مقدمة في الهندسة الوراثية

Introduction In Genetic Engineering

الهندسة الوراث **GENETIC ENGINEERING**

مقدمة

شهدت حقول الوراثة وعلم الأحياء الجزيئي والكيمياء الحياتية خلال عقدين الماضيين ثورة هائلة غيرت الكثير من المفاهيم الحيائية وفتحت الابواب واسعة معرفة الكثير من الأسرار الخافية التي لازالت تكشف طبيعة الكائن الحي وخاصة على مستوى الوراثي . لم تكن هذه الثورة وليدة اكتشاف تقنية منفردة أو ناتجة عن انبثاق فكرة نظرية واحدة ، وانما كانت نتيجة تطوير مجموعة من التقنيات محورها الأساس هو **كلونة الجبين** و **الهجينية** او **تطويع الجين** تعرف بمجموعها الجينية **تقنية الهندسة الوراثية** **اوتقنية الدنا**

♠ Gene cloning

♣ Gene manipulation

♥ Recombinant DNA technolog

♦ Gentic engineering

تعرف الهندسة الوراثية على انها التلاعب بالمحتوى الوراثي لكائن معين من اجل تغيير مادتة الوراثية . يشمل هذا التعريف العام كل الطرق التي من شأنها فى المادة الوراثية للكائن مثل عن طرق **تربية الحيوانات والنباتات** والطرق الوراثية التقليدية الأخرى مثل أحداث الطفرات الوراثية تزاوجات في الأحياء المجهرية فضلا عن تقنيات الهندسة الوراثية الحديثة التي تعرف تقنية الدنا الهجينية التي تعتمد على تكوين بني وراثية جديدة عن طريق ربط مواد وراثية مختلفة في أنايب الأختبار (خارج الخلايا) بما أن ظهور مصطلح الهندسة الوراثية كان متزامنا مع تطور التقنيات الحديثة لتغيير البني الوراثية فأنه غالبا ما يستعمل للإشارة إلى هذه التقنيات

Animal and plant breeding ♠

على هذا الأساس سيستخدم هذا المصطلح في هذا الكتاب للاشارة إلى هذه التقنيات الحديثة وليس إلى التقنيات التقليدية الأخرى يعد حقل الهندسة الوراثية واحدا من احدث الحقول العلمية حيث كانت بدايته الحقيقية مع بداية عقد السبعينات من هذا القرن . لقد نال هذا الموضوع اهتماما كبيرا جدا ليس على المستويات العلمية فحسب وانما على المستويات الاجتماعية والسياسة والدينية أيضا، وأثير حوله الكثير من الجدل والنقاش بين مؤيد متحمس وبين معارض حذر . ان موضوعا مثل الهندسة الوراثية يستحق فعلا الكثير من النقاش والجدل لأن الأساس فيه تكوين بنى وراثية جديدة عن طريق اضافة أو حذف معلومات وراثية معينة لانتاج احياء ذات مواصفات جديدة تختلف عن مواصفاته الطبيعية. لذا يؤكد المتحمسون على ضرورة تطوير هذا الموضوع للحصول على سلالات كفؤة ومفيدة في انتاج العديد من المواد الطبية والصناعية المهمة، اضافة الى تحسين السلالات وجعلها اكثر مقاومة للأمراض والظروف المناخية القاسية ، في حين يعترض القسم الاخر على الاستمرار في تطوير هذا الموضوع خوفا من تكوين كائنات جديدة ذات مواصفات مدمرة يمكن أن تلحق اضرار جسيمة للانسان

على الرغم من حداثة هذا الموضوع، الا أن فكرته الأساسية غائرة في القدم وتمتد بعيدا إلى فجر الحضارات مثل حضارات وادي الرافدين ووادي النيل والحضارة الإغريقية، فقد كان الانسان تواقا ومنذ الأزل للحصول على الكائن الخارق الذي يحمل كل المواصفات الحميدة التي تحملها الكائنات المختلفة . ان شخصيات ملحمة كلكامش العراقية والثيران المجنحة في الحضارة الاشورية، وابي الهول في الحضارة المصرية، والكايميرا (مخلوق خرافي مكون من رأس اسد وجسم عنزة وذيل افعى) في الأساطير الإغريقية القديمة ماهي الا دلائل واضحة على تفكير الانسان ومنذ فجر الحضارات في الحصول على الكائن الخارق. لم تغب فكرة الحصول على الكائن الخارق عن ذهن الانسان على مر العصور . وبتقدم العلوم وتوفر الوسائل العلمية الوراثية استمرت المحاولات للوصول إلى الهدف المنشود . الا أن حاجز النوع يحمل صفات وراثية مشتقة من انواع مختلفة وذلك لعدم امكانية حدوث التزاوج بين الأفراد العائدة لانواع مختلفة، وهذا اقتصر تحسين السلالات على تبادل

الصفات المرغوبة المتواجدة في افراد النوع الواحد فقط . ظل حاجز التوع صامدا أمام الكثير من المحاولات لاجتيازه إلى أن تطورت تقنيات الهندسة الوراثية الحديثة التي مكنت

الانسان من تجاوز هذا المانع الصعبه وتكوين بنى وراثية جديدة مشتقة من انواع مختلفة وهنا حدث الأنعطاف الكبير الذي غير الكثير من المفاهيم الحياتية واوضح العديد من الأسرار الفافية واضاف بادا جديدا للمعرفة الانسانية ا لاتقتصر فائدة الهندسة الوراثية على انتاج كائنات جينية ذات مواصفات مرغوبة حسب. فقد كانت وسيلة ممتازة للتعرف على الكثير من الأسرار العلمية وبالذات تلك التي تخى بناء ووظيفة الجين التي اغنت المعرفة الانسانية بكثير من المعلومات التي ستكون وبالا شلة ذات فائدة كبيرة في التعرف على طبيعة الكائن الحي بشكل افضل

.

1- كلونة الجين

تعد كلونة الجين المحور الأساس في تقنية الهندسة الوراثية حيث تنقل من خلالها الجينإت من كائن إلى آخر، يمكن تعريف كلونة الجين على انها عملية تكوين اتحادات وراثية جديدة بأي طريقة مناسبة) عن طريق غرس جزيئات **دنا** منتج خارج الخلية بطريقة مناسبة ا في بلازميد او فايروس او اي ناقل كلونة مناسب ليتسني ادخالها إلى كائن اخر لايحتوي اصلا مثل هذه الجزيئات بحيث يمكنها التكاثر المستمر في المضيف الجديد. يؤكد هذا التعريف على نقطتين مهمتين. **الأولى** هي امكانية ادخال قطعة دنا غريبة إلى كائن لايحتويها اصلا وهذا يعني **امكانية تجاوز حاجز النوع** بحيث يمكن نقل الجينات من كائن معين الى اي كائن آخر حتى لو كان عائدا إلى نوع مختلف تماما. أما النقطة **الثانية** التي يؤكد عليها التعريف فهي امكانية اكثار الجينات المكلونة في خلايا المضيف على نسخة أو أكثر من االجين المكلون . أن لعملية اكثار الجين فائدة كبيرة حيث يمكن من خلالها الحصول على او كميات هائلة من الجين المرغوب يمكن استعمالها لأغراض تحديد تتابع نيوكليوتيدات **DNA** او اجراء عمليات التطفير خارج الخلايا **in vitro mutagensis**التلاعب في

او لأغراض أخرى مفيدة في تقنيات الهندسة الوراثية او تتابع الجين , **sequencing** للحصول على جين ذي مواصفات افضل من الجين الاصلي

الخطوات الأساسية لكلونة الجين

لاتمام عملية كلونة الين يجب توفر وسائل مختلفة يمكن من خلاله الوصول إلى الهدف المنشود . يوضح الشكل اسا مخططا لكلونة احد الجينات الحيوانية في خلية بكتريا ويلاحظ من هذا المخطط لوسائل المختلفة المطلوبة لاجراء تجربة

الكلونة وهذه الوسائل هي :-

1- عزل وتنقية جزيئة الدنا المرغوب كلونتها، ويطلق على هذه الدنا مصطلح

الدنا الهدفtarget DNA الغريبة forign DNA او الدنا المسافرة passenger DNA او الدنا

طورت طرق عديدة لعزل الدنا الكروموسومية من خلايا البكتريا وخلايا حقيقية النواة (نباتية وحيوانية) وتعتمد جميعها على تكسير جدران الخلايا (البكتيرية والنباتية) بشكل هاديء لأيؤثر كثيرا على الكروموسومات ومن ثم فصلها عن باقي مكونات الخلية الأخرى باتباع طرق مختلفة تضمن الحصول على جزيئات الدنا بصورة نقي ,

2- توفر ناقل كلونة مناسب والحصول علية بصورة نقية ليتم ربط قطعة الدنا الغربية بهذا الناقل. تتوفر في الوقت الحاضر نواقل كلونة مختلفة يمكن استخدام المناسب منها حسب نوع التجربة ومعظم هذه النواقل مشتقة من البلازميدات والفايروسات. طورت طرق عديدة لعزل وتنقية نواقل الكلونة بحيث يمكن من خلالها الحصول على هذه النواقل بشكل نقي ملائم لتجارب الكلونة

3- يجب توفر وسيلة مناسبة لتقطيع جزيئة الدنا الغريبة للحصول على قطعة دنا صغيرة قابلة للكلونة تحتوي على الجين المرغوب ، وكذا لقطع ناقل الكلونة مرة واحدة لجعله مناسبا لاستقبال قطعة الدنا الغريبة امه من عملية تقطيع جزيئات الدنا بشكل مسيطر عليه ممكنة بعد كتر از انزيمات التقييد تتميز هذه الأنزيماتبقابليتها على التعرف على تتابعات معينة من النيوكليوتيدات في جزيئة الدنا ومن ثم تقطع الجزيئة قرب هذه التتابعات الانتاج قطع دنا في خلايا البكتريا ، مما يعني امكانية التحكم في عملية تقطيع جزيئات الدنا من خلال اختيارانزيم التقييد الملائم

4- يجب توفر وسيلة مناسبة لربط قطع الدنا الغريبة مع ناقل الكلونة لتكوين الجزيئة الهجينة أن اكتشاف أنزيم لايكيز

الدنا طريق إعادة بناء الأسرة الفوسفاتية ثنائية الايستر، جعل ربط قطع الدنا DNA Ligase الذي يعمل على ربط قطع الدنا مع بعضها عن المختلفة ممكنا، وبهذا اصبح بالإمكان ربط قطع دنا مشتقة من مصادر مختلفة لتكوين جزيئات هجينة لاتوجد اصلا في الطبيعة

5- و يجب توفر وسيلة بمناسبة لمراقبة عمليات تقطيع وربط جزيئات الدنا وذلك لانه من الضروري جدا معرفة فيما إذا كان إنزيم التقييد المستعمل قادرا على تقطيع جزيئة الدنا ام لا قبل الاستمرار في تجربة الكلونة ، كما أنه من الضروري معرفة عدد قطع الدنا الناتجة عن عملية التقطيع وتقدير حجومها المعرفة صلاحيتها للكلونة علاوة على ذلك فان التاكد من حدوث عملية الربط بين قطع الدنا الغريبة وناقل الكلونة يعد أمرا مهما قبل الاسترسال في التجربة. كما أن عملية القطع والربط التي تجري عادة في انبوبة اختبار لايمكن مراقبتها بصريا لذا وجب استخدام طرق اخرى، للتأكد من حدوث هذه العمليات، تتم مراقبة - اية القطع والربط في الوقت الحاضر باستخدام الترحيل الكهربائي في هلام الأكاروز أو هلام البولي اكرلامايد polyacylamid - Agaros

حيث تضاف جزيئات الدنا إلى طبقة رقيقة من الهلام، وبعد امرار التيار الكهربائي ستتحرك قطع الدنا المختلفة إلى مسافات تتناسب مع اوزانها الجزيئية مكونة حزما منفصلة على الهلام يمكن تحديد اعدادها واحجامها بسهولة

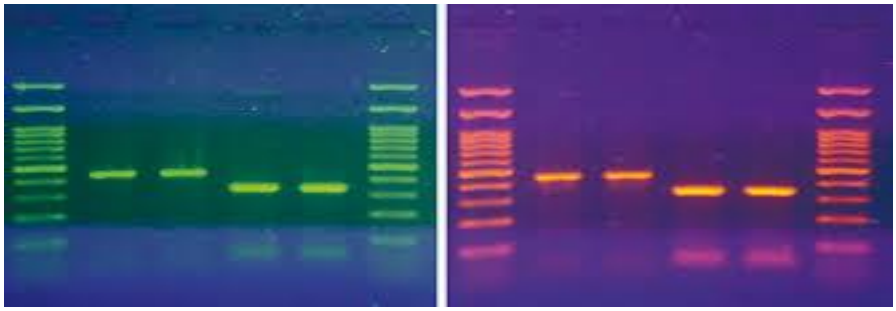


Fig 1 Agarose gel

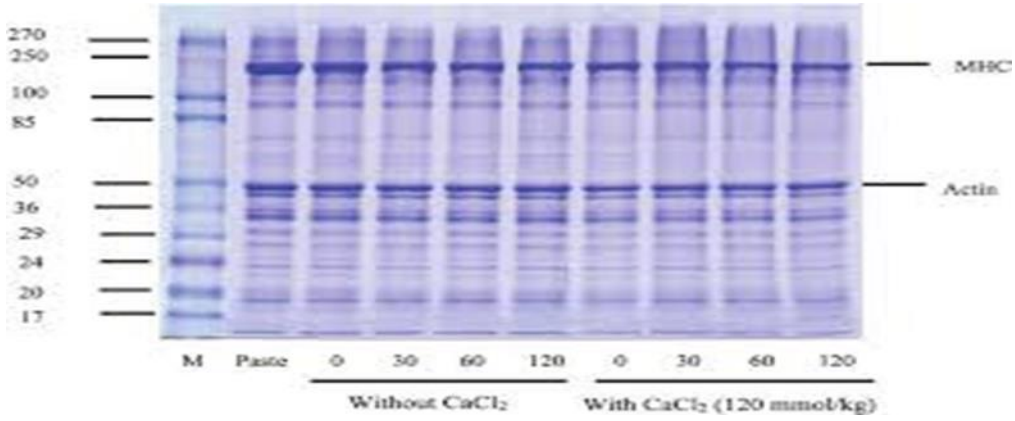


Fig2 Polyacrylamide gel

عمليات الربط إلى خلايا الكائن المضيف بحيث يمكن لهذه الجزيئات أن يجب توفر وسيلة يمكن من خلالها ادخال الجزيئات الهجينة الناتجة عن نديم نفسها في المضيف الجديد وتتوارث بثبات بين الأجيال المتعاقبة . من اكثر الطرق المستخدمة في إدخال الجزيئات الهجينة هي الطريقة التحول علاوة على طرق وطريقة التحول بالعاثي اخرى يمكن استخدامها في حالة تعذر استخدام الطريقتين السابقتين لأجل زيادة كفاءة ادخال الجزيئات الهجينة إلى خلايا المضيف ، طورت العديد من طرق التحول والتحول بالعائي لأستعمالها مع المضايف المختلفة

الأنتقاء الخلايا المستقبلة للجزيئة الهجينة العاملة للجين المرغوب وتمييزها عن بعد ادخال الجزيئات الهجينة إلى خلايا المضيف يجب توفر طريقة ملائمة الأعداد الهائلة من الخلايا المستقبلة للجزيئات الهجينة الأخرى، طورت عدة طرق للأنتقاء المباشر وغير المباشر التي يمكن من خلالها انتقاء الخلايا الهجينة المرغوبة بسهولة وكفاءة عالية بعد ا صول على الخلايا الحاوية على الجين المكلون يمكن انماءها في وسط زرعى منا سب، للحصول على

اعداد هائلة منها ، وبمعنى اخر سيتم الحصول على اعداد هائلة من نسخ الجين المرغوب الذي يوجد بشكل نسخة واحدة في الكائن الأصلي ، وعندها سيكون من السهولة عزل الجين المكلون من هذه الخلايا والحصول علية بكميات كبيرة مناسب لاجراء الدراسات المختلف علية

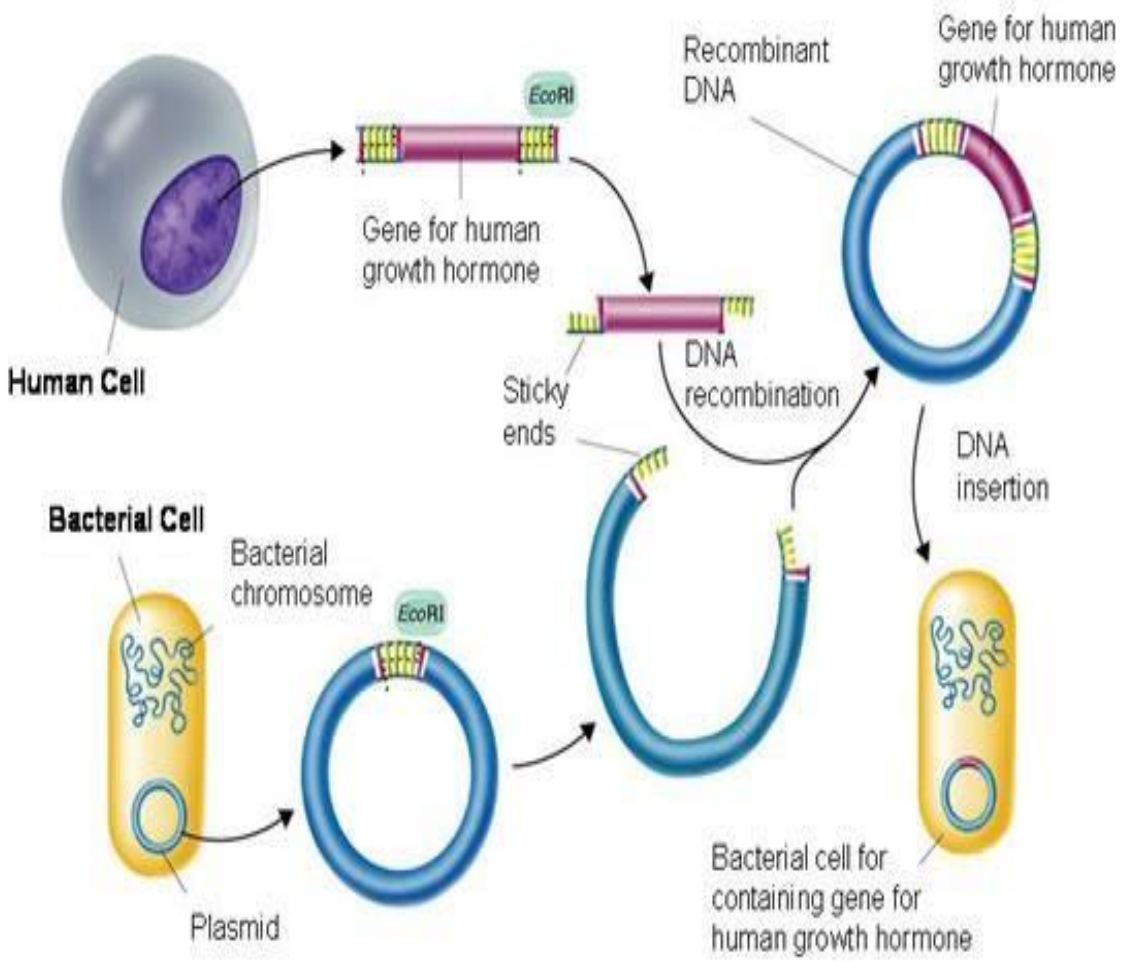


Fig 3 Cloning of bacteria

التقنيات الاخرى :-

لاتقتصر تقنيات الهندسة الوراثية على تلك المستخدمة في تجارب الكلونة فحسب وانما تشمل تقنيات اخرى مهمة وضرورية لاكمال الصورة والوصول إلى الهدف المنشود في تجارب الكاملة. تستخدم هذه التقنيات عادة بعد الحصول على الجين من خلالها دراسة الجين المكلون من الناحية البنائية الوظيفية علاوة على تطويعه بالشكل الذي يخدم هدف التجربة DNA sequencingالتي يمكن بواسطتها تحديد تتابع

التي يمكن بواسطتها تحديد تتابع النيوكليوتيدات الجين المكلون بشكل دقيق مما ساعد في كشف الكثير من الأسرار التي تحيط في تركيب جين ووظيفته وعصت أجرية واضحة حول العديد من التساؤلات التي كانت تدور حول طبيعة عمل الجينات. من التقنيات المهمة الأخرى هي تقنيةالتطفير خارج الخلية التي يمكن بواسطتها احداث طفرات وراثية

عن طريق معاملات خاصة تجري في أنبوبة الأختبار ان مايميز هذه الطريقة عن طرق التطفير التقليدية التي تحدث عادة داخل الخلايا هوخضوعها الكامل لسيطرة الباحث حيث يمكن تغيير نيوكليوتيد واحد معين بدون التاثيرعلى على متتابعات الأخرى ، in-vitor retagensisالتي يمكن بواسطتها احداث طفرات

وبهذا يمكن من خلال هذه التقنية الحصول طفرات مرغوبة بالشكل الذي يريده الباحث ، وقد ساهمت هذه التقنيات في تحسين المعلومات حول طبيعة وظيفت الجين علاوة على فائدتها في تحسين موصفات الجين المكلون باستخدام تقنيات اخرى من اجل الحصول على كميات كبيرة من ناتجة معدلات التعبير الجيني وهذا هو احد الأهداف الرئيسية لتقنية الهندسة expression rate الوراثية

تطبيقات الهندسة الوراثية :-

لم يكن الاهتمام الكبير بالهندسة الوراثية متاتية فقط من فائدتها الكبيرة في اغناء المعرفة الانسانية بالكثير من المعلومات الأساسية حول الكائن الحي التي لم يكن بالامكان التوصل اليها بدون هذه التقنية ولا كان هذا الاهتمام عائدا بالأساس إلى الامكانات التطبيقية الهائلة

لهذا الحقل الجديد في المجالات الطبية والزراعية والصناعية تعدالتقنية الحيوية بداية تطبيقات الهندسة الوراثية حيث اعطى ثمارها وذلك من خلال انتاج العديد من الهرمونات والانزيمات المهمة طبية وصناعية فقد اصبح مكاننا في الوقت الى الحاضر انتاج عدد من البروتينات الحيوانية من قبل خلايا البكتريا عن طريق كلونة الجينات المسؤولة عن تخليق هذه المواد في البكتريا . ان لمثل الكتريا عن طريق كلونة الجينات المسؤولة عن تعليق هذه المواد في المجالات الطبية او الصناعية، التي لايمكن الحصول عليها بكميات تجارية لان الكائن الاصلى ينتجها بكميات قليلة مما يجعل عملية عزها وتنقيتها غير اقتصادية . وبهذا فأن تقنيات الهندسة الوراثية ستساعد في الحصول على هذه المواد بكميات كبيرة وبصورة اقتصادية وذلك من خلال كلونة الجينات المشفرة لها وتهيئة الظروف المثلى لتعبيرها في البكتريا أو الاحياء المجهرية الأخرى. لقد تم بالفعل الحصول على العديد من الجينات المكلونة في البكتريا ، ولعل اشهر مثل على ذلك هو انتاج هرمون الأنسولين البشري

وبكميات تجارية بعد كلونة من قبل بكتريا ***Escherichia coli*** الجين المسؤول عن الانتاج

هناك العديد من الأمثلة الأخرى لانتاج هرمونات وانزيمات مهمة من قبل البكتريا المهندسة وراثية. أما في مجال الزراعة فقد استخدمت الهندسة الوراثية لتطوير سلالات مقاومة الأمراض الفطرية والظروف المناخية الصحية مما يسهم اسهاما فعليا في زيادة انتاج المحاصيل الزراعية ويؤمن للانسان غذائه الضروري. آن سرد الأمثلة اعلاه لايعني ان تقنية الهندسة الوراثية قادرة وبصورة مطلقة على جعل كل الجينات المكلونة قابلة للعمل في مضايفها الجديدة، وذلك لوجد معوقات عديدة تقف في طريق تعبيرها في البيئية الجديدة. ولأهمية الموضوع فأن البحوث، مستمرة في هذا المجال لتذليل الصعوبات التي تعيق فعاليات الجينات المكلونة. وقد طورت بالفعل وسائل مختلفة لمساعدة الجينات المكلونة في التعبير عن صفاتها في المضيف الجديد

.

المصادر

1- البكري غالب (1990),مبادئ الهندسة الوراثية.

2- عماش هدى (1994),مبادئ عام الحياة الجزئي.

3- زيدان حيدرواخرون(2013),مبادئ الوراثة الجزيئية.

4- K.Setow.Jane(2004),Genetic Engineering,Principles And Method.

5- D.Watson.James(2004),Moleculer Biology Of The Gene.

Restriction enzyines الإنزيمات المقيدة أو القاطعة

مقدمة:

هي إنزيمات متخصصة غالبا في تقطيع الدنا من مواقع معينة تختلف اعتمادا على نوع الإنزيم. وتتعرف إنزيمات القطع على تسلسل معين من أزواج القواعد Base pairs في الحامض النووي وتقوم بعمل قطع فيه عند تلك النقطة التي تسمى موقع القطع Restriction siteوتوجد هذه الإنزيمات غالبا في البكتيريا كما يوجد بعضها في الطحالب الخضراء . ومهمتها هي حماية البكتيريا من الإصابة بالفيروسات وذلك عن طريق إحداث قطع بالحامض النووي المكون للفيروس ، بينما تتم حماية الحامض النووي الخاص بالبكتيريا نفسها عن طريق إضافة مجموعة الميثيل .Methylation .

وتم اكتشاف هذه الإنزيمات عام ١٩٩٢م في بعض أنواع بكتيريا القولون Eschericia coliمن السلالات K , E التي تصاب بالعاثيات أو البكتيريوفاج (الفيروسات التي تتطفل على البكتيريا) حيث تعمل هذه الإنزيمات على إعطاء البكتيريا مناعة تعمل على منع أو عرقلة نمو وتكاثر العاثيات وذلك عن طريق إتلاف المادة الوراثية لها أو تقييد فعاليتها . لذلك أطلق علي هذه الإنزيمات بالإنزيمات المقيدة أو المحددة أو القاطعة . وآلية المناعة في البكتيريا تعتمد على إنزيمات القطع ، ويصل عدد الإنزيمات المكتشفة حتى الآن إلى أكثر من 400 إنزيم قادر على تمييز أكثر من 150 موقع تقييد أو قطع على الحامض النووي DNA ويتم تسميتها تبعا للكائن الحي التي عزلت منه.

أنواع الإنزيمات المقيدة أو القاطعة:

قسمت هذه الإنزيمات اعتمادا على قدرتها على القطع المتخصص واحتياجاتها الكيميائية للقيام بوظائفها إلى ثلاثة أنواع هي:

أولا : الإنزيمات المقيدة - الطراز الأول Type 1 Restriction enzymes

وتشمل الإنزيمات الأولية المستخلصة من بكتيريا القولون السلالة K و E المصابة بالعاثي الامدا وتعمل هذه الإنزيمات على القطع العشوائي للحامض النووي DNA ولوحظ بأن هذه الإنزيمات ترتبط في مواقع القطع ثم تبدأ بهدم السلاسل المزدوجة في اتجاه واحد لمسافة تتراوح بين 1000–5000 نيوكليوتيد ثم تبدأ بعدها بهدم سلسلة مفردة لمسافة أخرى وتتوقف بعدها عن العمل. تحتاج هذه الإنزيمات لعوامل مساعدة مثل أيونات المغنيسيوم.

وأدينوسين ثلاثي الفوسفات ATP .

وأدينوسيل ميثونين(.S – adenosyl methionine).

ثانيا : الإنزيمات المقيدة - الطراز الثاني Type II Restriction enzymes

: تعتبر هذه المجموعة من الإنزيمات من أهم مجاميع إنزيمات القطع لاستخدامها على نطاق واسع في الهندسة الوراثية . وتمتاز هذه الإنزيمات بقدرتها على قطع الحامض النووي DNAعند مواقع معينة Restriction sites فقط بحيث تعطي عددا ثابتة من القطع لكل نوع من الأحياء. وتستهدف هذه الإنزيمات ترددات (تتابعات) Sequences معينة بحيث أنها تتعرف على هذه التتابعات وتقوم بالقطع قبل أو بعد هذا التتابع مباشرة. فمثلا يمكن للإنزيم القاطع Eco R1 أن يتعرف على الترد 3–GAATTC– 5 ويقوم بالقطع بين الجوانين والأدنين من النهاية الخامسة. وهكذا فإن الإنزيم يقوم بقطع سلاسل الدنا في جميع المواقع التي تحتوي على هذا التتابع. ويختلف عدد تتابعات مواقع القطع التي تتعرف عليها الإنزيمات من إنزيم إلى آخر ولكنها في الغالب تتراوح بين أربعة إلى ستة تتابعات (ترددات) (شكل ١). ونظرا للأعداد الكبيرة التي اكتشفت من هذه الإنزيمات

فإنه تم اقتراح نظام تسمية وضعه العالمان سميث وناثان **Smith and Nathan** عام 1973م وعلى النحو التالي:

أ- يرمز لجنس الكائن الذي اكتشف فيه الإنزيم بالحرف الأول من اسم الإنزيم ويرمز لنوع الكائن بالحرفين الثاني والثالث من اسم النوع . فمثلا الإنزيم المسمى Eco مأخوذ من البكتيريا coli . E فالحرف الأول من اسم الإنزيم مأخوذ من اسم جنس البكتيريا Eschericia والحرفان الثاني والثالث مأخوذان من اسم نوع البكتيريا coli .

والإنزيم Hin المأخوذ من اسم البكتيريا. .Haemophilus influenza والانزيم Hpa مأخوذ من اسم البكتيريا Haemophilus parainfluenza .الإنزيمات. وكذلك الانزيمات الاخرى .

Anmar Nazar

ب- في حالة احتواء البكتيريا على بلازميد أو عاث فإنه يجب إضافة اسم البلازميد أو العائي إلى اسم الإنزيم . فمثلا في حالة الإنزيم Eco المشتق من اسم البكتيريا R

coli .فإذا كانت البكتيريا تحتوي على البلازميد R1 فإن اسم الإنزيم يصبح Eco R1

ج- في حالة وجود أكثر من إنزيم لنفس النوع من البكتيريا فإنه تستخدم الأرقام الرومانية بعد نهاية الاسم كما هي الحال في الإنزيم Eco RT و Eco RII و آ Hind وHind II

.Hind III,

ثالثا : الإنزيمات المقيدة - الطراز الثالث Type III Restriction enzymes:

وهي إنزيمات وسط في صفاتها بين الطراز الأول و الطراز الثاني ، وتقوم هذه الإنزيمات بالقطع في مواقع محددة وتحتاج إلى أيونات المغنيسيوم وجزيئات ATP .

الإنزيم	التتابع المتعرف عليه وموقع القطع	الاسم العلمي للبكتيريا المعزولة منها
Bam HI	G↓GATCC CCTAG↑C	Bacillus amyloliquef aciens H.
Bg1 II	A↓GATCT TCTAG↑A	Bacillus globigi
Eco RI	G↓AATTC CTTAA↑G	Eschericia coli RY13
Eco RII	↓CCTGG GGACC↑	Eschericia coli R245
Hind III	A↓AGCTT TTCGA↑A	Haemophilus influenzae Rd
Hha I	GCG↓C C↑GCG	Haemophilus haemolyticus
Hpa I	GTT↓AAC CAA↑TTG	Haemophilus parainfluenza

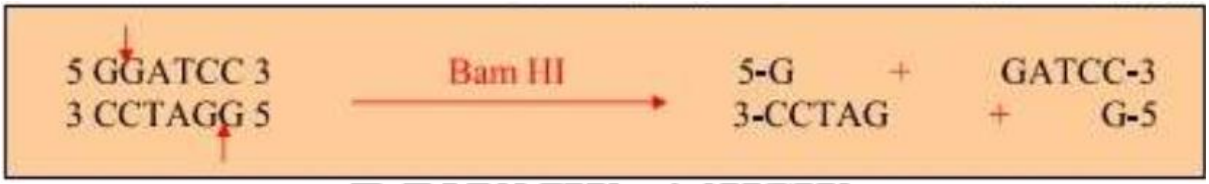
Microcoleus strain	CC TNAGG GGANT CC N = أي من النيوكليوتيدات الأربعة	Mst II
Providencia stuartil 164	CTGCA G G ACGTC	Pst I
Thermus aquaticus YT1	T CGA AGC T	Taq I
Serratia marcescens	CCC GGG GGG CCC	Sma I
Staphylococcus aureus 3A	GATC CTAG	Sau 3A
Nocardia otitidis	GC GGCCGC CGCCGG CG	Not I

(شكل 1) انزيمات التقييد ومواقع القطع الخاصة بها

مواقع عمل إنزيمات القطع :

إن إنزيمات القطع (الطراز الثاني) كما ذكرت سابقا تمتلك مواقع معينة على الحامض النووي DNA تتخصص في قطعها ولكن تختلف هذه الإنزيمات في بعض الأمور فيما يخص طبيعة موقع القطع ومكان القطع ونواتجه . ومن أهم هذه الاختلافات ما يلي :

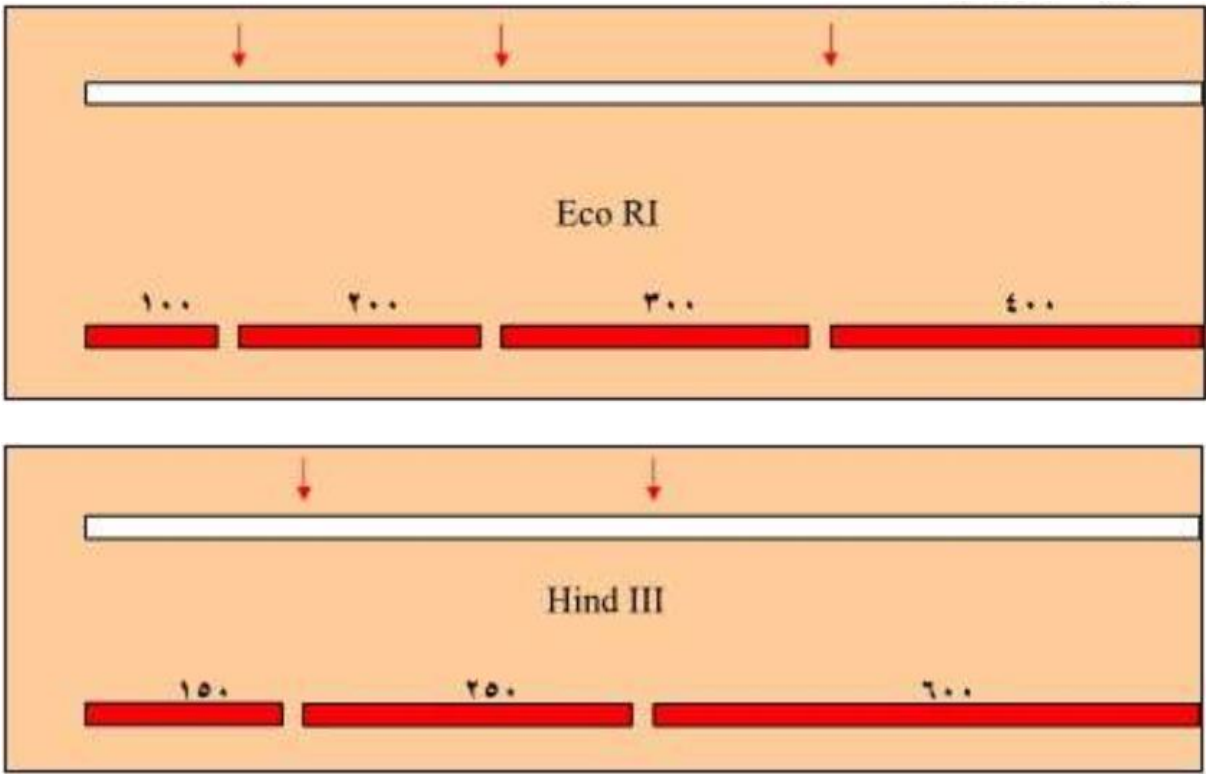
1- من ملاحظة نواتج قطع بعض هذه الإنزيمات فإنه يتبين بأن بعضها يؤدي إلى إنتاج قطع ذات نهايات لزجة Sticky ends بينما تنتج إنزيمات أخرى قطعة ذات نهايات عمياء أو غير الزجة .Blunt ends فمثلا يقوم الإنزيم Bam HI بتمييز موقع التتابع أو التردد التالي 5-GGATCC-3 وقطعه بين الكوانين عند النهاية الخامسة منتجة القطع التالية 5-G و ATCC3- G.



كما أن الانزيمEco RI يقوم بتمييز موقع التردد التابع GAATTC3 5ويقوم بالقطع بين الكوانين والأدنين عند النهاية الخامسة منتجا القطع التالية 5-G و 3-AATTC.

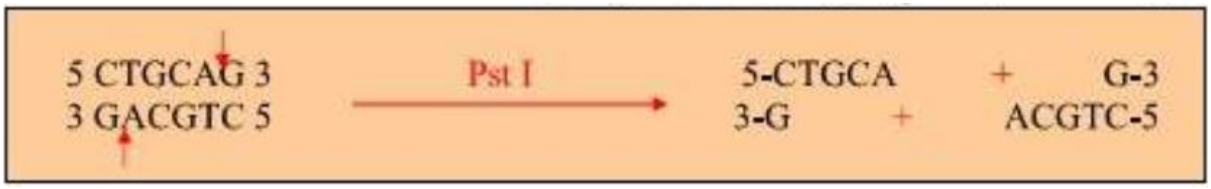
إنزيم Eco RI له المقدرة على قطع الدنا إلى قطع مختلفة الطول تحتوي على 100 و 200 و 300 و 400 نيوكليوتيدة . بينما إنزيم Hind III المعزول من بكتيريا

هيموفليس أنفلونزا فإنه يقوم بقطع الدنا إلى قطع مختلفة في الطول تحتوي على 150 و 250 و 900 نيوكليوتيدة كما في الشكل الآتي:



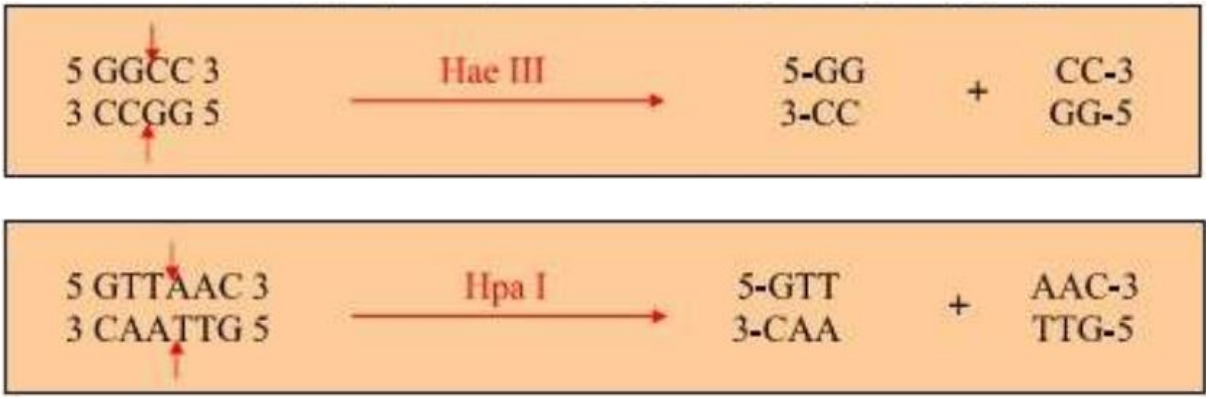
أما الإنزيم PstI فإنه يقوم بتمييز التردد

5CTGCAG3 ويقطع بين الكوانين والأدنين عند النهاية الثالثة منتجا القطع التالية 5 G–3 و 5–ACGTC + 3–G.



ويلاحظ من القطع الناتجة عن عمل هذه الإنزيمات بأن نهايات القطع الناتجة تكون مكملة أو متممة Complementary مما يسمح لها بالالتصاق مرة أخرى لذلك تسمى

هذه القطع بالقطع ذات النهايات اللزجة Sticky ends . ويعود إنتاج هذه النهايات إلى موقع القطع على سلسلتي مزدوج الحامض النووي حيث يكون غير مناظر . أما في الإنزيمات HpaI و Hae III و SmaI فإن مواقع القطع هذه تكون متناظرة تماما كما يلاحظ فيما يلي :



لذلك فإنه لا وجود للتكامل في نهايات القطع الناتجة وتدعى مثل هذه القطع بالقطع ذات النهايات العمياء Blunt ends لعدم قدرتها على الالتحام مرة أخرى إلا إذا أجريت لها بعض التحويرات لجعلها لزجة وتتم هذه التحويرات بواسطة إنزيمات تحوير الدنا DNA Modifying enzymes.

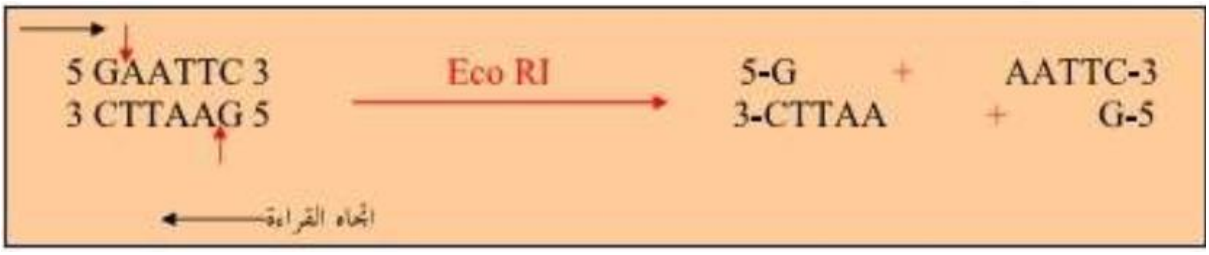
2- من ملاحظة القطع الناتجة من عمل الإنزيمات Bam HI و Eco RI و القطع الناتجة عن الإنزيم Pst I فإنه يلاحظ بأن النتوءات الخاصة بالنهايات اللزجة مختلفة الاتجاه ، فمثلا نتوءات القطع الناتجة عن الإنزيمات Bam HI و Eco RI ممتدة من النهاية الثالثة بينما تكون ممتدة من النهاية الخامسة في القطع الناتجة من الإنزيمPstI.

3- إن تتابعات (ترددات) مواقع القطع (التقييد) تختلف في عدد نيوكليوتيداتها فبعض الإنزيمات تستطيع تمييز مواقع تقييد رباعية التردد وتقطع قبلها أو بعدها أو بينها كما هو الحال في الانزيمات التالية :-

والبعض الآخر من الإنزيمات يستطيع تمييز مواقع تقييد خماسية التردد مثل الإنزيم AvaII..الذي يميز الموقع 5-GGTCC-3و الإنزيم Eco RII الذي يميز الموقع 5 3-CCAGG-3وغيرها من الإنزيمات . وتكون معظم الإنزيمات الأخرى ذات مواقع تقييد سداسية التردد وتشذ عن ذلك مجموعة من الإنزيمات مثل الإنزيم HgaI الذي يميز الموقع 5-GACGA-3ويقوم بالقطع بعده بخمسة نيوكليوتيدات في السلسلة الأولى وعشرة نيوكليوتيدات في السلسلة الثانية . وكذلك الإنزيم Bbv I الذي يقوم بالقطع بعد ثمانية نيوكليوتيدات من موقع التقييد (القطع).

5-(GCAGC(N)8 في السلسلة الأولى وبعد أثني عشر نيوكليوتيد في السلسلة الثانية 12(N)CGTCG.-3 هذا إضافة إلى إنزيمات أخرى .

4- إن معظم ترددات مواقع تقييد الإنزيمات هي ترددات بالندرومية Palindromes حيث يمكن قراءة تردد موقع القطع بنفس الاتجاه في كلتا سلسلتي الحامض النووي . فمثلا يمكن قراءة التردد 5-GAATTC-3لموقع تقييد الأنزيم Eco RI بنفس الاتجاه في سلسلتي الحامض النووي كما يلي :



إلا أن مواقع تقييد (قطع) البعض الآخر من هذه الإنزيمات تكون ترددات (تتابعات) غير بالندرومية حيث تختلف مواقع قطع هذه الإنزيمات في سلسلتي الحامض النووي .

فمثلا يقطع الإنزيم BinI بعد أربعة نيوكليوتيدات من التابع 3-4(N) GGATC)-5

في السلسلة الأولى وبعد خمسة نيوكليوتيدات من التتابع 5- (N)5 CCTAG)-3

في السلسلة الثانية.

5- الاختلاف في قطع الحامض النووي الناتجة عن القطع بالإنزيمات. إن معظم الإنزيمات القاطعة ذات مواقع قطع ثابتة لذلك فإن الحامض النووي الناتج عن فعل هذه الإنزيمات تكون ذات نهايات معروفة وثابتة ، فمثلا القطع الناتجة من عمل الإنزيم EcoRI...تنتهي دائما بالتتابعات التالية 5-G و 3-CTTAA وكذلك الحال في معظم الإنزيمات. إلا أنه في إنزيمات أخرى مثل إنزيم Dde I وHinfI و Asu I فإن نهايات القطع الناتجة عن نشاطها تكون مختلفة ذلك لأن هذه الإنزيمات تستطيع تمييز أكثر من موقع تقييد أو قطع مختلف . فمثلا الإنزيم Dde I يستطيع تمييز التتابعات التالية كمواقع قطع له وهي 5-CTAAG-3 و 5-CTTAG-3 و5- CTCAG-3 -5 و3-CTGAG- 5ومن ملاحظة مواقع قطع هذا الإنزيم المؤشرة بالأسهم فإن القطع الناتجة عن نشاطه ستكون بأربع نهايات مختلفة هي :

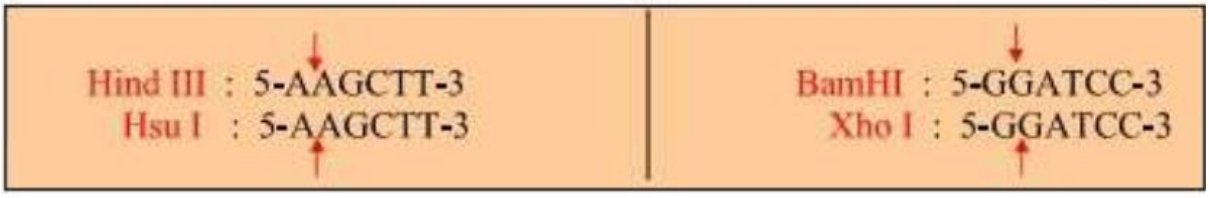
5-C	5-C	5-C	5-C
3-GATTC ,	3-GAGTC ,	3-GACTC ,	3-GAATC

ويلاحظ أن الاختلاف هنا هو دائما في النيوكليوتيد الوسطي من النهاية الثالثة (انظر الشكل السابق) . كما أن الإنزيم Hinfl يستطيع تمييز موقع القطع التالي......... 5-GANTC-3).حيث إن (N يمكن أن تكون A أو T أو C او G)و الإنزيم Asul.. الذي يستطيع تمييز موقع القطع التالي5-GGNCC-3

كما أنه يمكن الحصول على قطع حامض نووي DNA بنهايات مختلفة عديدة كما هو الحال مع القطع الناتجة عن الإنزيم Bgl I الذي يستطيع موقع القطع التالي - 5- GCCNNNNNNC- 3و الإنزيم Xmn I الذي يستطيع تمييز موقع القطع التالي 5- GAANNNNTTC-3و غيرها من الإنزيمات الأخرى .

6-بعض الإنزيمات لها مواقع تقييد مشتركة وقد تقطع هذه المواقع بنفس المكان أو أماكن مختلفة بنفس الموقع وتدعى مثل هذه الإنزيمات بالإنزيمات المتناظرة ISOschizomersوقد تكون متناظرة تماما Perfect Isoschizomers عندما يكون مكان قطعها متشابها كما هو الحال مع الإنزيمات Hind III و Hsu1

والإنزيمات Baam HI و Xho .



كما أن بعض الإنزيمات المتناظرة تكون غير تامة التناظر Irniperfect IsOschizontiersحيث أن لها مواقع تقييد متشابهة و أماكن قطع مختلفة مثل الإنزيمات Sma1 و Xma 1 و الإنزيمات Hind II و Sal L .

7 -يمكن لعدد من الإنزيمات القاطعة أن تعمل في تردد مشترك لموقع تقييد معين حيث أن لكل منها موقع تقييد داخل التردد المشترك . فمثلا الإنزيمات Bam HI و Mbo I و Sau 3A تعمل على التردد 3 5-GGjATCC-حيث يتمكن الإنزيمان Mbo1

و Sat 3A من العمل على التردد الرباعي GATC الذي يقع ضمن التردد السداسي الذي يمثل موقع تقييد الإنزيم. Bam HI.وكذلك الإنزيمات llind III وAlu I

حيث يقطع الإنزيم الأول في التردد الرباعي AGCT الذي يقع ضمن التردد السداسي AAAGCTT الذي يمثل موقع تقييد الإنزيم الثاني .

Anmar Nazar

المصادر:-

1- البكري غالب (1990),مبادئ الهندسة الوراثية.

2- عماش هدى (1994),مبادئ عام الحياة الجزئي.

3- زيدان حيدرواخرون(2013),مبادئ الوراثة الجزيئية.

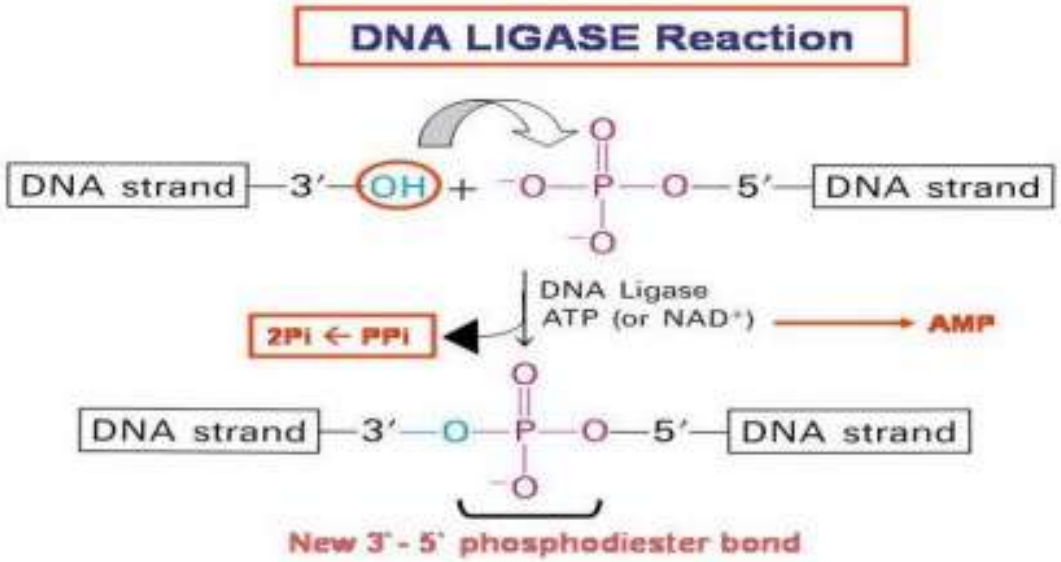
4 -K.Setow.Jane(2004),Genetic Engineering,Principles And Method.

5 -D.Watson.James(2004),Moleculer Biology Of The Gene.

ربط قطع الدنا DNA Ligation

ان عملية ربط تلك القطع من الخطوات الاساسية والمهمة التي تجري طبيعيا في الخلايا الحية او خلال تجارب الهندسة الوراثية، وذلك بألاعتماد على قدرة الانزيمات اللاحمة (الانزيمات الرابطة DNA ligases) الموجودة ضمن الانزيمات المشاركة في عملية التضاعف replication واصلاح الاخطاء.

حيث تتمتع هذه الانزيمات بالقدرة على بناء الاصرة الفوسفاتية ثنائية الايستر phosphodiester bond بين مجموعة الهدروكسيل ($3^{-}OH$) لاحدى النيوكليوتيدات ومجموعة الفوسفات ($5^{-}P$) للنيوكليوتيد المتجاور (الشكل 1)، وقد استثمرت هذه القدرة في تجارب الهندسة الوراثية بعد عزل هذا الانزيم من عدة كائنات حقيقية وبدائية النواة وكذلك الفيروسات وجميعها تشترك بقابليتها على اصلاح الكسور الموجودة في الخيوط المفردة لكلا النوعين من النهايات اللاصقة او المستوية.



الشكل1: بناء الاصرة الفوسفاتية ثنائية الايستر

تركزت الدراسات حول الانزيمين المعزولين من بكتريا *E.coli* ومن العاثي T4 ، وملخص خصائصهما ان الوزن الجزيئي للاول يبلغ 74000 دالتون اما الثاني فقد بلغ 60000 دالتون كما ان حاجة الاول للعوامل المساعدة تركزت بوجود العامل NAD^{+} اما الثاني فيحتاج للعامل ATP، اما آلية عملهما

فانهما يتشابهان حيث ينشطر العامل المساعد ليكون معقدا من الانزيم و AMP الذي يرتبط بالثلمة (الكسر) الحاملة للمجموعتين ($3^{-}OH$) و ($5^{-}P$) ليقوم باعادة تكوين الاصرة ومحررا AMP من العملية.

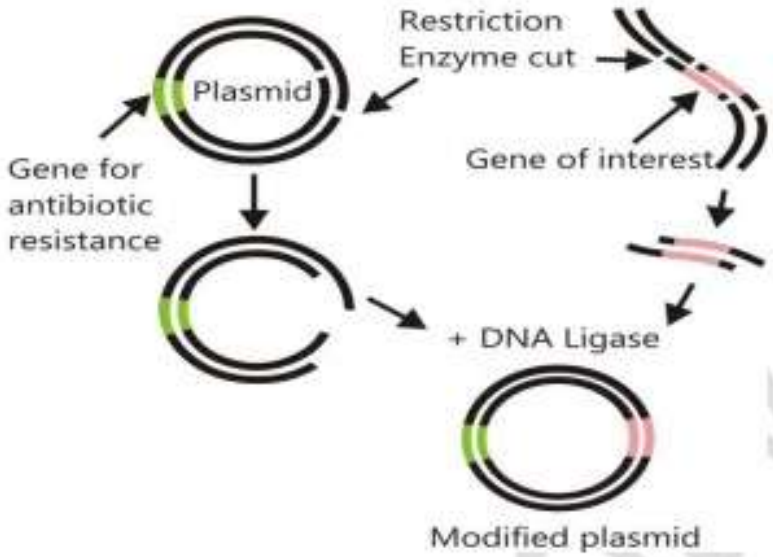
الا ان الافضلية تتجه نحو الانزيم المعزول من العاثي T4 لقابليته على ربط قطع الدنا ذات النهايات المستوية واللاصقة على حد سواء بينما انزيم بكتريا *E.coli* فانه يعمل اساسا على ربط النهايات اللاصقة، عزل الانزيم من العاثي T4 اصلا من خلايا *E.coli* مصابة بالعاثي T4، ولاجل تسريع وتسهيل عملية الحصول عليه تم كلونة الجين المسؤل عن انتاجه في احد نواقل العاثي لامدا الذي ادخل فيما بعد الى بكتريا E.coli على شكل عاثي اولي prophage، وبهذا اصبح ممكنا الحصول على كميات كبيرة من هذا الانزيم وبسهولة من بكتريا E.coli الحاوية على العاثي الهجين لامدا، ويتوفر الان تجاريا وباسعار مناسبة ويستعمل بشكل واسع في تجارب لبهندسة الوراثية.

1-ربط قطع الدنا ذات النهايات اللاصقة: Sticky Ends Ligation

عند الشروع في اي تجربة من تجارب الكلونة، يجب اولا اختيار انزيم التقييد المناسب لقطع ناقل الكلونة وجزيئة الدنا الغريبة المرغوب كلونتها، ويفضل عادة ان يكون الانزيم المستعمل من النوع الذي ينتج قطع دنا ذات نهايات لاصقة متكاملة لسهولة ربط مثل هذه القطع بواسطة انزيم DNA ligase.

تتحد النهايات اللاصقة اولا عن طريق ارتباط قواعدها النيتروجينية المتكاملة بواسطة الاواصر الهيدروجينية، الا ان هذا الاتحاد لا يكون قوياً بالدرجة الكافية لحمل قطعتي الدنا معاً بصورة ثابتة ولكنه يسهل عمل انزيم لايجيز الدنا الذي يضاف فيما بعد لاصلاح الكسرين الباقيين في العمود الفقري للخيطين، اللذان يبعدان عن بعضهما ببضعة ازواج قاعدية، وذلك عن طريق تكوين الاواصر الفوسفاتية ثنائية الايستر. يؤدي عمل انزيم DNA ligase الى تكوين جزيئة دنا هجينة مستقرة يمكن ادخالها فيما بعد الى خلية المضيف الملائم باتباع احدى الطرق الملائمة مثل التحول transformation .

ومن الجدير بالذكر ان مناطق ارتباط النهايات اللاصقة المتكاملة ستكون حساسة لنفس الانزيم الذي انتجها او الامر، وبهذا سيكون من السهوله استخلاص قطعة الدنا الغريبة المكلونه وذلك بمعاملة الجزئية الهجينة بنفس الانزيم.



الشكل 2 : ربط قطعة الدنا الغريبة الى ناقل كلونة مناسب.

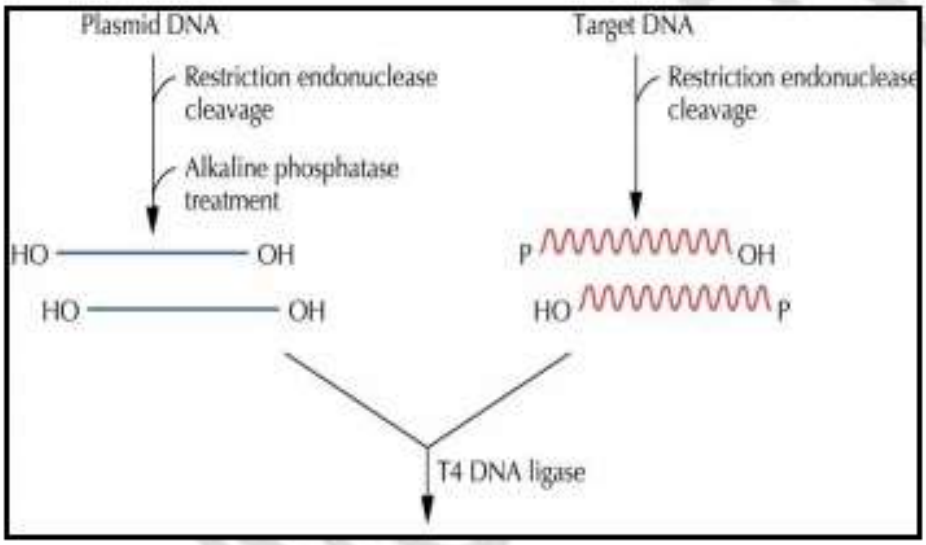
ان هدف الكلونة هو ربط قطعة الدنا الغريبة (المرغوبة) الى ناقل كلونة مناسب، في انبوبة الاختبار، ليتسنى فيما بعد ادخال الجزيئات الهجينة الناتجة الى الخلايا المضيفة (الشكل 2). ولكن يجب على الباحث وضع في حساباته ان تكوين الجزيئات الهجينة ليس الاحتمال الوحيد الناتج من عملية الربط بواسطة DNA ligase، وانما هناك احتمالات اخرى يمكن حدوثها في خليط التفاعل فقد ترتبط نهايتا ناقل الكلونة مع بعضها مما يؤدي الى تدوير الناقل على نفسه circularization بدون الارتباط بقطعة الدنا الغريبة، كما يمكن ارتباط جزيئتين من ناقل الكلونة مع بعضها لتكوين ناقل ثنائية(دايمر dimer) لاتحتوي على قطعة دنا غريبة.

تؤدي مثل هذه الارتباطات بدون شك الى اختزال كفاءة عملية الكلونة ، وذلك لان كثير من الخلايا المتحولة ستحتوي على نواقل الكلونة فقط بدون قطعة الدنا الغريبة. لذا يتوجب تهيئة كافة الظروف الملائمة التي من شأنها زيادة احتمالية الحصول على افضل النتائج من خلال الحصول على جزيئات هجينة والتقليل من الارتباطات الاخرى.

ان احد العوامل المهمة التي تساعد على زيادة تكوين الجزيئات الهجينة هي اجراء التفاعل بوجود تركيز عالي من قطع الدنا. وقد اوضحت الدراسات ان نسبة تركيز جزيئات الناقل الى تركيز الدنا الغريبة في

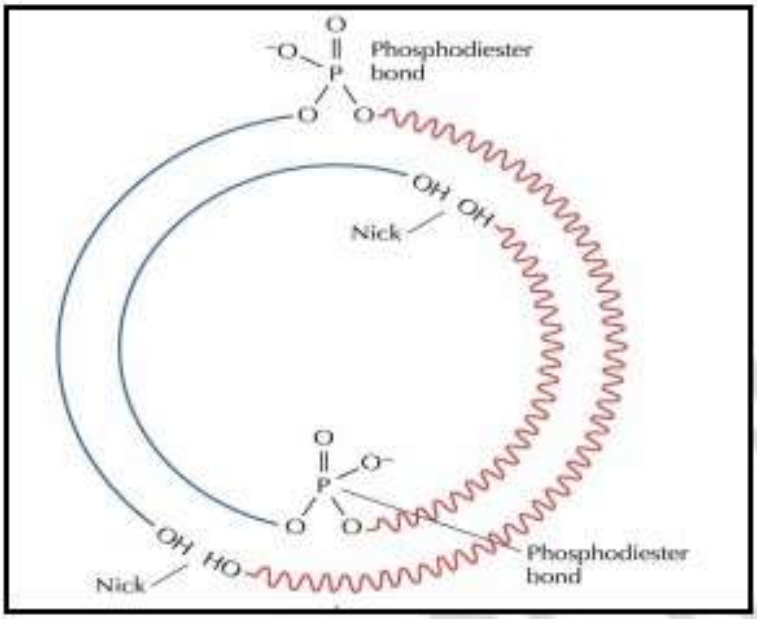
خليط التفاعل لها دور مهم في زيادة كفاءة عملية الربط والحصول على جزيئات هجينة، ولهذا تتم تفاعلات الربط في الغالب بخلط جزيئات الناقل والدنا بنسبة ثلاثة الى واحد.

طريقة اخرى تستخدم لزيادة كفاءة الكلونة هي معاملة نواقل الكلونة (وقبل خلطها مع الدنا الغريبة) بانزيم الفوسفاتيز القاعدي alkaline phosphatase المعزول من البكتريا او العجول الذي يعمل على ازالة مجاميع الفوسفات من الطرف 5 للنهايات اللاصقة مما يمنع تدور النواقل او ارتباطها مع بعضها (الشكل 3).



الشكل 3: معاملة نواقل الكلونة بانزيم الفوسفاتيز القاعدي

ان الطريقة الوحيدة لتدوير النواقل المعاملة بهذا الانزيم هي ربطها مع قطعة دنا غريبة غير معاملة بالانزيم، التي ستوفر مجموعة فوسفات طرفية في كل من منطقتي الارتباط، في هذه الحالة سيعمل انزيم DNA ligase على اصلاح الكسرين الحاويين على مجموعة فوسفات، في حين يبقى كسر واحد في كل من منطقتي الارتباط (Nick) بدون تصليح (الشكل 4). الا ان بقاء هذين الكسرين لايؤثر كثيرا على استقرار الجزيئة الهجينة بحيث يمكن ادخالها الى خلايا المضيف التي تعمل على اصلاحها فيما بعد بواسطة اجهزة الاصلاح التي تحتويها هذه الخلايا.



الشكل 4: بقاء كسر واحد في كل من منطقتي الارتباط (Nick) بدون تصليح.

هناك عوامل اخرى تؤثر على كفاءة تفاعلات الربط مثل درجة حرارة التفاعل، على الرغم من ان درجة الحرارة المثلى لفعالية انزيم DNA ligase هي 37 م°. الا ان تفاعلات ربط قطع الدنا ذات النهايات اللاصقة لا تجري في مثل هذه الدرجة لان الاواصر الهيدروجينية التي تربط القواعد المتكاملة للنهايات اللاصقة لا تكون مستقرة في مثل هذه الدرجة العالية، لذا تجرى هذه التفاعلات بدرجة حرارة تضمن التوزان بين فعالية الانزيم واستقرار الاواصر الهيدروجينية، وغالبا ما تتراوح درجة الحرارة المستعملة بين 10م°- 15 م°.

بالنظر لسهولة وكفاءة عملية ربط قطع الدنا ذات النهايات اللاصقة فانها تستخدم بشكل واسع في تجارب الكلونة، الا ان ذلك لا يعني عدم استعمال قطع الدنا ذات النهايات المستوية في مثل هذه التجارب وخاصة في حالة عدم توفر انزيم تقييد الملائم الذي ينتج نهايات لاصقة.

لاجل ربط قطع الدنا ذات النهايات المستوية لابد من استعمال انزيم لايجيز الدنا T4 القادر على ربط هذه النهايات، ولكن نظرا لطبيعة النهايات المستوية فان عملية ربطها اقل كفاءة واكثر بطأ من عملية

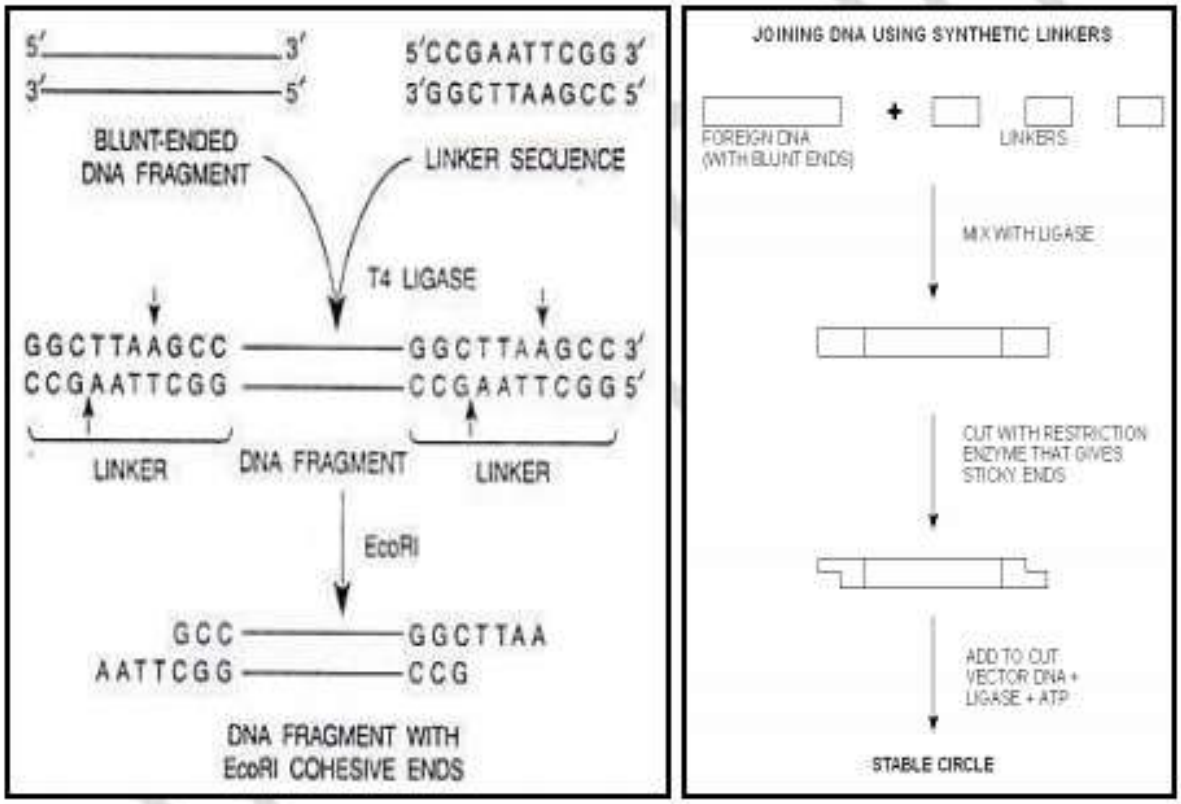
ربط قطع الدنا ذات النهايات اللاصقة، فقد وجد ان عملية ربط قطع الدنا ذات النهايات اللاصقة اسرع بحوالي مئة مرة من عملية ربط قطع الدنا ذات النهايات المستوية ويعود السبب في ذلك الى عدم قدرة النهايات المستوية على الاتحاد الاولي مع بعضها (كما في حالة النهايات اللاصقة) لتسهيل عمل لايجيز الدنا. فلكي يقوم لايجيز الدنا بربط النهايات المستوية لابد من التقاء هذه النهايات اولا بحيث تصبح متقابلة وقريبة من بعضها ليتسنى للانزيم ربطها معا. وبما احتمال التقاء النهايات المستوية بهذا الشكل في محلول التفاعل قليل جدا، وان حدث يكون لفترة زمنية قصيرة جدا، فان تركيز الدنا في خليط التفاعل يجب ان يكون اعلى من التركيز المستعمل في ربط النهايات اللاصقة وذلك لزيادة فرص التقاء النهايات المستوية مع بعضها. ويعتقد ان تفاعل ربط قطع الدنا ذات النهايات المستوية يحتاج، في الاقل، الى جزيئتين من انزيم لايجيز الدنا T4، واحدة تعمل على حمل النهايتين المستويتين في موضع متقابل، وتعمل الاخرى على تكوين الاواصر الفوسفاتية ثنائية الايستر بين النهايتين لاتمام عملية الربط. لذا فان تركيز لايجيز الدنا T4 المستعمل في مثل هذا التفاعل يكون اكثر بحدود 10–30 مرة من تركيز الانزيم المطلوب للحصول على نفس معدل الارتباط باستعمال النهايات اللاصقة. بما ان تفاعلات ربط قطع الدنا ذات النهايات المستوية لاتعتمد على اتحاد النهايات بواسطة الاواصر الهيدروجينية، فان درجة الحرارة لا تلعب نفس الدور المؤثر الذي تلعبه في تفاعلات ربط النهايات اللاصقة، وعموما تتراوح درجة الحرارة المستعملة في تفاعلات ربط النهايات المستوية بين 25–20 م°.

ذكرنا ان احد الشروط الاساسية لربط النهايات اللاصقة هو ان تكون هذه النهايات منتجة بنفس انزيم التقييد. وبهذا سيكون ممكنا استخلاص الدنا المكلونة بسهولة عن طريق معاملة الجزيئة الهجينة بنفس انزيم التقييد المستعمل في قطع الدنا الغريبة وناقل الكلونة. اما في حالة ربط قطع الدنا ذات النهايات المستوية فان العملية ممكنة سواء كانت هذه النهايات منتجة بنفس الانزيم او بانزيمين مختلفين. وفي الحالة الثانية سيكون موضع الارتباط الناتج غير حساس لكلا الانزيمين مما يعني عدم امكانية استخلاص الدنا المكلونة من جزيئة الناقل وهذا يمثل مشكلة كبيرة في تجارب الكلونة، ولاجل تجاوز هذه المشكلة استنبطت وسائل يمكن من خلالها زيادة كفاءة كلونة قطع الدنا ذات النهايات المستوية ومن ثم استخلاصها بسهولة من ناقل الكلونة. اهم هذه الوسائل هي استخدام الجزيئات الرابطة Linker molecules، الوصيلات Adaptors و التذييل بالبوليمرات المتجانسة Homopolymer Tailing .

2-1:الجزيئات الرابطة Linker molecules:

الجزيئات الرابطة عبارة عن تتابعات قصيرة مكونة من 8-10 ازواج من النيوكليوتيدات مصنعة مختبريا بحيث تحتوي على موضع حساس لواحد او اكثر من انزيمات التقييد، تستخدم عادة في عمليات كلونة قطع الدنا ذات النهايات المستوية بطريقه تسمح باستخلاصها من الناقل اذا دعت الحاجة لذلك.

يوضح الشكل ادناه كلونة قطع دنا ذات نهايات مستوية باستخدام جزيئة رابطة من نوع EcoRI.



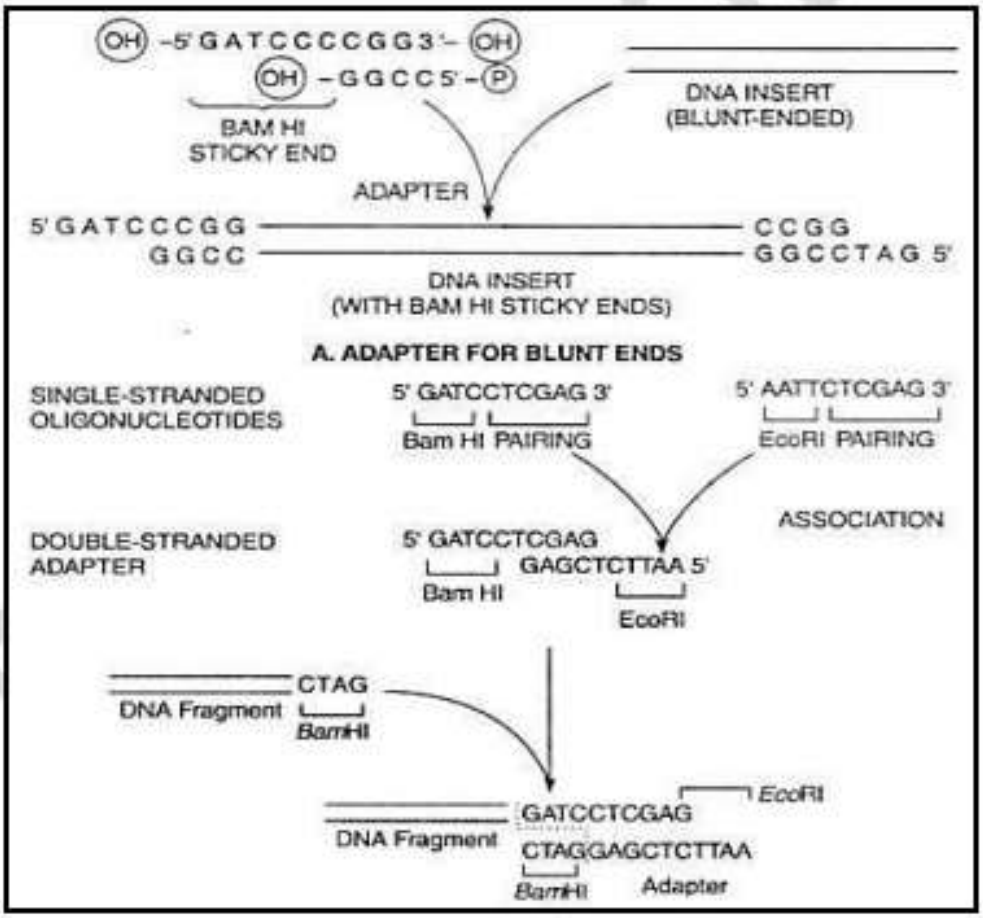
الشكل 5 : استخدام الجزيئات الرابطة Linkers في تجارب الكلونة.

اي انها تحتوي على موضع حساس لانزيم تلصق EcoRI ، اولا الجزيئات الرابطة الى طرفي قطع الدنا ذات النهايات المستوية بواسطة انزيم لايجيز الدنا T4 ، ثم تعامل القطع الناتجة بانزيم EcoRI الذي يقطع مواضعه الحساسة في الجزيئات الرابطة لانتاج قطع دنا ذات نهايات لاصقة من نوع EcoRI.

يمكن بعد ذلك كلونة هذه القطع وبسهولة عن طريق ارتباط نهاياتها اللاصقة مع النهايات اللاصقة لناقل الكلونة المقطوع بالانزيم EcoRI. ان مواضع الارتباط الناتجة ستكون في هذه الحالة حساسة للانزيم EcoRI مما يسمح بأستخلاص الدنا المكلونة عن طريق معاملة الجزيئة الهجينة بالانزيم EcoRI.

2-2: استخدام الوصيلات Adaptors:

على الرغم من استخدام الجزيئات الرابطة وبنجاح في الكلونة، الا ان استخدامها لا يكون ممكنا في حالة احتواء قطعة الدنا الغريبة على موضع حساس او اكثر لنفس الانزيم الذي يستعمل لقطع الجزيئات الرابطة، ففي هذه الحالة ستقطع جزيئة الدنا الغريبة الى قطعتين او اكثر مما يفقدها هويتها المميزه.



الشكل 6: كلونة قطع دنا ذات نهايات مستوية باستخدام الوصيلات من نوع BamHI.

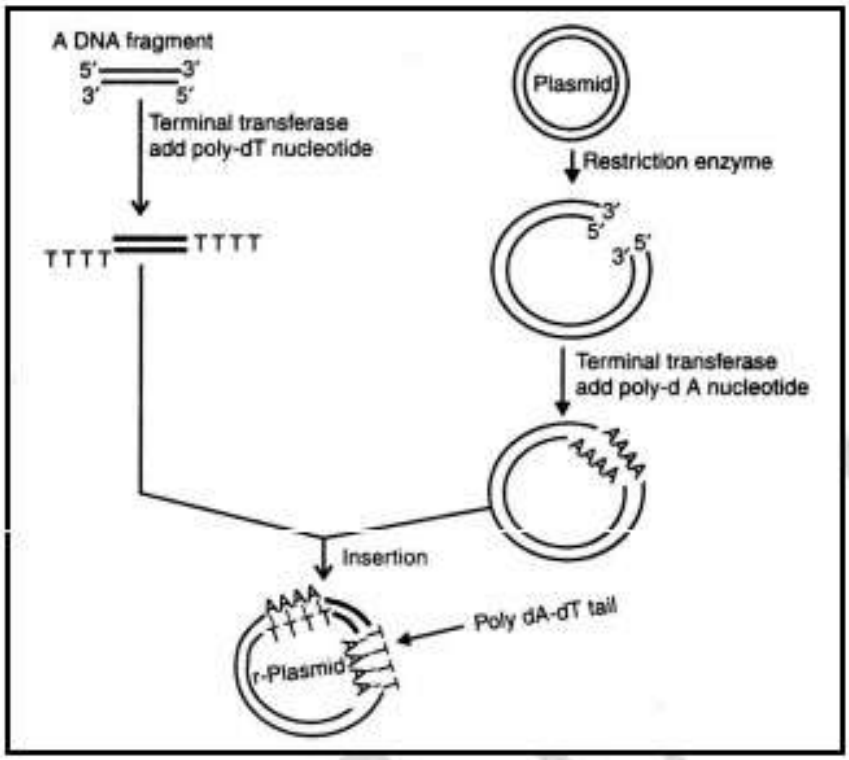
يمكن تجاوز هذه المشكلة باستخدام انزيم اخر لقطع الجزيئات الرابطة وفي حالة تعذر الحصول على الانزيم الملائم لذلك، وخاصة اذا كانت قطع الدنا الغريبة كبيرة الحجم ومحتوية على مواضع حساسة لعدد من الانزيمات، فعندئذ يمكن اللجوء الى حل اخر وهو تحوير الموضع الحساس داخل الدنا الغريبة ليصبح مقاوما لانزيم التقييد. وبما ان عمليات التحوير تتسم بالصعوبة والتعقيد يلجأ عادة الى حل جذري وعام لهذه المشكلة وهو استخدام الوصيلات Adaptors ، وهي عبارة عن قطع صغيرة مصنعة في المختبر تحتوي على نهاية لاصقة ومنزوعة الفوسفات في احد طرفيها والطرف الاخر ذات نهاية مستوية حاوية على مجموعة الفوسفات. يوضح (الشكل 6) كلونة قطع دنا ذات نهايات مستوية باستخدام الوصيلات من نوع BamHI.

تربط النهايات المستوية للوصيلات اولا الى قطع الدنا الغريبة باستعمال انزيم لايجيز T4 لانتاج قطع دنا ذات نهايات لاصقة من نوع BamHI، وبما ان هذه النهايات لا تحتوي على مجاميع الفوسفات لا يكون هناك اي احتمال لارتباطها مع بعضها في محلول التفاعل. وبعد اتمام ربط الوصيلات وقبل كلونة القطع الناتجة عن هذا الارتباط لابد من اضافة مجموعة فوسفات الى الطرف5 من النهايات اللاصقة لتصبح جاهزة للكلونة في موضع BamHI لناقل الكلونة وتكوين الجزيئة الهجينة.

2-3: استخدام التذييل بالبوليمرات المتجانسة Homopolymer tailing :

يقصد بها انها خيط دنا مفرد مكون من عدد من الوحدات البنائية(النيوكليوتيدات) المتماثلة، فاذا كان هذا الخيط مكوناً، على سبيل المثال، من عدد من النيوكليوتيدات من نوع الادينوسين منقوص الاوكسجين deoxyadenosine dA يطلق عليه اسم متعدد الادينوسين منقوص الاوكسجين polydeoxyadenosine او متعدد dA للاختصار.

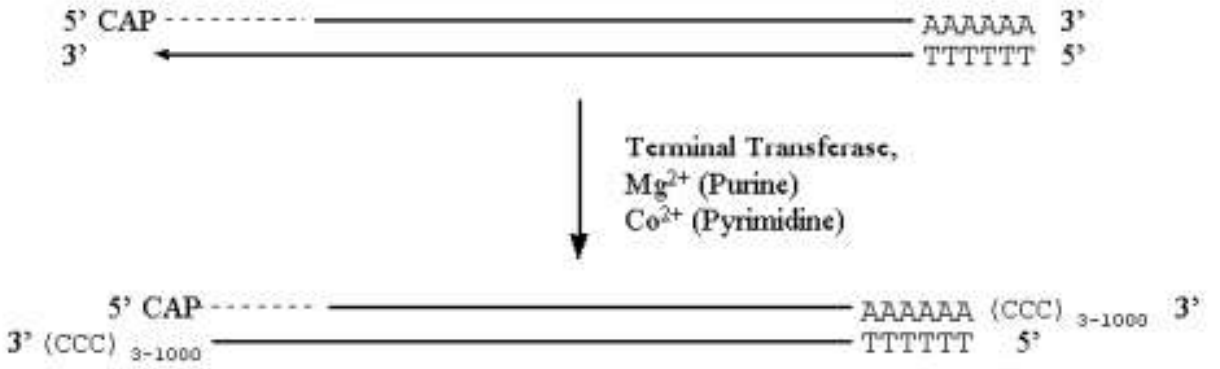
تتضمن عملية التذييل اضافة عدد من dA يتراوح بين 10-40 نيوكليوتيد الى طرفي 3-oH لاحد قطع الدنا، واضافة عدد من dT الى طرفي 3-oH للقطعة الثانية التي يراد ربطها الى القطعة الاولى مما يؤدي الى تكوين قطع دنا ذات نهايات لاصقة متكاملة يمكن ربطها معا لتكوين جزيئة هجين دائرية.



الشكل 7: التذييل اضافة عدد من dA الى طرفي 3-oH لاحد قطع الدنا، واضافة عدد من dT الى طرفي 3-oH للقطعة الثانية

يمكن ادخال الجزيئة الهجينة المتكونة الى المضيف الملائم الذي يعمل على ملئ الفراغات واصلاح الكسور الباقية في الجزيئة، بواسطة اجهزة الاصلاح الموجودة فيه لتكوين جزيئة هجينة كاملة ومستقرة.

ان الانزيم المسؤول عن تخليق الذيول هو انزيم Terminal deoxynucleotidyl – transferase (terminal transferase) الترانسفيريز الطرفي الذي يقوم باضافة النيوكليوتيدات وبصورة متعاقبة الى النهاية 3-oH منتجا ذيولا متكونة من عدد من النيوكليوتيدات المتماثلة.



الشكل 8: انزيم λ exonuclease يعمل على هضم خيوط الدنا من الطرف 5 منتجا ذات نهايات 3-oH مكشوفة

يشترط لعمل هذا الانزيم توفر نهاية 3-oH حرة ومكشوفة exposed ليتسنى له اضافة النيوكليوتيدات الى هذه النهاية. وبما ان معظم النهايات اللاصقة تكون ناتئة في الطرف 5-p فان مجموعة 3-oH تكون مغطاة مما يعيق عمل الانزيم، كما ان الطرف 3-oH للنهايات المستوية لا يكون مكشوفا بالدرجة الكافية لاستعماله من قبل انزيم الترانسفيريز الطرفي. لذا فان حلزونات الدنا غالبا ما تعامل بانزيم λ exonuclease الذي يعمل على هضم خيوط الدنا من الطرف 5 منتجا بذلك جزيئات دنا ذات نهايات 3-oH مكشوفة وملائمة لعمل انزيم الترانسيفريز الطرفي (الشكل 8).

من الجدير بالذكر ان قطع الدنا المنتجة بانزيم تقييد مثل PstI تكون ملائمة لعمل انزيم الترانسيفريز الطرفي بدون معاملتها بانزيم λ exonuclease لانها تحتوي على نهايات ناتئه في الطرف 3-oH.

DO NOT COPY

نواقل الاستنسال Cloning vectors

البلازميدات Plasmid :

البلازميدات عبارة عن جزيئات DNA دائرية او خطية الشكل لها القابلية على التكرار المستقل عن كروموسوم المضيف وتتوارث بثبات بشكل جزيئات منفصلة عن الكروموسوم.

تنتشر البلازميدات بشكل واسع في خلايا البكتريا وتكون مختلفة الحجم تتراوح بين 1×10^{6} – 200×10^{6} دالتون . وهي غير ضرورية لحياة المضيف الا ان وجودها يعطي المضيف صفات اضافية تمكنه من العيش بظروف استثنائية. اهم الصفات المحمولة على البلازميدات هي المقاومة للمضادات الحيوية وانتاج الهيمولايسين وتخمير السكريات ومقاومة المعادن الثقيلة وغيرها.

تقسم البلازميدات الى:

1- البلازميدات الاقترانية Conjugative plasmid وهي بلازميدات تنتقل بالاقتران نتيجة لاحتوائها على tra genes وتكون كبيرة الحجم وتوجد بواقع نسخة الى نسختين في الخلية أي من النوع المتشدد Stringent plasmid.

2- البلازميدات غير الاقترانية Non-conjugative plasmid وهي بلازميدات لاتنتقل بالاقتران نتيجة لعدم احتوائها على جينات الاقتران وتكون صغيرة الحجم وتوجد بواقع 15-30 نسخة بالخلية أي من النوع المسترخي Relaxed plasmid .

تستعمل البلازميدات بشكل واسع كنواقل استنسال اذ تم تطوير انواع مختلفة من هذه النواقل لتكون ملائمة للاستعمال في تجارب الاستنسال المختلفة . ولكي يكون البلازميد ناقل استنسال نموذجيا يجب ان تتوفر فيه الخصائص التالية:

1- ان يكون البلازميد صغير الحجم وبنسخ عديدة في الخلية وهذه الصفتين مهمة لجعله اكثر كفاءة في التحول الوراثي ولعزله بكميات كبيرة وصغر حجمه يقللمن فرص وجود مواضع حساسة متعددة لانزيم تقييد واحد.

2- ان تكون خصائصه معروفة بشكل جيد بالنسبة لمواقع الجينات ومواقع المواضع الحساسة لانزيمات التقييد ومن المفضل ان يكون تتابع نيوكلوتيداته معروفا.

3- ان يكون له القابلية على التضاعف بشكل سريع في المضيف المرغوب بحيث يمكن الحصول عليه بسهولة وبكميات كبيرة من ناقل الاستنسال او الجزيئات الهجينة الناتجة من عملية الاستنسال.

4- انيحتوي على صفة انتقائية مثل المقاومة للمضادات الحيوية يمكن على اساسها انتقاء الخلايا المتحولة .

5- ان يحتوي على صفة انتقائية اخرى يمكن تثبيط فعاليتها عن طريق غرس قطعة الدنا المستنسلة في وسط الجين المسوؤل عن هذه الصفة وتسمى العملية بالتثبيط بالغرس Insertional inactivation

6- ان يحتوي على مواضع حساسة مفردة لعدد كبير من انزيمات التقييد مما يوفر حرية كبيرة في استنسال انواع بمختلفة من قطع الدنا المقطوعة بانزيمات التقييد المختلفة ومن المفضل انه تكون بعض هذه المواضع الحساسة المفردة واقعة في تتابع الجينات المسوؤلة عن الصفات الانتقائية لكي يمكن اجراء عملية التثبيط بالغرس.

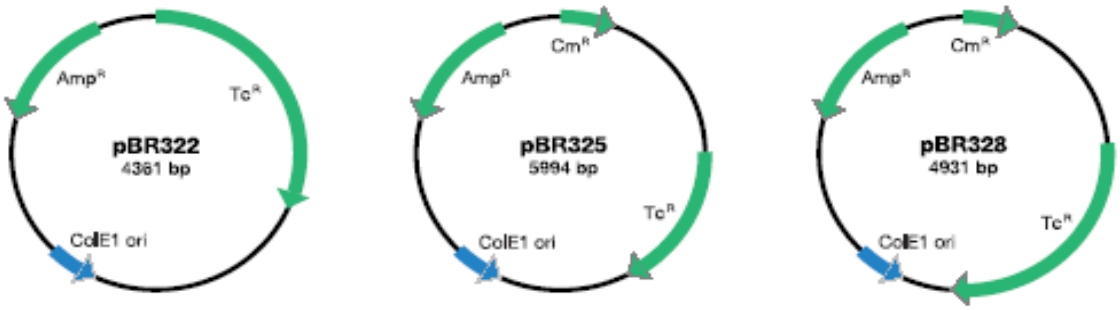
الناقل *pBR322* :

الناقل البلازميدي *pBR322* من اكثر النواقل المستعملة في تجارب الهندسة الوراثية , يحتوي هذا الناقل على جين المقاومة للامبسلين وجين المقاومة للتراسيكلين المشتقين من البلازميدين *RSF2124* و *pSCIOI* على التوالي . اما منشا التكرار لهذا الناقل فمصدره البلازميد *pMB1* المشابه للبلازميد *Col E1* . اشتق هذا الناقل البلازميدي خلال سلسلة طويلة من التجارب بني خلالها العديد من البلازميدات التي تتصف بصفات مختلفة . يحتوي البلازميد *pBR322* على كل الصفات المرغوب فيها في ناقل الاستنسال المثالي وهي :

1- البلازميد *pBR322* من النوع المسترخي Relaxed plasmid (حواي 15 نسخة بالخلية) ويمكن اكثاره الى حوالي 1000-3000 نسخة باضافة المضاد الحياتي الكلورامفينيكول الى المزرعة.

2- يكون صغير الحجم (4363 زوجا قاعديا) مما يجعله سهل العزل ومناسبا لاستنسال قطع الدنا كبيرة الحجم نسبيا.

3- تتابع نيوكلوتيداته معروف بشكل كامل . وبهذا تكون القطع الناتجة عن معاملته بانزيمات التقييد ذات اطوال معروفة بحيث يمكن استعمالها كدلائل حجمية يمكن على اساسها تعيين احجام قطع الدنا المجهولة الحجم.
4- يحتوي على صفتين مظهرية هما المقاومة للامبسلين والمقاومة للتتراسايكلين حيث يمكن استعمال أي منهما لانتقاء الخلايا الحاوية على هذا البلازميد.
5- وجود عشرين انزيم تقييد تقطع هذا البلازميد مرة واحدة مما يوفر حرية كبيرة في استنسال الدنا الغريبة في أي من المواضع العشرين. يحتوي جين مقاومة التتراسايكلين على ستة مواضع حساسة مفردة لانزيمات التقييد وهي *Eco RV, Bam HI, Sph I, Sal I , Xma I, Nru I* كما يقطع الانزيمين *Cla I & Hind III* حفاز هذا الجين. ويلاحظ ايضا ان ثلاث انزيمات اخرى هي *ScaI, Puv I , Pst I* لها مواضع حساسة مفردة في جين المقاومة للامبسلين . وبهذا ستؤدي استنسال الدنا الغريبة في أي من هذه المواضع الى حالة التثبيط بالغرس لاحد الصفتين المظهريتين مما يعطي حرية كبيرة في استنسال قطع الدنا المختلفة المقطوعة بهذه الانزيمات.
ان استنسال الدنا الغريبة في احد المواضع الحساسة المفردة الواقعة في جين المقاومة للتتراسايكلين سيثبط فعالية هذا الجين مما يسمح بانتقاء خلايا *E.coli* المتحولة بالبلازميد الهجين حيث تكون مقاومة للامبسلين وحساسة للتتراسايكلين, في حين تكون الخلايا المتحولة بالبلازميد المتدور مقاومة لكلا المضادين الحياتيين. تنتقى الخلايا الهجينة عمليا عن طريق زرع الخلايا المتحولة في وسط صلب يحتوي على الامبسلين ومن ثم تكرر replica–plated المستعمرات النامية على الوسط الصلب المحتوي على التتراسايكلين لتعيين المستعمرات الحساسة لهذا المضاد الحياتي.

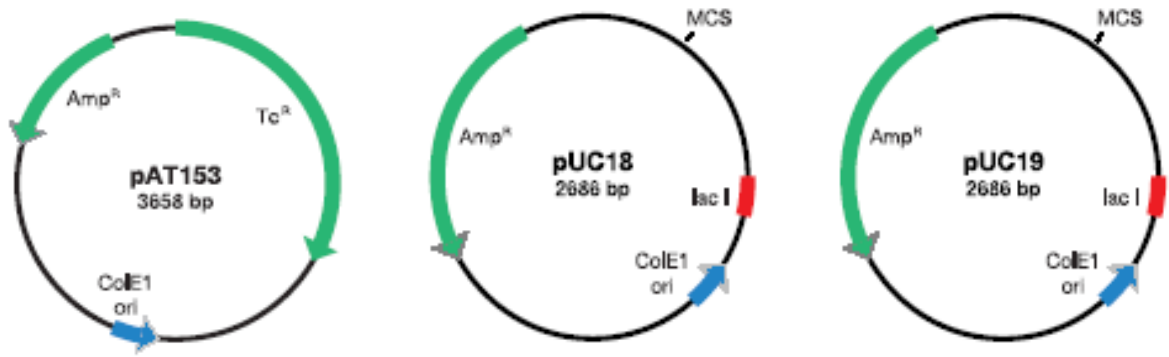


Standard vector maps (also on the following page). Amp^R: resistance to ampicillin; Cm^R: resistance to chloramphenicol; Tc^R: resistance to tetracycline; ori: origin of replication; lac I: gene for lac repressor; M13 ori: origin of replication from M13 phage for production of ssDNA.

اشتقاق النواقل المحسنة من البلازميد *pBR322*

1- البلازميد *pBR325*:
تم اشتقاق هذا البلازميد بادخال جين مقاومة الكلورامفنيكول المشتق من العاثي p1-Cm الى البلازميد *pBR322* ويحتوي هذا الجين على الموضع الحساس لانزيم التقييد *EcoRI* . يمتلك هذا البلازميد ثلاث صفات للمقاومة هي الامبسلين والتتراسايكلين والكلورامفينيكول .
2- البلازميد *pBR328*: يمتلك هذا البلازميد ثلاث صفات للمقاومة هي الامبسلين والتتراسايكلين والكلورامفينيكول .
3- الناقل البلازميدي *pAT153*:
وهو من البلازميدات المشتقة من البلازميد *pBR322* اذ تم حذف قطعة دنا صغيرة تبلغ 700 زوج قاعدي من البلازميد *pBR322* مقطوعة بالانزيم *Hae II* وهذه القطعة لم تؤثر على فعالية الجيني المقاومة للامبسلين والتتراسايكلين وانما غير من قابلية الناقل التكرارية والاقترانية ,اذ ازدادت قابلية الناقل الاقترانية بنسبة 1.5- 3 مرات مقارنة بالبلازميد *pBR322* ففي هذه الحالة يمكن دراسة وظيفة الجين المستنسل اما الصفة الثانية اصبح الناقل غير اقتراني . على الرغم من ان البلازميد*pBR322* غير قادر على الانتقال الذاتي لكنه ينتقل بواسطة التحريك mobilization اذا وجد بالخلية بلازميد اقتراني اخر مثل البلازميد *Colk* وبهذا يكون استعمال البلازميد *pAT153* اكثر امانا من البلازميد *pBR322* حيث يستبعد احتمال انتقال جزيئات *pAT153* الهجينة الى خلايا اخرى ومن ثم

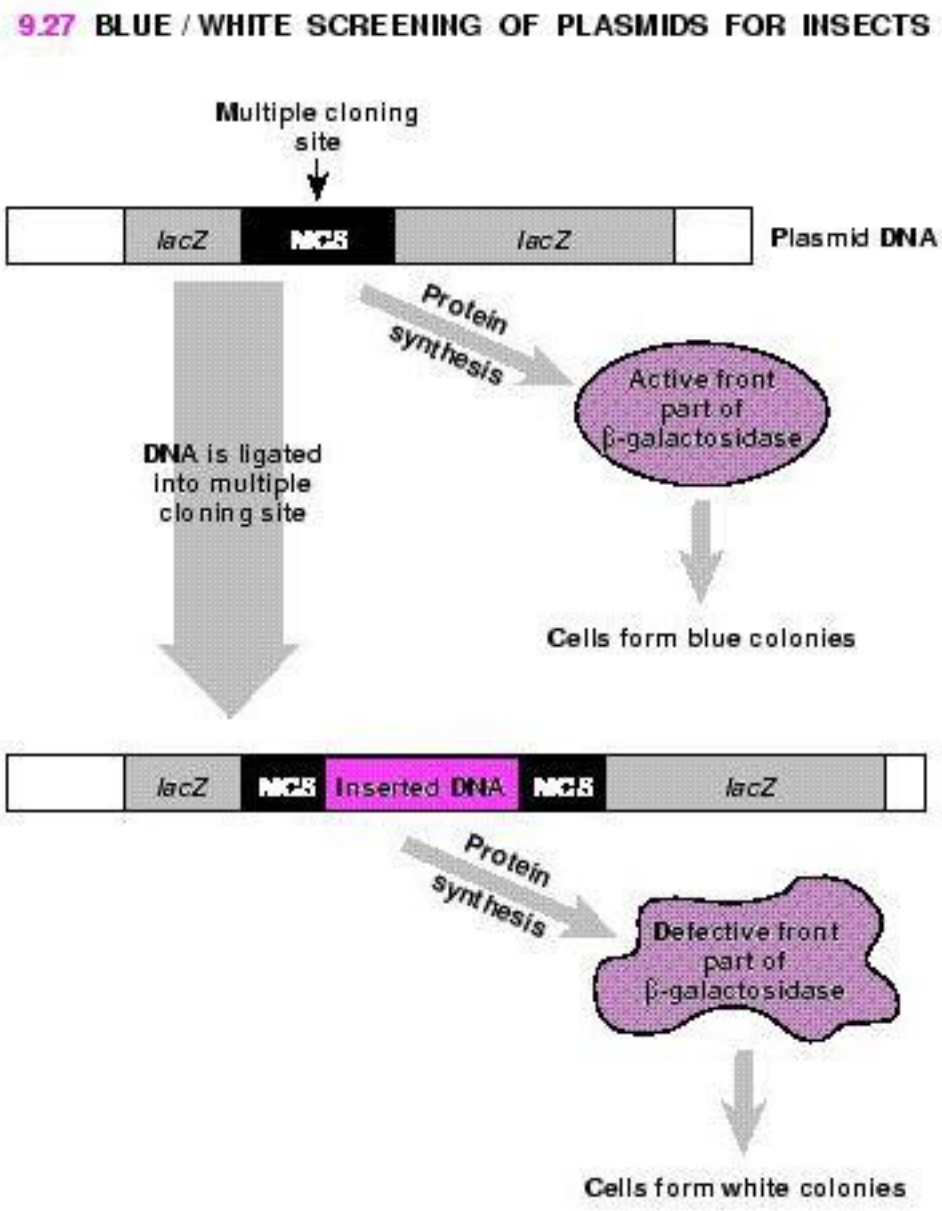
تسربها الى خارج المختبر . لهذا يفضل استعمال هذا الناقل عند استنسال الجين الذ يمكن ان يشكل خطورة عند تسربه الى خارج المختبر.



4- البلازميدين *pUC 19& pUC18* :

اشتق البلازميد *pUC18* عن طريق حذف جزء كبير من البلازميد *pBR322* بحيث لم يبقى سوى منشأ التكرار وجين المقاومة للامبسلين ثم اضيف الجين *lacZ`* الذي يشفر الى انزيم ß-galactosidase وتم تغير تتابع النيوكلوتيدات في هذا البلازميد بحيث لم يعد يحتوي على مواضع حساسة مفردة لانزيمات التقييد الا في منطقة الجين *lacZ`* حيث تتجمع في منطقة صغيرة من هذا الجين. وبهذا تعتمد عملية الاستنسال على تثبيط فعالية *lacZ`* مما يسهل عملية الكشف عن الهجائن التي تكون مقاومة للامبسلين ولكنها غير قادرة على انتج انزيم ß-galactosidase . فضلا عن ذلك فان المواضع الحساسة المتجمعة في البلازميد هي نفسها موجودة في الناقل *M13amp8* االمشتق من العاثي M13 مما يعني امكانية نقل القطعة المستنسلة في الناقل *pUC18* مباشرة الى ناقل *M13amp8* لغرض تحديد تتابع نيوكلوتيداتها او لغرض احداث طفرات وراثية في هذه القطعة.

الناقل البلازميدي *pUC19* مماثل للناقل *pUC18* مع وجود فارق واحد وهو ان القطعة الحاوية على المواضع الحساسة المفردة مغروسة بشكل معاكس لاتجاه غرسها في *pUC18*.



5- الناقل pHP34 :

يحتوي هذا الناقل على موضع حساس مفرد لانزيم *Sma I* الذي ينتج نهايات مستوية , ويحاط هذا الموضع من الجانبين بموضعين حساسين لانزيم *Eco RI* وبهذا يمكن استنسال قطع الدنا ذات النهايات المستوية في الموضع *Sma I* وعند استخلاص القطع المستنسلة من الناقل الهجين يعامل بانزيم *Eco RI* على شرط ان تكون القطعة المستنسلة غير حاوية على موضع داخلي حساس لهذا الانزيم.

<u>الناقل p3T</u>

الشكل التالي يوضح الناقل *p3T* الذي يحتوي على الصفتين المظهريتين هما جين المقاومة للامبسلين وجين *lacZ`* الذي يحتوي على قطعة دنا تضم عددا من المواضع الحساسة المفردة لانزيمات التقييد وتسمى هذه القطعة بالـ poly linker وهذه لاتؤثر على فعالية جين *lacZ`*

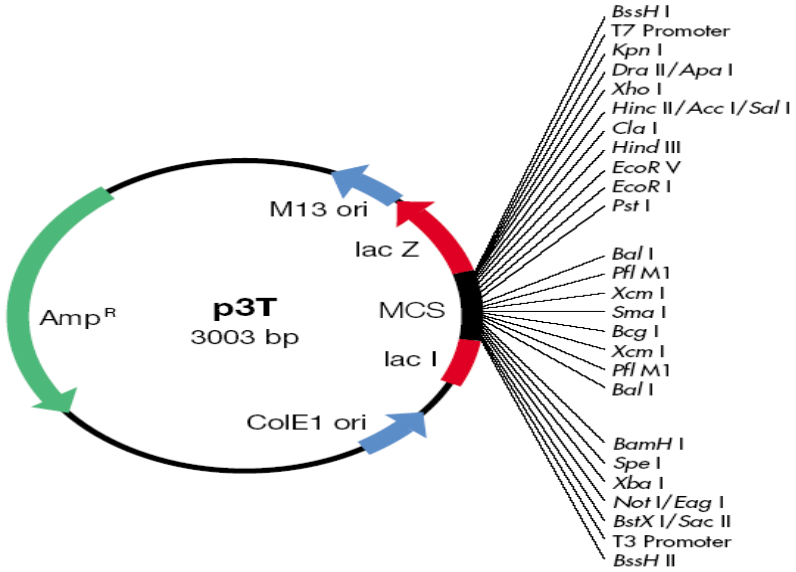


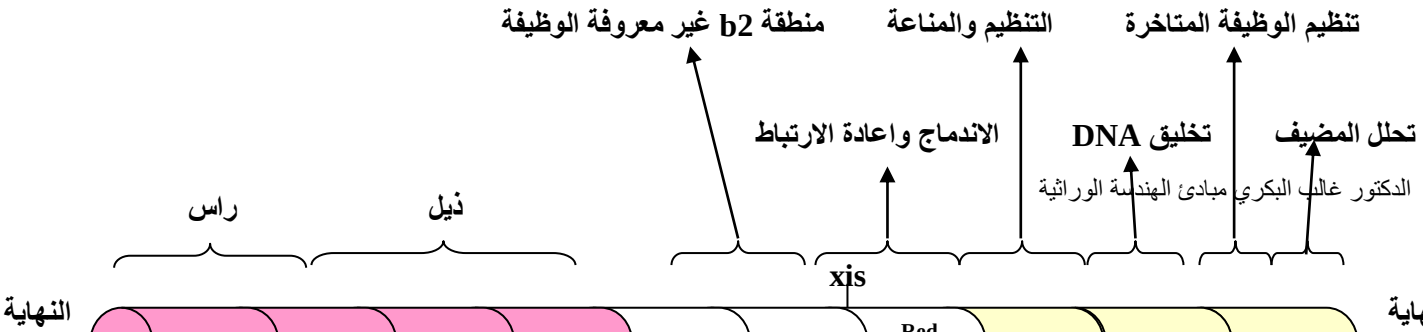
Figure 1.

The p3T vector. Amp^R: ampicillin resistance gene; ColE1 ori: pBR322 derived origin of replication; lac I: β-galactosidase promoter sequence; lacZ: the alpha peptide of β-galactosidase; fd: the f1 filamenteous phage derived origin of replication.

العاثيات كنواقل استنسال لبكتريا *E.coli* :

العاثي لامدا (λ) هو فيروس يصيب بكتريا *E.coli* وتم تطويره لاستعماله كناقل استنسال. ان دنا العاثي لامدا بشكلها الطبيعي عبارة عن جزيئة خطية مزدوجة الخيط يبلغ حجمها حوالي 48.5 زوج قاعدي وقد حدد تتابع نيوكلوتيداته بالكامل. ويتصف دنا العاثي باحتوائه على نهايات لاصقة حيث يوجد في كل نهاية نتوء قصير لاحد الخيطين مكون من 12 نيوكلوتيد وان تسلسل القواعد النتروجينية لهذين النتوئين مكملان لبعضهما. عند دخول دنا العاثي لخلية المضيف ترتبط النهايتان اللاصقتان ببعضهما لتكوين موضع يعرف بـ cohesive sit (cos site) مما يجعل جزيئة الدنا الخطية تاخذ الشكل الدائري داخل المضيف.

الخارطة الكروموسومية للعاثي لامدا اذ يلاحظ تجمع الجينات المرتبطة وظيفيا في مواقع معينة من الخارطة . يلاحظ وجود الجينات الواقعة عليسار الخارطة تشفر لبروتينات الراس والذيل لجزيئة العاثي اما الجينات الواقعة في وسط الخارطة فتكون مسؤولة عن عملية اعادة الارتباط recombination وعملية lysogenization التي تنغرس خلالها دنا العاثي الدائري في كروموسوم المضيف وتتكرر معه على شكل عاثي اولي prophage . اما الجينات المتجمعة في يمين الخارطة فتكون مسؤولة عن عن تنظيم عمل الجينات gene regulation ومناعة العاثي الاولي للاصابة الفوقية super infection وتخليق الدنا وتنظيم الوظائف المتاخرة late function regulation وكذلك تحليل المضيف. اظهرت الدراسات ان معظم المنطقة الوسطى للخارطة الكروموسومية لاتكون ضرورية لنمو العاثي وبهذا ازالتها او استبدالها بقطعة دنا اخرى لا يؤثر كثيرا على قابلية العاثي للاصابة والنمو.



النوقل المشتقة من العاثي لامدا

ان الدنا الطبيعية بحد ذاتها لاتصلح بحد ذاتها ان تكون ناقل استنسال مناسبا لوجود مشكلتين اساسيتين كان لابد من تجاوزها قبل ان يمكن استعمالها كناقل استنسال لبكتريا *E.coli* وهاتان المشكلتان هما:

1- صغر التي يمكن استنسالها في العاثي الطبيعي

2- وجود مواضع حساسة متعددة لانزيمات التقييد الشائعة

يمكن تقسيم النوقل المشتقة من لامدا الى صنفين هما:

1- نواقل الغرس Insetion vectors

وتشمل :

أ- الناقل Charon 16 A

ب- الناقل λ NM607

2- نواقل الاستبدال Replacement vectors

وتشمل :

أ- الناقل λWES. λB`

ب- الناقل λ EMBL4

الكوزميد Cosmid

يعرف الكوزميد بانه جزيئة هجينة مكونة من بلازميد يحتوي على موضع cos site المشتق من العاثي لامدا ويحتوي الناقل على صفة مظهرية واحدة على الاقل ومنشأ التكرار ومواضع حساسة مفردة لعدد من انزيمات التقييد.

وهو من النواقل المتخصصة لاستيعاب قطع دنا كبيرة الحجم ويستعمل لبناء بنك الجينات.

بنك الجينات Gene bank :

يعني بنك الجينات تكوين من recombinant clones (مستعمرات او بقع عاثيات) تحتوي بمجموعها على كل او معظم الجينات الموجودة في كائن معين. تبنى بنوك الجينات عادة بهضم الدنا الكلية بعد عزلها من الكائن هضما جزئيا باحد انزيمات التقييد ومن ثم غرس القطع الناتجة في ناقل استنسال غالبا ماتستعمل نواقل الاستنسال المشتقة من

العاثي لامدا او الكوزميدات لهذا الغرض . بعد ادخال الجزيئات الهجينة الى المضيف المناسب سيتم الحصول على مجموعة من الكلونات التي تحتوي على كل الجينات الموجودة في الكائن المعني. بعد الحصول على البنك الجينات يمكن انتقاء الجين المرغوب عن طريق مسح المستعمرات او البقع الممثلة للبنك الحاوية على الجين . وتتم العملية باحد الطرائق التالية:

1- طريقة الانتقاء المباشر تعتمد على اساس الصفة المظهرية للجين المستنسل كما في حالة استنسال الجينات المشفرة للمضادات الحيوية والانزيمات.

2- الانتقاء غير المباشر وتشمل :

أ- الطرائق المناعية

ب- طرائق تهجين الاحماض النووية باستعمال المجسات.

الترحيل الكهربائي Electrophoresis لجزيئات الـ DNA :

اذ يتم فصل جزيئات الدنا ذات الاطوال المختلفة وتحديد حجومها بدقة , فضلا عن ذلك امكانية استعمالها للتفريق بين الاشكال الفيزياوية المختلفة لجزيئة الدنا ودراسة خصائصها . تعتمد عملية الفصل باستخدام وسط ساند من مادة خاملة غير مشحونة مثل هلام الاكاروز agarose او polyacrylamide ونتيجة للشحنة السالبة لمجموعة الفوسفات لجزيئات الاحماض النووية فانها تنفصل بالمجال الكهربائي.

بعد معاملة جزيئات الدنا بانزيمات التقييد يضاف مزيج القطع الناتجة من هذه المعاملة الى حفر صغيرة في احد نهايتي رقعة الهلام المحضر بشكل طبقة رقيقة فوق لوح زجاجي , ثم يمرر التيار الكهربائي خلال الهلام . بما ان جزيئات الدنا تحمل شحنة سالبة فانها ستتحرك الى القطب الموجب بفعل التيار الكهربائي بسرع تتناسب مع اوزانها الجزيئية واشكالها الفيزيائية , فقد لوحظ ان هجرة القطع تتناسب عكسيا مع لوغارتم اوزانها الجزيئية وبهذا ستهاجر القطع الصغيرة لمسافات اطول مقارنة بالقطع كبيرة الحجم وبالتالي ستكون كل مجموعة من القطع المتماثلة بالطول حزمة محددة في موقع معين من الهلام .

ان هلام الاكاروز المستعمل بشكل واسع في هذه التقنية هو عبارة عن سلسلة متشابكة من السكريات المتعددة المكونة من الكالكتوز ومشتقاته والمرتبطة مع بعضها باواصر هيدروجينية لتكوين شبكة معقدة . اما هلام البولي اكرالاميد فهو ناتج من ارتباط مادة الاكريلامايد المتبلورة مع مادة بز-اكريلامايد لتكوين شبكة معقدة ذات ثقوب اصغر قطرا من تللك الموجودة في هلام الاكاروز. ولهذا السبب فان هلام البولي اكريلامايد اكثر ملائمة في فصل قطع الدنا صغيرة الحجم التي يقل طولها عن اربعة كيلو زوج قاعدي من الاكاروز الذي يفصل القطع الكبيرة التي يصل طولها الى 200 كيلو زوج قاعدي. وعموما فان الاكاروز يستعمل بتركيز 1% وبطول 12سم الذي يكون ملائما لفصل جزيئات الدنا التي تتراوح اطوالها بين 0.2- 30 كيلو زوج قاعدي. في حين يمكن استعمال هلام الاكريلامايد بتركيز 7.5 % لفصل جزيئات الدنا التي تتراوح اطوالها بين 0.05- 2 كيلو زوج قاعدي. وفي حالة استعماله بتراكيز عالية يكون البولي اكريلامايد ملائما لفصل قطع الدنا التي تتراوح اطوالها بين بضعة – 300 زوج قاعدي بحيث يمكن تمييز القطع التي تختلف بفارق نيوكلوتيد واحد فقط.

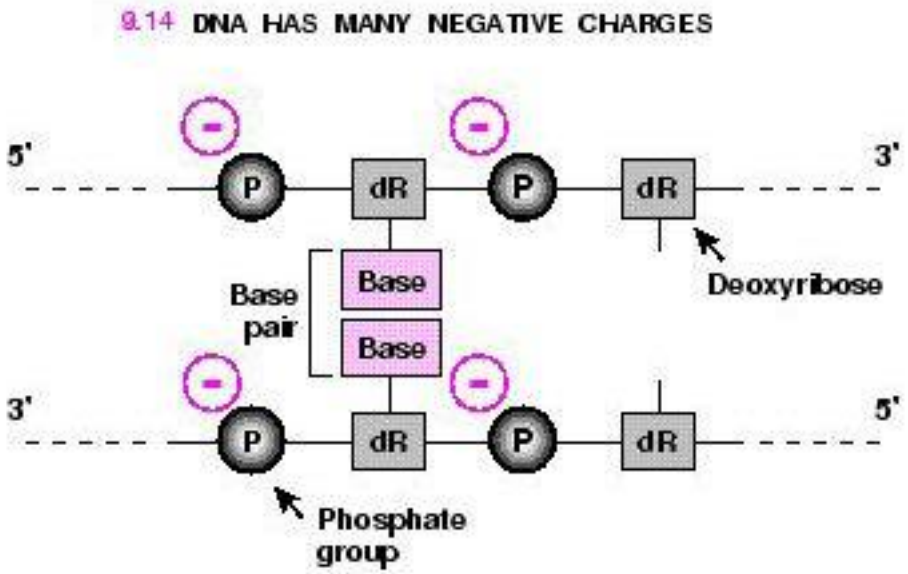
يتضح من ذلك ان قابلية الهلام على فصل قطع الدنا تعتمد على تركيزه المستعمل فكلما زاد التركيز زادت قابلية الفصل . كذلك يتناسب معدل الهجرة لقطع الدنا عكسيا مع تركيز الهلام .

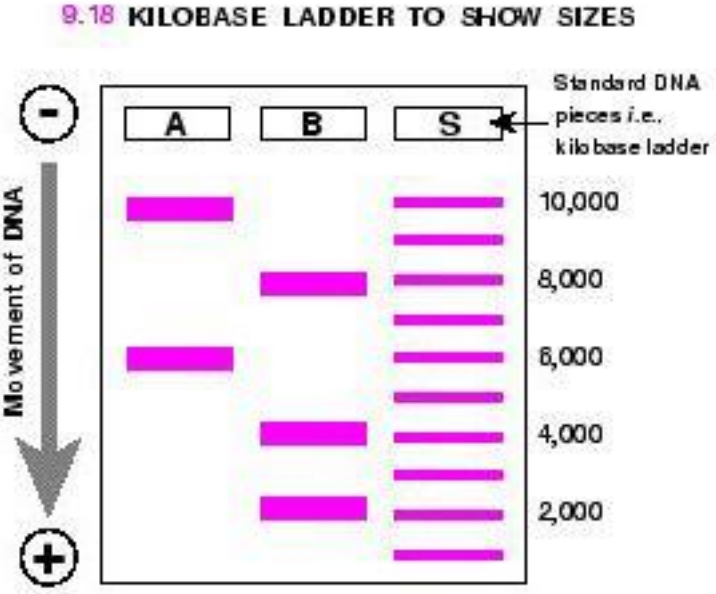
بعد الانتهاء من عملية الترحيل الكهربائي لابد من تعيين مواقع حزم الدنا على الهلام من اجل معرفة اعدادها وتحديد حجومها ويتم ذلك عن طريق تصبيغها بمادة بروميد الاثيديوم المتألقة حيث ينقع الهلام في محلول الصبغة بتركيز 0.5 مايكروغرام /مل لمدة 45 دقيقة وبعد ارتباط الصبغة بجزيئات الدنا يتم فحص الهلام بالاشعة فوق البنفسجية بطول موجي 300 نانومتر عندها ستتألق الصبغة المتحدة مع الدنا باللون البرتقالي مما يتيح المجال لملاحظة حزم الدنا بسهولة .ويمكن تقدير كمية الدنا في كل حزمة من شدة تألق الحزم اذ تتناسب كمية الدنا وحجم قطع الدنا في كل حزمة مع شدة التألق. أي تكون شدة تألق الحزم المكونة من قطع كبيرة الحجم اشد من تألق الحزم المكونة من قطع صغيرة ,

ولهذه الصفة اهمية كبيرة اذ يمكن تمييز الحزم الناتجة من الهضم الكامل complete digestion عن الهضم الجزئي partial digestion بانزيم التقييد وذلك من مقارنة شدة تألق الحزم المصبوغة مع اوزانها الجزيئية.

يمكن استعمال الترحيل الكهربائي الهلامي لتعيين حجوم جزيئات الدنا اعتمادا على المسافات التي تقطعها جزيئات الدنا على الهلام اذ تتناسب المسافة التي تقطعها جزيئة معينة تناسبا عكسيا مع وزنها الجزيئي. يتم رسم علاقة خطية بين لوغارتم المسافات التي تقطعها جزيئات معروفة الحجم الجزيئي (دلائل حجمية عادة تستعمل دنا لامدا او البلازميد *pBR322* المقطوعة باحد انزيمات التقييد) ولوغارتم الاوزان الجزيئية لقطع الدنا . ويستعمل هذا المنحنى القياسي لتحديد اوزان القطع المجهولة.

يستعمل الترحيا الكهربائي بتحديد وفصل الاشكال الفيزياوية لجزيئة دنا معينة او البلازميدات والتي تشمل شكل الدائري المغلق تساهميا ccc والشكل الخطي linear والشكل المفتوح oc .



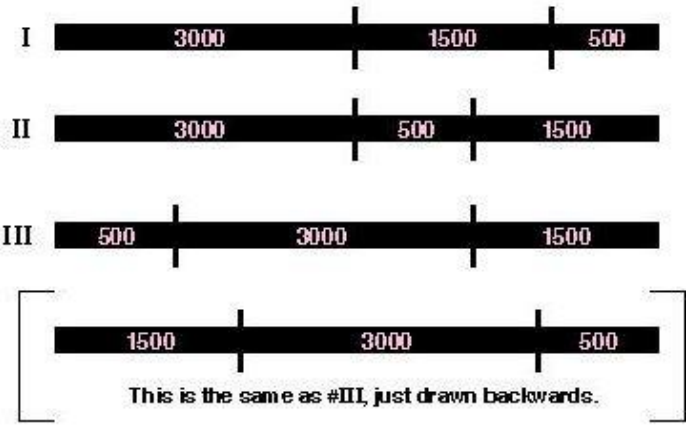


/الدكتور غالب البكري مبادء الهندية الوراثيه

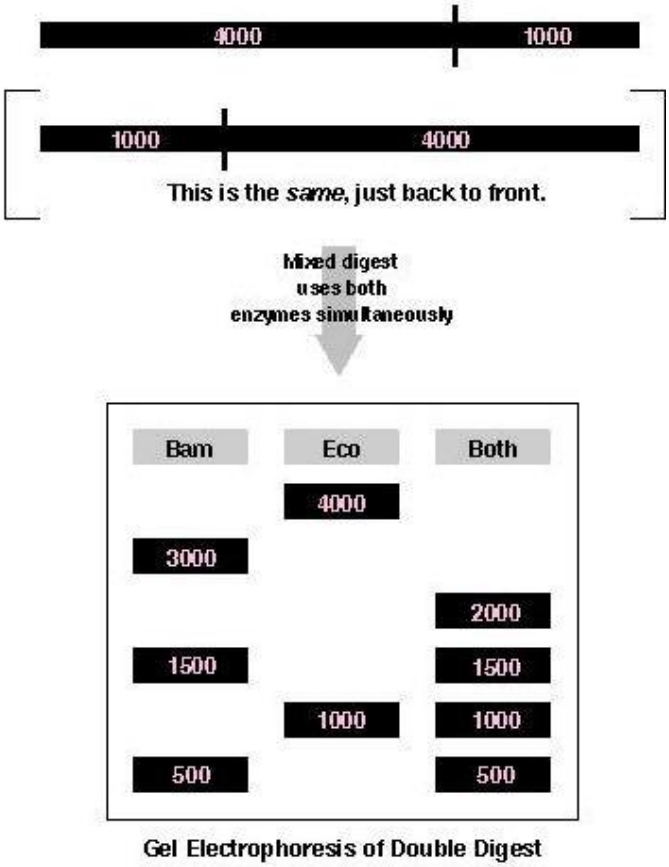
رسم خرائط التقييد

يتم بناء خرائط التقييد restriction map لجزيئات الدنا التي يمكن خلالها تحديد مواقع المواضع الحساسة لانزيمات التقييد على جزيئة معينة. لخرائط التقييد فوائد كثيرة في الهندسة الوراثية فمن خلالها يمكن اختبار انزيم التقييد الملائم لقطع الجين المطلوب استنساله. تبنى خرائط التقييد عن طريق معاملة جزيئة الدنا بعدد من انزيمات التقييد بصورة منفردة , وتعين اعداد وحجوم القطع الناتجة عن كل معاملة باستخدام الترحيل الكهربائي الهلامي بوجود الدلائل الحجمية. ثم تجري بعد ذلك سلسة من تفاعلات الهضم الثنائي double digestion , أي معاملة جزيئة الدنا بزوج من الانزيمات في كل مرة . يمكن اجراء تفاعلات الهضم الثنائي بخطوة واحدة اذا كان الانزيمان يعملان تحت نفس الظروف من اس هيدروجيني ودرجة حرارة وملوحة وتركيز مغنيسيوم وغيرها. في حالة اختلاف متطلبات الانزيمين يعامل الدنا باحد الانزيمين اولا ومن ثم يضاف الانزيم الثاني بعد تهيئة الظروف لعمله في انبوبة الاختبار . بعد اجراء سلسلة من التفاعلات المفردة والثنائية لانزيمات التقييد المرغوب تحديد مواضعها الحساسة على جزيئة الدنا تقارن احجام القطع الناتجة عن هذه التفاعلات حيث يمكن من خلال هذه المقارنة تحديد مواقع المواضع الحساسة للانزيمات المستعملة.

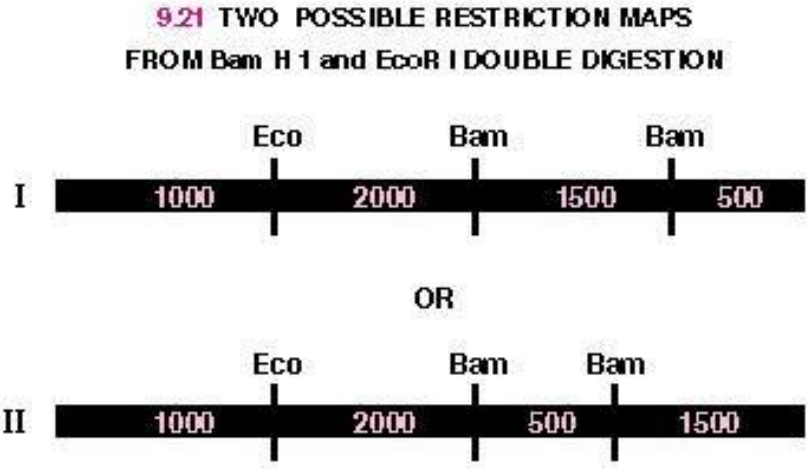
9.20 POSSIBLE MAPS WITH FIRST ENZYME



9.20 USING A SECOND RESTRICTION ENZYME



Gel Electrophoresis of Double Digest



لاتقتصر فائدة خرائط التقييد على استخدامها لاختيار انزيم التقي المناسب لقطع الجين المرغوب وانما فوائد اخرى مثل فائدتها في عمليات تحديد تتابعات الدنا كذلك لها فائدة كبيرة في التشخيص المبكر لبعض الامراض الوراثية في الاجنة مثل مرض فقر الدم المنجلي , ينتج هذا المرض من حدوث طفرة وراثية ناشئة من تغير قاعدة نتروجينية واحدة حيث يتغير التتابع GAG الى GTG مما يغير تتابع القواعد النتروجينية لذلك الجين ويؤدي الى ظهور المرض . لقد وجد ان المنطقة التي يشملها التغير تمثل الموضع الحساس للانزيم Dde I (GTAG) وبهذا سيؤدي تغير A الى T الى ازالة الموضع الحساس لهذا اتلانزيم يمكن على هذا الاساس تشخيص المرض عن طريق معاملة دنا الشخص المريض بالانزيم Dde I ومقارنتها مع دنا فرد طبيعي معاملة بنفس الانزيم فستظهر دنا المريض فاقدة للموضع الحساس لهذا الانزيم.

وصمة سوثرن southern blotting

Anmar Hasan

أن تحديد مواضع عمل انزيمات التقييد لايكون كافية وحده احيانا للبدء في عملية الكلونة مالم تبن خرائط وراثية genetics maps لتحديد مواقع وحجوم الجينات على جزيئة الدنا لكي يمكن اختيار الأنزيم الملائم الذي يقطع الجزيئة على

جانبي الجين المرغوب.

علاوة على ذلك تستدعي الحاجة احيانا إلى معرفة موقع وحجم قطعة الدنا الحاملة لجين معين والناتجة من هضم المجين genome الكامل بانزيم تقييد معين . أن تحديد موقع هذه القطعة يكون مستحيلا اذا كان المجين كبيرة جدا كما في حالة اللبائن. لان عدد القطع الناتجة من المعاملة بأنزيم التقييد سيكون هائلا بحيث تتكون مسحة من هذه القطع على طول مسار الهلام بعد ترحيلها كهربائية، وتمثل هذه المسحة اعدادا هائلة من قطع الدنا المختلفة الأطوال والمتجاورة مع بعضها بحيث يصعب تمييزها الى حزم منفصلة لتحديد الحزمة الممثلة للحزمة المرغوبة ، لذا توجب ابتكار وسيلة ملائمة للكشف عن موقع وحجم.

قطعة الدنيا الحاملة لهذا الجين وتمييزها من الاف او ملايين القطع المتجاورة على الهلام.

ابتكر سوثرن Southern في عام ١٩٧٠ طريقة ذكية للكشف وبكفاءة عالية عن قطع الدنا الموجودة في الهلام والحاملة للجين المرغوب فيه ، ومناسبة كذلك البناء خرائط الجينات ، وقد اطلق على هذه الطريقة اسم وصمة سودرن Southern blotting تيمنا باسم مكتشفها.

تستند هذه الطريقة على امكانية ارتباط او تزاوج الخيوط المفردة لجزيئات الدنا والرنا في حالة احتوائها على تتابعات متكاملة لتكون حلزونة مزدوجة متجانسة

Anmar Nazar Hasan

مكونة من **دنا – دنا** . او حلزونة مزدوجة غير متجانس مكون من **دنا – رنا** . يمكن حدوث عملية الارتباط هذه عند وجود الخيوط المفردة المتكاملة في محلول ملائم، او حتى اذا كان احد الخيطين مثبتة على ورقة ترشيح من نوع نترات السليلوز .nitrocellulose filter

تتلخص طريقة وصمة سودرن الموضحة بالشكل (3-1) بترحيل خليط قطع الدنا كهربائيا على هلام الاكاروز ، ومن ثم معاملتها وهي في الهلام بمادة قلوية لمسخها (فصل خيطي الحلزون عن بعضهما). يوضع الهلام بعد عملية المسخ على سطح ورقة ترشيح مشبعة بمحلول منظم ويغطي سطحه العلوي بورقة ترشيح من نوع نترات السيللوز ، ثم توضع حزمة من اوراق التنشيف الجافة على سطح مرشح نترات السيللوز . يترك الهلام على هذه الحالة لعدة ساعات ، حيث يمر اثناءها المحلول المنظم من ورقة الترشيح السفلي خلال الهلام، ويسحب الى اعلى عن طريق امتصاصه بواسطة حزمة اوراق التنشيف . وبهذا سيحمل المحلول المنظم خلال حركته الى اعلى في الهلام، قطع الدنا الممسوخة إلى خارج الهلام. وعند ملامسته المرشح نترات السيللوز ترتبط جزيئات الدنا بهذا المرشح لان لها الفة قوية لمادة نترات السيللوز . نتيجة لهذه العملية ستنتقل حزم الدنا من الهلام وترتبط بمرشح نترات السيللوز بنفس النمط الموجود في الهلام. يرفع مرشح نترات السيللوز من على سطح.

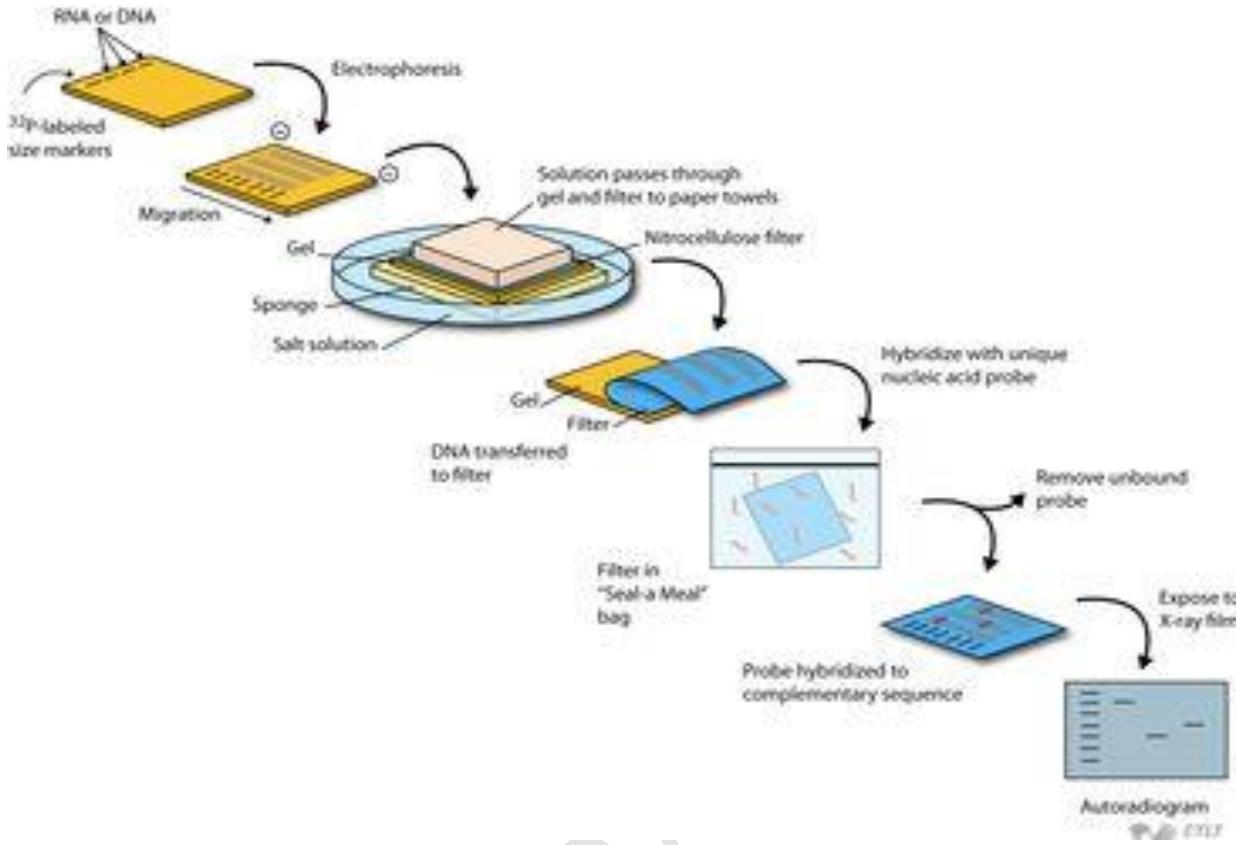
Anmar Nazar Hasan

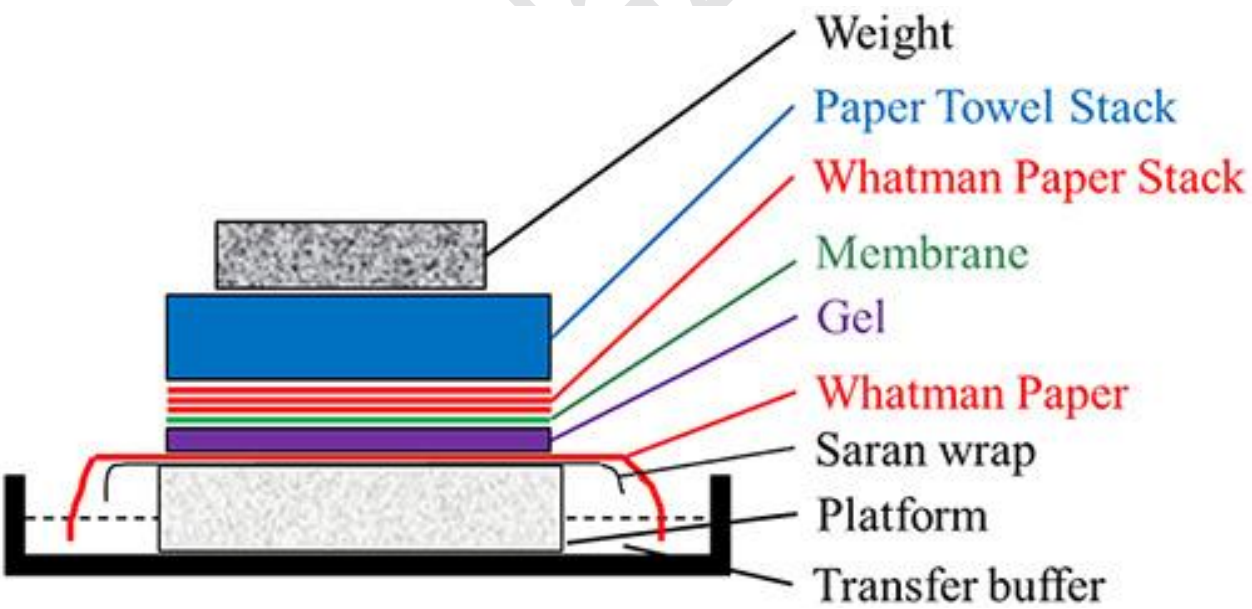
لهلام ويخبز بدرجة 80 م لتثبيت جزيئات الدنا بصورة كاملة على المرشح. يغمر المرشح بعد التثبيت في محلول يحتوي على مجس يمكن أن يكون جزيئة دنا او رنا ممسوخة ومعلمه بنظير الفسفور المشع p32 ومكملة لتتابع الدنا المطلوب تمييزها . ونتيجة لارتباط المجس مع قطعة الدنا المكملة سيتكون حلزون مزدوج مشع. يغسل مرشح نترات السيللوز لازالة المجسات غير المرتبطة ، ثم يحدد موقع قطعة الدنا المطلوبة باستخدام التصوير الاشعاعي الذاتي، وذلك يوضح فيلم حساس للاشعة السينية

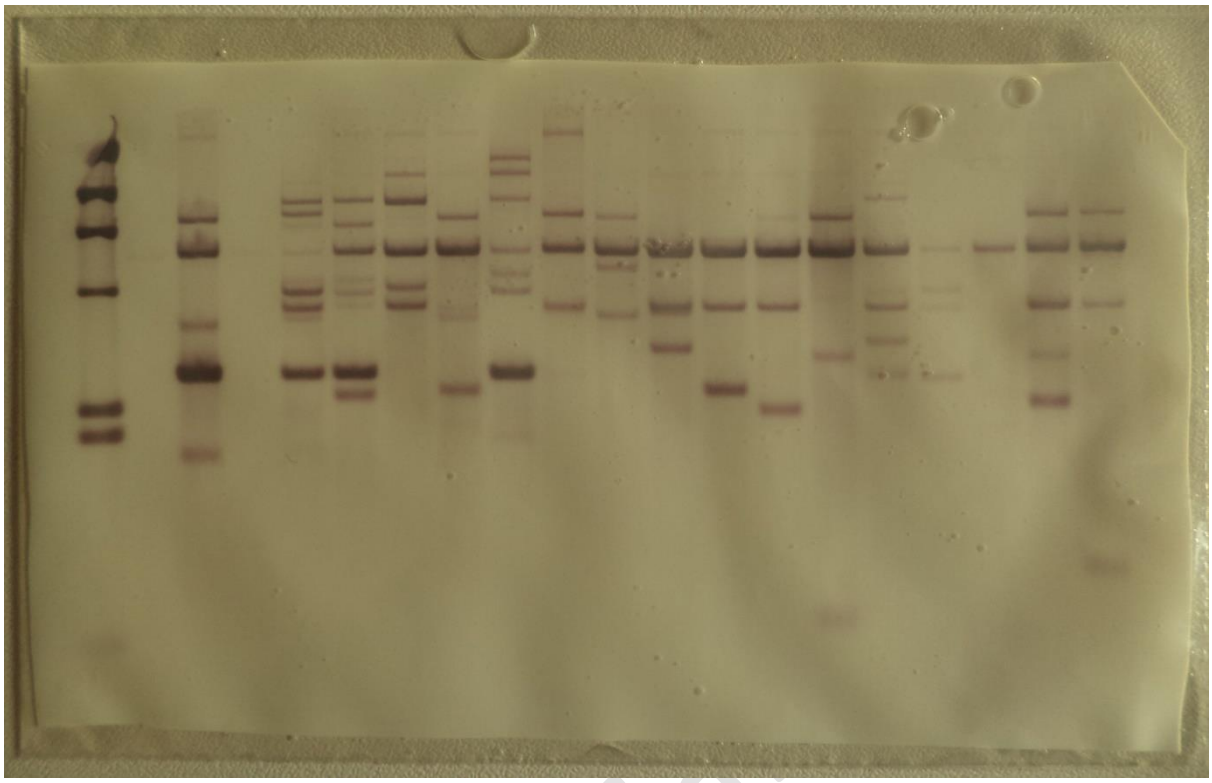
على سطح مرشح نترات السيللوز ، حيث تكون الدنا المرتبطة مع المجس المشع منطقة سوداء على الفيلم في موقع مماثل لموقعها على الهلام. يمكن قياس حجم هذه القطعة بمقارنتها مع دلائل حجمية مشعة مرحلة على نفس الهلام. تتميز هذه الطريقة بحساسيتها العالية جدا حيث يمكن بواسطتها الكشف عن وجود جين معين في الهلام حتى لو كان موجودة بنسخة واحدة ..

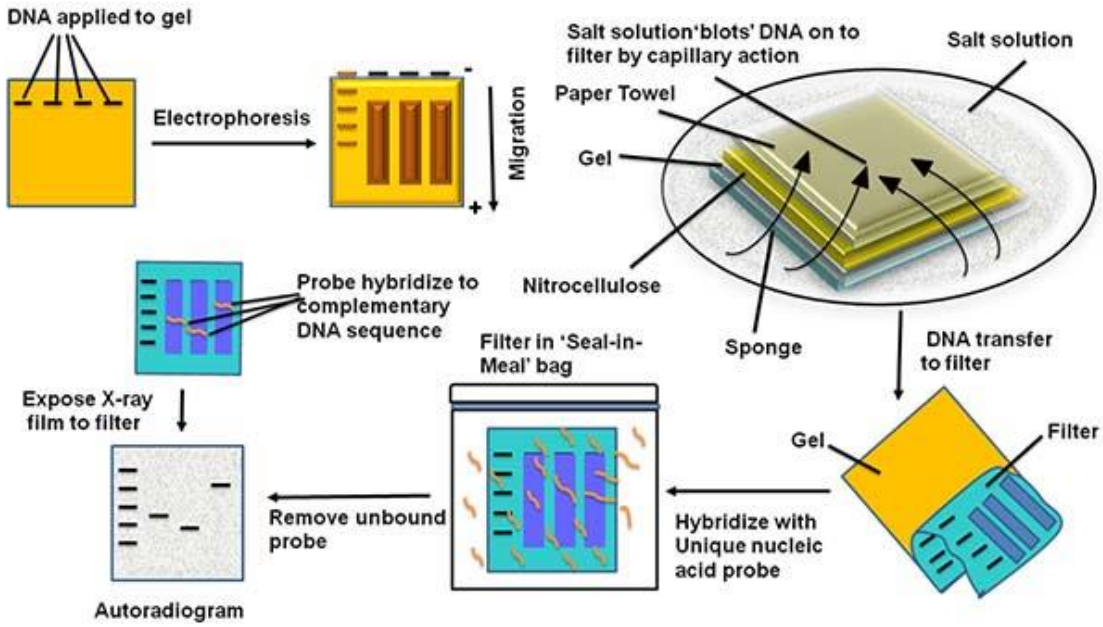
ان الطريقة المتبعة في تعليم جزيئات الدنا اشعاعية للحصول على المجسات هي طريقة انتقال الثلمة nick – translation .

Anmar Nazar Hasan


RNA or DNA
Electrophoresis
32P-labeled size markers
Migration
Solution passes through gel and filter to paper towels
Nitrocellulose filter
Gel
Sponge
Salt solution
Hybridize with unique nucleic acid probe
Gel
Filter
DNA transferred to filter
Remove unbound probe
Filter in "Seal-a Meal" bag
Probe hybridized to complementary sequence
Autoradiogram


Weight
Paper Towel Stack
Whatman Paper Stack
Membrane
Gel
Whatman Paper
Saran wrap
Platform
Transfer buffer




DNA applied to gel
Electrophoresis
Migration
Salt solution'blots' DNA on to filter by capillary action
Salt solution
Paper Towel
Gel
Nitrocellulose
Sponge
DNA transfer to filter
Probe hybridize to complementary DNA sequence
Filter in 'Seal-in-Meal' bag
Expose X-ray film to filter
Gel
Filter
Remove unbound probe
Hybridize with Unique nucleic acid probe
Autoradiogram

وفضلا عن فائدتها في الكشف عن قطعة دنا معينة في خليط من القطع المختلفة ، فان وضمة سودرن مفيدة كذلك في بناء خرائط التقييد وخرائط الجينات وذلك بمعاملة قطع الدنا باكثر من انزيم تقييد ومن ثم تحديد اعداد وحجوم القطع المشعة الناتجة عن كل معاملة حيث يمكن من خلالها رسم خرائط التقييد كما اوضح سابقا .

Anmar Nazar Hasan

المصادر :-

1- البكري غالب (1990),مبادئ الهندسة الوراثية.

2- عماش هدى (1994),مبادئ عام الحياة الجزئي.

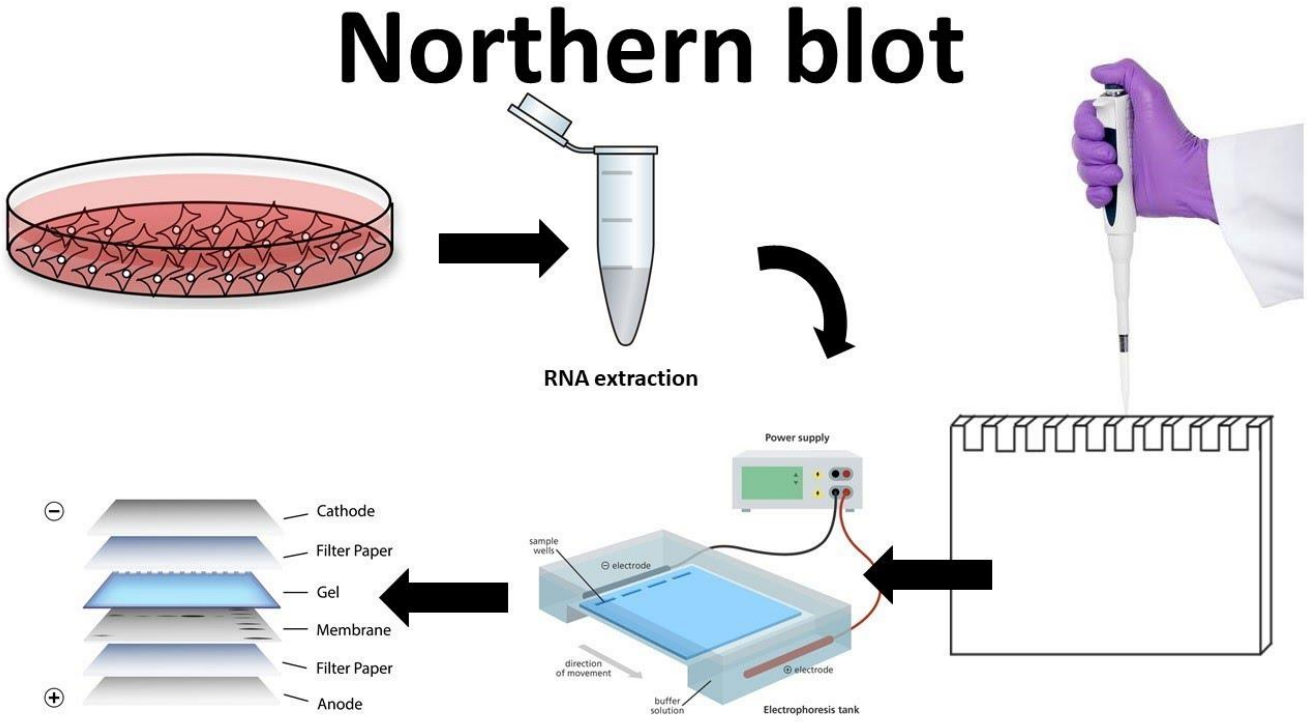
3- زيدان حيدرواخرون(2013),مبادئ الوراثة الجزيئية.

4- K.Setow.Jane(2004),Genetic Engineering,Principles And Method.

5- D.Watson.James(2004),Moleculer Biology Of The Gene.

Anmar Nazar Hasan

وصمة نورثن Northern blotting



على الرغم من الكفاءة العالية التقنيه وصمة سودرن في تحديد مواقع وحجوم قطع الدنا، الا انها لم تكن ملائمة لنقل جزيئات الرنا من الهلام إلى مرشح نترات السللوز ، بسبب عدم ارتباط الرنا بمثل هذا المرشح. لذا فقد عمد باحثون اخرون إلى تطوير تقنية مشابهة لتنقية سودرن يمكن استعمالها لنقل جزيئات الرنا من الهلام الى ورقة فعاله كيمياوية .

تحضر هذه الورقة عن طريق معاملتها بسلسلة من التفاعلات الكيمياوية بحيث تصبح قابلة للارتباط بقوة مع جزيئات الرنا . تنقل حزم الرنا من الهلام إلى هذه

Anmar

الورقة بنفس الطريقة المتبعة في تقنية سودرن ثم تهجن مع مجسات دنا، ليتم تحديد مواقعها بعد ذلك بطريقة التصوير الاشعاعي الذاتي . بما أن هذه الطريقة هي امتداد التقنية وصمة سودرن فقد اطلق عليها جزافا اسم وصمة نوردرن Northern blotting

يسمح الارتباط القوي لجزيئات الرنا بالورقة الفعالة كيمياويا باعادة استعمال هذه الورقة في اكثر من تجربة واحدة . حيث يمكن ازالة المجس المرتبط بجزيئات الرنا عن طريق غسله بدرجة حرارة غير ملائمة لاستقرار الخيوط الهجينة . وبهذا ستبقى جزيئات الرنا وحدها مرتبطة بالورقة وبنفس المواقع السابقة وعندها

تصبح جاهزة للارتباط مع مجس يختلف عن الأول ويمكن بواسطته الكشف عن جزيئة رنا اخرى.

على الرغم من أن طريقة وصمة نورذرن قد صممت اساساً لنقل حزم الرنا من الهلام إلى الورقة الفعالة كيمياوية ، الا أن المعلومات اللاحقة اثبتت ملاءمتها لنقل

حزم الدنا ايضا. فقد وجد أن قطع الدنا، وخاصة الصغيره منها ترتبط بكفاءة عالية الى الورقة الفعالة كيمياوية .

أوضحت البحوث اللاحقة امكانية نقل حزم الرنا، بصورة مباشرة من الهلام الى مرشح نترات السليللوز بشرط توفير ظروف تختلف عن تلك المستعملة في نقل

Anmar Nazar Hasan

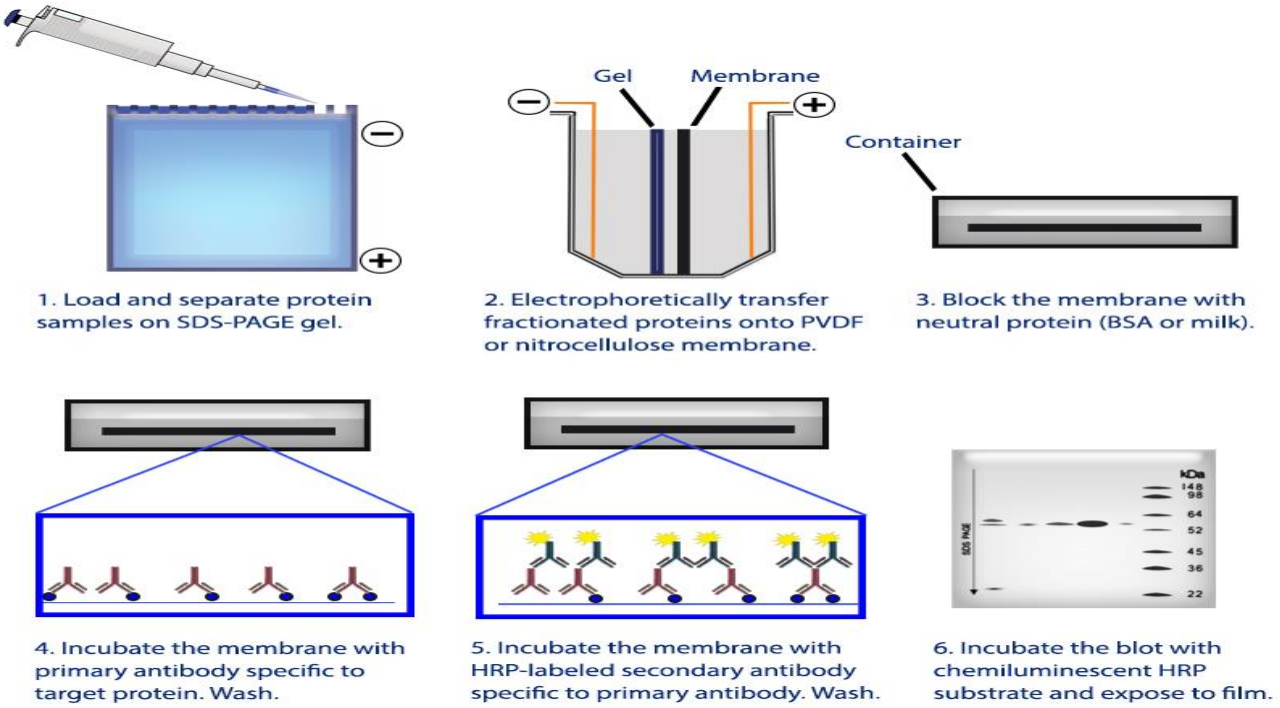
جزيئات الدنا. وبهذا فقد اعتمدت هذه الطريقة بصورة واسعة لانها لاتتطلب تحضير الورقة الفعالة كيمياوية كما هي الحال في طريقة وصمة نورذرن .

كان لتقنية سودرن دور كبير في تطوير تقنيات اخرى مشابه يمكن استخدامها في نقل الجزيئات المختلفة من الهلام. فعلاوة على وصمة نورذرن ، طورت تقنية اخرى اطلق عليها هذه المره اسم وصمة ويسترن Westren blotting

Anmar Nazar Hasan

Hasan

وصمة ويسترن Westren blotting



تستخدم هذه التقنية اساسا لنقل جزيئات البروتينات من الهلام إلى مرشح نترات السليلوز . فبعد اجراء الترحيل الكهربائي في هلام البولي اكريلامايد تنقل حزم

البروتينات من الهلام إلى ورقة نترات السللوز ، ويكشف عن البروتين المطلوب عن طريق مفاعلته مع ضد antibody متخصص ومعلم اشعاعية . من الجدير بالذكر أن مصطلح وصمة ويسترن قد يستخدم أحيانا ليعني عملية نقل جزيئات الرنا الى مرشح نترات السليلوز .

Anmar Nazar Hasan

مدرس المادة انمار نزار حسن

Anmar

تحديد تتابع نيوكليوتيدات الدنا

Anmar Nazar Hasan

. تعد تقنية تحديد تتابعات الدنا واحدة من أهم تقنيات الهندسة الوراثية . فمن خلالها اصبح ممكنا التعرف على تتابع النيوكليوتيدات لقطعة دنا معينة بدقة بالغة. ومما لاشك فيه أن هذه التقنية اضفت بعدا جديدا لعلم الحياة الجزيئي وكشفت كثيرا من الأسرار التي تحيط بجزيئة الدنا. كما أمكن من خلالها التعرف على طبيعة العديد من الجينات المكلونة وخواصها.

تستخدم في الوقت الحاضر طريقتان رئيسيتان لتحديد تتابع النيوكليوتيدات . طور الأولى سنجر وكولسون Sanger and Coulson وتدعي طريقة ايقاف السلسة chain termination method. اما الثانية فقد طورها ماكسام وجلبرت Maxam and Gilbert ويطلق عليها اسم طريقة التحلل الكيمياوي chemical degradation. تشترط طريقة سنجر .

وكولسون كلونة الدنا المرغوب تحديد تتابعاتها في احد النواقل المشتقة من العائي Ml3 للحصول عليها بشكل خيط مفرد .. وهذه الطريقة اكثر استعمالا في الوقت الحاضر من طريقة ماكسام وجلبرت التي لازالت تستعمل تحت ظروف معينة. .

طريقة سنجر وركولسون (طريقة ايقاف السلسلة)

تشترط هذه الطريقة ان تكون قطعة الدنا المرغوب تحديد تتابعاتها على شكل خيط مفرد لكي تستخدم بمثابة قالب لتخليق الخيط الثاني بواسطة بوليمريز الدنا. لذا تكلون قطع الدنا قيد الدرس في احد النواقل المشتقة من العائي M13 للحصول عليها بشكل خيط مفرد ملائم لاجراء هذه العملية.

Anmar Nazar Hasan

تعتمد هذه الطريقة على استغلال خاصيتين من خصائص انزيم بوليمريز الدنا. الأولى هي قابليته على تخليق خيط جديد مكمل للخيط المكلون (القالب)

عن طريق اضافته للنيوكليوتيدات الجديدة واحدة بعد اخرى اما الخاصية الثانية فهي قابليته على استعمال 2, 3 dideoxynucleoside triphosphates

,كمادة أساس في بناء الخيط الجديد. آن هذه المادة هي من مشابهات مولدات النيوكليوتيدات (deoxynucleoside triphosphates) التي يستخدمها الانزيم، عادة في بناء الخيط الجديد. وبهذا سيضيف الأنزيم هذه المشابهات إلى خيط الدنا الجديد، في حالة وجودها في الوسط، وبما انها تفتقر إلى مجموعة الهيدروكسيل في الموقع 3 للسكر الخماسي فان اضافتها ستؤدي إلى ايقاف نمو سلسلة الدنا الجديدة بسبب تعذر اضافة النيوكليوتيدات الى طرفها الفاقد لمجموعة(3 -OH)

يمثل الشكل التالي مخططا لطريقة سنجر وكولسون لتحديد تتابعات قطعة دنا مكلونه بشكل خيط مفرد في احد النواقل المشتقة من M13. لاجل تخليق الخيط المكمل للخيط المكلون لابد من وجود باديء ذي نهاية حره من نوع OH-3 ليستخدمها انزيم بوليمريز الدنا في اضافة النيوكليوتيدات الجديدة. لذا يضاف في هذه الحالة باديء مخلق كيمياوية ومكمل للتتابع المجاور لقطعة الدنا المكلونه في الناقل (يمكن الحصول على الباديء بصورة تجارية حيث تتوفر انواع مختلفة ملائمة للاستعمال مع نواقل M13 المختلفة). بعد ارتباط الباديء بالمنطقة المجاورة للدنا المكلونه تبدأ عملية تخليق الخيط الجديد وذلك باضافة قطعة كلينو Klenow fragment لانزيم بوليمريز الدنا (ا) (قطعة كلينو هي الجزء المسؤول عن تخليق خيوط الدنا في جزيئة بوليمريز الدنا (ا)، اما

Anmar Nazar Hasan

الجزء الاخر للانزيم فيكون مسؤولا عن تحطيم الدنا، والانواع الأربعة من مولدات النيوكليوتيدات وهي(((dCTP , dGTP, dTTP , dATP)))

. ويجب أن تكون واحدة او اكثر من هذه المولدات معلمه اشعاعيا بواسطة p32. يقسم الخليط بعد ذلك إلى أربعة أنابيب ويضاف لكل انبوب احد مشابهات مولدات النيوكليوتيدات. فيضاف للانبوب الاول مثلا ddATP والثاني ddCTP والثالث ddGTP والرابع ddTTP. وبهذا ستبدأ قطعة كلينو لانزيم بوليمريز الدنا باضافة النيوكليوتيدات إلى الطرف OH-3 للباديء لبناء الخيط الجديد. وبما آن مشابهات المولدات موجوده في الوسط فان اضافتها ستؤدي إلى توقف نمو خيط الدنا الجديد.

فاذا كان الانبوب الاول محتويا على ddATP فان انزيم بوليمريز الدنا سيضيف dATP او ddATP مقابل كل T في القالب وسيؤدي هذا إلى استمرار عملية التخليق في الحالة الأولى والى ايقافها في الحالة الثانية. يضاف ddATP إلى الخليط بتركيز محسوب بحيث يكون المجال متاحا لأنزيم بوليمريز الدنا لاضافة dATP احيانا و ddATP احيانا اخرى ينتج عن هذه العملية تكوين خليط من خيوط دنا جديدة مشعة وذات اطوال مختلفة تنتهي ب ddATP في الطرف 3. تخلق الدنا الجديدة في الأنابيب الثلاثة الأخرى بنفس الطريقة. وهذا وبعد انتهاء فترة التفاعل في الأنابيب الاربعة سنحصل على خليط من خيوط الدنا الجديدة المختلفة الأطوال التي تحتوي جميعا على نفس النيوكليوتيد في الطرف 5 ولكنها تختلف في الطرف 3، حيث ينتهى قسم منها ب ddATP وقسم آخر با ddTTP وهكذا

و تفصل الخيوط الجديدة الناتجة عن كل تفاعل من التفاعلات الأربعة على شكل حزم دنا تميزه وحسب اطوالها عن طريق ترحيلها كهربائية في هلام البولي اكريلامايد. يحضر الهلام المستخدم. بطريقة تسمح بفصل حزم الدنا حتى لو كانت مختلفة بمقدار نيوكليوتيد واحد في الطول، وغالبا مايستعمل لهذا الغرض هلام رقيق جدا (اقل من 0.5 ملم). كما يضاف للهلام المستعمل مادة اليوريا التي تعمل على مسخ الدنا وفصل الخيوط الجديدة عن

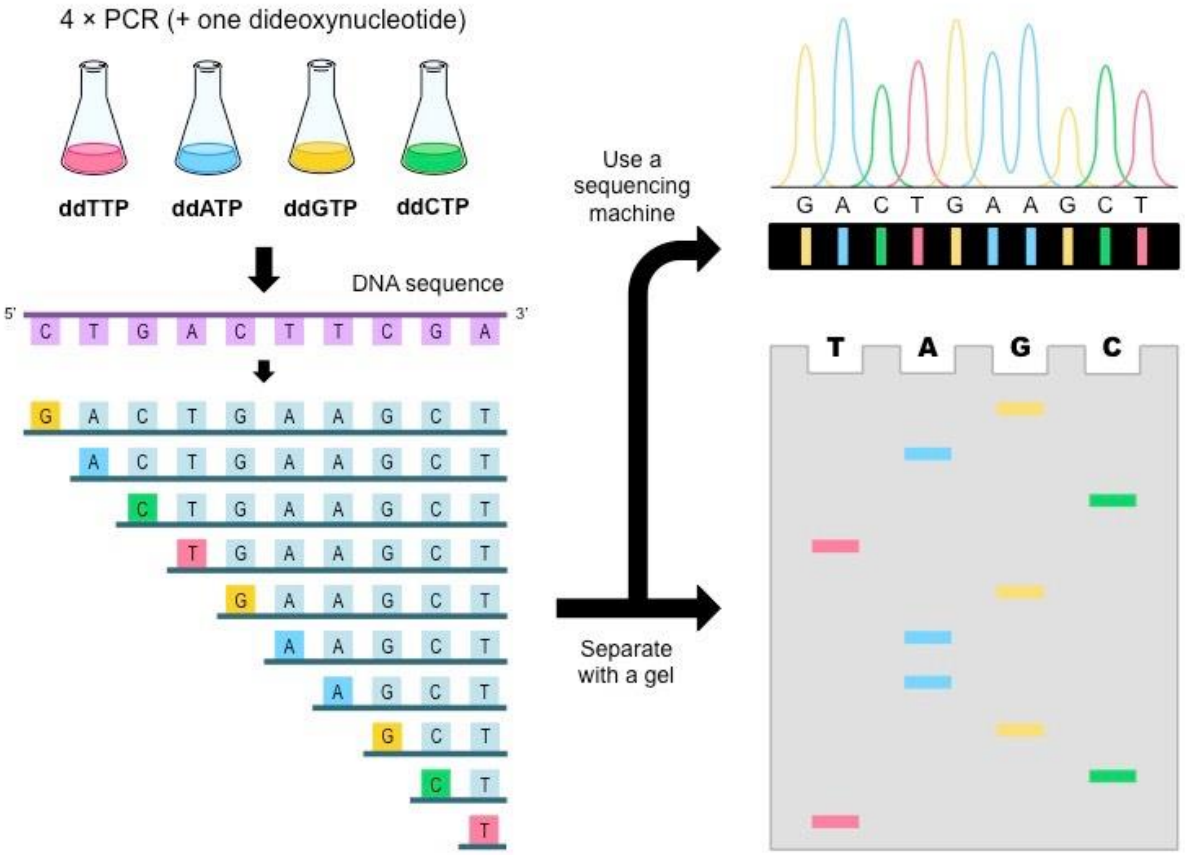
Anmar Nazar Hasan

القالب المكلون في الناقل. ولاجل منع الخيوط الممسوخه من الارتباط مع بعضها مره اخرى يجب رفع درجة حرارة الهلام الى 60م او اكثر ويتم ذلك عن طريق اجراء الترحيل الكهربائي باستخدام فولتية عالية . بعد انتهاء الترحيل الكهربائي وفصل الخيوط المفردة المعلمة اشعاعيا يتم تحديد مواقعها على الهلام بطريقة التصوير الاشعاعي الذاتي Autoradiography بعد تعيين مواقع الحزم المختلفة يمكن وببساطه قراءة التصوير الاشعاعي الذاتي لتحديد تابع النيوكليوتيدات لقطعة الدنا المكلونه كما هو موضح بالشكلين

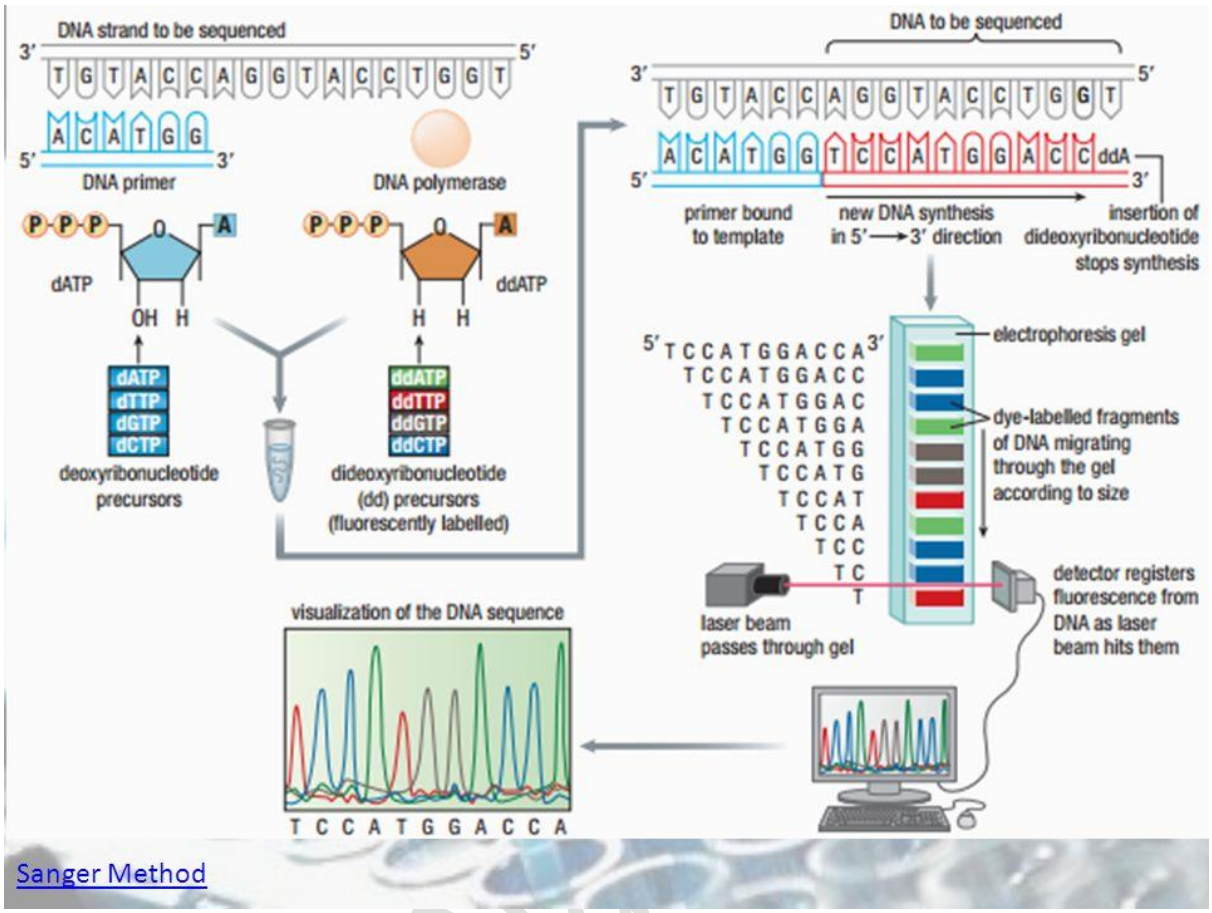
تتسم قراءة التصوير الاشعاعي الذاتي لتحديد تتابع النيوكليوتيدات بالسهولة . حيث يتم اولا تحديد الحزمة المهاجرة لاطول مسافة وهي تمثل طبعا اصغر قطعة دنا مخلقه في الخليط. وهذا يعني أن نمو هذه القطعة قد توقف عند النيوكليوتيد الأول للقالب (أي ان شبيه المولد قد اضيف مقابل النيوكليوتيد الأول للقالب).

اذا نلاحظ أن اصغر حزمة تقع في المجال الذي يحتوي على ddCTP مما يعني ان النيوكليوتيد الأول في الخيط الجديد هو من نوع C. الخطوة الثانية هي تحديد موقع الحزمة المهاجرة بمسافة اقل من الأولى وتعيين المجال الذي تحركت فيه والتي تكون أطول من الحزمة الأولى بمقدار نيوكليوتيد واحد فقط. الحزمة في المجال C ايضا مما يشير الى أن النيوكليوتيد الثاني في الخيط الجديد هو من النوع C ايضا. أما الحزمة الثالثة من ناحية مسافة الهجرة فتقع في المجال A الذي يحتوي على (ddATP) وبهذا سيكون النيوكليوتيد الثالث من نوع A وهكذا تستمر القراءة لتحديد مواقع الحزم ومجال حركتها لمعرفة تتابع النيوكليوتيدات بالكامل.

Anmar Nazar Hasan


4 × PCR (+ one dideoxynucleotide)
ddTTP
ddATP
ddGTP
ddCTP
DNA sequence
5'
3'
C T G A C T T C G A
Use a sequencing machine
Separate with a gel
G A C T G A A G C T
T A G C

Anmar Na



Sanger Method

Anmar Na