الصبغيات

تعد الصبغيات التي تحمل المادة الوراثية من المكونات الخلوية التي درست بشكل دقيق. و قد سميت الصبغيات من قبل العالم Waldeyer عام 1888. و قبل هذا التاريخ بأربعين عاماً قام الباحث النباتي Hofmeister بدراسة الصبغيات في الخلايا الحية لأمهات الطلع في نبات *Tradescantia* و رسمها، و يعد هذا أول تمثيل للصبغيات في المراجع البيولوجية. تمتلك الصبغيات وظائف هامة جداً منها قدرتها على التضاعف الذاتي الدقيق و المنظم و بنقل المعلومات الوراثية من جيل إلى آخر. و تحتفظ الصبغيات بخواصها المورفولوجية و الفيزيولوجية على امتداد السلسلة المتعاقبة للانقسامات الخلوية، و تتوزع في الخلايا الجسمية في نهاية الميتوز و في الخلايا الجنسية بعد الميوز.

مورفولوجيا الصبغيات:

تظهر الصبغيات في المرحلة البينية (مرحلة الراحة) بشكل كتل حبيبية تسمى المادة الكروماتينية Chromatin (أول من استخدم هذا المصطلح هو العالم الألماني فلمنغ عام 1880). و يعد الدوران الثاني و الثالث للميتوز من أفضل الأدوار ملائمة لدراسة الصبغيات، حيث تكون في الدور الثاني متحلزنة و قصيرة جداً و أكثر كثافة من الأدوار الأخرى، كما أنها تتلون بشدة بالملونات الأساسية مثل ملون فولكن حيث تظهر باللون الأحمر و بشكل ايجابي عند تعريضها للأشعة فوق البنفسجية بطول موجة A2600 (شكل 4).

شكل 4 . تلون المادة الكروماتينية باللون الأحمر نتيجة الصبغ بالملونات الأساسية.

و يمكن أن تميز في كل صبغي جزيئاً مركزياً "Centromere" أو منطقة الانخماص الأولي "Primary constriction" و ذراعاً واحداً أو ذراعين.

Damascus University

و بحسب موقع الجزيء المركزي نستطيع أن نميز الصبغيات الآتية:

1- صبغيات مركزية الجزيء المركزي "metacentric" وفيها يقع الجزيء المركزي في منتصف الصبغي حيث يقسمه إلى ذراعين متساويين في الطول.

2- صبغيات تحت وسطية الجزيء المركزي "submetacentric" وفيها يقع الجزيء المركزي بعيداً عن نقطة الوسط في الصبغي، وبذا يتكون الصبغي من ذراع قصير يرمز له بالحرف(p)، وآخر طويل يرمز له بالحرف (q).

3- صبغيات قرب طرفية الجزيء المركزي Acrocentric وفيها يقع الجزيء المركزي قرب طرف الصبغي.

4- صبغيات طرفية الجزيء المركزي telocentric وفيها يقع الجزيء المركزي عند طرف الصبغي (شكل 5).

شكل 5 . تصنيف الصبغيات حسب توضع الجزيء المركزي.

إذن يحدد شكل الصبغي بحسب موقع الجزيء المركزي (و هو مكان ارتباط ذراعي الصبغي). و يلعب الجزيء المركزي الذي يملك بنية معقدة جداً دوراً هاماً في حركة الصبغيات أثناء أدوار الانقسام, و أيضاً يعد نقطة تثبيت لخيوط المغزل, حيث يجذب هذه الخيوط أثناء الدور الاستوائي. و قد يحتوي الصبغي أحياناً على جزئيين مركزيين أو أكثر كما هو الحال عند *Ascaris megaocephala* أو عند بعض الحشرات من رتبة Hemiptera.

التيلوميرات (Telomeres) هي القطع المورثية التي تتوضع على أطراف الصبغيات (chromosomes) وقد عرف العلماء عنها منذ الثلاثينات امتلاكها خواص فريدة تحمي أطراف الصبغيات. تم عزل التيلوميرات للمرة الأولى في سبعينيات و ثمانينيات القرن الماضي وظهر أنها تتألف من تكرارات للـ DNA (DNA repeats). إذا نقلت هذه التكرارات إلى أطراف صبغيات اصطناعية في الخميرة (yeast) فإنها تستطيع حماية هذه الصبغيات من التحطم (Degradation).

توجد صفة مورفولوجية أخرى في الصبغيات هي المناطق المنظمة للنويات NOR أو منطقة الانخماص الثانوي "Secondary constriction" و نظراً لثبات موقع هذه المناطق فإنها تستخدم أيضاً كالجزيء المركزي في تصنيف الصبغيات. و يوجد في كل مجموعة صبغية أحادية صبغي واحد على الأقل يحمل الانخماص الثانوي (في الذرة الصبغي رقم 6 و في الإنسان الصبغيات 13, 14, 15, 21 و 22).

يؤدي فقدان NOR إلى الموت بسبب تخريب المورثات التي تنسخ الـ RNAr الضروري لتشكيل الجسيمات الريبية التي يتم عليها اصطناع البروتين.

يوجد في بعض الصبغيات تشكلات مورفولوجية تسمى التوابع و تكون على شكل جسيم دائري أو متطاول منفصل عن الأجزاء الأخرى للصبغي بخيط دقيق كروماتيني طويل أو قصير, و يكون شكل التابع وحجمه و الخيط المرتبط به ثابت لكل صبغي. توجد هذه التوابع عند الإنسان على الصبغيات المذكورة سابقاً.

تصل الصبغيات كما نعلم إلى أقصى حالة لها من التراص و الحلزنة الشديدة في الدور الثاني، حيث يتألف الصبغي من صبيغيين أو كروماتيدين. تم بمساعدة المجهر الالكتروني تمييز خيط حلزوني يسمى الخيط الصبغي داخل كل كروماتيد و قد يحتوي الكروماتيد الواحد على خيط صبغي واحد أو على 2–4 خيوط صبغية. و يظهر المجهر الالكتروني أن الخيط الصبغي يتألف من لييفات و يعد اللييف المكون من بروتين نووي الوحدة الأساسية في بنية الكروماتيد. تتوضع على معظم الخيط الصبغي حبيبات ولوعة بالملونات تسمى الحبيبات الصبغية و تبدو عاتمة بالمجهر الضوئي بسبب شدة التحلزن و التكثيف, تفيد هذه الحبيبات في تصنيف الصبغيات و تحديد ذاتيتها لأنها تمثل مواقع ثابتة و لها أشكال و أحجام محددة في الصبغيات غير المتقابلة.

في عام 1960 اعتمد المختصون بالوراثة الخلوية للإنسان على تصنيف الصبغيات و ترتيبها حسب أطوالها و موقع الجزيء المركزي و صنفت تبعاً لذلك في سبع مجموعات:

المجموعة A: تضم الصبغيات 1, 2 و 3.

المجموعة B: تضم الصبغيات 4 و 5.

المجموعة C: تضم الصبغيات من 6 إلى 12 بالإضافة إلى الصبغي X.

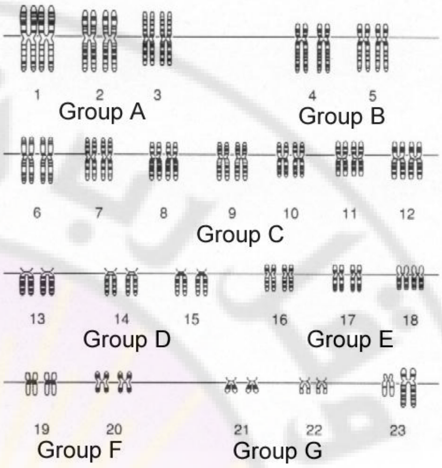
المجموعة D: تضم الصبغيات 13, 14 و 15.

المجموعة E: تضم الصبغيات 16, 17 و 18.

المجموعة F: تضم الصبغيات 19 و 20.

المجموعة G: تضم الصبغيات 21 و 22 بالإضافة إلى الصبغي Y.

غالباً يتدرج ترقيم الصبغيات من الأطول إلى الأقصر، وعلى ذلك فإن الصبغي (X) يضم إلى المجموعة C ، بينما الصبغي (Y) وهو قصير بشكل واضح يضم إلى المجموعة الأخيرة G (شكل 6).



شكل 6 . صبغيات الإنسان: الصبغيات الجسمية 1–22 و الصبغيات الجنسية X و Y .

عدد الصبغيات الوراثية في كل خلية من خلايا جسم الانسان 46 صبغي وهذه الـ 46 صبغي عبارة عن 23 زوج. كل زوج منها عبارة عن صبغيين متشابهين بشكل كبير (ونستطيع القول تجاوزاً أنهما متطابقان)، زوج من هذه الصبغيات تعطيه الأمهات و الأخر يعطيه الآباء. كل زوج من هذه الأزواج المتطابقة يعطيه الأخصائيين رقما يميزه عن الآخر ابتداء برقم واحد للزوج الأول و انتهاء بالزوج الأخير رقم 23.

الزوج الثالث والعشرين له خاصية مهمة من ناحية تحديد الجنس (الذكورة أوالأنوثة) لذلك يطلق عليه الأخصائيين الزوج الجنسي، وفي المقابل يطلق على بقية الأزواج من 1 إلى 22 الأزواج الجسمية وذلك تميزاً لها. عند مقارنة الزوج الجنسي عند الرجال والنساء نجد فيه اختلاف, فالصبغيين الجنسين- في الزوج الجنسي عند الإناث تقريباً متطابقين (إي متشابهين بدرجة عالية في الشكل والطول) وكل واحد منهما يرمز إليه بالحرف X. بينما الصبغيين في الزوج الجنسي لدى الذكور مختلفين فأحدهما يرمز له بالحرف X (وهو يشبه الصبغي X لدى الإناث) بينما الصبغي الآخر مختلف فهو أقصر بكثير من الصبغي X ويرمز له بالحرف (Y).

و لا توجد علاقة بين عدد الصبغيات و درجة رقي المتعضية، فعند الإنسان يكون العدد الصبغي 2n= 46 و عند السرطان Paralithodes تكون 2n= 208 و عند الدجاج تكون 2n= 78.

جدول: عدد الصبغيات عند بعض النباتات و الحيوانات.

المتعضية	العدد الصبغي
Arabidopsis thaliana	10
الذرة	20
التبغ البري	24
التبغ المزروع	48
الحصان	64
الأبقار	60
الكلاب	78
الفيلة	56
الأرانب	44
فئران التجارب	42

يتميز كل صبغي ضمن المجموعة الصبغية الأحادية بطول و حجم ثابتين, و بالتالي فإن أبعاد الصبغي من الصفات الثابتة له و تتراوح أطوال الصبغيات من 0.2–50 ميكروناً و قطرها من 0.2 – 5 ميكروناً.

وفي الوقت الحاضر يمكن التمييز بين صبغيات المجموعة الواحدة اعتماداً على طرائق تلوين خاصة تسمى التعصيب الصبغي Chromosomal binding، التي طورت بين 1960 و 1970 حيث تتم تفاعلات خاصة بين أصبغة كيميائية و مواد مضيئة و الـ DNA مما يسمح بتوضيح نماذج مختلفة من العصابات البيضاء و السوداء منها G و C و Q و R و H. و من المواد المستخدمة ملون Giemsa و Quinacrine و قد تحتاج عملية ظهور عصابات محددة إلى المعالجة المسبقة بـ HCl و NaOH (شكل 7).

شكل 7 . التعصيب الصبغي.

الطابع النووي:

الطابع النووي "Karyotype" هو مجموع خصائص المجموعة الصبغية (عدد الصبغيات, شكلها, حجمها, طولها و بنيتها). لدراسة الطابع النووي ترتب الصبغيات في مجموعات و ذلك وفقاً إلى طول الصبغي و موقع الجزيء المركزي. و تدرس هذه الظاهرة في النباتات على مقاطع عرضية لقمة الجذور المنقسمة، أما في الحيوانات و الإنسان فتدرس عن طريق زراعة الكريات البيضاء، عناصر نخاع العظم و الخلايا الليفية الأصلية. حيث أن دراسة الطابع النووي الذي يمثل خصائص المادة الصبغية المضاعفة و الثابتة لكل نوع يكشف عن وجود زيادة أو نقص في عدد الصبغيات أو في شكلها أو في بنيتها (أي وجود شذوذ صبغي), الأمر الذي يمكن أن يؤدي إلى تشكل تشوهات جسمية.

و لدراسة الطابع النووي تضاف مادة الكولشيسين Colchicine أو مادة الكولسيميد Colcemide في وقت مناسب من الدورة الخلوية. و تعمل هذه المواد على منع هجرة الصبغيات إلى قطبي الخلية و يعود ذلك إما إلى تعطيل انفصال الصبغي طولياً أو إلى تخريب مغزل الانقسام, و بالتالي عدم تمكن الصبغيات من الانتقال إلى القطبين. و يتم بعد ذلك تلوين الصبغيات بملون Aceyo-orcein و بملون فولكن. ثم تصور الصبغيات و تحمض و تقطع الصور و ترتيب حسب طول الصبغيات و اعتماداً على توضع الجزيء المركزي.

الصبغيات العملاقة:

تعد الصبغيات العملاقة Giant chromosomes مادة مناسبة لدراسة بنية المادة الوراثية و وظيفتها. و توجد هذه الصبغيات في نوى خلايا يرقات ثنائيات الأجنحة كالذباب و البعوض مثلاً (الغدد اللعابية، أوعية مالبيكي و الخلايا المغذية للمبيض و الجسم الدهني). و تصل إلى أقصى حجم لها في الغدد اللعابية، حيث تكون ذات بنية واضحة. و تعود ضخامة هذه الصبغيات إلى تضاعف الكروماتيدات مرات عديدة بوساطة الميتوز الداخلي فبدلاً من انشطار الكروماتيدات طولياً فإنها تلتصق مع بعضها البعض فتكون حزماً من الخيوط المتعددة و تصل درجة التعدد حتى 16000 كروماتيد، مما يدل على القطر الضخم لهذه الصبغيات, و هي أطول من الصبغيات العادية بـ 100 مرة. تتوضع على حزم الخيوط المتعددة حبيبات صبغية

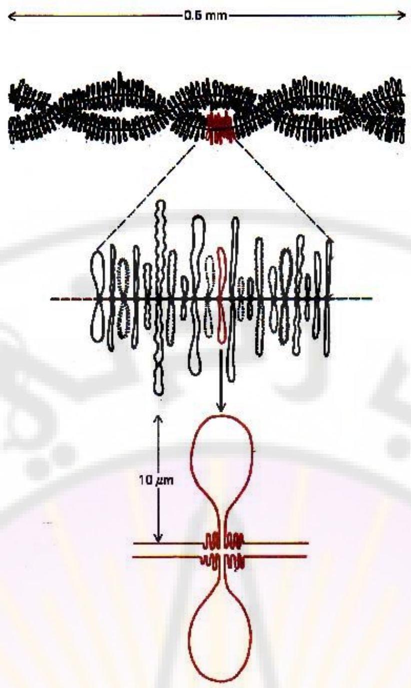
ملتصقة بعضها ببعض بشدة و غنية بالـ DNA و هي ذات تلون شديد حيث تشكل أقراص عرضية, يفصلها عن بعضها مناطق تتلون بشكل ضعيف تسمى المسافات بين الأقراص.

و للصبغيات العملاقة أهمية خاصة في الأبحاث الوراثية حيث أدت إلى معرفة التوزع الخطي للمورثات و مواقعها على الصبغيات.

و تستخدم الصبغيات العملاقة في معرفة الفعالية المورثية. ففي مرحلة محددة تفقد بعض الأقراص بنيتها الواضحة, حيث تتضخم لتشكل ما يسمى بـ الانتفاخات. و فيما بعد قد يختفي الانتفاخ ليتشكل انتفاخ أخر من قرص آخر و هكذا, وقد تأكد أن الـ DNA في هذه الانتفاخات ينسخ الـ RNA الذي يتراكم حول الانتفاخ. و تميز الانتفاخات مراحل التحول الشكلي Metamorphosis, حيث تظهر و تختفي خلال التشكل الفردي في تعاقب محدد و منظم و هذا يثبت فعالية و كظم المورثات في وقت معين و مكان معين.

الصبغيات الفرشاتية:

الصبغيات الفرشاتية Lampbrush chromosomes صبغيات عملاقة (طولها 1مم) و ذات فعالية خاصة (شكل 8). توجد في نوى الخلايا المولدة للبيوض عند الفقاريات و في الخلايا المنوية لذبابة الخل. و يمكن رؤية هذه الصبغيات في مرحلة الخيوط المضاعفة للدور الأول للميوز I. و تبرز من الكروماتيد عقد صبغية تشبه الشعر الخشن لفرشاة المصابيح (و من هنا جاء اسم هذه الصبغيات). و تتوزع هذه العقد كأقراص الصبغيات العملاقة بترتيب خاص. و يصل طول الـ DNA في الحالة الممددة إلى 1400 سم. و يتم في العقد الصبغية نسخ الـ RNAو DNA و بهذه الصورة تؤمن الخلية البيضية الناضجة مادة النويات الكثيرة العدد و بالتالي الريبوزومات. علاوة على ذلك و في الوقت نفسه يتم نسخ الـ RNAm الضروري لاصطناع البروتينات بعد الالقاح.



شكل 8. الصبغيات الفرشاتية

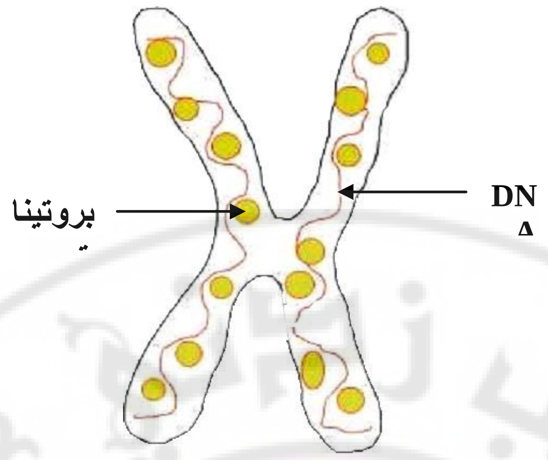
البنية الجزيئية للصبغيات:

عند تلوين خزعة من خصية برمائي, لاحظ Flemming (1880) أن النواة تحتوي على مادة حبيبية تتلون بالأحمر، سماها المادة الصبغية أو الكروماتينية, و يمكن ملاحظة هذه المادة الحبيبية في طور الراحة بوساطة المجهر الضوئي. لكن المجهر الالكتروني وضح أن الكروماتين مكون من خيط طويل جداً.

عند بدء انقسام الخلية تتجمع المادة الكروماتينية في أشفاع من أجسام خيطية الشكل هي الصبغيات الحقيقية. و قد وجد أن الصبغيات تتركب كيميائياً من الـ DNA و البروتينات الأساسية (الهيستونات) و البروتينات الحمضية (غير الهيستونية). و تشغل هذه البروتينات 31% من المادة الكروماتينية للكتلة الجافة في نوى الإنسان في طور الراحة و يوجد أيضاً كمية قليلة من الـ RNA (شكل).

و قد تشترك بعض هذه المواد في تنظيم ترجمة المعلومات الوراثية للـ DNA أي التحكم في التعبير المورثي للمورثات.

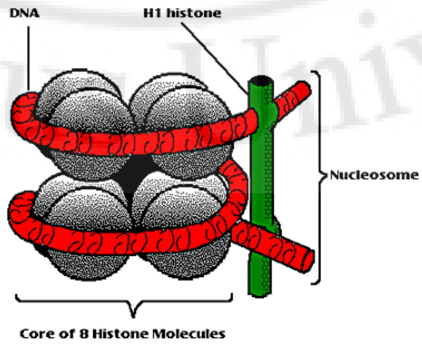
– و يعد الـ DNA و الهيستونات المركبات الرئيسة للصبغيات، حيث تبقى نسبتهما ثابتة في كل نواة و ذلك لتضاعف الهيستونات مع الـ DNA في المرحلة S من الطور البيني.



شكل . البنية الجزيئية للصبغيات.

يبرهن على وجود الـ DNA و البروتينات في الصبغيات بمعالجة الصبغي بأنزيم التربسين و أنزيم Deoxyribonuclease (اختصاراً DNAase). حيث يزيل الأنزيم الأول البروتينات و يبقي على أشرطة الـ DNA فيظهر الصبغي متآكل مع الاحتفاظ بطوله. بينما يزيل الأنزيم الثاني أشرطة الـ DNA و يبقي على البروتينات مما يؤدي إلى تفكك الصبغي إلى قطع أو وحدات صغيرة تسمى الجسيمات النووية أو النكليوزومات Nucleosomes التي تتوزع على طول الليف الكروماتيني للصبغي.

إن طول شريط مفرود من الـ DNA لخلايا الثدييات في الطور Metaphase يصل لـ 1 متر. وبما أن طول الصبغي في الخلية ذاتها وفي الطور ذاته هو عبارة عن 115 ميكرون فقط، فلا بد من تقصير شريط الـ DNA بمقدار 10,000 طية تقريباً. تتم عملية الطي من خلال خلق ما يسمى بـ"الجسيمات النووية" و قد اكتشف النيكلوزوم في عام1974 من قبل العالم Kornberg و كل منها مكون من DNA و من جزيء هيستوني مكون من عدد معين من الهيستونات.



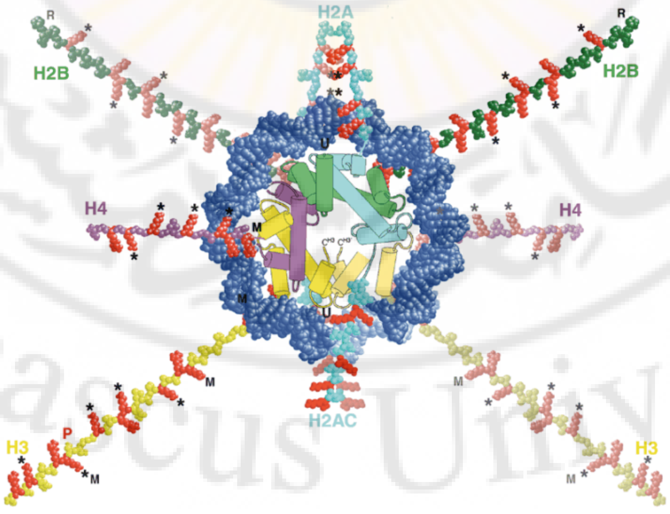
Nucleosome

شكل . بنية النيكلوزوم.

يتكون شريط الـ DNA في الجسيم النووي من 146 أساس أزوتي, أما الجسيم الهيستوني فيتكون من 8 بروتينات هيستونية هي عبارة عن نسختين من كل من البروتينات الهيستونية التالية: H2A, H2B, H3, H4.

– الهيستونات Histones البروتينات الأساسية:

الهيستونات عبارة عن بروتينات كروية, يتكون كل منها من لب كاره للماء و طرفان أميني و حمضي، وهي بروتينات تمتلك نسبة معينة من الشحنة الإيجابية المتناسبة مع وجود الحمضين الأمينيين اللايسين و الأرجنين فيها. تلك الشحنة الموجبة تمكن الهيستون من الالتصاق جيداً بشريط الـ DNA (سالب الشحنة بسبب الفوسفات) في الجسيم النووي و هناك خمسة أنواع من الهيستونات هي: H2B , H2A , H1 , H4 , H3 (جدول) و تساهم الهيستونات جميعها (عدا H1) في تشكيل الجسيم النووي بالتعاون مع شريط الـ DNA. هناك علاقة خاصة بين الهيستونات و الـ DNA و خاصة في مناطق الـ DNA الغنية بالـ T و الـ A الموجودة في الثلم الصغير للشريط المضاعف حيث يكون شريط الـ DNA المضاعف أكثر قابلية للانثناء في تلك المنطقة.



شكل. بنية الهيستونات

Damascus University

جدول. أنواع الهيستونات و صفاتها.

الهيستون	الميزات	عدد الحموض الأمينية	الوزن الجزيئي
H1	غني جداً باللايسين	215	21500
H2a	غني باللايسين	129	14000
H2b	غني باللايسين	125	12775
H3	غني بالأرجنين	135	11280
H4	غني بالأرجنين	102	11280

نعلم أن الهيستونات موجودة في الكائنات الراقية وتكون غالباً مماثلة للهيستون H2, و لكن وجد في البكتيريا أشباه هيستونات بقرب صبغياتها. الهيستون H1 هو مفتاح انتقال الخلية إلى الطور S (طور الانقسام الخلوي) (طور الخيط الصبغي A 100). و الهيستونان H3 و H4 هما الأكثر ارتباطاً بالـ DNA.

– و تكون البروتينات الحمضية (غير الهيستونية) أقل من 1000 نوع وهي عبارة عن أنواع مختلفة من عوامل النسخ التي تنظم آلية نسخ الـ DNA إلى الـ RNA.

أنواع الكروماتين:

نجد في الصبغيات نمطين من الكروماتين: الكروماتين الحقيقي Euchromatin و الكروماتين غير المتجانس Heterochromatin.

1– الكروماتين الحقيقي:

يشكل الكروماتين الحقيقي جزءاً رئيساً من بنية الصبغي، حيث تحتوي على عدد كبير من المورثات التي تملك قدرة كامنة للترجمة, و بخلاف الكروماتين غير المتجانس تكون الأسس الميتيلية قليلة, و يحتوي كميات كبيرة من الـ DNA و البروتينات الهيستونية و غير الهيستونية. يكون الكروماتين الحقيقي متكثف بشكل قليل جداً، مما يدل على أهميته في عملية الترجمة و تشكيل البروتينات و الأنزيمات المختلفة. و قد يكتسب صفات الكروماتين الاختياري غير الفعال، و يعد هذا أحد الأساليب التي تنظم آلية التعبير المورثي, و قد تحدث الطفرات بشكل كبير في الكروماتين الحقيقي. و يتم نسخه بوقت مبكر في المرحلة S للدورة الخلوية و يكون بحالة منتشرة في المرحلة البينية و بحالة حلزنة في طور الانقسام.

2- الكروماتين غير المتجانس:

يكون هذا الكروماتين بحالة مكثفة في جميع مراحل الدورة الانقسامية. و يتلون بشدة بالملونات الأساسية للنواة مثل أصبغة فولكن, حيث يمكن رؤيته جيداً تحت المجهر الضوئي حتى في الطور البيني. و كقاعدة عامة ينسخ الكروماتين غير المتجانس في وقت متأخر من نسخ الكروماتين الحقيقي, و لا يترجم أي أنه خامل وراثياً, و لوحظ فيه عدد قليل من الطفرات.

تحتوي نواة النسج الفعالة و الخلايا الجنينية على كمية قليلة من الكروماتين غير المتجانس.

يميز في الكروماتين غير المتجانس نمطان: الكروماتين الاختياري Facultative heterochromatin و الكروماتين الأساسي أو البنيوي Constitutive heterochromatin. و يوجد النوع الأول في أحد الصبغيات المتقابلة و ينقلب إلى كروماتين حقيقي ويحتوي على مورثات فعالة. أما الكروماتين الأساسي أو البنيوي فيوجد في كلا الصبغيات المتقابلة, و يكون مكثفاً و خاملاً بشكل دائم, حيث يوجد في الجزيء المركزي و في نهاية الصبغي Telomere و في منطقة منظم النوية, و يتوضع في طور الراحة بالقرب من الغشاء النووي. و يلعب الكروماتين الأساسي دوراً هاماً في انجذاب الصبغيات و حركتها فهو ضروري للانقسامات النووية المتكررة خلال حياة الفرد.

أسس البيولوجية الجزيئية

تعود أول ملاحظة للـ DNA في العلم الحديث للطبيب السويسري فريدريك ميشر Friedrich Meischer 1869 عندما استطاع استخلاص مادة مجهرية من القيح و أسماها نووين (نيوكلين) بسبب و جودها داخل النواة. حاول كلاً من Rosalind Franklin و Maurice Wilkins إيجاد بنية الـ DNA باستخدام انحراف أشعة X و ساعد على ذلك اكتشاف Robert Feulgen, 1914 صبغة الفوكسين (صبغة حمراء مزرقة) و هي تلون الـ DNA. بعدها تم اكتشاف الـ DNA في نويات معظم خلايا حقيقيات النوى.

في العام 1917 تحققت خطوة مهمة على صعيد فهم تركيب المورثة على يد العالم الرياضي الأمريكي سيول رايت الذي توقع أن المورثة هي التي تتحكم بتفاعلات الإنزيمات. و كان ذلك قبل أن يتمكن العلماء من عزل أي إنزيم, الأمر الذي لم يتم قبل 1926. حلل الكيميائي Levene عام 1920 مكونات جزيء الـ DNA و وجد أنه يتألف من أربعة أسس أزوتية و

سكر ريبوز منقوص الأوكسجين و مجموعة الفوسفات. و استطاع في عام 1929 اكتشاف مكونات الوحدة الأساسية للـ DNA و هي النوويدات و بين أن الـ DNA ما هو إلا تكرار لهذه الوحدة.

في عام 1939 أجريت تجارب من قبل تورجون كاسبيرسون Torbjörn Caspersson و جان براشيت Jean Brachet و جاك شولتز Jack Schultz لتظهر دور الـ RNA في اصطناع البروتينات. أما ووبرت كانترين فهو أول من تحدث عن دور الـ RNA كناقل للحموض النووية إلى الجسيمات الريبية لإتمام عملية اصطناع البروتين.

بدأ فريق من العلماء برئاسة البيوفيزيائي البريطاني موريس ولكنز مشروعا يهدف إلى معرفة تركيب الـ DNA و توصلوا إلى تحديد طريقة عملها. وكان هذا الفريق يؤمن بأن سر الحياة لا بد أن يشكّل نوعاً من القدرة على الاستنساخ أو نقل الذات. وقد استخدم الفريق التصوير البلوري بالأشعة السينية (X-ray Crystallography), وهي تقنية اكتشفت عام 1938, وتعتمد تصوير البلورات من زوايا عدة بواسطة الأشعة السينية, لجعل هذه البلورات ترمي طيفاً من الأشعة على صفيحة فوتوغرافية كاشفة بذلك بنيتها الهندسية وترتيباتها الداخلية.

في عام 1943 أجرى أوزوالد أفري تجربة بمزج خلايا بكتيريا نيموكوكس (*Pneumococcus*) ميتة و تحمل خاصية السطح الناعم مع بكتيريا حية من نفس النوع و لكن ذات سطح خشن. كان من نتائج التجربة انتقال خاصية السطح الخشن إلى البكتيريا ذات السطح الناعم و سمى الـ DNA بالعامل الناقل.

المادة الوراثية

تعود أهمية المادة الوراثية إلى أنها تشكل مادة المورثات و تحتوي على المعلومات الضرورية لتنظيم الحموض الأمينية في السلاسل الببتيدية أي تشرف على اصطناع البروتينات التي تساهم في مراقبة الاستقلابات في الخلية و التي تتأثر بالبيئة، إضافة إلى أنه تقوم بنقل المعلومات الوراثية من جيل إلى آخر.

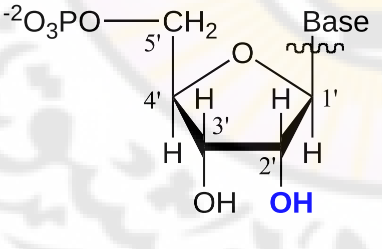
بنية الحموض النووية:

تكون الحموض النووية ذات وزن جزيئي عالي, و يوجد نمطان منها:

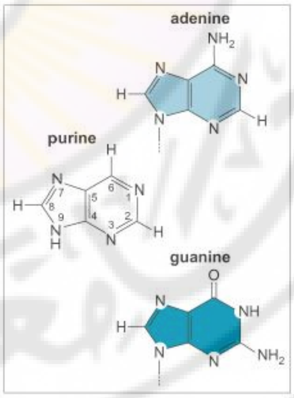
- الحمـــض الريبـــي النـــووي منقـــوص الأوكســـجين: دي أوكســـي ريبـــو نيوكليـــك أســـيد (Deoxyribo Neuclic Acid) ويعرف بأوائل حروفه المكوّنة لاسمه اختصاراً بـ (DNA) و هو حامل للمعلومات الوراثية.

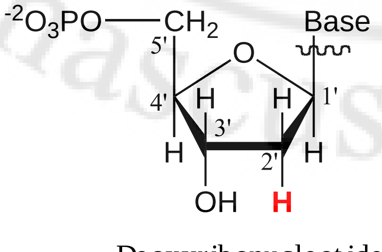
- الحمض الريبي النووي: ريبو نيوكليك أسيد Ribo Neuclic Acid ويعرف بأوائل حروفه المكوّنة لاسمه اختصاراً(RNA) و يشترك في تركيب البروتينات.

تتكون الوحدة الأساسية لبناء جزيئة الـ DNA، والتي تسمى بالنيكليوتيد, من ثلاثة أجزاء كيميائية مختلفة: الجزء الأول: السكر الخماسي ريبوز منقوص الأكسجين للـ DNA و الريبوز للـ RNA و الجزء الثاني: أساس أزوتي عضوي مشتق أما من هيكل البيورينات (Purines) وهما الأدينين Adenine (A) و الغوانين Guanine (G)، أو من هيكل البريميدينات (Pyrimidines) وهما التايمين Thymine (T) و السيتوزين Cytosine (C). يتم الارتباط بين الأسس الأربعة السابقة و السكر بوساطة رابطة مشتركة و يشكل هذا الاتحاد ما يسمى النيكلوزيد (شكل).

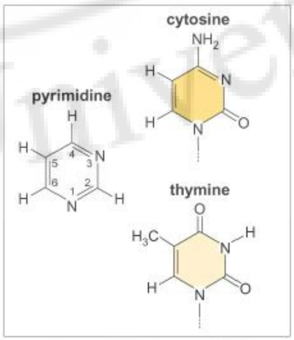


Ribonucleotide





Deoxyribonucleotide



شكل . مركبات الحموض النووية من الأسس الزوتية الأربعة و السكر.

يقوم الجزء الثالث (مجموعة الفوسفات) بربط النيكليوزيدات المتجاورة ببعضها البعض في سلسلة بوليميرية بوساطة الرابطة الفوسفاتية ثنائية الاستر (Phosphodiester Bond), في كل من ذرات الكربون الخامسة '5 للسكر الأول مع ذرات الكربون الثالثة '3 للسكر الثاني.

تتألف الحموض النووية من سلاسل بوليميرية طويلة جداً تتكون من نيكليوتيدات متعددة، تتحد فيما بينها بواسطة الرابطة الفوسفاتية ثنائية الاستر في المكانين '5 و'3 للسكر. و يدعى جزيء الـ DNA بالجزيء المستقطب نظراً لأن السلسلة يمكن أن تقرأ فيها ارتباطات السكر إلى الفوسفات بـ 3 ' إلى 5 ' أو 5 ' إلى 3 '. و تعود البنية الخطية في سلسلة الـ DNA إلى وجود مكانين للارتباط فقط في السكر هما 3 ' و 5 ' أما في الموقع 2 ' فلا يوجد مجموعة هيدروكسيل يمكن أن يتم فيها ارتباط و هذا ما يجعل إمكانية تشكل الفوسفات الحلقية مستحيلاً و هذا ما يجعل الـ DNA لا يتحلمأ بالقلويات بينما الـ RNA يتحلمأ و تعتبر هذه الخاصية ميزة للـ DNA عن الـ RNA. أما زمرة الهيدروكسيل الحرة في مجموعة الفوسفات فهي التي تعطي الصفة الحمضية للـ DNA.

يحتوي الـ DNA التابع للقمح إضافة إلى الأسس الأزوتية الأربعة السابقة إلى 5 ميتيل سيتوزين بينما يحتوي الـ DNA عند آكل الجراثيم T2 و T4 و T6 على 5 هيدروكسي ميتيل سيتوزين و عند آكل الجراثيم PBS فان اليوراسيل يحمل محل التيمين.

و يقسم الـ DNA إلى صفين أساسيين هما: الصف الغني بالأدينين و التيمين و الصف الغني بأشفاع الغوانين و السيتوزين.

لقد أظهر العالم دوتي بأن الـ DNA الغني بأشفاع الغوانين و السيتوزين يتميز بكثافة العوم أو الطفو في محاليل مركزة من كلور السيزيوم أي أن الخصائص الفيزيائية للـ DNA تتأثر بدرجة الغنى بأشفاع C و G أي أن كثافته أعلى من الكثافة التي يتميز بها الـ DNA الغني بـ T و A و قد استطاعوا تحديد مقدار الـ C و G في أنماط مختلفة من الـ DNA و بلغت عند الثدييات 40-45% بينما في الجراثيم 30-75% و ذلك عن طريق تشويه الـ DNA بالحرارة.

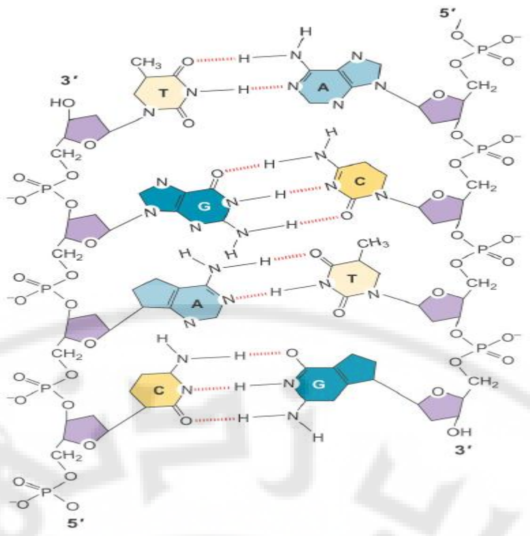
جدول. النسبة المئوية لكمية الـ C و G في جينومات بعض المتعضيات.

المتعضية	النسبة المئوية % للـ C و G
الانسان	39.7
الأغنام	42.4

الدجاج	42
السلحفاة	43.3
سمك السلمون	41.2
قنفذ البحر	35
E.coli	51.7
Staphylococcus aureus	50
الفاج λ	55.8
الفاج T7	48

بنية الـ DNA:

اعتقد Avery و غيره سابقاً أن بنية الـ DNA بسيطة تتمثل بتواتر متكرر من النيكليوتيدات الأربعة. لكن الأبحاث الكيميائية التي أجراها Chargaff و مساعدوه على متعضيات كثيرة مختلفة بينت أن الـ DNA يمتلك بنية معقدة جداً ضرورية لنقل المعلومات الوراثية. و قد أثبت أن تكرار الأسس العضوية يختلف من نوع إلى آخر، و بالتالي استبعدت فكرة كون جزئيات الـ DNA مؤلفة من تكرار واحد متشابه من النيكليوتيدات الأربعة. أظهرت أبحاث شارغاف أيضاً ميزة بارزة أخرى لجميع جزئيات الـ DNA و هي أن المقدار الكمي للنيكليوتيدات التي تحوي Aتساوي المقدار الكمي للنكليوتيدات التي تحوي T و المقدار الكمي للنكليوتيدات التي يدخل فيها G تساوي المقدار الكمي للنكليوتيدات التي يدخل فيها C. أي أن كمية البيورين تساوي كمية البيريميدين (جدول).



شكل . بنية الحمض النووي الـ DNA.

جدول . تركيب الأسس الأزوتية في الـ DNA (حسب شارغاف)

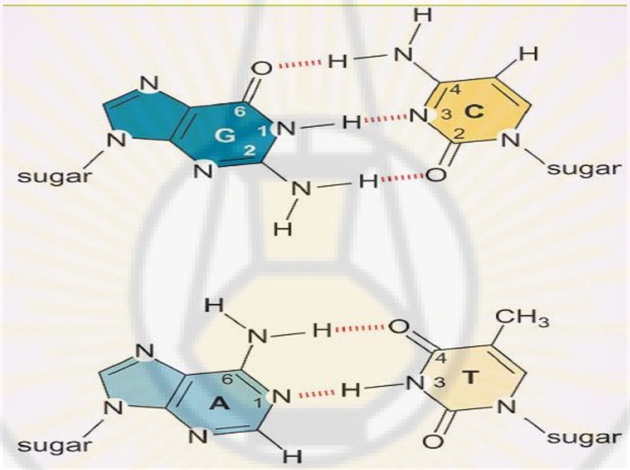
المتعضية	تركيب الأسس الأزوتية في الـ DNA حسب شاركوف			
	كمية الأسس (مول %)			
	C	G	T	A
Escherichia coli	25.2	24.9	23.9	26.0
Sterptococcus pneumoniae	18.0	20.5	31.6	29.8
Mycobacterium tuberculosis	35.4	34.9	14.6	15.1
الخميرة yeast	17.1	18.7	32.9	31.1
قنفذ البحر Sea urchin	18.4	17.7	32.1	32.8
سمك الرنجة Herring	22.6	22.2	27.5	27.8
الفأر Rat	21.5	21.4	28.4	28.6
الإنسان Human	19.8	19.9	29.4	30.9

و تدعى هذه المساواة بقواعد شارغاف: T=A و C,=G و نستنتج من هذه القواعد أن النسبة C+A على T+ G = 1 (أي تتعادل الأسس التي تحمل المجموعة NH2على الكربون رقم 6 مع الأسس التي تحمل مجموعة الكيتون على الموقع نفسه) و أن النسبة T+A على C + G تتغير حسب النوع.

اقترح واطسون و كريك عام 1953 نموذج يوضح بنية الـ DNA حيث حصلا في عام 1962 على جائزة نوبل و ذلك بناءاً على معطيات شارغاف و دراسات ويلكنز و فرانكلين التي بينت باستخدام أشعة X أن ألياف الـ DNA تحتوي على أكثر من سلسلة متعددة النيكليوتيدات. و

بناءاً على المعطيات السابقة افترض واطسن و كريك أن الـ DNA يتألف من سلسلتين من متعدد البوليميرات, تتكون كل منهما عدد من النيكليوتيدات، و تلتف السلسلتان حول محور مشترك بشكل حلزون مضاعف. و تتألف كل سلسلة من عمود فقري متشابه عند جميع الكائنات الحية، و هو ارتباط السكر مع الفوسفات ويرتبط بالعمود الفقري الأسس الآزوتية التي تتميز بتتال خاص لكل الـDNA.

ترتبط الأسس الأزوتية للسلسلتين برابطة هيدروجينية ضعيفة (Hydrogen Bond) و ترتبط القواعد مع بعضها بشكل منظم، بحيث ترتبط القاعدة أدينين مع القاعدة تايمين في السلسلة المقابلة برابطة هيدروجينية ثنائية، بينما يرتبط الغوانين مع السيتوزين برابطة هيدروجينية ثلاثية (شكل).

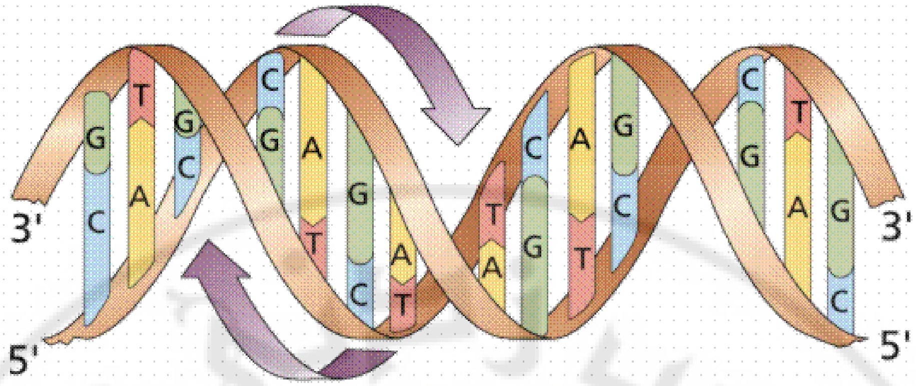


شكل: ترتيب ازدواج الأسس في الـ DNA .

ازدواج C و G بثلاثة روابط هيدروجينية.

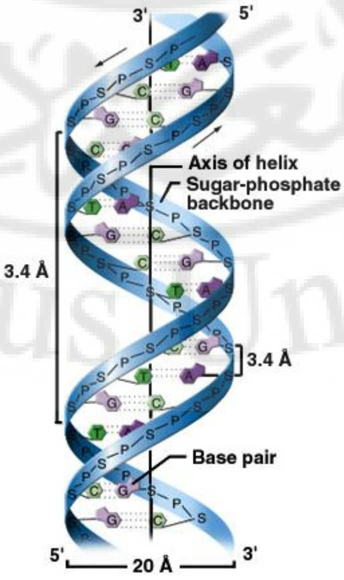
ازدواج A و T بواسطة رابطتين هيدروجينيتين (الخطوط المتقطعة).

يتكون جزيء الـ DNA من سلسلتين متوازيتين تنتظمان على هيئة سلم ملتف لولبياً (Double Helix). يتكون جانبا السلم اللولبي من تعاقب السكر الخماسي وقاعدة الفوسفات (أي في المحيط)، بينما تتوضع الأسس الأزوتية في داخل الحلزون المضاعف. و لأن المسافة ثابتة بين سلسلتي الـ DNA فان الأسس البيورينية كبيرة الحجم (المؤلفة من حلقتين) ترتبط مع الأسس البيريميدينية صغيرة الحجم (المؤلفة من حلقة واحدة) (شكل).



شكل: بنية الحلزون المزدوج.

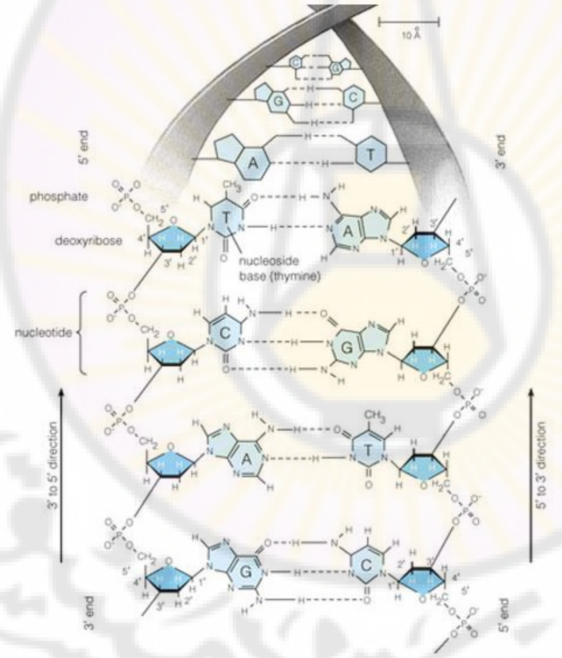
تفصل الأسس الأزوتية المتجاورة عن بعضها البعض بمسافة قدرها 3.4 انغستروم و يبلغ طول البنية المتكررة (اللفة) على طول الحلزون (34 أنغستروماً) و تتألف اللفة من عشر قواعد، فتبلغ المسافة بين قاعدتين متتاليتين (3,4 أنغسترومات) أو 0.34 نانومتر و يبلغ عمق الميزابة الكبرى (10 أنغسترومات). يكون عرض سلسلة الـ DNA من 20 إلى 26 انغستروم وطول النيكليوتيد الواحد 3.3 انغستروم. على الرغم من أن النيكليوتيد صغير جداً في الحجم إلا أن بوليمرات الـ DNA يمكنها تشكيل جزيئات ضخمة تحتوي على ملايين النيكليوتيدات فمثلاً: يبلغ طول الصبغي رقم 1 (أكبر صبغي بشري) حوالي 220 مليون أسس أزوتي مزدوج.



شكل: أبعاد الحلزون المزدوج.

تقرأ سلسلتي الـ DNA بطريقة متعاكسة، إذ تقرأ إحدى السلسلتين من اليسار إلى اليمين، أي نزولاً مع التيار(أي من '5 إلى '3)، في حين تقرأ السلسلة الثانية من اليمين إلى اليسار، أي صعوداً عكس التيار(أي من '3 إلى '5) (شكل).

تسمى أحد سلسلتي الـ DNA بالنهاية الخامسة (و يرمز لها '5) وذلك لعدم ارتباط ذرة الكربون الخامسة بسكر خماسي بينما السلسلة الأخرى تسمى بالنهاية الثالثة ('3) ولنفس السبب السابق. وتلتقي السلسلتين بشكل متوازي و عكسي (Antiparallel)، بحيث أن '5 يقابلها على السلسلة المتوازية '3.



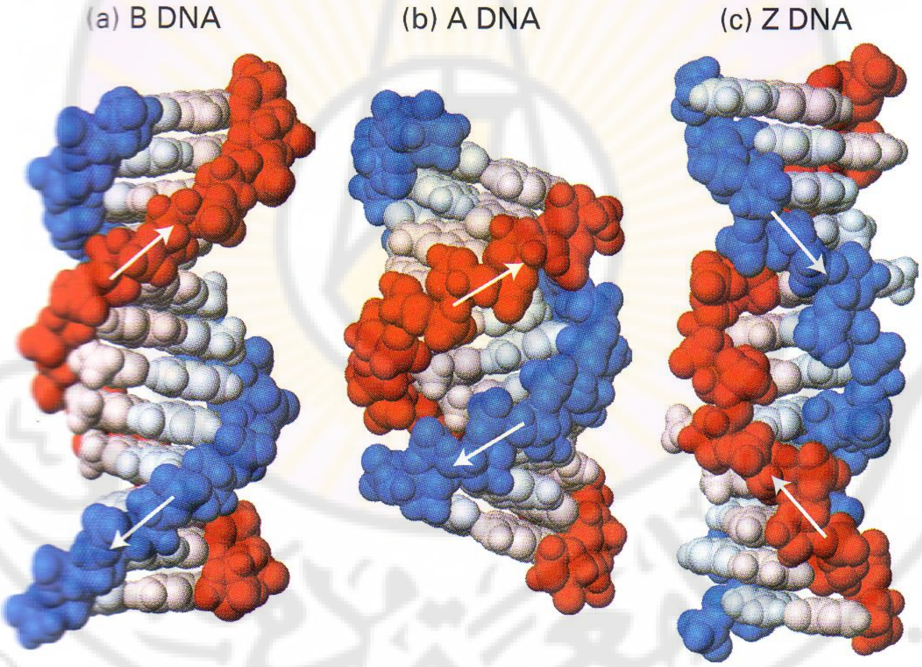
شكل: تقرأ سلسلتي الـ DNA بطريقة متعاكسة.

يوجد جزيء الـ DNA في الكائن الحي عادةً بالشكل الذي وضع من قبل واطسون و كريك عام 1953, بأنه حلزون مزدوج ملتف يميناً (باتجاه عقارب الساعة، و بنفس اتجاه التفاف سلسلتي الـ DNA مما يجعل الأسس قريبة من بعضها بشكل كبير) و يدعى شكل B (Biology). و الشكل B هو ترتيب أو تنظيم جزيئات الـ DNA في محلول مائي يحتوي

Damascus University

على نسبة منخفضة من الأملاح. إلا أن جزئيات الـ DNA ليست ساكنة بل على العكس تظهر قدرة كبيرة من المرونة في التركيب.

يتغير شكل جزيئية الـ DNA تبعاً للوسط الذي تتواجد فيه و يعتمد الشكل الصحيح لجزيء معين من الـ DNA على طبيعة الجزيئات التي يتفاعل معها. في حالة وجود تراكيز عالية من الأملاح أو قلة الماء فان الـ DNA يوجد على A و التي يوجد فيها 11 زوج من النيكليوتيدات في اللفة الواحدة. و قد اكتشف مؤخراً أن بعض سلاسل الـ DNA أظهرت اتجاهاً فريداً معاكساً لحركة عقارب الساعة و تكون الأسس متباعدة عن بعضها و هو حلزون مزدوج ملتف يساراً و يدعى شكل Z ، و يشير الشكل Z إلى الممر المتعرج للعمود الفقري للسكر و الفوسفات لهذا التركيب كما هو موضح في الشكل..



شكل: طرق ترتيب و تنظيم جزيئات الـ DNA.

شكل B: الشكل الأكثر شيوعاً (يملك دوران نحو اليمين و باتجاه عقارب الساعة).

شكل A: حلزون مزدوج ملتف يساراً.

شكل Z: معاكس لحركة عقارب الساعة.

جدول . أنماط الحلزون المضاعف تحت الظروف المختلفة.

أنماط الحلزون	الظروف الفيزيولوجية للخلية	عدد أشفاع الأسس	دورات /لفة	القطر

المضاعف		في كل لفة		
B	انخفاض نسبة الأيونات القوية	10	36° + يمين	20 A°
Z	تركيز ملحي عالي	12	30° − يسار	18 A°
A	وجــود أيونـــات الصـــوديوم و البوتاسيوم	11	34.6° + يمين	23 A°
C	و جود أيون الليتيوم	9.33	38.6° − يسار	19 A°

لكل نوع من الكائنات الحية تركيب وراثي فريد يدعى الجينوم و هم عبارة عن كامل المادة الوراثية الموجودة في الصبغيات. يتألف الجينوم من تسلسلات من الـ DNA مختلفة الطول و التكرارية و تكون مميزة للنوع و يمكن استخدامها في التمييز بين الأنواع بطرائق البصمة الوراثية المختلفة (SSR, RAPD, RFLP, AFLP) و بشكل عام تتألف بنية الجينوم من تسلسلات عاليـة التكراريـة Highly repeated sequences و تسلسـلات متوسـطة التكرارية Moderately repeated sequences و تسلسلات عديمة التكرارية Non repeated sequences.

A− التسلسلات عالية التكرارية ومن خصائصها:

- عبارة عن تسلسلات ذات تكرارية مرتفعة تصل إلى 10^5 نسخة.
- تكون عادةً قصيرة (عدة مئات من النيكليوتيدات).
- تتواجد على شكل عناقيد clusters.
- تتكرر هذه التسلسلات مرة بعد المرة دون انقطاع و تكون عبارة عن تسلسلات مترادفة.
- يمكن أن تصنف هذه التسلسلات إلى 3 تصنيفات متداخلة:

Microsatellite DNAs   Minisatellite DNAs   Satellite DNA

1− دنا التابع Satellite DNAs و هي

- تسلسلات قصيرة (من 5 إلى عدة مئات من الأزواج القاعدية).
- تتكرر بشكل مترادف Tandem repeats.
- تحدث في الجسيم المركزي centromers.
- الوظيفة غير مفهومة تماماً.

2− دنا التوابع الصغيرة Minisatellite DNAs

- تسلسلات من 12−100 من الأزواج القاعدية.
- عناقيد تصل إلى 3000 تكرار.

Damascus University

- غير مستقرة (السبب غير معروف).
- يتغير العدد زيادة أو نقصان بين الأجيال.
- عالي النوعية.
- يستخدم دنا التوابع الصغيرة في حالات تثبيت الأبوة كما تستخدم في حالات الجريمة للتأكد من هوية الفاعل.

3- دنا التوابع الدقيقة DNAs Microsatellite
- تسلسلات قصيرة من 1 إلى 5 من الأزواج القاعدية.
- عناقيد صغيرة من 50 إلى 100 زوج قاعدي.
- موزعة بشكل متساوي.
- يصل عددها إلى 300000 في جينوم الإنسان.

B – التسلسلات متوسطة التكرارية
-تشكل 20-80 % من مجموع الـ DNA و تتباين وفقاً للكائن الحي.
- تسلسلات متكررة مع وظائف مرمزة (مشفرة).
- تشفر لـ RNAm و RNAt و بروتينات الهستونات.
- تتواجد بأعداد متضاعفة (الحاجة له بكميات كبيرة).

C – تسلسلات عديمة التكرارية:
- يمكن أن تشكل حتى 70% من مجموع الـ DNA في الكائن الحي.
- يصل طولها إلى 1000 زوج قاعدي.
- عديمة التكرار (نسخة واحدة).
- عبارة عن مورثات تتبع الوراثة المندلية.
- تتوضع دوماً على صبغيات معينة.
- تضم الحجم الأكبر من المعلومات الوراثية.

جدول. النسبة المئوية للـ DNA المتكرر في بعض المتعضيات.

المتعضية	النسبة المئوية % للـ DNA المتكرر
الانسان	21
الفأر	35

العجل	42
ذبابة الفاكهة	70
القمح	42
البازلاء	52
الذرة	60
الخميرة *Saccharomycetes cerevisiae*	5
E.coli	0.3

تضاعف الـ DNA:

يعد تضاعف الـ DNA من أهم العمليات الحيوية الخلوية، فلولا تضاعف الـ DNA لماتت معظم الخلايا، فهي وسيلة التطور و التجديد و النمو. تنتهي العملية ببناء جزيئات من الـ DNA مطابقة لجزئ الـ DNA الرئيسي، ولها السبب يتم تسمية عملية تضاعف الـ DNA بعملية شبه محافظة.

يتم تضاعف الـ DNA في الطور S من الطور البيني و ليس في طور الانقسام وتبقى كمية الـ DNA ثابتة خلال هذا الطور وهي تعادل ضعف كمية الـ DNA الموجودة في الطور G1.

يبدأ تضاعف الـ DNA في مواقع ثابتة و فريدة و تسمى المنشأ "Origin". يستخدم في هذه العملية عدة أنزيمات مثل دنا بوليميراز "DNA polymerase" و رنا بريماز "RNA primase" و دنا هيليكاز "DNA Helicase" و البروتين الرابط للسلسلة الأحادية "DNA Single strand binding protein" و غيرها. تبدأ عملية التضاعف عند قيام إنزيم دنا هيليكيز "DNA Helicase" بحل سلسلتي الـ DNA ليفسح المجال لكل سلسلة من الـ DNA ببناء سلسلة متممة و مكملة لها، بعدها ترتبط البروتينات الرابطة للسلسلة الأحادية بسلسلتي الـ DNA المنفصلتين لمنع إعادة ارتباطهما ببعض. بعد قيام إنزيم الـ DNA هيليكيز بحل السلسلتين تنشأ نقاط بدأ للتضاعف في السلسلتين و تسمى هذه النقاط بشوكة التضاعف (Replication Fork) و يكون شكلها قريب من شكل الحرف Y.

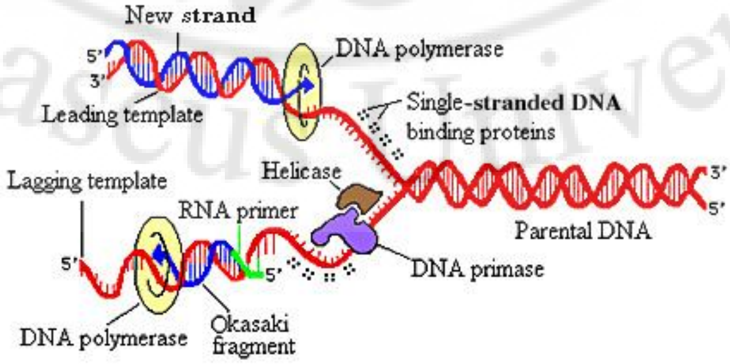
أنزيم الـ DNA بوليميراز DNA polymerase الإنزيم الرئيسي المسؤول عن تصنيع سلاسل الـ DNA الجديدة، يتم بناء السلسلتين الجديدتين باتجاه واحد و هو من '5 إلى '3 وذلك لقدرة

دنا بوليميراز على إضافة نيوكليوتيد جديد على مجموعة الهيدروكسيل (OH) الموجودة على ذرة الكربون رقم 3 فقط.

سيتم بناء أحد السلسلتين الجديدتين بشكل مستمر و سريع، تسمى هذه السلسلة بالسلسلة القائدة و تتخذ من سلسلة الـ DNA الأصلية ذات الاتجاه 5'-3' قالباً لها و السبب في سرعة بناء السلسلة هو وجود مجموعة الهيدروكسيل الحرة مما يسهل عمل دنا بوليميراز DNA polymerase.

أما السلسلة المقابلة فيكون بناؤها بطيء نسبياً مقارنةً بالسلسلة المتقدمة، وتسمى هذه السلسلة بالسلسلة المتأخرة و تتخذ من السلسلة الأصلية للـ DNA ذات الاتجاه 3'-5' قالباً لها. يتم تصنيع هذه السلسلة بشكل أكثر تعقيداً مقارنةً بالسلسلة القائدة. تبدأ العملية أيضاً بإضافة مجموعة من النيكليوتيدات عن طريق إنزيم رنا برايميز RNA primase (لإضافة مجموعة هيدروكسيل حرة) ليأتي بعدها إنزيم دنا بوليميراز لإضافة نيكليوتيدات متممة لسلسلة الـ DNA الأصلية. عندما يصل إنزيم دنا بوليميراز إلى سلسلة النيكليوتيدات التي تم إنشاؤها بواسطة إنزيم رنا برايميز يتم استبدال إنزيم دنا بوليميراز بنوع آخر من نفس الإنزيم (دنا بوليميراز) حتى يستبدل نيكليوتيدات الـ RNA بنيكليوتيدات دنا. و يتم وصل هذه بالسلسلة التي تسبقها بواسطة إنزيم دنا الرابط Ligase و ذلك عن طريق إضافة مجموعة الفوسفات بين ذرتي الكربون الثالثة و الخامسة.

في السلسلة المتأخرة, يتم بناء السلسلة الجديدة على شكل قطع غير متصلة، كل قطعة تحتوي مابين 100-1000 نيوكليوتيد، و تسمى هذه القطع بقطع أوكازاكي و يتم وصلها لاحقاً بواسطة إنزيم ربط الـ DNA (شكل).



شكل : تضاعف الـ DNA.

أنزيمات التضاعف في حقيقيات النوى:

1- أنزيم Alpha Polymerase (Primase): يتكون من أربع تحت وحدات, إحداها كبيرة ذات فعالية وسائطية تكون مورثتها على ذراع الصبغي X القصير, و تحت وحدتين لهما فعالية أنزيمية Primase, و تحت وحدة رابعة لم يعرف دورها.

2- أنزيم Beta Polymerase: يضمن تضاعف الـ DNA, يتكون من 335 حمض أميني تكون مورثاتها على ذراع الصبغي الثامن القصير و هو مقابل الـ DNA Polymerase 1 في طلائعيات النوى.

3- أنزيم Gamma Polymerase: يكون في الميتوكوندريا (المصورات الحيوية), و هو رباعي القطع و متجانس في الدجاج و ثنائي القطع ومتغاير في ذبابة الخل و وحيد القطع عند فطر الخميرة.

4- أنزيم Delta Polymerase: اكتشف في غدة العجل الصعترية و هو ثنائي القطع عند الإنسان, إحدى قطعتيه لديها فعالية وسائطية و القطعة الأخرى لم يعرف دورها وهو لا يعمل إلا بوجود بروتين PCNA.

5- أنزيم Epsilon Polymerase: اكتشف مؤخراً و يستخرج من المشيمة البشرية و من الغدة الصعترية. لا تعرف وظيفته حتى الآن, لكنه يشارك في تضاعف الـ DNA و في ترميمه.

أنزيمات التضاعف في طلائعيات النوى:

1- Topoisomerase: مجموعة أنزيمات التماكب الفراغي، تستخدم لفك التحلزن في الشريط المضاعف للـ DNA و تحويله إلى شريطين مفردين، و من أنماطها:

- **النمط I**: يقطع أحد شريطي الـ DNA في الشريط المضاعف، ثم يرمم القطعة فيكون بذلك قد فك التحلزن.

- **النمط II:** يقطع شريطي الـ DNA و بالتالي يفك التحلزن.

2- **RNA Polymerase:** و الذي يعتبر معقداً فعالاً و ليس أنزيماً مفرداً حيث يتركب من القطعة الأساسية و هي أنزيم الـ RNA Polymerase.

3- **DNA Polymerase:** نمطه الفعال في طلائعيات النوى هو **DNA PM III** الذي يتألف من سبع تحت وحدات، كل منها تُرمز بمورثة خاصة، حيث يقوم بـ:

- تركيب القسم DNA من قطعة أوكازاكي.
- تعويض قطعة الـ RNA المفككة من قطعة اوكازاكي.
- تركيب الشريط المقابل بشكل مستمر.
- ملاحظة الأخطاء الحاصلة خلال التركيب و تصحيحها، حيث يقوم بقطع الأساس المضاف بشكل خاطئ و إضافة الأساس الصحيح.

4 - **RNase** :أنزيم تفكيك الـ RNA، ونمطه الفعال في طلائعيات النوى هو **RNase H**. حيث يقوم بتفكيك القسم RNA من قطعة اوكازاكي و يركب DNA PM قطعة DNA بدلاً منها.

5- **Ligase:** أنزيم الربط بين القطع المركَّبة المنفصلة عن بعضها.

طرق تضاعف الـ DNA

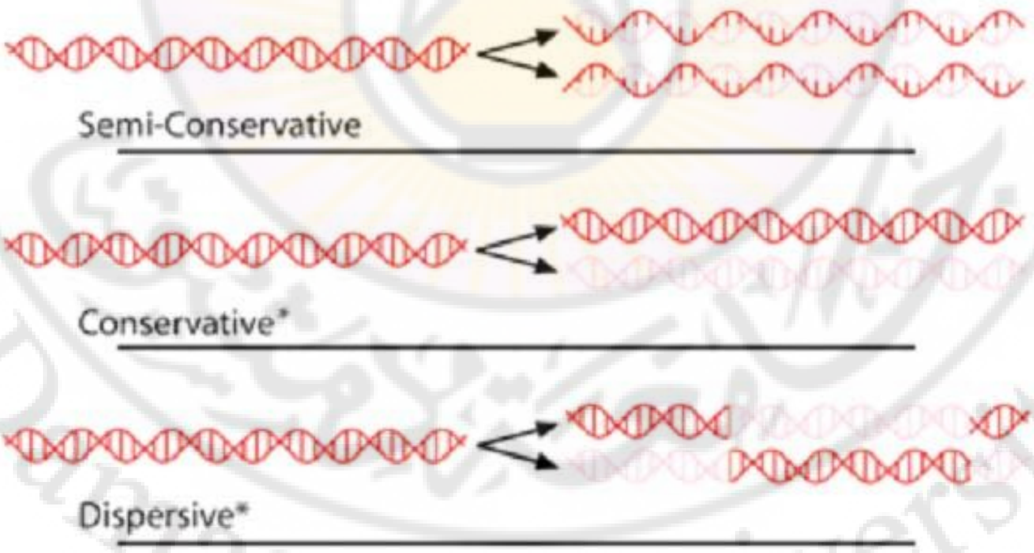
يعد جزيء الـ DNA كالصبغيات نموذجاً للتضاعف الذاتي، و يفسر موديل واطسن و كريك آلية التضاعف، حيث تنفصل السلسلتان المتممتان للحلزون المضاعف لـ DNA عن بعضهما لتصبح كل منها قالباً لتشكيل السلسلة المتممة. و بهذه الصورة فان المعلومات الوراثية المتمثلة بتتال محدد للأسس الأزوتية في جزيء الـ DNA ستتكرر بشكل كامل في الأجيال التالية. مع أن انفصال السلسلتان عن بعضهما يتم بسهولة، فإن السلسلة الواحدة تحافظ على بنيتها متماسكة، ويعود ذلك إلى ضعف الروابط الهيدروجينية بين السلسلتين و قوة الروابط المشتركة داخل كل سلسلة.

يبدأ التضاعف بانفصال موضعي للسلسلتين المتممتين في الحلزون المضاعف للـ DNA و تحت تأثير إنزيم التكثيف DNA Polymerase. و تعمل كل سلسلة كقالب لتشكيل سلسلة جديدة من النيكيلوزيدات الريبية منقوصة الأوكسجين ثلاثية الفوسفات الموجودة في النواة. و

بالنتيجة تتضاعف المعلومات الوراثية بشكل كامل، و يتكون حلزونان مضاعفان جديدان للـ DNA كل منهما نسخة طبق الأصل عن جزيء الـ DNA الأبوي.

و بما أن سلسلتي الـ DNA الأبوي تتوزعان على الخليتين البنتين في نهاية الانقسام، حيث يتألف الحلزون المضاعف الجديد للـ DNA من سلسلة قديمة هي السلسلة الأبوية و سلسلة أخرى جديدة منسوخة و هذه هي آلية التضاعف نصف المحافظة "Semiconservative".

في عام 1958 أجرى الباحثان Meselson و Stahl تجارب لإثبات طريقة تضاعف الـ DNA فبالإضافة إلى الطريقة نصف المحافظة اقترحا أيضاً الطريقة المحافظة للتضاعف، "Conservative" و فيها يتم الاحتفاظ بكامل الـ DNA الأبوي الذي يتوضع في إحدى الخليتين البنتين، في حين تتشكل الجزيئتان البنتان من جديد و تتوضعان في الخلية البنت الأخرى. كما اقترحا طريقة أخرى و هي الطريقة التحطيمية "Dispersive" و فيها يتم تحطيم جزيء الـ DNA الأبوي إلى نيكليوتيدات تلعب دور القالب لبناء قطع جديدة للحلزونين المضاعفين الناتجين.



شكل : طرق تضاعف الـ DNA .

من أجل تحديد الطريقة التي يتضاعف بها الـ DNA قاما بزراعة *E. coli* على وسط يحتوي الأزوت الثقيل N_{15} لفترة 15 جيل حيث تصبح جزيئات الـ DNA موسومة بـ N_{15}. نقلت بعد

ذلك الخلايا المعاملة إلى وسط يحتوي N_{14} و الذي يتميز بكثافته المنخفضة و وزنه الخفيف مقارنة مع N_{15}. و تم بعد فترة محددة قياس كثافة الـ DNA في هذه الخلايا. وجد أن كثافة جزيئات الـ DNA في الجيل الأول كانت متعادلة بين الـ DNA N_{15} و الـ DNA N_{14}. و في الجيل الثاني كانت نصف جزيئات الـ DNA خفيفة الكثافة و كان النصف الآخر مشابه للجيل الأول (متوسط الكثافة). و بعد الانقسام الثالث في وسط N_{14} كانت ¾ جزيئات الـ DNA ذات كثافة مساوية للـ DNA N_{14} و 4/1 متوسط الكثافة. أكدت النسبة بين عدد الأجيال و توزع كثافة الـ DNA على أن هذا الجزيء يتضاعف بالطريقة نصف المحافظة و التي تتوافق مع موديل الـ DNA المقترح من قبل واطسن و كريك.

سرعة تضاعف الـ DNA:

في البكتريا: يتألف جينوم البكتريا من 7, $4X10^6$ زوج نيكليوتيدي و ينسخ بدون أخطاء.
إذا كان هناك خطأ في نيكليوتيد وحيد فهو 10^9. يتم التضاعف لـ 1000 نيكليوتيد/ثانية و لا تأخذ آلية التضاعف أكثر من 40 دقيقة.

في حقيقيات النوى:
تتألف صبغيات الإنسان من $150X10^6$ زوج نيكليوتيدي و يتم التضاعف لـ 50 نيكليوتيد/ثانية و تأخذ آلية التضاعف حوالي الشهر.
يتميز الـ DNA بالتضاعف الدقيق حيث تكون الأخطاء أقل من 1 لكل 10^9 نيكليوتيد. لكن أحياناً يكون هناك حذف أو إضافة أسس قد تؤدي إلى خطأ وراثي و من ثم الطفرة.

أهم خصائص ووظائف DNA؟

يتميز الـ DNA بقدرته على نسخ نفسه بنفسه و إعطاء نسخ مطابقة تماماً للأصل وهذا يحدث عند انقسام الخلايا لتكوين خلايا أخرى أوأنسجة جديدة أو عند تكوين النطاف التناسلية (التكاثرية) في المناسل لكل من الذكر والأنثى البالغين.

تتكون أجزاء الـ DNA المتتالية من المورثات "genes" (وهي الشفرات الوراثية codes التي تحدد نوع البروتين الذي يصطنع المواد البنائية أو الوظيفية (الإنزيمات) أو الهرمونات وغيرها، ووجود شفرة خاطئة على المورث "defective code" تؤدي إلى ترجمة خاطئة، وبالتالي تصنيع بروتينات بنائية أو وظيفية شاذة لا تؤدي دورها الطبيعي كما ينبغي.

يتعرض الـ DNA للعوامل الكيميائية أو الطبيعية كالإشعاعات مثل الأشعة فوق البنفسجية Ultra Violet (UV)أو الأشعة المؤينة Ionizing Radiation كالأشعة السينية X-ray أو الإشعاعات النووية Nuclear Radiation و التي تؤدي إلى تخريب بناؤه الكيميائي. و لكن للـ DNA القدرة على إصلاح نفسه بواسطة إنزيمات الإصلاح, Repairing Enzymes ويؤدي نقص أحد هذه الإنزيمات في الجسم إلى عدم قدرة الـ DNA على إصلاح نفسه مما يؤدي إلى حدوث مخاطر صحية كبيرة كحدوث الطفرات الجينية أو تسرطن الأنسجة.

للـ DNA القدرة على تخزين المعلومات الوراثية، حيث تتجمع ضمنه جميع المعلومات اللازمة لإنتاج كائن فريد والمحافظة عليه و نقل المعلومات المخزنة عليه إلى مجموع الذرية.

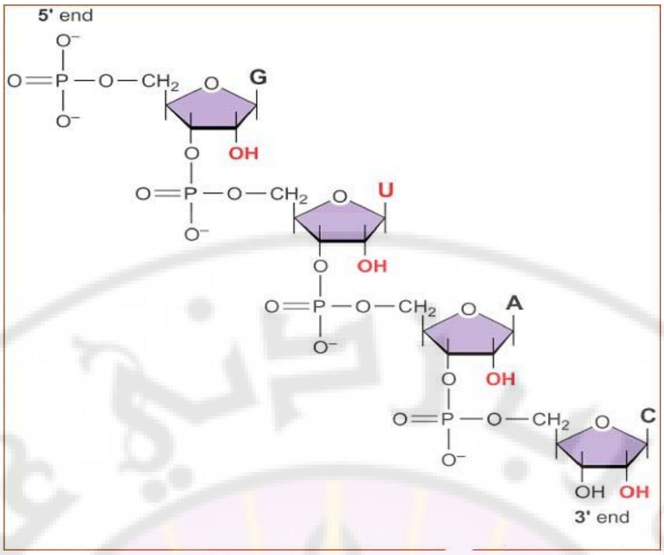
للـ DNA القدرة على التعبير عن الرسالة الوراثية حيث تنسخ المعلومات المخزنة في جزيء الـ DNA ثم تترجم إلى بروتينات نوعية و ذلك حسب احتياجات الخلية.

الـ RNA:

يوجد الـ RNA في أغلب المتعضيات بشكل سلسلة مفردة, و هو يمتص الأشعة فوق البنفسجية بطول موجة A260 و يلون بالملونات الأساسية و يكشف عنه بأنزيم RNA-ase وهو مكون متعدد من ارتباط النكليوزيدات الريبية أحادية الفوسفات حيث يتم الربط بين الكربون5 C' من النيكليوزيد الأول مع حمض الفوسفور الذي يرتبط بدوره بالموقع 3 C' من النيكليوزيد الثاني أو 2 C' أي أن مجموعة الفوسفات هي التي تدخل في الوصل بين النيكليوتيدات و هذا ما يثبت بالهضم أو الانشطار القلوي و معالجة الـ RNA بأنزيم فوسفو دي استيراز المستخرج من سم الأفاعي.

بنية الـ RNA:

يتألف الـ RNA من سكر الريبوز, حمض الفوسفور و الأسس الأزوتية C, G, U و A أحادية الفوسفات المرتبطة خطياً. يلاحظ بأن نسب كمية الأسس تختلف باختلاف مصدره و نوعه فيما عدا بعض الحالات الخاصة مثل حالة الـ RNA الفيروسي مضاعف السلسلة و الـ RNA الناقل وحيد السلسلة حيث تتساوى فيهما كمية U, A, C و G. بين ايلسون أن عدد النيكليوتيدات الحاملة لزمرة أمينية في المكان 6 مثلاً A و C تعادل عدد النيكليوتيدات الحاملة لزمرة أوكسو مثل G و U في مكان 6 و هذا يساعد و مهم عند تشكيل البنية الثانوية للـ RNA الناقل (شكل).



شكل : بنية الـ RNA مفرد السلسلة (مؤلف من السكر الريبوزي و الأسس الأزوتية الأربعة A و C و G و U و زمرة الفوسفات).

نسخ الـ RNA:

يتركب الـ RNA و ينسخ من النيكليوزيدات الريبية ثلاثية الفوسفات بتأثير أنزيم الـ RNA بوليميراز أو أنزيم النسخ و من أحد سلسلتي الـ DNA التي تعتبر كنموذج و هذه هي الخطوة الأولى في التعبير الجيني. و عند بدء عملية النسخ يتشكل أما الـ RNA الناقل أو الريبوزومي أو الرسول. يتم التعرف على نقاط بدء النسخ من سلسلة الـ DNA بواسطة إنزيم تكثيف الـ RNA ثم الارتباط بها و تتقدم عملية النسخ من 5' إلى 3' أي تدخل النيكليوتيدات الجديدة في المكان 3'.

شكل : آلية نسخ الـ RNA من الـ DNA.

يتوسط في عملية النسخ في طلائعيات النوى نمط واحد من الأنزيمات و هو إنزيم RNA polymerase بينما لوحظ في حقيقيات النوى تواجد ثلاثة أنماط من الـ RNA polymerase، حيث يوجد النمط I في النواة و النمطان II و III في السيتوبلاسما. تقوم هذه الأنماط بنسخ ثلاثة أنماط من الحموض النووية تختلف بحجمها و بخواصها البنيوية و الوظيفية و هي الـ RNA الريبوزومي Ribosomal (RNAr) و الـ RNA الرسول Messenger (RNAm) و الـ RNA الناقل Transfer (RNAt).

الـ RNA الريبوزومي (RNAr):

يمثل الـ RNAr مادة ذات وزن جزيئي عالي من نصف مليون إلى 1.200.000 و هو يحتوي على 3200 نيكليوتيد عند البكتريا و 5200 نيكليوتيد عند الثدييات و تبلغ نسبة الـ RNAr في الخلية 80% من المجموع الكلي للحموض النووية الريبية. يتشكل هذا الحمض في المنطقة المنظمة للنوية و يدخل الـ RNAr غير النوعي في بنية الجسيمات الريبية التي تؤمن اصطناع البروتين بنسبة أكثر من 50%. يتم نسخه بوساطة RNA polymerase I و تنحصر مورثات الـ RNAr التي تنسخ الـ DNA (50–1000 نسخة) في صبغي واحد أو عدة صبغيات. يوجد في حقيقيات النوى 4 أنواع من الـ RNAr: S18 يرتبط مع 30 جزيء مختلف و يستخدم لبناء الوحدة الصغيرة من الجسيم الريبي. S28– S 5.8 –S 5 يرتبط كل جزيء منها مع 45 بروتين مختلف و يستخدم لبناء الوحدة الكبيرة من الجسيم الريبي.

الـ RNA الرسول (RNAm):

و هو ذو وزن جزيئي عالي يتروح بين عدة مئات الآلاف و حتى 2 مليون و وزنه الجزيئي 4×10^{6}. و يتناسب طوله (عدد النيكليوتيدات) طرداً مع كمية المعلومات الوراثية التي يحملها, فعدد نكليوتيداته عند *E. coli* يتراوح بين 900–1500 نيكليوتيد. يشكل الـ RNAm 5% من مجموع الحموض النووية في الخلية و يتميز بكونه غير ثابت استقلابياً و هو مفرد السلسلة و تتألف أسسه من C، G، U و A و ينثني خارج الجسيمات الريبية مما يؤدي إلى ازدواج أسسه المتقابلة فتأخذ شكل عرى دبوس الشعر مشكلة البنية الثانوية. نصف عمره قصير يتراوح بين دقيقة إلى دقيقتين و يلاحظ في بعض طلائعيات النوى تتالي من نيكليوتيد الدينيل مرتبطة بالنهاية '3 مشكلة ذيل يتراوح طوله بين 60–200 نيكليوتيد حسب نوع الـ RNA الرسول و

هذا الذيل لا يترجم عند تركيب البروتين. يتم نسخ الـ RNAm في النواة من إحدى سلسلتي الـ DNA بمساعدة أنزيم التكثيف RNA polymerase II الذي يرتبط على جزء من أحدى سلسلتي الـ DNA مما يبعد سلسلتي الـ DNA عن بعضهما بعضاً. و تقوم السلسلة التي يتحرك عليها أنزيم الـ RNA Polymerase بالازدواج مع النيكليوزيدات الريبية ثلاثية الفوسفات الموجودة في البلاسما النووية. و بالتالي يكون تتالي نيكليوتيدات الـ RNAm متمماً لنيكليوتيدات إحدى سلسلتي الـ DNA و يتم النسخ في الاتجاه '5 إلى '3. و عند اكتمال تكون جزيء الـ RNAm ترتبط سلسلتا الـ DNA المنفصلتان مجدداً و يتحرر الـ RNAm و يخرج من النواة إلى السيتوبلاسما حاملاً المعلومات الوراثية التي تترجم إلى تتالي محدد من الحموض الأمينية في جزيء البروتين. تترتب المعلومات الوراثية في مجموعات، تتألف كل منها من ثلاثة نيكليوتيدات تسمى الكودونات Codons، و هي متممة للشفرة ثلاثية النيكليوتيد في جزيء الـ DNA.

بعض أنواع الـ RNAm نوعية فقط لعدد من الخلايا و التي تعطي بروتينات ضرورية لعمل الخلية, مثل الهيموغلوبين الموجود في الكريات الحمراء.

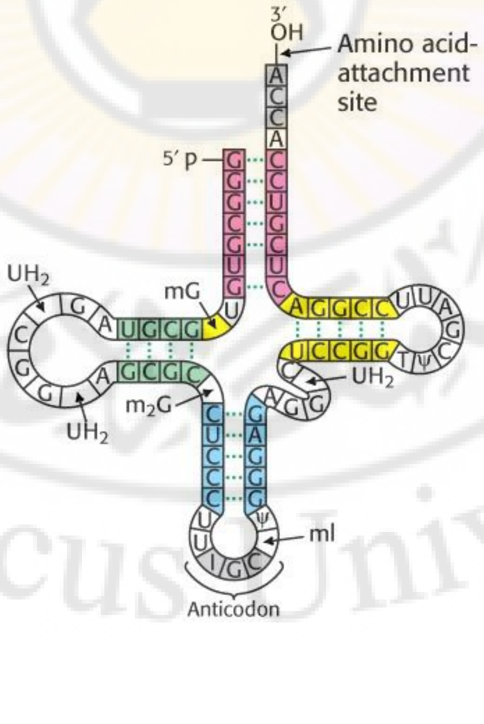
الـ RNA الناقل (RNAt):

الـ RNAt الناقل هو حمض نووي ذو وزن جزيئي منخفض 25000 يحتوي على 70−90 نكليوتيد. وتصل نسبته إلى 15% من مجموع الحموض النووية الموجودة في خلايا حقيقيات و طلائعيات النوى. يتم نسخ الـ RNAt من إحدى سلسلتي الـ DNA بوساطة RNA polymerase III.

يلعب دور مهم في عملية الترجمة الوراثية فهو يقوم بنقل الحموض الأمينية و اصطفاءها لأنه نوعي حيث يوجد لكل حمض أميني ناقلين أو أكثر من الـ RNA الناقل. فالـ RNAt متكيف للبحث عن حمض أميني معين و منشط بأنزيمات التنشيط. و تبلغ مجموع جزيئاته في الخلية الثديية الواحدة 10^8. أما بنيته الثانوية فتكون على شكل ورقة البرسيم و هي ناتجة عن عرى و مناطق حلزونية مزدوجة و مرتبطة بروابط هيدروجينية (شكل) ونميز فيها:

- ذراع الحمض الأميني: نلاحظ فيه أن إحدى السلسلتين تنتهي بالنهاية '5 أما السلسلة الأخرى فتنتهي بالنهاية '3 و التي تحمل التتالي C-C-A-OH حيث يرتبط الحمض الأميني تحت تأثير الأنزيمات المناسبة و يتألف الذراع من سبع أزواج من الأسس الأزوتية.

- عروة اليوراسيل ثنائي الهيدروجين (I): تتوضع بنهاية سويقة حلزونية مؤلفة من 3-4 أزواج من الأسس الأزوتية و تحتوي على 8-11 نكليوتيد و تفيد بالتعرف على أنزيم التنشيط.
- عروة الانتيكودون (II): تتوضع بنهاية سويقة حلزونية مؤلفة من 5 أزواج من الأسس الأزوتية و تحتوي على 7 نيكليوتيدات و في مركزها يوجد ثلاث نيكليوتيدات و تسمى الرامزة المقابلة و تتقابل مع أسس الـ RNA الرسول.
- ذراع إضافي يتغير حجمه من نوع لآخر (III): يتألف من 3-18 نيكليوتيد.
- عروة التيميدين الريبي و اليوريدين الكاذب (IV): توجد بنهاية سويقة حلزونية مؤلفة من 5 أزواج من الأسس الأزوتية و تحتوي على 7 نيكليوتيدات و تفيد بالتعرف على سطح الجسيم الريبي.
- تمت دراسة البنية الثالثية للـ RNAt بواسطة استخدام انعراج الأشعة X للأشكال البلورية لأملاح الـ RNA الناقل لحمض الفنيل آلانين و تنتج هذه البنية عن تشكيل روابط هيدروجينية بين الأسس البنيوية و الأسس غير العادية الناتجة عن متيلة الأسس العادية فتصبح هذه الأسس غير قادرة على تشكيل روابط هيدروجينية ثابتة من حيث الطاقة لذلك تتشكل البنية الثالثية.



شكل : البنية الثانوية الـ RNA الناقل.

الشفرة الوراثية :

تشكل الشفرة الوراثية Genetic code وحسب كريك صلة بين لغتين عظيمتين, لغة الحموض النووية و لغة البروتينات، فهي مفتاح لترجمة تتالي نيكليوتيدات في الـ DNA إلى تتالي من الحموض الأمينية في جزيء البروتين. و بما أن الـ DNA و البروتينات جزيئات خطية فمن الطبيعي أن تنشأ الفكرة التالية: إن تتالي النيكليوتيدات الخطي و النوعي في الـ DNA (الذي يسمى بالسيسترون) يحدد تتالياً محدداً من الحموض الأمينية في السلسلة الببتيدية. فالمورثة هي الوحدة الأساسية في الوراثة، و لأنها مكونة من نيكليوتيدات، فان النيكليوتيد هو الوحدة الأساسية في المورثة. أي أن المورثة تشرف على تركيب جزيء بروتيني معين عن طريق سيطرتها على التفاعلات الكيميائية الحيوية.

تُرمز المعلومات الوراثية في الـ DNA بوساطة الأنماط الأربعة من النيكليوتيدات و التي تختلف بتتاليها من مورثة إلى أخرى، أي أن الشفرة الوراثية عبارة عن قاموس صغير يتألف من أربعة حروف هجائية (نيكليوتيدات) تترجم إلى لغة مؤلفة من عشرين حمض من الحموض الأمينية. نستطيع أن نستنتج من المقارنة بين لغة الحموض النووية و لغة البروتينات أن المطابقة بين النيكليوتيدات و تتالي الحموض الأمينية لا تبنى حسب القاعدة (واحد لواحد). و لا تستطيع أيضاً الشفرة المكونة من حرفين ربط جميع الحموض الأمينية، حيث تبقى أربعة حموض بدون ربط. أما الشفرة المكونة من ثلاثة حروف (نيكليوتيدات) فهي ليست كافية فقط و إنما فائضة. إن كل ثلاث من الأسس الأربعة تحدد حامضاً أمينياً واحداً. أي أن الظفيرة في جزيء الـ DNA وشفرة المعلومات المنتسخة عنها تقرأ على شكل مجموعة من ثلاث أسس فمثلاً CAU هي شفرة الحمض الأميني Histidine و GGU هي شفرة الحمض الأميني الغلايسين. وعليه تكون احتمالات تشكيل حمض أميني من الأسس الأربع ثلاثاً فثلاثاً في وقت واحد هي 4 × 4 × 4 = 64 قراءة محتملة للحموض الأمينية, و هذا العدد أكثر بكثير مما يوجد في الحموض الأمينية (أي يوجد لكل حمض أميني أكثر من شفرة وراثية) مثال GUU, GUC, GUA, GUG تعطي الحمض الأميني فالين.

و قد تمكن العلماء في الفترة ما بين 1961–1964 من معرفة جميع الأحماض الأمينية و نتائج هذه الأبحاث و يعود الفضل في ذلك إلى الأبحاث التي أجراها Nirenberg و مساعدوه و التي تعد نتائجها من الاكتشافات البيولوجية العظيمة. يمكن إجمال هذه النتائج في الآتي:

- الشفرة الوراثية هي شفرة ثلاثية و تسمى في الـ RNAm الكودون.
- يتحدد كل حمض أميني بأكثر من كودون.
- تتميز الشفرة الوراثية بالعمومية، حيث تستخدمها جميع الكائنات الحية من الفيروسات

وحتى الثدييات.

- الشفرة الوراثية شفرة منحلة.
- الكودونات غير متراكبة أو متداخلة تقرأ باتجاه واحد من '5 إلى '3 و من بداية محددة و بدون انقطاع أي كودون بعد الآخر و إلا فتكون القراءة خاطئة.

فمثلاً تتالي نيكليوتيدات التالي في الـ RNAm: 5'UCU AGA GCU A3' فقراءتها تكون من اليسار إلى اليمين و هي ستحدد الحموض الأمينية: سيرين, أرجينين و آلانين. لكن في حال قرأت ابتداءً من النيكليوتيد الثاني C فسنحصل على تتالي مغاير للحموض الأمينية: لوسين, حمض الغلوتاميك و لوسين. و يؤدي إضافة نيكليوتيد واحد أو حذفه إلى كارثة لأنه يبدل موقع الحموض الأمينية، و بالتالي تغير بنية البروتين, وهذا يدل على أن النيكليوتيد هو الوحدة الأساسية في الطفرة.

– تبدأ جميع السلاسل البروتينية بالحمض الأميني الميثيونين و يرمز له بـ AUG حيث تبدأ الترجمة و يعتبر الحمض السابق إشارة لبدء الترجمة.

– توجد ثلاثة كودونات (Amber) UGA, (Ocher) UAA, (Opal) UAG من أصل الـ 64 لا تحدد حموضاً أمينية و هي تمثل كودونات التوقف التي تنهي السلسلة الببتيدية المتشكلة.

جدول : الشفرة الوراثية.

Second letter

First letter	U	C	A	G	
U	UUU UUC Phenyl-alanine	UCU UCC UCA UCG Serine	UAU UAC Tyrosine	UGU UGC Cysteine	U C
	UUA UUG Leucine		UAA Stop codon UAG Stop codon	UGA Stop codon UGG Tryptophan	A G
C	CUU CUC CUA CUG Leucine	CCU CCC CCA CCG Proline	CAU CAC Histidine	CGU CGC CGA CGG Arginine	U C
			CAA CAG Glutamine		A G
A	AUU AUC AUA Isoleucine	ACU ACC ACA ACG Threonine	AAU AAC Asparagine	AGU AGC Serine	U C
	AUG Methionine; initiation codon		AAA AAG Lysine	AGA AGG Arginine	A G
G	GUU GUC GUA GUG Valine	GCU GCC GCA GCG Alanine	GAU GAC Aspartic acid	GGU GGC GGA GGG Glycine	U C
			GAA GAG Glutamic acid		A G

تركيب البروتين:

تلعب البروتينات التي تشكل أكثر من نصف الكتلة الجافة للخلية دوراً هاماً في الفعاليات الحيوية الأساسية كافة في كل الكائنات. و تقوم البروتينات بوظيفة بنائية، و بعضها الآخر يقوم بدور الوسيط (الأنزيمات) كما تحدد البروتينات بنية الخلايا و وظيفتها و شكلها و نموها و تمايزها. و يتحدد الطابع الظاهري بسبب خصائص بروتين واحد أو أكثر. و يتم اصطناع الجزيئات البروتينية المختلفة حسب المعلومات الوراثية الموجودة في الـ DNA بشكل شفرة. هذه المعلومات الوراثية تحدد تتالياً معيناً من الحموض الأمينية في جزيء معين من البروتين.

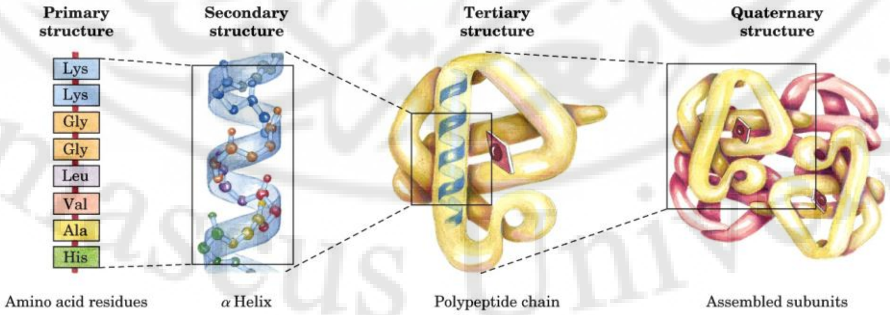
يتألف البروتين من سلاسل ببتيدية مؤلفة من ترابط حموض نووية تلتف فيما بعد لتشكل بنية ثلاثية الأبعاد فريدة (يتميز كل بروتين ببنية مختلفة عن البروتينات الأخرى) تدعى هذه البنية بالحالة الأصلية للبروتين و تتحدد حسب ترتيب الحموض الأمينية في عملية الترابط التي تشكل السلاسل البروتينية.

- بنية أولية: يحددها تسلسل الحموض الأمينية.

- بنية ثانوية: تتألف من بنى ثانوية تتشكل من التفاف السلاسل الببتيدية على بعضها بشكل حلزونات ألفا و صفائح بيتا.

- بنية ثالثية: وهي ما يحدد شكل البروتين النهائي، تتألف من اجتماع البنى الثانوية للبروتين (لوالب ألفا و صفائح بيتا) بوساطة قوى فيزيائية غير تكافئية لتعطي الشكل النهائي للبروتين.

- بنية رابعية: يستخدم عادةً هذا المصطلح للدلالة على البنية التي يكونها اتحاد بروتينين أو أكثر في ما يسمى الوحدة البروتينية.



شكل: البنى المختلفة للبروتين.

و تضيف هذه العملية مستوى أخر أكثر تخصصاً لعملية نقل المعلومات. لأنها تتضمن تحويل القواعد الأربعة الموجوة على الحمض النووي (وهى بالطبع رموز الشفرة الوراثية) إلى عشرين

نوع مختلف من الحموض الأمينية لتترابط مع بعضها بروابط ببتيدية وهكذا يتم اصطناع البروتين و تكون هذه العمليات على درجة كبيرة من التعقيد. تحتاج عملية الترجمة Translation إلى مساعدة وظائف أكثر من مائة نوع من الجزئيات الكبيرة Macromolecules و جميع أنواع الـ RNA (RNAm ,RNAt, RNAr) والجسيمات الريبية Ribosomes و الحموض الأمينية و الأنزيمات و بعض العناصر المعدنية كالـ K^+ و Mg^{++}.

لا يساهم الـ DNA مباشرة في تركيب البروتينات, لكن تنسخ المعلومات الوراثية إلى سلسلة مفردة من الـ RNAt وذلك عن طريق تفكك شريطي جزئ الـ DNA وذلك بتكسير الروابط الهيدروجينية التي تربط بين القواعد النيتروجينية (الأدنين Adeinie، و التيامين Thyamine، الغوانين Guanine و السيتوزين Cytosine) في جزئي الشريط وتستمر حتى يتكون شريطان منفصلان عن بعضهما من جزئ DNA الأصلي, و باستخدام أنزيم التكثيف RNA polymerase. تسمى هذه العملية بالنسخ Transcription (يتم نسخ الـ DNA إلى RNAr و RNAt و يبدأ النسخ بارتباط هذا الأنزيم إلى تتابع خاص في الـ DNA و يسمى promoter أو الحافز أو إشارة البدء الخاصة، و ينتهي بالـ Terminar (إشارة التوقف الخاصة) و يعمل أنزيم التكثيف على فك دورة واحدة من حلزون الـ DNA فاصلاً قطعة صغيرة مفردة السلسلة للـ DNA و التي تستخدم كقالب لنسخ الـ RNAm، حيث تقترن كل قاعدة نيتروجينية من كل شريط بجذب نيكليوتيدات حرة موجودة في سائل النواة مشابهة للتي كانت متصلة معها في الجزيء الأصلي. وبعد ذلك يقوم الـRNA Polymerase بربط النيكليوزيدات الريبية ثلاثية الفوسفات إلى بعضها البعض.

تؤدي حركة الأنزيم المذكور على طول قالب الـ DNA إلى نمو و تطاول سلسلة الـ RNAm في الاتجاه '5 إلى '3 إلى إضافة نيكليوتيدات في كل مرة من أجل الوصول إلى إشارة التوقف الخاصة. ثم ينفصل الحمض النووي RNAm ويبتعد عن شريط DNA و يتكون بالتالي RNAm والذي يحمل نفس الشفرة الوراثية الموجودة على الـ DNA ثم يغادر النواة و يتوضع على الجسيمات الريبية في السيتوبلاسما.

أن عملية الترجمة Translation و التي تعرف أيضاً بعملية اصطناع البروتين Protein Synthesis تتضمن ثلاثة مراحل رئيسية هي:

1- الابتداء, Initiation

2- الإضافة, Elongation

3- الانتهاء, Termination

1- عملية الابتداء

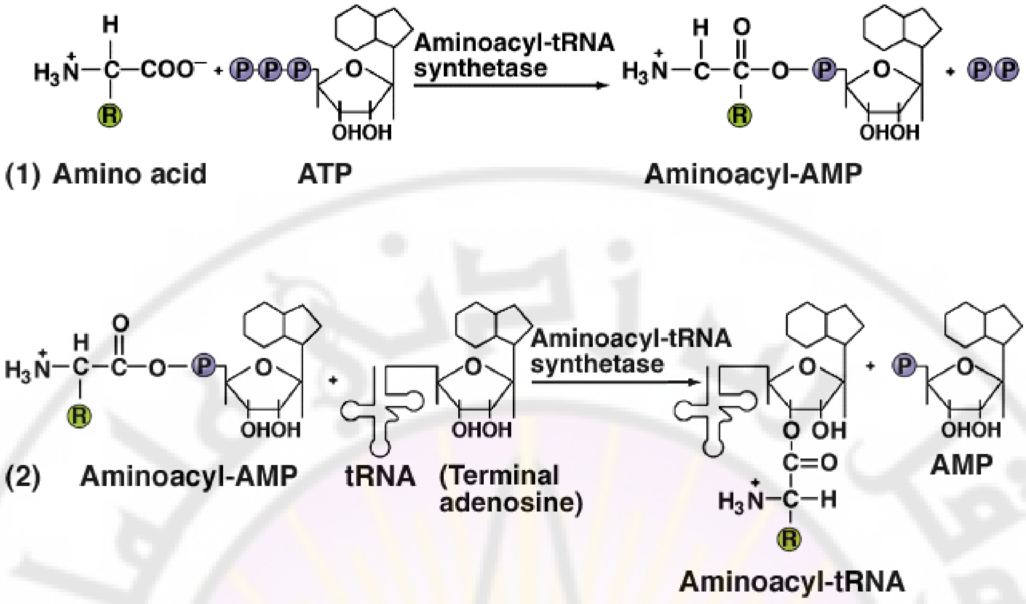
تلعب جزئيات الـ RNAt دور الوسيط الرئيسي في عملية تركيب البروتين, مع العلم أنه يوجد لكل حمض أميني أكثر من RNAt. و يتعرف الـ RNAt على حمضه الأميني بمساعدة مجموعة خاصة من الأنزيمات تسمى أنزيمات التنشيط أمينو أسيل RNAt سنتيتاز. تتميز أنزيمات التنشيط باحتوائها على ثلاثة مواقع نوعية يحتلها الحمض الأميني و الـ RNAt و مصدر للطاقة ATP، و يستطيع إنزيم التنشيط معرفة الحمض الأميني المحدد بدقة عالية و معرفة الـ RNAt المناسب. يتضمن تفاعل ارتباط الحمض الأميني مع الـ RNAt الخاص به مرحلتين:

I- تنشيط الأحماض الأمينية و ذلك بتفاعل الحمض الأميني مع ATP بأنزيم التنشيط و يتحول على أثر ذلك الـ ATP إلى AMP و يتحرر مجموعتين من الفوسفات و ترتبط AMP إلى الجذر الكربوكسيلي من الحمض الأميني مشكلاً حمض أميني أدينوزين أحادي الفوسفات منشطاً. يستطيع هذا الحمض بصورة تلقائية أن يشكل الرابطة الببتيدية، حيث لا تستطيع الحموض الأمينية الحرة أن ترتبط مباشرة بالسلسلة متعددة الببتيدات. هذا و يحتفظ الأنزيم بالحمض الأميني المنشط حتى ارتباطه بالـ RNAt بوساطة أنزيم التنشيط النوعي.

II- ارتباط الحمض الأميني المنشط بالنهاية 3'-OH للادينوزين في الـ RNAt و ينفصل نتيجة ذلك AMP و أنزيم التنشيط.

و هكذا نرى أن أنزيم التنشيط يلعب دوراً هاماً في عملية ترجمة المعلومات الوراثية حيث ترتبط حموضاً أمينيةً محددة مع جزئيات الـ RNAt المطابقة لها. و يتم الازدواج بين كودونات الـ RNAm و أنتي كودونات الـ RNAt في المراكز الوظيفية للجسيمات الريبية. يبقى الـ RNAt محتفظاً بالحمض الأميني حتى ارتباطه في المكان المناسب من السلسلة الببتيدية النامية، و يغادر بعد ذلك الـ RNA الناقل سطح الجسيم الريبي لالتقاط حمض أميني آخر و نقله أو أنه ينحل (شكل).

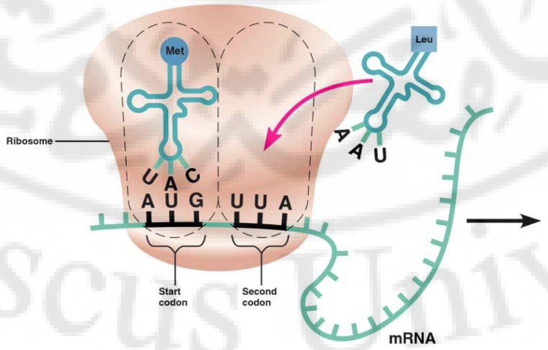
Damascus University



شكل: تنشيط الأحماض الأمينية بتوسط أنزيمات التنشيط أمينو أسيل RNAt سنتيتاز.

2- عملية الإضافة:

تتمثل المرحلة التالية من الاصطناع الحيوي للبروتين بعد تكوين أمينو أسيل RNAt بترتيب الحموض الأمينية و تشكيل الروابط الببتيدية بينها و تتحقق عملية الترتيب هذه بفضل الجسيمات الريبية التي تتحرك على طول شريط الـ RNAm مما يؤدي إلى تمكن الـ RNAtمن قراءة الكودونات (شكل).



شكل : مرحلة الإضافة من تركيب البروتين.

Damascus University

تتشابه الجسميات الريبية في حقيقيات و طلائعيات النوى بوظيفتها و تركيبها الكيميائي و هي عبارة عن إحدى عضيات الخلايا الحية المؤلفة من بروتينات ريبوزومية و RNAm.
مهمتها الأساسية ترجمة الـ RNAm إلى سلاسل ببتيدية تترابط فيما بعد لتشكيل البروتينات و بالتالي فهي تشكل أحد المراكز المهمة في عملية تحويل المعلومات الوراثية إلى البروتينات المشفرة ضمن هذه الصيغة الوراثية. يمكن تخيل الجسيمات الريبية على أنها المصنع الذي يحول المعلومات الوراثية المشفرة إلى تسلسل ببتيدي من حموض أمينية. يمكن للجسيمات الريبية أن تسبح في الخلية بحرية أو ترتبط بالشبكة البلاسمية الداخلية أو إلى الغلاف النووي Nuclear envelope. و قد لوحظت الجسيمات الريبية في منتصف الخمسينات من قبل جورج بالاد بوساطة المجهر الإلكتروني كجسيمات كثيفة أو حبيبات و نال على هذا الاكتشاف جائزة نوبل. تم عزل الجسيمات الريبية معملياً وفصل وحداته عن بعضها وفصل مكونات كل وحدة من الـ RNA والبروتينات عن بعضها البعض وفحص كل هذا بالميكروسكوب الإلكتروني وقد اتضح من هذه الدراسة أن الجسيمات الريبية تعد تراكيب ثلاثية الأبعاد Three-dimensional structure.

يتألف الجسيم الريبي من تحت وحدتين وهما تحت وحدة صغيرة وتحت وحدة كبيرة Small and large subunits. ففي البكتريا نجد أن تحت الوحدة الأصغر (S30) تحتوى على 21 نوعاً من البروتينات وجزئ واحد من RNA. أما تحت الوحدة الأكبر (S50) فتحتوى على 35 نوعاً من البروتينات و جزيئين من RNA؛ (S: ثابت و يستخدم كوحدة تقدر بسرعة تثفيل الذرات في المحلول أثناء الطرد المركزي). تكون الجسيمات الريبية عادةً أضخم عند حقيقيات النوى S40-S60. و نشير في الجدول التالي إلى الفرق بين الجسيمات الريبية في البكتريا و المتيوكونري و حقيقيات النوى.

جدول . بنية الجسيمات الريبية في البكتريا و الميتوكوندري و حقيقيات النوى

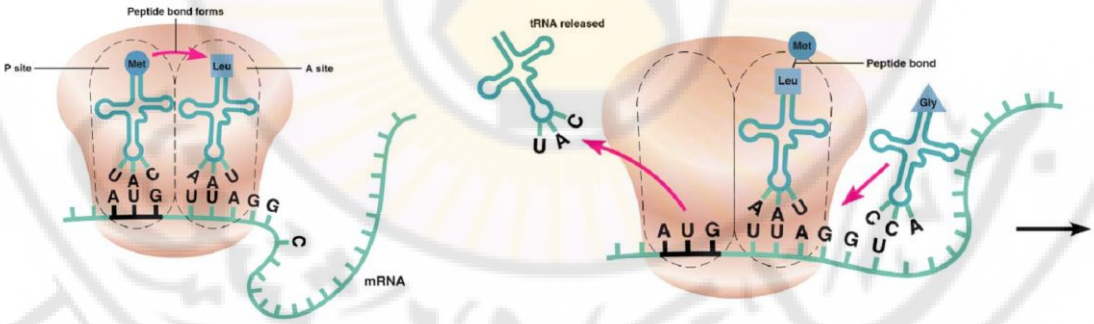
الخاصة المدروسة		الجسيمات الريبية		
		البكتريا	الميتوكوندري	حقيقيات النوى
التركيب الكيميائي		70S	55S	80S
الوحدة الكبيرة	الحجم	50S	39S	60S
	RNAr	(nt 2904) 23S (nt 120) 5S	(nt 1560) 16S	(nt 4700) 28S (nt 120) 5S (nt 160) 5.8S
	البروتين	33	48	49
الوحدة الصغيرة	الحجم	30S	28S	40S

RNAr	(nt 1542) 16S	(nt 950) 12S	(nt 1900) 18S
البروتين	21	29	33

Nt : نيكليوتيد.

أما الـ RNAm فهو متطابق (مثل الضبة والمفتاح) مع تجويف متكون بين تلامس سطحي تحت الوحدتين. يوجد داخل كل جسيم ريبي موقعان هما مواقع ارتباط الـ RNAt ويطلق عليهما A و P. الموقع A هو Aminoacyl RNAt site ومن هنا جاءت تسميته بالموقع A وهو يقوم بربط الـ Aminoacyl RNAt والذي سوف يستخدم لإضافة حمض أميني إلى السلسلة الببتيدية النامية.

أما الموقع P (Peptidyl RNAt Site) فهو يربط RNAt المرتبط بسلسلة الأحماض الأمينية النامية. وبعد تكوين الرابطة الببتيدية بين الحمض الأميني الحاوي على المجموعة الأمينية الحرة في الموقع A و بين الحمض الأميني الحاوي على المجموعة الكربوكسيلية في الموقع P ونهاية السلسلة الببتيدية النامية (شكل), يتحرك الـ RNAt مع السلسلة الببتيدية المتصلة به إلى الموقع P من الجسيم الريبي تاركاً الموقع A حراً و متاحاً للارتباط بجزيء Aminoacyle RNAt المقبل. و يتوسط هذا التفاعل أنزيم Peptidyl transferase المرتبط ارتباطاً وثيقاً بالجسيم الريبي و يحصل هذا التفاعل على الطاقة من فسفرة المركب GTP إلى GDP.



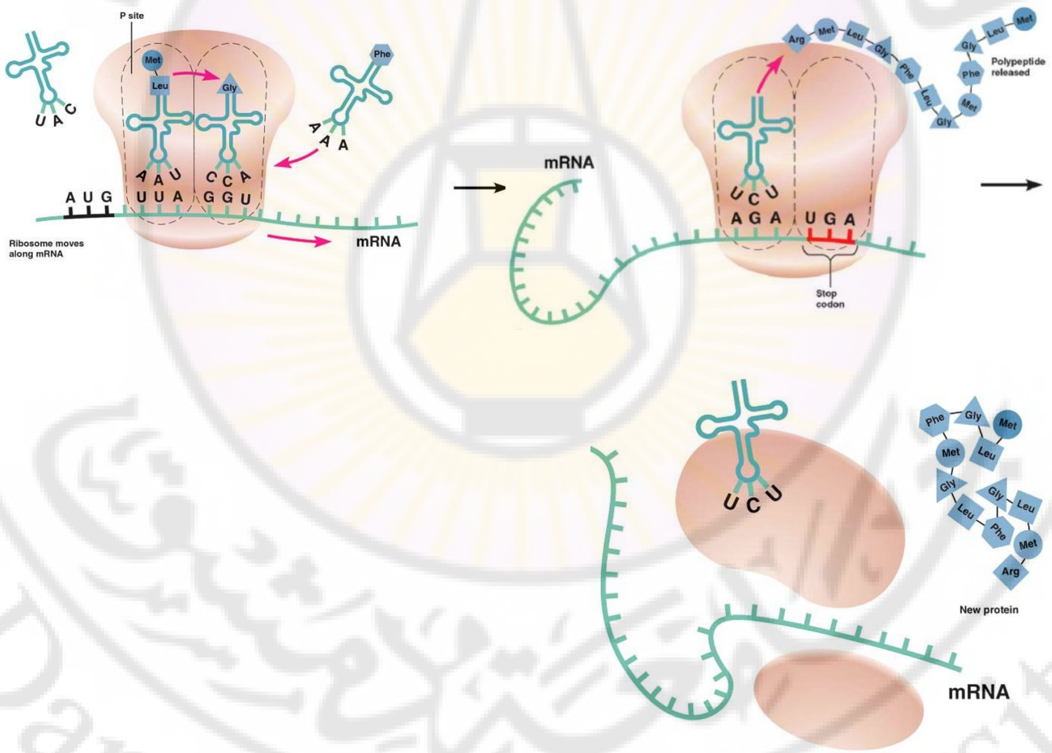
شكل. تكوين الرابطة الببتيدية بين الحمض الأميني الحاوي على المجموعة الأمينية الحرة في الموقع A و بين الحمض الأميني الحاوي على المجموعة الكربوكسيلية في الموقع P ونهاية السلسلة الببتيدية النامية.

3- عملية الانتهاء:

تمتلك السلسلة الببتيدية دائماً نهايتين حرتين (غير مرتبطتين) إحداهما تدعى النهاية النتروجينية N-terminus و الأخرى مشكلة من زمرة كربونيل (النهاية الكربونية C-terminus). و يتم اصطناع السلاسل الببتيدية في الاتجاه من النهاية النتروجينية إلى اليسار N إلى النهاية

الكربونية على اليمين، لأنه دائماً يبدأ من الحمض الأميني الميتونين و الذي يحمل في طلائعيات النوى جذر الفورميل CHO.

تنتهي عملية اصطناع السلسلة الببتيدية بواسطة عوامل تعرف بعوامل الانتهاء Termination أو كودونات التوقف (أو الانتهاء) Stop Codons و التي توجد في التعاقب الأخير للشفرة. والكودونات، UGA, UAG, UAA عبارة عن إشارات توقف خاصة و هي لا تشفر لأي حمض أميني. تسبب عملية التعرف على كودون التوقف Termination codon انفصال تحت وحدتي الجسيم الريبي عن بعضهما و بالتالي يمكن استخدامهم في ابتداء عملية اصطناع سلسلة ببتيدية جديدة باستخدام جزئ RNAm آخر فهي لا تحتاج لتفاعلات الفصل. كما أن البعض الأخر من RNAm عبارة عن خلايا مميزة النواة تكون مغطاة لكنها لا تحتوى على الذيل Poly – A (شكل).



شكل : عملية الانتهاء في تركيب البروتين.

تستغرق عملية تكوين كل رابطة ببتيدية حوالي 20/1 من الثانية و بالتالي لو كان حجم جزئ البروتين هو 500 حمض أميني فسوف يستغرق اصطناع هذا الجزئي من البروتين حوالي 25

Damascus University

ثانية. يمكن حساب الوقت اللازم لاصطناع جزيء البروتين بضرب عدد الأحماض الأمينية الموجودة بالجزئي في 20/1 ويميز الناتج بالثانية.

بما أن طلائعيات النوى تفتقد إلى وجود نواة حقيقية فان النسخ (نسخ الـ DNA إلى الأنماط الثلاثة من الـ RNA) و الترجمة (ترجمة الـ RNAm إلى بروتين) تتمان في المكان والزمان نفسه و ذلك على عكس حقيقيات النوى حيث يتم النسخ في النواة و الترجمة في السيتوبلاسما أي تختلفان بالزمان و المكان.

نمط التعبير المورثي عند بدائيات النواة و عند حقيقيات النواة.

عند بدائيات النواة:

تبدأ عملية الترجمة قبل انتهاء عملية النسخ لأن كل من الـ DNA و الجسيمات الريبية موجودين في السيتوبلازم البكتيري (لا يوجد غلاف نووي) ولهذا السبب تعد صناعة البروتين سريعة عند بدائيات النواة.

عند حقيقيات النواة:

تبدأ عملية الترجمة بعد انتهاء عملية نسخ RNAm و مغادرته النواة علماً انه ينسخ من Pre RNAm (RNAm قبل الرسول) ثم يطرأ عليه تغيرات تتمثل في حذف القطع غير الدالة ثم لصق القطع الدالة مع بعضها البعض فيتشكل أخيراً RNAm ناضج (مستعد للترجمة).

Damascus University

مقدمة في الهندسة الوراثية:

يقوم علم الأحياء الجزيئي أو البيولوجيا الجزيئية (Molecular biology) بدراسة الأحياء على المستوى الجزيئي، لذلك فهو يتداخل مع كلاً من علم الأحياء و الكيمياء في عدة فروع و يتقاطع مع الكيمياء الحيوية و علم الوراثة في عدة مناطق و تخصصات. تهتم البيولوجيا الجزيئية بدراسة مختلف العلاقات المتبادلة بين كافة الأنظمة الخلوية و بخاصة العلاقات بين الـ DNA و الـ RNA و عملية الاصطناع البروتيني إضافة إلى آليات تنظيم هذه العملية و كافة العمليات الحيوية.

يصف وليم أستبوري علم الأحياء الجزيئي في مقالة له في مجلة Nature: بأنه ليس تقانة بل هو مقاربة، مقاربة بين وجهة نظر العلوم الأساسية مع علم الأحياء حول فكرة موجهة للبحث ضمن الحقائق و الخطوط العريضة عن خطة جزيئية موافقة. إنه علم يهتم أساساً بأشكال الجزيئات الحيوية و بشكل أكثر تحديداً بالبنى ثلاثية الأبعاد و التشكيلات البنيوية بحيث لا تقتصر فقط على الدراسة الشكلية morphology بل تتعداها لتدرس التشكل genesis و الوظيفة.

استخدم الباحثون في الأحياء الجزيئية قديماً, تقانات محددة منشؤها علم الأحياء الجزيئي, ولكن مع زيادة التطور و المعرفة العلمية بدأ الباحثون في هذا المجال باستخدام معظم التقانات المتعلقة بعلم الوراثة وعلم الكيمياء الحيوية و الفيزياء الحيوية الخ.

ما هي الهندسة الوراثية:

الهندسة الوراثية أو ما يعرف أحيانًا بهندسة المورثات هي أحدث الطرق العلمية في تغيير التركيب الوراثي والتحكم في الصفات الوراثية للكائن الحي (نبات – حيوان – إنسان) مع إضافة بعض المورثات ذات الصفات الاقتصادية الهامة و بطريقة سريعة بهدف زيادة الإنتاج الزراعي والحيواني كماً ونوعاً. وقد نشأ علم الهندسة الوراثية عام 1984، كتطبيق عملي على المعلومات النظرية المستمدة من بحوث "الجينوم" التي عرفتنا بالخريطة الوراثية البشرية.

تاريخ الهندسة الوراثية

بعض الأحداث الهامة في تاريخ الهندسة الوراثية:

- 1933: تم فصل البروتينات في المحاليل من قبل Tiseluis باستخدام الرحلان الكهربائي.

- 1950: تم الكشف و لأول مرة عن وجود ما يسمى بالبلاسميد في خلايا بعض الجراثيم.

- 1953: اكتشاف بنية الـ DNA من قبل الباحثين Watson و Crick و إعلان تحديد تسلسل أول بروتين Insulin Bovine من قبل الباحث Sanger .

- 1956: تم البرهان على النظرية القائلة بأن المعلومات الوراثية الموجودة على سلسلة الـ DNA يشفرها تتابع أزواج من القواعد الأزوتية.

- 1960: استخدام التسلسلات الجزيئية في الدراسات التطورية من قبل الباحث Zackarchanll و استخدامها في بناء شبكة القرابة من قبل الباحثينMargoliash و Fitch.

- 1965: تم التأكد من أن المورثات المسؤولة عن حساسية الجراثيم ضد المضادات الحيوية محمولة على صبغيات إضافية غير أساسية، سميت بالبلاسميدات.

- 1966: تم فك رموز الشفرة الوراثية.

- 1967: تم عزل الإنزيم الخاص بوصل قطع الـ DNA (DNA-Ligase).

- 1970: انطلاق التقانات الحيوية Biotechnology، و تركيب أول جزيئة DNA من قبل الباحث Berg و زملاؤه. و الإعلان عن بنك Brook Havour لبيانات البروتينات.

- 1975: نشر طريقة تقانة الـ Southern blot من قبل الباحث Southern. تحديد طرق تسلسل الـ DNA من قبل الباحثين Moxam و Gilbert من جامعة Harvord و الباحث Sanger من بريطانيا.

- 1980: نشر أول ورقة تصف استخدام MMR متعدد الأبعاد في تحديد بنية البروتينات. ظهور الـ PCR الذي يضخم كمية قليلة من الـ DNA إلى كمية كافية للدراسة و التحليل. و تجمع البيانات في مواقع خاصة مختصة بقواعد بيانات البروتينات كالـ NCBI في الولايات

المتحدة الأمريكية، Swissو PROT في أوروبا. و وصف استخدام صبغي الخميرة YAC (Yeast Artificial chromosomes). و نشر الخريطة الوراثية للـ *E. coli*.

– 1990: وصف طريقة الحصول على EST (Expressed sequence Tags). تحديد تسلسلات المجموع الوراثي للكائنات الحية مثل *Saccharomyses cerevisiae* الذي يصل طوله إلى 12.1 ميغاباز و كذلك البكتريا *E. coli* (4.7 ميغاباز). صدور العديد من المواقع المجانية على الإنترنيت مختصة بالمعلوماتية الحيوية.

– 2000: نشر جينوم *Psuedomonas aeruglnosa* الذي يصل طوله إلى 6.3 ميغاباز و استكمال المجموع الوراثي لكائنات مهمة كنبات *Arabidopsis thaliana* (100 ميغاباز) و *D. melanogaster* (180 ميغاباز) و الإنسان (3000 ميغاباز).

1– الأنزيمات التي تستخدم في معالجة شريط الـ DNA.

الأنزيمات التي تستخدم في معالجة شريط الـ DNA و هي:

– أنزيمات التقييد Restriction Enzyme

– أنزيمات البلمرة Polymerases E.

– أنزيمات النيكليوز Nucleases E.

– أنزيمات التعديل Modifying E.

– أنزيمات الربط Ligases E.

اكتشفت هذه الأنزيمات في السبعينيات، حيث قام بتوصيف تلك الأنزيمات العالمان Nathans & Smith وقد حازا على جائزة نوبل عام 1978 لاكتشافهم أنزيمات الاندونيوكلياز المقيدة. و يوجد حالياً أكثر من 500 نوع من هذه الأنزيمات متوفرة تجارياً.

إنزيمات التقييد (القطع) Restriction enzymes-cutting DNA

لا شك في أن لكل كائن حي طرق دفاعية مختلفة تحميه من الكائنات الأخرى مثلاً تقوم بعض أنواع من البكتيريا بإنتاج إنزيمات مهمتها تدمير الفيروسات التي تهاجمها, و من هذه

الإنزيمات، الإنزيمات القاطعة التي تقوم بقص الحمض النووي (الـ DNA) للفيروس و بذلك يُشل عمله و يُبطل مفعوله. و بما أن الـ DNA مادة موجودة بشكل طبيعي في البكتيريا كما هو الحال في الفيروسات والكثير من الكائنات الحية فإن هذه الإنزيمات قد تشكل خطراً على البكتيريا نفسها في قصها للـ DNA الخاص بها. ولكن هذا لا يحدث و السر في ذلك هو قيام البكتيريا بتحوير أجزاء من الـ DNA الخاص بها عن طريق إضافة مجموعة الميثيل إلى بعض الأسس الأزوتية من نوع الأدنين أو السيتوزين فلا يستطيع الأنزيم Methyl القاطع من قطع الحمض النووي الخاص بالبكتيريا.

توجد إنزيمات القطع في ثلاثة أنواع وهي (I, II و III) و تكون معظم الإنزيمات المستخدمة من النوع الثاني II لأنها تقطع تسلسل نوعي من الـ DNA و تتعرف عليه من خلال قطعه لرابطة الفوسفات ثنائية الاستر. أما النوعان I و III فهما لا يتعرفان على تسلسل معين للقطع و إنما يعملان على إزالة النيكليوتيدات في نهاية الـ RNA و الـ DNA.

يختص كل إنزيم بمعرفة تتابع محدد من النيكليوتيدات في الـ DNA و تكون معظم التتابعات المعروفة مكونة من أربع أو خمسة أو ستة أزواج من القواعد طولاً و يمكن أن تصل إلى ثمانية أزواج من القواعد. و هذا التسلسل المعين يعرف باسم موقع القطع Restriction site أو موقع التعرف (Recognition Site (Sequence.

على افتراض أن هذه الأسس موزعة عشوائياً فانه يمكن حساب تواتر أي تتابع خاص 4^n عندما تكون n طولاً للتتابع المحدد للأنزيم، و على هذا الأساس يمكن التنبؤ بالعثور على جزيء رباعي النيكليوتيد ضمن 256 زوج قاعدي، و خماسي النيكليوتيد ضمن 1024 زوج قاعدي و سداسي النيكليوتيد ضمن 4096 زوج قاعدي. و عليه فالأنزيم المحدد لتتابع رباعي النيكليوتيد سينتج القطع الأقصر من الـ DNA بالمقارنة مع الأنزيم المحدد لتتابع سداسي النيكليوتيد. وقد وضع في الجدول التالي بعض الأنزيمات المألوفة المستخدمة مع تتابعاتها المحددة و مواقع القطع. ساعد اكتشاف الإنزيمات القاطعة (Restriction Nucleases) في عملية استخلاص المورثات و قطع الـ DNA و نسخها.

جدول. أهم أنزيمات القطع المحددة وموقع عمل كل منها:

الكائن الحي المنتج للإنزيم	التتابع المستهدف Target Sequence	الإنزيم
Escherichia coli RY13	GAA TTC CTT AAG	EcoRI

H Bacillus amylolique faciens	TCC GGA AGG CCT	BamHI
Bacillus globigii	TCT AGA AGA TCT	BgIII
Haemophilus aegypius	GCpy PuGC CGpu pyCG	HaeII
Haemophilus influenza R	CTT AAG GAA TTC	HindIII

تسمية إنزيمات القطع:

تعتمد تسمية إنزيم القطع على الاسم اللاتيني للكائن الحي الذي يحوي الإنزيم, حيث يستخدم اسم الجنس للتعبير عن الجزء الأول من اسم الإنزيم و الحروف الأولى من اسم النوع تضاف إلى الاسم الأول مثلاً: الإنزيم Eco يوجد في البكتريا *Escherichia coli* حيث استخدم الحرف الأول من اسم الجنس E و الحرفيين الأوليين من اسم النوع co فأصبح الاسم Eco.

يمكن أن يضاف إلى اسم الإنزيم بعض الحروف أو الأرقام التي تعبر عن اسم السلالة و رقمها مثلاً: *Eco*RI و هو إنزيم تم اكتشافه في السلالة R y13 من البكتريا *Escherichia coli*.

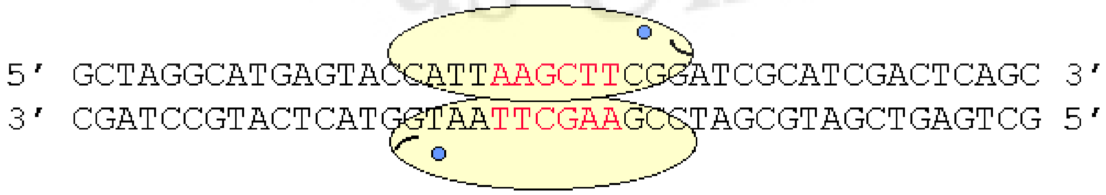
خصائص أنزيمات القطع:

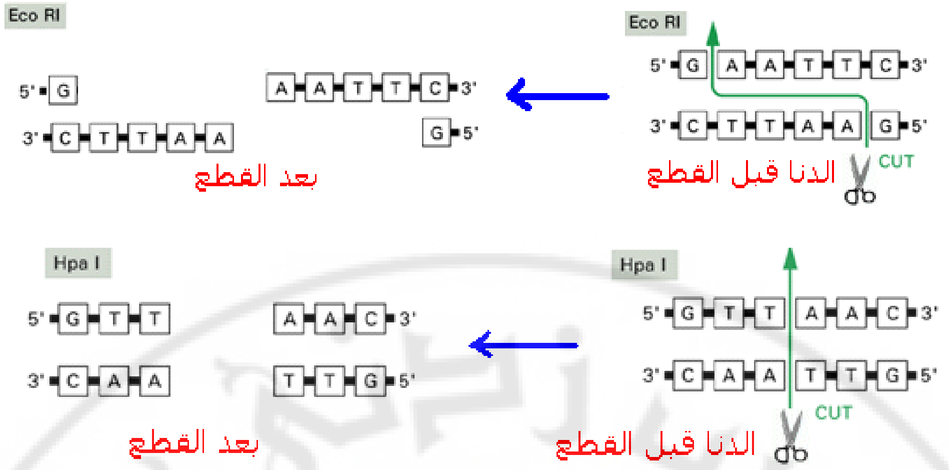
1- غالباً ما يتم عزلها من أنواع البكتريا المختلفة أو فطر الخميرة.

2- تقطع الحمض النووي في نقطة محددة أو مكان وموقع قطع معين Recognition .Site

3- تعمل كنظام مناعي مصغر للبكتريا يحميها من جزئيات الـ DNA الغريب مثل الإصابة الفيروسية.

4- أنزيمات القطع إما أن تترك نهايات لاصقة أو بشكل متعرج cohesive or sticky في 5' و 3' مثل الإنزيم القاطع (Eco RI) الذي يقطع عندما يجد 6 من الأحماض النووية في هذا التسلسل (GAATTC) أو نهايات تامة أو حادة أو بشكل رأسي مستقيم blunt مثل الإنزيم القاطع (Hpa1) الذي يقطع عندما يجد 6 من الأحماض النووية في هذا التسلسل (GTTAAC) يوجد في بكتيريا الهيموفلس بارا انفلونزا (*Hemophilus parainfluenzae*) (شكل).





شكل : آليات قطع الأنزيم.

تكون مناطق القطع غالباً متقابلة sequences DNA palindromic (أي توجد منطقة القطع بنفس التتابع على شريطي الـ DNA العلوي والسفلي عكس بعضهما).

وضع نقاط القطع الأنزيمي:

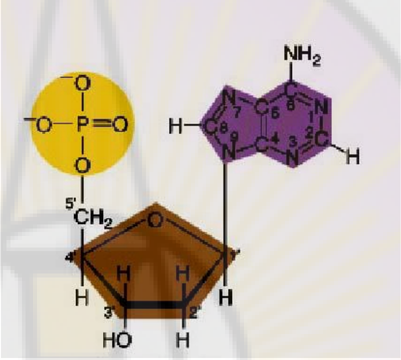
يعد استعمال إنزيمات القطع بسيطاً نوعاً ما إذ تضاف كمية مناسبة من الإنزيم للـ DNA المستهدف في محلول منظم و يحضن التفاعل في 37 ^{o}م. يحدد نشاط الإنزيم بالوحدات و الوحدة تعبر عن كمية الإنزيم التي باستطاعتها قطع ميكروغرام واحد من الـ DNA في ساعة واحدة و بدرجة حرارة 37 ^{o}م. يعتمد قطع الإنزيم على المعايير التالية:

- درجة الحرارة: لكل أنزيم درجة حرارة قطع خاصة به فمثلاً هناك أنزيمات تقطع بدرجة حرارة 37 أو 25 أو 65 ^{o}م و هكذا
- المحلول المنظم
- تركيز الأنزيم
- تركيز كمية الـ DNA

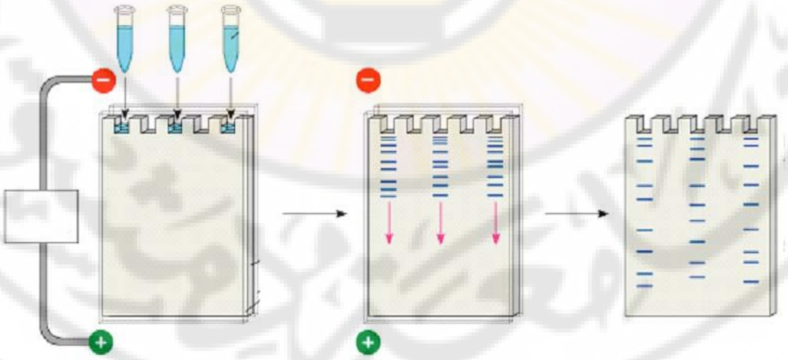
تتعرض الفعالية الإنزيمية إلى عدد من المشاكل منها وجود تراكيز عالية من الغليسيرول, اختلاف تناسب كمية الإنزيم إلى كمية الـ DNA, ارتفاع الـ pH, وجود المذيبات العضوية مثل الايتانول و غيره.

2 – الرحلان الكهربائي الهلامي Gel electrophoresis

تعد تقنية الرحلان الكهربائي من المقومات الأساسية للهندسة الوراثية, و التي بواسطتها يتم تصور قطع الحمض النووي مباشرة, تعتمد هذه الطريقة على طبيعة الحموض النووية التي تمثل مركبات متعددة الشحنة السالبة Polyanionic (شكل) في درجة pH متعادلة, تحمل الأحماض النووية شحنات سالبة متعددة من خلال المجموعات الفوسفاتية ثنائية الاستر لسلاسل الحمض النووي. و يعني ذلك هجرة الجزيئات نحو القطب الموجب عند وضعها في مجال كهربائي (شكل). يوجد نوعان من المادة الهلامية gel تستعملان بشكل واسع و هما: الأغاروز Agarose و متعدد الأكريلامايد Polyacrylamide.



شكل: الشحنة السالبة لـ DNA لوجود زمرة الفوسفات.



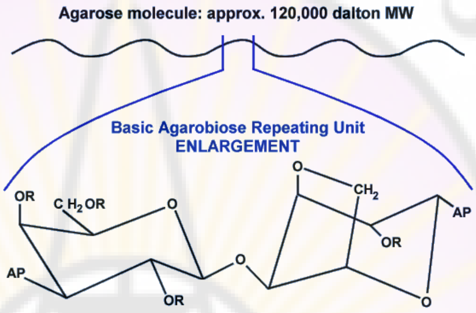
شكل. الرحلان الكهربائي لـ DNA نحو القطب الموجب.

تمر الجزيئات عبر حقل كهربائي متنوع الجهد و تهاجر إلى الالكترود المناسب, و تعتمد سرعة الهجرة على: الجهد المختلف بين الالكترودين، شحنة الحموض النووية، المسافة بين الالكترودين، و لزوجة المحاليل (تركيز الهلامة و حجم الثقوب). فبذلك تهاجر القطع الصغيرة

(ذات الوزن الجزيئي المنخفض) بسرعة أكبر من هجرة القطع الكبيرة (ذات الوزن الجزيئي المرتفع).

جزيء الأغاروز :

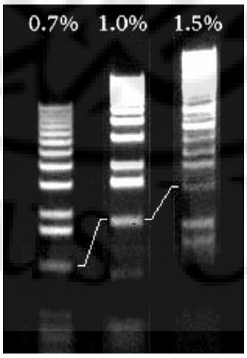
جزيء الأغاروز عبارة عن متعدد السكاريد الخطي (وزنه الجزيئي حوالي KDa 12000) و مركب من تكرار وحدة Agarobiose و مستخلص من الطحلب البحري Seaweed. كما يتميز الأغاروز أيضاً بأنه مادة هشة ضعيفة و تتكسر بسهولة بالتسخين (طورت في عام 1970) (شكل).



شكل . بنية جزيئية الأغاروز.

يتروح تركيز هلامة الأغاروز بين0,7 و 2%. تكون المسامات في الهلامة كبيرة في حال التركيز 0,7% و تستخدم لفصل القطع الكبيرة من الـ DNA (5–10 Kb), في حين تكون المسامات صغيرة في حال التركيز 2% و تستخدم لفصل القطع الصغيرة من الـ DNA (0.2-1 Kb). يمكن في بعض الحالات استخدام تراكيز أعلى من ذلك (شكل).

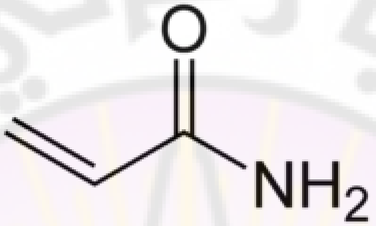
تستخدم هلامة الأغاروز لإظهار قطع الـ DNA الناتجة عن استخدام أنزيمات القطع, تحديد نقاوة الـ DNA، فصل قطع الـ DNA أو الـ RNA و تحديد أطوالها.



شكل. تركيز هلامة الأغاروز

هلامة الأكريلامايد:

وصفت هلامة متعدد الأكريلامايد من قبل Raymond and Weintuab عام 1959 و تستخدم هذه الهلامة في فصل جزيئات صغيرة من الحمض النووي الـ DNA (شكل) و يكون ذلك مهماً في عزل القطع التي تختلف في الطول بأساس أزوتي واحد فقط, و ذلك لان حجم مساماتها أصغر و هي أكثر مرونة و تحدد بوضوح الحزم مقارنة بهلامة الأغاروز.



شكل . بنية الأكريلامايد.

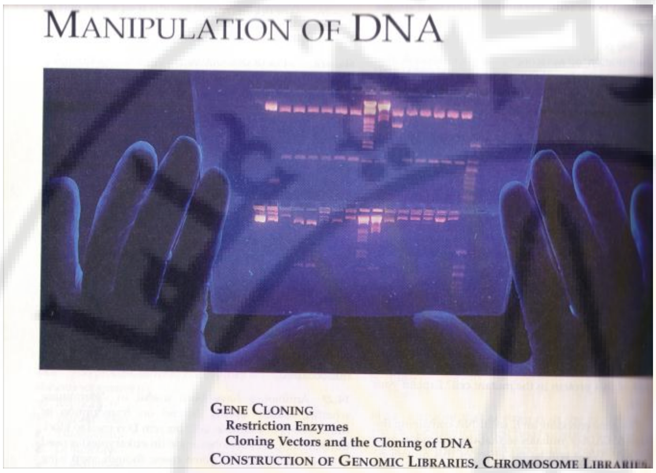
يتروواح تركيز هلامة متعدد الأكريلامايد بين 3-30%، و هي تسمح بفصل جزيئات البروتين التي تتراوح أوزانها الجزيئية من 5 إلى 2000 KDa و تكون الهلامة رقيقة جداً (5 مم أو أقل) كما يمكن حفظ هذه الهلامة في الكحول مدة طويلة. كما تستخدم هلامة متعدد الأكريلامايد لفصل جزيئات البروتين و متعدد الببتيد و لتحديد تتابع الـ DNA (شكل).

شكل. الرحلان الكهربائي باستخدام هلامة الأكريلامايد.

يستمر الرحلان الكهربائي حتى وصول الصبغة المرئية المستخدمة (صبغة بروموفينول الزرقاء ذات الوزن الجزيئي 300 bp) إلى نهاية الغشاء (دليل نهاية الرحلان الكهربائي).

كما يمكن في بعض الأحيان استخدام صبغة Xylene cyanol ذات الوزن الجزيئي 5000bp (شكل).

يمكن رؤية الحامض النووي المتوضع على الهلامة بإضافة صبغة الأثيديوم بروමايد (شكل) ، التي تتخلل بين الأسس الأزوتية للـ DNA و تتفاعل معها فيظهر الـ DNA عندئذ ذو وميض فلوريسنتي فيسهل تعينها وتصويرها بالأشعة فوق البنفسجية (UV)، و لا بد من إضافة مؤشر يعبر عن الطول الجزيئي (*1 kb ladder*), و هو عبارة عن محلول تجاري يتألف من قطع الـ *DNA* ذات أطوال معروفة و يستخدم هذا المؤشر للمقارنة.



شكل A : استخدام صبغة بروموفينول الزرقاء

B : صبغة الأثيديوم بروමايد

3- نقل الحموض النووية إلى غشاء من النتروسيللوز:

تستخدم هذه الطريقة عند الحاجة إلى توسيم الأحماض النووية بمسابر العناصر المشعة لتحديد طول المورثة وعدد نسخها على الجينوم.

من أجل نقل و تثبيت الـ DNA من الهلامة إلى غشاء من النتروسيللوز تتم معاملة الهلامة على درجة حرارة الغرفة بالمحاليل المخفة مثل HCl (للحصول على قطع كبيرة من الـ DNA لتسهيل عملية النقل) و من ثم توضع في محاليل تحتوي على NaOH و NaCl لفصل سلاسل الـ DNA. تنقل الهلامة إلى وعاء يحتوي على محلول النقل و يوضع غشاء النتروسيللوز فوق الهلامة مدة 12 ساعة و ينتقل بالتالي الـ DNA إلى الغشاء عن طريق الخاصة الشعرية. يتم تثبيت الـ DNA بوضعه مدة ساعتين على درجة حرارة 80°م.

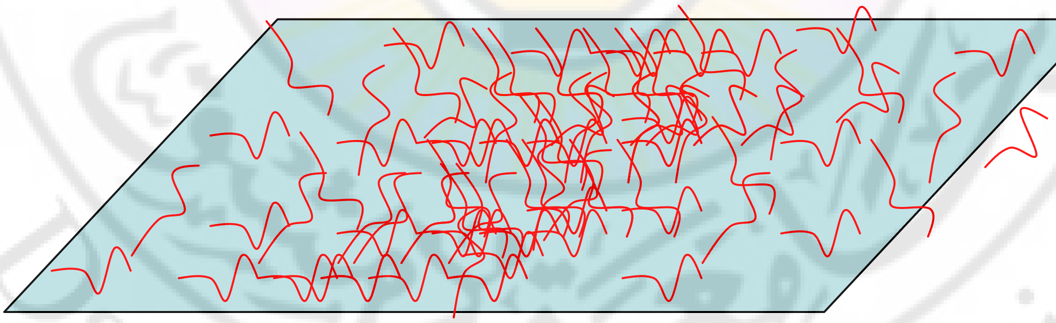
4- التهجين الجزيئي و التوسيم الإشعاعي للحموض النووية:

تكمن أهم مشكلة تواجه أي برنامج لعمليات التنسيل، في الحفاظ على إمكانية تعقب الكمية القليلة من الحمض النووي المستخدم. لأن فقدان أي جزء من هذه المادة يعني التناقص في

العمل بعد كل خطوة. توجد طريقة لتعقب المادة النووية و تتضمن توسميها بوساطة جزيء نشط إشعاعياً (عادةً يستخدم النيكليوزيد ثلاثي الفوسفات dNTP بتوسيم أحد العناصر, H^3 أو P^{32} الموجودة في بنية النيكليوزيد. تستخدم تلك العناصر لأنها ذات طاقة عالية. و بذلك يمكن قياس النشاط الإشعاعي بوساطة مقياس إشعاعي لغرض تحديد كمية الحمض النووي ذو النشاط الإشعاعي العالي ضمن تجارب التهجين و يعرف هذا الجزيء بالمسبار النشط إشعاعياً Radioactive probe. من بعض الطرق المعروفة في توسيم الحموض النووية: التوسيم الطرفي، الترجمة المتممة Nick translation و التوسيم عن طريق استطالة البادىء Primer extension.

5- التهجين المسبق و التهجين فوق المرشحات:

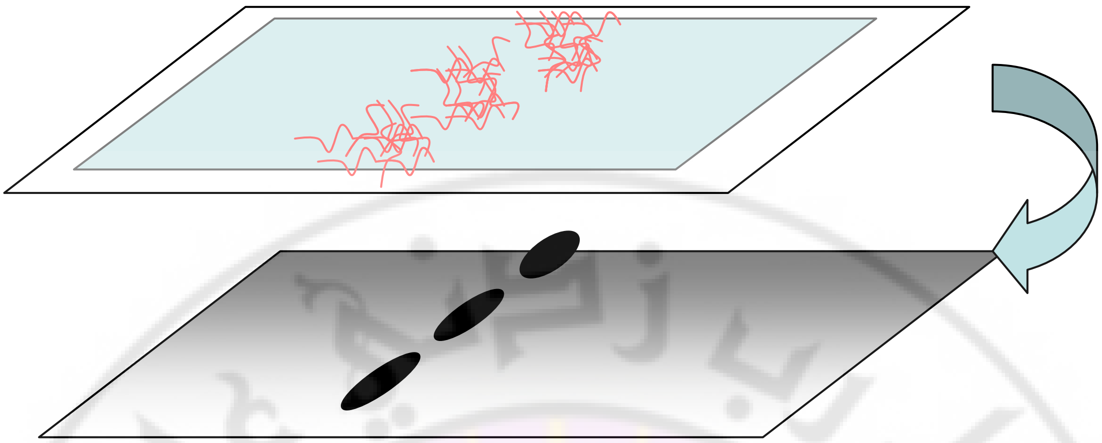
يتوضع محلول التهجين المسبق في المواقع الحرة على غشاء النتروسيللوز (شكل) و هذا يمنع التثبيت اللانوعي للمسبار. و من ثم تفصل سلاسل الـ DNA المزدوجة للمسبار المعلم إشعاعيا عن طريق التسخين بدرجة حرارة 100°م و تضاف إلى الغشاء. يجرى التهجين بدرجة حرارة تتراوح بين 65°م و 85°م لعدة ساعات لفسح المجال في تشكيل الازدواج الملائم، و يمكن تقدير درجة التهجين باستخدام مقياس طيف وميضي Scintillation spectrometer و يوضع الغشاء في قارورة زجاجية في فرن التهجين مدة 16 ساعة تحت تأثير الرج الخفيف.



شكل: تهجين المسبار مع غشاء النتروسيللوز.

6- الغسيل و التصوير الإشعاعي الذاتي للمرشحات:

يتم الغسيل من أجل نزع المسبار غير المهجن و إزالة التهجين اللانوعي, ثم توضع المرشحات النتروسيللوزية في حقيبة بلاستيكية و توضع في علبة بتماس مع فيلم أشعة X لإنتاج الصورة الذاتية autoradiogram.



شكل. الصورة الذاتية **autoradiogram** على فيلم X .

بيولوجية الهندسة الوراثية

النواقل والحوامل الوراثية

النواقل هي في الغالب فيروسات أو بلاسميدات كما أن هناك أنواع مصنعة تستخدم في المختبرات الطبية.

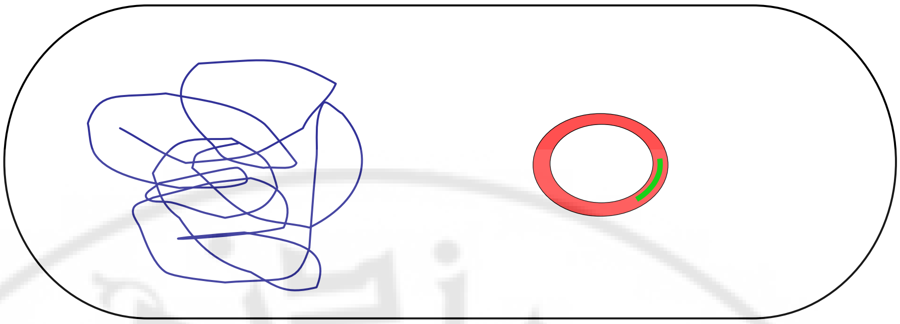
خلايا بدائيات النوى المضيفةProkaryotic hosts

تعد هذه الخلايا من أفضل الخلايا المضيفة و هي خلايا سهلة الاستخدام و لها القابلية العالية على التكاثر وتتضمن سلالات متنوعة و معروفة وراثياً و كذلك مدى إمكانيتها في استقبال النواقل.

تستخدم الخلايا البكتيرية و خاصة خلايا *E. coli* و هي خلايا غير مميزة النواة Prokaryotic Cells سالبة غرام، و مفردة الصبغي (الكروموسوم)، حجم ذخيرتها الوراثية (10^6x4) bp. تعيش هذه البكتريا في أمعاء الإنسان و الثدييات (القولون). يتميز سيتوبلازما البكتريا بوجود صبغي حلقي وحيد (يمثل الـ DNA الرئيسي للبكتريا) و جزيئات من الـ DNA الحلقي صغيرة الحجم تدعى البلاسميدات Plasmides (كل بلاسميد يضم حوالي 100 مورثة) (شكل). يتضاعف البلاسميد بتضاعف البكتريا، و في حالات خاصة يتضاعف خارج أوقات تضاعف البكتريا فيصبح عدد البلاسميدات في البكتريا الواحدة من 50 إلى 100 (سيتم مناقشة خصائص البلاسميدات ضمن فقرات لاحقة).

تستخدم هذه الخلايا في معظم عمليات التنسيل الجيني في المختبرات كخلايا مضيفة كما تستخدم خلايا بكتيرية أخرى من أجناس *Bacillus*، *Pseudomonas* و *Streptomyces*.

من المعوقات الرئيسية لاستخدام *E. coli* في عملية التنسيل كونها من بدائيات النوى التي ينقصها الغشاء النووي و يعني ذلك أن مورثات محددة لحقيقيات النوى قد لا يمكنها أداء وظيفتها في خلايا *E. coli*. فقد لا يكون من السهل التأكد بأن الخلية بدائية النوى تستطيع إنتاج البروتين الكامل الوظيفة.

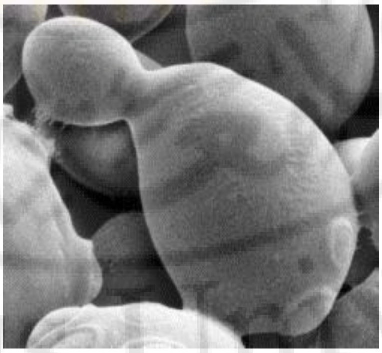


شكل: تتميز الخلية البكتيرية بوجود صبغي حلقي وحيد (يمثل الـ DNA الرئيسي للبكتريا) و جزيئات من الـ DNA الحلقي صغيرة الحجم تدعى البلاسميدات.

خلايا حقيقيات النوى المضيفة Eukaryotic cell hosts

تعد خمائر *Saccharomyces cerevisiae* (شكل)من أفضل الكائنات حقيقية النوى المجهرية استخداماً في الهندسة الوراثية. لقد استخدمت هذه الكائنات الحية لقرون عديدة في إنتاج الخبز و صناعة البيرة.

تحتوي ذخيرتها الوراثية على (107x1.35) زوج من أزواج قواعد الـ DNA و لذلك تزيد بما يقرب من ثلاثة أضعاف و نصف عن الذخيرة الوراثية لبكتيريا *E. coli*. كما تستخدم فطريات أخرى في عمليات التنسيل مثل *Aspergillus nidulans* و *Neurospora crassa*.



شكل: خميرة *Saccharomyces cerevisiae* (تستخدم في عمليات التنسيل).

النواقل البلاسميدية المستخدمة في بكتريا *E. coli*:

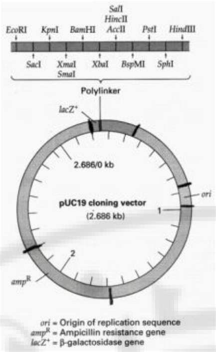
ما هي البلاسميدات:

تم اكتشاف العديد من الأنواع البلاسميدية الطبيعة منذ عام 1973، في البكتيريا وفي بعض أنوع الخميرة (Yeast). البلاسميدات هي عبارة عن جزيئات DNA شبيهة بالفيروسات الصغيرة و لكنها لا تحتوي على غلاف من البروتين. تتكون البلاسميدات من جزيئات من الحمض النووي الـ DNA، مضاعفة السلسلة، حلقية، و تكون نسبياً صغيرة بالمقارنة مع صبغي الخلية و غالباً موجودة في حالة صبغي إضافي Extrachomosomal.

تتميز البلاسميدات بقدرتها على التضاعف الذاتي و بمعزل عن بقية الصبغيات الموجودة في الخلية و ذلك لاحتوائها على وحدة التضاعف الذاتي (وهي تسلسل نوعي من الـ DNA مؤلف من 50−100 pb و موجودة ضمن البلاسميد).

بالإضافة إلى ذلك فهناك الكثير من المورثات التي قد تكون على البلاسميد و هي مفيدة للعلماء في عملية نسخ المورثات، فمثلاً يوجد على البلاسميد مورثة خاصة تكافح المضادات الحيوية Antibiotics (كالأمبيسيلين و التتراسيكلين و البنسلين و الكاناميسين و الكلورومفينيوكول). تساعد هذه المورثات الحامية من المضادات الحيوية في التعرف على و عزل البكتيريا التي تحتوي على البلاسميد الذي يحمل المورث الذي نود استنساخه. كما تمتلك البلاسميدات أيضاً منطقة التنسيل المتعددة (أماكن وجود إنزيمات القطع) و يتم في هذه المنطقة إدخال الـ DNA الغريب (شكل). يوجد بلاسميدات تستطيع التكاثر داخل البكتيريا و الخميرة في آن واحد.

اعتماداً على نوع الحمض النووي نستطيع تمييز نوعين من البلاسميدات فهناك البلاسميدات ذات الحمض النووي DNA و البلاسميدات ذات الحمض النووي RNA. و تمييز أيضاً عن طريق وزنها الجزيئي فمنها الصغير (وزن جزيئي منخفض) 2−5 كيلوباز و منها الكبير(وزن جزيئي عالي). تستخدم هذه البلاسميدات في الهندسة الوراثية كحامل للمورثات الغريبة.



شكل:بنية البلاسميد pUC19. حيث,

ori: منطقة التضاعف الذاتي.

ampR: مورثة تكافح المضاد الحيوي.

lacZ: مورثة β_galactosidase و التي ترمز لنفس الإنزيم بيتا غالاكتوسيداز.

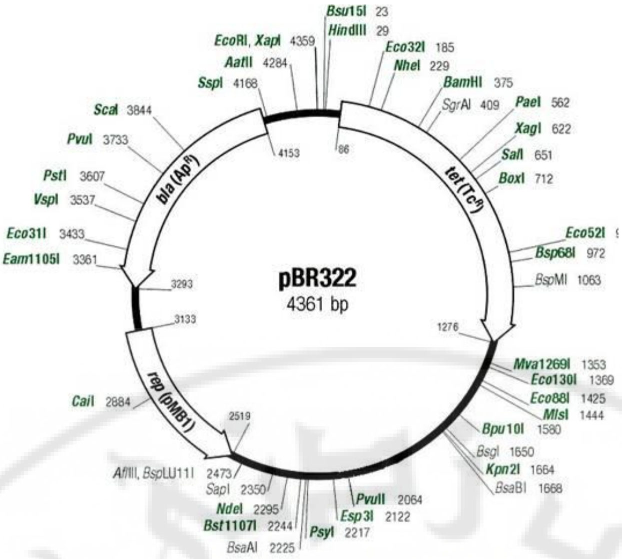
منطقة التنسيل المتعددة polylinker

بلاسميدات التنسيل الأساسية:

تُحور البلاسميدات الموجودة طبيعياً بشكل واسع في الهندسة الوراثية لإنتاج النواقل التي تحمل الصفات المرغوبة. و من البلاسميدات شائعة الاستخدام البلاسميد pBR322 الذي طور من قبل الباحث Francisco Bolivar و زملائه. يتضمن تركيب البلاسميد pBR322 سلسلة من المعاملات للوصول به لأن يمتلك سمات الناقل الجيد، مثل الوزن الجزيئي المنخفض، و مورثات مقاومة للمضادات الحيوية (الأمبيسيلين و التتراسيكلين Tc^r, Ap^r), بالإضافة إلى عدة مواقع أحادية القطع.

نواقل بلاسميدية مبتكرة أخرى

بالرغم من الاستخدام الواسع لبلاسميدات pBR322 (شكل) و pAT153 لغرض التطبيقات العديدة في التنسيل الجيني فانه توجد نواقل بلاسميدية أخرى ملائمة. و منها سلسلة بلاسميدات العائلة البلاسميدية pUC التي لاقت انتشاراً واسعاً، و هي تحتوي على سمات خاصة لا توجد في النواقل الأبسط. حيث تمتلك هذه البلاسميدات منطقة تحتوي على عدة مواقع قطع مفردة لإنزيم الأندونيوكلياز ضمن امتداد قصير للـ DNA. و تعرف هذه المنطقة بموقع التنسيل المتعدد أو polylinker site (MCS) و التي تكون مفيدة بسبب إمكانية الاختيار للموقع القابل لإدخال قطع الـ DNA.



شكل . بنية البلاسميد pBR322. حيث,

rep: منطقة التضاعف الذاتي.

tetr-ampR: مورثتان تكافحان(تتحكم) المضاد الحيوي.

lacZ: مورثة β_galactosidase و التي ترمز لنفس الإنزيم بيتا غالاكتوسيداز.

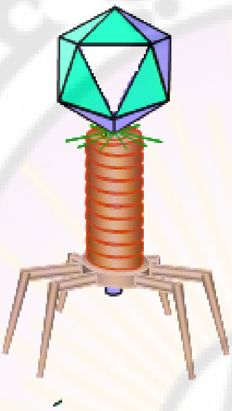
- **مواقع أحادية لأنزيمات القطع (Kpn21,Esp31 و غيرها).**

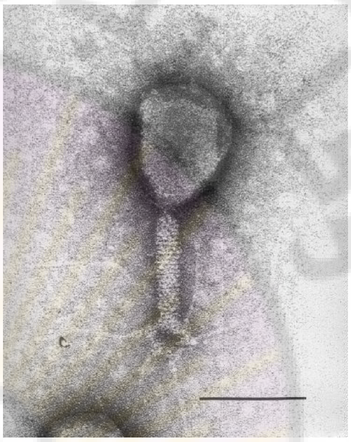
تمتلك بلاسميدات pUC بالإضافة إلى منطقة التنسيل المتعدد منطقة أخرى تدعى مورثة β_galactosidase و التي ترمز لنفس الإنزيم بيتا غالاكتوسيداز β_ galactosidase.

على الرغم من احتواء النواقل البلاسميدية للعديد من الخواص المفيدة, فإنها تحتوي أيضاً على عدد من السلبيات و أحد أهم هذه السلبيات هو حجم قطعة الـ DNA التي يمكن إدخالها إلى البلاسميدات و التي تكون بأقصى مدى 5 kb من الـ DNA على الأكثر و التي تؤثر بشدة على فعالية التنسيل. في بعض التطبيقات فأنه من المهم زيادة حجم القطع التي يمكن تنسيلها و يحتاج مثل هذا النوع من العمل لنواقل لها القابلية لاستقبال قطع أكبر من الـ DNA و منها الفاج البكتيري Bacteriophage lambda و التي سنتعرض له في القسم التالي.

الفاجات:

بالرغم من أن النواقل التي بنيت على أساس الفاجات البكتيرية هي أكثر تخصصاً من النواقل البلاسميدية, إلا أنها متشابهة معها في الوظيفة من الناحية الجوهرية, أي أنها تعمل كحاملة لقطع جزيئات الـ DNA و قد طور بشكل واسع نوعان من الفاجات البكتيرية (M13 -λ) لأغراض التنسيل (شكل).





شكل. الفاج لمدا و λ

تعد الفاجات أفضل من البلاسميدات للأسباب الآتية:

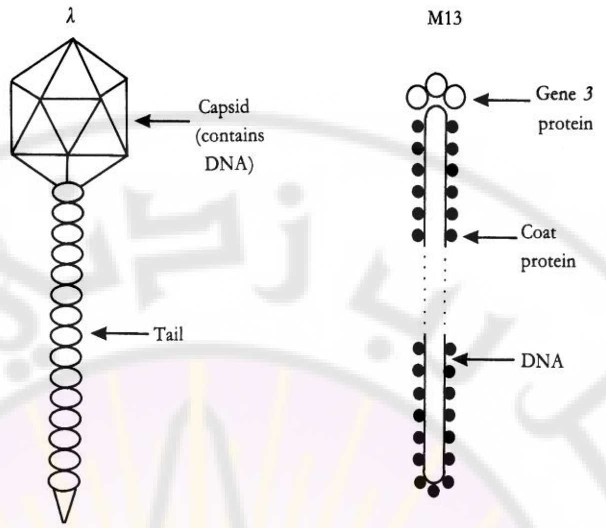
- تستطيع الفاجات إصابة الخلايا بفعالية أكبر من البلاسميدات.
- معدل ظهور المستعمرات عادةً يكون أعلى.
- تعود فعالية الفاج δ لأنها تستخدم في بناء المكتبات الوراثية.

ما هي الفاجات البكتيرية

هي ببساطة فيروسات آكلات البكتيريا و تعتمد في توالدها (تضاعفها) على البكتيريا. وتصنف الفاجات تركيبياً ضمن ثلاثة مجموعات رئيسية:

- عديمة الذنب: (غير مذنبة) Tailless.
- المذنبة (Head and tail): بحيث يوجد الرأس (الحاوي على الـ DNA الفيروسي) مع الذنب (يستخدم لإصابة الخلايا المضيفة *E. coli*).

- خيطية Filamentous (شكل).

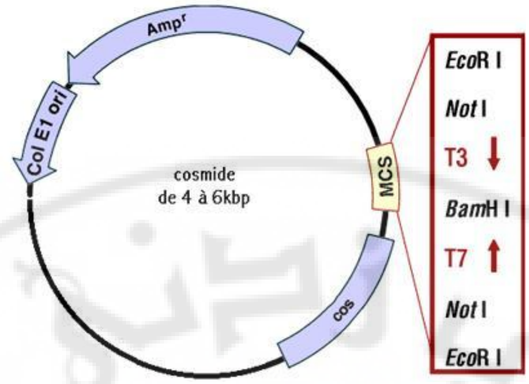


شكل. مقارنة بين الفاج لمدا و M13

تتكون مادتها الوراثية من طاق مفرد أو مزدوج من الـ DNA أو الـ RNA و غالباً ما تكون مؤلفة من سلسلتين مزدوجتين من الـ DNA. تكون المادة الوراثية للفاجات المذنبة و غير المذنبة محاطة بغلاف بروتيني عشروني السطوح يدعى الكابسيد Capside و الذي يعرف في بعض الأحيان بمعطف الفاج Coat. تؤلف المادة الوراثية في الفاجات المزدوجة الطاق في الحالات المثلى 50% من كتلة الفاج.

تتكون المادة الوراثية للفاج λ (و هو فيروس موجود في *E. coli*) من 48.5 kb طولاً لتؤلف ما يقرب من 46 مورثة.
تختلف الفاجات البكتيرية الخيطية M13 عن الفاجات λ في التركيب و دورة الحياة. تتمثل المادة الوراثية للفاج M13 في كونها جزيئات من الـ DNA مفردة السلسلة حلقية الشكل و بطول 6407 bp و يستطيع الفاج إصابة الخلايا البكتيرية *E. coli* فقط.

لقد حوّرت هذه النواقل لكي تستطيع حمل أكبر كمية من الـ DNA فعلى سبيل المثال الكوسميد (Cosmids) (شكل) عبارة عن تهجين جزء من فاج ليمبدا (Phage) مع البلاسميد (Plasmid) و بذلك تكون ملائمة لتنسيل قطع الـ DNA لما يقرب 47 كيلوباز (kb) في الطول.



شكل . بنية الكوسميد. حيث,

ori: منطقة التضاعف الذاتي.

ampR: مورثة تكافح المضاد الحيوي.

COS: مورثة β_galactosidase و التي ترمز لنفس الإنزيم بيتا غالاكتوسيداز.

MCS: منطقة إنزيمات القطع.

الباك الفيروسي المسمى بصبغي p1 الصناعي (PAC/ P1-derived artificial Chromosomes) عبارة عن تحوير للفاج (P1 Bacteriophage) و إضافته إلى البلازميد.

النواقل الصبغية الصنعية (Artificial Chromosomes):

نظراً للحاجة إلى نقل إحجام كبيرة من الـ DNA فقد قام العلماء بتحوير بعض الناقلات الطبيعية لكي تقوم بهذه المهمة.

من هذه النواقل:

1- صبغي الخميرة الصنعي, الياك YAC /(Yeast Artificial Chromosomes) (شكل).

يستطيع هذا الناقل نقل قطعة كبيرة من الـ DNA أكبر من 500 كيلوباز (500 kb) و الياك عبارة عن قطعة من الـ DNA مترابطة و تحتوي على:

طرفين الصبغي(2 Telomeres)

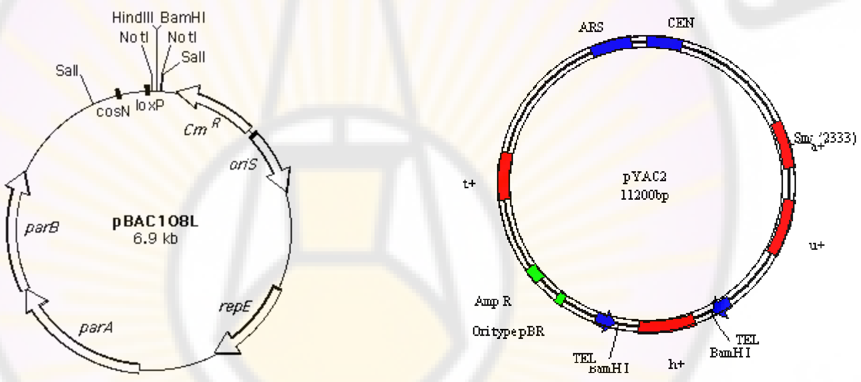
و الجزيء المركزي للصبغي (Centromere)

و مركز للتضاعف (Autonomous replicating sequence ARS).

و يمكن استخدامه من أجل تنسيل قطع كبيرة جداً من الـ DNA و لإنتاج مكتبة وراثية لكائن حي ما.

2- صبغي البكتريا الصنعي, الباك BAC (Bacterial Artificial Chromosomes) (شكل).

يستطيع هذا الناقل حمل حتى 150 كيلوباز (هو عبارة عن تحوير للبلاسميد المعروف ببلاسميد تكاثر بكتيريا *E. coli* (Fertility plasmid-factor).



شكل. بنية الياك و الباك.

Damascus University

التنسيل cloning

على الرغم من أن الـ DNA يمثل كامل الذخيرة الوراثية للكائن الحي فإنه من الممكن أن يحتوي على الانترونات (قطع الـ DNA غير المشفر)، مناطق السيطرة (Control Regions)، و تتابعات التكرار (Repetitive Sequences). إن وجود تلك القطع أو المناطق يمكن أن تؤدي إلى حدوث بعض الصعوبات في عملية التنسيل, و بشكل خاص إذا كانت الذخيرة الوراثية كبيرة و كان الهدف هو عزل نسخة مفردة من المورثة.

التنسيل من الـ RNAm (بناء الـDNAc):

لا يمكن تنسيل الـ RNAm مباشرة لذا يجب تحويله إلى DNA قبل البدء في عملية التنسيل. يحوي الـ RNAm النقي دائماً على ذيل مؤلف من متعددات A بالنهاية '3 ، و يهجن هذا الطرف مع قطع من الـ DNA الصنعية تحوي متعددات T التي تعمل كبادىء لاصطناع سلسلة الـ DNA. و من ثم يخلط الـ RNAm مع النيكليوتيدات الأربعة بالإضافة لأنزيم النسخ العكسي الذي يحفز اصطناع سلسلة الـ DNA المكملة لسلسلة الـ RNAm. يمكن إزالة الـ RNAm بوساطة الاماهة القلوية ليتم فيما بعد تحويل الـDNAc المفرد السلسلة إلى سلسلة مزدوجة و ذلك باستخدام أنزيم DNA-polymerase. يتم توليد البادىء ('3 – OH) ضمن بناء السلسلة الثانية و ذلك عن طريق مناطق قصيرة تشبه رأس الدبوس و التي تتشكل في نهاية الـ DNA مضاعف السلسلة. يشذب الـ DNAc مضاعف السلسلة بعد بناء السلسلة الثانية بوساطة أنزيم (S1 nuclease) ليعطي جزيئة ذات نهاية مسطحة نشطة يمكن فيما بعد تنسيلها ضمن ناقل ملائم.

أصناف الـ RNAm

المصدر	عدد جزيئات الـ RNAm المختلفة	وفرتها (جزيء/خلية)
كبد الفأر	9	1200
Cytoplasmic poly (A) RNA	700	300
RNAm السيتوبلاسمي	11500	15
Chick Oviduct	1	100000
Polysomal poly (A) RNA	7	4000
قناة البيض في الدجاج	5	12500

بالرغم من أن متعدد (A) لجزيئات الـ RNAm يستخدم غالباً في بناء الـ DNAc فإنه قد يكون غير ملائم في بعض الحالات, و حين يكون الـ RNAm غير متعدد (A) فإنه يمكن استخدام بادئات من أجل التفاعل السلسلي للبوليميراز من أجل تضخيم التتابع المرغوب اختيارياً.

تدخل القطعة المراد نسخها (المورثة) في إحدى النواقل الوراثية (بكتيريا، خمائر, بلاسميد أو غيرها) المعروفة بقدرتها على التضاعف الذاتي. بغض النظر عن نوع الناقل الوراثي المستخدم فان طريقة إدخال قطعة الـDNA المراد نسخها إلى الناقل تقريباً واحدة و لا يختلف تنسيل الـDNAc بنواقل بكترية أو فاجية كقاعدة عامة، عن تنسيل أي قطعة أخرى من الـ DNA. علماً بأنه لا توجد طريقة تنسيل واحدة تستطيع تغطية جميع الاحتياجات.
هذه الخطوات ببساطة كما يلي:

– تصميم قطعة مهجنة من الـ DNA المراد نسخها (مورثة) و الـ DNA من ناقل وراثي و لديه القدرة على التضاعف. و ذلك عن طريق استخدام الإنزيمات القاطعة (Restriction enzymes).
– نقل القطعة المهجنة الموجودة داخل الناقل إلى خلية حية و عادةً تستخدم بكتيريا خاصة من النوع المعروف *E. coli* أو الخميرة.
- اختيار المستعمرات البكتيرية التي تحتوي على الناقل و القطعة المهجنة و السماح لها بالتكاثر عن طريق أطباق الزراعة (Culture Plates) أو في محاليل سائلة.
– استخلاص القطع المهجنة و استخراج الـ DNA منها بكميات كبيرة.

1– تصميم القطع المهجنة من الـ DNA:

يضاف إلى قطعة الـ DNA إنزيم قطع محدد و ليكن مثلاً إنزيم (أ) فيقوم هذا الإنزيم بقطع الـDNA في مكان محدد حسب التسلسل الخاص به و يضاف الإنزيم نفسه للناقل و الذي يقوم بقطعه أيضاً في نفس التسلسل و من ثم تضاف القطع المراد نسخها (الـ DNA) بعد قطعها بالإنزيم القاطع إلى الناقل المقطّع فتتداخل التسلسلات النووية بين الناقل و بين قطع الـ DNA

المراد نسخها. و ينتج قطعة مهجنة من الناقل و بداخله القطعة المراد نسخها (مورثة). يضاف إنزيم الوصل أو الربط (Ligase) لربط قطعة الـ DNA مع البلاسميد (شكل).

إن أكثر النواقل استخداماً هي البلاسميد و لكن يمكن استخدام الفاج أو الياك أو أي ناقل أخر و الذي يحدد نوع الناقل المراد استخدامه هو في العادة كبر القطعة المراد استنساخها. ففي حالة القطع الصغيرة يستخدم البلاسميد أو الفاج بينما يستخدم الياك أو الباك في حالة القطع الكبيرة من الـ DNA.

شكل . تصميم القطع المهجنة من الـ DNA

2- نقل القطعة المهجنة المحمولة داخل الناقل إلى خلية حية:

غالباً ما تستعمل البكتيريا (*E. coli*) في عملية الزراعة و ذلك لسهولة إدخال الناقل إليها، و إلى سرعة انقسامها (تنقسم البكتريا تقريباً كل 20 دقيقة)، إضافة إلى توفر طرق الاختيار خاصة التي تعتمد على خاصة الحماية من المضادات الحيوية. و يدخل البلاسميد أو الفاج

تلقائياً إلى داخل البكتيريا بينما النواقل الأخرى تحتاج إلى مساعدة، و في العادة تتمثل بتغيير تركيز الأملاح المحيطة بالبكتيريا، أو تعرضها إلى نبضة كهربائية لكي يحرض الجدار المحيط بالبكتيريا لإدخال النواقل.

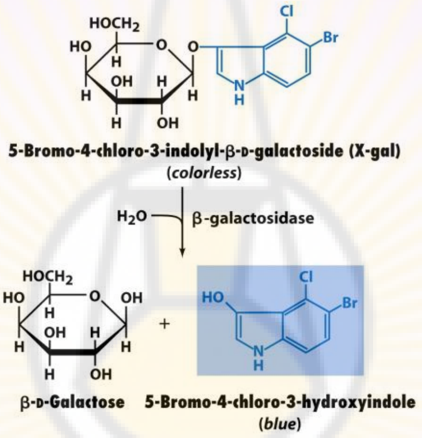
شكل. نقل القطعة المهجنة المحمولة داخل الناقل إلى البكتريا.

3- اختيار المستعمرات البكتيرية التي تحتوي على الناقل و القطعة المهجنة:

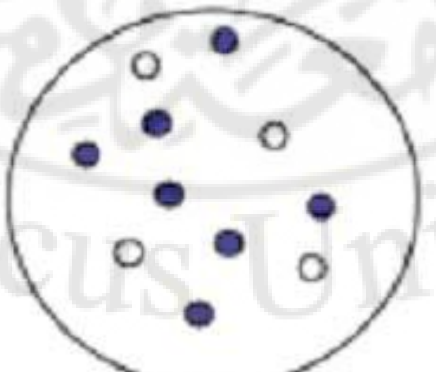
مع تكاثر الخلايا البكتيرية و تكاثر البلاسميد بداخلها ينتج لدينا أعداداً كثيرةً من المستعمرات البكتيرية و بها البلاسميد المهجن. و لكن قد يكون في داخل الطبق الذي زرع فيه البكتريا بعض البكتريا التي لا تحتوي على البلاسميد المهجن و يمكن التعرف عليها عن طريق استعمال نواقل تحمل مورثات واقية من المضادات الحيوية، كالمورث الواقي من المضاد الحيوي الامبيسيلين أو التتراسيكلين و غيرها فيضاف المضاد الحيوي إلى وسط النمو وهو سوف يمنع تكاثر أي خلية بكتيرية أخرى.

4- استخلاص القطع المهجنة و الاستخراج الكمي للـDNA:

بعد أن نميز المستعمرات التي تحتوي على البلاسميد المهجن فإنه يمكن نقلها إلى طبق جديد للمحافظة عليها و التكاثر. و يستفاد من قطع الـ DNA المنسوخة في القيام بالمزيد من البحوث أو التجارب عليها (مثلاً إنتاج مكتبة الـDNA أو محاولة استنتاج التسلسل النووي للقطعة). و يمكن الكشف عن البكتريا التي تحمل قطع الـ DNA المهجن و ذلك بوضع IPTG(I,SO-propylthiogalactoside) (مصدر لنسخ المورثة LacZ) و X gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactopyranoside) في وسط النمو. حيث تعمل هذه المواد على تلون البكتريا بلون أزرق و هو دليل على أن هذا الـ DNA المهجن لم يدخل ضمن البكتريا, أما إذا تلونت البكتريا بلون أبيض فهو دليل على دخول الـ DNA المهجن إليها (شكل).



شكل. آلية ظهور اللون الأزرق، دليل على نجاح عملية التنسيل.



شكل. تلون البكتريا باللون الأبيض و الأزرق.

على الرغم من استخدام النواقل البلاسميدية بفاعلية جيدة في عملية التنسيل فانه توجد حالات قد تكون فيها غير ملائمة. فإذا كان العمل بحاجة إلى عدد كبير من المركبات كالحالة التي تكون ضعف وفرة الـ RNAm المراد تنسيله, فان الفاجات تكون أكثر ملائمة لأنها تزيد من فعالية عملية التنسيل.

Damascus University

تقانات الهندسة الوراثية و تطبيقاتها

تحفظ المعلومات الوراثية و إنتاج المواد اللازمة لصنع الخلايا و الحفاظ عليها في على الحمض النووي (DNA). و تقوم الخلية بمضاعفة كمية الحمض النووي وقت انقسام الخلية بشكل تلقائي و سريع مع وجود نظام تصحيح للأخطاء خلال النسخ. و تبلغ سرعة النسخ والمضاعفة حتى 1000 قاعدة نيتروجينية بالثانية (داخل النظام الحيوي) و ذلك كما ذكرنا في وقت التكاثر والانقسام فقط.

ومع التطور في مجال التكنولوجيا الحيوية والذي يقوم على التعامل مع الحمض النووي (DNA) بشكل أساسي، استدعى ذلك العلماء على أن يبحثوا عن طريقة أو تقنية مماثلة تقوم على مضاعفة كمية الحمض النووي (DNA) بشكل كبير، فكان هناك عدة محاولات لتنشيط الخلية على الانقسام المستمر بإضافة عوامل النمو growth factors، ولكن هذه الطريقة لم تكن ذات جدوى لدى العلماء لأسباب كثيرة. إلى أن توصل العالم Kerry Mullis في عام 1985 بنشر اختراعه لتقانة الـ PCR فكانت هذه التقانة بوابةً لكثير من التطورات المتسارعة في مجال التكنولوجيا الحيوية. من أهم الأسباب التي ساعدت هذه التقانة على الانتشار عدم اعتمادها على النظام الحيوي (أي الخلية) و التحكم بكمية الحمض النووي (DNA)، أي أنها طريقة لنسخ الحمض النووي في المختبر لذلك فهي تقانة حيوية لاستنساخ قطعة محددة من الحمض النووي بعد استخلاصها من خلايا أو سوائل الجسم و مضاعفة إنتاجها لكي يتسنى إجراء الاختبارات و الفحوصات الإضافية عليها.

تقانة الـ PCR

تعد هذه التقانة سريعة, سهلة, حساسة و أوتوماتيكية و هي تحتاج إلى توافر مواد معينة لكي يحدث التفاعل:

1 -البادئات Primers وهي عبارة عن نيكليوتيدات قصيرة (30– 18 Oligonucleotides أساس آزوتي) قادرة على الارتباط مع الأسس الأزوتية للحمض النووي المراد تضخيمه و تكون البادئات غنية بـC, G (من 40–60%) و يجب حساب درجة الحرارة الملائمة للبادئات.

2– كميات وافرة من النيوكليوزيدات ثلاثية الفوسفات منقوصة الأوكسجين Deoxynuleoside triphosphates (dATP,dCTP,dGTP,dTTP) (dNTPs)

3 – أنزيم البوليميراز Polymerase إنزيم مقاوم للحرارة المرتفعة، وأهمهاTaq Polymerase المستخلص من بكتيريا تعيش في مياه الينابيع الحارة Thermus aquaticus في درجة حرارة أعلى من 110 ْم (F 230). يعد هذا الإنزيم مسؤولاً عن تضاعف الـ DNA و هو جزء من اسم الطريقة Polymerase Chain Reaction.

4– محاليل واقيه Buffers.

5– شوارد مناسبة، أهمها شاردة المغنيزيوم Mg+2 التي تعتبر عامل متمم Co-factor لأنزيم البوليمراز.

يتم تضخيم قطعة من الـ DNA باستخدام جهاز التدوير الحراري الآليThermocycle و ذلك للتحكم بدرجة حرارة التفاعل بشكل دقيق و متتالي ويقوم هذا الجهاز بتغير درجة الحرارة بشكل سريع، لآن تغير درجة الحرارة هو الأساس الذي تقوم عليه فكرة هذه التقانة. يتم الإكثار بعدد من الدورات يتراوح بين 25–40 دورة و تتكون كل دورة PCR من ثلاث مراحل كالآتي (شكل):

I– Denaturation: مرحلة التمسخ الحراري لجزيء الـ DNA:

أي فصل السلسلة المزدوجة ds-DNA نتيجة تحطم الروابط الهيدروجينية. وتتم هذه المرحلة عند درجة حرارة 94 ºم, حيث تتوقف جميع التفاعلات الأنزيمية.

II– Primers Annealing: مرحلة تشفع البادئات:

يتم ذلك بتخفيض درجة الحرارة إلى 35–65 ºم, (و ذلك تبعاً لطول البادئ و تركيبه من الأسس الآزوتية). حيث يلتصق البادئ على الـ DNA في المكان المناسب, ويقوم أنزيم البوليميراز بإكمال السلسلة المتممة ومضاعفة سلسلة الـ DNA.

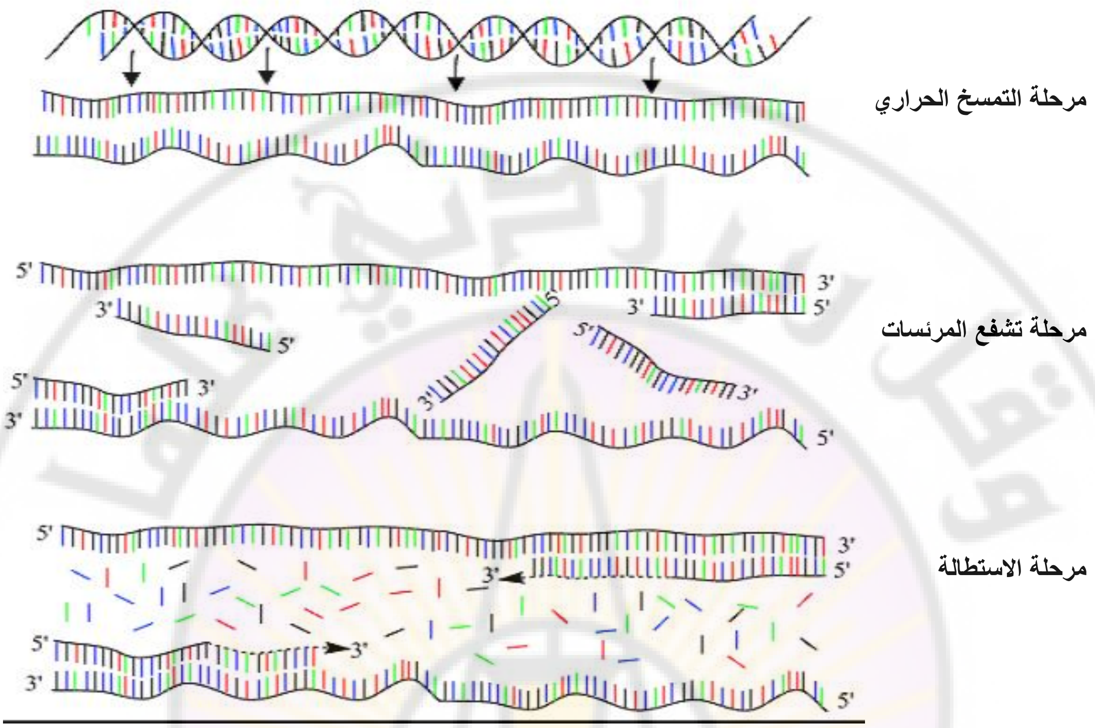
III– Extension: مرحلة إعادة تركيب السلسلة الجديدة المكملة لقطعة الـ DNA الأصلية:

و ذلك باستخدام نيكليوتيدات مفردة ثلاثية الفوسفات TTP, GTP , CTP ,ATP وبمساعدة أنزيم البوليميراز, من خلال رفع درجة الحرارة إلى 70–75 مº.

تسمح هذه التقانة بالحصول على ملايين من النسخ المضاعفة من قطعة واحدة من الـ DNA والتي تتضاعف أسياً exponentially, من خلال استخدام دورات حرارية متعددة.

إن الحساسية العالية التي تبديها هذه التقنية تجعلها عرضة لإعطاء نتائج إيجابية كاذبة بسبب أي تلوث خارجي المنشأ ومن أهم مصادر هذا التلوث: منتجات تضخيم سابقة أو التلوث من عينة أخرى. لذا يعتبر التلوث العقبة الوحيدة المهمة التي تواجه استخدام هذه التقنية لغايات تشخيصية و يمكن تجنب التلوث بالانتباه الجيد لتفاصيل العمل المخبري.

تفاعل البلمرة المتسلسل الـ PCR



شكل. المراحل المختلفة للـPCR

شكل. يوضح قطع الـ DNA و التي ضخمت بالـ PCR في هلامة الأغاروز و موضحة من خلال صبغة بروموفينول الزرقاء.

تطبيقات تقانة الـ PCR:

لتقانة PCR تطبيقات كثيرة في مجال أبحاث الحمض النووي (DNA) خاصةً و الوراثة عامةً ومنها:

– الكشف عن الطفرات الوراثية: وذلك عن طريق وضعب ادىء خاص للطفرة لتضخيم المورث الخاص بها ومنه نقوم بمعرفة المرض إذا كان على زوجي الصبغيات أو على إحداهما (allele).

– تحديد البصمة الوراثية: و هو العنصر الأهم في عملية التجميع الجيني للحمض النووي (DNA Recombinant) حيث يقوم الـ PCR بتضخيم المورث المراد إدخاله على البلاسميد أو الحمض النووي (DNA) المضيف.

– تحديد تتابع القواعد النيتروجينية في الحمض النووي (DNA Sequencer).

– معرفة طول الحمض النووي (DNA).

– الحصول على الحمض النووي المكمل (DNAc).

– تحديد المورث المطلوب من خليط من المورثات.

– دور فعال في مشروع الخارطة الوراثية البشرية (Human genome project) .

– و في مجال الطب الشرعي (اختبار الأمومة، حالات الاغتصاب، تحديد الهوية ... الخ). وغيرها من التطبيقات المخبرية والبحثية.

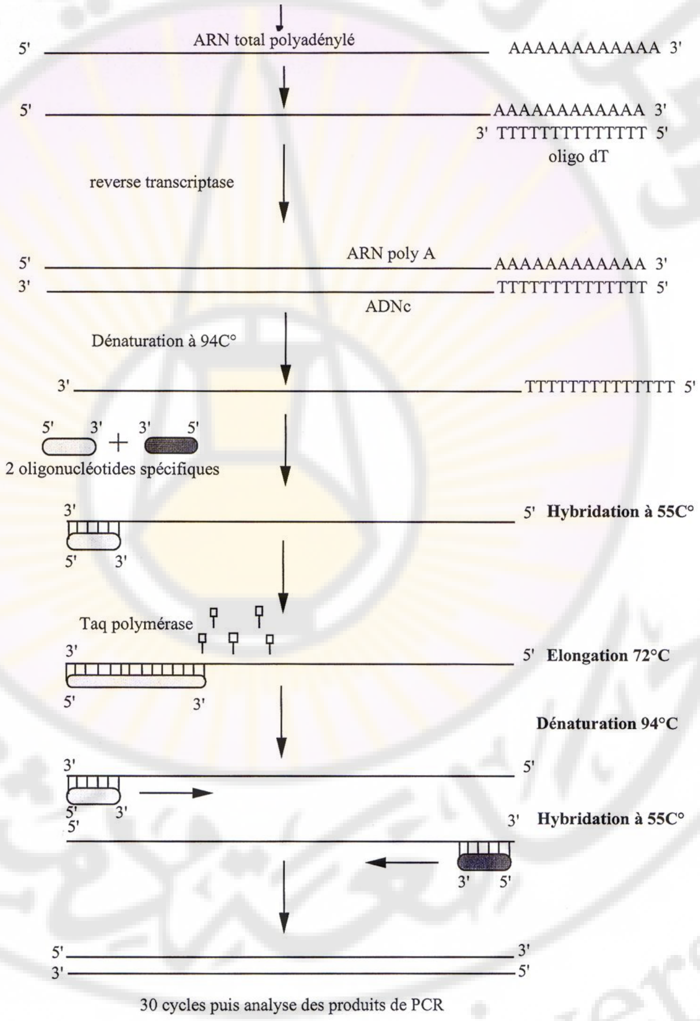
<u>النسخ العكسي المترافق مع التضخيم بواسطة Tag polymerase (تقانة RT-PCR):</u>

تمكن هذه التقانة من التحديد الدقيق للكميات القليلة من الـ RNA و تحليلها في المجالات المهمة لمعظم الدراسات البيولوجية الجزيئية. يعطي التكيف مع طرق الـ PCR الخاصة بـ RNA الباحث السرعة في العمل و النوعية و الدقة في النتائج. و بما أن الـ RNA لا يصلح أن يكون قالباً في الـ PCR فان ذلك يستدعي إلى تحويله إلى الـ DNA المتمم و الذي يكون ملائماً لتفاعلات الـPCR (شكل).

و تعد تقانة الـ RT-PCR ذات أهمية في تحديد التعبير الجيني و تشخيص عوامل العدوى و تشخيص الأمراض الوراثية. و لا بد من توافر مواد معينة لكي يحدث التفاعل:

_ إنزيمات النسخ العكسي: و تمثل RNA-dependent DNA polymerases و التي تساهم في بناء الـ DNA المتمم.

البادئات: يستخدم البادئ Oligo-dT (متعدد 12–18) في النسخ العكسي الذي يقتضي تركيب الـ DNAc المتمم ابتداءً من RNAm ذيل A (Poly A). اصطناع الضفيرة الأولى للـ DNAc المتمم بواسطة إنزيم النسخ العكسي (RT).



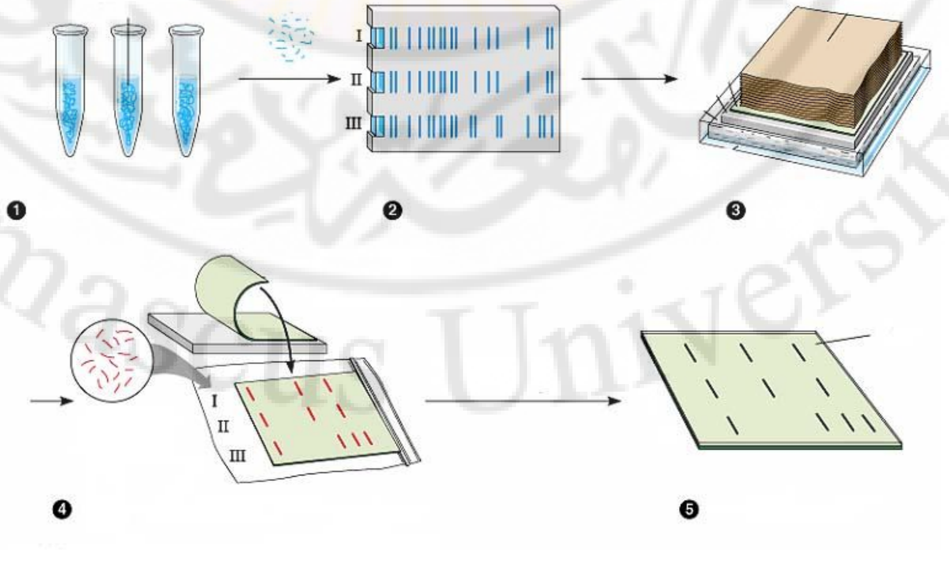
شكل.مراحل الـ RT-PCR

Damascus University

تقانة Southern blot :

على الرغم من أن تقانة الـ PCR قد حلت محل تقانة ساوزرن إلا أن هذه التقانة ما زالت ضرورية لكشف بعض التغيرات كبيرة الحجم في الـ DNA و التي لا يمكن كشفها بتقانة الـ PCR حيث طورت هذه التقانة في عام 1975 من قبل العالم Southern.

مبدأ الطريقة: ينقى الـ DNA الصبغي و يقطع باستخدام إنزيمات التحديد restriction enzymes للحصول على قطع من الـ DNA مختلفة الأطوال، تفصل بعد ذلك بالرحلان الكهربائي على هلامة الأغاروز. تغمر الهلامة في حمض كلور الماء ثم بهيدروكسيد الصوديوم Sodium hydroacid لكي يفصل الـ DNA و يتم تحويل هذه القطع من سلسلة مضاعفة double strands إلى سلسلة مفردة Single strands. تنقل قطع الـ DNA مفردة السلسلة بعد ذلك من الأغاروز إلى غشاء ذو نوعية خاصة Membrane و تدعى هذه العملية بتبقع ساوزرن حيث يهجن الـ DNA مع مسابر الـ DNA (DNA probe) الموسومة بالفوسفور المشع p32 و معروف تتابعها النيكليوتيدي ثم يفصل الـ DNA المشع إلى سلسلتين مفردتين لتركها تتهجن مع قطع الـ DNA المماثلة لها. تغسل الكميات الإضافية من الـ DNAc . يجفف غشاء النايلون و يوضع على صفيحة من فيلم لأشعة x و ذلك ليسمح للنشاط الإشعاعي للمسبار أن يتعرض على الفيلم و تسمى العملية بالتصوير الإشعاعي الذاتي حيث تظهر عصابات فاتحة اللون على خلفية غامقة في مواضع تتفق مع أوزانها الجزيئية و يمكن مقارنة أطوال هذه الحزم مع أجزاء DNA قياسية توضع كمعلمات في بئر ثاني. و يستفاد من تقانة southern blot لتحديد أطوال المورثات و قطع الـ DNA و عدد نسخ هذه المورثة في الجينوم.



شكل. مراحل تقانة Southern blot

1- قطع الـ DNA باستخدام إنزيمات القطع.

2- بالرحلان الكهربائي على هلامة الأغاروز.

3- نقل قطع الـ DNA من الأغاروز إلى غشاء ذو نوعية خاصة من النتروسيللوز.

4- يهجن الـ DNA مع مسابر الـ DNA الموسومة بالفوسفور المشع p32.

5- بالتصوير الإشعاعي الذاتي.

تقانة Northern blot:

يفصل الـ RNA بالرحلان الكهربائي على هلامة الأغاروز إلى قطع مختلفة الحجم, تنقل قطع الـ RNA مفردة السلسلة بعد ذلك من الأغاروز إلى غشاء ذو نوعية خاصة Membrane و تدعى هذه العملية بتبقع Northern حيث يهجن الـ RNA مع مسابر من الـ DNA الموسومة بالفوسفور المشع p32. و يستفاد من تقانة Northern blot في تحديد أماكن نسخ المورثة و التعبير الجيني.

تقانة Western blot (الطريقة المناعية):

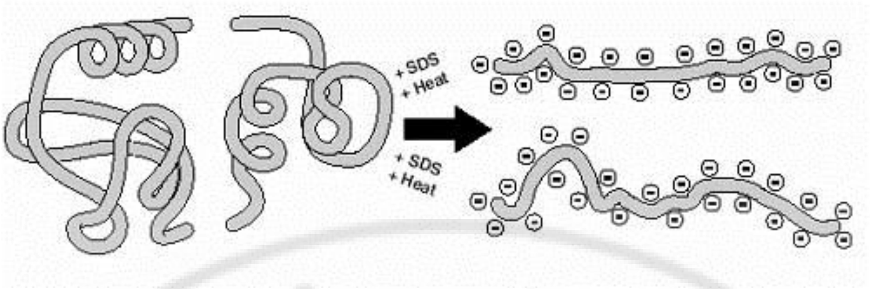
تعتمد هذه الطريقة على استخدام الطريقة المناعية لفحص الناتج البروتيني للمورثة المنسلة في عينة أو مستخلص ما كبديل عن طريقة الفحص بمسابر الحموض النووية.

خطوات الطريقة:

الفصل على هلامة متعدد الأكريلامايد:

الطريقة الأكثر شيوعاً للفصل الكهربائي للبروتين هي استخدام هلامة متعدد الأكريلامايد polyacrylamide ومحاليل تحتوي على كبريتات دوديسيل الصوديوم (Sodium Dodecyl Sulfate SDS) و هناك طريقتين لتنفيذ ذلك:

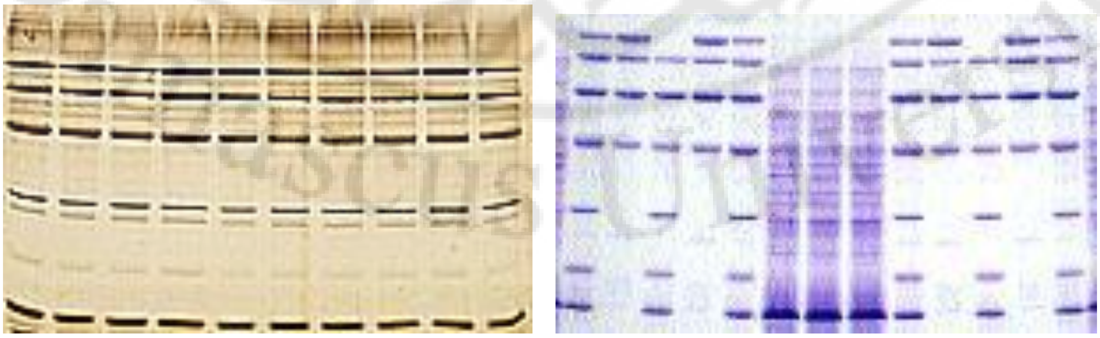
a - SDS-PAGE: أي الفصل الكهربائي لهلامة كبريتات دوديسيل الصوديوم متعدد الأكريلامايد SDS-Polyacrylamide Gel Electrophoresis. تحافظ مادة الـ SDS على سلسلة البروتينات في حالة مفككة denatured state (مثل تحويل الروابط ثنائية الكبريت S-S إلى SH و SH) و بذلك يسمح لفصل البروتينات حسب وزنهم الجزيئي. كما تقوم هذه المادة بشحن البروتينات بالشحنة السالبة ونقلها إلى القطب الكهربائي الموجب (شكل).



شكل. تأثير مادة الـ SDS على البروتينات.

b- SDS- PAGE ثنائي الأبعاد: كما يشير الاسم فإن هذه الطريقة تشمل هجرة سلسلة البروتينات في بعدين. في البُعد الأول تقوم السلسلة البروتينية بالانفصال حسب نقطة التعادل الكهربائي و تُقاس نقطة التعادل الكهربائي لبروتين مُعين بواسطة الرقم النسبي للأحماض الأمينية الموجبة (كاللايسين) والسالبة (كالغلوتامين), وتقوم الأحماض الأمينية السالبة بتزويد أعلى نقطة تعادل كهربائي, و من جهة أخرى تقوم الأحماض الامينية الموجبة بتزويد أقل نقطة تعادل كهربائي. أما في البعد الثاني تنفصل السلسلة البروتينية حسب وزنها الجزيئي.

يمكن رؤية البروتينات المتوضعة على الهلامة بإضافة صبغة أزرق الكوماسي فتظهر البروتينات بشكل حزم ملونة باللون الأزرق (Coomassie Blue)، كما يمكن استخدام التلوين بنترات الفضة عندما يكون التلوين بأزرق الكوماسي غير فعال. و لا بد من إضافة مؤشر يعبر عن الطول الجزيئي *KDa*. ثم يتم نقل البروتينات باستخدام تيار كهربائي لسحب البروتينات من الهلام إلى غشاء مصنوع من النيتروسيليوز بالخاصية الشعرية Capillary action. إن التصاق البروتينات على الغشاء بسبب تفاعلات كارهة للماء hydrophobic interactions، بالإضافة إلى التفاعلات المشحونة بين الغشاء والبروتين. يمكن التأكد من نقل البروتين إلى الغشاء بصبغ الغشاء بصبغة أحمر البونسو Ponceau S.

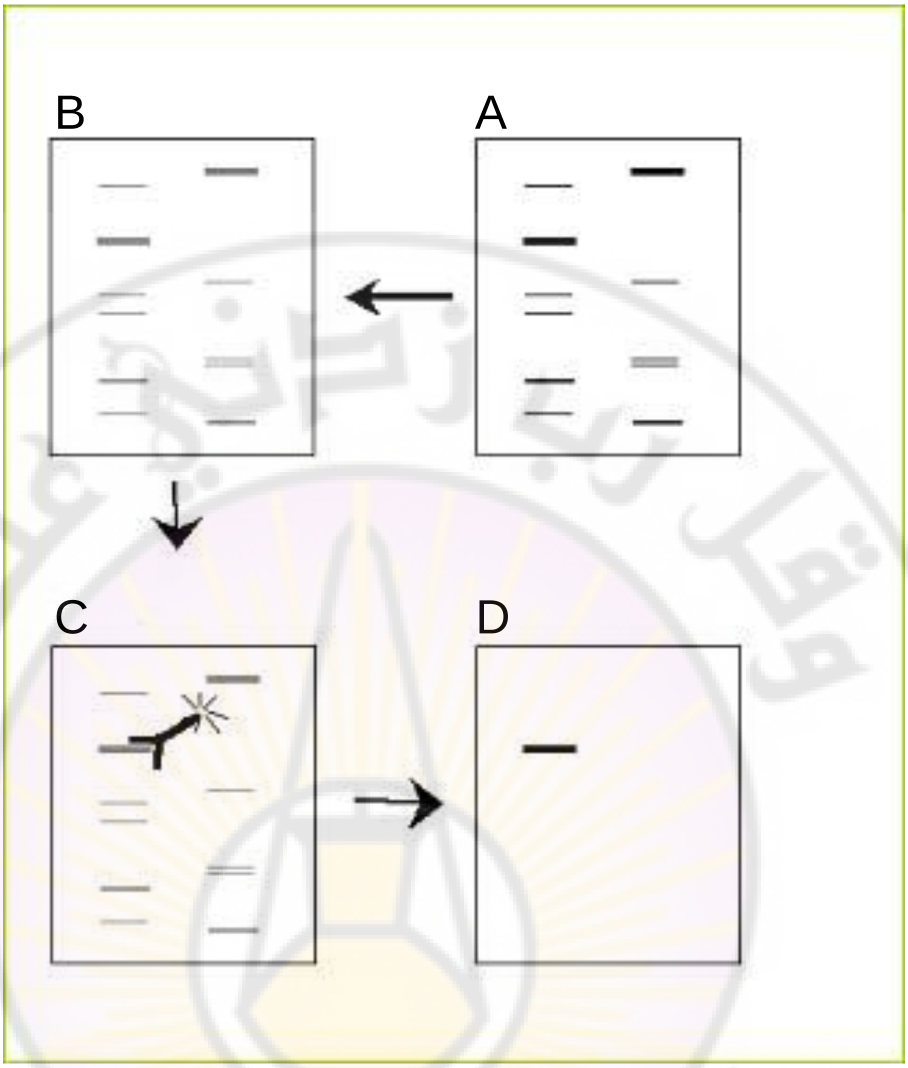


شكل. A : استخدام صبغة أزرق الكوماسي

B : صبغة نترات الفضة

يتم التحقق من وجود البروتين المطلوب على الغشاء عن طريق إضافة جسم مضاد معدل مرتبط بإنزيم ما و يكون هذا جزءاً من الإستجابة المناعية. بعد حضن الغشاء في محلول مخفف من البروتين – عادة ما يكون هذا البروتين هو ألبومين مصل البقر Bovine Serum Albumin المعروف بالـ BSA أو حليب مسحوب الدسم مع مقدار صغير من منظف مثل توين Tween 20 و من الجسم المضاد الأولي (عادة بتركيز بين 0,5 ميكروغرام/مل إلى 5 ميكروغرام/مل) مع التحريك الخفيف.

بعد ذلك لا بد من غسل الغشاء لإزالة الأجسام المضادة الأولية غير ملتصقة، يتم إضافة جسم مضاد آخر للغشاء، موجه نحو جزء الجسم المضاد الأولي. وهذا يعرف بالجسم المضاد الثانوي، و بسبب خواصه المستهدِفة و عادة ما يكون الجسم المضاد الثانوي مرتبط بجزيئية بيوتين أو إلى إنزيم مراسل مثل فسفاتاز قلوي alkaline phosphatase أو بيروكسيداز. هذا يعني أن عدة أجسام مضادة ثانوية ستلتصق بجسم مضاد أولي واحد وتقوم بتعزيز الكشف عن البروتين. و يتم الكشف عن وجود البروتين و غيابه بإحدى الطرائق التالية: الكشف اللوني Colorimetric detection و الإضاءة الكيميائية Chemiluminescence و الكشف المشع Radioactive detection و الكشف الفلوري Fluorescent detection. و يستفاد من تقانة Western blot في تحديد الوزن الجزيئي للبروتين و تمركز البروتين في المتعضيات المختلفة للخلية (شكل).



شكل. مراحل Western Blot .

A : الرحلان الكهربائي في هلامة متعدد الأكريلامايد.

B : نقل البروتينات من الهلام إلى غشاء مصنوع من النيتروسيليوز.

C : إضافة أجسام مضادة.

D : الكشف عن البروتين.

ميزات الهندسة الوراثية

– السرعة في نقل المورثات من كائن حي إلى آخر وذلك بمرور أسابيع قليلة ومحددة بدلاً من الطريقة التقليدية والسائدة والمتعارف عليها في تغيير التركيب الجيني وباستعمال التهجين والتربية والتي تحتاج إلى سنوات طويلة.

– نقل المورثات بطرق مباشرة ومضمونة النتائج بحيث لا تسمح بنقل المورثات غير المرغوبة التي قد تكون مرتبطة : بالكروموسوم (الصبغي) والتي قد تنتقل بالطرق التقليدية مسببة لأهم مشاكل وعيوب طريقة التهجين والتربية العادية.

– نقل المورثات بواسطة الهندسة الوراثية قضى على البعد النوعي بين الكائنات الحية، حيث يمكن نقل صفة مرغوبة من بكتريا إلى إنسان أو نبات (قمح) مثلاً أو العكس، خلاف ما هو متبع بالطرق التقليدية

– نقل مورثات خالية من الأمراض وذات صفات وراثية مرغوبة إلى كائنات حية جديدة تنقصها هذه الصفات.

أهم تطبيقات الهندسة الوراثية:

1– المجال الطبي يعاني الإنسان من العديد من الأمراض الوراثية الناتجة عن حدوث الطفرات الوراثية الضارة في اتحاد قواعد الحمض النووي المكون للمورث وأيضا نتيجة لحدوث بعض الشذوذ الكروموسي في الخلية، مما يؤدي إلى خلل في فعالية البروتين المنتج والمتسبب في أعراض المرض والتي تختلف طبيعتها وشدتها اعتمادًا على نوع وطبيعة المورث الطافر.

2– المجال الصناعي:أهمها إنتاج بروتينات وهرمونات مهمة للإنسان بواسطة أنواع من البكتريا على سبيل المثال:–

إنتاج هرمون النمو لزيادة الطول للأشخاص قصيري القامة ,إنتاج هرمون الانسولين الخاص بمرض السكر.إنتاج لقاح للتطعيم ضد مرض الالتهاب الكبدي (B).

3– المجال الزراعي: إنتاج اصناف ثنائية جديدة مهندسة وراثيًا مقاومة للأمراض والحشرات و مبيدات الأعشاب المسببة لنقص كبير في الإنتاج الزراعي وأيضًا تحسين الصفات الاقتصادية مع زيادة الإنتاج كمًا ونوعًا. أتاحت الحصول على محاصيل زراعية وفيرة أكثر ملاءمة للنمو في ظروف مناخية معينة، كما أتاحت إدخال تحسينات على المواد الكيميائية المستخدمة في الزراعة (كالأسمدة ومبيدات الأعشاب الضارة والمواد المستخدمة في مكافحة الحشرات والأعشاب الضارة). وبفضل هذه التكنولوجية، صار من الممكن استنباط أنواع جديدة من النباتات ذات خصائص مُحَسنة وذلك بسرعة أكبر ودقة أفضل من ذي قبل (على سبيل المثال القدرة الإنتاجية العالية والتكيف مع ظروف مثل التربة ذات الملوحة والأراضي المشبعة

بالماء ومقاومة بعض مبيدات الأعشاب الضارة والأوبئة) و هي أنواع يمكن أن تتكاثر بشكل أفضل. كما أنه يتم حاليا إنتاج نباتات مثبتة للأزوت (nitrogen-fixing plants). إن عملية استنبات الأنسجة النباتية ستكون عظيمة الفائدة بالنسبة للبلدان النامية ذات الاقتصاديات الزراعية الضعيفة.

4- المجال البيئي:إنتاج المبيدات الحيوية عن طريق الهندسة الوراثية لإحلالها بدلا من استخدام المبيدات الكيميائية التي تسبب وتزيد من التلوث البيئي، وأيضًا إنتاج أنواع من البكتريا المهندسة وراثيًا تستطيع أن حلل مخلفات المدن والقمامة والمخلفات الصناعية وتلوث البحار من المواد البترولية وذلك عن طريق إضافة مجموعات متتالية من البكتريا المصنعة تعمل على تحويل المواد العضوية المعقدة التركيب الكيميائية والمرتفعة السمية إلى مواد بسيطة التركيب وأقل سمية وأخيرًا تعمل على تغذية باقي هذه المواد البسيطة وتحويلها إلى جزيئات بسيطة جدًا ليس لها تأثير ضار على البيئة وصحة الإنسان.

Damascus University