المقدمة:

علم الوراثة الخلوية هو فرع من فروع علم الوراثة يهتم بدراسة الظواهر الوراثية وكيفية ارتباط الصبغيات بسلوك الخلية لا سيما سلوكها اثناء الانقسام المتساوي (الميتوزي)والانقسام الاختزالي (المنصف) دون الحاجة الى الى استخراج الحمض النووي وذلك عن طريق استخدام المجهرالضوئي .

وقد ساهم علم الوراثة في فهم الميكانيزمات الوراثية في عالم النبات من حيث التصنيف وتطور السلالات .

كما يعتبر من أكثر الأنظمة التي يرتكز عليها التحسين النباتي اذ ساهم في التعرف على المادة النباتية ووضع الخريطة الجينية لها

وقد اوضحت التجربة ان الوراثة الخلوية هي اساس الاستغلال العقلاني للتهجين بين الانواع كما تطبق في الزراعة المخبرية.

يمكن للوراثة الخلوية ان تساهم في خلق التنوعية باعطاء الحلول لبعض المشاكل التي يواجهها المربون مثل تذبذب الانتاج ونوعية المحاصيل...الخ.

ان مجال الوراثة الخلوية واسع جدا و المنهجيات المستخدمة فيها عديدة ، فهي تهتم قبل كل شيء بدراسة الكروموسومات اثناء الانقسام الميتوزي(الخيطي او المتساوي) والانقسام الميوزي(المنصف او الاختزالي).

الفصل الأول: البنية والبنية التحتية للكروموسومات

Structure et ulrastucture des chromosomes

مقدمة:

في خلايا النباتات الراقية تنتظم المادة الوراثية في تركيب معقد يسمى ADNيتكون من 35 % من بروتين الهستون وبروتينات غير هستونية من 10-15 بالمائة ويتمركز داخل نواة الخلية ،من اهم ادوار ADN هي النسخ المتماثل والاصلاح واعادة التركيب.

الكروموسوم او الصبغي :

مشتق من اللغة الاغريقية Chromosoma حيثchroma تعني اللون و soma تعني الجسم.

وهي حزمة منظمة البناء والتركيب يتكون معظمها من حمض نووي ريبوزي منقوص الاكسجين ADN

تقع في نواة الخلية وهي عادة لاتوجد منفردة وانما تقترن في العضويات حقيقيات النواة مع العديد مع العديد من البروتينات الهيكلية تسمى **الهستون.**

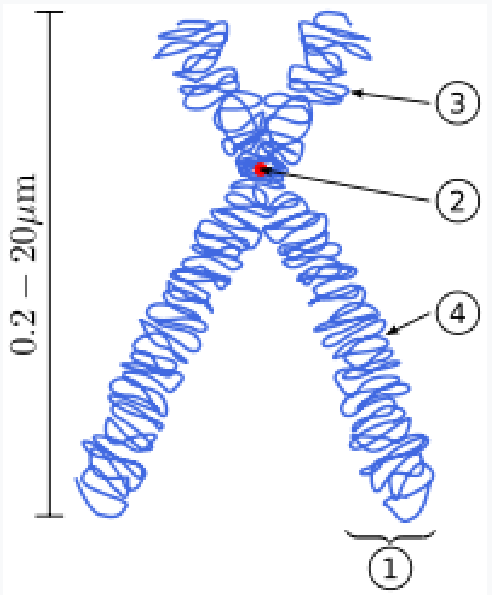
تقوم هذه البروتينات الى جانب بروتينات اخرى بمرافقة عملية لف لسلسلة ال ADN لكي لا تبقى على شكل خيوط متشابكة .

يمكن ملاحظة الكروموسومات عادة تحت المجهر الضوئي فقط عندما تكون الخلية في طور الانقسام الخلوي

الطور الاستوائي = Metaphase وذلك عندما تجتمع كل الكروموسومات بشكلها المكثف في منتصف الخلية .

وقبل ان يحدث الانقسام ينسخ كل كروموسوم وترتبط النسخة الجديدة من الكروموسوم بالكروموسوم الاصلي عبر منطقة تدعى بالجسيم المركزي**Centromère** مما يعطي للصبغي اشارة حرف **X** . **الشكل 1**

وذلك عندما يتوضع الجسم المركزي قرب مركزالصبغي وياخذ شكلا مكونا من ذراعين فقط وفي هذه الحالة يطلق على الكروماتدين الملتحمين عند منطقة الجسيم المركزي اسم **الصبغي.**



مخطط للكروموسوم (الصبغي) وفيه يظهر
(1) الكروماتيد
(2) قسيم مركزي
(3) الذراع القصير للكروماتيد
(4) والذراع الطويل للكروماتيد

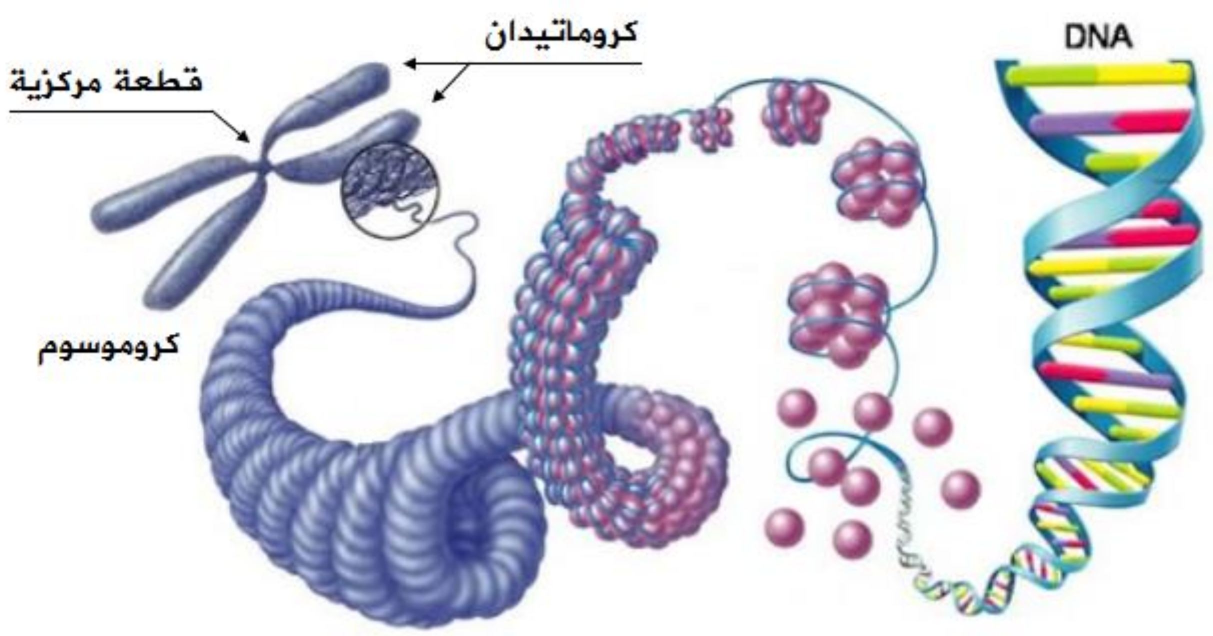
الشكل1

تحتوي الخلايا الحية لجميع الكائنات الحية من نبات وحيوان على عدد معين من الكروموسومات الخاصة بكل نوع منها

فهي تحمل المورثات التي تنقل صفات الاباء الى الابناء ويتطبق ذلك ايضا على وحيدات الخلايا.

يتكون تركيب الكروموسومات من جينات وهو يحمل بذلك الصفات الوراثية .

كل كروماتيد يترتب بشكل حلزوني ويحمل في طياته عشرات الالاف من الجينات وكل جين له موقع خاص به على التركيب الحلزوني للكروماتيد مشابه بالضبط لموقع نفس المورثة على الكروماتيد المقابل .

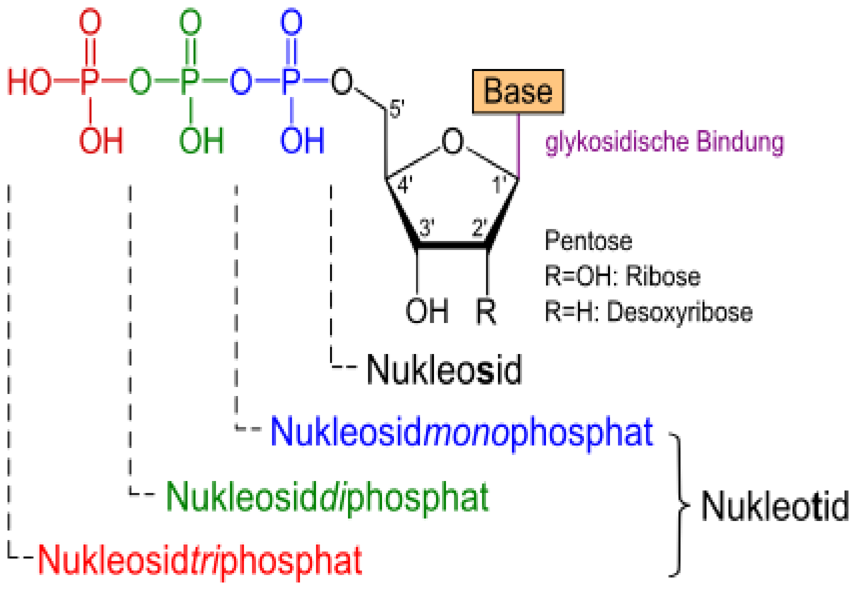


النيوكليوتيدات :

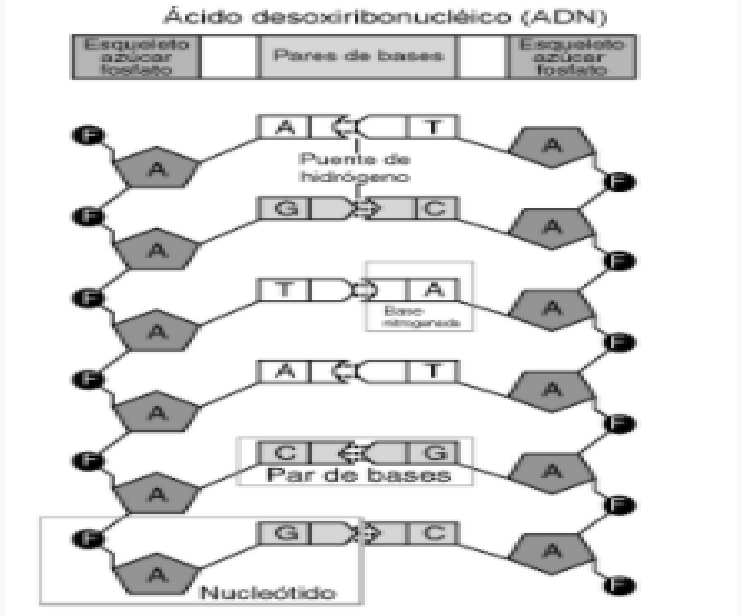
كل جين يتألف من سلسلة من النيوكليوتيدات ونطلق عليها اسم الاليل هذا الاليل يتحد مع أليل اخر في الكروماتيد المقابل

وعليه تتكون كل مورثة من اليلين اليل تمت وراثته من الانثى واليل تمت وراثته من الذكر.

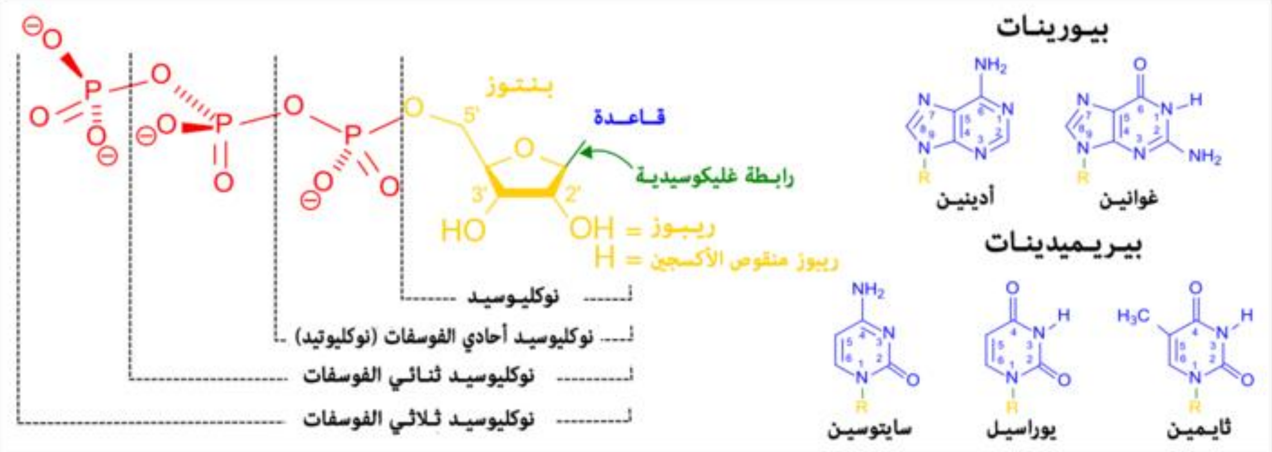
اذا كان الاليلان متشابهان تشابها تاما في تسلسل النيوكليوتيدات فيطلق عليه في هذه الحالة اسم متماثل الجينات **Homozygote** واذاكان الاليلان مختلفان في تسلسل النيوكليوتيدات فيسمى **Heterozygote**



شكل 1: بنية النوكليتيدات والنكليوسيدات. في النوكليوتيد ترتبط مجموعة 5'-OH لـ بنتوز مع مجموعة أو أكثر من مجموعات الفوسفات (أزرق، أخضر، وأحمر). فمثلا النوكليوسيد ثلاثي الفوسفات ATP توجد به ثلاثة مجموعات فوسفات . وترتبط بذرة الكربون C1' قاعدة تكون مرتبطة بحلقة البنتوز . فإذا كانت البقية R عباره عن مجموعة كربوكسيل، فيصبح لدينا ريبوز فيه هيدروجين (بقية)؛ ويسمى هذا ريبوز منقوص الأكسجين Desoxyrebose ، وهي المادة الهامة في بنية الدنا. **الشكل** يعرّف أيضا الـ **Nucleotide** و الـ **Nucleoside**.



سلسلة من النوكليوتيدات تكوّن جزء من الدنا.



بناء النوكليوتيد

مكونات المحور البروتيني للكروموسوم:

يتكون الهيكل الداخلي للكروموسوم من نوعن اساسيين من البروتين :

La topoisomerase I- II /Les condensines I -II

La topoisomerase I

هو بروتين دوره ازالة التراكيب (الابراج الفائقة) على مستوى جزيء **ADN**

وازالة العقد الناتجة عن نشاط الانزيمات المؤثرة على مستوى ADN

La topoisomerase II

لها القدرة على قص وقطع جزيء ال ADN وتمرير الشريط المقطوع واعادة لصق الطرفين.

هذه الوظيفة ضرورية للسماح بالفصل الصحيح للكروماتيدات الشقيقة اثناء مرحلة تكثيف الكروماتيدات في الطور الاولي.

Les condensines I -II

تلعب هذه البروتينات دور الصيانة الهيكلية للكروموسوم.

الفصل الثاني : طرق دراسة الكروموسومات

Méthodes d'études des chromosomes

I - في الحالة الميتوزية :

مقدمة:

تقوم دراسة كروموسومات الكائنات الحية طبقا لعددها ومظهرها في نواة الخلية للكائنات من حقيقيات النواة ويستخدم تعبير النمط النووي Caryotype للدلالة على مجموع الكروموسومات الخاصة باحد الكائنات فهو يحدد الجنس.

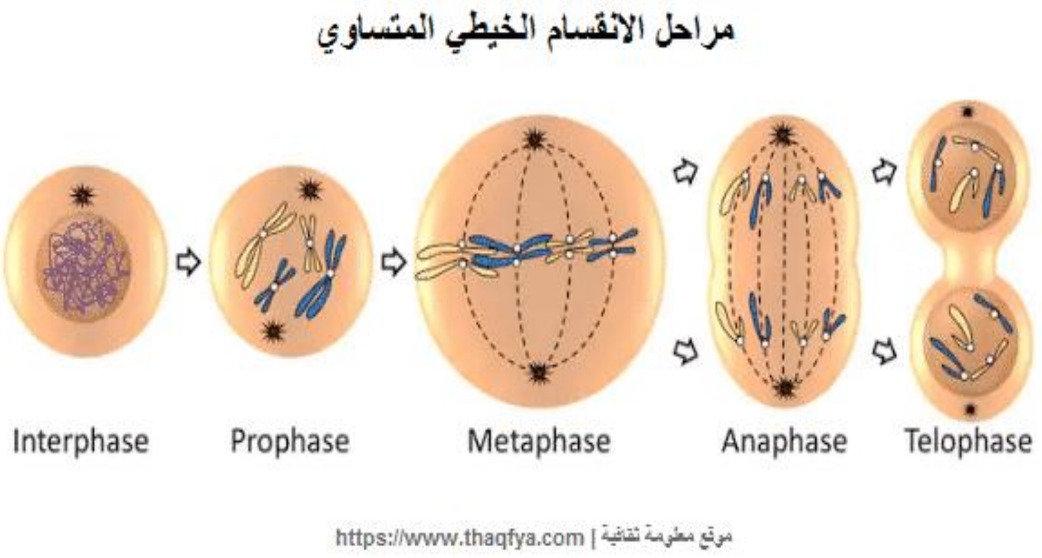
و ان دراسة كروموسومات خلية الكائن الحي وترتيبها طبقا لحجمها وخصائها الشكلية يعرف ب Caryogramme (النمط الظاهري).

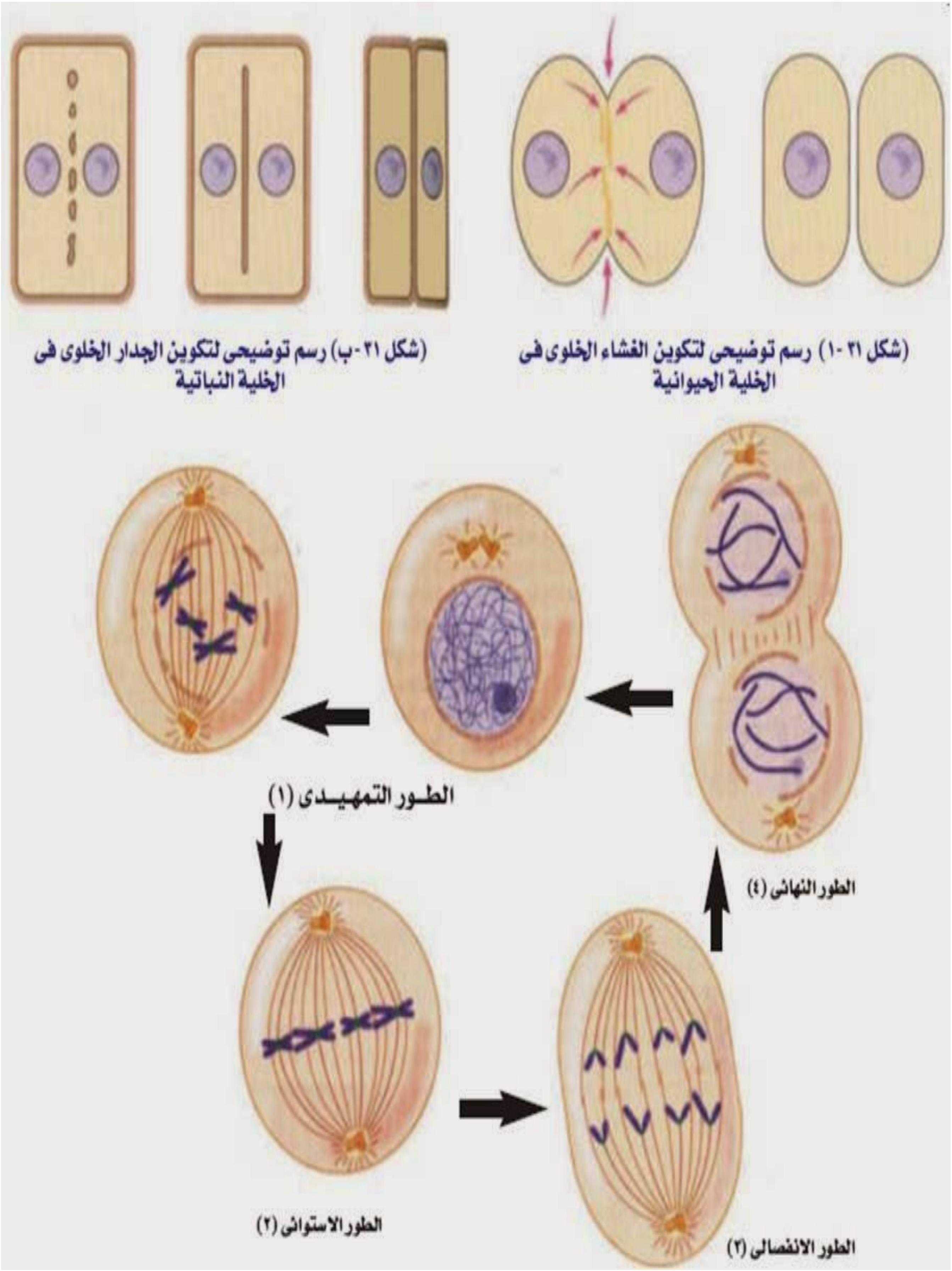
ان الهدف من التقنيات المقدمة هو :

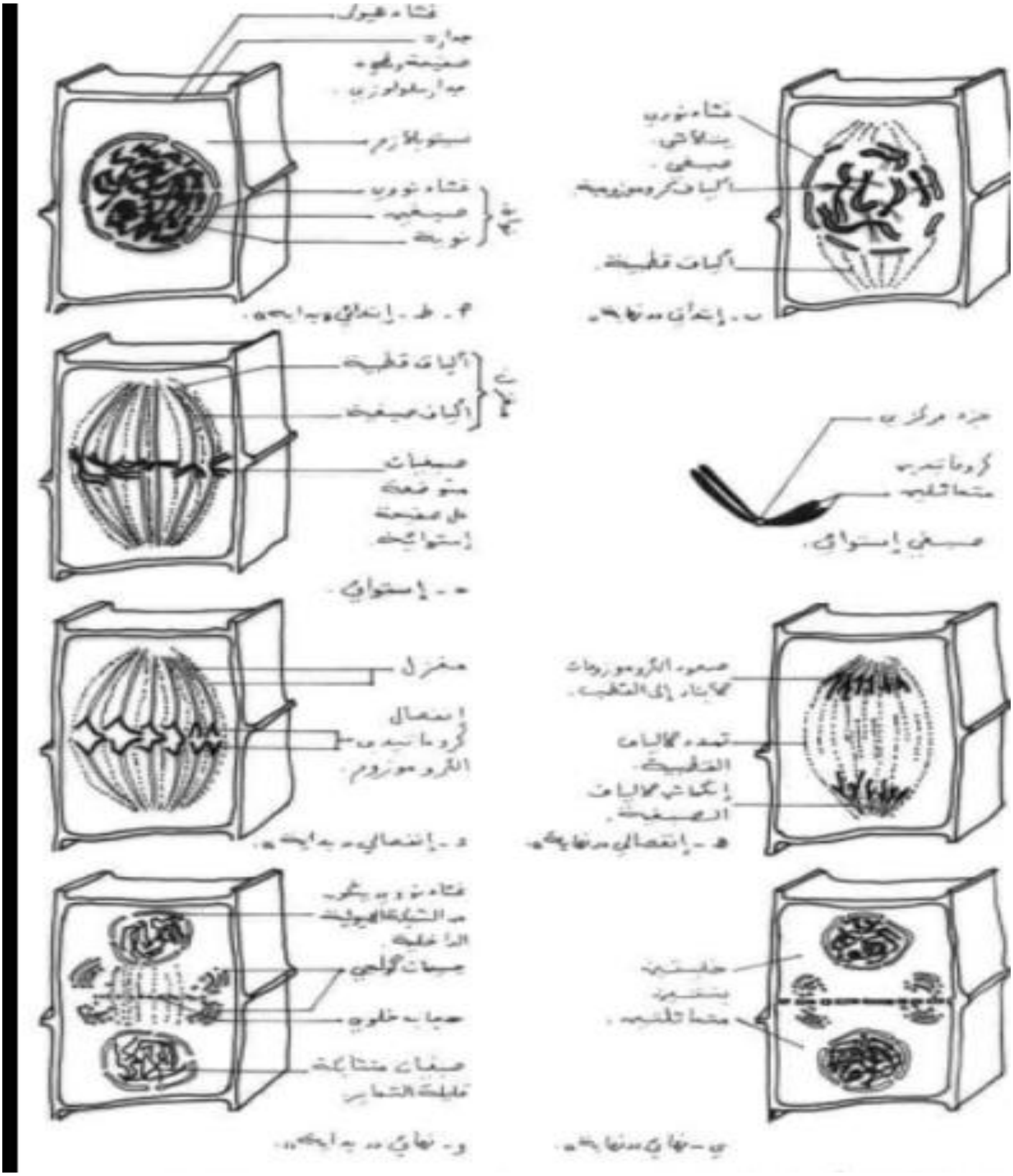
- التعرف على عدد الكروموسومات

- دراسة مورفولوجيتها لتاسيس الانماط النووية او لغرض التعديلات الكروموسومية (كالحذف ،اعادة الترتيب،...الخ)

تتكون مادة الدراسة من بذور أو نباتات أو أنسجة نبتت في مزرعة مخبرية موضوعة في ظروف تسمح بالنمو النشط. يتم اخذ الأنسجة عندما تكون النسبة المئوية للخلايا المنقسمة (مؤشر الانقسام) عالية ؛ على سبيل المثال ، لتحضير البروتوبلاست ، يتم استخدام مستعمرات الأنسجة في مرحلة النمو المثالية.




(شكل ٣١ -ب) رسم توضيحى لتكوين الجدار الخلوى فى الخلية النباتية
(شكل ٣١ -١) رسم توضيحى لتكوين الغشاء الخلوى فى الخلية الحيوانية
الطـور التمهـيـدى (١)
الطور النهائى (٤)
الطور الاستوائى (٢)
الطور الانفصالى (٣)



غشاء هيولي
جدار
صفيحة وسطى
جدار سيللوزي
سيتوبلازم
غشاء نووي
صبغين
نوية
أ - ط - إنتقالي وبداية
غشاء نووي يتلاشى
صبغي
ألياف كروموزومية
ألياف قطبية
ألياف قطبية
ألياف صبغية
صبغيات متوضعة على صفيحة إستوائية
ج - إستوائي
جزء مركزي
كروماتيدين متماثلين
صبغي إستوائي
مغزل
إنفصال كروماتيدي الكروموزوم
د - إنفصالي بداية
صعود الكروموزومات إلى القطب
تمدد الألياف القطبية
إنكماش الألياف الصبغية
هـ - إنفصالي نهاية
غشاء نووي يتكون من الشبكة الهيولية الداخلية
حبيبات غولجي
صفيحة خلوية
صبغيات متماثلة قليلة التمايز
و - نهائي بداية
خلية بنت
متماثلة
ي - نهائي نهاية

تمر الدراسة ب7مراحل :

1- المعالجة المسبقة : Le prétraitement

يتم ذلك عن طريق نقع الأنسجة المنقسمة في عامل ميتوكلاستيك

يتكون من :

8-hydroxyquinoléine - L'α-bromonaphtalène,-colchicine - ماء بارد (2-0م°)

والذي له التأثيرات الرئيسية التالية:

* ايقاف الانقسام الخلوي في المرحلة الاستوائية.

* تقليص حجم الكوموسومات.

2- التثبيت :La fixation

المثبت المستعمل يتكون من:

I = Ethanol acétique (3 :1)/II = Ethanol – Chloroforme – Acide acétique (6 :3 :1)

* يمنع استمرار الانقسامات الخلوية

*يحافظ على السلامة الهيكلية للكرةموسومات

3- التخزين : Le stockage

يمكن تخزين المادة النباتية لعدة شهور في الايثانول.

4- التمييه :L'hydrolyse

هذه الخطوة ضرورية بشكل عام للحصول لاحقًا على تمدد جيد للخلايا والكروموسومات بين الشريحة والساترة. عامل تليين الأنسجة الأكثر شيوعًا هو حمض الهيدروكلوريك.. يذيب التحلل المائي الأملاح البكتيرية الصفيحة المتوسطة ويسمح بتخفيف السيتوبلازم.

5- التلوين :La coloration

نستخدم كاشف شيفت يعطي لون احمر للصبغيات . تسمى تقنية التلوين هذه بتقنيةFeulgen »

لأنه تم وصفها لأول مرة بواسطة(1926) Feulgen.

6- التجميع :le montage

معظم التقنيات المقدمة تخص الانقسام الميتوزي في الخلايا المرستيمية الجذرية.توضع المنطقة المرستيمية المميهة والملونة والمفصولة على الشريحة في قطرة من ماء حمضي وتغطى بالساترة من اجل تفكك الخلايا ويجب مراعاة الضغط الخفيف على الساترة لكي لا تنفجر الخلايا.

7- الملاحظة: L’observation

يبلغ متوسط طول الكروموسومات النباتية حوالي 6 ميكرومتر. يتم رصد الخلايا المنقسمة بسرعة تحت المجهر الضوئي باستخدام تكبير منخفض عادة :تكبير 10.

I -1النمط النووي:**Le caryotype**

النمط النووي هو تمثيل ضوئي لكروموسومات نوع معين مجمعة معًا في أزواج ومصنفة وفقًا لأطوالها الإجمالية.

ا/ انواع النمط النووي :

***- النمط النووي المتناظر:**

يوضح الكروموسومات ذات الحجم المتماثل من حيث الحجم وتوضع الجسيمات المركزية. مما يعطيها مظهرا متجانسا.

***- النمط النووي غير المتناظر:**

يحتوي النمط النووي غيرالمتناظر على كروموسومات ذات جسيم مركزي تحت طرفي أو طرفي وفرق كبير بين الأطوال النسبية للكروموسومات .

ب/ -النمط الظاهري Le caryogramme=idiogramme

ان دراسة جميع كروموسومات كائن يسمى أحياناً علم دراسة نواة الخلية وتوصف الكرروموسومات بعد ترتيبها تبعا لمظهرها تحت المجهر بطريقة عيارية تعرف بالكاريوغرام.وترتب الكروموسومات في شكل ازواج تبع لحجمها وتبعا لضع القطع المركزية في الكروموسومات من نفس الحجم.

*** تسمية الكروموسومات حسب موقع الجسيم المركزي:**

التسمية تبعا للطول:

- Longueur du bras long **BL**
- Longueur du bras court **BC**
- Longueur totale du chromosome **LT = BC + BL**
- Longueur totale relative **LTR = (LT/∑ LT) x 100**
- Rapport bras long sur bras court **r = BL/BC**
- Différence entre la longueur du bras long et la longueur du bras court **d= BL-BC**
- Indice centromérique pour chaque paire chromosomique **Ic% = (BC/BT) x100**
- Indice d’asymétrie du caryotype **Ias % = (∑BL / ∑LT) x 100**

التسمية تبعا لتوضع الجسيم المركزي:

مركزي- تحت مركزي-تحت طرفي –طرفي.

1 - **Le chromosome métacentrique**

2- **Le chromosome submetacentrique**

3- **Le chromosome subtelocntrique**

4- **Le chromosome acrocentrique**

II- **في الحالة الميوزية :**

مقدمة:

تتم دراسة أزواج الكروموسوم في الانقسام الاختزالي في الطور الأول والطور الاستوائي للخلايا الام لحبوب الطلع.

تعتمد هذه التقنية على انفجار الخلايا عن طريق الصدمة التناضحية بعد الهضم الأنزيمي لجدار الخلوي.مما يسمح بالانتشار المثالي للارتباطات الكروموسومية. فتتشكل خيوط طويلة متشابكة ؛ هذا يسهل دراسة الكروموسومات بالمجهر الضوئي والإلكتروني.

وتتم الدراسة عبر 6 مراحل:

1-اخذ العينات: **le prélèvement**

يتم اخذ العينات في مرحلة الطور الاول من الانقسام الاختزالي ويجب مراعاة توقيت الانقسامات الاختزالية والحجم الطبيعي للاسدية.

2- البحث عن المرحلة المناسبة لاخذ العينات: **La recherche du stade**

3- التثبيت: la fixation

المثبت الذي يخترق أنسجة الخلية بسرعة ويضمن التوقف السريع للانقسام دون الإضرار أو تدمير البنية الصبغية. للتثبيت أيضًا دور تعقيم الأنسجة وذلك من أجل الحفاظ على المادة النباتية بشكل جيد .

المثبتات المستخدمة كثيرة جدا. الأكثر استخدامًا هي:

- **Les fluides proposés par Carnoy (1886)**
- **F.A.A (éthanol- formol-acide acétique : 14 :6 :11)**
- **Butanol-acide acétique acide chromique : 9 :3 :2)**
- **Carmin acétique du Belling**

4- التخزين: le stockage

تتيح هذه العملية تأجيل الملاحظات التي لا تكون ممكنة دائمًا في وقت أخذ العينات . يتم التخزين عادة في 70٪ أو 50٪ من الإيثانول.

5-التجميع:Le montage

يتم التجميع تحت عدسة مكبرة ثنائية العين .تسمح مرونة الأنسجة بتحرير الخلايا ونميز 03 مراحل أساسية من التجميع:

1-التلوين

2- الانحدار

الانحدار بنسبة 45٪ من ماء الأسيتيك سوف يخفف السيتوبلازم ويسمح بفك التكوينات الصبغية. تسخين طفيف في هذه المرحلة يزيد من حدة الانحدار.

3- الانتشار

عندما يتم الحصول على تباين جيد بين السيتوبلازم وصبغ الكروموسومات ، يتم تنفيذ الانتشار الفعلي عن طريق ممارسة ضغط قوي إلى حد ما ، مع الإبهام ، على الغطاء.

في بعض الأحيان يكون الانحدار مفرطًا وتتغير الصبغيات إلى حد مما يسمح باستخدام La fuschine carbolique

لاعادة تلوين الكروموسومات.

6-الملاحظة: L'observation

يبلغ متوسط طول الكروموسومات النباتية حوالي 6 ميكرومتر. يتم رصد الخلايا المنقسمة بسرعة تحت المجهر الضوئي باستخدام تكبير منخفض عادة :تكبير .10

الفصل الثالث: Les techniques de marquage

تقنيات الوسم (التأشير)

مقدمة :

ظهرت تقنيات وسم الكروموسومات في السبعينات .

يمكن تمييز الكروموسومات في الطور الاستوائي باستخدام تقنيات تلوين تسمى **Bandes (شرائط)**

كلما تم تكثيف الكروموسومات ، قل عددالشرائط التي يمكن ملاحظتها ، وكلما قل التحليل الذي يمكن أن يكتشف التشوهات الصغيرة.ولذلك يتم استخدام عدد الشرائط لكل دفعة أحادية الصيغة الصبغية لتحديد دقة التحليل الوراثي الخلوي. تعد هذه التقنيات عالية الدقة أكثر حساسية في الأداء والتفسير من النمط النووي القياسي ، ولكنها تسمح باكتشاف حالات شذوذ أصغر بكثير.

giemsa*

كان غوستاف جيمسا (1867-1948) كيميائيًا وصيدليًا في القرن العشرين طور تقنية التلوين التي كانت مفيدة في التعرف على طفيلي الملاريا ***Plasmodium falciparum*.** في مسحات الدم.

Le giemsa*

Giemsa هي صبغة خاصة بالكروموسوم ، وتتكون من خليط من صبغتين (أزرق ميثيلين ويوزين) وردي أرجواني. يتيح بشكل خاص إبراز المناطق الكروموسومية.

<u>G-Banding Ou Bandes G:</u>

التلوين Giemsa بادخال انزيم التربسين وهو ما يعرف ب: *GTG banding* .

يستخدم في هذا التلوين الجيسما .مما يسمح بتشكل شرائط على الكروموسومات في الطور الاستوائي.

تتميز هذه الصبغة بخصوصية الالتصاق بالثايمين والأدينين ، وبالتالي تشيرالشرائط التي تم الكشف عنها إلى مناطق غنية بـ AT

<u>Bandes Q :</u>

جاءت هذه التسمية من استخدام الكيناكرين la quinacrine moutarde على الكروموسومات ويتم فحصها باستخدام المجهر الضوئي.

تسمى الشرائط المظلمة bandes Q وتتوافق بشكل وثيق مع شرائط bandes G و هذه التقنية مفيدة في الكشف عن تغاير الشكل . وهو الاختلاف الطبيعي في مظهر الكروموسومات.

:Bandes R

نتحصل عليها بملون جيسما بالاضافة الى تدخل حراري .غنية بالقواعد الازوتية الغوانين والسيتوزين

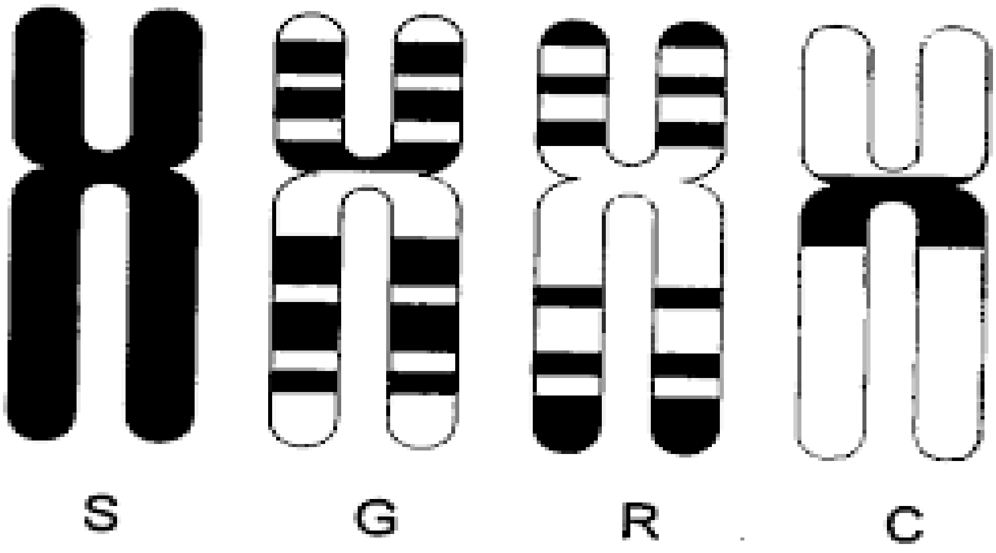
فهي تحتوي على العديد من الجينات ، وكروماتينها قليل التكثف .

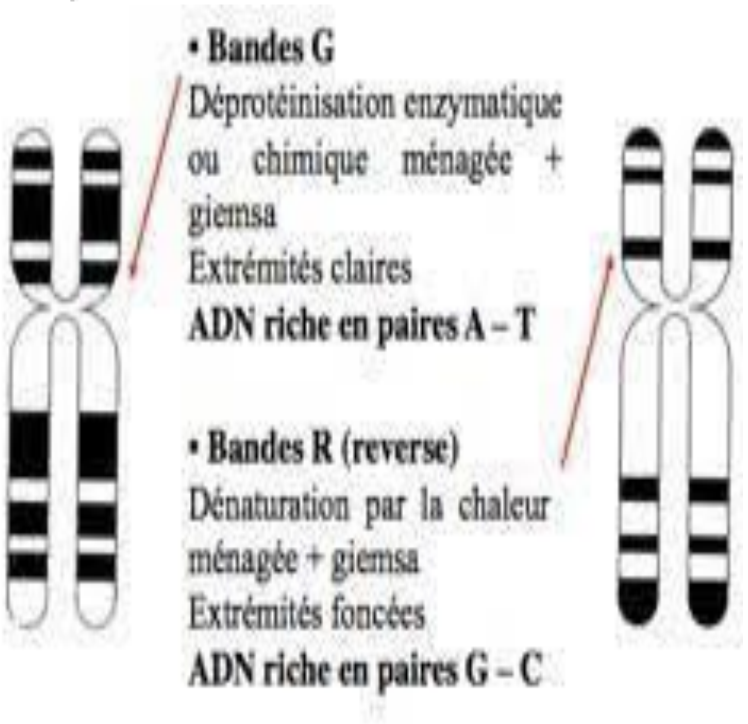
:Bandes C

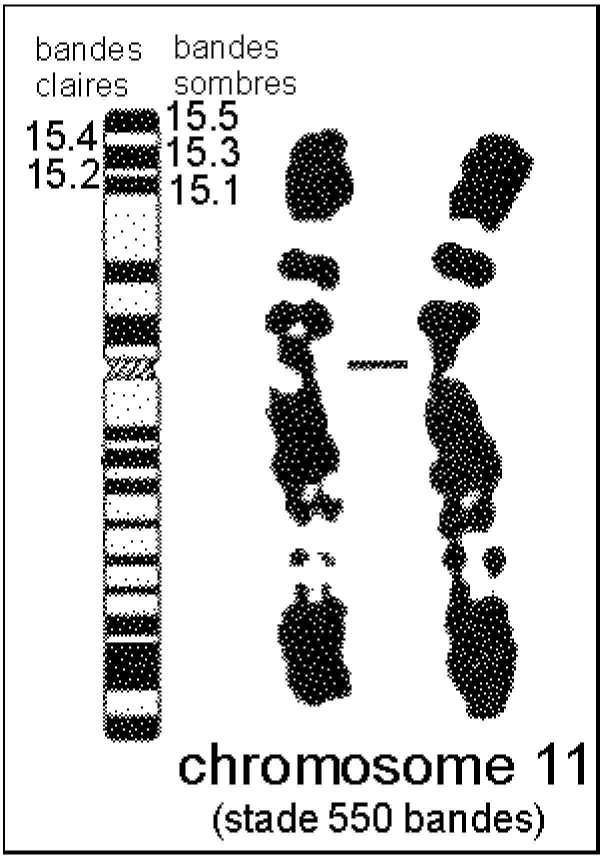
تستخدم تقنيات Bandes Cلتلوين الصبغيات عند مختلف الكائنات الحية .تتمثل مزاياها الرئيسية في انها طريقة غير مكلفة

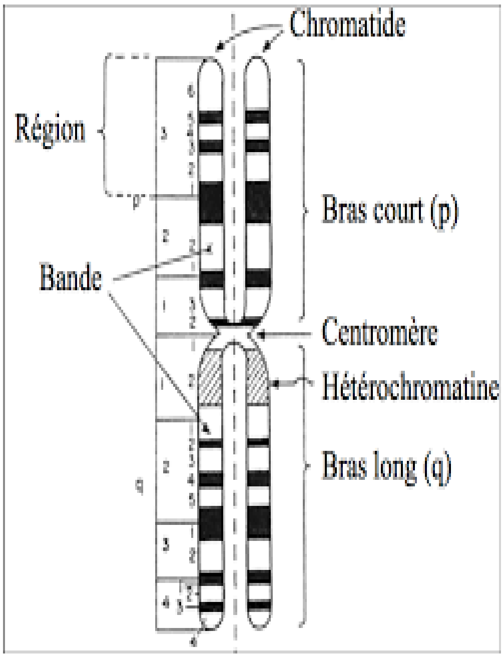
وسريعة نسبيا لتحديد التغيرات المورفولوجية او النمط النووي.

يتشط هذا النوع من الشريط بواسطة اكسيد الباريوم وGiemsa وهو يلون بدقة السنتروميرات (الجسيم المركزي).


S
G
R
C

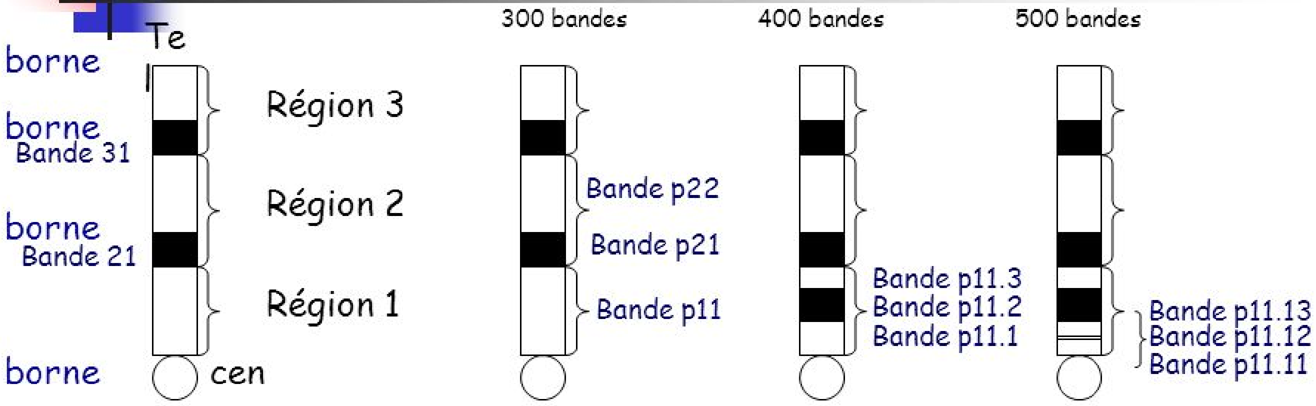

• Bandes G
Déprotéinisation enzymatique ou chimique ménagée + giemsa
Extrémités claires
ADN riche en paires A – T
• Bandes R (reverse)
Dénaturation par la chaleur ménagée + giemsa
Extrémités foncées
ADN riche en paires G – C


bandes claires
bandes sombres
15.4
15.2
15.5
15.3
15.1
chromosome 11
(stade 550 bandes)


Chromatide
Région
Bras court (p)
Bande
Centromère
Hétérochromatine
Bras long (q)

Formule chromosomique

Identification et définition des bornes, régions et bandes:



-Les bandes et les régions sont numérotées du centromère vers le télomère.

-les bandes peuvent être subdivisés en sous-bandes qui peuvent être subdivisées en sous-sous-bandes

-le numéro de la bande et de la sous-bande sont séparés par un point.

التهجين :

هو عبارة عن إلقاح بين أفراد سلالتين نقيتين متشابهتان بصفة واحدة أو عدة صفات، والغرض منه هو الحصول على جيل أو فرد جديد يجمع بين صفات الأبوين معا، أو للحصول على فرد يزيد بصفاته على أبويه حيث كلما كان الفرق أكبر في الصفات كانت نتائج الهجين أكثر قوة ووضوحا، على شرط أن يكونا من صنف واحد.

يلجأ المربي أحيانا إلى التهجين أو التلقيح الخلطي بين نباتين أو حيوانين من سلالتين مختلفتين ليجمع الصفات المرغوبة في كل منهما فمثلاً يأخذ حبوب اللقاح من نبات معين وينشرها على ميسم نبات اخر بعد قطع اسدية هذا النبات حتى لا يحدث التلقيح الذاتي .ثم يغبف زهرة النبات الذي نثرت عليه حبوب اللقاح بكيس حتى يمنع وصول حبوب اللقاح من نبات اخر وعندما تنضج البذور يزرعها فيحصل بذلك على نباتات جديدة تجمع الصفات المرغوبة في كلا الابوين.

و يفسر التهجين على المستوى الحمض النووي ADN ب:

إذا كان الفصل بين خيوط الحمض النووي متبوعًا بتبريد تدريجي وبطيء ، فسيكون هناك إعادة ارتباط تدريجي بين الخيوط التكميلية للحمض النووي.

يمكن ان يحدث هذا الارتباط بين سلاسل RNA و DNA ’مما يجعل من الممكن الحصول على تهجين DNA / RNA

اكثر استقرارا.

يتم فصل نواتج التهجين(الحمض النووي احادي السلسلة والحمض النووي مزدوج السلسلة والهجين (DNA / RNA عن طريق الطرد المركزي بتدرج تركيز كلوريد السيزيوم.

*** التهجين الجزيئي: Hybridation moléculaire**

ان الوراثة الجزيئية قد أتاحت المفتاح للتلاعب بالبنية الوراثية الداخلية و"صياغة" أصناف جديدة وفقًا للبرنامج المحدد مسبقًا .و التهجين الجزيئي هو تقنية لإظهار تسلسل الحمض النووي داخل خلية أو نسيج أو بيئة معينة ، على سبيل المثال لتحديد موقع على الكروموسوم .

وهو يقوم على مبدأ تكامل القواعد الازوتية ، ولا سيما بين سلاسلRNA أو DNA.

*** درجة حرارة اندماج الحمض النووي ADN : la température de fusion de l'ADN**

تسمى ايضا بدرجة حرار التغير ™ التي تتماشى مع فتح او التفاف 50 % من سلسلة الحمض النووي المسخنة

ان التاثير المفرط اللون الذي يتوافق مع كسر روابط الهيدروجين (روابط ضعيفة) وفصل السلسلتين للحمض النووي الذي ينتج عنه ارتفاع في امتصاص الاشعة الفوق بنفسجية الى 260نانومتر.

ان قيمة Tmالخاصة بالADNهي معادلة خطية لنسبة (G+C) من الحمض النووي.

تعتبر نتيجة المرور من الصورة الثنائية الى الاحادية للحمض النووي هي ارتفاع في معامل اختفاء الحمض النووي .فهذا ما يمثل التاثير المفرط اللون.

القواعد الاوزتية التي تمتص هذه الاشعة هي منظمة في صورة مزدوجة .بينما القواعد الازوتية للحمض النووي المنفرد الخيط تكون واضحة وتفقد تنظيمها وفي هذه الحالة فان معامل الاختفاء الجزيئي يكون مرتفعا

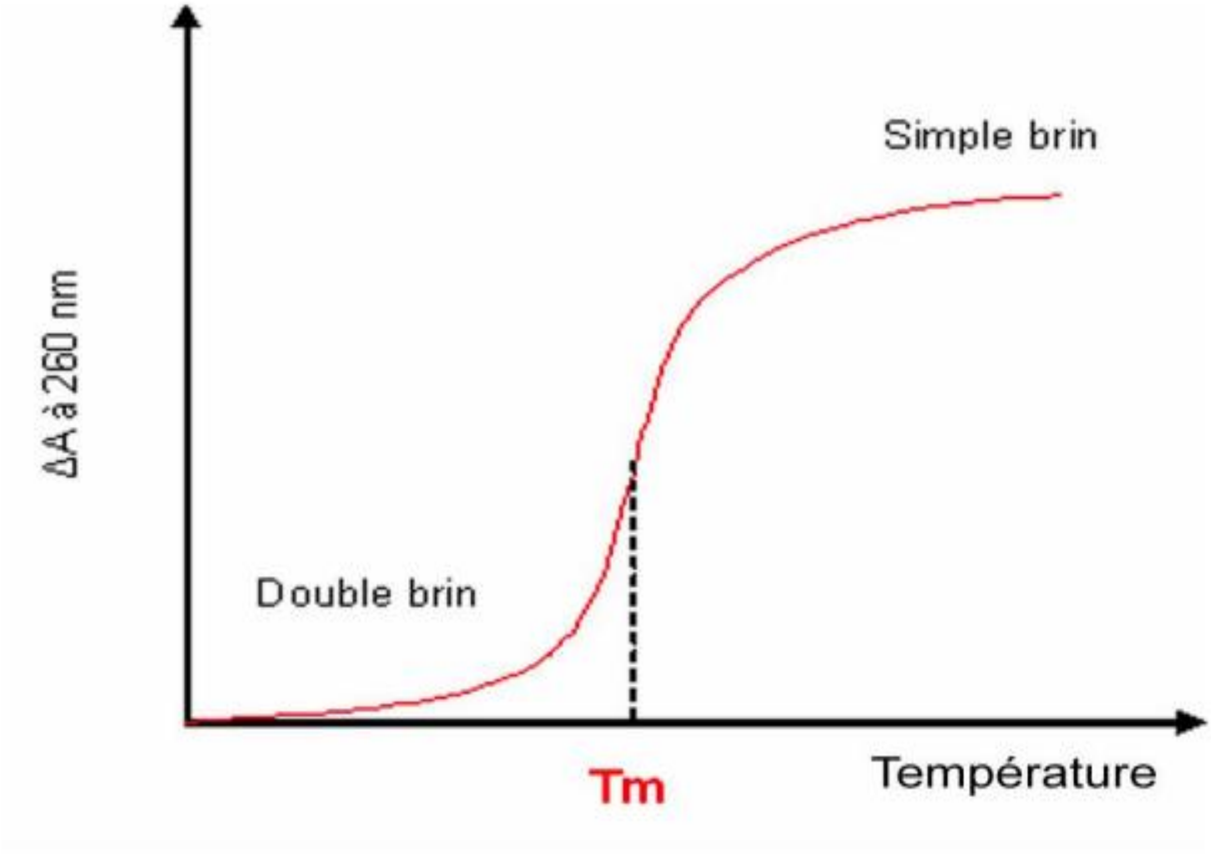


Figure: Mise en évidence du phénomène coopératif de passage de l'ADN double brin à l'ADN simple brin et mesure de la Tm.

Accédez aux paramètr

*انواع التهجين

1 - تهجين المرحلة السائلة: **Hybridation en phase liquide**

يتم وضع الأجزاء التكميلية في محلول يحتوي على عازلة و فورماميد. التحريض الحراري يضمن الترابط بين الأجزاء للحمض النووي التكميلية. تكون درجة الحرارة هذه عموما اقل ب:15 م°من Tmالمعني .ويتم تحديد الكميات الهجينة

المتكونة وفقا لثلاث طرق:

.1 .les méthodes spectrophotométriques (la diminution en DO à 260nm est due à l'augmentation du taux des hybrides)

2. la technique de la nucléase S1 (digestion des ADN et ARN simples brins)

3. La chromatographie sur hydroxylapatite (Seuls les doubles brins se fixent en raison d'une forte concentration en sels).

2- التهجين على دعامة صلبة: Hybridation sur support solide

التسلسل التكميلي المستهدف ثابت على دعامة صلبة. تسهل هذه الطريقة فصل الكسور المهجنة عن الكسور غير المهجنة. ومع ذلك ، فإن معدل التهجين أقل بكثير من معدل المرحلة السائلة (حتى 10 مرات)

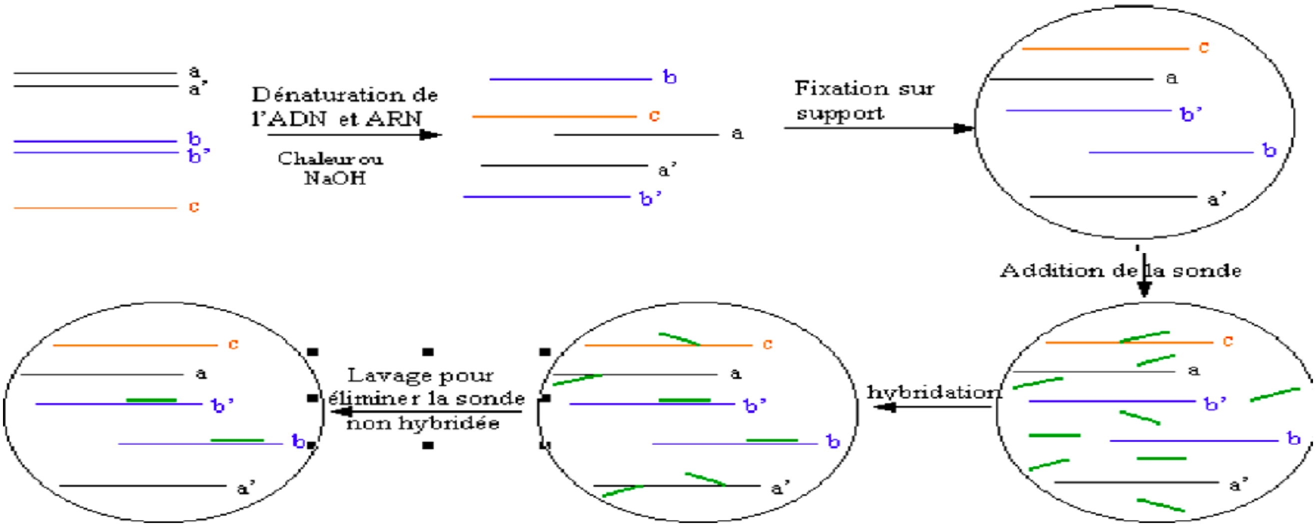


Figure: Hybridation sur support

يتم إجراء التهجين على الدعامة بعدة أنواع من الدعامات التي تجعل من الممكن تجميد خيوط الأحماض النووية:

1-النيتروسليلوز: يمثل دعامة التثبيت الأولى التي تم استخدامها لربط الأحماض النووية. يتطلب هذا الدعم تركيزًا أيونيًا عاليًا ، مما يجعل من الممكن إنشاء روابط لا رجعة فيها تحت الفراغ وعند 80 درجة مئوية.

2- **الأغشية الاصطناعية (القائمة على النايلون):** وبالمثل ، فهي تتطلب قوى أيونية قوية. تسمح هذه الأغشية بروابط أكثر ثباتًا من تلك التي يتم الحصول عليها باستخدام **النيتروسليلوز** نظرًا لمعالجتها بالأشعة فوق البنفسجية القصيرة (254 نانومتر). سيسمح هذا النوع من الروابط بالعديد من عمليات إزالة التهجين وإعادة التهجين.

*** المسبارات وعلاماتها (الوسم): Les sondes et leurs marquages**

هو جزء من النوكليوتيدات يسمح لك بالبحث على وجه التحديد عن جزء من الحمض النووي الذي تريد دراسته.

مع تقدم التقنيات ، أصبح من الممكن الآن توليد أجزاء من الحمض النووي بأحجام مختلفة تتوافق مع أجزاء مختلفة من الكروموسوم.

Marquage(الوسم) هو الخطوة التي يتم فيها إدخال الفلوروكرومات في قطعة من الحمض النووي.

اليوم ، ترتبط الفلوروكرومات مباشرة بالنيوكليوتيدات. يتم استخدام طرق مختلفة لدمج الفلوروكروم في جزء من الحمض النووي.

الفلوروكرومات هي جزيئات قادرة على الاثارة (تراكم الطاقة) بطول موجة معين .يسمى الطول الموجي للاثارة . واستعادة جزء من هذه الطاقة في شكل طول موجي اقل طاقة يسمى طول موجة الانبعاث.و لذلك تتميز جميعها بطول موجة الإثارة وطول موجة الانبعاث.

الطول الموجي للإثارة =(λ exc)

طول موجة الانبعاث =(λ em)

الفلوروكرومات المستعملة غالبا هي :

Le DAPI (4’,6-diamidino-2-phenylindole) (310nm – 372nm) se fixe sur les régions riches en AT de l’ADN et est appliqué directement sur les préparations chromosomiques après l’hybridation pour colorer de façon aspécifique tous les chromosomes, ce qui permet de les repérer.

· **Le FITC (Fluorescein isothiocyanate)** (exc 495nm – λem 519nm) fluoresce dans le vert

· **La Cyanine 3** (Cy3) (λexc 495nm – λem 519nm) fluoresce dans l’orange

· **Le Texas red** (λexc 589nm – λem 615nm) fluoresce dans le rouge

· **La Cyanine 5** (λexc 650nm – λem670nm) fluoresce dans le rouge

· **La Cyanine 5.5** (λexc 675nm – λem 694nm) fluoresce dans le rouge

التهجين الموضعي المتالق

La FISH (HYBRIDATION IN SITU EN FLUORESCENCE)

التهجين الموضعي المتالق:FISH (HYBRIDATION IN SITU EN FLUORESCENCE)

هو تقنية خلوية تعتمد على فكرة التهجين الموضعي للتحري عن وجود تسلسلات ADN او ال ARN في نسيج ما.

يتم تحديد مكان هذا التسلسل باستخدام مسبار(شريط من الحمض النووي) (Sonde)يحتوي على صبغات متالقة تتم رؤيتها بواسطة مجهر متالق في حالة وجودالتسلسل النووي المطلوب.وهو متمم للتسلسل المراد تحديد مكانه.

تبدا العملية بتثبيت العينة المراد فحصها بطور معين لتسهيل دخول المسبار للخلية واتحاده مع التسلسل المتمم ’تغسل العينة للتخلص من المسبار الزائدة التي لم تتحد مع التسلسل المتمم.

يتم التحري عن وجود التسلسل باستخدام مجهر معين (مشع او متالق او مناعي) وذلك بحسب المادة المعلمة للمسبار والتي قد تكون مشعة او لاصقة او مناعية.يستخدم التهجين الموضعي في العديد من التطبيقات الطبية التشخيصية للتحري عن وجود صبغيات معينة.

https://www.youtube.com/watch?v=_UMLBc2ZJ-A

القواعدالاساسية التي تعتمدعليها تقنية التهجين الموضعي: FISH

تعتمد تقنية الوراثة الخلوية الجزيئية على ثلاث خصائص للحمض النووي :

*- التكامل الاجباري للقواعد النيتروجينة

*- روابط هيدروجينية ضعيفة (تساهمية) تضمن تماسك خيوط اللولب المزدوج

*- روابط Phosphodiester(اقوى 40 مرة من الروابط الهيدروجينية)والتي تضمن استقرار سلسلة النيوكليوتيدات لكل خيط DNA .

في ظروف معينة من درجة الحرارة أو درجة الحموضة أو الملوحة ، يمكن أن ينفصل شريطا جزيء الحمض النووي ثم إعادة الارتباط بطريقة معينة.

الخطوات المتبعة في تقنيةFISH:

1- انفصال شريطا ال ADN / التهجين:

هذه هي العملية التي تتكون من الجمع بين المسبار ، الذي يتم تغيير طبيعته بشكل عام عن طريق الحرارة ، والحمض النووي للكروموسومات والنواة التي تم تغييرها أيضًا. سيحدث هذا التهجين في ظل ظروف دقيقة لدرجة الحرارة ودرجة الحموضة والملوحة.

يتم استخدام جهاز يسمى "ثيرموبريت" للحفاظ على المستحضر للتهجين عند درجة الحرارة المطلوبة.

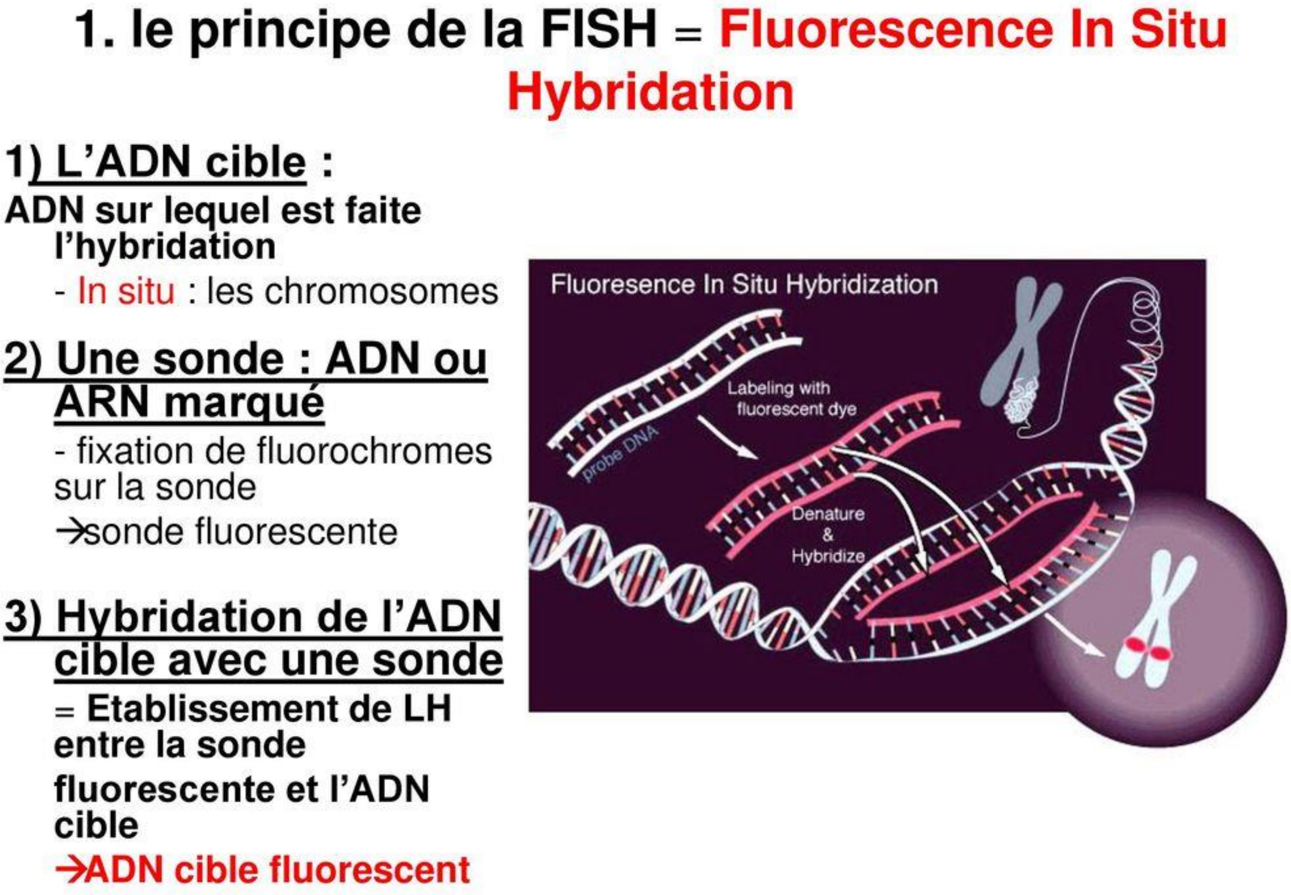
تعتمد كفاءة هذه الخطوة على وقت التهجين وتركيز المسبار. يختلف وقت التهجين من 5 دقائق لمسبارات الجسيمات المركزية ، إلى 24 أو 48 ساعة لتحقيقات أكثر تعقيدًا مثل مسبارات الطلاء.

تعتبر معالجة البيبسين بغسولات ما بعد التهجين ضرورية للتخلص من التهجين غير النوعي وتقليل شوائب المستحضر.

2-ملاحظة وتحليل الهجن :Visualisation et analyse des hybrides

تصدر الجزيئات الضوء عند الإثارة بطول موجي مناسب. تسمح باكتشاف ألوان متعددة أثناء الملاحظة نفسها.

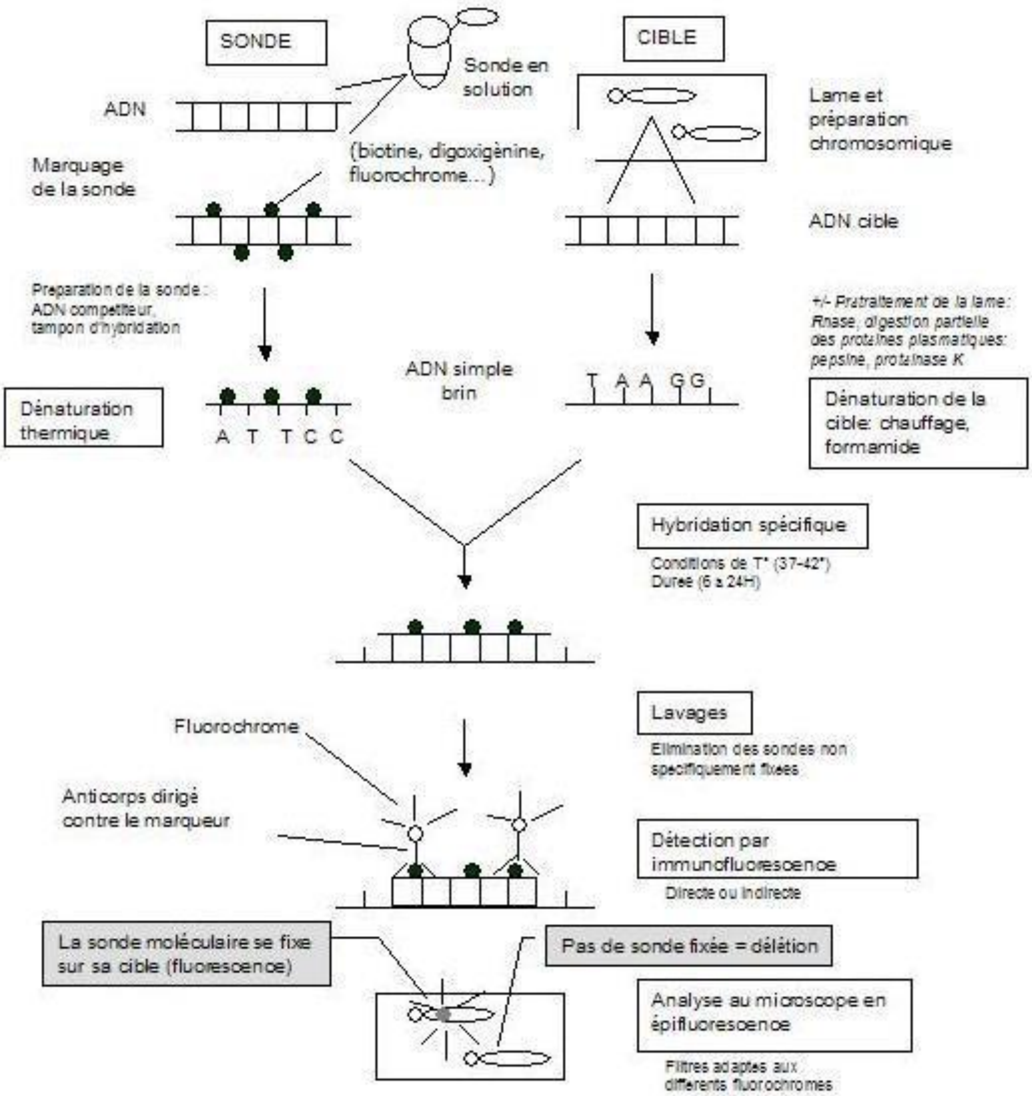
يمكن ملاحظة المسبار بالمجهر المتالق في المنطقة الكروموسومية.



ان تطور البيولوجيا الجزيئية سمح للوراثة الخلوية بان تنطلق بفضل تقنيات التهجين الموضعي المتالق FISH.

تسمح هذه التقنية بالتحليل النوعي للكروموسوم او منطقة كروموسومية .من خلال هذه التقنية نلاحظ التلون الكروموسومي والمسبارات المركزية والمسبارات ذات الموقع المتخصص.

أتاح ظهور طرق التهجين المتعدد مع عدة مسبارات في نفس تحضير الخلية إمكانية تحليل جميع الكروموسومات في تجربة واحدة. يتم تعريف هذه التقنيات التي تسمح بالتحليل المتزامن لجميع الكروموسومات على أنها شاملة.


SONDE
Sonde en solution
CIBLE
ADN
Lame et préparation chromosomique
Marquage de la sonde
(biotine, digoxigènine, fluorochrome...)
ADN cible
Preparation de la sonde : ADN competiteur, tampon d'hybridation
+/- Pretraitement de la lame: Rnase, digestion partielle des proteines plasmatiques: pepsine, proteinase K
ADN simple brin
T A A G G
Dénaturation thermique
A T T C C
Dénaturation de la cible: chauffage, formamide
Hybridation spécifique
Conditions de T° (37-42°)
Duree (6 a 24H)
Fluorochrome
Lavages
Elimination des sondes non specifiquement fixees
Anticorps dirigé contre le marqueur
Détection par immunofluorescence
Directe ou indirecte
La sonde moléculaire se fixe sur sa cible (fluorescence)
Pas de sonde fixée = délétion
Analyse au microscope en épifluorescence
Filtres adaptes aux differents fluorochromes