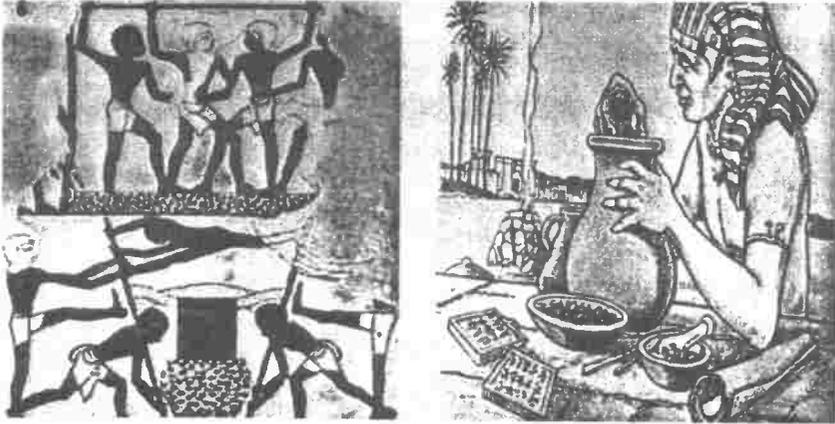


الباب الثانى

هندسة الجينات ودورها فى التكنولوجيا الحيوية

Genes Manipulation and Biotechnology

ربما تخيل المصري القديم حارس مصر وأسرارها وعلم المصريين على هيئة كائن مهندس وراثيا 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 البشري إلى البكتيريا. وربما كان أبو الهول دليل على أن قدماء المصريين هم أول من فكر في الهندسة الوراثية وربما أول من إستخدمها، فهم أول من إكتشف إستخدام الكائنات الحية الدقيقة في الصناعات الغذائية (البيوتكنولوجي) فقد إستخدموها في تخمير الخبز وعمل النبيذ من الفاكهة وتخمير الشعير وتخمير اللبن والقشدة (شكل ٥) .



شكل ٥ : تخمير الخبز وعمل النبيذ من قبل القدماء المصريين

قصة الجينات Genes History

إكتشف مندل عام ١٨٦٥ 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 جديد . وأجرى العالم البريطاني جريفنت

تجربه مثيرة على البكتيريا المسببة لمرض الإلتهاب الرئوي وإستنتاج 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 افري 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 نسبة من البروتين لذلك لم يتوافر دليل قطعي على أن المادة المسنولة هي DNA • وبعد دراسات مستفيضة تم إستخلاص الإنزيم المحلل للمادة الوراثية DNA وهو إنزيم **Deoxyribonuclease** 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 الكمية 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 كميته البروتين في الخلايا الجسدية لا تساوى ضعف كميته 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 وهي:

١- **Regulator genes** وهي الجينات المنظمة لعمل عديد من الجينات الأخرى والتي يطلق عليها اسم الجينات العاملة أو الفاعلة.

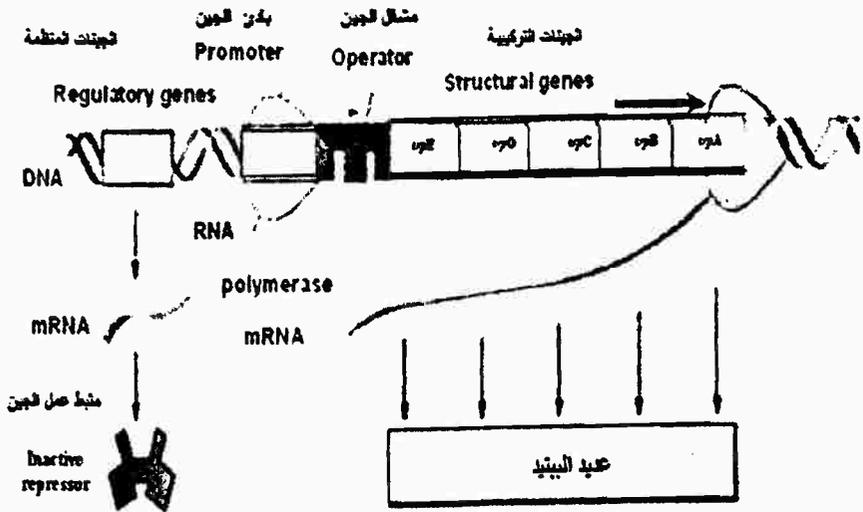
٢- **Operator genes** وهي الجينات العاملة التي تقوم بدور عامل التليفون وهي التي تتحكم في فتح وغلق عدد كبير من الجينات الأخرى التي يطلق عليها الجينات التركيبية **Structural genes**.

٣- **Structural genes** وهي الجينات المسنولة عن التركيب الخاص بالبروتينات أو بروتين الإنزيم.

ولقد افترض أن تنظيم نشاط الجين يكون عن طريق الجينات العاملة أو الفاعلة **Regulator genes** ، حيث يتحكم في فتح أو قفل عدد من الجينات التركيبية **Structural genes** والمسنولة عن إنتاج إنزيمات معينة تؤدي تفاعلات بيوكيميائية 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 اسم القامع أو الكابح. ويفترض أن هذا المثبط **Repressor** عبارة عن بروتينات تقوم بمنع الجين العامل أو الفاعل من إتاحة الفرصة لإنزيم بلمرة الحامض النووي RNA من العمل وبالتالي لا يؤدي وظيفته. وإقترح أن ذلك يتم بطريقتين؛ الأولى هي أن المثبط ينتج دون قدرة على التثبيط إلا في وجود منشط **Effector** وعند وجوده يقوم بالإلتصاق بمنطقة **Operator** فيمنع إنزيم بلمرة الحامض النووي RNA من نسخ DNA وبالتالي لا تتم الرسالة. وإن الآلية الثانية للكابح تتم عن طريق تثبيطه

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

و هناك نظرية تفترض أن البروتين القاعدي المعروف بالهستون والذي يحتوي على نسبة كبيرة في تركيبه على الحمضين الأمينيين الأرجينين والليسين والموجود بالكروموسومات يعمل كمادة مثبتة لفصل المادة الوراثية



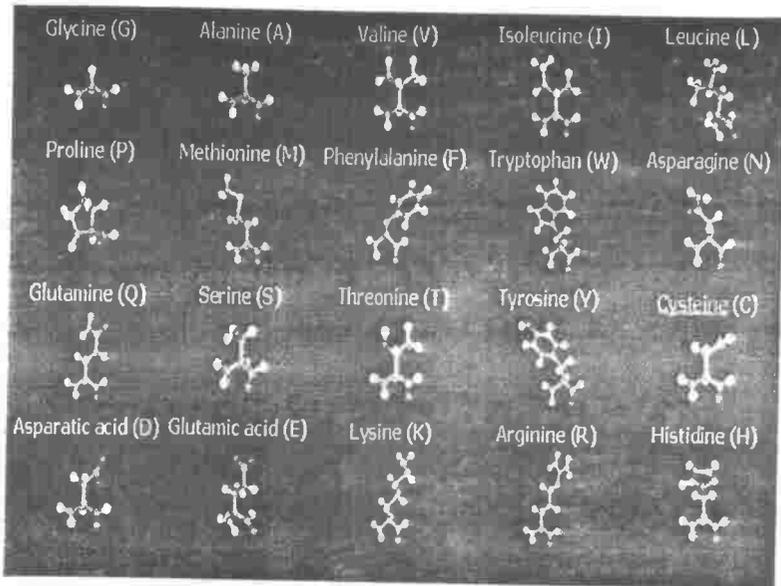
شكل ٦: تنظيم عمل الجين

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

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

إن 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 وتلك 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 للنوكليوتيدات فيما يعرف بالحامض النووى **DNA**. وترسل النواة رسالة الى الخلية تسمى رسالة الحامض النووى **RNA** ليتم ترجمتها على المصنع الصغير المسمى بالريبوسوم **Ribosome** فيتكون بذلك بروتينا معينا. يتكون هذا البروتين من تتابع للأحماض الأمينية حيث تتباين كيميائيا تباينا واسعا نتيجة تكونها من عشرين حمض أميني يجعل هذا التباين ممكنا ويتم بناء هذا العدد الهائل من البروتينات داخل الخلية بأوامرها التى ترسلها مع الرسول وبذلك يتكون الحمض الأميني الصحيح فى المكان الصحيح لينتهى الأمر بصناعة البروتين الذى يقوم بعضه بدور بنائى فى الخلية والبعض الآخر له دور تنظيمى أى يقوم بتنظيم سير التفاعلات الحيوية داخل الخلية، والبروتينات هى الوحدات المكونة للإنزيمات والتى تشبه الكماشة حيث تستطيع ربط المركبات الكيميائية معا أو تجدها معا أو تفككها من بعضها ويتم

ذلك بدقة متناهية، والبروتينات هي التي تصنع الغشاء المحيط بالخلية كما تصنع الأبواب التي تسمح بدخول المركبات إليها أو خروجها منها من خلال إتحادها مع المركبات الداخلة أو الخارجة وتحور فيها حتى يمكنها الدخول أو الخروج حتى الكائنات الممرضة كالبكتيريا فإن الإنزيمات هي أسنانها التي تقوم بتمزيق مكونات الخلية وتحليلها إلى مواد أبسط لإمتصاصها والتغذية عليها. ومن هنا يمكن القول أن الشفرة الوراثية هي ترتيب النيوكليوتيدات Nucleotides (والتي سوف يتم التطرق إليها فيما بعد) في جزئ الحامض النووي mRNA الذي يذهب إلى الرايبوسوم حيث يترجم إلى 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 حمضا وعدد القواعد النيتروجينية الداخلة في تركيب جميع النيوكليوتيدات أربعة هم أدينين (A)، جوانين (G) سيتوسين (C)، ثيامين (T). وللحصول على 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 نيتروجينية واحدة) لأن معنى ذلك أن عدد الأحماض الأمينية هو أربعة فقط وهذا مناف للواقع حيث أن عددهم هو عشرون ولو كانت اللغة ثنائية الحروف $2^4 = 16$ حمض أميني وهو أقل من العدد المطلوب (شكل ٧). إذن الشفرة الوراثية تتكون من ثلاثة حروف $3^4 = 81$ 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.

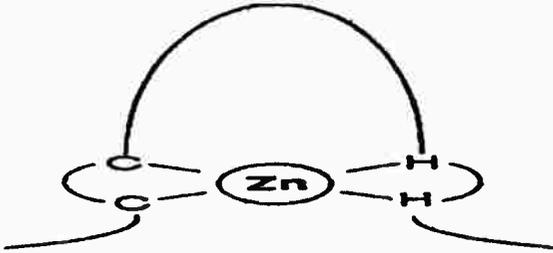


شكل ٧: الأحماض الأمينية الموجودة في الطبيعة

ففي عام ١٩٦٥م عندما تم التوصل الي الشفرة الخاصة بكل حمض أميني والتي يطلق عليها اسم كودونات Codons تأكد بعد ذلك أن هناك أكثر من شفرة لكل حمض أميني. أيضا 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 بمعنى 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 عددا من البروتينيات تعرف بعوامل النسخ **Transcription factors** التى ترتبط بجزئ من الجين يدعى المنشط أو المعزز **Promoter** ويمكن باقى الجين من التعبير عن نفسه فى بدء عمل نسخ الحامض النووى الرسول mRNA المسنولة عن إنتاج الإنزيم والذى يقوم بإتمام التفاعل الحيوى وإظهار الصفة المحددة وعليه فإن عامل النسخ هذا هو بمثابة مفتاح التشغيل للجين **On-gene** . 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) .



Cys - His Zink finger

شكل ٨: أصابع الزنك

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

الزنك عندما حلت تتابعات الأحماض الأمينية في إهدى عوامل النسخ ووجد
أن هناك ترتيب خاص لتتابع الأحماض الأمينية في تسع تتابعات أو قطع
متعاقبة أو وحدات متتالية مرقمة من ١-٩ بينهما تشابهات مهمة حيث تتشابه
أو تتطابق وجود زوج من الأحماض السيستئينية (C) وزوجا من
الأحماض الهستيدينية (H) وإن زوجى السيستئين والهيستيدين في كل
وحدة بنائية بنضمنا الى أيون الزنك مما يجعل الأحماض الأمينية الموجودة
بينهما تتخلق .

كما وجد من الدراسات المكثفة سنة ١٩٩١ باستخدام الرنين
المغناطيسى أنه لكى تستطيع أصابع الزنك الإتصال بجزء 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 أميني معين (E, G, A) يتصل مع
قاعدة نيتروجينية واحدة من الزوج القاعدى على DNA بالمجموعات
الفوسفاتية فى سلاسل السكر والفوسفات التى تكون جانبى سلم DNA .
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 Intrones ثم توصل الأكسونات
ببعضها الحامض النووى RNA splicing حيث تنبج الأنترونات للخارج
فى شكل عروات قبل إستبعادها .

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 للقنسوة دور فى بناء البروتين عندما ينتقل الى
 للرابيوسومات كما يبدو انها تقوم بحماية للنسخة النامية من الحامض النووى
RNA من عملية التحلل والهدم، ويضاف لجزئ الحامض النووى **nhRNA**
 ذيل عديد الانيين **Poly A Tail** قاعدة الادينوسين يقوم بها إنزيم خاص
 يسمى **Poly A- Polymerase** ويبدو ان للذيل وظيفة تسهيل خروج الحامض
 للنووى **mRNA** من النواة الى السيتوبلازم ويؤخر هدمه فى السيتوبلازم
 ليتيح الدخول فى أكثر من دورة من دورات الترجمة.

آلية عمل الجينات **Gene Mechanism**

والآن يأتي السؤال الهام وهو كيف يمكن لعلماء البيولوجيا للجزيئية فهم
 كيفية عمل الجينات؟ لذا استخدم مهندسا الوراثة تقنية سميت إستبدال
 الجينات المستهدفة **gene targeting** وفيه 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** فلذا أدى ذلك الى
 إحداث تشوه فى مخ الفأر كان ذلك دليل على مسئولية هذا الجين عن تكوين
 المخ. ولقد أصبحت تقنية الإستهداف الجينى تقنية مثيرة وهامة عندما إستخدم
 فى مشروع الجينوم البشرى لكشف أسرار الجينات المسنولة عن الأمراض
 الوراثةية حيث ان دراسة تسلسل النيكلوتيدات للجين لا يفسر وظيفته فى حياة
 الكائن الحى.

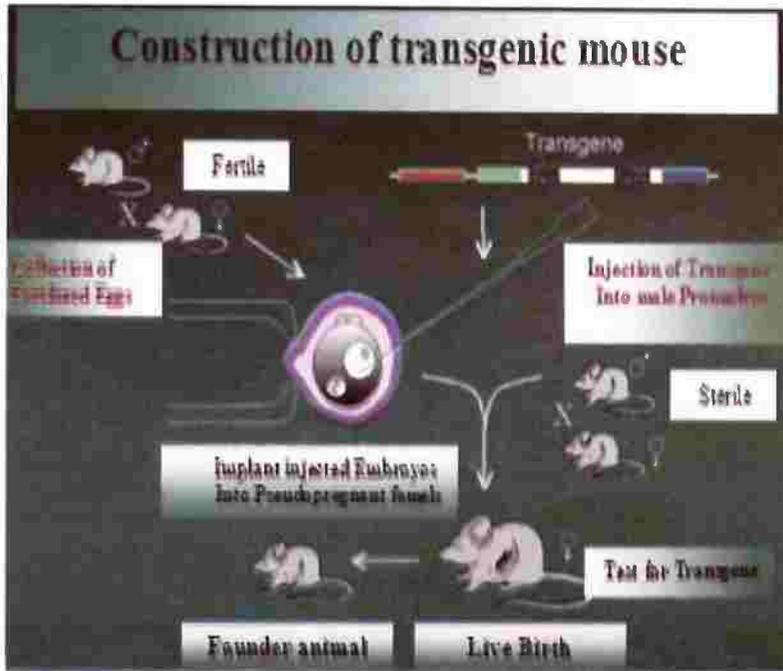
على إيه حال تبدأ التقنية بعزل جين من الخلايا الجذعية المشتقة من
 الجنين (**ES**) **Embryo-derived stem cells** والمراد دراسة وظيفته
 ويحور ذلك الجين لإنتاج جين طافر يتم إستبداله بالجين السوى ويكون ذلك

عن طريق إيلاج جين مقاوم للنيوميسين (neo r) **neomycin resistance** وذلك لتسهيل أمر العثور عن الخلايا التي 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 السلبي حيث أن هذا الجين يسبب حساسية للخلايا الحاضنة له ضد المضاد الحيوى الكانسيكلوفير . وبعد تصميم الجين الطافر هذا يتم تحميله 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 إحتوانه 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 بال tk .
- أو لا يتم الإيلاج أصلا فى الخلايا .

ولعزل الخلايا التى تحمل الطفرة المستهدفة يتم وضع الخلايا كلها فى وسط يحتوى على عقارين أحدهما مضاد المينوميسين المعروف باسم G418 والثانى مضاد الكانسيكلوفير فيقوم المضاد الأول بقتل الخلايا التى لا تحتوى على الجين الطافر فيبقى 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 الحيوي الثاني . وعليه يتم الحصول على الخلايا المطلوبة والتي هندست وراثيا فإذا كانت مأخوذة من فأر بني اللون، يتم إيلاج تلك الخلايا داخل خلايا جنينية وهي فى طور الكيمية الأريمية (البلاستولة) لأنثى فأر أسود اللون ثم ننقل الخلايا الجنينية الى رحم أم بديلة حيث تنمو وتكون النسل (شكل ٩) .



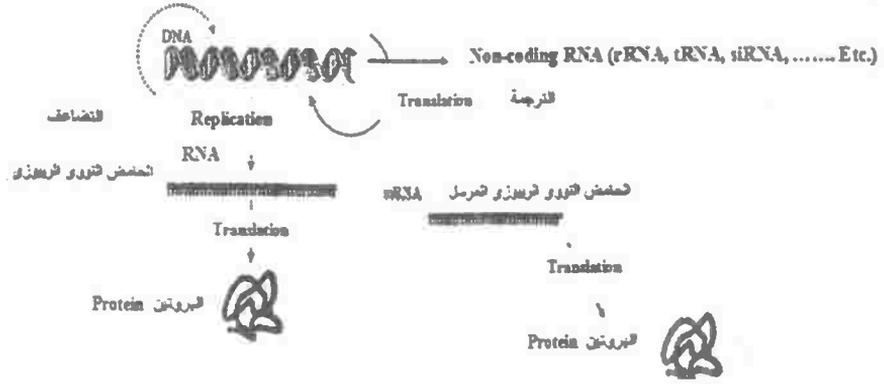
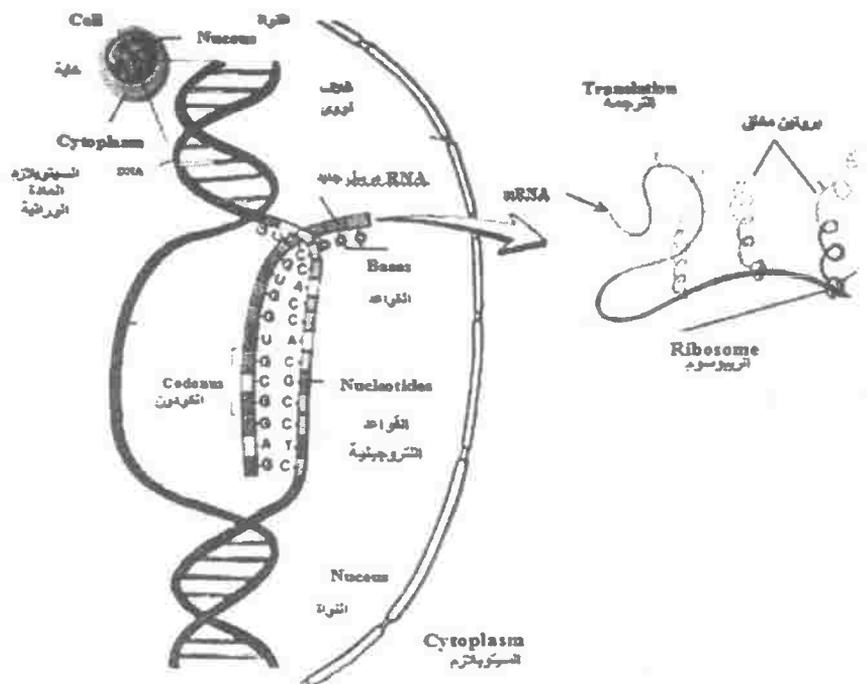
شكل ٩ : كيفية الحصول على فئران محورة وراثيا

وتفحص الفئران للحصول على الفأر المحتوى على ظلال بنية ممزوجة باللون الأسود لتشير تلك الصفة على أنه الفأر المطلوب والحاوي 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 الشنوذ الجسدى أو المرضى لتتعرف على وظيفة الجين المستهدف .

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) نيوكليتيدها يسمح بتركيب جزئ الحامض النووى tRNA بوجود موقعين نوعيين يمكن لإحدهما أن يتعرف على الحمض الأمينى ويرتبط به بمساعدة إنزيم نوعى يسمى الحامض النووى tRNA synthetase فى حين يقوم الموقع الآخر وهو المحتوى على الكودون المضاد والذي يحتوى على ثلاث قواعد بالتعرف على الكودون الموجود فى تتابع جزئ الحامض النووى mRNA مما يسمح للأحماض الأمينية أن تصطف طبقا لهذا التتابع النيوكليتيدي . ويوجد لكل حمض أميني الحامض النووى tRNA أو أكثر والذي يعد بمثابة عربة لنقل لأحماض الأمينية من السيتوبلازم إلى الرايبوسوم حيث يتحد الحمض الأمينى والمعين مع إحدى نهايتي الحمض النووى الرايبوسومى فى حين يتم التزاوج الصحيح بين الكودون ومضاد الكودون بالروابط الهيدروجينية، وعليه يقوم الحامض النووى tRNA بدور أساسى كوسيط فى عملية الترجمة أو يقوم بتحويل تتابع النيوكليتيديات إلى تتابع من الأحماض الأمينية وفى 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) .



شكل ١٠: نباء البروتين

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

الجين لإنتاج الحامض النووي mRNA مع بقاء نسبة صغيرة فقط يتم على التتابعات المنسوخة عمليات تجهيز وتعديل وحذف لتتابعات من الحامض النووي RNA النووى قبل خروجها النهائى الى السيتوبلازم. وتتلقى النواة جينات معينة لنسخها لتقوم بوظائف محددة تبعا لنوع الخلية ومكانتها ووظيفتها فى النسيج أو العضو لذلك فإنزيمات بلمرة الحامض النووي RNA لا بد لها من التعرف على منطقة المستبدئ أو المحفز الموجودة فى الجين والمعروفة بإسم Promoter عن طريق إرتباط بروتينات نوعية مع تتابعات 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 باستخدام أصابع الزنك فى عامل النسخ ويكون عادة على بعد ٢٥٠ قاعدة من موقع بدء النسخ، فيؤدى عامل النسخ على تحفيز النشاط النسخى لإنزيمات بلمرة الحامض النووي RNA وينتج سلسلة الحامض النووي RNA من عدد من الوحدات يتراوح عددها بين ٨٠٠٠-٢٠٠٠٠ نيكلويدة وهى أطول كثيراً من طول الحامض النووي mRNA الذى يكون البروتين (١٢٠٠ نيكلويدة تشفر لحوالى ٤٠٠ حمض أميني ليكون سلسلة البروتين)

والسؤال الآن كيف يتسنى لإنزيم Aminoacyl-tRNA synthetase وربط الحامض النووي tRNA بالحمض الأميني المعين والتوفيق بين الحمض الأميني الصحيح وبين الحامض النووي tRNA النوعي الخاص وخاصة للأحماض الأمينية المتشابهة التركيب حيث يقوم الإنزيم بالفرقة بين الأحماض الأمينية تبعا للمراكز النشطة له وكذلك التفاته حول الحامض النووي tRNA الملانم. ويدخل فى بناء البروتين الريبوسومات وهى بمثابة

لنوال يتكون عليها البروتين ويتكون جسم الرايبوسوم الذي يظهر كحبيبات على الشبكة الأندوبلازمية من الحامض النووي RNA الرايبوسومي من تحت وحدتين أحدهما كبيرة والأخرى أصغر ويبدأ تخليق البروتين عندما ترتبط تحت وحدة رايبوسومية بجزئ الحامض النووي mRNA الذي يكون له أول كودون AUG وهو كودون أو شفرة البدء للترجمة وتكوين سلسلة عديد الببتيد أو البروتين التي ستبنى، ثم ترتبط تحت وحدة رايبوسوم كبيرة بالمركب السابق وعندئذ تبدأ تفاعلات بناء البروتين . ويوجد على الرايبوسوم موقعين يمكن أن ترتبط بهما جزيئات الحامض النووي 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 النووي tRNA بالكودون التالي على جزئ الحامض النووي mRNA وبالتالي يصبح الحمض الأميني الذي يحمله الحامض النووي tRNA الحمض الأميني التالي في السلسلة عديد الببتيد، ثم حدوث تفاعل نقل الببتيديل الذي ينتج عنه رابطة ببتيديية بعده يكون الحامض النووي RNA الأول فارغا ويترك الرايبوسوم، أما الحامض النووي tRNA الثاني فيحمل الحمض الأميني له مع الحمض الأميني الأول (الميثيونين) . ويتحرك الرايبوسوم على إمتداد الحامض النووي mRNA فينتقل الحامض النووي 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 النووي mRNA وهناك بروتين يرتبط بكودون الإيقاف يسمى عامل الإطلاق Release factor حيث يحرر الرايبوسوم من الحامض النووي RNA الرسول (شكل ١٠) .

يمكن أن يقود تسلسل الأحماض الأمينية إلى بروتينات ذات أشكال متشابهة ولقد وضعت حديثًا 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 جدًا من بروتين ما ثم فذف هذه البلورات بالأشعة السينية أو من خلال دراسة البروتين بتحليل طيف الرنين المغناطيسي النووي **Nuclear Resonance Magnetic**

و عند استعمال 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 أجل عمل برنامج حاسوبي لنمجة البروتين وإبتكار أشكال لطى 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 المجالات 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** كعلما قائما بذاته يتناول أفاقا غير مسبوقه 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 منحى جديد. ولا شك أن هذه الثورة العلمية التي نعيشها الآن في مجال دراسات الأحماض النووية والتي سيكون لها أبلغ الأثر فى حياة الإنسان في القرن الحادي والعشرين.

أنواع الأحماض النووية Types of Nucleic Acids

١- حامض الديوكسى رايبونوكلييك (**Deoxyribonucleic acid (DNA)**

٢- حامض الرايبونوكلييك (**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 النووي DNA والحامض النووي RNA

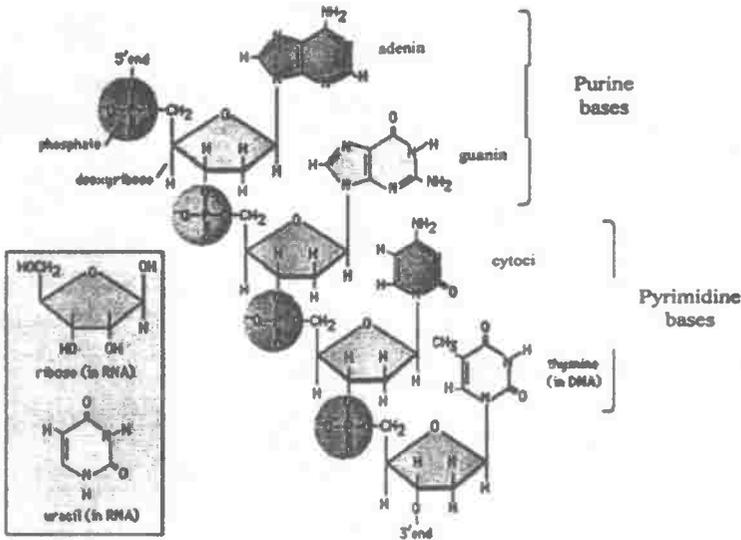
الحامض النووي RNA	الحامض النووي DNA	وجه المقارنة
النواة والبلازم	النواة	وجوده
يساعد DNA في الوظيفة	المادة الوراثية ومكون للكروموسومات	الوظيفة
الحامض النووي الراسل mRNA، الحامض النووي الناقل tRNA، الحامض النووي الريبوسومي rRNA	ليس له أنواع	أنواعه
الرايبوز	الديوكسي رايبوز	السكر الخماسي
الأدينين - اليوراسيل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

حامض الديوكسي رايبونوكلييك

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

علم 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) .

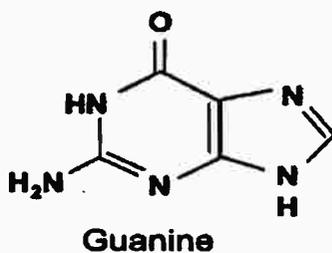


شكل ١١ : التركيب الجزيئي للمادة الوراثية في شريط DNA

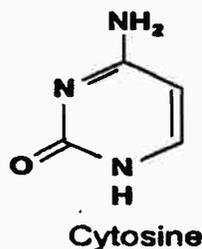
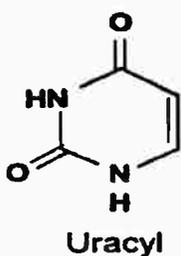
ويلتفا حول بعضهما فيكونان حلزوناً مزدوجاً **double helix** طويلاً سمكه ٢ نانومتر، وطول اللفة الكاملة منه ٣٤ نانومتر ويتكون جزئ الحمض من عدة آلاف من هذه اللفات . ويمكن تشبيهه الجزيء بالسلم، حيث يتكون كلا من جانبيه من سلسلة من جزيئات السكر والفوسفات المتبادلة بينما تتكون الدرجات **Rungs or Steps** فيه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

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

Purines



Pyrimidines



شكل ١٢: أنواع القواعد النيتروجينية المختلفة في شريط DNA

ويلاحظ أن الأدينين والثايمين يرتبطان برابطتين هيدروجينيتين بينما الجوانين والسيتوسين يرتبطان بثلاث من هذه الروابط. وعلى ذلك فالطاقة اللازمة لكسر الجوانين عن السيتوسين أكثر من تلك اللازمة لكسر الأدينين عن الثايمين. ويلاحظ أن هذا الشكل السلمي يتحاذن على نفسه ليكون ما يسمى بالحلزون المزدوج **double helix**. وتمثل النيوكليوتيدات **Nucleotides** الوحدات البنائية لجزئ الحمض النووي (الوحدة التركيبية في الأحماض النووية هي النيوكليوتيدة)، وتتركب كل نيوكليوتيدة من جزئ سكر خماسي يرتبط من ناحية ذرة للكربون رقم ٥ بمجموعة الفوسفات، ومن ناحية ذرة الكربون رقم ١ بقاعدة نيتروجينية ويتكون جزئ DNA من آلاف من هذه النيوكليوتيدات. ومن المعروف أن ذرات الكربون في جزئ السكر الخماسي يعطى لكل منها رقماً معيناً يحدد موقعها، ويلاحظ أن القواعد النيتروجينية تتصل بذرة الكربون رقم ١ في السكر الخماسي وأن الروابط الكيميائية بين السكر والقواعد النيتروجينية وبين السكر ومجموعات الفوسفات هي روابط تساهمية **covalent bonds** كما يلاحظ أن مجموعة الفوسفات تتصل بذرة الكربون رقم ٥ لجزئ السكر من طرف بينما تتصل من الطرف الآخر بذرة الكربون رقم ٣ في جزئ السكر التالي، كما أن مجموعتي الفوسفات المتصلة بذرة الكربون رقم ٥ في السكر الخماسي في كل نيوكليوتيدتين متقابلتين في شريط (DNA) تكونا متعاكستين في الإتجاه.

ومما تقدم ندرك أنه إذا كان تتابع القواعد النيتروجينية في الجزئ من أحد الشريطين 3' TCCAA 5'، فإن قطعة الشريط الأخر التي تتكامل معها يكون ترتيب قواعد النيتروجينية 5' AGGTT 3' ويتضح من ذلك أن شريطي جزئ DNA متوازيان عكسياً **antibarallel** حيث أن الطرف 3' لأحد الشريطين والطرف 5' للشريط الأخر يكونان في الناحية نفسها.

ويلاحظ أنه إذا نزلت مجموعة الفوسفات من النيوكليوتيد أطلق على المركب

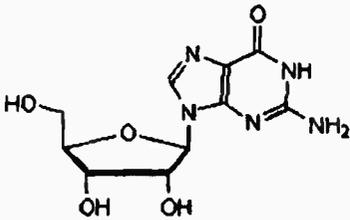
• الباقي اسم نيوكليوسيد **nucleoside**

وعلى ذلك فالنيوكليوسيدات المعروفة (شكل ١٣) هي أدينوسين

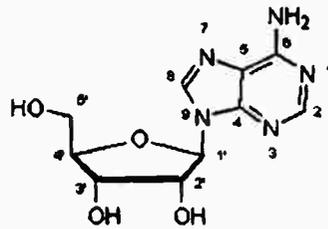
adenosine، جوانوسين **guanosine**، سيتيدين **cytidine**، يوريدين

uridine، ثايميدين **thymidine**، ويضاف المقطع الأولي (دي أوكسي) -

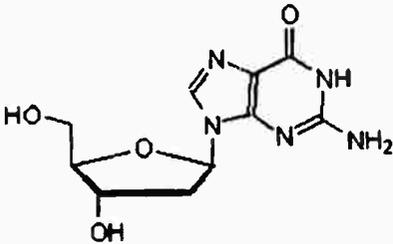
• **Deoxy** للدلالة على الذي أوكسي نيوكليوسيدات **deoxyribonucleosides**



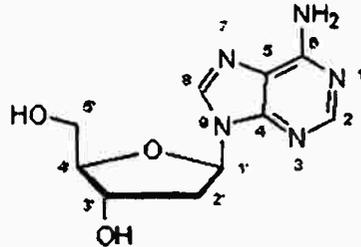
Adenosine



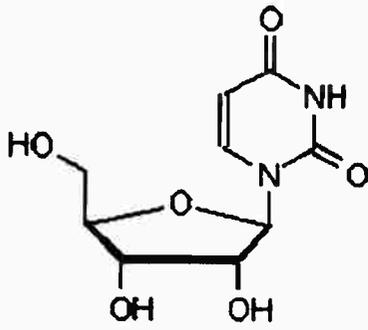
Adenosine



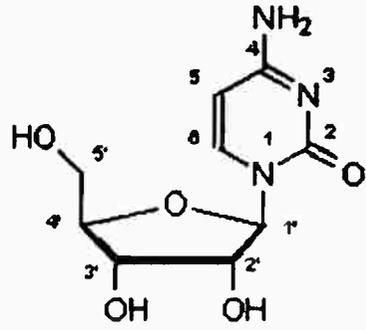
Deoxyguanosine



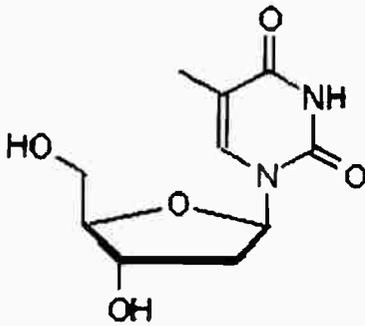
Deoxyadenosine



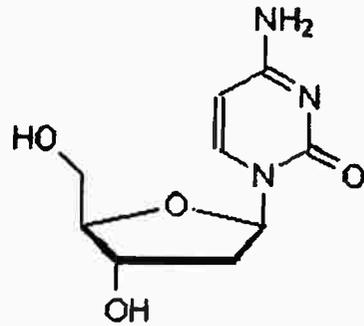
Uridine



Cytidine



Thymidine (Deoxythymidine)



Deoxycytidine

شكل ١٣: أنواع النيوكليوسيدات المختلفة

ويمكن بإيجاز القول أن تركيب الحامض النووي DNA ذو طبيعة تسمح له بحمل المعلومات الوراثية، بالإضافة إلى أن طبيعة هذا التركيب تسمح له أيضاً 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 النووي DNA عبارة عن نيوكليوتيد **Nucleotide** يتكون من سكر خماسي وهو الديوكسي ريبوز **Deoxyribose** وفوسفات **phosphate** وقاعدة نيتروجينية **Nitrogen base**. والقواعد النيتروجينية تتضمن مجموعتان من

البورين Purines وتتضمن الأدينين (A) والجوانين
• Guanine (G) أما المجموعة الثانية فهي البيريميدين Pyrimidines
وتشتمل على الثايمين Thymine (T) والسيتوسين Cytosine (C)
وترتبط النيوكليوتيدات ببعضها بواسطة روابط تساهمية لتكوين عمود فقري
من تعاقب السكر والفوسفات Sugar-Phosphate backbone
والنيوكليوتيدات ترتبط ببعضها عن طريق الروابط التساهمية التي تربط ذرة
الكربون الثالثة في جزئ سكر بالفوسفات المرتبطة بذرة الكربون الخامسة في
جزئ السكر المجاور له ليكون 3,5 phosphodiester linkage

ولذا فمن الممكن تكوين عديد النيوكليوتيدات بأى طول كان . فنحن نعلم
أن جزيئات DNA داخل الخلايا تتكون من ملايين القواعد فى الطول، وأن
النيوكليوتيدات يمكنها أن ترتبط مع بعضها بأى طراز . ومهما كان طول هذه
السلسلة فلها نهايتين، النهاية الخامسة The 5`end والتي لها ذرة الكربون
الخامسة والنهاية الثالثة The 3`end والتي لها ذرة الكربون الثالثة والتي لا
ترتبط بنيوكليوتيد آخر . وعندما إهتم هذان العالمان بدراسة الحامض النووى
DNA كمادة وراثية فقد أوضحا لنا الكثيراً من خصائصه الطبيعية
والكيميائية، كما أنهما إتهما بتجميع المعلومات المتكاملة عن هذا الحامض مع
بعضها فى نموذج يوضح كيف يقوم هذا الجزئ بحمل المعلومات الوراثية
بالإضافة إلى قدرته على مضاعفة نفسه self-duplication بنفس تركيبه
السابق .

خواص الأحماض النووية Properties of Nucleic Acid

تمتص القواعد النتروجينية من نوع البورين والبيريميدين الموجودة
فى الأحماض النووية الأشعة فوق البنفسجية بدرجة كبيرة عند موجة ذات طول

٢٦٠ نانوميتر . وتستخدم هذه الخاصية لتقدير هذه القواعد النتروجينية كميًا من خلال تقدير نيوكليوتيداتها وأيضًا الأحماض النووية الداخلة في تركيبها . وعلى كل حال، فإن للحمض النووي DNA معامل إمتصاص نوعي عند طول الموجة ٢٦٠ نانوميتر لكنه يقل بمقدار حوالي ٣٥ - 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 للأشعة فوق البنفسجية بالنسبة للقواعد الأزوتية المتحدة بجزيئات الحمض النووي DNA عن نظيرتها الحرة يرجع ذلك لتكون روابط هيدروجينية بين القواعد النتروجينية المترابكة الواحدة فوق الأخرى في كل من السلسلتين الحلزونيتين للحمض النووي DNA . وهذه الخاصية مفيدة في تقدير درجة الحلزونة **Helicity** الحمض النووي DNA .

وعند تسخين الحمض النووي DNA المبلر 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 نو 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

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

خصائص الحامض النووي DNA Characteristics

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

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

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

فولما لنموذج الحامض النووي DNA والصورة أظهرت بوضوح أن الحامض النووي DNA عبارة عن تركيب حلزوني الشكل، وأن هناك ثلاثة أنواع هامة من النماذج المنتظمة والمتعاقبة في الجزيء والتي لها أبعاد ٣٤ نانومتر، ٢ نانومتر. ومن هذا النموذج توصل فرانكلين إلى أن القواعد النيوكليوتيدية **Nucleotide bases** (والتي هي عبارة عن جزيئات مسطحة) هي عبارة عن رفوف مترابطة فوق بعض مثل درجات السلم المترابطة فوق بعضها. وباستخدام هذه المعلومة بدأ العالمان واطسن وكريك بوضع عدة نماذج لمكونات الحامض النووي DNA مع محاولة توفيقهم مع بعض ليتفقوا مع البيانات المأخوذة من تجارب العالم فرانكلين. وبعد عدة تجارب قاما العالمان بوضع نموذج للحامض النووي DNA يتكون من سلسلتين من عديد النيوكليوتيد **two nucleotide chains** ملتفتين حول بعضهما في صورة حلزون مزدوج. ونجد أيضاً أن السكر والفوسفات المكونين للعمود الفقري للسلسلتين يكونوا الجدار الخارجى للحلزون، أما القواعد المتصلة بكتلة السلسلتين فتوجد في الوسط.

الروابط الهيدروجينية المتكونة في الخيط المزدوج للحامض النووي DNA في عام ١٩٥٠ قام العالم إيون تشارجاف ومساعدوه بجامعة كولومبيا بدراسة نسب القواعد النيتروجينية في الحامض النووي DNA بالنسبة لبعضها البعض ووجدوا أنه بعض النظر عن مصدر الحامض النووي DNA (أى نوع الخلية التي أخذ منها أو نوع الكائن الحي المأخوذ منه) وجد أن نسبة الأدينين (A) إلى الثايمين (T) وأيضاً نسبة الجوانين (G) إلى السيتوزين (C) جميعها لا تتعد عن الواحد الصحيح كما وجد أيضاً أن نسبة البيورين إلى البيرييميدين أيضاً تساوى الواحد الصحيح. أو بمعنى آخر وجد أن الأدينين A يساوى الثايمين T وأن السيتوزين C يساوى الجوانين G أى

(G=C) و (A=T) رصدت الدراسات التي أجريت على حيود أشعة أكس X-ray diffraction أن للحلزون المزدوج إتساع منتظم ودقيق وإستدل على ذلك من حيود مقداره اثنتين نانومتر وهذه النتيجة تتفق مع النتائج السابقة التي 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) والذان يحتويان على حلقتين فى تركيبهما . ولذا فالدراسات التي أجراها واطمن 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 اثنتين نانومتر . أما لو إتحدت قاعدتين من البيورين (كل واحدة منها إتساعها ١٢ نانومتر) فسوف تكون نقط الإتصال بإتساع أوسع من اثنتين نانومتر ، أما لو إتحدت قاعدتين من البيريميدين فسوف يكون إتساعها أقل من اثنتين نانومتر . وبالتالي فلا بد 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 . وبالتالي فكل أدينين (A) فى أحد خيطى السلسلة لا بد أن يقابل ثايمين (T) فى الخيط المقابل وأيضاً كل سيتوزين (C) فى أحد خيطى السلسلة لا بد أن يقابله جوانين (G) فى الخيط المقابل . ولذلك فتعاقب القواعد فى السلسلتين تكون متممة Complementary لبعضهما . وبديهي أيضاً 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:



فيكون ترتيب القواعد فى الخيط المقابل هو

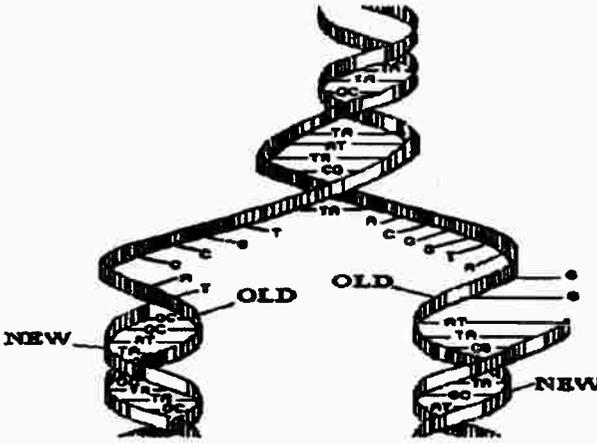


ونموذج الحلزون المزدوج للحامض النووى DNA يؤكد الإعتقاد للسائد بأن تعاقب القواعد فى الحمض النووى DNA يمكن أن يسمح بتخزين المعلومات الوراثية. وحيث أن جزئ DNA داخل الخلية يمكن أن يتكون من الملايين من القواعد فى الطول، لذا فهو يسمح بتخزين كمية كبيرة جدا من المعلومات الوراثية.

تضاعف أو تناسخ (تكرار) المادة الوراثية DNA Replication

تتضمن 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 جديدة 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 الى جزئين. ومن المهم أن نذكر أن تتابع القواعد النيتروجينية فى 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

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



شكل ١٤ : عملية تضاعف وتناسخ شريط DNA

آلية تضاعف المادة الوراثية Mechanism of DNA Replication

ويوصف تضاعف جزئ حمض DNA بأنه "شبه محافظ" **semiconservative**، ذلك أن كل جزئ ناتج عن التضاعف يكون محتفظاً بأحد شريطي الجزئ الأصلي، بينهما يكون الشريط الآخر لهذا الجزئ الناتج مستحدث التكوين. ويتحكم الحامض النووي في العمليات البيولوجية في أي كائن حي وذلك لأنه يعتبر المركز الوحيد للمعلومات الوراثية **Genetic Information** التي تنتقل بطريقة دقيقة من الآباء إلى النسل الناتج ويتم تضاعف الحامض النووي DNA بثلاثة طرق هي :-

١- الطريقة شبه المحافظة Semiconservative of DNA Replication

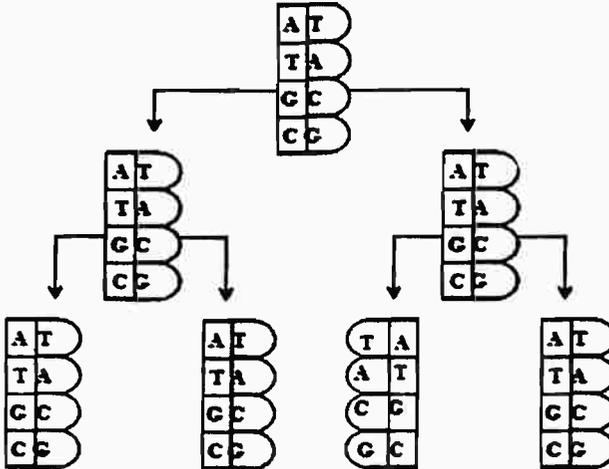
٢- الطريقة المحافظة Conservative of DNA Replication

٣- الطريقة التشتتية Dispersive Replication mechanism

١- الطريقة شبه المحافظة لتكرار المادة الوراثية

Semiconservative of DNA Replication

اصبح من الواضح الآن أن الحامض النووي DNA يتكون من حلزون مزدوج تتزاوج فيه القواعد النتروجينية بنظام محدد ومعين كما سبق الإشارة سلفا وبالتالي فتزاوج القواعد هذا يمدنا بالآلية البسيطة لتكرار الحامض النووي DNA (شكل ١٥) . فلو تكسرت الروابط الهيدروجينية بين الخيطين وإنفصلت السلسلتين عن بعضهما . فكل نصف حلزون في هذه الحالة يمكن أن يتكامل مع نيوكليوتيدات جديدة لتحل محل النيوكليوتيدات التي كانت متزاوجة معه في الخيط القديم . وبعبارة أخرى أنه يمكن لكل خيط أبوي في هذه الحالة أن يدير



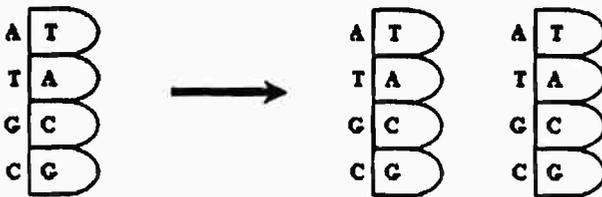
شكل ١٥ : الطريقة شبه المحافظة لتكرار المادة الوراثية DNA

عملية تكوين خليط مكمل جديد على أساس شروط نظام تزاوج القواعد النتروجينية السابق نكره، وبالتالي فكل خيط أبوي يعمل كقالب لخيط جديد. فمثلا الجوانين (G) فى الخيط الأبوي يعمل كقالب لوضع السيتوسين (C) وأيضا الثايمين (T) فى الخيط الأبوي يعمل كقالب لوضع الأدينين (A) . وسميت هذه الطريقة فى تكرار DNA بالطريقة شبه المحافظة للتكرار نظرا لأن الحلزون الأبوي المزدوج يحافظ عليه جزئيا أثناء تكرار الحامض النووى DNA وآلية التكرار شبه المحافظة **Semiconservative Replication Mechanism** هذه قد تم إقتراحها بواسطة العالمان واطسن وكريك، وهى طريقة بسيطة وتوضح كيفية مضاعفة الحامض النووى DNA .

٢- الطريقة المحافظة لتكرار المادة الوراثية

Replication of DNA Conservative

إن آلية هذه الطريقة المحافظة هنا تعنى بقاء الحلزونات الأبوية المزدوجة كما هى بدون أن تنفصل أى بدون تكسر الروابط الهيدروجينية الموجودة بين القواعد النتروجينية ومن هنا جاءت التسمية أنها محافظ عليها تماما. وفى هذه الطريقة فإن الحلزون المزدوج يقوم بتكوين حلزون مزدوج جديد مكون من خيطين مخلقين (شكل ١٦)



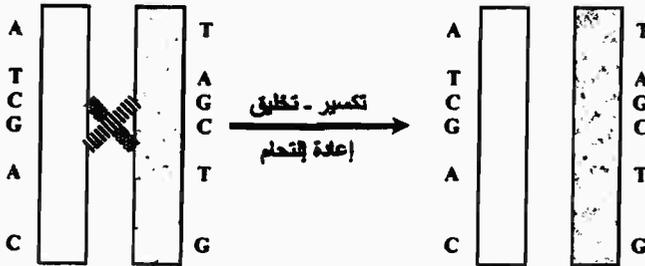
شكل ١٦ : الطريقة المحافظة لتكرار المادة الوراثية DNA

يوضح الشكل الآلية المحافظة لتكرار DNA (مضاعفة) ويتضح في الشكل أن الحلزون الأبوي يبقى كما هو دون أن تنفصل السلسلتين ويستخدم كقالب وتطبع عليه القواعد المقابلة للقواعد النيروجينية الموجودة في القالب الأبوي. وبالتالي 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، والتي تعمل مع بعضها البعض بنظام متكامل. ولذا يطلق

عليها العلماء **Replication machine** • ويجب ملاحظة أن هناك بعض الفروق التي توجد بين خلايا النباتات الراقية مميزة النواة **eukaryotic cells** وخلايا النباتات الدنيئة غير مميزة النواة **prokaryotic cells** • ففي الخلايا غير مميزة النواة يوجد الحمض النووي DNA على شكل خيط دائري مفرد وغير مغلف بغشاء نووي • أما في الخلايا مميزة النواة فيوجد بداخل نواتها الكروموسومات وكل كروموسوم مفرد يحتوي على جزئ من حلزون مزدوج مكون من خيطين ملتفين حول بعضهما ومعهم كمية كبيرة من البروتين والحمض النووي RNA •

وتجدر بالإشارة إلى أن الخيطين المكونين لجزئ DNA والملتفين حول بعضهما على شكل حلزون يجب أن يعودا عن هذا الالتفاف 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 فلا بد أن يلف أحدهما عكسياً حول الخيط الآخر • ويحفز عملية فصل خيطي DNA (المكملين لبعضهما) إنزيمات تسمى DNA **helicase enzymes** والتي تنتقل على طول الحلزون وكلما إنتقلت لمكان على الحلزون تقوم بفك الخيطين عن بعضهما، وفي نفس اللحظة التي ينفصل فيها الخيطان عن بعضهما تقوم بروتينات يطلق عليها اسم **helix-destabilizing proteins** بالإرتباط على خيط DNA المفرد وذلك لتجنب إرتباطه مره أخرى بالخيط المكمل حتى تتم عملية أخذ نسخة (Copy) من كلا الخيطين • وحيث أن جزيئات 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

المجموعة من الإنزيمات تقوم بقطع الجزء من DNA ثم إعادة وصله (لحامه) مرة أخرى بعد إجراء عملية التكرار. وجديراً بالنكر أن عملية تخليق DNA دائماً تتم في إتجاه 5' _____ 3'، حيث إن الإنزيمات التي تحفز عملية ربط النيوكليوتيدات ببعضها يطلق عليها **DNA Polymerases** وهي إنزيمات لها عدة خصائص تجعلها موانمة ومتخصصة لعملية التكرار بمواصفات وحدود معينة، فهي قادرة على إضافة نيوكليوتيد **Nucleotide** فقط إلى النهاية (3' end) من الخيط عديد النيوكليوتيد **Ploynucleotide strand** والذي يتم تخليقه كنسخة من الخيط الأصلي (لاحظ أن النسخة التي يتم تخليقها تكون بها القواعد المكتملة للقواعد المرجودة بالخيط الأصلي). وكم نكرنا 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 الجزئين 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 **5' Phosphate group** للنوكليوتيد القادم بالـ **3' Hydroxyl Group of the Sugar** عند نهاية الخيط. لذا فالخيط الجديد المخلق من DNA عادة ما ينمو في إتجاه 5' _____ 3'.

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 التى ستكون على هيئة صورة تجمع فى قاع الأنبوبة .
- ٥- يتم التخلص من الجزء العلوى (السائل الموجود أعلى الأنبوبة) .
- ٦- يتم غسل 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 كالاتى:

خطوات علمة لعزل وإستخلاص المادة الوراثية فى النبات



Break down the cell wall & membranes

تحطيم جدر الخلايا



Centrifuge to separate the solids from the dissolved DNA

عملية الفصل بالطرد المركزي لفصل المواد الصلبة عن المادة الوراثية الذائبة



Precipitate the DNA using ethanol

عملية ترسيب المادة الوراثية بواسطة الإيثانول



Dissolve DNA in distilled or buffer

إذابة المادة الوراثية فى قدر من الماء المقطر أو محلول منظم

Wash the DNA pellet with Ethanol and dry pellet

غسيل الجزء المتجمع أسفل الأنبوية (المادة الوراثية) بإيثانول مخفف



Centrifuge to separate the DNA from the dissolved salts and sugars

عملية فصل المادة الوراثية عن الأملاح والسكريات بالطرد المركزي

شكل ١٨ : خطوات إستخلاص وعزل المادة الوراثية فى النبات

Polymerase Chain Reaction (PCR)

تُحفظ المعلومات الوراثية وغيرها داخل الحمض النووي (DNA) .
وتقوم الخلية بمضاعفة كمية الحمض النووي وقت إنقسام الخلية بشكل تلقائي وبشكل سريع مع وجود نظام تصحيح للأخطاء خلال النسخ . وتبلغ سرعة النسخ والمضاعفة إلى ١٠٠٠ قاعدة نيتروجينية بالثانية (داخل النظام الحيوي) .
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 هو عدم إعتماها 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 أي إرتباط خاطئ **Miss match** .

تعريف تقنية التفاعل البنائي التتابعي؟

هي تقنية عملية تقوم على إكثار نسخ الحمض النووي (DNA) خارج النظام الحيوي . 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 البنائي التتابعي

Requirements of PCR Technology

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

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

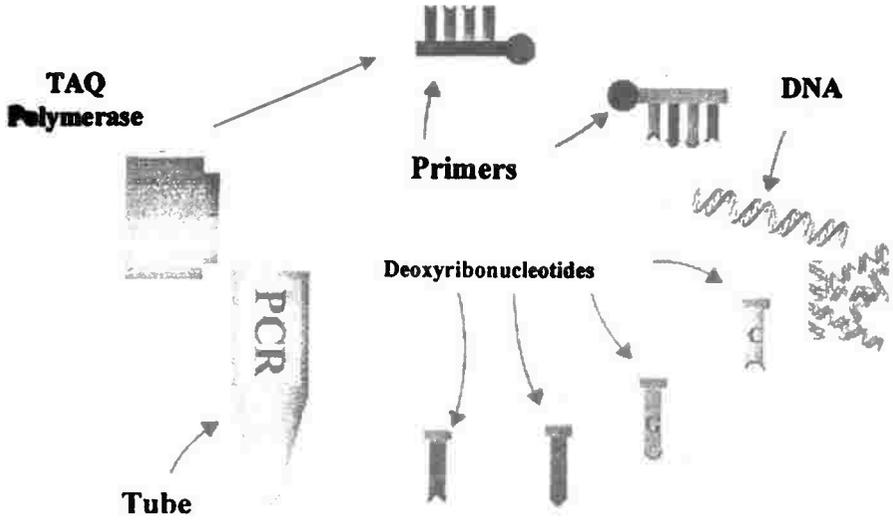
٢. إنزيم DNA polymerase لبناء وترتيب القواعد النيروجينية (وحدات الحمض النووي DNA)، ويجب أن يكون هذا الإنزيم مقاوم للحرارة العالية ليتمكن من العمل، على أية حال، يعد Tag Polymerase من الإنزيمات المقاوم للحرارة العالية.

٣. وجود مجموعة متفرقة من القواعد النيروجينية: (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 البنائي التتابعي .



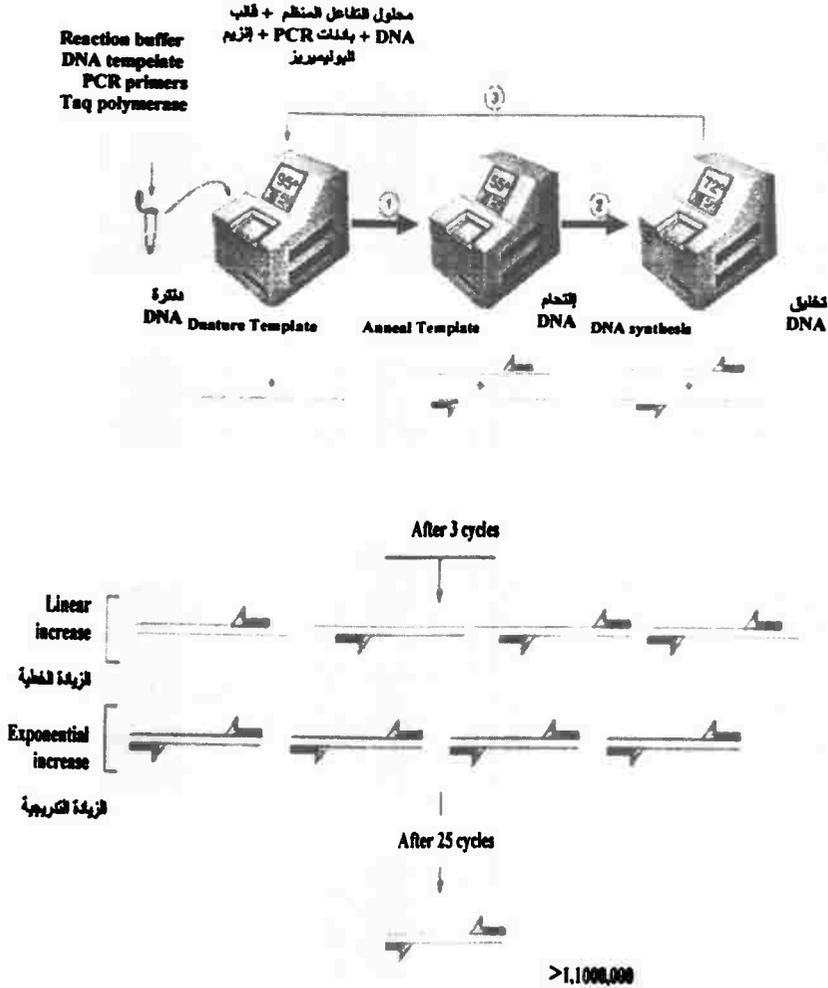
شكل ١٩: متطلبات تقنية التفاعل البنائي التتابعي (PCR)

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

٣. مرحلة التمديد extend: وتتم برفع درجة الحرارة إلى ٧٥م ليقوم أنزيم البلمريز بعمله في بناء الحمض النووي (DNA) الجديد .
 وهذه المراحل الثلاث تعتبر دورة كاملة وفيها يصبح الحمض النووي



اشكال ٢٠-٢١: الدورات الحرارية ومراحل التفاعل التسلسلي في تقنية

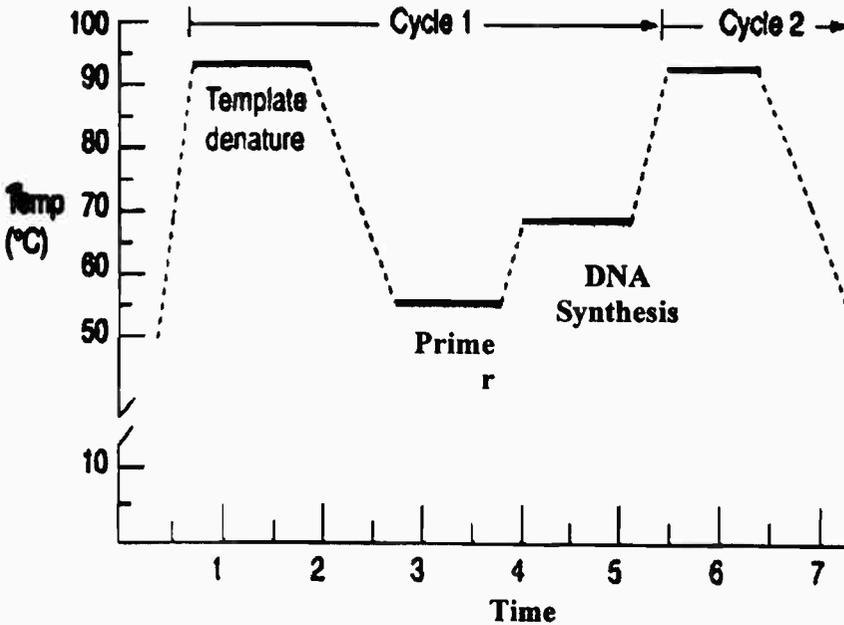
PCR

(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 لهذه التقنية يمكن الوصول إلى شكل (٢٢) الآتى:



شكل ٢٢: الدورات الحرارية ومراحل التفاعل التسلسلى فى تقنية PCR

استخدامات تقنية التفاعل البنائي التتابعي Applications of PCR

لتقنية PCR استخدامات عديدة في مجال أبحاث الحمض النووي

والوراثة ومنها:

- الكشف عن الطفرات الوراثية: وذلك عن طريق وضع بادئ (بريمر) خاص للطفرة لإكثار الجين الخاص بها، ومنه نقوم بمعرفة المرض إذا كان على زوجي الكروموسومات أو على إحداهما (اليل allele) .
- تحديد البصمة الوراثية .
- الكشف عن الفيروسات وهي الوسيلة الأدق في تحديد نوع وجنس الفيروس وكميته .
- إكثار الجين المراد إدخاله على البلازميد أو الحمض النووي (DNA) المضيف وهو العنصر الأهم في عملية التجميع الجيني **Recombinant DNA** .
- تغيير نهايات الجين لتصبح متوافقة مع إنزيمات القطع **Restriction enzymes**
- تحديد تتابع القواعد النيتروجينية في الحمض النووي (DNA)
• **DNA Sequencer**
- معرفة طول الحمض النووي DNA .
- تحديد الجين المطلوب من خليط من الجينات .
- يستخدم في تقنية **Microarrays** .
- في مشروع الخريطة الجينية **Genome map** .
- الساوثرن بلوت **Southern plot** أو تهجين الأحماض النووية .
- تقنية إرتباط الحمض النووي (DNA) بالبروتين **DNA-Protein Interaction**

- في مجال الطب الشرعي (إختبار الأبوة، حالات الاغتصاب، تحديد الهوية ٠٠ إلخ) وغيرها من الإستخدامات المعملية والبحثية.

أنواع تقنية التفاعل البنائي التتابعي **Types of PCR**

هناك نوعان من التفاعل البنائي التتابعي يمكن إيجازها في الآتي:

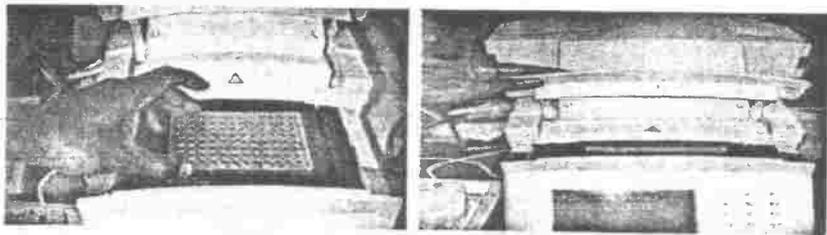
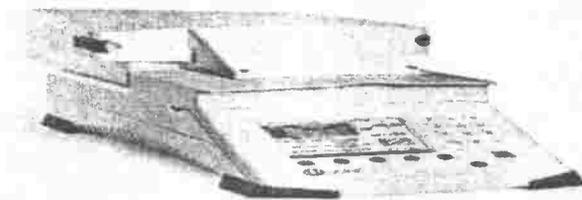
- التفاعل البنائي التتابعي العادي وهو ما تم سرده والتطرق اليه في الخطوات

السابقة **Normal PCR**

- التفاعل البنائي التتابعي بإستخدام الكمبيوتر **Computerized Real Time**

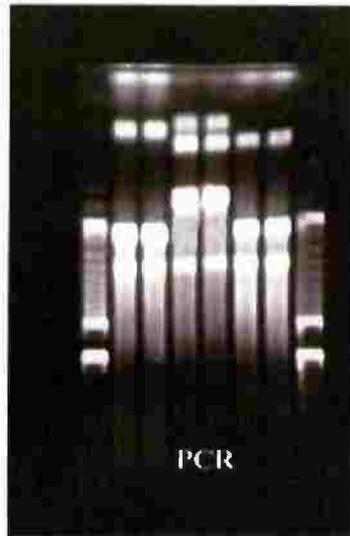
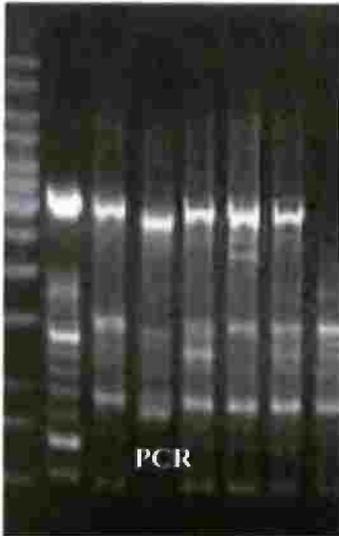
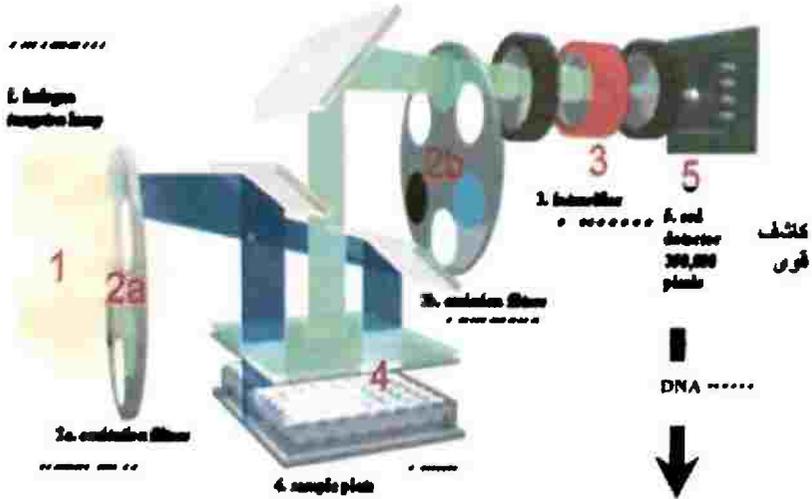
PCR

وهذا النوع يقوم على نفس المبدأ ولكن الخلاف الوحيد هو ربط جهاز PCR بكمبيوتر لتحديد الوقت الحقيقي لبدأ التفاعل ومن ثم الكمية الحقيقية لعدد نسخ الحمض النووي (DNA) . ويعتمد ذلك على وجود قواعد نيتروجينية حرة مشعة لتحديد ذلك، مما يسهل على الباحثين تقدير الوقت لتحديد مدى وجود الجين المطلوب من عدمه، وكمية الجين بدون الوصول إلى نهاية



شكل ٢٣: جهاز Real Time PCR المستخدم في تفاعل PCR

الدورات الحرارية المحددة (شكل ٢٣-٢٤)



شكل ٢٤ : نواتج التفاعل البنائي المتسلسل