رسم الخرائط الكروموسومية في البكتريا

Gene mapping to genomics

احد اهم اهداف التحليل الوراثي هو تحديد مواقع الموروثات على الكرموسوم. اذ ان المعرفه حول تنظيم الكروموسوم يلعب دوراً رئيسيا في فهم وظائف الجينات ويساهم بدرجة كبيرة في التقدم الحاصل في دراسه البكتريا.

في البكتريا تعتمد الطريقة التقليدية لرسم الخريطة الجينية. على انتاج التراكيب الجديدة بعملية نقل الجينات بواسطه الاقتران conjugation والتحولTransformationوالنقل بالعائيات Transduction (التوصيل) . هذه الطرق تعززت في الوقت الحاضر بطرق اخرى تعتمد على تكنلوجيا الموروثات خارج الجسم الحي *invitro*. وان فهم هذه الطرق التقليدية ضروري لمعرفة وراثة البكتريا

1. تحليل الاقتران Conjugational analysis

ان اندغام البلازميد F في كروموسوم بكتريا الاشريكيا القولونية *E.coli* يولد سلاله تسمى Hfr لها القدرة على تحويل نسخه من الكروموسوم الى خلية بكتريا مستقبلة مناسبة . ان نقل كامل الكروموسوم ياخذ 100 دقيقة من الوقت. ولهذا السبب قسمت الخارطة الكروموسومية ل *E.coli* من 0 الى 100 دقيقة (شكل 1) وكل مورث يأخذ موقع مطابق للوقت الذي يشتغل فيه ابتداء من موقع افتراضي عند موقع الموروث المشفر للحامض الاميني الثريويين الذي يأخذ الزمن صفر (thr ,o min)، حيث يستمر النقل باتجاه عقرب الساعة.

ان الوقت الحقيقي الذي ينتقل عنده مورث معين واتجاه النقل (Direction of transfer) سوف يكون معتمدا على سلاله Hfr المستخدمه، لأن البلازميد F يمكن ان يندغم عند مواقع مختلفة او اتجاه مختلف او كلاهما .

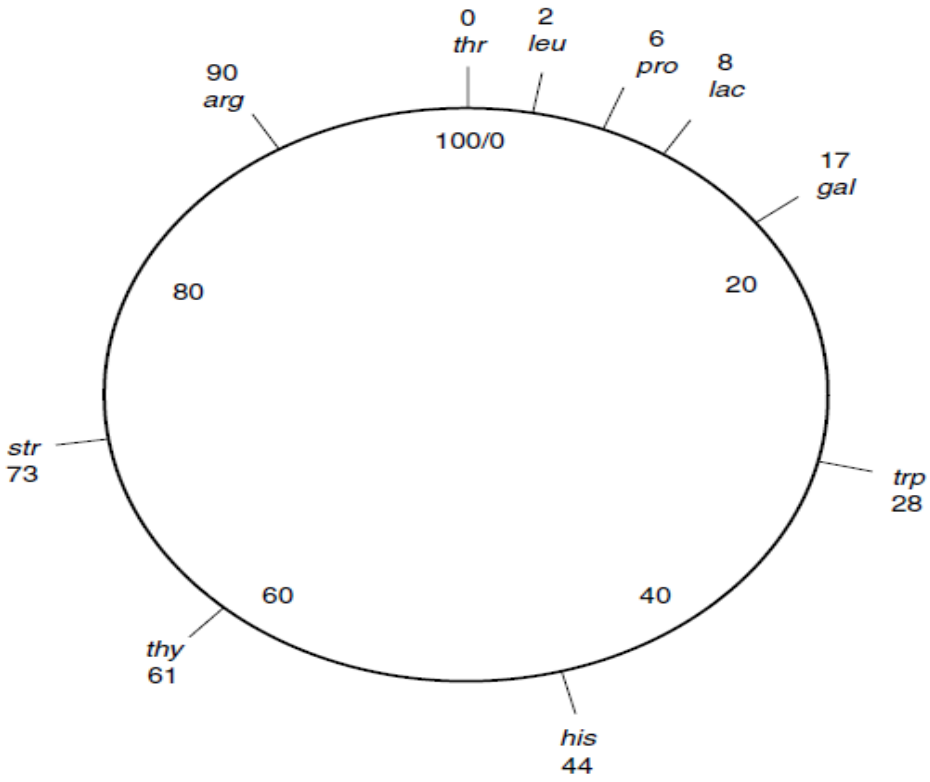

Figure.1 *E. coli* genetic map. The genes shown are those for synthesis of threonine, leucine, proline, tryptophan, histidine, thymine and arginine; for utilization of lactose and galactose; and for resistance to streptomycin. Note that the positions shown represent, in many cases, groups of genes rather than a single gene. The arg regulon also includes genes at other positions. The units shown (map times) represent minutes taken for conjugal transfer, starting with the threonine locus Streptomycin in this instance is used as a counter selecting agent On this medium, the donor will be unable to grow (because of the streptomycin) and the parental recipient will not grow (because of the absence of threonine). The only cells that can grow will be the recombinant recipients that have received the thr gene

انه من النادر حدوث انتقال الكروموسوم الكامل وان ثنائيات التزاوج تميل الى الانفصال باوقات موزعة عشوائيا وكلما كان الوقت اللازم لانتقال الجين اطول كان اكثر احتمالا لانفصال ثنائي التزواج قبل انتقال ذلك الموروث. وبالتالي سوف يكون هناك تدرج في النقل موافق او مطابق لموقع المورث بالنسبة الى النقطة التي ابتدء عندها النقل.

وهذا قدم طريقة مناسبة لتحديد الموقع النسبي للموروثات على كروموسوم بكتريا *E.coli* (شكل 2).

اذا تم تزاوج سلاله Hfr من نوع (Prototrophic Hfr) مع مستقبل تحتوي طفرات غذائية متعددة (Auxotrophic recipient) (في الموروثات thr, leu, trp, his, arg) . ان عدد الخلايا المستلمة التي حصلت على كل من هذه الموروثات الواسمه يمكن حسابه عن طريق استنبات كمية من الخليط على الوسط الزراعي الادنى معزز بأربعة من الاحماض الامينية الخمسة . مثلاً عدد التراكيب الوراثية الحاملة ل thr تقاس بأستخدام الوسط الحاوي على Leu , trp , his , arginine وغير حاوي على thr. كما انه من الضروي منع نمو السلالة الام الواهبة (Prototrophic) مثلاً بأستخدام مستقبلة مقاومة للستربتومايسين (Streptomycin – resistant recipient) مع اضافة الستربتومابسين في الوسط . في هذه الحالة بستخدم على انه عامل انتقائي مضاد (Counter selecting agents).

وفي هذا الوسط لايقدر الواهب على النمو (بسبب وجود الستربتومايسين) ولاتنمو ايضا الخلايا المستقبلة الام (بسبب عدم وجود الحامض الاميني الثريونين في الوسط) والخلايا الوحيدة القادرة على النمو هي تلك الخلايا المستقبلة ذات التراكيب الجديدة التي استلمت مورث thr.

النتائج مبينة في الشكل 2 و3 . في تلك الحالة أستخدام سلالة واهبة Hfr H والتي تنتقل منها الموروثات بأتجاه عقرب الساعة تبدء بنقطة قريبة جداً من موقع الموروث thr. وهناك علاقة خطية بين لوغارتيم عدد التراكيب الجديدة وموقع المورث ذو العلاقة على الخريطة. فلو كان فرضاً ان موقع مورث trp غير معلوم، سوف يسمح تحديد عدد التراكيب الجديدة الحاملة للموروث +trp بتحديد موقع المورث .

2. الفصل المتعمد لثنائيات التزاوج

طريقة اخرى اكثر دقة لرسم طريقة المورثات التي تنتقل مبكرا خلال التزاوج تتضمن الفصل المتعمد لثنائيات التزاوج (بواسطة الرج الشديد) في عينات الخليط المأخوذة بأوقات مختلفة بعد ابتداء التزاوج وتسمى العلمية بالتزاوج المتقطع interrupted mating. تبدأ التراكيب الجديد الحاوية على موروث معين بالظهور في اوقات محددة بعد أبتداء التزاوج (The time of entry) والذي هو قياس لبعد هذا الموروث عن اصل او نقطة بداية الانتقال.

ومن مساويء طريقة التزاوج المتقطع عدم امكانيتها التفريق بين مواقع الجينات التي تبعد عن بعضها باقل من دقيقتين والمساوية الى مسافة من الكروموسوم لها محتوى من المادة الوراثية مسؤولة عن 200 جين ويمكن التغلب على هذه المشكلة باستعمال طريقة النقل بالعاثي (Transduction).لقد وضع الباحث تويلر عام 1972 خريطة جينية لبكتريا *E.coli* بطريقة التزاوج المنقطع وضحت مواقع اكثر 450 جينا اضافة الى نقطة البداية لعدد من سلالات Hfr . كما استخمدت هذه الطريقة ايضاً لوضع االخريطة الكرموسومية لبكتريا السالمونيلاتايفي ميوريوم التي وضحت موقع 350 جيناً.

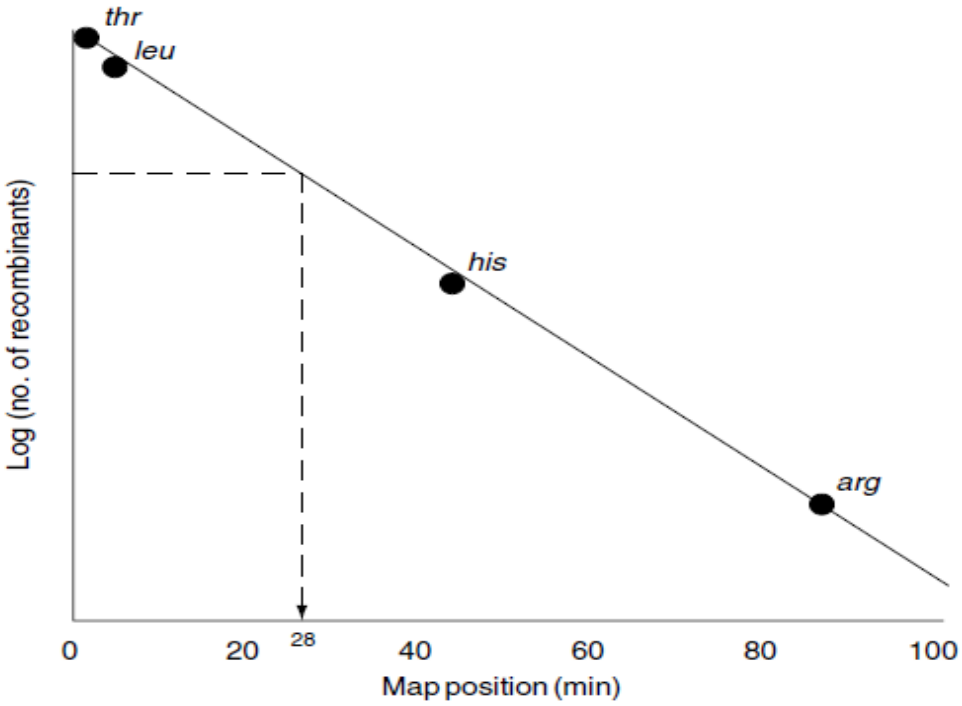

Figure.2 Gene mapping using the gradient of transfer by conjugation. Determination Of the position of the *trp* gene.

3. رسم الخرائط الكروموسومية بواسطة التحول والتوصيل

يمكن ان يستخدم التحول لرسم خريطة المواقع النسبية (Relative positions) للموروثات بواسطة انتخاب التراكيب الجديدة Recombinants التي حدث فيها انتقال واسم واحد marker ومن ثم تحديد تكرار التركيب الجديدة (Frequency of recombination) للمورث الواسم الثاني. فأذا كان الواسمان قريبا من بعضهما . سوف يميلان الى يتم توارثهما سوياً.

فأذا عُلم المورثات الواسمان ب A و B : سوف تكون الخلية الواهبة بالنمط البري لكلا الموروثين (A,B) بينما تكون الخلية المستقبلة طافرة ثنائية (A^-,B^-). بعد تحول الخلية المستقبلة بالدنا الكروموسومي المستخلص من الواهبة، تزرع الخلايا في طبق حاوي وسط زرعي يسمح فقط لنمو الخلايا +A. ويمكن بعد ذلك اختيار المستعمرات النامية من هذا التحول لوجود المورث +B (الواسم غير االمنتخب (Unselected marker).

ولغرض ادخال قطعة من الدنا الخطية الى الكروموسوم، تتطلب العملية حدوث حالتين من التراكيب الجديدة بعملية العبور Recombination event (cross overs). ونظراً لأنتخاب المتحولات التي استلمت المورث A فأنه يجب ان تقع احدى عمليتي التعابر الى يسار المورث A (شكل 3) والثانية سوف تكون الى

يمين من الموروث A^- اما بين الموروثان B,A او الى يمين المورث B- فاذا كان Aو B قريبين من بعضهما فأنه من المستعبد وقع حدث التعابر الثاني في المنطقة القصيرة الواقعة بينهما وبالتالي فأن كلا الواسمين سوف يتم ادخالها معاً وهو مايطلق عليه التحول المترافق (Co-transformation).
وفي حالة كون المورثين ابعد عن بعضها يزداد احتمال وقوع حدث التعابر الثاني في المساقة الواقعة بينهما وبالتالي انخفاض تكرار التحول المترافق.

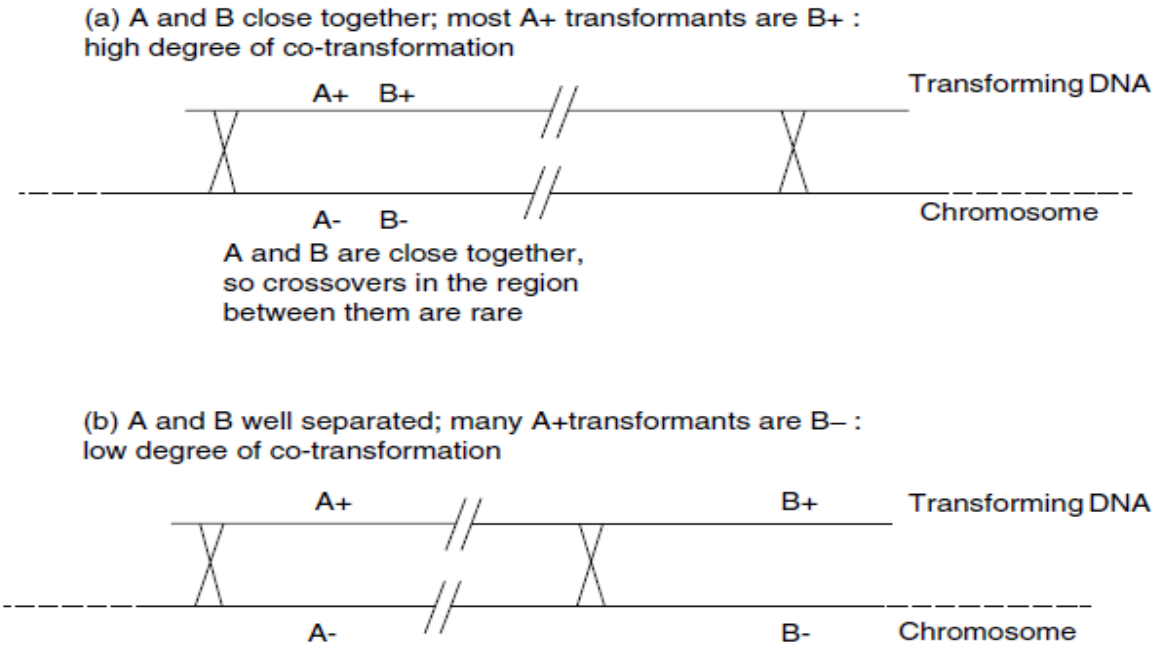

Figure .3 Determination of the relative position of two genes by co-transformation Frequency

ويمكن ان يستخدم التوصيل العام بالعاثي Generalized Transduction وبنفس الطريقة . مما يعطي وسيلة فعالة لرسم خرائط ذات تدريج قريب لمواقع المورثات على الكروموسوم البكتيري. وعلى سبيل المثال : اذا تمت تنمية العاثي Pi على سلالة *E.coli* ذات النمط الاصلي protrophic strain ، فأنه يمكن استخدام تحضيرات العاثي من التنمية لأصابة خلايا من سلالة مستقبلة حاوية طافرات غذائية Auxotrotrophic للحامض الاميني ثريونين والبرولين (thr , pro). فأن زراعة هذه الخلايا على وسط زرعي حاوي على threonine وغير حاوي الى proline سوف يكشف حالات التوصيل التي استلمت المورث pro من الخلية الواهبة بعملية التوصيل بالعاثي (Transduction) هذه الخلايا يمكن اختيارها بعد ذلك لقابليتها على النمو بغياب الثريوثين.اي بمعنى اذا حصل فيها استلام مورث thr ايضاً.

ان المقدار المرتفع لحالات التوصيل المترافق CO-Transduction يؤشر كون الجينات ذات مواقع اكثر تجاوراً.

4.الطرق المعتمدة على تقنية المورثات خارج الجسم الحي (gene mapping by *in vitro* gene technology) التقنيات الجزيئية لرسم خرائط المورثات Molecular techniques:

1. Gene libraries مكتبات الجينات
2. خرائط التقيد والترحيل الكهربائي النبضي في الهلام Restriction mapping and pulsed-field gel electrophorese
3. تحليل تتابع الموروثات Gene sequencing.