المصادر

كتاب مقدمة في التقنية الحيوية	تأليف : الدكتور محمود محمد رفعت و الدتور سعد بن عياض العتيبي. / الهيئة المصرية العامة للكتب و الوثائق المصرية , سبتمبر 2008
كتاب اساسيات التقانة الحيوية	تأليف : الدكتور علي إبراهيم علي عبية و الدكتور احمد عبد الفتاح محمود / مكتبة المعارف الحديثة 2012/05/15
أسس التقانة الحيوية	تأليف : كولن راتليج (Colin Ratledge) و بيورن كريستيانسن (Bjorn Kristiansen) / سلسلة كتب التقنيات الاستراتيجية و المتقدمة .

الية عمل الجينات Gene Mechanism

الان وبعد كل ما ذكر سابقا يأتي الاهم وهو كيف يمكن لعلماء البيولوجيا الحيوية فهم كيفية عمل الجينات؟ لذا استخدم مهندسي الوراثة تقنية سميت استبدال الجينات المستهدفة Gene targeting وفية يتم استحداث لطفرة واستبدالها بجين سوى داخل إحدى الخلايا الجنينية الجذعية المصدر Embryo -derived stem cell من أجنة الفاران ثم إدخالها فى خلايا جنين الفأر فتكون بذلك اجنة معطلة الجين المستهدف out knocked فأذا أدى ذلك الى إحداث تشوه في مخ الفأر كان ذلك دليل على مسئولية هذا الجين عن تكوين المخ .اصبح الاستهداف الجيني تقنية مثيرة وهامة عندما استخدم في مشروع الجينوم البشرى لكشف أسرار الجينات المسئولة عن الأمراض الوراثية حيث ان دراسة تسلسل النيكلوتيدات للجين لا يفسر وظيفته فى حياة الكائن الحى .

تبدأ التقنية بعزل جين من خلايا الجذعية المشتقة من الجنين Embryo- derived stem cells (EC) والمراد دراسة وظيفته ويحور ذلك الجين لإنتاج جين طافر يتم استبداله بالجين السوى ويكون ذلك عن طريق إيلاج جين مقاوم للنيوميسين Neomycin resistance (neo r) وذلك لتسهيل امر العثور عن الخلايا التى تم الايلاج فيها ويسمى هذا الجزء من الجين بالواسم الموجب , كما يضاف للجين جزء آخر يسمى الجين بجين الثياميدين كيناز tk ويعتبر واسم ثاني ويعرف بالواسم السلبى حيث ان هذا الجين يسبب حساسية للخلايا الحاوية علية ضد المضاد الحيوى الكانسيكلوفير بعد تصميم الجين الطافر هذا يتم تحميلة على ناقل مناسب مثل بلازميد القولون يتم إدخال الناقل الى خلايا جنين الفأر ES فيقوم الناقل :

اما بنقل الجين الطافر بدلا من الجين السوى (المستهدف) على كر وموسوم من كروموسومات خلايا الفأر الجنينية وفى هذه الحالة سوف يتم استبدال الجين السوى بجين مشابه مع احتوائه على الجزء الخاص بجين neo r فى منتصفة دون الجزء الخاص بال tk وذلك لان انزيم القطع المحدد سوف يتعرف على الجين المستهدف فقط بمعنى معرفة تسلسل البداية والنهاية له

او بنقل الجين المستهدف بطريقة عشوائية فسوف يتم نقل الجين الطافر كله اى بالواسمة الثانية والخاصة بال tk او لا يتم الإيلاج من أصلة فى الخلايا

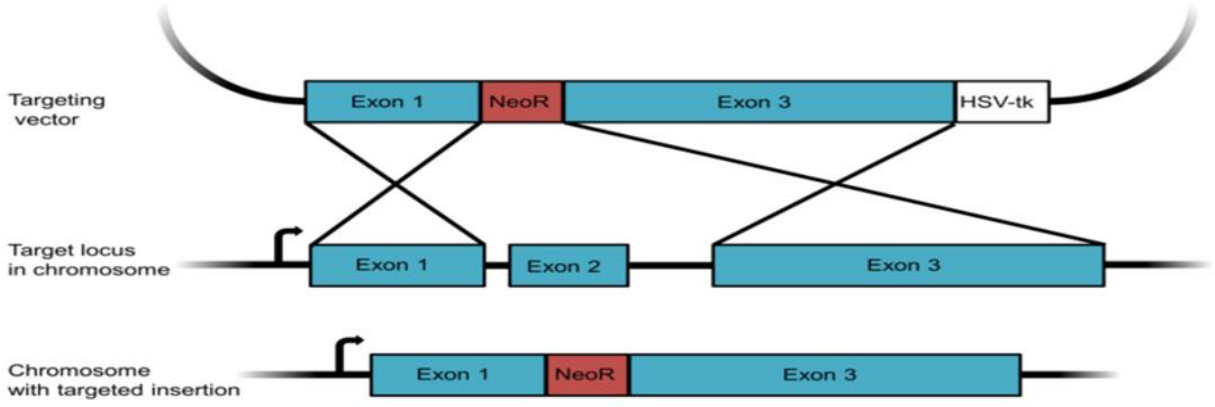


Figure 1: A knockout targeting vector designed to insert a resistance gene. The vector contains a neomycin resistance gene (NeoR) flanked by homology arms. The negative selection marker HSV-tk is used to select against random recombinants.

ولعزل الخلايا التى تحمل الطفرة المستهدفة يتم وضع الخلايا كلها فى وسط يحتوى على عقارين أحدهما مضاد المينوميسين المعروف G418 والثانى مضاد الكانسيكلوفير يقوم المضاد الأول بقتل الخلايا التى لا تحتوى على الجين الطافر فيقضى على الخلايا التى لم يحدث لها انتقال للجين المستهدف اما العقار الثانى فهو مميت للخلايا التى انتقل

اليها الجين الطافر عشوائيا الحاوي على الوسيمة الثانية الخاصة بالجين tk والمسببة للحساسية للمضاد الحيوى الثاني، وعليه يتم الحصول على الخلايا المطلوبة والتي هندست وراثيا

فاذا كانت تلك الجينات مأخوذة من فأر بنى اللون , يتم إيلاج تلك الخلايا داخل خلايا جنينية وهى فى طور الكيسية الاريمية (البلاستولة) لأنثى فأر اسود اللون ثم ننقل الخلايا الجنينية الى رحم ام بديلة حيث تنمو وتكون النسل وتفحص الفئران للحصول على الفأر المحتوى على ظلال بنية ممزوجة باللون الأسود لتشير تلك الصفة على انه الفأر المطلوب و الحاوي على خلايا ES المهندسة جينياً وتعرف تلك الفئران بالفئران الكيميرية Chimeras (الخلطية) , بعد ذلك يتم تزاوج الذكور الكيميرية مع إناث سود ويختبر النسل Progeny بحثا عن الطفرة المستهدفة ويستبعد الفار الأسود والبنى ويستمر فى تزاوج الذكور والإناث الباقية لتلد فئران تحمل الطفرة بصورة نقية اى نسختين من الجين الطافر فتظهر عندئذ الشذوذ الجسدى او المرضى لنتعرف على وظيفة الجين المستهدف .

استخلاص الاحماض النووية DNA EXTRACTION

الأحماض النووية هي عبارة عن جزيئات كبيرة الوزن الجزيئى توجد في جميع الخلايا الحية في صورة طليقة أو متحدة مع البروتين، وتتكون أساسا من وحدات عديدة من النيكلوتيدات الأحادية المرتبطة مع بعضها وتحمل الصفات الوراثية وهي المسئولة عن نقل المعلومات لتخليق البروتين. وبدأ علماء (الكيمياء الحيوية) أبحاثهم على الأحماض النووية منذ حوالي مائة عام مضت حين إستطاعوا فصلها من أنوية الخلايا فالأحماض النووية توجد في كل الخلايا الحية حيث أنها ليست فقط مسؤولة عن حمل وانتقال (الصفات الوراثية) ولكنها تتحكم أيضاً في ترجمة هذه التعليمات عند تكوين البروتينات المختلفة بالخلايا وذلك بتحكمها في ترتيب وتتابع الأحماض الأمينية لكل بروتين يتكون بكل خلية والأحماض النووية لها وزن جزيئيي مرتفع وهي عبارة عن نيوكلتيدات (بولي نيوكلتيدات) وحداتها البنائية هي النيوكلتيدات.

خواص الحامض النووى DNA

1. تمتص القواعد النيتروجينية من نوع البيورين والبيرميدين الموجودة في الأحماض النووية الأشعة الفوق بنفسجية بدرجة كبيرة عند موجة ذات طول 260 نانوميتر (260 nm) .
2. عند تسخين الحمض النووي DNA بدرجة كبيرة ببطء فان السلسلتين الحلزونيتين الشكل تبتعدان عن بعضهما وتسمى عملية الابتعاد هذه بعملية انفصال السلسلتين .Melting وبزيادة درجة الحرارة تزداد درجة الامتصاص النوعي، وتسمى درجة الحرارة التي يحدث عندها الزيادة المفاجئة في الامتصاص للأشعة فوق البنفسجية بدرجة حرارة الانفصال (Melting temperature Tm) للحمض النووي , ولكل نوع من انواع الحمض النووي DNA درجة Tm خاصة به .
3. ويمكن فصل سلسلتي الحمض النووي DNA عن بعضهما إذا انخفض رقم pH المحلول عن 4 او اذا ارتفع عن 11.
4. حيث أن الأحماض النووية عبارة عن الكتروليتات عديدة (Polyelectrolytes) مع وجود شحنة سالبة واحدة لكل وحدة نيوكليوتيدية (هذه الشحنة ناتجة عن تاين الفوسفات ثنائي الاستر) في نطاق pH من 4 الى 11 .
5. عند اعادة تبريد المحلول ببطء فانه يحدث اعادة لتكوين الشكل الحلزوني ذو السلستين مع امكانية حدوث تبادل بين السلاسل وتسمى هذه العملية . Annealing.

الاهمية الحيوية للأحماض النووية

تمثل الاحماض النووية البنك المركزي الخلوي الذى يحتوى على جميع أسرار الصفات الوراثية وشفرات تكوين البروتين التي يؤدى وجودها الى ظهور الصفات كما يؤدى اختفاءها الى غياب الصفات أو ربما ظهور أمراض.

فصل الأحماض النووية Isolation Of Nucleic Acid

هناك عدة طرق لعزل الدنا الا ان مبادئ العزل اواستخلاص الDNA واحدة في جميع تلك الطرق، وبما إن الأحماض النووية تظهر في الخلية الحية بشكل بروتين نووي معقد Complex nucleoprotein لذا وبشكل عام، تبدأ عمليات الاستخلاص كما يأتي :

١ - تكسير الأغشية الخلوية لتسهيل خروج الDNA وبقيه المكونات الخلوية، دون التعرض لأضرار كبيرة.

٢- يتم فصل DNA من المكونات الخلوية باستخدام العديد من عمليات إزالة البروتينات Deproteinization process من خلال استخدام معاملات أنزيمية وكيمياوية.

٣ -إزالة البروتينات المسوخة من خلال معاملتها بالمذيبات المناسبة وبواسطة الترسيب الميكانيكي (Centrifugation) الذي يؤدي إلى ترسيب البروتينات المسوخة وفصلها عن الDNA .

تعد عملية استخلاص الدنا من العمليات الضرورية للحصول عليه واستخدامه في الاختبارات الجزيئية والتحليلات الجنائية وأيا كان مصدر الاستخلاص (خلايا البكتريا خلايا النباتية اوالخلايا حقيقية النواة) فان عملية الاستخلاص توفر ايضا إزالة الشوائب كالبروتينات والدهون وغيرها من الشوائب الكيميائية ويمكن تلخيص خطوات الاستخلاص كالاتي :

1. **تحليل الخلايا Cell lyses** واخراج محتوياتها واذا كانت الخلايا محتوية على جدار كالخلايا النباتية فيجب تحطيم الجدار الخلوي اولا وعادة يتم ذلك بالتبريد الفائق (بواسطة النتروجين السائل حيث يوفر درجة حرارة تقترب من (190 م°).
2. **تحليل الانوية Nucli lyses** لخلايا حقيقية النواة. التخلص نت الشوائب او ملوثات الدنا ى يتم ذلك:
   A. **باضافة محلل RNAase** الذي يقوم بتحليل الحامض النووي الرايبوزي RNA .
   B. التخلص من البروتينات بواسطة الترسيب وفي هذه الخطوة يتم استخدام مذيبات عضوية وبفرات (buffers) عالية التركيز بالأملاح.
3. تنقية DNA من محاليل الخطوة 3 بواسطة الكحول ويستخدم الايثانول المبرد او الايزوبروبانول المبرد لكن الاخير يمتاز بترسيبه للسكريات مع DNA في درجات الحرارة الواطئة.
4. وضع الDNA في بفر ملائم للحفاظ عليه ويوضع في درجة (-20 م°) .

أولا / استخلاص وعزل المادة الوراثية من الانسجة النباتية:

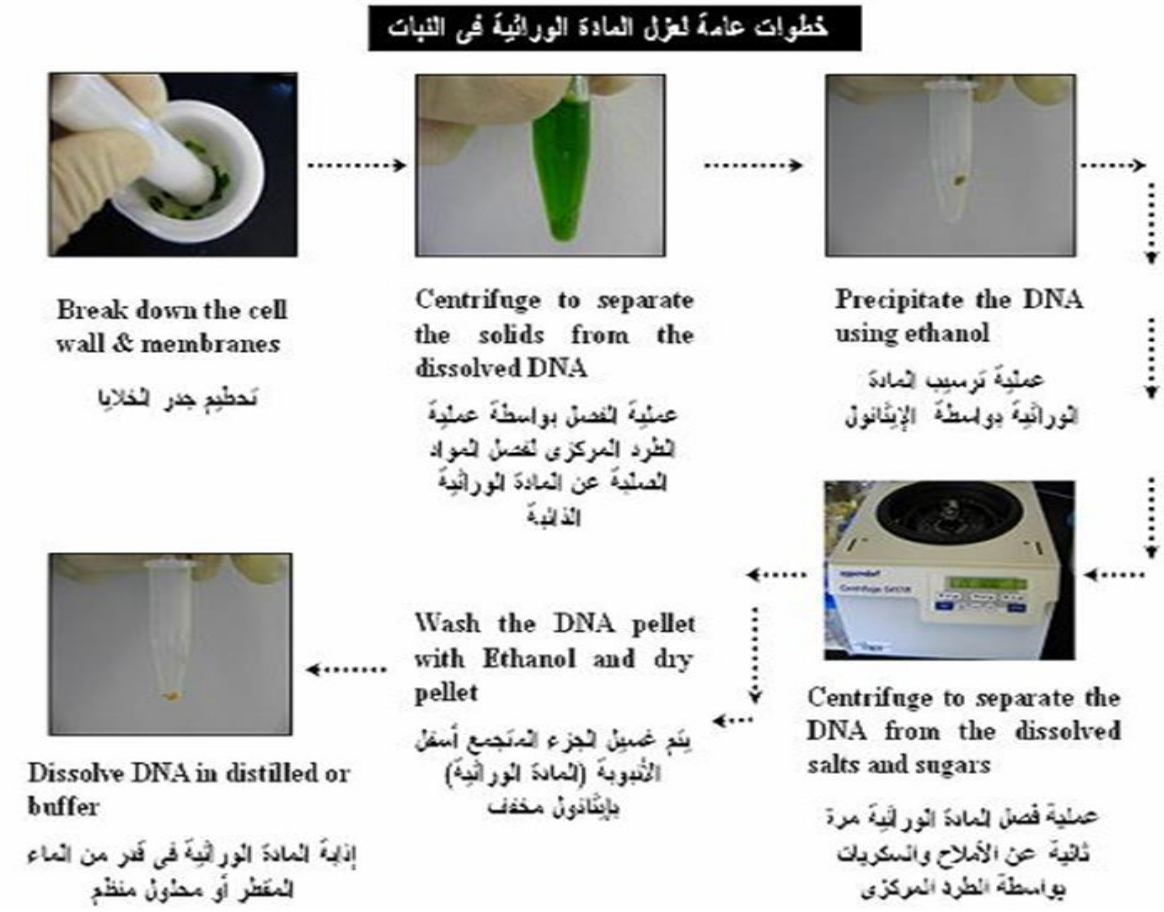
Extraction and Isolation of Plant DNA

كما ذكرنا سابقا ان طريقة عزل المادة الوراثية من أي كائن حي هي **واحدة** في جميع تلك الطرق ، وانما الاختلاف فقط في طريقة الاستخلاص سواء من النبات، او الحيوان او الكائنات الاخرى. ويمكن الاشارة الى استخلاص وعزل المادة الوراثية في النبات في كما يلي (شكل 15) :

1. يتم جمع أي جزء من نبات سليم وقوي من النبات المراد استخلاص المادة الوراثية له ويفضل ان تكون تلك الاجزاء الطازجة.

2. يطحن اجزاء منها على درجة حرارة منخفضة (أقل من40 درجة م^{o}) وذلك بعد إضافة محلول مائي للفينول المركز وصوديوم دوديسايل سلفات Sodium dodecyl sulfate(أو أي مادة اخرى مناسبة لتقليل الجذب السطحي) إليها.
3. بعد هذه المعاملة يتغير التركيب الطبيعي للبروتينات الموجودة بالأنسجة وتصبح غير ذائبة في المحلول المائي وترسب بينما نجد أن الأحماض النووية تظل ذائبة في المحلول المائي.
4. وبترك المطحون المتجانس الناتج ينفصل إلى طبقتين سائلتين ويمكن الإسراع بفصل الطبقتين بإجراء عملية طرد مركزي على درجة حرارة منخفضة.
5. حيث يتم بعدها فصل الطبقة العليا المائية (والمحتوية على الأحماض النووية جميعها) عن الطبقة السفلى الأخرى الغنية بالفينول والتي يستغنى عنها.
6. ترسب الأحماض النووية من الطبقة المائية المفصولة وذلك بإضافة كحول الإيثايل اليها بعد ذلك يفصل الراسب المتكون بواسطة الطرد المركزي . وتنقى الأحماض النووية به بإذابته في الماء ثم إعادة ترسيبه بالكحول كما سبق وفصله بالطرد المركزي على صورة نقية.
7. ويمكن فصل كل من الحمضين النووين DNA و RNA كل على حدة بعد ذلك إما بمعاملته بإنزيم ريبونيوكليز (Ribonucleasa) وذلك لتكسير الحمض النووي RNA وتحويله إلى جزيئات صغيره ذائبة مع ترك الحمض النووي DNA كما هو بدون التأثير عليه .
8. أو بمعاملة الخليط بإنزيم ديؤكسي ريبونيوكليز (Deoxyribonuclease) حيث تتكسر جزيئات الحمض النووي DNA تاركاً الحمض النووي RNA بدون تأثر . وبعد التخلص من أحد الحمضين النوويين يضاف محلول مائي للفينول وذلك لترسيب وإزالة ماتبقى من بروتين ثم تفصل الطبقة المائية المحتوية على الحمض النووي المراد الحصول عليه بالطرد المركزي. حيث يضاف لها بعد ذلك كحول الإيثايل لترسيب الحمض النووي

وحيث أن الحمض النووي DNA على صورته الطبيعية عبارة عن لولب حلزوني طويل فإن إضافة كحول



الإيثايل إليه ينتج عنه ترسيب DNA على هيئة راسب طويل ليفي حيث يمكن الحصول عليه من المحلول بلفه حول محرك زجاجي حيث يوضع بعد ذلك في مذيب مناسب مثل الأسيتون لتجفيفه حيث يسهل إزالته جافاً عن المحرك الزجاجي ويحفظ جافاً في زجاجات على درجة حرارة(– 20 درجة م°).

شكل 15: خطوات استخلاص وعزل المادة الوراثية في النبات

ثانيا / استخلاص الحامض النووي DNA من البكتريا السالبة لصبغة غرام *E.coli*

يمكن تلخيص خطوات استخلاص الدنا من البكتريا السالبة بالخطوات التالية :

1. تنمية الخلايا:

A. تنشر البكتريا المراد استخلاص الاحماض النووية منها على وسط صلب ملائم وتحضن بدرجة 37 م° لمدة 24 ساعة، بعدها تؤخذ مستعمرة منفردة وتستعمل لتلقيح 50 مل من وسط لوريا السائل مناسبوتحضن بدرجة 37 م° لمدة 24 ساعة.

B. ينقل المزروع السائل إلى أنبوبة بولي اثيلين معقمة و ينبذ بسرعة 4000 دورة/دقيقة لمدة 15 دقائق يزال الرائق ويعلق الراسب في 5 مل من دارئ TE ثم تنبذ الأنابيب بسرعة 4000 دورة/دقيقة .

C. تكرر الخطوة السابقة (عملية الغسل Washing) لمرتين.

D. بعدها يعلق الراسب في 5 مل من الدارئ وتحفظ الانابيب بدرجة 4 م° لحين الاستعمال

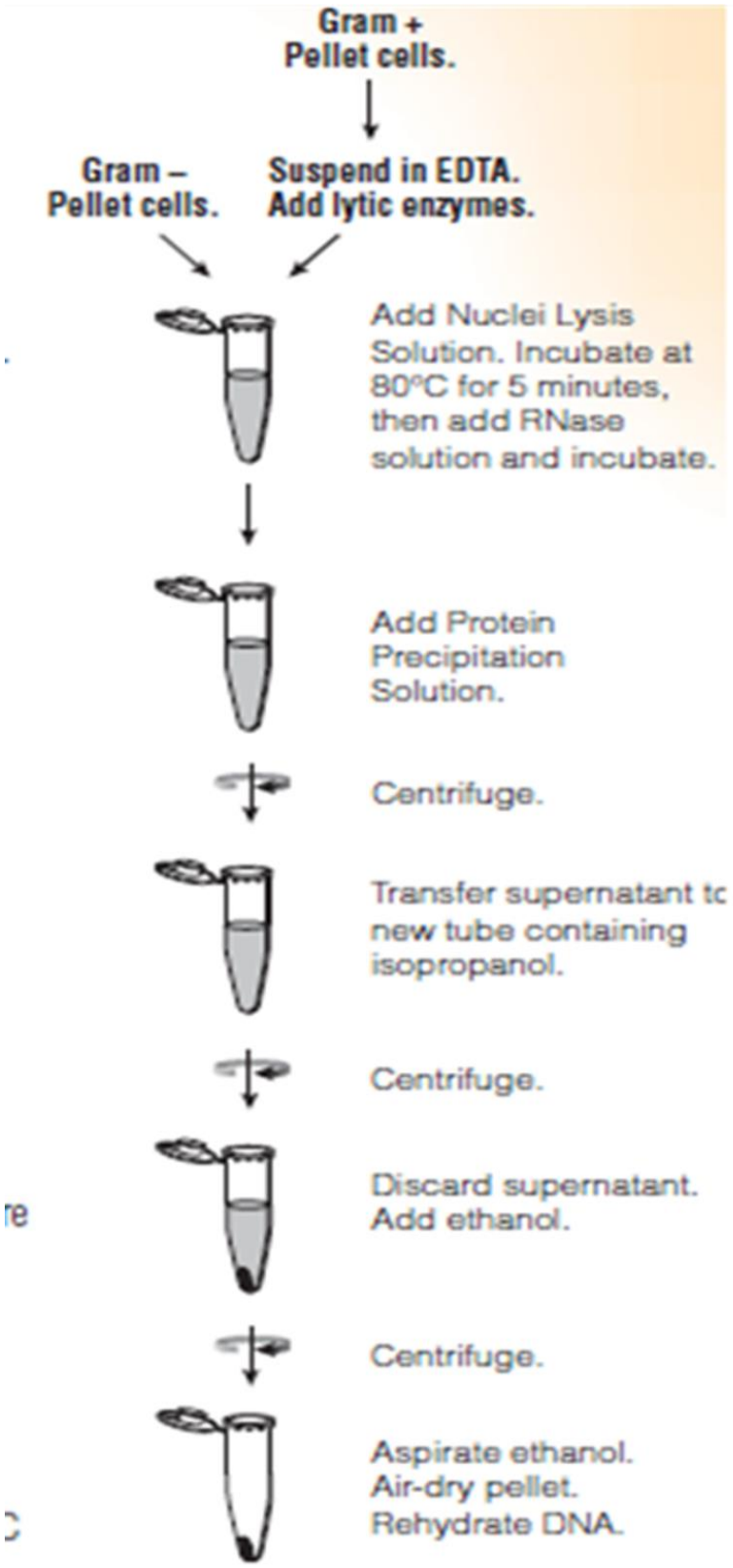
2. استخلاص الدنا

A. انقل المزروع البكتيري الى انبوبة ابندروف.
B. ضعها في جهاز الطرد المركزي بسرعة 14000-16000 دورة لمدة دقيقة واحدة .
C. اضف 200µl من محلول GT buffer الى الانبوبة ثم رجها .
D. احضنها بدرجة حرارة الغرفة لمدة 5 دقائق.
E. اضف 200 µl من محلول بفر GB ثم رج بقوة لمدة 5 ثوان .
F. احضن بدرجه 70 ؟م لمده 10 دقائق.
G. اضف 5 µl من محلول RNase الى الانبوبه .
H. احضن بدرجة حرارة الغرفة لمدة 5 دقائق.
I. اضف 200 µl من محلول الايثانول المركز ثم رج الانبوبه بقوة.
J. ضع انبوبة spin column GD في داخل انبوبة جمع collection tube ثم انقل محتويات الانبوبه اليها .
K. ضع الانبوبة في جهاز السنترفيوج بسرعة 14-16000 دورة لمدة 2 دقيقة .
L. استبدل انبوبة الجمع بواحدة جديدة .
M. اضف 400 µl الى انبوبة.
N. ضع الانبوبة في جهاز السنترفيوج بسرعة 14-16000 دورة لمدة 30 ثانية.
O. اضف 600 µl من محلول الغسل . Wash buffer
P. ضع الانبوبة في جهاز السنترفيوج بسرعة 14-16000 دورة لمدة 30 ثانية.
Q. استبدل انبوبة الجمع بانبوبة ابندروف لتخزين الدنا فيها .
R. اضف 100 µl من محلول . Elution buffer
S. اترك الانبوبة لمدة 3-5 دقائق حتى يمتص المحلول من قبل اغشية السيليكا
T. ضع الانبوبة في جهاز السنترفيوج بسرعة 14-16000 دورة لمدة 30 ثانية. ثم خذ انبوبه الابندروف واحكم اغلاها واخزنها في درجة حرارة -4 م° لحين استعمالها لاحقا في الفحوصات المطلوبة .

و هناك طرق اخرى تعتمد على تزويد العاملين او الباحثين في هذا المجال بمحاليل جاهزة مصنعة من قبل شركات متخصصة مثل (Promega DNA Extraction Kit و Sigma DNA extraction kit و غيرها من الشركات الاخرى) يحتوي العلبة المجهزة من قبل الشركات اعلاه على كل المحاليل و المواد الضرورية لعملية الاستخلاص و التنقية الدنا و كتيب خاص بطرائق العمل (ملحق رقم 1 لاطلاع).

الشكل 16 .والمخطط الآتي يلخص عملية الاستخلاص والعزل كالآتي :

شكل 16 : بعض منتجات المستخدمة في استخلاص DNA



شكل 17 : خطوات استخلاص وعزل المادة الوراثية في البكتريا السالبة لصبغة كرام

فوائد المحاليل و المواد الكيمياوية المستخدمة في الاستخلاص (مهم)

1. Ethylene diamine tetra acetic acid EDTA

يعمل على تحليل جدار الخلية وذلك لأنه يقوم بسحب الايونات الموجبة (Mg+2) والتي تحافظ على استقرارية الجدران وأغشية الخلايا .

2. $(C_{12}H_{25}Na_4S)$ Sodium dodecyl sulphate SDS

منظف ايوني يعمل على إكمال تحلل الخلايا البكتيرية عن طريق ترسيب البروتينات . كما تقوم بتفكيك الأواصر التي تربط البروتينات والشحوم في الغشاء البلازمي مما يجعلها تترسب (يحطم جدار الخلية وغشائها) ، في الأمكان أيضاً إضافة سترات الصوديوم Sodium citrate التي هي عامل تكليب Chelating agent لغرض سحب عنصر الكالسيوم من الغشاء البلازمي مما يؤدي إلى تفكك الغشاء البلازمي.

3. NaCl يتاين إلى - Cl .و+Na ويرتبط مع البروتينات ويقوم بترسيبها . كما انه يحمي النهايات الفوسفاتية السالبة الطليقة في اللولب الحلزوني مما يسمح لشريطي اللولب بالتقارب وزيادة الالتفاف مما يفصله عن محتويات الخلية الأخرى ويجعله يترسب بسهولة .
4. ايثانول100% يقوم بترسيب DNA حيث يقوم بسحب جزيئات الماء وبالتالي تحويلDNA من الشكل الذائب إلي الشكل الغير ذائب وبالتالي ترسيبه .
5. ايثانول% 70 لغسل عينه ال DNA .
6. TEويستخدم لأذابه DNA (يتكون من 50mM Tris-HCl مع20 mM EDTA).

طريقة الترحيل الكهربائي للحامض النووي الدنا Gel Electrophoresis of DNA

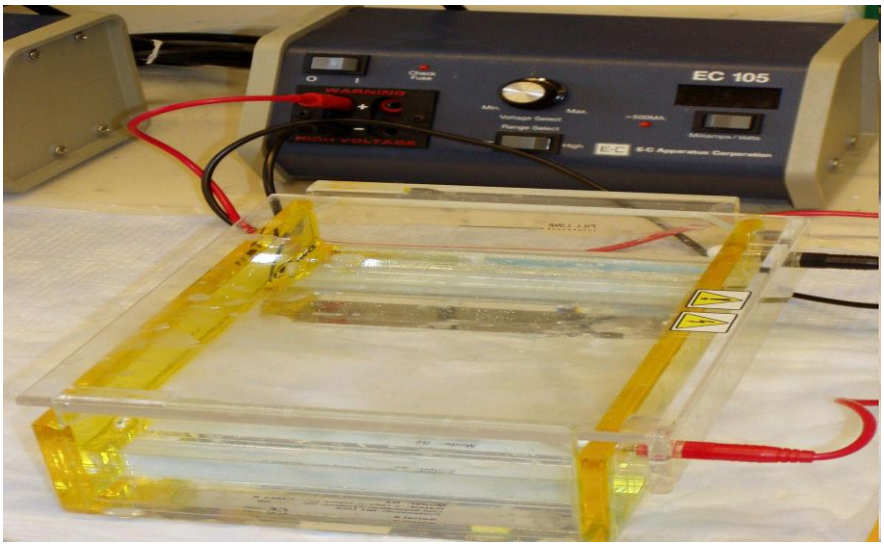
الترحيل الكهربائي وهو حركة الايونات والجزيئات المشحونة خلال وسط معين عند تسليط تيار كهربائي. بعد طريقة استخلاص الحامض النووي الدنا للتأكد من وجود الحامض النووي الدنا المستخلص من العينات المستخدمة وذلك بأجراء طريقة الترحيل الكهربائي للحامض النووي الدنا، تم الترحيل الكهربائي في هلام يتكون من ثقوب دقيقة Accurate holes، لغرض إعاقة الحركة للجزيئات المختلفة وذلك من خلال تأثيره المنخلي Sieving effect للثقوب الدقيقة اذ ان حركة الجزيئات الصغيرة تكون اسرع من الجزيئات الكبيرة فتعمل هذه الثقوب بتنظيم الحركة للجزيئات المختلفة، جزيئات الحامض النووي الدنا تحمل شحنة سالبة عندما نضع الحامض النووي الدنا في مجال كهربائي فإنه سوف يرحل من القطب السالب الى القطب الموجب اعتمادا على قوة المجال الكهربائي والمحلول الدارئ الخاص بحركة العينات في الثقوب. إن الجزيئة ذات الشحنة السالبة الانيون (Anion) تهاجر وتنجذب نحو القطب الموجب الانود (Anode) والجزيئات ذات الشحنة الموجبة الكاتيون (Cation) تهاجر وتنجذب نحو القطب السالب الكاثود. (Cathode) ان جزيئات الدنا والرنا تحمل شحنة اصلية سالبة وذلك بسبب احتواء عمودها الفقري من الفوسفات اما البروتينات فهي مختلفة الشحنات وذلك باختلاف الاحماض الامينية المتواجدة فيها ، لذلك فان المحصلة لشحنة الجزيئات لها دور كبير ومهم في تحركها داخل الهلام.

يتكون جهاز الترحيل الكهربائي Gel Electrophoresis (الشكل ادناه) من حوض كبير يحوي على قطبين سالب وموجب وحوض اخر أصغر يصب فيه الهلام ويوضع هذا الحوض داخل الحوض الكبير ومشط وجهاز ينظم التيار الكهربائي شكل 18.

.

المواد المستخدمة في طريقة الترحيل الكهربائي

1- الأكاروز Agarose
2- مادة البروميد الاثيديوم (Ethidium Bromide)
3- صبغة برومو فينول الزرقاء (DNA Loading Dye)
4- محلول بفر منظم (x TBE Buffer solution 10)
5- ماء مقطر (D.W)



شكل 18 : جهاز الترحيل الكهربائي

مراحل الترحيل الكهربائي

اولا : تحضير هلام الأكاروز

1- تم تحضير البفر بإضافة الماء المقطر بمقدار 90 مل في بيكر خاص ثم أُضيف الـ TBE بمقدار 10 مل فأصبحت الكمية 100 مل وبتركيز 1 X. إذ استخدم قالب بحجم 30 عينة نظيف 50 مل من محلول البفر في بيكر خاص يتحمل الحرارة العالية ويضاف له 0.5 غم من الأكاروز.

2- وضع البيكر الذي يحتوي على المزيج في فرن الموجات الدقيق Microwave لمدة 30 ثانية ومن ثم يخرج ويعمل له مزج ويعاد الى فرن الموجات الدقيق Microwave مرة ثانية ولمدة 30 ثانية الى ان يصل المزيج الى درجة نقاوة عالية وخالي من أي دقائق عالقة حيث تم خلال عملية الغليان اذابة الأكاروز بشكل كامل.

3- بعد ان نخرج المزيج من فرن الموجات الدقيق Microwave يترك الى ان يصل المزيج لدرجة حرارة 50 درجة مئوية بعدها نضيف له صبغة الاثيديوم بروماید بمقدار 0.2 بواسطة ماصة الكترونية ثم عمل مزج للمحلول عن طريق رج البيكر جيدا لتتجانس الصبغة مع المزيج.

4- يتم تجهيز صفيحة الاسناد Try ويثبت المشط Camp في احدى طرفي الصفيحة لصب الهلام فيها وعمل الثقوب.

5- يضاف مزيج الأكاروز في صفيحة الاسناد بعد وصول المزيج لدرجة حرارة ملائمة تجعله يتحرك بصورة انسيابية داخل صفيحة الاسناد.

6- يترك المزيج الى ان يتصلب بدرجة حرارة الغرفة.

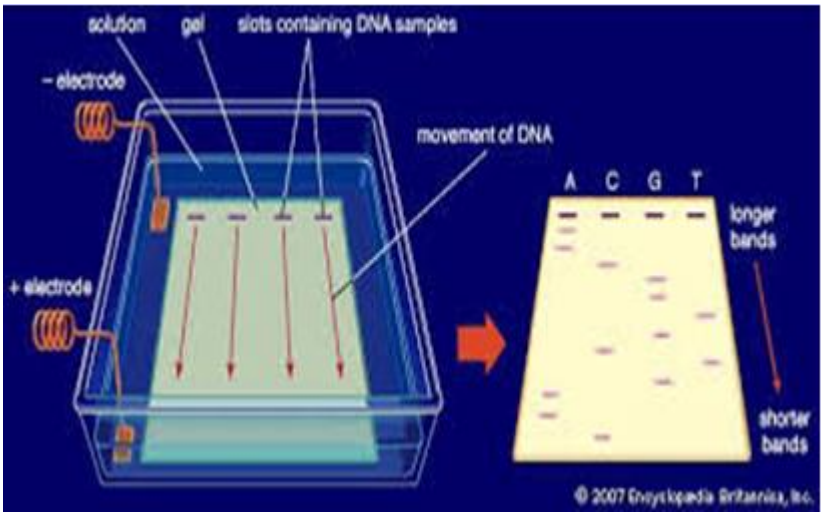
7- إزالة المشط بهدوء شديد وذلك لتجنب تصدع هلام الأكاروز وبالتالي عدم الاستفادة من الثقوب الدقيقة في الهلام.

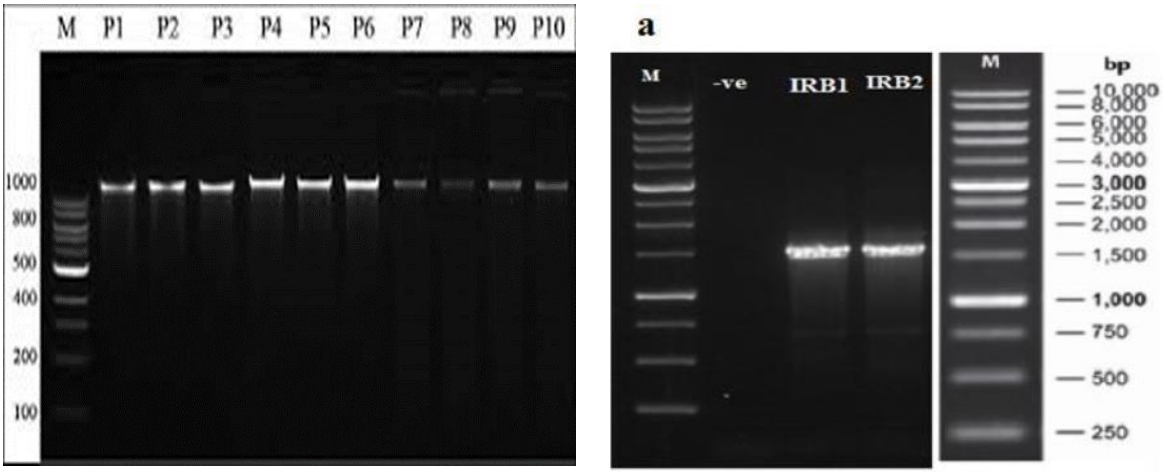
8- وضع الصفيحة المتصلبة على القاعدة الخاصة بها في وحدة الترحيل الكهربائي.

9- تغطية الهلام بمحلول بفر منظم وبهذه الطريقة سيكون الهلام مهيأً لحقن العينات.

طريقة العمل الترحيل الكهربائي

سحب 2 مايكروليتر من الصبغة الزرقاء (Bromophenol Blue) ومزجها مع 3 مايكروليتر من عينة الدنا المستخلص باستعمال الماصة الاوتوماتيكية ومزجها جيدا لتتجانس العينة، بعدها تحقن العينة الممزوجة بشكل دقيق في الثقوب الدقيقة (Accurate holes) لهلام الأكاروز، من ثم يشغل الجهاز على طاقة كهربائية مقدارها 100 فولت، وبتيار كهربائي 40 ملي امبير، ولمدة 45 دقيقة بعدها يتم فصل التيار الكهربائي وسحب قطعة الهلام من الجهاز. يتم الكشف عن حزم الدنا باستعمال جهاز مطياف الاشعة فوق البنفسجية الذي يعطي مشاهدة صورية لحزم الدنا . تصور الحزم الملونة بصبغة الاثيديوم بروميد بجهاز التوثيق الفوتوغرافي بأستخدام الاشعة فوق البنفسجية





شكل 19 :طريقة عمل جهاز الترحيل الكهربائي

a.Agarose gel electrophoresis of DNA extraction

,b. A garose gel electrophoresis of purified 16S rDNA for IRB1 and IRB2

تقنية التفاعل البنائي التتابعي Polymerase Chain Reaction (PCR)

تحفظ المعلومات الوراثية وغيرها داخل الحمض النووي DNA. وتقوم الخلية بمضاعفة كمية الحمض النووي وقت انقسام الخلية بشكل تلقائي وبشكل سريع مع وجود نظام تصحيح للأخطاء خلال النسخ. وتبلغ سرعة النسخ والمضاعفة الى 1000 قاعدة نيتروجينية بالثانية (داخل النظام الحيوي). ومع التطور في مجال التكنولوجيا الحيوية والذي يقوم على التعامل مع الحمض النووي DNA بشكل اساسي، استدعى ذلك العلماء الى ان يبحثوا عن طريقة او تقنية تقوم على مضاعفة كمية الحمض النووي DNA بشكل كبير، فكان هنا عدة محاولات لتحفيز الخلية على الانقسام المستمر بإضافة عوامل النمو Growth Factors، ولكن لم تكن هذه الطريقة ذات جدوى لدى العلماء لأسباب كثيرة، الى ان قام العالم Dr Kerry Mullis في عام 1985 والحاصل على جائزه نوبل في الكيمياء عام 1993 بنشر اختراعه لتقنية PCR فكانت هذه التقنية البوابة لكثير من التطورات المتسارعة في مجال التكنولوجيا الحيوية، من اهم الاسباب التي ساعدت هذه التقنية على الانتشار هو عدم اعتمادها على النظام الحيوي (أي الخلية) والتحكم بكمية الحمض النووي DNA والسرعة في الانتاج، ولكن كان من عيوب هذه التقنية عدم وجود نظام اصلاح عند حدوث أي ارتباط خاطئ Miss match.

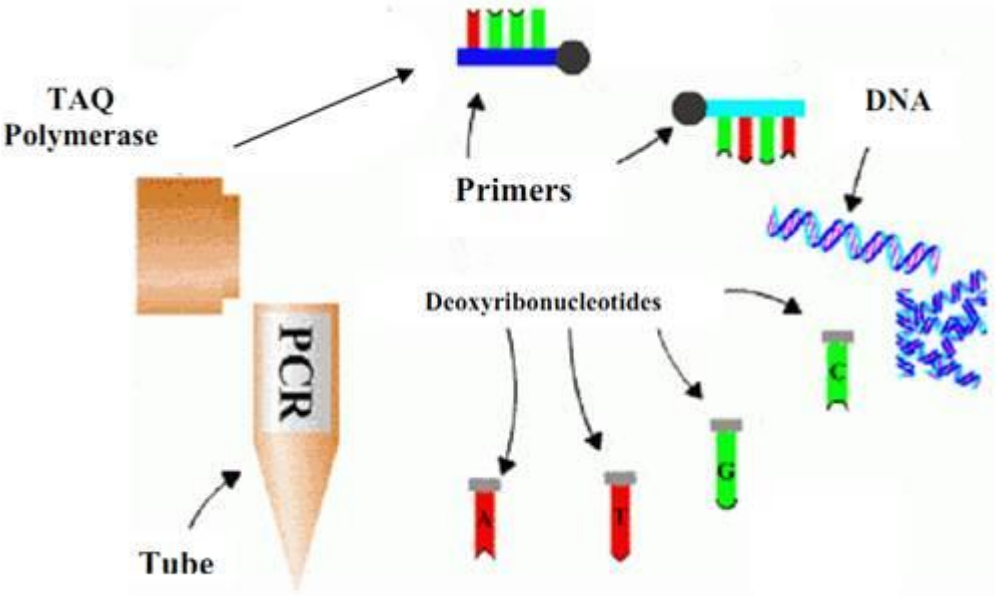
تعريف تقنية التفاعل البنائي التتابعي؟

هي تقنية عملية تقوم على اكثار نسخ الحمض النووي DNA خارج النظام الحيوي. أي انها طريق لنسخ الحمض النووي معمليا ولك فهي تقنية حيوية لاستنساخ قطعة من محددة من الحمض النووي ومضاعفة انتاجها لكي يتسنى اجراء اختبارات وفحوصات اضافية.

متطلبات تقنية التفاعل البنائي التتابعي PCR of Technology Requirements

يتطلب امر انتاج الحمض النووي DNA بواسطة PCR توفير الاحتياجات الاتية:

1. جهاز للتحكم في درجات حرارة التفاعل بشكل دقيق ومتتالي (الدورة الحرارية Thermo cycle) حيث يقوم هذا الجهاز بتغيير درجة الحرارة بشكل سريع، لان تغيير درجة الحرارة هو الاساس الذي تقوم عليه فكرة هذه التقنية.
2. انزيم DNA polymerase لبناء ترتيب القواعد النيتروجينية (وحدات الحمض النووي DNA)، ويجب ان يكون هذا الانزيم مقاوم للحرارة العالية ليتمكن من العمل، على اية حال، يعد Tag Polymerase من الانزيمات المقاوم للحرارة العالية.
3. وجود مجموعة متفرقة من القواعد النيتروجينية: (T – C – G-A) ليتمكن الانزيم من ترتيبها في مواقعها اثناء عملية نسخ الحمض النووي DNA .
4. وجود بادئ Primer وهو عبارة عن قطعة صغيرة من الحمض النووي DNA ليتمكن الانزيم من بدء البناء والنسخ عليها.
5. وجود نسخة من الحمض النووي DNA المراد نسخه.
6. وجود محلول او سط ليتم به التفاعل وهذا المحلول يختلف من تفاعل واخر. ويوضح شكل (1) متطلبات تقنية التفاعل البنائي التتابعي.



شكل 20: متطلبات تقنية التفاعل البنائي التتابعي (PCR)

عملية النسخ Replication Technique

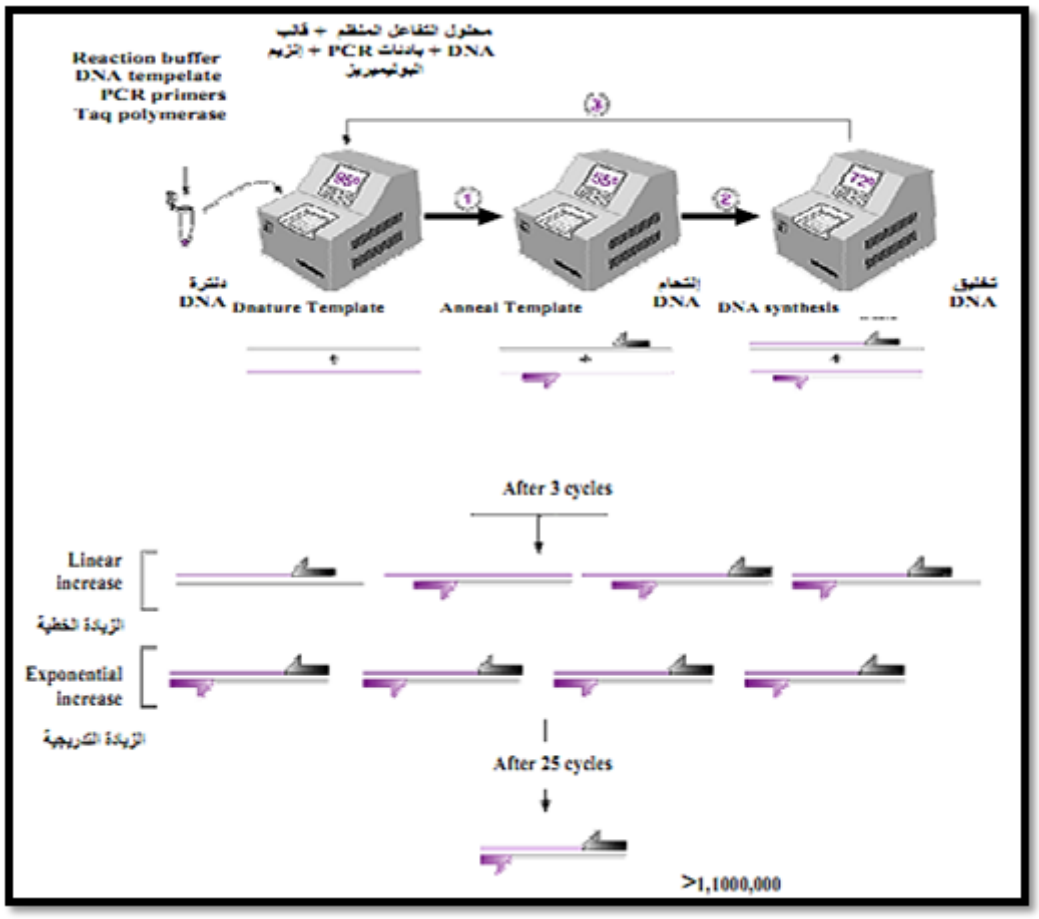
بعد وضع الحمض النووي المراد نسخه مع البادئ وانزيم البوليمريز ومجموعة من الاحماض النووية من انبوب داخل جهاز التحكم الحراري فان عملية النسخ تمر بثلاث مراحل منفصلة (أشكال 20– 21 – 22) :

1. مرحلة التفكيك او الدنترة Denature : وتتم برفع درجة الحرارة الى 95 م وذلك لفك الحمض النووي DNA الاصلي.
2. مرحلة الالتصاق او الالتحام anneal : وتتم بخفض درجة الحرارة الى ما بين 55-60 م ليقوم البادئ بالالتصاق فيزيائياً بواسطة الروابط الهيدروجينية مع الحمض النووي DNA الأصلي.
3. مرحلة التمدد extend : وتتم برفع درجة الحرارة الى 75م ليقوم انزيم البوليمريز بعمله في بناء الحمض النووي DNA الجديد.

وهذه المراحل الثالث تعتبر دورة كاملة وفيها يصبح الحمض النوويDNA الاصلي قد تضاعف، وتعتمد كمية ناتج الحمض النووي على عدد الدورات التي يتم انجازها.

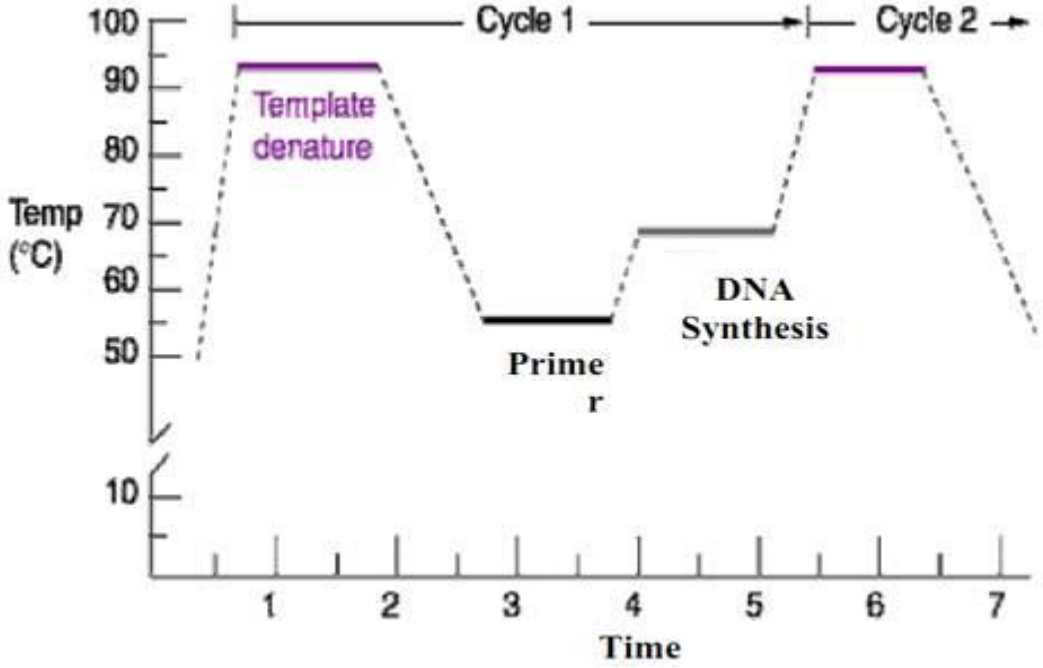
وإذا اخذنا في الاعتبار عدد دورات PCR وعدد النسخ الناشئة، يمكن ايجازها في الجدول الاتي

عدد الدورات	١	٢	٤	١٠	١٥	٢٠
عدد النسخ	٢	٤	١٦	١,٠٢٤	٣٢,٧٦٨	١,٠٤٨,٥٧٦



اشكال 21: الدورات الحرارية ومراحل التفاعل التسلسلي في تقنية PCR

وإذا اخذنا في الاعتبار درجات الحرارة والمراحل الحرارية المختلفة لهذه التقنية يمكن الوصول الى شكل (3) الاتي:: :



شكل 22 : الدورات الحرارية ومراحل التفاعل التسلسلي في تقنية PCR

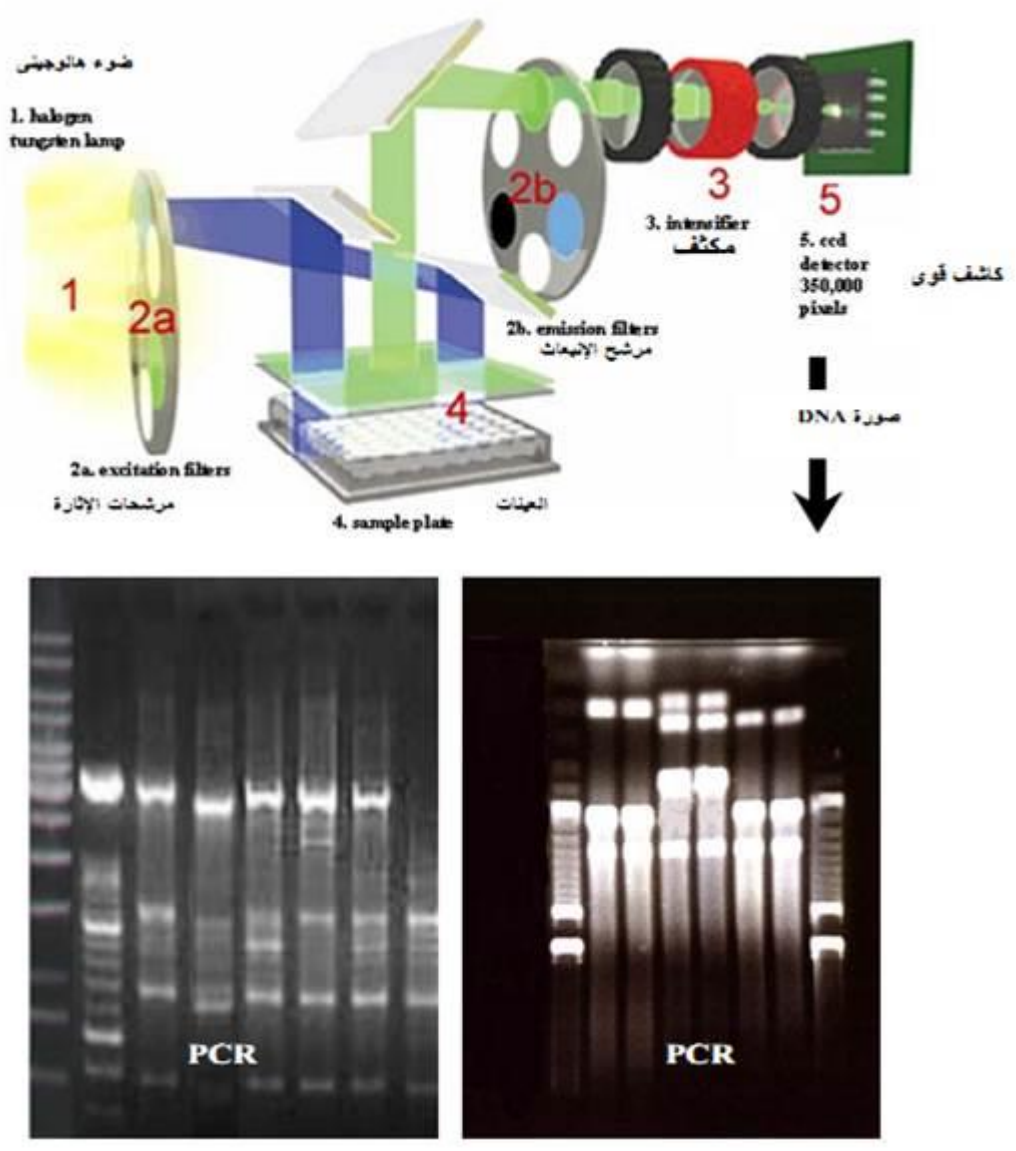
استخدامات تقنية التفاعل البنائي التتابعي Applications of PCR

- لتقنية PCR استخدامات عديدة في مجال ابحاث الحمض النووي والوراثة ومنها:
- الكشف عن الطفرات الوراثية: وذلك عن طريق وضع بادئ (بريمر) خاص للطفرة لإكثار الجين الخاص بها، ومنه نقوم بمعرفة المرض اذا كان على زوجي الكروموسومات او على احداهما (أليل allele).
- تحديد البصمة الوراثية.
- الكشف عن الفيروسات وهي الوسيلة الادق في تحديد نوع وجنس الفيروس وكميته.
- اكثار الجين المراد ادخاله على البلازميد او الحمض النووي DNA المضيف وهو العنصر الاهم في عملية التجميع الجيني Recombinant DNA.
- تغيير نهايات الجين لتصبح متوافقة مع انزيمات القطع Restriction enzymes
- تحديد تتابع القواعد النيتروجينية في الحمض النووي DNA Sequencer.
- معرفة طول الحمض النووي DNA.
- تحديد الجين المطلوب من خليط من الجينات.
- يستخدم في تقنية Microarrays.
- في مشروع الخريطة الجينية Genome map.
- الساوثرن بلوت Southern plot أو تهجين الاحماض النووية.
- تقنية ارتباط الحمض النووي DNA بالبروتين DNA-Protein Interaction
- في مجال الطب الشرعي (اختبار الابوة، حالات الاغتصاب، تحديد الهوية.. إلخ) وغيرها من الاستخدامات المعملية البحثية.

شكل 23 : جهاز Real Time PCR المستخدم في تفاعل PCR

أنواع تقنية التفاعل البنائي التتابعي Types of PCR

- هناك نوعان من التفاعل البنائي التتابعي يمكن ايجازها في الاتي:
- التفاعل البنائي التتابعي العادي وهو ما تم سرده والتطرق اليه في الخطوات السابقة Normal PCR
- التفاعل البنائي التتابعي باستخدام الكمبيوتر Computerized Real Time PCR
- وهذا النوع يقوم على نفس المبدأ ولكن الخلاف الوحيد هو ربط جهاز PCR بكمبيوتر لتحديد الوقت الحقيقي لبدا التفاعل ومن ثم الكمية الحقيقية لعدد نسخ الحمض النووي DNA. ويعتمد ذلك على وجود قواعد نيتروجينية حرة مشعة لتحديد ذلك، مما يسهل على الباحثين تقدير الوقت لتحديد مدى وجود الجين المطلوب من عدمه، وكمية الجين بدون الوصول الى نهاية



شكل 29: نواتج التفاعل البنائي المتسلسل

مميزات و عيوب تفاعل البلمرة المتسلسل(PCR)

إن تفاعل البلمرة المتسلسل يشمل العديد من التطبيقات واسعة المجال و التى تعتمد اساسا على ثلاث ميزات أساسيه له وهى:-

1. سرعة وسهولة إستخدامه:-

فإستنساخ ال (DNA)بواسطة تفاعل البلمرة المتسلسل يطبق خلال ساعات قليلة فهو يتكون من 30 دوره تتضمن تفكيك و تكوين وإعادة تركيب شريط جديد من (DNA) فى خلال دوره واحده مدتها من 3 إلى 5 دقائق .

2. حساسيته:-

تفاعل البلمره المتسلسل قادر على مضاعفة التتابعات من كميات صغيرة من ال(DNA) المستهدف مما له تطبيقات عديده كما فى الطب الشرعى عندما تحتوى العينه على كميه ضئيله من الخلايا .

3. قوته:-

تفاعل البلمرة المتسلسل يسمح بمضاعفة تتابع بعينه من (DNA) والذى يمكن إحضاره من وسط يصعب فيه عزل ال(DNA)التقليدى .

- **عيوبه**

1. الحاجة إلى معرفة تتابع الجين المستهدف
2. محدودية الكميات المنتجة من ال(DNA).
3. عدم دقة النسخ

حيث أن إنزيم (Taq polymerase) ليس له القدرة على تصحيح الاخطاء (proof reading).