الهندسة الوراثية

من المبادئ والأساليب إلى البحث العلمي

ترجمة: رائدة ريناوي، د. أسعد سخنيني

Genetic engineering:
from principles and methods to research and applications

Dan Michael[1,2] and Anat Yarden[1]
[1]The Department of Science Teaching and [2]The Department of Molecular Cell Biology, The Weizmann Institute of Science, Rehovot, Israel.

ייעוץ מדעי:
פרופ' משה אורן, פרופ' מיכאל ווקר, פרופ' הלל פרום

ליווי הפיתוח וייעוץ דידקטי:
אילת אברהם, ד"ר זהבה ברק, ד"ר רות לנץ

עיצוב גרפי:
אסף מסעוד

עריכה גרפית:
זיו אריאלי

עימוד במחשב:
ציפי עובדיה

تدقيق لغوي:
فراس عبد

بإشراف:
د. عوني جبارة
مفتش المناهج والمواد التعليمية في العلوم، الرياضيات والتكنولوجيا

©כל הזכויות שמורות למשרד החינוך. הפרויקט מבוצע על ידי מוסד הטכניון ע"פ מכרז 30/8.14. הפרויקט מבוצע עבור המזכירות הפדגוגית, משרד החינוך.

הטכניון
הפקולטה לחינוך למדע וטכנולוגיה
מינהלת מל"מ המרכז הישראלי לחינוך מדעי טכנולוגי ע"ש עמוס דה שליט
המינהל למדע וטכנולוגיה
משרד החינוך

فهرس

من علوم الوراثة الجُزيئيّة إلى البيوتكنولوجيا الحديثة 5

أسس البيولوجيا الجُزيئيّة 6

من الصفات إلى الوحدات الوراثية 6

الـDNA كمادة وراثيّة في عالم الأحياء 7

المسار من الـDNA إلى البروتين والشيفرة الوراثية 14

مبادئ ومُميّزات عملية بناء البروتين التي تُسمى "الترجمة" (Translation) 19

من الصفة إلى الجين وصيغ الجين 20

من الكروموسوم إلى تسلسل الجينوم 23

مُراقبة التعبير عن الجينات ونواتجها 25

مُراقبة التعبير عن الجينات بمستوى الـ DNA: 62

عمليّات التغيير والمُراقبة بمستوى الـRNA: 27

عمليّات التغيير والمُراقبة التي تتمّ خلال تحويل الـ RNA إلى بروتين 31

من البيوتكنولوجيا التقليديّة إلى البيوتكنولوجيا العصريّة التي تعتمد على الهندسة الوراثيّة 33

قَطْع الـDNA بواسطة إنزيمات التقييد وتشخيصه 41

"قصة حرب": اكتشاف إنزيمات التقييد 41

القوة هي بالتنوّع: أنواع مُختلفة من إنزيمات التقييد وأنواع مُختلفة من القطع 43

التشخيص الأولي لجُزيء الـDNA: قطع الـDNA، فصل المقاطع في الجل وخرائط التقييد 48

استنساخ الـDNA بواسطة ناقلات 55

البلازميدات كناقلات للجينات في عملية الاستنساخ (פלסמידים כנשאים בשיבוט) 65

استنساخ عدة مقاطع من الـDNA داخل بلازميد في نفس الوقت: 26

البكتيريوفاج كناقل (נשא) في عملية الاستنساخ: 68

استنساخ DNA بواسطة مكتبات ومجسات 73

استنساخ جين مسرطن بواسطة مكتبة جينومية 75

استنساخ بواسطة مكتبات DNA مكمل 82

إنزيم النسخ العكسي وإنتاج DNA مكمل 83

إنتاج مكتبة DNA مُكمل 84

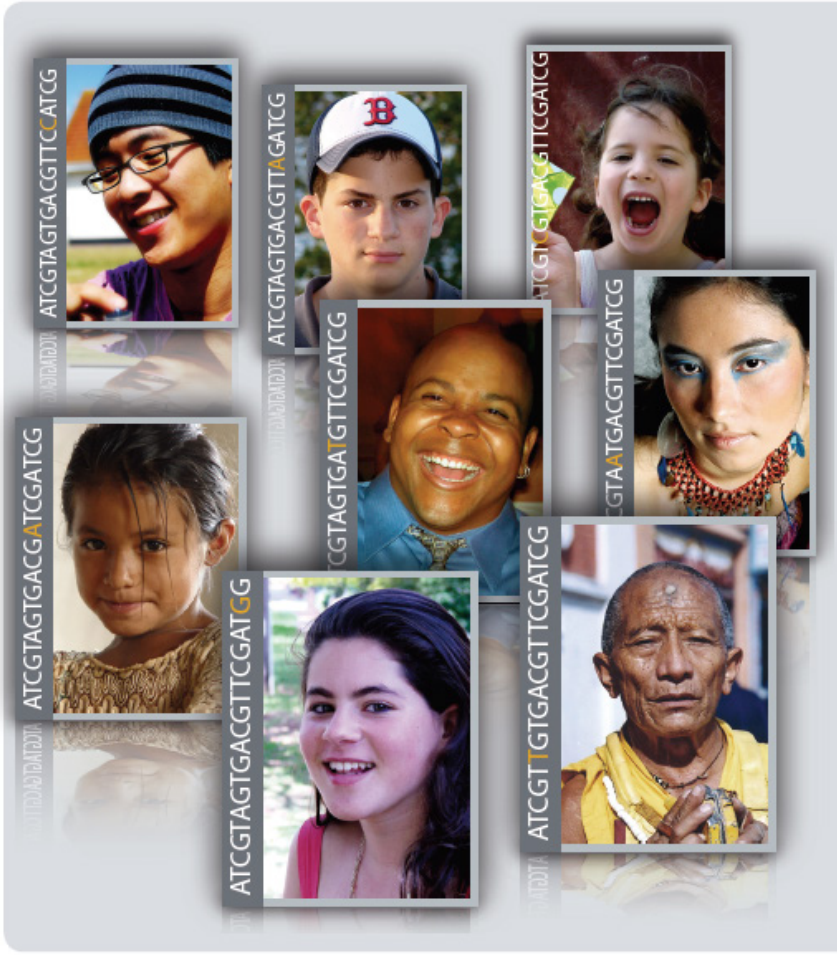
إيجاد الجين \ الـ DNA المطلوب في المكتبة بواسطة كاشف، تشرب وتهجين 86
استراتيجية استنساخ DNA مُكمل مشتق من جينات مختلفة 89

تفاعل تسلسل البوليميراز (تفاعل الـ PCR) 93
الطريق إلى نقطة تحوّل تكنولوجيّة: نظرة خاطفة إلى عقل المُخترع..... 94
مبدأ عمل الـ PCR 97
استعمالات الـ PCR 103
RT-PCR..... 103
استعمالات الـRT-PCR 301
الـ PCR في القانون والطب..... 105
الفحص الوراثي بواسطة "المضاعفة المشروطة بوجود طفرة" 109

تشخيص التعبير عن الجينات ونواتجها..... 116
تشخيص التعبير عن الجينات في مستوى الـ DNA 117
تشخيص تعبير RNA..... 121
تشخيص التعبير عن RNA بواسطة التشرب الشمالي..... 121
سؤال 7.1..... 122
تشخيص التعبير عن RNA بواسطة RT-PCR 124
تشخيص تعبير RNA بمساعدة رقائق DNA..... 127
تشخيص التعبير عن بروتينات..... 131

الهندسة خلايا وكائنات حية لأهداف البحث والتطبيقات البيوتكنولوجية..... 144
عند التقاء الـ DNA الريكومبيننتي والنقود: "ولادة" البيوتكنولوجيا الحديثة 145
تعبير زائد عن ناتج جين في خلايا حيوانية تنمو في مستنبت 148
كتم التعبير عن جين في خلايا حيوانية..... 155
استغلال "RNA معيق" لكتم تعبير جين 156
تعبير زائد عن ناتج جين في حيوانات ترانسجينية (مُهَنْدَسة جينيًّا)..... 161

من علوم الوراثة الجُزيئيّة إلى البيوتكنولوجيا الحديثة



عنما نقوم بدراسة الDNA التابع للأشخاص المُختلفين نكتشف أنّنا نتشابه مع بعضنا البعض أكثر مما نختلف عن بعضنا! في الحقيقة الDNA التابع لكل شخصين على سطح الكرة الأرضيّة مُتطابق بنسبة 99.5% من الـ DNA، فقط 0.5% من تسلسل الـ DNA مسؤول عن الاختلاف الوراثي بين الناس. من المهم دراسة الاختلاف بين الناس على مستوى الDNA ، لأنّه في بعض الأحيان يُمْكن أن نُفسّر لماذا يمرض شخص مُعيّن بمرض مُعيّن، بينما يُقاوم أشخاص آخرين هذا المرض ولا يمرضون به. إذا كان بإمكاننا تحديد مكان الاختلاف الموجود في الـ DNA لدى الافراد، بشكل دقيق، الأمر الذي له أهمية من ناحية طبيّة، بإمكاننا عندها بالإضافة إلى فهم العوامل الوراثية المُسببة للأمراض أن نقوم بتحضير الملف الشخصي للمريض لنتمكن من اختيار الدواء الأفضل لعلاجه. في الواقع، إمكانيّة معرفة التسلسل الكامل لقواعد الـ DNA الموجود لدى كل شخص، وهو تسلسل مكوّن من ما يُقارب ٣ مليار قاعدة، ومعرفة ما هي مُساهمة القواعد الموجودة في مكان مُعيّن في صفات الشخص، فتحت أمام الباحثين والأطباء عصر الطب الشخصي (רפואה אישית). في هذا العصر تتم مُلائمة الأدوية ليس فقط بحسب نوع المرض وإنما بحسب المعلومات الموجودة في تسلسل الـ DNA التابع للمريض.

أسس البيولوجيا الجُزيئيّة

مُنذ آلاف السنين، عرف الإنسان أنّ الأفراد المُختلفين التابعين لنوع معيّن من الكائنات الحيّة لديهم **صفات مُميّزة تنتقل بالوراثة**. مثلًا، الأبقار التي تُنتج الكثير من الحليب ستلد أبقارًا لديها صفة مُشابهه، أنسال النباتات التي تُنْتِج ثمارًا كبيرة الحجم ستُنتج هي أيضًا ثمارًا كبيرة الحجم. منذ أن عرف الإنسان هذا الأمر، بدأ بإنتخاب الأفراد (בחירה - Selection) ذوي الصفات المطلوبة وعمل على تحسينها. قام بتحسين صفات الأفراد عن طريق تهجين أفراد لديهم الصفات المطلوبة والحصول على صفات مُحسّنة لدى أنسالها. كما وَرَد في التوراة، هجّن الانسان الأغنام للحصول على أغنام ذات صفات مرغوبة، وهو يبحث كلّ الوقت عن طُرق تُمكنه من " التدخل في قوانين خلق" الكائنات الحيّة من أجل الحصول على احتياجاته وتحقيق أهدافه.

من الصفات إلى الوحدات الوراثية

كيف تنتقل صفة وراثية مُعيّنة منَ الشخص إلى نسله، أي، من جيل إلى آخر؟ ساهم جريجور مندل (Gregor Mendel) الذي عاش بين السنوات 1822-1884، مُساهمة أوليّة وهامة في حل لغز طريقة توريث الصفات، "حرّك" مندل علم الوراثة قُدمًا، وهناك من يُطلق على نظريته اسم الوراثة المندليّة. فهم مندل أنَّ هناك "وحدات مُنفصلة مُحدّدة" تشترك في تحديد الصفات، تنتقل هذه الوحدات بالوراثة من الفرد إلى نسله. لأول مرة سنة 1909، أطلق العالِم هندي يوهنسون على "الوحدة المُحدّدة" التي تشترك في تحديد الصفة الاسم "جين". كان مندل يعلم أنّ لدى كل فرد **زوج من الصيغ** لكل "وحدة مُحدّدة" تُحدّد صفة مُعيّنة. كذلك، علم بأن الفرد يحصل على صيغة واحدة لهذه الوحدة من الأب، وصيغة أخرى من الأم. في بعض الأحيان، تكون الصيغة التي حصل عليها من الأب مُطابقة لتلك التي حصل عليها من الأم.

على سبيل المثال، عندما قام مندل ببحث طريقة توريث لون بذور البازيلاء التي كان لونها في بعض الأحيان أصفرًا وفي أحيان أخرى أخضرًا، ادّعى أنّ "الوحدة المُحدّدة" التي تشترك في تحديد هذه الصفة موجودة بصيغتين (أليلين). أشار إلى أحد الأليلين الذي يشترك في تحديد لون بذرة البازيلاء بالحرف Y (Yellow)، أما الأليل الآخر فأشار له بالحرف y. حدّد أنّ النبتة التي تملك أليلان من الصيغة Y، أي عندما تكون النبتة YY، يكون لون بذورها أصفرًا. النبتة التي يُشار إليها بـ YY حصلت على أحد أليلات Y من خلية التكاثر الأنثوية وأليل Y مُطابق من خلية التكاثر الذكرية للنبتة. بالمُقابل إذا كان لدى النبتة أليلين من الصيغة y، أي إذا كانت النبتة yy يكون لون بذورها أخضرًا. أمّا إذا كانت النبتة Yy فيكون لون البذور أصفر. لذلك نقول أنّ أليل Yهو أليل سائد بالنسبة للأليل y أمّا الأليل y فهو أليل مُنتحي بالنسبة للأليل Y. كذلك نقول أنَّ Yوَ y هما صيغتان لجين مُعيّن، وكل نبتة تحصل على إحدى هذه الصيغ من إحدى خلايا التكاثر وتحصل على الصيغة الثانية من خلية التكاثر الأخرى. على سبيل المثال، في نبتة البازيلاء، كما هو الحال عند الإنسان الذي لديه 20000 جين تقريبًا، تتمثّل كل الجينات لدى **الفرد** بواسطة صيغتين، في بعض الأحيان تكون هذه الصيغ مُطابقة الواحدة للأخرى وفي بعض الأحيان تختلف قليلًا الواحدة عن الأخرى.

بعد أنْ تنازل مندل عن نيته بأنْ يُصبح كاهنًا وبعد أنْ توقف عن تعلّم الفيزياء، عمل كمعلم بديل، خلال هذه الفترة بدأ بالعمل في مجال الوراثة من الجانب الكميّ له، الجانب الذي لم يُفكر البيولوجيين بالعمل به من قبل. يمكن أن ننسب توجه مندل الكمي الذي شق الطريق في هذا المجال إلى معرفته في مجال الفيزياء.

"الوحدة المُحدّدة" التي تنتقل بالوراثة تُسمّى **"جين"** ولذلك فإنّ العِلم الذي يبحث في الوراثة يُسمّى عِلم الوراثة "גנטיקה". لكل جين صيغ مُختلفة، **وصيغة الجين** تُدعى **"أليل"** أيضًا. الجين لدى الفرد مُمثّل بواسطة زوج من الأليلات، أليل واحد من الأب وأليل آخر من الأم. في بعض الاحيان يُمكن أنْ تكون أليلات الجين لدى الفرد مُختلفة عن بعضها، وفي أحيان أخرى يُمكن تكون مُطابقة لبعضها البعض. مصدر كلمة "أليل" (Allele) من الكلمة اليونانيّة "al-lelon" التي تعني "هذا مع هذا" (زوج).

من المُعتاد أنْ نقول أنَّ كل واحد من الأبوين يقوم، بواسطة خلية تكاثره، بتوريث صيغة واحدة فقط (أليل واحد) من كل جين، لكل واحد من نسله.

مِمَّ تتركب الجينات التي تنتقل بالوراثة وتشترك بتحديد الصفات؟ بكلمات أخرى، ما هي المادة الوراثيّة؟ أين تتواجد هذه المادة داخل الخلية؟

الـDNA كمادة وراثيّة في عالم الأحياء

في سنة 1865، اقترح مندل أنّ **توريث الصفات من جيل إلى آخر يتمّ عن طريق "وحدات مُحدّدة" منفصلة** تنتقل عن طريق خلايا التكاثر، اليوم، تُعرف هذه الوحدات باسم جينات، لكون الجينات تنتقل عن طريق الوراثة تمّ اعتبارها مادّة وراثيّة، ونحن نعلم اليوم أنّ المادّة الوراثيّة لا تتكون من جينات فقط، وقد كانت مهمّة تشخيص المادّة الوراثيّة الموجودة في الخلية مهمّة مُثيرة للتحدي.

غُرست الجذور العلمية التي أدّت إلى تشخيص المادّة الوراثيّة في الفترة التي صُمّمت فيها أسس الوراثة المندليّة. في سنة 1869، بحث العالم السويسري ميشر (J. F. Miescher) في كيمياء نواة الخليّة، النواة هي عُضيّ موجود في خلايا جميع الكائنات الحيّة ما عدا البكتيريا. لهذا الهدف قام ميشر بإزالة سيتوبلازم الخلية المحيط بنواتها وقام بعزل النواة. وجد ميشر أنّ أنوية الخلايا تحوي مادة حامضية غنيّة بالفوسفور وتُرزم على شكل جُزيء كبير. بعد مرور فترة زمنيّة سُميّت المادّة التي وُجدت في النواة باسم "حامض نووي" (Nucleic acid). هُناك ثلاثة مواد يتكرّر وجودها في الحامض النووي: مجموعة فوسفات، سُكّر وقواعد نيتروجينيّة.

في سنة 1920، تمّ اكتشاف نوعين من الأحماض النووية في الخلية: الأول موجود في نواة الخلية ويُسمّى DNA، والآخر موجود في النواة وفي السيتوبلازم ويُسمّى RNA. في تلك الفترة أيضًا علمنا بوجود جُزيء آخر يُشكل أحد المكوّنات الأساسية في الخلية وهو البروتين. المُشترك بين الـ DNA ، الـ RNA وَالبروتينات هو أنّ جميعها جُزيئات بوليميرية مبنية من وحدات بناء مُحدّدة تتكرر في الجُزيئات.

مع اكتشاف الجُزيئات البوليميرية سُئل السؤال، هل أحد هذه الجُزيئات هو الجُزيء المسؤول عن توريث صفات الكائن الحي؟ في سنة 1944، بالاعتماد على نتائج أوليّة للعالم جريفث (F. Griffith) ، نجح العلماء إفري، ماكلويد وماكرتي (O. Avery, C. MacLeod and M. McCarthy) بالإثبات أنّ الـ DNA هو المادّة الوراثيّة. أثبت هؤلاء العلماء ذلك عندما نجحوا بتغيير صفات بكتيريا مُعينة عند إدخال DNA تابع لبكتيريا أخرى إليها. قام إفري وشُركائه بإدخال DNA تابع لبكتيريا مُسببة للالتهاب الرئوي إلى بكتيريا "بريئة" لا تستطيع التسبب بهذا المرض، أدى ذلك إلى تحوّل البكتيريا التي دخل إليها الـ DNA إلى بكتيريا عنيفة أيضًا تُسبب الالتهاب الرئوي. صفة العنف التي "اكتسبتها" البكتيريا تنتقل بالوراثة إلى جميع أنسالها. لذلك يُمكن أنْ نقول: إنّ الـ DNA الغريب هو الذي منح البكتيريا "البريئة" التي حصلت عليه، صفة جديدة تنتقل بالوراثة.

> نقول: إنَّ البكتيريا التي حصلت على صفة جديدة بسبب إدخال DNA إلى داخلها، مرّت بعملية تحوّل وراثي (ترانسفورماتسيا) (Transformation).

للمرّة الأولى، عرّف إفري وشركائه الـ DNA على أنّه مادّة وراثيّة، ومن هنا تبلورت الفرضية أنَ الـتركيب الكيميائي للـجينات هو DNA ومكانها في نواة الخلية. لكن مرّ وقت طويل منذ ذلك الحين حتى اتضح كيف يعمل الـ DNA كمادة وراثيّة تحوي على جينات تشترك في تحديد الصفات. في هذا السياق، طُرح سؤالان: ما هو المبنى الجُزيئي للـ DNA؟ وهل بإمكان المبنى أنْ يشرح صفاته كمادّة وراثيّة؟

> الوحدة الأساسيّة التي تشترك في تحديد صفة وراثيّة تُسمّى "جين"، ويُسمّى مُجمل الجينات التي حصل عليها الفرد من أبويه باسم "جينوتيب" (Genotype). للجينوتيب مُساهمة حاسمة في تحديد الصفات التي يتمّ التعبير عنها لدى الفرد. صفات الفرد عبارة عن "الفينوتيب" (Phenotype). الفينوتيب هو ناتج العلاقات المُتبادلة بين الجينوتيب والبيئة المحيطة.

في سنة 1953، نجح العالمان، البريطاني فرنسيس كريك (Francis Crick) والأمريكي جيمس واطسون (James Watson) بعرض نموذج ثُلاثي الأبعاد لجُزيء الـ DNA، وبواسطة هذا النموذج قاما باقتراح فرضيّة تشرح كيف يُمكّن مبنى الـ DNA من عمله كجُزيء ناقل للمعلومات التي تنتقل بالوراثة. بعد 9 سنوات حظي هاذان العالمان بجائزة نوبل على هذا الانجاز الرائع. حتى نفهم مبنى الـ DNA وتأثير هذا المبنى على عمله، يجب أنْ نتعرّف أوّلًا على صفات الـ DNA بما في ذلك مكوّناته الكيميائية والعلاقات المُتبادلة بين مكوّناته المُختلفة.

المُركّبات الأساسيّة والصفات الأساسيّة للـ DNA كمادّة وراثيّة هي:

1. يوجد **في الـ DNA 3 مُركّبات (رسم1.1):** سُكّر من النوع دي أوكسي ريبوز، مجموعة فوسفات (تحوي في وسطها ذرة فوسفور، Phosphate) وَ 4 قواعد نيتروجينيّة وهي:

- أدنين (Adenine [A])
- سايتوسين (Cytosine [C])
- غوانين (Guanine [G])
- ثايمين (Thymine [T])

تتكرّر هذه المركّبات عددًا كبيرًا من المرّات في الـ DNA.

2. **يتحد كل من السُكّر، مجموعة الفوسفات وأحد القواعد النيتروجينيّة في وحدة أساسيّة تتكرّر عددًا كبيرًا من المرّات في الـ DNA وتُسمّى نوكليوتيد** (**N**ucleotide, **N**) (رسم 1.2). في حين أنّ النوكليوتيد الموجود في جُزيء الـ DNA مكوّن من جُزيء سُكّر واحد، قاعدة نيتروجينيّة واحدة ومجموعة فوسفات واحدة (رسم 1.2 أ')، النوكليوتيد الحرّ الموجود في الخلية والذي يرتبط ليكوّن بوليمير الـ DNA لديه 3 مجموعات فوسفات، تُزال منها مجموعتان خلال عملية ربط نوكليوتيدان مُتجاوران عند بناء الـ DNA (رسم 1.2 ب').

3. **النوكليوتيد الحُرّ الذي سيندمج في الـ DNA (رسم 1.2 ب') يحوي واحد من بين 4 قواعد مُختلفة. فيما يلي النوكليوتيدات الأربعة:**

- دي أوكسي أدنوزين ثُلاثي الفوسفات. (d**A**TP: deoxy**A**denosine-**t**ri-**p**hosphate)

(في الرسم 1.2 ب' يجب تثبيت قاعدة الأدنين في المُربع الخاص بـ"القاعدة النيتروجينيّة").

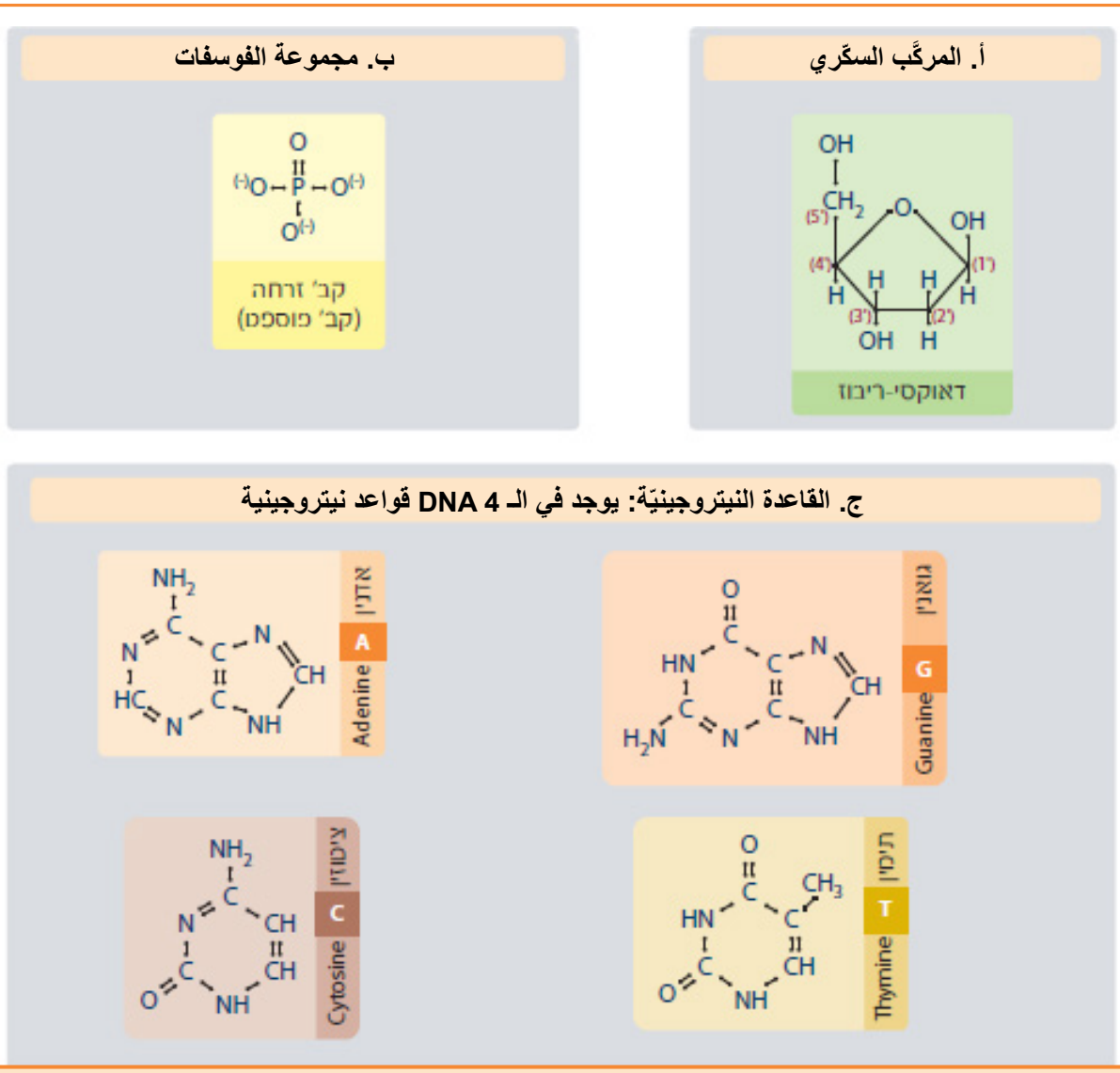
الكلمة: "دي أوكسي" تُشير إلى عدم وجود مجموعة هيدروكسيل (OH) في الموضع 2' التابع للسكّر دي أوكسي ريبوز.

- دي أوكسي غوانوزين ثُلاثي الفوسفات. (d**G**TP)
- دي أوكسي سيتيدين ثُلاثي الفوسفات. (d**C**TP)
- دي أوكسي ثيميدين ثُلاثي الفوسفات. (d**T**TP)

عندما نرغب بالقول أنّ النوكليوتيدات الأربعة موجودة في الخلية أو في أنبوب الاختبار نستعمل اسم يُعبر عن جميعها **dNTP**. **dNTP** هو اختصار لـ deoxy-**N**ucleotide-**t**ri-**p**hosphate.

لمُركبات الـ DNA ومُشتقاتها توجد مُصطلحات دقيقة تُظهر أهميتها. كما ذُكر هُناك 4 قواعد نيتروجينيّة: **A**denine (**A**), **G**uanine (**G**), **C**ytosine (**C**), Thymine (**T**). عندما ترتبط القاعدة النيتروجينيّة بسُكّر من نوع دي أوكسي ريبوز يَنْتُج **نوكليوزيد** (Nucleoside). النوكليوزيدات الأربعة هي: deoxy-**A**denosine, deoxy-**G**uanosine, deoxy-**C**ytidine, deoxy-**T**hymidine بالتلاؤم. عندما يرتبط النوكليوزيد بمجموعات فوسفات يَنْتُج نوكليوتيد (Nucleotide). عدد مجموعات الفوسفات المرتبطة بالنوكليوزيد يتراوح بين 1 (mono-phosphate)، كما هو الحال في الـ DNA، وَ 3 (tri-phosphate)، كما في النوكليوتيد الحُرّ الذي سيندمج في الـ DNA لاحقًا. لتسهيل الأمر تتمّ الإشارة إلى تسلسل النوكليوتيدات في الـ DNA بحسب القاعدة النيتروجينيّة الموجودة في النوكليوتيد: A, G, C, T.

4. **يحتوي السكّر دي أوكسي ريبوز على خمس ذرات كربون مُرقمة 1'-5'** (رسم 1.1). الكربون الموجود في الموضع 1' يرتبط بالقاعدة النيتروجينية الموجودة في النوكليوتيد. ذرات الكربون 3' وَ 5' ذات أهمية كبيرة في إنتاج أربطة داخل جُزيئيّة بين النوكليوتيدات.



رسم 1.1: مبنى مركّبات الـ DNA الثلاثة: السكّر، مجموعة الفوسفات، والقواعد النيتروجينية

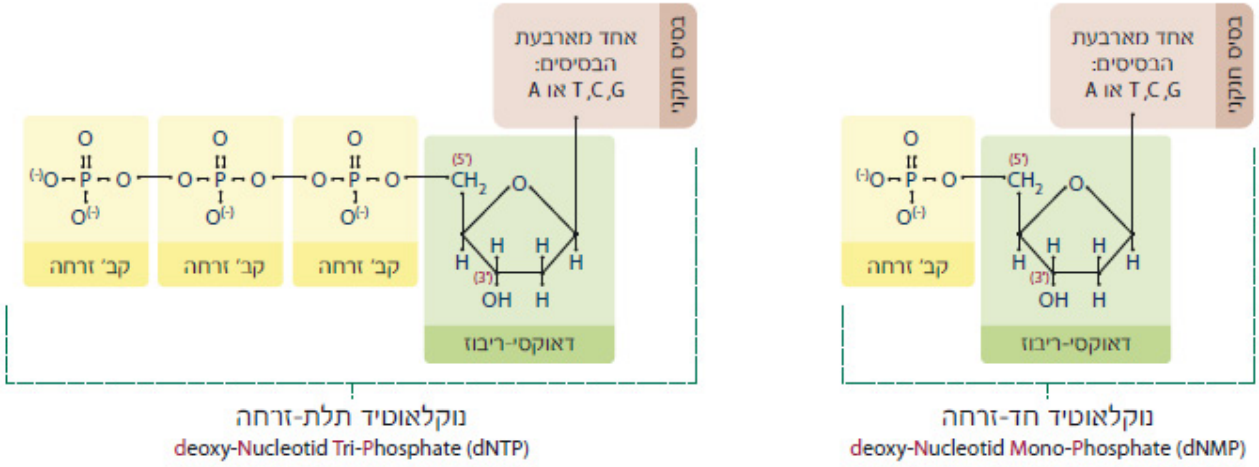
أ. للسكّر دي أوكسي ريبوز 5 ذرات كربون يُشار لها '5-'1. "دي أوكسي" تُشير إلى نقص مجموعة الهيدروكسيل (OH) على الكربون '2.

ب. مجموعة الفوسفات (حامض الفوسفوريك)، هي الجزء الذي يمنح الـ DNA شحنته السالبة وصفة الحامضية التي يتمتع بها، ولذلك ينتمي الـ DNA إلى مجموعة "الأحماض النوويّة". إحدى وظائف مجموعة الفوسفات الموجودة في الـ DNA هي الربط بين جُزيئي سكّر مُتجاورين.

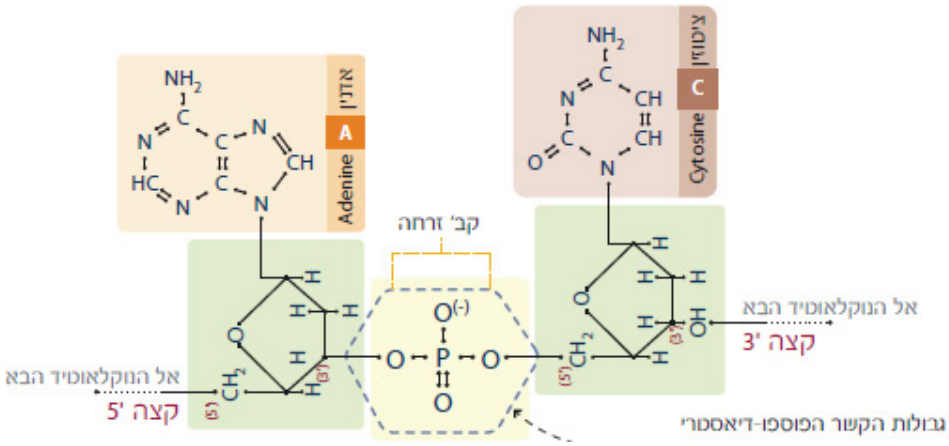
ج. يوجد في الـ DNA أربع قواعد نيتروجينية. توجد في كل واحدة من القواعد G وَ A حلقتان نيتروجينيتان، وهُما تنتميان إلى المجموعة الفرعيّة المعروفة باسم بورينات (Purine). بالمُقابل، تحتوي كل من القواعد T وَC على حلقة نيتروجينية واحدة، وتنتميان إلى المجموعة الفرعيّة بريميدينات (Pyrimidine). كل قاعدة نيتروجينيّة موجودة في الـ DNA ترتبط بواسطة ذرة نيتروجين واحدة مع ذرة كربون '1 الموجودة في السكر دي أوكسي ريبوز.

أ. مبنى النوكليوتيد الموجود في الـ DNA

ب. مبنى النوكليوتيد الحُرّ قبل اندماجه في الـ DNA



ג. يرتبط كل نوكليوتيدان في الـ DNA برباط فوسفو دي إستير



رسم 1.2: مبنى النوكليوتيد والرباط الفوسفو دي إستير بين نوكليوتيدين في الـ DNA.

الوحدة الأساسيّة التي تتكرّر عددًا كبيرًا من المرّات في الـ DNA تُسمّى نوكليوتيد. النوكليوتيد الواحد الموجود في الـ DNA مُكوّن من قاعدة نيتروجينيّة مُرتبطة بسكّر دي أوكسي ريبوز، السكر مرتبط بمجموعة فوسفات واحدة (قسم أ في الرسم). في الـ DNA أربعة أنواع من النوكليوتيدات التي تختلف فيما بينها، فقط، بنوع القاعدة النيتروجينية الموجودة فيها. النوكليوتيدات الحُرّة التي ستندمج لاحقًا في الـ DNA تحتوي على ٣ مجموعات فوسفات (قسم ب في الرسم).

الاسم العام للنوكليوتيدات الحُرّة هو dNTP. هُناك أربعة أنواع من جُزيئات الـ dNTP الحُرّة التي تندمج لتكوّن الـ DNA، كل واحد منها يحوي أحد القواعد النيتروجينية الأربعة. النوكليوتيدات الحرّة الأربعة هي: dATP، dTTP، dCTP وَdGTP. يُمكن أن نُطلق عليها باختصار A، T، C، G وَ A. النوكليوتيد الحُرّ يخسر مجموعتي فوسفات عند اندماجه بالـ DNA.

يُمكن أن نرى في القسم ج' من الرسم، ارتباط النوكلوتيدان بواسطة رباط فوسفو دي إستير. تُشكل مجموعة الفوسفات مركز أو نواة رباط الفوسفو دي إستير. يمتد رباط الفوسفو دي إستير من كربون '٣ لجزيء السكر في نوكليوتيد معيّن حتى الكربون '٥ للسكر في النوكليوتيد المُجاور. الأربطة الفوسفو دي إستيرية المُتتالية الموجودة بين النوكليوتيدات تُمكن من تكوّن المبنى البوليميري للـ DNA.

5. **النوكليوتيدات الموجودة في الـ DNA مُرتبطة ببعضها البعض بواسطة رباط فوسفودي إستيري وهي تُنْتِج "جديلة بوليميريّة" (Strand).**

الرباط الفوسفو دي إستير الذي يربط بين النوكليوتيدات (الرسم 1.2 ج') يَنْتُج بين مجموعة الفوسفات التابعة للنوكيوتيد الذي يندمج (الرسم 1.2 ج') وَبين السكر الموجود في طرف الـ DNA (الطرف '3، الرسم 1.3). حدود الرباط الفوسفو دي إستيري (الرسم 1.2 ج') هي كربون '3 في السكر التابع للنوكليوتيد والكربون '5 في السكر التابع للنوكليوتيد المُجاور، وفي مركز الرباط تتواجد

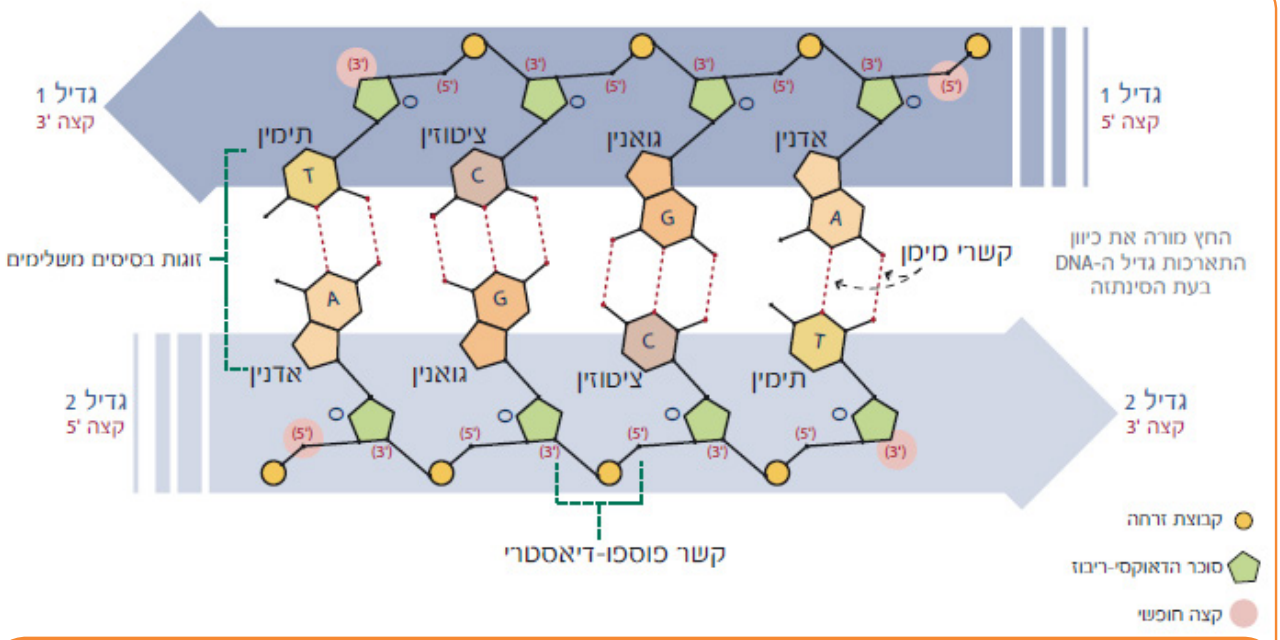
مجموعة الفوسفات.

6. **يُبنى جُزيء الـ DNA من جديلتين بوليميريتين بحيث أن قواعد الـ DNA تترتب بإزواج.** كما يظهر في الرسم 1.3، جُزيء الـ DNA هو جُزيء ثُنائي الجديلة. تتواجد كل قاعدة في جديلة الـ DNA مُقابل قاعدة موجودة في الجديلة الأخرى للجُزيء، أي أنّ القواعد تترتب على شكل أزواج. كما نُلاحظ في الرسم 1.3، فإنّ القواعد ترتبط ببعضها بواسطة أربطة هيدروجينية حسب قانونية مُحدّدة: A يرتبط دائمًا مع T الموجود مُقابله بالضبط، وَ G يرتبط دائمًا مع C الموجود مُقابله أيضًا. لهذا تتحقق القاعدة أنَّ T مُكمّل لِـA وَ C مُكمّل لِـ G.

بشكل عام مبنى الـ DNA وثباته لا يتأثر من تسلسل القواعد الموجودة فيه تقريبًا. مع ذلك، تُعتبر المناطق الموجودة في الـ DNA والتي تتواجد فيها كمية أكبر من أزواج القواعد C-G أكثر ثباتًا مُقارنة بالمناطق التي تكون فيها كمية أكبر من أزواج القواعد A-T. السبب لذلك يعود لوجود ثلاثة أربطة هيدروجينية بين C وَ G ورباطان هيدروجينيان بين زوج القواعد A-T.

7. **تسلسل القواعد في الجديلة الواحدة يُحدّد تسلسل القواعد في الجديلة الأخرى.**

ترتبط قاعدة مُعيّنة في الجديلة الواحدة بالقاعدة الموجودة مُقابلها في الجديلة الثانية، لذا نقول: إنّ هذه القواعد تُكمّل بعضها البعض، لذلك كل تسلسل القواعد في جديلة واحدة مُكمّل لتسلسل القواعد في الجديلة الأخرى.



רסם 1.3: جُزيء الـ DNA هو جُزيء ثُنائي الجديلة تربط بين جدائله أربطة هيدروجينيّة.
جُزيء الـ DNA مبني من جديلتين بوليميريتين. يعرض الرسم جديلتي DNA على شكل مُسطح مفتوح، بهدف التوضيح فقط. كل جديلة هي بوليمير من النوكليوتيدات. النوكليوتيد هو الوحدة الأساسيّة، المونومير، الذي يتكرّر في البوليمير. كل قاعدة في إحدى الجدائل مُرتبطة بأربطة هيدروجينية مع القاعدة المُكمّلة الموجودة مُقابلها في الجديلة الثانية، الارتباط بحسب القانونية التالية: A ترتبط بِـ T وَ G ترتبط بِـ C. في الواقع، أزواج القواعد A-T وَ C-G تُمكن من ارتباط الجديلة الواحدة بالجديلة الأخرى بواسطة أربطة هيدروجينية. يتحدّد اتجاه كل جديلة بحسب الذرات الحرّة للكربون في جُزيء السكر الموجود في أطراف الجديلة ("الطرف الحُرّ"). ذرات الكربون المقصودة هي ذرات كربون 3' وكربون 5' لجُزيء السكّر. اتجاه جديلة واحدة مُعاكس لاتجاه الجديلة المُقابلة: اتجاه إحدى الجدائل دائمًا 5' ← 3' واتجاه الجديلة المُقابلة دائمًا 3' → 5'.

8. **المبنى الفراغي للـ DNA هو مبنى لولب ثُنائي.** بحث مبنى الـ DNA الفراغي الثُلاثي الأبعاد من قبل العالمان واطسون وكريك مَكنهم من المعرفة أنّ جديلتي الـ DNA ترتبط الواحدة بالأخرى لتكوّن جديلة ثُنائية ملتوية، كما هو معروض في الرسم 1.4، مبنى الـ DNA هو مبنى لولبي ("هيلكس") مُزدوج، ولذلك يُطلق على الـ DNA اسم "اللولب المُزدوج"، ("הסליל הלולאני הכפול" - The double helix).

9. **مُضاعفة الـ DNA في الخلايا ضروري لنقل المعلومات الوراثيّة إلى الخلايا الابنة.** يخزن جُزيء الـ DNA المعلومات الضرورية من أجل تضاعفه، أي لإنتاج نسخة إضافيّة منه. مُضاعفة الـ DNA في الخلايا تحتاج إلى بناء جديلتي DNA جديدتين. **في عملية مُضاعفة الـ DNA، تُستخدم كل واحدة من الجدائل القديمة لإنتاج جديلة جديدة.** يحتاج بناء الـ DNA، أولًا وقبل كل شيء إلى إنزيمات تقوم بفصل جدائل الـ DNA (كالهيليكاز) وإلى الإنزيم DNA بوليميراز.

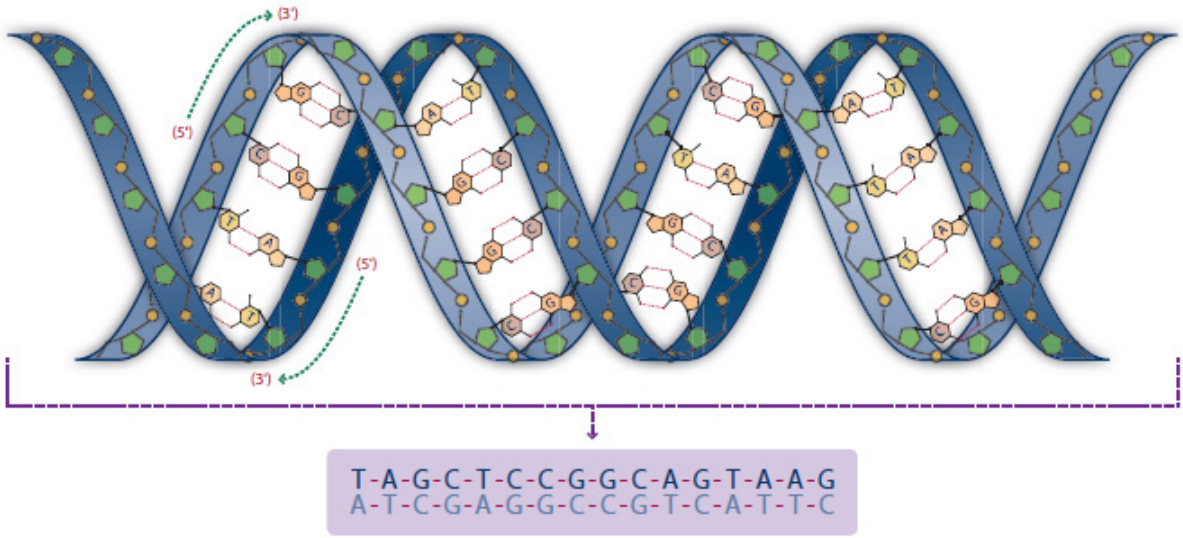
- مبنى اللولب المُزدوج قوي بما يكفي ليضمن بقاء الجُزيء ثُنائي الجديلة دون التعرض لضرر لفترة طويلة. مع هذا، في الزمن المُناسب يُمكن أنْ تنفصل جدائل الـ DNA عن بعضها البعض بهدف مُضاعفة الـ DNA أو بهدف التعبير عن الجينات، كما سنشرح في لاحقًا في هذا الفصل.
- مُضاعفة الـ DNA، هي مرحلة ضرورية قبل انقسام الخلايا وهي تُمكّن الخلية من توريث كامل المعلومات الوراثية لخليتي الابنة الناتجتين.

10. **الإنزيم DNA بوليميراز هو المسؤول الأساسيّ عن بناء جدائل الـ DNA الجديدة.** تتمّ مُضاعفة الـ DNA (بناء **جديلتين** جديدتين) بعد فصل الجدائل. كشف ارثر كورنبرغ (A. Korenberg) الحائز على جائزة نوبل، أنَّ الإنزيم DNA بوليميراز يُمكّن من إضافة نوكليوتيد جديد مُكمّل مُقابل كل نوكليوتيد موجود في الجديلة القديمة، والربط بين النوكليوتيدات الجديدة بأربطة فوسفو دي إستيريّة. النوكليوتيدات الجديدة التي ترتبط ببعضها تُنْتِج جديلة DNA جديدة. لكن من أجل بداية عمل الـ DNA بوليميراز نحتاج إلى أوليجو- نوكليوتيد. الأوليجو- نوكليوتيد هو بوليمير DNA أو RNA أحادي الجديلة، قصير يتراوح طوله بين عدّة نوكليوتيدات إلى عدّة عشرات من النوكليوتيدات. أوليجو- نوكليوتيد من الـ RNA الذي يُستعمل لبناء الـ DNA هو ذا تسلسل قواعد مُكمّلة لتسلسل قصير موجود على جديلة الـ DNA القديمة، أوليجو- نوكليوتيد كهذا يرتبط بالجديلة القديمة. يستخدم الـ DNA بوليميراز الطرف 3' للأوليجو – نوكليوتيد حتى يبدأ بربط النوكليوتيدات المُكمّلة بأربطة فوسفو دي إستيرية وإنتاج جديلة جديدة. لذلك أوليجو – نوكليوتيد كهذا، الذي يُستعمل لبداية إنتاج الـ DNA يُسمّى **برايمر أو بادئ** (Primer).

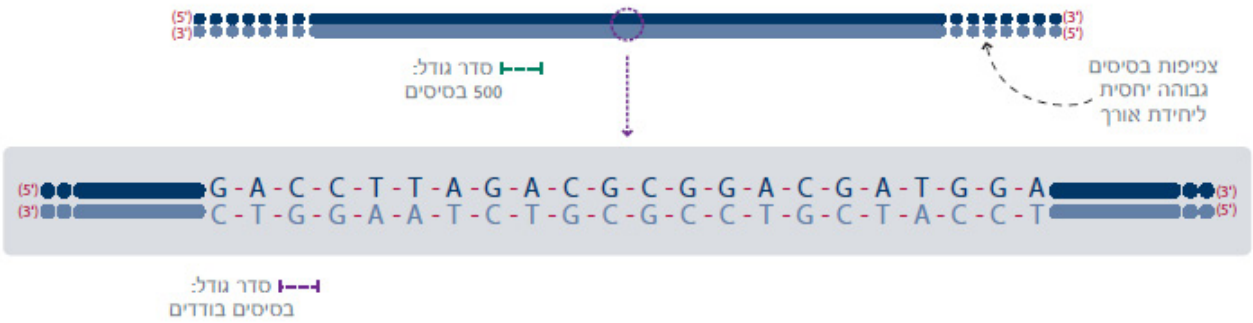
بعد **بناء جديلتي** الـ DNA الجديدتين بحسب تسلسل جديلتي جُزيء الـ DNA الموجود (القديم)، سيكون صحيحًا أنْ نقول: إنَّ جُزيء الـ DNA **تضاعف**. عملية المُضاعفة تُمكّن من الحصول على جُزيئي DNA ثُنائيي الجديلة مُتطابقين من جُزيء واحد من الـ DNA ثُنائي الجديلة. كل جُزيء كهذا مبني من جديلة أصلية (قديمة) وجديلة جديدة. خلال انقسام الخلايا (ميتوزا)، ينتقل كل واحد من هذين الجزيئين إلى خلية واحدة من الخلايا الناتجة. مُضاعفة الـ DNA تُمكّن من نقل المعلومات الوراثية من خلية إلى أخرى بشكل دقيق، كذلك فإنَّ مُضاعفة الـ DNA تُمكّن خلايا التكاثر من نقل نسخة واحدة من المعلومات الوراثية من جيل إلى آخر، بما فيه الجينات الموجودة فيها بعد حدوث الانقسام الاختزالي (ميوزا).

مُضاعفة الـ DNA يُمكن أنْ تُفسِّر طريقة توريث الصفات، ولكنها لا تُفسِّر لماذا يختلف الأفراد بصفاتهم عن بعضهم البعض. يختلف الأفراد بصفاتهم، أوّلًا، لأنَّ لديهم صيغ مُختلفة من الجينات. بما أنَّ الجينات هي مقاطع مُحدّدة في الـ DNA، فالسؤال الذي يطرح نفسه، كيف تزوّد الجينات الموجودة في الـ DNA "معلومات" لتحديد الصفات؟ بالإضافة إلى ذلك، من المهم أنْ نفهم كيف تنتظم "المعلومات"، كيف "تَقرأ" وَ"تُترجم" الخلية المعلومات الموجودة في الجينات.

أ. المبنى الفراغي للـ DNA هو لولب مُزدوج



ב. רסום תכטיטיّה לערוץ הـ DNA כמא יזהר בזה הכתאב



ג. أشكال لعرض الـDNA أحادي الجديلة مثل الأوليجو- نوكليوتيد

رسم 1.4: طريقة عرض الـ DNA - شكل اللولب المُزدوج والرسوم التخطيطية كما تظهر في الكتاب

أ. نموذج ثُلاثي الأبعاد يعرض مبنى الـ DNA كما تمّ عرضه وتحديد مبناه من قبل العالمان واطسون وكريك. جدائل الـDNA ترتبط الواحدة بالأخرى وتلتف بفضل الأربطة الهيدروجينية الموجودة بين أزواج القواعد.

ب+ج. رسوم تخطيطية صُمّمت خصيصًا لهذا الكتاب لتعرض بشكل تخطيطي ومُختصر، DNA ثُنائي الجديلة وَ DNA أُحادي الجديلة. مقياس الرسم يختلف من رسم معيّن في الكتاب إلى رسم آخر، يُمكن أنْ يتغيّر مقياس الرسم التابع للرسم نفسه حسب الحاجة لذلك. النقاط تُشير إلى كثافة عالية للنوكليوتيدات لوحدة الطول مُقارنة مع الخطّ المُتواصل. أوليجو- نوكليوتيد هو بوليمير DNA أحادي الجديلة، له وظائف في مُضاعفة الـ DNA في أنبوب الاختبار وله أيضًا وظائف في عمليات كشف وتحديد الأحماض النووية (فصل 6-7).

المسار من الـAND إلى البروتين والشيفرة الوراثية

حتى الآن، تمّ التركيز على الحقيقة أنَّه يُمكن أن يكون لدى الأفراد المُختلفين اللذين ينتمون لنفس النوع من الكائنات الحية صفات مُختلفة. لكن يُمكن أيضًا أنْ نجد إختلافًا حتى في صفات أنواع مُختلفة من خلايا نفس الفرد. هكذا ومن خلال الرسم 1.11 يُمكن أن نُلاحظ أنَّ لخلايا الدم، خلايا الاعصاب وخلايا الإندوتيل شكل مُختلف. الشكل المُختلف لهذه الخلايا يعكس الحقيقة أنَّ الأنواع المختلفة لخلايا فرد مُعيّن تملك صفات مُختلفة. الصفات المُختلفة تمنح الخلايا القدرة على أداء وظائف مُختلفة. لنفهم هذه الظاهرة يجب أن نعرف أن كل نوع من الخلايا يحتوي على بروتينات خاصة تُميّزه. **البروتينات هي "المسؤول المُباشر" الذي يشترك في تحديد الصفات**. ما هي البروتينات؟

البروتينات هي جُزيئات بوليميرية تتركّب من أحماض أمينيّة (رسم 1.5). تتركّب البروتينات من تركيبات مُختلفة من الأحماض الأمينية ويشترك في تكوينها 20 نوع من الأحماض الأمينية التي ترتبط ببعضها لإنتاج البروتين بواسطة أربطة ببتيدية، لكلّ بروتين تسلسل مُميّز من الأحماض الأمينيّة (رسم 1.6 أ')، وهناك أهميّة قُصوى للتسلسل بتحديد الشكل والمبنى الفراغي الذي يُميّز البروتين (رسم 1.6 ب'). المبنى المُختلف للبروتينات المُختلفة يُمكّنها من تنفيذ تفاعلات كيميائيّة مُختلفة تشترك في تحديد صفات الخلية ووظائفها.

من المُعتاد القول، إنَّ الـ DNA يحتوي على جينات هي بمثابة "ملفات برمجة" تؤثر على صفات ووظائف الخلية. بالمُقابل، البروتينات تُلقب بـ"خيول عمل" الخلية التي تُنفذ "أوامر الـ DNA"، وهنا تكمن أهمية البروتينات في تحديد الصفات.

كما ذكرنا، يُحدّد الـ DNA الصفات (كما اتضح لأول مرّة في تجربة إفري وشركائه)، وهو أيضًا عبارة عن المادة الوراثيّة. البروتينات تشترك في تحديد الصفات، ولكنها ليست المادّة الوراثية. لذلك في سنوات الـ 50 من القرن العشرين، طُرحت الفرضية بأنَّ الـ DNA يحتوي على الشيفرة لإنتاج البروتينات. تمّ نَفي الفرضية التي تقول إنّ إنتاج البروتين يتمّ باستخدام الـ DNA بشكل مُباشر، لأنَّ الـ DNA موجود في النواة بينما يتمّ إنتاج البروتينات في السيتوبلازم. بالمُقابل، حقيقة كون الخلايا التي تُنتج الكثير من البروتينات تحتوي أيضًا على الكثير من الـ RNA، أثارت احتمال اشتراك الـ RNA في إنتاج البروتينات. للتعرف على مبنى الـ RNA وتعدد أشكاله أُنظر إلى الرسم 1.7. الفرضية المُحدّدة التي طُرحت في تلك الفترة، كانت أنَّ الـ RNA يُمكن أنْ يكون بمثابة "رسول" ينقل المعلومات من الـ DNA الموجود في النواة إلى الستوبلازم، بهدف انتاج البروتينات فيه. لاقت هذه الفرضيّة تعزيزًا عندما تمّ اكتشاف الإنزيم **بوليميراز RNA** سنة 1959. يستطيع هذا الإنزيم أن يقوم بإنتاج RNA بحسب تسلسل القواعد الموجود في الـ DNA. سُمّيت عمليّة إنتاج RNA من الـDNA بواسطة الـ RNA بوليميراز باسم **"نسخ"** (Transcription). خلال النسخ يقوم الإنزيم RNA بوليميراز بوضع نوكليوتيد مُكمّل (من الـ RNA) مُقابل كل نوكليوتيد في الـ DNA، ويقوم بربط سلسلة النوكليوتيدات الجديدة ببعضها بواسطة أربطة فوسفو دي إستيريّة، لنحصل على جُزيء RNA. الإنزيم يستخدم جديلة واحدة فقط من جدائل الـDNA "كقالب" من أجل بناء RNA أحادي الجديلة.

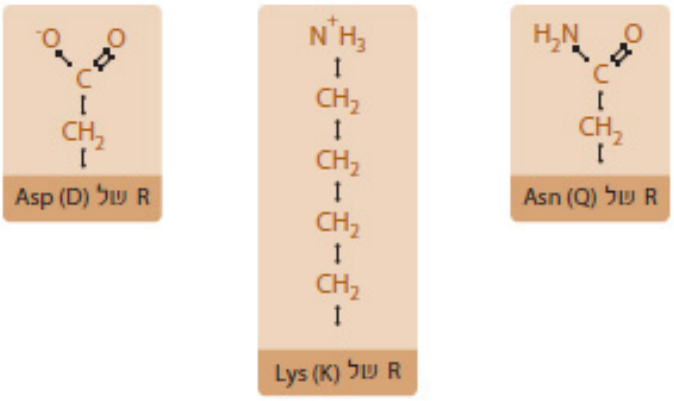
على خلاف الـ DNA، جُزيئات الـ RNA المُختلفة هي بطبيعتها ذات مبنى غير موّحد. هناك حالات يُمكِّن فيها تسلسل النوكليوتيدات في جُزيء RNA مُعيّن، من تكوّن أزواج من القواعد داخل الجُزيء. في حالات كهذه تنتج مناطق ثُنائية الجديلة في الـ RNA والـ RNA الناتج يكون ذا مبنى مُحدّد وثابت نسبيًا.

أ. المبنى العام لجميع الأحماض الأمينيّة

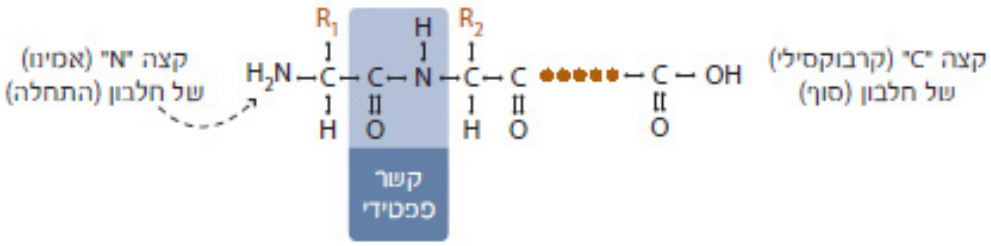
ב. رموز بعض الأحماض الأمينية وتصنيفها

שם:	גלוטמין	אספרגין	היסטידין	ארגינין	לידין	חומצה גלוטמית	חומצה אספרטית
סימון:	Gln	Asn	His	Arg	Lys	Glu	Asp
סימון מקוצר:	Q	N	H	R	K	E	D
סיווג:	R עם קבוצה אמידית		R בסיסי			R חומצי	

ج. أمثلة لمجموعات مُميّزة للأحماض الأمينية ("R")



د. الرباط الببتيدي بين حامضين أمينيين



رسم 1.5: الأحماض الأمينيّة هي "وحدات بناء" (مونوميرات) البروتينات.

تتركّب البروتينات من 20 وحدة مونيميريّة مُختلفة، تُعرف باسم أحماض أمينيّة، يتمّ بناء البروتين عن طريق دمج هذه الوحدات للحصول على تركيبات مُتعدّدة منها. لدى كل حامض أميني يوجد مجموعة كربوكسيلية (COOH) ومجموعة أمينيّة (NH2). هذه المجموعات تشترك في إنتاج الرباط الببتيدي بين كل حامضين أمينيين في البروتين. لدى كل حامض أميني مجموعة كيميائية تُميّزه ("R")، وهذه المجموعة تمنح الحامض الأميني صفاته الخاصة. تنقسم الأحماض الأمينيّة إلى مجموعات فرعيّة بحسب طابع المجموعة المُميّزة (مجموعات حامضيّة، قاعديّة، غير مشحونة، هيدروفوبيّة وغيرها). الرباط الببتيدي بين حامضيين أمينيين هو رباط كوفلنتي يتفكك في الخلية، فقط، بوجود إنزيمات مُعيّنة.

أ. يتكوّن كل بروتين من تسلسل خاص من الأحماض الأمينيّة

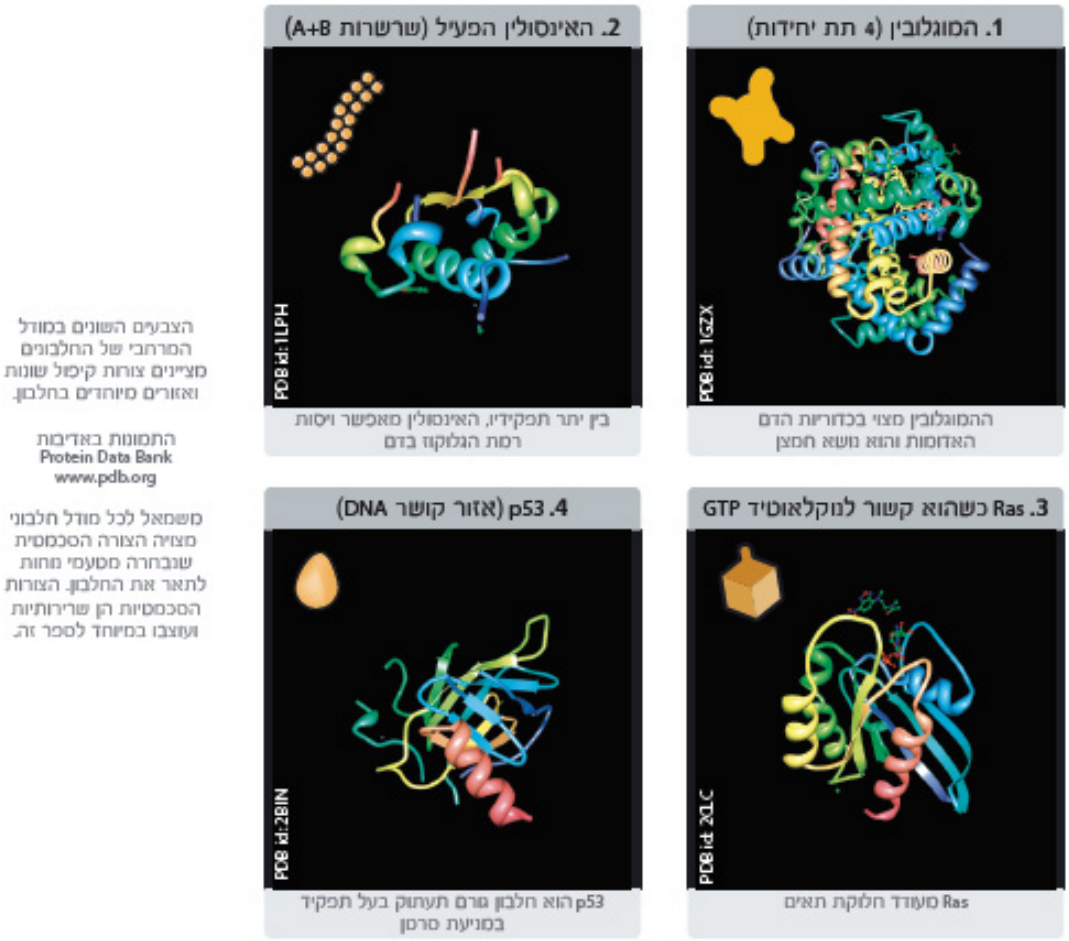
1. תת-יחידה α של חלבון ההמוגלובין
141 חומצות אמינו
V-L-S-P-A-D-K-T-N-V-K-A-A-W

2. שרשרת A של חלבון האינסולין
21 חומצות אמינו
G-I-V-E-Q-C-C-T-S-I-C-S-L-Y

3. החלבון Ras
189 חומצות אמינו
M-T-E-Y-K-L-V-V-V-G-A-G-G-V

4. החלבון p53
393 חומצות אמינו
M-E-E-P-Q-S-D-P-S-V-E-P-P-L

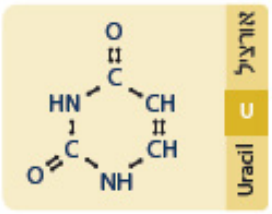
ב. لكل بروتين مبنى فراغي يُميّزه ويحدّد الوظيفة الخاصة به



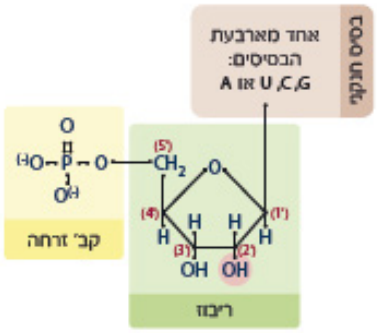
رسم 1.6: تسلسل الأحماض الأمينيّة الخاص بالبروتين يحدّد مبناه الفراغي المُميّز

البروتينات مكوّنة من تركيبات مُختلفة من 20 حامض أميني، لذا يظهر اختلاف كبير بين البروتينات المُختلفة. هنالك بروتينات طولها عدة عشرات من الأحماض الأمينيّة، بينما يُمكن أنْ يصل طول بروتينات أخرى أكثر من 1000 حامض أميني. تسلسل الأحماض الأمينيّة في البروتينات المُختلفة (قسم أ في الرسم) هو عامل مهم في تحديد المبنى الفراغي للبروتين (قسم ب في الرسم). المبنى المُميّز لكل بروتين يُمكّنه من أداء الوظيفة الخاصة به داخل الخلية أو خارجها.

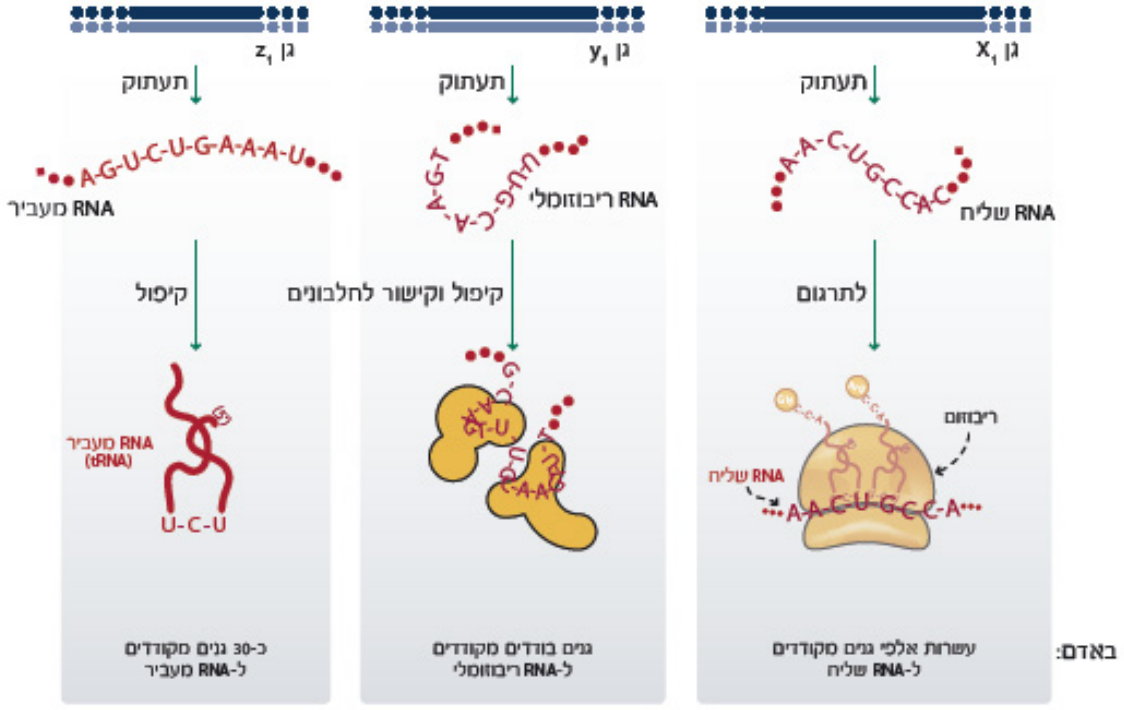
أ. القاعدة النيتروجينية يوراسيل (U) موجودة في الـRNA بدلًا من الثايمين (T)



ب. مبنى نوكليوتيد في جُزيء RNA



ج. يَنْتُج الـRNA في عمليّة النسخ كجديلة أحاديّة؛ لجُزيئات الـRNA المُختلفة مبنى ووظائف مُختلفة



כמו כן כ-30% מהגנום מקודד למולקולות RNA שיש להן תפקידי בקרה בתא והן אינן מתוארות באיור זה

רسم 1.7: مبنى، شكل ووظيفة جُزيئات الـRNA المُختلفة

يتركّب الـRNA من نوكليوتيدات أيضًا، لكن السكّر الموجود فيه هو ريبوز وليس دي أوكسي ريبوز كما هو الحال في الـDNA . في الكربون 2' الموجود في الريبوز توجد مجموعة هيدروكسيل لا تتواجد في السكّر دي أوكسي ريبوز. إضافة إلى ذلك، الـRNA لا يحتوي على القاعدة ثايمين وبدلًا منها يحتوي على القاعدة يوراسيل. يَنْتُج الـ RNAفي النواة عن طريق عمليّة النسخ المسؤول عنها الإنزيم RNA بوليميراز. يَنْتُج الـ RNA كجديلة أحادية ذات مبنى غير ثابت. في بعض الأحيان، كما هو الحال في الـ tRNA، تتواجد في جديلة الـRNA تسلسلات قصيرة تُكمّل بعضها البعض وتُنْتِج أزواج من القواعد المكمّلة داخل الجديلة ذاتها، وهي تُمكّن من طيّ جديلة الـ RNA وإنتاج مبنى ثانوي ثابت. الـRNA الريبوزومي هو مثال يُشير إلى أنَّ الـRNA يستطيع الارتباط بالبروتينات. ارتباط كهذا ضروري لإنتاج الريبوزوم.

أُثبتت الحقيقة أنَّ الـ RNA هو المسؤول المُباشرعن إنتاج البروتينات بواسطة التجارب التي أُجريت في سنوات الـ 60 من القرن العشرين. كان تحت تصرف الباحثين جهاز يقوم بإنتاج البروتينات داخل أنبوب اختبار. شمل هذا الجهاز سائل سيتوبلازم بدون أنوية خلايا.عندما تمّت إضافة DNA للأنبوب الذي يحتوي على سيتوبلازم، لم يتمّ إنتاج بروتين جديد، بينما عندما أضاف الباحثون، إلى الستوبلازم، تسلسل الـ RNA UUUUUUUUUUUUUUUUUUUUU نَتَج في الأنبوب بروتين بسيط مبني من عدّة وحدات مُتكررة من الحامض الأميني Phenylanine. من هنا نستنتج أنَّ الـ RNA وليس الـ DNA هو العامل الوسيط في إنتاج البروتينات في السيتوبلازم.

ما هي الشيفرة الوراثيّة الكامنة في الـDNA الموجود في النواة والمسؤولة عن إنتاج البروتين، هل يتمّ تحويل الشيفرة في المرحلة الأولى إلى RNA؟ اتضح جوهر الشيفرة الوراثية عن طريق نفي الفرضيات المطروحة. هكذاعندما طُرح السؤال: هل تستطيع قاعدة مُعيّنة في الـ DNA أنْ **تُشفّر** إلى حامض أميني واحد؟ كانت الإجابة "لا". قاعدة واحدة لا تستطيع أنْ تُشفِّر إلى حامض أميني واحد، لأنّه في الحالة القائمة على هذا الإفتراض، الـDNA الذي يحتوي فقط على 4 أنواع من القواعد سيُشفِّر إلى بروتينات تحتوي على 4 أحماض أمينيّة فقط. وإذا كانت الشيفرة مكوّنة من تركيبات مُختلفة مكونة من قاعدتين (نفرض مثلًا: TT، AG وغيرها)، سيكون الـ DNA قادرًا على التشفير إلى 16 حامض أميني فقط. لهذا شيفرة مكوّنة من قاعدتين لم تكن كافية أيضًا، حيث أنَّ البروتينات مكوّنة من 20 حامض أميني، وفي الواقع اتّضح أنَّ الشيفرة الوراثية مكوّنة من ثُلاثيّات من القواعد، كما خمّن الباحثون فرنسيس كريك وسيدني بارنر، وتكفي ثلاثية قواعد واحدة لتُشفِّر إلى حامض أميني واحد.

الشيفرة الوراثية:

1. **الشيفرة الوراثية مكوّنة من ثُلاثيّات من القواعد.** بحسب قوانين الاحتمال البسيطة، تُنْتِج القواعد الأربعة للـDNA 64 ثُلاثيّة مُختلفة من القواعد (4x4 x4). تُسمّى كل ثُلاثيّة من النوكليوتيدات، التي يَنْتُج بحسبها البروتين باسم **كودون** (Codon). مثلًا، الكودونات CGC وَ ACA تؤدي إلى دمج الأحماض الأمينيّة Arginine وَ Threonine في البروتين، على التوالي.

2.**كودون مُعيّن يُمكن أنْ يُشفِّر إلى حامض أميني واحد فقط.** مثلًا الكودون UUU يُشفِّر إلى الحامض الأميني Phenylanine فقط. قائمة الشيفرة الوراثيّة الكاملة مُرفقة في الجهة الداخلية للغلاف الخلفي للكتاب.

3. **لكل واحد من الـ 64 كودون توجد وظيفة في الشيفرة الوراثيّة.** بما أنَّه يوجد لدينا 20 حامض أميني فقط، فإنَّ أحماض أمينيّة مُعيّنة تُشفَّر بواسطة أكثر من كودون واحد. هذه القاعدة لا تنطبق على الحامض الأميني Methionine الذي يُشفَّر بواسطة كودون واحد فقط. تُقرأ الشيفرة الوراثية من موضع مُعيّن على شكل ثُلاثيات من القواعد وبشكل مُتواصل حتى نقطة النهاية.

4. **نهاية إنتاج بروتين تتمّ بواسطة أحد الكودونات الثلاثة التي تُعرف بـ"كودونات وقف الترجمة"**((Termination codons). يُشار إلى كودونات الوقف بواسطة "*"، أُنظروا إلى قائمة الشيفرة الوراثية في القسم الداخلي للغلاف الخلفي للكتاب.

5. مصدر المعلومات لإنتاج بروتين مُعيّن موجود في الـ DNA وهو عمليًا تسلسل كودونات مُعيّنة. تسلسل الكودونات الموجود في الـDNA ينتقل إلى الـ RNA في عملية **النسخ**. الـ RNA الذي لديه تسلسل كودونات مُعيّن والذي ينتقل من النواة إلى السيتوبلازم لإنتاج البروتين بحسب هذا التسلسل يُسمّى **"RNA رسول"** (messenger RNA وباختصار **mRNA**).

سؤال 1.1

أمامكم وصف لعشرة مقاطع DNA أحادي الجديلة (أوليجو- نوكليوتيدات)، موجودة في محلول داخل أنبوب اختبار واحد، في درجة حرارة عالية. عندما تُمنح الإمكانية، أي عندما نقوم بتبريد المحلول ترتبط كل جديلة أحادية من بين الجدائل المعروضة بجديلة أحادية أخرى ذات تسلسل مُكمّل لها. بعد الإرتباط نحصل على 5 جُزيئات DNA ثُنائي الجديلة.

D_1: A-T-C-G-G-T-T-A
D_9: T-A-C-C-C-G-T-A
D_4: G-G-C-C-T-A
D_7: T-A-G-C-C-A-A-T
D_6: G-T-A-A-T-T
D_3: A-T-G-G-G-C-A-T
D_{10}: T-A-A-A-T-A-T-T
D_2: C-A-T-T-A-A
D_8: C-C-G-G-A-T
D_5: A-T-T-T-A-T-A-A

حدّدوا أزواج الأوليجو- نوكليوتيدات التي لها القدرة على الأرتباط ببعضها بشكل كامل.

سؤال 1.2

أمامكم 3 تسلسلات DNA (D1-D3)، ثلاثة تسلسلات RNA (R1-R3) وثلاثة تسلسلات من البروتينات (P1-P3). كل تسلسل DNA يُشفِّر لتسلسل RNA مُعيّن وكل تسلسل RNA يُشفِّر إلى بروتين مُعيّن.

D_1: CCA - CCG - AGG - CGT
GGT - GGC - TCC - GCA

D_2: GAA - ATG - GGG - TAA
CTT - TAC - CCC - ATT

D_3: TTT - TCT - TGG - CGT
AAA - AGA - ACC - GCA

R_1: GAA-AUG-GGG-UAA

R_2: CCA-CCG-AGG-CGU

R_3: UUU-UCU-UGG-CGU

P_1: P-P-R-R

P_2: F-S-W-R

P_3: E-M-G

رتّبوا التسلسلات في ثلاثيات بحيث تتواجد في كل ثُلاثية: تسلسل واحد من الـDNA ، تسلسل واحد من الـRNA وتسلسل واحد من البروتين. يجب أن تحتوي الثُلاثيّة على تسلسل DNA مُعيّن،تسلسل الـRNA الذي يُشفَّر منه وتسلسل البروتين الذي يُشفِّر له هذا الـRNA. استعينوا بقائمة الشيفرة الوراثيّة الموجودة في الغلاف الداخلي الخلفي للكتاب.

سؤال 1.3

أمامك أربعة تسلسلات قصيرة من الـDNA ، مصدر هذه التسلسلات من نفس الفرد.

D_1: AGCTTGGTTGCT
(3')TCGAACCAACGA

D_2: (5')AGATTTCGGCGT
TCTAAAGCCGCA

D_3: ATGCCCGTAAAC
TACGGGCATTTG(5')

D_4: AGAATTCGGCGT(3')
TCTTAAGCCGCA

1. إثنان فقط من بين التسلسلات الأربعة هما أليلان. حسب رأيك، أي من بين التسلسلات هما الأليلان؟ علِّل.
2. أشِر بـ3' أو 5' إلى أطراف الجدائل المُختلفة، لكل واحد من مقاطع الـDNA الموجودة في الرسم التابع لسؤال.

مبادئ ومُميّزات عملية بناء البروتين التي تُسمى "الترجمة" (Translation)

1. بحسب "المبدأ المركزي" ("The central dogma") الذي نَصّه فرنسيس كريك، يُمكِّن الـDNA من إنتاج RNA في عمليّة النسخ داخل النواة، يمرّ الـ RNA رسول بعملية ترجمة لإنتاج البروتين في السيتوبلازم (القسم العلوي من الجهة اليُمنى للرسم 1.8).

2. **الـ RNA رسول يصل إلى الريبوزوم.** حتى تمرّ المعلومات الموجودة على شكل تسلسل من الكودونات في الـ RNA رسول بعملية ترجمة إلى تسلسل أحماض أمينيّة في البروتين، على الـ RNA رسول أن يتواجد في جُسَيْم (عُضيّ) يُدعى ريبوزوم (Ribosom) (رسم 1.8). الريبوزوم مكوّن من جُزيئات RNA ريبوزومي وبروتينات، وهو مكوّن من وحدتين فرعيتين.

3. **ترجمة الـ RNA رسول إلى بروتين تحتاج إلى عدّة مكوّنات،** على رأس هذه المكوّنات الـRNA الرسول، الريبوزوم وجُزيئات RNA صغيرة تُسمّى "RNA ناقل" (transfer RNA) أو باختصار tRNA.

> **"الترجمة"** هو اسم العمليّة التي يقوم فيها كل من الـ RNA رسول، الريبوزوم والـ RNA الناقل بإنتاج البروتين، حيث تتمّ ترجمة تسلسل الكودونات إلى تسلسل أحماض أمينيّة. عمليًا في عملية الترجمة يحدث فك الشيفرة الموجودة في الـ RNA بواسطة المكوّنات المُختلفة الضرورية لإنتاج البروتين.

4. **الـ tRNA ينقل الأحماض الأمينيّة من السيتوبلازم إلى مكان إنتاج البروتين، إلى الريبوزوم، الـtRNA ضروري لفك الشيفرة الوراثية الموجودة على الـRNA رسول.** tRNA هو RNA قصير يرتبط بأحد أطرافه حامض أميني مُعيّن، وفي مكان بارز منه تتواجد ثلاثيّة قواعد تُعرف بـ" انتي كودون" (رسم 1.8). الانتي كودون ذا قُدرة على الإرتباط بالكودون الموجود على الـ RNA رسول حيث أن القواعد الموجودة في الانتي كودون مُكمِّلة لتسلسل قواعد الكودون. يرتبط RNA ناقل ذا انتي كودون مُعيّن حامض أميني مُعيّن.

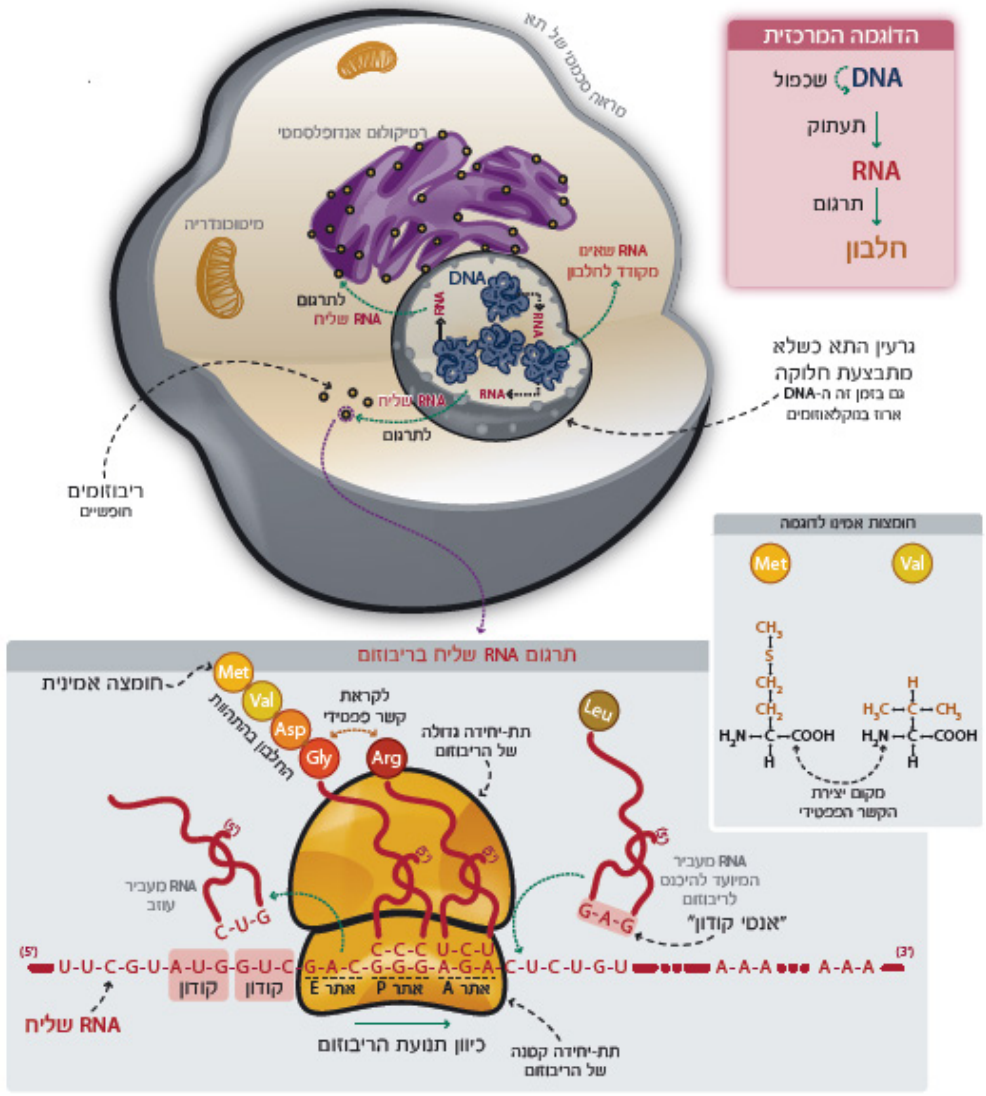
5. **خلال عملية الترجمة يَنْتُج رباط ببتيدي بين حامضين أمينيين مرتبطين بجُزيئي tRNA موجودان الواحد بجانب الآخر في الريبوزوم.** خلال إنتاج الرباط الببتيدي جُزيء الـtRNA المُرتبط بالبروتين الناتج (رسم 1.8) ينفصل عن الحامض الأميني الذي

يرتبط به ويعود إلى السيتوبلازم. الـtRNA الذي بقي في الريبوزوم، والذي يرتبط بالبروتين يتحرّك إلى الخلف ويصل إلى الريبوزوم، وَ tRNA جديد يحمل معه حامض أميني آخر يرتبط هو أيضًا بالبروتين الناتج. تتكرّر هذه العمليّة مرّات عديدة حتى انتهاء الترجمة.

6. **عمليّة الترجمة تنتهي عندما يصل الريبوزوم إلى كودون وقف، وهذا الكودون يأمر بوقف الترجمة.** كودونات الوقف الثلاثة الموجودة في الشيفرة الوراثية هي: UAA، UGA وَ UAG.

من الصفة إلى الجين وصيغ الجين

افتتحنا الفصل بأحجية آلية توريث الصفات. كما ذكرنا، للـ DNA وظيفة مركزيّة في تحديد الصفات، ومُضاعفة الـ DNA ضرورية لتوريثها. كما ذكرنا أيضًا، تَنْتُج البروتينات بعمليّة الترجمة والـ DNA هو من يحدّد إنتاج البروتينات. البروتينات تُنفّذ "أوامر الـ DNA"، ولها دور فعّال في تحديد الصفات. بقي لدينا سؤال مركزي وهو: كيف نُميّز ونُفسّر الصفات على مُستوى الكائن الحي، الخلية، وعلى المُستوى الجُزيئي أيضًا؟ سنُحاول الإجابة عن هذا السؤال بمُساعدة، مثال، مرض فقر الدم المنجلي.



רשם 1.8: המבדא המרכזי וترجمة الـRNA رسول لإنتاج البروتين.

بالإضافة إلى المبدأ المركزي يُمكن أنْ نُلاحظ توضيحًا للطريقة التي نحصل فيها على بروتين، الـ RNA رسول (mRNA) الناتج في النواة ينتقل إلى السيتوبلازم. الـRNA رسول يحتوي على كودونات تُشفّر إلى أحماض أمينيّة. عندما يتواجد الـ RNA في الريبوزوم تتمّ ترجمة المعلومات الموجودة فيه إلى بروتين بمُساعدة جُزيئات tRNA (RNA ناقل) تحمل أحماض أمينيّة مُعيّنة بحسب الأنتي كودون الخاص بها والذي يرتبط بالكودون الموجود على mRNA.

الصفة التي تنتقل بالوراثة لا تكون صفة ايجابيّة دائمًا، وهذا ما يحدُث لدى مرضى فقر الدم المنجلي. يواجه المرضى في هذا المرض صعوبة عند قيامهم بجهد جسماني بسبب نقص الأوكسجين في انسجتهم، وهم يُعانون من أوجاع بسبب انسداد في شعيراتهم الدموية (صفة على مستوى الكائن الحي). شكل خلايا الدم الحمراء لدى المرضى مُشوّه ويُشبه المنجل (رسم 1.9). بسبب تشوه مبنى خلايا الدم فهي لا تسطيع أنْ تحمل الأوكسجين بالنجاعة المطلوبة (صفة على مستوى الخلية). خلايا الدم المنجليّة مسؤولة عن انسداد الشعيرات، ولذلك قسم من المرضى يتعرضون للموت المُبكّر.

المنجل (Sickle) هو أداة زراعية حادة تُستعمل لحصاد المحصول، شكل المنجل كالقمر في حالة الهلال.

الهيموجلوبين هو البروتين الأكثر انتشارًا في خلايا الدم الحمراء. يوجد في الهيموجلوبين جُزيء هيم (Heme) يرتبط بالأوكسجين كي يتمّ نقله إلى خلايا أنسجة الجسم. الهيموجلوبين هو بروتين مبنى من أربع سلاسل بروتينيّة: سلسلتي جلوبين α وسلسلتي جلوبين β. وُجد أنَّ الشحنة الكهربائيّة ومبنى جلوبين β (β-globin) الذي استخلص من خلايا الدم الحمراء لمرضى فقر الدم المنجلي، غير سليمة بالمُقارنة مع البروتين التابع للأشخاص الأصحاء. هذا يعني أنَّ بروتين الجلوبين لدى المرضى معطوب ويُعتبر بروتين طافر (صفة على مستوى الجُزيء).

كيف نشرح صفة الجُزيء الطافر لجلوبين βلدى المرضى؟ بداية الشرح تنبع من الحقيقة أنَّ المعلومات الضرورية لإنتاج جلوبين β موجودة في مقطع DNA مُحدّد موجود في نواة الخلية. مقطع الـ DNA الضروري لإنتاج بروتين جلوبين β يُسمّى "جين β-globin". للتعرّف على تعريف المُصطلح جين أُنظر إلى الصندوق 1.1.

صندوق 1.1: الجين (Gene).

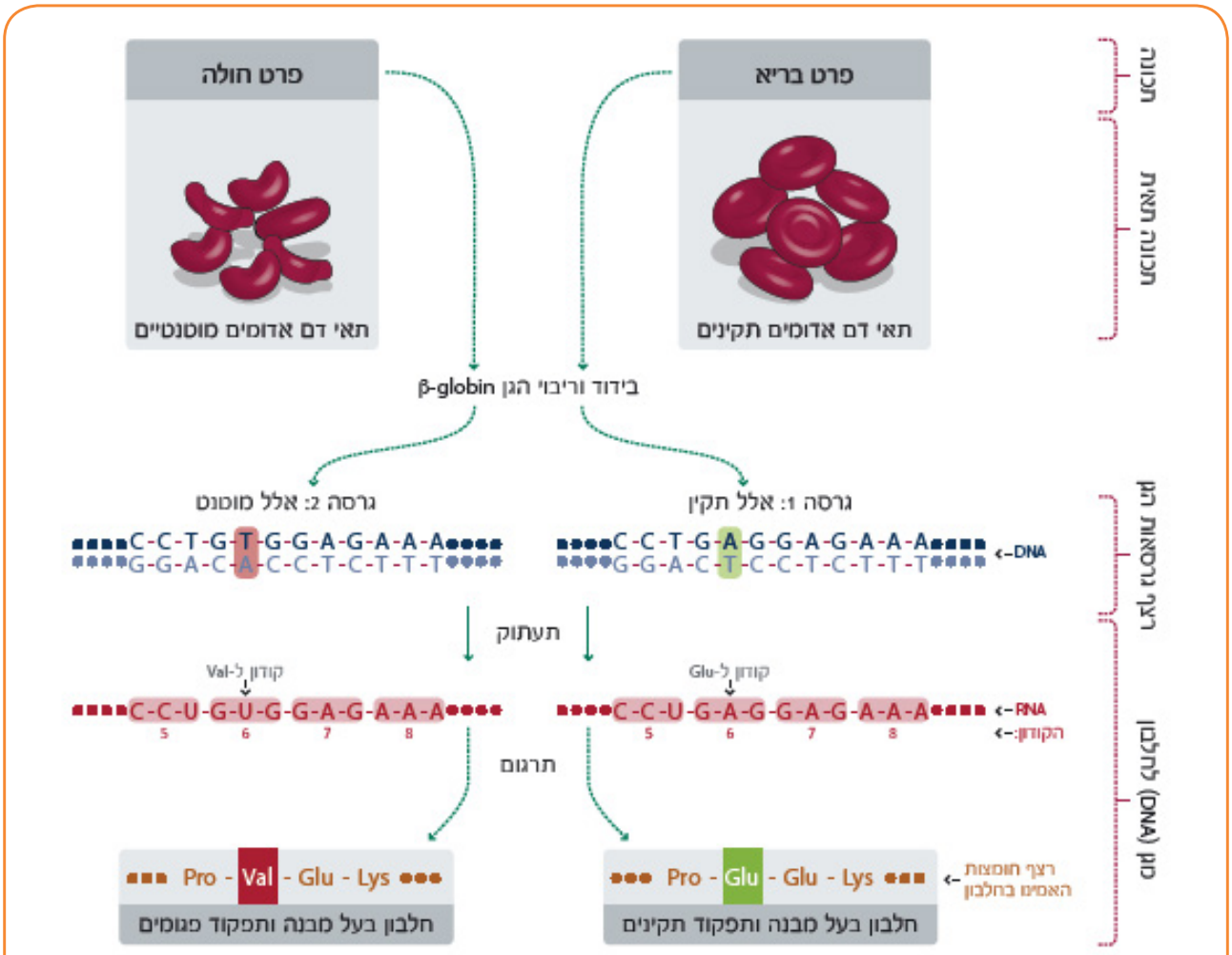
نقول إنّ الجين يشترك في تحديد صفة، عندما نقول ذلك لا نقصد أن صفة مُعيّنة تحدّد بالضرورة بواسطة جين واحد فقط. صفات كثيرة ككمية الحليب التي تُنْتِجها الأبقار، حجم ثمار الأشجار أو حتى قُدرة النباتات على مُقاومة الجفاف المستمر، هي صفات تتحدّد بواسطة أكثر من جين واحد. كذلك صفات الخلايا المُختلفة كقدرة الخلايا على الانقسام والتكاثر، الحركة والتنفس هي صفات تحدّد بواسطة جينات عديدة.

قبل كل شيء، الجين هو مقطع DNA مُحدّد ولكل جين تسلسل قواعد خاص. قسم من القواعد الموجودة في الجين يمرّ بعملية نسخ بواسطة الإنزيم RNA بوليميراز كي نحصل على جُزيء RNA ذا تسلسل مُكمّل لتسلسل إحدى جدائل الـ DNA (جديلة "القالب"). من هنا فإنّ الناتج الأولي للجين هو تسلسل RNA مُعيّن. لذلك نقول **الجين يُشفِّر إلى RNA**، أي أنَّ المعلومات الموجودة في تسلسل القواعد في الـDNA تنتقل كشيفرة إلى الـ RNA.

جينات عديدة، من ضمن ما يُقارب 20000 جين لدى الإنسان، تمرّ بعملية نسخ لإنتاج RNA يُعرف باسم RNA رسول (mRNA). في كل جُزيء RNA رسول يوجد تسلسل مُعيّن من الكودونات، يُترجم هذا التسلسل إلى تسلسل أحماض أمينيّة تُكوّن بروتين. يُعتبر البروتين ناتجًا ثانويًا للجين، ولذلك نقول في بعض الأحيان: إنَّ **الجين يُشفِّر إلى بروتين**. مع ذلك فهناك جينات لا تُشفِّر إلى بروتينات وإنما إلى RNA فقط. أمثلة على جينات كهذه هي الجينات التي تُشفِّر إلى RNA ناقل (tRNA) وإلى RNA ريبوزومي (rRNA). جُزيئات الـ RNA هذه لا تُترجم إلى بروتين ووظيفتها هي وظيفة مبنويّة أو إنزيميّة.

للتلخيص، يُمكن أنْ نُعرّف الجين باختصار: **"الجين هو مقطع DNA يَنْتُج منه RNA"**. حتى يتمّ اعتبار مقطع DNA كهذا جينًا، يجب على نواتجه أي الـ RNA أو الـ RNA والبروتين أنْ تشترك في تحديد صفة أو صفات.

لنفحص ما إذا كان العطب في بروتين جلوبين β نابع عن خلل في جين β-globin، يجب أنْ نعزل ونُضاعف مقطع DNA يحتوي على هذا الجين. هكذا قام الباحثون بعزل مقطع DNA يحتوي على الجين β-globin من خلايا شخص سليم، وأيضًا من خلايا شخص مريض بفقر الدم المنجلي. كانت الفرضية السائدة قبل تنفيذ هذا العزل أنَّ للجين صيغتان: صيغة سليمة تتواجد لدى الأفراد الأصحاء، وصيغة طافرة تتواجد لدى المرضى. كما ذكرنا، كل صيغة للجين تُسمى أليل (Allele).



רסם 1.9: من الصفة إلى الجين وصيَغه: فقر الدم المنجلي هو صفة يتمّ تفسيرها بواسطة طفرة نقطيّة في جين واحد

لدى مرضى فقر الدم المنجلي خلايا الدم الحمراء معطوبة، شكلها يشبه المنجل وتنتقل هذه الصفة بالوراثة. الخلايا الشبيهة بالمنجل هي خلايا طافرة، مبنى بروتين الهيموجلوبين في الخلايا الطافرة غير سليم ووظيفته غير سليمة أيضًا. كيف يَنْتُج البروتين الطافر؟ الجين β-globin يُشفِّر إلى سلسلة بروتينية تُركِّب الهيموجلوبين. يُعرض في هذا الرسم تسلسل قواعد صيغة الجين الموجودة لدى الأصحاء (الأليل السليم)، وتسلسل قواعد صيغة الجين الموجودة لدى المرضى (الأليل الطافر). وُجد أنَّ هُناك طفرة في الكودون السادس في الجين الذي عُزل من شخص مريض. في هذه الطفرة حدث استبدال للقاعدة A الموجودة في إحدى جدائل DNA الشخص السليم (تُعرض باللون الأخضر) بالقاعدة T الموجودة في صيغة الجين لدى المريض (تُعرض باللون الأحمر). استبدال كهذا في نقطة واحدة يُعرف باسم طفرة نُقطيّة. الطفرة في الـ DNA مسؤولة عن وجود كودون طافر في الـ RNA. الـ RNA الطافر يُشفِّر إلى بروتين طافر فيه الحامض الأميني السادس هو Val بدلًا من الحامض Glu الموجود في البروتين الطبيعي. تغيير في قاعدة واحدة (طفرة نُقطيّة) في كودون واحد لجين واحد كان كافيًا للإضرار بمبنى بروتين الهيموجلوبين ووظيفته، وظهر كمرض خطير.

في الواقع، عندما عُزل جين β-globin من شخص مريض وتمّ تحديد تسلسل القواعد الموجود فيه (بواسطة الطرق المعروضة في الفصول 3-5)، وُجد فيه تغيير بالمُقارنة مع الجين β-globin الذي عُزل من شخص سليم (رسم 1.9). عمليًا، وُجد أنَّ الشخص المريض والشخص السليم لديهما صيغ مُختلفة من الجين، أي أليلات مُختلفة للجين. كان هناك اختلاف موضعي في زوج واحد من القواعد بين هذه الصيغ للجين. كان الفرق بينهما استبدال القاعدة A الموجودة في جديلة مُعيّنة، في موضع مُحدّد في الأليل السليم، بالقاعدة T الموجودة في الأليل الطافر الذي عُزل من مريض. إذا كان التغيير بقاعدة واحدة مسؤولًا عن تحديد صفة تختلف عن الصفة المُنتشرة لدى الأفراد، عندها يُسمّى هذا التغيير **طفرة نُقطيّة**.

- جينات فرد مُعيّن - عدا بعض الجينات على كروموسوم Y- تتمثل بواسطة أليلين (مصدر أحدهما من الأب ومصدر الآخر من الأم). ليس بالضرورة أن يكون أليلا جين معيّن لدى فرد مُعيّن مُختلفان عن بعضهما.
- طفرة في الـ DNA هي تغيير في تسلسل النوكليوتيدات المسؤول عن صفة مُحدّدة، حيث ينتقل هذا التغيير بالوراثة. إذا كان تغيير معيّن في التسلسل لا يُظهر صفة جديدة أو مسؤول عن تغيير صغير جدًا في صفة موجودة، فإنّ هذه التغييرات تُسمّى أشكال مُتعددة للـ DNA (DNA polymorphism).

الطفرة النقطيّة التي وُجدت في جين β-globin، لدى مرضى فقر الدم المنجلي، تفسِّر التغيير في جُزيء الهيموجلوبين، والتغيير في المبنى المسؤول في نهاية الأمر عن خلل في النشاط وعن تشويه في مبنى خلايا الدم الحمراء، كما يظهر في الرسم 1.9. بعد نسخ الجين الطافر يَنْتُج RNA طافر، وبعد ترجمة هذا الـ RNA يَنْتُج بروتين طافر. الحامض الأميني السادس في البروتين الطافر هو حامض الفالين (Valine, Val) بدلًا من الحامض الأميني جلوتامات (Glutamic acid, Glu). هكذا كان بإمكان تغيير قاعدة واحدة أنْ يُسبب تغيير في حامض أميني واحد في بروتين واحد. هذا التغييرالصغير جدًّا (بقاعدة واحدة من بين 3 مليار قاعدة في جينوم الإنسان!) كان لديه قُدرة على إحداث تغيير كبير، حيث ظهر على شكل مرض خطير يؤدي في بعض الأحيان إلى الموت المبكر.

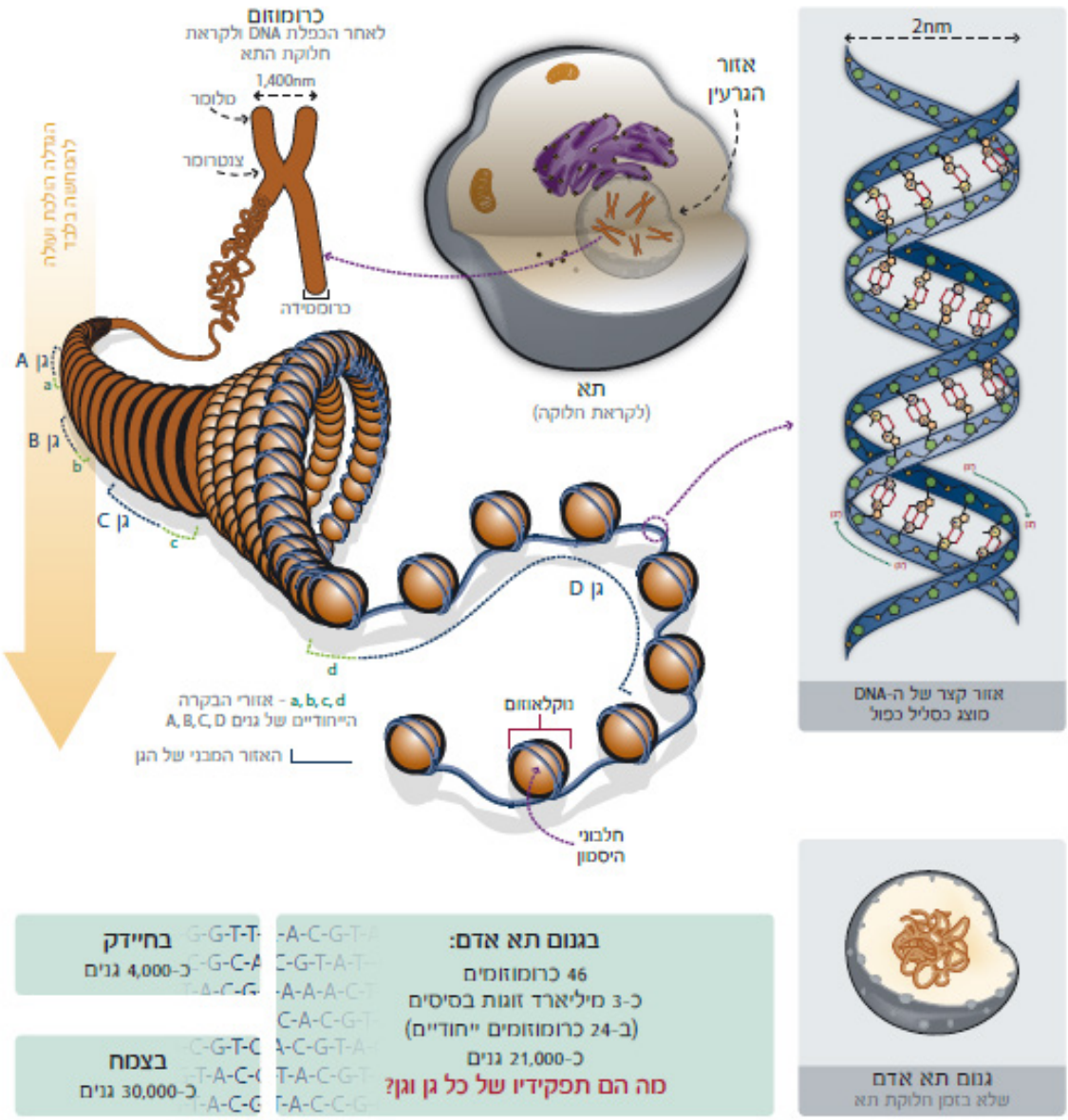
الطفرة المُحدّدة التي ذُكرت هي التي بيّنت أنّ نقل الأوكسجين بشكل سليم والحفاظ على مبنى سليم لخلايا الدم هما وظيفتان من وظائف الجين β-globin. ومع ذلك هناك جينات إضافيّة مسؤولة عن هاتين الوظيفتين، في الواقع هناك جين إضافي يؤثّر على هاتين الصفتين، وهو الجين الذي يُشفِّر إلى الوحدة الفرعية الثانيّة للهيموجلوبين وهي سلسلة α-globin.

للتلخيص، فقر الدم المنجلي هو مرض وراثي يحدُث بسبب وجود طفرة نقطيّة في جين واحد، ولذلك يُسمّى "مرض أحادي الجين". نسبيًا، من السهل تحديد الجين والطفرة المسؤولان عن "مرض أحادي الجين". لكن هناك أمراض عديدة، من بينها السكّريّ، يُمكن أن تُفسَّر بواسطة تغييرات في جينات عديدة فقط.

من الكروموسوم إلى تسلسل الجينوم

يُطلق على مُجمل الـ DNA الموجود في الخلية اسم جينوم (Genome). الجينوم مُقسم إلى كروموسومات. في الخلايا حقيقية النواة، الكروموسوم (Chromosome)هو جُسَيْم موجود في نواة الخلية ويحتوي على قسم من الجينوم، الكروموسوم قبل كل شيء عبارة عن جُزيء DNA كبير. بالإضافة إلى الـ DNA، تتواجد في الكروموسوم بروتينات ترتبط بالـ DNA. البروتينات الشائعة في الـ DNA هي الهستونات (Histones)، تُساهم الهستونات في رزم وضغط (رص) الـ DNA ليصل إلى الحجم المطلوب. يعرض الرسم 1.10 المبنى المُنتظم والمُتراص للكروموسوم كما يُمكن رؤيته بعد مُضاعفة الـ DNA ومباشرة قبل انقسام الخلية. حالًا بعد انقسام الخلايا يختفي المظهر المنتظم للكروموسومات، ويمكن أنْ نجدها أقل تراصًا عندما "تلتف وتتشابك داخل النواة كأنها خليط من المعكرونة"

تحتوي خلايا الإنسان الجسمية، وليس خلايا التكاثر، على 22 زوج من الكروموسومات وعلى كروموسومين جنسيين (لدى الأنثى XX ولدى الذكر XY)، أي أنَّ الإنسان لديه بالمُجمل 46 كروموسوم. يتضاعف كل كروموسوم عند مُضاعفة الـ DNA. قبل حدوث الانقسام تتحرك نسخة واحدة من الكروموسوم الذي تضاعف إلى أحد أطراف الخلية، أما النسخة الأخرى فتتحرك باتجاه الطرف الآخر لها. هكذا نضمن حصول كل خلية من الخلايا الناتجة بعد الانقسام على مجموعة كروموسومات مكوّنة من 46 كروموسوم.



رسم 1.10: من الجينوم إلى الكروموسوم والجينات

يُسمّى مُجمل الـ DNA الموجود في الخلية باسم جينوم، وهو موجود على شكل جُسيّمات تُسمى كروموسومات. الـ DNA الموجود في الكروموسومات ليس "حُرًّا" بل هو مرزوم بواسطة بروتينات ترتبط بالـ DNA. تُعرف الوحدة الأساسية التي يلتف فيها الـ DNA حول البروتينات المُسمّاة هستونات باسم نوكلئوزوم. في الرسم، يُمكن أنْ نرى كيف تبدو الكروموسومات بعد مُضاعفة الـ DNA وقبل انقسام الخليّة. يوجد في نواة خلية الانسان الجِسميّة (ليس في خلايا التكاثر) 22 زوج من الكروموسومات بالإضافة إلى كروموسومين جنسيين، (XX لدى الأنثى وَ XY لدى الذكر). مصدر 23 كروموسوم من الأب ومثل هذا العدد من الأم. لدى الإنسان 24 كروموسوم تحتوي على 3,000,000,000 زوج من القواعد. يوجد في جينوم الإنسان ما يُقارب 20,000 جين. **وكل جين لديه تسلسل قواعد خاص.** أحد التحديّات الهامة في مجال البيولوجيا هو نَسْب الوظائف لجينات ذات تسلسل قواعد معروف.

في إطار "مشروع الجينوم البشري" تمّ تحديد عدد وتسلسل قواعد الجينوم البشري بدقة كبيرة نسبيًا. وُجد أنَّ في الـ 24 كروموسوم الموجودة في جينوم خلية الانسان توجد 3) 109X3 مليار) زوج من القواعد. أتاح بحث وتحليل تسلسل القواعد التحديد أنَّ فقط جُزء من مُجمل الـ DNA الموجود في النواة (فقط جُزء من الجينوم) يحتوي على جينات. كذلك عُرِف أنَّ 3% فقط من الـ DNA الموجود في الجينوم يُشفِّر إلى بروتينات. إضافة إلى ذلك، تقريبًا 20% من الـ DNA الموجود في الجينوم يُشفِّر إلى جُزيئات RNA لا تُشفِّر إلى بروتين. لا يزال من المتوقع أنْ تتضح وظائف جُزيئات كثيرة من جُزيئات الـ RNA غيرالمُشفِّرة. بقيّة أجزاء الـ DNA الموجودة في الجينوم يُمكن أنْ تكون لها وظائف مُراقبة مُختلفة. لكن الإكتشاف المهم لمشروع الجينوم البشري هو بدون

شك أنَّ الجينوم يشمل 20,000 جين تشكّل 25% من الجينوم. حتى الآن يُعرف فقط القليل من وظائف الجينات المُختلفة. كما سيوضح لاحقًا، أحد الأهداف المركزية للبحث الذي يعتمد على الهندسة الوراثيّة هو إيجاد الوظائف المُختلفة لكل الجينات كي نفحص إمكانيّة استغلالها لفائدة الإنسان.

- إذا قُمنا "بمدِّ" الـDNA المرزوم في كروموسومات خلية الإنسان لوجدنا أنَّ طول الـ DNA الذي عُزل عن البروتينات والموجود في خلية واحدة يُقارب 2 متر. إذا قُمنا بذلك في جميع الخلايا الموجودة لدى فرد مُعيّن، لوجدنا أنَّ طول الـ DNA الكلي لهذا الفرد يساوي البُعد بين الأرض والقمر ذهابا وإيابًا!
- أتاح تحديد تسلسل الـ DNA في الجينوم من معرفة ترتيب النوكليوتيدات في الجينوم. يتمّ تحديد التسلسل من أجل معرفة أي نوكليوتيد من النوكليوتيدات الأربعة يتلو نوكليوتيد مُعيّن وأي نوكليوتيد يتبعه، وهكذا. تحديد تسلسل الـ DNA يُمكن من تحديد مقاطع الـ DNA التي تُشفِّر إلى بروتين.

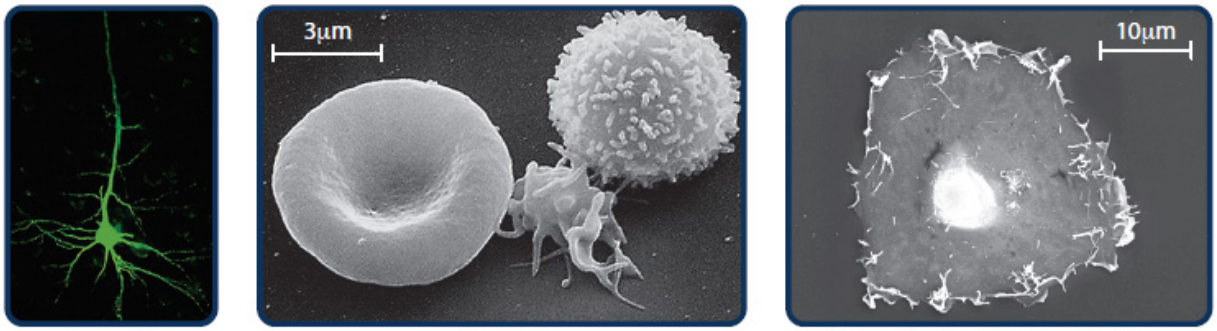
مُراقبة التعبير عن الجينات ونواتجها

بالرغم من الاختلاف في صفات ووظائف الخلايا حقيقيّة النواة (كتلك الموجودة في رسم 1.11)، إلا أنَّ هناك أمر واحد مُشترك لدى جميعها: إذا كان مصدر الخلايا من نفس الكائن الحي، فإنّ أنوية هذه الخلايا تحتوي على نفس تسلسل الـ DNA بما في ذلك نفس الجينات أيضًا. بما أنَّ الجينات تشترك في تحديد الصفات، السؤال الذي يطرح نفسه هو كيف يُمكن أن يكون هناك وضع فيه خلايا مُختلفة تحمل جينات مُتطابقة ومع ذلك لديها صفات مُختلفة؟ بكلمات أخرى، ممّ ينبع الاختلاف في صفات الخلايا؟ (كمثال على ذلك نعرض الاختلاف بين الخلايا التي تظهر في الرسم (1.11).

الجين الذي تمّ التعبير عنه هو الجين الذي تمّ نسخه، أي نَتَج بحسبه RNA. عندما تتمّ ترجمة الـ RNA إلى بروتين فهذا يعني أنَّه تمّ التعبير عن الجين على مستوى الـ RNA وعلى مستوى البروتين أيضًا.

لمعرفة مصدر الاختلاف بين الخلايا، يجب أولًا أنْ نُدرك أهميّة عمليّة النسخ. عملية النسخ هي عمليّة مُراقبة ينتج فيها تسلسل RNA ذا تسلسل مُكمّل لتسلسل قالب الجين. يُسمّى الإنزيم المسؤول عن عمليّة النسخ RNA بوليميراز (RNA polymerase). عندما يتعلق الأمر بنسخ جين مُعيّن فإنَّ الـ RNA بوليميراز يبدأ بالعمل فقط في خلايا مُعيّنة وفي وقت مُلائم. لذلك في خليّة مُعيّنة في وضع معيّن وزمن مُعطى، لا يَنْتُج RNA من كل الجينات الموجودة فيها. الجينات التي يقوم الـ RNA بوليميراز بنسخها، بما في ذلك الجينات التي يَنْتُج منها بروتين تُسمى "الجينات التي تمّ التعبير عنها" (Expressed genes). الأهم من ذلك ليس فقط أنَّ خلية مُعيّنة لا تُعبّر عن كل الجينات الموجودة فيها، بل انَّه يوجد لكل نوع من الانواع المُختلفة لخلايا هذا الكائن الحيّ نموذج تعبير عن الجينات خاص بنوع الخلية (Unique gene expression pattern).

1. **في خليّة مُعيّنة يُمكن أنْ يتمّ التعبير عن جينات مُعيّنة ولا يتمّ التعبير عنها في خلايا أخرى.** مع ذلك هناك جينات عديدة يتمّ التعبير عنها في أكثر من نوع واحد من الخلايا، وجينات أخرى يتمّ التعبير عنها في معظم أنواع الخلايا.



תא רקמת חיפוי פנימית (אנדותל) | תאי דם
מימין תא דם לבן ומשמאל תא דם אדום. במרכז טסית דם (שאינה תא). | תא עצב

رسم 1.11: الخلايا المُختلفة الموجودة في جسم الإنسان لديها شكل مُختلف وصفات مُختلفة، يعود ذلك إلى تعبير الخلايا المُختلفة عن بروتينات مُختلفة خاصة بها

خلايا النسيج الطلائي الداخلي (خلايا الإندوتيل) التي تُبطن الأوعية الدموية، خلايا الدم والخلايا العصبية تختلف عن بعضها بالشكل، لدى كل واحدة من هذه الخلايا صفات ووظائف مُختلفة في الجسم. تُحدّد الصفات من قبل الـDNA ولكنها تتحدّد بشكل فعلي بواسطة البروتينات التي تَنْتُج في الخلايا. يُمكن أنْ نفسر أنَّ خلايا مُعيّنة تتمتع بصفات مُعيّنة تُميّزها عن غيرها بواسطة الحقيقة التي تنص على أنَّ كل خلية تحتوي على بروتينات خاصة بها فقط. من المعروف أيضًا أنَّ خلايا من أنواع مُختلفة يُمكن أن تحتوي على بروتينات متطابقة. مقياس الرسم في الصور المُختلفة ليس موحدًا. تمّ إدخال بروتين مُشع باللون الأخضر إلى الخلية العصبيّة.

2. **يُمكن أنْ يتمّ التعبير عن جينات مُعيّنة "بشدّة كبيرة" في نوع مُعيّن من الخلايا، بينما يتمّ التعبير عن هذه الجينات "بشدّة مُنخفضة" في خلايا من نوع آخر.** معنى هذا أنّه من المُمكن أن يتمّ إنتاج عدد كبير من جُزيئات الـ RNA من جين مُعيّن في خلية مُعيّنة، بينما يَنْتُج عدد قليل من جُزيئات الـ RNA من هذا الجين في نوع آخر من الخلايا.

بما أنَّ التعبير عن الجينات يتعلق بنوع الخلية، فإنّ كل خلية "مُجهّزة" بمجموعة من البروتينات الخاصة بها والتي تُمكّن الخلية من أداء الوظائف التي تُميّزها. مجموعة البروتينات الخاصة التي يتم التعبير عنها في كل خلية وخلية يُمكن أنْ تُفسِّر الاختلاف في صفات هذه الخلايا.

ظاهرة تَميُّز نوع مُعين من الخلايا بالجينات التي يتم التعبير عنها داخلها، تُثير السؤال التالي: كيف تتمّ عمليّة مُراقبة التعبير عن الجينات؟ بكلمات أخرى، كيف يتحددّ انتاج الـ RNA والبروتين الناتجان من جين مُعيّن في الخلية؟ وكيف تتحدّد كمية نواتج هذا الجين فيها؟

مُراقبة التعبير عن الجينات تتمّ على ثلاثة مُستويات:

1. عمليّات **تغيير ومُراقبة** تتمّ على **مُستوى الـ DNA**، هذه العمليّات تُحدّد زمن وكميّة نسخ الجين وإنتاج RNA منه.

2. عمليّات **تغيير ومُراقبة** تتمّ على **مُستوى الـ RNA**، بعض هذه العمليّات مسؤولة عن "مُعالجة" الـRNA مباشرة بعد إنتاجه، وبعضها الآخر يُحدّد كم من الوقت يبقى الـRNA الناتج في الخلية؟ وما هي وتيرة ترجمته إلى بروتين؟

3. عمليّات **تغيير ومُراقبة** تتمّ على مُستوى **البروتين**، هذه العمليّات مسؤولة عن إضافة مجموعات جانبيّة خاصة إلى البروتين بعد ترجمته، تُغيّر هذه المجموعات مبنى البروتين ووظائفه، ولمجموعات مُعيّنة منها وظيفة في تحديد زمن ووتيرة تفكيك البروتين.

مُراقبة التعبير عن الجينات بمستوى الـ DNA:

تتم عمليّة مراقبة التعبير عن الجينات بمستوى الـ DNA عن طريق عوامل النسخ التي تراقب عملية نسخ الـ RNA. **عامل النسخ** (Transcription factor) عبارة عن بروتين يرتبط مع الـ DNA في "**منطقة المُراقبة**" الخاصة بالجين (رسم1.12). منطقة المراقبة موجودة بالقرب من منطقة أخرى في الجين تُسمّى **"منطقة مبنى الجين"** وهي عبارة عن المنطقة التي يُنسخ بحسبها جُزيء الـRNA . يرتبط عامل النسخ بتسلسل DNA مُحدّد ومُميّز مكوّن من 6-20 قاعدة، يُعرف هذا التسلسل باسم **موقع الربط** (Binding site). يحتوي عامل النسخ على جُزئين بروتينيْن أساسييْن، حيث يرتبط أحدهما بموقع الربط ولذلك يُسمّى "الجُزء الرابط للـ DNA" (DNA binding domain). يعمل الجُزء المركزي الآخر لعامل النسخ بشكل مُباشر على " تفعيل الـ DNA

بوليميراز" (رسم 1.12). يرتبط عامل نسخ مُعيّن بتسلسل الـ DNA الذي يُشكّل موقع الربط الخاص به، هذا الموقع يُمكن أنْ يظهر في منطقة مُراقبة مجموعة صغيرة من الجينات (أُنظروا إلى سؤال 7.7 أيضًا).

يقوم عامل النسخ بتفعيل الـ RNA بوليميراز حيث أنَّه يُمكّن الـ RNA بوليميراز من الوصول بدقة إلى موقع بداية النسخ، ويُسهّل بداية عمله بنسخ الـ DNA (رسم 1.13 أ'). يقوم عامل النسخ بذلك بواسطة تغيير مبنى ووظيفة بروتينات موجودة في منطقة بداية النسخ. خلال عملية النسخ يتعرف الـ RNA بوليميراز على النوكليوتيدات الموجودة في الـ DNA، ويُضيف مقابل كل نوكليوتيد في الـ DNA نوكليوتيد مُكمّل يحتوي على سكّر ريبوز ("نوكليوتيد RNA") (رسم 1.13 ب'). مثلًا، مُقابل الأدنين (A) الموجود في الـ DNA يُضيف الـRNA بوليميراز قاعدة يوراسيل (U) مُكمِّلة، مُقابل C الموجودة في الـ DNA يُضيف G وهكذا. يقوم الـ RNA بوليميراز بربط النوكليوتيدات المُكمّلة ببعضها بأربطة فوسفو دي إستيرية. هكذا نحصل على بوليمير من النوكليوتيدات التي تحتوي على الريبوز (RNA)، ذا تسلسل مُكمّل لتسلسل النوكليوتيدات الموجود في الجين.

عامل النسخ الفعّال المُرتبط بموقع الربط الخاص به والموجود في منطقة مُراقبة الجين يُمكّن الـ RNA بوليميراز من العمل مرّة تلو الأخرى بهدف نسخ الجين بشكل مُتكرّر. بعد هذه المُساهمة لعامل النسخ، نحصل على نُسخ كثيرة من الـ RNA أي من ناتج الجين.

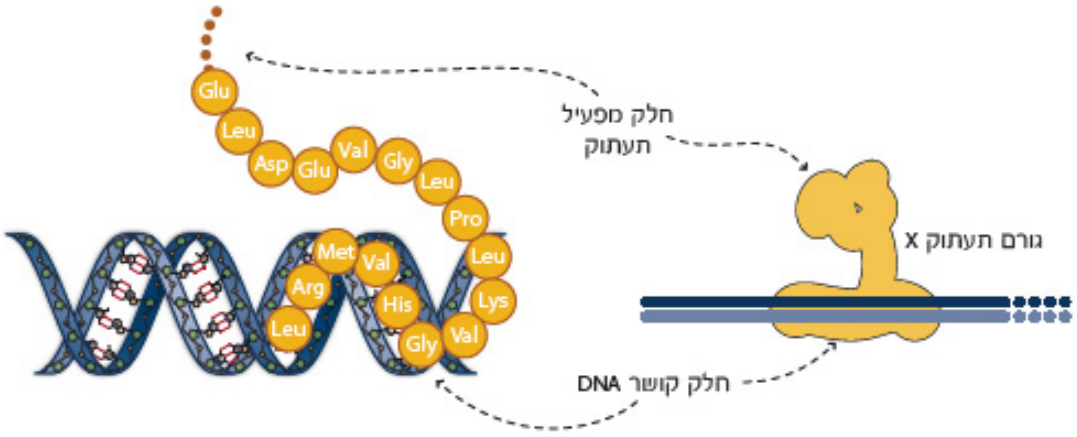
يُمكن أنْ نجد في الخلية جينات لا يتمّ التعبير عنها. ما هو التفسير المُمكن لهذه الحقيقة؟ مثلًا، يُمكن أنْ لا يتواجد عامل نسخ مُعيّن في خلية مُعيّنة، لذلك لا يتمّ التعبير عن الجينات التي تحتوي على موقع ربط لعامل النسخ المذكور. من المُمكن أيضًا أنْ يتمّ التعبير عن عامل نسخ مُعيّن في الخلية، ولكن يكون هذا العامل موجود في وضع غير فعّال، حيث أنَّه لم يمرّ **"بتغيير في المبنى"** ليتمكّن من الارتباط بموقع الربط وبالتالي لا يتمّ تفعيل الـ RNA بوليميراز. في بعض الأحيان يكون حدوث هذا التغييرفي المبنى مُتعلقًا بحدوث تغيير في بيئة الخلية. هكذا وفي أعقاب التغيير في بيئة الخلية يتحوّل عامل النسخ غير الفعّال إلى عامل نسخ فعّال، ويتم نسخ الجينات التي كانت "ساكنة" قبل حدوث هذا التغيير. نواتج هذه الجينات تُساعد الخلية في التعامل مع التغيير الذي حدث في بيئة الخلية.

عمليّات التغيير والمُراقبة بمستوى الـRNA:

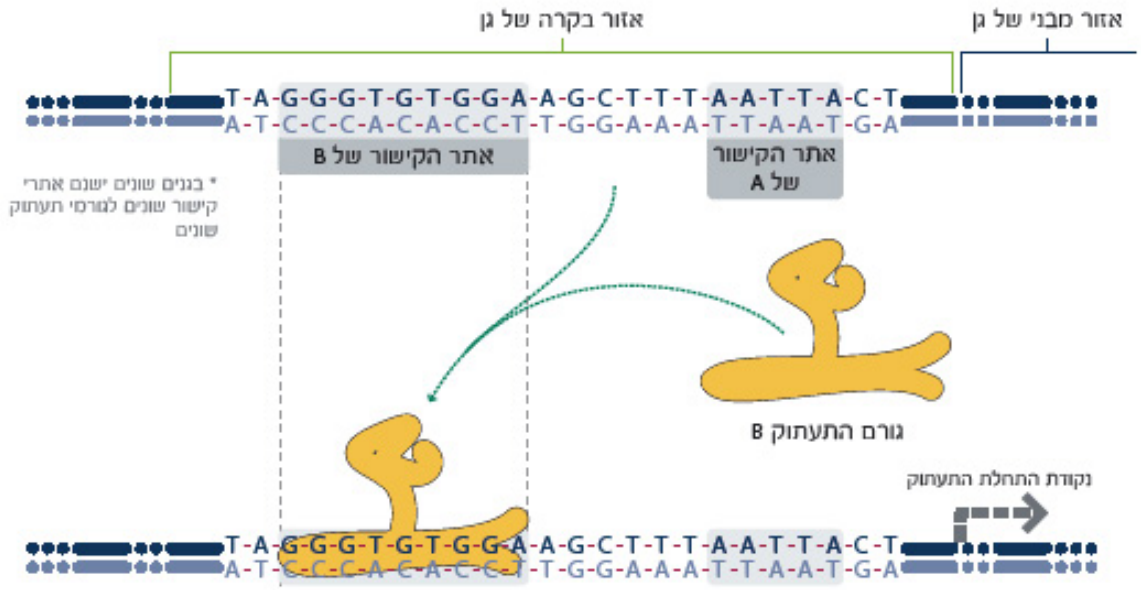
في الخلايا حقيقيّة النواة تَنْتُج جُزيئات الـ RNA التي تُشفِّر إلى بروتينات في نواة الخلية بواسطة عمليّة النسخ. جُزيء الـ RNA الذي يُشفِّر إلى بروتين، والذي نَتَج لتوّه في النواة يتكوّن من تسلسلات قواعد تُسمى **إكسونات** (Exons)، وتسلسلات قواعد تُسمّى **إنترونات** (Introns). كما نُلاحظ في الرسم 1.14 أ '، يفصل إنترون بين كل اكسونين، وبالعكس. الإنترونات هي تسلسلات RNA لا تشترك في التشفير إلى البروتين.

يُسمّى الـ RNA الذي يخرج إلى السيتوبلازم من أجل ترجمته إلى بروتين RNA رسول، وهو RNA خالي من الإنترونات. كذلك الـ RNA الرسول الناتج بعد عملية الوصل يحتوي على تسلسلات لا تُشفِّر إلى بروتين أيضًا. تتواجد هذه التسلسلات على أطراف الـ RNA ولها وظائف مُراقبة مُختلفة تحدّد وتيرة ترجمة ووتيرة تفكيك الـ RNA الموجود في السيتوبلازم.

أ. مبنى عامل النسخ وأشكال مُختلفة تعرض ارتباطه بالـ DNA



ב. عامل نسخ خاص يرتبط بتسلسل DNA مُعيّن موجود في منطقة المراقبة، يُسمّى هذا التسلسل بموقع الربط



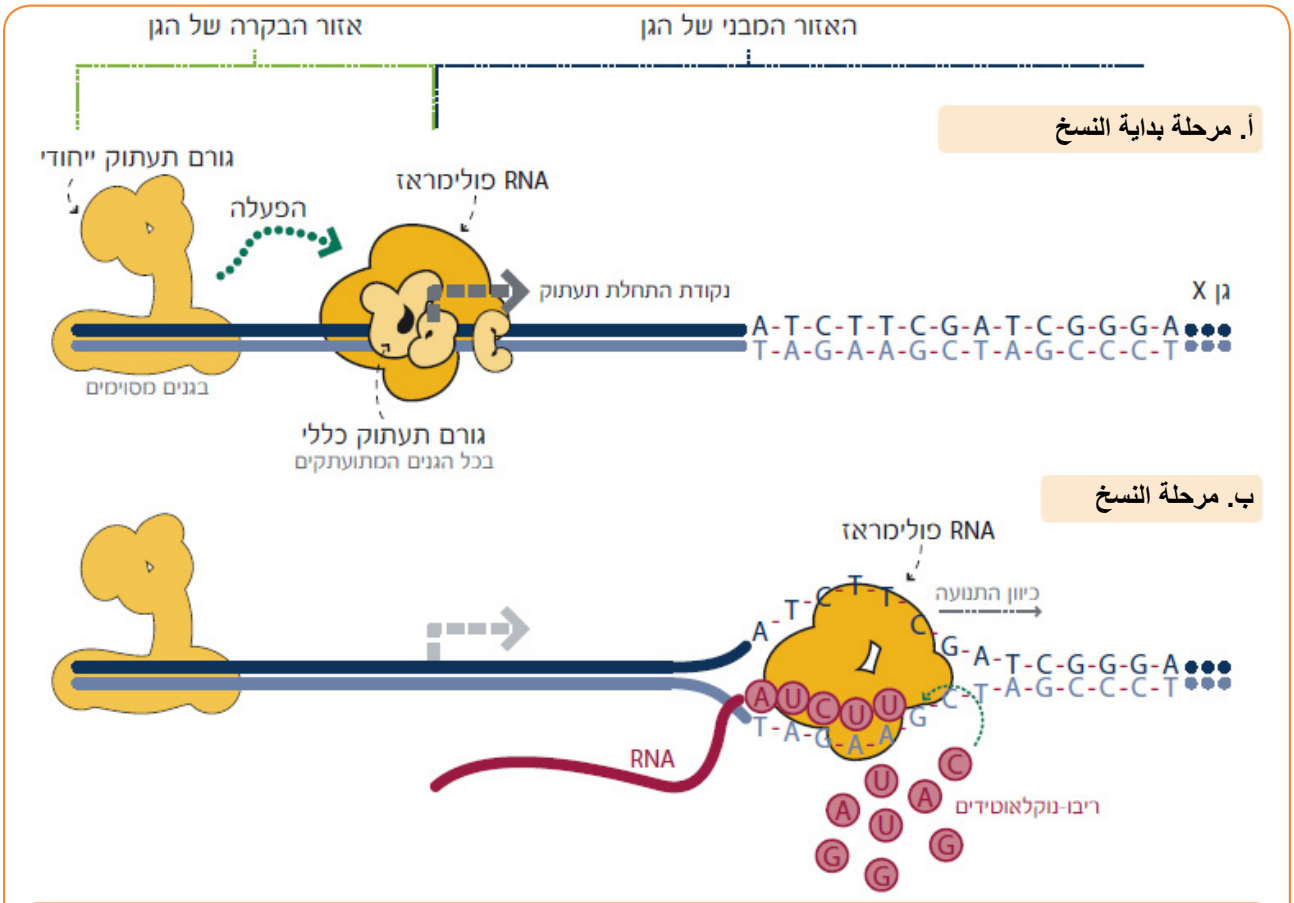
رسم 1.12: مبنى عامل النسخ وعرض طريقة ارتباطه بموقع الربط الخاص به والموجود في منطقة مُراقبة الجين

لدى عامل النسخ جزيئَيْن أساسيَيْن: جُزء رباط للـ DNA وجُزء يفعّل عمليّة النسخ. يتمّ ربط عامل النسخ بالـ DNA في تسلسل DNA خاص يُسمّى موقع الربط. **موقع الربط** لعامل النسخ موجود في منطقة مُراقبة الجين. ترتبط عوامل النسخ المُختلفة بمواقع ربط ذات تسلسلات مُختلفة. موقع مُراقبة الجين يحتوي على مجموعة من مواقع الربط المُختلفة لعوامل نسخ مُختلفة.

الإنترونات هي تسلسلات غير موجودة في جُزيئات الـ RNA التي تخرج من النواة إلى السيتوبلازم، حيث تتمّ إزالة هذه التسلسلات في عمليّة خاصة تُعرف بإسم عمليّة **القطع والوَصْل** (שחבור-Splicing). في هذه العمليّة يتمّ ربط تسلسلات الإكسونات ببعضها. المعلومات التي تُترجم إلى بروتينات يُمكن أنْ تكون موّزّعة على عدّة إكسونات، لذلك بعد إزالة الإنترونات تتواجد الكودونات التي تحمل هذه المعلومات الواحد بجانب الآخر على شكل مجموعة واحدة. فقط جُزيئات الـ RNA الخالية من الإنترونات من لحظة إنتاجها أو تلك التي أُزيلت منها الإنترونات يُمكنها أنْ تمرّ بعملية ترجمة صحيحة.

لاستيعاب المصطلحات "إنترون" و "إكسون"، استعِن بالأهميّة الوظيفيّة للمناطق المُختلفة الموجودة في الـ RNA، الـ Intron يبقى في داخل (Intra) النواة بعد عمليّة القطع والوَصْل (مصيره التفكك)، أمّا الـ Exon فيخرج إلى الخارج (Exit) إلى السيتوبلازم بهدف ترجمته إلى بروتين.

عمليّة القطع والوصل ليست عمليّة موحدة، فجُزيئات الـ RNA الناتجة من جين مُعيّن يُمكن أنْ تمرّ بعمليات مُعالجة مُختلفة. بالإضافة إلى عمليّة "الوَصْل العادي" التي تتمّ خلالها إزالة كل الإنترونات وفقط الإنترونات، من الممكن أنْ تمرّ نُسخ الـ RNA بعمليّة "وَصْل بديل". في عمليّة الوَصْل البديل تتمّ إزالة إكسون أو إكسونات بالإضافة إلى إزالة الإنترونات (رسم 1.14ب').



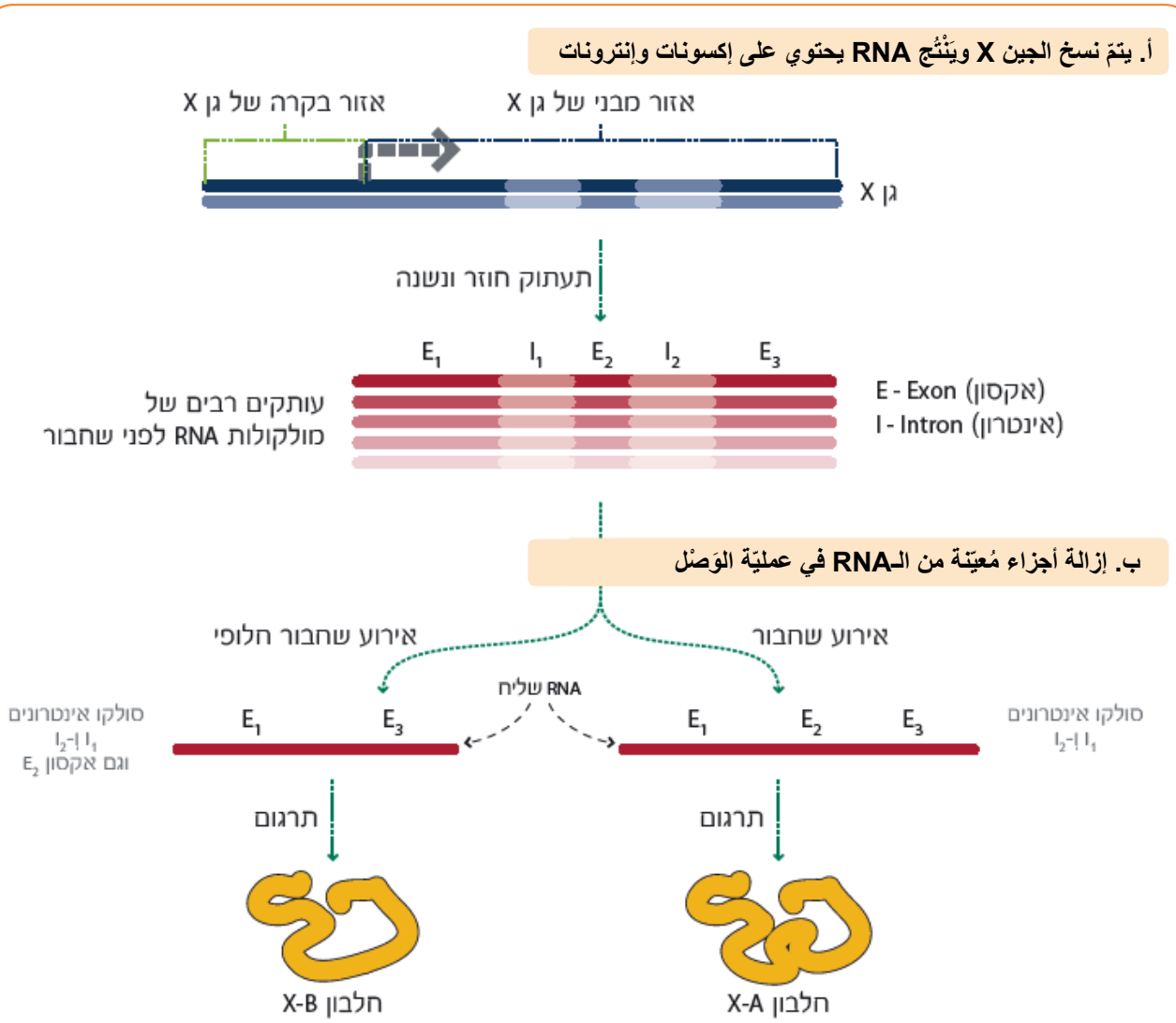
رسم 1.13: عامل النسخ يُفعّل الـRNA بوليميراز ليبدأ بنسخ الجين وإنتاج RNA

أ. عامل النسخ يقوم بتفعيل الـ RNA بوليميراز حيث يُمكّنه من الوصول بدقة إلى نقطة بداية عمليّة النسخ مما يُسهّل عمله.

ب. عمليّة النسخ تتمّ بواسطة RNA بوليميراز، فهو يقوم بإنتاج RNA أحادي الجديلة بحسب المعلومات الموجودة في إحدى جدائل الـ DNA التابعة للجين. تسلسل القواعد في جديلة الـ RNA مُكمّل لتسلسل القواعد الموجود في جديلة قالب الـ DNA.

الوَصْل البديل (שחבור חלופי - Alternative splicing) يُعرَّف بأنَّه عمليّة يتمّ فيها إنتاج عدّة أنواع من الـ RNA الرسول من نفس الجين. هذا الأمر مُمكن، لأنَّه يُمكن أنْ تتمّ إزالة مقاطع مُعيّنة من نسخة مُعيّنة من جُزيء الـ RNA، بينما لا تتمّ إزالة هذه المقاطع من نُسخةٍ أخرى من جُزيء الـ RNA الذي نَتَج هو أيضًا من نفس الجين. في حالة نموذجية من عمليّة الوَصْل والوَصْل البديل نحصل على جُزيئات RNA مُختلفة (عادة ذات طول مُختلف)، حيث تحوي معلومات تتمّ ترجمتها إلى بروتينات تسلسلها مُختلف أيضًا. وظائف هذه البروتينات، نواتج نفس الجين يُمكن أنْ تكون مُختلفة أيضًا، وفي بعض الأحيان مُتعاكسة. هذا الوضع الذي بحسبه يقوم جين مُعيّن (في أعقاب النسخ والوصل البديل) بالتشفير إلى بروتينات مُختلفة شائع جدًّا.

حدوث عمليّات الوَصْل والوَصْل البديل تُشير إلى انَّ عمليّات الوَصْل ليست تعقيدًا لا حاجة له. هذه العمليّات تُساهم في إحداث تنوّع بين جُزيئات الRNA الناتجة من نفس الجين، وهكذا يُمكن أنْ يَنْتُج من جين واحد تشكيلة من البروتينات المهمة.



رسم 1.14: عمليّة الوَصْل وعمليّة الوَصْل البديل ونواتجهما

لا يوجد تمثيل لكل منطقة مبنى الجين في جُزيء الـ RNA رسول، يَنْتُج هذا الأمر بسبب إزالة الإنترونات من الـ RNA الناتج خلال عمليّة الوَصْل. عمليّات الوَصْل البديل تؤدّي إلى إنتاج عدّة أنواع من RNA رسول من نفس الجين، ويُترجم كل نوع من الـ RNA إلى بروتين مُختلف. البروتينات المُختلفة الناتجة من نفس الجين يُمكن أنْ تكون لديها وظائف مُختلفة.

عمليّات التغيير والمُراقبة التي تتمّ خلال تحويل الـ RNA إلى بروتين

فقط القليل من الجينات الموجودة في الخلية (عدّة آلاف في الخلية البشرية) يتمّ التعبير عنها في وضع مُعطى. بالرغم من ذلك، بعد أنْ تَنْتُج جُزيئات RNA من بعض الجينات الموجودة في الجينوم، يُمكن أنْ يصل عدد البروتينات المُختلفة الموجودة في الخلية إلى عدد أكبر بألف مرّة من عدد الجينات التي تمّ التعبير عنها. يعود الفضل بهذا إلى عدّة عمليّات تغيير ومُراقبة تتمّ على مُستوى الـ RNA والبروتين. كما يظهر في الرسم 1.15، من جين واحد وبعد حدوث عمليّة الوَصْل البديل، يُمكن أنْ نحصل، تقريبًا، على 10 أنواع مُختلفة من جُزيئات الـ RNA رسول. في غالبية الحالات يَنْتُج من كل جُزيء RNA عند الإنسان بروتين واحد، لكن في أعقاب حدوث عمليّة الوَصْل البديل يصبح عدد البروتينات المُختلفة الناتجة أكبر من ذلك بـ 10 مرّات. هذا ليس نهاية الأمر، فالبروتينات المُختلفة يُمكن أنْ تتغيّر بواسطة "إنزيمات تغيير" مُختلفة. نقصد بالاسم العام "إنزيمات تغيير" مجموعة من البروتينات المسؤولة عن إضافة فوسفات، مجموعات سُكريّة، جُزيئات بروتينيّة صغيرة كاليوبيكويتين (אוביקוויטין) وغيرها إلى جميع بروتينات الخلية تقريبًا. بسبب هذه التغييرات يُمكن أنْ تتواجد نسخ البروتين الناتجة من جُزيء RNA واحد بأشكال وصور مُختلفة. يُقدّر عدد البروتينات الناتجة من جُزيء RNA واحد بعد عمليّة الترجمة وعمليّات التغيير التي يمرّ بها البروتين بما يُقارب 100 بروتين مُختلف، ولكل واحد من هذه البروتينات وظيفة خاصة به. هكذا، إذا فرضنا أنَّ هناك تقريبًا 6000 جين مُشفِّر إلى بروتين في خلية بشريّة مُعيّنة، معنى هذا أنّها نقطة الإنطلاق لإنتاج ما يُقارب 6 ملايين من البروتينات ومُشتقاتها التي تُمكِّن من إثراء تشكيلة وظائف البروتينات (الرسم 1.15ب').

في حين أنَّ عمليّة الوَصْل البديل التي تتمّ على مُستوى الـRNA، وعمليّات التغيير التي تتمّ على مُستوى البروتين تُساهم في وجود تشكيلة هائلة من البروتينات، هناك عمليّات مُراقبة تقوم بتنظيم زمن وشدّة التعبير عن الجينات. هكذا، عندما ينتج الـRNA ويمرّ بعمليّة وَصْل بديل، يكون هذا الـ RNA الرسول خاضعًا لتأثيرجُزيئات RNA أخرى، التي تستطيع إعاقة ترجمته أو حتى تُسبب تفكيكه (فصل 8). الـ RNA الرسول خاضعًا أيضًا لتأثير إنزيمات أخرى مسؤولة عن تفكيكه (RNases). الـ RNA الذي يستطيع الصمود أمام عمليّات المُراقبة المذكورة، يكون مؤهلًا للمرور بعمليّة الترجمة، إنَّ زمن ترجمة جُزيء RNA مُعيّن ووتيرة ترجمته يُمكن أنْ تكون هي أيضًا مُراقبة بواسطة جُزيئات RNA أو بروتينات مُعيّنة. فقط في نهاية هذه "السلسلة من العقبات" يَنْتُج البروتين.

أخيرًا، ليس هناك بروتين أبدي: هناك بروتينات وظيفتها تفكيك بروتينات أخرى. تفكيك البروتينات في الوقت المناسب يضمن من جملة الأمور، أنْ تكون كميّة البروتينات الموجودة في الخلية مساوية للكمية المطلوبة من هذه البروتينات. كل انحراف عن الكمية الضرورية من بروتين مُعيّن يُمكن أنْ يضر بوظائف الخلية.

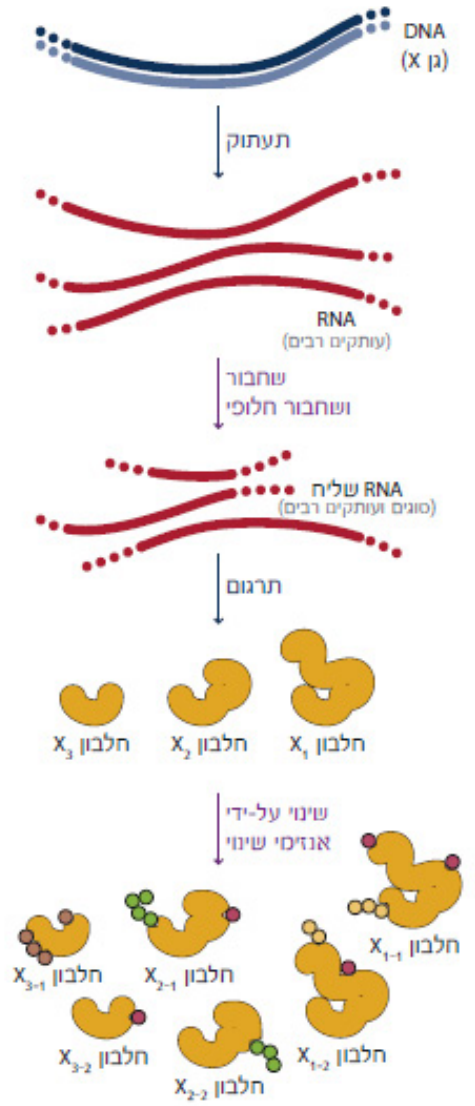
كان العالم جينتشون من مؤسسي مركز الأبحاث جينيطونون. وقد قام بإجراء بحث رائد على البكتيريا في الفترة التي لم تُعرف فيها وظائف الـ DNA في تحديد الصفات.

عرف جينتشون أن البكتيريا تستطيع "السباحة " وقرر أن يفحص أهمية الـ DNA لنشاط البكتيريا.

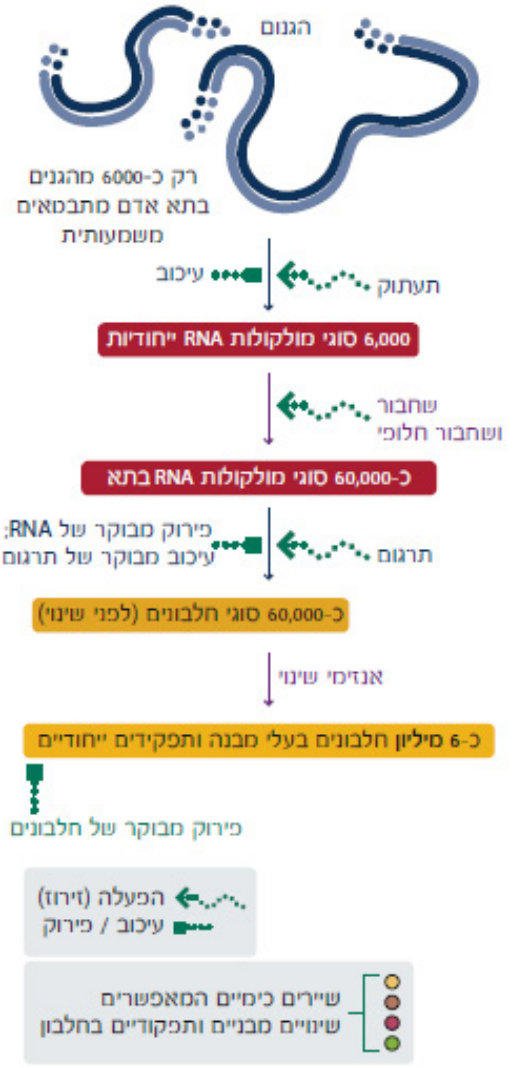
عندما قام بإخراج رُبع الـ DNA من البكتيريا وأمر البكتيريا "بالسباحة"، فعلت البكتيريا ذلك. وعندما قام بإخراج ربع آخر من الـ DNA وأمرها "بالسباحة"، فعلت ذلك أيضًا. أما عندما قام بإخراج كل الـ DNA من البكتيريا وأمرها "بالسباحة"، لم تستطع ذلك.

يوريكا!! صرخ جينتشون، بكتيريا بدون الـ DNA لا تسمع! أسرع جينتشون وسجّل ذلك في دفتر نتائجه...

أ. جين واحد يُنْتِج بروتينات عديدة:
آليّات الإنتاج وآليّات التغيير



أ. من الجينوم إلى البروتيوُوم:
مُساهمة آليّات الإنتاج، التغيير والمُراقبة في الحصول على تشكيلة هائلة من البروتينات في الخليّة



رسم 1.15: عمليّات جُزيئيّة تحدُث في الخلايا البشريّة في مسار تحويل الجين إلى RNA ثمّ إلى بروتين

هناك عمليتا إنتاج أساسيتان تحدثان على طول مسار إنتاج البروتين بالاعتماد على المعلومات الموجودة في الجينات: عملية النسخ وعملية الترجمة. توجد أيضًا عمليتا تغيير تقومان بتصميم جُزيئات الـ RNA والبروتينات: عمليّة الوَصْل وعملية إضافة مجموعات كيميائيّة بواسطة إنزيمات التغيير. تضمن عمليّات الإنتاج والتغيير وجود تشكيلة هائلة من البروتينات ومُشتقاتها في الخليّة، هذه التشكيلة أكبر 1000 مرّة تقريبًا من عدد الجينات التي يتمّ التعبير عنها. تتمّ عمليّة مُراقبة زمن إنتاج البروتينات، كميّة إنتاجها وعمليّات التغيير التي تحدُث لها، من خلال عمليّات مُراقبة إيجابيّة وسلبيّة. السهم الأخضر، في الرسم، يُشير إلى تحفيز(تفعيل) والسهم الأخضر المغلق يُشير إلى إعاقة عمليّات الإنتاج أو التغيير. مسؤولية تحفيز أو إعاقة عمليّات الإنتاج والتغيير تتمّ بواسطة بروتينات وجُزيئات RNA ذات وظائف إنزيميّة معروفة.

من البيوتكنولوجيا التقليديّة إلى البيوتكنولوجيا العصريّة التي تعتمد على الهندسة الوراثيّة

ذُكر في سفر التكوين أنَّ سيدنا نوح الذي كان يعمل مُزارعًا، غرس كرمًا بعد زوال الطوفان "וישת מן היין וישכר". هذه القصة التي وردت في التوراة هي بدون شك شهادة أوليّة على العمل بمجال البيوتكنولوجيا التقليديّة. حدث كل هذا قبل أنْ نفهم كيف يتحول السكَّر الموجود في العنب إلى كحول بمساعدة الكائنات الحيّة الدقيقة كالبكتيريا والخمائر. خلال آلاف السنين، شمل العمل في مجال البيوتكنولوجيا التقليديّة إنتاج العديد من المُنْتَجات، مثل: الأجبان، البيرة (العجة) والعجين الذي استُخدم لصنع الخبز والكعك.

تُعرَّف البيوتكنولوجيا بإنها مُجمل العمليّات الكيميائيّة، البيولوجيّة، الوراثيّة والهندسيّة التي تُمكِّن من استغلال الكائنات الحيّة ومُكوناتها لفائدة الإنسان. كذلك تُعتبر الكائنات الحية التي نتجت نتيجة لعمليّات التحسين الوراثي الذي تدخل فيه الإنسان، منتوجات بيوتكنولوجيّةً أيضًا. بالإضافة إلى ذلك، أتاحت البيوتكنولوجيا التقليديّة استعمال الكائنات الحية لإنتاج الأدوية، وفي الواقع فإنّ أحد إنجازات البيوتكنولوجيا التقليدية هو استخلاص الإنسولين من بنكرياس حيوانات مُختلفة كالأبقار والخنازير لمعالجة مرضى السكّريّ.(صندوق1.2).

الكائن الحي ليس فقط حيوان بل يُمكن أنْ يكون أيضًا نبات، فطر أو حتى بكتيريا. مصدر الاسم جاء من اللغة اليونانيّة organon والتي تعني أداة أو جهاز. الكائن الحي في مجال البيولوجيا يعني مجموعة جُزيئات تؤثّر الواحدة على الأخرى، تتجمع هذه الجزيئات في جهاز كامل لديه مميّزات الحياة.

رافق استخدام الإنسولين المُستخلص من الحيوانات في علاج مرض السكّريّ (رسم 1.16أ') مشاكل صحيّة واقتصاديّة عديدة، كان بالإمكان حل هذه المشاكل الصحيّة عن طريق استخلاص إنسولين بشري واستخدامه لعلاج المرضى. لأول مرة، في سنة 1978 استخلص إنسولين بشري من بكتيريا أُلزمت بإنتاجه. لقد تمّ شق الطريق أمام هذا الإنجاز بفضل نقل الـDNA البشري الذي يُشفِّر إلى الإنسولين إلى داخل البكتيريا (رسم 1.16ب').

الإنسولين البشري الذي يُنْتَج في البكتيريا، الخميرة، في خلايا القوارض أو حتى في الخلايا النباتيّة، هو بدون أدنى شك أحد رموز البيوتكنولوجيا العصرية. البيوتكنولوجيا العصريّة تستغل تقنيّات الهندسة الوراثيّة لنقل الـ DNA (بما في ذلك الجينات) من كائن حي مُعيّن، بهدف التعبير عنه داخل كائن حيّ آخر(أُنظر إلى المثال في الرسم 1.16ب'). حتى يتمّ التعبير عن الـ DNA التابع للكائن "المُتبرع" داخل كائن حيّ آخر يتمّ إنتاج تركيبة جديدة من الـDNA. يتمّ ربط الـ DNA المُشفِّر إلى البروتين المطلوب (الذي يشترك بتحديد الصفة المطلوبة)، والذي حصلنا عليه من "الكائن الحيّ المُتبرع"، بالـ DNA الذي يحتوي على منطقة مُراقبة مُناسبة للتعبير عنه داخل "الكائن الحيّ المُستقبل". يتمّ إدخال ناتج الربط الريكومبننتي إلى الكائن الحيّ "المُستقبل" الذي يقوم بدوره بالتعبير عن هذا الـ DNA.

الهندسة الوراثيّة تُتيح إنتاج تركيبات جديدة من الـ DNA. من أجل إنتاج هذه التركيبات الجديدة، يجب أولًا أنْ نقطع الـ DNA الذي حصلنا عليه من مصادر مُختلفة. بعدها نُتيح ربط الـ DNA من أحد المصادر (مثلاً من كائن واحد) مع الـ DNA من المصدر الآخر (مثلًا كائن آخر). هذه التقنيّة الأساسيّة التابعة لتقنيات الهندسة الوراثيّة مُمكنة بسبب وجود تركيب ومبنى موحّد للـ DNA لدى جميع الكائنات الحيّة، وحتى عند فيروسات مُعيّنة أيضًا. تُسمّى هذه التقنيّة بتقنيّة الـ DNA الريكومبننتي (Recombinant DNA). معنى هذا الاسم هو دمج من جديد لـDNA من مصادر مُختلفة.

صندوق 1.2: مرض السكّريّ والانسولين

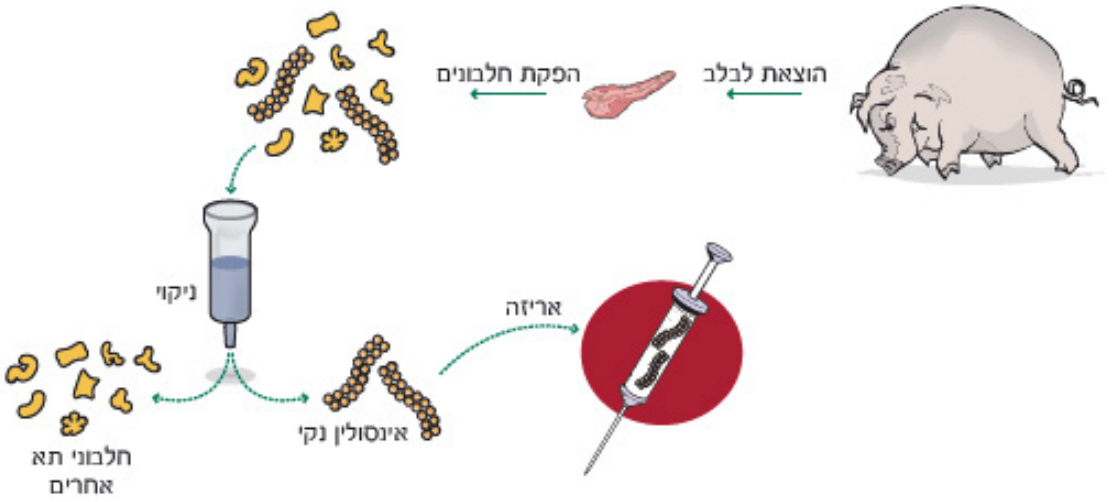
يعاني مرضى السكّريّ من مستوى مرتفع من الجلوكوز في الدم، مما يضرّ بصحتهم بشكل كبير. السكّريّ هو مرض مُنتشر فنسبة المرض به والموت بسببه بارتفاع مستمر. يُشكل هذا المرض في الولايات المتحدة في القرن الـ21 وباء حقيقيًا: بحسب مُعطيات سنة 2007، يُعاني 25 مليون إنسان من مرض السكّريّ (تقريبًا 10% من سكان الولايات المُتحدة)، في الولايات المُتحدة، يموت ما يُقارب رُبع مليون إنسان سنويًا بسبب هذا المرض. تُنسب هذه المعطيات المُرعبة في الأساس إلى زيادة التغذية غير السليمة والنشاط البدني غير الكافي.

عندما نتناول الطعام يرتفع مستوى الجلوكوز في الدم. "تشعر" خلايا β الموجودة في البنكرياس (Pancreas) بالتغيير في مستوى الجلوكوز في الدم، فتقوم بإفراز هورمون الإنسولين. عندما يصل الإنسولين إلى الكبد يقوم بكبح إنتاج الجلوكوز فيه، أمّا عندما يصل إلى الأنسجة العضليّة أو الدهنيّة، فيقوم بمُساعدة خلايا هذه الأنسجة على استيعاب الجلوكوز الموجود في الدم إلى داخلها. الجلوكوز ضروري في هذه الخلايا لاستخراج الطاقة ولبناء الكربوهيدرات، الدهون والبروتينات.

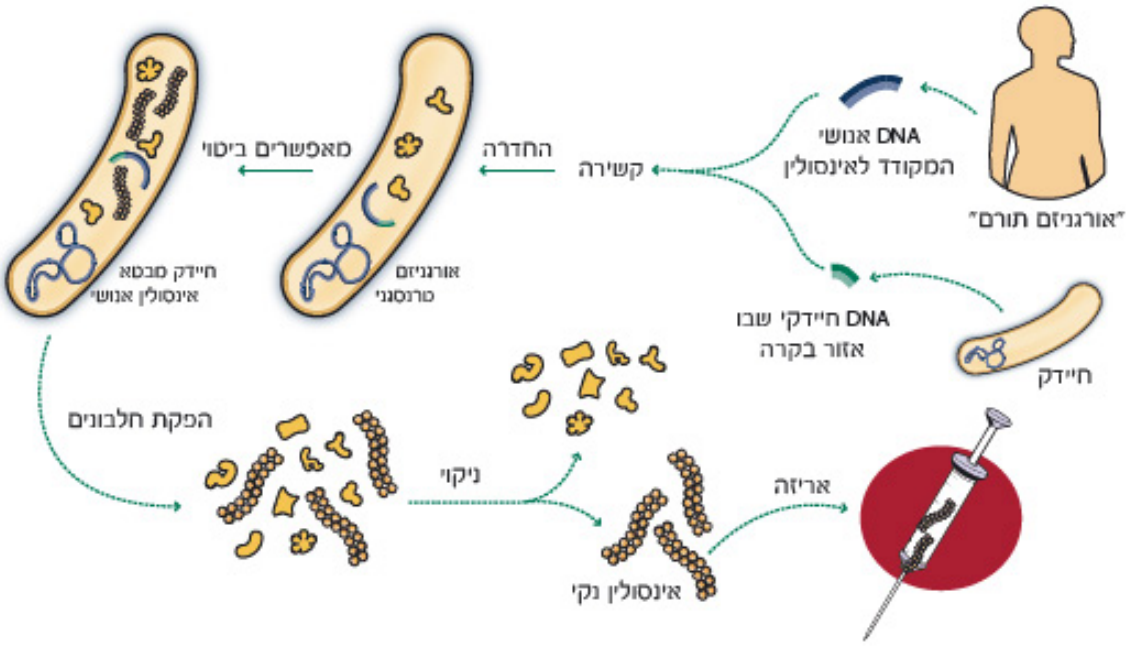
هناك نوعان من مرض السكّريّ ، يُشكّل مرضى السكّريّ من النوع 1 ما يُقارب 5% من مُجمل مرضى السكّريّ. البنكرياس لدى هؤلاء المرضى لا يستطيع إنتاج كميّة كافية من الإنسولين. إذا كان هناك نقص في الإنسولين في الدم، وبما أنَّ الإنسولين ضروري لتقوم الخلايا باستيعاب الجلوكوز سيرتفع مستوى الجلوكوز في الدم. لدى هؤلاء المرضى "ستجوع" الخلايا إلى الجلوكوز، لأنَّه لا يستطيع الدخول إلى الخلايا. بالمُقابل فإن مرضى السكّريّ من نوع 2، الذين يُشكلون 95% من مرضى السكّريّ، يُنتجون كميّة كافية، بل تزيد عن المطلوب، من الإنسولين، لكن خلايا الجسم لديهم لا تستطيع استغلال الإنسولين بشكل سليم من أجل القيام بعملها. أي أنّ جسم مرضى السكّريّ من النوع 2 مُقاوم نسبيًّا للإنسولين.

حتى سنوات الـ20 من القرن العشرين كان الموت مصير مرضى السكّريّ من النوع 1، وكانوا عادة من الأطفال. لكن في بداية القرن العشرين نجح فريدريك بانتنج (Frederick Banting) بإنقاذ حياة كلاب مريضة بالسكّريّ بواسطة حقنهم بمُستخلص بروتيني استخلصه من البنكرياس. خلال فترة زمنيّة قصيرة استعملت مُستخلصات بنكرياس الأبقار والخنازير لاستخلاص الإنسولين النقي لعلاج الإنسان، وقد استُخدم الإنسولين لإنقاذ حياة مرضى السكّريّ من النوع 1. عندما يزداد وضع مرضى السكّريّ من النوع 2 سوءً تتلف خلايا البنكرياس لديهم ويحدُث نقص في الإنسولين في أجسامهم، لذلك يحتاجون إلى الانسولين كعلاج أيضًا.

أ. البيوتكنولوجيا التقليديّة: استخلاص الإنسولين من الحيوانات



ב. البيوتكنولوجيا التي تعتمد على الهندسة الوراثيّة: إنتاج الإنسولين البشري داخل البكتيريا واستخلاصه منها.



رسم 1.16: استخلاص وتنقية الإنسولين بواسطة عمليّات بيوتكنولوجية

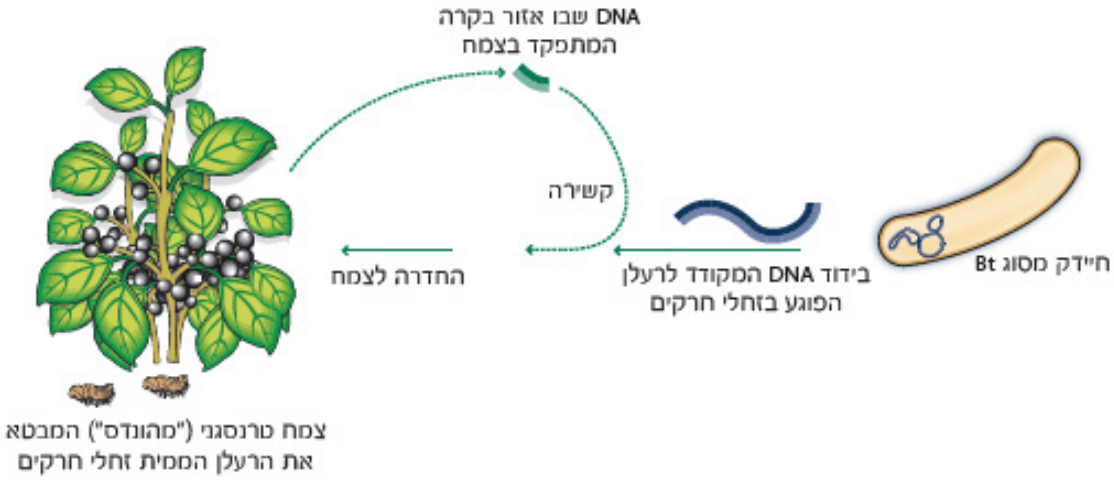
أ. كان استخلاص الإنسولين من بنكرياس الحيوانات، بين السنوات 1922-1980، أحد الانجازات البارزة للبيوتكنولوجيا التقليديّة.

ب. تُمكِّن تقنيّة الـ DNA الريكومبيننتي من إنتاج تركيبات جديدة من الـ DNA بهدف التعبير عن DNA من كائن حيّ معيّن في كائن حيّ آخر. إذا رغبنا بالتعبير عن بروتين بشري مُعيّن داخل بكتيريا، نقوم بربط الـ DNA البشري المُشفِّر لهذا البروتين بمنطقة مُراقبة تابعة للبكتيريا. بعد إدخال التركيبة الجديدة من الـ DNA (DNA إنسان - بكتيريا) إلى البكتيريا، تُتيح عوامل النسخ الموجودة داخل البكتيريا التعبير عن الـ DNA البشري وإنتاج البروتين البشري. وفي النهاية يتمّ استخلاص البروتينات التي أُنتجت بتقنيّات الـ DNA الريكومبيننتي من البكتيريا، ومن ثمّ تتمّ تنقية هذه البروتينات.

كما ذكرنا، تركيبات الـ DNA الجديدة التي تُشفِّر إلى بروتينات (التي تُعتبر أدوية)، تُنقل إلى الكائن الحي المرغوب، الذي يُشكّل "مصنع لإنتاج البروتينات". هذا الأمر يُمكّن من الحصول على تشكيلة من البروتينات البشريّة بجودة عاليّة. الإمكانيّات الكامنة في الهندسة الوراثيّة تُمكّن أيضًا من استغلال تركيبات DNA جديدة، من أجل منح كائن حيّ مُعيّن صفات جديدة تحسّن من صفاته (رسم 1.17). يُسمّى الكائن الحيّ الذي يستقبل جين من كائن حيّ مُتبرع ويُعبّر عنه داخل جسمه **بكائن ترانسجيني أو متحوّل وراثيًا** (Transgenic organism). في بعض الأحيان يُطلق عليه اسم "كائن مُهَنْدَس وراثيًّا". أمّا الجين الذي يدخل إلى الكائن الحيّ الترانسجيني ويُعبّر عنه داخله يُسمّى **ترانسجين**.

أ. أسس عمليّة التحسين الوراثي بواسطة الهندسة الوراثيّة

ב. מثال على تحسين وراثي في النباتات: إنتاج نباتات صامدة أمام حشرات بواسطة جين مصدره من البكتيريا



רسم 1.17: عمليّات التحسين الوراثي للكائنات الحية بواسطة الهندسة الوراثية

في التحسين الوراثي العصري للكائنات الحيّة يتمّ استغلال تقنيّة الـ DNA الريكومبننتي، وهي تعتبر التقنية المركزيّة من تقنيّات الهندسة الوراثيّة. أوّلًا، نقوم بإيجاد الـ DNA المُشفِّر إلى البروتين الذي يمنح الصفة المطلوبة في "الكائن الحيّ المُتبرع"، ثمّ نقوم بربط هذا الـDNA بـDNA آخر يعمل كمنطقة مُراقبة في "الكائن الحيّ المُستقبل". يتمّ إدخال تركيبة الـ DNA الجديدة الناتجة (الـDNA الريكومبننتي) إلى "الكائن الحيّ المُستقبل" الذي يقوم بالتعبير عن الـ DNA الذي أُدخل إليه. البروتين الناتج يمنح صفة مُحسنّة أو صفة جديدة ذات قيمة بيوتكنولوجيّة. حتى الآن تمّ إنتاج نباتات ترانسجينيّة عديدة تُعبّر عن جينات من بكتيريا، من نباتات أخرى أو حتى جينات بشريّة.

حتى الآن، يظهر أنَّ استغلال تشكيلة الكائنات الحيّة التي أُنتجت بطرق الهندسة الوراثيّة لأهداف زراعيّة وطبيّة هو تعبير عن القدرة الهائلة الكامنة في هذا المجال. الطموح لإيجاد علاج للأمراض ولإنتاج نباتات ترانسجينيّة يُمكنها أنْ توفِّر غذاء ذا جودة أكبر لسكان هذا العالم، يُشجع البحث في مواضيع عديدة. أحد مجالات البحث والتطبيق الأساسيّة الذي يحتاج إلى مجال الهندسة الوراثيّة هو المجال الذي يبحث في إيجاد وظائف الجينات وتحديد الجينات التي تملك أهميّة بيولوجيّة، زراعيّة، طبيّة وإقتصاديّة. فقط عندما نعرف وظيفة الجين يُمكن أنْ نقوم باستغلاله من أجل انتاج الأدوية أو من أجل تحسين صفات الكائن الحي. نحن لانزال في بداية الطريق لتحديد وظائف الجينات، ولاتزال الطريق طويلة أمامنا حتى نجد تطبيقات بيوتكنولوجيّة جديدة.

ماذا يجب أن نعمل حتى نجد وظيفة الجين والتطبيق البيوتكنولوجي المناسب له؟ سنتحدث عن هذا في بقية فصول الكتاب.

سؤال 1.4

حدّدوا بالنسبة لكل واحدة من الجمل التاليّة ما إذا كانت صحيحة أمْ غير صحيحة، صححوا الجمل غير الصحيحة.

1. عن الصفات التي تنتقل بالوراثة، مسؤولة وحدات مُنفردة تُدعى "جينات".
2. الجين، قبل كل شيء، عبارة عن مقطع بروتين يخزن معلومات.
3. تتواجد لدى كل فرد صيغتان من كل جين.
4. تختلف صيغ الجين الواحدة عن الأخرى بسبب الاختلاف في تسلسل الأحماض الامينيّة للجين.
5. المصطلحات "صيغة الجين" وَ " أليل" هي مصطلحات مُترادفة.
6. في معظم الحالات تحتوي كل خليّة في الكائن الحي على قسم من جينات الكائن الحيّ فقط.
7. الجينات تنتقل بالوراثة من جيل إلى آخر بواسطة خلايا جنسيّة: كل خليّة جنسيّة تنقل زوج من الأليلات من كل جين.
8. يُمكن أن نجد البروتينات في السيتوبلازم، ولكن يُمكن أنْ نجدها في النواة أيضًا، في مكان إنتاجها.
9. أثبت افري وشُركائه أنَّ البروتينات ليست مسؤولة عن الصفات.
10. أثبت واطسون وكريك أنَّ الـDNA هو المادة الوراثيّة.
11. دي أوكسي أدنوزين ثُلاثي الفوسفات (dATP) هو نوع النوكليوتيد الذي يتمّ دمجه في الـDNA.
12. يوجد في الخلية 4 نوكليوتيدات يُمكنها أنْ تندمج في الـRNA.
13. النوكليوتيدات في الـDNA وأيضًا في الـRNA ترتبط ببعضها بواسطة أربطة ببتيديّة.
14. في الطرف 3' لجديلة DNA أو RNA يتواجد سكَّر يحتوي على مجموعة هيدروكسيل (OH) في الموضع 3' لجُزيء السكَّر.
15. الطرف 5' للأوليجو- نوكليوتيد الذي يعمل كبرايمر يُستخدم لبداية إنتاج جديلة DNA مُكملّة.
16. في عمليّة مُضاعفة الـDNA، يحدُث بناء لجديلتي DNA جديدتين ترتبطان الواحدة بالأخرى لإنتاج جُزيء DNA جديد.
17. DNA بوليميراز هو إنزيم يقوم ببناء RNA بحسب الـDNA.
18. RNAبوليميراز الموجود في سيتوبلازم الخلايا حقيقيّة النواة يقوم بإنتاج RNA بحسب الـRNA.
19. الإنزيم المسؤول عن عمليّة النسخ هو DNA بوليميراز.
20. عندما نجد في خليّة مُعيّنة بروتين X ناتج بحسب الجين X. معنى هذا أنَّ الجين Xتُرجم إلى بروتين في الخلية.
21. جين مُعيّن يُمكن أنْ يتمّ التعبير عنه في نوع واحد فقط من الخلايا.
22. الطفرة تؤدّي دائمًا إلى انخفاض في نشاط البروتين.
23. تعبير مُرتفع عن جين مُعيّن يُمكن أنْ يتميّز بوتيرة نسخ عالية لهذا الجين.
24. عندما تمّ رفع درجة الحرارة بـ 0.5 درجة مئوية ارتفع التعبير عن جين H70 في خلايا الإنسان. من هنا يُمكن أنْ نستنتج أنَّ الخليّة التي تعرّضت إلى درجة حرارة عالية أحتوت على كميّة أقل من الـRNA التابع لـH70 مُقارنة بخلايا تجربة المُراقبة.
25. عندما ارتفعت درجة الحرارة، في بيئة الخليّة، مرّ البروتين H99 بتغيّر في المبنى وكنتيجة لذلك ازداد نشاطه. نستنتج من ذلك أنَّ وتيرة نسخ الجين H99 ازدادت وهذا هو الامر المسؤول عن ارتفاع نشاط البروتين.

سؤال 1.5

عندما ترتفع درجة الحرارة في بيئة الخليّة بدرجة مئوية واحدة يرتفع التعبير عن ما يُقارب 20 جين، سنُسمي هذه الجينات باختصار H-Heat (H-H70-H89). لهذا نفترض أنَّ هذه الجينات ضروريّة لحماية الخليّة من الحرارة، لذلك يُمكن أنْ نتنبأ بأنَّ هذه الجينات مسؤولة عن صفة مُقاومة الخلايا للحرارة.

حدّدوا أي من الجمل التالية تصف حدث مُمكن، صححوا الجمل غير الصحيحة.

1. عندما ترتفع درجة الحرارة، في بيئة الخليّة، يظهر أنَّ عامل النسخ Y قد ارتبط بمنطقة مُراقبة الجين H77.
2. عندما تنخفض درجة الحرارة في بيئة الخلية مُجددًا إلى درجة الحرارة المثاليّة تعود وترتفع كميّة الـRNA بوليميراز الموجود على الجين H70.
3. عندما ترتفع درجة الحرارة في بيئة الخليّة ترتفع أيضًا وتيرة ترجمة الـRNA الناتج من جين H82.
4. الجين H79 يُشفِّر إلى بروتين يرتبط بالبروتينات التي مرّت بعملية تخثّر بعد تعرّضها للحرارة ويزيد من سرعة تفككها.
5. إذا قمنا بمنع التعبير عن الجينات H72 وَ H82 بشكل مُحدّد، تزداد مُقاومة الخلايا لدرجات الحرارة المرتفعة.
6. يُشفِّر الجين H80 إلى بروتين وظيفته إيقاف إنتاج بروتينات ذات حساسيّة زائدة للحرارة وَ "توفير المشاكل" لحين عودة درجة الحرارة إلى الدرجة المثاليّة.
7. الجين H80 ضروري لمنح صفة المُقاومة النسبيّة لتغيير الحرارة، ولكن هذا الجين وحده لا يكفي ليمنح (ليضمن) هذه الصفة.
8. كَتْم التعبير عن الجين Y المذكور في البند 1 بشكل مُحدَّد، يزيد من مُقاومة الخلايا لارتفاع درجة حرارة البيئة.
9. شخص لديه طفرة في الجين H77، هذه الطفرة تحوّل الناتج البروتيني لهذا الجين إلى ناتج غير فعّال. هذه الطفرة تُصعِّب على الشخص التعامل مع ارتفاع درجة حرارة جسمه عند تعرضه للانفلونزا.
10. هناك تشابه بين تسلسل الأحماض الامينيّة للبروتين المُشفَّر بواسطة الجينH77 وبين الجين المُشفَّر بواسطة الجين H88.

سؤال 1.6

قبل انقسام الخلايا بقليل، وليس كما هو الحال في المراحل الأخرى من دورة حياة الخلايا، نجد أنَّ التعبير عن الجين W ضعيفًا بينما يكون التعبير عن الجين S قويًا. يحدث هذا نتيجة وجود كميّة كبيرة نسبيًا من جُزيئات الRNA الناتجة من الجين S، ووجود كميّة صغيرة نسبيًا من جُزيئات الRNA الناتجة عن الجين W.

أي من الأقوال التالية مقبولًا وأيْ منها غير مقبول؟ علل إجابتك. صحح الأقوال إذا كان بإمكانك فعل ذلك.

1. للجين S وظيفة في تحضير الخلايا لعملية الإنقسام، بينما لا يوجد للجين W وظيفة كهذه.
2. قريبًا من لحظة انقسام الخلية، يكون مستوى فعاليّة عوامل النسخ المُرتبطة بمنطقة مُراقبة الجين S مُرتفعًا، خصوصًا بالمُقارنة مع عوامل النسخ المُرتبطة بمنطقة مُراقبة الجين W.
3. وتيرة تكرار عمليّة نسخ الجين S بواسطة الـDNA بوليميرازعالية بالمُقارنة مع عمليّة نسخ الجين W.
4. قُبيل انقسام الخلية، تزداد وتيرة نسخ الجين Z الذي يُشفِّر إلى عامل نسخ مُعيّن، ولهذا يرتبط عامل النسخ بمنطقة مُراقبة الجين S.
5. قبل انقسام الخلايا يرتبط بالجين S بروتين يُعيق عمليّة النسخ.
6. قُبيل انقسام الخلية يزداد نشاط عامل مُعيّن يقوم بتفكيك الRNA الناتج من الجينW بشكل انتقائي.

עיקרי הפרק

מفاهيم ومُصطلحات

- صفة تنتقل بالوراثة
- جين
- أليل (صيغة من الجين)
- مادّة وراثيّة
- جينوتيب
- فينوتيب
- طفرة، طفرة نقطيّة
- البروتينات والأحماض الأمينيّة كوحدات بناء أساسيّة
- الخليّة تحتوي على نواة، عضيّات، سيتوبلازم غشاء وأحماض نوويّة:RNA، DNA
- قواعد نيتروجينيّة: أدنين(A)، غوانين (G)، سايتوسين (C)، ثايمين (T) ويوراسيل (U)
- نوكليوتيد DNA : مجموعة فوسفات، دي أوكسي ريبوز، قواعد نيتروجينيَة (C، T، G، A)
- نوكليوتيد RNA: مجموعة فوسفات، ريبوز، قواعد نيتروجينيَة (C، U، G، A)
- رباط فوسفو دي إستر
- جديلة DNA، جديلتان مُكمّلتان
- قواعد مُكملّة : C-G A-T/U
- أربطة هيدروجينيّة
- اللولب المُزدوج
- مُضاعفة الـDNA:إنتاج جديلتين
- جمع برايمر(بادئ): برايمرات (بادئات)
- "المبدأ المركزي" (The central dogma)
- جديلة القالب
- الشيفرة الوراثيّة (Genetic code)
- الكودون وأنواع الكودونات
- ريبوزوم
- صفة على مستوى الكائن الحي
- صفة على مستوي الخلية
- صفة جُزيئيّة
- جينوم
- كروموسوم
- نوكلئوزوم
- التعبير عن الجين
- RNA مُشفِّر وَ RNA غير مُشفِّر
- RNA رسول
- RNAريبوزومي،RNA ناقل، RNA صغير مُعيق (فصل 8)
- عامل نسخ
- منطقة مُراقبة
- موقع ربط لعامل النسخ
- إنترون
- إكسون
- بيوتكنولوجيا
- DNA ريكومبننتي
- ترانسجين
- كائن حيّ ترانسجيني – متحوّل وراثيّا

النقاط الأساسيّة في الفصل

مفاهيم أُسس وعمليّات

- الـDNA كمادّة وراثيّة
- مُضاعفة الـDNA: إنتاج جديلتي DNA
- نسخ (Transcription)
- ترجمة (Translation)
- تسلسل مُميّز من الأحماض الأمينية توجّه لإنتاج مبنى بروتين خاص. للبروتين ذا المبنى الخاص يوجد وظيفة خاصة.
- الـDNA ونواتجه كمسؤولين عن الصفات.
- الجين يشترك بتحديد الصفة
- الجين يُشفِّر إلى RNA
- الجين يُشفِّر إلى بروتين
- الجينات موجودة في الـDNA
- DNA لا يحتوي على جينات
- DNA مُشفِّر
- DNA غير مُشفِّر
- تعبير عن الجينات بشكل انتقائي
- مُراقبة عمليّة النسخ
- المُراقبة والتغيير التي تحدُث على الـRNA.
- المُراقبة والتغيير التي تحدُث على البروتينات.
- القطع والوَصْل (Splicing)
- الوَصْل البديل (Alternative Splicing)
- تفكيك الـRNA
- تفكيك البروتين
- كائن حيّ "مُتبرع" بالـDNA

توجهات بحث

- مُساهمة ميشر
- تجربة إيفري وشُركائه
- مُساهمة واطسون وكريك
- مُساهمة آرثر كورنبرغ
- إقحام الـDNA الريكومبننتي إلى الخلية
- ما هي وظائف الجينات؟

أنواع البروتينات

- DNA بوليميراز
- RNA بوليميراز
- البروتينات الموجودة في الريبوزوم، النواة، السيتوبلازم، غشاء الخلية.
- بروتينات الهيموجلوبين
- بروتين الهيموجلوبين
- عامل نسخ أيًا كان.
- إنزيم RNase
- إنسولين
- هستونات
- بروتينات تُفكك البروتينات

قَطْع الDNA بواسطة إنزيمات التقييد وتشخيصه

في سنوات الـ50 من القرن العشرين تمّ استخلاص الـDNA من داخل الخلايا دون صعوبة خاصة، وأصبح من الممكن الحصول على كمّيّات كبيرة من الـ DNA النقي، من البروتينات والجُزيئات الأخرى. بفضل وجود DNA نقي استطاع العالمان واطسون وكريك تحديد المبنى الثلاثيّ الأبعاد للـ DNA (فصل 1)،لكن كانت تنقصهم وسائل لتحديد المعلومات المُشفَّرة في الـ DNA. عمليًّا كانت تنقص الوسائل لعزل الجينات وتحديد تسلسل قواعدها، وبالذات كانت تنقص وسائل علاج أوّلي لجزيء الـ DNA الموجود في الخليّة لأنّه عبارة عن جُزيء طويل. لقد شُقّت الطريق في هذا المجال بفضل اكتشاف مجموعة إنزيمات ذات قدرة على قَطْع الـ DNA بشكل مُراقب الى مقاطع DNA قصيرة. تُعرف في أيامنا عدّة مئات من هذه الإنزيمات والتي تُسمّى باسم **انزيمات التقييد** (אנזימי הגבלה – Restriction enzymes)، في بعض الأحيان نسمي هذه الإنزيمات، إنزيمات القطع أيضًا. تُستعمل هذه الانزيمات على نطاق واسعٍ وهي حيوية للعاملين في مجال البيولوجيا الجُزيئيّة وكذلك في مجال الهندسة الوراثيّة.

كيف تمّ اكتشاف إنزيمات القطع التي تُعرف باسم إنزيمات التقييد؟ ما هو مصدر التسميّة؟ ما الذي يُميّز إنزيمات التقييد، وكيف تعمل هذه الإنزيمات؟ كيف يُمكن استعمال هذه الإنزيمات في التشخيص الأولي لمقاطع الDNA؟

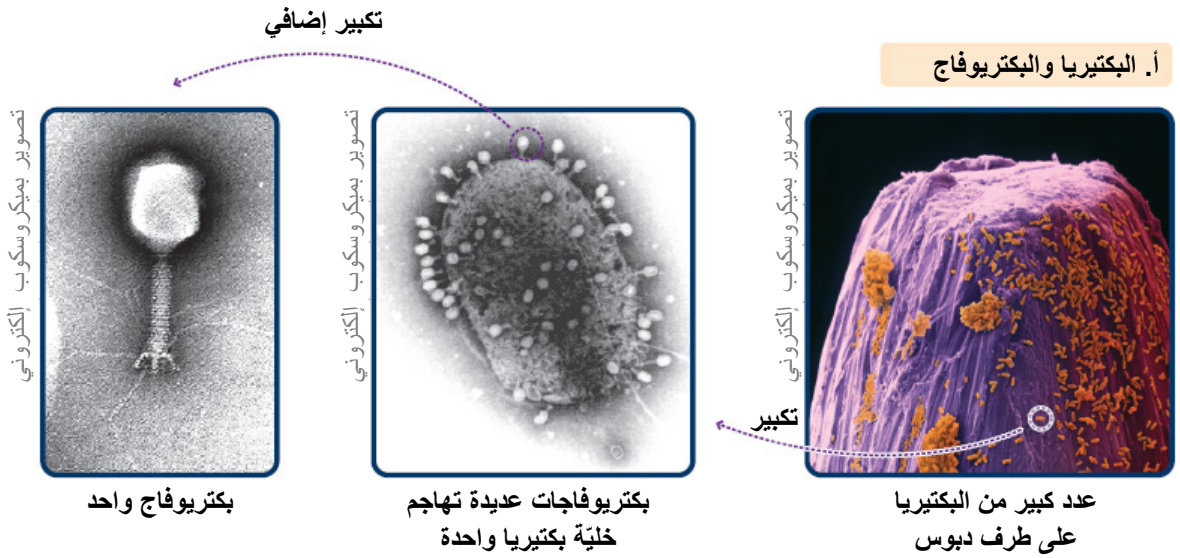
"قصة حرب": اكتشاف إنزيمات التقييد

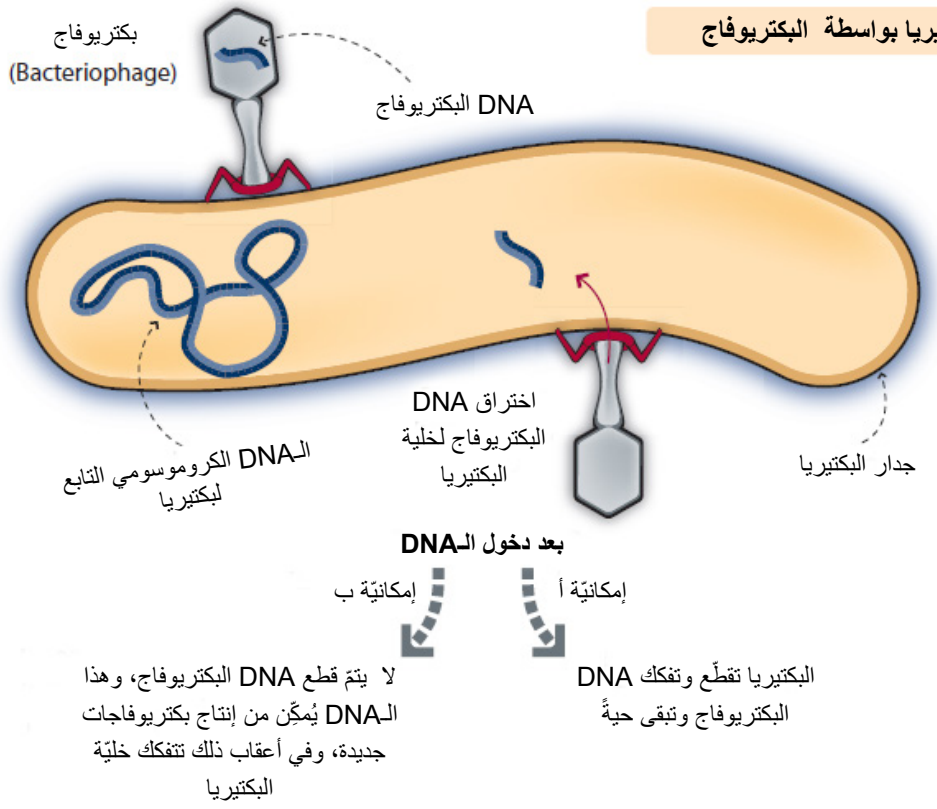
في بداية سنوات الخمسين، في الولايات المتحدة، قام العالمان لوري وهومن (Salvador Luria and Mary Human) ببحث العلاقة المتبادلة بين البكتيريا والبكتيريوفاجات (בקטריופאג'ים). البكتريوفاجات هي فيروسات تهاجم البكتيريا حيث تتشبث بالبكتيريا وتُدخل إليها الـDNA الخاص بها، كما هو موضّح في الرسم 2.1. في بعض الأحيان في أعقاب دخول الـDNA التابع للبكتريوفاج إلى البكتيريا، يتكاثر البكتريوفاج داخل البكتيريا ويؤدّي إلى تفكيكها. البكتيريا من جانبها تحاول المُقاومة ، حيث إنّ لديها وسائل تدافع بها عن نفسها ضد الفيروسات. طريقة دفاع البكتيريا عن نفسها ليست سهلة، حيث تبيّن أنّ البكتيريا تستطيع أن تحمي نفسها من أنواع معيّنة من البكتريوفاجات، ولكنها تعجز عن حماية نفسها من أنواع أخرى منها. ادّعى العالِم لوري أنّ البكتيريا تستطيع أن تجِدْ من (تقيّد) تكاثر بكتريوفاجات معيّنة فقط داخلها. لهذا عُرفت هذه الظاهرة باسم **ظاهرة التقييد** (**תופעת ההגבלה**).

لم يستطع العالِم لوري أن يكتشف اللآلية الجُزيئيّة لظاهرة،لكنّه اكتفى بالتنبؤ ووصف الأحداث المُمكنة. ادعى لوري أنّ الـ DNA التابع لنوع مُعيّن من البكتيريا يمرّ بـ" تغيير" خاص به، وَالـ DNA التابع لبكتريوفاج معيّن يمرّ أيضًا بـنفس "التغيير" أو "بتغيير" آخر. وقد اقترح أنّه عندما يكون "التغيير" الذي يحدث على الـ DNA التابع

حاول طالب البحث الجديد في فريق البحث التابع للدكتورة جينيطيت أن يُنمي البكتيريا. لم ينجح بذلك خلال الأيام الأولى لأنّ البكتيريا حيث تكاثرت بصعوبة. أخبره شخص يعمل في المُختبر المُجاور أنّه من الممكن أن تكون البكتيريا ملوثة بالبكتريوفاجات، وهي فيروسات ذات قدرة على مُهاجمة البكتيريا والقضاء عليها. في الحال تذكر طالب البحث عدّة أقوال عن البكتيريا.

- البكتيريا للبكتيريا الصديقة: أنتِ تبدين في حالة سيئة.... البكتيريا الصديقة: لدي فيروس....
- ماذا قالت "انثى البكتيريا" لـ"ذكر البكتيريا"؟ من يحتاج إلى البيولوجيا عندما تكون الكيمياء بيننا؟





رسم 2.1: البكتيريا، البكتريوفاجات والعلاقات المتبادلة بينها.

أ. صور توضّح النسبة بين حجم البكتيريا والبكتريوفاج.

ب. خلال عدوى البكتيريوفاج للبكتيريا، يقوم البكتريوفاج بالالتصاق بالبكتيريا وإدخال الـ DNA الخاص به إليها. يصف الرسم أيضًا التأثيرات الممكنة لعمليّة العدوى. لصفات الـ DNA التابع للبكتيريا ولصفات الـ DNA الخاص بالبكتريوفاج وظيفة حاسمة في نجاح معركة البكتريوفاج ضد البكتيريا أو عدمه.

للبكتريوفاج **مختلفًا** عن "التغيير" الموجود في الـ DNA التابع للبكتيريا **تتغلب** البكتيريا على البكتريوفاج وعندها تستطيع أن تمنع تكاثر البكتريوفاج داخلها وبالتالي تمنع تتفكك خليّة البكتيريا. بالمقابل عندما يكون "التغيير" الموجود في الـDNA التابع للبكتريوفاج **مطابقًا** "للتغيير" في الـDNA التابع للبكتيريا **لا** تستطيع البكتيريا حماية نفسها من البكتريوفاج، ويتكاثر البكتريوفاج داخل البكتيريا ممّا يؤدي إلى تفكك البكتيريا وموتها.

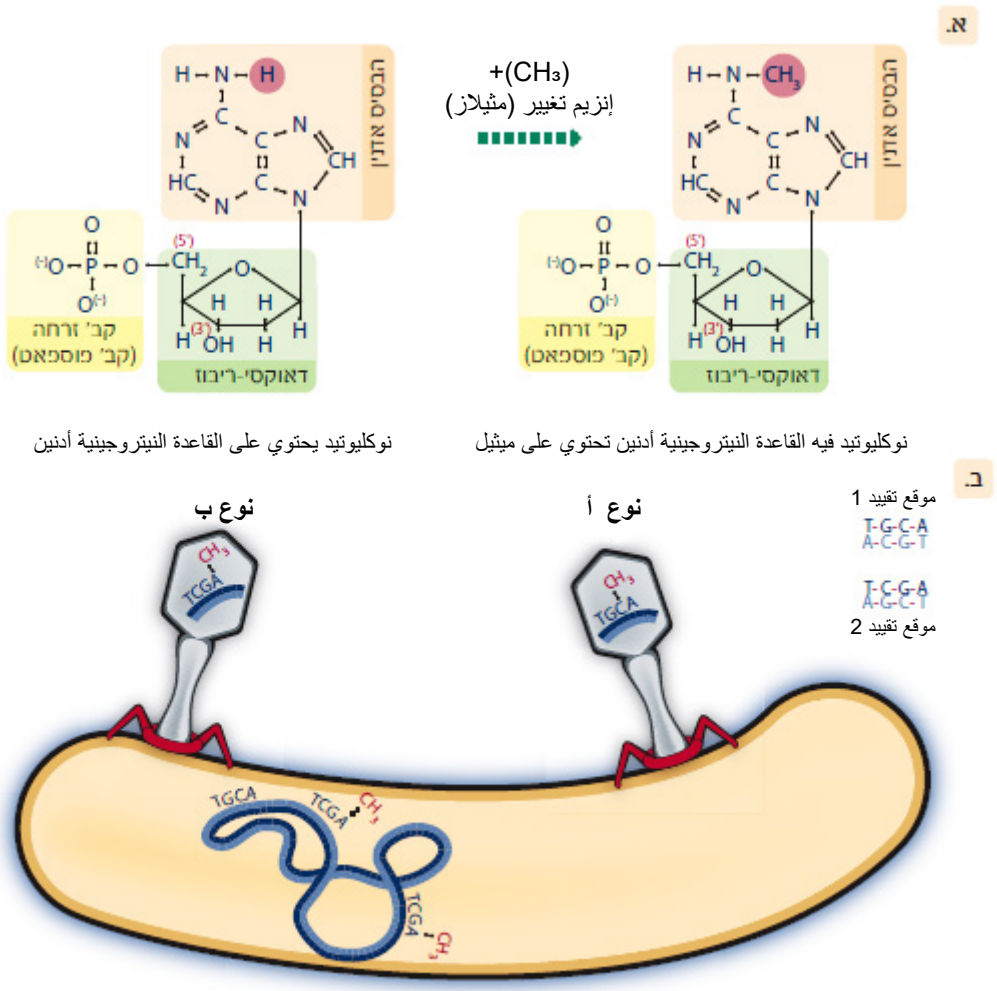
"التغيير" وكذلك الآلية الجزيئية لظاهرة التقييد بقيت غير معروفة لمدّة 10 سنوات بعد أن انتهى بحث لوري. في سنة 1962، فقط، حصلنا على المعلومات الأوّلية عن آلية التقييد على يد البيوكيميائي السويسري آربر (Werner Arber)، حيث قام مع زملائه بمعرفة "التغيير" الموجود في الـ DNA والذي تنبأ به لوري. التغيير الذي تمّ اكتشافه هو مجموعة **ميثيل** (CH_3) تقوم بإضافتها إنزيمات تغيير معيّنة، تُعرف باسم ميثيلازات (מתילאזות)، تُضاف مجموعة الميثيل إلى القاعدة أدنين (A) أو إلى القاعدة سايتوسين (C) (انظروا الرسم 2.2 أ'). إنزيمات التغيير هذه تقوم بإضافة مجموعة الميثيل في مواقع ذات 4-8 قواعد تُعرف باسم **مواقع تقييد** (אתרי הגבלה –Restriction Sites). مواقع تقييد معيّنة لها تسلسل DNA مُعيّن وخاص. مواقع التقييد يُمكنها أن تتواجد في الـ DNA من أي مصدر كان بما في ذلك الـ DNA الخاص بالبكتيريا والبكتريوفاجات. مجموعة الميثيل الموجودة في مواقع تقييد معيّنة يُمكنها أن تحمي من إنزيمات أخرى تُعرف باسم انزيمات التقييد. **إنزيمات التقييد** تتعرّف على التسلسل في موقع التقييد وتقوم بقطعه، فقط، عندما **لا تتواجد** عليه مجموعة ميثيل. الباحث الأول الذي قام بعزل إنزيم تقييد يقوم بالقطع في موقع تقييد خاص كان هيملتون سميث (Hamilton Smith).

ساعد عزل وتشخيص الميثيلازات وإنزيمات التقييد على شرح ظاهرة التقييد بمصطلحات البيولوجيا الجُزيئية. اتضح أنّ بكتيريا معيّنة يُمكنها أن تُعبر عن ميثيلاز (מתילאז) خاص يُغيّر الـ DNA ويُضيف له مجموعة ميثيل في موقع تقييد **معيّن**. وفي نفس الوقت تقوم هذه البكتيريا بالتعبير عن (إنتاج) إنزيم تقييد خاص يستطيع القطع في نفس موقع التقييد فقط اذا لم يكن عليه مجموعة ميثيل. بهذه الطريقة يكون الـ DNA التابع لهذه البكتيريا محميًا من إنزيمات القطع الخاصة بالبكتيريا ذاتها بواسطة مجموعة الميثيل. لكن إنزيم التقييد ضروريّ، حيث يشكِّل "سلاح" البكتيريا الذي يقوم بقطع الـ DNA التابع للبكتريوفاجات. هذا القطع يمكنه أن يتمّ في الحالة التي يكون فيها الـ DNA التابع للبكتريوفاج غير مرتبط بمجموعة ميثيل في موقع التقييد الذي يتعرف عليه إنزيم التقييد التابع للبكتيريا. في حالة كهذه لا يستطيع البكتريوفاج التكاثر داخل البكتيريا وتفكيكها.(انظر المثال في الرسم 2.2 ب'). حاز الباحثان آربر وسميث سنة 1978 على جائزة نوبل على اكتشافهما إنزيمات التقييد وتحليلهما لآلية التقييد. لوري "المتنبئ بإنزيمات التقييد" حاز على جائزة نوبل سنة 1969 على عمله في مجال مبنى وتكاثر الفيروسات. إنزيمات التقييد هي أداة ضرورية في الهندسة الوراثية. ما هي مميزاتها البارزة؟

> وجود DNA البكتريوفاج كاملًا هو أمر ضروريّ لأجل تكاثر البكتريوفاج داخل البكتيريا. هذا التكاثر يؤدّي إلى تفكيك البكتيريا

القوة هي بالتنوّع: أنواع مُختلفة من إنزيمات التقييد وأنواع مُختلفة من القطع

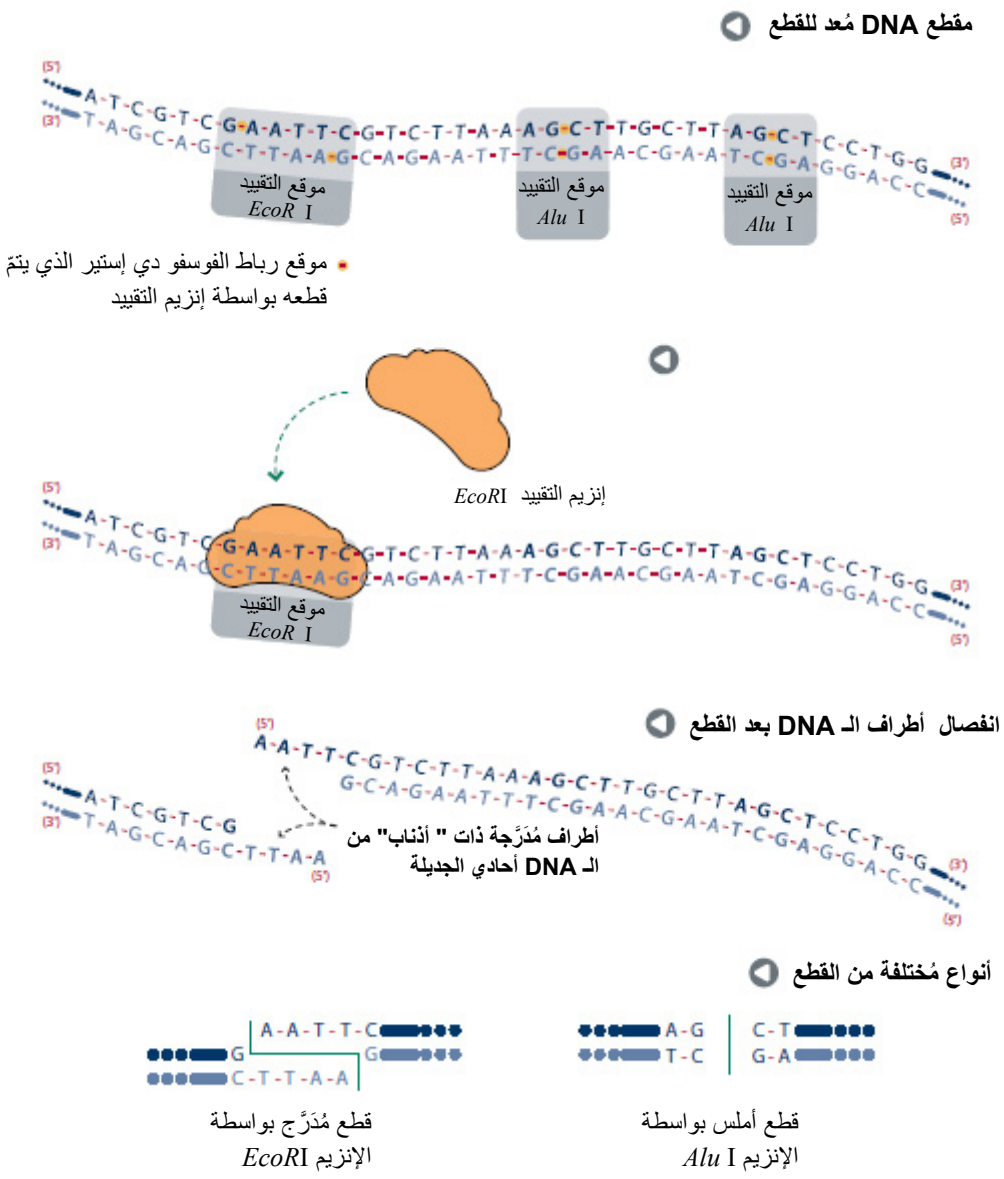
إنزيمات التقييد مصدرها من البكتيريا، وهي تقوم بقطع الـ DNA في تسلسلات قواعد مُعيّنة تُعرف باسم **مواقع تقييد**. هدف إنزيمات التقييد داخل البكتيريا هو قطع الـ DNA التابع لفيروسات (لبكتريوفاجات) مُعيّنة تُهاجمها ، وبذلك تحدّ من تكاثر هذه الفيروسات داخلها (الرسوم 2.1 ب' و 2.2 ب'). يستعمل الباحثون في مجال الهندسة الوراثية إنزيمات التقييد من أجل قطع الـ DNA داخل أنابيب الاختبار من أجل الحصول على مقاطع DNA قصيرة، تساعد في تنفيذ عدة عمليّات أساسيّة في مجال الهندسة الوراثيّة. يتعرّف كل إنزيم تقييد على موقع تقييد ذا تسلسل قواعد مُعيّن يبلغ طوله 4، 6 أو 8 قواعد. إنزيم التقييد يرتبط بموقع التقييد الخاص الذي يستطيع التعرّف عليه ويقوم بقطع الـ DNA في هذا الموقع (انظر الرسم 2.3). يتمّ القطع بواسطة تفكيك الأربطة الفوسفو دي إستيريّة بين اثنان من النوكليوتيدات في كلّ واحدة من جديلتي الـ DNA.



הרסם 2.2: התגייר עלהקוואדים בוואסטה מגמוגה מתיל (CH_3), וטאתירות מקאן התגייר בה"א ה-DNA על העלאקה המתבדלת בין הבקטריופאגות והבקטריה.

א. יעגץ הרסם נוקליוטיד האדנין ונוקליוטיד האדנין הדי אֻצִיפת לה מגמוגה מתיל.

ב. מתאל לטאהרה התגייר: מתיללאז מֻעִיּן יֻצִיף מגמוגה מתיל לאחדא הקואדתין –אדנין או סאיטוסין – בי מוקע תגייר מֻעִיּן פקט. בי הדא הרסם יוגד תפציל למוקעֵיְ התגייר המוגודין בי הבקטריה ובי כֻּל ואחד מן נוקעֵיְ הבקטריופאג. כדלך יֻבִּין הרסם אַנַّ המיתילאז התאבע לבקטריה יקום בּאצִיפת מגמוגה מתיל אִלא האדנין על התסלסל TCGA. לא יוגד לדא הבקטריופאג מתילאז, ואלـ DNA התאבע לה ימרّ בעמליּה אצִיפת מגמוגה מתיל בי הבקטריה התי יַנְתֻּג פיהא. חַסְב הדא הרסם הבקטריופאג מן הנוע א לא יסתטיע התכאתר בי הבקטריה, אמّא הנוע ב פיסתטיע דלך. ינבע הדא מן אַנَّ הנוע ב לדיה מגמוגה מתיל בי נפס מוקע תואגד מגמוגה המתיל לדא הבקטריה (בי מוקע התקיד רקם 2)، בכלאף מא הו לדא הבקטריה מן הנוע א התי לדיהא מגמוגה מתיל בי מוצע התקיד 1. באלאצאפה אלא דלך אִנזים התקיד לבקטריה יסתטיע הקטע בי הדא המוקע פקט אִדא לם תתואגד עליה מגמוגה מתיל כמא הו החאל בי הבקטריופאג מן הנוע א. לדלך בכטריופאג מן הנוע א לא יסתטיע התכאתר דאכל הבקטריה.



الرسم 2.3: قَطْع الـ DNA بواسطة إنزيمات التقييد

القطع بواسطة الإنزيم (EcoRIإي-كو-آر-وان) هو قطع يُنْتِج أطراف ذات ذنب من الـ DNA أحادي الجديلة، وبسبب مظهر الأطراف المُدرَّج يُسمّى هذا القطع "قطع مُدَرَّج". بالمُقابل القطع بـ AluI يؤدّي إلى إنتاج أطراف ذات مظهر أملس.

تسلسل القواعد في موقع التقييد هو تسلسل من نوع بوليندروم (פוליינדרום). **بوليندروم** هو تسلسل يُقرأ بنفس الشكل من اليسار إلى اليمين ومن اليمين إلى اليسار. مثلاً الكلمات توت، باب، "שמש" هي بوليندروم، الجملة "ילד כותב בתוך דלי" والرقم 12321 هي أيضًا تسلسلات بوليندروميّة.

موقع بوليندرومي في الـ DNA هو موقع يشمل الجديلتين، وهو موقع فيه التسلسل في الجديلة المُشفِّرة من الطرف 5' الى الطرف 3'،الذي يُقرأ من اليسار الى اليمين مطابق للتسلسل الموجود في الجديلة المُكمّلة والذي يُقرأ من اليمين الى اليسار، أي من الطرف 5' الى الطرف 3' أيضًا. مثلاً،موقع التقييد للإنزيم EcoRI الذي يظهر في الرسم 2.3، فيه تسلسل الجديلة الأولى من اليسار الى اليمين (GAATTC) مطابق لتسلسل الجديلة الأخرى الذي يُقرأ من اليمين الى اليسار (CTTAAG).

الجدول 2.1 يعرض معلومات تتعلّق بإنزيمات تقييد مقبولة الاستعمال، ويعرض معلومات عن مكان القطع الدقيق في مواقع القطع الخاصة بهذه الإنزيمات داخل مواقع التقييد. حتى الآن تمّ عزل عدّة مئات من إنزيمات التقييد وهي موجودة تحت تصرّف البيولوجيين الذي يعملون في مجال البيولوجيا الجزيئيّة.

اسم الإنزيم	اسم البكتيريا التي عُزل منها الإنزيم	موقع وطريقة القطع
BamH I	*Bacillus amy. H*	5'-G|GATCC-3' 3'-CCTAG|G-5'
EcoR I	*Escherichia coli RY13*	5'-G|AATTC-3' 3'-CTTAA|G-5'
Hae II	*Haemophilus aegyptius*	5'-PuGCGC|Py-3' 3'-Py|CGCGPu-5'
Hae III	*Haemophilus aegyptius*	5'-GG|CC-3' 3'-CC|GG-5'
Hha I	*Haemophilus haemolyticus*	5'-GCG|C-3' 3'-C|GCG-5'
Hind III	*Haemophilus influenzae Rd*	5'-A|AGCTT-3' 3'-TTCGA|A-5'
Hpa I	*Haemophilus paraifluenzae*	5'-GTT|AAC-3' 3'-CAA|TTG-5'
Not I	*Nocardia otitidis-caviarum*	5'-GC|GGCCGC-3' 3'-CGCCGG|CG-5'
Pst I	*Providencia stuartii 164*	5'-CTGCA|G-3' 3'-G|ACGTC-5'
Sal I	*Streptomyces albus G*	5'-G|TCGAC-3' 3'-CAGCT|G-5'

القائمة 2.1: إنزيمات التقييد، اسم البكتيريا التي عُزلت منها ومواقع التقييد الخاصة بها.

- Pu – بورين: أدينين (A) أو جوانين (G).
- Py – بريميدين: سيتوزين (C) أو ثايمين (T).
- I مكان القطع في جديلة الـ DNA (مكان فك الرباط الفوسفو دي إستيري).

كما هو معروض في الجدول 2.1 وفي الرسم 2.3، إنزيم التقييد يستطيع القطع بأحد الشكلين الأساسيين للقطع. عندما يكون القطع على يمين وعلى يسار مركز موقع التقييد البوليندرومي، كما يظهر في المثال الموجود الرسم 2.3 بالنسبة للإنزيم *EcoRI*، تظهر أطراف الـ DNA بعد انفصال الجديلتين على شكل درجة ولذلك هذا الشكل، من أشكال القطع، يُسمّى **"بالقطع المُدَرَّج"**، في القطع **المُدَرَّج** نحصل على "ذنب" من الـ DNA الأحادي الجديلة في كل واحد من طرفَيْ الـ DNA. يميل الطرف الأحادي الجديلة لأن يرتبط (يلتصق) بطرف أحادي الجديلة ذا تسلسل مكمّل له، لذلك تُعرف أطراف القطع **المُدَرَّج** باسم **أطراف لاصقة** أيضًا. بالمقابل في أعقاب القطع بواسطة الإنزيم *Alu I* الذي يتمّ في مركز موقع التقييد، تَنْتُج بعد القطع أطراف DNA ذات مظهر أملس (كما يظهر في الرسم 2.3)، لذلك يُسمّى هذا القطع **"قطع أملس"**.

عادةً تُشتق اسماء إنزيمات التقييد المُختلفة من الحرف الأول لاسم البكتيريا والحرفان الاول والثاني لنوع البكتيريا. هكذا مثلًا، الإنزيم Sal I هو إنزيم تقييد عُزل من بكتيريا **Streptomyces albus**. والرقم الروماني (I) يُشير إلى أنَّ هذا الإنزيم هو الإنزيم الأول الذي عُزل من هذه البكتيريا.

سؤال 2.1

أ. أي من الإنزيمات المعروضة في الجدول 2.1 تُنْتِج أطراف ملساء وأيّ منها تُنْتِج أطراف مُدَرَّجة؟

ب. عندما نتمعّن في الجدول جيّدًا، يُمكن أن نلاحظ وجود نوعين من القطع **المُدَرَّج**، حسب نوع الأطراف اللاصقة الناتجة عن القطع. هناك إنزيمات تُنْتِج طرف أحادي الجديلة طرفه 3' وإنزيمات تُنْتِج طرف أحادي الجديلة طرفه 5'. حدّد بالنسبة للإنزيمات الموجودة في القائمة 2.1، نوع الأطراف اللاصقة الناتجة بواسطة القطع بهذه الإنزيمات.(رمز: تمعّن مرّة أخرى في الطرف الأحادي الجديلة الموجود في الرسم 2.3)

سؤال 2.2

افترض أنَّك قُمت بحضن مقطع مُعيّن من الـ DNA مع 7 إنزيمات تقييد مُختلفة. الرسم التخطيطيّ س‘ 2.2 يعرض مقاطع الـ DNA الناتجة بعد القطع. رقم المقطع لا يُعبِّر عن ترتيبه في مقطع الـ DNA الأصليّ.

أ. رتِّبوا من جديد المقاطع الموجودة في الرسم س‘ 2.2 بحسب مكان وجودها (ترتيبها) في المقطع الأصليّ.

رمز: تأكّد بعد "ترتيب المقاطع" من حصولك على مواقع تقييد بوليندرومية

ب. حدِّدوا أزواج المقاطع التي نَتَجت بعد قطعها بواسطة إنزيم تقييد مُعيّن يظهر اسمه في القائمة 2.1.

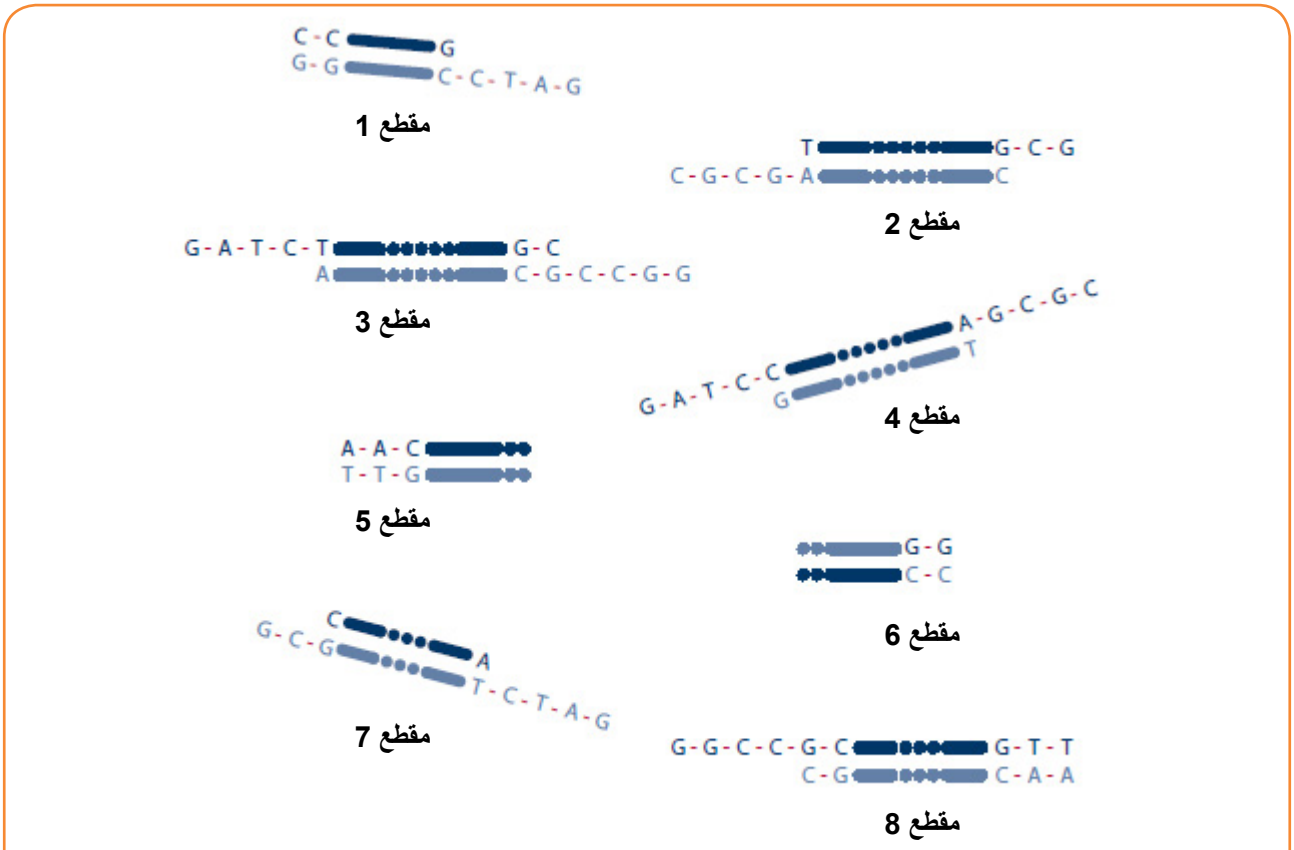
ج. توجد نواتج قطع من بين تلك الموجودة في الرسم س‘ 2.2 لديها ميل للارتباط الواحدة بالأخرى بالرغم من انها نتجت بواسطة القطع بإنزيمات تقييد مُختلفة – حدد من هي هذه المقاطع.

سؤال 2.3

تتواجد مواقع التقييد في تسلسل الـDNA بشكل عشوائيّ، يُشتق احتمال وجود مواقع تقييد مُعيّنة في موقع مُعيّن من قوانين الاحتمال البسيطة. لديكم مقطع من الـDNA طوله 30000 زوج من القواعد (30 كيلو قاعدة، 30Kb). حسب قوانين الاحتمال، أيّ إنزيم من بين الانزيمات التالية من المفترض أن يقطع مقطع الـ DNA المذكور أكبر عدد من المرات؟

أ. HaeIII ب. EcoRI ج. NotI

رمز: تمعّن في الجدول 2.1 وفتش عن عدد القواعد التي يتكوّن منها موقع التقييد في كل واحد من هذه الإنزيمات.



الرسم س‘ 2.2: مقاطع DNA قصيرة نَتَجت من قطع مقطع DNA بواسطة 7 إنزيمات تقييد مُختلفة.
ما هو ترتيب هذه المقاطع في المقطع الاصليّ؟

التشخيص الأولي لجُزيء الـDNA: قطع الـDNA، فصل المقاطع في الجل وخرائط التقييد

تناول القسم السابق، من هذا الفصل، قدرة إنزيمات التقييد المقبول استعمالها على قطع الـ DNA في موقع تقييد خاص ومميّزات نواتج القطع. أحد استعمالات إنزيمات التقييد هو إجراء تشخيص أولي لجُزيء DNA مُعيّن (مقطع DNA مُعيّن). التشخيص الأوليّ لمقطع الـ DNA يشمل تحديد مكان مواقع التقييد المُختلفة الموجودة في المقطع، هذه المعلومات تُمكّن من تحضير **خريطة التقييد**.

من أجل تحضير خريطة تقييد مقطع مُعيّن من الـ DNA نقوم بحضن مقطع الـ DNA مع عدد من إنزيمات التقييد المقبول استعمالها.

نقول "مقطع DNA" أو "جُزيء DNA" بلسان المُفرد، ولكن غالبًا يُقصد بذلك نُسخ عديدة مُتطابقة من جزيء DNA/مقطع DNA. في الهندسة الوراثية يتمّ العمل دائمًا مع عدد كبير من نُسخ جزيء الـDNA الذي نبحثه، لأنّ العمل مع جُزيء DNA واحد ووحيد لا يُتيح بحثه. بالإضافة إلى ذلك، من أجل التعرُّف على الـDNA وتشخيصه بواسطة الوسائل المُستعملة لذلك نحتاج إلى عدد كبير من النُسخ من كلّ جُزيء DNA.

وبالنسبة لكل إنزيم نسأل الأسئلة التاليّة:

1. هل تمّ قَطْع مقطع الـ DNA بواسطة الإنزيم؟
2. ما عدد مقاطع الـ DNA التي نَتَجت بعد القطع؟
3. ما طول مقاطع الـ DNA الناتجة؟

كيف يتم تحضير خريطة التقييد؟

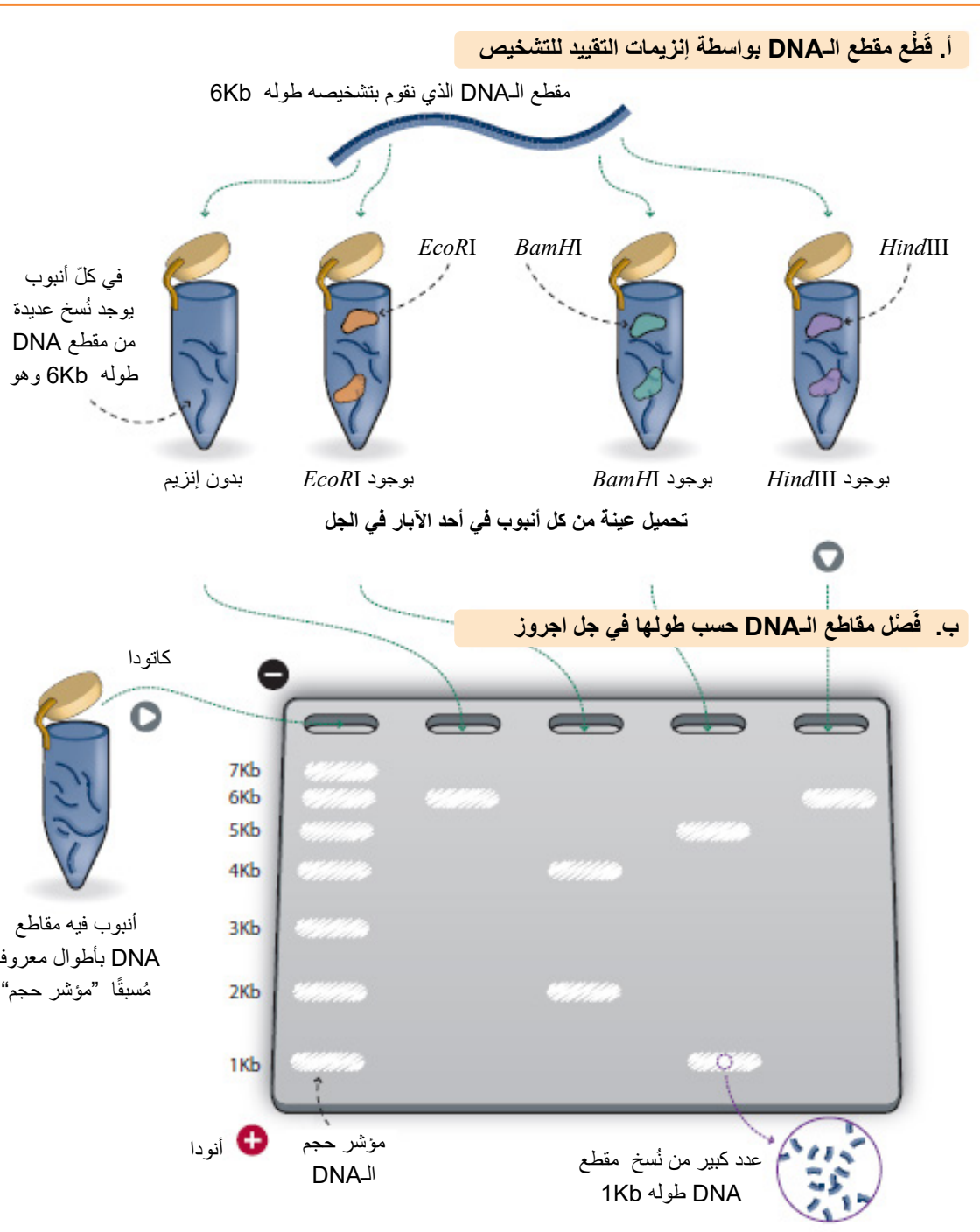
يصف الرسم 2.4 المراحل الأوليّة لتحضير خريطة تقييد مقطع DNA مُعيّن طوله 6000 قاعدة (6 kb). في المرحلة الأولى يتمّ حضن " عيّنات" من مقطع الـ DNA في عدّة أنابيب اختبار، في نفس الوقت، مع إنزيمات تقييد مُختلفة (في درجة حرارة 37ºC بوجود بوفر مناسب). إذا كان تسلسل مقطع الـ DNA الذي نقوم بتشخيصه يحتوي على موقع تقييد واحد أو أكثر يستطيع أنْ يتعرَّف عليه الإنزيم، سيَنْتُج في الأنبوب خليط من مقاطع DNA طولها أصغر من kb6. لتحديد عدد وطول المقاطع التي نَتَجت بعد عمليّة القطع، نقوم بفصلها بالجل بواسطة حقل كهربائي. شرح مُفصّل عن فصل مقاطع الـ DNA بالجل بواسطة حقل كهربائي (**الكتروفوريزا في الجل**) موجود في الصندوق 2.1. باختصار، الحقل الكهربائي الذي يتمّ وصل الجل به يُمكّن من تحرك مقاطع الـ DNA بحسب طولها: كلّما كان المقطع أطول تكون المسافة التي يقطعها خلال زمن محدّد أصغر، وكلما كان المقطع أقصر يقطع مسافة كبيرة نسبيًا في الجل. في الرسم 2.4 ب' يُعرض رسم تخطيطيّ لجل يحتوي على مقاطع DNA فُصلت عن بعضها البعض.

نتائج البحث المعروضة في الرسم 2.4 ب' تُشير الى أنَّ مقطع الـDNA على ما يبدو لا يحتوي على موقع تقييد يتعرّف عليه الإنزيم *Hind*III. بالمُقابل فإنّ القطع بواسطة كلّ واحد من الإنزيمات *EcoRI* و *BamH* I أدّى الى إنتاج مقطعين من الـDNA، ولذلك يُمكن الاستنتاج أنَّه لكلّ من *EcoR*I و *BamH* I يوجد بالتأكيد موقع تقييد واحد في هذا المقطع. يُمكن أنْ نُقدِّر طول مقاطع الـ DNA الناتجة بعد القطع بواسطة المُقارنة بين المسافة التي تقطعها المقاطع المُختلفة في الجل والمسافة التي تقطعها مقاطع من الـ DNA ذات أطوال معروفة مُسبقًا (مؤشر حجم للـDNA (סולם DNA) في الرسم 2.4 ب'). المعلومات عن عدد وطول مقاطع الـ DNA الناتجة بعد القطع بإنزيمات التقييد، تُمكّنا من إنتاج "خريطة تقييد" لمقطع الـDNA الأصليّ. **خريطة التقييد** لجُزيء DNA مُعيّن تصف مكان مواقع التقييد المُختلفة في جُزيء الـDNA والمسافة بينها.

من المُعتاد تحضير خريطة تقييد في مرحلة مُبكّرة نسبيًا من البحث، حيث أن الخريطة تُمكّن من معرفة الإنزيمات التي يمكن أن نستعملها لقطع مقطع الـ DNA الذي نبحثه، من أجل "انتزاع" أجزاء من المقطع التي نرغب ببحثها بشكل منفرد (فصل 3).

بقيّة مراحل عمليّة تحضير خريطة التقييد لمقطع الـ DNA الذي يبلغ طوله kb6 معروض في الرسم 2.5. الرسم 2.5أ' ي ع رض خريطتي تقييد مُمكنتين للمقطع المكوّن من kb6 والناتجتان عن معالجة المعلومات التي عُرضت في الرسم 2.4. من أجل تحديد مكان مواقع التقييد للإنزيمات *EcoR*I و *BamH* I الواحد بالنسبة للآخر، يجب أن نقطع مقطع الـ DNA بواسطة الإنزيمين *EcoR*I و *BamH* I عندما يكونان في نفس الأنبوب (قَطْع مزدوج- חיתוך כפול). الرسم 2.5 ب' يعرض نتائج القطع المزدوج لمقطع الـ DNA.

معالجة المعلومات الإضافيّة بالنسبة للإمكانيات التي عُرضت في القسم أ من الرسم، تُمكِّن من تحديد خريطة تقييد مقطع الـ DNA المفحوص بحيث تظهر فيها مواقع التقييد الخاصة بالإنزيمات المُستعملة في التجربة(الرسم 2.5 ج'). يُمكن أنْ ننفِّذ القطع بواسطة إنزيمات تقييد إضافيّة من أجل الحصول على خريطة تقييد أكثر تفصيلًا. استعمالات خرائط التقييد معروضة في الفصل 3.



الرسم 2.4: تحديد مكان مواقع التقييد الموجودة في مقطع الـDNA – قطع الـDNA بواسطة إنزيمات التقييد وفَصْل مقاطع الـDNA بواسطة الكتروفوريزا في جل اجروز

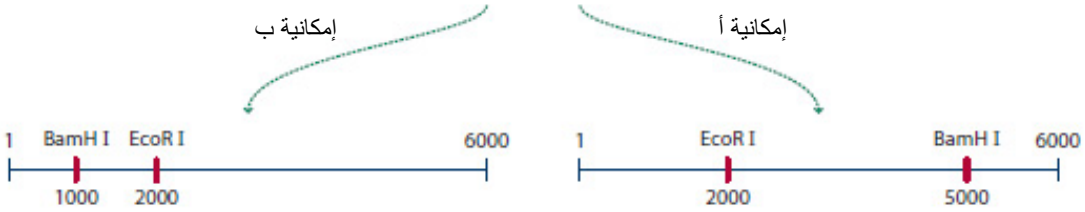
أ. حضن مقطع الـDNA مع إنزيمات التقييد ونقل القليل من عينة الـDNA الذي حُضن مع إنزيمات القطع إلى داخل بئر في الجل.

ب. تمرير تيار كهربائي عبر الجل والسائل الذي يتواجد فيه. كلما كان المقطع أصغر يتحرَّك إلى مسافة أبعد عن البئر.

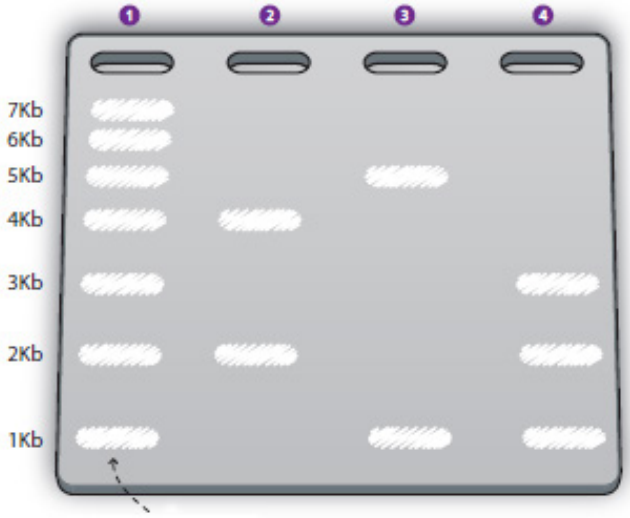
أ. لتحضير خريطة تقييد مقطع الـDNA الذي يبلغ طوله 6Kb نعتمد على النتائج المعروضة في الرسم 2.4.

1. بحسب المعلومات التي تظهر في الجل (الرسم 2.4 ب') يُمكن أن نعيّن على الخريطة موقع التقييد للإنزيم *EcoR*I

2. أين يتواجد موقع التقييد للإنزيم *BamH*I



ب. لإكمال تحضير خريطة تقييد المقطع المذكور توجد حاجة لقطع مقطع الـDNA "قطعًا مزدوجًا"



"مؤشر حجم DNA"

1. مقاطع DNA ذات أطوال معروفة مُسبقًا.
2. نتائج قَطْع مقطع الـDNA بواسطة *EcoR*I
3. نتائج قَطْع مقطع الـDNA بواسطة *BamH*I
4. نتائج قَطْع مقطع الـDNA بواسطة *EcoR*I وَ *BamH*I ("قَطْع مُزدوج").

ج. خريطة التقييد مقطع الـDNA الذي يبلغ طوله 6Kb.

الرسم 2.5: تحضير خريطة تقييد مقطع DNA مُعيّن (يُعرض مقطع الـ DNA في الرسم 2.4 ويبلغ طوله 6Kb).
يتمّ تحضير الخريطة بالاعتماد على تشخيص نواتج القطع في الجل. الأرقام تُشير الى عدد القواعد في مقطع الـ DNA.

صندوق 2.1: الالكتروفوريزا في الجل لفَصْل مقاطع DNA بحسب طولها.

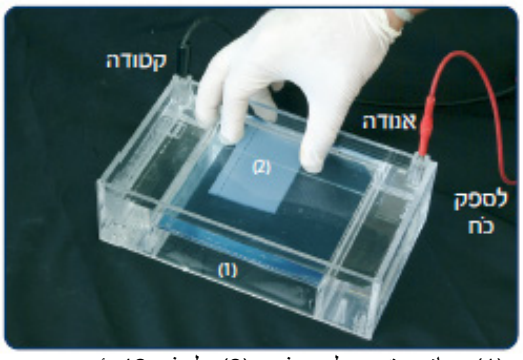
من أجل تشخيص طول مقاطع DNA ومن أجل عزل مقاطع DNA مُعيّنة، نستعمل مبدأ فَصْل مقاطع DNA بحسب أطوالها. الطريقة المقبولة لفصل مقاطع DNA بحسب طولها، والتي تُمكّن أيضًا من رؤيتها، هي طريقة تُعرف باسم **الكتروفوريزا في الجل** (Gel Electrophoresis). الجل النموذجي المُستخدم مُكوّن من الأجروز و نسيجه يُذكّر بالجل الذي نأكله. الكتروفوريزا معناها الفصل بواسطة حقل كهربائيّ. في الرسم 2.6 أ' يُمكنكم رؤية جل مصنوع من الأجروز، عند إدخال الجل الى جهاز يحتوي على محلول مائي يحوي أملاح، المحلول ذا قيمة PH ثابتة (بوفر) وتوصيله بالتيار الكهربائي تتمّ عمليّة فصل مقاطع الـDNA. يتمّ تحضير جل الأجروز بواسطة غَلْي محلول مكوّن من مسحوق الأجروز و بوفر مناسب، ثم تبريد محلول الأجروز بعد صبه في قالب، تتحددّ أبعاد الجل بعد تصلبه بحسب ابعاد القالب. قبل أن يتصلب الجل يُدخل اليه "مشط مع أسنان عريضة نسبيًّا"، الأمر الذي يُمكّن من إنتاج آبار في القسم الأعلى من الجل (تخيّلوا مثلجات أُخرجت منها العصى: يؤدّي ذلك إلى إنتاج بئر واحدة). خلال تحضير الجل يُضاف إلى الأجروز مادّة مُشعّة ذات قُدرة على الارتباط بالـ DNA، مثلًا: بروميد الايثيديوم.

كيف يتمّ فَصْل مقاطع الDNA في الجل بحسب أطوالها؟ الى داخل الآبار الموجودة في الجل تُدخل بحذر عينات DNA (الرسم 2.6 أ'2). يتمّ تمرير تيّار كهربائيّ خلال الجهاز الذي وُضع فيه كل من محلول البوفر والجل. التيّار الكهربائيّ يُحرّك جُزيئات الـDNA المشحونة بشحنة كهربائيّة سالبة باتّجاه الأنودا، وهو الالكترود المشحون بشحنة موجبة (مصدر الشحنة السالبة للـDNA هو مجموعات الفوسفات السالبة الموجودة فيه). كما يُوضح في الرسم 2.6 ب'، مقاطع الـDNA القصيرة تتحرك مسافة كبيرة نسبيًا وتصل إلى بعد كبير عن البئر التي وُضعت فيها العيّنة بالمقارنة مع مقاطع الـ DNA الطويلة التي تتحرك مسافة صغيرة نسبيًا ولا تبتعد عن البئر كثيرًا. لماذا تتحرك مقاطع الـ DNA القصيرة مسافة كبيرة في الجل؟ الجل هو بوليمير ذا بنية مساميّة، يمكن أنْ نشبهه بالإسفنج. كلما كان مقطع الـ DNA أقصر يسهل عليه "الانزلاق" داخل "ثقوب" الأجروز ولذلك فإن المقطع يتحرك مسافة كبيرة نسبيًا للمسافة التي يقطعها مقطع DNA طويل. بعد مرور وقت مُعيّن يتم إخراج الجل من الجهاز، ثم يتمّ تعريض الجل لأشعة فوق بنفسجية (UV) (الرسوم 2.6ب' و2.6ج'). يُمكن أنْ نلاحظ خطوط مُشعة في الأماكن التي تتواجد فيها مقاطع DNA. السبب في ذلك يعود لارتباط مادة بروميد الايثيديوم بجزيئات الـ DNA خلال حركتها في الجل. الضوء فوق البنفسجي الذي يتمّ تعريض الجل له، يُمكّننا من رؤية إشعاع مادة بروميد الايثيديوم ذات التركيز الكبير في جزيئات الـ DNA بالنسبة لتركيزها في الجل، وهكذا يُمكننا أنْ نُحددّ الأماكن التي وصلت اليها مقاطع الـ DNA. كل خطّ برتقالي مُشع في الجل (الذي يظهر بالأبيض في الصورة المُصورة بالأسود والأبيض) يحتوي على جُزيء DNA بطول مُعيّن. في الجل المعروض في القسم ج للرسم 2.6 يُمكن رؤية خطوط مُشعة سميكة وبجانبها خطوط دقيقة ذات شدّة إشعاع أقلّ نسبيًا. كلّما كان الخطّ ذا سمك أكبر وذا اشعاع أكبر يتواجد فيه DNA أكثر.

انتبهوا: بروميد الإيثيديوم هي مادّة سامة ويمكن أنْ تسبب السرطان، لذلك تُمنع ملامستها للجسم.

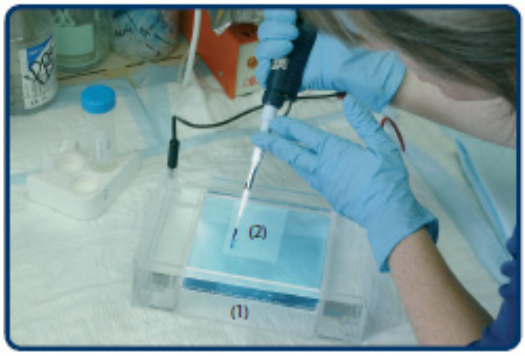
حتى الآن لا يُمكن أنْ نعرف اذا كانت طريقة الفصل هذه ستُستعمل أيضًا في المُستقبل البعيد، أو أنه سيتمّ ايجاد طُرق أسهل وأرخص منها.

أ1.نضع الجل في جهاز الفصل الذي يُمرّر تيّار كهربائيّ(جهاز الالكتروفوريزا)



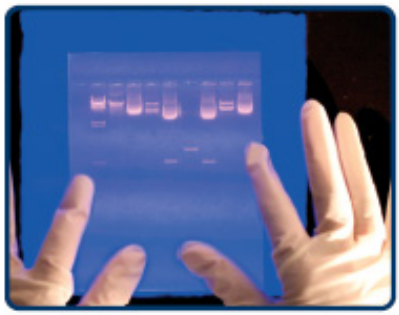
(1) جهاز يحتوي على بوفر (2) جل فيه 12 بئر

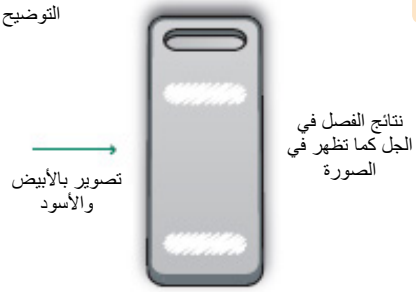
أ2. نُحمّل عيّنة DNA داخل البئر في الجل



ب. حركة مقاطع الـDNA في الجل

ج. جل يحتوي على DNA وضع على مُسطّح يُطلق أشعة UV





رسم 2.6: فَصْل مقاطع الـDNA بحسب طولها (حجمها) بواسطة الكتروفوريزا في جل أجروز.

أ. إدخال جل الأجروز الى داخل جهاز الاكتروفوريزا وتحميل عيّنات الـDNA في آبار الجل.

ب. وصف تخطيطيّ لفصل مقاطع الـDNA في بئر واحدة في الجل والتي تُجسد مبدأ حركة المقاطع بحسب حجمها. كلّما كان المقطع أصغر فإنّه يقطع مسافة أكبر.

ج. جل حقيقي يحوي مقاطع DNA مُختلفة، مُضاء بأشعة UV. تُمثل الخطوط المُشعة مقاطع DNA مُختلفة، وأحجامها مُختلفة أيضًا. معنى الاختلاف في سُمك الخطوط وفي شدّة الإشعاع موجود في الصندوق 2.1.

سؤال 2.4

عندما نقوم بتحضير خريطة التقييد يجب أن نأخذ بعين الاعتبار بأنّها خريطة تقديرية. فمثلاً، إذا لم نلاحظ في الجل تغييرًا في طول مقطع الـ DNA بعد تعريضه لإنزيم قَطْع مُعيّن، نفترض أنّ هذا المقطع لا يحوي موقع قَطْع لهذا الإنزيم. ما هي الأسباب المحتملة وراء اعتبار الخريطة التي حُضرت بواسطة استعمال إنزيمات التقييد هي خريطة تقديرية فقط، أُذكر، على الأقلّ، سببين لذلك.

سؤال 2.5

من أجل التدّرب على طريقة تحضير خريطة التقييد، إفترضوا أنّ لديكم جزيء DNA طوله 6Kb، خريطة التقييد هذا المقطع هي الموجودة في الامكانية ب' في الرسم 2.5 أ'.

أ. ما هو عدد الخطوط التي تظهر في الجل، بعد قَطْع جُزيء الـ DNA المذكور قطعًا مُزدوجًا بواسطة الإنزيمات EcoRI و BamHI؟

ب. ما هي أطوال مقاطع الـ DNA الموجودة في هذه الخطوط؟

ج. بماذا يتميّز الخطّ الذي يُمثِّل مقطع الـ DNA ذا الوزن الجُزيئي الأصغر(الحجم الأصغر) أي الخط الأبعد عن البئر، عن بقية الخطوط؟

سؤال 2.6

عند تشخيص مقطع DNA طوله Kb6.6 بواسطة انزيمات التقييد HindIII وَ SmaI، حصلنا على النتائج التالية:

1. بَعد القَطْع بالإنزيم HindIII حصلنا على مقاطع أطوالها 4.2Kb، 2Kb وَ0.4Kb.
2. بَعد القَطْع بالإنزيم SmaI نَتَجت مقاطع طولها 3.6Kb وَ3Kb.
3. بَعد القَطْع المُزدوج بالإنزيمات HindIII وَ SmaI نَتَجت مقاطع أطوالها Kb3.2، Kb2، Kb1 وَ 0.4Kb.

أ. أُرسم جل تُعبّر فيه عن نواتج القَطْع المذكورة، إلى جانبها أُرسم مقطع الـ DNA بدون قَطْعه والى جانبه أُرسم أيضًا مؤشر حجم مقاطع DNA تشمل جُزيئات DNA بأطوال معروفة مُسبقاً، طولها 1، 2، 3، 4، 5، 6 وَ7Kb .

ب. أُرسم خريطة التقييد مقطع الـ DNA الذي يبلغ طوله 6.6Kb. أشِر إلى الأماكن التي تقوم فيها الإنزيمات HindIII وَ SmaI بقطع هذا التسلسل.

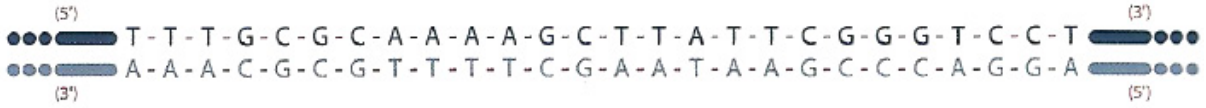
سؤال 2.7

مبنى جل الأجروز مساميّ، ويتمّ وضعه في مادّة سائلة. المقاطع الكبيرة تتحرّك بصعوبة في الجل، في حين أنّ المقاطع الأصغر تتحرك بسهولة أكثر وتقطع مسافة أكبر نسبيًا من المسافة التي تقطعها المقاطع الكبيرة في زمن معطى. عليكم القيام بفصل مقاطع صغيرة جدًّا وتحديدًا عليكم الفصل بين مقطعين طولهما 200 وَ 300 قاعدة. تقومون بذلك باستخدام جل نموذجيّ تركيز الأجروز فيه 1%. تبيّن أنّ الفصل بين هذه المقاطع الصغيرة صعب، حيث ظهر المقطعان كخط واحد. ، ماذا يجب أن تعمل لتتمكّن من الفصل بين هذه المقاطع وتشخيصها؟

سؤال 2.8

يُعرض في الرسم س' 2.8 تسلسلي نوكليوتيدات لمقطع مُعيّن من الـ DNA (الفصل 5 يتناول طرق تحديد تسلسل الDNA). مصدر تسلسلات الـDNA المعروضة هو منطقة مُحدّدة في الـDNA عُزلت من فردين مُختلفين من نفس النوع من الكائنات، مثلاً فأر.

تسلسل مُعيّن لدى الفرد أ



تسلسل مُعيّن لدى الفرد ب

רשם س'2.8: الاختلاف في تسلسل الـDNA بين فردين مُختلفين ينتميان لنفس النوع من الكائنات الحية.
هل توجد طريقة سريعة لتشخيص هذا الاختلاف بين الأفراد الآخرين؟

أ. حدِّدوا الفروق الموجودة بين تسلسلي الـ DNA لدى الفردين. في كل ما يتعلق بالتسلسل المُعطى، إفترضوا أنّ كلّ فرد من أفراد العشيرة يملك إحدى الإمكانيتين الموجودتين، في الرسم، فقط.

ب. لو رغبتم بتشخيص التسلسل المذكور لدى فرد ثالث من أفراد العشيرة، أي اذا اردتم أنْ تُحددّوا إذا كان التسلسل الموجود لديه مطابق لتسلسل الفرد أ أم لتسلسل الفرد ب، أيّ من بين الادوات التي تعلّمت عنها حتى الان ستستعمل لتحقيق هذا الهدف؟

ج. هل تدل، حسب رأيكم، الاختلافات في التسلسل بين الافراد ْ بالضرورة على وجود طفرة في التسلسل؟

النقاط الأساسيّة في الفصل

أُسس

- تشخيص مقطع DNA بواسطة قطعه وتشخيص نواتج القطع.
- فَصْل مقاطع DNA بحسب طولها (كِبرها)

مصطلحات

- ظاهرة التقييد
- موقع تقييد (Restriction site)
- قَطْع مُدرّج
- قَطْع أملس
- أطراف لاصقة
- بوليندروم

طرق

- قَطْع بواسطة إنزيمات التقييد
- الكتروفوريزا في الجل

تطبيقات

- خريطة تقييد (Restriction map)

أدوات في "صندوق الأدوات"

- بكتيريا (Bacteria)
- بكتريوفاجات
- إنزيمات التقييد (Restriction enzymes)
- جل أجروز
- جهاز الكتروفوريزا

مواد

- أجروز
- بروميد الإيثيديوم

مواقع انترنت

- www.neb.com موقع شركة New England Biolabs من بين ما تقوم به الشركة، تقوم بتزويد انزيمات التقييد؛ انظروا كُتيّب انزيمات التقييد والمعلومات التقنية الموجودة فيه استعملوا Enzyme finder.

استنساخ الDNA بواسطة ناقلات

تشخيص ودراسة الـ DNA الجينومي أُلزِم رواد مجال بحث الجينوم باستعمال إنزيمات التقييد. قطع الـ DNA الجينومي بواسطة إنزيمات التقييد أَنتَج خليط من المقاطع القصيرة، ومن أجل مُتابعة عملية البحث والتطبيق توجد حاجة لمُضاعفة كل مقطع بشكل منفرد. يجب أن نعلم أنَّ هناك قاعدة اساسيّة تقول: فقط مقطع DNA معزول، ليس طويل جدًّا موجود بكميات كبيرة يُمكن أن يُستعمل في البحث وفي تطبيقات أخرى.

كان كوهن وبوير أول "المهندسين الوراثيين" لكّن غالبيّة العاملين في الهندسة الوراثيّة في أيامنا لا يُعرفون باسم "مُهندسين وراثيين" وإنما بيولوجيين جُزيئيين. يعود السبب لهذا الأمر إلى أنَّ الهندسة الوراثيّة في أيامنا تُستخدم كأداة لتقدم مجالات بحث وتطبيق مُتعددّة، عمليًا، نحتاج في مجال الهندسة الوراثيّة إلى معلومات كثيرة في مجالات إضافيّة. هذا لم يحصل أبدًا: كوهن وبوير لم يتعاملا بتجارة المفرّق

حتى سنة 1972 لم تُعرف طريقة تُمكّن من عزل ومُضاعفة مقاطع قصيرة من الـDNA . لكن، في هذه السنة حدث تحوّل مهم بعد لقاء الطبيب الأمريكي ستانلي كوهن (Stanley N.Cohen) مع العالِم الأمريكي هربرت بوير(Herbert Boyer) ، اللذان نُعتا بالمهندسين الوراثيين الأوائل. فكر الاثنان بنهج تجريبي مكّن من عزل ومُضاعفة مقطع DNA قصير داخل البكتيريا.

عزل مقطع DNA **ومُضاعفته** داخل الكائن الحي كالبكتيريا يُعرف **بالاستنساخ** (DNA Cloning). في الاستنساخ الذي تشترك فيه الخلايا تَنْتُج كلونة (Clone) جديدة مكوّنة من خلايا عديدة مُتطابقة وراثيًا، وفي جميعها كمية هائلة من مقطع الـ DNA المعزول. تجربة كوهين وبوير الرائدة غيرت مجال البيولوجيا كله إلى حد كبير.

أي وسائل استخدمت من قبل كوهين وبوير من أجل استنساخ مقطع DNA؟ كيف تطورت طُرق الاستنساخ منذ ذلك الحين؟ هذا جُزء مما يعالجه هذا الفصل.

الدكتور جينطي الذي أنهى عمله في المختبر في ساعات الليل المُتأخرة، خرج ليتناول الحمص في مطعم مُجاور، لم يكن الحمص لذيذًا، لذلك نادى للنادل فورًا...

"ارغب أن أعلمك" قال جينطي بغضب، "أن الحمص فظيع، إنه تالف وهذا يعني أنه مليء بالبكتيريا، واِعلم أن شخص يعمل بعملي كان من الممكن أن يقذف الصحن أمام وجهك مباشرة، ويقول لك أن البكتيريا تحوي بالتأكيد على طن من البلازميدات...."

"حقًا؟" قال النادل..."اختلطت الأمور علي قليلًا... أأنت جاد، أنت الشخص الأول الذي يقول بلازميدات... بالإضافة إلى ذلك، البلازميدات لم تكن في قائمة الطعام؟"

"حقًا!" صرخ جينطي

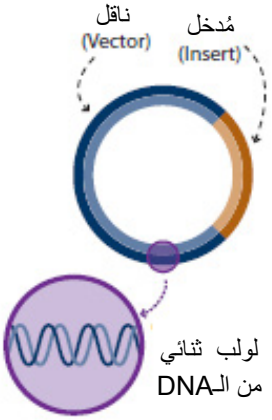
"جيد، اذًا أنا لا أفهم ما المشكلة" قال النادل، "لا تدفع مُقابل البلازميدات...."

البلازميدات كناقلات للجينات في عملية الاستنساخ (פלסמידים כנשאים בשיבוט)

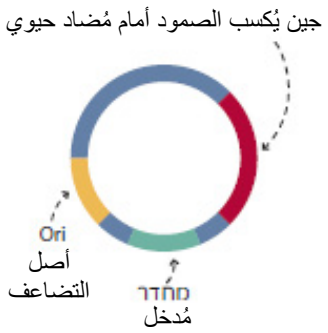
الـDNA الجينومي التابع للبكتيريا موجود في كروموسوم واحد دائري مبني من عدة ملايين من القواعد. في بعض الأحيان يُمكن أن تحوي البكتيريا جُزيئات DNA دائرية إضافية ليست جُزءً من الكروموسوم. هذا الجُزيء الدائري مبني من عدّة آلاف من القواعد ويُعرف باسم **بلازميد** (رسم 3.1). في بعض الأحيان توجد في البكتيريا المُختلفة بلازميدات مُختلفة، تختلف فيما بينها بطول وتسلسل الـDNA الموجود فيها. لكل بلازميد توجد خريطة تقييد خاصة به (الرسم 3.2).

أ. صورة البلازميد

ب. رسم توضيحي أول لعرض البلازميد



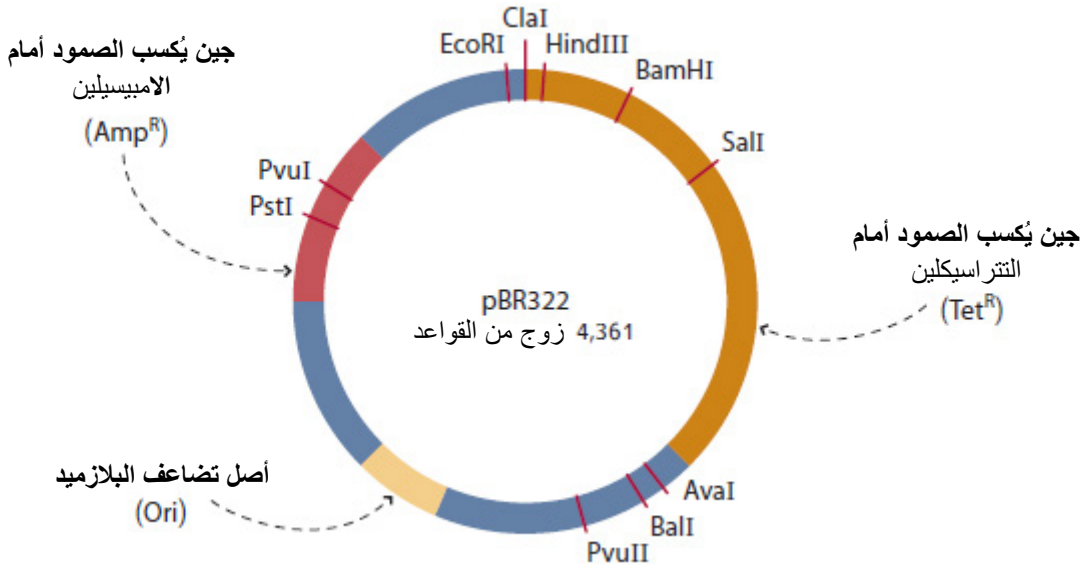
ج. رسم توضيحي ثاني لعرض البلازميد



د. بلازميدات في البكتيريا؛ كل بلازميد أصغر بـ1000 مرّة تقريبًا من الكروموسوم

رسم 3.1: طُرق مُختلفة لعرض البلازميد

بالرغم من بساطة طرق العرض المتعدّدة للبلازميد، يجب أن لا نُخطئ بالنسبة لمُميّزات البلازميد: البلازميد مكوّن من DNA كالـDNA الموجود في الكروموسوم، وهو ذا مبنى لولب ثنائي الجديلة كما هو معروض في القسم ب من الرسم.



رسم 3.2: خريطة تقييد البلازميد pBR322.

خريطة التقييد تعرض عدد قليل من مواقع تقييد مُختلفة، مكان أصل التضاعف والجينات التي تُكسب الصمود أمام المُضادات الحيوية.

اكتشف الاطباء وظائف البلازميدات في البكتيريا، في سنة 1959 قام اطباء يابانيون بعلاج مرضى بمرض ديزنطاريا (דיזינטריה)، وهو مرض يصيب الأمعاء بسبب إصابتها بالبكتيريا. عالج الاطباء المرضى بواسطة مُضاد حيوي، وقد نجحوا في شفاء العديد من المرضى، حيث أدت المُضادات الحيوية الى موت البكتيريا. بالرغم من نجاح الأطباء في شفاء العديد من المرضى الا أنهم لاحظوا أنَّ المضادات الحيوية لم تُحسّن وضع مرضى آخرين، أي أنّ البكتيريا طَوّرت مقاومة ضد المُضادات الحيوية لدى مرضى مُعينين. عندما قام الاطباء بعزل هذه البكتيريا، وَجدوا أنَّ البكتيريا المُقاومة للمُضادات الحيوية تحوي داخلها بلازميدات أيضًا، بالإضافةِ إلى كروموسوم البكتيريا. من خلال ذلك، ومن خلال تجارب إضافية تمّ الاستنتاج أنَّ البلازميدات هي التي منحت البكتيريا مقاومة للمُضاد الحيوي. في يومنا هذا معروف أنّ البلازميدات تمنح البكتيريا القدرة على الحياة في "بيئة معادية" (סביבה עוינת)، مثلًا: بيئة تحتوي على مُضادات حيوية. بالإضافة إلى ذلك فإنّ أنواع مُختلفة من البكتيريا يُمكنها أن تحوي بلازميدات مُختلفة، البلازميدات المُختلفة تحوي جينات مُختلفة تمنح صمودًا أمام أنواع مُختلفة من المُضادات الحيوية. كل جين يمنح مقاومة لمضاد حيوي مُعيّن يُشفّر إلى بروتين خاص يشترك بتفكيك أو إبطال مفعول (נטרול) هذا المُضاد الحيوي.

كانت البلازميدات موضوع بحث خلال سنوات عديدة، لكن فقط في سنة 1972 وُجد لها استخدامًا عمليًّا. في تلك السنة التقى الطبيب ستانلي كوهن والعالِم هربرت بوير في مؤتمر علمي وقررا أن يتعاونا فيما بينهما. ابدى كوهن اهتمامًا بالمُقاومة التي تُطورها البكتيريا أمام المُضادات الحيوية وتمحورت أبحاثه في دراسة البلازميدات، أما بوير فقد تمحورت دراساته في بحث إنزيمات التقييد. اقترح هذان العالمان فكرة عزل بلازميدين من نوعين مختلفين من البكتيريا، بحيث يكون هذان البلازميدان مُختلفان بحجمهما وبتسلسل قواعد الـDNA الموجود فيهما وإنتاج بلازميد جديد غير موجود بشكل طبيعي داخل البكتيريا. خطط العالمان لقطع كل واحد من هذه البلازميدات وخلط نواتج القطع كي يتمّ ارتباط مقطع DNA من أحد البلازميدين مع مقطع DNA من البلازميد الثاني. خطط العالمان أن يقوما بعزل ومُضاعفة البلازميد الناتج الجديد داخل البكتيريا (استنساخ أو كلونة-שיבוט).

لتنفيذ فكرة كوهن وبوير (كما هو موصوف في رسم 3.3)، في المرحلة الاولى، استُخلصت البلازميدات المُختلفة من البكتيريا، احتوى كل واحد من البلازميدات على جين يُكسب مُقاومة لمُضاد حيوي مُختلف. في المرحلة الثانية قُطعت البلازميدات المُختلفة بواسطة نفس انزيم التقييد، بعدها تمّ خلط المقاطع الناتجة من قطع البلازميدات المختلفة مع بعضها البعض. المقاطع المُختلفة كانت ذات نفس الأطراف اللاصقة لأنّها كانت نواتج قطع بنفس انزيم التقييد. في أعقاب حدوث التصاق واحد من بين التصاقات عديدة، بحيث يلتصق فيه الطرفين اللاصقين لمقطع واحد في كلا الطرفين اللاصقين لمقطع آخر يَنْتُج جُزيء حَلَقي (مرحلة ب' في رسم 3.3). من أجل حدوث **رباط كوفلنتي** بين الأطراف اللاصقة للمقاطع ومن أجل إنتاج بلازميد ثابت تتمّ إضافة الإنزيم DNAليجاز. الإنزيم **DNA ليجاز** يُنْتِج رباط فوسفو دي إستير بين النوكليوتيدات. أثبت كوهن وبوير ومن تابع عملهم أنه بفضل شموليّة (אוניברסליות) مبنى الـ DNA، يُمكن أن يتمّ ربط الأطراف اللاصقة أو حتى الاطراف الملساء لجزيء DNA من مصدر مُعيّن مع أطراف جزيء DNA من مصدر آخر. لهذه الصفة للـDNA توجد أهمية كبيرة، حيث تُمكّن من ربط مقاطع DNA مصدرها من كائنات حية مُختلفة! هذا أحد أسس ومبادئ الهندسة الوراثية والذي يُمكّن من إنتاج تركيبات جديدة من الـ DNA التي تُعرف باسم DNA ريكومبننتي (**DNA Recombinant**).

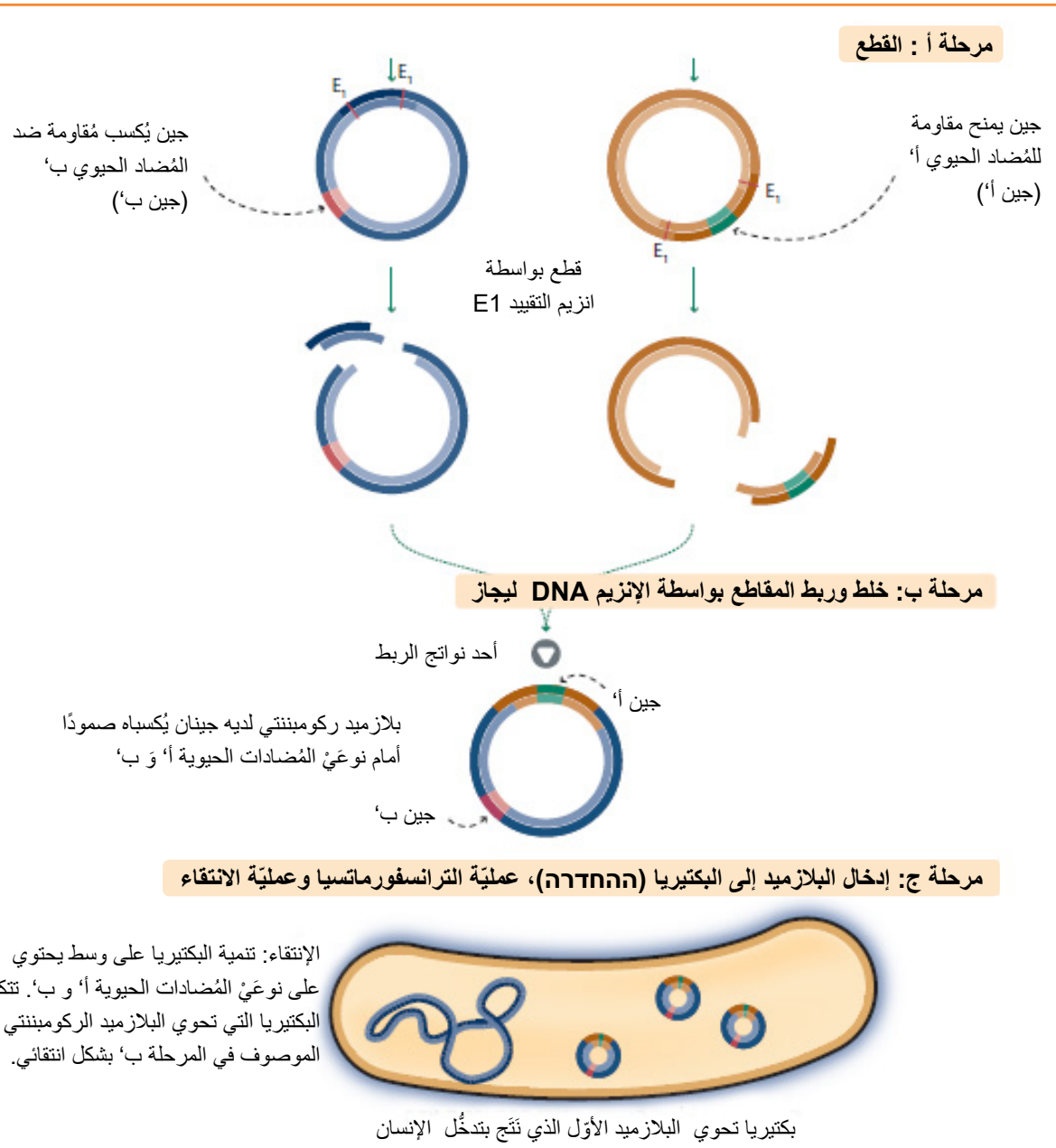
نواتج الربط في تجربة كوهن وبوير، البلازميدات الاولى التي أنتجها الإنسان(!)، أُدخلت إلى داخل بكتيريا خالية من البلازميدات. البكتيريا التي استوعبت هذا البلازميد أو بلازميد آخر مرّت بعملية تحوّل (**ترانسفورماتسيا טרנספורמציה ,Transformation**)، بما معناه حدث تغيير في الصفات الوراثية للبكتيريا التي استوعبت البلازميد. نفذ كوهن وبوير تجربة، فيها فقط البكتيريا التي تحتوي على بلازميد يُكسب صمود أمام نوعين من المُضادات الحيوية تستطيع البقاء حيَّة (مرحلة ج' في الرسم 3.3). بلازميد كهذا يُمكن أن يَنْتُج فقط إذا كان ناتج ربط مقطعين مصدرهما من بلازميدين مُختلفين، بحيث أنّ كل مقطع يحمل أحد الجينات التي تُكسب مقاومة لمُضاد حيوي معيّن. داخل البكتيريا التي تمكّنت من العيش بوجود نوعَيْ المضادات الحيوية، تمّت مُضاعفة البلازميد عددًا من المرّات. كذلك فإن البكتيريا تضاعفت، "ونسلها" (צאצאים) أيضًا يحتوي على نفس البلازميد، لذلك من المقبول القول أنّ البلازميد مرّ بعملية مُضاعفة (ריבוי). البلازميد الناتج من ربط المقطعين من مصدرين مُختلفين يُعرف باسم **بلازميد ركومبننتي** (פלסמיד רקומביננטי - Recombinant plasmid)، وهو بلازميد نَتَج بواسطة دمج جديد لمقاطع DNA (רקומבינציה)، وهو غير موجود بشكل طبيعي في الطبيعة. هذا البلازميد يُعرف في بعض الأحيان باسم "بلازميد مُهندَس" لأنّه يَنْتُج في الأنبوب بطرق الهندسة الوراثيّة.

كلمة **ترانسفورماتسيا** تصف تغيير في الصفات الوراثية والبيولوجية للخلية. هذا التغيير نابع من التعبير عن جينات مُعيّنة لم تكن موجودة من قبل في الخلية، وأُدخلت إليها من الخارج. إدخال هذه البلازميدات إلى البكتيريا يُمكّن من التعبير عن جينات موجودة داخل البلازميد، كتلك الجينات التي تُكسب الصمود أمام المُضادات الحيوية. هكذا وفي أعقاب دخول البلازميد، البكتيريا الحساسة للمُضاد الحيوي يُمكن أن تُصبح مُقاومة لهذا المُضاد، ويُقال عن هذه البكتيريا أنها مرّت بعملية ترانسفورماتسيا. بكتيريا مرّت بترانسفورماتسيا تُعرف باسم بكتيريا مُتحوّلة (טרנספורמנט). لأنها حصلت على صفة جديدة، وفي هذه الحالة صمود أمام مُضاد حيوي.

كما نلاحظ من النتائج المعروضة في الرسم 3.3، أثبت كوهن وبوير وبدون أدنى شك أنّه بالإمكان ربط مقطع من الـDNA من

بلازميد مُعيّن مع مقطع من الـDNA من بلازميد آخر. الناتج وهو البلازميد الركومبنتي، ذا قدرة على "حمل" ونقل مقطع DNA مرغوب إلى داخل البكتيريا، ولذلك فهو يُدعى **ناقل** (vector - נשא).

عمليًا يتمّ عزل مقطع الـDNA الذي دُمج مع البلازميد الذي أُدخل إلى البكتيريا، عن بقية المقاطع التي وجدت في الخليط في مرحلة ربط هذه المقاطع. البلازميد الذي يحمل المقطع الجديد في داخله يمرّ بعملية مضاعفة نتيجة لمُضاعفة مُتكرّرة للبلازميد داخل البكتيريا ونتيجة لمُضاعفة خلايا البكتيريا ذاتها. **عزل** مقطع الـDNA **ومُضاعفته** داخل كائن حي كالبكتيريا مثلاً، يُعرف باسم **استنساخ أو كلونة (שיבוט - DNA cloning)**



رسم 3.3: وصف سير تجربة كوهن وبوير الرائدة لإنتاج البلازميد الركومبنتي الأوّل الذي صنعه الانسان.
بلازميدان مُختلفان قُطعا بواسطة نفس إنزيم التقييد، مكّنوا من ارتباط المقاطع الناتجة. كان الهدف أن يُستنسخ داخل البكتيريا أحد نواتج الربط، أي، البلازميد المكوّن من مقطعين من البلازميدين المُختلفين، والذي يملك جينين يُكسبانه الصمود أمام نوعَيْ المُضادات الحيوية. لأجل ذلك نُميّت البكتيريا على وسط يحوي نوعَيْ المُضادات الحيوية المُلائمين.

المُصطلح "استنساخ" جاء ليوضح الحقيقة أنّه خلال العزل والمُضاعفة تقوم خليّة واحدة بإنتاج كلونة (שבט clone-) جديدة من الخلايا المُتطابقة من ناحيّة وراثيّة، وفي جميع هذه الخلايا يتواجد نفس مقطع الـDNA المعزول.

فيما يلي تلخيص لبعض الصفات الهامة للبلازميد، والتي تُمكّنه من أداء وظيفته كناقل ناجع في استنساخ الـDNA:

1. البلازميد أصغر بكثير من كروموسوم البكتيريا، لذلك يُمكن استخلاص البلازميدات في المُختبر بسهولة عن طريق إزالة كروموسوم البكتيريا، جدار البكتيريا، البروتينات والـRNA.

2. بعد استخلاص البلازميد يُمكن إجراء تغييرات فيه: يُمكن الربط بين البلازميد وبين مقاطع DNA أخرى عن طريق استخدام إنزيمات التقييد وإنزيم DNA ليجاز. بكلمات أخرى، يُمكن إدخال مقطع DNA مُعيّن إلى البلازميد وعندها يَنْتُج بلازميد ركومبنتي. المقطع الذي يتمّ دمجه داخل البلازميد والذي لم يتواجد فيه من قبل يُعرف باسم **مُدخل** (מחדר insert) (رسم 3.1 ب').

3. يُمكن إدخال بلازميد واحد إلى بكتيريا لم يتواجد فيها بلازميد من قبل. البلازميد الذي مصدره من خليط من البلازميدات ودخل إلى البكتيريا يمرّ عمليًّا **بعزل** عن بقية البلازميدات المختلفة الموجودة في الخليط.

4. البلازميدات تمرّ **بمُضاعفة** ناجعة داخل البكتيريا. عمليًا، البلازميد يتضاعف عددًا كبيرًا من المرّات خلال جيل واحد من البكتيريا، وهذا بعكس الكروموسوم الذي يتضاعف مرّة واحدة فقط خلال الجيل الواحد. مُضاعفة متكرّرة للبلازميد يُمكن أن تؤدي إلى أن يصل عدد نُسخ البلازميد في البكتيريا الواحدة إلى عدة عشرات أو حتى مئات، إلى جانب نسخة واحدة فقط من الكروموسوم. مُضاعفة البلازميدات، بالإضافة إلى قدرة المُضاعفة للبكتيريا ذاتها، تُمكّن من الحصول على المقطع الذي عُزل في البكتيريا بكميات كبيرة، هذه الكميات الكبيرة ضرورية خلال العمل في مجال الهندسة الوراثيّة. العزل والمضاعفة هما جوهر عملية **الاستنساخ**.

يُمكن أن تتمّ مُضاعفة متكرّرة للبلازميد بفضل منطقة مراقبة مُضاعفة ذاتية موجودة في البلازميد وتُسمّى **"أصل التضاعف"** ("origin of replication") وباختصار تُعرف بـ **"Ori"** (انظر رسم 3.2). "أصل التضاعف" هو تسلسل قصير من الـDNA موجود في البلازميد، حيث ترتبط إليه بروتينات مسؤولة عن فصل جدائل الـDNA من أجل تمكين الإنزيم DNA بوليميراز، المسؤول الأساسي عن مُضاعفة الـDNA من القيام بعمله.

5.البلازميدات التي تُستعمل لأهداف الاستنساخ تحمل جين يمنح الصمود أمام مُضادات حيوية. إذا دخل هذا الجين الى الخلية فهو يُمكّن الخلية من العيش في ظروف معيشية تحوي المُضاد الحيوي الملائم. ظروف معيشية كهذه تمنع تكاثر بكتيريا لا تحتوي على هذا البلازميد. كما سيوضح لاحقًا، هذا الانتقاء (סלקציה) ضروري لتحقيق الاستنساخ.

تجربة كوهن وبوير شملت ربط مقطع DNA من بلازميد معيّن، مع مقطع DNA من بلازميد آخر، ومضاعفة البلازميد الركومبنتي في البكتيريا. في هذه التجربة الرائدة لم يكن هناك اهتمام خاص بعزل ومُضاعفة مقطع DNA مُعيّن: كانت تجربة بسيطة تهدف إلى إثبات المبدأ الذي بحسبه يُمكن إنتاج بلازميد ركومبنتي بواسطة بلازميدات وبكتيريا. منذ ذلك الحين تطوّرت طرق العمل، وخلال العمل الروتيني في المختبر الذي يشترك فيه بلازميدان، يُطمح عادة إلى نقل مقطع مُعيّن من أحد البلازميدات إلى البلازميد الآخر. في الرسم 3.4 يتمّ وصف كيفية نقل مقطع DNA معروف مُسبقًا من بلازميد معيّن الى بلازميد آخر. تُجرى التجربة الموصوفة في الرسم 3.4 لأجل بحث الوظيفة البيولوجية لمقطع مُحدّد من الـDNA (مقطع 2 من بلازميد B). فرضية البحث هي أنّه يُمكن تنفيذ البحث فقط إذا وُجد هذا المقطع في بلازميد A. لأجل ذلك نبدأ باستخلاص البلازميدات المُختلفة من البكتيريا، بعدها نقوم بقطع البلازميدات بواسطة إنزيمات التقييد.

رسم 3.4: نقل مقطع DNA من بلازميد معيّن إلى آخر واستنساخ البلازميد الركومبيننتي

بَعد قطع البلازميدات نستعمل الجل من أجل الحصول على المقاطع التي نرغب بربطها، وبَعد خلط المقاطع المرغوبة وربطها نُدخل نُسخ عديدة من نواتج الربط، البلازميد الركومبيننتي، إلى البكتيريا. البكتيريا التي مرّت بترانسفورماتسيا تُنتج مستعمرات من البكتيريا.

إذا قُطع البلازميد الذي سيُستعمل كناقل بواسطة إنزيم تقييد واحد فقط، يجب أن تتمّ مُعالجته بَعد القطع بواسطة إنزيم إضافي يُدعى فوسفاتاز قلوي (פוספאטאז בסיסי-Alkaline Phosphatase) ويُسمّى باختصار A.P.(انظر الصندوق). بَعد ذلك يتمّ فصل المقاطع الناتجة من قطع البلازميدات المُختلفة بواسطة الجل. هذه المرّة الفصل بالجل ليس فقط بهدف تشخيص المقاطع وإنما أيضًا بهدف الحصول على المقاطع التي يجب أن نربطها لنحصل على البلازميد الريكومبنتي. بَعد الاستخلاص من الجل (انظروا إلى الصندوق السفليّ من الجهة اليُسرى)، يتمّ خلط المقاطع التي نرغب بربطها وإضافة الـDNA ليجاز. تَنْتُج بلازميدات تشمل في داخلها مقطع جديد إضافي هو المُدخل (המחדר). هذه البلازميدات هي بلازميدات ريكومبنتية. بالإضافة الى هذه البلازميدات تُنْتِج بلازميدات خالية من المُدخل وهي ناتجة من مقاطع "هربت" من عمل الإنزيم A.P.. بَعد ذلك يتمّ إدخال نواتج الربط الى البكتيريا (ترانسفورماتسيا). بسبب ظروف التجربة الخاصة، الى خلية بكتيريا واحدة يدخل بلازميد واحد فقط وهكذا يتمّ تطبيق المرحلة الأولى من عمليّة العزل. تُنقل البكتيريا الترانسفورماتية (المُتحوّلة) إلى وسط غذائي يحتوي على المُضاد الحيوي الذي يُمكّن من عملية الانتقاء (סלקציה). في ظروف الانتقاء هذه تعيش وتتكاثر فقط البكتيريا الترانسفورماتية التي تحتوي على البلازميد الذي يشمل جين يمنح البكتيريا مُقاومة للمُضاد الحيوي الموجود في الوسط الغذائي. البكتيريا التي مرّت بترانسفورماتسيا تتكاثر وتُنْتِج مستعمرة معزولة "كلونة بكتيريا".

الإزيم A.P. ليس إنزيم تقييد، وهو يُستعمل هنا من أجل إزالة مجموعة فوسفات (קבוצת זרחה) موجودة في نهاية الأطراف اللاصقة للبلازميد. بهذه الطريقة، المقطع الذي يُعالج بالإنزيم لا يُمكن أن يعود ويُغلق على نفسه بوجود الإنزيم DNA ليجاز بواسطة رباط فوسفو دي إستير كوفلنتي. المقطع الإضافي (المُدخل) يجب أن يزوّد مجموعات الفوسفات الضرورية لإنتاج الأربطة الكوفلنتية بين المُدخل والناقل. بلازميد دائري كامل فقط يؤدي إلى حدوث ترانسفورماتسيا للبكتيريا. استعمال بلازميد تمّت مُعالجته بـA.P. يضمن أن تكون نسبة كبيرة من بين البلازميدات الدائرية الناتجة بعد خلط المقاطع وارتباطها، هي بلازميدات تحوي مقطع إضافي وليست بلاسميدات خالية من المدخل.

من اجل استخلاص مقطع DNA من الجل يتم قطع المنطقة التي يتواجد فيها المقطع ومن ثم خلط قطعة الجل بالماء، بعد ذلك يتم حضن المحلول بوجود مادة تربط الـ DNA، يتم تنقيّة هذه المادة وبعدها يتم استخلاص الـ DNA النقي.

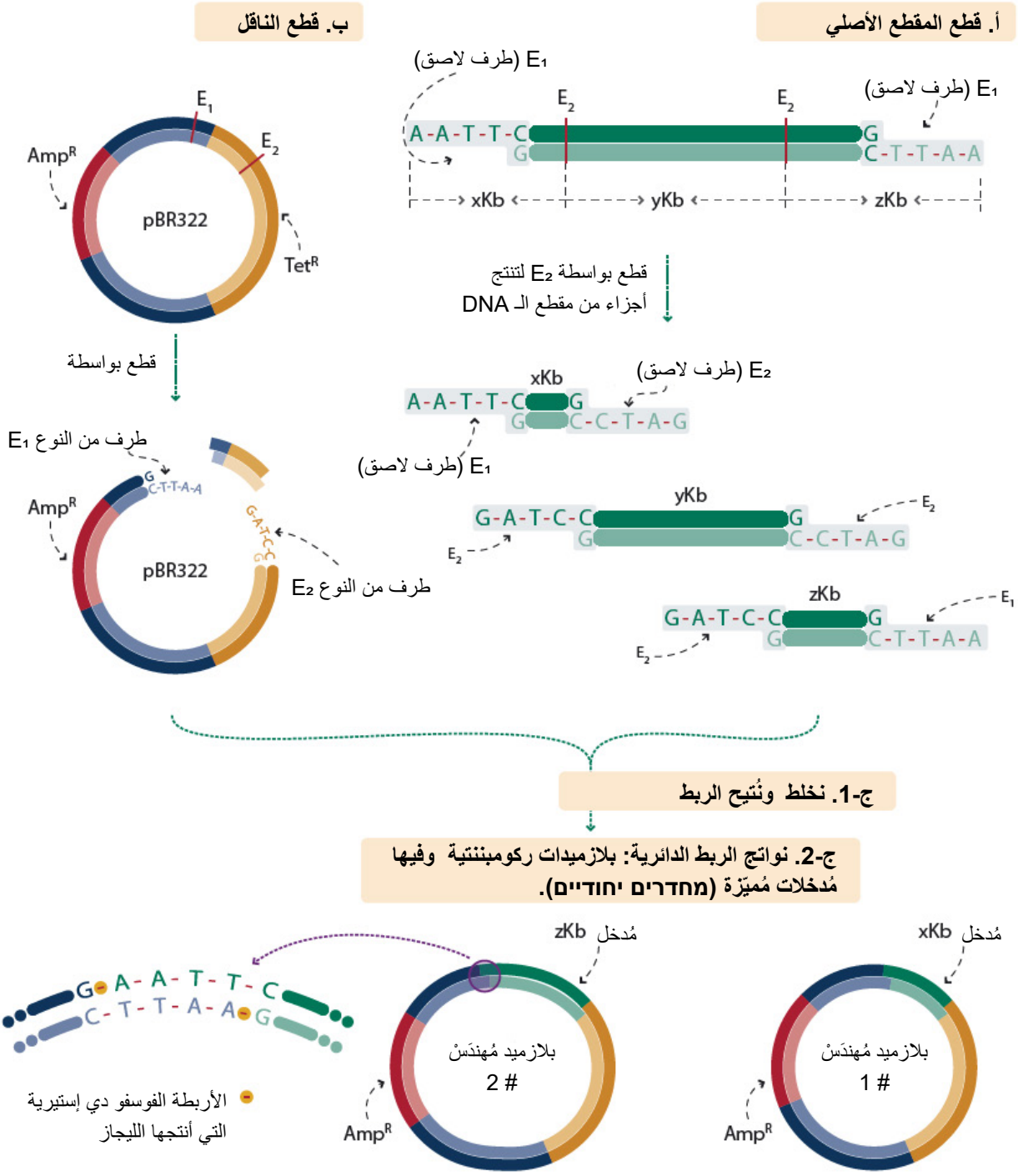
استنساخ عدة مقاطع من الـDNA داخل بلازميد في نفس الوقت:

في بعض الأحيان نرغب، في نفس الوقت، أنْ نقوم باستنساخ أكثر من مقطع واحد من خليط يحتوي على عدد كبير من مقاطع الـ DNA. في مثل هذه الحالات لا نستعين بالجل، وإنما نستغل قدرة البلازميدات والبكتيريا على عزل مقاطع الـDNA من بين مقاطع كثيرة موجودة في الخليط.

مثلاً نفترض أنّه لدينا مقطع DNA، خريطة التقييد الخاصة بهذا المقطع معروضة في الجهة العليا للرسم 3.5. يُمكننا أن نُسمي المقطع الأصلي باسم "مقطع المصدر" (מקטע מקור). نفترض أيضًا أننا نرغب في بحث خواص مناطق مُختلفة في هذا المقطع من الـDNA. لهذا الهدف يجب أن نستنسخ اقسام (اجزاء –תתי מקטע) من مقطع المصدر (كما ذُكر سابقًا، فقط مقطع ليس كبير نسبيًا، معزول وموجود بكمية كبيرة، أي المقطع الذي مرّ باستنساخ يُمكن استعماله في البحث). في المرحلة الأولى يتمّ قطع مقطع المصدر وعندها نحصل على خليط من مقاطع من الـDNA (في المثال في الرسم 3.5 تُعرض ثلاثة أجزاء من المقطع المذكور (תתי- מקטע)). في الرسم 3.5 يُمكن رؤية مراحل استنساخ أجزاء المقطع بواسطة البلازميد pBR322.

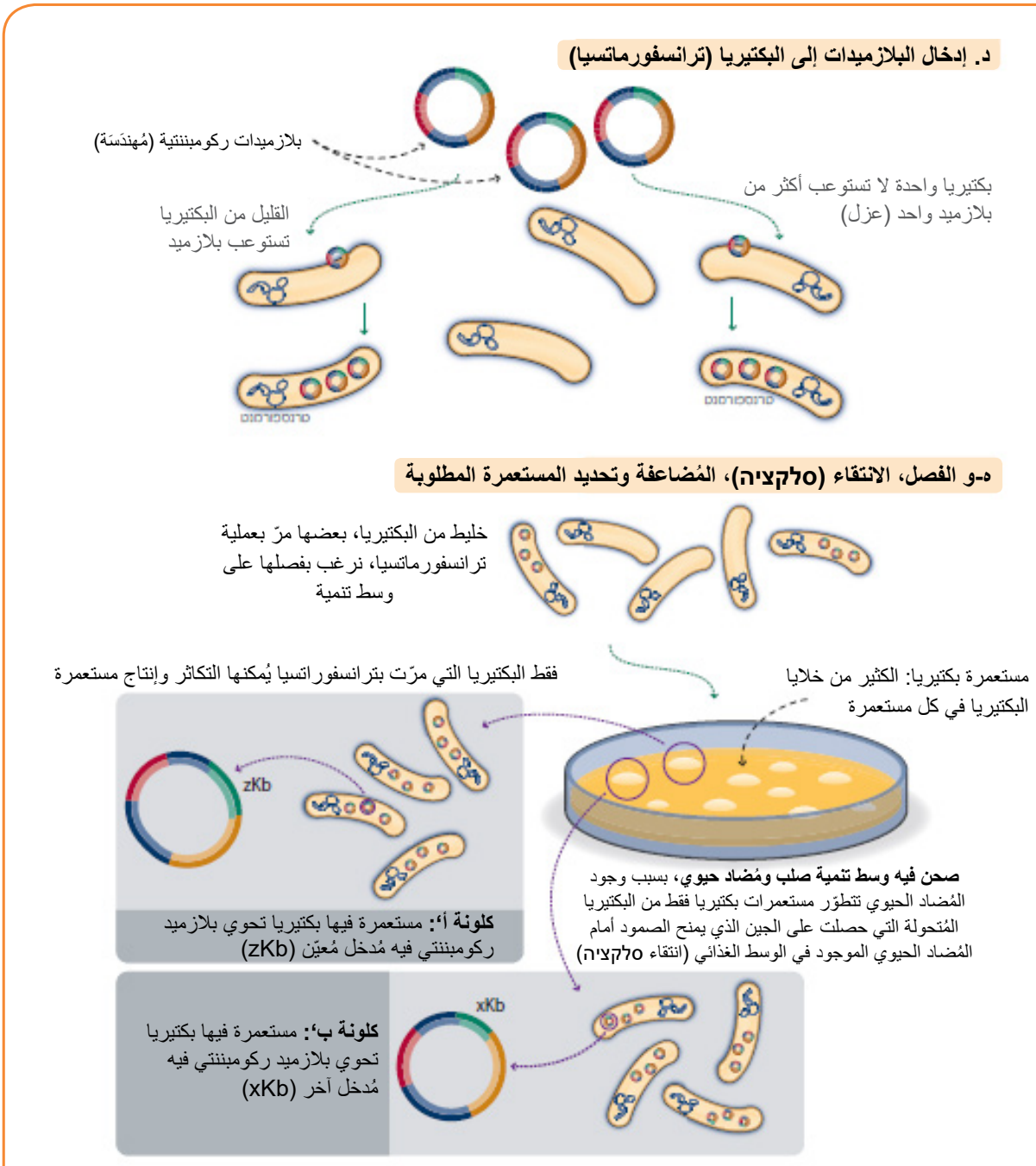
المراحل الستة الأساسية (أ' حتى و' في هذه الفقرة و أ' حتى و' في الرسم3.5 أيضًا) اللازمة لاستنساخ عدد من مقاطع الـDNA في نفس الوقت بواسطة البلازميدات والبكتيريا هي كالتالي:

أ. **قطع الـ DNA الذي نرغب باستنساخ مقاطع منه:** يتمّ قطع "DNA المصدر" بواسطة إنزيم أو إنزيمات تقييد للحصول على خليط من مقاطع الـ DNA.



رسم 3.5: استنساخ عدد من المقاطع في نفس الوقت بواسطة البلازميدات والبكتيريا.

بَعد قطع المقطع الاصلي، نُتيح ربط أجزاء المقطع مع جُزيء بلازميد، ينتج عدد معيّن من نواتج الربط، بلازميدات ركومبيننتية خاصة (פלסמידים רקומבננטיים יחודיים) تتمة الرسم في الصفحة التالية.



رسم 3.5: تتمة.

الترانسفورماتسيا للبكتيريا بواسطة البلازميدات الركومبيننتية المُختلفة، وفصل البكتيريا التي مرّت بترانسفورماتسيا على وسط يحوي مُضاد حيوي (وسط انتقائي) يُمكن من اتمام الاستنساخ. تَنْتُج مستعمرات بكتيريا وفي كل واحدة منها بلازميد ركومبيننتي يحوي مُدخل مُعيّن.

ب. **قطع البلازميد:** نقوم بقطع البلازميد بواسطة إنزيم او إنزيمات تقييد (إنزيمات قاطعة) مناسبة. بعد قطع البلازميد يتمّ تحريك النواتج في جل الكتروفوريزا، ويتمّ عزل المقطع الذي سيُستعمل كناقل من أجل ربطه مع المقاطع الناتجة في المرحلة الاولى

ج. **ربط المقاطع (Ligation):** يتمّ خلط مقطع البلازميد الذي يُستعمل كناقل مع مقاطع الـDNA التي نرغب بربطها به لأجل استنساخها. الإنزيمات المُستعملة لقطع الناقل تُحدّد الأطراف اللاصقة الناتجة. نوع الأطراف اللاصقة الناتجة عند الناقل تُحدّد أي مقطع من المقاطع الناتجة في المرحلة أ' ترتبط بالناقل، أي ما هي الأطراف التي يُمكنها أنْ ترتبط بأطراف الناقل؟ من

المفهوم أنّ نوع الإنزيمات المستعملة لقطع الناقل تُحدّد حسب خريطة التقييد، الموقع الدقيق الذي ستندمج فيه المقاطع التي نرغب بدمجها مع الناقل. في نهاية مرحلة الربط تَنْتُج بلازميدات ريكومبننتية. في المثال المعروض أمامنا ينتج خليط من بلازميدات ريكومبننتية مُختلفة تحوي أجزاء مُختلفة من المقطع.

د. **الترانسفورماتسيا:** في هذه المرحلة يتمّ ادخال البلازميدات الريكومبننتية إلى البكتيريا. ظروف التجربة تُمكّن خليّة البكتيريا الواحدة من استيعاب بلازميد واحد فقط. لهذا يتمّ عزل أوليّ للبلازميد الريكومبننتي الذي دخل إلى البكتيريا عن سائر البلازميدات الريكومبننتية الأخرى. بعد دخول البلازميد إلى البكتيريا تتمّ مُضاعفته داخل البكتيريا عددًا كبيرًا من المرّات، وهكذا تتمّ المُضاعفة الأولية للبلازميد داخل خليّة البكتيريا.

في مرحلة الربط بين مقطع الـDNA الناقل والمقطع الذي نرغب بإدخاله إلى البكتيريا يتكوّن أولًا اربطة هيدروجينية ضعيفة بسبب وجود أطراف لاصقة ذات تسلسل قواعد مُكمّل. بعدها يقوم الإنزيم DNA ليجاز بالربط الكوفلنتي بين مقطع الـDNA والناقل وبتكوين أربطة فوسفو دي استيرية بينهما.

ه. **لإكمال الاستنساخ نُتيح عمليّة فصل، انتقاء ومُضاعفة ثانوية:** نقوم بنقل البكتيريا التي مرّت بترانسفورماتسيا (تحوّل) (المرحلة د في الرسم 3.5) إلى صحن بتري يحوي غذاء ومُضاد حيوي. المُضاد الحيوي يُمكّن من انتقاء البكتيريا بما معناه، فقط البكتيريا التي حصلت على البلازميد الذي يحوي جين يمنح الصمود أمام المُضاد الحيوي، تستطيع العيش والتكاثر في هذا الوسط. البكتيريا التي لم تحصل على البلازميد المُناسب وهي غالبيّة الخلايا تموت بوجود المُضاد الحيوي في بيئتها.

خلية البكتيريا التي مرّت بعملية ترانسفورماتسيا واستطاعت أن تعيش وتتكاثر على وسط التنمية، تُنتج خلال يوم أو أقل مستعمرة بكتيريا منفردة حجمها بحجم رأس الدبوس، حيث نتجت من تكاثر خليّة بكتيريا ونسلها. في مستعمرة كهذه تتواجد ملايين خلايا البكتيريا التي تحوي البلازميد الريكومبننتي ذاته. هكذا تحققت عمليّة العزل والمُضاعفة الثانوية للبلازميد.

ظروف التجربة تمكّن من فصل الخلايا التي مرّت بعمليّة ترانسفورماتسيا عن الخلايا الأخرى عن طريق نقلها الى وسط التنمية، عندها نحصل على مستعمرات بكتيريا منفصلة الواحدة عن الأخرى. الفصل بين المستعمرات يُمكّن من تحقيق العزل في عمليّة الاستنساخ.

و. **تحديد المُستعمرة المطلوبة:** في هذه المرحلة يتمّ تشخيص المُستعمرات الناتجة، نتساءل أي بلازميد يتواجد في كل مُستعمرة، وبشكل أدق أي مقطع DNA دخل إلى البلازميد الموجود في المستعمرة؟ لتشخيص مستعمرة معيّنة يتمّ نقل بكتيريا من هذه المستعمرة الى وسط تنمية سائل. تتمّ تنميّة هذه البكتيريا عدّة ساعات في درجة حرارة 37ºC، بعدها نحصل على مُستنبت بكتيريا سائل مصدره من مستعمرة واحدة. نقوم باستخلاص نُسخ كثيرة من البلازميد الموجود داخل خلايا البكتيريا. يتمّ قطع البلازميد الذي استُخلص من المستعمرة التي نقوم بفحصها بواسطة إنزيمات التقييد التي استُعملت في مرحلة قطع البلازميد الناقل قبل إدخال المُدخل إليه. أخيرًا يتمّ تحديد طول المُدخل بواسطة التحريك في الجل، كذلك يُمكن ان نحصل على معلومات عن مميّزات البلازميد الموجود في المستعمرة التي اخترناها (الكلونة المفحوصة).

للتلخيص، ما هي نتيجة تجربة استنساخ عدّة مقاطع من الـ DNA في نفس الوقت، كما هو موصوف في الرسم 3.5؟ المقطع ذا الأطراف من نوع E1 قُطعت بواسطة الإنزيم E2 ونتجت من عمليّة القطع ثلاثة مقاطع أقصر منه، أطوالها zKb, yKb, xKb. فقط مقطعان من بين المقاطع الثلاثة كانت ذات أطراف لاصقة E1/E2 ولذلك فقط هما يستطيعان الارتباط بالناقل الذي قُطع بواسطة الإنزيمات E1 وَ E2. بالمُقابل المقطع الذي يبلغ طوله zKb كان ذا أطراف لاصقة E2/E2، لذلك لم يكن بإمكانه الارتباط بالناقل ذا الأطراف E1/E2. لذلك، من المُرجح أن تحوي 50% من المستعمرات الناتجة بعد الانتقاء على بلازميد مع مُدخل بطول xKb، وَ 50% من المستعمرات تحوي بلازميد مع مُدخل بطول zKb.

سؤال 3.1

لديك مقطع DNA من مصدر مُعيّن نَتَج بَعد القطع بواسطة الإنزيم HaeIII، ومقطع DNA من مصدر آخر نَتَج بَعد القطع بواسطة الإنزيم HpaI، هل يُمكن الربط بين مقطعَي الـDNA المذكورين بالرغم من الحصول عليهما بواسطة إنزيمات تقييد مُختلفة (استعينوا بالقائمة 2.1)؟ ما هو الإنزيم الذي نحتاج إليه للقيام بربط المقاطع وما هو نشاطه؟

سؤال 3.2

1. سؤال تلخيصي: اذكروا كل المكوّنات اللازمة من أجل نقل مقطع DNA من بلازميد مُعيّن إلى بلازميد آخر.
2. اقترحوا طريقة لنقل مقطع DNA من بلازميد أ الى داخل بلازميد آخر، بلازميد ب، بحسب خريطة التقييد الموجودة في رسم السؤال 3.2. هدفكم نقل المنطقة أو المقطع المُشار إليه بسهم ذا رأسين والموجود في بلازميد أ إلى داخل بلازميد ب. طُلب منكم نقل المقطع الأصغر الذي يشمل المنطقة المطلوبة إلى بلازميد ب. الأعداد في خريطة التقييد تُشير الى عدد القواعد من نقطة بداية العدّ (نقطة الصفر). بمُساعدة هذه الأعداد يُمكن حساب الأطوال المتوقعة للمقاطع (الأطوال بين مواقع التقييد).

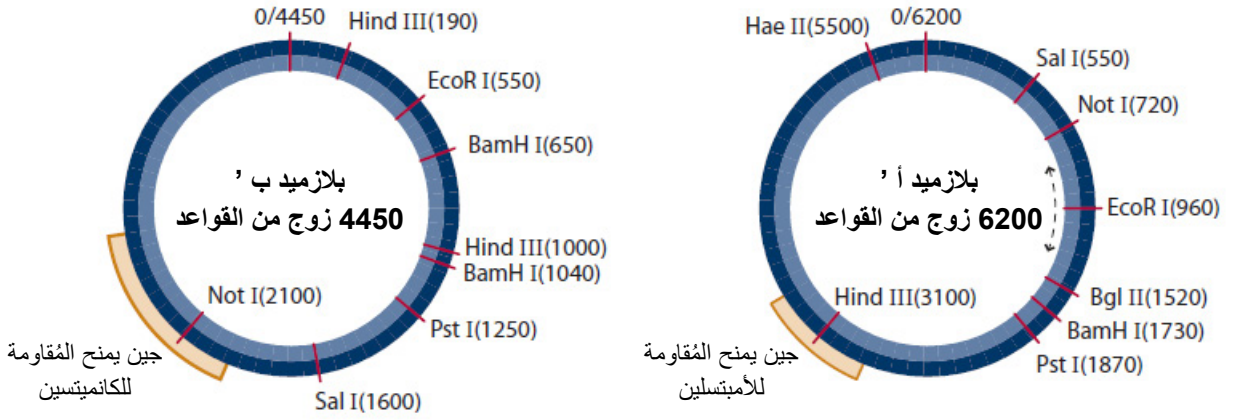
إرشاد لحل السؤال: قبل نقل مقطع الـDNA من بلازميد أ إلى بلازميد ب يجب أن نتأكّد من أنّ عمليّة النقل ذاتها لن تضرّ بالجين الذي يُكسب الصمود أمام المُضاد الحيوي الموجود في البلازميد ب. ضرر كهذا يُمكن أنْ يحدث إذا تمّت إضافة مقطع DNA داخل الجين الذي يُكسب الصمود للمُضاد الحيوي. لماذا علينا الحفاظ على هذا الجين وعدم إصابته بضرر؟

أجيبوا عن الاسئلة حسب المراحل أ- د:

أ. أي إنزيمات تستعمل لقطع بلازميد أ وأيها تستعمل لقطع بلازميد ب، من أجل نقل المقطع الأصغر الذي يشمل المنطقة المُشار إليها بسهم من بلازميد أ إلى البلازميد ب؟ أُذكر أسماء الإنزيمات وعلّل اختيارك.

ب. بعد القيام بقطع البلازميدين يتمّ تحريك نواتج القطع في جل الكتروفوريزا من أجل عزل المقاطع التي نرغب بربطها. حدّد أي المقاطع تُعزل وما هي الأطوال الدقيقة لهذه المقاطع؟

ج. بعد الربط بين المقاطع وإجراء الترانسفورماتسيا تتمّ تنميّة البكتيريا بوجود مُضاد حيوي، ما هو هذا المُضاد؟ ما هو الطول الدقيق للبلازميد الريكومبننتي الناتج؟



رسم س' 3.2: خريطتا تقييد البلازميديْن المستعملَيْن لنقل مقطع الـDNA من أحد البلازميديْن إلى البلازميد الآخر. (للتمرين فقط)

د. أي إنزيمات تستعمل لقطع البلازميدات التي عُزلت من مستعمرات البكتيريا، بهدف تحديد المستعمرة التي تحتوي على البلازميد الريكومبننتي المرغوب؟ ما هو طول المقاطع الناتجة من قطع هذا البلازميد المرغوب بواسطة الإنزيمات التي ذكرتها (يُمكن أنْ نُحددّ طول المقاطع باستخدام جل الكتروفوريزا؟ انتبه يُمكن أن تكون هناك أكثر من طريقة واحدة من أجل الاجابة على السؤال والتأكد من حصولنا على البلازميد المطلوب.

سؤال 3.3

حصل طالب البحث جنيطين على إجابتك عن السؤال 3.2. واقترح طريقة بديلة تُمكّن من نقل مقطع من البلازميد أ إلى البلازميد ب، وهو أصغر من المقطع الذي اقترحت أنْ تنقله في إجابتك. المقطع الذي اقترحه يحتوي على المنطقة المُشار اليها والمطلوب نقلها. اِقترح استعمال الإنزيمات SalI وَ BglII لـقطع البلازميد أ وإدخال المقطع الناتج بطول 970 قاعدة إلى البلازميد ب. رأى طالب البحث جينتشك اقتراح جنيطين واستغرب قائلًا: بالرغم من وجود موقع تقييد لـSalI في البلازميد ب، إلا أنّ هذا البلازميد لا يحوي موقع تقييد لـBglII ليُمكّن من ارتباط المقطع الذي نُقل من بلازميد أ ذا الاطراف BglII / SalI. قال جنيطين أنّه سيقطع البلازميد بالإنزيمات BamHI / SalI وستسير الأمور على ما يُرام.

وعملياً السؤال

1. موقع التقييد لـBamHI هو باختصار G/GATCC وموقع التقييد لـBglII هو A/GATCT. صِفْ مواقع تقييد هذه الإنزيمات بشكل كامل، بحيث تشمل تسلسل النوكليوتيدات الموجود في الجديليتن. ارسم الأطراف المُدرّجة التي تَنْتُج بَعد القطع بكل واحد من الإنزيمات في كل واحد من مواقع تقييد BamHI وَ BglII. هل يُمكن ربط الطرف الناتج عن القطع بواسطة إنزيم التقييد BamHI مع الطرف الناتج بواسطة القطع بالإنزيم BglII؟ هل كان جنيطين على حق عندما ادعّى أنَّ طريقته مُمكنة؟
2. أجب عن البنود أ- ب الموجودة في السؤال 3.2، في هذه المرّة أجب عن البنود بحسب الطريقة التي اقترحها جنيطين.
3. هل يُمكن قطع البلازميد الريكومبننتي الناتج من تنفيذ اقتراح جنيطين بواسطة الإنزيم BglII؟ إفحص جيدًّا تسلسل النوكليوتيدات في منطقة الربط بين الجديلة الأحادية التي نَتَجت من القطع بالإنزيم BamHI والجديلة الأحادية التي نَتَجت من القطع بالإنزيم BglII.
4. اجب مرة أخرى عن البند ج في السؤال 3.2، تطرّق إلى البلازميد الريكومبننتي الناتج حسب اقتراح جنيطين.

سؤال 3.4

خُذْ بعين الاعتبار كل ما تعرفه عن البلازميدات. عندما يتمّ خلط مقطع صغير ومقطع كبير للحصول على بلازميد ريكومبننتي، هل نسمّي الجزء الكبير "ناقل جينات" دائمًا؟ ما هي الصفات التي يجب أن تتواجد في المقطع حتى يُعتبر ناقل للجينات؟

سؤال 3.5

اعتمد على الرسم 3.5، وتطرّق إلى حالة خاصة مُعطياتها كما يلي:

موقع التقييد/الإنزيم E_1 (إنزيم 1) هو EcoRI؛

موقع التقييد/الإنزيم E_2 (إنزيم 2) هو BamHI؛

كبر المقطع X هو 1.5Kb؛

كبر المقطع Y هو 4Kb؛

كبر المقطع Z هو3.5 Kb ؛

أجب عن الاسئلة التالية بالاعتماد على المعطيات المذكورة أعلاه وعلى الرسم 3.5.

1. ما هي الأطراف اللاصقة لكل واحد من المقاطع الثلاثة المذكورة (مقطع طوله 1.5Kb، مقطع طولهKb4 ومقطع طوله 3.5Kb)؟
2. على فرض أنك ترغب باستنساخ المقطع ذا الطول 1.5 Kb والمقطع ذا الطول 3.5Kb، ما هي الاطراف اللاصقة التي يجب أن تتواجد في مقطع البلازميد الذي يُستعمل كناقل للجين؟
3. أي عمليات تُمكّن من عزل مقطع الـ DNA الذي نرغب باستنساخه، أُذكر عمليتين على الأقل. ما الذي يُمكّن من مُضاعفة المقاطع التي نقوم باستنساخها؟
4. أنت الآن في مرحلة هوَ و (الرسم 3.5) من عمليّة الاستنساخ وترغب بتشخيص هويّة البلازميد الريكومبننتي الموجود في مستعمرات البكتيريا المُختلفة. ماذا عليك أنْ تفعل لتحقيق ذلك؟ ماهي الإنزيمات التي تستعملها لقطع البلازميدات التي

استخلصتها من المستعمرات المُختلفة؟ وكيف يتمّ تمييزها بَعد القطع؟ عادةً يتمّ تشخيص الـ DNA الموجود في عدد من المستعمرات، مثلًا: 10 مستعمرات أو أكثر، ما هي النتائج التي تتوقع الحصول عليها عند قيامك بتشخيص 10 مستعمرات؟

السؤال 3.6

1. بالتأكيد لاحظتم خلال إجاباتكم، عن السؤال 3.5، وجود مقطع DNA طوله 4Kb وأطرافه BamHI / BamHI. لماذا لم يمرّ هذا المقطع بعمليّة استنساخ؟

السؤال 3.7

في عملية قطع الـ DNA بواسطة إنزيمات التقييد يُمكن أنْ تَنْتُج أطراف ملساء أو أطراف لاصقة (مُدرّجة)، حاول أنْ تُخمّن أي الأطراف يكون استعمالها أنجع عند ربط مقاطع الـDNA ببعضها؟ علّل.

السؤال 3.8

1. كتتمّة لسؤال 3.5، أنت معنيٌ باستنساخ المقطع الذي يبلغ طوله 4Kb (مقطع y)، المعروض في الرسم 3.5 باستعمال الناقل pBR322. صِف مراحل عمليّة الاستنساخ حسب مراحلها الستة، انتبه إلى إنزيم/إنزيمات التقييد التي عليك استعمالها خلال عمليّة الاستنساخ، تطرّق إلى نواتج الربط والاستنساخ المرغوبة وغير المرغوبة.
2. في حالات مُعيّنة يتمّ دخول بلازميد خالٍ من المُدخل إلى خلية البكتيريا وحدوث ترانسفورماتسيا لها. بلازميد كهذا غير مرغوب به. اقترح طُرقًا تزيد من نجاعة عمليّة الاستنساخ حسب المُعطيات المعروضة في البند 1 للسؤال. عمليًا عليك اقتراح طريقة تمنع قدر الإمكان الحصول على بلازميدات غير مرغوبة وطريقة تزيد من سرعة تحديد الكلونة المطلوبة. خُذْ بعين الاعتبار أنَّ للحالة الخاصة التي نستعمل فيها البلازميد pBR322 في عمليّة الاستنساخ، الموصوفة في السؤال، توجد طريقة لانتقاء البكتيريا وهي تُتيح إزالة المستعمرات التي تحوي بلازميدات خالية من المُدخل دون الحاجة إلى استخلاص وقطع الـ DNA.

البكتيريوفاج كناقل (נשא) في عملية الاستنساخ:

طول المُدخل هو أحد القيود (מגבלה) التي تواجهنا عند استعمال البلازميد كناقل للجينات، البلاسميد يستطيع أنْ ينقل مقاطع ذات طول محدود. عمليًّا لا يُمكن استنساخ مقطع يزيد طوله عن 10Kb بشكل ناجع باستخدام البلازميدات، بالمقابل فإنّ البكتيريوفاج أي الفيروس الذي يُهاجم البكتيريا (الذي وُصف في الفصل 2) يمكن أنْ يُستعمل كناقل ناجع في استنساخ مقاطع DNA طويلة يصل طولها إلى 25Kb (25000 زوج من القواعد). بما أنَّ بعض الجينات يصل طولها الى طول كهذا، عندها يجب علينا أنْ نستعمل البكتيريوفاج كناقل لهذه الجينات.

ما هي الصفات التي يتمتّع بها البكتيريوفاج والتي تمكّنه من القيام بوظيفته كناقل جينات في عمليّة الاستنساخ؟ البكتيريوفاج كناقل يُشبه البلازميد، فهو صغير الحجم ويمكن استخلاصه بطريقة سهله نسبيًّا. كذلك، كما هو الحال في البلازميد، يمكن إدخال مقطع DNA مرغوب (مُدخل) إلى البكتيريوفاج، أيضًا يُمكن أنْ يتمّ رزم الـ DNAالريكومبنننتي داخل الغلاف البروتيني (הקופסית חלבונית) للبكتيريوفاج، عندها ينتج لدينا بكتيريوفاج يُمكنه إدخال الـDNA الريكومبنننتي إلى البكتيريا بسهولة، خلال مهاجمته للبكتيريا. أخيرًا، البكتيريوفاج كالبلازميد يُمكنه عزل مقطع معيّن من الـDNA عن مقاطع أخرى ومضاعفته داخل البكتيريا (استنساخ).

من أجل استغلال صفات البكتريوفاج كناقل ناجع للـDNA، يتمّ استعمال نوع خاص من البكتيريا، بكتيريا خاليّة من إنزيمات التقييد.

مراحل استنساخ مقاطع مختلفة من الـDNA في نفس الوقت باستعمال البكتريوفاج كناقل للـDNA: (استعن بالرسم 3.6)

أ. **قطع الـDNA:** يتمّ قطع الـDNA بواسطة إنزيم تقييد، يَنْتُج لدينا خليط من مقاطع DNA مختلفة، نرغب باستنساخ كل واحد من هذه المقاطع.

ب. **قطع البكتريوفاج الناقل:** قطع DNA البكتريوفاج بواسطة نفس إنزيم التقييد.

ج. **عمليّة الربط وإنتاج ناقلات ريكومبننتية:** نُتيح ربط جزيء الـ DNA التابع للبكتريوفاج مع مقاطع الـDNA التي نرغب باستنساخها، بحيث أنّ المقطع الواحد من الخليط يرتبط بجزيء ناقل واحد فقط.

د. **إنتاج بكتريوفاجات ريكومبننتية:** يتمّ خلط النواتج الريكومبننتية التي نَتَجت في المرحلة السابقة مع بروتينات غلاف البكتريوفاج. تتمّ عمليّة تركيب ذاتي للبكتريوفاجات، وفي نهايتها تَنْتُج بكتريوفاجات ريكومبننتية، بحيث يُرزم في كل بكتريوفاج جُزيء الناقل المرتبط بمُدخل خاص (عزل أولي). بإمكان الغلاف البروتيني للبكتريوفاج الارتباط بالبكتيريا وإدخال الـ DNA إليها.

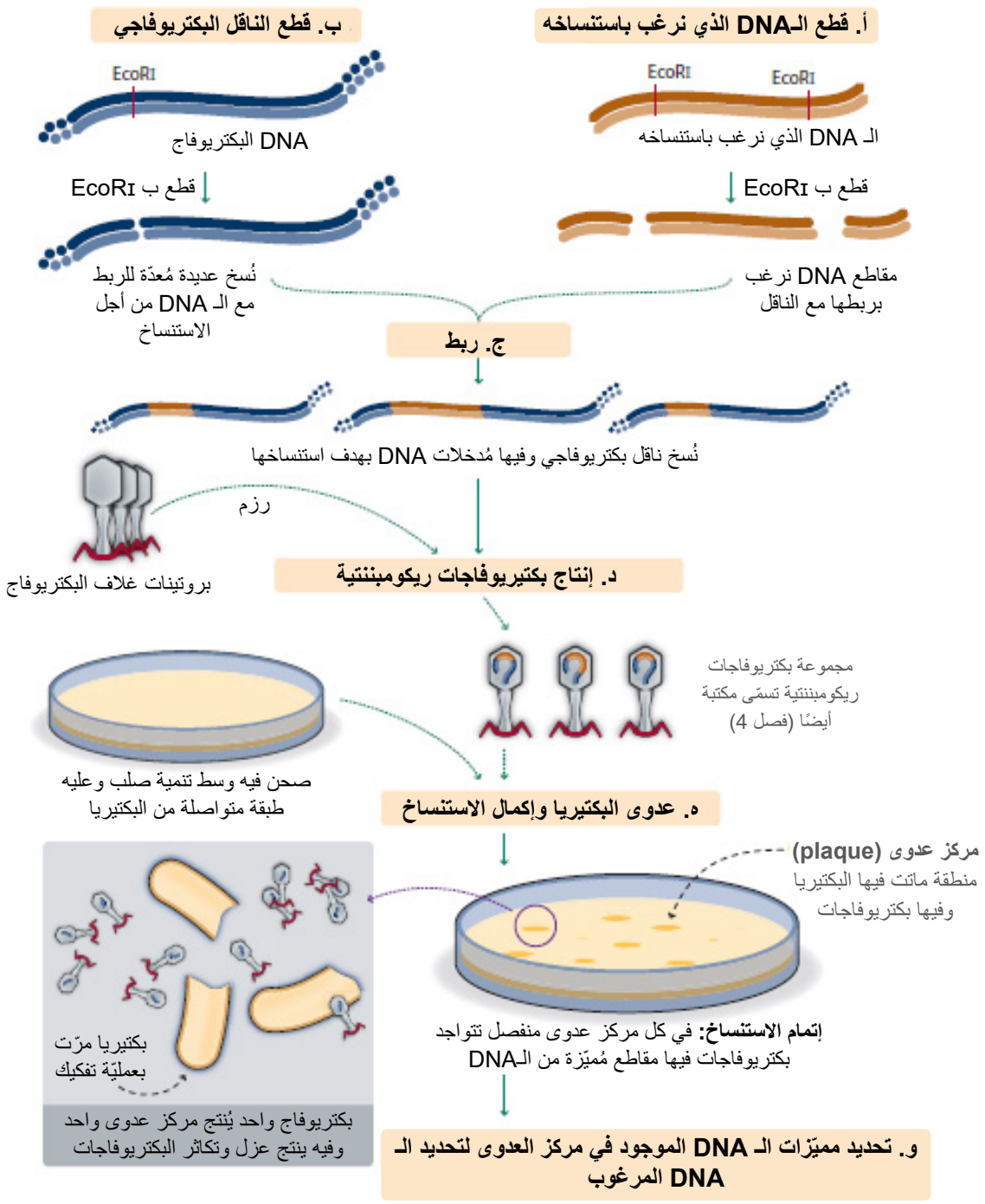
ه. **عدوى البكتيريا وإكمال عمليّة الاستنساخ (الكلونة) (שיבוט):** حتى نُتيح عزل ومضاعفة الـ DNA الموجود في البكتيريوفاج نقوم باستعمال وسط غذائي صلب تنمو عليه البكتيريا على شكل طبقة متواصلة من الخلايا. نُتيح عدوى البكتيريوفاجات لبعض البكتيريا. خلال العدوى تتمّ عدّة أحداث بواسطتها يُدخِل بكتريوفاج معيّن الـ DNA الريكومبننتي الموجود داخله إلى خليّة بكتيريا واحدة، وبعد ذلك يتكاثر البكتريوفاج، تتفكك البكتيريا وتقوم البكتيريوفاجات بعدوى خلايا البكتيريا المُجاورة. نتيجة لذلك يَنْتُج لدينا مركز عدوى كما هو موصوف في الرسم 3.6. مركز العدوى هو "ثقب" في طبقة البكتيريا يَنْتُج بسبب موت البكتيريا. يحتوي هذا المركز على الكثير من البكتريوفاجات التي تحوي مُدخل معيّن من الـ DNA (مُضاعفة). البكتريوفاجات المُختلفة تُنْتِج مراكز عدوى مختلفة، منفصلة وبعيدة عن بعضها، لذلك يتحقق مبدأ العزل (عزل ثانوي) الذي يعتبر عمليّة مهمّة في عمليّة الاستنساخ.

و. **تشخيص الـ DNA الموجود في مركز العدوى من أجل تحديد الـ DNA المرغوب:** يمكن استعمال البكتريوفاجات الموجودة في مركز العدوى من أجل استخلاص الـ DNA الموجود فيها وتشخيصه بواسطة إنزيمات التقييد، كذلك يمكن تحديد المركز الذي يحوي الـ DNA المرغوب مباشرة بواسطة أدوات خاصة سنتعلم عنها في الفصل التالي.

وُصف في هذا الفصل جهازان لاستنساخ **عدد صغير** نسبيًّا من مقاطع الـ DNA الموجودة على شكل خليط، استنساخ هذه المقاطع يتمّ في الوقت ذاته. في نهاية هذه العمليّة يَنْتُج **عدد صغير** نسبيًّا من المستعمرات أو مراكز العدوى التي تختلف عن بعضها بنوع مقطع الـ DNA الذي استُنسخ فيها. بالمُقابل عندما يكون الجينوم الكامل هو المادّة التي نستعملها لاستنساخ عدّة مقاطع في الوقت ذاته، عندها يَنْتُج بعد قطع الجينوم خليط يحوي مقاطع كثيرة جدًّا يُمكننا تقدير عددها. عندما نُتيح ارتباط المقاطع الموجودة في هذا الخليط (مصدرها من الجينوم) مع جُزيئات الناقل يُمكن أنْ تَنْتُج مئات الآلاف من الناقلات الريكومبننتية الخاصة. تُستعمل هذه الناقلات لإنتاج مجموعة كبيرة من البكتريوفاجات الريكومبننتية التي تُسمّى "مكتبة". بعد إكمال الاستنساخ يُمكن انْ تَنْتُج مئات الآلاف من مراكز العدوى.

إذا استعملنا جينوم كامل لخلية إنسان، يُمكن أن نحسب عدد المقاطع المُميزة التي تَنْتُج بعد قطع الجينوم. طول جينوم الإنسان ثلاثة مليار قاعدة، ولأنَّ القطع المُراقب للجينوم بواسطة إنزيم تقييد يؤدي إلى الحصول على مقاطع معدل طولها 15000 قاعدة، الاستنتاج الواضح هو أنَّ المادة التي ستستعمل للاستنساخ يُمكن أنْ تحوي 200000 مقطع مُميّز نرغب باستنساخها في نفس الوقت.

في الفصل التالي سوف نشرح كيف يُمكن تحديد مكان مقطع DNA مرغوب أو جين مرغوب من بين كل الجينوم عندما يتواجد هذا المقطع أو الجين بين مئات آلاف المستعمرات أو مراكز العدوى.



رسم 3.6: استنساخ عدّة مقاطع مُختلفة من الـDNA في نفس الوقت بواسطة البكتريوفاجات والبكتيريا.

سؤال 3.9

أي من بين الجمل التالية صحيحة، صحح الجمل غير الصحيحة.

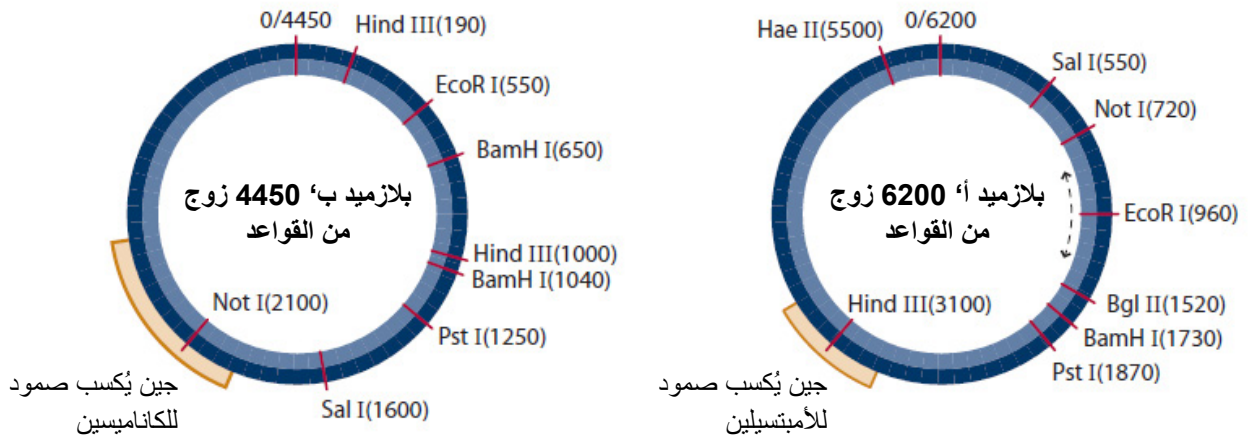
1. يُمكن عزل مقطع DNA عن طريق استنساخه ومُضاعفته.
2. البلازميد والبكتريوفاج هما ناقلا جينات، يُمكن أن نُدخل إليهما مقاطع الـDNA التي نرغب بعزلها ومُضاعفتها.
3. مُدخل ريكومبننتي يُمكن أنْ يَشمل بلازميد غير موجود في المُدخل الطبيعي.

4. عندما نستنسخ عددًا كبيرًا من مقاطع الـ DNA في الوقت ذاته نحصل على مكتبة DNA.
5. يَنْتُج مركز العدوى المنفرد في مُستنبت البكتيريا بواسطة عدد كبير من البكتريوفاجات.
6. الإنزيم A.P. هو إنزيم مُفيد لأنَّه يُمكّن من زيادة عدد مُستعمرات البكتيريا التي تحوي ناقل بلازميدي لا يشمل مُدخل.
7. الإنزيم DNA ليجاز ضروري لقطع مقاطع الـ DNA قبل دمجها مع الناقل.
8. يتمّ استعمال المُضادات الحيويّة في مُستعمرات البكتيريا لنُمكّن نمو كل البكتيريا التُي زُرعت في الصحن البتري.
9. للحصول على بلازميد ريكومبننتي يجب خلط مقاطع DNA مُختلفة وحضنها مع الإنزيم DNA ليجاز.
10. بفضل شموليّة مبنى الـ DNA يُمكن ربط مقطع DNA مصدره من خليّة بكتيريا مع مقطع DNA من خليّة إنسان.

سؤال 3.10

تمعّنوا في رسم **سؤال 3.10** (الرسم تقريبًا مُطابق لرسم **سؤال 3.2**). المطلوب منكم هذه المرّة نقل المقطع الموجود بين موقعَي BamHI في بلاسميد ب' إلى البلازميد أ'، لهذا الهدف سيقطع بلازميد أ' بواسطة الانزيم BamHI.

انتبهوا: في بلازميد أ' يوجد موقع تقييد واحد فقط يتعرّف عليه الإنزيم BamHI ويقوم بقطعه.



رسم سؤال 3.10: خريطة التقييد للبلازميدين اللذان سيستخدمان لنقل مقطع DNA من أحد البلازميدين إلى الآخر (للتمرين فقط)

1. لتحقيق الهدف المذكور، يجب "مُعالجة" البلازميد أ' بإنزيم إضافي بعد قطعه بواسطة BamHI، ما هو هذا الإنزيم؟ ولماذا نحتاج إلى معالجة البلازميد بواسطة هذا الإنزيم؟
2. بعد مُعالجة البلازميدين بإنزيمات التقييد يجب فصل المقاطع الناتجة بواسطة الجل، من ثم علينا عزل المقاطع التي نرغب بربطها من الجل. اذكروا مرّة أخرى أي إنزيمات تستعملون لقطع كل واحد من البلازميدين؟ ارسموا نتائج الفصل بالجل وسجلوا الطول الدقيق للمقاطع التي علينا عزلها واخراجها من الجل لتحقيق الهدف المذكور.
3. بعد حدوث التحوّل الوراثي (الترانسفورماتسيا)، عزل البكتيريا التي مرّت بعملية تحوّل وراثي(טרנספורמנטים) وتنميّة البكتيريا على وسط يحتوي على مُضاد حيوي (ما هو هذا المُضاد؟)، حصلنا على عدّة عشرات من مستعمرات البكتيريا. قررّتم فحص طول المُدخل في بعض المستعمرات بواسطة استعمال انزيمات القطع PstI وَ BglII.
   - من ضمن المستعمرات العشرة التي فُحصت، حصلنا في 7 منها على مقطع طوله 740 قاعدة بالإضافة إلى مقطع طويل يُمثّل معظم الناقل الريكومبننتي. ما هو طول المُدخل وما هو التفسير العلمي للنتائج الموجودة في المستعمرات السبعة؟
   - في مستعمرتان من بين المستعمرات العشرة التي فُحصت حصلنا على 350 قاعدة. لماذا حصلنا، حسب رأيكم، على هذه النتيجة؟
   - في واحدة من بين المستعمرات العشرة التي فُحصت حصلنا على مقطع طوله 1130 قاعدة. ما هو التفسير العلمي لهذه النتيجة؟

النقاط الأساسيّة في الفصل

الأدوات الموجودة في "صندوق الأدوات"

- بلازميدات
- بكتريوفاجات
- إنزيمات تقييد (Restriction enzymes)
- DNA ليجاز (DNA ligase)
- الإنزيم الفوسفاتاز القلوي (A.P.) (Alkaline phosphatase).

مفاهيم ومصطلحات

- ناقل (Vector)
- مُدخل (Insert)
- استنساخ (Cloning)
- DNA ريكومبنتي (Recombinant DNA)
- بلازميد ريكومبنتي، بكتريوفاج ريكومبنتي ترانسفورماتسيا (تحوّل) (Transformation)
- مستعمرة بكتيريا (Clone)
- مركز عدوى (Plaque)
- أصل التضاعف (Ori)

مبادئ

- عزل ومُضاعفة مقاطع الـ DNA في البكتيريا بواسطة بلازميدات أو بكتريوفاجات (استنساخ)
- انتقاء (selection) يُمكّن من تكاثر البكتيريا التي تحتوي على جين يُكسبها صمود للمُضاد الحيوي

طُرق

- استخلاص بلازميدات من البكتيريا
- قطع DNA بواسطة إنزيمات التقييد
- استخلاص مقاطع الـ DNA من الجل
- إزالة مجموعة فوسفات من طرف مقطع الـ DNA بواسطة الإنزيم A.P..
- الربط بين مقاطع الـ DNA (DNA Ligation)
- إدخال DNA إلى بكتيريا يؤدي إلى ترانسفورماتسيا (تحوّل).

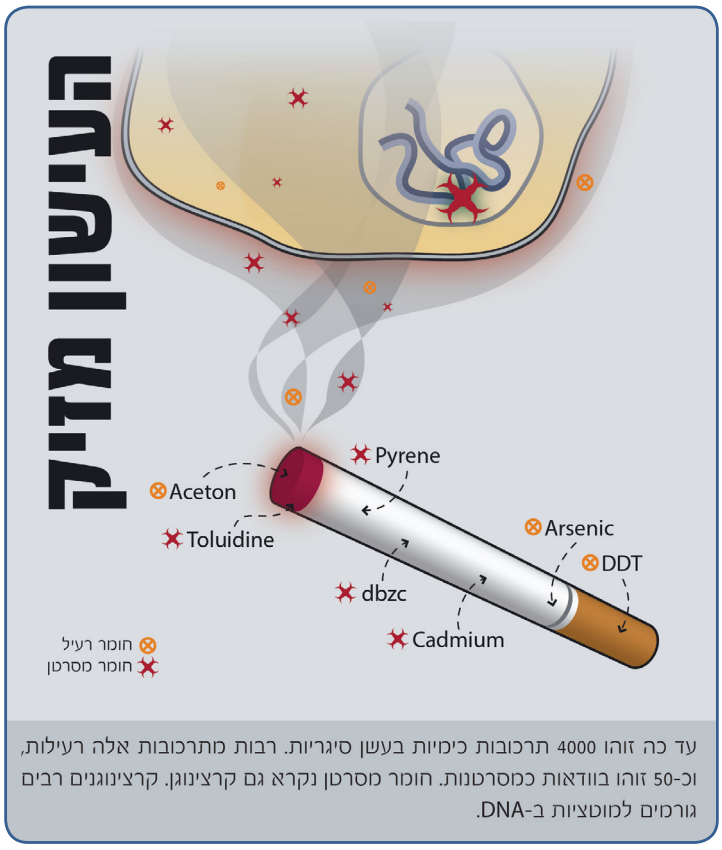
تطبيقات

- استنساخ مقطع DNA واستنساخ عدد كبير من مقاطع الـ DNA في نفس الوقت.

مواد

- صحن يحتوي على وسط غذائي لتنميّة البكتيريا
- وسط غذائي سائل لتنميّة البكتيريا
- مُضادات حيوية

استنساخ DNA بواسطة مكتبات ومجسات



עד כה זוהו 4000 תרכובות כימיות בעשן סיגריות. רבות מתרכובות אלה רעילות, וכ-50 זוהו בוודאות כמסרטנות. חומר מסרטן נקרא גם קרצינוגן. קרצינוגנים רבים גורמים למוטציות ב-DNA.

המדרה על استنساخ مقاطع DNA (فصل 3) رفعت إلى جدول الأعمال العلمي إمكانية استنساخ جينات كاملة لأهداف البحث. جين هو مقطع DNA يحتوي على تسلسل قواعد خاص، يَنْتُج منه RNA في عمليّة النسخ. في الـ RNA يمكن أن يُشفر ناتج جين معيّن بحسب شيفرا معلومات لإنتاج بروتين خاص. الجين الذي يَنْتُج منه RNA ويحتوي على معلومات لإنتاج بروتين، هو جين مشفر لبروتين. الجين ونواتجه (RNA وبروتين أو فقط RNA) يمكن أن تُنسب وظائف محدّدة في الخليّة. بالإضافة لذلك فإنّ جين وبروتين يشفر له ، يشاركان في تحديد صفة أو صفات محدّدة في الخليّة والكائن الحيّ. غالبًا صفة معيّنة في الخليّة أو الكائن الحيّ تُحدَّد بواسطة أكثر من جين واحد.

استنساخ جين معرّف كعزل ومضاعفة مقطع DNA مصدره الجينوم ويمكن بواسطته إنتاج RNA في الخليّة. يمكن اليوم بواسطة الأساليب الحديثة استنساخ جينات بسرعة نسبية وبدون علاقة بنوعها ووظيفتها. ولكن في نهاية سنوات الـ 70 وبداية سنوات الـ 80 من القرن الـ 20 أراد رواد الاستنساخ التركيز على استنساخ محدّد لجينات معيّنة فقط، التي اعتبرت "مثيرة للاهتمام" من ناحية علميّة وطبيّة. لقد اختاروا هذا التوجه لأنّ الطرق التي توفرت في ذلك الحين تطلبت مراحل عمل متعدِّدة. من بين الجينات "المثيرة للاهتمام" التي تمّ استنساخها يمكن إيجاد جين النمو والجين المشفر لبروتين الإنسولين الحيوي للمحافظة على مستوى جلوكوز منتظم في الدم. في مراحل لاحقة تمّ استنساخ جينات عديدة تشفر لهورمونات إضافيّة، جينات تشفر لعوامل إنقسام خلايا وجينات تشفر لبروتينات تشارك في نقل إشارات بين خلايا عصبيّة. بعض جينات النباتات اعتُبرت أيضًا مثيرة للاهتمام ومن بينها جينات تكسب النبتة مقدرة الصمود في ظروف جفاف متطرفة أو جينات تمكن النبتة مقاومة الأمراض. استنساخ جينات تشارك في تحديد هذه الصفات جعل من الممكن تشخيص البروتينات التي تشفر لها هذه الجينات. لا يقل أهمّيّة كان استنساخ جينات من المحتمل أن تكون لها علاقة بالسرطان، وكذلك جينات تشفر لبروتينات حيوية لمبنى سليم للخليّة ولسلامة عضياتها. جينات كهذه استُنسخت من خلايا إنسان، بكتيريا، خلايا نبات وحتى من خلايا حشرات.

يوجد جينات تشفر لـ RNA ، ولكن الـ RNA لا يترجم لبروتين. من بين هذه الجينات مثلا الجينات المشفرة للـ RNA المكون للريبوزوم

جين هو مقطع DNA مصدره الجينوم ومنه يَنْتُج الـ RNA. جين ممكن أن يشفر لبروتين. **استنساخ جين** يُعرّف كعزل ومضاعفة مقطع DNA جينومي، وفي ظروف مناسبة يمكن إنتاج RNA. رواد استنساخ الجينات استنسخوا جينات اعتبرت حينها مهمة علميًّا وطبيًّا. فتمّ استنساخ الجين المشفر للإنسولين، والجين المشفر لهرمون النمو وجينات لها علاقة بالسرطان.

أهمّيّة استنساخ الجينات لم تكن واضحة للجميع في البداية. لماذا يجب استنساخ جين؟ هذا الفصل والفصل 8 يوضحان كيف يمكن تحديد وظائف جين بواسطة التحكم بكمية ناتج الجين في الخلية. أوّلًا، يمكن اقحام جين مستنسخ للخليّة، وإذا كان يشفر لبروتين، يمكن إنتاج كمّيّات فائضه من البروتين في الخليّة (تعبير زائد عن البروتين). ثانياً، يمكّن الاستنساخ من استغلال طرق لمنع إنتاج البروتين. البحث في تصرف الخليّة نتيجة لتعبير زائد لبروتين معيّن أو نتيجة للحدّ من إنتاجه، يساعد على تحديد وظائف البروتين والجين المسؤول عن إنتاجه. هكذا مثلا، يتم الاستنتاج أن لجين وظيفة في عملية تنفس خلية اذا ادّى تعبير زائد عنه الى تكثيف عمليات التنفس. بشكل مشابه يمكن التحديد أنّ الحدّ من إنتاج بروتين جين معيّن يؤدّي الى توقف إنقسام الخليّة، فإنّ وظيفة هذا الجين هي تمكين الخليّة من الإنقسام. عند تحديد وظائف جين يمكن حينها نقله لكائن حيّ آخر بهدف تغيير خواص الكائن الحيّ بالشكل الذي نريده (فصل 8). ولا يقل أهمّيّة – دراسة جين مستنسخ يمكن أن يحدّد ما إذا كان يشارك في أمراض. يمكن التحديد أنّ جين معيّن يشارك فعلًا في مرض، إذا وُجدت طُفرات في هذا الجين لدى مرضى. ونهاية، في بعض الحالات يتمّ استغلال جين مستنسخ لكي يتمّ إنتاج كمية كبيرة من ناتجه البروتيني الذي يمكن استعماله كدواء كما هو الأمر بالنسبة للإنسولين وهورمونات النمو (فصل 8).

استنساخ جينات ضروري لفهم اسهام نواتجهم في أداء الخلية والكائن الحي. من الصحيح القول أيضا أنه يمكن فهم أعمق لعمليات مركبة في الخلية (مثلا، تنفس، حركة وانقسام) فقط بعد استنساخ الجينات التي لها وظيفة في هذه العمليات.

كيف يتمّ في عمليّة مركزة استنساخ وإيجاد جين مسؤول عن صفة معيّنة من بين مجمل الـ DNA في الخليّة (الجينوم)؟ من أجل استنساخ وإيجاد جين معيّن اتبع رواد الاستنساخ عزل ومضاعفة (استنساخ) في نفس الوقت لجينات ومقاطع DNA تشمل كلّ الجينوم. استنساخ في نفس الوقت لمقاطع الجينوم، التي وصل عددها أحيانًا إلى مئات الألاف، تمّ بواسطة الوسائل التي وُصفت في الفصل 3. مجموعة مقاطع الجينوم الموجودة في نُسخ من ناقل تُسمّى **مكتبة جينومية**. بسبب كبر عدد المقاطع في هذه المجموعة، يجب استعمال "وسائل خاصة" سنشرح عنها في هذا الفصل لإيجاد المقطع الذي يحتوي على الجين المطلوب. ولكن بالإضافة إلى "وسائل خاصّة" هناك حاجة إلى "وسائل فريدة من نوعها" لإيجاد كلّ جين من الجينات. في الحقيقة لكلّ جين حكاية خاصّة لطريقة تحديده. من الجدير بالذكر أنّ المصطلح "استنساخ جين" يُستعمل غالبًا لوصف عمليّات الاستنساخ والتحديد معًا.

استنساخ الجينات ومقاطع الـ DNA التي تشفر لبروتين بمساعدة مكتبات وَ"وسائل خاصّة" متنوعة انخفض مع مرور الزمن ولم يعد اليوم دارجًا. وبالرغم من ذلك، يمكن أن نجد في هذا الفصل أسس ومبادئ الاستنساخ بواسطة مكتبات لسببين. الأول، لتوضيح طريقة الحصول على معلومات بيولوجية حيوية بواسطة الاستنساخ المركز، والثاني، للتعرُّف على مبادئ وأساليب استُعملت للاستنساخ وما زالت تُستعمل، حتى إذا كان استعمالها اليوم ليس للاستنساخ.

استنساخ الجين مطلوب لتحديد وظائفه. فهكذا، استنساخ جين في خلايا يُمَكّن الخلايا من انتاج فائض من البروتين الذي يشفر له (تعبير زائد). خلافا لذلك، يمكن استغلال وسائل خاصة لمنع التعبير عن جين مستنسخ بشكل مركز. نتيجة لذلك يتغيّر أحيانًا سلوك الخليّة. بحث التغيّرات في سلوك وصفات الخليّة تُمَكّن دراسة وظائف الجين. بالإضافة لذلك، جين مستنسخ يُمَكّن فحص علاقته الممكنة بأمراض. يمكن استعمال جين مُستنسخ لإنتاج بروتين يُستخدم كدواء.

جينو كان متعودًا أن يستغل ساعات الصباح الباكرة لقراءة مقالات بحث قبل البدء في عمله بالإبحاث. ذات صباح وضع جانو على مكتبه مقال عنوانه: "استنساخ جين يمكنه تفسير التصرف الذكوري النموذجي". أثار الأمر اهتمام جينو الذي كان مشغولا باستنساخ جين آخر...

المقدّمة للمقال كانت مثيرة للاهتمام بشكل خاص: "تميّز الرجال أحيانًا بقلة الاهتمام بمواضيع تهم النساء، والأمر يُساهم في التوتر بين الجنسين. لذلك باشرنا في استنساخ الجين ق.ا. (قلة اهتمام) الذي فرضنا أنّه موجود على كروموزوم Y ويمكنه مراقبة التصرف الذكوري الخاص..." في وصف الطريقة وجد جينو تفاصيل مفيدة: "تمّ إعداد المكتبة من مقاطع DNA مصدرها RNA من نسيج دماغ رجال..." وقد اهتم بالأمر لأنّه بعد استنساخ الجين، وجد بأنّه يتمّ التعبير عنه بشدة لدى رجال يسوقون بتهور مع موسيقى مرتفعة، بينما وُجِدَ أنّ لدى رجال هادئين هذا الجين لا يُنْتِج RNA تقريبًا. ونهاية الاستنتاجات في المقال كانت مثيرة للاهتمام بشكل خاص: نحن نقترح، هكذا كَتَبَ، إجراء معالجة جينية للرجال غيرمهذبين بشكل خاصّ، بهدف كبت التعبير عن جين ق.ح. لديهم، واعادتهم للطريق المستقيم...

في هذه المرحلة أصبح واضحًا لجينو ماذا عليه أن يعمل... جرى يبحث عن جانو كي يسأله عن برنامج الحاسوب الذي استعمله لإنتاج المقال المُقنع جدًّا والمزور...

استنساخ جين مسرطن بواسطة مكتبة جينومية

الخلايا الطبيعيّة في الكائن الحيّ تنقسم وتتكاثر بطريقة منتظمة: الخلايا تَنْتُج في الموعد الملائم، بكمية ملائمة وفي الأماكن المطلوبة. أحيانًا يحدُث تشويش، وخليّة طبيعيّة تتحوّل إلى خليّة سرطانيّة. خليّة سرطانيّة هي ناتج لـ "تغيّرات مسرطنة" حدثت داخل الخليّة، تُميّزها عن خليّة طبيعيّة. الخليّة السرطانيّة تورث "التغيّرات" التي حدثت فيها إلى الخلايا الجديدة. نتيجة للـ "تغيّرات" تنقسم الخليّة والخلايا من سلالتها بوتيرة مرتفعة وغير مقيدة. إنقسامات متكرّرة لخلايا سرطانيّة تُنْتِج بداية تكتل خلايا سرطانيّة يمكن أن تتطوّر إلى ورم خبيث. إمكانية ظهور خليّة سرطانيّة تزداد نتيجة لتعرُّض الخلايا إلى عوامل مسرطنة تزيد من احتمال الـ "تغيّرات" في الخليّة.

أسئلة أساسية في دراسة السرطان هي:

ما هي ماهية الـ"التغييرات المسرطنة" التي يمكن أن تحدث في خلية وكيف يمكن أن تساهم في تحويله الى خلية مسرطنة؟ هل تحدث التغييرات في الجينات وان كان الأمر كذلك في أي جينات؟ هل يمكن استنساخ وتحديد جين محدد حدث فيه "التغيير"؟ هل يمكن دراسة خواص هذا الجين ("الجين المسرطن")؟ لأي بروتين يشفر "الجين المسرطن" وما هي وظائف البروتين في الخلية؟

في العديد من المختبرات درسوا في بداية سنوات الـ 80 من القرن الـ 20 البيولوجيا الخلوية والجزيئية للسرطان. في مختبر الباحث الأمريكي روبرت واينبرج (Robert Weinberg) وفي مختبرات أخرى سأل الباحثون أنفسهم ما اذا كانت "الصفة السرطانية" موجودة داخل الـ DNA وما اذا كان من الممكن نقلها بواسطة إقحام DNA من خليّة سرطانيّة إلى خليّة عاديّة. للإجابة عن هذا السؤال هناك حاجة لاستعمال خلايا تنمو في مستنبت (صندوق 4.1)

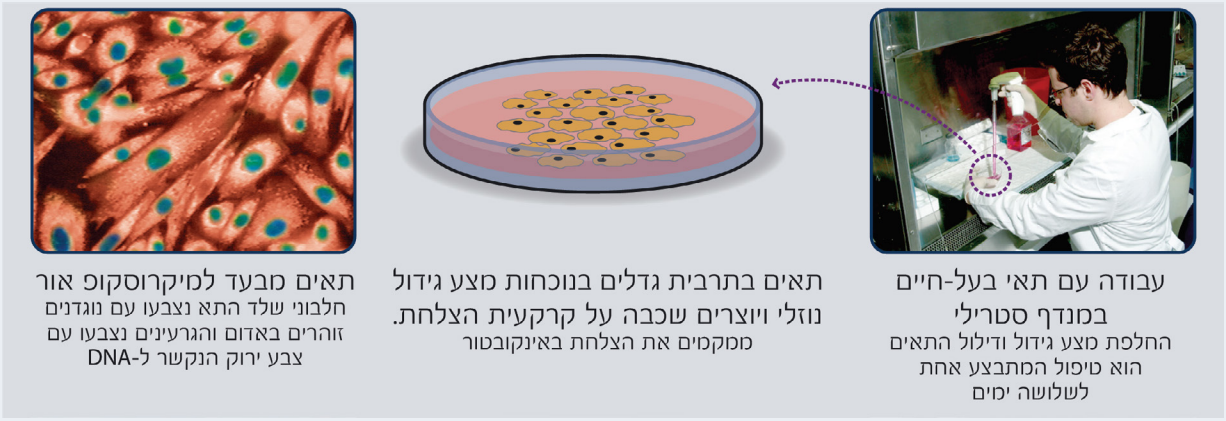
خلية سرطانية مصدرها من خلية عادية مرّت تحوُّل. نتيجة للتحوُّل تنقسم الخليّة السرطانية بشكل غير مُراقب. سأل باحثون أنفسهم ما إذا كان بالإمكان نقل الصفة السرطانية من خليّة سرطانية الى خليّة عاديّة بواسطة نقل DNA مصدره خليّة سرطانية. تجربة كهذه يمكن تنفيذها بواسطة استعمال خلايا تنمو في مستنبت.

في الرسم 4.1 نرى كيف يمكن أن نؤدّي إلى ظهور خلايا سرطانية في مستنبت وكيف يمكن نقل الصفة السرطانية بواسطة الـ DNA إلى خلايا عادية. بحسب الوصف في هذا الرسم، تعريض خلايا غير سرطانية في مستنبت لمادّة مسرطنة (مادّة كيميائيّة معيّنة في هذه الحالة) تؤدّي الى ظهور خلايا سرطانية في المستنبت. يمكن استخلاص DNA من هذه الخلايا السرطانية وقطعه بواسطة إنزيم تقييد. في المرحلة القادمة نُدخل مقاطع DNA مصدرها خلايا سرطانية الى خلايا غير سرطانية. في الواقع، جزء قليل من الخلايا غير سرطانية تستوعب في داخلها بشكل عشوائيّ مقطع DNA معيّن، حيث يندمج في الجينوم ويتحوّل إلى جزء لا يتجزأ من الـ DNA في نواة الخليّة. يتضح من مجمل الخلايا غير السرطانية التي اندمج إلى داخلها مقطع DNA عشوائي مصدره خلية سرطانية، عدد قليل منها تتحوّل لخلايا سرطانية. معنى هذه النتيجة هو أن ليس كلّ الـ DNA الذي مصدره خلية سرطانية لديه المقدرة أن يؤدّي الى تحوّل سرطاني. نستنتج من ذلك أنّه يمكن تحويل خلية غير سرطانية الى خلية سرطانية بواسطة اقحام مقطع DNA محدّد مصدره خلية سرطانية. لذلك السؤال الذي يطرح نفسه، ما هو مقطع الـ DNA الذي يمكن أن يؤدّي إلى تحوّل سرطاني؟

في تجربة ضابطة عند أخذ DNA من خلايا عاديّة واقحام مقاطع منها لخلايا غير سرطانية، لا تؤدّي هذه المقاطع الى تحوّل سرطاني.

صندوق 4.1: تنمية خلايا عادية وخلايا سرطانية في مستنبت

مستنبت خلايا هو مجموعة من الخلايا التي تنمو خارج الجسم في وعاء يحتوي على مستنبت تنمية سائل فيه المكوّنات الغذائية الحيوية: سكريات، حوامض أمينية، أملاح وعوامل نمو. يتم وضع الصحن أو الوعاء الذي يحتوي على الخلايا في انكوباتور يحافظ على درجة حرارة مثالية للتنمية. معالجة الخلايا يتمّ في وسط معقم لمنع تلويث مستنبت الخلايا ببكتيريا أو فطريات.

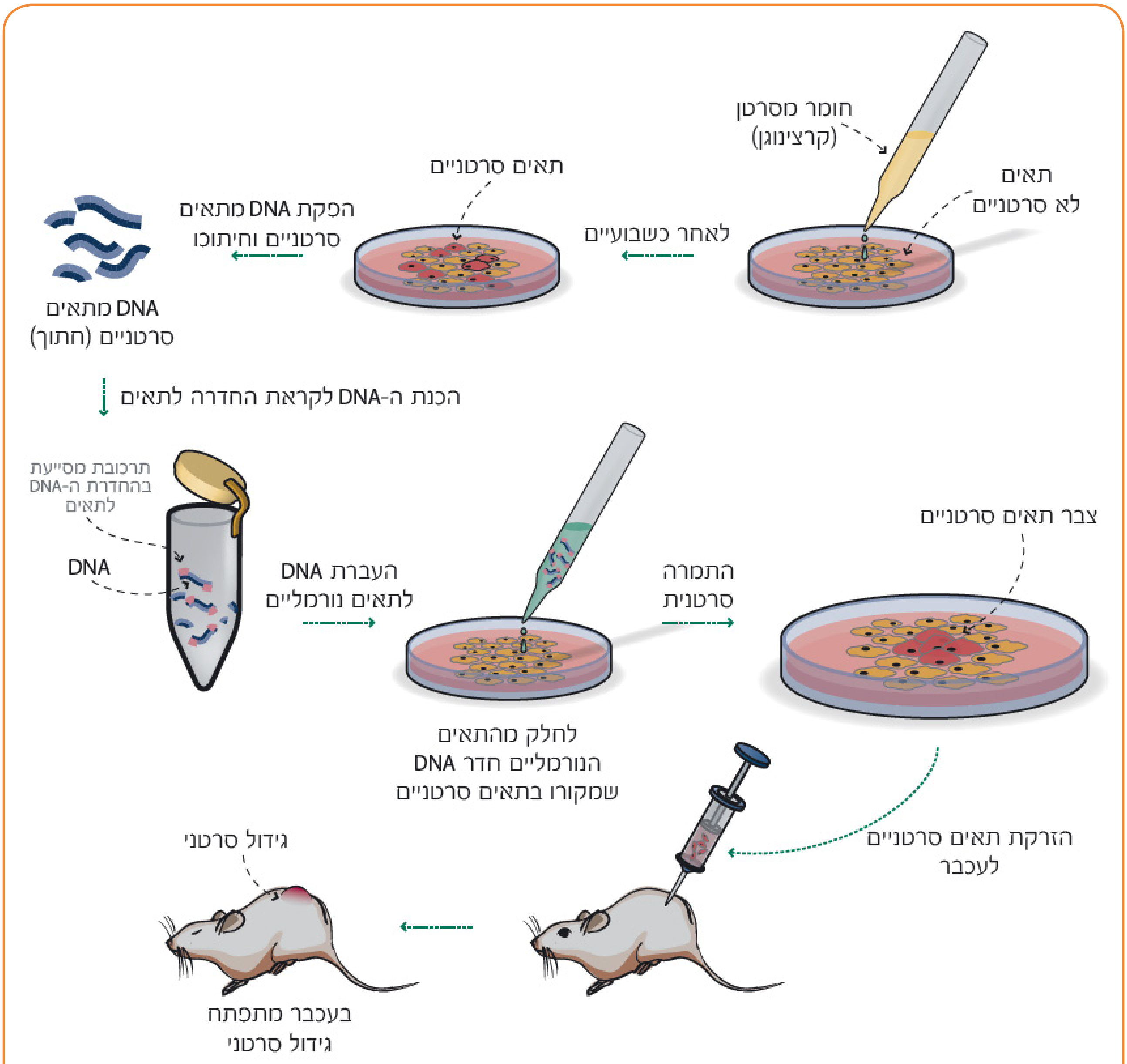


עבודה עם תאי בעל-חיים במנדף סטרילי
החלפת מצע גידול ודילול התאים הוא טיפול המתבצע אחת לשלושה ימים

תאים בתרבית גדלים בנוכחות מצע גידול נוזלי ויוצרים שכבה על קרקעית הצלחת.
ממקמים את הצלחת באינקובטור

תאים מבעד למיקרוסקופ אור
חלבוני שלד התא נצבעו עם נוגדנים זוהרים באדום והגרעינים נצבעו עם צבע ירוק הנקשר ל-DNA

باستثناء بعض الخلايا كخلايا الدم التي تنمو في معلق، خلايا حيوانية عادية التي تنمو في معلق تتميز بأن نموها يعاق نتيجة للتلامس مع خلايا مجاورة (Contact inhibition). لذلك فان خلايا عادية تتوقف عن الانقسام عندما تغطي كل الصحن بطبقة خلايا واحدة متجانسة. لكي نواصل في تنمية هذه الخلايا يجب تخفيفها ونقل جزء من الخلايا الى صحن جديد. بالمقابل خلايا سرطانية لا يتم اعاقتها نتيجة للتلامس مع خلايا أخرى، ونتيجة لاستمرار الانقسامات تنتج في المستنبت مجموعات من الخلايا التي تنمو على سطح بعضها البعض. للحصول على خلايا سرطانية في المختبر يمكن اخذ خلايا عادية وتعريضها لمادة مسرطنة (كرسينوجين). تعرض الخلايا لمادة مسرطنة تؤدي الى تغيير سرطاني في قسم منها ونتيجة له تنتج تجمعات من الخلايا السرطانية التي تنمو على بعضها. كل تجمع خلايا مصدره خلية واحدة مرت تغيير سرطاني. ما هو اسهام المادة المسرطنة الأولي لعملية التحول السرطاني؟ المادة المسرطنة تؤدي الى تغيير في الـ DNA (طفرة). الطفرة المسرطنة هي أحيانا مجرد طفرة نقطية، أي تغيير نوكليوتيد واحد بنوكليوتيد أخر. عند حدوث الطفرة في جين ينتج ناتج فعال أكثر، وناتج هذا الجين يؤدي الى تحفيز انقسام الخلايا، يسمى الجين "جين مسرطن" (Oncogene).



رسم 4.1: DNA من خلايا سرطانية يمكنه تحويل خلايا عادية إلى خلايا سرطانية في عمليّة تُسمّى تحوّل.

في أعقاب اقتحام عشوائي لمقاطع DNA من خلايا سرطانية إلى خلايا عادية، فقط عدد قليل من الخلايا تتحوّل إلى خلايا سرطانية. هذه الحقيقة يمكن أن تبيّن أنّ مقطع DNA محدّد فقط، من الخلية السرطانية، يمكن أن يؤدّي إلى تحول سرطاني. لذلك فإنّ السؤال المطروح هو: ما هو مقطع الـ DNA المسؤول عن التحوّل السرطاني؟ هل هو جين، وهل يمكن استنساخه؟

عندما تتعرّض خلايا عادية في مستنبت إلى مادّة مسرطنة (كرسينوجين) تتحوّل بعض الخلايا العادية إلى سرطانية. من هذه الخلايا السرطانية يمكن استخلاص DNA واقحامه في خلايا غير سرطانية. عدد قليل من الخلايا غير السرطانية التي استوعبت DNA من الخلايا السرطانية تتحوّل بنفسها إلى خلايا سرطانية. ومن هنا يتضح أنّ هناك مقطع DNA محدّد (أو مقاطع قليلة محدّدة) يمكنه تحويل خلية غير سرطانية إلى خلية سرطانية. الخلية السرطانية تنقسم وينتج تكتل من الخلايا السرطانية الذي يمكنه أن يؤدّي إلى

ورم سرطاني في فأر خاص لا يحتوي على جهاز مناعة. مجموعة التجربة الموصوفة هنا لا تكفي للإجابة عن السؤال التالي: أيّ مقاطع من بين مقاطع الـ DNA المتعدّدة التابعة للخلايا السرطانية مسؤولة عن التحوّل السرطاني؟

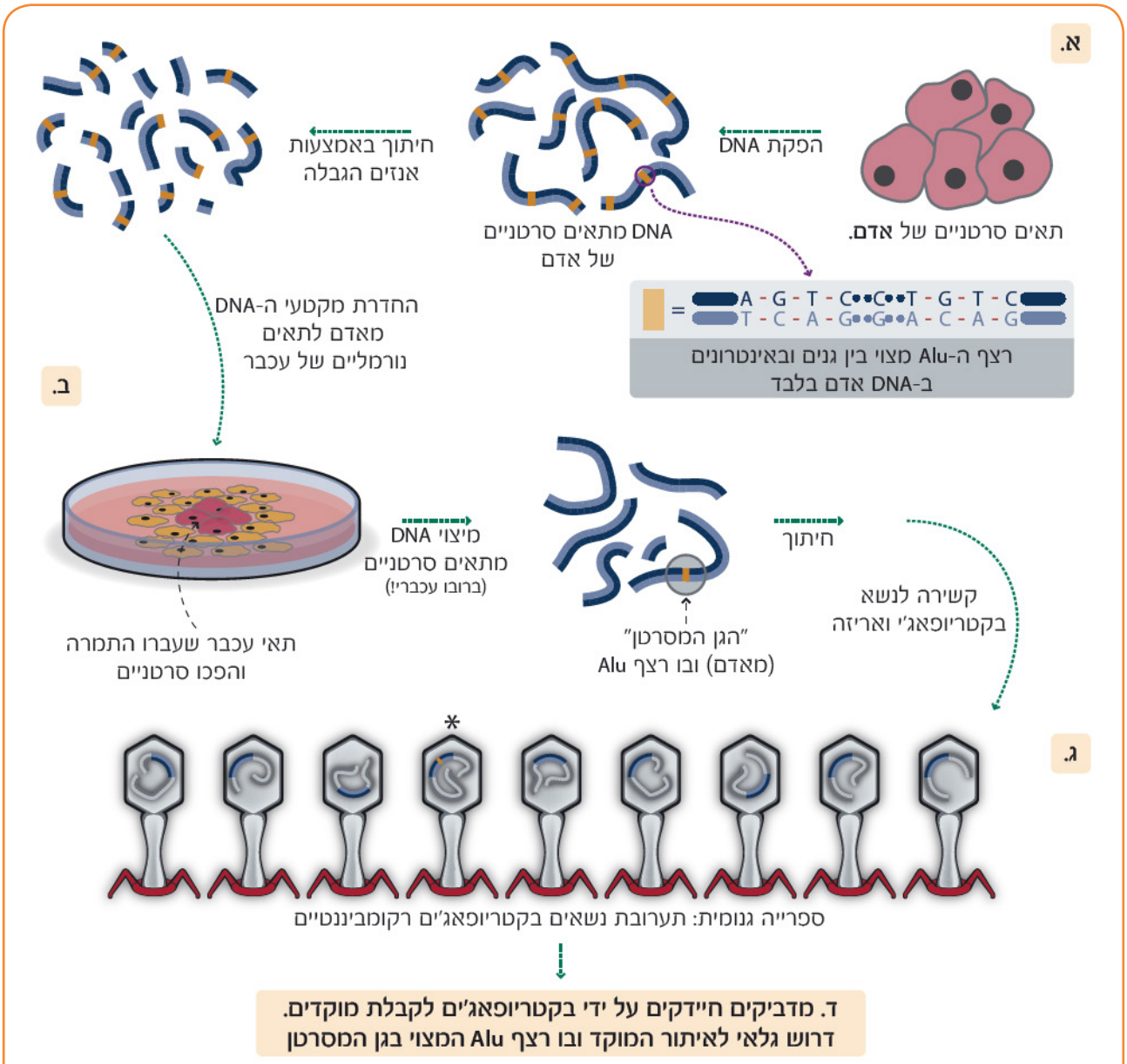
افترض الباحثون أنّ على مقطع الـ DNA المحدّد الذي يمكنه أن يؤدّي إلى ظهور خلية سرطانية، يوجد جين محدد لُقّب بـ "الجين المسرطن". كان التحدي الأساسي للباحثون إيجاد مقطع الـ DNA الذي يحتوي على "الجين المسرطن" من بين كل مقاطع الـ DNA المتعدّدة التي مصدرها الجين المسرطن، بهدف دراسة التغيير الذي حدث فيه. أراد الباحثون **استنساخ الجين المسرطن**.

في بداية سنوات الـ 80 من القرن الـ 20 اعتبر استنساخ جينات مسرطنة تحدي. وفعلًا، فإنّ التحدي الذي واجه فاينبرج وزملائه كان صعبًا بشكل خاصّ، لأنّه لم تتوفر لديهم أي معلومات عن هوية تسلسل الجين المسرطن المطلوب استنساخه. لذلك احتاج الباحثون إلى أسلوب مبتكر موصوف في رسم 4.2. في البداية استخلص DNA من خلايا إنسان سرطانية. اقحم هذا الـ DNA إلى خلايا فأر غير سرطانية. بواسطة هذا الـ DNA من الإنسان حصل حدث خاص وفيه خلية فأر واحدة، لم تكن سرطانية، استوعبت عشوائيًّا مقطع DNA محدّد وتحوّلت إلى خلية سرطانية (العملية التي حصلت في الخلية تسمى **" تحوّل"**). أدّت الخلية السرطانية الى إنتاج تكتل خلايا سرطانية استُخلص منها DNA، والتحدي كان إيجاد مقطع الـ DNA البشري الذي يحتوي على الجين المسرطن في هذا الـ DNA التابع للفأر.

كما هو موصوف في الرسم 4.2 وكما مشروح في الجدول 4.2، استُخلص في المرحلة التالية **DNA جينومي** من الخلايا السرطانية للفأر، وقطع بانزيمات تقييد. نَتَجت مجموعة من حوالي 200000 مقطع خاص من الجينوم. بعد ذلك استُنسخ كل مقطع في DNA بكتيريوفاج ناقل، ونَتَجت مجموعة كبيرة من المقاطع في نواقل بكتيريوفاج (كما هو موصوف في الفصل 3). بسبب كبر المجموعة سُمّيت مكتبة. المكتبة الناتجة كانت مكتبة جينومية لـ DNA من فأر (رسم 4.2ج). خاصية هذه المكتبة أن معظم البكتيريوفاجات فيها حملت مقاطع DNA جينومية لفأر، ولكن بكتيريوفاج واحد احتوى على مقطع مصدره إنسان وفيه "الجين المسرطن". ونهاية، لإتمام الاستنساخ، استُعملت البكتيريوفاجات في المكتبة لإنتاج بؤر داخل طبقة من خلايا البكتيريا (كما هو ممثل في رسم 3.1 في الفصل 3). السؤال المطروح: أيّ من البؤر المتعدّدة الناتجة تحتوي على بكتيريوفاج فيه الجين المسرطن البشري؟ المهمة المحدّدة والأبسط كانت إيجاد البؤرة الوحيدة التي تحتوي على DNA بشري.

خلافًا لـ DNA من الفأر، فإنّ DNA الإنسان يتميّز بإحتوائه على تسلسل نوكليوتيدات تُسمى Alu وهو يتكرر في أماكن متعددة في الجينوم ومن ضمنها الانترونات (رسم 4.2). وقد توقع الباحثون وجود تسلسل Alu في الجين المسرطن أيضًا. لإيجاد البؤرة المطلوبة التي تحتوي على الجين البشري المسرطن، عمل الباحثون على تحديد البؤرة التي تحتوي على التسلسل Alu. تمّ إيجاد هذه البؤرة بواسطة كاشف DNA (الفصل ج). في هذا الاستنساخ كان كاشف الـ DNA عبارة عن مقطع DNA يحتوي على تسلسل Alu موسوم بنظير مُشع. الكاشف مخصص للارتباط بالتسلسل المُكمل للـ Alu الموجود في البؤرة. بعد الارتباط يمكن الكشف عن موقع الوسم المُشع وبذلك إيجاد البؤرة التي تحتوي على تسلسل Alu. أكد الباحثون فرضيتهم أنّ هذه البؤرة هي أيضًا البؤرة التي تحتوي على الجين المسرطن. وفعلًا، نجح فاينبرج وزملاؤه بواسطة البروتوكول التجريبي من استنساخ الجين المسرطن المسمّى Ras (الجدول 4.3)

التحدي الذي واجه باحثين ومن بينهم الباحث فاينبرج كان استنساخ مقطع الـ DNA الذي عند انتقاله إلى خلية عادية يؤدّي إلى تحوّلها لمسرطنة (تحدي استنساخ "الجين المسرطن"). الوسيلة التي اتبعها فاينبرج وزملائه موصوفة في رسم 4.2. DNA مصدره من خلايا سرطانية بشرية، أُدخل الى خلايا فأر عادية. أحد مقاطع الـ DNA التي مصدرها خلية إنسان أدّى الى تكون تكتل خلايا فأر سرطانية. استُعمل DNA من الخلايا السرطانية للفأر لإعداد مكتبة جينومية بهدف استنساخ الجين المسرطن.



רשם 4.2: طريقة فاينبرج لاستنساخ الجين المسرطن من خلايا إنسان: من خلايا سرطانية إلى مكتبة جينومية.

لإيجاد مقطع DNA معيّن يحتوي على الجين المسرطن الموجود بين مقاطع الـ DNA المتعددة، نفّذ فاينبرج وزملاؤه العملية التالية. في المرحلة أ تمّ قطع DNA من خلايا سرطانية للإنسان. في المرحلة ب اقحمت مقاطع DNA مصدرها خلايا سرطانية من إنسان الى داخل خلايا غير سرطانية من فأر. مقاطع DNA مختلفة من خلايا سرطانية من إنسان اندمجت عشوائيًّا في جينوم خلايا فأر مختلفة. فقط في احدى خلايا الفأر اندمج مقطع يحتوي على الجين المسرطن من الإنسان. هذه الخلية تحوّلت إلى خلية سرطانية وأنتجت تكتل خلايا سرطانية. ومن ثم استُخلص وقُطع DNA من خلايا الفأر السرطانية الذي يحتوي على الجين المسرطن من الإنسان. في المرحلة ج أُقحمت المقاطع الناتجة إلى جزيئات ناقل من نوع بكتيريوفاج، وبعد الرزم نَتَجت مجموعة كبيرة من البكتيريوفاجات الريكومبيننتية التي تسمّى مكتبة. في المكتبة كان مخفي البكتيريوفاج الذي يحتوي على الجين المسرطن. وفي النهاية، بعد عدوى البكتيريا بالمكتبة نتجت بؤر. استغلّ الباحثون احتواء الـ DNA البشري (وليس الفأري) على تسلسل DNA يسمّى Alu والذي يتكرر بتردد عالي في الجينوم، وإنّه يمكن ايجاده في انترونات الجينات. ولذلك استطاع الباحثون تحديد البؤرة التي احتوت على الجين المسرطن بواسطة تشخيص البؤرة التي تحتوي على تسلسل Alu.

مكتبة جينومية هي مجموعة من مقاطع الـ DNA من الجينوم التي ارتبط كل واحد منها بناقل بكتيريوفاجي معيّن. التحدي في استنساخ الجين المسرطن هو إيجاد البكتيريوفاج الذي يحتوي على الجين البشري المسرطن. ولأنّ فقط جينوم بشري يحتوي على نسخ متعددة من تسلسل قواعد خاص يسمّى Alu، من المتوقع إيجاد هذا التسلسل في الجين المسرطن أيضًا. لذلك من الممكن استعمال كاشف DNA يحتوي على تسلسل Alu للكشف عن البكتيريوفاج الذي يحتوي على الجين المسرطن.

صندوق 4.2: استنساخ DNA بواسطة مكتبة جينومية

رواد الاستنساخ المركز لـ DNA وجدوا أنفسهم أمام مهام استنساخ جينات معيّنة. الجين المطلوب استنساخه موجود في مكان ما داخل DNA الخلية (الجينوم). كل جين موجود بين جينات أخرى (حوالي 20000 جين في خلية إنسان، حوالي 6000 جين في خلية خميرة وحوالي 4000 جين في بكتيريا) ومقاطع DNA لا تحتوي على جينات. بهدف عملية استنساخ يجب قطع الـ DNA لمقاطع من 10kb-20kb، حيث يَنْتُج من جينوم معطى مادّة أساس من عشرات الألاف وحتى مئات الألاف من مقاطع DNA خاصة (يتعلق بكبر جينوم الكائن الحي). إيجاد جين من بين مئات آلاف المقاطع هي مهمة استنساخ تحتاج إلى كاشف (الفصل ج)

استنساخ من جينوم يشبه في أسسه عمليات الاستنساخ التي وصفت في الفصل 3 (الرسمان 3.5 و 3.6). بهدف الاستنساخ من الجينوم يجب قطع الـ DNA الجينومي والناقل البكتيريوفاجي وربط نُسخ الناقل بمقاطع الـ DNA الجينومي. في الاستنساخ من الجينوم تَنْتُج مجموعة كبيرة بشكل خاص من مقاطع الـ DNA الخاصة داخل جزيئات الناقل. بعد ذلك يتمّ رزم الـ DNA في جسيمات البكتيريوفاجات، وتَنْتُج مجموعة من البكتيريوفاجات الريكومبننتية. بسبب كبر هذه المجموعة فإنها تسمّى **مكتبة**. ولأنّ الجينوم هو مصدر هذه المجموعة من مقاطع الـ DNA الموجودة في جزيئات الناقل، فإنّه يسمّى **مكتبة جينومية**.

صندوق 4.3: البيولوجيا الجزيئية للسرطان هي قصة جزيئية متعددة الأحداث

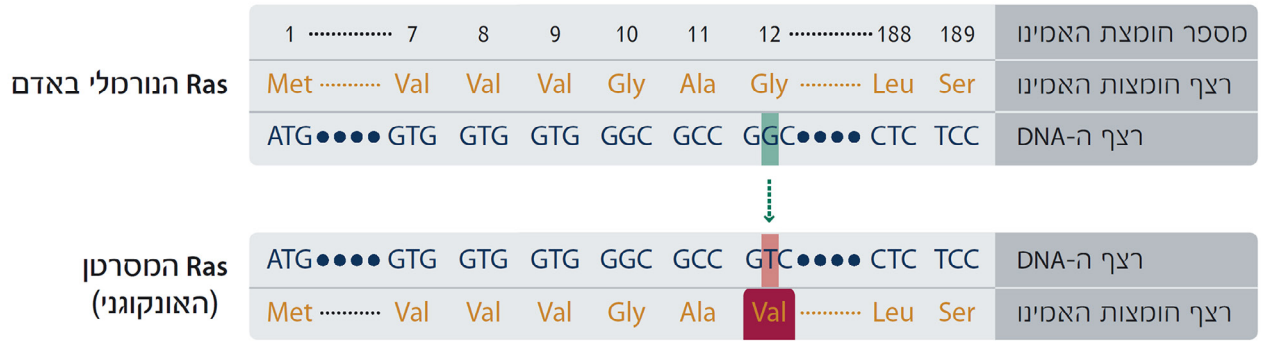
جين Ras هو أحد الجينات المتورطة أحيانًا في التحوّل السرطاني، استُنسخ بواسطة كاشف الـ Alu. مباشرة بعد الاستنساخ تمّ تحديد تسلسل القواعد في الجين المشفر لبروتين صغير المسمّى هو أيضًا Ras. المفاجأة كانت أنّ هذا الجين موجود في كل الخلايا العادية عند الإنسان. إذا وجد Ras في كل الخلايا العادية في الجسم، لماذا لا يتورط Ras بالسرطان في كل خلايا الجسم؟ للتذكير، Ras الذي تمّ استنساخه مصدره خلية سرطانية، والسؤال المطروح هنا: ما الخاص بذلك؟ هل يوجد اختلاف بين Ras في خلايا سرطانية وبين Ras في خلايا عادية؟ وفعلًا وُجد أنّ تسلسل النوكليوتيدات للجين Ras المسرطن يختلف عن التسلسل في الجين Ras في الخلايا العادية، والاختلاف بينهم هو في نوكليوتيد واحد! بكلمات أخرى، في Ras المسرطن يوجد **طفرة نقطية**، (point mutation).

وكما أعطي الجين Ras هذا الأسم، جينات أخرى اعطيت أسماء مثل: Fos, Myc وغيرها. في الأغلب لا يوجد أهمية لمصدر اسم الجينات.

تُستخدم المكتبة الجينومية لاستنساخ جينات ومقاطع DNA من الجينوم كما هو مشروح في الصندوق 4.2. استُخدم كاشف DNA فيه تسلسل قواعد خاص يسمّى Alu لاستنساخ وإيجاد الجين المسرطن. وُجد أنّ هذا الجين يشفر لبروتين Ras الموجود في كل خلايا الجسم (ومن ضمنها الخلايا العادية). كما هو مبين في الرسم 4.3، احتوى الجين Ras المسرطن على **طفرة نقطية**.

كما هو موصوف في الرسم 4.3، عند فحص الانعكاسات لهذه الطفرة النقطية، نجد بأنّها مسؤولة عن استبدال حامض أميني واحد بأخر في الـ Ras المسرطن مقارنة بالـ Ras العادي. لا يوجد اختلافات أخرى بالتسلسل المشفر للبروتين بين Ras مسرطن و Ras عادي، وكلاهما يشفر لبروتين يحتوي على 189 حامض أميني. ومن هنا نستنتج أنّ تغيير صغير في جين معيّن كاف لكي يؤدّي إلى تحوّل سرطاني. بيّنت تشخيصات إضافية أنّ التغيير الصغير كاف لكي يؤدّي الى بروتين فعّال 10 أضعاف، في تحفيز انقسام الخلايا، مقارنة ببروتين عاديّ. هذه الفعالية الزائدة تؤدّي الى ظهور وتراكم خلايا سرطانية.

البروتين الناتج عن جين Ras الطافر أكث نشاطا ونتيجة لذلك يحدُث تحوّل سرطاني. الجين الذي يؤدّي إلى تحوّل (أليل مسرطن) يسمّى اونكوجين (Oncogene). Onco من اليونانية تعني: كتلة، تجمع أو ورم، والاسم يوضح مقدرة الاونكوجين على أن يؤدّي إلى ظهور تكتلات خلايا وورم. إذا فحصنا أورام سرطانية مختلفة، نجد أنّه ليس في كل ورم الأنكوجين هو Ras طافر. وفي المقابل نجد أنّه في أورام سرطانية مختلفة يوجد أحيانًا طفرات في جينات أخرى خلاف Ras، وهذه الجينات تعمل كاونكوجينات. الاستنتاجات هي أنّ الـ Ras هو ليس الاونكوجين الوحيد، وفي حالات السرطان المختلفة تشارك اونكوجينات مختلفة ويوجد أكثر من طريقة واحدة لتحويل خلية عادية الى خلية سرطانية.



רسم 4.3: مقارنة تسلسل الـ Ras العادي بتسلسل Ras مسرطن.

في الجين العادي المشفر لـ Ras يتواجد تسلسل نوكليوتيدات يمكّن من إنتاج بروتين Ras فيه 189 حامض أميني. في أليل Ras المسرطن يوجد طفرة: في مركز كودون 12 يوجد نوكليوتيد مع القاعدة T (ثيمين) بدل القاعدة G (جوانين). نتيجة لذلك الكودون GGC تحوّل لـ GTC، وعند الترجمة يوضع في الموقع 12، في البروتين Ras المسرطن، الحامض الأميني فالين (Val) بدل جليسين (Gly). هذا التغيير المحدّد بالـ Ras يفعّل البروتين ويحوّله إلى أكثر نشاطًا.

سؤال 4.1

عملية استنساخ الجين Ras من قبل فاينبرج وزملاؤه كانت معقدة. لفهم مدى تعقيدها يجب الإجابة عن السؤال التالي: لماذا لم يكن من الممكن استعمال مكتبة من خلايا إنسان سرطانية لكي يتمّ استنساخ الجين المسرطن بمساعدة الكاشف Alu؟

الطفرة النقطية التي اكتُشفت بـ Ras مسؤولة عن إنتاج بروتين Ras فعّال بشكل زائد ويحفّز انقسام غير مقيد للخلية. Ras الذي يحتوي على هذه الطفرة هو جين مسرطن. بشكل عام جين مسرطن يسمّى أيضًا **اونكوجين**.

استنساخ بواسطة مكتبات DNA مكمل

يوجد حالات فيها عملية استنساخ جينات كاملة بواسطة مكتبة تواجه صعوبات بسبب كبر الجينات. من بين العوامل التي تساهم في كبر الجينات هو وجود انترونات. عادة لا توجد أهمية للانترونات لإنّها لا تمثّل في الـ RNA الرسول معلومات لإنتاج بروتين. بالإضافة إلى ذلك فإنّ المعلومات الوراثية في الـ RNA رسول كافية لدراسة العديد من وظائف الجين. استغلال RNA رسول لدراسة جينات ولتطبيقات أخرى هي عملية مريحة. ولكن من المعروف أنّ الـ RNA هو أُحادي الجديلة، ولذلك لا يُمكن استنساخه بواسطة نواقل. للتغلب على هذا العائق نستعمل إنزيمات منتجة للـ DNA من الـ RNA. هذا الإنزيم يحفظ المعلومات المشفرة في الـ RNA بشكل دقيق داخل الـ DNA الذي يقوم بإنتاجه. هذا الانزيم يسمّى Reverse transcriptase (باختصار RT) أو "إنزيم النسخ العكسي" (صندوق 4.4).

صندوق 4.4: إنزيم النسخ العكسي: اكتشافه، هدفه ومصدر اسمه

درس الباحثان هوارد تمين ودافيد بولتيمور (Howard Temin and David Baltimore) فيروسات جينوماتها من RNA أُحادي الجديلة المسمّاه ريترو-فيروسات. قسم من الفيروسات تستطيع أن تؤدّي إلى تحوّل سرطاني. عملية عدوى الخلايا الحيوانية بالريتروفيروسات موصوفة في الرسم 4.4.

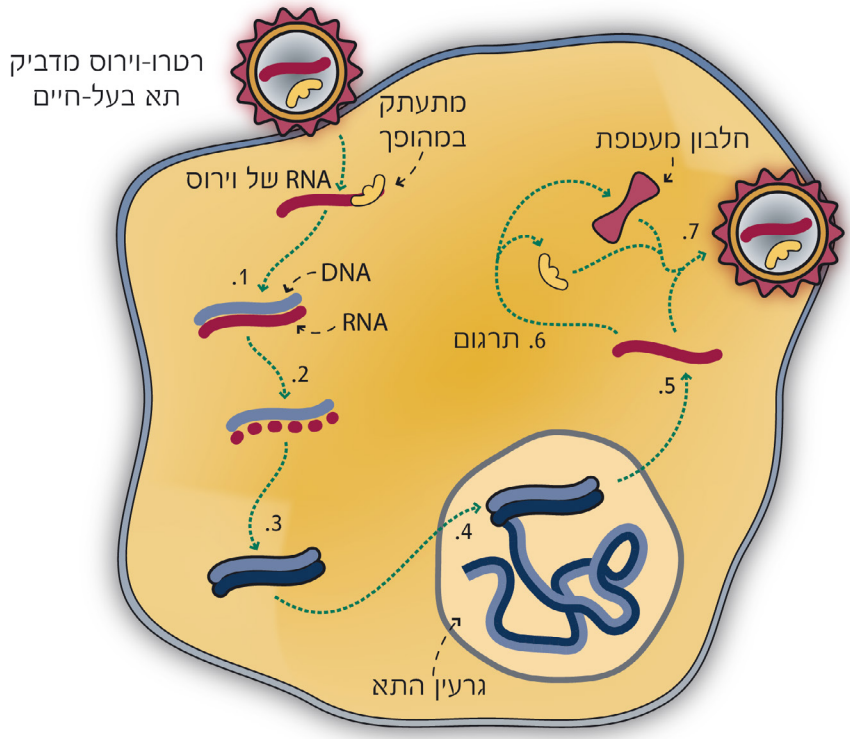
سأل الباحثون أنفسهم، ماذا يحدث عندما يخترق جزيء RNA فيروسي خلية معيّنة؟ اتّضح أنّ الـ RNA الفيروسي مطلوب لترجمة بروتينات الفيروس وبالاضافة لذلك فانه يشكل المادة الوراثية للفيروسات الجديدة الناتجة في الخلية. ولكن كيف يتضاعف RNA الفيروس؟ اتّضح أنّ هذا النوع من الفيروسات يحتوي على إنزيم يسمى "انزيم النسخ العكسي" الذي يستخدم الـ RNA لإنتاج DNA ثنائي الجديلة. لأنّ العملية التي كانت معروفة هي التحوّل من DNA إلى RNA فقط، لذلك فإنّ التحوّل من RNA لـ DNA اعتبرت عملية عكسية، وهذا مصدر اسم الانزيم الفيروسي، المسمّى "النسخ العكسي" (Reverse transcriptase). وجود "النسخ العكسي" هو الذي أعطى الريترو-فيروسات اسمها: الكلمة Retro تعني الخلف، وقد جاءت لتذكر أن من DNA إلى RNA هي إلى الأمام ومن RNA إلى DNA إلى الخلف.

بعد أن يُنْتِج إنزيم النسخ العكسي DNA فيه المعلومات الوراثية التي مصدرها RNA الفيروس، يندمج هذا الـ DNA في جينوم الخلية. وعندما يكون في الجينوم ينسخ الـ DNA التابع للفيروس بواسطة الإنزيم الخلوي RNA بوليميراز. وفي أعقاب النسخ تَنْتُج نُسخ عديدة من الـ RNA الفيروسي بهدف ترجمة بروتينات الفيروس، ولكي تشكّل جينوم في الفيروسات الجديدة الناتجة في الخلية (تكاثر). إنزيم النسخ العكسي موجود في مجموعة الريترو-فيروسات فقط (في جينات الحيوانات لا يوجد جين يشفّر لهذا الإنزيم). اتّضح لاحقًا أنّ مسبب مرض الايدز، فيروس الـ HIV، هو ريترو-فيروس. لا يقل أهمية كان الاكتشاف أنّ جينوم الريترو-فيروس من النوع المسرطن يحتوي على مقطع RNA إضافي غير موجود في الريترو-فيروسات غير المسرطنة. عندما حوّل هذا المقطع الإضافي إلى DNA بواسطة إنزيم النسخ العكسي أصبح ممكنًا أن يحدّد أنّ مصدره في جين حيوان. اتّضح أيضًا أنّ المقطع الإضافي المسرطن معرّف على أنّه اونكوجين، لأنّ مصدره جين خلوي يحتوي على طُفرات. حصل تمين وبولتيمور على جائزة نوبل مقابل اكتشاف إنزيم النسخ العكسي.

أداة هامة في صندوق أدوات العاملين في الهندسة الوراثية هو الإنزيم المُنْتِج DNA من الـ RNA والمسمّى إنزيم النسخ العكسي. مصدر هذا الإنزيم هو الريترو-فيروسات، وهي فيروسات تحتوي على مادّة وراثية من نوع RNA أُحادي الجديلة. يوجد ريتروفيروسات لها مقدرة على أن تؤدي الى تحوّل سرطاني (في معظم الحالات في خلايا حيوانات وليس في خلايا إنسان) أو ريترو-فيروسات لها المقدرة على التسبب بأمراض، مثال فيروس الـ HIV المسبب للإيدز.

إنزيم النسخ العكسي وإنتاج DNA مكمل

بحسب الشائع، من DNA يَنْتُج RNA في عملية النسخ، بينما من RNA يَنْتُج بروتين في عملية الترجمة. على مدار سنوات عديدة لم تكن إمكانية إنتاج DNA من RNA ممكنة. كانت هذه دراسات لفيروسات جينومها مكوّن من RNA أُحادي الجديلة التي أدّت إلى اكتشاف إنزيم النسخ العكسي. هذا الإنزيم تحوّل الى أداة مهمة في صندوق أدوات العاملين في الهندسة الوراثية. لمعلومات عن اكتشاف هذا الانزيم، وظيفته ومصدر اسمه راجع الصندوق 4.4.



רסם 4.4: דורת חיית הריטרו-פיירוס: מן העדוי וחתי בזוגי גסיסמת פיירוס גדידה.

ריטרופיירוסות מחתלפה תעדי חלאיי איוכריוטית מחתלפה. פהכדא מתלא, פיירוס הי HIV הזי יוּדּי לי AIDS, וה אידּא ריטרו-פיירוס, יעדי חלאיי גהאז המנאעה לדא הזנסאן. בי עמלית העדוי יתלטצ הריטרו-פיירוס בי חלית הההדף ויִדחל אלידה הי RNA וזנזיים הנסח העכסי. מע אקחאם הי RNA התאבע לריטרו-פיירוס לחלית יבני זנזיים הנסח העכסי גדילה DNA בחסב הי RNA ויַנְתּُג הגין RNA-DNA (מרחלה 1). בעד פצל הי RNA מן הההגין (2), יבני זנזיים הנסח העכסי, או הי DNA בוליימיראז חלוי גדילה DNA מִכמלה ויַנְתּُג DNA תנאיי הגדילה (3) הזי יגדמג בי הגיגום (4). מן מוצעה בי הגיגום יתמّ נסח מקטע הי DNA הזי יגפר לברוטיגות הפיירוס לי RNA וגתכרג נסח עדיגה אלי הסיגטובלאזמא (5). הי RNA יִתרגם, וגַנְתּُג ברוטיגות הפיירוס (6), RNA וברוטיגות הפיירוס נִתְּגִג גסיסמת הפיירוס (7) התי יאכן אן גתכרג מן חלחלית וגתקום בעדוי אחרי חלאיי.

כיף יעמל זנזיים הנסח העכסי, מא הי חלטרוף חלמלאמה לעמלה וביאדא יגתלף נגאטה ען נגאט הזנזיים DNA בוליימיראז? הזגאבה חלכאמלה מוצדדה בי גדול 4.1 והרסם 4.5. באגתצאר, הזנזיים יגתאג לגדילה RNA ולברזימר יתרבט בהי RNA (אנטר אלי חלמרבּע חלגאנבי). זנזיים הנסח העכסי יבטיל חלברזימר בחסב חלמעלומאת עלי חלי RNA בזפאפה נוכליוטידאת מן נוע dNTP, וכל נוכליוטיד יִפאף יִכמל נוכליוטיד מוצדד עלי חלי RNA (מקאבל A יִפאף T והכדא).

ברזימר הו אוליגו-נוכליוטיד (תסלסל קצייר ואחאדי חלגדילה מן חלנוכליוטידאת). ברזימר יממכן אן יתרבט לגדילה RNA או DNA. עגד זפאפה אנזיימאת מלאימה אלי חלאנבובה יממכנהא זבטאלה חלברזימר בחסב חלמעלומאת חלמוצדדה עלי חלגדילה חלתי ארתבט בהא.

אדאה האמה בי צגדוק אדואת חלעאמלין בי חלהגדסה חלוראתיה הו חלזנזיים חלמִנְתِג DNA מן חלי RNA וחלמסמّי זנזיים הנסח העכסי. מצדר הדא חלזנזיים הו חלריטרו-פיירוסאת, והי פיירוסאת תחתוי עלי מאדّה וראתיה מן נוע RNA أُחאדי חלגדילה. יוגד ריטרופיירוסאת להא מקדרה עלי אן תוּדּי אלי תחוّל סרטאני (בי מעטם חלחאלאת בי חלאיא חיוואנאת ולים בי חלאיא إנסאן) או ריטרו-פיירוסאת להא חלמקדרה עלי חלתסבב בהמראץ, מתאל פיירוס חלי HIV חלמסבב לחלזיגז.

بحسب المعلومات الوراثية في الـ RNA تَنْتُج نُسخة مُكملة من DNA أُحادي الجديلة. لذلك النتيجة في المرحلة الأولى هي جزيء هجين يحتوي على جديلة RNA وجديلة DNA. لاحقًا يتفكك الـ RNA المرتبط في الـ DNA. هذا التفكك يُمكّن إنزيم DNA بوليميراز أو أنواع معيّنة من إنزيمات النسخ العكسي من البدء في عملية بناء جديلة DNA إضافية بحسب تسلسلجديلة الـ DNA أُحادية الجديلة، وفي النهاية يَنْتُج جزيء DNA ثنائي الجديلة. في عملية تحويل جزيء الـ RNA أُحادي الجديلة الى جزيء DNA ثنائي الجديلة تُحفظ المعلومات الوراثية التي كانت على الـ RNA في الـ DNA الناتج. لأنّ عملية التحول تمّت من خلال إنتاج جدائل مكملة، يُسمّى الـ DNA الناتج من الـ RNA بـ DNA مُكمل (complementary DNA) وباختصار يُسمّى cDNA.

	DNA פולימראז	המתעתק במהופך	
		שלב א'	שלב ב'
גדיל תבנית	שני גדילים משלימים של DNA	RNA (חד-גדילי)	DNA חד-גדילי
דרישה לתחל	כן	כן	כן
הארכת תחל על ידי הוספת:	dNTP	dNTP	dNTP
תוצאה סופית	שתי מולקולות DNA דו-גדיליות	מולקולה היברידית RNA: DNA שה-RNA שבה מפורק מיד ומתקבל DNA חד-גדילי המיועד לשלב ב'.	מולקולה של DNA דו-גדילי

جدول 4.1: مقارنة بين خواص عمل الإنزيمين DNA بوليميراز وإنزيم النسخ العكسي.

إنتاج مكتبة DNA مُكمل

لاستنساخ وإيجاد DNA مكمل محدّد اعتاد رواد الاستنساخ إنتاج مكتبة DNA مُكمل. مادّة الأساس لعملية استنساخ DNA مُكمل محدّد هي جزيئات الـ RNA في الخلية.

مراحل إنتاج مكتبة DNA مُكمل هي:

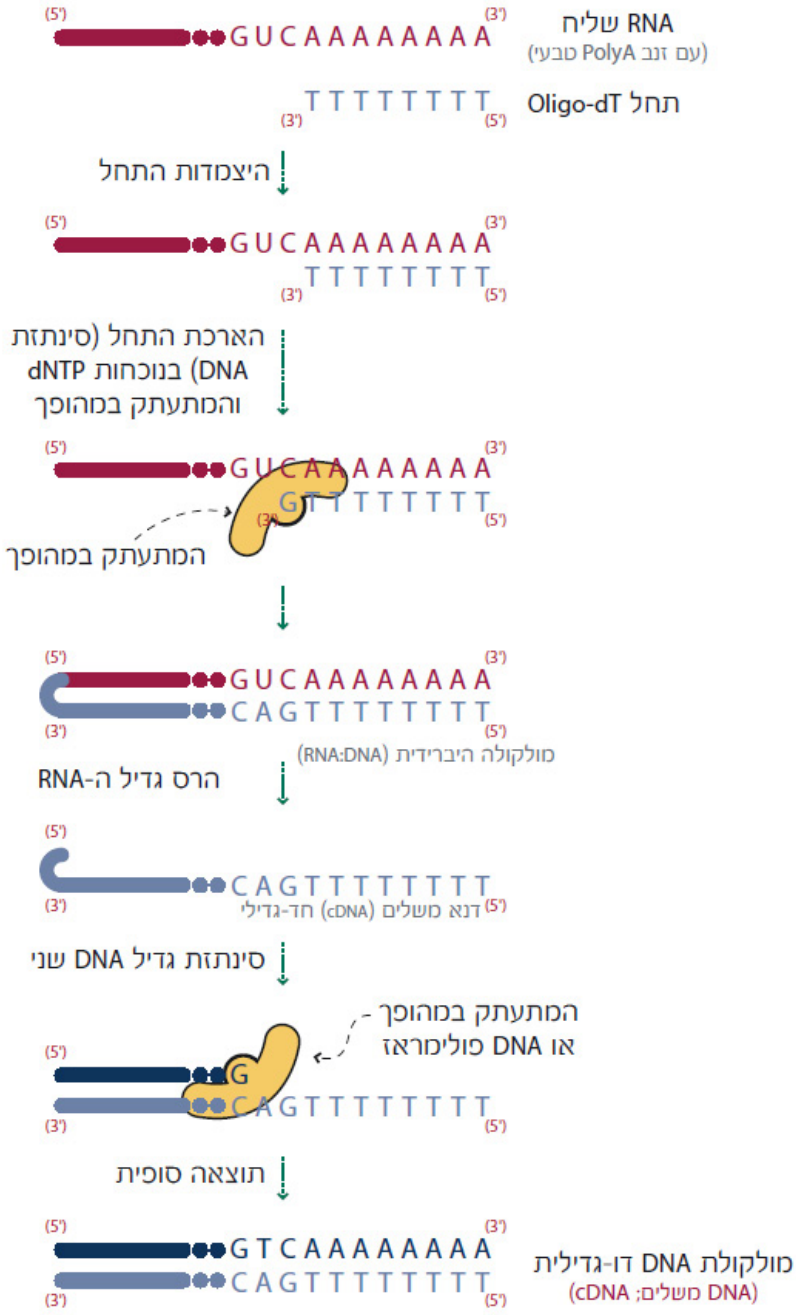
أ. استخلاص الـ RNA رسول من الخلايا. ينتج مجموعة جزيئات RNA رسول مصدرها جينات متعدّدة تمّ التعبير عنها في الخلايا قبل عملية الاستخلاص.

ب. إنتاج DNA مُكمل (cDNA): لهذه المرحلة، بالإضافة للـ RNA رسول من المرحلة أ مطلوب أيضًا برايمر وانزيم النسخ العكسي. يمكن استعمال برايمر يحتوي على ثيمين (T) فقط (Oligo-dT) الذي يرتبط في الطرف Poly A الموجود في الطرف 3 لل RNA رسول. الإنزيم يطيل البرايمر بإضافة نوكليوتيدات مُكملة. في هذه المرحلة يتمّ الحصول على خليط غير متجانس من جزيئات الـ DNA المُكمل مصدرها جينات مختلفة. مراحل التحويل من RNA رسول إلى DNA مُكمل موصوفة في الرسم 4.5.

ج. اقحام الـ DNA المُكمل للناقل وإنتاج مكتبة: يتمّ ربط جزيئات cDNA مختلفة من المرحلة ب لنُسخ متعدّدة من النواقل التي يمكن أن تكون بلاسميد أو بكتيريوفاج. يَنْتُج خليط غير متجانس من جزيئات ريكومبيننتية كل واحدة منها مبنيّة من ناقل رُبِط له مقطع DNA خاص. الخليط يسمّى مكتبة.

د. إتمام الاستنساخ: يتم اقحام المكتبة الى البكتيريا. في أعقاب ذلك يتمّ عزل ومضاعفة مقاطع DNA خاصة في البؤر أو المستعمرات. هذه المرحلة هي المرحلة الأخيرة قبل إيجاد الـ DNA المطلوب في بؤرة أو مستعمرة محدّدة بواسطة كاشف.

في الجدول 4.1 يوجد تلخيص لمتطلبات عمل إنزيم النسخ العكسي. في الرسم 4.5 يوجد وصف لعمل إنزيم النسخ العكسي بهدف تحويل RNA أُحادي الجديلة لـ DNA ثنائي الجديلة المسمّى DNA مُكمل أو cDNA. في طرف RNA رسول يوجد بشكل طبيعي تسلسل من نوكليوتيدات من نوع A (يسمى Poly A)، لذا يُمكن استعمال برايمر Oligo dT لاعداد DNA مُكمل. هذا البرايمر يرتبط بالتسلسل Poly A الموجود في طرف الـ RNA رسول.



רסם 4.5: מ-RNA רסול إلى DNA مُكمل ثنائي الجديلة بواسطة إنزيم النسخ العكسي.

RNA رسول يشكّل قالب، ويُمكن استعمال برايمر مكوَّن من نوكليوتيدات، من نوع T ، ترتبط بالطرف Poly A للـ RNA الرسول. القالب والبرامر يمكنان إنتاج DNA مُكمل أُحادي الجديلة بمساعدة إنزيم النسخ العكسي. في المرحلة التالية يُنتج إنزيم النسخ العكسي أو DNA بوليميراز خلوي DNA ثنائي الجديلة بحسب الـ DNA المُكمل أُحادي الجديلة.

الـ DNA المُكمل الناتج من خليط الـ RNA غير المتجانس المستخلص من الخلايا يمكن أن يُستخدم لإعداد مكتبة DNA مُكمل. مكتبة DNA مكمّل هي مجموعة من مقاطع DNA مكمّل غير متجانسة موجودة داخل جزيئات نواقل.

المراحل المختلفة لاعداد مكتبة DNAمكمل (مراحل أ-د) مفصلة في الصفحات السابقة وفي هذه الصفحة، مكتبة DNA مكمل تستعمل لاستنساخ وإيجاد DNA مكمل مكمل مطلوب مصدره جين معين. لاستغلال DNA مكمل مستنسخ إيجابيات مقارنة باستغلال الجين المستنسخ. يمكن استغلال DNA مكمل الناتج عن جين معين لتحديد وظائف الجين.

من المهم تقييم الاختلافات الجوهرية بين مكتبة جينومية ومكتبة DNA مُكمل. تلخيص الاختلافات في الصندوق 4.5.

صندوق 4.5: الاختلافات الجوهرية بين مكتبة جينومية ومكتبة DNA مُكمل

إحدى خواص مكتبة جينومية هي أنّ معظم المقاطع فيها لا تحتوي على جينات بل على DNA آخر. كذلك يمكن إيجاد تمثيل لكل الجينات في مكتبة جينومية، ولا يوجد تفضيل لتمثيل جين واحد على آخر. في المقابل، في مكتبة DNA مكمل يوجد تمثيل مختلف للجينات المختلفة. هذه الحقيقة نابعة أوّلًا لأنّ في خلية معيّنة (خلية من نوع معين: خلية دم، خلية مخ الخ) وفي وضع معيّن تتواجد به الخلية، لا يتم انتاج RNA من كل الجينات (فصل 7). وأكثر من ذلك، في الخلية يوجد كميات مختلفة من RNA من جينات مختلفة: من قسم من الجينات تنتج كميات قليلة من الـ RNA ومن قسم أخر تنتج كميات كبيرة. لذلك في مكتبة DNA مُكمل يكون العديد من النسخ من DNA مُكمل لجينات تمّ التعبير عنها في الخلية ونَتَج منها العديد من الـ RNA (تعبير مرتفع لجينات يتم التعبير عنها بشكل خاص). لذلك يوجد احتمال منخفض أن نجد في مكتبة معيّنة DNA مكمل لجين لا يتم التعبير عنه بمستوى مرتفع. لذلك لكي يتمّ استنساخ DNA مُكمل الناتج عن جين معيّن، يجب الاختيار بدقة فقط الخلايا التي يتمّ بها إنتاج كمّيّة كبيرة من RNA الجين المطلوب.

بعد أن نَتَجت مكتبة، نتوجّه لإيجاد الجين أو الـ DNA المُكمل وننفّذ ذلك بطرق تشمل الكاشف، التشرب والتهجين. ما هي أنواع الكواشف المختلفة؟ ما هي خواصها؟ وكيف يتمّ استعمالها؟ ما هي وظيفة التشرب والتهجين؟

إيجاد الجين \ الـ DNA المطلوب في المكتبة بواسطة كاشف، تشرب وتهجين

في نهاية عملية إنتاج مكتبة جينومية أو مكتبة DNA مُكمل تَنْتُج بضعة عشرات صحون فيها عدة مئات الآلاف من البؤر وفي واحد منها يمكن أن يتواجد الجين المطلوب. بدون وسيلة ملائمة لإيجاد البؤرة الواحدة من بين مئات الآلاف من البؤر والذي يحتوي على الجين المطلوب، تكون مهمة ايجاده بدون أمل، الوسيلة الأساسية لإيجاد مقطع DNA محدّد أو جين محدّد هي "الكاشف".

لايجاد مقطع DNA مطلوب، في احدى البؤر في مكتبة بكتيريوفاجات بواسطة استعمال كاشف ملائم، ننفذ العملية الموصوفة في رسم 4.6:

أ. نقل المكتبة لفلتر والحصول على التشرب: لكي يتمّ تحديد الـ DNA المطلوب الموجود في إحدى البؤر، يتمّ نقل جزء من الـ DNA الموجود في البؤر الى مسطح دقيق يسمى فلتر. لهذا الهدف يوضع الفلتر على البؤر، فيقوم الفلتر بتشرب جزء من محتويات كل بؤرة وبضمنها جزء من الـ DNA الخاص الموجود بداخلها ويتم بنهاية العملية الحصول على تشرب. التشرب هو الفلتر وعليه بقع مادة مصدرها البؤر. البقع تقع على الفلتر بنفس مواقعها الموجودة في الصحن.

ورقة الترشيح هي ورقة دائرية أو مربعة (بحسب الضرورة). في حالات معينة تكون عبارة عن ورقة نيتروسيلولوز، ولكن يوجد موادّ أكثر تطورا تستعمل اليوم. يسمى الفلتر بهذا الاسم لأنّه يسمح للسوائل من المرور من خلاله، ولكنه يربط اليه جزيئات كبيرة.

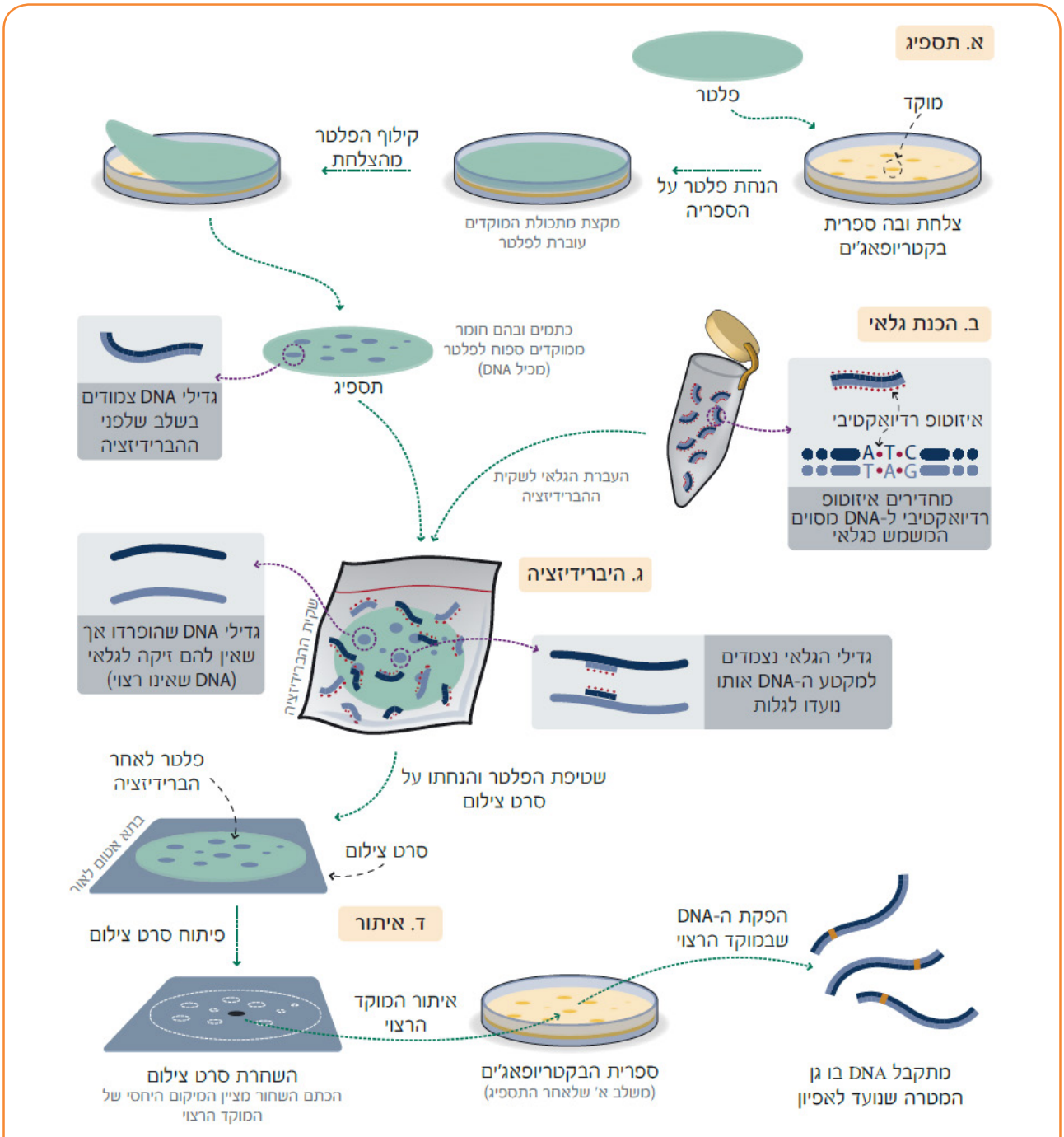
عند ارتباط مواد كالـ DNA، RNA أو بروتينات بفلتر، تسمى العملية تشرب (Blot). المواد التي ارتبطت بالفلتر في الحالة الخاصة التي يتم بها الحصول على مكتبة جينومية هي بكتيريوفاجات تحتوي على الـ DNA الخاص بها.

ب. اعداد الكاشف: بهدف إيجاد الـ DNA المطلوب على التشرب يتمّ استعمال كاشف. كاشف (Probe) هو جزيء لديه المقدرة للالتصاق بجزيء آخر مطلوب الكشف عنه (جزيء الهدف). كاشف يمكن أن يكون جزيء DNA, RNA أو جسم مضاد. التصاق الكاشف بالهدف ناتج عن ارتباط غير كوفلنتي بينهما. التصاق كاشف DNA بـ DNA الهدف ناتج عن احتواء الكاشف على تسلسل مُكمل للهدف. بهدف تشخيص موقع ارتباط الكاشف يتم استعمال كاشف موسوم. الوسم على الكاشف هو عادة نظير مُشع أو مجموعة فلوريسنتية.

ج. لكي يساعد كاشف DNA على إيجاد DNA الهدف المطلوب، يجب الحصول على عملية تهجين. في عملية التهجين يرتبط الكاشف بـ DNA الهدف ويَنْتُج هجين من كاشف-DNA هدف. الهجين ينتج في احدى البقع على التشرب مصدرها احدى بؤر المكتبة. للحصول على التهجين يتم تمرير محلول من خلال الفلتر يخثر جزيئات الـ DNA الموجودة في البقع ومن ثم يتم تمرير

محلول يحتوي على جدائل الكاشف. بعد ذلك تلتصق جدائل الكاشف الموسوم بجدائل الـ DNA الموجودة على الفلتر. يلتصق الكاشف بكميات كبيرة فقط بالبقعة التي مصدرها بؤرة محدّدة من البكتيريوفاجات التي تحتوي على DNA الهدف. معلومات إضافية عن أسس استعمال الكاشف والتهجين (وليس فقط في الحالة الخاصة لمكتبة) موجودة في الصندوق 4.6.

د. تشخيص البؤرة المطلوبة التي تحتوي على الجين (أو الـ RNA) المطلوب: يتم غسل بقايا الكاشف الموسوم الذي لم يلتصق ويتم تعريض الفلتر لفيلم تصوير حساس للأشعة النووية أو الضوء. فيلم التصوير يسود فقط في النقطة التي تتواجد بها البقعة التي التصق بها الكاشف. الموقع النسبي للنقطة السوداء على الفلتر مماثل للموقع النسبي للبؤرة في الصحن (رسم 4.6). بالاعتماد على هذه المعلومات يتمّ تحديد وعزل البؤرة التي تحتوي على الـ DNA المطلوب. يتمّ تشخيص الـ DNA المطلوب بعدّة طرق من النهاية تحديد تسلسل الـ DNA.



רסם 4.6: עמלית ايجاد DNA هدف الموجود في مكان ما في المكتبة بمساعدة كاشف، تشرب وتهجين

صندوق 4.6: تهجين حوامض نووية وتطبيقاتها

يُمكن السماح لجديلة حامض نووي أحادية (RNA أو DNA) من مصدر معيّن الالتصاق بجديلة حامض نووي أحادية من مصدر آخر في عملية تسمّى تهجين (المعنى الحرفي لهجين يعني شيء مكوّن من قسمين، من مصادر مختلفة). لكي يحدُث تهجين يجب أن يكون للجزيئين أحاديي الجديلة اللذين سيلتصقان تسلسل قواعد نيتروجينية مُكملة. نتيجة للالتصاق يَنْتُج حامض نووي هجين ثنائي الجديلة. يُستغل التهجين، من بين الأمور الأخرى، للكشف عن جينات وكذلك لتحديد كمّيّات وأنواع حوامض نووية.

في عملية تهجين حوامض نووية يتمّ خلط مقاطع "كاشف" مع مقاطع "الهدف". كاشف حامض نووي يحتوي على تسلسل خاص مُكمل لتسلسل الـ DNA أو الـ RNA الهدف الذي نريد الكشف عنه. إذا كان الكاشف والهدف ثنائيي الجديلة، يتم فصل الجدائل قبل التهجين بواسطة التسخين أو معالجة بمادّة كيميائيّة ملائمة (تخثير). بعد خلط الكاشف والهدف تتمّ عملية الالتصاق بين جدائل الكاشف وجدائل الهدف (بحسب المبدأ A-T و- G-C). عند بناء مكتبات، يكون الهدف تحديد البقعة التي تحتوي على الـ DNA أو الجين المطلوب من بين البقع الواقعة على التشرب، فيُستَعمل كاشف ملائم يرتبط بالهدف ويكشف عن البقعة المطلوبة.

للكشف عن مقطع DNA مطلوب (هدف) نحتاج إلى استعمال حوامض نووية موسومة بنظير مُشع أو مجموعة فلوريسنتية مضيئة (تُشع ضوء). في الحالات التي يتمّ فيها إيجاد DNA في مكتبة (أو RNA في تشرب شمالي – كما هو موصوف في الفصل 7) متبع وسم الكاشف. في هذه الحالات يتواجد الكاشف في محلول، بينما يكون الـ RNA أو الـ DNA الهدف ملتصق بالسطح (مثلًا، فلتر). لكن، في الحالات التي يتمّ فيها "التهجين العكسي" يكون فيها خليط الـ DNA غير المتجانس موسوم وموجود في المحلول، ويكون الكاشف ملتصق بالفلتر وغير موسوم. للقيام بهذه العملية يتمّ وضع كواشف مختلفة قريبة جدًّا من بعضها على سطح يسمّى رقاقة DNA (الفصل 7). لذلك من المهم تحديد أن الوسم لا يهدف الى تعريف الكاشف والهدف. بدلا من ذلك، خاصية الهدف هو بوجوده داخل محيط من جزيئات مختلفة عن بعضها (أحيانا لا نعرف عنها شيئا)، بينما يستعمل الكاشف الذي نعرف هويته لتحديد موقع الهدف المخبأ.

بهدف القيام بتهجين نموذجي، هنالك حاجة لتنفيذ تخثير للـ DNA ثنائي الجديلة للحصول على DNA أُحادي الجديلة. التخثير يتمّ بواسطة تسخين و\أو معالجة كيميائيّة تؤدي إلى تفكيك الترابط الهيدروجيني الذي يربط الجديلتين المُكملتين. من بين العوامل التي تؤثر على التخثير المطلوب بهدف فصل الجديلتين بشكل كامل:

1. طول الجديلتين: مطلوب طاقة أكبر لفصل جدائل طويلة تحتوي على عدد أكبر من الترابط الهيدروجيني مقارنة بالطاقة اللازمة لفصل جدائل قصيرة.
2. تركيبة القواعد: لأنه يوجد بين القاعدتين C-G رباط هيدروجيني إضافي مقارنة بالقاعدتين A-T ، مطلوب طاقة أعلى لفصل جدائل غنية بـ C-G.

يُمكن التحكم بالتخثير بواسطة البيئة المحيطة الكيميائيّة: أيونات مثل Na+ تثبت ثنائي الجديلة، بينما موادّ كيميائيّة معيّنة مثل Formamide تؤدّي إلى الاخلال بثبات الاربطة الهيدروجينية التي لها دور بتثبيت المبنى ثنائي الجديلة.

ونهاية، ليس فقط DNA يشكّل كاشفًا: كذلك جسم مضاد ضد بروتين معين يمكن أن يشكّل كاشفًا لاستنساخ DNA. لهذا الهدف يستعملون نوع خاص من مكتبة DNA مُكمل بها يمكن لـ DNA الهدف أن يُنْتِج RNA وبروتين. هكذا في كل حالة يَنْتُج أيضًا في المكتبة بروتين خاص مصدره الـ DNA المستنسخ. الجسم المضاد يكشف عن البقعة المطلوبة التي تحتوي على البروتين ذي الصلة. ومن ثم يمكن عزل الـ DNA المطلوب المشفر للبروتين من المستعمرة ومضاعفته. لاستعمال أجسام مضادة ككواشف يوجد إيجابية وذلك لأنّه لا يوجد حاجة لمعلومات مسبقة عن تسلسل الـ DNA المطلوب استنساخه.

التهجين بين حوامض نووية هي عملية يتمّ بها ارتباط حوامض نووية من مصدرين مختلفين، لأنّ التسلسل فيها مُكمل لبعضهما. من بين استعمالات التهجين بين حوامض نووية هي الكشف عن حوامض نووية (DNA أو RNA) مطلوبة وأحيانًا لتحديد كميتها النسبيّة أيضًا (الفصل 7). هوية الكاشف الجزيئية معروفة دائما، وهدفه الكشف عن DNA أو RNA معيّن يسمّى الهدف، مخبأ بداخل خليط من مقاطع حوامض نووية

استراتيجية استنساخ DNA مُكمل مشتق من جينات مختلفة

استراتيجية الاستنساخ هي مجموعة من طرق العمل المطلوبة لزيادة إمكانية نجاح الاستنساخ. يجب اختيار استراتيجية استنساخ بانتباه قبل البدء بالاستنساخ. بحسب الاستراتيجية يتمّ اختيار الخلايا التي يُستخلص منها الـ DNA أو الـ RNA ويتمّ تحديد الإنزيمات التي تُستعمل لإعداد المكتبة ونوع النواقل التي ستستخدم في المكتبة. كذلك يتمّ تحديد نوع الكاشف ونوع التهجين ، وكل ذلك بهدف إيجاد الـ DNA المطلوب. تخطيط استراتيجية الاستنساخ يحتاج إلى طرح الأسئلة التالية:

1. ماذا نريد أن نستنسخ (جين أو مقطع DNA جينومي آخر أو DNA مُكمل)؟
2. أيّ خلايا مفضل أن تُستعمل للحصول على DNA أو RNA لهدف الاستنساخ؟
3. أيّ معلومات و\أو موادّ موجودة في المختبر يمكن أن تساعد في اختيار الكاشف الملائم؟

اليوم وفي اعقاب المعلومات المتوفرة من مشاريع الجينوم المختلفة، فان استعمال مكتبات جينومية انخفض جدا. لذلك تُعرض هنا فقط اعتبارات لاختيار استراتيجيات استنساخ DNA مُكمل. أحد الاعتبارات المركزية هو اختيار خلايا لاستخلاص RNA. لقد سبق أن وضحت أهمية الـ RNA المطلوب في الخلية لنجاح الاستنساخ (صندوق 4.5). لاستنساخ DNA مُكمل المشتق من جين معيّن، يجب اختيار فقط الخلايا التي يعبّر فيها الجين عن كمية كبيرة نسبيًّا من الـ RNA. مثلًا، لاستنساخ DNA مُكمل يشفر لهورمون النمو (Growth Hormone) استُخلص RNA من خلايا الغدة النخامية. في هذه الخلايا فقط يَنْتُج العديد من الـ RNA من جين هورمون النمو. هذا الـ RNA يُستخدم لإعداد DNA مُكمل.

الاعتبار الآخر في اختيار استراتيجية الاستنساخ، ومن ضمنها نوع المكتبة المطلوب، يأخذ بعين الاعتبار نوع الكاشف الملائم لتحديد موقع المستعمرة في المكتبة. هكذا، في العديد من عمليات استنساخ DNA مُكمل، لا يوجد في بداية الطريق مقطع DNA يمكنه أن يُستعمل ككاشف. في هذه الحالات مطلوب بروتين نتج من الـ DNA المطلوب استنساخه. يتم الحصول على البروتين، ذات الصلة نقي وبكميات كافية تُمكّن تحديد تسلسله أو إعداد أجسام مضادة ضده. إذا نجحوا في تحديد تسلسل البروتين، يحددون ماذا يمكن أن يكون تسلسل الـ DNA الملائم الذي يشفر للبروتين. ينفّذون ذلك بالاعتماد على الشيفرا الوراثية. في هذه الحالة يحاولون الحصول على كاشف DNA ولهذا الهدف يبنون بطريقة كيميائيّة (بدون إنزيم) خليط من اوليغو- نوكليوتيدات من ضمنها الاوليغو-نوكليوتيد المطلوب. هذا الاوليغو-نوكليوتيد نَتَج بالاعتماد على تسلسل البروتين الملائم، وله القدرة على الالتصاق للـ DNA المكمل الذي نريد استنساخه.

في المرحلة القادمة نؤشر هذه الاوليغونوكيوتيدات بنظير مشع لكي تُستعمل ككاشف في عملية التهجين لإيجاد المستعمرة المطلوبة في مكتبة ال DNA المكمل العادية.

اذا نجحوا في إيجاد جسم مضاد ملائم للبروتين ذي الصلة يمكن استعمال استراتيجية كشف خاصة أخرى يستعمل الجسم المضاد ككاشف. لاستخدام الجسم المضاد ككاشف يجب استعمال مكتبات يمكن التعبير فيها عن ال DNA المكمل ل RNA وبروتين. لان التشرب هو فلتر لا يحتوي فقط على DNA بل على بروتينات أيضًا، يمكن استعمال الجسم المضاد المؤشر ككاشف عن البروتين المعبر عنه في مستعمرات المكتبة. يمكنون الجسم المضاد الموسوم من الارتباط بالبروتين الملائم الموجود في البقعة الملائمة ومن ثم يتم عزل المستعمرة التي تحتوي على ال DNA المكمل المطلوب.

نهاية، استنساخ جينات و DNA مكمل بواسطة مكتبات أخذ بالانخفاض لسببين أساسيين: احد أحد الأسباب أنّه

بهدف الحصول على أجسام مضادة تُستعمل كأجسام مضادة لبروتين، يجب استعمال البروتين لتطعيم حيوانات تُنْتِج في جسمها أجسام مضادة ضد البروتين، يتم إنتاج الأجسام المضادة بواسطة جهاز المناعة وتكون لها ألفة ارتباط عالية للبروتين المعيّن.

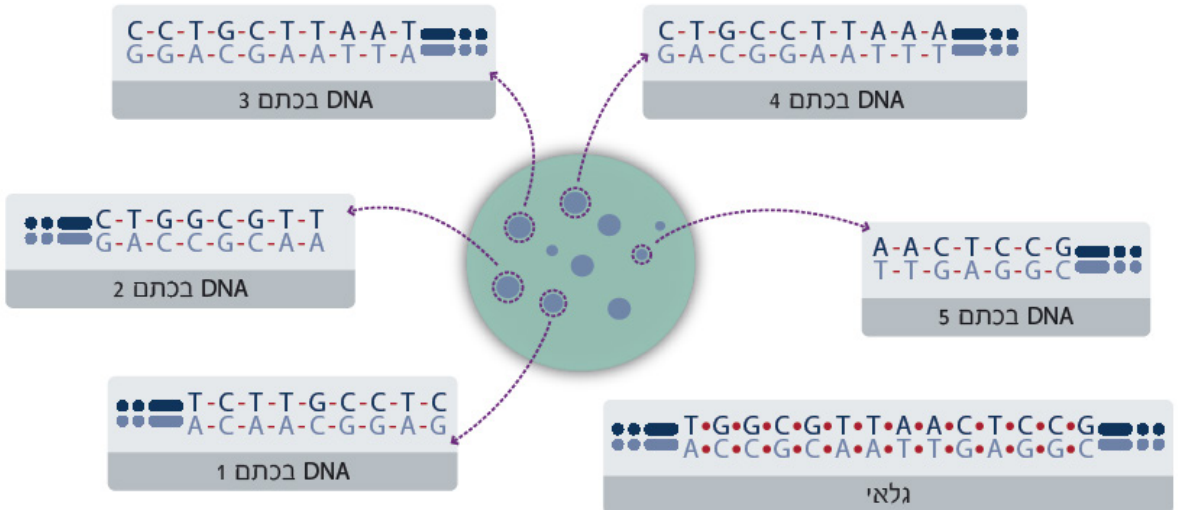
عادة، لا يُمكن استعمال كاشف من نوع جسم مضاد بهدف إيجاد مستعمرة في مكتبة جينومية تمّ إعدادها من كائنات ايوكريوتية. السبب لذلك أن في البكتيريا ينقص إنزيمات مطلوبة لإبعاد الانترونات. لذلك، حتى اذا تم استنساخ DNA جينومي ايوكريوتي في بكتيريا فإنّه سيكون بدون قيمة لأنّ ال RNA الناتج لن يمر معالجة لذلك ترجمته لبروتين فعال سيفشل في معظم الحالات. بدون بروتين ملائم في مستعمرات المكتبة لا يوجد إمكانية لاستعمال الجسم المضاد ككاشف.

عندما نتوجه إلى استنساخ DNA مُكمل يجب أوّلًا تخطيط استراتيجية الاستنساخ . أوّلًا، يجب اختيار خلايا يُستخلص منها RNA . يختارون خلايا فيها الجين الملائم يتمّ التعبير عنه بكمية عالية، أي خلايا تحتوي على العديد من الـ RNA المعيّن الذي نريد استنساخ الـ DNA المكمل الخاص به. هكذا، الـ DNA المُكمل الذي يشفّر لهورمون النمو استُنسخ من خلايا الغدة النخامية التي يتم فيها التعبير عن الجين ويُنْتِج RNA.

في نطاق مشاريع جينوم متعدّدة استُنسخت الجينات المختلفة بطريقة "الفيلم المتحرك". الجينات والمعلومات عن تسلسلها متوفر للجميع. مشاريع الجينوم أتاحت أيضًا إنتاج مجموعات جزيئات DNA مُكمل مشتقة من جينات مختلفة، حيث أصبحت متوفرة لكل من يحتاجها. السبب الآخر لانخفاض عمليات استنساخ بواسطة مكتبات هو أنه أصبح من الممكن الاستنساخ في أنبوب اختبار (بدون بكتيريا) في عملية تسمّى pcr (الفصل 6). وفي المقابل، استنساخ بواسطة مكتبات ما زال مهما في الحالات المطلوب فيها تحديد الجين المسؤول عن ظاهرة معيّنة كما هو الامر في حالة الجين المسرطن Ras. في حالة مشابهة لتلك لا يوجد مناص من مكتبات، حيث انه عند الحديث عن ظواهر معيّنة من الممكن أن لا يكون هنالك رمزا لتسلسل ال DNA المسؤول عن الظاهرة، لهذا السبب ولأن جزء من الطرق التي وُصفت في هذا الفصل ما زالت تُطبق حتى إذا لم يكن لهدف الاستنساخ، يوجد أهمية للمواضيع التي نوقشت في هذا الفصل. مثلًا إعداد DNA مكمل، تشربات من انواع مختلفة وتهجين تُستعمل حتى يومنا هذا لأهداف مختلفة. (الفصل 6 - 8)

سؤال 4.2

1. في الرسم 4.2 يوجد وصف لتشرب يحتوي على بقع وبداخلها DNA . كذلك يمكن أن نجد في الرسم تفصيل لجزء من تسلسل الـ DNA في خمس بقع. بالإضافة إلى ذلك يوجد وصف لجزء من تسلسل الكاشف. بعد التهجين بين الكاشف الموسوم و DNA الهدف في البقع وكشف فيلم التصوير للتشرب، لأي بقع يرتبط الكاشف الذي ارتباطه يؤدي الى اسوداد فيلم التصوير؟ ماذا يمكن أن يكون التفسير الممكن لنتيجة التهجين؟
2. فرح الباحثان بدراسة استنساخ الجين المسرطن بواسطة الكاشف Alu وقرروا أن يسألوا هل يوجد في خلايا سرطانية لم تدرس بعد جين مسرطن مختلف عن Ras. في تجربتهما للاستنساخ، التي شملت مراحل مشابهة لتلك التي استعملت في استنساخ Ras المسرطن، قاما باكتشاف بؤرتين تحتويان على DNA من انسان بواسطة استعمال الكاشف Alu. قبل تشخيص تسلسل الـ DNA في هاتين البؤرتين كان لهما ثلاث فرضيات لماذا وُجدت بؤرتين وليس بؤرة واحدة فقط. ما هي برأيك هذه الفرضيات الثلاث؟



רסם ס-4.2: לאי מן הבקע קי התשרב ירתבט הכאשפ המוסום?

לאחיתיר נוע הכאשפ יוגד אהמיה לאחתמאלת נחאג האיתנשתנ ואיחיגד הלـ DNA המכמל המטלוב. יבה העדיב מן הלאחלת מדּא הסאשא היה ברוטין. תחדיד תלשלס הברוטין יֻמכּן מן אינתאג נוכליוטיד יֻשתעמל ככאשפ מלאימ. בדל מן דלכ, יהכמ תשתעמל הברוטין לאינתאג אכשמ מדאנ וענדהא יֻשתעמל הכשמ המדאנ ככאשפ.

سؤال 4.3

الباحثان جيني وجينيّة نجحا في مهمتهما لعزل أونكوجين جديد. عزلا كل الجين الذي طوله 30000 أزواج من القواعد (30Kb). أرادا أن يتابعا البحث ويدرسا وظائفه في الخلية، ولكن لهذا الهدف كان من المهم لهما أن يحصلا على الـ DNA المُكمل المشتق من هذا الجين. اقترحت جينيتية إعداد مكتبة DNA مُكمل واستعمال كاشف.

1. ما هي مراحل عمل جينيّة؟
2. أي كاشف ملائم ستختار جينيّة؟

عندما سمع جيني بخطة عمل جينيّة ومع الأخذ بعين الاعتبار بأن الجين هو بشري. اقترح عليها اختيار طريق مختلفة. عرف جيني بأنّه تتوفر مجموعة كبيرة من الـ DNA المُكمل المستنسخ مصدره من الإنسان، واقترح محاولة فحص وجود DNA مُكمل في هذه المجموعة الذي مصدره الجين المسرطن الذي استنسخوه. كل ما كان يريد فعله هو شراء الـ DNA المكمل وتوفير اشهر من العمل الشاق في اعداده.

1. أي معلومات يحتاج جيني لتنفيذ خطته؟
2. كيف يمكنه الحصول على هذه المعلومات وكيف سيستعملها لأهدافه؟

سؤال 4.4

خلال التهجين بهدف إيجاد جين، يستعملون فائض من كاشف موسوم، معظم جزيئات الكاشف لن ترتبط بجزيئات الـ DNA الموجودة على الفلتر. هل يمكنكم التخمين لماذا يوجد حاجة لفائض من جزيئات الكاشف؟

إذا اردتم إيجاد جين جديد (جين Y) في المكتبة بحيث يكون من "أقرباء" الجين الذي تمّ استنساخه (جين X)، وإذا علمتم أنّ الجينين X و Y متشابهان بنسبة 70% فقط من تسلسلهما – ماذا يكون الكاشف لإيجاد الجين Y؟ حدّدوا شروط التهجين في هذه الحالة الخاصة مقارنة بالتهجين الذي يكون فيه تماثل بنسبة 100% بين تسلسل الهدف وتسلسل الكاشف. تطرّقوا إلى المتغيّرات الأربع التالية:

1. طول الكاشف.
2. تركيز الأملاح النسبي خلال التهجين.
3. درجة الحرارة النسبية خلال التهجين.
4. الشطف لإبعاد الكاشف الفائض بنهاية التهجين.

سؤال 4.5

اهتم الباحثان جيني وجينيّة بنوع نحل معين وصل الى البلاد من إفريقيا ووجدا أنّه يضر تربية النحل المُنْتِج للعسل. وجدا أنّه يوجد بروتين في النحل العنيف غير موجود في النحل الآخر. من هنا استنتجا أنّه من الممكن أن يكون هذا البروتين مسؤول عن الصفات العنيفة ووضعوا هدف استنساخ الـ DNA المُكمل المشفر لهذا البروتين. لهذا الهدف أرادوا استخلاص بروتين بكميات تمكّنهم من تحديد تسلسل الحوامض الأمينية في البروتين و\أو إنتاج أجسام مضادة ضد البروتين.

1. بالاعتماد على هذه المعلومات، اقترحوا استراتيجية واحدة، على الأقل، لاستنساخ الـ DNA المُكمل المطلوب. فصلوا أسس المراحل والطرق اللازمة لتنفيذ استراتيجية الاستنساخ.
2. اقترحوا استعمال زراعي في أعقاب نجاح استنساخ الـ DNA المشفّر للبروتين المسؤول عن الصفات العنيفة لدى النحلة الأفريقية.

سؤال 4.6

قمتم بتنمية نبتة معيّنة خلال أسبوعين في ظروف جفاف صعبة. وبشكل مفاجئ صمدت النبتة. فرضتم أنّه إذا فهمتم كيفية صمود النبتة، يمكنكم بطرق الهندسة الوراثية أن تحسّنوا صمود صنف بندورة، في الجفاف، له أهمية اقتصادية، باختصار أردتم أن تصبحوا اغنياء. فرضيتكم أنّ الصمود في الجفاف بفضل جينات معيّنة. هذه الجينات تشفّر لبروتينات تعطي صمود للخلية ، ولكن أي جين أو جينات مسؤولة عن الصمود في الجفاف (ما هي الجينات الملائمة)؟

أ. صفوا كيف يجب استنساخ وإيجاد الجين أو الجينات التي لها علاقة بتزويد الصمود للجفاف (التي مصدرها النبتة البرية) وذلك عند الاستعانة بالمكتبة. لهذا الهدف استعملوا، فقط، جمل قصيرة مطلوبة من بين الجمل المعروضة أمامكم ورتّبوها بالشكل الصحيح.

1. نجد ونعزل البروتينات التي تختلف بكمياتها من النبات الذي نمى في الجفاف مقارنة بكمياتها في النبات الضابط (هذه البروتينات هي البروتينات ذات الصلة)
2. نستخلص بروتينات من النبات الضابط.
3. نستخلص بروتينات من النبات الذي نمى في جفاف.
4. نُنْتِج أجسام مضادة ضد البروتينات المناسبة.
5. نستخلص RNA من نبات يصمد في الجفاف ونُنْتِج منها DNA مُكمل.
6. نستخلص من مستعمرات المكتبة الـ DNA المُكمل للجينات المناسبة.
7. نستعمل الـ DNA المُكمل والنواقل لإعداد مكتبة تمكّن التعبير عن البروتينات.
8. ننفّذ تهجين مع جسم مضاد يُستعمل ككاشف بهدف إيجاد المستعمرة التي يتمّ فيها التعبير عن البروتين المناسب وفيها يتواجد الـ DNA الملائم أيضًا. نكرّر هذه العملية مع أجسام مضادة ملائمة أخرى.
9. نحدّد تسلسلات الـ DNA المُكمل التي تشفّر للبروتينات الملائمة.
10. نحدّد تسلسلات البروتينات الملائمة.
11. نشخص بواسطة تسلسل البروتين، وباستعمال الكمبيوتر، وقاعدة البيانات الجين المشفّر للبروتين الملائم. لهذا الهدف نستغل مقدرة البرمجات المحوسبة على تحويل تسلسل DNA لتسلسل بروتين. نكرّر هذه العملية لكل تسلسل بروتين يمكن أن يكون مسؤول عن الصمود للجفاف.
12. نطلب الجينات الملائمة من شركة تخزن مجموعات جينات.

ب. في حالة أخرى فرضوا أنّه للحصول على الجينات التي تكسب صمود للجفاف لا يوجد حاجة لاستعمال مكتبة. في هذه الحالة نستعين بمجموعة الجينات النباتية التي تم اكتشافها من خلال مشروع الجينوم. رتّبوا فقط الجمل الضرورية ترتيبًا صحيحًا بحيث تصف عملية مختصرة للحصول على الجينات التي تكسب صمود للجفاف.

ج. بعد الحصول على الجينات التي تُكسب الصمود للجفاف، ماذا برأيكم من المفضل أن تحاولوا القيام به لإكساب نبتة بندورة حساسة للجفاف صمود نسبي في ظروف الجفاف؟

عند وجود بروتين يريدون استنساخ الجين الخاص به، بدون معرفة تسلسل الجين، يمكن استعمال الجسم المضاد ككاشف. لهذا الهدف يجب استعمال مكتبة يمكن بها التعبير عن البروتينات. يُمَكّنون الجسم المضاد من الارتباط بالبروتين في البقعة التي مصدرها المستعمرة التي تعبّر عن البروتين المطلوب. بعد ذلك يعزلون من هذه المستعمرة الـ DNA المطلوب.

تفاعل تسلسل البوليميراز
(تفاعل الـ PCR)

هذا الاكتشاف الاستثنائي بأصالته هو طريقة ثوريّة أدت إلى تسارع تقدُّم مجال البيولوجيا الجزيئيّة، وهو عبارة عن تطبيق يشقّ الطريق أمام العِلم، الطب، وحتى أنه يُمكّن من تحقيق القانون والعدالة بشكل أنجع وأفضل. هذه هي فقط بعض من تعليقات وأراء العلماء والمحللين بهذه الطريقة التكنولوجية الرائدة، التي يعود الفضل إلى اكتشافها لشخص واحد فقط، للعالِم الامريكي كاري مولس (Kary Mullis). عمل كاري مولس في شركة بيوتكنولوجية تقوم بإنتاج الأوليجو-نوكليوتيدات التي تُستعمل لأهداف عديدة، مثلًا كبرايمرات (فصل 1،5). أراد كاري مولس في إطار عمله استغلال الأوليجو-نوكليوتيدات لتشخيص الطفرات في الـ DNA، عن طريق الاعتماد على الأُسس والوسائل التي طوّرها سانجر لتحديد تسلسل النوكليوتيدات. دون علاقة بذلك، وتقريبًا دون أن يُدرك أهميّة الامر، وجد كاري نفسه يطوّر طريقة مُبتكرة أدت إلى تغيير جذري، أُطلق عليها اسم **"PCR"** (Polymerase Chain Reaction). تُمكّن هذه الطريقة من مضاعفة دورية للـ DNA في أنبوب الاختبار، للحصول على كميّات كبيرة من مقاطع مُحدّدة من الـ DNA. عمليًّا، تُستعمل الطريقة **لاستنساخ** مقاطع DNA، نرغب باستنساخها دون الحاجة إلى المكتبات أو إلى البكتيريا، حيث يتمّ ذلك خلال ساعات معدودة فقط، بدل من أن يستغرق أشهرًا طويلةً. بسبب الوقت القصير الذي تحتاجه هذه الطريقة وبفضل حساسيتها الكبيرة، لا يزال استعمالها واسع النطاق في هذه الفترة أيضًا، حتى بَعد مرور 30 سنة على تطويرها.

لقد غيّر تفاعل الـ PCR مجالات مُهمّة في حياتنا تغييرًا جذريًا. التشخيص الوراثي والطبي الذي نحتاجه أحيانًا، التشخيص الجنائي الذي يدعم القانون يعتمد على الاستخدام الذكي لتفاعل الـPCR . الاستعمال المُستمر لتفاعل الـ PCR في مجال العلم يؤدّي إلى تقدم مجالات بحث متنوّعة، قسم من هذه المجالات يهدف إلى زيادة تشكيلة المنتوجات الريكومبنتيّة في مجال الزراعة والطب.

ما هي طريقة الـ PCR، ما هي مبادئ عملها؟ في أي المجالات وُجدت تطبيقات لها؟ ما هي الصفات التي تمتّع بها كاري مولس كإنسان وكعالِم من أجل تطوير هذا الاختراع؟

خرج جينتشك لنزهة، خلال نزهته صادف راعيًا يبكي بسبب موت أغنامه لسبب غير مفهوم، خاف الراعي أن تموت جميع أغنامه.

اسمع، قال له جينتشك ، أنا عالِم أحياء وبإمكاني أن أُساعدك في اكتشاف سبب موت أغنامك، وربما في علاجها أيضًا. عرف الراعي أنه لن يخسر شيئًا جراء قبوله عرض المساعدة فوافق عليه وقال: أنا موافق.

قام جينتشك بأخذ عينات دم من الأغنام، نقل هذه العينات إلى مركز الأبحاث جينيطونون، وهناك قام أحد الباحثين بمساعدته بإجراء تفاعل PCR، هَدِف هذا التفاعل إلى التشخيص الدقيق لمُسبب المرض. كان النجاح أكبر مما توقع جينتشك، فقد نجح في العودة إلى الراعي وهو يحمل الدواء المناسب لقطيعه.

كان الراعي سعيدًا بنجاة قطيعه وأحس أنه مدين لجينتشك بالكثير، لذلك عرض عليه أن يكافئه بمنحه عدة أغنام من قطيعه.

ضحك جينتشك وقرر الاكتفاء بالحصول على خروف واحد.

إختر الخروف الذي تُريده، حتى أنّه بإمكانك اختيار أكبر خروف، قال الراعي.

جيد، قال جينتشك سأختار هذا....

حقًا، قال الراعي أنت لست أي عالم أحياء، أنت عالم أحياء يبحث في البيولوجيا الجُزيئية....

كيف عرفت؟ قال جينتشك مُستغربًا جدا...

ما معنى "كيف عرفت"؟ قال الراعي عدد أغنام قطيعي 252، وقد قمت أنت باختيار الكلب...

الطريق إلى نقطة تحوّل تكنولوجيّة: نظرة خاطفة إلى عقل المُخترع

في سنة 1983 عمل كاري مولس كمسؤول عن إنتاج أوليجو- نوكليوتيدات في شركة بيوتكنولوجية، لم يُكلفه عمله جُهدًا كبيرًا، وكان لديه الكثير من الوقت الحرّ خلال العمل، قرر أن يستغل هذا الوقت لمحاولة اكتشاف تطبيقات جديدة للأوليجو نوكليوتيدات.

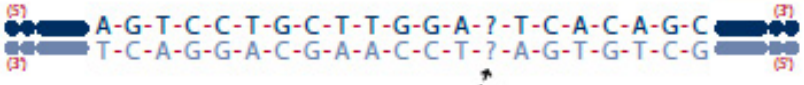
كان لدى كاري معلومات كثيرة في مجال البيولوجيا الجُزيئيّة. وكان على عِلْم بوجود حاجة لفحص وجود طفرات في الـ DNA، وخصوصًا في الجينات التي يُمكن أن تكون لها علاقة بالأمراض. التشخيص السريع للطفرات التي تتواجد في هذه الجينات، يمكن أن يُضاعف احتمال انقاذ حياة المرضى. أراد مولس أن يطوّر طريقة للقيام بتشخيص ناجع للطفرات النقطية التي يكون التغيير فيها في نوكليوتيد واحد فقط. لهذا، وكما هو موصوف في الرسم 6.1 أ'، أراد مولس أن يُحدّد هوية نوكليوتيد واحد فقط، في مكان مُعيّن، في جين مُعيّن، ولدى شخص مُحدّد. خطط أن يُحدّد هوية هذا النوكليوتيد بواسطة استغلال مبادئ تحديد التسلسل بحسب طريقة سانجر (الفصل 5).

كما قال كاري عن نفسه، راودتني الأفكار عندما كنت أُسافر لقضاء عطلة نهاية الأسبوع في كاليفورنيا. خلال السفر حدّد كاري أنّ طريقة تشخيص نوكليوتيد واحد يجب أن تكون سريعة ولا تحتاج إلى استنساخ. لذلك خطط استعمال الـ DNA الجينومي كاملًا (وليس مقطع مُستنسخ فقط)، وكذلك استعمال برايمر يرتبط بالـ DNA بالقرب من النوكليوتيد الذي يرغب بتحديد هويته. كما وُصف في الرسم 6.1 أ'، خطط كاري إلى استعمال الـ DNA كقالب، بالإضافة إلى DNA بوليميراز وبرايمر. كان الهدف أن يتمّ الإنتاج بشكل مُقيّد، في تجربة تشمل 4 أنابيب اختبار، وفي كل أنبوب يتواجد فقط أحد النوكليوتيدات المُنهية الاربعة من النوع نوكليوتيدات منقوصة الأكسجين (دي أوكسي) (ddNTP) (فصل 5)، والموسومة راديواكتيفيًّا. كما هو موصوف في الرسم 6.1 ب'، بإمكان البرايمر أن يستطيل، فقط في الأنبوب الذي يحتوي فيه النوكليوتيد المُنهي الموجود في هذا الأنبوب، أن يُكمّل النوكليوتيد الذي نرغب بتحديد هويته. عندما يُضاف نوكليوتيد راديواكتيفي منقوص الأكسجين للبرايمر بواسطة الإنزيم DNA بوليميراز، لا يُمكن أن تتمّ استطالة إضافية لجديلة الـ DNA، ويَنْتُج أوليجو- نوكليوتيد راديوأكتيفي قصير. عن طريق تحديد الأنبوب الذي حصلنا فيه على أوليجو- نوكليوتيد راديواكتيفي، يمكننا أن نعرف أي نوكليوتيد أُضيف إلى البرايمر وعندها يُمكن تحديد هوية النوكليوتيد المطلوب. عملية تحديد الأنبوب الذي يحتوي على أوليجو- نوكليوتيد راديواكتيفي موصوفة في القسم ج للرسم 6.1، وهي تحتاج إلى فصل نواتج عملية الإنتاج المُقيَّدة بواسطة الجل.

لقد حددّ كاري أنَّ الطرف ٣' للبرايمر يجب أنْ يكون قريبًا من النوكليوتيد الذي نرغب بتحديد هويته.

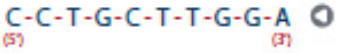
أ. المُركَّبات التي نحتاجها لتحديد هوية نوكليوتيد في موضع معيّن، عن طريق تجربة تشمل 4 أنابيب اختبار

أ1. في كل واحد من أنابيب الاختبار يوجد



النوكليوتيد الذي نرغب بتحديد هويته (لدى مريض مثلاً)

DNA بوليميراز



برايمر بإمكانه الارتباط بالقرب من النوكليوتيد المطلوب

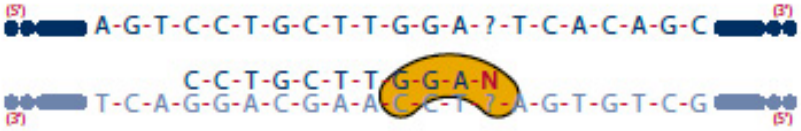
أ2. في أنبوب اختبار مُعيّن فقط

"نوكليوتيد مُنهي" موسوم (من نوع دي أوكسي)

أنبوب 1:	أنبوب 2:	أنبوب 3:	أنبوب 4:
مُرَكَّبات أ١ + ddT	مُرَكَّبات أ١ + ddA	مُرَكَّبات أ١ + ddG	مُرَكَّبات أ١ + ddC

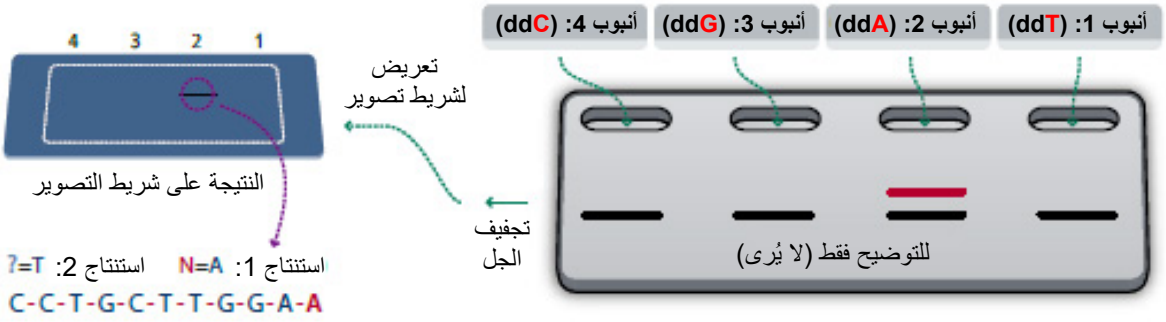
ب. الإنتاج المُقيّد واستطالة البرايمر التي تحدُث فقط في أنبوب اختبار واحد

نقوم بفصل جدائل الـ DNA بواسطة التسخين (1)، ارتباط البرايمر (2)، استطالة البرايمر بنوكليوتيد واحد (3).
النتيجة المتوّقعة



ما هي هوية النوكليوتيد الذي أضيف للبرايمر (ما هو N)؟

ج. تحديد هوية النوكليوتيد المطلوب في الـ DNA بحسب تشخيص الأنبوب الذي نَتَج فيه أوليجو-نوكليوتيد راديواكتيفي؛ لهذا الهدف يتمّ إجراء الكتروفوريزا بالجل.



الرسم 6.1: التجربة النظرية التي فكر فيها كاري مولس، والتي هدفت إلى تشخيص سريع للطفرات دون الحاجة لعمليّة الاستنساخ.

كما سرد كاري، خلال سفره ليلاً وبسبب شكوكه، بدأ يفحص الإمكانيات التي تزيد من دقة الطريقة المُقترحة. وقد فكر أنّه من أجل ذلك عليه تنفيذ فحص لتشخيص نوكليوتيد إضافي: النوكليوتيد المُكمّل للنوكليوتيد الذي قام بتشخيصه. يتمّ ذلك بواسطة برايمر إضافي ذا قُدرة على الارتباط بالجديلة المُكمّلة بالقرب من النوكليوتيد الإضافي المذكور. خلال مواصلته السفر فكر لدينا مقطع DNA، برايمران، 4 نكليوتيدات وَ DNA بوليميراز – بينما كانت صديقته نائمة بجانبه – كان على حافة ابتكار يؤدّي إلى تغيير جذري في مجاله! ولكن لا تزال الطريق طويلة أمامه حتى يصل لابتكاره، الذي لم يتوقع يومًا بأنّه سيصل إليه. في هذه المرحلة بدأ كاري بالتفكير في المشاكل التي يُمكن أن تواجهه خلال استعماله للتطبيق، وقد أقلقه أنّ الـ DNA الجينومي الذي بحوزته يُمكن أن يكون غير نقي بشكل كافٍ، ويُمكن أن يحتوي على شوائب من النوكليوتيدات من النوع (dNTP). في هذه الحالة من المتوقع أن لا تنجح طريقته في تحديد هوية نوكليوتيد في مكان مُعيّن في التسلسل. البرايمرات ستستطيل وستنتج جدائل DNA مُكمّلة، طويلة، وعديمة القيمة في تحقيق الهدف الذي يرغب به عن طريق استعماله للطريقة.

لم يستسلم كاري لليأس، استنتاجاته أثارت فُضوله وحاول أن يوجه تفكيره باتجاه آخر، حاول أن يُخمّن ماذا يحدُث اذا استبدلت النوكليوتيدات، التي يُزود بها الأنابيب، من نوكليوتيدات من النوع ddNTP إلى نوكليوتيدات من النوع dNTP؟ حاول أن يتوقع ماذا يحدُث اذا كانت مواقع ارتباط البرايمرات بعيدة عن بعضها عدّة مئات من القواعد؟ وماذا يُمكن أن يحدُث إذا أتحنا حدوث عملية ثلاثيّة المراحل: فصل جدائل الـ DNA، ارتباط البرايمرات واستطالتها بواسطة الـ DNA بوليميراز؟ خمّن مولس أنّه في هذه الحالة ستحدُث مضاعفة كاملة لمقطع DNA قصير، حدود المقطع الذي سيمُرّ بالمضاعفة هو أطراف البرايمرات.

في مثل هذا الوضع، يقوم الكثير من العلماء بالتوقف عن التفكير بما يفكرون به، بسبب ابتعادهم عن الهدف الاصلي، لكن كاري تابع التفكير وسأل نفسه سؤالاً إضافيًّا حاسمًا نبع من معرفته في مجال برامج الحاسوب والحلقات المستعملة فيها: ماذا يحدُث إذا قمنا بتكرير عملية المضاعفة مرّة أخرى؟ من جُزيء DNA واحد وبَعد عمليّة مُضاعفة واحدة مؤلفة من ثلاثة مراحل تَنْتُج (نظريًا، في هذه المرحلة "حاول" كاري حساب عدد النسخ الناتجة ذهنيًا) نسختين كاملتين من الـDNA ثنائي الجديلة. وبعد عمليتي مُضاعفة ثلاثيتي المراحل (دورتين من المُضاعفة) تَنْتُج أربع نُسخ كهذه (تأكدوا بأنفسكم، ارسموا ذلك على ورقة).

المقطع الموجود بين البرايمران يمرّ مُضاعفة كاملة (من جديلتين تَنْتُج أربع جدائل). بالمُقابل من المقاطع الموجودة على جانبَي نقطة ارتباط البرايمرات تَنْتُج فقط جديلة واحدة إضافيّة، ناتجة عن استطالة برايمر، معنى ذلك أنَّ المُضاعفة جُزئيّة فقط (افحصوا ذلك بأنفسكم على ورقة).

لقد فوجئ كاري جدًا من اكتشافه، أوقف سيارته على جانب الطريق، وباستعمال الورقة والقلم، بدأ يحسب زيادة عدد نُسخ الـ DNA المرغوب (الموجود بين البرايمرين) كدالة لعدد دورات المُضاعفة. فوجئ كاري عندما اكتشف أنّه بَعد 20 دورة من المضاعفة، سيَنْتُج في الأُنبوب، ما يُقارب مليون نسخة من الـ DNA المرغوب. هذه هي المبادئ، المفاهيم والتقنيات الأساسية للعمليّة، والتي أطلق عليها كاري فيما بعد اسم **Polymerase Chain Reaction (PCR) بالعبرية תגובת השרשרת של הפולימיראז وبالعربية تفاعل تسلسل البوليميراز.** (كلمة سلسلة تتطرق إلى سلسلة دورات المُضاعفة). تتميّز طريقة كاري المُبتكرة بإمكانية مُضاعفة مقطع DNA وإنتاج كميات كبيرة من هذا المقطع المحدّد داخل أنبوب الاختبار، وهذا يُعتبر استنساخ دون الحاجة إلى استعمال المكتبات أو البكتيريا. حتى هذه المرحة لم يُدرك كاري الأهمية والقدرة الكامنة في تفاعل الـ PCR. لم يتوقع أبداً أن يُحدث تغييرًا جذريًا في طُرق العمل في مجال البيولوجيا الجُزيئية، ولم يتوقع أنْ يؤدّي هذا التغيير إلى تقصير الزمن اللازم للاستنساخ. لم يتوقع أيضًا ظهور مجموعة التطبيقات الإضافية لهذه الطريقة التي برزت فيما بعد، ومن بينها التشخيص الطبي والوراثي السهل والناجع.

عاد كاري إلى مكان عمله، وكما يحدُث عادةً عند وجود فكرة جديدة، شكك زملاءه في العمل باكتشافه، ومرّت شهور طويلة حتى استطاع أن يُثبت من خلال تجربة في المختبر أنّ الـ PCR قابل للتنفيذ. عندما قام بإثبات اكتشافه بواسطة تجربة حظي على بركة المسؤولين عنه، بعدها سجّل براءة اختراع باكتشافه، وتمّ عرض اكتشافه أمام كبار العلماء. في المرحلة التالية تمّ تشكيل فريق من الباحثين، من الشركة التي يعمل فيها، وقد عمل هذا الفريق جاهدًا على تطوير الطريقة، وعلى إيجاد ظروف مثالية لتطبيقها. في نهاية الأمر تمّ الإثبات أنّ الـ PCR ليس قابلًا للتنفيذ فحسب، بل هو عملي جدًّا أيضًا، وقد تساءل الكثير من العلماء "كيف لم أفكر بهذا الأمر بنفسي؟" في سنة 1993 أي بَعد مُدّة زمنية قصيرة نسبيًا بعد اكتشاف مولس، استدعي إلى ستوكهولم ليقوم باستلام جائزة نوبل للكيمياء من قبل ملك السويد. في أيامنا هذه، وبسبب التطبيقات العديدة لهذه الطريقة لا يمكننا أن نتخيل العمل في مختبر البيولوجيا الجُزيئية أو في مُستشفى أو حتى في مُختبر للفحص الجنائي دون استعمال الـ PCR.

مبدأ عمل الـ PCR

تُستعمل عملية الـ PCR لإنتاج أعداد كبيرة من نُسخ مقطع DNA نرغب في مضاعفته داخل أنبوب الاختبار. يتمّ إنتاج عدد كبير من نُسخ الـDNA للمقطع المرغوب بواسطة **مضاعفة متكررة** لمقطع الـ DNA وفي بعض الأحيان يُعرف ذلك باسم **مُفاقمة** مقطع الـ DNA. خلال عملية PCR نموذجية، توجد مُضاعفة كبيرة للمقطع المرغوب، يَنْتُج خلالها في الأنبوب ما يُقارب مليار جُزيء DNA جديد، خلال ساعات معدودة فقط. ما هي المُركّبات والظروف الضرورية لمُضاعفة الـ DNA في الأنبوب؟ بماذا تختلف مُضاعفة الـ DNA في أنبوب الاختبار عن مُضاعفته في الخلية؟ الإجابات عن هذه الاسئلة موجودة في الجدول 6.1.

المُرَكَّبات والمُميّزات	مُضاعفة الـDNA في الخلية	مضاعفة الـ DNA في أنبوب الاختبار
الجُزيء المُستخدم للمُضاعفة	DNA ثُنائي الجديلة	DNA ثُنائي الجديلة
المركّب اللازم لبداية المُضاعفة	برايمرات، وهي عبارة عن أوليجو-نوكليوتيدات (طبيعية موجودة في الخلية)	برايمرات، وهي عبارة عن أوليجو - نوكليوتيدات (اصطناعية)
مُركّبات ضرورية إضافيّة	DNA بوليميراز، نوكليوتيدات من النوع dNTP وأيونات مغنيسيوم	DNA بوليميراز، نوكليوتيدات من النوع dNTP وأيونات مغنيسيوم
فصل الجدائل لأجل المُضاعفة	يتمّ بواسطة إنزيمات وبروتينات أخرى	يتمّ بواسطة تغيير درجة الحرارة (C°95)
المُضاعفة	تتمّ مُضاعفة كل الـ DNA الموجود في الخلية مرة واحدة فقط	تتمّ مُضاعفة مقطع DNA مُحدّد فقط، صغير نسبيًا وبعدد كبير من المرات
تصحيح الاخطاء خلال المُضاعفة	تصحيح الاخطاء ناجع جدًا	فقط لقسم من انزيمات الـ DNA بوليميراز المُستعملة، توجد قدرة محدودة على تصحيح الاخطاء.

قائمة 6.1: التشابه والاختلاف بين مُضاعفة الـDNA في الخلية ومُضاعفة الـDNA في أنبوب الاختبار بواسطة الـPCR .

من خلال التمعن في الجدول 6.1، وفي الرسم 6.2 أ، نلاحظ أنّه لأجل **مُضاعفة الـDNA في أنبوب الاختبار، نحتاج** الى المُركّبات التالية:

1. **DNA هدف**: في بعض الأحيان يُعرف هذا الـDNA أيضًا باسم "الـ DNA المصدر". وهو عبارة عن DNA من مصدر مُعيّن، وهو يشمل المقطع الذي نهدف لمضاعفته والذي يدعى أيضًا "المقطع المرغوب".
2. **زوج من البرايمرات:** لكل برايمر تسلسل مُعيّن من الـ DNA، يرتبط كل تسلسل بجديلة واحدة من جدائل الـDNA في موقع خاص مكمّل لتسلسله. تُحدّد البرايمرات مقطع الـ DNA الذي تتمّ مُضاعفته، خلال التفاعل نحتاج إلى كمية كبيرة من زوج البرايمرات.
3. **نوكليوتيدات**: من نوع dNTP، وهي وحدات بناء الـ DNA الذي سيتكون خلال عملية المُضاعفة.
4. **الانزيم DNA بوليميراز**: الذي يقوم بإطالة البرايمرات بواسطة إضافة النوكليوتيدات.

أ. مكونات الـ PCR

- مقطع DNA يحتوي على المقطع الذي نهدف لمُضاعفته

- برايمر1 A-C-G-G-T-T-C (3'→5')
- برايمر2 T-T-A-G-T-C-G (5'→3')

البرايمرات هنا هي للتوضيح فقط؛ في الواقع طول كل برايمر 20 نوكليوتيد تقريبًا

- نوكليوتيدات: dGTP(G)، dCTP(C)، dTTP(T)، dATP(A)
- الإنزيم DNA بوليمراز I:

ب. المراحل الثلاثة لدورة المُضاعفة

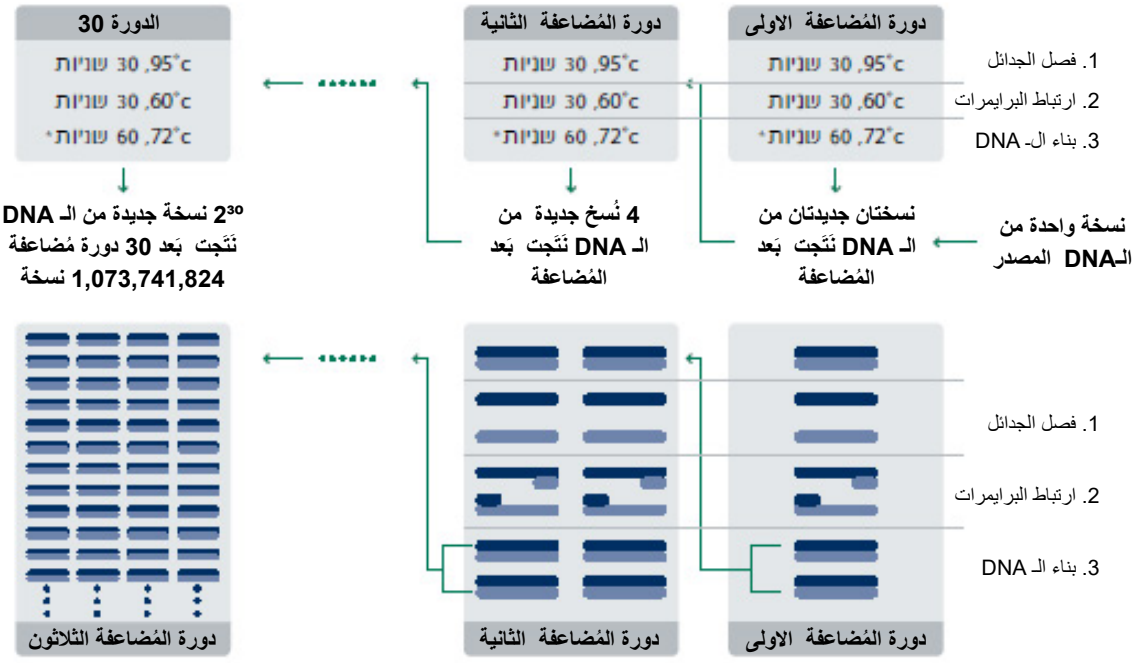
1.فصل الجدائل (بـ95°C)

2.ارتباط البرايمرات (بـ 50°C-°C60)

3. استطالة البرايمرات وإنتاج الـDNA (بـ72°C)

الرسم 6.2: تفاعل تسلسل البوليميراز (PCR).
أ- ب: مكونات ومراحل دورة مُضاعفة واحدة. بقية الرسم في الصفحة التالية.

ج. مضاعفة مقطع الـ DNA بواسطة سلسلة من دورات المُضاعفة



- زمن إنتاج الـDNA مرتبط بطول المقطع الهدف

د. جهاز الـ PCR

رسم 6.2 تتمة: سلسلة تفاعل البوليميراز (PCR).

ج. مُضاعفة الـDNA بواسطة دورات من سلسلة المُضاعفة. وصف سيرورة مُضاعفة مقطع DNA مكوّنة من 30 دورة مُضاعفة.

د. جهاز الـ PCR الذي يُمكنه الانتقال من درجة حرارة إلى أخرى بشكل سريع وأُوتوماتيكي بحسب ما هو مطلوب في التجربة.

من أجل مُضاعفة الـ DNA في أنبوب الاختبار نحتاج أيضًا الى المكوّنات والأدوات التالية:

1. بوفر يحتوي على أيونات مغنيسيوم ضرورية لنشاط البوليميراز.
2. جهاز PCR، تُثبت فيه الأنابيب التي تحتوي على مركَّبات تفاعل الـ PCR (رسم 6.2 د'). الجهاز يُتيح الانتقال السريع، الأوتوماتيكي والموقوت بين درجات الحرارة المُختلفة.

مَضاعفة الـ DNA بواسطة تفاعل الـ PCR تتم على شكل دورات. كل دورة مكوّنة من 3 مراحل (انظروا الرسم 6.2 ب' و ج):

1. **فصل الجدائل** (Denaturation): تتمّ عملية الفصل في درجة حرارة 95ºC. فصل الجدائل يُمكّن جُزيء الـ DNA ثُنائي الجديلة من الانفصال الى جُزيئي DNA أحاديي الجديلة.
2. **ارتباط البرايمرات** (Annealing): برايمران لديهما تسلسل مُحدّد (حصيلة تخطيط مُسبق)، طول كل واحد منهما ما يُقارب 20 نوكليوتيد، ترتبط البرايمرات بـ DNA أحادي الجديلة تسلسله مُكمّل لتسلسلها. تُصمم البرايمرات للارتباط على بُعد مُحدّد الواحد من الآخر. تسلسل البرايمر يُحدّد مكان الارتباط بالـ DNA والبُعد بين مكان ارتباط البرايمرين يُحدّد طول مقطع الـ DNA الذي يُضاعف. هذا الارتباط مُمكن في درجة حرارة بين 50ºC إلى 60ºC.
3. **بناء الـ DNA** (DNA synthesis): تُعرف هذه المرحلة في بعض الأحيان باسم مرحلة الاستطالة (Elongation) أيضًا ، ففي هذه المرحلة يتعرف الـ DNA بوليميراز على الطرف 3' للبرايمر المرتبط بالـ DNA ويقوم بإطالته، بواسطة إضافة نوكليوتيدات، بحسب المعلومات الموجودة في كل واحدة من جدائل الـ DNA الهدف. بناء الـ DNA يتمّ في درجة حرارة بين 68ºC إلى 72ºC، وفي نهاية هذه المرحلة تَنْتُج نُسخ إضافية من الـ DNA الذي نقوم بمُضاعفته.

نلاحظ من خلال وصف المراحل أنّ هناك حاجة لتغيير درجة الحرارة بين المرحلة والأخرى، لذلك يتمّ ادخال أنبوب الاختبار الذي يحتوي على مكوّنات الـ PCR إلى جهاز الـ PCR، صورة الجهاز معروضة في الرسم 6.2 د'. هذا الجهاز مزوّد بأجهزة تسخين تبريد يتمّ التحكم بها بواسطة نظام قابل للبرمجة. يُمكّن الجهاز من الانتقال السريع بين درجات الحرارة المطلوبة بحسب خطة التجربة التي حُددت مسبقًا. بسبب الحاجة إلى درجات حرارة عالية خلال عملية المُضاعفة في أنبوب الاختبار، يتمّ استعمال إنزيم DNA بوليميراز مُقاوم للحرارة. من أجل الحصول على كميات كبيرة من الـ DNA المرغوب بواسطة مُضاعفة الـ DNA في الأنبوب، يتمّ تكرار العملية ثلاثيّة المراحل (دورة المُضاعفة) مرّات عديدة.

الإنزيم DNA بولميراز المُقاوم للحرارة يُستخلص من بكتيريا تنمو في ينابيع المياه الحارة التي تصل درجة حرارتها 75ºC. الإنزيم الأوّل المُقاوم للحرارة الذي تمّ استعماله بهدف مُضاعفة الـ DNA في الأنبوب كان DNA بوليميراز، استُخلص من Thermus aquaticus وعُرف باسم Taq Polymerase.
درجة الحرارة المثاليّة لنشاط هذا الإنزيم هي 72ºC، والإنزيم يُمكنه أن يُحافظ على مستوى نشاط كبير أيضًا بعد البقاء فترة قصيرة وليست متواصلة في درجة حرارة 95ºC. بَعد مرور سنوات أُدخلت أنواع أخرى من DNA بوليميراز المُقاوم للحرارة (Pow , Supertherm وغيرها)، قسم من هذه الإنزيمات ذات صفات مُشابهة لصفات الإنزيم Taq وقسم منهم ذا صفات مُحسّنة كالقدرة الافضل على تصحيح الاخطاء خلال المُضاعفة. وجود إنزيم DNA بوليميراز مُقاوم للحرارة كان أحد العوامل الأساسيّة التي مُكّنت من التشغيل الآلي لعمليّة الـ PCR.

مثلًا، إذا كان جُزيء الـ DNA الأصلي يحتوي على نسخة واحدة فقط من الـ DNA الذي نرغب بمضاعفته، من السهل أن نحسب عدد نسخ الـ DNA الناتج بعد كل دورة مضاعفة (الرسم 6.2 ج'). هكذا، بَعد الدورة الأولى تَنْتُج نُسختان من الـ DNA، بعد دورتين تَنْتُج 4 نُسخ وبَعد ثلاثة دورات تَنْتُج 8 نُسخ. إذا واصلنا حساباتنا بنفس الطريقة نجد أنّه بَعد 30 دورة مُضاعفة بظروف مثاليّة يُمكن أن نحصل على أكثر من مليار نسخة. عدد النُسخ الناتجة بظروف مثالية بَعد n دورات هو "2. يتمّ تحديد عدد دورات المُضاعفة (n) بحسب الكمية النهائية المطلوبة من المقطع الذي نقوم بمُضاعفته. عمليًا، عدد نُسخ مقطع الـ DNA المرغوب الناتجة في نهاية عملية المُضاعفة تتعلق بكمية الـ DNA المصدر التي وُجدت في الأنبوب في بداية العملية، وكذلك بعدد دورات المُضاعفة.

بسبب إيجابيات عملية الـ PCR مُقارنة بالطرق الأخرى، تمّ استعمال هذه التقنية بسرعة كبيرة في مجالات عديدة، يُمكن أن نذكر **3 إيجابيات** واضحة لاستعمال عملية الـ PCR وهي:

1. **الاستنساخ بسرعة وسهولة:** بالرغم من أن البكتيريا لها قُدرة جيدة على مُضاعفة الـ DNA بواسطة مُضاعفة البلازميدات داخلها، إلّا انّه بواسطة تفاعل الـ PCR يُمكن أن نحصل على الـ DNA المطلوب بكميات هائلة. بالإضافة الى ذلك، فإنّ المُضاعفة بواسطة الـ PCR تُمكّن من مُضاعفة مقطع مُحدّد من الـ DNA، ولذلك تُصبح كمية الـDNA الأصلي، غير المُتجانس الذي أُدخل إلى الأنبوب في بداية العملية، صغيرة جدًا وقابلة للإهمال. لذلك تتمّ في الأنبوب أيضًا، عملية عزل للمقطع المطلوب الذي تمّت مُضاعفته. عملية العزل والمُضاعفة بواسطة الـ PCR هي عملية استنساخ يُمكن تنفيذها خلال ساعات معدودة فقط. عمليًا، يُمكّن تفاعل الـ PCR في حالات عديدة من التخلي عن الاستنساخ بواسطة المكتبات والكواشف الذي يحتاج بشكل خاص إلى مهارة عالية، بالإضافة إلى أشهر طويلة من العمل! سيتمّ توضيح هذه الأفضلية في موضوع "استعمالات الـ PCR" الذي نتطرق له في هذا الفصل.

2. **حساسية الطريقة:** الـPCR يُمكّن من مُضاعفة مقطع الـ DNA والحصول على نسخ كثيرة من المقطع بواسطة استعمال كميات ضئيلة جدًّا من الـ DNA المصدر، حتى أنه بإمكاننا مُضاعفة DNA مصدره من خلية واحدة فقط. بفضل هذا يُمكن استنساخ جينات من مصادر مُعينة لا نستطيع القيام بعملية استنساخها بواسطة المكتبات.

3. **قُدرة الطريقة:** من المُمكن إجراء المُضاعفة بواسطة تفاعل الـ PCR، حتى في الحالة التي يكون فيها الـ DNA الهدف الذي نرغب بمضاعفة مقطع منه، بدرجة نقاوة منخفضة، أو حتى ذا جودة مُنخفضة (مثلاً، DNA بدون الأطراف الضرورية للاستنساخ داخل ناقل). هذه الحقيقة تُمكّن من إجراء أبحاث في مجالات متنوعة بإمكانها الحصول على عينات من DNA يُمكن استخدامها في تفاعل الـ PCR فقط ، كالبحث الذي يعتمد على بقايا أنسجة من أشخاص موتى، أو حتى الأبحاث التي تعتمد على بقايا متحجرات عُمرها ملايين السنين.

مكّنت حساسية وقدرة تفاعل الـ PCR الكبيرتان من تطوير تطبيقات في مجالات عديدة ومتنوعة، كتطبيقات في مجال القانون والعدالة، مجال التشخيص الطبي وغيرها من المجالات كما سيوضح لاحقًا.

بالرغم من شعبية تفاعل الـ PCR له عدد من العوائق وهي:

1. **توجد حاجة لمعلومات مُسبقة عن الـ DNA الذي نرغب بمُضاعفته:** تسلسل الـ DNA الذي نرغب بمُضاعفته يجب أن يكون معروفًا، على الأقل، بشكل جُزئيّ، وذلك لإنتاج البرايمرات المستعملة في التفاعل. مع أنَّ معلومات مُسبقة كثيرة عن تسلسل الـ DNA أصبحت متوفرة في أيامنا بعد أنْ تمَّ تحديد تسلسل الـ DNA الكامل لجينوم كائنات كثيرة (في مشاريع الجينوم).

2. **طول المقطع الذي نرغب بمُضاعفته:** لا يُمكن القيام بمُضاعفة ناجعة لمقطع DNA يزيد طوله عن عدّة آلاف من القواعد.

3. **تراكم الاخطاء:** تتمّ مُضاعفة الـ DNA في الخلايا بدرجة عالية جدًّا من الدقّة، وذلك يعود لوجود إنزيمات مسؤولة عن تصحيح الأخطاء. إحدى الحالات التي يتمّ فيها تشغيل أنظمة التصحيح، عندما يقوم الـ DNA بوليميراز بإضافة نوكليوتيد خاطئ في جديلة الـ DNA التي يقوم ببنائها، وبذلك يَنْتُج عدم تلائم بين قواعد مُتقابلة موجودة على الجديلتين. عمليًا، نسبة الخطأ (نسبة الطفرات) في عمليّة مُضاعفة الـ DNA في **الخلية** هي بنسبة قاعدة واحدة لكل 3 مليار قاعدة، فقط! بالمُقابل، خلال عمليّة مُضاعفة الـ DNA في أنبوب الاختبار، فإنّ الإنزيم الوحيد الذي يُصحح الاخطاء هو الـ DNA بوليميراز ذاته. ليست جميع الإنزيمات المُستعملة في الـPCR لديها قُدرة على تصحيح الأخطاء، فإنزيم ذا قُدرة جيدة لتصحيح الاخطاء يضمن أن لا تزيد نسبة الخطأ عن 1 لـ 6000 نوكليوتيد. هذه النسبة من الطفرات عالية جدًّا بالمُقارنة مع نسبة الطفرات التي تحدُث عند مُضاعفة الـ DNA داخل الخلايا.

4. **نواتج مُضاعفة غير مرغوبة (مشاكل تنبع من تخصصيّة المُضاعفة):** عدا عن حالات خاصة، البرايمرات المُصممّة لأجل مُضاعفة مقطع مُعيّن من الـ DNA تُصمّم بدقة وحذر لتكون هناك ملاءمة تامّة بين تسلسل البرايمر وتسلسل واحد ووحيد موجود في الـ DNA المصدر، يكون هذا التسلسل مكمّلًا لتسلسل البرايمر. تصميم البرايمرات بهذا الشكل يُمكّن في غالبيّة الحالات -عدا عن تلك التي تحدُث فيها الاخطاء المُمكنة التي ذُكرت في البند -3 من الحصول على ناتج PCR واحد، وهو الناتج المرغوب. لكن في بعض الأحيان، يحدُث ارتباط البرايمرات بأكثر من زوج من التسلسلات على الـ DNA المصدر. عادةً تكون حالات الارتباط الإضافيّة من نوع "الارتباط الجُزئيّ"، وفيها يشترك فقط قسم من النوكليوتيدات الموجودة في البرايمر. ارتباط كهذا يتمّ في مواقع مُختلفة عن تلك المواقع التي من المفروض أن تتمّ فيها عمليّة الارتباط الصحيحة والكاملة. الارتباط الجُزئي بتسلسلات غير مرغوبة يُمكن أنْ يؤدّي إلى إنتاج ناتج أو نواتج مُضاعفة غير مرغوب بها، وهي تَنْتُج بالإضافة إلى النواتج المطلوبة أو بدلاً عنها. لذلك يتمّ التشديد على فحص نواتج تفاعل الـPCR بواسطة التحريك بالجل للتأكد من الحصول على مقطع الـ DNA المطلوب وذا الطول المُتوقّع. في بعض الأحيان لا يتمّ الاكتفاء بتشخيص طول المقطع، وإنما يتمّ التأكد من الحصول على الناتج المطلوب بواسطة تحديد تسلسلِه.

> يُمكن أن ترتبط البرايمرات بشكل جُزئي، بحيث ترتبط فقط بعض القواعد التي تكوّن البرايمر مع الـ DNA الأصلي (في هذا الارتباط تشترك تقريبًا 60% من قواعد البرايمر). ارتباط جُزئي كهذا يتميز بثبات قليل نسبيًّا، لكن بالرغم من ذلك يُمكنه أن يتسبب في بعض الأحيان في الحصول على ناتج PCR غير مرغوب. من أجل تقليص احتمال حدوث ارتباط جزئي غير مرغوب للبرايمرات، يتمّ التشديد على ارتباط البرايمرات بالـ DNA في درجات حرارة عالية نسبيًّا بحيث تكون ملائمة لطول البرايمر. كلما كان البرايمر أطول من المفضل، بل يجب رفع درجة الحرارة في مرحلة ارتباط البرايمرات لمنع حدوث ارتباط غير مرغوب. كذلك يجب الامتناع عن استعمال برايمرات قصيرة طولها أقل من 17 نوكليوتيد، لأنها تؤدي إلى ارتباط غير مرغوب والحصول على نواتج مُضاعفة غير مرغوبة أيضًا.

سؤال 6.1

حسب رأيك، ما هي الصفات التي تحلى بها كاري مولس كإنسان وكباحث والتي أتاحت له تحقيق الإنجاز العلمي المثير للإعجاب: تطوير الـ PCR، الطريقة الجزيئية المُبتكرة؟

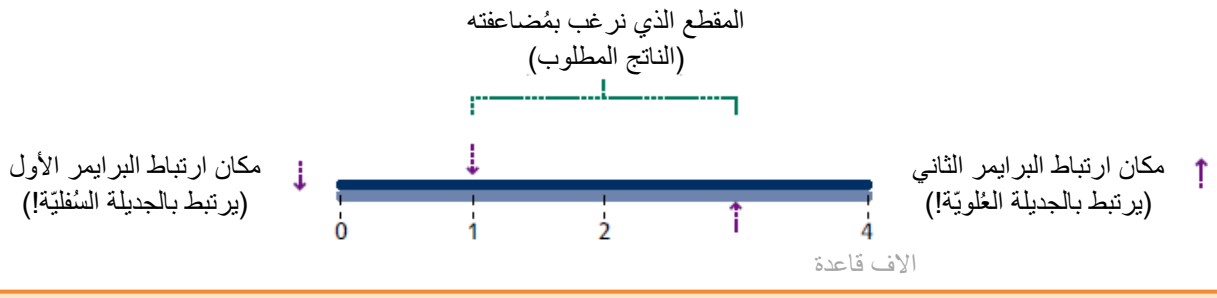
سؤال 6.2

إفترضوا أنه خلال تفاعل PCR مُعيّن، كانت المادة الوراثية المُستعملة في التفاعل، تحتوي على 4 نُسخ من الـ DNA الذي نرغب باستنساخه، ما هو العدد المتوقّع، من نسخ الـ DNA المرغوب، الذي سنحصل عليه في ظروف مُضاعفة مثاليّة، بعد 12 دورة مُضاعفة؟

سؤال 6.3

1. تتم مُضاعفة الـ DNA في خلايا أحد الثدييات في درجة حرارة 37ºC، بينما تتطلب مُضاعفة الـ DNA في أنبوب الاختبار درجات حرارة عالية تصل إلى 95ºC. اشرحوا لماذا نحتاج إلى درجات حرارة عالية خلال عمليّة المُضاعفة في أنبوب الاختبار؟ أُذكروا ما هي العوامل التي تتواجد في الخليّة والتي تُمكّن من المُضاعفة في درجات حرارة مُخفضة أكثر بكثير من تلك التي تُستخدم في أنبوب الاختبار؟
2. عند تطوير طريقة الـ PCR، وفي الفترة الأولى لاستعمالها، كانت هناك حاجة لإضافة كمية طازجة من الإنزيم بعد كل دورة مُضاعفة. ما هو السبب لذلك، حسب رأيك؟
3. بدأ استعمال الـ PCR على نطاق واسع، فقط، بَعد أن تطورت العمليّة وأصبحت آلية (اوتوماتيكية). حسب رأيك، ما هي العوامل التي مكّنت من تطوير الطريقة وتحويلها إلى طريقة آلية؟

سؤال 6.4



رسم س'6.4: وصف تخطيطي لمقطع DNA نرغب بمُضاعفة قسم منه.

تُمكّن عملية الـ PCR من مُضاعفة واستنساخ مقطع DNA يُشكل جُزءً من مقطع DNA أكبر منه. خلال عمل الـ DNA بوليميراز، يُمكن أن يقوم بإنتاج DNA أطول من الـ DNA المطلوب، هل هذا البناء الإضافي وغير المطلوب ذا أهميّة؟ افترضوا أنه لديكم مقطع DNA مكوّن من 4000 نوكليوتيد/قاعدة. كما يظهر في رسم س'6.4-، هدفكم هو مُضاعفة مقطع طوله 2000 قاعدة، من القاعدة الموجودة في الموقع 1000 وحتى القاعدة الموجودة في الموقع 3000. بحوزتكم برايمران مُناسبان لتحقيق هذا الهدف. ارسموا نواتج المُضاعفة في كل واحدة من دورات المُضاعفة الأربعة الأولى. ارسموا نواتج المُضاعفة الناتجة بعد دورة المُضاعفة الأولى، ثمّ ارسموا فقط النواتج التي يتمّ الحصول عليها من أحد النواتج التي حصلنا عليها في الدورة الأولى.

أ. ما هو عدد النواتج المرغوبة التي نحصل عليها بعد دورة المُضاعفة الثانية، والتي يبلغ طولها 2000 زوج من القواعد، ولا تحتوي على "ذنب" DNA أحادي الجديلة؟

ب. ما هو عدد النواتج المرغوبة التي لا تحتوي على "ذنب" DNA أحادي الجديلة، التي نحصل عليها بَعد دورة المُضاعفة الرابعة والخامسة؟

سؤال 6.5

في السؤال 4 في الفصل الخامس، تم عرض الطريقة التي استنسخت بواسطتها باحثة جينات من نباتات ذات ثمار صغيرة الحجم، بعد أنْ حددّت الباحثة أنَّ هذه الجينات تحتوي على طفرات. عادت الباحثة إلى حقل الأشجار ووجدت نباتات تحمل ثمار أكبر حجمًا من معدل حجم الثمار. رغبت الباحثة حالًا، باستنساخ الجينات التي يُمكن أن يكون لها علاقة بحجم الثمار الكبيرة. في هذه المرّة قررت استنساخ الجينات التي لها علاقة بحجم الثمار بواسطة تفاعل الـPCR. في هذه المرة أيضًا، أرادت أن تعرف ما إذا كانت الجينات التي قامت باستنساخها تحتوي على طفرات. أي من الأدوات التالية يُمكن أنْ تتخلى عنها الباحثة ولماذا؟

1. استخلاص DNA أو RNA
2. مكتبة بكتريوفاجات
3. كاشف راديوأكتيفي
4. DNA بوليميراز
5. بناء أوليجو- نوكليوتيدات
6. تحديد تسلسل المقطع المُستنسخ
7. بلازميدات وبكتيريا
8. برايمرات ونوكليوتيدات

استعمالات الـ PCR

هل الشخص حامل لطفرة مُعينّة تُنبئ بتطور مرض مُعيّن لديه في المستقبل؟ هل بإمكان أهل حاملين طفرة مُعيّنة في جين له علاقة بمرض ما، إنجاب أطفال أصحاء؟ هل النباتات والحيوانات التي تمّت هندسة جيناتها تحمل بالفعل التغيير الوراثي المرغوب؟ هل يُمكن إدانة المُشتبه به بتنفيذ الجريمة بشكل مؤكد؟ للحصول على إجابة سريعة ودقيقة على هذه الاسئلة يتمّ استعمال تفاعل الـ PCR. عمليًا، من الصعب أنْ نفهم بشكل عميق، حياتنا في هذا العالَم المتقدِّم وكل ما يتعلق بالعِلم، الطب، القانون والعدالة، وحتى كل ما يتعلق بجودة الغذاء الذي نتناوله دون معرفة مبادئ واستعمالات الـ PCR.

في هذا الفصل يتمّ وصف بعض استعمالات الـ PCR الشائعة. حتى كتابة هذه السطور وعبرها يُمكن تقدير أهمية تفاعل الـPCR والإمكانيات المتنوعة الكامنة فيه. لكن قبل عرض هذه الاستعمالات "الجذابة" من المُفضل أن نعرف كيف يُسهِّل تفاعل الـ PCR عمل الباحث الذي يعمل في مجال الهندسة الوراثية.

RT-PCR

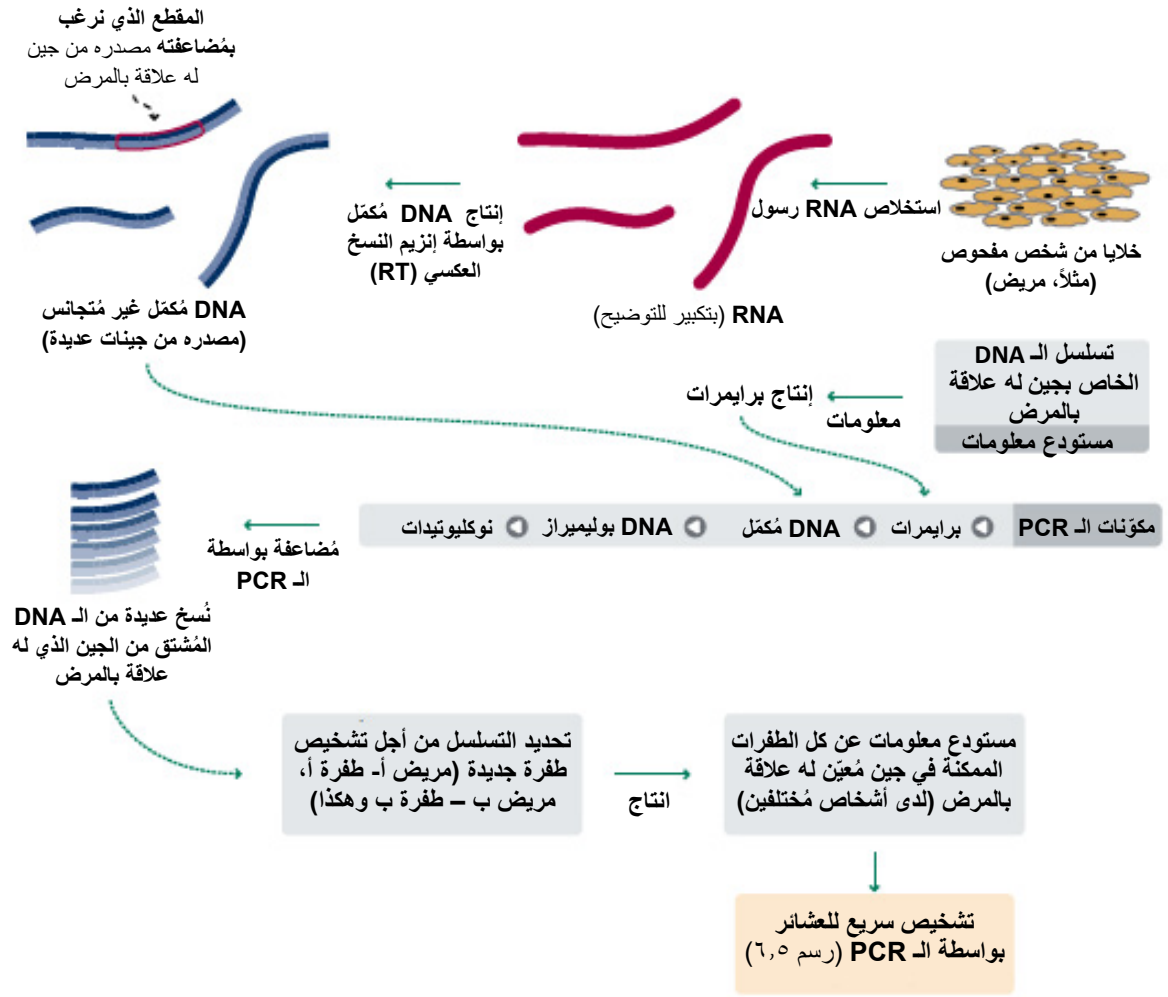
منذ أنْ اتسع نطاق استعمال طريقة الـ PCR في مُختبرات البحث، زادت نجاعة توجهات بحث عديدة، وفي بعض الأحيان قصُر الزمن اللازم لتنفيذها بعدّة مرّات، حيث أصبحت تحتاج الى ساعات معدودة بعد أن كانت تستغرق أسابيع أو حتى أشهر طويلة. ازدادت نجاعة توجهات بحث عديدة تعتمد على عملية ثُنائية المراحل تُعرف بـ RT-PCR (Reverse Transcriptase-PCR)، في المرحلة الأولى من هذه العمليّة يتمّ استخلاص RNA، وبحسبه يتمّ بناء DNA مُكمِّل بواسطة إنزيم النسخ العكسي (Reverse Transcriptase) (كما هو موضح في الفصل 4) (مرحلة الـ RT). في المرحلة الثانية يتمّ استعمال الـ DNA المُكمّل الناتج، غير المُتجانس، لمُضاعفة مقطع DNA مرغوب بواسطة الـ PCR.

استعمالات الـRT-PCR

1. **الاستنساخ من جديد بهدف تشخيص الطفرات:** في بعض الأحيان يوجد اختلاف بين تسلسل قواعد جين مُعيّن لدى الأشخاص الأصحاء والمرضى. من أجل تشخيص الطفرات التي يُمكن أن تكون مسؤولة عن مرض معيّن يتمّ إجراء عملية الـ RT-PCR من أجل استنساخ DNA مُكمّل مصدره من المرضى (الرسم 6.3). الاستنساخ في هذه الحالة يهدف إلى تشخيص طفرة جديدة موجودة لدى شخص مُعيّن، فمن المُمكن أن تتواجد طفرات مُختلفة في نفس الجين عند المرضى المُختلفين. عمليًا يتم استنساخ الـ DNA المُكمّل المطلوب من عدد كبير من المرضى بهدف تشخيص تشكيلة الطفرات المُمكنة في هذا الجين لدى عشيرة الأفراد. هذا التشخيص الأولي للطفرات يُمكنه أن يُساعد في فهم وظائف الجين السليم، ويزوّد المعلومات من أجل إجراء فحوصات تشخيص مُسبقة لدى كل العشيرة (سنشرح الأمر لاحقًا).
2. **الاستنساخ من جديد من أجل التعبير عن جين:** كما سيوضح في الفصل 8، يُمكن استغلال الـ RT-PCR من أجل استنساخ الـ DNA المُكمّل المرغوب، لدمجه مع ناقل جينات مُعيّن، بهدف التعبير عن البروتين الذي يُشفِّر له هذا الـ DNA المُكمِّل. يُمكن الحصول على المعلومات عن البرايمرات المُناسبة في مستودعات المعلومات التي تحوي تسلسلات كل الجينات التابعة لكائنات عديدة (هذه المستودعات هي نواتج مشاريع الجينوم).

3. **تشخيص كميّة وجودة RNA مُعيّن في الخليّة:** تُساعد عمليّة الـRT-PCR على تحديد الخلايا التي يَنْتُج فيها RNA خاص بجين مُعيّن، وكذلك تحديد الوقت الذي يَنْتُج فيه هذا الـ RNA، كما وتُساعد هذه الطريقة على تحديد كميّة وجودة هذا الـ RNA. معلومات كهذه عن تعبير الـ RNA الخاص بجين مُعيّن لها أهمية كبيرة في تحديد وظائف هذا الجين. يُمكن إيجاد تفاصيل إضافيّة عن هذه العمليّات في الفصل السابع.

استعمالات إضافيّة لتفاعل الـ PCR التي لا يضمّ مرحلة RT ستذكر في هذا الفصل وفي فصول أخرى.



رسم 6.3: استنساخ جينات من جديد بواسطة الـ RT-PCR من أجل تشخيص الطفرات.

استنساخ من جديد لـ DNA مصدره من جين نعتقد بأن له علاقة بمرض معيّن. تمّ الاستنساخ بواسطة RT-PCR. تمّ تكرار الاستنساخ عددًا كبيرًا من المرات بوجود DNA من أفراد مُختلفين، من أجل تشخيص طفرات جديدة موجودة لدى الأفراد المُختلفين (" أفراد مُختارين")، ومن أجل جمع المعلومات عن كل الطفرات الممكنة الموجودة في العشيرة.

الـ PCR في القانون والطب

تقريبًا منذ أن أكتُشفت طريقة الـ PCR تمّ استخدامها خارج نطاق مُختبر الباحث. يعود هذا في الأساس إلى الحساسيّة العالية للطريقة، وأيضًا لكونها لا تُلزم استخدام DNA نقي أو حتى كميّات كبيرة منه. عمليًا، تكفي كميّة ضئيلة من الـ DNA كتلك الموجودة في بُقعة دم، في قطرة من اللعاب، أو في جذر شعرة من أجل مُضاعفة الـ DNA بواسطة الـ PCR واستخلاص المعلومات منه. هذه المعلومات من الممكن أن تشُق الطريق أمام تجريم أو تبرئة متهم بجريمة مُعيّنة. يكفي أن نأخذ خليّة واحدة فقط، من جنين مكوّن من 8 خلايا نَتَج عن طريق اخصاب في الأنابيب لنفحص بواسطة الـ PCR عن وجود جينات فيها طفرات، في جينوم هذا الجنين. هذه المعلومات التشخيصيّة يُمكنها أن تُساعد في اتخاذ القرار بزرع الجنين في رحم الأُم أو الامتناع عن ذلك. هذه هي فقط بعض من التطبيقات التي وُجدت لتفاعل الـ PCR.

التطبيقات في التشخيص الوراثي والجنائي

المكان هو مسرح الجريمة الذي يصل اليه المُحققون من مُختبر التشخيص الجنائي. ما هي المشاكل التي تواجه المُحققين؟ وجد المُحققون شعرة مشبوهة، وبعد جهد كبير تمكّنوا من تحديد مشبوهين بتنفيذ الجريمة، عندها حصل مُختصو الطب الجنائي على عينة دم من كل واحد من المشبوهين. الآن، بالإمكان المُقارنة بين الـ DNA الموجود في الشعرة المشبوهة وبين الـ DNA الذي استُخلص من دم كل واحد من المشبوهين (تطبيق مُقارنة). فرضية العمل هنا هي أنّه الى جانب التشابه في تسلسل الـ DNA بين الاشخاص المُختلفين، تتواجد في الـ DNA تسلسلات تختلف من شخص إلى آخر. الحديث هنا عن اختلاف طبيعي نَتَج على مرّ الاجيال، تتميّز هذه الاختلافات بأنها تغييرات غير ضارّة وتعرف باسم "بوليمورفيزم" في العشيرة ("صور متعددة" للـ DNA). التشخيص السريع للاختلاف بين التسلسلات لدى أشخاص مُختلفين ومُقارنتها بتسلسل الأدلة الجنائيّة، هي الأساس للتطبيقات في مجال القانون والعدالة. عمليًا، يتمّ التركيز على الاختلاف الموجود بين الافراد في تسلسلات قصيرة تتكرر تباعًا في نفس المكان وتعرف باسم تسلسلات قصيرة، متكررة ومتلاحقة، بالإنجليزية Short tandem repeats، وباختصار **STR**. الـ STR هي تسلسلات مكوّنة من عدّة عشرات أو مئات من القواعد الموجودة في القسم الأكبر من الجينوم، وهي لا تُشفِّر إلى بروتينات. يُعرض هنا مثال لتسلسل مُعيّن، وللتوضيح هو تسلسل موجود على كروموسوم 13 لدى شخص مُعيّن (الفرد a):

بوليمورفيزم شائع هو 1 من بين 1200 قاعدة في الجينوم مُختلف بين شخص واخر.
اختلاف كهذا يُدعى:SNP
(Single Nucleotide Polymorphysm)
وفي الغالب لا يتم التركيز على هذا الاختلاف في الطب الجنائي.

CCGTAAATCCCT**AATCAATCAATCAATCAATC**TTGGCATGA

سنطلق على هذا التسلسل اسم تسلسل أ'، بحيث أن التسلسل المتكرر هو AATC. الـ STR يظهر بأحرف مُشددة، ونلاحظ أيضًا أنّ هذا الـSTR فيه n=6 بحيث أنّ n هو عدد المرّات الذي يتكرّر فيها التسلسل. التسلسل أ' موجود على كروموسوم 13 في مكان معيّن، ويتمّ تحديده بحسب التسلسل الموجود على طرفيّ التسلسل المتكرّر.

التسلسل ب' موجود هو أيضًا على الكروموسوم 13 الآخر في الخليّة، أي على الكروموسوم الهومولوجي، ويظهر كما يلي:

CCGTAAATCCCT**AATCAATCAATCAATC**TTGGCATGA

هنا أيضًا يظهر الـ STR مشددًا، وهو مكوّن من نفس التسلسل الموجود في التسلسل أ'، ولكن. n=4 على أطراف التسلسل يوجد تطابق بين التسلسل أ' والتسلسل ب'.

بسبب التشابه بين التسلسل أ' والتسلسل ب' وبسبب حقيقة كونهما موجودان في نفس المكان على زوج الكروموسومات الهومولوجي، التسلسلات أ' وب' هي أليلات (نُعرّف تسلسل أ' بأنّه أليل 1 وتسلسل ب' بأليل 2).

أليلات تُعرّف بأنها صيغ مُمكنة لمقاطع DNA أو جينات. يُمكن أن نعتبر الأليل "صيغة من الـ DNA". يوجد في الخليّة أليلان لكل جين (صيغتان)، حيث يتواجد كل واحد منهما على أحد الكروموسومين الهومولوجيّين (المُتشابهان). أحد الكروموسومين مصدره من الأب والآخر من الأم. بنفس الشكل أيضًا DNA آخر في الخليّة بما في ذلك الـSTR يتواجد منه أليلان (صيغتان)،حيث تتواجد كل صيغة على أحد الكروموسومين الهمولوجيين. في الغالب يكون الاختلاف بسيطًا بين أليلي الجين أو أليلي DNA آخر في الخليّة. لمقطع DNA مُعيّن أو جين مُعيّن يُمكن أنْ يكون عدد كبير من الأليلات لدى عشيرة الأفراد.

ف

يما يلي نعرض التسلسلات ج وَ د لدى شخص آخر(شخص b)، وهما موجودان على كروموسوم 13 أيضًا وفي نفس المكان:

تسلسل ج:

CCGTAAATCCCT**AATCAATCAATC**TTGGCATGA

تسلسل د:

CCGTAAATCCCT**AATCAATCAATCAATCAATC**TTGGCATGA

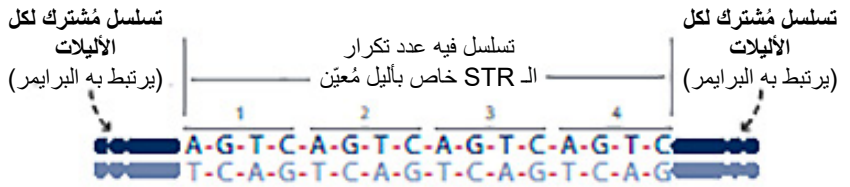
التسلسلات ج وَ د لدى الشخص b، هما أليلان إضافيّان،(الأليلات 3 وَ 4). من هنا نستنتج أنَّ لـ STR مُعيّن يُمكن أن تتواجد أليلات عديدة في العشيرة السكانيّة!

الهدف من التشخيص الوراثي لشخص معيّن هو استغلال الـPCR، من أجل تحديد نوع أليلات STR الموجودة عند هذا الشخص، وفي التشخيص الجنائي يتمّ تحديد أليلات الـ STR عند المتهمين، ومن ثُم مُقارنتها مع الوقائع الموجودة في الأدلة القانونية. هذه المُقارنة هي الأساس الذي نعتمد عليه لاستنتاجاتنا بالنسبة للقضية. كيف يتمّ تنفيذ هذا الامر؟ كما هو موضّح في الرسم 6.4، عمليّة تشخيص أليلات STR التابعة لفرد مُعيّن مكوّنة من ثلاثة مراحل أساسيّة. أوّلًا، يجب تحديد نوع الـ STR الذي نرغب بفحصه، ثُمَّ تحديد هويّة الأطراف الواقعة على يمين وعلى يسار التسلسل المُتكرر (6.4أ'). ثانيًا، يجب أن نقوم بمُضاعفة المقطع الذي يشمل الـ STR بواسطة تفاعل الـ PCR (6.4 ب'). في النهاية يتمّ تشخيص نواتج الـ PCR بواسطة تحريكها في الجل (6.4ج'). في التشخيص الجنائي تتمّ دراسة نموذج نواتج الـ PCR الناتجة في الجل عن طريق مقارنة نموذج خطوط الـ DNA الناتج لدى المتهمين المُختلفين مع نموذج الخطوط التابع للأدلة الموجودة في موقع الجريمة.

للتوسع والتلخيص، العمليّات المطلوبة للتشخيص الوراثي للأشخاص (وليس فقط المُتهمين بتنفيذ الجرائم) بواسطة تشخيص الـ STR هي كالآتي (استعينوا بالرسم 6.4):

1. تخطيط وإنتاج كيميائي للبرايمرات المُشتقة من المناطق الموجودة على طرفيّ الـ STR. مثلًا، من أجل الحصول على مقطع DNA مكوّن، على الأقل، من 150 نوكليوتيد، يجب إنتاج برايمر بحسب التسلسل الموجود على بُعد 75 قاعدة تقريبًا على يمين الـ STR وبرايمر آخر بحسب التسلسل الموجود على بُعد 75 قاعدة تقريبًا على يسار الـ STR.

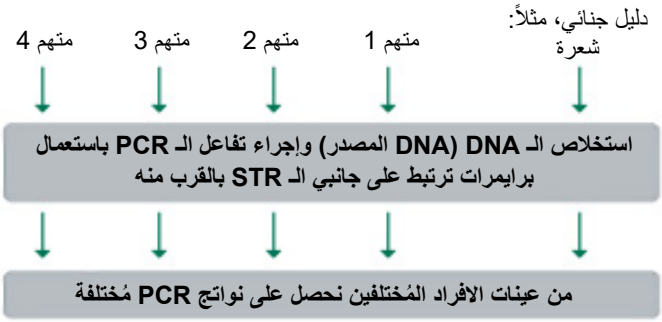
أ. تشكيلة أليلات STR من نوع AGTC موجودة في العشيرة (مجموعة وهمية للتوضيح فقط)



أليل 1:
STR من نوع AGTC (التسلسل المُتكرر) n=4 (التسلسل يتكرر 4 مرات في مكان معيّن في الجينوم)

أليل 2 n=15 | أليل 3 n=30 | أليل 4 n=45 | أليل 5 n=60 | أليل 6 n=82

ب. مجموعة الفحص للتعرف على الاشخاص بحسب STR الخاص بهم



ج. نتائج فحص مُقارنة STR بين أفراد متهمين وبين الدليل الجنائي

رسم 6.4:مُضاعفة مقاطع الـDNA التي تحوي STR بهدف التشخيص الجنائي

لدى كل شخص أليلان (متطابقان أو مُختلفان) لـ STR من نوع مُعيّن، من بين جميع الأليلات المُمكنة الموجودة لدى جميع الأفراد. من اجل التشخيص الوراثي لشخص مُعيّن هناك حاجة لمُضاعفة STR مُعيّن ومقارنة نموذج الخطوط الناتج في الجل بنموذج الخطوط الناتج من الدليل الجنائي.

2. تنفيذ تفاعلات PCR مُنفصلة لعيّنات DNA من كل واحد من المفحوصين؛ في حالة التشخيص الجنائي، يتمّ أيضًا إجراء تفاعل PCR لعينة الـ DNA التي وُجدت في مكان الجريمة.
3. فصل نواتج الـ PCR التي نَتَجت بعد المرحلة ب' بواسطة الجل. إذا تمّ اجراء الفحص لنوع واحد من الـ STR فقط ، يَنْتُج ناتجين DNA أساسيين (يظهرا في الجل على شكل خطين)، ناتج واحد من كل أليل، أو ناتج واحد فقط عندما يكون الأليلان متطابقان. كلما كان المقطع الناتج أطول فإنّ ذلك يدل على أنّه يوجد تكرار أكثر لـتسلسل الـ STR.
4. المُقارنة بين نواتج الـ PCR الناتجة لدى أفراد مُختلفين بواسطة مُقارنة نموذج الخطوط. في التشخيص الجنائي تتمّ المُقارنة بين النواتج التي نَتَجت لدى المُتهمين وبين النواتج التي نَتَجت من الأدلة الموجودة في مكان الجريمة.
5. التوصّل إلى استنتاجات قانونيّة أو استنتاجات أخرى.

سؤال 6.6

بالرغم من القدرة الكبيرة لتفاعل الـ PCR على إنتاج كميّات كبيرة من الـ DNA المطلوب، إلا أنَّ هناك حالات تكون فيها المُضاعفة غير مثاليّة. أي من العوامل التالية يُمكنها أن تقلل من عدد نُسخ الـ DNA المطلوب الذي يَنْتُج في تفاعل الـPCR؟

1. حصلنا على عينة الـ DNA المصدر من مومياء عمرها ما يُقارب 2500 سنة.
2. مقطع الـ DNA الذي نرغب بمُضاعفته مُكوّن من 15000 قاعدة تقريبًا.
3. لمُضاعفة المقطع المطلوب تمَّ إدخال أيونات المغنيسيوم إلى أنبوب الاختبار بكميّة مُضاعفة عن تلك التي يحتاجها البوليميراز للقيام بعمله.
4. تستطيع البرايمرات المُستعملة الارتباط بشكل جُزئي بعدّة مواقع موجودة في الـ DNA المصدر.

سؤال 6.7

في هذا السؤال عليكم تحديد المجرم من بين عدّة متهمين.

يُعرض في الرسم 6.4 أ' حدث مُعيّن مُتعلق بـ STR مُعيّن، التسلسل المُتكرر في هذا الـSTR هو AGTC، يتواجد لدى أفراد العشيرة 6 أليلات مُختلفة لهذا الـSTR. على يمين وعلى يسار التسلسل المُتكرر تتواجد تسلسلات مُعيّنة مُتطابقة في كل الأليلات. يعرض الرسم أليلات 4 مُتهمين، لدى كل مُتهم أليلان من الأليلات الستة المُمكنة، يمكن أن يكون أليلا الشخص مُتطابقان أو مُختلفان. يعرض الرسم نواتج مُضاعفة مقاطع DNA مصدرها من أليلات كل مُتهم، وكذلك أليلات مصدرها من الشعرة التي تُعتبر دليلًا جنائيًّا. بعد هذه المُقارنة الجُزيئيّة يُمكن تحديد الشخص الذي اقترف الجريمة.

إفترضوا أنكم تستعملون برايمر مُعيّن، الطرف 5' لهذا البرايمر موجود على بُعد 70 قاعدة على يسار تسلسل الـ STR، وبرايمر إضافي الطرف 5' الخاص به موجود على يمين تسلسل الـSTR ويبعد عنه 80 قاعدة.

حدّدوا حسب الرسم 6.4ج' ما يلي:

1. أي متهم من بين المُتهمين الأربعة بريء؟
2. حدّد حسب كبر المقاطع الناتجة لدى كل مُتهم، ما هو عدد المرّات التي يتكرر فيها تسلسل الـ STR من النوع AGTC في كل واحد من أليلات كل متهم؟

سؤال 6.8

إجابتكم عن سؤال 6.7 برّأت ثلاثة من بين المُتهمين من الجريمة المذكورة. ادّعى المُتهم الرابع الذي أُدين بالجرم أنّه بريء بالرغم من النتائج التي ظهرت في الفحص الوراثي، وقام هذا المُتهم باتهام شخص آخر لم يتمّ اعتقاله. عندما أُجريَ تفاعل الـ STR للمُتهم الجديد تبيّن أنّ نموذج خطوط فحص الـ STR الموجود لديه مُطابق هو أيضًا لنتائج الـ STR الخاصة بالدليل الجنائي. بحسب المعلومات الموجودة عن نوع واحد من الـ STR فقط، لا يُمكن أن نُحدّد أي من المُتهمين هو المُجرم، غضب القاضي جدًّا على العاملين في المُختبر الجنائي لاكتفائهم بفحص نوع واحد فقط من أنواع الـ STR الموجودة في الجينوم، وأصدر أمرًا بإجراء فحص مُقارنة إضافي لـ 3 أنواع مُختلفة من الـ SRT الموجودة في ثلاثة مواقع مُختلفة في الجينوم.

على افتراض أنّ كل واحد من المُتهمين هيتروزيجوت في كل واحد من أنواع الـ STR الثلاثة (لديه أليلان مُختلفان، ليس كالهوموزيجوت الذي لديه أليلان مُتطابقان)، وعلى فرض أننا نقوم بتحريك جميع النواتج التابعة للأنواع الثلاثة من الـ STR لفرد مُعيّن، في بئر واحد في الجل، ما هو عدد خطوط الـ DNA الناتجة لدى كل مُتهم؟

أُرسموا بشكل تخطيطي نتائج فحص المُقارنة التابع للمُتهمين وللدليل الجنائي، الذي بحسبه تمّت إدانة المُتهم الجديد وتبرئة المُتهم الذي استأنف الحُكم، يجب أن يحتوي فحص المُقارنة على نواتج تابعة لـ3 أنواع مُختلفة من الـ STR.

التطبيقات في مجال الطب

تنقسم استعمالات الـ PCR في مجال الطب الى قسمين، التشخيص في مجال الأمراض التلويثيّة والتشخيص في مجال الأمراض الوراثية. في مجال تشخيص الأمراض التلويثيةّ يتمّ الاعتماد على تشخيص فيروس مُعيّن أو بكتيريا مُعيّنة مسببة للأمراض بواسطة تفاعل الـPCR، فمثلًا يتمّ تشخيص هويّة مُسبب المرض لدى المريض بواسطة هذا التفاعل. كذلك يتم استعمال تفاعل الـ PCR لفحص وجود مُسببات الأمراض في غذاء مُعيّن عندما يكون هنالك شك بصلاحية هذا الغذاء، لنعرف ما إذا كانت هناك حاجة لمنع تناول هذا الطعام. لتحقيق هذا الهدف يتمّ استعمال برايمرات خاصة تتناسب مع مسبب المرض فقط، حيث تتمّ مضاعفة الـ DNA بواسطة الـ PCR، وفي حال تكوّن ناتج مضاعفة فإنّ ذلك يشير إلى وجود مسبب المرض. التشخيص بواسطة هذه الطريقة سريع نسبيًّا ومن الممكن أن يؤثّر على نوع العلاج الذي يُعطى للمريض. على سبيل المثال، يمكن استعمال هذه الطريقة لفحص كون شخص ما حاملا لفيروس الـ HIV الذي يسبب مرض الايدز، من خلال الحصول على عينة دم من الشخص، وإجراء عمليّة RT-PCR بواسطة برايمرات مُكمّلة لتسلسلات موجودة عند فيروس الـ HIV فقط. وعندها نستنتج أنّ الشخص يحمل فيروس الـ HIV فقط في حالة تكوّن ناتج في عملية الـPCR.

في حالات عديدة، من المقبول إجراء فحص مناعي يفحص وجود أجسام مُضادة ضد فيروس الـ HIV في دم المفحوص. وجود أجسام مُضادة في دمه تدل على وجود الفيروس. في بعض الأحيان يُفضلون التشخيص بواسطة الـ PCR وليس التشخيص المناعي لكون الفحص المناعي للـ HIV لا يُطبق في الأشهر الأولى بعد العدوى بالمرض، حيث أن جهاز المناعة لم يُنْتِج أجساماً مُضادة ضد المرض ولا يُمكن استخدام هذا الفحص في المراحل الأولى من العدوى. بالإضافة الى ذلك، اليوم هناك عشرات الأنواع من فيروس الـ HIV، وهناك أدوية مُعينة ناجعة ضد نوع مُعيّن من الفيروسات وغير ناجعة ضد أنواع أخرى. الأنواع المُختلفة من هذه الفيروسات تختلف عن بعضها في تسلسل الـ RNA الموجود لديها، لذلك يُمكن استخدام برايمرات أُعدت لتشخيص الأنواع المختلفة منها. لذلك يُمكن استعمال RT-PCR لتشخيص الـ HIV الموجود في دم المريض وبالتالي مُلائمة الدواء المناسب له.

توجد أهمية كبيره جدًّا لاستعمال الـ PCR في مجال تشخيص الأمراض الوراثية- الطبية، حيث يُمكننا فحص كون شخص معيّن يحمل طفرة وراثية مسؤولة عن مرض وراثي مُعيّن، كذلك يمكننا فحص احتمال تطوّر مرض مُستقبلي مُعيّن لدى الجنين كنتيجة لطفرة وراثية ورثها من والديه. من المعروف أيضًا ان هذه الفحوصات الوراثيّة تعتمد على معلومات مسبقة تتغير من مرض لآخر.

الفحص الوراثي بواسطة "المضاعفة المشروطة بوجود طفرة"

ما هي المُعطيات والطرق المُتاحة أمام المُشخصين الوراثيين؟ سنركّز على حالة خاصة تقوم بتشخيص مرض التليف الكيسي (Cystic Fibrosis CF-)، يعاني المريض في هذا المرض من إفرازات لزجة في مجرى التنفس ومن صعوبات في التنفس، يتميّز المرض بتطوّره عند الاشخاص الحاملين لطفرات في كلا أليلي جين CETR. التليف الكيسي هو مرض وراثي مُتنحي (حتى يعاني الشخص من المرض يجب أن يحمل نسختين غير سليمتين للجين المسؤول عنه)، عند وجود طفرة وراثية نقطية في نوكليوتيد واحد في كل واحد من أليلي جين CFTR يتمّ إنتاج بروتين CFTR تالف.

بعد سنوات عديدة من البحث الذي تمّ خلاله فُحص مئات المرضى، ظهر أنَّ هناك 29 نوع من الطفرات الوراثيّة النقطيّة في هذا الجين. لهذا نستنتج أنَّ كل شخص حامل للمرض - يُعتبر سليم من الناحية السريرية - لديه في احد أليلات الجين

التليف الكيسي هو أحد الأمراض الوراثية الأكثر شيوعاً، حيث تصل نسبته في مجموعات سكانيّة مُعينة إلى مريض واحد من بين كل 2500 شخص تقريبًا. يتم توريث المرض بشكل متنحي: فالمرض موجود لدى الأشخاص الذين تتواجد لديهم طفرة في كِلا أليلي الجين المسؤول عن المرض. الجين CFTR المسؤول عن وجود المرض يُشفِّر الى بروتين CFTR الموجود في غشاء الخلية. بروتين CFTR مسؤول عن مرور أيونات الكلور المُهمة لأداء الخلايا السليم. عدم وجود البروتين السليم يشوش بشكل خاص عمل الخلايا التي تُبطِّن أنابيب الرئة، لهذا السبب تتراكم طبقة مُخاطيّة سميكة في رئتي مريض التليف الكيسي، الأمر الذي يُؤدي إلى صعوبات في التنفس. المادّة المُخاطية تؤدّي إلى تكاثر البكتيريا بسهولة مما يؤدّي إلى حدوث التهابات متكرّرة في الرئتين.

CFTR، أي واحدة من بين 29 الطفرات الممكنة. يكون الأليل الثاني سليمًا عند الشخص المعرّف كحامل للمرض. الاستشارة الوراثيّة الناجعة هي تلك الاستشارة التي تساعد على تحديد ما إذا كان أحد الوالدين حاملاً لأليل طافر. إذا كان كِلا الوالدين حاملان للمرض على الاستشارة الوراثيّة أن تطلب من الأهل إجراء فحص وراثي للجنين في المراحل المبكرة من الحمل، حيث يتمّ فيه فحص حصول الجنين على زوج أليلات المرض من كلا والديه، عندما يكون الأمر كذلك، من المعتاد إجهاض الجنين.

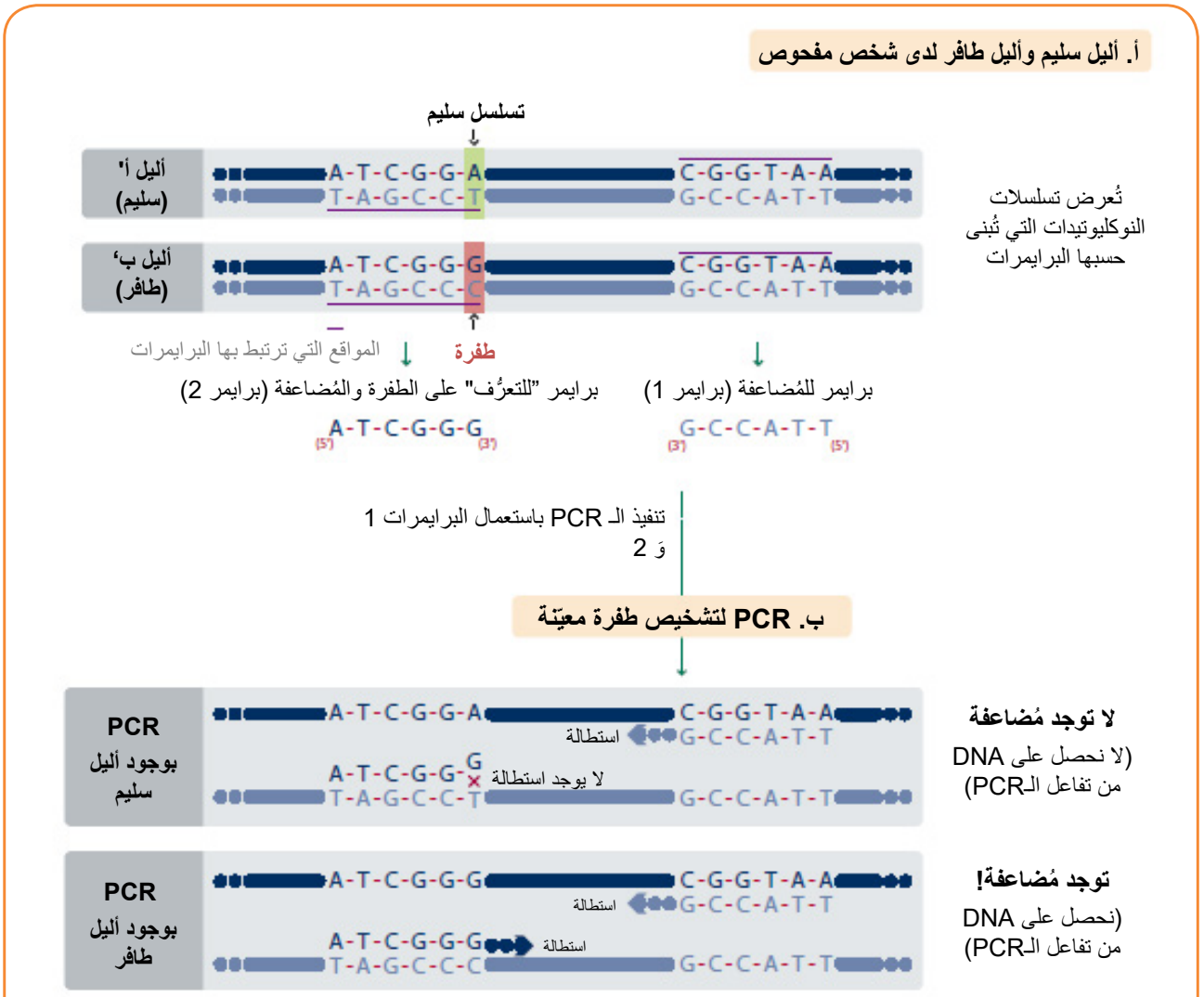
ما هي النواحي التقنية لإجراء فحص وجود طفرة في أليلات الجين المسؤول عن مرض التليف الكيسي؟ نركّز هنا على إحدى الطُرق السريعة التي طُوّرت لتشخيص طفرة نقطية ذات مُميزات معروفة مُسبقًا وموجودة في مواقع مُعيّنة، وذلك باستعمال تفاعل الـ PCR. هذه الطريقة تُمكّن من مُضاعفة الـ DNA في الحالات التي توجد فيها طفرة فقط، تُعرف هذه الطريقة باسم **"مضاعفة مشروطة بوجود الطفرة"**. تمّ تلخيص المبادئ التي تعتمد عليها الطريقة في الرسم 6.5. من أجل المُضاعفة المشروطة بوجود طفرة يتمّ استعمال برايمر خاص ذا تسلسل مناسب لتسلسل موجود في الأليل الطافر، يتمّ استعمال برايمر بحيث يحتوي الطرف 3' التابع له على القاعدة المكمّلة للقاعدة التي تُميّز التسلسل الطافر، والبرايمر الآخر مُشتق من التسلسل السليم (تعريف التسلسل السليم هو ذلك التسلسل الذي لم يتمّ فيه تشخيص طفرات ابدًا عند المرضى بهذا بالمرض).

في المثال الموجود في الرسم 6.5، لدى المفحوص أليل سليم وَ أليل طافر، لذا فإنَّ هذا الشخص "حامل للمرض". ناتج الـ PCR يَنْتُج، فقط، من DNA مصدره من النسخة التي تحتوي على طفرة، بالرغم من أنَّه تمّ تصميم البرايمر ليتعرف على أليل طافر، إلّا أنَّه يرتبط بالأليل السليم أيضًا، لكّن هذا الارتباط لا يكون كاملاً، والإنزيمDNA بوليميراز لا يستطيع أن يرتبط بالطرف 3' للبرايمر، ولا يستطيع اطالته، لأنّ هذا الطرف الهام غير مرتبط بجديلة الـDNA (رسم 6.5).

ماذا يجب علينا أن نعمل حسب هذه الطريقة لنحدّد ما إذا كان الشخص لديه أليل طافر، أي أنّه حامل لمرض التليف الكيسي. حسب طريقة تفاعل الـ PCR المشروط بوجود طفرة، يجب استعمال 29 زوج من البرايمرات، بحيث أن كل زوج منها صُممّ للتعرُّف على طفرة معيّنة موجودة في موقع محدّد. لكن هل هناك حاجة لـ29 تفاعل PCR مُنفرد عندما نستعمل DNA تابع لشخص مُعيّن؟ الجواب هو لا، يُمكننا بالتأكيد ادخال أكثر من زوج واحد من البرايمرات التي أُعِدَّت لتشخيص الطفرات إلى داخل أنبوب اختبار واحد وعندها يُعرّف تفاعل

الـ PCR باسم **Multiplex PCR** (أي أنَّ تفاعل الـPCR بإمكانه مُضاعفة أكثر من مقطع DNA واحد في أنبوب اختبار واحد، في الوقت ذاته). من أجل فحص الطفرات في جين CFTR، يتمّ استعمال أربعة أنابيب اختبار (أي أربعة تفاعلات في أربعة انابيب)، وفي كل أنبوب يوجد مجموعة فرعيّة من الـ 29 زوج من البرايمرات (مثلًا: 7 أزواج من البرايمرات بحيث أن كل زوج يفحص وجود طفرة معيّنة مُختلفة في أنبوب واحد، 8 أزواج من البرايمرات في الأنبوب الثاني وهكذا دواليك).

في حال عدم الحصول على ناتج PCR لشخص معيّن، فإنّه يُعدّ شخصًا سليمًا، أي غير حامل للمرض، ولكن هذا الأمر يبقى مشكوكًا بمصداقيّته ما دمنا لم نحصل على تأكيد بأن تفاعل الـPCRعمل كما يجب، أيْ وُجدت عيّنة DNA كافية من الشخص، الانزيم المستعمل سليم، الخ. من أجل فحص عمل تفاعل الـ PCR بشكل سليم يتمّ إجراء ضابط إيجابي، وإلى كل أنبوب اختبار يتمّ ادخال زوج من البرايمرات يؤدي إلى مُضاعفة الـ DNA في حالة كون الـ DNA سليم أو طافر، ولإنتاج مثل هذا المقطع يتمّ استعمال برايمرات تُناسب مقاطع لم يتمّ فيها تشخيص طفرات أبدًا من قبل.

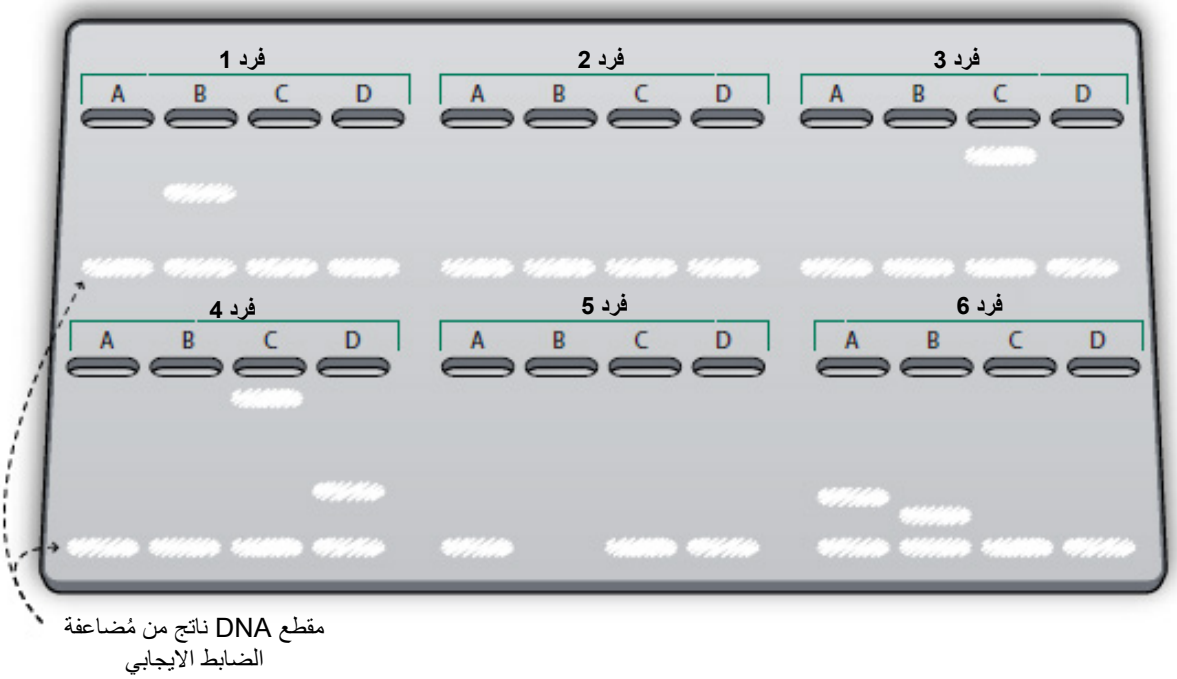


الرسم 6.5: تشخيص وجود طفرات بواسطة تفاعل PCR عن طريق المُضاعفة المشروطة بوجود طفرة

طريقة المُضاعفة المشروطة بوجود طفرة تُمكِّن من الحصول على عدد كبير من نسخ الـ DNA بواسطة تفاعل الـPCR فقط إذا احتوى تسلسل الـ DNA على طفرة. لهذا الهدف يتمّ استعمال برايمر، بحيث يكون الطرف 3' له عبارة عن القاعدة المُكمّلة للقاعدة الموجودة في الأليل الطافر. **بقية الرسم في الصفحة التالية.**

نقوم بفصل نواتج الـ PCR الناتجة من كل شخص بواسطة الجل في أربعة أعمدة فصل، في كل عمود يجب علينا أن نجد خطًّا واحدًا على الأقل، هذا هو الخطّ الناتج عن الضابط الإيجابي ولا يدلّ على طفرة وراثيّة. إذا وُجد خطّ إضافي من الـ DNA في أحد الأعمدة فهو يُشير إلى وجود طفرة في أحد الأليلات. يتمّ تصميم البرايمرات الموجودة في نفس الأنبوب بحيث أن كل زوج من البرايمرات يمكِّن من مضاعفة مقطع خاص من الـ DNA له طول مُحدّد، لهذا فإنّ طول معيّن لمقطع الـ DNA يدلّ على طفرة محدّدة ومعروفة. كل مقطع بإمكانه قطع مسافة خاصة به في الجل، وبحسب المسافة التي يقطعها المقطع الناتج يمكننا تحديد طول المقطع وبالتالي تشخيص الطفرات المختلفة.

ج. نواتج تفاعل الـPCR المُشتقة من الجين CFTR، مصدرها من المُضاعفة العادية والمُضاعفة المشروطة بوجود طفرة



الرسم 6.5 تتمة: التعرُّف على الطفرات المُمكنة في الجين المُشفر لـ CFTR لدى أفراد مُختلفين بواسطة مُضاعفة مشروطة بوجود طفرة

تمّ استخلاص الـ DNA من أشخاص مُختلفين بهدف تشخيص الطفرات المُمكنة في الجين المُشفِّر لـ CFTR. تمّ استعمال أربع كميات من الـ DNA من نفس الشخص لمُضاعفة الـ DNA بواسطة تفاعل الـPCR في أربعة أنابيب مُختلفة. أُضيف إلى كلّ أنبوب (A,B,C,D) 8-9 أزواج من البرايمرات لهدفين: مُضاعفة كضابط إيجابي ومُضاعفة مشروطة بوجود الطفرة . لهذا الهدف تمّ استعمال زوج واحد من البرايمرات يُمكّن من الحصول على مقطع DNA دون علاقة بوجود الطفرة أو عدم وجودها (تجربة مُراقبة). بقية أزواج البرايمرات الموجودة في الأنبوب (7-8) هي خاصة بالأنبوب وغير موجودة في الأنابيب الأخرى. وقد أُعِدّت لتُمكّن من وجود مُضاعفة فقط في حال وجود طفرة من ضمن 7 أو 8 طفرات يتمّ فحص وجودها في الأنبوب الواحد. تفاعل PCR بوجود أكثر من زوج من البرايمرات يُدعى **Multiplex PCR**. يتمّ فصل نواتج تفاعل الـ PCR في الجل كما يُعرض في الرسم. جهاز التجربة الخاص الذي يقوم بإجراء التفاعلات الأربعة بنفس الوقت Multiplex PCR أُعِدّ ليفحص ما إذا كان الفرد يحمل طفرة واحدة أو اثنتين من بين 29 طفرة مُختلفة، في الجين CFTR، التي تتواجد لدى العشيرة السكانيّة. مثلًا: فرد 1 هو شخص يحمل طفرة في أليل واحد كما يُمكن أن نستنتج من وجود ناتج مُضاعفة مشروط بوجود طفرة في الأنبوب B.

سؤال 6.9

أُجري فحص PCR لعدّة أشخاص بهدف فحص وجود طفرة في أليلات الجين الذي يُسبب مرض التليف الكيسي. استعمل التقنيين الذين يعملون في المُختبر برايمرات مُعدّة للتعرُّف على الطفرات، ومكّنوا من حدوث عمليّة المُضاعفة بواسطة الـ PCR. استعينوا بالرسم 6.5ج، وحدّدوا أي من الأشخاص الذين تمّ فحصهم مريض، أي منهم سليم، وأيهم حامل المرض؟ ما هو عدد الطفرات المُختلفة التي ظهرت في نتائج الفحص الذي تُعرض نتائجه في هذا الرسم؟

سؤال 6.10

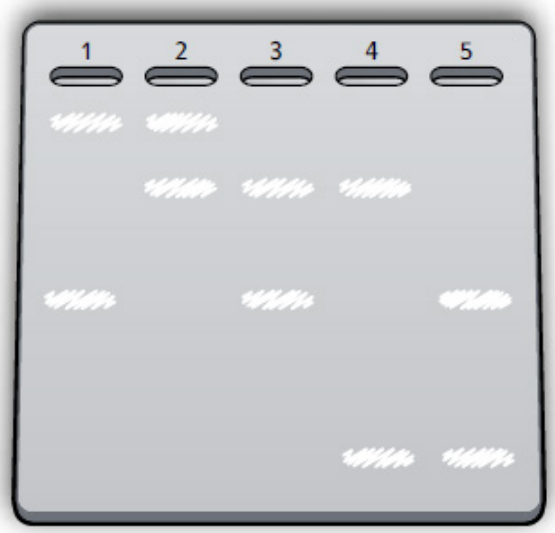
أنهيت تعليمك في مجال الهندسة الوراثيّة، سافرت في رحلة إلى إحدى مُدن أمريكا الجنوبية. في لقاء لك مع أحد زُعماء الجالية اليهودية في المكان عرفت أن أفراد الجالية يمتنعون عن أكل الهمبورغر في المطاعم المحليّة بحجة أنه مكوّن من لحوم حيوانات من المُحرّم عليهم تناول لحومها. بعد تفكير قصير، اقترحت على زعيم الجالية أن تُزوده بمعلومات يوميّة وموثوق بها عن الأماكن التي تُقدم الهمبورغر المكوّن من لُحوم من المسموح تناولها. وافق الزعيم على هذا الاقتراح بحماس، وأنت أسرعت لتأسيس شركة محدودة الضمان، شركة "الهمبورغر السعيد"

1. ما هي الاستراتيجيّة التي تنصح شركة "الهمبورغر السعيد" باختيارها لتنفيذ الفحوصات على عيّنات من الغذاء، وما هي المعلومات التي تحتاجها للقيام بهذه الفحوصات؟
2. ما هي الأدوات اللازمة لتنفيذ الفحوصات؟
3. ما هو الضابط الإيجابي والسلبي الذي ستستعمله خلال إجراء الفحوصات في جهاز التجربة؟
4. هل ستستفيد الطائفة الارثوذكسية من خدمات شركة "الهمبورغر السعيد"؟

سؤال 6.11

يجري تحديد القرابة العائلية بشكل عام، وتحديد الأبوة بشكل خاص بواسطة تفاعل PCR يقوم بمُضاعفة تسلسل STR .

1. اشرحوا ما هي المبادئ والتقنيّات التي تُمكن من الاستعانة بـالـ STR للأفراد المُختلفين لتحديد القرابة العائليّة بينهم؟



رسم س'6.11: جل يعرض مقاطع DNA عبارة عن نواتج تفاعل PCR لمقاطع STR

2. في رسم س'- 6.11 تُعرض نتائج فحص STR مُعيّن لدى عائلة مُعيّنة. يصف الرسم جل يحوي مقاطع الـ DNA الناتجة بعد مُضاعفة الـ DNA بواسطة الـPCR. نرى في الرسم نتائج فحص STR أجري لأم وأربعة من أبناءها. في أي واحد من الأعمدة تُعرض نتائج الـ STR التابع للأم ؟ وفي أيها تُعرض النتائج التابعة للأولاد؟ اشرحوا إجاباتكم.
3. ارسموا بجانب رسم س'- 6.11، عمود إضافي تعرضون فيه الأليلات الناتجة في تفاعل الـ PCR للـ STR الموجود لدى الأب؟ اشرحوا كيف حدّدتم ذلك؟

سؤال 6.12

عند بعض الأهل يكون أليل جين معيّن طافر ("أليل طافر فيه طفرة، أليل معطوب"). إذا وُجد هذا الأليل في الخلية المنوية و/أو في خلية البويضة من المُمكن أن يؤدّي في حالات مُعيّنة إلى مرض عند الأبناء. في أيامنا، يُمكن في بعض الحالات منع ولادة أطفال مرضى عن طريق الإخصاب داخل الأنابيب وإجراء فحص PCR. بالفعل، بالإمكان إجراء إخصاب أنابيب والحصول على جنين من 8 خلايا، ويُمكن أخذ إحدى هذه الخلايا من أجل القيام بالمُضاعفة بواسطة الـ PCR، وفحص وُجود طفرات لدى الجنين. بحسب النتائج التي تظهر يتمّ اتخاذ القرار بزرع الجنين المكوّن من سبعة خلايا في رحم الأم أو عدم القيام بذلك. يجب أن نوضّح أنّ نقص خلية واحدة لا يؤثر على تطوّر الجنين في المستقبل. إذا كان لدى أم سليمة أليل معطوب لجين مُعيّن على أحد كروموسومات X الموجودة لديها، يوصى بإجراء فحص لتحديد جنس الجنين، لأنّه في حالة كون الجنين ذكرًا ((XYيولد طفل مريض. من المُفضّل إجراء فحص جنس الجنين بأسرع وقت مُمكن، من المُمكن أيضًا أن يتمّ إجراء الفحص بعد الإخصاب داخل الأنبوب مباشرة، وقبل زرع الجنين داخل الرحم. يتمّ ذلك بواسطة الـPCR بمُساعدة برايمرات مُكمّلة لتسلسلات مُميّزة موجودة فقط على كروموسوم Y. وهكذا بالإمكان التعرّف على الذكور من بين الأجنة الموجودة، في هذه الحالة الخاصة المعروضة هنا هي أجنة مريضة. يُطلق على هذا النوع من الأمراض اسم الأمراض المرتبطة بكروموسوم x.

1. اذكروا ما هي المعلومات والمواد الضرورية للفحص الذي يهدف لتحديد الأجنة المريضة بمرض مرتبط بكروموسوم x.
2. ما هي مراحل فحص وجود طفرة مرتبطة بكروموسوم x لدى جنين، مكوّن من 8 خلايا، نَتَج من بويضة تابعة لأم حاملة للطفرة؟ بكلمات أخرى، ما هي مراحل تشخيص جنس الجنين لدى جنين مكوّن من ثمانية خلايا؟
3. عائلة لديها ثمانية بنات، لدى الأب رغبة شديدة بإنجاب مولود ذكر- هل توفرون له خدمات لتشخيص جنس الجنين قبل زرع الجنين في رحم الأم لضمان ولادتها مولودًا ذكرًا؟ اذكروا اعتبارات طبية، أخلاقية ونفسية (...) تؤيد وتُعارض هذا التشخيص.

النقاط الأساسيّة في الفصل

أدوات في" صندوق الأدوات"

- DNA بوليميراز مُقاوم للحرارة
- أوليجو- نوكليوتيدات تُستعمل كبرايمرات
- DNA
- جهاز الـ PCR

أُسس وعمليّات

- فصل الجدائل
- ارتباط البرايمرات
- بناء DNA بواسطة DNA بوليميراز
- المراحل الثلاث لدورة المضاعفة
- PCR
- عمليّة RT-PCR ثُنائيّة المراحل
- مُضاعفة مشروطة بوجود طفرة

موادّ

- نوكليوتيدات
- أيونات مغنيسيوم وبوفر

مُصطلحات

- دورة مُضاعفة
- مُضاعفة (مُفاقمة) (Amplification)
- أليل (Allele)
- حامل (أليل معطوب)

أسس

- مُضاعفة مُتكررة في أنبوب الاختبار
- استنساخ في أنبوب اختبار دون الحاجة إلى مكتبات
- ارتباط البرايميرات مُتعلق بتكميلها للقواعد

أُسماء ومُصطلحات

- STR
- Multiplex PCR
- فيروس الـ HIV المُسبب للإيدز
- مرض التليّف الكيسي
- جين CFTR

تطبيقات

- استنساخ بواسطة تفاعل PCR بسهولة وسرعة
- استنساخ من جديد بواسطة تفاعل الـ PCR بهدف تشخيص الطفرات
- استنساخ بواسطة تفاعل الـ PCR بهدف التعبير عن الجينات
- تفاعل الـ PCR لتشخيص كميّة وجودة الـ RNA
- تفاعل PCR لمُضاعفة الـ SRT بهدف التشخيص الوراثي والتشخيص الجنائي
- تفاعل الـ PCR لتشخيص مُسببات أمراض مُعيّنة
- تفاعل الـ PCR لتشخيص سريع لطفرات نموذجيّة بواسطة مُضاعفة مشروطة بوجود طفرة
- ARMS-Amplification Refratory Mutation) (system
- تفاعل PCR للتشخيص الوراثي للأجنة قبل زرعها في الرحم

تشخيص التعبير عن الجينات ونواتجها

استنساخ جين هو خطوة ضرورية لربطه بوظيفة أو وظائف معينة. في بعض الأحيان تكون عمليات الكشف عن وظائف الجين طويلة. في الفصل الخامس تمّ عرض الأساليب المتبعة اليوم لتحديد وظائف الجين. كما جاء هناك، إذا وجد تشابه بين جزء من تسلسل الجين المستنسخ وجزء من تسلسل جين آخر له وظيفة معروفة، يمكن أحيانًا تخمين بعض وظائف الجين المدروس. كذلك طفرات في الجين المسؤولة عن تغيّرات في الخلية وفي الكائن الحي، كما في حالة الجين المسؤول عن التليف الكيسي، تساهم في فهم وظائف الجين. ولكن في العديد من الجينات لم يتمّ إيجاد طفرات مسببة للمرض، ومقارنة التسلسل الخاص بهم مع تسلسل جينات أخرى لا يساعد في التنبؤ بوظائفها الممكنة. في مثل هذه الحالات، من المهم استخدام تشخيص تعبير الجين لمحاولة ربط الجين بوظيفة الأولية.

يقولون عن الجين أنّه يتمّ التعبير عنه عندما يَنْتُج منه RNA في الخلية. يتمّ تعريف التعبير عن جين مشفّر لبروتين على أنّه وضع يتمّ فيه تكوين RNA وبروتين الجين داخل الخلية. الاهتمام الكبير الذي يميّز التعبير عن الجينات هو أنّ التعبير عن الجين قد يكون موجودًا فقط في بعض خلايا الكائن الحي، وأحيانًا في توقيت محدد فقط. من أجل تشخيص تعبير جين، من المهم التحقق في أي خلايا يتمّ التعبير عن RNA وبروتين الجين المحدّد وتحديد متى أو استجابة لما يعبر عن الجين. أخيرًا يسأل عن شدة التعبير عن الجين. الإجابة عن هذه الأسئلة تجعل من الممكن فهم بعض وظائف الجينات.

تعرض الخلية لأشعة الشمس يسبب تفاعلات جزيئية داخل الخلايا. وبالتالي ، في أعقاب الإشعاع ، تنتج إشارة أولية في الخلية مما يؤدي إلى تنشيط عوامل نسخ. تسمح عوامل النسخ ذات الصلة للخلية بإنتاج RNA وبروتينات معينة ضرورية للخلية للتعامل مع الحالة الجديدة. هذا التغيير في التعبير الجيني قد يسمح في بعض الحالات بالحماية من أضرار الإشعاع. من ناحية أخرى ، إذا تضررت الخلية بشدة ، فإن التعبير عن جينات أخرى التي تسبب منتجاتها موت الخلية يزداد.

وهكذا مثلًا، من أجل فهم وظائف جين معيّن في النباتات، تمّ طرح السؤال حول مكان التعبير عنه: هل فقط في جذور النبات أم في الأوراق أيضًا؟ بالإضافة إلى ذلك، أجري بحث حول السؤال كيف يمكن أن تتغير شدة التعبير عن الجين في ظروف الجفاف مقارنةً بالحالة التي لا يوجد فيها نقص في الماء (مسألة توقيت التعبير)؟ عندما وجد أن مستوى التعبير عن الجين المعين ترتفع في ظروف الجفاف، كان من الممكن التكهن أن الجين يشفر لبروتين يعطي النبتة المقدرة على الصمود في الجفاف. بالنسبة لجين آخر من الثدييات سؤل السؤال عما إذا كان يتمّ التعبير عنه في نوع معين من الخلايا فقط (على سبيل المثال ، إذا كان التعبير عنه يقتصر على خلايا الدم، الكبد أو البنكرياس)، وإذا كان التعبير عن الجين يزداد عند ارتفاع مستوى السكر في محيط الخلية. بشكل مشابه، إذا وجد أن جين معين يتم التعبير عنه فقط عندما تبدأ الخلايا بالتمايز إلى خلايا عضلية ، من المحتمل جدًا أن يكون لهذا الجين دورًا في تمايز الخلايا الى خلايا عضلية.

يُعرَّف تعبير جين يشفر لبروتين في خلية بأنه حالة يتكون فيها الـ RNA والبروتين الخاص به. لا يتمّ التعبير عن جميع الجينات في خلية معينة وفي وقت معين. من أجل التحقيق في وظائف الجين، من المعتاد أن نسأل عن الخلايا التي يتمّ التعبير فيها عن الجين، متى وبأي شدة؟ على سبيل المثال، قد يكون للجين الذي يعبر عنه بشدة مرتفعة في خلايا عند تعرضها لضائقة (Stress)، دورًا يسمح للخلية بالتغلب على الضائقة.

ممّا ذُكر هنا يَنْتُج أنّ تشخيص التعبير عن جين وبضمن ذلك تشخيص موقع، توقيت، وشدة التعبير، قد توفر معلومات أساسية حول الوظائف المحتملة للجين في الخلية والكائن الحي.

في بعض الأحيان، بدلاً من معلومات مفصلة حول جين واحد، هناك حاجة لمعلومات يتم بها مقارنة التعبير عن جينات متعددة في نفس الوقت. على سبيل المثال، إذا تمّ فحص خلية سرطانية معينة، يجب أن يُطرح السؤال: ما هي الجينات التي ازداد أو انخفض التعبير عنها في الخلية السرطانية مقارنة بالخلية الطبيعية؟

المعلومات التي تقارن مدى التغيير في التعبير عن جينات متعددة يمكن أن تعلم شيئا عن عملية السرطان والجينات المتعلقة به. مثال آخر هو أخذ خلايا، تعريضها لأشعة UV (كالموجودة في أشعة الشمس) والسؤال: من هي الجينات التي تم تغيير التعبير عنها بسبب التعرُّض للأشعة؟ يمكن الافتراض أنّ بعض الجينات التي تغيّر التعبير عنها في أعقاب التعرُّض للأشعة ضرورية للخلية لمواجهة مع وضع الضائقة (Stress) الذي حدث بعد التعرُّض للأشعة. قد يكون الجين الذي يشترط التعبير عنه بالتعرُّض للأشعة "جينًا مهمًا"، وقد يساهم بحثه في فهم الآليات التي توفر الصمود للأشعة. في أعقاب معلومات المستمدة من التشخيص الموازي للتعبير عن عدة جينات، يمكن التركيز على التعبير عن جين معين وإجراء دراسة أخرى قد تؤدّي إلى إيجاد العديد من الوظائف الأخرى لهذا الجين في الخلية والكائن الحي.

يتناول هذا الفصل الأبحاث التي تهدف الى تشخيص التعبير عن جينات. يتطلب تشخيص التعبير فهم عمليات مراقبة التعبير (الفصل 1). باختصار، مراقبة التعبير عن جين معيّن يحدّد مقدار الـ RNA، إنْ وجد، الذي سيتمّ إنتاجه في ظروف معينة من الجين المحدّد. تُحدّد آليات مراقبة إضافية ما سيحدُث للـ RNA الناتج، وخاصة وتيرة تحلله، وما إذا كان البروتين الناتج سيبقى طويلاً في الخلية أو يتفكك بسرعة.

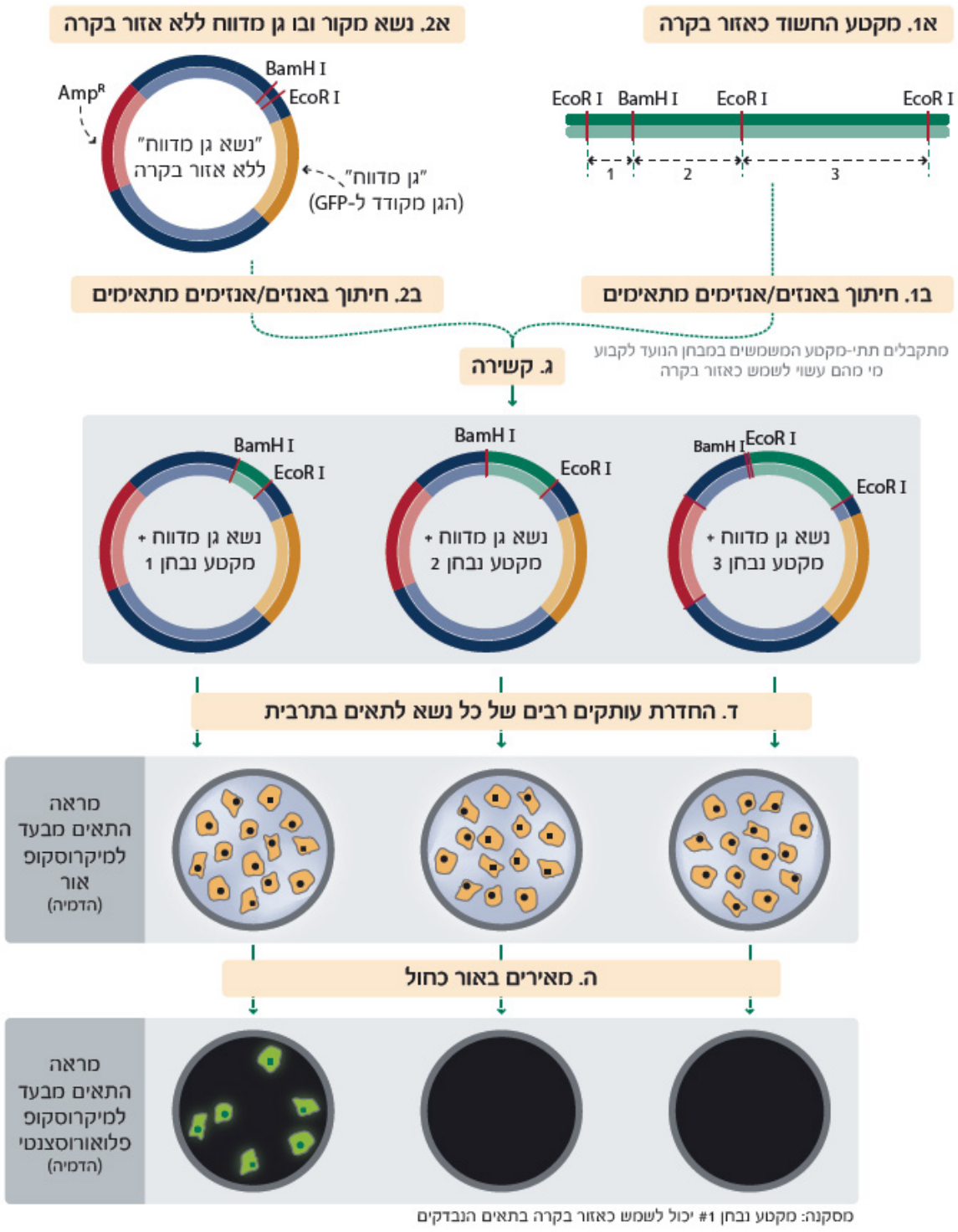
يركّز الفصل على المبادئ والأساليب المستخدمة لتشخيص التعبير عن جينات، أي كيف يتمّ تحديد الكمية النسبية لـ RNA وبروتين في خلية معينة، في حالة معينة. يوضح الفصل أن الهندسة الوراثية ضرورية لدراسة مراقبة التعبير وتشخيص التعبير عن جينات ونواتجها، وأن تشخيص التعبير قد يكون له آثار بحثية وطبية وبيوتكنولوجية مهمة.

تشخيص التعبير عن الجينات في مستوى الـ DNA

يتطلب التعبير عن جين عملية متعددة المراحل، والنسخ هو المرحلة الأولى. لكل جين يوجد منطقة مراقبة خاصة به مع مواقع ربط بعوامل النسخ خاصة. ربط عامل نسخ خاص بموقع ربط معين في موقع المراقبة للجين قد يسمح بالتعبير عنه، أي يمكن نسخه فيَنْتُج RNA (الفصل 1.) لا يمكن العثور على عامل النسخ الفريد إلا في أنواع معينة من الخلايا في وقت معين. لهذه المعطيات أهمية بالنسبة للأسئلة ما إذا سيتمّ نسخ الجين المدروس وما إذا سيَنْتُج منه RNA، وإذا كان الأمر كذلك - في أي خلية وفي أي توقيت (سؤال أين ومتى). لفهم لماذا، أين، ومتى يتمّ التعبير عن جين، يجب تحديد هوية عوامل النسخ التي ترتبط بمنطقة المراقبة. لهذا الهدف يجب أولا تحديد أين تبدأ منطقة المراقبة في الـ DNA وأين تنتهي؟

لتحديد حدود منطقة المراقبة، يستخدمون أساليب الهندسة الوراثية لاستنساخ أجزاء صغيرة من المنطقة التي يمكن أن تكون منطقة مراقبة. في المرحلة التالية يسألون، ما هي الأجزاء الصغيرة من منطقة المراقبة التي من المحتمل أن تسمح بنسخ الجين؟ للحصول على إجابة مباشرة عن هذا السؤال ، من الممكن استخدام ناقل يحتوي على "جين مخبر" (Reporter gene) جين مخبر معدّ لتشخيص تعبير هو جين بدون منطقة مراقبة خاص به، ووظيفته هي "الإبلاغ" عما إذا كانت قطعة تقع بجواره تعمل كمنطقة مراقبة (الشكل 7.1). جين مخبر نموذجي هو مقطع DNA يشفّر لبروتين قادرًا على إعطاء لون للخلية التي يتمّ التعبير عنه فيها. مثال على جين مخبر هو مقطع DNA يشفّر لـ GFP (Green Fluorescent Protein) وإذا تمّ التعبير عن GFP في الخلية، فستشع هذه الخلية اللون الأخضر.

عامل النسخ هو بروتين يرتبط بجزء من الـ DNA في جين يعمل كمنطقة مراقبة. يسمح عامل النسخ للـ RNA بوليميراز بنسخ الجين (لإنتاج RNA رسول). لتحديد مناطق الجين التي تعمل كمنطقة مراقبة، يتمّ استخدام أقسام مختلفة من الجين وإدخال كل منها على حدة في ناقل يحتوي على جين مخبر (الشكل 7.1). اذا حصل تعبير عن الجين المخبر، يَنْتُج في الخلايا بروتين له لون، وعندها يمكن التحديد أنّ مقطع الـ DNA الذي تمّ فحصه هو منطقة المراقبة (الشكل 7.1).



رسم 7.1: استخدام "الجين المخبر" لإيجاد مقطع الـ DNA الذي يشكّل منطقة مراقبة.

"جين مخبر" يشيروجود منطقة مراقبة فعّالة، لأنّ منطقة المراقبة تُتيح نسخ الجين المخبر. بعد النسخ يَنْتُج "بروتين مضيء" يشفر له الجين المخبر. هذا البروتين يُعطي لون خاص للخلية. الجين المخبر في هذا الرسم هو مقطع DNA يشفر لبروتين GFP (Green Fluorescent Protein) يؤدّي وجوده في الخلية إلى إشعاع اللون الأخضر من الخلايا التي تعرّضت لاضاءة زرقاء.

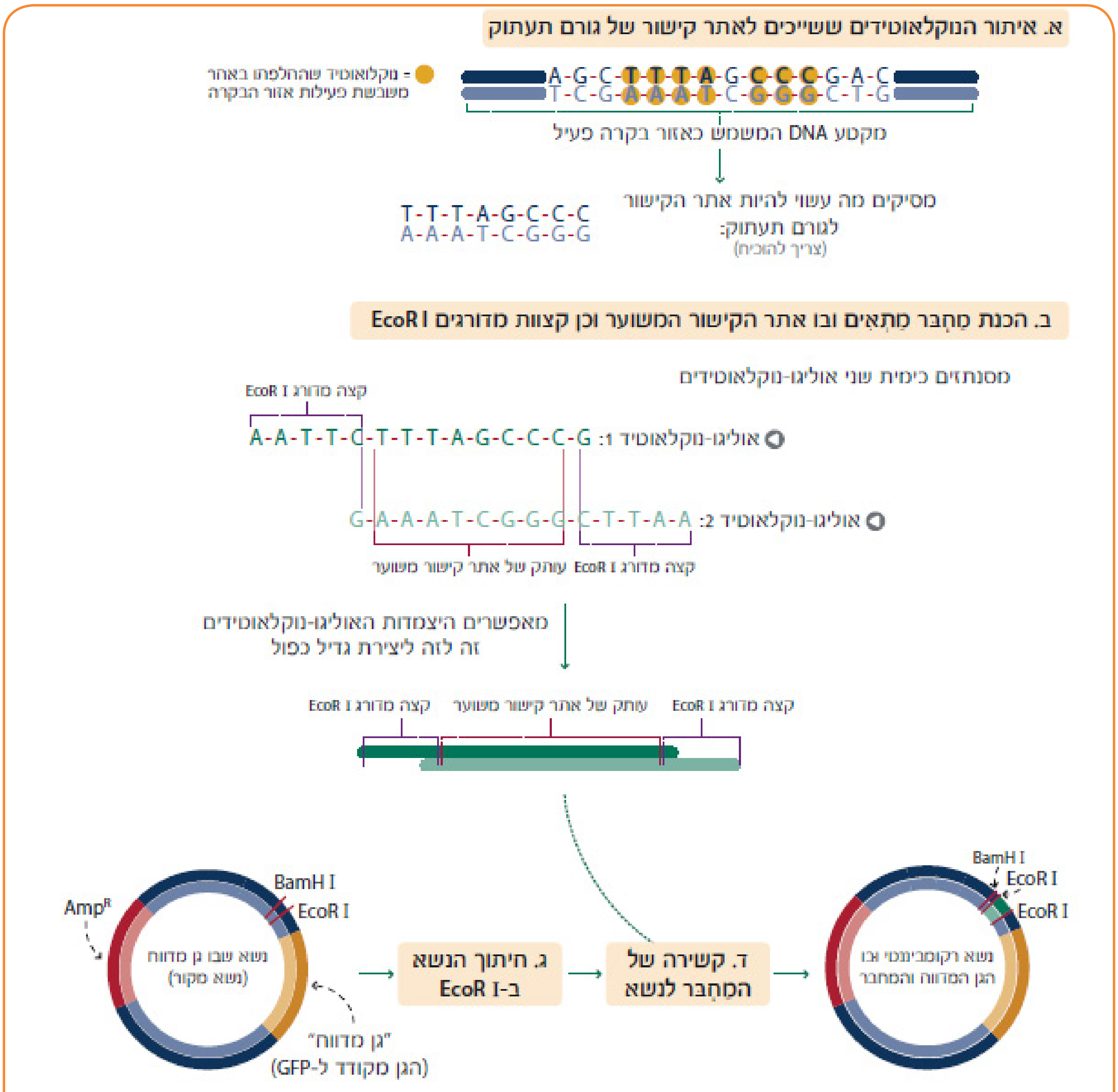
لا تعمل منطقة مراقبة معينة بالضرورة في جميع الخلايا المختلفة في الكائن الحي، وتعتمد وظيفتها في تعبير RNA بشكل أساسي على وجود عامل النسخ في الخلية التي تمّ فحصها. في منطقة المراقبة، لا يعمل معظم التسلسل في التحكم في التعبير عن الجين. وبالتالي، فإنّ الجزء ذي الصلة من منطقة المراقبة المسؤول عن التعبير عن الجين هو موقع الارتباط بعامل النسخ.

لأنّه لا يوجد منطقة مراقبة على الناقل الأصلي الذي يحتوي على الجين المخبر (الشكل 7.1 أ 2)، فإنّ إدخال هذا الناقل في الخلايا لن يؤدّي إلى تعبير الجين المخبر، وتبقى هذه الخلايا عديمة اللون. كما هو مبين في الشكل 7.1، من أجل تحديد مقطع DNA قد يكون بمثابة منطقة مراقبة النسخ، يمكن إدراج مقاطع DNA مختارة في الناقل الأصلي على مقربة من الجين المخبر. في المرحلة التالية يتمّ إدخال كل بلازميد ريكومبيننتي ناتج في خلايا، ويسألون عما إذا كان يتمّ التعبير عن الجين المخبر. إذا تمّ التعبير عن الجين وتوهجت الخلايا باللون الأخضر، فإنّ الجزء الذي تمّ فحصه يعمل بالفعل كمنطقة مراقبة للنسخ في الخلايا التي يتمّ فحصها. في المقابل، إذا لم يتمّ التعبير عن الجين المخبر وبقيت الخلايا عديمة اللون، فإنّ المقطع المدرج غير قادر على أن يكون منطقة مراقبة للنسخ في الخلايا التي تمّ فحصها. ومع ذلك، قد يعمل المقطع الذي تمّ فحصه كمنطقة مراقبة في خلايا أخرى أو في ظل ظروف أخرى تتواجد فيها عوامل النسخ ذات صلة بوظيفته.

في مقطع الـ DNA الذي يعمل كمنطقة مراقبة كالمقطع المدروس 1 في الشكل 7.1 ، هنالك مقطع أصغر يرتبط به عامل النسخ ويسمّى أيضًا "موقع الربط". لتحديد تسلسل موقع الربط، يفحصون النيوكليوتيدات التي يؤدّي تبديلها بآخرين إلى فقدان مقدرة التعبير عن الجين. كما هو مبين في الشكل 7.2 أ ، من المنطقي الافتراض أن نوكليوتيد حرج كهذا يشكل جزء من موقع ربط عامل النسخ. موقع ربط كهذا لعامل نسخ خاص هو عبارة عن تسلسل DNA فريد من 6 إلى 20 نوكليوتيد. تجدر الإشارة إلى أنه في خلية نموذجية هناك المئات من عوامل النسخ الفريدة. يحتوي كل جين على مجموعة محدّدة من مواقع الربط الفريدة الموجودة في منطقة المراقبة الخاصة به والتي تربط عوامل النسخ الخاصة (انظر الشكل 7.7).

من المتبع التحقق من الموقع الدقيق الذي يرتبط به عامل نسخ معيّن باستخدام رابط. الرابط (linker) عبارة عن جزء قصير من الـ DNA يتمّ إنتاجه من اوليجو- نوكليوتيدين يحتويان على تسلسل مكمل (الشكل 7.2). يمكن ربط الرابط بقسم DNA آخر. للأغراض الموضحة هنا ، يتم بناء أوليجو-نوكليوتيدات ويكونون منها رابط يحتوي على نسخة من التسلسل المشتبه في أنه يتمكن من ربط عامل النسخ. كما هو مبين في الشكل 7.2 ب ، يدمجون رابط كهذا بالقرب من الجين الذي يشفر لـ GFP. يتم إقحام الناقل الريكومبيننتي في الخلايا ويختبرون ما إذا كان التسلسل الذي يحتويه الموصل يسمح بظهور اللون الأخضر في الخلايا. في هذه الحالة، يستنتج أن الرابط يحتوي على تسلسل DNA يعمل كموقع ربط لعامل النسخ.

موقع الربط لعامل النسخ هو تسلسل محدّد وقصير من النيوكليوتيدات (طول 6-20 النيوكليوتيدات) الذي يرتبط به عامل النسخ الخاص. تحتوي منطقة مراقبة نموذجية على عدد كبير من مواقع الربط لعوامل النسخ المختلفة. للعثور على موقع ارتباط، يستعينون بعملية إنتاج طفرات في الـ DNA في المنطقة التي قد تكون موقع ارتباط (الشكل 7.2 أ) ويفحصون تأثير هذه الطفرات على وظيفة مقطع الـ DNA.



الشكل 7.2: التحقق من وجود موقع ارتباط لعامل نسخ باستخدام رابط مناسب على مقربة من جين مخبر.

أ. عند دراسة منطقة تحكم معينة، من الممكن إحداث طفرات في النوكليوتيدات التي يُعتقد أنها ضرورية للربط بعامل النسخ. وبالتالي، يمكن بدء عملية لتحديد الموقع الدقيق الذي يرتبط به عامل النسخ.

ب. عندما يريدون التحقق مما إذا كان يمكن استخدام تسلسل معيّن كموقع ارتباط لعامل النسخ، يمكنك إنتاج رابط مناسب بتسلسل موقع الارتباط التقريبي. في المرحلة الأولى، يتمّ استخدام اثنين من الأوليجو - نوكليوتيدات لإنشاء رابط. يحتوي الرابط في هذا الرسم التوضيحي على أطراف لاصقة من EcoR I والتي يمكن وضعها في الحامل مع الجين المخبر. من الممكن فحص ما إذا كان الرابط مع موقع الارتباط التقريبي يسمح بالتعبير عن الجين المُخبر في الخلايا. إذا كان الأمر كذلك، فهذا يكون اثبات لكون المقطع هو موقع ربط.

للتحقق من أن تسلسل معين هو بالفعل رابط لعامل النسخ، يمكنك استخدام الرابط. يتمّ بناء أوليجو - نوكليوتيدات، ويكونون منها رابط يحتوي على موقع الربط المتوقع، حيث يُدمج في ناقل بالقرب من الجين المخبر (الشكل 7.2 ب). عندما يتمّ العثور على موقع ارتباط فعال لعملية التحكم في النسخ، يسألون من هو عامل النسخ الذي يرتبط به؟

حتى الآن، تمّ التوضيح أنّه من أجل نسخ جين، هناك حاجة إلى ارتباط بعامل نسخ بالـ DNA في منطقة مراقبة الجين. لكن الخلية لا تحتوي على جميع عوامل النسخ التي يمكن للجينوم أن يشفرها، لذلك لا يتمّ التعبير عن جميع الجينات في الخلية. بالإضافة إلى ذلك، حتى لو تواجد في الخلية عامل نسخ ذو صلة، فليس من الضروري أن ينشط نسخ الجينات التي يمكنه الارتباط بموقع مراقبتها. تعمل بعض عوامل النسخ بطريقة مشروطة (conditional)، أي في ظل ظروف معينة فقط ، لذلك يوجد في الخلية عوامل نسخ معينة يجب أن يتمّ تنشيطها في مسارات لتوصيل الاشارات لكي تفعل نسخ جينات معينة. مسار كهذا يبدأ بـ "عامل أولي" معين موجود في الخلية أو في بيئتها الخارجية (على سبيل المثال هرمون) ، الذي يُنْتِج إشارة أولية يتمّ نقلها عن طريق العديد من البروتينات التي تتمثل مهمتها في نقل الإشارات إلى عامل النسخ. تؤدّي الإشارات في نهاية الأمر إلى ربط عامل نسخ فعّال بمواقع الارتباط في مناطق المراقبة في الجينات وإلى النسخ الذي يَنْتُج خلاله RNA لهذه الجينات. التعبير عن هذه الجينات يُتيح تغيير صفات الخلية المشروطة بـ"العامل الأولي".

تشخيص تعبير RNA

يعتمد التعبير عن جين معين على نوع الخلية والظروف السائدة في بيئتها. على سبيل المثال، يتمّ التعبير عن الجينات المشفّرة للأجسام المضادة فقط في خلايا الجهاز المناعي. قد تساعد المعلومات حول التعبير عن الجين، وخاصةً موقعه وتوقيته في تحديد وظيفته. على سبيل المثال، الجين الذي يتكون منه RNA عندما تبدأ الخلايا في الانقسام، قد يكون مشاركا في تنفيذ انقسام الخلايا.

عند تشخيص التعبير عن جين، من المهم أوّلًا تشخيص التعبير عن الـ RNA الخاص به، أي تشخيص كميته، وجودته وتوقيت التعبير عنه. ومع ذلك، من المهم أن نفهم أنّ كمية الـ RNA لجين معين تعتمد على عوامل أخرى إلى جانب وتيرة النسخ. ليس كالـ DNA الذي يتم حفظه كاملا خلال حياة الخلية وحتى يتمّ تصحيحه عند الضرورة، الـ RNA المنتج من جينات مختلفة في الخلية يُحفظ فقط لفترة زمنية محدودة. يتراوح زمن نصف عمر الـ RNA للجينات المختلفة من بضع دقائق إلى عدة أيام ، ويتحدّد بواسطة عوامل مختلفة (الفصل 1). قد يختلف زمن نصف العمر مع التغيير في بيئة الخلية وداخلها.

يحتوي هذا القسم الفرعي على معلومات حول الطرق المستعملة لتشخيص التعبير عن الـ RNA.

تشخيص التعبير عن RNA بواسطة التشرب الشمالي

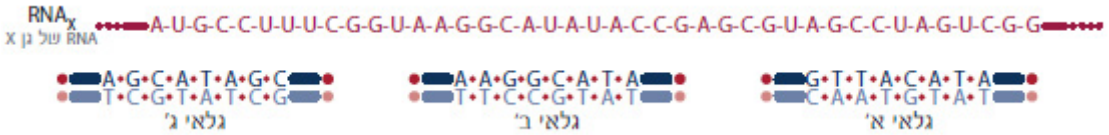
يمكن تمييز جودة وكمية RNA معين بواسطة كاشف حمض نووي موسوم وبحسب مبادئ التهجين كما هو مفصل في الفصل 4. لتسهيل هذا التهجين، يجب تمرير الـ RNA إلى فلتر في عملية ينتج عنها تشرب يسمى تشرب شمالي (Northern Blot). الطريقة التي تستخدم التشرب الشمالي هي الطريقة الأساسية لتشخيص وجود وكمية RNA في الخلية. وفقًا لهذه الطريقة، وكما هو مبين في الشكل 7.3 ، يقومون أوّلًا بإنتاج RNA من خلايا ويفصلون بين الجزيئات المختلفة حسب حجمها في جل أجار. كلما كان الجزيء أكبر (أطول) يقطع مسافة أصغر في الجل، بينما ستقطع الجزيئات الأصغر مسافة أطول نسبيًّا. يتمّ بعد ذلك نقل الـ RNA إلى فلتر، ويتمّ الحصول على تشرب شمالي (يتم امتصاص RNA من الجل في الفلتر). لمعرفة ما إذا كان هناك جزيء RNA معين بين جزيئات الـ RNA على الفلتر، يستخدمون كاشف حمض نووي موسوم (عادة كاشف DNA موسوم). الكاشف الذي سخن وفصلت جدائله يرتبط بجزيء الـ RNA المطلوب. كلما زاد عدد جزيئات الـ RNA في التشرب، كلما ارتبطت كمية اكبر من الكاشف الموسوم، وكلما زاد تغميق فيلم التصوير الذي الصق بالتشرب. لذلك ، فإن درجة تغميق الفيلم هي مقياس للكمية النسبية لجزيء RNA الذي نَتَج في الخلايا.

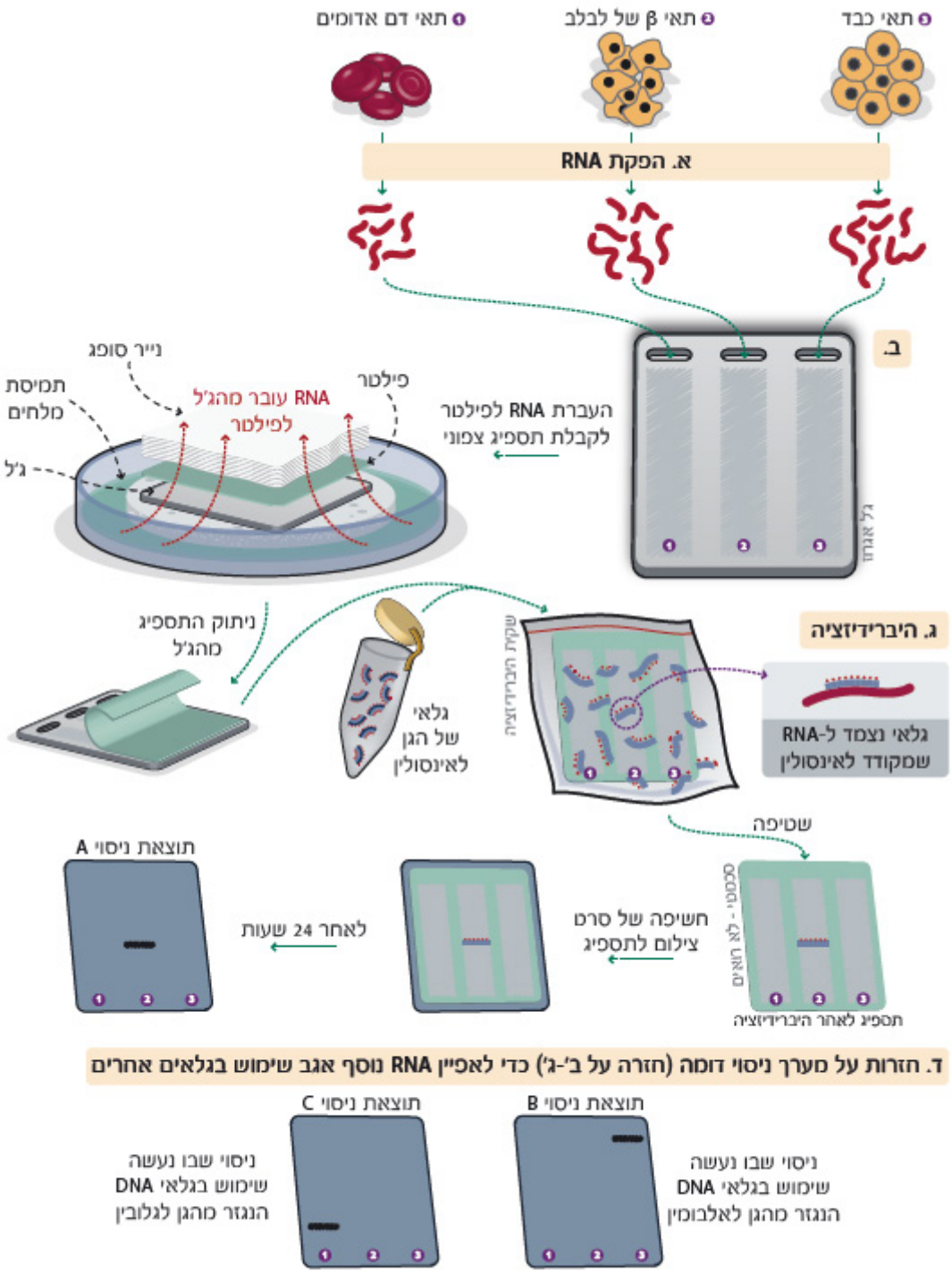
بيّنت نتيجة تشخيص التعبير في الشكل 7.3 أنّ بعض جزيئات الـ RNA رسول غير معبر عنها في جميع أنواع الخلايا. وكما يظهر في الشكل، يمكن إيجاد RNA الجين المشفّر للانسولين في خلايا b الموجودة في البنكرياس، وبالتالي فمن المعتاد أن يقال: إنّ خلايا البنكرياس هذه تُعبّر عن الجين المسؤول عن إنتاج الإنسولين. لا يتمّ التعبير عن جين الإنسولين في خلايا الكبد أو خلايا الدم الحمراء. في المقابل، يمكن العثور على الـ RNA المشفر لجلوبين (بروتين يلعب دورًا في نقل الأكسجين في الدم) في خلايا الدم الحمراء وليس في خلايا بنكرياس أو الكبد، وأخيراً، يتمّ التعبير عن الـ RNA المشفّر للألبومين (Serum Albumin) في خلايا الكبد التي تلعب دورًا في إيصال هذا البروتين إلى مجرى الدم، وهناك ينظم عمل الدورة الدموية.

تسمح الطريقة، التي تستخدم التشرب الشمالي ، من بين أشياء أخرى ، بالتشخيص الكمي النسبي للـ RNA نتيجة لتغيرات في بيئة الخلية وداخلها. على سبيل المثال، يمكن التساؤل عما إذا تغيرت الكمية النسبية للـ RNA لبعض الجينات في أعقاب تعرُّض الخلايا إلى عامل انقسام.

سؤال 7.1

فيما يلي تسلسل RNA نَتَج من جين X. تريدون تشخيص كميته في الخلايا باستخدام الطريقة التي تستعمل التشرب الشمالي. بالإضافة إلى ذلك، إليكم تسلسل القواعد في 3 كواشف مختلفة. واحد منهم فقط سيكون مناسبا لتشخيص كمية الحمض الـ RNA الذي هو ناتج الجين X. ما هو الكاشف الملائم؟ ارسموا شكل الكاشف الذي مر تهجين مع RNA الجين X.





הרשם 7.3: تشخيص تعبير RNA في خلايا مختلفة باستخدام التشرب الشمالي.

أ. استخلاص RNA من خلايا من أنسجة مختلفة لنفس الكائن الحي.

ب. فصل الحمض االـ RNA في الجل أجار، ونقل إلى فلتر والحصول على ما يسمّى "التشرب الشمالي".

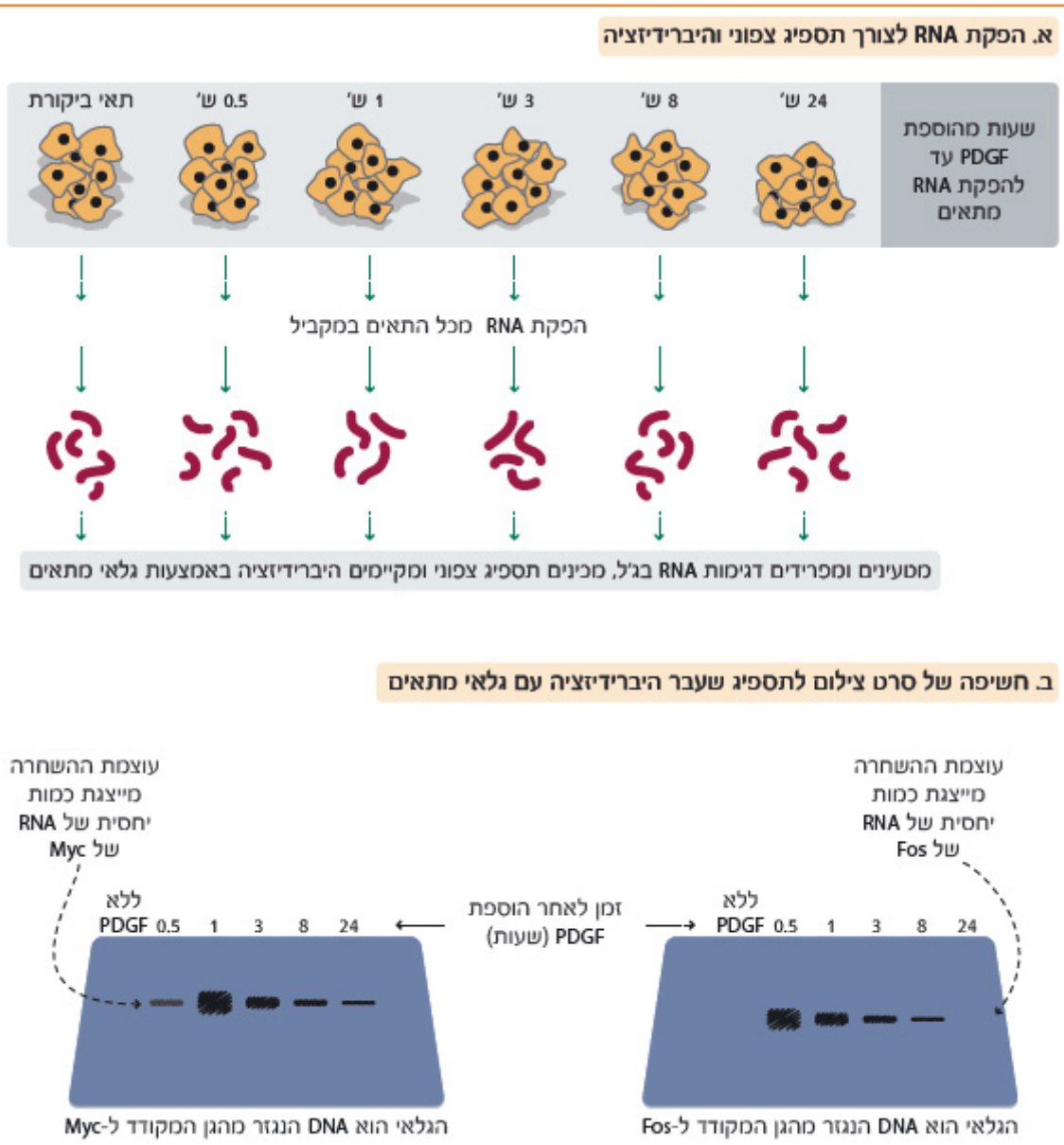
ج. تهجين بواسطة اضافة محلول يحتوي على كاشف موسوم خاص للكشف عن RNA معين (على سبيل المثال، كاشف مشتق من جين الأنسولين) تعريض فيلم إلى فلتر التشرب الذي يرتبط به الكاشف الموسوم. يوضح هذا الجزء من الرسم نتائج تهجين كاشف مشتق من جين الأنسولين لـ RNA من خلايا الكبد والبنكرياس وخلايا دم حمراء.

د. استخدام الكواشف المشتقة من جين الألبومين ومن الجين للجلوبين لتحديد وجود والكمية النسبية لـ RNA هذه الجينات في خلايا مختلفة من هذا الكائن الحي.

تشخيص التعبير عن RNA بواسطة RT-PCR

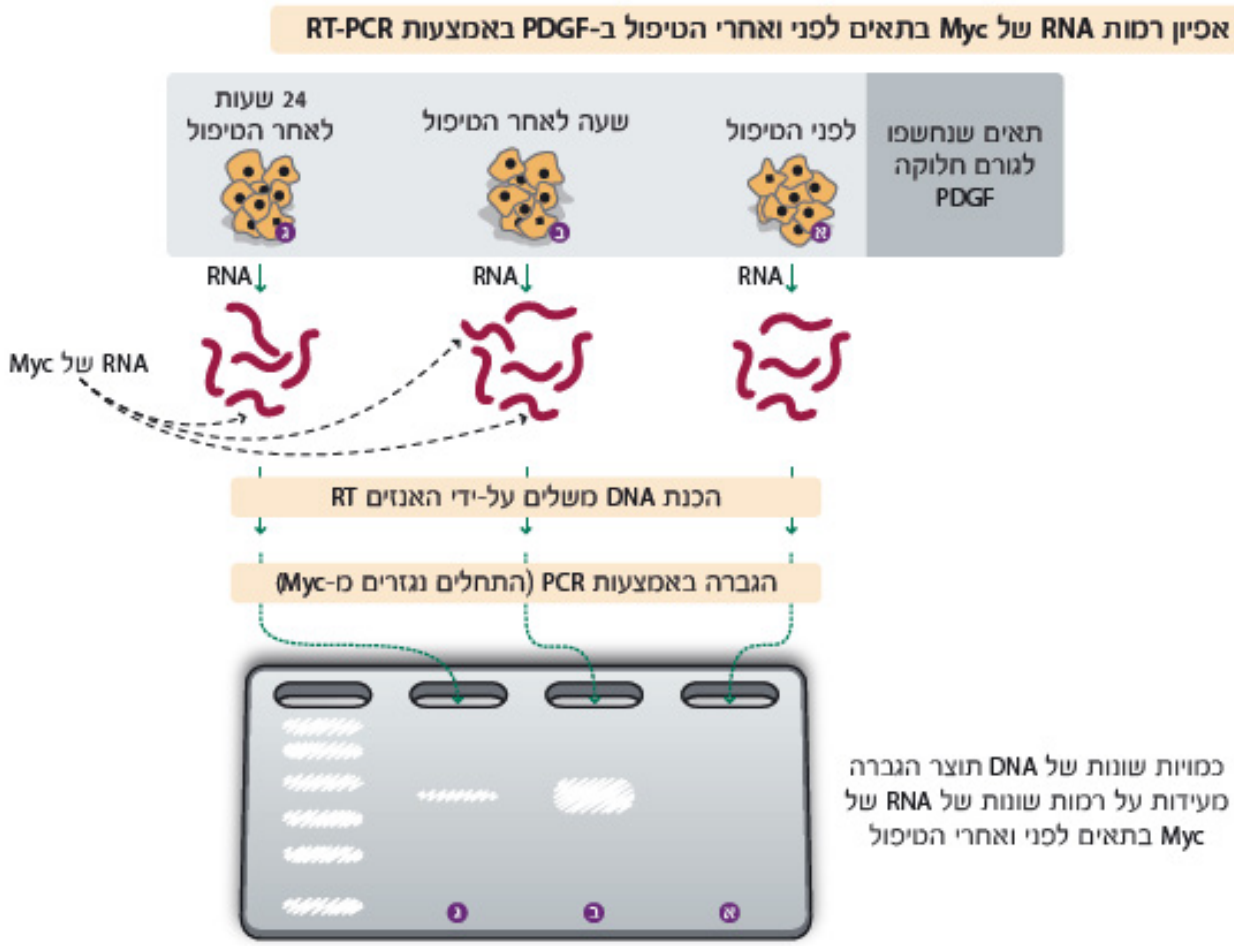
حساسية طريقة التشرب الشمالي محدودة. لذلك، إذا تعذر تمييز شريط يمثل RNA معينًا ، فمن غير الممكن استبعاد احتمال بقاء كمية صغيرة من RNA الجين المفحوص في الخلية. لحالة كهذه، يوجد بديل يستخدم طريقة RT-PCR. كما هو مبيّن في الشكل 7.5، من أجل تحديد وقياس كمية من RNA محدد عن طريق RT-PCR، في المرحلة الأولى، يتمّ استخلاص RNA من الخلايا وينتجون منها DNA مكمل بمساعدة إنزيم النسخ العكسي (RT). يستخدم هذا الـ DNA المكمل، مع برايمرات تبنى بحسب الجين الذين يريدون تشخيص الـ RNA الخاص به للمضاعفة بواسطة الـPCR. كمية الـ DNA التي يتمّ الحصول عليها في عملية الـ PCR تتناسب بشكل مباشر مع كمية الـ RNA للجين الذي يتمّ اختباره ، وبالتالي فإنّ الفرق في كميات منتجات التضخيم بعد RT-PCR يشير إلى وجود اختلاف في كميات RNA معين في الخلايا المختلفة (الشكل 7.5). توضيح لاستخدام RT-PCR لتشخيص كمي ونوعي لـ RNA، يمكن الحصول عليه من دراسة جين Myc عند مقارنة المعلومات في الشكل 7.4 بالمعلومات الواردة في الشكل 7.5.

تمكن الطريقة التي تستخدم التشرب الشمالي من دراسة، على سبيل المثال ، فيما إذا كانت كمية الـ RNA من جين معين قد تغيّرت واستجابة للتغيّرات في بيئة الخلية. يوضح الشكل 7.4 مثل هذا الوصف للـ RNA في الخلية استجابة لتعرُّض الخلية لعامل انقسام PDGF. في هذا الشكل، يمكننا أن نرى تشخيصا للكمية النسبية من RNA لجينين في أوقات مختلفة بعد إعطاء PDGF



يصف الرسم 7.4: استخدام التشرب الشمالي لتشخيص الكميات النسبية من RNA لجينات معينة بَعد تعرُّض الخلايا التي تمّ فحصها لعامل الانقسام PDGF لفترات زمنية مختلفة.

كما هو موضح في هذا الرسم، في الخلايا التي تعرّضت لـ PDGF وتمّ فيها تنشيط مسار توصيل الإشارات، كان مستوى الـ RNA لجين Fos مرتفعًا جدًا بعد نصف ساعة من تعرُّض الخلايا لـ PDGF. انخفضت كمية RNA Fos مع مرور الوقت من التعرض الأولي لعامل الانقسام. وهكذا، بعد 24 ساعة ، لم يكن هناك دليل على وجود RNA FOS في الخلية. في المقابل ، ظَهَر RNA لجين Myc بعد حوالي ساعة من إضافة PDGF ، وعلى الرغم من انخفاض مستوى الـ RNA من Myc في الخلية بعد 3 ساعات ، بقي مستوى قابل للتشخيص بعد 24 ساعة من إضافة عامل الانقسام ، عندما تمكنت العديد من الخلايا من الانقسام. أظهرت دراسات أخرى أن Fos وَ Myc ضروريان بالفعل لانقسام الخلايا.



איור 7.5: RT-PCR לאפיון כמויות יחסיות של RNA בתא כשיטה חלופית לתספיג צפוני והיברידיזציה.

לאפיון איכותו וכמותו היחסית של RNA של גן מסוים ניתן להיעזר ב-RT-PCR. כך, מפיקים מהתאים RNA, מייצרים DNA משלים ואחר כך מגבירים מקטע DNA באמצעות PCR. למעשה, מגבירים מקטע DNA המייצג RNA של גן מסוים. הגברה כזו מצריכה זוג תחלים בעלי רצף המצוי בגן שאת ביטויו חוקרים. הכמות היחסית של ה-DNA תוצר ההגברה מלמדת על הכמות היחסית של ה-RNA של הגן הנבחן בתא הנבחן.

عندما وجد بمساعدة التشرب الشمالي أن كمية الـ RNA المشفر للإنسولين ازدادت بعد تعرُّض خلايا البنكرياس لتركيز عالٍ من الجلوكوز، تم طرح السؤال حول أي جينات أخرى تغير مستوى الـ RNA الخاص بها بعد العلاج. هذا السؤال مهم، لأنّ تغيير بيئة الخلية يؤدّي غالبًا إلى تغيير في التعبير عن العديد من الجينات في نفس الوقت. في غياب فرضية مسبقة فيما يتعلق بهوية الجينات التي سيتم تغيير التعبير عنها نتيجة للعلاج، من الضروري استخدام رقائق DNA.

تشخيص تعبير RNA بمساعدة رقائق DNA

تشخيص تعبير RNA بالوسائل التي وُصفت حتى الآن تُتيح فقط دراسة تعبير RNA اشتق من عدد قليل من الجينات المعروفة. وهكذا وبالرغم من العدد الكبير للجينات التي يتمّ التعبير عنها في الخلية في نفس الوقت، الطرق التي وُصفت حتى الآن لا تُتيح فحص متزامن للتعبير عن مئات وحتى آلاف الجينات. للتعامل مع هذا التحدي، من المعتاد استخدام طريقة متقدمة تتيح دراسة متزامنة للتعبير عن العديد من الجينات دون الحاجة إلى فرضيات مسبقة حول طريقة التعبير عنها. قد يكون البحث المتزامن للتعبير عن العديد من الجينات ذا صلة بفهم مساهمة الجينات في سلوك خلايا مختلفة في أوضاع مختلفة.

توضح الحالة التالية الحاجة إلى استخدام وسائل متقدمة لوصف التعبير عن جينات. وبالتالي، من أجل تحسين القدرة على علاج حالات السكري، تمّ طرح سؤال حول كيفية سلوك خلايا b في البنكرياس عند تعرضها لمستوى جلوكوز مرتفع نسبيًا ولفترة طويلة نسبيًا (24 ساعة). وأثار اهتمام خاص التغييرات التي قد تحدُث في التعبير عن الجينات نتيجة لهذا التغيير في بيئة الخلية. في المرحلة الأولى، فحص الباحثون احتمال وجود تعبيرًا زائدًا عن الـ RNA المشفّر للانسولين في الخلايا المعرّضة لتركيز عالٍ من الجلوكوز (الخلايا المعالجة).

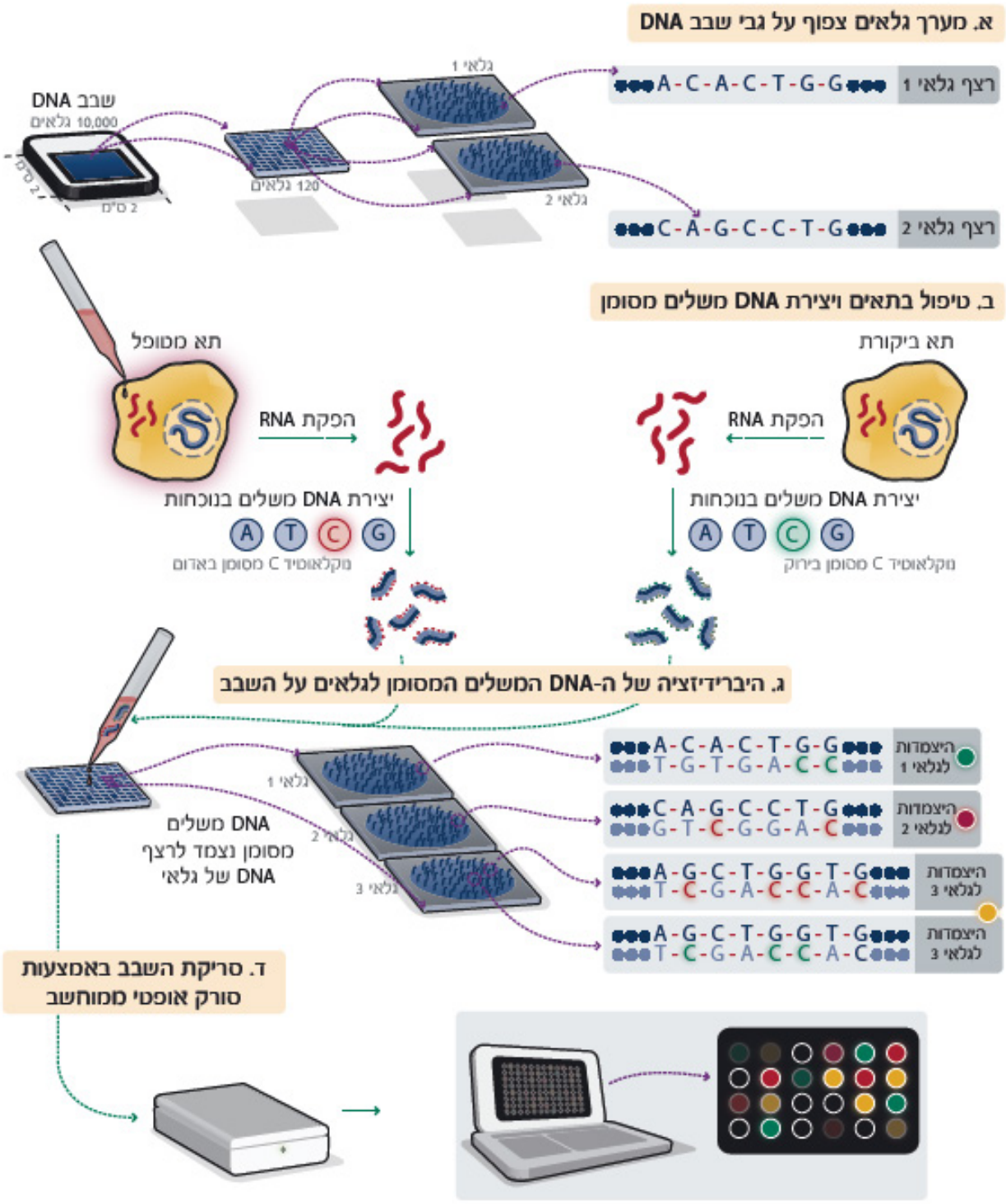
وبالفعل، عندما نفّذوا تشخيص للـ RNA بطريقة التشرب الشمالي، وُجد أن كمية الـ RNA المشفر للأنسولين كان أكبر بمقدار 1.5 مرة في الخلايا المعالجة مقارنة بالخلايا التي نمت في بيئة ذات تركيز جلوكوز طبيعي. هذا الاكتشاف مناسب للفرضية التجريبية، لكن من المعروف أن التغيير في بيئة الخلية يؤدي إلى تغيير في التعبير عن أكثر من جين واحد، وفي الواقع إلى تغيير في التعبير عن العديد من الجينات. نظرًا لعدم وجود شك محدد حول تغييرات إضافية محتملة في تعبير جينات في ظل هذه الظروف التجريبية ، كانت هناك حاجة إلى استخدام طريقة متقدمة تستخدم رقائق DNA. هذه الطريقة تجعل من الممكن في وقت واحد دراسة التعبير عن الآلاف من الجينات. هذه الطريقة مناسبة لدراسة التعبير عن جينات، حتى لو لم يكن هناك شك مسبق في أن التعبير عنها يتغير نتيجة للعلاج.

رقائق DNA هي عبارة عن أسطح صغيرة (حوالي 2 سم^2) عليها تتواجد بكثافة عالية وبشكل منفصل آلاف الكواشف، كل واحد منها هو مقطع DNA مشتق من جين معين. الكواشف الموجودة على الرقائق يمكنها ربط حوامض نووية لها تسلسل مكمل في عملية التهجين (انظر صندوق 4.6 في الفصل 4). رقائق DNA تمكن، من بين أشياء أخرى، باختبار التغيرات في التعبير عن العديد من الجينات في نفس الوقت كما هو مبين في الشكل 7.6. ولتحقيق هذا الهدف، يتمّ استخراج الـ RNA من خلايا ضابطة ومن الخلايا المعالجة من الـ RNA يكونون DNA مكمل مع نيوكليوتيدات مناسبة مشعة. في المرحلة التالية يفحصون الكواشف يرتبط بها DNA مكمل مؤشر، ومصدر هذا الـ DNA المكمل (من الخلايا الضابطة أو من الخلايا المعالجة) بذلك تمكن الرقائق من الكشف عن تغييرات في التعبير عن العديد من الجينات في الخلية المعالجة.

رقائق DNA هي أسطح يوجد عليها العديد من الكواشف (آلاف) ، وهي تُستخدم، من بين استخدامات أخرى، لاختبار تغيير في التعبير عن جزيئات RNA مختلفة في خلايا مختلفة في نفس الوقت. المراحل (1-5) الضرورية لاستعمال الرقائق بهدف تشخيص تعبير جينات مفصلة في الصفحات التالية وفي الشكل 7.6.

الخطوات النموذجية لاختبار تعبير RNA باستخدام رقائق الـ DNA هي (الرسم 7.6):

1. تحضير رقاقة DNA - تحتوي رقاقة DNA على آلاف "الكواشف" غير المؤشرة الموجودة على الرقاقة بشكل منفصل. الكواشف هي في الواقع جزيئات DNA ذات تسلسل خاص تمثّل آلاف الجينات المختلفة. استخدم الباحثون الذين سألوا عما يحدُث على مستوى الـ RNA في خلايا من بنكرياس بفأر تعرّض إلى مستوى عالٍ من الجلوكوز، رقائق الـ DNA التي تحتوي على الآلاف من الكواشف التي تستمد تسلسلها من جينات الفأر.
2. **استخلاص RNA من نوعين من الخلايا** حيث يريدون فحص ما يحدُث في نوع واحد مقارنة بالنوع الاخر. في بعض الأحيان يتمّ اختيار خلايا معينة خضعت لمعالجة، مثل التعرض للجلوكوز، وخلايا أخرى غير معالجة تُسمّى خلايا ضابطة.
3. **إعداد DNA مكمل موسوم –** يضيفون للـ RNA المستخلص من كل نوع من نوعَي الخلايا إنزيم RT النسخ العكسي وينتجون DNA مكمل والى داخله يربطون نوكليوتيد متوهج. وهكذا، بوجود RNA من خلايا ضابطة، يتمّ تشكيل DNA مكمل يحتوي على نوكلوتيد متوهجة باللون الأخضر. وبشكل مشابه، بوجود RNA من خلايا معالجة، ينتجون DNA مكمل يتوهج باللون الأحمر.
4. **حدوث تهجين –** يمكنون تهجين نوعي الـ DNA المكمل الموسومين بالأخضر أو الأحمر مع الكواشف الموجودة على الرقاقة. فقط إذا وُجد في العينات DNA موسوم مع تسلسل مكمل لتسلسل الكاشف ستحدُث عمليات ارتباط يمكن الكشف عنها. قسم من الكواشف لا يلتصق بها DNA مكمل على الإطلاق، حيث لا يتمّ التعبير عن بعض الجينات في أي من أنواع الخلايا. لقسم آخر من الكواشف ترتبط كميات متساوية من جزيئات DNA مكمل مصدرها من نوعَي الخلايا التي تمّ فحصها. مثل هذه الحالات تمثّل وضع لم يحدُث فيها تغيير في التعبير عن هذه الجينات في الخلايا المعالجة. في المقابل هناك كواشف تلتصق بها كمية كبيرة من DNA مكمل مصدره في واحدة فقط من نوعَي الخلايا. تكشف هذه الحالات عن الجينات التي تمّ فيها تغيير تعبير RNA في الخلية المعالجة.
5. **معالجة المعطيات -** عن طريق الإضاءة من ماسح رقائق يفحصون شدة التوهج من مناطق مختلفة من الرقاقة التي توجد عليها الكواشف. يعالج الكمبيوتر ويحدّد موقع وشدة التوهج. توهج مماثل باللون الأخضر والأحمر يعالج من قبل الحاسوب كإشارة صفراء. هذه الإشارة تعني أنّ جين معيّن يعبر عن كميات متطابقة من الـ RNA في كلا النوعين من الخلايا. توهج يغلب عليه اللون الأحمر يشير إلى زيادة في تعبير الـ RNA لجين معين في الخلايا المعالجة. في المقابل، توهج يغلب عليه اللون الأخضر يشير إلى انخفاض في تعبير جين معين في الخلايا المعالجة. بالاعتماد على الموقع على الرقاقة يربطون بين DNA كاشف معين لجين معين، فحص الرقاقة يمكن من تحديد التغير في تعبير RNA من جينات مختلفة.



הרשם 7.6: הכשף על התגיר בכמיות RNA לגדיד מן הגינות בי חלאיה מעלגה מקארנה בחלאיה מטבטה בואסטה הטריקה התי תסתכם רקאנק DNA

בעד אסתכלאס RNA וּאנתאג DNA מכמל מוֹשר מן חלאיה מטבטה ומן חלאיה מעלגה, יתם תנפיד תהגין לל- DNA המוֹשר לכואשף המוגודה על רקאקה הל- DNA . התהגין יחדֹת פקט מע הכואשף התי יתמ הסגול עליהא מן הגינות התי יתמ התעבּיר ען הל- RNA הכאס בהא בי אחד אנוּאע החלאיה. יממכן התנבּוֹ בהאכתלאפאת בי התעבּיר ען גין מעין בי החלאיה המכתלפה ען טריק לון וֹשדה העלאמה עגד נקטה מעינה בי הרקאקה.

تشخيص تعبير RNA باستخدام رقائق DNA يتطلب استخراج RNA من خلايا ضابطة وخلايا معالجة. يتمّ إنتاج DNA مكمّل موسوم من هذا الـ RNA (لون مختلف لـ RNA من مصدر مختلف). في المرحلة التالية، يتمّ تهجين الـ DNA المكمل الموسوم بالكواشف على الرقاقة. قد يكون هناك ثلاثة أنواع من عمليات الارتباط يتمّ تحويلها إلى إشارات حمراء، خضراء أو صفراء (كما هو مبين في الشكل 7.6). عادة يكتشفون أنه بعد علاج نموذجي، يختلف التعبير عن 1%-3% من الجينات في الخلية.

في تجربة تستخدم رقاقة نموذجية، يتمّ الحصول على معلومات حول التعبير عن آلاف الجينات في الخلايا المختلفة. عادة، يتغيّر التعبير عن حوالي 3%-1% من الجينات في الخلية المعالجة مقارنة بالخلية الضابط. وجد الباحثون الذين استخدموا رقائق الـ DNA لاختبار ما يحدث في خلايا b من البنكرياس استجابة لتركيز جلوكوز مرتفع، أن التعبير عن 80 جين قد تغير (ازداد أو انخفض) في الخلايا المعالجة مقارنة بالخلايا الضابطة التي تعرّضت إلى مستويات طبيعية من الجلوكوز. عندما حُدّدت هوية الجينات التي تغير التعبير عنها اتضح أنه حدث ارتفاع في التعبير عن جينات تشارك في ترجمة وطي بروتين الإنسولين وفي التعبير عن جينات مشاركة في إفراز الإنسولين خارج الخلية. بالإضافة اليهم، وُجد أن تعبير جينات تفتقر إلى دور معروف قد تغيّر أيضًا. أحد الاستنتاجات هو أن خلية البنكرياس يمكنها "معالجة" المعلومات حول الزيادة في تركيز الجلوكوز باستخدام البروتينات في مسارات توصيل المؤشرات لإحداث تغيير في التعبير عن جينات ونواتجها. تمّ تصميم التغيير لمطابقة وظيفة الخلية مع الحالة الجديدة عن طريق زيادة إفراز الإنسولين في الجسم في حالات ارتفاع مستويات الجلوكوز. إنّ تحديد التغيّر في تعبير الجينات التي تمّ فحصها سابقًا وتفتقر لوظيفة معروفة يسمح بتحديد دور أولي لهذه الجينات ونواتجها. يمكن القول أنّ مثل هذه الجينات تلعب دورًا في تكيف الخلايا المفحوصة مع ظروف بيئية جديدة (الظروف التي يوجد فيها تركيز جلوكوز مرتفع).

تشخيص التغييرات في تعبير جينات أمر شائع أيضًا في الخلايا من مصادر مختلفة بهدف دراسة الاختلافات في العمليات الأساسية للخلايا المختلفة. هكذا تستخدم رقائق DNA أيضًا لدراسة عمليات في الخميرة والبكتيريا وفي العديد من الكائنات الحية الأخرى. على سبيل المثال، يمكن دراسة التغيّر في تعبير جينات حين "تستيقظ خميرة من غيبوبتها" وتبدأ بعمليات الأيض التي تمكنها من نفخ العجين. تتبع هذا التغيير قد يساعد في تحسين العمليات الصناعية. من الممكن أيضًا دراسة كيف تتكيف البكتيريا لوجود مواد لها القدرة على اعاقة انقسامها. علاوة على ذلك، يعلق علماء وأطباء آمالاً كبيرة على استخدام الرقائق، ليس فقط لأغراض البحث العلمي، ولكن أيضًا للتشخيص الطبي، مثلًا، في مجال التشخيص لمعالجة أنواع مختلفة من السرطان.

وبالتالي، من المعروف أن للخلايا السرطانية مواصفات مختلفة وقد يكون للمراحل المبكرة من المرض مظهر خارجي موحد. ومع ذلك، في حين أن الإزالة المبكرة للورم الأولي لدى بعض المرضى تزيد من فرص الشفاء، لدى مرضى آخرين ستتطور بعد إزالة السرطان انبثاثات سرطانية. نظرًا لأنّ مظهر الخلايا للورم الأولي لا يمكن أن يشير إلى فرص الشفاء في المستقبل، فمن المعتاد أن تعطي بعد الجراحة لإزالة الورم الأولي علاج كيميائي وقائي لجميع المرضى على الرغم من العوارض الجانبية لهذا العلاج. لو كان من الممكن التحديد لدى المريض ما إذا كان الورم الأولي في جسمه قد يطوّر إنبثاثات سرطانية، فسيكون ذلك ذا فائدة كبيرة. وبالتالي يمكن إعطاء العلاج الكيميائي فقط للمرضى الذين يعانون من مخاطر عالية من الانبثاثات.

يود الأطباء الاستفادة من المعلومات من رقائق DNA، رقائق تقيس تعبير جينات، لتجنب العلاج الكيميائي غير الضروري. نقطة الانطلاق للباحثين هي أنه في بعض الأحيان في نوع معين من السرطان، يوجد نوعان فرعيان من المرض: السرطان ذو الإمكانات الانبثاثية والسرطان الذي لا يتجه لتطوير سرطان انبثاثي وأن النوعين الفرعيين لا يتميزان بمظهرهما. من المعروف أيضًا أنّ كل نوع ثانوي من السرطان يتميز بنمط فريد من أشكال التعبير الجيني التي يمكن التعرّف عليها بواسطة رقائق DNA. وبالفعل، يمكن أن يُتيح استخدام رقائق DNA اكتشاف الجينات التي يتمّ التعبير عنها في بعض الأورام والتي لا يتمّ التعبير عنها في غيرها. وبالتالي كان الأمل في أنّه من الممكن من خلال رقائق الـ DNA التنبؤ في مرحلة مبكرة التطوّر المستقبلي للمرض. لذلك ، كان الهدف الأصلي هو توفير العلاج الكيميائي الوقائي على أساس النتائج من تشخيص التعبير في رقائق الـ DNA بهدف الامتناع من إعطاء علاج كيميائي غير ضروري لأصحاب النوع الفرعي من السرطان الذي لن يتطوّر لانبثاثي. أصبح من الواضح الآن أنّ معلومات التعبير الجيني ليست كافية لتحديد أنواع الورم وما إذا كان يمكن أن يَنْتُج انبثاث. لذلك، يمكن الحصول على معلومات مبكرة عن نوع المرض بالضبط بواسطة دمج فحوصات تعبير جينات تتمّ باستخدام رقائق DNA مع اختبارات جزيئية أخرى. ومن المأمول أنّ المعلومات الجزيئية المختلفة التي تمّ الحصول عليها من اختبارات مختلفة ستمكن من المساعدة في اختيار العلاج الطبي المناسب.

صندوق 7.1: إيجاد طفرات باستخدام رقائق DNA وبمساعدة PCR

لا تُستخدم رقائق DNA فقط لاختبارات مقارنة تعبير RNA. تحتوي بعض الرقائق على كاشفات قصيرة من الـ DNA مصممة للسماح لمقاطع DNA بالالتصاق فقط إذا كانت بهم طفرة مقارنة بالتسلسل في الجين السليم. يتمّ استخدام رقاقة DNA مع كواشف كهذه لإيجاد طفرات محتملة في عينات مفحوصة. على سبيل المثال، لإيجاد أشخاص يحملون طفرة في الجين المشفّر لـ CFTR (تتواجد أليلات نادرة منه لدى مرضى التليف الكيسي، الفصل 6)، يمكن وضع كاشفات مشتقة من الجين المشفّر لـ CFTR على الرقاقة. سيحتوي تسلسل كل كاشف على الرقاقة، باستثناء كاشف الضابط، على واحدة من العديد من الطفرات المحتملة في جين CFTR. يمكن إجراء مضاعفة وتوسيم جين من شخص مختار باستخدام PCR واجراء تهجين على الرقاقة بوجود منتج التضخيم الموسوم. يوفرون ظروف تهجين خاصة تسمح بالتصاق الهدف (في هذه الحالة، منتج PCR) للكاشف فقط إذا كان هناك ملاءمة بنسبة 100% بين القواعد. يتيح لنا إيجاد كاشف مع طفرة معينة مرتبطة بها مُنْتَج PCR تحديد نوع الطفرة في الخلية.

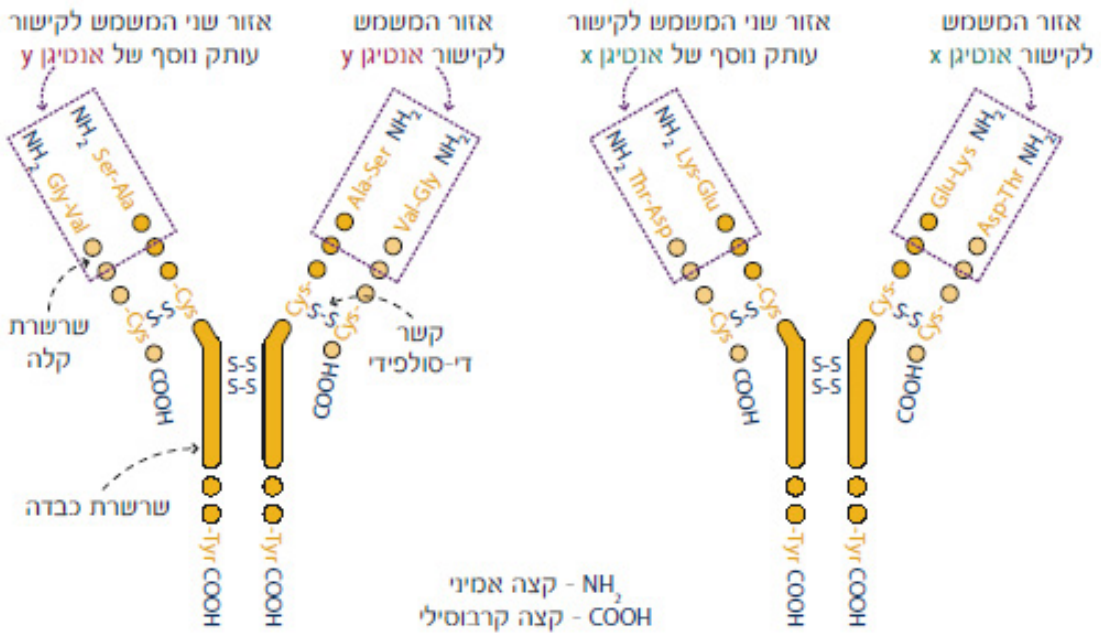
تشخيص التعبير عن بروتينات

على غرار تشخيص التعبير عن الـ RNA، يمكن أن يساعد تشخيص وجود وكمية بروتين معين في خلية في تحديد دور الجين الذي يشفر البروتين وتحديد دور البروتين في الخلية. على سبيل المثال، إذا ازدادت كمية بروتين معين في وضع معين (بعد الإشعاع ، على سبيل المثال)، فمن الممكن الافتراض أنّ هذا البروتين المعيّن يلعب دورًا في تكيف الخلية مع الوضع الجديد التي تتواجد فيه. ليس دائمًا ارتفاع في الناتج البروتيني نابع عن ارتفاع في مستوى الـ RNA المشفّر لهذا البروتين. أحيانا انخفاض وتيرة تحليل البروتين هو العامل المؤثّر. كيف يمكنك تحديد كمية بروتين معين تحتوي عليه خلية في وضع معين؟ كيف يمكنك تحديد ما إذا كان بروتين معين مرتبطًا ببروتين آخر وما إذا كان الرابط يؤثّر على النشاط؟ إن الجسم المضاد هو أهم أداة للتعامل مع أسئلة بمستوى البروتين (الشكل 7.7 والاطار 7.2).

صندوق 7.2: الجسم المضاد كأداة للكشف عن البروتينات ودراستها

يتكون الجسم المضاد من سلسلتين بروتينيتين طويلتين وسلسلتين بروتينيتين قصيرتين تربطهما أربطة دي- سولفيد (ثنائي كبريتيد). الرباط ثنائي الكبريتيد هو رباط كوفلنتي (تساهمي) بين ذرتين من الكبريت، وفي البروتينات تتكوّن هذه الأربطة بين اثنين من الأحماض الأمينية من نوع سيستين (الشكل 7.7). يتمّ إنتاج الأجسام المضادة في الجسم بواسطة خلايا B التابعة لجهاز المناعة. وجود العديد من الأجسام المضادة في الجسم يمكّن جهاز المناعة، من بين أشياء أخرى، بربط مسببات الأمراض (مثل البكتيريا والفيروسات) والمساعدة في حماية الجسم منها، في جسمنا يوجد مئات الآلاف من الأجسام المضادة بأنواع مختلفة التي يمكن أن تربط مئات الآلاف من الأنتيجينات المختلفة، العديد منها بروتينات. بشكل عام، يمكن القول أن للجسم المضاد ألفة (Affinity) لأنتيجين معين ومقدرة على ربطه. أنتيجين هو جزيء - أو جزء محدد من جزيء – (في كثير من الحالات يكون الأنتيجين عبارة عن مقطعًا فريدًا من بروتين محدّد) يرتبط بجسم مضاد. بالرغم من التشابه في المبنى العام لأجسام مضادة من أنواع مختلفة، إلّا أنّها تختلف بقدرتها على ربط أنتيجينات: في معظم الحالات، كل جسم مضاد لديه القدرة على ربط أنتيجين واحد فقط بنجاعة. بسبب هذه الخاصية، يُستخدم الجسم المضاد كأداة لتحديد وعزل بروتين معيّن، ومن بين خصائصه الأخرى فإنّه يُستخدم كـ"كاشف" ناجع.

تنجم الاختلافات الوظيفية بين الأجسام المضادة المختلفة عن الاختلافات البنائية في منطقة صغيرة من الجسم المضاد المسمّاه "منطقة ربط أنتيجين" (الشكل 7.7). لحث كائن حي على إنتاج أجسام مضادة تخصصية لبروتين معين يحقنونه بهذا البروتين. الكائنات الحية المتبع استعمالها لإنتاج أجسام مضادة ضد بروتينات لهدف البحث هي أرانب وفئران.



הרסם 7.7: מבנה חלבון נוגדן המשמש לקישור אנטיגן, כגון חלבון.

חלבון הנוגדן מורכב משתי שרשראות קלות זהות ושתי שרשראות כבדות זהות, המחוברות זו לזו בקשרי דיסולפיד (S-S), ומכיל אטום גופרית (S) בכל שרשרת. חומצות האמינו הספציפיות בקצה האמיני של כל שרשרת מהוות את אזור הנוגדן המשתנה, המקשר לאנטיגן ספציפי. שאר חומצות האמינו בשרשראות הקלות והכבדות מהוות את אזורי הנוגדן הקבועים. אזורי הנוגדן המשתנים של שרשרת כבדה ושרשרת קלה מהווים יחד את אתר הקישור לאנטיגן, המכיר את האנטיגן הספציפי שהוביל לייצור הנוגדן.

יתכן שנוגדנים שונים יכולים להבחין בין שני אפיטופים שונים על אותו אנטיגן, אם כל אפיטופ מתאים לאתר הקישור של אחד הנוגדנים. נוגדנים יכולים גם להיקשר לאנטיגן שלם ולא רק לחלבון, אם הם מזהים אפיטופים על חלבון שאינו חלבון.

הרסם 7.7: מבנה חלבון נוגדן המשמש לקישור אנטיגן, כגון חלבון.

חלבון הנוגדן מורכב משתי שרשראות קלות זהות ושתי שרשראות כבדות זהות, המחוברות זו לזו בקשרי דיסולפיד (S-S), ומכיל אטום גופרית (S) בכל שרשרת. חומצות האמינו הספציפיות בקצה האמיני של כל שרשרת מהוות את אזור הנוגדן המשתנה, המקשר לאנטיגן ספציפי. שאר חומצות האמינו בשרשראות הקלות והכבדות מהוות את אזורי הנוגדן הקבועים. אזורי הנוגדן המשתנים של שרשרת כבדה ושרשרת קלה מהווים יחד את אתר הקישור לאנטיגן, המכיר את האנטיגן הספציפי שהוביל לייצור הנוגדן.

יתכן שנוגדנים שונים יכולים להבחין בין שני אפיטופים שונים על אותו אנטיגן, אם כל אפיטופ מתאים לאתר הקישור של אחד הנוגדנים. נוגדנים יכולים גם להיקשר לאנטיגן שלם ולא רק לחלבון, אם הם מזהים אפיטופים על חלבון שאינו חלבון.

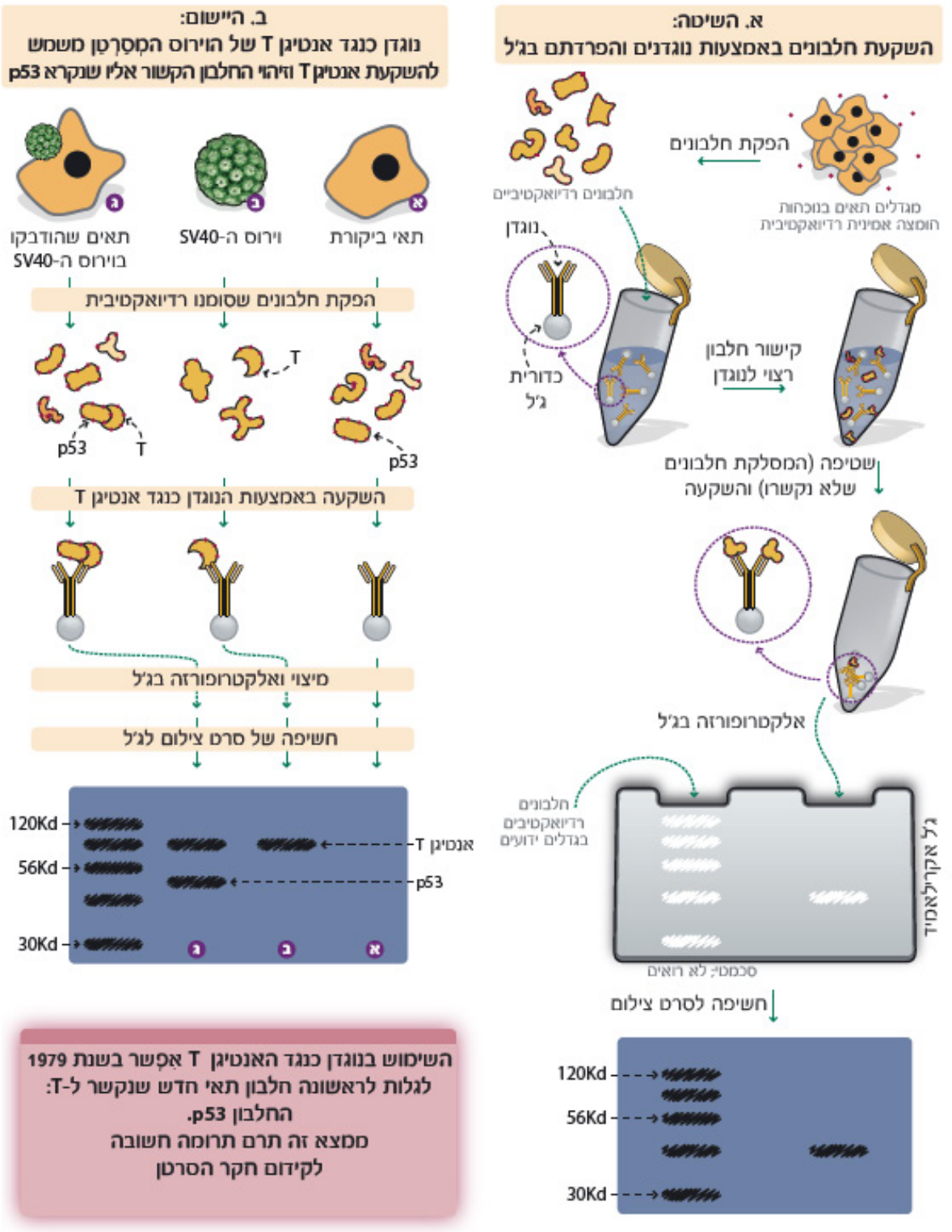
יُتيح توفر جسم مضاد رابط بروتين معين دراسة ناتج الجين المستنسخ لمعرفة ما إذا كان هذا البروتين موجودًا في خلية معينة ولمعرفة الكمية النسبية للبروتين في هذه الخلية مقارنة بخلايا أخرى. من الممكن أيضًا فحص كيف تتأثر كمية البروتين خلال التغيّرات في بيئة الخلية أو خلال التغيّرات داخلها، وكذلك التحقق مما إذا كان البروتين يربط بروتينات أخرى موجودة في الخلية. يوضح الشكل 7.8 أ كيف يمكن ترسيب بروتينات باستخدام أجسام مضادة الإجابة على هذه الأسئلة. من أجل ترسيب وعزل بروتين باستخدام أجسام مضادة، يتمّ تثبيت الجسم المضاد في كريات جل صغيرة. وضع الجسم المضاد المثبت مع مستخلص خلوي يحتوي على خليط من بروتينات الخلية المتنوع تمكن الجسم المضاد من ربط البروتين المطلوب. بعد الارتباط ، يمكنون الكريات من الترسب ومعها تترسب الأجسام المضادة والبروتين المطلوب المرتبط بها، ثم يزيلون البروتينات التي لم تترسب. في المرحلة الأخيرة، يحررون البروتين المطلوب عن الجسم المضاد الراسب بمساعدة محلول منظّم ملائم. لتحديد ما إذا ترسب بروتين ولتحديد كميته يستخدمون جل أكريل أميد.

لتحديد البروتين بعد الفصل بالجل يمكن استخدام عدّة طرق. وفقًا لإحدى الطرق، كما هو موضح في الشكل 7.8 أ، يتمّ استخدام وسم اشعاع نووي في المرحلة الأولى من التجربة. في هذه المرحلة، تُزرع الخلايا بوجود حامض أميني مشع نوويا بحيث يتمّ وسم بروتينات الخلية التي يتمّ بنائها بنظائر مشعة. وبالتالي ، فإن البروتين الذي يترسب بواسطة الجسم المضاد وكذلك أي بروتين آخر يترسب عندما يكون مرتبطا مع البروتين المشخص بواسطة الجسم المضاد (بروتين راسب مرافق) سيكون مشع نوويا، لأنّ وجود بروتينات مشعة في الجل يمكن تمييزها عن طريق التعريض لفيلم، ظهور شريط أسود في الفيلم يمثّل بروتين ترسب بواسطة الجسم المضاد. تسمح لنا درجة تغميق الفيلم تحديد الكمية النسبية للبروتين.

يمكن العثور على أحد الأمثلة الكلاسيكية على استخدام الأجسام المضادة لتشخيص بروتينات في أبحاث السرطان الناتج عن

الفيروسات. في محاولة لفهم الآلية التي يؤدّي فيها الفيروس المسمّى SV40 إلى الإصابة بسرطان في الخلايا الحيوانية، تمّ إعداد أجسام مضادة ضد أحد بروتينات الفيروس المسمّى أنتيجين T (T antigen) . لدراسة الأنتيجين T في خلايا مصابة بالفيروس، نُميت الخلايا في وجود حامض أميني مشع نوويا وتمّ ترسيب بروتينات بواسطة أجسام مضادة ضد الأنتيجين T. كما هو موضح في الشكل 7.8 ب، بعد الترسيب بواسطة الجسم المضاد وفصل البروتينات المشعة في الجل، كان من الممكن تشخيص شريط أسود في فيلم التصوير يمثّل الأنتيجين T.

لكن من المثير للدهشة أنّ الترسيب مع الجسم المضاد ضد T مكنت من أن تحدد في فيلم التصوير شريط أسود يمثل بروتينًا آخر يبلغ حجمه الظاهر للعين 53000 دالتون (53Kd). أظهرت تجارب أخرى أنّ هذا البروتين خلوي وغير فيروسي، وهو يترسب بمساعدة مع أجسام مضادة ضد الأنتيجين T لأنّه يرتبط هو بنفسه ببروتين T وليس لأنّه يتمّ التعرُّف عليه مباشرة بواسطة الجسم المضاد. بعد هذه النتيجة، قرر باحثون أن يستنسخوا الجين الذي يشفّر لبروتين الـ 53000 دالتون الذي حصل على الاسم p53 (p اختصار كلمة بروتين وَ 53 للإشارة إلى الوزن الجزيئي للبروتين) (الفصل 8). توقع الباحثون أنّ استنساخ الجين المشفّر لـ p53 سيسمح بفهم وظائف p53 في العمليات التي تؤثّر على انقسام الخلايا والسرطان.



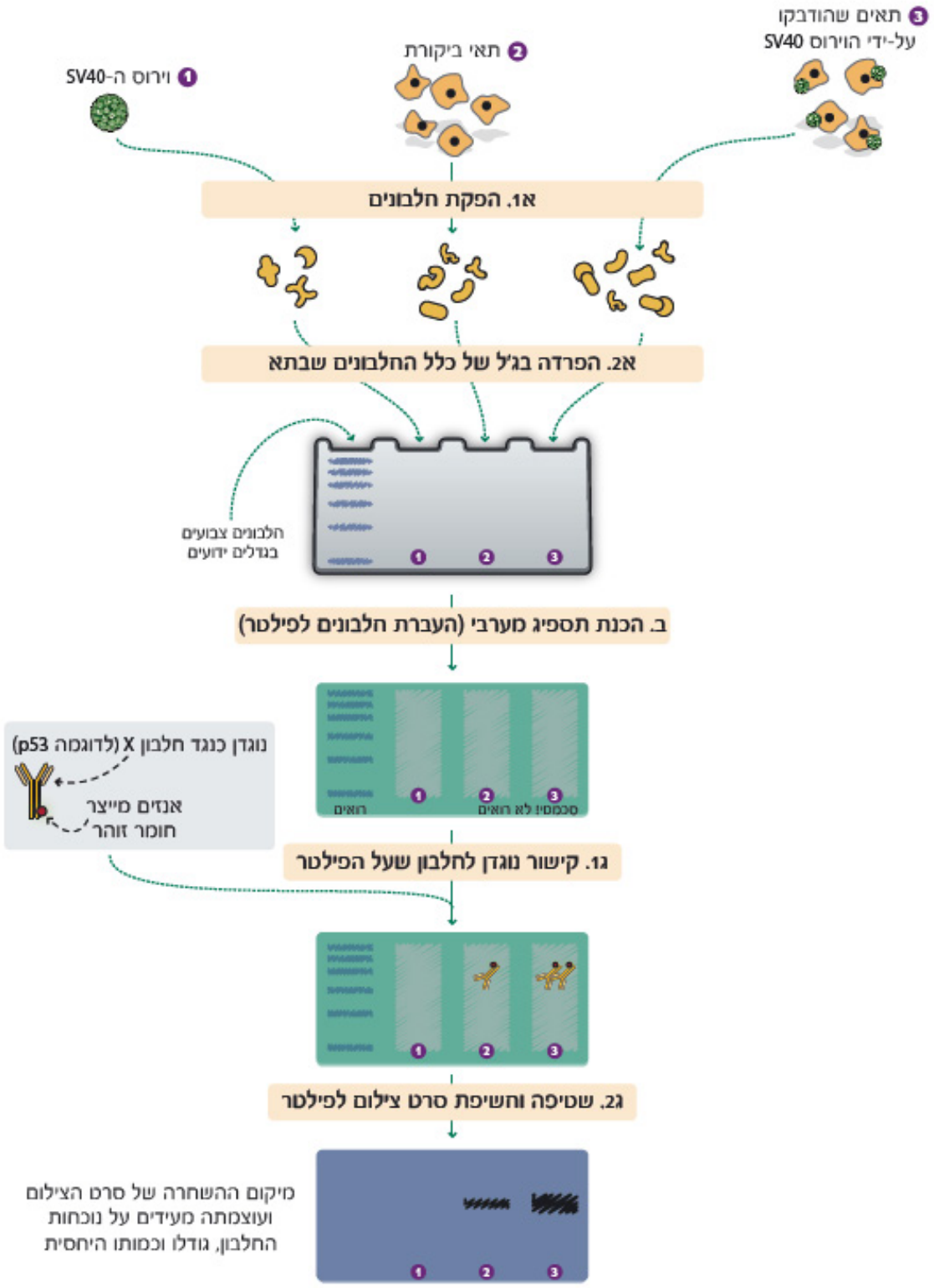
הרשם 7.8: ترسيب باستخدام أجسام مضادة بهدف تحديد وتشخيص البروتينات.

أ. الطريقة لتشخيص بروتينات بواسطة الوسم المشع، جسم مضاد والفصل بالجل. يزرعون خلايا بوجود حامض أميني مشع ويستخلصون البروتينات المشعة. لتشخيص بروتين معين يرسبونه بواسطة جسم مضاد يرتبط به بشكل تخصصي. في نهاية الترسيب، يتمّ الحصول على بروتين مرتبط بجسم مضاد، وبمساعدة بوفر مناسب يمكن استخلاص (تحرير) البروتين المرتبط. في المرحلة التالية، يتمّ فصل البروتين في الجل لتشخيصه وفقًا لحجمه. نظرًا لأن البروتين مشع، يمكنك تعريض فيلم تصوير للجل وقياس الكمية النسبية للبروتين.

ب. تطبيق للطريقة لتشخيص بروتينات مشعة بواسطة أجسام مضادة. يصف الرسم عمليات عزل وترسيب بروتينات مشعة من مصادر مختلفة بواسطة جسم مضاد ضد الأنتيجين T (الذي مصدره فيروس). بعد الفصل بالجل ، وجد أنّ الأنتيجين T يربط بروتين خلوي تمّت تسميته – P53

لا يتم دائمًا وسم البروتينات الخلوية بمادة مشعة بهدف تشخيصها. في طريقة بديلة موضحة في الشكل 7.9، يمكن الملاحظة أنّه من أجل إيجاد بروتين معين وتحديد كميته النسبية، في المرحلة أ، يتمّ استخلاص بروتينات غير موسومة وفصلها في الجل. في المرحلة ب ، يتمّ نقل البروتينات إلى فلتر للحصول على **"تشرب غربي" (Western blot)**. في المرحلة ج، يمكن استخدام جسم مضاد يتعرّف بشكل تخصصي على البروتين المطلوب الموجود في التشرب. لاستكمال عملية إيجاد البروتين على التشرب وتحديد كميته النسبية يستعملون جسم مضاد ربط به مجموعة متوهجة. التوهج تمكن اسوداد فيلم التصوير، وتشير شدّة الاسوداد إلى الكمية النسبية للبروتين في الخلايا التي أستخلص منها.

يوضح الشكل 7.9 تجربة استخدم فيها التشرب الغربي لدراسة بروتين p53. تمّ استخلاص بروتينات من فيروسات (1)، من خلايا ضابطة (2) ومن خلايا مصابة بالفيروس SV40 (3). بعد فصل خليط البروتينات في الجل والحصول على "التشرب الغربي"، تعرض التشرب لجسم مضاد يربط p53. أظهرت نتائج التجربة (كما مبين في الرسم) أنّ p53 غير موجود في الفيروسات ولكن في الخلايا. وبالتالي، كان معروفًا بالفعل أنّ في الخلايا المصابة بالفيروس SV40 تمّ التعبير عن أنتيجين T للفيروس. وقد وُجد أن هذه الخلايا لديها كمية عالية نسبيًّا من p53 مقارنة بالخلايا غير المصابة بالفيروس. الاستنتاج من النتائج المعروضة في الأشكال 7.8 وَ 7.9 هو أنّ الأنتيجين T من الفيروس، وهو يرتبط بـ p53 الذي مصدره من الخلية. أظهرت تجارب إضافية أنّ أنتيجين T يشوش على تحليل البروتين p53 وأنّه وفي أعقاب ذلك تزداد كميته، في الخلية، أعلى من المستويات الطبيعية. الفرضية التي طرحت كانت أنه نتيجة لتراكم p53 في الخلايا المصابة بالفيروس تغيّرت وظيفة p53 وأنّ هذا التغيير كان مرتبطًا بتحوّل الخلية المصابة بالفيروس إلى خلية سرطانية.



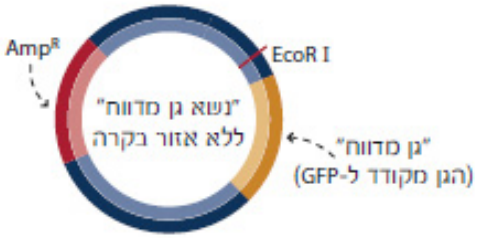
הרשם 7.9: תם תסמים הטריקה התי תשתחם "התשרב הערבי" לתמייז בעס הברוטינות ותחדיד כמיתה התשבית

מן אֶגל תשחיס ברוטינות בה הזה הטריקה, יתַם פסלה בהגל ונקלה אֶל פלתר להחסול עס התשרב הערבי. יתַם תחדיד החגם והכמית התשבית להברוטין בואסטת השתחדם גסם מסאד תחסססי יָרתבט בהברוטין המוגד בה התשרב. יָשתחדמון גסם מסאד מתוהג יָדדי לאסודד פיהם תסויָר. בה מגמוגת התגרבת המיבַּנת בה הָרסם התוסיחי, השתُחדמת אֶגסאם מסאדת סד הברוטין p53 לתשחיס וגוד ותחדיד כמית p53 בה הפיָרוס (SV40 1)، בה חלָיה סאבטת (2) וגה חלָיה מסאבת בהפיָרוס (3).

سؤال 7.2

طُلب منكم تحديد حدود منطقة المراقبة لجين معين تقومون بدراسته. في حوزتكم مقطع DNA يحتوي في طرفيه على مواقع تقييد لـ Hind III و Not I. تنوون اقحامه إلى ناقل يحتوي على جين مخبر لفحص ما إذا كان بمثابة منطقة مراقبة نشطة في خلايا معينة. لا يحتوي الناقل الذي بداخله الجين المخبر المبين في الشكل 7.2 على مواقع تقييد لـ Hind III و Not I. قررتم إدخال رابط في الناقل يحتوي على مواقع التقييد لـ Hind III و Not I واستخدام موقع تقييد EcoR I الموجود داخل الناقل هذا كموقع لادخال الرابط. في الواقع ، يجب عليكم إعداد رابط يحتوي على أطراف مدرجة ملائمة لـ EcoR I والذي يحتوي تسلسله على تسلسل مواقع التقييد الخاصة بـ Hind III و Not I . يُطلب منكم أيضًا وضع نيوكليوتيدين اثنين الذان يستخدمان كفجوة بين تسلسل موقع تقييد Hind III وتسلسل موقع تقييد Not I.

1. ما هو التسلسل الدقيق لكل من الأوليغو-نوكليوتيدين الأثنين الذين يجب أن ينتجى للاستخدام في بناء الرابط للغرض المحدد هنا؟ استعينوا في الجدول 2.1 في الفصل 2.
2. صفوا الخطوات اللازمة لدمج الرابط في الناقل الذي يحتوي على الجين المخبر، ولاستنساخ الناقل الريكومبيننتي.
3. لقد حصلتم على الناقل وبداخله رابط وجين مخبر كما ذكر هنا. ما الخطوات اللازمة لاختبار ما إذا كان المقطع المستخلص الموجود لديكم والذي يحتوي في طرفيه على مواقع Hind III و Not I هو منطقة مراقبة نشطة؟



رسم س7.2-: الناقل الذي يُمَكِّن فحص وجود منطقة مراقبة في مقطع DNA مفحوص

سؤال 7.3

هناك ثلاثة مقاطع يُفترض أن تعمل كمناطق مراقبة وكل واحد منها ألصِق داخل ناقل يحتوي على الجين المخبر المشفر لـGFP. تم اقحام النواقل الريكومبيننتية المختلفة في نوعين من الخلايا كما هو موضح في الجدول. تم إضاءة الخلايا ذات الناقلات المختلفة بالضوء الأزرق ، ويشير الجدول إلى الحالات التي لوحظ بها خلايا متوهجة بالأخضر.

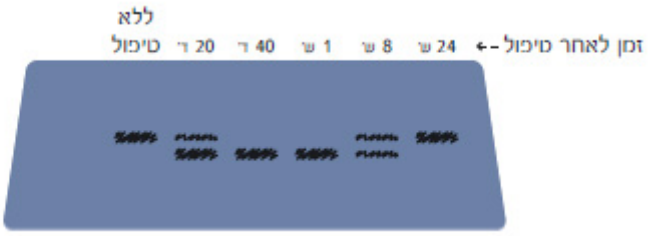
ناقل يحتوي على جين مخبر ومقطع خاص	نوع الخلايا	
	خلايا عادية	خلايا سرطانية
مقطع 1	لا يوجد توهج أخضر	خلايا خضراء
مقطع 2	خلايا خضراء	خلايا خضراء
مقطع 3	لا يوجد توهج أخضر	لا يوجد توهج أخضر

حدد أي العبارات التالية صحيحة. إصلحوا تلك التي ليست صحيحة.

1. يتصرف المقطع 1 كمنطقة مراقبة في كل أنواع الخلايا.
2. المقطع 1 يتصرف كمنطقة مراقبة في الخلايا السرطانية التي تم فحصها.
3. لم يتصرف المقطع 3 كمنطقة مراقبة في أي من الحالات.
4. يربط المقطعان 1 و 2 عامل نسخ.
5. لا يمكن للمقطع 3 ربط عامل النسخ.
6. في الخلايا السرطانية التي تحتوي على المقطع 1 ينتج RNA مشفر لبروتين الـ GFP
7. يرتبط عامل النسخ المرتبط بالمقطع 1 في الخلايا السرطانية بتسلسل الموجود في البلازميد.
8. عامل النسخ المرتبط بالمقطع 2 ينشط الـ RNA بوليميريز.
9. بعد إقحام البلازميد الذي يحتوي على مقطع 2 بجوار الجين المخبر لداخل الخلايا، إنتجت جميع خلايا GFP وأشعوا الضوء الأخضر.

سؤال 7.4

الرسم س-7.4 يصف فيلم تصوير عُرّض لتشرب شمالي مرّ تهجين مع كاشف مشتق من الجين المفضل لديكم، الجين X.



رسم س7.4-: نتائج تشخيص تعبير RNA مصدره جين X (فيلم التصوير بعد تعرضه للتشرب الشمالي).

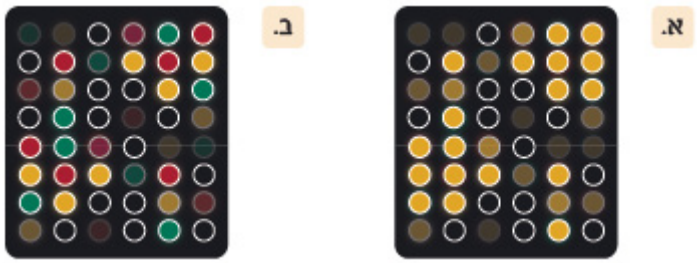
اذكر أي من العبارات التالية صحيح. صحح غير الصحيحة منها.

1. الأشرطة السوداء تمثل جزيئات RNA مصدرها الجين X.
2. مسبب اسوداد فيلم التصوير هو كاشف DNA واحد الذي يرتبط بثلاثة أنواع من جزيئات RNA.
3. في الخلايا غير المعالجة يتضح أن جين X يُنتِج نوعًا رئيسيًا واحدا من جزيء RNA.
4. بعد حوالي 20 دقيقة من بدء العلاج، يبدو أنه ينتج في الخلايا نوعان من جزيئات الـ RNA المستمدة من جين X
5. يمثل الشريط الأسود المنخفض نسخًا من RNA ناتج من جين مختلف عن جين X بعد العلاج المعطى للخلايا.
6. يمثل الشريط الموجود في الموضع السفلي في فيلم التصوير جزيء RNA أقصر من ذلك الذي يمثله الشريط الموجود في الموضع الأعلى.
7. كمية نسخ جزيئات الـ RNA الطويلة في الخلايا غير المعالجة مماثلة لكميتها في الخلايا التي تم فحصها بعد 20 دقيقة من العلاج.
8. قد يمثل كلا الشريطين في نفس العمود RNA ناتج معالجة وRNA ناتج معالجة بديلة.
9. متابعة لـ 8، فإن جزيء الـ RNA القصير من الجين X هو ناتج معالجة، في حين أن جزيء الـRNA الطويل الناتج عن الجين X هو ناتج معالجة بديلة.
10. في جزيء الـ RNA القصير الناتج عن معالجة بديلة قد يكون هناك جزء مفقود مكون من إكسونات يتواجد في جزيء الـ RNA الطويل.
11. متابعة لـ 8 - 10 المعالجة التي تعرضت لها الخلايا تسرع معالجة بديلة وتمنع المعالجة الصحيحة.
12. يبدو أنه بعد 8 ساعات من العلاج عادت الخلايا "لمسارها الطبيعي" وتأثير العلاج انتهى.

سؤال 7.5

لقد أكملت دراساتك في الهندسة الوراثية وتم قبولك للعمل في شركة يتمثل دورها في التحقق من وجود تأثيرات الجانبية للأدوية المعدة لاستخدام الانسان نتيجة لسمية غير المتوقعة. سجلت الشركة براءة اختراع على تطوير تمكنت بواسطته أن تبين أن الأدوية السامة تتسبب في تغيير التعبير عن 22 جينًا في خلايا كبد التي تم تنميتها في مستنبت. هذا مقارنة بتعبير هذه الجينات في خلايا الكبد التي لم تتعرض لنفس المادة. يتم تمثيل هذه الجينات وغيرها من الجينات بواسطة كاشفات على رقاقة DNA. خلال الأسبوع الأول من عملك، طُلب منك فحص هل يمكن المصادقة على استخدام دواءين تجريبيين.

1. ما هي الخطوات في عملك على اختبار الأدوية باستخدام رقائق DNA؟ صف عملك من مرحلة نمو الخلايا في مستنبت وحتى الحصول على نتيجة في رقاقة DNA.
2. في نهاية الأسبوع الأول من عملك، وجدت أنه في التجربة التي تم بها استخدام الدواء أ، تم الحصول على النتيجة في رقاقة DNA كما هو مبين في الجزء أ من الرسم س-7.5. اشرح النتيجة. هل يمكن استخدام الدواء في البشر؟ علل.
3. لقد وجدت أنه في التجربة التي استخدمت بها الدواء ب تم الحصول على النتائج التي المبينة في الجزء ب من الرسم. اشرح النتيجة. هل يمكن استخدام الدواء في البشر؟ علل.
4. كيف يمكن أن تفسر أن بعض المناطق على الرقائق بقيت سوداء؟
5. كيف تفسر أنه في معالجة نتائج الشريحة أ وجدت مناطق ذات نقاط تختلف بشدة اللون الأصفر؟



رسم س7.5-: نتيجة تم الحصول عليها بعد تهجين DNA مكمل موسوم على رقائق DNA

سؤال 7.6

لقد طُلب منك دراسة التعبير عن 18 جينا محددا بمستوى الـ RNA ومستوى البروتين في خلايا معالجة مقارنة بخلايا غير معالجة. للقيام بذلك استعنت بطريقة تستخدم التشرب الشمالي وطريقة تستخدم التشرب الغربي. النتائج التي حصلت عليها كانت كما يلي:

אפיון / גן	תוצאות בשיטה העושה שימוש בתספיג צפוני		תוצאות בשיטה העושה שימוש בתספיג מערבי	
	כמות יחסית של RNA בתא ביקורת	כמות יחסית של RNA בתא מטופל	כמות יחסית של חלבון בתא ביקורת	כמות יחסית של חלבון בתא מטופל
גנים נחקרים #1-7	++	++	+++	+++
גן נחקר #8	+	++	+	++
גן נחקר #9	+	+	+	+++
גן נחקר #10	+	++	+++	+++
גן נחקר #11	+++	-	+	-
גן נחקר #12	-	+++	-	+++
גנים נחקרים #13-18	-	-	-	-

1. ما هي الجينات التي قد يكون ازداد نسخها في أعقاب المعالجة؟
2. لأي جينات قد يتسبب العلاج في إبطاء تحلل البروتين الذي يشفرونه؟
3. من بين الجينات التي تمت دراستها، ما هي النسبة المئوية للجينات التي تأثر تعبيرها نتيجة للمعالجة؟ ما هي النسبة المئوية للجينات التي تغير تعبير البروتين فيها كنتيجة للعلاج؟ ما هي النسبة المئوية للجينات التي تغير تعبير الـ RNA كنتيجة للعلاج؟
4. اقترح آليتين جزيئيتين في الخلية التي قد تفسر التغير في كمية الـ RNA للجين المدروس رقم 8 بعد العلاج.
5. اقترح آليتين قد تفسران كيف يسبب العلاج زيادة في كمية البروتين المدروس الذي يشفر له الجين رقم 9.
6. هل يمكن القول على وجه اليقين أن نسخ الجين رقم 9 لا يتغير نتيجة للعلاج؟
7. إذا كان لديك منطقة المراقبة للجين رقم 9 وناقل يحتوي على جين مُبلغ، اقترح طريقة لفحص ما إذا كان نسخ الجين رقم 9 يتأثر بالفعل بالمعالجة أم لا. قدم مجرى تجربة مفصل قدر الامكان.
8. أي من الجينات الـ 18 التي شملتها الدراسة هو الأكثر تأثرا من العلاج؟ افترض أن العلاج عبارة عن إشعاع تعرضت له الخلايا وأن النتيجة البيولوجية للعلاج هي موت بعض الخلايا. وفقًا لهذه النتيجة من العلاج، اقترح تحدي لوظيفة هذا الجين.
9. هل تعتقد أن الجين رقم 11 قد يعمل أيضًا في حماية الخلية من العلاج؟
10. هل من العملي الاستمرار في تشخيص التعبير عن جميع الجينات البالغ عددها 20000 في خلية بشرية بعد استعمال طريقة التشرب الشمالي؟ علل وقدم بديلا، إن وجدت.

سؤال 7.7

SDF-1 هو بروتين يفرز خارج الخلية. في الرسم س-7.77 مبين جزء من تسلسل الجين المشفر لـ SDF-1. بالتسلسل مبينة نقطة بداية النسخ (+1) وكذلك مشدد الكودون الأول المشفر للحامض الأميني الأول في البروتين الذي يبدأ منه إطار القراءة المفتوح. في تسلسل منطقة المراقبة، أي على اليسار من نقطة بدء النسخ، تم وضع علامة على مواقع ارتباط عوامل النسخ المختلفة وتم الإشارة إلى أسمائها.

רסם س7.7-: منطقة مراقبة الجين SDF-1.

أ. ماذا يمكنك أن تقول عن تسلسل النيوكليوتيدات بين نقطة بداية النسخ والكودون الأول؟

ב. من المعروف أن نسخ الجين SDF-1 يحدث في خلية معينة، هي الخلية أ ، لكن من غير المعروف ما إذا كان الجين قد يُنسخ في الخلية ب وتحت أي ظروف. لهذا الغرض، تم إدخال أجزاء من منطقة مراقبة الجين في ناقل يحتوي على الجين المخبر GFP. تم إقحام النواقل الريكومبيننتية الناتجة في الخلايا من النوع أ و ب التي نمت في ظروف ضابطة تحت ظروف السيطرة أو عُرّضت لمعالجة معينة. افترض أنه عندما يسمح مقطع معين من إنتاج بروتين GFP، فإنه يربط عامل نسخ يمكن التعبير عن الجين الخلوي SDF-1. النتائج التي تصف تعبير GFP بعد الاقحام مبين في الجدول التالي:

מקטע ה-DNA בסמוך לגן המדווח	ביטוי יחסי של GFP בתא א'		ביטוי יחסי של GFP בתא ב'	
	תנאי ביקורת	לאחר טיפול	תנאי ביקורת	לאחר טיפול
F→A	++	++++	-	++
F→D	++	++	-	-
D→B	-	++	-	++

تشير الأحرف اللاتينية أعلى التسلسل إلى نقطة البداية أو النهاية لمقاطع مختلفة، كما هو موضح في الرسم س- 7.7.

أجب عن الأسئلة التالية:

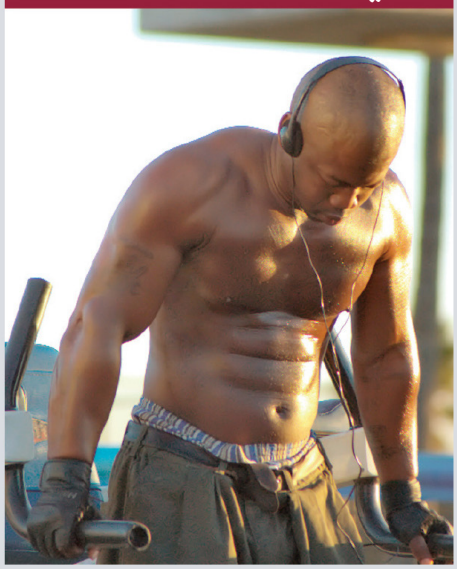
1. ما هو التشابه والاختلاف بين التعبير عن جين SDF-1 في الخلية أ وتعبيره في الخلية ب؟
2. ماذا يمكنك أن تقول عن دور المقاطع F-D في مراقبة في التعبير عن الجين SDF-1؟
3. ما الذي يمكنك قوله حول ربط عوامل النسخ ADF-1 و SP-1 بمنطقة المراقبة للجين في الخلايا المختلفة وفي الظروف المختلفة؟
4. ما هي عوامل النسخ - واحدة على الأقل - التي قد تكون مسؤولة عن التعبير عن جين SDF-1 في الخلية أ تحت الظروف الضابطة ولكن ليس تحت ظروف العلاج؟
5. ماذا ستفعل لتحديد بالضبط عوامل النسخ - واحدة على الأقل - المسؤولة عن التعبير فقط في ظل الظروف الضابطة؟

الهندسة خلايا وكائنات حية لأهداف البحث والتطبيقات البيوتكنولوجية

أحد التطبيقات الرئيسية للهندسة الوراثية هو دراسة وظائف الجينات. بعد تحديد وظيفة الجين، يمكن فحص إمكانية استغلال الجين لإنتاج دواء. العديد من الأدوية التي نتجت بمساعدة الهندسة الوراثية هي في الواقع بروتينات ريكومبيننتية، مثل الإنسولين الذي يتمّ إنتاجه في البكتيريا. لا يقل أهمية استغلال لتحسين الكائنات الحية لخدمة الانسان. كما هو موصوف في الرسم 8.1، لتنفيذ تطبيقات بيوتكنولوجية متطورة، هناك حاجة للتقدُّم في ثلاثة مسارات متتالية أساسية. أوّلًا، يجب استنساخ جينات لها صلة، ولهذا الهدف نتقدّم في "مسار أ": "من DNA إلى جين مستنسخ". بعد استنساخ جين، نتقدّم في "المسار ب": "من جين إلى تحديد وظائف الجين"، أي، يعملون لتحديد وظائف الجين المتنوعة. هكذا باختصار يمكن استغلال جين مستنسخ لكي يتمّ إنتاج كميات فائضة من نواتجه في الخلية (RNA وبروتين أو RNA فقط). في المقابل، وجود جين مستنسخ يُتيح وقف التعبير عن بروتين يشفر له. دراسة التغيير في وظيفة الخلية نتيجة للتعبير الزائد (إنتاج فائض) لناتج جين معيّن، بالإضافة إلى دراسة تصرف الخلية نتيجة لوقف التعبير عن ناتج الجين، تُستعمل لتحديد وظائف الجين ونواتجه.

يمكن التحكم في التعبير عن جين ليس فقط في خلية وحيدة بل في الكائن الحي الكامل. لذلك عند فحص تأثير تنظيم التعبير عن جين في كائن حي كامل، يُمكن طرح السؤال التالي، مثلًا، إذا تغيّر حجم الكائن الحي أو إذا تغيّر تصرفه وغير ذلك . بعد تحديد وظائف جين في خلية وكائن حي، يمكن أحيانًا استغلال الجين لتطبيق بيوتكنولوجي بحسب مسار جـ: "من بين وظائف الجين في التطبيق البيوتكنولوجي". هذا الفصل يبحث في تشكيلة المبادئ والتوجهات التجريبية التي تُستعمل لتعريف وظائف الجين (التلخيص موجود في الرسم 8.18). الفصل يوضح أيضًا كيف اكتُشفت وظائف جينات محدّدة، وكيف استُغلت جينات لها وظائف معروفة في تطبيقات بيوتكنولوجية؟

أن تكون قانونيا وصحيا رياضة بدون مخدرات



في عصر الهندسة الوراثية يمكن استعمال الخلايا كـ "معامل" لإنتاج كميات كبيرة من البروتينات الريكومبيننتية المستعملة كأدوية. الرياضيون الذين يحاولون تحسين أدائهم "اكتشفوا" بعض هذه البروتينات الريكومبيننتية، ويتناولونها لتحسين انجازاتهم. أحد البروتينات الذي استُعمل بشكل غير قانوني هو هورمون النمو الريكومبيننتي. عند حقنه لشخص بالغ بكمية أكبر بـ 25 ضعف من تلك المستهلكة من قبل ولد مُعالج، يؤدي إلى رفع كتلة العضلات وبذلك يزود الجسم بقوة. من الصعب الكشف عن بقايا هذا الهرمون الريكومبيننتي المستعمل كمخدر. الرياضيون الذين يستعملون بروتينات ريكومبيننتية بجرعات كبيرة متعرضين لمخاطر صحية ومن بينها السرطان.

تُتيح الهندسة الوراثية تعبير زائد لنواتج جين أو الحد من التعبير عن جين في خلية. دراسة التغيير في تصرف الخلية أو دراسة الكائن الحي في أعقاب تنظيم تعبير كهذا تُتيح تحديد وظائف جين معيّن. بعد تحديد وظائف جين معيّن يُمكن فحص إمكانية استعماله في تطبيقات بيوتكنولوجية. التطبيقات البيوتكنولوجية الشائعة هي إنتاج أدوية وتحسين كائنات حية.

جينيك: هل سمعت! انتقل للسكن في حينا عدد من باحثي معهد جينتو.

جينتين: وهل تخاف من أن بعضهم يعملون في الاستنساخ؟

جينيك: تمامًا! لا أُريد بتاتا أن يستنسخني واحدا منهم

جينتين: ليس هناك ما يقلقك، هنالك وسائل لمعرفة من منهم يعمل في استنساخ الكائنات الحية...

- اذا استلطفت كلبا سيقترح عليك واحدا مماثلا
- غير متزوج ولديه 17 ابنا
- عندما يولد لزوجتك توأم سيقال بأنك هاويا
- تنظر من الشباك فترى نفسك تنظف سيارته...

جينيك: الأن، هدأتني

عند التقاء الـ DNA الريكومبيننتي والنقود: "ولادة" البيوتكنولوجيا الحديثة

السنة هي 1976، أربع سنوات بعد أن وضع كوهن وبوير فكرة الاستنساخ بواسطة بلاسميدات وبكتيريا، وبرهنوا بأن تكنولوجيا الـ DNA الريكومبيننتي ممكنة. هذه السنة أثمرت لقاء تاريخي إضافي لهربرت بوير مع مبادر ورجل أعمال يدعى بوب سوانسون (Bob Swanson). بوير، خلافا لاخرين، اقنع بواسطة سوانسون انه يوجد وسيلة لاستعمال هذه التكنولوجيا لهدف التطبيقات الاقتصادية. الفكرة التجارية التي كانت نصب أعين الاثنين كانت واضحة: استعمال تكنولوجية كوهن – بوير، تكنولوجية DNA ريكومبيننتي، لكي يتمّ إنتاج بروتينات بشرية ذات قيمة طبية وتجارية في البكتيريا. قدّروا بأنه لتحقيق ذلك يجب دمج الـ DNA المشفّر للبروتين المطلوب للإنسان بملاذاة للـ DNA تحتوي على موقع مُراقبة لدى البكتيريا، وذلك باستعمال ناقل ملائم. في نهاية عملية تحول البكتيريا مع بلاسميد ريكومبيننتي كهذا من المتوقع أن يتمّ التعبير عن البروتين الريكومبيننتي البشري في البكتيريا. بوير وسوانسون علموا أنّه يوجد طلب كبير لبروتين الإنسولين، ولذلك فإنّ إنتاجه في البكتيريا يُجني فوائد اقتصادية.

حتى 1978 كان متبعًا استخلاص إنسولين من بنكرياس حيوانات وبالإساس من بنكرياس خنزير. استخلاص وتنقية إنسولين من بنكرياس خنزير لمعالجة مرضى سكري هو بدون شك أحد إنجازات الصناعة البيوتكنولوجية التقليدية في السنوات 1922-1978. رغم أنّ صفات الإنسولين من بنكرياس خنزير تحسن مع مرّ السنين، إلا أنّ استعماله تبقى مع إشكالية بسبب ظواهر جانبية وتكلفة مرتفعة نسبيًّا. لو ما زلنا حتى يومنا هذا نستخلص الإنسولين من بنكرياس خنزير بكميات تخدم 10 ملايين إنسان حياتهم متعلقة به، كنا بحاجة إلى 10 مليارات من بنكرياس الخنزير في السنة.

DNA	פרקים 2-6 מסלול א'	גן משובט	פרקים 5, 7-8 מסלול ב'	קביעת תפקידיו של גן	פרק 8 מסלול ג'	יישומים ביוטכנולוגיים מבוססי הנדסה גנטית

רשם 8.1: متطلبات تحقيق تطبيقات بيوتكنولوجية تعتمد على الهندسة الوراثية.

في هذا الرسم يوجد عرض لمسارات البحث والتطوير الرئيسية التي تعتبر الأساس لوجود البيوتكنولوجية المعتمدة على الهندسة الوراثية. بيوتكنولوجيا متطورة كهذه تُتيح من بين أمور أخرى، تحسين كائنات حية بواسطة تعبير زائد لجينات معيّنة أو الحد من التعبير عن جينات أخرى. بالإضافة إلى ذلك بعض الجينات التي حُدّدت وظيفتها يُمكن أن تُستخدم لإنتاج أدوية، وأحيانًا يُمكن أن تُستخدم الجينات لعلاج جيني (وراثي).

أحد إنجازات البيوتكنولوجيا المعتمدة على الهندسة الوراثية هو إنتاج إنسولين بشري في البكتيريا. تطبيق بيوتكنولوجي كهذا يُتيح الحصول على إنسولين بجودة عالية، بكميات كبيرة وبسعر منخفض نسبيًّا. لكي يتم التعبير عن بروتين انسان في بكتيريا، يجب اقحام الى داخل البكتيريا ناقل ملائم الصق به DNA بشري يشفر للبروتين المطلوب. لتحقيق تطبيق بيوتكنولوجي شبيه بهذا المبدأ يجب العمل بحسب الخطوات الثلاث المفصلة في الرسم 8.1

رافق السعي وراء انتاج انسولين من انسان في بكتيريا بواسطة DNA ريكومبيننتي أمال عديدة. إحدى الآمال كانت أنّه يُمكن إنتاج كميات كبيرة من الإنسولين في خلية بكتيريا وأنّ استخلاصه من البكتيريا ستكون سهلة واقتصادية. وهكذا، وبالرغم من الصعوبات المتوقعة وبالرغم من أنه حتى سنة 1976 لم يُستنسخ الـ DNA المشفّر للإنسولين، استثمر كل من سوانسون وبوير 500 دولار لتأسيس الشركة البيوتكنولوجية الأولى في العالَم التي ستعتمد على الهندسة الوراثية. اسم الشركة كان Genentech (جيننتيك).

النجاح لم يتأخر في التحقق. في سنة 1978، في يوم واحد بَعد أن استُخلص في شركة جيننتيك إنسولين إنسان من بكتيريا، باعت جيننتيك حقوق إنتاج الإنسولين لشركة ليلي (Lilly) التي سيطرة على سوق إنتاج الإنسولين من البنكرياس. في سنة 1980 تم اصدار الشركة في البورصة الأمريكية، وفي اليوم الأول لتداول أسهمها كان السعر الاولي للسهم 35 دولار وارتفع إلى 89 دولار، رقم قياسي تاريخي في تلك الفترة للسهم الواحد في اليوم. ربح بوير وسوانسون 85 مليون دولار كل واحد منهما. العديد من العاملين الآخرين الذين حصلوا على أسهم بدلًا من معاشهم أصبحوا أغنياء أيضًا.

في أعقاب شركة جيننتيك تأسست شركات إضافية استعملت تكنولوجيا الـ DNA الريكومبيننتي. احتاجت الشركات للمعرفة التي تراكمت في الجامعات، وسريعًا اتضح أنّ باحثين في مؤسسات أبحاث اكاديمية يمكن أن يكونوا شركاء لمبادرات بيوتكنولوجية ربحية. يستخدم اليوم العلماء كمستشارين في شركات بيوتكنولوجية واحيانا يتركون مؤسسات الأبحاث الاكاديمية لصالح مهنة في شركات بيوتكنولوجية.

كانت سنة 1980 سنة تحوّل ليس فقط بسبب نجاح شركة جيننتك في البورصة، بل أيضًا لأنّه، في هذه السنة، تمّ الحصول على تصريح من معهد الصحة الأميركي لإنتاج بروتينات إضافية في البكتيريا. هذه البروتينات كانت هورمون النمو البشري (Human Growth Hormone) (الفصل 4) والبروتين الذي يحد من نشاط هورمون النمو سوماتوستاتين (Somatostatin). هورمون النمو يُعطى لأولاد لا يُنْتِج جسمهم كمية كافية من الهورمون. إذا لا يزودون بهذا الهورمون يبقون أقزامًا. يُساعد هورمون النمو على علاج عظام مكسورة أيضًا، وفي معالجة أنواع معيّنة من الجروح. في الولايات المتحدة لوحدها يحتاج حوالي 10000 ولد لهذا الهورمون. في المقابل، سوماستاتين الذي يتمّ إنتاجه في البكتيريا أيضًا، يُستعمل لمعالجة أشخاص لا يستطيعون إنتاج هذا الهورمون ويمكن أن يتحولوا إلى "عمالقة" اذا لم يحصلوا عليه.

> قبل أن يصبح من الممكن إنتاج هورمون النمو في البكتيريا، كان من الواجب استخلاصه من الغدد النخامية التي مصدرها من الموتى. لتزويد احتياجات 1000 ولد، تمّ تشريح 70000 جثة سنويًّا. أدى إنتاج هورمون النمو في البكتيريا إلى انخفاض تكاليف الإنتاج وأمن تزويد دائم ونوعي لهذا الهورمون.

إمكانية إنتاج كميات كبيرة من البروتين، أي إنتاج زائد للبروتين (Protein overproduction) في البكتيريا لأهداف طبية، طُرحت على بساط البحث إمكانية استعمال مستنبتات خلايا حيوانية لإنتاج زائد لبروتينات يُمكن أن تُستعمل كأدوية. أحد البروتينات الذي يَنْتُج بإنتاج زائد في خلايا ثدييات تنمو في مستنبت، هو الهورمون اريثروبويتين (Erythropoietin) أو باختصار EPO. هذا الهورمون يتمّ إنتاجه في الكلى بكميات منخفضة، يُفرز لمجرى الدم، يصل النخاع العظمي بواسطة الدم، وهناك يُحفّز إنتاج خلايا دم حمراء.

بروتين بشري إضافي يتمّ إنتاجه في البكتيريا هو هورمون النمو. هذا الإنتاج البيوتكنولوجي يمكن من التنازل عن الحاجة لاستخلاص الهورمون من جثث موتى. هذا الهورمون يُعطى بشكل خاص لأولاد لا يُنْتِج جسمهم كميات كافية من الهورمون.

باحثوا شركة أمجين (Amgen) تمكنوا من اقحام بلاسميد يحتوي على الجين المشفر لـ EPO الى داخل خلايا تنمو في مستنبت. تمكنت الخلايا من التعبير الزائد عن هورمون الـ EPO، وبعد استخلاص الهورمون من هذه الخلايا تبيّن أنّه يعمل تمامًا كالـ EPO الذي يَنْتُج في الجسم. الـ EPO الذي يتم انتاجه بأساليب الهندسة الوراثية ويحقن للإنسان، ينجح في رفع عدد خلايا الدم الحمراء في مرضى فقر الدم ويوفر الحاجة إلى

> الحاجة لإنتاج بروتينات ريكومبيننتية معيّنة (بروتينات يتمّ إنتاجها بطرق الـ DNA الريكومبيننتي) في خلايا حيوانات في مستنبت وليس في بكتيريا سببها أنّه ليس كل بروتين بشري يتمّ التعبير عنه في بكتيريا يَنْتُج في صورته الفعّالة. مثلًا: العديد من البروتينات تصبح فعّالة فقط بعد أن ترتبط بها سكريات معيّنة في أماكن ملائمة على البروتين. هذا الأمر لا يحدُث في البكتيريا لأنّها لا تحتوي على إنزيمات يمكنها القيام بذلك. بالإضافة إلى ذلك، ليس كل بروتين بشري يَنْتُج في الشكل الصحيح في خلية البكتيريا. طي ومبنى ثلاثي غير صحيح يعني عدم نشاط صحيح للبروتين.
>
> إيجابية استعمال خلايا في مستنبت لهدف التعبير الزائد هو أنّ هذه الخلايا تنقسم بسرعة وتمكّن من تعزيز وتيرة إنتاج البروتين الريكومبيننتي.
>
> عندما تُصاب الكلى ويصبح حاجة لعلاج ديالیزا، يتضرر انتاج الاريثروبويتين (EPO) أيضًا. يتطوّر لدى المرضى فقر دم حاد (نقص في خلايا الدم الحمراء) يؤدّي إلى ضعف حاد في الجسم، وذلك نتيجة لنقص الاكسجين. كذلك مرضى السرطان الذين يحتاجون لعلاج كيماوي يمكن أن يتطوّر لديهم فقر دم. هكذا EPO ريكومبيننتي ينقذ حياة مرضى السرطان ومرضى الكلى.

التبرع بالدم. الـ EPO هو دواء مكلف نسبيًّا، ودورة مبيعاته السنوية تُقدّر بملياردات الدولارات. ولكن اتضح أنّ مستهلكي الدواء هم ليس مرضى فقط (انظر لصندوق 8.1).

يوجد اليوم في السوق حوالي 30 بروتين يتمّ إنتاجها بطرق الهندسة الوراثية وتُستعمل كأدوية. معظم هذه البروتينات هي هورمونات، عوامل نمو وبروتينات تنظّم رد فعل جهاز المناعة. حوالي 300 بروتين آخر موجودة في مراحل فحص إمكانية استعمالها كأدوية. هذا العدد يمثّل جزء بالمئة فقط من عدد الجينات لدى الإنسان، وهذا الأمر يدل على إمكانيات إضافية موجودة في هذا المجال.

مسار البحث والتطوير الذي يهدف الى إيصال بروتين معيّن إلى خط النهاية كدواء، هو مسار مكلف جدًّا. تكلفته تُقدّر بأكثر من مليارد دولار للبروتين، وذلك بالأساس بسبب الحاجة إلى تجارب سريرية معقدة بهدف تصريح الدواء.

يهدف بحث وظائف الجينات الى إيجاد جينات إضافية يمكن استغلالها لتطوير أدوية. مبادئ البحث في وظائف الجينات المختلفة موصوفة في قصة الغلاف الموزعة على افتتاحيات الفصول المختلفة للكتاب، وفي الرسم 8.18. يمكن تلخيص المبادئ على الشكل التالي: لكي نعرف الوظائف المختلفة لجين، يسعون من بين أمور أخرى إلى تنظيم التعبير عن الجين (رفع التعبير عنه أو الحد من التعبير عنه بمساعدة الهندسة الوراثية). عادة تعبير زائد عن جين ومنع التعبير عنه يُتيح فحص كيفية تغيّر سلوك الخلية والكائن الحي، ومنه ممكن التوصل إلى وظائف الجين المدروس. بين الحين والآخر يؤدي بحث كهذا لإيجاد جين له أهمية في مجال الطب. جين يصبح له أهمية طبية عندما يؤدي تنظيم كمية ناتجه في الجسم (زيادة أو تقليل كميته في الجسم) إلى تحسين الحالة الصحية للفرد.

يتواجد اليوم في مختبرات الأبحاث في العالَم آلاف الجينات التي يتمّ التعبير الزائد عن نواتجها أو الحد من التعبير عنها.

كيف يتمّ تنظيم التعبير عن نواتج الجين في الخلية؟ أي، كيف يتمّ التحكم في التعبير عن نواتج الجين في الخلية؟

الهندسة الوراثية تُتيح تعبير زائد لبروتينات لها قيمة طبية في خلايا ثدييات تنمو في مستنبت؟ مثال على تطبيق كهذا هو إنتاج الهورمون EPO الذي يُعطى للذين يعانون من فقر الدم. كي يتمّ اختبار إمكانية استغلال جينات إضافية لإنتاج أدوية، يجب التقدُم في مسار يبدأ بتحديد وظائف جين مفحوص. تقليل التعبير عن جين في كائن حي يمكن أن يُستعمل كدواء في أنواع معيّنة من الأمراض.

صندوق 8.1: سموم من مصدر غير متوقع – بروتينات تمّ إنتاجها بمساعدة الهندسة الوراثية.

يشارك الرياضيون في مسابقات، سموم غير قانونية لتعزيز الأداء هو اغراء يصعب مواجهته. من المعروف أنّ سموم كالمنشطات تعزز من أداءات جسدية معيّنة. من السهل الكشف عن سموم كهذه في فحوصات. في عهد الهندسة الوراثية، في مجال الطب بدأ رياضيون باستعمال بروتينين ريكومبيننتيين، على الأقل، يُمكنها تعزيز الأداء ويصعب الكشف عنها لدى المفحوصين. الأول هو هورمون النمو، والثاني هو الـ EPO. عندما يتمّ حقن هورمون النمو للبالغين بكمية أكبر بـ 25 ضعف من الكمية التي يستهلكها الأولاد، تؤدي إلى رفع كتلة العضلات وحجمها وهكذا تُعطي أفضلية القوة للمستعملين.

بمساعدة الـ EPO يرفع الرياضيون المخالفون من تركيز خلايا الدم الحمراء في دمهم، الأمر الذي يرفع من تزويد الاكسجين للعضلات. هكذا يحسّن مستخدمو الـ EPO اداءاتهم الرياضية في مجالات رياضية تحتاج إلى قدرات هوائية جيدة كالركض لمسافات طويلة، السباحة وسباق الدراجات. من الجدير بالذكر أنّ الرياضيين الذين يستهلكون هذه البروتينات الريكومبيننتية بوجبات كبيرة لتحسين أداءاتهم معرضون لمخاطر صحية ومن ضمنها السرطان.

تعبير زائد عن ناتج جين في خلايا حيوانية تنمو في مستنبت

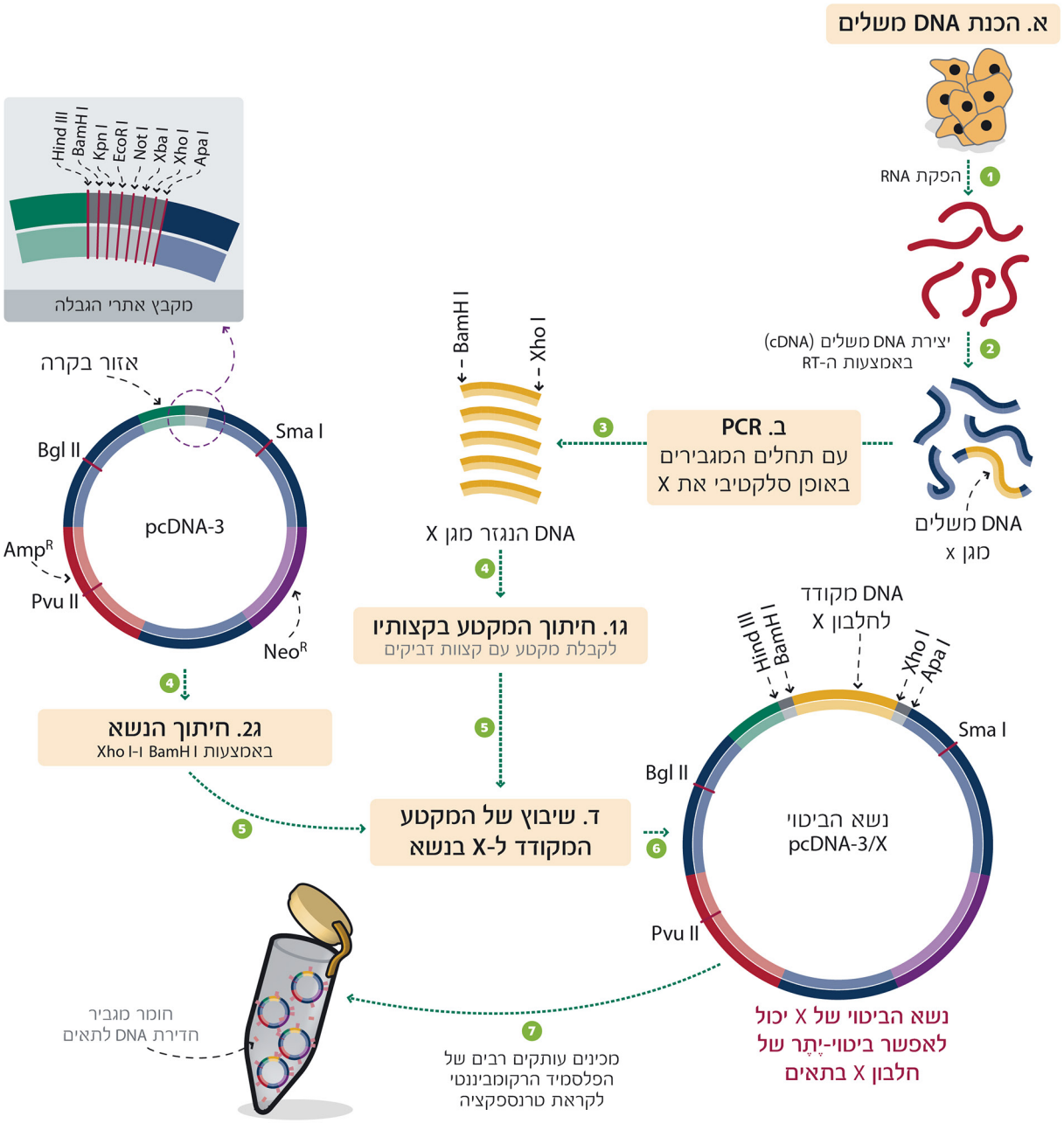
استنساخ جين واستنساخ الـ DNA المُكمل له يُتيح تنفيذ تجارب متنوعة تهدف إلى تحديد وظائف الجين.

إحدى العمليات الأولى للكشف عن وظائف جين هي التعبير الزائد (Over-expression) عن الجين في الخلايا. يُمكن تعريف تعبير زائد عن جين في خلية كحالة يتمّ فيها إجبار الخلية على إنتاج كمية كبيرة (فائض) من ناتج الجين (RNA وبروتين أو RNA فقط). إحدى الطرق لتحقيق التعبير الزائد في خلايا حيوانية تبدأ بدمج الجين – أو مقطع الـ DNA الذي يشفّر للبروتين المطلوب – داخل ناقل ملائم يسمّى ناقل تعبير. ناقل تعبير (Expression Vector) تقليدي هو بلاسميد يحتوي على منطقة مُراقبة ملائمة بجانبه يوضع الجين \الـ DNA المُكمل المعنيين بالتعبير عنه. لكي يتمّ إكمال عملية العبير الزائد عن الـ DNA المطلوب بهدف إنتاج البروتين المطلوب للخلية، مثلًا، يقحمون ناقل التعبير الريكومبيننتي للخلايا. التعبير عن البروتين المطلوب في الخلايا يصبح ممكنًا بمساعدة منطقة المراقبة لدى الناقل وعوامل نسخ خلوية ترتبط به. بعد الحصول على تعبير زائد لناتج الجين المعيّن، يفحصون ردة فعل الخلية للتعبير الزائد هذا بهدف تعريف وظائف الجين.

كما ذُكر للتعبير داخل خلايا عن مقطع DNA معيّن، يجب دمجه داخل ناقل يُتيح التعبير عنه. يمكن تنفيذ دمج كهذا بواسطة عمليات أساسية موصوفة في فصل 3. كما هو موصوف هناك، يمكن قطع الناقل والـ DNA المخصص للدمج باستعمال نفس انزيمات التقييد لتمكين الربط بين الـ DNA المطلوب والناقل.

للحصول على تعبير زائد عن البروتين يُمكن استعمال الـ DNA المُكمل للجين المدروس. لكي يتمّ دمج DNA مُكمل داخل ناقل لإنتاج ناقل تعبير، يُمكن استغلال عملية الـ PCR-RT (رسم 8.2). هكذا كما هو موصوف في الرسم 8.2، في المرحلة الأولى يستخلصون RNA ملائم ناتج عن التعبير عن الجين المطلوب وينتجون DNA مكمل. في المرحلة التالية يُستعمل الـ DNA المُكمل لمضاعفة انتقائية للـ DNA المطلوب الذي يرغبون اقحامه للناقل. يقومون بذلك بواسطة برايمرات تحتوي على تسلسلات مشتقة من الـ DNA المطلوب. يلصقون المقطع الناتج في الـ PCR للناقل الملائم، ويَنْتُج ناقل تعبير (رسم 8.2). إذا كان المقطع المطلوب الصاقه لا يحتوي على مواقع تقييد في أطرافه يُمكن استعمال PCR خاص (صندوق 8.2)

إحدى العمليات الأولى للكشف عن وظائف جين هي تعبير زائد عن ناتج الجين في الخلايا. للحصول على تعبير زائد لناتج الجين في خلية يجب اقحام الجين إلى داخله (أو الـ DNA المُكمل للجين) عندما يكون ملتصق بناقل. ناقل يمَكّن تعبير زائد عن RNA أو RNA وبروتين داخل الخلية يسمى ناقل تعبير. تعبير زائد عن نواتج جين بمساعدة ناقل تعبير تمكن من فحص نوع التغيير الذي حدث في الخلية نتيجة لهذا التعبير بهدف تحديد وظائف الجين.



רסם 8.2: استعمال RT-PCR لإنتاج ناقل ريكومبيننتي أُعِدّ للتعبير الزائد عن بروتين.

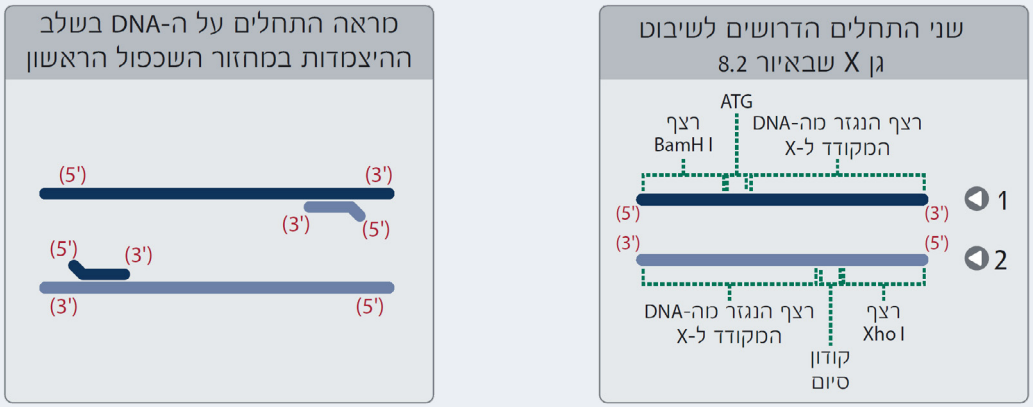
الناقل pcDNA-3 يمكّن تعبير زائد عن DNA مطلوب (إنتاج RNA وبروتين ناتج عنه) في خلايا ثدييات. بهدف التعبير بواسطة هذا الناقل يجب الصاق مقطع الـ DNA المطلوب في داخله، عادة DNA مُكمل مشتق منه. لهذا الهدف من المتبع إعداد DNA مُكمل (مرحلة أ) وتنفيذ مضاعفة للـ DNA المطلوب بواسطة PCR (مرحلة ب). لهذا الهدف يستعملون برايمرات لها تسلسل مشابه لتسلسل الـ DNA المطلوب. يستغلون مواقع تقييد موجودة في أطراف المقطع المضاعف لكي يتمّ دمجه في داخل الناقل pcDNA-3 (مراحل ج و-د). في العملية 7 يعدون ناقل التعبير الريكومبيننتي للاقحام في الخلايا لتمكين عملية التعبير الزائد عن البروتين المطلوب.

AmpR – الجين الذي يُكسب الصمود للانتيبيوتيكا أمبيسلين، NeoR – الجين الذي يُكسب الصمود للانتيبيوتيكا G418.

كما هو موصوف في الرسم 8.2ج 2، لناقل تعبير يوجد منطقة مراقبة تمكن نسخ الجين في الخلية المستقبلة. للحصول على تعبير زائد للبروتين في الخلايا من المتبع استعمال DNA مكمل مخصص لدمج بداخل ناقل التعبير قريبا من منطقة المراقبة. للحصول على DNA مُكمل ممكن تنفيذ RT-PCR (رسم 8.2 أ-ب). هكذا يستخلصون RNA، ينتجون DNA مُكمل وبعد ذلك يضاعفون مقطع الـ DNA المُكمل المطلوب بواسطة الـ PCR.

صندوق 8.2: "PCR يضيف مواقع تقييد" وينجع دمج مقطع DNA في ناقل.

لاقحام مقطع DNA محدد لداخل ناقل، يمكن الاستعانة بالـ PCR. اذا كان مقطع الـ DNA الذي نريد اقحامه لا يحتوي في أطرافه على مواقع تقييد ملائمة يمكنها أن تستعمل للارتباط والاندماج بالناقل، يمكن عندها استعمال برايمرات خاصة. هكذا يمكن إجراء PCR مع برايمرات تحتوي على تسلسل مشتق من الـ DNA المطلوب (الذي يحدّد أطراف المقطع الذي سيُضاعف) وبجواره تسلسل موقع تقييد يضعونه بطرف البرايمر. يُمكن استعمال PCR بمساعدة برايمرات كهذه ، لأنّه بَعد المضاعفة يَنْتُج المقطع المطلوب الذي يحتوي في طرفيه على إضافة مصطنعة لمواقع تقييد مطلوبة. في المرحلة التالية يُمكن استعمال إنزيمات تقييد لقطع المقطع – ناتج المضاعفة – في مواقع التقييد التي أُضيفت في طرفيه وعندها يتمّ دمجه في الناقل (رسم 8.2). تدعى العملية من بدايتها وحتى نهايتها استنساخ بواسطة "PCR مضيف مواقع تقييد". يمكن توضيح استنساخ بواسطة "PCR مضيف مواقع تقييد" بواسطة الحالة الخاصة لاستنساخ الـ DNA المشفّر لـ p53 (رسم 8.3)

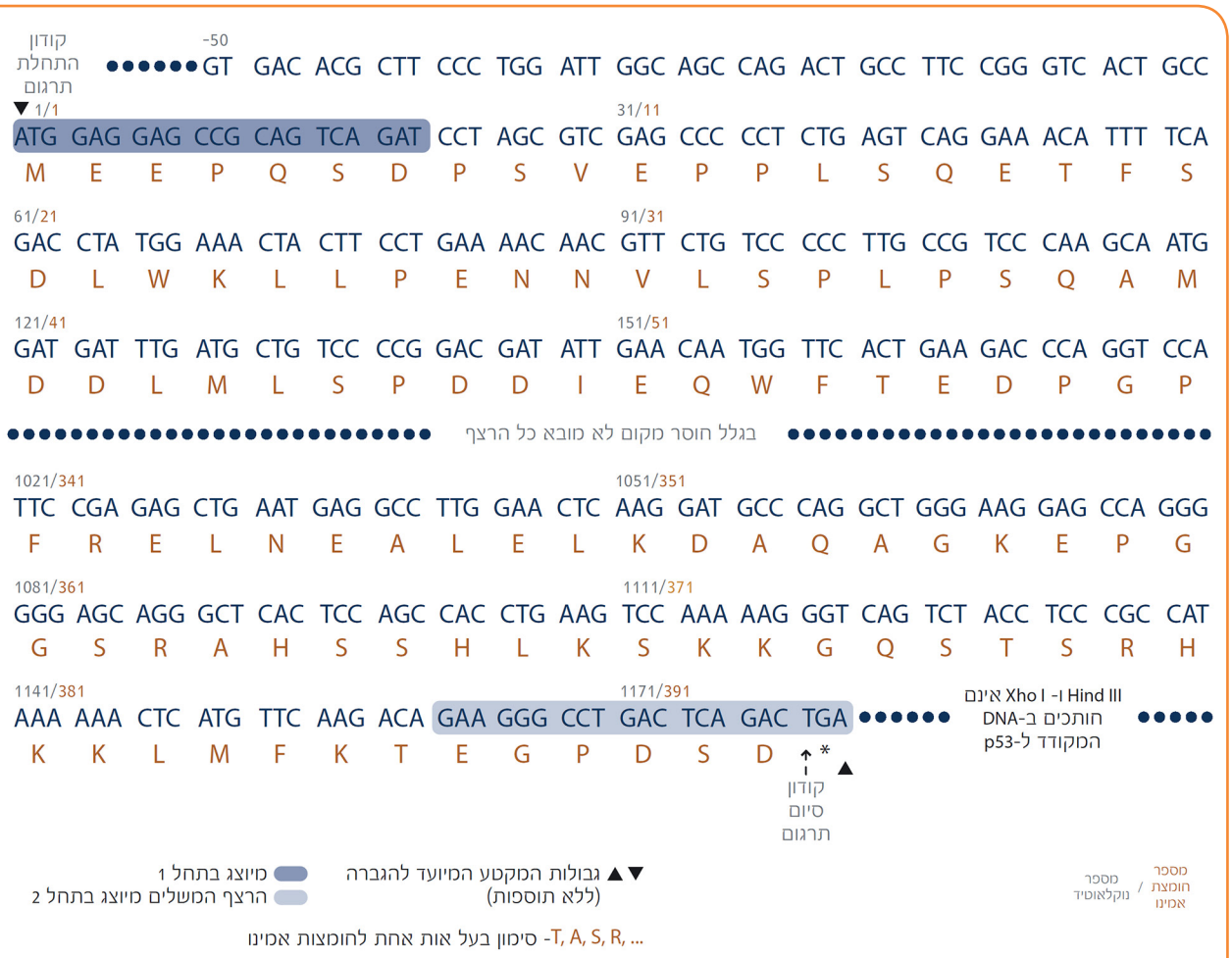


רסם 8.2

בעד الحصول على ناقل التعبير الريكومبيننتي يستعدون لإدخاله في الخلايا لكي يتمّ التعبير عن الـ DNA المطلوب. إدخال الناقل أو أي مادة وراثية أخرى تتمّ بعملية تسمى تعداء Transfection. بعملية تعداء نموذجية يتمّ استعمال مركّبات كيميائية (كالـ CaPO4 أو غيرها) خصصت للمساعدة في ادخال ناجع للـ DNA إلى الخلايا. في جزء من الحالات تؤدي المركّبات إلى ثقوب صغيرة، في غشاء الخلية، يدخل من خلالها الـ DNA، هذه الثقوب تُغلق لاحقًا. بعد دخول ناقل التعبير الريكومبيننتي الذي يحتوي مقطع DNA مشفّر مطلوب يصبح ممكنًا تعبير زائد للـ RNA والبروتين. تعبير زائد عن الـ RNA والبروتين المطلوب يتمّ نتيجة لاحتواء الناقل على موقع مراقبة "قوي" (رسم 8.2). موقع المراقبة الموجود في ناقل التعبير يرتبط بنجاعة كبيرة بعوامل نسخ خلوية تفعّل عملية النسخ.

بحسب إحدى الطرق البديلة لإدخال DNA إلى خلايا يستعملون تيار كهربائييؤدي إلى ثقوب صغيرة في غشاء الخلية، حيث تُتيح هذه الثقوب دخول الـ DNA إلى الخلية. تسمّى هذه الطريقة الثقب الكهربائي (Electroporation). الكلمة pore بالإنجليزية معناها "ثقب".

لمضاعفة مقطع DNA مُكمل مطلوب هناك حاجة لبرايمرات تحتوي على تسلسلات قواعد موجودة في الـ DNA المُكمل المطلوب. يُمكن قَطع الـ DNA المُكمل الذي تمّت مضاعفته في طرفيه بهدف دمجه في الناقل. إذا لم يحتوي طرفي الـ DNA المُكمل المطلوب على مواقع تقييد ملائمة، ممكن إجراء PCR خاص يسمّى "PCR مضيف لمواقع تقييد" (صندوق 8.2). بَعد الحصول على ناقل التعبير المطلوب يدخلونه إلى الخلايا في عملية تسمّى "تعداء" transfection.

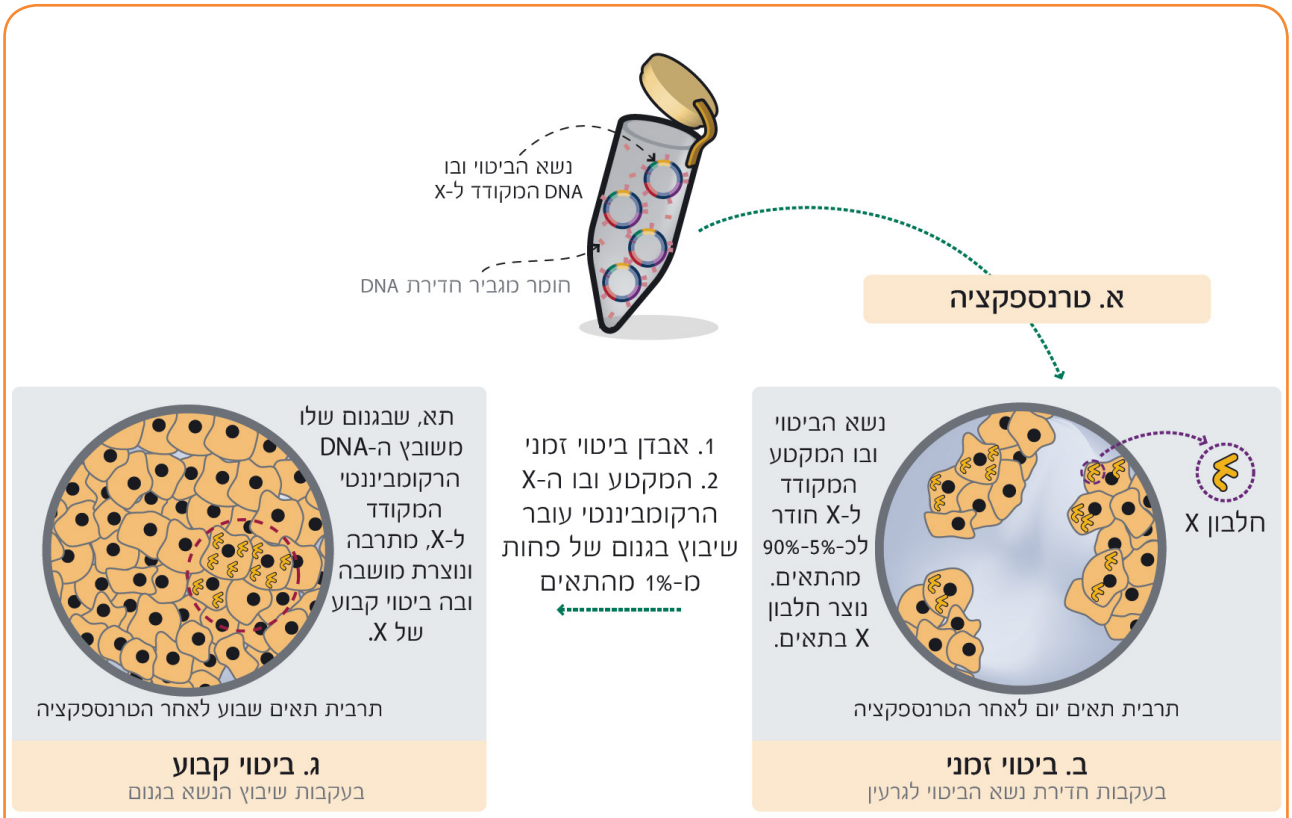


رسم 8.3: تخطيط برايمرات بهدف تنفيذ "PCR مضيف مواقع تقييد": الحالة الخاصة للجين المشفّر لـ p53.

تسلسل الـ DNA الذي مصدره الجين المشفّر لـ p53 يظهر باللون الأزرق، وتسلسل البروتين p53 باللون البني. تسلسل الـ DNA الموصوف هو للجديلة المشفّرة ("الجديلة العليا"). البرايمرات المخصصة لمضاعفة مقطع الـ DNA المشفّر لـ p53 تحتوي على "إضافة" أيضًا، وهي تسلسل موقع المراقبة. هذه "الإضافة" مخصصة لتمكين مضاعفة المقطع المطلوب، حيث يَنْتُج في طرفيه موقعي تقييد مصنعة مطلوبة. مواقع التقييد هذه تُستعمل لقطع المقطع المضاعف من طرفيه لكي يتمّ دمج المقطع بناقل بلاسميدي ملائم.

تعداء (transfection) هي عملية يتمّ بها إدخال حوامض نووية (RNA أو DNA) إلى داخل الخلية. بعد إدخال ناقل التعبير الذي يحتوي على الـ DNA المُكمل المطلوب إلى الخلايا، يصبح ممكنًا في الخلايا التعبير عن RNA وبروتين. التعبير يصبح ممكنًا نتيجة لوجود منطقة مُراقبة قريبة للـ DNA المُكمل. ترتبط بموقع المراقبة هذا عوامل نسخ تفعّل الـ RNA بوليميراز.

في أعقاب التعداء تستوعب الخلايا إلى داخلها DNA. نسبة الخلايا التي تستوعب DNA تتراوح ما بين أحاد الى عشرات، ويتعلق الأمر بنوع الخلية وطريقة الاقحام. مباشرة بَعد دخول الـ DNA المطلوب إلى الخلية وبَعد وصوله النواة يصبح من الممكن التعبير عنه (إنتاج RNA ومن ثم بروتين)، ولكن هذا التعبير هو تعبير مؤقت ("transient expression") (رسم 8.4ب). التعبير مؤقت لأنّ الـ DNA الذي دخل يتحلل بعد أيام محدودة من التعداء. ولكن بنسبة منخفضة جدًّا من الخلايا التي يحدُث فيها التعبير المؤقت، تحدُث أيضًا عملية اندماج الـ DNA الريكومبيننتي الخاص داخل DNA الخلية (الجينوم). هذا الاندماج يمنع من تحليل الـ DNA. في أعقاب ذلك وعلى فرض أنّه لا يوجد تأثير سلبي لناتج الـ DNA المندمج في جينوم الخلية على حياة الخلية ووظائفها، يبقى الـ DNA الخاص في جينوم الخلية مع مرور الزمن. بالإضافة إلى ذلك، في عملية انقسام الخلية ينتقل الـ DNA الخاص (الذي مصدره من خارج الخلية) بالوراثة للخلايا الابنة أيضًا. في الخلية وفي الخلايا الابنة يصبح تعبير دائم لناتج الجين ("Stable expression") (رسم 8.4 ج). في أعقاب التعبير الدائم يمكن فحص، على مرّ الوقت، إذا تغيّرت تصرفات الخلية وكيف تغيّرت؟ هذه المعلومات عن تصرفات الخلية مهمة لفهم وظيفة الجين الذي يتمّ التعبير الزائد عن ناتجه. كمثال، نعرض الحالة الخاصة للجين p53 (صندق 8.3).



רסם 8.4: תעבור זרוד לברוטין X בתלויה חיוונית תנמו בי מסתנבת.

מקטע מُשפّר לברוטין X דُמج בי ناقل התעבור pcDNA-3. يمكن התעבור عن هذا الناقل בי תלויה ثدبيات כתלויה انسان أو فأر. الناقل الذي يحتوي على المقطع المشفّر لـ X يقحم لخلايا بالتعداء (التعداء هي عملية يتمّ بها اقحام DNA أو حتى RNA للخلية). يصل الناقل النواة في العديد من الخلايا وهناك يتمّ نسخه. الـ RNA الرسول الناتج يُترجم في السيتوبلازم إلى البروتين X. التعبير الناتج هو تعبير مؤقت لـ X (قسم ب من الرسم). هذا التعبير سوف يتوقف في معظم الخلايا بسبب هدم الـ DNA الريكومبيننتي. خلال التعبير المؤقت يحدُث في قسم قليل من الخلايا اندماج للـ DNA الريكومبيننتي في الجينوم. في أعقاب ذلك يتمّ تعبير دائم لـ X (قسم ج للرسم). بحسب العينة في الرسم، لا يوجد تأثير سلبي على الخلايا.

مباشرة بَعد نقل ناقل التعبير إلى الخلايا يتمّ تعبير مؤقت لـ RNA وبروتين. (رسم 8.4) هذا التعبير يتوقف بعد أيام محدودة من التعداء بسبب تحليل الـ DNA الذي دخل. في عدد قليل من الخلايا يندمج الـ DNA في الجينوم وفي أعقاب ذلك لا يتحلل ويتمّ تعبير دائم لـ RNA وبروتين. التعبير المؤقت والثابت يُصنفان كتعبير زائد.

صندوق 8.3: من تعبير زائد إلى تحديد وظائف جين: قصة p53، جين على مفرق الحياة والموت

خلال دراسة التغيير السرطاني المسؤول عنه الفيروس SV40 (فصل 7)، تمّ إعداد أجسام مضادة ضد انتيجين T التابع لهذا الفيروس بهدف دراسة كيف يؤدي الفيروس إلى سرطان؟ في سنة 1979 نجحت 3 مجموعات أبحاث في الولايات المتحدة وفي انجلترا من تشخيص بروتين له كتلة مولارية مساوية لـ 53000) 53Kd دالتون) بواسطة أجسام مضادة ضد أنتيجين T. هذا البروتين وجد ملتصقا لانتيجين T في خلايا أعدوا بالفيروس. اتضح أن البروتين الذي حصل على الاسم p53، مصدره الخلية وليس الفيروس (الفصل 7). تساءل مكتشفو الـ p53 عن وظيفة الـ p53 في الخلية. للإجابة عن هذا السؤال استُنسخ الجين p53 بهدف فحص تأثيرات التعبير الزائد لل p53 عل تصرف الخلايا.

لتقييم وظائف جين، ومن ضمن ذلك وظائف p53، مطلوب معلومات مسبقة، فرضيات يمكن فحصها بطريقة تجريبية وكذلك مجموعات تجريبية لفحص الفرضيات. لأنّ أنتيجين T الفيروسي يؤدي إلى انقسامات غير مراقبة للخلايا، كانت الفرضية

العامة التي طُرحت أنّ p53 من الممكن أن يكون متورط في عمليات سرطانية.

الفرضية المركزة الأولية كانت أنّ التعبير الزائد لـ p53 في الخلايا يؤدي الى تحول سرطاني. لفحص هذه الفرضية يوجد حاجة إلى ناقل تعبير. يمكن إعداد ناقل التعبير الذي يحتوي على الـ DNA المشفّر لـ p53 بمساعدة الـ PCR (كما هو موصوف في رسم 8.2). عند الحصول على الناقل الذي يمكنه أن يعبّر عن p53، يمكن فحص الفرضية الأولية بخصوص تورط ممكن لـ p53 في عمليات سرطانية.

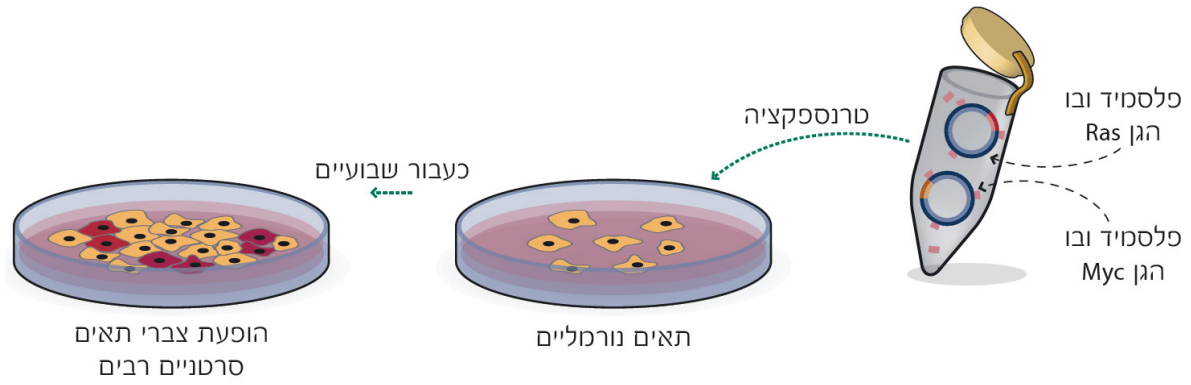
توجه باحثون في معهد وايزمان في بداية سنوات الـ 80 لتنفيذ مهمة استنساخ جين p53 وفي حوزتهم أجسام مضادة ضد p53، وهكذا استُنسخ مقطع الـ DNA المشفّر لـ p53. خلال فترة قصيرة (في تلك الأيام، استنساخ جين خلال سنة-سنتين، كان يُعتبر فترة زمنية قصيرة) كان الباحثون موشي اورن، فاردا روتر، ودافيد جفعول مسؤولين عن استنساخ الجينات والـ DNA المُكمل الذي يُشفّر لـ p53 في الفأر والإنسان. هؤلاء الباحثون كانوا مسؤولين أيضًا عن إيجاد وظائف عديدة لـ p53 في الخلية.

لفحص تورط جين بتحول سرطاني، يقحمون لداخل الخلية ناقل التعبير الذي يحتوي على الجين الذي يوجد شك بتورط بالتحول السرطاني. اذا كان بالفعل الجين متورطا في التحول السرطاني للخلايا، ستظهر مجموعات خلايا سرطانية. هكذا، كما هو موصوف في رسم 8.5أ، عند اقحام معا إلى خلايا عادية نواقل تعبير تحتوي على DNA يشفر للانكوجينين Ras وَ Myc (Ras وَ Myc هي أسماء جينات مسرطنة)، يؤدي التعبير الزائد للانكوجينين إلى ظهور تراكم خلايا سرطانية (رسم 8.5أ). في المقابل، اقحام الى الخلايا ناقل التعبيرالذي يحتوي على DNA يشفر لـ p53، لم تؤدي إلى تحول سرطاني (الرسم 8.5ب). كان الاستنتاج من هذه النتائج أنّ التعبير الزائد عن p53 لا يؤدي إلى تحول الخلايا وأنّ p53 ليس أونكوجين.

الفرضية التي لا يتمّ دعمها بواسطة النتائج التجريبية تتطلب فرضية بديلة. وبالفعل، عندما تراكمت معلومات كافية أصبح من الممكن طرح فرضية جديدة وبحسبها p53 يقوم في الواقع بكبح عمليات سرطانية. وبالفعل، عندما اقحم إلى خلايا عادية في مستنبت ناقل التعبير عن p53 مع نواقل التعبير عن Ras و-Myc انخفض بشكل كبير عدد تجمعات الخلايا السرطانية التي نَتَجت (رسم 8.5ج) (قارنوا ذلك بالتعداء بواسطة Ras و Myc فقط). هذا التوجه التجريبي ساهم بالفهم أن p53 هو جين كابت للسرطان (Tumor suppressor gene). اتضح كذلك أن أنتيجين T يسبب سرطان بواسطة الارتباط بـ p53 وشل عمله.

في أعقاب التعداء والتعبير عن الـ DNA الذي نُقل للخلية يمكن فحص ما إذا تغيّرت الخلية وكيف تغيّرت؟ المعلومات عن التغيير الذي حدث في الخلية نتيجة للتعبير الزائد عن نواتج الجين مهمة لفهم وظائف الجين. ممكن توضيح هذا المبدأ بواسطة الحالة الخاصة للجين p53. كما هو مشروح في صندوق 8.5، تعبير زائد للجينات المسماة Myc وَ Ras تؤدي الى تحوّل سرطاني لخلايا في المستنبت.

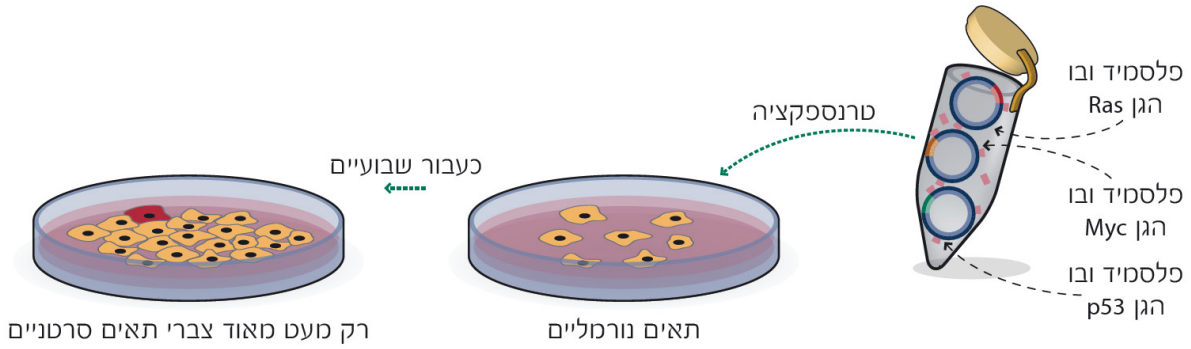
أ. تعداء خلايا عادية بواسطة نواقل تعبير لـ Myc و Ras تؤدي لظهور تجمعات خلايا سرطانية



ב. P53 לא يمكنه أن يؤدّي إلى تحوّل سرطاني

الجينات الملصقة في البلاسميدات التي تدخل إلى الخلية	تحوّل سرطاني (ظهور تجمعات خلايا سرطانية)
Myc	-
Ras	-
Myc+Ras	+++
P53	-
P53+Ras	-
P53+Myc	-

ج. تعبير زائد عن p53 يكبت تحول سرطاني ناتج عن Myc وَ Ras



رسم 8.5: تعبير زائد عن جينات بهدف دراسة وظائفها: دراسة علاقة جينات معينة بالتحكم بانقسام الخلايا.

قسم أ من الرسم يصف كيف يمكن حث ظهور تجمعات خلايا سرطانية في مستنبت؟ لهذا الهدف يُدخلون إلى خلايا عادية نواقل التعبير التي تحتوي على الانكوجينات المشفرة لبروتينات Myc وَ Ras. وفي المقابل، عند ادخال ناقل تعبير يحتوي على DNA مشفر لبروتين p53 إلى الخلايا، لا يحدُث تحوّل سرطاني (قسم ب من الرسم). بالإضافة لذلك، بمقدرة الـ p53 كبت تحول سرطاني ممكن حدوثه في أعقاب ادخال Myc وَ Ras إلى خلايا عادية (قسم ج من الرسم). لذلك فإن p53 "جين كابت للسرطان" (Tumor suppressor).

عندما يتم نقل البلاسميد الذي يحتوي على الجين p53 بالإضافة للجينين Myc و Ras إلى الخلايا. فأن تعبير زائد عنه يكبت مساهمة Myc وَ Ras في ظهور تجمعات خلايا سرطانية في المستنبت (رسم 8.5ج). هذا الاكتشاف ساهم بالفهم أن الـ p53 هو جين كابت للسرطان.

صندوق 8.3: متابعة

يجب دعم دراسة خلايا في مستنبت بواسطة دراسة على جسم الإنسان. بحسب النتائج من مختبر الباحث الأميريكي برت فوجلشتاين (Bert Vogelstein) ومن مختبرات أخرى، حوالي 50% من الأورام السرطانية في الإنسان تحمل طفرة في الجين p53. في أورام مختلفة لدى أشخاص مختلفين وُجدت طفرات مختلفة في الجين p53. الأشكال المختلفة من طوافر الـ p53 في الأورام السرطانية فقدت بدون استثناء تقريبًا مقدرتها على كبت سرطان في اختبار التحوّل بواسطة الـ Myc وَ Ras. من هنا يستنتجون أن لـ p53 وظيفة في منع السرطان لدى الإنسان وأن طفرة به تخل من مقدرته على التصرف كمانع لتطور السرطان. بسبب أهمية جين p53 هذه فأن المئات من مجموعات الباحثين تجري دراسات لفحص وظائفه . عدد مقالات البحث التي تناولت بشكل مباشر أو غير مباشر الـ p53 بلغت حوالي 60000 في سنة 2013، عدد قياسي بالنسبة لدراسة جين واحد. لذلك من بين حوالي 21000 جين تشفر لبروتينات في الإنسان، p53 **يُعتبر اليوم الجين الأكثر دراسة في العالَم.**

كتم التعبير عن جين في خلايا حيوانية

لتحديد وظائف جين معيّن في خلية وفي كائن حي، ليس كافيا الاعتماد على التعبير الزائد عن الجين في خلايا المستنبت. أحد الأسباب لذلك هو أنّ التعبير الزائد لا يؤدي دائمًا الى تغيير مرئي للعين في الخلية وفي تصرفها. الطرق المكملة تهدف الى **تعطيل أو كتم** التعبير عن جين بأمل أن تكون الخلية حساسة لانعدام أو كبت التعبير عن الجين.

لتعطيل التعبير عن جين يعملون بمستوى الـ DNA **ولكتم** التعبير عن جين يعملون بمستوى الـ RNA. بمستوى الـ DNA يمكن إصابة الجين المدروس في الخلية بشكل موجّه، مركز **وتشويش تسلسل الجين**. يمكن إجراء ذلك في خلية في عملية يتمّ بها تبديل مقطع في الجين بمقطع يحتوي تسلسل غريب يعطل التعبير عن الجين. بالإضافة، يمكن استعمال خلية جنينية تمّ تشويش تسلسل جين معيّن بها لإنتاج فأر به الجين المدروس مشوش في كل خلية من خلاياه. من التغييرات التي حدثت في فأر كهذا نتيجة **لانعدام التعبير** عن جين معيّن، يمكن استنتاج **وظائف الجين المبحوث في الكائن الحي**. وبالفعل، عندما أُنتج فأر ينقصه p53 في كل الخلايا اتضحت دون أدنى شك الوظيفة الرئيسية لـ p53. فئران بدون تعبير عن p53 ماتت من سرطان خلال عدّة أشهر من ولادتها (مدة حياة فأر هو حوالي سنتين). هذه النتيجة عززت الاستنتاج أنّ p53 هو جين كابت للسرطان.

من الصعب تشويش تسلسل جين بمستوى الـ DNA وتعطيل التعبير عنه، ولذلك فإنّ هذه الطريقة غير منتشرة في دراسة خلايا في مستنبت. في الطريقة البديلة يدرسون تأثير **كتم التعبير** عن جين في خلايا داخل مستنبت بمساعدة **"RNA مُعيق"**. "RNA مُعيق" معيّن هو RNA له تسلسل مُكمّل لقسم من تسلسل RNA رسول معيّن. RNA مُعيق يرتبط بـ RNA رسول. في أعقاب هذا الارتباط يؤدّي الـ RNA المُعيق إلى كتم ترجمة الـ RNA رسول أو إلى هدمه. عمليا، RNA مُعيق معيّن يكتم بشكل انتقائي ومركز التعبير عن RNA رسول معين ويمكن دراسة تأثير كتم التعبير على التعبير عن الـ RNA في الخلية. كتم كهذا يُتيح استنتاج وظائف الجين المبحوث.

الطرق المكملة للطريقة التي تمكن تعبير زائد للبروتين، والمستعملة هي أيضًا لتحديد وظائف جين، هي الطرق التي تمكن تعطيل أو كتم التعبير عن الجين المدروس. تعطيل تعبير بمستوى الـ DNA يتمّ بواسطة تشويش تسلسل DNA الجين. بمستوى الـ RNA يؤدون الى كبت التعبير عن الـ RNA بمساعدة "RNA مُعيق".

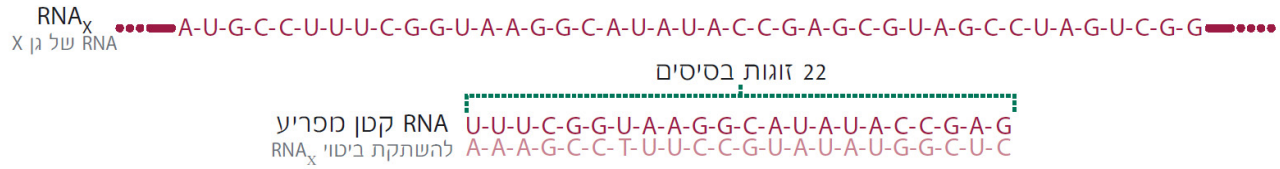
استغلال "RNA معيق" لكتم تعبير جين

كما ذُكر، بحث جوهري بوظائف جين ممكنة بواسطة التحكم في التعبير عنه: تعبير زائد من جهة وكتم التعبير من جهة أخرى. إحدى الطرق الأولى التي فحصت بهدف كتم التعبير عن جينات استغلت RNA من نوع Anti-sense. هذا الـ RNA يمكن أن يَنْتُج بشكل طبيعي في الخلية. رسم 8.6 يوضح أنه يمكن أحيانًا إيجاد مقطع DNA في الجينوم يمكن أن يَنْتُج منه جزيئان من الـ RNA. في هذه الحالة الخاصة كل واحد من الجزيئين يَنْتُج من طرف آخر من المقطع. عمليا يَنْتُج جزيئان من الـ RNA من كل جديلة من الجديلتين المختلفتين لمقطع الـ DNA. إذا وُجد في مقطع كهذا جين مشفر لبروتين، فإنّ أحد جزيئات الـ RNA الناتجة يمرّ بتغيير ليتحول إلى RNA رسول. جزيء RNA رسول يسمّى أيضًا جزيء RNA من نوع Sense. RNA من نوع sense هو RNA له "معنى" لأنه يَنْتُج بروتين منه. جزيء الـ RNA الناتج من الاتجاه الآخر – (وعمليا من الجديلة الأخرى) يسمّى Anti-sense RNA. RNA من نوع Anti-sense لا يشفر لبروتين، وهو RNA مع تسلسل مكمل لـ RNA من نوع Sense. جزيء RNA من نوع Sense وجزيء RNA من نوع Anti-sense يمكن أن يلتصقان معا لإنتاج جزيء RNA ثنائي الجديلة (رسم 8.6ب). في أعقاب التصاق كهذا هنالك إمكانيتان. بحسب الإمكانية الأولى تحصل إعاقة لعملية ترجمة الـ RNA من نوع Sense، وبحسب الإمكانية الثانيةيتفكك جزيء الـ RNA ثنائي الجديلة. في الإمكانيتين لا يمكن استعمال الـ RNA رسول لإنتاج بروتين، والنتيجة هي كتم التعبير عن جين.

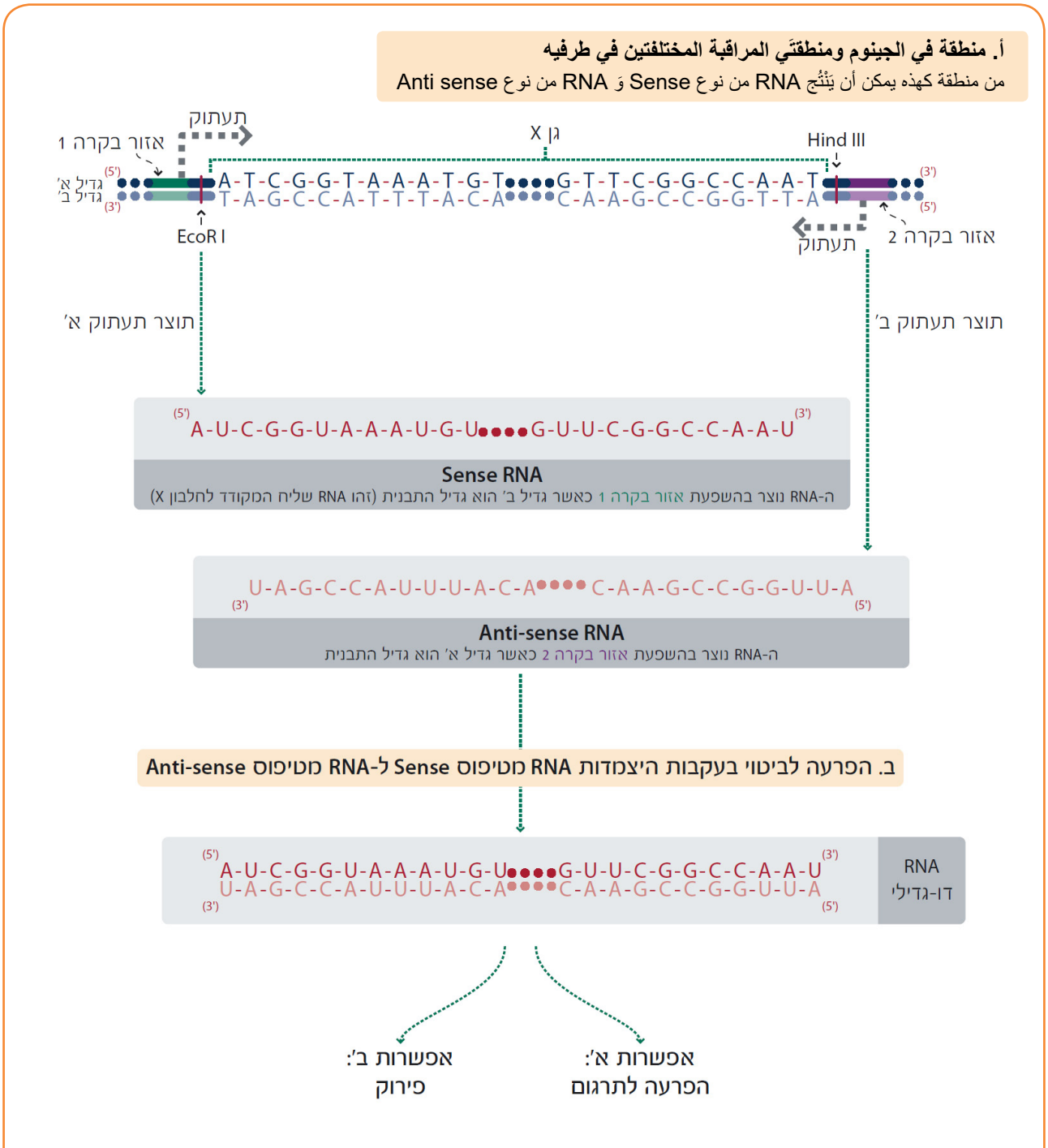
لـ RNA من نوع Anti-sense نجاعة محدودة في كتم التعبير عن جين مدروس. حدث، سنة 1998، تحوّل حاد في أعقاب اكتشاف **RNA معيق ثنائي الجديلة** يقحم إلى داخل الخلية من الخارج. RNA كهذا يُعيق التعبير بنجاعة أكبر بـ 10 أضعاف من Anti-sense RNA عادي. كان المكتشفان العالمين الأمريكيين أندرو فاير وكريج ميلو (Andrew Fire and Craig Mello) اللذان حازا على جائزة نوبل لسنة 2006 على هذا الاكتشاف.

بحسب مجموعة التجربة التي طوّرها كل من ميلو وفاير لكتم تعبير RNA رسول معيّن، يجب تزويد DNA مُصَنّع صغير من خارج الخلية يسمى "RNA صغير معيق". **RNA صغير معيق** (وفي الإنجليزية **siRNA** وهو اختصار لـ small interfering RNA) هو RNA ثنائي الجديلة طوله 22 زوج من القواعد، له تسلسل مكمل لتسلسل RNA رسول معين يريدون كتم التعبير عنه. يكونون هذا الـ RNA في أنبوب اختبار من جديلتَي RNA تحتويان على تسلسل مكمل الواحد للآخر تمّ بناءهما بطريقة كيميائية. يدخلون الـ RNA الصغير المعيق للخلية بواسطة التعداء كما هو مبين في رسم 8.7. بعد اقتحام الـ RNA الصغير المعيق الخلية، جديلة واحدة منه تتمركز داخل مركّب معقد من البروتينات الفريدة من نوعها. داخل هذا المركّب المعقد يتمركز الـ RNA رسول أيضًا ذات التسلسل المكمل.

الاثنان يرتبطان داخل المركَّب المعقد، وفي أعقاب ذلك يتحلل الـ RNA رسول. هكذا يكتم بشكل مركّز التعبير عن الـ RNA رسول الذي وُجّه ضده الـ RNA الصغير المعيق الذي تسلسله مكمل وخاص.



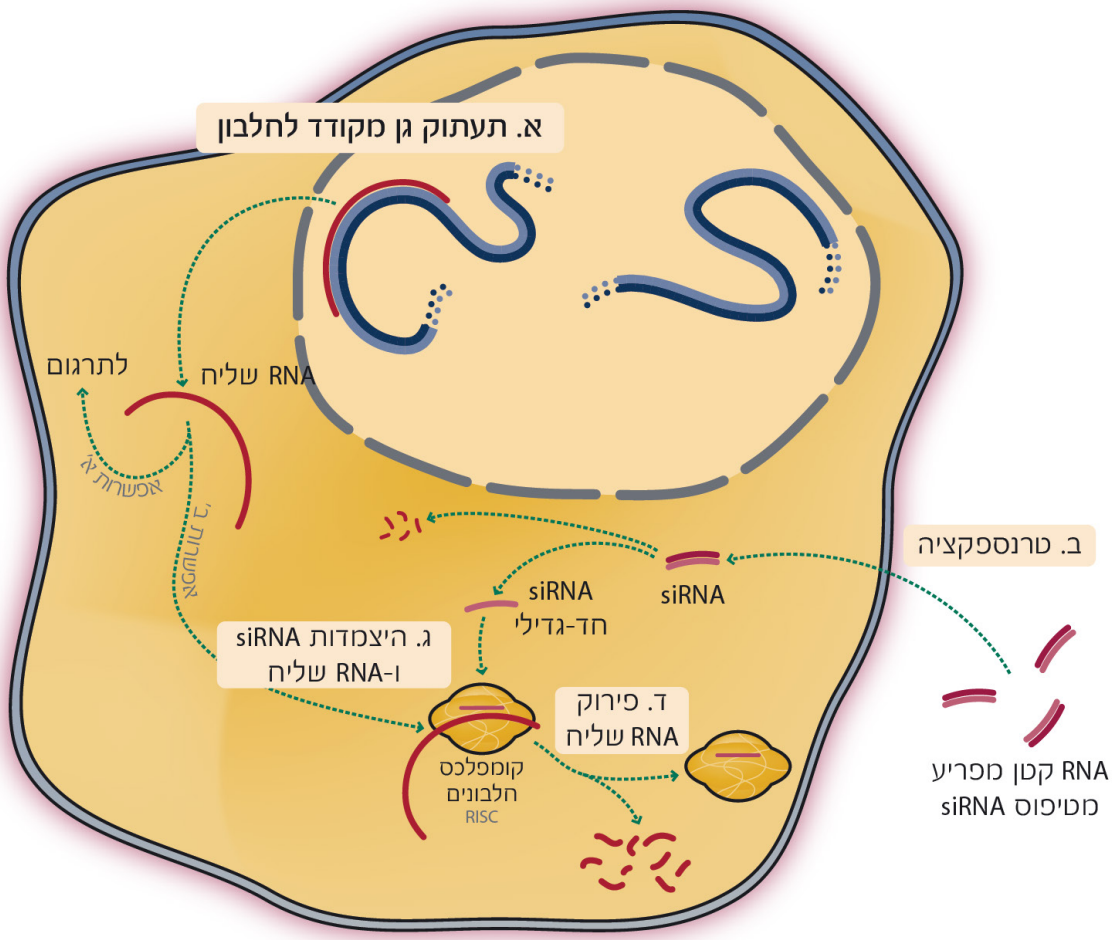
כתם التعبير عن جين لدراسة وظائفه . يمكن كتم تعبير بمستوى الـ RNA بواسطة استغلال "RNA صغير معيق". **"RNA صغير معيق"** (siRNA) هو RNA ثنائي الجديلة طوله 22 زوج من القواعد. جديلة واحدة من هذا الـ RNA ترتبط بجزيئات RNA رسول ذات تسلسل مكمل لها (انظروا إلى الرسم في أسفل الصفحة). في أعقاب هذا الارتباط الذي يحدُث في مركّب معقد خاص من البروتينات يتحلل الـ RNA رسول (رسم 8.7).



רסם 8.6: RNA מן נוע Anti sense ירתבט ב- RNA רסול (Sense RA) ויעיק התעיבר עניה.

יֻמָכֵּן הגינום אפיגם תגיתנ RNA אל ישפר ליתרוטין. אחיבאים הRNA הזאי אל ישפר ליתרוטין הוא RNA מן נוע Anti-sense. הזה הRNA יכמן אן יוּדֵּי אלי תפכיך או יכמן אן ימנע תרגמה RNA רסול מכמֵּל והו RNA מן נוע Sense.

בחיות "Knock out" יחצלון על תעטיל תעביר כאמל (אי אנ הלאיא לא תֻּנְתִּג RNA או ברותין בתאיא). בקבאל, siRNA אלד מצדרה מן חארג אלח'לייה יוּדֵּי אלי כתם אלתעביר, אי לח'פץ כמיה אלברותין ד'י אלצלה בנסבה 70%-80% פקט. לכן איצא כתם כהדא יכפי פי מעט אלחאלאת לכי יוּדֵּי אלי תגייר פי אלח'לייה (אי יוּדֵּי אלי תגיר נמט ט'אהרי ח'לוי). התגייר ימכן אן ידל עלי וט'איף אלג'ין אלד תמ כתם אלתעביר עניה. לד'לך, איצא תעטיל תעביר כאמל ען ג'ין פי חיות Knock out וכד'לך כתם תעביר בואסטה RNA צגיר מעיק המא אדאתין חיויתין פי אלבחת אלמסתכדם לאיגאד וט'איף ג'ין מדרוס.



רסם 8.7: استغلال RNA صغير معيق من نوع siRNA لهدف كتم التعبير عن RNA رسول.

يمكن "فرض" إعاقة التعبير عن RNA رسول معيّن بواسطة تحليله وذلك بتدخل من الخارج. لهذا الهدف يقحمون إلى داخل الخلية RNA ثنائي الجديلة صغير مُصَنّعمكوّن من 22 زوج من القواعد يسمّى siRNA وبالعربية "RNA صغير معيق" (مرحلة ب في الرسم). يخططون تسلسل الـ siRNA هذا بحيث يحتوي على تسلسل مكمل لتسلسل الـ RNA رسول الذي يريدون كتم التعبير عنه. عند تواجده في الخلية تتمركز جديلة واحدة من الـ siRNA في مركّب معقد من البروتينات، حيث يلتقي بداخله بالـ RNA رسول (مرحلة ج). وتكون النتيجة كبت محدد للتعبير (مرحلة د).

تسلسل الـ RNA الصغير المعيق هو الذي يحدّد "تصفية مستهدفة" لـ RNA ناتج جين معيّن وفي أعقابه يمكن فحص ما اذا تغيّرت تصرفات الخلية (بمستويات خلوية وجزيئية). من هذا التوجه التجريبي يمكن الاستنتاج ما هي وظيفة الجين المشفّر لهذا الـ RNA؟ رسم 8.7 يوضح نسخ جين معيّن وتحليل الـ RNA الخاص به بواسطة RNA صغير معيق الخاص فقط له (يعني ذلك، ان له تسلسل مكمل له) والذي ينقل إلى الخلية بطريقة التعداء.

استعمال RNA صغير معيق (siRNA) بهدف دراسة وظائف جين هو اليوم أمر شائع. ممكن تمثيل ذلك بواسطة الحالة الدراسية للبحث في وظائف الجين المشفر لـ p53. كما ذُكر، وجود p53 في كائن حي تمكّن من كبت السرطان. علاوة على ذلك، تعبير زائد قسري لـ p53 في خلية سرطانية يؤدّي أحيانًا إلى موت الخلية. إضافة إلى ذلك، وُجد أن p53 هو عامل نسخ يمكّن نسخ عدد كبير من الجينات. موت خلية سرطانية نتيجة لتعبير زائد عن p53 يمكن مبدئيا أن يفسر مقدرة p53 على كبت ظهور تراكم خلايا سرطانية في مستنبت. من هذه الاكتشافات وُضعت فرضية – كانت بحاجة إلى إثبات – أنه أيضًا في خلايا الجسم غير السرطانية يوجد لـ p53 الطبيعي وظيفة في بموت الخلايا في التوقيت المطلوب. كما هو ممثل في الرسم 8.8 أ، في الخلية التي تتعرّض لأشعة تؤدّي الى ضائقة (stress) في داخلها، ترتفع بشكل ملحوظ كمية p53. يواكب أحيانًا الارتفاع بكمية p53 الذي مصدره الجين الطبيعي موت الخلية. في هذه الحالة يجب تحديد وجود علاقة سببية بين ارتفاع كمية الـ p53 في الخلية وبين الموت. علاقة سببية مثبتة كهذه تعني أن p53 مطلوب لموت الخلايا، وأن الارتفاع بكميته ليست ناتج عشوائي يواكب الموت نفسه.

يمكن إثبات علاقة سببية بين تعبير زائد عن p53 في أعقاب التعرّض للأشعة وبين موت الخلية. يقومون بذلك بمساعدة RNA صغير معيق مخصص لتقليل كمية p53 في خلية. وبالفعل، كما هو مبين في الرسم 8.8ب، RNA صغير معيق ضد p53 الذي يكتم التعبير عنه، يمنع من موت الخلية في أعقاب اشعة. من هنا فإنّ p53 مطلوب لموت الخلايا في أعقاب الأشعة. أبحاث إضافية أظهرت أن p53 يؤدي إلى موت الخلية في التوقيت المطلوب، وذلك مرتبط بقدرته على التصرف كعامل نسخ. بالفعل في أعقاب الأشعة ارتبط p53 في مناطق المراقبة لجينات لها دور في التسبب بموت مقصود ومبرمج (Apoptosis) ويؤدي إلى نسخهم. نواتج هذه الجينات هي التي تنفّذ "أوامر" p53 لقتل الخلية بشكل مبرمج.

لماذا يؤدّي p53 إلى موت خلايا في ظروف توتر معيّنة كالتعرض لأشعة شديدة؟ كما هو معروف، الأشعة تؤدّي إلى طفرات ممكن أن تتراكم في جينات معينة تؤدي إلى تورط فعال في السرطان (كالـ Ras فصل 4). يوجد "منطق" من قبل الكائن الحي لتفضيل موت خلية تعرّضت لأشعة. وذلك لأنّ البديل غير المرغوب هو بقاء الخلية التي تراكمت بها الطفرات وتحوّلها إلى خلية سرطانية. بالإضافة لذلك p53 مسؤول في خلايا عادية عن كبت سرطان أيضًا بسبب مقدرته على كبت تعبير جينات لها وظيفة في تعزيز وتيرة انقسام الخلية. هذا الكبت يحدُث عندما تصبح الظروف، في الخلية العادية وفي بيئتها، غير مناسبة لمتابعة انقسامات خلايا غير ضارة.

صندوق 8.4: RNA صغير معيق في تطبيقات بيوتكنولوجية في الطب والزراعة

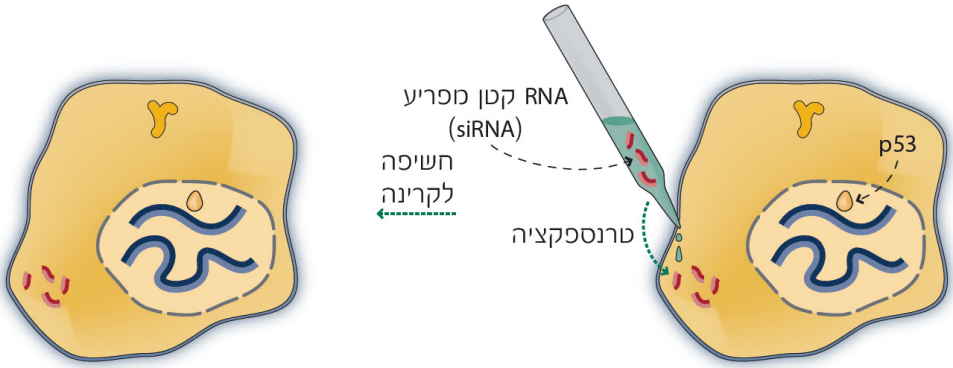
في العديد من الأمراض يمكن إيجاد تعبير زائد لبروتينات تؤدّي إلى المرض. مثال على بروتينات كهذه هي بروتينات لها علاقة بحساسيات مختلفة. بروتينات مسؤولة عن تكوين أوعية دموية في ورم سرطاني وبروتين الهنتجتين الذي يؤدّي إلى تعبير زائد عن شكله الطافر إلى مرض هنتنجتون التنكسي. لذلك ازدادت إمكانية استخدام الـ RNA الصغير المعيق لكتم التعبير عن الـ RNA الذي يشفر لبروتينات غير مرغوب فيها. كتم التعبير عن هذه البروتينات قد يؤدّي إلى فوائد طبية ، وقد تمّ تسجيل براءات اختراع بالفعل على تسلسلات قصيرة لـ RNA قد تكون ذات قيمة طبية. هذه التطبيقات يمكن تصنيفها على أنها علاج جيني.

للأغراض الطبية التي ذُكرت يمكن أيضًا إقحام DNA، إلى داخل الخلية، يشفر لـ RNA صغير معيق. إذا اندمج DNA كهذا داخل الجينوم، يمكن التأكد من أن التعبير الدائم عن RNA صغير معيق في الخلية. سيؤدي هذا إلى كتم على المدى الطويل للتعبير عن RNA الهدف غير المرغوب فيه. إن كتم تعبير طويل الأمد يثير الكثير من الآمال في استخدام RNA صغير معيق لإعاقة تكاثر فيروسات التي يعرف تسلسلها. ومن بين الإنجازات الأخرى ، يأمل المطورون في تحقيق تقدم كبير في مكافحة كل من فيروسات مهاجمة النباتات وفيروس نقص المناعة البشرية ، الذي يسببالإيدز.

يمكن عرض استخدام الـ RNA الصغير المعيق لدراسة وظائف جين باستخدام الحالة الخاصة للجين p53. نتيجة للإشعاع ، يزداد تعبير p53 في الخلية وتزداد كمية البروتينات المسببة للموت (الشكل 8.8 أ) لإثبات وجود صلة سببية بين ازدياد p53 وموت الخلية، يمكن كتم التعبير عن p53 بواسطة RNA صغير معيق.

أ. خلية معينة، فيها تعبير صحيح عن p53، تموت بعد تعرُّضها لأشعة:

ב. התעבר על p53 בואסטה RNA סגיר מעיק, לם תמות בעד תעָרְצָה לאשעה



רשם 8.8: RNA סגיר מעיק בהדף כתם תעבר p53 יממן מן ربط جين الـ p53 בוظيفة התשבב בموت مراقب للخلايا.

أ. خلية مع تعبير طبيعي عن p53، وهو جين كابت للسرطان، تموت بعد التعرُّض للأشعة. الأشعة تؤدّي إلى ارتفاع كمية p53 في الخلية وإلى ارتفاع نواتج جينات تؤدّي الى موت خلايا مراقب (Apoptosis). من الضروري إثبات أن p53 هو بالفعل سبب الموت، أي أن الزيادة في كمية p53 في الخلية هي المسؤولة عن التعبير عن الجينات التي تنفذ القتل. ولذلك يكررون التجربة في أ ويستعملون RNA صغير معيق ضد RNA الـ p53 (قسم ب من الشكل).

ب. خلية اقحم إلى داخلها RNA صغير معيق له تسلسل مكمّل لتسلسل p53، هي خلية كتم بداخلها التعبير عن p53. وجد أنه في حالة عدم وجود ما يكفي من p53 في الخلية وبعد الاشعاع، لا يحدث نسخ مثالي للجينات التي تشفر للبروتينات المنفذة للقتل. نتيجة لذلك ، لا تموت الخلايا التي تعرّضت للإشعاع. هذا يثبت أن p53 مطلوب للتسبب في موت مراقب لخلايا تعرّضت للإشعاع. تتراكم في الخلية التي لا تحتوي على p53 بعد تعرُّضها للاشعاع طفرات يمكن أن تحوّلها إلى خلية سرطانية. وهكذا، يلعب الـ p53 دورًا في قتل الخلايا التي قد تصبح سرطانية.

كما هو موضح في الشكل 8.8 ب ، فإن كبت التعبير عن p53 باستخدام RNA صغير يمنع من زيادة كمية البروتينات المسببة للموت، ويمنع من موت الخلية بعد إشعاع شديد. وبالتالي فإن إحدى وظائف p53 هو التسبب في موت خلية بعد إشعاع شديد. تتطلب وظيفة p53 هذه قدرته على التصرف كعامل نسخ مما يزيد من نسخ الجينات التي تسبب إلى موت مراقب للخلية. بهذه الطريقة ، يقلل p53 من احتمال تكوّن ورم سرطاني بعد الإشعاع.

تعبير زائد عن ناتج جين في حيوانات ترانسجينية (مُهَندَسة جينيًّا)

إقحام جين لخلايا في مستنبت وتعبير زائد عنه يجعل من الممكن فحص وظائف الجين في خلية واحدة كما وُضح في حالة الجين المشفر عن p53 (الشكل 8.5). على الرغم من مزايا التعبير الزائد عن جين في مستنبت خلايا، فإنّ هذا التعبير لا يؤدي إلى نتائج مهمة في جميع الجينات. كمثال لذلك يمكن عرض حالة الجين المشفر لهرمون النمو (Growth Hormone = GH). يتمّ إفراز هذا الهرمون من الخلايا النخامية، ولكن معظم نشاطه ينفّذ داخل خلايا أخرى في الجسم. تعبير زائد عن الهرمون GH في نوع واحد من الخلايا، في مستنبت، لا يعني بالضرورة أنّه يمكن أن يوضح كيف يؤثر على تطور الكائن الحي، وما هي مساهمته في تنوع الخلايا في الجسم.

من أجل دراسة دور الجين في الكائن الحي بأكمله (*in vivo*) في سياق عمليات تنموية وعمليات سلوكية، وحتى في سياق مقاومة أمراض، يجب محاولة التعبير عن الجين تعبيرًا زائدًا في الكائن الحي ككل. من أجل تعبير زائد في كائن حي كالفأر، يحقنون جين، وُضع بالقرب من موقع مراقبة مرغوب، إلى بويضة مخصبة كما هو موضح في الشكل 8.9. أثناء حقن الـ DNA في البويضة المخصبة، يتمّ اقحام حوالي 500 نسخة من الجين الذين يرغبون في التعبير عنه تعبيرًا زائدًا. هناك بويضات مخصبة، لأسباب تقنية، لن تتلقى هذا الحمض الـDNA الغريب، ولكن ببعضها سيندمج بالجينوم عدة نسخ من الجين. يتمّ ادخال البويضات المخصبة والمحقونة لفأرة حاضنة. في بعض الفئران التي ستلدها هذه الفأرة سيتواجد الجين المحقون في كل خلية من خلاياها. يُطلق على الحيوان الذي يحمل في كل خلاياه جينًا تمّ حقنه "من الخارج" حيوانًا ترانسجيني (Transgenic Animal)، ويسمّى الجين المضاف المندمج في الجينوم Transgene، يمكن أن يؤدي الحيوان الترانسجيني إلى ولادة حيوانات ترانسجينية أخرى، حيث أن الترانسجين ينتقل بالوراثة المندلية مع باقي الجينات في الخلية.

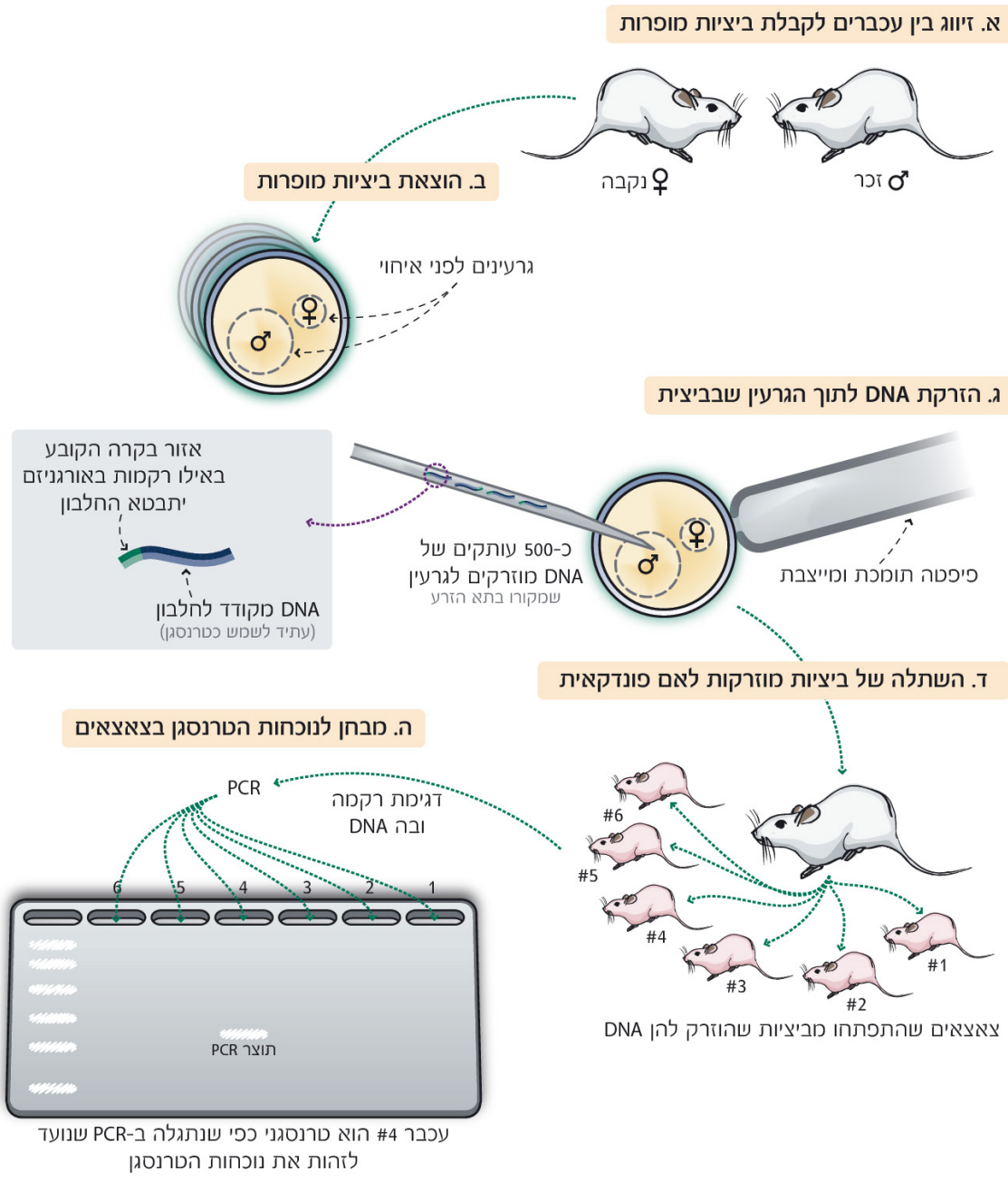
يتمّ إدخال جين الى بويضة كي يندمج في الجينوم. في أعقاب الإدخال، يمكن أن يندمج عدد من نسخ الجين في الجينوم (من نسخة واحدة إلى بضع عشرات). موقع الاندماج في الجينوم عشوائي، وفي بعض الحالات قد يحدُث الاندماج داخل جين وظيفي، ونتيجة لذلك يحدُث خلل في وظيفة هذا الجين.

الترانسجين الموجود بالقرب من منطقة مراقبة "قوية" يتمّ التعبير عنه تعبيرًا زائدًا، ويتمّ الحصول على ناتج الجين بفائض. أحيانًا يفضلون اختيار نوع معيّن من منطقة المراقبة التي تسمح بالتعبير عن الترانسجين فقط في خلايا معيّنة لدى الكائن الحي. على سبيل المثال، من أجل الحصول على فئران ترانسجينية تحمل الجين المشفّر لهرمون النمو، يتمّ استخدام منطقة مراقبة تمكّن تعبير عن الترانسجين بشكل أساسي في الكبد. في أعقاب التعبير الزائد عن هرمون النمو في الكبد، يتمّ إفراز هذا الهرمون إلى مجرى الدم ونتيجة لذلك يكون هذا الهرمون نشطًا بيولوجيًا. في الواقع، كما يتضح من الشكل 8.10 أ، فإن الفئران الترانسجينية لهرمون النمو تكون أكبر بضعفين من الفئران الضابطة.

PCR يمكّن من إيجاد الفئران الترانسجينية ولهذا الهدف يستعملون برايمرات خاصة بالـ DNA المقحم.

اختيار منطقة مراقبة تمكن التعبير عن الجين في الكبد لا يتم بشكل عرضيًا. الكبد هو عضو يُفرز بروتينات الى مجرى الدم، والتعبير عن هرمون النمو في الكبد يسمح بإفرازه الى الدم. الإفراز من الكبد الى الدم هو تقليدللعملية التي يمرّ بها هرمون النمو في الغدة النخامية. بالإضافة إلى ذلك، نظرًا لكبر حجم الكبد مقارنة بالغدة النخامية، فإنّ التعبير الزائد في الكبد يضمن 100 إلى 1000 ضعف من التعبير الزائد عن الهرمون في مجرى الدم. رغم هذا التعبير الزائد فإنّ الحيوانات الترانسجينية لا تكبر أكثر من ضعف حجم الحيوانات الضابطة، مما يشير ذلك إلى ضابط سلبي، في الكائن الحي، وظيفته تحييد جزء كبير من التأثير الزائد لهرمون النمو.

لتحديد وظائف الجين في كائن حي، من المتبع إنتاج كائن حي ترانسجيني. كائن حي ترانسجيني هو كائن حي تحتوي كل خلية من خلاياه على جين (أو DNA مكمل بالقرب من منطقة مراقبة) تمّ حقنه من الخارج ، التعبير عن جين كهذا المسمّى ترانسجين في قسم من خلايا الكائن الحي أو في كلها يمكن أن يؤدّي إلى تغيير في الكائن الحي. مثلا، تعبير زائد عن الترانسجين المشفّر لهرمون النمو في الفئران أو الأسماك أدى الى زيادة في حجم هذه الكائنات.



الشكل 8.9: تكوين فأر ترانسجيني: فأر يحمل جين من مصدر خارجي (ترانسجين).

يمكن إنتاج فأر يوجد في خلاياه تعبيرًا زائدًا عن جين، وحتى تعبير عن جين مصدره من كائن حي آخر. تعبير كهذا يُتيح دراسة وظائف الجين المعيّن في الكائن الحي. بهدف إنتاج فأر ترانسجيني يتمّ حقن العديد من نسخ الجين في بويضات مخصبة. يتمّ حقن الـ DNA المطلوب في النواة الكبيرة لهذه البويضة قبل مرحلة اندماج النوى. يتمّ نقل البويضات المحقونة إلى أم حاضنة. يتمّ فحص وجود الترانسجين في خلايا الجسم للنسل باستخدام PCR. بعد ذلك يتمّ فحص وجود تعبير عن الترانسجين في الحيوانات الترانسجينية وما هو تأثير هذا التعبير؟ من التغيير البيولوجي الذي حدث في الفأر الترانسجيني يحدّدون وظيفة الجين المعيّن الذي استُخدم في الترانسجين.

يوضح الشكل 8.9 كيف يمكن إنتاج فأر ترانسجيني؟ في المرحلة الأولى ، يتمّ الحقن في بويضة مخصبة بالجين أو DNA مكمل موجود بجوار منطقة مراقبة مطلوبة. الجين المحقون يسمّى ترانسجين. يتمّ نقل البويضات المحقونة إلى فأرة حاضنة. بعد الحقن، يمر الترانسجين اندماج في الجينوم ويتطور من البويضة المخصبة فأر ترانسجيني.

توقع الباحثان الأمريكيان، بالميتر (Palmiter) وبرينستر (Brinster)، اللذان أنتجا الفئران الترانسجينية لهرمون النمو، في مقال نُشر عام 1982، أنّه ليس بعيدًا اليوم الذي يمكن فيه إنتاج كائنات حية ترانسجينية أخرى تُعبّر عن هرمون النمو الزائد لتحسين الزراعة. وبالفعل، في عام 1992 تمّ الحصول على الأسماك الترانسجينية الأولى التي تُعبّرُ تعبيرًا زائدًا عن هرمون النمو. السمكة الترانسجينية المبينة في الصورة 8.10 ب احتاجت إلى 18 شهرًا للوصول إلى الحجم المناسب للتسويق، مقارنةً بـ 36 شهرًا تحتاجه الأسماك "العادية". هذه الحقيقة ذات أهمية اقتصادية في عالَم بحاجة ماسة إلى زيادة الإمدادات الغذائية غير المكلفة لسكانه.

على الرغم من النجاح، لا تزال هناك أسئلة حول مخاطر تناول اللحم من هذه الأسماك الترانسجينية (بقايا هرمون النمو مصدر الحساسية). رغم أنّه لا توجد إثباتات قاطعة أنّ المخاطر حقيقة. بالإضافة إلى ذلك هناك مخاوف جدية من أنّ أسماك ترانسجينية لهرمون النمو ستجد طريقها إلى الطبيعة وتسبب القضاء على مجموعات أسماك طبيعية بسبب تكاثرها السريع، لا توجد لهذه المخاوف البيئية أسس واقعية. ومع ذلك، هناك وعي بأنه من الحكمة توخي الحذر وتجنب إيذاء تنوع الأنواع. في الوقت نفسه، تُبذل اليوم جهود كبيرة لإنتاج أسماك ترانسجينية تحمل جينات توفر لها مقاومة للأمراض. هذه الأسماك لها قيمة زراعية-اقتصادية ، وهي أقل عرضة للنقد العلمي والعام.

في الآونة الأخيرة، ازداد الاهتمام بالحيوانات الترانسجينية التي تُنْتِج أدوية. أحد الأدوية "المرغوب فيها" هو البروتين مضاد-ثرومبين (Anti-thrombin)، وهو بروتين مضاد لتخثر الدم.

א. הדמיה של עכבר טרנסגני שבו ביטוי-יתר של הורמון הגדילה לצד עכבר ביקורת

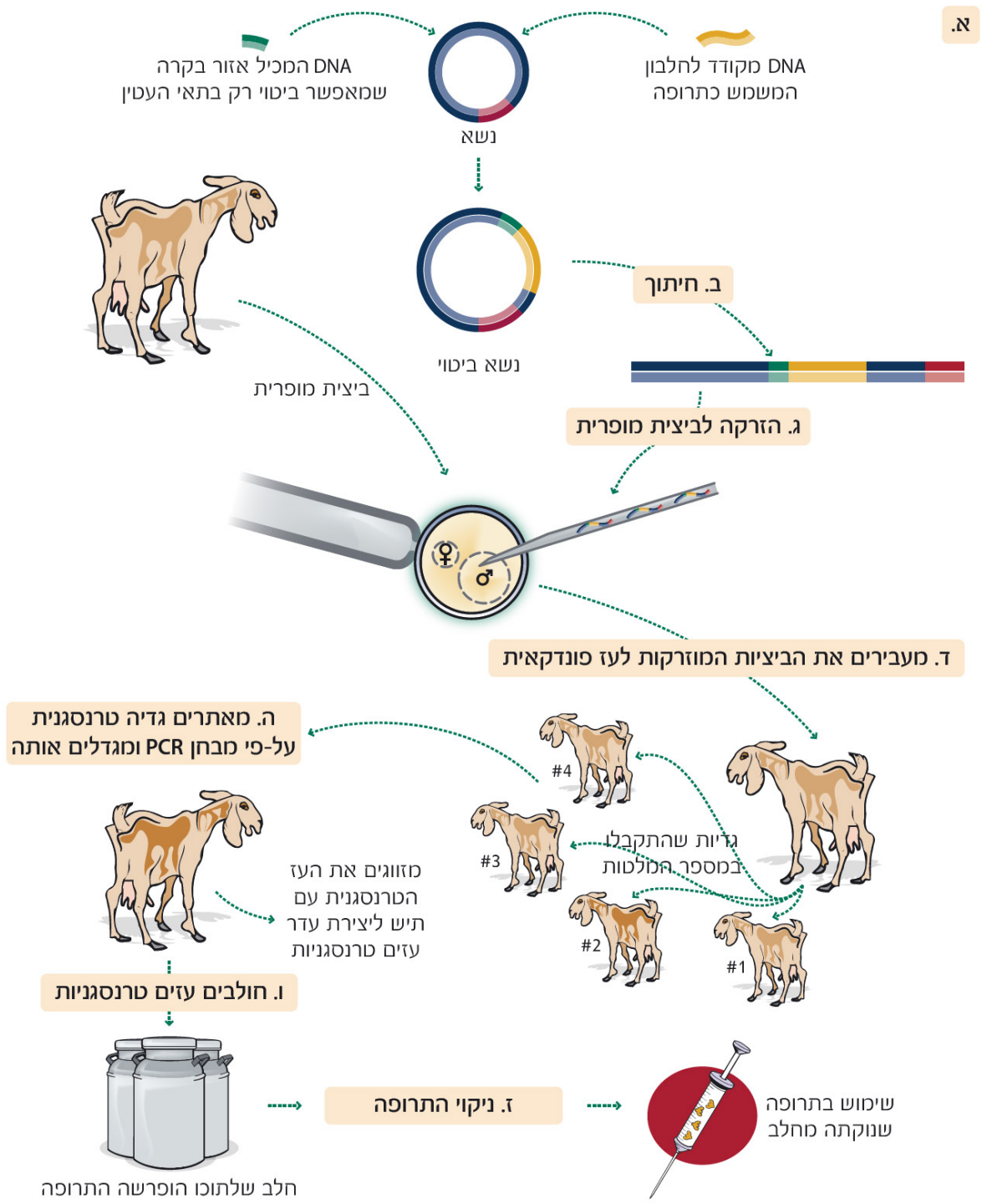
עכבר טרנסגני שבו ביטוי-יתר של הורמון הגדילה, גדול פי 2 מעכבר ביקורת.

ב. דג סלמון טרנסגני שבו ביטוי-יתר של הורמון הגדילה לצד דג ביקורת

הדגים שבתמונה בקעו מהביצים באותו יום. בדג העליון ביטוי-יתר של הורמון הגדילה בעוד הדג התחתון הוא דג ביקורת. הדג הטרנסגני מגיע לגודל ראוי לשיווק בתוך כ-18 חודשים, בעוד שלדגים שאינם טרנסגניים נדרשים 36 חודשים להגיע לאותו גודל.

الشكل 8.10: الحيوانات الترانسجينية التي يكون فيها الترانسجين هو جين هرمون النمو.

تمّ استخدام بويضات مخصبة لحقن جين هرمون النمو، الذي وُضع بالقرب من منطقة مراقبة مناسبة. تمّ الحصول على كائنات حية ترانسجينية، والتعبير عن جين هرمون النمو في الفأر وسمك السلمون أدّى إلى تسريع نمو هذه الكائنات الحية. هذه الكائنات الحية أكبر بكثير من الكائنات الحية المستخدمة كضابط (أي الكائنات التي لا تحتوي على جين من مصدر خارجي).



الشكل 8.11: إنتاج عنزة ترانسجينية تفرز إلى الحليب بروتين- دواء.

في المرحلة أ ينتجون ناقل يتمّ فيه وضع الـ DNA الذي يشفّر لبروتين الدواء على مقربة من منطقة مراقبة تعمل فقط في خلايا الضرع. يقطعون هذا الناقل الريكومبيننتي (مرحلة ب) لحقنه في بويضة مخصبة (ج) وفي المرحلة التالية يدخلون البويضة المحقونة إلى عنزة حاضنة (د). يتمّ فحص الجَدْي الناتج في عمليات الوضع التالية، يتمّ فحص احتوائها على الترانسجين ومقدرتها على إفراز بروتين الدواء في حليبها. يستخلصون الدواء من الحليب ويتابعون الحلب والاستخلاص.

يمكن الحصول على حيوان ترانسجيني يُنْتج دواءً يفرزه الى حليبه. على سبيل المثال ، يمكن أن نُنْتج عنزة ترانسجينية تفرز إلى حليبها كمية كبيرة من البروتين المضاد للثرومبين ، الذي يلعب دورًا في منع تخثر الدم. لتنفيذ هذا التطبيق، يتمّ تنفيذ العملية الموضحة في الشكل 8.11.

إنتاج مضاد الثرومبين في خلايا هامستر في مستنبت هي عملية مكلفة، لأنّ كل خلية تُنْتِج كمية منخفضة نسبيًا من المادة، كما يلزم أيضًا عملية تنقية معقدة. نتيجة لذلك، في وقت مبكر من سنوات الـ 80 من القرن الـ 20 فكر العلماء في بدائل. كانت الفكرة الأخذ بالحسبان حقيقة أنّ غدد الحليب لدى الأبقار والماعز يمكن أن تُنْتِج كميات كبيرة من البروتينات المعقدة التي تُفرز خارج الخلية. لذلك، اقترح الباحثون أن تُنْتَج في غدد الحليب لهذه الحيوانات أيضًا بروتينات ريكومبيننتية ذات قيمة طبية يتمّ إفرازها في الحليب.

لإنتاج حيوان ترانسجيني، على سبيل المثال الماعز، يُنْتِج بروتينًا ريكومبيننتي مرغوبًا يُفرز في الحليب تُستخدم أساليب الهندسة الوراثية. في المرحلة الأولى، يتمّ استنساخ الجين الذي يشفر البروتين المطلوب وكذلك منطقة مراقبة مناسبة. منطقة مراقبة مناسبة هي منطقة مراقبة لجين نشط فقط في غدد الحليب للماعز. بعد الانتهاء من إدخال الجين ومنطقة المراقبة المطلوبة في ناقل تعبير مناسب، ، يحقنون الناقل الريكومبيننتي في بويضة مخصبة، كما هو مبين في الشكل 8.11، من أجل الحصول على عنزة ترانسجينية. بعد نقل البويضات إلى ماعز حاضنة، يجرون للجَدْي المولود فحص PCR لإيجاد الماعز التي تحتوي على الترانسجين في الجينوم. في حالة البروتين الريكومبيننتي المضاد للثرومبين، تم التعبير عنه كما هو متوقع في خلايا غدة الحليب ونتج كما هو متوقع في حليب الماعز الترانسجيني.

تقدر قيمة ليتر حليب كهذا من حيوان ترانسجيني بحوال 2000 دولار. ومن المثير للذكر أنّ سلطات الصحة رفضت سنوات عديدة المصادقة على تسويق الدواء الذي تمّ استخلاصه من الحليب. في عام 2006 فقط، أي بعد حوالي 20 عامًا من إقرار الفكرة، تمّت المصادقة على تسويق أول دواء من حليب حيوانات ترانسجينية: الدواء المضاد للثرومبين. هذا إنجاز كبير، ونتيجة لذلك، يحاولون اليوم إنتاج أدوية إضافية في حليب الحيوانات الترانسجينية. تتضمن هذه الأدوية بروتينًا يساعد على التئام الجروح ، وبروتين مضاد لنشاط غاز الأعصاب، وبروتين فيروسي مطلوب للتطعيم ضد نفس الفيروس.

- أولئك الذين يحتاجون إلى مضادات ثرومبين هم أولاً أولئك المرضى الذين لا يمكن لأجسامهم أن تُنْتِج المبنى الصحيح لهذا البروتين بسبب طفرة في الجين (1 من أصل حوالي 5000 شخص). كذلك يحتاج إلى هذا الدواء المرضى الذين أجريت لهم عملية جراحية في القلب.
- استخدام ترانسجين لإنتاج بروتين ذي قيمة طبية يتمّ إفرازه في الحليب يمكن أن يسمح بالحصول على كمية كبيرة من البروتين المرغوب بجودة عالية. البروتين عالي الجودة هو بروتين مطوي بشكل صحيح ومضافة إليه أطراف سكرية في المواقع الضرورية. بالإضافة إلى ذلك، فإن عمليات إنتاج واستخلاص البروتين الريكومبيننتي من الحليب سهلة نسبياً، حيث يتمّ إفراز البروتين خارج الخلية وخارج جسم الحيوان الترانسجيني. بسبب هذه الحقائق قد ينخفض سعر الدواء بشكل كبير.
- كان هناك تأخير طويل في المصادقة على استخدام الدواء المضاد للثرومبين من حليب ماعز. تتبع أسباب التأخير من الخوف من أن يستجيب جسم مُستهلك الدواء بإنتاج أجسام مضادة. قد يكون هذا هو الحال إذا لم يكن الدواء نقيا بنسبة 100 في المائة من بقايا بروتينات الماعز التي قد تسببللجهاز المناعي لإنتاج أجسام مضادة غير مرغوب فيها. يذكر أن حليب الماعز والجبن المصنوعة منه هو من ماعز غير ترانسجيني.

كما هو مبيّن في الشكل 8.11 ، للحصول على عنزة ترانسجينية تُنْتِج مضاد الثرومبين الذي يفرز في الحليب ، يتمّ وضع الجين الذي يشفر لمضاد الثرومبين بالقرب من منطقة مراقبة مخصصة للسماح بالتعبير الجيني في خلايا الضرع وحدها. يتمّ حقن هذا الترانسجين في بويضات مخصبة، وفي النهاية يتمّ الحصول على ماعز ترانسجيني. لتر من حليب الماعز الترانسجينية التي تُنْتِج مضادة الثرومبين يساوي 2000 دولار.