الفصـــل السادس

6

الأحمـــاض النوويـــة

Nucleic Acids

obeikandl.com

obeikandl.com

الفصـــل السادس

الأحمـــاض النوويـــة

Nucleic Acids

الأحماض النووية جزيئات كبيرة توجد فى كل الكائنات الحية ، وهى نوعان ، أولهما حمض دى اوكسى ريبونيوكليك (ح ن د) Deoxyribonucleic acid (DNA) ، والآخر حمض ريبونيوكليك (ح ن ر) Ribonucleic acid (RNA) ، وللحمضين أهمية بيولوجية قصوى ، حيث يمثل ح ن د المادة الوراثية التى تختزن فيها المعلومات الوراثية ، كما أن المواد البروتينية تتكون فى الخلايا بناء على آلية معينة يتحكم فيها الحمض النووى (ح ن ر) . وتمثل المعادلة الآتية جوهر علم البيولوجيا منذ مايقرب من أربعين عاما وحتى الوقت الحالى :

$$DNA \rightarrow RNA \rightarrow Protein$$

وبناء على ذلك فإن الدراسة الهستوكيميائية للأحماض النووية فى الكائنات المختلفة تعتبر ذات أهمية بالغة سواء فى الحالات السوية أو المرضية .

وكان العالم الألمانى فردرتش مايشر (١٨٤٤ – ١٨٩٥) أول من استطاع فصل حمض ح ن د ، وكان ذلك عام ١٨٦٨ من أنوية خلايا صديدية ، وقد حصل على المادة نفسها من الحيوانات المنوية لأسماك السالمون ، ووجد أن كميات ح ن د فى الأنسجة المختلفة لحيوان ما – ماعدا المناسل – ثابتة ولكنها تختلف من نوع لآخر . وقد عرف بعد ذلك أنه يوجد فى الخلايا حمض نووى آخر هو ح ن ر ، وأن كميات هذا الحمض تختلف عن بعضها فى خلايا الأنسجة المختلفة ، كما تختلف في الخلية نفسها من وقت لآخر حسب دورة أنشطتها البيولوجية المختلفة . وقد تتابعت جهود العلماء عبر سنوات طويلة للكشف عن طبيعة تركيب الأحماض النووية ، وقد عرف فيما بعد أن النيوكليوتيدات Nucleotides تمثل الوحدات البنائية لجزىء الحمض النووى ، وتتركب كل نيوكليوتيد من جزىء سكر خماسى ، يرتبط من ناحية ذرة الكربون رقم ٥َ بمجموعة الفوسفات ، ومن ناحية ذرة الكربون رقم ١َ بقاعدة

نيتروجينية . والقواعد النيتروجينية على طرازين ؛ أحدهما هو البيورينات Purines ، وهي مركبات عضوية " ثنائية الحلقات dicyclic وهي تشمل الأدنين Adenine والجوانين Gua-nine . أما الطراز الثاني فهو «البيريميدينات » Pyrimidines ، وهي مركبات عضوية «أحادية الحلقة » monocyclic وتشمل الثايمين Thymine والسيتوسين Cytosine واليوراسيل Uracil .

وقد قام Chargaff فيما بين عامي ١٩٤٩ ، ١٩٥٣ بدراسة القواعد النيتروجينية لمادة ح ن د بالتفصيل ووجد أن نسبها لبعضها البعض تختلف كثيرا من نوع لآخر ، على أنه وجد أن هناك نظاماً حاكماً لها وهو أن كمية الأدنين تساوى كمية الثايمين ، بينما كمية السيتوسين تساوى كمية الجوانين ، وبمعنى آخر أن كمية C + G تساوى كمية A + G وعلى ذلك ، فإن $\frac{A+T}{C+G}$ ثابتة للنواع الواحد .

وقد عرف أن الأحماض النووية تمتص أشعة الضوء فوق البنفسجي عند موجة طولها ٢٨٠ نانوميتر وأن ذلك يرجع إلى وجود القواعد النيتروجينية .

وتجدر الإشارة إلى أن الثايميدين المشع يستخدم للاستدلال على وجود ح ن د ، ويستخدم اليوريدين المشع للاستدلال على وجود ح ن ر .

ويلاحظ أنه إذا نزعت مجموعة الفوسفات من النيوكليوتيد ، أطلق على المركب الباقي اسم «نيوكليوسيد» Nucleoside ، وعلى ذلك فالنيوكليوسيدات المعروفة هي : أدينوزين Adenosine ، جوانوزين Guanosine ، سيتيدين Cytidine ، يوريدين Uridine ، ثايميدين Thymidine ، ويضاف المقطع الأولى دى أوكسى – Deoxy للدلاله على ال دى أوكسى ريبونيوكليوسيدات Deoxyribonucleosides .

البناء الجزيئى لحمض دي أوكسى ريبونيوكليك

Molecular Organization of DNA

لتوضيح التنظيم الجزيئى لحامض دى اكسى ريبونيوكليك ، قدمت عدة مقترحات أو نظريات كانت من أهمها نظرية العالم «ليڤين» Livine (١٩٥٠) ، عرفت باسم نظرية «رباعية النيوكليتيدات» (Tetranucleotide theory) التى تشير الى أن جزىء هذا الحامض يتكون

من وحدات متتابعة من القواعد النيتروجينية الأربع (أدنين - جوانين - ثيمين - سيتوسين) بكميات أو اعداد متساوية ، أى (١ : ١ : ١ : ١) .

إلا أن العالم «داڤيدسون Davidson» عارض هذه النظرية فيما بعد (١٩٥٢) وإن كان ذلك بصورة جزئية ، حيث أعلن أن كمية هذه القواعد ليست متساوية كلها مع بعضها ، ولكن كمية الأدنين تساوى كمية الثيمين (١ : ١) وكمية الجوانين تساوى كمية السيتوسين (١ : ١) غير أن مجموع كميتى الأدنين والثيمين قد يكون أكثر أو أقل من مجموع كميتى الجوانين والسيتوسين .

أى أن $A = T$ ، $G = C$

ولكن $A + T \lesseqgtr G + C$

كذلك وجد أن كمية أو أعداد اليوارسيل (u) مساوية لأعداد الثيمين . أى إن $T = U$

وبصورة نهائية ، فإن $A + G = T + C$

وكذلك $U = C$

وقد استدل من ذلك على وجود ترابطات معينة بين هذه القواعد النيتروجينية المختلفة .

نموذج واطسن وكريك (الحلزوني المزدوج)

Model of Watson & Crick (Double hellix)

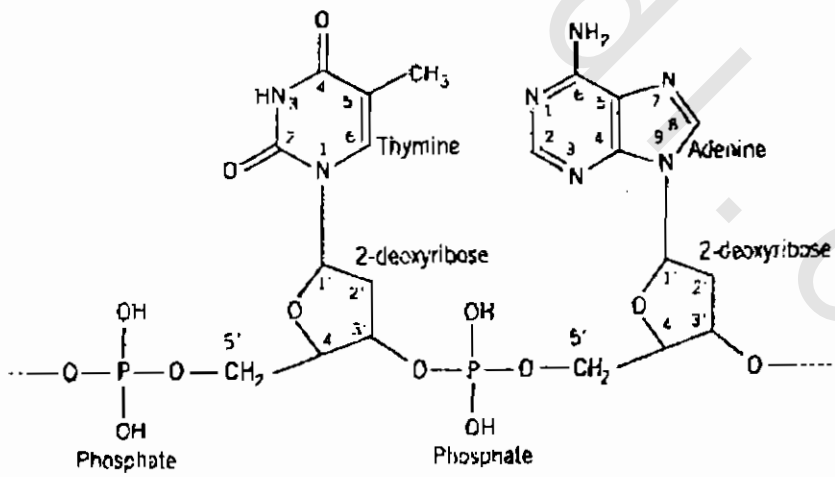
وفى عام ١٩٥٤ ، وفى جامعة كمبردج بانجلترا ، قدم البيولوجيان واطسون (الأمريكى) James Watson ، وكريك (البريطانى) Francis Crick بتقديم نموذج للتركيب الجزيئى لمادة ح ن د ، كما أيدت تجارب عالم الفيزياء ولكنز (النيوزلندى) Maurice Wilkins هذا النموذج. وقد فتح هذا الاكتشاف آفاقاً جديدة فى علم الأحياء ، ومن أجل هذا الانجاز العلمى الكبير منحت جائزة نوبل فى الطب وعلم وظائف الأعضاء للعلماء الثلاثة فى عام ١٩٦٢ ، وكان لهذا الاكتشاف أثر عظيم في مجال علم « البيولوجيا الجزيئية» ، وعلم الوراثة ، «الهندسة الوراثية» .

obeikandl.com

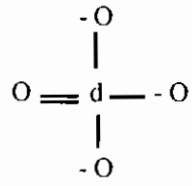
وحسب هذا النموذج ، فإن جزىء ح ن ر يتكون من شريطين أو سلسلتين Strands جانبيتين تتكون كل منهما من السكر الخماسى والفوسفات بطريقة متتابعة بينما توجد القواعدالنيتروجينية من هاتين السلسلتين بصورة محددة . وبذلك يبدو هذا التنظيم على هيئة السلم الخشبى ، الذى يتكون من جانبين (من السكر والفوسفات) بينما تتكون درجات السلم من القواعد النيتروجينية . غير أن هذا السلم يلتف حول بعضه متخذا شكل السلم الحلزونى . ونظرا لأنه يتكون من جانبين أو سلسلتين ، فإنه يشار إليه باسم اللولب أو "الحلزون المزدوج" double helix .

وقد وجد أن سمك هذا الحلزون حوالى ١٠ أنجستروم وهو سمك منتظم بالنسبة للتركيب بأكمله ، بينما يبلغ طول اللفة الواحدة حوالى ٣٤ أنجستروم gyte وقد وجد أن جزىء الحامض يتكون من عدة آلاف من هذه اللفات وتحتوى اللفة الواحدة على عشرة أزواج من القواعد النيتروجينية .

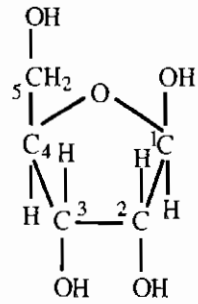
ومن الواضح أن الوحدة البنائية فى جزىء ح ن د هى النيوكليوتيد ، ويتكون جزىء ح ن د من آلاف منها ولذلك يطلق عليه أحياناً عديد النيوكليوتيدات Polynucleotide . ويلاحظ أن حمض الفوسفوريك يستخدم مجموعتين من مجموعاته الحمضية الثلاث فى روابط الداى استر diester ٣ ، ٥ ، وتعزى الخواص الحمضية لحمض ح ن د إلى المجموعة السالبة الثالثة ، وهى تمكن ح دن د من الاتحاد بالهستونات ، كما يعزى اليها قابلية حمض ح ن د للاصباغ القاعدية .



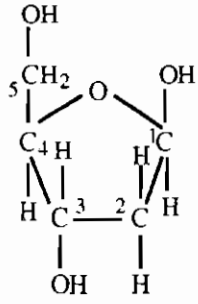
جزء من جزىء ح ن د لتوضيح الروابط الفوسفاتية بين نيوكليوتيدات متتالية



مجموعة الفوسفات
Phosphate group

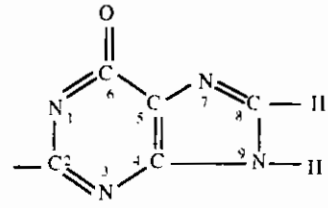


السكر الخماسى « ريبوز»
Pentose sugar
(ribose)

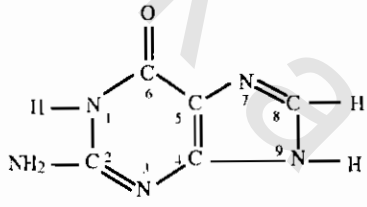


السكر الخماسى «دى أكسى ريبوز»
Pentose sugar
(deoxyribose)

البيورينات
Purine bases

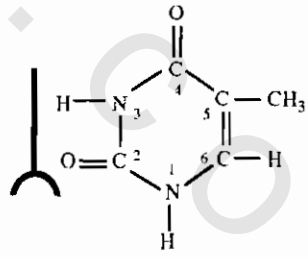


أدينين
Adenine

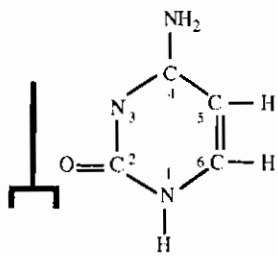


جوانين
Guanine

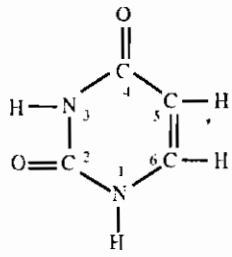
البيريميدينات
Pyrimidine bases



ثيمين
Thymine



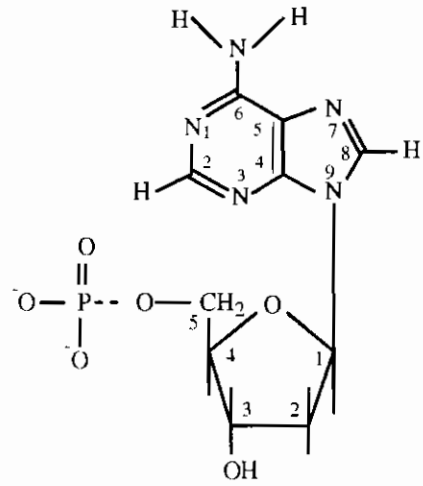
سيتوسين
Cytosine



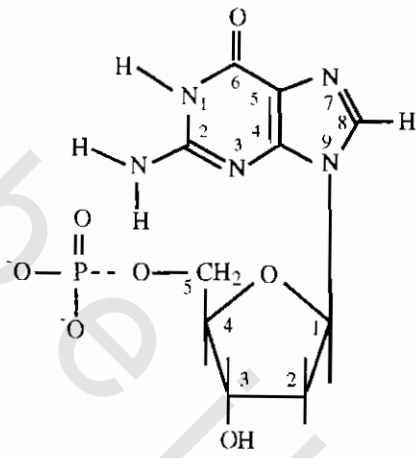
يوراسيل
Uracil

obeikandl.com

نيوكليوتيدات البيورينات
Purine nucles tides

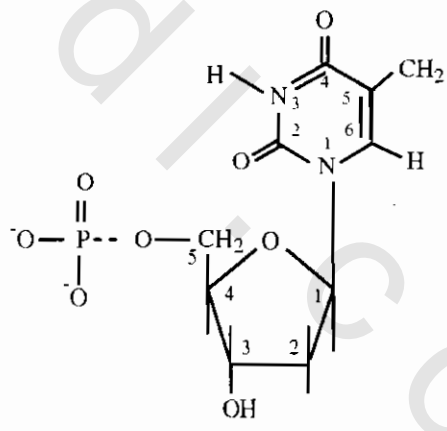


نيوكليوتيدة أدنين
Adenine nucleotide

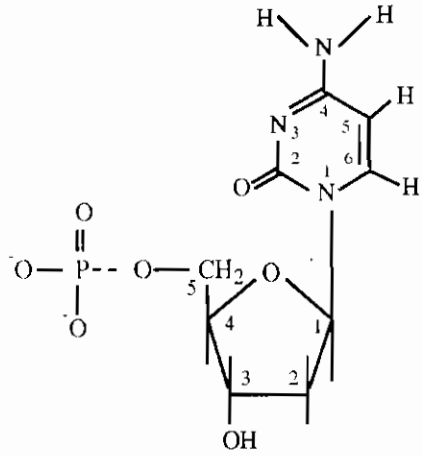


نيوكليوتيدة جوانين
Guanine nucleotide

نيوكيلوتيدات البريميدينات
Pyrimidine nucleotides



نيوكليوتيدة ثيمين
Thymine nucleotide



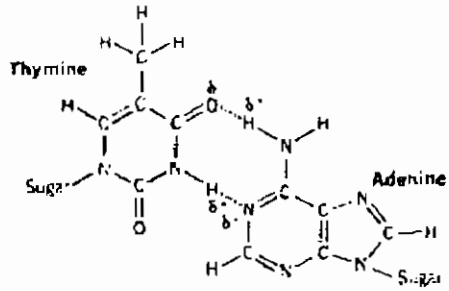
نيوكليوتيدة سيتوسين
Cytosine nucleotide

Part of DNA mslecule showing Phosphite dicster

linkage between successive nucleotides

تكوين الروابط الهيدروجينية بين القواعد النيتروچينية

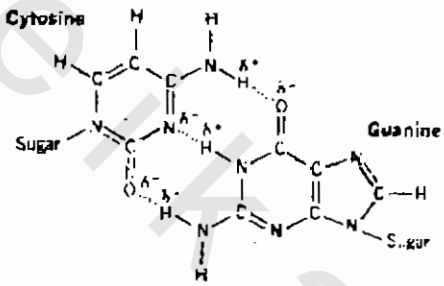
Formation of hydrogen bonds between the nucleotides .



رابطتا هيدروچين بين الأدنين والثيمين

Two hydrogen bonds between

adenine and thymine



ثلاث روابط هيدروچينية بين الجوانين والسيتوسين

Three hydrogen bonds

between guanine and cytssine

القواعد النيتروچينية ودورها في تثبيت النموذج الحلزوني لحامض دي أكسي ريبونيوكليك

Significance of nitrogensus bases in stabilizing the helical structure of DNA:إن توصل العالمين واطسن وكريك لهذا النموذج اللولبى أو الحلزونى لم يتم هكذا عن طريق الصدفة أو بيسر وسهولة ، ولكنه تم بعد دراسات مستفيضة من النواحى السيتولوچية والبيوكيميائية والميكروسكوبية المختلفة بما فيها الميكروسكوب الألكترونى لتوضيح كيفية تماسك شريطى أو سلسلتى ح ن د ببعضهما والدور الذى تلعبه القواعد النيتروچينة فى هذا المجال . وبطبيعة الحال ، فإن هذين العالمين قد استفادا أيضا فائدة مؤكدة من جميع الدراسات والبحوث السابقة فى هذا الخصوص .

وبداية ، فقد أصبح مؤكدا أن جزىء هذا الحامض يتكون هيكله الأساسى من شريطى السكر والفوسفات بطريقة متتابعة بالغة الدقة ، وتفصل بينهما مسافة محددة . وقد أدى ذلك إلى الاستنتاج بضرورة وجود القواعد النيتروچينية بين هاتين السلسلتين . وبقى السؤال : كيف تنتظم هذه القواعد مع بعضها لتحقيق هذا النمط المتماسك المنتظم ؟

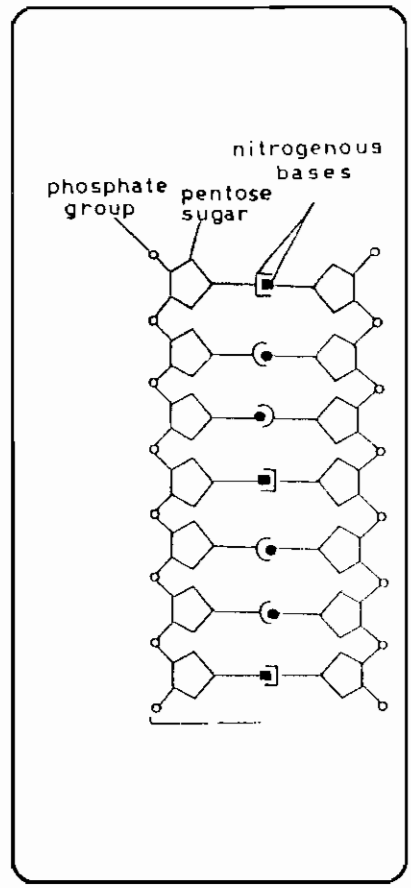
وقد اقترحت فى هذا الشأن اقتراحات مختلفة يمكن إجمالها فيما يلى :

أ – يوجد كل اثنين من البيورينات بجوار بعضهما فى المسافة أو الحيز بين السلسلتين، ولكن هذا الافتراض استبعد لأن أبعاد هاتين القاعدتين (وكل منهما ثنائى الحلقة) لاتكفى لهما تلك المسافة المحددة .

ب – افترض بدلا من ذلك أن هذه المسافه يشغلها اثنان من البيريميدينات (وكل منهما أحادى الحلقة) ولكن المسافة بين السلسلتين أكثر اتساعا بما لايسمح بثبات هاتين القاعدتين.

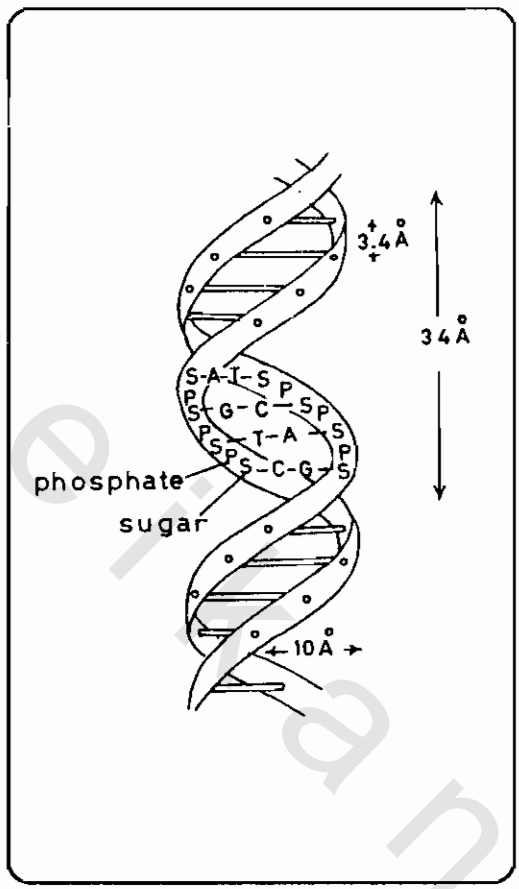
جـ – كان الافتراض الثالث أن هذه المسافة يشغلها أحد البيورينات (ثنائى الحلقة) وأحد البيريميدينات (أحادى الحلقة) ووجد أن هناك تطابقاً تاماً بين المساحة التى يحتلانها والمسافة الموجودة بين سلسلتى جزىء الحامض .

وبذلك تم تحديد هذا التنظيم ولكنه وجد أنه ليس أى بيورين يمكن أن يتماسك مع أى بيريدين . وبعد عدة تجارب ومحاولات تبين أنه لابد من تواجد البيورين (أدنين " A " بجوار البيريميدين (ثيمين "T") لكى يتماسكان معا وتنشأ بينهما روابط هيدروچينية بعد تفاعلات حيوية معينة تلعب فيها الإنزيمات دورا أساسيا . وبالمثل لابد من تواجد البيورين (جوانين " G ") بجوار البيريميدين (سيتبوسين "C") حتى ترتبطان معا أيضا بالروابط الهيدروچينية ، وتكون هناك رابطتان بين الأدنين والثيمين وثلاث روابط بين الجوانين والسيتوسين A= T G ≡ C.



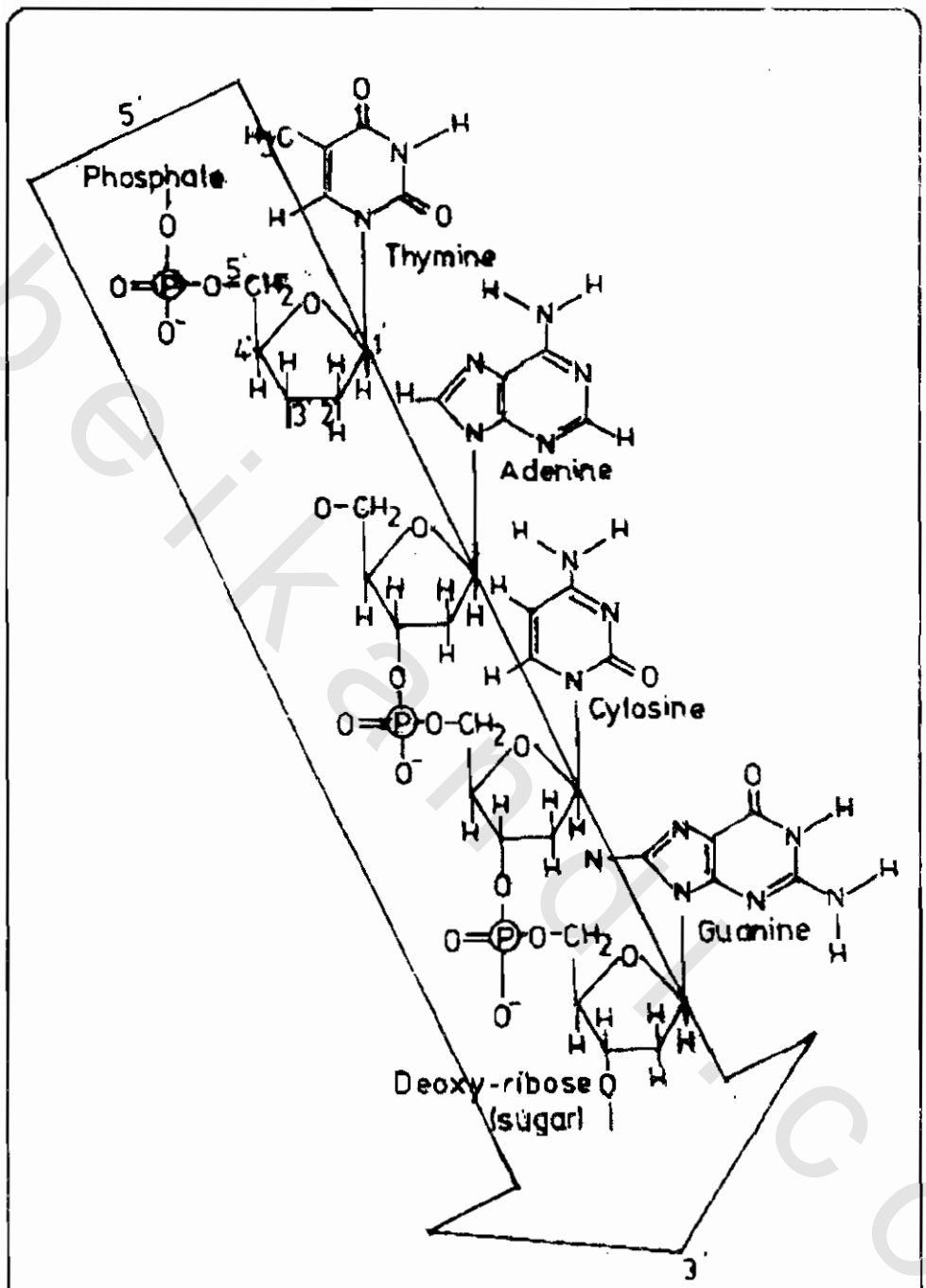
جزء غير ملتف من جزىء « ح ن د »

Uncoilled part of DNA molecule



جزء من الحلزون المزدوج لجزىء « ح ن د »

Part of the double helix of DNA .



قطعة من جزيء ح ن د

part of DNA molecule

ويتبين مما تقدم أنه إذا كان تتابع القواعد النيتروچينية فى جزء من أحد الشريطين مثلا 3 TCCAA 5 ، فإن قطعة الشريط الآخر التى تتكامل معها يكون ترتيب قواعدها النيتروجينية 5 AGGTT 3 . ويتضح من ذلك أن شريطى جزىء ح ن د متوازيان عكسيا Antiparaller حيث إن الطرف ٣ لأحد الشريطين والطرف ٥ للشريط الآخر يكونان فى الناحية نفسها .

نماذج بنائية أخرى :

أوضحت تجارب بعض العلماء بعد ذلك وجود طرز بنائية أخرى لجزىء حمض ح ن د تختلف فى بعض التفاصيل عن النموذج الذى قدمه واطسون وكريك ، فمثلا ، بينما تحتوى الدورة الكاملة فى حلزون واطسون وكريك على عشرة أزواج من القواعد النيتروجينية فإن تجارب هؤلاء العلماء قدمت نماذج تحوى 11 زوجا من القواعد النيتروجينية فى الدورة الكاملة من الحلزون .

ومن الجدير بالذكر أن العالم رتش Rich أكد فى عام ١٩٧٩ ما قال به من قبل العالمان " بول وجوفين " F.M.Pohl & T.Jovin بوجود حمض ح ن د يسارى الالتفاف ، على عكس النموذج الذى قال به واطسون وكريك اليمينى الالتفاف والذى يوصف بأنه B-DNA .

ويلاحظ أنه فى الطراز يسارى الالتفاف يتبع شريطا سلسلة (فوسفات – سكر) نظاما متعرجا ، ويوصف هذا الطراز بأنه Z- DNA وهو يوجد مثلا فى " كروموسومات البوليتين " Polytene للغدد اللعابية لذبابة الدروسوفلا Salivary glands of Drosophila ، حيث يوصف جزىء ح ن د المرتبط شريطاه معا بالصورة العادية أو الأصلية native .

فصل (فك) والتحام شريطى ح ن د :

أمكن للعلماء – اعتماداً على أن الروابط بين القواعد النيتروجينية لشريطى حمض ح ن د ضعيفة (هيدروجينية) فك شريطى الجزىء باستخدام المثبتات أو الحرارة أو درجة pH قاعديه فى ظروف معينة ، ويطلق على عملية فصل الشريطين اسم " الفك " Denaturation أو التنويب أو الانصهار Melting .

وقد وجد أن درجة الحرارة التى تحدث عندها عملية الفك تختلف اعتمادا على مقدار

نصيب الجزىء من ثنائيات القواعد النيتروجينية GC/AT وذلك أنه كلما أحتوى ح ن د على G/C (ذو الثلاث روابط هيدروجينية) أكثر ، ارتفعت درجة الحرارة التى يتم عندها فك الجزىء وذلك لاحتياجها لكمية أكبر من تلك الطاقة . ويمكن بعد ذلك إعادة التحام Annealing أوا عادة ربط Renaturation الشريطين معا واستعادة نمط أو شكل جزىء ح ن د الأصلى . وقد كان ذلك من العوامل الأساسية لتثبيت نظرية واطسن وكريك فى هذا الخصوص .

ويتصل حمض ح ن د فى حقيقيات النواة (الإيوكاريوتات Eukaryotes) بالهستونات الغنية بالليسين وكذلك الغنية بالأرجنين وفق نظام معين وكذلك بالبروتينات غير الهستونية لتكوين الكروماتين ، ولازال العلماء يبحثون الكثير من الاسرار عن عملية تنشيط الكروماتين ، وآلية العلاقة بين حمض ح ن د والهستونات فى حالات مضاعفه جزىء ح ن د ونسخ حمض ح ن ر .

ومما هو جدير بالذكر أنه فى أوليات النواه (البروكاريوتات Prokaryotes) فإن حمض ح ن د يشاهد على شكل جزىء واحد حلقى الشكل يستنند إلى غشاء البلازما ، دون ان تتصل به أية هستونات أو بروتينات أخرى ، ويوصف عندئذ بأنه "عار" naked ، وبذلك لايوجد كروماتين بالمعنى المعروف فى حقيقيات النواة .

العلاقة بين حامض دي أكسي ريبونيوكليك والكروموسومات :

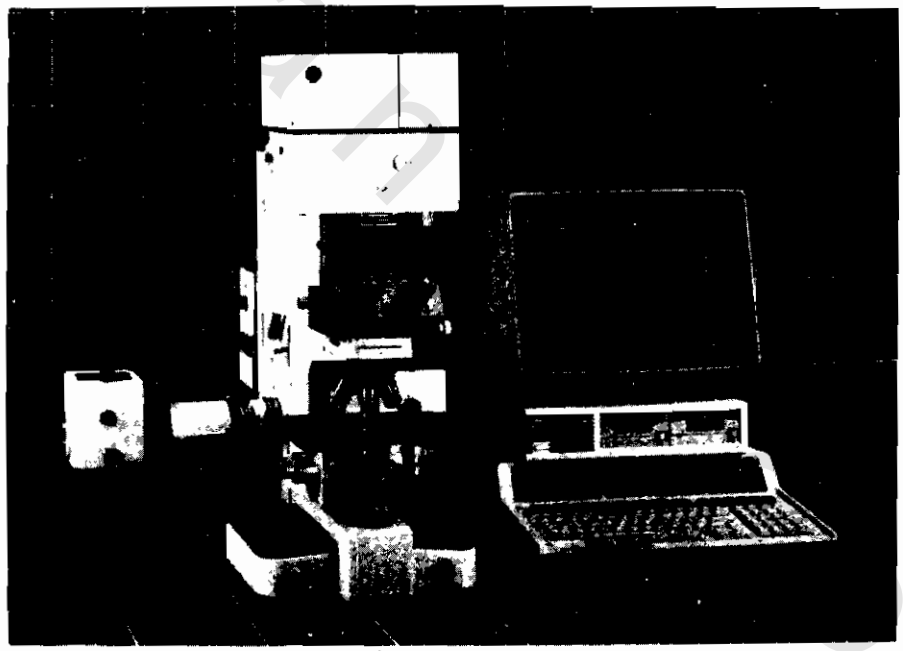
Relation between DNA and Chromosomes :

من المعروف الآن أن كل كروموسوم يتكون بصورة رئيسية من جزىء أو أكثر من ح ن د . وعلى ذلك فإنه توجد علاقة اساسية بين هذه المادة وتكاثر الكروموسومات أو تضاعفها أثناء عملية الآنقسام .

وكما سبقت الآشارة فإن دورة الآنقسام تبدأ بظاهرة لا يمكن مشاهدتها ميكروسكوبيا وهى المرحلة التى يشار إليها بالرمز " S " وهى مرحلة تضاعف أو تناسخ جزيئات ح ن د قبل أن تبدأ فى الكروموسومات ذاتها .

تناسخ ح ن د : Replication of DNA

يفضل فى هذا المجال استخدام لفظ تناسخ أو استنساخ للدلالة على تكوين نسخ جديدة من النموذج الأصلى وليس انقسام أو تضاغف النموذج الأصلى ، وإن كانت المحصلة النهائية هي وجود ضعف عدد أو كمية ح ن د فى الكروموسومات فى المرحلة البينية ، التى لا يزال بها العدد الزوجى (٢ ن) من الكروموسومات ، حتى إذا انقسمت هذه الخلية إلى خليتين بنويتين daughter cells ، احتوت كل منهما على نصف هذا العدد أو تلك الكمية من ح ن د . وبعبارة أخرى ، فإن كل خلية ناتجة سوف تحتوى على نفس العدد أو نفس الكمية من ح ن د . هذا فى الخلايا الجسدية Somatic cells ، أما الخلايا الجنسية التى تحتوى على العدد الفردى من الكروموسومات فإنها ستحتوى على نصف كمية ح ن د التى كانت موجودة فى الخلية الأم .



جهاز القياس الخلوى الضوئى
(لقياس كمية الأحماض النووية)
Cytophotometer

والمعروف أن عملية الاستنساخ هذه تستخدم العديد من الإنزيمات التى تتوفر فى الخلايا المختلفة . وقد تمكن العالم " كورنبرج" Kornberg فى أواخر الخمسينات من عزل العديد من هذه الإنزيمات ، منها (4- deoxyribonucleotide triphosphatases) التى تشتمل على « دى أكسى أدينورين» deoxyadenosine و « دى أكسى سيتوتيدين » deoxycytotidine «ودى أكسى جوانين» deoxyguanine وإنزيم «ثلاثى فوسفات ثيميدين» thymidine triphoshatase وغيرها .

ميكانيكة تناسخ ح ن د : Mechanism of DNA replication

يمكن تلخيص عملية التناسخ هذه على النحو التالى :

أولا : يبدأ خيط أو شريط كل جزىء من جزيئات ح ن د فى الكروموسومات فى إزالة التفافهما حول بعضهما ، ويبدأ ذلك فى أية منطقة معينة من هذا الجزىء ولكنه يستمر حتى يصبح الشريطان منفصلين عن بعضهما تماما . والمعروف أن ذلك يحدث تحت تأثير إنزيمات خاصة معينة .

ثانيا : يبدأ كل شريط – بمساعدة إنزيمات أخرى – فى تكوين أو تخليق نسخة مكملة له تماما Complementary جهاز القياس الخلوى الضوئى (لقياس كمية الأحماض النووية) Cytophotometer بنفس نظام التكامل المألوف بحيث يأتى " أدنين " مقابل " ثيمين " والعكس بالعكس ، كما يأتى " جوانين " مقابل " سيتوسين " والعكس بالعكس أيضا وترتبط كل قاعدتين متجاورتين مع بعضهما بالروابط الهيدروجينية كما سبق ذكره

ثالثا : تستمر عملية البناء هذه وعندما يتم تكوين النسختين أو الشريطين الجديدين ، فإن الشريطين المتكاملين يلتفان حول بعضهما وبذلك يتكون جزىء جديد من ح ن د . ويلاحظ أن هذا الجزىء يتكون من « شريط أصلى أو قديم» old strand وشريط جديد new strand

وتجدر الإشارة إلى أن عملية الاستنساخ هذه متطلب رئيسى وأساسى لانقسام الخلية بحيث يحتوى كل كروموسوم على جزيئين بدلا من جزىء واحد من ح ن د ، حتى إذا انشق كل كروموسوم بعد ذلك إلى كروماتيدتين أو كروموسومين بنويين فإن كلا منهما يحتوى مرة

أخرى على جزيء واحد كما كان الحال فى الكروموسوم الأصلى . وعلى العكس من ذلك ، فإن عملية الاستنساخ هذه قد تحدث خدمة لغرض آخر ليس هو انقسام الخلية .

وهنا تجدر الاشارة مرة أخرى إلى أن هناك ارتباطا شديدا بين دورة الانقسام الخلوية وعملية الاستنساخ هذه . فالمعروف أن الفترة الأولى فى هذه الدورة وهى المرحلة البينية interphase فإنه يشار إلى الفترة الأولى فيها بالرمز " ج١ " "G_1" وهى مرحلة ماقبل الاستنساخ لأنه لا تحدث فيها عمليات التناسخ هذه لأن ح ن د يكون عندئذ فى الأجسام الكروماتينية ولم تتميز بعد الى الكروموسومات .

وتلى ذلك الفترة " س أو S" وهى التى تحدث خلالها عملية النسخ هذه ، وتأتى بعد ذلك الفترة " ج٢ " "G_2" وهى التى تفصل ما بين عملية تناسخ ح ن د وبداية عملية الانقسام الحقيقية والتى يشار اليها بصورة عامة بالرمز "M" والتى « تبدأ بالمرحلة التمهيدية » Prophase .

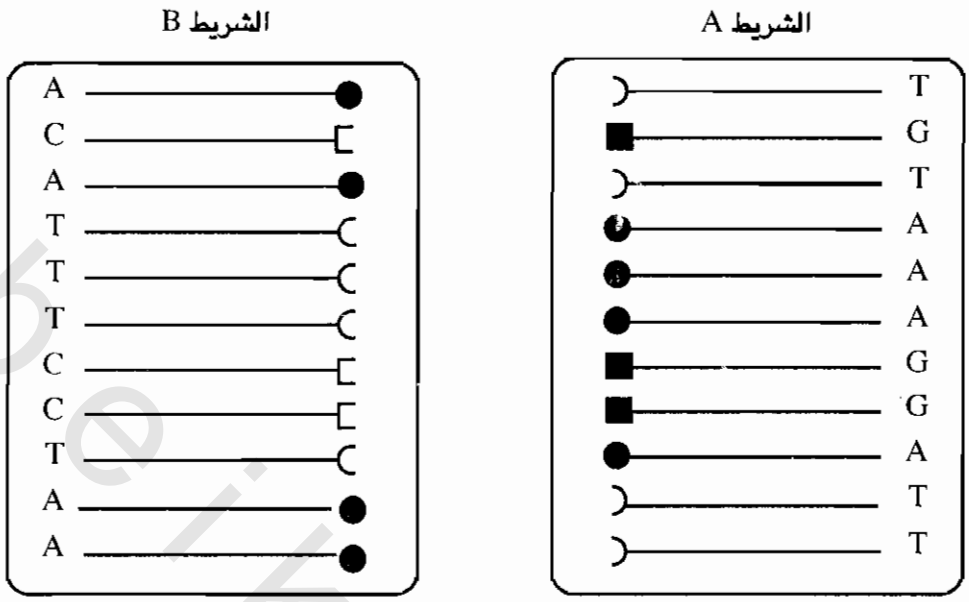
إثبات عملية تناسخ ح ن د :

أجرى العديد من التجارب لإثبات حدوث هذه العملية ، كان من أهمها الطريقة التى استخدمت فيها النظائر المشعة :

Application of radioactive isotopes as an evidence of DNA replication

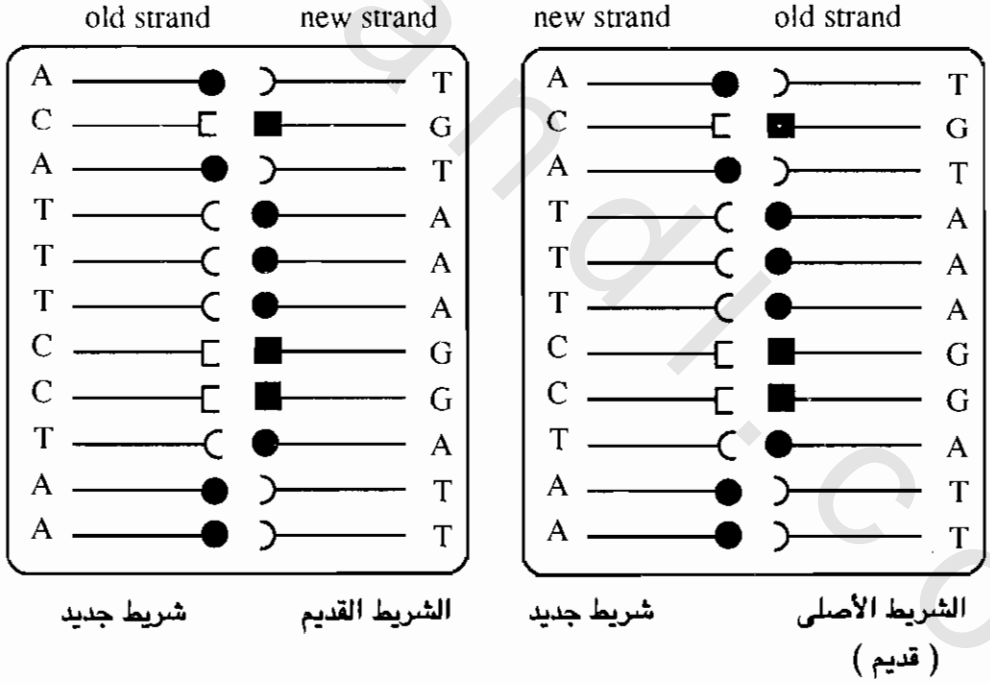
استخدم فى هذه الطريقة عنصر «ثيمدين» المشع ، ثم وضعه مع بقية مكونات ح ن د والإنزيمات البنائية الخاصة به . وتم وضع عدد من الكروموسومات النشطة فى الانقسام من البكتريا أو غيرها فى هذا الوسط . وبعد مرور فترة تعادل استكمال عملية الانقسام ، تم فحص الكروموسومات الناتجة . وقد وجد أنها تحتوى جميعها على العنصر المشع . وقد دل ذلك على أن كل كروموسوم منها يحتوى على شريط جديد مستنسخ من "ح ن د" دخل فى تركيبه هذا العنصر المشع .

وفى المرحلة الثانية من هذه التجارب ، تم نقل هذه الكروموسومات إلى وسط جديد لايحتوى علي العنصر المشع ولكنه يحتوى على جميع مكونات "ح ن د" وإنزيماته البناءة . وبعد اتمام عملية انقسام هذه الكروموسومات تم فحص الكروموسومات الناتجة ميكروسكوبيا حيث تبين أن نصفها فقط يحتوى على العنصر المشع بينما لا يحتوى عليه النصف الأخر . ومعنى ذلك أن النوع الأول هو الذى كان به الشريط الذى يحتوى على العنصر المشع . أما الشريط الجديد فلا يحتوى بالطبع على العنصر المشع . أما النوع الثانى ، فأجد الشريطين فيه لا يحتوى أصلاً على العنصر المشع وكذلك الشريط الجديد المستنسخ .



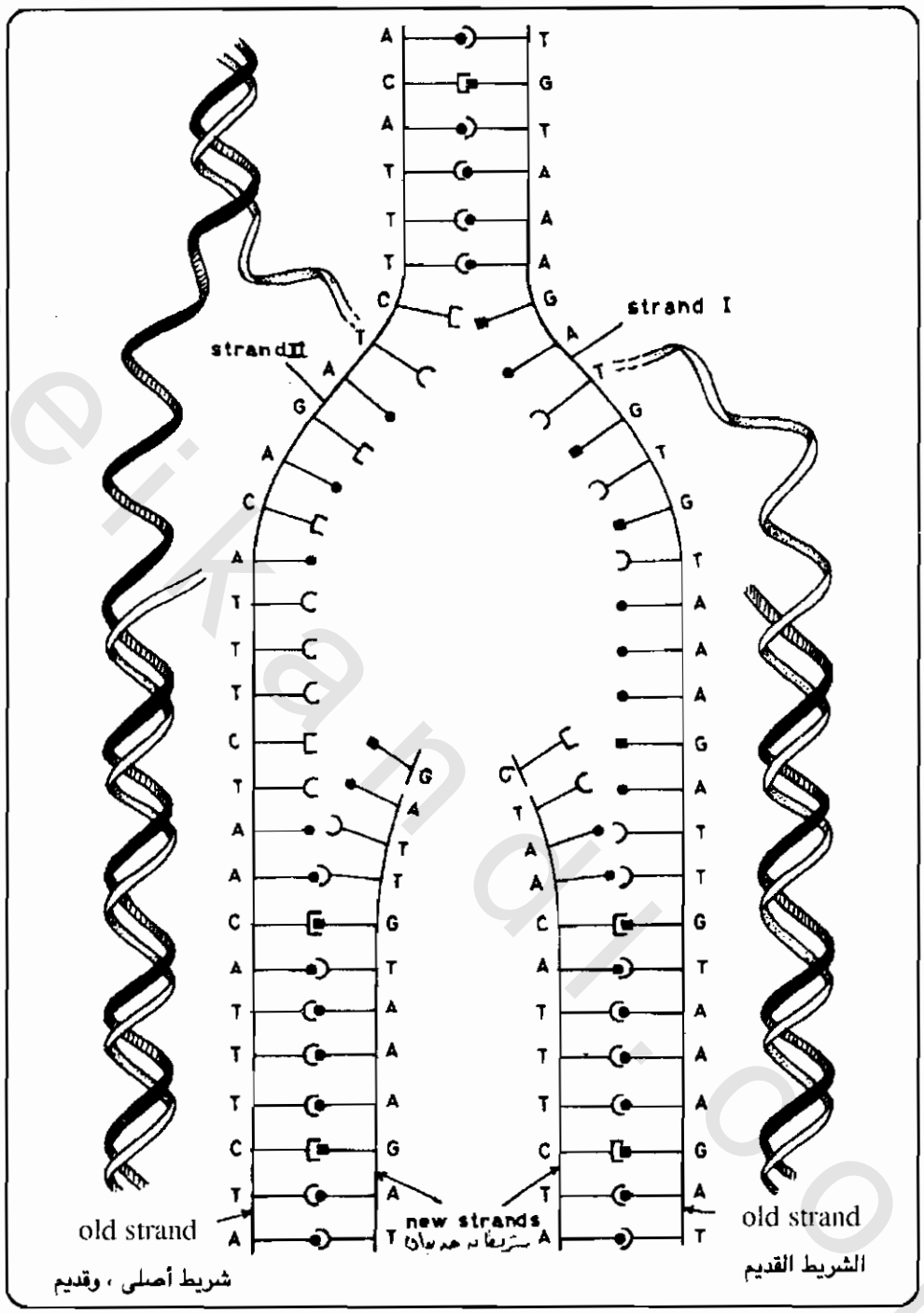
Two separated strands of part of DNA molecule

شريطان منفصلان عن جزيء من ح ن د



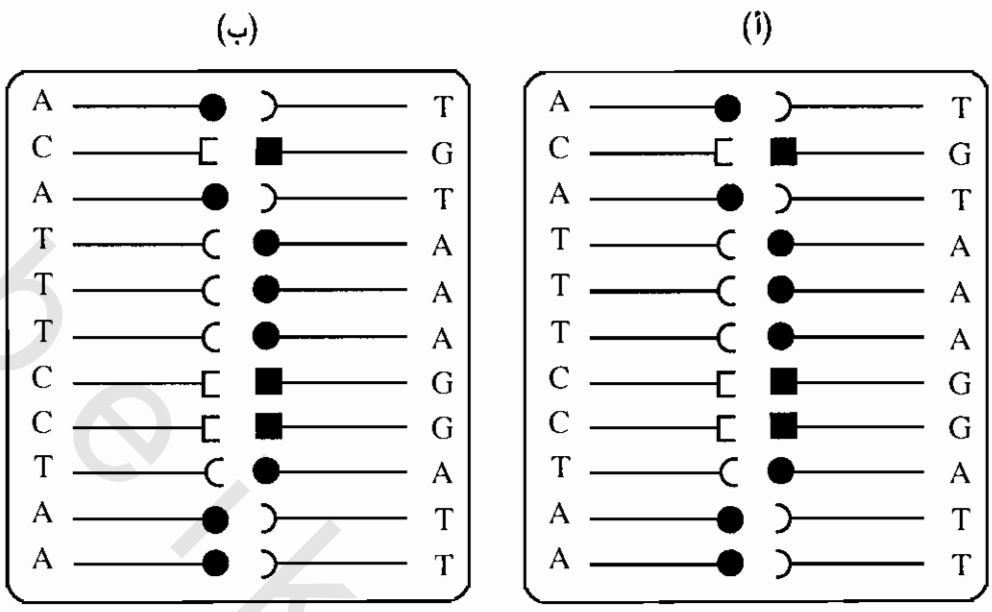
Formation of two molecules of DNA from the original molecule

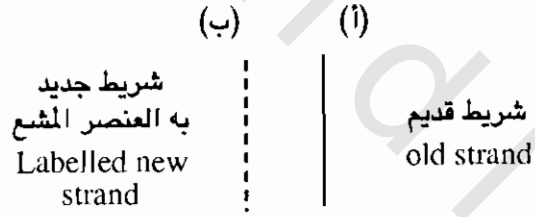
تكوين جزيئين من ح ن د من الجزيء الأصلى



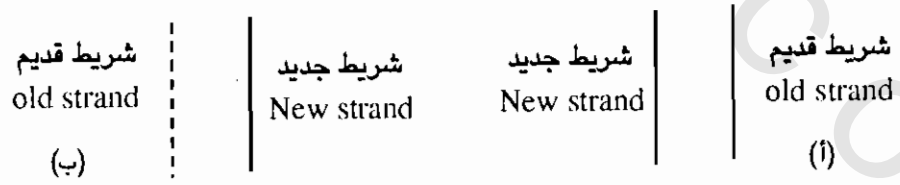
REPLICATION OF DNA

شكل يوضح تناسخ جزيء ح ن د

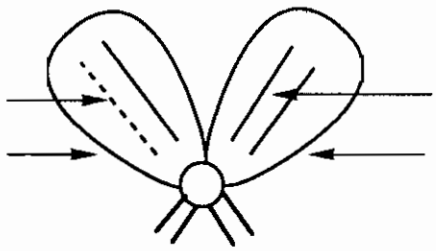




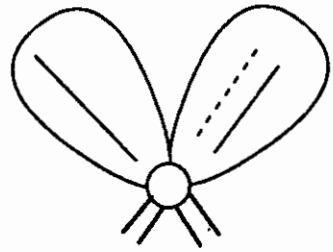
الجيل الأول للكروموسومات



الجيل الثانى للكروموسومات



الجيل الثانى للكروموسومات
نصفها فقط به العنصر المشع



الجيل الأول للكروموسومات جميعها بها العنصر
المشع Lbelled Chromosomes

الجيل الثانى للكروموسومات

الأحماض النووية ودورها في العمليات الوراثية :

Role of nucleic acids in genetic activities.

أصبح من المؤكد الآن أن الأحماض النووية تقوم بالدور الأساسى فى تحديد وانتقال الصفات الوراثية حتى أنه أصبح يشار اليها عامة على أنها « المادة الوراثية » genetic material . وقد جاء ذلك بعد سلسلة طويلة من الدراسات والتجارب . لعله من المناسب الإشارة إلى احدى التجارب المبدئية فى تلك المجالات ، وتصمنت الآتى بصورة مختصرة :

- تم استخلاص ح ن د بصورة نقية من أحد أنواع البكتريا التى تتميز بخاصية وراثية معينة ، وهى وجود وقشرة كربوهيدارتية محيطة بها .
- وضع ح ن د المستخلص فى وسط نقلت إليه بعض البكتريا العارية من تلك الخاصية الوراثية ، أى لا تحتوى على القشرة الكربوهيدراتية ، وتركت حتى إتمام عمليات الانشقاق أو التكاثر
- وجد أن جميع أفراد البكتريا الناتجة قد احتوت على القشرة الكربوهيدراتية ، ومعنى ذلك أن مادة ح ن د قد أكسبت هذه البكتريا صفة وراثية جديدة لم تكن موجودة بها .

obeikandl.com

- عند ما تركت هذه البكتريا لتتكاثر ، ظل النسل الناتج عنها مكتسبا لتلك الخاصية الوراثية الجديدة .

شـفرة الـوراثة Genetic code

بداية ، فإن الاحماض النووية هى المسئولة عن تحديد أنماط البروتينات التى يتم تخليقها أو تكوينها ، وهذه البروتنيات هى التى تنعكس على هيئة خصائص وراثية .

والأساس فى ذلك ، أو الذى يتحكم بصورة أساسية فى تلك العمليات هو نمط تواجد وترتيب القواعد النيتروجينة الموجودة فى جزيئات ح ن د الموجود داخل كروموسومات كل فرد. ومعنى ذلك أن كمية ح ن د التى تعادل (٢٠ × ١٠ $^{-١٢}$) الموجودة فى البويضة المخصبة فى الانسان هى المسئولة عن تحديد أنواع البروتينات فى الفرد الناتج ، وبالتالى تحديد خصائصه الوراثية .

ويقود هذا الى التساؤل : "كيف يقوم ح ن د بالتحكم فى تحديد تلك الأنواع من البروتينات التى تؤدى الى تحديد الخصائص الوراثية أو بعبارة أخرى ، **ما هى طبيعة الشفرة الوراثية التى تلعب ذلك الدور ؟**

وللإجابة عن ذلك السؤال ، تتعين الإشارة الى أن أية تعليمات أو معلومات إنما تتم عن طريق استخدام إشارات أو كلمات معينة . والمعروف أن كل كلمة تتكون من أحرف معينة ، وأن هذه الكلمات تعبر عن معان مختلفة ، ليس فقط لأنها تتكون من أحرف متباينة ولكن قد يكون ذلك بسبب اختلاف ترتيب أو تتابع نفس الحروف فى الكلمات المختلفة . مثال ذلك الأحرف الثلاثة : (T , A , R) يمكن أن تعبر عن معان مختلفة حسب تتابعها ، وذلك مثل (ART - TAR - RAT) وهكذا .

وقياسا على ذلك ، فإن كل جزىء من جزيئات ح ن د ، إنما يتكون بصورة أساسية من أربعة أحرف أبجدية أو عناصر كيميائية ، وهى القواعد النيتروجينية :" أدينين A" وثيمين T "جوانين G" و"سيتوسين C" . ولاشك أن نمط تتابع هذه الأحرف فى كلمات معينة تعطى معان مختلفة . فإذا كانت كل كلمة فى هذا المجال تتكون من ثلاثة أحرف ، فإن هذه الأحرف الأربعة تعطى أعداداً لانهاية لها من المعانى .

وهنا تجدر الاشارة الى حالة مماثلة هى "شفرة مورس" Morse Code التلغرافية التى تتكون من علامتين فقط (نقطة . وشرطة -) . ولكنه من الممكن بهاتين العلامتين فقط إعطاء معان أو معلومات يمكن أن تعطى قاموسا لغويا بأكمله . على أنه فى حال الشفرة genetic Code n أو قاموس الوراثة . ومن الناحية الرياضية فإن عدد الشفرات التى يمكن أن تتكون من أربع قواعد نيتروجينة (الأدنين - الثيمين - الجوانين - السيتوسين - والبوراسيل) هى $(٤)^{٣} = ٦٤$ شفرة مختلفة . ومن الناحية العملية ، فإنه وجد أن ٦١ شفرة فقط من هذه الشفرات هى التى تدل على الأحماض الأمينة وتعرف الشفرات الثلاث المتبقية بانها " شفرات غير دالة none sense codons وبما أن عدد الأحماض الأمينية الأسياسية هو عشرون ، فإن لمعظم الأحماض الأمينية أكثر من شفرة واحدة حيث قد يتراوح عددها بين ١ - ٦ للحمض الأمينى .

obeikandl.com

التجارب البكترية .

للتحقق من ذلك قام العديد من الباحثين باجراء بعض التجارب على أنواع مختلفة من البكتريا خاصة بكتريا « نوروسبورا » تبين منها فاعلية مثل تلك الكلمات (القواعد النيتروچينة) فى تحديد أنواع الاحماض الأمينية التى تندمج مع بعضها مكونة أنواعا من البروتينات المختلفة مشتملة على الإنزيمات التى تلعب دورا أساسيا فى تلك النواحى ، على أنه يجب ملاحظة أن هذا الأمر لا يتوقف على ح ن د فقط ، وإنما تتم هذه العمليات الوراثية فى مجملها عن طريق تداخل أو تعاون الحامضين النوويين معا . على أنه يلاحظ أن بعض الكائنات التى لا يوجد بها ح ن د ولكنها تحتوى على ح ن فقط ، فإن ح ن ر هو الذى يقوم بتجديد وتكوين أنماط البروتينات المختلفة .

الشفرات الوراثية الثلاثة Triplet Csdons	الحامض الأمينى	Amino acid
CGU - CCG	آلانين	Alanine
CCG	أرچينين	Arginine
CAA - GAU	حامض اسبارتيك	Asparfic acid
CAU - AAU - AAC	اسباراچين	Asparagine
GUU	سيستين	Cysteine
GAA - GAU	حامض جلوتاميك	Glutamic acid
ACC - GAU	جلوتامين	Glut amine
GUU	جليسين	Glycine
CAC - CAU	هستدين	Histidene
AUU	أيسوليسين	Isoleucine
CUU - GUU - AUU	ليوسين	Leucine
AUU - AAA	لسين	Lysine
GAU	مثيونين	Methionine
UUU	فينيل آلانين	Phenylolanine
CCU - ACC	برولين	Proline
CCU - CUU	سيرين	Serine
ACC - AAC	ثريونين	Threonine
GGU	تربتوفان	Tryptophane
AUU	تيروسين	Tyrosine
UGU	ڤالين	Valine

جدول يوضح الشفرات الوراثية الثلاثية
Triplet Codo ns

- كما سبق القول ، فإن التعليمات الوراثية (الخاصة بتجديد أنماط تكوين البروتينات، والتى ستنعكس على هيئه خصائص وراثية ، توجد فى الكروموسومات فى أنوية الخلايا ، وهى بالتجديد النظام الذى توجد به البنتروچينات القاعدية فى جزيئات ح ن د فى تلك الكروموسومات.

وبصورة عامة يمكن إيجاز العمليات الوراثية على النحو التالى :

التعاون أو التداخل ح ن د ، ح ر ن في العمليات الوراثية :

Interrelation between DNA and RNA in genetics operations .

كما سبقت الاشارة فإن مادة ح ن د الموجودة فى الكروموسومات (فى أنوية الخلايا) هى التى تصدر التعليمات الخاصة بنمط تكوين البروتينات المتطلبة . والمعروف أن عملية تكوين البروتينات هذه تحدث فى السيتوبلازم

والسؤال الآن : **كيف تنتقل التعليمات الموجودة في الكروموسومات في أنوية الخلايا الي المنطقة الخاصة بتكوين هذه البروتينات وهي سيتوبلازم الخلية ؟**

وردا على هذ السؤال ، تجب الاشارة الى أن أنوية الخلايا - بجانب احتوائها على جزيئات ح ن د فى الكرموسومات - فانها تحتوى أيضا على العديد من الإنزيمات التى تلعب الدور الاساسى فى تكوين مواد معينة ، أهمها جزيئات "ح ن ر" التى وجد أنها تقوم بنقل التعليمات الوراثية (أى التعليمات الخاصة بتحديد أنواع الاحماض الأمينية وبالتالى البروتينات) من النواة الى السيتوبلازم حيث يتم تكوين أو تخليق هذه المركبات طبقا لتلك المعلومات أو التعليمات .

حامض ريبونيوكليك (ح ن ر) وأنواعه :

RNA and its different types :

هو النوع الثانى من الأحماض النووية يتواجد بصورة أساسية فى سيتوبلازم ونويات الخلية . والمعروف أن هذا الحامض ينشأ أساسا من جزيئات ح ن د بنفس طريقة التناسخ التى سبقت الاشارة إليها فى حالة ح ن د . ويتم ذلك فى النواه ثم تأخذ شرائط ح ن ر طريقها الى السيتوبلازم عن طريق الثقوب الموجودة فى الأغشية النووية . معنى ذلك أن شريط ح ن د فى النواة يعمل على تكوين شريط ح ن د كما يعمل على تكوين شريط ح ن ر .

يقوم هذا الحمض بتخليق البروتينات فى السيتوبلازم وهو يختلف فى عدة أمور أساسية عن مادة ح ن د ، ويتضح ذلك مما يلى :

١ - ان السكر الموجود فى حمض ح ن ر RNA هو سكر الريبوز Ribose بينما الموجود فى حمض ح ن د DNA هو سكر دى أوكسى ريبوز Deoxyribose.

٢ - أن القواعد النيتروجينية فى حمض (ح ن ر) هى : الأدنين والجوانين والسيتوسين والبوراسيل ، بينما القواعد النتروجينية فى حمض ح ن د هى الادينين والجوانين والسيتوسين والثايمين .

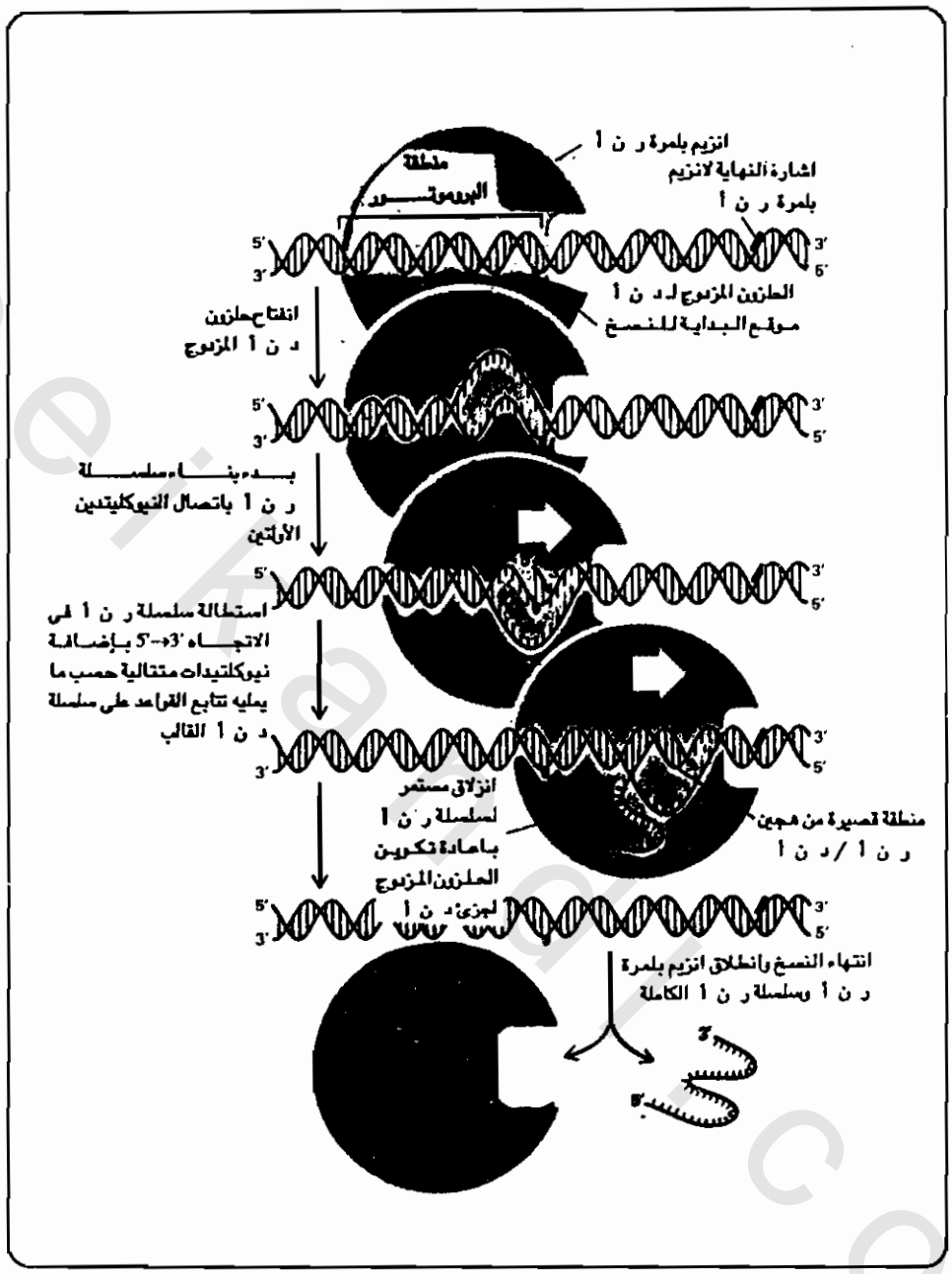
٣ - أن جزىء حمض ح ن ر يتكون من شريط واحد قد يلتف فى بعض المواقع على بعضه ، أما جزىء حمض ح ن د فهو يتكون من شريطين متواجهين ويتكاملان مع بعضهما .

٤ - يكون حمض ح ن د المادة الأساسية فى الكروموسومات ، وهو يعتبر بذلك المادة الوراثية ، كما يوجد هذا الحمض ايضا فى الميتوكوندريا والبلاستيدات أما حمض ح ن ر فهو ينشأ فى منطقة النوية ، ويدخل فى تكوين الريبوسومات فى السيتوبلازم كما يوجد فى الميتوكوندريا

والمعروف أنه يوجد من ح ن ر الأنواع الرئيسية التالية :

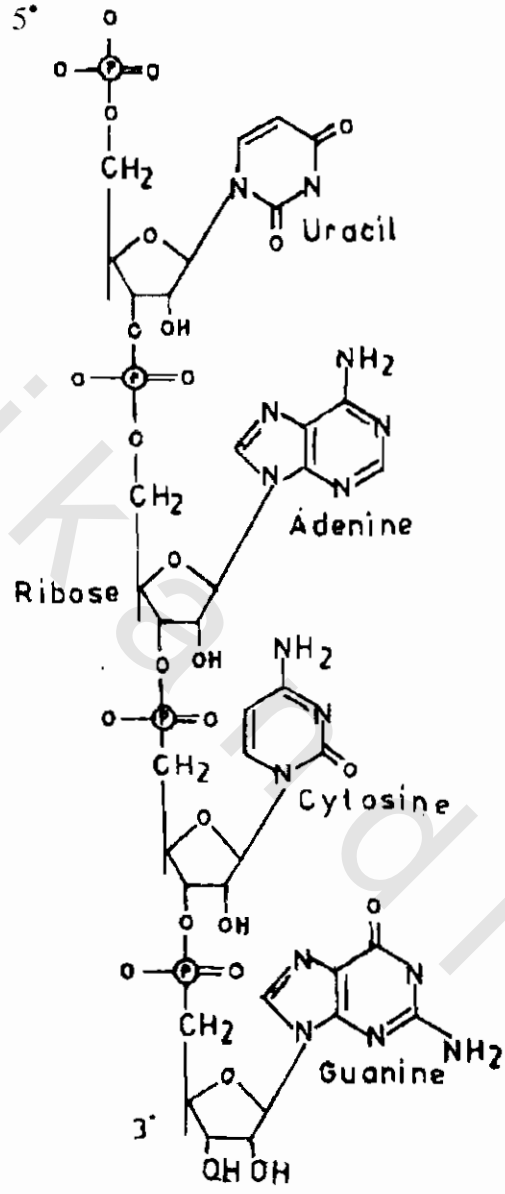
حمض ح ن ر الرسول : - Messenger RNA

يتميز جزىء حمض ح ن ر الرسول بشكله البسيط ، حيث أنه يتكون من شريط واحد ، ويكون هذا الحمض حوالى ١٪ من كمية حمض الريبونيوكليك فى الخلية ويتكون جزىء حمض ح ن ر الرسول بعملية نسخ Tramscription من شريط حمض ح ن د ، ويعتمد تتابع النيوكليوتيدات فيه حسب تتابع النيوكليوتيدات على شريط حمض ح ن د . كما يعتمد طول جزىء حمض ح ن ر الرسول على طول الجزء من حمض ح ن د المراد نسخه ، ويطلق على المجموعات التى تتكون من ثلاث قواعد نيتروجينية متتابعة لنيوكليوتيدات حمض ح ن ر الرسول اسم " الشفرات الوراثية " Genetic codons أو الثلاثية Triplet codons ويلاحظ أن نسخ هذا الجزىء فى الاتجاه ٥ - ٣ أمام جزىء ح ن د المراد نسخه . ويتكسر هذ الحامض سريعا بعد اتمام عمله تكوين البروتين .



رسم تخطيطي لعملية بناء ح ن ر بواسطة إنزيم بلمرة ح ن ر

يبدأ الإنزيم عملية البناء من نفس نقط بداية نوعية على ح ن ر تسمى الأيزوموتور ويستكمل البناء عند نقطة إنهاء (توقف) حيث يتحرر عندها الأنزيم وتنزلق سلسة ح ن ر



جزيء ح ن ر
RNA mslecule

حمض ح ن ر الناقل : Transfer RNA (t-RNA)

يوجد من هذا الحمض ٢٠ طرازاً على الأقل ، ويتكون كل منها من حوالى ٧٥ – ٨٠ نيوكليوتيد – ويبلغ وزن الجزىء حوالى ٢٥,٠٠٠ ، كما أن حوالى ١٠٪ من قواعده النيتوجينية ليست مألوفة ، ويلاحظ أن سلسلة هذا الحمض ليست مستقيمة ولكنها تلتف حول نفسها لتكون شكلا يشبه ورقة البرسيم Clover - shaped

حمض ح ن ر الريبوسومي : Ribosomal RNA (r - RNA)

يعتبر حمض ح ن ر الريبوسومى هو المكون الرئيسى للريبوسومات حيث تحتوى كل ريبوسومة على جزيئين من حمض ح ن ر ، أحدهما تقريبا ضعف الآخر – ومن الناحية الشكلية تبدو الريبوسومة مكونة من وحدتين Two subunits أحدهما أصغر من الاخرى ، وكل منهما تتكون من جزىء حمض ح ن ر الريبوسومى وسلسلة من عديد الببتيد ، ويعتقد أنه فى الكائنات حقيقية النواة (الايوكاريوت) Eukaaaryotes . تقوم الريبوسومات الحره (فى ارضية السيتوبلازم) بتحليق البروتينات التى ستقوم بوظيفتها داخل الخلية ، بينما تقوم الريبوسومات المتصلة بالشبكة الاندوبلازمية بتخليق البروتينات التى تفرزها الخلية وتقوم بوظيفة ما خارج الخلية ، وتحتوى الريبوسومات على معظم حمض ح ن ر بالخلية ، وهى ضرورية فى تخليق البروتينات .

وعلى ذلك توجز هذه العمليات بصورة عامة فيما يلى :

- تصدر عن شريط ح ن د فى النواه نسخة مكملة من ح ن ر الرسول RNA messenger مكملة لذلك الشريط وتمثل أو تدل على نظام ترتيب هذه القواعد فى شريط ح ن د ، وعلى ذلك فانها تحمل رسالة معينة عنه وبعد أن يتم نسخ هذا الشريط فى النواة حاملا تلك المعلومات يترك النواة الى السيتوبلازم عن طريق الثقوب الموجودة فى الاغلفة النووية

فى السيتوبلازم ، يلتقط كل جزىء من جزيئات ح ن ر الناقل حمضا أمينيا معينا حسب الشفرة الوراثية الثلاثية الموجودة فى إحدى نهايتيه Triplet Code n مثال ذلك يقوم ح ن ر الناقل الذى يحمل الكوردون الثلاثى "CGG" بالتقاط الحامض الأمينى " برولين Proline " ، كما يلتقط ح ن ر الرسول الذى يوجه به الكوردون "ACA" الحامض الأمينى ثالين Valine كما هو موضح فى الجدول السابق .

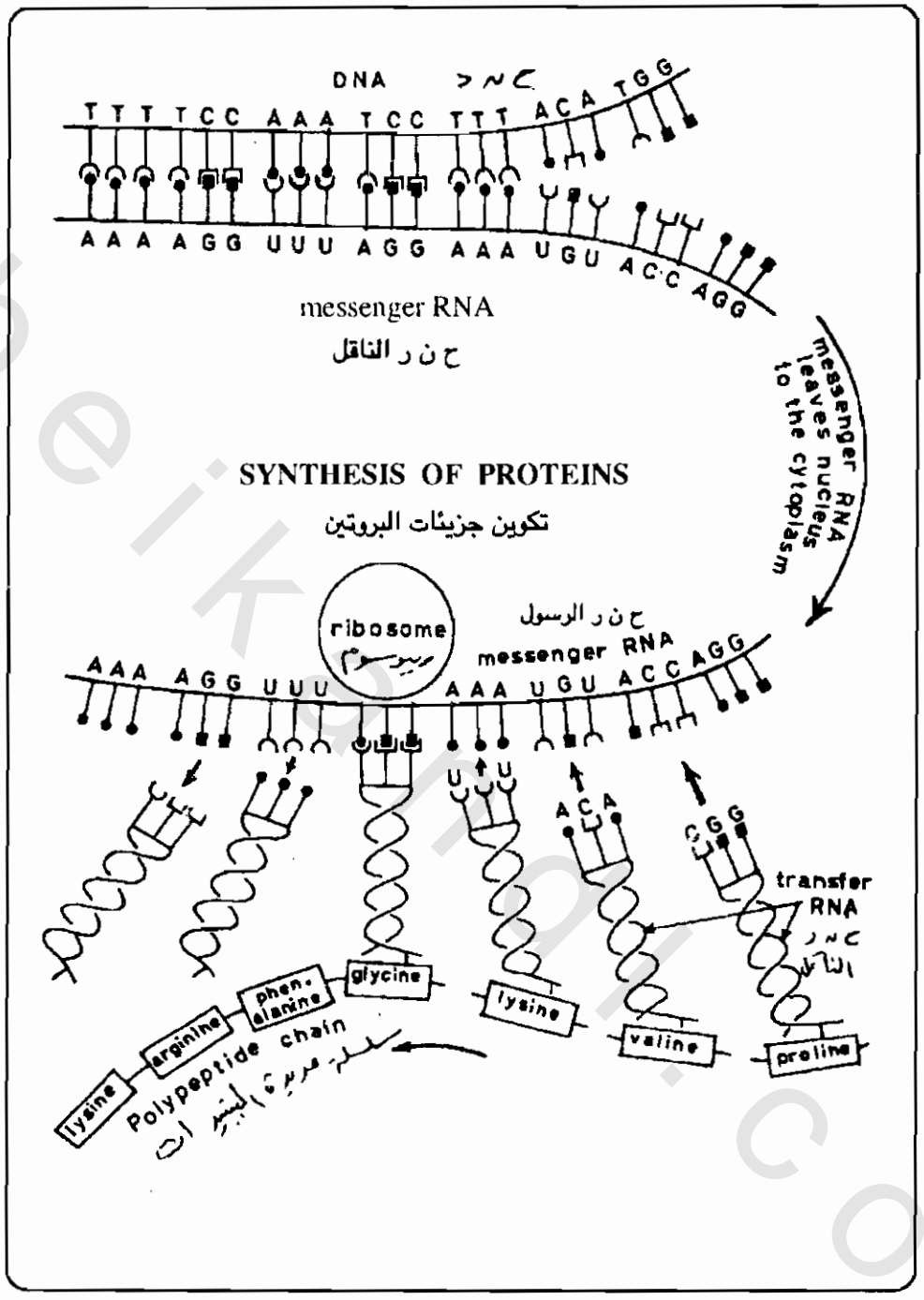
- يتحرك ح ن ر الناقل والمتصل به الحامض الأميني الذى تم تحديده والتقاطه على طول شريط ح ن ر الرسول في السيتوبلازم حتى تصادف شفرته الثلاثية الحرة شفرة ثلاثية مقابلة (معاكسة) ومكملة له anti-Codo n ؛ حيث يرتبط بها (A٢٢، VGU في الحالتين السابقتين) ، وبذلك يتم تحديد وضع ذلك الحامض الأميني . وهكذا ، حتى تصطف الأحماض الأمينية المختارة على شريط ح ن ر الرسول .

- عندما يتم ترتيب هذه المجموعة من الأحماض الأمينية بالطريقة المسنطيلة والمحددة ، فإنها تتحد مع بعضها تحت تاثير إنزيمات بناءة معينة ، وبذلك تتكون جزيئات البروتينات الى سوف تنعكس على هيئة خصائص وراثية .

- المعروف أن أندماج هذه الاحماض الأمينة يتم فى أماكن تواجد ح ن ر الريبوسومى RNA المتواجد بصورة أساسية على حواف الشبكة الاندوبلازمية ، ثم تدخل تلك الأحماض الأمينية متحدة مع الريبوسومات فى تجاويف الشبكة الاندوبلازمية حيث يتم تصنيع المواد البروتينية المطلوبة .

- بالنسبة لجزيئات ح ن ر الناقل ، فإنها - بعد أن أدت وظيفتها فى نقل الاحماض الأمينية الى اماكنها المحددة - تتفتت وتنتشر فى النويات والسيتوبلازم .

obeikandl.com



تكوين جزيئات البروتين

Synthesis of protein mole cules

توضيح الآحماض النووية في الخلايا والأنسجة الحيوانية

Identification of Nucleic Acids in Animal cells and Tissues :

قدم العديد من الطرق الهستوكيميائية لهذا الغرض ، ولكن أهمها ما يلى :

طريقة فويلجن وروزينبك Feulgen and Rossenbeck

(حامض بيرايوديك – شف) (Periodic Acid , Schiff PAS,.)

تعتمد هذه الطريقة على استخدام حامض بيرايوديك Periodic Acid الذى يعمل على أكسدة الوحدات السكرية فى ح د ن إلى مجموعات الجليكول glycol groups - HCOH- HCOH- التى تتأكسد بدورها إلى مجموعات الديهيدية aldehyde groups - HCO - HCO ويلى ذلك استخدام محلول أو تفاعل شف Schiff's reagent الذى يتم تحضيره بصورة أساسية بإذابة الفوكسين القاعدى basic fachsin فى الماء المغلى ، ثم اضافة ميتابيسلفيت الصوديوم أو البوتاسيوم Na or K metabisulphite -وحامض هيدروكلوريك عيارى NHCL حيث يتولد غاز أكسيد الكبريت مختزلا للون الصبغى الآحمر الداكن إلى محلول عديم اللون يطلق عليه " الفوكسين الآبيض " عديم اللون Leucofuchsin . وتتفاعل الآلديهيدات مع هذا المحلول مكونة مركبا بنفسجيا داكنا magenta compounds ، تتخذ عندئذ دليلا واضحا على وجود مكونات ح د ن .

الطرق المعملية للكشف عن الاحماض النووية

قدم الباحثون منذ اكثر من سبعين عاما حتى وقتنا الحاضر الكثير من الطرق الهستوكيميائي عن الاحماض النووية ، كما قاموا بكثير من التعديلات على الطرق المقترحة بهدف تحسينها وقدموا الدراسات المستفيضة عن الجوانب النظرية لآليات صياغتها . ومن أشهر الطرق المعروفه في هذا الصدد مايلى :

طريقة فولجن للكشف عن ح ن د : Feulgen Method for DNA

طريقة فولجن وروسنبك ١٩٢٤ : Feulgen and Rossenbeck , 1924

١ – مرور القطاعات الشمعية حتي الماء ، وأزل الزئبق من القطاعات اذا كان المثبت يحتوى عليه .

٢ – اغمس القطاعات لفترة قصيرة في محلول N - HCl

٣ – ضع القطاعات – لفترة تعتمد علي نوع المثبت في N - HCl عند ٦٠°م لاجراء عملية تحلل مائي حسب الجدول التالى .

٤ – اغمس القطاعات لفترة قصيرة في N - HCl بارد ثم في ماء مقطر .

٥ – ضع القطاعات في محلول شف Schiff's solution .

(في حالة استخدام محلول دى توماسى de Tomasi تتوضع الشرائح فيه لمدة تتراوح بين ٣٠ – ٦٠ دقيقة ، ولكن توضع الشرائح لفترة أطول اذا استخدم محلول بارجر و دى لاماتر Barger and De Iamater)

٦ – صف الشرائح واغمسها في ثلاث تغييرات من محلول طازج من بيكبريتات الصوديوم أو البوتاسيوم (٥ سم٣ من ١٠٪ بيكبريتات البوتاسيوم + ٥ سم٣ + ٩٠ سم٣ ماء مقطر)

٧– اغمس القطاعات في الماء .

٨ – اصبغ أرضية الخلايا – اذا أردت – باستخدام ١٪ لايت جرين Light green في الماء لمدة دقيقة واحدة أو باستخدام ١/٢٪ فاست جرين Fast green لمدة من ٣٠ – ٦٠ ثانية).

٩ – روق باستخدام الزيلول وغط باستخدام بلسم كندا .

النتيجـــــة :

يبدو (ح ن د) بلون بنفسجى يميل للحمرة .

ملحوظـــات :

يعتمد الوقت اللازم لاجراء عملية التحلل Hydrolysis على نوع المثبت . وفي حالة استعمال محلول عيارى يدكل N- Hcl تراعى التوقيتات الموضحة في الجدول التالى : K. Bauer (1932)

المثبـــت	الزمن بالدقيقة	المثبـــت	الزمن بالدقيقة
Apáthy	٥	Formalin	٨
Bouin	لاينصح به	Formol sublimate	٨
Carnoy (3 :1)	١٤	Helly	٨
Carnoy (6:3:1)	٦	Regaud	١٤
Champy	٦	Susa	١٨
Flemming	١٤	Zenker	٥
		Zenker formol	٥

يمكن استعمال – لغرض عملية التحلل المائي – محلول ٥ عيارى يدكل 5N - HCL وذلك عند درجة حرارة ٢٠ – ٢٢° م .

وفي هذه الحالة أيضا فان فترة التحلل تعتمد علي نوع المثبت وفقا لما يلى :

– المثبتات المحتوية علي الكحول ..... ٢٠ دقيقة الي ساعتين.

– المثبتات المحتوية علي الفورمالين ... ٢٥ دقيقة الي ٤ ساعات .

طرق تحضير صبغ شف : Prepartion of Schiff's reagent

طريقة دي توماسي : de Tomasi ,1936

ذوب ١ جم فوكسين قاعدى في ٢٠٠ سم ٣ في ماء مقطر يغلى . رج لمدة خمس دقائق وبرد الي درجة ٥٠° م بالضبط . رشح ثم أضف الي الرشيح ٢٠ سم٣ حمض يد كل عيارى . برد الي ٢٥° م ثم اضف ١ جم من صوديوم (أو بوتاسيوم) ميتابابسلفيت ($Na_2 S_2 O_5$) اترك المحلول في الظلام لمدة ١٤ – ٢٤ ساعة ثم اضف ٢ جم فحم نباتى نشط ، ورج لمدة دقيقة واحدة ثم رشح . احفظ الرشيح في الظلام عند درجة حرارة صفر – ٤° م. راع أن تستعمل المحلول وهو في درجة حرارة الغرفة .

obeikandl.com

طريقة بارجر و ديلاماتر : Barger and Delamater , 1948

ذوب ١ جم فوكسين قاعدي في ٤٠٠ سم ٣ ماء مقطر يغلى . برد الي درجة حرارة ٥٠° م ثم رشح ، أضف الي الرشح ١ سم٣ كلوريد ثيونيل Thionyl Chloride (socl2) اترك المحلول في الظلام لمدة ١٢ ساعة . أضف ١ جم نباتى نشط ورج ثم رشح . احفظ الرشيح في الظلام عند درجة حرارة صفر - ٤ °م . راع أن تستعمل المحلول وهو في درجة حرارة الغفة .

اقترح هوروبن وكيڤل دافز : Horobin and Kevill - Davies عام ١٩٧١ استعمال الفوكسين القاعدي محل محلول شف . وتتلخص طريقة تحضير محلول الصباغة فيما يلى :

ذوب ٠,٥ جم فوكسين قاعدى في ١٠٠ سم٣ من (ايثانول - ماء - حمض يد كل مركز بنسب٨٠ : ٢٠ : ١ بالحجم) . ويستعمل هذا الخليط بدلا من محلول شف ، ويستغرق وقت الصباغة حوالى عشرين دقيقة .

وقد وجد بصفة عامة أن حفظ محلول شف فى درجة حرارة بين ١ - ٥ م فى زجاجة معتمة محكمة القفل ، واستخدام المحلول فى الظلام (أو داخل وعاء معتم مغلق) يساعد على اطالة صلاحية المحلول حتى مدة ستة أشهر .

وقد أفادت طريقة فولجن كثيراً من الدراسات التى أجريت فى مجال الاورام أو الدراسات المتعلقة بالدورة الخلوية .

وقد أمكن استغلال القطاعات المصبوغة بطريقة فولجن فى التقدير الكمى Quantitative Estimation لكمية حمض ح ن د باستخدام طريقة القياسات الضوئية Cytophotometric method– وكان من أوائل من استخدموا هذه الطريقة Stowell and Cooper , 1945 وبذلك اصبح من الممكن قياس كمية ح ن د فى الخلية الواحدة ، واستقر مبدأ ثبات كمية ح ن د فى أنوية خلايا النوع الواحد . وغنى عن القول أن هذه الطريقة اثبتت كميًا احتواء الخلايا الجسدية على ضعف ما تحتويه الجاميطات من مادة ح ن د والمعروف أن هذه الطريقة تعتمد على قابلته الأحماض النووية للأشعة فوق البنفسجية عن طول موجات معبة تتراوح بين ٢٤٠ - ٢٨٠ ناتومتر . ويوضح جهاز السيتوموتومتر الموضح تحديد معدلات

امتصاص تلك الاشعة على شاشة معينة ، ويمكن بعد ذلك أجراء عمليات بإستخدام مادة Ianthanum ، كما استخدم Watson املاح اليورانيوم والرصاص لهذا الغرض وخلايا فترة السبعينيات وحتى الان جرت العديد من المحاولات لابتكار وسيلة تطبق بها طريقة فولجن باستخدام المجهر الالكترونى لدراسة ح ن د . وقد اقترح Gautier and Schreyer, 1970 مادة ruthenium المعاملة بثانى اكسيد الكبريت بدلا من كاشف (شف) .كما اقترح Cgli-) ati and Gautier , 1973 , Gautier and Fakan , 1974) مادة Osmium ammine التى استخدامها Moyne (1980) بنجاح فى الكشف عن ح ن د باستخدام المجهر الالكترونى .

طريقة مثيل جرين – بيرونين للكشف عن ح ن د ، ح ن ر :

The Methyl Green - Pyronin Method for DNA & RNA :

اقترح هذه الطريقة براشت Brachet في أوائل الخمسينيات وهى تعتمد على استخدام خليط من صبغى المثيل جرين Methyl Green والبيرونين Pyronin ، علي اساس أن الميثيل جرين له قابلية لمادة ح ن د ، والبيرونين لمادة ح ن ر . وحسب طريقة براشت تستخدم قطاعان، يعامل أحدهما بانزيم ريبونيوكليز Ribonuclaese ثم يصبغ القطاعات بصبغ مثيل جرين بيرونين . ومن المفترض عندئذ أن القطاع الذى عومل بإنزيم الريبونيوكليز يصبغ فيه ح ن د فقط . وقد فسر Kurnick في نهاية الخمسينيات آلية الصباغة على أساس أن البيرونين يصبغ الحمض النورى الاقل في درجة التبلمر ، حيث وجد أن ح ن د اذا انقصت بلمرته فانه يصبغ بالبيرونين تماما مثل ح ن ر . وعلى العكس من هذا الاتجاه ، وجد Taft (1951) أن معامله بدرجات أس هيدروجينى pH 3 & pH ll .7 ودرجات حرارة 1°c & 24°c أدي الي تقليل بلمرة ح ن د دون أن يوثر ذلك علي قابليته للاصطباغ بالميثيل جرين . وقد فسر ذلك على اساس أن مثل هذه المعاملات تقلل البلمرة عن طريق كسر الروابط الهيدروجينية ، وأن ذلك التأثير ينعكس فسرعان ما تستعاد هذه الروابط مرة أخرى . وقد فسر Rosenkranz and & Bendich (1958) قابلية ح ن د لصبغ الميثيل جرين على اساس بقاء الاول فى حالته كشريط مزدوج وان هذه القابلية تفقد اذا اختلت هذه الحالة .

ومن الجدير بالذكر أن ماير Mayer (1897) أشار بوجود شوائب في صورة ميثيل فيوليت Methyl violet في صبغ الميثيل جرين ، وقد استخدم ينا Unna (1913) كلوروفورم في استخلاص هذه الشوائب . وقد استعرض كاستن Kasten and & Sandritter (1962) الطرق المختلفة لتنقية الميثيل جرين . ومن ناحية أخرى قال ألكفت Alqvist and Andersson (1972) بضرور تنقية صبغ البيرونين عن طريق غسله بالكلوروفورم ٢٠ مرة ،كما أكد Kasten (1962) على ضرورة التخلص من الشوائب البيرونين .

طريقة فولجن – هيكسامين – فضة (عن كورسون ١٩٦٤) :

Feulgen - Hexamine - Silver (Feulgen - Silver Methenamine) After Korson , 1964

تعتمد هذه الطريقة على استخدام محاليل الفضة القاعدية بدلا من محلول (شف) في التفاعل مع مجموعات الالدهيد الناتجة من عملية التحلل المائي . وقد اقترح جوموري طريقة تحضير محلول Hexamine (Methenamine) - Silver لهذا الغرض ، وقال بفاعلية الطريقة مع الجليكوجين والمخاطيات Mucins فقط ، ولكن كورسون Korson برهن عام ١٩٦٤ على تميز هذه الطريقة في الكشف عن (ح ن د) خاصة اذا استخدم محلول عياري لحمض الستريك .

طريقة جالوسيانين كروم ألم : The gallocyanin - chromalum Method (GCA)

اقترح هذه الطريقة اينارسون Einarson (1936 , 1939 , 1949 , 1951) لصباغة الأحماض النووية بصفة عامة ، وفي عام ١٩٥١ قال بامكانية استخدامها للتقدير الكمي للاحماض النووية عن طريق القياسات الضوئية Cytophotometric ويعتبر الجالوسيانين صبغ أو كسازنينى Oxazine dye ، وعندما يخلط مع الكروم ألم يتكون ثلاثة أملاح ، هى :

- lake cation (gallocyanin - Cr $(H_2 O)_4$)

- lake hydroxide (gallocyanin - Cr $(H_2O)_4$ OH)

- lake sulphate (gallocyanin - Cr $(H_2O)_4)_2$ SO_4

ويعتقد ان الملح الاول أحمر اللون يتحد مع مجموعات الفوسفات في الاحماض النووية ليكون ملحا ازرق داكنا يتميز بمقاومته لعمليات نزع الماء بالكحول والترويق بالزيلول . ويعطي

الصبغ أفضل نتائجه عند درجة أس هيدروجيني بين ١,٥ - ١,٧٥ وقد قام de Boer and Sarnaker بتعديل الطريقة الاصلية عام ١٩٥٦ .

طريقة الصباغة بواسطة اكريدين أورانج والفحص بميكروسكوب الاستشعاع :

Staining with Acridine orange and examination with Fluorecent Microscope

بدأ استخدام " الاكريدين أورانج " في صباغة البروتينات النووية عام ١٩٤٠ بواسطة Bukatsch and Haitinger وفي عام ١٩٦٦ أجرى Rigler دراسة مستفيضة عن استشعاع هذا الصبغ عند موجة طولها ٥٣٠ نانوميتر في قطاعات مثبتة . وقد قام Darzynkiewicz عام ١٩٧٩ بعمل استعراض كامل للابحاث التي أجريت عن استخدام هذا الصبغ للكشف عن الاحماض النووية .

وعادة يستشع ح ن د باللون الاخضر ، بينما يستشع ح ن ر باللون الاحمر ، ويستخدم الاكريدين اورانج بتركيز ١,٠٪ في منظم فوسفات درجة أسه الهيدروجيني (٦) . ويراعى تجنب بعض المثبتات مثل البوان والفورمالين.

طرق صباغة تخصصية أخرى :

تطورت طرق الصباغة كثيرا في السنوات الاخيرة بغرض تحقيق تمييز لاجزاء معينة من المادة الكروماتينية . ومن أمثلة ذلك الصباغة الشريطية للكروموسومات Chromosome banding techniques حيث تبدو الكروموسومات مخططة عرضيا ، ويختلف نظام التخطيط في الكروموسومات المختلفة مما يسمح بالتمييز بينها بسهولة . وتفيد هذه الطريقة في التعرف علي البتر الكروموسومى Deletion في بعض الحالات المرضية ، كما تفيد احيانا في تصنيف الحيوانات في الحالات التي يتعذر فيها تحديد الوضع التصنيفى في المجموعات المتقاربة . ويلاحظ ان نظام التخطيط يختلف حسب نوع الصبغة المستخدمة . ومن أشهر الاصباغ المستعملة :(Quinacrine , Giemsa) .

كما استحدثت طرق لصباغة السنترومیرات Centromeres والتوابع الكروموسومية Satellites ومناطق تنظيم النوية Nucleus - Organizer Regions وكذلك طرق استشعاع Fluorescene لصباغة أجسام بار Barr Bodies .

طرق استخلاص الاحماض النووية :

Extraction Techniques for Nucleic Acids

طبقت عدة طرق لاستخلاص الاحماض النووية هستوكيميائيا اعتماداً علي ما هو معروف في مجال علم الكيمياء . وتختلف استجابة كل من الحمضين النووين لعمليات الاستخلاص وفقا لظروف معينة . وفيما يلى باختصار نبذة عن هذه الطرق :

الاستخلاص بمحاليل كلوريد الصوديوم :

وجد أن حفظ قطاعات مثبته في الفورمالين أو الفورمالين مع حمض الخليك والكحول لمدة خمس ساعات عند درجة حرارة ٣٧° م أو لمدة ساعتين عند درجة ٥٦° م في محلول ٠,١٧ عيارى كلوريد صوديوم يؤدى الي استخلاص ح ن د تماما . بينما لم يتأثر هذا الحمض فى القطاعات اذا وضعت في محلول واحد عيارى أو نصف عيارى (1.0 M or 0.5 M) من كلوريد الصوديوم . وقد وجد Mirsky and Pollister (١٩٤٢ ، ١٩٤٣ ، ١٩٤٦) أن محلول ٠,١٥ عيارى كلوريد صوديوم يستخلص ح ن ر ، بينما يؤدى محلول واحد عيارى كلوريد صوديوم الي استخلاص ح ن د .

حمض فوق الكلوريك : Perchloric Acid

اقترح Erickson et al عام ١٩٤٩ طريقة لاستخلاص ح ن ر من قطاعات مثبتة في الكحول باستخدام محلول مخفف من حمض فوق الكلوريك لفترات من ٤ – ١٢ ساعة . كما استخدموا حمض فوق الكلوريك الساخن لمدة عشرين دقيقة لاستخلاص ح ن د ، ح ن ر من القطاعات . ويعتقد العالم الانجليزى Pearse , 1960 أن حمض فوق الكلوريك البارد – بالاضافة الي قيامه باستخلاص ح ن ر – فإنه يودي الي فك بلمرة ح ن د واستخلاص بعض البروتينات والمواد عديدة التسكر والليبوبروتينات .

حمض ثلاثي كلوروخليك : Trichloroacetic Acid

قام Schneider في عام ١٩٤٥ باستخدام ٥٪ محلول مائي عند درجة ٩٠° م لمدة ١٥ دقيقة في استخلاص الاحماض النووية من الأنسجة . وقد استخدمت هذه الطريقة مع بعض العينات النباتية وسحبات نخاع العظم وغير ذلك بواسطة عدد من الباحثين .

الاستخلاص باستخدام انزيمات تكسير الأحماض النووية The Nucleases

يمكن تمييز إنزيمات هضم الاحماض النووية الى :

أ – إنزيمات تكسير الأحماض النووية (أو" نيوكليزس" Nucleases) وهى تكسر الاحماض النووية الي مكوناتها من النيوكليوتيدات .

ب – إنزيمات تكسر النيوكليوتيدات (أو نيوكليوتيديزس Nucleotidases الي نيوكليوسيدات Nucleosides).

جـ – إنزيمات تكسر النيوكليوسيدات (أو نيوكليوسيديزس Nucleosidases الي مكوناتها من قواعد نيتروجينية وسكر).

ومن الناحية الهستوكيميائية فإن المجموعة الأولى هى التي تعنينا ، وهى تنقسم إلى طرازين :

أ – ريبونيوكلييزس Ribonucleases وهى تكسر ح ن ر .

ب – دى أوكسى ريبونيوكلييزس Deoxyribouncleases وهى تكسر ح ن د .

ريبونيوكلييزس : Ribonucleases

قام Van Herwerden في عام ١٩١٣ بالحصول على مستخلص من الطحال واستخدمه في هضم الحبيبات القاعدية في سينوبلازم بويضات نجم البحر . ولا شك – حسب معلوماتنا الآن – ان هذا المستخلص يحتوي علي انزيم ريبونيوكلييز الذى قام بتكسير ح ن ر في سيتوبلازم هذه البويضات . وفي عام ١٩٤٠ استطاع Kunitz أن يفصل الإنزيم في صورة بلورات من بنكرياس الثور . وكان براشت Brachet أول من قام باستخلاص الأجسام القاعدية من السيتوبلازم في عينات مثبتة في مثبت " هللى " Helly وقد أجريت الكثير من الدراسات عن طرق الحصول على الانزيم بصورة نقية وعن أحسن الظروف لاجراء عملية الاستخلاص وعن أفضل المثبتات التي تستعمل عندئذ لتثبيت العينات . ونذكر من ذلك الدراسة التي اجراها Amano (1962) ، وقد خلصت هذه الدراسة الي تفضيل تثبيت العينات لمدة ٢٤ ساعة فى مثبت كارنوي الطازج ثم حفظ القطاعات لمدة ٤ ساعات عند درجة ٤٠° م في ١ ملجم من بلورات الانزيم مذابة في ١سم٣ ماء مقطر .

openkanal.com

دي أوكسي ريبونيوكليز : Deoxyribonuclease

كان فيشر وآخرون Fischer et al , 1941 and Mccarty , 1946 أول من استخدموا انزيم دي أوكسي ريبونيوكليز للاغراض الهستوكيميائية ، وان كان الانزيم الذي استعملوه لم يكن نقيا تماما . وفي عام ١٩٤٨ حصل Kunitz على عينات نقيه من الانزيم . وتنشط بلورات الإنزيم بأيونات الماغنسيوم والمنجنيز . ويمكن تثبيط الانزيم المنشط بالماغنسيوم باستخدام 0.01 M - citrate ، أما الانزيم المنشط بالمنجنيز فإنه لايتأثر .

وقد أمكن منذ أوائل الستينيات ابتكار طرق لاستخدام إنزيمات تكسير الاحماض النووية في مجال الدراسات بالمجهر الالكتروني . ويعتبر Leduc (1960) وزملاءه أول من طرق هذا المجال .

طريقة فولجن – هيكسامين – فضة (عن كورسون ١٩٦٤) :

Feulgen - Hexamine - Silver method method (after Korson , 1964)

١ – ثبت العينات في فورمالين متعادل او محلول كارنوى .

٢ – ضع الشرائح في محلول واحد عيارى 1- M - citric acid .

مسخن مسبقا الي درجة ٦٠° م لمدة ٣٠ دقيقة عند درجة الحرارة نفسها .

٣ – اغسل الشرائح في ماء مقطر لمدة خمس دقائق .

٤ – ضع الشرائح في محلول Gomori's methenamine silver مسخن مسبقا عند درجة ٦٠° م لمدة ٣٠ دقيقة – احفظ درجة الحرارة ثابتة لمدة ساعة .

٥ – اغسل الشرائح في الماء المقطر .

٦ – ضع الشرائح في ٠,٢٪ كلوريد ذهب لمدة خمس دقائق .

٧ – اغمس القطاعات في الماء ، وروق في الزيول ثم غط .

النتيجة :

يبدو ح ن د بلون أسود .

تحضير محلول هيكسامين - فضة (جوموري) :

ضف ٥ سم٣ من ٥٪ نيترات الفضة الي ١٠٠ سم٣ من ٣٪ هيكسامين ، عندئذ سيتكون راسب ثم يذوب . ضف ٥ سم٣ من منظم بورات Borate buffer عند أس هيدروجيني (٨) . ضف قطرة من فينول فيثالين الي ٣٪ حمض البوريك ثم عايرها titrate باستخدام محلول عيارى من هيدروكسيد الصوديوم حتى يصبح اللون قرنفليًا . ضف ماء مقطر حتى يصل الحجم الي ٢٠٠ سم٣ .

طريقة ميثيل جرين - بيرونين لبراشت (١٩٤٢) للكشف عن ح ن د،ح ن ر :

The Methyl green - Pyronin Method for DNA &RNA (Brachet , 1942)

١ - ثبت العينات في ١٠٪ فورمالين أسه الهيدروجيني (٧) لمدة من ٤ - ١٦ ساعة .

٢ - مرر القطاعات حتى الماء .

٣ - اصبغ في محلول صبغ ميثيل جرين - بيرونين لمدة تتراوح بين ١٠ دقائق ، ٢٤ ساعة .

٤ - اغمس القطاعات في الماء المقطر .

٥ - جفف القطاعات بورق ترشيح .

٦ - انزع الماء في الأسيتون بسرعة .

٧ -اغمس في خليط بنسب متساوية من الأسيتون والزيلول .

٨ - اغمس في خليط من ١٠٪ أسيتون ، ٩٠٪ زيلول .

٩ - روق في تغييرتين من الزيلول .

النتيجـــة :

ح ن د أخضر يميل للزرقة

ح ن ر أحمر .

obeikandi.com

تحضير صبغ ميثيل جرين - بيرونين :

محلول (أ) :

٥٪ محلول مائي من البيرونين ١٧,٥ سم٣

٢٪ محلول مائي من ميثيل جرين مغسول لمدة ٣ أيام بالكوروفورم ١٧,٥ سم٣ وكحول أميل ١٠ سم٣ ..... ١٠ سم٣

ماء مقطر ٢٥٠ سم٣

محلوب (ب) :

٠,٢ عيارى منظم خلات أسه الهيدروجينى ٤,٨

أو منظم سترات أسه الهيدروجينى (٥) يحضر باضافة ٥١,٥ سم٣ من ٠,٢ عيارى فوسفات ثنائي الصوديوم الهيدروجينية + ٤٨,٥ سم٣ من ٠,١ عيارى حمض الستريك .

محلول الاستعمال :

يحضر محلول الصباغة من أحجام متساوية من محلول أ ، محلول ب .

طريقة ميثيل جرين - بيرونين لكيرنيك (١٩٥٥) للكشف عن ح ن د،ح ن ر:

The Methyl green - Pyronin Method for DNA and RNA (Kurnick, 1955):

تحضير صبغ ميثيل جرين - بيرونين :

٢ ٪ محلول مائي من بيرونين^{Y} المغسول بالكوروفورم ١٢,٥ سم٣

٢٪ محلول مائي ميثيل جرين المغسول بالكلوروفوم ٧,٥ سم٣

ماء مقطر ٣٠ سم٣

طريقـــة الصـــباغة :

١ - ثبت العينات في محلول كارنوى

٢ - مرر القطاعات حتى الماء .

obeikandi.com

٣ – اصبغ لمدة ست دقائق في محلول الصبغ .

٤ – جفف القطاعات باستخدام ورق ترشيح .

٥ – ضع القطاعات في تغييرتين من ن – بيوتانول n - butyl alcohol لمدة خمس دقائق لكل تغييرة .

٦ – ضع الشرائح في الزيلول لمدة خمس دقائق .

٧ – ضع الشرائح في زيت السيدار Cedar oil لمدة خمس دقائق .

٨ – غط بصمغ بلسم كندا .

النتيجـــة :

ح ن د أخضر يميل الى الزرقة .

ح ن ر احمر .

طريقة اكردين أورانج الاستشعاعية للكشف عن ح ن د ، ح ن ر (بيرتالانفي وناجي ١٩٦٢)

Acridne orange fluorescence method for DNA & RNA (Bertalanffy and Nagy , 1962)

١ – ثبت القطاعات مع مراعاة تجنب الفورمالين .

٢ – مرر القطاعات حتى الماء المقطر .

٣ – اغمس القطاعات في ١٪ حمض خليك لمدة ١٥ ثانية .

٤ – اغمس القطاعات في الماء المقطر لمدة ١٥ ثانية .

٥ – اصبغ القطاعات في محلول اكردين اورانج (١٢٥ ملجم / ١٠٠ سم٣) لمدة عشر ثوان .

٦ – عامل القطاعات بمنظم فوسفات أسه الهيدروجيني (٦) لمدة دقيقة واحدة .

٧ – ميز الصبغ في ٢٢٪ كلوريد كالسيوم لمدة عشرين ثانية .

٨ – عامل القطاعات بمنظم الفوسفات اسه الهيدروجيني (٦) لمدة عشر ثوان .

obeikandi.com

٩ – غط القطاعات وهى مبلولة وافحصها باستخدم ميكروسكوب الاستشعاع .

النتيجـــة :

ح ن د اخضر فاتح .

ح ن ر أحمر

طرق استخلاص الأحماض النووية :

الاستخلاص باستخدام حمض فوق الكلوريك (اركسون وزملاؤه ١٩٤٩) :

Extration With Perchloric Acid (Erickson et al , 1949)

– ثبت العينات في الفورمالين أو فورمول سبلمت .

–لازالة ح ن ر بمفرده مرر القطاعات حتى الماء ثم أزل كلوريد الزئبق اذا لزم الامر . عامل القطاعات بمحلول ١٠٪ حمض فوق الكلوريك عند ٤ ° م لمدة ١٢ – ١٨ ساعة.

– لازالة ح ن ر ، ح ن د عامل القطاعات بمحلول ٥٪ حمض فوق الكلوريك عند ٦٠ ° م لمدة ٢٠ – ٣٠ دقيقة .

– ضع القطاعات في اي من الحالتين ١ – ٥ دقائق في محلول ١٪ كربونات الصوديوم لمعادلة الحمض ، اغسل في الماء ثم اصبغ القطاعات باستخدام محلول مائي ١٪ أزرق التولويدين Toluidine blue

الاستخلاص باستخدام حمض ثلاثي كلور الخليك (شفيدر ١٩٤٥) :

Extraction with Trichloroacetic acid (Schneider , 1945)

تستخلص هذه الطريقة مادتى ح ن د ، ح ن ر

– مرر القطاعات حتى الماء .

– عامل القطاعات بمحلول ٤٪ حمض ثلاثى كلورخليك عند درجة ٩٠° م تماما لمدة ١٥دقيقة .

– اغسل القطاعات بالماء .

– اصبغ باستخدام ازرق التولويدين .

الاستخلاص باستخدام حمض الهيدروكلوريك (دمسي وزملاؤه ١٩٥٠) :

Extraction with Hydrochloric acid (Dempsey et al , 1950)

تستخلص هذه الطريقة مادتى ح ن د ، ح ن ر

- مرر القطاعات حتى الماء .
- عامل القطاعات بمحلول واحد عيارى يدكل N-Hcl لمدة ثلاث ساعات عند درجة حرارة ٣٧°م
- اغسل القطاعات بالماء .
- اصبغ القطاعات 2mmol methylene blue عند درجة اس هيدروجينى (٥,٧) لمدة ١٢ - ٢٤ ساعة .

طريقة استخلاص ح ن ر باستخلاص إنزيم ريبونيوكليز :

Extraction of RNA by Ribonuclease :

١ - مرر القطاعات الشمعية للعينات المثبتة في محلول كارنوى الي الماء .

٢ - احفظ القطاعات لمدة ساعة واحدة عند درجة ٣٧° م في محلول الانزيم في الماء المقطر (١/٢ -١ ملج / سم٣).

٣ - اغسل القطاعات في ماء جار .

٤ - اصبغ القطاعات المعاملة والقطاعات الضابطة بأي صبغ متخصص لصباغة ح ن ر .

النتائج : التراكيب التي تزال بإنزيم ريبونيوكليز تعتبر ح ن ر .

طريقة استخلاص ح ن د باستخدام انزيم دي اوكسي ريبونيوكليز :

Extraction of DNA by Deoxyribonuclease:

١ - مرر القطاعات الشمعية للعينات المثبتة في محلول كارنوى الي الماء .

٢ - احفظ القطاعات لمدة ٣ -٦ ساعات عند درجة ٣٧° م بمحلول دي اوكسى ريبونيوكليز متبلر في الماء (٠,٠٥ ملجم / سم٣) . لاترج الانزيم تجنبا لتكسره .

٣ - اغسل القطاعات فى الماء .

٤ - انزع الماء بالكحول ثم ضع القطاعات في خليط كحول / أثير .

٥ - غط القطاعات بطبقة رقيقة من ١٪ سيللودين .

٦ - اجرخطوات تفاعل فولجن الخاص بمادة ح ن د

النتيجـــة :

ح ن د لن يظهر في القطاعات المعاملة بالإنزيم ، علي عكس القطاعات الضابطة .

obeikandl.com