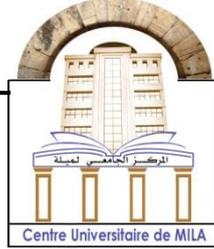


الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

People's Democratic Republic of Algeria

وزارة التعليم العالي و البحث العلمي

Ministry of Higher Education and Scientific Research



N° Ref :.....

المركز الجامعي عبد الحفيظ بوالصوف- ميلة

معهد علوم الطبيعة والحياة

قسم العلوم البيولوجية والفلاحية

مذكرة أعدت بغرض الحصول على شهادة الماستر

مجال: علوم الطبيعة و الحياة

قسم: العلوم البيولوجية

تخصص: البيوكيمياء التطبيقية

الموضوع:

تصميم عدة للكشف عن الحذف المجهري للكروموسوم Y بواسطة QF-PCR

Design of a kit for the detection of Y chromosome microdeletions  
by QF-PCR

من تقديم :

العيون رزيقة

جبلي عبير

أمام لجنة المناقشة:

رئيس	MCB	بوشريط حنان
ممتحن	MCA	مجاني سمية
مشرف	MCA	شكروود كريم

Année Universitaire : 2023/2024

## الفهرس

قائمة الإختصارات

قائمة الجداول

قائمة الصور

شكر وعرفان

إهداء

ملخص

1	مقدمة (Introduction)
1	الفصل 01: عموميات عن تقنية الـ PCR (Generalities about pcr technology)
1	لمحة تاريخية
1	1- تعريف (Definition)
2	2-1- الحمض النووي (DNA)
3	2- المبدأ (Principe)
3	3- الجهات الفاعلة في تقنية الـ PCR (Players in PCR technology)
4	4- تصميم البادئات (Design of primers)
4	5- معايير إختيار البادئات (Criteria for selecting primers)
4	6- مراحل تفاعل البوليميراز المتسلسل (Stages of the polymerase chain reaction)
5	1- تمسخ الحمض النووي (DNA Denaturation)
5	2- تهجين البادئات (Hybridization of primers)
6	3- إستطالة وتمديد البادئات (Elongation and extension of primers)
7	7- أنواع تقنية الـ PCR (Types of PCR)
7	1- البلمرة المتسلسلة النوعية (PCR qualitative)
8	2- البلمرة المتسلسلة الكمية (quantitative PCR)
9	3- تقنية البلمرة المتعددة الجينات (multiplex PCR)
10	4- البلمرة المتسلسلة المتعمقة (nested PCR)

11.....	7- التفاعل المتسلسل بالإنعكاس للبوليميراز في السلاسل النووية (RT-PCR)
12.....	8- خصائص تفاعل البوليميراز المتسلسل (Characteristics of the polymerase chain reaction)
12.....	9- تطبيقات تفاعل البوليميراز المتسلسل (Polymerase Chain Reaction Applications)
13.....	10- مزايا تقنية البلمرة المتسلسلة (PCR)(Advantages of polymerase chain reaction PCR)
13.....	11- حدود تقنية البلمرة المتسلسلة (PCR) (Limitations of polymerase chain reaction PCR)
1 ..	<b>Quantitative fluorescent polymerase chain reaction (QF-PCR)</b>
	الفصل 02: تقنية البلمرة المتسلسلة الفلورية الكمية (QF-PCR) (Quantitative fluorescent polymerase chain reaction (QF-PCR))
14.....	(PCR)
14.....	1- تعريف (Definition)
14.....	2- مبدأ البلمرة المتسلسلة الفلورية الكمية (Principle of quantitative fluorescent chain polymerase)
15.....	3- بروتوكول لتفاعل البوليميراز المتسلسل الفلوري الكمي (QF-PCR) مثال : تحليل الحذف المجهرى للكروموسوم Y
15.....	1-3- المعدات المطلوبة (Equipment required)
15.....	2-3- طريقة العمل (Way of Working)
	4- تطبيقات تقنية البلمرة المتسلسلة الفلورية الكمية (Applications of quantitative fluorescent polymerase chain reaction)
16.....	
16.....	5- مزايا تقنية البلمرة المتسلسلة الفلورية الكمية (Avantages of quantitative fluorescent polymerase chain reaction)
	6- حدود تقنية البلمرة المتسلسلة الفلورية الكمية (Limitations of quantitative fluorescent polymerase chain reaction)
17.....	(technology)
17.....	7- تقنية الكهرباء الشعيرية (Capillary Electricity Technology)
18.....	
19.....	الفصل 03: الحذف الدقيق للكروموسوم Y (Y chromosome microdeletion)
19.....	1- الكروموسوم Y البشري (Human Y chromosome)
19.....	2- بنية الصبغي Y البشري (Structure of the human Y chromosome)
19.....	1-2- المنطقة الأولى
20.....	2-2- المنطقة الثانية
21.....	3- الأنواع المختلفة من تسلسل كروموسوم Y (Different types of Y chromosome sequences)
24.....	4- الأمبليكونات والمتناظرات (Amplicons and palindromics)

25.....	5- الحذف الدقيق للكروموسوم Y (Y chromosome microdeletion)
25.....	1-5-1- لمحة تاريخية
26.....	2-5-2- تعريف (Definition)
26.....	3-5-3- أنواع الحذف المختلفة في منطقة MSY
28.....	4-5-4- الأسباب المؤدية لحدوث حذف في الصبغي Y (Causes of Y chromosome deletion)
29.....	5-5-5- تحليل الحذف المجهرى للصبغي Y (Y chromosome microdeletion analysis)
29.....	1-5-5-1- طريقة
30.....	6- الآثار السريرية للحذف الصغير في الصبغي Y (Clinical implications of small deletions in the Y chromosome)
32.....	7- طرق ومؤشرات البحث عن حذفات الصبغي Y لدى الرجال الذين يعانون من العقم (Methods and indications for looking for Y chromosome deletions in infertile men)
34.....	الفصل 04: المواد والطرق (Materials and methods)
34.....	1) بنك البيانات NCBI
34.....	2) موارد وخدمات NCBI الرئيسية:
34.....	3) أهمية NCBI :
35.....	4) كيفية الوصول إلى موارد NCBI :
35.....	5) استخدام NCBI في الأبحاث:
35.....	1. إستخراج التسلسل الجيني (اخترنا الجين USP9Y المكون للمنطقة AZF كمثال )
36.....	2- أداة التصميم التمهيدي (Primer-BLAST)
39.....	3- نتائج تصميم البادئات
39.....	4- طلب البادئات عبر بنك البيانات Eurogentec
42.....	الفصل 05: النتائج (Results)
42.....	1- تحديد تسلسل STS:
44.....	2- تصميم البادئات:
46.....	المناقشة
48.....	خاتمة (Conclusion)

قائمة الإختصارات

**PCR** : Polymerase Chain Reaction

**UV** : Ultraviolet

**DNA**: Deoxyribonucleic acid

**DNAc**: Complementary DNA

**RNA**: Ribonucleic acid

**RNAm**: Messenger RNA

**DNTPs**: DeoxyNucleotides-Triphosphates

**A**: Adenine

**C**: Cytosine

**G**: Guanine

**T**: Thymine

**Mg<sup>++</sup>**: Magnesium

**TH**: Hybridization temperature

**LOD**: Limit of Detection

**SD**: Standard Deviation

**CV**: Coefficient of variation

**CQ**: Quantization cycle

**QF-PCR**: Quantitative Fluorescent Polymerase Chain Reaction

**RT-PCR**: Reverse Transcriptase PCR

**°C**: Degree Celsius

**MgCl<sub>2</sub>**: Magnesium chloride

**Taq**: *Thermus aquaticus*

**STS**: Sequence Tagged Sites

**SCO**: Sertoli-Cell Only

**EAA**: European Academy of Andrology

**EMQN**: European Molecular Genetics Quality Network

**AZF**: Azoospermia factor

**MSY**: Male specific region of the Y

**NRY**: Non recombining region of the Y

**SRY**: sex-determining region Y

**TDF**: testis determining factor

**PAR**: pseudo\_autosomal region

رقم الصفحة	العنوان	قائمة الجداول
23	الجينات الموجودة في منطقة MSY	الجدول 1
31	حذفات منطقة MSY في الكروموسوم Y	الجدول 2
44	بادئات مواقع ال STS المختارة للدراسة وخصائصها	الجدول 3

رقم الصفحة	العنوان	قائمة الصور
2	بنية وتركيبه جزيء الحمض النووي.	الصورة 1
7	مراحل تقنية الـ PCR.	الصورة 2
8	مبدأ عمل تقنية البلمرة المتسلسلة النوعية.	الصورة 3
9	مبدأ عمل تقنية البلمرة المتسلسلة الكمية.	الصورة 4
10	مبدأ عمل تقنية البلمرة المتعددة الجينات.	الصورة 5
11	مبدأ عمل تقنية البلمرة المتسلسلة المتعمقة.	الصورة 6
11	مبدأ عمل تقنية التفاعل المتسلسل بالإنعكاس للبوليميراز في السلاسل النووية.	الصورة 7
14	مبدأ عمل تقنية البلمرة المتسلسلة الفلورية الكمية.	الصورة 8
18	تقنية الكهراء الشعيرية.	الصورة 9
19	الخريطة الجينية البشرية	الصورة 10
21	بنية الكروموسوم Y	الصورة 11
22	تسلسلات الكروموسوم Y	الصورة 12
25	الامبليكونات و المتناظرات في الكروموسوم Y	الصورة 13
27	مناطق الحذف في MSY	الصورة 14
28	البنية المتناظرة و اليات إعادة التركيب و تفاصيل الحذف في AZFc	الصورة 15
30	نتائج متحصل عليها من تقنية الكهراء الشعيرية	الصورة 16
34	قاعدة البيانات <<NCBI>>	الصورة 17
34	تسلسل الجين USP9Y	الصورة 18

35	موقع NCBI	الصورة 19
35	إختيار أداة Primer blast	الصورة 20
36	تحليل التصميم التمهيدي للتسلسل الجين USP9Y	الصورة 21
36	الحصول على نتائج من التصميم التمهيدي	الصورة 22
37	البادئات المناسبة	الصورة 23
38	البوابة الرئيسية للموقع eurogentec	الصورة 24
38	الخطوة الثانية من مراحل طلب البادئة	الصورة 25
39	الخطوة الثالثة من مراحل طلب البادئة	الصورة 26
39	ملأ خاوتي إسم موقع STS و التسلسل الجيني للبادئة	الصورة 27
40	إختيار لون البادئة	الصورة 28
40	ملأ الفراغات المتبقية لإكمال معلومات الطلب	الصورة 29
41	الضغط على ايقونة الطلب لإرسال المعلومات المختارة	الصورة 30

## شكر و عرفان:

قال رسول الله صلى الله عليه وسلم

"من لم يشكر الناس لم يشكر الله"

صدق رسول الله صلى الله عليه وسلم

الحمد لله على إحسانه و الشكر له على توفيقه و امتنانه و نشهد أن لا إله إلا الله وحده لا شريك له  
تعظيمًا لشأنه و نشهد أن سيدنا و نبينا محمد عبده و رسوله الداعي إلى رضوانه صلى الله عليه و على آله  
و أصحابه و أتباعه و سلم .

بعد شكر الله سبحانه و تعالى على توفيقه لنا لإتمام هذا البحث المتواضع نتقدم بجزيل الشكر إلى  
الأولياء الأعزاء الذين أعانونا و شجعونا على الإستمرار في مسيرة العلم و النجاح، و إكمال الدراسة  
الجامعية و البحث، كما نتوجه بالشكر الجزيل إلى من شرفنا بإشرافه على مذكرة بحثنا الأستاذ الدكتور "  
شكروود كريم" الذي لن تكفي حروف هذه المذكرة لإيفائه حقه بصبره الكبير علينا، ولتوجيهاته العلمية  
التي لا تقدر بثمن؛ و التي ساهمت بشكل كبير في إتمام و استكمال هذا العمل؛ إلى كل أساتذة قسم  
العلوم الطبيعية و الحياة؛ كما نتوجه بخالص شكرنا و تقديرنا إلى كل من ساعدنا من قريب أو من بعيد  
على إنجاز و إتمام هذا العمل.

إهداء

## بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

“يَرْفَعِ اللَّهُ الَّذِينَ آمَنُوا مِنْكُمْ وَالَّذِينَ أُوتُوا الْعِلْمَ دَرَجَاتٍ”

اللهم كما أنعمت فزّدْ وكما زدت فبارك وكما باركت فتممّ وكما أتممت فثبّت الحمد لله  
أولاً وآخراً

وصلت رحلتي الجامعية إلى نهايتها بعد تعب ومشقة.. لم يكن الأمر سهلاً لكن بفضل الله  
عز وجل استعطت إكمال مشواري، أهدي تخرجي لأعز الناس لمن أمرنا الله ببرهما، إلى من  
بدلاً الكثير وقدم ما لا يمكن أن يرد لخير داعم لي طوال مسيرتي الدراسية...

"أمي"

الغالية التي شاء الله أن تفارقني يوم 26-11-2023 أهدي لروحها الطاهرة هذا البحث  
راجية من الله أن يكون صدقة جارية لها رحمك الله يا قطعة من قلبي فارقتني جمعني الله  
بك في جنات النعيم

"أبي"

حبيبي الغالي سندي وكل قوتي وسعادتي أطال الله في عمرك وحفظك من كل سوء يؤذيك  
يا من علماني معنى العائلة الحقيقية يا خير قدوة لي أهديكم ثمرة جهدي وأرجو من الله أن  
تكون الجنة جزاءكم.



بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

(وَأَخِرُ دَعْوَاهُمْ أَنْ الْحَمْدُ لِلَّهِ رَبِّ الْعَالَمِينَ )

الحمد لله عند البدء وعند الختام, فما تناهى دربٌ, ولا خُتمَ جهد, ولا تم سعي إلا بفضلِهِ, الحمد لله على التمام وعلى لذة الانجاز ها هي السنين قد انطوت و تعب الايام قد زال وها نحن اليوم امام حلمنا نقف بكل شموخ ونعبر بانجازنا وفخرنا لأنفسنا لما نحن فيه, بكل حب نهدي هذا التخرج الى كل من سعى معنا لاتمام هذه المسيرة دمتم لنا سندا لا عمر له

" أبي "

يا من احمل اسمه بكل فخر و ساندي و علمي ان الحياة صراع و سلاحها العلم, الذي علمني الصبر و الاستمرار رغم الصعاب, لطالما حفنتني دعواته اطال الله في عمرك

" أمي "

يا ملاكي الطاهر, وقوتي بعد الله, داعمتي الأولى و الأبدية, اهذيك هذا الانجاز الذي لولا تضحياتك لما كان له وجود, دمتني قوتي و دخري في هذه الحياة اطال الله في عمرك

" اخوأي "

من قال فيهم ( سنشد عضدك بأخيك ), الى اللذان غمراني بالحب و أمداني بالقوة دائما و كانا موضع الاتكاء في كل عثرتي, اللذان رزقني الله بهما ( أيوب , خالد ) دمتم نورا لي حياتي

" سندي "

الى أجمل صدفة من الف اختيار, من استندت عليه في تعبي و حزني, الى جسر المحبة و العطاء " هارون " دمت السند المساند لي

" صديقاتي "

الى رفيقات الخطوة الأولى و الخطوة ما قبل الاخيرة, إلى من كانوا خلال السنين العجاف سحبا ممطرا و كانوا نورا لي قلبي و لو بكلمة طيبة انا ممتنة لكم جميعا: مایسة, رحمة, هناء, عبیر, هالة, رقية, خلود,

أمنة, أسماء, حياة,

Razika

## ملخص

تعتبر الحذفات الصغيرة في الصبغي Y من بين التغيرات الجينية المهمة التي قد تؤثر على الخصوبة و التنمية الجنسية عند الذكور ,وبما أن الصبغي Y يحمل معلومات تحدد الجنس و التطور الجنسي , فإن الكشف عن الحذفات الصغيرة فيه يعتبر أمرا ضروريا لتشخيص و فهم العديد من الإضطرابات الجنسية و الصحية .

تهدف هذه المذكرة إلى تصميم مجموعة من البادئات المستهدفة للكشف عن الحذفات الصغيرة في الصبغي Y باستخدام تقنية البلمرة المتسلسلة الفلورية الكمية (QF-PCR), التي تعتبر واحدة من أحدث التقنيات و الأكثر فعالية في تحليل الطفرات الجينية, حيث قمنا بتحديد المواقع المستهدفة في الصبغي Y باستخدام البيانات الجينية المتاحة والتي شملت المواقع الشائعة للحذفات بعد ذلك, استخدمنا هذه المواقع لتصميم البادئات المناسبة .

يتم اختبار البادئات المصممة لتحديد كفاءتها و دقتها في الكشف عن الحذفات المحددة باستخدام التجارب العلمية و تحليل النتائج بواسطة تقنية البلمرة المتسلسلة الفلورية و تحليل الجينات , ثم يتم تقييم النتائج و مقارنتها بالتقنيات الأخرى المستخدمة في كشف الحذفات مما يسلط الضوء على كفاءة و موثوقية تقنية QF-PCR .

استخدام تقنية QF-PCR في كشف الحذفات الصغيرة في الصبغي Y يمثل خطوة هامة في تطوير أدوات التشخيص الجيني و فهم الآثار الجينية لتلك الحذفات على الصبغي Y و الإضطرابات الجنسية و الصحية المرتبطة بها , وبالتالي فإن هذه المجموعة المصممة من البادئات قد تساهم بشكل كبير في تحسين التشخيص المبكر و العلاج للمرضى المتأثرين بتلك الحذفات.

**Abstract**

Small deletions on the Y chromosome are among the important genetic alterations that may affect male fertility and sexual development. Since the Y chromosome carries information that governs sex and sexual development, detection of small deletions is essential for the diagnosis and understanding of many sexual and health disorders.

The aim of this note is to design a set of targeted primers to detect small deletions in the Y chromosome using quantitative fluorescent polymerase chain reaction (QF-PCR), which is one of the latest and most efficient techniques for analyzing genetic mutations, we identified target sites on the Y chromosome using available genetic data, including common deletion sites, and used these sites to design suitable primers.

The designed primers are tested to determine their efficiency and accuracy in detecting specific deletions using scientific experiments, and the results are analyzed by fluorescent polymerase chain reaction (PCR) and gene analysis, and then the results are evaluated and compared with other techniques used for deletion detection, highlighting the efficiency and reliability of QF-PCR.

The use of QF-PCR to detect small deletions on the Y chromosome represents an important step in the development of genetic diagnostic tools and understanding of the genetic effects of Y chromosome deletions and associated sexual and health disorders, and thus this designed set of primers may contribute significantly to improving early diagnosis and treatment of patients affected by these deletions.

### Résumé

Les petites délétions du chromosome Y font partie des changements génétiques importants qui peuvent affecter la fertilité masculine et le développement sexuel, et comme le chromosome Y contient des informations qui déterminent le sexe et le développement sexuel, la détection de petites délétions est essentielle pour diagnostiquer et comprendre de nombreux troubles sexuels et de santé.

Cette note vise à concevoir un ensemble de préfixes cibles pour détecter de petites délétions dans le chromosome Y à l'aide de la technique de polymérisation par fluorescence quantique (QF-PCR), qui est considérée comme l'une des techniques les plus récentes et les plus efficaces dans l'analyse des mutations génétiques, où nous avons identifié des sites cibles dans le chromosome Y à l'aide des données génétiques disponibles qui comprenaient des sites communs pour les délétions. Après cela, nous avons utilisé ces sites pour concevoir les préfixes appropriés.

Les préfixes conçus pour déterminer leur efficacité et leur précision dans la détection de délétions spécifiques sont testés à l'aide d'expériences scientifiques et les résultats sont analysés par fluoropolymérisation et analyse génique, puis les résultats sont évalués et comparés à d'autres techniques utilisées dans la détection des délétions mettant en évidence l'efficacité et la fiabilité de la technologie QF-PCR.

L'utilisation de la technologie QF-PCR dans la détection de petites délétions dans le chromosome Y représente une étape importante dans le développement d'outils de diagnostic génétique et la compréhension des effets génétiques de ces délétions sur le chromosome Y et les troubles sexuels et de santé associés.

مقدمة

## مقدمة (Introduction)

تفاعل البوليميراز المتسلسل (PCR: Polymerase Chain Reaction) هو تقنية ثورية في البيولوجيا الجزيئية تم تطويرها من قبل Kary Mullis وزملاؤه في عام 1983م ، تسمح هذه الطريقة بتضخيم كميات صغيرة من الحمض النووي أو الحمض النووي الريبي بشكل انتقائي إلى مستويات يمكن اكتشافها ، مما يوفر أداة أساسية لمجموعة واسعة من التطبيقات في البحث العلمي والطبي. يعتمد تفاعل البوليميراز المتسلسل على استخدام إنزيم خاص وهو بوليميراز الحمض النووي (DNA polymerase)، وهو قادر على نسخ تسلسلات محددة من الحمض النووي ( DNA Deoxyribonucleic acid) أو الحمض النووي الريبي ( Ribonucleic Acid RNA ) بشكل انتقائي. تتضمن عملية تفاعل البوليميراز المتسلسل عدة خطوات رئيسية ، بما في ذلك التسخين ، حيث يتم تسخين الحمض النووي المزدوج الشريط لفصله إلى خيوط منفردة ، والتجهين ، حيث ترتبط البادئات المحددة بالتسلسلات المستهدفة ، والإمتداد ، حيث يتم تصنيع خيوط جديدة من الحمض النووي من البادئات.. أحدثت هذه التقنية ثورة في العديد من مجالات علم الأحياء ، من الطب الشرعي والبحوث الجينية إلى التشخيص الطبي والبيولوجيا التطورية. يستخدم على نطاق واسع للكشف المبكر عن الأمراض الوراثية ، وتوصيف مسببات الأمراض ، وتحديد الأفراد كجزء من علم الوراثة الشرعي (Mullis, K. B., 1988) .

الإنحلالات أو الحذوفات الدقيقة (Microdeletions) هي أقسام صغيرة مفقودة من الحمض النووي على الكروموسوم، قد تكون لها تأثيرات كبيرة على الصحة والتطور، وقد تسبب الأمراض الوراثية واضطرابات التطور. يعتبر الكشف الدقيق عن هذه الحذوفات الدقيقة أمرًا حاسمًا لتشخيص ورعاية المرضى.

من خلال دمج الـ PCR مع تقنيات الكشف الخاصة، يمكن للعلماء تحديد الحذوفات الدقيقة المرتبطة ببعض الحالات الوراثية. إن الحساسية والتخصصية للـ PCR تجعلها أداة قوية لتشخيص هذه التغيرات الجينية، وبالتالي فتح الباب أمام التدخلات المبكرة والعلاج المناسب للمرضى المعنيين، هذا الجمع بين الـ PCR وكشف الحذوفات الدقيقة يمثل تقدمًا كبيرًا في مجال الطب الشخصي والجيني السريري.



الفصل الأول

عموميات عن تقنية الـ PCR

Generalities about pcr technology

## الفصل 01: عموميات عن تقنية ال PCR (Generalities about pcr technology)

### لمحة تاريخية

تقنية ال (PCR : Polymerase Chain Reaction) هي تقنية حيوية مهمة تستخدم لاستنساخ وتكرار الحمض النووي بشكل سريع ودقيق. وقد تم تطويرها من قبل الكيميائي الأمريكي كاري موليس في عام 1983 أثناء عمله في شركة Cetus Corporation في كاليفورنيا. وهنا نوضح لمحة تاريخية عن تطور تقنية PCR:

✓ 1983: في الربيع، وأثناء تجواله في سيارته على طريق 128 بكاليفورنيا، جاءت فكرة PCR إلى موليس. كانت هذه الفكرة الأصلية تهدف إلى إيجاد طريقة لتكرار تكوينات الحمض النووي بسرعة وفعالية.

✓ 1985: نشر موليس وزملاؤه أول ورقة علمية تصف تقنية PCR، والتي نالت اهتمامًا كبيرًا في مجال البحوث العلمية. (Mullis et al, 1987).

✓ 1986: تم تطبيق تقنية PCR لأول مر في الطب البيطري لاستنساخ جينات الفيروسات. (Frohman et al, 1988).

✓ 1987: تم تطوير تقنية PCR لاستخدامها في الكشف الجزيئي، حيث يمكن استخدامها للكشف عن وجود جينات محددة.

✓ 1988: تم استخدام تقنية PCR لأول مرة لاستنساخ الحمض النووي من عينات مومياء قديمة، مما أظهرت فعالية ودقة العملية. (Pääbo et al, 1990).

✓ 1993: حصل كاري موليس على جائزة نوبل في الكيمياء لاختراعه لتقنية PCR، واعُتبرت هذه الجائزة تقديرًا للتقنية الثورية ودورها في تطوير العلوم والطب.

هذه الأحداث تعكس ما مدى أهمية وتأثير هذه التقنية الحيوية على التطور العلمي والطبي.

### 1- تعريف (Definition)

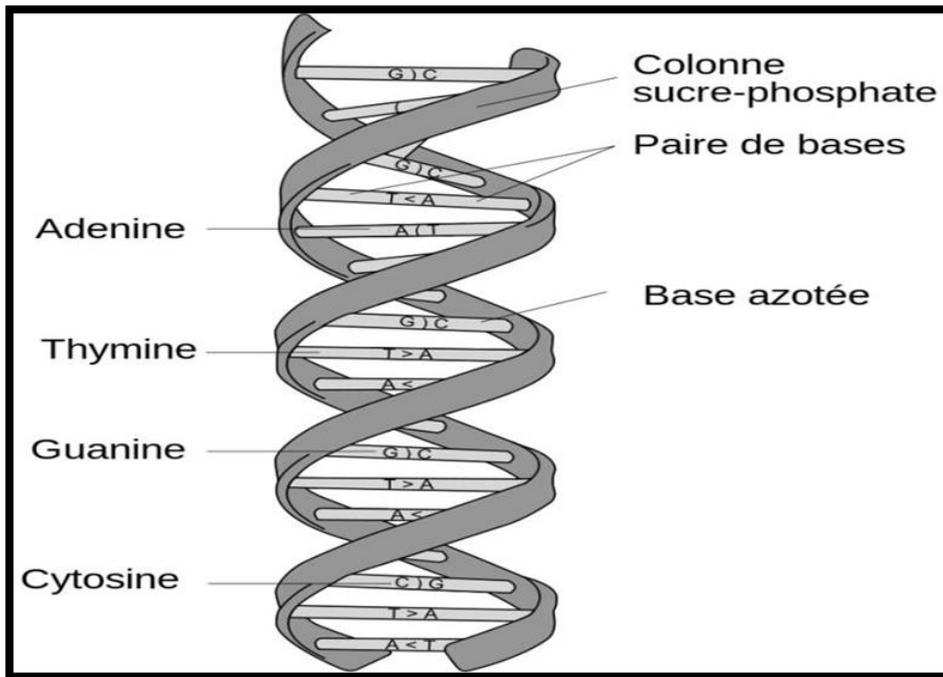
وفقا لقاموس أكسفورد للكيمياء الحيوية والبيولوجيا الجزيئي (Datta, Smith et al, 2000)، يتم تعريف تفاعل البوليميراز المتسلسل على أنه طريقة لتضخيم تسلسل معين من النيوكليوتيدات لحمض ديوكسيريبونوكلييك مزدوج الشريط. يتم تحديد هذا التتابع باستخدام النيوكليوتيدات الاصطناعية القصيرة التي تكون متكاملة في طرفي تتابع الحمض النووي (DNA) المراد تضخيمها، والتي تطول بعد ذلك بواسطة إنزيم بلمرة الحمض النووي (DNA) عن طريق قراءة قالب الحمض النووي (DNA). تغطي سلاسل الحمض النووي الجديدة المنطقة التي تحدها المنطقتان النهائيتان المختارتان. تتكرر هذه العملية عدة مرات، مع تضخيم يصل إلى 10000 عامل لجزء من الحمض النووي المستهدف.

لا يتوجب إضافة إنزيم البوليميراز في كل مرة لأنه لا يتم تعطيله عند درجة حرارة تمسخ الحمض النووي ( Brock and Freeze, 1969) يمكن العثور على الحمض النووي المستخدم في متغيرات الأنسجة والكائنات الحية مثل الجلد والشعر والدم المحيطي واللحاح والميكروبات.

## 2-1- الحمض النووي (DNA)

الحمض النووي الريبي منقوص الأكسجين هو جزيء كبير يحتوي على جميع المعلومات الوراثية ، وبالتالي فهو حامل الوراثة، يتم استخدامه لبناء جينوم الكائنات الحية وينتقل أثناء التكاثر (Holland et al., 1991). يتكون من العديد من النيوكليوتيدات ، كل نيوكليوتيد يحتوي على سكر وقاعدة نيتروجينية وفوسفات. يشكل السكر والفوسفات «العمود الفقري» لجزيء الحمض النووي (DNA) ، بينما تتبع القواعد النيتروجينية بعضها بعضا لتكوين شريط الحمض النووي. هناك نوعان من القواعد النيتروجينية: بيريميدين (السيتوزين و الثايمين) وقواعد البيورين (الأدينين و الجوانين). تكامل الخيوط ممكن بفضل الرابطة بين الأدينين و الثايمين (بواسطة رابطتين هيدروجينيتين) وبين السيتوزين و الجوانين (بواسطة 3 روابط هيدروجينية) مما يمنح الحمض النووي بنية مزدوجة.

الحمض النووي حلزوني الشكل، لتكوين هذا اللولب المزدوج تلتف سلسلتان متكاملتان من النيوكليوتيدات حول المحور نفسه، يتم إقران السلسلتين في وضع مضاد للتوازي ، أي أن السلسلتين لهما اتجاه عكسي لبعضهما البعض: اتجاه 5' → 3' و 3' → 5' مضاد للإتجاه. يتم توفير خصائص التخليق الإنزيمي والبدء في الاختبار الخاص بالحمض النووي المزدوج عن طريق بوليميراز الحمض النووي المعتمد على الحمض النووي المستقر للحرارة، يتم ضمان خصائص تمسخ وتهجين خيوط الحمض النووي التكميلية في المختبر من خلال انتقالات درجة الحرارة (التي يوفرها جهاز التدوير الحراري) تتكرر دوريا أثناء التضخيم.



الصورة 01: بنية وتركيبية جزيء الحمض النووي (DNA) (Fidel., 2014)

## 2- المبدأ (Principe)

يتكون المبدأ من تضخيم جزء من الحمض النووي (DNA) أو الحمض النووي الريبي (ARN) الذي يعمل كقالب ، يتم الحصول عليه بعد الاستخراج من عينات من أنواع مختلفة (الدم ، الخزعات ، السائل النخاعي ، إلخ) ، محددة بواسطة مواد أولية محددة (Primers أو التمهيدي). تتكون هذه من قطعة مكونة من حوالي 20 زوجا من القواعد، يتبع ارتباطها بالحمض النووي المستهدف باستطالة عن طريق البوليميراز Taq (Thermusaquaticus) مما يؤدي إلى تخليق الحمض النووي المزدوج بالطول المعتاد البالغ حوالي 1000 زوج من النيوكليوتيدات، يتكرر هذا التضخيم عدة مرات من أجل الحصول على كمية كافية من الحمض النووي ليتم اكتشافها وتحليلها.

## 3- الجهات الفاعلة في تقنية الـ PCR (Players in PCR technology)

## 1) الحمض النووي القالب (AND matrix)

قبل تفاعل البوليميراز المتسلسل يتم استخراج الحمض النووي من العينة المراد تحليلها (مثل اللعاب والشعر والخلايا والحفريات وما إلى ذلك) وتنقيتها، ثم يتم استخدام هذا الحمض النووي المنقى ، الذي يحتوي على الجزء المراد تضخيمه كقالب لتفاعل البوليميراز المتسلسل.

## 2) بوليميراز الحمض النووي (DNA polymerase)

جميع أنواع البوليميراز الحمض النووي المستخدمة في تفاعل البوليميراز المتسلسل مستقرة للحرارة ، مما يعني أنه لا يتم تغيير طبيعتها في درجات الحرارة العالية اللازمة لتفاعل البوليميراز المتسلسل (حتى 100 درجة مئوية)، البوليميراز Taq هو الإنزيم الأكثر استخداما لقوته في درجات الحرارة العالية.

في تفاعل البوليميراز المتسلسل (PCR) ينسخ إنزيم بلمرة الحمض النووي نيوكليوتيدات الحمض النووي (DNA) عن طريق الارتباط بالحمض النووي أحادي الشريط، ثم يقوم بتجميع شريط جديد يكمل الشريط الأصلي، لبدء العمل تحتاج بوليميراز الحمض النووي إلى منطقة قصيرة من الحمض النووي المزدوج الشريط (Winter et al ., 1999)

3) البادئات (primers): هي قليل النيوكليوتيدات (oligonucleotides) من 17 إلى 30 زوجا من القواعد يجب أن تكون مكتملة تماما للتسلسل المستهدف مع تكوين عام بنسبة 50% (G + C).

لا ينبغي أن تهجن القوالب مع بعضها البعض أو على نفسها لتجنب تشكيل الهياكل الطفيلية مثل ثنائيات البادئات والتي يمكن أن تقلل من حساسية الـ PCR .

4) النوكليوتيدات (deoxyNucleotide-Triphosphates) dNTP: يتم استخدام أربعة ديوكسينيوكليوتيدات ثلاثية الفوسفات dGTP ,dATP ,dCTP ,dTTP بواسطة بوليميراز Taq لتجميع شريط الحمض النووي التكميلي أثناء تفاعل البوليميراز المتسلسل.

5) المغنيسيوم (Mg ++): هو عامل مساعد أساسي للتشغيل السليم للبوليميراز ودمج السلائف أثناء تفاعل البوليميراز المتسلسل. يجب أن يكون موجودا بتركيز معين عادة في شكل  $MgCl_2$  .

## 4- تصميم البادئات (Design of primers)

يعد تصميم البادئات أمراً حاسماً لنجاح تفاعل البوليميراز المتسلسل، حيث إنه يؤثر على حساسية وخصوصية ومتانة التقنية و يمكن أن تؤثر البادئات سيئة التصميم على نجاح تفاعل البوليميراز المتسلسل (Bustin, Mueller, et al., 2020).

عند تصميم البادئات من الضروري توجيهها في اتجاه '5←'3 والشريط المكمل في الإتجاه الآخر، '3←'5 (Albert et al., 1990).

## 5- معايير إختيار البادئات (Criteria for selecting primers)

عند اختيار البادئات من الضروري مراعاة عدد من المعايير المهمة:

## ◆ طول البادئات (primers Length of)

يعد طول البادئات الأمثل أمراً حاسماً لنجاح اختبار تفاعل البوليميراز المتسلسل حيث أنه يعزز كفاءة التهجين، يتراوح هذا الطول عموماً بين 16 و30 نيوكليوتيدة مع اختلاف في الطول لا يزيد عن 3 نيوكليوتيدات بين البادئات الأمامية والعكسية (Wu et al., 2004).

## ◆ درجة حرارة الذوبان (Melting temperature)

للحصول على أفضل النتائج من الضروري أن تظل درجة حرارة انصهار البادئات بين 55 درجة مئوية و65 درجة مئوية، مع وجود فرق 5 درجات مئوية كحد أقصى بين البادئين.

## ◆ الخصوصية (Privacy)

خصوصية البادئات ضرورية لأنها تقلل من الأخطاء في النتائج، يمكن أن تتأثر بعوامل مثل طول البادئات ونقاؤها وكمية الإنزيم في التفاعل ودرجة حرارة التلدين، بالإضافة إلى إضافات أخرى (Zhong et al., 2016).

## ◆ التكامل (Integration)

عند تصميم البادئات من الضروري تجنب أي تجانس بين البادئات لمنع تكوين البنى الثانوية (BELAID Nadia., 2017).

## ◆ محتوى G/C (G/C content)

يعد هذا المعيار مهماً لاختيار البادئات التي لا تحتوي على تسلسلات متعددة G أو متعددة C، مما قد يؤدي إلى تهجين غير محدد يجب أن يتراوح محتوى G/C بين 40% و60% (Chuang et al., 2013).

## 6- مراحل تفاعل البوليميراز المتسلسل (Stages of the polymerase chain reaction)

يتكون تفاعل البوليميراز المتسلسل من سلسلة من حوالي أربعين دورة (تشير التقديرات إلى أن هناك حوالي 34 إلى 35 دورة PCR نظرية للكشف عن نسخة واحدة)، لكل منها 3 خطوات رئيسية: تمسخ الحمض النووي المزدوج، تهجين

البادئات ذات نفس الإتجاه والمضادة للإتجاه وأخيرا تمديد أو إستطالة البادئات. جميع العناصر اللازمة للتفاعل (البادئات ، الديوكسيريبونوكليوتيدات (dNTPs) وبوليميراز Taq موجودة في فائض كبير جدا في خليط التفاعل والذي سيخضع لدرجات حرارة مختلفة تتوافق مع كل خطوة من الخطوات.

### I- تمسخ الحمض النووي (DNA Denaturation)

#### ▪ التمسح الأولي (Primary denaturation)

قبل بدء دورات تفاعل تضخيم الحمض النووي، تتمثل الخطوة الحاسمة في تسخين العينة إلى 95 درجة مئوية لمدة 10 إلى 15 دقيقة، هذا التسخين الأولي له عدة وظائف: فهو يفك الحمض النووي المزدوج الشريط ويزيل أي هياكل ثانوية ، ويفسد الإنزيمات الموجودة في المحلول مثل النسخ العكسي. بالإضافة إلى ذلك ، تعزز هذه الخطوة الحرارية تجانس خليط التفاعل عن طريق زيادة الحركة البراونية.

#### ▪ تمسخ خلال الدورات (scanned during the cycles)

يتم إجراء مراحل تمسخ الحمض النووي عند 95 درجة مئوية لمدة دقيقة واحدة، يتم استخدامها لمزامنة التفاعلات وهو أمر بالغ الأهمية لدقة تفاعل البوليميراز المتسلسل عن طريق تحطيم حلزونات الحمض النووي المزدوجة إلى جزيئات خطية منفردة (إزالة تهجين الحمض النووي). هذا التمسح يجعل الحمض النووي في متناول البادئات التي ستدخل في الخطوة التالية من التفاعل. بالإضافة إلى ذلك تطلق هذه المراحل بوليميراز الحمض النووي الذي قد لا يزال مرتبطا بقالب.

### II- تهجين البادئات (Hybridization of primers)

بعد التمسح ، يتم تبريد خليط التفاعل بسرعة إلى درجة حرارة التهجين (TH:Température d'hybridation) ، حيث يمكن أن ترتبط البادئات الزائدة بمجموعة التسلسلات المستهدفة. هذه الخطوة ضرورية لتفاعل البوليميراز المتسلسل لأنها تضمن أن كمية البادئات المستخدمة تتناسب مع مقدار الهدف ، مما يسمح بالتضخيم الأمثل. مطلوب تهجين كامل (100%) لتجنب الإختلاف العشوائي والذي يتم التحقق منه باستخدام عينات مكررة بشكل عام بين 55 و 65 درجة مئوية ، تتوافق درجة حرارة التهجين بشكل عام مع درجة حرارة الإنصهار ( $T_m$ ) وتعتمد بشكل أساسي على ثلاثة معايير رئيسية:

✓ التركيب الأساسي للبادئة: الرابطة الهيدروجينية الإضافية لزوج قاعدة G-C تجعل للازدواج الغني ب GC أكثر استقرارا من للازدواج الغني ب AT

✓ طول وتركيز البادئة: يتناسب معدل إعادة التجديد مع هاذين العاملين. تركيزات عالية من البادئات وبالتالي تعزيز تشكيل للازدواج

✓ تكوين خليط التفاعل : تأثير التركيب الأيوني للوسط ( $Na^+$  ,  $Mg^{2+}$  المواد المضافات ، إلخ..)

تم تصميم البادئات للتهجين في مواقع محددة في الحمض النووي بحيث يمكن لبوليميراز الحمض النووي تخليق المنطقة محل الاهتمام أثناء التمديد. أثناء التمديد، تكون الحركية من الدرجة الثانية: تبحث البادئات ببطء عن تسلسلاتها التكميلية بالحركة البراونية ، ثم تهجن بسرعة بمجرد العثور عليها ( Smith et al., 1975; Murugan 2002; Sikorav )

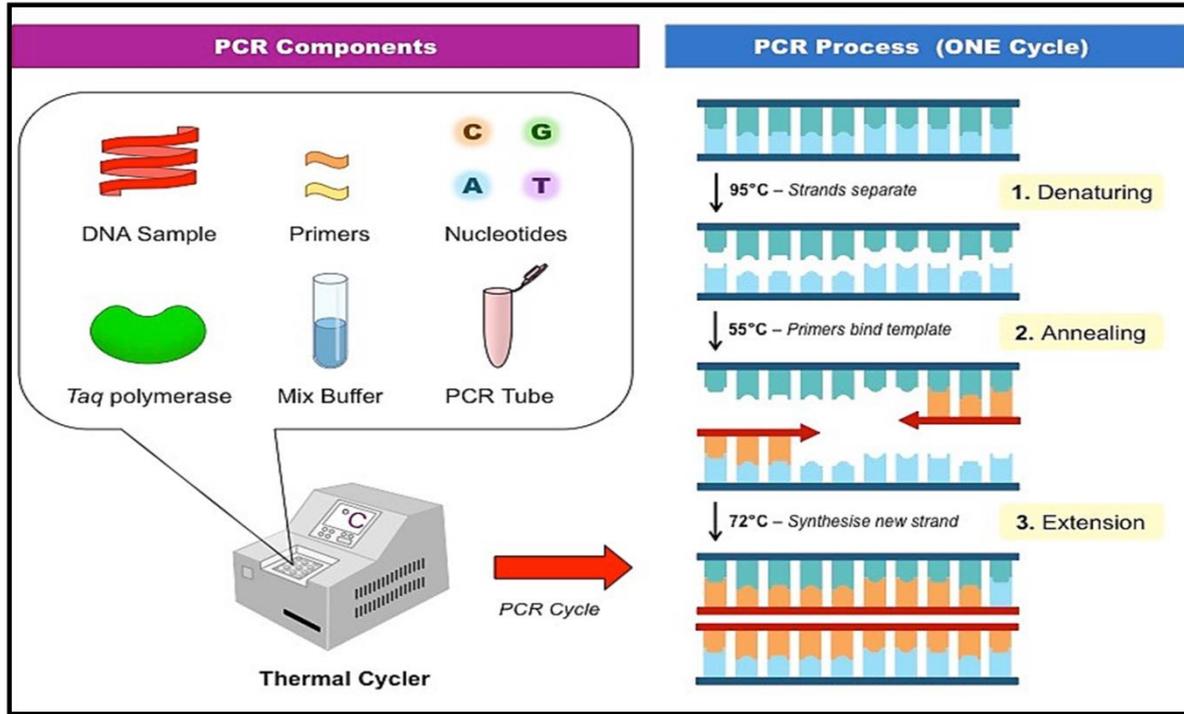
(et al., 2009) خلال تفاعل البوليميراز المتسلسل، هناك منافسة بين البادئات والخيوط التكميلية على المستوى الجزيئي. تحتوي الخيوط التكميلية على تهجين أكثر ملاءمة من الناحية الديناميكية الحرارية من البادئات الموجودة على الدراع القالب بسبب طولها للتعويض عن ذلك، يتم الاحتفاظ بتركيز البادئة أعلى بكثير من تركيز الأهداف والخيوط التكميلية. ومع ذلك، إذا لم يتم تهجين البادئين في وقت واحد، فإن إعادة تهجين الشريط المكمل يصبح أكثر ملاءمة، مما يقلل من كفاءة التفاعل. مع زيادة تركيز الهدف وانخفاض تركيز البادئة، يصبح تهجين الهدف على نفسه أكثر احتمالاً. هذه الظاهرة هي السبب الرئيسي لتوقف التضخيم، والمعروفة باسم مرحلة "الهضبة".

على الرغم من أن النشاط الإنزيمي للبوليميراز Taq يظل جيداً في نهاية التفاعل (Lawyer, Stoffel et al., 1993) تساهم مشاكل التهجين هذه في رؤية ديناميكية لتثبيط تفاعل البوليميراز المتسلسل. (Birch., 1996)

### III- إستطالة وتمديد البادئات (Elongation and extension of primers)

خلال هذه المرحلة ترتفع درجة الحرارة بسرعة إلى 72 درجة مئوية وهي درجة الحرارة المثلى للبوليميراز Taq سيقوم هذا الحمض النووي المعتمد على بوليميراز الحمض النووي بعد ذلك بتجميع شريط مكمل من البادئين المهجنين عن طريق "قراءة" تسلسل الدراع القالب في اتجاه 3OH' نحو 5'P (البلمرة عن طريق تمديد البادئات). وبالتالي فإنه يوسع البادئات في النهاية 3OH' عن طريق دمج النيوكليوتيدات الموجودة في الوسط بشكل صحيح وفقاً لقواعد الاقتران التي وضعها WATSON & CRICK في عام 1953 (Watson and Crick., 1953).

في هذه المرحلة نلاحظ بلمرة حبل مركب حديث يكون تسلسله مكملًا لتسلسل الدراع القالب المحدد على أنه الهدف. يعتمد الوقت المخصص لهذه الخطوة على حجم الأمبليكون وعملية الإنزيم (Von Hippel et al., 1994)، يتم تنفيذ كل هذه الخطوات واحدة تلو الأخرى في وقت قياسي على مدار 30 إلى 40 دورة تضخيم تزداد خلالها كمية الأمبليكونات أضعافاً مضاعفة (Wittwer et al., 1990).



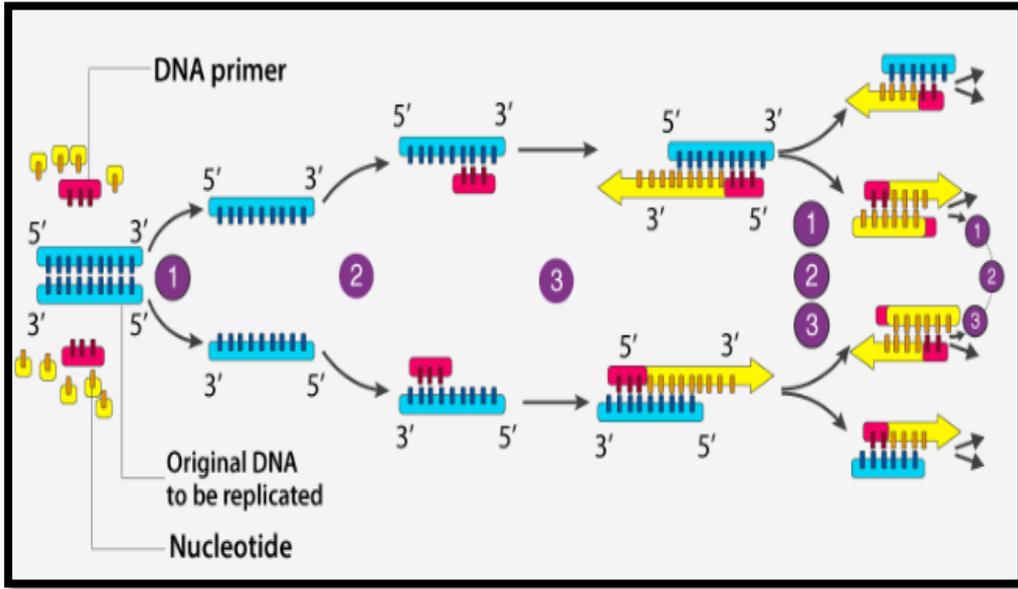
الصورة 02: مراحل تقنية ال PCR (John., 2020)

## 7- أنواع تقنية ال PCR (Types of PCR)

## 1- البلمرة المتسلسلة النوعية (PCR qualitative)

هي تقنية في علم الأحياء الجزيئي تُستخدم لكشف وجود أو عدم وجود جزيئات محددة من الحمض النووي في عينة ما، تعتمد هذه التقنية على تكرار الحمض النووي باستخدام إنزيم معين يسمى البوليميراز الحمض النووي، تلاها تكاثر متسارع للحمض النووي المستهدف (Mullis and Faloona., 1987).

بشكل عام، تُستخدم البلمرة المتسلسلة النوعية لاكتشاف وجود عوامل ممرضة مثل الفيروسات والبكتيريا أو الطفيليات في العينات السريرية أو البيئية. يمكن أيضًا استخدامها لاكتشاف وجود جينات معينة مرتبطة بأمراض وراثية أو سرطانات (Saiki et al ., 1988).



الصورة 03: مبدأ عمل تقنية البلمرة المتسلسلة النوعية (Ramirez., 2022)

## II- البلمرة المتسلسلة الكمية (quantitative PCR)

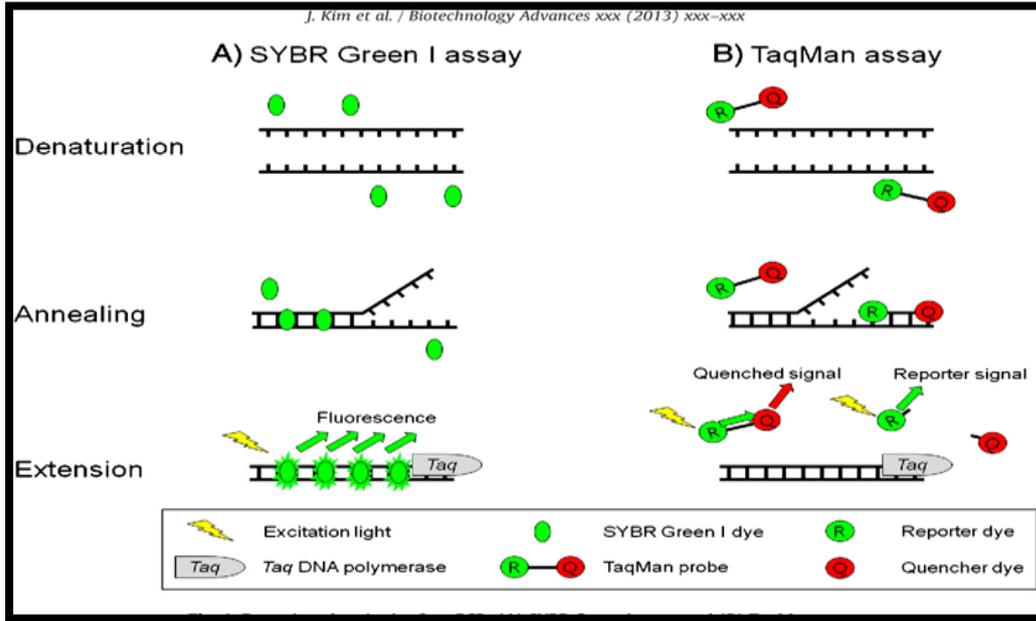
هي تقنية قابلة للتكرار بشكل كبير وسريعة وحساسة غالبًا ما تُستخدم لتقليل خطر التلوث (waleed et al., )

(2014) هناك تقنيتان للكشف المرتبطتان بها وهما:

▪ الصبغة الخضراء SYBR green.

▪ Taq man (or) fluoride probes.

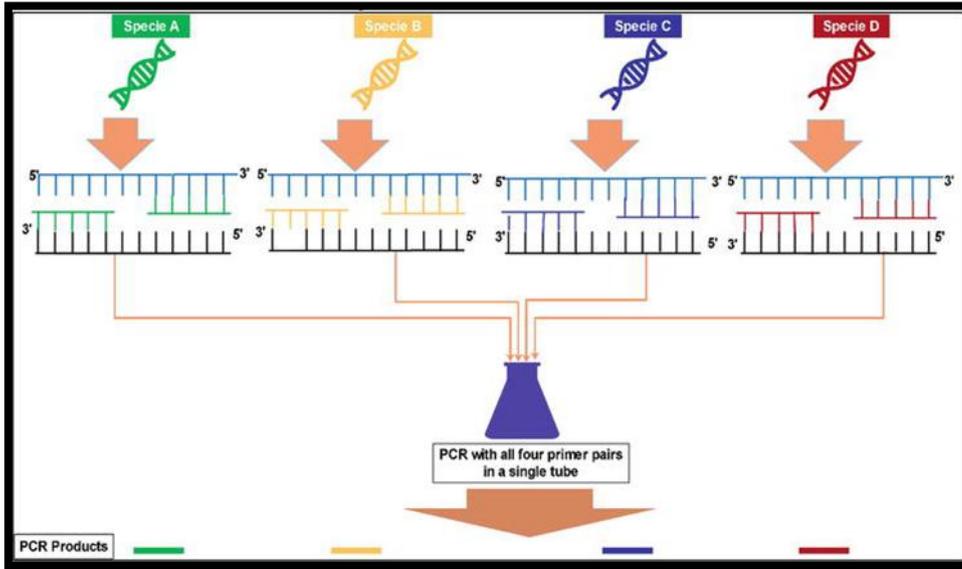
و من المزايا التي تتصف بها التحكم الكمي في جودة الحمض النووي المستهدف, سرعة وكفاءة البلمرة مما يساعد في تقليل أوقات الإنتظار وزمن التشغيل, القضاء على خطوات ما بعد التكاثر, توافر مواد كيميائية للبلمرة ذات جودة مراقبة مما يساهم في زيادة الموثوقية; سنرى مزيدا من المعلومات عن هذا النوع في الفصل القادم.



الصورة 04: مبدأ عمل تقنية البلمرة المتسلسلة الكمية (Jaai et al., 2013)

### III- تقنية البلمرة المتعددة الجينات (multiplex PCR)

البلمرة المتعددة الجينات هي تقنية تعديلية لتقنية البلمرة المتسلسلة (PCR) تسمح بالكشف السريع عن عدة أهداف في نفس التفاعل. تستخدم هذه التقنية مجموعات متعددة من البادئات في خليط واحد من إنتاج أمبوليكونات بأحجام متغيرة تكون محددة لتسلسلات مختلفة من الحمض النووي. تُمكن من استهداف عدة جينات في آن واحد خلال اختبار واحد، مما يوفر استخدامًا أقل للمواد الكيميائية والوقت مقارنة بالطرق التقليدية (Chamberlain et al., 1988).

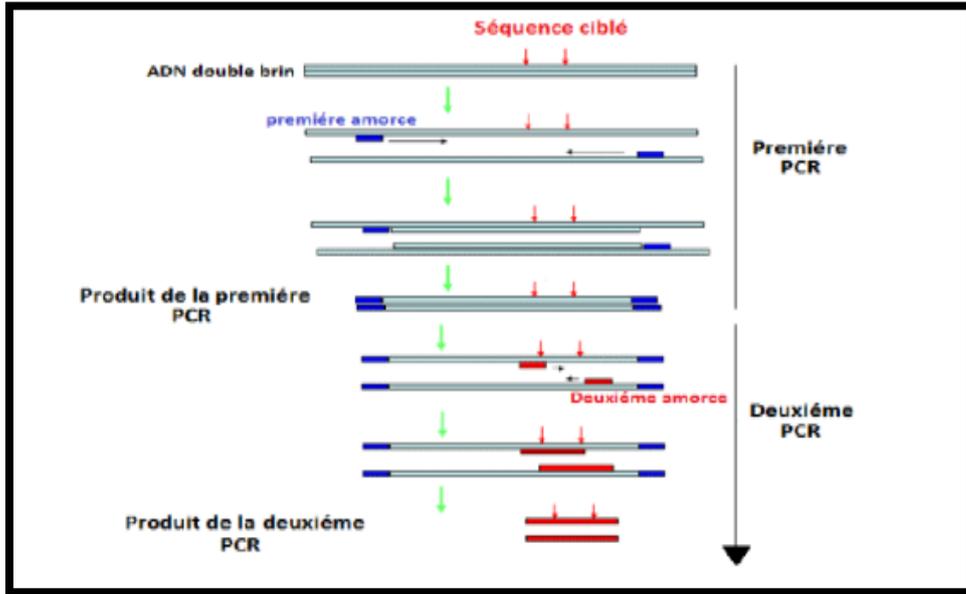


الصورة 05: مبدأ عمل تقنية البلمرة المتعددة الجينات (Aklilu., 2022)

#### IV- البلمرة المتسلسلة المتعمقة (nested PCR)

هي سلسلة من تفاعلات البلمرة المتسلسلة التي تُجرى لتضخيم تسلسل معين، من خلال إجراء تفاعلين متتاليين حيث يتم تكبير منتج البلمرة الأولى مرة أخرى خلال الثانية، الميزة الرئيسية لهذا التكبير الثاني هو زيادة خصوصية هذه التقنية.

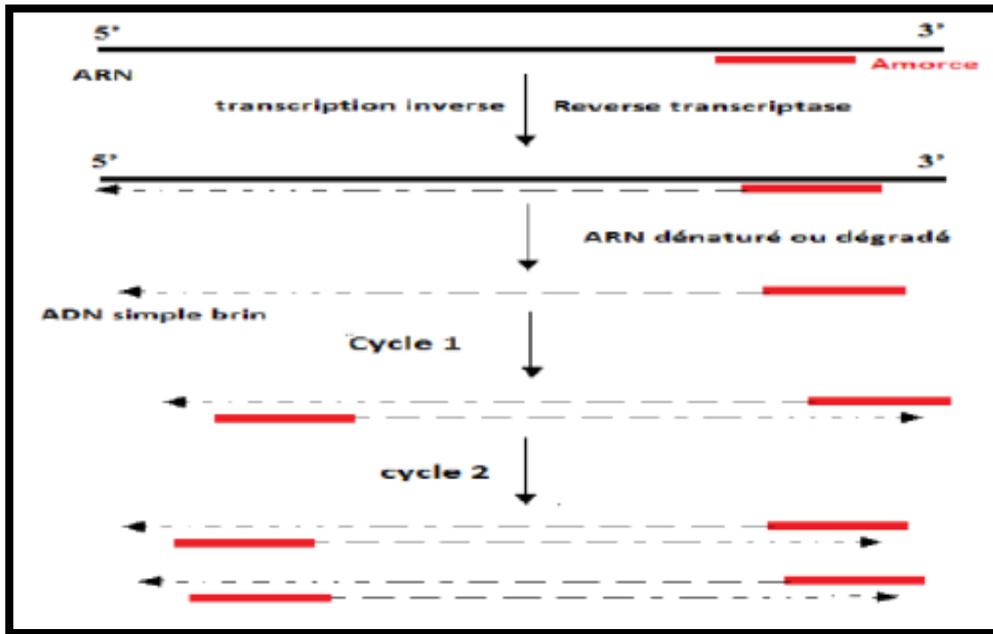
تستخدم في هذه التقنية على التوالي زوجان من البادئات المختلفة: زوج البادئات الخارجية التي تُمكن في البداية تكبير جزء من الحمض النووي المستهدف، زوج من البادئات الداخلية التي تستخدم لتحديد المنطقة الداخلية (أو المتداخلة) لجزء من النوكليوتيدات المنبثق من التضاعف الأولي وتنتج قطعًا أصغر حجمًا من تلك التي حصل عليها التضاعف الأولي (Tella., 2013).



الصورة 06: مبدأ عمل تقنية البلمرة المتسلسلة المتعمقة (Tellaa., 2013)

#### V- التفاعل المتسلسل بالإنعكاس للبوليميراز في السلاسل النووية (RT-PCR)

هو تقنية تستخدم في علم الأحياء الجزيئي لتكبير واكتشاف الأحماض الريبوزية النووية (ARN) المحددة، ينطوي هذا النهج أولاً على تحول الARN إلى حمض نووي ريبوزي مكمل (ADNC) باستخدام إنزيم يُعرف بالبوليميراز الإنعكاسية، ثم تكبير هذا الADNC باستخدام تقنية البوليميراز في السلاسل النووية، تتيح هذه الطريقة اكتشاف وقياس الARN الموجودة في العينة، مما يجعلها أداة قيمة في البحث الوراثي وعلم الفيروسات والتشخيص الطبي (Saiki et al., 1988).



الصورة 07: مبدأ عمل تقنية التفاعل المتسلسل بالإنعكاس للبوليميراز في السلاسل النووية

(Tellaa., 2013)

## 8- خصائص تفاعل البوليميراز المتسلسل (Characteristics of the polymerase chain reaction)

### ❖ خصوصية التحليل (Specificity of analysis)

تُعزى خصوصية الكشف إلى القدرة على استهداف تسلسل معروف من بين التسلسلات الأخرى غير المحددة الموجودة في وسط التفاعل (Saiki et al., 1988).

### ❖ حساسية التحليل (Sensitivity of analysis)

يشتهر تفاعل البوليميراز المتسلسل بحساسيته العالية، مما يتيح الكشف عن كميات صغيرة من الحمض النووي أو الحمض النووي الريبي المستهدف (Mullis et al., 1986).

### ❖ قابلية التكرار (Repeatability)

أي القدرة على إعادة تكرار النتائج بدقة وموثوقية عند تكرار التجربة في نفس الظروف وبنفس البروتوكول. هذه السمة أساسية في تقنية PCR لضمان اتساق وموثوقية النتائج (Bustin et al., 2009).

### ❖ السرعة (Speed)

تستطيع تقنية PCR إنتاج مليارات النسخ من تسلسل معين من الحمض النووي في ساعات قليلة فقط، مما يجعلها تقنية سريعة لتكاثر الحمض النووي (Mullis et al., 1986).

### ❖ سهولة الاستخدام (Ease of use)

تعتبر تقنية PCR تقنية بسيطة نسبيًا ويمكن تنفيذها في معظم مختبرات الأحياء الجزيئية باستخدام معدات أساسية (Saiki et al., 1988).

## 9- تطبيقات تفاعل البوليميراز المتسلسل (Polymerase Chain Reaction Applications)

تطبيقات تفاعل البوليميراز المتسلسل عديدة ومنها :

(أ) في البيولوجيا الخلوية والجزيئية ، يستخدم تفاعل البوليميراز المتسلسل في:

- عزل وتنقية الجينات
- تحديد الأنواع الحيوانية والنباتية
- تحديد الكائنات الحية الدقيقة في اختبارات الغذاء
- الإستنساخ الجزيئي
- اختبارات الأبوة
- تحديد المعلومات الوراثية للشخص (على سبيل المثال في علم الجريمة)

- الكشف عن الكائنات المحورة وراثيا
- (ب) في التشخيص الطبي ، يمكن استخدام تفاعل البوليميراز المتسلسل في :
  - الكشف عن الأمراض الوراثية
  - الكشف عن الطفرات على مستوى الجينوم وطبيعتها وأحجامها ومواقعها
  - الكشف عن الأمراض المعدية. أمثلة: الإيدز أو التهاب الكبد C أو عدوى الكلاميديا
  - فحص ما قبل الولادة مثل التثلث الصبغي على سبيل المثال
  - الكشف عن الأورام

### 10- مزايا تقنية البلمرة المتسلسلة (PCR) (Advantages of polymerase chain reaction PCR)

- ◆ توفير الوقت والجهد.
- ◆ القدرة على اكتشاف تراكيز ضئيلة جداً من الحموض النووية.
- ◆ إنتاج عدد كبير من النسخ (بحوالي مليار نسخة لكل 30 دورة تستغرق من ساعتين إلى أربع ساعات).
- ◆ البلمرة المتسلسلة الرباعية (PCR) سريعة و هذا ما يجعلها طريقة فعالة للحصول بسرعة على نتائج دقيقة في علم الأحياء الجزيئي.
- ◆ قدرة على اكتشاف السلالات والتغيرات الجينية بدقة.

### 11- حدود تقنية البلمرة المتسلسلة (PCR) (Limitations of polymerase chain reaction )

#### (PCR)

- ◆ خطر تثبيط البوليميراز Taq بواسطة المواد مثل الأصبغة، الهيم، أو المواد البيولوجية مما يؤدي إلى ظهور نتائج إيجابية خاطئة.
- ◆ استخدام بروميد الإيثيديوم للكشف (مادة مسرطنة).
- ◆ التكلفة المرتفعة لتقنية مقارنة بالتقنيات الأخرى .
- ◆ قد تؤدي تقنية PCR إلى الحصول على نتائج غير دقيقة نتيجة للتقديرات الخاطئة أو الظروف غير المناسبة للتفاعل.
- ◆ إمكانية الحصول على نتائج غير قابلة للتفسير بشكل واضح في حالة وجود أعطال في العينات أو في العملية.

## الفصل الثاني

قنية البلمرة المتسلسلة الفلورية الكمية (QF-)

Quantitative fluorescent (PCR

polymerase chain reaction (QF-PCR)

الفصل 02 :تقنية البلمرة المتسلسلة الفلورية الكمية (QF-PCR)

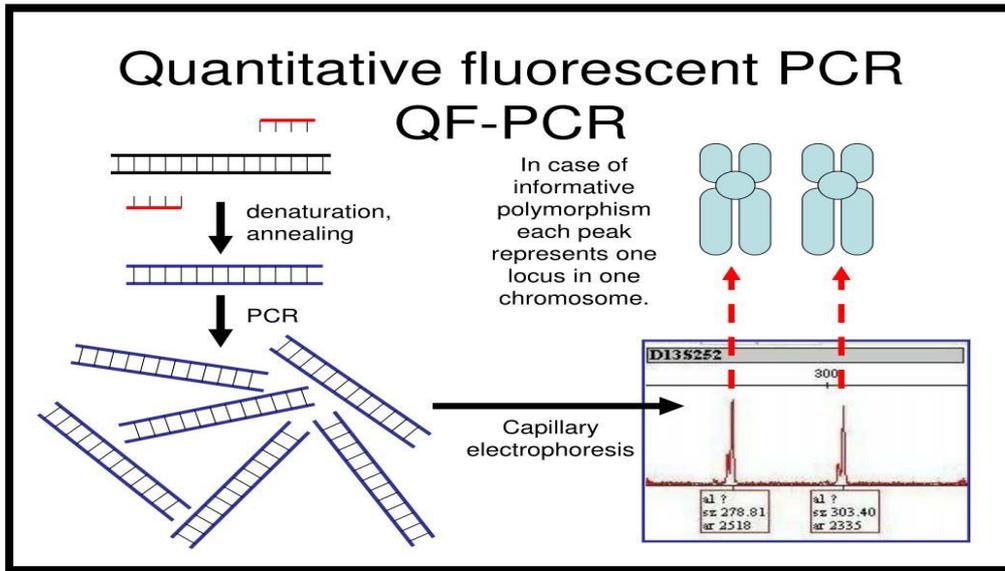
(Quantitative fluorescent polymerase chain reaction (QF-PCR)

1- تعريف (Definition)

تعتبر تقنية البلمرة المتسلسلة الفلورية الكمية ( Quantitative fluorescent polymerase chain reaction ) من تقنيات علم الأحياء الجزيئي التي تُستخدم لاكتشاف وتحليل الطفرات الصبغية في الحمض النووي (DNA). تجمع هذه التقنية بين تقنية البلمرة المتسلسلة (PCR) والكشف الفلوري لتكبير وتحليل تسلسلات محددة من الـ DNA تُستخدم على نطاق واسع في الوراثة الطبية لتشخيص الطفرات الصبغية، خاصة في التشخيص السابق للولادة (Mann and Ogilvie 2012).

2- مبدأ البلمرة المتسلسلة الفلورية الكمية ( Principle of quantitative fluorescent chain ) (polymerase

مبدأ عمل تقنية البلمرة المتسلسلة الفلورية الكمية (QF-PCR) يقوم على تكبير تسلسلات معينة من حمض (DNA) باستخدام تقنية البلمرة المتسلسلة (PCR) مع استخدام الكشف الفلوري لقياس كمية المنتجات المكبرة، يتم تكبير علامات محددة موجودة على الكروموسومات التي يتم تحليلها، بالإضافة إلى علامات مرجعية موجودة على كروموسومات أخرى، يتم قياس كمية كل علامة مكبرة باستخدام الأشعة مما يسمح بتحديد ما إذا كانت هناك طفرات صبغية (Mann and Ogilvie 2012).



صورة 08: مبدأ عمل تقنية البلمرة المتسلسلة الفلورية الكمية (Matthew et al., 2014)

## الفصل 02: تقنية البلمرة المتسلسلة الفلورية الكمية (QF-PCR) Quantitative fluorescent polymerase chain reaction (QF-PCR)

3- بروتوكول لتفاعل البوليميراز المتسلسل الفلوري الكمي (QF-PCR) مثال : تحليل الحذف  
المجهري للكروموسوم Y

(Quantitative fluorescent polymerase chain reaction (QF-PCR) protocol Example:  
Microdeletion analysis of the Y chromosome)

### 1-3- المعدات المطلوبة (Equipment required)

- ◆ كواشف تفاعل البوليميراز المتسلسل (بوليميراز taq، مخازن التفاعل المؤقتة، dNTPs و بادئات محددة)
- ◆ الحمض النووي الجينومي للتحليل
- ◆ الدورة الحرارية
- ◆ جهاز الفصل بتقنية الكهرباء الشعرية
- ◆ علامات الحجم
- ◆ الكواشف الفلورية

### 2-3- طريقة العمل (Way of Working)

#### ❖ إستخلاص الحمض النووي (DNA extraction)

- ◆ استخلاص الحمض النووي الجينومي من العينات البيولوجية.

#### ❖ تحضير تفاعل البوليميراز المتسلسل (Polymerase Chain Reaction Preparation)

- ◆ نحضر مزيج تفاعل البوليميراز المتسلسل PCR الذي يحتوي على بوليميراز taq، ومخازن التفاعل المؤقتة، و dNTPs، و بادئات خاصة بمناطق كروموسوم Y التي تحتوي على الحذف المجهرى المراد تحليله.

#### ❖ تفاعل البلمرة المتسلسل (polymerase chain reaction)

- ◆ نضيف الحمض النووي الجينومي المستخلص إلى مزيج تفاعل البوليميراز المتسلسل.
- ◆ نضبط تفاعل البوليميراز المتسلسل على المعايير التالية:
  - ✓ تمسخ مبدئي عند درجة حرارة 95 درجة مئوية لمدة 5 دقائق.
  - ✓ من 35 إلى 40 دورة من التسخن عند درجة حرارة 95 درجة مئوية لمدة 30 ثانية، والتجهين عند درجة حرارة التجهين المحددة للبرايمر لمدة 30 ثانية، والتمديد عند درجة حرارة 72 درجة مئوية لمدة 30 ثانية إلى دقيقة واحدة.
  - ✓ مرحلة التمديد النهائي عند درجة حرارة 72 درجة مئوية لمدة 5 دقائق.

## Quantitative fluorescent polymerase chain reaction (QF-PCR)

### ❖ تحليل نواتج تفاعل البوليميراز المتسلسل (Analyzing PCR products)

- ◆ نقوم بتحليل نواتج تفاعل البوليميراز المتسلسل على جهاز الفصل بتقنية الكهروكهرباء الشعرية ونقوم بإجراء الرحلان الكهربائي.
- ◆ رؤية النطاقات المضخمة باستخدام صبغة محددة ومقارنتها مع علامات الحجم لتحديد وجود الحذف المجهرى للصبغي Y.

### ❖ تفسير النتائج (Interpreting the results)

- ◆ تحليل لنتائج للكشف عن وجود أو عدم وجود الحذف المجهرى للكروموسوم Y.
- ◆ مقارنة النتائج مع العينات الشاهدة للتحقق من صحة الإستنتاجات.

## 4- تطبيقات تقنية البلمرة المتسلسلة الفلورية الكمية ( Applications of quantitative )

### (fluorescent polymerase chain reaction)

- ◆ التشخيص الجنيني السابق للولادة للكشف عن الطفرات .
- ◆ الكشف عن الحذف الجزيئي للصبغيات .
- ◆ تقييم خطر نقل الأمراض الجينية للجنين .
- ◆ إكتشاف الطفرات الصبغية المرتبطة ببعض أنواع السرطان.
- ◆ إستخدامها في التحقق من الهوية الجينية، مثل تحديد الجينات المسؤولة عن اللون الجلدي أو الشعري.

## 5- مزايا تقنية البلمرة المتسلسلة الفلورية الكمية ( Avantages of quantitative fluorescent )

### (polymerase chain reaction)

- ◆ سرعة التحليل: تعتبر الQF-PCR سريعة وفعالة، حيث يمكن إجراء التحليل في غضون ساعات قليلة مما يسمح بالحصول على النتائج بسرعة وبالتالي التحكم السريع في الحالات الطبية المستعجلة ( Mann and Ogilvie, 2012).
- ◆ دقة عالية: تعتبر الQF-PCR دقيقة في تحديد التغيرات الصغيرة في الهياكل الكروموسومية، مما يساعد على تحديد الأمراض الوراثية بدقة وبشكل مبكر (Chen et al., 2005).
- ◆ إقتصادية: تكون تقنية الQF-PCR أكثر اقتصادية من تقنيات التحليل التقليدية للصبغيات، مما يقلل من التكلفة الإجمالية للتحليل ويجعلها أكثر توافراً للمرضى (Mann and Ogilvie, 2012).

## Quantitative fluorescent polymerase chain reaction (QF-PCR)

- ♦ يمكن تطبيقها على نطاق واسع: تقنية الـ QF-PCR قابلة للتطبيق على نطاق واسع في مختلف التطبيقات الطبية، بما في ذلك التشخيص الجيني السريع للأمراض والكشف المبكر عن التشوهات الصبغية (Chen et al., 2005).
- ♦ كفاءة معتمدة: تعتبر تقنية الـ QF-PCR كفاءة ومعتمدة من قبل المجتمع العلمي، حيث تم استخدامها بنجاح في العديد من الدراسات والتطبيقات الطبية (Mann and Ogilvie, 2012).

## 6- حدود تقنية البلمرة المتسلسلة الفلورية الكمية ( Limitations of quantitative fluorescent polymerase chain reaction technology )

- ♦ المعايير والمقاييس: قد تكون هناك صعوبة في إنشاء المعايير والمقاييس اللازمة لتقنية الـ QF-PCR، خاصة عند استخدامها لأغراض التشخيص السريري (Stuppia et al., 2015).
- ♦ التحديات التقنية: قد تواجه تقنية الـ QF-PCR تحديات تقنية مثل وجود مستويات منخفضة من الحمض النووي المتاح للتحليل أو وجود تغييرات وراثية معقدة (Gitschier, 2000).
- ♦ القدرة على الكشف: قد تكون تقنية الـ QF-PCR غير قادرة على الكشف عن بعض التغيرات الجينية النادرة أو المعقدة (Deng et al., 2015).
- ♦ الخطأ البشري: قد تكون هناك فرصة لحدوث أخطاء بشرية أثناء تنفيذ التقنية، مما قد يؤدي إلى نتائج غير دقيقة (Zhao et al., 2017).

## 7- تقنية الهجرة الكهربائية الشعيرية (Capillary Electricity Technology)

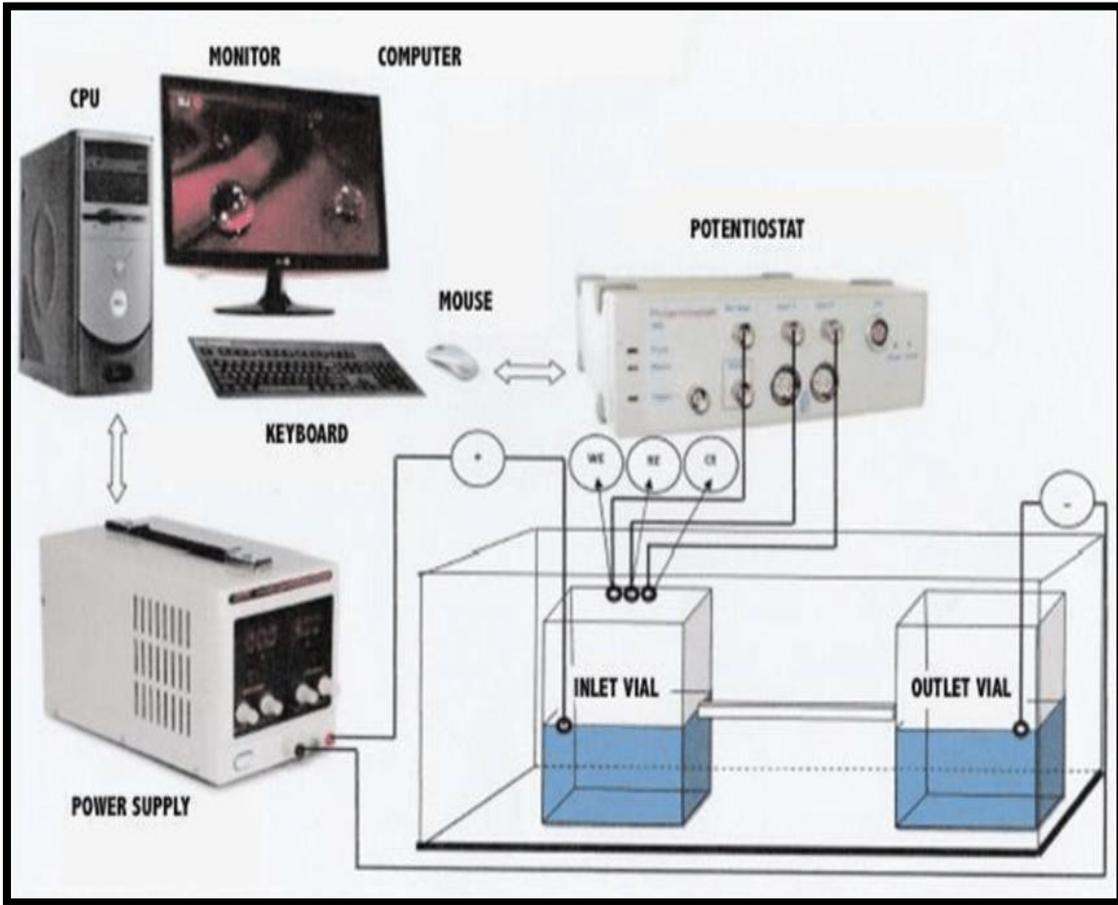
- هي تقنية لفصل الجزيئات بناءً على حجمها وشحنتها الكهربائية، تستخدم في علم الأحياء الجزيئي والكيمياء الحيوية لفصل الجزيئات مثل الحمض النووي أو البروتينات استناداً إلى حجمها وشحنتها (Grossman et al., 1989).
- تحقن الجزيئات المراد تحليلها في أنبوب شعيري رفيع مليء بهلام أو بوليمر وتوضع في حقل كهربائي، تتحرك الجزيئات بسرعات مختلفة بناءً على حجمها وشحنتها، مما يسمح بفصلها. يتم الكشف عن الجزيئات عادةً بواسطة الفلورسنتس أو امتصاص الأشعة فوق البنفسجية (Yeung, 2007).
- مبدأ الكهرباء القابلة للتحويل هو مشابه لمبدأ الكهرباء على الهلام ولكنه يستخدم أنبوباً رفيعاً مملوءاً بجل أو بوليمر لفصل الجزيئات بناءً على حجمها وشحنتها الكهربائية ويعتمد على الخطوات التالية :
- (a) التحضير الأنبوبي: يُملأ أنبوب رفيع من الزجاج أو البلاستيك بجل أو بوليمر مع وسائل الفصل، التي تساعد في تحريك الجزيئات، يُدرج الأنبوب في نظام كهربائي.
- (b) حقن العينات: تُحقن العينات التي تحتوي على الجزيئات المراد فصلها في الأنبوب يمكن تحقيق الفصل في وضع (حقن هيدروديناميكي) حيث يتم تطبيق ضغط لحقن العينات.

Quantitative fluorescent polymerase chain reaction (QF-PCR)

(c) تطبيق التيار الكهربائي: يُطبق جهد كهربائي على طرفي الأنبوب تبدأ الجزيئات المشحونة في العينات بالتحرك في الأنبوب بناءً على شحنتها وحجمها, تتحرك الجزيئات الأصغر أو الأكثر تشحيمًا بسرعة أكبر من الجزيئات الأكبر أو أقل تشحيمًا.

(d) الكشف والتحليل: تصل الجزيئات المفصلة إلى جهاز الكشف في أوقات مختلفة بناءً على حجمها وشحنتها, مما يسمح بتحديد هويتها وكميتها يمكن تحليل البيانات المحصلة للحصول على معلومات حول الجزيئات الموجودة في العينة.

- تُستخدم الكهرباء القابلة للتحريك على نطاق واسع في العديد من مجالات البيولوجيا والبيوكيمياء والتكنولوجيا الحيوية لفصل وتحليل الجزيئات مثل الأحماض النووية، والبروتينات، والبيبتيدات، والكربوهيدرات، والأيونات، تقدم مزايا مثل التحريك السريع والدقة العالية، والتلقائية الكبيرة، مما يجعلها تقنية قيمة للبحث والتشخيص.



الصورة 09 : تقنية الهجرة الكهربائية الشعيرية (Putu et al., 2021)

## الفصل الثالث

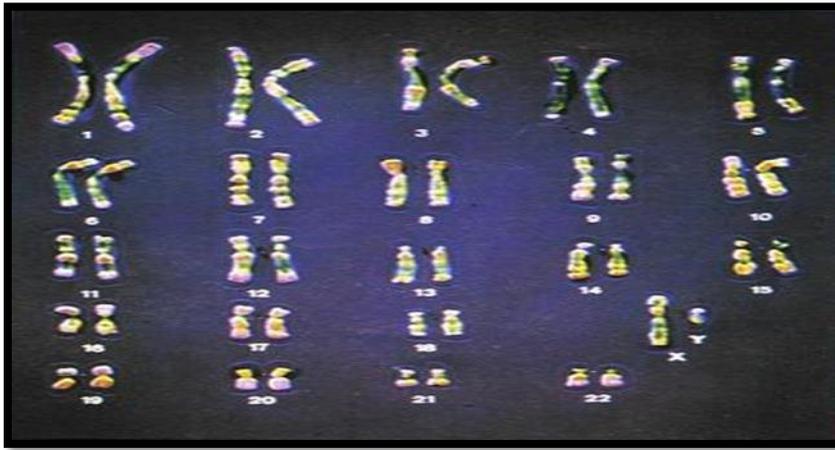
### الحذف الدقيق للكروموسوم Y

(Y chromosome microdeletion)

## الفصل 03: الحذف الدقيق للكروموسوم Y (Y chromosome microdeletion)

## 1- الكروموسوم Y البشري (Human Y chromosome)

الكروموسوم Y البشري هو كروموسوم صغير يبلغ حوالي 60 مليون زوج من القواعد وهو ما يمثل 2 إلى 3% فقط من إجمالي الجينوم البشري. يتكون بشكل أساسي من heterochromatin وهو شكل من أشكال الكروماتين الكثيف مما يعني أنه يحتوي على عدد قليل من الجينات. لفترة طويلة اعتُبر الكروموسوم Y صحراء جينية ومع ذلك فمن المقبول الآن أنه قد تعرض للانحطاط في مسار التطور. وعلى الرغم من هذا التنكس، فقد تخصص الكروموسوم Y في التمايز الذكوري والتحكم في تكوين الحيوانات المنوية (Graves et al.2006).



الصور 10: الخريطة الجينية البشرية (Pascal M.,2013)

## 2- بنية الصبغي Y البشري (Structure of the human Y chromosome)

يتكون الصبغي Y من منطقتين مختلفتين في الحجم بحيث تحتوي المنطقة الأولى على PAR1 و PAR2 و المنطقة الثانية على MSY.

## 1-2- المنطقة الأولى

## • المناطق الصبغية الكاذبة (PAR: pseudo\_autosomal region)

تقع على طرفي الكروموسوم Y وتُغطّي حوالي 5% من طوله، تتواجد أيضًا على طرفي الكروموسوم X وتتشابه معه في التسلسل الجيني مما يسهّل اقتران الكروموسومين أثناء المرحلة الأولى من الانقسام الاختزالي. يُمكن تكوين هذه الثنائيات خلال مرحلة التقسيم الميوزي الأول، عملية إعادة الترتيب المتماثل، وبالتالي يُمكن من الإختلاط الجيني وإصلاح الحمض النووي.

## 2-2- المنطقة الثانية

## • المنطقة المحددة للذكور (Male specific region of the Y)

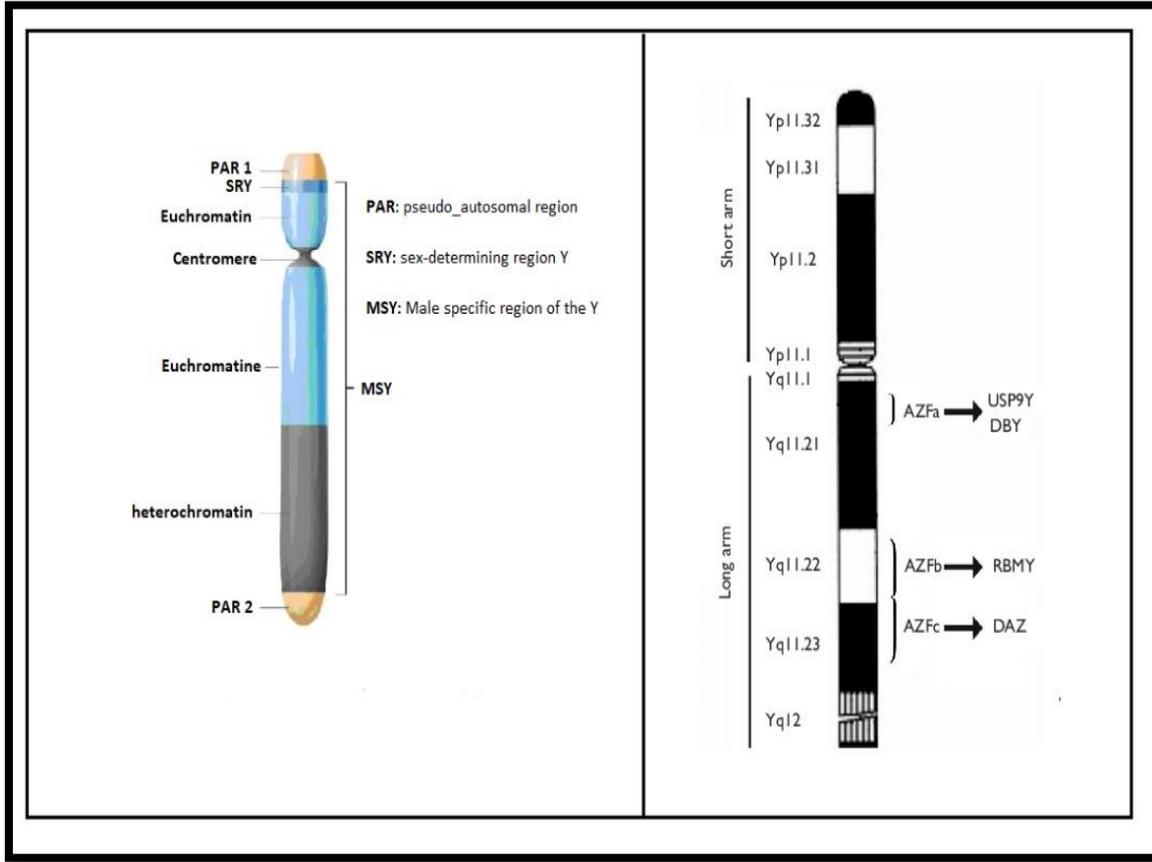
تمثل منطقة MSY (Male specific region of the Y) أي المنطقة المحددة للصبغي Y بـ 95% من طول الصبغي Y ولا تخضع للتزاوج مع الصبغي X كانت تُسمى في البداية NRY (region of the Y Non recombining) أي المنطقة غير المتلاحقة للصبغي Y وأُعيد تسميتها MSY بعد اكتشاف عمليات إعادة التركيب الداخلي (Skaletsky et al., 2003).

وتتكون هذه المنطقة من جزء euchromatic (نشط نسخيًا) تبلغ مساحته حوالي 23 مليون زوج قواعد، ومنطقة كبيرة Heterochromatic (غير نشطة نسخيًا) متغيرة الحجم، تبلغ حوالي 30 مليون زوج قواعد حسب الفرد.

تجمع المنطقة euchromatic الذراع القصيرة للصبغي Y معًا والجزء الأكثر تركيزًا من الذراع الطويلة، وهي تحمل الجين SRY (sex-determining region Y) أي المنطقة المحددة للجنس Y الذي تم اكتشافه في عام 1990 ويقع على الذراع القصيرة للصبغي Y، في النطاق p11.3 (Sinclair et al., 1990). يشفر جين SRY عامل تحديد الخصية: TDF (testis determining factor) وهو العامل المحدد للخصية والمسؤول عن تمايزها تحتوي المنطقة euchromatic أيضًا على منطقة تُشارك في تكوين الحيوانات المنوية تسمى (AZF (Azoospermia factor) أي عامل فقد النطاف. تقع هذه المنطقة التي تم اكتشافها في عام 1976، في الجزء الطرفي euchromatic من الصبغي Y في Yq11.23 (Tiepolo and Zuffardi 1976). تقع المنطقة Heterochromatic في Yq12 في نهاية الذراع الطويلة للصبغي Y، تتكون بشكل أساسي من تسلسلين متكررين للغاية DY1 و DY2.

يعد قراءة تسلسل الصبغي Y البشري أمرًا معقدًا بسبب كثرة التكرارات في التسلسل، في عام 2003 تم تحديد تسلسل أكثر من 97% من الجزء euchromatic للصبغي (Skaletsky et al., 2003).

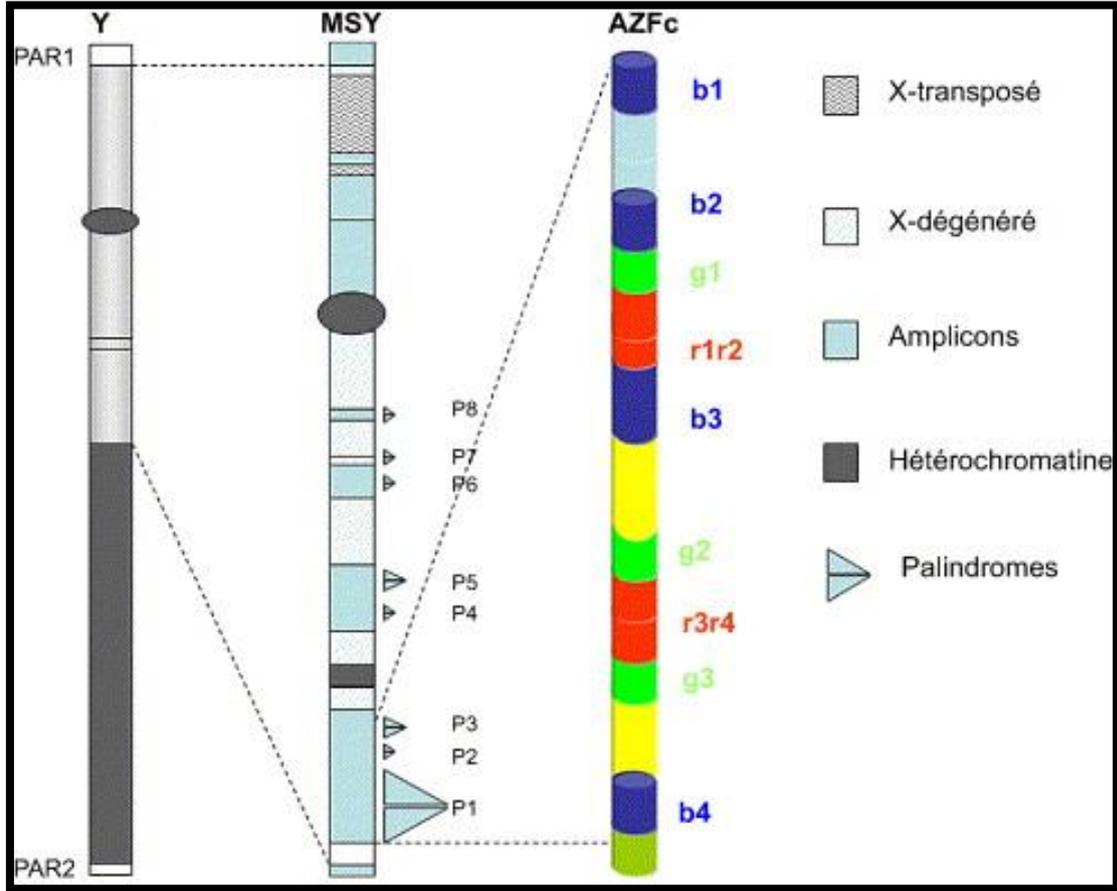
في الآونة الأخيرة تم تحديد تسلسل euchromatic إضافي يبلغ حوالي 0.45 مليون زوج قواعد من المنطقة المحيطة بالمركز للكروموسوم Y، مما يثري فهمنا لهيكله (Kirsch et al., 2005).



الصورة 11: بنية الكروموسوم Y (Zahra.,2018)

### 3- الأنواع المختلفة من تسلسل كروموسوم Y (Different types of Y chromosome sequences)

- يتألف الكروموسوم Y من ثلاثة أنواع من التتابعات التي توفر معلومات عن تطور هذا الكروموسوم ووظائفه الحالية:
- تتابعات الكروموسوم X-Degenerate (المتحللة إلى حد كبير)، وهي بقايا الكروموسومات الذاتية التي اشتق منها كروموسوم X وكروموسوم Y؛ ولا تزال تتضمن 16 جيناً وظيفياً يتم التعبير عنها في جميع خلايا كلا الجنسين،
  - التسلسلات (X-transposed) المنقولة حديثاً من الكروموسوم X) منذ 3 إلى 4 ملايين سنة، أي بعد تباعد الإنسان والغوريلا والشمبانزي والبونوبو؛ وهي تتضمن جينين وظيفيين ولها تماثل بنسبة 99% مع الكروموسوم X.
  - تسلسلات متكررة كبيرة ذات هوية صبغية داخلية تزيد عن 99.9% تم الحصول عليها من مصادر مختلفة، ثم تم تضخيمها ولهذا السبب سُميت بالمضخمات أو الأம்பليكونات (Ampliconic)، والتي تحتوي على 60 جيناً وظيفياً يقتصر تعبيرها على الخصية (Skaletsky et al., 2003).



الصورة 12: تسلسلات الكروموسوم Y (Ravel et al., 2006)

تحتوي منطقة MSY على 156 (transcriptional units)، 78 وحدة non-coding و 78 ترمز إلى 27 بروتينا مختلفا. من بين الجينات المشفرة، 12 ubiquitous و 11 توجد على وجه التحديد أو في الغالب في الخصية (Skaletsky et al., 2003).

يتم ترجمة الأول ضمن تسلسلات X-Degenerate بينما يتم ترجمة الأخير بشكل أساسي في تسلسلات الأمبليكون (Ginalski et al., 2004).

الجدول 1 : الجينات الموجودة في منطقة MSY

(Strachan &amp; Read, 2018)

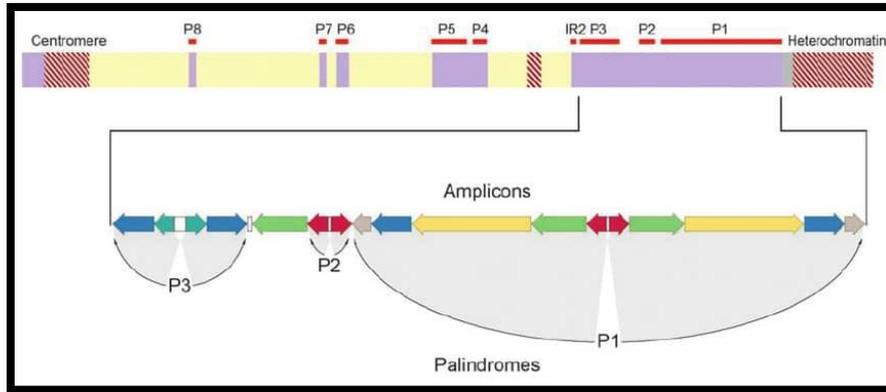
الأنسجة	number of copies	Gene	MSY Sequence
الخصية	1	TGIF2LY	X-Transposed
دماغ الجنين والدماغ بشكل عام	1	PCDH11Y	
	2		Total
غلبة الخصية	1	SRY	X-degenerate
في كل خلايا الجسم	1	RPS4Y1	
في كل خلايا الجسم	1	ZFY	
الاسنان	1	AMELY	
دماغ الجنين، البروستات	1	TBL1Y	
في كل خلايا الجسم	1	PRKY	
في كل خلايا الجسم	1	USP9Y	
في كل خلايا الجسم	1	DBY	
في كل خلايا الجسم	1	UTY	
في كل خلايا الجسم	1	TMSB4Y	
دماغ الجنين -الدماغ- البروستات -الخصية	1	NLGN4Y	
في كل خلايا الجسم	1	CYof15A	
في كل خلايا الجسم	1	CYof15B	
في كل خلايا الجسم	1	SMCY	

في كل خلايا الجسم	1	EIFIAY	
في كل خلايا الجسم	1	RPS4Y2	
	16		Total
الخصية	35	TSPY	Ampliconic
الخصية	2	VCY	
الخصية	2	XKRY	
الخصية	4	CDY	
الخصية	2	HSFY	
الخصية	6	RBMV	
الخصية	2	PRY	
الخصية	3	BPY2	
الخصية	4	DAZ	
	60		Total
	78		Grand total

### 43- الأمبليكونات والمتناظرات (Amplicons and palindromics)

السمة المميزة للأمبليكونات هي أنها تحتوي على نسختين أو أكثر من الجينات المتجانسة للغاية اللازمة لخصوبة الذكور وهي محاطة بتتابعات معكوسة، ويشكل العنصران معًا تسلسلين متماثلين يشكلان معًا تسلسلاً متناظراً، أي تسلسل حمض نووي يُقرأ بنفس الطريقة في كلا الاتجاهين بالنسبة لنقطة مركزية (palindromic)، وإليك مثال على ذلك: تتابعان متعاقبان متقابلان على التوالي، GGTAC، ثم CATGG، تشكلان معًا التسلسل المتناظر CATGG- GGTAC وينتج عن ثني التسلسلين المتناظرين في اتجاهين متناظرين حلقة تجمع نسخًا من الجينات المتماثلة للغاية في السببية المتضخمة، يمكن أن يتحور أحدهما ولا يتحور الآخر، وتؤدي عمليات تبادل التسلسلات باستخدام آلية التحويل (transposition) إلى تحويل النسخة المتحورة إلى نسختها غير المتحورة، داخل كروموسوم Y نفسه، دون اللجوء إلى إعادة التركيب المتماثل

(homologous recombination) وبالطبع، على العكس يمكن تحويل الجين غير المتحور إلى نظيره المتحور، لكن هذه الطفرة المزدوجة تواجه خطر الإزالة عن طريق الإنتقاء (Rozen and coll., 2003).



الصورة 13: الأمبليكونات و المتناظرات في الكروموسوم Y (Hossein and Farhat., 2007)

## 5- الحذف الدقيق للكروموسوم Y (Y chromosome microdeletion)

### 1-5- لمحة تاريخية

الدور الرئيسي الذي يلعبه الصبغي Y في تحديد الجنس معروف منذ فترة طويلة، لكن مشاركته في خصوبة الذكور لم يتم استكشافه إلى في وقت لاحق. في عام 1976، أظهر Tiepolo و Zuffardi لأول مرة الدور الغالب لصبغي Y في التحكم في تكوين الحيوانات المنوية (Tiepolo and Zuffardi 1976). عند إجراء التحليل الوراثي الخلوي لـ 1170 رجلاً يعانون من العقم أظهروا أن 6 منهم لديهم حذف مجهري للجزء الطرفي euchromatic من الذراع الطويلة لصبغي Y، الذي كانت نقطة كسره تقع في Yq11، نظراً لأن هؤلاء الرجال الـ 6 كانوا يعانون من فقد النطاق فقد أطلقوا على فاصل الحذف هذا اسم AZF (عامل فقد النطاق) واقترحوا وجود عوامل تحكم في تكوين الحيوانات المنوية في هذه المنطقة.

أكد تطوير تقنيات البيولوجيا الجزيئية و قراءة تسلسل الـ DNA وجود جينات تشارك في خصوبة الذكور في هذه المنطقة، إن استخدام أجهزة قياس الحمض النووي بتقنية تفاعل البوليميراز المتسلسل (PCR) جعل من الممكن اكتشاف عمليات حذف صغيرة في منطقة AZF في الرجال الذين يعانون من فقد النطاق وقليل النطاق والتي لا يمكن اكتشافها باستخدام تقنيات الوراثة الخلوية التقليدية. أدى تحليل هذا الحذف الدقيق (الحذف الخلالي الذي يؤثر على أقل من 2106 نيوكليوتيدات) إلى تحديد 3 مواضع تحمل جينات في Yq11 تشارك في التحكم في تكوين الحيوانات المنوية، وبالتالي 3 مناطق AZF يعتقد أنها غير متداخلة: AZFa, AZFb و AZFc (Vogt et al., 1996)

رسم الخرائط الفيزيائية للصبغي Y (Kuroda-Kawaguchi et al., 2001; Tilford et al., 2001) جعل من الممكن تحديد بنية مناطق AZF و إظهار أن مناطق AZFb و AZFc متداخلة جزئياً (Repping et al. 2002; Skaletsky et al., 2003) وبالتالي اقترح Repping وزملاؤه تصنيفاً أكثر دقة لعمليات الحذف في منطقة MSY إلى 4 أنواع من عمليات الحذف (Repping et al., 2002).

عمليات الحذف هذه هي أحداث جديدة تنتج عن إعادة التركيب داخل الكروموسومات بين التسلسلات المتماثلة

(Kuroda et al. 2001; Skaletsky et al. 2003).

### 2-5- تعريف (Definition)

الحذف الدقيق للصبغي Y هو طفرات جينية تحدث عندما تكون أجزاء صغيرة من الصبغي Y مفقودة ، يمكن أن تؤثر عمليات الحذف الدقيقة هذه على الجينات الضرورية لتكوين الحيوانات المنوية ، والتي يمكن أن تؤدي إلى مشاكل في الخصوبة لدى الرجال. غالباً ما تتم دراسة هذه التشوهات في سياق العقم عند الذكور (Ferlin et al. 2006).

### 3-5- أنواع الحذف المختلفة في منطقة MSY

#### (a) المنطقة AZFa

تقع المنطقة AZFa في الجزء القريب من Yq11 (Vollrath et al., 1992) يُقدَّر حجمها بحوالي 800 ألف زوج قاعدة وتحتوي على جينين وهما USP9Y وDDX3Y ، و يوجدان في نسخة واحدة على الصبغي Y تنتج حذفات AZFa نتيجة لاندماجات متكررة داخل الصبغي بين تسلسلين من الفيروسات البشرية (HERV15: Human Endogenous Retroviral 15) التي تحيط بمنطقة AZFa والتي تظهر تشابهاً عالياً في التسلسل (Blanco 2000; Kamp et al., 2000). هذه الحذفيات تحذف الجينين USP9Y وDDX3Y (et al., 2000; Sun et al., 2000).

#### (b) المنطقة AZFb

تقع المنطقة AZFb في الجزء القريب من Yq11، وهي منطقة واسعة يبلغ حجمها ما بين 6.2 و 7.7 مليون زوج قواعد (Repping et al., 2002); تتداخل جزئياً مع منطقة AZFc تتوافق الحذوفات الدقيقة في منطقة AZFb مع حذفات بين السلسلتين المتناظرتين P5 و P1 القريبتين (Vogt et al., 1996).

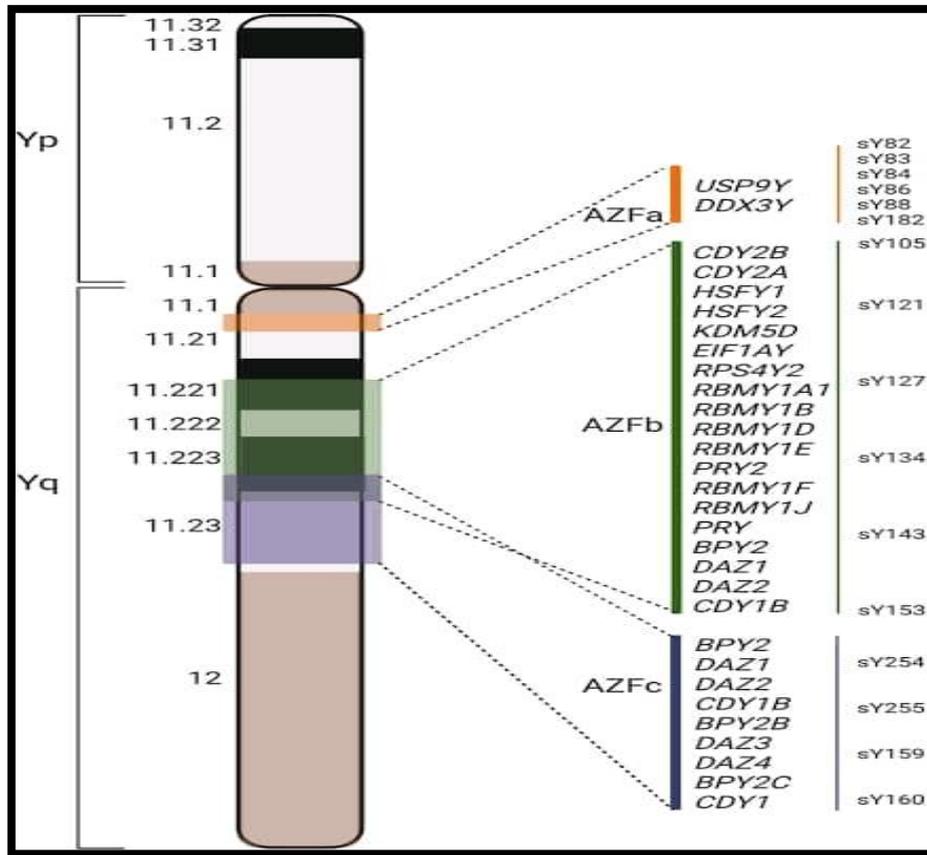
تقع منطقة AZFb بين السلسلة المتناظرة P5 و السلسلة المتناظرة P1 البعيدة (P1.1) ، والتي توجد أيضاً في منطقة AZFc تتوافق هذه الحذفات مع الحذفات الصغيرة في منطقة AZFb+c وقد وُصفت الحذفات الأكثر ندرة ، توجد بين السلسلة المتناظرة P4 والجزء البعيد من السلسلة المتناظرة P1 أيضاً، عادةً ما تنشأ هذه الحذفات نتيجة لإعادة تركيب متماثل بين السلسلة المتناظرة P5 أو P4 والجزء القريب أو البعيد من السلسلة المتناظرة P1 (Repping et al., 2002; Vogt, 2004).

تحتوي منطقة AZFb على جينات موجودة فقط في هذه المنطقة مثل HSFY ، eIF-1AY ، وSMCY ، وتحتوي أيضاً على جينات أخرى تحمل نسخة واحدة أو أكثر في منطقة AZFc مثل BPY2 ، CDY ، و DAZ. كما تحتوي على النسخ الوظيفية لعائلتين من الجينات المتواجدة بأعداد متعددة على طول كروموسوم RBMY : Y و PRY .

#### (c) المنطقة AZFc

تمتد على مساحة تقدر بحوالي 3.5 مليون زوج قواعد ، تتألف هذه المنطقة من 6 عائلات مميزة من الأمبليكونات مما يشير إلى وجود تنوع وراثي كبير (Yen 2001). تنشأ حذفات AZFc نتيجة لانزلاق جيني بين الأمبليكونات b2 في النصف القائم (P3) و (b4) في النصف القائم (P1) في هذه المنطقة (Kuroda-Kawaguchi et al., 2001).

تم تحديد أحد عشر عائلة من النسخ في AZFc، يتم التعبير عنها بشكل حصري أو تقريبي حصري في الخصيتين، على الرغم من أن المنطقة تحتوي بشكل عام على 27 جيناً يحتمل أن تكون وظيفية من بينها DAZ المعروف أيضاً باسم SPGY، حيث يحمل النسخ الوظيفية من الجين، يشفر هذا الجين بروتيناً مرتبطاً بالحمض النووي الريبوزي الخاص بالخصية (Reijo et al. 1995)، والذي يحتوي على نمط (RRM :RNA recognition motif) وعدة نسخ من وحدة DAZ المكونة من 24 حمض أميني (Reijo et al., 1995; Saxena et al., 1996) يبدو أن تكرار DAZ يلعب دوراً رئيسياً في التفاعلات البروتينية\_بروتينية (Tsui et al., 2000) في منطقة AZFc، يتواجد الجين DAZ في أربع نسخ مرتبة في مجموعتين متميزتين، هذه المجموعتان المتباعدتان بمسافة 1.47 مليون زوج قواعد، تتألف من زوج من الجينات DAZ المقلوبة : مزدوج DAZ1/DAZ2 داخل النطاق التكراري (P2)، ومزدوج DAZ3/DAZ4 داخل النطاق التكراري (P1) (Fernandes et al., 2002).

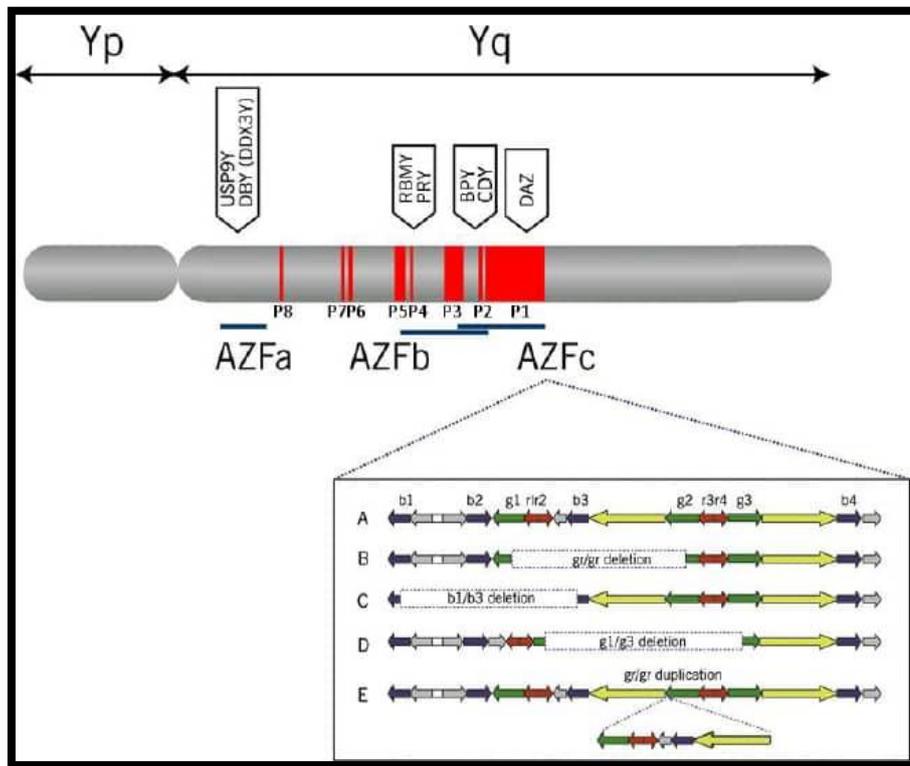


الصورة:14 مناطق الحذف في MSY (Fedder et al., 2023)

#### A. عمليات الحذف الجزئي في المنطقة AZFc (Partial deletions in AZFc)

تم تحديد ثلاث عمليات حذف إضافية تؤثر على منطقة AZFc، تُعرف باسم عمليات الحذف الجزئي لـ AZFc لأنها تؤثر على جزء فقط من المنطقة (Repping et al., 2003; Fernandes et al., 2004; Fernandes et al., 2002; Repping et al. 2004).

- ◆ تنتج عمليات الحذف gr/gr من إعادة التركيب بين الأمبليكونات g1/r1/r2 و g2/r3/r4 مما يحذف 1.6 مليون زوج قواعد من منطقة AZFc، أي نصف جيناتها، وعلى الرغم من أنها لا تقضي على جميع نسخ العائلة الجينية نفسها إلا أنها تؤدي إلى تقليل عدد نسخ خمس عائلات جينية ولا سيما نسختين من جين DAZ من أصل أربع نسخ.
- ◆ تتشابه عمليات الحذف b1/b3 الناتجة عن إعادة التركيب بين الأمبليكونات b1 و b3 في الحجم مع عمليات الحذف من gr/gr ولكنها تؤثر على جزء أقرب إلى منطقة AZFc وهي أقل شيوعاً وينتج عنها حذف جين PRY وانخفاض في عدد نسخ الجينات الأخرى في هذه المنطقة.
- ◆ حذف b2/b3، المعروفة أيضاً باسم u3-gr/gr أو g1/g3، لا تنتج عن إعادة تركيب المتماثل ولكن تحدث بين البدائل المعكوسة لمنطقة AZFc.



الصورة 15: البنية المتناظرة واليات إعادة التركيب و تفاصيل الحذف في منطقة AZFc (Kamila K et al., 2012)

#### 4-5- الأسباب المؤدية لحدوث حذف في الصبغي Y (Causes of Y chromosome deletion)

توجد عدة أسباب مؤدية لحدوث حذف في الصبغي Y (Y chromosome deletion)، والتي يمكن أن تشمل العوامل الوراثية والبيئية، هناك عدة أنواع من الحذف التي يمكن أن تحدث في الصبغي Y، وكل نوع قد يكون له أسبابه الخاصة. ومن أمثلة هذه الأسباب:

1. **الوراثة:** قد يتم نقل الحذف في الصبغي Y من الأب إلى الإبن. يمكن أن يكون هذا نتيجة للتوريث المتصلة بالصبغي Y، حيث ينتقل الصبغي Y من الأب إلى الابن دون تغييرات كبيرة، مما يجعل الحذف الذي يحدث في الصبغي Y ينتقل أيضاً.

2. التعرض للعوامل البيئية: بعض العوامل البيئية مثل التعرض للمواد الكيميائية الضارة، أو الإشعاع، قد يؤدي إلى حدوث تغيرات جينية تشمل الحذف في الصبغي Y.

3. التغيرات العشوائية في الطبيعة: قد تحدث تغيرات عشوائية في الصبغيات خلال النمو الخلوي والإنقسام الخلوي، مما قد يؤدي إلى حدوث حذف في الصبغي Y دون وجود أسباب واضحة.

#### 5-5- تحليل الحذف المجهرى للصبغي Y (Y chromosome microdeletion analysis)

الحذف الدقيق للصبغي Y هو السبب الوراثي الأكثر شيوعاً لفشل الحيوانات المنوية لدى الرجال المصابين بالعقم أي أن فقد النطاق يرتبط بحذف مناطق عامل فقد النطاق (AZF) من كروموسوم Y. هناك 13 موقعاً شائعاً للحذف (SY81, SY84, SY86, SY121, SY124, SY127, SY128, SY130, SY133, SY134, SY182, SY254, SY255) في 3 مناطق AZF (a,b,c) تم فحصها بحيث كل منطقة AZF تقابلها علامات STS محددة مثل: AZFa:(Sy83,Sy86), AZFb:(Sy142, Sy143) و AZFc:(Sy254,Sy255).

#### 5-5-1- طريقة

يتم الكشف عن الحذف الصغير لكروموسوم Y باستخدام محددات وراثية تسمى المواقع الموسومة بالتسلسل (STS) تستهدف 6 مواقع STS للكشف بحيث يتم استخلاص الحمض النووي الريبي المنزوع الاكسجين الجينومي (ADNg) من خلايا الدم الوريدي للمرضى وتحليله باستخدام مجموعة اختبار الحمض النووي المجهرى للحذف المجهرى للصبغي Y البشري، ونستخدم بادئات محددة، مسابر فلورية، بوليميراز الحمض النووي المقاوم للحرارة (إنزيم Taq) وأربعة أنواع من مونومرات النوكليوتيدات (dNTPs). يتم إجراء تفاعل البوليميراز المتسلسل الكمي الفلوري في الوقت الفعلي (PCR) على كل عينة مع إضافة SRY و  $\beta$ -actin (Internal controls) اللذان نعتبرهما كشاهدين لتأكيد سيران تفاعل ال PCR. صممت البادئات والمسابر المستخدمة في هذه الدراسة للكشف عن علامات STS استناداً على الدراسات الحديثة لأكاديمية الأندولوجيا الأوروبية (EAA/EMQN) (Krausz et al., 2013).

مما يسمح ذلك بالكشف السريع عن عمليات الحذف المحتملة في 6 مواقع داخل منطقة AZF للصبغي Y. (Dutta et al., 2021, Emirdar et Acet 2023)

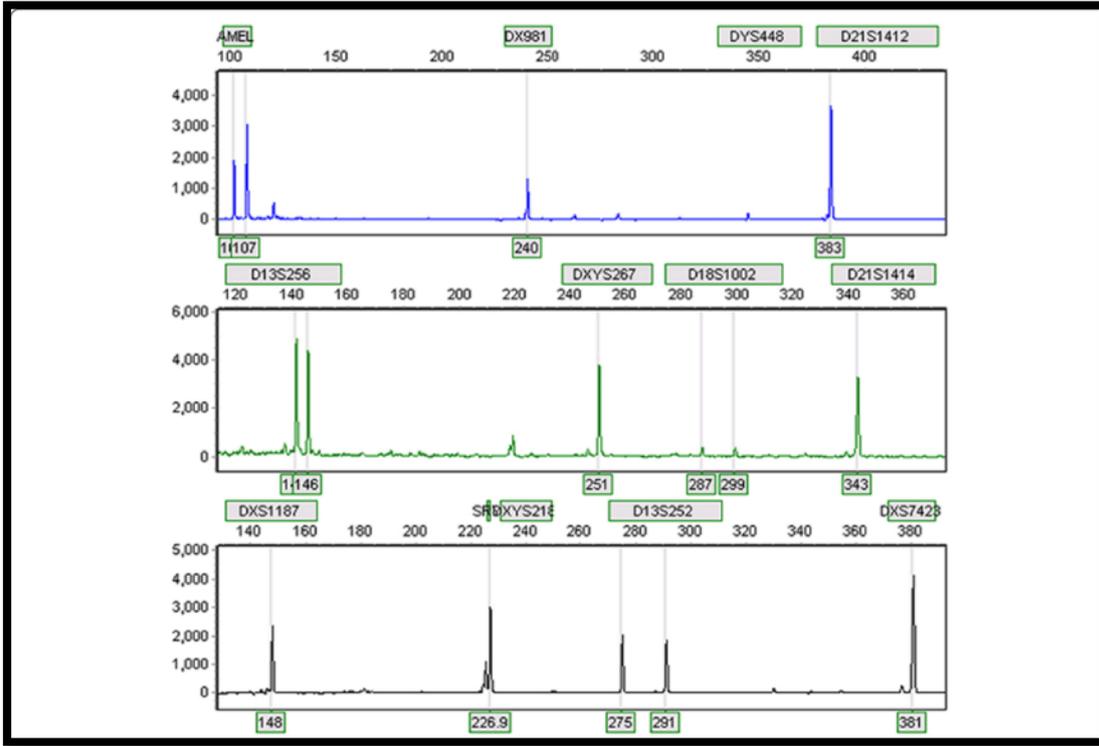
تضمنت تركيبة التفاعلات ما يلي:

◆ التفاعل 1: الكشف عن ال  $\beta$ -actin, SY83, SY86.

◆ التفاعل 2: الكشف عن ال SRY, SY142, SY143.

◆ التفاعل 3: الكشف عن ال SRY, SY254, SY255.

تم استخدام  $\beta$ -actin و SRY كضوابط داخلية لأنها لا تتعرض للحذف، ولضمان الحصول على نتائج صحيحة و مؤكدة يجب إعطاء لكل موقع من STS لون و حجم خاص به؛ بعد ذلك نطبق تقنية الكهرباء الشعيرية (مبدأ العمل المذكور في الفصل الثاني) و نقرأ النتائج الموضحة في جهاز الكشف الذي يعطينا منحنيات كما موضحة في الصورة الموالية:



الصورة 16 : نتائج متحصل عليها من تقنية الهجرة الكهربائية الشعيرية (Yuan et al., 2019)

- ◆ المواقع التي تظهر لنا منحنيات لم يحدث لها حذف بينما المواقع التي لم تظهر فيها المنحنيات هي مواقع حدث فيها حذف.
- ◆ تختلف هذه الحذوفات من شخص الى آخر، قد تكون حذوفات جزئية أو كلية و قد يكون لها أعراض على الشخص وقد لا يكون .

## 6- الآثار السريرية للحذف الصغير في الصبغي Y (Clinical implications of small deletions in the Y chromosome)

تعتبر الحذوفات الصغيرة في الصبغي Y سببًا شائعًا لمشاكل الخصوبة عند الذكور، بما في ذلك العقم التام (عدم وجود حيوانات منوية) والعقم الشديد بالحيوانات المنوية (تركيز منخفض للحيوانات المنوية). يتم تحديد هذه الحذوفات الصغيرة في حوالي 10 إلى 18% من حالات هذه الاضطرابات (Krausz and Degl'Innocenti 2006). تكتشف حذوفات الصبغي Y بشكل أكثر شيوعًا في الرجال الذين يعانون من العقم التام مقارنة بأولئك الذين يعانون من العقم الشديد بالحيوانات المنوية (15% مقابل 5-7%). تُلاحظ تقريبًا حصريًا لدى الرجال الذين تكون تركيزات حيواناتهم المنوية أقل من مليون وحدة / مل وبنسبة أقل بكثير لدى أولئك الذين تتراوح تركيزاتهم بين 1 و 5 ملايين / مل (Simoni et al., 2004). يعتبر حذف المنطقة AZFc الأكثر شيوعًا، حيث تكون موجودة في حوالي 60% من الحالات المدروسة. بعد ذلك، تأتي حذوفات AZFb و

AZFa + b + c أو AZFb + c، وتمثل حوالي 35٪ من الحالات. تعتبر حذفات AZFa الأقل شيوعًا، حيث تكون موجودة في حوالي 5٪ فقط من الحالات (Krausz and Degl'Innocenti 2006).

يُلخص الجدول أدناه الحالة الراهنة للمعرفة المتعلقة بالتأثير السريري لحذف منطقة MSY وتكرار حدوثها (d'après Noordam and Repping, 2006).

الجدول 2: حذفيات منطقة MSY في كروموسوم Y

(d'après Noordam and Repping, 2006)

نوع الحذف	عدد الجينات المتضررة	النمط الظاهري	التردد	
			فقد النطاف azoo-spermia	قلة النطاف oligoazoo-spermia
AZFa	2	Azoospermia (SCO:Sertoli-CellOnly)	<1%	0%
P5/P1 proximal	23	Azoospermia (SCO or maturation stop)	1%	0%
P5/P1 distal	31	Azoospermia (SCO or maturation stop)	1%	0%
AZFc (b2/b4)	13	Severe azoospermia/oligozoospermia	6%	5%
gr/gr	6	Variable (risk factor for spermatogenesis disorder)	3%	3%
b1/b3	7	unknown	/	/
b2/b3	7	Unknown	/	/

حذفات AZFa و P5/P1 ترتبط بالعقم التام، مصحوبة بتغيرات في نسيج الخصية تُشخص بمتلازمة Sertoli-CellOnly (SCO) أو توقف في التطور الجنسي، والتي تظهر عادةً خلال مرحلة الانقسام الميوزي. من ناحية أخرى، تظهر حذفات b2/b4 (حذفات AZFc) طيفًا متنوعًا للغاية في الظواهر، حيث يمكن أن يتراوح بين العقم التام مع SCO نسيجي إلى العقم الشديد بالحيوانات المنوية. يمكن أن تعزى هذه التباينات إلى تدهور تدريجي في ظروف الخصية مع مرور الوقت، أو إلى تأثيرات بيئية أو وراثية، مثل التعويض بالكروموسوم X أو الجينات الجسمية، بالإضافة إلى وجود أو عدم وجود X،45 (Krausz and Degl'Innocenti 2006).

حذفات gr/gr تحدث لدى الرجال الذين يعانون من العقم التام أو العقم الشديد بالحيوانات المنوية، وتحدث أيضًا لدى بعض الذين يحملون عددًا طبيعيًا من الحيوانات المنوية ولكن بنسبة أقل. يُعتقد حاليًا بشكل عام أن حذفات gr/gr قد تشكل عامل خطر لتدهور تكوين الحيوانات المنوية و يمكن تفسير التباين الظاهر لدى حاملة هذه الحذفات بواسطة عوامل وراثية أو بيئية، كما يُقترح أن حذفات gr/gr قد تكون مرتبطة بزيادة خطر الإصابة بسرطان الخصية (Nathanson et al., 2005).

وبالفعل، يواجه المصابون بحذف gr/gr خطرًا مضاعفًا لتطور ورم في الخصية ويزيد هذا الخطر ثلاث مرات في حالة وجود تاريخ عائلي بسرطان الخصية. ومع ذلك، يظل الجدل حول تأثير حذفات b1/b3 و b2/b3 في تدهور تكوين الحيوانات المنوية.

## 7- طرق ومؤشرات البحث عن حذفات الصبغي Y لدى الرجال الذين يعانون من العقم (Methods and indications for looking for Y chromosome deletions in infertile men)

تطوّرت طرق البحث عن الحذفات الصغيرة في الصبغي Y لدى الرجال العقيمين بشكل كبير بفضل التقدم في رسم الخرائط الصبغية واستخدام علامات PCR محددة. هذه العلامات المعروفة باسم STS (Sequence-Tagged Sites)، سمحت بتطوير تقنيات PCR متعددة لاكتشاف الحذفات الصغيرة في مناطق AZF من الصبغي Y. ففي عام 1999م تم إنشاء برنامج أوروبي لاكتشاف الحذفات الصغيرة في الصبغي Y من قبل EAA (الأكاديمية الأوروبية لعلم الذكورة) و EMQN (الشبكة الأوروبية لجودة الجينات الجزيئية)، لقد سمح هذا البرنامج بتوحيد طرق اكتشاف وتقييم الحذفات الصغيرة في الصبغي Y، مما يعزز التعامل الأفضل مع المرضى المعنيين (Simoni et al., 1999؛ Simoni 2001).

حيث ساهم هذا البرنامج في ضمان موثوقية النتائج وإعادة التناسق بين المختبرات كما يُوصى باستخدام ما لا يقل عن علامتين STS في كل منطقة AZFa، AZFb و AZFc لاكتشاف حوالي 95% من حذفات الصبغي Y المعنية بمشاكل تكوين الحيوانات المنوية. عندما يتم اكتشاف حذف يمكن استخدام علامات إضافية لتحديد مدى الحذف ومع ذلك يجب ملاحظة أن هذه الطريقة لا تسمح بكشف الحذفات الجزئية.

تُوصى باختبار الحذفات الصغيرة في الصبغي Y لدى المرضى الذين يعانون من عقم ذي أصل مجهول، والذين يظهرون إما عقمًا تامًا للحيوانات المنوية أو عقمًا شديدًا بتركيز أقل من 5 ملايين حيوان منوي في كل ميليلتر من السائل المنوي. تهدف هذه التوصية إلى تحديد الشوائب الجينية الكامنة التي قد تساهم في العقم، وهو أمر قد يكون حاسمًا لتوجيه خيارات العلاج والتوجيه الجيني لهؤلاء المرضى (Krausz and Degl'Innocenti 2006؛ Simoni et al.,

(2004). يتضمن الفحص الذي يُجرى بشكل شائع البحث عن الحذفیات AZFa، P5/P1 القريبة، P5/P1 البعيدة و AZFc، ويتمتع بعدة مزايا:

- ❖ من الناحية التشخيصية: يُوصى باختبار الحذفیات الصغيرة في الصبغي Y ضمن التقييم الجيني للرجال الذين يعانون من عقم أو عقم تام للحيوانات المنوية غير المنعكس، والذين يظهرون نمطًا طبيعيًا للصبغيات.
- ❖ من الناحية التنبؤية: في حالة الرجال الذين يُعانون من عقم تام غير منشأ ويفكرون في إجراء الإخصاب الاصطناعي بالحقن المجهرى مع استخراج الحيوانات المنوية من الخصية، يُمكن ربط نوع حذفات منطقة التوجيه الأكثر تعقيدا (AZF) بفرص استرداد الحيوانات المنوية خلال الاستكشاف الجراحي للخصية.
- ❖ من الناحية التوجيهية الجينية: يُمكن بحث الحذفیات الصغيرة في الصبغي Y من تقييم مخاطر نقل الطفرات إلى الذرية أثناء التعامل مع الإجهاض الاصطناعي المعزز لتكوين الحيوانات المنوية. بالإضافة إلى ذلك، يُقترح أن يكون للصبغي Y المحذوف تأثير متزايد على عدم استقرار الانقسام المتساوي خلال الانقسامات الخلوية الأولى للجنين، مما يؤدي إلى تشكيل سلالة خلوية 45 (Le Bourhis et al., 2000; Patsalis et al., 2005). كما يُمكن أن يؤدي أيضا إلى تشكيل أطفال يظهرون شذوذات جسمية مبكرة 45، X / 46، XYdel. يمكن أن يتنوع ظاهرهم بشكل كبير، من صبي يحمل حذفية الصبغي Y إلى فتاة تظهر متلازمة تيرنر (45، X)، مرورًا بمراحل مختلفة من الغموض الجنسي. تعتبر هذه التباينات الظاهرية نتيجة لتأثير مركب لحذفية الصبغي Y مع الصبغيات الجنسية الأخرى والعوامل الوراثية والهرمونية التي تؤثر على التطور الجنسي والإنجابي (Patsalis et al., 2002).
- ❖ وقائيًا: في بعض الأمراض، كشفت الدراسات أن الحذف الجيني يمكن أن يؤدي إلى تدهور تدريجي في إنتاج الحيوانات المنوية، متحولًا من تركيز منخفض (عقم شديد بالحيوانات المنوية) إلى عدم وجود تام للحيوانات المنوية (عقم تام) على مر السنين (Krausz et al. 2003). سيكون من المفيد للغاية فحص هؤلاء الرجال قبل تفاقم العقم لديهم من أجل تزويدهم بتخزين وقائي للحيوانات المنوية، هذا الأخير يجنبهم الحاجة إلى الإستخراج الجراحي للحيوانات المنوية من الخصية في مرحلة لاحقة (Krausz et al. 2000).



**الفصل الرابع**  
**المواد والطرق**  
**(Materials and methods)**

## الفصل 04: المواد والطرق (Materials and methods)

## (1) بنك البيانات NCBI

المركز الوطني لمعلومات التكنولوجيا الحيوية (NCBI) هو مصدر رئيسي للمعلومات البيولوجية والتقنية الحيوية. تأسس في عام 1988 كجزء من المكتبة الوطنية للطب في الولايات المتحدة (NLM)، وهي جزء من المعاهد الوطنية للصحة، يقدم NCBI مجموعة واسعة من الأدوات والموارد للأبحاث البيولوجية والطبية، والتي تُستخدم على نطاق واسع من قبل العلماء والباحثين في جميع أنحاء العالم.

## (2) موارد وخدمات NCBI الرئيسية :

1. **PubMed** : قاعدة بيانات تضم ملايين الأبحاث العلمية والمقالات الطبية من جميع أنحاء العالم، وهي واحدة من أكبر قواعد البيانات البليوغرافية في مجال الطب.
2. **GenBank1**: قاعدة بيانات لتسلسلات النوكليوتيدات من أكثر من 300,000 كائن حي، وتحتوي على تسلسلات الحمض النووي والحمض النووي الريبي.
3. **BLAST (Basic Local Alignment Search Tool)** : أداة تستخدم لمقارنة تسلسلات الأحماض النووية أو البروتينات لتحديد التشابهات الوظيفية والتطورية.
4. **RefSeq** : مجموعة شاملة من التسلسلات المرجعية للحمض النووي والحمض النووي الريبي والبروتينات، والتي توفر نقطة مرجعية موحدة للدراسات الجينومية.
5. **Entrez** : نظام بحث وتكامل يتيح الوصول إلى مجموعة متنوعة من قواعد البيانات الحيوية والبيولوجية الطبية التي تديرها NCBI.
6. **OMIM (Online Mendelian Inheritance in Man)** : كتالوج شامل لأمراض الجينات البشرية والصفات الجينية.
7. **ClinVar** : قاعدة بيانات لتقديم وتبادل المعلومات حول العلاقات بين التغيرات الجينية والظواهر الصحية.
8. **dbSNP** : قاعدة بيانات للتغيرات في تسلسلات الحمض النووي التي تُعرف باسم تعدد أشكال النوكليوتيدات الفردية (SNPs).

## (3) أهمية NCBI :

- البحث الطبي والعلمي: يعتبر NCBI مصدرًا حيويًا للباحثين الذين يدرسون الأمراض الجينية والجزئيات الحيوية.
- تسريع الاكتشافات العلمية: من خلال توفير بيانات متاحة للجمهور، يساعد NCBI العلماء على توفير الوقت والموارد وتسريع عملية الاكتشافات العلمية.
- التعليم: يستخدم NCBI كأداة تعليمية للطلاب والأكاديميين لتعلم وفهم الجينات وعلم الجينوم.

## 4) كيفية الوصول إلى موارد NCBI :

يمكن الوصول إلى موارد NCBI من خلال موقعه الإلكتروني [ncbi.nlm.nih.gov](http://ncbi.nlm.nih.gov). الموقع يحتوي على واجهة بحث تتيح للمستخدمين البحث في قواعد البيانات المختلفة والحصول على المعلومات البيولوجية والطبية.

## 5) إستخدام NCBI في الأبحاث:

الباحثون يستخدمون NCBI لتحميل وتحليل بيانات التسلسل، مقارنة التسلسلات، العثور على معلومات عن الجينات والبروتينات، والوصول إلى الأبحاث العلمية والمقالات الطبية. توفر أدوات مثل BLAST و Entrez إمكانيات متقدمة للتحليل البيولوجي واستخراج المعلومات القيمة من قواعد البيانات.

من خلال هذه الموارد والخدمات، يلعب NCBI دورًا حيويًا في تقدم الأبحاث الطبية والبيولوجية، مما يساهم في تحسين فهمنا للأمراض وتطوير علاجات جديدة.

## 1. إستخراج التسلسل الجيني (اخترانا الجين USP9Y المكون للمنطقة AZF كمثال )

تتمثل الخطوة الأولى من تصميم البادئات في استخراج التسلسل الجيني USP9Y من قاعدة بيانات NCBI

عبر الموقع [ncbi.nlm.nih.gov](http://ncbi.nlm.nih.gov)



الصورة 17: قاعدة البيانات <<NCBI>>

بعد ذلك، نسمح التسلسل المستخرج من جين USP9Y ونلصقه في مستند Word من الضروري أيضًا تحديد الإكزون الأنسب وهو في هذه الحالة الإكزون 1 ثم نبدأ في اختيار البادئات المناسبة - هذه الخطوة موضحة في (الصورة 18).

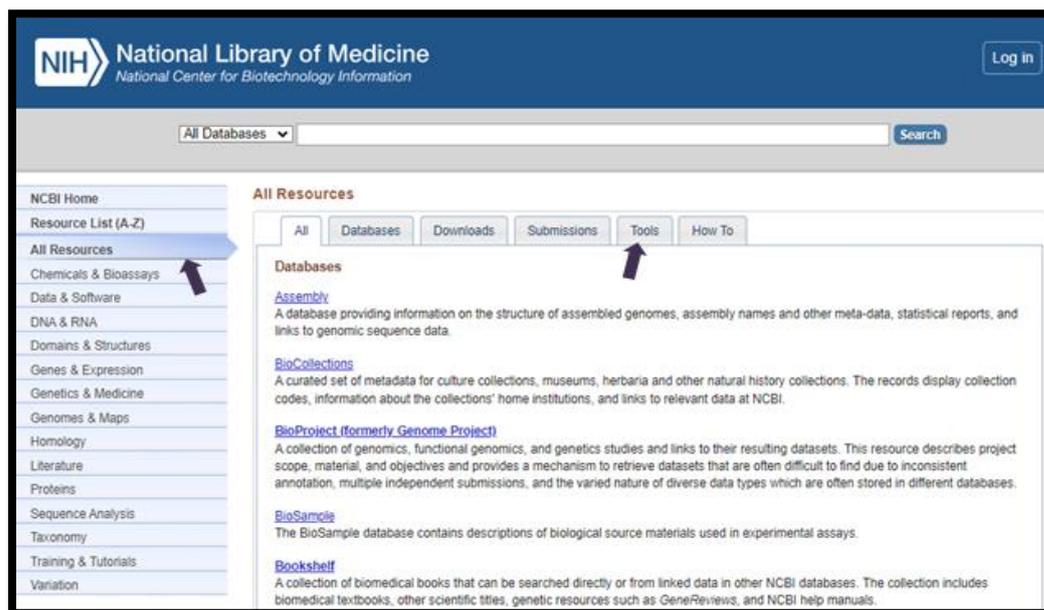
TGAATAATTGAACTTTGTTTATTTCTCCATATTTTTGCAGTGGTAATTCATTATAAAAACCTAATGAAAC  
 AATGTTTTTATAGATGGTGGAAAGACTTTTTCTGGGCTCAGAGGTGAAACTGACCCTTGTGTATCAGCA  
 GCATTTCTGACTGACTGAGAGAGTGTAGTGATTAACAGAGTTGTGATGTTAGTTAAGAACTTAGATTTG  
 CCATTGTAGCTTTTCTACCAATTAGCAGATTGTTTAACTCACTGAAATTTGTAAGTGGTAGACGTGGACT  
 TAGTCATTACTGGGCAGCTTATGAATTGTATTCACTTACTCATGATGTAATAAATGGTTAGTCTCCACTTT  
 TAAGGCTCTAGTTCCTAGTGGCTAAATAGGACTTATTTATACAGTATGATAACTGCTGTATTAATAACA  
 TGTCTCAAATGTGGAATAGTAGAAGAGGTGAAGAAAATCATAGTTTGGGTAGAATACTGTTTGTCTGCTC  
 TTAATAAAGTGTGGTATTTTGGTGATTCCATAAATAGGTCAGATACTTCCACTGGAGGGGAAACAGTTTAA  
 AGGATATATGTGATACTATTAATAGAATGAGGAAGACACACCAGATATTTAGGAGGAAATAGCCGAGCTT  
 GAAACTAAGAGCTGGTTTGAATGAGACTGGGTCATAAGTGATTTCAAGTACCAGATTAAGGCCTGAGAT  
 TTTATTTTAAAGCACTGAAGTCAGATTTTTCCTTTTAAAGAAAGGATTGATGATGAAATCTGCTTTT  
 GTTTTGCAGAGACTTGGAGATAATTCTGGTGGCTGTGTGGAGTATGTGTTGGAGGTGAGTTGCTAGCTG  
 AAGAATTAACAATAGTTTGTAGCAGTTTGGGTAAGAGATGTTTACAGAAATGTTTTGTGGAATAAAGCT  
 GAACAGTCAGAGACCTATGAGATTACCATGGTCTGATAGAGGGGAGCTAATACAATCTTTCTTTTTTT  
 GTCAGTGAGTTAATTACTAAGCTGGGGCAGGATATTTGTCTTTTACTTCATAAGAAAATAGCTCACAGTT  
 TAACAGCTTAAACAACAACAATATCTTTTCGTTTTTGTGGGTAGCAGTTATTTATCTGAAGGCTGGTAT  
 GTCCACTTCCACAATGGCTTACTCACATGATTGTGACAGCAGGGCTGATTTCTTTGTAGCAGTTGGCA  
 AGAGGTATGCTTGTCTGTAAGGATATATCTGTAAGCCTGTTTCAAGTGTGTTGGGGGAAAGCTTGGCTATC  
 AAGCTAAGGGTACCTATGTTGAGGCTAGGGAATTATCTATTGTAGCCTGCTTGGGAAAAATATTATGAG  
 AAATTTTTGTTGTTCTGATTTGAACAGTAGAAGTGTGTAGTACTTGAGGTTCTTGGGGTATTTTAAAT  
 ATGGATTTTTCTGTCTGCAAAAACAATATTTGTGGAGATAGTGTGAATCTGTAATCACTTTGGGATGAC  
 TGATAACAGTAGTAAGTCTTGTAAATACCTGGACATFAGAGGCTCTTTCCTGTATTTCTGTCTTTAGTTAT  
 TTTTCCCTCCACAATAAATTTTTGTTTTTTAGTATAAGTCACTTGGTCTCCTTGATTAATCTATAGATTT  
 TTCTACATGTAATATCATGTCTCTGAAATAGGCAGTTTTACTCCCTTCTTCTGATTTGGATGCCA  
 TTTTATATCTATCTCTTCTTTCTTTGCTCTGACTAGGACTCTCCATACTAAGTTGAATTAGAGGGGCTCT  
 TGTCTTGTTCAGATCTTAGAGAAAGGCTTTGGCCCTTTTCCATTTGGTATGAAGTTAGTCTTGCCT

الصورة 18: تسلسل الجين USP9Y (الإكسون 1)

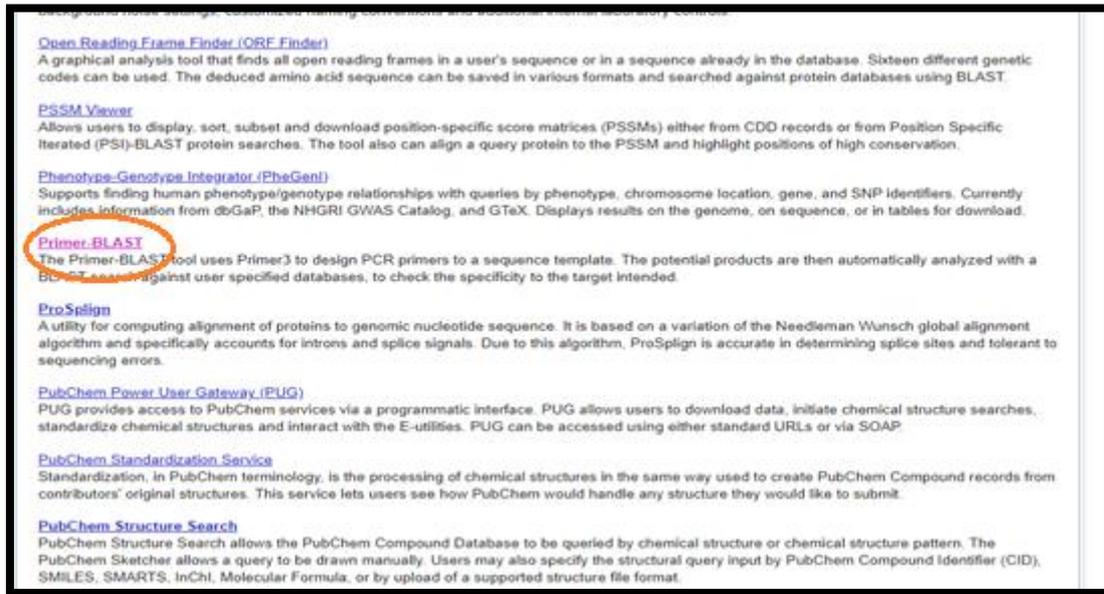
## 2- أداة التصميم التمهيدي (Primer-BLAST)

تطبيق Primer-BLAST هو أداة متقدمة تُستخدم في علم الجينات والجينومات لتصميم الأساسيات البرمجية (primers) وفحصها في نفس الوقت. يُستخدم هذا التطبيق لتكامل ميزات برنامج BLAST، وهو أداة تحديد تسلسل البروتينات والجينات متاح من المركز الوطني لمعلومات التكنولوجيا الحيوية (NCBI) على الرابط <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast>.

◆ الخطوة التالية من تصميم البادئات الخاصة بجين USP9Y هي معرفة خصائص هذه البادئات باستخدام أداة Primer-BLAST عبر الخطوات التالية:



الصورة 19: موقع NCBI



الصورة 20: اختيار أداة Primer blast

- ننسخ التسلسل المدروس في البرنامج، ونحدد التمهيدي الأمامي والعكسي لتمكين البرنامج من تحديد فترة البحث كما هو موضح في (الصورة 21).

الصورة 21: تحليل التصميم التمهيدي للتسلسل جين USP9Y

- نختار <GetPrimers> للحصول على النتائج

Specificity check  Enable search for primer pairs specific to the intended PCR template ?

Search mode  ?

Database  ?

Exclusion  Exclude predicted Refseq transcripts (accession with XM, XR prefix)  Exclude uncultured/environmental sample sequences ?

Organism   ?

Enter an organism name (or organism group name such as enterobacteriaceae, rodents), taxonomy id or select from the suggestion list as you type: ?

Entrez query (optional)  ?

Primer specificity stringency Primer must have at least  total mismatches to unintended targets, including at least  mismatches within the last  bps at the 3' end. ?

Ignore targets that have  or more mismatches to the primer. ?

Max target amplicon size  ?

Allow splice variants  Allow primer to amplify mRNA splice variants (requires refseq mRNA sequence as PCR template input) ?

Show results in a new window  Use new graphic view ?

الصورة 22: الحصول على نتائج من التصميم التمهيدي

• تظهر النتائج في (الصورة 23):

Input PCR template none

Specificity of primers Target templates were found in selected database: Refseq mRNA (Organism limited to Homo sapiens)

Other reports [Search Summary](#)

### — Detailed primer reports

**Primer pair 1**

	Sequence (5->3)	Length	Tm	GC%	Self complementarity	Self 3' complementarity
Forward primer	CTGGGCTCAGAGGTGAAACT	20	59.31	55.00	6.00	2.00
Reverse primer	GCCACCAGAATTATCTCCAAGC	22	59.38	50.00	4.00	2.00

Products on target templates

>NM\_004654.4 Homo sapiens ubiquitin specific peptidase 9 Y-linked (USP9Y), mRNA

product length = 702

Forward primer 1 CTGGGCTCAGAGGTGAAACT 20  
 Template 103 ..... 122

Reverse primer 1 GCCACCAGAATTATCTCCAAGC 22  
 Template 804 ..... 783

الصورة 23: البادئات المناسبة

## 3- نتائج تصميم البادئات

يجب أن يستوفي الزوج التمهيدي المصمم على المعايير التالية:

- ✓ إختيار الزوج التمهيدي الذي يعطي أقل عدد من النواتج غير المحددة من أجل تضخيم المنتج محل الاهتمام فقط.
- ✓ يجب أن تكون درجات حرارة التهجين للبراميرين التمهيديين متقاربة قدر الإمكان، حيث أن درجة حرارة التهجين أثناء تفاعل البوليميراز المتسلسل مبرمجة كدرجة حرارة واحدة.
- ✓ يجب أن يكون محتوى GC من 40% إلى 60% .

## 4- طلب البادئات عبر بنك البيانات Eurogentec

تطبيق Eurogentec هو تطبيق يهدف إلى تسهيل الوصول إلى المعلومات والخدمات المتعلقة بشركة Eurogentec.

## 1. تاريخ وتأسيس شركة Eurogentec:

تأسست Eurogentec في عام 1985 في مدينة Liège ببلجيكا، وهي تعد جزءًا من مجموعة Kaneka Corporation اليابانية منذ عام 2017. الشركة نمت لتصبح لاعب رائد في صناعة التقنيات الحيوية.

## 2. المنتجات والخدمات:

تقدم Eurogentec مجموعة شاملة من المنتجات والخدمات المتخصصة تشمل:

- الأجسام المضادة والأدوات الجزيئية: تتضمن الأجسام المضادة الموجهة ضد أهداف محددة والأدوات الجزيئية مثل الإنزيمات والمواد المضافة للنظام الوراثي.
- الكيمواويات البيولوجية المخصصة: تتيح للعملاء تخصيص المنتجات والخدمات وفقًا لاحتياجاتهم الخاصة.

## 3. التطبيقات:

تستخدم منتجات Eurogentec على نطاق واسع في الأبحاث الأكاديمية والصناعية والتشخيصية، مما يشمل استخدامها في العديد من التطبيقات مثل:

- التشخيص الجزيئي والطب الشخصي.
- تطوير الأدوية والعلاجات الجديدة.
- البحوث في علم الأحياء الجزيئي والجينوم.

## 4. الإبتكار والبحث و التطوير:

تضطلع Eurogentec بدور رائد في الإبتكار و البحث والتطوير، حيث تستثمر بشكل مستمر في تطوير منتجات جديدة وتحسين العمليات التكنولوجية لتلبية احتياجات السوق المتغيرة والمتطلبات العلمية.

## 5. المجتمع العلمي والدعم العلمي:

تشارك Eurogentec بنشاط في دعم المجتمع العلمي من خلال المشاركة في المؤتمرات العلمية والفعاليات، وتقديم الدعم الفني والاستشاري للباحثين والمختبرات.

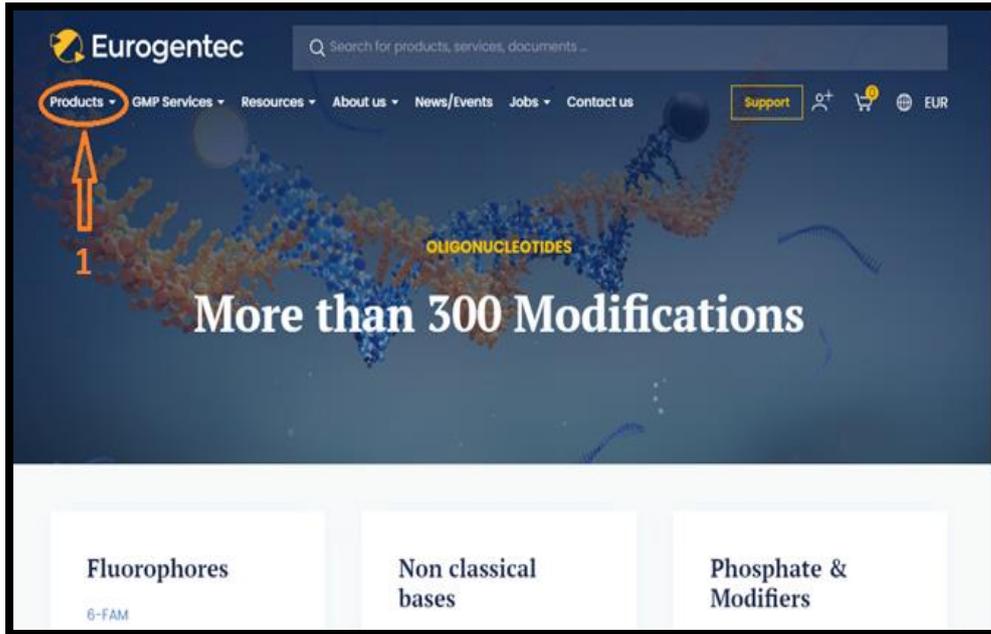
## 6. الموقع و الوجود العالمي:

بالإضافة إلى مقرها الرئيسي في بلجيكا، تمتلك Eurogentec شبكة عالمية من الشركات التابعة والمكاتب الإقليمية التي تدعم عملياتها الدولية وتوفر خدماتها للأسواق العالمية.

باختصار، تعتبر Eurogentec شركة رائدة في مجال التقنيات الحيوية تقدم حلولاً متقدمة ومخصصة للأبحاث والتطبيقات الصناعية والطبية، مما يساهم في تقدم العلوم والإبتكار.

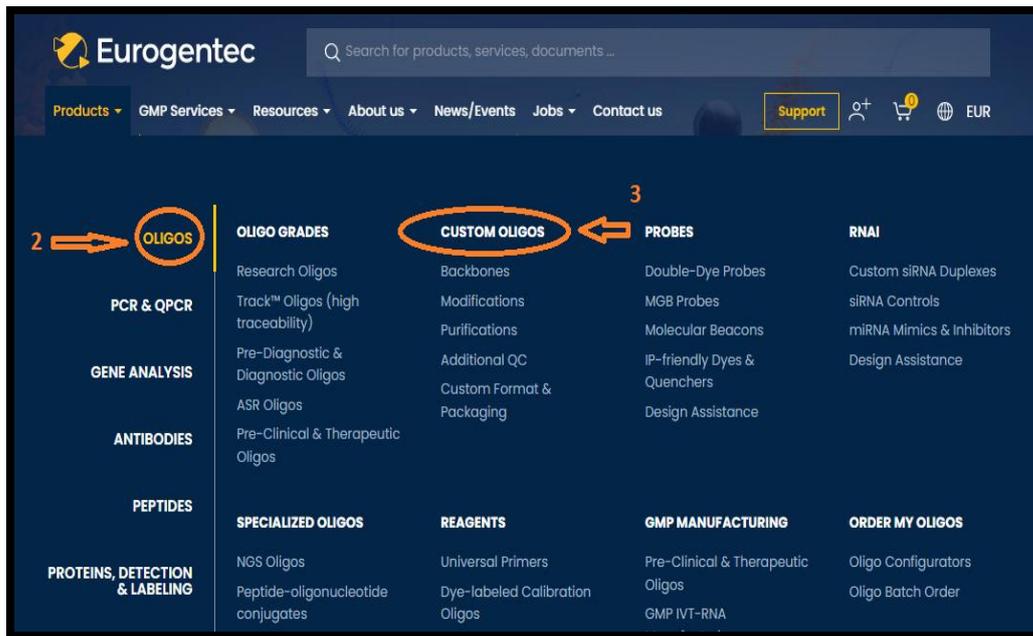
## ◆ الخطوة الأولى من خطوات الطلب:

فتح بنك المعلومات eurogentec على الرابط التالي <https://www.eurogentec.com/en>



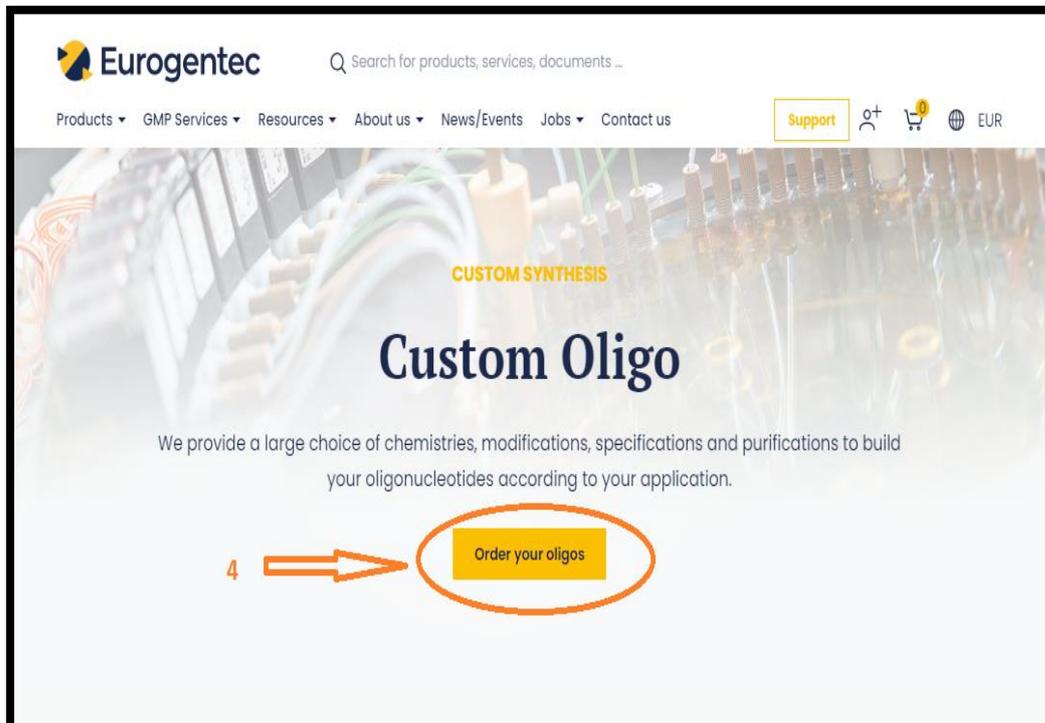
الصورة 24: البوابة الرئيسية للموقع eurogentec

◆ الخطوة الثانية :



الصورة 25: الخطوة الثانية من مراحل طلب البادئة

◆ الخطوة الثالثة:



الصورة 26: الخطوة الثالثة من مراحل طلب البادئة

## ◆ الخطوة الرابعة:

تفتح لنا نافذة لإدخال المعلومات الخاصة بالبادة المراد طلبها نتبع الخطوات كما يلي :

◆ ندخل اسم موقع ال STS وتسلسل البادة في الخانة الخاصة بكل منهما مثل ما هو موضح في الصورة التالية:

الصورة 27 : ملأ خاني اسم موقع STS و التسلسل الجيني للبادة

## ◆ نختار لون للبادة في الجهة 5'

الصورة 28 : إختيار لون للبادة

◆ نكمل ملاً الخانات المتبقية كالتالي:

**Eurogentec** Search for products, services, documents ...

Products ▾ GMP Services ▾ Resources ▾ About us ▾ News/Events Jobs ▾ Contact us

Clicking on the link between two bases changes it to a phosphorothioate linkage (yellow) (S), A \* is then added to the sequence.

Synthesis scale (Check the Minimum Guaranteed Yield)

40 nmol (10-99 bases) ▾

Purification

IEX-HPLC ▾

Additional QC (Check the free included QCs)

MALDI-TOF MS ▾

Format

Dried ▾

الصورة 29: ملاً الفراغات المتبقية لإكمال معلومات الطلب

◆ الخطوة الخامسة والأخيرة: نقوم بالطلب كالتالي:

**Eurogentec** Search for products, services, documents ...

Products ▾ GMP Services ▾ Resources ▾ About us ▾ News/Events Jobs ▾ Contact us

Support + Shopping Cart EUR

**Custom Oligonucleotides** Choose your oligotype ▾

Need to order multiple custom oligos? Batch order

Name

sy83

Enter your sequence

GGCCCTCCATCCTACAAAA

DNA = ACGT RNA = (ACGU) 2'-O-Me RNA = [ACGU] 2'-O-MOE RNA = (ACGT) LNA = [ACGT] Phosphorothioates = A\*(G\*U\*C)

Please note:

- insert the letter X to introduce abasic internal modifications or modifications not listed under A, C, G, T or (U).

Modifications must be defined in the "Internal modifications" frame.

الصورة 30 : الضغط على أيقونة الطلب لإرسال المعلومات المختارة



**الفصل الخامس**

**النتائج**

**(Results)**

## الفصل 05: النتائج (Results)

## 1- تحديد تسلسل STS:

## SY83/AZFa •

CTTGAATCAAAGAAGGCCCTCCATCCTACAAAAGATCTACTTCTTTGACTTTGATGCCTGTCATGCCACATAT  
 GTTTATAATCCTGTAAAACCAAAAGCAGTCTGCAATGGTTTAAACACAAGACAGGATTAGCAACAGCAGCCCTA  
 AACATCTGACTGAGAACCACAAATTGGATGCCAGACTGTAACATTCTGTGGTCTATGCTAACACAGCTCCA  
 ACACCTTATATTCAGGAAGGACTGCTCTGCTAAGTAGTATGTCAGCCAAACCAATTG

## SY86/AZFa •

ATGGATCCCTCAGCACATGGGTGACACACAGACTATGCTTCAGCAGGTCTGTCTGGGCCAAGACACATTGTT  
 TCTCATCAGCTCCAGGGGATGTCAAGGCTGCAGATCCATGGATCTCACTTTCAGGACAGAGACTTGGTAAT  
 GGCTTCCCAGAGTTGTTACAAAGAAATCCCAAAGACTGGGCCCTTAAACAACAACCTTGATTCTCACAGTCC  
 TTGAGGCTAGAAGTCTGAGATCAAGCTATGGCCAGGGCTGGTTCCTCCTGAGGCCTCTCTCCTTGGGTTGTAG  
 ATGCTGTCTTCTCCCTGTGTCTCACAGGGTGTCCCTCTGTGTGTGTCTGTGTCTCATCTCCTTCTTATGA  
 GGTGTCTTAGTCCATTTAGGCTGCTGTACAGCATGCCGTAGACTGGGTGGCTTATCAGCAACAGACATTGA  
 TTCTCCACAGTCTGGAAGCTGGACGTCTGAGATCAGGGTATGGGCAGG

## SY142/AZFb •

AAGCTTCTATTCGAGGGCTTCATGACCCCTGCAGGATGAGAAGCAGGTAGTCATATTTGGCTTCTGCTTGGTA  
 ATCTAGCCTCTATTTCAATTCATCTGCATAGGCTTTTCATTGTGGAGGGGTTCTTTCATTGGGCTGTTGCTAGAT  
 AAAGCTGTCTCTACCACAGATTATTTAGATGTCAGGGATTGCAGAGAGCAAA

## Sy143/ AZFb •

CTATTCNAGGGCTTCATGACCCCTGCAGGATGAGAAGCAGGTAGTCATATTTGGCTTCTGCTTGGTAATCTAG  
 CCTCTATTTCAATTCATCTGCATAGGCTTTTCATTGGGGAGGGGTTCTTTCATTGGGCTGTTGCTAGATAAAGC  
 TGTCTCTACCACAGATTATTTAGATGTCAGGGATTGCAGAGAGCAAAAGGGACTTTGGGTAGGCTGTCTGC  
 ACTCCAGATTGTGGGTCATTGTCTCCTTTTGGGGGTTGAAGTTGTTTGCACCTTTTCAGGAGGATTTTGGGTCCT  
 CTGACAGGANTCAGTGAACATTGATTAGTCTCCAGCACACGGCAGCTCATCCTCCCAGGTGAACTTTNNTTTT  
 CNNTTGCTGTCTATGGGGGATCCACAGNGCTCCTCATCAGCAGTTNTGTACACCCNTATCATGCTTGC

## sy254/AZFc •

AAGGCTGGGTGTTACCAGAAGGCAAATCGTGCCAAACACTGTTTTTGTGGTGGAATTGATGCTAGGGTAT  
 TGTATTCGTACCTCATTTTTACCTTAACATACATCATGAACAATGGGATGTGGGCCCTGTTACAAACTTAAATTT  
 TTTTTGTACTTCTGGAGGTTTAGAATTGCTTTTAGGTTTGACCCATAGGTAATAAAATATCTTTGACAAAG  
 GGCTGCTGGTCATTCGGGGATAAATGGGGGAGAAATTTCCACCTCATGGTAGTAAATTGTAGTAAAGTTGA  
 AATTTTTGAATGCTGAATTTTTACTCTGACGTTTCAGTTCTTTTCCATAGATGGATGAAACTGAGATTGGAAGCT  
 GCTTTGGTAGATACGGTTCAGTGAAAGAAGTGAA

## sy255/AZFc •

GGTCTGAACGTGCTGAGTTACAGGATTCGGCGTGATTTGGGGCTGCAGGTAGGTTTCAGTGTTTGGATTCCG  
 CAGACGTTCTGAAACTGTGGTGGAGGAGGAGGATTAACACAAAGGACGTGGCTGCACATGACGAGCACA  
 TAACTTTTGTCTTCT

## SRY •

AGAAGTGAGTTTTGGATAGTAAATAAGTTTCGAACTCTGGCACCTTTCAATTTTGTGCACTCTCCTTGTTTTT  
 GACAATGCAATCATATGCTTCTGCTATGTTAAGCGTATTCAACAGCGATGATTACAGTCCAGCTGTGCAAGAG  
 AATATTCCCGCTCTCCGGAGAAGCTCTTCCTTCTTTGCACTGAAAGCTGTAAGTCTAAGTATCAGTGTGAAAC  
 GGGAGAAAACAGTAAAGGCAACGTCCAGGATAGAGTGAAGCGACCCATGAACGCATTCATCGTGTGGTCTC  
 GCGATCAGAGGCGCAAGATGGCTCTAGAGAATCCAGAATGCGAAACTCAGAGATCAGCAAGCAGCTGGGA  
 TACCAGTGGAAAATGCTTACTGAAGCCGAAAAATGGCCATTCTTCCAGGAGGCACAGAAATTACAGGCCATG  
 CACAGAGAGAAATACCCGAATTATAAGTATCGACCTCGTCGGAAGGCGAAGATGCTGCCGAAGAATTGCAGT  
 TTGCTTCCCGCAGATCCCGCTTCGGTACTCTGCAGCGAAGTGCAACTGGACAACAGTTGTACAGGGATGACT  
 GTACGAAAGCCACACACTCAAGAATGGAGCACCAGCTAGGCCACTTACCGCCCATCAACGCAGCCAGCTCAC  
 CGCAGCAACGGGACCGCTACAGCCACTGGACAAAGCTGTAGGACAATCGGGTAACATTGGCTACAAAGACCT  
 ACCTAGATGCTCCTTTTTACGATAACTTACAGCCCTCACTTTCTTATGTTTAGTTTCAATATTGTTTTCTTTCTCT  
 GGCTAATAAAGGCCTTATTCATTTCA

## β-Actin (exon 6) •

ATCATTGCTCCTCCTGAGCGCAAGTACTCCGTGTGGATCGGCGGCTCCATCCTGGCCTCGCTGTCCACCTTCCA  
GCAGATGTGGATCAGCAAGCAGGAGTATGACGAGTCCGGCCCCCTCCATCGTCCACCGCAAATGCTTCTAGGC  
GGACTATGACTTAGTTGCGTTACACCCTTTCTTGACAAAACCTAACTTGCAGAAAACAAGATGAGATTGGC  
ATGGCTTTATTTGTTTTTTTTGTTTTGTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTGGCTTGACTCAGGATTTAAAACTGGAA  
CGGTGAAGGTGACAGCAGTCGGTTGGAGCGAGCATCCCCAAAGTTCACAATGTGGCCGAGGACTTTGATTG  
CACATTGTTGTTTTTTAATAGTCATTCCAAATATGAGATGCGTTGTTACAGGAAGTCCCTTGCCATCCTAAAA  
GCCACCCCACTTCTCTAAGGAGAATGGCCAGTCCTCTCCCAAGTCCACACAGGGGAGGTGATAGCATTGC  
TTTCGTGTA AATTATGTAATGCAAATTTTTTAATCTTCGCCTTAATACTTTTTTATTTTGT TTTTATTTTGAATGA  
TGAGCCTTCGTGCCCCCTTCCCCTTTTTTGTCCCCAACTTGAGATGTATGAAGGCTTTTGGTCTCCCTGGG  
AGTGGGTGGAGGCAGCCAGGGCTTACCTGTACTGACTTGAGACCAGTTGAATAAAAAGTGACACCTTAAA  
AATGA

## 2- تصميم البادئات:

الجدول 3: بادئات مواقع ال STS المختارة للدراسة وخصائصها

AZF region	STS	Primer sequence (5'–3')	TM(C°)	GC(%)	Product size (bp)	5'fluorescence labeling
AZFa	sY83	F 5'GGCCCTCCATCCTACAAAA 3'	57.5	53	263	Alexa Fluor 488 (blue)
		R 5' CAATTTGGTTTGGCTGACATAC 3'	58,4	41		
	Sy86	F 5' GTGACACACAGACTATGCTTC 3'	59,5	48	320	ATTO 520 (green)
		R 5' ACACACAGAGGGACAACCCT 3'	60	55		
AZFb	sY142	F 5' TTGGCTTCTGCTTG GTAATCTAG 3'	58	43,48	108	Alexa Fluor 555 (yellow)
		R 5'GGTGACAGACAGCTTTATCTAGC 3'	59	47,83		

	Sy143	F 5' CTGCTTGGTAATCTAGCCTCTA 3'	57	45,45	244	Alexa Fluor
		R 5' CCTGTCAGAGGACCCAAAATC 3'	58	52,38		594 (Red)
AZFc	sY254	F 5' AAGGCTGGGTGTTACCAGAA 3'	58.85	50	401	Alexa Fluor
		R 5' CACTTCTTTCACTGAACCGTAACT 3'	59.19	41.67		555 (yellow)
	sY255	F 5' GGTCTGAACGTGCTGAGTTACA 3'	60.55	50	140	Alexa Fluor
		R 5' GCTCGTCATGTGCAGCCA 3'	60.74	61 ,11		594 (Red)
Internal controls (ZFY)	SRY	F 5' CCAGCTGTGCAAGAGAATATTC 3'	60 ,1	45	220	Alexa Fluor
		R 5' TGCGAAACTCAGAGATCAGCA 3'	59,50	48		488 (blue)
	$\beta$ -Actin	F 5' ATCATTGCTCCTCCTGAGCG 3'	59,89	55	199	Alexa Fluor
		R 5' TGCGCAAGTTAGGTTTTGTC 3'	57,23	45		594 (Red)

المناقشة

## المناقشة (Discussion)

تعتبر الحذفات في الصبغي Y موضوعا هاما في البحث الجيني نظرا لتأثيرها على مجموعة متنوعة من الأمراض والظواهر الجينية، فتوفير طرق دقيقة وفعالة للكشف عن هذه الحذفات يمكن أن يساهم في تشخيص الإضطرابات الجنسية و المشاكل الصحية ذات صلة بالكروموسوم Y من بين هذه الطرق نسلط الضوء على تقنية QF-PCR التي تعتمد على تحليل الحمض النووي بواسطة تفاعل سلسلة البلمرة مع استخدام العلامات الفلورية لتحديد النسخ الكمية للجينات المستهدفة.

- من بعض الأبحاث المهمة فيما يخص تقنية ال QF-PCR و الحذفات الدقيقة في الصبغي Y ما يلي :

- Krausz و L و CHoefsloot عام 2006 م أظهروا أن تقنية QF-PCR فعالة في كشف الحذف المجهري في مناطق معينة (AZF) من الكروموسوم Y ، مما يساعد في التشخيص الجيني للعقم الذكري.
- أما Quintana-Murci, L., & McElreavey, K h في عام 2000م أشاروا في دراسة إلى أن تحليل الحذف في الكروموسوم Y يمكن أن يكون له قيمة تشخيصية كبيرة في تقييم العقم الذكري، حيث يتم تحديد العلاقة بين وجود الحذفات الجينية والتأثير على الإنتاجية الحيوية للحيوانات المنوية.
- وفي عام 2000م أشار كل من Kamp, C وآخرون في هذ دراسة الى الآثار المرضية للحذفات الوراثية في منطقة AZF على كروموسوم Y، وأظهرت أن هذه الحذفات قد تنتج عن أحداث إعادة ترتيب داخل الكروموسوم نفسه، مما يعزز من فهمنا لآليات العقم الذكري.

- هدفنا في هذه الوحدة هو تصميم مجموعة من البادئات باستخدام البيانات الجينية المتاحة التي تسمح لنا بالكشف عن الحذفات التي تحدث في الكروموسوم Y عن طريق تقنية البلمرة المتسلسلة الفلورية الكمية (QF-PCR) حيث قمنا باستخراج التسلسل الجيني للمواقع الشائعة للحذف واخترنا منها 6 مواقع للدراسة وهي كالتالي: Sy83, Sy86, Sy143, Sy142, Sy254 و Sy255 ثم قمنا بتصميم لكل موقع بادئتين ترتبط كل منهما بطريقة متخصصة مع القطعة الجينية الخاصة بها في اتجاهين متعاكسين مع مراعات الشروط الأساسية لتصميم البادئات ثم قمنا بمقارنة هذه البادئات مع بادئات منشأة من قبل باحثين في هذا المجال فلاحظنا وجود بادئات لمواقع STS مشتركة وأخرى مختلفة فاخترنا من المواقع المشتركة بادئات الموقع Sy83 بعد ذلك قمنا بطلب هذه البادئات من موقع خاص (Eurogentec) تحت شروط معينة مثل تعيين لكل زوج من البادئات لون معين يقبله جهاز SeqStudio genetique Analyzer المستعمل في هذه المرحلة؛ بعد أن تصبح البادئات جاهزة تأتي المرحلة الأخيرة وهي مرحلة تأكيد الفعالية للبادئات حيث تعطي احتمالين إما:

- نتائج جيدة: تؤكد الفعالية.

- نتائج غير مرضية: نستبدل البادئتين

نظرا لعدم توفر الإمكانيات اللازمة للقيام بهذه المرحلة قمنا بالتوقف في مرحلة التصميم.

خاتمة

**(Conclusion) خاتمة**

في عصر الجينومات المتقدمة أصبح من الممكن تحليل الحمض النووي بدقة لا مثيل لها مما يمنحنا فرصة لفهم أدق وأعمق لتغيرات الجينات على المستوى الجزيئي, يعتبر الكروموسوم Y أحد الأجزاء الحيوية من جهاز النقل الوراثي الذكري والمعروف بدوره الحاسم في تطور الذكورية والتنوع الجيني الذكوري, على الرغم من هذه الأهمية إلا أن الكروموسوم Y يمكن أن يتعرض إلى ما يسمى بالإنحلال أو الحذوفات الدقيقة (Microdeletion) والتي يمكن أن تؤدي إلى مشاكل في الخصوبة لدى الرجال.

تعتبر التقنية المعروفة بـ Quantitative Fluorescent Polymerase Chain Reaction (qF-PCR) واحدة من أبرز الطرق المستخدمة حالياً للكشف عن الحذوفات الدقيقة في الكروموسوم Y بشكل سريع وفعال, تعمل هذه التقنية على تضخيم المناطق المستهدفة في الصبغي باستخدام سلسلة من التفاعلات الجزيئية المتتالية والتي تسمح بكشف الإنخفاضات في كمية الحمض النووي المستهدف وهذا ما عالجه في هذه المذكرة.

توفر تقنية QF-PCR ميزة السرعة والدقة في الكشف عن الحذوفات الدقيقة حيث يمكن تحديد المناطق المتضررة بدقة عالية وتقييم حجم الحذف ونوعه وهذا ما يسمح للأطباء والباحثين بتشخيص الإضطرابات المرتبطة بالكروموسوم Y بشكل أكثر دقة وتوجيه الخطط العلاجية والإستشارية بشكل أفضل, كما يمكن استخدامها أيضاً في علاج أمراض أخرى مثل الأمراض المعدية, الأورام , و التشخيص ما قبل الولادة.

المصائر

*A*

- ABM. (Sans date). Multiplex PCR [Schéma]. Disponible sur [https://www.abmgood.com/marketing/knowledge\\_base/polymerase\\_chain\\_variation\\_system.php](https://www.abmgood.com/marketing/knowledge_base/polymerase_chain_variation_system.php).
- Aklilu Alemayehu.2022. Biology and Epidemiology of Malaria Recurrence: Implication for Control and Elimination. [En ligne].[https://www.researchgate.net/figure/Diagram-showing-the-multiplex-PCR-approach-46-Multiplex-PCR-is-a-type-of-PCR-in-which\\_fig1\\_366225577](https://www.researchgate.net/figure/Diagram-showing-the-multiplex-PCR-approach-46-Multiplex-PCR-is-a-type-of-PCR-in-which_fig1_366225577). Consulté le 03/07/2024.
- Albert, J., & Fenyö, E. M. (1990). Simple, sensitive, and specific detection of human immunodeficiency virus type 1 in clinical specimens by polymerase chain reaction with nested primers. *Journal of Clinical Microbiology*, 28(7), 1560-1564.
- an Den Veyver, I. B. (2001). Genetic testing in the evaluation of the fetus with an abnormal sonographic finding. *Seminars in Perinatology*, 25(5), 360-370.

*B*

- Belaid, N. (2017). Elaboration d'amorces pour le gène de la Glutathion peroxydase 3 GPx3. Récupéré de <http://dspace.univtlemcen.dz/bitstream/112/12000/1/Belaid-nadia.pdf>
- Birch, D. E. (1996). Simplified hot start PCR. *Nature*, 381(6581), 445-446.
- Blanco, P., Shlumukova, M., Sargent, C. A., Jobling, M. A., Affara, N., & Hurles, M. E. (2000). Divergent outcomes of intrachromosomal recombination on the human Y chromosome: Male infertility and recurrent polymorphism. *Journal of Medical Genetics*, 37, 752-758.
- Bustin, S. A., Benes, V., Garson, J. A., Hellemans, J., Huggett, J., Kubista, M., Wittwer, C. T. (2009). The MIQE guidelines: Minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clinical Chemistry*, 55(4), 611-622.

- Bustin, S. A., Mueller, R., & Nolan, T. (2020). Parameters for successful PCR primer design. In R. Biassoni & A. Raso (Eds.), *Quantitative Real-Time PCR* (pp. 5-22). Springer.
- Butler, J. M. (2005). Genetics and genomics of core short tandem repeat loci used in human identity testing. *Journal of Forensic Sciences*, 50(1), 1-15.

### ٢

- C. Ravel. Et al.2006.Polymorphismes du chromosome Y et fertilité masculine Molecular anomalies of the Y chromosome: consequences on male fertility. [En ligne]. <https://www.google.com/url?sa=i&url=https%3A%2F%2Fwww.sciencedirect.com%2Fscience%2Farticle%2Fpii%2FS1297958906002876&psig=AOvVaw0EuuNtaCvyevf7CCImWhAJ&ust=1720112594583000&source=images&cd=vfe&opi=89978449&ved=0CBEQjRxqFwoTCJT7ZubJlcDFQAAAAdAAAAABAF>. Consulté le 03/07/2024.
- Chamberlain, J. S., Gibbs, R. A., Ranier, J. E., Nguyen, P. N., & Caskey, C. T. (1988). Deletion screening of the Duchenne muscular dystrophy locus via multiplex DNA amplification. *Nucleic Acids Research*, 16(23), 11141-11156.
- Chen, C. P., Chern, S. R., Wang, W., et al. (2005). Rapid prenatal diagnosis of common chromosome aneuploidies by QF-PCR and karyotyping. *Taiwanese Journal of Obstetrics and Gynecology*, 44(2), 122-127.
- Chuang, L.-Y., Cheng, Y.-H., & Yang, C.-H. (2013). Specific primer design for the polymerase chain reaction. *Biotechnology Letters*, 35(10), 1541-1549.

### ٣

- Deng, H., Chen, W., & Yan, Z. (2015). Detection of a deletion (Y chromosome microdeletions).
- Dutta, S., Paladhi, P., Pal, S., Bose, G., Ghosh, P., Chattopadhyay, R., ... & Chakravarty, B. (2021). Prevalence of Y chromosome microdeletion in azoospermia factor subregions among infertile men from West Bengal, India. *Molecular Genetics & Genomic Medicine*, 9, e1769. <https://doi.org/10.1002/mgg3.1769>

### ٤

- Edward, U., Muller, A., Hammerschmidt, S., Gerardy-Schahn, R., & Frosch, M. (1994). Molecular analysis of the biosynthesis pathway of the alpha-2,8 polysialic acid capsule by *Neisseria meningitidis* serogroup B. *Molecular Microbiology*, 14, 141-149. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.1994.tb01280.x>
- Emirdar, V., & Acet, F. (2023). The effect of azoospermia factor microdeletions on intracytoplasmic sperm injection results in azoospermia patients. *Pakistan Journal of Medical Sciences*, 39, 672-676. <https://doi.org/10.12669/pjms.39.3.3936>

## F

- Fedder J. *et al.* 2023. Complete or partial loss of the Y chromosome in an unselected cohort of 865 non-vasectomized, azoospermic men. [En ligne]. <https://doi.org/10.1186/s12610-023-00212-z>. Consulté le 03/07/2024.
- Ferlin, A., Arredi, B., & Foresta, C. (2006). Genetic causes of male infertility. *Reproductive Toxicology*, 22(2), 133-141. <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2005.12.002>
- Ferlin, A., Tessari, A., Ganz, F., Marchina, E., Barlati, S., Garolla, A., Engl, B., & Foresta, C. (2005). Association of partial AZFc region deletions with spermatogenic impairment and male infertility. *Journal of Medical Genetics*, 42, 209-213. <https://doi.org/10.1136/jmg.2004.026435>
- Fernandes, S., Huellen, K., Goncalves, J., Dukal, H., Zeisler, J., Rajpert De Meyts, E., ... Vogt, P. H. (2002). High frequency of DAZ1/DAZ2 gene deletions in patients with severe oligozoospermia. *Molecular Human Reproduction*, 8, 286-298. <https://doi.org/10.1093/molehr/8.3.286>
- Fernandes, S., Paracchini, S., Meyer, L. H., Floridia, G., Tyler-Smith, C., & Vogt, P. H. (2004). A large AZFc deletion removes DAZ3/DAZ4 and nearby genes from men in Y haplogroup N. *American Journal of Human Genetics*, 74, 180-187. <https://doi.org/10.1086/381055>
- Fidel Botero C. 2014. Molecular systematics, phylogenetics and evolution of Phyllostomid bats (Mammalia, Chiroptera): a mitogenomic approach using high-

throughput sequencing technologies. [En ligne].

[https://www.google.com/url?sa=i&url=https%3A%2F%2Fwww.researchgate.net%2Ffigure%2FStructure-en-double-helice-de-la-molecule-dADN-La-molecule-est-constituee-dun\\_fig2\\_305320151&psig=AOvVaw3WdXJIVtzUo6kvGNmlvmlB&ust=1720125838543000&source=images&cd=vfe&opi=89978449&ved=0CBEQjRxqFwoTCOixztLYjlcDFQAAAAAdAAAAABAE](https://www.google.com/url?sa=i&url=https%3A%2F%2Fwww.researchgate.net%2Ffigure%2FStructure-en-double-helice-de-la-molecule-dADN-La-molecule-est-constituee-dun_fig2_305320151&psig=AOvVaw3WdXJIVtzUo6kvGNmlvmlB&ust=1720125838543000&source=images&cd=vfe&opi=89978449&ved=0CBEQjRxqFwoTCOixztLYjlcDFQAAAAAdAAAAABAE). Consulté le 03/07/2024.

- Frohman, M. A., Dush, M. K., & Martin, G. R. (1988). Rapid production of full-length cDNAs from rare transcripts: Amplification using a single gene-specific oligonucleotide primer. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 85(23), 8998-9002. <https://doi.org/10.1073/pnas.85.23.8998>

### G

- Ginalski, K., Rychlewski, L., Baker, D., & Grishin, N. V. (2004). Protein structure prediction for the male-specific region of the human Y chromosome. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101, 2305-2310. <https://doi.org/10.1073/pnas.0308624100>
- Gitschier, J. (2000). Maternal age effect and trinucleotide repeat expansion. *Nature Genetics*, 26(4), 379-380. <https://doi.org/10.1038/82485>
- Graves, J. A., Koina, E., & Sankovic, N. (2006). How the gene content of human sex chromosomes evolved. *Current Opinion in Genetics & Development*, 16, 219-224. <https://doi.org/10.1016/j.gde.2006.04.006>
- Grossman, P. D., Colburn, J. C., Caporaso, N. E., Fultz, T. J., Hogan, M. E., & Lasken, R. S. (1989). High-sensitivity fluorescent sequencing of DNA in picoliter reaction volumes using an electrophoretic microchannel array. *Genome Research*, 5(5), 400-407. <https://doi.org/10.1101/gr.5.5.400>

### H

- Hammer, M. F. (1998). A recent common ancestry for human Y chromosomes. *Nature*, 394(1), 234-235. <https://doi.org/10.1038/28201>

- Hossein,S, N & Farhat, F.2007. Genetics of Azoospermia: Current Knowledge, Clinical Implications, and Future Directions. Part II: Y Chromosome Microdeletions.[En ligne]. [https://www.google.com/url?sa=i&url=https%3A%2F%2Fwww.researchgate.net%2Ffigure%2FPalindromic-structure-of-the-Y-chromosome-As-an-example-the-structure-of-P1-to-P3-is\\_fig3\\_5581054&psig=AOvVaw3i6MIB1F-OyO-dXTY0flpp&ust=1720115399347000&source=images&cd=vfe&opi=89978449&ved=0CB EQjRxqFwoTCIDHh72ljcDFQAAAAAdAAAAABAE](https://www.google.com/url?sa=i&url=https%3A%2F%2Fwww.researchgate.net%2Ffigure%2FPalindromic-structure-of-the-Y-chromosome-As-an-example-the-structure-of-P1-to-P3-is_fig3_5581054&psig=AOvVaw3i6MIB1F-OyO-dXTY0flpp&ust=1720115399347000&source=images&cd=vfe&opi=89978449&ved=0CB EQjRxqFwoTCIDHh72ljcDFQAAAAAdAAAAABAE). Consulté le 03/07/2024.
- Hucklenbroich, K., Gromoll, J., Heinrich, M., Hohoff, C., Nieschlag, E., & Simoni, M. (2005). Partial deletions in the AZFc region of the Y chromosome occur in men with impaired as well as normal spermatogenesis. Human Reproduction, 20, 191-197. <https://doi.org/10.1093/humrep/deh554>
- Jaai Kim. 2013. Quantitative real-time PCR approaches for microbial community studies in wastewater treatment systems: applications and considerations. [En ligne]. <https://www.google.com/url?sa=i&url=https%3A%2F%2Fwww.semanticscholar.org%2Fpaper%2FQuantitative-real-time-PCR-approaches-for-microbial-Kim-Lim%2F2703a4f3f178bf4c76a6b44364cd815a99656d71&psig=AOvVaw19nj58sDmOf9Eqo0GQeL0y&ust=1720129886391000&source=images&cd=vfe&opi=89978449&ved=0CB EQjRxqFwoTCMCBjNDbjcDFQAAAAAdAAAAABAE>. Consulté le 03/07/2024.
- John M Walker and Ralph Rapley.2020. The Polymerase Chain Reaction (PCR).[En ligne]. <https://mail.almerja.com/reading.php?idm=141742> .Consulté le 03/07/2024.



- Kamila K.et al.2012. Gene Mutations Associated with Male Infertility. [En ligne]. [https://www.researchgate.net/figure/The-structure-of-AZF-subregions-and-associated-genes-on-the-Y-chromosome-A-the\\_fig1\\_224830686](https://www.researchgate.net/figure/The-structure-of-AZF-subregions-and-associated-genes-on-the-Y-chromosome-A-the_fig1_224830686). Consulté le 03/07/2024. Consulté le 03/07/2024.
- Kamp, C., Hirschmann, P., Voss, H., Huellen, K., & Vogt, P. H. (2000). Two long homologous retroviral sequence blocks in proximal Yq11 cause AZFa microdeletions as a result of intrachromosomal recombination events. Human Molecular Genetics, 9, 2563-2572. <https://doi.org/10.1093/hmg/9.17.2563>

- Kirsch, S., Weiss, B., Miner, T. L., Waterston, R. H., Clark, R. A., Eichler, E. E., ... Rappold, G. (2005). Interchromosomal segmental duplications of the pericentromeric region on the human Y chromosome. *Genome Research*, 15, 195-204. <https://doi.org/10.1101/gr.2764005>
- Kotzot, D. (2018). The role of c
- Krausz, C., & Degl'Innocenti, S. (2006). Y chromosome and male infertility: Update, 2006. *Frontiers in Bioscience*, 11, 3049-3061. <https://doi.org/10.2741/2022>
- Krausz, C., Forti, G., & McElreavey, K. (2003). The Y chromosome and male fertility and infertility. *International Journal of Andrology*, 26, 70-75. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2605.2003.00412.x>
- Krausz, C., Hoefsloot, L., Simoni, M., & Tüttelmann, F. (2014). EAA/EMQN best practice guidelines for molecular diagnosis of Y-chromosomal microdeletions: State-of-the-art 2013. *Andrology*, 2, 5-19. <https://doi.org/10.1111/j.2047-2927.2013.00183.x>
- Krausz, C., Quintana-Murci, L., & McElreavey, K. (2000). Prognostic value of Y deletion analysis - What is the clinical prognostic value of Y chromosome microdeletion analysis? *Human Reproduction*, 15, 1431-1434. <https://doi.org/10.1093/humrep/15.7.1431>
- Kuroda-Kawaguchi, T., Skaletsky, H., Brown, L. G., Minx, P. J., Cordum, H. S., Waterston, R. H., ... Page, D. C. (2001). The AZFc region of the Y chromosome features massive palindromes and uniform recurrent deletions in infertile men. *Nature Genetics*, 29, 279-286. <https://doi.org/10.1038/ng757>

## I

- Lawyer, F. C., Stoffel, S., et al. (1993). High-level expression, purification, and enzymatic characterization of full-length *Thermus aquaticus* DNA polymerase and a truncated form deficient in 5' to 3' exonuclease activity. *PCR Methods and Applications*, 2(4), 275-287. <https://doi.org/10.1101/gr.5.5.400>
- Le Bourhis, C., Siffroi, J. P., McElreavey, K., & Dadoune, J. P. (2000). Y chromosome microdeletions and germinal mosaicism in infertile males. *Molecular Human Reproduction*, 6, 688-693. <https://doi.org/10.1093/molehr/6.8.688>



- Mann, K., & Ogilvie, C. M. (2012). QF-PCR: Application, overview and review of the literature. *Advanced Science Letters*, 21(8), 2464-2468. <https://doi.org/10.1166/asl.2012.4016>
- Matthew W. Et al. 2014. Molecular cytogenetic practical. [En ligne]. [https://www.google.com/url?sa=i&url=https%3A%2F%2Fwww.slideserve.com%2Fmareo%2Fmolecular-cytogenetic-practical&psig=AOvVaw3W\\_hSPGhG1iTDHdvsZW4hp&ust=1720131778762000&source=images&cd=vfe&opi=89978449&ved=OCBEQjRxqFwoTCICqSL7ijlcDFQAAAAAdAAAAABAE](https://www.google.com/url?sa=i&url=https%3A%2F%2Fwww.slideserve.com%2Fmareo%2Fmolecular-cytogenetic-practical&psig=AOvVaw3W_hSPGhG1iTDHdvsZW4hp&ust=1720131778762000&source=images&cd=vfe&opi=89978449&ved=OCBEQjRxqFwoTCICqSL7ijlcDFQAAAAAdAAAAABAE). Consulté le 03/07/2024.
- Mullis, K. B. (1988). Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods in Enzymology*, 155, 335-350. [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(88\)55023-6](https://doi.org/10.1016/0076-6879(88)55023-6)
- Mullis, K. B., & Faloona, F. A. (1987). Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods in Enzymology*, 155, 335-350. [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(87\)55023-6](https://doi.org/10.1016/0076-6879(87)55023-6)
- Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G., & Erlich, H. (1986). Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: The polymerase chain reaction. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, 51(Pt 1), 263-273. <https://doi.org/10.1101/sqb.1986.051.01.032>



- Nathanson, K. L., Kanetsky, P. A., Hawes, R., Vaughn, D. J., Letrero, R., Tucker, K., ... Rapley, E. A. (2005). The Y deletion gr/gr and susceptibility to testicular germ cell tumor. *American Journal of Human Genetics*, 77(6), 1034-1043.
- Nobel Media AB. (2021). Nobelprize.org. Retrieved March 12, 2021, from <https://www.nobelprize.org>
- Noordam, M. J., & Repping, S. (2006). The human Y chromosome: a masculine chromosome. *Current Opinion in Genetics & Development*, 16(3), 225-232.



- Pääbo, S., Irwin, D. M., & Wilson, A. C. (1990). DNA damage promotes jumping between templates during enzymatic amplification. *Journal of Biological Chemistry*, 265(8), 4718-4721.
- Pascal M.2013. Pour mieux comprendre le jargon et ne plus le subir : le stage « Initiation à la biologie moléculaire et aux neurosciences. [En ligne]. <https://www.csc.asso.fr/article/connaitre/112/>. Consulté le 03/07/2024.
- Patsalis, P. C., Sismani, C., Quintana-Murci, L., Taleb-Bekkouche, F., Krausz, C., & McElreavey, K. (2002). Effects of transmission of Y chromosome AZFc deletions. *The Lancet*, 360(9346), 1222-1224.
- Patsalis, P. C., Skordis, N., Sismani, C., Kousoulidou, L., Koumbaris, G., Eftychi, C., ... McElreavey, K. (2005). Identification of high frequency of Y chromosome deletions in patients with sex chromosome mosaicism and correlation with the clinical phenotype and Y-chromosome instability. *American Journal of Medical Genetics Part A*, 135(2), 145-149.
- Pertl, B., Zechner, U., Spielberger, B. D., et al. (2000). Rapid detection of trisomy 21 by quantitative fluorescent PCR. *Molecular Pathology*, 53(6), 300-303.
- Pertl, B., Zechner, U., Spielberger, B. D., et al. (2000). Rapid detection of trisomy 21 by quantitative fluorescent PCR. *Prenatal Diagnosis*, 32(4), 309-314.
- Putu Udiyani P. ET al.2021.Micro-band Boron-doped Diamond Electrode in Capillary Electrophoresis for Simultaneous Detection of AMP, ADP, and ATP. [En ligne] [https://www.researchgate.net/figure/The-capillary-electrophoresis-system\\_fig1\\_350968859](https://www.researchgate.net/figure/The-capillary-electrophoresis-system_fig1_350968859). Consulté le 03/07/2024.



- Ramirez A.2022. Le test PCR comme outil de diagnostic (1/2) : Principes de base. [En ligne].<https://www.google.com/url?sa=i&url=https%3A%2F%2Fwww.3trois3.com%2Farticles%2Fle-test-pcr-comme-outil-de-diagnostic-1-2-principes-de->

[base 15823%2F&psig=AOvVaw2fPFGNrcLn4LuQP5x-uHN&ust=1720128160234000&source=images&cd=vfe&opi=89978449&ved=0CBEQjRxqFwoTCJDkwoDVjlcDFQAAAAAdAAAAABAE](https://www.google.com/search?base=15823%2F&psig=AOvVaw2fPFGNrcLn4LuQP5x-uHN&ust=1720128160234000&source=images&cd=vfe&opi=89978449&ved=0CBEQjRxqFwoTCJDkwoDVjlcDFQAAAAAdAAAAABAE). Consulté le 03/07/2024.

- Reijo, R., Lee, T. Y., Salo, P., Alagappan, R., Brown, L. G., Rosenberg, M., ... Page, D. C. (1995). Diverse spermatogenic defects in humans caused by Y chromosome deletions encompassing a novel RNA-binding protein gene. *Nature Genetics*, 10(3), 383-393.
- Repping, S., Skaletsky, H., Brown, L., van Daalen, S. K., Korver, C. M., Pyntikova, T., ... Rozen, S. (2003). Polymorphism for a 1.6-Mb deletion of the human Y chromosome persists through balance between recurrent mutation and haploid selection. *Nature Genetics*, 35(3), 247-251.
- Repping, S., Skaletsky, H., Lange, J., Silber, S., Van Der Veen, F., Oates, R. D., ... Rozen, S. (2002). Recombination between palindromes P5 and P1 on the human Y chromosome causes massive deletions and spermatogenic failure. *American Journal of Human Genetics*, 71(4), 906-922.
- Repping, S., van Daalen, S. K., Korver, C. M., Brown, L. G., Marszalek, J. D., Gianotten, J., ... Rozen, S. (2004). A family of human Y chromosomes has dispersed throughout northern Eurasia despite a 1.8-Mb deletion in the azoospermia factor c region. *Genomics*, 83(6), 1046-1052.
- Repping, S., van Daalen, S. K., Korver, C. M., Brown, L. G., Marszalek, J. D., Gianotten, J., ... Rozen, S. (2004). A family of human Y chromosomes has dispersed throughout northern Eurasia despite a 1.8-Mb deletion in the azoospermia factor c region. *Genomics*, 83(6), 1046-1052.
- Rozen, S., et al. (2003). *Nature*, 423(6942), 873-876.



- Saiki, R. K., Scharf, S., Faloona, F., et al. (1985). Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science*, 230(4732), 1350-1354.
- Saxena, R., Brown, L. G., Hawkins, T., Alagappan, R. K., Skaletsky, H., Reeve, M. P., ... Page, D. C. (1996). The DAZ gene cluster on the human Y chromosome arose from an

- autosomal gene that was transposed, repeatedly amplified and pruned. *Nature Genetics*, 14(3), 292-299.
- Sikorav, J. L., Orland, H., et al. (2009). Mechanism of thermal renaturation and hybridization of nucleic acids: Kramers' process and universality in Watson-Crick base pairing. *Journal of Physical Chemistry B*, 113(12), 3715-3725.
  - Simoni, M. (2001). Molecular diagnosis of Y chromosome microdeletions in Europe: state-of-the-art and quality control. *Human Reproduction*, 16(3), 402-409.
  - Simoni, M., Bakker, E., & Krausz, C. (2004). EAA/EMQN best practice guidelines for molecular diagnosis of Y-chromosomal microdeletions. State of the art 2004. *International Journal of Andrology*, 27(4), 240-249.
  - Simoni, M., Bakker, E., Eurlings, M. C. M., Matthijs, G., Moro, E., Muller, C. R., & Vogt, P. H. (1999). Laboratory guidelines for molecular diagnosis of Y-chromosomal microdeletions. *International Journal of Andrology*, 22(5), 292-299.
  - Sinclair, A. H., Berta, P., Palmer, M. S., Hawkins, J. R., Griffiths, B. L., Smith, M. J., ... Goodfellow, P. N. (1990). A gene from the human sex-determining region encodes a protein with homology to a conserved DNA-binding motif. *Nature*, 346(6281), 240-244.
  - Skaletsky, H., Kuroda-Kawaguchi, T., Minx, P. J., Cordum, H. S., Hillier, L., Brown, L. G., ... Page, D. C. (2003). The male-specific region of the human Y chromosome is a mosaic of discrete sequence classes. *Nature*, 423(6942), 825-837.
  - Smith, M. J., Britten, R. J., et al. (1975). Studies on nucleic acid reassociation kinetics: reactivity of single-stranded tails in DNA-DNA renaturation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 72(12), 4805-4809.
  - Strachan, T., & Read, A. P. (2018). *Human Molecular Genetics* (5th ed.). Garland Science.
  - Stuppia, L., Antonucci, I., Palka, G., Gatta, V., & Use of the QF-PCR. (2015). *International Journal of Molecular Sciences*, 16(8), 18346-18359.
  - Sun, C., Skaletsky, H., Rozen, S., Gromoll, J., Nieschlag, E., Oates, R., & Page, D. C. (2000). Deletion of azoospermia factor a (AZFa) region of human Y chromosome caused by recombination between HERV15 proviruses. *Human Molecular Genetics*, 9(15), 2291-2296.

*T*

- Tellaa, R. (2013). Apport de la biologie moléculaire dans le diagnostic des infections fongiques invasives: revue de la littérature. Thèse de doctorat : Pharmacie. Rabat : Université Mohammed V- Souissi- Faculté de médecine et de pharmacie- Rabat, 88 p.
- Tiepolo, L., & Zuffardi, O. (1976). Localization of factors controlling spermatogenesis in the nonfluorescent portion of the human Y chromosome long arm. *Human Genetics*, 34(2), 119-124.
- Tilford, C. A., Kuroda-Kawaguchi, T., Skaletsky, H., Rozen, S., Brown, L. G., Rosenberg, M., ... Page, D. C. (2001). A physical map of the human Y chromosome. *Nature*, 409(6822), 943-945.
- Tsui, S. L., Dai, T., Roettger, S., Schempp, W., Salido, E. C., & Yen, P. H. (2000). Identification of two novel proteins that interact with germ-cell-specific RNA-binding proteins DAZ and DAZL1. *Genomics*, 65(3), 266-273.

*V*

- Vogt, P. H. (2004). Genomic heterogeneity and instability of the AZF locus on the human Y chromosome. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 224(1-2), 1-9.
- Vogt, P. H., Edelmann, A., Kirsch, S., Henegariu, O., Hirschmann, P., Kiesewetter, F., ... Nieschlag, E. (1996). Human Y chromosome azoospermia factors (AZF) mapped to different subregions in Yq11. *Human Molecular Genetics*, 5(7), 933-943.
- Vollrath, D., Foote, S., Hilton, A., Brown, L. G., Beer-Romero, P., Bogan, J. S., & Page, D. C. (1992). The human Y chromosome: a 43-interval map based on naturally occurring deletions. *Science*, 258(5084), 52-59.
- Von Hippel, P. H., Fairfield, F. R., et al. (1994). On the processivity of polymerases. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 726, 118-131.

*W*

- Watson, J. D., & Crick, F. H. (1953). The structure of DNA. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, 18, 123-131.

- Winter, P. C., Hickey, G. I., & Fletcher, H. L. (1999). Génétique. Chapitre A: Génétique moléculaire, chapitre E: la technologie de l'ADN recombinant. Edi. Berti, Paris-France, pp. 50-332.
- Wittwer, C. T., Fillmore, G. C., et al. (1990). Minimizing the time required for DNA amplification by efficient heat transfer to small samples. Analytical Biochemistry, 186(2), 328-331.
- Wu, J.-S., Lee, C., Wu, C.-C., & Shiue, Y.-L. (2004). Primer design using genetic algorithm. Bioinformatics (Oxford, England), 20(11), 1710-1717.

Y

- Yen, P. (2001). The fragility of fertility. Nature Genetics, 29(3), 243-244.
- Yeung, E. S. (2007). Ultrahigh-speed DNA sequencing by capillary electrophoresis. Analytical Chemistry, 79(24), 938-942.
- yto genetics in current obstetric and pediatric practice: A pragmatic approach. Fetal Diagnosis and Therapy, 43(1), 1-11. <https://doi.org/10.1159/000477416>
- Yuan L. et al. 2019. Discrepancy of QF-PCR, CMA and karyotyping on a de novo case of mosaic isodicentric Y chromosomes. [En ligne]. [https://www.researchgate.net/figure/Rapid-QF-PCR-analysis-on-uncultured-amniotic-cells-The-analysis-indicated-the-fetus\\_fig2\\_330261328](https://www.researchgate.net/figure/Rapid-QF-PCR-analysis-on-uncultured-amniotic-cells-The-analysis-indicated-the-fetus_fig2_330261328). Consulté le 03/07/2024.

Z

- Zahra Mahmoud A. 2018. Imprinting of X Chromosome. [En ligne] <https://www.google.com/url?sa=i&url=https%3A%2F%2Fmail.almerja.com%2Fmore.php%3Fidm%3D105170&psig=AOvVaw0NZzNrl3QeOlqndBDnWFzU&ust=1720110516668000&source=images&cd=vfe&opi=89978449&ved=0CBEQjRxqFwoTCNDR9qKTjlcDFQAAAAdAAAAABAE>. Consulté le 03/07/2024.

- 
- Zhao, S., Zhu, X., & Yang, T. (2017). A new method for measuring human fetal nuchal translucency thickness using quantitative fluorescent polymerase chain reaction (QF-PCR). *Journal of Medical Imaging and Health Informatics*, 7(6), 1362-1366.
  - Zhong, Y., Huang, L., Zhang, Z., Xiong, Y., Sun, L., & Weng, J. (2016). Enhancing the specificity of polymerase chain reaction by graphene oxide through surface modification: Zwitterionic polymer is superior to other polymers with different charges. *International Journal of Nanomedicine*, 11, 5989-6002.

**Site web**

- <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>
- [https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/.](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/)
- <https://www.eurogentec.com/en>

## الموضوع : تصميم عدة للكشف عن الحذف المجهري للكروموسوم Y بواسطة QF-PCR

## ملخص

تعتبر الحذفات الصغيرة في الصبغي Y من بين التغيرات الجينية المهمة التي قد تؤثر على الخصوبة و التنمية الجنسية عند الذكور ,وبما أن الصبغي Y يحمل معلومات تحدد الجنس و التطور الجنسي , فإن الكشف عن الحذفات الصغيرة فيه يعتبر أمرا ضروريا لتشخيص و فهم العديد من الإضطرابات الجنسية و الصحية .

تهدف هذه المذكرة إلى تصميم مجموعة من البادئات المستهدفة للكشف عن الحذفات الصغيرة في الصبغي Y باستخدام تقنية البلمرة المتسلسلة الفلورية الكمية (QF-PCR), التي تعتبر واحدة من أحدث التقنيات و الأكثر فعالية في تحليل الطفرات الجينية حيث قمنا بتحديد المواقع المستهدفة في الصبغي Y باستخدام البيانات الجينية المتاحة والتي شملت المواقع الشائعة للحذفات بعد ذلك, استخدمنا هذه المواقع لتصميم البادئات المناسبة .

يتم اختبار البادئات المصممة لتحديد كفاءتها و دقتها في الكشف عن الحذفات المحددة باستخدام التجارب العلمية و تحليل النتائج بواسطة تقنية البلمرة المتسلسلة الفلورية و تحليل الجينات , ثم يتم تقييم النتائج و مقارنتها بالتقنيات الأخرى المستخدمة في كشف الحذفات مما يسلط الضوء على كفاءة و موثوقية تقنية QF-PCR .

استخدام تقنية QF-PCR في كشف الحذفات الصغيرة في الصبغي Y يمثل خطوة هامة في تطوير أدوات التشخيص الجيني و فهم الآثار الجينية لتلك الحذفات على الصبغي Y و الإضطرابات الجنسية و الصحية المرتبطة بها , وبالتالي فإن هذه المجموعة المصممة من البادئات قد تساهم بشكل كبير في تحسين التشخيص المبكر و العلاج المرضى المتأثرين بتلك الحذفات.

الكلمات المفتاحية: الحذف المجهري للكروموسوم Y, QF-PCR , primers ,EUROGENTEC , NCBI , STS

## لجنة المناقشة:

رئيس : بوشريط حنان	M.C.B	المركز الجامعي عبد الحفيظ بوصوف -ميلة
مشرف : شكروود كريم	M.C.A	المركز الجامعي عبد الحفيظ بوصوف -ميلة
مناقش: مجاني سمية	M.C.A	المركز الجامعي عبد الحفيظ بوصوف -ميلة