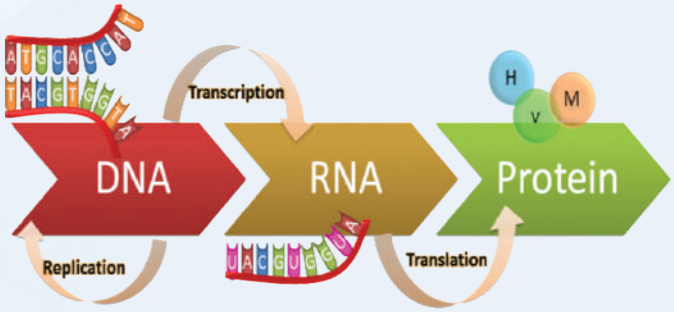
الكشف عن صحة النبات
باستخدام تقنية رقائق الحمض النووي



يؤدي نشاط كل جين إلى إنتاج بروتين والذي يقوم بعدة أدوار في الخلية، هذا المبدأ يسمى في علم البيولوجيا الجزيئية بالمبدأ الرئيسي

من هنا يمكننا أن نستنتج أنه كلما زاد نشاط جين من الجينات زادت كمية الـ mRNA المنتجة وبالتالي تزيد نسبة البروتينات المصنعة من طرف هذا الجين.

يعني أنه إذا أردنا أن نتعرف على الجينات النشطة في الخلية يمكننا أن نأخذ كل البروتينات في الخلية ونرى من هو البروتين الموجود بأكبر نسبة، لكن من الجانب العملي تمثل عدة تحديات:

أولاً: بنية البروتين مختلفة عن بنية الجين وتحليلها لا يزال صعباً وسوف يأخذ وقتاً كبيراً.

ثانياً: رأينا أن الحمض الأميني الواحد يمكن تشفيره من طرف عدة كودونات، يعني حتى لو عرفنا تسلسل الأحماض الأمينية في البروتين سوف يكون لدينا عدة احتمالات لصيغة الجين الذي أنتج هذا البروتين.

الطريقة الأسهل هي استخلاص الـ mRNA الموجود في الخلية وقياس نسبته، إذ أن بنيته مكملة لبنية الجين وله خاصية هامة وهو أنه قابل للتهجين يعني أنه يمكننا أن نصنع نسخة مكملة له (cDNA) باستعمال الجزيئات القاعدية

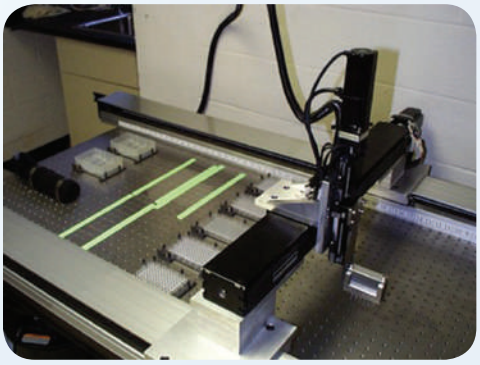
مفهوم تقنية رقائق الحمض النووي

أو ما تسمى الـ Microarray، بما أننا سوف نقوم بقياس نسبة الـ mRNA فما علي إلا أن أحضّر شريحة وأضع فيها سلاسل مكملة لسلاسل الـ mRNA التي يمكن للخلية إنتاجها وبالتالي عندما أضيف الـ mRNA إلى الشريحة فسوف تلتصق بالسلسلة التي تكملها، ولمعرفة كم نسخة تم إنتاجها من كل جين أقوم بوضع نسخ كثيرة من كل cDNA وأقيس نسبة الـ mRNA التي التصقت (هجن) مع السلاسل المكملة. ولقياس هذه النسبة أقوم بإضافة عنصر مشع لكل mRNA وبعدها أقيس في الشريحة نسبة إضاءة كل نقطة.

طرائق صنع رقائق الـ Microarray) DNA

ا- الطريقة الأولى هي استعمال روبوتات:

تقوم بتثبيت السلاسل المكملة في الفتحات (المسابير أو Probes) الموجودة في الشريحة وفي هذه الطريقة يتم أولاً تجهيز مكتبة السلاسل التكميلية (cDNA library) ووضعها في الروبوت وإخباره بمكان وضع كل سلسلة.



الكشف عن صحة النبات
باستخدام تقنية رقائق الحمض النووي

٢-الطريقة الثانية هي تتمثل في بناء السلاسل التكميلية:
حيث يضاف في كل مرة جزء قاعدي إلى السلاسل بشكل متوازي يتم استعمال الشريحة وقناع الشريحة في وضعها الأولي تحتوي على سلاسل مكونة من مجموعة هيدروكسيل وجزء حامي يمنع التصاق مركبات أخرى و في كل مرة يتم استعمال قناع يحتوي على فراغات تحدد المكان الذي نريد إضافة الجزيء القاعدي إليه، مثلا T ثم يقوم تحفيز الأماكن المحددة باستعمال الضوء مما يؤدي إلى نزع الجزء الحامي وبعدها يتم وضع المركب T على الشريحة فيلتصق فقط في الأماكن المفتوحة, بعدها يتم غسل الشريحة لنزع المكونات التي لم تلتصق ويغير القناع و تضاف قواعد أخرى وهي الشريحة الأكثر استعمالاً، إذ تسمح بتحكم أكبر بالسلاسل التي يراد إضافاتها.

كيف يتم استعمال رقائق الحمض النووي من أجل دراسة صحة النباتات؟

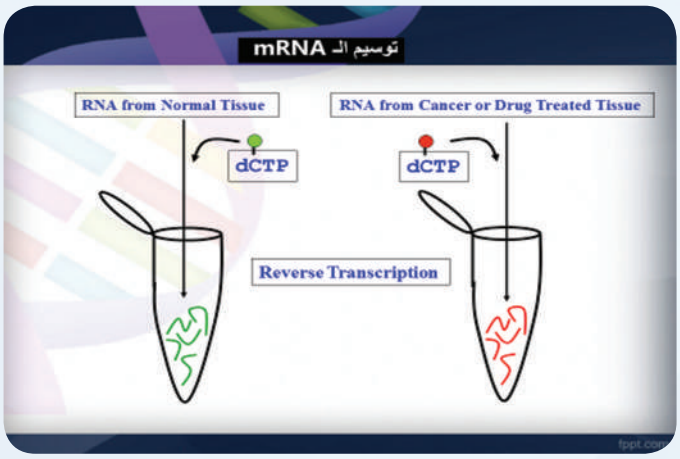
أن هذه الرقائق تستعمل من أجل قياس نسبة نشاط الجين ومعرفة الجينات النشطة والخامدة، لكن عندما تكون الخلية في حالة غير طبيعية (المرض النباتي مثلاً) فإن نشاط الجينات سوف يتغير فبعض الجينات التي يجب أن تكون نشطة يقل نشاطها بصفة ملحوظة أو ينعدم تقريباً أو من الجهة الأخرى يتم تنشيط جينات التي يجب أن تكون ذات نشاط ضعيف أو غير نشطة.

من أجل دراسة هذا التغيير نقوم بالخطوات التالية:

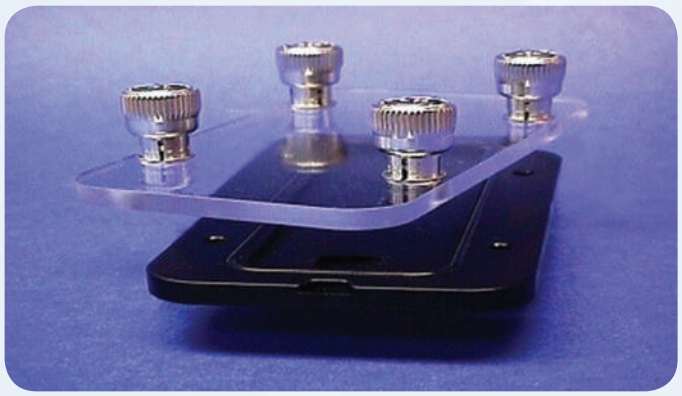
١-تحضير العينات: في هذه المرحلة يتم أخذ عينات من خلايا النبات غير الطبيعية والسليمة.

٢-استخراج الـ mRNA: يتم استخراج الـ mRNA من خلايا كل عينة ووضع mRNA العينات العادية في أنبوب و mRNA العينات المريضة في أنبوب آخر.

٣-توسيم الـ mRNA: يتم توسيم الـ mRNA باستعمال مكونات كيميائية تشع عندما تحفز باستعمال الليزر، فيتم توسيم واحد من الأنابيب بالمكون Cy٣ (الذي يشع عند استعمال الليزر الأخضر) والأنبوب الآخر بالمكون Cy٥ الذي يشع عند استعمال الليزر الأحمر)، ثم بعدها نقوم بوضع محتوى الأنبوبين معاً في أنبوب واحد.

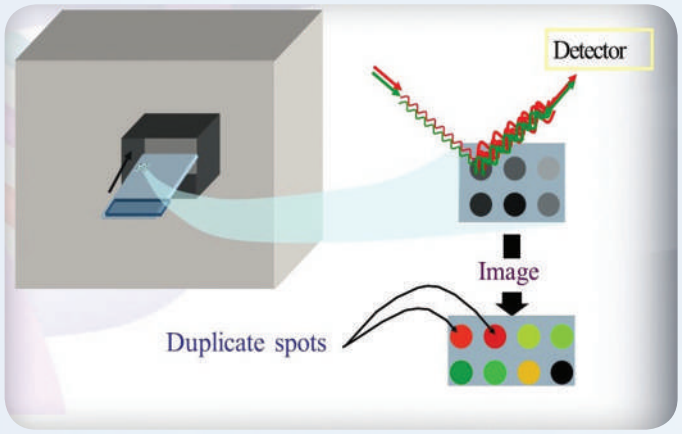


٤-التهجين: نقوم بإضافة الـ mRNA الموسمة إلى الـ Micrroarrayليتم بعدها عملية التهجين بحيث تلتصق كل mRNA بالسلسلة المكملة لها وفقا لمبدأ التهجين.



٥-غسل الرقاقة: يتم بعدها غسل الرقاقة من أجل الـ mRNA التي لم تلتحم مع مكملاتها من أجل تفادي أية أخطاء في قياس نسبة النشاط.

٦ -المسح بالليزر وتحليل الصور:الـ mRNA تكون موسومة بلونين مختلفين الأخضر للخلايا العادية والأحمر للخلايا ذات الحالة غير الطبيعية حيث يشع كل لون عند استعمال ليزر معين، فلقياس نسبة الجينات في الخلايا العادية نقوم بإرسال الليزر الأخضر فتشع الجينات العادية، فنأخذ صورة على هذا الإشعاع، ثم نقوم باستعمال الليزر الأحمر فتشع الجينات النشطة في الخلايا ذات الحالة غير الطبيعية.



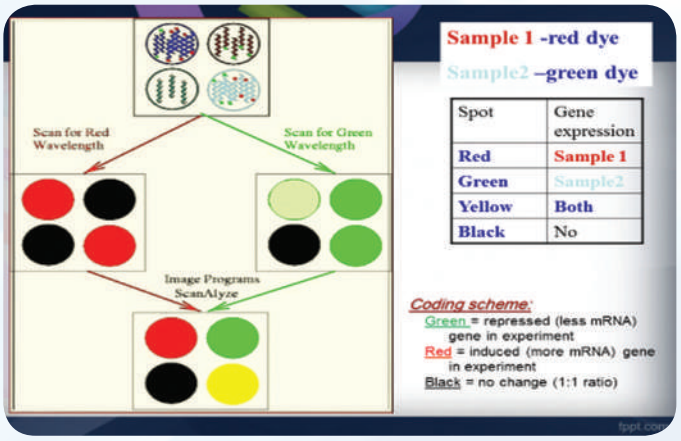
نقوم بعدها بأخذ هذه الصور ومعالجتها رقمياً لمعرفة نسبة إشعاع كل جين في كل من العينتين ولضمان القياسات المتحصل علها دقيقة يجب ضمان أن كل نقطة في الرقيقة تتعرض لنفس نسبة الضوء وأن الصورة مأخوذة بشكل واضح.

في العادة يتم دمج الصورتين للحصول على فكرة أولية عن الجينات النشطة والغير نشطة في الخلايا ذات الحالة غير طبيعية.

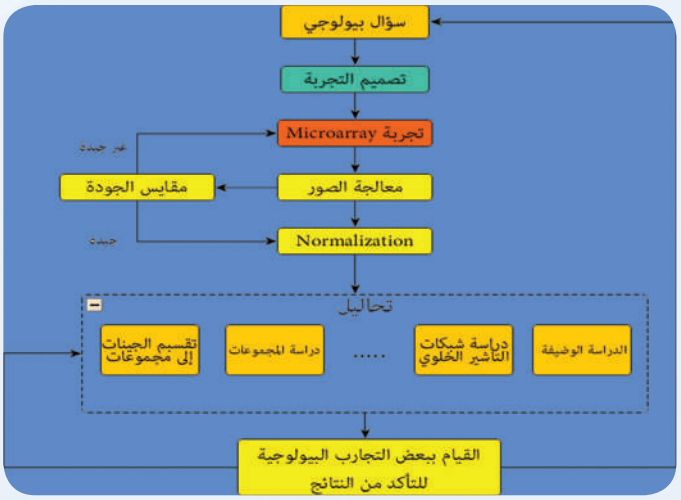
فمثلاً بعد دمج الصورتين لاحظنا أن لون أحد المسابير مائل للون الأخضر فهذا يعني أن نشاط الجين في الخلية العادية

الكشف عن صحة النبات
باستخدام تقنية رقائق الحمض النووي

أكثر من نشاطه في الخلية ذات الحالة غير طبيعية وإذا رأينا أن مسباراً له لون أحمر فنستنتج أن هذا الجين أكثر نشاطاً في الخلايا ذات الحالة غير طبيعية أما إذا كان لون المسبار أصفر فنستنتج أن نشاط هذا الجين لم يتغير.



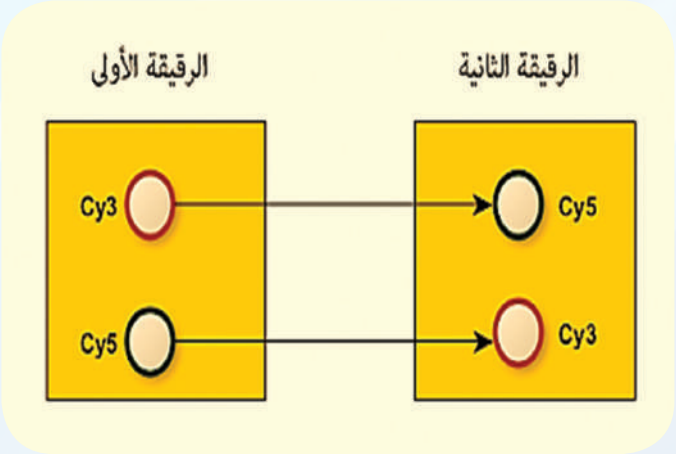
٧ – تحليل بيانات رقاقة الـ DNA: سنركز على طرق تحليل البيانات وما هي الاحتياطات التي يجب أخذها بعين الاعتبار في كل مرحلة. في العادة يتم تقسيم مراحل القيام بتجارب الـ Microarray إلى سبعة مراحل أساسية كما هو موضح في الشكل.



١- السؤال البيولوجي: حتى وإن كانت هذه المرحلة بديهية لكنها في رأيي هي من أهم المراحل إذ يجب على الباحث قبل الشروع في التجربة، معرفة نوع المشكلة التي يريد الإجابة عنها مثلاً: ما هو نوع المرض؟ ماهي خصائص العينات التي يجب أخذها؟ ما هي الحالة التي يجب أن تكون العينات فيها؟، تحديد الهدف في هذه المرحلة يساهم في زيادة احتمال الحصول على النتائج المرجوة ومن ثم فهم نتائج التجربة وتصحيح الأخطاء إن وجدت.

٢- تصميم التجربة: يتم خلال هذه المرحلة التفكير في تفاصيل التجربة و تحضير العينات مع انخفاض سعر الرقائق يستحسن استعمال عدة عينات من النوعين (مثلاً عشرة عينات لخلايا سليمة و عشرة عينات مريضة) من أجل زيادة الدقة الإحصائية و إلغاء الأخطاء الموجودة في كل عينة، حيث من المعلوم أنه لو أعدنا التجربة باستعمال نفس العينة ونفس الكمية ونستعمل نفس الجهاز ويقوم بالتجربة نفس الشخص لن تكون النتائج مطابقة ١٠٠٪ .

بالإضافة إلى هذا يجب أيضاً تحديد نوع الرقائق التي سوف تُستعمل، رقائق ثنائية القناة أم رقائق أحادية القناة في حالة استعمال رقيقة ثنائية القناة يجب فقط الأخذ بعين الاعتبار أن نسبة التهجين ونسبة الـ mRNA ستكون مختلفة بين العينتين وحتى إن كانت النسبة متساوية فإن نسبة إشعاع اللون الأحمر (Cy٣) واللون الأخضر (Cy٥) ليست متساوية، لتصحيح هذه المشكلة نقوم بعملية قلب الألوان حيث نقوم بالتجربة مرتين وفي كل تجربة نقلب الألوان بين العينتين، فالعينة التي كانت ملونة بالأحمر في التجربة الأولى تلون بالأخضر والعينة التي لُونت بالأخضر في التجربة الأولى تلون بالأحمر وتعاد التجربة.



رسم تخطيطي يوضح مبدأ قلب الألوان

٣- القيام بتجربة الMicroarray:

بعد تجهيز كل العينات واختيار نوع الرقيقة نقوم بالتجربة.

٤- معالجة الصور وحساب نسبة النشاط: في هذه المرحلة تستعمل برامج متخصصة من أجل تحديد نسبة الإشعاع في كل مسبار وتحديد نسبة التشويش الناجمة عن الإشعاعات الناجمة عن مصادر أخرى غير عملية التهجين. إذ أن هناك عدة عوامل يمكن أن تأثر على نسبة الإشعاع كوضعية الرقيقة، ضغط الغرفة،... إلخ، لهذا يجب أولاً حذف هذه التشويشات الخلفية والاحتفاظ بالإشارة الحقيقية قدر الإمكان، تختلف البرامج المستعملة في تحليل الصور لكنها كلها تعمل على حسب مبدأ واحد هو حساب نسبة الإشعاع في النقطة الأكثر كثافة بالنسبة لكل مسبار بعد ذلك يتم حذف نسبة التشويش.

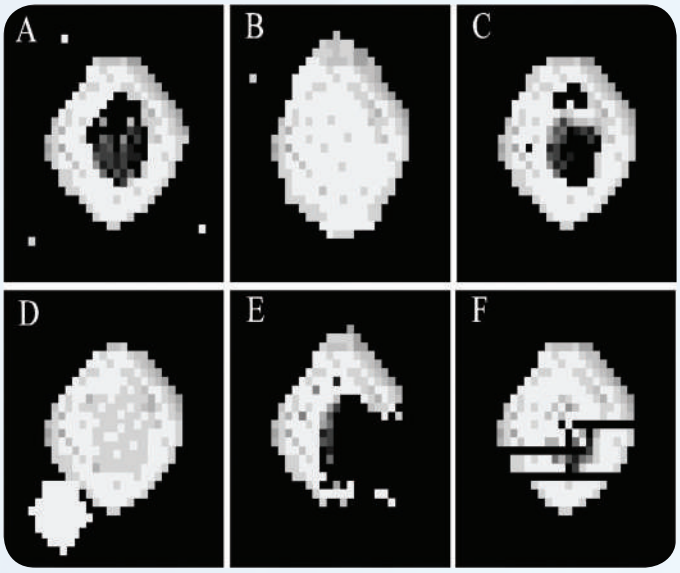
ليكن RR نسبة الإشعاع الأحمر الأولية وليكن GG نسبة الإشعاع الأخضر الأولية في الرقائق ثنائية القناة بعد حساب

الكشف عن صحة النبات
باستخدام تقنية رقائق الحمض النووي

نسبة التشويشات الخلفية RbRb بالنسبة للأحمر و GbGb بالنسبة للأخضر يتم حساب نسبة نشاط (تعبير) الجين بحذف نسبة التشويش فتصبح نسبة الإشعاع تساوي R-RbR-Rb بالنسبة للأحمر و G-GbG-Gb بالنسبة للأخضر هذه الطريقة تعتبر بسيطة لكن من بعض مشاكلها أنها تؤدي إلى قيم سالبة طورت طرق أخرى للتخلص من نسبة التشويش أكثر فعالية. بالنسبة لرقائق أحادية القناة يختلف تصميم الرقيقة حيث يتم تصميم مسبارين لكل جين. المسبار الأول يحتوي على سلسلة مطابقة لسلسلة الجين ونرمز لها بـ PMPM وسلسلة مغايرة ونرمز لها بـ MMMM، المبدأ هنا هو أن الإشعاع الناتج عن عملية التهجين في المسابير ذات السلسلة المطابقة تمثل نسبة النشاط الحقيقي والإشعاع الناتج عن السلسلة المغايرة يمثل التشويش والهدف أن يكون الفرق بين هذين الإشعاعين كبير، فإذا كان متساوي فهذا يعني أن القياس غير صحيح.

٥- مقاييس الجودة:

بعد حساب نسبة إشعاع كل جين وحساب قيمة التشويش الخلفي يستحسن القيام بقياس نسبة جودة البيانات لمعرفة هل يمكن مواصلة استعمالها ومعرفة أيضاً مدى نسبة نجاح التجربة، لا توجد بروتوكولات محددة من أجل تحديد نسبة الجودة، لكن من القياسات المستعملة بكثرة هي قياس نسبة الإشارة إلى الضجيج (SNR) والتي كلما كانت كبيرة كانت الجودة جيدة.



أمثلة عن عيوب البقع الضوئية
A- شكل دونات B- شكل بيضوي أو كمثري C- ذات ثقب داخلي غير متجانس D- قطعة أثرية عالية الكثافة E- شكل المنجل F-على شكل خدوش

هناك عدة طرق لحساب هذه القيمة ويمكن التطلع عليها في مصادر أخرى، مثلاً في البيان الموضع في الصورة في الأسفل يوضح رسم بياني لقيمة SNR للإشارتين الحمراء والخضراء لتجربتين. نلاحظ أن نسبة الـ SNR في التجربة الممثلة في الصورة العلوية أحسن من الصورة السفلية لأن نسبة الإشارة الحقيقية أكبر من نسبة الضجيج أما في الثانية نلاحظ أنها ضعيفة.

٦ - تنسيب القيم إلى الواحد:

هذه المرحلة مرحلة حساسة في معالجة بيانات الـ Microarray حيث أن نتائجها هي التي تحدد دقة النتائج النهائية.

كما قلنا سابقاً أن هناك دائماً اختلاف بين القياسات لتجربتين مختلفتين وذلك ناتج عن أسباب تقنية.

فعند المقارنة بين عينتين يجب أن تكون القيم قابلة للمقارنة، فمثلاً في التجربة الأولى كانت الكمية المستعملة كبيرة وفي الثانية كانت أقل بالطبع سوف تؤدي إلى قيم مختلفة في الإشعاع لكن هذا لا يعني أن جينات التجربة الأولى أكثر نشاطاً من التجربة الثانية لهذا وجبت الـ Normalization تنسيب القيم إلى الواحد.

تعتمد الطرق المستعملة في التنسيب على فقط نشاط بعض الجينات يتغير بين عينتين وهي الجينات المسؤولة عن الاختلاف أما أغلبية الجينات فلا يكون هناك تغير ملحوظ في نسبة نشاطها.

لهذا تم تصميم بعض الرقائق لتحتوي على مجموعة من الجينات تسمى الجينات المحافظة وهي جينات يعتقد أن نسبة نشاطها ثابتة بين كل أنواع الخلايا وبالتالي يمكننا استعمالها لتوحيد قيمة النشاط بين عينتين، لكن هذه الطريقة لها بعض السلبيات.

من بين الطرق الأكثر استعمالاً أيضاً هي طريقة الـ Normalization باستعمال طريقة الانحدار تقوم هذه الطريقة على الملاحظة القائمة أن نسبة الإشعاع بين الملون الكيميائي الأحمر والأخضر تختلف على حسب نسبة تركيز المحلول وأن المكونات الكيميائية تمتص إشعاع المكونات المجاورة مما يؤدي إلى نوع من الانحياز في نوع اللون النشط (Dye Bias) فالأصل أننا إذا قمنا بمقارنة نسبة إشعاع اللون الأحمر واللون الأخضر فإن النسبة بينهما ستكون مساوية للواحد بالنسبة لأغلب الجينات, يعني لو رسمناها في بيان الانتشار (Scatter plot) ستكون أغلبها على خط المحور ٤٥ درجة.

إعداد: الدكتور ينال أحمد القدسي
الهيئة العامة للبحوث العلمية الزراعية