تأسيس المكتبات الوراثية

أ.د. ماهر محمد شحاته

وضعت قوانين مندل لعلم الوراثة في النصف الثاني من القرن التاسع عشر، واقترح مسمى علم الوراثة في بداية القرن العشرين، وتبع ذلك العديد من الاكتشافات كان أهمها فك لغز المادة الوراثية عام ١٩٢٨ م واكتشاف شكل الدنا عام ١٩٥٣م. ومنذ ذلك الوقت كان إجراء الأبحاث على الدنا من أصعب الأمور، وكانت معظم الأبحاث تجرى بشكل غير مباشر على الرنا أو البروتين. ولكن الحال تحول بشكل كامل مع بزوغ مسمى الهندسة الوراثية عام ١٩٧٠م، حيث نجح العلماء في استنساخ هرمون الإنسولين. ومع توالي الاكتشافات وتطور التقنيات أصبح من السهل صنع نسخ عديدة من أي مورث أو مقطع محدد من الدنا. كما استطاع العلماء استكشاف المورثات الموجودة على الصبغيات وتغييرها وتعديلها بالشكل الذي يريدون، وليس هذا فحسب بل استطاعوا أن يعيدوا هذه المورثات المعدلة إلى الخلية وغرزها في الصبغي الذي يريدون. كما أمكن إنتاج كميات كبيرة من البروتينات كالهرمونات واللقاحات المختلفة والتي كانت تنتج في السابق من الجثث الميتة أو تستخلص من الحيوانات والتي كانت تحفها المخاطر من انتقال العدوى إلى الإنسان. وقد فتحت هذه الثورة العلمية المجال أمام العلماء لاختراع واكتشاف طرق جديدة وحديثة في التعامل و حفظ و تغيير هذه المادة الحيوية في الإنسان و الحيوان والنبات بواسطة المكتبات الوراثية.

يتناول هذا المقال تأسيس المكتبات الوراثية مع إعطاء فكرة عن إنزيمات القطع المحدد وتقنيات التشفيف (الطبع) للمادة الوراثية، وكيفية استخدامها لعمل المكتبات الوراثية، لتسهيل دراسة وتخزين وحفظ أصول المادة الوراثية، وسهولة تناولها في الدراسات البحثية والتطبيقية، خاصةً في عمليات الاستنسال الوراثي.

إنزيمات القطع

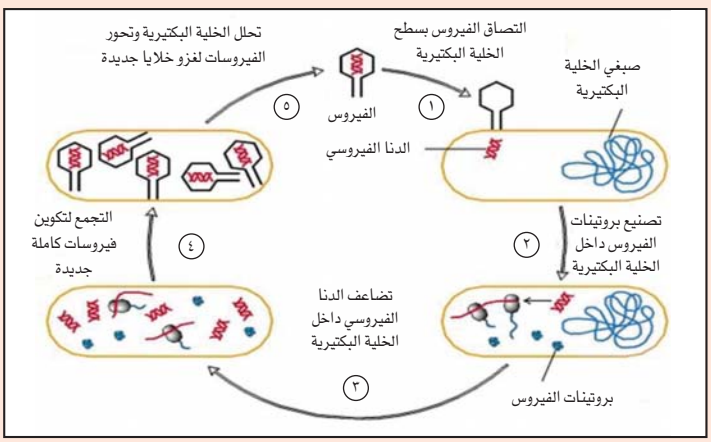
يتم قطع المادة الوراثية (الدنا) بالعديد من الإنزيمات، فمنها التي تقطعها على أطرافها الخارجية، وتسمى إنزيمات القطع الخارجية (Exonucleases)، ومنها التي تقطعها داخليا وتسمى إنزيمات القطع الداخلية (Endonucleases)، وهذا النوع من الإنزيمات قد يقطع الدنا بطريقة عشوائية مثل (DNase)، وتستخدم لهدم الدنا والتخلص منه، ومنها مايقطعه بطريقة منظمة وتسمى إنزيمات القطع المحدد أو إنزيمات القصر (Restriction enzymes)، وهي إنزيمات تتعرف على تتابعات محددة من الدنا وتقطعها في مناطق معينة إلى قطع عديدة، يمكن استخدامها على نطاق واسع في مجال الهندسة الوراثية وخاصة في عملية الاستنسال الوراثي.

اكتشاف إنزيمات القطع المحدد

تم اكتشاف هذا النوع من الإنزيمات في منتصف السبعينات من القرن العشرين بواسطة مجموعة من العلماء (Danna& Arber, Smith & Wilcox, Nathans)، وذلك عندما لاحظوا مهاجمة اللاقمات (الفيروسات) البكتيرية (Bacteriophage)، للخلايا البكتيرية لتحللها ثم تتحرر منها لغزو خلايا بكتيرية جديدة، إلا أنهم اكتشفوا أن تلك الخلايا البكتيرية لا زالت حية دون تحلل، وذلك لعدم قدرة اللاقمات على استكمال دورتها داخل تلك الخلايا، وقد وجد العلماء أن السبب في عدم تحلل الخلايا البكتيرية أنها تُفرز إنزيمات قطع تهاجم الدنا الفيروسي للاقمة وتقطعه مؤدية إلى خلل في شفرته الوراثية المسؤولة عن التضاعف وتصنيع الغلاف البر وتيني وعدم تكون فيروسات جديدة. وقد أكد هؤلاء العلماء أن الدنا البكتيري (Bacterial DNA) لا يهاجم بتلك الإنزيمات، حيث أنه يحمل مجموعات مثيل (Methyl groups) – في أماكن قطع تلك الإنزيمات– تحميه من التقطيع.

أنواع إنزيمات القطع المحدد

هناك ثلاثة أنواع من إنزيمات القطع المحدد، هي:



■ دورة حياة الفيروس داخل الخلية البكتيرية وتحرر فيروسات عديدة لغزو خلايا بكتيرية جديدة .

● **النوع الأول**

يتعرف هذا النوع على تتابعات محددة من الدنا إلا أنه لا يقطعها؛ بل يقوم بقطع تتابعات أخرى في أماكن بعيدة عنها على مسافات قد تصل أحيانا إلى ١٠٠٠ نيوكليوتيدة، و يقوم هذا الإنزيم بوظيفتي القطع والتحوير، وذلك طبقا لنوع وتركيز عامل الحفز المستخدم، إلا أن هذا النوع لا يستخدم في تجارب الاستنسال الوراثي.

● **النوع الثاني**

يتكون هذا النوع من تحت وحدتين (Twosub-units) بروتينيتين (kDa 25-20)، إحداهما تقوم بعملية القطع والأخرى تقوم بعملية التحوير. ويتميز هذا الإنزيم بأنه يقطع داخل التتابع الذي يتعرف عليه ليعطي إما نهايات مستوية (Blunt end) - مزدوجة النيوكليوتيدات - أو نهايات لزجة (Sticky end)، لها بروزات مفردة النيوكليوتيدات.

تتراوح التتابعات التي يتعرف عليها هذا النوع من إنزيمات القطع بين الرباعية إلى الثمانية (4-8 bp)، أي من أربعة إلى ثمانية أزواج من النيوكليوتيدات المتقابلة على الدنا، ويكون اتجاه القطع من (`3 - `5)، وهذا النوع شائع استخدامه في تجارب الاستنسال الوراثي.

● **النوع الثالث**

يتعرف هذا النوع على تتابعات محددة من الدنا - مثل النوع الأول - ويقطع أيضا في أماكن بعيدة عن تلك التتابعات، ولكن على مسافات أقل تصل إلى حوالي ٢٥ نيوكليوتيدة. وهناك نوعان من هذا الإنزيم أحدهما للقطع والثاني للتحوير، ويشتركان في التركيب بتحت وحدة مشتركة (share a common submit)، ولا يستخدم هذا الإنزيم في تجارب الاستنسال الوراثي.

تسمية إنزيمات القطع المحدد

يشتق اسم الإنزيم من البكتيريا التي يتم عزله منها. و يوجد حاليا حوالي ٢٥٠٠ إنزيم قطع، لا يستخدم منها على نطاق تجاري واسع إلا قرابة ٦٠٠ إنزيم فقط.

تتم تسمية إنزيم القطع كالتالي:

١- يمثل الحرف الأول من اسم الإنزيم الحرف الأول من اسم الجنس (Genus) البكتيري التابع له.

٢- يمثل الحرفان الثاني والثالث من اسم الإنزيم الحرف الأول والثاني من اسم النوع (Species) البكتيري له.

٣- يعبر الحرف الرابع (أحيانا) عن السلالة (Strain) البكتيرية الخاصة به.

٤- ينتهي الاسم برقم لاتيني (Latin Numeral No) يعبر عن أسبقية عزل الإنزيم من السلالة البكتيرية التابع لها.

يوضح المثال أدناه كيفية تسمية أحد إنزيمات القطع(EcoRI)، حيث يمثل الحرف الأول من اسم الإنزيم (E) الحرف الأول من اسم الجنس البكتيري (Escherichia)، والحرف الثاني والثالث (co) يمثلان الحرفين الأول والثاني من اسم النوع البكتيري (coli)، بينما يعبر الحرف الرابع (R) عن السلالة البكتيرية (RY13)، وينتهي اسم الإنزيم بالرقم اللاتيني (I) الذي يمثل أسبقية عزله من السلالة البكتيرية، حيث توجد إنزيمات أخرى تنتهي برقم II و III وهكذا.

صفات إنزيمات القطع المحدد

تتميز إنزيمات القطع المحدد بعدة صفات منها:

١- يمكنها التعرف على تتابعات محددة، وقطعها في مناطق معينة لتعطي نهايات مستوية أو نهايات لزجة.

٢- قد يكون التتابع الذي يتعرف عليه الإنزيم رباعي أو خماسي أو سداسي أو سباعي أو ثماني (4-8 bp)، إلا أن الشائع منها هو التتابع السداسي (6 bp).

٣- يسمى التتابع الذي يتعرف عليه الإنزيم باليندرومي (Palindromic) أي يقرأ من اليسار إلى اليمين (`3 - `5) على أحد الخيطين، وبالطريقة نفسها من اليمين إلى اليسار (`3 - `5) على الخيط المقابل. و ينطبق هذا على التتابعات الزوجية فقط، ومثال لذلك التتابع (`3-GAATC-`5) و (`5-GAATC-`3) الخاص بإنزيم (Ecore1).

٤- تسمى بعض الإنزيمات (Isoschizomeric) بمعنى أن التتابع نفسه يتعرف عليه إنزيمان مختلفان ويقطعه كل منهما، بطريقة مختلفة عن الآخر، ومثال ذلك يتعرف إنزيمي (SmaI & XmaI) على التتابع (`5-CCCGGG-`3) ويقطعه كل منهما حيث يقطعه الإنزيم (XmaI) ليعطي نهاية لزجة، بينما يقطعه الإنزيم (SmaI) ويعطي نهاية مستوية.

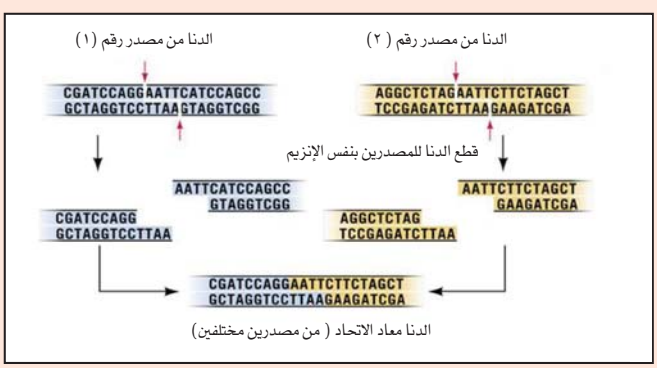
٥- تكوّن بعض التتابعات عائلة تشترك جميعها في جزء كبير من التتابع (Degenerate)، ويقطعها إنزيم واحد بالكيفية نفسها. ومثال ذلك التتابع الخاص بالإنزيم (HinfI) الذي يتعرف على التتابع (`5–GANTC-`3) حيث (N) قد تكون أي من القواعد الأربعة (A, T, G or C). حيث يقطع الإنزيم بين (A,G) ويعطي نهايات لزجة.

إنزيمات القطع المحدد في المختبرات

يقوم الباحث - في البداية - بتقسيم العمل (بإنزيمات القطع) في التجارب المعملية إلى ثلاث مراحل هي:

● **قبل القطع**

تشمل هذه المرحلة تحضير مخلوط التفاعل - بتركيزات محسوبة - المحتوي على الدنا، والإنزيم، ومنظم الرقم الهيدروجيني، وحجم محدد من الماء، ويحدد



■ استخدام إنزيمات القطع المحدد وإنزيمات الربط لدمج الدنا من مصدرين .

■ التتابع النيوكليوتيدي الذي يتعرف عليه إنزيم القطع (SmaI) ومكان القطع (السهم الأخضر) ليعطي نهايات مستوية.

■ التتابع النيوكليوتيدي الذي يتعرف عليه إنزيم القطع (EcoRI) ومكان القطع (السهم الأخضر) ليعطي نهايات لزجة.

الحجم الكلي للمخلوط بين ٢٠إلى٥٠ ميكروليتر.

● **مرحلة القطع**

عند إجراء عملية القطع في المختبر يجب مراعاة التالي:

١- يتراوح حجم مخلوط التفاعل من ٢٠ إلى ٥٠ ميكروليتر (Ml).

٢- يعبر عن تركيز الدنا بالميكروجرام/ميكروليتر (µg/µl).

٣- يعبر عن تركيز الإنزيم بالوحدة، و هي كمية الإنزيم اللازمة لقطع واحد ميكروجرام من الدنا عند درجة الحرارة المثلى للإنزيمات (تتراوح من ٢٥ °م إلى ٦٥ °م ولكن معظم الإنزيمات درجتها المثلى ٣٧ °م) في زمن قدره ساعة.

٤- تبلغ حرارة التحضين (Incubation temp) لمعظم الإنزيمات حوالي ٣٧ °م ماعدا بعض الإنزيمات التي قد تحتاج إلى درجة حرارة أعلى (مثل إنزيم TaqI عند ٦٥ °م) أو درجة حرارة أقل (مثل إنزيم SmaI عند ٢٥ °م).

٥- يتراوح زمن التحضين ما بين ساعة إلى أربع ساعات، حيث إن طاقة الحركة لمعظم إنزيمات القطع لا تتعدى ٤ ساعات.

٦- يتراوح الرقم الهيدروجيني لمخلوط التفاعل (pH) بين (7.4 - 7.6)، ويتم التحكم فيه بمكونات المنظم المحتوي على مادة (Tris) وذلك لضبط (pH)، ومركب كلوريد المغنسيوم ($MgCl_2$) كعامل مساعد لنشاط الإنزيم، و (DTT:Dithiothrietol) الذي يعمل كمثبت له.

● **مرحلة ما بعد القطع**

تتمثل هذه المرحلة في تحميل العينات (بشرية، وحيوانية، ونباتية) على هلام الأجاروز؛ وذلك لفصل قطع الدنا وتصويرها وتحليلها.

تطبيقات إنزيمات القطع

تستخدم إنزيمات القطع المحدد في عدة تطبيقات منها ما يلي:

● **في الإنسان**

يتم استخدام إنزيمات القطع في الطب الشرعي لإثبات البنوة، والتعرف على مرتكبي بعض الجرائم، وفي قضايا العنف، وجرائم الاعتداء الجنسي، وقضايا الهجرة، وقضايا المفقودين، وتحديد شخصية صاحب اللعاب الموجود على طوابع البريد ومظاريف الرسائل، وذلك في حالة الطرود الملغومة، ورسائل التهديد والاختطاف، وكذلك اختبار سبب الموت المفاجئ في صغار السن، واستبعاد أي شبهة جنائية(وذلك باكتشاف الطفرة الناتجة من تكرار تعرض الشخص لتصلب الشرايين التاجية) ، فضلا عن تحديد نقاوة السلالة البشرية عن طريق رصد الاختلاط بين الأعراق والأجناس، وبيان القارة التي ينحدر منها شخص ما، عن طريق مقارنة نتائج التحليل مع قاعدة البيانات الخاصة بمجموعات لأشخاص من القارات المختلفة.

● **في النبات والحيوان والكائنات الدقيقة**

يمكن استخدام إنزيمات القطع في عمل البصمات الوراثية، وذلك للتعرف على الأنواع والسلالات ودراسة العلاقات التطورية بينها، والاستفادة منها في علم التقسيم الجزيئي.

كذلك يستفاد من إنزيمات القطع في عمل البصمات للدراسات والعلاقات التطورية في تحضير الدلائل الجزيئية (DNA markers or ladders) التي تستخدم كأساس لمقارنة أوزان وأحجام الدنا عند الفصل الكهربائي.

ومثال ذلك استخدام (λ DNA virus) وتقطيعه بإنزيم قطع مثل (HindIII)، ويمكن من خلال تطبيق بعض المعادلات حساب عدد الأماكن التي يتعرف عليها هذا الإنزيم، وعدد القطع الناتجة عنه وذلك كما يلي:

عدد الأماكن التي يقطع فيها الإنزيم = طول الدنا معبرا عنه بالقواعد ÷ ٤ مضروباً في أس عدد القواعد التي يتعرف عليها الإنزيم. فمثلاً (λ AND) طوله (٤٨٥٠٠ bp)، وإنزيم (HindIII) يتعرف على تتابع سداسي ٦ فيكون عدد الأماكن التي يقطع فيها الإنزيم = ٤٨٥٠٠ ÷ $٤^{٦}$ = ١١,٨

عدد القطع = عدد الأماكن + ١

= ١١,٨ + ١ = ١٢,٨

ومن الجدير بالذكر أن عدد القطع الناتجة يظهر أقل من ذلك عند وضع العينة على هلام الأجاروز حيث إن بعض القطع الصغيرة تمر بسرعة وتتلاشى داخل السائل المنظم.

تقنيات الطبع

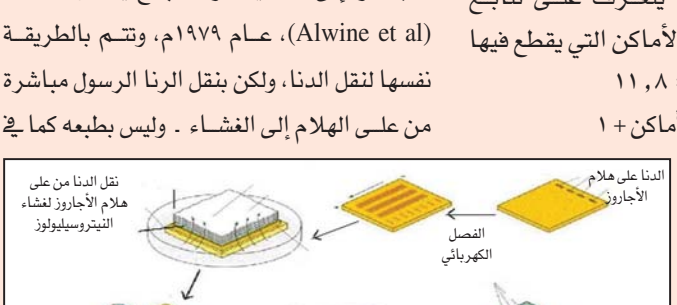
يتم التعامل في مختبرات التقنية الحيوية مع ثلاثة مكونات أساس من الجزيئات الأحيائية الكبيرة (Macromolecules) والهامة، وهي الدنا، والرنا، والبروتين، والتي يجب الحصول عليها في صورة جافة لسهولة حفظها لفترات طويلة، ولإجراء العديد من الدراسات التكميلية والتأكيدية عليها. ولذلك فقد وضعت تقنيات مختلفة للطبع (Blotting) لنقل تلك المركبات من على هلام الفصل الكهربائي إلى أغشية من النايلون أو النيتروسيليلوز (Nylon or nitrocellulose membranes). ومن أهم هذه التقنيات ما يلي:

● **طبعة سازورن**

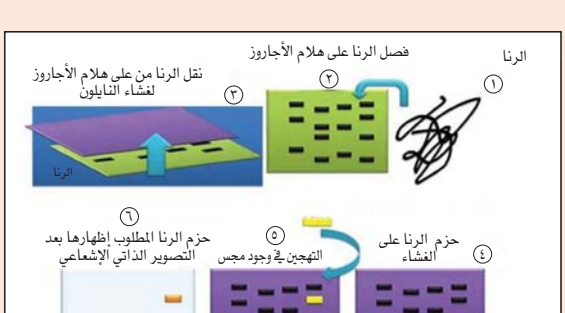
تستخدم طبعة سازورن (Southern blot) في نقل الدنا من على هلام الأجاروز إلى الأغشية، وقد سميت بهذا الاسم نسبة إلى العالم **سازورن** الذي نجح في تطبيقها عام ١٩٧٥م، وقد حاول هذا العالم نقل الرنا إلا أنه لم يوفق. وتتم هذه التقنية بتقطيع الدنا بواسطة إنزيمات القطع، ثم فصله على هلام الأجاروز، ويلي ذلك استخدام وسط قاعدي لفصل الدنا المزدوج إلى دنا مفرد، ثم وضع الغشاء فوق الهلام لأخذ طبعة منه، وتهجينه في وجود مسبار أو مجس (probe) من الدنا لإظهار أماكن خاصة لمورث أو أكثر، وهي طريقة تستخدم لعمل البصمات الوراثية.

● **طبعة نورثيرن**

تستخدم هذه الطبعة في نقل الرنا من على هلام الأجاروز إلى الأغشية. وقد نجح في نقلها العلماء (Alwine et al)، عام ١٩٧٩م، وتتم بالطريقة نفسها لنقل الدنا، ولكن بنقل الرنا الرسول مباشرة من على الهلام إلى الغشاء . وليس بطبعه كما في



■ خطوات تقنية طبعة سازورن .

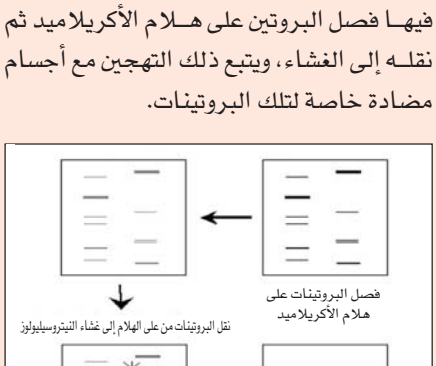


■ خطوات تقنية طبعة نورثيرن .

حالة الدنا، ثم التهجين مباشرة بواسطة مجس (Probe) من الدنا أو الرنا.

● **تقنية ويسترن**

تُعنى هذه التقنية بنقل البروتين من على هلام الأكريلاميد إلى الأغشية. وقد نجح في نقلها العالم (Burnettee) عام ١٩٨١م، و يتم فيها فصل البروتين على هلام الأكريلاميد ثم نقله إلى الغشاء، ويتبع ذلك التهجين مع أجسام مضادة خاصة لتلك البروتينات.



■ خطوات تقنية طبعة ويسترن .

المكتبة الوراثية

المكتبة الوراثية (Gene library) عبارة مصطلح يستخدم عند تجميع قطع الدنا المشتقة من مورث أي كائن حي، ومحمولة على نواقل وراثية خاصة (Cloning vectors) ، حيث يحمل كل ناقل قطعة من الدنا ذات طول محدد تختلف عن القطع المحمولة على الناقل الآخر وهكذا.

● **أنواع المكتبات الوراثية**

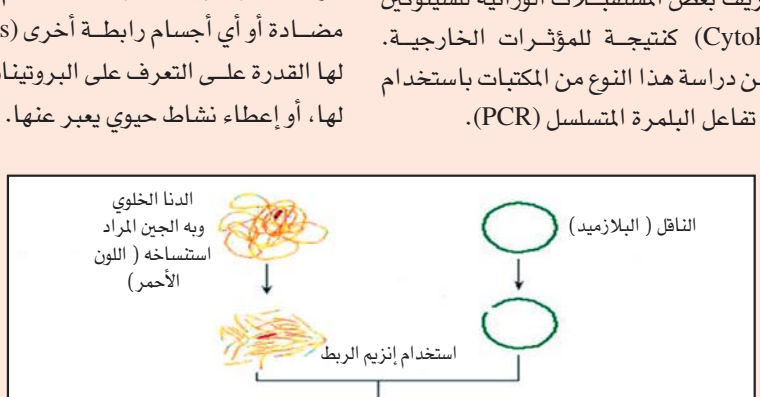
تنقسم المكتبات الوراثية إلى أربعة أنواع هي:

■ **مكتبة الجينوم** (Genomic library): ويتم الحصول عليها بتقطيع الدنا الخلوي بإنزيمات القطع وتحميله على النواقل الوراثية، بمساعدة إنزيمات الربط أو اللصق (Ligases)، ويمتاز هذا النوع بوجود الأجزاء الخاصة بالإنترونات مع الإكسونات على النواقل الوراثية، ولذلك تستخدم في الدراسات الوراثية.

■ **تحت مكتبة الجينوم:** ويتم الحصول عليها بتقطيع الدنا الخاص بعدد محدد من الصبغيات وتحميله على النواقل الوراثية.

■ **مكتبة الدنا المكمل:** ويتم الحصول عليها بفصل الرنا الرسول وتحويله إلى الدنا المكمل (cDNA) بإنزيم النسخ العكسي (Reverse transcriptase). تمثل هذه المكتبات الأجزاء المشفرة فقط من المورثات (أي الإكسونات دون الإنترونات)، وعليه فإن أطوالها في معظم الأحوال أقصر من الطول الأصلي للمورث (بالإكسونات والإنترونات). ويمكن استخدام تلك المورثات مباشرة وبسهولة في دراسة التعبير عن البروتينات المشفرة لها تلك المورثات.

■ **المكتبات المتمايزة (Differential library):** وتستخدم في دراسة المورثات ذات التعبير الوراثي المختلف طبقا للظروف المؤثرة مثل المؤثرات البيئية، وأهم ما يتميز به هذا النوع من المكتبات هو استنسال مورثات غير معروف تتابعها أو وظائفها. وقد استغلت هذه المكتبات في تعريف بعض المستقبلات الوراثية للسيتوكين (Cytokine) كنتيجة للمؤثرات الخارجية. ويمكن دراسة هذا النوع من المكتبات باستخدام تقنية تفاعل البلمرة المتسلسل (PCR).



■ طريقة الحصول على مكتبة الجينوم.

طرق فصل المورثات من المكتبة

هناك عدة تقنيات مختلفة تستخدم لفصل وعزل مورثات محددة من داخل مكتبة المورثات، ومن أهم تلك التقنيات:

● **المجسات**

المجسات (Probes) عبارة عن قطع قصيرة ذات أطوال محددة من الدنا المفرد (Short Single-stranded)، ومميزة بوجود مادة مشعة أو كيميائية، ولها تتابع مكمل لجزء يخص المورث المرغوب فصله.

● **تغيير ظروف التهجين**

يمكن فصل مجموعة من المورثات – تكون مايسمى بالعائلة الوراثية (Gene family)– بواسطة تغيير ظروف التهجين. تغيير درجة الحرارة وتركيب منظم أيون الهيدروجين. وكذلك باستخدام عدد من المجسات ذات التتابع المتعدد بحسب تعدد تتابع الكودونات (الشفرة الوراثية) المختلفة (Degeneracy) التي تخص حمض أميني واحد.

● **دراسة المنتج البروتيني**

يمكن فصل المورث عن طريق دراسة المنتج البروتيني، وهي طريقة غير مباشرة، تتم من خلال دراسة التعبير الوراثي، وذلك باستخدام نواقل لها خاصية إنتاج البروتين من المورثات المحمولة عليها. ويمكن التعرف على المنتجات الوراثية (البروتينات) باستخدام أجسام مضادة أو أي أجسام رابطة أخرى (Ligands) لها القدرة على التعرف على البروتينات المقابلة لها، أو إعطاء نشاط حيوي يعبر عنها.