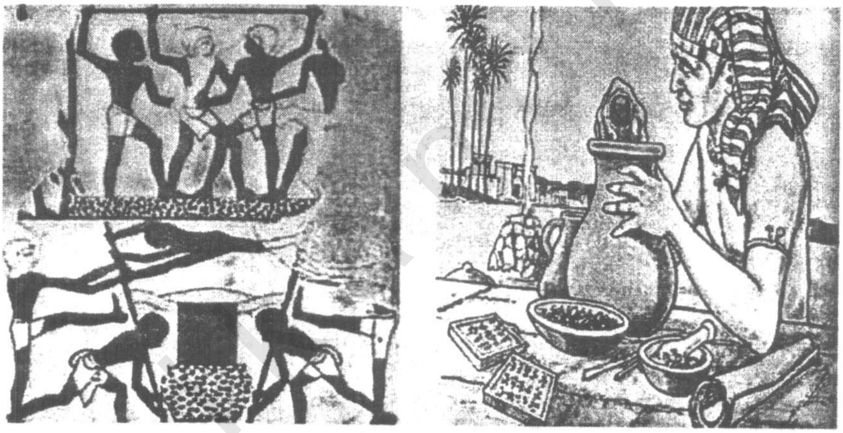
الباب الثانى

هندسة الجينات ودورها فى التكنولوجيا الحيوية

Genes Manipulation and Biotechnology

obeikandi.com

ربما تخيل المصري القديم حارس مصر وأسرارها وعلم المصريات على هيئة كائن مهندس وراثياً جسد في قوة الأسد ورأسه تحمل الحكمة والذكاء ولقد تحولت الفكرة الخيالية على يد علماء التكنولوجيا الحيوية الجزيئية إلى حقيقة عندما جمعوا بين جنس العنز والخروف، وفي سنة ١٩٨٦ ونقل هرمون النمو إلى الخنازير ونقل جين الأنسولين البشرى إلى البكتيريا٠ وربما كان أبو الهول دليل على أن قدماء المصريون هم أول من فكر في الهندسة الوراثية وربما أول من إستخدمها، فهم أول من إكتشف إستخدام الكائنات الحية الدقيقة في الصناعات الغذائية (البيوتكنولوجى) فقد إستخدموها في تخمير الخبز وعمل النبيذ من الفاكهة وتخمير الشعير وتخمير اللبن والقشدة (شكل ٥)٠



شكل ٥: تخمير الخبز وعمل النبيذ من قبل القدماء المصريين

قصة الجينات Genes History

إكتشف مندل عام١٨٦٥ قوانين الوراثة وتم نشر أبحاثه في مجلة علمية إقليمية في وطنه (النمسا) فكانت مجهولة لمعظم البيولوجيين حتى عام ١٩٠٢ عندما أعاد كل من دى فريز (هولندا) وكورينز (ألمانيا) وتشيرماك (النمسا) إكتشاف قوانين مندل من جديد٠ وأجرى العالم البريطاني جريفت

تجربه مثيرة على البكتيريا المسببة لمرض الإلتهاب الرئوي وإستنتج أن هناك مادة تنتقل من البكتيريا الممرضة الميتة إلى البكتيريا غير الممرضة الحية وهو ما يعرف بالتحول البكتيري Bacterial transformation • وكان السؤال عندئذ ما هي طبيعة المادة الوراثية المنقولة والتي سببت المرض ؟ حتى إستطاع العالم افرى وفريقه العلمي عام ١٩٤٥م من عزل المادة المسببة للتحول البكتيري وأثبت التحليل الكيميائي أن المادة المعزولة هي DNA وعليه أمكن تفسير التحول البكتيري على أساس أن إحدى السلالتين إمتصت DNA الخاص بالسلالة الأخرى وبالتالي إكتسبت الخصائص الوراثية للسلالة المنقول منها DNA ولكن المشكلة التي واجهها العلماء أن المادة المسببة للتحول البكتيري لم تكن نقيه وبها نسبه من البروتين لذلك لم يتوافر دليل قطعي على أن المادة المسئولة هي DNA • وبعد دراسات مستفيضة تم إستخلاص الإنزيم المحلل للمادة الوراثية DNA وهو إنزيم Deoxyribonuclase وتم معالجه المادة الوراثية المسببة للتحول البكتيري بهذا الإنزيم فتوقفت عملية التحول البكتيري، وبما أن الإنزيم لا يؤثر على البروتين إذن المادة الوراثية هي مادة DNA وتم قياس كميتها في مختلف الخلايا ووجد أنها تحتوى على نفس الكمية وأن الخلايا الجسمية تحتوى على ضعف الكميه التي بالخلايا التناسلية وهذه العلاقة تحقق الثبات الوراثي•

وعند دراسة البروتين في الخلايا المختلفة وجد أن كميته تتفاوت من نسيج إلى آخر كما أن البروتين يهدم ويبنى بإستمرار في الخلية وبالتالي فهو غير ثابت ولا يحقق الثبات الوراثي لأن كميه البروتين في الخلايا الجسدية لا تساوى ضعف كميه البروتين في الخلايا التناسلية وبالتالي وفرت تلك الدراسة دليل آخر على أن المادة الوراثية هي DNA•

تركيب وتنظيم الجين Gene Structure and Regulation

قسم الباحثون الجينات من حيث الوظيفة إلى ثلاثة أنواع وهى:

١- Regulator genes وهى الجينات المنظمة لعمل عديد من الجينات الأخرى والتي يطلق عليها إسم الجينات العاملة أو الفاعلة.

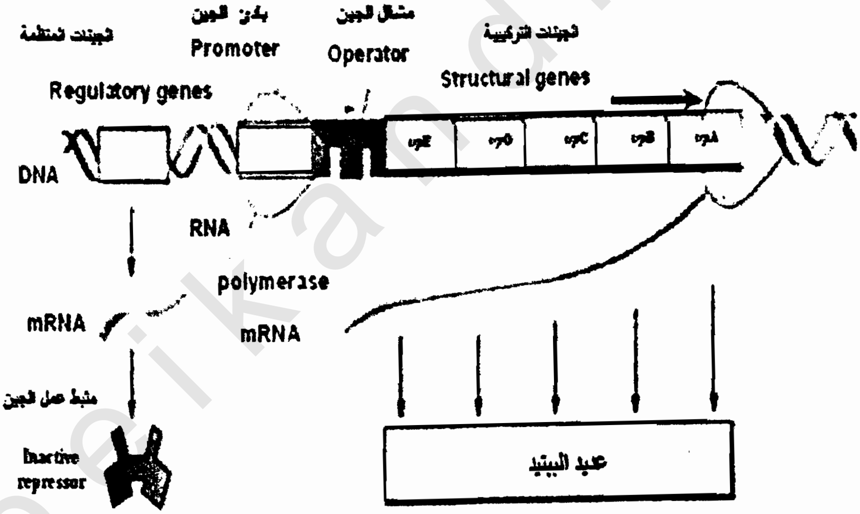
٢- Operator genes وهى الجينات العاملة التي تقوم بدور عامل التليفون وهى التي تتحكم في فتح وغلق عدد كبير من الجينات الأخرى التي يطلق عليها الجينات التركيبية Structural genes .

٣- Structural genes وهى الجينات المسئولة عن التركيب الخاص بالبروتينات أو ببروتين الإنزيم.

ولقد إفترض أن تنظيم نشاط الجين يكون عن طريق الجينات العاملة أو الفاعلة Regulator genes ، حيث يتحكم في فتح أو قفل عدد من الجينات التركيبيةStructural genes والمسئولة عن إنتاج إنزيمات معينة تؤدى تفاعلات بيوكميائية معينة في سلسلة من التفاعلات ينتج عنها في النهاية ظاهرة فسيولوجية معينة. ويتم ذلك بأن يقوم الجين المنظم لعمل عديد من الجينات الأخرى Regulator gene بإفراز مثبط لعمل Operator genes ويطلق على هذا المثبط إسم القامع أو الكابح. ويفترض أن هذا المثبط Repressor عبارة عن بروتينيات تقوم بمنع الجين العامل أو الفاعل من إتاحة الفرصة لإنزيم بلمرة الحامض النووى RNA من العمل وبالتالي لا يؤدى وظيفته. وإقترح أن ذلك يتم بطريقتين؛ الاولى هى أن المثبط ينتج دون قدرة على التثبيط إلا فى وجود منشط Effector وعند وجوده يقوم بالإلتصاق بمنطقة Operator فيمنع إنزيم بلمرة الحامض النووى RNA من نسخ DNA وبالتالى لا تتم الرسالة. وإن الآلية الثانية للكابح تتم عن طريق تثبيطه

بمـادة ذات وزن جزيء منخفض Effector والتي تلغي قدرة الكابح على العمل وبالتالي يصبح genes Operator حر تاركا الجينات التركيبية Structural genes قادرة على العمل من خلال إصدارها الأوامر الخاصة بتكوين البروتين وهي الحامض النووى mRNA وبالتالى لإنتاج إنزيمات متخصصة لإتمام تفاعلات معينة وظهور ظاهرة فسيولوجية أو صفة أو تميز خلوي أو تكشف خلايا أو أنسجة معينة (شكل ٦)٠

وهناك نظرية تفترض أن البروتين القاعدي المعروف بالهستون والذي يحتوي على نسبة كبيرة في تركيبه على الحمضين الأمينين الأرجنين والليسين والموجود بالكروموسومات يعمل كمادة مثبطة لفصل المادة الوراثية



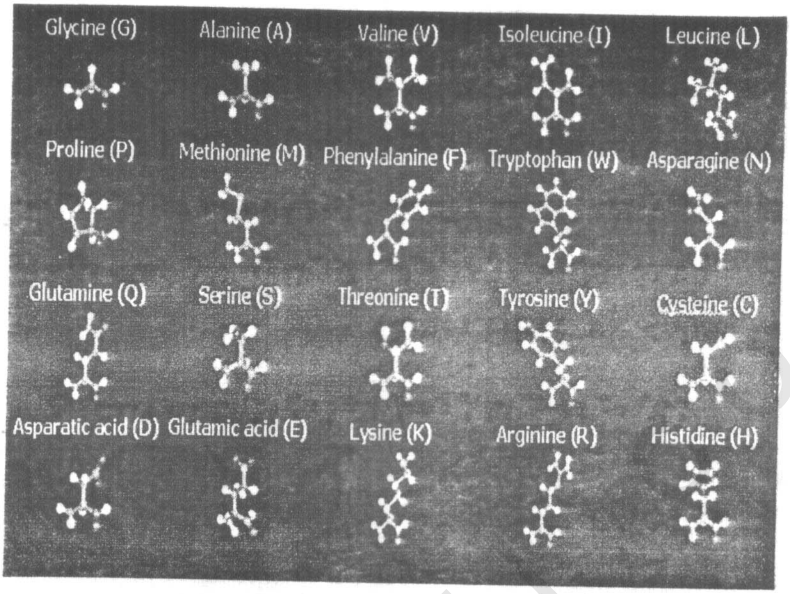
شكل ٦: تنظيم عمل الجين

إذا ما إتحد بها وبذلك ينظم فعلها من المراحل الجنينية وحتى الموت٠ ويسبق منطقة العامل أو Operator منطقة تسمى بمنطقة المستبدئ أو المحفز

Promoter وهى التى تحدد لإنزيم بلمرة الحامض النووى mRNA من أين يبدأ العمل؟

إذن الجين Gene هو جزء من DNA وهى بمثابة الحبات فى المسبحة، وللجينات لغة تخاطب بها الخلية حيث تنقل إليها رسائل تقرأها الخلية فتنفذ ما فيها من تعليمات وأوامر فى بدقة متناهية، فلغة الجينات تتألف من أربع حروف هى A, C, T, G السابق ذكرها، أما كلماتها فتتألف من ثلاث حروف فقط من تلك الحروف الأربعة ولتلك اللغة شفرات لكى تفهمها الخلية كعلامات الترقيم والفواصل بمعنى إبدأ من هنا، توقف هنا. كما أن بعض الشفرات تعمل كأقواس بين الجمل ليست لها أهمية تسمى الأنترونات Introns. وبعض أجزاء من DNA تعمل كمنظم لعمل الجين تعرف بالجينات المنظمة كما سبق ذكره . وتلك هى السيمفونية الربانية التى تعزفها الخلية لتقوم بوظائفها التى حددها الله فى صورة هذا التسلسل والتتابع الدقيق للنيوكليتيدات فيما يعرف بالحامض النووى DNA. وترسل النواة رسالة الى الخلية تسمى رسالة الحامض النووى RNA ليتم ترجمتها على المصنع الصغير المسمى بالرايبوسوم Ribosome فيتكون بذلك بروتيناً معيناً. يتكون هذا البروتين من تتابع للاحماض الأمينية حيث تتباين كيميائيًا تباينًا واسعاً نتيجة تكونها من عشرين حمض أمينى يجعل هذا التباين ممكنا ويتم بناء هذا العدد الهائل من البروتينات داخل الخلية بأوامرها التى ترسلها مع الرسول وبذلك يتكون الحمض الأمينى الصحيح فى المكان الصحيح لينتهى الأمر بصناعة البروتين الذى يقوم بعضة بدور بنائى فى الخلية والبعض الآخر له دور تنظيمى أى يقوم بتنظيم سير التفاعلات الحيوية داخل الخلية. والبروتينات هى الوحدات المكونة للإنزيمات والتى تشبة الكماشة حيث تستطيع ربط المركبات الكيميائية معا أو تجدلها معا أو تفككها من بعضها ويتم

ذلك بدقة متناهية. والبروتينات هي التى تصنع الغشاء المحيط بالخلية كما تصنع الأبواب التى تسمح بدخول المركبات اليها أو خروجها منها من خلال إتحادها مع المركبات الداخلة أو الخارجة وتحور فيها حتى يمكنها الدخول أو الخروج حتى الكائنات الممرضة كالبكتيريا فإن الإنزيمات هى أسنانها التى تقوم بتمزيق مكونات الخلية وتحليلها إلى مواد أبسط لإمتصاصها والتغذية عليها. ومن هنا يمكن القول أن الشفرة الوراثية هى ترتيب النيوكليوتيدات Nucleotides (والتى سوف يتم التطرق إليها فيما بعد) في جزئ الحامض النووى mRNA الذي يذهب إلي الرايبوسوم حيث يترجم الي تتابع للأحماض الأمينية في سلسلة عديد الببتيد الذي يكون بروتينا ما. وكان معروف في بداية تفكير العلماء عن الشفرة الوراثية أن عدد الأحماض الأمينية الموجودة في الطبيعة عشرون حمضًا وعدد القواعد النيتروجينيه الداخلة في تركيب جميع النيوكليوتيدات أربعة هم أدينين (A)، جوانين (G) سيتوسين (C)، ثيامين (T). وللحصول علي لغة وراثية سليمة لابد من أن تشكل حروف هذه اللغة (القواعد النيتروجينية الأربعة) عشرين كلمة(الأحماض الأمينية)، وبالتالي الكلمة الوراثية (الحمض الأميني) إما أن يتكون من حرف أو حرفين أو ثلاثة أحرف أو أكثر ومنطقي إستحالة تكون الكلمة الوراثية من حرف واحد (قاعدة نيتروجينيه واحدة) لإن معنى ذلك أن عدد الأحماض الأمينيه هو أربعه فقط وهذا مناف للواقع حيث أن عددهم هو عشرون ولو كانت اللغة ثنائية الحروف ٤ ٢=١٦ حمض أميني وهو أقل من العدد المطلوب (شكل ٧). إذن الشفرة الوراثية تتكون من ثلاثة حروف ٤ ٣ =٦٤ حمض أميني أي أكثر من العدد الموجود فعلا من الأحماض الأمينية، وبالرغم من ذلك فإن هذا العدد رغم أنه يزيد عن العدد الفعلي للأحماض الأمينية إلا أنه يعتبر أصغر مجال نظري لكلمة شفرة.

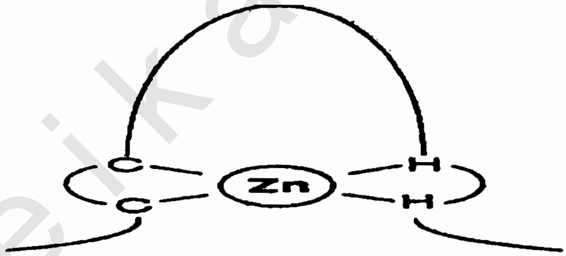


شكل ٧: الأحماض الأمينية الموجودة في الطبيعة

ففي عام ١٩٦٥م عندما تم التوصل الي الشفرة الخاصة بكل حمض أميني والتي يطلق عليها إسم كودونات **Codons** تأكد بعد ذلك أن هناك أكثر من شفرة لكل حمض أميني. أيضاً هناك كودونات توقف آلية بناء البروتين. كما أن هناك كودون بداية، أي يعطي الإشارة للنقطة التي يبدأ عندها بداية آلية جديدة لصنع بروتين جديد. ومما أظهرته الدراسات علي الشفرة الوراثية أنها عامة أو كونية بمعني أن الأحماض الأمينية في الكائنات المختلفة لها نفس الشفرة فمثلا الحمض الأميني الجليسين في جميع الكائنات الحية يتواجد بشفرته المعروفة **GGU, GGC, GGA**. ويتم توزيع الجينات علي الكروموسوم بشكل مقنن وليس عشوائياً وهذا التحديد يتم بواسطة المسافات الفاصلة بين الجينات علي الكروموسوم.

تنشيط الجين Gene Activation

لتنشيط أى جين لا بد من وجود عدداً من البروتينيات تعرف بعوامل النسخ **Transcription factors** التى ترتبط بجزئ من الجين يدعى المنشط أو المعزز **Promoter** ليتمكن باقى الجين من التعبير عن نفسه فى بدء عمل نسخ الحامض النووى الرسول **mRNA** المسئولة عن إنتاج الإنزيم والذى يقوم بإتمام التفاعل الحيوى وإظهار الصفة المحددة وعليه فإن عامل النسخ هذا هو بمثابة مفتاح التشغيل للجين **On-gene** ٠ وكان العلماء يفكرون فى الوسيلة التى يهتدى بها عامل النسخ هذا للوصول الى الجزء المنشط أو المعزز للجين حتى أمكنهم من فك اللغز عندما وجدوا أن أحد عوامل النسخ يحتوى على نتوءات عرفت فيما بعد بإسم أصابع الزنك **Zinc fingers** والتى وجد أنها وسيلة لتعرف على الجزء الخاص من الجين والمسئول عن تنشيطه (شكل ٨)٠



Cys – His Zink finger

شكل ٨: أصابع الزنك

إكتشف كلاك أصابع الزنك عام ١٩٨٥ ووجد إنها عبارة عن متواليات من أحماض أمينية تستطيع الإنطواء حول أيون الزنك ولقد إكتشفت أصابع

الزنك عندما حلت تتابعات الأحماض الأمينية فى إحدى عوامل النسخ ووجد أن هناك ترتيب خاص لتتابع الأحماض الأمينية فى تسع تتابعات أو قطع متعاقبة أو وحدات متتالية مرقمة من ١-٩ بينهما تشابهات مهمة حيث تتشابه أو تتطابق وجود زوج من الأحماض السيستينينية (C) وزوجا من الأحماض الهيستيدينية (H) وإن زوجى السيستينين والهيستيدين فى كل وحدة بنائية ينضمان الى أيون الزنك مما يجعل الأحماض الأمينية الموجودة بينهما تتخلق٠

كما وجد من الدراسات المكثفة سنة ١٩٩١ بإستخدام الرنين المغناطيسى أنه لكى تستطيع أصابع الزنك الإتصال بجزىء DNA لا بد لها من إستعمال إصبعين على الأقل لكى يتعلق البروتين بصندوق TATA بقوة كافية وتعتبر أصابع الزنك رؤوس قارئة Reading heads تتصل ببعضها بوصلات مرنة، كما وجد أن حمض أمينى معين (E, G, A) يتصل مع قاعدة نيتروجينية واحدة من الزوج القاعدى على DNA بالمجموعات الفوسفاتية فى سلاسل السكر والفوسفات التى تكون جانبى سلم DNA٠ ونظراً لأن الجين فى الخلايا مميزة النواة eukaryotes لا يتكون من تتابعات شفرية مستمرة بل تتخلله تتابعات غير شفرية طويلة بعكس جينات أولية النواة prokaryotes فتسمى التتابعات التى تمثل بإسم الأكسونات Exons وتسمى التتابعات التى تعرف بإسم الأنترونات Introns ثم توصل الأكسونات ببعضها الحامض النووى RNA splicing حيث تنبعج الأنترونات للخارج فى شكل عروات قبل إستبعادها٠

وتأتى مرحلة تعديل وتجهيز نسخة الحامض النووى RNA حيث تعرف جزيئات الحامض النووى RNA غير المتجانسة بإسم الحامض النووى nhRNA فيتم إضافة قلنسوة الجوانين المميثلة G-methylated

nucleotide حيث ان للقلنسوة دور فى بناء البروتين عندما ينتقل الى الرابيوسومات كما يبدو أنها تقوم بحماية النسخة النامية من الحامض النووى RNA من عملية التحلل والهدم، ويضاف لجزئ الحامض النووى nhRNA نيل عديد الادنيين Poly A Tail قاعدة الادينوسين يقوم بها إنزيم خاص يسمىPoly A- Polymerase ويبدو أن للذيل وظيفة تسهيل خروج الحامض النووى mRNA من النواة الى السيتوبلازم ويؤخر هدمه فى السيتوبلازم ليتيح الدخول فى أكثر من دورة من دورات الترجمة٠

آلية عمل الجينات Gene Mechanism

والآن يأتي السؤال الهام وهو كيف يمكن لعلماء البيولوجيا الجزيئية فهم كيفية عمل الجينات؟ لذا إستخدم مهندسوا الوراثة تقنية سميت إستبدال الجينات المستهدفة gene targeting وفية يتم إستحداث لطفرة وإستبدالها بجين سوى داخل إحدى الخلايا الجذعية المشتقة من الجنين Embryo - derived stem cells من أجنة الفئران ثم إدخالها فى خلايا جنين الفأر فتكون بذلك أجنة معطلة الجين المستهدف knocked out فإذا أدى ذلك الى إحداث تشوه فى مخ الفأر كان ذلك دليل على مسئولية هذا الجين عن تكوين المخ٠ ولقد أصبحت تقنية الإستهداف الجينى تقنية مثيرة وهامة عندما إستخدم فى مشروع الجينوم البشرى لكشف أسرار الجينات المسئولة عن الأمراض الوراثية حيث ان دراسة تسلسل النيكلوتيدات للجين لا يفسر وظيفته فى حياة الكائن الحى٠

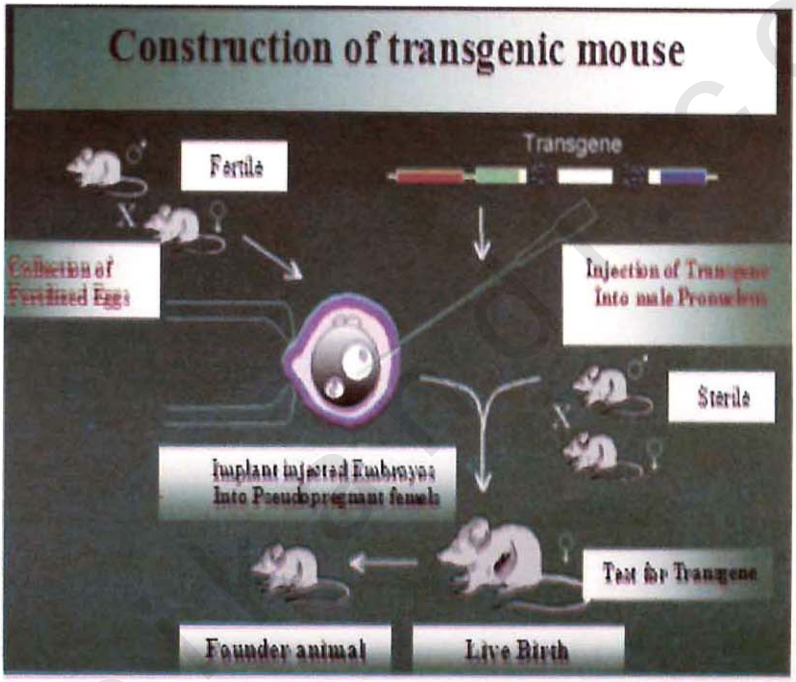
على أيه حال تبدأ التقنية بعزل جين من الخلايا الجذعية المشتقة من الجنين (Embryo-derived stem cells (ES والمراد دراسة وظيفته ويحور ذلك الجين لإنتاج جين طافر يتم إستبداله بالجين السوى ويكون ذلك

عن طريق إيلاج جين مقاوم للنيوميسين neomycin resistance (neo r) وذلك لتسهيل أمر العثور عن الخلايا التى تم الإيلاج فيها ويسمى هذا الجزء من الجين بالواسم الموجب، كما يضاف للجين جزء آخر يسمى بجين الثياميدين كيناز tk ويعتبر واسم ثانى ويعرف بالواسم السلبى حيث أن هذا الجين يسبب حساسية للخلايا الحاضنة له ضد المضاد الحيوى الكانسيكلوفير • وبعد تصميم الجين الطافر هذا يتم تحميلة على ناقل مناسب مثل بلازميد القولون حيث يتم إدخال الناقل الى خلايا جنين الفأر الجذعية (ES) فيقوم الناقل:

- إما بنقل الجين الطافر بدلا من الجين السوى (المستهدف) على كروموسوم من كروموسومات خلايا الفأر الجنينية وفى هذه الحالة سوف يتم إستبدال الجين السوى بجين مشابه مع إحتوائه على الجزء الخاص بجين neo r فى منتصفه دون الجزء الخاص بال tk وذلك لأن إنزيم القطع المحدد سوف يتعرف على الجين المستهدف فقط بمعنى معرفة تسلسل البداية والنهاية له•
- أو بنقل الجين المستهدف بطريقة عشوائية ويتم نقل الجين الطافر كله أى بالواسمة الثانية والخاصة بالـ tk•
- أو لا يتم الإيلاج أصلاً فى الخلايا•

ولعزل الخلايا التى تحمل الطفرة المستهدفة يتم وضع الخلايا كلها فى وسط يحتوى على عقارين أحدهما مضاد المينوميسين المعروف بإسم G418 والثانى مضاد الكانسيكلوفير فيقوم المضاد الأول بقتل الخلايا التى لا تحتوى على الجين الطافر فيقضى على الخلايا التى لم يحدث لها إنتقال للجين المستهدف أما العقار الثانى فهو مميت للخلايا التى إنتقل إليها الجين الطافر عشوائيا والحاوي على القطعة الثانية الخاصة بالجين tk والمسببة للحساسية

للمضاد الحيوى الثانى. وعليه يتم الحصول على الخلايا المطلوبة والتى هندست وراثياً فإذا كانت مأخوذة من فأر بنى اللون، يتم إيلاج تلك الخلايا داخل خلايا جنينية وهى فى طور الكيسية الأريمية (البلاستولة) لأنثى فأر أسود اللون ثم ننقل الخلايا الجنينية الى رحم أم بديلة حيث تنمو وتكون النسل (شكل ٩) .



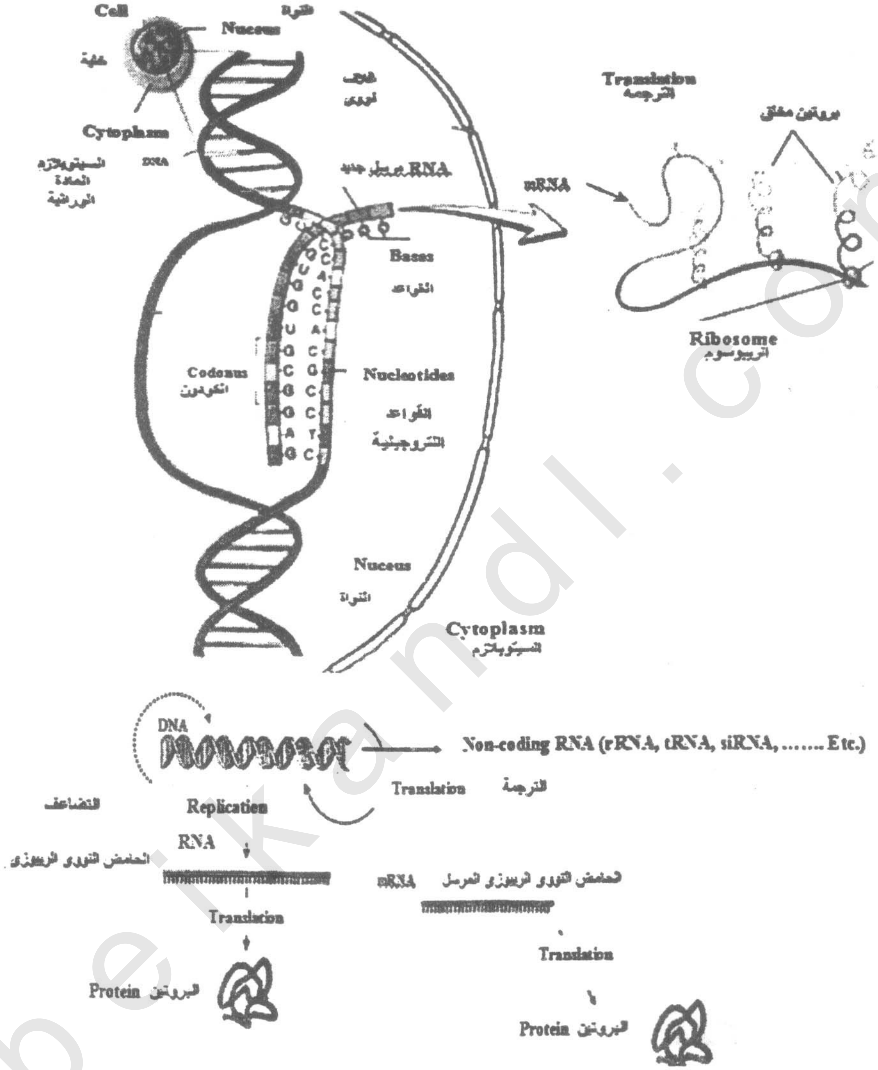
شكل ٩: كيفية الحصول على فئران محورة وراثياً

وتفحص الفئران للحصول على الفأر المحتوى على ظلال بنية ممزوجة باللون الأسود لتشير تلك الصفة على أنة الفأر المطلوب والحاوى على خلايا ES المهندسة وتعرف تلك الفئران بالفئران الكيميرية أو يتم تسميتها بالخليطة Chimeras ، وبعد ذلك يتم تزاوج الذكور الكيميرية أو الخليطة مع إناث

سوداء ويختبر النسل Progeny بحثا عن الطفرة المستهدفة ويستبعد الفار الأسود والبنى ويستمر فى تزاوج الذكور والإناث الباقية لتلد فئران تحمل الطفرة بصورة نقية أى نسختين من الجين الطافر فتظهر عندئذ الشذوذ الجسدى أو المرضى لنتعرف على وظيفة الجين المستهدف ٠

التخليق الحيوى أو بناء البروتين Protein Synthesis

تحتوى الخلية على مجموعة من الحامض النووى الناقل tRNA وهي عبارة عن جزيئات من الأحماض النووية الرايبوسومية صغيرة الطول (٧٠- ٩٠) نيوكليتيدة يسمح بتركيب جزئ الحامض النووى tRNA بوجود موقعين نوعيين يمكن لإحدهما أن يتعرف على االحمض الأمينى ويرتبط به بمساعدة إنزيم نوعى يسمى الحامض النووى tRNA synthetase في حين يقوم الموقع الآخر وهو المحتوى على الكودون المضاد والذي يحتوى على ثلاث قواعد بالتعرف على الكودون الموجود في تتابع جزئ الحامض النووى mRNA مما يسمح للأحماض الأمينية أن تصطف طبقا لهذا التتابع النيوكليتيدى ٠ ويوجد لكل حمض أميني الحامض النووى tRNA أو أكثر والذى يعد بمثابة عربة لنقل لأحماض الأمينية من السيتوبلازم إلى الرابيوسوم حيث يتحد الحمض الأمينى والمعين مع أحدى نهايتي الحمض النووي الرابيوسومى في حين يتم التزاوج الصحيح بين الكودون ومضاد الكودون بالروابط الهيدروجينية، وعليه يقوم الحامض النووى tRNA بدور أساسي كوسيط في عملية الترجمة أو يقوم بتحويل تتابع النيوكلتيدات إلى تتابع من الأحماض الأمينية وفي نفس الوقت يتم تكوين رابطة ذات طاقة عالية عند النهاية الكربوكسيلية لهذا الحمض بحيث يمكنها أن تتفاعل مع المجموعة الأمينية للحامض الأمينى التالي (شكل ١٠)٠



شكل ١٠: نباء البروتين

ويتم نسخ الحامض النووى RNA أى الرسالة التى ترسلها النواة الى الخلية بدرجة إنتقائية حيث يحدث نسخ جزئي فقط لتتابعات معينة من DNA

obeikandl.com

الجين لإنتاج الحامض النووى mRNA مع بقاء نسبة صغيرة فقط يتم على التتابعات المنسوخة عمليات تجهيز وتعديل وحذف لتتابعات من الحامض النووى RNA النووى قبل خروجها النهائى الى السيتوبلازم. وتنتقى النواة جينات معينة لنسخها لتقوم بوظائف محددة تبعا لنوع الخلية ومكانتها ووظيفتها فى النسيج أو العضو لذلك فإنزيمات بلمرة الحامض النووى RNA لابد لها من التعرف على منطقة المستبدئ أو المحفز الموجودة فى الجين والمعروفة بإسم Promoter عن طريق إرتباط بروتينات نوعية مع تتبعات معينة من DNA القالب لتنشيط المحفز . ويطلق على تلك البروتينات النوعية إسم عوامل النسخ Transcription factors كما سبق ذكره، وهى بمثابة مفتاح التشغيل لبدء التناسخ، وتبحث عوامل النسخ على تتابع معين يعرف بصندوق TATA يتم التعرف عليه بإستخدام أصابع الزنك فى عامل النسخ ويكون عادة على بعد ٢٥٠ قاعدة من موقع بدء النسخ، فيؤدى عامل النسخ على تحفير النشاط النسخى لإنزيمات بلمرة الحامض النووى RNA وينتج سلسلة الحامض النووى RNA من عدد من الوحدات يتراوح عددها بين ٨٠٠٠-٢٠٠٠٠ نيكلوتيدة وهى أطول كثيراً من طول الحامض النووى mRNA الذى يكون البروتين (١٢٠٠ نيكلوتيدة تشفر لحوالى ٤٠٠ حمض أمينى ليكون سلسلة البروتين).

والسؤال الآن كيف يتسنى لإنزيم Aminoacyl-tRNA synthetase ربط الحامض النووى tRNA بالحمض الأميني المعين والتوفيق بين الحمض الأميني الصحيح وبين الحامض النووى tRNA النوعي الخاص وخاصة للأحماض الأمينية المتشابهة التركيب حيث يقوم الإنزيم بالتفرقة بين الأحماض الأمينية تبعا للمراكز النشطة له وكذلك التفاته حول الحامض النووى tRNA الملائم. ويدخل في بناء البروتين الرابيوسومات وهي بمثابة

أنوال يتكون عليها البروتين ويتكون جسم الرايبوسوم الذي يظهر كحبيبات على الشبكة الأندوبلازمية من الحامض النووى RNA الرايبوسومى من تحت وحدتين أحدهما كبيرة والأخرى أصغر ويبدأ تخليق البروتين عندما ترتبط تحت وحدة رايبوسومية بجزئ الحامض النووى mRNA الذي يكون له أول كودون AUG وهو كودون أو شفرة البدأ للترجمة وتكوين سلسلة عديد الببتيد أو البروتين التي ستبنى، ثم ترتبط تحت وحدة ريبوسوم كبيرة بالمركب السابق وعندئذ تبدأ تفاعلات بناء البروتين. ويوجد على الرايبوسوم موقعين يمكن أن ترتبط بهما جزيئات الحامض النووى tRNA أحدهما يطلق عليه موقع الببتيديل P والثاني يطلق عليه الموقع أمينو أسيل A وتبدأ سلسلة عديد الببتيد في الإستطالة في دورة تتكون من ثلاث خطوات.

يرتبط مضاد الكودون الحامض النووى tRNA بالكودون التالي على جزئ الحامض النووى mRNA وبالتالي يصبح الحمض الأميني الذي يحمله الحامض النووى tRNA الحمض الأميني التالي في السلسلة عديد الببتيد، ثم حدوث تفاعل نقل الببتيديل الذي ينتج عنه رابطة ببتيدية بعده يكون tالحامض النووى RNA الأول فارغا ويترك الرايبوسوم، أما الحامض النووى tRNA الثاني فيحمل الحمض الأميني له مع الحمض الأميني الأول (المثيونين). ويتحرك الرايبوسوم على إمتداد الحامض النووى mRNA فينتقل الحامض النووى tRNA حاملا الحمض أو الحمضين الأمينين إلى الموقع P ويدخل إلى الموقع A كودون جديد وهو التالي ثم تبدأ الدورة مرة أخرى مكونة الحمض الأميني الثالث وهكذا يتكرر الأمر. وتقف عملية البناء عندما يصل الرايبوسوم إلى كودون وقف البناء على الحامض النووى mRNA وهناك بروتين يرتبط بكودون الإيقاف يسمى عامل الإطلاق Release factor حيث يحرر الرايبوسوم من الحامض النووى RNA الرسول (شكل ١٠).

يمكن أن يقود تسلسل الأحماض الأمينية إلى بروتينات ذات أشكال متشابهة ولقد وضعت حديثا مجموعة دولية من علماء البيولوجيا التركيبية Structural Biologists برنامجًا عرف بمبادرة بناء البروتين Protein Structure Initiative ليحل محل البروتينات إما من خلال صنع بلورات نقية جداً من بروتين ما ثم قذف هذه البلورات بالأشعة السينية أو من خلال دراسة البروتين بتحليل طيف الرنين المغناطيسي النووي Nuclear Resonance Magnetic ·

وعند إستعمال المعلومات عن البناء ذات الصلة من أجل جمع البروتينات في عائلات تتشارك على الأرجح في السمات الهندسية التركيبية ثم إستهداف بروتينات ممثلة لكل عائلة لدراستها بالتقنيات الفيزيائية المجهدة Painstaking Physical Techniques · وقد يستطيعوا في المستقبل القريب وضع نماذج البروتين المدروسة في صورة برامج على أجهزة الحاسب الآلي من اجل عمل برنامج حاسوبي لنمذجة البروتين وإبتكار أشكال لطي البروتينات، ويتصور العلماء وجود ١٠٠٠ صورة أساسية لطريقة طي البروتين ·

هذا وسوف نلقى بمزيد من الضوء على البنية الأساسية للمادة الوراثية كما يلي:

الأحماض النووية Nucleic Acids

تلقى الأحماض النووية عظيم الإهتمام في الدراسات والبحوث في الحقبة الحالية، لما أحدثته من ثورة في العلوم البيولوجية، فرصدت لأبحاثها مليارات الدولارات وأنشأت من أجلها العديد من المعامل البحثية والمنح الدراسية وصدرت لدراساتها المجلات العلمية المتخصصة، وقد أدت الأبحاث

فيها إلى تقنيات فريدة جمع بعضها تحت إسم الهندسة الوراثية Genetic Engineering، ثم تطورت إلى أن أصبحت البيولوجيا الجزيئية Molecular Biology كعلماً قائما بذاته يتناول آفاقا غير مسبوقة في أساليب البحث وتقنياته وأهدافه، وإرتبط ذلك ببعض جوانب التكنولوجيا الحيوية Biotechnology. وكان لذلك آثارا تطبيقية ذات مردود إقتصادي في مجالات مختلفة منها الإنتاج الزراعي والحيواني سواء من ناحية الكم أو النوع، كما دفعت هذه الدراسات بالفكر البشرى إلى منحنى جديد. ولا شك أن هذه الثورة العلمية التي نعيشها الآن في مجال دراسات الأحماض النووية والتى سيكون لها أبلغ الأثر فى حياة الإنسان في القرن الحادي والعشرين.

أنواع الأحماض النووية Types of Nucleic Acids

١- حامض الديوكسى رايبونيوكلييك (Deoxyribonucleic acid (DNA

٢- حامض الرايبونيوكلييك (Ribonucleic acid (RNA

ويوجد ثلاثة أنواع من الحامض النووى RNA وهي:

أ- الحامض النووى الرسول mRNA

ب- الحامض النووى الناقل tRNA

ج- الحامض النووى الرايبوسومي rRNA

وقبل التطرق بشئ من التفاصيل إلى وظيفة تلك الأنواع من الأحماض النووية، يجب معرفة أهم الفروق بين تلك الأحماض فى الجدول التالى.

جدول (٢): الفرق بين الحامض النووى DNA والحامض النووى RNA

وجه المقارنة	الحامض النووى DNA	الحامض النووى RNA
وجوده	النواة	النواة والسيتوبلازم
الوظيفة	المادة الوراثية ومكون للكروموسومات	يساعد DNA في الوظيفة
أنواعه	ليس له أنواع	الحامض النووى الراسل mRNA، الحامض النووى الناقل tRNA ، الحامض النووى الرايبوسومي rRNA
السكر الخماسي	الديوكسى رايبوز	الرايبوز
القواعد النيتروجينية	الأدينين – الثايمين الجوانين - السيتوسين	الأدينين – اليوراسيل الجوانين – السيتوسين
الشكل	ثنائي حلزون الشكل (Double helix) سلسلتين من متعدد النيوكليوتيدات	خيط واحد النيوكليوتيدات المتعددة

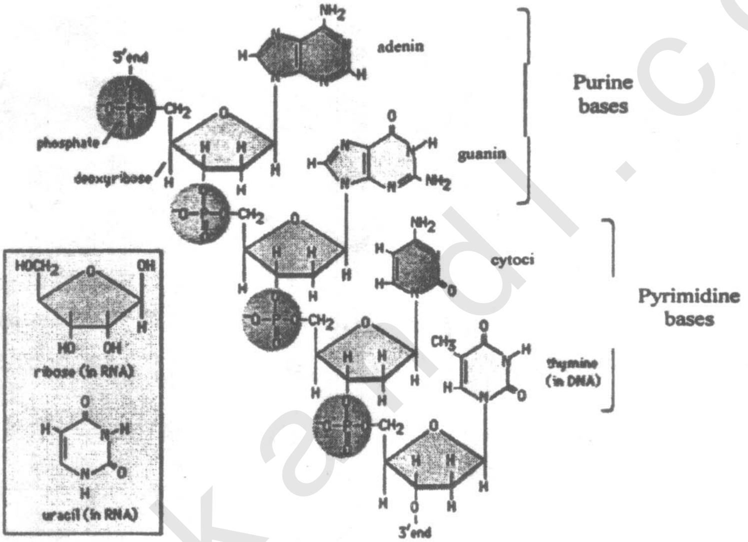
حامض الديوكسى رايبونيوكليك

Deoxyribonucleic Acid (DNA)

وهو من المكونات الأساسية للكروموسومات وهو يمثل المادة الوراثية لمعظم الكائنات الحية، وهي المادة الموجهة لعمليات إنتقال الصفات الوراثية من الآباء للذرية. وفي عام ١٩٥٤، قدم البيولوجيان واطسون James Watson (الأمريكي) وكريك Francis Crick (البريطاني) بالتعاون مع

obeikandl.com

عالم الفيزياء الحيوية ولكنز Maurice Wilkins (النيوزلندي) في جامعة كمبريدج بإنجلترا نموذجا يوضح التركيب الجزيئي لحمض DNA· ومن أجل هذا الإنجاز العلمي الكبير تم منحهما جائزة نوبل في الطب وعلم وظائف الأعضاء عام ١٩٦٢· وحسب هذا النموذج تترتب النيوكليوتيدات على صورة شريطين two strands متكاملين complementary (شكل ١١)·

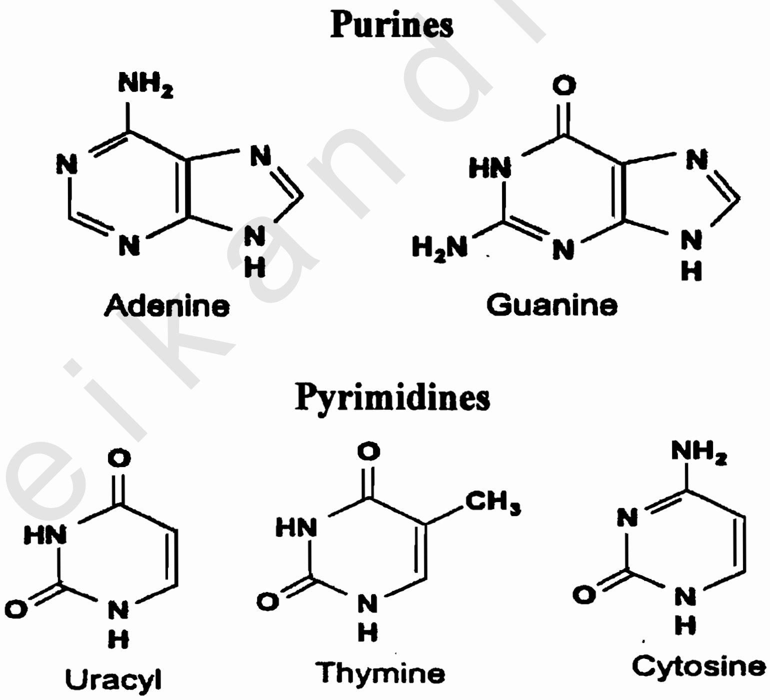


شكل ١١: التركيب الجزيئي للمادة الوراثية في شريط DNA

ويلتفا حول بعضهما فيكونان حلزونا مزدوجا double helix طويلا سمكه ٢ نانومتر، وطول اللفة الكاملة منه ٣٤ نانومتر ويتكون جزئ الحمض من عدة آلاف من هذه اللفات· ويمكن تشبيه الجزيء بالسلم، حيث يتكون كلا من جانبيه من سلسلة من جزيئات السكر والفوسفات المتبادلة بينما تتكون الدرجات Rungs or Steps فيه (والتي تربط بين الجانبين) من القواعد النيتروجينية، والمسافة بين الجانبين ثابتة وتسمح بالضبط بوجود قاعدة

obeikandl.com

نيتروجينية أحادية الحلقة مرتبطة مع قاعدة أخرى ثنائية الحلقة، والقواعد النيتروجينية كما سبق القول على طرازين: أحدهما هو البيورينات **Purines** وهى مركبات عضوية ثنائية الحلقات وهى الأدينين **Adenine** و الجوانين **Guanine**، أما الطراز الثانى فهو البيريميدينات **Pyrimidines** وهى مركبات عضوية أحادية الحلقة وهى الثايمين **Thymine** والسيتوسين **Cytosine** وينتظم الجزىء بحيث يرتبط الجوانين مع السيتوسين ويرتبط الأدينين مع الثايمين (شكل ١٢)٠



شكل ١٢: أنواع القواعد النتروجينية المختلفة فى شريط DNA

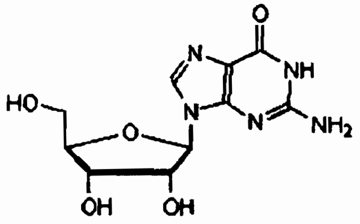
obeikandl.com

ويلاحظ أن الأدينين والثايمين يرتبطـان برابطتين هيدروجينيتين بينما الجوانين والسيتوسين يرتبطـان بثلاث من هذه الروابط. وعلى ذلك فالطاقة اللازمة لكسر الجوانين عن السيتوسين أكثر من تلك اللازمة لكسر الأدينين عن الثـايمين. ويلاحظ أن هذا الشكل السلمي يتحلزن على نفسه ليكون ما يسمى بـالحلزون المـزدوج double helix. وتمثـل النيوكليوتيـدات Nucleotides الوحـدات البنائيـة لجزئ الحمض النـووي (الوحـدة التركيبيـة فـي الأحمـاض النووية هي النيوكليوتيدة). وتتركب كل نيوكليوتيدة من جزئ سكر خماسي يرتبط مـن ناحيـة ذرة الكربـون رقـم ٥ بمجموعـة الفوسفات. ومـن ناحيـة ذرة الكربـون رقـم ١ بقاعدة نيتروجينيـة ويتكـون جـزئ DNA مـن آلاف مـن هـذه النيوكليوتيدات. ومن المعروف أن ذرات الكربون فى جزىء السكر الخماسى يعطـى لكل منها رقمـا معينـا يحدد موقعها، ويلاحـظ أن القواعد النيتروجينيـة تتصل بـذرة الكربـون رقـم ١ فـى السكر الخماسـى وأن الروابط الكميائيـة بـين السكر والقواعد النيتروجينيـة وبين السكر ومجموعـات الفوسفات هـى روابـط تساهمية covalent bonds كمـا يلاحـظ أن مجموعـة الفوسفات تتـصل بـذرة الكربون رقم ٥ لجزىء السكر من طرف بينمـا تتصل مـن الطرف الأخر بذرة الكربون رقم ٣ فى جزىء السكر التالي، كما أن مجموعتى الفوسفات المتصلة بذرة الكربـون رقـم ٥ فـى السكر الخماسـى فـى كل نيوكليوتيدين متقابلتين فـى شريط (DNA) تكونا متعاكستين في الإتجاه.

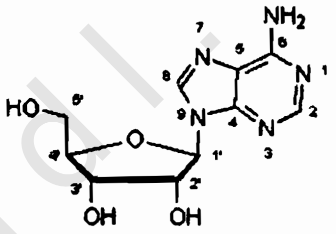
ومما تقدم ندرك أنه إذا كان تتابع القواعد النيتروجينيـة فـى الجزىء مـن أحد الشريطين'3 TCCAA '5، فـإن قطعة الشريط الآخر التـى تتكامـل معها يكون ترتيـب قواعدها النيتروجينية '5 AGGTT '3 ويتضح من ذلك أن شـريطي جـزىء DNA متوازيـان عكسيا antibarallel حيـث أن الطـرف '3لأحـد الشريطين والطـرف '5 للشريط الاخر يكونـان فـى الناحيـة نفسها.

ويلاحظ أنه إذا نزعت مجموعة الفوسفات من النيوكليوتيد أطلق على المركب الباقى إسم نيوكليوسيد nucleoside ٠

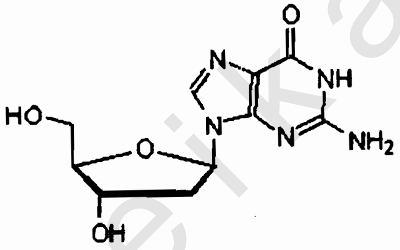
وعلـى ذلـك فالنيوكليوسـيدات المعرفـة (شـكل ١٣) هـي أدينوسـين adenosine، جوانوسـين guanosine، سـيتيدين cytidine، يوريـدين uridine، ثايميـدين thymidine، ويـضاف المقطـع الأولـي (دي أوكسي) - Deoxy للدلالة على الدي أوكسي نيوكليوسيدات deoxyribonucleosides ٠



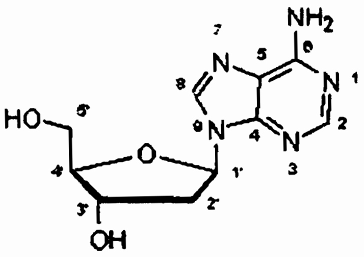
Adenosine



Adenosine

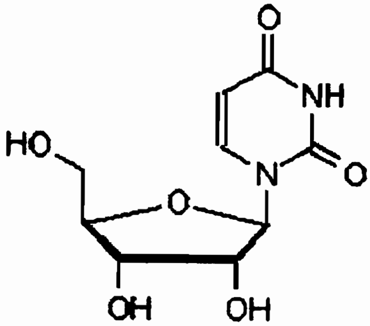


Deoxyguanosine

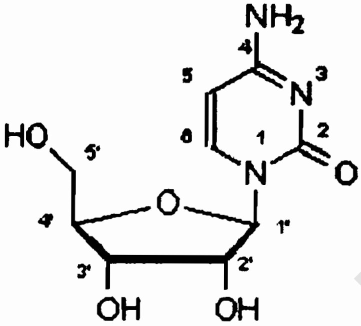


Deoxyadenosine

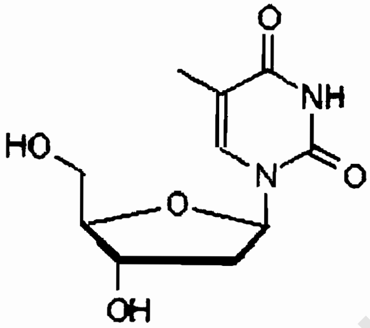
obeikandi.com



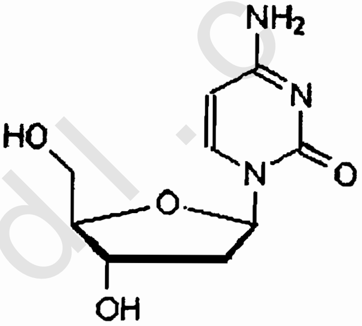
Uridine



Cytidine



Thymidine (Deoxythymidine)



Deoxycytidine

شكل ١٣: أنواع النيوكليوسيدات المختلفة

ويمكن بإيجاز القول أن تركيب الحامض النووى **DNA** ذو طبيعة تسمح له بحمل المعلومات الوراثية، بالإضافة إلى أن طبيعة هذا التركيب تسمح له أيضا بمضاعفة نفسه. ويمكن أن ترتبط النيوكليوتيدات **Nucleotides** بروابط تساهمية بأى نظام لتكوين بوليمرات عديدة الوحدات وطويل **Long polymers**. وكما ذكرنا فكل بناء من قوالب الحامض النووى **DNA** عبارة عن نيوكليوتيد **Nucleotide** يتكون من سكر خماسى وهو الديوكسى ريبوز **Deoxyribose** وفوسفات **phosphate** وقاعدة نيتروجينية **Nitrogen base**. والقواعد النيتروجينية تتضمن مجموعتان من

obeikandl.com

البيـــورين Purines وتتـــضمن الأدينيـــــن Adenine (A) والجـــوانين Guanine (G) أمـا المجموعـة الثانيـة فهـى البيريميـدين Pyrimidines٠ وتشتمل علـى الثـايمين Thymine (T) والسيتوسين(C) Cytosine ، وترتبط النيوكليوتيدات ببعضها بواسطة روابط تساهمية لتكوين عمود فقرى مـن تعاقـب الـسكر والفوسـفات Sugar-Phosphate backbone٠ والنيوكليوتيدات ترتبط ببعضها عن طريق الروابط التساهمية التـى تربط ذرة الكربون الثالثة فى جزئ سكر بالفوسفات المرتبطة بذرة الكربون الخامسة فـى جزئ السكر المجاور له ليكون 3,5 phosphodiester linkage٠

ولذا فمن الممكن تكوين عديد النيوكليوتيدات بأى طول كان٠ فنحن نعلم أن جزيئات DNA داخل الخلايا تتكون مـن ملايين القواعد فـى الطـول، وأن النيوكليوتيدات يمكنها أن ترتبط مع بعضها بأى طراز٠ ومهما كان طـول هذه السلسلة فلها نهايتين، النهايـة الخامسة The 5`end والتـى لهـا ذرة الكربـون الخامسة والنهاية الثالثة The 3`end والتـى لهـا ذرة الكربون الثالثـة والتـى لا ترتبط بنيوكليوتيد أخر٠ وعندما إهتم هذان العالمان بدراسة الحامض النـووى DNA كمـادة وراثيـة فقـد أوضـحا لنـا الكثيـرًا مـن خصائـصه الطبيعيـة والكيميائية، كما أنهما إهتما بتجميع المعلومات المتكاملة عن هذا الحـامض مـع بعضها فـى نموذج يوضـح كيـف يقوم هذا الجزئ بحمل المعلومـات الوراثيـة بالإضـافة إلـى قدرتـه علـى مضاعفة نفسه self-duplication بنفس تركيبـه السابق٠

خواص الأحماض النووية Properties of Nucleic Acid

تمتص القواعد النتروجينيـة مـن نـوع البيورين والبيريميـدين الموجـودة في الأحماض النووية الأشعة فوق البنفسجية بدرجة كبيرة عند موجة ذات طـول

٢٦٠ نانوميتر • وتستخدم هذه الخاصية لتقدير هذه القواعد النتروجينية كمياً من خلال تقدير نيوكليتيداتها وأيضاً الأحماض النووية الداخلة فى تركيبها• وعلى كل حال، فإن للحمض النووي DNA معامل إمتصاص نوعي عند طول الموجة ٢٦٠ نانومتير لكنه يقل بمقدار حوالي ٣٥ ـ ٤٠ % عن معامل الإمتصاص النوعي المتوقع من حاصل جمع الإمتصاص لكل قاعدة (على حدة) من القواعد الداخلة بتركيب الحمض النووي DNA• وهذه النظرية تسمى بنظرية التأثير الهيبوكرومي Hypochromic Influence Theory • وهنا الإنخفاض في درجة الإمتصاص النوعي للاشعة فوق البنفسجية بالنسبة للقواعد الآزوتية المتحدة بجزيئات الحمض النووي DNA عن نظيرتها الحرة يرجع ذلك لتكون روابط هيدروجينية بين القواعد النتروجينية المتراكبة الواحدة فوق الأخرى في كل من السلسلتين الحلزونيتين للحمض النووي DNA• وهذه الخاصية مفيدة في تقدير درجة الحلزنة Helicity الحمض النووي DNA•

وعند تسخين الحمض النووي DNA المبلمر بدرجة كبيرة لكن ببطئ فإن السلسلتين حلزونيتي الشكل به تبتعدان عن بعضهما وتسمى عملية الإبتعاد هذه بعملية إنفصال أو تشتيت السلسلتين Melting• وهذا التحول من الشكل الحلزوني ذو السلسلتين الى أي شكل عشوائي يحدث من خلال رفع درجة الحرارة ونتيجة لهذا التحول تزداد درجة الإمتصاص النوعي• وتسمى درجة الحرارة التي يحدث عندها الزيادة المفاجئة في الإمتصاص للأشعة فوق البنفسجية بدرجة حرارة الإنفصال أو الإنصهار (Melting temperature (Tm للحمض النووي• ولكل نوع من أنواع الحمض النووي DNA درجة Tm خاصة به• أما عند إعادة تبريد المحلول ببطئ فإنه يحدث إعادة لتكوين

obeikandl.com

الشكل الحلزوني ذو السلسلتين مع امكانية حدوث تبادل بين السلاسل وتسمى هذه العملية بالإلتحام Annealing.

خصائص الحامض النووى DNA Characteristics

تم التعرف على معلومات هامة عن تركيب الحامض النووى DNA عن طريق حيود أشعة أكس X-ray diffraction أى إنحراف أشعة أكس إنحرافا ضئيلاً عند مرورها بحواف الحامض النووى كما ذكر العالم روزالين فرانكلين Rosalin Franklin. فحيود أشعة أكس هى بمثابة طريقة فعالة لتقدير المسافات بين الذرات الموجودة فى جزيئات متراصة بانتظام (تركيب متعاقب من البلورات). ولأشعة أكس طول موجة صغير جدا لدرجة أنها تتبعثر بواسطة الإلكترونات المغلفة للذرة فى الجزئ. والذرات التى لها سحابة إلكترونية كثيفة مثل الفوسفور Phosphorus والأوكسجين Oxygen تسبب إنحراف الإلكترونات بقوة أكبر مقارنة بالذرات ذات العدد الذرى الأقل.

من المعروف أنه عند تعريض التركيب البلورى للحمض النووى لأى تركيب لأشعة أكس المكثفة يحدث أن يسبب الترتيب المنتظم للذرات فى البلورة إلى حيود أشعة أكس أو إلتوائها فى إتجاهات معينة. ونظام حيود أشعة أكس هذا يمكن رؤيته فى فيلم ضوئى (فيلم تصوير) كنقاط معتمة. وعن طريق التحليل الرياضي Mathematical analysis لترتيب النقاط المعتمة والمسافة بينهما يمكن أن يستخدم لتقدير المسافة بين الذرات وإتجاه هذه الذرات داخل الجزئ بدقة كاملة.

وعندما سعى العالمان واطسن وكريك لحل مشكلة تركيب الحامض النووى DNA كان فرانكلين قد صور بالفعل عن طريق أشعة أكس X-ray

فيلما لنموذج الحامض النووى DNA والصورة أظهرت بوضوح أن الحامض النووى DNA عبارة عن تركيب حلزونى الشكل، وأن هناك ثلاثة أنواع هامة من النماذج المنتظمة والمتعاقبة فى الجزئ والتى لها أبعاد ٣٤ نانومتر، ٢ نانومتر٠ ومن هذا النموذج توصل فرانكلين إلى أن القواعد النيوكيلوتيدية Nucleotide bases (والتى هى عبارة عن جزيئات مسطحة) هى عبارة عن رفوف متراصة فوق بعض مثل درجات السلم المتراصة فوق بعضها٠ وبإستخدام هذه المعلومة بدأ العالمان واطسن وكريك بوضع عدة نماذج لمكونات الحامض النووى DNA مع محاولة توفيقهم مع بعض ليتفقوا مع البيانات المأخوذة من تجارب العالم فرانكلين٠ وبعد عدة تجارب قاما العالمان بوضع نموذج للحامض النووى DNA يتكون من سلسلتين من عديد النيوكليوتيد two nucleotide chains ملتفين حول بعضهما فى صورة حلزون مزدوج٠ ونجد أيضاً أن السكر والفوسفات المكونين للعمود الفقرى للسلسلتين يكونوا الجدار الخارجى للحلزون، أما القواعد المتصلة بكلتا السلسلتين فتوجد فى الوسط٠

الروابط الهيدروجينية المتكونة فى الخيط المزدوج للحامض النووى DNA فى عام ١٩٥٠ قام العالم إدون تشارجاف ومساعدوه بجامعة كولومبيا بدراسة نسب القواعد النتروجينية فى الحامض النووى DNA بالنسبة لبعضها البعض ووجدوا أنه بعض النظر عن مصدر الحامض النووى DNA (أى نوع الخلية التى أخذ منها أو نوع الكائن الحى المأخوذ منه) وجد أن نسبة الأدينين (A) إلى الثايمين (T) وأيضاً نسبة الجوانين (G) إلى الستيوزين (C) جميعها لا تبتعد عن الواحد الصحيح كما وجد أيضاً أن نسبة البيورين إلى البيريميدين أيضاً تساوى الواحد الصحيح٠ أو بمعنى أخر وجد أن الأدينين A يساوى الثايمين T وأن الستيوزين C يساوى الجوانين G أى

(G=C) و (A=T) رصدت الدراسات التى أجريت على حيود أشعة أكس X-ray diffraction أن للحلزون المزدوج إتساع منتظم ودقيق وإستدل علي ذلك من حيود مقداره أثنين نانومتر وهذه النتيجة تتفق مع النتائج السابقة التى تفيد أن قواعد البيريميدين وهما السيتوسين (C) والثايمين (T) تحتوى فقط على حلقة واحدة من الذرات وهما أصغر من قواعد البيورين وهما الجوانين(G) والأدينين (A) واللذان يحتويان على حلقتين فى تركيبهما. ولذا فالدراسات التى أجراها واطسن وكريك على نماذج الحامض النووى DNA أكدت أنه عند نقط إتصال خيطى الجزئ ترتبط قاعدة من البيورين مع قاعدة من البيريميدين فيكون إتساع الحلزون عند هذه النقطة يساوى أثنين نانومتر. أما لو إتحدت قاعدتين من البيورين (كل واحدة منها إتساعها ١٢ نانومتر) فسوف تكون نقط الإتصال بإتساع أوسع من إثنين نانومتر، أما لو إتحدت قاعدتين من البيريميدين فسوف يكون إتساعها أقل من إثنين نانومتر. وبالتالى فلابد أن يكون هناك إرتباط ما بين قاعدة من البيورين مع قاعدة من البيريميدين. ثم أثبتت الدراسات بعد ذلك أن الأدينين (A) يرتبط بالثايمين(T) وأن السيتوسين (C) يرتبط بالجوانين (G) والسبب فى أن الثايمين (T) يرتبط فقط بالأدينين (A) هو أنهم يرتبطوا ببعض بزوج من الروابط الهيدروجينية two hydrogen bonds أما السيتوسين (C) والذى لا يرتبط إلا بالجوانين (G) فهما يرتبطان ببعض بعدد ثلاث روابط هيدروجينية. وبالتالى فكل أدينين (A) فى أحد خيطى السلسلة لابد أن يقابل ثايمين (T) فى الخيط المقابل وأيضا كل سيتوزين (C) فى أحد خيطى السلسلة لابد أن يقابله جوانين (G) فى الخيط المقابل. ولذلك فتعاقب القواعد فى السلسلتين تكون متممة Complementary لبعضهما. وبديهي أيضا أنها لا يمكن أن تكون متطابقة مع بعضها. أو بمعنى آخر أننا لو نتتبع

تتابع القواعد فى أحد السلسلتين فيمكننا معرفة ماهية القواعد فى السلسلة الأخرى ومثالا لذلك فلو كان ترتيب القواعد فى أحد الخيطين هو:

3_____AGTCACTG_____5\

فيكون ترتيب القواعد فى الخيط المقابل هو

5_____TCAGTGAC_____3\

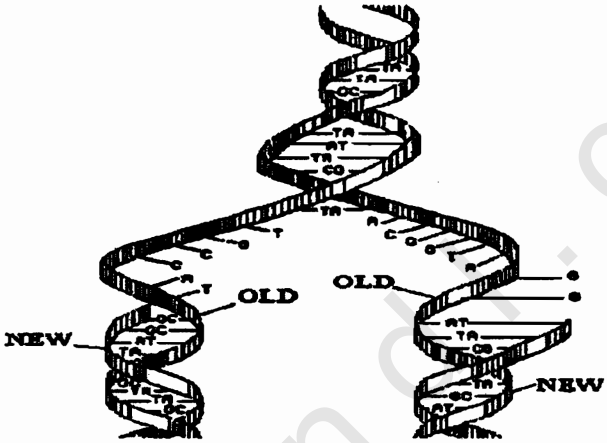
ونموذج الحلزون المزدوج للحامض النووى DNA يؤكد الإعتقاد السائد بأن تعاقب القواعد فى الحمض النووى DNA يمكن أن يسمح بتخزين المعلومات الوراثية. وحيث أن جزئ DNA داخل الخلية يمكن أن يتكون من الملايين من القواعد فى الطول، لذا فهو يسمح بتخزين كمية كبيرة جدا من المعلومات الوراثية.

تضاعف أو تناسخ (تكرار) المادة الوراثية DNA Replication

تشتمل آلية تضاعف جزئ حمض DNA على فك إرتباط شريطي عديد النيوكليوتيدات المكونين للجزئ بعضهما عن بعض وذلك بفك الروابط الهيدروجينية الضعيفة التي تربط بينهما. ويتبع هذا تراص نيوكليوتيدات جديده أمام كل شريط، وإرتباط بعضها ببعض بمساعدة إنزيم البلمرة DNA polymerase، وبذلك يتم تخليق شريطين جديدين من عديد النيوكليوتيدات. وبمعنى آخر فإن كل شريط قديم يعمل كقالب يتكون وفقا له شريط جديد، وبذلك فإن كل جزئ من حمض DNA يكون قد تضاعف الي جزيئين. ومن المهم أن نذكر أن تتابع القواعد النيتروجينية في الشريط القديم هو الذي يحدد تتابعها على الشريط الجديد، ومن هنا جاء القول بأن الشريط القديم يعمل كقالب للشريط الجديد، فإذا كانت القاعدة النيتروجينية على الشريط القديم (A) مثلا، جاءت أمامها القاعدة (T)على الشريط الجديد، والعكس بالعكس، كذلك إذا كانت

obeikandl.com

القاعدة (G) على الشريط القديم، جاءت أمامها القاعدة (C) على الشريط الجديد، والعكس صحيح (شكل ١٤)٠



شكل ١٤: عملية تضاعف وتناسخ شريط DNA

Mechanism of DNA Replication آلية تضاعف المادة الوراثية

ويوصف تضاعف جزئ حمض DNA بأنه "شبه محافظ" semiconservative، ذلك أن كل جزئ ناتج عن التضاعف يكون محتفظا بأحد شريطي الجزئ الأصلي، بينهما يكون الشريط الآخر لهذا الجزئ الناتج مستحدث التكوين٠ ويتحكم الحامض النووي في العمليات البيولوجية في أى كائن حى وذلك لأنه يعتبر المركز الوحيد للمعلومات الوراثية Genetic Information التى تنتقل بطريقة دقيقة من الآباء إلى النسل الناتج ويتم تضاعف الحامض النووى DNA بثلاثة طرق هى :-

١-الطريقة شبه المحافظة **Semiconservative of DNA Replication**

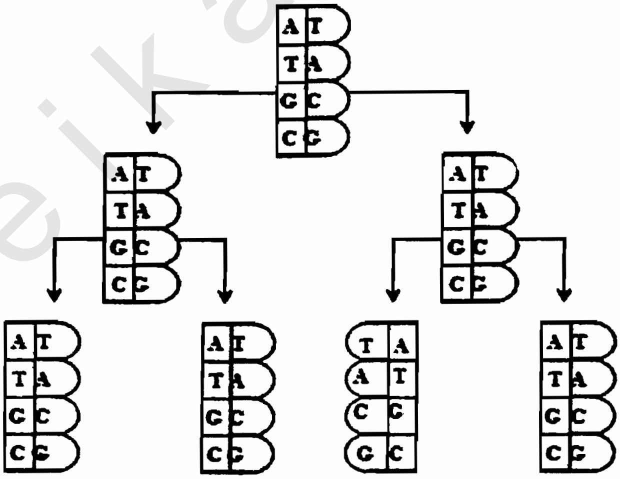
٢- الطريقة المحافظة **Conservative of DNA Replication**

٣- الطريقة التشتتية **Dispersive Replication mechanism**

١- الطريقة شبة المحافظة لتكرار المادة الوراثية

Semiconservative of DNA Replication

أصبح من الواضح الآن أن الحامض النووى DNA يتكون من حلزون مزدوج تتزاوج فيه القواعد النتروجينية بنظام محدد ومعين كما سبق الإشارة سلفاً وبالتالى فتزاوج القواعد هذا يمدنا بالآلية البسيطة لتكرار الحامض النووى DNA (شكل ١٥)٠ فلو تكسرت الروابط الهيدروجينية بين الخيطين وإنفصلت السلسلتين عن بعضهما٠ فكل نصف حلزون فى هذه الحالة يمكن أن يتكامل مع نيوكليوتيدات جديدة لتحل محل النيوكليوتيدات التى كانت متزاوجة معه فى الخيط القديم٠ وبعبارة أخرى أنه يمكن لكل خيط أبوى فى هذه الحالة أن يدير



شكل ١٥: الطريقة شبه المحافظة لتكرار المادة الوراثية DNA

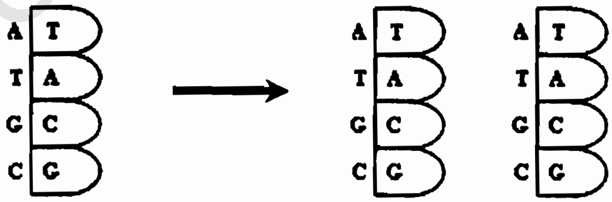
obeikandl.com

عمليـة تكـوين خلـيط مكمـل جديـد علـى أسـاس شـروط نظـام تـزاوج القـواعـد النتروجينية السابق ذكره، وبالتـالى فكل خيط أبوى يعمل كقالب لخيط جديد • فمثلا الجوانين (G) فى الخيط الأبوى يعمل كقالب لوضـع السيتوسين (C) وأيضاً الثـايمين (T) فـى الخيط الأبوى يعمل كقالب لوضـع الأدينين (A)• وسميت هذه الطريقة فى تكرار DNA بالطريقة شبه المحافظة للتكرار نظرا لأن الحلـزون الأبـوى المـزدوج يحـافظ عليـه جزئيـا أثنـاء تكـرار الحـامض النـووى DNA وآليـة التكـرار شـبه المحافظـة Semiconservative Replication Mechanism هذه قد تم إقتراحها بواسطة العالمـان واطـسن وكريك، وهى طريقة بسيطة وتوضح كيفية مضاعفة الحامض النووى DNA•

٢ـ الطريقة المحافظة لتكرار المادة الوراثية

Replication of DNA Conservative

إن آليـة هـذة الطريقـة المحافظـة هنـا تعنـى بقـاء الحلزونـات الأبويـة المزدوجـة كمـا هـى بـدون أن تنفصـل أى بـدون تكسـر الـروابط الهيدروجينيـة الموجودة بين القواعد النتروجينية ومن هنا جاءت التسمية أنها محـافظ عليها تماما• وفى هذه الطريقة فإن الحلزون المزدوج يقوم بتكوين حلزون مزدوج جديد مكون من خيطين مخلقين (شكل ١٦)



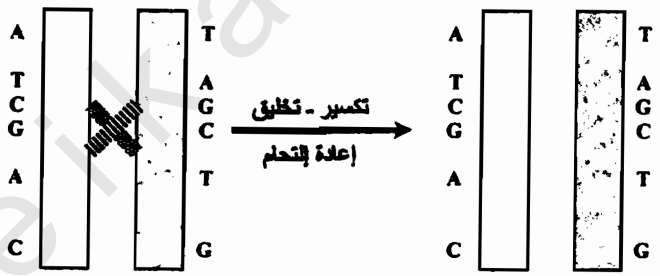
شكل ١٦ : الطريقة المحافظة لتكرار المادة الوراثية DNA

يوضح الشكل الآلية المحافظة لتكرار (مضاعفة) DNA ويتضح فى الشكل أن الحلزون الأبوى يبقى كما هو دون أن تنفصل السلسلتين ويستخدم كقالب وتطبع عليه القواعد المقابلة للقواعد النيتروجينية الموجودة فى القالب الأبوى. وبالتالى ينتج قالب جديد من DNA (وهو المرسوم بالنقط وليس بخطوط متصلة).

٣- الطريقة التشتتية لتكرار المادة الوراثية

Dispersive Replication of DNA

يتم فيها تداخل أجزاء من الخيوط الأبوية والخيوط الجديدة من خلال عمليات تكسير وتخليق وإلتحام لهذه الأجزاء وتجدر الإشارة أن هذا التداخل بين أجزاء الخيوط يتم بطريقة عشوائية. والشكل (١٧) يوضح هذا التداخل العشوائى (تكسير - تخليق - إعادة إلتحام) أثناء الطريقة التشتتية لتكرار الحامض النووى DNA.



شكل ١٧: الطريقة التشتتية لتكرار المادة الوراثية DNA

بالرغم من بساطة آلية تكرار الحامض النووى إلا أن عملية التكرار هذه تحتاج إلى تركيب متخصص يحتوى على عدد كبير من البروتينات والإنزيمات، والتى تعمل مع بعضها البعض بنظام متكامل. ولذا يطلق

عليها العلماء Replication machine • ويجب ملاحظة أن هناك بعض الفروق التى توجد بين خلايا النباتات الراقية مميزة النواة eukaryotic cells وخلايا النباتات الدنيئة غير مميزة النواة prokaryotic cells • ففى الخلايا غير مميزة النواة يوجد الحمض النووى DNA على شكل خيط دائرى مفرد وغير مغلف بغشاء نووى• أما فى الخلايا مميزة النواة فيوجد بداخل نواتها الكروموسومات وكل كروموسوم مفرد يحتوى على جزئ من حلزون مزدوج مكون من خيطين ملتفين حول بعضهما ومعهم كمية كبيرة من البروتين والحامض النووى RNA•

وتجدر بالإشارة إلى أن الخيطين المكونين لجزئ DNA والملتفين حول بعضهما على شكل حلزون يجب أن يعودا عن هذا الإلتفاف ليبتعد الخيطين المكونين للحلزون عن بعضهما أثناء عملية تكرار DNA • فكما ذكرنا سلفاً عن نموذج واطسن وكريك للحلزون المزدوج المتكون من التفاف خطين DNA حول بعضهما مثل الحبل المجدول• ولو أردنا نزع (إبعاد) هذين الخيطين عن بعضهما فلابد أن يلف أحدهما عكسيا حول الخيط الآخر • ويحفز عملية فصل خيطى DNA (المكملين لبعضها) إنزيمات تسمى DNA helicase enzymes والتى تنتقل على طول الحلزون وكلما إنتقلت لمكان على الحلزون تقوم بفك الخيطين عن بعضهما، وفى نفس اللحظة التى ينفصل فيها الخيطان عن بعضهما تقوم بروتينات يطلق عليها إسم helix-destabilzing proteins بالإرتباط على خيط DNA المفرد وذلك لتجنب إرتباطه مره أخرى بالخيط المكمل حتى تتم عملية أخذ نسخة (Copy) من كلا الخيطين• وحيث أن جزئيات DNA طويلة جداً ورفيعة لذا فيجب أن تتم هذه العملية بحيث تبقى الصفات المحمولة على جزئ DNA دون تغير • ولذلك فهناك إنزيمات متخصصة يطلق عليها Topoisomerases وهذه

obeikandl.com

المجموعة من الإنزيمات تقوم بقطع الجزء من DNA ثم إعادة وصله (لحامه) مرة أخرى بعد إجراء عملية التكرار . وجديرا بالذكر أن عملية تخليق DNA دائما تتم فى إتجاه 5/ ______ 3/، حيث إن الإنزيمات التى تحفز عملية ربط النيوكليوتيدات ببعضها يطلق عليها DNA Polymerases وهى إنزيمات لها عدة خصائص تجعلها موائمة ومتخصصة لعملية التكرار بمواصفات وحدود معينة، فهى قادرة على إضافة نيوكليوتيد Nucleotide فقط إلى النهاية (3' end) من الخيط عديد النيوكليوتيد Ploynucleotide strand والذى يتم تخليقه كنسخة من الخيط الأصلى (لاحظ أن النسخة التى يتم تخليقها تكون بها القواعد المكتملة للقواعد الموجودة بالخيط الأصلى).

وكم ذكرنا من قبل أن هناك نيوكليوتيدات Nucleotides تعرف بإسم Nucleoside Triphosphates وهذه تستخدم كمادة لازمة لتفاعلات البلمرة Ploymerization Reactions، وهذه الجزئيات مشابهة لحامل الطاقة ATP من ناحية أن كلا الجزيئين يحتوى على ثلاث مجموعات فوسفات مرتبطة بذرة الكربون الخامسة بمجموعة السكر والقاعدة. ومع كل إرتباط عند إثنين النيوكليوتيدات مع بعضهما ويتم نزع مجموعتين فوسفات من جزئ النيوكليوسيدات ثلاثية الفوسفات Nucleoside Triphosphates . ويجدر الإشارة أنه لأن سلسلة عديد النيوكليوتيد Ploynucleotide Chain المخلقة تمتد لتطول بواسطة ربط Phosphate group 5' للنيوكليوتيد القادم بالـ 3`Hydroxyl Group of the Sugar عند نهاية الخيط. لذا فالخيط الجديد المخلق من DNA عادة ما ينمو فى إتجاه 5/ ______ 3/ .

obeikandi.com

إستخلاص وعزل المادة الوراثية فى النبات

Extraction and Isolation of Plant DNA

يمكن القول أن طريقة عزل المادة الوراثية من أى كائن حى واحدة، وإنما الإختلاف فقط فى طريقة الإستخلاص سواء من النبات، أو الحيوان أو الكائنات الأخرى. ويمكن الإشارة إلى إستخلاص وعزل المادة الوراثية فى النبات فى كما يلى (شكل ١٨):

١- يتم جمع أى جزء من نبات سليم وقوى من النبات المراد إستخلاص المادة الوراثية له ويفضل أن تكون تلك الأجزاء الطازجة.

٢- يطحن أجزاء النبات فى هون بإستخدام يد هون جيداً ثم يضاف محلول الإستخلاص المنظم.

٣- يعرض المستخلص الناتج لعملية الطرد المركزى لفصل الجزء الرائق العلوى من محلول الإستخلاص المنظم عن بقية حطام الأجزاء النباتية الأخرى.

٤- يخلط الجزء الرائق العلوى بعد فصله فى أنبوبة نظيفة مع الإيثانول لترسيب المادة الوراثية والتى ستكون على هيئة صورة تجمع فى قاع الأنبوبة.

٥- يتم التخلص من الجزء العلوى (السائل الموجود أعلى الأنبوبة).

٦- يتم غسيل الجزء المتجمع فى قاع الأنبوبة بإيثانول مخفف.

٧- يتم تجفيف المادة الوراثية ثم تذاب فى قدر من الماء المقطر أو محلول منظم.

والمخطط الآتى يلخص عملية الإستخلاص والعزل كالآتى:

خطوات عامة لعزل وإستخلاص المادة الوراثية فى النبات

شكل ١٨ : خطوات إستخلاص وعزل المادة الوراثية فى النبات

obeikandl.com

تقنية التفاعل البنائى التتابعى

Polymerase Chain Reaction (PCR)

تحفظ المعلومات الوراثية وغيرها داخل الحمض النووي (DNA)٠
وتقوم الخلية بمضاعفة كمية الحمض النووي وقت إنقسام الخلية بشكل تلقائي وبشكل سريع مع وجود نظام تصحيح للأخطاء خلال النسخ٠ وتبلغ سرعة النسخ والمضاعفة إلى ١٠٠٠قاعدة نيتروجينية بالثانية(داخل النظام الحيوي)٠
ومع التطور في مجال التكنولوجيا الحيوية والذي يقوم على التعامل مع الحمض النووي (DNA) بشكل أساسي، إستدعى ذلك العلماء إلى أن يبحثوا عن طريقة أو تقنية تقوم على مضاعفة كمية الحمض النووي (DNA) بشكل كبير، فكان هناك عدة محاولات لتحفيز الخلية على الإنقسام المستمر بإضافة عوامل النمو **Growth Factors**، ولكن لم تكن هذه الطريقة ذات جدوى لدى العلماء لأسباب كثيرة، إلى أن قام العالم **Dr Kerry Mullis** في عام ١٩٨٥ والحاصل على جائزة نوبل في الكيمياء عام ١٩٩٣ بنشر إختراعه لتقنية **PCR** فكانت هذه التقنية البوابة لكثير من التطورات المتسارعة في مجال التكنولوجيا الحيوية، من أهم الأسباب التي ساعدت هذه التقنية على الإنتشار هوعدم إعتمادها على النظام الحيوي (أي الخلية) والتحكم بكمية الحمض النووي (DNA) والسرعة في الإنتاج، ولكن كان من عيوب هذه التقنية عدم وجود نظام إصلاح عند حدوث أى إرتباط خاطئ **Miss match**٠

تعريف تقنية التفاعل البنائى التتابعى؟

هى تقنية عملية تقوم على إكثار نسخ الحمض النووي (DNA) خارج النظام الحيوي٠ أي أنها طريقة لنسخ الحمض النووي معملياً ولذلك فهي تقنية

حيوية لإستنساخ قطعة من محددة من الحمض النووي ومضاعفة إنتاجها لكي يتسنى إجراء إختبارات وفحوصات إضافية.

متطلبات تقنية التفاعل البنائى التتابعى

Requirements of PCR Technology

يتطلب أمر إنتاج الحمض النووي (DNA) بواسطة PCR توفير الإحتياجات الآتية:

١. جهاز للتحكم فى درجات حرارة التفاعل بشكل دقيق ومتتالي (الدورة الحرارية Thermocycle) حيث يقوم هذا الجهاز بتغيير درجة الحرارة بشكل سريع، لأن تغيير درجة الحرارة هو الأساس الذي تقوم عليه فكرة هذه التقنية.

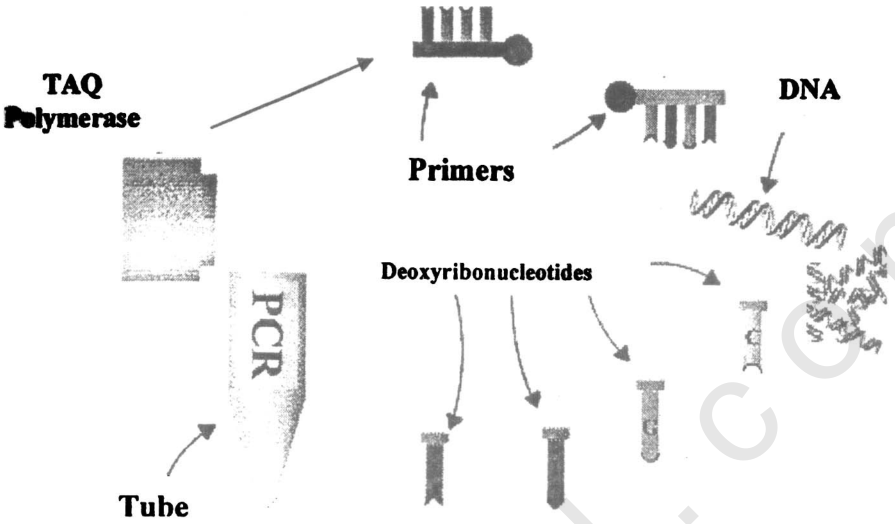
٢. إنزيم DNA polymerase لبناء وترتيب القواعد النيتروجينية (وحدات الحمض النووي DNA)، ويجب أن يكون هذا الإنزيم مقاوم للحرارة العالية ليتمكن من العمل، على أيه حال، يعد Tag Polymerase من الإنزيمات المقاوم للحرارة العالية.

٣. وجود مجموعة متفرقة من القواعد النيتروجينية: (T – C – G - A) ليتمكن الإنزيم من ترتيبها في مواقعها أثناء عملية نسخ الحمض النووي (DNA).

٤. وجود بادئ Primer وهو عبارة عن قطعة صغيرة من الحمض النووي (DNA) ليتمكن الإنزيم من بدء البناء والنسخ عليها.

٥. وجود نسخة من الحمض النووي (DNA) المراد نسخه.

٦. وجود محلول أو وسط ليتم به التفاعل وهذا المحلول يختلف من تفاعل وآخر. ويوضح شكل (١٩) متطلبات تقنية التفاعل البنائى التتابعى.



شكل١٩: متطلبات تقنية التفاعل البنائى التتابعى (PCR)

عملية النسخ Replication Technique

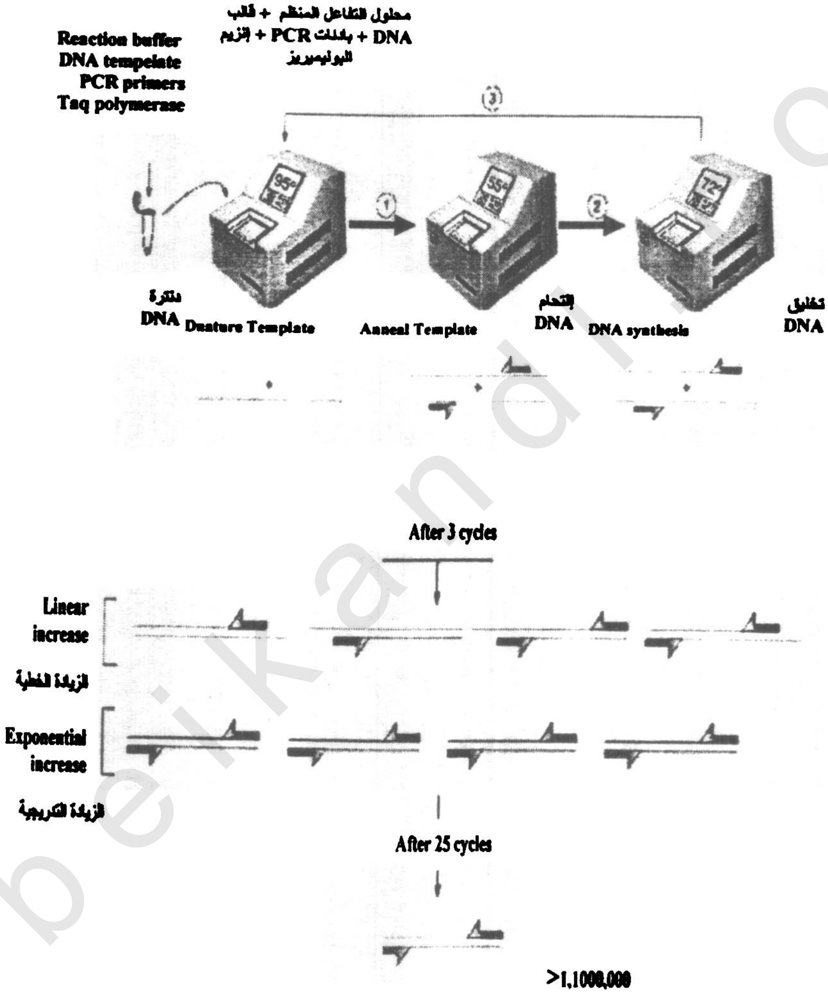
بعد وضع الحمض النووي المراد نسخة مع البادئ وإنزيم البوليمريز ومجموعة من الأحماض النووية في أنبوب داخل جهاز التحكم الحراري فإن عملية النسخ تمر بثلاث مراحل منفصلة (أشكال ٢٠ – ٢١- ٢٢):

١. مرحلة التفكيك أو الدنترة **Denature**: وتتم برفع درجة الحرارة إلى ٩٥ ْم وذلك لفك الحمض النووي (DNA) الأصلى.

٢. مرحلة الالتصاق أو الإلتحام **anneal**: وتتم بخفض درجة الحرارة إلى ما بين ٥٥-٦٠ ْم ليقوم البادئ بالألتصاق فيزيائياً بواسطة الروابط الهيدروجينية مع الحمض النووي (DNA) الأصلى.

٣. مرحلة التمدد **extend**: وتتم برفع درجة الحرارة إلى ٧٥°م ليقوم أنزيم البلمريز بعمله في بناء الحمض النووي (DNA) الجديد٠

وهذه المراحل الثلاث تعتبر دورة كاملة وفيها يصبح الحمض النووي



أشكال ٢٠-٢١: الدورات الحرارية ومراحل التفاعل التسلسلى فى تقنية PCR

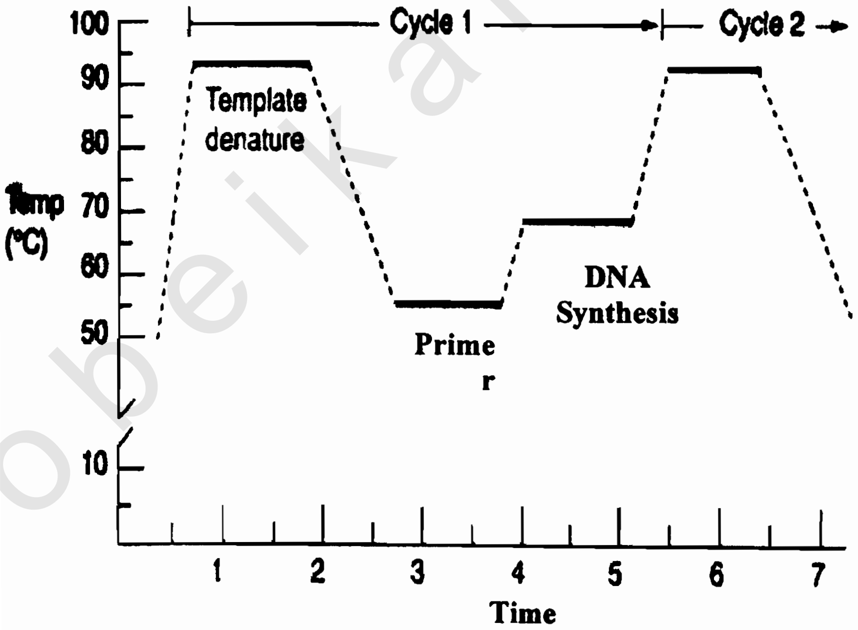
obeikandi.com

(DNA) الأصلى قد تضاعف، وتعتمد كمية ناتج الحمض النووي على عدد الدورات التى يتم إنجازها.

وإذا أخذنا فى الإعتبار عدد دورات PCR وعدد النسخ الناشئة، يمكن إيجازها فى الجدول الآتى:

عدد الدورات	١	٢	٤	١٠	١٥	٢٠
عدد النسخ	٢	٤	١٦	١,٠٢٤	٣٢,٧٦٨	١,٠٤٨,٥٧٦

وإذا أخذنا فى الإعتبار درجات الحرارة والمراحل الحرارية المختلفة لهذة التقنية يمكن الوصول إلى شكل (٢٢) الاتى:



شكل ٢٢ : الدورات الحرارية ومراحل التفاعل التسلسلى فى تقنية PCR

أستخدامات تقنية التفاعل البنائى التتابعى Applications of PCR

لتقنيـة PCR إسـتخدامات عديـدة فـي مجـال أبحـاث الحمـض النـووي والوراثة ومنها:

- الكشف عن الطفرات الوراثيـة: وذلك عن طريـق وضـع بـادئ (بريمـر) خـاص للطفرة لإكثـار الجين الخـاص بهـا، ومنـه نقوم بمعرفة المرض إذا كان على زوجى الكروموسومات أو على إحداهما (أليل allele)٠
- تحديد البصمة الوراثيـة٠
- الكـشف عـن الفيروسـات وهـي الوسـيلة الأدق فـي تحديـد نـوع وجـنس الفيروس وكميته٠
- إكثـار الجين المراد إدخالـه علـى البلازميد أو الحمـض النـووي (DNA) المضيف وهو العنصر الأهم في عمليـة التجميـع الجينـي Recombinant DNA٠
- تغيير نهايـات الجين لتـصبح متوافقـة مـع إنزيمـات القطـع Restriction enzymes
- تحديـد تتـابع القواعـد النيتروجينيـة فــي الحمــض النــووي (DNA) DNA Sequencer٠
- معرفة طول الحمض النووي DNA٠
- تحديد الجين المطلوب من خليط من الجينات٠
- يستخدم في تقنية Microarrays٠
- في مشروع الخريطة الجينية Genome map٠
- الساوثرن بلوت Southern plot أو تهجين الأحماض النووية٠
- تقنيـة إرتبـاط الحمـض النـووي (DNA) بـالبروتين DNA-Protein Interaction

obeikandl.com

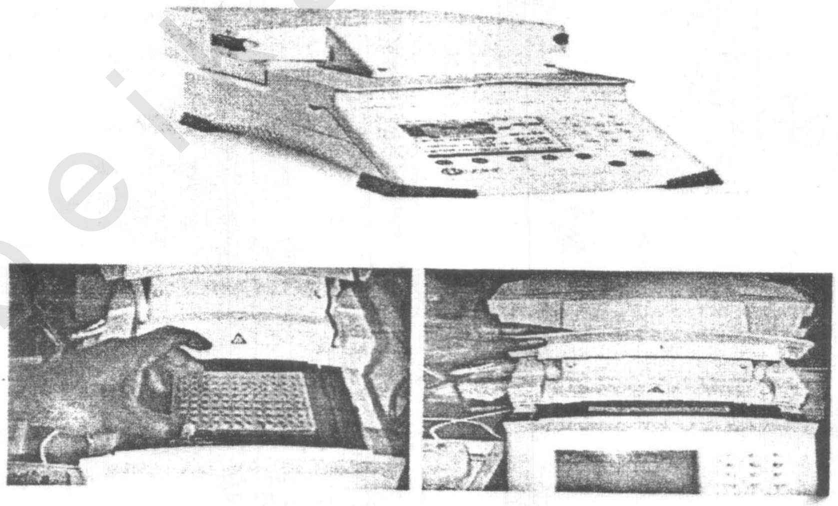
- فـي مجـال الطـب الـشرعي (إختبـار الأبـوة، حـالات الاغتـصاب، تحديـد الهوية ٠٠إلخ) وغيرها من الإستخدامات المعملية والبحثية٠

أنواع تقنية التفاعل البنائى التتابعى Types of PCR

هناك نوعان من التفاعل البنائى التتابعى يمكن إيجازها فى الآتى:

- التفاعل البنائى التتابعى العادي وهو ما تم سرده والتطرق اليه فـي الخطـوات السابقة **Normal PCR**
- التفاعل البنائى التتابعى بإستخدام الكمبيوتر **Computerized Real Time PCR**

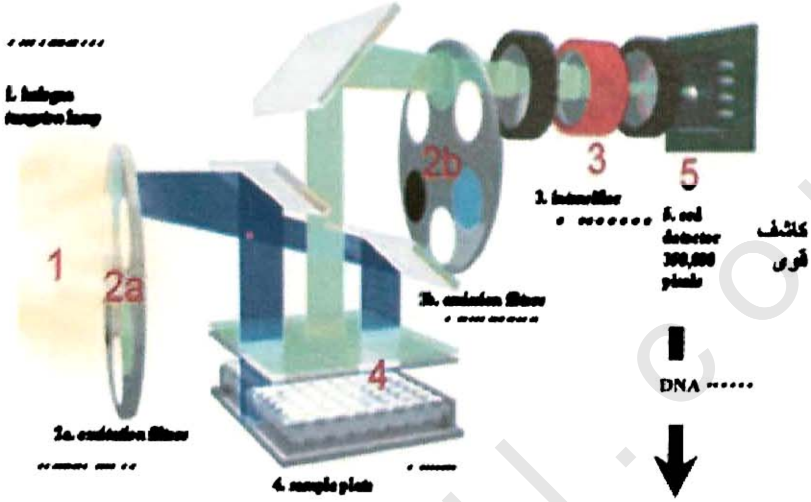
وهـذا النـوع يقـوم علـى نفـس المبـدأ ولكـن الخـلاف الوحيـد هـو ربـط جهـاز PCR بكمبيـوتر لتحديـد الوقـت الحقيقـي لبـدأ التفاعـل ومـن ثـم الكميـة الحقيقية لعدد نسخ الحمض النووي (DNA)٠ ويعتمد ذلك علـى وجـود قواعد نيتروجينية حرة مشعة لتحديد ذلك، مما يسهل على الباحثين تقدير الوقت لتحديد مدى وجود الجين المطلوب من عدمه، وكميـة الجين بـدون الوصـول إلـى نهاية

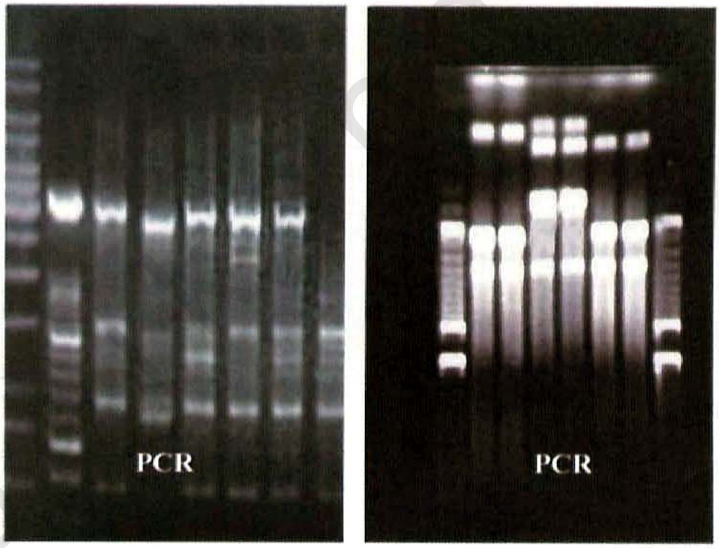


شكل ٢٣ : جهاز Real Time PCR المستخدم فى تفاعل PCR

obeikandl.com

الدورات الحرارية المحددة (شكل ٢٣ـ ٢٤)٠





شكل ٢٤ : نواتج التفاعل البنائى المتسلسل