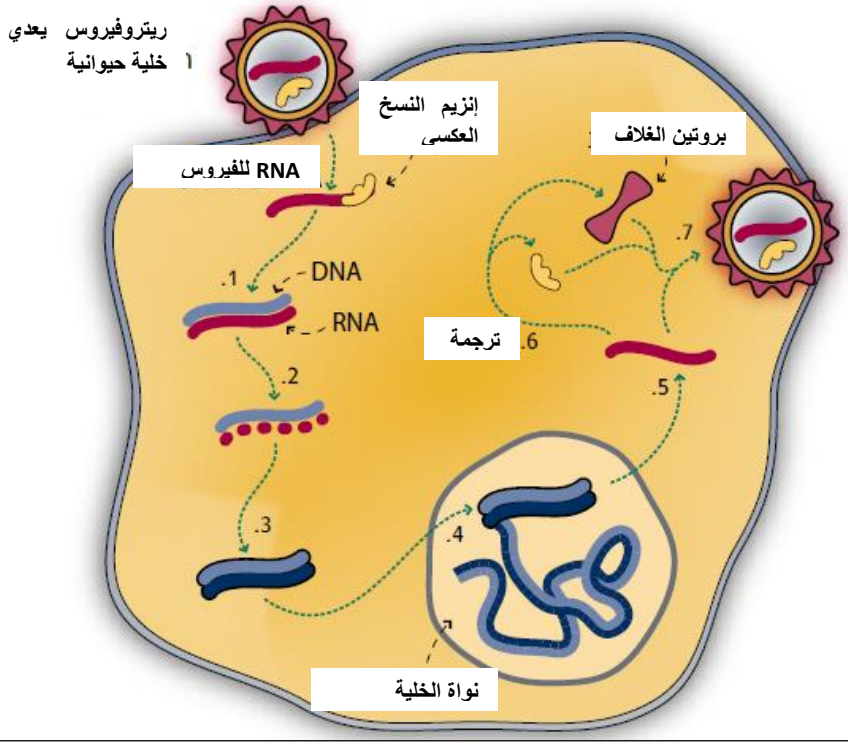
الاستنساخ بواسطة مكتبة ال DNA المُكمّل

تُرافق عملية استنساخ الجينات الكاملة بواسطة مكتبة جينات صعوبات نابعة من كبر حجم هذه الجينات. يُحدد طول الجينات من جملة أمور كثيرة بحسب وجود تسلسلات الانترونات. في أغلب الأحيان لا توجد حاجة للإنترونات لأن الإنترونات غير موجودة في ال RNA الرسول الذي تتواجد فيه المعلومات لبناء البروتين. كذلك فإن المعلومات الوراثية الموجودة في ال RNA كافية من أجل بحث العديد من وظائف البروتين. استغلال ال RNA الرسول لبحث الجينات ولتطبيقات أخرى هو أمر سهل نسبيًا ولكن في نفس الوقت تواجهنا مشكلة بهذا الأمر أيضًا: كما هو معروف ال RNA أحادي الجديلة ولذلك لا نستطيع استنساخه داخل حامل للجينات (ناقل). حتّى نتغلب على هذه المشكلة نستعمل **إنزيم يقوم بإنتاج جُزيء DNA من جُزيء RNA.** يُعرف هذا الإنزيم باسم Reverse transcriptase (باختصار RT) وهو يقوم بالحفاظ على المعلومات الموجودة في الRNA في جُزيء ال DNA التي يقوم بإنتاجها أيضًا. يُسمّى هذا الإنزيم باللغة العربية إنزيم النسخ العكسي وبالعبرية "המתעתק במהפוך" أو"המתעתק לאחור" (الصندوق 4.4).

إنزيم النسخ العكسي وإنتاج ال DNA المُكمّل

بحسب " הדוגמה המרכזית "، من DNA ينتج RNA في عملية النسخ، ومن ال RNA ينتج بروتين في عملية الترجمة. لسنوات طويلة ساد الاعتقاد أنّ انتاج DNA من RNA ليس مُمكنًا ولكن خلال بحث الفيروسات ذات الجينوم المكوّن من RNA أحادي الجديلة تم اكتشاف إنزيم النسخ العكسي. اصبح هذا الإنزيم أداة مُهمة في "صندوق أدوات" العاملين في مجال الهندسة الوراثية. عن اكتشاف هذا الأنزيم، هدفه ومصدر اسمه، انظر الصندوق 4.4.



الرسم 4.4: دورة حياة الريتروفيروس: من العدوى وحتى تكوّن فيروسات جديدة .

فيروسات مختلفة من الريتروفيروسات تقوم بعدوى خلايا مُختلفة حقيقية النواة. هكذا مثلاً، فيروس HIV الذي يُسبب مرض الأيدز، هو ريتروفيروس يقوم بعدوى خلايا جهاز المناعة لدى الإنسان. يقوم الفيروس بالارتباط بالخلية الهدف وإدخال ال RNA وإنزيم النسخ العكسي إلى داخل الخلية. عندما يدخل ال RNA التابع للريتروفيروس إلى الخلية يقوم إنزيم النسخ العكسي ببناء جديلة DNA بالاعتماد على جديلة ال RNA وينتج جزيء هجين RNA:DNA (مرحلة1). بعد أن يتم تفكيك ال RNA من الجزيء الهجين (2)، يقوم إنزيم النسخ العكسي، أو ال DNA بوليميراز التابع للخلية، ببناء جديلة DNA مكمّلة وينتج DNA ثنائي الجديلة (3) الذي يندمج في الجينوم (4). يتم انتاج RNA من مقطع ال DNA الموجود في الجينوم والذي يُشفّر إلى بروتينات الفيروس، تخرج نسخ عديدة من ال RNA إلى السيتوبلازم(5). تتم ترجمة ال RNA، وتنتج بروتينات الفيروس(6)؛ ال RNA وبروتينات الفيروس تُنتج فيروسات (7) يُمكنها أن تخرج من الخلية وتقوم بعدوى خلايا إضافيّة.

كيف يعمل إنزيم النسخ العكسي، ما هي مُتطلباته وبماذا تختلف فعاليته عن فعالية ال DNA بوليميراز؟ الإجابة الكاملة عن هذا السؤال يُمكن أنْ نجدها في القائمة 4.1 وفي الرسم 4.5. باختصار، الإنزيم يحتاج إلى جديلة قالب وفي المرحلة الأولى يكون هذا القالب هو جديلة ال RNA. كذلك فإنَّ الإنزيم يحتاج إلى بادئة تلتصق ل RNA (انظروا الى الصندوق الجانبي). إنزيم النسخ العكسي يقوم بإطالة البادئة بحسب المعلومات الموجودة في جديلة ال RNA عن طريق إضافة نوكلوئتيدات من النوع dNTP، وكل نوكلوئتيد مُكمل للنوكلوئتيد المُقابل له والموجود على جديلة الRNA (مثلًا مُقابل A تتم إضافة T وهكذا). بحسب المعلومات الوراثية الموجودة في الRNA نحصل على نسخة **مُكمّلة** من ال DNA أحادي الجديلة. لذلك فإن نتيجة المرحلة الأولى هي جُزيء هجين (מולקולה היברידית) إحدى جدائله هي جديلة RNA والجديلة الثانية المرتبطة بها جديلة DNA. في مرحلة مُتقدمة يتفكك ال RNA المُرتبط مع ال DNA ولذلك يتمكن الإنزيم DNA بوليميراز (أو انواع مُعيّنة من إنزيمات النسخ العكسي) من إنتاج جديلة DNA إضافية بحسب قالب ال DNA الأحادي الجديلة، في نهاية هذه العملية نحصل على DNA ثُنائي الجديلة. في العملية التي نحوّل فيها جُزيء RNA أحادي الجديلة إلى DNA ثُنائي الجديلة نقوم بحفظ المعلومات الوراثية التي وُجدت في ال RNA، أيضًا في ال DNA الناتج. لكون هذه العملية تمت من خلال انتاج جدائل مُكمّلة، فإن ال DNA الناتج من RNA يُسمّى DNA مُكمّل (DNAמשלים – Complementary DNA) وباختصار يُسمّى cDNA.

	DNAبوليميراز	إنزيم النسخ العكسي	
		مرحلة أ	مرحلة ب
جديلة القالب	جديلتي DNA مكملّتان لبعضهما	RNA (أحادي الجديلة)	DNA (أحادي الجديلة)
الحاجة الى بادئة	نعم نحتاج الى بادئة	نعم نحتاج الى بادئة	نعم نحتاج الى بادئة
اطالة البادئة بواسطة إضافة:	dNTP	dNTP	dNTP
نتيجة نهائية	جزيئي DNA ثنائيي الجديلة	جزيء هجين RNA:DNA ال RNA يتفكك في الحال وينتج DNA أحادي الجديلة الذي يُستغل في المرحلة ب	جزيء DNA ثنائي الجديلة

القائمة 4.1: مقارنة بين مُميزات فعالية الإنزيم DNA بوليميراز وإنزيم النسخ العكسي.

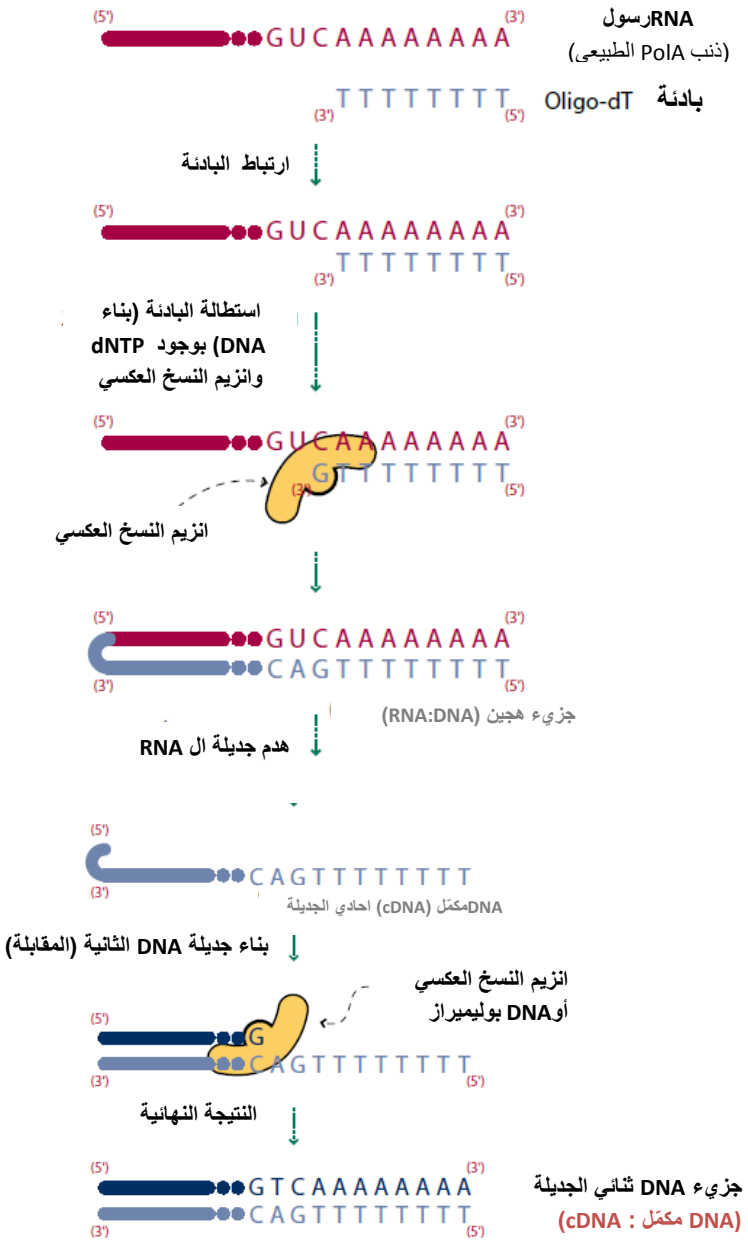
إنتاج مكتبة DNA مُكمّل.

من أجل استنساخ وتشخيص DNA مُكمّل إعتاد رواد الاستنساخ على إنتاج مكتبة DNA مُكمّل. بحيث أن المادة المُستخدمة لمهمة استنساخ DNA مُكمّل مُعيّن هو جُزيئات ال RNA الموجودة في الخلية.

مراحل إنتاج مكتبة DNA مُكمّل هي:

أ. **استخلاص ال RNA:** يتم استخلاص جُزيئات ال RNA رسول. نحصل على مجموعة من جُزيئات RNA الرسول مصدرها من جينات عديدة تم التعبير عنها في الخلية قبل عملية الاستخلاص.

ب. **انتاج DNA مُكمّل (cDNA):** في هذه المرحلة نحتاج بالإضافة الى ال RNA الرسول الذي حصلنا عليه في المرحلة الأولى إلى بادئة وإلى إنزيم النسخ العكسي. بالإمكان استعمال بادئة تحتوي فقط على ثيمين فقط (T) (Oligo-dT) الذي يرتبط للذنب Poly A في الطرف 3' لRNA الرسول. الإنزيم يقوم بإطالة البادئة بإضافة نوكلوئتيدات مُكمّلة. في هذه المرحلة نحصل على DNA مُكمّل غير مُتجانس (هيتروجيني) مصدره من الجينات المُختلفة. مراحل تحويل RNA رسول إلى DNA مُكمّل موصوفة في الرسم 4.5.



الرسم 4.5: من RNA رسول إلى DNA مُكمّل ثنائي الجديلة بواسطة إنزيم النسخ العكسي.

يُستعمل ال RNA رسول كقالب، بالإمكان استعمال بادئة فيها نوكليوتيدات من نوع T التي ترتبط بالذنب Poly A ل RNA الرسول. القالب والبادئة وبوجود إنزيم النسخ العكسي يُمكّنان من انتاج DNA مُكمّل أحادي الجديلة. في المرحلة التالية يقوم إنزيم النسخ العكسي أو ال DNA بوليميراز التابع للخلية بإنتاج DNA ثُنائي الجديلة باستخدام ال DNA الأحادي الجديلة.

ج. **ادخال ال DNA المُكمل وإنتاج مكتبة:** يتم ربط جُزيئات cDNA مُختلفة الناتجة في المرحلة ب' إلى نُسخ عديدة من الناقل البلاسميدي أو البكتريوفاجي (הנשא). نحصل على مجموعة غير مُتجانسة من الجزيئات الركومبننتية والتي تتكوّن كل واحدة منها من مقطع مُعيّن دُمج مع الناقل، هذه المجموعة تُسمى مكتبة.

د. **اكمال الاستنساخ:** يتم ادخال المكتبة إلى بكتيريا وبذلك يتم إحداث عزل ومُضاعفة لمقاطع DNA مُعينة في مراكز أو في مستوطنات. هذه المرحلة هي المرحلة الأخيرة قبل تحديد مكان ال DNA المطلوب في مركز أو في مستوطنة من خلال استعمال مجس (مسبار أو مكشاف).

من المهم أن نعرف أنَّه توجد فروق أساسية بين المكتبة الجينوميّة ومكتبة ال DNA المُكمّل. تلخيص للفروق موجود في الصندوق 4.5.

الصندوق 4.5: عن الفروق الأساسية بين المكتبة الجينومية ومكتبة ال DNA المُكمل

احد مُميزات المكتبة الجينومية هو أنَّ مُعظم المقاطع الموجودة فيها لا تحتوي على جينات وإنما تحتوي على DNA آخر. كذلك في المكتبة الجينومية يوجد تمثيل لجميع الجينات الموجودة لدى الكائن، ولا توجد أفضلية لجين مُعيّن على جين آخر. بالمُقابل في مكتبة ال DNA المُكمل يوجد تمثيل مُختلف للجينات المُختلفة. تنبع هذه الحقيقة في الأساس من أنَّ في خلية معينة (خلية من نوع مُعيّن: خلية دم، خلية عصبية وما شابه) وفي وضع معيّن تتواجد فيه الخلية لا تتواجد جُزيئات RNA رسول ناتجة من كل الجينات (الفصل 7). زيادة على ذلك، توجد في الخلية كميات مُختلفة من RNAمصدره من جينات مُختلفة: توجد جُزيئات كثيرة من RNA الناتج من جين مُعين وجُزيئات قليلة من الRNA الناتج من جين آخر. لذلك في مكتبة ال DNA المُكمّل تتواجد نُسخ عديدة من ال DNA المُكمّل للجينات التي تم التعبير عنها بشدة ونتج عنها الكثير من جُزيئات ال RNA (تمثيل كبير للجينات التي يتم التعبير عنها بشكل كبير). لهذا السبب هناك احتمال ضئيل أن نجد في مكتبة مُعيّنة DNA مُكمّل الذي نتج من جين لا يتم التعبير عنه بكميّة كبيرة في الخلية. لذلك حتى نقوم باستنساخ DNA مُكمّل الناتج من جين مُعيّن ، يجب أن نختار بشكل دقيق تلك الخلايا التي أنتجت الكثير من ال RNA من الجين المطلوب.

بعد أنْ نتجت مكتبة، ننتقل إلى مرحلة تحديد الجين او ال DNA المُكمّل، يتم ذلك بوسائل تضم **المجس، التشرّب والتهجين** (הגלאי, התספיג וההיברדציה). ما هي انواع المجسات المُختلفة، ما هي صفاتها وكيف يتم استعمالها؟ ما هي وظائف التشرب والتهجين؟

تحديد مكان الجين/ ال DNA المطلوب في المكتبة بواسطة مجس، تشرّب وتهجين.

في نهاية عملية انتاج المكتبة الجينومية أو مكتبة DNA المُكمّل نحصل على عدة عشرات من الصحون التي تحتوي على مئات الآلاف من المراكز، في أحد هذه المراكز يتواجد ال DNA المطلوب. هنالك حاجة لوسيلة ناجعة لتحديد المركز الوحيد من بين مئات الآلاف من المراكز الذي يتواجد فيه الجين المطلوب، بدون وسيلة ناجعة لتحقيق هذا الأمر تكون عملية تحديد مكان الجين غير ممكنة تقريبًا "كإيجاد إبرة في كومة من القش". الوسيلة الاساسية لتحديد مقطع DNA مُعيّن أو جين مُعيّن يُسمى مجس (مسبار، مكشاف، **גלאי**).

من أجل تحديد ال DNA المطلوب أو الجين المطلوب، في أحد المراكز في مكتبة بكتريوفاجات بمُساعدة مسبار، يتم تنفيذ العملية الموصوفة في الرسم 4.6، مراحل العملية هي:

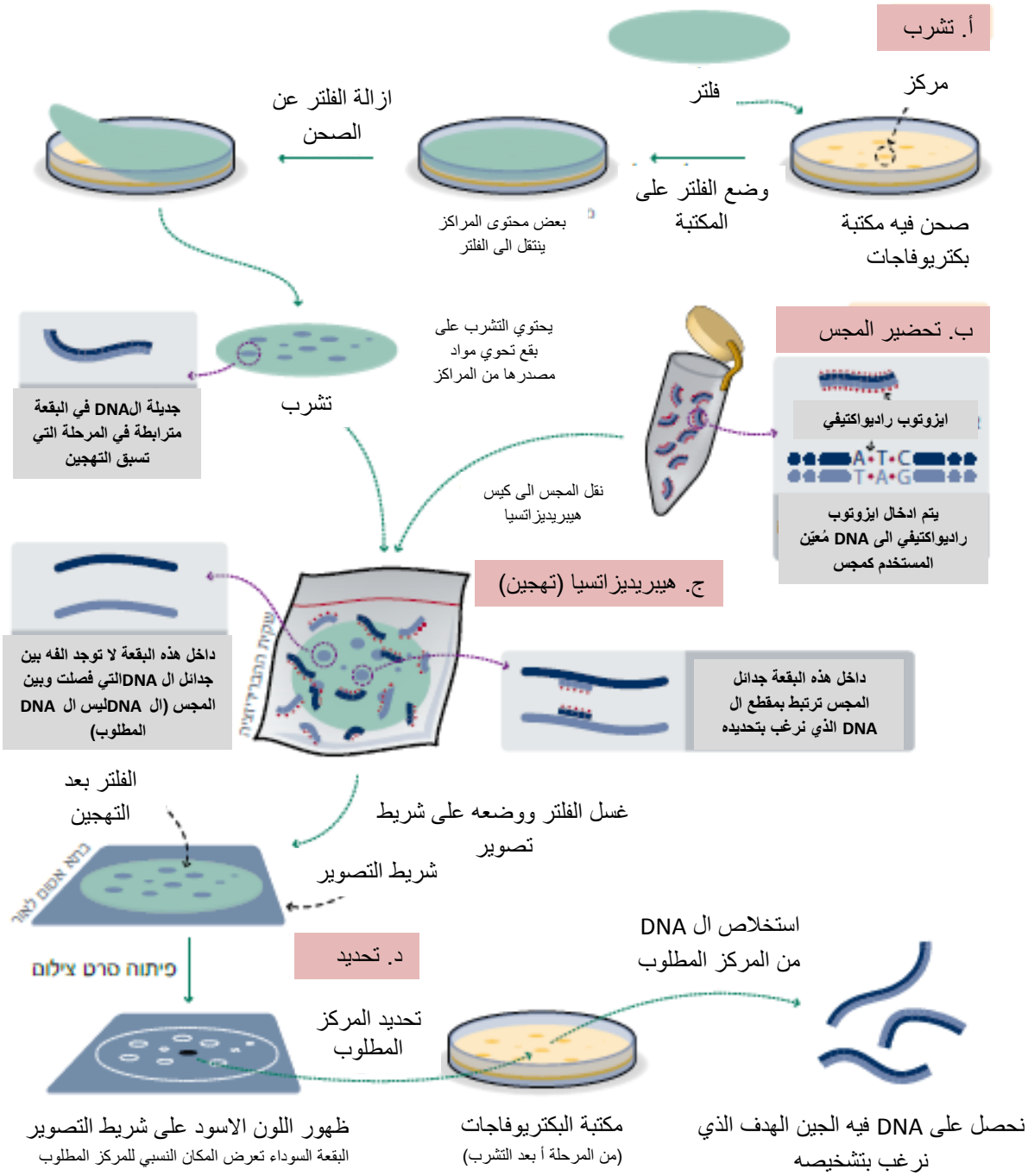
أ. نقل المكتبة إلى فلتر والحصول على تشرب: من أجل تحديد ال DNA المطلوب الموجود في أحد المراكز، يتم نقل ال DNA الموجود في المراكز إلى سطح دقيق وصلب يُسمى فلتر. لهذا الهدف يتم وضع الفلتر على المراكز، جُزء من مُحتوى كل مركز ومن الDNA الخاص الموجود فيه ينتقل إلى الفلتر بحيث يتشرب الفلتر، في نهاية هذه العملية نحصل على **تشرّب**. التشرّب هو الفلتر الذي تتواجد عليه بُقع من المواد مصدرها من المراكز. البُقع موجودة على الفلتر بحيث تُشكّل صورة مرآة دقيقة للمراكز الموجودة على الصحن.

ب. تحضير الفاحص(גלאי probe): من أجل تحديد مكان ال DNA المطلوب على التشرّب نقوم باستخدام فاحص. الفاحص **(גלאי probe)** هو جُزيء لديه القدرة على الارتباط بُجزيء آخر (الجُزيء الذي أُعد الفاحص للكشف عنه- الجُزيء الهدف). يُمكن أن يكون الفاحص جُزيء DNA، RNA أو جسم مُضاد. ارتباط الفاحص بالجُزيء الهدف يتم بفضل ربط غير كوفلنتي بينهما. ارتباط فاحص DNA بجُزيء DNA الهدف يتم بفضل الحقيقة أن للفاحص جدائل مُكملة لتسلسل موجود لدى الDNA الهدف. من أجل معرفة حدوث ارتباط بين الفاحص والDNA الهدف يتم استعمال فاحص مؤشر أو موسوم(מסומן) الوسم على الفاحص هو عادة نظير راديوأكتيفي أو جُزيء فلورسنتي.

ج. **التهجين היברידיזציה**: حتى يقوم فاحص من ال DNA بتحديد مكان الDNA الهدف يجب القيام بعملية تُعرف باسم **تهجين היברידיזציה**. في عملية التهجين يرتبط الفاحص بال DNA الهدف ويُنتج جُزيء هجين مكوّن من فاحص- DNAهدف. ينتج هذه الجُزيء الهجين في أحد البقع الموجودة في التشرّب ومصدره من مركز مُعيّن (خاص) في المكتبة. من أجل القيام بالتهجين نستعين بكيس مُحكم نُمكّن فيه من فصل جدائل ال DNA التي مصدرها من المراكز وأيضًا من فصل جدائل الفاحص. بعد ذلك ترتبط جدائل موسومة للفاحص مع

جدائل ال DNA الموجودة على الفلتر. ارتباط بكميات كبيرة يكون فقط لتلك البقعة التي مصدرها من مركز خاص للبكتريوفاجات الذي يتواجد فيه ال DNA الهدف. معلومات إضافيّة عن أسس استعمال الفاحص والتهجين (وليس فقط في الحالة الخاصة للمكتبات) موجودة في الصندوق 4.6.

د. **تحديد المركز المطلوب والذي يتواجد فيه الجين (أو ال DNA) المطلوب**: يتم شطف الفاحص الموسوم الذي لم يرتبط ومن ثم يتم تعريض الفلتر إلى شريط تصوير حساس للأشعة الراديوأكتيفية أو للضوء. يُصبح لون شريط التصوير أسود فقط في النقطة التي تتواجد فيها بقعة تحتوي على فاحص مرتبط بمقطع ال DNA المطلوب. المكان النسبي" للنُقطة السوداء" على الفلتر مُطابق للمكان النسبي للبقعة المُلائمة الموجودة على الصحن (الرسم 4.6). بحسب هذه المعلومات نعود إلى الصحن الذي يحتوي على المراكز الأصلية ونعزل منها المركز الذي يتواجد فيه الDNA المطلوب. يتم تشخيص الDNA المطلوب بعدة وسائل من بينها القطع ومن ثم تحديد تسلسل ال DNA.



الرسم 4.6: عملية تحديد DNA الهدف الموجود في مكان معين في مكتبة بواسطة مجس، تشرب وتهجين.

المراحل لتحديد مكان ال DNA الهدف في المكتبة: أ) نقل المكتبة الى فلتر بواسطة تشرب. ب) تأشير مقطع DNA معيّن والمستخدم كمجس رادبواكتيفي. ج) تهجين: لهذا الهدف ترفع درجة الحرارة لتمكين جدائل ال DNAوالمجس من الارتباط في بقعة معينة على الفلتر. د) البقعة مع المجس الراديواكتيفي تؤدي على اسوداد شريط التصوير. وفي اعقاب ذلك بإمكاننا تحديد مكان المركز المطلوب الذي يحتوي على الجين الهدف.