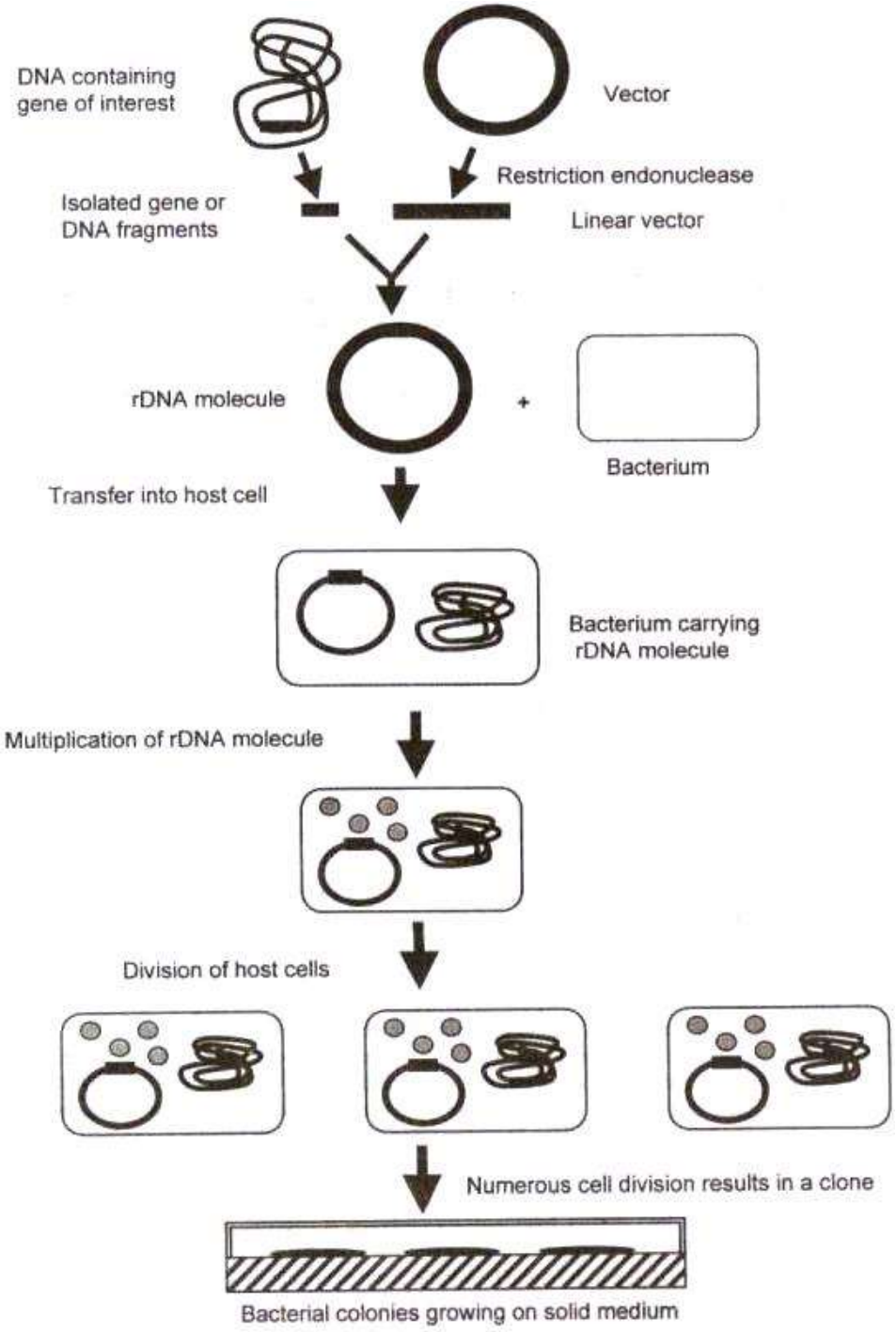
الكلية	العلوم
القسم	التقنيات الاحيائية
المادة باللغة الانجليزية	Plant tissue culture technique
المادة باللغة العربية	تقنية زراعة الانسجة النباتية
المرحلة الدراسية	الرابعة
اسم التدريسي	أنمار كامل مبارك
عنوان المحاضرة باللغة الانجليزية	Recombinant DNA technology
عنوان المحاضرة باللغة العربية	تقانة الدنا المعاد ارتباطه
رقم المحاضرة	الثامنة
المصادر والمراجع	George, E. F., Hall, M. A., & De Klerk, G.-J. (2008).** *Plant Propagation by Tissue Culture*. Springer https://uodiyala.edu.iq/uploads/PDF%20ELIBRARY%20UODIYALA/EL34/Plant%20Propagation%20by%20Tissue%20Culture%203rd%20Edition.pdf
	Pierik, R. L. M. (1997).** *In Vitro Culture of Higher Plants*. Springer
	Reed, B. M. (2008).** *Plant Tissue Culture: Techniques *and Experiments
	https://biot202.wordpress.com/wp-content/uploads/2015/09/plant-tissue-culture-third-edition-techniques-and-experiments-by-roberta-h-smith.pdf

أساس تقانة الدنا المعاد إرتباطه
Principle of recombinant DNA technology

أزدادت المعرفة حول الخلية ووظائفها إلى درجة كبيرة خلال القرن العشرين وساهم علم الوراثة بالمعلومات الأساسية في ذلك وتراكمت معلومات واسعة حول تركيب جزيئة الدنا وتضاعفها والسيطرة على التعبير الجيني. كانت التطورات التي حصلت خلال العقود الثلاثة الماضية سريعة جداً تحقق خلالها معرفة تعاقب الجينات(Gene sequencing) ونسخ الجين (Gene cloning) ونقله إلى الكائنات بدائية وحقيقية النواة. وربما تحتاج خطوات تقانة الهندسة الوراثية أو لا تحتاج إلى مرحلة ارتباط الدنا (rDNA)، ومع تقدم تقانة نقل الجين أصبح بالإمكان نقل الدنا الصناعي إلى خلايا مضيفات مختلفة دون الحاجة إلى ناقل كما أصبح بالإمكان هندسة كائن مضيف ليحمل خصائص مرغوبة.

وظفت تقانات التعامل مع التركيبات الوراثية لإنتاج أفراد بتراكيب وراثية جديدة لصفات موروثة. صنفت هذه التقانات إلى نوعين الأول المعالجات على مستوى الخلية وتشمل زراعة الخلايا (مثل زراعة الخلايا أحادية الأساس الكروسومي) وتهجين الخلايا الجسمية عن طريق دمج البروتوبلاست، وثانياً المعالجات على المستوى الجزيئي وتشمل بناء جزيئات rDNA صناعية وإدخالها إلى ناقل ثم توطيدها في خلية المضيف أو الكائن الحي. سميت الطريقة الأخيرة بتقانة الدنا المعاد ارتباطه Recombinant DNA (rDNA). لذلك فأن مصطلح الهندسة الوراثية وتقانة rDNA هي مصطلحات متداخلة مع بعضها. عليه فأن كل المعالجات المتضمنة استخدام جين مبني (Constructed gene) أو نقل الجين المركب تسمى تقانة rDNA . يولج الجين المراد نسخه إلى ناقل نسخ (Cloning vector أي بلازميد)، إذ لا يتضاعف هذا الجين الغريب (جزء الدنا) المدخل (بعملية التحول) إلى خلية البكتريا مع البكتريا. يعود السبب في ذلك لكون إنزيم DNA polymerase (المسؤول عن استنساخ الدنا) لا يبدأ بالعملية عشوائياً بل يجريها على مواقع منتخبة تعرف بمناطق التضاعف (Origin of replication). وعموماً لا تمتلك قطع الدنا الصغيرة منطقة تضاعف، وباستخدام تقانة rDNA أصبح ممكناً إدخال جين في ناقل نسخ يقوم بعمل نسخ من قطعة الدنا المدخلة. أن ناقل النسخ ببساطة هو عبارة عن جزيئة دنا تحتوي على منطقة تضاعف، يمكنها التضاعف داخل خلية المضيف المنتخب لهذا الغرض. علماً أن أكثر البلازميدات شيوعاً هي جزيئات الدنا الكروموسومية الاضافية الدائرية، المتضاعفة تلقائياً والتي تستعمل كذلك كناقل. تستعمل أحياناً الفيروسات كناقل لإدخال الجين إلى الكائنات المجهرية، وهي ناقل جيدة لخلايا الحيوان. تتطلب عملية قطع وإدخال الجين الغريب المرغوب إلى البلازميد انزيمات خاصة تسمى انزيمات القطع Restriction emzymes أو Restriction nuclease تعمل هذه الانزيمات على قطع جزيئات

الـدنا الكبيـرة إلـى وحـدات أصـغر خـلال شـقها تعاقبـات نيوكليوتيديـة معينـة تسـمى مواقـع التمييز(Recongnition sites)، عليه فأن أنزيمات القطع Restriction endonuclease عبارة عن انزيمـات DNase وDeoxy–ribonuclease عاليـة التخصـص. يقطـع الـدنا والـدنا الغريـب المـراد إدخاله بنفس الانزيمات ليشكل نهايات يتمم بعضها الآخر.



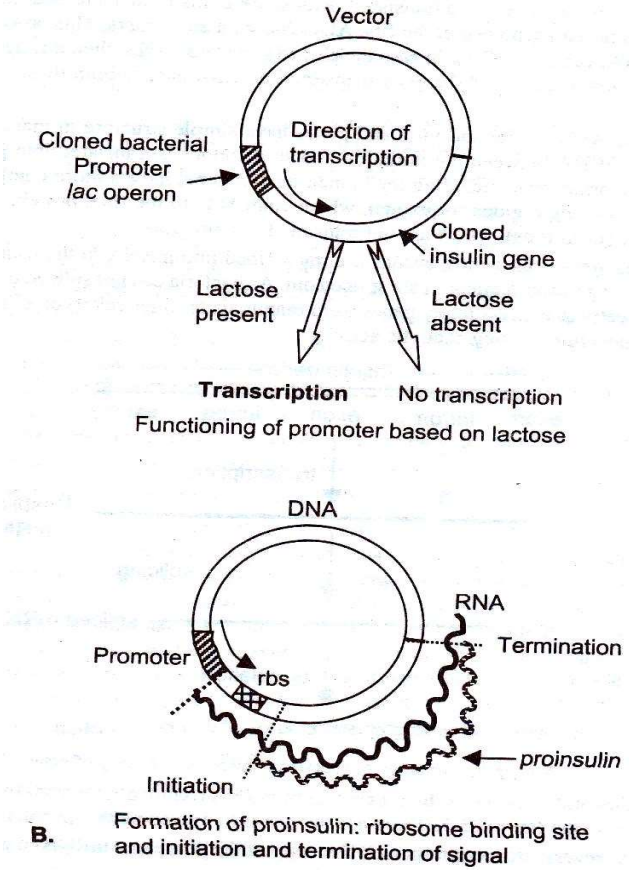
شكل(25-1): بناء الدنا المعاد ارتباطه (بلازميد) والبكتريا المعاد ارتباطها

وهكذا تلتحم نهايات الدنا الغريب تماماً مع النهايات المقطوعة للناقل لتكوين جزيئة دائرية مرة ثانية حيث تدخل هذه التوليفة الكايميرية أو الدنا معاد الارتباط (الحامل) إلى خلية المضيف (خلية

بكتيرية) بعملية التحول. نظرياً يمكن نسخ جين مرغوب من أصل غريب داخل خلية المضيف وعادة يلاحظ التعبير الجيني على شكل منتوج الجين(Gene product) وهو تكون البروتين. يشتمل هذا على تكوين الرنا المراسل mRNA والـ Polypeptide ذات العلاقة. يوجد في العديد من جينات الكائنات حقيقية النواة خطوة إضافية قبل عملية الترجمة وهي إزالة التعاقبات غير المشفرة من الرنا المراسل (mRNA) بعملية تسمى الوصل (Splicing).

عملية استنساخ الدنا DNA transcription

تتم عملية استنساخ الدنا إلى رنا مراسل بأنزيم يسمى RNApolymerase، يميز هذا الانزيم موقع الربط على الدنا المسمى بالمحفز(Promote). تتوقف عملية بناء الرنا المراسل بإشارة إنهاء من كودون يسمى (Terminator codon)، هذا يعني أنه الجين الواقع بين المحفز والموقف (Terminator) سوف يستنسخ فقط.



شكل (25-5): تفعيل جين الانسولين بواسطة محفز Loc Operon (A) وموقع المكونات المختلفة لنظام النسخ (B)

لا تحتوي الجينات المعزولة بطرق خاصة كاستنساخ الـ cDNA أو البناء الصناعي على محفز خاص بها، لذا يجب إدخالها إلى ناقل بموقع قريب من موقع المحفز، وحتى عندما يكون الجين المستنسخ حاملاً لمحفز فأن الاخير ربما لا يعمل في خلية المضيف الجديدة. تحت هذه الظروف يجب

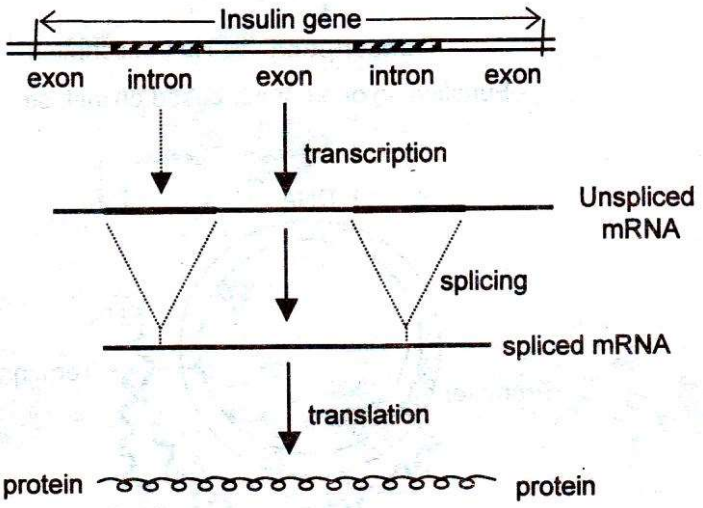
إبدال المحفز الأصلي. يلاحظ من شكل (A2 -25) موقع جين الانسولين المستنسخ مع محفز اللاكتوز Lac promoter في الناقل. أن هذا الجين قد يستنسخ بوجود اللاكتوز لأن اوبرون اللاكتوز يعمل بوجود اللاكتوز ويستنسخ الجين المرتبط بنفس اتجاهه. وبالمثل فأن موقع ربط الرايبوسوم (rbs) وكودون الانتهاء (Termination codon) موضحة في شكل (B2 -25) بخصوص جين الانسولين في الناقل.

الترجمة Translation

تعد ترجمة الرنا المراسل mRNA إلى بروتينات عملية معقدة تشمل على تداخل الرنا المراسل مع الرايبوسومات. ولكي تحصل الترجمة، يجب أن يحمل الرنا المراسل موقع ربط الرايبوسومات أمام الجين المراد ترجمته. يرتبط الرايبوسوم في هذا الموقع ويتحرك على امتداد الرنا المراسل فيسبب بدء بناء البروتين عند أول كودون AUG يقابله. تتوقف هذه العملية بكودون التوقف (UAA وAUG أوUGA) وفي حالة نقص rbs على الجين المستنسخ فمن الضروري استعمال ناقل حاوي على محفز وrbs حيث يدخل الجين باتجاه كلا من المحفز والـ rbs.

وصل الرنا المراسل Splicing mRNA

تمتلك البكتريا والفيروسات والجينات تراكيب بسيطة، وهي أن كافة المعلومات الوراثية الموجودة على الرنا المراسل بين كودونات الشروع والتوقف تترجم إلى بروتينات. أن العديد من جينات الكائنات حقيقية النواة ومن ضمنها جين الانسولين البشري تمتلك تراكيب أكثر تعقيداً، فهي تحتوي على مناطق تشفيرCoding regions تسمى اكسونات (Exons) تساهم في الترتيب النهائي للبروتين، ومناطق لا تشفير (Non–codingregions) تسمى انترونات (Introns) لم تترجم إلى بروتينات. تستنسخ الجينات الحاوية على انترونات في الكائنات حقيقية النواة إلى رنا مراسل بالطريقة العادية ولكن توصل بعد ذلك تعاقبات الانترون المتنافرة. وبسبب كون البكتريا لا تستطيع وصل الانترونات لذا لا يمكن استعمالها مباشرة في تعبير العديد من جينات اللبائن أو كائنات أخرى حقيقية النواة، ويتم ذلك باستعمال جزيئات الرنا الرايبوسوم (Ribosomes–RNA molecules) ذات الفعالية المحفزة.



شكل (25-3): تكوين رنا مراسل mRNA فعال عن طريق ربط الجين

أن عملية تكوين الانسولين (ثنائي الببتايد Dipeptide) بمعالجة الرنا المراسل mRNA (إزالة الانترونات) وترجمة الاكسونات موضحة بشكل (25-3). هناك طريقتان لمعالجة هذه المشكلة:

1. استعمال انزيم Reverse transcriptase، تحضر نسخة من الدنا التكميلي cDNA من الرنا المراسل المعالج، ثم يدخل هذا الجين (cDNA) في الناقل.
2. بالإمكان تصنيع جين خاص ببناء البروتين في أنبوبة اختبار غير حاوية على انترونات.

التعديل بعد الاستنساخ Post–transcriptional modification

تدخل العديد من البروتينات في تعديلات بعد الاستنساخ حيث تصنع البروتينات المقرر نقلها خارج الخلية باستعمال 15-30 حامض أميني أضافي في نهاية الامين (نهاية N). يطلق على الحوامض الامينية الإضافية بتعاقبات الاشارة (Signal sequences) أن الميزة الشائعة لهذه التعاقبات هي إنها تحتوي على قلب مركزي من حوامض امينية غير محبة للماء (Hydrophobic) محاطة ببقايا قطبية محبة للماء (Hydrophilic)، وخلال مرورها من خلال الاغشية ينشق تعاقب الاشارة جاعلاً من البروتين فعالاً.

اختيار البكتريا المعاد ارتباطها Selection of recombinant bacteria

هناك طرق عديدة لتسهيل مهمة انتخاب البكتريا المعاد ارتباطها تشمل :

1. إكمال النواقص الوراثية في التغذية، نمو أو عدم نمو البكتريا على وسط انتقائي مناسب.

2. عند استعمال جين مصنع، يكون الانتخاب سهلاً مقارنة مع قطع الدنا المستعملة من مكتبة منظومات جينات الكائن الحي التي تتطلب الانتخاب لصفات مناسبة.

3. عن طريق تقانة تهجين الحوامض النووية Nucleic acid hybridization

لذا يجب توخي الحذر والدقة في جميع خطوات عملية إعادة ارتباط كائنات حية غير حقيقية النواة. كانت ولا تزال *E.coli* أكثر أنواع البكتريا استخداماً في تقانات إعادة ارتباط الدنا. علماً إن إنتاج كائنات حية حقيقية النواة ثم إعادة ارتباطها قد ورد في فصول هذا الكتاب.

ملحق Annexure

أن الطريقة الأساسية هي استخلاص الدنا من منظومة جينات الواهب (Donor) وتقطيعه إلى قطع تحتوي من جين إلى عدة جينات والسماح لهذه القطع بادخال نفسها بشكل فردي إلى داخل البلازميدات المفتوحة. تعمل هذه الجزيئات الدائرية الصغيرة كحوامل أو نواقل لقطع الدنا. يطلق على جزيئات الناقل مع مدخلاتها بالدنا المعاد ارتباطها (Recombinant DNA) لأنها تحتوي على توليفات دنا جديدة من منظومة جينات الواهب مع دنا الناقل من مصدر مختلف تماماً (بلازميد أو فايروس). يستعمل خليط الدنا المعاد ارتباطه في تحول خلايا البكتريا بعد طليها في الاطباق والسماح لها بالنمو وتكوين المستعمرات. عندها ستنقسم خلية فردية محولة تحتوي على ناقل معاد ارتباطه لتكون مستعمرة، وتستمر بالانقسام إلى ملايين الخلايات تحمل جمعياً نفس الناقل المعاد ارتباطه. لذا فأن مستعمرة مفردة حاوية على مجتمع كبير بمدخلات دنا متطابقة تماماً يطلق عليه سلالة الدنا (DNA clone).

أ. انزيمات القطع Restriction enzymes (Resticton endonuclease)

أصبحت تقانة اعادة توليف الدنا ممكنة بعد اكتشاف انزيمات القطع التي تنتجها البكتريا كميكانيكية دفاعية ضد الملتهم Phage. تعمل الانزيمات كالمقصات تقطع دنا الملتهم وبالتالي توقف فعاليته، وهذا مهم جداً لأن هذه الانزيمات لا تقطع عشوائياً بل تقطع تعاقب الدنا الهدف في معالجات الدنا. تحتوي اي جزيئة دنا سواء من فايروسات أو إنسان؛ على مواقع تعد هدفاً لانزيم القطع تصيبه بالصدفة وبالتالي تقطع الدنا إلى قطع محدودة الحجم ومناسبة لعملية النسخ. أن مواقع القطع عادة غير مناسبة لإداء وظيفة الكائن الحي ولا يمكن قطعها داخل الجسم الحي، ويعود سبب ذلك إلى أن أغلب الكائنات الحية لا تمتلك انزيمات القطع.

يميز انزيم القطع EcoRI من بكتريا *E.coli* تعاقب ازواج النيوكليوتيدات الستة التالية في دنا أي كائن حي:

5′-GAATTC-3′

3′-CTTAAG-5′

يسمى هذا النوع من القطع (بالندرومات الدنا DNA palandrume)، الذي يعني أن كلا الشريطين لهما نفس التعاقب النيوكليوتيدي ولكن باتجاه موازي معاكس. هناك العديد من انزيمات القطع

المختلفة تميز وتقطع بالندرومات محددة، على سبيل المثال يقطع انزيم Eco-RI ضمن هذا التعاقب ولكن في زوج من القطوع المائلة بين النيوكليوتيدات A G:

5′ - G | AATTC – 3′ ⟶ 5′ - G AATTC - 3′

3′ - CTTAA | G – 5′ 3″ – CTTAA G – 5′

يترك هذا القطع المائل زوجاً متماثلاً من شريط مفرد ذو نهايات لزجة ويطلق عليها لزجة بسبب احتواءها على أصرة هيدروجينية يمكنها الالتصاق إلى تعاقب تكميلي. علماً أن إنتاج هذه النهايات اللزجة تعد ميزة أضافية لانزيمات القطع تجعلها مناسبة للاستعمال في تقانة إعادة ارتباط الدنا. وعند قطع جزيئتي دنا مختلفتين بنفس انزيم القطع، سينتج كلاهما قطع لها نفس النهايات التكميلية اللزجة الأمر الذي يزيد من فرص تكون كايميرات الدنا.

شخصت العشرات من انزيمات القطع مخصوصة لتعاقبات معينة كما هو معروض في الجدول التالي، علماً أن كل تعاقبات الهدف هي بالندرومات، ولكن كما هو الحال في EcoRI تعمل بعض الانزيمات قطوع مائلة في حين تعمل انزيمات أخرى قطوعات غير حادة (Blunt) وحتى النوع الأخير من القطوع والذي تنقصه النهايات اللزجة، يمكن استعماله في عمل دنا معاد ارتباطه.

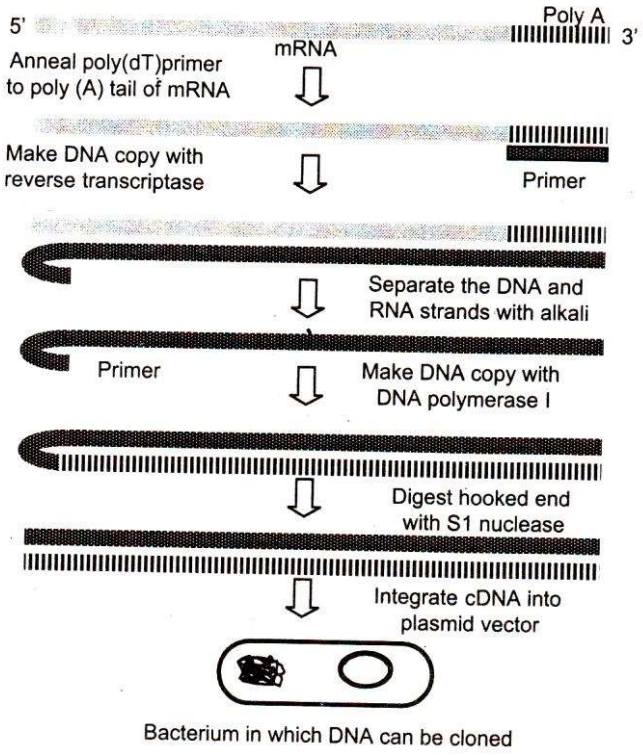
جدول (25-5): مواقع تشخيص وشق لإنزيمات قطع مختلفة

Enzyme	Restriction site in double-stranded DNA	
Eco RI	5′-G↓AATT C-3′	(sticky ends)
	3′-CTTAA↑G-5′	
Hind II	5′-GTPy↓PuAC-3′	
	3′-CAPu↑PyTG-5′	(blunt ends)
Hind III	5′-A↓AGCTT-3′	
	3′-TTCGA↑A-5′	(sticky ends)
Hae III	5′-GG↓CC-3′	
	3′-CC↑GG-5′	(blunt ends)

ب. الدنا التكميلي Complementary DNA (cDNA)

وهو عبارة عن دنا صناعي مصنوع من الرنا المراسل باستخدام انزيم خاص يسمى Reverse transcriptase معزول أصلاً من فايروسات تسمى Retroviruses. وعند استعمال الرنا المراسل كقالب، يصنع الانزيم المشار إليه جزيئة دنا مفردة الشريط تستعمل كقالب لتضيع دنا مزدوج الشريط شكل (25-4). ولكونه مصنوعاً من رنا مراسل فأن الـ cDNA يكون خالٍ من التعاقبات التنظيمية النازلة والصاعدة وكذلك من الانترونات. وهذا يعني أن cDNA من الكائنات حقيقية النواة يمكن أن يترجم إلى بروتين فعال داخل البكتريا وهذه من الصفات المهمة عند تعبير جينات الكائنات حقيقية النواة في مضيفات بكتيرية. تهجن سلسلة dt مع ذيل (A) المتعدد لشريط الرنا المراسل. يستفاد من (dt)

كبادئ Primer لفعل انزيم Reverse transcriptase الذي يستخدم الرنا المراسل كقالب لتصنيع شريط دنا تكميلي. تكون نهايات cDNA الناتج على شكل حلقة دبوس الشعر. وعندما يتفسخ الرنا المراسل الناتج في هجين الرنا- الدنا عن طريق المعاملة بهيدروكسيد الصوديوم أو انزيم RNase H، تبقى قطعة قصيرة من الرنا. تصبح حلقة دبوس الشعر هذه بادئاً لانزيم DNA–polymerase-1. والذي يكمل شريط الدنا المزدوج. تنشق الحلقة بواسطة انزيم SI nuclease (الذي يعمل على حلقة الشريط المفرد) لإنتاج جزيئة cDNA ثنائية الشريط. يمكن إدخال هذا الدنا مزدوج الشريط في بلازميد أو كوزميد أو في نواقل نسخ الملتهم λ خلال التحام النهايات غير الحادة.



شكل (25-4): تصنيع شريط مزدوج للـ cDNA من mRNA باستعمال انزيم Reverse transcriptase

ج. الهجرة الكهربائية على الهلام Gel electrophoresis

تستعمل تقانة الهجرة الكهربائية على الهلام لفصل البروتينات والاحماض النووية. عموماً توضع عينة من جزيئة كبيرة معينة (بروتين أو دنا أو رنا) في حفرة عمودية عند أوقرب نهاية الهلام. يتكون هلام الترحيل من شبكة شبه صلبة من أشرطة مستقيمة مترابطة، ينشر الهلام كشريحة رقيقة يحتوي على عدد من حفر العينات، وبعد تحميل الحفر الموجودة في الهلام بالعينة يمرر مجال كهربائي خلال الهلام فترحل الجزيئات الكبيرة المشحونة المتساوية الحجم سوية باتجاه القطب الموجب خلال الهلام، كحزم منفصلة غير مرئية. تعتمد المسافة التي تقطعها الحزمة في الهلام على كتلة جزيئاتها الكبيرة وحجم الفتحات (حجم المسامات في الهلام). ومن البديهي أن الجزيئات الأصغر تقطع مسافة

أبعد من الجزيئات الأكبر. ترصد الهجرة الكهربائية على الهلام بملاحظة هجرة صبغة مرئية تسمى صبغة التعقب (Tracking dye) خلال الهلام. الصبغة عبارة عن مركب ذو وزن جزيئي واطيء مشحونة وتعبأ في كل حفرة عند بدء الهجرة. وعند وصول صبغة التعقيب إلى نهاية الهلام تتوقف عملية الهجرة وتظهر الحزم الموجودة في كل مسلك تحت كل حفرة عن طريق صبغ الهلام بصبغة سواء كانت خاصة للبروتين أو الدنا أو الرنا (شكل 25-5). يمكن رؤية الحزم المفصولة في الحالات التالية:

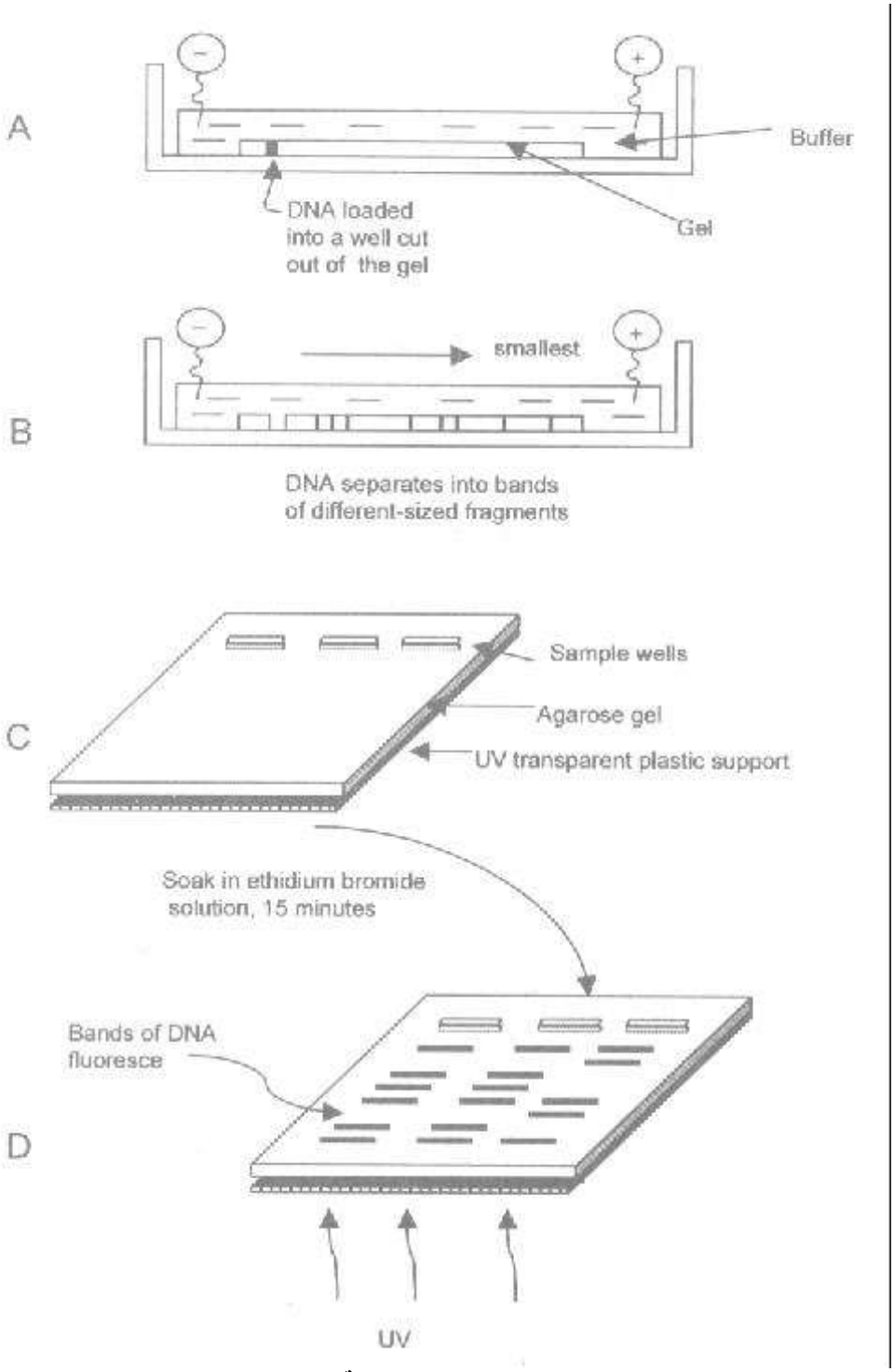
أ. عندما تكون هناك مادة كافية موجودة في الحزمة للارتباط مع الصبغة تجعل من الحزمة مرئية.

ب. عندما تختلف الجزيئات الكبيرة المفردة في العينة فيما بينها بالحجم. خلاف ذلك لا يمكن كشف الحزمة. وفي حالة كون الفرق قليلاً أو معدوماً بين حجوم الجزيئات في عينة مركزة فيلاحظ ظهور بقعة كبيرة ملونة. كما أن شدة الحزمة المصبوغة تعكس تواتر ظهور الجزيئة الكبيرة في العينة.

يمكن تحديد الوزن الجزيئي النسبي للحزم من خلال ترحيل مركبات بأوزان جزيئية مختلفة ومعلومة مع العينة على نفس الهلام ولكن في حفر مختلفة.يتناسب لوغارتم الوزن الجزيئي النسبي مع المسافة النسبية التي يقطعها (R_f) خلال الهلام. تعرف قيمة (R_f) بإنها المسافة المقطوعة من قبل حزمة مقسوماً على المسافة التي تقطعها صبغة التعقيب (جبهة الايون).

يعتبر هلام Polyacrylamide مفضلاً عند فصل البروتينات. أن عملية البلمرة المزدوجة (Co–Polymerization) Monomeric acrylaimd والرابط التبادلي المسمى Bisacrylamide تشكل شبكة من أشرطة مستقيمة متقاطعة من Polyacrylamide. يحدد حجم مسامة الهلام Polyacrylamide عن طريق تركيزالـ Acrylamide ونسبته إلى الـ Bisacrylamide. ان الهجرة الكهربائية على هلام Sodium dodecyl sulphate (SDS)-polyacrylamide الحاوي على 10% هلام Polyacrylamide يفصل البروتينات التي تتراوح بين 20-200 kDa.

استعمل الاكاروز وهو عبارة عن سكر متعدد يستخرج من ادغال بحرية بشكل روتيني كمادة هلامية في تقانه الفصل بالهجرة الكهربائية لجزيئات الاحماض النووية متوسطة الحجم. يفصل 1% من هلام الاكاروز سلاسل الدنا المزدوجة التي تتراوح بين 600-20000 bp وإذا فصلت الحزم بشكل جيد يمكن قطع حزمة فردية من الهلام كما يمكن إزالة عينة الدنا النقية من الهلام، لذلك فأن هجرة الدنا الكهربائية يمكن أن تكون أما تشخيصية (لتوضيح أي قطعة دنا موجودة) أو تحضيرية (مفيدة في عزل قطع دنا معينة).



شكل (25-5): الهجرة الكهربائية على الهلام

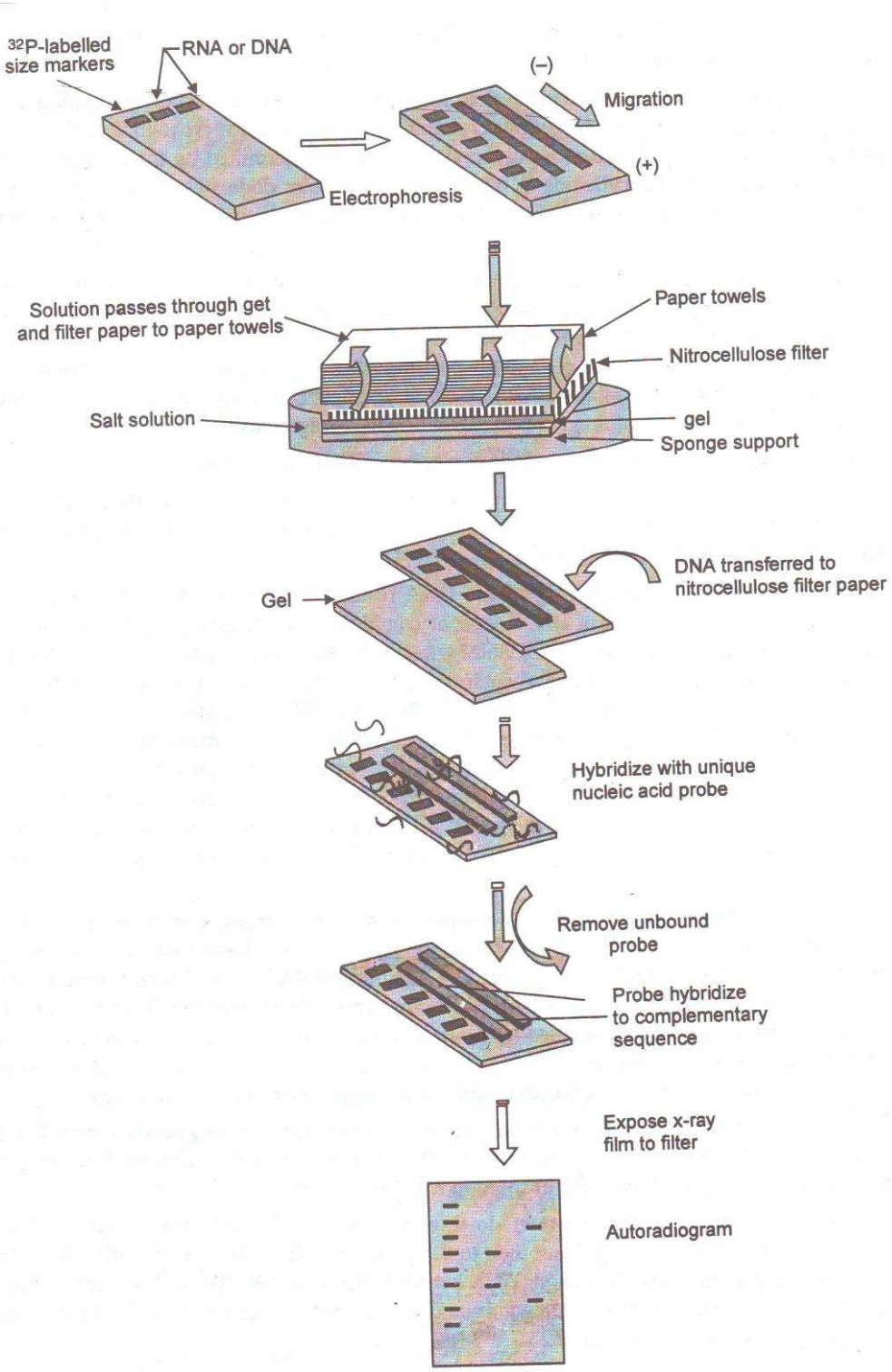
د. استعمال مجسات (Probes) للكشف عن حامض نووي محدد في خليط تقانه التنشيف (Blotting technique).

من خلال عملية معالجة جين أو منظومة جينات، من الضروري الكشف وعزل جزيئات دنا محددة من خليط معين. هناك عدة طرق لتجزئة الدنا ولكن اكثرها استخداماً هي طريقة الهجرة الكهربائية. ينتج من هظم دنا منظومة الجينات بانزيم القطع العديد من القطع بحيث تظهر على الهلام المصبوغ مسحة (لطخة) من الدنا. يمكن لمجس أن يميز قطعة واحدة من الخليط باستخدام تقانه طورت

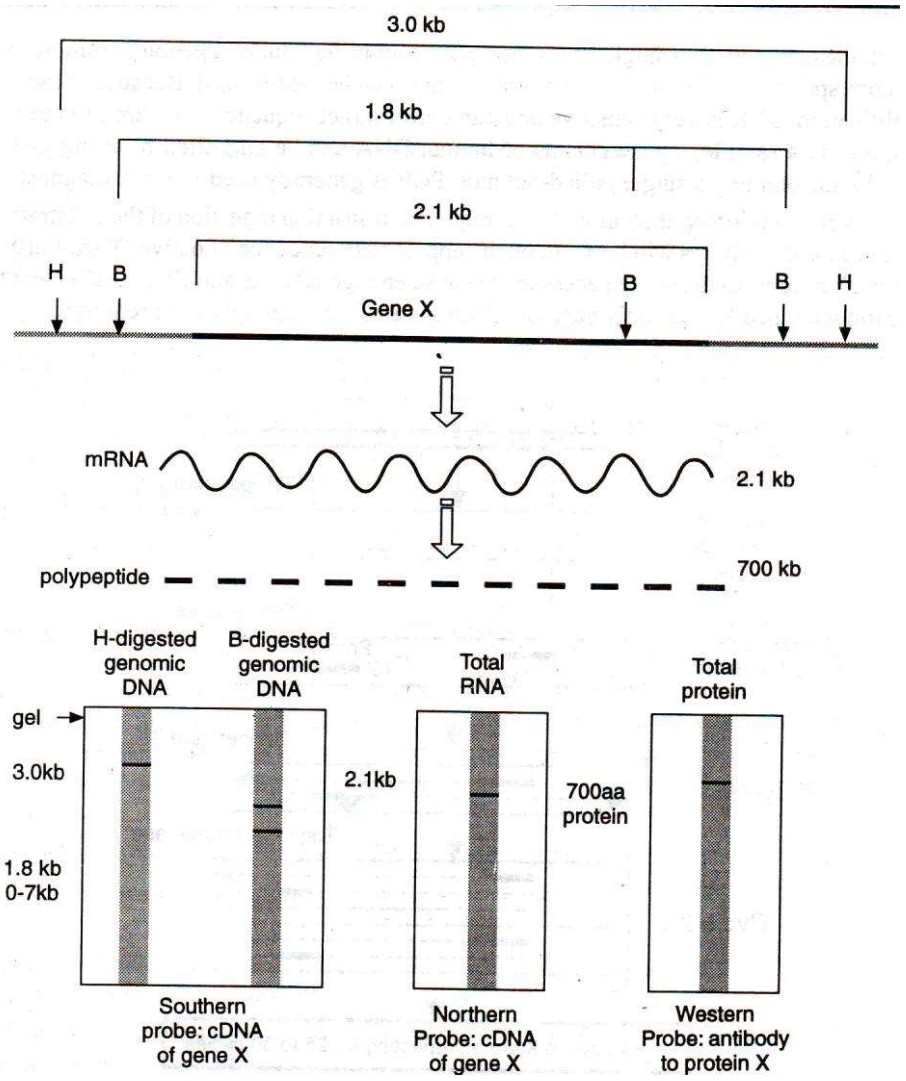
من قبل E.M.Southern يطلق عليها Southern blotting، وبعد تجزئة قطع الدنا على الهلام يوضع غشاء ماص على الهلام فتنتقل حزم الدنا على الغشاء بالخاصية الشعرية وعند نقلها الى الغشاء تبقى حزم الدنا في المواقع نفسها، أي تطبع على الغشاء تماماً بنفس مواقعها على الهلام، بعدها يوضع الغشاء في حمام مائي بمجس معلم (قطعة في الحامض النووي المعلوم تستعمل في تشخيص جزيئات دنا محدد تحمل التعاقبات التكميلية)، يستعمل جهاز Autoradiogram للكشف عن وجود أي حزمة على الهلام مناظرة للمجس . وكما ذكر سابقاً في موضوع الهجرة الكهربائية يمكن الاستدلال على حجم أي قطعة في العينة المفحوصة. يوضح الشكل (25-6) الطريقة العامة للتقانة.

يمكن توسيع التقانه الأخيرة للتحري عن جزيئة رنا معينة في خليط من جزيئات رنا مجزئة على الهلام. سميت هذه التقانه Northern blotting لتمييزها عن تقانة Southern المتبعة في تحليل الدنا. يتم طبع (Blotting) الرنا المجزئة على غشاء ثم تكشف بمجس بنفس طريقة Southern blotting. من تطبيقات تحليل Northern هي تحديد فيما إذا تم نسخ جين معين في نسيج ما أو تحت ظروف بيئية معلومة. يستخلص الرنا من عينة خلوية مناسبة ويرحل كهربائياً ويطبع على الغشاء (Blotted) وباستخدام مجس يكشف عنه مع الجين المستنسخ المدروس. حيث أن الاشارة الموجبة توضح وجود النسخة (Transcript).

انتشرت تطبيقات الدنا المستنسخ كمجس للكشف عن جزء منظومة جينات معينة محمولة على ناقل عن قطعة دنا معينة أو عن رنا معينة . وفي كافة الحالات المذكورة تستثمر قابلية الاحماض النووية على الارتباط في تعاقبات تكميلية في المحلول. طورت تقانة موازية لما سبق سميت Western blotting بهدف نقل بروتين مفصول بالهجرة الكهربائية من على الهلام ثم إظهار بروتينات معينة بمضادات الاجسام (Antibodies). والجدير بالذكر أن المجس هنا عبارة عن جسم مضاد معلم وليس دنا. تعد التقانات الثلاث أعلاه أدوات تجريبية كبيرة الفائدة في الكشف وإيجاد حجوم جزيئات كبيرة معينة في مجال الوراثة الجزيئية. وموضح في شكل (25-7) مقارنة بين التقانات الثلاث.



شكل (25-6): الهجرة الكهربائية على الهلام والتنشيف في تشخيص جينات مستنسخة محددة. يطلق على هذه الطريقة Southern blotting عندما ينقل الدنا إلى Nitrocellulose وتسمى Northern blotting عند نقل الرنا.



شكل (25-7): مقارنة لتحليلات Southern وNorthern وWestern لجينX حيث يمثل B وH مواقع الهدف لانزيمات التقييد B وH. مواقع الحزم على Southern blotting لا يمكن مقارنتها مع المواقع على الهلامين Western وSouthern

تفاعل سلسلة البوليميريز Polymerase chain reaction (PCR)

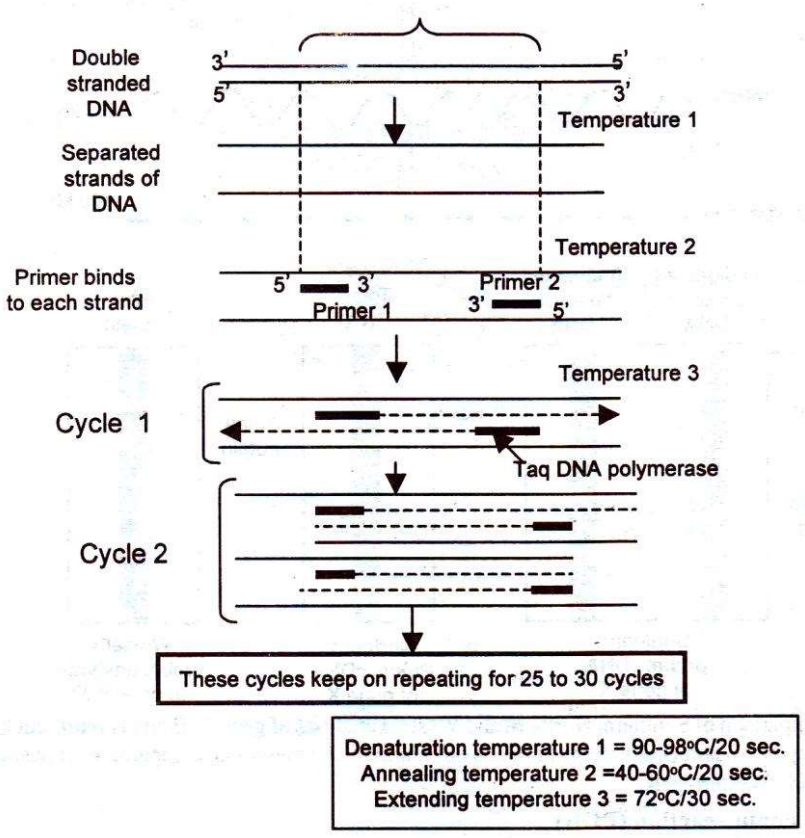
إذا استنسخت منطقة ما من الدنا وحدد تعاقبها، عندها يمكن استعمال هذا التعاقب في استرجاع اجزاء من منطقة مكافئة لها من دنا محدد دون الحاجة إلى الاستنساخ. تستخدم تقانه تسمى (PCR) لهذا الغرض.

أن أساس العمل بهذه التقانه موضحاً في شكل (25-8) يستعمل DNApolymerase و Taq polymerase مقاومة للحرارة معزولة من بكتريا *Thermus aquaticus*، لتحفيز النمو من بادئات الدنا (DNAprimers). يتم اكمال بناء (اطالة) زوج من البادئات على اشرطة متقابلة باتجاه بعضها البعض. وبعد انتهاء تضاعف القطعة بين بادئين (دورة واحدة) تفصل القطعتين المزدوجتين الجديدتين لتكوين قوالب الشريط المفرد. تتم الدورة الثانية للتضاعف عن طريق خفض درجة الحرارة بوجود

العناصر الضرورية للهجرة. وبتكرار دورات البناء والفصل تزداد باطراد عدد القطع المتضاعفة، وبالتالي يمكن أنجاز تكاثرات (Amplifications) قد تصل إلى مليون مرة.

باستعمال تقانه PCR يمكن اكثار نسخة واحدة من جين في منظومة جينات بشرط إمكانية تصنيع بادئات مطابقة لتعاقبات معلومة للجين. وبسبب الاكثار الاسي تكون تقانة (PCR) حساسة جداً وبالتالي يمكن الكشف عن التعاقبات الهدف الموجودة باعداد نسخ واطئة جداً في العينة. وعلى سبيل المثال يمكن اكثار قطع من دنا الانسان باستعمال عدد قليل من خلايا Follicle المحيطة بشعرة واحدة. وعلى العموم تستخدم تقانة (PCR) في تشخيص الدنا.

ومما تجدر الاشارة إليه أن التقانه لا تحتاج إلى الهضم بانزيم القطع Restriction digestion للدنا (Substrate DNA) بالنظر لكون البادئات سوف تستقر في تعاقب مناسب للدنا الأصلي، إضافة إلى عدم الحاجة إلى طرائق استنساخ مطولة نتيجة اكثار كمية كافية من الدنا بحيث تكون حزمة واضحة على الهلام، إضافة إلى الاحتياج إلى كمية قليلة جداً من الدنا لهذا الغرض.



شكل (25-8): سلسلة تفاعل البوليمر في توسيع مناطق قصيرة ومحدودة من الدنا دون الحاجة إلى الاستنساخ