التقانات الجزيئية المستخدمة

للكشف عن الحموض النووية والبروتينات

يتركب جزيء الـDNA هندسياً من سلسلتين من متعدد النيوكليوتيد مرتبطتين براوبط هيدروجينية بين الأسس الآزوتية (يرتبط الأدنين مع التايمين برابطتين هيدروجينيتين A=T والسيتوسين مع الغوانين بثلاث روابط هيدروجينية C≡G) تلتف كل واحدة حول الأخرى في التفاف حلزوني مفتول في توازٍ متعاكس.

تبدو قطع الـ DNA التي لها نفس الطول على هلام الآغاروز متشابهة ولكن يمكن أن تختلف فيما بينها من حيث تسلسلات الـDNA ، وبما أن تسلسل النكليوتيدات في جزيء الـ DNA هو الذي يحدد الدور الرئيسي من حيث الوظيفة، ويتطلب الكشف عن جزيئات نوعية من الـ DNA والـRNA أو البروتينات من بين عدة آلاف من الجزيئات الأخرى الموجودة معها الجمع ما بين عدة تقانات في آن واحد وتدعى هذه التقانات اصطلاحاً تقانات التلطيخ Blotting technique، وترتكز هذه الأساليب بشكل رئيسي على مسابر « Prpbs » عبارة عن تسلسلات نكليوتيدية قصيرة مفردة من الـ DNA موسومة إشعاعياً

التلطيخ: هو مصطلح يطلق على نقل الجزئيات من الهلام إلى غشاء راشح بفعل الخاصية الشعرية

عند تعريض جزيء الـDNA لدرجات حرارة عالية أو وسط قلوي عالي إلى تحطم الروابط الهيدروجينية التي تربط الأسس الآزوتية مما ينتج عنه سلسلتي الـDNA وتحولها إلى سلاسل مفردة أما في حال تطبيق شروط معاكسة لعملية الانفصال مثل انخفاض درجة الحرارة أو تعديل الوسط القلوي سوف يؤدي إلى التحام السلاسل مع بعضها البعض بشكل طبيعي نتيجة إعادة تشكل الروابط الهيدروجينية بين الأسس وهكذا يمكن أن ترتبط السلسلة المفردة مع سلسلة الـDNA مفردة أخرى أو يمكن أن ترتبط سلسلة الـDNA مع سلسلة الـRNA شرط أن تحتوي تسلسلات نيكلوتيدية متكاملة وهذا ما يسمى بالتهجين Hybridization

تقانات التلطيخ

أولاً- تقانة ساترون اللطاخي Southern Blotting

سميت أول تقانه تلطيخ باسم ساترون اللطاخي Southern Blotting نسبة إلى الباحث Edwin Sourthen الذي طوّر عام 1975 تقانة للبحث عن قطعة محددة من الـDNA ضمن المجين الوراثي

مبدأ التقانة :

يعتمد مبدأ التقانه على التهجين ما بين الحموض النووية والتي يستعمل فيها الـ DNA كـ كاشف عن وجود قطعة معينة (مستهدفة) من الـ DNA المجين الوراثي (نبات أو حيوان أو إنسان أو فيروس أو بكتيريا)

يدعى الـ DNAالمستعمل في هذه الطريقة بالمسبار الـDNA أو مسبر التهجين

يستعمل هذا المسبار للتحري عن وجود قطعة مستهدفة من الـDNA مكملة له (حسب مبدأ تكامل الأسس الآزوتية) في مزيج مؤلف من عدة أنواع من الـ DNA ، وبناءً عليه سوف يتم تشكيل السلسلتين حلزونياً مزدوجاً أما في حال إذا كان التتالي غير متتام لا يتم تشكيل الحلزون المزدوج وتسمى هذه عملية الربط ما بين المسبر الـDNA وقطعة الـ DNA المستهدفة بالتهجين.

مراحل تقانه Southern Blotting

1-مراحل استخلاص الحمض النووي

يستخلص الحمض النووي المراد دراسته من أحد أنواع الخلايا أو الأنسجة ويجب أن يكون نقياً.

2-مرحلة الهضم الانزيمي:

يهضم الـ DNA المستخلص بواسطة أحد أنزيمات التقطيع الحصري التي يقطع بشكل متكرر مثل الأنزيم القطع EcoR I يمتلك هذا الأنزيم الكثير من مواقع القطع في المجين الوراثي وعليه سوف نحصل في نهاية الهضم الانزيمي على الكثير من القطع مختلفة الأطوال.

3-مرحلة الرحلان الكهربائي:

يتم فصل قطع الـ DNA عن بعضها بواسطة تقانة الرحلان الكهربائي (الآغاروز أو بولي أكريل أميد) وعليه سوف تهاجر قطع الـDNA من القطب السالب إلى الموجب وتتحرك القطع الصغيرة بشكل اسرع من القطع الكبيرة.

4-مرحلة التلوين

بعد الانتهاء من مرحلة الرحلان الكهربائي يلون الهلام بروميد الاثيديوم إذ يصبغ الـDNA المعالج بهذه المركب يجعله مفلور في حالة تعرضه للأشعة البنفسجية، تعتبر هذه المرحلة ضرورية لمعرفة نوعية الـDNA المستخلص كما تعطي نتائج عن عملية الهضم الأنزيمي.

5-مرحلة نقل قطع الـDNA من الهلام إلى ورق النتروسيللوز

يتم نقل جميع قطع الـDNA الموجودة على هلام الأغاروز وبنفس الترتيب إلى ورق الترشيح مؤلفة من مادة النتروسيللوز أو من مادة النيلون بشكل يحافظ على التوضع الذي كانت في الهلام، لكن قبل عملية جراء الرحلان الكهربائي يتم تمسيخ (فصل) قطع الـDNA المفصولة باستعمال محلول قلوي (هيدروكسيد الصوديوم)، **وتعتبر هذه الخطوة مهمة** حيث تساعد في فصل سلسلتي الـDNA نتيجة كسر الروابط الهيدروجينية ما بين الأسس الآزوتية وتكسير قطع الـDNAS إلى قطع صغيرة

تعتبر عملية النقل عملية مهمة في عمليات التهجين (يستخدم هذه الفلاتر لأنها تتحمل جيداً المعالجات الضرورية لعملية التهجين بشكل خاص درجة الحرارة العالية).

عملية نقل سلاسل الـDNA من الهلام إلى فلتر النتروسيللوز

a. يوضع في وعاء وقاء غني لمترات الصوديوم
b. يوضع في الوقاء مسند وفوق المسند ورقة ترشيح يتصل من طرفيه مع الوقاء ليؤمن عملية الإماهة المستمرة
c. يوضع الهلام فوق ورق الترشيح
d. يوضع فوق الهلام ورقة النتروسيللوز أو النيلون
e. يوضع فوق ورق النتروسيللوز ورق ماص يوضع فوقه صفيحة زجاجية لمجانسة الضغط ويوضع فوق الصفيحة الزجاجية ثقل

أثناء عملية النقل تهاجر جزيئات الـDNA الموجودة في هلام الأغاروز إلى فلتر ورق النتروسيللوز أو النيلون وبنفس الترتيب وتلتصق عليه

6-مرحلة ربط سلاسل الـDNA المفردة إلى فلتر النتروسيللوز أو النيلون:

يتم ربط سلاسل الـDNA إلى فلاتر إما بالتسخين الفلتر مدة 5 دقائق عند درجة حرارة 80م° (في حال مادة النتروسيللوز) أو بتعريض الفلتر مدة 5 دقائق إلى إشعاعات فوق البنفسجية (في حال استخدام فلتر النيلون).

7-إضافة كميات كبيرة من جزيئات الـDNAغير نوعية مستخلصة من السائل المنوي للثور حيث يرتبط الـDNAغير النوعي إلى فلاتر النتروسيللوز و يتوضع في جميع أماكن الخالية من الـDNAالذي تم نقله من الهاتم

الهدف من ذلك عند انتقال الـ DNA من هاتم آغاروز إلى نتروسيللوز يرتبط بمواقع محددة وقليلة من فلتر السيللوز وعند إضافة المسابر الموسومة ترتبط بمواقع غير نوعية موجودة على الفلتر بدلاً منت أن تتهجن مع السلاسل المتممة لها وهكذا سوف تمتلئ الفلاتر بالإشعاعات وتعيق مراحل اللاحقة ولذلك يتم إضافة الـDNA غير نوعي لملء الفراغات ومنع ارتباط المسابر بها

8-مرحلة التهجين:

تبدأ عملية التهجين Hybrization فيتم حضن الغشاء ضمن محلول يحتوي مسابر موسومة Labelied Prob (عبارة عن سلاسل نكليوتيدية قصيرة لا يتجاوز طولها 25 نكليوتيد مفردة من الـ DNA يتم وسمها إشعاعياً من النهاية 5 بالفوسفور (P^{32}) 32

يتم تصنيع المسابر بطريقة الفوسفواميدات ويتم اختيار تسلسلاتها النكليوتيدية بحيث تهجن مع التسلسلات النكليوتيدية للمورث النوعي الذي نبحث عنه.

تتم عملية التهجين عند درجة الحرارة 45م° ولمدة 15 ساعة إذ يتم ربط المسبار وحيد السلسلة مع سلسلة الـ DNAالمفردة براوبط هيدروجينية كالتي ترتبط ما بين شريطي الـDNA في الحلزون DNA المضاف

9-مرحلة الغسيل

تغسل بعد ذلك الفلاتر جيداً ويلطف بواسطة محاليل سترات الصوديوم مختلفة التراكيز وبشكل متكرر ولإزاحة كل الكميات الزائدة من المسابير الموسومة إشعاعياً والتي لم ترتبط أو تتهجن مع تسلسلات الـDNA المتممة لها على الفلاتر.

10-مرحلة التصوير الشعاعي

بعد نهاية الغسيل يجفف الفلتر ويوضع في جهاز التصوير الشعاعي الذاتي ويوضع له بشكل مقابل فيلم حساس للأشعة السينية يظهر الفيلم عن عصابات (لطاخات سوداء نوعية وحيدة أو قصيرة أو متعددة حيث تدل هذه العصابات على مواضع ارتباط المسابير الموسومة إشعاعياً مع تسلسلات الـ DNA المراد الكشف عنه)