار العمليات التطورية المختلفة والتي تثمر هذا التنوع الحيوي.

التقنيات الجزيئية الحديثة لعمل البصمة الوراثية:

إن التقنيات الحديثة التى بزغت فى النصف الثانى من القرن العشرين فى البيولوجيا الجزيئية ساعدت على التعرف السريع والدقيق للاختلافات الوراثية بين الأنواع المختلفة.

بل إن هذه التقنيات وصلت من الدقة أن تظهر التباينات المختلفة بين الأفراد، والتي تميز كل فرد على حدة، فيما أطلق عليه بعد ذلك البصمة الوراثية (DNA fingerprinting)، ولذلك فإن البصمة الوراثية تم إستخدامها على نطاق واسع فى الطب الشرعى. وقد إستطاع علماء الوراثة إستخدام هذه التقنيات فى التعرف على التباين الوراثى بين العشائر والأنواع والأصناف المختلفة، والذى يصعب التعرف عليه بالوسائل المورفولوجية المختلفة، كما تم استخدام هذه التقنيات حديثا للتأكد من انتقال الجينات إلى الأنواع المنتجة بالهندسة الوراثية.

ويوضح الشكل (١٣٩) التالي العمليات المختلفة التى يتم إتباعها لعمل البصمة الوراثية لكائن ما. وكما يظهر في هذا الشكل فإن عمل البصمة الوراثية لكائن ما يعتمد على عمليات بيولوجية وتكنولوجية ووراثية مختلفة.



شكل ١٣٩

الأدوات الجزئية (Molecular Tools):

إن دراسة الاختلافات والعلاقات بين الأفراد المختلفة كانت فى السابق تعتمد على الدراسة المقارنة للأشكال المظهرية (Morphology) والفسيولوجية (Physiology) بين الأفراد موضع الدراسة.

أما بالنسبة إلى استخدام الأدوات الجزيئية فأنها تعتمد أيضا على الدراسة المقارنة (Comparative study)، ولكن المقارنة تشتمل على معلومات مباشرة و غير مباشرة للتتابعات الحمض النووى DNA والبروتينات الموجودة في الكائن.

ويمكن تقسيم هذه الأدوات إلى:-

١) اختبارات تعتمد على الفروق فى المحتوى البروتينى (Protien assays):-

- الإختبارات المناعية (Protien immunology).
- التفريد الكهربى البروتينى(Protien electrophoresis).

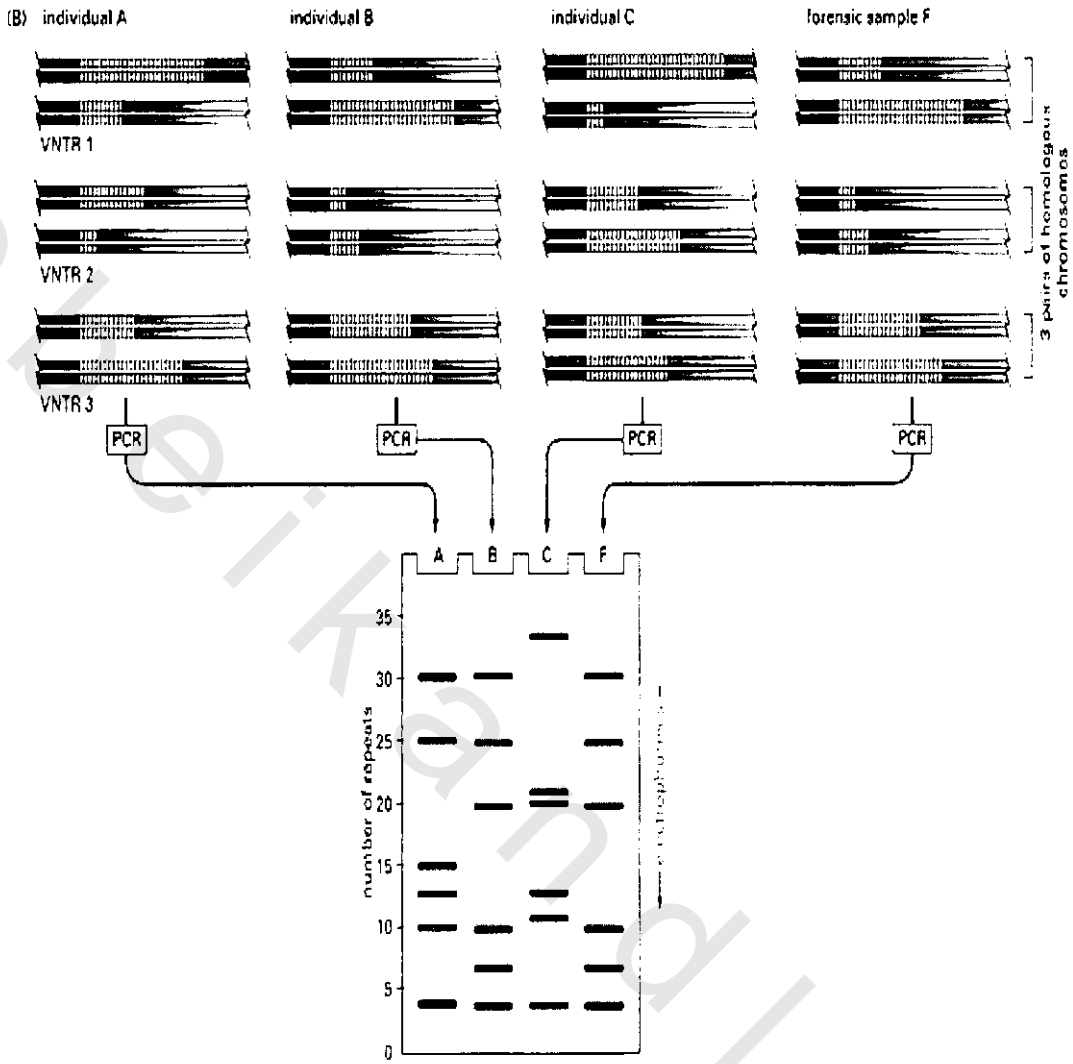
٢) إختبارات تعتمد على المادة الوراثية (DNA assays):-

- إختبارات تهجين المادة الوراثيةDNA-DNA hybridization.
- التحليل القصرى(RFLP) Restriction analysis .
- التفاعل التسلسلى للبوليمراز PCR مثل RAPD.

الواسمات الجزيئية وكشف التباين الوراثى:

يمكننا تعريف الواسمات الجزيئية بأنها عبارة عن تتابعات مميزة فى محتوى الكائن من المادة الوراثية DNA وتنشأ هذه التتابعات المتفردة عن حذف تتابعات أو إضافتها أو تعديل موضعها مما يؤدى إلى إختلافات تركيبية بين الأفراد.

وقد مكنتنا البيولوجية الحديثة من تعيين هوية هذه الواسمات بدقة وسهولة. ويمكننا القول بان حصر الاختلافات والتباينات بين فرد وآخر يمكن أن نطلق عليه البصمة الوراثية او الهوية الوراثية لهذا الكائن. ويوضح الشكل التوضيحى الأتى كيفية المقارنة بين بعض الأفراد التي تحمل تراكيب فردية مميزة لكل منها.



شكل ١٤٠

ويمكننا أن نلخص بعض التقنيات الهامة فى تحديد البصمة الوراثية للكائن:

١. تكنولوجيا تهجين الدنا:

وتعتمد هذه التقنية على مبدأ التكامل بين جديلتى الـDNA فيمكن الكشف عن اى تتابع فى المادة الوراثية عن طريق استخدام نسخه مشابهه له ويمكن التعرف عليها بسهولة ويطلق على هذه النسخه (مسبر الدنا)(DNA Probe) .هذا المسبر قد يكون أى جزء من الـ DNAأوالـ RNA على شرط أن يكون مكمل للتتابع المراد البحث عليه ويمكن التهجين معه بسهولة. ومن الضرورى ان يتم تعليم هذا المسبر بمادة يسهل الكشف عنها مثل العناصر المشعة أو مواد كيماوية ملونة، وبالطبع يجب أن يكون كل من المسبر والتتابع المراد الكشف عنه وحيد الجديلة (Single strand).

ولذلك يجب أن يتم تحويل كل خيوط الـDNA المزدوجة إلى خيوط مفردة قبل القيام بعملية التهجين. وقد تتم عملية التهجين هذه بإحدى الطريقتين:

أ- بشكل مباشر على أجزاء الـDNA فى الجل.

ب- على ورق راشح معين يحتوى على قطع الـDNA بعد أنتقالها عليه.

والطريقة الأخيرة هى الأكثر شيوعا وسهولة فى المعمل.

ومعنى ذلك إننا لا يمكننا التعرف فقط إلا على الشظايا التى تحمل التتابع المكمل لهذا المسبر. وبالطبع يمكننا التعرف على التتابعات المرغوب فيها عن طريق استخدام فيلم أشعة أكس (X-Ray film)، وذلك فى حالة إستخدام العناصر المشعة أو عن طريق تغيير اللون، وذلك فى حالة إستخدام تفاعلا لونيا.

وقد أطلق على عملية الكشف عن الـDNAبواسطة التهجين إسم ساذرن (Southern-blotting)، وذلك على إسم العالم مبتكر هذه الطريقة والتى سمى بنفس الإسم، والذى نشرها عام ١٩٧٥. وأسوة بذلك تم إطلاق إسم نورذرن(Northern-blotting) على تهجين الـ (RNA) وإسم وسترن (Westren-blotting) على تهجين البروتين.

٢. إستخدام تقنية الرفلبات(RFLP):-

إن تقنية الرفلبات(RFLP) والتى تعتمد على التباينات فى أطوال شظاياالـDNAالناتجة عن إستخدام أنزيمات القصر، وهى من أكثر الطرق شيوعا وإستخداما لعمل البصمة الوراثية. حيث أن حدوث أى طفرة أو تغيير فى المادة الوراثية للكائن قد تنجم عن حذف أو إضافة أو تبديل تتابعات معينة فيها. وبالتالى فإن إستخدام أى من أنزيمات القصر سينتج عنه شظايا تختلف فى أطوالها من فرد لآخر بسبب تغيير مواقع التعرف لهذا الانزيم على طول المادة الوراثية. وهذه التباينات فى أطوال الشظايا الناتجة بين الأفراد المختلفة والتى تعتبر مميزة لكل فرد أو نوع تسمى رفلبات(Restriction fragments length polymorphisms).

استخدام المناطق ذات التتابعات القصيرة المتكررة:

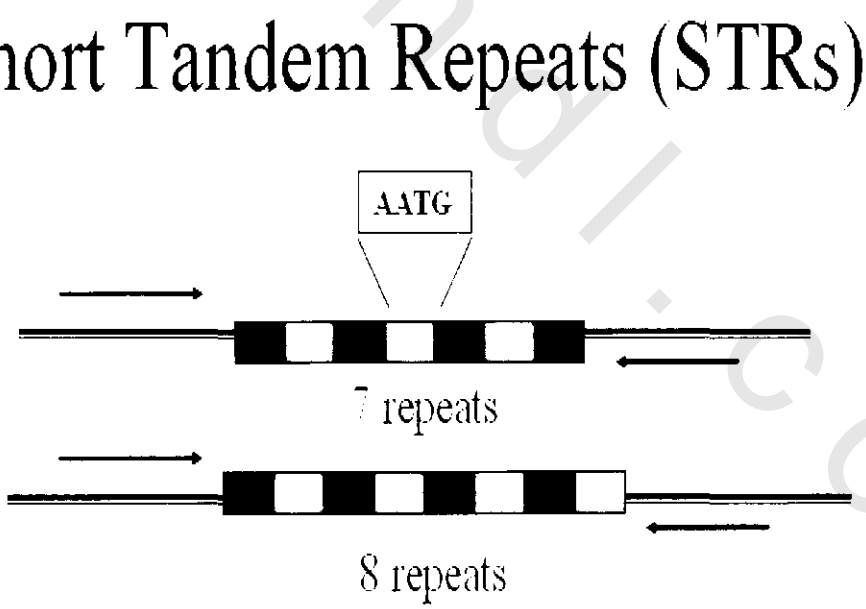
(Short tandem repeats):

إن المناطق ذات التتابعات القصيرة المتكررة(STR) (Short tandem repeats) هي مناطق متفردة ومميزة لكل فرد على حدة، لذلك كانت هذه المناطق هى المناطق المرشحة فى الـ DNAلكي تستخدم لدراسة البصمة الو راثية بين الأفراد المختلفة، وهى تتألف من مكررات لتتابع أساسي يتألف من خمسة عشر زوجا من

القواعد وقد إكتشفها العالم جينيريز وفريقه البحثى بجامعة ليستر. فقد استطاع تحديد بعض المجاميع من التوابع الصغيرة التى تحمل تتابعات متشابهة أو متطابقة. وقد استطاعوا ان يصمموا طريقة لكشف هذه التتابعات عام ١٩٨٥ وذلك باستخدام مسبر خاص تم عزله من منطقة الأنترون فى الجيل الذى يشفر لبروتين العضلات والمسمى ميوجلوبين. وقد اطلقوا على هذه التقنية البصمة الوراثية. ونظرا لوجود عددا كبيرا من المكررات فى كل موقع فقد استطاعت هذه التتابعات المتكررة(STR) أن تظهر التباينات بين الأفراد المختلفة وخاصة أننا يمكننا أن نفحص ما يقرب من عشرين موقعا وراثيا مختلفا فى الوقت الواحد. وقد إستخدمت هذه التقنية فى الطب الشرعى وإثبات البنوة والقرابة وغيرها من التطبيقات المفيدة.

ويوضح الشكل (١٤١) التالي رسم تخطيطي لهذه التتابعات القصيرة المتكررة. وكما هو موضح فى الشكل التالى فإن عدد وحدات هذه التتابعات يختلف من فرد الى أخر فى حين أن البوادئ (Primers) المستخدمة فى أجراء التضاعف ثابتة.

شكل ١٤١: التتابعات القصيرة المتكررة



التكنيك العملى لعمل البصمة الوراثية:-

يجب دراسة الاختلافات فيما يقرب من عدة مئات من الوحدات المتكررة(STR) والتى يتكون كل منها من (١٥-٦٠) قاعدة مزدوجة. وهذه التقنية تسمح لنا بالتعرف على الإختلافات الوراثية فى النبات والحيوان داخل العشيرة الواحدة وبين العشائر المختلفة.

الطريقة العملية:

يتم إستخدام DNAعالى النقاء اما فى حالة الحيوان يتم إستخلاصه من الدم.

١. بتم هضم ما يقرب من ٥ميكروجرام من العينة المراد تحليلها باستخدام أنزيمات القصر وغالبا تستخدم كل من الإنزيمات (Hinf I, Hae II, Mbo I, Alu I) وهذه الإنزيمات تساعد على تجزئة ال DNA إلى أجزاء صغيرة بسبب قدرتها على القطع فى أمكن كثيرة ومتكررة على طول ال DNA وبالتالى فإن القطع الكبيرة الباقية والتى لم تقطع هى فى الغالب تتابعات ذات تكرار عالى والتى يمكن إستخدامها لعمل البصمة الوراثية.

٢. إجراء الفريد الكهربى على جل الأجاروز حتى يتم تفريد جميع شظايا المادة الوراثية على مسافات مناسبة.

٣. مقارنة الوقت والتفريد الخاص بالعينة المختبرة مع عينة تجريبية معلومة التركيب وذات شظايا معروفة الحجم.

٤. نقل الـDNA من على الجيل إلى الورق الراشح عن طريق تقنية (ساذرن)السابق شرحها وذلك لإعدادها للتهجين مع المسبر.

٥. يتم إضافة المسابر المعلمة إشعاعيا(ويكون عبارة عن تتابع معلوم يتكون من ١٢-٦٠ قاعدة مزدوجة) إلى الورق الراشح ثم تترك لفترة من الزمن حتى يمكنها التكامل من الشظايا المكملة لها من ال DNA.

٦. الشظايا التى هجنت مع المسابر المشعة يمكن التعرف عليها بسهولة حيث أنها تكون مشعة هى الأخرى.

٧. يتم إزالة المجسات الزائدة التى لم تهجن مع الـ DNAعن طريق غسيل الورق الراشح بمحاليل معينة.

٨. يتم تعريض الورق الراشح إلى فيلم أشعة إكس للحصول على صورة من البصمة الناتجة.

ويكون الناتج النهائى لهذه البصمة الوراثية هو عبارة عن نموذج من الـ DNA المميزة للفرد (ويكون حوالى ١٠-٢٥٪ من هذه القطع متجانس بين أى فردين على

سبيل الصدفة) ما عدا فى حالات التربية الداخلية أو فى حالة التوأم. ويستخدم هذا التكنيك غالبا فى تحديد القرابات بين الأفراد أولدراسة البنوة والأبوة، كما يمكن مقارنة العشائر صغيرة الحجم حتى تقل الفروق الفردية، وبالتالى فإنه يمكننا الحصول على نماذج للشظايا ذات بصمة مميزة للعشيرة.

تحليل النتائج:-

(تقدير نسبة الأصالة الوراثية (Homozygosity) للفرد والعشيرة).

عن طريق معرفة عدد الشظايا فى نموذج البصمة الوراثية للفرد أو العشيرة يمكننا تقدير نسبة الأصالة الوراثية (Homozygosity). فإذا قل عدد الشظايا فى نموذج البصمة الوراثية كان ذلك دليلا على أرتفاع نسبة الأليلات الأصيلة فى الفرد أو العشيرة موضع الدراسة.

(تقدير نسبة التشابه) (Similarity Index).

لقياس مقدار التشابه بين أى فردين يجب تحديد عدد الشظايا المشتركة بين نموذج كل منهما ثم مضاعفة هذا الرقم بالضرب فى أثنين ثم قسمته على العدد الكلى للشظايا فى كلا من النموذجين. وبالطبع فإن نسبة نموذج البصمة الوراثية لكل منهما يزداد بزيادة درجة القرابة.

(التباينات المنحدرة من العشيرة) (Population Subdivision).

عن طريق تقدير التباين الوراثى فى موقع وراثى واحد (One single locus) نستطيع أن نتعرف ونقدر التباينات والأقسام المختلفة المنحدرة من العشيرة. ويتم أختبار ذلك عن طريق دراسة نسبة التشابه والأختلاف بين الأفراد داخل العشيرة. و ذلك عن طريق أجراء أختبار أحصائى بسيط لأختبار معنوية الفروق بين من عشيرتين مختلفتين.

كيف يمكننا أستغلال هذا التكنيك للحفاظ على الأصول الوراثية؟

العلاقات ما بين الأفراد:

(Relationships between individuals):

هذه التقنية هامة جدا فى تحديد ماإذا كانت العشيرة قد فقدت قدر كبير من التباين الوراثى فيها بسبب أحتوائها على عدد صغير من الأفراد أم لا. لذلك فهي مفيدة جدا فى برامج التربية التي تجرى في الأماكن المغلقة مثل حدائق الحيوان مثلا، حيث يحرص المشرفون على برامج التربية أجراء التهجين بين الأنواع غير القريبة وراثيا.

معرفة مستوى النقاء الوراثى فى العشائر والأفراد:

أن أرتفاع نسبة الأصالة الوراثية فى عشيرة ما، يدل على حدوث التربية الداخلية(Inbreeding). هذا بالطبع يهدد كفاءة العشيرة ويشير إلى أنه يجب مراقبة السلوك التزاوجى فى هذه العشيرة حتى يمكن الحفاظ عليها.

درجة التقسيم فى العشيرة (Population subdivision):

أذا كانت نسبة التشابه الوراثى بين مجموعتين من الأفراد داخل العشيرة قليلة، كان ذلك دليلا يأن التدفق الجينى (Gene flow) بين هاتين المجموعتين قد أنخفض وبالتالى يجب أعتبار كلا منهما مجموعة مستقلة عند دراستها.

التحليل الجنائى للحياة البرية (Wildlife forensics):

نظرا لأن البصمة الوراثية متفردة ومميزة لكل فرد على حدة فأنه يتم أستخدامها الأن فى الكشف عن جرائم الأعتداء على الحياة البرية والصيد غير المشروع فى الأماكن المحرم الصيد فيها.

obeikandl.com

obeikandl.com

تكنيكات الـ PCR
تقنيات معتمد على تفاعل الـ PCR

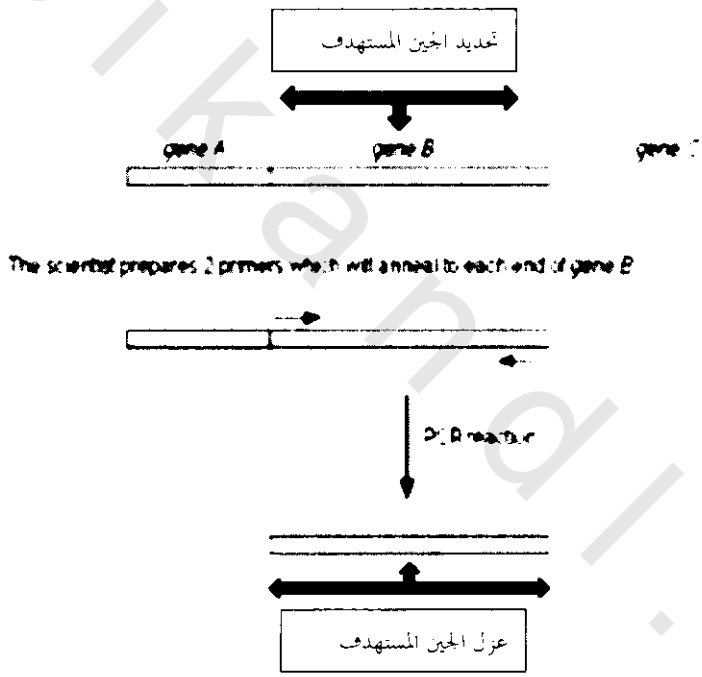
obeikandl.com

(١) تفاعل (RAPD PCR) (التضاعف العشوائي للمادة الوراثية:

يعتبر تفاعل الـ RAPDاحد تقنيات الـ PCRولكنة يعمل علي تضاعف قطع من الـ DNA(المادة الوراثية) والتي بالضرورة تكون غير معروفة (مجهولة) بالنسبة للعلماء (عشوائية).

وفي الغالب يستخدم الـPCR لعزل و تضاعف قطع معلومة من تتابعات الـ DNA. ولذلك يقوم العلماء باختيار وتحديد قطعة او تتابع الـDNAالمستهدف ثم يقوموا بتصميم بوادئ (Primers) ترتبط بالمنطقة المحيطة للتابع المستهدف للقيام بعملية التضاعف لقطعة الـDNAالمحددة

- فمثلا (كما يظهر بالصورة)، شكل (١٤٢).



شكل ١٤٢

- فمثلا اذا كانت قطع الـDNAالمستخدمة تحتوي علي ثلاث جينات مختلفة يقوم العلماء ببناء بؤادي لعزل احد هذة الجينات فقط (مثلاًجينB) والذي يتم تضاعفة عن طريق تفاعل الPCR.

ولكن في تحليل الـ RAPD تكون قطعة الDNA المرغوبة غير معروفة ولذلك يقوم العلماء بتصميم بؤادي ذات تتابع عشؤائي .بعبارة اخري يقوم العلماء بتخليق

obeikandl.com

عشرة قواعد بشكل عشوائي اويقوم الحاسب بهذا العمل ثم يتم تصميمها وانتاجها. ثم يقوم العلماء بعمل تفاعل الPCRوتفريد النواتج علي جيل اجاروز لرؤية قطع الDNA المتضاعفة والناتجة من وجود البادي العشوائي.

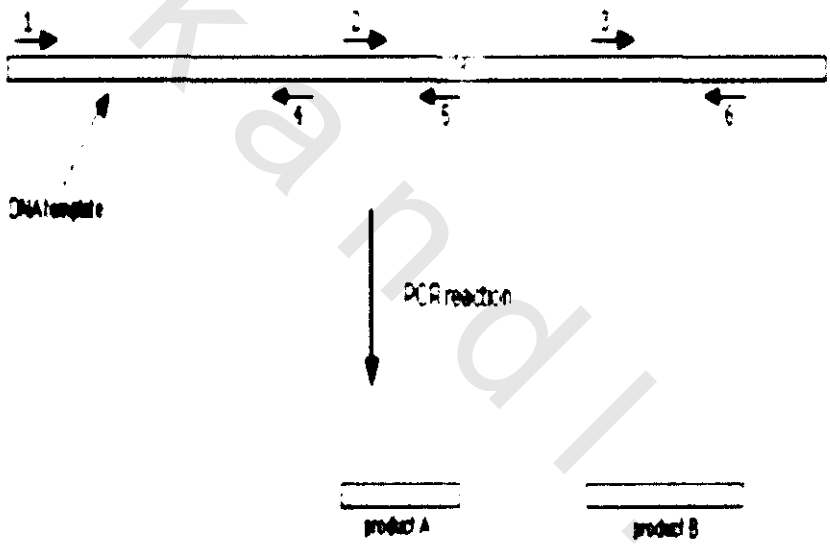
ويجب ان نتذكر ان لكي نحصل علي نتائج من الـRAPD-PCR:-

١- يجب ان يكون اتجاة البؤادي متعاكس في الاتجاة.

٢- ان تكون المسافة بين البؤادي معقولة اي ليست كبيرة جدا او صغيرة جدا.

ويظهر الشكل التالي كيفية تضاعف قطعتين من الـDNA(A)و(B) علي الرغم من وجود ٦ بؤادي.

وكما يظهر في الشكل (١٤٣) :-



شكل ١٤٣

- فمثلا القطعة(A)نتجت من البادى (2)و(5) اما القطعة (B)نتجت من البادى (3)و(6)

وذلك لتوافر الشروط سالفة الذكر من حيث المسافة والاتجاة.

وكما يظهر الشكل فان الاسهم تمثل نسخ من البادي والتي جميعها تحمل نفس التتابع.ويمثل اتجاة سهم اتجاة تخليق الـ DNA. وتمثل الارقام من(١) الي (٦) المواقع

obeikandl.com

علي خيط الDNAالقالب والذي يرتبط بة البؤادي. البؤادي ١ , ٢ , ٣سوف ترتبط بالخيط العلوي اما البؤادي ٤،٥،٦سوف ترتبط بالخيط السفلي.

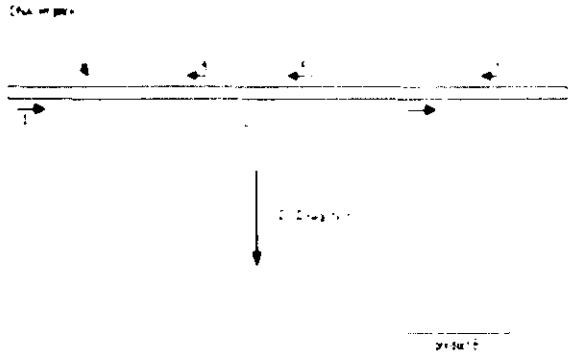
ويظهر الشكل (١٤٤) التالي كيفية حدوث التضاعف بين بادئين (١)،(٢)

شكل ١٤٤ : (ايجاد اختلافات وراثية بين جينومين باستخدام تحليل الRAPD)

بالنظر الي الصور السابقة يمكن ان نستنتج بإننا اذا استخدمنا جينوم مختلف او قالبDNA مختلف سوف نحصل علي نتائج مختلفة بين العينات المختلفة.

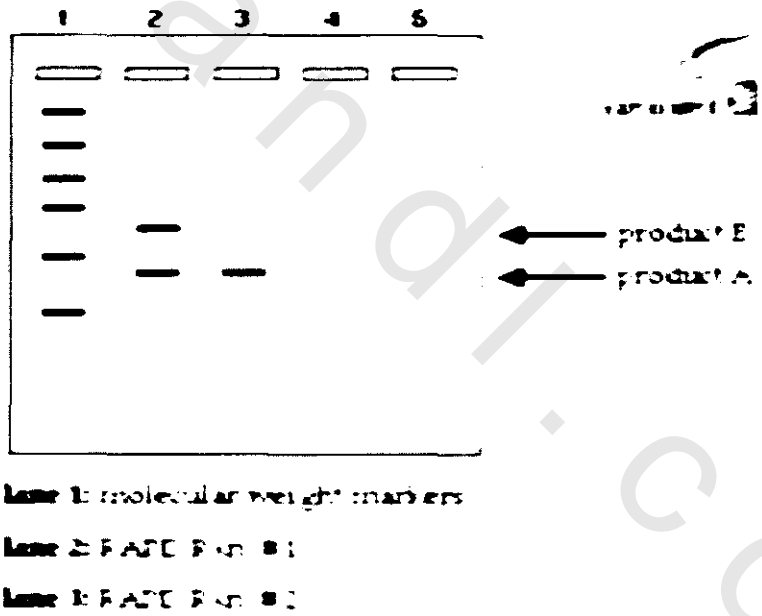
- مثلا:-

اذا افترضنا ان هناك تغير في منطقة اتصال القالب بالبادي رقم٢ فسوف نجد ان البادي لن يستطيع الالتحام بالقالب وبالتالي ان القطعة(A) لن تنتج من التفاعل.كما يوضح الشكل.



التفريد الكهربي علي الجيل:-

بعد إجراءالتفاعلين السابقيين يتم تفريد النتائج علي جيل الاجاروز كهربيا وسوف تظهر النتائج كما توضح الصورة التالية (شكل ١٤٥) حيث سيظهر قطعتين في التفاعل الاول(AوB) اما التفاعل الثاني س ظهر به قطعة واحدة (B).



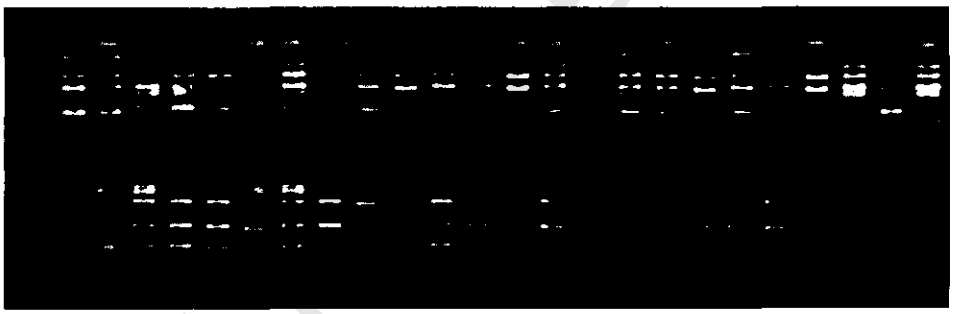
شكل ١٤٥

(٢) تكنيك الـ ISSR (التتابع البسيط البيني المتكرر)

ما هو تكنيك التتابع البسيط البيني المتكرر:-

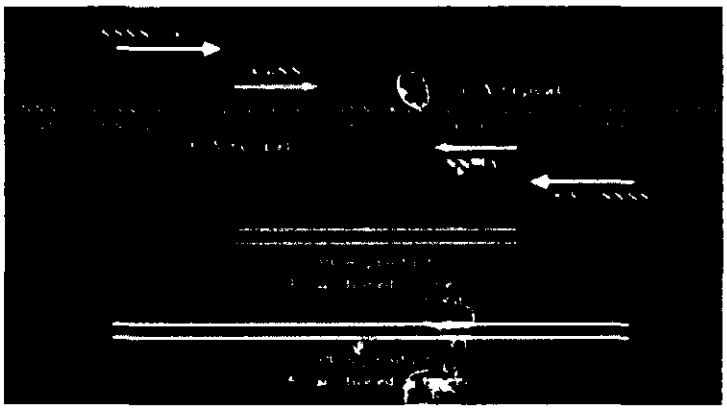
هو تكنيك لانتاج واسمات جزيئية وقد تم تطويرة حديثا لاكتشاف الاختلافات الوراثية داخل مناطق التتابع البسيط المتكرر وهو تكنيك بسيط وعشوائي ومشابهة لتكنيك الـ RAPD في البساطة والعشوائية حيث انة لا يحتاج الي معرفة مسبقة لتتابع الجينوم الذي سوف تتم دراستة. مناطق التتابع البيني البسيط هي مناطق قصيرة الطول وتتراوح احيانا من ١٠ الى ٢٠قاعدة مزدوجة وتتباين بشدة بين الافراد والكائنات المختلفة والعشائر والانواع المختلفة وقد تتكون من تكرار لقاعدة واحدة او ثنين او ثلاثة مثل (Aاو AGاوCGA.....وهكذا) والتي قد تكرر من اربع الي عشرة مرات. وتكنيك الISSRغالبا ما يستهدف مناطق التكرارت ثنائية وثلاثية القواعد لانها تميز الجينومات النووية(اما التكرارات احادية القواعد توجد في جينومات الكلوروبلاست).

قد اظهرت دراسة الاختلافات في مواقع الISSRانسب تقترب من النسب الوراثية المندلية (العالم تسميورا واخرون ١٩٩٧) كما في الشكل (١٤٦) التالى:



شكل ١٤٦

ان التباين الوراثي والاختلافات الكبيرة لتكنيك ISSRمقارنة بتكنيك الRFLPاوRAPDيجعل هذا التكنيك مثالي لعمل خرائط وراثية للانواع المختلفة(ناجاكوا وكوهيرا ١٩٩٧)ويظهر الشكل التالي تضاعف منطقة بين منطقتين في التتابع البسيط المتكرر باستخدام بوادئ تستهدف الطرف(5")(خارج المنطقة)اوالطرف(3") (داخل المنطقة)من مناطق (CA) المتكرر.



شكل ١٤٧

الطرق المختلفة لعمل تكنيك الISSR

في السنوات الاخيرة تم اختبار وتطوير عدة بروتوكولات لدراسة التباين الوراثي وتقدير في وراثة العشائر والدراسات الوراثية الاخري باستخدام تكنيك الISSR.

مميزات تكنيك ISSR:-

- يحتاج الي كمية صغيرة جدا من الDNA(٥-٢٠نانوجرام)
- ينتج هذا التكنيك عدد كبير من الواسمات التي يمكن تكرارها عن اعادة التجربة.
- لقد تم تطوير هذا التكنيك للعمل اليا لمساعدة الباحثين في تحليل عدد كبير من العشائر ودراستها.
- يتغلب هذا التكنيك علي مشكلة ضرورة معرفة التتابعات المحيطة بالتتابعات المدروسة والتي يتطلبها تكنيك ال(SSR).

عيوب تكنيك ISSR:-

ينتج واسمات سائدة وبالتالي لايقدم معلومات كثيرة وجيدة عن جميع التتابعات الموجودة في الجينوم.

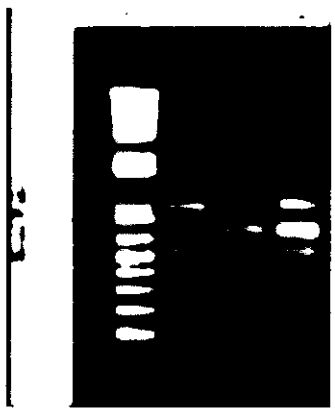
التقنيات المختلفة لاداء تكنيك ال ISSR

١. تكنيك الISSRباستخدام جيل الاجاروز:-

هو تكنيك سريع و ذو كفاءة عالية لدراسة التباين الوراثي وعمل الخريطة جينومية. يظهرهذا التكنيك التباين بين العينات والتي قد تختلف في اكثر من ٢٪ من

obeikandl.com

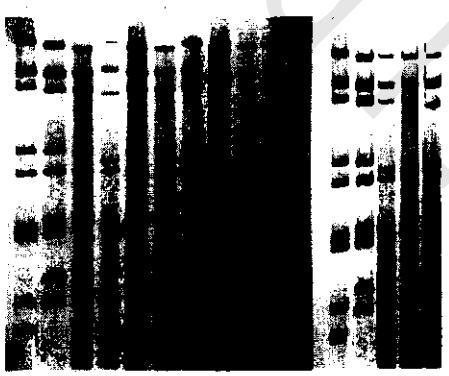
تركيبها الوراثي. ويعيب هذا التكنيك عدم قدرتة علي اكتشاف بعض القطع المنتجة ذات التضاعف الضعيف.(كما في الصورة)، شكل (١٤٨).



شكل ١٤٨

٢. تكنيك الISSRباستخدام جيل البولي اكريلاميد وصبغة السيلفر:-

هي طريقة ذات كفاءة عالية ويمكن الاعتماد عليها لاظهار التباين الوراثي . وهي اكثر امانا من الطرق المعتمدة علي العناصر المشعة ولكنها تحتاج الي عمل وجهد اكثر من طريقة جيل الاجاروز.

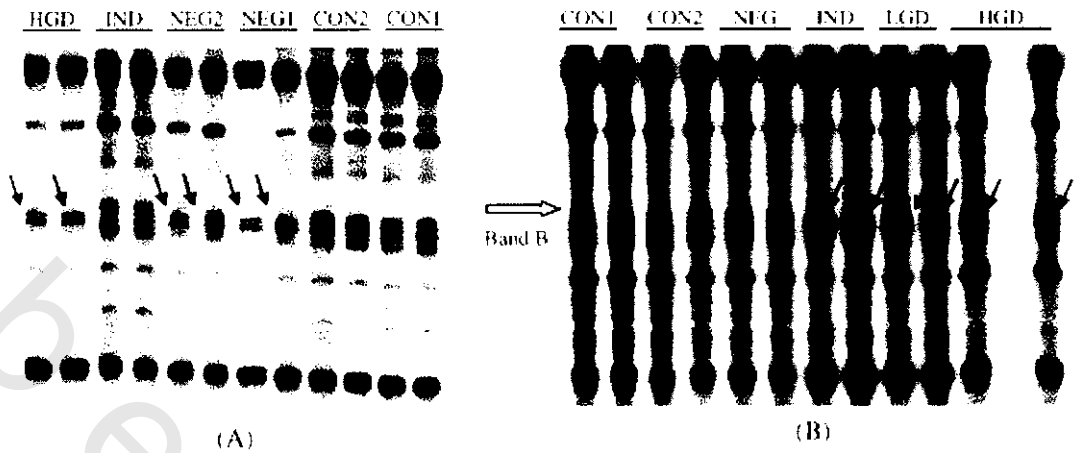


شكل ١٤٩

٣. تكنيك الISSRباستخدام العناصر المشعة:-

هو اكثر التكنيكات حساسية وكفاءة في اظهار التباين الوراثي ولكنة يحتاج الي جهد كبير وخطر التعرض للاشعاع الناتج من التفاعل مع العناصر المشعة.

obeikandl.com

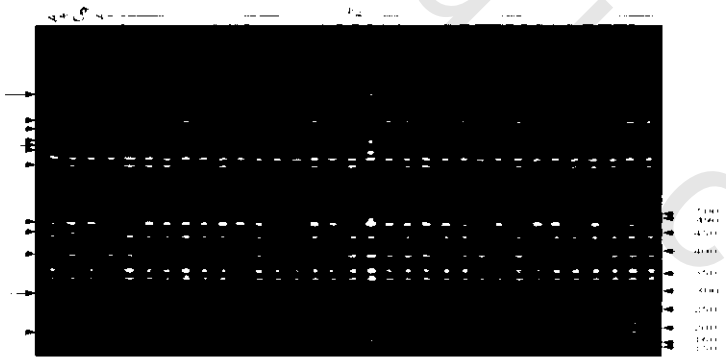


شكل ١٥٠

٤. تكنيك ISSRباستخدام الصبغات الفلوروسنتية(FISSR):-

تتميز هذة الطريقة بكلا من ميزة السرعة وميزة الحساسية والدقة ولكنة الاكثر تكلفة بين الطرق الاخري.

وقد تم تطوير هذة الطريقة للعمل اليا باستخدام قواعد او بوادئ معلمة فلوروسنتية وبالتالي قد تحتاج الي نظام الي للسلسلة . وتصلح هذة الطريقة لتحليل ودراسة عدد كبير من العينات.



شكل ١٥١

ملحوظة:-

١. يجب تكرار تضاعف تجربة ISSR لكل عينة مرتين علي الاقل.
٢. قد تظهر او تختفي بعض القطع عند التكرار علي حسب طبيعة واحتمالات وظروف تفاعل ال PCR.

٣. يتم حصر قطع ال DNA التي تظهر مرتين بعد اعادة التجربة مرتين لكل عينة وبادئ معين. ولا تحصر قطع ال DNAالتي تظهر مرة واحدة فقط عند تكرار التجربة.

٤. كل قطع DNAظهرت علي الجيل وتم حصرها (ظهرت مرتين) يتم اعتبارها قطعة سائدة في حين ان القطع التي لم يتم حصرها (لم تظهر مرتين) تعامل كقطعة متنحية (غير موجودة).

- يجب ملاحظة ان الافراد النقية (الاصلية) او الافراد الهجينة في احد القطع لا يمكن التفرقة بينهم باستخدام هذا التكنيك.
- ويمكن معاملة ذلك احصائيا بواسطة معامل (فاي).
- وتمثل مجموعة البوادئ التالية امثلة لتركيب البوادئ المستعملة في تكنيك ال ISSR.

Name*	Sequence
814	(CT)8TG
844A	(CT)8AC
844B	(CT)8GC
17898A	(CA)6AC
17898B	(CA)6GT
17899A	(CA)6AG
17899B	(CA)6GG
HB 8	(GA)6GG
HB 9	(GT)6GG
HB 10	(GA)6CC
HB 11	(GT)6CC
HB 12	(CAC)3GC
HB 13	(GAG)3GC
HB 14	(CTC)3GC
HB 15	(GTG)3GC

شكل ١٥٢

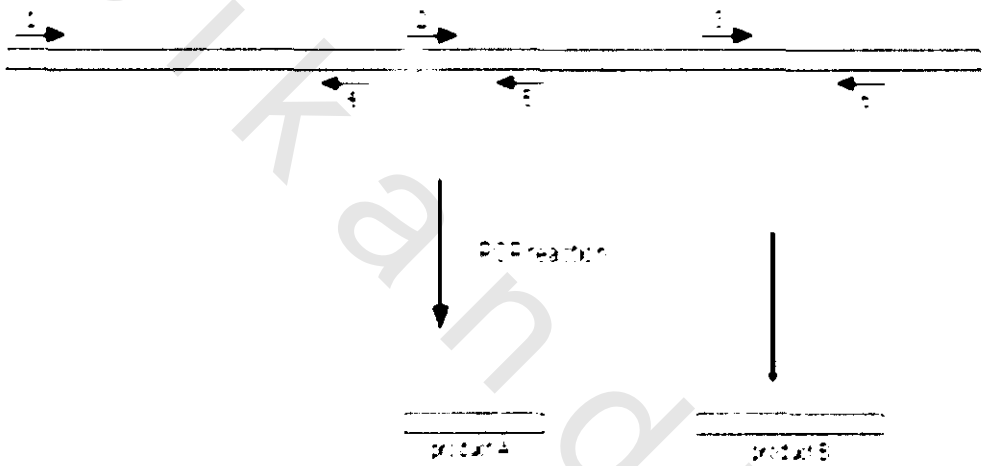
obeikandl.com

(٣)تكنيك (Triple RAPD) تكنيك تضاعف الـ DNA المتباين عشوائيًا ثلاثي البوادئ

يعمل تكنيك ال(RAPD) (تضاعف الDNA المتباين عشوائيا) علي تضاعف قطع من الـ DNAمجهولة وعشوائية. يقوم العلماء بتصميم بؤادي ذات تتابعات عشوائية. تم تطوير استراتيجية جديدة لزيادة قدرة تفاعل الRAPD في اظهار التباين الوراثي عن طريق استخدان ثلاث بوادئ مختلفة التركيب وعشوائية في التفاعل الواحد.

يجب ان نتذكر ان في تفاعل الRAPD العادي يتم استخدام بادئ واحد فقط ويجب ان نتذكر انة يجب ان يتوفر شرطين لحدوث التفاعل وانتاج قطع متضاعفة:-

١. شرط الاتجاة (تكون البوادئ متعاكسة)مثل البادئ (٥،٢) أو (١،٣) أو (١،٤).
٢. ان تكون المسافة بين البوادئ معقولة مثل (٥،٢)او(١،٣).



شكل ١٥٣

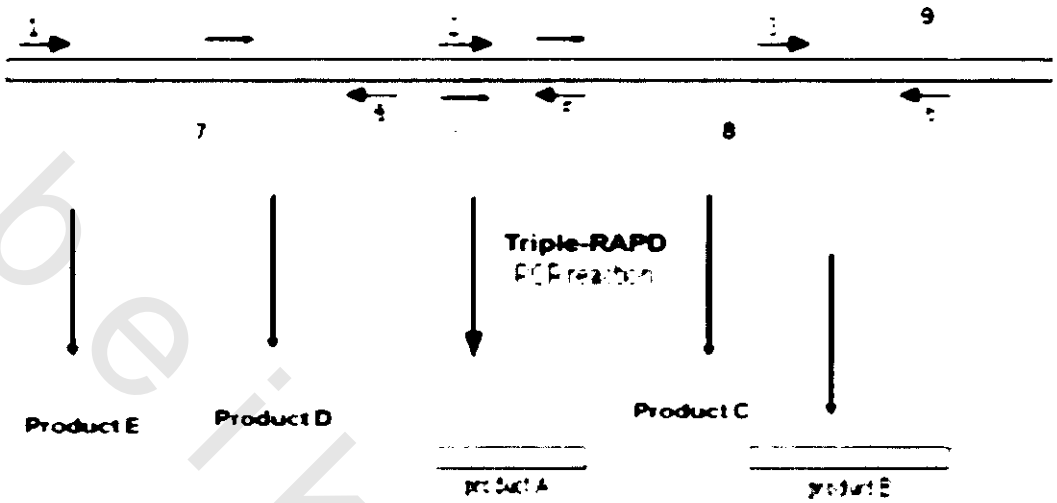
- عندئذ توافر الشرطين تظهر نواتج التفاعل كما في الصورة (قطعةA)،(B).
- وعلي الرغم من ذلك فان قدرة تفاعل الـ RAPDالاصلي قد زادت بشكل كبير عند استخدام بادئيين في التفاعل الواحد وذلك كما اظهرة العالم(كلن لانكهورست واخرون سنة ١٩٩١) كما يظهر في الصورة فان هناك قطع جديدة ظهرت وهي (C).

تكنيك الـ RAPD ثلاثي البؤادي:-

قد تم تطوير هذا التكنيك بواسطة د/ احمد منصور الزهيري واخرون سنة ٢٠٠٨ ويعتمد هذا التكنيك علي استخدام ثلاث بوادئ متباينة التركيب وذات صفات تفاعلية مشتركة وقد اظهر هذا التكنيك كفاءة عالية في اظهار التباين الوراثي بين الجينومات المختلفة وظهور قطع متضاعفة جديدة لم تكن متواجدةعند استخدام كل

obeikandi.com

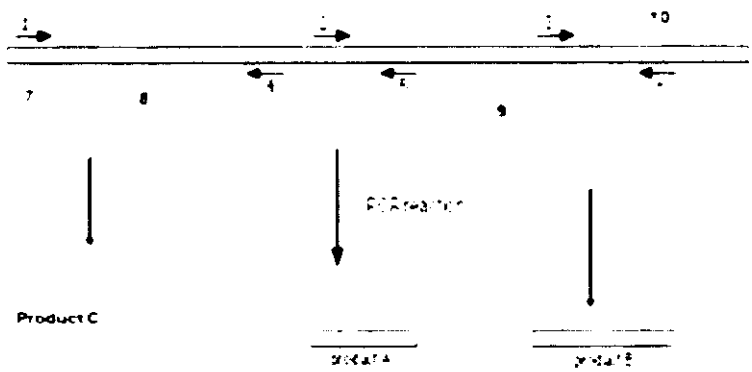
بادئ علي حدة كما هو موضح بالصورة فالقطع (C)،(D)،(E) ظهرت عند استخدام الثلاث بوادئ معا، (شكل ١٥٤).



شكل ١٥٤

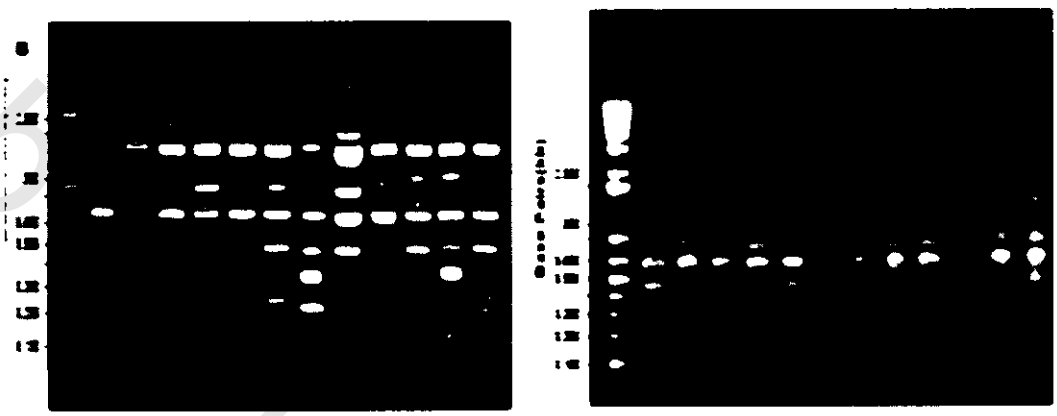
ويتميز تكنيك الRAPD ثلاثي البوادئ بقدرتة علي اظهار التباين الوراثي بين التراكيب الوراثية المختلفة عن طريق (شكل ١٥٥):-

١. ظهور قطع متضاعفة جديدة لم تظهر بأستخدام البوادئ الثلاثة منفردة
٢. عدد القطع الناتجة من اضافة الثلاث بوادئ معا اكثر من المجموع البسيط الكلي لكل بادئ علي حد
٣. عدد واحجام القطع الناتجة تختلف علي حسب تتابع البوادئ وعينة الDNA
٤. عينات الDNA المأخوذة من مصادر مختلفة تنتج اختلافات واضحة في نواتج التفاعل موضحة التباين الوراثي
٥. يظهر قدر كبير من التباين بين العينات المختلفة
٦. تتراوح احجام القطع الناتجة من ١٠٠ قاعدة الي ٢٠٠٠ قاعدة.



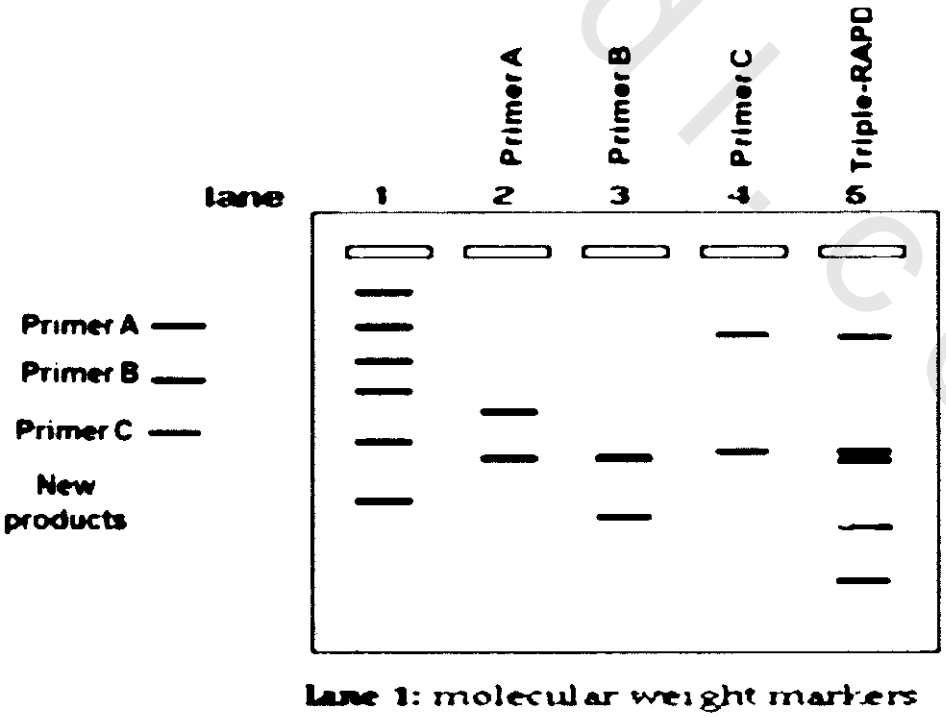
شكل ١٥٥

- يوضح الشكل التالي صورة تبين الفرق بين نواتج تفاعل ال RAPDالعادي (بادئ واحد) وبين ال RAPDالثلاثي (ثلاثة بوادئ). (لاحمد منصور الزهيري واخرون ٢٠٠٨)، (شكل ١٥٦).



شكل ١٥٦

- يوضح الشكل التخطيطي التالي الفرق بين نواتج الRAPD العادي باستخدام بوادئ (A)،(B)،(C) منفردة وبين استخدام الثلاث بوادئ معا في تكنيك الRAPD الثلاثي، (شكل ١٥٧).



شكل ١٥٧

ويلاحظ ظهور قطع جديدة لم تكن موجودة في تفاعل تكنيك الـRAPD الثلاثي لم تكن موجودة في التفاعلات المنفردة.

- المرجع (Mansour et al 2008)

Mansour A, Omayma M. Ismail, Solliman M. Mohei EL-Din. **(2008)** Diversity assessments among Mango (*Mangifera indica* L.) cultivars in Egypt using ISSR and three-primer based RAPD fingerprints. *The African Journal of Plant Science and Biotechnology* **2(2)**, 87-92.

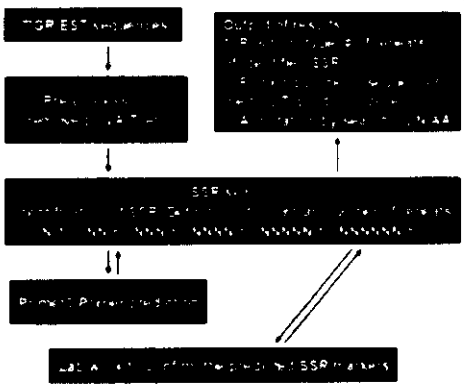
(٤) تكنيك الـ SSR (تفاعل التتابع البسيط المتكرر)

تحليل التتابع البسيط المتكرر:- (الفكرة الاساسية)

توجد مناطق التتابع البسيط المتكرر(ميكروساتالايت)في جميع جينومات اوليات وحقيقات النواة.

التكررات ثنائية القواعدمثلn(CA)اوn(GA)هي الاكثر تكرارا في معظم حقيقيات النواة(علي سبيل المثال في الانسان مناطق تكرارالn(CA)توجد كل ٣٠الف قاعدة)

التغير في اعداد التكرارات في الجينومات المختلفة يظهر التباين الوراثي في مناطق التتابع البسيط المتكرر والذي يمكن الكشف عنة عن طريق تصميم بؤادي لتستهدف تضاعف المناطق المحيطة بهذة المناطق عن طريق الPCRويلي ذلك رؤيتة علي جيل الاجاروز او البولي اكريلاميد. من الممكن ان تتم عملية التضاعف والفحص اتوماتيكيا عند استخدام بؤادي معلمة بصبغات فلوريسنتية.



شكل ١٥٨

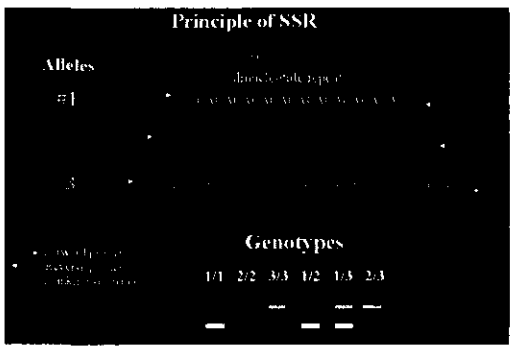
المميزات:-

- يحتاج هذا التكنيك الي كمية صغيرة جدا من الDNA(حوالي ٥ نانو جرام).
- تعطي هذة الطريقة واسمات حزيئية ذات سيادة مشتركة(CO-dominant)ويمكن تكرار النتائج بين المعامل المختلفة.
- امكانية عمل التحليل بالكامل اليا بما في ذلك امككانية دراسة اكثر من موقع في نفس الوقت باستخدام عدد من البوادي المعلمة لدراسة حجم وعدد اكبر من الجينومات المختلفة في دراسة العشائر.
- بالاضافة الي كون واسمات التتابع البسيط المتكرر واسمات متميزة لعمل الخرائط الوراثيةفهي ايضا مفيدة جدا في دراسات وراثة العشائر وتحديد التنوع الحيوي ونقاء البذور وكفاءة الهجين ومتابعة الجينات وتقييم الاصناف الوراثية بالاضافة الي دراسات القرابة والتطور وحفظ الاصول الوراثية واللطب الشرعي.
- ويظهر الشكل التالي الخطوات المختلفة للتعرف وعزل مناطق الSSR:

١. البحث في قواعد البيانات الجينومية مثل (TIGR).
٢. ازالة مناطق T، Aالمتكررة والمذيلة للتتابعات.
٣. البحث عن مناطق (SSR)بالتكرارات الموضحة بالصورة.
٤. تصميم بوادي لعزل منطقة الSSR.
٥. التجربة المعملية للتاكيد عن صحة منطقة الSSRالتي تم التنبا بها.
٦. الحصول علي النتائج المرغوبة.

- يوضح الشكل التالي كيفية التعرف علي التباين الوراثي باستخدام تقنية التتابع البسيط المتكرر(SSR).تمثل الاسهم في الصورة البوادئ المتعاكسة الاتجاة والتي تعمل علي تضاعف التتابع المرغوبn(CA)في نفس الموقع والذي تختلف اطوالة من جينوم الي اخر.

يظهر الجيل في نهاية الصورة الاطوال المتباينة والتوافيق الممكنة بينهما في الجينومات المختلفة، (شكل ١٥٩).



شكل ١٥٩

عيوب تكنيك التتابع البسيط المتكرر(SSR):-

- يتطلب تحليل ال(SSR) معرفة مسبقة بالتتابعات المحيطة بمنطقة(التتابع البسيط المتكرر) حيث يمكن تصميم بوادئ خاصة بها وهذا يحتاج الي عمل وجهد معملي كبير.

(الطرق المختلفة لدراسة SSRالتتابع البسيط المتكرر)

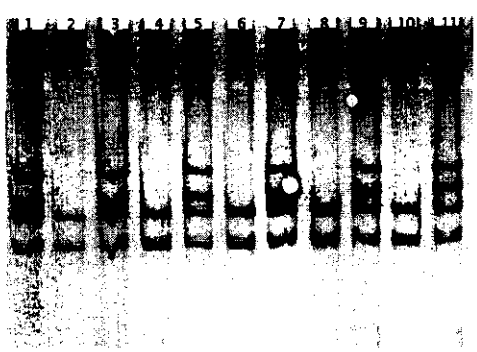
١. دراسة وتحليل مناطق الSSR باستخدام التفريد الكهربي للجيل اجاروز:-

هو تكنيك سريع وكفؤ لدراسة التباين الوراثي وعمل الخرائط الوراثية وهذه الطريقة ذات كفاءة عالية للتفرقة بين منتجات التفاعل التي تختلف في ٢٪ فقط فيما بينها . ويمكن استخدام ودراسة اكثر من منطقة في وقت واحد، (شكل ١٦٠).

شكل ١٦٠

٢. دراسة وتحليل مناطق الSSRباستخدام التفريد الكهربي لجيل البولي اكريلاميد وصبغة السيلفر:-

هو تكنيك جيد ويمكن الاعتماد علية للفصل الدقيق بين نواتج تفاعل الSSRوهواكثر دقة من التكنيك السابق باستخدام الاجاروز وهو تكنيك امن حيث لا يتم اسنخدام العناصر المشعة فية ولكن يحتاج الي عمل وجهد اكثر من تكنيك جيل الاجاروز، (شكل ١٦١).

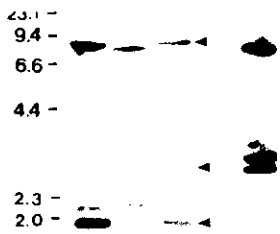


شكل ١٦١

٣. دراسة وتحليل مناطق(SSR)باستخدام العناصر المشعة:-

هو اكثر التكنيكات حساسية ودقة ولكنة يحتاج الي عمل وجهد كبير بالاضافة الي مخاطر التعرض للعناصر المشعة، (شكل ١٦٢).

شكل ١٦٢



٤. دراسة وتحليل مناطق ال(SSR)باستخدام القواعد الفلوريسنتية:-

هو احد الطرق الدقيقة لتقدير كثافة وحجم القطع الناتجة ويمكن عملة بشكل آلي بنظام السلسلة ويعمل بكفاءة عند دراسة مواقع متعددة في الجينوم، (شكل ١٦٣).

شكل ١٦٣

obeikandi.com