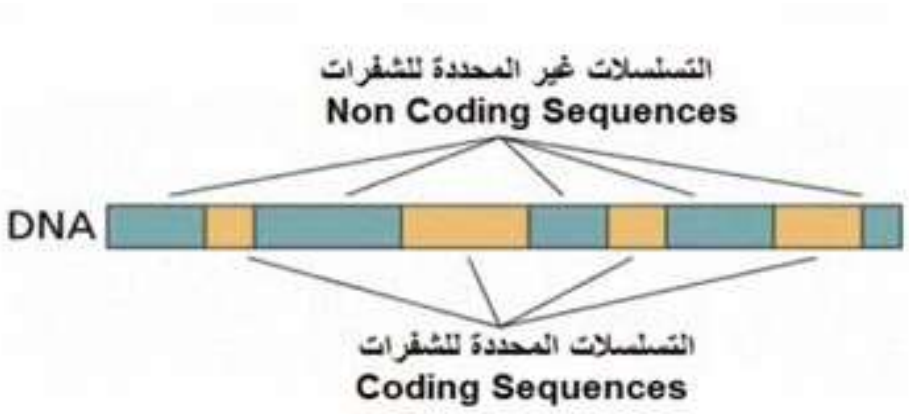
محاضرة رابعة

أولاً: البصمة الوراثية.

هي النمط الوراثي المميز لكل فرد وتظهر على شكل تتابعات مميزة لقطع الـ DNA في تقنية الترحيل الكهربائي .

تنقسم قطع الـDNA إلى نوعين من التسلسلات:

1- التسلسلات المحددة للشفرات (المورثات) وهي المسؤولة عن انتقال الصفات الوراثية
2- التسلسلات غير المحددة للشفرات: وهي تختلف اختلافاً كبيراً بين النوع الواحد لأنها تحتوي على تسلسلات قصيرة متكررة Short Tandem Repeats (STR_S) تكون سبباً لاختلاف الأفراد عن بعضها.



أي أن البصمة الوراثية تعبر عن الاختلافات بين الافراد في منطقة الانترون.

اكتشاف البصمة الوراثية:

أوضح العالم د. أليك جيفريز أن أجزاء من المادة الوراثية قد تتكرر عدة مرات وتعيد نفسها في تتابعات عشوائية غير مفهومة ، وهذه التتابعات مميزة لكل فرد ولايمكن أن تتشابه بين اثنين إلا في حال التوائم المتماثلة فقط.

لذلك نجد أن كل فرد يمتلك بصمة وراثية خاصة به، وتورث، أي أن الفرد يحصل على نصف هذه الاختلافات من الأب والنصف الآخر من الأم ليكون مزيجاً وراثياً يجمع بين خصائص الأبوين. ولقد وجد أيضاً أن البصمة الوراثية تختلف باختلاف الأنماط الجغرافية للمورثات في شعوب العالم فعلى سبيل المثال يختلف الآسيويون عن الأفارقة. والجدير بالذكر في تركيب الـDNA هو أن المورثات لا تمثل سوى 5% من تركيبه فقط. أما بقية الـDNA (95%) فتعتبر وراثياً غير فعالة وتعرف أحياناً بالـDNA الخردة (Junk DNA).

إلا أن هذه الـDNA الخردة لها دور في تنظيم عمل المورثات، كما يمثل قسم كبير منها ما يسمى بالـ DNA التكراري لأنه يتألف من وحدات متكررة Repetitive DNA ، وكل وحدة تكرارية عبارة عن تسلسل مؤلف من حوالي (10 – 60) نيوكليوتيدة. وهذا التسلسل يتكرر إلى العديد من النسخ فقد يصل ما بين (100 – 100000) نسخة فيسمى DNA متوسط التكرار، كما أن هناك تسلسل يتكرر مليون مرة ويسمى DNA عالي التكرار.

إذاً تعتمد تقنية البصمة الوراثية على التباين المتواجد، ما بين الأفراد، في التسلسلات المتكررة لنيوكليوتيدات الـDNA والتي توجد في مناطق مختلفة عليه. هذه المناطق ذات المتكررات توجد في الغالب في السنترومیرات أو عند نهاية الكروموسومات. كما أنها توجد في مناطق أخرى على طول الكروموسوم.

خطوات تحضير البصمة الوراثية:

1- استخلاص الـDNA وتنقيته حيث تستخلص عينة الـDNA من أنسجة الجسم أو سوائله مثل الشعر أو الدم.

2- تقطيع الـDNA باستخدام أنزيمات القطع حيث تمتاز هذه الأنزيمات بقدرتها على التعرف على مناطق محددة في جزيء الـDNA وقطعه عند تلك المناطق. لذلك فإن هذه الأنزيمات تستخدم في تقنية البصمة الوراثية للتعرف على الـ STRs والقطع عندها تحديدا فينتج ملايين من القطع الصغيرة من الـDNA متباينة الأحجام والأطوال.

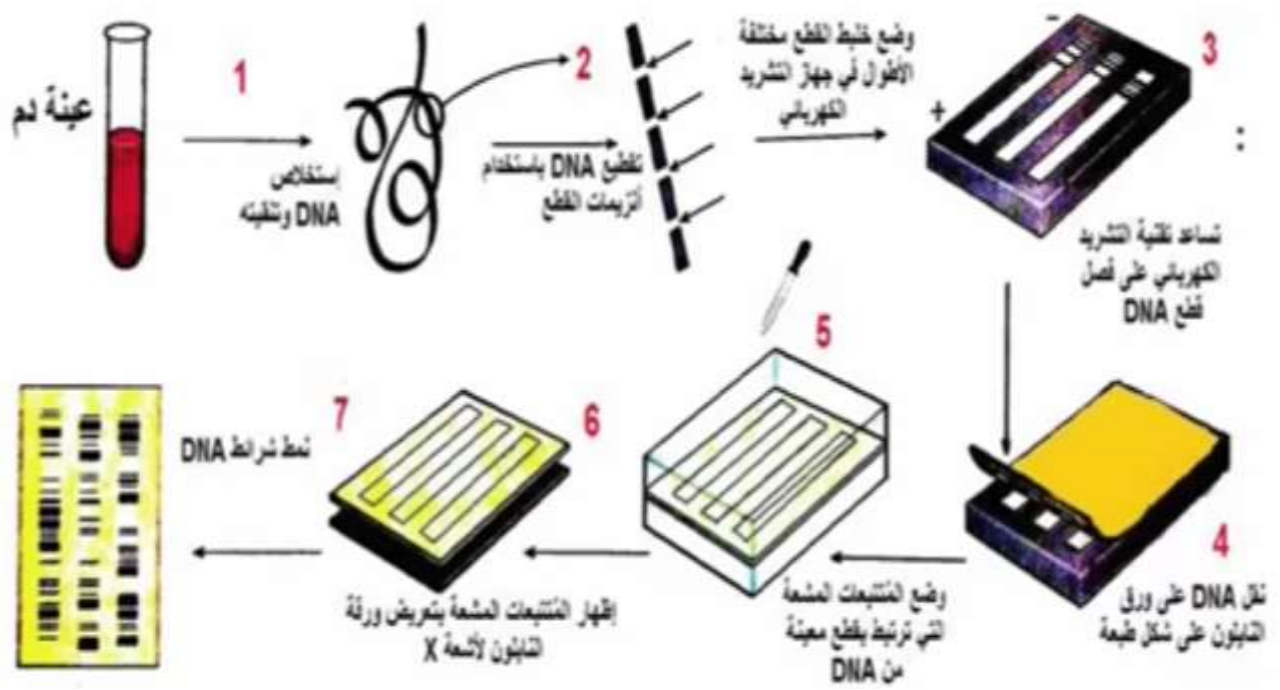
3- يتم فصل قطع الـDNA بواسطة تقنية الترحيل الكهربائي من خلال وضع خليط الـDNA في مسار كهربائي ضمن مادة هلامية تسمى الأغاروز . ويعتمد مبدأ هذه التقنية على أن جزيئات الـDNA تحمل الشحنة السالبة وبالتالي فهي تتنافر مع القطب السالب في جهاز الترحيل الكهربائي فتتحرك باتجاه القطب الموجب عبر الفراغات الجزيئية لمادة الآغاروز. كما أن مقدار حركة قطع الـDNA في المادة الهلامية يعتمد على حجم هذه القطع وشحنتها حيث تتحرك القطع الأصغر حجماً لمسافة أكبر باتجاه القطب الموجب وبالتالي ينفصل في النهاية خليط قطع الـDNA إلى نمط من الشرائط المتتابعة عبر المادة الهلامية.

4- نقل الـDNA إلى ورق النايلون على شكل طبعة.

5- وضع المتتبعات المشعة التي ترتبط بقطع معينة من الـDNA .

6- اظهار المتتبعات المشعة بتعريض ورق النايلون لأشعة X .

7- نحصل على نمط من شرائط الـDNA بخطوط داكنة وخطوط فاتحة فيكون هذا النمط مميزاً للفرد ويسمى بالبصمة الوراثية.



الشكل ( ). خطوات تحضير البصمة الوراثية

- استخدامات البصمة الوراثية:

1- في القضايا الجنائية للتعرف على المشتبه بهم.

2- في قضايا النسب واثبات البنوة.

3- تحديد هوية ضحايا الكوارث والمفقودين.

- مزايا استخدام البصمة الوراثية:

1- تنوع مصادر البصمة الوراثية (الدم – الشعر – السائل المنوي....الخ)

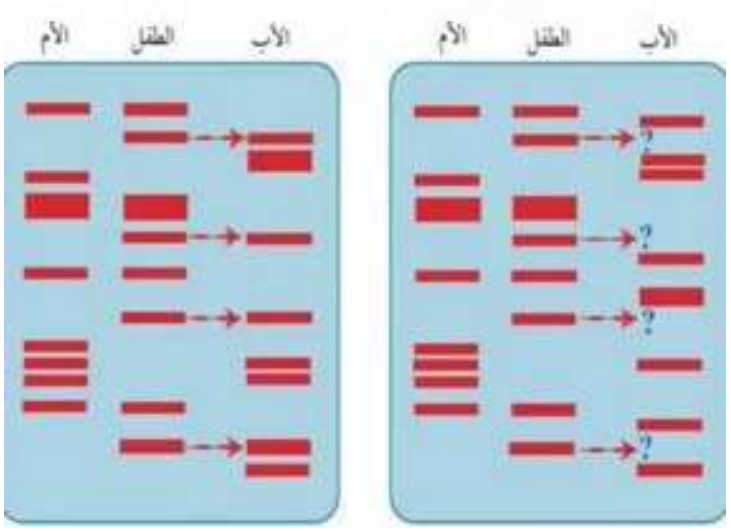
2- يقاوم الـDNA عوامل التحلل والتعفن لفترة طويلة.

3- سهولة قراءة وحفظ وتخزين البصمة الوراثية.

4- يمكن مضاعفة البصمة الوراثية بواسطة تقنية PCR.(وذلك عندما تكون العينة صغيرة الحجم فقد تكون شعرة واحدة أو قطرة من الدم)

ملاحظة: في تقنية الـPCR تتم محاكاة عملية تضاعف الـDNA لإنتاج نسخ كثيرة من الـDNA داخل أنبوب زجاجي.

مثال: أي الشكلين التاليين يعطي دليلاً كافياً للأبوة؟



الشكل (أ) **الشكل (ب)**

الجواب : الشكل (ب) لأن قطع المادة الوراثية للطفل نصفها يتطابق مع الأب ونصفها الآخر يتطابق مع الأم.

ثانياً: الواسمات الوراثية (Genetic Markers)

منذ بداية الثمانينات بدء عمل دؤوب للتعرف على بعض الجينات بذاتها التي تؤثر على صفة كمية بدرجة كبيرة أو يكون موقعها قريب لجينات على الكروموسوم تؤثر على هذه الصفة.

وقد حدث التقدم في هذا المجال بعد أن تيسر تحليل الـDNA بسرعة وبدقة وبدء عمل خرائط وراثية للأنواع المختلفة من الحيوانات.

المواقع الجينية التي تؤثر على صفة كمية يطلق عليها مواقع صفات كمية Quantitative Traits Loci (QTL). فإذا امكن التعرف على مثل هذه المواقع فإنه يمكن الانتخاب المباشر لها. أي بتحليل الـDNA للأفراد المرشحين كآباء وانتخاب من توجد به هذه الجينات. وبالتالي توفير الوقت والمال وتكون هناك دقة عالية في الانتخاب حيث يكون الانتخاب على أساس المحتوى الجيني وليس على أساس المظهر فقط وبذلك يكون هناك فرص لإنتاج سلالات مميزة.

وقد يكون موقع معين لا يؤثر على الصفة موضع الاهتمام ولكنه مرتبط بجينات تؤثر عليها ، ولهذا يمكن الانتخاب المباشر لمثل هذه الجينات أي انتخاب بمعاونة جينات واسمة تعطي علامة على وجود جينات أخرى لا يمكن التعرف عليها بصورة مباشرة.

تعريف الواسمات الوراثية:

الواسمة هي جين يورث بطريقة مندلية بسيطة ويمكن أن يقوم بدور واسمة Marker لجينات أخرى تتحكم في صفات كمية (QTL) نظراً لوجودها جميعاً على نفس الكروموسوم. ولهذا لا تتوزع هذه الجينات مستقلة، وبذلك نتعرف على وجود جينات الصفة الكمية إذا تم معرفة موقع الواسمة. وهذه الواسمات ليست بالضرورة أن تكون جينات وظيفية ولكنها ممكن أن تكون مثلاً أي سلسلة من النيوكليوتيدات يمكن تتبعها في التكوين الوراثي للحيوان.

وقد اكتشفت بعض التتابعات النيوكليوتيدية التي تتكرر في التركيب الوراثي للكائنات دون أن يكون لها وظيفة معينة معلومة، لكنها متخصصة في جين معين مرتبط بصفة معينة، ويطلق عليها ميكروستالايت Microsatelite أي التوابع الصغرى.

أنماط الواسمات الوراثية:

1- الواسمات المظهرية: Morphological Marker : وهي واسمة يمكن أن نراها على الحيوان مثل لون العيون ، وجود القرون...الخ

2- الواسمات البيولوجية Biological Marker: وهو صور مختلفة من البروتينات تمثل انعكاس لتتابعات من النيوكليوتيدات مثل : بروتينات شرش(مصل) الحليب، مجاميع الدم.

3- الواسمات الجزيئية Molecular Marker: يكون فيه التعامل مع جزيء الـDNA. وهو عبارة عن تسلسل من النيوكليوتيدات له شكلان:

- الشكل الأول Type I Marker : وهو عبارة عن مناطق من الجينوم تحمل شيفرة وراثية وهي الجينات. يكون تسلسل هذه الجينات محفوظ بين أنواع الثدييات أي يكون ترتيب النيوكليوتيدات ثابت لايتغير. وإن تحديد مواقع الجينات في الأنواع المختلفة يفيد في رسم الخرائط الوراثية.
- الشكل الثاني Type II Marker: وهي تسلسلات من النيوكليوتيدات مجهولة. وليس لهذه التسلسلات صفة الحفظ بين الانواع المختلفة إلا إذا كانت الأنواع قريبة جداً.

وضع الخريطة الوراثية Gene Mapping:

آ- في الأبقار:

- لوحظ لأول مرة في عام 1990 وجود علاقة غير مباشرة بين الواسمات الوراثية ومعدلات النمو وصفات الذبيحة في أبقار الأنجس. كما لوحظ في عام 1998 ولأول مرة أن موقع الميوستاتين (Myostatin Locus) مكون من سلسلة من الطفرات، ويوجد في العديد من سلالات الأبقار الاوربية، ويسبب ازدواج العضلات (Double muscling).

- أيضاً تم التأكد من أن QTL المؤثرة على صفات اللحم قريبة من جين ال Myostatin على الكروموسوم رقم 2.
- وتم اكتشاف الواسمة الوراثية للتوقع لصفة اللحم المرمري (واسمة الموقع الوراثي للهرمون المسؤول عن تمثيل وتطور الخلايا الدهنية).
- كما تم اكتشاف واسمة الاستعداد للإصابة بالتهاب الضرع على الكروموسوم رقم 6.

ب- في الاغنام:

- تم وضع خريطة لموقع الصفة الكمية لإنتاج الحليب ؛ حيث تقع على الكروموسوم رقم 6 وتشمل 11 واسمة.
- موقع الصفة الكمية المسؤولة عن نمو العضلات وعمق الدهن يوجد على الكروموسومات 2 و18 في أغنام التكسل.

ثالثاً: الخريطة الوراثية ومشروع الجينوم.

أدى اكتشاف شكل وتركيب الـDNA سنة 1953 إلى ثورة في علوم الأحياء الجزيئية والهندسة الوراثية التي أسست بدورها لظهور عدد من علوم الوراثة الحديثة كعلم الجينوم(Genomics) وعلم المعلوماتية الحيوية (Bioinformatics).

ما هو الجينوم:

الجينوم هو مجموع جينات الكائن الحي، ويسمى الجهاز الوراثي للإنسان مثلاً بالجينوم البشري. ويحمله كل حيوان منوي وكل بويضة. وينتج عن التزاوج ضعف المحتوى الجيني.

يعتبر العلماء الجينوم المادة الخام لكتاب الحياة، حيث يحتوي على المعلومات الكاملة عن تركيب الكائن الحي وخصائصه التي تميزه عن باقي المخلوقات وعن افراد مجموعته، بالإضافة لآلية النمو والتطور. وبدأ في الوقت الحالي اعتماد الخريطة الوراثية (مخطط كامل لجميع الجينات الموجودة داخل خلايا الكائن الحي) كوسيلة لمسح الجينات المحددة لكثير من الأمراض الحيوانية، بالإضافة لمعرفة العلاقات التطورية بين الأنواع. ويؤدي تفكيك الشفرة الوراثية الكاملة لأي كائن إلى معرفة تسلسل قواعد الحمض النووي وما يقابله من أحماض أمينية في سلسلة البروتين.

مجالات علم الجينوم:

1- علم الجينوم الهيكلي(Structural Genomics): يهتم بوصف الطبيعة الفيزيائية لكامل الجينوم وتحديد الخريطة التفصيلية لكل جين من حيث موقعه في السلسلة الوراثية وتركيبه وعلاقته بالجينات الاخرى في الجينوم.

2- علم الجينوم الوظيفي (Functional Genomics): يهدف إلى فهم آليات عمل كل المورثات وكذلك تحديد الفروق في نشاط المورثات بين نسيج وآخر. والتعرف على آليات التفاعل المعقدة بين العوامل الوراثية والبيئة.

3- علم الجينوم المقارن (Comparative Genomics): يدرس تركيب ووظائف الجينومات للكائنات الحية المختلفة بهدف فهم طبيعة التنوع بين الكائنات الحية وعلاقة المخزون الوراثي لها بقدرتها على التكيف مع بيئاتها المختلفة.

في نيسان 2003م تمكن العلماء من استكمال خريطة المورثات الكاملة للجنس البشري، وقد توافق ذلك مع الذكرى الخمسين لاكتشاف بنية الـDNA. وهو مشروع بحثي بدأ العمل به رسميا في عام1990 وكان من المخطط له أن يستغرق 15 عاما، لكن التطورات التكنولوجية سرعت العمل به حتى انتهى قبل الموعد المحدد له بسنتين تقريبا .حيث أعلن عن الانتهاء منه بدقة % 99,9 وقد تمثلت الأهداف المعلنة للمشروع فيما يلي:

- التعرف على المورثات التي يحتوي عليها الحمض النووي البشري، حيث ثبت أن التوقعات الأولى التي تراوحت ما بين 40 ألف إلى 100 ألف مورث مشفر للبروتين أكبر بكثير من العدد الفعلي. إذ تنبأ المشروع بوجود 30 ألف مورث، ولكن حتى وقت كتابة هذه السطور يبلغ عدد المورثات البشرية المشفرة للبروتين والموضحة تفاصيلها في قواعد البيانات العامة أكثر بقليل من 20 ألف مورث(20500 مورث).
- تحديد تتابعات القواعد الآزوتية التي تشفر للحمض النووي وعددها 3.2 مليار زوج قاعدي.
- تخزين هذه المعلومات على قواعد للبيانات.
- دراسة القضايا الأخلاقية والقانونية والاجتماعية التي قد تنتج عن المشروع.

وقد بلغت تكلفة المشروع ما يقارب 3 مليار دولار. وفي سنة 2007 تم الانتهاء من جينوم العالم جيمس واتسون كأول جينوم خاص في مدة شهرين وبتكلفة 2 مليون دولار، أما حالياً فيمكن عمل أي جينوم بشري بتكلفة أقل من ألف دولار في غضون عدة أيام.

ولا تكاد تمر سنة دون ان نسمع عن باحثين يعلنون اتمام الخارطة الوراثية لكائن حي معين. فهناك 6454 نوع من الكائنات الحية قد تم انجاز خرائطها الوراثية سواء بشكل كامل أو جزئي.

وتؤدي هذه التقنية إلى تطوير وتحسين السلالات من خلال:

- تطوير طرق الفحص والكشف عن الامراض: يمكن اجراء الفحوصات الاستقصائية عن طريق قراءة ومقارنة تسلسل الجينوم لعدد كبير من الافراد الذين لديهم القابلية للإصابة بمرض معين مع جماعات أخرى مقاومة لهذا المرض وبالتالي تحديد الاختلافات الوراثية بين المجموعتين ثم التعرف على المورثات المسببة للأمراض، والتي تؤثر بشكل كبير في العملية الانتاجية وتكاليفها، وخصوصاً التي لا تظهر أعراضها إلا في مراحل متقدمة من

العمر. وفي المقابل فإن تحديد المورثات المسؤولة عن الصفات المناعية يساعد المربين في اختيار الحيوانات الاكثر قدرة مناعية وانتخابها في مرحة عمرية مبكرة ومكاثرتها.
- تحديد المورثات المتعلقة بالإنتاجية: مثل المورثات المسؤولة عن كمية الحليب أو كفاءة تحويل الغذاء ...الخ . مما يساهم في انتخاب حيوانات ذات مقدرة انتاجية عالية.

رابعاً: المكتبة الجينية Gene library

عرفنا أن الجينوم هو مجموع المحتوى الوراثي للخلية ؛الذى يتكون من العديد من الجينات. فالمكتبة الجينية(الوراثية) عبارة عن توليفة أو تجميع من مستعمرات بكتيرية تحتوي كل مستعمرة منها على جين معين من الجينوم الكلى للكائن نظرياً. بمعنى اخر انه يتم تقطيع الجينوم كله للكائن بواسطة الانزيمات . ثم يتم اخذ كل قطعة (شظية) من القطع الناتجة ودمجها في بلازميد ليتم نقلها بعد ذلك للبكتريا التي تنمو بدورها وتكون مستعمرة يحمل كل أفرادها نسخاً من القطعة (الشظية) الأصلية. تشكل هذه المستعمرات سوياً مكتبة جينية حية.

أي أنه عند عزل المحتوي الوراثي الكاملGenomic DNA للكائن الحي وتقطيعه بواسطة إنزيمات القطع المحددة ثم أخذ كل قطع من DNA وعمل استنساخ لها بواسطة ناقل استنساخي Cloning vector ففي هذه الحالة نكون قد حصلنا علي ما يسمى بالمجموعات المكتبية للمحتوي الوراثي للفرد Genomic library وهي مجموعة من المستنسخات Clones التي تمثل الحامض النووي لحيوان أو مخلوق محدد. وتستخدم الـ Genomic library في عمليات عزل ودراسة أي جين.

- مصادر الـ DNA :

- الـ DNA الكرموسومي : الكرموسوم هو المصدر الاساسي للـ DNA والمعلومات الوراثية . فعندما نحتاج الى دارسة جين معين ولدينا بعض المعلومات حول تتابع الجين وموضعه يمكننا استخلاص DNA من خلال الخلية التي نريدها عن طريق انزيمات القطع لعزل الجين المطلوب. ويمكن استخدام الكرموسوم ككل فقط في الخلايا الأولية أو بدائية النواة فقط .

أما عند العمل مع الخلايا حقيقة النواة فهناك مشكلة بسيطة، كونها تحتوى على مناطق لا يمكن ترجمتها الى بروتين تسمى Intronغير معلوم وظيفتها بالضبط ولكن يرجح انها تعمل كمنظم وللتحكم في تتابع DNA .

ويتكون تتابع DNA الكرموسوم في حقيقات النواة من تتابعين هما :
1- الإكسونات Exon: وهو الجزء من التتابع الذى يتم نسخه الى شريط mRNA الرسول ليتم ترجمته الى بروتين وهو يمثل الجزء الصغير من الكرموسوم وتمثل حوالى 5٪
2- الإنترونات Intron: وهو تتابع DNA الذى يتخلل الإكسونات.

وتكون الإنترونات الجزء الاكبر من الكرموسوم ويمثل حوالى 95٪ .ولكن برغم ذلك لا يتم نسخه الى شريط RNA الرسول ليتم ترجمته الى بروتين لذلك ينبغي التخلص منه حتى يمكن الحصول على الجين .

- **عزل isolation الحمض النووي mRNA**

معظم الكائنات حقيقة النوى يحتوي mRNA الخاص بها على نهاية عديدة الأدينين لذا استخدمت هذه الميزة لاستخلاص mRNA من باقي الاحماض النووية RNA مثلRNA الريبوسومي(r-RNA) و RNA الناقل(t-RNA).

واستناداً لما سبق نجد أنه يوجد نوعان من المكتبات الجينية:

- المكتبة الجينية الناتجة من شريط DNA الجينومي: تتم من خلال عزل قطع من الحامض النووي من الجينوم. وتبدأ العملية باستخلاص الـDNA من الكائن المراد بناء مكتبته الجينية. ثم اجراء عملية هضم جزئي(تقطيع) للـDNA بأنزيم قطع يتميز بارتفاع معدل نشاطه القطعي مثل Sau *IIIA* المعزول من جراثيم Staphylococcus aureus. والغرض من ذلك هو الحصول على شظايا (قطع) طويلة نسبياً، مما يضمن أن معظم المورثات ستكون سليمة ولم يحدث لها أي تجزئة نتيجة القطع. حيث يفضل استخدام الفاج كناقل في مثل هذه المكتبات لأنه يسمح بإدخال شظية DNA كبيرة نسبياً (حوالي 20 كيلو قاعدة). وللحصول على مكتبة كاملة يكون عدد الشظايا المطلوبة متناسباً عكسياً مع حجم الشظية وطردياً مع حجم الجينوم كما في الجدول( ).

المصدر	عدد شظايا الـDNA في المكتبة الكاملة
بكتريا القولون	1500 شظية
الخميرة	4500 شظية
الدروسوفلا	50000 شظية
الثديات	800000 شظية

- ثم يتم بعد ذلك إدخال هذه الجزيئات إلى البلازميد حيث تجري عملية تنسيلها (اكثارها). وفي هذه الحالة فإن المكتبة الجينية تمثل عينة من جميع تتابعات الـDNA في كائن ما.

- المكتبة الجينية لمكمل DNA (cDNA) : تتم عن طريق استخلاص mRNA من الخلايا المتخصصة في انتاج بروتين معين بكميات كبيرة وبالتالي تكون نسبة mRNA الذي يشفر لهذا البروتين عالية. ثم يتم انتاج نسخ من الـDNA على قالب من الـmRNA باستخدام أنزيم النسخ العكسي، والشريط المتكون من هذه العملية

يسمى باسم DNA المكمل Complementary DNAويكتب اختصاراً هكذا cDNA. ويتم تحويل جزيئات الـDNA وحيدة السلسلة إلى جزيئات مزدوجة بفعل أنزيم بلمرة DNA. ثم اكثاره.

إن جزئ cDNA يحتوي فقط على التتابعات الشفرية (الاكسونات) بدون الانترونات. أي أن هذه المكتبة تحتوي فقط على تلك المناطق من الجينوم التي تم نسخها إلى mRNA لأن خلايا الأنسجة المختلفة تكون عادة متخصصة بإنتاج أنواع معينة من mRNA. لذلك تستخدم هذه الطريقة في حال استهداف مورث معين ذي قوة تعبير عالية في خلايا معروفة كما هو الحال في عزل مورثات البومين البيض من خلايا قناة البيض أو مورثات الأنسولين من خلايا البنكرياس وغيرها.

عموماً في المكتبة الجينية نظرياً كل مستعمرة تحصل على جين معين من الجينوم كله تمثل كتاب في مكتبة تحمل العديد من الكتب مثله.. التي تكون في النهاية الجينوم كامل.