تحديد التسلسل النكليوتيدي – DNA sequencing

تعتبر تقنيات تحديد التسلسل النكليوتيدي هي حجر الأساس في العديد من الدراسات الجينية، إذ تم الاعتماد عليها بشكل كبير في مشروع الجينوم البشري، بالإضافة لدورها في دراسة الطفرات الوراثية, كما أسهمت هذه التقنيات في تطور علم الصيدلة الجينية pharmacogenetics الذي يدرس تأثير الاختلافات الجينية بين الأفراد على الاستجابة للأدوية، بما في ذلك الاختلاف في مدى استقلاب الدواء وفعاليته واحتمالية حدوث آثاره الجانبية من شخص لآخر.

تسلسل الحمض النووي (DNA Sequencing): هو عملية تحديد الترتيب الدقيق للنيوكليوتيدات ضمن جزء من الحمض النووي، أو ضمن جينوم كامل.

تختلف الخطوات اللازمة لتحديد ترتيب النيوكليوتيدات باختلاف تقنية التسلسل المستخدمة, ومن أكثر التقنيات شيوعا: تسلسل سانغر – تسلسل إلومينا – تسيليل باك بيو – تسلسل النانوبور.

سيتم تناول تسلسل سانغر التقليدي – وسانغر الآلي في هذه المحاضرة.

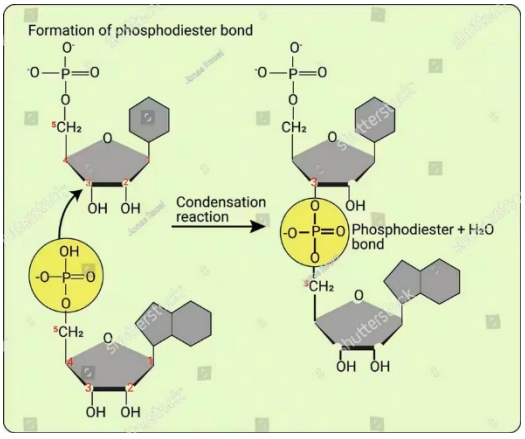
تقنية تسلسل سانغر التقليدية:

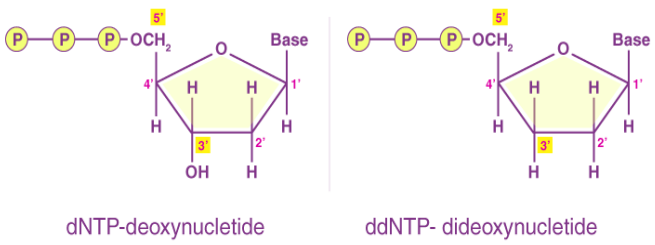
ابتُكرت عام 1977، ويستند المبدأ الأساسي لهذه الطريقة إلى تخليق سلسلة جديدة من الحمض النووي تكون مكملة للسلسلة القالب (Template Strand) ، مع إدخال نيوكليوتيدات معدلة وموسومة قادرة على إيقاف عملية الاستطالة عند دمجها في السلسلة النامية.

وبذلك تتكوّن مجموعة من قطع الحمض النووي بأطوال مختلفة، يمكن تحليلها لاحقًا لتحديد التسلسل الكامل للقواعد النيتروجينية.

يتم إيقاف استطالة السلسلة بواسطة ddNTPs (Dideoxynucleoside Triphosphates)، تشمل: ddATP – ddTTP – ddCTP – ddGTP، والتي تختلف عن النوكليوتيدات ثلاثية الفوسفات منقوصة الأكسجين العادية (dNTPs) في غياب مجموعة الهيدروكسيل (-OH) عند ذرة الكربون الثالثة (3') لسكر الديوكسيرايبوز.

ويؤدي غياب هذه المجموعة إلى منع تكوين رابطة الفوسفو دي استر مع مجموعة الفوسفات 5' للنيوكليوتيد التالي، وبالتالي تتوقف عملية البلمرة فور دمج ddNTP في السلسلة النامية، مما يؤدي إلى إنهاء استطالة السلسلة.





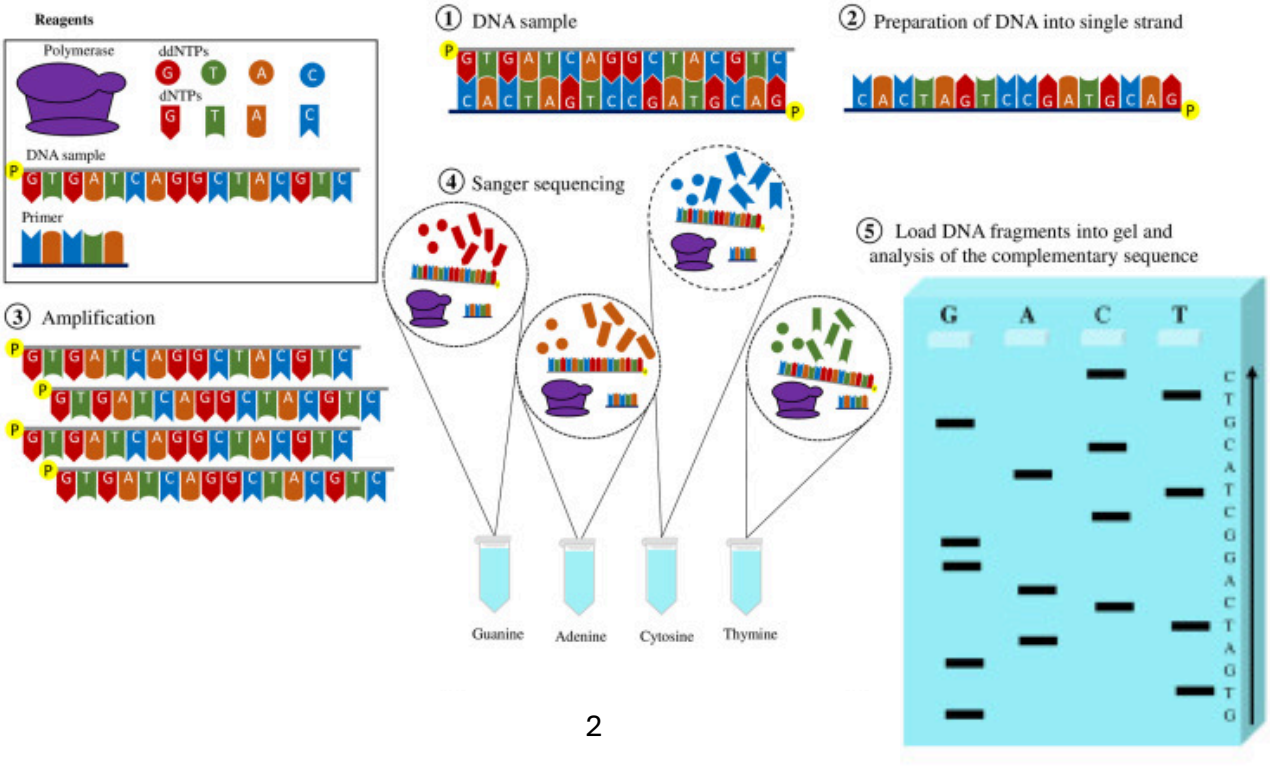
يُصمم نوع خاص من ddNTP لكل قاعدة نيتروجينية، وتكون جميعها موسومة بنفس المادة المشعة، لذلك النسخة التقليدية القديمة من طريقة سانغر تتطلب أربع تفاعلات منفصلة لكل سلسلة DNA، بحيث يحتوي كل أنبوب تفاعل على:

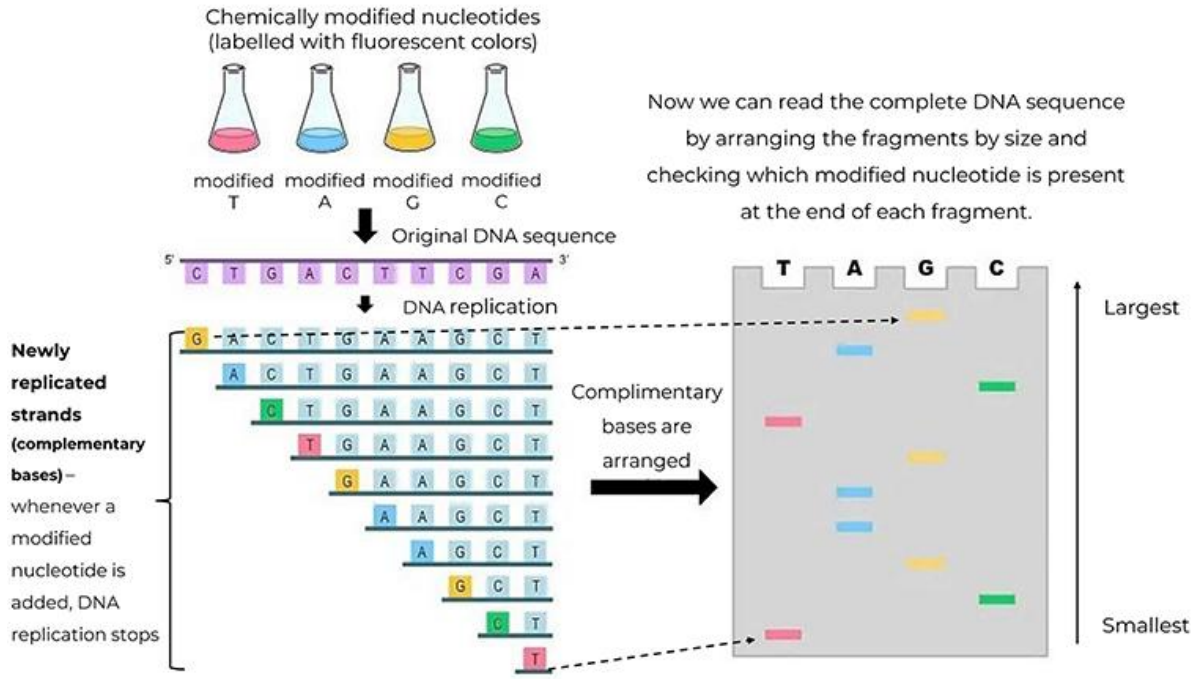
- الحمض النووي القالب(Template DNA).
- البادئ(Primer).
- إنزيمDNA Polymerase.
- النوكليوتيدات الطبيعية (dNTPs) : بكميات كبيرة.
- نوع واحد فقط من ddNTP (النكليوتيدات المنهية للتفاعل)في كل أنبوب: بكميات قليلة.

إذ يجب أن يكون تركيز ddNTP أقل من تركيز dNTP لضمان استمرار تفاعل البلمرة والاستطالة قبل حدوث الإنهاء العشوائي للسلسلة. خلال مرحلة البلمرة يقوم DNA Polymerase بتخليق نسخ مكملة من جزيء الحمض النووي للعينة عن طريق إضافة الـdNTPs ، حتى يتم إضافة ddNTP بشكل عشوائي في موقع معين، عندها تتوقف إضافة النيوكليوتيدات بسبب غياب مجموعة الهيدروكسيل وتتوقف عملية الاستطالة نهائيًا، مما يؤدي إلى تكوين مجموعة من السلاسل بأطوال مختلفة تنتهي جميعها بنفس القاعدة النيتروجينية الممثلة بواسطة ddNTP الخاص بذلك التفاعل. مع إجراء عدة دورات حرارية (Thermal Cycles) تنتج العديد من النسخ المختلفة، مما يضمن أن كل موضع نيوكليوتيدي في السلسلة سيكون قد تضمن ddNTP واحد على الأقل في كل أنبوب.

بعد ذلك تُفصل نواتج التفاعل بواسطة الرحلان الكهربائي على هلام البولي أكريلاميد، وفي هذه التقنية تُستغل الشحنة السالبة لجزيئات DNA، فتتحرك عبر الهلام باتجاه القطب الموجب. تنفصل سلاسل الـ DNA وفقا لاختلاف أطوال السلاسل الناتجة، يتم تعريض الهلام للأشعة السينية لاظهار العُصابات bands للاستدلال على موقع تواجد سلاسل ال DNA، ولأن السلاسل الأقصر تتحرك لمسافة أكبر، تُقرأ النتائج من الأسفل إلى الأعلى لتحديد التسلسل النووي.

ملاحظة: التسلسل الناتج عن هذه التقنية يمثل السلسلة المكملة (Complementary Strand) للتسلسل الهدف المراد تحليله.



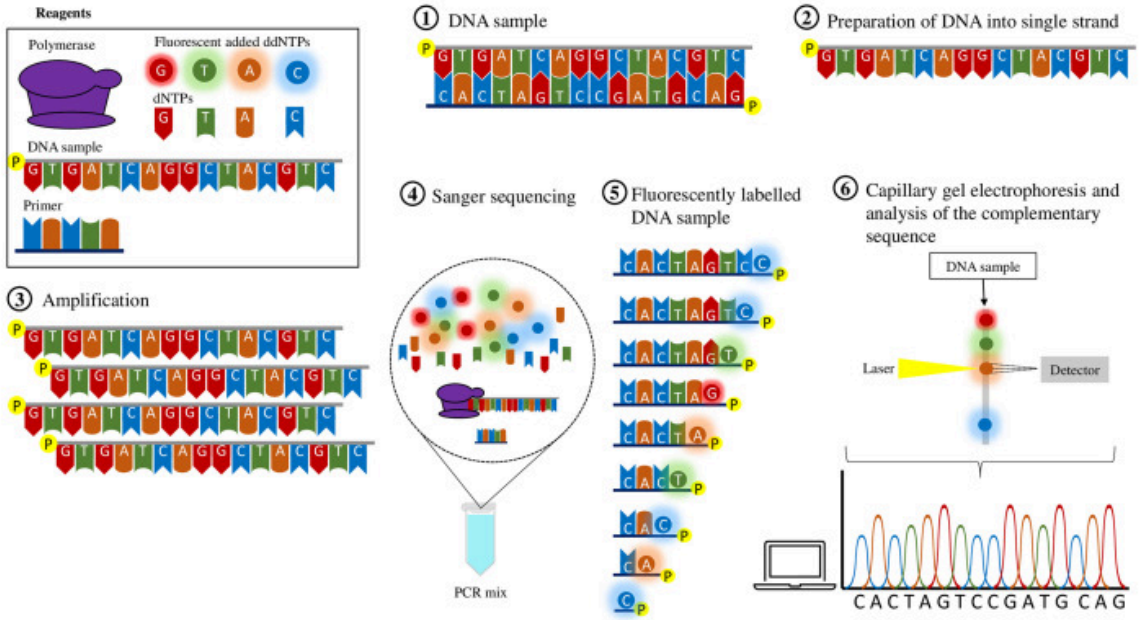


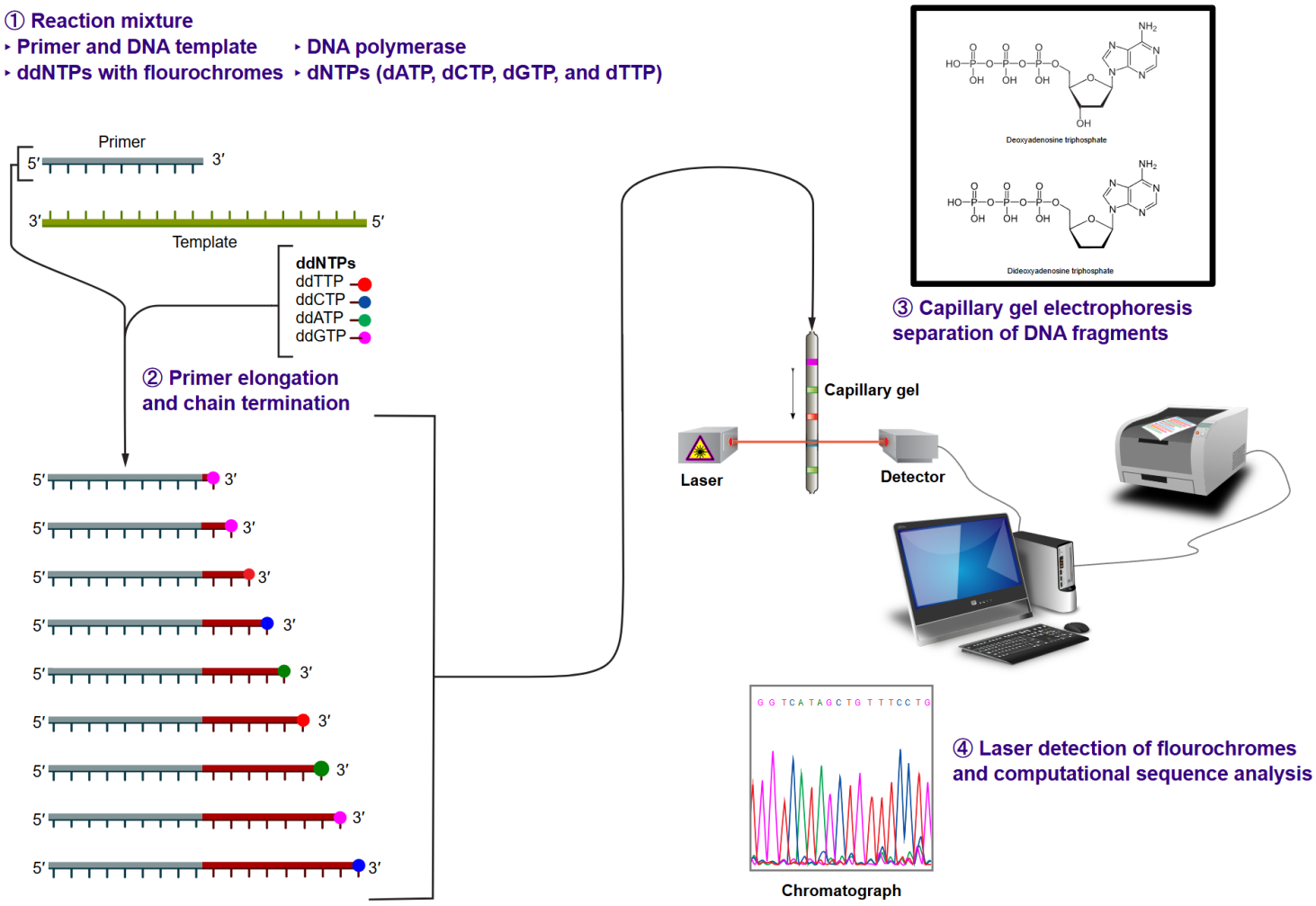
تطوير طريقة سانغر باستخدام الوسوم الفلورية (تقنية سانغر الآلية):

مع التقدم التقني، شهدت طريقة سانغر تطورًا كبيرًا من خلال استخدام ddNTPs الموسومة بأصباغ فلورية (Fluorescently Labeled ddNTPs) وتقنية الرحلان الكهربائي الشعري(Capillary Electrophoresis) .

في هذه النسخة الحديثة لم يعد من الضروري إجراء أربع تفاعلات منفصلة؛ إذ أصبح بالإمكان إجراء التفاعل بأكمله داخل أنبوب واحد فقط، حيث يُوسم كل نوع من ddNTP بصبغة فلورية ذات لون مميز خاص به.

توفر هذه العلامات الفلورية معلومات عن آخر ddNTP أُضيف إلى كل سلسلة DNA. وبعد فصل السلاسل حسب الحجم بواسطة الرحلان الكهربائي الشعري، يتم تعريضها إلى شعاع ليزر، ما يؤدي لتوهج الأصباغ الفلورية الموجودة على النهايات النهائية للسلاسل, يُلتقط الضوء المنبعث بواسطة كواشف طيفية, ثم تُحلَّل الإشارات الناتجة باستخدام برامج حاسوبية متخصصة لإعادة بناء التسلسل الكامل للحمض النووي عن طريق رسم كروماتوغرام يدل على نوع النكليوتيدات وترتيبها في السلسلة.





رغم اكتشاف تقنيات أحث وأسرع, إلا أنه لا تزال طريقة سانغر مستخدمة حتى يومنا هذا، خاصة في التطبيقات التي تتطلب دقة عالية مثل:

- تأكيد الطفرات الجينية.
- تسلسل الجينات المفردة.
- تحليل المقاطع القصيرة من الحمض النووي.
- التحقق من نتائج تقنيات التسلسل الحديثة مثل NGS.

المراجع:

-PubMed. DNA Sequencing Methods: From Past to Present

-Integra. DNA sequencing methods: from Sanger to NGS