

الباب الثامن

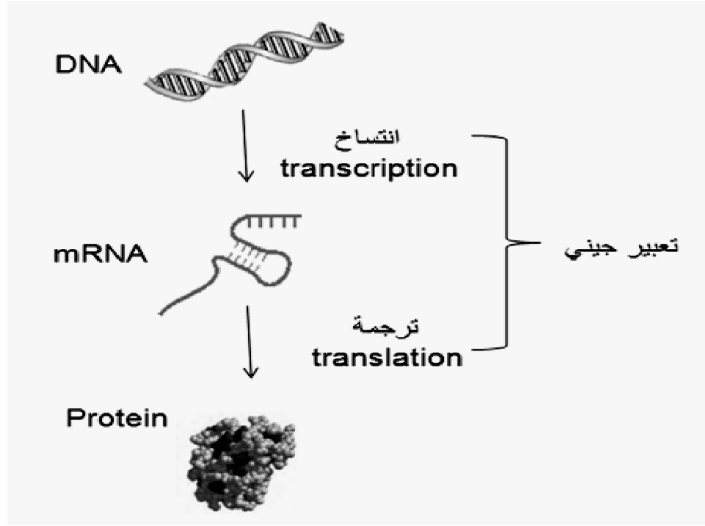
تقنية مصفوفات الدنا المجهرية

DNA Microarrays

مقدمة

علم وظائف المجين Functional genomics

هو علم يهتم بدراسة التغيرات التي تطرأ على أنماط التعبير الجيني gene expression كماً ونوعاً في أزمدة مختلفة أو نتيجة للتعرض لعوامل خارجية قد تكون طبيعية (تغير شروط الوسط) أو مرضية (كوجود عامل ممرض أو التعرض لمادة سامة). ومن المعروف أن التعبير الجيني ينقسم إلى مرحلتين (الشكل ٨-١): مرحلة الانتساخ transcription وفيها يتم تشكيل نسخة رنا مرسل انطلافاً من المورثة، أما المرحلة الثانية فهي الترجمة translation وفيها تترجم نسخة الرنا المرسل إلى بروتين وظيفي.



الشكل ٨-١: مراحل عملية التعبير الجيني gene expression

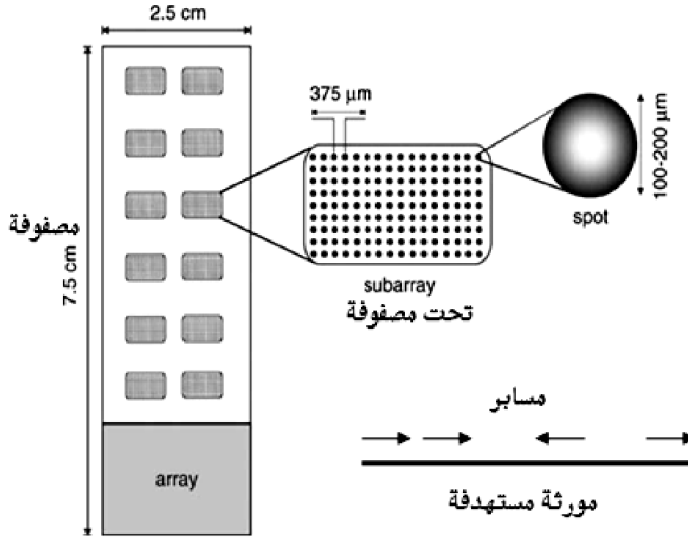
هناك آليات عدة للتحكم بمستوى تعبير مورثة معينة، وتتوزع هذه الآليات على مرحلتين التعبير الجيني (الانتساخ والترجمة) وبذلك فإن كل مورثة يمكن أن يتم رفع مستوى تعبيرها up regulation أو خفضه down regulation أو حتى إيقافه بالكامل switch off.

إن أحد أهم أهداف علم وظائف المجين هي البحث عن المورثات التي يزداد أو ينقص مستوى تعبيرها بتأثير شروط معينة، وقد ساعد التطور الهائل في التقنيات الحيوية والبرمجيات الرقمية في تسهيل عملية تتبع التغيرات الحاصلة في تعبير آلاف من مورثات

الكائن الحي في أن gene expression profiling، الأمر الذي كان في الماضي صعباً للغاية، نظراً لكم الهائل من البيانات الناتجة عن مراقبة تغيرات تعبير مورثات الكائن الحي.

دراسة التعبير الجيني باستعمال مصفوفات الدنا

يطلق على هذه التقنية أسماء أخرى من مثل: DNA chip, biochip, gene chip، يوضح الشكل ٨-٢ بنية مصفوفة الدنا، فهي عبارة عن شريحة صغيرة الحجم بحجم الشريحة المجهريّة، مصنوعة من مادة خاملة (زجاج أو سليكون) ومقسمة إلى عدد من المناطق الأصغر، يطلق على كل منها اسم تحت مصفوفة sub array تحوي كل واحدة منها عدداً كبيراً من البقع spots المتوضعة في صفوفٍ وأعمدةٍ، وتمثل كل بقعة منها إحدى مورثات الجين، إذ إن كل بقعة تحوي مسابر تتمم بشكلٍ نوعيٍّ مناطق مختارة من المورثة المعنية. بما أن المسابر قصير (عديد نكليوتيد) لذلك تحوي البقعة الواحدة خليطاً من مسابر عدة ترتبط في مناطق متفرقة على طول المورثة.



الشكل ٨-٢: بنية مصفوفات الدنا.

ولابد من الإشارة هنا إلى أن توزيع المسابر على بقع المصفوفة يتم بواسطة روبوتاتٍ خاصةٍ وعمليةٍ مؤتمتةٍ بالكامل. وفي السابق وقبل تطور هذه الوسائل التقنية كان توزيع المسابر يتم بشكلٍ يدويٍّ على شريحة تحوي ٩٦ حفرةً 96-well plate، وكان هذا الشكل

من المصفوفات يعرف بـ Macroarray لأنه يمثل عدداً محدوداً من المورثات، بعدد حفر الشريحة.

يتم تثبيت المسابر على سطح الشريحة probes immobilization باستعمال واحدة من التقنيات الثلاث الآتية:

١. الطرق النقطي الخفيف drop touch

٢. النفث الكهربائي

٣. الطباعة الضوئية الحجرية photolithography

مبدأ عمل مصفوفات الدنا

يعتمد مبدأ عملها على التهجين الحاصل بين المسابر المثبتة على سطح الشريحة وقطع الدنا المتممة لها والموجودة في محلول العينة وفقاً لقاعدة تتام الأسس base pair complementation

تحضير العينات وإجراء الفحص

تقاس شدة التعبير الجيني من خلال تحديد كمية الرنا المرسال mRNA الذي تنتجه المورثة، لكن وبما أن المسابر المثبتة immobilized على سطح المصفوفة طبيعتها DNA (مسابر الدنا أكثر ثباتاً من مسابر الرنا)، لذا كان من الضروري تحويل الرنا المرسال المستخلص من خلايا العينة إلى دنا متمم cDNA وذلك بواسطة تفاعل النسخ العكسي reverse transcription.

مراحل تحضير العينات

يوضح الشكل ٨-٣ مراحل تحضير العينات لتحميلها على مصفوفة الدنا:

- يعزل الرنا المرسال الكلي mRNA من العينة المفحوصة (خلايا أو نسيج ما) .
- يتم تحويل الـ mRNA إلى دنا متمم cDNA بواسطة النسخ العكسي باستعمال إنزيم reverse transcriptase مما يؤدي إلى الحصول على حلزون هجين RNA-DNA hybrid.

- يتم تفكيك طاق الرنا الأصلي والإبقاء على طاق الدنا المتمم cDNA من خلال المعالجة بقلوي مثل NaOH.
- ينقى الدنا المتمم باستعمال تقنية كروماتوغرافيا الألفة affinity chromatography على أعمدة السليكا.
- تتم تجزئة الدنا المتمم cDNA fragmentation إلى قطع أصغر باستعمال إنزيمات الاقتطاع restriction enzymes.
- توسم العينات labeling بملونات متألقة: مثلاً Cy5 ذو التآلق الأحمر للعيينة المجهولة، و Cy3 ذو التآلق الأخضر للعيينة الشاهدة.
- تمزج كميتين متساويتين من كل من العينة المجهولة والشاهدة ثم يحمل المزيج على المصفوفة، وتحضن طيلة الليل over night في فرن تهجين hybridization oven في درجة حرارة مقدارها ٣٧°م ليتم الارتباط بين المسابر في المصفوفة و قطع الدنا في العينة
- تغسل الشريحة لإزالة بقايا الدنا غير المرتبطة .

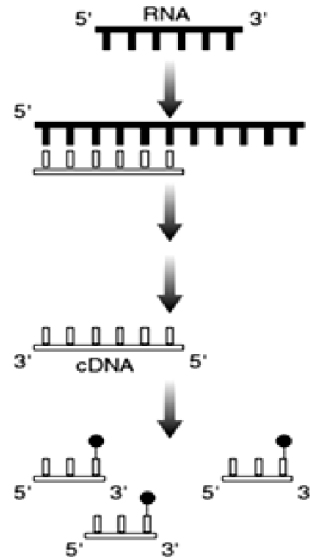
1. استخلاص RNA

2. تصنيع cDNA

3. تفكيك RNA بوسط قلوي

4. تنقية cDNA على الأعمدة

5. تجزئة cDNA ووسم نهاياته



Legend: RNA DNA

الشكل ٨-٣: مراحل تحضير العينات ووسمها قبل تحميلها على مصفوفة الدنا.

ملاحظة:

يمكن أن تكون العينتان (المجهولة والشاهدة) من شخصين أحدهما مريض والآخر سليم، أو من الشخص ذاته ولكن من منطقتين مختلفتين (نسيج سليم وآخر مرضي)، أو حتى من النسيج والمنطقة ذاتها لكن في لحظتين زمنيتين مختلفتين وذلك لدراسة الاختلافات في مستوى التعبير الجيني في كل حال.

قراءة النتائج وتفسيرها:

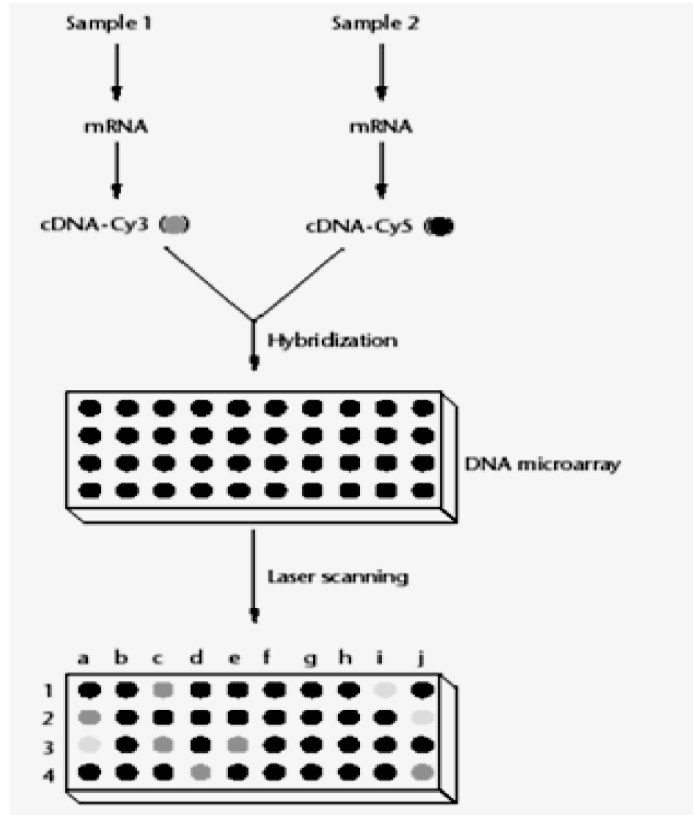
تُعرض المصفوفة بعد انتهاء عمليات الغسل إلى الأشعة فوق البنفسجية UV مما يؤدي إلى تألق البقع التي حدث فيها تهجين (ارتباط الدنا الموسومة بالمسابر) ، في حين تبقى البقع التي لم يحدث فيها تهجين عاتمة (الشكل ٨-٤).

لقراءة النتائج وتوثيقها تستعمل آلة ماسحة خاصة scanner مزودة بمنبعين ضوئيين ليزريين أحدهما أخضر اللون والآخر أحمر، يعملان بالتناوب بحيث تلتقط صورة للمصفوفة بأحد الضوئين أولاً (الأخضر مثلاً) ثم تلتقط صورة ثانية بالضوء الآخر (أحمر)، ترسل الصورتان إلى حاسب خاص مزود ببرنامج معالجة متخصص، يقوم بدمج الصورتين لتنشأ صورة تظهر فيها تدرجات لونية عدة (الشكل ٨-٤):

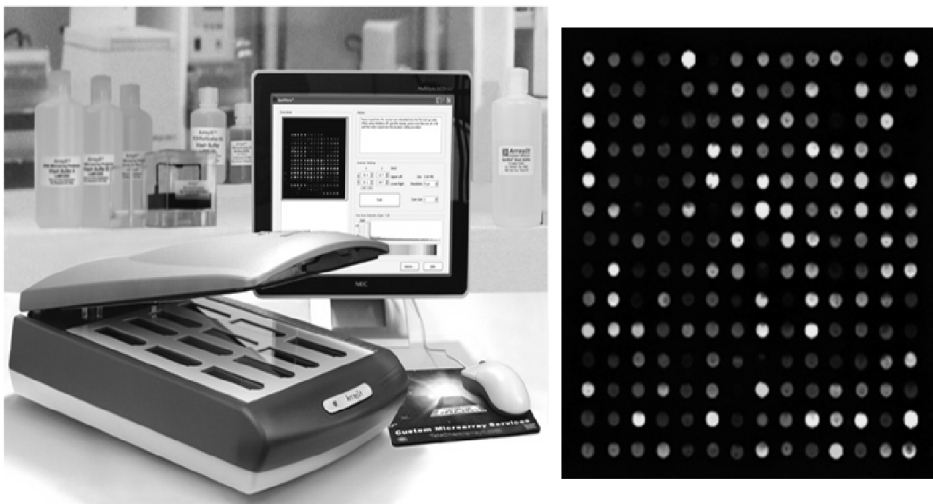
- بقع خضراء: ناتجة عن ارتباط الدنا فقط من العينة الشاهدة (الموسومة بـ Cy3 الأخضر)، أي إن المورثة المدروسة لا يتم التعبير عنها في العينة المجهولة، مما يدل على حدوث إطفاء للمورثة switch off أو تخفيض لمستوى تعبيرها down regulation في عينة المجهول.

- بقع حمراء: ناتجة عن ارتباط الدنا فقط من العينة المجهولة (الموسومة بـ Cy5 الأحمر)، أي إن المورثة المدروسة يتم التعبير عنها فقط في العينة المجهولة، مما يدل على حدوث تفعيل للمورثة switch on أو زيادة لمستوى تعبيرها down regulation في عينة المجهول.

- يقع صفراء: ناتجة عن ارتباط كميات متساوية من الدنا من كلا العينتين، أي إن المورثة المدروسة يتم التعبير عنها بالمقدار ذاته في كل من العينتين الشاهدة والمجهولة.
 - يقع سوداء: ناتجة عن عدم ارتباط أي من دنا العينتين الشاهدة والمجهولة، أي إن المورثة المدروسة لا يتم التعبير عنها إطلاقاً في كلا الحالتين.
- وتعد تقنية مصفوفات الدنا طريقة نوعية ونصف كمية لقياس مستوى التعبير الجيني، لأن النتائج المنبثقة عنها تشير إلى زيادة أو نقصان التعبير الجيني بشكل تقريبي من دون وجود وحدات قياس، على الرغم من أن بعض البرمجيات المتطورة المستعملة لقراءة النتائج وتفسيرها تعطي نسبة مئوية لزيادة/نقصان مستوى التعبير الجيني اعتماداً على قياس التدرج اللوني بين اللونين الأحمر والأخضر، الشكل ٨-٥ يوضح بعض التجهيزات الحديثة المستعملة في هذه التقنية.



الشكل ٨-٤: قراءة وتفسير لون التألق وشدته في تقنية مصفوفات الدنا.



الشكل ٨-٥: بعض التجهيزات و البرمجيات المستعملة لقراءة وتفسير نتائج مصفوفات الدنا.

تطبيقات تقنية مصفوفات الدنا

يمكن باستعمال مصفوفات الدنا قياس التغيرات الحاصلة في تعبير مختلف مورثات كائنٍ حيٍّ، ما مما له تطبيقاتٌ مهمة في المجالات الآتية:

١- دراسة التغيرات المرضية للتعبير الجيني

أي دراسة ما هي المورثات التي يزداد أو ينقص مستوى تعبيرها بالتزامن مع الإصابة بمرضٍ معينٍ. فلتحديد المورثات المسؤولة عن تطور سرطانٍ ما وليكن سرطان الثدي: نأخذ عيّنتين من المريضة ذاتها إحداها من الورم والأخرى من منطقة سليمةٍ غير مصابةٍ بالورم، ويمكن طبعاً المقارنة مع عينةٍ ثالثةٍ لامرأةٍ غير مصابةٍ بسرطان الثدي.

يعزل الرنا المرسال الكلي من العينات المأخوذة، ويتم تحويله إلى دنا متمم cDNA، توضع العينة السليمة بالواسم Cy3 (الأخضر) وتوضع العينة المرضية بالواسم Cy5 (الأحمر)، و تعامل العينتان كما هو مبينٌ في الفقرة السابقة.

بعد تحميل العينات على المصفوفة المجهرية microarray وإجراء عمليات الحضان والغسل المذكورة سابقاً نقوم بقراءة النتائج باستعمال الماسح الليزري ومعالجتها ببرنامجٍ خاصٍ نلاحظ مايلي:

- يتوقع أن معظم البقع الضوئية ستكون ذات تدرجٍ أصفرٍ وتعبر عن مورثات لم يكن هناك فارقٌ في تعبيرها بين كلٍّ من العينة السليمة والعينة الورمية.

- في حال ظهور بقعٍ خضراء اللون، فهذه تدل على مورثاتٍ حدث فيها تراجعٌ لمستوى التعبير الجيني down regulation في العينة المريضة، ومن المحتمل أن هذا قد أدى إلى تناقص إنتاج بروتيناتٍ مهمةٍ، يلعب غيابها دوراً مهماً في تطور السرطان، مثل المورثات الكابحة للورم tumor suppressor genes.

- في حال ظهور بقعٍ حمراء اللون، فهذه تدل على مورثاتٍ حدث فيها زيادةٌ لمستوى التعبير الجيني up regulation في العينة المريضة، ومن المحتمل أن هذا قد أدى إلى زيادة إنتاج بروتيناتٍ، تلعب دوراً مهماً في تطور السرطان، مثل المورثات المحرزة على انقسام وتكاثر الخلايا proto-oncogenes.

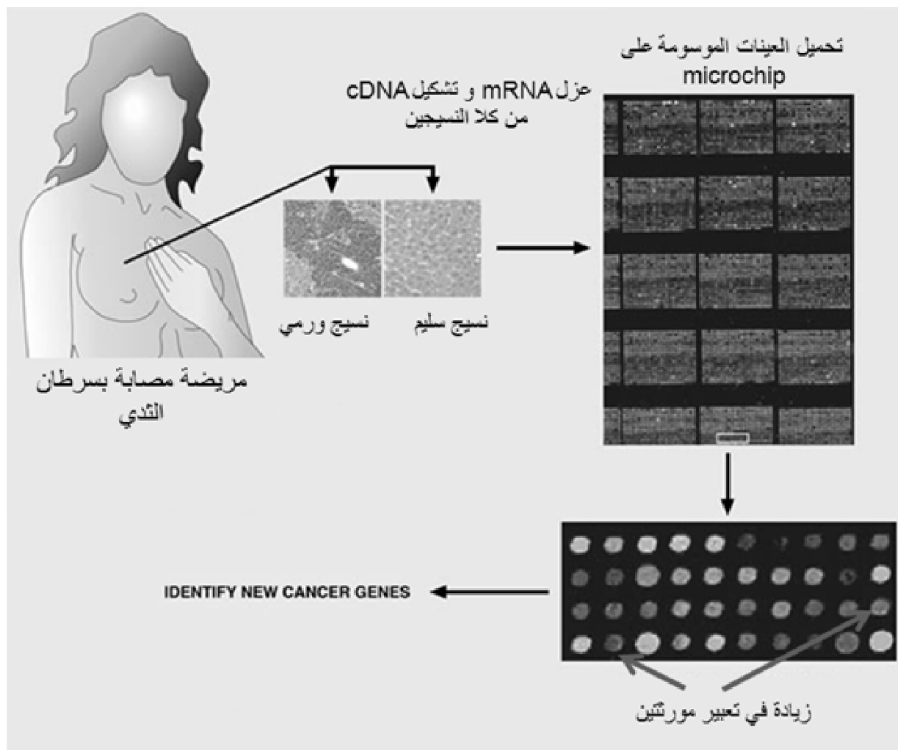
عند معرفة المورثات التي حصل لها زيادةٌ أو نقصانٌ في التعبير الجيني، يمكن البدء باختيار علاجٍ مناسبٍ لهذه الحال، بحيث يتم تعويض البروتينات الناقصة أو تثبيط البروتينات التي حصل لها فرط في الإنتاج.

ويمكن أيضاً استعمال هذه التقنية كوسيلةٍ للتشخيص الباكر لسرطان الثدي (الشكل ٨-٦)، قبل ظهور الأعراض السريرية، وبالتالي التدخل الباكر قبل تطور المرض وانتشاره، مع ما يتضمنه ذلك من نسب شفاءٍ عاليةٍ للمرض.

٢- تشخيص الأخماج باستعمال بصمة التعبير الجيني

عندما يقوم كائنٌ حيٌّ دقيقٌ (عاملٌ ممرضٌ) بجمع كائنٍ حيٍّ فإنه يسبب تغيراً في نمط التعبير الجيني gene expression profile لهذا الكائن الحي، حيث يزداد تعبير مورثاتٍ محددةٍ بينما ينقص تعبير مورثاتٍ أخرى.

يكون هذا التغير مميزاً للعامل الممرض طالما أنه يصيب الكائن ذاته وفي الشروط نفسها، ويمكن اعتبار ذلك بمنزلة بصمةٍ مميزةٍ للعامل الممرض واستعمالها في تشخيص الأخماج.



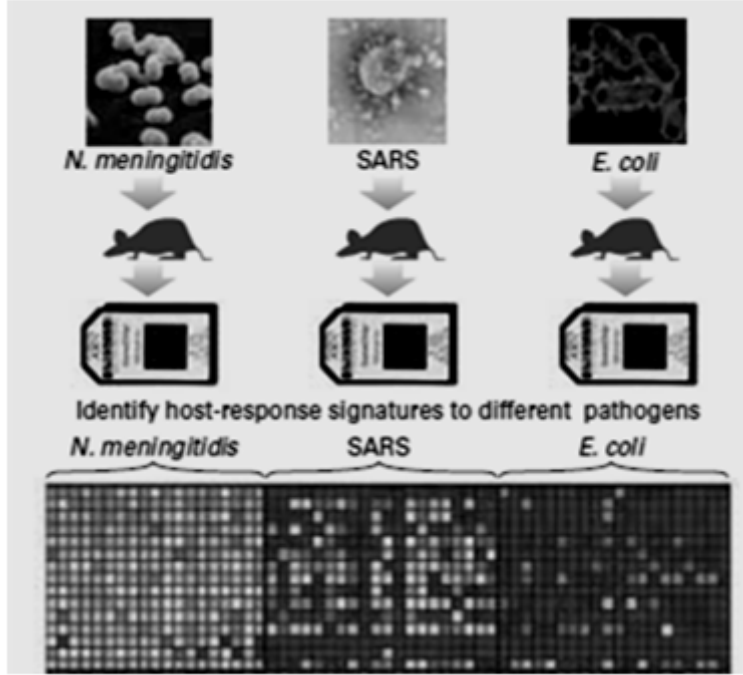
الشكل ٨-٦: استعمال مصفوفات الدنا لتشخيص المورثات المسؤولة عن الإصابة بسرطان الثدي.

في المثال الموضح في الشكل ٨-٧ قام العلماء بأخذ ثلاثة فئران من السلالة ذاتها، وخمخ كل منها بأحد ثلاثة عوامل ممرضة هي جراثيم الإشريكية القولونية، جراثيم النيسيريا السحائية وفيروس السارس، ثم قاموا بعزل الرنا المرسال من هذه الفئران وتحويله إلى دنا متمم cDNA ثم دراسته باستعمال تقنية مصفوفات الدنا.

لوحظ دائماً أن كل عامل ممرض يؤدي إلى الحصول على توزيع مميز للبقع الملونة، تساعد في تمييزه عن باقي العوامل الممرضة الأخرى.

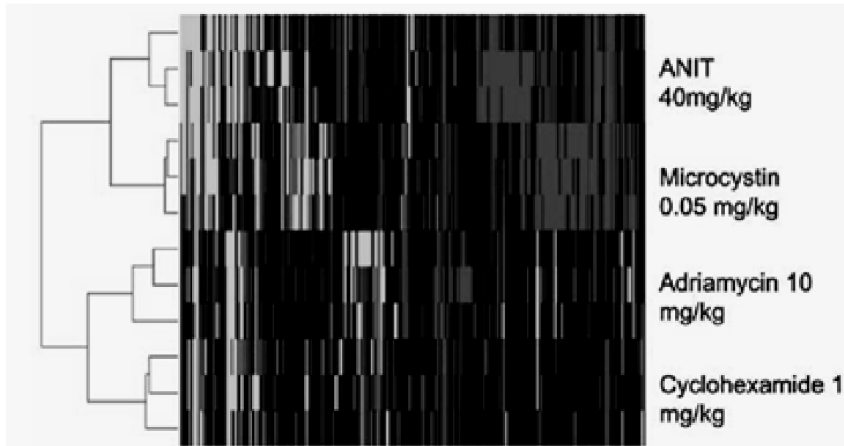
٣- دراسة تأثير المواد السامة على تعبير المورثات

تمتلك بعض المركبات الكيميائية سمية للمورثات gene toxic، إذ يمكن أن تؤدي إلى طفرات في المورثات مسببة تغيراً في بنية البروتينات الناتجة عنها، وفي حالات أخرى قد تحدث الطفرة في المناطق التي تنظم تعبير المورثة (مثل المحرّض promotor)، مما يؤدي إلى زيادة أو نقصان كمية البروتين المنتج دون التأثير على بنيته.



الشكل ٨-٧: استعمال تقنية مصفوفات الدنا لتشخيص العوامل الممرضة.

من المهم جداً بالنسبة لأي دواءٍ أو عقارٍ مكتشف أن تتم دراسة تأثيره على عمل وتعبير المورثات، قبل أن يتم اعتماده بوصفه علاجاً مرخصاً. وتقدم تقنية مصفوفات الدنا حلاً سريعاً يمكننا من دراسة تأثير أي دواءٍ على عددٍ هائلٍ من المورثات من خلال تجربة واحدة كما هو مبين في الشكل ٨-٨.



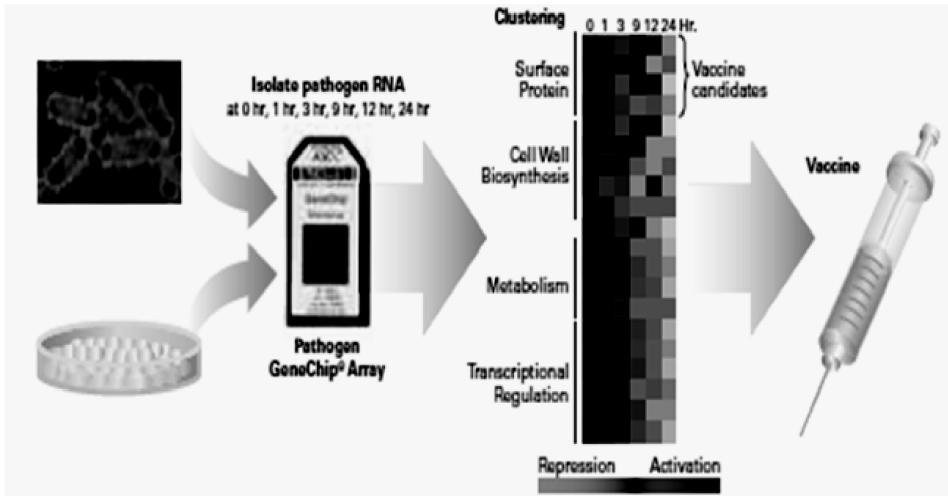
الشكل ٨-٨: استعمال مصفوفات الدنا لدراسة السمية الجينية لعدد من المواد بجرعات مختلفة. نلاحظ من الشكل اختلاف نمط التعبير الجيني لحيوان التجربة وفقاً لكل مادة من المواد التي أعطيت له.

٤- تطوير اللقاحات الجديدة

يمكن أن يكون اللقاح عاملاً ممرضاً كاملاً حياً مضعفاً أو مقتولاً، وقد يكون جزءاً من هذا العامل الممرض (محفظة، غشائه، أحد بروتيناته). أياً كان نوع اللقاح فهو يمتلك مستضدات antigens، تحرض الجهاز المناعي للكائن الحي (المناعة الخلطية) وتؤدي إلى استجابة مناعية تتمثل بإنتاج أضدادٍ نوعيةٍ.

تختلف قدرة اللقاح على إحداث الاستجابة المناعية تبعاً لنوعه، وفي حال اللقاحات الجزئية، التي تمثل جزءاً من العامل الممرض تكمن الصعوبة في معرفة الجزء المناسب والذي يضم المستضدات الأكثر قدرةً على إحداث الاستجابة المناعية، وتساعد تقنية مصفوفات الدنا بشكلٍ فعالٍ في معرفة أي أجزاء العامل الممرض يصلح أن يستعمل بوصفه لقاحاً فعالاً.

لتحقيق ذلك تتم زراعة العامل الممرض على وسطٍ مناسبٍ وتتم مراقبة التغيرات الحاصلة على تعبير مختلف مورثاته خلال مراحل نموه المختلفة، من خلال أخذ عينات من المستنبت بفواصل زمنية محددة وتحليلها باستعمال مصفوفة الدنا، كما هو مبينٌ في الشكل ٨-٩.



الشكل ٨-٩: استعمال تقنية مصفوفات الدنا في تطوير لقاحات جديدة.

يوضح الشكل تغيرات التعبير الجيني لدى العامل الممرض لكلٍ من:

- مورثات البروتينات السطحية للعامل الممرض surface proteins.
- المورثات التي ترمز اصطناع بروتينات الجدار الخلوي cell wall proteins.
- المورثات التي ترمز بروتينات تشارك في العمليات الاستقلابية metabolism proteins.
- المورثات التي ترمز بروتينات تلعب دوراً في تنظيم الانتساخ transcriptional regulation.

كما هو واضح فإن بعض البروتينات السطحية يزداد مستوى إنتاجها بمرور الوقت- تصبح البقع المعبرة عنها حمراء كلما تقدم الزمن- لذلك تعد هذه البروتينات مؤهلة لاختبارها كلقاحات محتملة.

٥- تحديد الشروط المثلى لإنتاج مركب حيوي على نطاق صناعي

تستعمل الكائنات الحية الدقيقة لإنتاج البروتينات المأشوبة أو للحصول على نواتجها الاستقلابية، وفي الواقع فإن اصطناع مثل هذه النواتج تتحكم فيه مورثات متعددة وبالنسبة للمصنع فإنه من الضروري معرفة الشروط المثلى التي تجعل الكائنات الحية الدقيقة تعطي أكبر مردودٍ ممكنٍ من المنتج المطلوب، الأمر الذي يحسن الإنتاجية ويخفض الكلفة. يمكن باستعمال مصفوفات الدنا دراسة التغيرات التي تطرأ على تعبير المورثات المرمزة للمنتج المستهدف في شروط مختلفة (من حرارة ودرجة حموضة ونسبة الغازات.... إلخ)، وتثبت الشروط التي تعطي أكبر قوة تعبير جيني لتلك المورثات.

٦- تطبيقات أخرى

هناك تطبيقات أخرى متنوعة لتقنية مصفوفات الدنا نذكر منها:

- دراسة واستكشاف وظائف المورثات في مجين الكائنات الحية functional genomics
- دراسة مدى الاستجابة لعلاجٍ دوائيٍ معطى، فقد يثبط العلاج تعبير بعض المورثات المسؤولة عن ظهور الصفة المرضية، أو قد يزيد العلاج من التعبير الجيني لبعض المورثات التي قد تساعد على شفاء المرض.