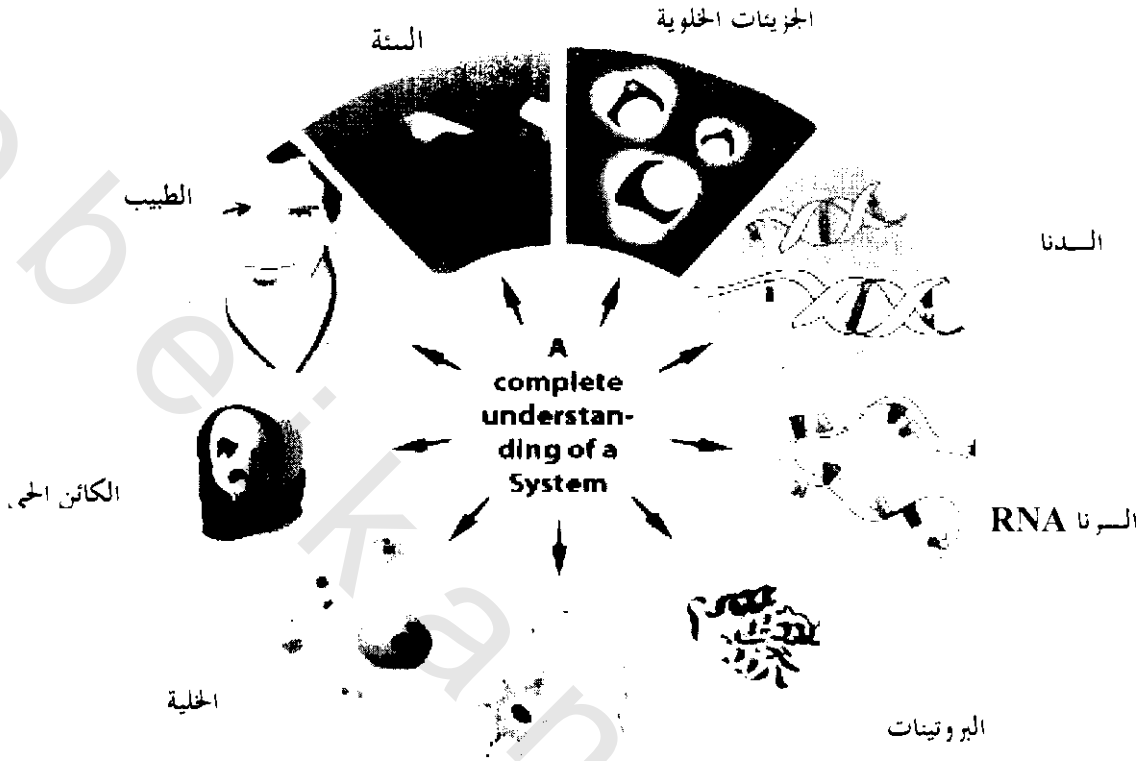
مقدمة

علم المعلوماتية الحيوية هو علم يستخدم الحاسب الألى والبرامج وقواعد البيانات لحل وشرح وتفسير العديد من التساؤلات البيولوجية ويتعامل هذا العلم مع مجموعة البيانات البيولوجية الهائلة الناتجة من المشروعات العلمية الكبيرة مثل مشروع الجينوم البشرى . ويوجد مجالين كبيرين من العلوم البيولوجية يستخدم فيهما علم المعلوماتية الحيوية بشكل أساسى ومتزايد وهما علم الجينومية Genomics (دراسة التركيب والوظيفة للمجموع الكلى لجينات الكائن الحى) وعلم البروتيومية Proteomics (دراسة التركيب والوظيفة للمجموع الكلى لبروتينات الكائن الحى).

ويعرف الجينوم بأنة مجموعة من تتابعات DNA التي تكون التركيب الوراثى للكائن الحى والتي تنتقل من جيل لأخر وتشمل هذه التتابعات كل الجينات (الوحدة الوظيفية والطبيعية لمادة الوراثة المنتقلة من الأب إلي الأبناء) والجزيئات الأخرى المنسوخة والغير مشفره . وعلي الجانب الأخر يشير علم البروتيومية إلي تحليل المجموعة الكاملة من بروتينات الكائن الحى والدراسة الكاملة للتركيب والوظيفة داخل الكائن.

بالأضافة الى ذلك فإن علم المعلوماتية الحيوية يستخدم في فروع كثيرة من علم البيولوجي مثل علم خرائط التمثيل الغذائي و شبكات الأتصال الخلوية و التفاعلات البيوكيميائية وغيرها . وتهدف كل هذه النواحي الهامة في علم المعلوماتية الحيوية إلي فهم الأنظمة البيولوجية المعقدة.

وقد أدى التوسع الكبير فى مجال المعلوماتية الحيوية الى أرتباطه بمجموعة كبيرة من العلوم الأخرى فى محيط الكائن الحى ولينتج ما يسمى بالنظام البيولوجي المتكامل " System biology" حيث أن النظام البيولوجي المتكامل يعتبر وسيلة لحل وتفسير العديد التساؤلات البيولوجية المعقدة وهو يتكون من اندماج علم الجينومية وعلم البروتيومات وعلم المعلوماتية الحيوية والعديد من العلوم الأخرى المتعلقة بها وذلك لشرح وتفسير كيفية عمل المسار الحيوي في الخلية و التعرف علي كيفية تفاعل الجينات والبروتينات والعناصر الاخرى الداخلية والخارجية المرتبطة بالمسار الحيوي مع بعضها البعض ومع البيئة المحيطة. كما يظهر فى الشكل ١



شكل ١ : صورة توضح الموجة القادمة من علم المعلوماتية الحيوية والتى النظام البيولوجي المتكامل (System biology) والتى تشتمل على مجموعة كبيرة من العلوم البيولوجية

obeikandl.com

نبذة تاريخية عن علم المعلوماتية الحيوية:

شهدت تسعينات القرن العشرين، تقدّماً قوياً في علوم الوراثة والجينات، خصوصاً في المشاريع الخاصةالتعرّف على التركيب الوراثي لعدد من الكائنات الحيّة، مثل الخميرة والفأر وذبابة الفاكهة وغيرها. وتوّجت هذه الجهود بالكشف عن التركيبة الوراثية (الجينية) للانسان. وبديهي ان تلك الانجازات ولّدت كمية كبيرة من المعرفة و المعلومات المتطورة في مجال علم البيولوجيا، تضمنت معرفة الخريطة الجينية لكثير من الكائنات المختلفة، والمركبات البروتينية الناتجة من الجينات المختلفة والتفاعل بينها وما ينتجه ذلك التفاعل من بروتينات أساسية وانزيمات وغيرها.

كما تمت دراسة الأنزيمات المسؤولة عن قراءة الشفرة الوراثية والتعامل مع معطياتها بمزيد من التفصيل، بما في ذلك نسخ المعلومات التي تحملها تلك الشفرة الحيّة والفريدة من نوعها. وبذا، استطاع العلماء التعرّف على تلك المعلومات التي تحُدّد تركيب الجسم وطبيعة عمله ونسق نموه. وهكذا، أدّت تلك التطورات إلى نمو نوعي في معلومات البشر عن الظواهر البيولوجية وتراكيبها وآلياتها. لذلك ظهرت الحاجة الى حفظ هذه المعلومات في قواعد بيانات بيولوجية Biological Databases والتى قد يتراوح عددها بين ٥٠٠ و١٠٠٠ قاعدة حتى الأن وتتزايد هذه القواعد مع مرور الوقت وزيادة الأبحاث والمعلومات كما لوحظ أندماج العديد من قواعد البيانات المتشابهة للتسهيل على الباحث. فمثلا قواعد البيانات الجينية الخاصة بكائن ما توضع فى محتوى الكترونى تسمى «بنك الجينات» GENE BANK وتختص بحفظ المعلومات عن تركيب وتتابعات الجينات الوراثية للكائنات لهذا الكائن . وغالبا ما نجد هذه البنوك الجينية للكائنات المختلفة مرتبطة مع بعضها ومع قواعد البيانات البروتينية لنفس الكائنات بالأضافة الى بعض المعلومات البيولوجية الأخرى. وأدى التزايد الكمي والنوعى للمعلومات البيولوجية إلى تطوير حقول علمية أخرى، خصوصاً الطبية منها.

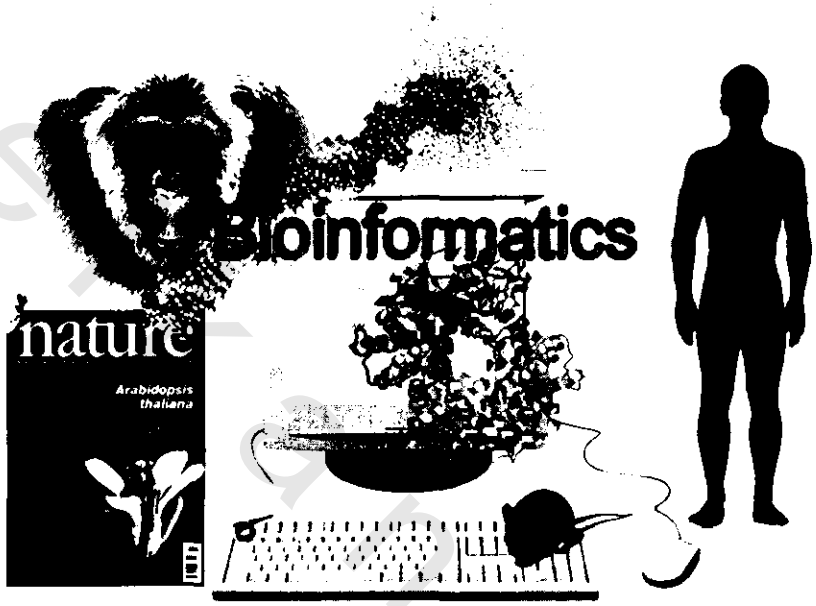
وترجع بداية أستخدام علم المعلوماتية الحيوية إلي العالمة "مارجريت داي هوف" في عام ١٩٦٨ حيث قامت هذه العالمة بعمل خريطة وكتالوج للتتابعات البروتنية توضح فيه تركيب وتتابع مجموعة من البروتينات الفيروسية. وقد ساعد ذلك على عمل برنامج حوسبى للبحث عن مناطق التشابه والأختلاف بين التتابعات الجينية والبروتينية المختلفة وتعد هذه الخطوة من أهم الخطوات البارزة في تطور علم المعلوماتية الحيوية. حيث استخدم العلماء في هذه الدراسة أول برامج بحثى للكشف عن تشابه التتابعات والذى أطلق عليه أسم الـ FASTP وبذلك تم توضيح أن تتابع

الجينوم الفيروسي المسبب للسرطان V-sis مشابه جدا لتتابع للجين PDGF الخلوي وزودت هذه النتيجة علماء البيولوجي بمعلومات كثيرة عن كيفة تسبب هذا التتابع الفيروسي فى احداث السرطان. وقد نشر هذا البحث فى عام ١٩٦٩ فى دورية علمية شهيرة والمعروفة بأسم (Scientific American) .

ويعد مشروع الجينوم البشري (Human genome project) من أكبر وانجح المشروعات العلمية التى أستخدمت علم المعلوماتية الحيوية بكثافة. ومن الجدير بالذكر أن أول الجينومات التي تم التعرف على تتابعها كانت من الفيروسات وهو فاج MS2 وكذلك جينوم البكتريا المسببة مرض الأنفلونزا. ويزود علم المعلوماتية الحيوية العلماء بالبرامج السهلة والميسرة لتحليل البيانات الضخمة والتي تعتبرالأن وسيلة أساسية لحل الكثير من المشاكل العلمية الجديدة .كما يعتبر علم المعلوماتية الحيوية علم حيوي مثير ويعبرعن طريقة حديثة للتفكير فى المشاكل البيولوجية والتى سوف يقود تطور الحاسب الألى فيها اكتشافات بيولوجية كبيرة. أن معرفة برامج الحاسب الألى وقواعد البيانات الخاصة بالعلوماتية الحيوية أصبحت جزء لايتجزء من العمل البيولوجى الحديث ولكل من يعمل فى ذلك المجال فى القرن الحادى والعشرين.

شكل٢ : شكل توضيحى يبين أستخدام الحاسب فى تحليل المعاومات البيولوجية

ويقوم علم المعلوماتية الحيوية بحل المشاكل البيولوجية الهامة والتي تشمل فهم الارتباط بين التركيب الجيني والشكل المظهري للأمراض البشرية وكذلك فهم العلاقة بين تركيب ووظيفة البروتينات.

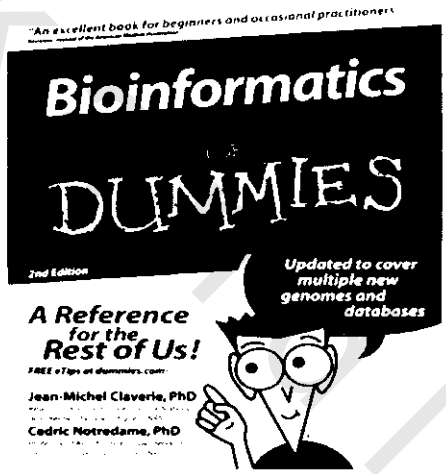


شكل٣: يوضح رسم تخيلى للمفهوم العام للمعلوماتية الحيوية والدمج بين علوم البيولوجى وعلوم الحاسب

الفصل الأول

أساسيات هامة للبدء فى تعلم المعلوماتية الحيوية Bioinformatics

يعتبر علم المعلوماتية الحيوية دمج بين علوم البيولوجيا وعلوم الحاسب الألى . ويختص هذا العلم بدراسة كيفية استخدام إمكانيات الحاسب الآلي في تحليل وتفسير النتائج البيولوجية المختلفة. ومن المراجع السهلة التى ينصح بها للمبتدئين فى هذا العلم كتاب (Bioinformatics for Dummies) هو أحد السلاسل الشهيرة التى يهتم بتبسيط العلوم والمفاهيم المختلفة للمبتدئين وقد تم الأستعانة ببعض الصور التوضيحة منه لتوضيح بعض المفاهيم الخاصة بهذه العلم



شكل٤ : صورة توضح شكل غلاف الكتاب الخاص بتعليم علم المعلوماتية الحيوية للمبتدئين الذى تم الأستعانه ببعض الصور التوضيحية منه لتوضيح بعض المفاهيم

والراغب فى دراسة وفهم هذا العلم يجب أن تتوفر لدية مجموعة من الأدوات والمعلومات الخاصة بهذا العلم مثل:-

١- امتلاك جهاز كمبيوتر به مايكروسوفت ويندوز.

٢- أن يكون لديك إنترنت متصل بحاسوبك ويفضل أن يكون سريع.

٣- أن تكون لديك بعض المعلومات الأساسية في البيولوجيا الجزيئية.

٤- أن تجيد استخدام شبكة الإنترنت ولكن ليس بالضرورة أن تجيد استخدام كل البرامج العادية للحاسب.

٥- معرفة ما هي البرامج والوسائل التي تحتاجها البحث الخاص بك الخاصة بالمعلوماتية الحيوية Bioinformatics.

ويجب ملاحظة أن معظم شركات البيوتكنولوجى التجارية الخاصة تعتبر أن الإنترنت وسيلة غير أمنة لنقل البيانات لذلك لها برامجها الخاصة وشبكاتها الخاصة لنقل بياناتها وتحليلها حيث تعتبرهذه البيانات من من الأسرار الهامة لدى هذه الشركة لأغراض المنافسة التجارية . بينما عندما يستخدم الباحث العادى البرامج التحليلية الخاصة بالمعلوماتية الحيوية الوجوده مجانا على الأنترنت لا يعتبر هذا سراً من هذه الأسرارحيث أنه سيقوم فى النهاية بنشر نتائجة فى المجلات العلمية. وعلى الرغم من أن هناك الكثير من البرامج التحليلية المجانية الخاصة بالمعلوماتية الحيوية متاحة على شبكة الإنترنت إلا أن هناك كثير من المعامل الخاصة والمؤسسات العلمية الكبيرة تفضل تطوير برامج تحليلية خاصة بها تتناسب مع طبيعة الأبحاث بها. لذلك تحرص هذه المعامل البيولوجية على وجود مبرمج للحاسب الألى واحد على الأقل ضمن فريقها البحثى لتطوير تلك البرامج الخاصة.

ولكن ما هي المعلوماتية الحيوية؟

١ - التعريف الضيق:

* *المعلوماتية الحيوية الكلاسيكية:* هو علم يستخدم في المقام الأول لتحليل التتابعات سواء بروتينية اوجينومية.

* *المعلوماتية الحيوية الحديثة:* (ما بعد علوم الجينوم) هوعلم يشتمل على دراسة المقارنة للجينومات المختلفة والحامض النووي وتحليل وظائف الجينومات وتحليل المجموعة البروتينية الكاملة للجينوم بالأضافة الى المعلوماتية الطبية.

٢- التعريف الواسع للمعلوماتية الحيوية:

هو عبارة عن تحليل كمية كبيرة من المعلومات البيولوجية سواء كانت تتابعات وراثية أو غيرها عن طريق الحاسب الآلي.

قبل ظهور علم المعلوماتية الحيوية ،كان هناك مصطلحان علميان لوصف مكان إجراء التجارب البيولوجية و هما:

١ - In vivo: وهي إجراء التجارب على الكائن الحي مباشرة .

٢ - In vitro: وهي إجراء التجارب داخل المعمل .

حديثا وبعد أستخدام علم المعلوماتية الحيوية تم إدخال مصطلح In silico وهي إجراء التجارب نظرياً على الحاسب الآلي قبل إجرائها على النظم الحيوية أو فى المعامل.

التتابعات البيولوجية:

أولا التتابعات البروتينية (Protein sequences)

تتكون البروتينات عادة من ٢٠ وحدة بنائية مختلفة يطلق عليها الأحماض الأمينية. وتختلف البروتينات فى تركيبها ووظائفها بأختلاف عدد ونوع الأحماض الأمينية الداخلة فى تركيبها كما يوضح الجدول التالى:-

(جدول١): قائمة بـ ٢٠ حمض أميني مع ذكر أسمائها الكاملة والشفرة الثلاثية (المكونة من ثلاثة أحرف) والشفرة الأحادية (المكونة من حرف واحد) لهذه الأحماض والتى يطلق عليها عالميا شفرات الاتحاد الدولي للكيماء البحتة والتطبيقية (الأيوباك IUPAC).

The 20 Amino Acids and Their Official Codes

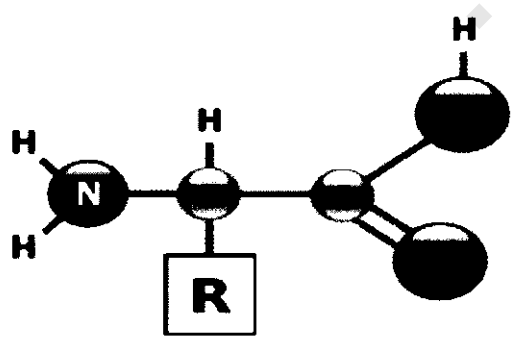
#	1-Letter Code	3-Letter Code	Name
1	A	Ala	Alanine
2	R	Arg	Arginine
3	N	Asn	Asparagine
4	D	Asp	Aspartic acid
5	C	Cys	Cysteine
6	Q	Gln	Glutamine
7	E	Glu	Glutamic acid
8	G	Gly	Glycine
9	H	His	Histidine
10	I	Ile	Isoleucine
11	L	Leu	Leucine
12	K	Lys	Lysine
13	M	Met	Methionine
14	F	Phe	Phenylalanine
15	P	Pro	Proline
16	S	Ser	Serine
17	T	Thr	Threonine
18	W	Trp	Tryptophan
19	Y	Tyr	Tyrosine
20	V	Val	Valine

أكواد الأحماض الأمينية السبعة الإضافية:

تستخدم هذه الأكواد السبعة الأضافية اما لوصف بعض الأحماض الأمينية الجديدة التى تم أكتشافه حديثا فى بعض أنواع البكتريا أو للتعبيرعن عدم التأكد من صحة وجود بعض الأحماض الأمينية.

(جدول٢): قائمة أكواد الأحماض الأمينية السبعة الإضافية (شفرات الاتحاد الدولي للكيماء البحتة والتطبيقية (الأيوباك IUPAC).

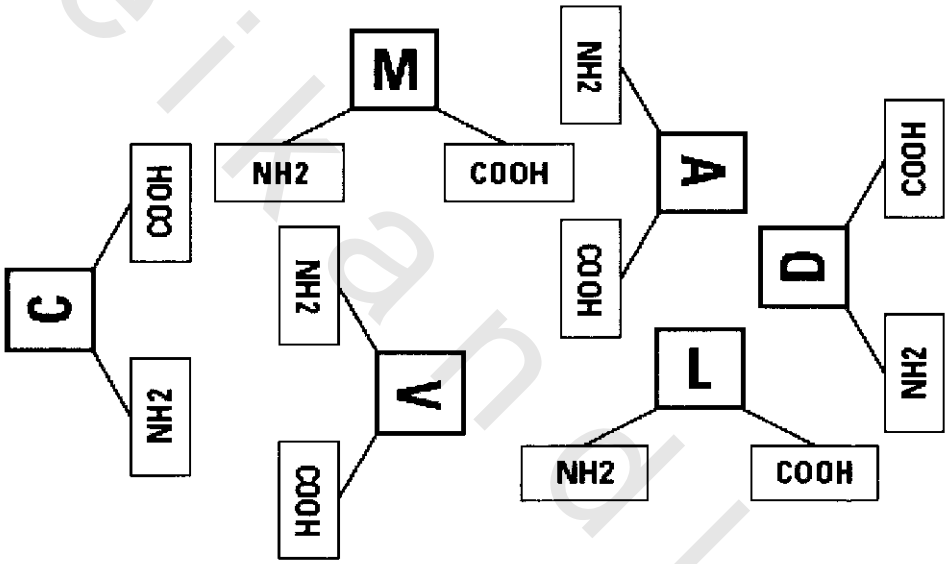
1-Letter Code	3-Letter Code	Meaning
B	Asn or Asp	Asparagine or aspartic acid
J	Xle	Isoleucine or leucine
O (letter)	Pyl	Pyrrolysine
U	Sec	Selenocysteine
Z	Gln or Glu	Glutamine or glutamic acid
X	Xaa	Any residue
--	-----	No corresponding residue (gap)



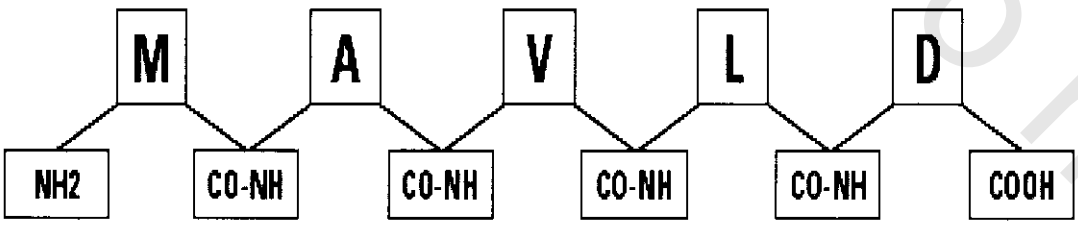
شكل ٥: يوضح البنية الكيميائية لحمض أميني في الكربون ألفا، لاحظ جذر الأمين NH٢ إلى اليسار وجذر الكربوكسيل COOH إلى اليمين

كيفية قراءة التتابع البروتيني:

تكوين السلسلة البيتيرية : الأحماض الأمينية (Amino Acid) هي لبنات البناء الرئيسية لبناء البروتين والببتيد في الجسم. يمكن ملاحظتها بسهولة بعد هضم البروتين (شكل٥ و٦). على الرغم من أختلاف تركيب وشحنة الأحماض الأمينية ألا أنها جميعا تتشابه فى وجود طرف أمينى(NH2) وطرف كربوكسيلى(COOH) . ترتبط الأحماض الأمينية مع بعضها عن طريق ارتباط الطرف الأميني(NH2) مع الطرف الكربوكسيلى(COOH) للحمض الأميني الآخر مكوناً رابطة ببتيدية مع خروج جزيء ماء (H2O)كما هو موضح بهذا الشكل٥ .



شكل ٦: صورة توضح التركيب العام للأحماض الأمينية المختلفة. يجب ملاحظة الطرف الأميني(NH2) والطرف الكربوكسيلى(COOH) لكل حمض الأميني.



شكل ٧: شكل يوضح ارتباط الطرف الأميني(NH2) مع الطرف الكربوكسيلى(COOH) للحمض الأميني الآخر مكوناً رابطة ببتيدية مع خروج جزيء ماء(H2O).

ولكن كيف يمكن ان نقرأ السلسلة الببتيدية؟

فى الغالب يتم قراءة السلسلة الببتدية بدأ من الطرف الأمينى أقصى اليسار الى الطرف الكربوكسيلى اقصى اليمين.

مثال لقرأة سلسلة ببتيدية قصيرة مكونة من خمس أحماض أمينية بالشفرة أحادية الكود أو بالأسم الكامل (M إلى D) :

MAVLD = Methanine – Alanine – Valeine – Leusine – Aspartic

كما يمكن قرأه نفس الأحماض الأمينية بإستخدام الشفرة الثلاثية

MAVLD = Met – Ala – Val – 1eu – ASP

مثال: الأنسولين Insulin يتكون من ١١٠ حمض أميني والذى يمكن كتابته على الصورة التالية (٣٠ جليسين Glycines + ٤٤ ألانين Alanines + ٥ تيروزين Tyrosines + ٤ جلوتامينGlutamines + ...)

ولكن هذه الطريقة تستهلك كميه كبيرة من المساحة التخزينية لجهاز الحاسب الآلي وخاصة عن التعامل مع كمية كبيرة من التتابعات البروتينية.

ولذلك تظهر فائدة الشفرات الأحادية والتى يمثل فيها كل حمض أمينى عن طريق حرف واحد وذلك لتوفير المساحة التخزينية لجهاز الحاسب الآلي وأيضا لزيادة سرعة التعامل مع اكبر قدرمن هذة البينات فى أقل وقت ممكن. وبناء على ذلك فيمكن مثلا كتابة جزىء الأنسولين الكلمل بإستخدام الشفرات الأحادية فى عدد أقل من السطور كما يلى :

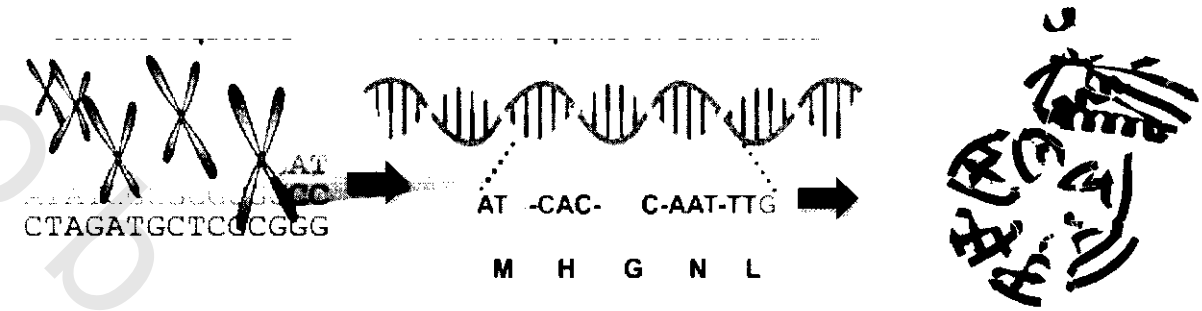
Insulin =
MALWMRLLPLLALLALWGPDPAAAFVNQHLCGSHLVEALYLV
CGERGFFYTPKTRREAEDLQVGQVELGGGPGAGSLQPLALE
GSLQKRGIVEQCCTSICSLYQLENYCN

الشكل الثلاثي الأبعاد للبروتين Protein 3-D structures

إذا حدث تغير في أحد التتابعات الشفرية المكونة للأحماض الأمينية يؤدى ذلك إلى التغير في التركيب البروتينى الناتج وبالتالي التغير في الوظيفة وافضل مثال على ذلك هومرض أنيميا خلايا الدم المنجلية حيث أن التغير الحادث فى أحد الشفرات الوراثية لأحد الأحماض الأمنية يؤدى الى تغير التركيب البروتينى الناتج وبالتالى قدرتة على أداء وظيفته.

obeikandl.com

التركيب ثلاثى الأبعاد للبروتين ← التركيب البروتينى الناتج ← التتابع الوراثى داخل الجينوم



شكل ٨: شكل يوضح التركيب ثلاثى الأبعاد للبروتين والذى يؤثر فى نشاط ووظيفة البروتين.

نبذة تاريخية عن الشكل ثلاثي الأبعاد(3D) للبروتين :-

أول شكل ثلاثي الأبعاد(3D) للبروتين تم تحديده عام ١٩٨٥ بواسطة العالمان Kendraw and Perutz باستخدام الأشعة السينية وعلم البلوريات. وقد حصل كلاهما على جائزة نوبل في العلوم وبالإضافة إلى فوز أحدهما بجائزة نوبل في مجال البيولوجيا الجزيئية. وفى ذلك السياق وقد لوحظ أن :

١- البروتينات المتشابه فى التركيب ثلاثي الأبعاد تؤدي وظائف متشابهة. من المتوقع أن تكون البروتينات التي تحتوى على تتابعات ببتيدية متشابهة أن تتشابه فى الشكل ثلاثي الأبعاد الخاص بها وبالتالي تؤدي نفس الوظائف.

- وظيفة البروتين تعتمد اعتماد مباشر على الشكل الثلاثي الأبعاد لهذا البروتين.

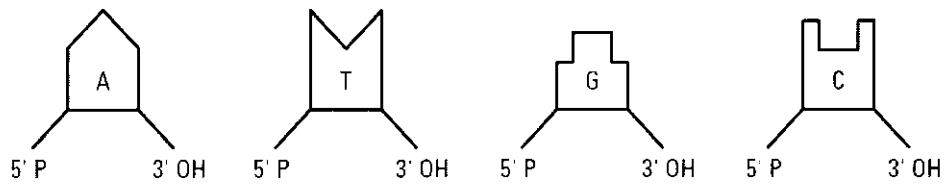
الوظيفة ← التركيب ← التتابعات

Function→Sequence → Structure

ثانيا تتابعات الـ DNA (Sequences DNA)

كيفية قراءة تتابعات الـ DNA بالطريقة الصحيحة؟

- يتكون الـ DNA من وحدات تسمى النيوكليوتيدات((Nucleotides والتى يرمز لها بـ C (سيتوزين) ، A(أدنين)،T (ثيامين)، G(جوانين). ولكل قاعدة من القواعد النتروجينية السابقة طرف هيدروكسيلي(3`OH ) و طرف فوسفاتي(5` Po4) وارتباطها معا يكون روابط فوسفودای أستر.



شكل ٩: شكل يوضح القواعد النتروجينية الأربعة التى يتكون منها الـ DNA.

- الأحماض النووية أسهل في قرائتها وتخزينها على الحاسب عن الأحماض الأمينية لأنها تحتوي على ٤ قواعد فقط أي أربع رموز فقط وهي A – T – G – C.

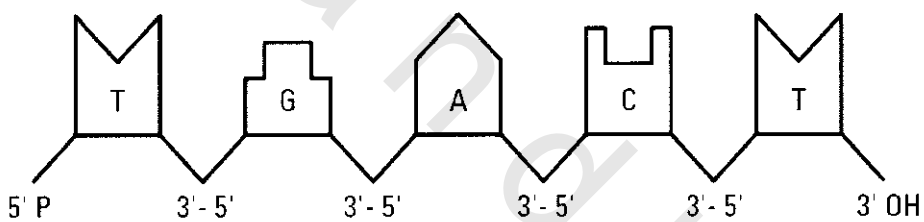
وبالتالى يمكن قراءة التتابع التالى كما يلى:

TGACT = Thymine-Guanine-Adenine-Cytosine-Thymine

أو

T (ثيامين) – C (سيتوزين) – A(أدنين) – G (جوانين) – T (ثيامين)

TGACT =



شكل ١٠: شكل يوضح أرتباط القواعد النتروجينية الأربعة التى يتكون منها الـ DNA بروابط فوسفودای أستر

شفرات الأيوباك لتتابعات الـ DNA:

شفرات الأيوباك هى الشفرات المتعارف عليها عالميا للتشفير عن النيوكليوتيدات والتى تظهر فى الجدول التالى:

جدول٣ : قائمة أكواد النيكليوتيدات لتتابعات الـ DNA (شفرات الاتحاد الدولي للكيماء البحتة والتطبيقية (الأيوباك IUPAC)).

1-Letter Code	*Nucleotide Name*	*Category*
A	Adenine	Purine
C	Cytosine	Pyrimidine
G	Guanine	Purine
T	Thymine	Pyrimidine
N	Any nucleotide (any base)	(n/a)
R	A or G	Purine
Y	C or T	Pyrimidine
--	-----	None (gap)

ملحوظات:

R يرمز به عند الاشتباه في G أو A

Y يرمز به عند الاشتباه في T أو C

N يرمز به عند الاشتباه في أي نيوكليوتيده من الأربع (A,T,C,G)

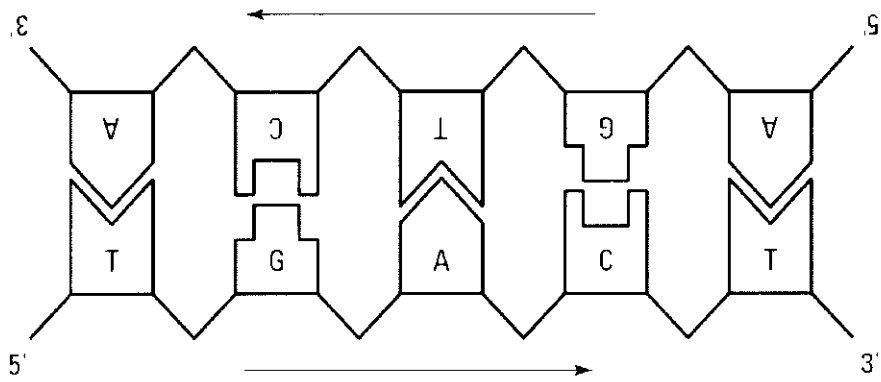
يوضع الرمز (--) فى التتابع عندما لاتوجد اى نيوكليوتيدة

- Palindromes التتابعات المتعاكسة (البالندرومية)

أجزاء من الـ DNA إذا تم قرأتها فى أتجاه معين (٥-٣ مثلا) من أحد الخيطين تعطى نفس القراءة عند قرائتها من الطرف الآخر فى الأتجاه (٥-٣) . أى أن هذه التتابعات هى صور متشابه ومتكاملة ومتعاكسة فى الأتجاه لمقطع من الـ DNA كما هو موضح فى المثال التالى.

ATGCTGATCTTGGCCATCAATG and

CATTGATGGCCAAGATCAGCAT



شكل ١١ : شكل يوضح التتابعات المتعاكسة المتكاملة (البالندرومية)

الأهمية البيولوجية للتتابعات المتعاكسة (البالندرومية) الـ Palindromes

التتابعات المتعاكسة ذات أهمية كبيرة داخل الجينوم وتؤدى وظائف هامة. فعلى سبيل المثال:

- معظم إنزيمات قطع (القصر) الـ DNA (Restriction enzyme) تقطع عند هذه المناطق وتسمى فى هذه الحالة "مناطق القصر".
- هذه المناطق تستخدم كمناطق ارتباط بروتينات التحفيز الخاصة ببدء نسخ الجينات لزيادة نشاطها أو إيقافه.
- لها تأثير قوي ومباشر على الشكل الثلاثي الأبعاد لجزيئات الـ DNA.

ثالثا تتابعات الـ RNA (Sequences DNA)

جزيئات الحمض النووى الريبوزى (الـ RNA)هي أكثر أنواع الأحماض النووية نشاطاً حيث يتم تخليقها وتحللها بشكل مستمر داخل الخلية الحية.

ويلخص علماء المعلوماتية الحيوية (Bioinformatics) الفرق بين تتابعات DNA و RNA كما يلى:-

١ - الـRNA يختلف عن الـ DNA بقاعدة واحدة هي (U بدلاً من T).

٢-الـ RNA خيط مفرد وليس حلزون مزدوج مثل DNA.

وفيما يلى جدول يوضح قائمة الأحماض النووية (النيوكليوتدات) التى تكون الـRNA وأختصاراتها المعروفة فى مجال المعلوماتية الحيوية.

جدول ٤ : قائمة أكواد النيكليوتيدات لتتابعات الـ RNA (شفرات الاتحاد الدولي للكيماء البحتة والتطبيقية (الأيوباك IUPAC)).

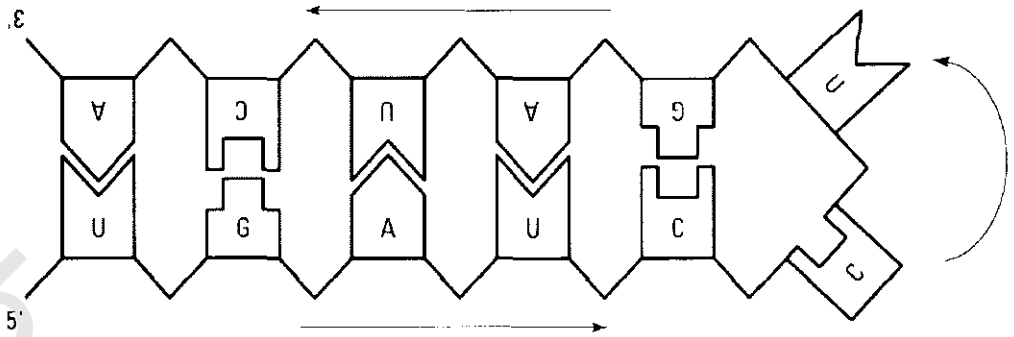
1-Letter Code	*Nucleotide Base Name*	*Category*
A	Adenine	Purine
C	Cytosine	Pyrimidine
G	Guanine	Purine
U	Uracil	Pyrimidine
N	Any nucleotide	Purine or Pyrimidine
R	A or G	Purine
Y	C or U	Pyrimidine
--	-------	None (gap)

هناك أكثر من نوع من أنواع الـRNA:

- الـRNA الرسول mRNA والذى ينتج عن الترجمة المباشرة للجينات.
- الـRNA الناقل tRNA والذى يقوم بنقل الأحماض الأمينية إلى الريبوسوم لتخليقها.
- الـRNA الريبوسومى rRNA يدخل في تركيب الريبوسوم.
- جزيئات الـRNA الصغيرة (Small RNAs).

- عند وجود مناطق متشابهة في جزيئات الـRNA يؤدى ذلك عمل التفاف بعض المناطق على بعضها وتظهر كأنها مناطق مزدوجة الخيط.
- الوظيفة البيولوجية للجزيئات الـRNA تأتي من الشكل ثلاثي الأبعاد أو من التتابعات المتكاملة مع الجين المتخصص.
- جزيئات الـRNA الصغيرة (Small RNAs) والتي ،تم التعرف عليها حديثا، تقوم بوظيفة بيولوجية هامة في تنظيم نشاط بعض الجينات.

obeikandi.com



شكل ١٢ : شكل التفاف خيط الـ RNA على بعضها لتكوين خيط مزدوج

الشفرات الجينية

معلومات هامه يجب ذكرها:

فى لغة المعلوماتية الحيوية نقول ان الجين يتكون من عدد من المواقع (Bases) بدلاً من عدد من النيكلوتيدات المزدوجة. فمثلا جزىء الـ DNA الذى طوله ٤٠٠ نيكلوتيده يتضمن فى الواقع ضعف عدد القواعد (٨٠٠ قاعدة) لأن كل موقع يحتوي زوج من النيكلوتيدات.لذللك يتم قياس طول الـ DNA بعدد أزواج القواعد واختصارها Base Pair (bp)

وهناك وحدات أكبر مثل kb أو Mb هذه الوحدات (Mega – bp) تستخدم أيضاً.

- الف قاعدة Kb (Kilo base) = 1000 bp
- مليون قاعدة Mb (Mega base) = ١٠٠٠ kp

ومن الجدير بالذكر بأن الشفرات الوراثية هى شفرة عامة لجميع الكائنات الحية ولكن هناك بعض الاستثناءات. النيكلوتيدات الأربع تكون ٦٤ شفرة وراثية (Codes) والتى بدورها تشفرلأنتاج ٢٠ حمض أميني مختلف. كل حمض أمينى له أكثر من شفرة واحدة وكل شفرة تتكون من ثلاثة أحرف(ثلاث نيوكليوتيدات) فقط. توجد أيضا شفرات عامة لبدء أو أنهاء عملية النسخ الجينى فى بداية ونهاية الجين. ومن الجدير بالذكر أنه تم اكتشاف هذه الشفرات الوراثية في الستينات من القرن العشرين.

ولكن كيف يمكن التعرف على الشفرات الوراثية فى أى تتابع وراثى؟

كما نرى في المثال التالي:

١) قراءة تتابع جزئ من الـ DNA:

ATGGAAGTATTTAAAGCGCCACCTATTGGGATATAAG

٢) تتقسيم تتابع جزئ الـ DNA إلى ٣ قواعد متتالية:

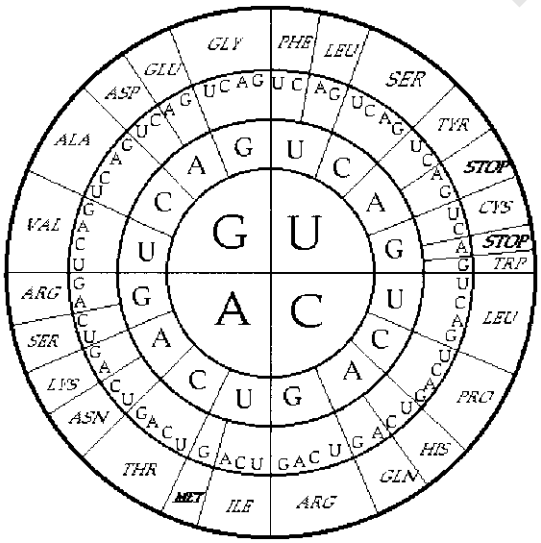
ATG- GAA- GTA- TTT –AAA- GCG- CCA- CCT- ATT- GGG-
ATA- TAA- G..

٣) تترجم كل شفرة ثلاثية إلى الحمض الأميني المقابل:

M E V F K A P P I G I STOP

وذلك مع ملاحظة أنه إذا كان تركيب الـDNA من الطرف `5 إلى الطرف `3 فإن السلسلة الببتيدية تتكون من الطرف الأمينى N إلى الطرف الكربوكسيلى C على التوالي.

ولذلك فإننا إذا علمنا من أين نبدأ قراءة الجين فإننا سوف نتوقع التركيب البروتينى الناتج من هذا الجين. لذلك فيمكن برمجة الحاسب الألى لكى يقوم بترجمة تتابعات الـ DNA ويحاكى الحاسب الألى الخلية في ترجمة الجينات الوراثية.



A

2nd base in codon

1st base in codon	U	C	A	G	3rd base in codon
U	Phe	Ser	Tyr	Cys	U
	Phe	Ser	Tyr	Cys	C
	Leu	Ser	STOP	STOP	A
	Leu	Ser	STOP	Trp	G
C	Leu	Pro	His	Arg	U
	Leu	Pro	His	Arg	C
	Leu	Pro	Gln	Arg	A
	Leu	Pro	Gln	Arg	G
A	Ile	Thr	Asn	Ser	U
	Ile	Thr	Asn	Ser	C
	Ile	Thr	Lys	Arg	A
	Met	Thr	Lys	Arg	G
G	Val	Ala	Asp	Gly	U
	Val	Ala	Asp	Gly	C
	Val	Ala	Glu	Gly	A
	Val	Ala	Glu	Gly	G

B

شكل ١٣ : تركيب الـ٦٤ شفرة وراثية(Codes) والأحماض الأمينية المتوقعة منها. A) الشكل الحلقى لقراءة الشفرات الوراثية.
B) جدول الشفرات الثلاثية والأحماض الأمينية المتوقعة منها.

تغيير قراءة الإطارللتتابعات الوراثية
(Changing the reading frames)

كما أتضح مسبقا فأن قراءة التتابعات الوراثية يعتمد على تقسيم التتابع المدروس الى أكواد مكونه من ٣ قواعد كما في المثال السابق .ولكن أذا تم استبعاد النيكلوتيده الأولى من بداية التتابع المرغوب فإن أطار قراءه سوف يتغير القراءة ومما يؤدي إلى تغير كبير في قراءة البروتين الناتج كما يلي:

تتابع وراثى

ATGGAAGTATTTAAAGCGCCACCTATTGGGATATAAG

- تغيير أطار قراءه بعد خذف القاعدة الأولى

A-TGG-AAG-TAT-TTA-AAG-CGC-CAC-CTA-TTG-GGA-TAT-AAG

- الأحماض الأمينية الناتجة

W K Y L K R H L L G Y K

من الملاحظ أن تجاهل قراءة القاعدة الأولى أدى الى تغيرالأحماض الأمينية الناتجة. وبناء علية فأن تجاهل قراءة القاعدة الثانية أو الثالثة لنفس التتابع سوف يؤدى أيضا الى تغيرالأحماض الأمينية الناتجة من نفس التتابع وبالتالى ظهور ثلاث تتابعات ببيتدية محتملة من تتابع وراثى واحد من الـ DNA

الستة طرق الممكنة لقراءة إطارالتتابع
(Six possible reading frames of DNA)

- هناك ٣ طرق مختلفة لقراءة تتابع وراثى واحد من الـDNA الواحد ، حيث أن الشفرة الوراثية شفرة ثلاثية القواعد وهناك خيطان من الـ DNA ولذا يكون لدينا ٦ طرق للقراءة وهذا ما يسمى القرأت الستة المحتملة للتابع الوراثى Six possible reading frames of DNA وبالتالي لكل جين ٦ طرق مختلفة محتملة يمكن أن ينتج بها بروتينات مختلفة يمكن أن يتنبئ بها الحاسب الألى .يستثنى من ذلك بعض الفيروسات التي تحتوي على خيط مفرد وبالتالي يستثنى من هذه القاعدة. ويستثنى من ذلك أيضاً أن هناك بعض التتابعات تسمى Stop condons (إشارات وقف القراءة TAA – TGA – TAG) . أما دون ذلك يسمى أطارالقراءة المفتوحة (Open Reading Frame ORF).

مناطق الـ DNA الغير مشفر (Non coding DNA):

هناك مناطق كبيرة من الـ DNA غير مشفرة داخل الجينومات المختلفة وتسمى الـDNA الغير مشفر (Non coding DNA) .هذه المناطق قد زادت من تعقيد الـ DNA فى الكائنات الراقية لأن الكائنات الراقية تحتوي على مناطق كثيرة غير مشفرة والتى لاتنتج اى بروتينات .وتوجد أيضا بعض المناطق الغير المشفرة داخل الجينات وفي هذه الحالة تسمى أنترونات (Introns) وذلك غالبا فى جينات الكائنات حقيقيات النواه.

هناك برامج حوسبية كثيرة داخل تطبيقات المعلوماتية الحيوية تعمل على اكتشاف المناطق الغير مشفرة فى تتابعات الـ DNA والتي تحدد بدقة أين تبدأ وتنتهي الجينات وأين توجد أنترونات (تتابعات غير مشفرة) وأكسونات (تتابعات مشفرة) داخل هذه الجينات.

العمل مع جينومات بأكملها (ويحكي التاريخ):

- تم اكتشاف أول تقنية فعالة لتعرف على تتابعات الحمض النووي الـ DNA سنة ١٩٧٧ وأطلق عليها "طريقة سانجر" للسلسة نسبة الى مكتشفها. أما فى سنة ١٩٩٥ تم انتهاء من سلسة تتابعات أول جينوم كامل (وهو فيروس الإنفلوانزا Hemphilus influezae.

وخلال هذه الفترة كان علماء البيولوجي يعملون على قطع صغيرة من DNA وكان طولها بضعة آلاف من النيكلوتيدات. وذلك لأنهم كانوا يبحثون عن جينات محددة وكانوا يعملون عليها من قبل. معظم أدوات وبرامج المعلوماتية الحيوية المتاحة الآن أنشئت منذ تلك الفترة مثل

- برامج أيجاد التشابه بين التتابعات BLAST .
- برامج تحديد القرابة والتقسيم Phylogeny .
- طرق التصور النوعي والتصميم للتتابعات الصغيرة Design.
- وسائل عرض مختلفة للتتابعات الصغيرة(مثل التتابعات البروتينية التى لا تتعدى بضعة الآلاف من الحروف) Visualization.

الجينومية: الحصول على جميع الجينات في آن واحد
Genomics: Getting all the gene

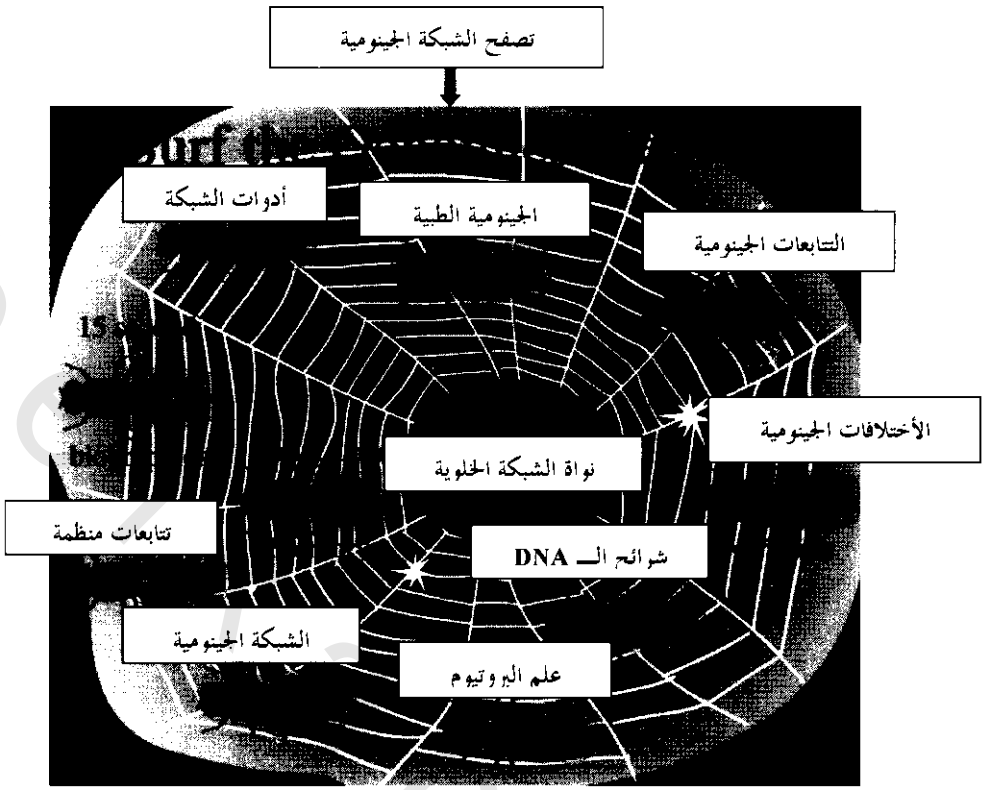
بعد الأنتهاء من معرفة التتابع الكامل لأول جينوم كان ذلك بداية "عصر الجينومية". هذا الفرع الجديد من العلم وهذه الثورة الجديدة دعت العلماء إلى تصميم أدوات جديدة من أدوات "المعلوماتية الحيوية" تكون قادرة على تخزين قواعد البيانات والبحث والتحليل وعرض هذه القطع الضخمة من الـ DNA فيماسمى بعد ذلك بنوك الجينات (Gene Banks) .

ودفع هذا التطور تطور ظهور علم "المعلوماتية الحيوية" بأدواته الجديده والذى ركز فى البداية على تحليل تتابعات الأحماض النووية الكبيرة وتحليلها إلى مكوناتها الأساسية (تتابع الجينات، ترجمة الجينات ، مناطق الشفرات البروتينية، مناطق الـ DNA الغير مشفرة، العناصر التنظيمية وغيرها).

وهذه المرحلة يتبعها مرحلة أكثر طولاً وأهمية وهي مرحلة تحليل الجينوم للتعرف على الوظائف البيولوجية المختلفة. وتشتمل المرحلة الثانية على:-

١ - البحث فى تتابعات الجينومات المتاحة.
٢ - تحليل جينومات محددة إلى تتابعات متخصصة.
٣- عرض الشكل الكلى للجينومات المختلفة وتحديد التشابه والأختلاف بينها.
٤ - تحليل التتابعات الجينومية المشفرة (ORF).
٥ - تحليل التتابعات الجينومية للكائنات الراقية Gene Scan.
٦ - إيجاد الجينات المتشابهة والمتناظرة Orthologous و Paralogous.
٧- إيجاد التكرارات (التعرف على المناطق والتتابعات المتكررة داخل الجينوم).

ويظهر الشكل الشبكى التالى بعض الأفكار الحديثة فى هذا العلم



شكل١٤: شكل الشبكى يوضح بعض النقاط البحثية الحديثة فى علم المعلوماتية الحيوية بعد تطور عوم الجينوم

التعرف على البروتينات بواسطة أسمائها

عند محاولة البحث عن تتابع بروتينى عن طريق الأسم فقط فى قاعدة البيانات ستجد العديد من التتابعات البروتينية التى تشبه أوتقارب أسم التتابع المرغوب فى قاعدة البيانات. لذلك يجب أن لاتنزعج أوتحتار فربما تكون هذه هى بداية الطريق لعمل بحث جيد والتوصل لنتائج مزهلة.

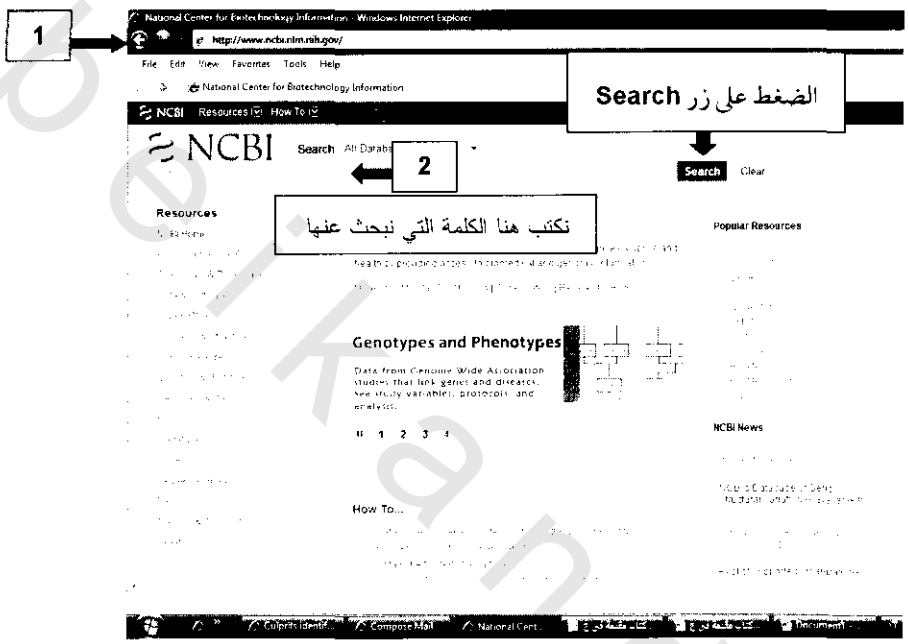
فمثلا إن كنت لم تسمع عن كلمة "HSF" قط في حياتك فأين تذهب من هذا؟

كيف يمكن معرفة المزيد عن هذا المصطلح الذي يبدو غامضاً مع هجاء غريب؟

كيف يمكنك أن تقرر بسرعة ما إذا كانت هذا البحث يمكن الأستمرار فيه فى سياق ما سبق لك معرفته عن الجينات الخاصة بك؟

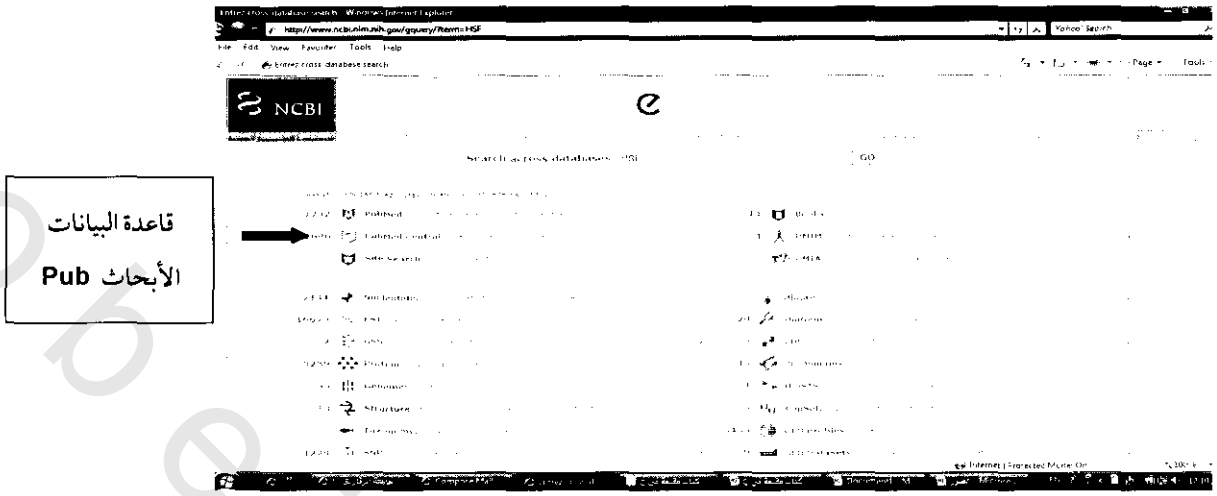
سوف يتم الحصول على الجواب من زيارة الصفحة الرئيسية للمركز الوطنى للبيوتكنولوجى National Center or Biotechnology Information (NCBI)

المركز الوطنى للبيوتكنولوجى (NCBI Home page)



شكل ١٥ : صورة توضح شكل الصفحة الرئيسية للمركز الوطنى للبيوتكنولوجى.هذه الصورة توضح الصفحة الرئيسية لـ NCBI السهم رقم ١ يوضح رابط الموقع وهو http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ . السهم رقم٢ يوضح المكان الذي يكتب به عنوان البحث المراد البحث عنه. عند كتابة كلمة للبحث عنها تفتح لنا الصفحة التالية.

- عند الدخول على الصفحة الرئيسية للمركز الوطنى للبيوتكنولوجى (NCBI) نجد كلمة Search (All Databases) . نكتب هنا الكلمة التي نبحث عنها ثم نقوم بالضغط على زر Search تظهر لنا صفحة بها جميع قواعد البيانات المتاحة وما تحتويه عن هذه الكلمة المستخدمة في البحث كما فى شكل ١٥.



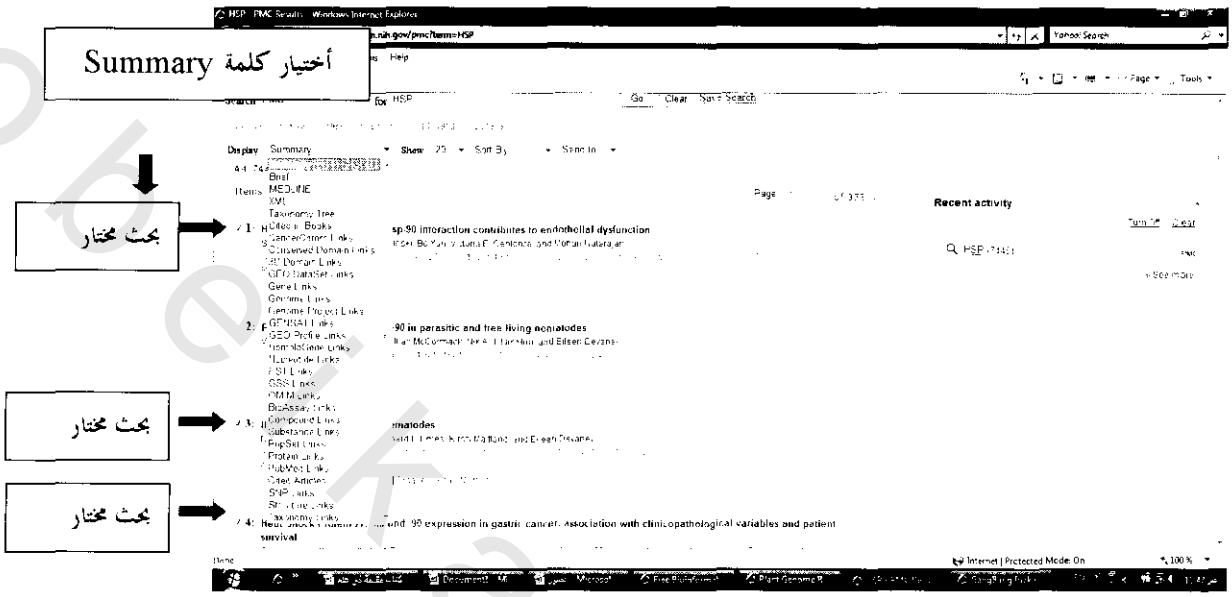
شكل ١٦ : هذه الصورة توضح جميع قواعد البيانات التي تحتوي معلومات عن هذا بروتين"HSF".

- عند الضغط على قاعدة البيانات Pub Med central نذهب إلى صفحة معلومات جديدة بها العديد من المقالات العلمية المحكمة والمنشورة فى مجلات عالمية عن كلمة البحث "HSP" التي نبحث عنها. هذه الصورة هي صورة الصفحة الرئيسية للـ PubMed وبها مجموعة من الأبحاث المراد البحث فيها فعند الرغبة في تحويلها إلى Text نضغط على Send to ونختار منها Text كما سيوضح في الصورة التالية شكل ١٧.

شكل ١٧ : هذه الصورة توضح شكل نتائج البحث فى قاعدة البيانات **Pub Med central**

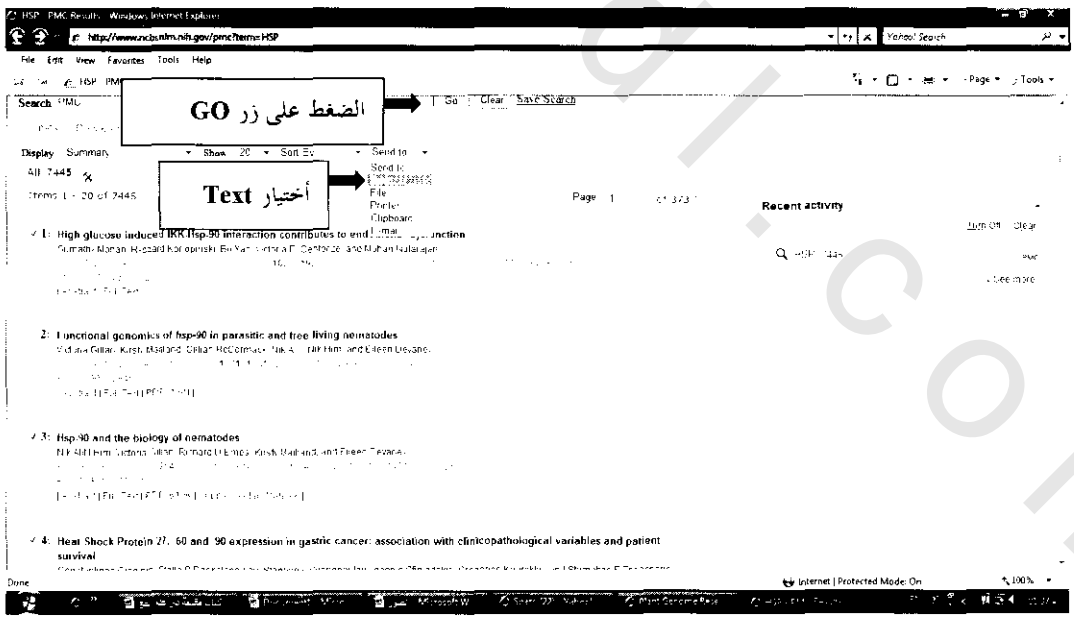
بعد البحث عن اى معلومات عن بروتين"HSF".

شكل ١٧- يمكن أختيار أى عدد من الأبحاث الناتجة ثم أختيار كلمة Summary للحصول على ملخصات الأبحاث المرغوبة كما فى (شكل ١٧الى شكل ٢٢)



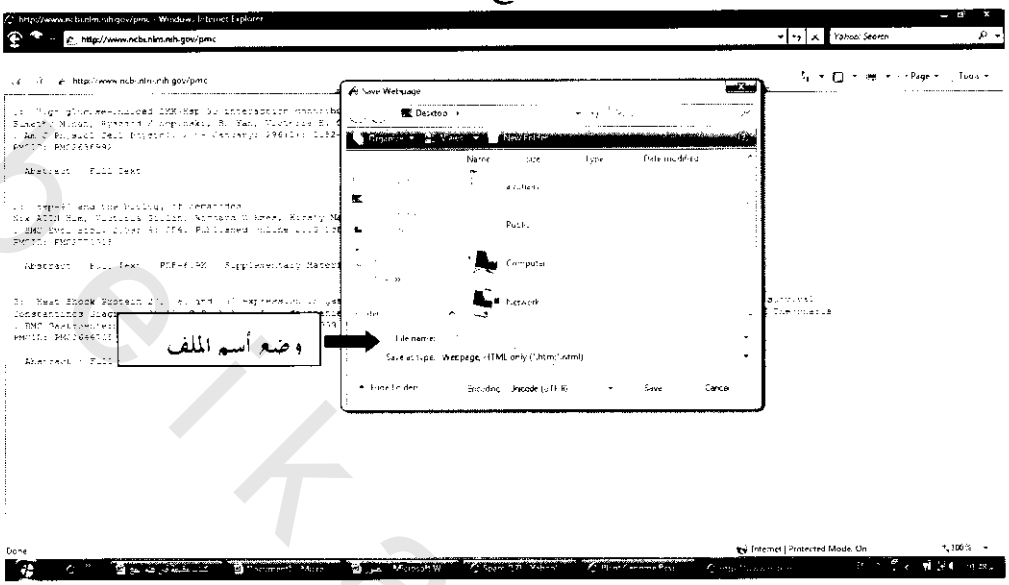
شكل ١٨ : أختيار أى عدد من الأبحاث الناتجة ثم أختيار كلمة Summary

- عند الضغط على Send to واختيار كلمة Text تحول الموضوع إلى كتابةText



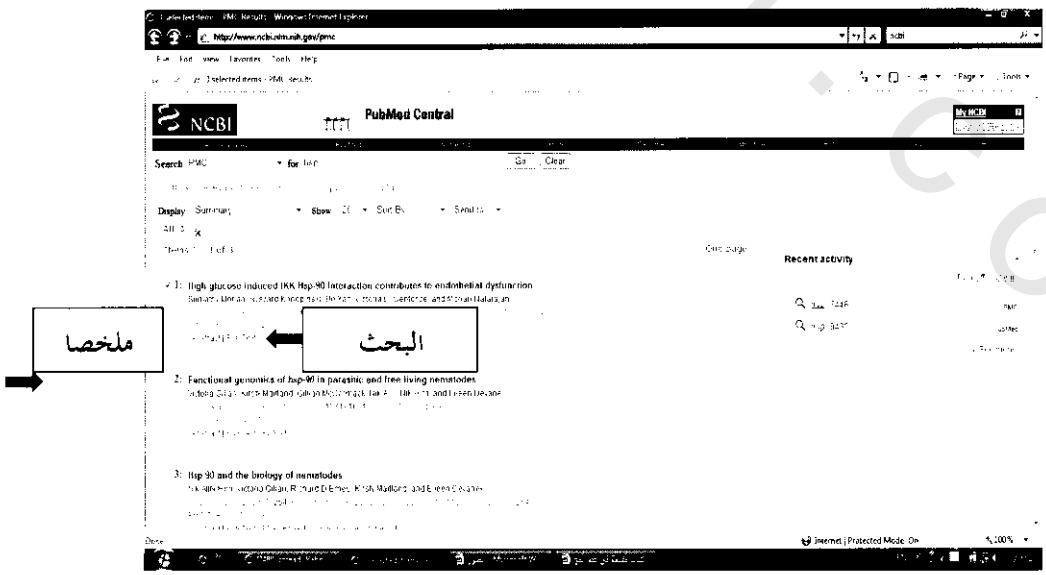
شكل ١٩ :أختيار أى عدد من الأبحاث وأظهارها على صورة ماف نصى Text مع ملاحظة أن الأبحاث الناتجة ستكون على شكل أسم البحث واسماء المؤلفين وأسم المجلة المنشور بها البحث وتاريخ النشر .

- كما يمكننا أن نختار المواضيع المراد فحصها عن طريق الصناديق المقابلة نضع علامة صح في الصندوق المقابل للمواضيع التي نريد تصفحها ثم حفظها أو طباعتها. حفظ النتائج عن طريق اختيار مكان الحفظ File → Save as.



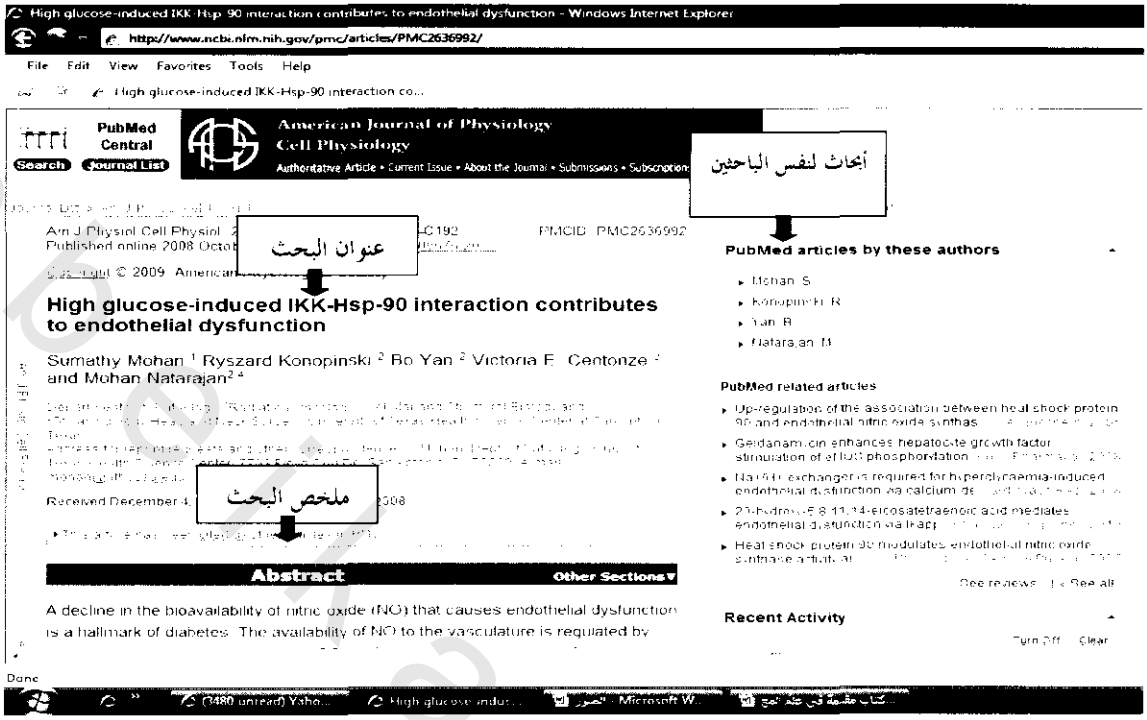
شكل ٢٠: أختيار حفظ النتائج عن طريق اختيار مكان الحفظ

- أما عند الرغبة في إظهار ملخصات الأبحاث الموجودة (Abstracts) أو رؤية الأطلاع على البحث بالكامل (Full text) (إذا كان موجودا) فيمكن الضغط على زر Abstracts أو Full text الظاهر أسفل عنوان البحث كما في الصورة (شكل ٢١).



شكل ٢١: الضغط على زر Abstracts أو Full text الظاهر أسفل عنوان البحث

وسوف تظهر لنا الملخصات أو الأبحاث الكاملة كما في الصورة (شكل ٢٢).



شكل ٢٢: أظهار الملخصات أو الأبحاث الكاملة

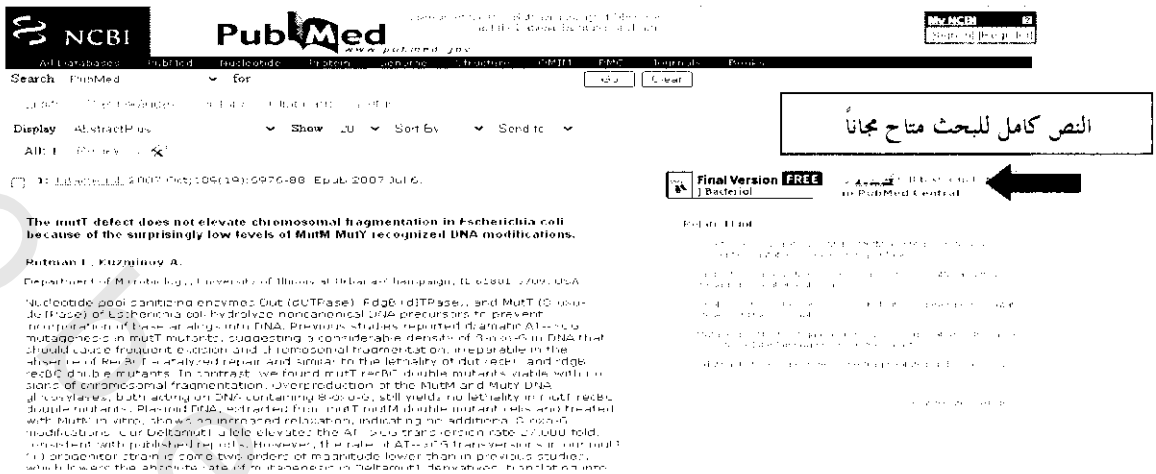
فعند الدخول على بحث معين سوف يفتح لنا صفحة البيانات الخاصة به ويظهر الموضوع كامل وعند الرغبة في حفظ هذا البحث نقوم بالضغط على كلمة File ثم Save as ثم نحدد المكان المراد الحفظ فيه كما في شكل ٢٠.

طرق متقدمة فى البحث داخل قاعدة الأبحاث Pub Med

يمكن البحث داخل قاعدة البيانات الخاصة بالأبحاث عن طريق:-

- البحث في Pub Med باستخدام اسم البروتين أو الجين.
- البحث في Pub Med باستخدام أسماء المؤلفين.
- البحث في Pub Med باستخدام أسماء البروتينات أو الجينات وأسماء المؤلفين.

كما يمكن أن نحصل على النص كامل للبحث مجاناً من (كما يتبين هذا من مستطيلات ملونة كبيرة تظهر أعلى العنوان) والرسم التالي سوف يوضح ذلك.



شكل ٢٣ : أمكانية الحصول على الأبحاث الكاملة مجانا عن ظهور المربع المشار اليه بالسهم.

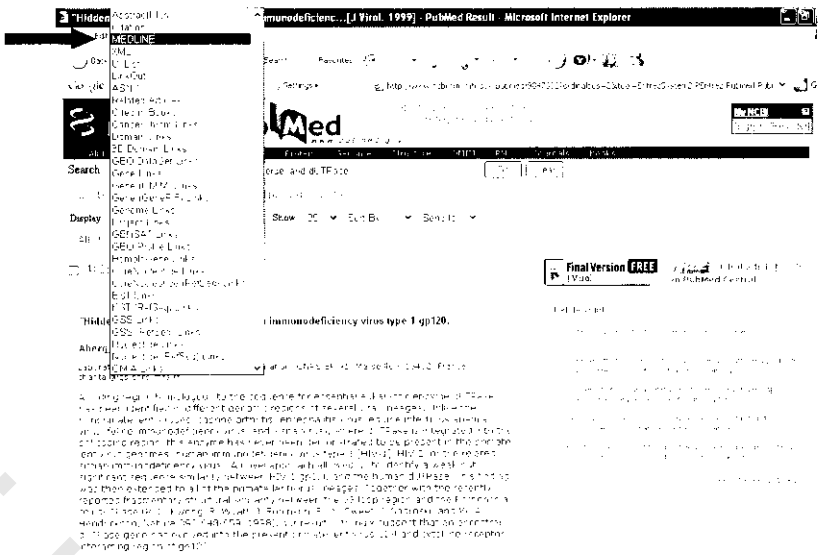
ولكن أحينا يكون البحث الكامل متاح ولكن يحتاج الى دفع أشتراك فى قاعدة البيانات المحتوية عليه كما فى الشكل التالى:

شكل ٢٤ : أمكانية الحصول على الأبحاث الكاملة ولكن عن طريق الأشتراك بقاعدة البينات.

الأستفادة من قاعدة بيانات الـ Medline

البحث عن البحث المطلوب، يمكن الأستعانة بقاعد بيانات الـ Medline للحصول على بعض الأختصارات الهامة كما يظهر فى الشكل التالى (شكل ٢٥):

بيانات الـ **Medline**

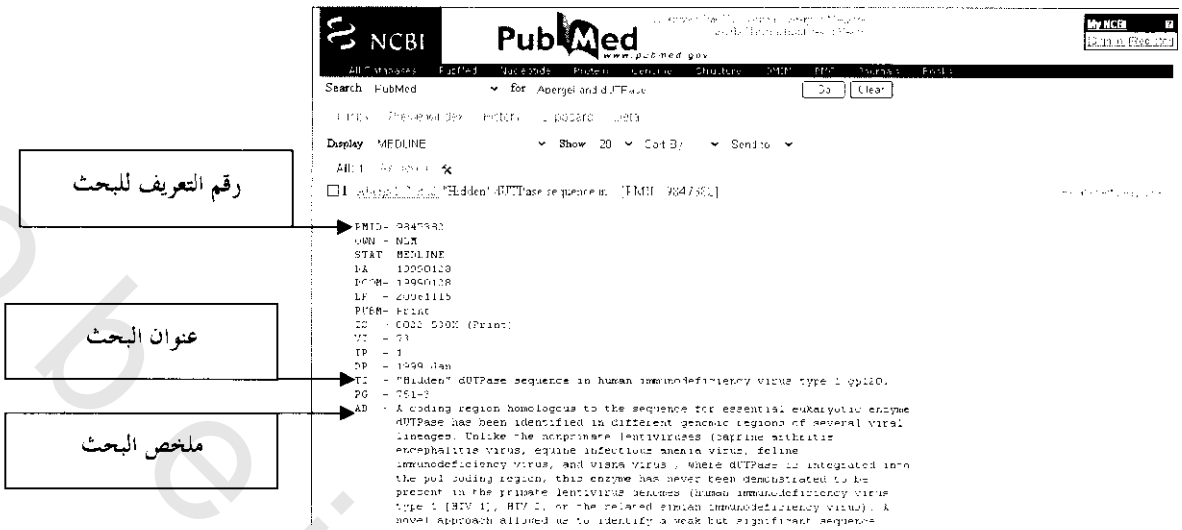


شكل ٢٥: كيفية الوصول الى قاعدة بيانات الـ Medline.

بعد اختيار كلمة الـMedline يظهر لنا بعض الأختصارات الهامة التى يمكن أستخدامها فى البحث المتقدم كمايلى بعض الأمثلة:-

رقم التعريف للبحث	PMID
عنوان البحث	TI
عنوان المعمل الذى أجرى البحث	AD
أسم الباحث	AU
مصدر البحث (أسم المجلة)	SO
تاريخ النشر	DP
ملخص البحث	AB

obeikandl.com



شكل ٢٦: شكل يوضح جزء من الى قاعدة بيانات الـ Medline.

كيفية أستخدام هذه الأختصارات فى البحث

على سبيل المثال:

يمكن أستخدام أي من هذه الأختصارات فى الأبحاث بعد وضعها بين علامتين [.....] كما يلى:-

- Down [AU] – أي أن أسم الباحث يسمى (Down).
- Down [TI] – أي أن الأبحاث تحتوى في عنوانها على كلمة (Down).
- Down [AD] – أي أن عنوان الباحث يحتوى على كلمة (Down).
- Down [AB] – أي أن الأبحاث تحتوى في ملخصها على كلمة (Down).

كيف يمكن تطبيق الأدوات السابقة لمعرفة باحث بعمل في نفس مجالك البحثى قريب منك جغرافيا

مثال عند وصولك إلى بلد ما جديد (على سبيل المثال الزقازيق) وتريد معرفة هل يعمل أحد فيها على "أبحاث النبات" فيجب أن نتبع الخطوات التالية كما يلى:

١- ندخل إلى www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/.

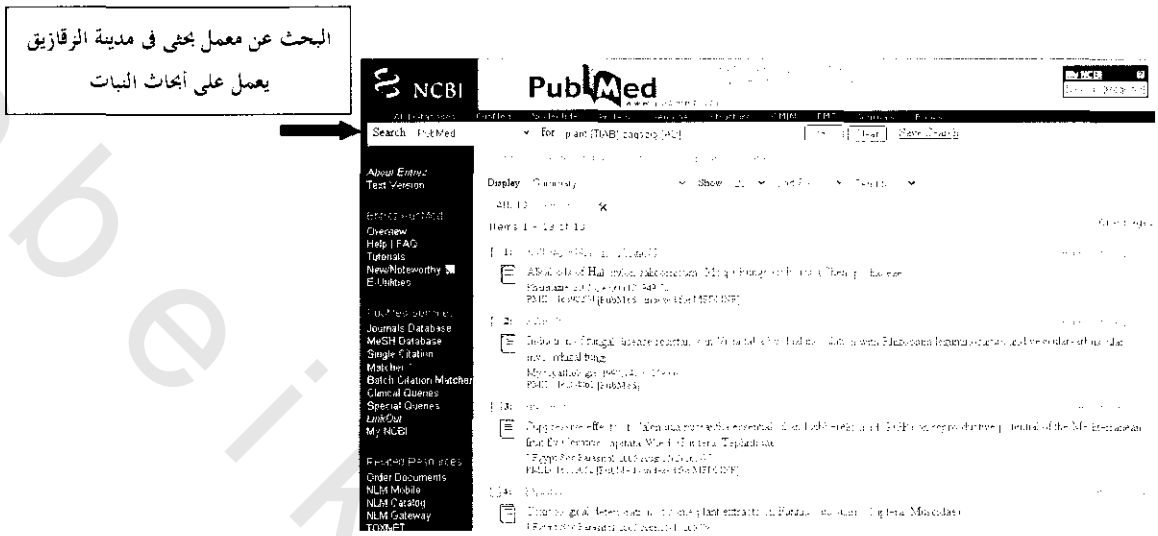
٢- نكتب في مربع For كلمة Plant [TiAB] Zagazig [AD]. ثم نضغط على كلمة Go ومعناها ابحث عن معمل بحثى فى مدينة الزقازيق يعمل على أبحاث النبات.

٣- اضغط على قائمة الباحثين الزرقاء والتي تحتها خط.

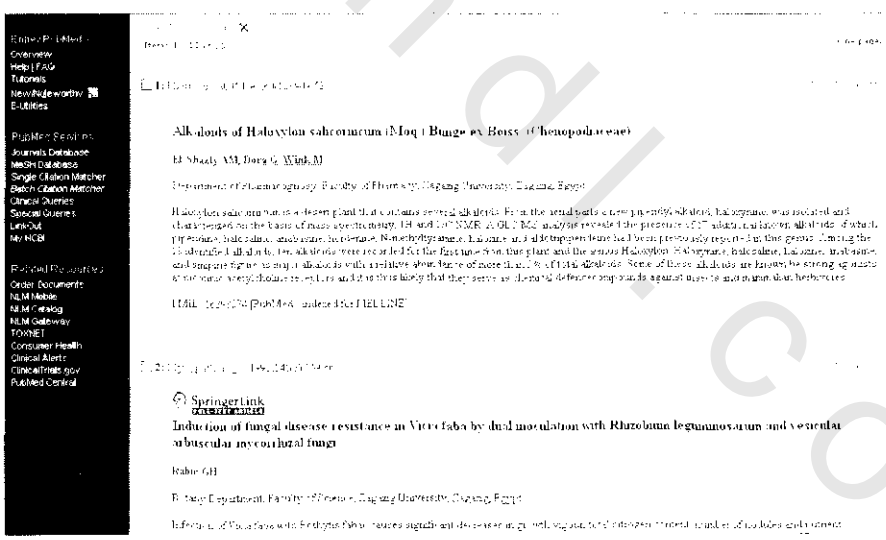
٤- العودة إلى العنوان السابق (بعد الخطوة ٢) باستخدام زر العودة في المتصفح.

٥- في العرض القائمة المنسدلة، وتغير الخيار من Summary إلى Abstract.

وفيما يلي شرح ذلك بالصور.



شكل ٢٧: البحث عن **Plant [TIAB] Zagazig [AD]** ومعناها هذا أي ابحث عن كلمة **Plant** في العنوان أو الاختصار ويكون مكان العمل في الزقازيق وهذه هو عملها بالصور.



شكل ٢٨: ملخص أحد الأبحاث الناتجة عن البحث عن أبحاث البنات في مدينة الزقازيق

البحث في الـ Pub Med باستخدام محددات البحث المتقدم (Limits)

Searching Pub Med using limits

عند الضغط على Limits أي بحث متقدم نجد الأختيارات التالية:-

١- "Links to full text" أي يعمل على إظهار ملخصات الأبحاث التي لها نص كامل.

٢- "Links to free full text" أي إظهار الأبحاث المجانية فقط.

٣- "Abstract" أي عرض ملخصات الأبحاث فقط.

٤- "Published in the last" تحديد الفترة السابقة التي تم خلالها النشر.

٥- "Added to PubMed in the last" تحديد تاريخ أضافة البحث على الـ PubMed.

٦-"Humans or Animal"يمكن هذا الأختيار من تحديد نوع البحث في نوع الكائن إنسان أو حيوان

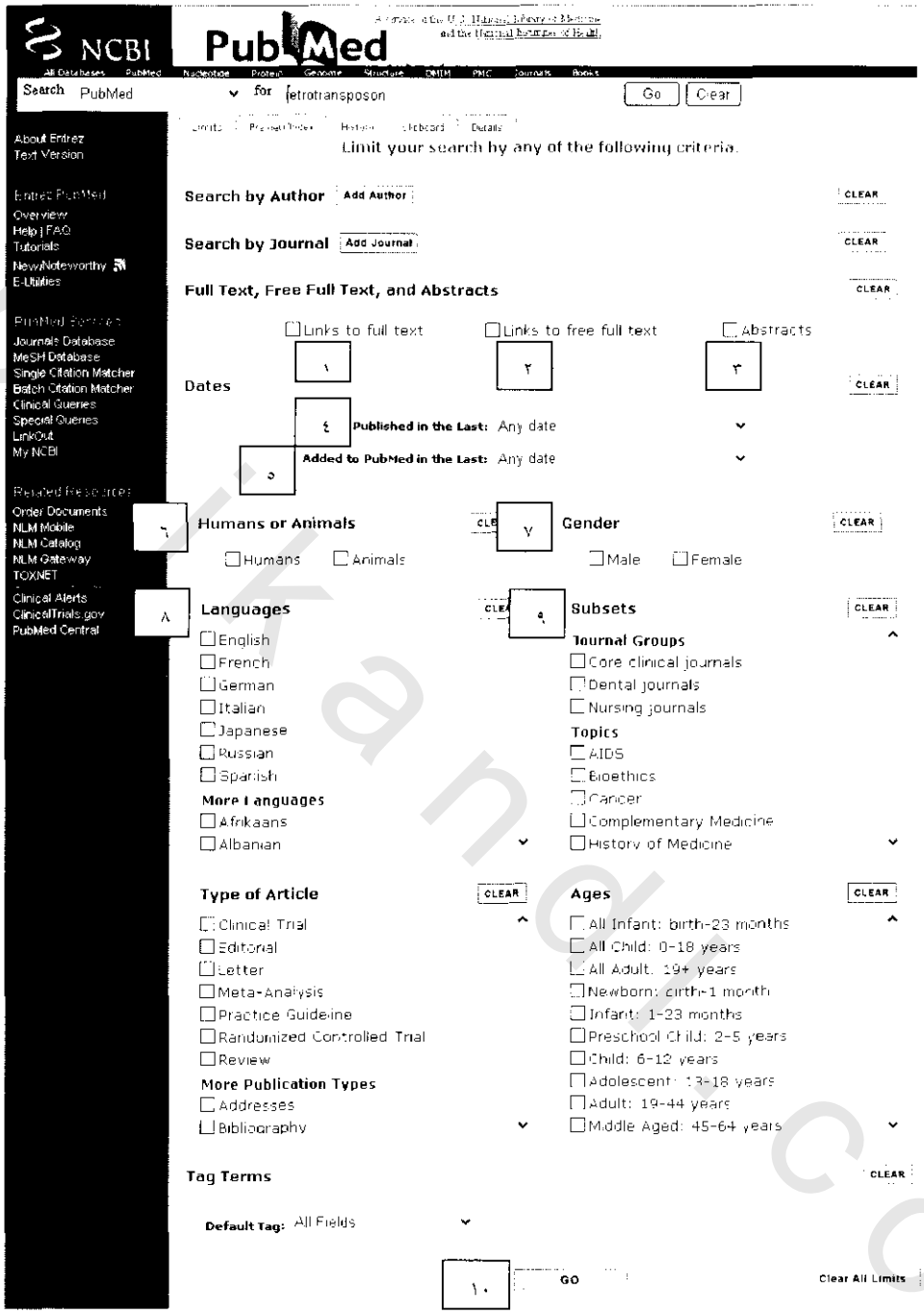
٧- كما يمكن تخصيص الجنس ذكر أم أنثى "Male or Female".

٨- "Languages "اللغة ومجال المجلة العلمية التي تم النشر فيها وكذلك نوع البحث والعمر.

٩- ثم تحديد حقل قواعد البيانات أي مكان البحث.

١٠- ثم الضغط على كلمة Go كما فى الشكل ٢٩.

obeikandl.com



شكل ٢٩: يوضح كيفية أستخدام الأختيارات المختلفة لمحددات البحث.

هناك بعض النصائح الإضافية عند البحث فى قاعدة أبحاث الـ PubMed وهي:

- عند البحث عن كلمتين أوأكثر معا مثل "Down Syndrome " يجب أن نضعهما بين علامات التنصيص حتى يتم البحث على هاتين الكلمتين معا ككلمة واحدة.
- الروابط المنطقية مثل AND أو OR أوNOT لابد من كتابتها بحروف Capital وهذه يعني أنها روابط وليس كلمة مكونة من هذه الحروف.
- مثلا عند كتابة dulpase [TI] Pyrophosphatase [TI] NOT Smith [AU] ومعناها ابحث في كلمة dutpase في العنوان أو pyrophosphate في العنوان فيما عدا الأبحاث الخاصة بالعالم Smith.
- إضافة حروف Capital في نهاية الاسم معناها أنه اسم مختصر مثل "Abergel C"
- يمكن البحث عن اى مقال علمى عن طريق رقم الـ PMID أي كل بحث له رقم خاص به والذى يوجد بجانب البحث.

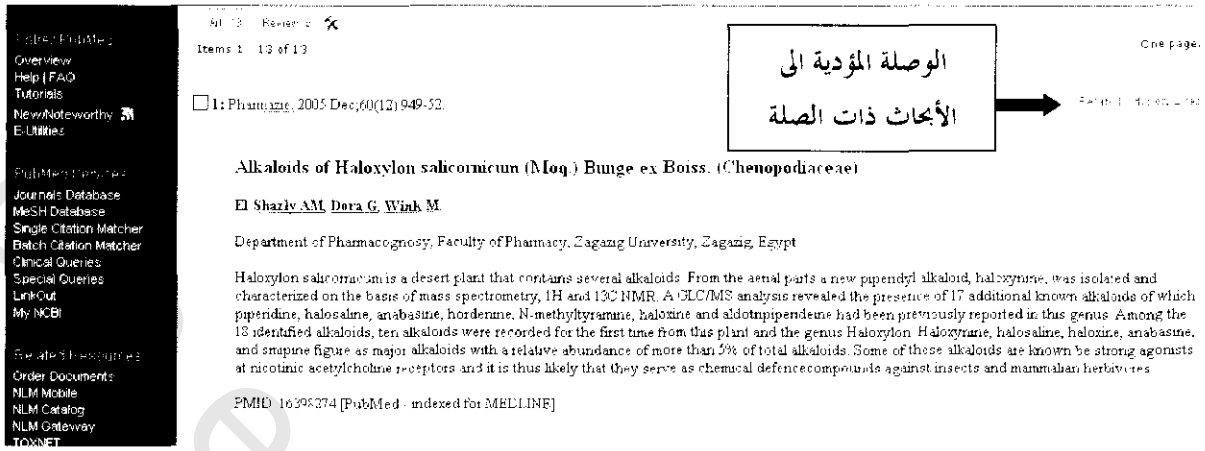
ملحوظة هامة جداً: في حالة استخدام أختيارات محددات البحث المتقدم (Limits) ، يجب بعد الانتهاء إزالتها وألا أنها سوف تظل سارية في كل الأبحاث القادمة.

أهم الأسباب التي تؤدي إلى فشل عملية البحث:

- أخطاء في الهجاء.
- استخدام محددات البحث المتقدم (Limits) غير السليم.
- استخدام اختصار خاطئ.

نصائح هامة

- قراءة أكثر من ملخص مختصر من الأبحاث في مجال التخصص الذي تبحث عنه لمعرفة أهم الكلمات والمصطلحات التي يتم استخدمها أثناء عملية البحث والتى في حالة عدم معرفتها وأستخدامها سوف نفقد الكثير من هذه الأبحاث.
- أستخدام الوصلة المؤدية الى الأبحاث ذات الصلة والموجودة تحت عنوان (Related Articles) والتى توجد فى أقصى اليمين فى صفحة نتائج البحث شكل ٣٠:



شكل ٣٠: يوضح كيفية أستخدام أستخدام الوصلة المؤدية الى الأبحاث ذات الصلة.

أشياء يمكن أن لا تجدها في قاعدة أبحاث الـ PubMed :

١- أسماء الباحثين بعد الاسم العاشر (رقم عشرة) لا يمكن أن تجدها في الأبحاث التي نشرت قبل سنة ١٩٩٥. وهذه تعتبر مشكلة كبيرة على سبيل المثال عند الرغبة فى معرفة الباحثين الأوائل فى مجال في مجال الجينومة.

٢- لا توجد الأبحاث التي نشرت قبل ١٩٦٥ على الـ PubMed أي لا تستطيع الاعتماد على الـ Pub Med في كتابة مقال تاريخي أو عن تاريخ العلم فى أي مجال.

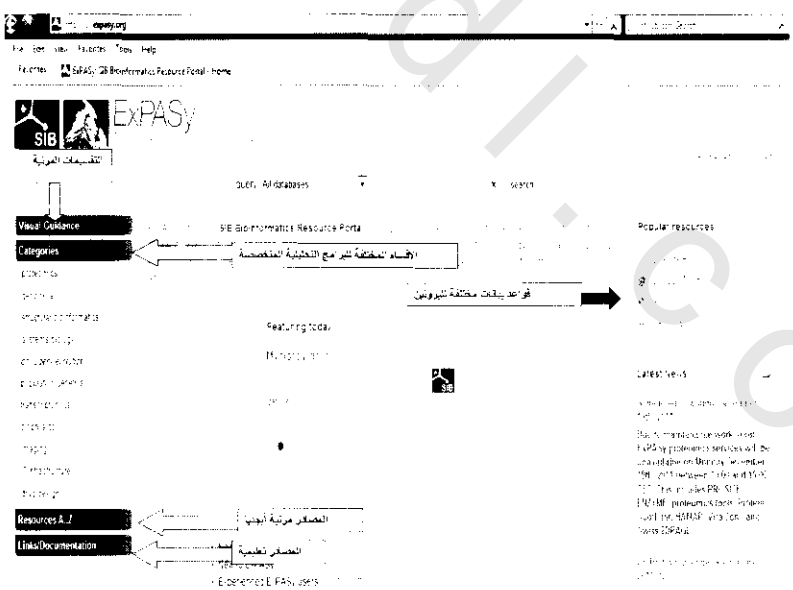
٣- لا توجد ملخصات معظم الأبحاث التي نشرت قبل سنة ١٩٧٦.

موقع الأكسبسي: الموقع المتميز فى المعلومات البروتينية
prime internet site for protein information EXPASY: A

موقع الأكسبسى EXPASY هو قاعدة بيانات بروتينية متميزة تختص بتجميع تراكيب وأشكال ووظائف البروتينات كما يضم مجموعة كبيرة من الروابط لمواقع وبرامج متخصصة فى تحليل التتابعات البروتينية . قد تم إنشاءه وإدارته عن طريق أحد العلماء المشهورين في علم المعلوماتية الحيوية للبروتينات وهو البوفيسور Amos Bairoch. يضم هذا الموقع العديد من الروابط وقواعد بيانات أخرى.

EXPASY اختصارلعبارة Expert Protein Analysis System ويحتوي هذا الموقع المتقدم على قاعدتين هامتان جداً وهاتان القاعدتان هما Swiss port protein و TrEMBI مرتبطتين في قاعدة واحدة تسمى Uniport knowledgebase.

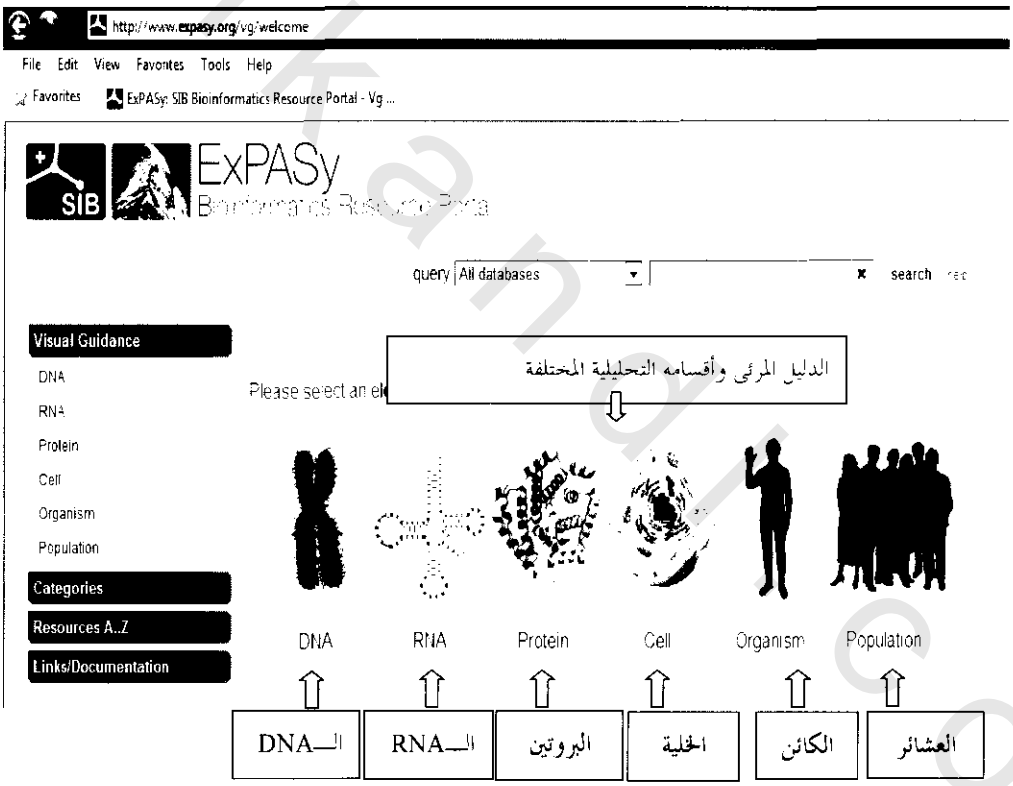
قاعدة الـ Swiss Port تحتوي على التتابعات الحقيقية للبروتينات الناتجة من الأبحاث مع وصف كامل لتركيبها وأجزائها الفعالة والتغيرات التى تحدث فى تركيبها بعد عملية الترجمة وغير ذلك من المعلومات الهامة.أما قاعدة الـ TrEMBL فهى تختص بالتنبؤ بالتتابعات الخاصة بروتين م وبرامج المعلوماتية الحيوية الخاصة بتحليل هذه التتابعات البروتينية شكل ٣١.



شكل ٣١: الصفحة الرئيسية لموقع لموقع الـ EXPASY. يحتوى الموقع على وصلات لقواعد بيانات Uniport knowledgebase ناحية اليمين وعدد كبير لبرامج تحليلية أخرى ناحية اليسار مقسمة الى عدة أقسام.

ويحتوى الموقع على عدة أقسام مختلفة ويحتوى كل منها على برامج متخصصة فى الفروع المختلفة من المعلوماتية الحيوية و تضم الأدوات والبرامج الخاصة بالتحليل والتى تبدأ بقسم الدليل المرئى وتنتهى بالقسم الخاص المحتوى على وصلات تعليمية وخدمات Links/Documentation.

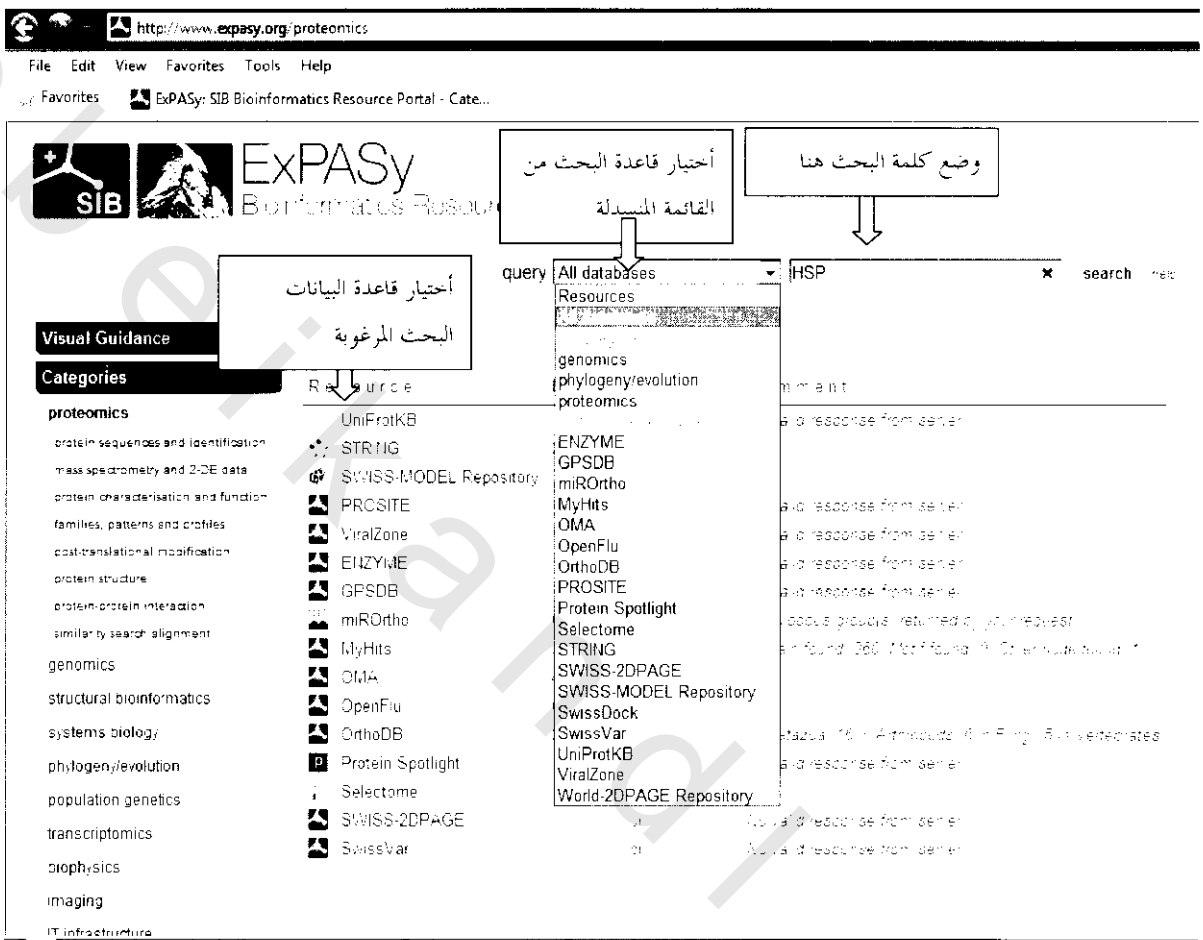
عند الدخول على أول الوصلات والتى تسمى (Visual Guidance) الموجودة فى القائمة اليسرى سوف تظهر مجموعة من الأقسام التى تشمل أقسام الـDNA والـRNA و الـبروتين و الـخلية و الـكائن و الـعشائر. كل قسم منهم يحتوى على مجموعة من البرامج التحليلية وقواعد البيانات الخاصة بكل قسم على حده كما يظهر فى شكل ٣٢.



شكل ٣٢ : الصفحة الخاصة بالدليل المرئى لقواعد بيانات وتحتوى على عدد كبير من البرامج التحليلية مقسمة الى عدة أقسام وهى قسم الـDNA و الـRNA و الـبروتين و الـخلية و الـكائن و الـعشائر.

فمثلا عند البحث عن بروتين الصدمة الحرارية والمسمى HSP نكتب كلمة البحث فى المكان المخصص للبحث والموجود ناحية اليمين ثم الضغط على كلمة البحث Search . سوف يقوم محرك البحث الخاص بالموقع على البحث فى جميع

قوائم البيانات المدرجة وسوف يظهر لنا ملخص نتيجة البحث كما فى الشكل ٣٠. يجب الأشارة الا أن كل قاعدة بيانات تعطى معلومات بيولوجيه أضافية هامة مرتبطة بكلمة البحث لذلك يجب على البحث التعرف عليها وأختيار ماينا سبه.

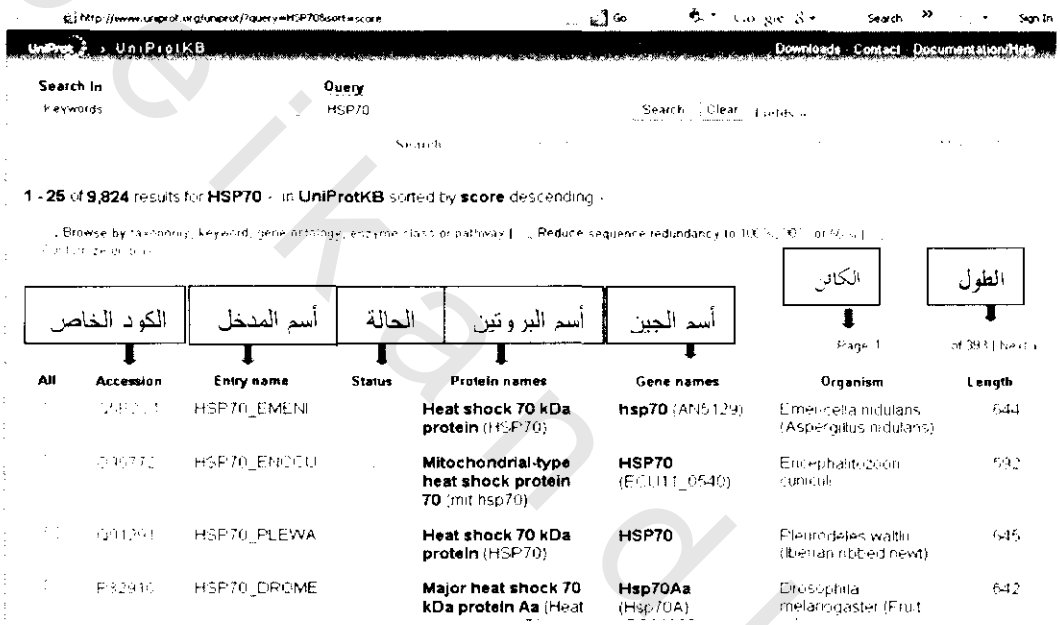


شكل ٣٣: عند البحث عن بروتين الصدمة الحرارية والمسمى HSP فى جميع قوائم البيانات المدرجة.

عند الدخول على قاعدة البيانات المعروفة بأسم UniportKB للبحث على بروتين HSP70 سوف تظهر النتائج كما فى جدول الشكل ٣٤. العمود الأول يحتوى على الكود الخاص(Accession) بأسم البروتين فى قاعدة البيانات. أما العمود الثانى يحتوى الأسم الخاص بأسم المدخل فى قاعدة البيانات أما بقية الأعمدة فهى كالتالى:

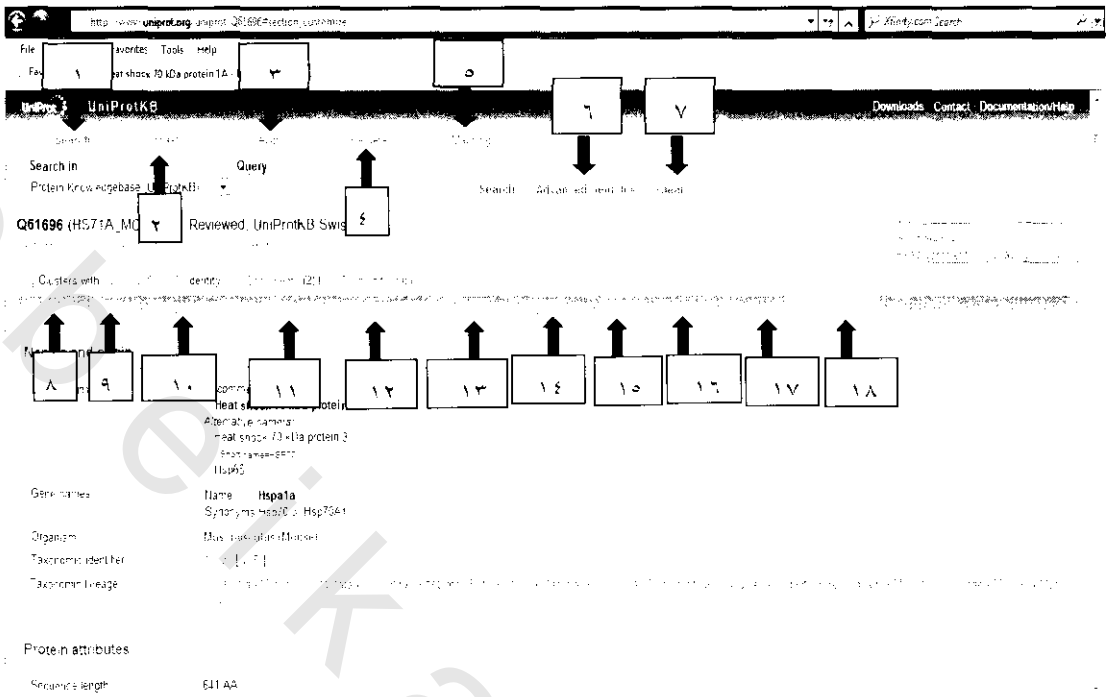
- عمود الحالة Status احتوائها على نجمة صفراء أي أن تتابع هذه البروتينات يوجد في قاعدتي البيانات , Swiss-protein و Tr EMBL وتمت مراجعة هذا البروتين.

- عمود البروتين Protein يحتوى على اسم البروتين (HSP 70) ويجب ملاحظة كيفية كتابة الأسم سواء كان بأحرف كبيرة أو بأحرف صغيرة.
- عمود أسم الجين Gene name يحتوى على اسم الجين (ANS129 (hsp 70.
- عمود أسم الكائن Organism يحتوى على أسم الكائن الذى تم أستخلاص البروتين منه.
- عمود الطول Length يحتوى على طول البروتين "أي كم عدد الأحماض الأمينية التى تكون البروتين.



شكل ٣٤ : عند البحث عن بروتين الصدمة الحرارية والمسمى HSP70 فى جميع قوائم البيانات المدرجة.

عند الضغط على الدخول على العمود الأول الذى يحتوى على الكود الخاص(Accession) بالبروتين سوف يتم فتح صفحة جديدة تحتوى على كثير من المعلومات الخاصة بهذا البروتين.



شكل ٣٥ : نتيجة البحث عن بروتين الصدمة الحرارية (hsp70) ANS129 .

ويمكن تلخيص نتائج الصفحة التى تظهر فى شكل ٣٥ كما يلى:

١. الزر(Search) الخاص بمحرك البحث داخل الصفحة للبحث عن أي بروتين أوجين.

٢. الزر(Blast) الخاص بعمل مقارنة لتتابعات البروتين المراد دراسة مع مجموعة البروتينات الموجودة فى قاعدة البيانات.

٣. الزر (Align)الخاص بقارنة التتابع المراد دراسة مع بروتين أخر أومجموعة بروتينات أخرى مختارة.

٤. الزر (Retrieve) الخاص بالحصول على التتابع المرغوب عن طريق كتابة الرقم الكودى.

٥. معرفة مكان التتابع المرغوب فى قاعدة البيانات (ID Mapping).

٦. خيارات البحث المتقدم (Advanced Search).

٧. زر(Clear) خاص بمسح محتوى البحث لعمل بحث أخر.

٨. زر الأسماء (Names)المعلومات الأولية الخاصة بأسم البروتين والجين المسؤول عنه والرقم التقسيمى وأسم الكائن الذى تم عزل البروتين منه

٩. زر (Attributes) خاص بأعطاء معلومات عن طول التتابع وحالتة (كامل أوغيركامل) ومعلومات تؤيد وجود هذا البروتين من عدمه.

١٠. زر التعليقات العامة (General Attributes) ويحتوى على وظيفة البروتين والوحدات المكونة للبروتين (Subunits) ومكان التواجد (location) ودرجة التشابه مع مجموعات أوعائلات بروتينية أخرى(Sequence Similarity).

١١. تعريفات وظيفية خاصة بالبروتين (Ontologies) مثل كلمات البحث (Key words) ومعلومات وظيفية للجين(GO)(Gene Ontologies) وتشمل العمليات البيولوجية والمحتوى السيتوبلازمى والوظيفة الجزيئية والمصطلحات التقنية لهذا البروتين.

١٢. خصائص التتابع (Sequence Features) وتشمل شرح تفصيلى لمحتويات التتابع والأماكن الفعالة داخله ووظيفتها.

١٣. التتابع (Sequence) ويحتوى هذا القسم على التتابع الخاص بهذا البروتين.

١٤. قسم المراجع (Refrences) ويحتوى على المراجع الخاصة بالمعلومات الموجودة بالبحث والتى يمكن الرجوع اليها.

١٥. قسم المراجع المرتبطة (Cross-Refrence) ويحتوى على وصلات للتتابع المدروس فى قواعد البيانات المختلفة مثل قواعد بيانات التتابعات أو الأشكال ثلاثية الأبعاد أو البروتوكولات أوغيرها من قواعد البيانات الهامة لتركيب أو وظيفة البروتين.

١٦. قسم معلومات المدخل (Entry Information) ويحتوى على أسم وحالة وتاريخ المعلومات المدخلة للبروتين الذى تم البحث عنه.

١٧. قسم الوثائق (Relevant Documents) ويحتوى على كل الوثائق ذات الصلة بالبروتين المطلوب.

١٨. زر تنسيق الترتيب (Customize order) لأمكانية تعديل ترتيب الأقسام السابقة.

obeikandl.com

تطبيق عملى على كيفية دراسة بروتين معين بأستخدام قاعدة البيانات UniportKB

١. الدخول على موقع http://www.uniprot.org/ وكتابة أسم البروتين المطلوب دراسته بعد الأطلاع على المراجع والأبحاث فى الـPubMed (شكل ٣٦).

٢. تظهر النتيجه بوجود ١٠ تتابعات منهم ٩ غير مراجعين (Unreviewed) وواحد فقط تمت مراجعته (Reviewed). (شكل ٣٧).

٣. يتم أختيار التتابع المراجع (ذو النجمة الصفراء) بالضغط عليه فتظهر لنا جميع البيانات والمعلومات الخاصة بهذا البروتين(شكل ٣٨).

٤. نضغط على المعلومات الخاصة بالتتابع لرؤية وحفظ التتابع المرغوب فى ملف بصيغة الـFASTA عن طريق الضغط على كلمة FASTA على اليمين(شكل ٣٩).

٥. ثم نضغط على الزر (Blast) فى أعلى الصفحة والذى سوف يقوم بمقارنة التتابع المدروس مع جميع تتابعات البروتينات الموجودة فى قاعدة البيانات لأيجاد الأكثر تشابها(شكل ٤٠).

٦. تظهر النتيجة بظهور عدد من التتابعات المتشابه مع التتابع المدروس فى التركيب الأولى والتى يتم أختيار بعض منها للدراسة (شكل ٤١).

٧. تظهر المقارنة فى شكل توازى (Alignment) أوشكل شجرة قرابه (Tree) مع أمكانية تلوين بعض نقاط التشابه أو الأختلاف فى التتابعات المدروسة من الناحية الكيميائية والفزيائية(شكل ٤٢).

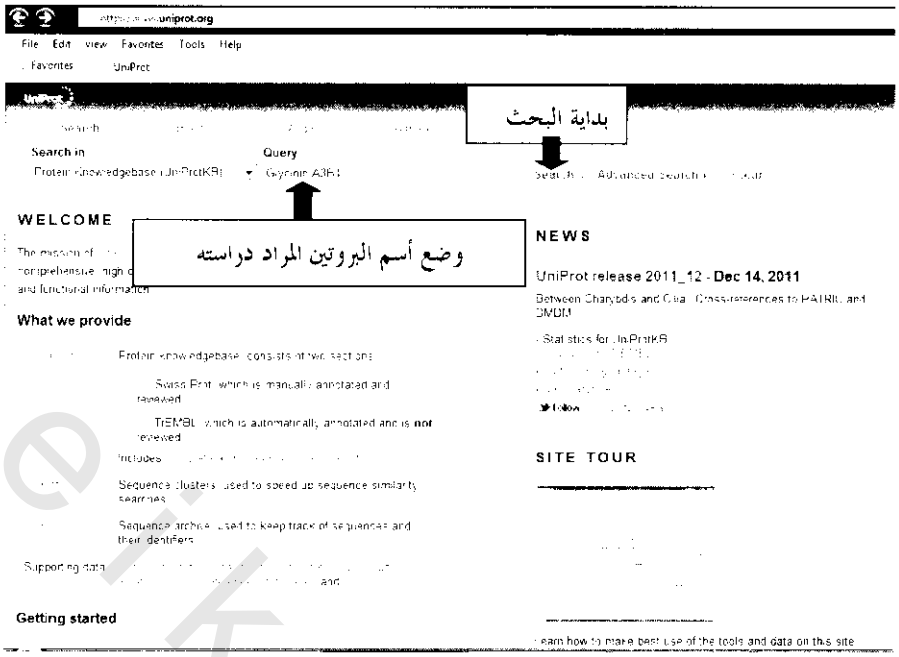
٨. يمكن حفظ ملف توازى التتابعات فى أكثر من صورة لأجراء تعديلات علية أو تحليله بواسطة برنامج أحر مثل Text, Tree, Fasta, Jalview (شكل ٣٩).

٩. يمكن الحصول وحفظ التتابعات المدروسة فى أى صورة عن طريق الأمر (Retrieve) (شكل ٤٣).

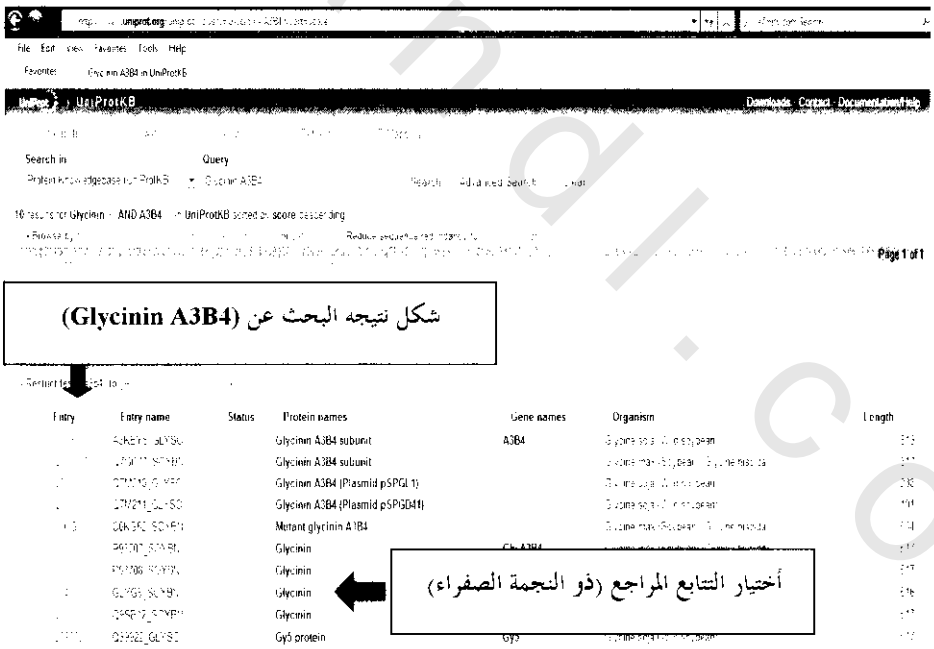
١٠. يمكن الحصول على معلومات أضافية من قواعد البيانات الأخرى عن طريق زر ID Mapping (شكل ٤٤).

١١. بالضغط على زر Swap يتم الأنتقال الى قاعدة بيانات أخرى تحتوى على معلومات أضافية عن البروتين المطلوب (شكل ٤٤).

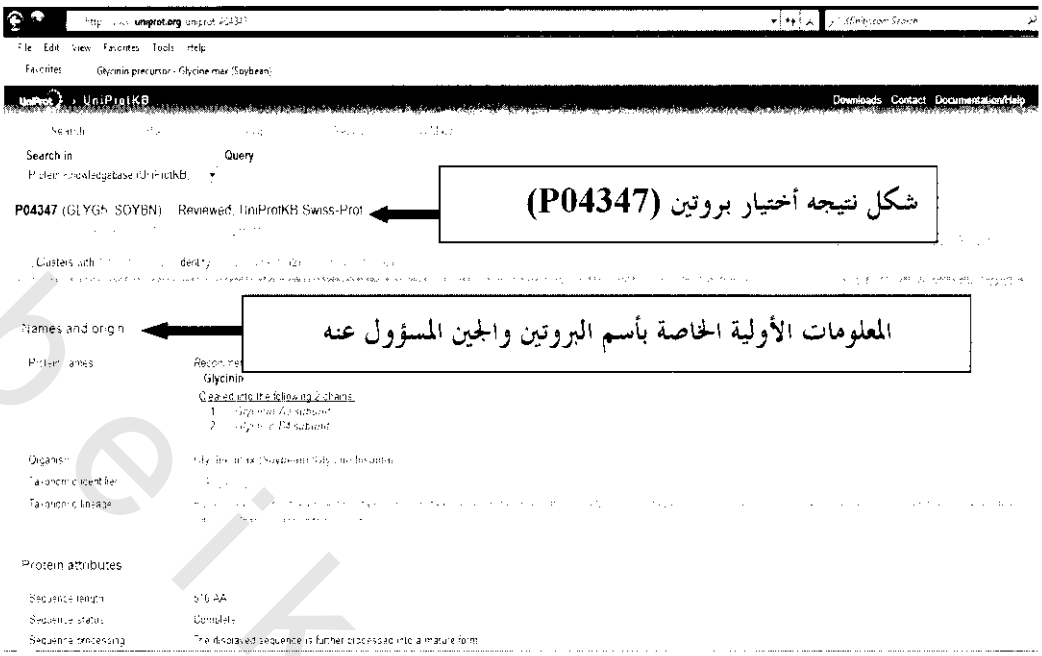
١٢. الأنتقال الى قاعدة الـ PDBe على سبيل المثال للبحث عن معلومات جديدة عن البروتين المرغوب (شكل ٤٥).



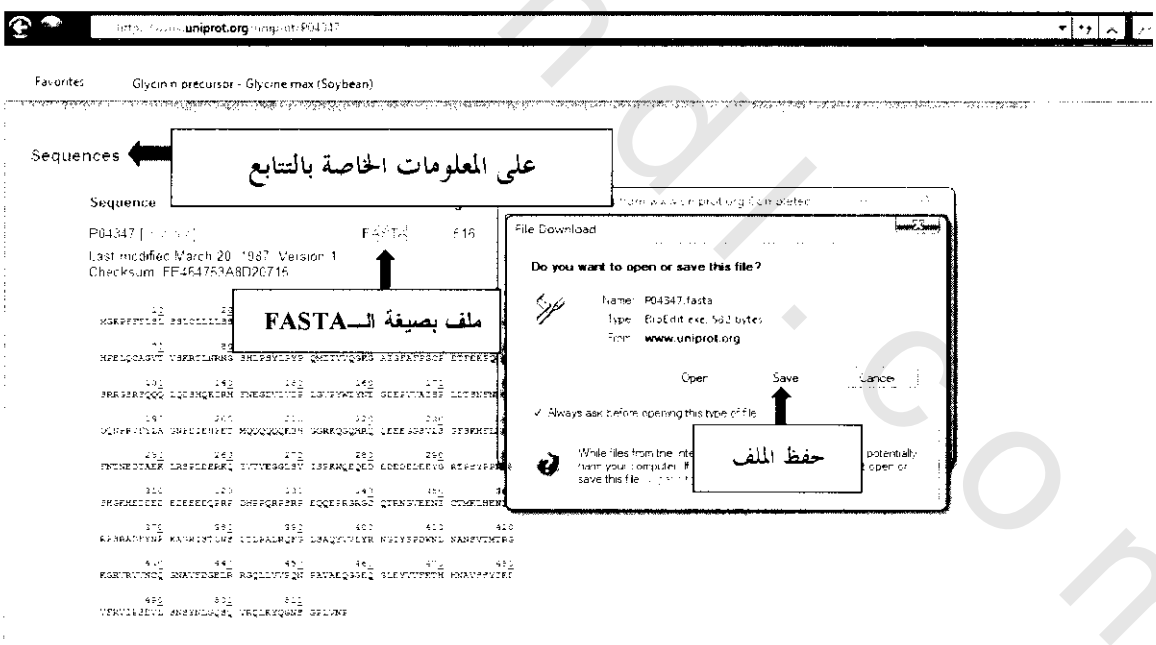
شكل ٣٦:الدخول على موقع http://www.uniprot.org/ وكتابة أسم البروتين المراد دراسة.



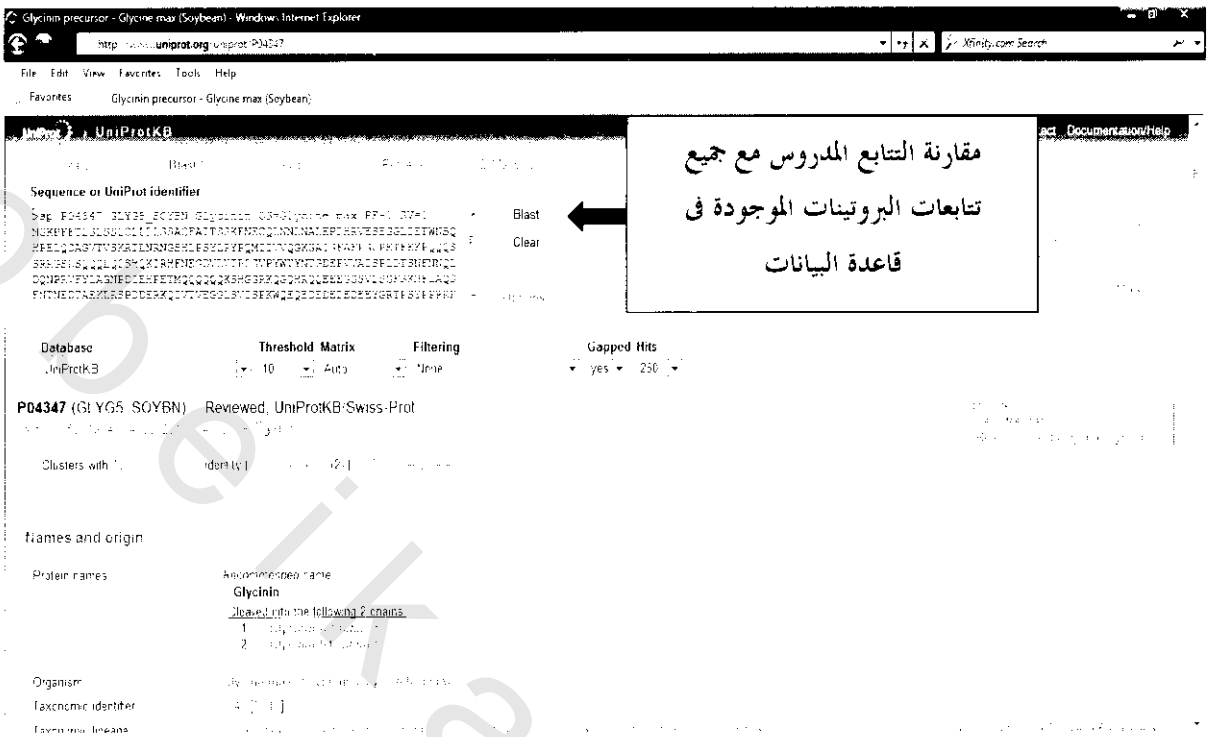
شكل ٣٧: شكل نتيجه البحث عن بروتين (Glycinin A3B4) والتى أسفرت عن وجود ١٠ تتابعات منهم ٩ غير مراجعين (Unreviewed) وواحد فقط تمت مراجعته (Reviewed)واحد فقط تمت مراجعته (Reviewed)



شكل ٣٨: شكل نتيجه أختيار بروتين (P04347) واحد فقط تمت مراجعته (Reviewed) والمعلومات الخاصة بهذا البروتين

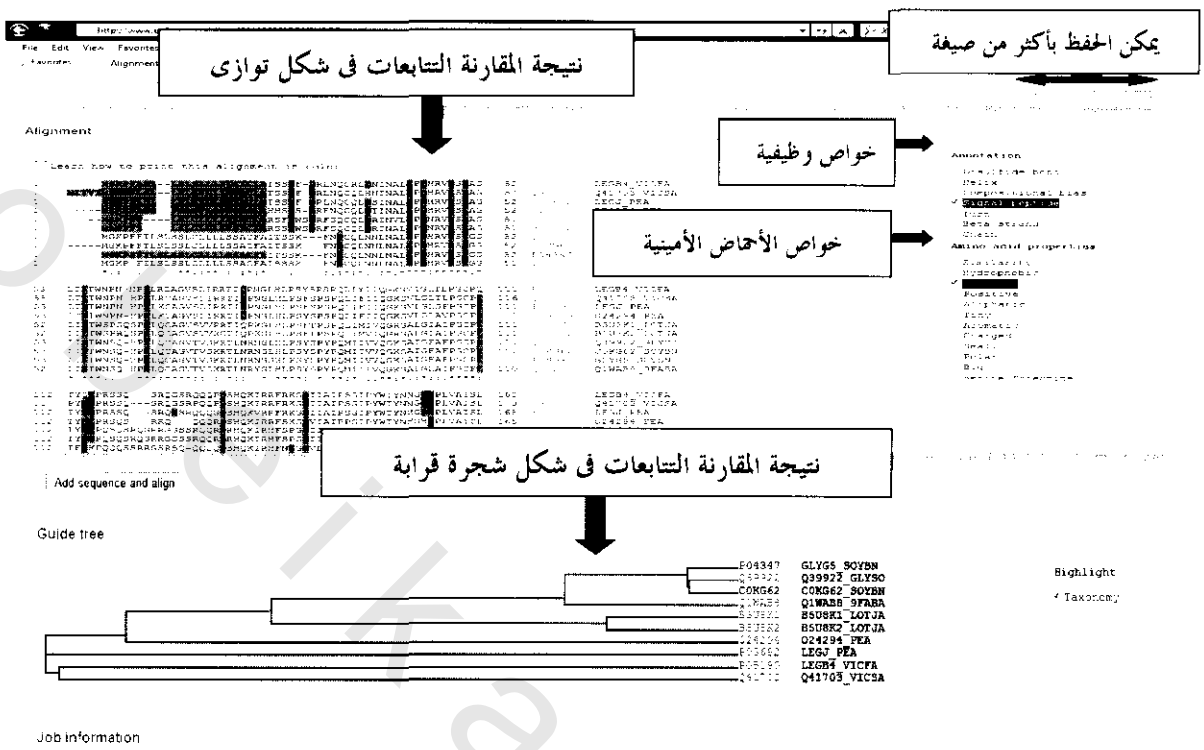


شكل ٣٩: على المعلومات الخاصة بالتتابع (Sequence) لرؤية وحفظ التتابع المرغوب فى ملف بصيغة الـFASTA

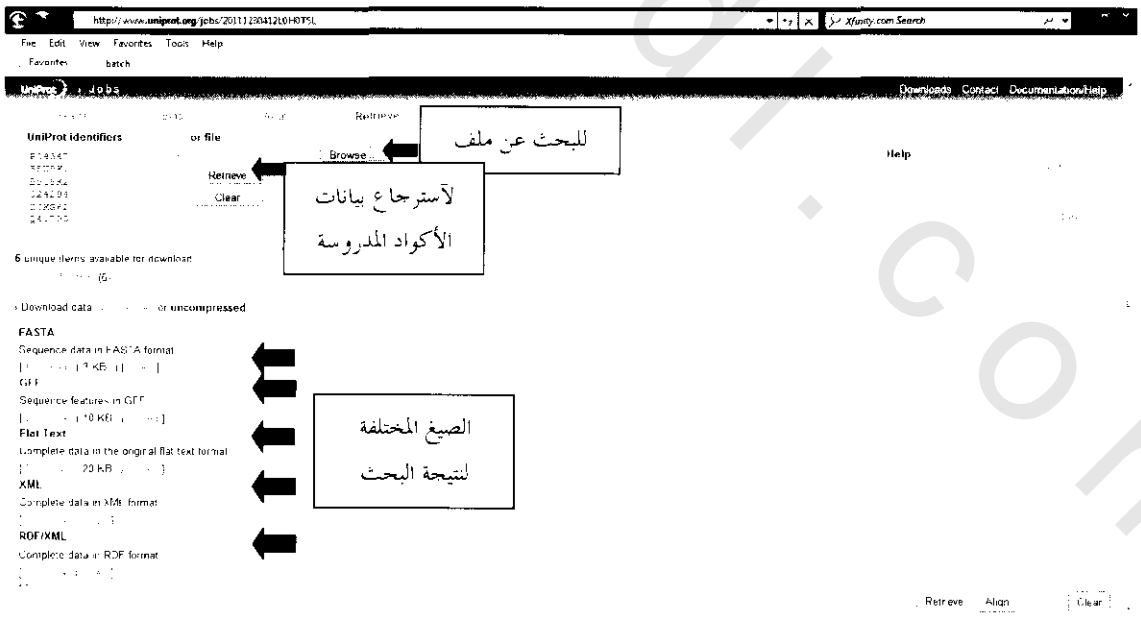


شكل ٤٠ : مقارنة التتابع المدروس مع جميع تتابعات البروتينات الموجودة فى قاعدة البيانات عن طريق الضغط على الزر (Blast) فى أعلى الصفحة.

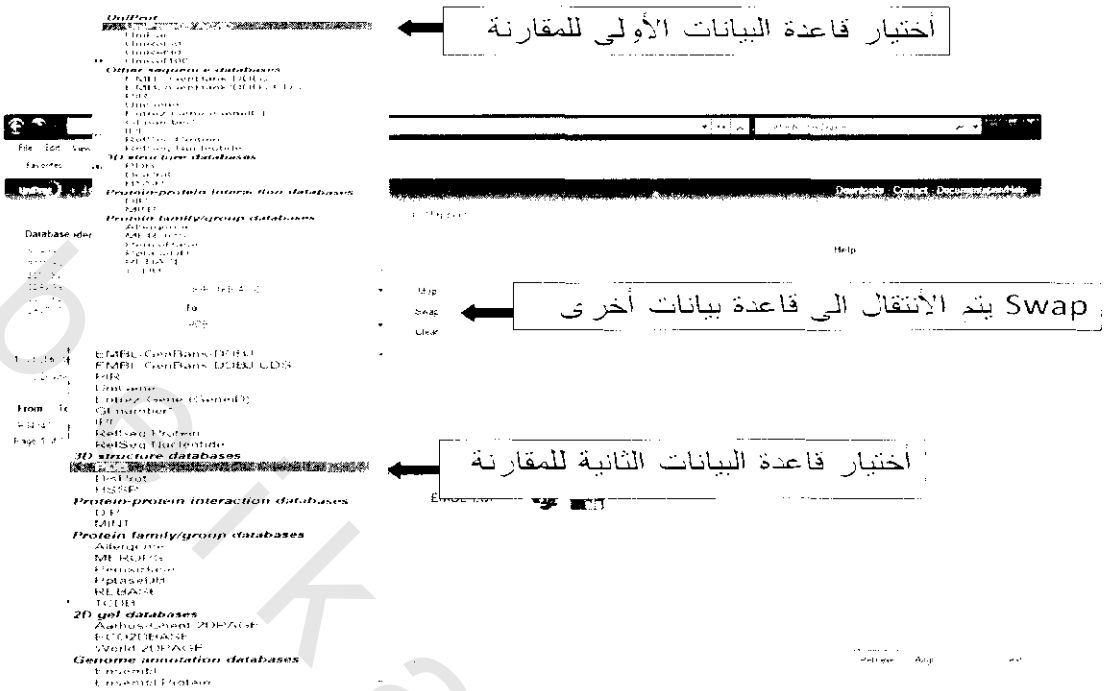
شكل ٤١ : ظهور مجموعة من التتابعات المشابهة للتتابع المدروس مع جميع تتابعات البروتينات الموجودة فى قاعدة البيانات.



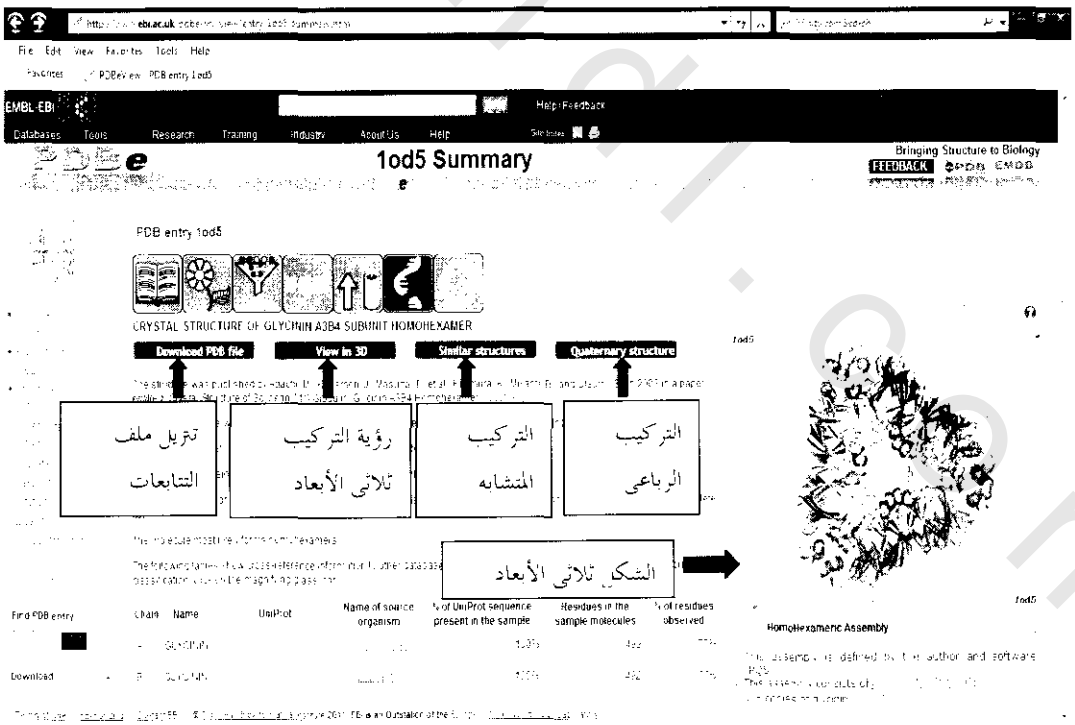
شكل ٤٢ : تظهرنتيجة المقارنة فى شكل توازى (Alignment) أوشكل شجرة قرابه (Tree) مع أمكانية تلوين بعض نقاط التشابه أو الأختلاف فى التتابعات المدروسة من الناحية الكيميائية والفزيائية.



شكل ٤٣ : يمكن الحصول وحفظ التتابعات المدروسة فى أى صورة عن طريق الأمر (Retrieve).



شكل ٤٤ : الحصول على معلومات أضافية من قواعد البيانات الأخرى عن طريق زر ID Mapping



شكل ٤٥ : الحصول على معلومات جديدة عن البروتين المرغوب من قاعدة الـ PDB والتى تحتوى على الشكل ثلاثى الأبعاد.

تحليل تتابعات المادة الوراثية الـ DNA

أولا: الحصول على تتابعات DNA

أشياء يجب تذكرها عن التتابعات البروتينية:

- التتابعات البروتينية هي تتابعات بسيطة يتراوح طولها فى المتوسط ٤٠٠ حمض أميني وقد تزيد أو تقل عن ذلك بحوالى ٢٠٠ حمض. ويستثنى من ذلك بعض التتابعات البروتينية الكبيرة.
- البروتينات الميكروبية أو حقيقيات النواة (النباتات أو الحيوانات) لها نفس الخصائص تقريباً.

أن تركيب الجينات المسئولة عن أنتاج البروتينات تكون أكثر تعقيداً في الحيوانات الراقية حيث تختلف أطوال الجينات في الإنسان عنها في الميكروبات (طولها في الميكروبات بضع مئات أوالاف من القواعد بينما في الأنسان قد تتعدى عشرات أومئات الآلاف من القواعد).

ملحوظة: ليس كل تتابعات الـ DNA ينتج عنها بروتين وداخل الجين نفسه هناك مناطق كثيرة عديمة الفائدة تسمى (junk DNA) ولا تنتج أي بروتين.

وتجدر الأشارة الى أن هناك ٣ أنواع من تتابعات الـ DNA تدخل في تركيب الجين:

١. مناطق مشفرة للبروتينات (The protein coding region)
٢. مناطق منظمة لعمل الجينات في العادة هي مناطق تسبق المناطق المشفرة للبروتينات(Requlatory region) .
٣. مناطق غير مشفرة للبروتينات(Untranslated regions) وهى مناطق لاتنتج بروتينات وتسمى (INTRONS) وهي توجد قبل أوبعد المناطق المشفرة للبروتين (EXONS) . وبناءاً على ذلك فالتعامل مع تتابعات الـ DNA تكون أكثر تعقيدا من التعامل مع تتابعات البروتين.

صيغ (Format) تتابعات الـDNA

هناك أكثر من صيغة أوطريقة تكتب بها تتابعات الـDNA أوالبروتين وتختلف البرامج المختلفة فى تقبلها لنوع الصيغة المستخدمة. وهناك نوعين مشهورين من هذه الصيغ وهى صيغة الـ FASTAو RAW.

س- ما الفرق بين FASTA format و RAW؟

- الـ FASTA format يبدأ بعلامة > ثم يلى ذلك فى نفس السطرأسم أو تعريف عن التتابع ثم يلى ذلك التتابع نفسة بدون أى فواصل أو مسافات أوحروف غريبة وأيضاً هناك FASTA للبروتين وهناك أخرى للجين (شكل ٤٦).

```
>gi|184402|gb|M64673.1|HUMHSF1 Human heat shock factor 1 (TCF5) mRNA, complete cds
CGGGCCCGTTGCAAGATGGCGGCGGCCATGCTGGGCCCCGGGGCTGTGTGTGCGCAGCGGGCGGCGGCGC
GGCCCGGAAGGCTGGCGCGGCGACGGCGTTAGCCCGGCCCTCGGCCCCTCTTTGCGGCCGCTCCCTCCGC
CTATTCCCTCCTTGCTCGAGATGGATCTGCCCGTGGGCCCCGGCGCGGCGGGGCCCAGCAACGTCCCGGC
CTTCCTGACCAAGCTGTGGACCCTCGTGAGCGACCCGGACACCGACGCGCTCATCTGCTGGAGCCCGAGC
GGGAACAGCTTCCACGTGTTCGACCAGGGCCAGTTTGCCAAGGAGGTGCTGCCCAAGTACTTCAAGCACA
ACAACATGGCCAGCTTCGTGCGGCAGCTCAACATGTATGGCTTCCGGAAAGTGGTCCACATCGAGCAGGG
CGGCCTGGTCAAGCCAGAGAGAGACGACACGGAGTTCCAGCACCCATGCTTCCTGCGTGGCCAGGAGCAG
CTCCTTGAGAACATCAAGAGGAAAGTGACCAGTGTGTCCACCCTGAAGAGTGAAGACATAAAGATCCGCC
AGGACAGCGTCACCAAGCTGCTGACGGACGTGCAGCTGATGAAGGGGAAGCAGGAGTGCATGGACTCCAA
GCTCCTGGCCATGAAGCATGAGAATGAGGCTCTGTGGCGGGAGGTGGCCAGCCTTCGGCAGAAGCATGCC
CAGCAACAGAAAGTCGTCAACAAGCTCATTCAGTTCCTGATCTCACTGGTGCAGTCAAACCGGATCCTGG
GGGTGAAGAGAAAGATCCCCCTGATGCTGAACGACAGTGGCTCAGCACATTCCATGCCCAAGTATAGCCG
GCAGTTCTCCCTGGAGCACGTCCACGGCTCGGGCCCCTACTCGGCCCCCTCCCCAGCCTACAGCAGCTCC
AGCCTCTACGCCCCTGATGCTGTGGCCAGCTCTGGACCCATCATCTCCGACATCACCGAGCTGGCTCCTG
```

شكل ٤٦ : شكل التتابعات بصيغة أوطريقة الـ FASTA format.

- صيغة الـRAW وتعتمد على وضع التتابع نفسة بدون أي علامات ولا أي تعريف ولا فواصل أو مسافات أوحروف غريبة (التتابع فقط) (شكل ٤٧).

```
CGAGGACCCCACCATCTCCCTGCTGACAGGCTCGGAGCCTCCCAAAGCCAAGGACCCCACTGTCTCCTAG
AGGCCCCGGAGGAGCTGGGCCAGCCGCCCACCCCCACCCCCAGTGCAGGGCTGGTCTTGGGGAGGCAGGG
CAGCCTCGCGGTCTTGGGCACTGGTGGGTCGGCCGCCATAGCCCCAGTAGGACAAACGGGCTCGGGTCTG
GGCAGCACCTCTGGTCAGGAGGGTCACCCTGGCCTGCCAGTCTGCCTTCCCCCAACCCCGTGTCCTGTGG
TTTGGTTGGGGCTTCACAGCCACACCTGGACTGACCCTGCAGGTTGTTCATAGTCAGAATTGTATTTTGG
ATTTTTACACAACTGTCCCGTTCCCCGCTCCACAGAGATACACAGATATATACACACAGTGGATGGACGG
ACAAGACAGGCAGAGATCTATAAACAGACAGGCTCTAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
```

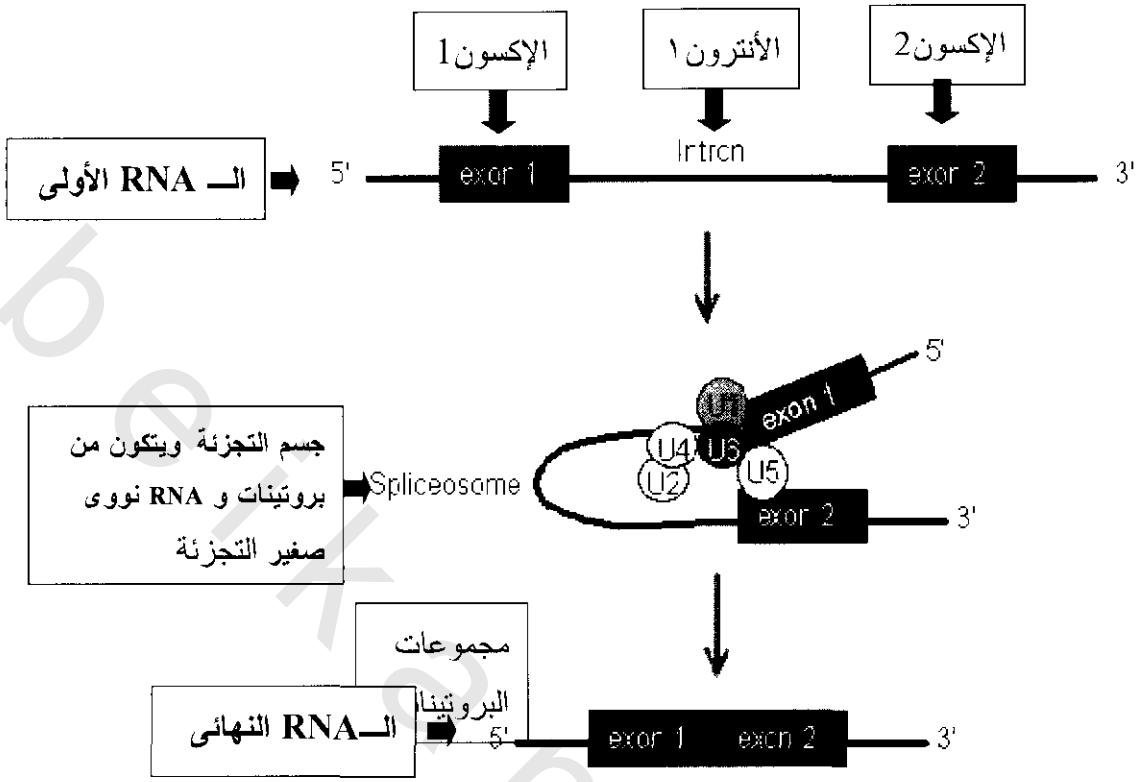
شكل ٤٧ : شكل التتابعات بصيغة أوطريقة الـ RAW.

ملحوظة: يجب الأخذ في الاعتبار الأبتعاد عن الأحرف الأخرى الغريبة (Parasite characters) عند تحميل ملفات التتابع الـ DNA .

مصطلحات هامه:

الـ RNA الأولى (PreMature RNA) : هو عبارة الـ RNA الناتج من نسخ الجين بالكامل من البداية حتى النهاية ولذلك فهو يشمل الإكسونات والإنترونات.

جزيء الـRNA النهائى (Mature RNA): ينتج من RNA الأولى بعد إزالة مناطق الإنترونات في عملية تسمى (RNA splicing). مجموعات البروتينات المستخدمة فى هذه العملية تكون مايسمى بجسم التجزئة (Spliesomes)

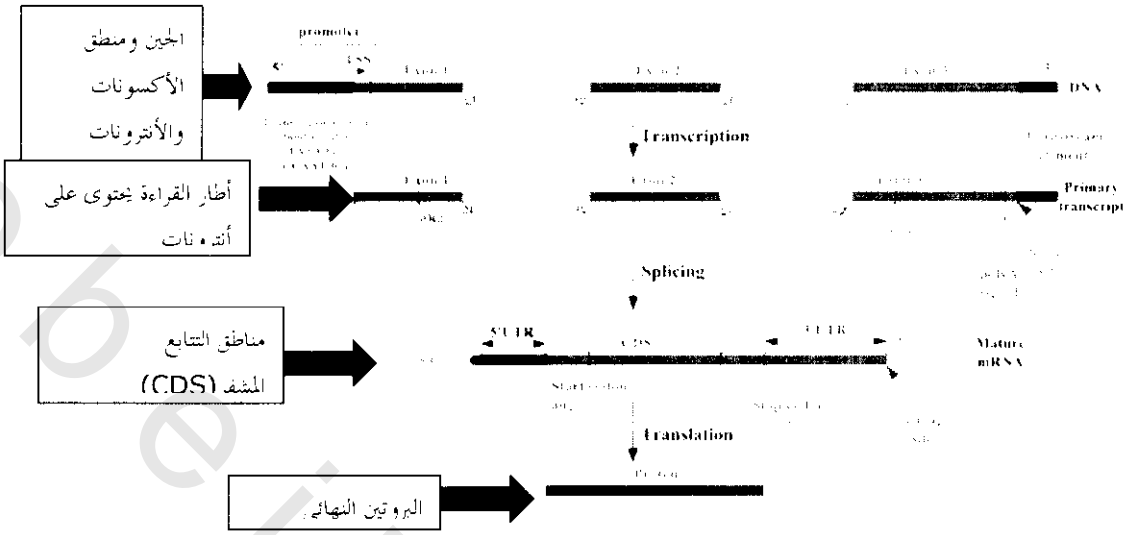


شكل ٤٨ : شكل تخطيطى يوضح إزالة مناطق الإنترونات للحصول على جزيء الـRNA النهائى في عملية تسمى (RNA splicing).

ماهو التتابع المشفر(Coding Sequence(CDS ؟

وكيف يختلف أطار القراءة(Open reading frame (ORF؟

التتابع المشفر هو المنطقة الحقيقية من الـDNA التى تترجم لتكون البروتينات. يحتوى أطار القراءة على أنترونات فى حين أن التتابع المشفر يحتوى فقط على مناطق الأكسونات المشفرة فقط مجمعة بشكل ممتالى ويمكن تميزها الى شفرات ثلاثية لأحماض أمينية فى الريبوسوم. فى أوليات النواه مناطق التتابع المشفر(CDS) ومناطق أطار القراءة (ORF) متشابه لعدم وجود أنترونات. شكل ٤٩



شكل ٤٩ : شكل تخطيطى يوضح الفرق بين التتابع المشفر وأطار القراءة

الحصول على التتابعات DNA من تتابعات البروتين: لماذا يجب الرجوع للخلف؟

هناك حالات يستوجب فيها البحث أن نحصل فيها على تركيب الـ DNA الخاص بجين ينتج بروتين معين فعلى سبيل المثال:-

عندما نرغب في كلونة الجين المسئول عن تكوين بروتين معين لنقله من كائن إلى كائن حتى يستطيع إنتاج هذا البروتين بشكله الطبيعي أو حتى بشكل محور بعد إحداث طفرة متخصصة به. فى هذه الحالة يجب أن نتبع الخطوات التالية:-

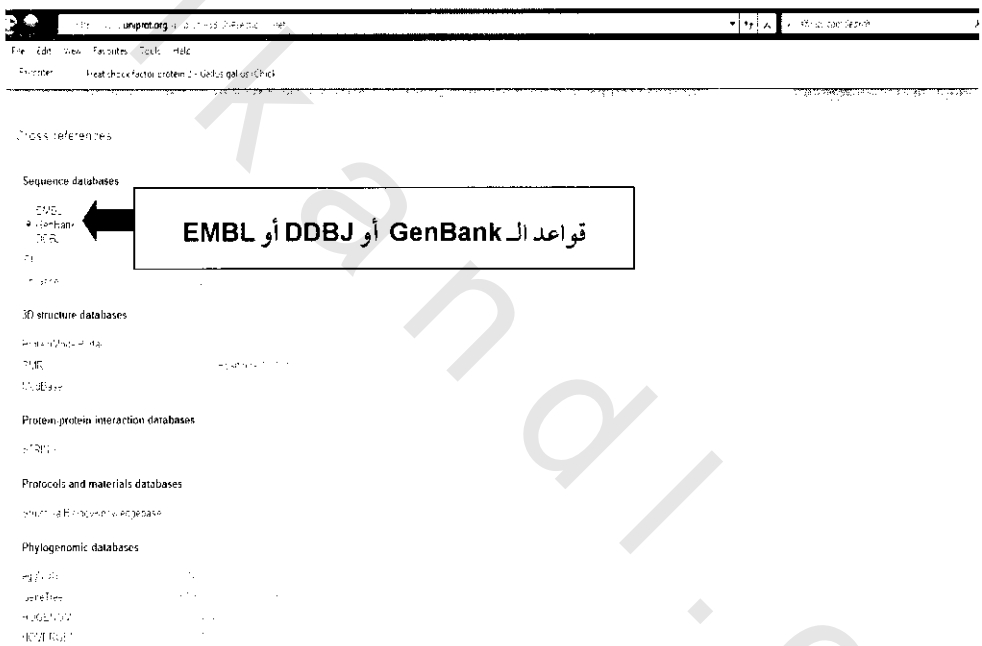
١- الذهاب لموقع EXPASY (http://www.expasy.org/) ويتم البحث عن بروتين معين وليكن (HSF) ونكتب الاسم ثم نضغط Go (شكل ٢٧).

- سوف تظهر لنا قاعدة بيانات UniportKB (القاعدة الخاصة بتتابعات البروتين) والتى تحتوى على مجموعة التتابعات البروتينية المرتبطة بهذا الاسم كل واحدة من هذه التتابعات لها رقم محدد (كود) خاص بها مثل Q00613. كل واحد من هذه الأرقام لا تكرر سوى مرة واحدة كما (شكل ٣٦-٣٧).

٢- عند الضغط على الرقم الخاص بالبروتين تظهر لنا المعلومات المطلوبة عن هذا البروتين ثم نضغط على Cross-refrence لكي نحصل على الجين المسئول عنه. وتظهر التتابعات الموازية لهذا البروتين في GenBank أو DDBJ أو EMBL(شكل ٥٠).

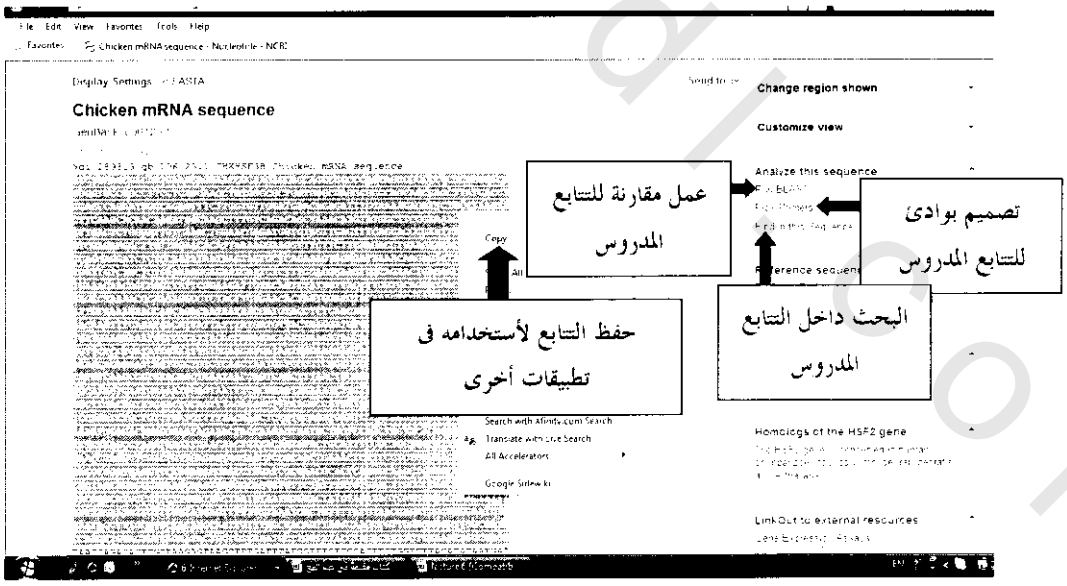
٣- عند اختيار GenBank تظهر لنا معلومات كثيرة عن هذا الجين من قاعدة الـ NCBI ثم في النهاية يظهر لنا التتابع البروتيني الخاص بهذا الجين ثم التتابع الجيني في NCBI فى شكلين هما شكل تخطيطى(Graphics)و شكل صيغة FASTA (شكل ٥١).

٤- ثم نقوم بعمل نسخ لهذا التتابع وحفظه بالطريقة العادية المعروفة وذلك لاستخدامها مرة وتحليها فى تطبيقات أخري مثل التعرف على منطق القصر أو تصميم بوادئ ت Primers أو لعزل الجين أو مقارنة التتابع مع تتابعات أخرى لمعرفة صلة القرابة.



شكل ٥٠: شكل يوضح نتيجة الضغط على Cross-refrence لكي نحصل على الجين المسئول عن البروتين. وتظهر التتابعات الموازية لهذا البروتين في قواعد الـ GenBank أو DDBJ أو EMBL

شكل ٥١: شكل يوضح أختيار الشكل الذى يظهر به التتابع الجينى في الـNCBI ، هما شكل تخطيطى(Graphics) أو شكل صيغة FASTA



شكل ٥٢: بعمل نسخ لهذا التتابع وحفظه بالطريقة العادية المعروفة وذلك لاستخدامها وتحليها فى تطبيقات أخري مثل التعرف على منطق القصر أو تصميم بوادئ ت Primers أو لعزل الجين أو مقارنة التتابع مع تتابعات أخرى لمعرفة صلة القرابة

بعض التطبيقات التى يمكن عملها على تتابع الـجين

أولا:- عمل مقارنة بين التتابع الجينى المدروس والتتابعات الجينات المشابهة على قاعدة البيانات:

يمكن أستخدام أمر BLAST وهو أختصار لعبارة Basic Local Alignment Search Toolوالموجود فى أقصى يمين الصفحة شكل (٥٢). ويستخدم هذا الأمر بكثرة وبكفاءة كبيرة في البحث عن نسبة التشابه أو الأختلاف بين التتابعات المختلفة ذات الصلة بالجين المدروس فى قاعدة البيانات. ويمكن تلخيصها كما يلى:

١- هذه الطريقة تم تصميمها بواسطة العالم Smith Waterman.

٢- تظهر هذه الطريقة أفضل المناطق المتشابهة داخل التتابعات المختلفة.

٣- تعطي المعنوية الإحصائية لدرجات التشابه بين التتابعات المختلفة.

٤- يمكن أن نستخدم هذه الطريقة في البحث عن تتابعات الـ DNA والبروتينات وجميع التوافيق والتباديل الممكنة بينهم مثل:

- مقارنة تتابع الـDNA مع قاعدة التتابعات DNA عن طريق برنامج Blastn.
- مقارنة ترجمة تتابع الـDNA مع تتابعات البروتينات عن طريق برنامج Blastx.
- مقارنة تتابع بروتينى مع قاعدة تتابعات البروتينات عن طريق برنامج Blastp.
- مقارنة ترجمة تتابع بروتينى مع قاعدة تتابعات عن طريق برنامج tBlastn DNA.
- مقارنة ترجمة تتابع DNA أمام قاعدة ترجمة تتابعات DNA عن طريق برنامج tBlastx.
- ويوجد هذا برنامج الـBLAST على الإنترنت أو كبرنامج مستقل أو داخل شبكات المواقع المتخصصة لقواعد البيانات مثل NCBI أو EMBL .

ماهى النتائج التى يمكن أن نحصل عليها من برامج الـBLAST ؟

تعطينا نتائج الـ Blast درجة التشابه أو الأختلاف بين التتابع المدروس والتتابعات الموجودة على قاعدة البيانات مع حساب درجة التشابه نتيجة الصدفة. مع الأخذ فى الأعتبار أن التتابعات المستخدمة فى المقارنة:

١- تتابعات عشوائية ٢- ذات تركيب ثابت.

obeikandl.com

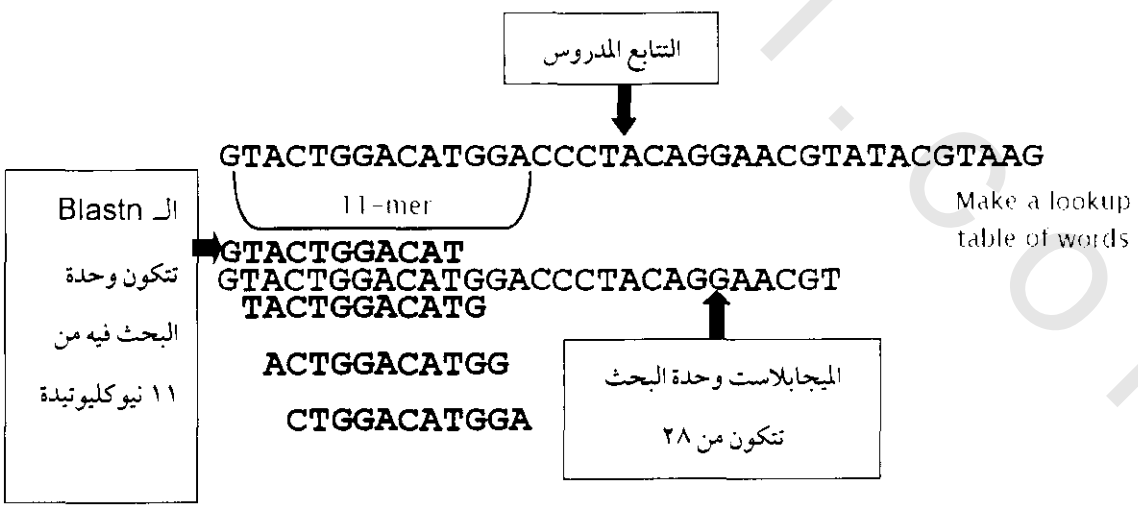
وتكون النتيجة المتوقعة بالتالى أن التشابهات التي توجد بين هذه التتابعات توضح تشابه تطوري، أي هذه التتابعات قادمة من أصل وراثي واحد ، وذلك لا يعني أن تكون لها نفس الوظيفة.

أنواع أخرى للبحث المتقدم عن طريق الـ Blast

١- ميجابلاست Megablast : هو أحد أنواع البحث بأستخدام الـ Blast لمقارنة تتابع من الـ DNA مع قاعدة بيانات تتابعات الـ DNA مثل نظيره الـ Blastn.ولكن يتميز الميجابلاست فى أن وحدة البحث تتكون من ٢٨ نيكلوتيده وبحد أدنى نيكلوتيده ١٢ فى حين أن نظيره الـ Blastn تتكون وحدة البحث فيه من ١١ نيوكليوتيدة وبحد أدنى ٧ نيكلوتيده.كما يظهر فى الجدول التالى مقارنة بين النوعين

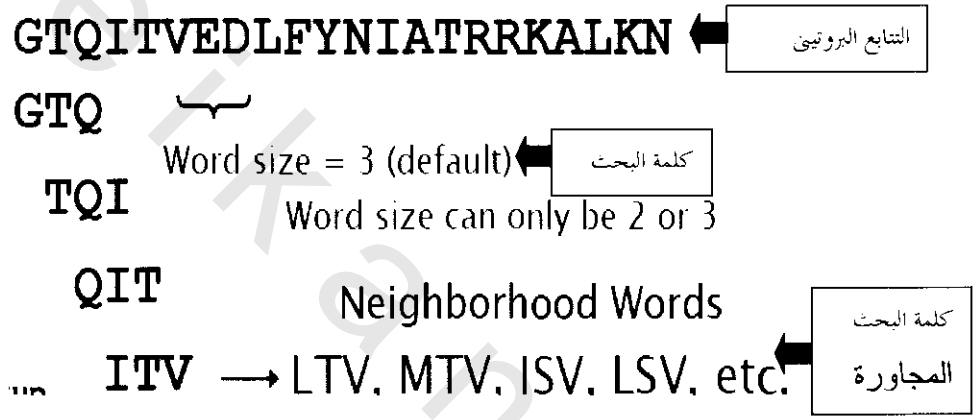
وحدة البحث	الوحدة المستخدمة	بحد أدنى
Blastn	١١	٧
Megablast ميجابلاست	٢٨	١٢

يعنى ذلك أن الميجابلاست سوف يظهر التتابعات الأكثر قرابة للتتابع المدروس وبالتالى يظهر عدد أقل من نتائج البحث. ولذلك هو اكثر دقة فى البحث عن التتابعات الأكثر قرابة للتتابع المدروس كما فى الشكل ٥٣.



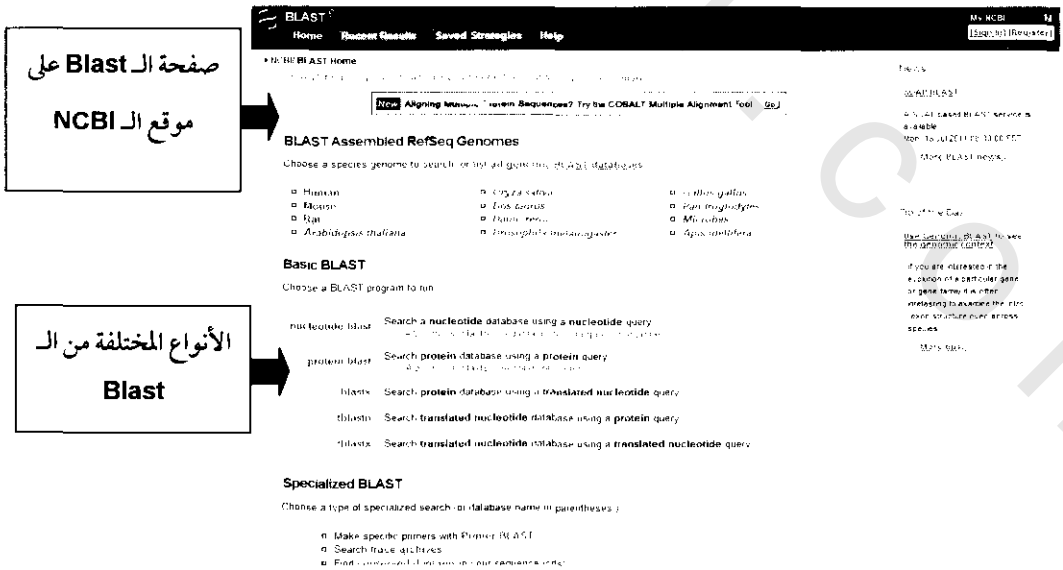
شكل ٥٣: يتميز الميجابلاست فى أن وحدة البحث تتكون من ٢٨ نيكلوتيده وبحد أدنى نيكلوتيده ١٢ فى حين أن نظيره الـ Blastn تتكون وحدة البحث فيه من ١١ نيوكليوتيدة وبحد أدنى ٧

أما فى حالة Blastp لمقارنة تتابع بروتينى مع قاعدة تتابعات البروتينات فأن وحدة البحث تتكون من٣ حروف أي ٣ أحماض أمينية ويعنى ذلك أنه عندما تكون هناك ٣ أحماض أمينية متشابهة تتكون بداية التشابه.كما يتطلب أيضا أن تكون هناك وحدتين متشابهتين للبحث على الأقل فى التتابع ولا تزيد المسافة بينهما عن ٤٠ حمض أميني. وهناك أيضا مايسمى "بوحدات البحث المجاورة" وهى عبارة عن وحدات بحث مكونة من ثلاث أحماض أمينية أيضا ولكن تكون مشابه للأحماض الأمينية المدروسة فى خواصها الكيميائية والفيزيائية ولكن غير متطابقة معها كما فى الشكل ٥٤.



شكل ٥٤: مقارنة تتابع بروتينى مع قاعدة تتابعات البروتينات

فأن وحدة البحث تتكون من٣ حروف أي ٣ أحماض أمينية والتى قد تكون متطابقة أوغير متطابقة "متجاوره".



شكل ٥٥. شكل صفحة الـ Blast على موقع الـ NCBI. توجد الأنواع المختلفة من الـ Blast فى الجانب الأيمن من الصفحة.

كيفية الوصول إلى BLAST:

١- فتح صفحة NCBI.(http://www.ncbi.nlm.nih.gov /) (شكل ٥٦).

٢- الضغط على كلمة BLAST ناحية اليمين (مشار إليها بسهم أحمر في الصور التوضيحية (شكل ٥٦).

٣- في أسفل الصفحة على اليسار نرى كلمة Nuclotide plast نضغط عليها (شكل ٥٥).

٤- في المستطيل الفارغ في الأعلى يتم وضع التتابع المراد مقارنته أو الرقم الكودى للتابع(شكل٥٧).

٥- نختار قاعدة البيانات التي نريد البحث بها من Choose search set (شكل٥٧).

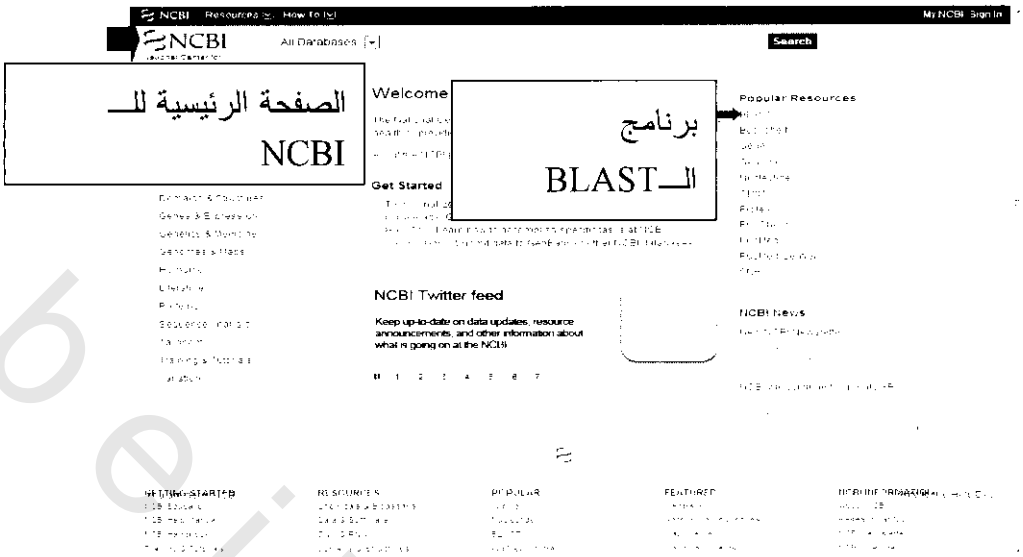
٦- نختار نوع الـ BLAST المراد تطبيقه في الأسفل من (Program Seletion)

٧- فيقوم بعمل مقارنة ويقوم بإعطاء نتيجة عبارة عن صفحة طويلة مكونة من ثلاث أقسام. القسم الأول يتكون من الملخص البيانى (Graphic Summary) بين التتابعات القريبة من التتابع المدروس مرتبة حسب درجة التشابه أو القرابة(شكل أ٥٨) . وبالنزول للأسفل نجد القسم الثانى والخاص بوصف هذه التتابعات (Descriptions) (شكل ب٥٨). وبالنزول الى أسفل نجد القسم الثالث الخاص بالتوازى والمقارنة (Alignment) والذى يختص بقارنة التتابع المدروس مع التتابعات القريبة (شكل ج٥٨).

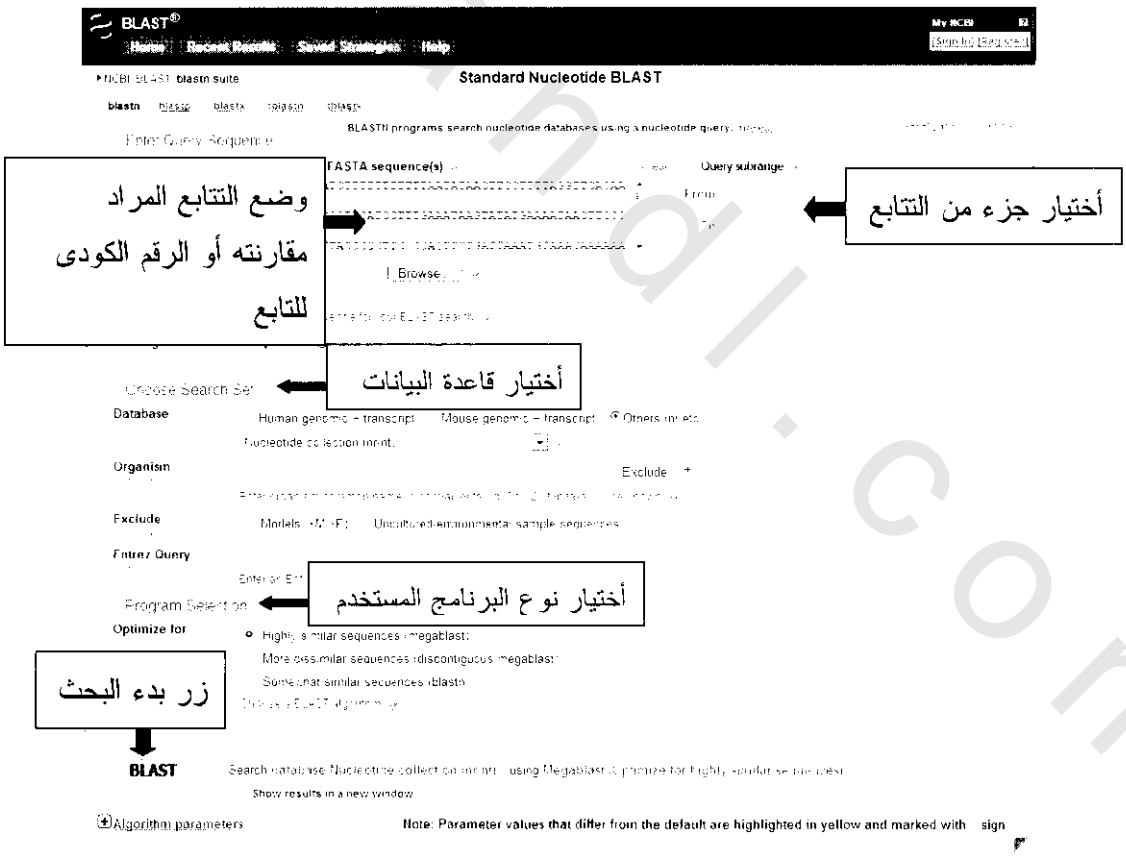
٨- يمكن الحصول على بعض التتابعات المرغوبة وحفظها لأستعمالها فى برامج أخري عن طريق الضغط على (Get selected sequences) .كما يمكن أيضا عمل شجرة قرابة بين التتابعات المختارة عن طريق أختيار الأمر (Distance tree of results) وذلك بعد أختيار التتابعات المرغوبة للمقارنة (شكل ج٥٨).

٩- عند الضغط على (Distance tree of results) نحصل على شكل تخطيطى يوضح درجة التشابه والأختلاف بين التتابعات المدروسة. يظهر لنا هذا الشكل الموضح في الصور(شكل ٥٩).

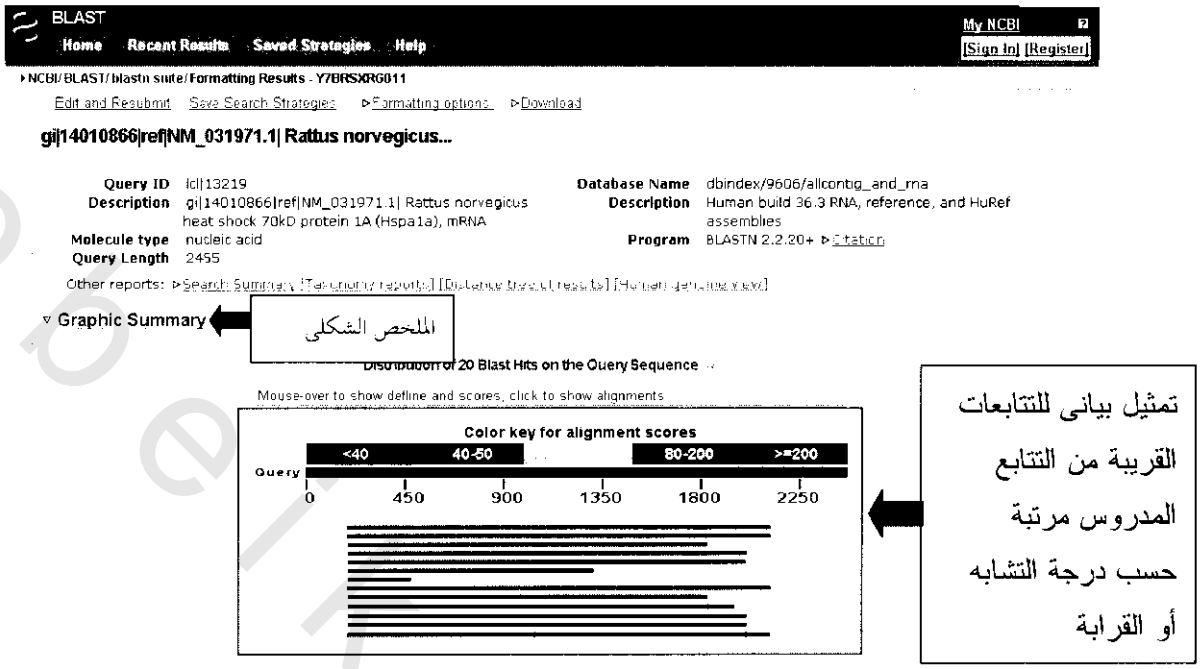
١٠- ويمكن أختيار أى نوع من الأنواع مختلفة من أشكال شجرة القرابة(شكل ٥٩).



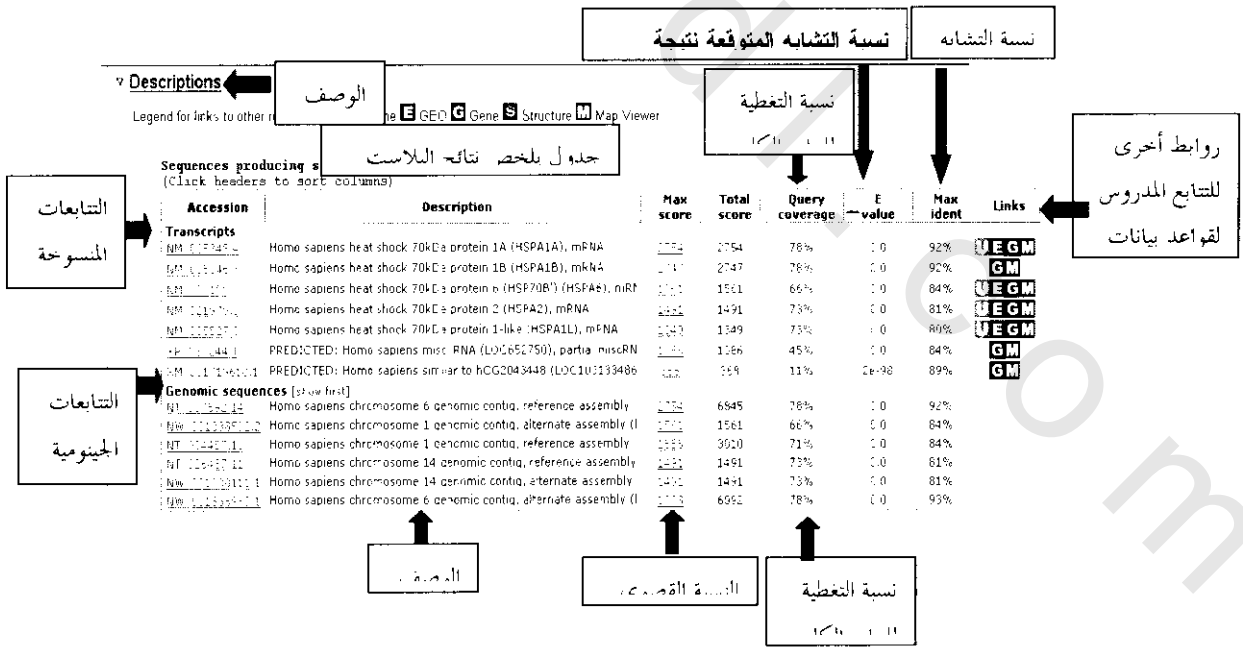
شكل ٥٦ : فتح الصفحة الرئيسية للمركز الوطنى لمعلومات التكنولوجيا الحيوية NCBI.



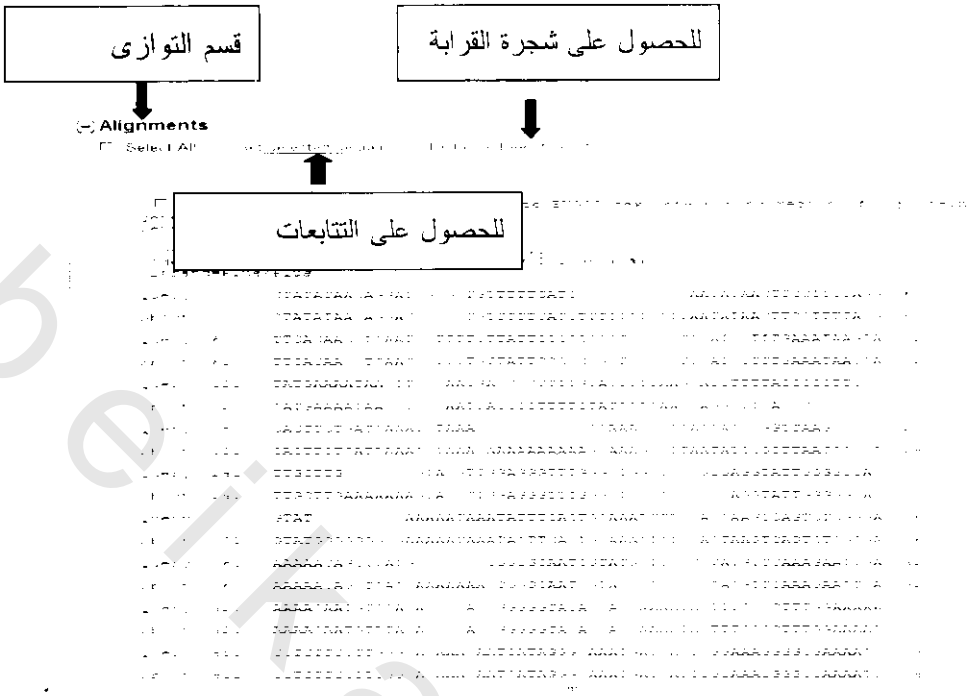
شكل ٥٧ : فتح الصفحة الرئيسية لبرنامج الـ Blast الخاص بمقارنة تتابعات الـ DNA.



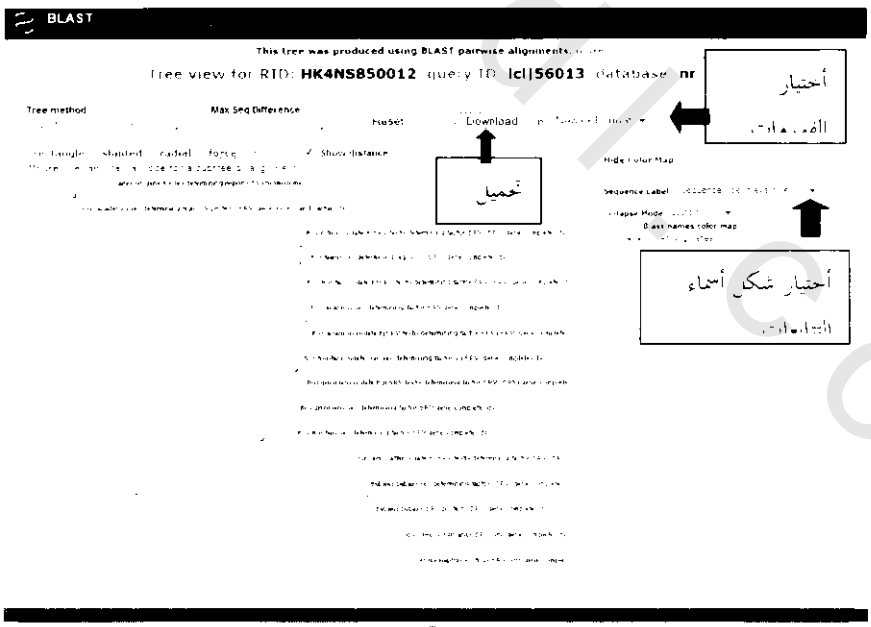
شكل٥٨ أ: الملخص الشكلى (Graphic Summary) بين التتابعات القريبة من التتابع المدروس مرتبة حسب درجة التشابه أو القرابة.



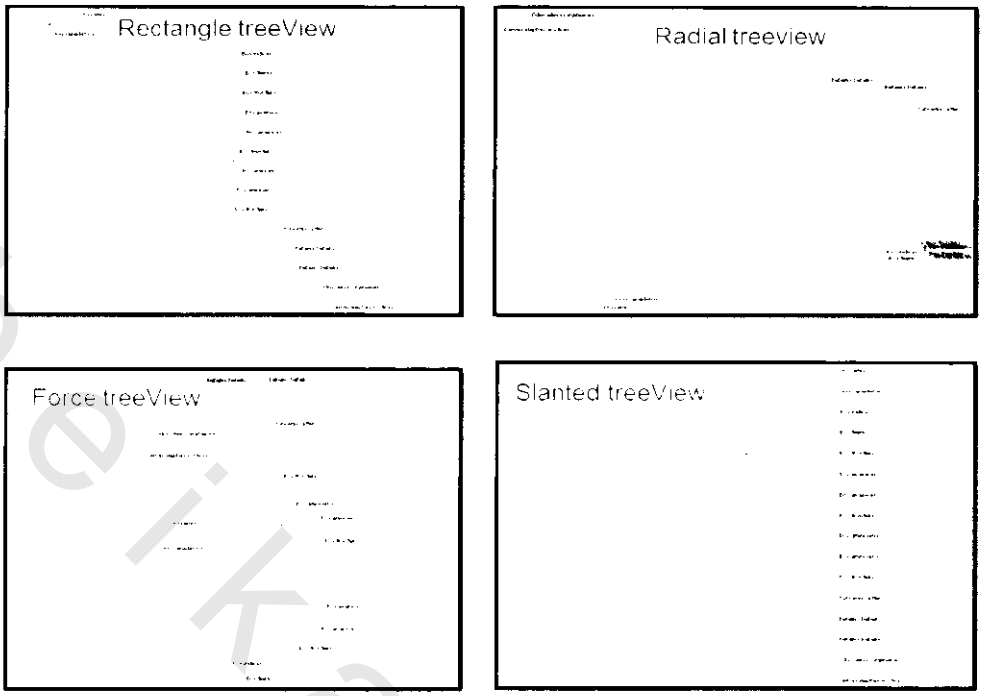
شكل ٥٨ ب: القسم الثانى والخاص بوصف هذه التتابعات (Descriptions).



شكل ٥٨ ج: القسم الثالث الخاص بالتوازى والمقارنة (Alignment) والذى يختص بمقارنة التتابع المدروس مع التتابعات القريبة.



شكل ٥٩: شجرة القرابة بين التتابعات المختارة.



شكل ٦٠: ويمكن أختيار أى نوع من الأنواع مختلفة من أشكال شجرة القرابة.

أنواع الـ **BLAST** الخاصة بالبروتين فقط:

النوع الأول: بلاست التتابعات البرتينية

blastp (protein-protein BLAST)

ويعمل هذا النوع على مقارنة التتابعات البروتينية بقاعدة بيانات البروتينات للبحث عن أكثر التتابعات البروتينية قرابة و تشابها من التتابع المدروس فى الكائنات الكائنات -المختلفة الموجودة فى قاعدة البيانات.

*النوع الثانى:- بلاست الـ **PSI** بلاست المناطق المتشابهة المتكررة*

PSI-BLAST (Position-Specific Iterated BLAST)

النوع الثالث:- بلاست النطاقات الوظيفية المتشابهة ***PHI-BLAST (Pattern Hit Initiated BLAST)*** *والذى يكرر البحث عن المناطق المتشابهة.*

ولكل واحد من هذه الأنواع مجموعة كبيرة من التطبيقات . ويعتبر النوع الأول هو الأكثر أستخداما.

obeikandl.com

كيف تقرأ نتائج التوازى بين التتابعات الناتجة من الـ Blast

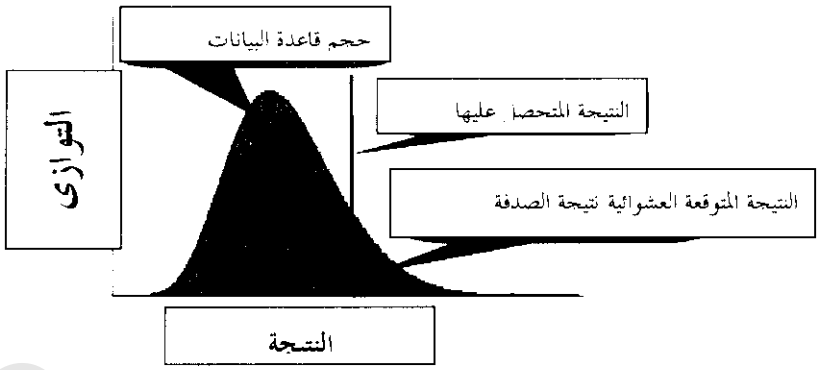
لكى نعرف كيف نقرأ نتائج التوازى بين التتابعات الناتجة من برنامج الـ Blast يجب أن نتعرف على بعض المصطلحات الملخصة فى الجدول التالى:

مصطلحات هامة لقراءة نتائج التوازى والتشابه بين التتابعات

الرقم	المصطلح	تعريف	التفسير
١	Expected value أو E.Value نسبة الصدفة	نسبة التشابه المتوقعة نتيجة الصدفة	كلما قلت هذه النسبة كلما زادت معنوية النتائج والعكس صحيح
٢	تطابق (*) Identical match	هو التشابه وتطابق ويعبر عنها برمز النجمة	يعبر عن التطابق الكامل بين الوحدة المدرسة والمقارنة
٣	أشارة موجبة Positive score (Conservative) (:) (.)	يعبر عن وجود تشابه غير متطابق ويرمز له بنقطة أوأثنين فمثلا إذا كان حدث تغير ولكن داخل نفس المجموعة (أي قاعدة بيورين بقاعدة بيورين أو بيريميدين بقاعدة بيريميدين أو لبوسين بأيزوليوسين) يأخذ رقم موجب.	يعبر عن تشابه فى الخواص بين الغالبية المقارنة مع وجود أحد الأختلافات أى أن التغير الناتج لاينتج عنه أختلاف معنوى فى شكل ووظيفة البروتين النهائى
٤	أشارة سالبة Negative score (-)	في هذه الحالة يكون التغير بين بروتين وبيرميدين أو العكس لذلك لا يكون Score إشارة سالبة	أى أن التغير الناتج ينتج عنه أختلاف معنوى فى شكل ووظيفة البروتين النهائى
٥	فراغ ( ) Gap	وهي منطقة فارغة أي هناك أحماض أمينية لا تقابل أي حمض آخر أو نيوكليوتيدات لا تقابل أي نيوكليوتيدات أخرى	ويعنى ذلك وجود طفرات حذف أو أضافة فى التتابع المدروس بمقارنة بتتابعات أخرى

الأسس الأحصائية لحساب نسبة الصدفة
Expected value أو E.Value

الرقم الأعلى للرقم (High Score) لنتيجة التوازى بين تتابعين عشوائيين يتبع الحد الأقصى للتوزيع العشوائى (Exterm Value distribution). ويجب معرفة ان نسبة الصدفة تعبر عن عدد المرات التى تحدث نتيجة الصدفة. وينطبق المثال التالى على التوازى بدون وجود فراغات بينية (شكل ٦١).



شكل٦١: شكل يوضح الأساس الأحصائى لحساب نسبة الصدفة .E. Value

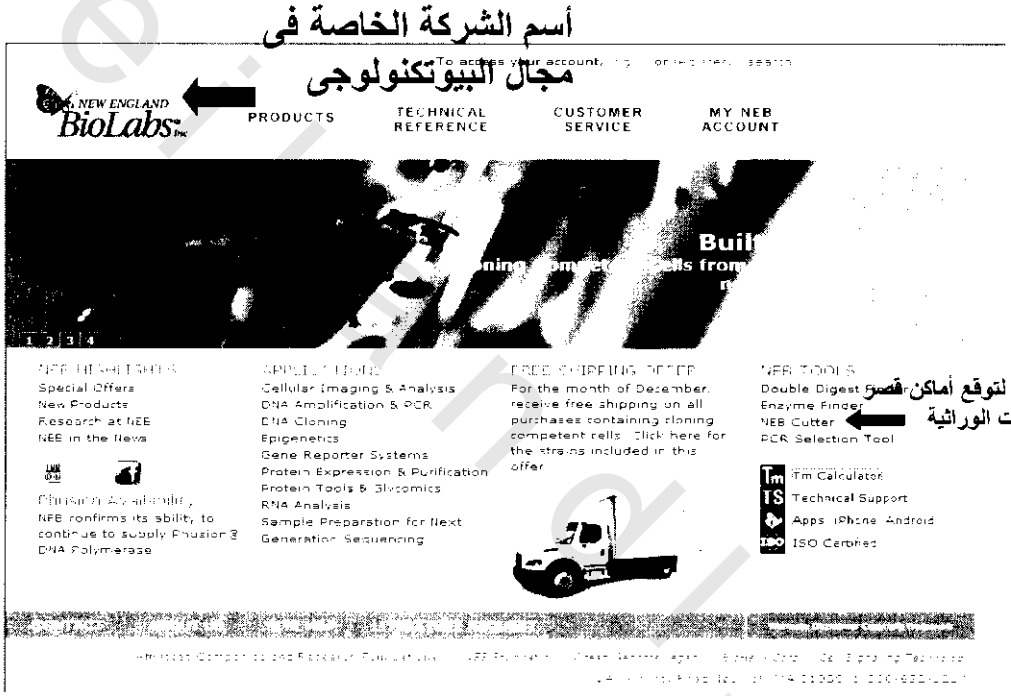
ويوضح الشكل التالى بعض معانى الأشارات الهامة المستخدمة للتعبيرعن نتائج التوازى بين التتابعات الناتجة من الـ Blast (شكل ٦٢)

```
>gi|127552|sp|P23367|MUTL_ECOLI  DNA mismatch repair protein mutL
          Length = 615

 Score = 42.0 bits (97),  Expect = 3e-04
 Identities = 26/59 (44%), Positives = 33/59 (55%), Gaps = 9/59 (15%)

Query  9    LPKNTHPFLYLSLEISPQNVDVNVHPTKHEVHF-----LHE---ESILEV-QQHIESKL  58
            L  +  P   L LEI P  VDVNVHP KHEV F     +H+    + +L V QQ +E+ L
Sbjct  280  LGADQQPAFVLYLEIDPHQVDVNVHPAKHEVRFHQSRLVHDFIYQGVLSVLQQQLETPL  338
```


شكل٦٢: شكل يوضح مصطلحات هامة لقراءة نتائج التوازى والتشابه بين التتابعات.

رسم خريطة لمواقع أنزيمات القصر تتابع جينى

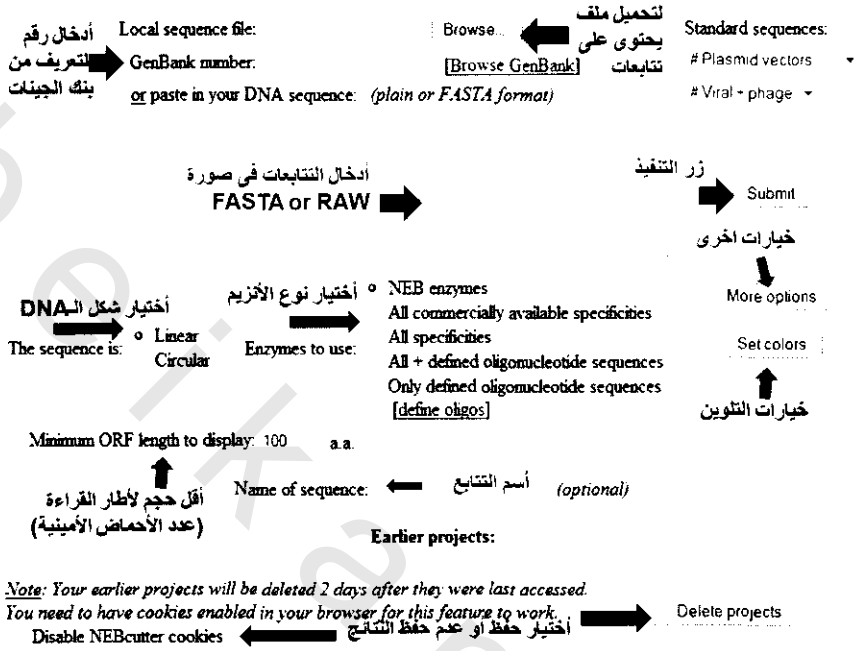
تتطلب بعض تجارب الهندسة الوراثية عمل خريطة كاملة لمواقع أنزيمات القصر فى تتابع جينى معين. وتفيد مثل هذه الخرائط العديد من تجارب التطويع الجينى. وهناك العديد من البرامج المجانية التى تساعد على رسم وتوقع شكل هذه الخرائط. بعض هذه البرامج توفره الشركات المنتجة لهذه الأنزيمات على مواقعها. ومن أشهر البرامج المستخدمة هو برنامج NEB cutter والموجود على موقع www.neb.com والخاص بشركة New England Biolabs الشهيرة فى منتجات البيوتكنولوجى.



شكل٦٣: شكل يوضح الصفحة الرئيسية لموقع شركة البيوتكنولوجى الخاصة New England Biolabs .

عند وضع التتابع المرغوب دراسته فى برنامج الـ NEB cutter يعمل البرنامج على التعرف على مناطق أطار القراءة فى الجين المرغوب بناء على الأكواد والشفرات الوراثية المعروفة فى بكتريا الـ E.coli كما يقوم البرنامج أيضا بالتعرف على مناطق القصر (القطع) فى التتابع المدروس الخاصة بأنزيمات القصر من النوع الثانى TypeII وبعض أنواع TypeIII المتوفرة تجاريا والتى تقطع فى أماكن متفردة. فى البداية يستخدم البرنامج الأنزيمات المتوفرة من الشركة ولكن يمكنك اختيار اى نوع من الأنزيمات الأخرى المتوفرة تجاريا كما يظهر فى(شكل ٦٤) وهناك أختيارات أخرى سوف تظهر مع صفحة النتائج. ويجب الأخذ فى الأعتبار أن الحد الأقصى لحجم الملف

الذى يمكن تحميله هو واحد ميجابايت كما أن أقصى طول للتتابع الذى يمكن دراسته هو ٣٠٠ الف قاعدة. ويوضح الشكل التالى صفحة الأدخال فى البرنامج مع وجود عدد من الأختيارات المختلفة.

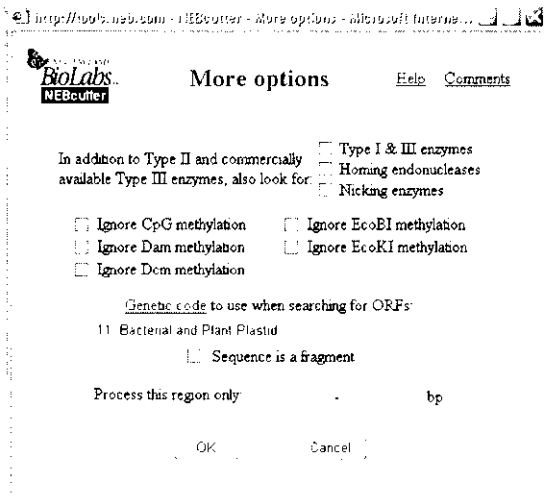


شكل٦٤: شكل يوضح صفحة الأدخال الرئيسية لبرنامج الـ NEBcutter والتى تحتوى على العديد من الأختيارات .

وبالضغط على زر خيارات أخرى (More options) تظهر لنا مجموعة جديدة من الأختيارات الهامة مثل أختيار مجموعة أخرى من أنزيمات القصر أو تجاهل بعض المناطق المعينة أثناء عملية القطع او تحديد منطقة معينة من التتابع المدروس لأجراء عملية القطع (شكل٦٤).

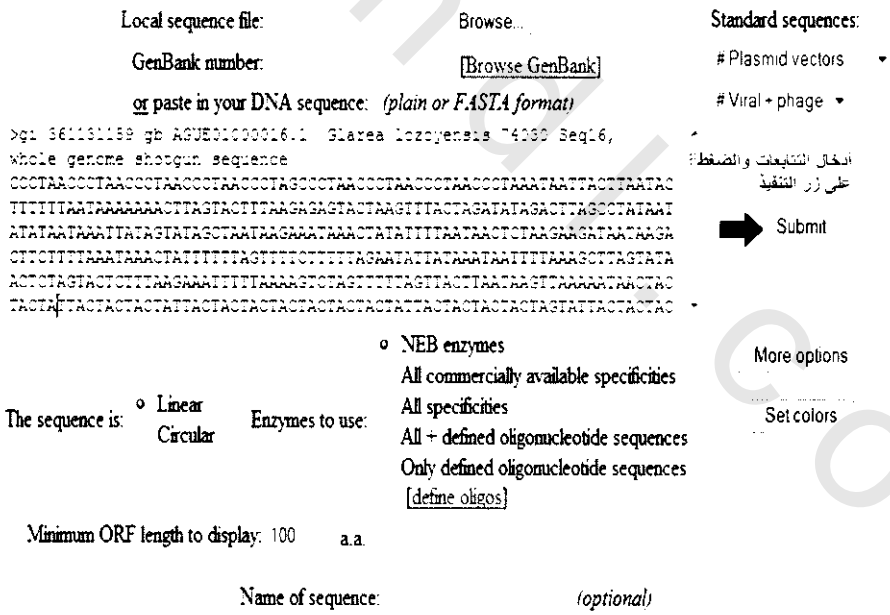
خيارات أضافية فى برنامج الـ NEBcutter

- تجاهل تحويرات مناطق الميثلة (أضافة مجموعة ميثل) المختلفة (مثل مناطق CpG, Dam, Dcm, EcoBI and EcoKI).
- أستخدام أنزيمات النوع الأول والثالث من أنزيمات القصر (type I & III restriction enzymes).
- أختيار جدول الأكواد الوراثية المختلفة لأحد الأنواع.
- أمكانية البحث فى جزء محدد من التتابع المدخل.
- أمكانية تخزين النتائج وأمكانية أسترجاعها خلال بضعة أيام.



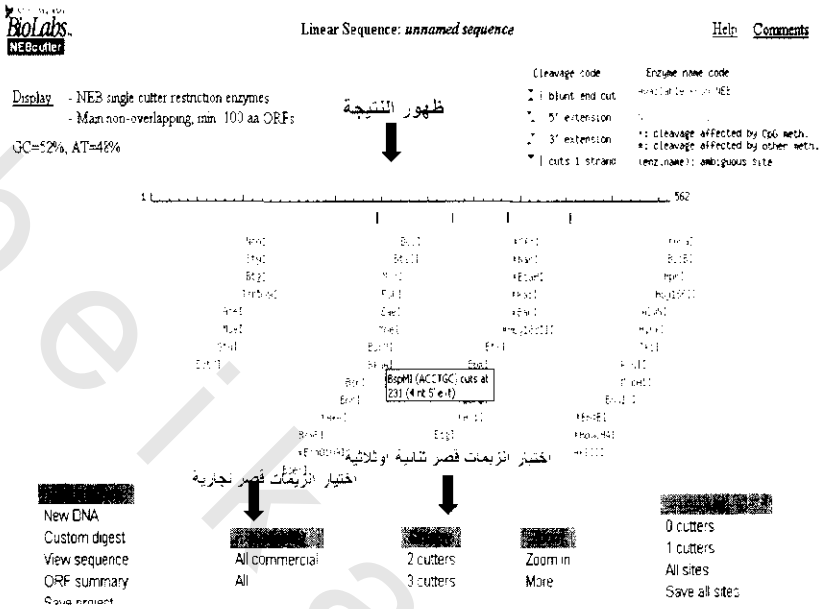
شكل٦٥: شكل يوضح الخيارات الأضافية لبرنامج الـ **NEBcutter** والتى تحتوى على العديد من الأختيارات المكملة.

ثم يتم أدخال التتابعات المرغوبة فى المكان المخصص والضغط على زر تنفيذ كما فى (الشكل ٦٦).



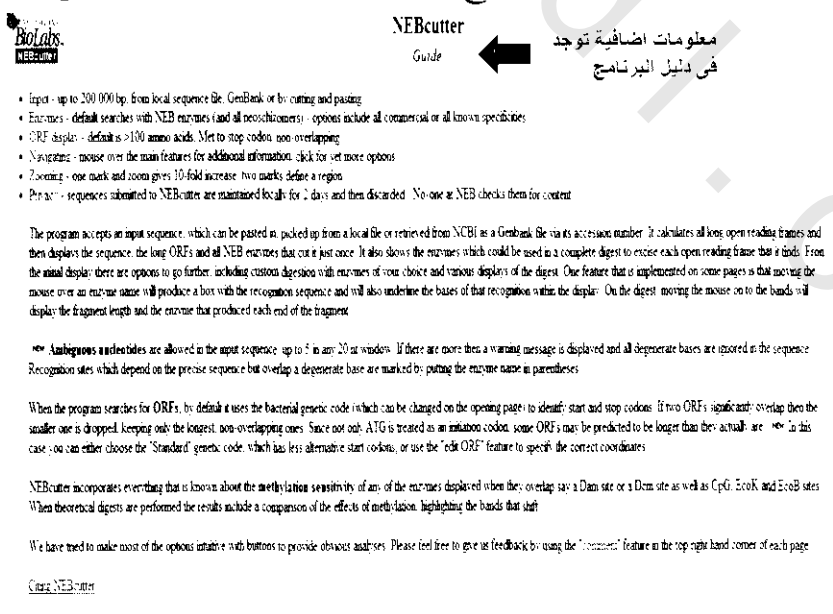
شكل٦٦: أدخال التتابعات فى صورة صيغة الـ **FASTA** والكبس على زر التنفيذ.

تخرج النتيجة من البرنامج كما فى (شكل٦٧) بحيث تظهر أماكن القصر المختلفة بأستخدام أنزيمات القصر المختلفة على طول التتابع المدروس.



شكل ٦٧ : شكل صورة النتائج المخرجة من لبرنامج الـ **NEBcutter** .

وعند الضغط على كلمة دليل فى أعلى يمين صفحة الأدخال نحصل على معلومات حول البرنامج وخواصه وكيفية أستخدامه كمافى شكل ٦٨ .



شكل ٦٨ : صورة توضح شكل صفحة الدليل لبرنامج الـ **NEBcutter** .

التناظر بين التتابعات البيولوجية

Sequence Alingment between biological sequences

أن أداة التناظر أو التوارى هى أداه هامة جداً في الدراسات البيولوجية ولذلك تستخدم هذه الأداة في علم Bioinformatics فى مقارنة البينة بين التتابعات البيولوجية مثل :

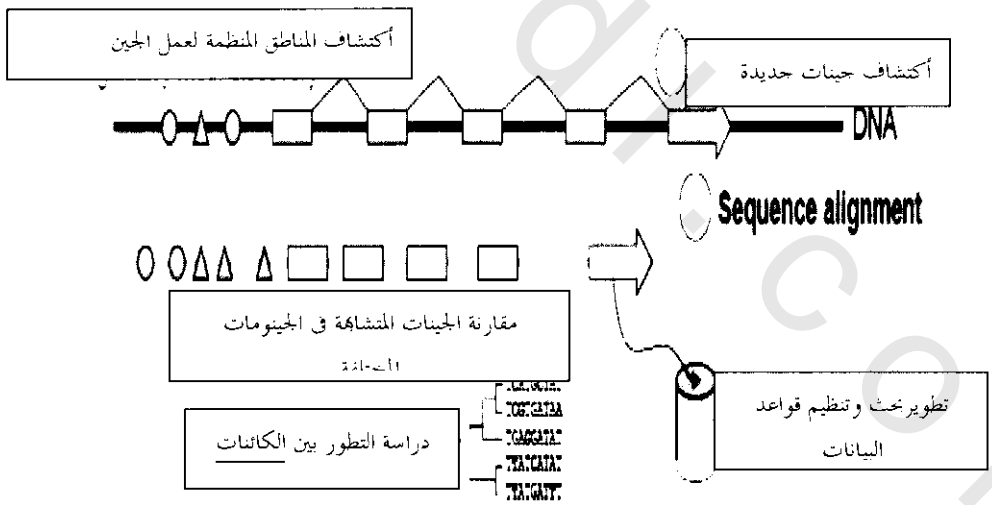
١ - مقارنة تتابعات الـ DNA.

٢- مقارنة تتابعات RNA.

٣- مقارنة تتابعات بروتينية.

وتتم هذه المقارنة بغرض إيجاد التشابهات أو الأختلافات بين التتابعات المختلفة. ويمكن عن طريق نتائج التناظر مساعدة الكثير من الأبحاث البيولوجية على سبيل المثال:

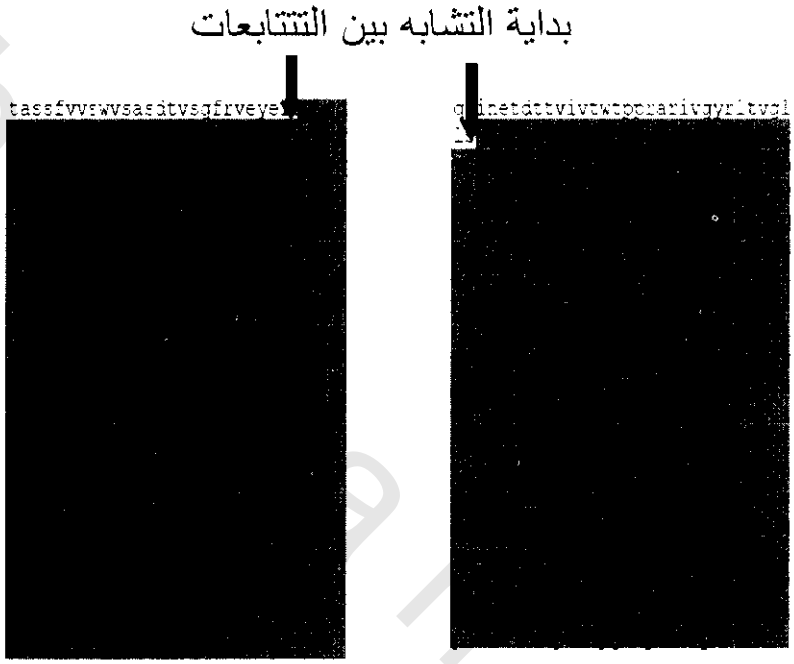
- اكتشاف الأصل المشترك لمجموعة جينات أو بروتينات.
- التنبؤ بالوظيفة والتركيب للجين او البروتين المدروس.
- تحديد التتابعات التحتية Sub sequence المتشابه في الجينات والبروتينات.
- تحديد المناطق النشطة المتشابهة.
- تحديد التتابعات المتداخلة.



شكل ٦٩ : صورة توضح بعض التطبيقات الناتجة من تناظر التتابعات البيولوجية

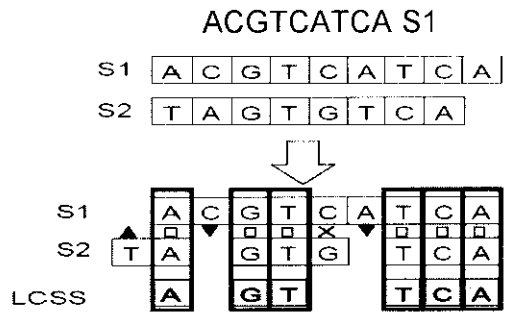
Sequence similarity

من الصعب بالعين المجردة إيجاد التشابه بين تتابعين أو جينات بكثرة عدد الحروف لذلك كان لابد من وجود برامج الحاسب الآلي لإيجاد هذه الفروق كما يظهر فى الشكل التالى:



شكل ٧٠: صورة توضح بعض صعوبة إيجاد التشابه بين تتابعين بالعين المجردة بدون عمل تناظر للتتابعات البيولوجية.

فعلى سبيل المثال: كيف يمكن المقارنة بين تتابعين من DNA لو أخذنا خيطين أحدهما S1 والآخر S2 للبحث عن أطول مقطع متشابه بين التتابعين سوف نحاول أن نحرك بعض التتابعات وليكن في الخيط الثاني ووضع بعض الفجوات بهذا التتابع لنحصل على أكبر قدر من التشابه بين الخيطين.



شكل ٧١: صورة توضح تحريك التتابعات لنحصل على أكبر قدر من التشابه بين الخيطين.

كيف يمكن أن نحسب أفضل توازي بين تتابعين؟

الناتج النهائي للتحوير في الخيطين لحساب أفضل توازى يشتمل على:

١- الدرجة المعطاه للطفور الناتج من التبديل أو التبادل في القواعد Substitution.

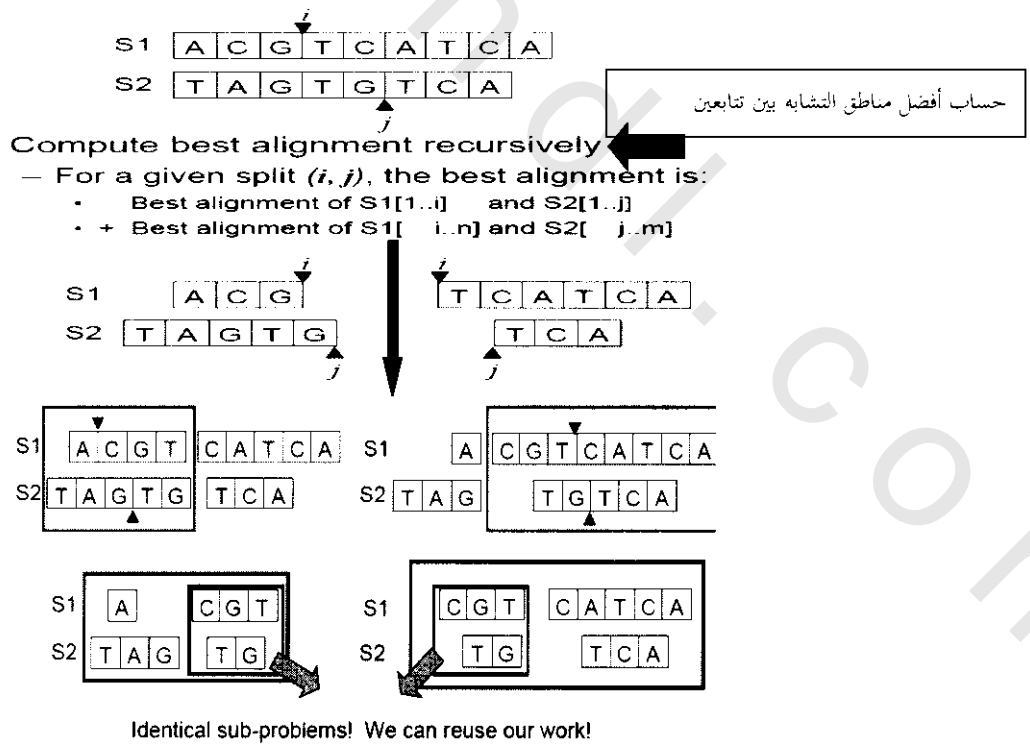
٢- الدرجة المعطاه للطفرة الناتجة من الإضافة أو الحزف تسمى Indel.

٣- الدرجة المعطاه للتشابه Similarirty.

ونحتاج إلى معادلة لحساب أفضل توازي أو تشابه بين هذه التتابعات. بكل من التتابعين المختلفتين أكثر من احتمال للتوازي لذلك نحاول أن نحسب رياضياً أكثرهم تشابهاً عن طريق الأرقام المعطاه لكل العناصر السابقة، لذلك كان أفضل الأشياء هو عمل برنامج الحاسب الآلي يستطيع أن يحسب هذه التشابهات ويختار أفضلها (أعلاها قيمة).

طريقة عمل البرنامج:

نضع الخيطين في مصفوفة حتى نحاول الوصول لأفضل حساب للتشابه ما بين الخيطين كما يوضح الشكل التالي:



شكل ٧٢: صورة توضح طريقة الوصول لأفضل حساب للتشابه ما بين الخيطين.

وهناك نوعين من التوازى:

١- (التوازى الجزئى) (Local alignment) لفحص مناطق التشابه بين تتابعين مختلفين جزئيا.

٢- (التوازى الكلى) (Global alignment) لبحث عن التشابه ما بين تتابعين على الطول الكلي للتتابعين.

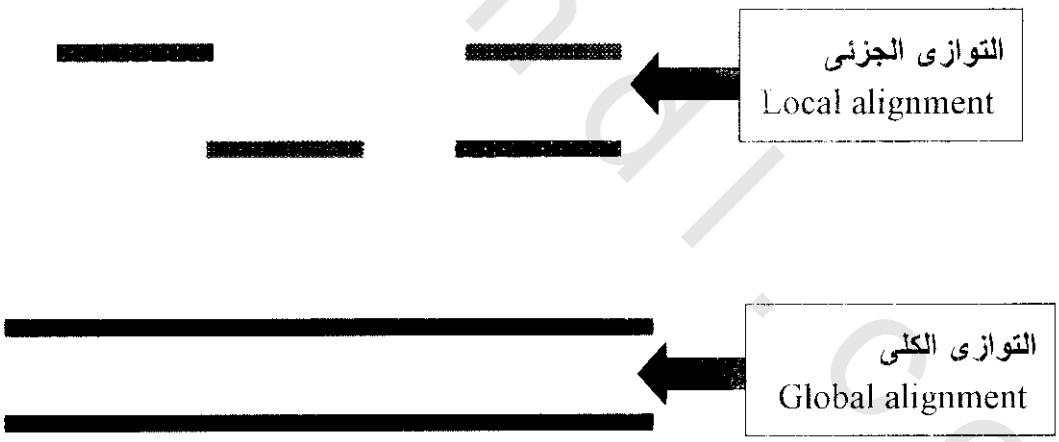
هناك تشابهه النواتج بين (التوازى الجزئى) (Local alignment) و(التوازى الكلى) (Global alignment):

١- ليس هناك أي نتيجة بالسالب.

٢- يبدأ بأعلى نتيجة بناء على المصفوفة المستخدمة ويستمر حتى صفر.

ويجدر الأشار أن التوازى الكلى (Global alignment) تم أكتشافه عن طريق العالم Needleman-Wunsch أما التوازى الجزئى (local alignment) تم أكتشافه عن طريق العالم Smith-Waterman

والشكل التالى يوضح الفرق بين الأثنين:



شكل ٧٣: صورة توضح التوازى الجزئى والتوازى الكلى.

أولاً: التوازى الجزئى (Local alignment)

ويمكن حساب التوازى الجزئى عن طريق وضع أرقام تعبرعن العناصرالوراثية المختلفة كما يلى:

فمثلا يمكن تبسيط المفاهيم كما يلى:

١. طفرة الأضافة اوالحذف = -٢ (Indel= - 2)

٢. طفرة التشابه= +١ (Match +1)

٣. طفرة الأختلاف = -١ (Mismatch -1)

وعلى ذلك يمكن حساب المثال التالى كما يلى:

المجموع = (+1x13) + (-1x2) + (-2x4) = 3

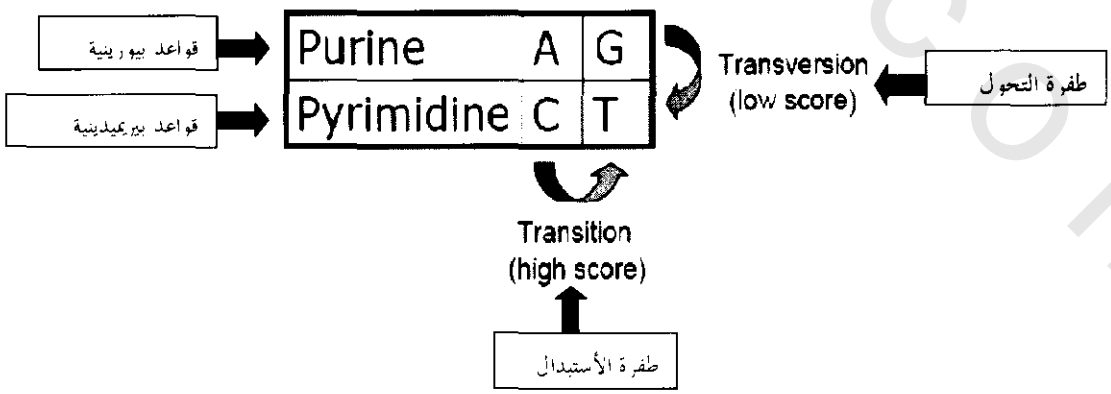
مثال أخر:

المجموع = (+1x5) + (-1x6) + (-2x11) = -23

ملحوظة: اختيار نظام درجات التقييم الطفور السابق ليست دقيقة من الناحية البيولوجية حيث أن هناك بعض الاختلافات (طفرات) تحتاج درجات تقييم أكثر عن غيرها.

فمثلا إذا تم تغيير قاعدة أو حمض أميني بحمض أميني آخر مشابه له فى الخواص (الحجم، الشحنة، الخ) لابد أن يأخذ درجة تقييم مختلفة عن تغيير حمض أميني بحمض أميني مختلف أخر مختلف فى الخاص.

المثال على ذلك:



شكل٧٤: صورة توضح أنواع طفرات الأستبدال المختلفة.

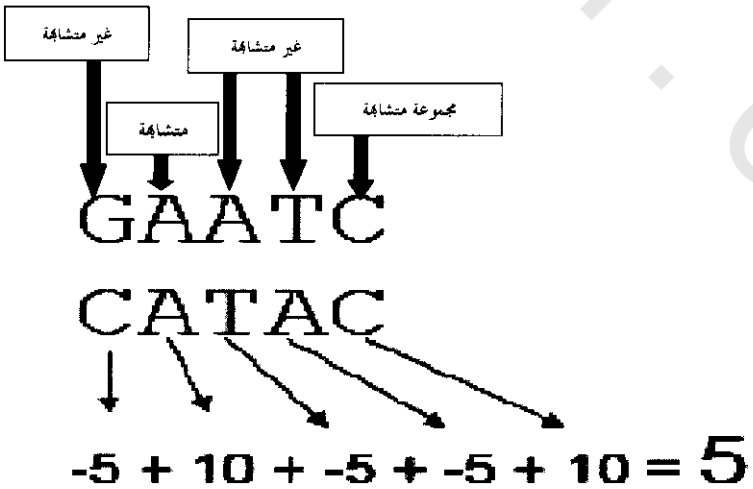
إذا حدث تبادل بين A, G (قواعد بيورينية) Purine أو بين C, T (قواعد بيريميدينية) يكون التقيم أعلى وذلك على العكس من حدوث تبادل بين T, G فإن هذا يأخذ تقييم أقل ويكون التقييم على حسب المصفوفة الجديدة التي وضعت في اعتبارها الأثر البيولوجى للطفرة والذى يزداد بتباعد خواص المجوعات الكيميائية المستبدلة (مثلا بيورين مع بيريميدين).

فمثلا يظهر الجدول التالى أن تقييم التشابة يقيم (١٠درجات) فى حين أن طفرة الأستبدال داخل نفس المجموعة الكيميائية يساوى صفر . أما طفرة الأستبدال من خارج المجموعة الكيميائية تقيم بـ (-٥) .

جدول يوضح أحد المصفوفات المقترحة لطفرات الـ DNA والتى أخذت فى الأعتبار الأثر البيولوجى للطفرة

	A	C	G	T
A	10	-5	0	-5
C	-5	10	-5	0
G	0	-5	10	-5
T	-5	0	-5	10

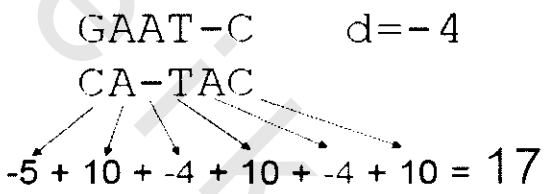
ويمكن تطبيق هذا الجدول على المثال التالى:



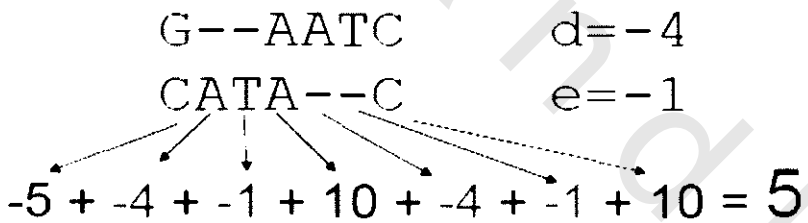
شكل ٧٥: صورة توضح أستخدام أحد المصفوفات المقترحة لتقييم التوازى والطفور.

تقييم الفراغات Scoring gaps (طفرات الحذف أو الأضافة):

يجب تحتوى المصفوفة على قيم تمثل طفرات الحذف أو الأضافة والتى تظهر فى التتابعات على شكل مسافة فارغة تمثل بخط قصير (-). وقد لوحظ أن الفراغ الأول (Gap opining) عند موقع محدد والذى يرمز له بالرمز (d) يأخذ تقييم أكبر من الفراغات التى تليه (Gap extensions) عند نفس الموقع والذى يرمز له بالرمز (e). فمثلا نجد أن الفراغ الأول (Gap opining) تأخذ تقييم(4-) فى حين أن الفراغات التى تليه (Gap extensions)) تأخذ تقييم(1-). وذلك يتضح بالمثال التالى:



مثال أخر:



تقييم عدد الأحتمالات الممكنة:

هناك أكثر من حل ممكن يمكن أن ينتج عن البرنامج وتكون نتيجة النهائية تعبر عن أفضل هذه الحلول وهى الأعلى قيمة حسابيا. حيث يمكن أن يكون هناك أكثر من حل آخر.

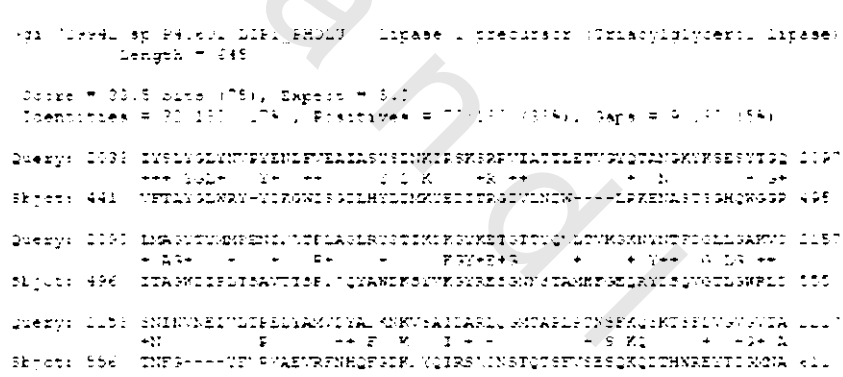
-GAATC	GAAT-C	GAATC
C-ATAC	C-ATAC	CATAC
GA-ATC	GAAT-C	GAATC-
CATA-C	CA-TAC	CA-TAC

```
GA-ATC
CATA-C

GAAT-C
CA-TAC

GAAT-C
C-ATAC

GAAT-C
-CATAC
```

أحتمالات كثيرة

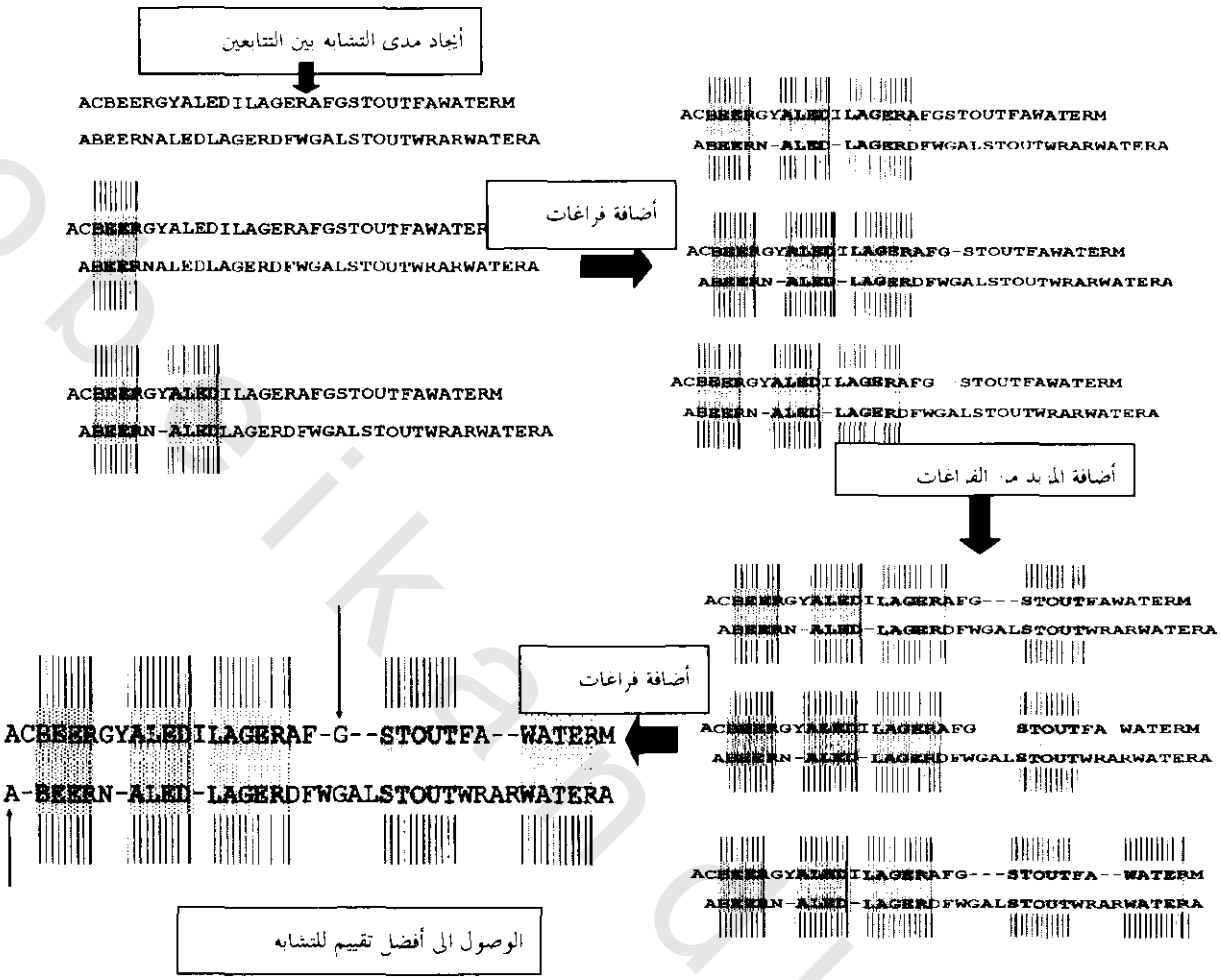
$$\binom{2n}{n} = \frac{(2n)!}{(n!)^2} \approx \frac{2^{2n}}{\sqrt{\pi n}}$$

وبحساب هذه الأمثلة يمكننا معرفة أيها أفضل.



وغالبا ماتكون الفراغات الحقيقية أكثر من واحد وتتواجد بشكل متتالى

ويمكنا أن نرى من المثال التالى كيف أثرت أضافة الفراغات فى زيادة التشابه بين التتابعات بشكل كبير ولماذا نحتاج الى هذه الفراغات

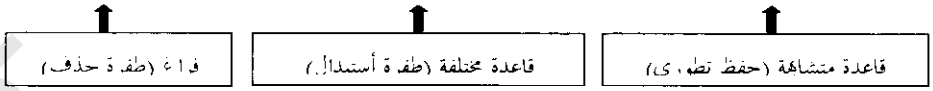


شكل ٧٦: صورة توضح كيف أثرت أضافة الفراغات فى زيادة التشابه بين التتابعات.

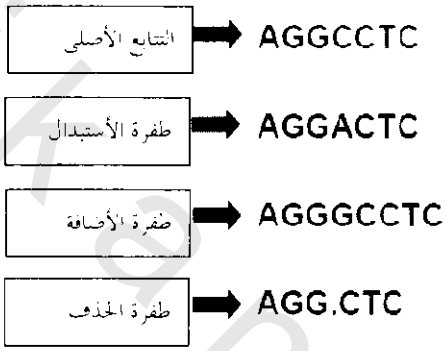
ولهذا فأنه عند حساب التوازى الجزئى بين تتابعين يجب الأخذ فى الأعتبار حساب المحصلة الكلية للفراغات ومواضع القواعد. وذلك يتم عن طريق توازى كل قاعدة فى التتابع الأول مع قاعدة أخرى أو فراغ فى الخيط الثانى كما يظهر فى الشكل التالى:

AGGCTATCACCTGACCTCCAGGCCGATGCCC
TAGCTATCACGACCGCGGTCGATTTGCCCGAC

-AGGCTATCACCTGACCTCCAGGCCGA--TGCCC---
TAG-CTATCAC--GACCGC--GGTCGATTTGCCCGAC



شكل ٧٧: شكل يوضح كيف أحتمالات التشابه والأختلاف بين القواعد فى تتابعين.



شكل ٧٨: شكل يوضح أنواع الطفرات المختلفة الممكن حدوثها على تتابع من الـ DN .

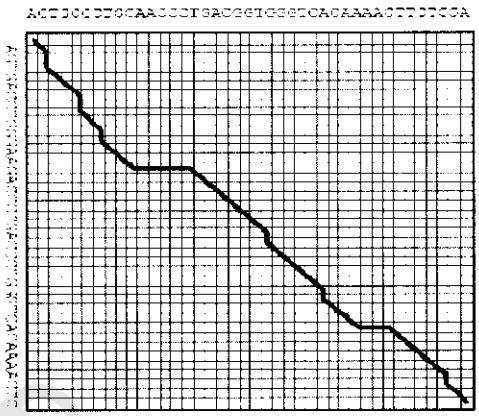
فأذا أفترضنا بأن:

التشابه (Match) = M + -عدم التشابه (Mismatch) = S- -الفراغ (Gap) = d-

لذلك فأن المجموع (F) = (عدد القواعد المتشابهة M X) – (عدد القواعد غير المتشابهة S X) – (عدد الفراغات GAP X d).

وكما يوضح (شكل ٧٩) فأن هناك عدد كبير من الأحتمالات التى يمكن توقعها عند عمل توازى بين تتابعين. وبناءعلى ذلك يتم حساب أعلى الأحتمالات ووضعها على رأس القائمة.

obeikandl.com



هناك عدد كبير جدا من الأحتمالات

$$O(2^{M+N})$$

شكل ٧٩: شكل يوضح شكل المصفوفة التى يمكن عن طريقها حساب أحتمالات التشابه بين تتابعين.

ونظرا لوجود أكثر من أحتمال ممكن عند عمل توازى بين تتابعيين فأنه قد لاتكون النتيجة التى قد يظهرها البرنامج فى البداية هى أفضل النتائج الممكنة (الشكل ٨٠) .

```
GAAT-C  GA-ATC
C-ATAC  CATA-C

GAAT-C  GAAT-C
-CATAC  CA-TAC
```

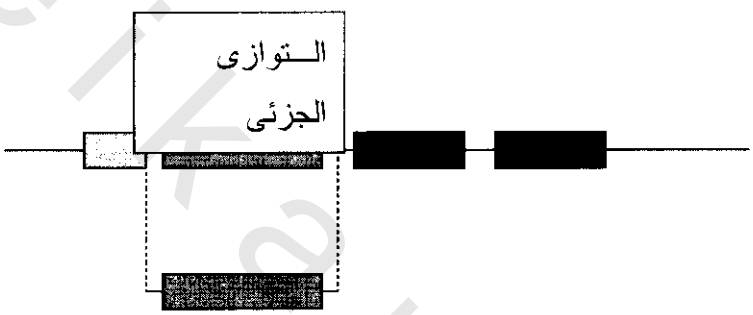
شكل ٨٠: شكل ستة أحتمالات مختلفة للتشابه بين تتابعين.

ونظرا لآن التطور الجزيئى فى الجينات المتناظره فى الكائنات المختلفة قد أشتمل على تغير فى أطوال هذه الجينات مع الأحتفاظ بالوظيفة لذلك لايتم غالبا حساب أى فراغات متواجدة عند الأطراف عند تصميم برامج التوازى الجزئى وذلك كما يظهر فى الشكل التالى . ويمكن وضح غير محدود من الفراغات عند الأطراف بدون التأثير على الناتج النهائى لحساب التوازى أو التشابه.

```
----------CTATCACCTGACCTCCAGGCCGATGCCCCTTCCGGC
GCGAGTTCATCTATCAC--GACCGC--GGTCG--------------
```

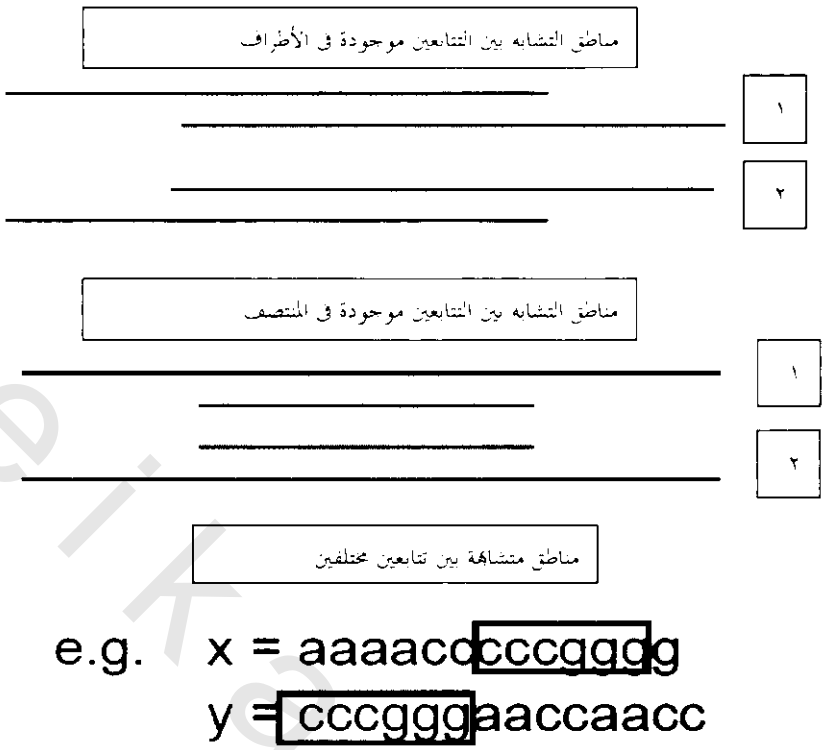
الشكل ٨١: شكل يوضح شكل الفراغات عند الأطراف التى يمكن تجاهلها عن حساب التشابه.

ونلاحظ أن الـتوازى الجزئى يمكنه أن يحدد بدقة مقدار التشابه والأختلاف بين تتابعات مختلفة فى الأطوال ولايحتاج أن تكون الأطوال متشابهة كما يوضح الشكل التالى:



شكل ٨٢: صورة توضح التوازى الجزئى بين تتابعين مختلفين فى الطول ولكن يحتويان على منطقة واحدة متشابهة.

ولذلك يمكن أستخدام التوازى الجزئى فى أكتشاف مناطق التشابه الوظيفى بين تتابعات بروتينية مختلفة الأطوال والتى تحتوى على مناطق فعالة ومتشابه وظيفيا. وقد يكون التشابهة الجزئى فى مناطق مختلفة فى التتابعين المدروسين ولكن ينجح التوازى الكلى فى أظهارها بنجاح كما يظهر فى الشكل (٨٣).

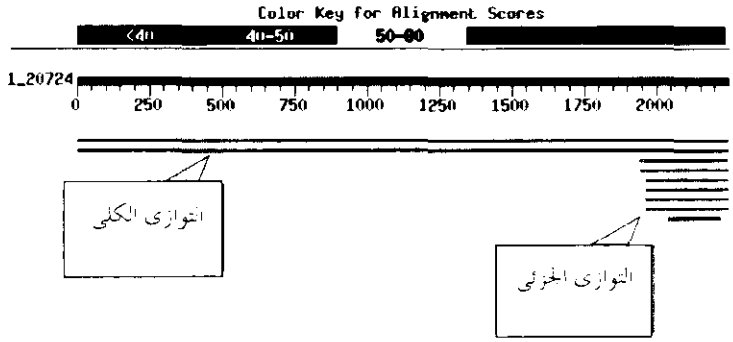


شكل (٨٣): يظهر الأماكن المختلفة التى قد يوجد بها التشابه الجزئى بين التتابعين سواء فى المنتصف أو الأطراف.

ويعمل التوازى الجزئى على معادلات بسيطة تعتمد فكرة حسابها على إيجاد مناطق متشابه بين تتابعين وهذه المناطق موجودة فى أماكن مختلفة فى كل منهما. ويفيد ذلك جدا فى أظهار التغيرات التى توجد بين نفس المجموعة من الجينات فى الكائنات المختلفة تطوريا. كما يفيد التشابه الجزئى فى الكشف عن المناطق الوظيفية المتشابهة فى البروتينات ذات الصلة.

وتجدر الأشارة أن بمقارنة جينومات الثدييات وجدأن هناك نسبة تشابه حوالى ٩٨٪ بين اى حيوانيين ثديين. وقد ظهرت مؤخرا مجموعة من المواقع والبرامج التى تقارن المحتوى الكلى لجينوم أحد الكائنات بجينوم أخر.

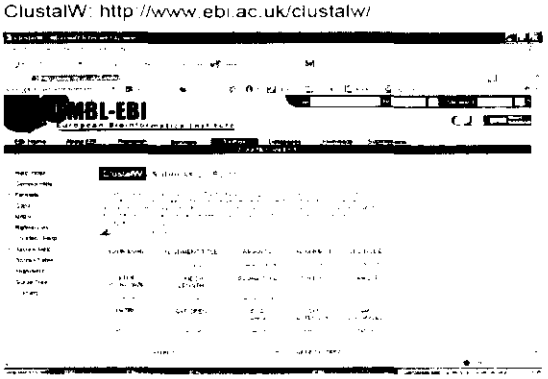
أما التوازى الكلى فيظهر الأختلاف الدقيق بين التتابعات متقاربة فى الأطوال والتركيب ولكن حدث فيها تغيير تطورى صغير يصعب ملاحظته.



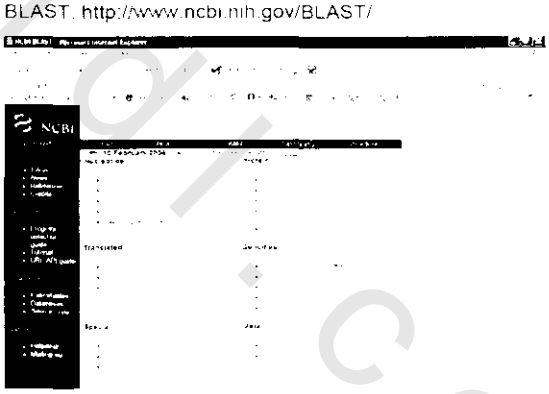
شكل ٨٤: صورة توضح الفرق التوازى الجزئى والتوازى الكلى

أفضل البرامج المستخدمة فى أظهار التوازى الجزئى هو برنامج BLAST وهو متواجد بشكل مجانى على موقع المركز الوطنى للتقنية الحيوية NCBI الموجود في الولايات كما يوجد أيضا أيضا برنامج Clustal Wعلى موقع المعمل الأوروبى للبيولوجيا الجزيئية(EMBL) والذى من خلاله يمكن أختيار عمل توازى جزئى أو كلى (شكل ٨٥).

ClustalW: http://www.ebi.ac.uk/clustalw/



BLAST: http://www.ncbi.nlm.gov/BLAST/



شكل ٨٥: أشهر البرامج وأكثرها أنتشارا لعمل التوازى الجزئى و التوازى الكلى.

ثانيًا: التوازى الكلى (Global Aligment)

يعتمد التوازى الكلى على فكرة التوازى بين كل حمض أمينى أو قاعدة نتروجينية فى التتابعات المدروسة على مستوى الأطوال الكلية لهذه التتابعات. التوازى الكلى هام جدا لعمل التوازى المتعدد للتتابعات (Multiple Sequence Alignments) ولكنه لايعطى كثيرا من المعلومات عند مقارنة تتابعيين.

التوازى الكلى أيضا غير مفيد على الأطلاق للكشف عن التشابه بين تتابعين لآن العمليات الأحصائية المستخدمة لحساب معامل الصدفة (E-Value) لاتنطبق عليه. فى التوازى الكلى أيضا لايحدث أختفاء مفاجى لآى حمض أميني أو قاعدة نتروجينية ولكن تكون التتابعات فى الناتج النهائى مشابهة تماما للتتابعات عند بداية التحليل مع أضافة بعض الفراغات عند الأختلاف فى الأطوال.

وهناك ثلاث أسباب رئيسية لعمل التوازى الكلى :

أولا: الكشف عن الاختلافات الصغيرة بين تتابعيين

وقد يحدث هذا مثلا مع تتابعات قد حدث لها تغيير عن طريق الخطأ. ويعتبر التوازى الكلى أفضل طريقة للتعرف أماكن الأختلافات الدقيقة بين تتابعين.

ثانيا: التعرف على تعدد المظاهر الوراثى (Genetic Polymorphism)

مثل الأختلافات فى قاعدة واحدة (SNPs) بين تتابعات وراثية قريبة الصلة.

ثالثا: مقارنة تتابعيين مختلفين و متداخلين جزئيا.

فى هذه الحالة يجب عمل التوازى الكلى للتتابعين مع عدم حساب قيم عدم التوازى عند الأطراف.

بعض المصطلحات الهامة فى التطور

Phylogenetics القرابة التطورية ما بين الأنواع المختلفة ويأخذ في الاعتبار أن هناك شيئان:

١ - هناك أصل لكل نوع.

٢ - هناك مسافة تطورية.

Cladogram: العلاقة بين الجينات المتشابهة التي لا يوجد بينها قرابة.

Orthologous: وجود نفس الجين بنفس الوظيفة في كائنات مختلفة تطورية مثل HSF.

Paralogous: موجود نسخة آخري من الجين في نفس الكائن نتيجة حدوث طفرات أو تضاعف وقد تقوم بوظيفة مختلفة.

Xanologous: حيث يتم إدخاله في كائن ولم يورث تطورياً مثل إدخال PT إلى داخل النباتات.

obeikandl.com

الفصل الثاني

مصادر معلومات المعلوماتية الحيوية

١. مشاريع سلسلة الجينوم (مثال مشروع الجينوم البشرى).

٢. نتائج تجارب المصفوفة الدقيقة.

٣. العناصر المتنقلة في الجينومات المعقدة (تركيبها وتطورها).

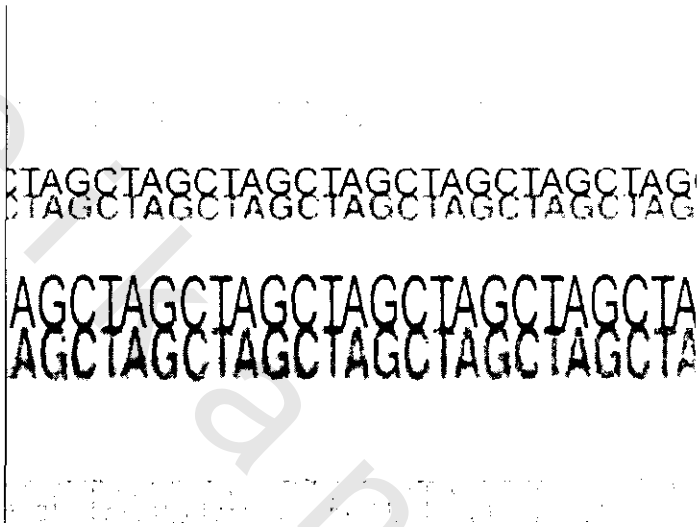
٤. نتائج التجارب البيولوجية (مثال الـ PCR).

obeikandl.com

دراسة الجينوم البشري والمعلوماتية الحيوية

مقدمة

إن دراسة المجموع الكلي للجينات البشرية أو(مايطلق علية الجينوم البشرى) هو في الحقيقة دراسة لتفاصيل هامة عن انفسنا. يتكون الجينوم البشري من ثلاثة بلايين قاعدة مكونة من أربع أنواع فقط من الحروف الابجدية للـ DNA (المادة الوراثية).

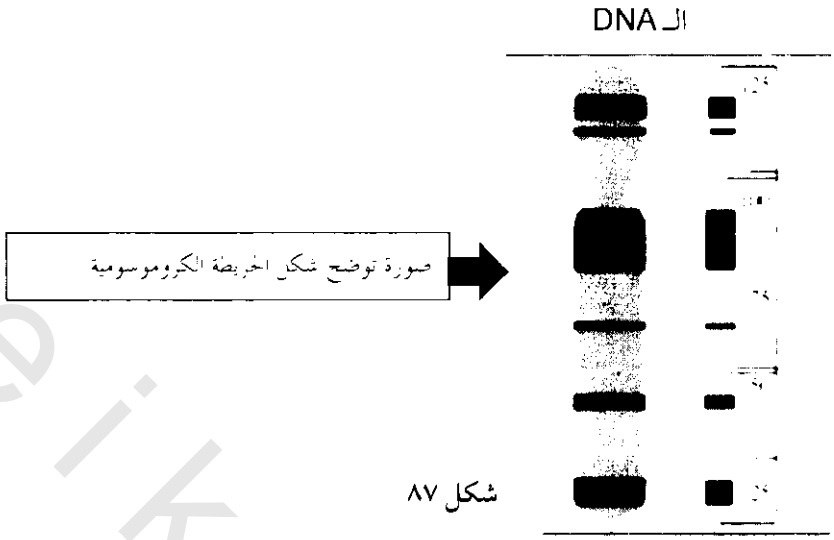


شكل ٨٦: يوضح ثلاثة بلايين قاعدة مكونة من أربع أنواع فقط من الحروف الابجدية للـ DNA (المادة الوراثية).

وينتظم الـ DNA الكلي داخل خلية الانسان في ما يسمي بالكرموسومات عددها ٢٣كرموسوم والتي توجد في كل خلية من بلايين الخلايا في اجسادنا. في سنة ٢٠٠٣ قدم مشروع الجينوم البشري مجموعة كاملة من التتابعات الممثلة لجينوم الانسان. وبالطبع ولآن البشر غير متطابقين فان هناك اختلافات جزئية بين الافراد. ولذلك فانة حاليا يوجد العديد من المشاريع البحثية الجديدة التي تدرس الاختلافات بين الافراد والجماعات البشرية. الجينوم الذى تمت سلسلته فى مشروع الجينوم البشرى والممثل لجينوم الانسان الحالي هو في الحقيقة عبارة عن تجميع من عدد (١٠٠فرد) تبرعوا بعينات من دمائهم للمشروع الاول.

كل شخص تبرع للمشروع بعينة من دمه قد وافق مسبقا علي ان يتم دراسة الـ DNA الخاص بة مع عدم وضع اي اسماء علي العينات ، وقد قام العلماء في النهاية باختيار بعض العينات للدراسة فقط .وبذلك لم يتمكن احد من معرفة اي العينات قد تم استخدامها. الهدف الاساسي من مشروع الجينوم البشري هو قراءة الثلاث بلايين

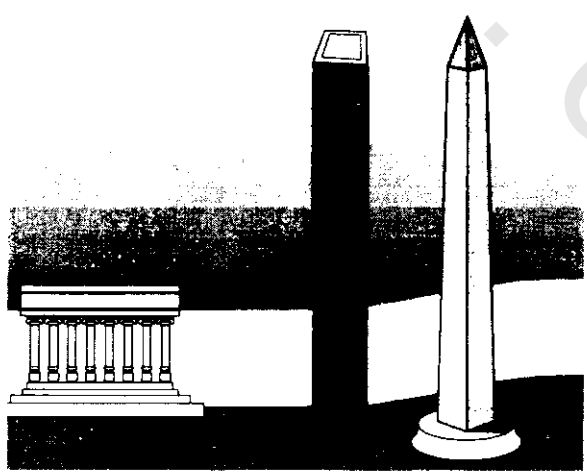
حرف من الجينوم البشري. وجدير بالذكر أنه قبل البدء في سلسلة الجينوم البشري، قام العلماء ببناء ما يسمي بالخرائط الكروموسومية وتطوير طرق استخلاصها وتحليل



شكل ٨٧

وعندما توفرت كل الادوات المناسبة ، قام العلماء بقراءة التتابعات (large scale sequencing) سنة ١٩٩١. وفي عام واحد فقط كان لديهم معلومات اولية تغطي حالي ٨٠٪ من الجينوم.

ولكى يمكننا تخيل حجم الجينوم البشرى داخل الخلية الواحد فيجب أن نتصور بأنه لوقام العلماء بكتابة حروف الجينوم البشري (٣ بليون حرف) الموجودة داخل خلية الانسان في كتاب بحجم دليل التليفونات مثلاً سوف نحتاج الي عدد من الكتب بطول مسلة واشنطن والتى يصل طولها الى حوالي ١٦٩ متر كما يوضح الشكل التالى:



شكل ٨٨: يوضح عدد من الكتب التى تحتوى على حروف الجينوم البشري (٣ بليون حرف) الموجودة داخل خلية الانسان بطول مسلة واشنطن حوالي ١٦٩ متر

obeikandl.com

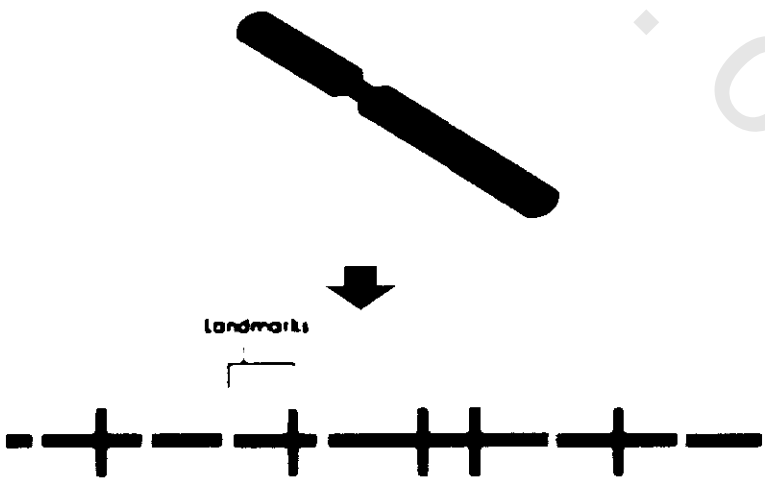
وحتي يتم معرفة التتابع بدقة لكل قاعدة في الجينوم ، قام العلماء بقراءة الثلاثة بلايين قاعدة من ٦ لي عشرة مرات علي الاقل. مع العلم بأن ان تجربة السلسلة المفردة تظهر فقط حوالي عدة مئات من القواعد في المرة الواحدة والتي تساوي جزء من صفحة واحدة من الكتاب.

ذلك يعني انة اذا اردنا ان نحصل علي التتابع الكلي لجينوم يجب عمل سلسلة لعدة الاف من التتابعات المتداخلة ويطلق علي هذة العملية (تجميع التتابعات).

شكل ٨٩: يوضح حوالي ان تجربة السلسلة المفردة تظهر عدة مئات من القواعد في المرة الواحدة والتي تساوي جزء من صفحة واحدة من الكتاب

أولاً: عملية الخرطنة (MAPPING):

حتي يبدأ المشروع قام العلماء ببناء خرائط للجينوم البشري فقاموا بتحديد الاف المحددات (LANDMARKS)علي طول كل كرموسوم والتي ساعدتهم علي دراسة الاجزاء المختلفة لكل كرموسوم.

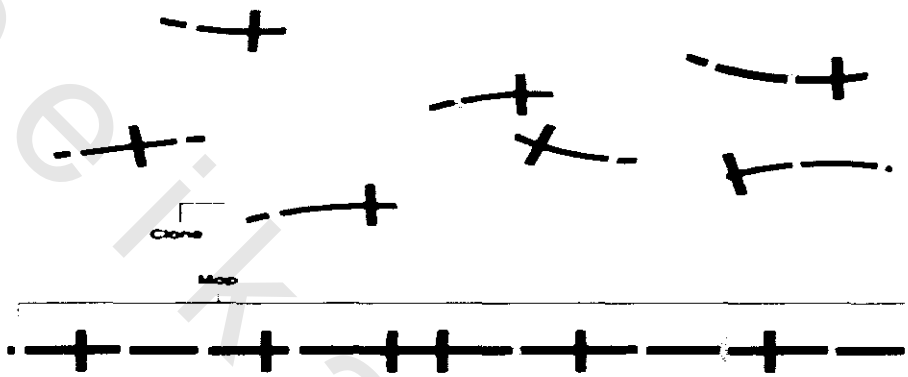


شكل ٩٠: صورة توضح عمل المحددات landmarks على الكرموسومات المدروسة

obeikandl.com

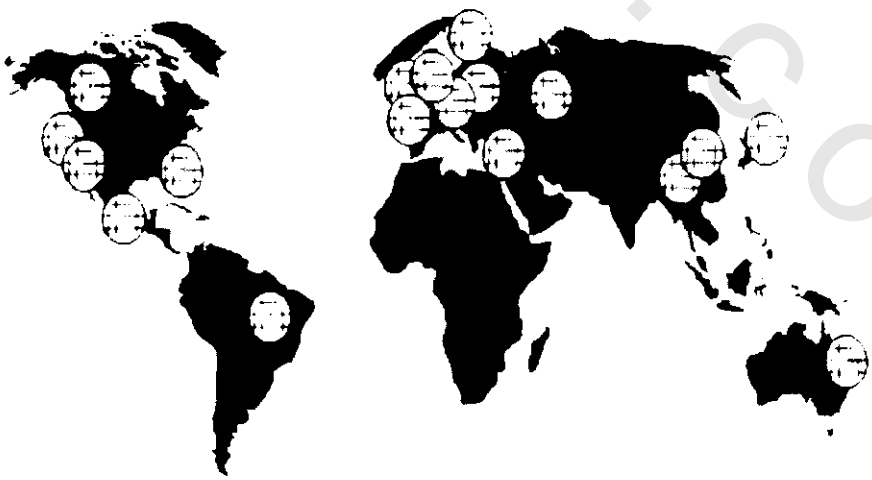
عمل هذة المحددات الكروموسومية كان ضرورياً للتحضير لعملية سلسلة الـDNA. كما ساعدت هذة الخرائط علي تحديد اماكن جينات الامراض.

ومع توفرعدد كافي من المحددات قام العلماء بعمل مكتبات من نسخ (كلون) اجزاء الجينوم وكل كلون (نسخة) تحتوي علي جزء صغير من الـ DNAوالتي يتم حفظها في البكتريا.



شكل ٩١: صورة توضح نسخ (كلون) الـ DNA (clone)

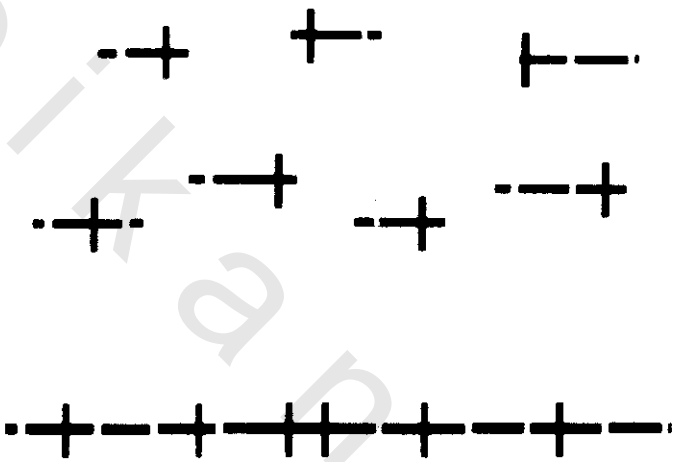
استخدام العلماء هذة المحددات لتوضيح الاماكن التي جاءت منها كل قطعة (DNA) من الجينوم الاصلي. وبهذة الطريقة تم التأكد من مصدر كل قطعة DNA تمت دراستها وموقعها في الجينوم. كما ساعدت علي توزيع وتنسيق العمل والتعاون بين المعامل المختلفة علي مستوي العالم حيث ان كل معمل تخصص في دراسة مجموعة محددة.



شكل ٩٢: صورة توضح توزيع وتنسيق العمل والتعاون بين المعامل المختلفة علي مستوي العالم

ثانيا :بناء المكتبات الجينومية:

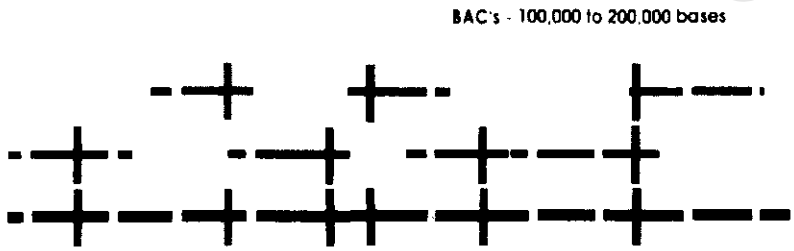
ان المكتبات الجينومية تعطي نفس المميزات المكتبات الحقيقية وهي الحصول علي المعلومات بشكل منتظم. في معظم المكتبات الجينومية يتم تخزين اجزاء الـ DNA(المادة الوراثية) في بكتريا الايكولاي (E.coli) (بكتريا تعيش في الامعاء). يتم تخزين قطعة صغيرة منفردة من الجينوم البشري فى كل خلية بكترية وبذلك تمثل كتاب صغير في المكتبة. المكتبات الجينومية تتيح سهولة تتبع كل قطعة جينومية وسهولة نسخها.



شكل ٩٣: يوضح تخزين قطع الـ DNA داخل خلايا الـ E.coli

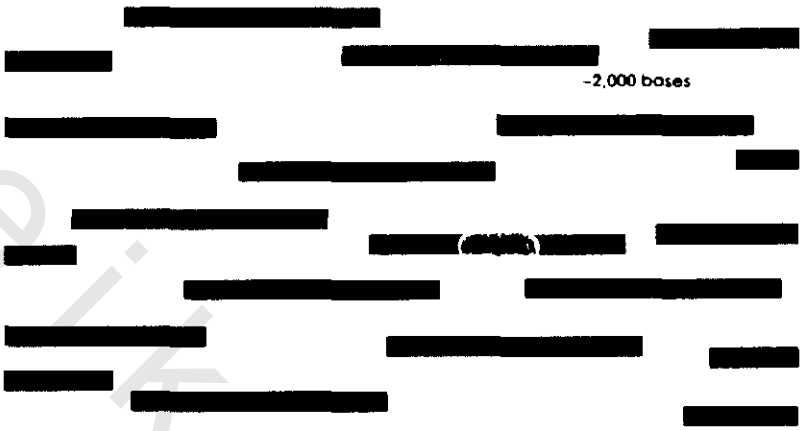
ثالثا المكتبات الجينومية الصغيرة (Subclones):

يتم عمل المكتبات الجينومية باستخدام كرموسوم البكتريا الصناعي (BAC) بحيث يحتوى كل كرموسوم بكتري يحتوي علي ١٠٠ الي ٢٠٠ الف قاعدة.



شكل ٩٤: كل كرموسوم بكتيري يحتوي علي قطعة من الـ DNA بطول ١٠٠ الي ٢٠٠ الف قاعدة

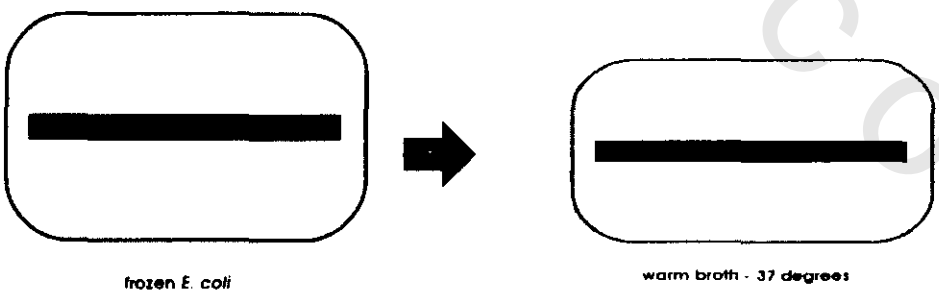
هذة المكتبات الكبيرة البكتيرية يتم عملها للحفاظ علي الترتيب الكروموسومى للتتابعات والتي يتم تقسيمها الي مكتبات فيروسية اصغر (اجزاء جينومية اصغر) والتي تصل الي حوالي ٢٠٠٠قاعدة والتي يتم تخزينها في فيروسات تسمي فاج والتي يمكنها عدوي واختراق بكتريا الـ E.coli



شكل ٩٥: مكتبات فيروسية اصغر تحتوى على اجزاء جينومية اصغر والتي تصل الي حوالي ٢٠٠٠قاعدة

رابعا التخزين داخل بكتريا الـ E.coli:

يمكن تخزين على اجزاء جينومية ببكتريا الـ E.coli لكى تحتوي علي اجزاء من جينوم الانسان او اي جينوم اخر تحت التبريد الشديد لفترات طويلة. وعندما يرغب العلماء في استعادة اي قطع الـ DNA من المكتبة الجينومية يمكنهم ببساطة ان يعيدوا حيوية البكتريا التي تحتوي علي الـDNAعن طريق رفع درجة حرارتها الي ٣٧درجة مئوية في بيئة نمو البكتريا.



شكل ٩٦: البكتريا التي تحتوي علي الـDNAعن طريق رفع درجة حرارتها الي ٣٧درجة مئوية

تنمو البكتريا علي ٣٧ درجة مئوية في بيئة النمو الخاصة بها وتقوم بنسخ قطعة الـ DNAالجينومية في كل خلية جديدة.

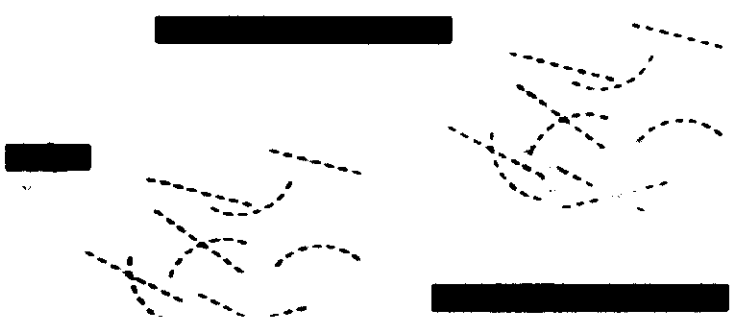
للاعداد لسلسلة الـ DNA يجب اولا نمو مجموعة من الخلايا التي تحتوي علي نفس قطعة الDNA في بيئة نمو البكتريا مع الاهتزاز الدوراني بقوة والذي يعمل علي امداد بيئة النمو بالهواء الذي يساعد علي سرعة نمو البكتريا وانقسامها وتضاعفها بمعدل مرة كل نصف ساعة.

بعد التحضين لمدة ليلة واحدة سنجد ان ثلث معلقة شاي من بيئة النمو تحتوي علي بلايين من خلايا ال E.coli وبالتالي بلايين النسخ من قطع الـDNA التي تحتويها كما يوضح الشكل التالي:

شكل ٩٧: صورة توضح بلايين الخلايا واحتواءهم علي بلايين من نسخ الـDNA

خامسا تحضير الـDNA لتفاعل السلسلة:

يتم استخلاص الDNAمن البكتريا بعد فتحها في اليوم التالي ثم يتم تنقية واستخلاص الـ DNA البشري من البقايا الخلوية الاخري.



شكل ٩٨: تنقية واستخلاص الـ DNA البشري من البقايا الخلوية الاخري

وبذلك تكون قد حصلنا علي عدد كافي من النسخ من قطعة الDNAلعمل تفاعل السلسلة.

3'-CATGGTAAGCCGTTTAGTTAGCGAGCTCTT-5'

شكل ٩٩: صورة توضح الحصول علي الـ DNAمن البكتريا لعمل تفاعل السلسلة

سادسا: تفاعل السلسلة:

يحتوي تفاعل السلسلة علي اربع مكونات رئيسية:

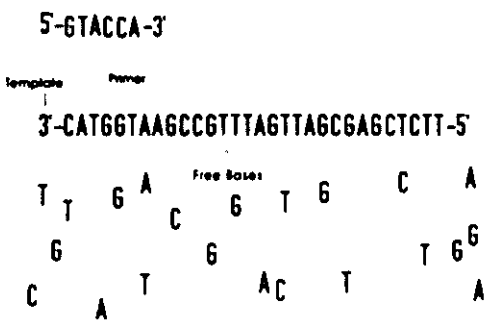
١- الدنا القالب الذي تم نسخة عن طريق الـ E.coil.

٢- القواعد الحرة وهي حجر البناء للـ DNA وهي اربع انواع A،T،G،C.

٣- قطع صغيرة من الدنا (بوادئ).

٤- انزيم البلمرة وهو الانزيم الذي يعمل على نسخ الـ DNA .

التفاعل الكيميائي الذي يتم لنسخ الـDNA في انبوبة الاختبار يشبة ما يحدث في الخلية الحية فكلاهما يعتمد علي انزيم البلمرة وايضا في كلتا الحالتين نجد ان خيطين الـ DNA يحتوي علي نهاية راسية تسمي نهاية طرفية(5) ونهاية ذليلية تسمي (3) وينمو الـ DNA من الطرف (3) في اتجاه (5)



شكل ١٠٠: صورة توضح مكونات تفاعل السلسلة

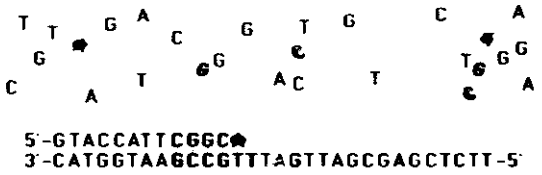
obeikandl.com

ويعتمد تكوين الDNAالجديد في كلتا الحالتيان ايضا عن تكامل القواعد حيث ان القواعد المختلفة في كلا الخيطين تتكامل بشكل خاص فمثلا الـ C تتكامل مع Gوالـ A تتكامل مع T

ويتكامل تتابع البوادئ مع التتابع المكمل لة علي الخيط القالب(Template DNA) بحيث أن القواعد الحرة تتكامل مع القواعد المكملة لها في الطرف(3). بعض هذة القواعد الحرة تحتوي علي صبغات فلورسنتية. فعندما تتصل احدي هذة القواعد الفلورسنتية بالخيط النامي توقف الخيط عن النمو. ويوجد لون مميز لكل نوع من الانواع الاربعة للقواعد.

شكل ١٠١

صورة توضح الصبغات الفلورسنتية للقواعد



صورة توضح كيفية تكوين الخيط الجديد واتصال احد القواعد الفلورسنتية

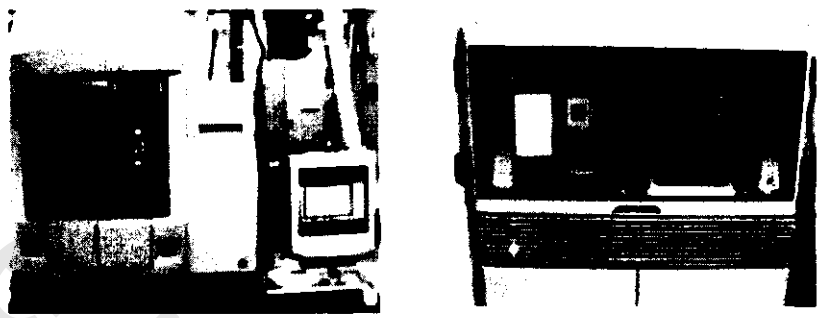
سابعا :منتجات تفاعل السلسة:

بعد انتهاء تفاعل السلسلة ينتج مصفوفة من قطع الـ DNA الملونة . اقصر قطعة تمثل طول البادئ بالاضافة قاعدة واحدة ملونة اما اطول قطعة فهي تمثل حوالي من ٥٠٠ الي ٨٠٠ قاعدة اعتمادا علي قدرة تفاعل السلسلة علي الاستمرار.

شكل ١٠٢: صورة توضح نواتج تفاعل السلسلة

obeikandl.com

يتم خروج مخرجات تفاعل السلسلة في جهاز السلسلة الاتوماتيكي وهذة الاجهزة تطورت كثيرا في العقد الاخير بحيث يمكنها معالجة عدد اكبر من العينات وبسرعة اكبر وبسهولة في التفاعل والتشغيل.



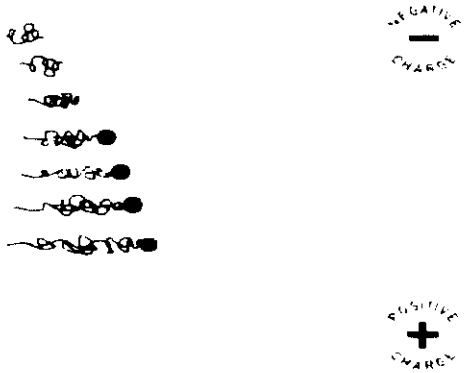
شكل ١٠٣: صور لاشكال جهاز السلسلة الاتوماتيكي

ثامنا :فصل منتجات تفاعل السلسلة:

١. يتم فصل قطع الـDNA الناتجة من تفاعل السلسلة عن طريق عملية التفريد الكهربي.

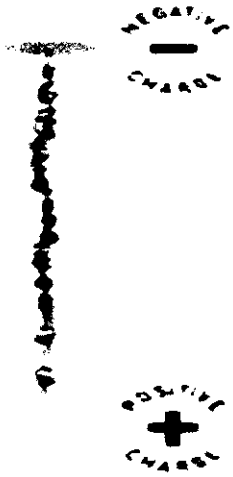
شكل ١٠٤: فصل قطع عن طريق عملية التفريد الكهربي

٢. ان قطع الـ DNAسالب الشحنة وبالتالي فهي تتحرك داخل ثقوب الجيل في اتجاة الشحنة الموجبة.



شكل ١٠٥: قطع تتحرك فى اتجاة الشحنة الموجبة.

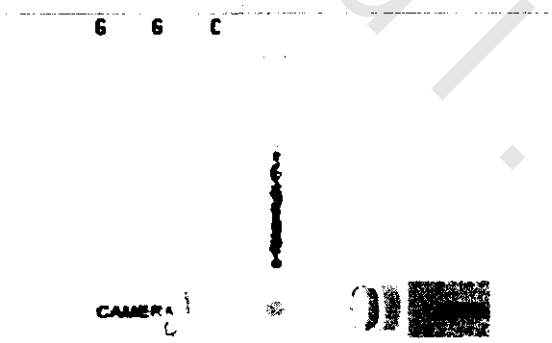
٣. تعمل ثقوب الجيل مثل الغربال حيث ان قطع الـ DNA القصيرة تتحرك سريعا في حين ان القطع الاطول تتحرك ابطأ.



شكل ١٠٦ : قطع الـ DNA القصيرة تتحرك أسرع في حين ان القطع الاطول تتحرك ابطأ

تاسعا : قراءة منتجات تفاعل السلسلة:

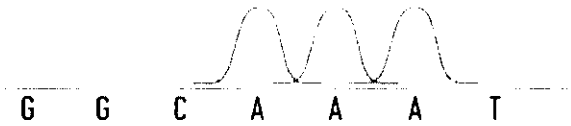
١- رد وصول قطعة الـ DNAالي نهاية الجيل يتم تنشيط الصبغة الفلورسنتة عن طريق شعاع الليزر.



شكل ١٠٧ : صورة توضح قراءة منتجات التفاعل بواسطة الليزر

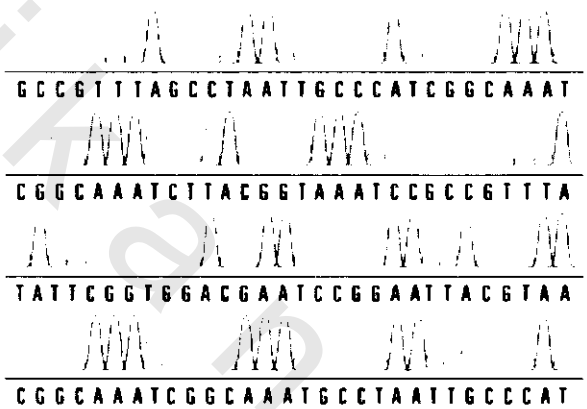
٢- تقوم الكاميرا الملحقة بالتعرف علي اللون الفلورسنتي ثم ترسل هذة المعلومات الي الكمبيوتر واحدة تلو الاخري،وبالتالي تسجل الالة الوان قواعد الـ DNA التي تمر عبر الجيل.

obeikandi.com



شكل ١٠٨ : صورة توضح تسجيل الالة الوان قواعد الـ DNA

٣- وبالتالي يمكن التعرف علي عدة مئات من القواعد عن طريق تفاعل سلسلة واحد.

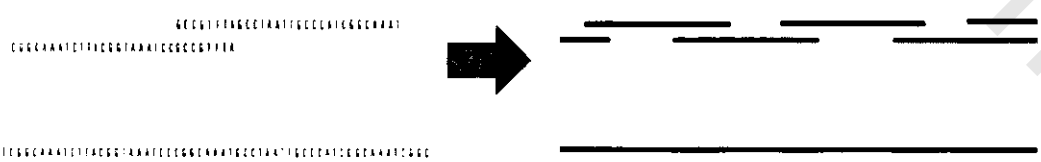


شكل ١٠٩ : عدة مئات من القواعد نتجت من تفاعل سلسلة واحد

عاشراً: تجميع النتائج:

١- تبدأ برامج الحاسب في تجميع ودمج التتابعات الناتجة من تفاعل السلسلة.

٢- تعمل هذة البرامج عن طريق تحديد اماكن تداخل (Over lap)التتابعات وبالتالي تساعد علي ترتيب وتجميع التتابع النهائي لخيط الـ DNA الذي تمت سلسلتة وتحديد مكانة الاصلي علي الكرموسوم.



شكل ١١٠ : أماكن تداخل تساعد علي ترتيب وتجميع التتابع النهائي علي الكرموسوم

٣- خلال مشروع الجينوم البشري تمت قراءة (سلسلة) كل قاعدة ما يقرب مع ٩ مرات في المتوسط.

٤- وهناك مناطق من الـ DNA كانت من السهل في قرائتها (سلسلتها) وبالتالي تمت قرائتها عدد اقل من المرات بينما هناك مناطق اخري كانت اصعب في قرائتها وبالتالي تمت قرأتها عدد اكبر من المرات.

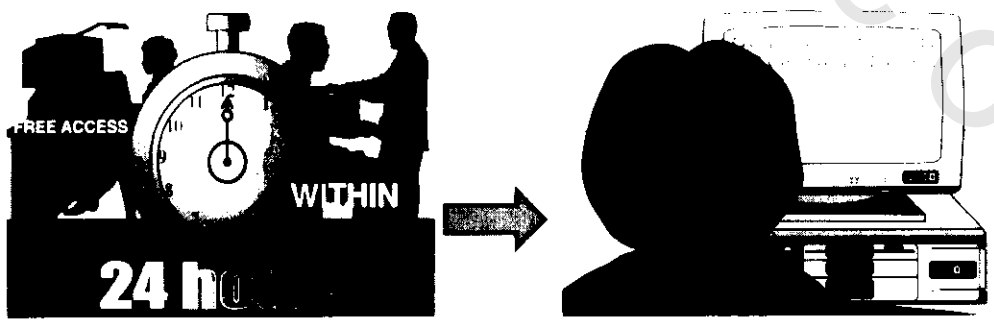
٥- خلال مشروع الجينوم البشري ،قام العلماء باجراء مايقرب من ٥٠مليون تجربة تتابع سلسلة.

٦- وشارك حوالي ٢٠٠٠عالم من مايقرب من ٢٤معمل علي مستوي العالم شارك في المشروع العملاق.

شكل ١١١: صورة توضح مشاركة أكثر من ٢٤معمل علي مستوي العالم فى المشروع

الحادي عشر: النسخة الاولية:

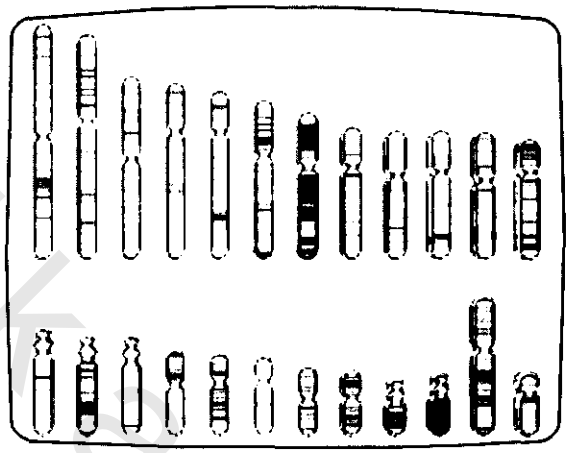
١. بمجرد تجميع اي قطعة الـ DNA بطول ٢٠٠٠قاعدة، يتم نشرها ووصفها غلي قاعدة بيانات عامة في خلال ٢٤ ساعة .



شكل ١١٢: شكل يوضح قدرة اي شخص لة قدرة الاتصال والتجوال علي الانترنت بمعرفة التتابعات

٢. وبأمكان اي شخص لة قدرة الاتصال والتجوال علي الانترنت مع رؤية وتحليل التتابعات.

٣. بعد ان تمت سلسلة وقراءة الجينوم البشري المكون من (ثلاثة بليون قاعدة)حوالي تسع مرات في المتوسط، قام مشروع الجينوم البشري بنشر النسخة الاولية من النتاءج والتي تغطي٩٩٪ من الجينوم وبدقة حوالي ٩٩,٩٩٪



شكل ١١٣: قيام مشروع الجينوم البشري بنشر النسخة الاولية من النتائج والتي تغطي٩٩٪

٤. وبذلك يكون المشروع قد قام بالانتهاء من كل اهدافة قبل الميعاد المحدد وبيميزانية اقل من المتوقع.

obeikandl.com

الخاتمة

١. من خلال مشروع الجينوم البشري تم التعرف علي جينومات اخري مثل الحصول علي نسخة متقدمة من جينوم الفأر المنزلي (Mouse) ونسخة اولية من الفأر الحقلي (Rate).

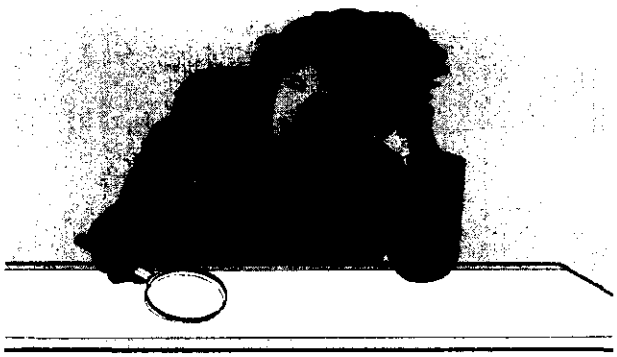
٢. وعلي الفور قام الباحثين الطبيين باستخدام المعلومات الناتجة ودراستها علي الفور.

٣. فعند بداية المشروع سنة ١٩٩٠كان هناك اقل من ١٠٠جين معروف مسبب للامراض ومع انتهاء المشروع سنة ٢٠٠٣ارتفع عدد الجينات المعروفة المسببة للامراض الي ١٤٠٠جين.

شكل ١١٤: قام الباحثين الطبيين باستخدام المعلومات الناتجة ودراستها علي الفور عن طريق برامج المعلوماتية الحيوية

٤. ان مشروع الجينوم البشري اعتمد علي معرفة التتابع الجينومي لفرد واحد وبالتالي كانت الخطوة التالية هي معرفة التتابعات المختلفة من عشائر بشرية مختلفة وعمل كتالوج للاختلافات البشرية والذي اطلق علية(هاب ماب) والذي انتهي العمل به سنة (٢٠٠٥)

٥. اعتمد مشروع الـ(هاب ماب)علي معرفة اختلافات البشر علي مستوي القواعد المفردة (SNPs) داخل مناطق كبيرة مرتبطة وراثيا وتنتقل معا كقطعة واحدة تسمي Haplo typeهابلوتيب.



شكل ١١٥: صورة توضح معرفة اختلافات البشر علي مستوي القواعد المفردة (SNPs) داخل مناطق كبيرة مرتبطة وراثيا

٦. فمثلا تمت مقارنة هذة القطع الكبيرةHaplo type بين الاشخاص المصابين بالمرض والاشخاص الخاليين من المرض لمعرفة القواعد المختلفة التي قد تكون مرتبطة بالمرض.

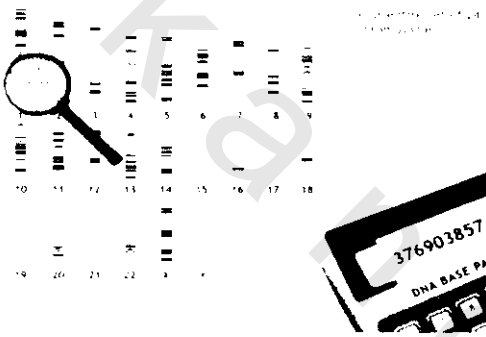
شكل ١١٦: صورة رمزية توضح البحث عن القواعد المختلفة التي قد تكون مرتبطة بالمرض.

٧. وقد تم استخدام هذا التكنيك للتعرف علي اماكن وجينات بعض الامراض ومن المتوقع ان يستخدم هذا التكنيك لمعرفة المزيد من جينات الامراض المنتقلة.

ملخص سلسلة الجينوم

كيف تمت سلسلة الجينوم البشري

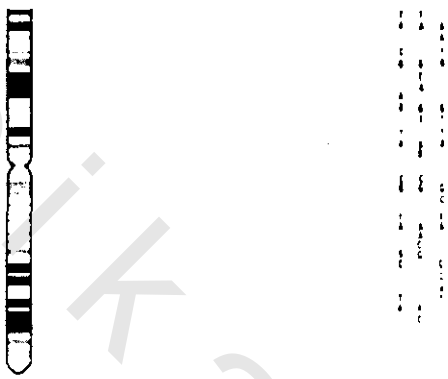
- كل فرد من البشر يحمل نسخة مختلفة قليلا من الجينوم البشري
- جميع خلايا الانسان تقريبا تحمل جميع المعلومات والتعليمات اللازمة لبناء الجسم وهوفيما يسمي بالجينوم.
- جميع هذة المعلومات مشفرة علي خيط طويل مع مادة كيميائية تسمي الDNAوالتي تتحلزن في تركيب يسمي الكرموسوم.
- توجد جميع المعلومات في تتابع من القواعد الكيميائية بطول خيط الـDNAوتوجد اربع انواع فقط التي تكون الـDNA وهي قواعد C-A-T-G بحيث (A-T) والـ (G-C) ويوضح ذلك في الشكل رقم (١١٧).



الشكل رقم (١١٧)

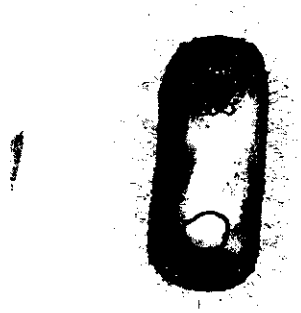
- توجد في كل خلية نسختين من الجينوم نسخة ابية من الاب ونسخة امية من الام
- وعند النظر في نسخة واحدة من الجينوم فنجد ان كل كرموسوم يحمل كم كبير من المعلومات.
- وتحتوي المجموعة الكاملة لكرموسومات الانسان في الخلية الواحدة علي٢٤ كرموسوم بطول ثلاث بليون قاعدة
- ان مشروع الجينوم البشري مجهود وتعاون دولي لفك شفرة كل حروف الـ DNA الموجود في جينوم الانسان.
- قام مركز سانجر بسلسلة جميع اجزاء الكروموسومات ١-٦-٩-١٠-٢٠-X-٢٢
- استخدام مشروع الجينوم البشري طريقة (TOP-down) (اعلي – اسفل) وهي تعتمد علي عمل خريطة كاملة للجينوم ثم تقسيم مهام سلسلة الكروموسومات علي المراكز المشتركة في المشروع.

- قامت المراكز المختلفة بتقسيم كل كروموسوم الي اجزاء نظرا لان اجهزة السلسلة المتوفرة في ذلك الوقت تستطيع فقط قراءة عدة مئات من حروف الDNAفي التفاعل الواحد.
- بعد تقسيم الكرموسوم الواحد الي مناطق محدودة ثم تقسيم هذة المناطق الي اجزاء ثم تقسيم هذة الاجزاء الي اجزاء اصغر ثم سلسلتها بعد ذلك تم تجميع نتائج السلسلة لمعرفة تتابعات الاجزاء الصغيرة كما في الشكل رقم (١١٨).



شكل رقم (١١٨)

- ثم تجميع الاجزاء الصغيرة لبناء الاجزاء الاكبر وهكذا حتي تم معرفة تتابعات الكروموسوم بالكامل.
- قد تم الحصول علي الـ DNAالمستخدم في مشروع الجينوم البشري من افراد مجهولين بشكل سري بعد موافقتهم علي ذلك
- اعطي كل فرد عينة من دمة والتي استخدمت لاستخلاص الـ DNA منها والذي تم تكسيرة الي اجزاء.
- تم دمج هذة الاجزاء مع بلازميدات بكترية معدلة وراثيا حيث تم تضاعفها ثم تم تخزينها في خلايا بكترية والشكل رقم (١١٩) يوضح ذلك.

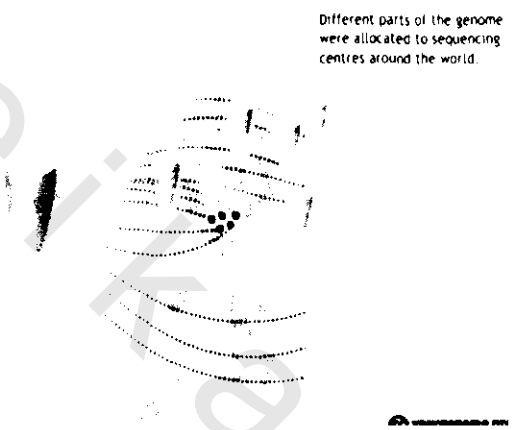


شكل رقم (١١٩)

obeikandl.com

- ونظر للحجم الهائل للعمل الذي تطلبة هذا المشروع تم تقسيم العمل بين عدد من المراكز العلمية حول العالم

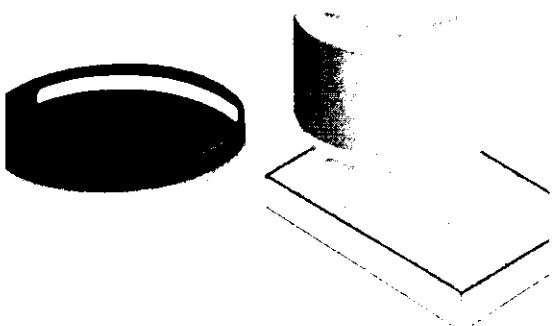
- في كل مركز من هذة المراكز تم تقسيم قطع الـ DNAالمخصصة لها والبالغ طولها حوالي مئات الالاف من القواعد الي قطع اصغر بطول عدة الاف وتم وضعها في بلازميدات بكترية شكل رقم (١٢٠).



شكل رقم (١٢٠)

- ثم تم وضع هذة البلازميدات ايضا في البكتريا ،حيث تم نسخ قطع الـ DNAالاصلي بواسطة نمو وانقسام البكتريا علي اطباق النمو.

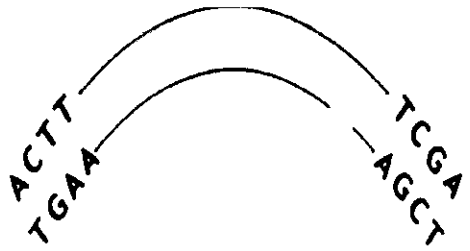
- تلي ذلك قيام بشر او الات بنقل كل مستعمرة بكترية والتي تحتوي قطع الـ DNAخاصة الي انابيب منفصلة للقيام بعملية السلسلة كما في الشكل رقم (١٢١) الذي يوضح نقل مستعمرات بكتيرية بالماكينة.



الشكل رقم (١٢١)

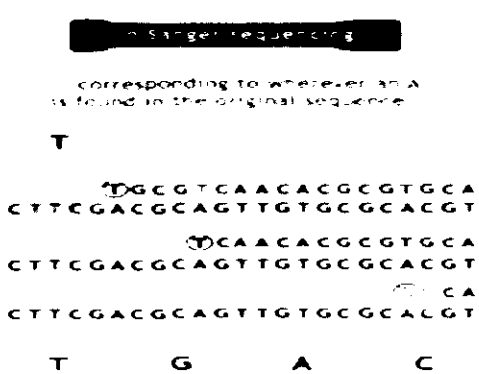
- عزل البكتريا وفصل الـ DNAالبشري من البلازميد البكتري هو جزء اصيل من عملية التحضير للسلسلة.

- يكون تتابع البلازميد معروف فى حين أن تتابع قطعة الDNAالبشري الداخلة غير معروفة الشكل رقم (١٢٢)



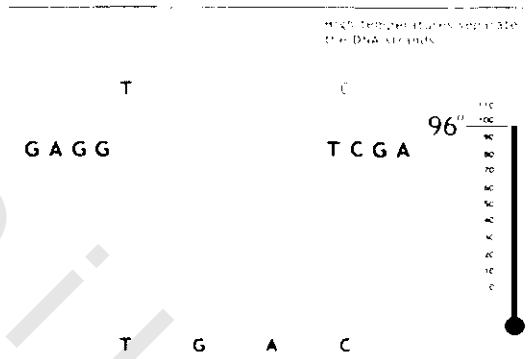
الشكل رقم (١٢٢)

- تمت السلسلة باستخدام طريقة(Sanger)سانجر المتطورة سنة ١٩٧٠.
- تعتمد طريقة سانجر علي فكرة عملية التكرار Replication في الخلية الحية.
- فمثلا لتكرار قطعة من ال DNA تم فصل خيطي الـ DNAعن بعضها بواسطة بعض الانزيمات الخاصة بذلك قبل ان يتحرك انزيم البلمرة علي احد الخيطين لاضافة القواعد الحرة من النيوكليوتيدات C-G-A-T لعمل الخيط المكمل لكل خيط قالب.
- في طريقة سانجر ، يتم اضافة بعض قواعد C-A-T-G المعدلة(المعلمة فلورسنتيا) الي خليط التفاعل.
- هذة القواعد المعدلة (داي ديوكسي) والتي تعمل علي انهاء التفاعل وهي معلمة بصبغات فلورسنتية.
- ويبدا التفاعل كما في الطريقة السابقة، يتم فصل خيطي الـ DNAعن بعضهم ثم تبدأ انزيمات البلمرة في اضافة قواعد T-A-C-Gولكن عند اضافة احد القواعد المعلمة الفلورسنتية يتوقف التفاعل.
- فمثلا اذا اخذنا قاعدة ال(T) كمثال سنجد اننا قد نحصل علي قطع كثيرة تنتهي بالقاعدة (T) تمثل مواضع وجود القاعدة (A)في التتابع الاصلي.والشكل رقم (١٢٣)يوضح تفاعل سانجر.



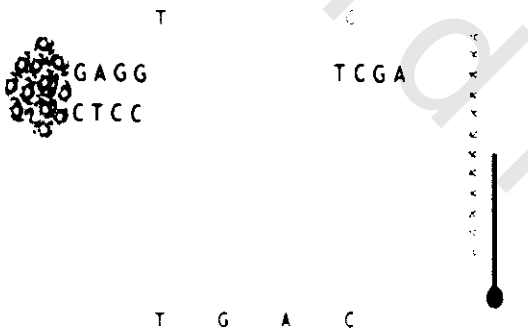
شكل رقم (١٢٣)

- لنري كيف يعمل ذلك مع الحروف الاخري في تتابع مجهول:-
- يعتمد التفاعل علي درجة الحرارة
- تعمل درجة الحرارة المرتفعة علي فصل خيطي الDNAعند درجة (٩٦درجة مئوية)والشكل رقم (١٢٤) يوضح ذلك



شكل رقم(١٢٤)

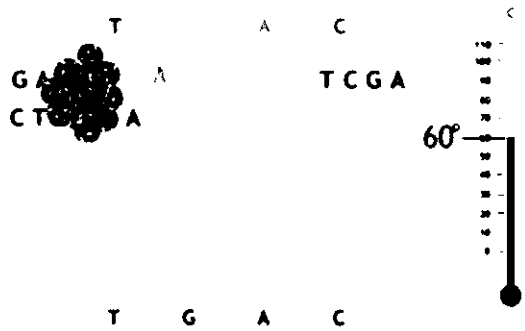
- عند درجة حرارة اقل (تعتمد على تركيب البادئ) يتم اتصال البوادئ (Primer) مع التتابع البلازميدي والتحام انزيم البلمرة علي درجة(٥٠درجة مئوية) الشكل رقم (١٢٥) يوضح ذلك



شكل رقم (١٢٥)

- وعند درجة حرارة اعلي قليلا من الدرجة السابقة (حوالي ٦٠درجة مئوية)يبدأ انزيم البلمرة في اضافة قواعد C-A-T-Gفي الخيط الجديد.الشكل رقم (١٢٦) يوضح ذلك.

obeikandl.com

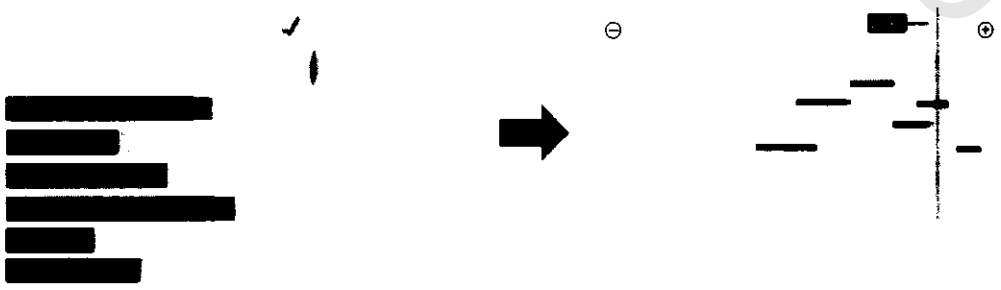


الشكل رقم (١٢٦)

- بعد عدة دورات ستكون هناك قطع من الـ DNAمعلمة بالقواعد الفلورسنتية من T-G-C-Aوالتي تمثل كل قاعدة في التتابع الاصلي. الشكل رقم (١٢٧) يوضح ذلك.

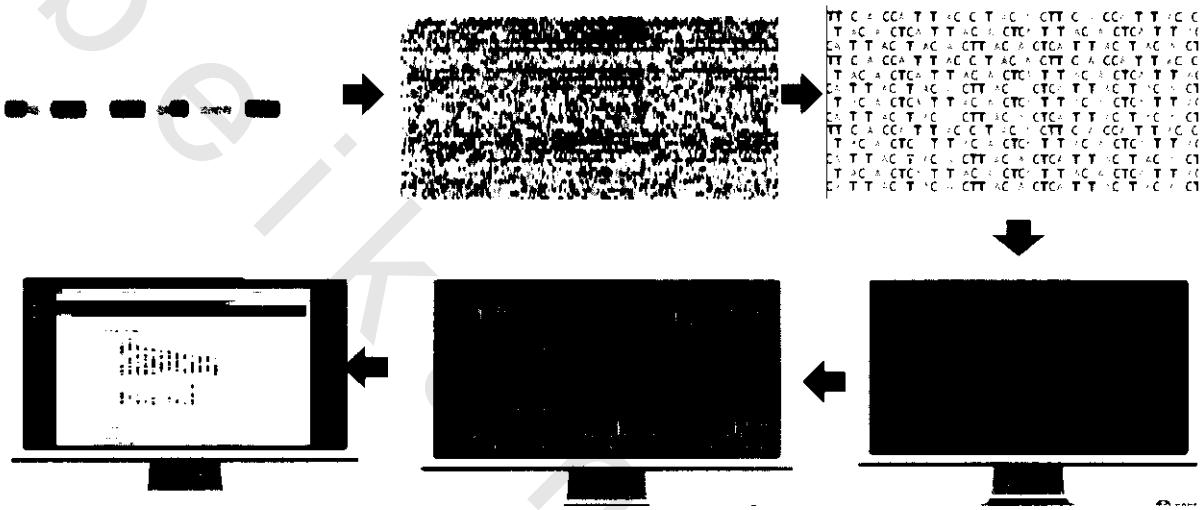
شكل رقم (١٢٧)

- وبالتالي فان الخطوة التالية ستكون وضع هذة القطع في ترتيبها حسب الحجم.
- سيتم تحميل العينة في الجيل الدقيق الخاص بالسلسلة وسيعمل الفصل الكهربائي علي تفريد قطع الـ DNAذات الشحنة السالبة الي اتجاة القطب الموجب.
- يعمل شعاع الليزر علي التعرف علي اللون الفلورسنتي في نهاية كل قطعة ويتم تخزين هذة المعلومات علي صورة منحنيات ملونة.كما في الشكل رقم (١٢٨).



شكل رقم (١٢٨)

- وبالنظر الي مخرجات اجهزة السلسلة المستخدمة لسلسلة الجينومات الكبيرة ،سوف تظهر بالشكل كما في الصورة رقم (١٢٩) كل صف يمثل تتابع مختلف وكل لون مفرد يمثل قاعدة او نيكلوتيدة محددة في التتابع.
- ولبناء الجينوم الكامل يتم تجميع كل التتابعات والبحث فيها عن مناطق تتداخل.
- تم وضع كل المعلومات الاولية والتتابعات المجمعة مجانا علي الانترنت للدراسة ولكل الباحثين.



شكل رقم (١٢٩)

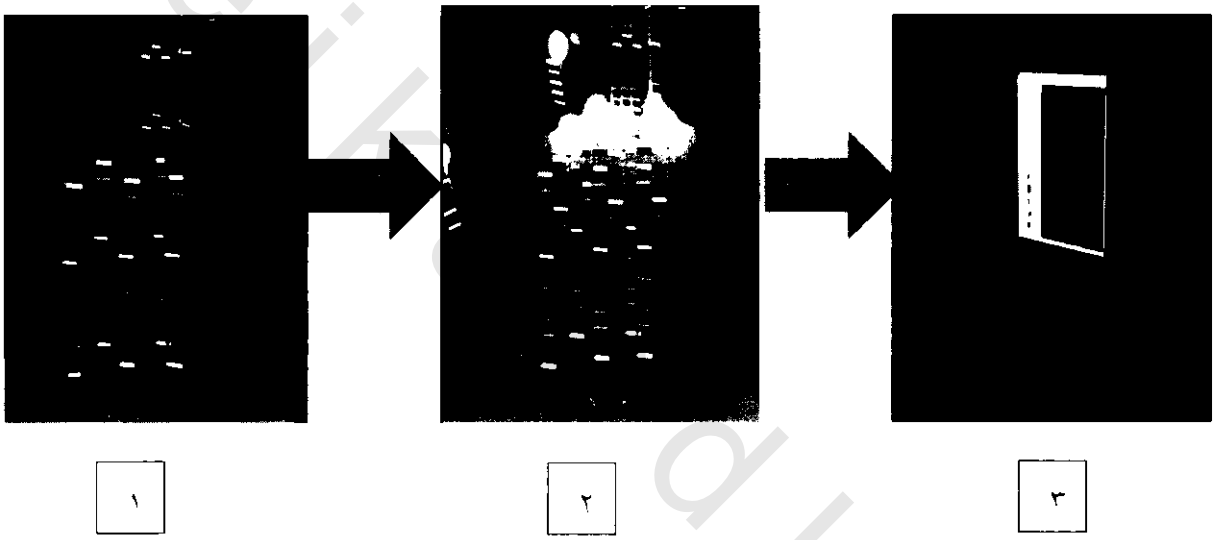
أستخدام المصفوفة الدقيقة

المصفوفة الدقيقة للـ DNA

١. تمثل كل نقطة علي شريحة المصفوفة الدقيقة قطعة محددة من الـDNAوتحتوي كل شريحة علي المجموع الكلي للجينوم الكائن.

٢. يضاف الي كل نقطة مجموعة قطع الـcDNA المعلمة.

٣. يتم قراءة وتحليل شريحة المصفوفة الدقيقة عن طريق برامج خاصة علي اجهزة الكمبيوتر.



شكل ١٣٠: يوضح خطوات قراءة المصفوفة الدقيقة.

هناك عدة تطبيقات لتكنولوجيا المصفوفة الدقيقة:

١- دراسة التعبير الجيني Gene Exprression profiling

٢- المصفوفة الدقيقة للبروتين Protein microarrays

٣- التهجين الجينومي المقارن CGH microarrays

أولا: دراسة التعبير الجيني:

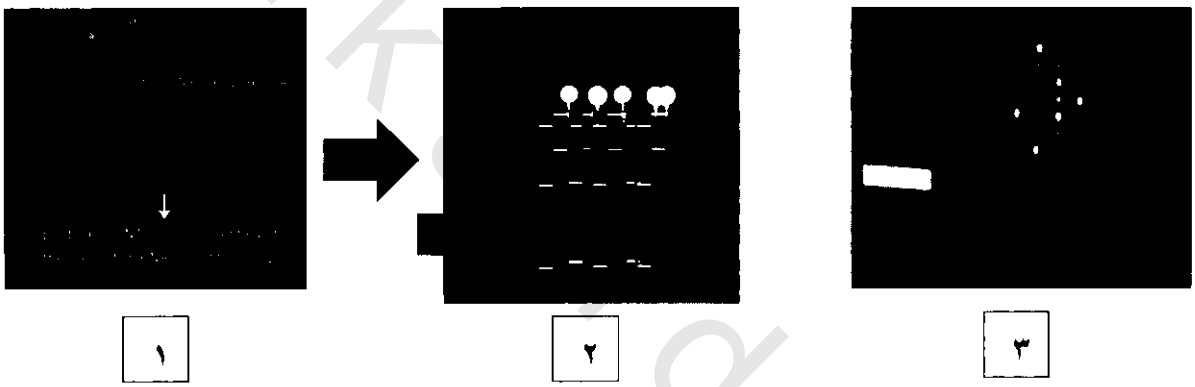
مثال : دراسة التعبير الجيني في نسيج الكبد

١- عزل جزيئات الرنا الرسول(mRNA) المنتجة في نسيج الكبد والشكل رقم (١) يوضح ذلك.

٢- انتاج الدنا المكمل (cDNA)من مجموعة جزيئات الـmRNA في العينة المدروسة الشكل رقم (٢) ذلك.

٣- وضع قطع الدنا المكمل المعلمة علي شريحة المصفوفة الدقيقة للجينوم الكامل الشكل رقم (٣) يوضح ذلك.

٤- تحديد اية من الجينات ثم التعبير عنها في هذة العينة المحددة عن طريق ملاحظة اي القطع الدنا المكمل اعطت نتيجة ايجابية علي نقط شريحة المصفوفة الدقيقة.



شكل ١٣١ : يوضح خطوات دراسة التعبير الجينى عن طريق شريحة المصفوفة الدقيقة.

ثانيا: المصفوفة الدقيقة للبروتين:

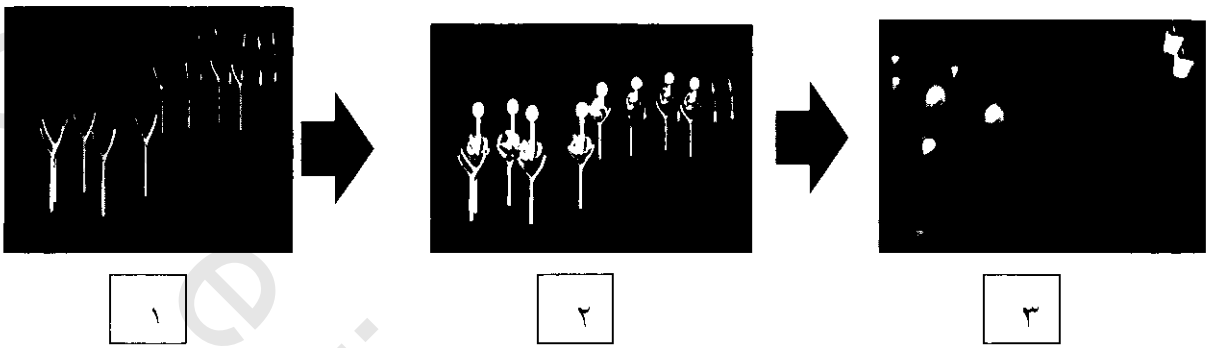
الغرض منها:

تحديد اي من البروتينات يتم ترجمتها في عينة محددة.

١- يتم عمل شريحة المصفوفة الدقيقة للاجسام المضادةالكاملة للكائن الخاصة لبروتينات محددة الشكل رقم (١) يوضح ذلك.

٢- ترتبط البروتينات باجسام مضادة محددة وتظهر نتيجة ايجابيةعلي الشريح الكلية الشكل رقم (٢) يوضح ذلك.

٣- ويمكن تحديد اي البروتينات تعمل سوياعن طريق وضع البروتينات الكلية المعلمة المعزولة من نسيج محدد علي الشريحةوملاحظة اي من البروتينات اعطت نتيجة ايجابية علي نقط شريحة المصفوفة الدقيقة الشكل رقم (٣) يوضح ذلك



شكل ١٣٢

ثالثا: المصفوفة الدقيقة للتهجين الجينومي المقارن (CGH):

الغرض منه، شكل (١٣٣):

المقارنة بين المجموع الكلي لجينات جينومين مختلفين.

١- يتم عمل شريحة المصفوفة الدقيقة لجينوم الكائن تحت الدراسة الشكل رقم رقم (١) يوضح ذلك.

٢- خلط عينات الـ cDNA المكمل المعلمة من الجينومين الشكل رقم (٢) يوضح ذلك.

٣- مقارنة نتيجة التهجين بين العينة الدروسة والعينة المقارنة الشكل رقم (٣) يوضح ذلك.

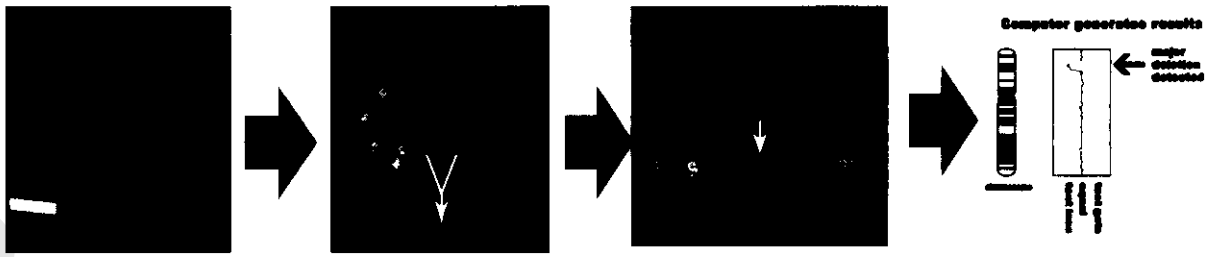
٤- تحليل النتائج عن طريق الكمبيوتر ومقارنة الاختلافات الشكل رقم (٤) يوضح ذلك.

يتم استخدام هذة التكنيك في عدة تطبيقات:

١- مقارنة جينومات الخلايا السرطانية والطبيعية.

٢- مقارنة جينومات خلايا الافراد والاباء الطبيعية.

٣- معرفة اصابة الفرد بالضمور العقلي.



شكل ١٣٣

الخطوات العملية لعمل المصفوفة الدقيقة، (شكل ١٣٤):

نظرة عامة:

١- استخلاص الرنا الرسول(mRNA)من العينات المدروسة ويوضح الشكل رقم (١) ذلك.

٢- بناء الدنا المكمل المعلم من خلال عملية النسخ العكسي يوضح الشكل رقم (٢) ذلك.

٣- خلط العينات وتهجين الدنا DNAالمكمل للcDNA للمصفوفة الدقيقة ويوضح الشكل رقم (٣) ذلك.

٤- خطوة الغسيل وتعني ازالة قطع الDNAغير المهجنة.

٥- الطرد المركزي.

٦- المسح والفحص، ويوضح الشكل رقم (٤) ورقم (٥) ذلك.

(١) استخلاص الmRNAمن العينات :-

يتم استخلاص RNA عالي الجودة من العينات الاختبارية وعينات المقارنة.

(٢) بناء الدنا المكمل المعلم من خلال عملية النسخ العكسي:-

يتم تحضين جزء من الRNAم انزيم النسخ العكسي لمدة ساعتين في وجود النيوكليوتيدات وصبغة cy(cy3&cy5) وقواعد (anct).

(٣) خلط العينات وتهجينها مع الدنا DNAالمكمل cDNA:-

أ- يتم خلط مجموعتين من الدنا المكمل في انبوبة واحدة.

ب-بعد الخلط يتم وضع الدنا المكمل علي شريحة المصفوفة الدقيقة وتركها للتهجين لليوم التالي.

(٤) خطوة الغسيل لازالة قطع الDNAالزائدة الغير مهجنة:-

يتم غسل شرائح المصفوفة الدقيقة ثلاث مرات متتالية بمحلول مركب من(xssc,1 و%sDs,1) علي درجة ٥٠مئوية لازالة قطع الDNA الزائدة الغير مهجنة.

(٥) عملية الطرد المركزي :-

تتم عملية الطرد المركزي لحامل الشرائح للتجفيف.

(٦) المسح والفحص:-

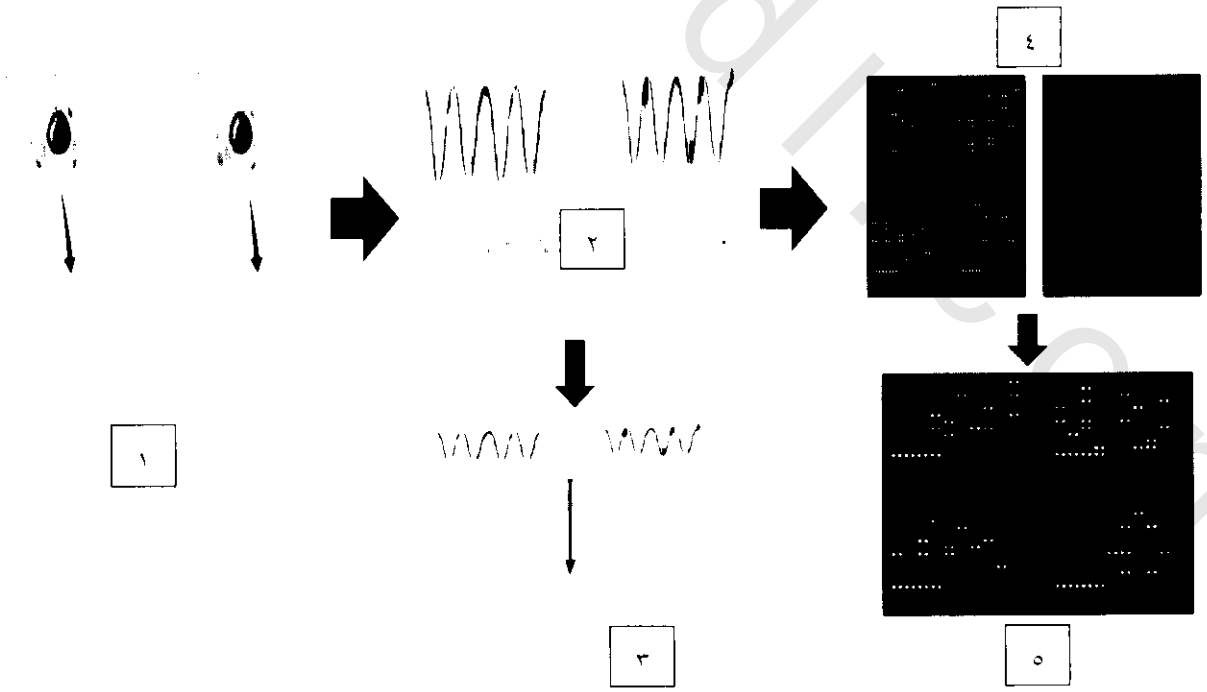
أ- يتم وضعالشريحة في ماسح ضوئي

ب- يتم مرور (شعاع الليزر) عبر الشريحة لقراءة كثافة الضوء المنبعث بكثافة ١٦ نقطة للون الرمادي.

ت- يتم مرور (شعاع الليزر) عبر الشريحة لقراءة كثافة الضوء المنبعث بكثافة ١٦ نقطة للون الرمادي مرة اخري.

ث- تطبيق لونين بناءعلي كثافة اللون الرمادي في الصورتين وهما اللون الاحمر واللون الاخضر اعتمادة علي درجة الحرارة.

ج- دمج الصورتين معا ينتج صورة ملونة تمثل اختلاف التعبير الجيني بين العينتين ويوضح الشكل رقم (٤و٥) ذلك.



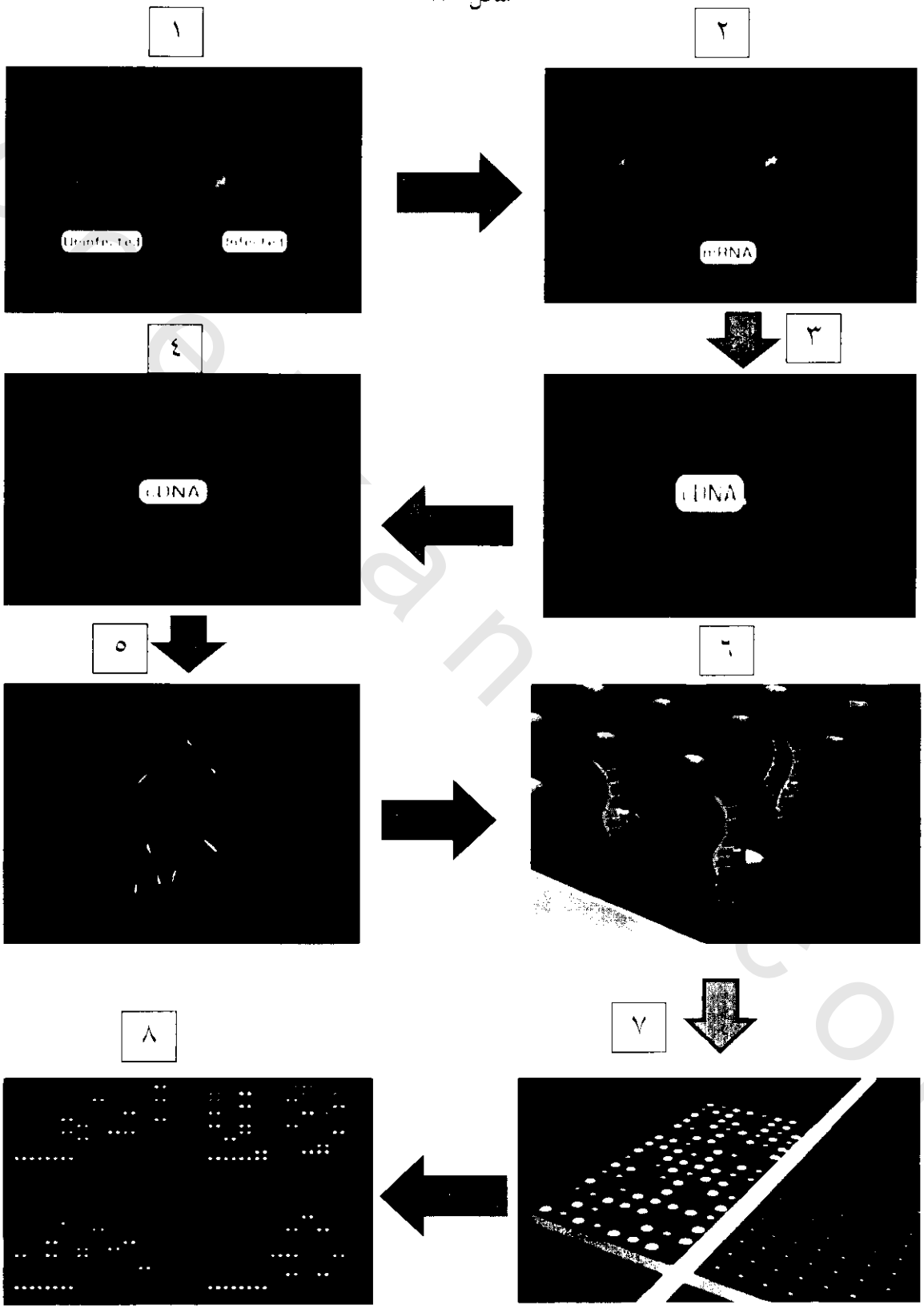
شكل ١٣٤

استخدام تكنيك المصفوفة الدقيقة للمقارنة بين الخلايا المصابة والسليمة، (شكل ١٣٥)

١. يقوم الباحث بالحصول علي عينات النباتات المصابة وغير المصابة والشكل رقم (١) يوضح ذلك.
٢. يتم عزل الـ mRNA (الرنا الرسول) من كلا العينتين الشكل رقم (٢) يوضح ذلك.
٣. يتم تحويل الـmRNA الي (cDNA) المكمل حيث انة اكثر ثبات ويوضح الشكل رقم (٣) ذلك.
٤. يتم تعليم الـ cDNA المكمل من العينة المصابة باللون الفلورسنتي الأحمر وتعليم cDNAالمكمل من العينة غير المصابة باللون الفلورسنتي الأخضر والشكل رقم (٤) يوضح ذلك.
٥. يتم خلط العينتين معا في هذة المرحلة ثم يتم وضعهما علي شريحة المصفوفة الدقيقة والشكل رقم (٥)يوضح ذلك.
٦. يتحد الـcDNA المكمل من العينات مع ال DNAالمتكامل معة في نقاط المصفوفة الدقيقة والشكل رقم (٦) ذلك.
٧. ثم يتم التخلص من قطع الـ cDNA المكمل الزائدة والغير مرتبطة علي شريحة المصفوفة الدقيقة والشكل رقم (٧) يوضح ذلك.
٨. ثم يتم مسح الشريحة عن طريق شعاع الليزر المرتبط بالجهاز والذي ينشط الصبغة الفلورسنتية المرتبطة بقطع الـ cDNAالمكمل والشكل رقم (٧) يوضح ذلك.
٩. يبدأ الحاسب في تجميع هذة المعلومات وحساب نسب اللون الاخضر والاحمر في كل نقطة والتي تعبر عن الجينات ثم التعبير عنها في العينة النباتية المصابة وغير المصابة والشكل رقم (٨) يوضح ذلك.

openkanar.com

شكل ١٣٥

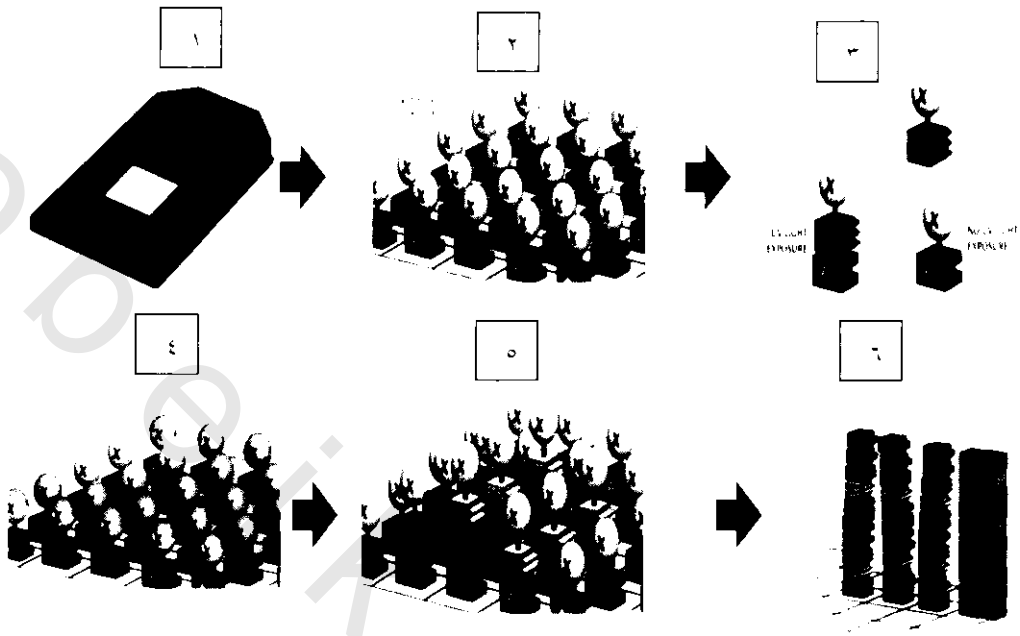


شرائح المصفوفة الدقيقة

شرائح المصفوفة الدقيقة، (شكل ١٣٦):

طور العالم ستيفن فودور تقنية تسمي بتقنية المصفوفة المعلمة لشريحة الجين Gene chip{R} Prob array) حيث قام ببناء تتابعات التي يريد ان يقوم بدراستها علي شريحة زجاجية من نوع معين.

- يتم بناء الDNAباستخدام التخليق الكيميائي الموجة ضوئيا.
- اولا توضح مادة مثبتة مع احدي النيوكليوتيدات علي الشريحة في وضع معين (شكل ١).
- النيوكليوتيدة تحتوي علي مجموعة حماية تسمي(x)والتي تمنع حدوث تفاعل بلمرة و مجموعة الحماية(x)حساسة للضوءويمكن التخلص منها عند التعرض للاشعة فوق البنفسيجية (شكل ٢).
- وبعد التخلص من مجموعة الحماية (x) تتم عملية البلمرة وبناء السلسلة النيوكليوتيدية (شكل ٣).
- يتم اضافة فلتر مصمم بشكل خاص بحيث يتم تعرض نيوكليوتيدات معينة للضوء وليتم استكمال البناء عليها واضافة نيكلوتيدات التالية عليها(شكل ٤).
- وعن طريق تغير وضع الفلتر تمكن العالم فودور من بناء شريحة الجين والتي تحمل مصفوفة من التتابعات بطول ٢٠ نيوكليوتيدات لكل تتابع (شكل ٥).
- وباضافة الدنا المكمل المعلم علي الشريحة يمكن اختبار عشرات الالاف من التتابعات المختلفة في نفس الوقت (شكل ٦).
- وتتم هذة المقارنات عن طريق الكمبيوتر الذي يقوم بفحص وتخزين التتابعات المدروسة والمتطابقة علي قاعدة البيانات.



شكل ١٣٦

بناء شريحة المصفوفة الدقيقة، (شكل ١٣٧):

١. شريحة المصفوفة الدقيقة هي مصفوفة فراغية من واسمات نيوكليوتيدية مرتبة علي سطح زجاجي داعم والشكل رقم (١) يوضح ذلك.

٢. الواسمات النيوكليوتيدية تمثل التتابعات النيوكليوتيدية في جينات معروفة ويتم بناء هذة الواسمات علي سطح صلب بطريقة معينة بحيث يكون كلا من موقع وتركيب التتابعات لهذة الواسمات معروفة.

٣. عن طريق المصفوفة الدقيقة يمكن التعرف علي كائنات او جينات محددة بواسطة التهجين للدنا DNAمن الكائن مع الواسمات النيوكليوتيدية علي شرائح المصفوفة.

٤. هناك عدة طرق لعمل شريحة المصفوفة الدقيقة والطريقة التي سوف يتم شرحها مأخوذة عن طريقة عمل شريحة الكمبيوتر.

٥. شريحة المصفوفة الدقيقة تتكون من قطعة من الزجاج مربعة بطول١,٥سنتيمتر وعرض١,٥ سنتيمتر ومغطاة بطبقة مثقوبة عند المناطق المرغوب وضع نيوكليوتيدات بها والشكل رقم (٢) يوضح شريحة المصفوفة.

٦. يتم وضع اول نيكلوتيدة وتثبيتها عن الشريحة بواسطة تفاعل التنشيط الضوئي ،ثم يتم غير الفلتر بواحد اخر والذي يظهر مواقع معينة لاضافة قواعد اخري ويتم تكرر هذة العملية حتي يتم تخليق وبناء السلاسل النيوكليوتيدية علي الشريحة في مواقع وتتابعات محددة ومعروفة.

٧. غالبا ما تكون طول السلسلة التي يتم بنائها علي الشريحة من ١٥ الي٢٥ قاعدة.

٨. يتم عزل الـ DNAمن الكائن وتجزئتة وتعليمة بصبغة فلورسنتية ثم يتم وضع القطع المعلمة علي الشريحة كما في الشكل رقم (٤).

٩. تتحد قطع الـDNAالجينومي المشابة المعلمة مع سلاسل نيوكليوتيدية مخلقة علي الشريحة اذاكانت متكاملة معها ويتم التخلص من القطع الاخري كما في الشكل رقم (٥).

١٠. يتم مسح سطح الشريحة عن طريق اشعة الليزر وتظهر النتائج علي شكل صورة مرئية كما في الشكل رقم (٦).

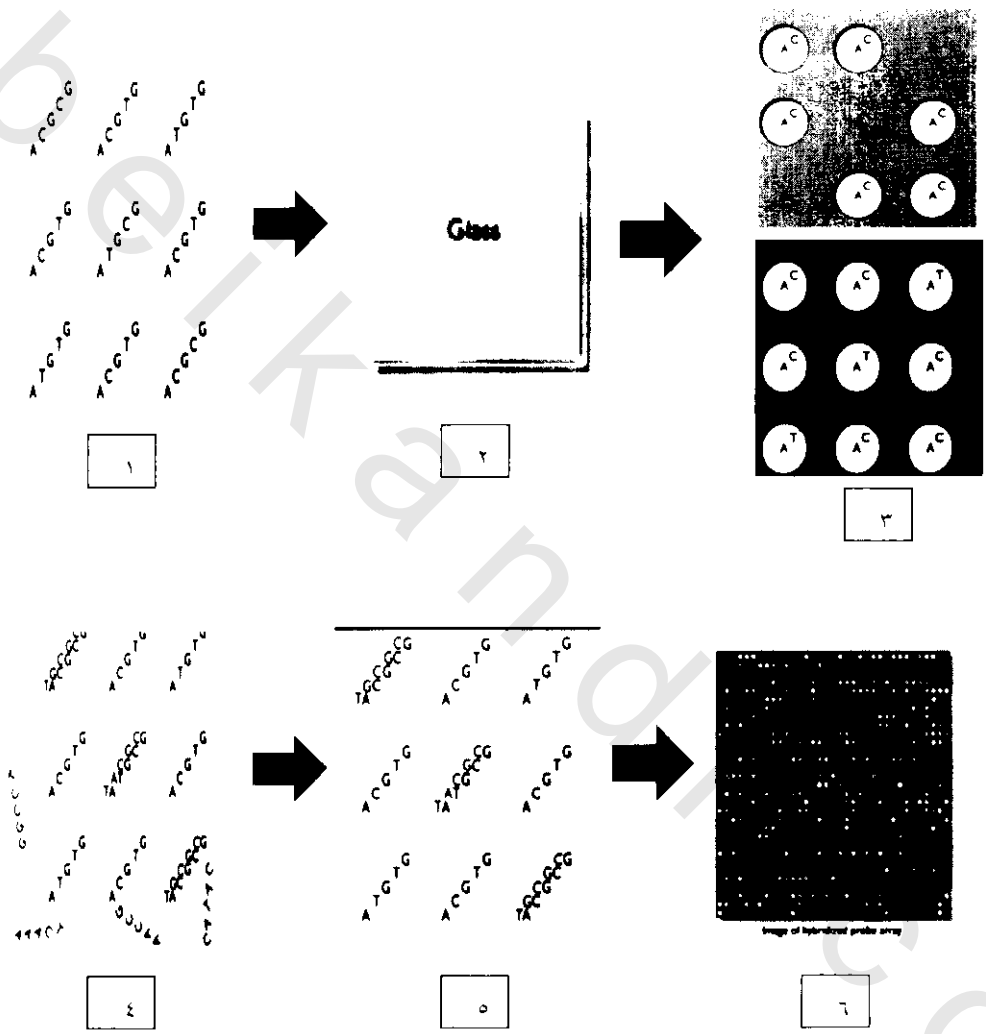
١١. تمثل كثافة اللون درجة الارتباط والتهجين بين الواسمات المختلفة.

١٢. يمكن عمل ما يقرب من مائتي الف واسم اوتتابع علي شريحة واحدة.

١٣. باستخدام هذة التكنولوجيا يمكن بناء اي تتابع مرغوب من النيوكلوتيدات لبناء واسم الشريحة.

علي سبيل المثال:-

يمكن التعرف علي وجود الجينات المقاومة للمضاد الحيوي وجينات اخري ببساطة كما يمكن معرفة مستوي التعبير الجيني عن طريق تهجين الدنا DNA المكمل الناتج من الـRNAالرسول.



شكل ١٣٧

العناصر المتنقلة في الجينومات المعقدة
(تركيبها وتطورها)

موجز: تحتوى جينومات الكائنات حقيقية النواة على مناطق كبيرة من الدنا المتكرر والتي نشأت عن العناصر المتنقلة، وقد نتج عن السلسلة المتكامله لهذه الجينومات معلومات كبيرة غير مسبوقة عن أصل وطبيعة وتباين هذه العناصر داخل هذه المناطق الجينومية والتي كان من المعتقد فى السابق عدم نشاطها. وقد ساعدت سلسلة الجينوم على التعرف على نوعين جديدين من العناصر الجينومية المتنقلة والمعروفة باسم الـ (Polintons) والـ (Helitrons) إلى جانب عدد كبير من عائلات ومجموعات جديدة من العناصر المتنقلة. ومن الجدير بالذكر أن العناصر المتنقلة هي الأصل التطوري لكثير من الجينات مثل جين RAG1 والذي يلعب دور كبير في جهاز المناعة كما أنها القوى المحركة للتطور والاستقرار الجينومي على المدى الطويل.

المقدمة: إن بقايا العناصر المتنقلة في الأجناس المختلفة ودرجة تشابها أو اختلافها تزيد من فهمنا وإدراكنا لحقائق القرابة والتنوع. وقد ظهر مفهوم ديناميكية الجينوم (Genome Dynamics) مع اكتشاف العناصر المتنقلة بواسطة العالمه الآمريكيه (باربراماكلنتوك). وقد كانت محاضرتها التي ألقتها عند حصولها على جائزة نوبل تمثل تحدي للبيولوجيين في هذا المجال. وقد كتبت باربراماكلنتوك ما يلي[1]:

"نحن نعلم الأن الكثير عن المكونات والعناصر الجينومية التي تغيير من بنية الجينوم ولكن لا نعلم شيئاً عن كيفية إحساس الخلية بالخطر و أتخاذها الدفاعات الداخلية ضده وهذاً سيكون أمرا عظيماً".

بعد ما يقرب من خمسين عاماً من الدراسات الجينوميه مازلنا نجهل العديد من ميكانيكيات إعادة البنية الجينومية والتى يتخذها الكائن استجابة للتغييرات والتحديات البيئية. هناك عديد من الدراسات التي انتهت إلى وجود علاقة وثيقة بين ظروف نمو النباتات وبين أحجام جينوماتها (Genome Size)، فنجد فى كثير من أنواع النباتات تباين كبير في حجم الجينوم بين العشائر والأفراد داخل العشيره الواحده ، فمثلاً نجد أن يوجد حوالى (50٪) من التباين الوراثي في نبات عباد الشمس وحوالي (1.15) مرة تباين وراثى في عشائر فول الصويا و(1.29) مرة تباين وراثى بين نباتات الفاصوليا وهكذا، وعلى الرغم من وجود هذه الاختلافات

والتباينات في أحجام الجينومات و ارتباط ذلك مع الاختلافات البيئية وظروف النمو المختلفة ، لم يتم رصد ودراسة هذه الاختلافات والتغيرات في المحتوى الجينومي (Genomic content).

في سنة 2000 نشر الدكتور كالندار[1] وآخرون ، مثالا على الاختلافات الجينومية في عشائر الشعير البري. وقد أظهر هذا البحث أن أحد العناصر الجينونية الأرتجاعية المتنقلة والتي تسمى (BARE1)،والمعروفة في الشعير بنشاطها وكثرتها، تتباين في عددها وتكرارها بين الأصناف المختلفة بمعدل ثلاثة أضعاف. وقد أظهرت الدراسة لأول مرة وجود علاقة بين عدد نسخ (BARE1) وحجم الجينوم وظروف البيئة المحلية المحيطة مما يوحي بوجود ميكانيكية جزيئية يمكن قياسها بين موطن النمو ونشاط العناصر المتنقلة في العشائر الطبيعية[1].

التتابعات المتكررة في الجينوم:

إن مصطلح "التتابعات المتكررة"(Repetitive Sequences) يشير إلى مقاطع متشابهة من الـ DNA والتي توجد على شكل نسخ متعددة في الجينوم. وقد تم اكتشاف هذه المناطق عند دراسة مناطق الاتصال والانفصال بين الكروموسومات أثناء الأنقسام الخلوي[2] وقد قسمت إلى مناطق عالية التكرار ومناطق متوسطة التكرار والتي تشير غالباً إلى المناطق المتكررة المتتالية (Tandem repeats) والمناطق المتكررة غير المتتالية (Interspersed repeats) بالإضافة إلى ذلك توجد بعض المناطق منخفضة التكرار في الجينوم والتي تمثل مجموعة مختلفة Low Copy Repeats (LCRs). وتقسم المناطق المتكررة إلى عائلات مختلفة ذات تتابعات مشتركة أو أصل مشترك وذلك بخلاف العائلات الجينية والتي تعرف وتقسم على حسب الوظيفة البيولوجية المشتركة بغض النظر عن التتابعات المشتركة. وبطبيعة الحال فقد نجد عناصر داخل المناطق المتكررة تتشابه في تتابعاتها وتختلف في أدوارها البيولوجية.

وبدراسة الفروق التركيبية بين النوعين الأول والثاني نجد أن التتابعات غير المتتالية عبارة عن مناطق من الـ DNA بحد أقصى ٢٠-٣٠ كليو قاعدة موجودة داخل الجينوم بشكل عشوائي. وعلى العكس من ذلك نجد أن التكرارات المتتالية تمثل مصفوفات من مقاطع الـ DNA والتي تتراص بشكل متوالي من الرأس إلى الذيل. وقد أظهرت الدراسات الحديثة أن التتابعات غير المتتالية تتكون في معظمها من عناصر متنقلة غير نشطة أو غير كاملة مندمجة داخل الجينوم. وبالتالي يمكن تعريف العناصر المتنقلة على أنها مقاطع من الـ DNA أو RNA يمكنها التكاثر والاندماج جينوم العائل. في نفس الوقت تقوم الجينومات بالحفاظ على تركيبها عن طريق

ميكانيكيات للتغلب على ذلك الاندماج. لذلك فإن كل من الجينوم والعناصر المتنقلة في صراع تنافسي متضاد معظم الوقت. وتقوم معظم العوائل في الكائنات حقيقة النواة بالتثبيط المستمر لنشاط العناصر المتنقلة للحد من آثارهاوأنتشارها ولكن على الرغم من ذلك تستطيع العناصر المتنقلة المقاومة والانتشار المحدود داخل عوائلها.

وقد أظهرت نتائج سلسلة الجينومات المختلفة أن العناصر المتنقلة توجد في جميعها ماعدا جينوم Plasmodium flaciparum[illegible].

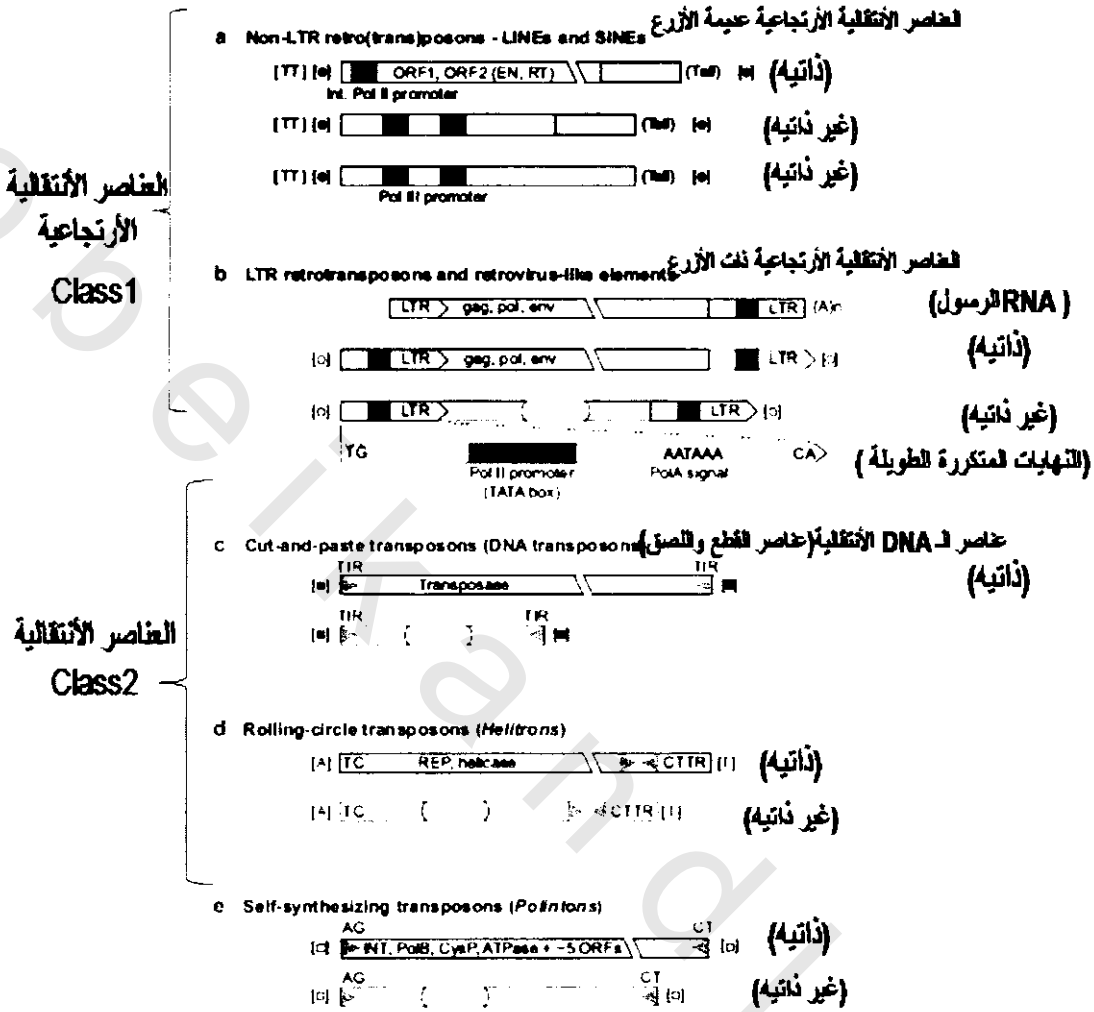
ولكن يبقى السؤال، لماذا توجد هذه العناصر على الرغم من تضاد نشاطها مع جينومات العوائل المختلفة؟

ببساطة لا يستطيع الجينوم التخلص من هذه العناصر كما لا يستطيع التخلص من الطفيليات. إذا كانت العناصر المتنقلة تكسب عوائلها مميزات تطورية تزيد من فرص وجودها ومقاومتها للأجهادات البيئية. إن المفهوم القائل بأهمية العناصر المتنقلة في تطور عوائلها ليس حديثاً ولكن التقدم الحادث في المجال وضع هذا المفهوم في مقدمة الجدل القائم عن تطور حقيقات النواة[٦][٧][٨].

تركيب وأنظمة العناصر المتنقلة:

يظهر الشكل في الصورة (١٣٨) شكل تخطيطي للتراكيب المختلفة للعناصر المتنقلة.

obeikandl.com



شكل ١٣٨

العناصر المتنقلة الارتجاعية ذات النهايات المتكررة الطويلة
(LTR-retrotransposon):

إن العناصر المتنقلة الارتجاعية ذات النهايات المتكررة الطويلة والمعروفة باسم (LTR-retrotransposon) هي من ضمن عائلات الطراز الأول من العناصر المتنقلة والتي تتضمن أيضاً الفيروسات الارتجاعية (Retrovirases) والعناصر الجينومية الطويلة مستمرة Long interspersed nuclear elements (LINE) والعناصر الجينومية القصيرة المنتشرة Short interspersed nuclear elements (SINE) وتتميز (LTR-retrotransposon) من وجود نهايات متكررة طرفية تحيط بمجموعة الجينات الخاصة بعملية التنقل والتي تسمى بروتينات الغلاف (Capsid)

والمعروفة باسم (Gag) وإنزيم البروتيز وإنزيم الاندماج (Integrase) وإنزيم النسخ العكسي وإنزيم (RNase H). ومن الجدير بالذكر بأن جميع عناصر عائلة الطراز الأول من العناصر المتنقلة لا تقوم بالانتقال بنفسها ولكن عن طريق عمل نسخة وسيطة منها من الـ (mRNA). هذا النسخ والانتشار يحدث بشكل طبيعي أثناء النمو ولكنه يستحث بالزيادة بوجود ضغوط حيوية أو غير حيوية مثل زراعة الأنسجة والجفاف والإصابات المرضية وغيرها[9][10]. وقد ثبت أن في بعض العناصر زيادة النسخ مرتبطة بزيادة العدد والانتشار في الجينوم مثل عناصر (Tnt1) في نبات الدخان وعنصر Tos17 في الأرز[11][12].

ومن الجدير بالذكر أن (LTR-retrotranposon) هي أكثر العناصر المتنقلة شيوعاً في جينومات نباتات العائلة النجيلية. ومن الملاحظ أن النسبة التي تشغلها هذه العناصر تزداد بزيادة حجم الجينوم ابتداء من نبات الأرز أصغر جينومات العائلة النجيلية حيث تشمل حوالي ١٤٪[13] مروراً بنبات الذرة حيث تمثل هذه العناصر (٥٠-٨٠٪)[14] وصولاً إلى الشعير حيث تمثل حوالي (٧٠٪) من حجم الجينوم[15].

وقد أثبت العالم سان مجويل[13] أن معظم عمليات الاندماج التي حدثت في العناصر المتنقلة الارتجاعية قد تمت في خلال ٢-٦ مليون عام الأخيرة.

العناصر الارتجاعية الجينومية الطويلة المنتشرة (LINE):

إن العناصر الارتجاعية الذاتية المنتشرة والتي لا تحتوي على تكرارات طرفية طويلة متكررة (LINE) تتركب من إطار أو إطارين في أطر القراءة الجينية (Open reading frame) (ORFs). تحتوي هذه العناصر أيضاً على محفز داخلي (Internal Promoter) في منطقة النهاية الطرفية `5 والتي تتحكم في عملية النسخ لها داخل جينوم العائل.

إن ميكانيكيات الانتقال والاندماج لهذه العناصر داخل جينوم العائل مدروسة جيداً وقد تم وصف هاتين العمليتين باسم (النسخ العكسي للهدف المعلم) Target-primed reverse transcription (TPR).

وقد تم تطوير هذا النموذج باكتشاف أن بداية النسخ العكسي لهذه العناصر لا يتطلب تزاوج القواعد بين البادئ والتتابع القالب[16] بالإضافة إلى أن كلا من نطاق إنزيم النسخ العكسي (RT) ونطاق إنزيم الاندماج (EN) في هذه العناصر يتم تشفيرهم بنفس إطار القراءة الجينية. أي أنه يتم نسخ جزئ واحد من الـ RNA

الرسول يحتوي على هذه المعلومات ويستعمل كقالب لإنزيم النسخ العكسي لإنتاج (دنامكل) (cDNA) للاندماج داخل الجينوم مرة أخرى.

وبناء على الخواص التركيبية لهذه العناصر ومدى التشابه في نطاق النسخ العكسي (RT) تم تقسيم هذه العناصر إلى خمس مجموعات وهي Jockey, I, RIE, L1, R2 وقد قسمت هذه العناصر بدورها إلى خمسة عشر مجموعة تحتية[١٠].

ويعتقد أن مجموعة الـ R2 تتكون من أقدم العناصر الارتجاعية عديمة النهايات الطرفية (Non-LTR retrotransposon) وهم R4, R2, NeSL, CRE وتتميز جميعها بوجود إطار قراءة واحد (ORF) لإنزيم النسخ العكسي والنهاية الطرفية (C) لإنزيم الاندماج. ومن الملاحظ أن إنزيم الاندماج (EN) في مجموعة R2 مشابهة لإنزيمات القصر المختلفة ويتم اندماج جميع العناصر المتنقلة من مجموعة الـ R2 في مواضع وأهداف محددة ومتخصصة. أما أفراد بقية المجموعات الأربع يشفر جينومها إلى إنزيم القصر Aparinic-apyrimidinic endonuclease (APE) والذي يتميز دائماً بوجود النهاية (N) في اتجاه إنزيم النسخ العكسي (RT).

العناصر الارتجاعية المنتشرة القصيرة
Short interspersed elements (SINE):

عادة يكون تركيب هذه العناصر تركيب موازيكى مختلط من RNA الناقل (tRNA) أو الـ RNA الريبوسومى (5S) أو (7SL) ويحتوي على تتابع محفز داخلي لإنزيم البلمرة الثالث Pol III عند النهاية (`5) الطرفية.

بالنسبة للنهاية (`3) الطرفية إما أن تكون مشتقة من عناصر الـ (LINE) أو تحتوي على ذيل متكرر من (A) أدنين مثل المتواجد في عناصر (L1).

ويتم انتقال هذه العناصر عن طريق كلاً من إنزيم النسخ العكسي وإنزيم الاندماج RT/EN الذي يتم تشفيرهم عن طريق العناصر الارتجاعية الذاتية عديمة الأذرع Autonomous non – LTR retrotransposon.

ومن الجدير بالذكر أن جميع العناصر الارتجاعية عديمة الأذرع Non-LTR retrotransposon يتم انتقالها رأسياً (من الأباء إلى النسل) مع بعض الاستثناءات[١١].

العناصر الارتجاعية ذات الأذرع الطويلة LTR-retrotransposon:

يتكون إطار القراءة وORF في العناصر الارتجاعية ذات الأذرع الطويلة (LTR-retrotransposon) من تتابعات جينية تشعر لكل من بروتينات الغلاف الروتيني (gag) والـ (cnv) والـ (Pol). ويتكون الـ (Pol) في إنزيم النسخ العكسي (RT) والاندماج (EN) ونطاق إنزيم اسباراتيل بروتيز (Aspartyl-protease) غالباً ما يسمى نطاق الاندماج (EN) في هذه العناصر باسم (INT) ويمكن لهذه العناصر الانتقال أفقياً (c1) على الرغم من أن عملية الانتقال كاملة الوضوح.

العناصر الارتجاعية الخليطة (بنى لوب) (Penelop):

تحتوي العناصر الارتجاعية الخليطة (بنى لوب) على إطار قراءة مفرد مكون من نطاقي إنزيم النسخ العكسي وإنزيم الاندماج.

ويشبه نطاق إنزيم الاندماج الأنترون المكود لإنزيم الاندماج والمعروف باسم GIY-YIE وقد سمي بذلك لاحتوائه على مجموعة الأحماض الأمينية (جليسين – أيزوليوسين – تيروزين – Xn – تيروزين – أيزوليوسين – جليسين)[illegible]، ومن الواضح أن نطاق إنزيم النسخ العكسي في عناصر (البنى لوب) مشابهه لإنزيم التلوميراز (Telomerases) وإنزيم النسخ العكسي البكتيري أكثر من إنزيم النسخ العكسي للعناصر الانتقالية الارتجاعية الأخرى.

ومن المحتمل أن يكون انتقال هذه العناصر مشابهه لموديل (النسخ العكسي للهدف المعلم "TPRT") والذي تتبعه العناصر الأخرى[illegible].

على الرغم من ذلك تتميز عناصر البنى لوب بوجود يشابهه الأذرع المتكررة الطرفية أو النهايات المتكررة المعكوسة (TIR) (Terminal inverted repeats) والتي لا توجد عادة للعناصر الارتجاعية عديمة الأذرع، بالإضافة إلى أن بعض هذه العناصر في أجناس مختلفة تختلط بأنترونات أثناء انتقالها[٢٥].

وبناء على الناحية التركيبية والقرابات الوراثية تعتبر عناصر البنى لوب نوع مميز ومختلف من العناصر الانتقالية الارتجاعية ولكن بالنظر إلى الاختلافات الواسعة في إنزيم النسخ العكسي (RTs) لهذه العناصر يعتقد أن هذه العناصر من أقدم العناصر الارتجاعية عديمة الأذرع.

obeikandi.com

العناصر الانتقالية الارتجاعية متوسطة التكرار

The Dictyastelium Intermediate Repeat Sequence:

إن العناصر الانتقالية الارتجاعية متوسطة التكرار (DIRS) تشفر لإنزيم للنسخ العكسي (RTs) أكثر شبهاً وقرابة إلى إنزيم النسخ العكسي الموجود في العناصر الانتقالية الارتجاعية ذات الأذرع الطويلة (LTR-retratransposon) منه إلى إنزيم النسخ العكسي الموجود في العناصر الانتقالية الارتجاعية عديمة الأذرع (Non-LTR retrotransposon)[٢٩].

وحتى وقت حديث كان ينظر إلى عناصر الـ (DIRS) على أنها ارتجاعية مبهمة وغامضة لخلوها من إنزيم الاندماج (INT) وتركيب الأذرع الطرفية الغير عادي[٣٠،٣١].

وعلى الرغم من ذلك فقد اكتشف بعد ذلك أن هذه العناصر تشفر إلى بروتين ينتمي عائلة بروتينات الاندماج وتسمى (إنزيم اندماج التيروسين) (Tyrosine INT). تلك الملاحظات بالإضافة إلى التركيب الفريد للنهايات الطرفية لهذه العناصر أدت إلى تقسيم هذه العناصر كمجموعة منفصلة من العناصر الانتقالية الارتجاعية ذات الأذرع الطويلة المتكررة[٣٠،٣٢].

وبالنظر إلى تنوع وتوزيع هذه العناصر في الكائنات حقيقيات النواة يتضح أن هذه العناصر توازى العناصر الانتقالية الارتجاعية في القدم داخل الجينومات المختلفة. بالإضافة إلى ذلك فإن إنزيم النسخ العكسي في هذه العناصر أكثر قرابة إلى عناصر (Gypsy) والتي ينظر إليهما على أنهما أقدم العناصر الانتقالية الارتجاعية ذات الأذرع[٣٣،٣٤] ولذلك فإن أكثر السيناريوهات أصالة عن نشأة هذه العناصر أنها نشأت عن عناصر شبيهه بعناصر (Gypsy) الانتقالية الارتجاعية بعدما استخدمت إنزيم اندماج التيروسين بدلاً من إنزيم الاندماج الموجود في هذه العناصر (DDE INT).

ويتوافق هذا السيناريو مع وجود إنزيم الاندماج والتركيب (Recombinase / INT) والذي تشفر له عناصر انتقالية جينومية في بعض الفطريات (Crypton Transposon)[٣٥].

وبناء على ذلك الاقتراح فإن من المعتقد أنه قد حدث اندماج بين أحد العناصر الارتجاعية من النوع الأولي (Gypsy) والتي نشأت عنه عناصر (DIRS).

وكما في عناصر البنى لوب فإن بعض عناصر الـ DIRS تحتوي على انترونات (Introns) (مناطق غير مشفرة) في جينوماتها. وهذه الانترونات قد تكون ذات أهمية

في الانتقال الارتجاعي داخل الجينوم لكلا العنصرين. فعلى سبيل المثال فإن RNA الرسول الغير مجزئ (non-spliced) الموجود داخل النواة لكلا العنصرين يمكنه الانتقال الارتجاعي أكثر كفاءة من المجزئ (Spliced).

العناصر الـ DNA الانتقالية (عناصر القطع اللصق):

تقوم هذه العناصر بقطع نفسها من موضعها الأصلي في الجينوم ثم الاندماج في موضع جينومي جديد. كلتا العمليتين (القطع واللصق) تتم عن طريق إنزيم الانتقال (Transposase) الذي يتصل بالنهايات الطرفية لهذه العناصر والأماكن التي سوف يتم الانتقال إليها مكوناً ما يسمى بأعناق الـ DNA (DNA-nicls).

ومعظم عناصر الـ DNA الانتقالية تحتوي على نهايات طرفية معكوسة (TIR) عند الأطراف. وعلى الرغم من ذلك فإن بعض عناصر الـ DNA الانتقالية النشطة تحتوي على نهايات غير كاملة أو غائبة مثل عناصر (MuDR) في نبات (الأرابيدوبسس).

وتنقسم هذه العناصر في حقيقيات النواة إلى ثلاثة عقد عائلة كبيرة كما يظهرها الجدول رقم (١). وكل عائلة تحتوي على عدة عائلات صغيرة مختلفة مكونة من عناصر ذاتية (Autonomous) وغير ذاتية) (Non-autonomous) والتي تنتقل عن طريق إنزيم انتقال خاص (Super family-specific transpasase) بكل عائلة. ومختلف إنزيمات الانتقال في كل عائلة كبيرة عن الأخرى وبالإضافة إلى ذلك فإنها تختلف في تكرارها في الأماكن المستهدفة TSDs (Target site duplications). وذلك على الرغم من تشابه بعض العناصر فيها مثل Harbinger وEn/Spm. وتشفر معظم العائلات الكبيرة بروتين واحد فقط وهو إنزيم الانتقال وذلك يتضمن عناصر Rebavkas, Novosib, Transib, Merlin, Mirge, IS4EU, Mariner, bAT, P, PiggBac، أما العناصر الانتقالية مثل MuDR, Harbinger, En/Spm فهي تشفر إلى كل من إنزيم الانتقال وبروتينات ربط الـ DNA.

إن عائلة العناصر المعروفة باسم (Harbinger) كانت أول عائلة من العناصر المتنقلة المكتشفة اعتماداً على دراسات حوستبيه. إن هذه العناصر الذاتية تشفر إلى اثنين من البروتينات وهما بروتين الانتقال (حوالي ٤٠٠ حمض أميني) وبروتين ربط الـ DNA (حوالي ٢٠٠ حمض أميني). ومن الجدير بالذكر أن بروتين الانتقال في هذه العناصر قريب الصلة بعناصر IS5 البكتيرية والتي تتضمن مجموعات IS5 وIS112

obeikandl.com

والـ ISL2. وتحاط هذه العناصر غالباً بمناطق طرفية TSD حوالي (٣ قواعد هيدروجينية) عادة ما تكون TAA أو TTA ولكن بعض العناصر في جينوم أسماك الزيبرا (Zebra fish) تحتوي على مناطق طرفية مكونة من ١٧ قاعدة وهي (AAAACACCWG-GTCTTTT) أكثر طولاً من أي عائلات العناصر الانتقالية[٣٢].

عناصر الهليترونات (Helitrons):

الهليترونات من عناصر الـ DNA المنتقلة والتي تنتقل عن طريق تكنيك الحلقة المستديرة (Rolling-circle). وتوجد هذه العناصر في جينومات النباتات والفطريات والحشرات والنيماتودا والفقاريات[٣٣].

وفي بعض الكائنات مثل نبات الأرابيدروبيسس والدودة الشريطية تمثل هذه العناصر حوالي ٢٪ من حجم الجينوم. إن عناصر الهليرونات الذاتية تشفر إلى بروتين بحجم (١٥٠٠ حمض أميني) ويسمى (Rop/HCl) ويتكون نطاق محفز للتضاعف والتكرار (Rep) وإنزيم الحلزنة (HCl) (Helicase).

يتكون نطاق التضاعف من حوالي (١٦٠ حمض أميني) يتكون من منطقتين. المنطقة الأولى تسمى (Two-His) وتتركب من الأحماض الأمينية (E-FYW-O-K-R-G-LAV-PVH-X-H) والمنطقة الثانية (KYK) وتتكون من الأحماض الأمينية (yg-LYW-FAT-Kg-Y-X-X-K) مفصول بين المنطقتين بحوالي ١٣٠ حمض أميني وهذه النطاقات هي نفس الموجودة في البلازميدات وخيوط الـ DNA الفيروسي الذي تتضاعف بنفس ميكانيكية الانتقال.

إن بروتينات التكرار (Rep-proteins) تقوم بأداء عمليتي القطع والربط للـ DNA أثناء التكرار بطريقة الدائرة الملتفة (Rolling Circle) وكذلك أثناء الانتقال. إن الهلبرونات هي النوع الوحيد من العناصر المنتقلة في حقيقيات النواة التي تندمج في الجينوم بدون وضع مناطق (TSDs) وغالباً ما يحدث اندماج عناصر الهليترونات بين نيكليوتيدات (T) و (A) في العائل. ولا تحتوي الهليترونات على المناطق المتكررة المعكوسة (TIRs) التي توجد غالباً في عناصر الـ DNA المتنقلة الأخرى. وعوضاً عن ذلك تحتوي الهليترونات على نهايات 5`-TC و CTRR-3`.

كما تحتوي أيضاً على مناطق (Hairpin) بطول حوالي ١٨ قاعدة مزدوجة ومفصولة عن بعضها بمناطق تتراوح أطوالها من ١٠-١٢ قاعدة عن النهاية 3`. ومن

المعتقد أن هذه المناطق تعمل على وقف التكرار بطريقة الدائرة الملتفة والتي من المعتقد أيضاً أن تكون هذه الطريقة التي تنتقل بها هذه العناصر. وحتى الآن لم توجد أي هليترونات بدون مناطق (Hairpin) إلا في الهلترونات الموجودة في فطر الإسباراجلس[٣٦].

وعلى الرغم من أنه لم يكتشف معملياً حتى الآن أي هليترونات نشطة إلا أنه يمكن توقع نشاطها وكيفية انتقالية اعتماداً على تركيبها. ويبدأ انتقال الهليترونات من الموقع المخصص لإنزيم التكرار على الخيط الموجب للعنصر. ثم تقوم النهاية الطرفية (3`-OH) لهذا الخيط بالعمل كبادئ للخيط القائد لكي يبدأ عملية التخليق مستخدماً بروتينات وإنزيمات العائل للتكرار. إن الخيط القائد المخلق حديثاً يبقى مرتبطاً بالنهاية (3`-OH). وتستمر عملية البناء حتى يتم بناء عنصر هليترون جديد مكون من الخيط الأبوي الموجب والخيط الجديد المخلق[٣٦].

ومن الصفات الهامة للهليترونات هي قدرتها على التداخل مع جينات العائل. فعلى سبيل المثال نجد أن هليترونات النبات تشفر بروتينات مشابهة لبروتينات (RPA) والمشتقة من الجينات المكودة للـ (RPA) في جينوم العائل في الأصل (36). وبالنظر إلى تركيب الـ RPA في الهليتونات يمكن الجزم بأن هذا البروتين يشترك في عملية الانتقال كإنزيم ربط خيوط الـ DNA المفردة.

والهليتونات الموجودة في نبات شقائق النعمان أو قنفد البحر أو الأسماك والضفادع تحمل إنزيم اندماج (EN) مشتق من الإنزيم الموجود في العناصر الارتجاعية عديمة الأذرع CR1[٣٨،٣٩].

وتجدر الإشارة إلى أن عدم التباين في إنزيم الاندماج بين الهليترونات المختلفة في الأنواع المتباعدة يدل على أهميتها في دورة الحياة لهذه العناصر.

وأخيراً، اكتشفت أن الهليترونات الغير ذاتية الموجودة في جينوم الذرة تحتوي على مناطق مشفرة (أكسونات / أنترونات) في العديد من جينات العائل[...].

ولذلك فإن الهليترونات قد تلعب دوراً هاماً كأداة مهمة في التطور البيولوجي للأنواع عن طريق قيامها كوسيط لتضاعف وخلط وتوظيف جينات العائل.

عناصر البولينتون (Polintons):

تتبع البولينتونات الطراز الثالث من عناصر الـ DNA الانتقالية وهي تشبه الهليترونات في أن كلاهما تم اكتشافها عن طريق دراسات كمبيوترية[illegible]. ويتراوح طول هذه العناصر حوالي ١٥-٢٠ ألف قاعدة وتحتوي على حوالي ٦ قواعد (TSDs) وحوالي من ١٠٠-١٠٠٠ قاعدة من النهايات الطرفية المعكوسة في كلاً الطرفية. وتعتبر هذه العناصر من أعقد العناصر الانتقالية في جينومات حقيقية النواة المعروفة حتى الآن. وتشفر البولينتونات لحوالي عشرة بروتينات مختلفة بما في ذلك إنزيم البلمرة (PolB) وإنزيم الاندماج وإنزيم الانتقال وغيرها من البروتينات الهامة لاستكمال دورة حياته. وتعتبر الإنزيمات السابق ذكرها هامة لكل أنواع البولينترنات التي تم اكتشافها في الحيوان أو الفطريات أو الكائنات الأولية[illegible].

وينتمي إنزيم البلمرة (PLOB) إلى مجموعة إنزيمات البلمرة الموجودة في جينومات البكترويوفاج والأدينوفيروس والبلازميدات الخطية في كل من النباتات والفطريات. إن النواحي والخواص التركيبية والوظيفية لهذا الإنزيم مدروسة جيداً [illegible] . وتجدر الإشارة إلى أن المحافظة على الخواص المختلفة لهذه الإنزيم بين العناصر في الكائنات المتباعدة وراثياً تدل على أن هذه الإنزيم ضروري لعملية انتقال البولينتونات.

إن النهايات الطرفية للبولينتونات تتركب من (١-٣ قاعدة) تكرارات طرفية متتالية والتي تكون هامة لحدوث ميكانيكية الإنزلاق (Slide-back mechanism) أثناء تخليق الـ DNA المعلم بالبروتين في البكتريوفاج[illegible]. واعتماداً على هذه الملاحظات تم اقتراح بأن البولينتونات تتكاثر عن طريق تكنيك التخليق الذاتي للبروتين المعلم بواسطة إنزيم (POLB)[illegible].

أولاً يقوم إنزيم الاندماج بقطع البولينتون من جينوم العائل أثناء عملية التكرار والتضاعف للـ DNA ويؤدي ذلك إلى التوصل بولينتون وحيد الخيط (Single-Strand) والذي يكون شكلاً مشابهاً لمضرب الكرة خارج الكروموسومات. ثانياً يقوم إنزيم الـ POLBبتكرار البولينتون الناتج مكوناً بولينتون ثنائي الخيط. وأخيراً بعد تخليق البولينتون ثنائي الخيط يتم ارتباط إنزيم الاندماج بالنهايات الطرفية له ويعمل على اندماجه في جينوم العائل (من العناصر المتنقلة إلى الجينات).

أول الأمثلة الواضحة لأحد الجينات الوظيفية التي نشأت عن طريق عنصر متنقل هو الجين المشفر لبروتين السنترومين CENP-B)B)[47,48].

obeikandi.com

هذا الجين محفوظ في الثدييات ومحدد موقعه ولكن وظيفته الكاملة غير واضحة. وبناء على دراسات التنشيط الجيني اتضح أن هذا الجين يشترط في عمليات التكاثر وليس في الأنشطة والعمليات المتعلقة بالسنترومير[٤٩، ٥٠].

ولقد تم اكتشاف جينات مشابهة لهذا الجين في الخميرة ولكن يعتقد أن هذه الجينات قد تطورت داخل جينوم الخميرة من العناصر المتنقلة Marino/Pogo مستقلة عن الجين المشابهة في الثدييات.

وذلك على الرغم من التشابه التركيبي بين هذا الجين في الثدييات والنباتات والفطريات الأخرى.

ويوجد ما يقرب من ٥٠ إلى ١٠٠ جين وظيفي في جينوم الثدييات نشأ عن عناصر DNA متنقلة وعناصر ارتجاعية متنقلة[٣٥، ٥١، ٥٢، ٥٣، ٥٤، ٥٥، ٥٦]، ومعظم هذه الجينات نشأت عن الإنزيمات الناقلة الخاصة بالعناصر (Mariner / Pogo, bAT, Piggy Bac, P, Harbinger, and Transib) ويمثل بروتين RAG1 أقدم بروتينات العائل التي نشأت من عناصر متنقلة[٣٥، ٣٩].

وقد نشأ جين RAG1 منذ ما يقرب من ٥٠٠ مليون عام مضى من أصل مشترك في الفقاريات من العنصر المتنقل (Transib)[٣٩]. وهذا الجين أيضاً هو الجين الوحيد في جينوم العائل المشتق عن عنصر متنقل والذي يظهر أنشطة شبيهة بالقطع والنقل في العناصر المتنقلة.

أما الخواص البيولوجية لبقية الجينات التي نشأت عن عناصر متنقلة فهي غير معروفة أو مرتبطة بربط جزيئات الـ DNA أو RNA (57) ,(58) ,(59).

إن نظام المناعة المبنى على جين RAG1 هو المثال الوحيد على تطور ميكانيكية المعقدة من عناصر انتقالية[illegible]. وهناك أمثلة أخرى لجينات تعمل أيضاً على إعادة ترتيب الـ DNA حيث أنها تشفر لبروتينات إنزيمات انتقال تشترك في وجود أحماض أمينية تحليلية مشابهة في إنزيمات الانتقال الأخرى. ويعتبر جين HARB11 والذي نشأ عن إنزيم الانتقال الخاص بعنصر (Harbinger) مثال على ذلك في الأصل التطوري المشترك في الأسماك والطيور والضفادع والثدييات[illegible].

وتعتبر العناصر الانتقالية الارتجاعية ذات الأذرع هي مصدراً آخراً للجينات المكودة للبروتينات. فعلى سبيل المثال هناك الكثير من الجينات المشتركة بين جينومات

الفأر والإنسان تطورت من بروتين الغلاف gag المكود له بواسطة عناصر Gypsy ذات الأذرع الطويلة.

أحد الجينات التي نشأت عن عناصر الـ Gypsy تسمى PEG10 أو KIAA1051 وهي تشمل نطاق الـ gag وبروتين البروتيز واللذان اندمجا معاً ليكونا إطاراً جديداً مثل الموجود في عناصر الـ Gypsy.

على الرغم من وجود أكثر من ٣٠ مثال على جينات نشأت من إنزيم الانتقال في العناصر المتنقلة، هناك مثال واحد فقط على استخدام إنزيم لنسخ العكس (RT) في العناصر المتنقلة لنشأة أحد الجينات. هذا الجين هو جين Rt11 أو PEG11 والذي نشأ عن إنزيم RT وبروتين الـ gag في عناصر الـ Gypsy.

ومن المثير للدهشة أن كلاً الجينات PEG11, PEG10 جينات معبرة أبوية وتجدر الإشارة أن حوالي ٥٠٪ من جميع الجينات التي نشأت من بروتين (gag) توجد على كروموسوم (X).

وتبدو أن جينات الـ RNA الصغير (Micro RNA) قد نشأت عن عناصر متنقلة فقد لوحظ أن قدرتها على التحكم في الجينات قد نشأت عن العلاقة المتضادة بين العناصر المتنقلة وجينوم العائل. إن تعبير العناصر المتنقلة وتخليق تتابعات متكررة في الـ DNA يواجه تكسير للـ RNA وميثلة الـ DNA، وذلك عن طريق RNA الصغير المنشأ عن طريق المناطق المتكررة المستهدفة. وهناك عمليات مناظرة تشتمل على تغير تركيب الكروماتين والتحكم في التعبير الجيني.

وكثير من هذه العمليات تتم بواسطة الـ RNA الصغير الناتج عن أصول تطورية ثابتة. ومما يبدو أن التحكم الغير وراثي في الجينات الوراثية في الإرابيدوبسيس قد تطور عن ميكانيكيات تثبيط العناصر المتنقلة. ويبدو أيضاً أن بعض الأصول التطورية للـ RNA الصغير قد نشأت عن عناصر ارتجاعية قديمة مثل MIR (SINE) أو L2 (LINE)، أو عناصر حديثة مثل Alu (SINE) أو جينات كاذبة متحورة (Pseudogenes). وأكد هذه النظرية حديثاً اكتشاف أن الطرف العناصر المتنقلة (5` Alus) يمكن أن يعمل كتتابع محفز للـ RNA الصغير مما يؤكد أن العناصر المتنقلة في الأصل التطوري للـ RNA الصغير الذي يتحكم في تنظيم التعبير الجيني في الثدييات.

obeikandi.com

العناصر المتنقلة العتيقة

إن دراسات المقارنة الجينومية الحديثة أظهرت وجود مناطق وتتابعات جينومية غير مشفرة لبروتينات متشابهة في عدة أنواع[٧٨]. وهذه المناطق تشتمل على عناصر انتقالية مثل (LF-SINE)[٧٩] وMER121[٨٠] وAMN SINE وSINE3-19[٨١، ٨٢]، وهذه العناصر السابقة تتبع عناصر الـ (SINE) (العناصر الانتقالية الارتجاعية ذات الأذرع القصيرة) أو شبيهة بها وهذه العناصر متشابهة تماماً في الفقاريات المختلفة ابتداء من الزواحف حتى الثدييات. وقد تم اكتشاف ٨٣ عائلة إضافية حديثاً من العناصر القليلة ومتوسطة التكرار وقد تم إضافتهم إلى قاعدة البيانات الخاصة بهم (Replace)[٣، ٤٠، ٤٢].

obeikandl.com

References المراجع العلمية

(1) McClintock B. 1984. The significance of responses of the genome to challenge. *Science* 226:792–801.

(2) Kalendar, R., Tanskanen, J., Immonen, S., Nevo, E. & Schulman, A. H. (2000) Genome evolution of wild barley (Hordeum spontaneum) by BARE-1 retrotransposon dynamics in response to sharp microclimatic divergenceProc. Natl. Acad. Sci USA 97, 6603–6607.

(3) Jonathan F. Wendel* and Susan R. Wessler (2000). Retrotransposon-mediated genome evolution on a local ecological scale. PNAS. 97(12):6250–6252.

(4) (Britten RJ, Kohne DE. 1968. Repeated sequences in DNA. Hundreds of thousands of copies of DNA sequences have been incorporated into the genomes of higher organisms. Science 161:529–40.

(5) Sharp AJ, Cheng Z, Eichler EE. 2006. Structural variation of the human genome. Annu. Rev. Genom. Hum. Genet. 7:407–42.

(6) Gardner MJ, Hall N, Fung E, White O, Berriman M, et al. 2002. Genome sequence of the human malaria parasite Plasmodium falciparum. Nature 419:498–511.

(7) Brosius J. 1991. Retroposons–seeds of evolution. Science 251:753.

(8) Hartl DL, Dykhuizen DE, Miller RD, Green L, de Framond J. 1983. Transposable element IS50 improves growth rate of E. coli cells without transposition. *Cell* 35:503–10

(9) Kidwell MG, Lisch DR. 2001. Perspective: transposable elements, parasitic DNA, and genome evolution. *Evol. Int. J. Org. Evol.* 55:1–24

(10) Wessler, S. R. 1996. Plant retrotransposons: turned on by stress.Curr. Biol. 6, 959–961.

(11) Grandbastien, M.-A. (1998). Activation of plant retrotransposons under stress conditions. Trends Plant Sci. 3:, 181–187.

(12) Hirochika, H. (1993). Activation of tobacco retrotransposons during tissue culture. EMBO J.12, 2521–2528.

(13) Hirochika, H., Sugimoto, K., Otsuki, Y., Tsugawa, H., and Kanda, M. (1996). Retrotransposons of rice involved in mutations induced by tissue culture. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **93:**, 7783–7788.

(14) Tarchini, R., Biddle, P., Wineland, R., Tingey, S., and Rafalski, A. (2000). The complete sequence of 340 kb of DNA around the rice *Adh1-Adh2* region reveals interrupted colinearity with maize chromosome 4. Plant Cell **12:** 381–391.

(15) SanMiguel , P., A. Tikhonov , Y.-K. Jin, N. Motchoulskaia , D. Zakharov , A. Melake-Berhan , P. S. Springer, K. J. Edwards, M. Lee, Z. Avramova , and **J. L. Bennetzen** (**1996**) Nested retrotransposons in the intergenic regions of the maize genome. *Science* 274:765-768.

(16) Vicient, C. M., Suoniemi, A.,Anamthawat-Jo´nsson, K.,Tanskanen, J., Behavav, A., Nevo, E. & Schulman, A. H. (1999)Retrotransposon BARE-1 and Its Role in Genome Evolution in the Genus Hordeum. Plant Cell 11, 1769–1784.

(17) Kulpa DA, Moran JV. 2006. Cis-preferential LINE-1 reverse transcriptase activity in ribonucleoprotein particles. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 13:655–60.

(18) Eickbush TH, Malik HS. 2002. Origins and evolution of retrotransposons. In *MobileDNA* , ed. NL Craig, R Craigie,MGellert,AMLambowitz, pp. 1111–144.Washington, DC: ASM Press.

(19) Kojima KK, Fujiwara H. 2004. Cross-genome screening of novel sequence-specific non- LTR retrotransposons: various multicopy RNA genes and microsatellites are selected as targets. *Mol. Biol. Evol.* 21:207–17.

(20) Kordis D, Gubensek F. 1997. Bov-B long interspersed repeated DNA (LINE) sequences are present in Vipera ammodytes phospholipase A2 genes and in genomes of Viperidae snakes. *Eur. J. Biochem.* 246:772–79.

(21) Jordan IK, Matyunina LV, McDonald JF. 1999. Evidence for the recent horizontal transfer of long terminal repeat retrotransposon. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96:12621–25.

(22) Lyozin GT, Makarova KS, Velikodvorskaja VV, Zelentsova HS, Khechumian RR, et al. 2001. The structure and evolution of Penelope in the virilis species group of *Drosophila*: an ancient lineage of retroelements. *J. Mol. Evol.* 52:445–56.

(23) Volff JN, Hornung U, Schartl M. 2001. Fish retroposons related to the Penelope element of *Drosophila* virilis define a new group of retrotransposable elements. *Mol. Genet. Genom.* 265:711–20.

(24) Eickbush TH, Malik HS. 2002. Origins and evolution of retrotransposons. In *MobileDNA II*, ed. NL Craig, R Craigie,MGellert,AMLambowitz, pp. 1111–144.Washington, DC: ASM Press.

(25) Evgen'ev MB, Arkhipova IR. 2005. Penelope-like elements—a new class of retroelements: distribution, function and possible evolutionary significance. *Cytogenet. Genome Res.* 110:510–21.

(26) Arkhipova IR, Pyatkov KI, Meselson M, Evgen'ev MB. 2003. Retroelements containing introns in diverse invertebrate taxa. *Nat. Genet.* 33:123–24.

(27) Cappello J, Handelsman K, Lodish HF. 1985. Sequence of Dictyostelium DIRS-1: an apparent retrotransposon with inverted terminal repeats and an internal circle junction sequence. *Cell* 43:105–15.

(28) Goodwin TJ, Poulter RT. 2001. The DIRS1 group of retrotransposons. *Mol. Biol. Evol.* 18:2067–82.

(29) Duncan L, Bouckaert K, Yeh F, Kirk DL. 2002. Kangaroo, a mobile element from Volvox carteri, is a member of a newly recognized third class of retrotransposons. *Genetics* 162:1617–30.

(30) Goodwin TJ, Poulter RT. 2004. A new group of tyrosine recombinase-encoding retrotransposons. *Mol. Biol. Evol.* 21:746–59.

(31) Poulter RT, Goodwin TJ. 2005. DIRS-1 and the other tyrosine recombinase retrotransposons. *Cytogenet. Genome Res.* 110:575–88.

(32) Goodwin TJ, Butler MI, Poulter RT. 2003. Cryptons: a group of tyrosine-recombinaseencoding DNA transposons from pathogenic fungi. *Microbiology* 149:3099–109.

(33) Craig NL. 1995. Unity in transposition reactions. *Science* 270:253–54.

(34) Kapitonov VV, Jurka J. 1999. Molecular paleontology of transposable elements from *Arabidopsis thaliana*. *Genetica* 107:27–37.

(35) Kapitonov VV, Jurka J. 2004. Harbinger transposons and an ancient *HARBI1* gene derived from a transposase. *DNA Cell Biol.* 23:311–24.

(36) Kapitonov VV, Jurka J. 2001. Rolling-circle transposons in eukaryotes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98:8714–19.

(37) Galagan JE, Calvo SE, Cuomo C, Ma LJ, Wortman JR, et al. 2005. Sequencing of *Aspergillus nidulans* and comparative analysis with *A. fumigatus* and A. oryzae. *Nature* 438:1105–15.

(38) Poulter RT, Goodwin TJ. 2005. DIRS-1 and the other tyrosine recombinase retrotransposons. *Cytogenet. Genome Res.* 110:575–88.

(39) Kapitonov VV, Jurka J. 2005. Helitron-1 SP, a family of autonomous Helitrons in the sea urchin genome. *Repbase Rep.* 5:393.

(40) Lai J, Li Y, Messing J, Dooner HK. 2005. Gene movement by Helitron transposons contributes to the haplotype variability of maize. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102:9068–73.

(41) Morgante M, Brunner S, Pea G, Fengler K, Zuccolo A, Rafalski A. 2005. Gene duplication and exon shuffling by helitron-like transposons generate intraspecies diversity in maize. *Nat. Genet.* 37:997–1002.

(42) Kapitonov VV, Jurka J. 2006. Self-synthesizing DNA transposons in eukaryotes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 103:4540–45.

obeikandl.com

"إستخدام التكنيكات الجزيئية
فى حفظ ودراسة الأختلافات الوراثية"

obeikandl.com

مقدمة

إن التنوع الوراثى والإختلافات الوراثية الناجمة عن التطور البيولوجى عبر ملايين السنين فى المناطق الجغرافية المختلفة إنما هو كنز وراثى يجب التعرف والحفاظ عليه وإستغلاله بقدر الإمكان. وقد تمكن مربو النبات وعلماء وراثة العشائر التعرف على هذا الكنز وتقدير أهميته وإستغلاله إلى حد بعيد. وتكمن أهمية التنوع الوراثى بالنسبة إلى مربى النبات فى إمكانية إستغلال هذا التنوع لإنتاج أصناف جديدة غير تقليدية متوائمة مع ظروف البيئة المحيطة وذات أهمية اقتصادية. لذلك فإن التعرف على هذا التنوع وإمكانية حصره أصبح الشغل الشاغل لعلماء وراثة العشائر لسنوات طويلة. كما أن الحفاظ على هذا الإرث البيولوجى أصبح ضرورة ملحة وقضية هامة لا يمكن الاستهانة بها. ومع التقدم المذهل في تقنيات الوراثة الجزئية فى نهاية القرن العشرين، أصبح من الممكن التعرف على هذه الاختلافات الوراثية وحصرها وتقديرها على المستوى الجزيئى وعمل بصمة وراثية للأنواع المختلفة حتى يمكننا الحفاظ عليها.

الوراثة المحافظة (Conservation Genetics):

إن الإهتمام بالحفاظ على التنوع الحيوى (Biodiversity) هو الهدف الرئيسى لعلماء البيولوجيا والوراثة المحافظة (Conservation Biology and Genetics) وكما هو معروف فإن هذا التنوع تم تنظيمه ودراسته بدآ من الوحدات عائلية (Family units) والقرابات الممتدة (Extended kinships) والتراكيب الوراثية المختلفة للعشائر داخل النوع الواحد وصولا إلى عمل مقاييس مدرجة للتباين الوراثى فى القدرة على التكاثر والبقاء للأنواع المختلفة التى انحدرت عبر التاريخ التطورى.

وكما نعلم فإن المظهر الخارجي للكائنات لايعبر عن الإختلافات الحقيقية للتراكيب الوراثية. ومن الغريب أنه فى الوقت الذي تطورت فيه الأدوات والتقنيات اللازمة لمعرفة وتقدير التباين الوراثى، هو أكثر وأسرع المراحل التطورية فى فقد هذا التنوع على مر التاريخ البيولوجى، وبالتالى فإن أحد أهداف الوراثة المحافظة هو الحفاظ على هذا التباين الوراثى، ولكنه لا يكفى، وأنما يجب أيضا أن يكون الحفاظ على استمرار العمليات التطورية نفسها هدفا آخر يجب الإهتمام به.

إن عمليات التهجين بين الأنواع المختلفة، وظهور الأنواع الجديده وغيرها من العمليات الديناميكية للتطور والتي أثرت تأثيرا كبيرا على كيفية تنظيم العمليات التطورية المختلفة، لا ينظر إليها بالإهتمام الكافى، بل على العكس ينظر إليها على أنها

نوع من أنواع العمليات البدائية التي يمكن تجاهلها أو التعامل معها بقدر قليل من الإهتمام.

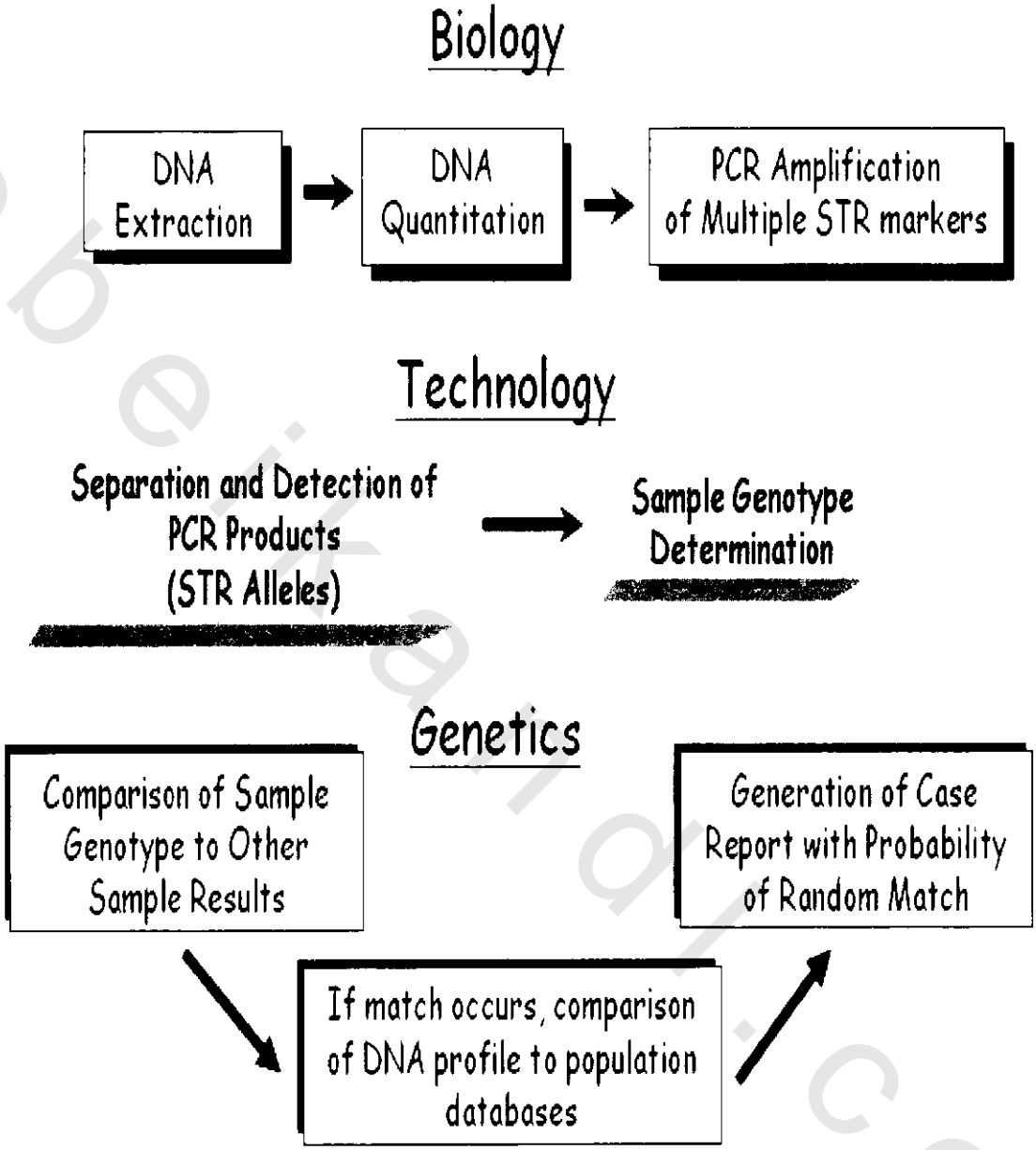
يجب القول بأنه ليس فقط على المجتمعات البشرية المختلفة الحفاظ على لتباين الوراثى الموجود، خاصة الأنواع المهددة بالانقراض، بل يجب عليهم أن يجدوا الوسيلة اللازمة للحفاظ على استمرار العمليات التطورية المختلفة والتي تثمر هذا التنوع الحيوي.

التقنيات الجزيئية الحديثة لعمل البصمة الوراثية:

إن التقنيات الحديثة التى بزغت فى النصف الثانى من القرن العشرين فى البيولوجيا الجزيئية ساعدت على التعرف السريع والدقيق للاختلافات الوراثية بين الأنواع المختلفة.

بل إن هذه التقنيات وصلت من الدقة أن تظهر التباينات المختلفة بين الأفراد، والتي تميز كل فرد على حدة، فيما أطلق عليه بعد ذلك البصمة الوراثية (DNA fingerprinting)، ولذلك فإن البصمة الوراثية تم إستخدامها على نطاق واسع فى الطب الشرعى. وقد إستطاع علماء الوراثة إستخدام هذه التقنيات فى التعرف على التباين الوراثى بين العشائر والأنواع والأصناف المختلفة، والذى يصعب التعرف عليه بالوسائل المورفولوجية المختلفة، كما تم استخدام هذه التقنيات حديثا للتأكد من انتقال الجينات إلى الأنواع المنتجة بالهندسة الوراثية.

ويوضح الشكل (١٣٩) التالي العمليات المختلفة التى يتم إتباعها لعمل البصمة الوراثية لكائن ما. وكما يظهر في هذا الشكل فإن عمل البصمة الوراثية لكائن ما يعتمد على عمليات بيولوجية وتكنولوجية ووراثية مختلفة.



شكل ١٣٩

الأدوات الجزئية (Molecular Tools):

إن دراسة الاختلافات والعلاقات بين الأفراد المختلفة كانت فى السابق تعتمد على الدراسة المقارنة للأشكال المظهرية (Morphology) والفسيولوجية (Physiology) بين الأفراد موضع الدراسة.

أما بالنسبة إلى استخدام الأدوات الجزيئية فأنها تعتمد أيضا على الدراسة المقارنة (Comparative study)، ولكن المقارنة تشتمل على معلومات مباشرة و غير مباشرة للتتابعات الحمض النووى DNA والبروتينات الموجودة في الكائن.

ويمكن تقسيم هذه الأدوات إلى:-

١) اختبارات تعتمد على الفروق فى المحتوى البروتينى (Protien assays):-

- الإختبارات المناعية (Protien immunology).
- التفريد الكهربى البروتينى(Protien electrophoresis).

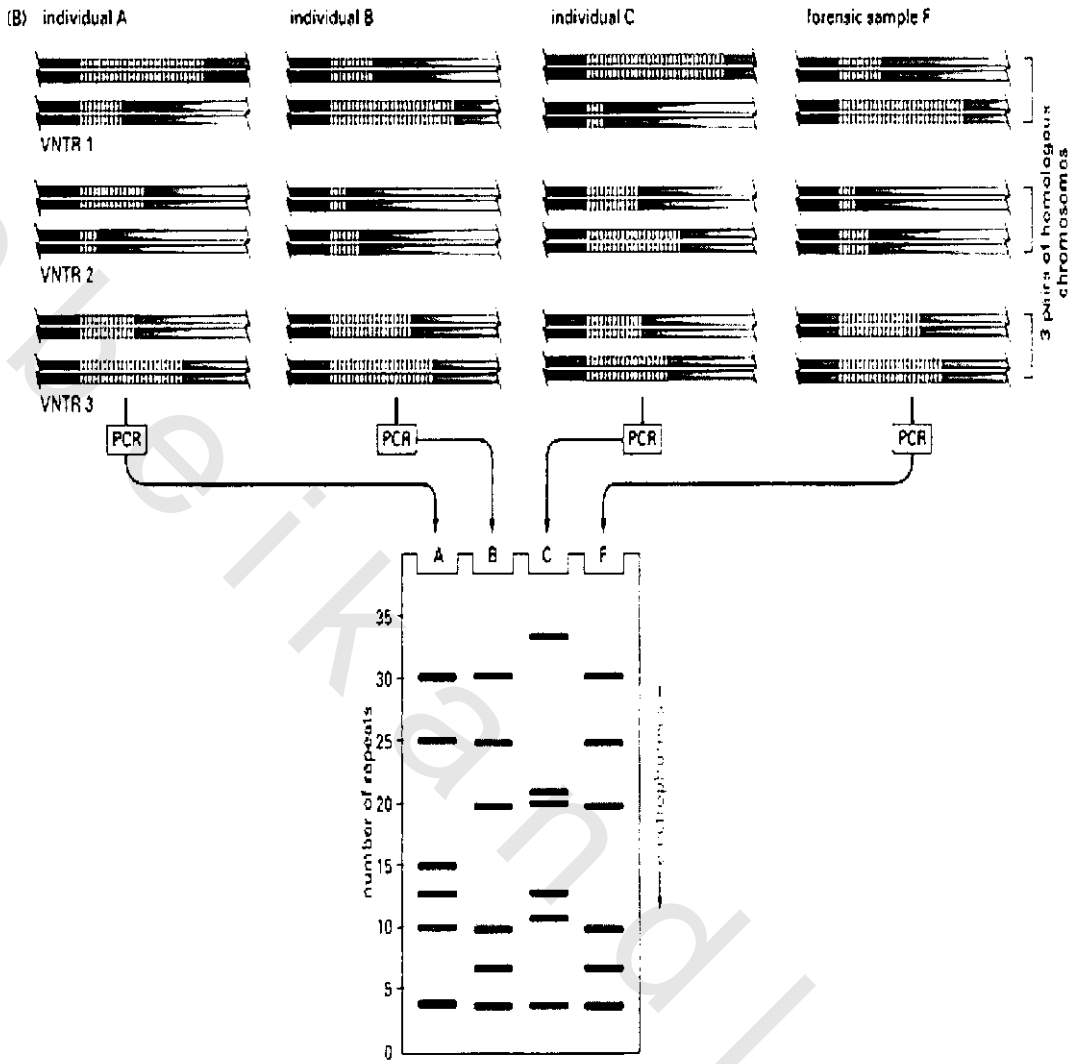
٢) إختبارات تعتمد على المادة الوراثية (DNA assays):-

- إختبارات تهجين المادة الوراثيةDNA-DNA hybridization.
- التحليل القصرى(RFLP) Restriction analysis .
- التفاعل التسلسلى للبوليمراز PCR مثل RAPD.

الواسمات الجزيئية وكشف التباين الوراثى:

يمكننا تعريف الواسمات الجزيئية بأنها عبارة عن تتابعات مميزة فى محتوى الكائن من المادة الوراثية DNA وتنشأ هذه التتابعات المتفردة عن حذف تتابعات أو إضافتها أو تعديل موضعها مما يؤدى إلى إختلافات تركيبية بين الأفراد.

وقد مكنتنا البيولوجية الحديثة من تعيين هوية هذه الواسمات بدقة وسهولة. ويمكننا القول بان حصر الاختلافات والتباينات بين فرد وآخر يمكن أن نطلق عليه البصمة الوراثية او الهوية الوراثية لهذا الكائن. ويوضح الشكل التوضيحى الأتى كيفية المقارنة بين بعض الأفراد التي تحمل تراكيب فردية مميزة لكل منها.



شكل ١٤٠

ويمكننا أن نلخص بعض التقنيات الهامة فى تحديد البصمة الوراثية للكائن:

١. تكنولوجيا تهجين الدنا:

وتعتمد هذه التقنية على مبدأ التكامل بين جديلتى الـDNA فيمكن الكشف عن اى تتابع فى المادة الوراثية عن طريق استخدام نسخه مشابهه له ويمكن التعرف عليها بسهولة ويطلق على هذه النسخه (مسبر الدنا)(DNA Probe) .هذا المسبر قد يكون أى جزء من الـ DNAأوالـ RNA على شرط أن يكون مكمل للتتابع المراد البحث عليه ويمكن التهجين معه بسهولة. ومن الضرورى ان يتم تعليم هذا المسبر بمادة يسهل الكشف عنها مثل العناصر المشعة أو مواد كيماوية ملونة، وبالطبع يجب أن يكون كل من المسبر والتتابع المراد الكشف عنه وحيد الجديلة (Single strand).

ولذلك يجب أن يتم تحويل كل خيوط الـDNA المزدوجة إلى خيوط مفردة قبل القيام بعملية التهجين. وقد تتم عملية التهجين هذه بإحدى الطريقتين:

أ- بشكل مباشر على أجزاء الـDNA فى الجل.

ب- على ورق راشح معين يحتوى على قطع الـDNA بعد أنتقالها عليه.

والطريقة الأخيرة هى الأكثر شيوعا وسهولة فى المعمل.

ومعنى ذلك إننا لا يمكننا التعرف فقط إلا على الشظايا التى تحمل التتابع المكمل لهذا المسبر. وبالطبع يمكننا التعرف على التتابعات المرغوب فيها عن طريق استخدام فيلم أشعة أكس (X-Ray film)، وذلك فى حالة إستخدام العناصر المشعة أو عن طريق تغيير اللون، وذلك فى حالة إستخدام تفاعلا لونيا.

وقد أطلق على عملية الكشف عن الـDNAبواسطة التهجين إسم ساذرن (Southern-blotting)، وذلك على إسم العالم مبتكر هذه الطريقة والتى سمى بنفس الإسم، والذى نشرها عام ١٩٧٥. وأسوة بذلك تم إطلاق إسم نورذرن(Northern-blotting) على تهجين الـ (RNA) وإسم وسترن (Westren-blotting) على تهجين البروتين.

٢. إستخدام تقنية الرفلبات(RFLP):-

إن تقنية الرفلبات(RFLP) والتى تعتمد على التباينات فى أطوال شظاياالـDNAالناتجة عن إستخدام أنزيمات القصر، وهى من أكثر الطرق شيوعا وإستخداما لعمل البصمة الوراثية. حيث أن حدوث أى طفرة أو تغيير فى المادة الوراثية للكائن قد تنجم عن حذف أو إضافة أو تبديل تتابعات معينة فيها. وبالتالى فإن إستخدام أى من أنزيمات القصر سينتج عنه شظايا تختلف فى أطوالها من فرد لآخر بسبب تغيير مواقع التعرف لهذا الانزيم على طول المادة الوراثية. وهذه التباينات فى أطوال الشظايا الناتجة بين الأفراد المختلفة والتى تعتبر مميزة لكل فرد أو نوع تسمى رفلبات(Restriction fragments length polymorphisms).

استخدام المناطق ذات التتابعات القصيرة المتكررة:

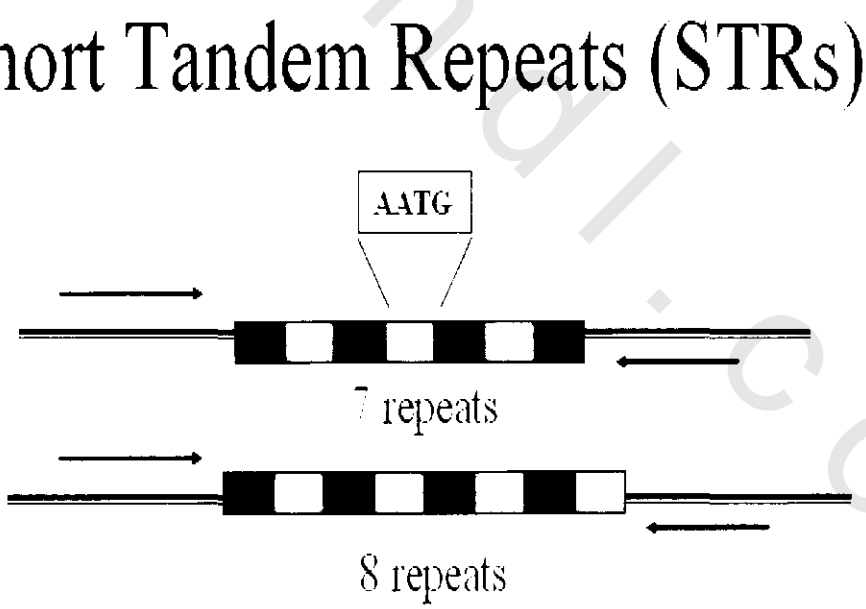
(Short tandem repeats):

إن المناطق ذات التتابعات القصيرة المتكررة(STR) (Short tandem repeats) هي مناطق متفردة ومميزة لكل فرد على حدة، لذلك كانت هذه المناطق هى المناطق المرشحة فى الـ DNAلكي تستخدم لدراسة البصمة الو راثية بين الأفراد المختلفة، وهى تتألف من مكررات لتتابع أساسي يتألف من خمسة عشر زوجا من

القواعد وقد إكتشفها العالم جينيريز وفريقه البحثى بجامعة ليستر. فقد استطاع تحديد بعض المجاميع من التوابع الصغيرة التى تحمل تتابعات متشابهة أو متطابقة. وقد استطاعوا ان يصمموا طريقة لكشف هذه التتابعات عام ١٩٨٥ وذلك باستخدام مسبر خاص تم عزله من منطقة الأنترون فى الجيل الذى يشفر لبروتين العضلات والمسمى ميوجلوبين. وقد اطلقوا على هذه التقنية البصمة الوراثية. ونظرا لوجود عددا كبيرا من المكررات فى كل موقع فقد استطاعت هذه التتابعات المتكررة(STR) أن تظهر التباينات بين الأفراد المختلفة وخاصة أننا يمكننا أن نفحص ما يقرب من عشرين موقعا وراثيا مختلفا فى الوقت الواحد. وقد إستخدمت هذه التقنية فى الطب الشرعى وإثبات البنوة والقرابة وغيرها من التطبيقات المفيدة.

ويوضح الشكل (١٤١) التالي رسم تخطيطي لهذه التتابعات القصيرة المتكررة. وكما هو موضح فى الشكل التالى فإن عدد وحدات هذه التتابعات يختلف من فرد الى أخر فى حين أن البوادئ (Primers) المستخدمة فى أجراء التضاعف ثابتة.

شكل ١٤١: التتابعات القصيرة المتكررة



التكنيك العملى لعمل البصمة الوراثية:-

يجب دراسة الاختلافات فيما يقرب من عدة مئات من الوحدات المتكررة(STR) والتى يتكون كل منها من (١٥-٦٠) قاعدة مزدوجة. وهذه التقنية تسمح لنا بالتعرف على الإختلافات الوراثية فى النبات والحيوان داخل العشيرة الواحدة وبين العشائر المختلفة.

الطريقة العملية:

يتم إستخدام DNAعالى النقاء اما فى حالة الحيوان يتم إستخلاصه من الدم.

١. بتم هضم ما يقرب من ٥ميكروجرام من العينة المراد تحليلها باستخدام أنزيمات القصر وغالبا تستخدم كل من الإنزيمات (Hinf I, Hae II, Mbo I, Alu I) وهذه الإنزيمات تساعد على تجزئة ال DNA إلى أجزاء صغيرة بسبب قدرتها على القطع فى أمكن كثيرة ومتكررة على طول ال DNA وبالتالى فإن القطع الكبيرة الباقية والتى لم تقطع هى فى الغالب تتابعات ذات تكرار عالى والتى يمكن إستخدامها لعمل البصمة الوراثية.

٢. إجراء الفريد الكهربى على جل الأجاروز حتى يتم تفريد جميع شظايا المادة الوراثية على مسافات مناسبة.

٣. مقارنة الوقت والتفريد الخاص بالعينة المختبرة مع عينة تجريبية معلومة التركيب وذات شظايا معروفة الحجم.

٤. نقل الـDNA من على الجيل إلى الورق الراشح عن طريق تقنية (ساذرن)السابق شرحها وذلك لإعدادها للتهجين مع المسبر.

٥. يتم إضافة المسابر المعلمة إشعاعيا(ويكون عبارة عن تتابع معلوم يتكون من ١٢-٦٠ قاعدة مزدوجة) إلى الورق الراشح ثم تترك لفترة من الزمن حتى يمكنها التكامل من الشظايا المكملة لها من ال DNA.

٦. الشظايا التى هجنت مع المسابر المشعة يمكن التعرف عليها بسهولة حيث أنها تكون مشعة هى الأخرى.

٧. يتم إزالة المجسات الزائدة التى لم تهجن مع الـ DNAعن طريق غسيل الورق الراشح بمحاليل معينة.

٨. يتم تعريض الورق الراشح إلى فيلم أشعة إكس للحصول على صورة من البصمة الناتجة.

ويكون الناتج النهائى لهذه البصمة الوراثية هو عبارة عن نموذج من الـ DNA المميزة للفرد (ويكون حوالى ١٠-٢٥٪ من هذه القطع متجانس بين أى فردين على

سبيل الصدفة) ما عدا فى حالات التربية الداخلية أو فى حالة التوأم. ويستخدم هذا التكنيك غالبا فى تحديد القرابات بين الأفراد أولدراسة البنوة والأبوة، كما يمكن مقارنة العشائر صغيرة الحجم حتى تقل الفروق الفردية، وبالتالى فإنه يمكننا الحصول على نماذج للشظايا ذات بصمة مميزة للعشيرة.

تحليل النتائج:-

(تقدير نسبة الأصالة الوراثية (Homozygosity) للفرد والعشيرة).

عن طريق معرفة عدد الشظايا فى نموذج البصمة الوراثية للفرد أو العشيرة يمكننا تقدير نسبة الأصالة الوراثية (Homozygosity). فإذا قل عدد الشظايا فى نموذج البصمة الوراثية كان ذلك دليلا على أرتفاع نسبة الأليلات الأصيلة فى الفرد أو العشيرة موضع الدراسة.

(تقدير نسبة التشابه) (Similarity Index).

لقياس مقدار التشابه بين أى فردين يجب تحديد عدد الشظايا المشتركة بين نموذج كل منهما ثم مضاعفة هذا الرقم بالضرب فى أثنين ثم قسمته على العدد الكلى للشظايا فى كلا من النموذجين. وبالطبع فإن نسبة نموذج البصمة الوراثية لكل منهما يزداد بزيادة درجة القرابة.

(التباينات المنحدرة من العشيرة) (Population Subdivision).

عن طريق تقدير التباين الوراثى فى موقع وراثى واحد (One single locus) نستطيع أن نتعرف ونقدر التباينات والأقسام المختلفة المنحدرة من العشيرة. ويتم أختبار ذلك عن طريق دراسة نسبة التشابه والأختلاف بين الأفراد داخل العشيرة. و ذلك عن طريق أجراء أختبار أحصائى بسيط لأختبار معنوية الفروق بين من عشيرتين مختلفتين.

كيف يمكننا أستغلال هذا التكنيك للحفاظ على الأصول الوراثية؟

العلاقات ما بين الأفراد:

(Relationships between individuals):

هذه التقنية هامة جدا فى تحديد ماإذا كانت العشيرة قد فقدت قدر كبير من التباين الوراثى فيها بسبب أحتوائها على عدد صغير من الأفراد أم لا. لذلك فهي مفيدة جدا فى برامج التربية التي تجرى في الأماكن المغلقة مثل حدائق الحيوان مثلا، حيث يحرص المشرفون على برامج التربية أجراء التهجين بين الأنواع غير القريبة وراثيا.

معرفة مستوى النقاء الوراثى فى العشائر والأفراد:

أن أرتفاع نسبة الأصالة الوراثية فى عشيرة ما، يدل على حدوث التربية الداخلية(Inbreeding). هذا بالطبع يهدد كفاءة العشيرة ويشير إلى أنه يجب مراقبة السلوك التزاوجى فى هذه العشيرة حتى يمكن الحفاظ عليها.

درجة التقسيم فى العشيرة (Population subdivision):

أذا كانت نسبة التشابه الوراثى بين مجموعتين من الأفراد داخل العشيرة قليلة، كان ذلك دليلا يأن التدفق الجينى (Gene flow) بين هاتين المجموعتين قد أنخفض وبالتالى يجب أعتبار كلا منهما مجموعة مستقلة عند دراستها.

التحليل الجنائى للحياة البرية (Wildlife forensics):

نظرا لأن البصمة الوراثية متفردة ومميزة لكل فرد على حدة فأنه يتم أستخدامها الأن فى الكشف عن جرائم الأعتداء على الحياة البرية والصيد غير المشروع فى الأماكن المحرم الصيد فيها.

obeikandl.com

obeikandl.com

تكنيكات الـ PCR
تقنيات معتمد على تفاعل الـ PCR

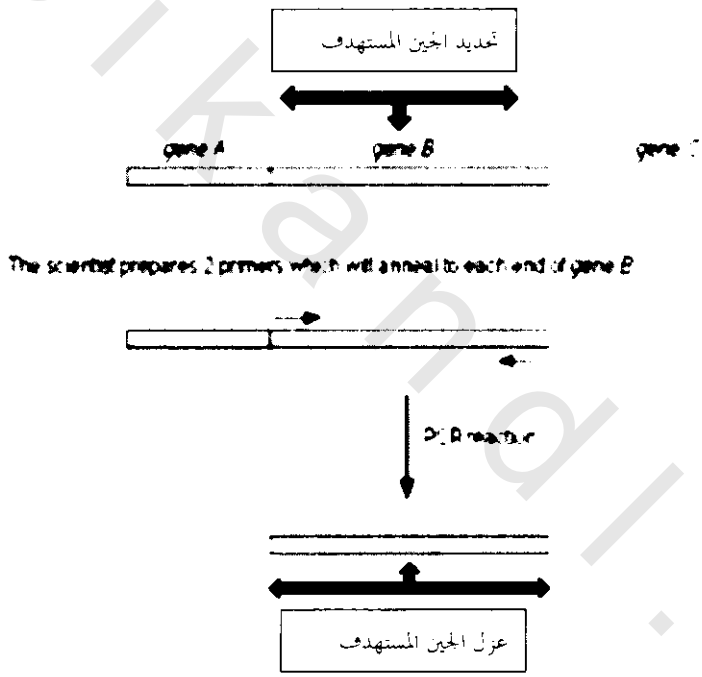
obeikandl.com

(١) تفاعل (RAPD PCR) (التضاعف العشوائي للمادة الوراثية:

يعتبر تفاعل الـ RAPDاحد تقنيات الـ PCRولكنة يعمل علي تضاعف قطع من الـ DNA(المادة الوراثية) والتي بالضرورة تكون غير معروفة (مجهولة) بالنسبة للعلماء (عشوائية).

وفي الغالب يستخدم الـPCR لعزل و تضاعف قطع معلومة من تتابعات الـ DNA. ولذلك يقوم العلماء باختيار وتحديد قطعة او تتابع الـDNAالمستهدف ثم يقوموا بتصميم بوادئ (Primers) ترتبط بالمنطقة المحيطة للتابع المستهدف للقيام بعملية التضاعف لقطعة الـDNAالمحددة

- فمثلا (كما يظهر بالصورة)، شكل (١٤٢).



شكل ١٤٢

- فمثلا اذا كانت قطع الـDNAالمستخدمة تحتوي علي ثلاث جينات مختلفة يقوم العلماء ببناء بؤادي لعزل احد هذة الجينات فقط (مثلاًجينB) والذي يتم تضاعفة عن طريق تفاعل الPCR.

ولكن في تحليل الـ RAPD تكون قطعة الDNA المرغوبة غير معروفة ولذلك يقوم العلماء بتصميم بؤادي ذات تتابع عشؤائي .بعبارة اخري يقوم العلماء بتخليق

obeikandl.com

عشرة قواعد بشكل عشوائي اويقوم الحاسب بهذا العمل ثم يتم تصميمها وانتاجها. ثم يقوم العلماء بعمل تفاعل الPCRوتفريد النواتج علي جيل اجاروز لرؤية قطع الDNA المتضاعفة والناتجة من وجود البادي العشوائي.

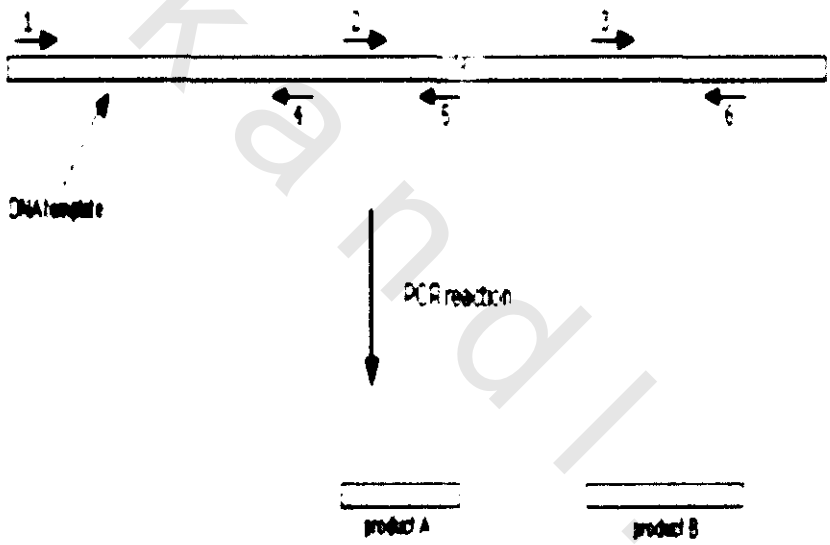
ويجب ان نتذكر ان لكي نحصل علي نتائج من الـRAPD-PCR:-

١- يجب ان يكون اتجاة البؤادي متعاكس في الاتجاة.

٢- ان تكون المسافة بين البؤادي معقولة اي ليست كبيرة جدا او صغيرة جدا.

ويظهر الشكل التالي كيفية تضاعف قطعتين من الـDNA(A)و(B) علي الرغم من وجود ٦ بؤادي.

وكما يظهر في الشكل (١٤٣) :-



شكل ١٤٣

- فمثلا القطعة(A)نتجت من البادى (2)و(5) اما القطعة (B)نتجت من البادى (3)و(6)

وذلك لتوافر الشروط سالفة الذكر من حيث المسافة والاتجاة.

وكما يظهر الشكل فان الاسهم تمثل نسخ من البادي والتي جميعها تحمل نفس التتابع.ويمثل اتجاة سهم اتجاة تخليق الـ DNA. وتمثل الارقام من(١) الي (٦) المواقع

obeikandl.com

علي خيط الDNAالقالب والذي يرتبط بة البؤادي. البؤادي ١ , ٢ , ٣سوف ترتبط بالخيط العلوي اما البؤادي ٤،٥،٦سوف ترتبط بالخيط السفلي.

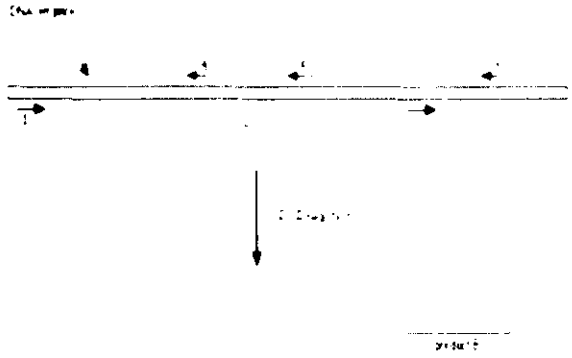
ويظهر الشكل (١٤٤) التالي كيفية حدوث التضاعف بين بادئين (١)،(٢)

شكل ١٤٤ : (ايجاد اختلافات وراثية بين جينومين باستخدام تحليل الRAPD)

بالنظر الي الصور السابقة يمكن ان نستنتج بإننا اذا استخدمنا جينوم مختلف او قالبDNA مختلف سوف نحصل علي نتائج مختلفة بين العينات المختلفة.

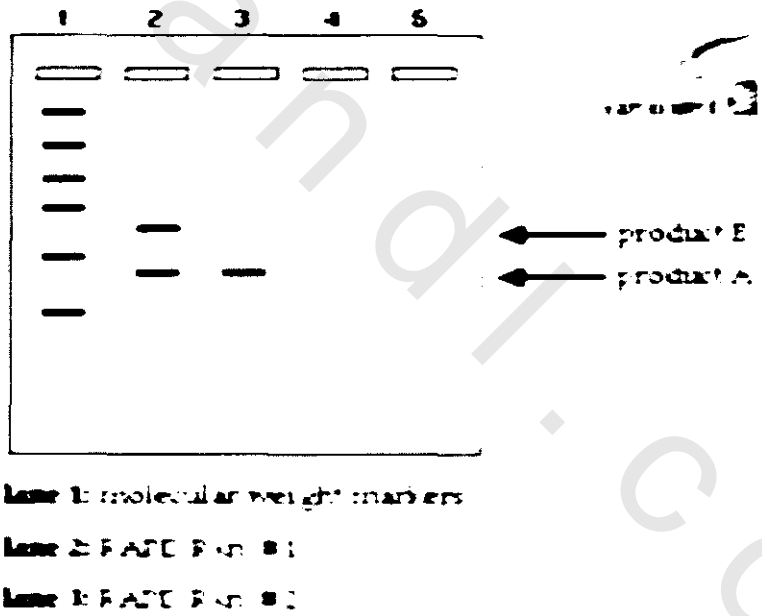
- مثلا:-

اذا افترضنا ان هناك تغير في منطقة اتصال القالب بالبادي رقم٢ فسوف نجد ان البادي لن يستطيع الالتحام بالقالب وبالتالي ان القطعة(A) لن تنتج من التفاعل.كما يوضح الشكل.



التفريد الكهربي علي الجيل:-

بعد إجراءالتفاعلين السابقيين يتم تفريد النتائج علي جيل الاجاروز كهربيا وسوف تظهر النتائج كما توضح الصورة التالية (شكل ١٤٥) حيث سيظهر قطعتين في التفاعل الاول(AوB) اما التفاعل الثاني س ظهر به قطعة واحدة (B).



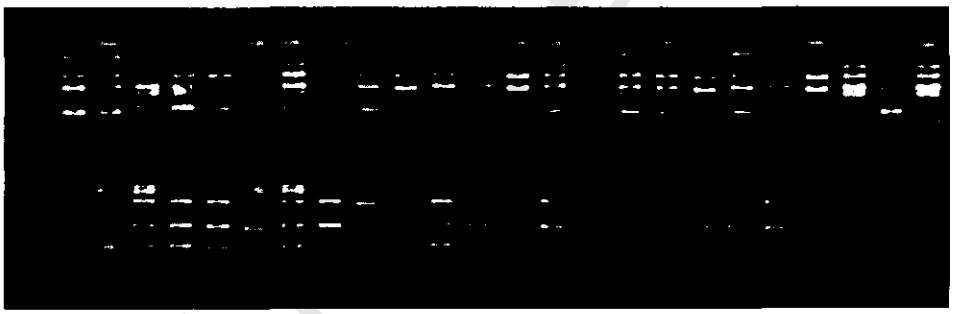
شكل ١٤٥

(٢) تكنيك الـ ISSR (التتابع البسيط البيني المتكرر)

ما هو تكنيك التتابع البسيط البيني المتكرر:-

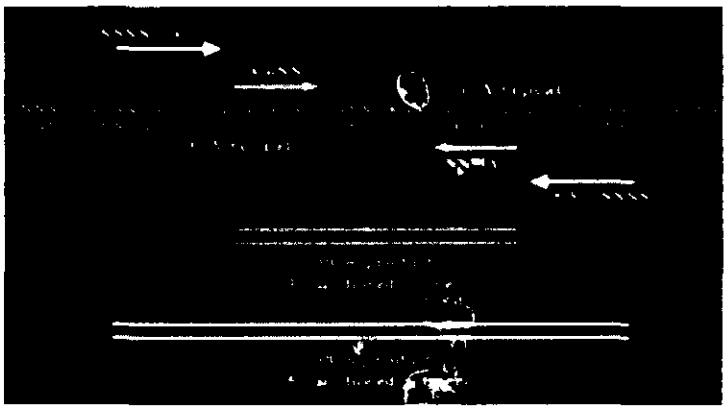
هو تكنيك لانتاج واسمات جزيئية وقد تم تطويرة حديثا لاكتشاف الاختلافات الوراثية داخل مناطق التتابع البسيط المتكرر وهو تكنيك بسيط وعشوائي ومشابهة لتكنيك الـ RAPD في البساطة والعشوائية حيث انة لا يحتاج الي معرفة مسبقة لتتابع الجينوم الذي سوف تتم دراستة. مناطق التتابع البيني البسيط هي مناطق قصيرة الطول وتتراوح احيانا من ١٠ الى ٢٠قاعدة مزدوجة وتتباين بشدة بين الافراد والكائنات المختلفة والعشائر والانواع المختلفة وقد تتكون من تكرار لقاعدة واحدة او ثنين او ثلاثة مثل (Aاو AGاوCGA.....وهكذا) والتي قد تكرر من اربع الي عشرة مرات. وتكنيك الISSRغالبا ما يستهدف مناطق التكرارت ثنائية وثلاثية القواعد لانها تميز الجينومات النووية(اما التكرارات احادية القواعد توجد في جينومات الكلوروبلاست).

قد اظهرت دراسة الاختلافات في مواقع الISSRانسب تقترب من النسب الوراثية المندلية (العالم تسميورا واخرون ١٩٩٧) كما في الشكل (١٤٦) التالى:



شكل ١٤٦

ان التباين الوراثي والاختلافات الكبيرة لتكنيك ISSRمقارنة بتكنيك الRFLPاوRAPDيجعل هذا التكنيك مثالي لعمل خرائط وراثية للانواع المختلفة(ناجاكوا وكوهيرا ١٩٩٧)ويظهر الشكل التالي تضاعف منطقة بين منطقتين في التتابع البسيط المتكرر باستخدام بوادئ تستهدف الطرف(5")(خارج المنطقة)اوالطرف(3") (داخل المنطقة)من مناطق (CA) المتكرر.



شكل ١٤٧

الطرق المختلفة لعمل تكنيك الISSR

في السنوات الاخيرة تم اختبار وتطوير عدة بروتوكولات لدراسة التباين الوراثي وتقدير في وراثة العشائر والدراسات الوراثية الاخري باستخدام تكنيك الISSR.

مميزات تكنيك ISSR:-

- يحتاج الي كمية صغيرة جدا من الDNA(٥-٢٠نانوجرام)
- ينتج هذا التكنيك عدد كبير من الواسمات التي يمكن تكرارها عن اعادة التجربة.
- لقد تم تطوير هذا التكنيك للعمل اليا لمساعدة الباحثين في تحليل عدد كبير من العشائر ودراستها.
- يتغلب هذا التكنيك علي مشكلة ضرورة معرفة التتابعات المحيطة بالتتابعات المدروسة والتي يتطلبها تكنيك ال(SSR).

عيوب تكنيك ISSR:-

ينتج واسمات سائدة وبالتالي لايقدم معلومات كثيرة وجيدة عن جميع التتابعات الموجودة في الجينوم.

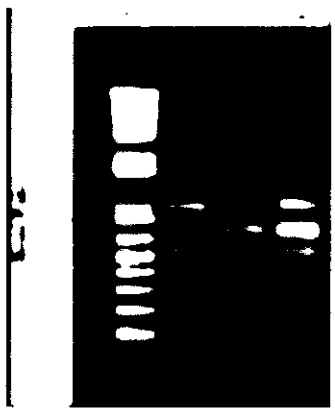
التقنيات المختلفة لاداء تكنيك ال ISSR

١. تكنيك الISSRباستخدام جيل الاجاروز:-

هو تكنيك سريع و ذو كفاءة عالية لدراسة التباين الوراثي وعمل الخريطة جينومية. يظهرهذا التكنيك التباين بين العينات والتي قد تختلف في اكثر من ٢٪ من

obeikandl.com

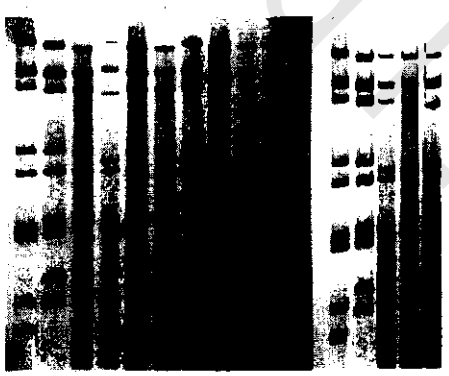
تركيبها الوراثي. ويعيب هذا التكنيك عدم قدرتة علي اكتشاف بعض القطع المنتجة ذات التضاعف الضعيف.(كما في الصورة)، شكل (١٤٨).



شكل ١٤٨

٢. تكنيك الISSRباستخدام جيل البولي اكريلاميد وصبغة السيلفر:-

هي طريقة ذات كفاءة عالية ويمكن الاعتماد عليها لاظهار التباين الوراثي . وهي اكثر امانا من الطرق المعتمدة علي العناصر المشعة ولكنها تحتاج الي عمل وجهد اكثر من طريقة جيل الاجاروز.

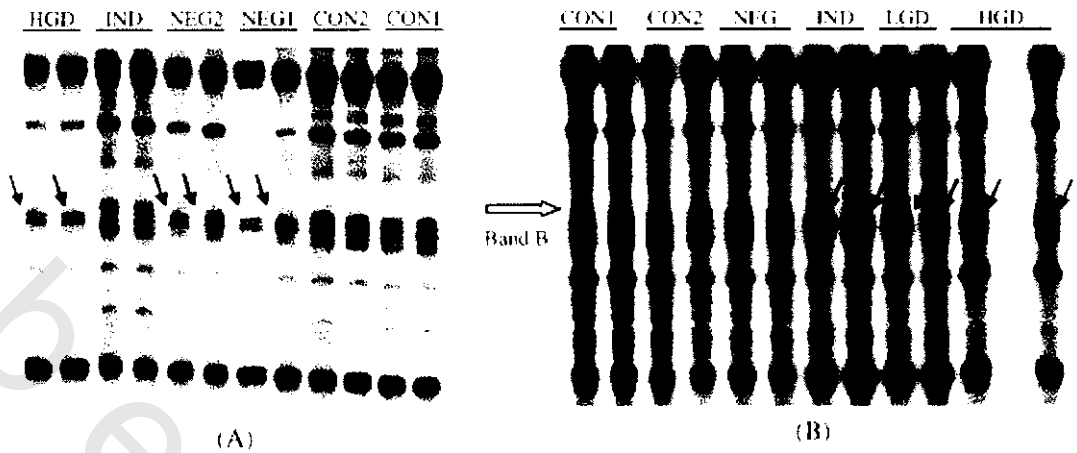


شكل ١٤٩

٣. تكنيك الISSRباستخدام العناصر المشعة:-

هو اكثر التكنيكات حساسية وكفاءة في اظهار التباين الوراثي ولكنة يحتاج الي جهد كبير وخطر التعرض للاشعاع الناتج من التفاعل مع العناصر المشعة.

obeikandl.com

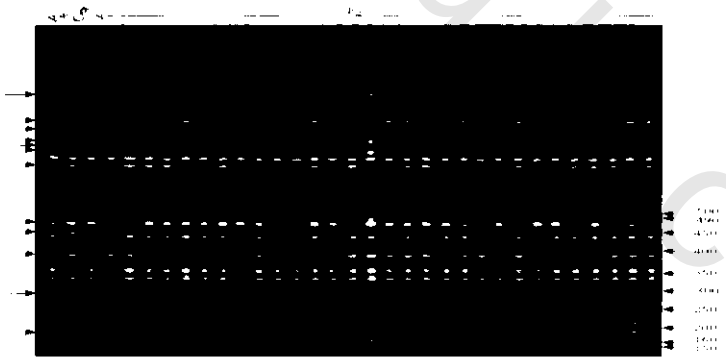


شكل ١٥٠

٤. تكنيك ISSRباستخدام الصبغات الفلوروسنتية(FISSR):-

تتميز هذة الطريقة بكلا من ميزة السرعة وميزة الحساسية والدقة ولكنة الاكثر تكلفة بين الطرق الاخري.

وقد تم تطوير هذة الطريقة للعمل اليا باستخدام قواعد او بوادئ معلمة فلوروسنتية وبالتالي قد تحتاج الي نظام الي للسلسلة . وتصلح هذة الطريقة لتحليل ودراسة عدد كبير من العينات.



شكل ١٥١

ملحوظة:-

١. يجب تكرار تضاعف تجربة ISSR لكل عينة مرتين علي الاقل.
٢. قد تظهر او تختفي بعض القطع عند التكرار علي حسب طبيعة واحتمالات وظروف تفاعل ال PCR.

٣. يتم حصر قطع ال DNA التي تظهر مرتين بعد اعادة التجربة مرتين لكل عينة وبادئ معين. ولا تحصر قطع ال DNAالتي تظهر مرة واحدة فقط عند تكرار التجربة.

٤. كل قطع DNAظهرت علي الجيل وتم حصرها (ظهرت مرتين) يتم اعتبارها قطعة سائدة في حين ان القطع التي لم يتم حصرها (لم تظهر مرتين) تعامل كقطعة متنحية (غير موجودة).

- يجب ملاحظة ان الافراد النقية (الاصلية) او الافراد الهجينة في احد القطع لا يمكن التفرقة بينهم باستخدام هذا التكنيك.
- ويمكن معاملة ذلك احصائيا بواسطة معامل (فاي).
- وتمثل مجموعة البوادئ التالية امثلة لتركيب البوادئ المستعملة في تكنيك ال ISSR.

Name*	Sequence
814	(CT)8TG
844A	(CT)8AC
844B	(CT)8GC
17898A	(CA)6AC
17898B	(CA)6GT
17899A	(CA)6AG
17899B	(CA)6GG
HB 8	(GA)6GG
HB 9	(GT)6GG
HB 10	(GA)6CC
HB 11	(GT)6CC
HB 12	(CAC)3GC
HB 13	(GAG)3GC
HB 14	(CTC)3GC
HB 15	(GTG)3GC

شكل ١٥٢

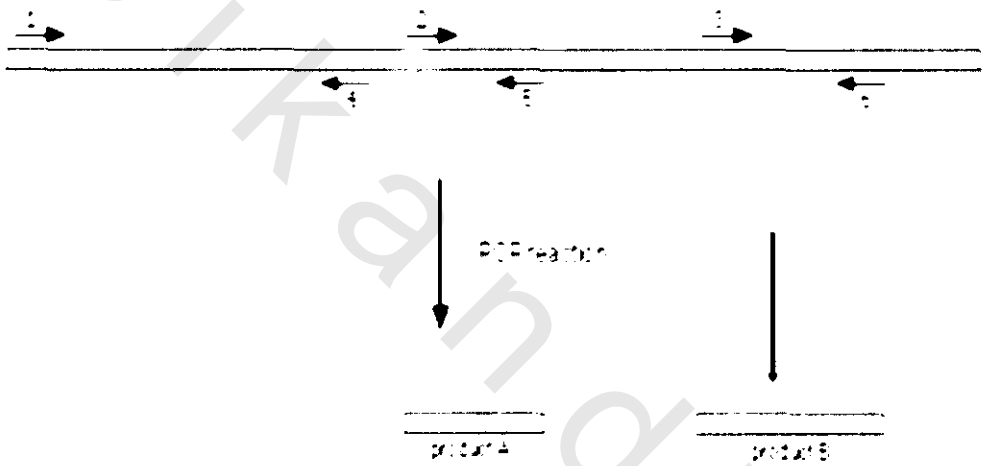
obeikandl.com

(٣)تكنيك (Triple RAPD) تكنيك تضاعف الـ DNA المتباين عشوائيًا ثلاثي البوادئ

يعمل تكنيك ال(RAPD) (تضاعف الDNA المتباين عشوائيا) علي تضاعف قطع من الـ DNAمجهولة وعشوائية. يقوم العلماء بتصميم بؤادي ذات تتابعات عشوائية. تم تطوير استراتيجية جديدة لزيادة قدرة تفاعل الRAPD في اظهار التباين الوراثي عن طريق استخدان ثلاث بوادئ مختلفة التركيب وعشوائية في التفاعل الواحد.

يجب ان نتذكر ان في تفاعل الRAPD العادي يتم استخدام بادئ واحد فقط ويجب ان نتذكر انة يجب ان يتوفر شرطين لحدوث التفاعل وانتاج قطع متضاعفة:-

١. شرط الاتجاة (تكون البوادئ متعاكسة)مثل البادئ (٥،٢) أو (١،٣) أو (١،٤).
٢. ان تكون المسافة بين البوادئ معقولة مثل (٥،٢)او(١،٣).



شكل ١٥٣

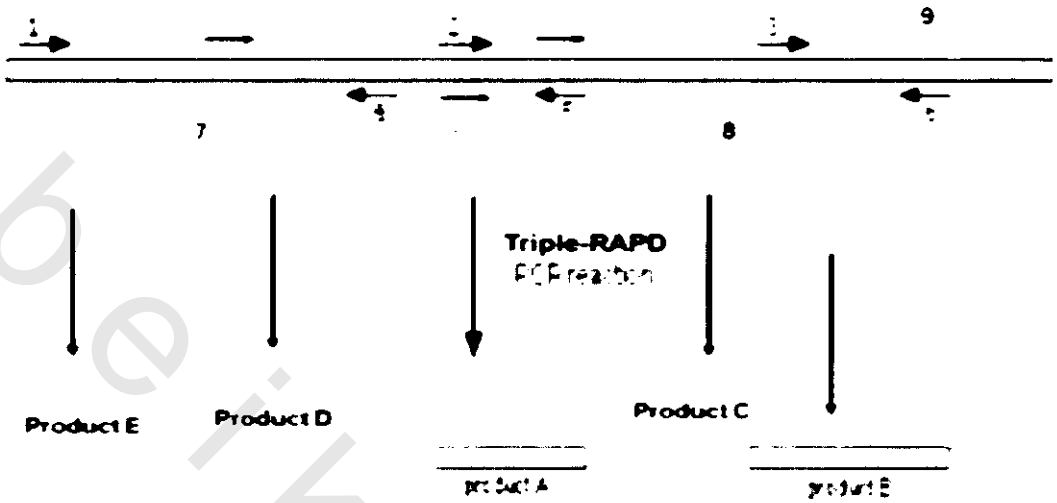
- عندئذ توافر الشرطين تظهر نواتج التفاعل كما في الصورة (قطعةA)،(B).
- وعلي الرغم من ذلك فان قدرة تفاعل الـ RAPDالاصلي قد زادت بشكل كبير عند استخدام بادئيين في التفاعل الواحد وذلك كما اظهرة العالم(كلن لانكهورست واخرون سنة ١٩٩١) كما يظهر في الصورة فان هناك قطع جديدة ظهرت وهي (C).

تكنيك الـ RAPD ثلاثي البؤادي:-

قد تم تطوير هذا التكنيك بواسطة د/ احمد منصور الزهيري واخرون سنة ٢٠٠٨ ويعتمد هذا التكنيك علي استخدام ثلاث بوادئ متباينة التركيب وذات صفات تفاعلية مشتركة وقد اظهر هذا التكنيك كفاءة عالية في اظهار التباين الوراثي بين الجينومات المختلفة وظهور قطع متضاعفة جديدة لم تكن متواجدةعند استخدام كل

obeikandi.com

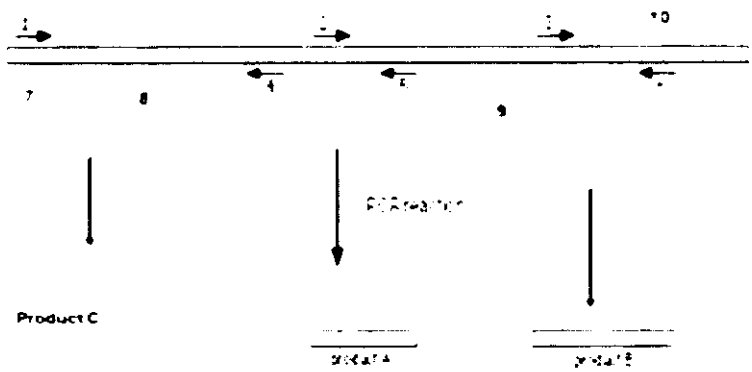
بادئ علي حدة كما هو موضح بالصورة فالقطع (C)،(D)،(E) ظهرت عند استخدام الثلاث بوادئ معا، (شكل ١٥٤).



شكل ١٥٤

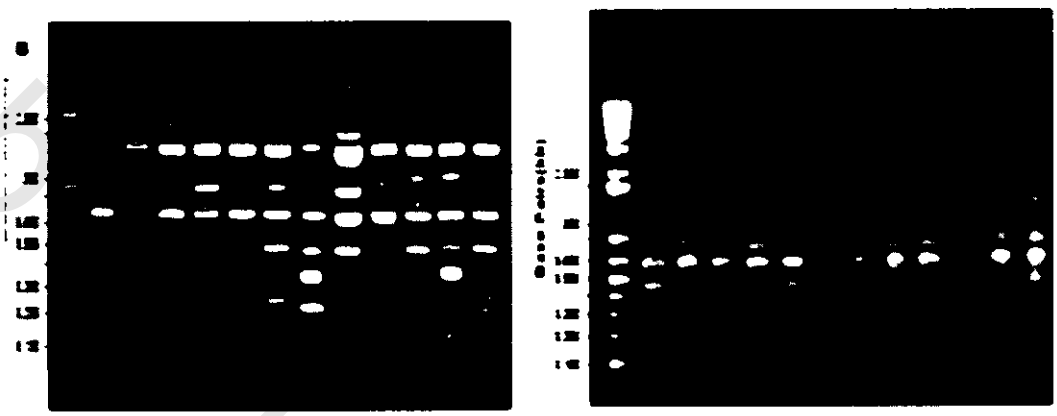
ويتميز تكنيك الRAPD ثلاثي البوادئ بقدرتة علي اظهار التباين الوراثي بين التراكيب الوراثية المختلفة عن طريق (شكل ١٥٥):-

١. ظهور قطع متضاعفة جديدة لم تظهر بأستخدام البوادئ الثلاثة منفردة
٢. عدد القطع الناتجة من اضافة الثلاث بوادئ معا اكثر من المجموع البسيط الكلي لكل بادئ علي حد
٣. عدد واحجام القطع الناتجة تختلف علي حسب تتابع البوادئ وعينة الDNA
٤. عينات الDNA المأخوذة من مصادر مختلفة تنتج اختلافات واضحة في نواتج التفاعل موضحة التباين الوراثي
٥. يظهر قدر كبير من التباين بين العينات المختلفة
٦. تتراوح احجام القطع الناتجة من ١٠٠ قاعدة الي ٢٠٠٠ قاعدة.



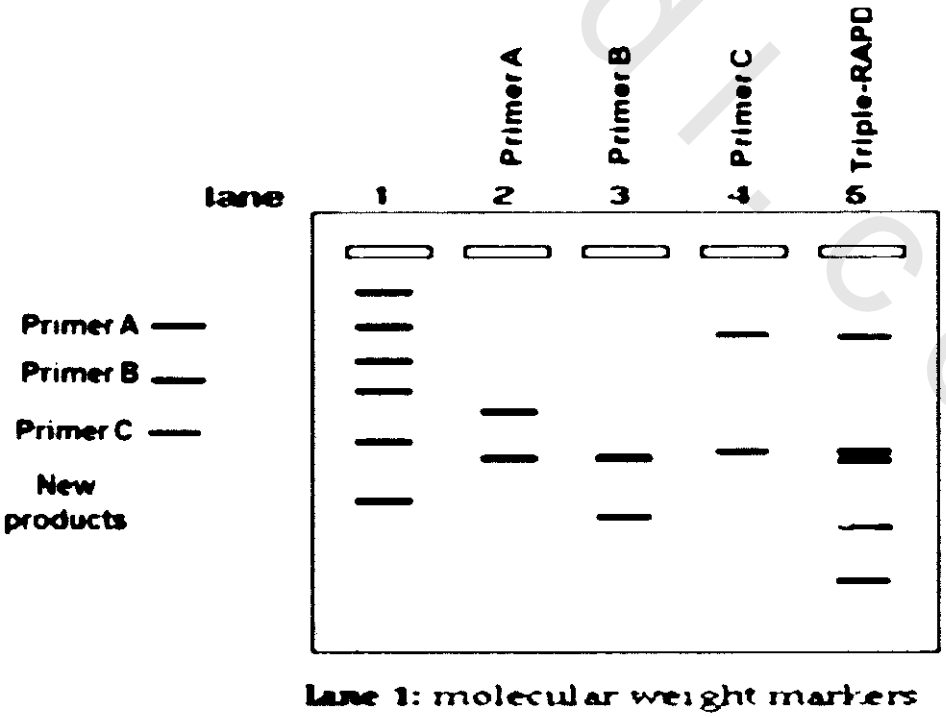
شكل ١٥٥

- يوضح الشكل التالي صورة تبين الفرق بين نواتج تفاعل ال RAPDالعادي (بادئ واحد) وبين ال RAPDالثلاثي (ثلاثة بوادئ). (لاحمد منصور الزهيري واخرون ٢٠٠٨)، (شكل ١٥٦).



شكل ١٥٦

- يوضح الشكل التخطيطي التالي الفرق بين نواتج الRAPD العادي باستخدام بوادئ (A)،(B)،(C) منفردة وبين استخدام الثلاث بوادئ معا في تكنيك الRAPD الثلاثي، (شكل ١٥٧).



شكل ١٥٧

ويلاحظ ظهور قطع جديدة لم تكن موجودة في تفاعل تكنيك الـRAPD الثلاثي لم تكن موجودة في التفاعلات المنفردة.

- المرجع (Mansour et al 2008)

Mansour A, Omayma M. Ismail, Solliman M. Mohei EL-Din. **(2008)** Diversity assessments among Mango (*Mangifera indica* L.) cultivars in Egypt using ISSR and three-primer based RAPD fingerprints. *The African Journal of Plant Science and Biotechnology* **2(2)**, 87-92.

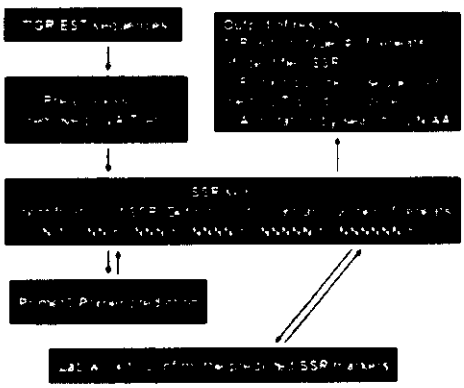
(٤) تكنيك الـ SSR (تفاعل التتابع البسيط المتكرر)

تحليل التتابع البسيط المتكرر:- (الفكرة الاساسية)

توجد مناطق التتابع البسيط المتكرر(ميكروساتالايت)في جميع جينومات اوليات وحقيقات النواة.

التكررات ثنائية القواعدمثلn(CA)اوn(GA)هي الاكثر تكرارا في معظم حقيقيات النواة(علي سبيل المثال في الانسان مناطق تكرارالn(CA)توجد كل ٣٠الف قاعدة)

التغير في اعداد التكرارات في الجينومات المختلفة يظهر التباين الوراثي في مناطق التتابع البسيط المتكرر والذي يمكن الكشف عنة عن طريق تصميم بؤادي لتستهدف تضاعف المناطق المحيطة بهذة المناطق عن طريق الPCRويلي ذلك رؤيتة علي جيل الاجاروز او البولي اكريلاميد. من الممكن ان تتم عملية التضاعف والفحص اتوماتيكيا عند استخدام بؤادي معلمة بصبغات فلوريسنتية.



شكل ١٥٨

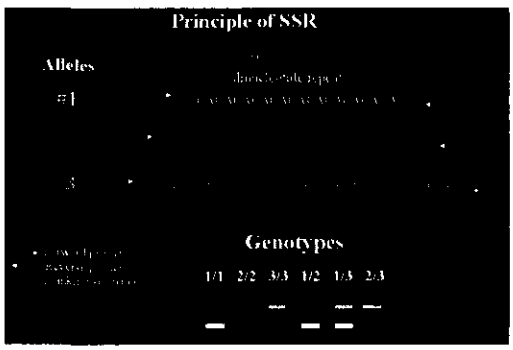
المميزات:-

- يحتاج هذا التكنيك الي كمية صغيرة جدا من الDNA(حوالي ٥ نانو جرام).
- تعطي هذة الطريقة واسمات حزيئية ذات سيادة مشتركة(CO-dominant)ويمكن تكرار النتائج بين المعامل المختلفة.
- امكانية عمل التحليل بالكامل اليا بما في ذلك امككانية دراسة اكثر من موقع في نفس الوقت باستخدام عدد من البوادي المعلمة لدراسة حجم وعدد اكبر من الجينومات المختلفة في دراسة العشائر.
- بالاضافة الي كون واسمات التتابع البسيط المتكرر واسمات متميزة لعمل الخرائط الوراثيةفهي ايضا مفيدة جدا في دراسات وراثة العشائر وتحديد التنوع الحيوي ونقاء البذور وكفاءة الهجين ومتابعة الجينات وتقييم الاصناف الوراثية بالاضافة الي دراسات القرابة والتطور وحفظ الاصول الوراثية واللطب الشرعي.
- ويظهر الشكل التالي الخطوات المختلفة للتعرف وعزل مناطق الSSR:

١. البحث في قواعد البيانات الجينومية مثل (TIGR).
٢. ازالة مناطق T، Aالمتكررة والمذيلة للتتابعات.
٣. البحث عن مناطق (SSR)بالتكرارات الموضحة بالصورة.
٤. تصميم بوادي لعزل منطقة الSSR.
٥. التجربة المعملية للتاكيد عن صحة منطقة الSSRالتي تم التنبا بها.
٦. الحصول علي النتائج المرغوبة.

- يوضح الشكل التالي كيفية التعرف علي التباين الوراثي باستخدام تقنية التتابع البسيط المتكرر(SSR).تمثل الاسهم في الصورة البوادئ المتعاكسة الاتجاة والتي تعمل علي تضاعف التتابع المرغوبn(CA)في نفس الموقع والذي تختلف اطوالة من جينوم الي اخر.

يظهر الجيل في نهاية الصورة الاطوال المتباينة والتوافيق الممكنة بينهما في الجينومات المختلفة، (شكل ١٥٩).



شكل ١٥٩

عيوب تكنيك التتابع البسيط المتكرر(SSR):-

- يتطلب تحليل ال(SSR) معرفة مسبقة بالتتابعات المحيطة بمنطقة(التتابع البسيط المتكرر) حيث يمكن تصميم بوادئ خاصة بها وهذا يحتاج الي عمل وجهد معملي كبير.

(الطرق المختلفة لدراسة SSRالتتابع البسيط المتكرر)

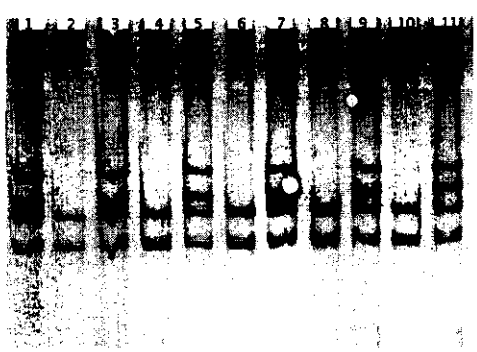
١. دراسة وتحليل مناطق الSSR باستخدام التفريد الكهربي للجيل اجاروز:-

هو تكنيك سريع وكفؤ لدراسة التباين الوراثي وعمل الخرائط الوراثية وهذه الطريقة ذات كفاءة عالية للتفرقة بين منتجات التفاعل التي تختلف في ٢٪ فقط فيما بينها . ويمكن استخدام ودراسة اكثر من منطقة في وقت واحد، (شكل ١٦٠).

شكل ١٦٠

٢. دراسة وتحليل مناطق الSSRباستخدام التفريد الكهربي لجيل البولي اكريلاميد وصبغة السيلفر:-

هو تكنيك جيد ويمكن الاعتماد علية للفصل الدقيق بين نواتج تفاعل الSSRوهواكثر دقة من التكنيك السابق باستخدام الاجاروز وهو تكنيك امن حيث لا يتم اسنخدام العناصر المشعة فية ولكن يحتاج الي عمل وجهد اكثر من تكنيك جيل الاجاروز، (شكل ١٦١).

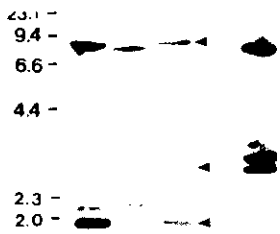


شكل ١٦١

٣. **دراسة وتحليل مناطق(SSR)باستخدام العناصر المشعة:-**

هو اكثر التكنيكات حساسية ودقة ولكنة يحتاج الي عمل وجهد كبير بالاضافة الي مخاطر التعرض للعناصر المشعة، (شكل ١٦٢).

شكل ١٦٢



٤. **دراسة وتحليل مناطق ال(SSR)باستخدام القواعد الفلوريسنتية:-**

هو احد الطرق الدقيقة لتقدير كثافة وحجم القطع الناتجة ويمكن عملة بشكل آلي بنظام السلسلة ويعمل بكفاءة عند دراسة مواقع متعددة في الجينوم، (شكل ١٦٣).

شكل ١٦٣

obeikandl.com