الوراثة الجزيئية Molecular Genetics

Assist.Prof. Dr.Ayoob Obaid Alfalahi

نبذة تاريخية عن تطور مفهوم الوراثة الجزيئية :

منذ إن عرف الإنسان كيف يزرع النباتات أو كيف يربي الحيوانات بدأ يتكهن بأنه لابد أن كل بذرة أو كل بيضه ملقحة تحتوي على خطة غير مرئية أو تصميم معين لنمو وتمايز (growth and differentiation) الكائن الذي تعود له. وقد نشأ علم الوراثة حول فكرة وجود عناصر غير مرئية محتوية على المعلومات الوراثية، والتي سميت فيما بعد باسم الجينات. وعند انقسام الخلية فان هذه العناصر تنتقل إلى كل من الخليتين الناتجتين من عملية الانقسام. إلا أنه قبل إن يتم الانقسام فلابد أن يكون بمقدور الخلية الأم تكوين استنساخة من جيناتها حتى تعطي مجموعة كاملة من هذه الجينات إلى كل خلية ناتجة من الإنقسام. إذ ان الجينات في الحيوان المنوي أو في البويضه تنقل الصفات الوراثية من جيل إلى الجيل التالي.

في البداية لم يمكن تحديد أو حتى تكهن طبيعة هذه الجزيئات (الجينات) التي يمكن أن تُخزن في الخلية ويكون بمقدورها **ادارة الأنشطة المختلفة للكائن الحي اثناء نموه وتمايزه** وفي نفس الوقت يكون باستطاعتها أن **تتناسخ بطريقة دقيقه وصحيحة وبشكل مستمر** تقريباً (unlimited). وعند اعلان قوانين مندل للوراثة تم تصحيح الفكرة السائدة عن العوامل الوراثية من **نظرية الدمج(blending theory)**التي كان الاعتقاد فيها سائداً قبل اعلان قوانين مندل، إلى **نظرية العوامل المستقلة (particulate theory)** والتي تظل فيها العوامل الوراثية (الجينات) محتفظه بكينونتها واستقلالها من جيل إلى جيل. وقد أدى ذلك إلى الإعتقاد بأن هذه العوامل الوراثية المسؤوله عن الصفات البيولوجية المختلفة لابد أنها تتكون من جزئيات معينه موجودة في الخلية الحية، وأن هذة الجينات لابد أن تكون مركبة من نظم من الذرات التي تخضع لقوانين الكيمياء والفيزياء.

أن نظرية العوامل المستقلة جاءت من ملاحظات مندل بأن الكائنات الحية ترث الصفات بطريقة مميزة (**قابلة للعد**) وتتم عن طريق "عوامل وراثية أو وحدات وراثية " اطلق عليها فيما بعد بالجينات (المورثات). ان هذا المصطلح والذي لا يزال مستخدما حتى وقتنا الحاضر يُعد مفهماً مبهما والتعريف العملي الأكثر حداثة للجينات هي **أنها الجزء (أو التسلسل) من الحامض النووي الذي يُرَمِّز لوظيفة خلوية معينة معروفة**. هذا الجزء من الحامض النووي هو **متغير** أي انه يمكن ان يكون **صغيراً** أو **كبيراً**، وقد يحتوي على القليل او الكثير من الأقسام الفرعية (اجزاء الجين). وبمعنى آخر ان كلمة جين تشير إلى الأجزاء من الحامض النووي المطلوبة من أجل عملية خلوية واحدة أو وظيفة واحدة، أكثر من كونها تشير إلى عنصر مادي واحد. المصطلح الذي يستخدم غالبا (ولكن ليس دائما صحيحا) هو "***جين واحد، بروتين واحد***" ويعني أن كل جين معين يرمز إلى نوع معين من البروتين في الخلية. حيث انتشر في الوراثة التقليدية مبدأ يقول (لكل جين واحد، بروتين واحد) بمعنى ان كل جين يحمل معلومات لبناء بروتين وأحد فقط، لكن هذه العبارة يشكك بها كثيرا هذه الأيام وتعتبر إحدى الأخطاء التي وقع بها علم الوراثة التقليدية (Classical genetics). **من المؤكد الآن أنه يمكن**

Molecular Genetic 4th Stage Field Crops Sciences

لنفس الجين أن ينتج عدة بروتينات ويتحكم بهذا الأمر طريقة التعبير للجين (Gene expression) ومن ثم الترجمة (تحويل) للشفرة الوراثية وتنظيم هذه العملية المعقدة. ويمكن تشبيه الجينات على انها مثل "الجُمَل" والنيوكليتيدات مثل "الأحرف". يمكن وضع سلسلة من النكليوتايدات معا دون ان تشكل وظيفة معينة (المنطقة الغير قابله للترجمة في الجين Untranslated region)، تماما كوضع مجموعة من الأحرف بشكل عشوائي دون أن تشكل جملة مفيدة، ومع ذلك فجميع الجمل يجب ان تحتوي على حروف، كما يجب أن تحتوي جميع الجينات على نيوكلتيدات.

عقب اعلان **نظرية الكروموسومات للوراثة** في بداية القرن العشرين أصبح من الواضح أن الكروموسومات هي الحاملة للمعلومات الوراثية ولكن تبين في المرحلة المبكرة أن الكروموسومات مكونة من مركبات عديدة تشمل **الأحماض النوويه والبروتينات** وخاصة الحامض النووي الديوكسي ريبوزي DNA. وقد تركز البحث على التعرف على انواع من **البروتينات** الخاصه نظراً لأن البروتينات تحتوي بين جزيئاتها على قدر واسع من الاختلافات الكيميائية والبيولوجية مما يؤهلها للقيام بمهمة المادة الوراثية في حين اعتبرت **الأحماض النووية** غير صالحة لهذه المهمة نظراً لإفتقارها إلى التباين الكيميائي الواسع بين جزيئاتها وعليه فانه من المستبعد وجود وظيفة وراثية لجزيء DNA ***وأن كل مهمته أن يعمل كإطار لتدعيم البنية الأساسية للكروموسوم***. ظلت المحاولات مركزة في هذا الإتجاه إلى أن وصلت إلى طريق مسدود حيث ثبت انه لا يوجد أي نوع من بروتينات الخلية يمكن أن تتوفر فيه شروط المادة الوراثية وهي:

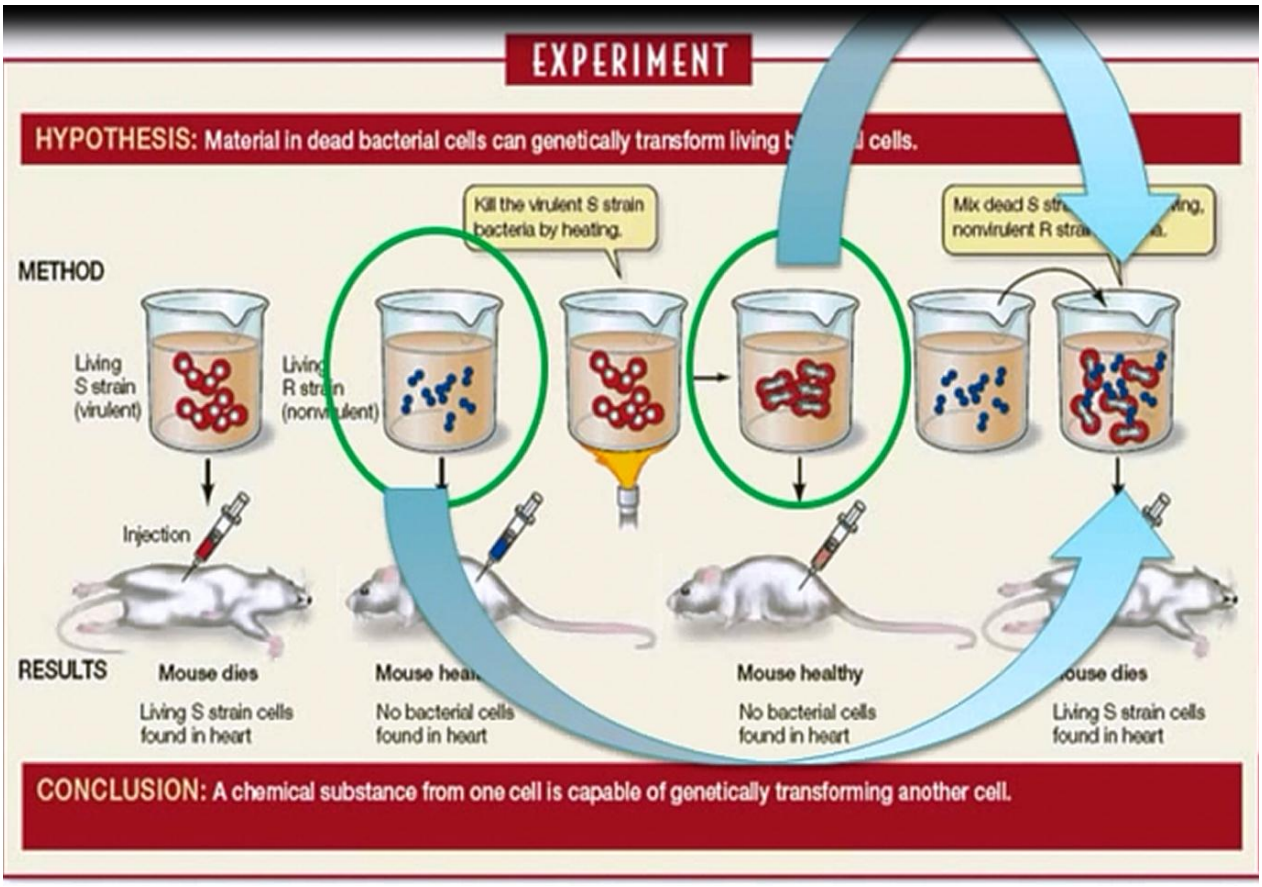
١. **أن يحتوي على جميع المعلومات الوراثية المطلوبة لإدارة وتنظيم الأنشطة الأيضية في الخلية.**
٢. له **القدرة على التناسخ بانتظام وبدقة** بحيث يمكن انتقال المعلومات وتوريثها للخلايا الناتجة من عملية الإنقسام بطريقة مضبوطه.
٣. له **القدرة على حدوث الطفرة بنسب منخفضة جداً** بحيث تحدث تغيرات وراثية يمكن توريثها إلى النسل.

وعليه تحول الإنتباه إلى DNA باعتباره هو بالفعل المادة الوراثية في معظم الخلايا الحية عدا قليل من الفيروسات حيث يكون RNA هو المادة الوراثية بها.

تم تأسيس علم **الوراثة الجينية الحقيقية** والتي تؤدي إلى علم **الوراثة الجزيئي** بناء على علم **الوراثة الكلاسيكي** لكنه **يرتكز أكثر على بنية وظيفة الجينات على المستوى الجزيئي**. مع أن الجينات تواجد على الكروموسومات وأن الكروموسومات تتكون من البروتينات والأحماض النووية DNA معاً كان أمراً معروفاً؛ إلاأن العلماء لم يعلموا أياً منهما المسؤول عن الوراثة في بادئ الأمر. وقد اكتشف **فردريك كَريفيث (Frederick Griffith)** في عام **١٩٢٨م ظاهرة التحويل الوراثي** في دراسة اطلق عليها " **تجربة كَريفيث** " (شكل ١) حيث اشارت هذه التجربة إلى إمكانية انتقال المادة الوراثية من بكتيريا ميتة إلى بكتيريا اخرى حية لا تمتلك القدرة على إحداث الإصابة حتى تتحول إلى بكتيريا يمكن ان تحدث الإصابة. وبعد ستة عشر عاماً في عام **١٩٤٤م** حدد **أسولد أفري (Oswald Avery)** الجزيء المسؤول عن التحويل بأنه الحامض النووي DNA(شكل ٢).

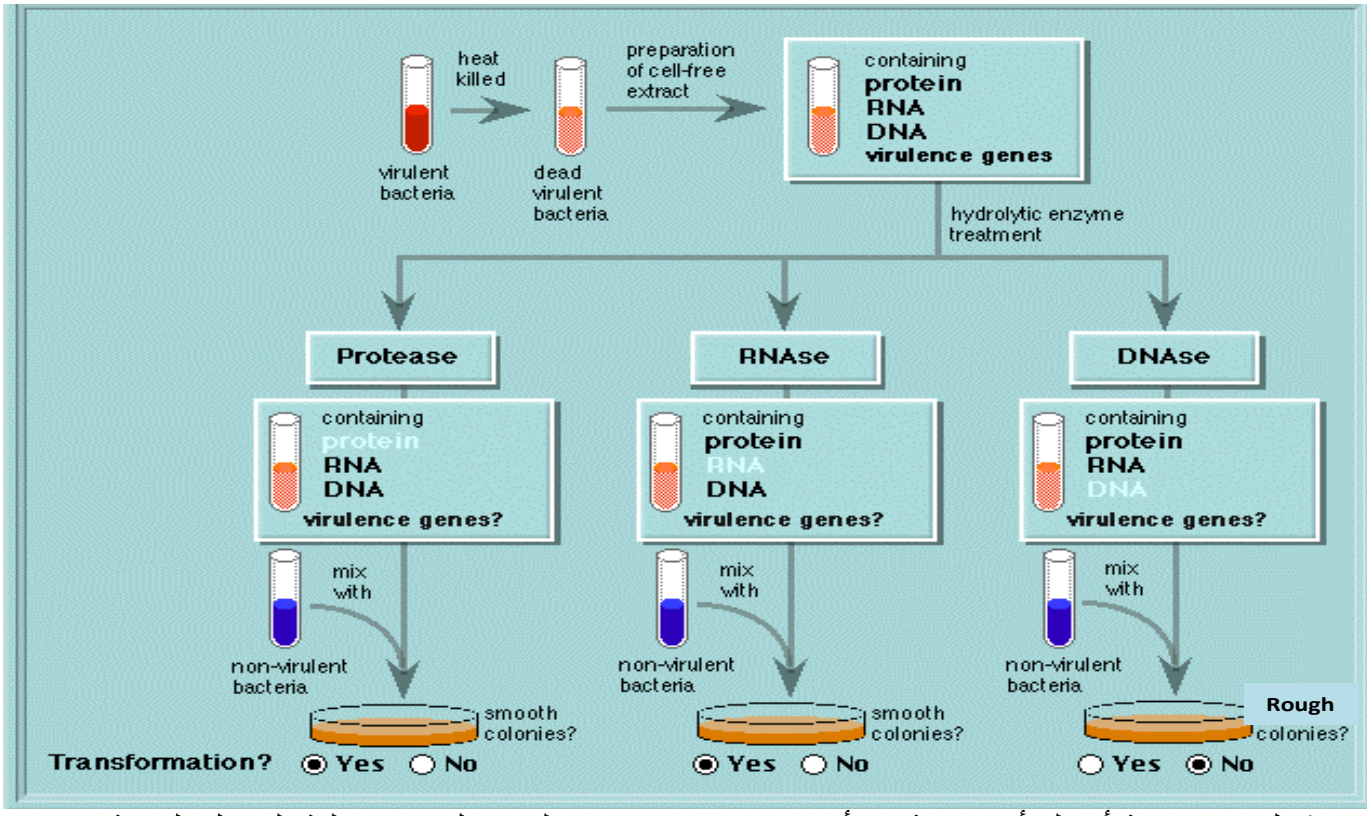
Assist.Prof. Dr.Ayoob Obaid Alfalahi
Molecular Genetic 4th Stage Field Crops Sciences

وكان قد تم التأكد من دور نواة الخلية كمستودع للمعلومات الوراثية في الكائنات الحية حقيقية النوى من قبل **جوجم هامرلنغ** (Joachim Hämmerling) في 1930s م من خلال عمله على الطحلب وحيد الخليةAcetabularia (جنس من الطحالب الخضراء)(شكل ٣).

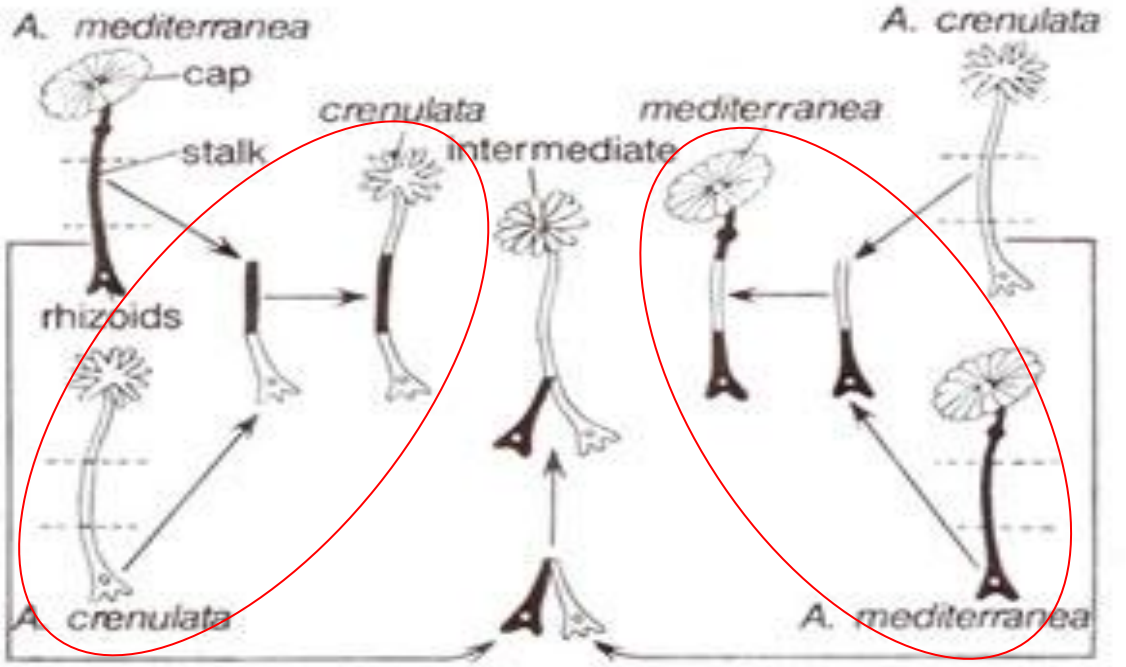


شكل ١: تجربة كرفث

Assist.Prof. Dr.Ayoob Obaid Alfalahi
Molecular Genetic/4th Stage Field Crops Sciences



شكل ٢: تجربة أسولد أفري لاثبات أن جزيء DNA هو المسؤول عن عملية التحول الوراثي



Hammerling's experiment in *Acetabularia*showing relative roles of nucleus and cytoplasm

شكل ٣: تجربة جوجم همرلنغ لاثباتدور نواة الخلية كمستودع للمعلومات الوراثية في الكائنات الحية حقيقية النوى

Assist.Prof. Dr.Ayoob Obaid Alfalahi
Molecular Genetic 4th Stage Field Crops Sciences

كما أكدت تجربة **هيرشي** Hershey **وشيز** Chase التي أُجريت في عام **1952** م أن الحامض النووي DNA وليس البروتين هو المادة الوراثية للفيروسات التي تصيب البكتيريا، مما قدم المزيد من الأدلة التي تُثبت أن الحامض النووي هو الجزيء المسؤول عن الوراثة.
حدد **جيمس واطسون وفرانسيس كريك** بنية الحامض النووي في عام **١٩٥٣**، باستخدام الأشعة السينية لعلم البلورات الذي انجز من قبل **روزاليند افرانكلين وموريس ويلكنز** وان نتائج هذه الدراسة أشارت إلى أن الحامض النووي له بنية حلزونية (على شكل لولبي). وكان **لنموذجهم الحلزوني المزدوج** اثنان من خيوط الحامض النووي مع النكليوتايدات مشيرة (المتجهه) إلى الداخل، ان كل من النكليوتايدات المكونة للحامض النووي DNA لها نيوكليوتيدة قرينة (مطابقه) على خيط آخر لتشكيل ما يشبه الدرجات على سلم مفتول. أظهرت هذه البنية المعلومات الوراثية الموجودة في تسلسل النيوكلتدات في كل شريط من الحامض النووي. مع أن بُنية DNA (الحامض النووي الريبوزي منقوص الأوكسجين) أظهرت كيفية عمل الوراثة، إلا أنه لم يكن معروفاً وقتها كيف يؤثر DNA على سلوك الخلية. وفي السنين اللاحقة، حاول العلماء أن يفهموا كيفية تحكم DNA بعملية تصنيع البروتين. فتم اكتشاف أن الخلية تستعمل DNA كقالب لتُصَنِعْ منه **مرسال الحامض النووي mRNA**، وهو **جزيء ذو تسلسل من النكليوتايدات يشبه DNA ويُستعمل لصُنع تسلسل من الأحماض الأمينية المكونة للبروتين**؛ ويعرف هذه **التحول من تسلسل النكليوتايدات إلى تسلسل الحامض الأميني بالشفرة الوراثية**. إذاً **فالعلاقة بين ترتيب النكليوتايدات وترتيب الأحماض الأمينية تدعى الشفرة الوراثية (genetic code).**

يتواجد DNA بشكل طبيعي على هيئة سلسلة مزدوجة، كل نيكلوتيد من السلسلة الأولى يقابله ويتممه نيكليوتيد من السلسلة الثانية. فكل سلسلة مفردة تقوم بعمل قالب للسلسلة الأخرى، وهذه هي آلية استنساخ DNA وانتقال الجينات. تترجم الخلية ترتيب النيكلتيدات في الجين إلى سلسلة من الأحماض الأمينية (amino acids) وهذه السلسلة تؤلف بروتين معين حيث ان ترتيب الأحماض الأمينية في البروتين تتوافق مع ترتيب النيكلتيدات في الجين.

ان الأحماض الأمينة التي تؤلف البروتين تحدد شكله الثلاثي الذي يحدد وظيفة البروتين ودوره، فتختلف بذلك البروتينات عن بعضها البعض لتلعب أدواراً مختلفة في الخلية، فالبروتينات تلعب تقريباً كافة الوظائف داخل الخلية. فتغير بسيط في DNA لجين معين يؤدي إلى تغير في الأحماض الأمينية لأحد البروتينات مما يغير شكله فتتغير وظيفته ودوره وقد يكون هذا التغير ممرض أو مميت للخلية وللكائن الحي. ومثال على ذلك مرض **فقر الدم المنجلي Sickle Cell Anemia** الناتج عن تغير لنيكلوتيد واحد مما يغير أحد الأحماض الأمينية مما يغير البروتين فيتغير دوره فتتشكل كريات دم غير قادرة على نقل الأوكسجين بشكل طبيعي فينتج عنه مرض فقر الدم المنجلي. وعلى الرغم من أن **الوراثة** تلعب دوراً في شكل وتصرفات الكائن الحي، لكن ما يمر به الكائن الحي من **تجارب** في حياته يلعب دورا كبيراً في ذلك. مثال على ذلك ان **الجينات** هي المسؤولة عن تحديد طول الشخص ولكن **التغذية والظروف** التي مر بها هذا الشخص في طفولته تؤثر وتلعب دوراً كبيراً أيضاً.

ان علم الوراثة الجزيئي يدرس العمليات الحيوية على المستوى الجزيئي مما يجعله متداخلا مع الكيمياء الحيوية وعلم الوراثة. ويمكن تعريف **علم الوراثة (Genetics) بانه العلم الذي يدرس المورثات (الجينات) وما ينتج عنهذه المورثات من تنوع الكائنات الحية وكيفية انتقال الصفات من**

Assist.Prof. Dr.Ayoob Obaid Alfalahi
Molecular Genetic 4th Stage Field Crops Sciences

الآباء إلى الابناء. وكانت مبادئ توريث الصفات مستخدمة منذ تاريخ بعيد لتحسين المحصول الزراعي وتحسين النسل الحيواني عن طريق تزويج حيوانات من سلالة ذات صفات جيدة وكمثال على ذلك **الحصان العربي الأصيل** حيث كان العرب يزاوجون الحصان والفرس الأقوياء ليحصلوا على نسل قوي واستمروا بذلك عبر السنين.

أن الإختلافات في الجين (وذلك بوجود عدة اليلات لجين معين) يؤدي إلى اختلافات في الصفات الظاهرية (phenotypic differences). وان هذه الإختلافات تعطي الوسيلة لتوضيح كيفية انتقال (transmission) الصفات من جيل إلى آخر دون توضيح كيفية انتاج هذه الصفات في عملية التطور (development) لكائن معين وهذا يُمَكِّنْ علماء الوراثة التقليدية (classical geneticists) لإيجاد علم التوريث (science of heredity) دون الإجابة على الأسئلة حول كيفية حصول هذا التطور.

ان ممارسة الوراثة التقليدية يتضمن **التحليل النظري** (theoretical analysis) لطرز الإنتقال المعقدة للصفات التي تشمل إعادة التركيب (recombination) للصفات الظاهرية (phenotypic traits). وأن تحليل هذه الطرز ينتج معلومات حول العمليات البايولوجية الأساسية مثل **ميكانيكية سلوك الكروموسومات** (chromosomal mechanics)، وكذلك يمكن الحصول على معلومات فيما يخص **الترتيب الخطي** (linear arrangement) للجينات المرتبطة بمجموعات. ولكن التوضيحاتالنظرية هذه لا تستند على المفاهيم التي تطرح الأسئلة التالية: **ما هو الجين؟ وكيف تتضاعف الجينات** (gene replication) ؟ **وماذا تعمل الجينات؟** أو **كيف تؤدي الإختلافات في الجينات (gene differences) إلى إختلافات في الصفات الظاهرية (phenotypic traits)**؟. كل هذه الأسئلة يمكن ان يجيب عليها علم الوراثة الجزيئي.

ويُعرف علم الوراثة الجزيئي **بانه فرع من علم الأحياء الحديث الذي يدرس تركيب ووظيفة المورثات (Genes) على المستوى الجزيئي ويهدف هذا العلم لفهم كيفية تناقل المعلومات الوراثية من جيل إلى آخر وكيفية حدوث طفرات وراثية في الخلايا وبين الأجيال.** ويجب التمييز بينه وبين فروع علم الوراثة الأخرى مثل علم الوراثة البيئية الذي **يدرس الوراثة في المجتمعات الطبيعية** (natural populations) وعلم **الوراثة السكانية** الذي يبحث التركيب الجيني لمجموعات من أفراد من نفس النوع (species) وكيف يحدث التغيير لهذا التركيب الجيني على مر الزمان والمكان الجغرافي. فعليه فان علم وراثة السكان يدرس **القوى التي تؤثر على التنوع الجيني للسكان ونشوء الأنواع** بتطوير نماذج رياضية وإحصائية. عليه فإن علم وراثة السكان **يهتم بدراسة توزيع تواتر الكروموسومات والتغيير تحت تأثير اربعة عمليات تطورية رئيسية هي: الانتقاء الطبيعي، الانحراف الجيني، الطفرة، وتدفق الجينات.** كما وإنه يأخذ في عين الاعتبار أيضا عوامل التقسيم مثل إعادة التركيب السكاني والهيكل السكاني.

أدى الفهم الجزيئي الحديث للوراثة إلى بداية ثورة من الأبحاث، وإحدى أهم هذه التطورات كان في عام **١٩٧٧** من قبل **فردريكس انغر** باستخدام **تكنولوجيا تسمح للعلماء بأن يقرأو تسلسل النوكلتيدات** في جزيء DNA (الحامض النووي الريبوزي منقوص الأكسجين). وفي عام **١٩٨٣** طور **كارلي بانكس موليس** تفاعل البوليميريز المتسلسل polymerase chain reaction (PCR)، مما أعطى طريقة جديدة لعزل وتضخيم جزء معين من DNA .

Assist.Prof. Dr.Ayoob Obaid Alfalahi
Molecular Genetic 4th Stage Field Crops Sciences

أن **مصطلح الوراثة الجزيئية** يشير في بعض الأحيان إلى النظرية ألأساسية القائلة أن الجينات توجه كل العمليات الحيوية (life processes) من خلال إنتاج البوليببتيدات (polypeptides) والتي هي عبارة عن الوحدات الأساسية المكونة للبروتينات، واحياناً أخرى يشير إلى **التعبير الجيني** (gene expression) **والتنظيم الجيني** (gene regulation) على المستوى الجزيئي، واحياناً اخرى يشير إلى المنهج الذي يستخدم اسلوب التحقيق من خلال تطبيق علم الكيمياء البيولوجية (biomedical science) التي تستند على إستراتيجيات التحقيق المستندة على النظرية الأساسية حول الجين.

أن كثرة إستخدام مصطلح الوراثة الجزيئية في هذه الأيام يعود إلى ان علم الوراثة المعاصر يتعامل بشكل كامل على المستوى الجزيئي. وعندما يُستخدم مصطلح الوراثة الجزيئية من قبل البايولوجون فإنهم يشيرون إلى مجموعة من التقنيات المختبرية التي تهدف الي كشف (identifying) قطعة الحامض النووي (DNA segment) المسؤولة عن بناء المادة البايولوجية (biologicalmolecules) تحت الدراسة أو حتى التلاعب بهذه القطعة من الحامض النووي لاجل تحقيق أهداف الباحث.ومن الجوانب التطبيقية لعلم الوراثة الجزيئية مثلاً: علم **الوراثة الجزيئي الإكلينيكي** (Clinical Molecular Genetics) **وهو علم يهتم بتطبيقات علم الوراثة ونقلها من المختبر إلى الفائدة التطبيقية المباشرة للإنسان، حيث يقوم الطبيب المعالج بتحليل نتائج فحص الحامض النووي DNA وعلاقة هذه النتيجة بالمريض.** ومن الأمراض التي تشخص عن طريق تحليل الحامض النووي **مرض التليف الكيسي.** ويمكن ان تساهم التقنات المستخدمة في الوراثة الجزيئية في العديد من التحسينات الحياتية خاصة في المجال الزراعي مثل في مجالات **تربية وتحسين النباتات والحيوانات** وبالتالي استخدام أصناف المحاصيل عالية الإنتاج لسد الفجوه بين الإنتاج والإستهلاك وكذلك إستخدام أدوات تشخيص الأمراض البيطرية واللقاحات. ان الاستخدام الغير صحيح للتكنولوجيا الحيوية والوراثة الجزيئية ينتج جوانب سلبية كبيرة اما اذا احسن التعامل مع هذا العلم فإنه يؤدي إلى فوائد كبيرة. ويوضح الجدول رقم ١ تلخيص لبعض الجوانب التطبيقية للوراثة الجزيئية.

References

1. Kary B. Mullis. 1990. The Unusual Origin of the Polymerase Chain Reaction. 262(4): 56-65.
2. Kenshi Hayashi, Kary B. Mullis, François Ferré, Richard A. Gibbs. 1994. The Polymerase Chain Reaction Birkhäuser Basel. P, 464.
3. Zahra M Alkhafaji and Hassan M Abu-Almaali. 2013. PCRing and Primer Design. University of Baghdad, Baghdad. P, 304.
4. Mahmood M. Refaat and Saad B. Aloutabi. 2008. Introduction to Biotechnology. The General Egyptian Association of International Books and Documents, Cairo. P, 312
5. Elsahookie, M.M., and Ayoob O. Alfalahi. 2008. Polyploidy and its relationship with plant breeding and adaptation. The Iraqi J. Agric. Sci. 39(6):49-71.
6. Elsahookie, M.M., and Ayoob O. Alfalahi. 2008. TILLING: Modern technique combines traditional mutagenesis and functional genomics. The Iraqi J. Agric. Sci. 40(1):1-25.

Assist.Prof. Dr.Ayoob Obaid Alfalahi
Molecular Genetic 4th Stage Field Crops Sciences

جدول ١: ملخص لبعض الجوانب التطبيقية لعلم الوراثة الجزيئية.

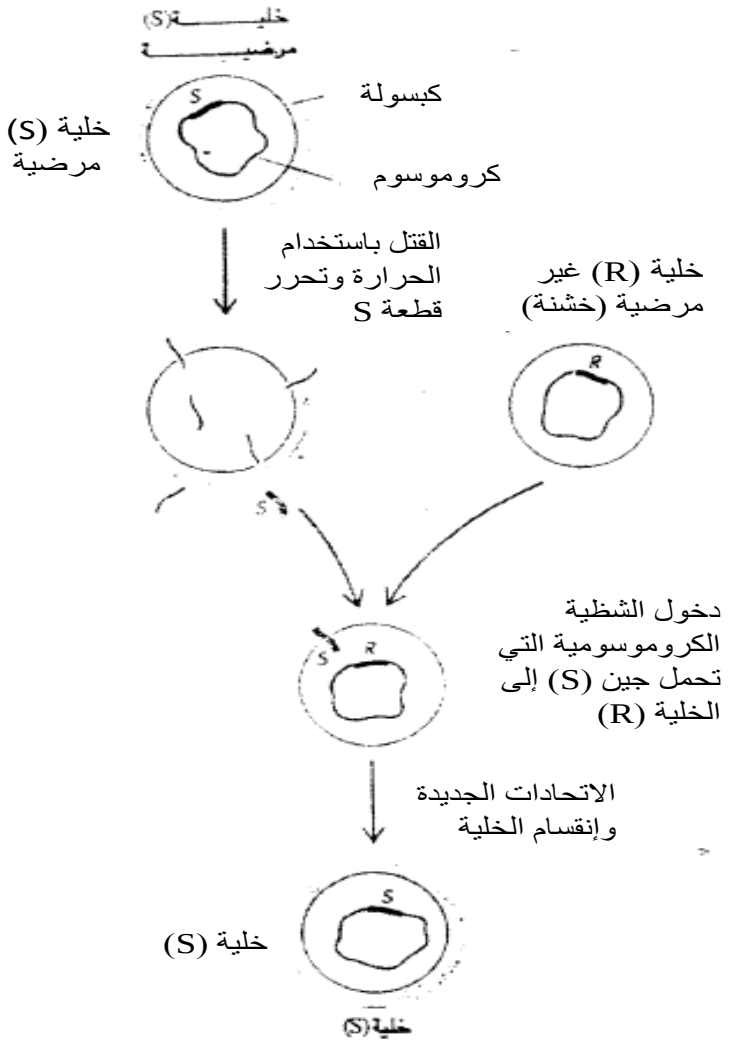
المجال	أهم التطبيقا ت
الرعاية الصحية	١. تفعيل إستخدام تقنيات التفاعل البنائي المتسلسل **PCR** في الكشف المبكر للأمراض. ٢. العلاج الجيني. ٣. صناعة الدواء بالتقنية الحيوية كما حدث في إنتاج الأنسولين البشري.
البيئة	١ .تفعيل الإستفادة من مخلفات المحروقات والحد من التلوث. ٢ .التخلص من مخلفات الصناعة. ٣ .الإستفادة من المخلفات العضوية. ٤ .تدوير إستخدام المياه.
الصناعة	١ .صناعة الدواء من المواد الكيماوية النباتية. ٢ .إنتاج المواد الكيمائية والمحفزات الحيوية.
الزراعة	١ .إنتاج نباتات محسنة وراثياً لمقاومة الأمراض والآفات خاصة المحاصيل الإقتصادية كالرز والذرة والقمح. ٢ .إنتاج نباتات محسنة وراثياً لتحمل الظروف البيئية القاسية خاصة الملوحة والجفاف لاسيما مع ظروف شحة الموارد المائية. ٣ . تطوير إنتاجية الحيوانات المزرعية. ٤ .الكشف المبكر لأمراض الحيوان.

يمكن تلخيص الأدلة على ان DNA هو المادة الوراثية في الاتي:

١. التحول الوراثي Genetic Transformation :

لقد اكتشف **فريدريك كَريفيث** في عام ١٩٢٨م ظاهرة التحويل الوراثي في دراسة اطلق عليها " **تجربة كَريفيث** " (شكل 4) حيث اشارت هذه التجربة إلى إمكانية انتقال المادة الوراثية من بكتيريا ميتة إلى بكتيريا اخرى حية لا تمتلك القدرة على إحداث الإصابة حتى تتحول إلى بكتيريا يمكن ان تحدث الإصابة. ثم بعد ستة عشر عاماً تمكن **أفري** (**Avery**) ومعاونوه عام ١٩٤٤ من التوصل إلى أن المادة الوراثية تكمن في DNA للخلية وليس في بروتينها وذلك بعد قيامهم بتجربة لها دلالات على التحول الوراثي بين سلالتين من البكتريا المسببه **للالتهاب الرئوي** في الانسان من نوع***Streptococcus pneumoniae***. حيث كانت السلالة الاولى والتي تسمى **S–type** لها القدرة على تكوين حافظة أو كبسولة من عديدات السكر (Polysaccharides) حولها مما يقيها من أجهزة الدفاع في الحيوان المصاب ويمكنها من احداث الاصابة بالمرض وقد اعطيت الاسم **S-type** (**Smooth**) لان مستعمراتها النامية على البيئة الصلبة تعطي مظهراً **املساً**. أما السلالة الاخرى المستخدمة فهي السلالة **R–type**(**Rough**) وهي سلالة طافرة (اي يوجد فيها طفرة وراثية mutation) حيث تفتقر إلى الأنزيم المسؤول عن بناء سكريات الكبسولة مما يجعل مظهر المستعمرة لهذه السلالة على البيئة الصلبة **خشناً**، وهذه السلالة تكون غير مرضية لعدم قدرتها على مقاومة الجهاز المناعي بالجسم نظراً لعدم وجود الكبسولة الواقية حولها. عندما أضاف Avery مستخلصاً نقياً من DNA للسلالة S–type بعد التخلص من البروتينات و RNA إلى مزرعة من السلالة R–type أمكنه الحصول على بعض الخلايا من نوع S–type (شكل ٤). ومن جهة أخرى فقدت السلالة S–type القدرة على تحويل السلالة R–type تماماً عندما تم تكسير DNA بالمعاملة بإنزيم DNase أي أن جزيء DNA هو المسؤول عن عملية التحول الوراثي. وكان هذا أول دليل عملي على أن DNA هو مادة الوراثة.

Assist.Prof. Dr.Ayoob Obaid Alfalahi
Molecular Genetic 4th Stage Field Crops Sciences

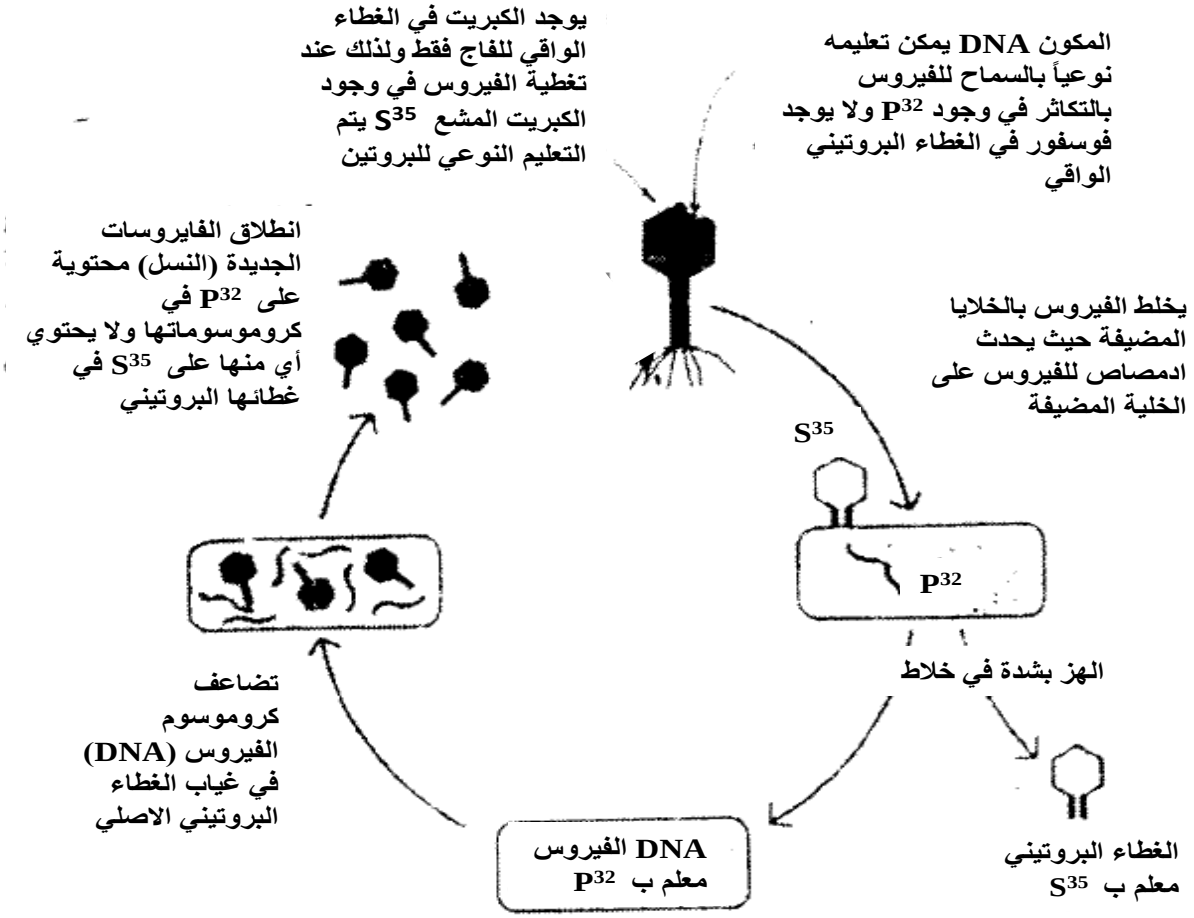


شكل ٤: مخطط يثبت تجربة التحول الوراثي لاثبات أن DNA هو المادة الوراثية حيث أضيفت صفة الكبسولة الملساء للنوع S – type ألى خلية من سلالة غير مكبسلة أي خشنة من نوع R – type فتحولت الأخيرة إلى خلايا ملساء من نوع S – type.

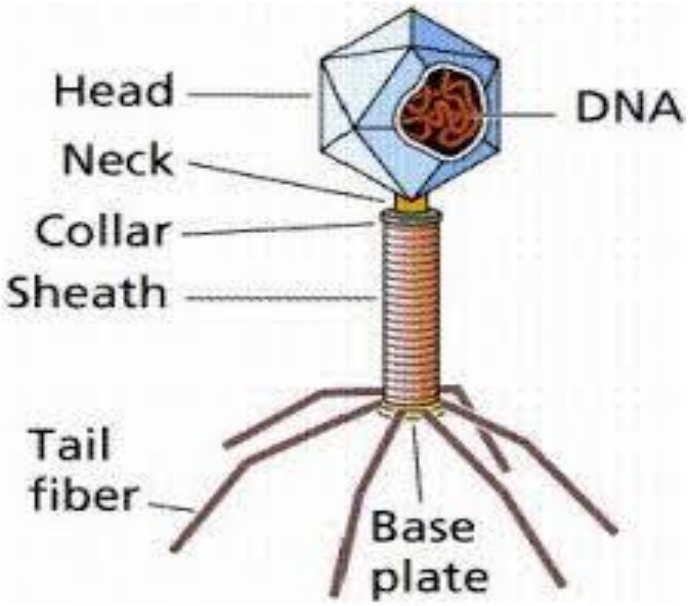
٢ ـ النقل الوراثي بواسطة الفاج Genetic Transduction :-

حيث قام **هيرشي** Hershey **وشيز** Chase عام **١٩٥٣** بعدوى بكتريا القولون اشريشيا كولاي E. Coli بالفاج T_2 (شكل ٦) بعد تعليم بروتينات الغطاء المحيط بالفاج بالكبريت المشع S^{35} في حين تم تعليم جزيء DNA الداخلي بالفوسفور المشع P^{32} ومن المعروف ان الفاج يقوم بحقن محتوياته الداخلية فقط (DNA) إلى داخل الخلية البكتيرية في حين يبقى الغطاء المغلف له معلقاً خارج الخلية المحقونة ويمكن التخلص منه بالرج بشدة في خلاط. لقد تبين أن معظم الفوسفور المشع (أي DNA الفاج) قد دخل إلى الخلية البكتيرية في حين لم تظهر آثار للكبريت المشع إلا النادر جداً والتي وجدت معلقة بالجدار الخارجي للخلية البكتيرية وقد وجد أن جميع النسل الناتج من الفاج بعد تكاثره داخل الخلية البكتيرية والذي خرج بعد تحليل الخلية البكتيرية وانفجارها يحتوي على P^{32} فوسفور مشع مصدره بالطبع DNA الفاج الأصلي ولا يحتوي أي نسل من الفاج على أي أثر من S^{35} مما يدل على ان بروتين الفاج لم يكن له أي دور في انتقال المادة الوراثية إلى النسل في حين أن DNA هو المادة الوراثية (شكل ٥). ولقد استخدم الفاج في نقل المادة الوراثية وعلى سبيل المثال نقل جين من خلية إلى خلية اخرى (شكل ٧).

Assist.Prof. Dr.Ayoob Obaid Alfalahi
Molecular Genetic 4th Stage Field Crops Sciences

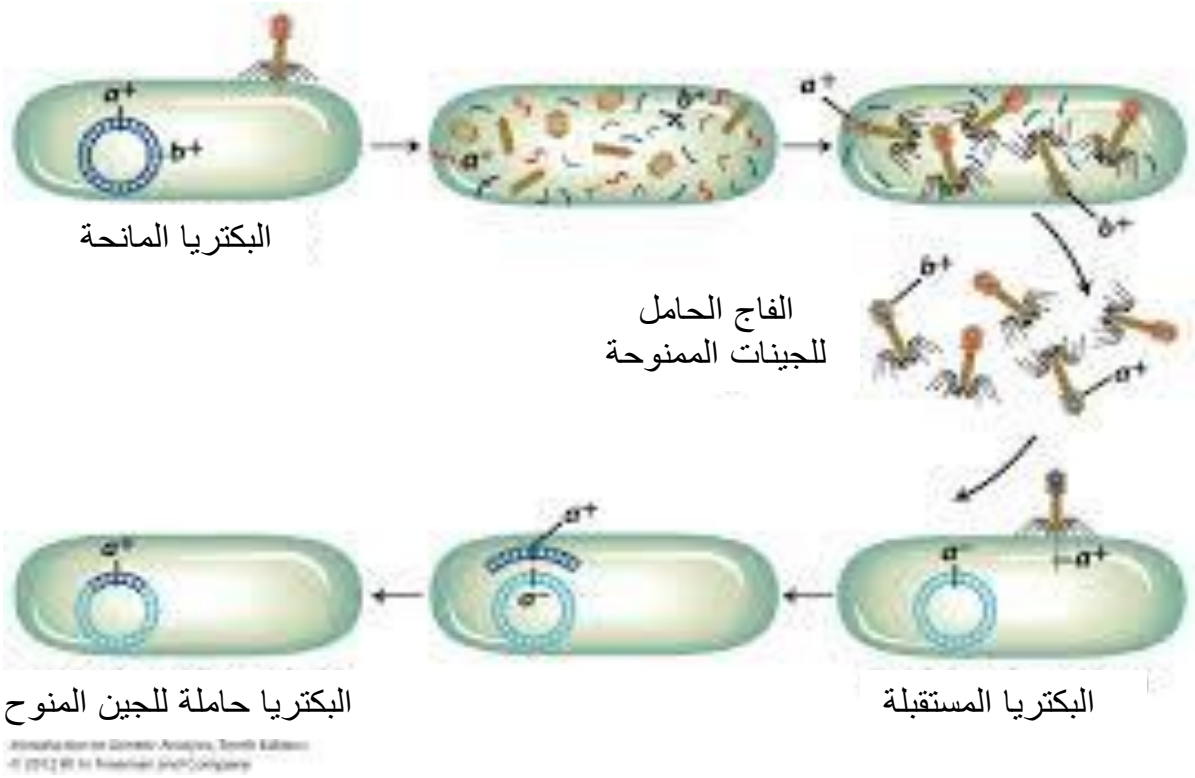


شكل 5: إثبات أن DNA للفاج T_2هو الذي يحمل المعلومات الوراثية وان الغطاء البروتيني يستخدم فقط كغطاء واقي ولا يحمل أي معلومات وراثية.



شكل 6: الفاج من نوع T_2

Assist.Prof. Dr.Ayoob Obaid Alfalahi
Molecular Genetic 4th Stage Field Crops Sciences



شكل 7: النقل الوراثي بواسطة الفاج

٣ ـ ثبات كمية DNA في الكروموسومات:

بينت الدراسات في **علم الخلية** (**Cytology**) و**علم كيمياء الخلية** (**Cytochemistry**) في الكائنات حقيقية النواة (eukaryotic) أن DNA يوجد في النواة فقط (فيما عدا DNA الميتوكوندريا والكلوروبلاست) بالاضافة إلى ذلك فقد ثبت أن كمية DNA في الخلية الثنائية العدد الكروموسومي (diploid cell) يكون ثابتاً دائماً للكائن الواحد ويساوي ضعف الكمية الموجودة في الخلية الجنسية الأحادية (haploid).بالإضافة إلى ذلك فإن DNA، بعكس البروتينات وغيرها من الجزيئات الأخرى في الخلية يكون ثابتاً أيضياً Metabolically Stable بمعنى انه **لا تجري له عملية بناء ثم هدم** بسرعة ولكن بمجرد أن يتم بناؤه في الخلية فإن DNA يظل فيها محتفظاً بخواصه طالما أن الخلية تنمو نمواً طبيعياً.

شهد عام ١٩٥٣ الميلاد الحقيقي لعلم الوراثة الجزيئية بالمعنى الحديث حين أعلن **واتسون وكريك** **Watson and Crick** نموذج الحلزون المزدوج لتفسير تركيب جزيء DNA (شكل ١٢). وذلك بعد اجرائهما لدراسات مستفيضة وكذلك تفسيرهما الصحيح للنتائج التي اظهرتها صور انحراف الأشعة السينية X – ray diffraction التي أجراها **ويلكنز** Wilkins، **وفرانكلين** Franklin لجزيء DNA وكذلك بالاستفادة من النتائج التي أعلنها **شاراجاف** **Charagaff** في ١٩٥٠s عن محتوى DNA من القواعد النيتروجينية فيما يعرف بقاعدة شاراجاف. وقد قوبل هذا النموذج في البداية بحملة من عدم التصديق الا أن البحوث والدراسات المستفيضة في هذا المجال أثبتت أن هذا النموذج هو الوحيد حتى الآن الذي يمكن على أساسه تفسير خواص المادة الوراثية وبذلك فتح الباب

Assist.Prof. Dr.Ayoob Obaid Alfalahi
Molecular Genetic 4th Stage Field Crops Sciences

على مصراعيه لتطور علم الوراثة الجزيئية. والجدول رقم ٢ يبين بعض الأحداث الهامة في مجال تطور علم الوراثة الجزيئية.

جدول ٢: أهم الإنجازات في مجال الوراثة الجزيئية.

١٨٦٩	ميشر (Miescher) عزل مادة DNA لأول مرة وأسماها نيوكلين Nuclein .
١٩٢٨	**فريدريك كَريفيث (Frederick Griffith)** إمكانية انتقال المادة الوراثية من بكتيريا ميتة إلى بكتيريا اخرى حية.
1930s	**هامرلنغ** التأكد من دور نواة الخلية كمستودع للمعلومات الوراثية في الكائنات الحية حقيقية من خلال عمله على الطحلب وحيد الخلية.
١٩٤٤	**أسولد أفري (Oswald Avery) ومعاونوه أثبتوا أن DNA هو المادة الوراثية من خلال تجارب التحول الوراثي في بكتريا القولون.**
1950s	**شاراجاف (Charagaff) اثبت العلاقة بين كمية القواعد النيتروجينية في جزيء DNA(C = G , A = T).**
1953	**هيرشي Hershey أثبت أن DNA هو المادة الوراثية في تجارب الانتقال الوراثي (انتقال بالفاج).**
1953	**جيمس واطسون وفرانسيس كريك Watson and Crick أعلان نموذج الحلزون المزدوج لتركيب جزيء DNA.**
1957	كورنبيركَ Kornberg إكتشاف انزيم بلمرة جزيءDNA(DNA Polymerase).
1961	مارمور ودوتي Marmur and Doty أكتشاف خاصية إعادة الاتحاد (Renaturation) في جزيء DNA المدنتر (Denatured) مما فتح المجال لعملية التهجين بين جزيئات الاحماض النووية.
١٩٦٢	اربر Arber أعطى اول دليل على وجود انزيمات القطع المحددة DNA (Restriction endonucleases)مما أدى بعد ذلك إلى تنقيتها واستخدامها في دراسة تتابع DNA بواسطة ناثان وسمث (Nathan and Smith).
١٩٦٦	نيرنبيرك واوكوه وخورانا (Nirenberg, Ochoa and Khorana) فك الشفرة الوراثية (Genetic Code).
١٩٦٧	جيليرت Gellert اكتشاف انزيم اللحام (DNA ligase) الذي يستخدم في وصل شظايا DNA ببعضها.
١٩٧٠	تيمن و ميتزوتاني وبالتيمور Temin, Mizutani and Baltimore اكتشاف انزيم الاستنساخ العكسي (Reverse Transcriptase) الذي أدى فيما بعد إلى الحصول على جينات تركيبية (cDNA) Synthetic genes.
١٩٧٢ - ١٩٧٣	تطور تقنيات كَلوَنَه DNA في معامل Beng, Cohen and Boyer
١٩٧٧	**فردريك سانغر** استخدام تكنولوجيا تسمح بقراءة تسلسل النوكلتيدات في جزيء DNA (الحامض النووي الريبوزي منقوص الأكسجين)
١٩٨١ - ١٩٨٢	Palmiter & Brinster انتاج فئران محوله وراثياً. كما أنتج Spardling دروسوفيلا محوله وراثياً.
١٩٨٣	**كاريبانكس موليس** طور تفاعل البوليميريز المتسلسل polymerase chain reaction (PCR).
١٩٨٣	Cech & Altman (حصلا على جائزة نوبل عام ١٩٨٩) أثبتا أن RNA يمتلك خواص انزيمية.
١٩٨٨	اختيار Watson كمنسق عام لمشروع الجينوم البشري.
١٩٨٩	اللجنة الإستشارية للمعهد القومي للصحة لبحوث DNA توافق لأول مرة على تجربة نقل جين بشري.
١٩٨٩	استطاع Collins & Tsui ومعاونوهما أن يستنسخو أي يكلونو (Clone) جين التليف الحويصلي وهو الجين الذي يؤدي أليله الطافر إلى موت طفل من كل ٢٠٠٠ طفل في الولايات المتحدة ،

Assist.Prof. Dr.Ayoob Obaid Alfalahi
Molecular Genetic 4th Stage Field Crops Sciences

	ويدعى هذا المرض بمرض الطفولة المميت.

تركيب جزيء DNA (DNA Structure)

قبل أن نتطرق إلى تركيب جزيء DNA (الحلزون المزدوج) يجدر بنا أولاً أن نتعرف على المكونات الكيميائية للأحماض النووية بنوعيها DNA وRNA نظراً للأدوار الرئيسية التي تقوم بها هذه الاحماض في حفظ المادة الوراثية ونقلها من جيل إلى جيل.

ألأحماض النووية Nucleic Acids :-

تلقى الأحماض النووية عظيم الإهتمام في الدراسات والبحوث في الحقبة الحالية لما أحدثتة من ثورة في العلوم البيولوجية. ولاشك ان هذه الثورة العلمية التي نعيشها الآن في مجال دراسات الأحماض النووية (شكل ٨) سيكون لها أبلغ الأثر في حياة الإنسان في القرن الحادي والعشرين.

أنواع الأحماض النووية Types of Nucleic Acids :-

١. حامض الديوكسي رايبونيوكلييك **Deoxyribonucleic acid (DNA)**
٢. حامض الرايبونيوكلييك**Ribonucleic acid (RNA)**

Assist.Prof.Dr.Ayoob Obaid Alfalahi

Molecular Genetic 4th Stage Field Crops Sciences

References

1. Kary B. Mullis. 1990. The Unusual Origin of the Polymerase Chain Reaction. 262(4): 56-65.
2. Kenshi Hayashi, Kary B. Mullis, François Ferré, Richard A. Gibbs. 1994. The Polymerase Chain Reaction Birkhäuser Basel. P, 464.
3. Zahra M Alkhafaji and Hassan M Abu-Almaali. 2013. PCRing and Primer Design. University of Baghdad, Baghdad. P, 304.
4. Mahmood M. Refaat and Saad B. Aloutabi. 2008. Introduction to Biotechnology. The General Egyptian Association of International Books and Documents, Cairo. P, 312
5. Elsahookie, M.M., and Ayoob O. Alfalahi. 2008. Polyploidy and its relationship with plant breeding and adaptation. The Iraqi J. Agric. Sci. 39(6):49-71.
6. Elsahookie, M.M., and Ayoob O. Alfalahi. 2008. TILLING: Modern technique combines traditional mutagenesis and functional genomics. The Iraqi J. Agric. Sci. 40(1):1-25.

ويوجد ثلاثة انواع من الحامض النووي **RNA** وهي:-

a. **الحامض النووي الرسول mRNA** ويقوم بنقل الشفرة الوراثية من الجينات في النواة إلى الرايبوسومات، ليتم تصنيع البروتينات المختلفة داخل السيتوبلازم.
b. **الحامض النووي الناقل tRNA** ويقوم بنقل الأحماض الأمينية في السيتوسول إلى الرايبوسومات لاستخدامها في عملية بناء البروتينات.
c. **الحامض النووي الرايبوسومي rRNA** يستخدم في إنتاج الرايبوسومات في النوية داخل نواة الخلية.

وقبل التطرق بشئ من التفصيل إلى وظيفة تلك الأنواع من الأحماض النووية، يجب معرفة اهم الفروقات بين تلك الأحماض (الجدول ٣).

جدول ٣: الفرق بين الحاض النووي **DNA** والحامض النووي **RNA**.

وجه المقارنة	الحامض النووي DNA	الحامض النووي RNA
وجوده	النواة بشكل رئيسي ويتواجد بشكل بسيط في والمايتوكوندريا والكلوروبلاست	النواة والسايتوبلازم
الوظيفة	المادة الوراثية ومكون للكروموسومات	يساعد DNAفي الوظيفة
أنواعه	ليس له أنواع	١. الحامض النووي الرسول **mRNA** ٢. الحامض النووي الناقل **tRNA** ٣. الحامض النووي الرايبوسومي **rRNA**
السكر الخماسي	الديوكسي رايبوز	الرايبوز
القواعد النيتروجينية	الأدنين – **الثايمين** – الكَوانين - السايتوسين	الأدنين – **اليوراسيل** – الكَوانين - السايتوسين
الشكل	ثنائي حلزوني الشكل (Double helix) ويتكون من سلسلتين من متعدد النكليوتايدات	يتكون من خيط واحد من النكليوتايدات المتعددة

تعد الأحماض النووية من الجزيئات الكبيرة الحجم نسبياً وذات أهمية بيولوجية قصوى. تحتوي معظم الكائنات الحية على كميات متفاوتة من الأحماض النووية بنوعيها DNA وRNA في حين أن بعض الفايروسات لايوجد بها الا DNA والبعض الآخر لا يحتوي إلا على RNA فقط. يوجد DNA في الكائنات الحقيقية النواة (Eukaryotic) داخل النواة في حين يتكون RNA في النواة ثم يمر منها إلى السايتوبلازم حيث يتم بناء البروتين على الرايبوسومات.

Assist.Prof. Dr.Ayoob Obaid Alfalahi
Molecular Genetic 4th Stage Field Crops Sciences

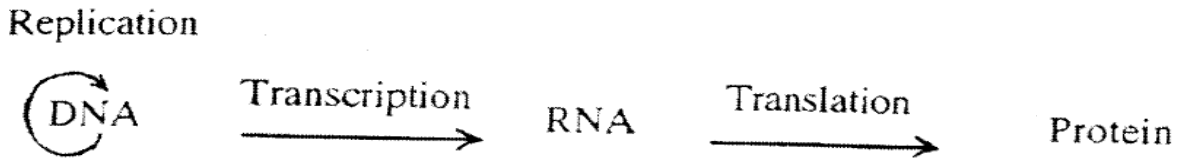
يتكون جزيء الحامض النووي من **سكر خماسي** (رايبوز في حالة RNA ، وديوكسي رايبوز في حالة الـ DNA) و**حامض الفوسفوريك** و**قواعد نيتروجينية** وهي اما من نوع **البيورين** (Purine) مثل أدينين adenine (A) وكَوانين guanine (G) وهي ثنائية الحلقة أو من نوع **البايريميدين** (Pyrimidine) مثل السايتوسين cytosine (C) والثايمين thymine (T) وهي احادية الحلقة. وكذلك اليوراسيل uracil (U) في حالة RNA.

يؤدي التحليل المائي الكامل لجزيء DNA إلى :-

DNA ——— سكر خماسي + قواعد نتروجينية + حامض فوسفوريك

(A, G / T, C) (ديوكسي ريبوز)

يعتبر الـ DNA من المكونات الأساسية للكروموسومات وهو يمثل المادة الوراثية لمعظم الكائنات الحية، وهو المادة الموجهة لعمليات إنتقال الصفات الوراثية من الآباء إلى الذرية، لذلك يعد DNA المخزن الرئيسي للمعلومات الوراثية وان لهذا الجزيء القدرة على مضاعفة نفسه (Self-duplication) بنفس تركيبه السابق. ويتم استنساخ (Transcription) المعلومات الوراثية الموجودة في جزيء DNA إلى استنساخ (Copies) من RNA الذي يحتوي تتابع نيوكلتيداته على الشفرات "الثلاثية الأحرف" الخاصة بتتابع الأحماض الأمينية عندما يتم بناء البروتينات في عملية تعرف بالترجمة (Translation) لهذه الشفرات. **يطلق على تتابع أو سير هذه الأحداث البيولوجية الهامة اسم المبدأ المركزي (Central Dogma)** ويمكن تلخيصها كالآتي:-

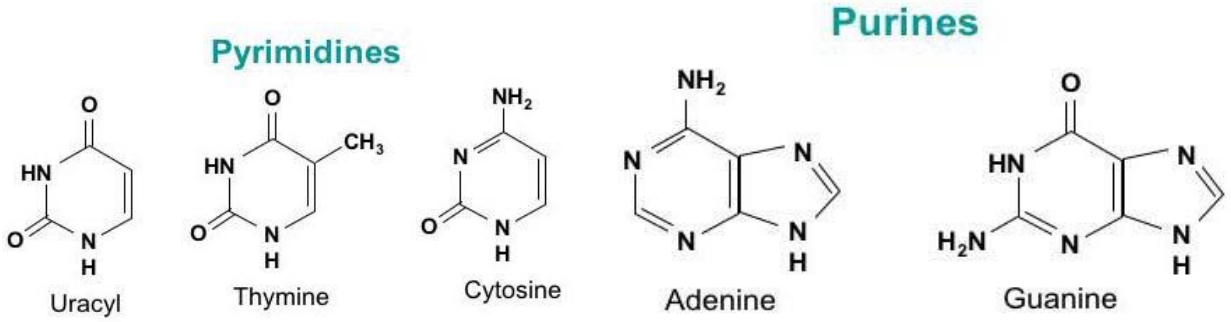


حيث يشير السهم الدائري حول DNA إلى قدرته على التناسح الذاتي، في حين يتم استنساخ جزيء RNA على قالب من DNA وتتم عملية بناء البروتين بالاعتماد على تتابع القواعد (الشفرات) في جزيء DNA التي يقال لها انها تترجم إلى تتابع مقابل من الأحماض الأمينية التي يتم ربطها على الرايبوسوم بروابط بيبتيدية.

ففي عام ١٩٥٣ ، قدم البيولوجيان **جيمس واطسون** James Watson (الأمريكي) **وفرنسيس كريك** Francis Crick (البريطاني) بالتعاون مع عالم الفيزياء الحيوية **موريس ولكنز** Maurice Wilkins (النيوزلندي) في جامعة كامبريدج في انكلترا نموذجاً يوضح التركيب الجزيئي لحامض DNA . وحسب هذا النموذج تترتب النكليوتايدات على صورة شريطين two strands متكاملين complementary ويلتفان حول بعضهما فيكونان حلزوناً مزدوجاً طويلاً سمكه ٢ نانومتر، وطول اللفة الكاملة منه ٤.٣ نانومتر ويتكون جزيء الحامض من عدة آلاف من هذه اللفات.

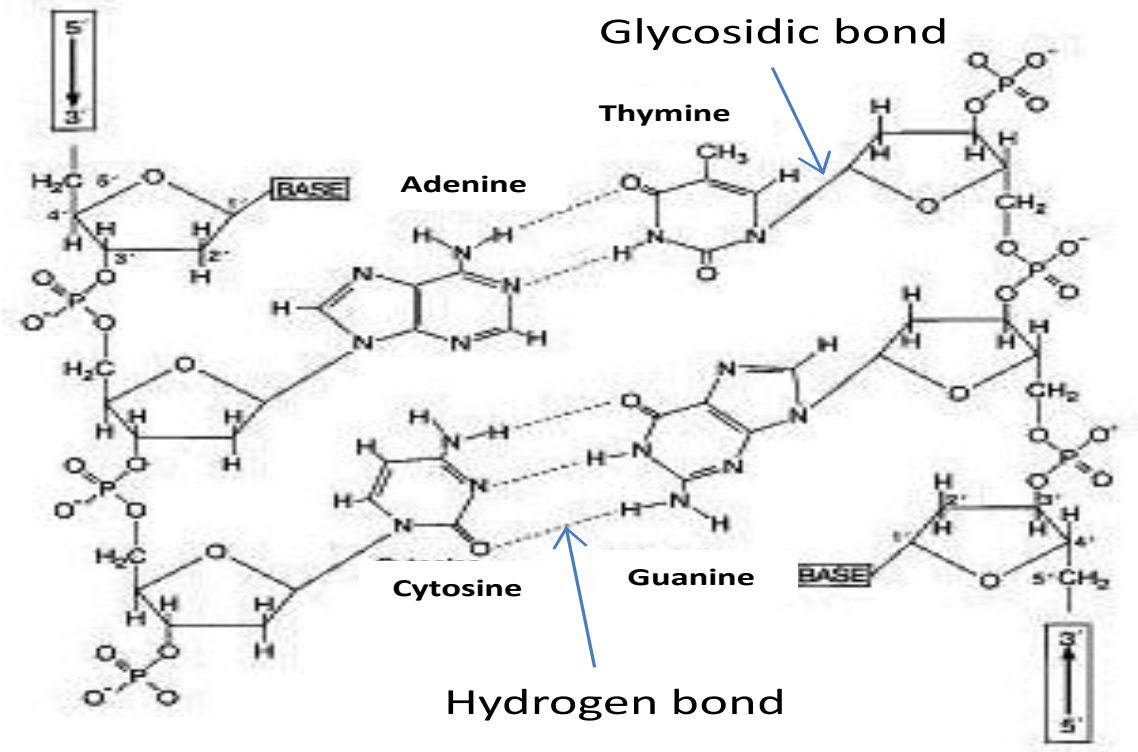
Assist.Prof. Dr.Ayoob Obaid Alfalahi
Molecular Genetic 4th Stage Field Crops Sciences

يتكون جزيء الحامض النووي من متعدد خطي من الوحدات البنائية الأساسية التي يطلق على كل منها نيوكليوتايد Nucleotide وتتكون النيوكليوتيدة من:١- **مجموعة فوسفاتية** ٢- **وسكر خماسي** ٣- **وقاعدة نايتروجينية** والتي تكون على طرازين: أحدهما هو البيورينات Purines وهي مركبات عضوية ثنائية الحلقات وهي الأدنين Adenine والگوانين Guanine، أما الطراز الثاني فهو البيريميدينات Pyrimidines وهي مركبات عضوية أحادية الحلقة وهي الثايمين Thymine والسايتوسين Cytosine (شكل ٩) وترتبط النكليوتايدات مع بعضها بروابط **فوسفو ايسترية ثنائية** (Phosphodiester bond) (شكل ١٠). تصل هذه الرابطة ذرة كربون رقم '5في السكر الخماسي للنيوكلتيد بذرة كربون رقم '3 في السكر الخماسي للنيوكليوتيدة التالية لها. وعلى ذلك فإن الهيكل الأساسي للحامض النووي DNA يتكون من تعاقب السكر الخماسي مع حامض الفوسفوريك في حين تتصل القواعد النيتروجينية بهذا السكر برابطة **گلايكوسيدية** (glycosidic bond) كما في الشكل ١٠ و ١١. لذا فمن الممكن تكوين عديد النكليوتايدات بأي طول كان. وأن النكليوتايدات يمكنها أن ترتبط مع بعضها بأي طراز. ومهما كان طول هذه السلسلة فلها نهايتين، النهاية الخامسة The 5`end والتي لها ذرة الكربون الخامسة والنهاية الثالثية The 3`end والتي لها ذرة الكربون الثالثة والتي لا ترتبط بنيوكليوتيد آخر.

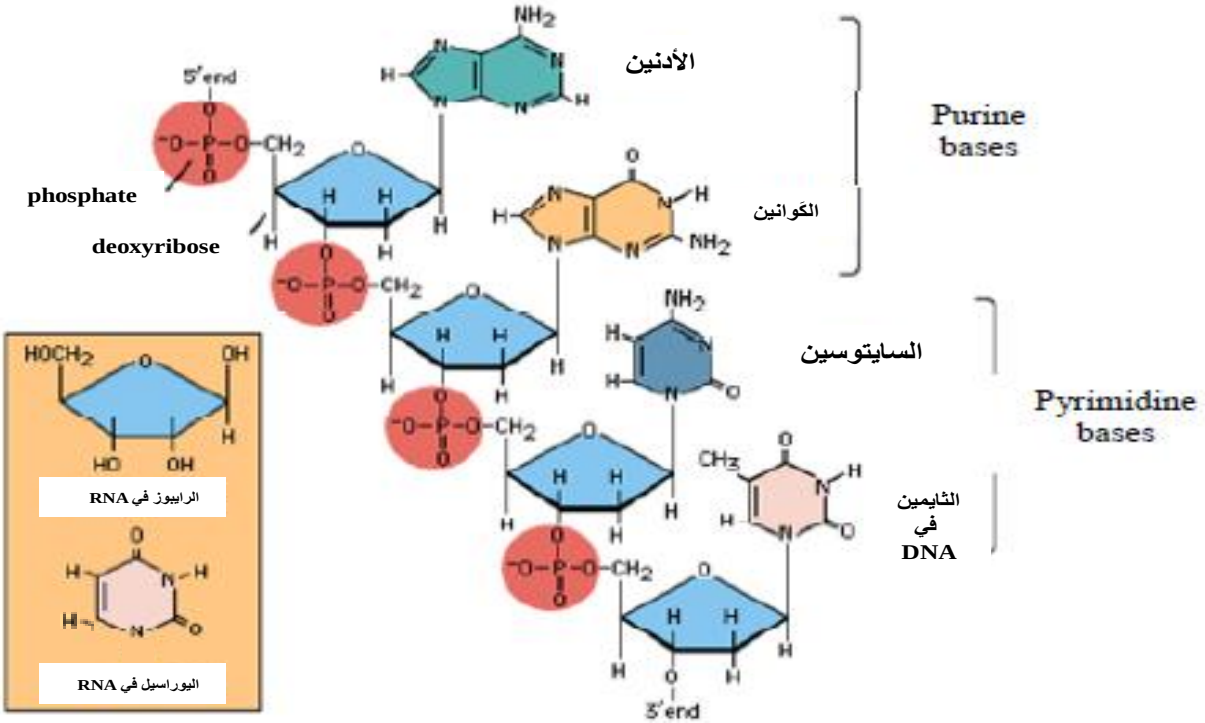


شكل 9: انواع القواعد النيتروجينية المختلفة الموجودة في النيوكليوتايدات والتي هي الوحدات البنائية الأساسية التي يتكون منها جزيء الحامض النووي DNA.

Assist.Prof. Dr.Ayoob Obaid Alfalahi
Molecular Genetic/4th Stage Field Crops Sciences

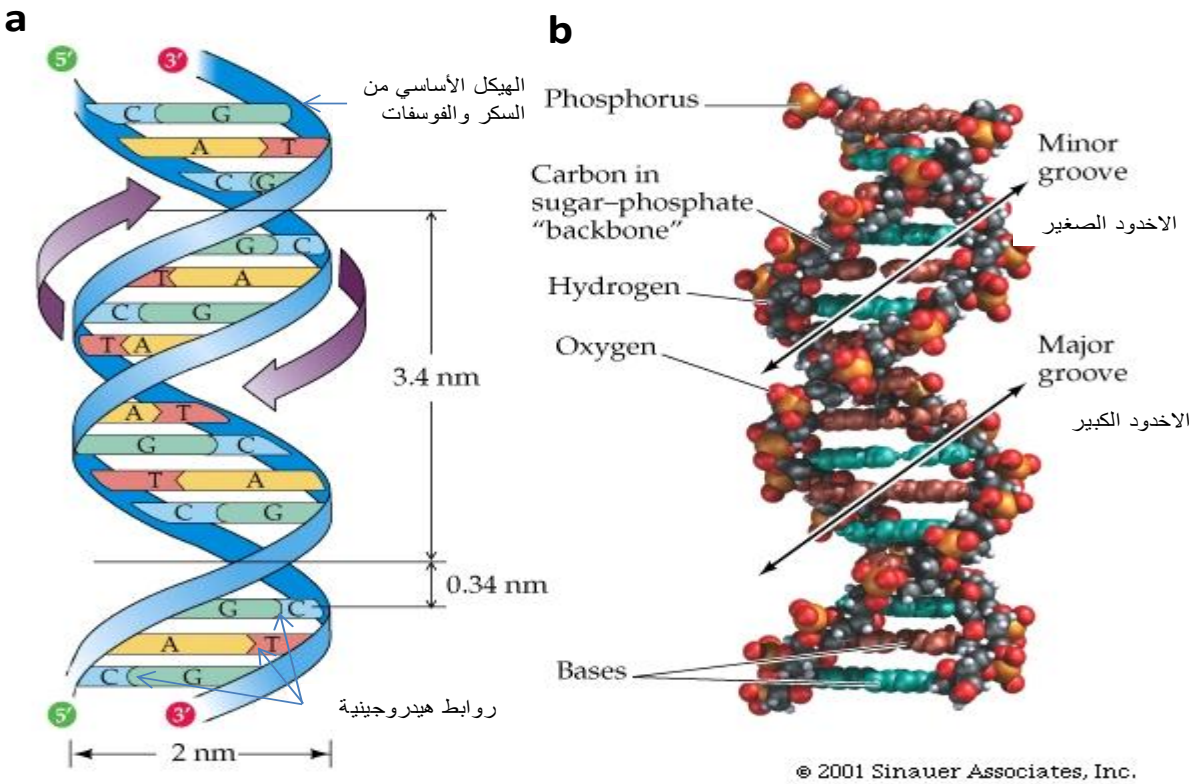


شكل 10: الهيكل الأساسي للحامض النووي DNA.



شكل 11: التركيب الجزيئي للمادة الوراثية في شريط DNA.

Assist.Prof. Dr.Ayoob Obaid Alfalahi
Molecular Genetic 4th Stage Field Crops Sciences



شكل12: نموذج الحلزون المزدوج لجزيء DNA. تتزاوج (تلتف) سلسلتان متكاملتان في تتابعات النكليوتايدات ومتضادتان في الإتجاه على شكل حلزون مزدوج يميني الدورة. حيث شكل a يمثل رسماً تخطيطياً للنموذج والشكل b يمثل نموذجاً فراغياً.

قاعدة شاراجاف Charagaff لتزاوج القواعد النيتروجينية:-

قام شاراجاف عام ١٩٤٩ – ١٩٥٣ بتحليل محتوى جزيء DNA من القواعد النيتروجينية في عدد كبير من الكائنات الحية المختلفة (الجدول ٤) وقد وجد ان القواعد الأربعة **لا توجد بكميات متساوية** كما ان **نسبتها تختلف من نوع من الكائنات إلى النوع الآخر** مما أدى إلى الاعتقاد بان **تتابع القواعد النيتروجينية في جزيء DNA أكثر اهمية من كمياتها أو مقدارها في تحديد خصائصها الوراثية**.

جدول ٤: البيانات التي أدت إلى استنباط قاعدة شاراجاف.

مصدر DNA	نسب القواعد				
	A/G	T/C	A/T	G/C	Purine/Pyrimidine
الثور	1.29	1.43	1.04	1.00	1.10
الإنسان	1.56	1.75	1.00	1.00	1.00
الدجاجة	1.45	1.29	1.06	0.91	0.99
سمك السالمون	1.43	1.43	1.02	1.02	1.02
نبات القمح	1.22	1.18	1.00	0.97	0.99
فطر الخميرة	1.67	1.92	1.03	1.20	1.00
فيروس الانفلونزا	1.74	1.54	1.07	0.91	1.00

Assist.Prof. Dr.Ayoob Obaid Alfalahi
Molecular Genetic 4th Stage Field Crops Sciences

بكتريا القولون (K_2)	1.05	0.95	1.09	0.99	1.00
البكتريا السبحية	0.40	0.40	1.09	1.08	1.10

كما اثبتت نتائج شاراجاف أيضاً أن **نسب القواعد النيتروجينية الأربعة ليست عشوائية** على الإطلاق حيث تبين أن كمية الأدنين (A) في جميع العينات تساوي كمية الثايمين (T) في حين تساوت كمية السايتوسين (C) مع كمية الكَوانين (G). وقد ساعدت هذه القاعدة البيولوجية الهامة في فهم التركيب الثلاثي الأبعاد (المُجَسَّمْ) لجزيءDNA في الحلزون المزدوج.

مواصفات الحامض النووي DNA Characteristics :-

تم التعرف على معلومات هامه عن تركيب الحامض النووي DNA عن طريق حيود أشعة أكس X-ray diffraction أي انحراف أشعة أكس إنحرافاً ضئيلاً عند مرورها بحواف الحامض النووي كما ذكر العالمان **روزالين فرانكلين** Rosalin Franklin **وويلكنز** Wilkins بتحليل صور انحراف أشعة X لجزيئات DNA في فترة من ١٩٥٠ – ١٩٥٢ لتوضيح انموذج الحلزون المزدوج لجزيء DNA (DNA Double Helix). فحيود أشعة أكس هي بمثابة طريقة فعالة لتقدير المسافات بين الذرات الموجودة في جزيئات متراصة بانتظام (تركيب متعاقب من البلورات). ولأشعة أكس طول موجة قصير جداً لدرجة أنها تتبعثر بواسطة الإلكترونات المغلفة للذرة في الجزيء. والذرات التي لها سحابة إلكترونية كثيفة مثل الفوسفور Phosphorus والأوكسجين Oxygen تسبب إنحراف الأشعة بقوة أكبر مقارنة بالذرات ذات العدد الذري الأقل.

من المعروف أنه عند تعريض التركيب البلوري للحامض النووي أشعة أكس المكثفة يحدث أن يسبب التركيب المنتظم للذرات في البلورة إلى حيود أشعة أكس أو إلتوائها في اتجاهات معينة. ونظام حيود أشعة أكس هذا يمكن رؤيته في فيلم ضوئي (فيلم تصوير) كنقاط معتمه (شكل ١٤). وعن طريق التحليل الرياضي Mathematical analysis لترتيب النقاط المعتمه والمسافة بينها يمكن ان يستخدم لتقدير المسافة بين الذرات واتجاه هذه الذرات داخل الجزيء بدقة كاملة.

وعندما سعى العالمان واطسون وكريك لحل مشكلة تركيب الحامض النووي DNA كانت **روزاليند فرانكلين** قد صورت بالفعل عن طريق أشعة أكس X-ray فيلماً لنموذج الحامض النووي DNA والصورة أظهرت بوضوح أن الحامض النووي DNA عبارة عن تركيب حلزوني الشكل، وأن هناك **ثلاثة أنواع هامة من النماذج المنتظمة والمتعاقبة** في الجزيء والتي لها أبعاد ٤.٣ نانومتر، ٢ نانومتر. ومن هذا النموذج توصلت فرانكلين إلى أن القواعد النيوكليوتيدية Nucleotide bases (والتي هي عبارة عن جزيئات مسطحة) هي عبارة عن رفوف متراصة فوق بعض مثل درجات السلم المتراصة فوق بعضها. وباستخدام هذه المعلومة بدأ العالمان واطسون وكريك بوضع عدة نماذج لمكونات الحامض النووي DNA مع محاولة توفيقهم مع بعض ليتفقوا مع البيانات المأخوذة من تجارب **روزاليند فرانكلين**. وبعد عدة تجارب قاما العالمان بوضع نموذج للحامض النووي DNA يتكون من سلسلتين من عديد النيوكليوتيد two nucleotide chains ملتفين حول بعضهما في صورة حلزون مزدوج. ونجد أيضاً أن السكر والفوسفات المكونين للعمود الفقري للسلسلتين يكونا الجدار الخارجي للحلزون، أما القواعد المتصلة بكلتا السلسلتين فتوجد في الوسط.

Assist.Prof. Dr.Ayoob Obaid Alfalahi
Molecular Genetic 4th Stage Field Crops Sciences

وفي نفس الوقت أمكن تحديد الروابط الفوسفواستيرية الثنائية التي تربط بانتظام بين النكليوتايدات في سلسلة DNA كما كان لقاعدة إرون شاراجاف (Erwin chargaff) اهمية كبيرة في التوصل إلى معرفة العلاقة بين القواعد النيتروجينية في جزيءDNA ذو التركيب الحلزوني المزدوج. أدى ذلك وغيره من الأبحاث إلى إعلان واتسون Watson وكريك Crick عام ١٩٥٣ عن نموذج الحلزون المزدوج لتفسير تركيب جزيء DNA بحيث توفرت في هذا النموذج الخواص والشروط المطلوبة للمادة الوراثية.

يتكون جزيء DNA حسب هذا النموذج من سلسلتين متكاملتين من متعددات النكليوتايدات ملتفة أو متحلزنة كل حول الأخرى بانتظام في شكل لولب مزدوج **يميني الإتجاه**. وتتكون كل سلسلة في هذا الحلزون من عديد من النكليوتايدات المرتبطة بروابط فوسفواستيرية ثنائية بين السكر والفوسفات في حين ترتبط القواعد النيتروجينية بالسكر برابطة كَلايكوسيدية (glycosidic bond) وتكون متعامدة على المحور الاساسي للجزيء وموجودة إلى الداخل بحيث تتقابل القواعد النيتروجينية من احدى السلسلتين مع القواعد المكملة لها في السلسلة المقابلة حسب قاعدة إرون شاراجاف (A=T,C=G). كذلك وجد ان القواعد النيتروجينية تكون مفلطحة واسطحها كارهة للماء مما يجعلها تتلاسق بقوى يطلق عليها قوى التراص (Stacking forces). ترتبط القواعد المتقابلة بين السلسلتين بروابط هيدروجينية بحيث ترتبط G مع C بثلاث روابط هيدروجينية في حين ترتبط A مع T برابطتين فقط (شكل ١٣).

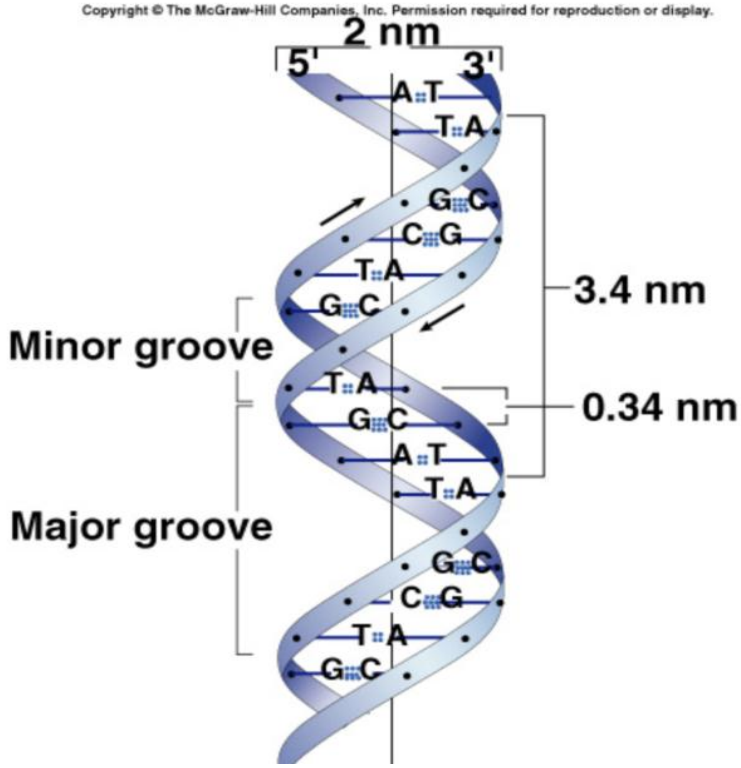
وقد وجد ان هذه التزاوجات بين القواعد هي الوحيدة الممكنة نظراً لأن تقابل قاعدتين من نوع البيورين (ثنائية الحلقة وكبيرة الحجم نسبياً) سيحتل فراغاً كبيراً بحيث لا يسمح بتكوين حلزون منتظم ومن جهة أخرى سيؤدي تقابل قاعدتين من نوع البيرميدين معاً إلى شغل فراغ صغير نسبياً مما يؤدي إلى خلخلة غير مرغوبة في الحلزون.

References

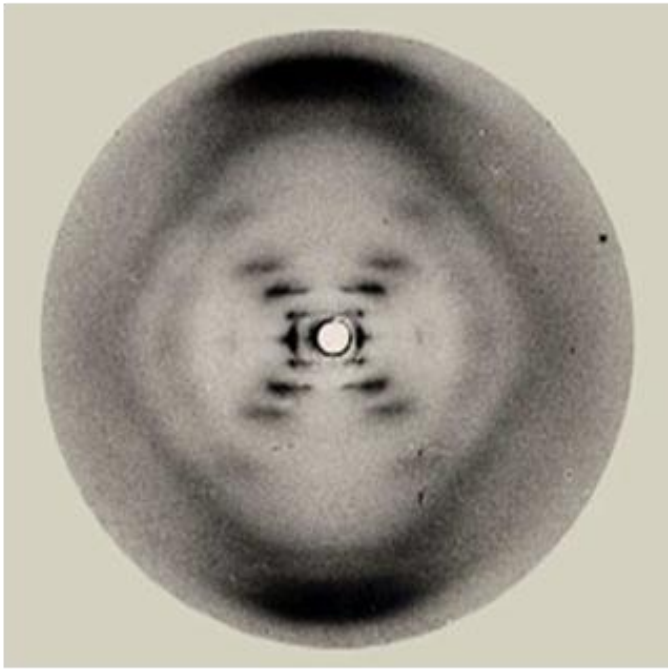
1. Kary B. Mullis. 1990. The Unusual Origin of the Polymerase Chain Reaction. 262(4): 56-65.
2. Kenshi Hayashi, Kary B. Mullis, François Ferré, Richard A. Gibbs. 1994. The Polymerase Chain Reaction Birkhäuser Basel. P, 464.
3. Zahra M Alkhafaji and Hassan M Abu-Almaali. 2013. PCRing and Primer Design. University of Baghdad, Baghdad. P, 304.
4. Mahmood M. Refaat and Saad B. Aloutabi. 2008. Introduction to Biotechnology. The General Egyptian Association of International Books and Documents, Cairo. P, 312
5. Elsahookie, M.M., and Ayoob O. Alfalahi. 2008. Polyploidy and its relationship with plant breeding and adaptation. The Iraqi J. Agric. Sci. 39(6):49-71.
6. Elsahookie, M.M., and Ayoob O. Alfalahi. 2008. TILLING: Modern technique combines traditional mutagenesis and functional genomics. The Iraqi J. Agric. Sci. 40(1):1-25.

Assist.Prof. Dr.Ayoob Obaid Alfalahi
Molecular Genetic 4th Stage Field Crops Sciences

Copyright © The McGraw-Hill Companies, Inc. Permission required for reproduction or display.



الشكل 13: يوضح الاخدودان المتكونان على طول المحور الأساسي لسلسلتي الحلزون المزدوج



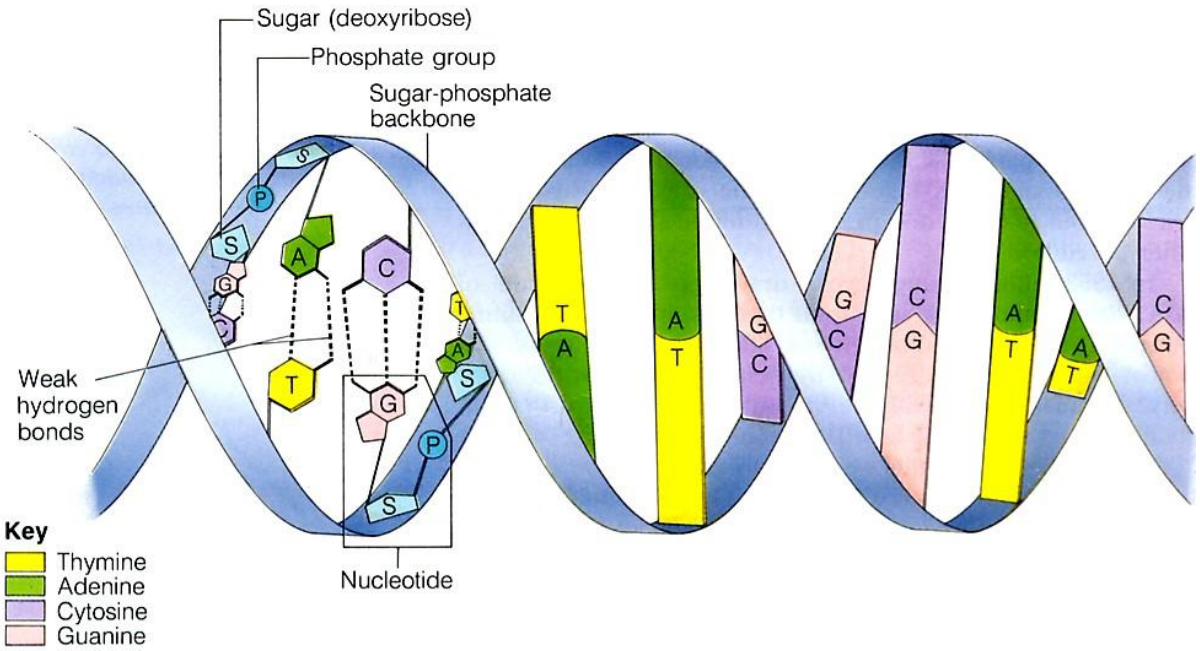
شكل 14: صورة انحراف الأشعة السينية بجزيء الـDNA حيث يدل الطراز المتقاطع في الوسط على أن جزيءالـDNA يأخذ شكل اللولب أو الحلزون بينما تدل المناطق الكثيفة في قمة وقاعدة الصورة على ان القواعد البيريميدينية (pyrimidines) والبيورينية (purines) بسمك ٣.٤ نانوميتر وتتراص بانتظام متجاورة ومتعامدة على محور الحلزون.

Assist.Prof. Dr.Ayoob Obaid Alfalahi
Molecular Genetic 4th Stage Field Crops Sciences

يؤدي التقيد بقاعدة تزاوج القواعد هذه Base Pairing Rule إلى وجود علاقة تكامل صارمة بين تتابع القواعد بين السلسلتين في الحلزون المزدوج. فمثلاً إذا كان لدينا:

3'-ATGCAGTC - 5' على أحد السلسلتين
فنجد 5'- TACGTCAG - 3' على السلسلة المقابلة.

يترتب على حتمية التزاوج بين A , T , G , C أنه لابد أن تكون الروابط الفوسفواستيرية الثنائية للسلسلتين موجهة في **اتجاهين متضادين Antiparallel** وعلى ذلك فإن الحلزون المزدوج إذا انقلب بواقع ١٨٠ درجة فانه سيبدو ظاهرياً مطابق للحلزون الأصلي (شكل ١٣).



شكل 15: نموذج الحلزون المزدوج. يظهر الهيكل الفوسفوري الثلاثي كشريط في حين تتراص القواعد النيتروجينية على بعضها متعامدة على المحور الطويل للحلزون.

وقد تبين ان الروابط الكَلايكوسيدية التي تربط القواعد بالسكر **لا تكون مواجهة لبعضها البعض بالضبط** مما يؤدي إلى أن الهيكل الأساسي (سكر– فوسفات) لسلسلتي الحلزون المزدوج لايكونان على مسافات متساوية من محور الحلزون وبذلك يكون الاخدودان المتكونان على طول المحور الأساسي غير متساويان في الحجم (العمق) (لاحظ شكل ١٣). فيتكون اخدود عميق يسمى الاخدود الكبير أو الرئيسي (Major groove) بالتناوب مع اخدود أقل عمقاً يسمى الاخدود الصغير (Minor groove).

تكون أرضية الاخدود الكبير مملوءة بذرات النيتروجين والاوكسجين التي تخص أزواج القواعد التي تعلوه والتي تمتد إلى الداخل من الهيكل الاساسي الخاص بها. وعلى العكس من ذلك نجد أن أرضية الأخدود الصغير تكون مملوءه بذرات النيتروجين والاوكسجين للقواعد والتي تمتد إلى الخارج في اتجاه الهيكل الاساسي.

Assist.Prof. Dr.Ayoob Obaid Alfalahi
Molecular Genetic 4th Stage Field Crops Sciences

وقد تبين ان إمكانات حدوث روابط هيدروجينية في الاخدود الكبير تؤدي إلى امكان زيادة الإعتماد عليه في التعرف على تتابع القواعد في جزيء DNA عما في الاخدود الصغير.

وقد ادت هذه الحقيقة إلى التكهن بان بعض البروتينات المتخصصة (مثل البروتين المثبط Repressor أو المحفز Promotor) التي تتفاعل وترتبط مع تتابعات معينة على جزيء DNA عن طريق تكوين روابط هيدروجينية مع مجاميع معينة توجد على الأغلب في الأخدود الكبير.

خواص الأحماض النووية Properties of Nucleic Acid:

تمتص **القواعد النيتروجينية** من نوع البيورين والبيريميدين الموجودة في الأحماض النووية **الأشعة فوق البنفسجية** بدرجة كبيرة عند موجة ذات طول ٢٦٠ نانومتر. وتستخدم هذه الخاصية **لتقدير هذه القواعد النيتروجينية كمياً** من خلال تقدير نيوكليوتيداتها وأيضاً الأحماض النووية الداخلة في تركيبها. وعلى كل حال، فإن للحامض النووي DNA **معامل امتصاص نوعي** عند طول الموجة ٢٦٠ نانومتر لكنه يقل بمقدار حوالي ٣٥– ٤٠ % عن **معامل الإمتصاص النوعي المتوقع** من حاصل جمع الإمتصاص لكل قاعدة (على حدة) من القواعد الداخلة بتركيب الحامض النووي DNA. وهذه النظرية تسمى **بنظرية التأثير الهيبوكرومي Hypochromic Influence Theory**. وهنا الإنخفاض في درجة الإمتصاص النوعي للأشعة فوق البنفسجية بالنسبة للقواعد النيتروجينية المتحدة بجزيئات الحامض النووي DNA عن نظيرتها الحرة **يرجع ذلك لتكوين روابط هيدروجينية** بين القواعد النيتروجينية المتراكبة الواحدة فوق الأخرى في كل من السلسلتين الحلزونيتين للحامض النووي DNA. **وهذه الخاصية مفيدة في تقدير درجة حلزنة Helicity الحامض النووي DNA.**

وعند تسخين الحامض النووي DNA المبلمر بدرجة كبيرة لكن ببطئ فإن السلسلتين الحلزونيتي الشكل تبتعدان عن بعضهما وتسمى عملية الإبتعاد هذه بعملية **إنفصال أو تشتيت السلسلتين Melting**. وهذا التحول من الشكل الحلزوني ذو السلسلتين إلى أي شكل عشوائي يحدث من خلال رفع درجة الحرارة ونتيجة لهذا التحول تزداد درجة الإمتصاص النوعي. وتسمى درجة الحرارة التي يحدث عندها الزيادة المفاجئة في الإمتصاص للأشعة فوق البنفسجية **بدرجة حرارة الإنفصال (Melting temperature Tm)** للحامض النووي. ولكل نوع من أنواع الحوامض النووية DNA درجة Tm خاصة به. أما عند إعادة تبريد المحلول ببطئ فإنه يحدث إعادة لتكوين الشكل الحلزوني ذو السلسلتين مع إمكانية حدوث تبادل بين السلاسل وتسمى هذه العملية **بالإلتحام Annealing**.

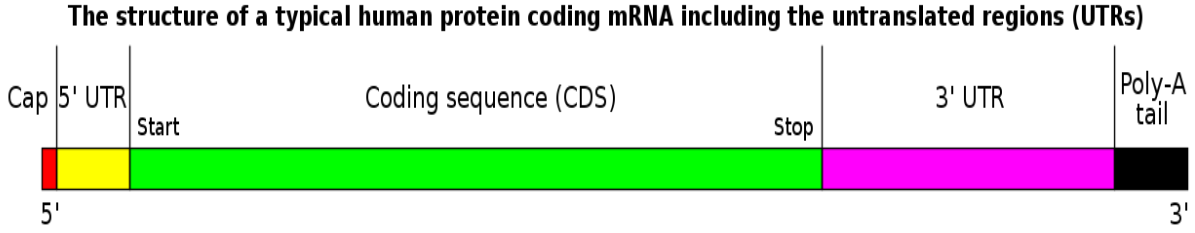
تركيب وتنظيم الجين Gene Structure and Regulation

لكي **يعبر الجين عن نفسه** وراثياً أي **يستنسخ الجين نفسه** ويكون صورة على شكل الحامض النووي mRNA ليتم ترجمتها على الرايبوسومات لتكوين البروتين اللازم لإظهار صفة نباتية معينة يجب أن يتكون هذا الجين من ثلاثة مناطق:

١. المنطقة الأولى: وتسمى **تسلسل المحفز Promoter sequence**: وهي تساعد في تحديد **توقيت عمل الجين وموقع تعبير الجين** فهي بمثابة شفرة للجين نفسه وتحدد **مكان بدء استنساخ الحامض النووي** الرسول **mRNA** (شكل ١٧).

Assist.Prof. Dr.Ayoob Obaid Alfalahi
Molecular Genetic 4th Stage Field Crops Sciences

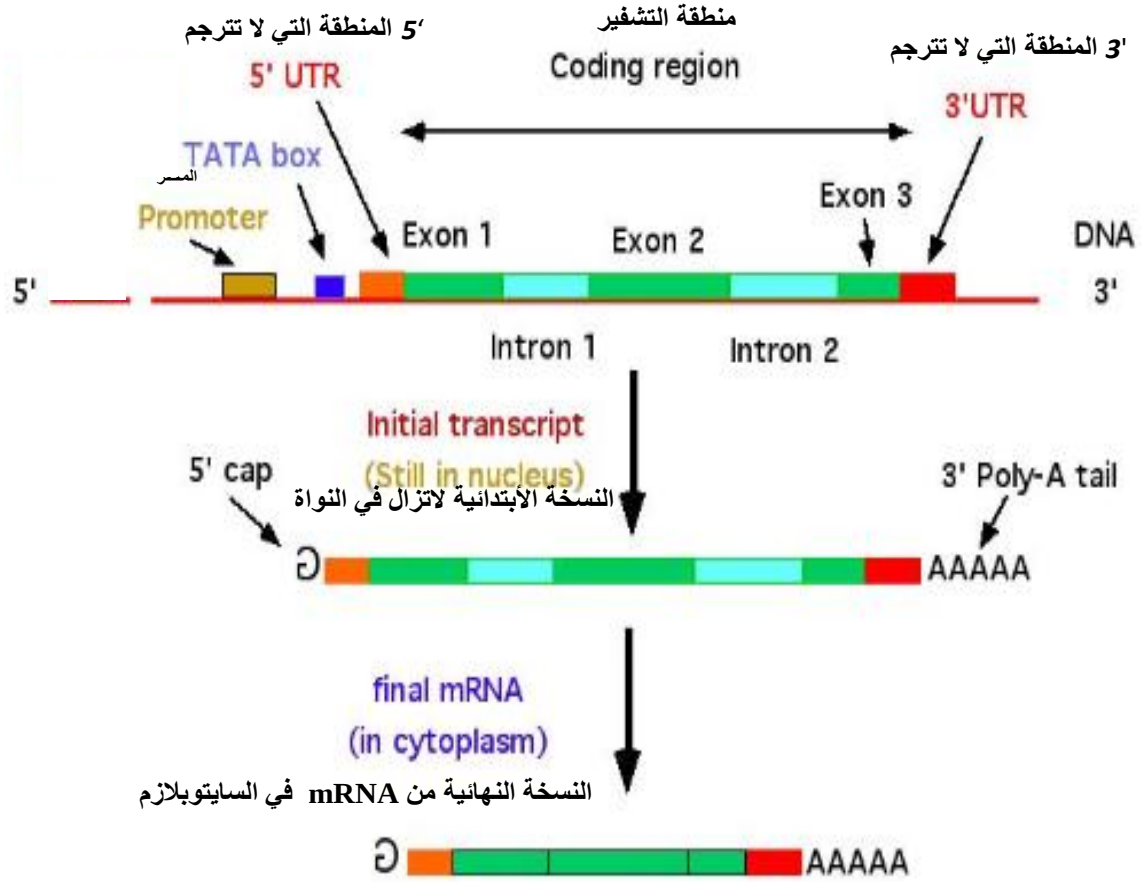
٢. المنطقة الثانية هي **منطقة التشفير Coding region**: وهي تحمل معلومات تحدد طبيعة البروتين الذي يشفره **الجين التركيبي Structural gene** (شكل ١٦).
٣. المنطقة الثالثة والتي يطلق عليها **منطقة الأدينين المتعدد** Polyadenylation (Poly-A tail): وهي المسؤولة عن **إنهاء عمل استنساخة الحامض النووي الرسول mRNA** على الوجه الصحيح وكإن تقول للجين إنهي عملية الاستنساخ هنا، ولذا تسمى Stop codon.



شكل 16: تركيب mRNA.

ولحسن الحظ أن أمام المتخصص في الهندسة الوراثية حرية واسعة في مزج هذه المناطق والمواءمة بينها وتجميعها من جينات مختلفة لتنتج ما يسمى **بالجينات الكيميرية أو الخليطة Chimeric genes)** وبذلك أمكن للمتخصصين في الهندسة الوراثية إختبار محفزات متباينة، فأمكنهم توجيه تعبير الجين إلى أعضاء بذاتها مثل الأوراق أو البذور أو الجذور أو الدرنات بل إلى أنماط بذاتها من الخلايا داخل النسيج الواحد. فقد يصمم الجين الكيميري أو الخليط من جينات كائنات مختلفة **فالمحفز** من فايروس نباتي ومنطقة **التشفير** من بكتريا *E. Coli* وموقع **متعدد الأدينين Poly A** من بكتريا تعود إلى الجنس Agrobacterium ثم يتم الإيلاج في خلية نباتية تقوم باستنساخ الحامض النووي mRNA لتترجمه الرايبوسومات Ribosomes لتنتج البروتينات التي هي هدف مصمم هذا الجين الكيميري.

Assist.Prof. Dr.Ayoob Obaid Alfalahi
Molecular Genetic 4th Stage Field Crops Sciences



شكل 17: تركيب الجين وإعادة تركيب RNA (RNA spilicing).

لقد قسم الباحثون الجينات من حيث الوظيفة إلى ثلاثة أنواع وهي:

١. **Regulatory genes**: وهي **الجينات المنظمة** لعمل العديد من الجينات الأخرى والتي يطلق عليها اسم **الجينات العاملة أو المشغلة** (Operator genes).
٢. **Operator genes**: وهي **الجينات العاملة** التي تتحكم في تشغيل وايقاف عدد كبير من الجينات الأخرى التي يطلق عليها **الجينات التركيبية** Structural genes.
٣. **Structural genes**: وهي الجينات **الجينات التركيبية** والمسؤولة عن التركيب الخاص بالبروتينات أو ببروتين الإنزيم.

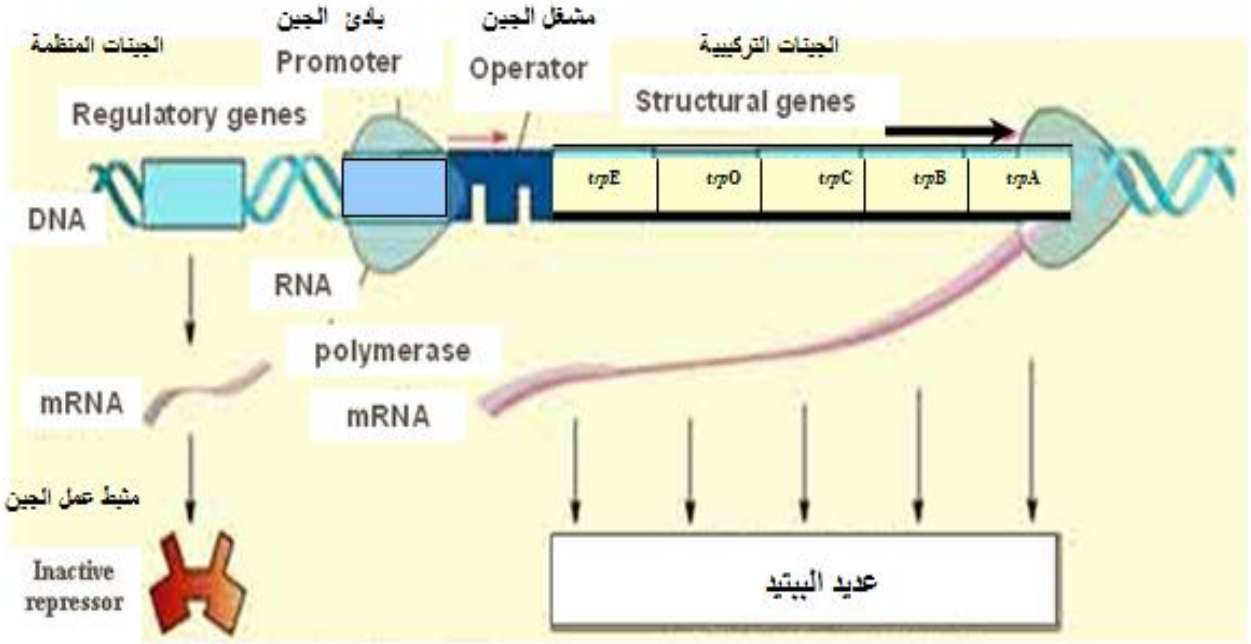
ولقد افترض ان السيطرة على نشاط (أو عمل) الجين التركيبي يكون عن طريق الجينات العاملة أو الفاعلة Operator genes حيث يتحكم في تشغيل أو إيقاف عمل عدد من الجينات التركيبية Structural genes والمسؤولة عن **انتاج انزيمات معينة تقوم بتفاعلات بايوكيميائية معينة في سلسلة من التفاعلات ينتج عنها في النهاية ظاهرة فسيولوجية معينة**. ويتم ذلك بان يقوم الجين المنظم Regulatory gene بانتاج مثبط لعمل الجينات العاملة أو الفاعلة Operator genes ويطلق على هذا **المثبط** اسم **القامع أو الكابح** Repressor ويفترض ان يكون هذا المثبط عبارة عن بروتينات تقوم بمنع الجين العامل أو الفاعل من إتاحة الفرصة لإنزيم بلمرة الحامض النووي RNA من العمل وبالتالي لايؤدي وظيفته. وقد أقترح أن ذلك يتم بطريقتين:

Assist.Prof. Dr.Ayoob Obaid Alfalahi
Molecular Genetic 4th Stage Field Crops Sciences

الأولى عند غياب **المنشط** يقوم **المثبط** بالإلتصاق بمنطقة Operator فيمنع انزيم بلمرة الحامض النووي RNA من استنساخ DNA وبالتالي لا تتم الرسالة (لا يتم كوين الحامض النووي mRNA).

وإن الآلية الثانية هي أن **المثبط** يفقد قدرته على التثبيط في وجود **المنشط Effecter**.
أي تتم عن طريق المنشط Effecter الذي يلغي قدرة المثبط عن العمل وبالتالي يصبح Operator genes حراً تاركاً الجينات التركيبية Structural genes قادرة على العمل من خلال إصدارها الأوامر الخاصه بتكوين البروتين وهي الحامض النووي mRNA وبالتالي انتاج انزيمات متخصصة لإتمام تفاعلات معينة أوظهور ظاهرة فسيولوجية أو صفة أو تميز خلوي أو تكشف خلايا أو أنسجة معينة.

وهناك نظريه تفترض ان **البروتين القاعدي المعروف بالهستون** الذي يحتوي على نسبه كبيره في تركيبه على الحامضين الامينين **الارجنين واللايسين** والموجود بالكروموسومات يعمل كماده مثبطه لفصل المادة الوراثيه اذا ما اتحد بها وبذلك ينظم عملها من المراحل الجنينيه وحتى الموت.



شكل 18: تنظيم عمل الجين.

بشكل عام أن الجين Gene هو جزء صغير من DNA وهو بمثابة الحبات في المسبحة، وللجينات لغة تخاطب بها الخلية حيث تنقل اليها رسائل تقرأها الخلية فتنفذ ما فيها من تعليمات وأوامر بدقة متناهية، فلغة الجينات تتألف من أربعة حروف هي A, C, T, G السابق ذكرها. أما كلماتها فتتألف من ثلاثة حروف فقط من تلك الحروف الأربعة ولتلك اللغة شفرات لكي تفهمها الخلية كعلامات الترقيم والفواصل بمعنى إبدأ من هنا ، توقف هنا. **كما أن بعض الشفرات تعمل كأقواس بين الجمل ليست لها أهمية تسمى الإنترونات Introns**. وبعض أجزاء من DNA تعمل كمنظم لعمل الجين تعرف بالجينات المنظمة كما سبق ذكرة. وتلك هي السينفونية الربانية التي تعزفها الخلية لتقوم

Assist.Prof. Dr.Ayoob Obaid Alfalahi
Molecular Genetic 4th Stage Field Crops Sciences

بوظائفها التي حددها الله في صورة هذا التسلسل والتتابع الدقيق للنيوكليوتيدات فيما يعرف بالحامض النووي DNA. وترسل النواة رسالة إلى الخلية تسمى رسالة الحامض النووي mRNA ليتم ترجمتها

References

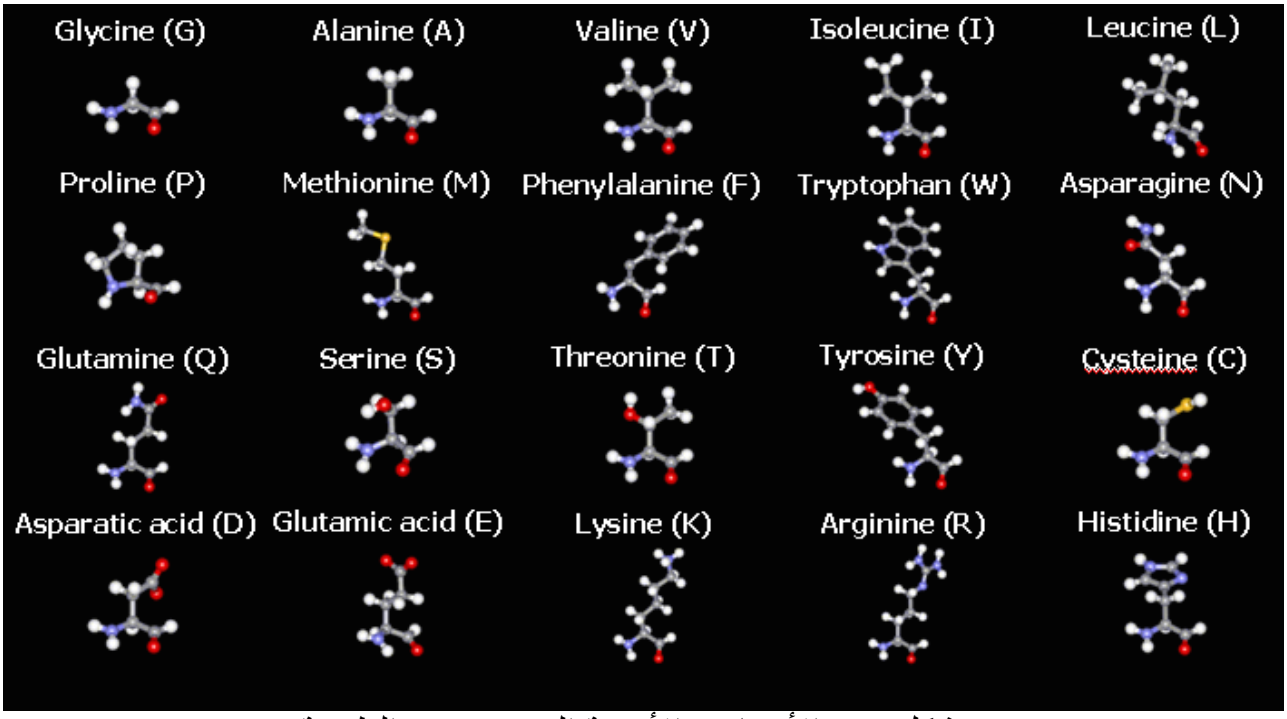
1. Kary B. Mullis. 1990. The Unusual Origin of the Polymerase Chain Reaction. 262(4): 56-65.
2. Kenshi Hayashi, Kary B. Mullis, François Ferré, Richard A. Gibbs. 1994. The Polymerase Chain Reaction Birkhäuser Basel. P, 464.
3. Zahra M Alkhafaji and Hassan M Abu-Almaali. 2013. PCRing and Primer Design. University of Baghdad, Baghdad. P, 304.
4. Mahmood M. Refaat and Saad B. Aloutabi. 2008. Introduction to Biotechnology. The General Egyptian Association of International Books and Documents, Cairo. P, 312
5. Elsahookie, M.M., and Ayoob O. Alfalahi. 2008. Polyploidy and its relationship with plant breeding and adaptation. The Iraqi J. Agric. Sci. 39(6):49-71.
6. Elsahookie, M.M., and Ayoob O. Alfalahi. 2008. TILLING: Modern technique combines traditional mutagenesis and functional genomics. The Iraqi J. Agric. Sci. 40(1):1-25.

Assist.Prof. Dr.Ayoob Obaid Alfalahi
Molecular Genetic/4th Stage Field Crops Sciences

على المصنع الصغير المسمى بالرايبوسوم Ribosome فيتكون بذلك بروتيناً معيناً. يتكون هذا البروتين من تتابع من الأحماض الأمينية حيث تتباين كيميائياً تبايناً واسعاً نتيجة وجود عشرين حامض أميني مختلف يجعل هذا التباين ممكناً ويتم بناء هذا العدد الهائل من البروتينات داخل الخلية بأوامرها التي ترسلها مع الرسول mRNA وبذلك يتكون الحامض الأميني الصحيح في المكان الصحيح لينتهي الأمر بصناعة البروتين الذي يقوم بعضه بدور بنائي في الخلية والبعض الآخر له دور تنظيمي أي يقوم بتنظيم سير التفاعلات الحيوية داخل الخلية. **والبروتينات هي الوحدات المكونة للإنزيمات والتي تشبه الكماشة حيث تستطيع ربط المركبات الكيميائية معاً أو تجدلها معاً أو تفككها من بعضها ويتم ذلك بدقة متناهية**. والبروتينات هي التي تصنع **الغشاء المحيط بالخلية** كما تصنع **الأبواب** التي تسمح بدخول المركبات اليها أو خروجها منها من خلال إتحادها مع المركبات الداخلة أو الخارجة وتحور فيها حتى يمكنها الدخول أو الخروج، وحتى الكائنات الممرضة كالبكتريا فإن الإنزيمات هي أسنانها التي تقوم بتمزيق مكونات الخلية وتحليلها إلى مواد أبسط لإمتصاصها والتغذية عليها. ومن هنا يمكن القول أن **الشفرة الوراثية** **هي ترتيب النكليوتايدات Nucleotides في جزيء الحامض النووي mRNA الذي يذهب إلى الرايبوسوم حيث يترجم إلى تتابع للأحماض الأمينية في سلسلة عديد الببتايد الذي يكون بروتيناً ما.** وكان معروف في بداية تفكير العلماء عن الشفرة الوراثية أن عدد الأحماض الأمينية الموجودة في الطبيعة عشرون حامضاً وعدد القواعد النيتروجينية الداخلة في تركيب جميع النكليوتايدات أربعة هم أدنين (A)، كَوانين (G)، سايتوسين (C)، ثايمين (T). وللحصول على لغة وراثية سليمة لابد من أن تشكل حروف هذه اللغة (القواعد النيتروجينية الأربعة) عشرين كلمة (الأحماض الأمينية)، وبالتالي الكلمة الوراثية (الحامض الأميني) إما أن يتكون من حرف أو حرفين أو ثلاثة أحرف أو أكثر ومنطقي إستحالة تكون الكلمة الوراثية من حرف واحد (قاعدة نيتروجينية واحدة) لأن معنى ذلك أن عدد الأحماض الأمينية هو أربعة فقط وهذا مناف للواقع حيث أن عددهم هو عشرون ولو كانت اللغة ثنائية الحروف ٤x٤ = ١٦ حامض أميني وهو أقل من العدد المطلوب (شكل ١٩) وجدول رقم ٥ يعرض مختصرات الأحماض الأمينية. إذن الشفرة الوراثية تتكون من ثلاثة حروف ٤x٤x٤= ٦٤ حامض أميني أي أكثر من العدد الموجود فعلاً من الأحماض الأمينية، وبالرغم من ذلك فإن هذا العدد رغم أنه يزيد عن العدد الفعلي للأحماض الأمينية إلا أنه يمكن فهم هذا الفارق في العدد من خلال ادراكنا بان هناك عدة شفرات وراثية **ترمز** لحامض اميني معين أو **بالإيعاز** لامر معين.

ففي عام ١٩٦٥ عندما تم التوصل إلى الشفرة الخاصة بكل حامض أميني والتي يطلق عليها إسم كودونات Codons تأكد بعد ذلك أن هناك أكثر من شفرة لكل حامض أميني. أيضاً **هناك كودونات توقف آلية بناء البروتين**. كما أن هناك **كودون بداية**، أي يعطي الإشارة للنقطة التي يبدأ عندها بداية آلية جديدة لصنع بروتين جديد. ومما أظهرت الدراسات على الشفرة الوراثية أنها **عامة أو كونية** بمعنى أن الأحماض الأمينية في الكائنات المختلفة لها نفس الشفرة فمثلاً الحامض الأميني **الكَلايسين** (Glycine) في جميع الكائنات الحية يتواجد بشفرته المعروفة GGU, GGC, GGA وهناك ثلاثة كلمات لا تشفر شيئاً وهي UAA, UAG, UGA. ويتم توزيع الجينات على الكروموسومات بشكل مقنن وليس عشوائياً وهذا التحديد يتم بواسطة المسافات الفاصلة بين الجينات على الكروموسوم.

Assist.Prof. Dr.Ayoob Obaid Alfalahi
Molecular Genetic 4th Stage Field Crops Sciences



شكل 19: الأحماض الأمينية الموجودة في الطبيعة.

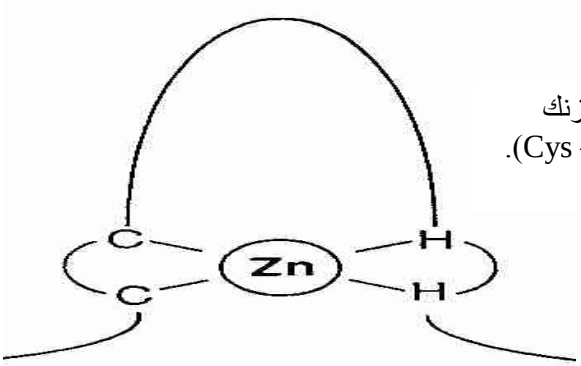
جدول ٥: مختصرات الأحماض الأمينية.

Ala: Alanine	Cys: Cysteine	Asp: Aspartic acid	Glu: Glutamic acid
Phe: Phenylalanine	Gly: Glycine	His: Histidine	Ile: Isoleucine
Lys: Lysine	Leu: Leucine	Met: Methionine	Asn: Asparagine
Pro: Proline	Gln: Glutamine	Arg: Arginine	Ser: Serine
Thr: Threonine	Val: Valine	Trp: Tryptophane	Tyr: Tyrosisne

تنشيط الجين Gene Activation:

لتنشيط أي جين لابد من وجود عدداً من البروتينات التي تعرف **بعوامل الاستنساخ Transcription factors** التي ترتبط بجزيء من الجين يدعى **المحفز Promoter** ليتمكن باقي الجين من التعبير عن نفسه Gene expression في بدأ عمل استنساخ الحامض النووي الرسول mRNA المسؤول عن إنتاج الإنزيم والذي يقوم بإتمام التفاعل الحيوي وإظهار الصفة المحددة وعليه فإن عامل الاستنساخ هذا هو بمثابة مفتاح التشغيل للجين. وكان العلماء يفكرون في الوسيلة التي يهدي بها عامل الاستنساخ هذا للوصول إلى الجزء **المحفز** للجين حتى إمكنهم من فك اللغز عندما وجدوا أن أحد عوامل الاستنساخ يحتوي على نتوءات عرفت فيما بعد بإسم **أصابع الزنك** Zinc fingers (شكل ٢٠) والتي وجد أنها وسيلة للتعرف على الجزء الخاص من الجين والمسؤول عن تنشيطه.

Assist.Prof. Dr.Ayoob Obaid Alfalahi
Molecular Genetic 4th Stage Field Crops Sciences



شكل 20: أصابع الزنك
.(Cys – His Zinc finger)

إكتشف **كلاك** إصابع الزنك عام **١٩٨٥** ووجد إنها **عبارة عن متواليات من أحماض أمينية تستطيع الإنطواء حول أيون الزنك** ولقد إكتشف أصابع الزنك عندما حللت تتابعات الأحماض الأمينية في إحدى عوامل الاستنساخ ووجد أن هناك ترتيب خاص لتتابع الأحماض الأمينية في تسع **تتابعات** أو **قطع متعاقبة** أو **وحدات متتالية** مرقمة من ١ – ٩ بينهما تشابهات مهمة حيث تتشابه أو تتطابق وجود زوج من الأحماض Cysteine (C) وزوجاً من الأحماض Histidine (H) وان زوجي Cysteine و Histidine في كل وحدة بنائية ينضمان إلى أيون الزنك مما يجعل الأحماض الأمينية الموجودة بينهما تصبح على شكل دائرة على النحو المبين في الشكل ٢٠.

تعتبر أصابع الزنك رؤوس قارئة Reading heads تتصل ببعضها بوصلات مرنه. ونظراً لان الجين في الخلايا الحقيقة النواة Eukaryotes لا يتكون من **تتابعات شفرية مستمرة** بل تتخلله تتابعات غير شفرية طويلة (بعكس جينات أولية النواة Prokaryotes) فتسمى التتابعات التي تترجم بإسم الإكسونات **Exons** وتسمى التتابعات التي لا تترجم بإسم الإنترونات **Introns** . وتسمى الاستنساخة الأولى من الحامض النووي RNA بإسم الحامض النووي المتباين heteronuclear RNA (hnRNA) وفي عملية تعرف **بإعادة تركيب** RNA (**RNA spilicing**) (شكل ٢١) يتم فيها توصيل الإكسونات ببعضها وتنبعج الإنترونات إلى الخارج بشكل عروات قبل إستبعادها لتكوين الحامض النووي المرسال mRNA (شكل 21) .

فيتم اضافة قلنسوة الجوانين المميثلة (G-methylated nucleotide) وتلعب هذه القلنسوة دوراً في بناء البروتين عندما ينتقل mRNA إلى الرابوسومات وكذلك يبدو انها تقوم بحماية الاستنساخة النامية من mRNA من عملية التحلل والهدم.

ويضاف لجزيء الحامض النووي hnRNA ذيل عديد الأدنين Poly A Tail. ويبدو أن للذيل وظيفة تسهيل خروج الحامض النووي mRNA من النواة إلى الساتوبلازم وكذلك يؤخر هدمه في السايتوبلازم ليتيح الدخول في أكثر من دورة من دورات الترجمة (شكل ٢٢).

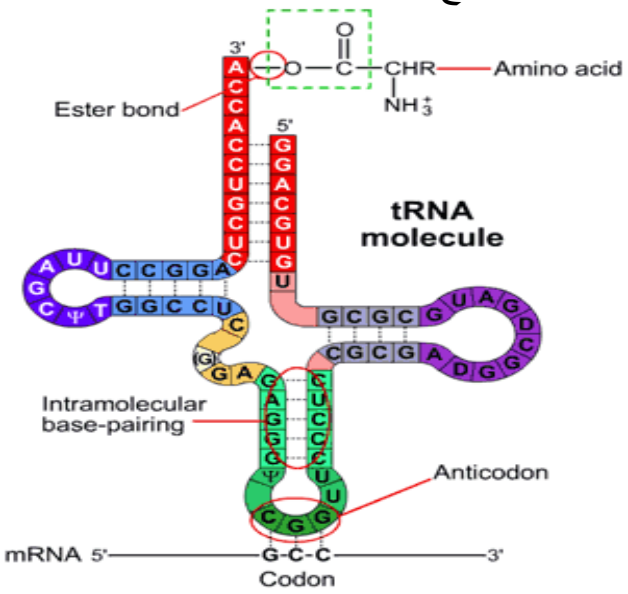
التخليق الحيوي أو بناء البروتين Protein Synthesis:-

ويتم استنساخ الحامض النووي الرسولmRNA أي الرسالة التي ترسلها النواة إلى الخلية بشكل إنتقائي حيث يحدث استنساخ جزئي فقط لتتابعات معينة من DNA الجين لإنتاج الحامض النووي mRNA. وتنتقي النواة جينات معينة لاستنساخها لتقوم بوظائف محددة تبعاً لنوع الخلية ومكانتها ووظيفتها في النسيج أو العضو لذلك **فإنزيمات بلمرة الحامض النووي RNA** لابد لها من التعرف

Assist.Prof. Dr.Ayoob Obaid Alfalahi
Molecular Genetic 4th Stage Field Crops Sciences

على منطقة **المحفز** الموجودة في الجين والمعروفة بإسم **Promoter** عن طريق إرتباط **بروتينات معينة** مع **تتابعات معينة** من DNA القالب لتنشيط المحفز. ويطلق على تلك البروتينات إسم **عوامل الاستنساخ (Transcription factors)**، وهي بمثابة مفتاح التشغيل لبدء التناسخ، وتبحث عوامل الاستنساخ على تتابع معين يعرف **بصندوق TATA** يتم التعرف عليه بإستخدام أصابع الزنك في عامل الاستنساخ **ويكون عادة على بعد ٢٥٠ قاعدة من موقع بدء الاستنساخ** فيؤدي عامل الاستنساخ على تحفيز النشاط الاستنساخي **لإنزيمات بلمرة الحامض النووي RNA** وينتج سلسلة الحامض النووي hnRNA من عدد من الوحدات يتراوح عددها بين ٨٠٠٠ – ٢٠٠٠٠ **نيوكليوتيدة** وهي أطول كثيراً من طول الحامض النووي mRNA الذي يؤدي إلى انتاج البروتين وكذلك فإن طول الحامض النووي mRNA يكون اطول من سلسلة البروتين (وعلى سبيل المثال إذا كان الحامض النووي mRNA يتكون من ١٢٠٠ نيكلوتيدة فإنها تشفر لحوالي ٤٠٠ حامض أميني ليكون سلسلة البروتين).

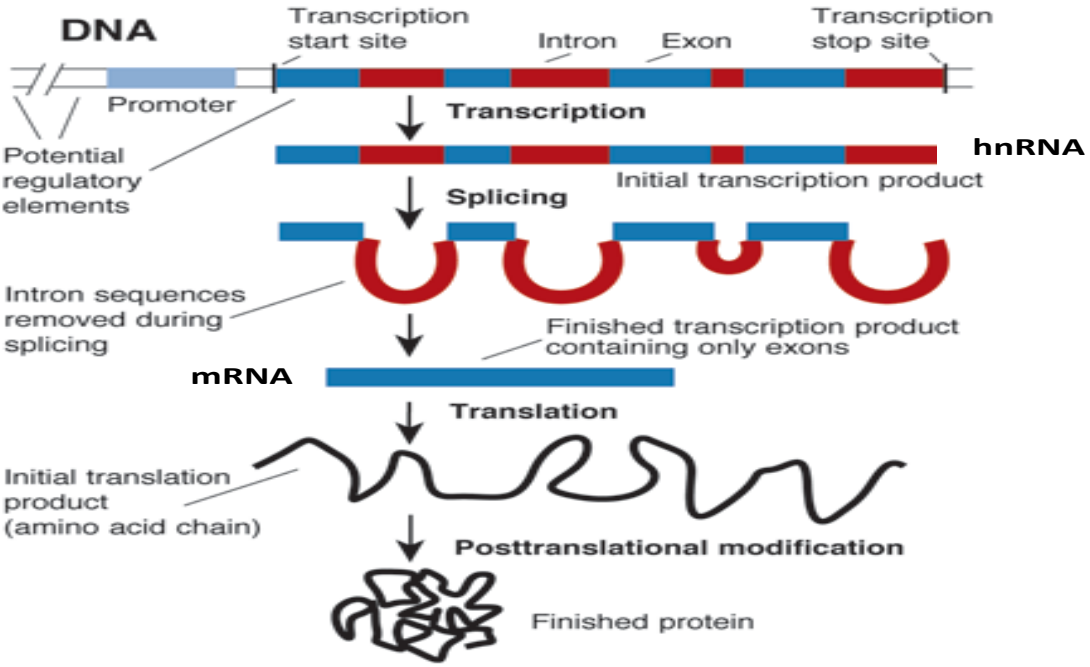
تحتوي الخلية على مجموعة من الحامض النووي الناقل tRNA وهي **عبارة عن جزيئات من الاحماض النووية الرايبوسومية صغيرة الطول (٧٠-٩٠) نيوكليوتيدة يسمح تركيب جزيء الحامض النووي tRNA بوجود موقعين نوعيين فيه حيث يمكن لاحد هذان الموقعان أن يتعرف على الحامض الأميني ويرتبط به بمساعدة إنزيم نوعي يسمى tRNA synthetase في حين يقوم الموقع الآخر وهو المحتوي على الكودون المضاد (Anticodon) والذي يحتوي على ثلاث قواعد بالتعرف على الكودون الموجود في تتابع جزيء الحامض النووي mRNA مما يسمح للأحماض الأمينية أن تصطف طبقاً لهذا التتابع النيوكليوتيدي. ويوجد لكل حامض أميني حامض نووي من نوع tRNA أو أكثر والذي يعد بمثابة عربة لنقل الأحماض الأمينية من السايتوبلازم إلى الرايبوسوم** حيث يتحد الحامض الأميني المعين مع احدى نهايتي الحامض النووي الرايبوسومي في حين يتم التزاوج الصحيح بين الكودون ومضاد الكودون بالروابط الهيدروجينية وعليه يقوم الحامض النووي tRNA **بدور أساسي كوسيط في عملية الترجمه** ويقوم بتحويل تتابع النكليوتايدات إلى تتابع من الأحماض الأمينية وفي نفس الوقت يتم تكوين رابطة ذات طاقة عالية عند النهاية الكربوكسيلية لهذا الحامض بحيث يمكنها أن تتفاعل مع المجموعة الأمينية للحامض الأميني التالي.



Assist.Prof. Dr.Ayoob Obaid Alfalahi
Molecular Genetic 4th Stage Field Crops Sciences

شكل ٢٦ الحامض النووي الناقل(tRNA)

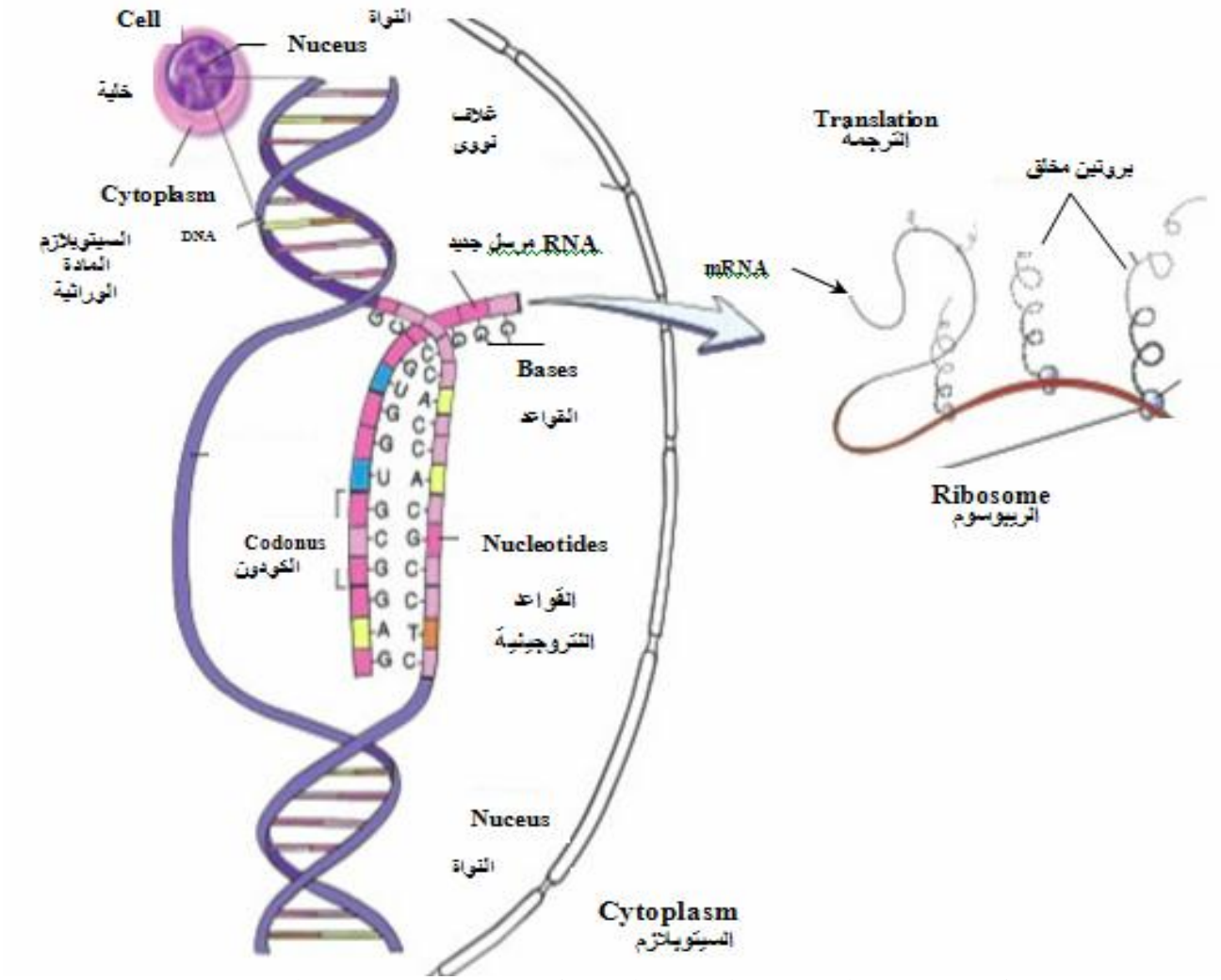
والسؤال الآن كيف يتسنى لإنزيم Aminoacyl-tRNA synthetase ربط الحامض النووي tRNA بالحامض الأميني المعين والتوفيق بين الحامض الأميني الصحيح وبين الحامض النووي tRNA النوعي الخاص وخاصة للأحماض الأمينية المتشابهة التركيب حيث يقوم الإنزيم بالتفرقة بين الأحماض الأمينية تبعاً للمراكز النشطة له وكذلك التفافه حول الحامض النووي tRNA الملائم.



شكل 21: إعادة التركيب RNA (RNA splicing) حيث يتم فيها توصل الإكسونات ببعضها وتنبعج الإنترونات إلى الخارج بشكل عروات قبل إستبعادها.

ويدخل في بناء البروتين الرايبوسومات وهي بمثابة مواقع يتكون عليها البروتين ويتكون جسم الرايبوسوم الذي يظهر كحبيبات على الشبكة الاندوبلازمية من الحامض النووي RNA الرايبوسومي من وحدتين أحدهما كبيرة والأخرى أصغر ويبدأ تخليق البروتين عندما ترتبط الوحدة الصغيرة المكونة للرايبوسوم بجزيء الحامض النووي mRNA الذي يكون له أول كودون AUG وهو كودون أو شفرة البدأ للترجمة وتكوين سلسلة عديد الببتايد أو البروتين التي ستبنى، ثم ترتبط الوحدة الكبيرة المكونة للرابوسوم بالمركب السابق وعندئذ تبدأ تفاعلات بناء البروتين. ويوجد على الرايبوسوم موقعين يمكن أن ترتبط بهما جزيئات الحامض النووي tRNA أحدهما يطلق عليه موقع الببتايديل (P site) والثاني يطلق عليه موقع أمينو أسيل (A site) (accepter site) وهناك موقع آخر يطلق عليه موقع الخروج (E site) وتبدأ سلسلة عديد الببتايد في الإستطالة في دورة تتكون من ثلاث خطوات وهي مرحلة البداية (Initiation) ومرحلة الإستطالة (Elongation) ثم مرحلة الإنتهاء (Termination).

Assist.Prof. Dr.Ayoob Obaid Alfalahi
Molecular Genetic 4th Stage Field Crops Sciences



شكل 22: بناء الحامض النووي المرسال mRNA ومن ثم البروتين.

يرتبط مضاد الكودون للحامض النووي tRNA بالكودون التالي على جزيء الحامض النووي mRNA وبالتالي يصبح الحامض الأميني الذي يحمله الحامض النووي tRNA الحامض الأميني التالي في السلسله عديد الببتايد، ثم حدوث تفاعل نقل الببتايديل الذي ينتج عنه رابطة ببتيدية بعده يكون الحامض النووي tRNA الأول فارغاً ويترك الرايبوسوم، أما الحامض النووي tRNA الثاني فيحمل الحامض الأميني له مع الحامض الأميني الأول (المثيونين). ويتحرك الرايبوسوم على إمتداد الحامض النووي mRNA فينتقل الحامض النووي tRNA حاملاً الحامض أو الحامضين الأمينيين في الموقع P ويدخل إلى الموقع A كودون جديد وهو التالي ثم تبدأ الدورة مرة أخرى مكونه الحامض الأميني الثالث وهكذا يتكرر الأمر. وتقف عملية البناء عندما يصل الرايبوسوم إلى كودون وقف البناء على الحامض النووي mRNA وهناك بروتين يرتبط بكودون الإيقاف يسمى عامل الإطلاق **Release factor** حيث يحرر الرايبوسوم من الحامض النووي الرسول mRNA (شكل ٢٣).

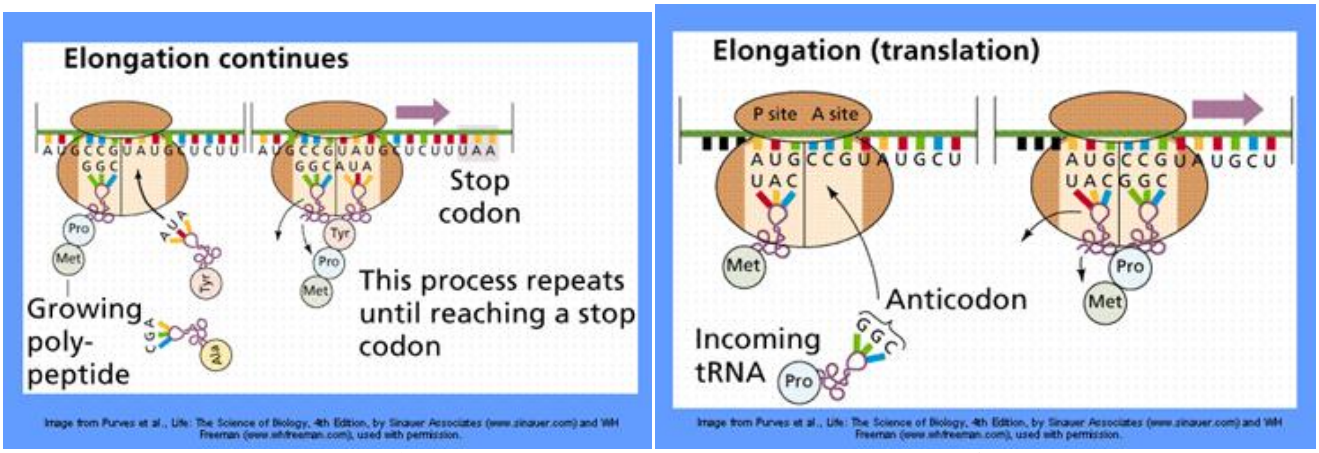
Assist.Prof. Dr.Ayoob Obaid Alfalahi
Molecular Genetic 4th Stage Field Crops Sciences

References

1. Kary B. Mullis. 1990. The Unusual Origin of the Polymerase Chain Reaction. 262(4): 56-65.
2. Kenshi Hayashi, Kary B. Mullis, François Ferré, Richard A. Gibbs. 1994. The Polymerase Chain Reaction Birkhäuser Basel. P, 464.
3. Zahra M Alkhafaji and Hassan M Abu-Almaali. 2013. PCRing and Primer Design. University of Baghdad, Baghdad. P, 304.
4. Mahmood M. Refaat and Saad B. Aloutabi. 2008. Introduction to Biotechnology. The General Egyptian Association of International Books and Documents, Cairo. P, 312
5. Elsahookie, M.M., and Ayoob O. Alfalahi. 2008. Polyploidy and its relationship with plant breeding and adaptation. The Iraqi J. Agric. Sci. 39(6):49-71.
6. Elsahookie, M.M., and Ayoob O. Alfalahi. 2008. TILLING: Modern technique combines traditional mutagenesis and functional genomics. The Iraqi J. Agric. Sci. 40(1):1-25.

Assist.Prof. Dr.Ayoob Obaid Alfalahi

Molecular Genetic 4th Stage Field Crops Sciences



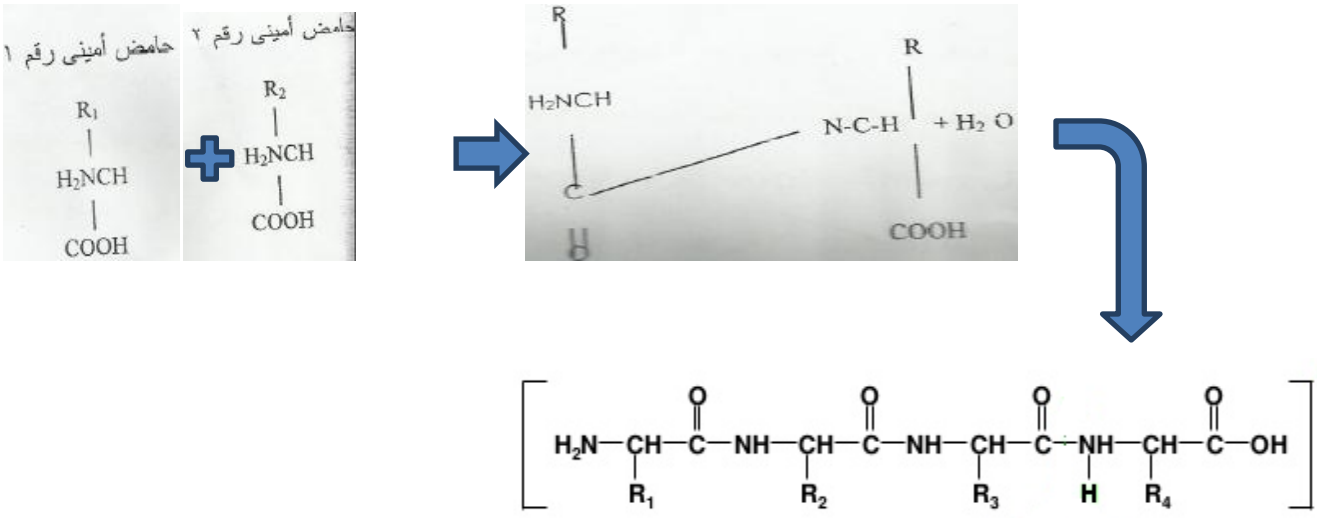
شكل 23: رسم تخطيطي يوضح خطوات بناء البروتين.

بناء البروتين Protein Synthesis:

أن معظم الجينات تبدي تأثيرها من خلال انتاجها للبروتينات سواء كانت جينات منظمة Regulatory genes أو جينات فعالة Operator genes أو **جينات تركيبية** Structural genes وهذه الأخيرة تنتج **بروتينات تركيبية** وهي البروتينات التي تدخل في تركيب مكونات الخلية أو مكونات الأنسجة والأعضاء المختلفة للكائن الحي أو قد تكون هذه **البروتينات وظيفية** وهي التي تقوم بوظيفة معينه داخل الخلية مثل الانزيمات.

وتعتبر الانزيمات جزيئات كبيرة معقدة التركيب حيث يُظهر بعضها درجه عالية من التخصص الوظيفي مثل الانزيمات التي تُحفز لتفاعل كيميائي معين، وهذا يبين **لماذا يكون للجين عادة تأثير متخصص على الشكل المظهري للكائن؟** وتترتب البروتينات عموما اما من نوع واحد من السلاسل عديدة الببتايد Polypeptide chain وقد يختلف هذا العدد من بروتين لآخر أو قد يتكون البروتين من اكثر من نوع من السلاسل عديدة الببتايد كما في حالة هموكَلوبين الدم في الانسان حيث يتركب من نوعين من السلاسل عديدة الببتايد هي الفا وبيتا (α , β) وان الجزيء الكامل من الهيموكَلوبين يتركب من اربعة سلاسل عديدة الببتايد، اثنين منهم من نوع الفا (α) واثنين من النوع بيتا (β) حيث تحتوي السلسلة الفا على ١٦٤ حامض اميني بينما تحتوي السلسلة بيتا على ١٦٦ حامض اميني وبشكل عام **تتركب السلسلة عديدة الببتايد من** تتابع معين طويل من الاحماض الامينية والتي ترتبط بعضها ببعض عن طريق الرابطة الببتايدية Peptide bond بين مجموعة الكربوكسيل (COOH) في اول حامض أميني في السلسلة مع مجموعة الامين (NH_2) الموجودة في الحامض الاميني الثاني في السلسلة. ويستمر تكوين الرابطة الببتايدية بين مجموعه الكربوكسيل في الحامض الاميني الثاني مع مجموعة الامين في الحامض الاميني الثالث ثم رابطه ببتيدية اخرى بين مجموعة الكربوكسيل في الحامض الاميني الثالث مع مجموعه الامين في الحامض الاميني الرابع وهكذا على طول السلسلة عديدة الببتايد كما هو مبين في شكل ٢٤.

Assist.Prof. Dr.Ayoob Obaid Alfalahi
Molecular Genetic 4th Stage Field Crops Sciences



شكل 24. **تتركب السلسلة عديدة الببتايد**

وبذلك سوف تحتوي السلسلة عديدة الببتايد على **مجموعة امينية** واحدة في الطرف الذي **بدأ** من عنده تكوين السلسلة ومجموعة **كربوسيل** حره واحدة في الطرف الاخر من السلسلة وهو الطرف الذي **ينتهي** عنده تكوين السلسلة عديدة الببتايد.وتسمى بالسلسلة عديدة الببتايد لاحتوائها على العديد من الاحماض الامينية التي تدخل في بنائها وعموما هناك عشرون حامض اميني مختلفة تدخل اساسا في تركيب كل البروتينات الطبيعية ولكن تختلف البروتينات عن بعضها في **عدد** الاحماض الامينية **ونوعها وترتيبها** في السلسلة عديدة الببتايد.وتختلف عدد الاحماض الامينية في السلسلة عديدة الببتايد باختلاف البروتينات حيث يتراوح مابين **٥١** حامض اميني كما في بروتين **الانسولين** إلى اكثر من **١٠٠٠** حامض اميني كما في بروتين **الفيبروين** Fibroin وهو بروتين **الحرير الطبيعي**. وعموما فان ترتيب الاحماض الامينية في سلسلة عديدة الببتايد يعرف **بالتركيب الأولي (primary structure) للبروتين** وهذا الترتيب الذي يحدده ويمليه تتابع النكليوتايدات الاربعة (C, G, T, A) في جين ما، ويمثل هذا التتابع النيوكليوتيدي الشفرة الوراثية لكل حامض اميني، ويتحكم الجين في التركيب الاولي للبروتين (تتابع الاحماض الامينية في البروتين) عبر ميكانيكية خاصة، وتتمثل هذه الميكانيكية **بالتعبير الجيني (Gene expression)** والتي هي عبارة عن عمليتين رئيسيتين هما:-

اولاً، عملية استنساخ الجين (gene transcription) وهي العملية التي يتم بواسطتها انتقال المعلومات الوراثية (التتابع النيوكلوتيدي في الجين) الموجودة في جين ما إلى السايتوبلازم عن طريق وسيط يعرف بالحامض النووي الرسول (mRNA).

وثانياً، عملية الترجمة إلى بروتين(Translation) وتعرف عملية الترجمة بانها عبارة عن تحويل المعلومات الوراثية من جزيئة mRNA إلى بروتين، حيث يتم تغيير لغة التعبير من الترتيب النيوكلوتيدي في جزيء mRNA إلى ترتيب الاحماض الامينية في البروتين كما سبق الاشارة اليهما.

وبشكل عام تشمل عملية بناء البروتين خطوتين هما:-

أولاً: ارتباط الحامض الاميني بالحامض النووي الناقل tRNA المناسب.
ثانياً:تجميع الاحماض الامينية المنشطة والمرتبطة بالاحماض النووية الناقلة إلى الرايبوسوم.

Assist.Prof. Dr.Ayoob Obaid Alfalahi
Molecular Genetic/4th Stage Field Crops Sciences

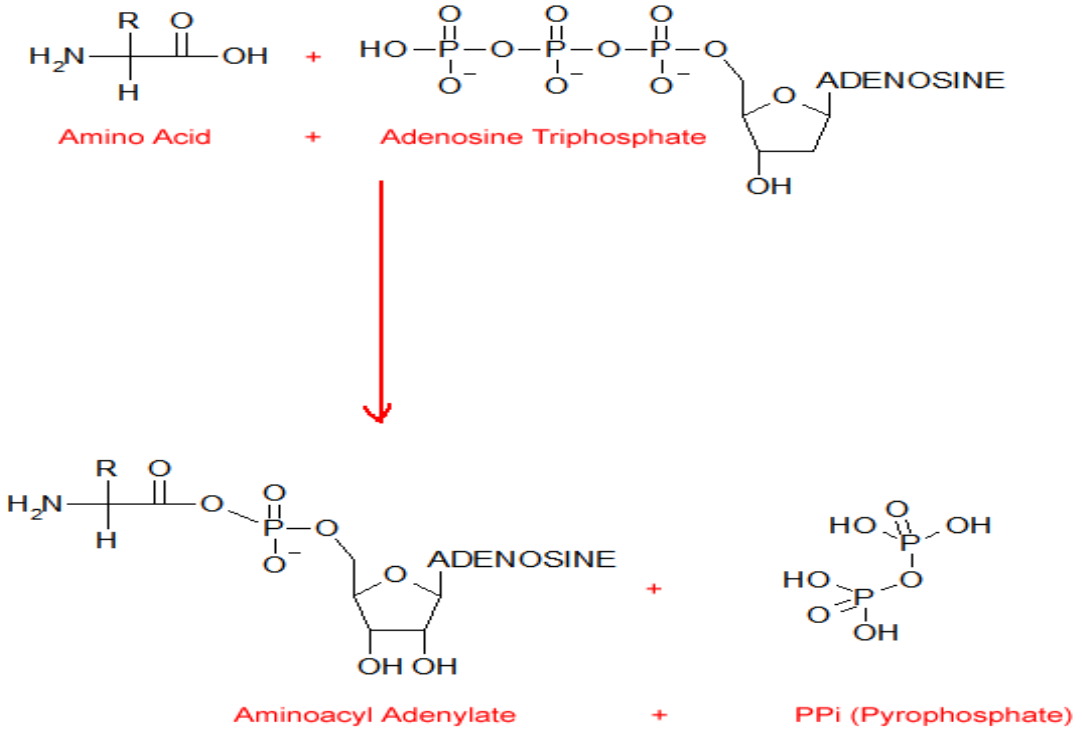
أولاً: ارتباط الحامض الاميني بالحامض النووي الناقل tRNA المناسب، وتتم هذه الخطوة على مرحلتين هما:-

١- تنشيط الاحماض الامينية Amino Acids Activation :

وفي هذه المرحلة يتم تنشيط كل حامض اميني من الاحماض الامينية العشرين قبل ارتباطها بالاحماض النووية الناقلة tRNA، حيث يقوم انزيم **Amino Acyl-tRNA synthetase** بتحفيز ارتباط كل حامض اميني بمركب **الادينوسين ثلاثي الفوسفات (ATP)** لتكوين مركب Amino acyl Adenylate(aa–AMP) كما في المعادلة التالية:

$$\text{Amino Acid} + \text{ATP} \xrightarrow{\text{Amino Acyl-tRNA synthetase}} \text{aa–AMP} + \text{PPi}$$

أن المركب الناتج من ارتباط الحامض الاميني بمركب الادنوسين احادي الفوسفات (AMP) يعرف باسم **الحامض الاميني المنشط** حيث يحتوي على مستوى من الطاقة تمكنه من الارتباط بالحامض النووي الناقل tRNA كما في شكل ٢٥.



شكل 25 تنشيط الاحماض الامينية

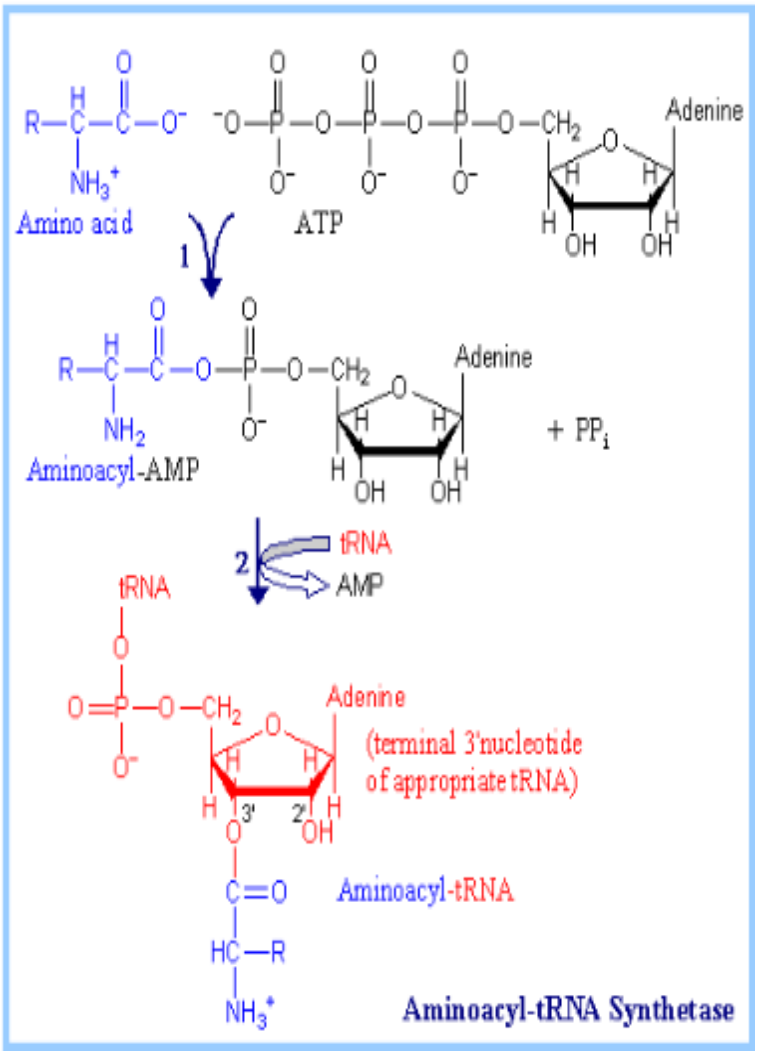
ومما يجدر الاشارة اليه ان **الخلية الحية تحتوي على الاقل على عشرين نوع من هذه الانزيمات** حيث يتعرف كل نوع منها على الحامض الاميني المعين وكذلك على الحامض النووي الناقل الذي

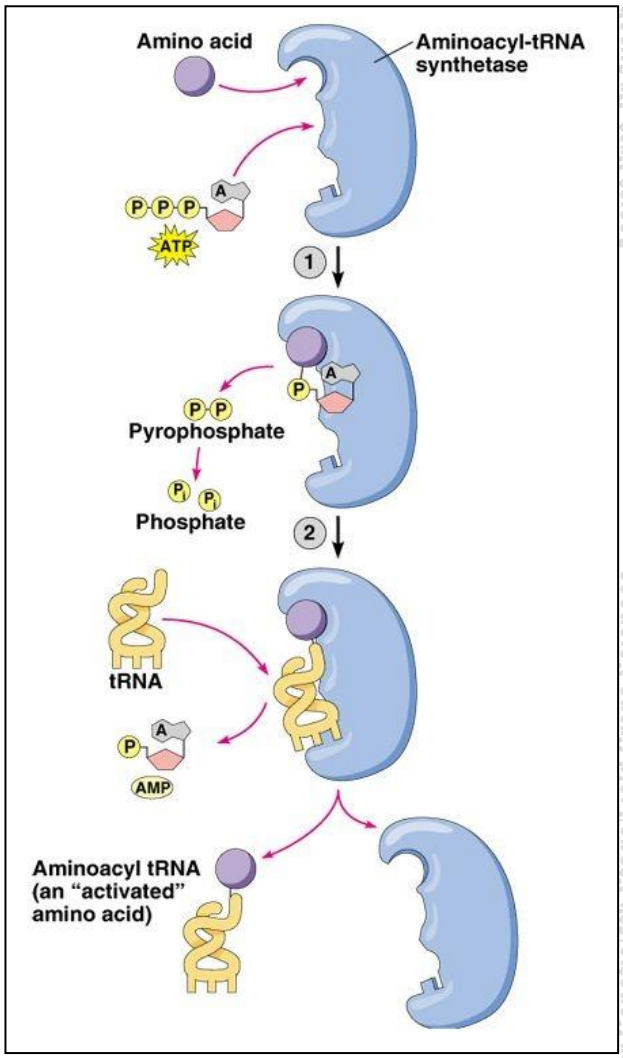
Assist.Prof. Dr.Ayoob Obaid Alfalahi
Molecular Genetic 4th Stage Field Crops Sciences

ينقل نفس الحامض الاميني المعين وبذلك فان كل نوع من هذه الانزيمات يحتوي على موقعين احدهما للتعرف على **الحامض الاميني** والآخر للتعرف على **الحامض النووي الناقل(tRNA)** (شكل ٢٦).

٢ـ نقل الحامض الاميني المنشط إلى الحامض النووي الناقل:

وفي هذه الخطوة يقوم نفس الانزيم بالتعرف على الحامض النووي الناقل وينتقل الحامض الاميني المنشط اليه حيث يرتبط الحامض الاميني به عند الطرف الذي يحتوي على نيوكليتيدة الادنين الطرفية ويتحرر الادنوسين احادي الفوسفات كما شكل ٢٧.





شكل ٢٧ : ارتباط الحامض الاميني بمركب الادنوسين احادي الفوسفات (AMP) وكذلك الارتباط بالحامض النووي الناقل tRNA .

ويكون اتصال الحامض الاميني بمجموعة الهايدروكسيل(3-OH) في سكر الرايبوز الموجود في نيوكلوتيدة الادنين الطرفية في جزئين tRNA عن طريق رابطة من نوع اسيل **Acyl bond** مع مجموعة الكربوكسيل الموجودة في الحامض الاميني كما في المعادلة التالية:

$$aa\text{–}AMP + tRNA \xrightarrow{\text{Amino Acyl–tRNA synthetase}} aa\text{–}tRNA + AMP$$

Assist.Prof. Dr.Ayoob Obaid Alfalahi
Molecular Genetic 4th Stage Field Crops Sciences

ثانياً: تجميع الاحماض الامينية المنشطة والمرتبطة بالاحماض النووية الناقلة في الرايبوسوم:

يبدأ تكوين **الروابط الببتايدية** بين الأحماض الامينية ويحتوي الرايبوسوم في كل الكائنات سواء بكتريا او كائنات راقية على موقعين احدهما يعرف باسم **Amino acyl site (A)** والآخر يعرف باسم **Peptidyl site (P)**.

وتبدا عملية ترجمة الرسالة الوراثية المتمثلة بالحامض النووي المرسال mRNA بارتباط الرايبوسوم بخيط mRNA عند **شفرة بداية الترجمة AUG** وهي الشفرة الخاصة بالحامض الاميني **مثيونين** (في البكتريا يكون فورمايل مثيونين) ويمكن تلخيص خطوات السلسلة عديدة الببتايد إلى ثلاث مراحل على النحو التالي:

a) **بدأ تكوين السلسلة Initiation**: تبدأ هذه الخطوة بارتباط الرايبوسوم بخيط mRNA عند شفرة بداية الترجمة حيث يتم دخول أول حامض نووي ناقل الذي يحمل الحامض الاميني **مثيونين** إلى الموقع (P) من الرايبوسوم.

b) **إطالة السلسلة Elongation**: وتتم إطالة السلسلة عديدة الببتايد في الطول على النحو التالي:

١. يدخل ثاني حامض نووي ناقل وما يحمله من حامض اميني في الموقع (A) من الرايبوسوم وبذلك يكون كلا الموقعين من الرايبوسوم محتلين بنوعين من الأحماض النووية الناقلة وما يحمله كل منها من حامض اميني، ثم يقوم انزيم **Peptidyl transferase** بتكوين الرابطة الببتايدية بين مجموعة الكربوكسيل في الحامض الاميني الأول مع مجموعة الامين في الحامض الاميني الثاني.

٢. بعد تكوين الرابطة الببتايدية بين الحامض الاميني الأول والثاني يتحرر الحامض النووي الناقل الاول ويترك الرايبوسوم ويصبح الحامض النووي الناقل الثاني محملا باثنين من الاحماض الامينية.

٣. يتحرك الرايبوسوم على طول خيط mRNA حركة مقدارها شفرة ثلاثية واحدة وبذلك ينتقل الحامض النووي الناقل الثاني من الموقع A إلى الموقع P من الرايبوسوم وبذلك يصبح الموقع A خالي.

٤. يدخل الحامض النووي الناقل الثالث وما يحمله من حامض اميني إلى الموقع A من الرايبوسوم وتتكون رابطة ببتيدية بين الحامض الاميني الثالث والحامض الاميني الثاني وبذلك يتحرر الحامض النووي الناقل الثاني ويترك الموقع P من الرايبوسوم بينما يصبح الموقع A محتل بالحامض النووي الناقل الثالث والذي يحمل الحامض الاميني الثاث.

٥. تتكرر هذه الخطوة كلما تحرك الرايبوسوم حركه مقدارها شفرة واحدة ليتم وضع حامض اميني اخر على طول خيط الـmRNA حتى يتم التعبير عن كل الشفرات الوراثية الموجودة في الرسالة الوراثية mRNA وتكون حركة الرايبوسوم في الاتجاه '5 إلى '3.

c) **انهاء ترجمة الرسالة Termination**:- تنتهي عملية تخليق السلسلة عديدة الببتايد عند وصول الرايبوسوم إلى احدى **شفرات انهاء الترجمة** الثلاث (**UAA UGA,UAG,**) حيث لا يتم وضع اي حامض اميني وتحرر السلسلة عديدة الببتايد من على سطح الرايبوسوم **بمساعدة بعض العوامل البروتينية** الموجودة بالخلية والتي تعرف باسم **عوامل التحرر**،بعد ذلك يترك الرايبوسوم خيط

Assist.Prof. Dr.Ayoob Obaid Alfalahi
Molecular Genetic 4th Stage Field Crops Sciences

mRNA ويذهب إلى السايتوبلازم للارتباط مرة أخرى بنفس الرسالة الوراثية mRNA أو الارتباط برسالة أخرى.

بالإضافة إلى **شفرة بداية الترجمةAUG**و **شفرات إنهاء الترجمة** الثلاث (**UGA, UAA, UAG**)فانه يوجد عدة شفرات تشترك لحامض اميني معين كما هو مبين في شكل ٢٨ .

Second base in codon

First base in codon	U	C	A	G	Third base in codon
U	UUU Phe	UCU Ser	UAU Tyr	UGU Cys	U
	UUC Phe	UCC Ser	UAC Tyr	UGC Cys	C
	UUA Leu	UCA Ser	UAA Stop	UGA Stop	A
	UUG Leu	UCG Ser	UAG Stop	UGG Trp	G
C	CUU Leu	CCU Pro	CAU His	CGU Arg	U
	CUC Leu	CCC Pro	CAC His	CGC Arg	C
	CUA Leu	CCA Pro	CAA Gln	CGA Arg	A
	CUG Leu	CCG Pro	CAG Gln	CGG Arg	G
A	AUU Ile	ACU Thr	AAU Asn	AGU Ser	U
	AUC Ile	ACC Thr	AAC Asn	AGC Ser	C
	AUA Ile	ACA Thr	AAA Lys	AGA Arg	A
	AUG Met or start	ACG Thr	AAG Lys	AGG Arg	G
G	GUU Val	GCU Ala	GAU Asp	GGU Gly	U
	GUC Val	GCC Ala	GAC Asp	GGC Gly	C
	GUA Val	GCA Ala	GAA Glu	GGA Gly	A
	GUG Val	GCG Ala	GAG Glu	GGG Gly	G

شكل ٢٨:جدول الكودونات وما يقابلها من الاحماض الامينية

تضاعف (تكرار) DNA (DNA replication):-

Assist.Prof. Dr.Ayoob Obaid Alfalahi
Molecular Genetic 4th Stage Field Crops Sciences

ان الخلية التي تكون في حالة انقسام تمر وبشكل نشط بسلسلة من المراحل تعرف هذه المراحل مجتمعةً باسم **دورة الخلية The cell cycle**وهي عبارة عن الأطوار المتتابعة من النمو والانقسام التي تحدث للخلية في الفترة الزمنية الواقعة بين انقسامين متتاليين وتختلف مدة هذة الفترة من خلية إلى أخرى. تستمر دورة الخلية لمدة أقلها ١٢ ساعة، ولا تنتقل الخلية من طور إلى آخر حتى تجهز المركبات الكيميائية التي تحتاجها للانقسام من أحماض أمينية وليبيدات وسكريات ولذلك يعتمد وقت

References

1. Kary B. Mullis. 1990. The Unusual Origin of the Polymerase Chain Reaction. 262(4): 56-65.
2. Kenshi Hayashi, Kary B. Mullis, François Ferré, Richard A. Gibbs. 1994. The Polymerase Chain Reaction Birkhäuser Basel. P, 464.
3. Zahra M Alkhafaji and Hassan M Abu-Almaali. 2013. PCRing and Primer Design. University of Baghdad, Baghdad. P, 304.
4. Mahmood M. Refaat and Saad B. Aloutabi. 2008. Introduction to Biotechnology. The General Egyptian Association of International Books and Documents, Cairo. P, 312
5. Elsahookie, M.M., and Ayoob O. Alfalahi. 2008. Polyploidy and its relationship with plant breeding and adaptation. The Iraqi J. Agric. Sci. 39(6):49-71.
6. Elsahookie, M.M., and Ayoob O. Alfalahi. 2008. TILLING: Modern technique combines traditional mutagenesis and functional genomics. The Iraqi J. Agric. Sci. 40(1):1-25.

Assist.Prof. Dr.Ayoob Obaid Alfalahi
Molecular Genetic/4th Stage Field Crops Sciences

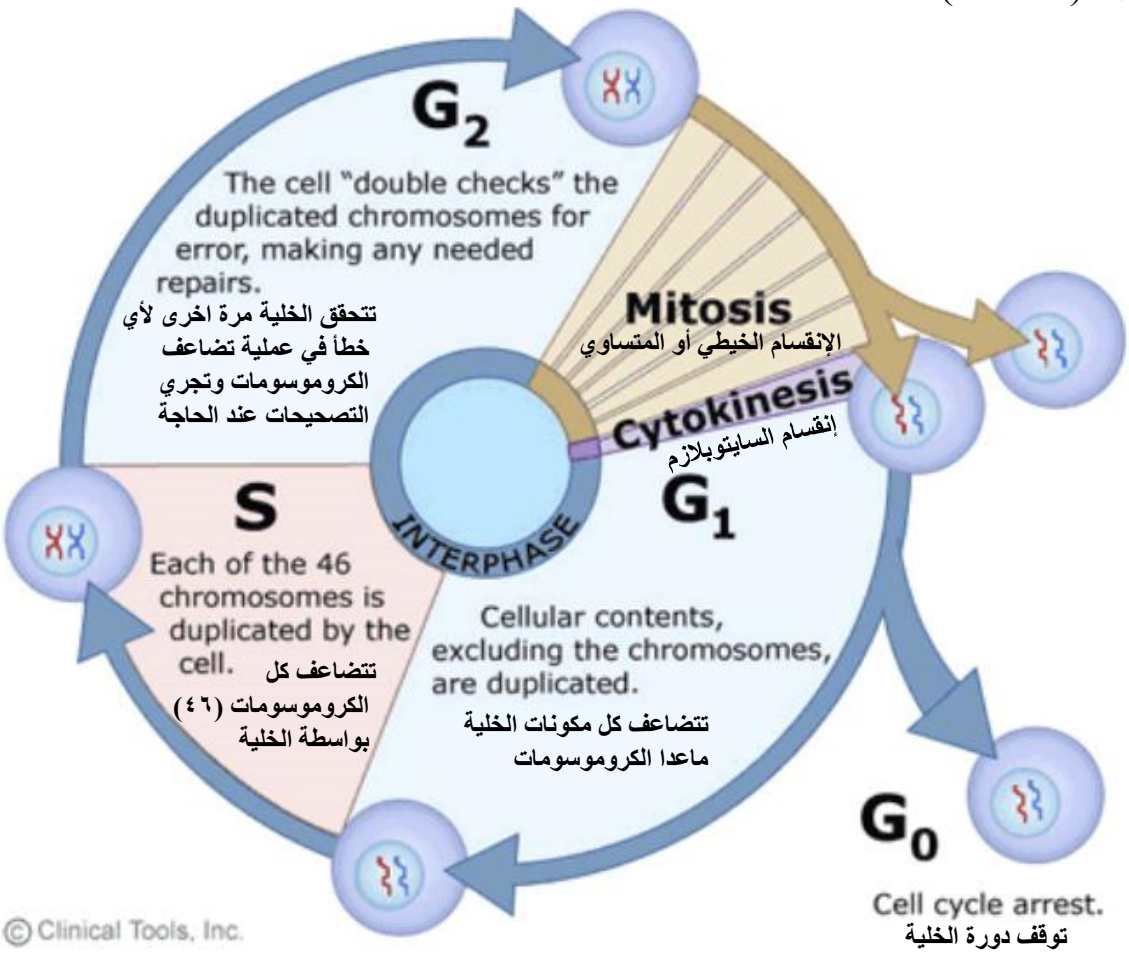
وسرعة انقسام الخلية على كمية المواد الغذائية التي يتلقاها الجسم. وتتكون دورة الخلية من طورين متبادلين هما الطور البيني وطور الانقسام الخلوي (شكل ٢٩).

١-الطور البيني (Interphase) :- ويستغرق ٩٠% من زمن الدورة، ويتضمن ثلاث فترات هي:

a. طور النمو الأول Growth phase (G_1) :- فيه يتضاعف عدد عضيات الخلية وبالتالي يزداد حجم الخلية.
b. طور البناء Synthesis phase (S) : **فيه يتناسخ الحامض النووي الرايبوزي منقوص الأوكسجين (DNA).**
c. طور النمو الثاني Growth phase (G_2) :- فيه تنمو الخلية سريعا تأهبًا للانقسام.

٢-الانقسام المتساوي(Mitosis phase (M phase:- تنقسم فيها نواة الخلية ومادتها النووية وتُقسم إلى أربعة مراحل فرعية

٣-الانقسام السايتوبلازم (cytokinesis):- هي طريقة ينقسم بوساطتها سيتوبلازم الخلية مكوِّنًا خلية جديدة– فتبدأ قبل نهاية الانقسام المتساويوالذي ينتهي بتكوين خليتين، تدخل كل خلية منهما طورا بينيا جديدا (شكل ٢٩).



شكل ٢٩: دورة الخلية.

Assist.Prof. Dr.Ayoob Obaid Alfalahi
Molecular Genetic 4th Stage Field Crops Sciences

إن خلايا أجسامنا تنقسم بمعدل ملايين الخلايا في الثانية، ولكن لا تنقسم الخلايا كلها بالمعدل نفسه، وبعضها لا ينقسم إلا أثناء النمو ثم يتوقف، أسرع الخلايا انقسامًا هي التي تبطن الأمعاء الدقيقة، فهي تنقسم كل بضعة أيام. أما خلايا الجلد فتنقسم كل بضعة أسابيع.

يمكن اعتبار ميكانيكية تناسخ جزيء DNA نتيجة مباشرة لطبيعة تركيب الحلزون المزدوج. إذ لابد أن تنفصل السلسلتين المكونتين للحلزون المزدوج حتى يتسنى استخدام كل منها كقالب لبناء جزيء جديد من DNA (شكل ٣٠). **ولكي يحدث هذا الإنفصال يجب ان تنفك أولاً حلزنة اللولب وذلك بدوران اجزاء الحلزون حول محورها** كما ان الروابط الهيدروجينية التي تربط بين أزواج القواعد المتقابلة في الجزيء الأصلي تكون سهلة الكسر عادة بدون الحاجة إلى بذل طاقة أو تفاعل انزيمي.

وجد أن المجاميع الجانبية في أزواج القواعد المتقابلة (بعكس مركبات عضوية أخرى) في مقدورها تكوين عدد من الروابط الهيدروجينية المتخصصة جداً، وبذلك يتوفر لدينا قالب نموذجي لبناء جزيء جديد عليه حيث **يتم التجاذب بين القواعد الموجودة اصلاً في القالب والقواعد المكملة في السلسلة الجاري بناؤها عندما تضاف القواعد واحدة تلو الأُخرى طبقاً لقاعدة شاراجاف والتي تنص على ان (A = T و G = C)**، فاذا كانت القاعدة النيتروجينية على الشريط القديم(A) مثلا، جاءت أمامها القاعدة (T) على الشريط الجديد، والعكس بالعكس، كذلك إذا كانت القاعدة (G) على الشريط القديم، جاءت أمامها القاعدة (C) على الشريط الجديد، والعكس صحيح. **ويتم ذلك بصورة دقيقة بحيث تنعدم تقريباً فرصة حدوث خطأ (10^{-8})** مما يؤدي إلى إنتاج جزيئات جديدة عبارة عن صورة طبق الأصل ودقيقة للجزيء الأصلي.

وعليه فان آلية تناسخ جزيء حامض DNA تشمل على **فك إرتباط شريطي عديد النيكلوتيدات المكونان للجزيء بعضها عن بعض** وذلك بفك الروابط الهيدروجينية الضعيفة التي تربط بينهما. ويتبع هذا تراصف نيوكلوتيدات جديده امام كل شريط، **وارتباط بعضها ببعض بمساعدة انزيم البلمرة DNA polymerase**، وبذلك يتم تخليق شريطين جديدين من عديد النيوكلوتيدات **ويتم التناسخ في الاتجاه '5 إلى '3 فقط** (شكل ٣٠). وبمعنى آخر فان كل شريط قديم يعمل كقالب لتكوين شريط جديد وفقاً له، وبذلك فان كل جزيء من حامض DNA يكون قد تناسخ إلى جزيئين. ومن المهم ان نذكر ان تتابع القواعد النيتروجينية في الشريط القديم هو الذي يحدد تتابعها على الشريط الجديد، ومن هنا جاء القول بان الشريط القديم يعمل كقالب للشريط الجديد.

يمكن متابعة عملية تناسخDNA بمشاهدة الفلم في CD المرفق مع محاضرات الوراثة الجزيئية، حيث في عملية تناسخ DNA تشترك العديد من الأنزيمات والبروتينات منها:-

١- **إنزيم الهيليكيز Helicase enzyme** الذي يحفز عملية فصل خيطي DNA (المكملين لبعضهما) والذي ينتقل على طول الحلزون وكلما إنتقل لمكان على الحلزون يقوم بفك الخيطين عن بعضهما.
٢- **بروتينات المرتبطة بالشريط المفرد Single-strand binding proteins** وهي بروتينات تقوم بالإرتباط على خيط DNA المفرد وذلك لتجنب إرتباطه مره أخرى بالخيط المكمل حتى تتم عملية أخذ استنساخة (Copy) من كلا الخيطين.

Assist.Prof. Dr.Ayoob Obaid Alfalahi
Molecular Genetic 4th Stage Field Crops Sciences

٣- **أنزيم بلمرة ١ (DNA polymerase I)** يعمل على بناء السلسلة المكملة (المستحدثة) للسلسلة القائدLeading strand.

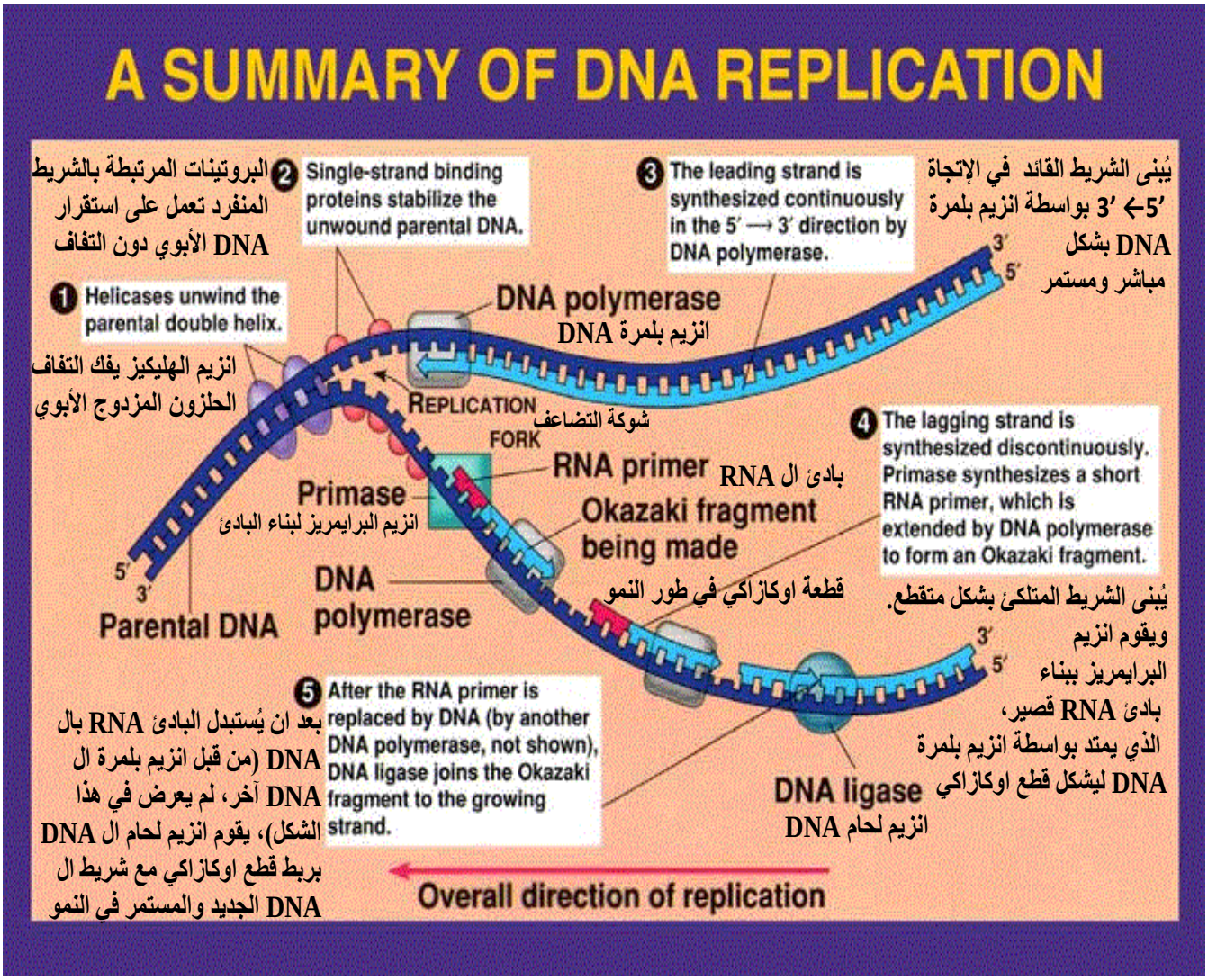
٤- **إنزيمات Topoisomerases** وهي مجموعة من الإنزيمات المتخصصة تقوم بتنظيم درجة التفاف DNA.

٥- **انزيم primase** لوضع RNA primer على السلسلة المتلكئة ليقوم DNA polymerase III ببناء السلسلة المكملة عليها وبشكل متقطع مكوناً قطع اوكازاكي Okazaki fragments.

٦- **أنزيم بلمرة ٢ (DNA polymerase II)**يعمل على بناء السلسلة المكملة (المستحدثة) للسلسلة المتلكئة Lagging strand .

٧- **أنزيم بلمرة ٣ (DNA polymeraseIII)** يعمل على تبديل RNA primer بشريط DNA لربط قطع اوكازاكي.

٨- **إنزيم اللحام (DNA ligase)**لربط قطع اوكازاكي واشرطة DNA مع بعضها في السلسلة المستحدثة على السلسلة المتلكئة.



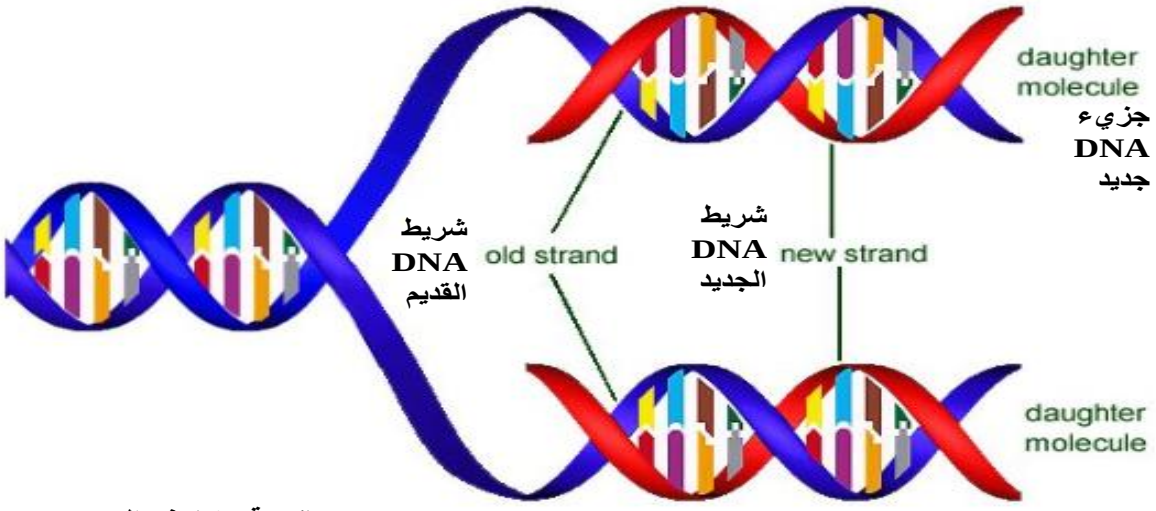
Assist.Prof. Dr.Ayoob Obaid Alfalahi
Molecular Genetic 4th Stage Field Crops Sciences

شكل ٣١: شكل تخطيطي يبين ميكانيكية تناسخ جزيء DNA . يتم التناسخ بفك حلزنة السلسلتين المكونتين للحلزون المزدوج ثم إستعمال كل سلسلة كقالب لبناءسلسلة جديدة حسب قانون تزاوج القواعد (A تقابل T و C تقابل G). يلاحظ أن التناسخ يتم في الاتجاه **5'** إلى **3'** فقط.

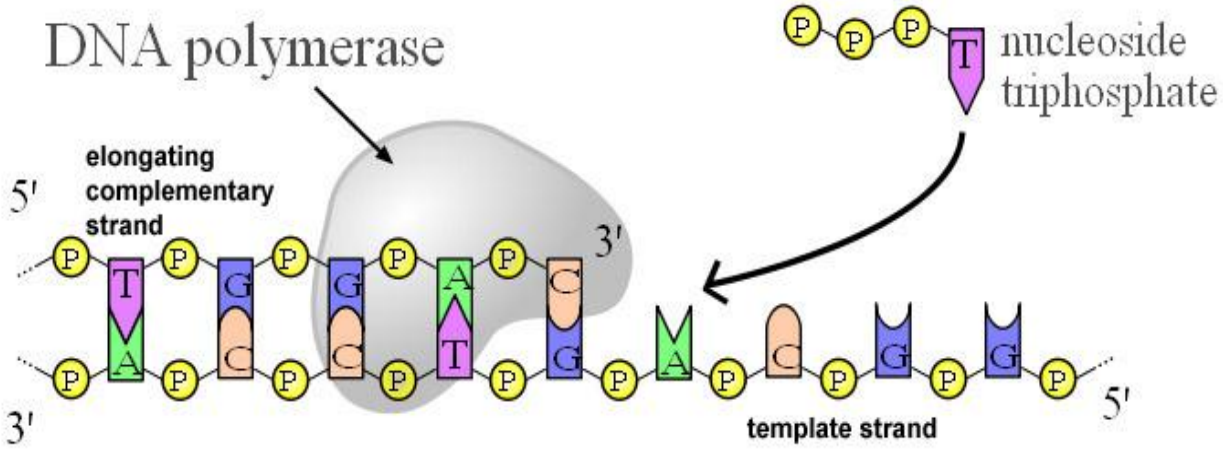
بالرغم من بساطة آلية مضاعفة الحامض النووي DNA إلا أن عملية المضاعفة هذه تحتاج إلى **تركيب متخصص يحتوي على عدد كبير من البروتينات والأنزيمات، والتي تعمل مع بعضها البعض بنظام متكامل.** ولذا يطلق العلماء على هذا التركيب المتخصص **ماكنة المضاعفة Replication machine**. ويجب ملاحظة أن هناك بعض الفروق التي توجد بين الخلايا الحقيقية النواة eukaryotic cell والخلايا الغير حقيقية النواة prokaryotic cell. ففي الخلايا الغير حقيقية النواة يوجد الحامض النووي DNA على شكل خيط دائري مفرد وغير مغلف بغشاء نووي. أما في الخلايا الحقيقية النواة فيوجد **غشاء نووي** يغلف الكروموسومات وكل كروموسوم يحتوي على جزيء من **حلزون مزدوج** مكون من خيطين ملتفين حول بعضهما ويوجد معهم كمية كبيرة من البروتين والحامض النووي RNA.

وتجدر الإشارة إلى أن الخيطين المكونين لجزيء DNA يكونان ملتفين حول بعضهما على شكل حلزون، ففي أثناء عملية مضاعفة DNA يجب أن يبتعد الخيطين عن بعضهما (شكل 31). وكما ذكرنا سابقاً عن نموذج واطسن وكريك للحلزون المزدوج المتكون من التفاف خيطين DNA حول بعضهما مثل **الحبل المجدول**. ولو أردنا تفريق (إبعاد) هذين الخيطين عن بعضهما فلابد أن يلف أحدهما عكسياً حول الخيط الآخر.ويحفز عملية فصل خيطي DNA (المكملين لبعضهما) انزيمات تسمى helicase enzymes والتي تنتقل على طول الحلزون وكلما إنتقلت لمكان على الحلزون تقوم بفك الخيطين عن بعضهما، وفي نفس اللحظة التي ينفصل فيها الخيطان عن بعضهما تقوم بروتينات يطلق عليها اسم Single-strand binding proteins بالإرتباط على خيط DNA المفرد وذلك لتجنب إرتباطه مره أخرى بالخيط المكمل حتى تتم عملية أخذ استنساخة (Copy) من كلا الخيطين. وكما هو معروف أن جزيئات DNA طويلة جداً ورفيعة لذا يجب أن تتم هذه العملية بحيث تبقى الصفات المحمولة على جزيء DNA دون تغيير. ولذلك فهناك إنزيمات متخصصة يطلق عليها **Topoisomerases وهذه المجموعة من الإنزيمات تقوم بتنظيم درجة التفاف DNA.** حيث ان مشكلة التفاف DNA تظهر نتيجة لطبيعة التفاف DNA في تركيبه الحلزوني المزدوج. ولاجل التغلب على هذه المشكلة المتسببة نتيجة الحلزون المزدوج تقوم هذه الإنزيمات (topoisomerases) **بالإرتباط** بكلا شريطي DNA**وبقطع** شريط DNA. وان هذا القطع البيني يسمح لشريط DNA ان يكون **غير مشتبك أو مفتول**، وفي نهاية هذه العمليات، فإن شريط DNA يعاد ربطه مرة أخرى. ويجدر الإشارة انه لأن سلسلة عديد النيوكليوتيد Polynucleotide chain المستحدثة تمتد لتطول بواسطة ربط **مجموعة الفوسفات** المرتبطة بذرة الكربون الخامسة للسكر الخماسي (5' Phosphate group of the sugar) من النيوكليوتيد القادم مع **مجموعة الهيدروكسيل** المرتبطة بذرة الكربون الثالثة للسكر الخماسي (3'Hydroxyl group of the sugar) عند نهاية الخيط. لذا فالخيط الجديد المخلق من DNA عادة ما ينمو في إتجاه 5'←3'.

Assist.Prof. Dr.Ayoob Obaid Alfalahi
Molecular Genetic 4th Stage Field Crops Sciences



ميكانيكية تضاعف ال DNA
Mechanism of DNA replication



شكل ٣٢: ميكانيكية تناسخ الحامض النووي DNA وإضافة ونمو وإستطالة السلسلة في الإتجاه 3'←5'.

آلية تناسخ المادة الوراثية (DNA) Mechanism of DNA Replication:-

يوصف تناسخ جزيء الحامض النوويDNA بانه شبه محافظ Semi-conservative ، وذلك لان كل جزيء من DNAناتج عن التناسخ يكون محتفظاً باحد شريطي الجزيء الأصلي، بينما يكون الشريط الآخر لهذا الجزيء الناتج مستحدث التكوين. ويتحكم الحامض النووي في العمليات البايولوجية في أي كائن حي وذلك لانه يعتبر المركز الوحيد للمعلومات الوراثية Genetic information التي تنتقل بطريقة دقيقة من الآباء إلى النسل ويتم تناسخ الحامض النووي DNA بثلاثة طرق هي:-

١. الطريقة شبه المحافظة Semi-conservative replication :-(شكل 33 A)
٢. الطريقة المحافظة Conservative replication :-(شكل 33 B)
٣. الطريقة التشتتية Dispersive replication :-(شكل 33 C)

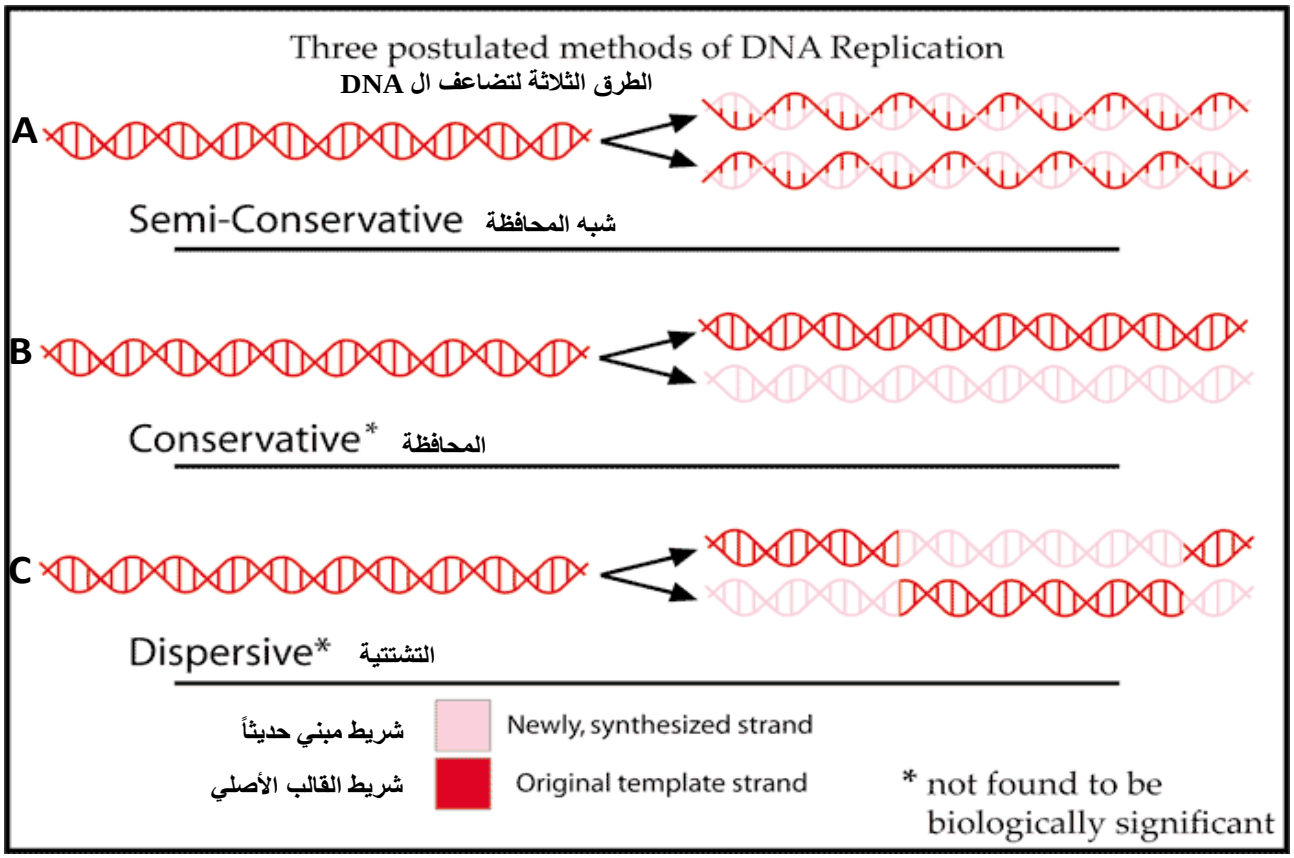
Assist.Prof. Dr.Ayoob Obaid Alfalahi
Molecular Genetic 4th Stage Field Crops Sciences

١. **الطريقة شبه المحافظة لتناسخ المادة الوراثية (Semi-conservative replication of DNA):-**

يقترح نموذج واتسون وكريك ان التناسخ يتم حسب ميكانيكية تُعرف بالطريقة شبه المحافظة Semi-conservative بمعنى أن نصف جزيء DNA الأصلي (أي احدى السلسلتين لجزيء DNA الأصلي) يحافظ عليه في حين يتم بناء سلسلة جديدة عليها(شكل 33A).

٢. **الطريقة المحافظة لتناسخ المادة الوراثية Conservative replication of DNA:-** في هذه الطريقة يقوم الحلزون المزدوج بتكوين حلزون مزدوج آخر جديد مكون من خيطين مخلقين (شكل33 B). ويتضح في هذا الشكل الآلية المحافظة لمضاعفة DNAالتي تتمثل بأن الحلزون الأبوي يبقى كما هو دون ان تنفصل السلسلتين ويُستَعمل كقالب وتطبع عليه القواعد المقابلة للقواعد النيتروجينية الموجودة في القالب الأبوي. وبالتالي ينتج قالب جديد من الDNA.

٣. **الطريقة التشتتية لتناسخ المادة الوراثية Dispersive replication of DNA:** يتم فيها تداخل أجزاء من الخيوط الأبوية والخيوط الجديدة في أثناء عمليات **تكسر وبناء وإلتحام** لهذه الأجزاء. وتجدر الإشارة أن هذا التداخل بين أجزاء الخيوط **يتم بطريقة عشوائية**. والشكل 33C يوضح هذا التداخل العشوائي (تكسير – وبناء– إعادة إلتحام) أثناء الطريقة التشتتية لمضاعفة الحامض النووي DNA.



شكل ٣٣: طرق تناسخ الحامض النووي DNA.

Assist.Prof.Dr.Ayoob Obaid Alfalahi
Molecular Genetic 4th Stage Field Crops Sciences

وقد أمكن التحقق من صحة ميكانيكية الطريقة شبه المحافظة بالادلة التجريبية:- فقد قام **ميسيلسون وستال Meselson and Stahl** عام **١٩٥٨** بتجربة على **بكتريا القولون** واستعملا **النيتروجين** .

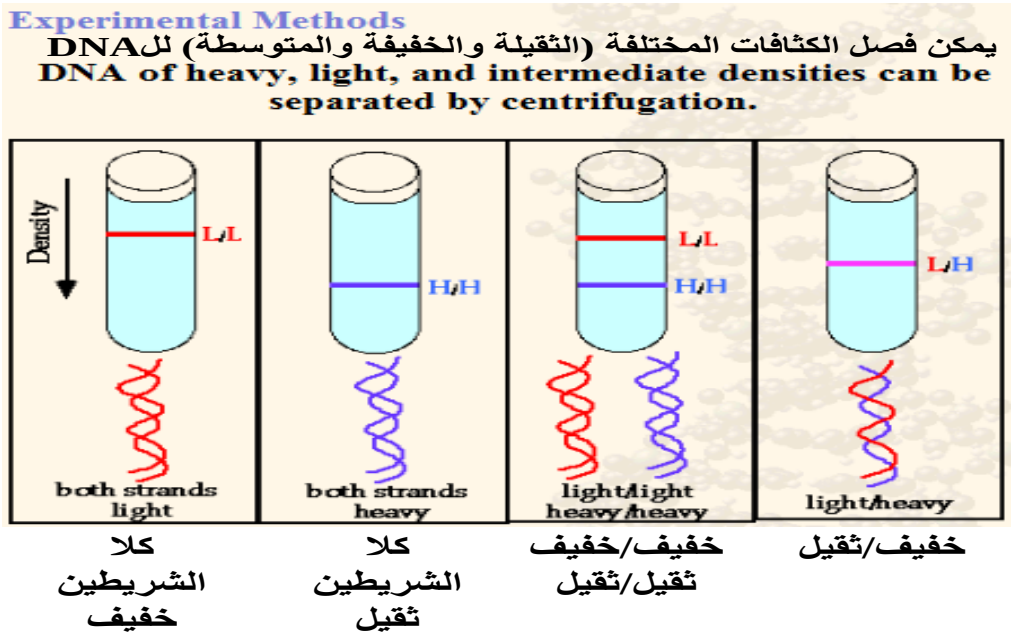
References

1. Kary B. Mullis. 1990. The Unusual Origin of the Polymerase Chain Reaction. 262(4): 56-65.
2. Kenshi Hayashi, Kary B. Mullis, François Ferré, Richard A. Gibbs. 1994. The Polymerase Chain Reaction Birkhäuser Basel. P, 464.
3. Zahra M Alkhafaji and Hassan M Abu-Almaali. 2013. PCRing and Primer Design. University of Baghdad, Baghdad. P, 304.
4. Mahmood M. Refaat and Saad B. Aloutabi. 2008. Introduction to Biotechnology. The General Egyptian Association of International Books and Documents, Cairo. P, 312
5. Elsahookie, M.M., and Ayoob O. Alfalahi. 2008. Polyploidy and its relationship with plant breeding and adaptation. The Iraqi J. Agric. Sci. 39(6):49-71.
6. Elsahookie, M.M., and Ayoob O. Alfalahi. 2008. TILLING: Modern technique combines traditional mutagenesis and functional genomics. The Iraqi J. Agric. Sci. 40(1):1-25.

Assist.Prof. Dr.Ayoob Obaid Alfalahi
Molecular Genetic 4th Stage Field Crops Sciences

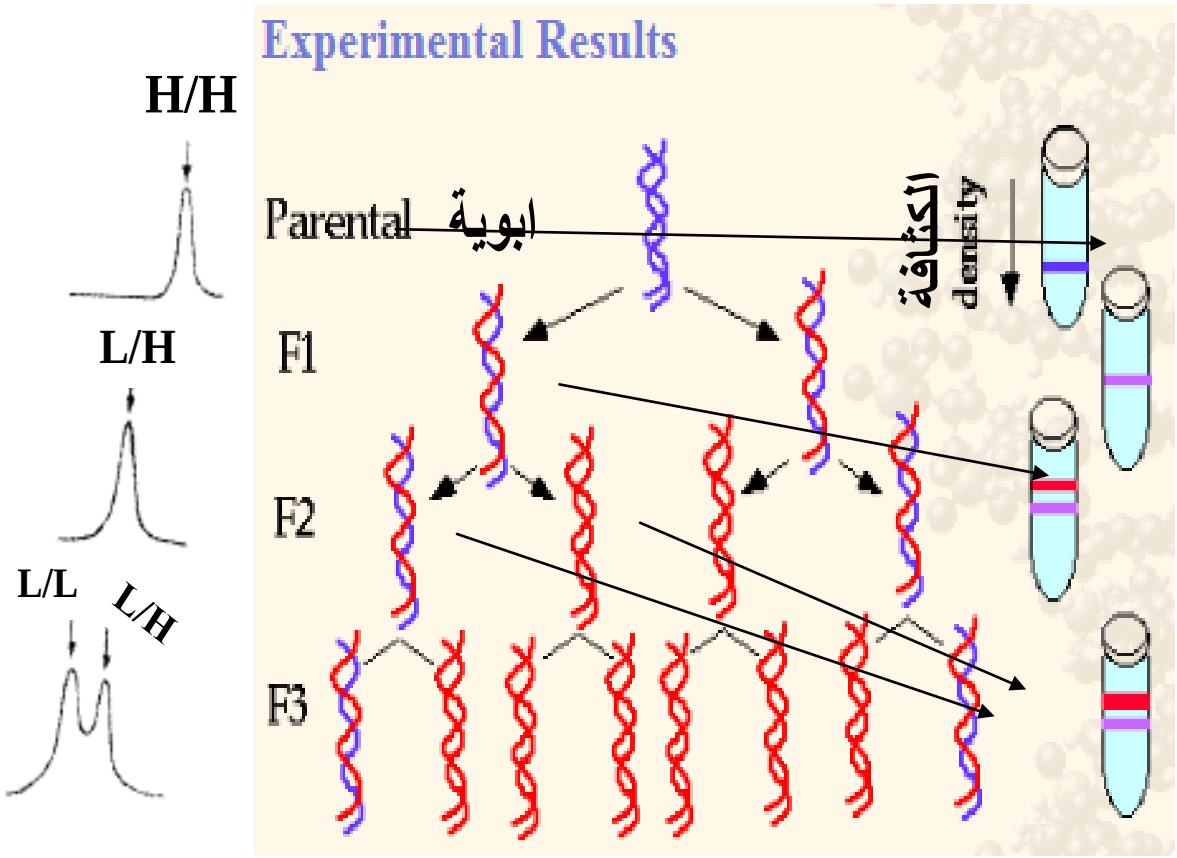
الثقيل (النظير المشع) N^{15} في تنمية المزرعة البكتيرية لعدة اجيال حتى يتأكد من أن كل ذرات النيتروجين في جزيء DNA معلمة بالنيتروجين الثقيل، وبعد ذلك تم نقل الخلايا البكتيرية إلى مزرعة تحتوي على النيتروجين العادي (الخفيف) N^{14}. ثم استخلص DNA من الخلايا على مُدَدْ زمنية مختلفة وتم اذابة DNA من كل مدة زمنية في محلول **كلوريد السيزيوم**(Cesium chloride)وهو محلول **ملحي ثقيل** حيث يتم تقدير كثافته بواسطة الطرد المركزي الفائق السرعة **Ultracentrifugation في هذا المتدرج الكثافي (Density gradient) من محلول كلوريد السيزيوم** Cesium chloride (شكل 34).

وقد تبين انه بعد اول دورة (جيل) من الانقسام ظهرت قمة واحدة تمثل جزيء هجين ثقيل\خفيف (L/H) (Light/Heavy) نتيجة لتكوين الجزيء من سلسلة أصلية ثقيله وسلسلة مكملة حديثة التكوين خفيفة. وفي الجيل الثاني ظهرت قمتين لجزيئات DNA واحدة تمثل الهجين(Light/Heavy) والأخرى تمثل الخفيف فقط (Light/Light) (L/L) كما في الشكل 35). يعكس ذلك بوضوح حتمية انفصال السلسلتين الأصليتين ثم استعمال كل سلسلة كقالب لبناء استنساخة جديدة عليها.



شكل ٣٤: يمكن فصل الكثافات المختلفة باستخدام **محلول كلوريد السيزيوم** Cesium chloride

Assist.Prof. Dr.Ayoob Obaid Alfalahi
Molecular Genetic 4th Stage Field Crops Sciences

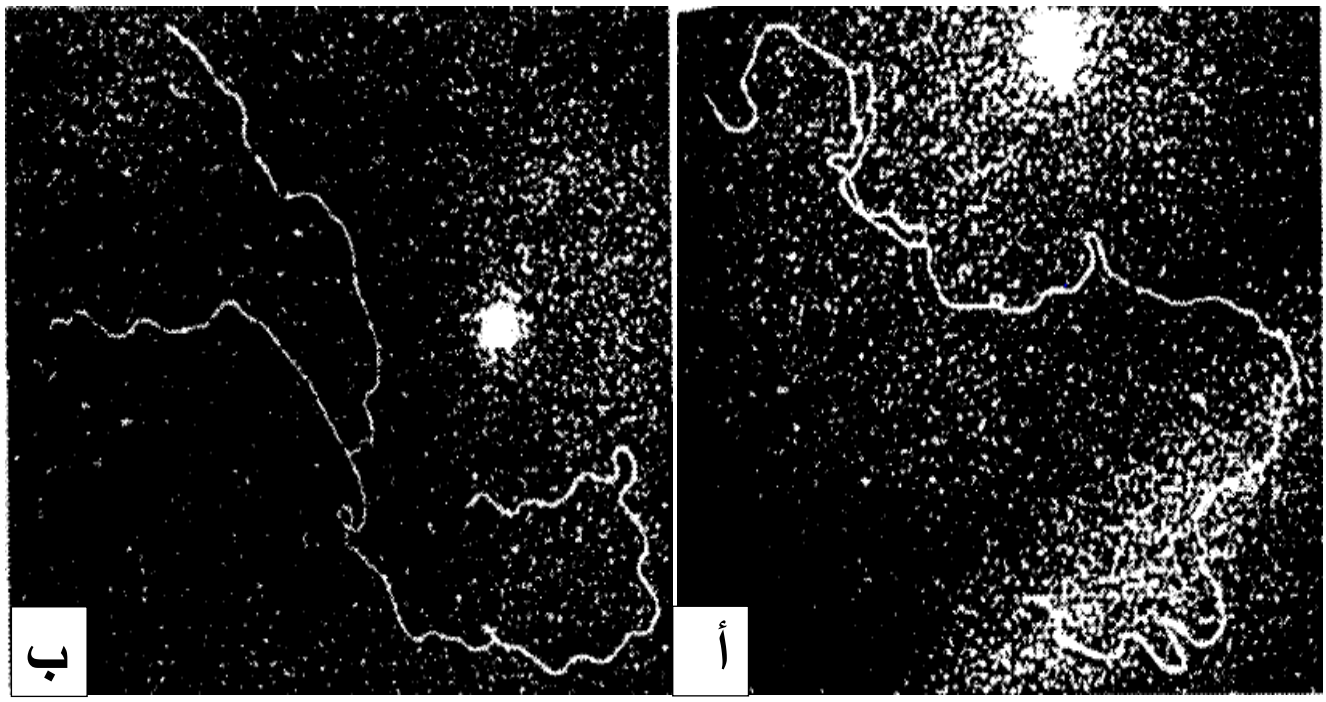


شكل٣٥: الطريقة شبة المحافظة لتناسخ DNA في بكتريا القولون وفي كروموسومات الخلايا حقيقية النواة. قام ميسيلسون وشتال بتعليم سلسلتي DNA الأبوية لبكتريا القولون بالنيتروجين الثقيل وتم تحليل النتائج بتقنية الكثافة المتدرجة لمحلول كلوريد السيزيوم.

منشأ التناسخ Replication origin:

يكون بدء التناسخ من نقطة محددة تسمى منشأ التناسخ وتختلف نقطة بدء التناسخ تبعاً لنوع الكائن، فعلى سبيل المثال عند عزل الجزيء الخطي لـDNA على فترات اثناء عملية التناسخ لفايروس الفاج T_7 وفحصه تحت المجهر الالكتروني كان المتوقع أن تبدأ عملية التناسخ عند إحدى النهايتين أو عندهما معاً حيث أنه من السهل تخيل أن يبدأ انفصال السلسلتين عند الأطراف وليس في المناطق الداخلية للحلزون المزدوج.إلا أنه تبين أن التناسخ يبدأ في الحقيقة من الداخل ومن نقطة معينة تسمى **نقطة منشأ التناسخ** وقد وجد انه بالنسبة لهذا الفايروس تكون على مسافة حوالي ١٧% من بداية النهاية اليسرى للجزيء كما في الشكل 36 أ.وبمجرد أن يبدأ بناء جزيء DNA يستمر البناء في الاتجاهين مما يعطي شكل العين (-O-) التي لا تلبث أن تنمو لتأخذ شكل حرف Y(شكل 36ب)(ومن هنا جاءت تسميتها **شوكة التناسخ Replication fork**). وتظل عملية التناسخ مستمرة حتى تصل الشوكة إلى نهاية جزيء DNA.

Assist.Prof. Dr.Ayoob Obaid Alfalahi
Molecular Genetic 4th Stage Field Crops Sciences



شكل ٣٦ : تناسخ جزيء DNA للفاج T_7 . (أ) صورة بالمجهر الالكتروني لجزيء DNA للفاج T_7الذي بدأ للتو في التناسخ والذي تظهر به **نقطة منشأ التناسخ** صغيرة تقع على مسافة ١٧% من النهاية اليسرى للخريطة الوراثية. (ب) مرحلة متقدمة من تناسخ الجزيء الذي يظهر فيه شكل حرف Y نتيجة لوصول شوكة التناسخ إلى نهاية الشوط.

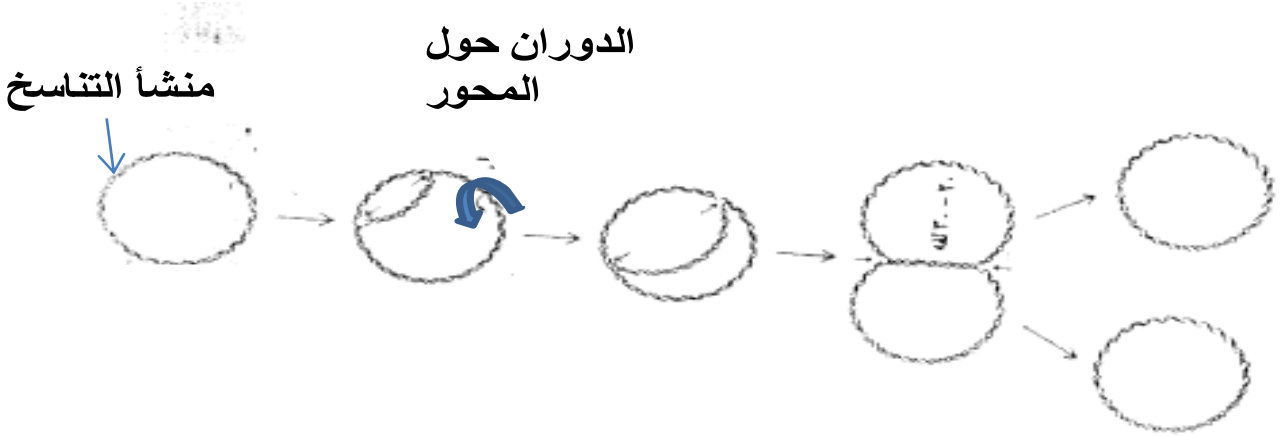
أما في حالة **جزيء DNA الحلقي** كما في **بكتريا القولون** لا يتحتم أن يتحول الجزيء الحلقي إلى جزيء خطي (مستقيم) ولو بصورة مؤقتة. على العكس من ذلك وجد عند دراسة المراحل الوسطية لتناسخ الكثير من الجزيئات الحلقية من DNA **أن السلاسل الأبوية تحافظ على الشكل الحلقي طول فترة التناسخ**. تظهر في مثل هذه الجزيئات أثناء تناسخهما شكل (θ ثيتا) عندما تبدأ في تكوين **نقطة منشأ التناسخ** (فقاعة التناسخ) عند نقطة البداية كما في شكل ٧3.تنمو الفقاعة (الشوكة) في الاتجاهين المتضادين

ولكن كيف يتسنى لجزيء حلقي مقفول من DNA أن تنفك حلزنته أثناء التناسخ؟

وللاجابة على هذا السؤال:-

أمكن اكتشاف مجموعة من الانزيمات يطلق عليها **Topoisomerases** تقوم بعملية فتح/غلق (nicking/closing) أو (كسر/ لحام) لجزيء DNA بحيث تساعد إما على ازدياد درجة الحلزنة أو استرخاء الحلزون حسب طبيعة المرحلة التي يمر بها الجزيء (شكل ٣٧).

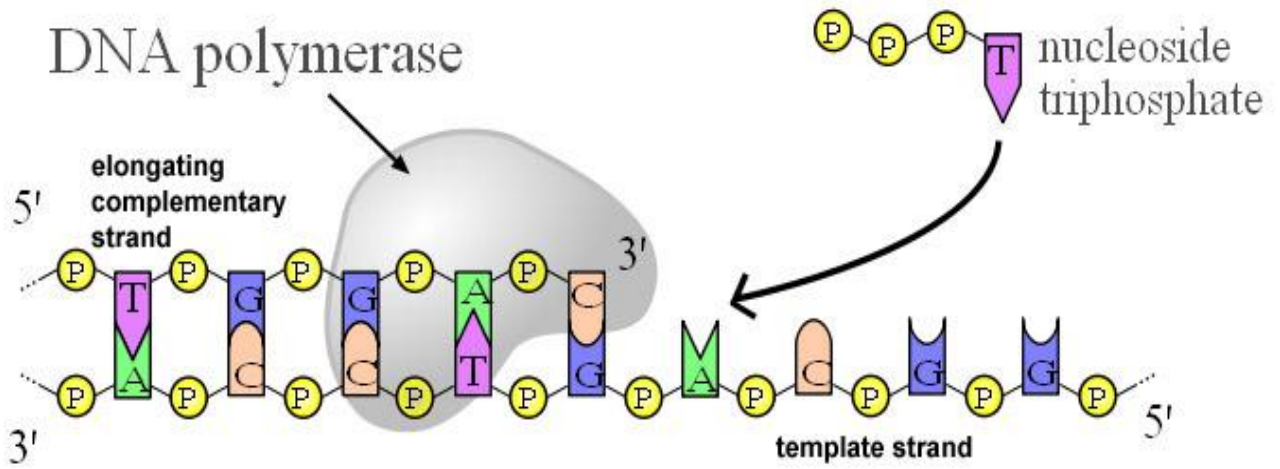
Assist.Prof. Dr.Ayoob Obaid Alfalahi
Molecular Genetic/4th Stage Field Crops Sciences



شكل ٣٧: شكل مبسط للتناسخ ثنائي الإتجاه لجزيء DNA الحلقي.

إتجاه التناسخ:

يكون إتجاه التناسخ من 5'←3' على كلا السلسلتين: سبق وان ذكرنا ان السلسلتين المشاركتين في جزيء DNA تكونان متضادتين في الإتجاه Antiparallel ويعني ذلك ان كلا السلسلتين الجاري بناؤهما على كل من شوكتي التناسخ لابد أن يكونا في اتجاهين متضادين أيضاً، وعلى ذلك فلابد أن يكون الاتجاه العام لنمو السلسلة في الاتجاه 5'←3' لإحدى السلسلتين بينما المفروض أن يكون النمو للسلسلة المضادة في الإتجاه 3'←5' إلا أن جميع انزيمات بلمرة DNA (DNA polymerase) المعروفه حتى الآن والتي تشارك في إضافة وحدات النكليوتايدات يمكنها إضافة ونمو وإستطالة السلسلة في الإتجاه 5'←3' فقط نظراً لأن التفاعل الكيميائي الذي تساعد فيه هذه الانزيمات يسمح للنيوكليتيدة الثلاثية الفوسفات للتفاعل فقط مع مجموعة الهيدروكسيل في النهاية 3'OH للسلسلة النامية كما في الشكل ٣٨.



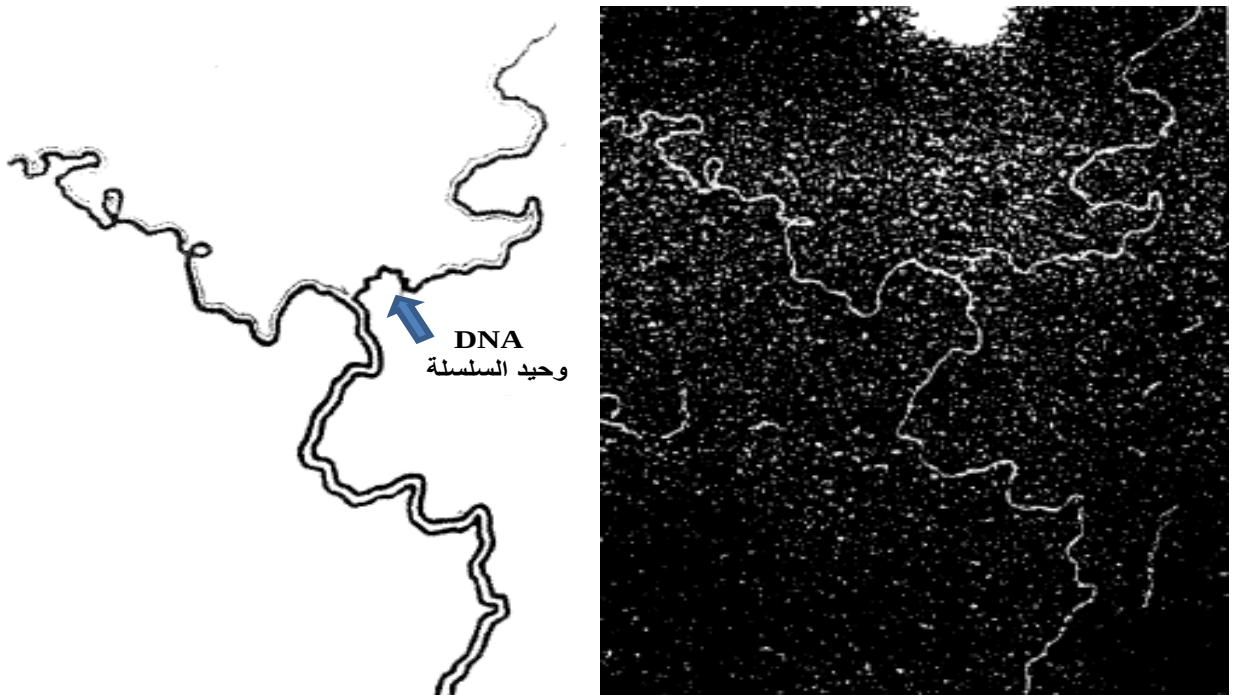
شكل٣٨ :إضافة ونمو وإستطالة السلسلة في الإتجاه 5'←3'

ولحل هذه المشكلة، تمكن أوكازاكي Okazaki عام ١٩٦٩ من اكتشاف قطع قصيرة متقطعة من DNA يتم بناؤها في الإتجاه 5'←3' على الخيط القالب المضاد لاتجاه البناء الطبيعي للسلسلة. وقد توصل إلى ذلك بعد تعريضه بكتريا القولون للثايميدين المشع **^{3}H-Thymidine لمدة ثواني قليلة**

Assist.Prof. Dr.Ayoob Obaid Alfalahi
Molecular Genetic 4th Stage Field Crops Sciences

حيث ظهرت له قطع من DNA قصيرة بطول حوالي ١٠٠٠ ـ ٢٠٠٠ نيوكليتيدة معلمة بالاشعاع، سميت هذه القطع القصيرة شظايا أوكازاكي Okazaki fragments نسبة إلى مكتشفها (تكون طول هذه الشظايا في خلايا الكائنات الحقيقية النواة بطول ٢٠٠ نيوكليتيدة فقط وقد يكون لذلك علاقة بطول شريط الـ DNA (الملتف حول النيوكليوسوم) توصل هذه القطع القصيرة ببعضها بفعل انزيم لحام DNA (DNA ligase)

وقد تأكد الآن أن شظايا أوكازاكي عبارة عن نواتج أولية لإحدى السلسلتين فقط وهي التي تأخذ الإتجاه 3'←5' والتي تسمى السلسلة المتلكئة (**lagging strand**). **أما السلسلة ذات الإتجاه** 5'←3' والتي تسمى بالسلسلة **القائد** (**leading strand**) **فإنها تبني أو يتم تناسخها على شكل خيط مستمر وغير متقطع من البداية. وهي لذلك تكون عادة اسرع في معدل بنائها وتسبق في ذلك** السلسلة **المتقطعة مما أدى إلى تسمية هذا** السلسلة بالسلسلة **القائد** (**leading strand**) **في حين سمي الخيط المتقطع** بالسلسلة **المتلكئة** (**lagging strand**). **يؤدي الفرق في سرعة البناء بين الخيطين إلى ظهور منطقة صغيرة من DNA الأبوي في صورة أحادية السلسلة عند شوكة التناسخ (لاحظ الشكل ٣٩) ثم تصبح مزدوجة السلسلة عند بدء شظية أوكازاكي في الظهور والتي يستمر بناؤها حتى تصل إلى نهاية الشظية السابقة لها والتي لا تلبث أن تلتحم بها. يبدأ بناء شظايا أوكازاكي عند نقط محددة على طول قالب السلسلة البطيئة وتحدد المسافة بين هذه النقاط متوسط طول شظايا أوكازاكي المتكونة أثناء تناسخ جزيء معين من DNA.**



الشكل ٣٩: يؤدي اختلاف سرعة الحركة بين السلسلة **القائد** (**leading strand**) **و** السلسلة **المتلكئة** (**Lagging strand**) **إلى ظهور منطقة صغيرة وحيدة السلسلة في جزيء DNA الأبوي عند شوكة التناسخ.**

آلية عمل الجين Gene Mechanism:

Assist.Prof. Dr.Ayoob Obaid Alfalahi
Molecular Genetic 4th Stage Field Crops Sciences

الآن يأتي السؤال الهام وهو كيف يمكن لعلماء البيولوجيا الجزيئية فهم كيفية عمل الجينات؟ لذا إستخدم مهندسو الوراثة تقنية سميت **إستبدال الجين المستهدف أو استهداف الجين Gene targeting** وفيه **يتم استحداث طفرة في جين معين واستبداله بالجين السوي داخل احدى الخلايا الجذعية المشتقة من الجنين** (Embryo-derived stem cells) من اجنه الفئران ثم ادخالها في خلايا جنين الفأر فتكون لذلك اجنة **معطلة الجين المستهدف (Knockedout gene)** فإذا ادى ذلك إلى إحداث تشوه في مخ الفأر كان ذلك دليل على مسؤلية هذا الجين عن تكوين المخ. **ولقد اصبحت تقنية الاستهداف الجيني تقنية مثيرة وهامه عندما إستخدم في مشروع الجينوم البشري لكشف أسرار الجينات المسؤولة عن الامراض الوراثية** حيث أن دراسة تسلسل النكليوتايدات للجين لا يفسر وظيفته في حياة الكائن الحي.

على أيه حال تبدأ التقنية **بعزل** الجين المراد دراسة وظيفته من الخلايا المشتقة من الجنين Embryo-derived stem cells (ES). ثم **يحور** ذلك الجين لانتاج جين طافر ثم يتم **استبداله** بالجين السوي ويتم الاستبدال **بعد اجراء بعض الخطوات المهمة** لضمان عملية الاستبدال بالجين السوي ويكون ذلك عن طريق **إيلاج** جزء (جين) آخر معه مقاوم للنيومايسين neomycin resistant (neo r)، وتكون الإضافة في وسط الجين وذلك لتسهيل امر العثور عن الخلايا التي تم الإيلاج فيها ويسمى هذا الجزء من الجين **بالواسم الموجب**، كما يضاف للجين جزء آخر يسمى بجين الثايميدين كاينيز (Tk) (Thymidine kinase) ويعتبر واسم ثاني ويعرف **بالواسم السلبي** حيث ان هذا الجين يسبب حساسية للخلايا الحاضنة له ضد المضاد الحيوي الكَانسيكلوفير (Ganciclovir). وبعد تصميم الجين الطافر هذا يتم **تحميله على ناقل مناسب** مثل **بلازميد القولون** حيث يتم ادخال الناقل إلى خلايا جنين الفأر الجذعية (ES) فيقوم البلازميد الناقل إما:

١- **بنقل الجين الطافر بدلا من الجين السوي (المستهدف)** على كروموسوم من كروموسومات خلايا الفأر الجنينية وفي هذه الحالة سوف يتم استبدال الجين السوي بجين مشابه مع احتوئه على الجزء الخاص بجين neo r في منتصفه دون الجزء الخاص بال Tk وذلك لان انزيم القطع المحدد سوف يتعرف على الجين المستهدف فقط بمعنى معرفة تسلسل البداية والنهاية له فقط.

٢- أو **بنقل الجين المستهدف بطريقة عشوائية** ويتم نقل الجين الطافر كله أي بالواسمة الثانية والخاصة بالـTk.

٣- أو **لا يتم الايلاج أصلا في الخلايا**.

ولعزل الخلايا التي تحمل الطفرة المستهدفة يتم وضع الخلايا كلها في وسط يحتوي على عقارين أحدهما **مضاد النيوميسين** المعروف باسم G418 والثاني مضاد الكانسيكلوفير فيقوم المضاد الاول بقتل الخلايا التي لا تحتوي على الجين الطافر فيقضي على الخلايا التي لم يحدث لها انتقال للجين المستهدف (الحالة الثالثة) أما العقار الثاني فهو مميت للخلايا التي أنتقل إليها الجين الطافر عشوائيا والحاوي على القطعة الثانية الخاصه بالجين Tk والمسببة للحساسية للمضاد الحيوي الثاني (الحالة الثانية).وعليه يتم الحصول على الخلايا المطلوبة (الحالة الأولى) والتي هندست وراثيا.

Assist.Prof. Dr.Ayoob Obaid Alfalahi
Molecular Genetic 4th Stage Field Crops Sciences

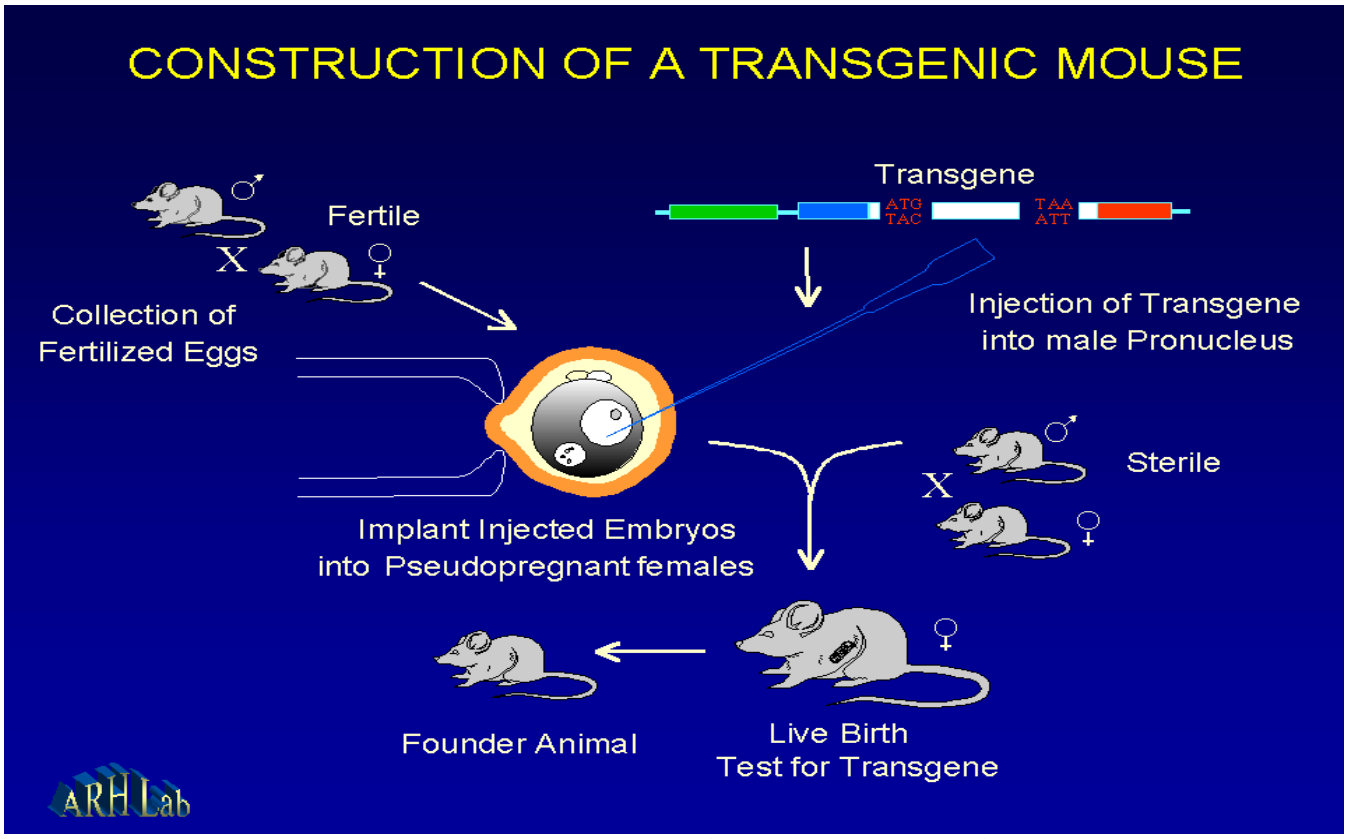
فإذا كانت مأخوذة من فأر **بني اللون**، يتم إيلاج تلك الخلايا داخل خلايا جنينية وهي في طور الكيسية الأريمية (blastocyst) لأنثى فأر **أسود اللون** ثم ننقل الخلايا الجنينية إلى رحم أم بديلة حيث تنمو وتكون النسل (شكل ٤٠). وتفحص الفئران للحصول على الفأر المحتوي على ظلال بنية ممزوجه باللون الاسود لتشير تلك الصفة على أنه الفأر المطلوب والحاوي على خلايا ES المهندسة وتعرف تلك الفئران بالفئران الكيميرية (الخليطة) Chimeras، وبعد ذلك يتم تزاوج الذكور الكيميرية

References

1. Kary B. Mullis. 1990. The Unusual Origin of the Polymerase Chain Reaction. 262(4): 56-65.
2. Kenshi Hayashi, Kary B. Mullis, François Ferré, Richard A. Gibbs. 1994. The Polymerase Chain Reaction Birkhäuser Basel. P, 464.
3. Zahra M Alkhafaji and Hassan M Abu-Almaali. 2013. PCRing and Primer Design. University of Baghdad, Baghdad. P, 304.
4. Mahmood M. Refaat and Saad B. Aloutabi. 2008. Introduction to Biotechnology. The General Egyptian Association of International Books and Documents, Cairo. P, 312
5. Elsahookie, M.M., and Ayoob O. Alfalahi. 2008. Polyploidy and its relationship with plant breeding and adaptation. The Iraqi J. Agric. Sci. 39(6):49-71.
6. Elsahookie, M.M., and Ayoob O. Alfalahi. 2008. TILLING: Modern technique combines traditional mutagenesis and functional genomics. The Iraqi J. Agric. Sci. 40(1):1-25.

Assist.Prof. Dr.Ayoob Obaid Alfalahi
Molecular Genetic 4th Stage Field Crops Sciences

(الخليطة) مع إناث سوداء ويختبر النسل Progeny بحثا عن الطفرة المستهدفة ويستبعد الفأر الاسودوالبني ويستمر في تزاوج الذكور والأناث الباقية لتلد فئران تحمل الطفرة بصورة نقية أي استنساختين من الجين الطافر فتظهر عندئذ الشذوذ الجسدي أو المرض للتعرف على وظيفة الجين المستهدف.



شكل ٤٠: كيفية الحصول على فئران محورة وراثيا.

بعض فوائد الهندسة الوراثية :

لقد اصبح للهندسة الوراثية اهداف عظيمة تحقق بعضها والعمل جارى على قدم وساق لتحقيق الباقي ولن تنتهي الطموحات التى فتحها هذا العلم لخدمة البشرية في كافة المجالات ومنها ما يخص مجال تطوير المحاصيل الزراعية:-

١. إنتاج نباتات مقاومة للأمراض الفيروسية :

وهي من أهم الصفات الواعدة التى تقدمها الهندسة الوراثية لتحسين الإنتاج النباتي حيث لا توجد وسيلة مباشرة لعلاج المحاصيل المصابة بالفيروسات سوى الوقاية من الإصابة بها عن طريق الممارسات الزراعية الجيدة مثل:

١-**استخدام دورة زراعية مناسبة.**

٢- **التخلص من الحشائش وبقايا المحصول السابق** التى تكون عائلا ثانيا للفيروس في فترة عدم وجود العائل الأساسي.

٣- **استعمال مبيدات الحشرات القاتلة للحشرات الناقلة للفيروس.**

Assist.Prof. Dr.Ayoob Obaid Alfalahi
Molecular Genetic 4th Stage Field Crops Sciences

وتعتمد فكرة هندسة النباتات المقاومة للأمراض الفيروسية على الدراسات السابقة في مجال **الوقاية المضادة Cross protection** والتي وجدت **أن عدوى النباتات بفيروسات ضعيفة تحصن النباتات ضد السلالات الأكثر ضراوة** وعندما تمكن **بيتش وزملاءه سنة ١٩٩٠** في جامعة واشنطن من نقل الجين المسئول عن إنتاج الغلاف البروتيني لفيروس التبغ الموازيكي **Tobacco mosaic virus** (TMV) في نبات الطماطم حيث عبر هذا الجين عن نفسه وانتج بروتين الغلاف الفيروسي وجد أن النباتات قاومت الإصابة الفيروسية بشدة وبذلك اثبت بيتش صحة نظريته الافتراضية القائلة أن بروتين غلاف (TMV) يضفي المقاومة على سلالات هذا الفيروس وغيرة من الفيروسات القريبة الصلة به، وبتلك التقنية أمكن هندسة اكثر من أثنى عشر نباتا مقاوم للفيروسات.

٢. نباتات مقاومة للحشرات:

اعتمدت فكرة مقاومة الحشرات خلال الثلاثون عاما الماضية على **إنتاج بروتين** تنتجه بكتريا Bacillus thuringiensis لتقوم تلك البروتينيات على قتل الحشرات. استخدمت تلك المستخلصات البروتينية Bt على نطاق واسع في مقاومة الحشرات حرشفية الأجنحة (الفراشات وأبى دقيق) والتي تعتبر آفات رئيسية حيث تقوم تلك البروتينات بالارتباط بأغشية أمعاء الحشرات المستهدفة بأن يتم انتقال الأيونات من البروتينات Bt إلى الخلايا الطلائية بالأمعاء فتتعطل قدرة الحشرات على التغذية فتموت. تلك المبيدات الحشرية ليس لها تأثير سام على الثدييات بل ولا على الأنواع الحشرية الأخرى وفاعليتها لا تدوم إلا وقتا قصيرا وبالتالي فهي آمنة بيئيا. ولقد ثبت ان وجود جينات Bt داخل نبات القطن قد جعلها مقاومة لكل **الآفات اليرقية الرئيسة** بما فيها **دودة جوزة القطن** وعلية يمكن ان يؤدى استخدام تلك النباتات المهندسة إلى خفض كميات المبيدات الحشرية بنسبة ٤٠-٦٠ %. ولقد تم البحث عن جينات Bt أخرى لتؤثر على حشرات غير يرقية وقد امكن تصميم جين فعال ضد **خنفساء كلورادو** التي تصيب **البطاطس**. كما امكن تصميم جين Bt اخر في شركة ميكوجين بسان دييجو بكاليفورنيا **لمقاومة النيماتودا**، كما صمم جين فعال ضد **البعوض الناقل للملاريا**. وقد اكدت الاختبارات ان بروتينات Bt انها آمنة بيئيا فضلا على ان نسبة وجودها في النباتات المهندسة وراثيا لا تتعدى ٠.١ % من البروتين الكلى في النبات المحور وهذا البروتين يتحلل تماما كأي بروتين في القناة الهضمية .

٣. ثمار أفضل نوعية وتقاوم التلف:

طور الباحثين طريقتين لاطالة عمر الثمرة

الاولى: هى **ايلاج جينات تؤثر على جينات النضج** وهذه الجينات هي المسئولة عن انتاج الاثيلين والأنزيمات الاخرى وذلك بأن تنتج بروتينات تقوم بالارتباط مع RNA الخاص بالنضج فيمنعه من استنساخ البروتينات الخاصة بالنضج فتؤخر النضج وتقاوم الرخاوة.

ثانيا: اما الاتجاه الآخر هو **ايلاج جين يقوم بتصنيع إنزيم يقوم بتحليل مركبات الطليعة Precursor** التي تكون الاثيلين وبذلك يتأخر التلف.

كما تمكن بعض الباحثون من ايلاج جين عرف High pigment gene وهو المسئول عن انتاج الصبغات الملونة في الطماطم مثل الانثوسيانين بكمية كبيرة ليرفع تركيز الصبغة في ثمار الطماطم لكى تتمكن ربة المنزل من استخدام عدد اقل من الثمار.

Assist.Prof. Dr.Ayoob Obaid Alfalahi
Molecular Genetic 4th Stage Field Crops Sciences

المادة الوراثية خارج النواة Extranuclear DNA:

بالإضافة إلى المادة الوراثية الموجودة في نواة الخلايا مميزة النواة، هناك كميات قليلة من المادة الوراثية موجودة في السيتوبلازم ويختلف في تكوينة عن المادة الوراثية النووية في تسلسله من القواعد.وتوجد هذه المادة الوراثية في العضيات التالية:

١- الميتوكوندريا (شكل 41).

٢- البلاستيدات الخضراء (شكل 42).

المادة الوراثية في الميتوكوندريا (Mitochondrial DNA) (mDNA):

تعتبر الميتوكوندريا عبارة عن عضيات (جسيمات) سايتوبلازمية صغيرة توجد في خلايا الكائنات حقيقية (مميزة) النواة، وتمد الكائنات الحية بالطاقة الضرورية للحياة عن طريق أكسدة المواد الغذائية لأنتاج الأدينين ثلاثي الفوسفات (ATP)، الذي يعتبر وقود التفاعلات الحيوية، حيث تنقل الطاقة المطلوبة على جزيء ادينين ثلاثي الفوسفات، بالأضافة إلى دورها في تنظيم العمليات الأيضية بالخلية.وتتميز الميتوكوندريا بأحتوائها على كمية قليلة من المادة الوراثية والتي تحتوي على **٣٧ جين** مسئوله عن قيام الميتوكوندريا بوظائفها الحيوية.

وتتميز المادة الوراثية للميتوكوندريا بما يلي:-

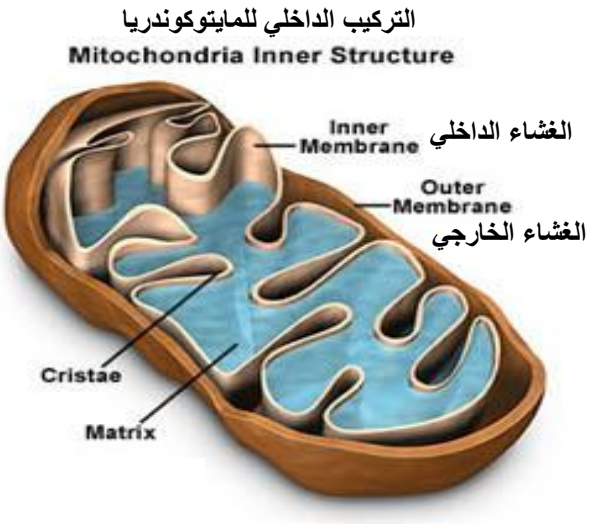
١- المادة الوراثية عبارة عن جزيئات صغيرة مقارنة بالنووية.

٢- توجد بصورة عامة بشكل DNA **مزدوج دائري** ذي **إلتواءات مفرطة**

٣- ولايرتبط بالهستونات.

٤-تنقسم اثناء انقسام الخلية، فيتضاعف DNA الموجود فيها ويعبر إلى الميتوكوندريا الوليدة.

٥- يشفر mDNA **للأحماض النووية الرايبوزية الناقلة** والرايبوسومية الموجودة في الميتوكوندريا، ولبعض البروتينات، بالرغم من أن ٩٥% من بروتينات الميتوكوندريا تشفر بواسطة DNA النواة.



شكل 41 الشكل الخارجي للميتوكوندريا كروموسوم الميتوكوندريا الحلقي

Assist.Prof. Dr.Ayoob Obaid Alfalahi
Molecular Genetic 4th Stage Field Crops Sciences

اما بالنسبة للأمراض فلقد وجد ان كثيرا من الأمراض الناتجة من الميتوكوندريا لم يتوفر لها علاج مؤكد، حيث وجد ان نصف الأفراد الذين يصابون بسبب خلل في وظائف الميتوكوندريا تظهر عليهم أعراض الأصابه وهم دون الخامسة من العمر، كما ان ٨٠% يموتون قبل بلوغهم سن العشرين، خاصة عند اولئك الذين ينتج عن الأصابة امراض سرطانية.

لذا فأن كثير من الدارسين في الوقت الحالي يعملون على دراسة تأثير المادة الوراثية في الميتوكوندريا والعوامل البيئية المسببه في ظهور مثل هذه الأمراض، ومن الأمراض التي تظهر على الأنسان بسبب اختلالات في المادة الوراثية للمايتوكوندريا **شيخوخه مبكرة**، وامراض **العضلات العصبي** و**امراض ايضية** تورث للنسل. **والعقم الذكري السايتوبلازمي** في النبات. كما وجد ان نسبة الطفرات في المادة الوراثية في المايتوكوندريا تكون أعلى بـ ١٠ – ٢٠ مره من تلك التي تحصل في المادة الوراثية النووية، حيث ان المادة الوراثية في الميتوكوندريا تكون أكثر عرضه لعمليات الأكسدة من المادة الوراثية النووية.

المادة الوراثية في البلاستيدات الخضراء Chloroplast DNA(cpDNA) :

تتميز النباتات عن غيرها من الكائنات الحية بقدرتها على انتاج الطاقة الضرورية للقيام بالوظائف الخلوية عن طريق البناء الضوئي، حيث تعتبر المادة الخضراء Chloroplast المركز الرئيسي للقيام بعملية البناء الضوئي. تم التعرف على وجود مادة وراثيه خاصة بالبلاستيدات الخضراء عندما تم ملاحظة تميز احد النباتات بوجود اختلاف للآلوان على نفس النبات، حيث كانت اجزاء من النبات ذات لون أخضر وأجزاء أخرى بيضاء اللون ممتزجة مع اللون الأخضر واجزاء اخرى بيضاء.

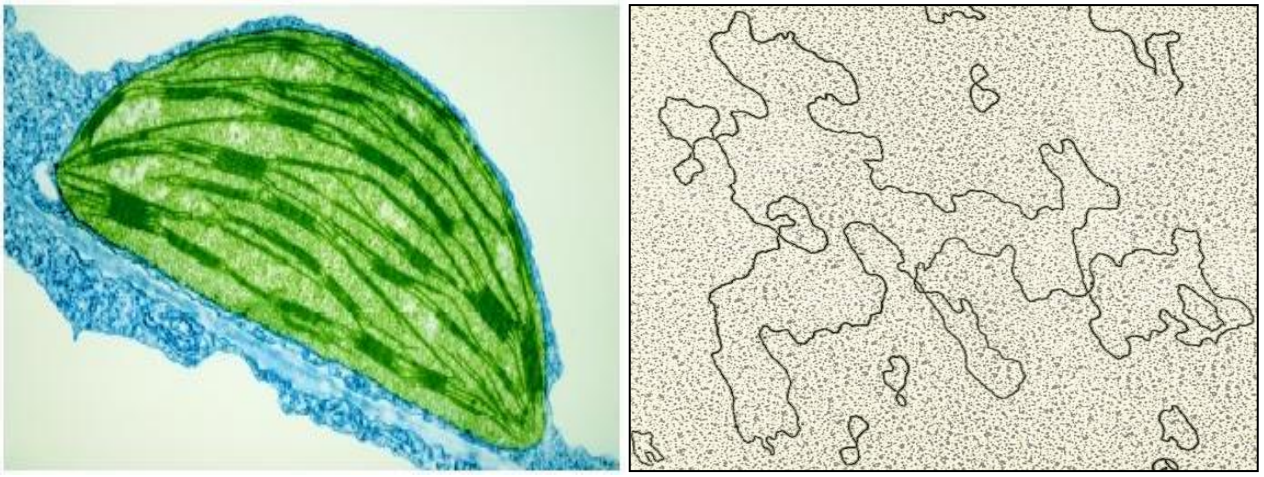
وتم القيام بالتجربة التالية **لإثبات وجود مادة وراثية خاصة بالبلاستيدات بخلاف الموجودة بالنواة** فعند تلقيح أزهار تنمو على أفرع **بيضاء** بحبوب لقاح من أزهار تنمو على أفرع **خضراء** وجد ان النسل الناتج كان يتميز بأوراق **بيضاء** وعند تلقيح أزهار تنمو على أفرع **خضراء** بحبوب لقاح من أزهار تنمو على أفرع **بيضاء** كان النسل الناتج يتميز بأوراق **خضراء**. حيث تم التوصل إلى ان أوراق النسل الناتج دائما مايكون لونها مطابق لصفة ألوان أوراق الفرع الذي تم تلقيح ازهاره. وتم الأستنتاج بأن السبب يعود إلى الصفات الوراثية التي تورث عن طريق الأم والتي لايمكن ان تفسر بواسطة قوانين مندل، حيث ان مثل هذه الجينات تكون موجودة في المادة الوراثية في البلاستيدات وليس لها علاقة بالمادة الوراثية الموجودة في النواة.

تتميز أغلب الجينات الموجودة في البلاستيدات بتخصصها في انتاج rRNA والبروتينات التي تدخل بطريق مباشر أو غير مباشر في عمليات البناء الضوئي، وعند حدوث إي خلل في عمليات تكوين المادة الخضراء ينتج عنها أوراق صفراء بشكل جزئي او كامل.
كما يتميز الجينوم في البلاستيدات بصغر حجمه ويحتوي بالتقريب على أكثر من ١٠٠ جين بحيث تعمل نصف هذه الجينات على إنتاج جزيئات RNA المهمة في تكوين البروتينات. وتتميز المادة الوراثية في البلاستيدات بالتالي:-

١- المادة الوراثية عبارة عن جزيئات صغيرة مقارنة بالنووية.
٢- يتميز بأنه **دائري** و**مفرط بالألتواء**.
٣- لا يرتبط مع الهستونات.

Assist.Prof. Dr.Ayoob Obaid Alfalahi
Molecular Genetic 4th Stage Field Crops Sciences

٤- ينقسم أثناء انقسام الخلية.
٥- يحمل DNA البلاستيدات المعلومات المشفرة لمكونات غشاء الخلية
٦- اكبر منDNA للمايتوكوندريا (mDNA).



شكل ٤٢ الشكل الحلقي لكروموسوم البلاستيدات الشكل الخارجي للبلاستيدات في الخلايا النباتية

الطفرات الوراثية Mutation:

يمكن تعريف الطفرة بانها تغير في تسلسل أو عدد النكليوتايدات في الحامض النووي DNA يؤدي إلى تكوين تسلسلات جديدة من النكليوتايدات فينتقل آثارها بصفات معينة إلى الأبناء. ان الطفرة يمكن أن تكون على مستوى الكروموسوم فيمكن ان يكون تغيير في عدد الكروموسومات أو تغيير في تركيب الكروموسوم الواحد أو حتى يمكن أن يكون التغيير من الصغر لحد تغير نيوكليوتيدة واحدة.

شاهد الانسان حدوث الطفرات الوراثية في الكثير من الكائنات الحية، واستفاد منها أحيانا دون معرفة حقيقتها أو أسبابها، نذكر على سبيل المثال ما لاحظه مزارع أمريكي عام ١٧٩١م كان قصر واعوجاج أرجل أحد الحملان وعدم استطاعة ذلك الحمل القفز عبر الاسيجة أو الركض بسرعة مما أدى إلى زيادة واضحة في وزن وصوف ذلك الحمل، دفعه ذلك إلى استخدام ذلك الحمل (عندما أصبح كبشا) لتوليد سلالة من الأغنام القصيرة الأرجل تمتاز بكثرة لحومها وغزارة صوفها. لكن ليست جميع الطفرات المكتشفة مفيدة للإنسان بل أن بعضها يسبب إنتاج حيوانات أو نباتات ذات أمراض وراثية مستعصية تسبب خسائر اقتصادية هامة مما يستوجب القضاء عليها لمنع انتقالها إلى الأجيال التالية. ولكن التقصي العلمي الحقيقي بالطفرات بدأ عندما أعلن العالم الهولندي "جو ديفريز" أحد مكتشفي نظرية مندل سنة ١٩٠١م أن ملاحظاته وتجاربه على النبات أثبتت حقيقة التطور (Evolution) من خلال تغيرات مفاجئة في وراثة الكائن الحي، أطلق عليها اسم الطفرة Mutation.

ويعود الفضل في وضع **نظرية الطفرات** إلى العالم Devries عام ١٩٠١، وبعد ذلك أجريت أبحاث عديدة حول الطفرات التلقائية في الكائنات الحية، ساهمت ذبابة الخل (Drosophila melanogater) بكونها مادة علمية ممتازة لهذه الدراسات إذ تم التعرف فيها على المئات من الآليلات الطبيعية والطافرة (أليلات لون العين، نوع الأجنحة، لون الجسم).

الأساس الجزيئي للطفرة The Molecular Basis Of Mutation:

Assist.Prof. Dr.Ayoob Obaid Alfalahi
Molecular Genetic 4th Stage Field Crops Sciences

تتحدد إمكانيات نمو وتمايز (Growth and differentiation) أي كائن حي بما يحتويه جينومه من الجينات، لذلك فأن أي تغير أو طفرة (Mutation) في المادة الوراثية يظهر تأثيره على الكائن الحي، ذلك إن المحتوى الجيني للخلية يُتَرجَمْ عادة إلى آلاف من البروتينات المختلفة والتي قد يؤدي أي تغيير فيها إلى آثار ضارة على الخلية والكائن الحي، **ولهذا السبب تتميز المادة الوراثية بالثبات والاستقرار في الخلية الحية على مدى الأجيال**، وهذا الثبات يضمن المحافظة على بقاء الكائنات ونموها. ولهذا فالخلية تعمل على جانبين مهمين لضمان ثبات والاستقرار المادة الوراثية في الخلية الحية على مدى الأجيال هما:

١- ان تكون **النظم الأنزيمية** الخاصة بتناسخ المادة الوراثية فيها **دقيقة جداً**.
٢-ان يكون بمقدور الخلية **استنباط نظم دقيقة لإصلاح الأخطاء العارضة** التي تحدث في جزيء المادة الوراثية اثناء حفظه أو تناسخه.

حيث ان المادة الوراثية عبارة عن مركب عضوي معقد قد يتعرض للتلف بطرق مختلفة مما يؤدي إلى **فقدان أو إضافة قواعد**، وإلى **تحطم الهيكلة الأساسية للمادة الوراثية**،أو قد يحدث **تغيير في الخواص الكيميائية للقواعد**، ونظراً لأن قدرة الكائن على تحمل أو مقاومة المعدل الطبيعي للتلف في المادة الوراثية محدودة، فلابد من وجود **ميكانيكيات انزيمية تخصصية لإصلاح** الأماكن التالفة في المادة الوراثية وهذه الميكانيكيات الانزيمية سنتطرق لها في محاضرات لاحقة.

طبيعة الطفرات:
ان الطفرات أو التغيرات في تتابعات القواعد التي تحدث في جزيء المادة الوراثية يمكن أن تحصل بصورة **تلقائية** أو بصورة **مستحدثة** بواسطة المطفرات (Mutagens) مثل **الإشعاع** و**المواد الكيميائية**. إذا كان التغيير على مستوى الجين فانه قد يؤدي إلى تغيير صورته أي تحوله إلى حالة أخرى، وقد يكون هذا التغيير خطراً يؤدي إلى **وقف عمل** الجين من إداء عملية معينة كإنتاج إنزيم أو هرمون معين وبالتالي يكون الجين موقوف النشاط أو قد يؤدي هذا التغيير إلى تقليل أو زيادة إنتاج الجين وبالتالي يؤثر على **نشاط الجين**.

يمكن تقسيم الطفرات على أساس تأثيراتها المظهرية:
١. **الطفرات الشكلية**: طفرات تؤدي إلى تغيير اللون أو الشكل أو الحجم.
٢. **الطفرات الفسيولوجية**: تؤدي إلى تغيرات في الوظيفة كالتغيرات في **معدل النمو للفرد** أو في **مقدرته على مقاومة ظروف بيئته** غير الملائمة كالحرارة والمنبهات الكيميائية وغيرها.
٣. **الطفرات الكيميائية**: تؤثر على قابلية الكائن الحي على إنتاج مادة أيضية مثل **سكر** أو **حامض أميني**.
٤. **الطفرات الشرطية**: وهي الطفرات التي يظهر تأثيرها على الكائن الحي في حالة وضع الكائن تحت ظروف نمو معينة وليس غيرها، كما هو الحال في **الطفرات الشرطية الحساسة للحرارة** التي تؤثر على نمو الكائن في درجة حرارة معينة وليس غيرها.
٥. **الطفرات المميتة**: تسبب موت الكائن الحي الذي يحتويها في أي مرحلة من مراحل النمو.

ويمكن تقسيم الطفرات على اساس سبب حدوثها إلى:

Assist.Prof. Dr.Ayoob Obaid Alfalahi
Molecular Genetic/4th Stage Field Crops Sciences

أولاً: الطفرات التلقائية (Spontaneous mutation)**:** تسمى أيضاً بالطفرات **الذاتية.** وهي الطفرات التي تحدث عند عدم تعرض الكائن لمادة مطفرة معروفة، تتضمن الطفرات التلقائية معظم التغيرات التي قد تحدث في تتابعات القواعد في جزيء المادة الوراثية، إذ نجد ان بعض الطفرات لها تأثير طفيف على **الناتج النهائي للجين**، والبعض الآخر قد **تقضي على وظيفة الجين**، ومن أسباب الطفرات التلقائية التي تحدث على مستوى DNA هي:

١- تعرض الكائن الحي للإشعاعات الموجودة في الطبيعة.
٢- تفاعلات بايولوجية تجري داخل الخلية.
٣- حصول تبدلات طبيعية في درجة الحرارة.

ثانياً: الطفرات المستحدثة (Induced mutation)**:-** تحدث هذه الطفرات نتيجة التعرض إلى بعض المواد الكيميائية أو الفيزيائية.

كما ويمكن تقسم الطفرات على اساس حجمها إلى نوعين:

١. **الطفرات الكروموسومية** Chromosome mutations :-
يطلق عليها **بالتغيرات الكبيرة** Macrolesions أو التغيرات في عدد الكروموسومات.

٢. **الطفرات الجينية** Gene mutations :
ويطلق عليها **بالتغيرات الصغيرة** Microlesions أو الطفرات **النقطية** Point mutations والتي تشمل تغير في **زوج نيوكليوتيدي واحد** ويمكن ان تؤدي إلى تغير في عدد وتركيب الجينات ضمن الكروموسوم الواحد (تغيرات في تركيب الكروموسوم).

أنواع الطفرات الجينية:

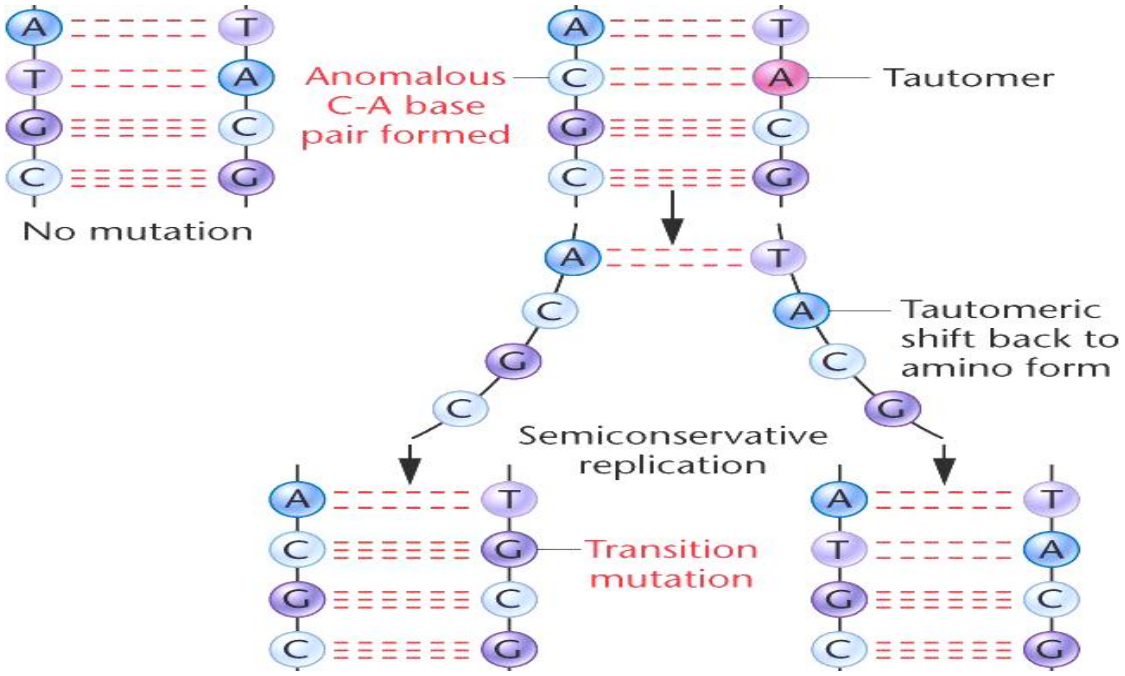
اولاً:- طفرة استبدال قاعدة.

ثانيا:- طفرة إضافة أو فقد قاعدة واحدة او شفرة كاملة (طفرة تغير الإطار Frame shift mutations).

Assist.Prof. Dr.Ayoob Obaid Alfalahi
Molecular Genetic/4th Stage Field Crops Sciences

اولاً:- طفرة استبدال قاعد

ان الطفرات الناتجة من الأستبدال أو الأحلال ينتج عنها بشكل عام ما يعرف **بطفرات تغير القاعدة الواحدة** وهي من ابسط أنواع الطفرات كما في شكل٤٥ التالي:-



شكل٤٥: يوضح حدوث طفرن نتيجة وجود القواعد بصورة النظام المشابه tautomeric shifts

كان الإفتراض الذي وضعه واتسون وكَريك بأن **تركيب القواعد ليس ثابتاً** بسبب تحرك ذرات الهيدروجين من وضع أو مكان إلى آخر في البيورينات أو البرميدينات، فنجد ان **الثايمين والكَوانين**

References

1. Kary B. Mullis. 1990. The Unusual Origin of the Polymerase Chain Reaction. 262(4): 56-65.
2. Kenshi Hayashi, Kary B. Mullis, François Ferré, Richard A. Gibbs. 1994. The Polymerase Chain Reaction Birkhäuser Basel. P, 464.
3. Zahra M Alkhafaji and Hassan M Abu-Almaali. 2013. PCRing and Primer Design. University of Baghdad, Baghdad. P, 304.
4. Mahmood M. Refaat and Saad B. Aloutabi. 2008. Introduction to Biotechnology. The General Egyptian Association of International Books and Documents, Cairo. P, 312
5. Elsahookie, M.M., and Ayoob O. Alfalahi. 2008. Polyploidy and its relationship with plant breeding and adaptation. The Iraqi J. Agric. Sci. 39(6):49-71.
6. Elsahookie, M.M., and Ayoob O. Alfalahi. 2008. TILLING: Modern technique combines traditional mutagenesis and functional genomics. The Iraqi J. Agric. Sci. 40(1):1-25.

Assist.Prof. Dr.Ayoob Obaid Alfalahi
Molecular Genetic 4th Stage Field Crops Sciences

علم ما فوق الوراثة (الوراثة اللاجينية) Epigenetics

لقد أضاف مفهوم **فوق الوراثة** بعداً جديداً لفهمنا لطبيعة العوامل المتحكمة في انتقال صفات الكائن الحي والتعبير عنها مظهريا أو فسيولوجياً، وربما ستعيد هذه الاكتشافات الجدل حول فرضيات جرى تحييدها في تفسير الدور الذي يمكن أن تلعبه **العوامل البيئية في إحداث تغيرات وراثية** تنتقل عبر الأجيال، ومثال ذلك تطور ما يسمى بالأنواع البيئية Ecotypes. تندرج العديد من الآليات ضمن التغيرات فوق الوراثية، ومنها تحورات الهستون وإعادة تشكل الكروماتين والايسلة وحتى تغايرات RNAi، إلا أن الآلية الأكثر شيوعاً والتي حظيت باهتمام كبير وتمت دراستها باستفاضة اكبر هي الميثلة Methylation.

يعرف علم ما فوق الوراثة بأنه العلم الذي يهتمّ بدراسة اختلاف الصفات (Traits) المظهرية أو الخلويّة أو الفسيولوجيّة التي لا تحدث بسبب تغيّرات في سلسلة الحامض النوويّ (حامض نووي ريبوزي منقوص الأكسجين). وبعبارةٍ أبسط، علم ما فوق الجينات هو الذي يدرس بشكلٍ رئيسيّ العوامل الخارجيّة والبيئيّة التي تنشّط أو تثبّط عمل الجينات، وتؤثّر على كيفيّة قراءة الخليّة للجينات. ومن هنا، فإنّ هذا العلم يسعى **لوصف التعديلات الديناميكيّة في القدرة الكامنة لخليّة ما على الاستنساخ وهذه التعديلات قد تنتقل أو لا تنتقل بالوراثة**، مع أنّ استخدام مصطلح "علم ما فوق الوراثة" لوصف العمليّات التي لا تنتقل بالوراثة هو أمرٌ مثيرٌ للجدل، وعلى خلاف علم الجينات القائم على دراسة التغيّرات في سلسلة الحامض النوويّ (DNA) (أي التركيب الوراثي Genotype)، فإنّ التغيّرات في التعبير الجينيّ والنمط المظهري (Phenotype) تحدث لأسباب أخرى في علم ما فوق الوراثة، ولهذا استُخدم مقطع **(Epi)** بمعنى: فوق أو خارج أو حول.

يشير المصطلح أيضًا إلى التغيّرات الوظيفيّة التي تحدث للمجموع الجينيّ (الجينوم Genome) أو التي تحدث في التعبير الجيني أو النمط المظهري التي تنتج عن آليات أخرى غير تلك التي تتعلق بتغير تسلسل DNA. ولذا يشير الاسم إلى تعديلات تحدث في وظيفة الجين دون أي تغيير في سلسلة النكليوتايدات التي تشكل الحامض النووي، ومن الأمثلة على هذا النوع من التغيّرات: **ميثلة الحامض النوويّ (DNA methylation) وتحورات الهستون (Histone modification)**، فكلاهما يعدّل كيفيّة تعبيرالجينات عن نفسها (Gene expression) دون تعديل سلسلة الحامض النوويّ التابعة لها، وقد يُتَحكّم بالتعبير الجيني عن طريق البروتينات الكابحة (Repressor genes) التي ترتبط بالمواقع الكاتمة (Silencer regions) المتواجدة على سلسلة الحامض النوويّ (DNA). هذه التغيّرات التخليقية قد تستمرّ خلال انقسامات الخليّة طوال فترة حياتها، وقد تستمرّ أيضًا لعدّة أجيال حتى لو أنّها لم تتضمّن تغيّرات في تركيب سلسلة الحامض النوويّ (DNA) للكائن الحيّ.

فبدلًا من ذلك، ثمّة عوامل غير جينيّة تسبّب تغيّرًا في سلوك أو طريقة تعبير الجينات نفسها. والدلائل القاطعة التي تدعم الوراثة اللاجينية تُظهر أنَّ هذه الآليات قد تسمح بتوريث التأثيرات المترتبة على تجارب الوالدين إلى الأجيال اللاحقة!. فالوراثة اللاجينية **تتعارض** مع فكرة أن **الوراثة تتم فقط عبر الكود الجيني** الذي يورث من الأبوين إلى النسل.

Assist.Prof. Dr.Ayoob Obaid Alfalahi
Molecular Genetic 4th Stage Field Crops Sciences

أحد الأمثلة على التغيّر ما فوق الوراثي في الكائنات حقيقيّة النواة (Eukaryotes) هي عمليّة التمايز الخلويّ، فخلال عمليّة التشكّل (Morphogenesis) فإنّ الخلايا الناتجة من انقسام البويضة المخصّبة ستتحول إلى جميع أنواع الخلايا الموجودة في هذا الكائن الحيّ، كالخلايا العصبيّة والعضليّة وبطانة الأوعيّة الدمويّة .. إلخ، عن طريق تنشيط بعض الجينات وتثبيط أخرى.

الأساس الجزيئيّ لما فوق الوراثة Molecular background of Epigenetics

قد تعدّل التغيرات فوق الوراثية من فعالية بعض الجينات، دون تغيير سلسلة الحامض النوويّ DNA، كما يمكن تنشيط أو تثبيط بروتينات الكروماتين المرتبطة بالحامض النوويّ DNA؛ **وهذا هو السبب في أنّ الخلايا المتمايزة في الكائنات الحيّة متعددة الخلايا تفعل فقط الجينات اللازمة لنشاطها وتُحفَظ التغيّرات فوق الجينية لدى انقسام الخلايا**، ويحدث معظمها خلال حياة النبات، لكن إذا حدث تثبيط جينيّ في حبة لقاح أو بويضة ونتج عنهما بويضة مخصّبة، فإنّ هذه التغيرات قد تنتقل إلى الجيل اللاحق.

قد ينجم عن الضرر الذي يلحق بالحامض النوويّ DNA تغيّرًا فوق وراثياً أيضًا وهذه الأضرار شائعة جدًا (**فهي تحدث ١٠٠٠ مرّة في اليوم الواحد في الخليّة الواحدة**)، ومع أن غالبيتها تُصحّح، **إلا انه قد يحدث التغير فوق الوراثي ويبقى في مكان إصلاح الضرر**. على وجه التحديد، إذا حدث كسر مزدوج في سلسلة الحامض النوويّ DNA، فستحدث سلسلة غير مبرمجة من العمليّات فوق الوراثية التي تتضمن كبت جينات معينة عبر ميثلة الحامض النوويّ، وتعديلات معينة في الهستون والكروماتين. بالإضافة إلى ذلك، قد يتجمّع إنزيم Parp1(poly(ADP)-ribose polymerase مع المركّب الناتج عنه (poly(ADP)-ribose(PAR) ممّا ينشّط الكروماتين ويحدث تغييرات فوق جينيّة معيّنة.

البحث في علم ما فوق الجينات يحتوي على تقنيّات مختلفة لفهم الظاهرة ما فوق الوراثية ومنها الترسّب المناعيّ الكروماتينيّ (Chromatin immunoprecipitation)، وFlourescent in situ hybridization وغيرها. كما تلعب تقنيات المعلومات الحيويّة دورًا متزايدًا في هذا المجال.

آليات التعديل فوق الوراثي Mechanisms of Epigenetic Modifications

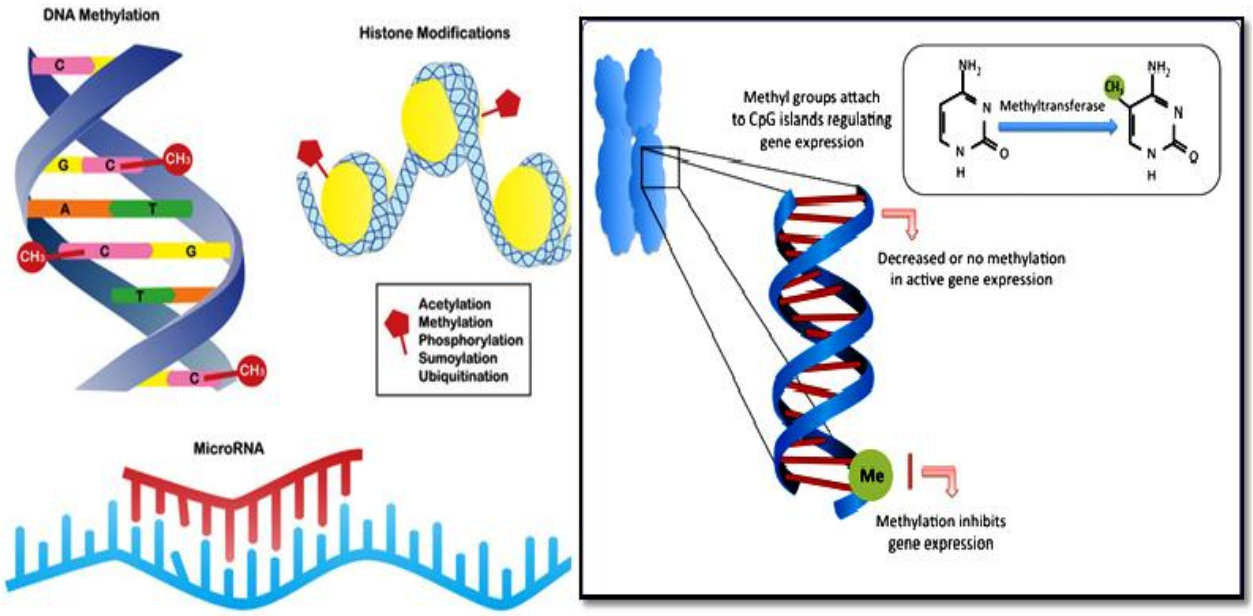
- **التعديلات "التساهمية" بين الحامض النوويّ والهستون**

يتألف الكروماتين من الحامض النوويّ DNA بالإضافة إلى بروتينات الهستون المرتبطة به، فإذا اختلفت الطريقة التي يرتبط بها الحامض مع هذه البروتينات، قد يختلف التعبير الجيني أيضًا، وتحدث التعديلات على الكروماتين Chromatin remodeling من خلال طريقتين أساسيّتين:

- **تعديلات ما بعد الترجمة Posttranslational modifications للأحماض الأمينيّة لبروتينات الهستون، ممّا يؤثّر على ارتباط الحامض النوويّ بها.**

Assist.Prof. Dr.Ayoob Obaid Alfalahi
Molecular Genetic 4th Stage Field Crops Sciences

♣ **إضافة مجموعات المثيل الوظيفيّة للحامض النوويّ DNA ممّا يجعل المواقع المميثلة أقلّ مقدرة على تعبير جيناتها عن نفسها ويحدث عادةً للمناطق المكرّرة في الحامض.**



التحورات فوق الوراثية وميثلة DNA وعلاقتها بالتعبير الجيني

يتعرض DNA الذي يتألف من سلسلة طويلة من الوحدات البنائية المسماة بالنكليوتيدات (Nucleotides)، بالإضافة إلى سكر خماسي رايبوزي منقوص الأوكسجين مرتبط بمجموعة فوسفات، إلى تحورات مختلفة تغير من تركيبه الكيميائي وبالتالي أداءه لوظائفه، ويعد ارتباط مجاميع المثيل به التي وصفت في منتصف القرن المنصرم احد أهم هذه التحورات. كيميائياً، تحدث الميثلة بإضافة مجموعة المثيل (CH_3) إلى نكليوتايد السايتوسين على موقع الذرة الخامسة للكاربون في حلقة البايرميدين (Pyrimidine ring) وتدعى حين إذ "٥- مثيل سايتوسين" (5-methylcytosine (Mc أو 5-methyl deoxycytosine للدلالة على أن هذه العملية تحدث بشكل خاص في الحامض النووي.

اكتشفت الميثلة في بادئ الأمر كجزء من أنظمة الدفاع لدى العائل في الكائنات بدائية النواة للتصدي لهجمات الفايروسات من خلال هضم وتقطيع دنا الكائن المتطفل وبالتالي إبطال مفعوله، لكنها موجودة أيضا في الكائنات حقيقية النواة وتختلف أهميتها باختلاف الكائن وموقعها في DNA، كما أنها تلعب دوراً مهما في السيطرة على العناصر المنتقلة TE (Transposable Elements) في الجينوم. لذا يساهم تفاعل الميثلة الكيموحيوي في التنظيم الطبيعي لعمل الجينوم وتطوره، كما استخدم في الكشف عن التباين في النظام الإنزيمي في الكائنات بدائية النواة، والتنظيم فوق الوراثي للتعبير الجيني وتركيب الجينوم في معظم الكائنات حقيقية النواة.

تختلف نسبة ميثلة DNA باختلاف أنواع الكائنات الحية، وقد تصل نسبة ميثلة السايتوسين إلى أكثر من ٣٠% في بعض الأنواع النباتية. إن النسبة العالية لتباين نمط الميثلة DNA وتركيب الكروماتين تلعب دوراً محورياً في التنظيم فوق الوراثي لعمل الجينات، وهو أمر ضروري

Assist.Prof. Dr.Ayoob Obaid Alfalahi
Molecular Genetic 4th Stage Field Crops Sciences

لتغيير المعلومات الوراثية وتحديد الشكل المظهري للكائن الحي. كما يمكن أن تشارك الحوامض النوويّة الرايبوزية الصغيرة (Small RNAs) في عمليّة التحكّم بالتعبير الجيني عن طريق تعديل الكروماتين، من خلال استهدافه لمواقع الحفّاز أو المحفز (Promoter) في سلسلة الحامض النوويّ DNA.

أنزيمات القطع Restriction Enzymes

حرص العديد من الباحثين على عزل ودراسة أنزيمات القطع وخصوصاُ في مجال الهندسة الوراثية، ، وتم تقسيمها إلى ثلاثة أنواع رئيسة:

- إنزيمات القطع من النوع الأول (Type I restriction enzymes): تتصف هذه الأنزيمات بصفات مميزة جداً، إذ تتعرف على تتابع معين في حلزون DNA ولكنها لا تقطع الحلزون خلال ذلك التتابع، **وإنما تتحرك على طول جزيئة DNA لمسافة تتراوح بين ١٠٠٠-٥٠٠٠ نكليوتايد من موقع التتابع الحساس ثم تقطع خيطا واحدا وبصورة عشوائية مكونة فجوة في ذلك الخيط يبلغ طولها حوالي ٧٥ نكليوتايد.**
- إنزيمات القطع من النوع الثاني (Type II restriction enzymes): يمكن لهذه الأنزيمات التعرف على تتابع معين من النكليوتايدات في حلزون DNA، ثم تقطع الحلزون خلال أو قرب ذلك التتابع لإنتاج قطع دنا محددة الأطوال، وهي ذات أهمية في تقنيات الهندسة الوراثية.
- إنزيمات القطع من النوع الثالث (Type III restriction enzymes): تتميز هذه الأنزيمات بقابليتها على قطع حلزون DNA في مواقع محددة ومعروفة، وبهذا تكون خصائص هذه الأنزيمات وسطاً بين صفات إنزيمات النوعين الأول والثاني.

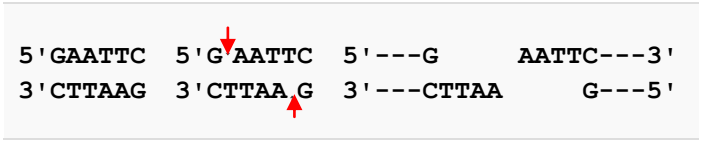
يمكن أن تختلف إنزيمات القطع بعدد **التتابعات المتناظرة (Palindromic sequence)** التي تميزها، فبعضها يميز تتابعات تتألف من أربعة نكليوتايدات وأخرى خمس أو ست..وهكذا. وبذا يتباين تكرار مواقع القطع في الجينوم لإنزيم معين بحسب عدد التتابعات التي يتعرف عليها، وعليه **يرتبط التكرار عكسياً مع عدد التتابعات بسبب زيادة ندرة مواقع القطع بزيادة عدد التتابعات** وفقاً للمعادلة التالية:

عدد مواقع القطع=$N^{\frac{1}{4}}$، و N تمثل عدد تتابعات النكليوتايد.

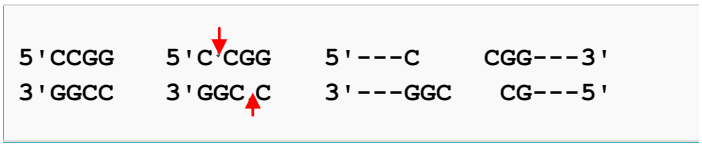
تختلف الإنزيمات أيضاً في شكل القطع الذي تنتجه في شريط DNA، وهذا يرتبط بشكل مباشر بتتابع القطع، فإما أن يقطع الإنزيم كلا شريطي DNA بشكل متقابل منتجاً نهايات ملساء (Blunt ends)، أو أن يقطع الشريطين بشكل متعرج منتجاً نهايات تعرف بالنهايات اللزجة (Sticky ends)، والأخيرة هي المفضلة في الدراسات الجزيئية **لسهولة ربط القطع الناتجة بالمكيفات (Adaptors) التي سترتبط في خطوة لاحقة بالبادئات.**

تنتمي الإنزيمات الثلاث *EcoRI* و*HpaII* و *MspI* إلى النوع الثالث الذي يقطع عند التتابع الهدف. إذ يتعرف إنزيم *EcoRI* على التتابع السداسي النكليوتايد (5'-GAATTC-3') المتناظر ويقطع بين الكوانين والادنين منتجاً تتابع رباعي النكليوتايد ذو نهاية لزجة (5'-AATT).

Assist.Prof. Dr.Ayoob Obaid Alfalahi
Molecular Genetic 4th Stage Field Crops Sciences



وهو بذلك يشترك مع الإنزيمين الآخرين بشكل نهايات القطع التي ينتجها، إلا إن إنزيمي *HpaII* و*MspI* يميزان ذات التتابع الرباعي (5'-CCGG-3')، ولذا يوصفان بأنهما إنزيمي قطع متناظرين (Isoschizomers).



ويكمن الاختلاف فيما بينهما في حساسيتها لتمثيل نكليوتايد السايتوسين، وبالتالي سيتوقف قطعهما للتتابع المذكور من عدمه تبعاً لما يلي:

١. **يقطع الإنزيمان التتابع في الحالة الاعتيادية، وهي عدم تمثيل أي من نكليوتايدي السايتوسين في التتابع الرباعي وفي كلا شريطي DNA.**
٢. **لا يقطع أي منهما في حالة تمثيل كلا نكليوتايدي السايتوسين الخارجي والداخلي.**
٣. **يقطع إنزيم *HpaII* في حالة تمثيل نكليوتايد السايتوسين الخارجي فقط لأحد شريطي دنا (Hemi-Methylated) وليس كلاهما.**
٤. **يقطع إنزيم *MspI* في حالة تمثيل نكليوتايد السايتوسين الداخلي فقط لأحد شريطي دنا (Hemi-Methylated) أو كلاهما (Fully-Methylated).**

✦ الحامض النوويّ الرايبوزيّ RNA المستنسخ والبروتينات المشفّرة

تنتج بعض الجينات مركبات معينة تساعد على إبقاءها فعالة باستمرار، على سبيل المثال فإنّ Hnf4 و MyoD هي مركبات تساعد على **تنظيم تعبير العديد من الجينات الخاصّة بنشاط الكبد والعضلات، ويعطي الحامض النوويّ الرايبوزيّ إشارات تتضمن استدعاءً محددًا لمجموعة من البروتينات لتعديل الكروماتين أيضًا، وإنزيمات ناقلة لمجموعة المثيل للحامض النوويّ DNA إلى مواقع محدّدة، كما تقوم سلاسل مقتطعة من الحامض النوويّ الرايبوزي بتغيّرات أخرى فوق جينية عن طريق تشكيل سلاسل مزدوجة من الحامض النوويّ الرايبوزيّ RNA.** وهذه التغيّرات سيتمّ وراثتها من قبل الجيل التالي **حتى لو لم يعد المحفّز الأصلي لتنشيطها موجودًا**. تنشّط وتثبّط هذه الجينات عادة عن طريق انتقال الإشارات **Signal Transduction**، لكنّها قد تنتقل أيضًا عبر الانتشار البسيط من خلال **وصلات الفواصل Gap junctions** بين الخلايا. تورّث الأمّ جزءًا كبيرًا من الحامض النوويّ الرايبوزيّ والبروتين للبويضة المخصّبة، ممّا ينتج تأثيرًا أميًّا (سايتوبلازمياً) على الأنماط المظهرية، بينما ينتقل جزء صغير من الحامض النوويّ الرايبوزيّ من الأب إلى البويضة المخصّبة (عن طريق حبة اللقاح)، لكن

Assist.Prof. Dr.Ayoob Obaid Alfalahi
Molecular Genetic 4th Stage Field Crops Sciences

هناك أدلّة جديدة تظهر بأنّنا نستطيع رؤية تغيّرات واضحة ناتجة من هذا الانتقال على مدى الأجيال المختلفة من الذرّيّة.

✦ الأحماض النوويّة الرايبوزيّة الدقيقة Micro RNAs

وهي مجموعة من الأحماض غير المشفِّرة، تتراوح أطوالها بين ١٧ إلى ٢٥ نكليوتايد (قاعدة نايتروجينية)، وتتحكّم بعمليّات حيويّة كثيرة في النباتات والحيوانات وقد تمّ اكتشاف ٢٠٠٠ نوع منها إلى عام ٢٠١٣ في الإنسان، وكل واحد من هذه الأحماض قد يستهدف ١٠٠-٢٠٠ حامض رايبوزيّ مراسل mRNA، حيث يكون مسؤولا عن تثبيطه ومعظم هذا التثبيط يحصل من خلال تحلّل الحامض الرايبوزيّ المراسل المُستهدَف، لكنّ البعض الآخر يحدث في مرحلة ترجمة الحامض إلى بروتينات.

ويبدو لنا أنّ هذه الأحماض الدقيقة (التي يتم التحكّم بها بطريقة فوق جينيّة) تنظم عمل أكثر من ٦٠% من الجينات المشفّرة التي تترجم إلى بروتينات، ومن الطرق المقترحة لكيفيّة تثبيط هذه الأحماض فوق وراثياً هي **الميثلة (الجزر المتميثلة) CpG islands المرتبطة بهذه الأحماض،** بالإضافة إلى وجود أحماضٍ أخرى يتمّ تثبيطها عن طريق تعديلات الهستون أو ميثلة الحامض النوويّ DNA المركبة.

✦ الحامض النوويّ الرايبوزيّ المراسل mRNA

في عام ٢٠١١، تمّتِ البرهنة على أنّ ميثلة هذا الحامض تلعب دورًا مهمًّا جدًا في التوازن الحراريّ في الجسم البشريّ، كما أنّ الجين المرتبط بالسُّمنة (FTO gene) يُحدث تغييرات على مستوى هذا الحامض.

✦ الأحماض النوويّة الرايبوزيّة الصغيرة RNAs

وهي أحماض صغيرة، يتروح طولها بين ٥٠-٢٥٠ نكليوتايد، وهي غير مشفّرة، وظيفتها الرئيسية هي التحكّم بالتعبير الجيني، ويُنظر لها كأداة فاعلة في الصراع مع البكتيريا المقاومة للأدوية وتلعب دورًا مهمًّا في الكثير من العمليّات الحيويّة مثل الارتباط بالحامض النوويّ الرايبوزيّ المراسل والبروتينات في غير حقيقية النواة (Prokaryotes).

✦ البريونات Prions

وهي بروتينات مُعدِية، تخرج عن الوظيفة الأساسية للبروتينات التي تقوم بوظائف خلويّة محدّدة، حيث تستطيع تحويل الأشكال الأصليّة للبروتينات إلى شكل آخر مُعْدٍ ومُؤذٍ، وتُعتَبر بهذه الصورة عاملًا فوق وراثياً يستطيع إحداث تغيير للنمط المظهري دون تغيير في الجينوم.

ويَعتبِر البعض أنّ البريونات الفطريّة عواملٌ فوق جينيّة **لأنّ النمط المظهري المعدي منها قد يتمّ وراثته دون تعديل في الجينوم**، ويُعتَبر البروتينان (PSI+) و(URE3) اللذان اكتُشِفا في الخميرة عامي ١٩٦٥ و ١٩٧١ أفضل مثالين على هذا النوع من البريونات. تعمل هذه البريونات من خلال تحطيم البروتينات المتجمّعة، مقلّلة من نشاطها. **وفي الخلايا التي تحتوي**

Assist.Prof. Dr.Ayoob Obaid Alfalahi
Molecular Genetic 4th Stage Field Crops Sciences

على البروتين PSI+ يحدث خلل في البروتين Sup35 مسبّبا معدلًا أعلى من القراءة لدى الرايبوسومات لشيفرة التوقّف.

تموقع الأجسام النوويّة Nuclear bodies packaging

يتمّ تعليب الجينوم (packaging) بمساعدة الأجسام النوويّة، وتموقع هذه الأجسام ليس عشوائيًا، **بل يحدّد إمكانية وصول الحامض النوويّ DNA للبروتينات المنظمة والمتحكّمة، وهذا يحدّد الاختلافات في تعبير الجينات عن نفسها وتمايز الخلايا، ويتمّ استبقاء بعض الأجسام النوويّة هذه في الخلايا التكاثرية**. وهكذا، فإنّ تموقع هذه الأجسام قابل للوراثة نسبيًا، وأفادت دراسات حديثة أنّ هناك علاقة بين هذا التموقع وبعض العوامل فوق الوراثية الأخرى، كميثلة الحامض النوويّ.

References

1. Kary B. Mullis. 1990. The Unusual Origin of the Polymerase Chain Reaction. 262(4): 56-65.
2. Kenshi Hayashi, Kary B. Mullis, François Ferré, Richard A. Gibbs. 1994. The Polymerase Chain Reaction Birkhäuser Basel. P, 464.
3. Zahra M Alkhafaji and Hassan M Abu-Almaali. 2013. PCRing and Primer Design. University of Baghdad, Baghdad. P, 304.
4. Mahmood M. Refaat and Saad B. Aloutabi. 2008. Introduction to Biotechnology. The General Egyptian Association of International Books and Documents, Cairo. P, 312
5. Elsahookie, M.M., and Ayoob O. Alfalahi. 2008. Polyploidy and its relationship with plant breeding and adaptation. The Iraqi J. Agric. Sci. 39(6):49-71.
6. Elsahookie, M.M., and Ayoob O. Alfalahi. 2008. TILLING: Modern technique combines traditional mutagenesis and functional genomics. The Iraqi J. Agric. Sci. 40(1):1-25.

Assist.Prof. Dr.Ayoob Obaid Alfalahi

Molecular Genetic 4th Stage Field Crops Sciences

مؤشرات الدنا DNA Markers

تعرف مؤشرات الدنا بأنها تتابعات من الدنا يمكن الاستدلال بها على موقع معين على الكروموسوم او الجين، وتستخدم لدراسة العلاقات الوراثية بين الأفراد وإيجاد البصمة الوراثية لكونها تعكس الاختلافات في المعلومات الوراثية المخزونة فيهم وهذه الاختلافات تكون ناتجة أما من الحذف Deletion او الإدخال Insertion او اعادة الترتيب Rearrangement للنيوكليوتيدات في جينوم الأفراد المدروسة لأي سبب كان كالطفرات الوراثية لذلك اعتمدت في دراسات التصنيف الجزيئي Molecular taxonomy والدراسات التطورية Evolutionary studies وفي بناء الخرائط الوراثية Genetic Mapping ، كما أصبحت من الأدوات المهمة لدراسة التنوع الوراثي Diversity Genetic، اذ تعد الاختيار الذي لا بديل له في تطوير الخطط الملائمة لحفظ الأنواع، وبما ان هذه المؤشرات تعكس الاختلافات مباشرة على مستوى القواعد المكونة للدنا ونظرا لان جينوم الكائنات الحية الراقية يحتوي على الملايين من هذه القواعد لذلك فان اعداد هذه المؤشرات كبيرة جداً .وبالتالي فان لها المقدرة على الكشف عن مئات المواقع Loci ولعدة أليلات للموقع الواحد.

ميزاتها:

تمتاز هذه المؤشرات مقارنة بالمؤشرات السابقة بمزايا عديدة ومن ابرز هذه المميزات إنها تظهر التغاير الذي يحدث على مستوى الدنا مباشرة و كما هو معروف فان الدنا هو المادة الوراثية المستقرة التي لا تتأثر بالبيئة لذا امتازت هذه المؤشرات بالاستقرارية Stability بعكس المؤشرات الوراثية المعتمدة على الصفات المظهرية التي تتأثر بشكل كبير بالظروف البيئية، وكذلك تمتاز هذه المؤشرات بكونها تعتمد على مادة الدنا الموجودة في جميع خلايا الكائن وبشكل متساوٍ لذا فان تحليل أي جزء من ذلك الكائن وفي أي مرحلة عمرية سوف يعكس بالنتيجة حالة الكائن الوراثية وعلى نحو دقيق مما يمنح هذا النوع من المؤشرات الشمولية ويجعلها تتفوق على المؤشرات المعتمدة على تحليل المحتوى البروتيني لذلك الكائن او حتى على ما تمثله هذه البروتينات من متناظرات إنزيمية.

تمتاز لمؤشرات الدنا ايضاً بمقدرتها على كشف أعداد كبيرة من التباينات Numerous Polymorphic مما جعلها قادرة على إيجاد أي اختلاف مهما كان طفيفاً وبين أقرب الأفراد فضلاً عن مقدرتها على تتبع التغيرات الوراثية عبر الأجيال كونها تستند إلى قوانين مندل في التوارث، كما تبرز أهمية مؤشرات الدنا من خلال تطبيقاتها الواسعة وفي شتى المجالات ومن أهمها في ايجاد البصمة الوراثية (DNA Fingerprinting) والتمييز والتشخيص المبكر لأصناف السلالات وتحديد القرابة بينها والتمييز المبكر للجنس في النباتات ومساعدة مربي النبات في تسهيل مهمة التضريب والتهجين او تطوير أصناف جديدة من خلال تحديد مستوى التغايرات وكذلك فحص نقاوة البذور وحفظ حقوق مربي النبات لتمييز الأصناف المقاومة للأمراض والكشف المبكر عن الإصابات المرضية .

ان من الجوانب العلمية والتطبيقية في مجال إيجاد البصمة الوراثية هو تطوير العديد من مؤشرات الدنا لاستخدامها في التحقق والتأكد من الثبات الوراثي للنباتات الناتجة من الزراعة

Molecular Genetic/4th Stage
Dr.Ayoob Alfalahi

النسيجية وخاصة النباتات المعمرة كالنخيل وأشجار الفاكهة وغيرها وإصدار شهادة التطابق الوراثي مع الأصل لضمان جودة المنتج ومنع الغش التجاري لحماية حقوق كل من المستثمر والمستهلك.

أنواع مؤشرات الدنا :

نتيجة لميزات هذه المؤشرات و مجالات تطبيقاتها الواسعة وبسبب التطور السريع في مجالات علم الأحياء الجزيئي فقد تم استحداث وإيجاد العديد من أنواع مؤشرات ألدنا فقد تم حديثاً تصنيف هذه المؤشرات الى نوعين أساسيين اعتماداً على نوع التقانة المستخدمة في إيجادها والكشف عنها وهي :

أولاً : مؤشرات الدنا المعتمدة على التهجين الجزيئي :

ظهرت أولى مؤشرات الدنا المعتمدة على التهجين الجزيئي بعد اكتشاف إنزيمات التقييد Restriction enzymes عام ١٩٦٨ و وصمة سوذرن Southren عام ١٩٧٥ ببناء أول تقانه أطلق عليها تباين أطوال قطع التقييد (RFLP) وتعرف على أنها توارث الاختلافات في مواقع القطع الإنزيمي الذي يتسبب في ظهور أطوال مختلفة من قطع الدنا على الأغاروز.

ان منهجية RFLP تعتمد على الاختلافات في طرز التقطيع الذي يحدث بسبب طفرة نيوكليوتيدية واحدة عن موقع القطع او بوساطة القطع المضافة او المحذوفة او المستبدلة عن تلك المواقع مما يؤدي الى تباين اطوال القطع الناتجة وبوجود المجس probe المعلم اما بمواد مشعة او مواد كيميائية يمكن التعرف على القطع المتباينة بارتباط المجس مع التسلل المكمل ولقد استخدمت هذه المؤشرات في بناء الخارطة الوراثية للإنسان وفي مجال تحسين النبات.

ثانياً : مؤشرات الدنا المعتمدة على تفاعل PCR

وصف التفاعل التضاعفي لسلسلة الدنا (PCR) لأول مرة من قبل الباحث Kary Mullis في عام ١٩٨٥على أساس أن عمل هذه التقانة هو مضاعفة قطعة معينة من الدنا المنتجة من الجينوم الكلي أنزيمياً وخارج الجسم الحي in vitro بوجود البادئات Primers والتي تربط بالتتابع المكمل لها على شريط الدنا القالب Template DNA

تعد هذه العملية محاكاة لما يحدث في الطبيعة في جميع الكائنات الحية والتي تتضاعف مادتها الوراثية أثناء الانقسام فالتفاعل بسيط ومحتوياته موجودة منذ قدم الحياة قبل ان ينفذها Mullis خارج الجسم الحي وقد توصل الى ذلك بالصدفة عندما كان يبحث عن طريقة لتشخيص الطفرة الوراثية التي تسبب مرض فقر الدم المنجلي (Sickle cell anemia) فتوصل الى طريقة لتضاعف قطعة من الدنا موجودة بكميات قليلة جداً لإجراء الدراسات اللازمة عليها.

أهمية المؤشرات التي تعتمد على PCR:

تكمن أهمية تفاعل PCR بتفردها بعدة مميزات كالدقة والخصوصية والحساسية العالية في الكشف عن قطعة دنا معينة ضمن الآلاف من القطع لذلك أصبحت لا يمكن الاستغناء عنها في دراسات الوراثة الجزيئية ، فضلاً عن أنها طريقة عمل سهلة نسبياً وسريعة وخاصة عند الاحتياج لتحليل عينات عديدة. لذلك فقد أصبح لهذا التفاعل تطبيقات واسعة منها دراسة التنوع الوراثي وإيجاد البصمة الوراثية وكذلك في مجال التربية والتحسين للحيوانات والنباتات الاقتصادية إذ استخدمت هذه التقانة لتسهيل نتائج التضريب والتهجين عند محاولة استنباط أصناف جديدة وكذلك استخدمت في مجال تشخيص الأمراض المختلفة كالأمراض الوراثية والوبائية وذلك بالاستناد إلى المبادئ الأساسية لهذه التفاعلات .

وتجري حالياً باستخدام تقانة PCR تشخيص الإصابات الفيروسية للإنسان ، كفيروس التهاب الكبد والأنفلونزا والحصبة وفيروسات نقص المناعة المكتسبة الإيدز (HIV)، وفيروسات أنفلونزا الطيور مثل الفايروس (H5N1)، والأمراض السرطانية، كذلك أصبحت من التقانات التي يعتمد عليها في تحديد الأبوة الشرعية ومجال التحقيق الجنائي والطب العدلي Forensic medicine.

مما تقدم تظهر الأهمية الكبيرة لهذه التقانة واستخداماتها الواسعة مما دعا الباحثين الى العمل الدوؤب والمستمر لإيجاد أنواع جديدة من مؤشرات الدنا المعتمدة على هذه التقانة فضلاً عن العدد الكبير الذي تحقق منها.

أولاً : المؤشرات التي تستهدف مواقع متعددة من الجينوم :

أ- المؤشرات التي تستخدم بادئات عشوائية تماماً كمؤشرات نسق النواتج المتضاعفة المتعددة العشوائية (Profiling Amplicon Multiple Arbitrary MAAP) وهذه تشمل بدورها مؤشرات التفاعل العشوائي متعددة الاشكال لسلسلة الدنا او RAPD RCR والتفاعل العشوائي لتسلسل الدنا او RCR – AP، Arbitrary Primed PCR وبصمة الدنا المتضاعفة DAF، DNA Amplification Fingerprinting

ب - المؤشرات التي تستخدم فيها بادئات شبه عشوائية Primers Semiarbitrary كمؤشرات تباين أطوال قطع الدنا المتضاعفة أو AFLP.

جـ - المؤشرات التي تستخدم فيها بادئات متخصصة كمواقع محددة متوزعة داخل الجينوم مثل PCR – Alu ومؤشرات التتابعات القصيرة المتكررة SSR.

ثانياً : المؤشرات التي تستهدف موقع محدد معروف التسلسل :

ان تطبيق هذا النوع يحتاج الى معرفة تسلسل موقع الدنا الهدف الذي ليس بالضرورة ان يكون في النواة بل قد يكون في المايتوكوندريا او الكلوروبلاست في الخلايا النباتية والحيوانية ومن الامثله على هذا النوع من المؤشرات:

- Amylase Gene Analysis – Alpha

Analysis Gene Ribosomal

يعد PCR التقنية الأكثر رواجاً في مختبرات الوراثة الجزيئية في جميع أنحاء العالم والأساس الذي تعتمد عليه الكثير من الدراسات على مستوى الدنا وبهذا استحق عليها Mullis جائزة نوبل عام ١٩٩٣ اذ جعلت امكانية استخدام قطرة دم او شعرة او حتى خلية واحدة لإجراء عمليات PCR عليها.

تتطلب تقانة PCR إنزيم بلمرة الدنا (Taq DNA Polymerase) ، والبادئات (Primers) والنيوكليوزيدات منقوصة الاوكسجين الثلاثية الفسفور (deoxynucleosid triphosphates) والمحلول الدارئ (PCR buffer) المحتوي على ايونات المغنيسيوم (++Mg) وقالب الدنا (DNA Template)، فضلاً عن جهاز المبلمر الحراري (Thermocycler).

أ – أنزيم البلمرة DNA Polymerase :

يعد إنزيم بلمرة الدنا واحداً من المكونات الأساسية و الرئيسة في تفاعلات PCR، اذ تعتمد هذه التفاعلات على قابلية هذا الإنزيم على البناء وبالتالي مضاعفة تتابعات محدده من الدنا القالب المكملة لتتابعات البادئ ، لذا فان الاهتمام في تطوير نوعية وكفاءة هذا الإنزيم حظي باهتمام الكثير من الباحثين و المختصين بهذا المجال ، وقد استهل العمل بهذه التقانة مع إنزيم البلمرة fragment klenow المستخلص من بكتريا القولون E.coli وهو من نوع DNA Polymerase I إلا أن هذا الإنزيم يفقد المقدرة على البناء عند تعرضه الى الحرارة العالية المطلوبة لمسخ خيوط الدنا القالب مما يجعل عمله يتوقف إلا بإضافة كميات أخرى منه في كل دورة مما جعل الباحثين يتجهون إلى استنباط نوع جديد هو Polymerase Taq الثابت حراريا والمعزول من البكتريا المحبة للحرارة Eubacterium Thermophallic وتدعى aqueticus Thermus إذ أن له المقدرة على الاستمرار بنشاطه وبدرجة ٩٥ مْ وبناء قطع اطول من الانزيم السابق ، إذ تتراوح افضل درجات فعاليته في البناء بين (٧٠ – ٨٠مْ) وله نشاط خاص في البناء يتراوح بـ (٣٥ – ١٠٠) نيوكليوتيدة في الثانية لكل جزيئه إنزيم إذ يضيف القواعد عند النهاية OH -٣

تتألف جزيئة الإنزيم DNA Polymerase Taq من سلسلة مفردة من الببتيد المتعدد وذي وزن جزئي يقارب ٩٥ كيلودالتون ، ولذا عرفت الوحدة الانزيمية one unit على إنها كمية الإنزيم اللازمة لسحب ١٠ نانومول من التركيب الكلي للنيوكليوتيدات dNTPs في خليط التفاعل وتحويلها إلى حامض الدنا القالب القابل للترسيب خلال ٣٠ ثانية وبدرجة ٧٥مْ وتحت ظروف التفاعل المثلى.

ب – البادئ The Primer :

يعرف البادئ بكونه قطعة قصيرة من الدنا او الرنا (RNA) ترتبط بقالب شريط الدنا المفرد الشريط عند النهاية -٣ المحتوية على مجموعة الهيدروكسيل OHالضرورية لبدأ عمل إنزيم بلمرة الدنا.

وهناك عدة أنوع من البادئات تختلف في طبيعتها باختلاف نوع المؤشرات فقد تكون ذات تتابعات عامة Universal ويمكن استخدامها مع جينوم كل الكائنات، وقد تكون تلك البادئات مصممة بشكل خاص ليتعرف على موقع متخصص متوزع بشكل عشوائي داخل الجينوم ، وقد يصمم البادئ بوجود تسلسل معين في تركيبه كتلك المستعملة في تحليلات AFLP و DAF كما سياتي شرحه لاحقاً.

جـ – المحلول المنظم: PCR buffer

المحلول المنظم هو المحلول الذي يحافظ على قيمة رقمه الهيدروجيني من التغيرات عند إضافة حامض أو قاعدة إليه أو عند تخفيف المحلول، ويقوم هذا المحلول بعملية تنظيم عمل إنزيم البلمرة والمحافظة على نشاطه لذا أصبح هناك العديد منها وفقاً لنوع الإنزيم المستخدم . وتختلف هذه المحاليل المنظمة من حيث تركيز مكوناتها والرقم الهيدروجيني لها ، إلا أن القياسية منها تحتوي على المكونات الرئيسة مثل كلوريد المغنيسيوم $MgCl_2$ بتركيز ٥٠ مللي مولر وكلوريد البوتاسيوم KCL وبتركيز ١.٥ مللي مولر والترس الحامضي Tri-HCl بتركيز ١٠٠ مللي مولر ذي رقم هيدروجيني قدره ٨.٣ فضلاً عن ٠.١% حجم/وزن من الجيلاتين ليصبح المحلول بقوة X١٠ ويتم تخفيفه اثناء تحضير التفاعل ليصبح X 1.

د – النيوكليوسيدات ثلاثية الفوسفات: (dNTPs)

وهي عبارة عن القواعد النتروجينية الاربع مع سكر منقوص الاوكسجين وثلاث مجاميع من الفوسفات والتي تشكل مادة بناء شريط الدنا و الذي يقوم انزيم بلمرة الدنا باضافته الى النهاية OH بدأً من نقطة ارتباط البادئ بالقالب وبطول يختلف حسب نوع المؤشرات المستخدمة وهي :

- Deoxy Adenosine Triphosphate (dATP)
- Deoxy Thymosine Triphosphate (dTTP)
- Deoxy Guanosine Triphosphate (dGTP)
- Deoxy Cytosine Triphosphate (dCTP)

وتضاف هذه المكونات الأربعة بتراكيز متساوية ومناسبة لأجراء التفاعل ويعتمد ذلك التركيز على تركيز Mg++ وذلك لأن زيادة تركيز dNTPs يؤدي الى قله Mg ++ الجاهز لفعالية إنزيم بلمرة الدنا ،وكذلك يتاثر تركيز dNTPs بتركيز البادئات المستعملة وطول القطع المتضاعفة وعدد دورات PCR ويمكن الوصول الى التركيز المناسب تجريبياً .

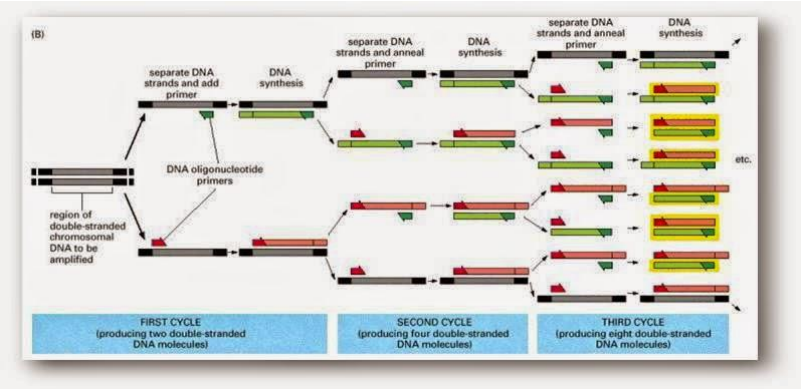
هـ – قالب الدنا DNA Template :

إن التطور في تقنيات لـ PCR وفرت طريقة سريعة وكفوءة للكشف عن وجود او غياب تتابع معين من قواعد الدنا في نموذج ما مما جعل بالإمكان تحليل مئات النماذج مرة واحدة وخاصة عند توفير قالب الدنا الملائم الذي يمكن الحصول عليه من مصادر عديدة كالمكتبات الجينومية Genomic libraries كما ويمكن الحصول على دنا الحيوانات والنباتات المختلفة وبشكل تجاري ومن مختلف الأنسجة والخلايا.

توجد عدة طرق لاستخلاص وتحضير الدنا وهناك بعض المشاكل تبرز عند استخلاص الدنا وهي تحلل الدنا degradation DNA لوجود السكريات المتعددة والمواد الفينولية وغيرها من المركبات والتي تعمل على تحطيم الدنا أوتثبيط عمل الإنزيمات القاطعة وإنزيمات بلمرة الدنا في المراحل اللاحقة كما تكون مستحضرات الدنا في هذه الحالة بلون بني بسبب اكسدة المواد الفينولية الى مركبات Quinone إذ تعد هذه المواد عوامل مؤكسدة قوية تعمل على تحطيم الدنا والبروتين لذلك لا يمكن الحصول في هذه الحالة على الدنا بوزن جزيئي لذلك يجب اختيار طريقة استخلاص مناسبة لتجنب المشاكل أعلاه واختصار خطوات العمل لتتوافق مع تقنيات PCR السريعة والتي تتطلب خطوات اقل لتجنب التلوث.

و- جهاز المبلمر الحراري Thermocycler :

إن اكتشاف جهاز المبلمر الحراري ادى الى تجاوز الكثير من المحددات المهمة لتقنية PCR عند بداية اكتشافها إذ كانت تستعمل طريقة النقل اليدوي للنماذج بين الحمامات المائية للحصول على الدرجات الحرارية المطلوبة لكل دورة من دورات PCR ، ويعد هذا الجهاز من اهم متطلبات تفاعل PCR ولقد تم تطوير هذه الأجهزة من ناحية استيعابها لعدد اكبر من العينات تصل الى حوالي ٩٦ حفرة بدلاً من الأنابيب وهذا يسرع في عملية تحضير النماذج وكذلك الكشف عن النواتج وعلى العموم يؤثر الجهاز المستعمل في نتائج التفاعل والمدة المستغرقة في كل دورة وعدد الدورات والوقت المستغرق بين دورة واخرى (Ramp time) والذي يفضل ان يكون اقصر ما يمكن وذلك ليمنع استطالة البادئات المرتبطة بالمواقع الخطأ.



مراحل التفاعل التضاعفي لسلسلة الدنا Stages PCR :

لقد تم تحديد تفاعل (PCR) بثلاث مراحل او خطوات أساسية تتكرر في كل دورة من دورات التضاعف ولمدة زمنية محددة، وهذه المراحل هي :

☒ المسخ Denaturation :

تعد هذه المرحلة الأولى و الأساسية في تحضير دنا القالب مزدوج السلسلة Double strand للعمليات اللاحقة ومن المعروف إن تلك العملية تحدث في الخلية In vivo أثناء

الطور البيني من الانقسام الخلوي وبواسطة إنزيمي DNA Helicase و Topoisomerase وإذ ان ارتباط الشريطين يكون عن طريق الأواصر الهيدروجينية فقد وجد بان الحرارة العالية ايضاً تؤدي الى فتح الشريطين وقد استثمرت هذه الظاهرة في تحقيق المرحلة الاولى من PCR وذلك برفع درجة الحرارة لمحلول التفاعل والذي يحتوي على قالب الدنا من (٩٢ – ٩٥ مْ) ولوقت يتراوح بين (٣ – ٥) دقائق للحصول على شريط مفرد ليعمل كقالب لبناء القطعة المكملة لها وتعتمد عملية المسخ على عدد من العوامل كنوعية ومصدر دنا القالب ونوع الإنزيم المستخدم.

☒ مرحلة ارتباط البادئ Primer annealing

وهي المرحلة التي تأتي بعد مرحلة المسخ مباشرة إذ يتم فيها ارتباط البادئات مع التتابعات من القواعد النتروجينية المكملة لها في الشريط المفرد من ألدنا القالب وذلك ببناء الأواصر الهيدروجينية بينهما وتعتمد درجة الحرارة وطول الفترة الزمنية اللازمة لهذه المرحلة على العديد من العوامل التي تحدد كفاءتها ، ومنها تركيز وطول البادئ ونسبة احتوائه على قواعد G+C ويتم احتساب درجة الحرارة اللازمة للارتباط من خلال تطبيق إحدى المعادلات الحسابية الملائمة لطول البادئ وذلك لاستخراج الدرجة الحرارية الحقيقية لتفكك ٥٠% منه (Melting Temperature (TM) والتي يمكن حسابها على وفق المعادلة الأتية :

حرارة الالتحام Annealing T. = (عدد قواعد G+C*4) + (عدد قواعد A+T X٢)

• الا ان هذه المعادلة تكون ملائمة للبادئات ذات التتابعات القصيرة دون ٢٠ نيوكليوتيدة اما البادئات التي يتراوح طولها من ٢٠ – ٣٠ نيوكليوتيدة فان المعادلة الأتية تكون مناسبة لها :

درجة الحرارة المثلى للالتحام = ٢٢ + ١.٤٦ [٢ (G + C) + (T + A)

• وهناك معادلات أخرى لأنواع أخرى من البادئات إلا أن نتائج اغلب البحوث أشارت الى أن المعادلة الأولى هي الاشمل مع إضافة ٣ – ١٢ درجة حرارية إلى الناتج لتعطي درجة الحرارة المثلى للارتباط .

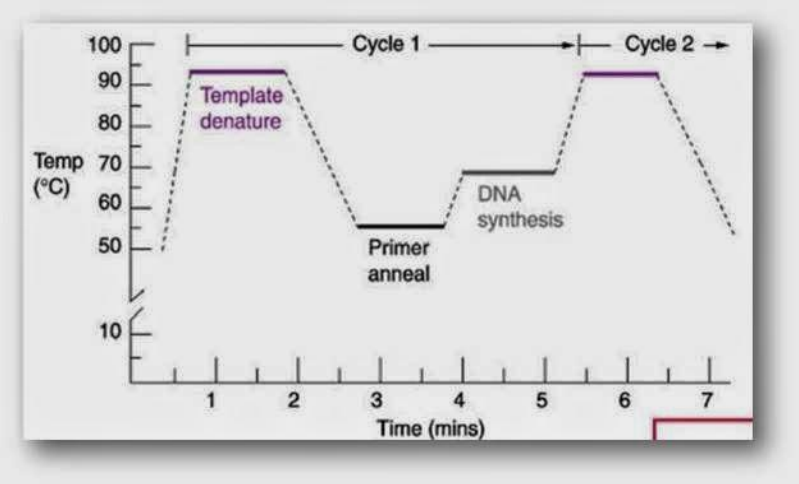
☒ مرحلة الاستطالة Extension Stage :

وهي المرحلة الاخيرة من تفاعل PCR وتتضمن عملية إضافة dNTPs الى النهاية OH للبادئ عند منطقة ارتباطه بقالب الدنا لتكوين شريط دنا مكمل لذلك القالب من قبل إنزيم البلمرة ، و ان افضل درجة حرارية تتم فيها عملية الاستطالة وهي الدرجة الملائمة لاعطاء أعلى فعالية للإنزيم وهي ٧٢ مْ أما المدة اللازمة لذلك فتختلف حسب نوع المؤشرات المستخدمة والمؤشرات التي تعطي نواتج تضاعف كبيرة الحجم تحتاج الى وقت اطول من تلك التي تعطي نواتج تضاعف قصيرة وذلك لقدرة انزيم البلمرة المستخدم Taq DNA polymerase على بناء ٣٥ – ١٠٠ نيوكليوتيدة في الثانية وعلى العموم تكون الفترة اللازمة للاستطالة أطول (١٠ دقائق) في الدورة الأخيرة لتفاعلات PCR وذلك لضمان

Molecular Genetic/4th Stage
Dr. Ayoob Alfalahi

استطالة جميع نواتج التفاعل وتجدر الاشارة الى ان عدد الدورات المستخدمة في تفاعلات PCR وهي ٤٠ دورة كافية للحصول على عدد نسخ ملائمة للدنا الهدف بحيث يمكن رؤيتها عند الكشف عنها باستخدام هلام الاكاروز كما ان فعالية الانزيم تقل بعد ذلك العدد من الدورات.

ديناميكية تفاعل PCR



التعددية الشكلية لقِطَع DNA المكوثرة عشوائياً RAPD

هي واحدة من مؤشرات الدنا المستثمرة لفعالية التفاعل التضاعفي لسلسلة الدنا PCR وتعرف على أنها تضاعف ألدنا إنزيميا باستخدام بادئات عشوائية. تأخذ هذه الطريقة التحليلية أهميتها من استخدام عدد كبير من البادئات القصيرة الوحيدة غير مزدوجة مؤلف من عشرة قواعد نايتروجينية (نكليوتايدات) على الاكثر (ذات تتابعات عشوائية لكن غالباً ما تحتوي على GC بنسبة ٥٠ % على الأقل) لإنتاج طيف من منتجات التضخيم لمواقع معينة منتشرة على المجين. من الطرائق الهامة والفعالة عند وجود مادة مرجعية للمقارنة مع المادة المراد فحصها ولكن عند وجود معلومات قليلة أو عدم توافر معلومات حول سلسلة الدنا الهدف؛ فإن هذه الطريقة ليست بذات الأهمية إضافة إلى أن تكرارية هذه الطريقة ضعيفة. يعتمد هذا النوع من مؤشرات الدنا على عدد مواقع ارتباط البادئ Binding مع الدنا من جانب، وتعتمد كذلك على البعد بين تلك المواقع Primer Distances من جانب اخر.

ان التباين في أعداد المواقع وأبعادها بين الأفراد ينتج اما طبيعياً من خلال الاتحادات الجديدةRecombination اثناء الانقسام الأختزاليMeiosis ، واما عن طريق الطفرات Mutations وكلاهما يسبب حالات الحذف Deletion، او الاضافة Insertion، او الاستبدال Substitution، وخصوصاً تلك التي تحدث في مواقع الارتباط المشار اليها مما يؤدي الى تغير في ترتيب القواعد المكملة لنتائج البادئ مما يفقده فرصة الارتباط به لاسيما انه يتأثر بتغيرات قاعدة واحدة فقط ، وتشير المصادر الا انه تمت الافادة من الطاقة الكامنة لمؤشرات الـ RAPD في مجالات متعددة منها الكشف عن التباينات الوراثية بين الأفراد،

وتحديد العلاقة الوراثية والتمييز والتشخيص بين الأنواع والأصناف الزراعية فضلاً عن تمييز المبكر للجنس ودراسة الثبات الوراثي للنباتات الناتجة من زراعة الأنسجة النباتي.

مميزاتها:

١- تطبق على مختلف الأنواع (إنسان ، حيوان ، نبات ، بكتيريا....وغيرها).
٢- هي تقنية سريعة وبسيطة لا تحتاج لخبرة.
٣- تكاليفها زهيدة.

مساوئها:

١- تقنية عشوائية.
٢- تكشف عن وجود السيادة أو عدم وجودها فقط أي أنها تميز بين النمطين الوراثيين (AA & aa)وتعجز عن التميز بين النمطين.(AA & Aa)
٣- نتائجها غير قابلة للتكرار...أي لا يمكن مقارنة نتائج اختبار الـ (RAPD) لعينة ما وبنفس الشروط في مختبرين اثنين وطبعاً هذا ناتج عن كون هذه التقنية عشوائية.

Molecular Genetic/4th Stage
Dr. Ayoob Alfalahi

تقدير الأحماض النووية Nucleic acid quantification

تعد تقدير الحامض النووي في العينة عملية مهمة لتحديد مقدار تركيز الـ DNA و RNA في العينة ودرجة نقاوته حيث تعتمد على هذه العملية الكثير من الفحوصات والتفاعلات الخاصة باختبارات DNA مثل جهاز PCR وأجهزة مختبرية جزيئية أخرى .

هناك العديد من الطرق المستعملة لقياس DNA في العينة منها:

١. جهاز المطياف الضوئي spectrophotometer
٢. جهاز Nanodrop

جهاز Nanodrop

يعتبر قياس الحامض النووي (DNA او RNA) في هذا الجهاز عملية سهلة وسريعة اضافة الى انها تكشف لنا عن نسبة الخطأ المحتمل وجودها في العينة حيث ان القراءات القياسية للحامض النووي هي كالاتي:

DNA= 1.8 ~

RNA= 2.0 ~

اما القراءات التي تختلف عن هذه النسب فهي دلالة على وجود تلوث في العينة، اي ان العينة لازالت حاوية على البروتين او بعض المواد الاخرى .تتم القراءة عند طول موجي ٢٦٠ -٢٨٠ nm .

طريقة عمل الجهاز:

١- اختر الايقونة الخاصة بالجهاز(Nanodrope) الموجودة على سطح المكتب.
٢- اختر Nucleic acid من القائمة .
٣- اختر نوع الحامض النووي DNA.
٤- اختر الوحدة القياسية الخاصة بالحامض النووي وهي ng/µL.
٥- اختر الطول الموجي الملائم للمحلول المراد فحصه، ان الطول الموجي ٢٨٠-٢٦٠ هو الملائم لقياس وتقدير الحامض النووي DNA.

Molecular Genetic/4th Stage
Dr. Ayoob Alfalahi

٦- اختر الايقونة (add to the report) لاضافة جميع القياسات الخاصة بجميع عيناتك وحفظها لحين الرجوع اليها عند الحاجة.

٧- صفر الجهاز بواسطة (Blank المحلول المذيب للحامض النووي). يجب ان يكون هذا المحلول مذيب جيد للحامض النووي اضافة الى ان الـ Blankالمستعمل لتصفير الجهاز يجب ان يكون بنفس درجة pH ونفس الدرجة الايونية للمحلول المستعمل للمذيب للحامض النووي (DNA).

٨- ضع ١-٢ µl من محلول البلانك على عدسة الجهاز ثم انزل ذراع الجهاز.ثم اضغط على كلمة(blank)

٩- نظف العدسة بورق التنظيف الخاص ثم ضع العينة واضغط على كلمة (Measure) ليبدأ الجهاز بالقياس.

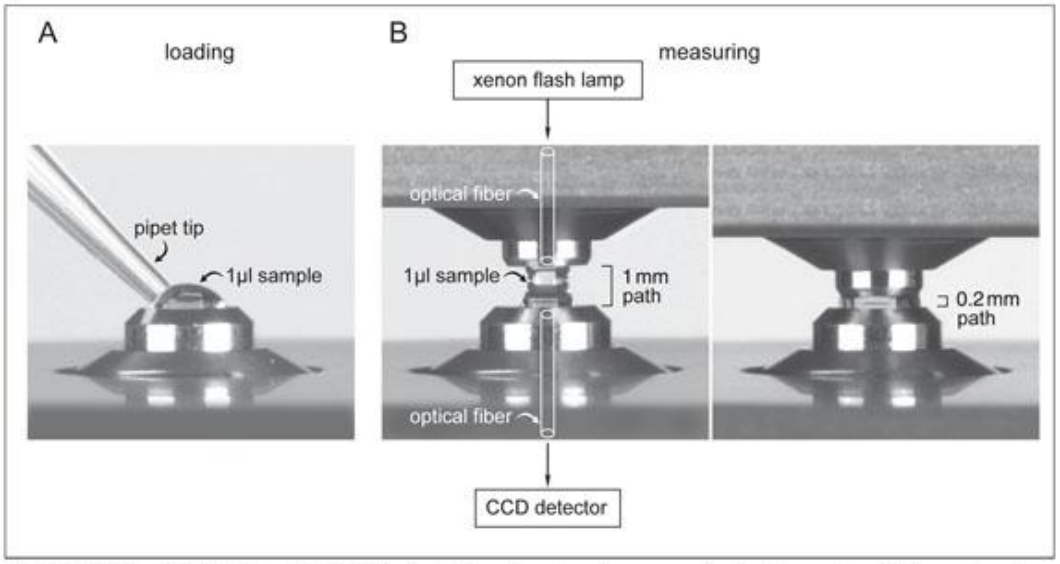


Figure A.3D.2 The NanoDrop ND-1000 Spectrophotometer microvolume sample retention system. (**A**) A sample volume of 1 µl is dispensed onto the lower optical surface. (**B**) Once the instrument lever arm is lowered, the upper optical surface engages with the sample, forming a liquid column with the path length defined by the gap between the two optical surfaces. During each measurement, the sample is assessed at both a 1-mm and 0.2-mm path, providing a large dynamic range of nucleic acid detection.

Micropippetes (الماصات الدقيقة)

هي من التقنيات الحديثة المستعملة بشكل واسع في الكثير من مختبرات الاحياء المجهرية، الوراثة، الوراثة الجزيئية . تستعمل لنقل احجام محددة بشكل دقيق وهي تقنية يوصى باستعمالها عند تخفيف المحاليل مثل المنظمات والحوامض والقواعد وعند نقل المحاليل الحاوية على الاحياء المجهرية .

Molecular Genetic/4th Stage
Dr. Ayoob Alfalahi

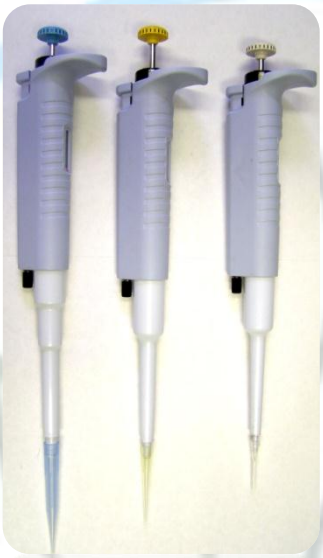
انواع Micropippete

الماصات ذات الحجوم الثابتة Fixed volume

تستخدم مع الحجم المحدد عليها فقط .

الماصات ذات الحجوم المتغيرة Adjestable volume

يتم التحكم بالحجم المطلوب من خلال تحريك العتلة الخاصة بتغيير الارقام الموجودة على جانب الماصة للحصول على الحجم المطلوب .



Tips (رؤوس الماصات الدقيقة)

تستعمل مع هذه الماصة أنابيب صغيرة تعرف "بالتبات" التي تختلف من حيث الحجم واللون وبعضها يكون مزود بفلتر لمنع وصول السائل المنقول الى الماصة وخصوصا الاحجام الصغيرة .

- الحجم الكبير يكون ازرق اللون ويتسع الحجم ١٠٠٠ µl ويستعمل مع الماصة الكبيرة الحجم .
- الحجم الاوسط يكون لونه اصفر ويستعمل للحجوم المتوسطة .
- الحجم الصغير الذي يكون لونه ابيض ويستعمل للحجوم الصغيرة جدا.

Pipette type	Volumes (µL)	Tip color
P10	0.5 – 1	white
P20	2 – 20	yellow

P200	20 – 200	yellow
P1000	200 – 1000	blue

ـ عند اختيار التيبات يجب ملاحظة ملائمة نهاية التبات لنهاية الماصة .

انابيب اخرى مستعملة في مختبر الوراثة الجزيئي

PCR Tube

يستعمل مع الاحجام الصغيرة مثل (٢٠٠µ l) 0.2ml

Eppendorf Tube

يستعمل للاحجام الكبيرة مثل ١.٥ مل.

Storage tube

تستخدم للخزن الطويل مزودة بغطاء محكم الغلق لتجنب تلف العينة .

التعقيم : يتم تعقيم الادوات المذكورة سابقا بالحرارة الرطبة (Autoclave).

طريقة استخدام الماصة :

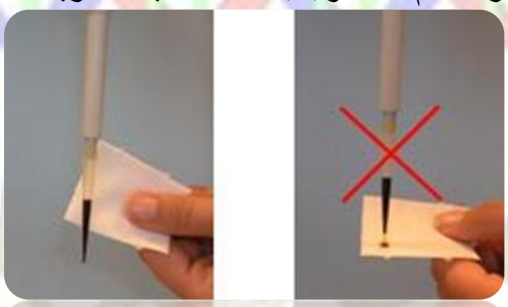
ـ يتم اختيار الماصة بالاعتماد على الحجم المطلوب نقله بحيث يكون مقارب او ضمن المدى المثبت على الماصة .

ـ يتم تحديد الحجم المطلوب

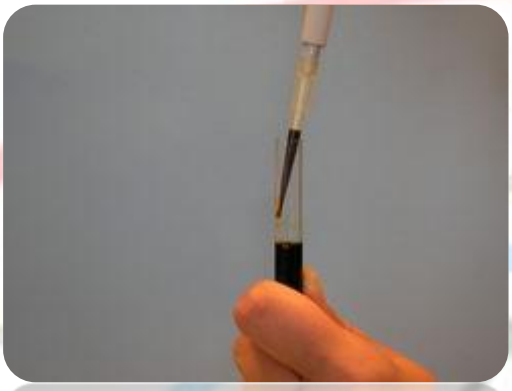
ـ عدم وضع الماصة على اي سطح وعند الانتهاء من العمل توضع على الحامل الخاص بها .

ـ قبل البدء بالعمل توضع الماصة المعقمة في الهود المخصص للعمل المجهز بالاشعة فوق البنفسجية امدة تتراوح بين الربع والنصف ساعة .

ـ بعد تحديد الحجم المطلوب يؤخذ التب المناسب ثم تضغط الضغطة الاولى بعدها يوضع في السائل المطلوب بشكل مستقيم ثم يترك الضغط بهدوء فيتم سحب الحجم المطلوب ثم ينقل الى الانبوب الجديد واذا كان هناك سائل على التب من الخارج يتم ازالته بالمسح بواسطة ورق ترشيح من الجوانب وليس من الحافة المدببة حتى لايتأثر الحجم المسحوب بفعل الخاصية الشعرية .



ينقل الحجم المسحوب الى انبوبة جديدة ويوضع التب على جدار الانبوبة ثم تضغط الضغطة الاولى والثانية لانزال السائل المنقول .



خطوات تفاعل انزيم البوليميريز المتسلسل PCR

أولاً :الاستخلاص Extraction

استمرار البحث عن طرق أكثر دقة للحصول على حامض نووي أكثر نقاوة أدى إلى تطوير العديد من البروتوكولات بالرغم من ذلك لازالت الخطوات الأساسية لعملية فصل الحامض النووي بدون تغيير حيث يتم عزله عن المواد الخلوية الأخرى بطريقة تضمن الحفاظ عليه في صورة أقرب إلى الشكل الطبيعي دون تكسر .

حيث يمكن تعديل الطرق الرئيسية مع التعديلات البسيطة للحصول على منتج بكميات تكفي لعدة استخدامات وهي:

- طحن الأنسجة المحتوية على الحامض النووي المراد دراسته أو الكشف عنه، وتسمى الخطوة تحليل الخلايا Cell lysis . يمكن ان تتم هذه الخطوة أما باستخدام طرق ميكانيكيه مثل الطحن مع النيتروجين السائل لتكسير الجدر والأغشية الخلوية... او طرق حيوية مقل استخدام الانزيم المحلل Lysozyme. يجب أن يتم الفصل في وسط له ظروف تقوم بتثبيط الإنزيمات والمواد الكيميائية الضاره . حيث توضع الخلايا بعد الطحن التام مباشرة في محلول منظم ملائم مثل CTAB
- تحليل الدهون في الأغشيه البلازميه باستخدام ماده منظفه Detergent مثل Sodium dodycle sulphate SDS.

CTAB /EDTA: هو عامل خلب Chelating agent يقوم بتجميع وحجز الأيونات الموجبه ثنائية التكافؤ مثل ايونات المغنيسيوم وايونات الكالسيوم والتي تلعب دورا محوريا في نشاط الانزيمات من خلال دورها كمرافقات انزيمية وبالتالي تلعب دورا في تثبيط عمل انزيم المحلل للحامض النووي Dnase.

ثانياً :التنقية Purification

يتم إزالة الجسيمات الغير قابلة للتحلل حيث يتم فصل البروتينات الهستونية والخلوية والمواد الغير قابلة للذوبان باستخدام الطرد المركزي ومواد كالكلوروفورم. لإزالة البروتينات، يتم استخدام انزيم محلل للبروتينات protease وهي خطوه احتياطية يتم إجراءها عادة للتأكد من عدم/ او تقليل تلوث عينة الحامض النووي بالبروتينات. كما يمكن ترسيب البروتينات باستخدام مادة خلات الصوديوم أو الأمونيوم Sodium or ammonium acetate.وقد يتم فصل البروتينات باستخدام مخلوط من الكلوروفورم والفينول، قبل خطوة ترسيب الحامض النووي.

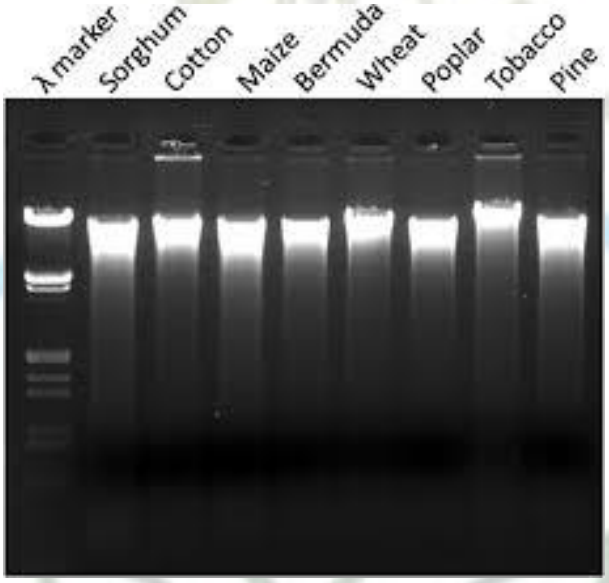
يجب ترسيب الحامض النووي وتحويله من الصوره الذائبة باستخدام الكحول المثلج الايثيلي أو كحول الايوزبروبانول لعدم ذوبانية الحامض النووي بهما حيث يتم فصل الأملاح الملوثة له(القابلة للذوبان في الكحول) ويظهر الحامض في صورة راسب خيطي.

ثالثاً :الإذابة والحفظ

يتم تعليق الحامض النووي النقي بإذابته في ماء مقطر معقم أو في محلول منظم مثل.TE buffer ، باستخدام هذه الطريقة يمكن الحصول على حامض نووي نقي وسليم من الأنسجة النباتية.

رابعاً :التحقق من جودة الحامض النووي

يتم عن طريق فصل العينة على جل الاكاروز المصبوغ ببروميد الإثيديوم Ethedium bromide . ثم يتم تصوير قطع الحامض النووي الناتجه تحت ضوء الأشعه فوق البنفسجيه.UV



خامساً :التحقق من وجود الحامض النووي

يتم ذلك باستخدام صبغه ثنائي فينيل الأمين، وعند تسخين الحامض النووي لدرجة أعلى من ٩٥ درجة مئوية في وسط حامضي ينتج تفاعل لوني ويعطي مركب أزرق اللون . لتحديد تركيز الحامض النووي بتحديد كثافة امتصاص المحلول للأشعة عند ٦٠٠ نانومتر ومقارنته مع منحنى قياسي من تركيز الحامض النووي المعروف.

سادساً :درجة نقاوة الحامض النووي

يتم قياس الكثافة الضوئية عند ٢٦٠ و٢٨٠ نانومتر، حيث يمتص الحامض النووي الأشعه فوق البنفسجيه عند ٢٦٠ و٢٨٠ بينما تمتص البروتينات الحلقية الموجات عند ٢٨٠ نانومتر فقط. الحامض النووي النقي يعطي نسبة ٢٨٠/٢٦٠ تساوي ١.٨ وقد تكون خالية نسبيا من البروتينات. وتعتبر العينة ملوثة بالبروتينات إذا كانت النسبة أقل من ١.٨ .

سابعاً :قياس كمية الحامض النووي

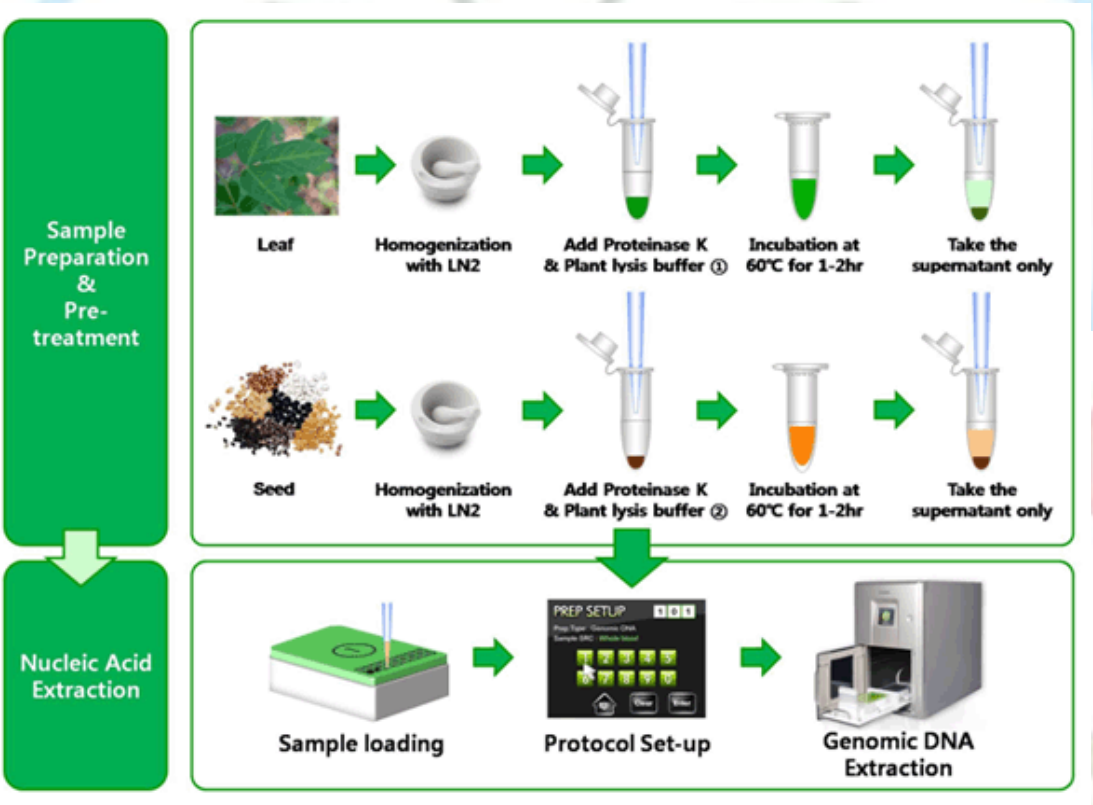
يمكن قياس كمية الحامض النووي باستخدام إنزيمات القطع، ثم فصل القطع على جل الاكاروز المصبوغ ببروميد الإثيديوم ومقارنة كثافتها مع كثافة حامض نووي معلوم الوزن الجزيئي DNA marker or ladder .

المادة الكيمياوية	الجهاز
محلول منظم CTAB buffer	أنابيب طرد مركزي دقيقة
الكحول الاثيلي الثلجي المطلق و ٧٠٪	هاون ومدقة
النيتروجين السائل	جهاز طرد مركزي دقيق
٧.٥ مولار من خلات الأمونيوم	حمام مائي ٥٥ درجة مئوية
الكلوروفورم : كحول الايزواميل(٢٤:١)	محلول منظمTBE 1X
محلول التحميل6X	جل الاكاروز وجهاز الفصل الكهربائي

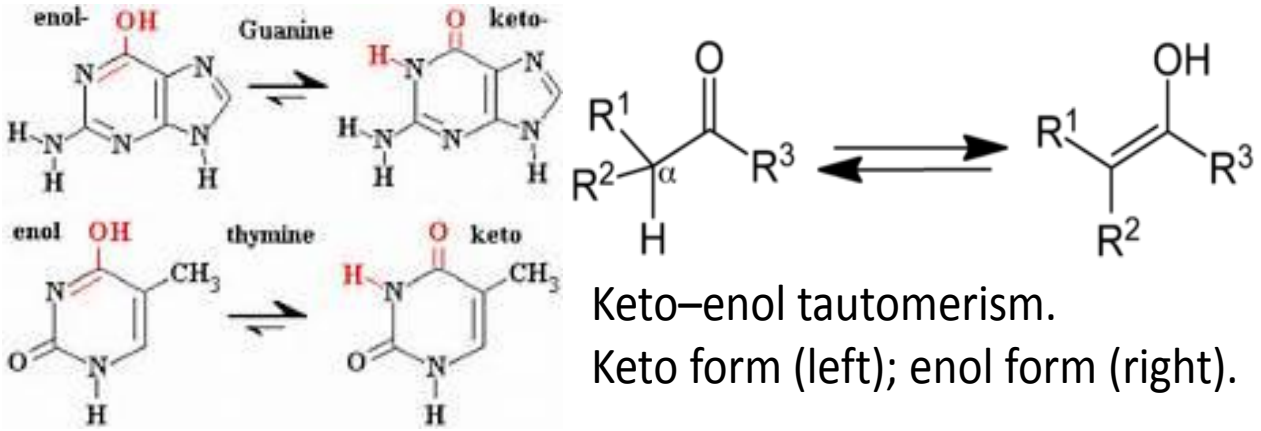
خطوات العمل

- يطحن ٢٠٠ ملغم من أوراق النبات الغضة في ٥٠٠ µl من محلول منظم CTAB
- ينقل الخليط لأنبوبة صغيرة ثم يحضن في حمام مائي ٥٥ درجة مئوية رجاج لمدة ١٥ دقيقة
- يطرد الخليط في جهاز الطرد المركزي ١٢٠٠٠ لفةإدقيقة لمدة ٥ دقائق.
- ينقل الرائق إلى أنابيب طرد مركزي دقيقة ولكل أنبوبة يضاف ٢٥٠ µl من خليط الكلوروفورم والفينول
- يخلط بالتقليب ثم الطرد المركزي ١٣٠٠٠ لفةإدقيقة لمدة دقيقة
- تنقل الطبقة المائية العليا فقط الى أنبوبة نظيفه ويضاف لها ٥٠ µl من خلات الصوديوم ومباشرة ٥٠٠ µl من الكحول الاثيلي المطلق الثلجي
- تقلب الأنابيب عدة مرات بخفه لترسيب الحامض النووي دون تكسيره وعندها يمكن رؤية الراسب الخيطي للحامض النووي ولضمان الترسيب الكامل يمكن وضع المحلول في- ٢٠ درجة مؤية لمده ساعه.
- بعد الترسيب يمكن سحب الحامض النووي على نهاية الماصة الدقيقة بتحريكها دائربا في المحلول الثلجي.

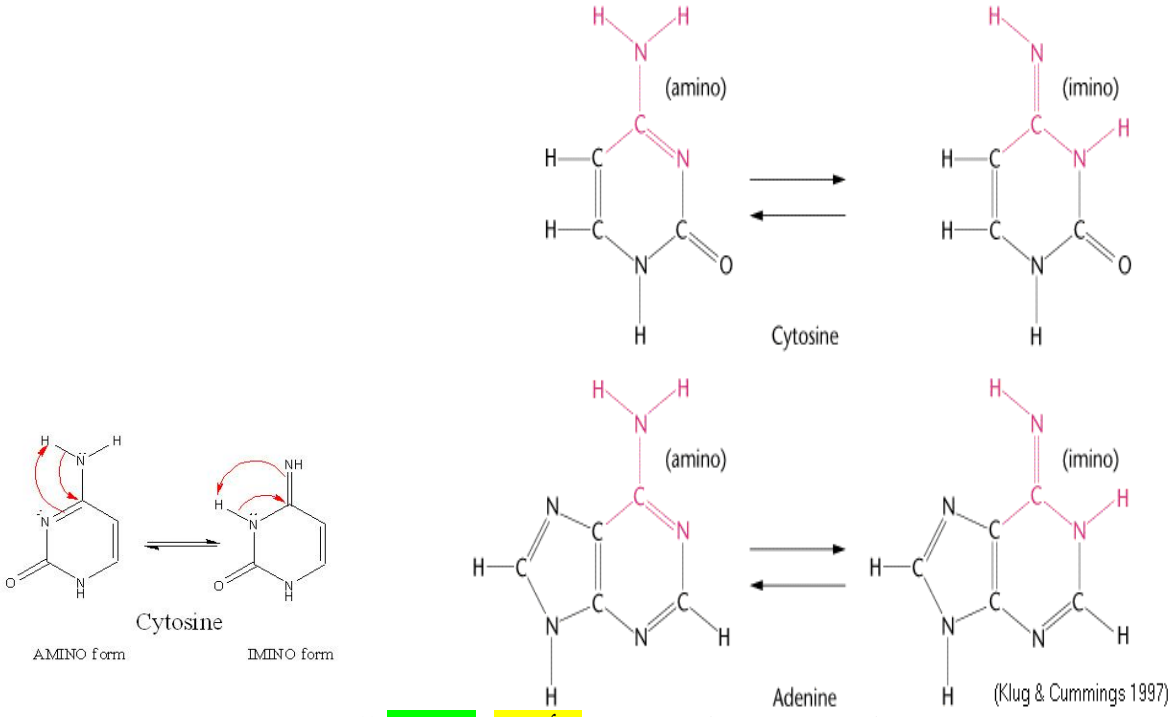
- لغسل الحامض النووي ينقل الراسب الى أنبوبة بها ٥٠٠ µl من الكحول الاثيلي الثلجي ٧٠٪ وتقلب الانبوبه بخفه وتعاد هذه الخطوه أو يمكن استبدالها بالطرد المركزي ١٣٠٠٠ لفة\دقيقة لمدة دقيقة حتى يتكون الراسب من الحامض النووي في قاع الانبوبة.
- يتم التخلص من الرائق وتطبيق الخطوه السابقه مرتين متتاليتين.
- بعد الغسل، يرسب الحامض التووي بالطرد المركزي
- يتم التخلص من الرائق ويترك راسب الحامض النووي ليجف بالهواء(١٥ دقيقة تقريبا)
- يعاد إذابة الحامض النووي في الماء المقطر المعقم الخالي من (Dnase ٥٠-٤٠٠µl من الماء حسب كمية الحامض النووي المستخلص).
- في حال توفر إنزيم(Rnase ١٠ ميكروجرام/مل)يضاف الى الماء قبل إذابة محلول الحامض النووي DNA في الماء(١٠/ µl مل من الماء)
- التخلص من إنزيم DNase
- بعد إذابة الحامض النووي يحضن المحلول في حمام مائي ٦٥ درجه مئوية لمدة ٢٠ دقيقة للتخلص من أي أنزيمات محللة للحامض النووي DNA DNases.
- يحفظ الحامض النووي في درجة حرارة ٤ درجة مئوية .



في الحالة الطبيعية تتواجد بنظام **الكيتو Keto** وفي الحالات النادرة بنظام **الإينول Enol**(شكل 44)، بينما السايتوسين والادينين في حالة الأمينو Amino وفي الحالات النادرة في حالة الإمينو Imino، حيث من المتوقع ان تبقى الحالات النادرة لأقل فترة زمنية ممكنة في صورة **النظام المشابه Tautomeric shifts**. ولكن في حالة وجود الشكل النادر اثناء فترة التناسخ سيؤدي إلى ظهور الاختلاف في تزاوج القواعد،A ممكن ان يتحد مع C و T ممكن ان يتحد مع G وما يتبعه من انعزال القواعد ذات الازدواج الخاطئ، وقد يكون الإستبدال على مستوى نوع القواعد بأن يكون T بدل A و C بدل G كنتيجة للإحلال الخطأ.



شكل A ٤٤: شكل يوضح الكيتو والإينول



شكل **B**٤٤: شكل يوضح الأمينووالإمينو للسايتوسين والادينين

هناك عدة تأثيرات تنتج من طفرة الاستبدال ويمكن تقسيمها على أساس تأثيرها على النحو التالي:

١ ـ الطفرة الساكنة

٢ ـ طفرات القراءة خاطئة
٣ ـ طفرة ايقاف الترجمة

١. **الطفرة الساكنة:** طفرة استبدال قاعدة لينتج شفرة لنفس الحامض الأميني وتعرف **بالطفرة الساكنة silent mutation**. حيث تحدث على مستوى القاعدة الثالثة للشفرة دون أي تأثير على ترجمة الحامض الأميني :

…GGT… …GGG…
…CCA… …CCC…
pro Pro

٢. **طفرات القراءة الخاطئة:** طفرة استبدال قاعدة لينتج استنساخ شفرة حامض أميني إلى شفرة حامض أميني آخر وتعرف **بالقراءة الخاطئة missense** (Faux sens). وتكون **مرادفة أو غير مرادفة**.

a) **طفرات خاطئة غير مرادفة** (non synonyme missense):
هي التغير في قاعدة واحدة في مستوى الشفرة (الثلاثية) بحيث يؤدي إلى تغير في الحامض الأميني. ويكون هذا الأخير **مختلف كيميائيا** (حامضية، قاعدية، متعادلة)عن الحامض الأميني الأصلي :

…TTC… …CTC…
AAG …GAG…
Lys Glu

تحدث هذه الطفرة بصفة عامة في إحدى **القاعدتين الأولى أو الثانية** من الشفرة الثلاثية ، واحتمال حدوثها في القاعدة الثالثة ضعيف جدا لأن أغلب الأحماض الأمينة لها أكثر من شفرة ثلاثية تختلف فقط في القاعدة الثالثة.

b) **طفرات خاطئة مرادفة** (synonyme missense):
يحدث استبدال شفرة ثلاثية لحامض أميني بشفرة أخرى لحامض أميني آخر من **نفس المجموعة الكيميائية** (حامضية، قاعدية، متعادلة):

…TCT… …TTT…
AGA AAA
Arg Lys

الحامضين الأمينيين (Lys, Arg) من مجموعة الأحماض الأمينة القاعدية.

٣. ***طفرة ايقاف الترجمة***: طفرة استبدال قاعدة لينتج ظهور طفرة ايقاف الترجمة translation stop codon بتحويل شفرة الحامض الأميني إلى شفرة **ايقاف الاستنساخ** ويطلق عليها **الطفرة عديمة المعنى nonsense.**

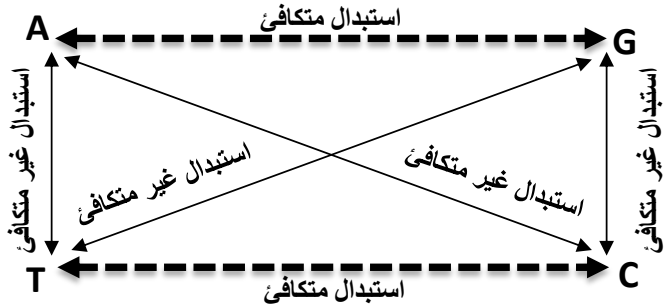
…ACT… …ACG…
UGA …UGC…
stop Cys

كما ويمكن تقسيم طفرات الاستبدال على اساس طبيعة الطفرة إلى:

١- الإستبدال المتكافئ Transitions.
٢- الإستبدال غير المتكافئ Transversions.

١. الاستبدال المتكافئ:
إذ يتم استبدال قاعدة نيتروجينية بيورينية أو بيريميدية بقاعدة أخرى من نفس النوع مكافئة لها كميائيا حيث تبقى نسبة أنماط القواعد (بيورينية وبيريميدية) ثابتة داخل خيط DNA .

٢. الاستبدال غير المتكافئ:
وفيه تستبدل قاعدة بيورينية بقاعدة بيريميدية أو العكس كما في الشكل 43، مما يؤدي إلى **إختلال في نسبة أنماط القواعد داخل DNA**، بالإضافة إلى ذلك تحدث معظم الاستبدالات غير المتكافئة **تزاوجات خاطئة تخل كثيرا بتركيب وتجانس الحلزون المزدوج لـ DNA** . وعلى كل حال يوجد عدد قليل من المواد المطفرة تسبب هذه الاستبدالات.

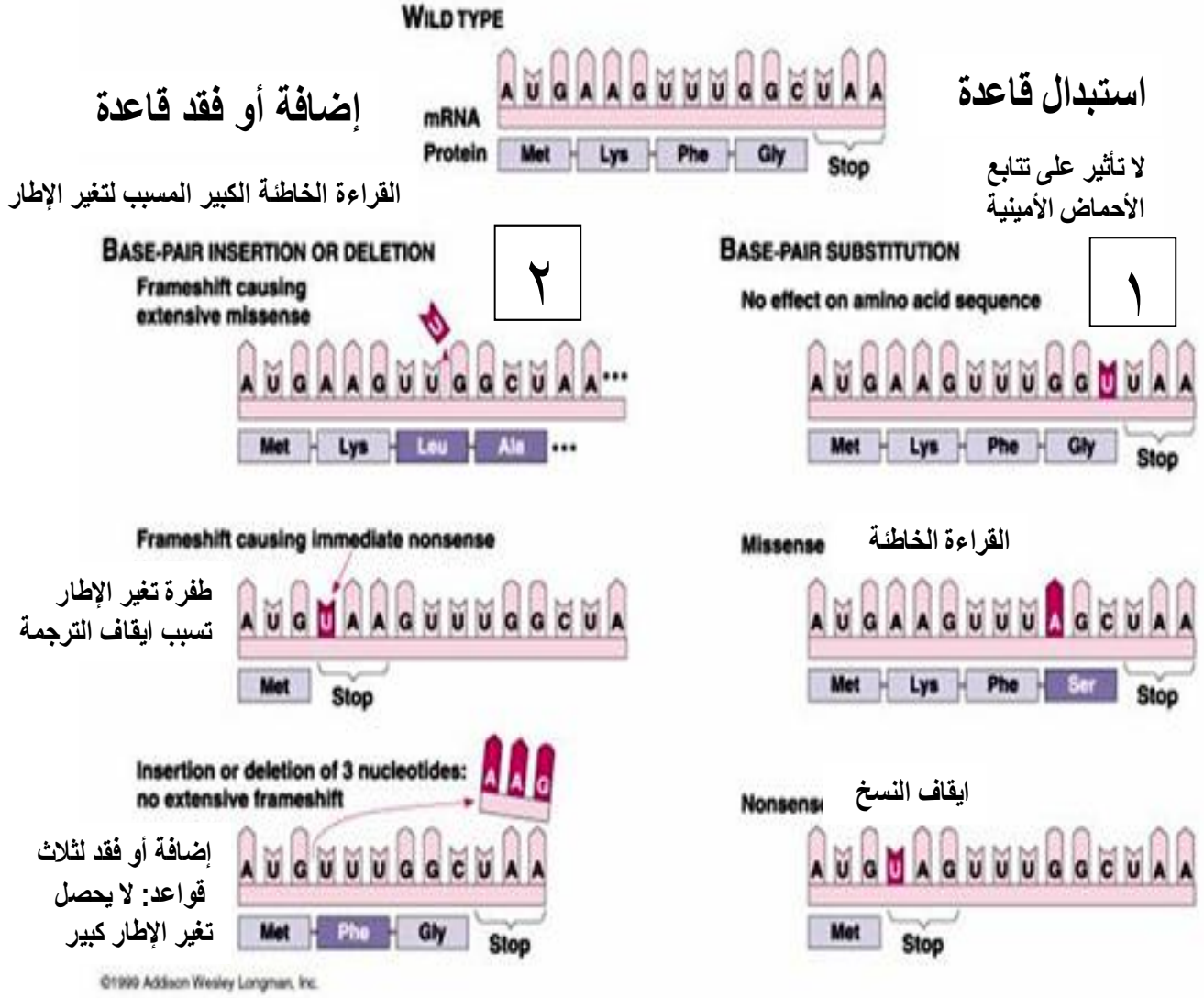


الشكل٤٣: الاستبدال المتكافئ وغير متكافئ بين قواعد DNA.

ثانيا:- طفرة إضافة أو فقد قاعدة واحدة او شفرة كاملة
(طفرة تغير الإطار Frame shift mutations)

يمثل هذا النوع من الطفرات نسبة كبيرة جداً من الطفرات التلقائية، حيث ينتج عن هذا النوع **إضافة أو فقد قاعدة واحدة** insertion or deletion one base بحيث يؤدي ذلك إلى تغيير في التتابع العام للأطار الجيني مما يترتب عليه اختلاف البروتين الناتج (شكل ٤٦، ٢)، ويمكن تقسيم تأثير أنواع طفرت تغير الإطار عن طريق :-

a) **طفرة فقد قاعدة** ينتج استنساخ شفرة حامض أميني إلى شفرة حامض أميني آخر وتعرف بالقراءة الخاطئة missense.
b) **طفرات ايقاف الترجمة** translation stop codon بتحويل شفرة الحامض الأميني إلى شفرة ايقاف الاستنساخ nonsense.
c) **طفرة فقد شفرة كاملة** مما ينتج عنة فقد لحامض اميني كامل في السلسلة الببتايديه (البروتين).



شكل٤٦ يوضح تأثير الأستبدال أو الأحلال (١) وتأثير النقص أو الإضافة (شفرة تغيير الإطار) (٢)

العوامل المطفرة:-

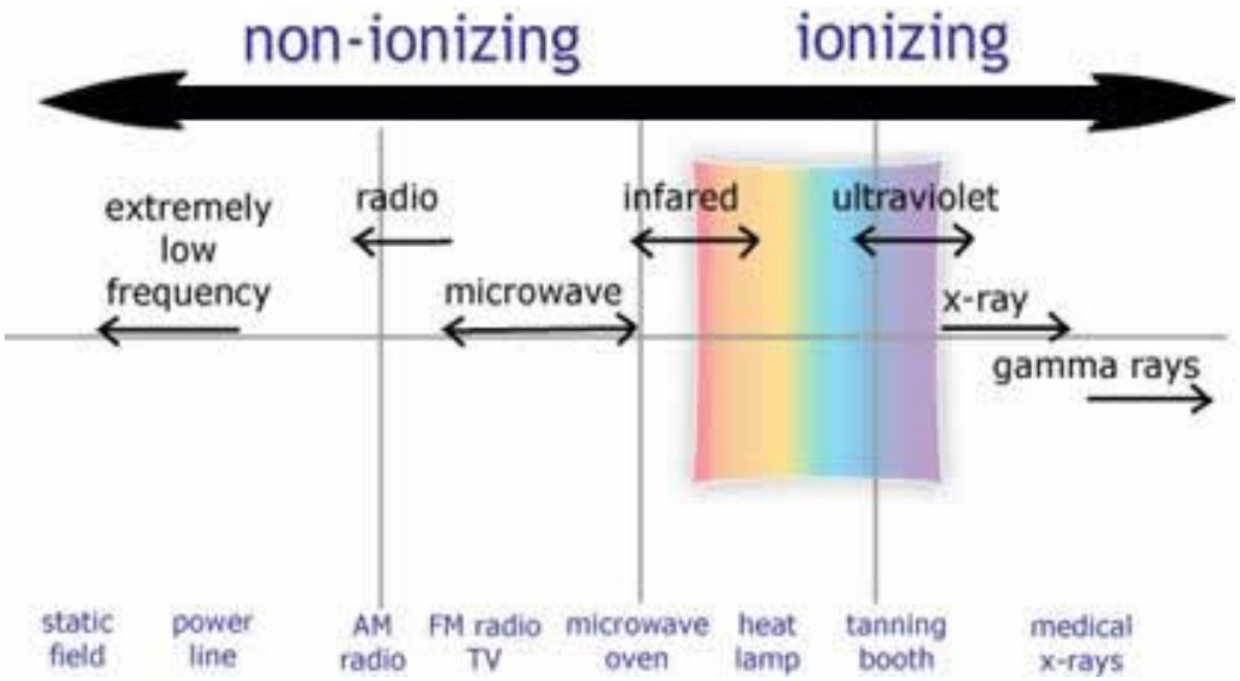
أولاً: العوامل الفيزيائية:-يمكن تقسيم جزء من الطيف الكهرومغناطيسي المتضمن طول موجات أقصر وذات طاقة أكبر من الضوء المرئي وتشمل :

a) **أشعة إكس وأشعة كَاما والأشعة الكونية**:- وهي إشعاعات مؤينة Ionizing radiationsوتكون ذات طاقة عالية جدا، بحيث تمكنها من إختراق الأنسجة الحية فتؤثر على بعض جزيئات DNA وتؤدي إلى تغير في **بناءها الكيميائي** ويمكن ان تُحدِث أنواعاً مختلفة من التغيرات الكبيرة في تركيب الكروموسوم (الشذوذ الكروموسومية) والتي تنتج من حدوث كسور في الكروموسومات. ان للأشعة المؤينة تأثير بايولوجي مباشر أو غير مباشر، ويقصد **بالتأثير المباشر**هو الضرر الذي يلحق بالجزيئات المهمة بايولوجياً في الخلية الحية والتي تتأين مباشرة أو تصبح بحالة متهيجة وقد تؤدي إلى تلف جزيئات الحامض النووي والجزيئات الكبيرة في السايتوبلازم، أما **التأثير غير المباشر للإشعاع** يؤدي إلى ضرر لجزيئات الخلية بفعل الجذور الحرة (الجذور الطليقة Free radicals) والتي تنشأ من تأين الجزيئات ولاسيما جزيئات الماء فهذا يؤدي إلى نشوء أيونات

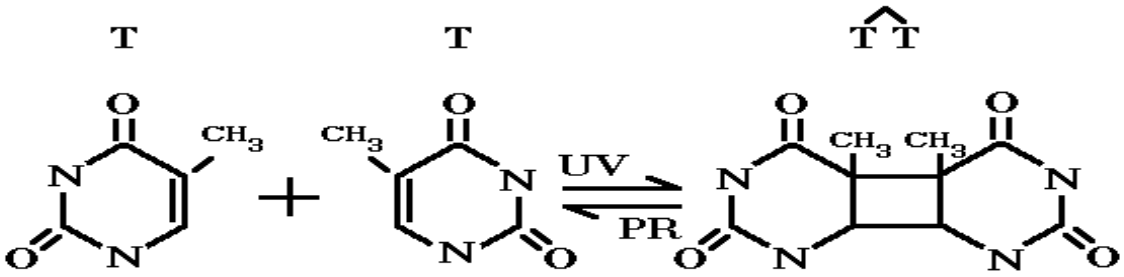
مختلفة مثل H_2O, H*, OH*, H_2*, H_3O, H_2O_2 والتي تتفاعل مع نواة الخلية والسايتوبلازم وتؤدي إلى تفكك الرابطة الكيميائية لذرات الكربون بسهولة فجرعة صغيرة من الأشعة المؤينة تؤدي إلى حدوث تغيرات في DNA وقد تؤدي إلى تلف DNA أو حصول تغيرات أو ضرر بالغ في بنية الكروموسوم.

$$2H_2O \rightarrow H_2 + H_2O_2$$
$$H_2O \rightarrow H^* + OH^* \text{ جذور حرة}$$
$$OH^* + OH^* \rightarrow H_2O_2 \text{ Free radicals}$$
$$OH^* + H_2 \rightarrow H_2O + H^*$$

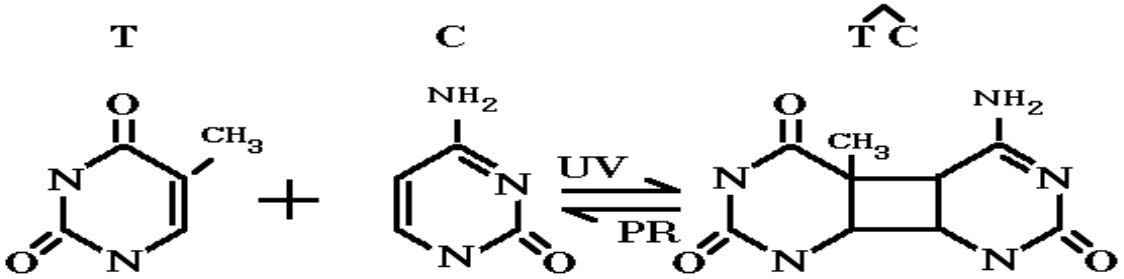
b) الأشعة فوق البنفسجية: هي موجة كهرومغناطيسية ذات طول موجي أقصر من الضوء المرئي لكنها أطول من الأشعة السينية سميت بفوق البنفسجية لأن طول موجة اللون البنفسجي هو الأقصر بين ألوان الطيف (شكل ٤٧). وطول موجتها يبدأ من ٤٠٠ نانومتر إلى ١٠ نانومتر. ولا تحتوي هذه الاشعة على طاقة تمكنها من إختراق الأنسجة الحية بحيث تؤدي إلى التأين، إلا إنها **تُمتص بواسطة القواعد الموجودة في الأنسجة السطحية لجسم الكائن الحي** (عديدة الخلايا)،**وينتج عن إمتصاص الإشعة نشاط القواعد مؤديا إلى تكون Dimers** (ارتباط بين جزيئات الثايمين المتجاورة على نفس الشريط)، وبالتالي لا تستطيع قواعد الثايمين تكوين أواصر هيدروجينية مع الأدنين وبالتالي يختل ترتيب أو تنظيم الخيط الحلزوني، وأكثرها شيوعاً ثنائيات الثايمين (شكل٤٨) وثنائيات الثايمين السايتوسين (شكل٤٩).



شكل٤٧ اجزاء الطيف الكهرومغناطيسي من أشعة إكس وأشعة كَاما والأشعة الكونية الأشعة فوق البنفسجية.



شكل٤٨ يوضح كيفية تكون ثنائيات الثايمين



شكل٤٩ يوضح كيفية تكون ثنائيات الثايمين والسايتوسين

ثانياً:-العوامل الكيميائية:-

هناك العديد من المواد الكيميائية لها القدرة على إحداث طفرات وراثية، ففي السنوات الأخيرة تم إكتشاف **العشرات** من تلك المواد التي لها القدرة على إحداث تغيرات وراثية اذا ما تعرضت لها الخلية أو النسيج أو الكائن الحي **وبتراكيز محددة ولفترة معينة من الزمن.تؤدي المطفرات الكيميائية إلى زيادة هائلة في معدل حدوث الطفرات، مما يعني إنها تتدخل بطريقة مباشرة في مسارات تناسخ المادة الوراثية**، وقد تعمل بطريقة مباشرة على جزئ المادة الوراثية مما يؤدي إلى ظهور طفرة تغير الإطار أو طفرات الاستبدال (الإحلال).ومن الأمثلة على هذه المطفرات الكيميائية **غاز الخردل** و**حامض النتروز** HNO_2 و**هيدروكسيل الأمين** NH_2OH و**العوامل الالكيلية** Alkylating agents حيث **تتفاعل هذه المواد مع مقاطع معينة من المادة الوراثية** ضمن الكروموسوم مسببة تغيراً في بنائه الوراثي، وقد يكون تأثير هذه المواد الكيميائية المطفرة **أخطر** من الأشعة المؤينة وذلك لقدرتها على النفاذ إلى داخل النواة والتفاعل مع المادة الوراثية فيها. كما ان هناك مواد كيميائية لها صيغة تركيبية تشبة بعض القواعد النايتروجينية تدعى **مشابهات القواعد Base analogs**. أن هذه المواد تختلف عن القواعد النايتروجينية الاعتيادية كونها تستطيع أن تزيد من احتمال حصول أخطاء تزاوجية في حالة توفرها في الخلية أثناء مرحلة استنساخ (تضاعف) DNA وقد تؤدي إلى حصول تغيرات كروموسومية ومن أهم مشابهات القواعد:-

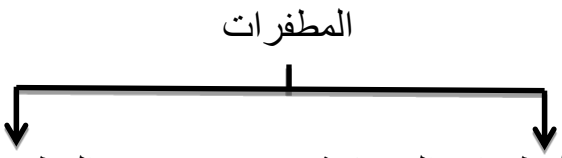
- ٥- بروموديوكسي يوراسيل (5-bromodeoxyuracil) الذي يشبه الثايمين Thymine.

❖ ٢- أمينوبيورين (2-aminopurine) الذي يشبه الأدنين.

ويمكن تقسم المطفرات الكيميائية إلى قسمين:-
١- المواد التي تعمل كمادة مطفرة على المادة الوراثية سواء كان متناسخاً أو غير متناسخ ومنها **المواد الالكيليه** و**حامض النتروز**.

٢- المواد التي تعمل على المادة الوراثية في حالته المتناسخة (المتضاعفة) فقط ومنها **صبغات الأكريدين** التي ترتبط بالمادة الوراثية اثناء التناسخ مؤدية إلى حدوث أخطاء اثناء عملية التناسخ، **ومشابهات القواعد** (Base analogs) المشابهة للقواعد العادية حيث تحل محل القواعد العادية اثناء التناسخ فيظهر تأثيرها باحداث طفرة معينة.

والشكل التالي يبين أهم المطفرات الفيزيائية والكيميائية المعروفة:-



X ray, Beta ray **Methanesulfonate**
Gamma ray Ethyleneimine
Ultra violet light **Diepoxybutane** الأشعة فوق البنفسجية
Deuterons Nitrous acid (HNO_2) الديترونات

ميكانيكيات إصلاح المادة الوراثية DNA Repair Mechanisms:
يعتبر تعدد ميكانيكيات الإصلاح في الكائنات الحية من الفيروسات وحتى الإنسان مؤشراً لأهمية حفظ الطفرات في كل من الخلايا الجسمية والجنسية على مستوى معتدل، ومن طرق إصلاح أضرار المادة الوراثية المحتوي على ثنائيات الثايمين التي تم دراستها في بكتيريا القولون هي :

١- الإصلاح بالتفاعل التنشيطي الضوئي Repair photo reactivation
يتضمن وجود **إنزيم** يقوم بكسر أو بشق ثنائيات الثايمين مباشرة دون استبعاد أي من النكليوتايدات المجاورة، هذا الإنزيم يعرف بأسم انزيم **الفوتوليز Photolyse** والذي يعمل على وصل ثنائيات الثايمين في الظلام ولكنه لا يستطيع أن يحدث كسر للروابط في ثنائيات الثايمين بدون وجود طاقة ضوئية خاصة الضوء المحتوي على **الطيف الأزرق**، حيث ينشط الأنزيم ويساعد على **حدوث تفاعل ضوئي كميائي** مؤدياً إلى كسر الرابطة بين الثنائيات (**ثنائيات الثايمين ، ثنائيات السايتوسين وثنائيات السايتوسين – الثايمين**) (شكل٥٠ أ).

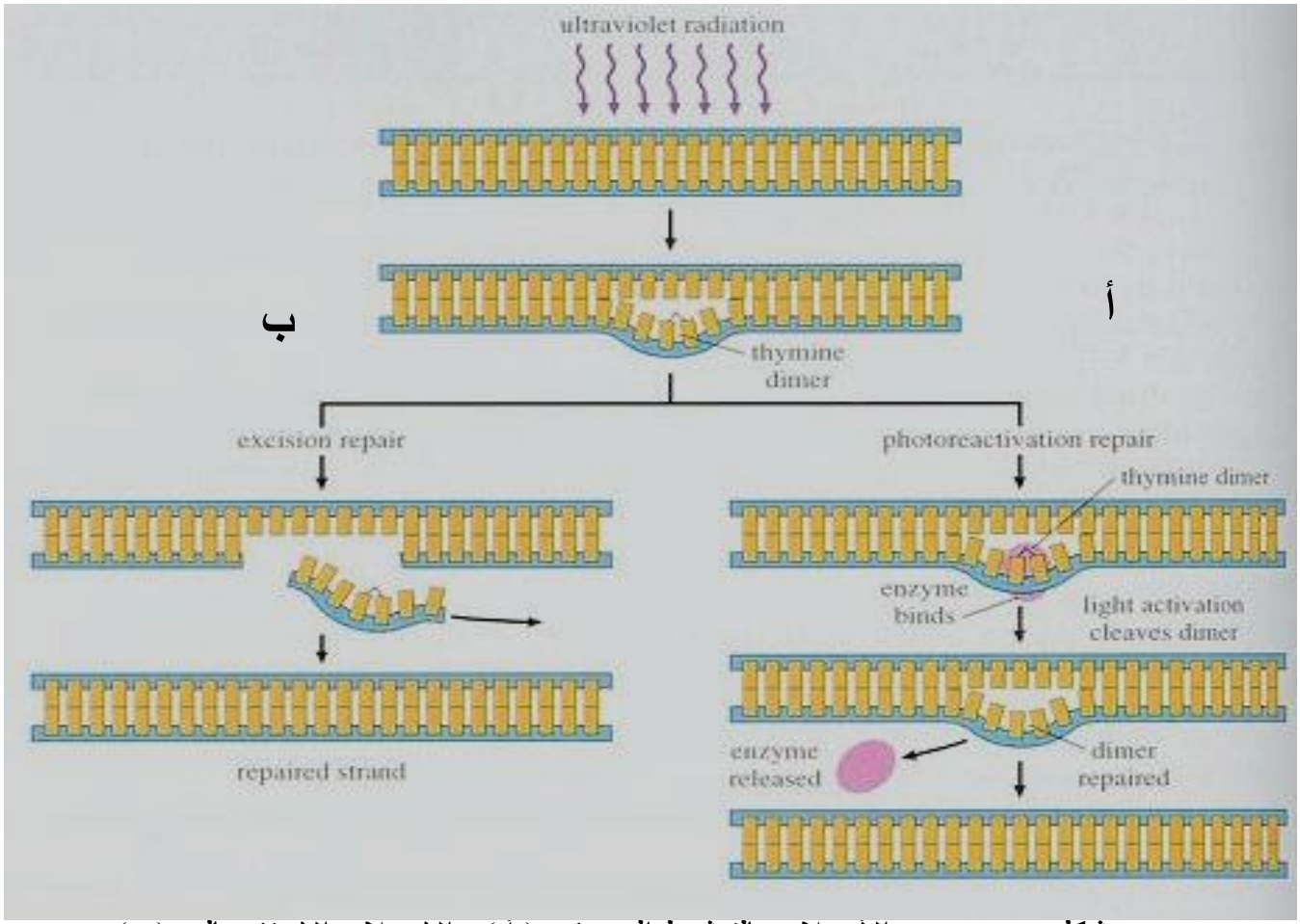
٢- الإصلاح الاستئصالي أو بالإزالة Excision repair
يتضمن عمل الاستئصال باستبعاد ثنائيات الثايمين من جزئ المادة الوراثية وإنتاج قطعة جديدة، وتتم عملية الاصلاح وبوجود إنزيمات هي:-

١) إندونيوكليز Endonuclease
٢) وإكسونيوكليز Exonuclease
٣) DNA polymerasnuclease II

٤) Ligase

حيث تتم الخطوة الأولى بحدوث **فصل** بواسطة انزيم endonuclease بعد التوصل لموقع ثنائيات الثايمين فيكسر الأنزيم **رابطة الفوسفو ثنائية الايستر** في العمود الفقري لخيط المادة الوراثية، ثم يأتي دور انزيم exonuclease حيث يعمل على **استبعاد** قطعة مجاورة على جانبي الثنائيات بعد ذلك يعمل انزيم DNA polymerasnuclease II **بسد الفجوه المتكونه** بأستخدام الخيط المكمل كقالب (شكل٥٠ ب).بعد الأنتهاء من سد الفجوة يعمل انزيم ligase على لحم الخيط بتكوين رابطة الفوسفوداي استر.

وقد تم التأكد من كون نشاط هذا الأنزيم (DNA polymerasnuclease II) لسد الفجوة هو ما تم ملاحظته في الخلايا الطافرة للجين المسئول عن تكوين DNA polymerase II حيث وجد ان كفاءتها في الأصلاح بالأستئصال تكون منخفضة جدا مما يؤكد دور هذا الأنزيم في عملية الإصلاح لملئ الفجوات الصغيرة، ولم يكن لأنزيم بلمرة DNA polymerase III دور نظرا لكبر حجمه ولضرورة ان يظل مرتبطا بشوكة التناسخ النامية لفترة طويله.



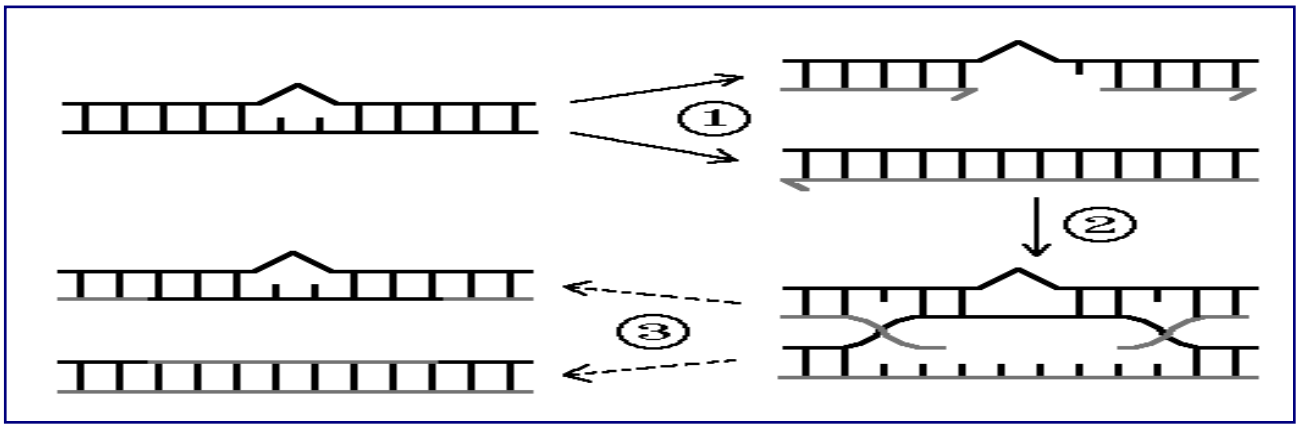
شكل٥٠: يوضح الأصلاح بالتنشيط الضوئي (أ) والإصلاح الإستئصالي (ب)

٣- إصلاح الإتحادات الجديدة Recombinational repair

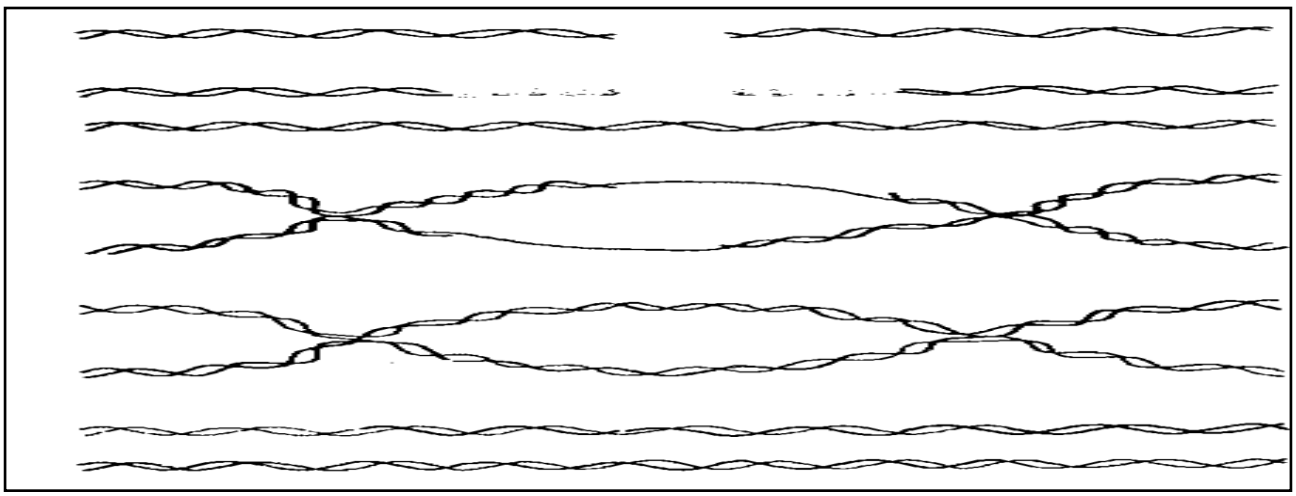
قد يحدث تكون لثنائيات الثايمين، أو **كسر مستعرض** يشمل السلسلتين وما يصاحب الكسرمن فقد جزء من الحلزون المزدوج نهائياً، فنجد ان جميع المعلومات الأصلية والمكملة قد فقدت في مكان التلف،

ولا يمكن إسترجاعها إلا عن طريق البحث عن **جزء آخر مناظر** في جزيء المادة الوراثية منفصل في الخلية نفسها ولكن متطابق مع الجزء التالف، يسمى هذا النوع **بالإصلاح الالي لعملية الإتحادات الجديدة**، وقد يحدث التلف في سلسلة مفردة، فيتم الإصلاح من السلسلة المكملة عند مرور شوكة التناسخ، وقد يحدث التلف لكلا السلسلتين في منطقة غير متناسخة فيلجأ للكروموسوم النظير

مثال : في بكتريا القولون وجد ان العنصر الأساسي في عملية التصحيح بالاتحادات الجديدة عبارة عن انزيم يقوم بأعادة الإتحاد annealing بين تتابعات كل من جانبي المنطقة التالفة والمنطقة المكملة لها في الجزئ السليم ، حيث يتم النشاط الإنزيمي عن طريق بروتين Rec A protein



شكل٥١: يوضح كيف يتم تناسخ المادة الوراثية في حالة تكون ثنائي الثايمين اثناء فترة التناسخ واستخدام الكروماتيدة الشقيقة كقالب لإصلاح الخلل



شكل٥٢: يوضح كيف يتم معالجة الكسر في الخيط المزدوج للمادة الوراثية واستخدام الكروموسوم النظير كقالب لإصلاح الخلل بسد الفجوات الناتجة عن الكسر المستعرض، والذي ينتج عنه وبحسب نوع وموقع الإرتباط إما ارتباط بدون عبورNon-crossing over حيث يتم استخدام الخيط السليم في الكروموسوم النظير كقالب ومن ثم انسحاب كل خيط للكروموسوم الأصلي، أو ارتباط وعبور crossing over وبعد الإنتهاء من سد الفجوات يتم كسر لجزء الخيط السليم وإعادة ارتباطه بخيط المادة الوراثية في الكروموسوم النظير وكذلك بالنسبة للخيط الآخر.