كلية الصيدلة
السنة الخامسة

سَلْسلة الـ DNA
DNA Sequencing

أ.د فوزة منعم

تقانة حيوية | نظري

هاي كيفك؟ .. مبروك انك وصلت لهون بهنيك .. وبحب بشرك اننا على وشك الانتهاء من المادة

المحاضرة صغير شغلة ساعة زمان بتكون قاضي عليها ..يلّلا

فهرس المحاضرة:

5 • متطلبات العمليّة.

8 • الطريقة اليدويّة.

12 • الطريقة الآلية.

15 • مقارنة بين الطريقتين.

سَلْسلة الـ DNA

DNA Sequencing

مفهوم سَلْسلة الـ DNA DNA Sequencing:

- نعلم أنّ الـ DNA هو **تتالي** سلسلة أسس نكليوتيدية، وفي عملية السَلْسلة نقوم **بمعرفة ترتيب هذه الأسس** (تهجئة حرف حرف...) وفقاً للخطوات التي سنشرحها في هذه المحاضرة.

فسَلْسلة الـ DNA إذاً هو تحديد تتالي الأسس النوكليوتيدية (A,T,C,G) لأيّ جزيئة DNA، وقد أصبح الآن متاحاً وممكناً بفضل التقانات التي جعلتنا قادرين على إنتاج وعزل الشدف المقتطعة بأنزيمات الاقتطاع.

طريقة الشطر الكيميائي
:Chemical cleavage
نسميها طريقة ماكسام وجلبرت
(Maxam & Gilbert method لن
نتحدث عنها).

طريقة إنهاء السلسلة أنزيمياً
:Enzyme chain termination
ونسميها طريقة سانجر Sanger method
(وهي الطريقة التي نعمل بها في
الوقت الحالي وسندرسها بالتفصيل).

ما أهمية سَلْسلة الـ DNA؟

Why DNA sequencing is important?

- يتنبأ بتسلسل الحموض الأمينية المكونة للبروتينات والتي يتم تشفيرها من الـ DNA (كل ثلاثية تشفر لحمض أميني ومجموع عدة حموض أمينية يشكل بروتين) وذلك بقراءة الثلاثيات Codons الموجودة في إطارات القراءة المفتوحة ORF وإعطاء الحموض الأمينية التي تشفّر لها.
- يحدِّد تركيب جزيئات الـ RNA التي يشفرها هذا الـ DNA سواء كانت rRNA أو tRNA (أي ليس فقط mRNA).
- يساعد في تحديد موقع وتركيب الإنترونات (وهي Junk DNA) في جينات حقيقيات النوى.
- يساعدنا على التعرّف على الشكل الجيني الكامل لأي كائن حي (Genome Sequencing)

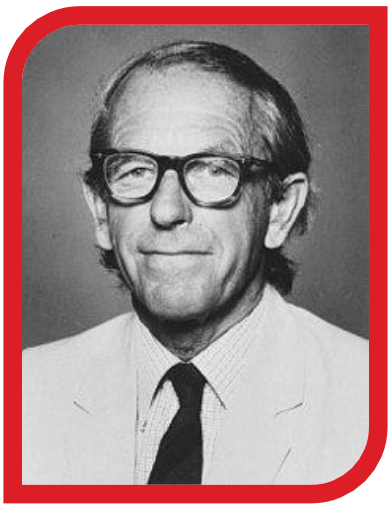
وقبل إجراء السَلْسلة فلابد من تهيئة العينة واستخلاص الـ DNA منها شأنها شأن جميع العمليات التي تجري على الـ DNA.

تجهيز الدنا لعملية السَلْسلة:

- قبل القيام بعملية السَلْسلة علينا أن نقوم بتنقية الـ DNA وعزله من الخلايا، ويتم ذلك بتحطيم الخلايا والنوى لتخرج المادة الوراثية منها، وذلك إما بطرق ميكانيكية، أو بطرق كيميائية، إضافة إلى فك ارتباط الـDNA بالبروتينات المرافقة له.
- القطع الكبيرة جداً من الـ DNA يتم تقطيعها إلى قطع أصغر وحفظها ضمن نواقل (بلاسميدات)، مما يسمح بتكثيرها بالمراحل اللاحقة من خلال وضعها في خلية مضيفة (كالجراثيم).
- يتم زرع هذه البكتيريا الحاوية على البلاسميدات في أوساط زرعية وكلما تكاثرت هذه الجراثيم، تتضاعف معها البلاسميدات (Cloning).
- أو يمكن بدلاً من التنسيل ببساطة تضخيم الجينة المراد سَلْسلتها باستخدام تفاعل الـ PCR.

أي أننا نحتاج لأعداد كبيرة من النسخ للقطعة المراد سلسلتها ويمكن الحصول عليها بالـ Cloning أو الـ PCR.

سَلْسلة الـ DNA باستخدام طريقة سانجر Sanger method:



طوّرها العالم البريطاني الشهير فريد سانجر Fred sanger عام 1977 من أجل سَلْسلة كلٍّ من الـ DNA والبروتينات وحصل على جائزة نوبل لكلٍّ منهما.

متطلبات عملية السلسلة Sequencing:

حتى تقوم بسلسلة شدفة من الـ DNA أنت بحاجة إلى:

- ✓ طاق الـ DNA الذي تريد أن تجري سَلْسلته (وسيكون هو الطاق المرصاف Template).
- ✓ مشرع DNA Primer قصير متمم لجزء من الـ DNA الذي تريد سَلْسلته، أي لا نستطيع سلسلة DNA لا نعرف أي تسلسل فيه لأننا نحتاج لتسلسل صغير معروف حتى تصنع Primer يحقق خاصية التتام.
- ✓ أنزيم الـ DNA polymerase.
- ✓ النكليوتيدات الأربعة منقوصة الأوكسجين التي تدخل في تركيب الـDNA: (Deoxy nucleotides triphosphates dNTPs): الأدينوزين A والتيميدين T والسيتوزين C والغوانوزين G بشكلها ثلاثي الفوسفات.
- ✓ والمكون الأهم هو النكليوتيدات الأربعة منقوصة ذرتي أوكسجين (Dideoxy nucleotides triphosphates (ddNTPs وهي عبارة عن نكليوتيدات مختلفة البنية قليلاً عن النكليوتيدات الأساسية، ويمكن أن تتقابل مع النكليوتيدات الأساسية على الطاق المقابل من الـDNA بشكل عادي مشكلة روابط هيدروجينية، لكنها لا يمكن أن ترتبط بنكليوتيد جديد برابط فوسفوديأستري، وبالتالي يتوقف عندها إطالة الـ DNA.

يستخدم المزيج السابق نفسه سواء في طريقة السلسلة اليدوية أو الآلية اللتين سنتحدث عنهما.

ما الفرق بين النوعين المذكورين من النكليوتيدات كيميائياً وما الهدف من استخدامهما؟

النكليوتيدات العادية dNTPs:

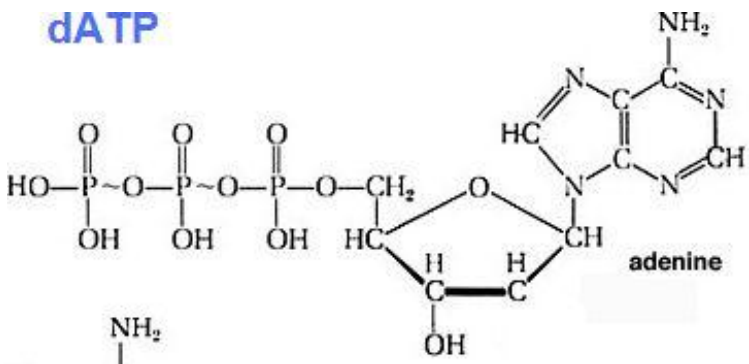
مكونة من أساس آزوتي + سكر ريبوز منقوص الأوكسيجين + فوسفات.

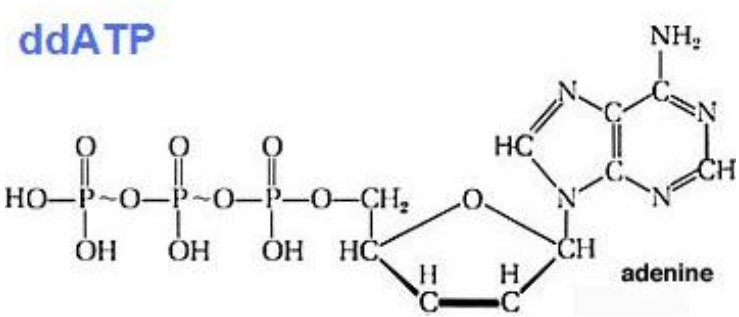
وهذه النكليوتيدات تملك مجموعة OH على السكر في الموقع 3'، وعن طريق هذه الـ OH يستطيع النكليوتيد أن يرتبط مع فوسفات النكليوتيد الذي بعده والموجودة في الموقع 5' ويشكل رابطة فوسفودي أسترية.

النكليوتيدات المنقوصة ذرتي أوكسجين ddNTPs:

هي نوكليوتيدات ثلاثية الفوسفات أيضاً ولكنها تتميز عن السابقة أنها منزوعة الأوكسجين O من الموقع 3' الموجود على السكر.

وبالتالي هذه النكليوتيدات غير قادرة على تشكيل رابطة فوسفودي أسترية مع النكليوتيد الذي يليها وبالتالي إذا تقابل أحد هذه النكليوتيدات مع أحد النكليوتيدات الموجودة على المرصاف ستتوقف إطالة الـ DNA لذلك تسمى نكليوتيدات إنهاء Chain terminators.





- وبما أنه يوجد أربع أنواع من الـ dNTPs تدخل في تركيب الـ DNA، فبالمقابل هناك أيضاً أربع أنواع من الـ ddNTPs:

dATP	dGTP	dCTP	dTTP
ddATP	ddGTP	ddCTP	ddTTP

وسنفهم أهمية هذه النكليوتيدات خلال شرح طريقة السلسلة.

- يمكن إجراء طريقة سانجر بطريقة بدائية أو بطريقة تعتمد على أجهزة آلية وعرضت الدكتورة Animation عن كل من الطريقتين.
- **وتعتمد كلا الطريقتين على 4 خطوات أساسية هي:**

فصل طاقي الـ DNA عن بعضهما
Strand Sepration

↓

ارتباط الـ Primer Annealing
,Primer

↓

الإطالة Extention

↓

الإنهاء بـ Termination ddNTPs

الطريقة اليدوية:

- حتى تتمكن من سَلْسلة الـ DNA بطريقة إيقاف السلسلة Chain termination method يجب أولاً أن يتم الحصول على الـ DNA بشكل أحادي الطاق.

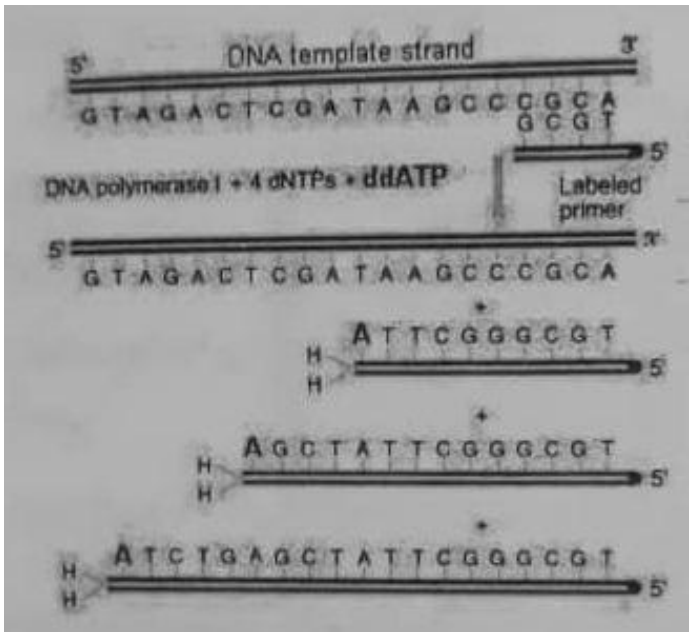
- يتم تجهيز مزيج حاو على الـ DNA وحيد الطاق (المرصاف المراد سَلْسلته)، وأنزيم الـ DNA polymerase، والنكليوتيدات الأربعة "العادية" منقوصة الأوكسجين (A, T, G, C) ومشرع قصير.

- يملك المشرع Primer تسلسل نكليوتيدات متمم للنهاية '3 (كما ذكرنا، أي يجب على الأقل أن نعرف تسلسل قصير في بداية DNA لنضيف Primer يناسبها) من المنطقة المراد سَلْسلتها وهو ضروري كما نعرف كي تتمكن الـ DNA polymerase من البدء بالتضاعف.

- يتم إضافة كميات متساوية من المزيج المتفاعل السابق إلى كل من الأنابيب الأربعة التي أضيف إلى كل منها سابقاً نوع معين من النكليوتيدات منقوص ذرتي أوكسجين ddNTP.

هذه الطريقة تحتاج إلى استخدام أربعة أنابيب بخلاف الطريقة الآلية التي تتم على أنبوب واحد فقط، لأننا إذا أضفنا المكونات في الطريقة اليدوية إلى أنبوب واحد فقط لن نكون قادرين أبداً على التمييز بين النكليوتيدات الغريبة عن بعضها البعض.

- يستمر التضاعف طالما أضيف نكليوتيد عادي إلى السلسلة المتنامية.
- إلا أنه عندما يضاف نكليوتيد منقوص ذرتي أوكسجين إلى السلسلة يتوقف اصطناع السلسلة مباشرة، وهذه الإضافة تتم بشكل عشوائي أي ممكن أن يتم إضافة هذا النكليوتيد من أول السَلسلة أو في آخرها أو منتصفها أو ألا يضاف، لذلك سنحصل على احتمالات عديدة جداً وتدعى هذه التسلسلات Terminated Molecules أي جزيئات مُنهى إطالتها.



للتوضيح:
لاحظ الشكل الآتي:
في الأنبوب الحاوي على ddATP نلاحظ أننا نحصل على عدة سلاسل من DNA كلها تنتهي بـ ddATP لأن الإضافة تتوقف عند نكليوتيد لا يحوي على ذرة أوكسيجين في الموقع 3' من السكر.

- من خلال معرفة أطوال هذه الشدف نستطيع معرفة مواقع وجود نكليوتيد A في الطاق المتمم، وكذلك الحال مع باقي الأنابيب الحاوية على ddCTP و ddGTP و ddTTP ويتم معرفة أطوالها من خلال ترحيلها على الهلامة ومقارنتها مع شدف الـ Ladder.
- وبالعودة للطاق الأصلي نستطيع معرفة تسلسل هذا الـ DNA فمثلاً في حال وجدنا في الموقع 3 من الطاق المتمم نكليوتيد A نستنتج أنه يقابله T من الطاق الأصلي وهكذا مع باقي النكليوتيدات.

مثال:

- لنفرض مثلاً أن لدينا سلسلة من الـ DNA بطول 10 نكليوتيدات نريد معرفة تسلسل النكليوتيدات فيها نقوم بنفس الطريقة التي ذكرناها سابقاً ويكون لدينا 4 أنابيب نلاحظ:

1) في الأنبوب الحاوي على ddATP ثلاث شدف أطوالها 3,6,7.

2) في الأنبوب الحاوي على ddCTP شدفتين أطوالهما 1,2.

3) في الأنبوب الحاوي على ddGTP شدفتين أطوالهما 10,8.

4) في الأنبوب الحاوي على ddTTP ثلاث شدف أطوالها 4,5,9.

من الأنبوب الأول بما أننا وجدنا شدفة بطول 3 نكليوتيدات، أي دخل نكليوتيد A منقوص ذرتي الأوكسيجين في الموقع 3 وأوقف الإطالة، ومنه نستنتج وجود T يقابله في الطاق الأساسي المراد معرفة تسلسله.

وبالنسبة لباقي الشدف أيضاً نستطيع معرفة وجود T في المواقع 6 و 7 و 3 من الطاق الأصلي.

من الأنبوب الثاني نستنتج وجود G في المواقع 1 و 2 من الطاق الأساسي.. وهكذا.

بذلك نستنتج أن تسلسل النكليوتيدات في الطاق الأساسي هو 3'-GGTAATTCAC-5'.

ملاحظة:

كما قلنا سابقاً الإضافة لهذه النكليوتيدات عشوائية لذلك من الممكن أن نجد في أي من الأنابيب الأربعة السابقة سلسلة DNA بطول 10 نكليوتيدات، أي تمت مضاعفة كامل تسلسل DNA الأساسي دون أي إضافة لنكليوتيدات ddNTP.

انتهى التوضيح.. نعود لمتابعة الخطوات الأساسية:

- تضاف محتويات الأنابيب الأربعة السابقة إلى أربعة أعمدة على هلامة الرحلان الكهربائي Electrophoresis gel حيث تنفصل السلاسل السابقة تبعاً لحجمها ولقياس النكليوتيدات.
- تتحرك السلسلة الأقصر مسافة أكبر على الهلامة لذلك يتم قراءة النتائج بدءاً من نهاية (أسفل) الهلامة إلى بدايتها (أعلاها) بمعدل أساس واحد في كل مرة فنستطيع استنتاج تسلسل الـ DNA الصحيح.

ملاحظة: ورد في أنيمشن آخر إمكانية استخدام نكليوتيد عادي [منقوص ذرة اكسجين واحدة] موسوم شعاعياً من نوع واحد في الأنابيب الأربعة، فمثلاً يستخدم نكليوتيد الأدينين dATP الموسوم بعنصر مشع في كل من الأنابيب الأربعة السابقة، وهذا النكليوتيد لا يوقف السلسلة بل تستمر الـ DNA polymerase بالإطالة إذا ارتبط إلى المرصاف.

وتكمن أهميته في التعرف على كل موقع ارتبط إليه نكليوتيد الأدينين على المرصاف فبعد إجراء الرحلان الكهربائي توضع الهلامة على فيلم أشعة X لإجراء التصوير الشعاعي الذاتي Autoradiography فيظهر بقعة عند كل موقع أرتبط إليه الأدينين (أي يؤكد لنا صحة عملية السلسلة لا أكثر).

ننتقل الآن إلى الطريقة الثانية وهي الطريقة الآلية التي يوضحها الأنميشن الثاني:

الطريقة الآلية (الانميشن بعنوان Cycle sequencing):

حتى يبدأ تفاعل السَلْسلة نقوم بتسخين المزيج للدرجة ٩٦ مئوية (نفس مكونات المزيج السابق مضافاً إليه نكليوتيدات الإيقاف الأربعة مع بعضها) حتى ينفصل الطاقين المتتامين لطاق الـ DNA المرصاف المراد سَلْسلته.

بعدها نخفض درجة الحرارة قليلاً (للدرجة ٥٠ مئوية) حتى يتسنى للمشرع Primer القصير إيجاد موقعه المتمم له على طاق الـ DNA المرصاف.

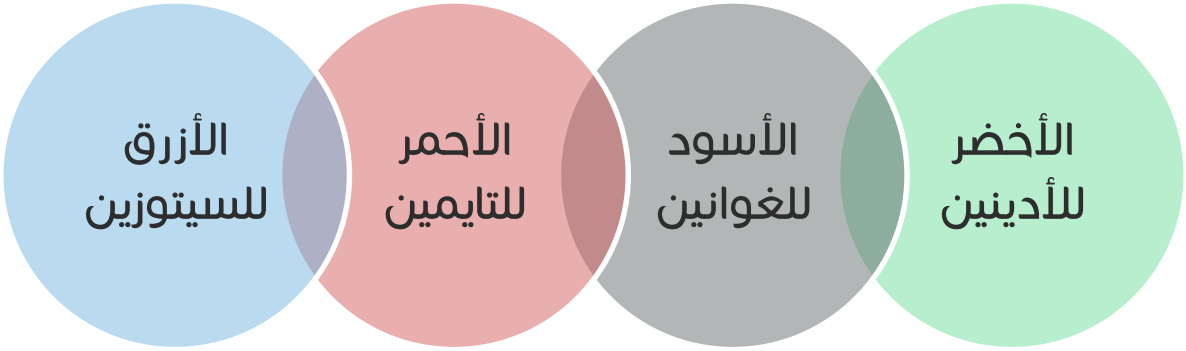
ومن ثم يتم رفع درجة الحرارة مجدداً (للدرجة ٦٠ تقريباً) مما يسمح لأنزيم الـ Polymerase (بما أننا استخدمنا حرارة فالأنزيم هو Taq Polymerase) بالارتباط إلى الـ DNA وتشكيل سلسلة جديدة مقابلة للمرصاف.

يتم التحكم بدرجات الحرارة وضبطها في مختلف مراحل الـ sequencing بإجراء التفاعل ضمن جهاز المدور الحراري thermo cycler، حيث يتم ضبط اعداداته بتحديد درجة الحرارة والزمن الملائم لكل مرحلة (كما في تفاعل الـ PCR).

- يكون تسلسل الطاق الجديد متمم لتسلسل طاق الـ DNA الأصلي (المرصاف).
- لا يميز أنزيم الـ Polymerase نهائياً بين dNTPs و ddNTPs لذلك يقوم بإطالة طاق الـ DNA عشوائياً حتى يصادف أن يرتبط نكليوتيد إنهاء مكان النكليوتيد العادي فيتوقف الاصطناع.

العملية السابقة لا تتم على طاق واحد من المرصاف وإنما هناك مليارات المرصافات الموجودة في العينة والتي يمكن أن يرتبط نكليوتيد الإنهاء عند أي موقع فيها لذلك ينتج عن ذلك مجموعات من سلاسل الـ DNA التي تملك أطوال مختلفة.

- في طريقة السَلْسلة الآلية Automating sequencing تملك الـddNTPs خاصة مميزة عن الطريقة السابقة أنها تكون موسومة، لكن الوسم لا يكون شعاعياً كما أشرنا إلى إمكانية استخدامه في الطريقة اليدوية وإنما يكون موسوماً بمادة مفلورة، وذلك من خلال ربط كل نوع من النكليوتيدات بصباغ يصدر لوناً مميزاً عند تعريضه لأشعة الليزر وهذه الألوان متعارف عليها عالمياً كما أشارت الدكتورة:



وإمكانية تمييز النكليوتيدات بالألوان هو ما يجعلنا قادرين على إجراء تفاعل السَلْسلة في أنبوب واحد.

- يتم نقل تفاعل السَلْسلة من الأنبوب الذي يجري فيه التفاعل إلى هلامة البولي أكريل أميد Polyacrylamide.
- يتم نقل الهلامة إلى جهاز سَلْسلة الـ DNA الذي يقوم بإجراء الرحلان الكهربائي وتحليل النتائج.
- تهاجر النكليوتيدات بالرحلان الكهربائي وفقاً لقياسها ويتم كشف كل منها باستخدام شعاع ليزري يمر أسفل الهلامة.
- كل من النكليوتيدات منقوصة ذرتي أكسجين تصدر ضوءاً ملوناً بطول موجة معينة ويسجل هذا الضوء على صورة الكترونية للهلامة.

- يفسر البرنامج الحاسوبي البيانات الواردة إليه ويخرجها على شكل مخطط رحلاني Electropherogram بحيث يتضمن هذا المخطط قمماً ملونة يمثل كل لون منها حرفاً من السلسلة (لا يعبر ارتفاع القمم عن الكمية).

أي أنّ هذا المخطط لا يتحسس النكليوتيدات العادية وإنما فقط النكليوتيدات منقوصة ذرتي الأوكسجين الذي تصدر الأشعة الملونة.

- نلاحظ في المخطط مناطق غير معروفة يرمز لها بحرف (N) وهي المناطق التي لم يتم قراءتها، وإذا كانت تهمنا نعيد عملية السَلْسلة مرات عديدة لتحديد هذه المناطق، وذلك باستخدام مشارع Primers قريبة من هذه المنطقة.

تتميز السَلْسلة الآلية أنها أرخص، أكثر أماناً (لا يحتاج عنصر مشع) وتسمح بقراءة عدد أكبر من الأسس[1] (غالباً 750-1000). وهي الأكثر استخداماً في مشاريع تحديد التسلسل.

ذكرنا في بداية المحاضرة انه يجب تقطيع القطع الكبيرة من الـ DNA لقطع أصغر وذلك لأنه من الصعب سلسلتها كما هي ولكن هذا التقطيع له مشكلتين:

يوجد بعض النكليوتيدات التي لا تُقرأ، وتحل هذه المشكلة بإعادة عملية السلسلة واستخدام Primers قريبة من هذه المنطقة.

من الممكن لقطعتين من هذا الـ DNA المقطوع أن تتداخلان بتسلسلات مشتركة من النكليوتيدات Over Lapping، وتحل هذه المشكلة من خلال استخدام أجهزة حاسوبية والتي تحدد ترتيب القطع وتطابق القطع مع بعضها.

[1] إن عملية تحديد التتالي النموذجية تتضمن تحديد تتالي 200 - 500 زوج أساس فقط من الأسس المقروءة.

نستنتج أن مفتاح طريقة سانجر في سلسلة الـ DNA هو النكليوتيدات الغريبة وفيما عدا ذلك، فخطوات الطريقة مألوفة وتشبه تفاعل الـ PCR والرحلان الكهربائي للـ DNA.

كما أن التسلسل الذي نتج لدينا في السَلْسلة هو التسلسل المكمّل للمرصاف وبالتالي يجب أن نعكسه لنحصل على تسلسل المرصاف. (هام جداً جداً).

ملاحظة:
ذكرت الدكتورة انه في حال لا نعرف أي تسلسل من هذا الـDNA المطلوب فإننا نقوم بالتجربة باستخدام Primers عديدة، في حال استخدام Cloning لتكثير القطعة المراد سلسلتها فإننا نعرف بالطبع تسلسل الناقل Vector المستخدم (البلاسميد غالباً) وبالتالي نستطيع استخدام Primer لجزء من البلاسميد قبل الجينة ونحدد سلسلة الجينة بعده.

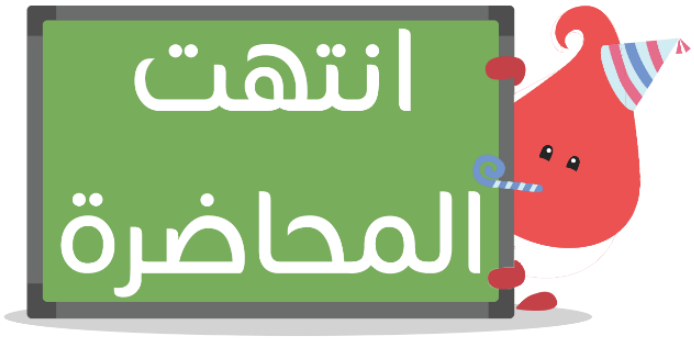
مقارنة بين طرق إجراء الرحلان الكهربائي في كل من الطريقتين اليدوية والآلية:

- في طريقة السلسة اليدوية يتم إجراء الرحلان على لوحة جل كبيرة تتراوح أبعادها من متر ونصف إلى مترين، حيث يمرر ناتج كل تفاعل من تفاعلات الأنابيب الأربعة على هلامة بولي أكريلاميد بوجود اليوريا التي تمنع التحام قطع الـ DNA مع بعضها خلال الرحلان الكهربائي، ونضيف أيضاً للهلامة صباغ أزرق، يرحل نحو القطب الموجب، والهدف منه أن نعرف متى نوقف التيار الكهربائي بحيث لا تخرج جزيئات الـ DNA من الهلامة، لأن هذا الصباغ يرحل بسرعة أكبر بقليل من جزيئات الـ DNA وبالتالي عندما يصل إلى نهاية الهلامة نوقف التيار.

- مع الإشارة إلى أنه كلما كان الجل أرق كان الرحلان أسرع لأن السماكة تعيق الحركة، وكلما كان أطول (يكون طوله 0.5-2 متر) كانت المسافات بين القطع المفصولة أكبر، وبالتالي كانت عملية الفصل أدق. ونحتاج لهذا الطول الكبير لأن القطع (الشدف) التي سنحصل عليها كبيرة جداً فمثلاً في حال أردنا معرفة تسلسل قطعة طولها 1000 نكليوتيد فسينتج لدينا 1000 قطعة من DNA نحتاج لفصلها.

من عيوب هذه الطريقة أنّ الـ PAGE: هو بوليمير للأكريلاميد، والأكريلاميد سام عصبياً Neurotoxin ويحتاج لأن يتم التعامل معه بحذر شديد.

- لذلك تم إيجاد الطريقة الآلية التي تعتمد غالباً على الرحلان الكهربائي الشعري Capillary electrophoresis، حيث يتم الترحيل ضمن أنابيب شعرية رفيعة ودقيقة جداً يتم تغليفها بالجل، ويكون طويل جداً وملفوف بشكل يشبه الحلزون، يؤمن سطح تماس كبير وقدرة ميز عالية High resolution، ويوفر مساحات كبيرة، وحالياً كل الأجهزة المستخدمة من نوع الرحلان الشعري.



عندما تتقبّل عيوبك لن يستطيع أحد أن يستعملها ضدك.