جامعة حماة

كلية الصيدلة

السنة الخامسة

مقرر التقانة الحيوية

المحاضرة الثامنة

اعداد : ابتسام جرجنازي

إشراف : د. ظلال قطان

استخدام التقانة الحيوية في تشخيص الأمراض الجرثومية والفيروسية

إن طرق تشخيص الأمراض الجرثومية التقليدية (الزرع الجرثومي – الاختبارات الكيميائية الحيوية (نظام API 20E)) لم تعد دقيقة النتائج لذلك يجب استخدام تقانات جديدة يمكنها الكشف عن العامل الممرض (أو أكثر من عامل ممرض) في نفس الوقت وبدقة كبيرة وذلك على مستوى المادة الوراثية التي تشكل بصمة تميز كل كائن عن آخر حيث لا مجال للتشابه أو النتائج المغلوطة، وسنستعرض عدة أنواع لتفاعل البوليمراز التسلسلي التقليدي PCR .. وسنبدأ بتذكرة عنه.

أولاً: تفاعل البوليمراز التسلسلي التقليدي Polymerase chain reaction PCR:

يعتبر تفاع ل الـ PCR من أهم التطورات النوعية في ثمانينيات القرن الماضي حيث سمح بتضخيم قطع معينة من الدنا وإنتاج ملايين النسخ منها وساهم في الكشف عن الأمراض الوراثية وتفرع عنه الكثير من التقانات الأخرى.

يعتمد مبدأ التضخيم على :

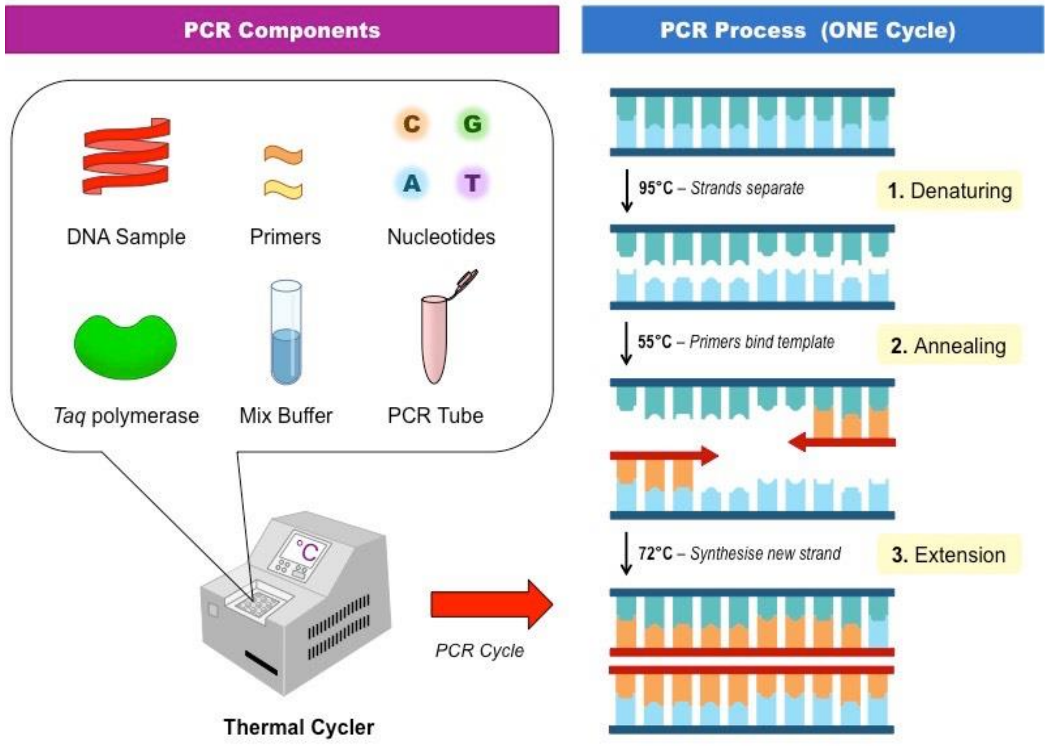
١- فصل سلسلتي الدنا الأصليين حيث تصبح كل واحدة منها قالباً لاصطناع سلسلة متممة لها.
٢- استخدام البوادئ Primers النوعية الخاصة للتتالي المراد تضخيمه حيث ترتبط بالتسلسل النكليوتيدي المتمم لها .
٣- يقوم أنزيم DNA polymerase بإضافة النكليوتيدات المتممة للقالب (مع العلم أنه يستخدم نوع من أنزيمات البلمرة المستخلص من جراثيم (المستحرة المائية) thermos aquaticus المسمى Taq DNA Polymerase.
٤- يحدث التفاعل بشكل متوالية هندسية تنتج ملايين النسخ من القطعة المطلوبة في غضون ساعات.

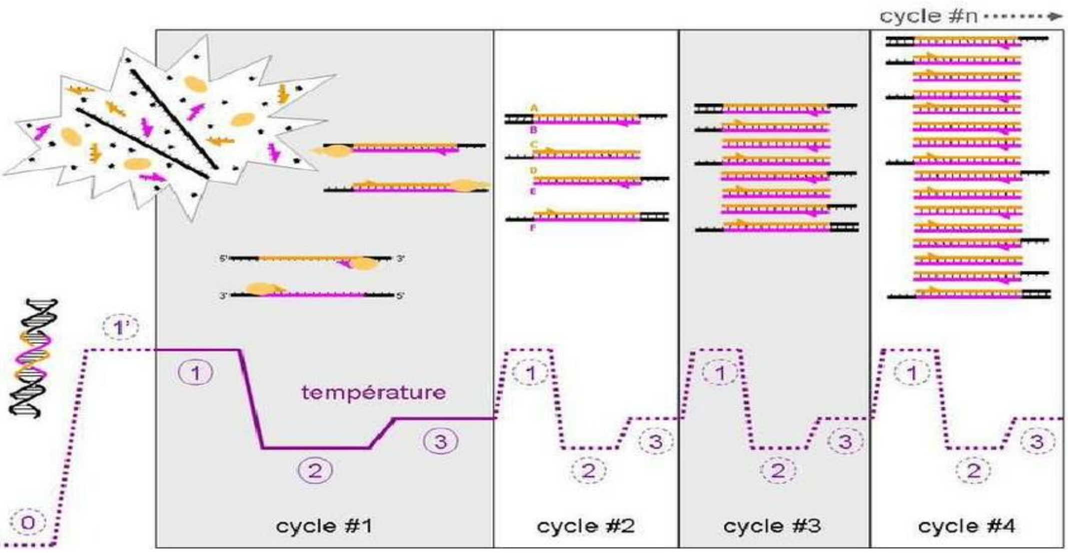
ويتألف تفاعل PCR من ثلاث خطوات أساسية تشكل جميعها مايسمى دورة حرارية thermocycle:

١- فصل سلسلتي الدنا المراد تضخيمه بدرجة الحرارة (٩٤-٩٥) درجة مئوية وتسمى هذه المرحلة بالدنترة أو التمسخ Denaturation.
٢- ارتباط البوادئ primers بالتسلسلات المتممة لها على درجة حرارة (٥٠-٦٠) تعتمد درجة الحرارة في هذه المرحلة على البرايمر المستخدم . وتدعى مرحلة ارتباط البوادئ Annealing.

٣- مرحلة الإطالة Extention حيث تتم في درجة حرارة (٧٢-٧٥) وتتضمن رصف النكليوتيدات المتممة لتسلسل الدنا القالب وذلك بواسطة أنزيم البلمرة Taq DNA polymeras.

بعد الانتهاء من التفاعل تفصل شدف الدنا الناتج عن التضخيم باستخدام الرحلان الكهربائي الذي يعتمد على شحنة الدنا السالبة التي تسمح له بالعبور من القطب السالب إلى الموجب عبر هلامة (أغاروز – بولي أكريل أميد) مع ترحيل العياريات في نفس الوقت (الدنا العياري (DNA Ladders)) الذي يتألف من قطع دنا معروفة الأحجام مسبقاً ويمكن عن طريقها مقارنة حجم قطع الدنا الناتج عن تفاعل pcr.

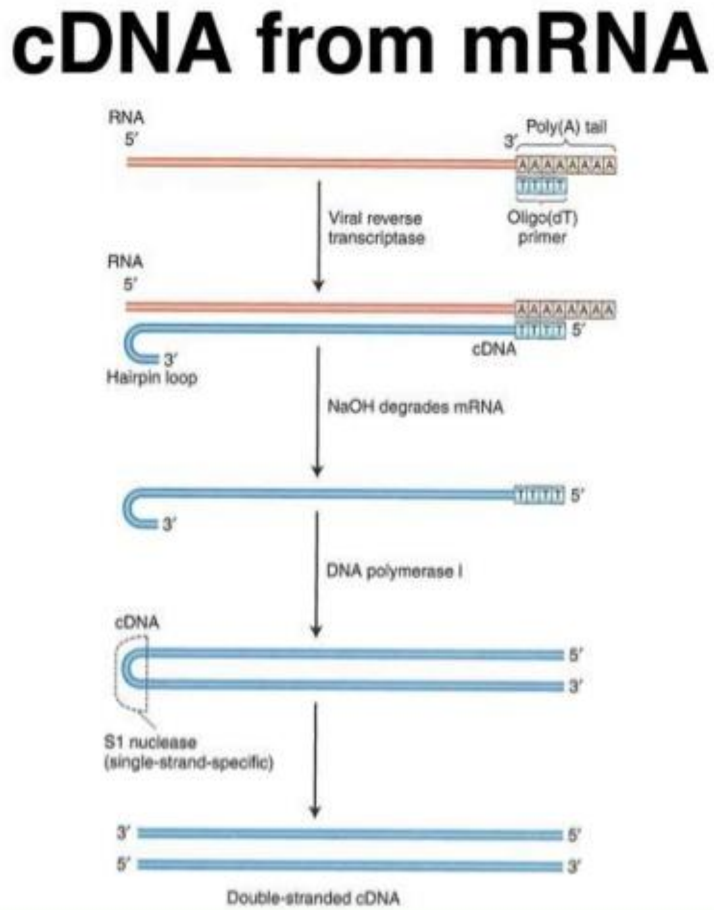




ثانياً: تفاعل البوليمراز التسلسلي بالنسخ العكسي

Reverse Transcription RT-PCR

- هو أحد تفاعلات الـ PCR التقليدي لكن المادة الوراثية المستخدمة هي (m(RNA بدلاً من ال DNA.
- يعتمد هذا التفاعل على مايلي:
- وجود عديد الأدنين Poly A في النهاية ٣َ لجزيء الرنا المرسال.
- استخدام برايمر مؤلف من عديد الثايمين Poly T .
- استخدام أنزيم النسخ العكسي، المستخلص من الفيروسات القهقرية.
- ينتج لدينا مايسمى Complementary DNA (cDNA)
- باستخدام برايمرات نوعية يتم بناء السلسلة المتممة للقالب بواسطة أنزيم دنا بوليمراز..



تطبيقات RT-PCR

- التحري عن جزيئات الرنا الفيروسي في مصل الأفراد الذين يشك بإصابتهم بفيروس معين كفيروس الإيدز، إذ يستخلص الرنا من بلاسما الدم ومن ثم يجري تفاعل RT-PCR ويرحل ناتج التضخيم ويقارن مع عينات شاهدة غير مصابة.

ثالثاً: تفاعل البوليمراز التسلسلي اللحظي والكمي

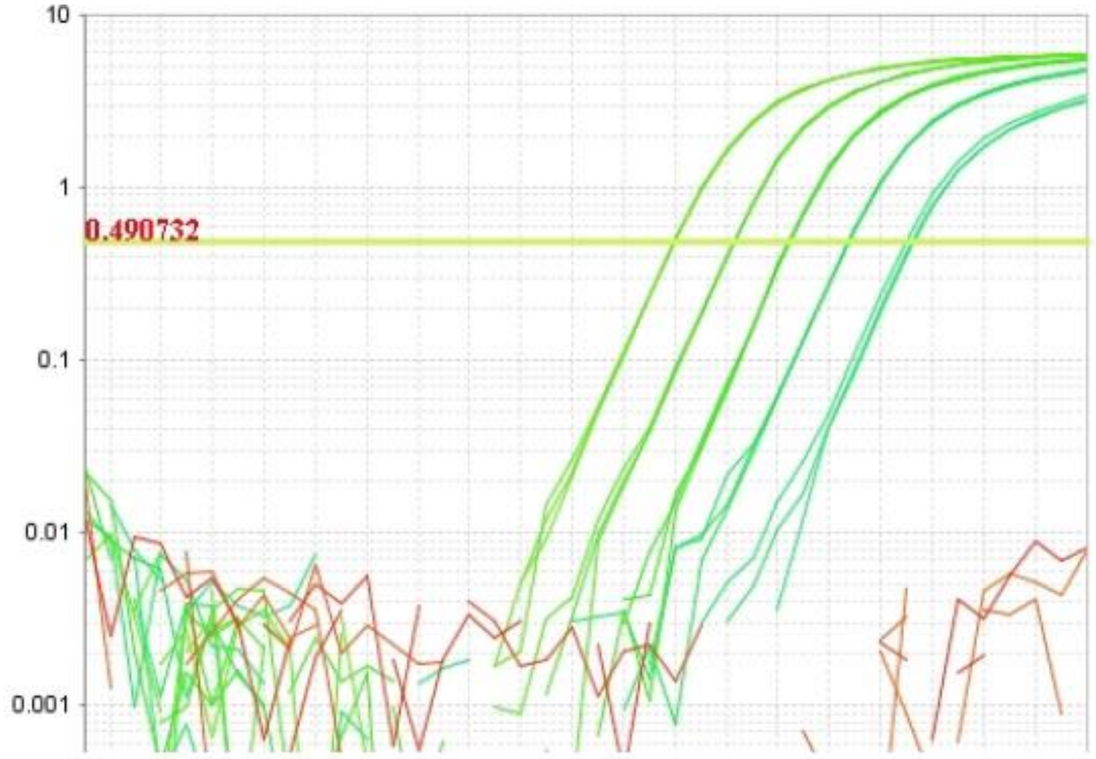
quantitative real time pcr q-PCR

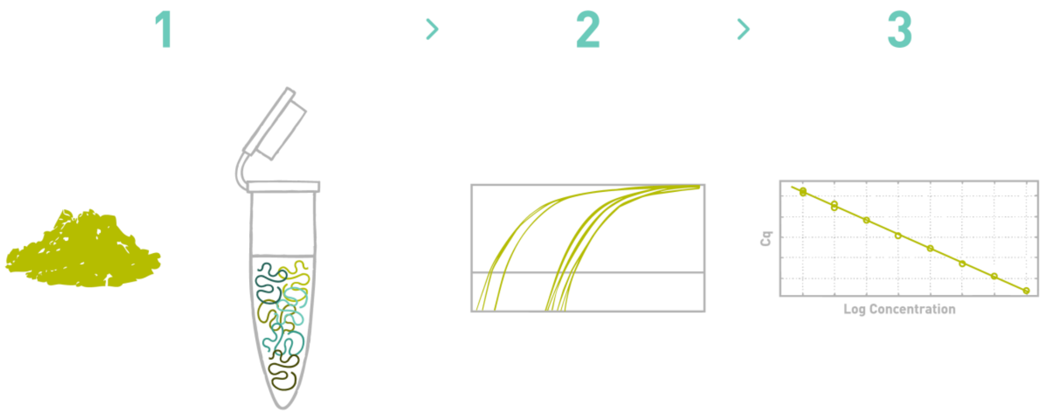
- تكمن المشكلة الأساسية في تفاعل ال PCR التقليدي بأنه يخضع للتثبيط بعد عدد معين من دورات التضخيم مما لا يمكن من تحديد عدد النسخ البدئية بشكل دقيق ، لأجل ذلك أجري تعديل على تفاعل PCRالتقليدي يقيس تراكم منتجات الدنا المضخم بشكل لحظي و كمي خلال الطور الخطي للتفاعل الأنزيمي وليس في نهاية التفاعل .

تطبيقات q-PCR

- إضافة إلى تحديد العدد البدئي لجزيء دنا محدد (فيروسي أو جرثومي) فإن التطبيقات المهمة لتفاعل q(PCR) هي قياس الفرق في التعبير الجيني لجين ما في مجموعتين خلويتين مختلفتين ، مثل استخدام الفارق في التعبير الجيني لإحدى الجينات الورمية بين خلايا الثدي السليمة والسرطانية ، الأمر الذي لا يمكن إجراءه بتفاعل PCRتقليدي، بسبب تراكم عدد نسخ دنا الجين الورمي بعد عدد من الدورات الذي يجعل من الصعوبة تقدير الاختلاف في عدد النسخ الأولية للرنا المرسال الناتج عن انتساخ الجين في عينتين مقارنتين.
- تستخدم للكشف عن نواتج التفاعل صبغات مفلورة مثل SYBER GREEN حيث ترتبط بجزيئات الدنا ثنائية الطاق وتزداد شدة الفلورة بشكل طردي مع تشكل جزيئات دنا جديدة نتيجة التضخيم.
- تجري مقارنة العينات عادة بمقارنة مايدعى بالدورة العتبة (Threshold cycle (CT وهي الدورة التي تبدأ فيها نواتج التضخيم بالتراكم فوق مستوى الفلورة البدئي وقيمتها ترتبط بعلاقة عكسية مع عدد النسخ البدئية للدنا مثلاً:

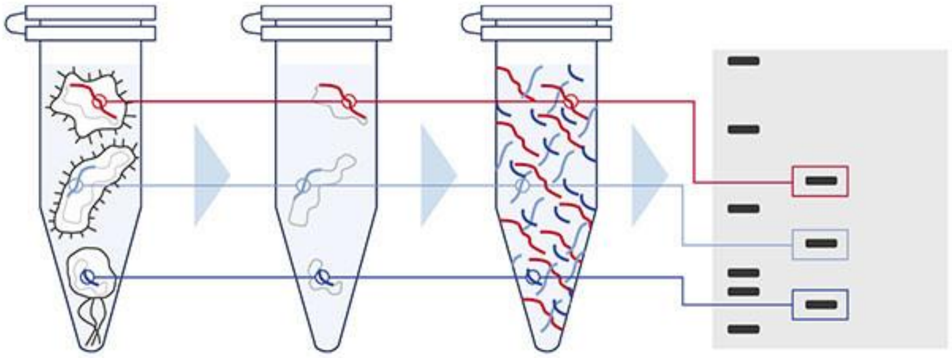
• كلما كان عدد جزيئات الدنا البدئي كبيراً كانت الإصابة الفيروسية كبيرة (أو التعبير عن الجين عالياً) فإن رقم CTيكون منخفضاً.





رابعاً: MULTIPLEX PCR

- نوع خاص من تفاعل PCR يستخدم للكشف عن عدة عوامل إمراضية في آن واحد وفي نفس العينة.
- يجب استخدام عدة برايمرات نوعية خاصة بكل عامل ممرض.
- مثلاً يمكننا الكشف عن وجود فيروس HIV وبكتريا في نفس العينة المرضية وفي تفاعل واحد عن طريق استخدام برايمرات نوعية خاصة بكل عامل ممرض.



تقانات التهجين:

تهدف هذه التقانات إلى الكشف عن جزيئات DNA أو RNA أو بروتين باستعمال كواشف موسومة ترتبط نوعياً بهذه الجزيئات بحيث تكون مسابير موسومة في حالتي الدنا والرنا وأضداد موسومة في حالة البروتينات .

وعلى الرغم من اختلاف أنواع الكواشف المستخدمة و طرق التحري ، تجتمع تقانات التهجين على مبدأ ارتباط جزيئتي دنا متكاملتين في التتالي النكليوتيدي أو ارتباط بعضهما مع بعض.أو ارتباط ضد مع مستضد وهو ما يدعى بالتهجين ، وهنا تبرز أهمية إلفة الارتباط بين الجزيئتين الذي يرتبط بشكل مباشر مع درجة التتام النكليوتيدي بين التسلسلين أو بين الضد والمستضد وعلى تطبيق شروط قاسية من الغسل

للتخفيف من الارتباطات غير النوعية بين الجزيئات ضعيفة الإلفة وغير المتتامة بشكل كلي في تسلسلاتها النكليوتيدية.

من أهم هذه التقانات (BLOTTING) تقانات التبقيع وتقانة (MICROARRAYS) المصفوفات الصغرية، وتقانة التهجين في الموضع ISH أو In situ hybridization .

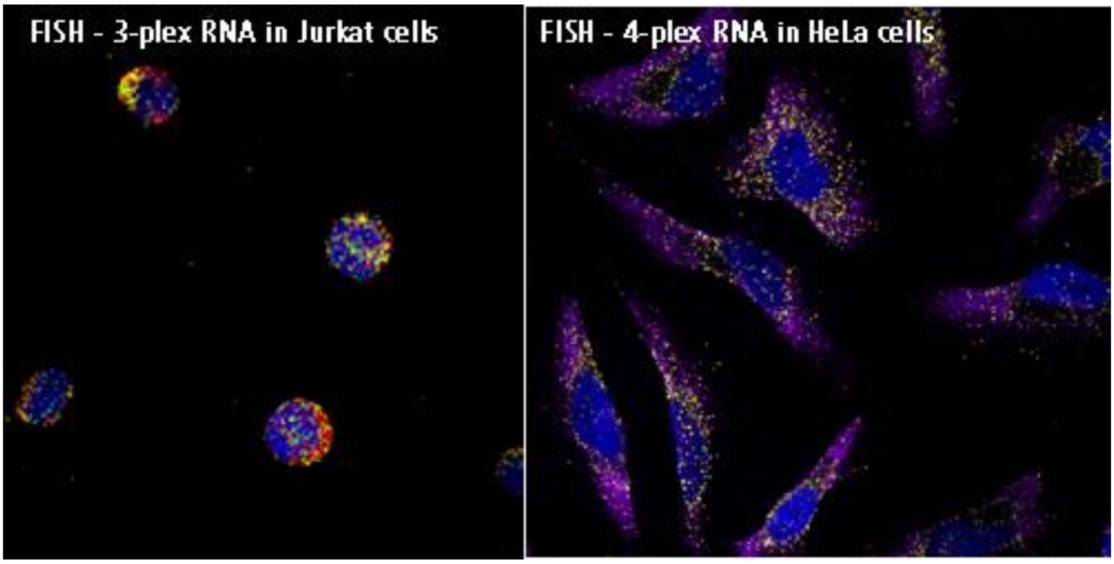
تقانات التبقيع جميعها تشترك بالخطوات التالية:

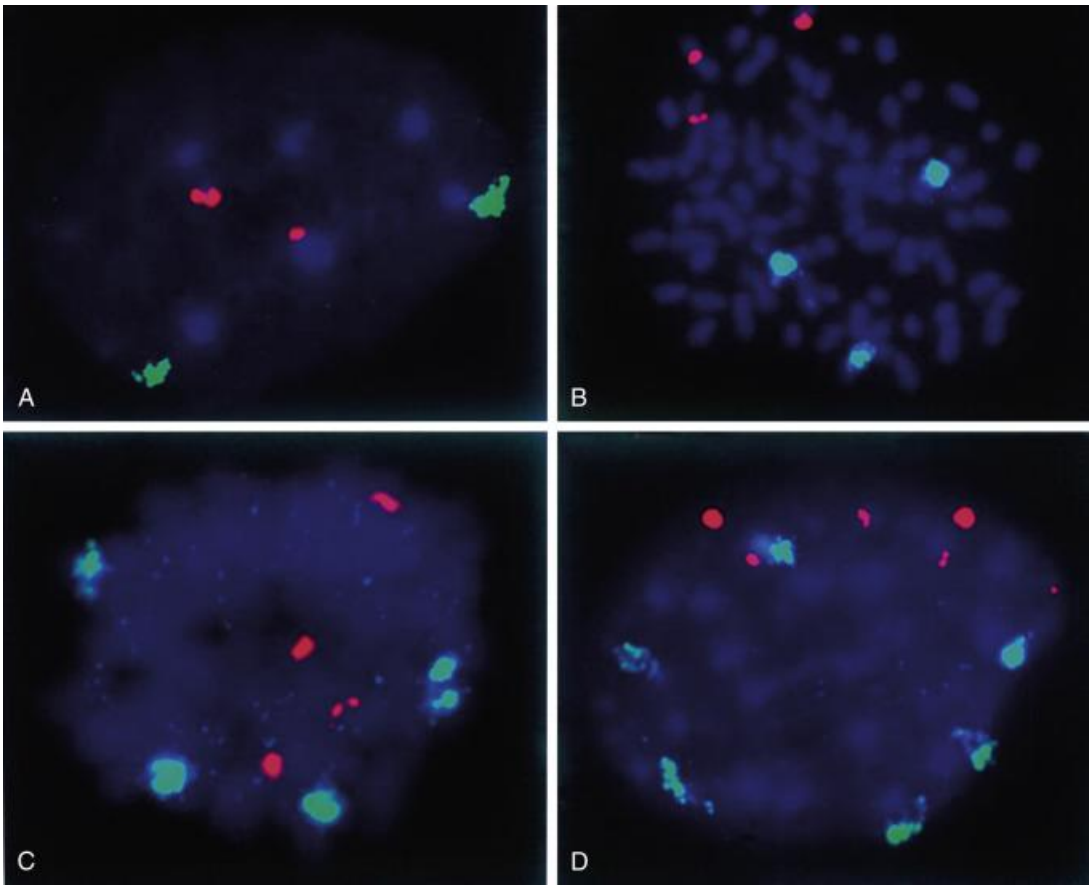
١- فصل الجزيئات المراد الكشف عنها بالرحلان الكهربائي في الهلام.
٢- نقل الجزيئات من الهلام إلى غشاء من النايلون أو السيللوز ترتبط به الجزيئات كل بحسب موقعه في الهلامة وهو الخطوة الأساسية في التبقيع إذ يترك بذلك كل جزء بصمة في الغشاء بموقع مقابل تماماً لرحلته باتجاه القطب المقابل.
٣- تهجين غشاء النايلون أو السيللوز مع كواشف نوعية موسومة للجزيء أو التتالي المراد الكشف عنه.
٤- الكشف عن إيجابية التهجين عن طريق مكشافات تتحرى إشارة الوسم في الغشاء.

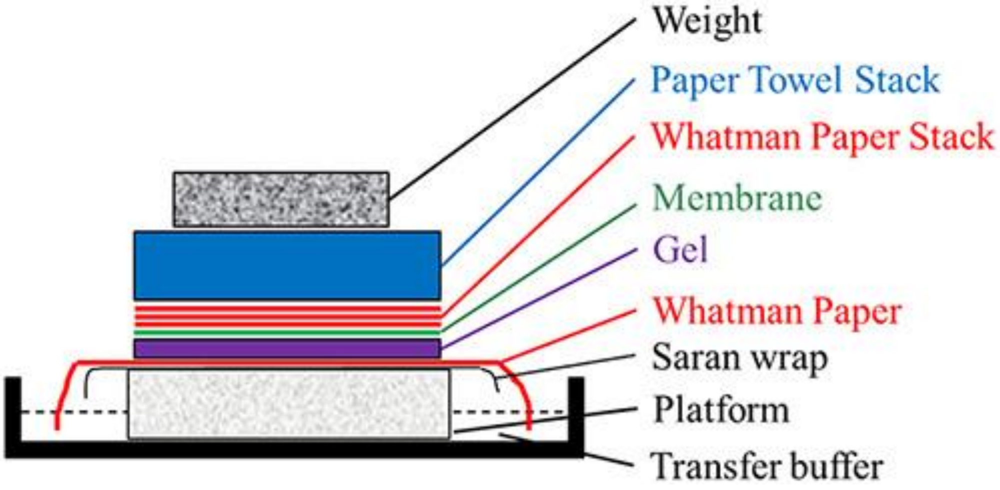
للتبقيع ثلاثة أنواع تدعى بأسماء لا تخلو من الطرفة سميت الأولى بتبقيع ساوثرن southern blotting التي أسسها العالم ED sothern لكشف جزيئات الدنا. بعد سنتين أسس العالم alwine تقانة أخرى للتحري عن الرنا. وسماها تبقيع نورثرن northern وبعد عدة سنوات أسس الباحث burnette طريقة مماثلة لكشف البروتين أسماها تبقيع ويسترن western .

أ- الهدف من تقانة تبقيع ساوثرن هو التحري عن الطفرات في الدنا باستخدام مسابير متممة للتسلسل الطافر ترتبط فقط به ، ولا ترتبط بالتسلسل الأصلي غير طافر.
ب- تعتبر تقانة تبقيع نورثرن مهمة في مقارنة مستوى التعبير الجيني بين الخلايا لجين يكثر أو يقل التعبير عنها في شروط معينة (الخلايا نفسها قبل وبعد الحضن مع محفز معين) أو خلايا مختلفة (خلايا طبيعية أو سرطانية).
ت- يستخدم تبقيع ويسترن للكشف عن وجود البروتينات في خلاصات خلايا أو نسج معينة كما يمكنه الكشف عن فعالية هذا البروتين في حال استخدمت أضداد نوعية فقط للبروتين الفعال ولا ترتبط بالبروتين غير الفعال.
ث- التهجين التألقي في الموضع (FISH) fluorescent in situ hybridization : يمثل التهجين في الموضع تقانة مميزة تتداخل من خلالها التقانات الحيوية الجزيئية والنسيجية لدراسة

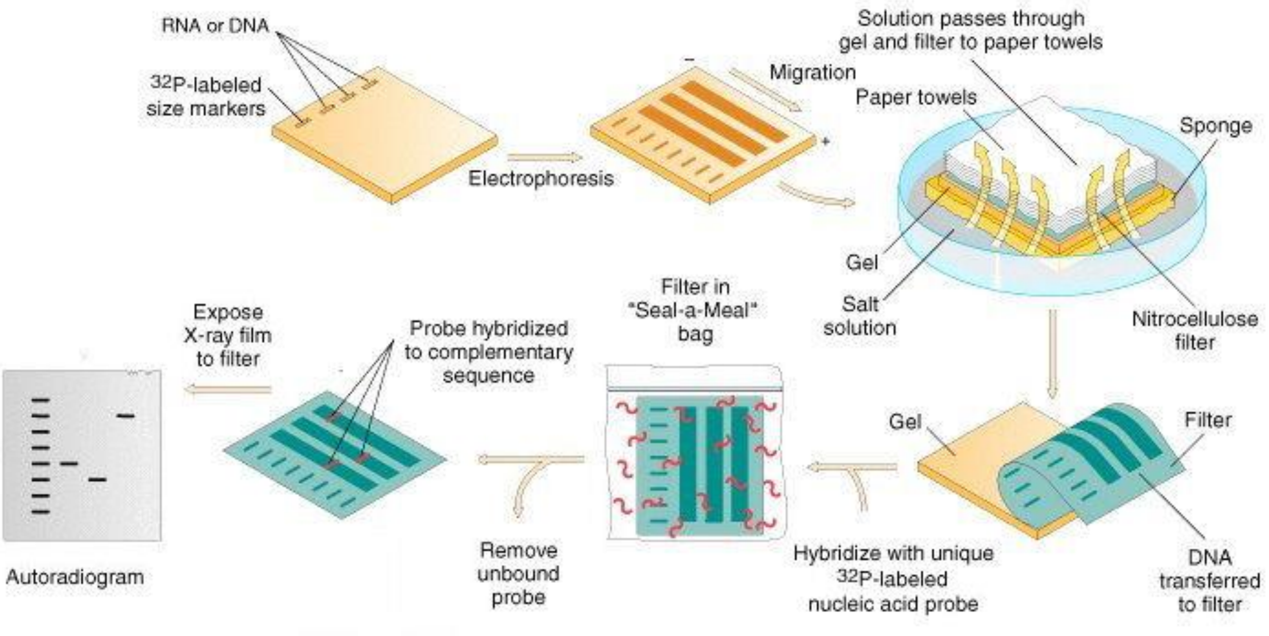
التركيب والتعبير الجيني في مقاطع النسج والمحضرات الخلوية يمكن بواسطتها تحديد مواقع نوعية للدنا والرنا في نوى الخلايا ، تتضمن الطريقة تفاعل تهجين بين مسبار نكليوتيدي موسوم وتتالي نكليوتيدي هدف متمم له ، ويمكن تحري الهجن إما بالتصوير الشعاعي الذاتي للمسابير الموسومة شعاعيا او باستخدام ملونات نسيجية للمسابير غير المشعة. ولاحقاً تم استخدام الوسم التألقي غير الشعاعي في نهاية السبعينات من استخدام التهجين التألقي في الموضع في مخابر التشريح المرضي كوسيلة تشخيصية جزيئية وطريقة للكشف عن العوامل الممرضة كالجراثيم والفيروسات في المقاطع النسيجية.







تقانة التبقيع

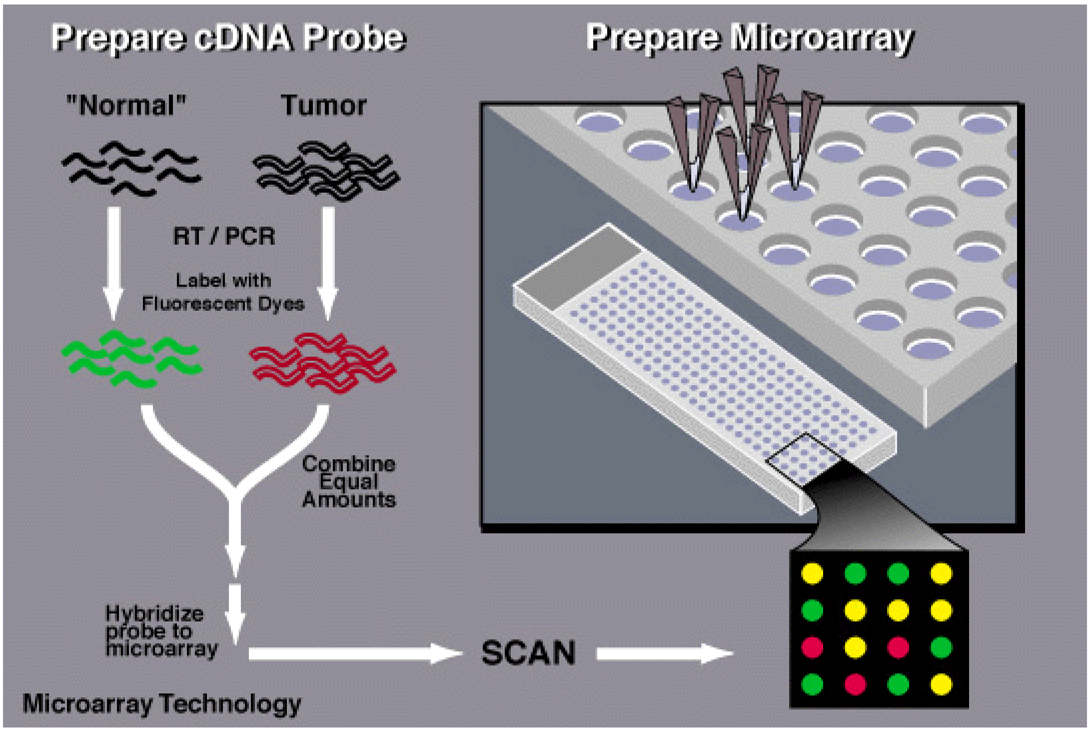


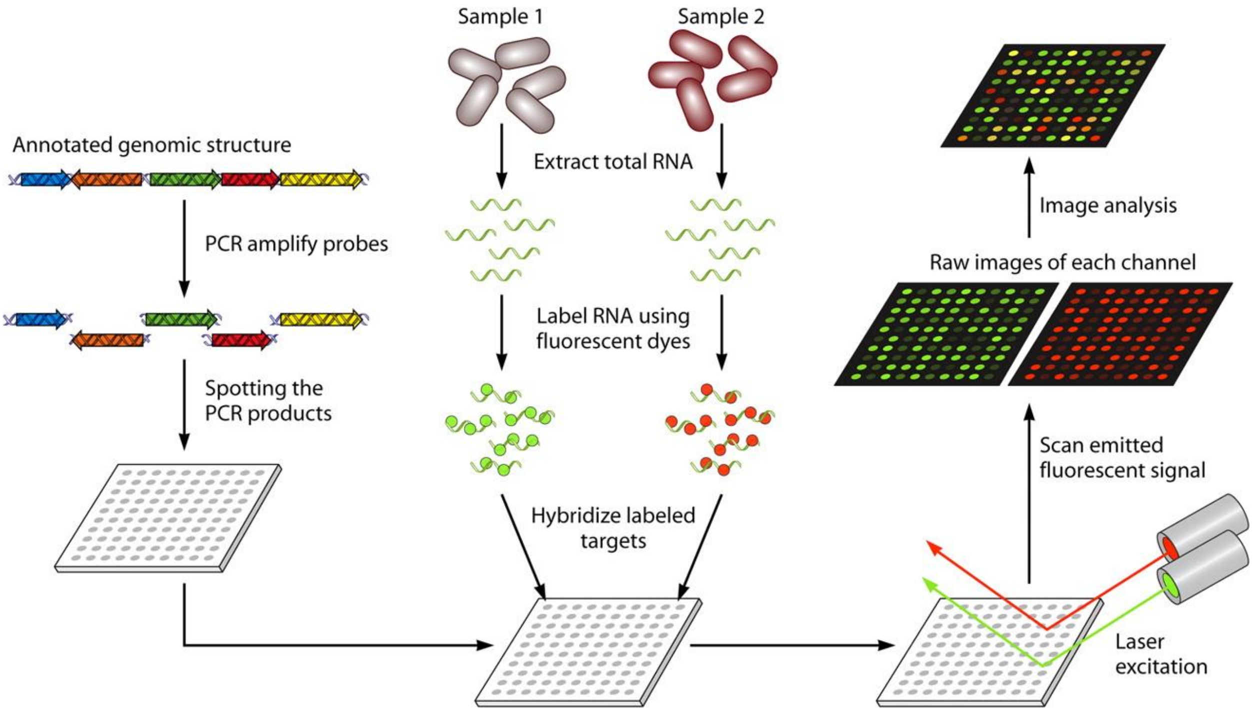
المصفوفات الصغرية Microarrays:

ظهرت في العقدين الأخيرين المصفوفات الصغرية كتقانة مهمة في مقايسة التعبير الجيني لعدد كبير جداً من الجينات يصل إلى عدة آلاف في الوقت نفسه. وتعتمد على ربط كثير من شدف الدنا الخاصة بقطع من جينات مختلفة على صفائح زجاجية وبشكل بقع صغرية . و من ثم تهجينها مع عينات مختلفة وموسومة من الدنا المتمم للرنا المرسال المستخلص من العينة المدروسة ويلي ذلك إجراء قياس كمي لشدة الاشارة الصادرة عن جميع الشدف بما يعكس كمية الرنا المرتبطة بالتسلسلات المتممة لها وخاصة بكل جين منها.

وهكذا يمكن تحديد التعبير الجيني للجينات المرتبطة بأحد أنواع السرطانات في عينة مريض من خلال وسم الدنا المتمم للرنا المرسال المستخلص من هذه العينة بواسم فلورة معين واستخدام دنا متمم لرنا معياري (من شخص سليم) مرتبط بواسم فلورة آخر . يتبع ذلك تهجين عينتي الدنا المتمم في نفس الوقت مع الصفيحة الحاوية على شدف الجينات المثبتة عليها بحيث ترتبط شدف الدنا المتمم الموسوم بشكل تنافسي مع بقع الدنا يتم بعدها التعبير التفاضلي لجينات معينة بعد تحديد كمية الواسمات المرتبطة في كل بقعة على الصفيحة التي تمثل إحدى تلك الجينات .

تجري اليوم دراسة التبدلات في التعبير الجيني لعدد كبير من الجينات و ربط ذلك مع أمراض عديدة ومتنوعة كالسرطانات والمتلازمات المختلفة .


Prepare cDNA Probe
Prepare Microarray
"Normal"
Tumor
RT / PCR
Label with
Fluorescent Dyes
Combine
Equal
Amounts
Hybridize
probe to
microarray
SCAN
Microarray Technology


Sample 1
Sample 2
Annotated genomic structure
Extract total RNA
PCR amplify probes
Label RNA using
fluorescent dyes
Spotting the
PCR products
Hybridize labeled
targets
Image analysis
Raw images of each channel
Scan emitted
fluorescent signal
Laser
excitation