مدخل إلى علم الأحياء الجزيئي Molecular Biology

لم يُثر علم في القرن العشرين الآفل، باستثناء الفيزياء النووية، جدلاً وحواراً وأملاً، مثل علم دراسة المورثات (الجينات) Genetics. هذا العلم الذي نشأ في بداية القرن المنصرم، نتيجة الحاجة إلى توفير أنواع جديدة ومحسنة من النبات والحيوان. والذي نما تدريجيا ليصبح في طليعة العلوم التجريبية. حيث ولد كفرع بيولوجي مستقل قبيل حلول القرن العشرين، وكان رواده يستهدفون جلاء الغموض عن ظاهرة التكوين (ماهيَّة الحياة)، وبخاصة العوامل المؤثرة فيها. ولكن سرعان ما تحول دارسو هذا العلم الحديث عن هذا الهدف، وانصرف معظمهم إلى متابعة انتقال الصفات من الآباء إلى الأبناء (علم الوراثة Heredity الذي كان الراهب النمساوي مندل Gregor Mendel أشهر رواده).

حتى بداية القرن العشرين كان يبدو أن علم المورثات قد تجمد على وضعه التقليدي، بأن بقيت الدراسات محصورة في ملاحظة دور المورثات كوحدات مولدة للصفات المتوارثة، وهكذا ظل مؤسسو هذا العلم، حتى نهاية ثلاثينيات القرن العشرين، لا يعرفون عن كنه المورثات إلا ما تكشفه لهم الطفرات الوراثية Mutations (وخاصة ذات الآثار المدمرة أو القاتلة)، ولهذا كانت حصيلة هذه الدراسات حتى بداية الأربعينيات، متواضعة جداً، ولا تتجاوز تحديد الجزء الذي تأثر بالطفرة سواء كان عضواً أو نسيجاً.

على أن هذا الجمود لم يدم طويلاً، فبحلول عام 1944، دخل علم المورثات عصراً جديداً، عندما تبين - على يدي العالم ايفري Oswald T. Avery - أن الحمض النووي DNA هو المتحكم في انتاج البروتينات اللازمة لبناء جسم كل كائن حي، وذلك بإصدار تعليمات يحدد فيها أنواع وكميات الأحماض الأمينية وفقاً لنوع العضو - بل والنسيج – الذي ستدخل هذه البروتينات في بنائه (ابتداء من المرحلة الجنينية حتى نهاية الحياة).

وكان الاختراق الجزيئي الرئيس –بالطبع- هو إثبات جيمس واطسن وفرنسيس كـــريك James D. Watson and Francis H. C. Crick عام 1953، أن المورثات محمولة على لولب مزدوج من جديلتين من الحمض النووي deoxyribonucleic acid (DNA)، تطورت على أثره الأبحاث المتعلقة بالكشف عن طبيعة المورثات (التي كان مندل يطلق عليها العوامل الوراثية وظلت تحمل هذا الاسم أكثر من سبعين عاماً)، والحقيقة أن المورث (Gene) ليس نوعاً من البروتين يدخل بذاته كوحدة بناء في تكوين مادة الخلية، وإنما هو أشبه بـ عقدة (تسلسل محدد) من شريط الحمض النووي DNA ويوجد منه الآلاف على كل صبغي Chromosome ومن مجموع المورثات في نواة الخلية يتكون النمط الجيني (Genotype)، الذي يرسم برنامج عملية بناء جسم الكائن الحي، وفقاً للتعليمات الصادرة من البرنامج الوراثي المسجل على شريط جزيء الحمض النووي DNA، الذي تم التعرف على مكوناته هو والحمض النووي الآخر ribonucleic acid (RNA)، الذي ينقل هذه التعليمات من النواة إلى السيتوبلازم حيث يتم تنفيذها.

وفي خلال ستينيات وسبعينيات القرن العشرين توصل علماء البيولوجيا إلى اكتشاف المزيد من التفاصيل عن المورثات، لا سيما في نهاية عام 1973، حينما أدرك علماء البيولوجيا الجزيئية من خلال تجاربهم المتواصلة، انهم جمعوا عُدَّةَ عملٍ بحثي رائعة، أطلقوا عليها اسم تقنيات الحمض النووي المُطَعَّم Recombinant DNA. ذلك تأتى من بعد اكتشاف انزيمات القطع أو التحديد Restriction Enzymes التي سهلت عملية معالجة الأحماض النووية، بهدف إيجاد طرائق لتحريك قطع من المادة الوراثية (Genes)، صغيرة ومحددة الهوية، من خلية إلى أخرى، ثم

Molecular Biology Dr. Ismail Al-Mohamed

ملاحظة ما تصنعه هذه المورثات المولَجة. وقد أعتبر أن التفاعل المتسلسل للبوليميراز (PCR)- -الذي اكتشف في عقد الثمانينات من القرن الماضي- هو أكثر التقانات التي سهلت عملية تطويع وإدارة المورثات. ونتيجة للتطور العلمي الحثيث، انبثق عن علم البيولوجيا الجزيئية، فرع حديث أطلق عليه تقانة تطويع المورثات أو الهندسة الوراثية Genetic Engineering الذي يشغل جُلَّ اهتمام الباحثين البيولوجيين اليوم.

ان التقدم الذي أحرزه علم البيولوجيا الجزيئية خلال الأعوام الماضية فتح مجالات رحبة في حقل التقانة الحيوية Biotechnology. فقد أوجد إمكانية دمج بروتوبلاست Protoplast fusion نوعين مختلفين لتكوين بروتوبلاست هجين ينمو إلى نبات كامل بعد سلسلة من المعالجات، وتستعمل هذه التقانة من أجل إدخال جينات جديدة إلى النوع، وكمثال نقل جين أو عدد من المورثات مقاومة لمرض معين من الأمراض البكتيرية أو الفطرية، أو لها القابلية على تثبيت النيتروجين...

وحديثاً، أدى التقدم المضطرد في التقانة الحيوية Biotechnology التي تعانقت مع تقانة النانو Nanotechnology - التي كثيراً ما يتردد صداها على مسامعنا في هذه الأيام كتقانة القرن الحادي والعشرين- ليكونا معاً نهجاً بحثياً متقدماً يرمي إلى دراسة مكونات خلايا الكائن الحي دراسة دقيقة. وقد استطاع هذا التحالف القائم بين التقانتين، المعروف باسم (تقانة النانو الحيوية Bio-nanotechnology)، أن يجذب إليه كثيراً من اهتمام الباحثين المتخصصين في مجالات الفيزياء والأحياء والكيمياء من مختلف المدارس البحثية في العالم، وذلك على مدى سنوات العقد الأول من هذا القرن. وليس ثمة شك، في أن فئة المواد النانوية المستخدمة في تطبيقات تقانة النانو الحيوية Bio-nanomaterial، تُعَدُّ الأكثر نمواً وازدهاراً في مجال الأبحاث العلمية، وذلك نظراً لما تتمتع به من خواص فريدة أهلتها للدخول في تقانات علم البيولوجيا الجزيئية.

وقد سعى علماء علم الأحياء الجزيئي، عقوداً طويلة لمحاولة الهيمنة على المورثات النباتية والحيوانية، ومحاولة إعادة ترتيبها لصياغتها على النسق الذي يتيح إضافة خواص متعددة إلى النباتات والحيوانات المستخدمة في مجال صناعة المنتجات الغذائية. لكن وعلى الرغم من تلك المحاولات الجادة فإنها كانت تصطدم بكثير من العقبات والقيود التقنية والفنية. ومع بزوغ فجر تقانة النانو والتحامها مع التقانة الحيوية، توافرت عدة أدوات وتقنيات جديدة وقوية كانت كفيلة بتحويل تلك الأحلام إلى أرض الواقع. فقد أتاحت تقانة النانو مجموعة من التقنيات والأدوات الجديدة الخاصة للتعامل مع جينات النباتات أو الحيوانات والتلاعب بها، وذلك من خلال توظيف الحبيبيات والألياف النانوية وكذلك الكبسولات في نقل المورثات المراد توصيلها إلى خلية ما بصورة مباشرة، بدلاً من استخدام الفيروسات كناقلات Viral Vectors. وقد أدى استخدام المواد النانوية كناقلات جينية إلى زيادة في كمية المورثات أو المواد الكيميائية المنقولة إلى الخلايا. وذلك بالإضافة إلى إتاحة إمكان السيطرة على الحمض النووي، الذي يتم الإفراج عنه وخروجه من الكبسولات داخل المكان المستهدف فقط من هيكل النبات.

وقد اتاحت تقانة النانو برمجة التفاعلات الجزيئية والخلوية، والتعامل المباشر مع جينات المحاصيل الزراعية وإعادة ترتيبها على النحو الذي يضمن إنتاجية أكبر، وإضافة بعض الصفات المرغوب فيها.

Molecular Biology Dr. Ismail Al-Mohamed

الفصل الأول

مدخل إلى بيولوجيا الخلية

1- مقدمة

أن المفهوم المتفق عليه اليوم لطبيعة الكائنات الحية Organisms هو سيادة قوانين الفيزياء والكيمياء على جميع وظائفها التي تتم على المستوى الجزيئي Molecular level، وعلى معظم وظائفها التي تتم على مستوى الخلايا. ومع ذلك فالكائنات المتعضية تتميز عن المادة الخاملة؛ في كونها أنظمة معقدة ذات كيان له كثير من الصفات المتغايرة، والأهم من ذلك هو أن كل أنشطتها تتم تنفيذاً لبرامج وراثية (جينية)، تحمل في طياتها معلومات مكتسبة تراكمت عبر التاريخ وهذا ما يميزها عن عالم الجمادات.

والخلية The Cell، هي أصغر وحدة في المتعضيات الحية، ومنها تتكون جميع الأحياء، بدءاً من الكائنات وحيدة الخلية المعروفة لدينا باسم الجراثيم (Bacteria)، وصولاً إلى أكثر الكائنات الحية تعقيداً. ويُعدُّ علم الخلية Cytology من الفروع الأصيلة في علم الحياة Biology، وقد ظهر كفرع مميز ومستقل في نهاية القرن التاسع عشر، ويعود الفضل في ظهوره كعلم إلى عدد من علوم وفروع المعرفة الأخرى، وعلى الأخص علوم الوراثة، الفيزيولوجيا، الأجنة ، التشريح والفيزياء البصرية وغيرها. وأدى ذلك إلى وجود علاقات وطيدة لهذا الفرع مع هذه العلوم وعلوم أخرى، حتى أصبح اليوم أحد أعمدة علم الأحياء الجزيئي (البيولوجيا الجزيئية) Molecular Biology الذي ظهر حديثاً، حيث ساهم علم الخلية في ظهوره وتطوره كفرع من فروع علوم الحياة.

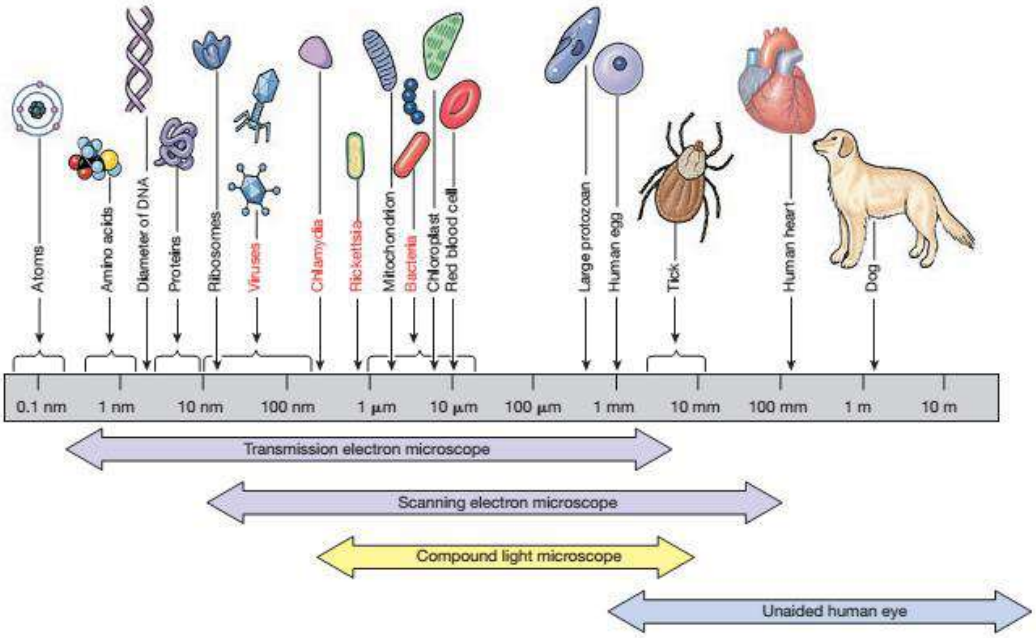
والخلية الوحدة الأساسية في الحياة؛ هي أصغر وأبسط وحدة حية تقوم بشتى الوظائف الحيوية من تكاثر وحركة وتغذية واستقلاب وطرح للفضلات. وقد أدخل مفهوم الخلية لأول مرة من قبل العالم الإنجليزي Robert Hooke في عام 1665، حيث وصف فراغات الفلين التي تذكر ببنية قرص الشمع عند النحل، وذلك من خلال ملاحظة مقاطع من نسيج الفلين بوساطة المجهر الضوئي البسيط الذي صنعه بنفسه. أطلق العالم Hooke مصطلح الخلية Cell (عن اللاتينية Cella أي الحجرة Chamber) على كل فراغ من الفراغات الموجودة في قطعة الفلين؛ لأن هذه الفراغات تشبه الحجيرات التي يقطنها رهبان المعابد. أدت ملاحظات هوك إلى وضع حجر الأساس لصياغة النظرية الخلوية Cell theory عام 1839 من قبل عالم النبات الألماني Matthias Schleiden ومواطنه عالم الحيوان Theodor Schwann، والتي تنص على أن جميع الكائنات الحية مؤلفة من خلايا ومنتجاتها، وأن كل خلية تنشأ من انقسام خلية سابقة لها. وهناك كائنات حية مؤلفة من خلية واحدة تعرف هذه الكائنات الحية بوحيدات الخلية Unicellular، مثالها الجراثيم Bacteria من الكائنات الحية بدائية النوى Prokaryotes والمتحول الأميبي Amoeba proteus وبعض الطحالب من الكائنات الحية حقيقية النوى Eukaryotes وغيرهما، وهناك كائنات مؤلفة من عدد متفاوت من الخلايا تبعا لنوع الكائن، وتعرف هذه الكائنات عموما بكثيرات أو عديدات الخلايا Multicellular. وقد يقتصر تركيب الكائن عديد الخلايا على عدد محدود منها، كما في مستعمرة باندورينا Pandorina colony التابعة للطحالب الخضراء Green Algae، والتي تتكون من 16-32 خلية فقط، وقد يرتفع عدد الخلايا في كائنات أخرى حتى يصعب حصره بدقة. فعلى سبيل المثال، يصل عدد الخلايا في طفل الانسان عند ولادته إلى ترليون Trillion (ألف مليار) خلية، ويزداد هذا العدد ليصل إلى نحو 40 ترليون خلية في الانسان البالغ، وقد صنفت هذه الخلايا عند

Molecular Biology Dr. Ismail Al Mohamed

الانسان إلى أكثر من /200/ نوع لها صفات بنيوية ووظيفية متباينة، تتشكل منها الأنسجة المختلفة، فمن الخلايا المتشابهة تتكون الأنسجة، ومن مجاميع الأنسجة تتكون الأعضاء، ومن مجاميع الأعضاء يتركب جسم الكائن الحي الراقي، فالكائنات الحية تشكل تسلسلاً هرمياً أكثر تعقيداً من أي نظام أخر، بدءاً من الجزيئات Molecules فالخلايا فالأنسجة حتى الكائنات الكاملة فالعشائر وأخيراً النوع.

2- أنواع الخلايا

حتى منتصف القرن التاسع عشر كانت المُتعضيات Organisms تنقسم إلى مجموعتين لا ثالثة لهما؛ هما الحيوانات والنباتات. حتى أن كل كائن لا يُفصح تركيبه بوضوح عن أنه حيوان (كالفطر والبكتريا وأمثالهما من الكائنات الدقيقة)، كان يلحق تلقائيا بمملكة النبات. على أن أخطر تغيير في الهيكل التصنيفي للمتعضيات قد حدث في ثلاثينيات القرن العشرين، اثر اكتشاف أن البكتيريا وأضرابها تختلف من سائر الكائنات الأخرى في نقطة مهمة هي: أن خلاياها ليست لها نواة بالمواصفات العلمية، ولهذا وضعت في مجموعة دنيا أطلق عليها اسم الـ مونيرا Monera أو بدائيات النواة، فقد مَكَّن التقدم التقني الهائل والسريع في مجال تطور المجاهر الضوئية وصولا إلى المجهر الإلكتروني النافذ Transmission electron microscope (TEM) حيث مَكَّن من فحص البنية الداخلية الدقيقة لأنواع كثيرة من الخلايا، وتم تمييز عضياتها المختلفة (شكل 1-1). وبالرغم من التنوع الواسع للخلايا الحية وتعقيدها البنيوي، فقد صنفها العلماء تبعاً لمستوى تعضيها إلى مجموعتين؛ حيث تضم المجموعة الأولى الخلايا بدائيات النوى Prokaryotic Cells، أما المجموعة الثانية فتضم الخلايا حقيقيات النوى Eukaryotic Cells.

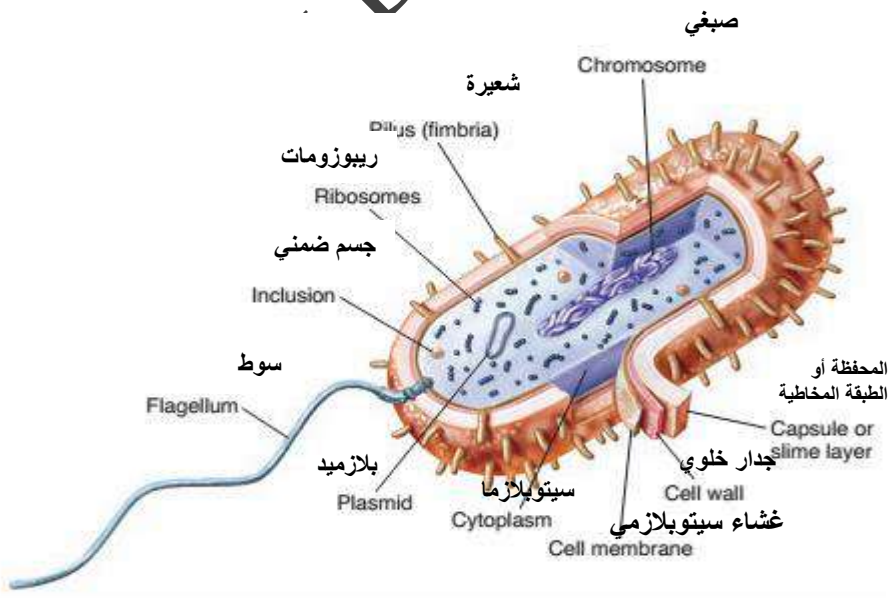


شكل 1-1. الأحجام النسبية للكائنات الحية ومكوناتها تبعاً لتطور المجاهر الفاحصة لها (عن Black and Black, 2015)

Ismail Al-Mohamed
Mole

2-1- خلايا بدائيات النوى Prokaryotes Cells: تعد من أبسط أشكال الخلايا، وبالرغم من بساطة بنيتها فهي تستطيع العيش في أقسى الظروف البيئية على وجه الأرض؛ نتيجة لدرجة تكيفها العالية. وتعد الجراثيم (Bacteria) مثالاً نموذجياً على هذا النوع من الخلايا وتتميز بثلاث صفات أساسية:

- امتلاكها لعدة أغشية خلوية: تحدث جميع التفاعلات الكيميائية داخل الخلية في العصارة الخلوية لخلوّها من عُضيات غشائية متخصصة. وتبدو السيتوبلازما (الهيولى) عند فحصها بالمجهر الإلكتروني غير متجانسة وفيها ريبوزومات ومادة وراثية غير محاطة بغشاء نووي؛ أي انها لا تحتوي على نواة حقيقية، وتدعى Nucleoid (شبيه النواة). وتحتوي خلايا بدائيات النوى طبقة حماية إضافية خارج غشاء الخلية، تدعى جدار الخلية Cell Wall، وغالبا ما تحتوي أيضا على طبقة ثالثة خارجية سكرية تشكل بنية شبيهة بالمحفظة Capsule (شكل 1-2)، ويتكون جدار الخلية في غالبيته من جزيئات سكرية يرتبط بعضها مع بعض، مشكلة شبكة تؤمن الحماية ضد الرضوض الفيزيائية، وتساعد في المحافظة على رطوبة الخلية.
- جميع بدائيات النوى خلايا وحيدات خلية Unicellular : لا تتجمع وتشكل كائنات حية متعددة الخلايا إلا أنها قد تتجمع على شكل عناقيد بعضها مع بعض وتشكل طبقة رقيقة تدعى Biofilm.
- لا تتضاعف بدائيات النوى بالانقسام الخيطي.



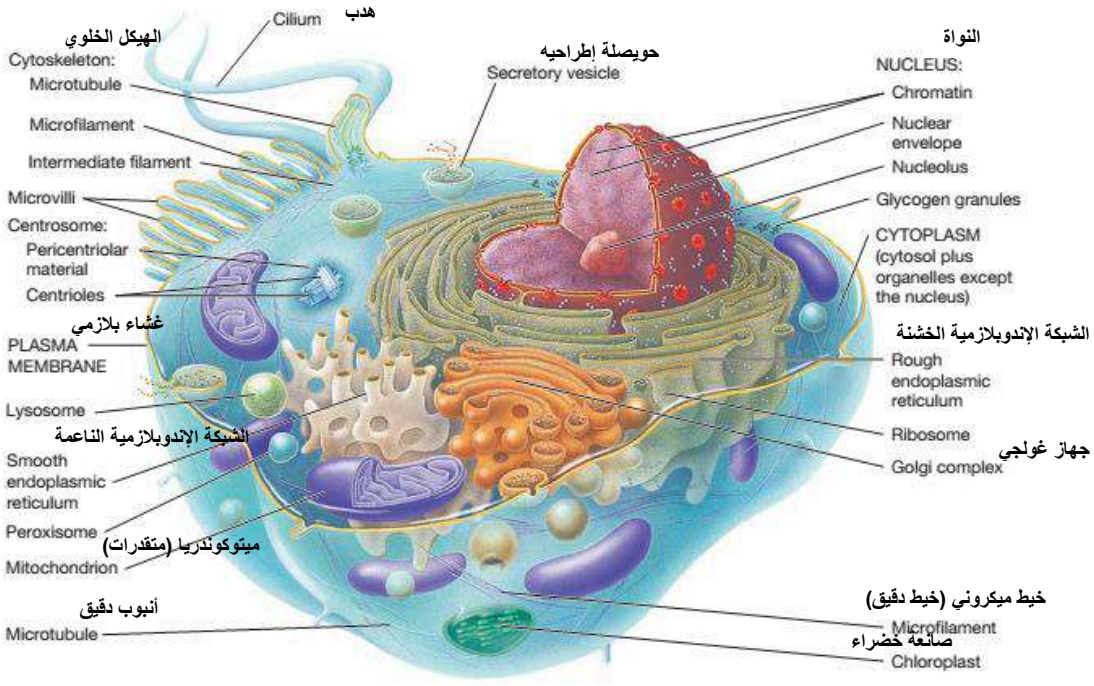
شكل 1-2. شكل تخطيطي لخلية بدائية النواة (خلية بكتيرية) (عن Black and Black, 2015)

2-2- خلايا حقيقيات النوى Eukaryotes Cells: تشكل خلايا حقيقيات النوى (كالخلايا الحيوانية والنباتية والفطور....) الثالوث الأكثر حداثة في مجموعات الكائنات الحية، وهي

Dr. Ismail Al Mohamed
Molec

خلايا أكثر تعقيدا من بدائيات النوى، قادرة على تشكيل كائنات حية متعددة الخلايا Multicellular. والميزة الملفتة للنظر عند فحصها بالمجهر، هي تعضي سيتوبلازماها بشكل كبير، إذ تُظهر المجاهر الضوئية بنية كبيرة فيها تدعى النواة Nucleus، وتُعدُّ السمة الأبرز في خلايا حقيقيات النوى (شكل 1-3). أما عند فحصها بالمجهر الإلكتروني، فتظهر بنى إضافية واضحة المعالم في السيتوبلازما، وتصنف هذه البنى إلى مجموعتين اثنتين:

- بنى سيتوبلازمية مغلفة على الأقل بغشاء واحد واضح المعالم تدعى العُضيّات Organelles. تسمح هذه الأغشية للعُضيّات بتشكيل حجيرات (أحياز) متخصصة في السيتوبلازما، تقوم بمجموعة من الوظائف الخلوية. وتُعد الأغشية المغلفة للعضيات ذات نفوذية انتقائية، تساعد في خلق وسط خاص يناسب الجزيئات الموجودة في داخل العُضيّات بشكل مثالي. ومن ضمن العضيات الغشائية التي توجد في خلايا حقيقيات النوى نذكر النواة Nucleus، و الشبكة السيتوبلازمية الداخلية Endoplasmic reticulum (ER)، وجهازغولجي Golgi complex، والمتقدرات (المصورات) الحيوية Mitochondria، والصانعات الخضر Chloroplasts، والجُسيمات الداخلية Endosomes، والجسيمات الحالة Lysosomes، والجسيمات البيروكسيدية (المؤكسدة) Peroxisomes. وتحتوي كل من هذه العضيات على جزيئات نوعية تقوم بمجموعة من الوظائف المستقلة.
- معقدات جزيئية غير مغلفة (محاطة) بغشاء، ولا تمتلك اسما عاما (مثل العضيات)، ولكن قد تشترك في سمة واحدة مهمة هي أنها تشغل مناطق خاصة في السيتوبلازما ومتخصصة بمجموعة من الوظائف الخلوية، وتتضمن: عناصر الهيكل الخلوي Cytoskeleton، الريبوسومات Ribosomes والجسيمات المحللة للبروتينات Proteasomes.



شكل 1-3. شكل تخطيطي لخلية حقيقية النواة (عن Tortora *et al.*, 2019)

Dr. Ismail Al-Mohamed
Mole

3- الفروقات الرئيسة ما بين الخلايا بدائية النوى وحقيقية النوى

الخلايا بدائية النواة أصغر حجما وأقل تعقيداً في مكوناتها من خلايا حقيقية النواة، حيث أنها لا تحتوي على نواة متميزة؛ بسبب عدم وجود غلاف نووي يحيط بمادتها الوراثية. لذلك فإن مادتها الوراثية تكون بتماس مباشر مع السيتوبلازم. من الناحية التطورية؛ تعتبر الخلايا بدائية النواة الأسلاف القديمة التي انحدرت منها الخلايا حقيقية النواة. وتظهر الأثار التي عثر عليها والتي تعود إلى أكثر من ثلاثة بلايين سنة مضت خلايا بدائية النواة فقط، بينما يعود ظهور الخلايا حقيقية النواة إلى حوالي بليون سنة بعد ذلك.

ومع وجود الكثير من الاختلافات بين الخلايا بدائية وحقيقية النواة (النباتية أو الحيوانية)، فإن هناك العديد من التماثل بينهما وخصوصا على المستوى الجزيئي حيث أن لتراكيبها نفس المكونات والمظهر تقريباً إضافة لتشابه وظائف العديد من أجزاءهما وشفراتهما الوراثية (جدول 1-1).

تعدُّ الجراثيم (Bacteria) أفضل الأمثلة على الخلايا بدائية النواة، وهي خلايا صغيرة يبلغ متوسط طولها قرابة 3 ميكرومتر وعرضها حوالي 1 ميكرومتر. تختلف أشكال البكتريا وحجومها فبعضها الكروي وأخرى عصوية، وبعضها ذو أشكال حلزونية أو ذات أشكال خاصة. كما تترتب البكتريا بطرق مختلفة؛ مزدوجة وأخرى مسبحية، وبعضها يشبه عنقود العنب.

جدول 1-1. مقارنة بين خلايا بدائيات النوى وحقيقيات النوى النباتية والحيوانية

نوع الخلية / الصفة	طلائعيات (بدائيات) النوى	حقيقيات النوى الحيوانية	حقيقيات النوى النباتية
الحجم Size of Cell	القطر 0.2-2 مايكرومتر	10-100 مايكرومتر	10-100 مايكرومتر
طريقة انقسام الخلايا Cell Division	انشطار ثنائي	انقسام خيطي ومنصف	انقسام خيطي وقد يوجد المنصف في بعض الأنواع
تصنيع RNA والبروتين	في السيتوبلازما	RNA في النواة والبروتين في السيتوبلازما	RNA في النواة والبروتين في السيتوبلازما
جدار الخلية Cell wall	موجود	غير موجود	موجود
الغشاء السيتوبلازمي	موجود	موجود	موجود
السوط والأهداب	سلسلة واحدة	قد توجد	لا توجد
الشبكة السيتوبلازمية	غير موجودة	موجودة	موجودة
الهيكل الخلوي	بدائي وغير متطور	متطور	متطور
المريكزات	غير موجودة	موجودة	غير موجودة
جهاز جولجي	غير موجودة	موجودة	موجودة
النواة	غير موجودة	موجودة	موجودة
المتقدرات	غير موجودة	موجودة	موجودة
الصانعات الخضراء	غير موجودة	غير موجودة	موجودة
الصبغيات	صبغي دائري واحد صغير نسبياً	عدد من الصبغيات كبيرة الحجم	عدد من الصبغيات كبيرة الحجم
الجُسيمات الداخلية والحالّة	غير موجودة	عادة موجودة	تقوم الفجوات عادة بوظائف الجُسيمات الداخلية والحالّة
الفجوات	غير موجودة	غير موجودة أو صغيرة الحجم	موجودة وكبيرة الحجم

Molecular Biology Dr. Ismail Al-Mohamed

ويختلف تنظيم المادة الوراثية داخل المنطقة النووية عند حقيقيات النوى عنه في بدائيات النوى. ففي الخلايا الجرثومية، تحتل محتويات النواة منطقة خاصة من جسم الخلية تشكل ثلث الحجم الكلي للخلية يطلق عليها النوكلوئيد Nucleoid. وتبدو هذه المنطقة مؤلفة من مجموعة متراصة من الألياف الرفيعة التي يتراوح قطرها ما بين 2-3 نانومتر وتتألف هذه الألياف المتراصة من الحمض النووي DNA. ويمكن الحصول على النوكلوئيد حراً في الوسط بعد حل الجدار الخلوي والغشاء السيتوبلاسمي. أما في الخلايا حقيقية النوى، تكون جزيئات الـ DNA خطية الشكل (غير حلقية) على عكس الشكل الحلقي الذي يشاهد عند بدائيات النوى، ويرتبط الـ DNA في حقيقيات النوى مع بروتينات هيستونية Histones ويتشكل تراكيب يطلق عليها الجسيمات النووية أو Nucleosomes وهي الدعامة الفيزيائية للمعلومات الوراثية. ومقارنة بالخلايا حقيقية النوى لا يرافق DNA الخلايا بدائية النواة البروتينات الهستونية (DNA عارٍ).

تحوي الخلايا بدائية النواة على كميات قليلة من المادة الوراثية، حيث يتراوح الطول الكلي لـ DNA الجراثيم ما بين 0.25-3 مم، على سبيل المثال، حيث يبلغ طول DNA الجرثومة *Escherichia coli* التي تعتبر الكائن الحي المثالي لأبحاث البيولوجيا الجزيئية 1.1 مم. وتكفي هذه الكمية من الذخيرة الوراثية لترميز بضعة الأفٍ من البروتينات الجرثومية. على الرغم من أن الخلايا حقيقية النواة البسيطة مثل خلايا الخمائر، لا تمتلك ذخيرة وراثية أكبر حجماً من تلك التي تحتويها بعض الخلايا الجرثومية بدائية النواة، ولكن جميع الخلايا حقيقية النواة ومن بينها الخلايا حقيقية النواة البسيطة، تمتلك معلومات وراثية أكبر بمرات عديدة من المعلومات الوراثية المشفرة من قبل الخلايا بدائية النواة.

كما يمكننا ملاحظة فروق أساسية أخرى ما بين الخلايا بدائية وحقيقية النواة (الحيوانية أو النباتية)، فيما يخص الآليات التي تتبعها هذه الخلايا أثناء مرحلة الانقسام. حيث تنقسم الخلايا حقيقية النواة بآلية الانقسام الخيطي؛ ويلاحظ أثناء هذا النمط من الانقسام تضاعف ألياف الكروماتين وتكاثفها على شكل صبغيات. وفي المراحل الأخيرة من الانقسام الخيطي يتم انفصال الصبغيات المتضاعفة وتوزيعها بشكل متساوٍ ما بين الخليتين البنتين بوساطة الجهاز الانقسامي المؤلف من الأنيبيبات وألياف المغزل والمريكزين. بينما في الخلايا بدائية النواة، لا يلاحظ أثناء مرحلة التضاعف تكاثف للصبغي ولا ظهور ألياف المغزل. فبعد تضاعف الـ DNA، يحدث تضيق في وسط الخلية، ويستمر هذا التضيق إلى أن يحدث انقسام الخلية الأم إلى خليتين بنتين. وفي النهاية تأخذ كل واحدة منها نسخة من الذخيرة الوراثية. يسمح هذا النمط من الانقسام الخلوي البسيط للخلايا بدائية النواة بالانقسام السريع، مقارنة بانقسام الخلايا حقيقية النواة. ففي ظروف غذائية جيدة، يحدث تضاعف الخلية الجرثومية عند بعض الأجناس كل 20 إلى 40 دقيقة.

يختلف كذلك محتوى سيتوبلازما هذين النمطين من الخلايا عند فحصهما بوساطة المجهر الإلكتروني. حيث يوجد داخل سيتوبلازما الخلايا الحقيقة النواة العديد من البنى المتنوعة (شكل 1-3)، ويتبين عند مقارنة النمطين من الخلايا وجود مجموعة من العضيات في الخلايا حقيقيات النوى والتي تتألف من أغشية وبدورها تكون محاطة بأغشية أيضاً. على سبيل المثال تحوي الخلايا النباتية والحيوانية على جسيمات كوندرية، وهي عضيات قادرة على تخزين الطاقة على شكل روابط كيميائية، واللازمة لفعاليات الخلايا المختلفة. كما تحوي على شبكة سيتوبلازمية داخلية؛ والتي تعتبر المقر الرئيس لتصنيع الكثير من البروتينات و الليبيدات الخلوية. وتضم أيضا هذه الخلايا على جهاز جولجي المتخصص في ربط السكريات ببعض البروتينات و الليبيدات؛ التي تم تصنيعها في الشبكة السيتوبلامية الداخلية. كما يلعب جهاز جولجي دوراً في توزيع المواد التي أشرف على

Molecular Biology Dr. Ismail Al-Mohamed

تعديلها إلى بنى خلوية خاصة، وذلك عبر شبكة من الحويصلات متغايرة الحجم المحاطة بالأغشية التي يشرف على افرازها أيضاً.

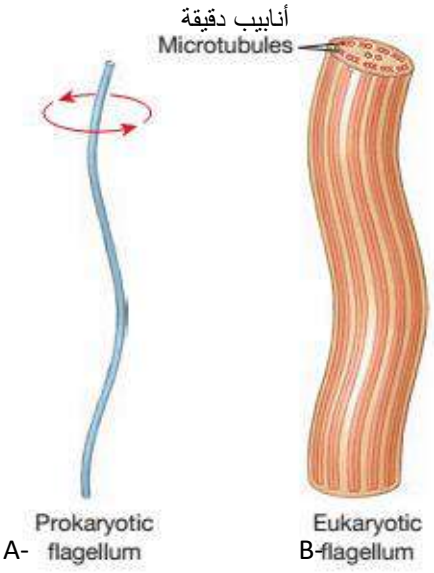
بشكل عام، تتجسد الوظيفة الأساسية لأغشية الخلايا حقيقية النواة في تجزئ سيتوبلازما هذه الخلايا إلى حجيرات منفصلةٍ، وكل حجيرة مسؤولة عن تأمين فعاليات خلوية محددة. وعلى عكس ما يُلاحظ في سيتوبلازما الخلايا حقيقية النواة، تفتقر سيتوبلازما معظم الخلايا بدائية النواة للبنى الخلوية المحاطة بالأغشية. بينما لوحظ عند الخلايا بدائية النواة وجود أغشية داخلية أطلق عليها الجسيمات الوسطية (Mesosomes)، وهي عبارة عن انثناءات داخلية تصدر من الغشاء السيتوبلازمي؛ وقد وجد انها مقر عمليات التنفس والتضاعف. كما لوحظ في سيتوبلازما الجراثيم Cyanobacteria (عرفت أولاً باسم الطحالب الزرقاء المخضرة) وجود صفائح أو شرائح على شكل أغشية معقدة أطلق عليها حاملات الأصبغة (Chromatophores) وتقوم هذه الأغشية بعملية التمثيل الضوئي (Photosynthesis).

تحوي كذلك الخلايا حقيقية النواة على العديد من البنى غير المحاطة بغشاء؛ مثل الأنبيبيات والليفات، التي تلعب دوراً هاماً في الحفاظ على قوام الخلية. كما تسهم هذه البنى الدقيقة في انتقال العضيات الخلوية داخل السيتوبلازما؛ كحويصلات الإفراز مثلاً، التي تتحرك نتيجة التقلصات التي تبديها هذه الأنابيب والألياف. كما أن لها دوراً أيضاً في تشكل المغزل خلال الانقسام الخلوي. بينما لم يلاحظ في الخلايا بدائية النواة حتى الآن بنى خلوية مشابهة للانيبيبات والليفات التي تم اكتشافها في الخلايا حقيقية النواة.

تتشابه الخلايا بدائية النواة وحقيقية النواة من حيث احتوائها على جسيمات ريبية، وهي عضيات خالية من الأغشية. على الرغم من أن ريبوزومات الخلايا البدائية أصغر حجما من ريبوزومات الخلايا حقيقية النواة؛ نظراً لاحتوائها على عددٍ أقل من العناصر البنيوية، لكنها تمتلك نفس الوظيفة، حيث تمثل المقر الأساس لتصنيع البروتينات. إن الآليات الجزيئية التي يتم من خلالها تجميع سلاسل الأحماض الأمينية على شكل سلاسل ببتيدية هي نفسها في النمطين المختلفين من الخلايا.

تحوي الخلايا حقيقية النواة على العديد من آليات الحركة المعقدة، على عكس آليات الحركة في الخلايا بدائية النواة التي تمتاز ببساطتها. مثلاً تتحرك الجراثيم عن طريق السوط، وهو ليف بروتيني رفيع (شكل 1-4) يتألف بشكل خاص من بروتين يطلق عليه الفلاجلين Flagellin. تحدث الحركات الدائرية للسوط ضغطاً على السائل الذي يحيط بالجراثيم مما يسمح بتحرك الخلية نحو الأمام.

تمتلك بعض وحيدات الخلية من حقيقيات النوى وكذلك النطاف على سياط، لكن السياط الموجودة على السطح الخارجي للخلايا حقيقية النواة أكثر تعقيداً من حيث التركيب من السياط الموجودة على سطح الخلايا بدائية النواة. كما تستخدم سياط الخلايا حقيقية النواة آليات مختلفة لتوليد الحركة (أصلان، 2014).



شكل 1-4. التباين في تركيب السياط ما بين خلايا بدائيات النوى (A) وحقيقيات النوى (B)

Molecular Biology Dr. Ismail Al-Mohamed

الفصل الثاني

التركيب الكيميائي والجزيئي للأحماض النووية

1- مقدمة

تعتمد حياة الخلية على آلاف التفاعلات الكيميائية المنسقة بعناية فائقة مع بعضها البعض، في المكان والزمان، تحت تأثير وسيطرة أوامر المادة الوراثية للخلية ومحيطها البيئي الذي تحيا فيه.

بدأ علم الوراثة الحديث بإعادة اكتشاف قوانين الراهب النمساوي Gregor **Mendel** الذي أعطى الدليل المقنع بأن الصفات يتم توريثها عبر الأجيال تقع سيطرة عوامل وراثية. لكن أبحاث مندل لم تشر بتاتاً إلى الطبيعة الكيميائية لهذه العوامل، وأماكن توضعها ضمن المتعضية.

اكتشفت الأحماض النووية منذ فترة طويلة ترجع إلى نهايات القرن الثامن عشر (1871)، وأعطي لها الاسم deoxyribonucleic acid (DNA) من قبل Richard Altmann عام 1889. إلا انها لم تجلب الانتباه إلى أهميتها الحيوية، بسبب قلة المعلومات المتوفرة آنذاك عن تركيبها الكيميائي، وكذلك بسبب تخلف الطرائق والأجهزة العلمية المستخدمة.

في عام 1924 نشر الكيميائي الألماني Robert Joachim Feulgen طريقة صباغة سميت باسمه أستطاع من خلالها تحديد موقع الحمض النووي DNA في نوى الخلايا. تعتمد طريقة صباغة Feulgen على ملون الفوكسين الأساسي، وهو ملون نوعي للصبغيات. ولقد أمكن تقدير كمية الـ DNA النسبية في خلايا مختلفة، عن طريق معايرة كمية ملون Feulgen التي امتصتها نوى هذه الخلايا بوساطة مقياس الطيف الضوئي.

استعمل ميرسكي وسويفت عام 1950 طريقة Feulgen لإظهار العلاقة ما بين كمية الـ DNA وعدد الصيغ الصبغية. وبعد معايرة كميات الـ DNA الموجودة في نوى الخلايا الجسمية والخلايا الجنسية (النطاف والبيوض) للثدييات، أثبت هذان العالمان أن كمية ال DNA في كل خلية تصل إلى الضعف قبل الانقسام الخلوي، ثم تنقص إلى النصف في نهاية الانقسام. وأن هذه الكمية ثابتة في كل الخلايا الجسمية للمتعضية، باستثناء خلايا الأعراس، التي تحوي فقط على نصف كمية الـ DNA ونصف عدد الصبغيات الذي تحويه الخلايا الجسمية.

وقد أثبتت التجارب التي أجريت لاحقاً، وجود كميات من الأحماض النووية في السيتوبلاسم، الميتوكوندريا ، البلازميدات والبلاستيدات إضافة لتلك الموجودة في النوى.

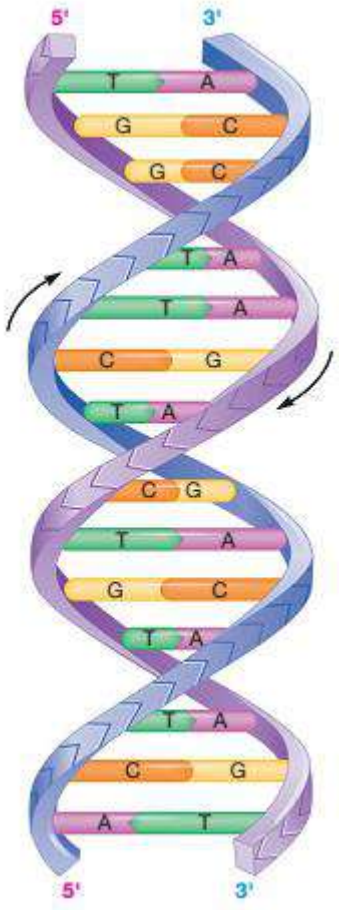
كما تأكدت الأهمية الكبيرة للأحماض النووية في الوراثة وبناء البروتينات بعد التجارب التي أجريت على العديد من الكائنات مثل تجارب Frederick Griffith عام (1928) على مكورات ذات الرئة. *Streptococcus pneumoniae* و Avery وزملاءه عام (1944) على ذات المكورات.

2- التركيب الكيميائي للحمض النووي DNA

كان التقدم الرئيس في تطور علم الوراثة والبيولوجيا الجزيئية هو اكتشاف ثلاثة من علماء الأحياء الدقيقة الامريكان (Oswald Avery, Colin MacLeod وMaclyn McCarty) في معهد Rockefeller عام 1944؛ أن سلسلة طويلة من الأحماض النووية يطلق عليها deoxyribonucleic acid (DNA) هي ذات المادة المكونة للمورثات (Genes). تسع

Molecular Biology Dr. Ismail Al-Mohamed

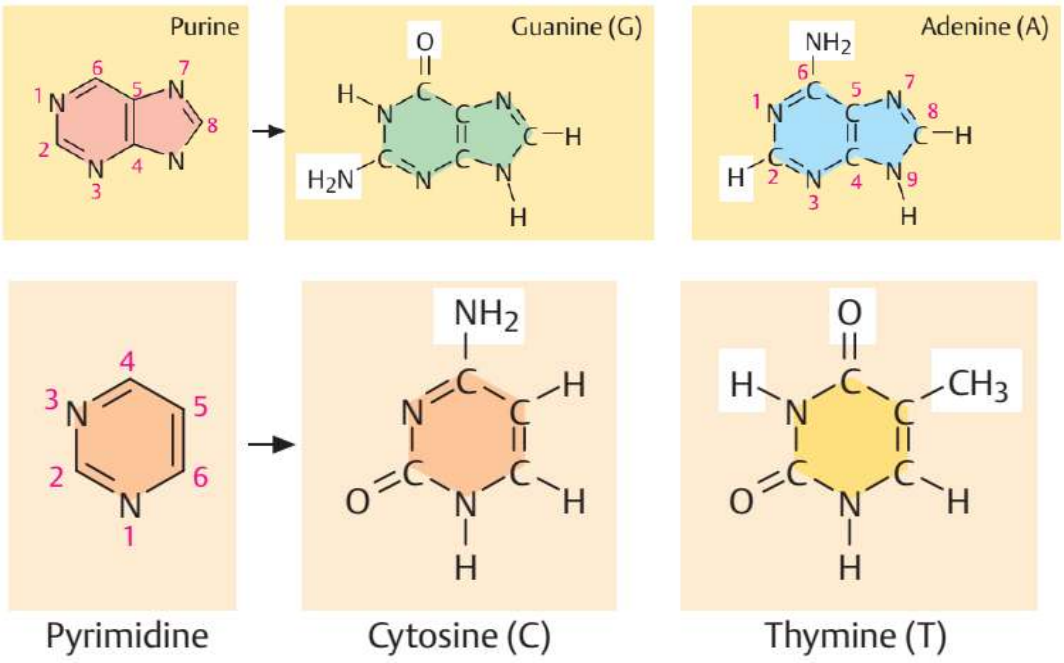
سنوات مضت بعدها قام العالمان James Watson و Francis Crick ومن خلال اعتمادهم على تجارب كل من العالمين Maurice Wilkins و Rosalind Franklin حول التركيب الجزيئي للDNA باستخدام اشعة اكس (X-ray) والتي تبين من خلالها التركيب الفيزيائي للـ DNA؛ بأن هناك تنظيما دقيقا لجزيء DNA على شكل حلزون مزدوج Double helix (شكل 2-1). بالإضافة إلى ذلك أقترح Crick آلية تضاعف الحمض النووي DNA وكيف يعمل كمادة وراثية. يشار إلى أن الحمض النووي DNA ومادة أخرى تدعى ribonucleic acid (RNA) تدعى بالحموض النووية **nucleic acids** كون هذه المكونات اكتشفت أولا في نوى الخلايا. وكما أن الأحماض الأمينية هي الوحدات الهيكلية (البنائية) للبروتينات، فما يسمى بالنيوكليوتيدات nucleotides تُعدُّ الوحدات الهيكلية للأحماض النووية.



الحمض النووي الريبوزي منقوص الأكسجين هو عبارة جزيئات مكونة من وحدات متكررة (Polymers) تدعى بالنيوكليوتيدات، تتألف هذه من سكر خماسي الكربون ومجموعة فوسفور وواحد من أربعة قواعد أزوتية (نيتروجينية). اثنان من هذه القواعد هما من البايرميدينات (Pyrimidines)؛ التي تحتوي على حلقة بنزين واحدة وهما الثيمين (Thymine) و السيتوزين (Cytosine). أما القاعدتان النيتروجينيتان الأخريان فهما من البيورينات (Purines)؛ التي تحتوي على حلقتي بنزين وهما الأدنين (Adenin) والغوانين (Guanine) (شكل 2-2). كما أن هناك أشكال محورة من هذه القواعد وبكمية قليلة في بعض الأحياء.

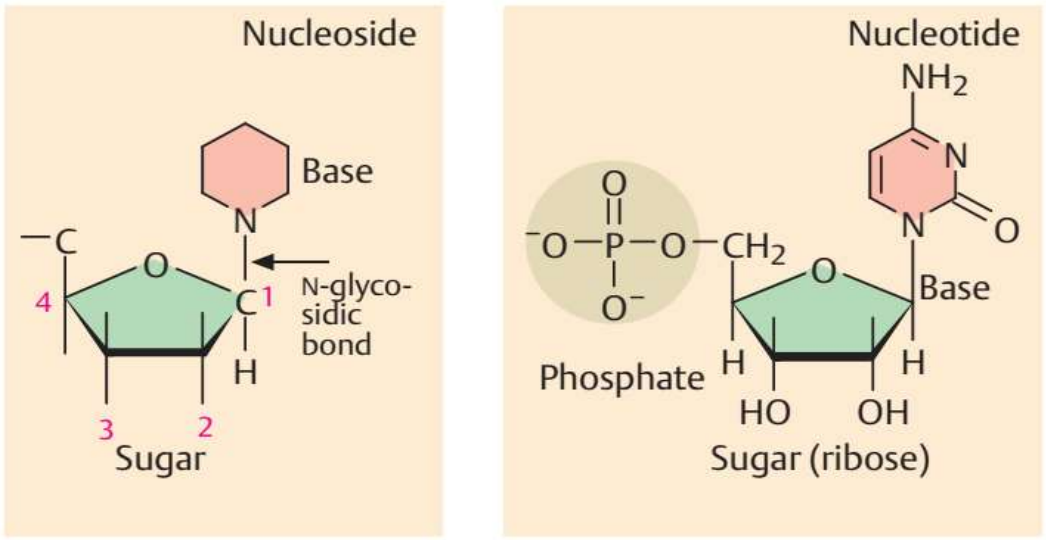
شكل 2-1. نموذج الحلزون المزدوج للحمض النووي DNA

Molecular Biology Dr. Ismail Mohamed



شكل 2-2. القواعد النيتروجينية في الحمض النووي DNA (عن Passarge, 2007)

عندما ترتبط القاعدة النيتروجينية مع السكر منقوص الأوكسجين Deoxyribose فإنها تكون مركباً يدعى نيوكليوزيد Nucleoside، وعندما يرتبط النيوكليوزيد مع مجموعة الفوسفور يتكون ما يدعى بالنيوكليوتيد Nucleotide (شكل 2-3). أثبت Levine أن الحمض النووي DNA عبارة عن Polymere (مركب عديد الجزيئات) لأربعة أشكال من النيوكليوتيدات Nucleotides الريبية منقوصة الأوكسجين (الأدنين، السيتوزين، الغوانين و الثيمين). ويوجد الـ DNA في الخلايا بدائية النواة وفي نوى الخلايا حقيقية النواة (خلايا نباتية و خلايا حيوانية). كما ظهر فيما بعد أن الـ DNA يمكن أن يتواجد في عضيات موجودة في سيتوبلاسما الخلايا حقيقية النواة، كالصانعات الخضراء Chloroplast والمتقدرات Mitochondria، لكن بكميات قليلة مما هو عليه في النوى. ويُعَدُّ الـ DNA الذخيرة الوراثية لجميع أنواع الخلايا، باستثناء بعض أنواع الفيروسات التي يقوم فيها الـ RNA بالدور نفسه.



شكل 2-3. النيوكليوتيد Nucleotide والنيوكليوزيد Nucleoside

Molecular Biology Dr. Ismail Mohamed

3- التركيب الجزيئي للحمض النووي DNA

3-1- البنية الأولية للـ DNA

يتمتع الـ DNA كما هو الحال في البروتينات، ببنية أولية وثانوية و ثالثية. و قد أثبت البيوكيميائي Levine أن الـ DNA عبارة عن بوليمير لأربعة أشكالٍ من النكليوتيدات الريبية منقوصة الأوكسجين (الأدنين والسيتوزين و الغوانين و الثيمين) التي تتحد بعضها مع بعض بوساطة روابط فوسفاتية ثنائية الأستر Phosphodiester bond. وتؤدي بلمرة النكليوتيدات إلى تشكل سلسلة من متعدد النكليوتيدات التي يطلق عليها البنية الأولية للـ DNA.

توصل Erwin Chargaff في عام 1950 إلى حقيقةٍ مهمةٍ جداً ساعدت على دحض نظرية "البنية رباعية النكليوتيد للـ DNA"، ومن خلالها استطاع العالمان Watson و Crick عام 1953 وضع تصورٍ لبنية جزيئة الـ DNA على شكل حلزون مزدوج أو مضاعف Double helix. إذ أيقن منذ البداية أن البنية الأولية للـ DNA (تسلسل النكليوتيدات) هي مصدر أهميته.

أثبتت نتائج العالم Chargaff التي أستخدم فيها الترحيل الورقي Paper Chromatography، وتحليل البوليمرات والتحليل المائي للأحماض النووية، بأن التركيز المولاري للقواعد ثلاث صفات هي:

1- أن تركيز قواعد Purines مساوٍ لقواعد Pyrimidine أي: T+C= G+A
2- أن تركيز قواعد Adenine و Thymine متساوي وكذلك Guanine و Cytosine

وجد Chargaff أن الكميات النسبية لكل قاعدة أزوتية موجودة في عينة من الـ DNA تختلف من نوع أحيائي إلى أخر. فيوجد على سبيل المثال في جميع خلايا البشر 30% من الادنين و 30% من الثيمين و 20% من السيتوزين و 20% من الغوانين بينما يوجد في جميع جراثيم الـ *E. coli* 24% من الثيمين و 26% من السيتوزين و26% من الغوانين. كما وجد Chargaff أن النسب بين الأسس الأربعة كانت متغيرة مع تغير المتعضيات.

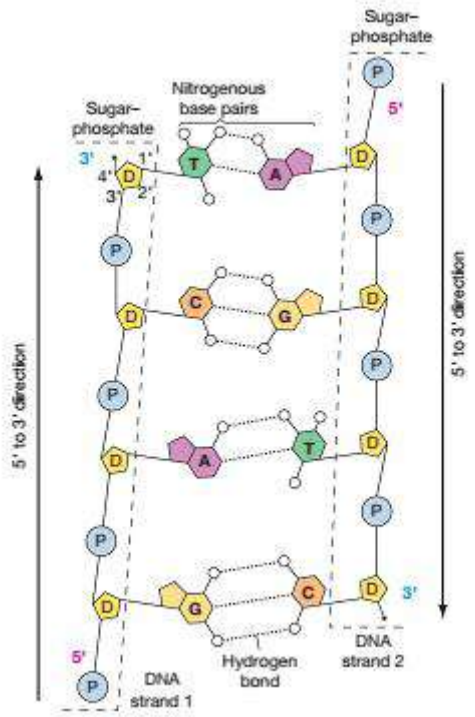
توالت الدراسات في مجال التعرف على بنية الـ DNA بعد أبحاث Chargaff، ووجد الباحثون أن الاختلاف في نموذج الـ DNA يتعلق بنوعية الكائن، وأن معظم الحيوانات يغلب عليها النموذج AT، أما عند الجراثيم فيلاحظ النموذج GC وأيضاً AT.

3-2- البنية الثانوية للـ DNA

تمكن العالمان Watson و Crick في عام 1953، استناداً على قواعد الباحث Chargaff، من تحديد تصور لنموذج البنية الثانوية لجزيئة الـ DNA. وفقاً لهذين الباحثين، تتمثل البنية الثانوية لجزيئة الـ DNA بسلسلتين من متعددات النكليوتيدات. حيث يتم أيضاً بلمرة نكليوتيدات السلسلة الثانية من جزيئة الـ DNA في الاتجاه 3' ← 5' . ولكي تتمكن هاتان السلسلتان من الارتباط، يجب أن تكونا متوازيتين ومتعاكستين في الاتجاه (شكل 2-4). كما دلت الدراسات الفيزيائية والكيميائية التي أجراها هذان الباحثان، أن سلسلتي جزيئة الـ DNA ترتبطان مع بعضهما البعض بروابط هيدروجينية Hydrogen Bonds ضعيفة، تتشكل ما بين الزمر الأمينية والزمر الكيتونية للأسس الآزوتية الداخلة في بنية الـ DNA.

Molecular Biology Dr. Ismail Al-Mohamed

حيث يرتبط دائما أساس آزوتي بيوريني من السلسلة الأولى مع أساس بيريميديني من السلسلة الثانية. وعلى هذا الأساس، فإن الأدنين (A) يقابله دائماً الثيمين (T) ويتم الارتباط بوساطة رابطتين هيدروجينيتين، كما يرتبط دائماً الغوانين (G) مع السيتوزين (C) بوساطة ثلاث روابط هيدروجينية . ويقال عندها أن الأسس الأزوتية A/T, C/G متكاملة أو متوافقة Complementary (شكل 2-4) في هذه الحالة، تكون إحدى السلسلتين متممة للأخرى بصورة آلية. فإذا عرفت البنية الأولية لإحدى سلاسل جزيئة الـ DNA (على سبيل المثال ATGC) يمكننا استنتاج البنية الأولية للسلسلة المتممة الثانية (أي TACG). وتعد هذه القاعدة الأساس في بنية الـ DNA ووظيفته.



شكل 2-4. البنية الثانوية للـ DNA، حيث يرتبط دائماً الأدنين مع الثيمين بوساطة رابطتين هيدروجينيتين كما يرتبط الغوانين مع السيتوزين بوساطة ثلاث روابط هيدروجينية.

3-3- البنية ثلاثية الأبعاد (نموذج الحلزون المزدوج Double helix)

وضع نموذج الحلزون المزدوج للحمض النووي الـ DNA في العام 1953، من قبل العالمان وطسن وكريك، حيث افترضا نموذج مجسم على شكل السلم قاموا ببنائه بأن الحمض النووي DNA مؤلف من شريطين يلتفان على بعضهما بطريقة حلزونية معينة بحيث ترتبط القواعد النيتروجينية للشريطين داخلياً (شكل 2-5). حيث تشكل جزيئات السكر و جزيئات حمض الفوسفور القائمتين الجانبيتين للسلم بينما تشكل الأسس الأزوتية درجات السلم وكل درجة من هذا السلم تتألف من ارتباط أساسين آزوتيين. استند نموذج الحلزون المزدوج الذي وضعه العالمان واطسن وكريك إلى العديد من المعلومات الكيميائية والفيزيائية التي نشرت حول الحمض النووي، حيث تم التعرف على التركيب الأولي لشريط متعدد النكليوتيدات المفرد والتي من خلاله ازداد الظن بوجود الحمض النووي كأشرطة متعددة النكليوتيدات متداخلة مع بعضها. إلا أن الشكل الذي ظهر من خلال صورة أشعة إكس (X-ray) الذي أخذ لبلورات من الحمض النووي من قبل العالمان فرانكلين وروزيلند جوسلنك (Franklin and Gosling, 1953) بين مايلي:

مكونات الحمض النووي موزعة بطريقة منظمة تنظيماً دقيقاً جداً.

إن كل جزيئة حمض نووي مؤلفة من شريطين أو أكثر بشكل حلزون.

إن الأشرطة تلتف في الحلزنة من اليمين.

كانت هذه النتائج بحق أول اللبنات الأساسية لصياغة نموذج الحلزون المزدوج. كما أن نتائج الدراسات البيوكيماوية حول التحليل المائي للحمض النووي، التي قام بها العالم شارجاف (Chargaff, 1950)؛ والتي أظهرت بأن هناك نسبة مئوية معينة من القواعد الأزوتية خاصة لكل

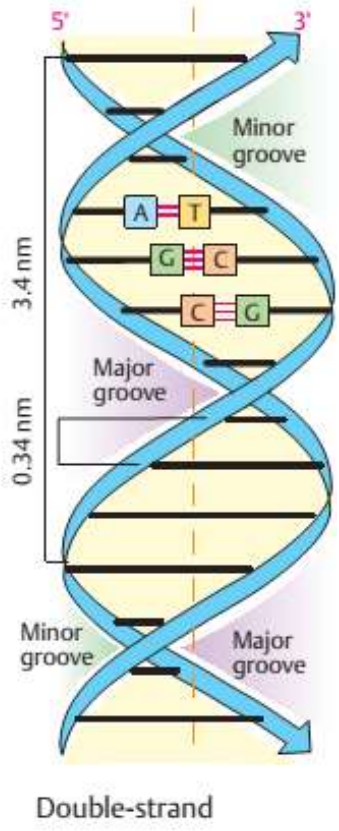
Molecular Biology Dr. Ismail Mohamed

نوع الحمض النووي، حيث تختلف هذه النسبة من حمض نووي لكائن إلى حمض نووي لكائن آخر. وجد شارجاف بأن الحمض النووي بشكل عام يحتوي على كمية من الأدنين مساوية لكمية الثيمين (A=T)، وكمية من الغوانين مساوية للسيتوزين (G=C)، ولكن كمية الأدنين و الثيمين معاً (A+T) و الغوانين والسيتوزين معاً (G+C) تختلف من مصدر حمض نووي إلى آخر. إن ذلك يوضح بأن نسبة الأدنين إلى الثيمين و الغوانين إلى السيتوزين متساوية، ولكن نسبة كلاً من الأدنين و الثيمين معاً (AT) تختلف عن نسبة الغوانين والسيتوزين معاً (GC). كان على واطسن وكريك الاستفادة من هذه المعلومات التفصيلية في بناء النموذج الجزيئي بطريقة منطقية علمية.

كان أبسط نموذج يمكن أن يبنى من سلاسل عديد النكليوتيدات هو أن ترتبط سلسلتان مع بعضهما بحيث تكون روابط الفوسفور ثنائي الاستر التي تربط النكليوتيدات نحو الخارج بينما ترتبط القواعد الأزوتية من الداخل. وهكذا تم ربط الأدنين و الثيمين و الغوانين مع السيتوزين ليظهر في النهاية نموذج الحلزون المزدوج الذي تلتف أشرطته نحو اليمين وهو ما يؤكد ما ظهر من تحليل بوساطة أشعة إكس X-rays للحمض النووي. تبين أن هذا السلم يلتف على نفسه التفافاً حلزونياً من اليمين الى اليسار.

حيث يبلغ قطر الحلزون المزدوج 20 انغستروماً وتضم الدورة (الخطوة) Pitch الواحدة من هذا الحلزون أو المسافة ما بين نقطتين متتاليتين تقعان في نفس الموقع على اللولب، عشرة أزواج من النيوكليوتيدات الريبية منقوصة الأوكسجين. ويبلغ ارتفاع الخطوة 3.46 نانومتراً، وبالتالي تقدر المسافة ما بين أزواج القواعد الآزوتية بـ 0.346 نانومتراً، كما يحوي الحلزون المزدوج على اخدودين، أحدهما كبير Major groove و الآخر صغير Minor groove (شكل 2-5).

ويعتبر نموذج الحلزون المزدوج الذي وضعه العالمان واطسون Watson وكريك Crick عام 1953، حجر الأساس لتفسير انتقال الصفات الوراثية من جيل إلى الجيل الذي يليه، وكيفية التعبير عن الصفات في عملية التنامي التي يبنى بها الكائن الحي الفرد انسجته المتمايزة. وبالنتيجة يُعد اللولب المزدوج للحمض النووي DNA هو تصور مذهل في إيجازه، لعلاقةٍ بين تفصيلات التركيب وبين الضرورة الوظيفية، حيث تستخدم المعلومات الوراثية المخزنة في جزيئة DNA كقالب لعملية التضاعف الذاتي، وانتقال نسخة من هذه المعلومات الوراثية بكل أمانة، من الآباء إلى الأبناء.



شكل 2-5. البنية ثلاثية الأبعاد للـ DNA (Double helix)، وفق تصور Watson & Crick (1953) يظهر اخدودين، أحدهما كبير Major groove و الآخر صغير Minor groove. (عن Passarge, 2007)

ومن جهة أخرى، تستخدم هذه المعلومات الوراثية لتأمين عملية اصطناع جميع جزيئات الـRNA الموجودة في سيتوبلازما الخلايا (RNA ناقل، RNA رايبوزومي و RNA

Molecular Biology Dr. Ismail Al-Mohamed

المرسال). يقوم الحمض النووي الريبي المرسال بنقل المعلومات الوراثية من الـ DNA إلى الريبوزومات، وتقوم هذه العضيات بدورها بعملية تصنيع البروتينات الضرورية لحياة الخلية والتي تعطي للمتعضية طابعها الظاهري Phenotype والوراثي Genotype الخاص بها.

4- بناء RNA- structure RNA

ان بناء الحمض النووي RNA يشابه بصورة عامة بناء الحمض النووي الـ DNA عدا بعض الفروقات (جدول)، حيث وعلى الرغم من كونه يتألف من سلسلة مفردة Single strand، إلا أنه تكثر فيه المواقع التي تحصل فيها بنية ثانوية، بحيث تلتف السلسلة المفردة على نفسها مشكلة بنية تسمى بملقط الشعر Hairpin، تتألف من منطقة الساق Stem التي تتقابل فيها الأسس المتممة، وتشكل روابط هيدروجينية مماثلة لتلك التي تشكلها في جزيء DNA، ومن منطقة العروة Loop التي تكمل التفاف ملقط الشعر ولا تكون فيها روابط هيدروجينية بين الأسس المتقابلة. وفي الواقع، يمكن لهذه البنى الثانوية لجزيء RNA أن تكون معدومة كما الحمض النووي المرسال mRNA، أو بسيطة كما في بنية الحمض النووي الناقل tRNA أو شديدة التعقيد كما في بنية الحمض النووي الريبوزومي rRNA (شكل 2-6 و7).

جدول 2-1. مقارنة بين الحمضين RNA و DNA

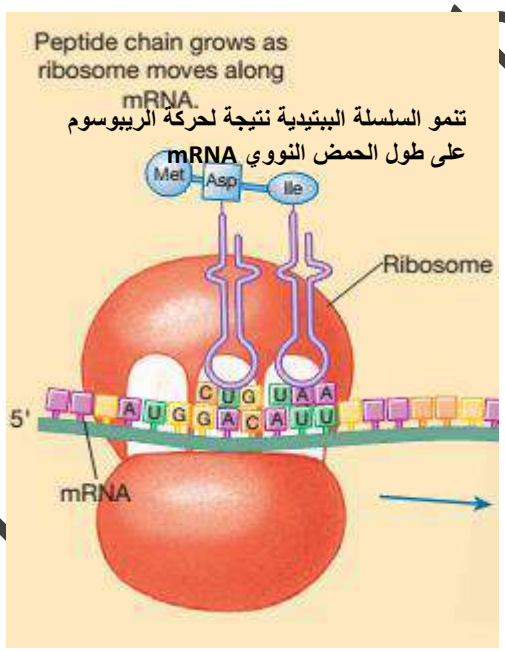
القوام (Backbone)	DNA	RNA
السلاسل Stand	سلسلة مزدوجة في الخلايا، ومعظم الفيروسات الـDNA لتشكل الحلزون المزدوج، سلسلة مفردة في فيروسات (parvoviruses)	سلسلة مفردة في الخلايا، ومعظم الفيروسات RNA، سلسلة مزدوجة في بعض الفيروسات (reoviruses)
التركيب Composition	السكر:السكر الخماسي الريبوزمنقوص الأوكسجين deoxyribose، القواعد الأزوتية هي: الأدنين، الغوانين،السيتوزين والثيمين	السكر: السكر الخماسي الريبوز ribose، وتدخل قاعدة Uracil عوضاً عن قاعدة Thymine
الوظيفة Function	يحدد كل الصفات الوراثية	اصطناع البروتين

Molecular Biology Dr. Ismail Al-Mohamed

يتواجد الـ RNA على ثلاثة انواع من الحمض النووي الريبي، ويتم نسخ الأنواع الثلاثة من مورثات خاصة لكل منها بوساطة أنزيمات خاصة تسمى أنزيمات بلمرة RNA وهي تقوم بعملية نسخ RNA من جزيء DNA، وتدعى Polymer (عديد الجزيئات) لأنها تقوم بإنتاج جزيئات ضخمة من جزيئات أصغر تعرف بـ Monomer (آحادي الجزيء) وهذه الانواع هي:

أ- الحمض النووي المرسال Messenger RNA (mRNA)

تكون الخلية الحمض النووي المرسال mRNA بوساطة الاستنساخ عن DNA النواة، ويتألف RNA المرسال من تتاليات ثلاثية للأسس النيوكليوتيدية، يشكل كل منها شيفرة Codon للأحماض الأمينية. ويتركب من جزيئات مختلفة الاحجام، ويكون مكملاً لجزيئة DNA المستنسخ عنها. ووظيفة mRNA هي حمل المعلومات الوراثية من جزيئة DNA في النواة الى الرايبوسومات في السيتوبلازما. ويوجد mRNA في كل من النواة وسيتوبلازما الخلية، على عكس DNA الذي يوجد حصراً في النواة، فيما عدا DNA الموجود في الميتوكوندريا. وهو الأقل وجوداً بين الأنواع الثلاثة للحمض النووي RNA، حيث أن وجوده مؤقت حتى يترجم المورث إلى بروتينات ثم يتحلل بعد ذلك.



شكل 2-6. الحمض النووي mRNA الموجود بين وحدتي الريبوزوم Ribosome (عن Black and Black, 2015)

ب- الحمض النووي الناقل Transfer RNA (tRNA)

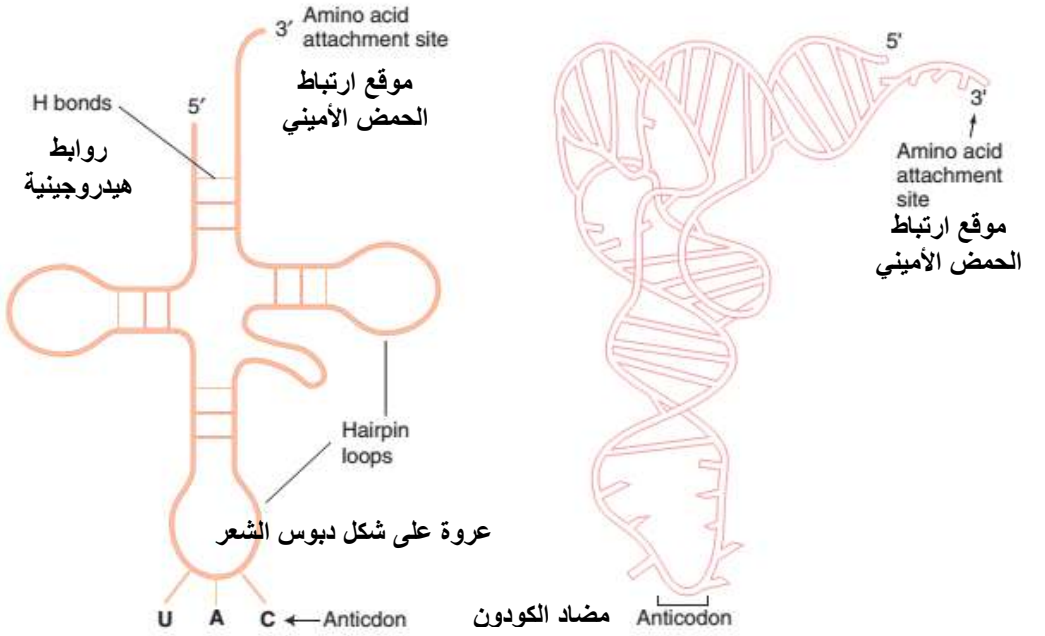
ينتج الحمض النووي (tRNA) ايضاً، بواسطة عملية الاستنساخ من الـ DNA ويتواجد في السايتوبلازم ومهمته هي نقل الاحماض الامينية المنشطة الى الرايبوسوم في عملية بناء البروتين. ويحتوي tRNA على الشفرة المعاكسة Anticodon، وتحوي ثلاثيات نيوكليوتيدية متممة لإحدى الشفرات الوراثية الموجودة في تسلسل mRNA. وهكذا، فإن tRNA النوعي يتعرف على الشفرة في mRNA عبر شفرته المعاكسة Anticodon، وينقل الحمض الأميني النوعي المناسب لتلك الشفرة إلى الريبوزومات حيث يتم إدراج ذلك الحمض الأميني أثناء ترجمة البروتينات. وتكون جزيئة هذا الحمض قصيرة تتكون من 75-85 نيوكليوتيدة وتشبه ورقة البرسيم وله خمس أذرع **(شكل 2-6).**

ج- الحمض النووي الريبوسومي Ribosomal RNA (rRNA)

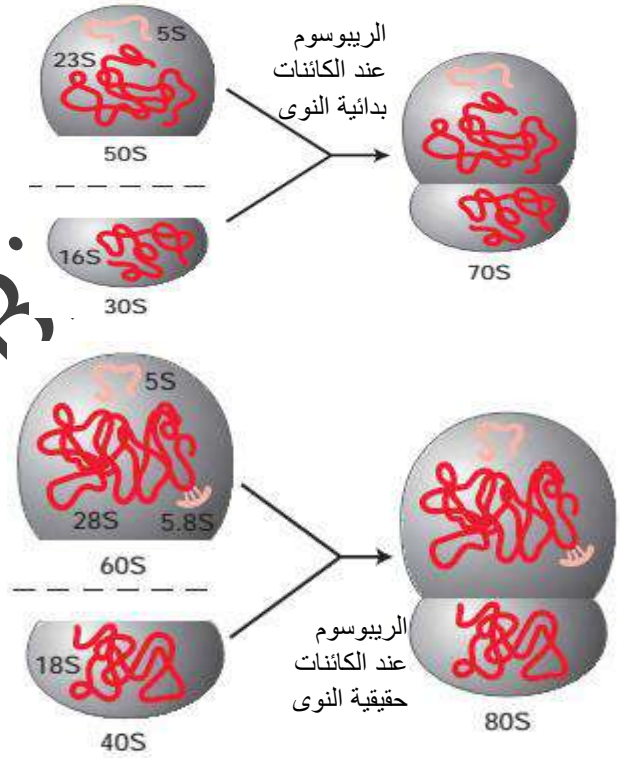
يدخل هذا النوع من RNA بشكل أساسي في تركيب الريبوزومات، إذ تصل نسبته إلى / 60% /من كتلة الريبوزومات الكلية، بينما تبلغ نسبة البروتينات /40%/. وتختلف ثابتة التثفيل Svedberg Centrifugation Constant لجزيئات rRNA باختلاف انماطها. وتتميز جزيئات rRNA بأنها غنية جداً باسس الغوانين والسيتوزين، وتشكل هيكلاً ترتبط به جزيئات البروتين التي تكون وحدتي الريبوزومات Ribosomal Subunits. ويتم اصطناع rRNA ضمن النوية

Molecular Biology Dr. I... named

Nucleolus داخل النواة. ثم تخرج إلى السيتوبلازما لتربط مع mRNA وتشرع بعملية ترجمة البروتينات الخلوية (**شكل 2-7**).



شكل 2-7. الحمض النووي الناقل (tRNA) (Talaro and Talaro, 2002)



شكل 2-8. الحمض النووي rRNA الموجود في الريبوسوم Ribosome عند خلايا بدائيات وحقيقيات النوى (Molecular cell Biology).

5- الخواص الفيزيائية والكيميائية للحموض النووية

على الرغم من أن الأحماض النووية لا تعد من الجزيئات الخازنة للطاقة، كما هي حال السكاكر والدسم والبروتينات، يمثل أحد النكليوتيدات وهو الأدينوزين ثلاثي الفوسفات adenosine triphosphate (ATP) الشكل الرئيس لخزن الطاقة الضرورية للعمليات الحيوية في كل أرجاء الخلية. تقوم الخلايا النباتية بامتصاص طاقة الشمس وخزنها في السكاكر بعملية التركيب الضوئي Photosynthesis لتنتقل السكاكر كالغذاء إلى الحيوانات. وفي كلتا الخلايا النباتية والحيوانية تتم أكسدة السكاكر في المتقدرات (Mitochondria) وتحرير الطاقة المختزنة في الروابط C-C تخزن هذه الطاقة وبشكل مؤقت في الرابطة عالية الطاقة وسهلة التفكك بين الفسفات الثالثة والثانية في جزيء الـ ATP المصطنع بدءاً من جزيء الأدينوزين ثنائي الفوسفات ADP والفسفات اللاعضوي، إذ تتفكك لاحقاً الرابطة بين الفسفات الثالثة والثانية بالحلمهة Hydrolysis معطية من جديد جزيء ADP وفسفات إضافةً إلى تحريرها للطاقة المختزنة في الرابطة التي تستخدم لتنشيط العمليات الحيوية ضمن الخلية.

وتتميز الحموض النووية DNA و RNA، بطريقة مشابهة للبروتينات في امتصاصها للضوء، فهي تمتص الضوء أيضاً ويرجع السبب إلى احتوائها على القواعد النيتروجينية حيث يتصف الحمض النووي DNA بامتصاصه للضوء في مجال الأشعة فوق البنفسجية ولا سيما عند طول موجة 260 نانومتراً بينما يمتص الـ RNA الضوء عند طول موجة 240 نانومتراً. وتختلف الحموض النووية DNA ذات السلاسل المفردة عن المزدوجة في قوة امتصاصها.

كما تتصف الحموض النووية DNA و RNA، بشكل مماثل للمركبات الحيوية الأخرى، بامتلاكها كثافة نوعية. وتعتمد هذه الكثافة على تركيز هذه الحموض وشكلها الفراغي (سلسلة مفردة، جزيئة مزدوجة السلسلة، جزيئة دائرية فاقدة اللف، جزيئة دائرية مرتخية) ونستطيع اعتماداً على الاختلافات في الكثافة، فصل الكثير من جزيئات الحموض النوية الموجودة بنفس المحلول بعضها عن بعض . فلو وضعنا تركيزاً محدداً من الحموض النووية في محلول يحتوي على تراكيز متدرجة من ملح كلوريد السيزيوم، ويتم نبذ هذا المحلول نبذاً مركزياً (تثفيل)، فإن جزيئات الـ DNA أو RNA سوف تتحرك باتجاه القوة الطاردة وتستقر في كثافة من كلوريد السيزيوم تعادل كثافتها. ويمكن بعد ذلك تحديد مواقع عصابات (حزم) الحموض النووية DNA و RNA من خلال استخدام خاصية هذه الحموض في امتصاصها للضوء عند طول موجة 240 نانومتراً أو 260 نانومتراً.

ويمكن استعمال الطريقة المذكورة لفصل DNA ملتهمات الجراثيم والبلازميدات عن DNA الجراثيم المضيفة. ويستخدم هذا النوع من التجارب بكثرة في أبحاث الهندسة الوراثية والتقانة الحيوية.

وبشكل مماثل للبروتينات، بطرأ على الحمض النووي DNA عملية تمسخ Denaturation، حيث تتحول من الشكل الحلزوني الفعّال إلى الشكل الممسوخ غير الفعال. وتؤثر عوامل كيميائية كثيرة (الحموض والأسس واليوريا والفورم ألدهيد والغوانيدين...) في تمسخ الحمض النووي DNA ومعظمها يقلل من صلابة الحلزون. وتؤثر عملية تمسخ الحمض النووي DNA بصورة عامةٍ في بنية وصفاته الفيزيائية والكيميائية، كالكثافة واللزوجة وطيف الامتصاص Absorption spectra، حيث تترافق عملية التمسخ بزيادة في الكثافة الضوئية وتقدر هذه الزيادة بـ 40%،

Molecular Biology Dr. Ismail Al-Mohamed

ويعزى ذلك إلى انفصال سلسلتي جزيئة الـ DNA بعضهما عن بعض مما يزيد في قيمة الكثافة الضوئية وتتناسب الكثافة الضوئية مع تركيز المادة وتدعى هذه الظاهرة بالتأثير اللوني المفرط.

وتؤثر كذلك درجات الحرارة العالية على الحمض النووي DNA. حيث تتحول جزيئات الـ DNA مضاعفة السلسلة إلى سلاسل مفردة من الـ DNA نتيجة كسر الروابط الهيدروجينية الضعيفة التي تربط بين الغوانين والسيتوزين من جهة والأدنين والثايمين من جهة ثانية. ويشار إلى هذه الظاهرة بانصهار الـ DNA أو دنترة الـ DNA وهي تترافق بزيادة في الكثافة الضوئية. أما الروابط الفوسفاتية ثنائية الإستر المكونة للعمود الفقري للـ DNA فتكون أقوى ولا يمكن شطرها إلا من خلال أنزيمات النوكلياز Nucleases Enzymes.

وتتغير درجات الحرارة اللازمة لانفصال سلاسل الحموض النووية المختلفة أو حرارة الانصهار Melting Temperature (T_m) مع اختلاف محتوى جزيئات الـ DNA من أزواج الأسس الأزوتية حيث يعتمد مبدأ الانفصال على القوى التي تربط الأسس الأزوتية، وبشكل خاص الروابط الهيدروجينية. وبما أن الروابط الهيدروجينية بين الغوانين والسيتوزين ثلاثية والروابط الهيدروجينية بين الأدنين والثيمين ثنائية، فإن الحموض النووية DNA الحاوية على محتوى كبير من الأزواج غوانين-سيتوزين سوف تحتاج إلى درجة حرارة أعلى من تلك الحاوية على محتوى عالٍ من الثيمين-الأدنين لكي تحول 50% من الجزيئات الحلزونية إلى سلاسل مفردة.

عند تبريد الـDNA المنصهر أو الساخن أو الممسوخ بشكل سريعٍ، فإن السلسلتين تبقيان منفصلتين. بينما يترافق الانخفاض التدريجي لدرجة الحرارة مع انخفاضٍ في الكثافة الضوئية، ويعني ذلك أن السلسلتين المتممتين عادتا للاتصال مرة أخرى نتيجة لتلاقي المتممات، ويشار إلى هذه الظاهرة بظاهرة إعادة ارتباط السلسلتين Renaturation.

Molecular Biology Dr. Ismail Al-Mohamed

الفصل الثالث

التركيب الجزيئي والكيميائي للصبغيات

1- مقدمة

تتكون الخلية -بصورة عامة- من قسمين رئيسين هما: النواة والسيتوبلازم. وتعتبر النواة مركز إدارة أعمال الخلية، فهي تسيطر على كل الفعاليات الحيوية، وتحتوي على النسخة الأصلية للمعلومات الحيوية المتوارثة عبر أجيال، والتي تحدد طبيعة الخلية ووظيفتها. وتضم النواة بين جنباتها خيوط دقيقة تعرف بالصبغيات (Chromosomes). هذه التراكيب الخيطية تظهر عند صبغها بلون غامق، منتشرة في النواة. والمصطلح مشتق من اللغة اليونانية القديمة، من مقطعين هما Chroma وتعني اللون و soma وتعني جسم. وقد تم ملاحظة الصبغيات في الخلايا المنقسمة في طور الانقسام العادي mitosis من قبل العالم فليمنغ Flemming عام 1879، ولوحظت في طور الانقسام الاختزالي meiosis من قبل ستراسبورغر Strasburger في العام 1888. واستخدم هذا الاسم -Chromosomes-لأول مرة من قبل الباحث والدبير Waldeyer عام 1888 للإشارة الى هذه التراكيب الخيطية الموجودة في النواة . لقد درست هذه التراكيب بصورة معمقة مقارنة ببقية العضيات الخلوية ففي العام 1903 اشار الباحث سوتون Sutton الى ان الموروثات (الجينات) Genes محمولة على هذه التراكيب. وقد اثبت الباحث مورغان Thomas H. Morgan خلال تجاربه على حشرة ذبابة الفاكهة (الدروسوفيلا) *Drosophila melanogaster* وجود المورثات مرتبة على الصبغيات وفق تسلسل منظم. ومما يميز هذه التراكيب عن غيرها قابليتها للتكاثر الذاتي والحفاظ على صفاتها الوظيفية والشكلية اثناء انقسام الخلية (شكل3-1).

شكل 3-1. صورة مجهرية للطور metaphase لصبغيات انسان (عن Passarge, 2007)

2- الصفات التركيبية لصبغيات خلايا بدائية النواة

تظل الفيروسات Viruses (حمض نووي وغلاف بروتيني) وما هو أدنى منها كالفيرويدات Viroids (حمض نووي عارٍ) متفردة في وضعها التصنيفي، كونها ليست خلوية Cellular بل

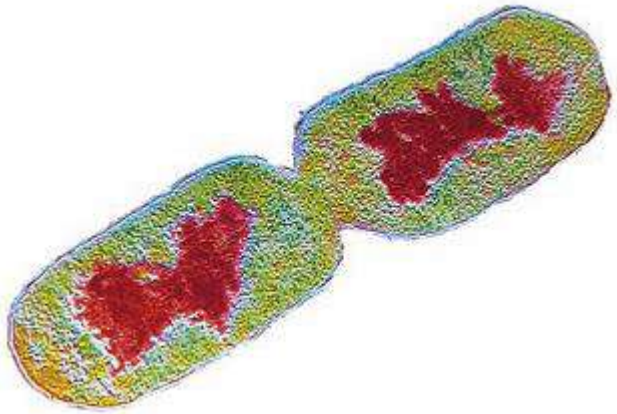
Dr. Ismail Al-Mohamed
Molec

هي جزيئات Particles متناهية الصغر، وبالتالي لا يمكن أن تلحق بالكائنات الحية الدقيقة تصنيفاً ولكن يمكن إجمالها مع الكائنات الدقيقة لصغر حجمها ولارتباطها العضوي مع الخلايا الحية.

وبخلاف الكائنات بدائية النوى وحقيقية النوى، والتي يُعدُّ فيها الحمض النووي DNA دائماً هو المادة الوراثية الأساسية ويؤدي الحمض النووي RNA دوراً مساعداً في عملية توريث الصفات، تُشفر الفيروسات Viruses مورثاتها بواحد فقط من الأحماض النووية إما DNA أو RNA ولا يمكن أن يجتمعا معاً في فيروس واحد. ويمكن أن يكون المجين Genome الفيروسي مفرد السلسلة أو مزدوج السلسلة، لذلك هنالك فيروسات يكون لديها الحمض النووي DNA مزدوج السلسلة كما هو المألوف، أو حمض نووي DNA مفرد السلسلة، أو حمض نووي RNA مزدوج السلسلة، أو حمض نووي RNA مفرد السلسلة. وحسب الفيروس، يمكن أن يكون الحمض النووي بشكل خطي أو حلقي. ويكون الحمض في بعض الفيروسات (مثل فيروس الانفلونزا influenza virus) في عدة قطع منفصلة.

وتختلف الفيروسات فيما بينها من حيث عدد المورثات الموجودة في حموضها النووية (DNA أو RNA). حيث يحوي بعضها على عدة جينات فقط في حين يصل عدد المورثات في بعضها الآخر للمئات. على سبيل المثال يحتوي آكل الجراثيم لامدا Lambda (lambda (λ) phage) الذي يهاجم البكتريا *E. coli* على صبغي مفرد واحد -كائن أحادي الصيغة الصبغية- الذي يتألف من جزيئة الحمض النووي DNA أي صبغي عارٍ من البروتينات، ويمكن الحصول على هذا الصبغي وتصويره بعد تمزيق الغلاف البروتيني الخارجي للآكل. دلت الدراسات الجزيئية أن قطر هذا الصبغي يبلغ 20 انغستروماً، وطوله 17 ميكروناً، ويبلغ وزنه الجزيئي أعلى بقليل من 30 مليون دالتون Dalton. ونظراً لوجود 10 أشفاع من النكليوتيدات في كل 34 انغستروماً من الـDNA؛ فإن صبغي الآكل لامدا يتألف من حوالي 50.000 زوجاً من النيوكليوتيدات، وهو يحوي على عدد من المورثات يتراوح ما بين 50 و65 مورثة.

مقارنة بالفيروسات، يتصف تركيب الذخيرة الوراثية للجراثيم بالتعقيد بعض الشيء، حيث أظهرت الصور المأخوذة بالمجهر الالكتروني لجرثومة *Escherichia coli*، أن الصبغي لديها يتم تكديسه (رصه) بشدة في منطقة صغيرة من جسم الخلية لا يتجاوز طولها الميكرون الواحد، والتي يطلق عليها شبيه النواة أو النوكلوئيد Nucleoid. وتمثل هذه منطقة من الخلية لا تحاط بغشاء، وهي تحوي على الـDNA وتقابل وظيفياً النواة في الخلايا حقيقيات النوى (الشكل 3-2).

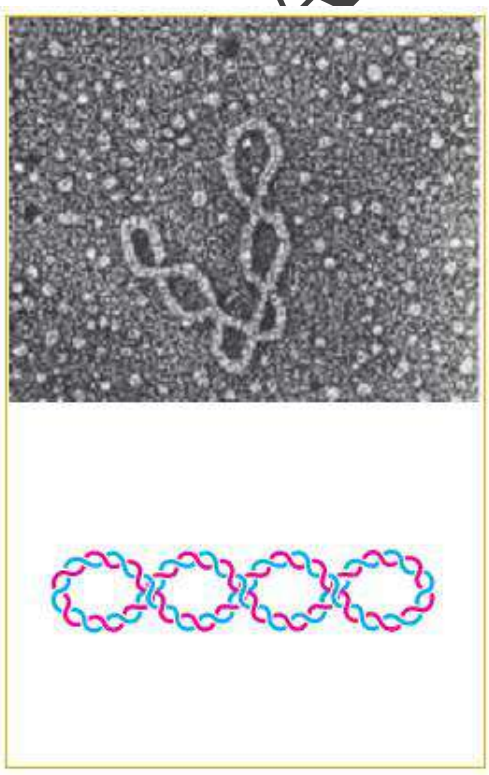


شكل 3-2. المنطقة النووية (Nucleoid) عند بكتريا *E. coli* بوساطة المجهر الإلكتروني النافذ TEM (عن Black and Black, 2015)

Molecular Biology Dr. Ismail Al-Mohamed

وتعتبر بكتريا القولون من أكثر الأحياء بدائية النواة التي تم دراستها في هذا المجال. يتألف الصبغي البكتيري (Nucleoid) أو الصبغي الملتف Folded Chromosome من حمض نووي DNA مكثف على هيئة حلقة، يبلغ محيطها حوالي 1100 ميكرون. تقع هذه الحلقة في منطقة خلوية تدعى المنطقة النووية Nuclear region. يترتب الحمض النووي في صبغي البكتريا على شكل طيات تمتد إلى الخارج، وتمتد من هذه الطيات طيات ثانوية أخرى. وهذا ما يمكن الحمض النووي البكتيري من أن يكون شديد الانطباق؛ بحيث يتمكن من اشغال حيز صغير جداً من قطر الخلية البالغ 1-2 ميكرون. ويدعى مثل هذا الحمض الشديد الانطباق بالحمض النووي DNA فائق الحلزنة Supercoiled DNA (شكل 3-3)

هناك نوعان من الحلزنة؛ الأولى هي: الحلزنة الفائقة، أو تدعى بالحلزنة الموجبة، والثانية قليلة الحلزنة وتدعى بالحلزنة السالبة. ويمكن ملاحظة حصول الحلزنة الموجبة والسالبة، عند كسر أحد خيوط المزدوج المحلزن، حيث أنه فيما إذا تحرر الخيط المكسور، وأخذ بالدوران بعكس اتجاه الحلزنة؛ فإنه سيكون ذو التفاف سالب وإذا حصل العكس فإنه سيكون ذو التفاف موجب. ويمكن لحلقة الحمض النووي الـ DNA المغلقة بأن تتجه لتصبح حلقة ذات حلزنة فائقة. ويلعب أنزيم الجايريز Gyrase دوراً مهماً في عملية الحلزنة الفائقة. فيما يكون لأنزيم تكسير الحمض النووي منقوص الأكسجين DNase دوراً معاكساً. يعتقد بأن لأنزيم تحطيم الحمض النووي DNase أهمية كبيرة في عملية تضاعف الحمض النووي، حيث أنه لابد من فك الحلزنة أولاً ويعمل الأنزيم الثاني الجايرين Gyrase على تحقيق الحلزنة مرة أخرى بعد اكتمال التضاعف.



شكل 3-3. الحمض النووي DNA فائق الحلزنة Supercoiled DNA (عن Molecular Cell Biology, 2015)

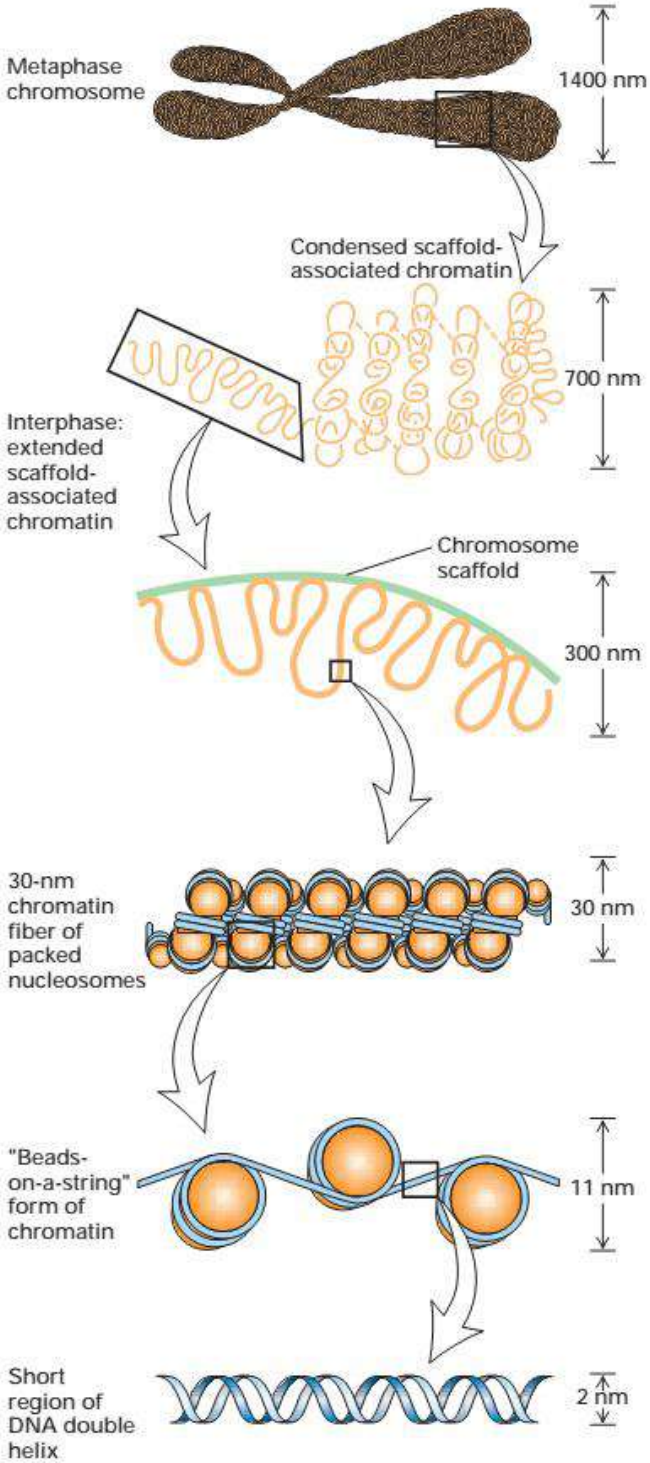
3- الصفات التركيبية لصبغيات خلايا حقيقة النواة

ان المحتوى الكلي من الاحماض النووية والبروتين في النواة يطلق عليه المادة الكروماتينية Chromatic material، وتعرف أيضاً بالكروماتين Chromatin، وسميت بهذا الاسم نظراً لشراهتها تجاه الصبغات القاعدية Basic dyes. تتخذ المادة الكروماتينية أشكالاً مختلفة داخل النواة تبعاً لحالة الخلية. فإن كانت الخلية في طور الاستعداد للانقسام أي الطور البيني Interphase تظهر المادة الكروماتينية على شكل شبكة تعرف باسم الشبكة الكروماتينية Chromatic reticulum، وسرعان ما تتقلص إلى أجسام عصوية سميكة نسبياً تعرف باسم الصبغيات

Molecular Biology Dr Al-Mohamed

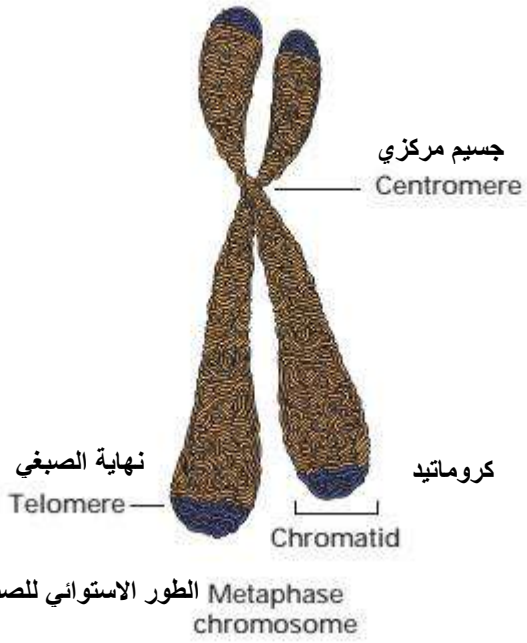
Chromosomes. وتظهر المادة الكروماتينية تحت المجهر الالكتروني على هيئة الياف رفيعة Fibers ذات قطر يتراوح بين 20-40 أنغستروم.

اثبت الباحثون أن الصبغيات غير مرئية حتى بعد تلوين الأنسجة أو الخلايا بالملون Feulgen أو صبغة Giemsa. لكن أثناء الانقسام العادي mitosis أو الانقسام المنصف (الاختزالي) Meiosis، تتعرض الصبغيات إلى عمليات تكثيف فتصبح مرئية بالمجهر الضوئي، وبالتالي يمكن التعرف على عددها وحجمها وشكلها. لذلك، تنفذ معظم الدراسات الوراثية الخلوية على الصبغيات الكثيفة والمرئية التي تظهر في الطور الثاني Metaphase من الانقسام العادي، بالنسبة للخلايا الجسمية أو الطور الثاني من الانقسام المنصف بالنسبة للخلايا الجنسية. حيث تكون هذه الصبغيات متضاعفة ويتألف كل صبغي من كروماتيدين أخوين منفصلين بعضهما عن بعض على كامل طول الصبغي، لكن يظلان ملتحمين مع بعضهما البعض في نقطة مشتركة وهي الجسيم المركزي Centromere (شكل3-5,4). يمثل عدد وطول صبغيات الطور الثاني من المراحل الانقسامية ما يسمى الطابع النووي. ويكون الطابع النووي لجميع خلايا المتعضية الواحدة نفسه، بينما يكون الطابع النووي لأنواع متقاربة أو متشابهة مختلف جداً، وهذا يدل على أن الذخائر الوراثية المتشابهة يمكن أن تتركب بطريقةٍ مختلفةٍ.



شكل 3-4. تمثيل لمستويات تنظيم الحمض النووي DNA في خلايا حقيقيات النواة، بدءاً من الحلزون المزدوج إلى صيغي الطور الانفصالي (عن Molecular cell Biology, 2015)

Molecular Biology Ismail Al-Mohamed



شكل3-5. شكل تخطيطي للصبغي في طور الانقسام الاستوائي (عن Molecular cell Biology, 2015)

كما أثبتت الأبحاث العلمية على الخلايا حقيقية النواة وجود جزيئة صغيرة من الحمض النووي DNA في عضيات أخرى غير النواة (Extrachromosomal DNA) كالجسيمات الكوندرية Mitochondria والصانعات (البلاستيدات) الخضراء Plastids. يشبه DNA الميتوكوندريا الـDNA الموجود في صبغي الخلية الجرثومية (*E. coli*)، حيث يكون حلقي الشكل وخالٍ من البروتينات. ويبلغ طوله عند الانسان 16.6 كيلو زوجاً من الأسس الأزوتية. يحمل الـ DNA الميتوكوندري الشيفرة الوراثية المسؤولة عن تصنيع بعض الأنزيمات الضرورية للفعاليات الحيوية لهذه العُضيَّات.

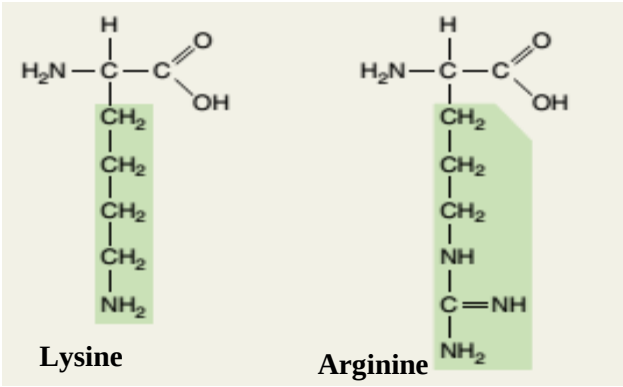
3-1 -البروتينات الصبغية

أوضحَ التحليل الكيميائي للصبغيات، أنها تتكون من كروماتين؛ يتألف أساساً من الحمض النووي DNA، بالإضافة لنوعين من البروتينات هما: البروتينات الهستونية Histones والبروتينات غير الهستونية Non-histones.

3-1-1- البروتينات الهستونية Histones

تُعَدُّ الهستونات البروتينات القاعدية Basic proteins الأكثر وفرة في الحمض النووي DNA لحقيقيات النوى، وهي ذات شحنة موجبة في الوسط المتعادل (pH=7). والمجاميع الخمس الرئيسة من هذه البروتينات يطلق عليها اصطلاحا: H_1, H_2A, H_2B, H_3, H_4، تُحمل الشحنة الموجبة بواسطة شوارد NH_3^+ للحمضين الأمينيين Lysine و Arginine اللذان يشكلان نسبة (20-30)% من المجموع الكلي للأحماض الامينية في كل جزيئة هستون (شكل3-6). ويميل الحمضي الاميني الى التجميع باتجاه احدى نهايتي جزيئة الهستون، وبالتالي تكون احدى نهايتي البروتين عالية الشحنة الموجبة.

Molecular Biology Dr. Ismail Mohamed



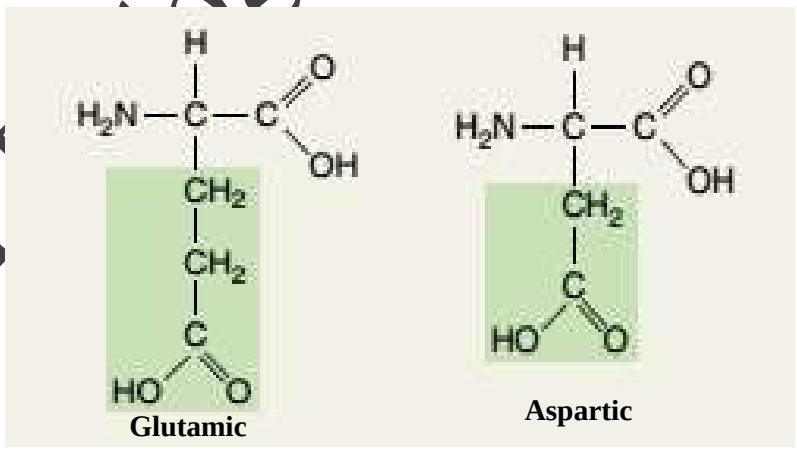
شكل 3-6. التركيب الكيميائي للحمضين الأمينيين Arginine و Lysine الداخلة في تركيب البروتينات الهستونية، والتي يرجع إليها الطبيعة القاعدية.

ان جزيئة DNA تحمل شحنات سالبة بكثافة بواسطة مجاميع الفوسفات PO^{-}_{4} السالبة الشحنة والتي تمثل العمود الفقري للـ DNA مع جزيء السكر الخماسي، ويعتقد ان هذه الشحنات السالبة تتفاعل مع النهايات الموجبة الشحنة للهستونات لتكوّن مركب متماسك يطلق عليه عادة الهستون النووي Nucleo-histone.

3-1-2-بروتينات غير هستونية Non-histones

بروتينات حمضية، تحتوي على نسبة عالية من الأحماض الأمينية الحمضية، مثل حمض الأسبارتيك والجلوتاميك (شكل 3-7)، ويطلق عليها البروتينات غير الهيستونية Non histone proteins لأنها تبقى في النواة بعد استخلاص كامل البروتينات الهيستونية ويصعب تحديد كميتها لأنها تعتمد بشكلٍ واضحٍ على الحالة الوظيفية للنواة.

تتضمن البروتينات غير الهيستونية المرافقة لـDNA الصبغيات عدة أنواعٍ من البروتينات التركيبية وأهمها أنزيم Topoisomerase II والوظيفية مثل أنزيمات RNA-polymerase, NAD-synthetase, DNA-polymerase و Nucleotide triphosphatase



شكل 3-7. التركيب الكيميائي للحمضين الأمينيين Aspartic و Glutamic الداخلة في تركيب البروتينات اللاهستونية، والتي يرجع إليها الطبيعة الحمضية.

تعتبر البروتينات غير الهيستونية أكثر تغييراً من حيث الكمية والنوعية مقارنة بالبروتينات الهيستونية. ويبدو أن ازدياد وزن الصبغيات خلال الانتقال من الطور البيني للدورة الخلوية إلى

Molecular Biology Dr Ismail Al-Mohamed

الطور الانقسامي مرتبط مباشرة بكمية البروتينات غير الهيستونية. كما تبين وجود اختلافات واسعة في نوعية البروتينات غير الهيستونية من نمط خلوي إلى أخر، مما يعكس التغيرات في النشاط الأنزيمي المعتمد على الـ DNA. على سبيل المثال، أثبت الباحثون ارتباط العديد من جزيئات أنزيم DNA polymerase على الـDNA في الخلايا التي تتميز بتضاعفٍ سريع لصبغاتها في حين يبقى هذا الأنزيم منحلاً في الحالات الأخرى. كما اثبت العلماء أن غياب نشاط أنزيمي الـ DNA poymerase و RNA polymerase في نوى النطاف يترافق مع انخفاض الكتلة المتوسطة الجافة للكروماتيد لتصل إلى حدها الأدنى.

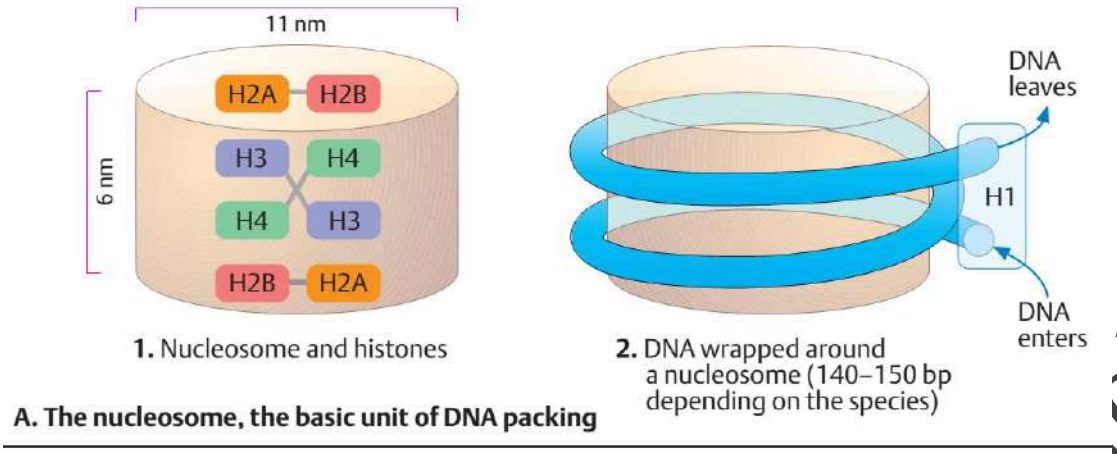
3-2- الجسيمات النووية Nucleosomes

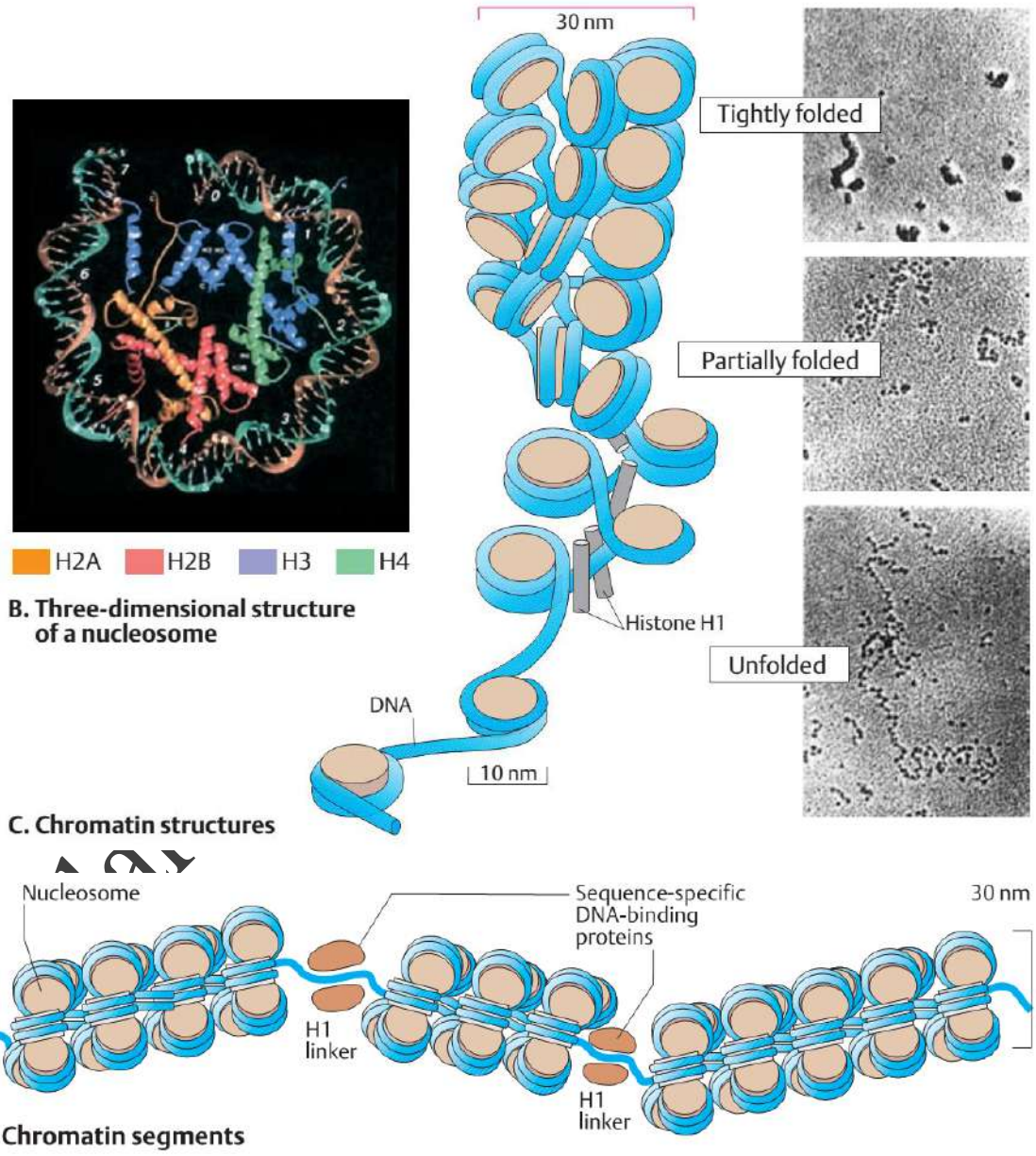
يظهر عند تحرير الكروماتين من النواة وفحصه باستخدام المجهر الالكتروني، تراكيب تشبه الخرز Beads، يطلق على كل خرزة منها بالجسيم النووي (Nucleosome)، والتي وصفت من قبل الباحث R.D. Kornberg عام 1974. وكل من هذه التراكيب قد يصل ارتفاعها إلى 6 نانومتر وعرضها بحدود 11 نانومترا تبعاً لنوع المتعضية. وقد أمكن عزل جسيم نووي مفرد بمعاملة الكروماتين بأنزيم يسمى Staphylococcal nuclease، وبالتالي أمكن دراسة مظهره ومكوناته، بشكل تفصيلي. حيث يبدو الجسيم النووي مؤلف من ثمان جزيئات octamer من البروتينات الهيستونية؛ جزيئتين من H_2A وجزيئتين من H_2B وجزيئتين من H_3 وجزيئتين من H4. ويحيط شريط من DNA اللب المركزي Core مكوناً لفتين متجاورتين مؤلفة من (150 bp) زوجاً من النيوكليوتيدات الخاصة بالـ DNA. اما الهيستون الخامس H1 فيكون بين الجسيمات النووية، حيث يصل بين جزيئات الـ DNA المكونة لجسمين نوويين، ويفصل كل جسيم نووي عن الآخر بحدود 50-70 زوجاً من قواعد الحمض النووي DNA الرابط بينهما (H1 linker) (شكل 3-8).

ان الجسيمات النووية أصغر من ان تكون جينات بحد ذاتها، حيث يعتقد ان الجين بصورة عامة يتألف من حوالي 1000 زوجاً من النيوكليوتيدات. ويظهر بان الجسيم النووي يحتوي على تسلسلات نيوكليوتيدية خاصة قد تلعب دوراً مهماً في فعاليات تضاعف DNA وعملية تكوين الاتحادات الجديدة (Recombination) والطفرات، أوالاستنساخ. وقد تبين أنه للهستونات دوراً تنظيمياً حيث تقوم بالتحوير التساهمي فعمليات الأستلة Acetylation والفسفرة Phosphorylation والتي تعمل على تسريع او ابطاء معدل الاستنساخ وتؤثر ايضاً على تكثف الصبغيات خلال التضاعف وخلال اصلاح الـDNA Repair DNA تشترك في عملية ADP-Ribosylation.

تظهر الجسيمات النووية شريط الـ DNA كالمسبحة المؤلفة من الخرزات ويكون على شكل لييف قطره 11 نانومتر وهذا الليف يلتف مرة اخرى حول محور مجوف على شكل حلزون مكون من 6-7 نيكليوسومات لكل لفة ليكون ليف قطره 30 نانومتر. وينتظم الأخير في عروات او قباب بواسطة منصات بروتينية في صبغي الطور البيني تحتوي كل منها 30000-100.000 نيوكليوتيدة وهذه قد تشكل تراكيب وراثية مستقلة سمكها 30 نانومتر وعندما تقترب الخلية من الدخول في الانقسام العادي Mitosis فان الكروماتين يتكثف بشكل اكثر بطول 100 ضعف حتى يبدو بهيئة صبغي انقسامي مميز بسمك 1400 نانومتر(شكل3-8).

Molecular Biology/ Dr. Ismail Al-Mohamed

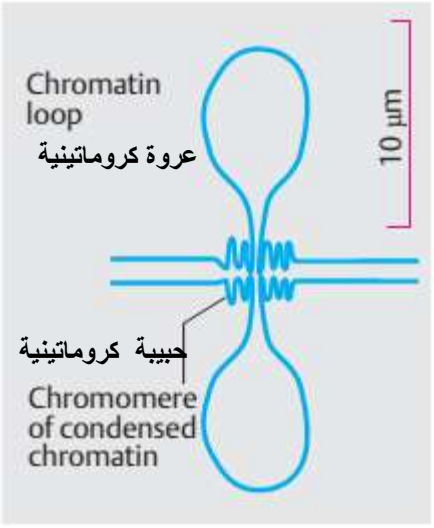




شكل 3-8. تنظيم الجسيم النووي (A): التركيب الدقيق للجسم النووي Nucleosome، (B): التركيب ثلاثي الأبعاد (C): التركيب الكروماتيني

3-3- الحبيبات الصبغية Chromomere

تمثل الحبيبات الصبغية **Chromomere** تراكيب منفصلة وواضحة في الصبغيات، وخاصة عندما تبدأ عملية تكثيف الصبغيات خلال الطور التمهيدي prophase من الانقسام العادي او الاختزالي. وتتوضح من خلال استعمال المجاهر الضوئية تراكيب تشبه الخرز على طول الصبغيات. كل من هذه الخرز أكبر بكثير من الجسيم نووي. (الشكل 3-9). تحت شروط معينة تضم هذه التراكيب بحدود 8-48 جسيم نووي. ويرى عدد من المتخصصين بالوراثة الخلوية بان الكروموميرات قد تطابق المورثات او مجاميع المورثات. هذه الفكرة التي طرحت لأول مرة من قبل ماكلينتوك Macklintoch عام 1931. أن هذه النظرية تم بناؤها من خلال دراسة صبغيات الغدد اللعابية في حشرة ذبابة الفاكهة *Drosophila melanogaster* ففي هذه الصبغيات تكون كل حزمة كما لو انها جين واحد، او عدد قليل من المورثات.



شكل 3-9. الحبيبات الصبغية لكروماتين مكثف

كما يعتقد ايضاً بان للكروموميرات علاقة بمناطق التحزم (Banding pattern) للصبغيات. وهي جسيمات ثابتة في العدد والحجم والموقع، حسب النوع. وان افضل دور يمكن ملاحظتها ودراستها بسهولة هو الطور القلائدي Leptotene او الطور التزاوجي Zygotene من الدور التمهيدي الاول Prophase 1 من الانقسام الاختزالي حيث تظهر كأجسام صغيرة في بداية تكثف المادة الكروماتينية وقد وصفت لأول مرة من قبل الباحث Belling عام 1931.

4-3- النمط النووي Karyotype لصبغيات حقيقيات النوى

اعتمدت دراسة تنظيم الحمض النووي في الصبغيات أساساً على طرائق التلوين. ويتوفر أنواع مختلفة من ملونات الصبغيات منها Giemsa banding أو (G-banding). أن فحص الصبغيات الملونة بتلك الطرق تحت المجهر الضوئي يوضح بأن هناك مناطق مختلفة الاصطباغ حيث تظهر مناطق شديدة الاصطباغ ومناطق باهتة الاصطباغ معطية الصبغي هيئة ذات حزم Banding. تدعى المناطق الفاقعة الاصطباغ بالكروماتين المتباين (الغيري) Heterochromatin ويأتي اصطباغها الشديد من الحلزنة الفائقة والشديدة في هذه المناطق بينما تدعى المناطق الباهتة اللون بالكروماتين الحقيقي Euchromatin حيث تكون الحلزنة فيها أقل شدة.

يُعَدُّ الكروماتين الحقيقي بأنه ذو نشاط استنساخي، حيث تكون جيناته فعالة، ويمتاز بأنه غير متكثف، ويشكل الغالبية من الكروماتين الملاحظ في نوى الطور البيني. ويكون منتشراً في النواة ولا يمكن ملاحظته بالمجهر الضوئي. ولكن الكروماتين المتباين يشتمل على مناطق صبغية تبقى متكثفة خلال الطور البيني، يعتبر الـ DNA في الكروماتين المتباين منطقة قليلة المورثات غير نشط أي خامل وراثياً، إذ يحوي بشكل رئيس على التسلسلات الخاصة بالجسيمات المركزية Centromeres، والقطع الطرفية Telomeres. يكون الكروماتين المتباين غير متاح لإنزيمات الانتساخ بسبب بنيته المرزومة بشدة، وعليه فالمورثات الموجودة ضمنه لا تنتسخ، ويكون موقعه

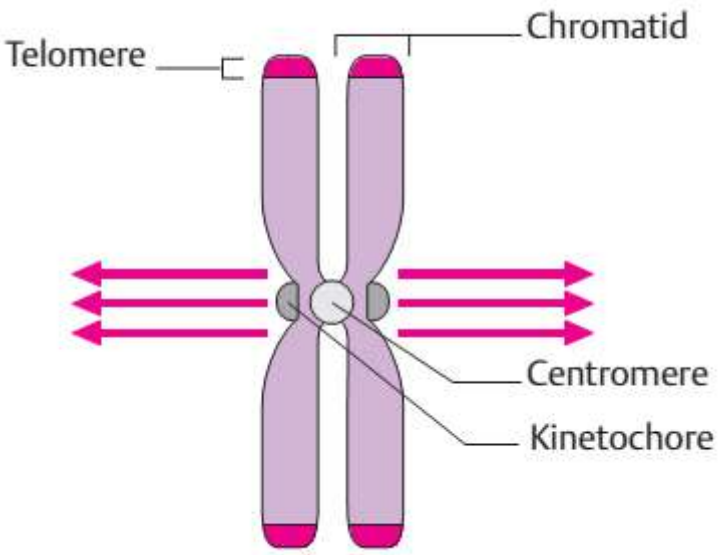
Molecular Biology Dr. Isma'il Unnamed

اما مترافقاً مع الغلاف النووي ويسمى بالكروماتين المحيطي Peripheral Chromatin او حول النوية ويسمى الكروماتين المرافق للنوية Nucleolus associated chromatin او منتشراً بشكل حبيبات كروماتينية في حشوة النواة ويسمى جزر الكروماتين Chromatin Islands او يكون عند القطع الطرفية (نهايتي الصبغي) Telomeres.

يوجد نوع أخر من الكروماتين المتباين في نوى خلايا إناث الثدييات Mammals، وهو واحد من الصبغيين الجنسيين X X ويطلق عليه جسيم بار Barr body. وهو صبغي محور كيميائياً ومتكثف لكتلة صغيرة جداً، وهو غير نشط ولا يستنسخ. وتضم مناطق الكروماتين المتباين على تسلسلات غير معبرة من الـDNA (مناطق غير جينية)، مثل الـDNA المتكرر (DNA Satellite أو Repetitive DNA).

الشكل المظهري لصبغيات حقيقيات النوى في طور الانقسام الاستوائي

تظهر الصبغيات على شكل خيوط ملتوية داخل النواة، وان طول الصبغي وحجمه يتغيران اثناء مراحل دورة الخلية. وان اطوار انقسام الخلية هي افضل المراحل لدراسة شكل الصبغي وخصوصاً الطور الاستوائي والطور الانفصالي حيث تظهر على شكل اجسام اسطوانية ذات كثافة عالية وتصطبغ بشدة بالصبغات القاعدية. يحوي كل صبغي منطقة (تخصر) تعرف بالجسيم المركزي Centromere الذي يرتبط إليه بروتين الجُسيم الحركي Kinetochore والتي تقسم الصبغي الى ذراعين (شكل 3-4)، ذراع قصير يطلق عليه ذراع p مشتق من الكلمة الفرنسية (*petit*) أو ذراع طويل يرمز له بالحرف q وهو الحرف التالي للحرف p.



يمكن تصنيف الصبغيات على اساس موقع الجسيم المركزي الى ثلاثة اصناف:

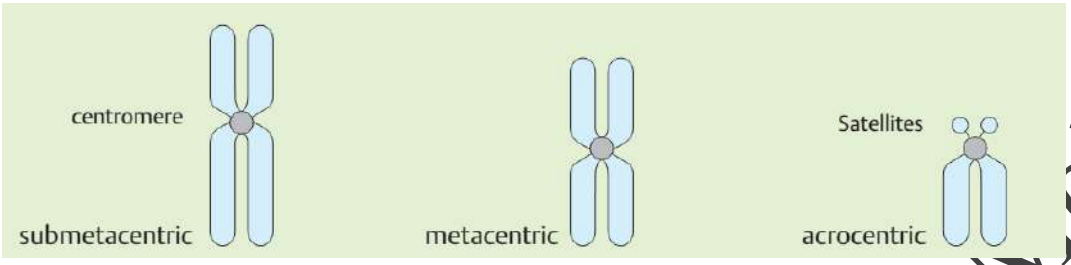
1- صبغي وسطي التمركز Metacentric
يكون موقع الجسيم المركزي Centromere في وسط الصبغي تماماً، وفيها يقسم الصبغي الى ذراعين متساويين في الطول ويظهر على شكل حرف V اثناء الطور الانفصالي .

2- صبغي تحت وسطي التمركز Submetacentric
وفيه يكون موقع الجسيم المركزي قريباً عن الوسط ويقسم الصبغي الى ذ ا رعين غير متساويين في الطول ويظهر اثناء الطور الانفصالي على شكل حرف (L) أو J باللغة الإنكليزية.

Molecular By Ismail Al-Mohamed

3- صبغي تحت نهائي التمركز (طرفي) Subtelocentric

يقع الجسيم المركزي قرب احدى نهايتي الصبغي حيث ينقسم الصبغي الى ذراع طويل وذراع قصير ويطلق عليه أيضاً acrocentric، وقد يقع الجسيم المركزي عند احدى نهايتي الصبغي ويبدو فيها الصبغي مؤلفاً من ذراع واحد عندها يطلق عليه Telocentric.



شكل 3-10. الشكل المظهري للصبغيات في طور الانقسام الاستوائي

Molecular Biology Dr. Ismail Al-Mohamed

الفصل الرابع

تضاعف الحمض النووي DNA وإصلاح ضرره

DNA Replication, Damage, and Repair

1- مقدمة

تتطلب الآليات الفعلية لانقسام الخلية Cell division، تعليمات أكبر بكثير مما هو مطلوب لتصميم صاروخ فضائي أو كمبيوتر فائق السرعة. بداية تحتاج الخلية لمضاعفة كل جزيئاتها؛ كالأحماض النووية RNA، DNA، والبروتينات والدهون وغير ذلك. على مستوى العضيات، هناك حاجة لمضاعفة عدة مئات من الميتوكوندريا، ومساحات كبيرة من الشبكة الإندوبلازمية، وأجسام جولجي جديدة وتراكيب الهيكل الخلوي وملايين الريبوسومات؛ بحيث تكون لدى الخلايا الوليدة المصادر الكافية كي تنمو ثم تنقسم. تمثل كل تلك العمليات دورة حياة الخلية.

تشير عملية تضاعف الحمض النووي DNA replication، إلى العملية التي يتم فيها نسخ كل من سلسلتي الحمض النووي DNA إلى سلسلة مكملة جديدة New complementary strand. يحدث هذا عند كل انقسام خلوي؛ ليضمن أن المعلومات الوراثية تنتقل إلى خلايا البنت (النسل الجديد). وتتطلب عملية تضاعف الحمض النووي عمل عالي الدقة، والتنسيق بمشاركة العديد من البروتينات في معقد يدعى Replisome، وتستوجب الدقة والسرعة الفائقة؛ حيث تتجمع سلسلتي DNA الجديدتين في معدل 1000 نيوكليوتيدة في الثانية، عند البكتريا *E. coli*. أثناء عملية التضاعف، تخدم كل من سلسلتي الحمض النووي DNA الأساسية كقالب Template لتشكيل السلسلة الجديدة، وهذا ما يعرف بالتضاعف شبه المحافظ Semiconservative replication، تتم عملية تضاعف الحمض النووي أيضاً أثناء تأشيب (إعادة اتحاد) Recombination الحمض النووي، وإصلاح الحمض النووي المتضرر.

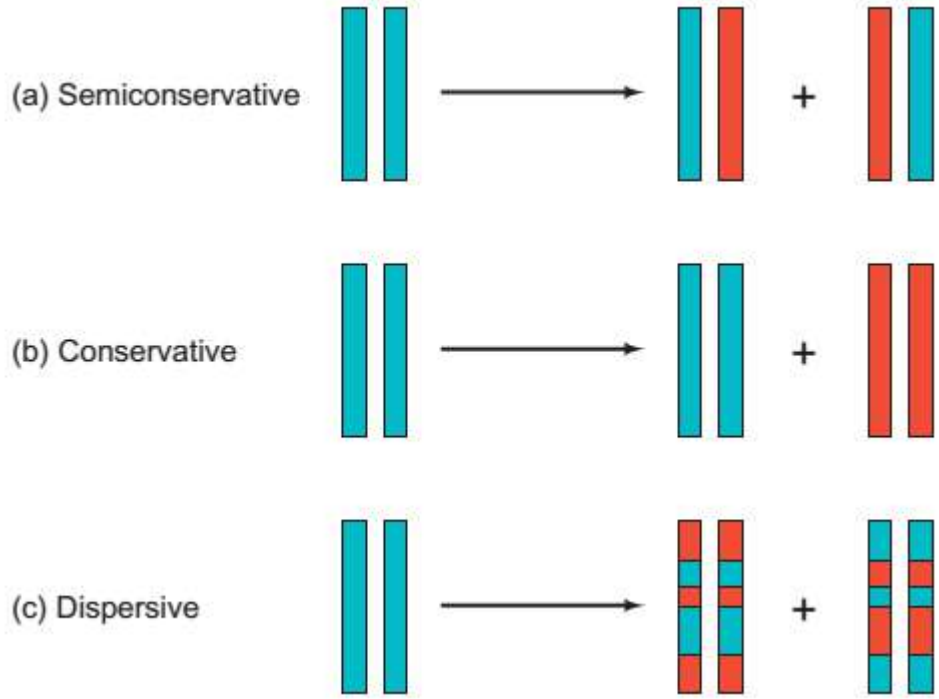
2- تضاعف الحمض النووي منقوص الأوكسجين DNA-Replication (DNA)

يُعَدُ تضاعف الحمض النووي DNA من أهم العمليات الحيوية الخلوية، فلولا تضاعف الـ DNA لماتت معظم الخلايا، فهي وسيلة للتطور والتجديد والنمو. تنتهي العملية ببناء جزيئي الـ DNA مطابقان لجزيء الحمض النووي الرايبوزي منقوص الأوكسجين الرئيس، وتكون عملية تضاعف الـ DNAعلى ثلاث انواع:

1- التضاعف المحافظ Conservative replication:
تبقى السلسلتين المكونتين للحلزون المزدوج double helix معاً، ثم يتم انتاج سلسلتين مزدوجتين جديدتين تماماً.
2- التضاعف شبه المحافظ Semiconservative replication: يتم التضاعف بفك حلزنة السلسلتين المكونتين للحلزون المزدوج، ثم استخدام كل سلسلة كقالب لبناء سلسلة جديدة.
3- التضاعف المشتت Dispersive replication: يُشظى فيه الحمض النووي DNA في السلسلتين المتكونتين، حيث تتواجد فيه قطع الحمض النووي الأبوي مع قطع الحمض النووي المتشكل حديثاً على نفس السلسلة بعد حدوث التضاعف (شكل 4-1).

Molecular Biology Dr. Ismail Al-Mohamed

التضاعف شبه المحافظ هو الأكثر شيوعاً في الكائنات الحية. ويستخدم في هذه العملية عدة أنزيمات أهمها Helicase، RNA polymerase، Topoisomerase، DNA polymerase ، Unwinding protein ، Ligase و Primase.....



شكل 4-1. فرضيات تضاعف الحمض النووي DNA: a - التضاعف شبه المحافظ، b- التضاعف المحافظ، c- التضاعف المشتت.

2- 1- التضاعف شبه المحافظ Semiconservative replication

تتصف عملية التضاعف شبه المحافظ استناداً إلى نظرية الحلزون المزدوج، المقترحة من قبل (Watson and Crick, 1953) ، بأن سلاسل الحلزون المزدوج تنفصل عن بعضها، حيث تقوم كل سلسلة مفردة بدور قالب لبناء نسخة متممة جديدة New complementary strand لنسخة القالب أو السلسلة الأبوية. تنتهي هذه العملية بتكوين زوجين من السلاسل المزدوجة. يحتوي كل زوج على شريط أبوي، وشريط جديد مماثل له. أثبتت التجارب العملية التي أجريت لمعرفة تضاعف الحمض النووي حصول مثل هذا النوع من التضاعف عند جميع الأحياء.

2-1-1- التضاعف شبه المحافظ للحمض النووي في بدائيات النوى

2-1-1-1- مرحلة بدء التضاعف

تبدأ عملية تضاعف صبغي بكتريا *E. coli* من نقطة واحدة تدعى بمنشأ أو بداية التضاعف Origin of replication، تتألف هذه المنطقة من تسلسل يبلغ طوله 250 زوجاً من النيوكليوتيدات تقريباً، ويتم التعرف عليها من قبل البروتينات i، "n، 'n، n، وكذلك البروتينات B، C المكونة للمعقد البروتيني Primosome (شكل 4-2).

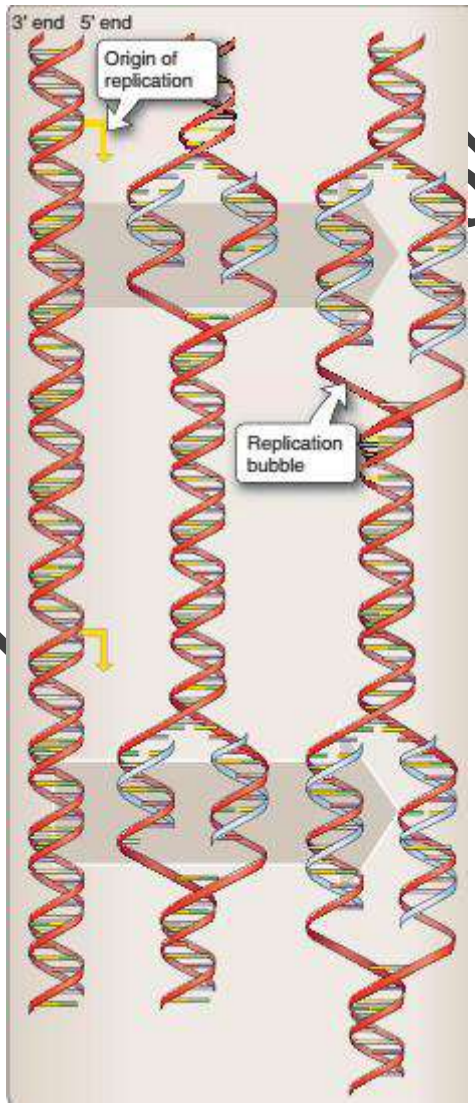
Molecular Biology Dr. :-Mohamed

يتم فتح الـDNA في نقطة منشأ التضاعف وعلى طوله بمساعدة ثلاثة أنواع من البروتينات الموجودة في المعقد الأنزيمي Replisome وهي على التوالي:

أ- أنزيم الـDNA gyrase: وهو أحد الأنزيمات الذي يحفز إزالة الالتفافات من الـDNA، وبالتالي يحفز تشكيل اللف السالب في جزيئة الـDNA، حيث يرتبط الأنزيم على سلسلة واحدة من جزيئة الـ DNA، ويقوم بقطع الروابط الفوسفاتية ثنائية الأستر لهيكل الـ DNA في مناطق محددة. وبعد ذلك، ينزع الأنزيم اللف الفائق من سلسلتي الـDNA ويعيد ربط المنطقة المقطوعة من جديد. يقوم أنزيم DNA gyrase بنزع الالتفافات عن الحلزون المزدوج فائق اللف كلما تقدمت شوكة التضاعف Replication fork.

ب- أنزيم الـ DNA Helicase أو أنزيم فاتح حلزون الـ DNA: يعمل هذا الأنزيم على كسر أو فصل سلسلتي الـDNA التي تربط أزواج الأسس الآزوتية للحلزون المضاعف؛ وبالتالي فصل سلسلتي الـ DNA بعضهما عن بعض. ويحصل هذا الأنزيم على الطاقة اللازمة للتفاعل عن طريق حلمهة جزيئات الـATP بوساطة أنزيمات ATPases الموجودة في المعقد الأنزيمي Replisome.

ت- بروتينات الارتباط بالسلاسل المفردة Single Strand DNA-Binding Protein(SSBP): ترتبط بروتينات SSBP مع سلسلتي الـDNA المفردتين والمتباعدتين بتحفيز من أنزيم DNA Helicase وتمنعهما من إعادة الارتباط لتشكيل الحلزون المزدوج. بهذه الطريقة تساعد هذه البروتينات في عملية فتح الحلزون المزدوج، وثبات القالب لبدء عملية تضاعف الـDNA.



شكل 4-2. منشأ وفقاعات تضاعف الحمض النووي DNA (عن Chandar and Viselli, 2010)

يتشكل نتيجة تكسير الروابط الهيدروجينية الضعيفة التي تربط البيورينات Purines (Adenine و Guanine) مع البيريميدينات Pyrimidines (Cytosine وThymine) ونتيجة ارتباط بروتينات الـSSBP مع سلسلتي الـDNA المفردتين المتباعدتين، ما يسمى بفقاعة التضاعف Replication bubble. تتكون فقاعة التضاعف من وحدتي يطلق على كل واحدة منها شوكة التضاعف Replication fork لأنها تأخذ شكل الحرف Y.

Molecular Biology Dr. I unnamed

تبدأ عملية التضاعف لدى *E. coli* في آن واحد على كل شوكة من شوكتي التضاعف وتستمر في اتجاهين متعاكسين وتبلغ سرعة تحرك المنطقة المنفرجة 15 ميكرومتراً في الدقيقة الواحدة مما يحفز بلمرة 45000 زوجاً من القواعد الأزوتية في الدقيقة الواحدة.

2-1-1-2- مرحلة انتساخ البادئة Transcription of primer

إن أنزيمات الـDNA Polymerases المسؤولة عن بناء سلاسل جديدة متممة للسلاسل المرصافية (القوالب) لا تستطيع أن تبدأ عملية البلمرة، إلا في حالة واحدة فقط، وهي عندما يتوفر لها مادة أولية تدعى بالبادئة Primer في نقطة بداية التضاعف (منشأ التضاعف). حيث تعتبر مرحلة تشكيل البادئة آخر مرحلة قبل البدء الحقيقي في عملية تضاعف الـDNA. ولقد كان الاعتقاد السابق أن الأنزيم المبلمر للـRNA أو الأنزيم RNA Polymerase هو الذي يقوم بعملية تصنيع البادئة إلا أن الأبحاث الحديث أثبتت أن أنزيماً مستقلاً، وهو أنزيم مكون البادئة أو أنزيم Primase، هو الذي يقوم بتكوين البادئة في نقطة بدء التضاعف.

اثبت العالم الياباني R.T. Okazaki عام 1968 أن البادئة هي عبارة عن سلسلة قصيرة من النيوكليوتيدات الريبية. ويبلغ طول البادئة ما بين 10 و 60 نيوكليوتيداً في بدائيات النواة. وتصنع البادئة من قبل معقد بروتيني يطلق عليه الجسيم المصنع للبادئة Primosome، الذي يتكون من أنزيم الـPrimase (الأنزيم المكون للبادئة) + البروتينات i، "n، 'n، n، وكذلك البروتينات B، C المكونة للمعقد البروتيني.

يتم التعرف على تسلسلات بداية تصنيع البادئة في منشأ التضاعف من قبل البروتينات i، "n، 'n، n . بعد ذلك، يتم انتساخ Transcription البادئة بوساطة أنزيم مكون البادئة أو أنزيم مكون البادئة أو الـ Primase، بمساعدة البروتينين B، C وانزيم الـATPase الذي يزود أنزيم Primase بالطاقة. أثناء عملية البلمرة، ووفقاً لمبدأ تكامل الأسس الأزوتية، يقوم أنزيم الـPrimase بتوجيه النيوكليوتيدات الريبية ثلاثية الفوسفات NTP توجيهاً مباشراً نحو سلسلة الـDNA القالب. بعد تشكيل البادئة، ينشأ هجين RNA-DNA في منطقة بدء التضاعف.

2-1-1-3- مرحلة إطالة البادئة

بعد تصنيع البادئة من قبل أنزيم الـPrimase ونشوء نهاية **3′** هيدروكسيلية حرة. يستخدم الأنزيم المبلمر للـDNA أو أنزيم الـ DNA polymerase هذه النهاية لإطالة قطعة البادئة. حيث يتحكم هذا الأنزيم بتوجيه النيوكليوتيدات الريبية منقوصة الأوكسجين ثلاثية الفوسفات dNTPs، ووفقاً لمبدأ تكامل الأسس الأزوتية، توجيهاً مباشراً نحو سلسلة الـDNA القالب.

ينتج عن عملية البلمرة قطع من الـDNA تدعى قطع أوكازاكي Okazaki Fragments وتسبق دائماً هذه القطع بتسلسلات من النيوكليوتيدات الريبية التي تشكل البادئة (شكل 3-4).

- **طريقة إطالة البادئة**

أ- يستخدم الأنزيم DNA polymerase III النهاية **3′** الهيدروكسيلية للبادئة من أجل البدء بمرحلة الإطالة. في هذه الحالة، ترتبط جزيئة البادئة عن طريق زمرتها **3′** الهيدروكسيلية مع الفوسفات ألفا للنيوكليوتيد منقوص الأوكسجين ثلاثي الفوسفات الأول المستخدم في عملية تضاعف الـDNA وتتشكل رابطة إسترية.

ب- تقوم بعدها المجموعة **3′** الهيدروكسيلية للنيوكليوتيد المضاف بالتفاعل مع الفوسفات الفا للنيوكليوتيد ثلاثي الفوسفات منقوص الأوكسجين التالي وتتشكل من جديد رابطة

Molecular Biology Dr. Ismail Al-Mohamed

إسترية. وبهذه الطريقة، يتشكل متعدد النيوكليوتيدات بإضافة النيوكليوتيدات الواحدة تلو الأخرى، مع تحرر زمرتي الفوسفات بيتا وغاما على شكل بيروفوسفات Pyrophosphate.

ت- في كل مرة يختار الأنزيم DNA Polymerase III النيوكليوتيد الريبي منقوص الأوكسجين المناسب الذي سيربطه مع النهاية الهيدروكسيلية الحرة **3′** وفقاً للتسلسل النيوكليوتيدي الموجود على سلسلة الـDNA القالب. على سبيل المثال، عندما تكون مجموعة الديوكسي أدينوزين أحادي الفوسفات Deoxyadenosine monophosphate (dAMP) على السلسلة القالب، فإن مجموعة الديوكسي تيميدين ثلاثي الفوسفات deoxythymidine triphosphate هي التي ستدخل في عملية البلمرة، وذلك وفقاً لمبدأ تكامل الأسس الآزوتية في جزيئة الـDNA (فرضية واطسن وكريك). ويتم تثبيت هذه النيوكليوتيدات في مكانها عن طريق تشكيل روابط هيدروجينية ما بين الأسس المتكاملة.

ث- تستمر عملية التضاعف الـDNA في نفس الوقت على سلسلتي الـDNA لكن باتجاهين متعاكسين (نظراً للقطبية المتعاكسة لسلسلتي جزيئة الـDNA). حيث تتصف جميع أنزيمات البلمرة ومن بينها أنزيم DNA polymerase III، بامتلاكها فعالية أنزيمية مبلمرة في اتجاهٍ واحدٍ فقط وهو الاتجاه 3′ ⟵ 5′ . بمعنى أخر، تستطيع هذه الأنزيمات إضافة النيوكليوتيدات على النهاية الهيدروكسيلية الحرة فقط و لا تستطيع إضافة النيوكليوتيدات على النهاية الفوسفاتية الحرة. لذلك، يقوم الأنزيم DNA polymerase III بنسخ إحدى السلسلتين بشكل مستمر في الاتجاه 3′ ⟵ 5′ وتدعى هذه السلسلة المتقدمة Leading strand، ويتطلب نسخ السلسلة المستمرة بادئة Primer واحدة فقط. بينما يقوم أنزيم DNA polymerase III آخر بنسخ السلسلة الثانية في الاتجاه 3′ ⟵ 5′ أيضاً لكن بشكلٍ غير مستمر على شكل قطع منفصلة. وتسمى هذه السلسلة المتأخرة (المتلكئة) Lagging strand.

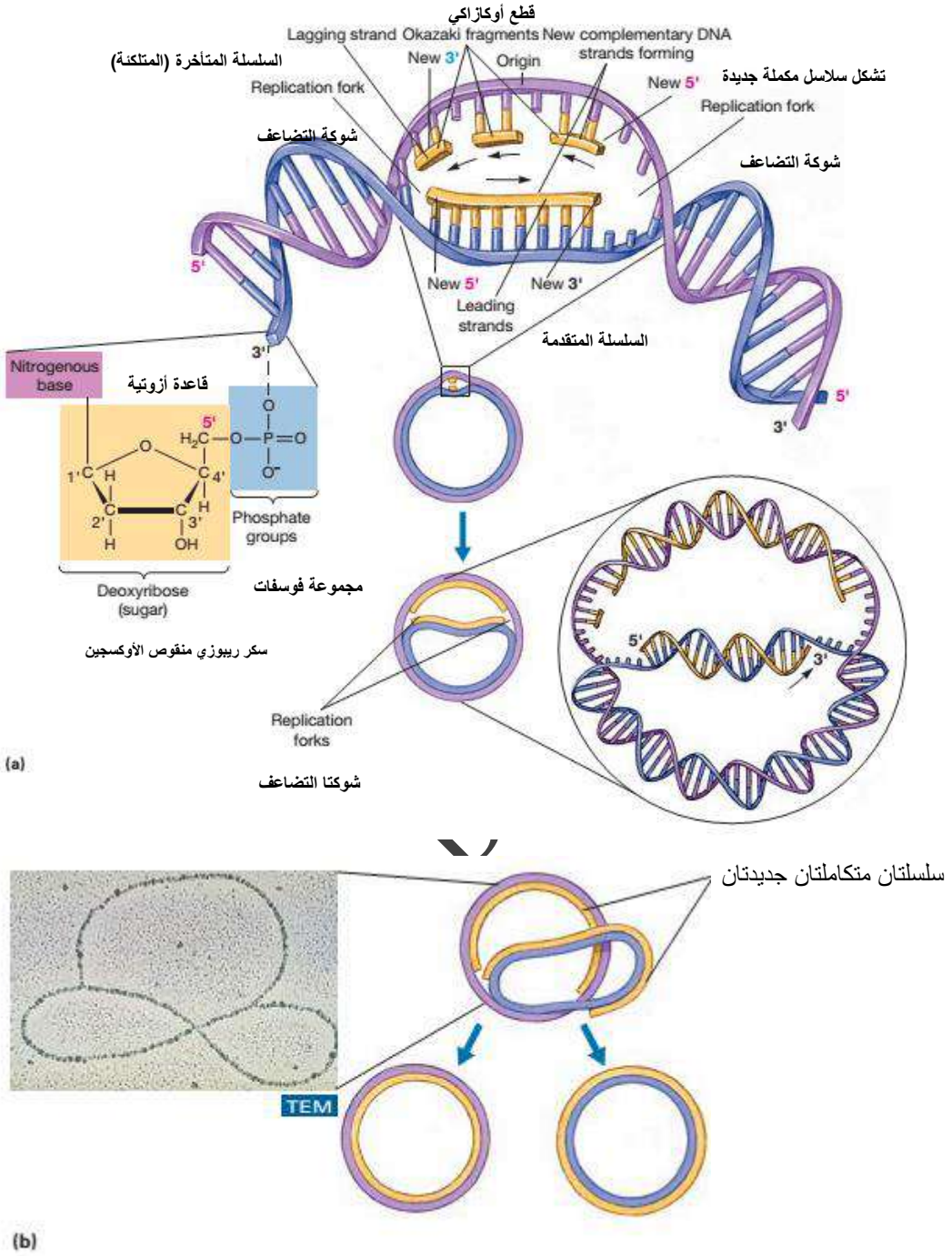
ج- بالنسبة للسلسلة المتأخرة، يقوم الأنزيم DNA polymerase بنسخ (بلمرة النيوكليوتيدات) بشكلٍ متقطع ولهذا يتم استخدام بادئة لكل قطعة DNA سيتم نسخها مما يؤدي إلى تشكل العديد من قطع أوكازاكي، والتي تسبق دائماً بسلاسل قصيرة من الـRNA (البادئات). وقد قدر الباحثون طول قطع أوكازاكي ما بين 1000 و 2000 نيوكليوتيداً في الخلايا الجرثومية وما بين 100 و 200 نيوكليوتيداً في حقيقيات النوى.

ح- بعد الانتهاء من تشكيل العديد من قطع أوكازاكي، يتم إزالة الـRNA البدئي بوساطة الفعالية الأنزيمية المحللة للأنزيم DNA polymerase I. تسلك هذه الفعالية الأنزيمية سلوك الأنزيم RNase H (تحت وحدة من أنزيم النسخ العكسي) الذي يهضم الـRNA الهجين مع الـDNA (شكل 4-3).

خ- يسبب هضم البادئة ترك فجوة Gap على سلسلة الـDNA المصنعة حديثاً لكن بتحفيز من الفعالية المبلمرة لأنزيم الـDNA polymerase I تملأ هذه الفجوة بالنيوكليوتيدات الريبية منزوعة الأوكسجين الملائمة لتحقيق التكامل ما بين الأسس الآزوتية الموجودة على سلسلتي جزيئة الـDNA.

د- يتم بعدها ربط قطع الـDNA المتجاورة بوساطة أنزيمات تدعى أنزيمات الربط أو الليغاز DNA Ligase (شكل 4-3). في حالة الـDNA الحلقي للخلية الجرثومية *E. coli* يستمر التضاعف على شوكة تضاعف وفي الاتجاهين المتعاكسين ويقف عند نقطة تلاقي الشوكتين.

Molecular Biology Dr. Ismail Al-Mohamed



شكل 4-3. تضاعف الحمض النووي DNA في خلايا بدائيات النوى a)- انفصال سلسلتي DNA، وبداية التضاعف عند شوكتي التضاعف لكل سلسلة b)- التقاء شوكتي التضاعف، وانفصال الصبغيات (عن Black and Black, 2015).

2-1-2 - تضاعف الحمض النووي DNA في الخلايا حقيقية النواة

اثبتت الدراسات أن الحمض النووي DNA الخاص بالخلايا حقيقيات النوى يتضاعف كذلك بطريقة التضاعف شبه المحافظ Semiconservative replication. وينص مبدأ هذه التجارب على تنمية خلايا حقيقيات النوى لمدة دورتين تضاعف في وسط زرع يحتوي على المركب برومو دي أوكسي يوريدين Bromodeoxyuridine (BrdU) الذي يدخل في تركيب الـDNA عوضاً عن التيميدين. وكما هو معروف، تتألف جميع الصبغيات من كروماتيدين؛ يتألف كل واحد من هذه الكروماتيدات من سلسلتين تحتويان على المركب BrdU، بينما يكون الكروماتيد الثاني هجيناً ويتألف من سلسلتين تحوي إحداهما على المركب BrdU بينما تحوي الثانية على التيميدين. وتنتمي السلسلة التي تحتوي على التيميدين إلى جزيئة الـDNA الأبوية أو الأصلية التي كانت في الخلايا قبل إضافة المركب BrdU إلى وسط الزرع.

على عكس DNA الخلية الجرثومية *E. coli*، يحتوي DNA الخلايا حقيقية النواة على العديد من نقاط التضاعف وبالتالي العديد من المتضاعفات أو وحدات التضاعف Replications. حيث تبدء عملية التضاعف عند كل منشأ (أو نقطة) تضاعف وتعمل أنزيمات التضاعف في الاتجاهين المتعاكسين إلى أن تلتقي شوكتا تضاعف تابعتان لمتضاعفتين متجاورتين (شكل 4-3). على سبيل المثال، أثبتت الدراسات التي اعتمدت على تقنية التصوير الشعاعي الذاتي Autoradiography وعلى استخدم التيميدين الموسوم بنظير الهيدروجين أن DNA الخلايا البشرية يتضاعف من خلال تكوين عددٍ كبيرٍ من فقاعات التضاعف أو وحدات التضاعف (شكل 4-2). ويبلغ عدد هذه المتضاعفات ما بين 20000 – 30000 متضاعفة وطول المتضاعفة الواحدة ما بين 100 و 200 زوج من الأسس الآزوتية. بالإضافة إلى ذلك، أثبتت هذه الدراسات أن هذه المتضاعفات لا تتضاعف في آن واحد، ويبدو أن الكروماتين الكثيف Heterochromatin يتضاعف في وقت متأخر. وأفضل مثال هو تضاعف DNA الصبغي X الخامل عند المرأة الذي يتضاعف في مرحلة متأخرة جداً من الطور الصبغي للدورة الخلوية.

على غرار الخلايا بدائية النواة، تعمل كذلك أنزيمات بلمرة الـDNA الخاصة بالخلايا حقيقية النواة في اتجاه واحد فقط بالنسبة لكلتا السلسلتين وهو الاتجاه 3' ← 5'. لذلك، يكون التضاعف من النوع المستمر على السلسلة المتقدمة Leading strand وغير المستمر على السلسلة المتأخرة (المتلكئة) Lagging strand . بالإضافة إلى ذلك، يتراوح طول قطع أوكازاكي الناتجة عن عملية البلمرة غير المستمرة ما بين 100 و 200 نيوكليوتيدة فقط بينما في الخلايا الجرثومية يتراوح طولها ما بين 1000 و 2000 نيوكليوتيدٍ. مما يدل أن عملية التضاعف الـDNA في الخلايا حقيقية النواة بطيئة، حيث تبلغ سرعة المنطقة المنفرجة حوالي ميكرومتر واحد في الدقيقة، بينما تبلغ سرعة المنطقة المنفرجة في الخلايا بدائية النواة حوالي 15 ميكرومتراً في الدقيقة الواحدة.

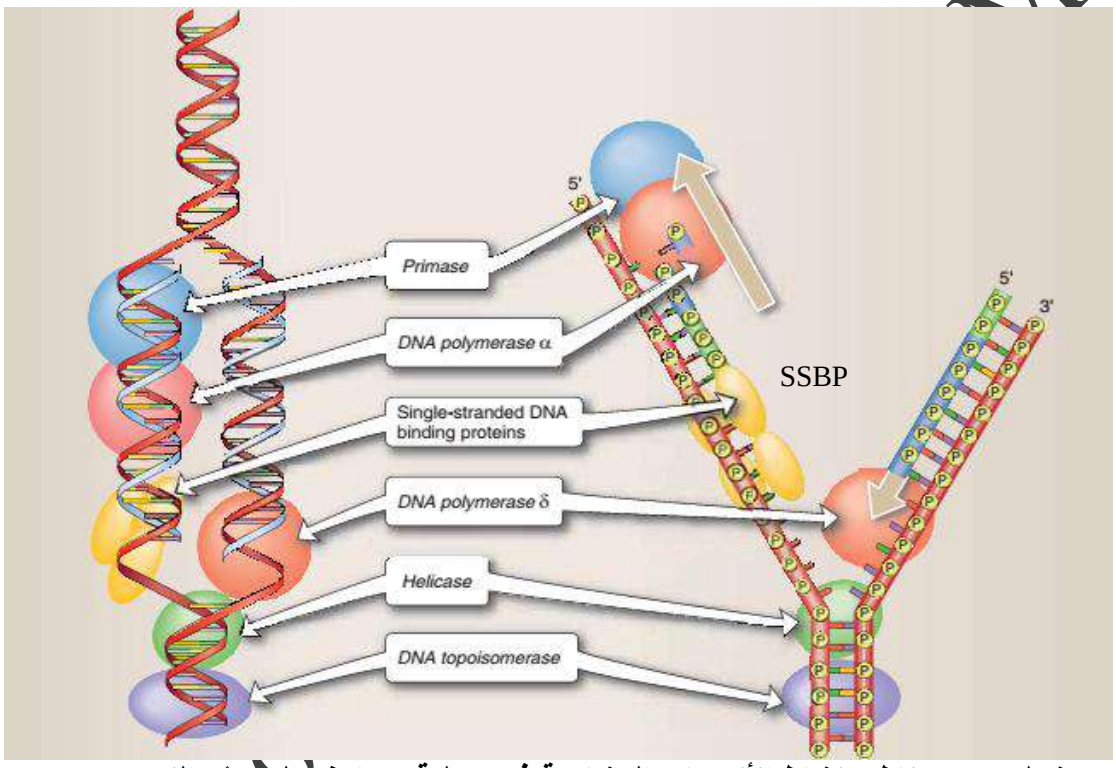
2-1-2-1- الأنزيمات المساهمة في تضاعف الـDNA في الخلايا حقيقية النواة

- **2-1-2- 1-1- أنزيمات البلمرة**

يوجد أربعة أنواع مختلفة من أنزيمات تضاعف الـDNA في الخلايا حقيقية النواة وسميت بأحرف إغريقية حسب ترتيب اكتشافها: أنزيم الـ DNA polymerase α، أنزيم DNA polymerase β، أنزيم الـ DNA polymerase γ، أنزيم DNA polymerase σ. تشبه هذه الأنزيمات من حيث الوظيفة أنزيمات البلمرة المستخلصة من الخلايا بدائية النواة.

Molecular Biology Dr. Ismail A-Mohamed

يؤدي أنزيم DNA polymerase α، الذي يتألف من أربع تحت وحدات، وظيفة البدء بنسخ الـDNA المتواجد في نوى الخلايا حقيقية النوى لكن يفتقر هذا الأنزيم إلى نشاط الفعالية المحللة Exonuclease في الاتجاه 5' ⟵ 3' وبالتالي، لا يستطيع هذا الأنزيم تصحيح الأخطاء. بينما يعتبر الأنزيم DNA polymerase σ أنزيم البلمرة الأساسي المسؤول عن تضاعف الـDNA عند حقيقيات النوى، كما يتميز باحتوائه على الفعالية المحللة في الاتجاه 5' ⟵ 3' وبالتالي يستطيع هذا الأنزيم تصحيح الأخطاء أثناء مرحلة التضاعف. أما الأنزيم DNA polymerase β فله دور أساسي في ترميم الـDNA. تتواجد الأنزيمات DNA polymerase α، σ، β في نوى الخلايا حقيقية النواة. أما الأنزيم DNA Polymerase γ فيتواجد في الجسيمات الكوندرية، وفي البلاستيدات الخضراء، ويعتقد أنه يلعب دوراً أساسياً في تضاعف DNA هذه العُضيَّات (الشكل 4-4).

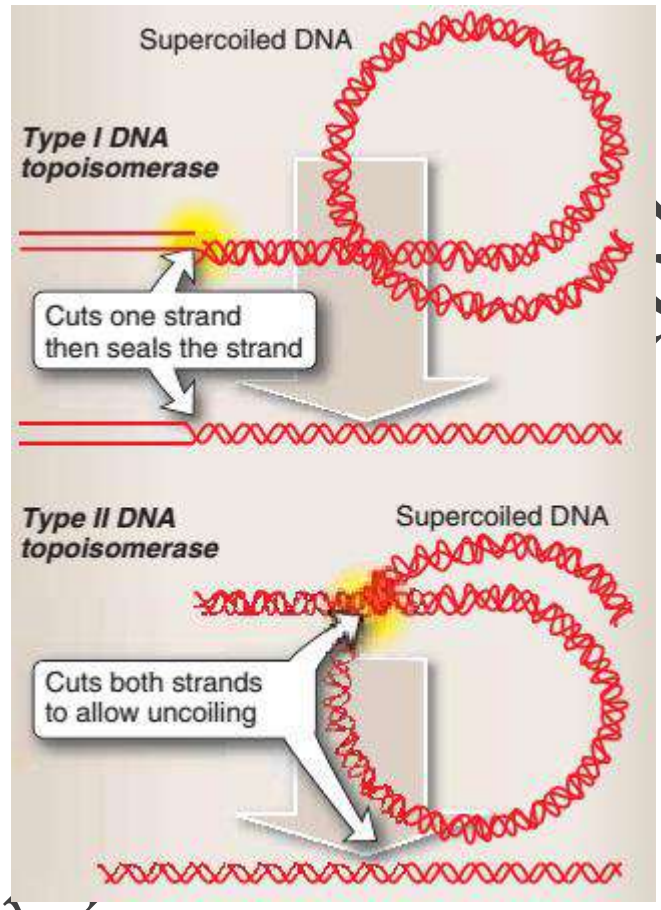


شكل 4-4. مناطق نشاط الأنزيمات المشاركة في عملية تضاعف الحمض النووي DNA polymeases (عن Chandar and Viselli, 2010).

Molecular Bio Mohamed

- 2-1-2-1-2- أنزيمات الـ Topoisomerases

يوجد نوعان من أنزيمات الـTopoisomerases في الخلايا حقيقية النواة. يتخصص أنزيم الـ Topoisomerase I (الذي يمتلك نفس وظيفة أنزيم الـ DNA Gyrase الجرثومي)، بالتأثير على جزيئة الـDNA فائقة اللف لتحويلها إلى شكلٍ مستريح (بدون لف) ويزداد نشاط هذا الأنزيم قبل البدء بعملية التضاعف. بالمقابل يتخصص الأنزيم الثاني Topoisomerase II بإعادة لف الحلزون المستريح إلى حلزون فائق اللف ويزداد نشاط هذا الأنزيم بعد انتهاء عملية تضاعف الـDNA لغرض احتواء الـDNA داخل النواة (الشكل 4-5).



شكل 4-5. نوعا أنزيم Topoisomerase (عن Chandar and Viselli 2010)

3- إصلاح خلل DNA DNA repair

يتعرض التركيب الكيميائي لجزيئات DNA إلى التغير لأسباب متعددة لهذا لابد من طريقة دقيقة لإصلاح الخلل للمحافظة على سلامة ودقة المعلومات ومن ثم المحافظة على النوع. تعرف الباحثون على بعض من أنواع الخلل الذي تتعرض له جزيئات DNA قبل عملية التضاعف والتي يمكن للخلية إصلاحها بفعالية كبيرة وهذا يحفظ المعلومات على جزيئة DNA من التغيير. ومن ثم تضاعف جزيئات DNA مع المحافظة على معلوماتها دون أي تغيير. تقع أنواع الخلل هذه مجموعتين:

3-1- المجموعة الأولى Spontaneous:

وهو خلل كثير الحدوث ينتج عن التذبذبات أو التقلبات الحرارية داخل العضية Thermal Fluctuation كما هو الحال عند نزع:

أ- نزع جذر الأمين Deamination عن القاعدة الأزوتية سيتوزين (C) وتحويلها إلى يوراسيل (U)

Molecular Biology Dr. Ismail Mohamed

ويمكن تتبع عملية إصلاح الخلل الناتج عن نزع جذر الأمين، من القاعدة الأزوتية السيتوزين (C) و تحويلها إلى القاعدة يوراسيل (U) في جزيء DNA، إذ تتم العملية وفقاً للمراحل الأتية:

1- يتعرف أنزيم Uracil DNA glycosidase على القاعدة يوراسيل التي طرأ عليها التغير ومن ثم يقتطعها عن سكر الرايبوز في سلسلة DNA
2- يميز أحد أنزيمات القطع Nuclease على سكر الريبوز الذي فقد قاعدته. ثم يعمل على كسر جسر الفوسفات في سلسلة الـDNA المعطوبة.
3- يعمل أنزيم Deoxyribose phosphodiesterase على قطع السكر.
4- يرمم أنزيم DNA Polymerase I النقص الحاصل
5- يصل أنزيم DNA ligase القطعة التي تم تركيبها حديثاً مع جسر الفوسفات في سلسلة الـ DNA

ب- نزع إحدى القواعد البيورينية (G وA) Depurination، حيث تفقد بحدود 5000 قاعدة بيورينية يومياً من الحمض النووي DNA في كل خلية، بسبب التذبذب الحراري.

وهو من الأخطاء الكثيرة الحدوث وتصلح بشكل فعّال وتكون عملية الإصلاح وفق المراحل الأتية:

1- يتعرف أنزيم خاص من مجموعة أنزيمات Nucleases على المنطقة التي فقدت منها القاعدة الأزوتية ثم يقطع سلسلة الـDNA المعطوبة التي فقدت القاعدة الأزوتية بالإضافة إلى قواعد أخرى حولها
2- يصنع أنزيم DNA polymerase القطعة المقتطعة في مكانها.
3- يصل أنزيم DNA ligase القطعة الصحيحة المصنعة حديثاً لإصلاح الخلل. لا يقتصر إصلاح الخلل على الأمثلة السابقة التي تنتج عن خلل يصيب إحدى القواعد. ولكن يتعدى ذلك إلى إصلاح الخلل عن عطب جزء كبير يحتوي على أكثر من قاعدة قد يصيب سلسلة الـDNA. إذ يمكن التعرف على الجزء المعطوب ومن ثم يتم اقتطاعه وبعدها يصنع جزء صحيح مكانه.

3-2- المجموعة الثانية: خلل تسببه نواتج الاستقلاب الفعالة، أو الأشعة، أو الكيميائية المسرطنة.

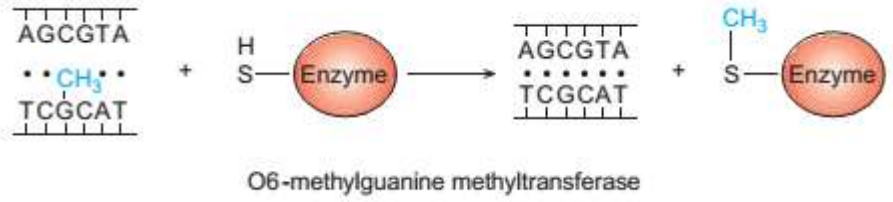
أ- تؤثر الأشعة فوق البنفسجية في قابلية القواعد الأزوتية للتقابل الصحيح وهذا يتسبب في تشكل روابط تساهمية بين القواعد المتجاورة كما هو الحال عند تشكل مثنيات الثيمين Thymine dimers
ب- القلوية Alkylation: تنتج عن إضافة جذر ميثيلي (CH_3) Methyl ، أو جذر إيثيلي Ethyl (C_2H_5) إلى مواقع مختلفة على القواعد الأزوتية في جزيء DNA
ت- اتحاد بعض المركبات الكيميائية المسرطنة مع القواعد الأزوتية في جزيء DNA، مثل هذه التغيرات يمكن لها أن تعيق أو تعطل كل من عمليات تركيب الـDNA وتضاعفه. كما يمكن لها أن تزيد من معدل الطفرات Mutations التي تغير التركيب الوراثي للكائن الحي، وهنا يمكن لنا أن نتخيل حجم الضرر الذي تحدثه تلك التغيرات في العضية إذا ما حدثت.

Molecular Biology Dr. Ismail Al-Mohamed

تقسم ألية إصلاح الخلل الذي يمكن أن تتعرض له جزيئات DNA بشكل عام إلى قسمين:

1- **إصلاح مباشر**: يتم فيه إصلاح الخلل الذي يصيب القواعد الأزوتية وهي في مكانها ضمن سلسلة الـDNA دون أن تستبدل، وتستطيع الخلية إصلاح نوعين من الخلل بشكل مباشر:
النوع الأول- تشكل مثنيات الثيمين Thymine dimers الناتجة عن تأثير الأشعة فوق البنفسجية إذ تستثمر الخلية الطاقة الشمسية لكسر الرابطة التساهمية التي تشكلت بين القواعد الأزوتية المتجاورة في عملية تعرف بإعادة التنشيط الضوئي Photoreactivation أو ما يسمى light repair مع أن هذا النوع من الإصلاح موجود عند أنواع مختلفة من الخلايا بدائيات النوى والخلايا حقيقيات النوى إلا أنه لا يشمل جميع أنواع الكائنات الحية، ومنها الإنسان.

النوع الثاني: - يتم أنزيمياً إذ يمكن للخلية إصلاح الخلل الناتج عن إضافة جذر المثيل بوساطة أنزيم O_6-methylguanine methyltransferase وهذا النوع من الخلل موجود في الإنسان (شكل 4-6).



شكل 4-6. ألية عمل Mechanism الأنزيم O6-methylguanine methyltransferase.

2- **إصلاح يتم فيه قطع للمنطقة التي تتعرض للخلل ومن ثم إصلاحها Excision damage of DNA**

يعتمد هذا النوع من الإصلاح على مجموعة من الأنزيمات التي تتوزع الأدوار وفقاً لنوع الخلل، مما ينتج عنه إصلاح للخطأ وإعادة ترتيب القواعد الأزوتية إلى الشكل الصحيح.
تعتمد أليات إصلاح الخلل على حقيقة أن جزيء DNA مزدوج السلسلة لذلك، يوجد نسختان متكاملتان من المعلومات الوراثية، كل منهما مكتوب على إحدى سلسلتي الـDNA فإذا ما حدث أي خلل في تركيب إحدى السلسلتين تستخدم السلسلة السليمة بوصفها قالباً Template strand لإصلاح الخطأ.
تتلخص مراحل عملية إصلاح الخلل من هذا النوع في جزيئات DNA بعدة خطوات مهمة تتلخص بالتالي:

1- يتعرف أولاً على الخلل الذي يصيب جزيء DNA
2- يقتطع الجزء المطلوب من سلسلة جزيء DNA إما باقتطاع القواعد الأزوتية أو كامل النيوكليوتيدات.
3- ترمم القطعة في مكانها
4- توصل القطعة الصحيحة المصنعة حديثاً لإصلاح الخلل.

تقسم عمليات الإصلاح من هذا النوع إلى ثلاثة أنوع:

أ- إصلاح للقواعد الأزوتية Base excision repair
ب- إصلاح للنيوكليوتيدات .Nucleotide excision repair

Molecular Biology Dr. A.A Mohamed

ت- إصلاح التقابل الخاطئ Mismatch repair

لقد وجد على سبيل المثال أن خلايا الخميرة *Saccharomyces cerevisiae* على بساطتها تحتوي على 50 نوعاً مختلفاً من الأنزيمات التي تعمل على مراقبة جزيء الـDNA وما قد يحدث من خلل ومن ثم تعمل على إصلاحها.

ووجد الباحثون أن لدى الخلية أكثر من خط للإصلاح معظمها يعتمد على مجموعات مختلفة من الأنزيمات. إذ يتعرف كل أنزيم من أنزيمات الإصلاح على نوع واحد من القواعد المعطوبة ثم يقوم باقتطاعها من سلسلة الـDNA.

يقدر عدد الأنزيمات التي تم التعرف عليها حتى الآن بحوالي 20 أنزيم تضم كل الأنزيمات التي تتعرف على القواعد المنزوعة الأمين Deaminated bases. والقواعد ذات السلسلة المفتوحة Bases with open rings والقواعد القلوية Alkylated bases، والقواعد التي تغيرت فيها روابط الكربون من ثنائية إلى أحادية.

بالإضافة إلى المنظومة السابقة من آليات الإصلاح، هنالك منظومة أخرى للإصلاح تعمل على إصلاح جزيئات الـDNA بعد الانتهاء من عملية التضاعف Postreplication repair وذلك عند فشل آليات الإصلاح السابقة لا يمكن لأنزيم النسخ DNA polymerase أن يستمر بعملية النسخ عند وصوله إلى منطقة الخلل على سلسلة الـDNA المعطوبة ولتجاوز هذه المشكلة تعمل الخلية على تصنيع قطعة جديدة من قطع أوكازاكي Okazaki بعد القواعد المعطوبة لتبدأ عملية النسخ من جديد. ينتج عن هذه العملية سلسلة غير متواصلة من الـDNA تحتوي على منطقة فراغ Gap. تعمل آليات الإصلاح التي عرفناها على ملء الفراغ لاحقاً لعملية التركيب. كما أنها تعمل على إصلاح المنطقة المعطوبة من سلسلة الـDNA

Molecular Biology Dr. Ismail Al-Mohamed

الفصل الخامس

أنزيمات استنساخ الأحماض النووية

1- مقدمة

تُعَدُّ الأنزيمات إحدى المفردات الهامة في لغة الكيمياء داخل المتعضيات الحية، وهي تساعد على ترجمة الأوامر الصادرة في الخلية إلى وقع ملموس، وهي المسؤولة عن كل عمليات البناء والهدم والتحوير التي تقوم بها الكائنات الحية. وقد تبين أن الخلايا الحيَّة تقوم بتصنيع أدواتها الخاصة المعروفة بالأنزيمات، وهي التي تعمل كعوامل مساعدة في انجاز تفاعلات الخلية الكيموحيوية في يسر ودقة.

وتتطلب الإحاطة بعلم البيولوجيا الجزيئية -الذي يهتم بالتعامل مع المادة الوراثية على أدنى مستوى جزيئي بغية دراسة تركيب الجين، وخواصه ووظائفه -معرفة طبيعة الأنزيمات المستخدمة في التقانة الحيوية Biotechnology؛ والتي تهدف إلى تشكيل جزيئات DNA مؤشبة (معاد توليفها) (Recombinant DNA)، بغية تطويع وإدارة المورثات وإعادة ترتيبها على النحو الذي يضمن إنتاجية أكبر، وإضافة بعض الصفات المرغوب فيها للكائن الحي المستهدف.

بداية، لابد من استخلاص الحمض النووي الريبي منقوص الأوكسجين (DNA) من المتعضيات بدائية النوى (الجراثيم)، أو حقيقية النوى (خلايا حيوانية أو نباتية) في مجال الدراسة، لإجراء التحويرات اللازمة، بهدف دمجه مع الحمض النووي للمضيف، أو إزالة الأجزاء غير المرغوب فيها. ولهذا، تُعَدُّ هذه الأنزيمات من الأدوات الهامة والضرورية في الهندسة الوراثية. و التعرف على طبيعتها، وآلية عملها، أمراً ضرورياً وأولياً، واعتمد ظهور التقانات الحيوية -أساساً - على المعارف المتراكمة حول العديد من المظاهر الحيوية المعتمدة على هذه الأنزيمات.

قبل سبعينيات القرن المنصرم، كانت عملية عزل الـ DNA عملية صعبة وشاقة للغاية، وتستغرق جهداً ووقتاً طويلاً، وكانت معظم الأبحاث تجري على الحموض النووية الريبية RNA_S، وعلى البروتينات. ويُعَدُّ ذلك التاريخ مرحلة فاصلة لما بعده، حيث كان للكشف عن أنزيمات القطع Nucleases بنمطيها الداخلي والخارجي، والتي تستعمل كأدوات للقطع في اماكن محددة، تحولاً اساسياً في تطور إدارة وتطويع المورثات. وكذلك كان لعزل أنزيمات الربط DNA Ligases، التي تربط سلاسل DNA، وفك الحلزنة وغيرها من الأنزيمات... اهمية كبيرة في تطور هندسة المورثات، والتقانة الحيوية.

ونظراً لاختلاف وظائف هذه الأنزيمات، فقد قسمت اعتماداً على ذلك إلى خمس مجاميع هي:

أ- أنزيمات القطع "هدم" الأحماض النووية Nucleases
ب- أنزيمات الربط (اللحام) Ligases
ت- أنزيمات البلمرة Polymerases
ث- أنزيمات التحوير Modifying Enzymes
ج- أنزيمات فك الحلزنة Topoisomerases

2 -أنزيمات هدم الأحماض النووية Nucleases

تعمل هذه الأنزيمات على استهداف الروابط الفوسفاتية ثنائية الأستر Phosphodiester bonds؛ التي تربط النيوكليوتيدات بعضها مع بعض، والتي تمثل العمود الفقري لسلاسل

Molecular Biology Dr. Ismail Al Mohamed

الأحماض النووية في الـ DNA والـ RNA. وتعمل هذه الأنزيمات بشكل معاكس لأنزيمات البلمرة Polymerases، والتي تعمل على تشكيل الروابط الفوسفاتية ثنائية الأستر بين النيوكليوتيدات، وقسمت هذه الأنزيمات إلى مجموعتين هما:

أنزيمات القطع الداخلي Endonucleases: وهي أنزيمات الهدم التي تهاجم روابط الفوسفور ثنائي الأستر من داخل سلاسل الحمض النووي DNA أو RNA وتؤدي الى إنتاج قطع مختلفة الحجم من الحمض النووي DNA أو RNA.

أما أنزيمات الهدم الخارجي Exonucleases: فهي تهاجم سلاسل الـ DNA، RNA من أطرافها؛ مؤدية الى تحرير نيوكليوتيدات أحادية أو ثنائية أو ثلاثية، و أحيانا أكثر من ذلك . وفي كلتا المجموعتين، فانه يمكن وجود أنزيمات هدم خاصة بالحمض النووي DNA تدعى Deoxyribonuclease (DNase) وأخرى خاصة بالحمض النووي RNA تدعى Ribonuclease (RNase).

1-2 -أنزيمات هدم الحمض النووي RNases (RNA)

استخلصت هذه الأنزيمات من مصادر مختلفة. فقد استخلصت ثلاثة أنواع من هذه الأنزيمات من بكتريا القولون *E. coli*؛ وهي RNase I, II, III. يعمل الأنزيم الأول RNase I، على هدم سلسلة الحمض النووي داخلياً اعتباراً من النهاية الثالثة '3 لإنتاج قطع مؤلفة من نيوكليوتيدة واحدة. أما الأنزيم RNase II، الذي يعمل على هدم سلسلة الحمض النووي داخلياً وخارجياً، اعتباراً من النهاية الخامسة '5 لإنتاج قطع مؤلفة من نيوكليوتيدة مفردة. بينما يعمل أنزيم RNase III، على الهدم الداخلي للمناطق المزدوجة من الحمض النووي.

كما تم استخلاص أنزيم هدم داخلي من بنكرياس الحيوانات؛ سمي (RNase A)، يهاجم داخليا مواقع ارتباط البيرميدينات (Pyrimidine nucleotides C , U) مع ذرة الكربون الثالثة '3 في السكر الخماسي حصراً، لإنتاج قطع حمض نووي مؤلف من نيوكليوتيدات بيرميدينية مفردة، إضافة الى قطع حمض نووي مختلفة الطول.

وتم عزل أنزيم هدم داخلي آخر، من الفطر *Aspergillus oryzae* سمي ($RNase\ T_1$) يعمل على مهاجمة روابط الأستر الموجودة في مواقع نيوكليوتيدات تحتوي على الجوانين فقط ومن النهاية الخامسة '5.

2-2 -أنزيمات هدم الحمض النووي DNases (DNA)

تعمل هذه الأنزيمات عل استهداف الروابط الفوسفاتية ثنائية الأستر في سلاسل الـ DNA. وقد تم عزلها من أنواع مختلفة من الأحياء، فقد وجد أن لبكتيريا القولون *E. coli* ثلاثة أنواع من أنزيمات DNases خارجية الهدم أطلق عليها: Exonucleases I، II، III؛ حيث يعمل الانزيم الأول، على مهاجمة روابط الأستر في السلاسل المفردة للحمض النووي DNA او RNA ، مؤدياً الى تقطيعها الى وحدات ثلاثية النيوكليوتيدات، ومن النهاية التي تربط فيها مجاميع الهيدروكسيل مع ذرة الكربون الثالثة للسكر. بينما يهاجم الأنزيم الثاني، السلاسل المزدوجة للحمض النووي DNA عند نفس موقع عمل الأنزيم الأول. ويختص الأنزيم الثالث، في مهاجمة روابط الأستر في السلاسل الحلزونية المزدوجة من الحمض النووي DNA. كما تم استخلاص نوعين من انزيمات الهدم الداخلي وذلك من طحال وبعض غدد الحيوانات سميت DNase I,II. حيث يعمل الانزيم الاول DNase I، على مهاجمة الروابط الداخلية للحمض النووي DNA؛ مؤدياً الى انتاج وحدات

Molecular Biology Dr. Ismail Al-Mohamed

لا يتجاوز طولها اربعة نيوكليوتيدات، تحتوي كل وحدة منها على مجموعة فوسفات مرتبطة مع ذرة الكربون الخامسة، ومجموعة هيدروكسيل مرتبطة مع ذرة الكربون الثالثة للسكر. بينما يعمل الأنزيم الثاني DNase II، المستخلص من الطحال والغدة الثموسية لبعض الحيوانات، على هدم الحمض النووي DNA داخلياً، منتجاً وحدات لا يزيد طولها على ستة نيوكليوتيدات، ترتبط مجاميع الهيدروكسيل فيها مع ذرة الكربون الخامسة بينما ترتبط مجاميع الفوسفات مع ذرة الكربون الثالثة.

بالإضافة الى هذه الأنزيمات، فقد تم عزل مجموعة أخرى من أنزيمات الهدم الداخلي للـDNA سميت بالأنزيمات المقيدة أو القاطعة " انزيمات التحديد " Restriction enzymes أكثر تخصصاً من سابقاتها وأكثر أهمية في الهندسة الوراثية.

2-3-الأنزيمات المقيدة أو القاطعة "انزيمات التحديد" *Restriction Endonucleases*

تمتلك البروتينات Proteins الموجودة في الخلايا ميزات مهمة، ما يسهل عملية دراستها. فهي توجد على شكل جزيئات منفصلة بعضها عن بعض، كما يوجد داخل كل خلية الكثير من النسخ من كل جزيئة بروتينية. بالإضافة إلى ذلك، تختلف البروتينات فيما بينها من حيث الوزن الجزيئي والخواص الفيزيائية والكيميائية، مما يسهل بالطبع عملية فصلها بعضها عن بعض باستخدام الطرائق المخبرية الشائعة مثل الرحلان الكهربائي Electrophoresis والكروماتوغرافيا Chromatography.

فيما يتعلق بالمورثات Genes، فهي توجد على عكس البروتينات على شكل نسخ وحيدة في المجين الوراثي أحادي الصيغة الصبغية. وتكون المورثات -بالإضافة إلى ذلك-متصلة أو مرتبطة مع بعضها بعض. وهذا الترابط ما بين المورثات جعل من عملية فصل وعزل واستخلاص مورثة محددة، بغية دراستها مهمة صعبة جداً أن لم تكن مستحيلة. وهذه الأسباب جعلت الباحثين العاملين في مجال البيولوجيا الجزيئية يجدون صعوبات كبيرة في دراسة المورثات، مقارنة بدراسة البروتينات. ولكن تغير الحال كليا في سنوات السبعينات من القرن العشرين، نتيجة اكتشاف نوع خاص من أنزيمات التقطيع الداخلي، التي أطلق عليها أنزيمات التقطيع الحصري أو أنزيمات التقييد. يهضم هذا النمط من أنزيمات النوكلياز الداخلي endonucleases جزيئات الـ DNA وبالتالي الحصول على قطع DNA محددة الطول. حيث اكتشف العالمان Stewart Linn و Werner Arber أنزيمات التقييد (القطع) Restriction endonucleases في نهاية ستينات القرن الماضي عند البكتريا *E. coli*. واخذت هذه الأنزيمات اسمها من كونها تمنع غزو البكتريا بالحمض النووي الغريب Foreign DNA، كالحمض النووي DNA الخاص بالفيروسات، من خلال تقطعيه، لذلك فهي تحدد restrict المدى العائلي للفيروس. بينما تتم حماية الحمض النووي الخاص بالبكتيريا نفسها عن طريق إضافة مجموعة الميثيل Methylation. وتقطع هذه الأنزيمات في مواقع محددة داخل الحمض النووي الغريب، بدلاً من أن تقوم بهضمه من أطرافه. وباستخدام أنزيمات القطع تيسرت وسهلت عملية استخلاص الـDNA، وكذلك تجزيئ الذخيرة الوراثية لأي كائن حي إلى قطعٍ صغيرة (مورثات) مما سهل عملية دراسة كل مورثة على حده.

في عام 1970، تم عزل أول أنزيم تقطيع حصري أو تقييد من الجرثومة المعوية *Escherichia coli* (السلالة K). وكان هذا الأنزيم قادراً على تقطيع الـDNA، لكن الموقع الدقيق للتقطيع بقي لسنوات عديدة غير معروف. وكان هذا الأنزيم، بالإضافة إلى ذلك، يبدي عددا من الفعاليات المعقدة مما جعل دراسته صعبة للغاية. وفي العام نفسه عزل Smith و Arber أنزيم تقييد من الجرثومة *Haemophilus influenzae* (السلالة Rd) وسمي *Hin*dII. ويتعرف

Molecular Biology Dr. Ismail Al-Mohamed

هذا الأنزيم على موقع التعارف الخاص به المبين أدناه والمؤلف من ستة أزواج من الأسس الأزوتية: 5'- GT(T/C): (G/A) AC-3'

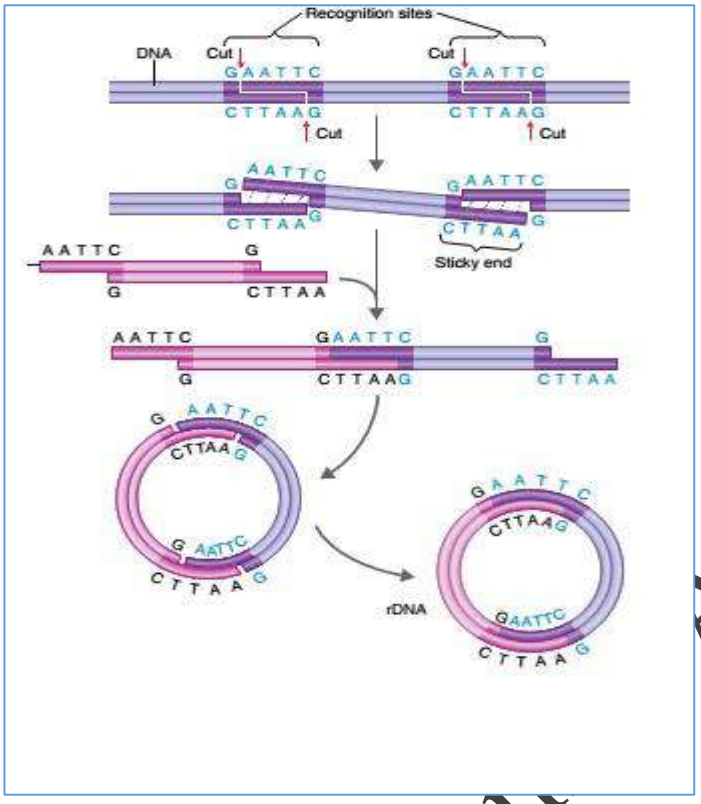
3'- CA(A/G): (C/T) TG-5'

يقوم هذا الأنزيم بقطع سلسلتي الـ DNA في الوقت نفسه، وذلك انطلاقاً من مركز التسلسل (المشار إليه بالتنقيط) ويترافق الهضم الأنزيمي مع ظهور قطع من الـ DNA ذات نهايات حادة Blunt end. وقد وجد Smith و Arber أن الأنزيم المعزول غير قادر على تقطيع صبغي الجرثومة *Haemophilus influenzae*، بينما يستطيع تقطيع صبغي ملتهم الجراثيم T7 Bacteriophage في 40 موقعاً مختلفاً. يتعرف أنزيم الحصر *Hin*dII دائماً على التسلسل نفسه المكون من ستة أزواج من الأسس الأزوتية ويقطع في كل مرة مركز هذا التسلسل لذلك يعرف هذا التسلسل بالموقع التمييزي Specific sequence recognition لـ *Hin*dII. وبالتالي، أينما وجد هذا الموقع التمييزي على جزيئة الـ DNA، وفي حال لم يطرأ عليه أي تعديل سيقوم *Hin*dII بتقطيع جزيئة الـ DNA في هذا الموقع. ولقد عزل Smith و Arber، بالإضافة إلى أنزيم التقييد *Hin*dII، أنزيم تقييد أخر من الجرثومة *Haemophilus influenzae* وأطلقا عليه اسم *Hin*dIII يستطيع هذا الأنزيم التعرف على الموقع التمييزي 5'- AAGCTT-3' ويقوم بعد ذلك بتقطيع جزيئة الـ DNA في هذا الموقع. ولكن لم يدون في النموذج التصنيفي الذي وضعه هذان الباحثان لأنهما أثبتا أن هذا الموقع غير موجود على صبغي الآكل T7. وبعد الاكتشاف الذي حققه Smith و Arber بوقت قصير عزل باحثون آخرون أنزيم تقييد آخر من الـ *Escherichia coli* (السلالة RY13) وأطلقوا عليه *Eco*RI يتعرف هذا الأنزيم على موقع التعارف ويقطع كل سلسلة بعد نكليوتيد الغوانين. وفي الوقت الحالي تم عزل أكثر من 900 أنزيم تقييد مختلف من أكثر من 230 نوعاً من الجراثيم.

2-3-1-الأهمية الحيوية لأنزيمات التقطيع الحصري

تستطيع أنزيمات التقطيع الحصري على عكس معظم الطرائق التي تقطع الـ DNA بشكل غير نوعي أو عشوائي (الطرائق الأنزيمية، الكيميائية والفيزيائية)، تجزئة المجين الوراثي الكامل بطريقة نوعية. فبعد أن تتعرف هذه الأنزيمات على تسلسلات القطع تقوم هذه الأنزيمات بقطع الرابطة الفوسفوأسترية الموجودة بين نيوكليوتيدات محددة موجودة ضمن هذا التسلسل، مما يؤدي إلى فصل المورثات بعضها عن بعض. وتترافق عملية الهضم الأنزيمي مع ظهور عدد من قطع الـ DNA، ويعتمد عدد هذه القطع وطولها على طول تسلسل القطع، وعلى نوع أنزيم التقطيع الحصري المستخدم. وبعد الانتهاء من مرحلة الهضم الأنزيمي، يمكن أن تفصل قطع الـ DNA بعضها عن بعضها الآخر بطريقة الرحلان الكهربائي. ولدراسة قطعة محددة من قطع التقييد، يجب أولاً فصلها من هلام الرحلان ثم تنقيتها من حبيبات الأغاروز، وبعد ذلك نستطيع دراستها بشكل مفصل. لقد عجل اكتشاف هذا النوع من الأنزيمات في نمو علمي الهندسة الوراثية والتقانة الحيوية وتطورهما. وتُعَد في الوقت الحالي أنزيمات التقطيع الحصري أداة رئيسة ومحورية في تقانة الـ DNA المؤشب Recombinant DNA، وفي أبحاث بناء المكتبات الوراثية Genomic libraries وتقانات تحديد التسلسل النيكليوتيدي للـ DNA **(شكل 5-1).**

Molecular Biology Dr. Ismail Al-Mohamed



شكل 5-1. دور انزيمات القطع Restriction enzymes في تكوين الحمض النووي المُطَعَّم (المؤشب) Recombinant DNA (rDNA) (عن Tortora *et al.*, 2019)

2-3-2-أنواع الإنزيمات المقيدة أو القاطعة:

قسمت هذه الإنزيمات اعتماداً على قدرتها على القطع المتخصص واحتياجاتها الكيميائية للقيام بوظائفها إلى ثلاثة أنواع هي:

2-3-2-1 -الإنزيمات المقيدة – الطراز الأول: Type I Restriction enzymes

وتشمل الإنزيمات الأولية المستخلصة من بكتيريا القولون السلالة E و K المصابة بالعاثي لامبدا. وتعمل هذه الإنزيمات على القطع العشوائي للحمض النووي DNA. ولوحظ بأن هذه الإنزيمات ترتبط في مواقع القطع، ثم تبدأ بهدم السلاسل المزدوجة في اتجاه واحد لمسافة تتراوح بين ٥٠٠٠- ١٠٠٠٠نيوكليوتيد، ثم تبدأ بعدها بهدم سلسلة مفردة لمسافة أخرى، وتتوقف بعدها عن العمل. تحتاج هذه الإنزيمات لعوامل مساعدة مثل أيونات المغنيسيوم وأدينوسين ثلاثي الفوسفات ATP و أدينوسيل ميثونين S-adenosylmethionine.

اكتشف الباحثون عددا قليلاً من أنزيمات التقطيع الحصري من النمط I (Type I restriction endonucleases) في الجراثيم المعوية *E. coli*، منها الأنزيمات *Eco*K, *Eco*B, *Eco*D. على سبيل المثال، يتعرف الأنزيم *Eco*K على تسلسل الـ DNA 5'-AACN6GTGC-3' ويمكن أن يكون الحرف (N) أي نيوكليوتيد. ويستطيع هذا الأنزيم تقطيع الـDNA بطريقة عشوائية، وبعيداً عن موقع التعارف. ومن أجل إتمام فعاليتها الحيوية تتطلب أنزيمات النمط I مركب الـATP ومركب الـ S-adenosylmethionine وأيونات المغنيزيوم (++Mg) كعوامل مساعدة. يتألف هذا النمط من الأنزيمات من ثلاث تحت وحدات مختلفة: تحت وحدة التحديد النوعي

Molecular Biology Dr. Ismail Al-Mohamed

(HsdS) التي تعين موقع التعرف في جزئية الـ DNA وتحت وحدة التعديل التي تضيف مجموعة الميثيل إلى موقع التعارف (HsdM) وتحت وحدة الحصر (HsdR) التي تقطع الـDNA.

بوجود S-adenosylmethionine، يرتبط هذا الأنزيم بموقع التعارف الخاص به بصرف النظر عما إذا كان ممثيلا أو لا. في حال كان موقع التعارف ممثيلا على السلسلتين، عندها فإن حلمهة الـATP تحفز فصل الأنزيم عن الـDNA. أما إذا كان موقع التعرف ممثيلا على سلسلة واحدة فقط (نصف ممثيل)، عندها يحفز الـATP مثيلة السلسلة الأخرى، ويكون عندها الـ S-adenosylmethionine هو المانح لزمرة المثيل. أما إذا كان الموقع غير ممثيل، عندئذٍ يحدث قطع الـDNA ويكون موقع التقطيع بعيداً عن موقع التعارف بمسافة تقدر ما بين 100 إلى 1000 نيوكليوتيد ويحدث التقطيع بعد التفاف تسلسلات الـDNA حول انزيم التقطيع مما يترافق مع ربط كل من موقع التعارف وموقع القطع. وبما أن الطول الحقيقي لهذا الالتفاف غير ثابت، وبما أن التسلسل النيوكليوتيدي في موقع التقطيع غير ثابت لذلك نادراً ما يستخدم هذا النمط من الأنزيمات في أبحاث الهندسة الوراثية. ولا شك أن المدهش في الأمر أن هذا النمط من الأنزيمات انتحارية لأنها تقطع الـ DNA مرة واحدة وتصبح بعدها غير فعالة.

2-2-3-2 - الإنزيمات المقيدة – الطراز الثاني Type II Restriction enzymes:

تُعتبر هذه المجموعة من الإنزيمات من أهم مجاميع إنزيمات القطع، لاستخدامها على نطاق واسع في الهندسة الوراثية. وتمتاز هذه الإنزيمات بقدرتها على قطع الحمض النووي DNA عند مواقع معينة Restriction sites فقط؛ بحيث تعطي عدداً ثابتاً من القطع لكل نوع من الأحياء. وتستهدف هذه الإنزيمات ترددات (تتابعات Sequences) معينة، بحيث أنها تتعرف على هذه التتابعات، وتقوم بالقطع قبل أو بعد هذا التتابع مباشرة. فمثلاً، يمكن للإنزيم القاطع *Eco*RI أن يتعرف على التردد 5'-GAATTC-3' ويقوم بالقطع بين الغوانين والأدنين من النهاية الخامسة. وهكذا، فإن الإنزيم يقوم بقطع سلاسل DNA في جميع المواقع التي تحتوي على هذا التتابع. ويختلف عدد تتابعات مواقع القطع التي تتعرف عليها الإنزيمات من إنزيم إلى آخر، ولكنها في الغالب تتراوح بين أربعة إلى ستة تتابعات (ترددات). ونظراً للأعداد الكبيرة التي اكتشفت من هذه الإنزيمات فإنه تم اقتراح نظام تسمية وضعه العالمان D. Nathans and H. O. Smith عام 1971 وعلى النحو التالي:

أ- يرمز لجنس الكائن الذي اكتشف فيه الإنزيم بالحرف الأول من اسم الإنزيم، ويرمز لنوع الكائن بالحرفين الثاني والثالث من اسم النوع. فمثلاً، الإنزيم المسمى *Eco* مأخوذ من البكتيريا *E. coli* فالحرف الأول من اسم الإنزيم مأخوذ من اسم جنس البكتيريا *Escherichia* والحرفان الثاني والثالث مأخوذان من اسم نوع البكتيريا *coli* وكذلك الحال بالنسبة للإنزيم *Hin* المأخوذ من اسم البكتيريا *Haemophilus influenzae* والإنزيم *Hpa* مأخوذ من اسم البكتيريا *Haemophilus parainfluenzae* وكذلك الحال بالنسبة لبقية الإنزيمات.

ب- في حالة احتواء البكتيريا على بلازميد أو عاث، فإنه يجب إضافة اسم البلازميد أو العاثي إلى اسم الإنزيم. فمثلاً، في حالة الإنزيم *Eco* المشتق من اسم البكتيريا *E. coli*، فإذا كانت البكتيريا تحتوي على البلازميد RI فإن اسم الإنزيم يصبح *Eco*RI.

ت- في حالة وجود أكثر من إنزيم لنفس النوع من البكتيريا، فإنه تُستخدم الأرقام الرومانية بعد نهاية الاسم كما هي الحال في الإنزيم *Eco*RI و*Eco*RII و *Hin*dI و *Hin*dIII و *Hin*dII، حيث تشير الأرقام الرومانية على ترتيب عزل أنزيم القطع من السلالة الجرثومية. فعلى سبيل المثال، أول أنزيم حصر تم عزله من الجرثومة *E. coli* (السلالة

Molecular Biology Dr. Ismail Al-Mohamed

RY13) تم تسميته *Eco*RI أما خامس أنزيم تم عزله من نفس السلالة فتمت تسميته *Eco*RV.

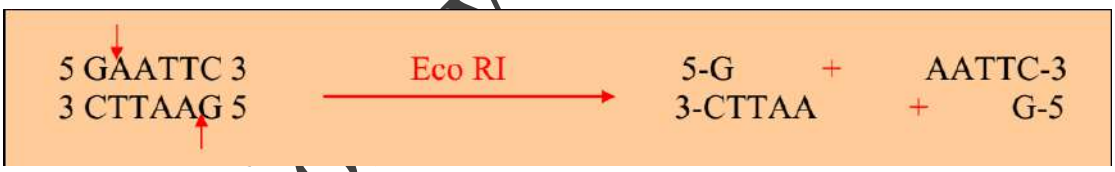
3-2-3-2 :الإنزيمات المقيدة – الطراز الثالث Type III Restriction enzymes: وهي إنزيمات وسط في صفاتها بين الطراز الأول والطراز الثاني، وتقوم هذه الإنزيمات بالقطع في مواقع محددة وتحتاج إلى أيونات المغنيسيوم وجزيئات ATP .

4-2-3-2 :مواقع عمل إنزيمات القطع

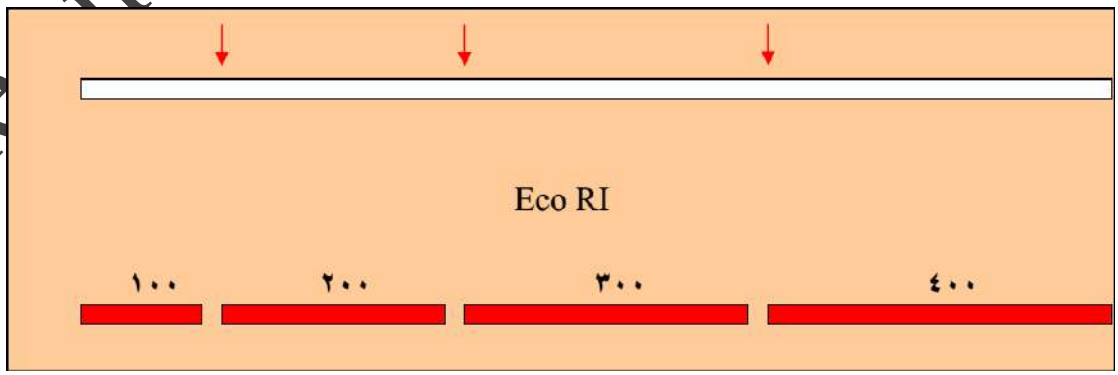
إن إنزيمات القطع (الطراز الثاني) تمتلك مواقع معينة على الحمض النووي DNA تتخصص في قطعها، ولكن تختلف هذه الإنزيمات في بعض الأمور فيما يخص طبيعة موقع القطع، ومكان القطع ونواتجه، ومن أهم هذه الاختلافات ما يلي:

1- من ملاحظة نواتج قطع بعض هذه الإنزيمات فإنه يتبين بأن بعضها يؤدي إلى إنتاج قطع ذات نهايات لزجة Sticky ends، بينما تُنتج إنزيمات أخرى قطعاً ذات نهايات عمياء Blunt ends أو غير لزجة. فمثلاً، يقوم الإنزيم *Bam*HI بتمييز موقع التتابع أو التردد التالي '5-GGATCC-3' وقطعه بين الغوانين عند النهاية الخامسة منتجاً القطع التالية 5-G و G-ATCC3.

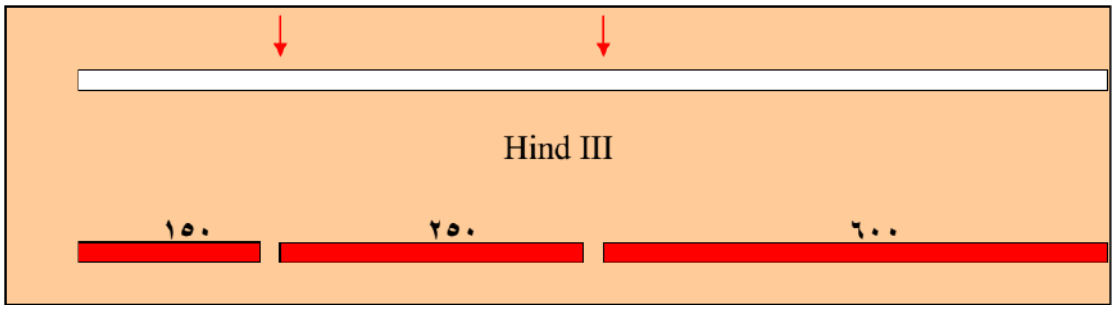
كما أن الانزيم *Eco*RI يقوم بتمييز موقع التردد (التتابع) '5 GAATTC 3' 5، ويقوم بالقطع بين الغوانين والأدنين عند النهاية الخامسة منتجاً القطع التالية 5-G و AATTC-3.



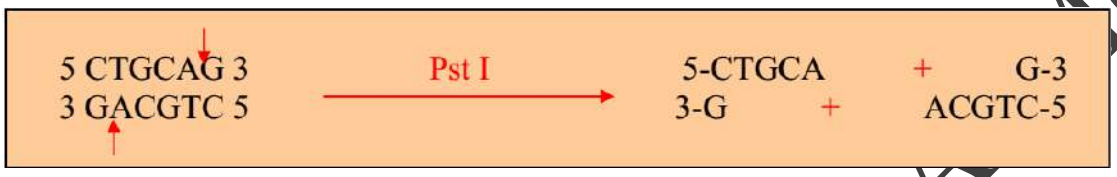
إنزيم *Eco*RI له المقدرة على قطع DNA إلى قطع مختلفة الطول تحتوي على 100 و 200 و 300و 400 نيوكليوتيدة. بينما إنزيم *Hin*dIII المعزول من بكتيريا هيموفليس انفلونزا، فإنه يقوم بقطع DNA إلى قطع مختلفة في الطول، تحتوي على 150 و 250 و 600 نيوكليوتيدة كما في الشكل الآتي:



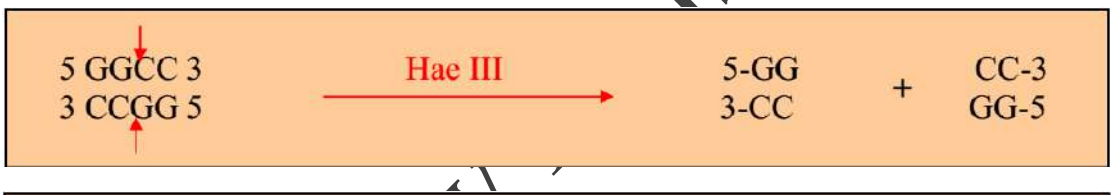
Molecular Biology Dr. Ismail Al-Mohamed

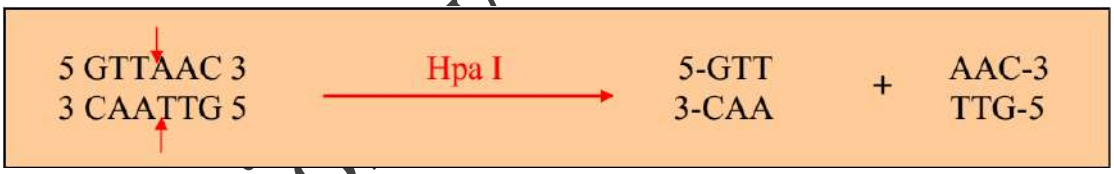


أما الإنزيم *Pst*I فإنه يقوم بتمييز التردد '3 -CTGCAG- 5'، ويقطع بين الغوانين والأدنين عند النهاية الثالثة، منتجاً القطع التالية 5'-CTGCA و G-3 .



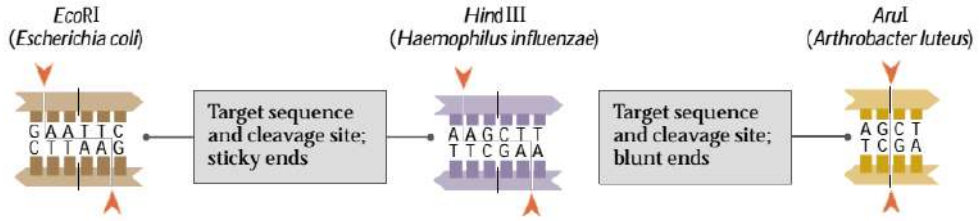
ويلاحظ من القطع الناتجة عن عمل هذه الإنزيمات بأن نهايات القطع الناتجة تكون مكملة أو متممة Complementary، مما يسمح لها بالالتصاق مرة أخرى، لذلك تُسمى هذه القطع بالقطع ذات النهايات اللزجة Sticky ends. ويعود إنتاج هذه النهايات إلى موقع القطع على سلسلتي مزدوج الحمض النووي حيث يكون غير متناظر. أما في الإنزيمات *Hpa*I و *Hae*III و *Sma*I فإن مواقع القطع هذه تكون متناظرة تماماً كما يلاحظ فيما يلي:





لذلك، فإنه لا وجود للتكامل في نهايات القطع الناتجة، وتُدعى مثل هذه القطع بالقطع ذات النهايات العمياء أو غير لزجة Blunt ends. لعدم قدرتها على الالتحام مرة أخرى، إلاّ إذا أجريت لها بعض التحويرات لجعلها لزجة، وتتم هذه التحويرات بوساطة إنزيمات تحوير DNA، DNA modifying enzymes. حيث تقطع بعض الأنزيمات سلسلتي الحمض النووي DNA في ذات الموقع، وتنتج قطعاً ذات نهايات غير لزجة Blunt ends كالأنزيم *Aru*I المعزول من البكتريا *Arthrobacter luteus* . بينما تنتج الأنزيمات *Hind*III و *Eco*RI قطع ذات نهايات لزجة Sticky ends **(شكل 5-2).**

Molecular Bio
Ismail A. Mohamed



شكل 5-2. بعض مصادر انزيمات التحديد، وشكل نهايات القطع غير لزجة Blunt ends أو لزجة Sticky ends عن (Biology,)

2- من ملاحظة القطع الناتجة من عمل الإنزيمات *Bam*HI و *Eco*RI، والقطع الناتجة عن الإنزيم *Pst*I، فإنه يلاحظ بأن النتوءات الخاصة بالنهايات اللزجة مختلفة الاتجاه، فمثلاً نتوءات القطع الناتجة عن الإنزيمات *Bam*HI و *Eco*RI ممتدة من النهاية الثالثة بينما تكون ممتدة من النهاية الخامسة في القطع الناتجة من الإنزيم *Ps*I.

3- إن تتابعات (ترددات) مواقع القطع (التقييد) تختلف في عدد نيوكليوتيداتها، فبعض الإنزيمات تستطيع تمييز مواقع تقييد رباعية التردد، وتقطع قبلها أو بعدها أو بينها، كما هو الحال في الإنزيمات التالية:

Mba I 5-GATC-3 , Sau 3A 5-GATC 3 , Hae III 5-GGCC-3

والبعض الآخر من الإنزيمات يستطيع تمييز مواقع تقييد خماسية التردد مثل الإنزيم *Ava*II الذي يميز الموقع 5'-CGTCC-3' والإنزيم *Eco*RII الذي يميز الموقع 5'-CCAGG-3' وغيرها من الإنزيمات. وتكون معظم الإنزيمات الأخرى ذات مواقع تقييد سداسية التردد وتشذ عن ذلك مجموعة من الإنزيمات مثل الإنزيم *Hga*I الذي يميز الموقع 5'-GACGA-3' ويقوم بالقطع بعده بخمسة نيوكليوتيدات في السلسلة الأولى وعشرة نيوكليوتيدات في السلسلة الثانية . وكذلك الإنزيم *Bbv*I الذي يقوم بالقطع بعد ثمانية نيوكليوتيدات من موقع التقييد (القطع5'-GCAGC(N)8) في السلسلة الأولى وبعد أثني عشر نيوكليوتيد في السلسلة الثانية 3'-CGTCG(N)12 هذا إضافة إلى إنزيمات أخرى.

4- إن معظم ترددات مواقع تقييد الإنزيمات هي ترددات بالندرومية Palindromes حيث يمكن قراءة تردد موقع القطع بنفس الاتجاه في كلتا سلسلتي الحمض النووي فمثلاً يمكن قراءة التردد 5'-GAATTC-3' لموقع تقييد الانزيم *Eco*RI بنفس الاتجاه في سلسلتي الحمض النووي كما يلي:

5 GAATTC 3
3 CTTAAG 5
Eco RI
5-G + AATTC-3
3-CTTAA + G-5
اتجاه القراءة

إلاّ أن مواقع تقييد (قطع) البعض الآخر من هذه الإنزيمات تكون ترددات(تتابعات)غير بالندرومية حيث تختلف مواقع قطع هذه الإنزيمات في سلسلتي الحمض النووي .فمثلاً

Molecular Biology Dr. Ismail Al-Mohamed

يقطع الإنزيم BinI بعد أربعة نيوكليوتيدات من التتابع '5-GGATC(N)4-3' في السلسلة الأولى، وبعد خمسة نيوكليوتيدات من التتابع '5-(N)CCTAG-5-'3 في السلسلة الثانية.

5- الاختلاف في قطع الحمض النووي الناتجة عن القطع بالإنزيمات. إن معظم الإنزيمات القاطعة ذات مواقع قطع ثابتة لذلك فإن الحمض النووي الناتج عن فعل هذه الإنزيمات تكون ذات نهايات معروفة وثابتة، فمثلاً القطع الناتجة من عمل الإنزيم *Eco*RI تنتهي دائماً بالتتابعات التالية 5-G و 3-CTTAA وكذلك الحال في معظم الإنزيمات .إلاّ أنه في إنزيمات أخرى مثل إنزيم *Dde*I و *Hinf*I و *Asu*I فإن نهايات القطع الناتجة عن نشاطها تكون مختلفة ذلك لأن هذه الإنزيمات تستطيع تمييز أكثر من موقع تقييد أو قطع مختلف. فمثلاً الإنزيم *Dde*I يستطيع تمييز التتابعات التالية كمواقع قطع له وهي -5 CTAAG-3 و 5-CTTAG-3 و 5-CTCAG-3 و 5-CTGAG-3 ومن ملاحظة مواقع قطع هذا الإنزيم المؤشرة بالأسهم فإن القطع الناتجة عن نشاطه ستكون بأربع نهايات مختلفة هي:

5-C	5-C	5-C	5-C
3-GATTC و	3-GAGTC و	3-GACTC و	3-GAATC

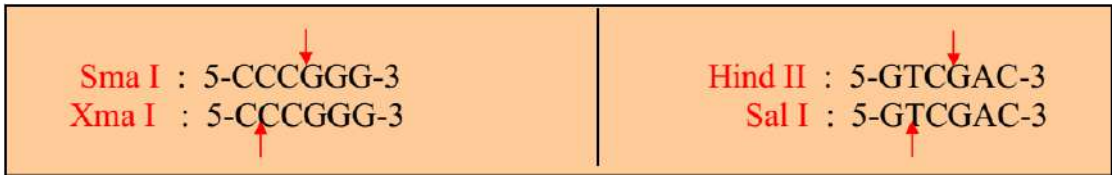
ويلاحظ أن الاختلاف هنا هو دائماً في النيوكليوتيد الوسطي من النهاية الثالثة (الشكل السابق) كما أن الإنزيم *Hinf*I يستطيع تمييز موقع القطع التالي -5 GANTC-3 (حيث إن N يمكن أن تكون A أو T أو C أو G) والإنزيم *Asu*I الذي يستطيع تمييز موقع القطع التالي 5-GGNCC-3. كما أنه يمكن الحصول على قطع حمض نووي DNA بنهايات مختلفة عديدة كما هو الحال مع القطع الناتجة عن الإنزيم *Bgl*I الذي يستطيع موقع القطع التالي -5-GCCNNNNNNC-3 والإنزيم *Xmn*I الذي يستطيع تمييز موقع القطع التالي 5-GAANNNNTTC-3 وغيرها من الإنزيمات الأخرى.

6- بعض الإنزيمات لها مواقع تقييد مشتركة وقد تقطع هذه المواقع بنفس المكان أو أماكن مختلفة بنفس الموقع وتُدعى مثل هذه الإنزيمات بالإنزيمات المتناظرة Isoschizomers وقد تكون متناظرة تماماً Perfect Isoschizomers عندما يكون مكان قطعها متشابهاً كما هو الحال مع الإنزيمات *Hin*dIII و *Hsu*I والإنزيمات *Bam*HI و Xho.

Hind III : 5-AAGCTT-3 Hsu I : 5-AAGCTT-3	BamHI : 5-GGATCC-3 Xho I : 5-GGATCC-3

Molecular Biology Dr. Ism Al-Mohamed

كما أن بعض الإنزيمات المتناظرة تكون غير تامة التناظر Imperfect Isoschizomers حيث أن لها مواقع تقييد متشابهة وأماكن قطع مختلفة مثل الإنزيمات *Sma*I و *Xma*I والإنزيمات *Hin*dII و *Sal*I .



7- يمكن لعدد من الإنزيمات القاطعة أن تعمل في تردد مشترك لموقع تقييد معين حيث إن لكل منها موقع تقييد داخل التردد المشترك فمثلاً الإنزيمات *Bam*HI و *Mbo*I و *Sau*3A تعمل على التردد 5-GGATCC-3 حيث يتمكن الإنزيمان *Mbo*I و *Sau*3A من العمل على التردد الرباعي GATC الذي يقع ضمن التردد السداسي الذي يمثل موقع تقييد الإنزيم *Bam*HI وكذلك الإنزيمات *Hin*dIII و *Alu*I حيث يقطع الإنزيم الأول في التردد الرباعي AGCT الذي يقع ضمن التردد السداسي AAAGCTTالذي يمثل موقع تقييد الإنزيم الثاني.

3- أنزيمات بلمرة الحمض النووي DNA Polymerases

تعد هذه أنزيمات من أهم الأنزيمات اللازمة لتضاعف واستنساخ الحمض النووي. لقد تم ذكر هذه الأنزيمات في فصل تضاعف الحمض النووي. بالإضافة لدور هذه الأنزيمات في تضاعف الحمض النووي فإن البعض منها يمتلك وظائف أخرى ذات أهمية كبيرة في الهندسة الوراثية. فأنزيمات بلمرة الحمض النووي منقوص الاوكسجين DNA في بكتريا القولون تمتلك نشاط هدم، بالإضافة لنشاط البناء. ينتج ذلك من وجود وحدتين في هذا الأنزيم الأولى تقوم بالبناء وتدعى بقطعة كلينو (Klenow Fragment)، بينما تدعى الوحدة الثانية بوحدة الهدم (Nuclease). وقد تم حديثاً باستخدام تقنيات جديدة قطع هاتين الوحدتين وتنقيتهما على انفراد.

أما في الأحياء حقيقية النوى فإن أنزيمات بلمرة الحمض النووي فيها لا تمتلك نشاط الهدم بل توجد أنزيمات مستقلة تقوم بذلك. وجد بأن هناك أنزيمين في هذه الأحياء يقومان بوظيفة الهدم. الأول هو أنزيم الهدم الداخلي Endonuclease، ويقوم بإزالة النيوكليوتيدات من داخل سلاسل الحمض النووي. والثاني هو أنزيم الهدم الخارجي Exonuclease، الذي يقوم بإزالة النيوكليوتيدات من نهاية السلاسل. وبالإضافة لهذه الأنزيمات فإن لإنزيم الاستنساخ العكسي Reverse transcriptase المعزول من الرواشح، أهمية في الهندسة الوراثية حيث يمكن بوساطته نسخ حمض نووي ريبوزي RNA من قالب الحمض النووي منقوص الأكسجين DNA.

4- أنزيمات الربط (اللحام) Ligases

تعمل هذه الأنزيمات على إعادة روابط الفوسفات ثنائي الأستر بين النيوكليوتيدات، وهي بهذه الوظيفة تكون عكس وظيفة الأنزيمات القاطعة أو المقيدة، التي تحطم هذه الروابط. يتوفر نوعان من هذه الأنزيمات هما DNA ligase المعزول من أنواع مختلفة من الكائنات الحية. يعمل هذا الأنزيم على إعادة ارتباط قطع الحمض النووي ذات النهايات اللزجة فقط ويحتاج إلى العامل المساعد +NAD في هذه العملية. أما الأنزيم الآخر فهو T4 ligase المعزول من العاث T4 بعد إصابته لبكتريا القولون *E. coli*. يتميز هذا الأنزيم عن الأنزيم الأول في أن القدرة على إعادة التحام قطع الحمض النووي ذو النهايات اللزجة Sticky ends أو الحادة Blunt ends على حد سواء، إضافة لاحتياجه للعامل المساعد ATP لإتمام عمله. ونظراً لعزل المورثات المشفرة لهذه

Molecular Biology Dr. Ismail Al-Mohamed

الأنزيمات فقد تم هندستها وراثياً، وأصبح بالإمكان الحصول على كميات كبيرة منه مختبرياً، وبطرائق سهلة نسبياً.

5- أنزيمات تحوير الحمض النووي DNA modifying enzymes

نحتاج في تقنية الهندسة الوراثية الى إجراء تعديل في الحمض النووي، بإضافة أو حذف لبعض النيوكليوتيدات أو إضافة أو حذف بعض الزمر الكيمائية ومن هذه الأنزيمات أنزيم الفوسفاتيز القاعدي Alkaline phosphatase المعزول من بكتريا القولون E. coli أو من أنسجة أمعاء الأبقار ويعمل هذا الأنزيم على إزالة مجموعة الفوسفات الموجودة في النهاية الخامسة لقطع الحمض النووي. تساعد هذه الإزالة في تقليل احتمالية التصاق قطع الحمض النووي اللزجة مع بعضها بعد القطع بالإنزيمات المحددة. أما أنزيم كاينيز متعدد النيوكليوتيد Polynucleotide kinase فإن له القدرة لإضافة مجموعة فوسفات للنهاية الخامسة من قطع الحمض النووي. وهو هنا يؤدي وظيفة معاكسة لأنزيم الفوسفاتيز القاعدي. أما الأنزيم الآخر المهم في عمليات التحوير فهو أنزيم الترانسفيريز Terminal transferase ويطلق عليه أيضاً terminal deoxynucleotidyl transferase (TDT) الذي يقوم بإضافة نيوكليوتيد أو أكثر للنهاية الهيدروكسيلية الثالثة لقطع الحمض النووي

6- أنزيمات إزالة الانطباق Topoisomerase

تعمل هذه الأنزيمات على إزالة البرم (الحلزنة) من أنواع الحمض النووي DNA شديد الانطباق Supercoiled DNA. ونظراً إلى أن عملية تضاعف هذا الحمض النووي أو تصنيعه تحتاج أولاً لإزالة الانطباق الشديد لتسهيل عمل أنزيمات البلمرة لذلك فإنه يتطلب أولاً إزالة الانطباق من سلسلتي الحمض النووي DNA ويتم ذلك بوساطة أنزيمات إزالة الانطباق أو الحلزنة.

وقد اكتشف نوعان من الأنزيمات التي لها علاقة بهذه العملية منذ العام 1971 سميت هذه بأنزيم Topoisomerase I و Topoisomerase II. تقوم هذه الأنزيمات بوظيفة قطع وغلق السلسلة المزدوجة Double helix مما يؤدي إلى إزالة الانطباقات الشديدة مؤدية إلى الحصول على حمض نووي مزدوج حلقي غير محلزن. تعمل هذه الأنزيمات على التخلص من الانطباقات من خلال كسر آواصر السكر-فوسفات المؤلفة للعمود الفقري لشريط واحد مفرد والتآصر مع النهايات المفتوحة في هذا الموقع والتحرك بعكس اتجاه البرم أو الالتفاف أو الانطباق حيث تنتهي العملية بإزالة البرم في هذا الموقع. يقوم بهذه المهمة الأنزيم الأول فيما يقوم الأنزيم الثاني Topoisomerase II أوما يدعى Gyrase بلحام نهايات الشريط مرة أخرى. ويذكر أن هذه العملية تحصل في كل موقع يحتوي على برم أو انطباق وعلى ذلك فأنه يتم كسر ولحام مناطق مختلفة من الحمض النووي لإزالة البرم كلياً. وعلى الرغم من أهمية هذه الأنزيمات إلا أنه لا تستخدم إلا بحدود ضيقة في مجالات الهندسة الوراثية، وذلك لأن الشركات العالمية أصبحت تزود المختبرات بنواقل بلازميدية plasmid vectors جاهزة للعمل.

Molecular Biology Dr. Ismail Al Mohamed

الفصل السادس

الواسمات الجزيئية Molecular makers، وتقانة التفاعل المتسلسل للبوليميراز (PCR)

1- مقدمة

أن معرفة العلاقات الوراثية بين مختلف مجاميع الكائنات الحية، وتعريف الأنواع أمر أساسي وهام لإدراك النشأة التطورية لهذه الكائنات، وفهم البيئة التي تعيشها تلك المجاميع كي نتمكن من إدراك أهميتها الاقتصادية، وكيفية إدارتها بالشكل الأمثل. ولإدراك هذا المقصد، يتزايد الاعتماد على المؤشرات الجزيئية Molecular markers، نظراً لبعض العيوب في الطرائق التقليدية. فظروف نمو الكائن الحي بأطواره المختلفة والظروف البيئية المحيطة به، والاختلاف في المراحل التطورية للعوائل، يمكن أن تجعل تشخيص المعضلة البيولوجية قيد الدراسة غير دقيق. بالإضافة إلى أن الطرائق التقليدية تتطلب غالباً وقتاً طويلاً للحصول على النتائج المرجوة للكشف عن السمات الشكلية/المورفولوجية.

كان إجراء الأبحاث على الحمض النووي DNA قبل سبعينيات القرن الماضي، يشوبه الكثير من التعقيد والعقبات التي واجهت علماء الوراثة والكيمياء. حيث كانت معظم الأبحاث تجرى بشكل غير مباشر على الحمض النووي الريبوزي RNA أو البروتين. وبالتالي، فإن دراسة نشوء وتطور وتصنيف الكائنات الحية اعتمد -بداية-على الصفات الشكلية الظاهرية، وقد قادت الملاحظات الناتجة عن ذلك في دراسة التباين بين المتعضيات الحية، من خلال التقدم في التقانات الكيموحيوية Biochemical techniques التي شهدها علم البيولوجيا الجزيئية، وذلك من خلال الفروق فيما بين عمليات التخمر، وإنتاج السكريات، والبروتين وشابهات الإنزيمات (Isozymes).... الخ. ورغم إسهام هذه التقانات بشكل كبير في تطور تصنيف بعض الكائنات من بدائيات النوى كالبكتريا، وبعض حقيقيات النوى كالخمائر، إلا أنها كانت أقل قدرة وفاعلية في مجال تصنيف الكائنات الراقية من حقيقيات النوى، حيث لم تزودنا بالمعلومات الكافية في مجال نشوء وتطور أنواع وسلالات تلك الكائنات، والتمييز بينها بمعايير أكثر دقة ومصداقية.

ومع تقدم الأبحاث المتعلقة بفحص الحمض النووي الـDNA، وتطور علم الأحياء الجزيئي Molecular Biology، استخدمت الواسمات الجزيئية Molecular markers بتقنيات مختلفة في عديد من الدراسات لتمييز التباين بين الكائنات المسببة للأمراض النباتية و عزلاتها المختلفة ووصفها. وقد استخدمت هذه الواسمات للتحري عن التنوع في مجتمعات الممرضات، والأنماط/السلالات المرضية، والأنماط التزاوجية، ونظم الخرائط الوراثية، ونشأة الأوبئة والتكيّف مع النبات العائل. وقد استخدمت هذه التقنيات ليس فقط في دراسة الممرضات النباتية، ولكن على عوائلها أيضاً، حيث سمحت تقنيات الواسمات الجزيئية بالكشف المباشر عن تسلسل الحمض النووي الخاص بالكائنات الحية، والذي لا يتأثر بتنوع العوامل البيئية، مما اتاح التعامل المباشر مع جينات المحاصيل الزراعية وإعادة ترتيبها على النحو الذي يضمن إنتاجية أكبر، وإضافة بعض الصفات المرغوب فيها.

ويعتبر إدخال التقنيات الحديثة المعتمدة على التفاعل المتسلسل للبوليميراز Polymerase Chain Reaction (PCR) كواسمات جزيئية ذو أهمية بالغة في زيادة فاعلية نشاط علم البيولوجيا الجزيئية، حيث كان لبساطة التعامل مع هذه التقنيات، واستخدام مناطق مخصصة من مجين Genome الكائن الحي، أهمية بالغة في تقدم معرفتنا بالمجاميع التصنيفية والتاريخ التطوري للأنواع والعلاقات الوظيفية التي تجمع بينها.

Molecular Biology Dr. Ismail Al-Mohamed

2- استخدام مشابهات الإنزيمات كواسمات جزيئية

تعرف مشابهات الإنزيمات Isozymes (Isoenzyme) على أنها أشكال جزيئية مضاعفة من أنزيم واحد، وهذه الأشكال عادة متشابهة ولكنها ليست متطابقة، أي أن مصطلح الأيزو أنزيمات يعبر عن أي مجموعة من الأنزيمات والتي تقوم كل منها بنفس العمل (أي بتسريع التفاعل نفسه). ويعزى الاختلاف في خواص Isozymes – رغم قيامها بعمل واحد- إلى اختلاف تركيبها البروتيني سواء التركيب الأولي أي المحتوى من الأحماض الأمينية، أو التركيب الثالثي والرابعي أي البنية الفراغية لجزئ البروتين.

ويعتبر تحليل Isozymes من التقانات الجزيئية الحيوية الهامة، لما يمثله من تطبيقات عديدة في مجال أمراض النبات. وقد تم تبني هذا الإجراء-من قبل الباحثين-بشكل روتيني في حل الخلافات التقسيمية ما بين الأنواع الفطرية، وتعريف المزارع الجديدة وتحليل الاختلافات الوراثية واقتفاء سير انتشار الممرضات، وتتبع الإنعزالات في المواقع الوراثية التي يحتلها الجين في الصبغي (Genetic loci)، ومعرفة مستوى تضاعف الصبغيات Ploidy levels للفطريات وغيرها من المسببات المرضية.

يُعَدُّ اختيار العينات وتحضيرها من أكثر الخطوات أهمية وحساسية لنجاح التحليل الأنزيمي، حيث تعتمد دقة ونوعية المعلومات الوراثية المستقاة من التجربة على حسن اختيار العينات والعناية الفائقة في تحضيرها، وذلك لكي نتفادى عدم وضوح وقلة تركيز مواد الصبغ أو غياب الحزم وظهور حزم شاذة لا تمثل الواقع وهذه المشاكل تتأتى من عدم اختيار المحلول المنظم المناسب وتطبيق طريقة غير مناسبة للاستخلاص.

وتستخدم مواد صبغ محددة؛ حيث تعمل على الأنزيمات النشطة، لذا يجب تجنب تغيير طبيعة الأنزيم في خلال تحضير العينات وبعده. ويجب حفظ العينات عند درجات حرارة لا تتجاوز 4° س في خلال التحضير والتخزين، ويمكن أن تترك مجمدة عند درجة 80°- س لمدة عام، وذلك يتفاوت حسب النوع المدروس، ومن الخطورة تكرار تجميد وتذويب العينات حيث يؤدي إلى فساد الخواص الطبيعية للأنزيم. ويجب توخي الحذر من عدم ترسب الأنزيمات نتيجة الأخطاء في تحضير المحلول المنظم، وقوته الأيونية وتغير درجة الحموضة، وعادة يستخدم محلول منظم Tris-HCl (0.01to 0.1 M pH 6.8 to 7.5)و تضاف عوامل مخلبية ومثبطات لأنزيمات تحلل البروتين ومثبتات أنزيمية لزيادة درجة إيضاح النتائج، وذلك مثل: Ethylenediaminetetraacetate (EDTA)، Polyvinylpyrollidone، Dithiothreitol، Phenylmethanesulfonyl fluoride (PMSF) والعديد من هذه الكواشف مواد شديدة السمية، لذلك يجب أخذ احتياطات الأمان الكاملة عند التعامل معها، وهنالك العديد من المواد الأخرى تضاف حسب ظروف التجربة بغية تحسين الأداء.

تستخدم العديد من تقنيات الرحلان (التفريد) الكهربائي Gel electrophoresis المختلفة بغية فصل مشابهات الإنزيمات، تتضمن جيل النشا والبولي أكريلاميد جيل وغيرها، ويتطلب تعريف ورؤية الأنزيمات وجود مواد صبغ فعالة ومحددة وهذه تعمل في وجود الأنزيمات النشطة والطبيعية (Nondenatured enzymes) ولهذا السبب يجب تجنب استخدام طريقة SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) في الترحيل الكهربائي والتي تعمل على تعطيل البروتين من خلال مادة Sodium dodecyl sulfate (SDS). ومن المعروف أن مشابهات الإنزيمات تظهر على الجيل من خلال التفاعل مع مواد صبغ معينة.

Molecular Biology Dr. Ismail Al-Mohamed

2-1- من تطبيقات تحليل مشابهات الأنزيم في تصنيف الفطريات

تستخدم طريقة تحليل مشابهات الإنزيمات Isozymes بكثرة للأغراض التقسيمية، وخاصة في حالة التنوع الشكلي للفئة التصنيفية. وعادة تتميز الأنواع الفطرية بسهولة من خلال التفريد الكهربائي، حيث يتم وضع توصيات حول فصل أو جمع الأنواع وتحت الأنواع، وتقود قدرة تحليل مشابهات الإنزيمات على التمييز بين الأنواع وتحت الأنواع في تطبيقها على الممرضات النباتية، حيث نستطيع من خلال هذه الطريقة التعرف على الممرضات غير المعروفة وعمل بصمة (Fingerprint) لنظام مكونات البروتين للسلالات الهامة، والذي نحصل عليه بعد التحليل المائي للإنزيمات، وسرعة ودقة التعرف على الممرضات تمكنا من السيطرة عليها ومنع حدوث خسائر اقتصادية. ويعتمد التعرف على الممرضات النباتية والحيوانية على تمييز المواقع الفريدة الأحادية للجينات على الصبغيات، والتي لا تتغير ضمن النوع أو تحت النوع، وهذا يتحدد عن طريق فحص أعداد كبيرة من العزلات، ومن مدى جغرافي واسع، ولأنظمة أنزيمية مختلفة، واختيار المواقع التي لا تظهر تباين ضمن الأنواع وعند التفريد الكهربائي يجب أن نقارن بسلالة قياسية من الممرض المشتبه به.

ويستخدم تحليل مشابهات الإنزيمات للتعرف على وجود العديد من الممرضات في الإصابة المختلطة؛ وهذا الإجراء يفيد أيضاً في تعريف فطريات الميكورهيزا. وتعتمد البصمة الأنزيمية لسلالات محددة على وجود مواقع وراثية عديدة المظاهر الشكلية Polymorphic loci ضمن النوع، ويجب تحديد أليل Allele أو اتحاد لمجموعة من الأليلات Alleles والتي يجب أن تكون فريدة ومميزة لكل سلالة بعينها. وتعتبر الأنزيمات التي تعبر عن درجات اختلاف وتنوع عالية مثل: peroxidases, esterases, phosphatases مفيدة لمثل هذا التطبيق.

وقد وجد أنه يمكن التمييز حتى ضمن السلالات القريبة النسب من بعضها من الفطر *Agaricus bitorquis* من خلال ملاحظة اختلاف شكل الحزم Banding patterns لكل من alcohol dehydrogenase, polyphenol oxidase, esterase, peroxidase.

وقد تم التعرف والتمييز ما بين العديد من سلالات فطر عيش الغراب التجاري، وعوامل المكافحة البيولوجية، وفطريات الميكورهيزا، عن طريق البصمة الإنزيمية لتحليل مشابهات الإنزيمات.

وبخلاف البكتريا والخمائر من حيث تطور تعريفها وتقسيمها، فإن التقنيات الكيموحيوية لم تستخدم بشكل تام ومطلق في تعريف وتصنيف الفطريات الهيفية (الخيطية) الشكل، لذلك، كان التحول من الاعتماد على الاختلافات المورفولوجية نحو الدلائل الجزيئية من الأمور الهامة في تصنيف الفطريات. وبالرغم من أن تحليل مشابهات الإنزيمات Isoenzymes أقل كلفة وسهولة بالمقارنة مع تقانات البيولوجيا الجزيئية التي تستخدم في تعريف السلالات مثل RFLP, AFLP, RAPD. ولكن من سلبياتها أنها متغيرة بتغير الظروف المحيطة بالتجربة، والبيئة النامي عليها الفطر، وتتأثر بتطور عمر الكائن المدروس.

Molecular Biology Dr. Ismail Al-Mohamed

3- اســـتخدام دلائل الحمض النووي Molecular markers DNA في دراســـة الكائنات الحية

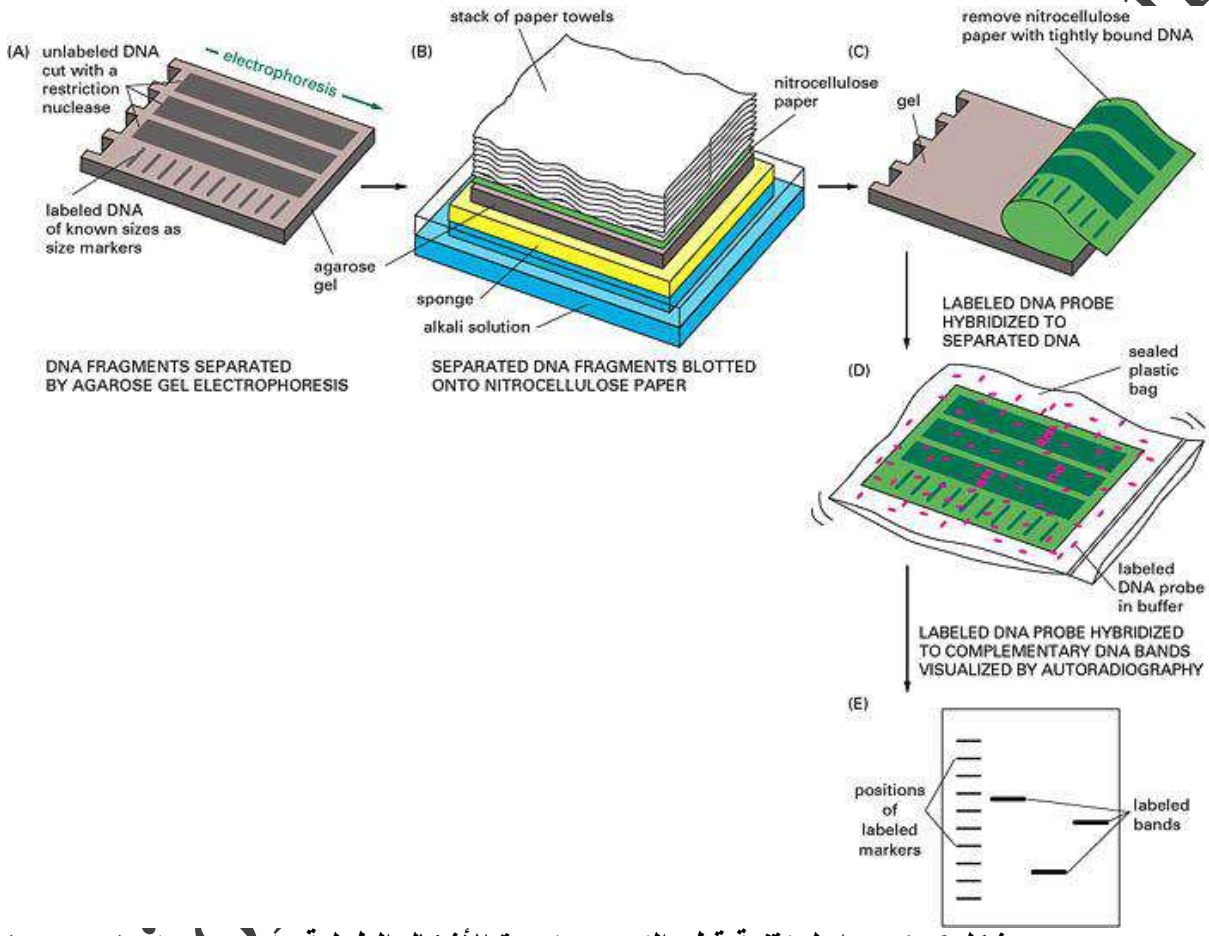
تُعد بصمة الحمض النووي Fingerprint technique DNA من التقنيات المستخدمة في دراسة تباين أو تماثل القرابة الوراثية بين أفراد الكائنات الحية، وتعتمد هذه الطريقة على معرفة التتابعات التكرارية tandem repeats للقواعد الأزوتية خلال صبغي سلالة الكائن المدروس، وذلك للتعرف على مدى التقارب أو الاختلاف بين هذه السلالة والسلالات المُعَرَّفة. وتتواجد هذه التتابعات في تعدد شكلي polymorphism . ويدعى هذا التعدد الشكلي بالتعدد الشكلي الترادفي التكراري البسيط simple tandem repeat polymorphism (STRP)، لأن التباين الوراثي ضمن جزيئات DNA يتكون من عدة نسخ قصيرة التسلسل يمكن أن تتكرر عدة مرات في تراتف معين على موقع محدد من الصبغي في المجين (الجينوم). ويمكن أن تختلف STRP الموجودة على مواقع مختلفة في تسلسلها وطولها لكل وحدة متكررة. بالإضافة انها تختلف في العدد الأقصى والأدنى من النسخ الترادفية التي تحدث في جزيئات الحمض النووي DNA في المجتمع المدروس. وغالباً ما تدعى STRP ذات الوحدة المتكررة من 2-9 زوج قاعدي (bp) بالتعدد الشكلي الطولي التسلسلي البسيط Simple Sequence Length Polymorphism (SSLP), أو Microsatellite. بينما غالبا ما تدعى STRP ذات الوحدة المتكررة من 10-60 زوج قاعدي (bp) بالعدد المتباين من المكررات الترادفية Variable Number of Tandem Repeats (VNTR) أو Minisatellite.

3-1- قطع التحديد (التقييد) متعددة الأشـــكال الطولية (RFLPs): Restriction Fragment Length Polymorphism

تدل تقنية (**RFLPs**) على التباين بين أفراد الكائنات الحية في حجم قطع الحمض النووي DNA التي تقطعها إنزيمات تحديد معينة؛ وتستخدم التباينات الشكلية التي تنتج عنها كواسمات على خرائط الارتباط الوراثي. فعندما يضاف الإنزيم القاطع إلى الحمض النووي DNA فانه يُقطِّعه إلى عدة قطع. وكل قطعة مقطوعة بالإنزيم تسمى قطعة محددة. ويختلف طول هذه القطع على حسب المسافة التي بين كل مقطع وأخر. ولكن يجب أن تكون كل قطعة محددة لها نفس الحجم في كل نوع من الكائنات الحية على حدة. ويمكن التأكد من ذلك بتحليل قياس لهذه القطعة بتقنيه الرحلان الكهربائي electrophoresis على الهلام.

Molecular Biology Dr Ismail Al-Mohamed

تستخدم هذه الطريقة لدراسة الحمض النووي DNA للنواة أو للميتوكوندريا عن طريق استخلاص الحمض النووي ثم يجزأ باستخدام إنزيمات القطع Restriction enzymes إلى قطع عند مناطق محددة. ويختلف حجم القطع الناتجة من الحمض النووي، حيث يتم التعرف عليها عن طريق الرحلان الكهربي electrophoresis وبعد تمام فصل هذه القطع من الحمض النووي يتم تهجينها مع حمض نووي لكائن معروف (بكتريا- بكتريوفاج)، ثم يكشف عن الحمض النووي المستنسخ المعلم بطريقة Southern Blotting شكل (6-1).



شكل 6-1. مراحل تقنية قطع التحديد متعددة الأشكال الطولية (RFLPs) (عن)

A : يفصل مزيج قطع DNA المزدوجة السلسلة والمتولدة عن المعاملة بإنزيمات القطع وذلك حسب طولها عن طريق الرحلان الكهربائي

B : توضع طبقة من غشاء النتروسيللوز أو النايلون فوق الهلام (الجيل) يتوسطها طبقة من الإسفنج في محلول قلوي ويعلوها مجموعة من ورق النشاف تضمن مرور المحلول القلوي المنظم عبر الجيل حيث يغير من طبيعة قطع الحمض النووي المزدوج السلسلة ويجعله أحادي السلسلة Single-stranded fragment والتي تلتصق بثبات على غشاء النتروسيللوز.

C : يسحب غشاء النتروسيللوز بحذر من على الهلام.

D : يوضع الغشاء النتروسيللوزي في كيس بلاستيكي محكم الإغلاق، ويحتوي على محلول منظم بالإضافة إلى تتابع حمض نووي DNA معلم إشعاعيا (probe) لتسلسل الحمض النووي المطلوب معرفته، ويجب أن تستمر مدة التهجين المدة المطلوبة وتحت الظروف المفضلة.

Molecular Biology med

E : ينزع الغشاء من الكيس البلاستيكي ويغسل تماما، وبذلك تتبقى فقط جزيئات الحمض النووي المعلم Probe التي نجحت في التهجين مع الحمض النووي المفرد السلسلة، وبعد التصوير الإشعاعي الذاتي تظهر جزيئات DNA-التي هجنت مع الحمض النووي المعلم labeled probe – كحزم Bands على الأتوراديوغراف.

3-2- التفاعل المتسلسل للبوليميراز Polymerase Chain Reaction (PCR)

تقوم الخلية بمضاعفة كمية الحمض النووي وقت انقسام الخلية بشكل تلقائي وسريع مع وجود نظام تصحيح للأخطاء خلال عملية النسخ. وقد تصل سرعة النسخ والمضاعفة إلى 1000 قاعدة بيتروجينية / الثانية (داخل النظام الحيوي). ومع التطور في مجال التقانة الحيوية والذي يقوم على التعامل مع الحمض النووي (DNA) بشكل أساس، استدعى 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 الانقسام المستمر بإضافة عوامل النمو Growth Factors، ولكن لم تكن هذه الطريقة ذات جدوى لدى العلماء لأسباب كثيرة، إلى أن قام العالم الأمريكي Kerry Mullis في عام 1985 بنشر اختراعه لتقنية التفاعل المتسلسل للبوليميراز (PCR) فكانت البوابة لكثير من التطورات المتسارعة في مجال التقانة الحيوية، ومن أهم الأسباب التي ساعدت هذه التقنية على الانتشار هو عدم اعتمادها على النظام الحيوي (الخلية)، والتحكم بكمية الحمض النووي DNA والسرعة في الإنتاج، ولكن من عيوب هذه التقنية عدم وجود نظام إصلاح عند حدوث أي ارتباط خاطئ Miss match.

وتقنية (PCR) هي عملية تقوم على إكثار نسخ الحمض النووي (DNA) خارج النظام الحيوي. أي أنها طريقة لاستنساخ قطعة محددة من الحمض النووي ومضاعفة انتاجها لكي يسنى إجراء اختبارات جزيئية إضافية.

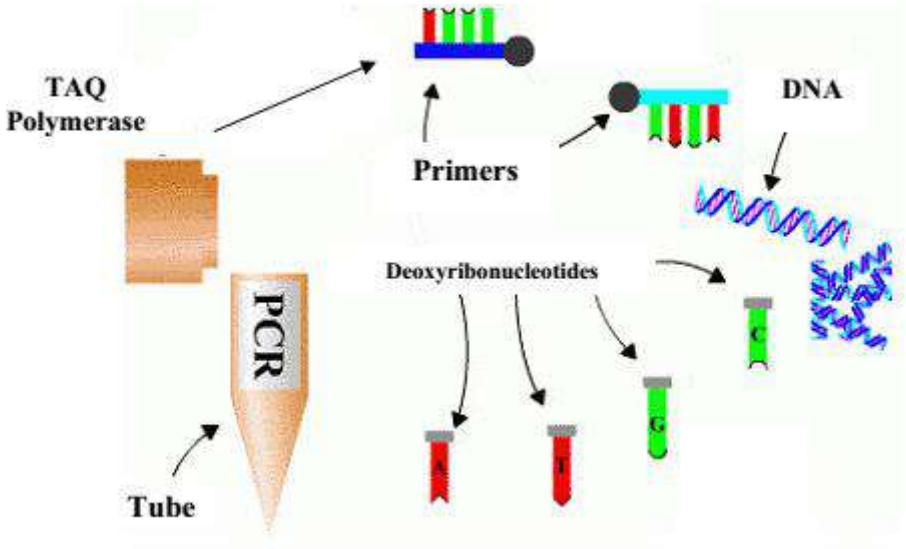
3-2-1- متطلبات تقنية PCR

يتطلب أمر انتاج الحمض النووي (DNA) بوساطة PCR توفير الاحتياجات الأتية:

1- جهاز التحكم في درجات حرارة التفاعل (Thermo-cycler)، حيث يقوم هذا الجهاز بتغيير درجة الحرارة بشكل سريع وفق برنامج زمني محدد، لأن تغيير درجة الحرارة هو الأساس الذي تقوم عليه مبدأ عمل الجهاز.
2- أنزيم DNA Polymerase لبناء وترتيب القواعد الأزوتية (وحدات الحمض النووي DNA)، ويجب أن يكون هذا لأنزيم مقاوماً لدرجات الحرارة العالية، ويعد أنزيم *Taq* polymerase المستخرج من بكتريا الينابيع الساخنة *Thermus aquaticus* من الأنزيمات المقاومة للحرارة العالية.
3- القواعد الأزوتية (A C G T) ليتمكن الأنزيم من ترتيبها في مواقعها أثناء عملية نسخ الحمض النووي (DNA).
4- البادئ Primer وهو عبارة عن قطعة صغيرة من الحمض النووي (DNA) كي يبدأ الأنزيم البناء والنسخ عليها.
5- عينة الحمض النووي DNA المراد نسخه.

Molecular Biology Dr. Ismail Al-Mohamed

6- محلول منظم Buffer Solution وهو محلول ملحي يستعمل في العمليات الكيميائية الحيوية يساعد على الاحتفاظ بتركيز أيون هيدروجين المحلول المضاف اليه ثابتاً في حدود معينة وذلك عتد لإضافة حامض أو قلوي إليه. (شكل 6-2)

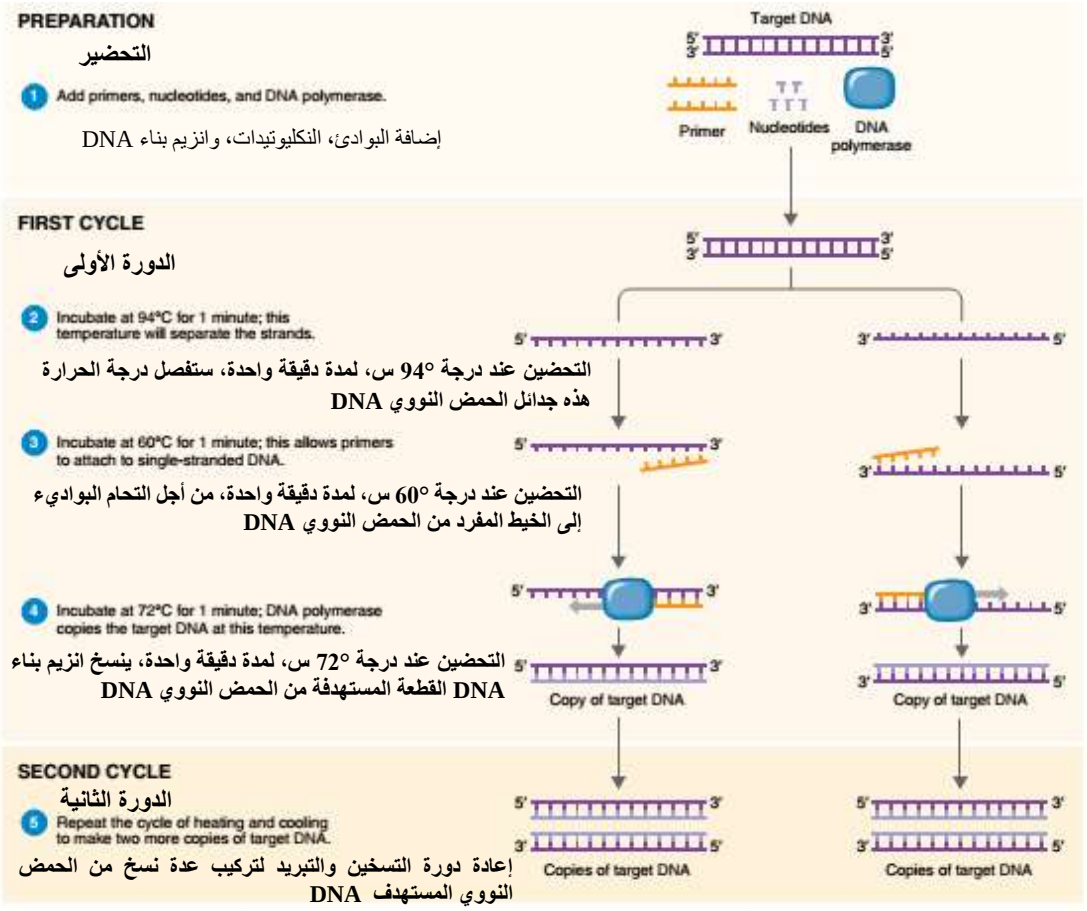


شكل 6-2. متطلبات تفاعل المتسلسل للبوليميراز PCR (عن عبيدة ومحمود، 2008)

وبشكل عام، تقنية PCR هي سلسلة من عمليات التسخين والتبريد التي تسمح بزيادة تركيز جزء صغير من الحمض النووي المعزول من كائن حي معين وتتم وفق تسلسل الخطوات التالية:

1)- تحضين أولي Initial incubation: مدته 3 دقائق عند 94˚س؛2)- فصل سلسلتي الحمض النووي DNA (DNA Denaturation): مدته 20 ثانية عند 94˚س؛ 3) التحام البادئة على إحدى السلسلتين (Annealing): مدته دقيقة واحدة عند 60˚س؛ 4)- الاستطالة Extension: مدتها 23 ثانية عند 67˚س ؛ 5) إعادة المراحل 2 ، 3 و4، 35 مرة؛ 6) تحضين نهائي (Final incubation): مدته 4 دقائق عند 72˚س. ويتم استخدام هلامة من الـ polyacrylamide لفصل نواتج الـPCR بوساطة الرحلان الكهربائي Gel electrophoresis (شكل 6-3)

Molecular Biology Dr. Isma named



شكل 6-3. مخطط تضاعف الحمض النووي DNA بتقنية التفاعل المتسلسل للبوليميراز(PCR) (عن Tortora *et al.*, 2019**)**

ومن المعروف ان تفاعل PCR ينتج عنه منحنى تضاعدي متضاعف بصورة أسيَّة (Exponential) أي ان النسخة الواحدة من جزيء ال DNA يتم تضخيمها بصورة تضاعفيه لتصبح نسختين والنسختين يصبحوا أربع والاربع نسخ يصبحوا ثمان والثمان يصبحوا ست عشرة نسخة وهكذا.

3-3- التفاعل المتسلسل للبوليميراز بالزمن الحقيقي (اللحظي) Real-Time PCR

يُعدّ التفاعل المتسلسل للبوليميراز بالزمن الحقيقي (اللحظي) Real-Time PCR الشكل المُعَدل من تفاعل PCR التقليدي الشائع؛ فهو أيضاً تفاعل كيميائي ينتج عنه تضاعف وتزايد في اعداد نسخ شرائط DNA، ولكن يتم مضاعفة الحمض النووي في وجود كاشف من إحدى الصبغات أو المجسات المشعة التي تساعد في رصد هذه العمليات لأجل اعطاء تقرير مفصل عن عدد الدورات وما يقابلها من تزايد وتضخم لنسخ الجين المستهدف.

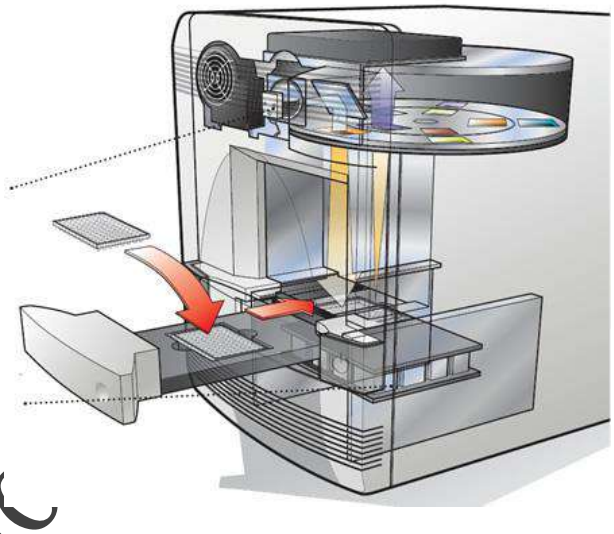
هناك العديد من الطرق التي نستطيع من خلالها متابعة ورصد تضاعف الـDNA في العينة، اذ تستعمل المعلمات المضيئة (Fluorescent markers) للارتباط مع DNA المتضاعف،

Molecular Biology Dr. Ismail Named

وكلما زادت اشرطة DNA المنسوخة زاد استعمال الصبغة المشعة. واستعمال هذه التقنية المعدلة مفيد جداً؛ بسبب القدرة على مشاهدة عمليات التضاعف والاستغناء عن عملية التحليل باستخدام الرحلان الكهربائي Electrophoresis لجزيئات الـ DNA في الأجاروز.

3-3-1- التركيب الخاص بال Real time PCR :

يتكون الجهاز بصفة عامة من 3 أجزاء رئيسة؛ وحدة التحكم الحرارى (Thermocycler) وهي تشبه جهاز ال PCR العادي وهى المسؤولة عن عمل التضاعف Amplification .اما التعديل Modification الذى حدث على ال Real-time PCR زيادة عن ال PCR العادي هو ان جهاز Real-time PCR موجود فيه Light Source إضافة إلى ألة للتصوير (كاميرا). مصدر الطاقة الضوئية Light Source وهو المسؤول عن توجيه طاقة ضوئية الي العينة بحيث ينتج عن ذلك انبعاث وميض لونى fluorescent او اضاءة معينة يتم قياسها من خلال ألة التصوير الخاصة حيث تقوم بتصوير وتتبع عملية التضاعف الـ Amplification للجين المراد قياسه او الكشف عنه (شكل 6-4).



شكل 6-4. جهاز تفاعل المتسلسل للبوليميراز بالزمن الحقيقي (اللحظي) Real-Time PCR

تشمل محتويات التفاعل اضافة مواد خاصة مثل الفلوروكروم، وهى عبارة عن مادة تمتص الضوء النافذ من مصدر الضوء light source الموجود بجهاز ال Real-time PCR بحيث تمتص اطوال موجية محدده ثم تقوم بإصدار انبعاثات طيفية لها ايضا اطوال موجية محددة تتمكن من خلالها الكاميرا من اجراء عملية القياس (Detection). وترتبط جزيئات الفلوروكروم بشرائط ال DNAالذى تم تضاعفه اثناء التفاعل و التي تقوم بامتصاص الضوء واطلاق انبعاثات طيفية ذات اطوال موجية محدده بحيث تقوم الكاميرا الخاصة بتصوير ذلك وبناء علية يمكن تتبع عملية التضاعف (Amplification) التى تمت للجين المراد الكشف عنة ويوجد نوعين من الفلوروكروم Fluorochromes متخصص Specific مثل TaqMan وغير متخصص Non specific مثل SYBR green (شكل 6-5).

Molecular Bio Ismail Al-Mohamed

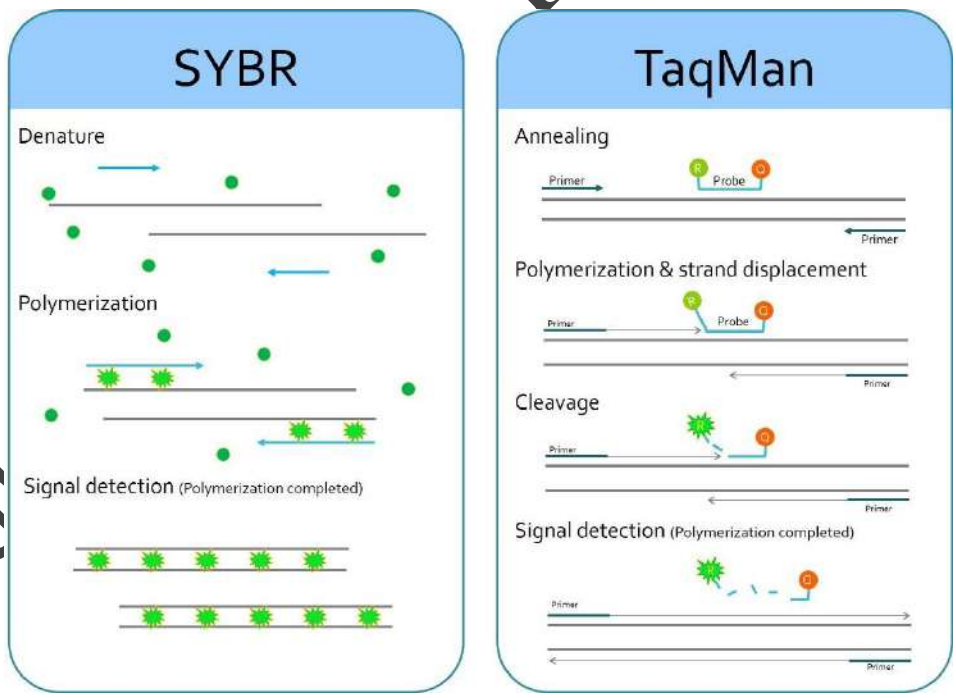
3-3-2- اهم الكواشف التي تساعد في رصد تضاعف الـ DNA بوساطة Rt-PCR

1-الصبغات المضيئة (Fluorescent dyes)

ان استعمال الصبغة المضيئة في تقنية Rt-PCR يعتبر الارخص والابسط لرصد التضاعف؛ حيث ان ارتباط هذه الصبغة يتزايد مع تزايد اشرطة DNA المزدوجة المنسوخة حديثا، لكن غير المفيد في هذه الطريقة هو ان الصبغة ترتبط مع اي تضاعف لأشرطة DNA بدون تخصص (Non-Specificity) للجين المطلوب.

2-المسبار (المجس) المشع (Fluorescent probes)

المسبار المشع هو قطعة من DNA متممة للجين المطلوب تضخيمه وتكاثره، حيث تكون مُعلمة بالصبغة المشعة. يُعد التاكمان (TaqMan) هو المسبار الابسط والاكثر شيوعاً، حيث يتكون من قطعة من الـ DNA تحتوي على جزيء (fluorophore) أو Reported مشع في أحد الأطراف، وجزيء (Quencher) ماص للإشعاع في طرفها الاخر (تمتص الاشعة المنبعثة من الجزيئة الباعثة للإشعاع (Fluorophore). لذلك، فان الاشعاع المنبعث من المسبار يكون منخفض او ضعيف في الظروف الطبيعية عندما يعمل الجهاز وتبدأ اشرطة الDNA بالتضاعف يبدأ المسبار بالارتباط مع الجين المطلوب لكن سرعان ما ينشطر بفعل انزيم البوليميريز (Polymerase) لذلك فان Quencher , Fluorophore سوف ينفصلان فيزيائيا ثم سيتزايد انبعاث الاشعاع بسبب ابتعاد Quencher عن Fluorophore (Reported) حيث يبدأ الاخير بالإشعاع بصورة طبيعية (شكل 6-5).



شكل 6-5. نوعا الفلوروكروم Fluorochromes المتخصص Specific مثل TaqMan وغير المتخصص Non specific مثل SYBR green المستخدمة في تفاعل Rt-PCR.

Molecular
Ismail Al-Mohamed

3-3-3- الفرق بين ال Real-time PCR وال PCR التقليدي

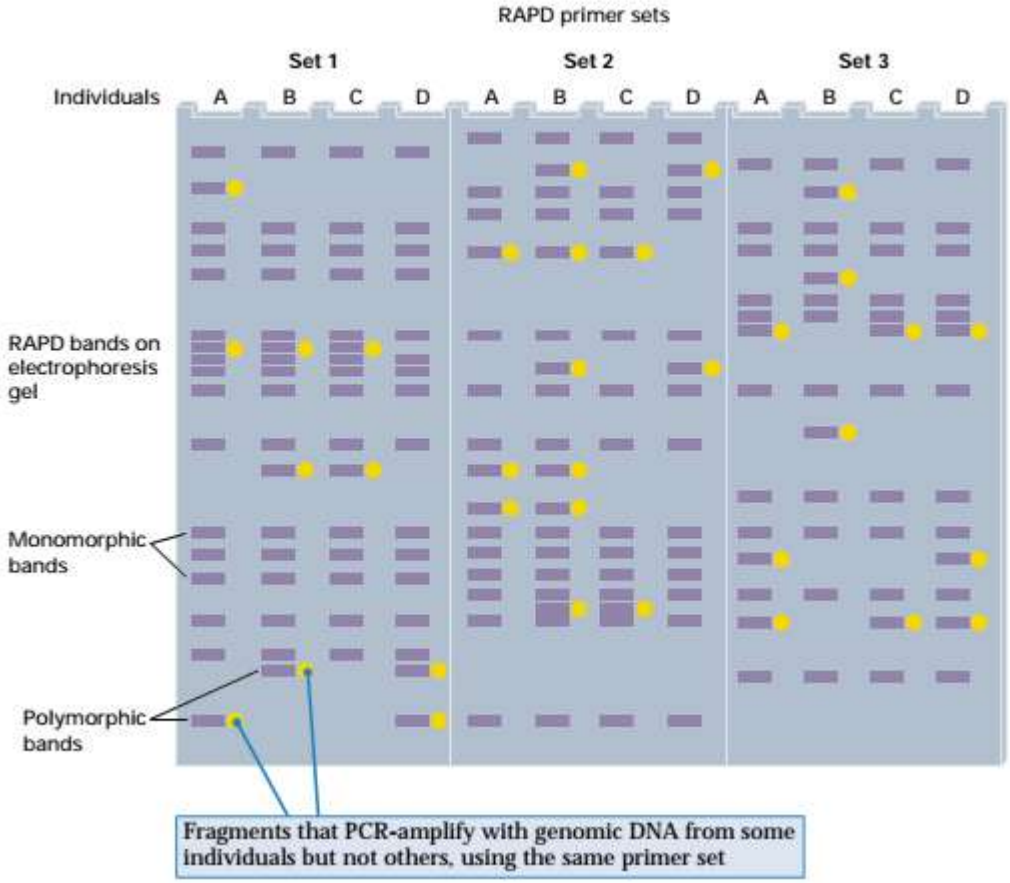
يُعَدُّ تفاعل Real-time PCR هو صورة معدلة من PCR العادي أو التقليدي حيث أن PCR العادي يتم من خلاله تضاعف DNA فقط بدون معرفة عدد النسخ التي تم تضاعفها اثناء اجراء التفاعل، اما في حالة Real time PCR فيمكن عمل تتبع لخطوات التفاعل وعمل تحليل كمي لحظي (Detection and Quantification) بحيث يمكن معرفة حجم النسخ من الـ DNA التي تم استنساخها اثناء تفاعل PCR.

3-4- أهم تقنيات تحليل تباين الحمض النووي الشائعة المعتمدة على PCR

3-4-1- تقنية التباين في شكل الحمض النووي DNA المستكثر عشوائيا(RAPD) Random Amplified Polymorphic DNA

تتطلب تقنية RFLP سالفة الذكر، والتي تنتج مؤشرات وراثية genetic marker غير معتمدة على تفاعل PCR الكثير من الوقت والجهد وإلى جود حمض نووي مستنسخ مُعلم شعاعياً، مما حدى بالباحثين إلى تطوير تقنية سريعة وموثوقة تعتمد على PCR، تدعى تقنية التباين في شكل الحمض النووي DNA المستكثر عشوائيا (RAPD) . في هذه الطريقة يستخدم مجموعة من بادئات Primers (بحدود 10-8 نكليوتيدات) عشوائية التسلسل. وتستعمل البادئات العشوائية زوجياً في تفاعلات PCR، بغية مضاعفة قطع من DNA لجينوم الكائن المستهدف. وكون البادئات المستخدمة في هذه التقنية قصيرة جداً، فإنها غالبا ما تلتحم إلى DNA جينوم الكائن في مواقع متعددة. من ضمن مجموعة القطع المتضاعفة هناك البعض يتضاعف لدى بعض عينات DNA ولكن لا يتم التضاعف لدى عينات البعض الأخر ويدل ذلك على أن وجود أو عدم وجود القطع المتضاعفة هو تعدد أشكال (polymorphic) في مجتمع الكائنات الحية المدروسة (شكل 6-6)

Molecular Biology Dr. Ismail Al-Mohamed



شكل 6-6. التباين في شكل الحمض النووي DNA المستكثر عشوائيا(RAPD)

وبالتالي يمكن الكشف عن التغيرات التي تحدث في الحمض النووي بالأسلوب نفسه المتبع في تقنية تكثيف الحمض النووي PCR. وتتميز هذه الطريقة بإمكانية استخدام كميات ضئيلة من الحمض النووي DNA كجرثومة وحيدة، أو نموات هيفية فطرية تعرضت للتخزين لفترات طويلة.

وعلى سبيل المثال، قدرت الاختلافات الوراثية بين تسع وثلاثين عزلة من الفطر *Fusarium oxysporum* f.sp. *ciceris* باستخدام (RAPD)، خمس وثلاثين من هذه العزلات كانت قد جمعت من ثماني محافظات مصرية، في حين استخدم مستخلص الحمض النووي لثلاث عزلات من سورية وواحدة من لبنان. أظهرت نماذج العصابات المتولدة bands من هذه العزلات باستخدام ستة بادئات عشوائية مستويات مختلفة من الاختلاف الوراثي بين العزلات من المواقع الجغرافية المختلفة بالنسبة للعزلات المصرية، في حين تجاوزت نسب التشابه بين العزلات السورية 90%.

وكذلك، استخدمت هذه التقنية لمعرفة مدى الاختلاف الوراثي فيما بين عزلات الفطر *Phytophthora colocasiae* المسبب لمرض لفحة أوراق القلقاس، والمعزولة من مناطق جغرافية متباينة في كل من دول اندونيسيا، الفلبين، تايلاند وفيتنام، بغية وضع استراتيجية ناجعة لمقاومة هذا المسبب المرضي.

ومما سبق يمكن أن يتم اعتماد اختبار RAPD-PCR كطريقة مفيدة لتحليل التباين الوراثي ضمن وفيما بين أنواع وأجناس الكائنات الحية.

Molecular Biology Dr. Mohamed

3-4-2- تقنية التعدد الشكلي لأطوال القطع المضخمة (AFLP) Amplified Fragment Length Polymorphism

تُعَدُ تقنية التعدد الشكلي لأطوال القطع المضخمة (AFLP) Amplified Fragment Length Polymorphism من الواسمات التي تعتمد على القطع بوساطة إنزيمات التحديد ثم التضخيم بواسطة المدّور الحراري، الذي يؤمن الحصول على الكمية الكافية من الحمض النووي DNA لدراسته ومقارنته دون الحاجة لعملية الوسم بالنيوكليوتيدات المشعة التي كانت ضرورية في حالة استخدام الهضم الأنزيمي لوحده. تم اكتشاف أساس هذه التقنية عن طريق الباحثين Zabeau وVos من جامعة Wageningen الزراعية بهولندا وُ مِنحا عليها شهادة براءة اختراع لعام 1993 من المكتب الأوروبي لبراءة الاختراعات، ثم صدر بحث لـ Vos وآخرون سنة (1995)، تم فيه تفصيل تقنية AFLP واستخدامها كبصمة وراثية للحمض النووي DNA.

وتعتمد واسمة AFLP على فكرة دمج مزايا نوعين من الواسمات الجزيئية وهما واسمة الـ RFLP والـ RAPD مما يتيح الحصول على أكبر عدد من التباينات الشكلية والذي هو ناتج بالأساس من عملية قطع الحمض النووي إلى قطع متعددة الأطوال والأشكال وذلك بوساطة إنزيمات التحديد بناءً على فكرة واسمة RFLP إضافة إلى إمكانية الحصول على نفس النتائج عند تكرار نفس التجربة مما يمنح هذه الواسمة صفة الثبات وهي من المميزات المهمة في دراسة التحليل الوراثي للكائنات الحية، كما أن فكرة واسمة RAPD تقوم بعملية تضخيم هذه القطع المتباينة في وقت قصير وبكميات كبيرة عن طريق التفاعل المتسلسل للبوليميراز (PCR) مما يمنح هذه الواسمة السرعة والدقة. تنتج هذه التقنية قطعاً من الحمض النووي DNA متضاعفة بواسطة بادئات خاصة بالهضم التحديدي Restriction digestion لجينوم الكائن المراد دراسته وبالاعتماد على اختلاف ترتيب النيوكليوتيدات تعطي هذه التقنية البصمة الوراثية لأى كائن حي ومن أي مصدر دونما حاجة مسبقة لمعرفة تتابعات حمضه النووي DNA وقراءة البيانات بهذه الطريقة تعتمد على مبدأ وجود أو عدم وجود مواقع الموارثات بدلاً من تحديد موقعها أو طولها، حيث تعتمد الطريقة على هضم الحمض النووي بإنزيمات التحديد وربط ملائمات Adaptors على قطع DNA ثم مضاعفة تلك القطع ويمكن تضخيم أكثر من 100قطعة Fragment لكل توليفة بادئات مستخدمة في الاختبار، وبذلك يتم الحصول على معلومات واسعة جداً بحسب تعدد البادئات المستخدمة، وتمثل كل قطعة تم تشخصيها بهذه الطريقة موقعاً جينياً مميزاً عن غيره، مما يمكن واسمة AFLP من إنتاج أكبر عدد من التعدد الشكلي polymorphism.

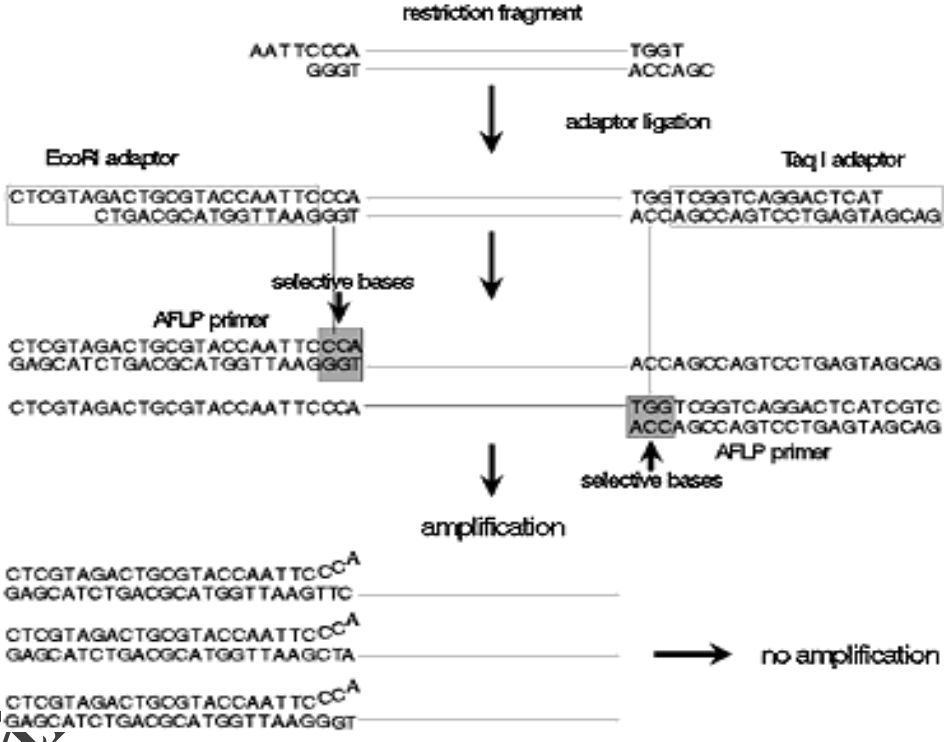
وبما أن تقنية AFLP إحدى الطرق التي تعتمد على مبدأ مكاثرة الحمض النووي وفق اختبار PCR أيضا، حيث تعد من الدلائل الجزيئية الهامة كونها تشمل مضاعفة قطع الحمض النووي DNA المتولدة عن إنزيمات قطع محددة والمضاف إليها أدوات ربط معينة Adapters.

Molecular Biology Dr. Ismail Al-Mohamed

ويمكن ايجاز خطوات تقنية AFLPs بالمراحل التالية:

1- تقطيع الحمض النووي DNA بإنزيمي قطع (مثلا ***EcoRI***, ***MseI***).
2- لحم وصلتي ربط adapters وكل منهما عبارة عن سلسلة مزدوجة من النيكليوتيدات إلى نهايات القطع المحددة.
3- مضاعفة الوحدات الفرعية الناتجة عن أنزيمات القطع باستخدام بادئين primer مكملين لوصلتي الربط وتسلسل مواقع القطع، وتمتد في نهايتهما '3 نكليوتيدات اختيارية منتقاة بغية التحكم بعملية التضاعف.
4- في النهاية يتم عمل تفريد كهربائي بجيل البولي اكريليميد للقطع المضاعفة.

ومن محاسن اختبار AFLP أنه فعال ودقيق بالمقارنة مع RAPD ولا تحتاج لوقت طويل بالمقارنة مع RFLP، ويعطي مستويات عالية من التباين الوراثي.ولكن يؤخذ عليه أنه مكلف ويحتاج لمهارة عالية في التنفيذ ويتطلب لتقنيات كثيرة (شكل 6-7).



شكل 6-7. المرحل المتسلسلة لاختبار AFLPs.

3-4-2-1- من تطبيقات تقنية AFLP

في مجال النبات والحاصلات الزراعية: تستخدم واسمة AFLP في عدد كبير من الدراسات والأبحاث، فقد استخدمت في دراسة التنوع الوراثي Genetic diversity وفي إنشاء خرائط الارتباط الوراثي لعدد من الأنواع النباتية والمحاصيل الزراعية، وفي تحليل الصفات الوراثية الكمية في بعض المحاصيل الحقلية ، وكذلك في تحديد مواقع مقاومة الذبول الذي يسببه فطر الفيوزاريوم الوعائي. ولها دور في توضيح العلاقات الوراثية بين وضمن الأنواع النباتية المختلفة

Molecular .1 Al-Mohamed

. وفي رسم الخرائط الوراثية لبعض اشجار الغابات ومنها شجرة الحور*Populus deltoids* . كما استعملت هذه الواسمة في دراسة التعبير الجنسي في الكائنات الحية وتم الحصول على بعض المؤشرات Markers التي يمكنها التفريق بين الجنسين خصوصاً في المراحل المبكرة والتي يصعب فيها التفريق وهذا يوفر على الباحثين في مجال التربية والتهجين وقتاً وجهداً كبيرين.

مجال الكائنات الدقيقة والأمراض النباتية : إن مراقبة صحة النبات واكتشاف الأمراض في أوقات مبكرة من الأمور المهمة التي تقلل من الخسائر وتعتبر الواسمات الجزيئية المعتمدة على تضخيم الحمض النووي مثل واسمة AFLP من الأدوات الأساسية والمهمة في التشخيص والتعرف والتفريق بين سلالات وأنواع كثير من المسببات المرضية فقد استخدمت واسمة AFLP في تعريف سلالات الفطر المسبب لمرض الصدأ على القمح حيث جمعت سلالات تنتمي إلى مناطق جغرافية متقاربة وتم تحديد نسبة القرابة الوراثية وأظهرت واسمة AFLP توافق في النتائج بين تعريف السلالات إعتماداً على رد فعل الأصناف التفريقية مع اختبارات المادة. كما تم بوساطة واسمةAFLP رسم موقع المورث المسؤول عن مقاومة مرض الصدأ على الكروموسوم وتتبعه في الجيلين الثاني والثالث. وفي تحديد مورث المقاومة لمرض البياض الدقيقي في هجين الشعير وللتفريق ين أنواع الفيوزاريوم المسبب لمرض عفن الجذور في نبات القمح. واسمة AFLP استخدمت أيضاً في دراسة الفروق بين سلالات البكتيريا وذلك لمعرفة المناسب منه لصناعة الأجبان.

مجال علم الحيوان والإنتاج الحيواني : تستخدم واسمة AFLPعلى نطاق واسع في دراسة التباين الوراثي وشجرة النسب في النباتات ولكنها استخدمت في الأنواع الحيوانية و الثدييات بنسبة أقل، حيث تمكن الباحثين من دراسة 23 نوعاً من حيوانات الفقمة (أسد البحر)، وتحصلوا على 310 مؤشراً يمكن من خلالها التعرف على التباين بين هذه الأنواع ورسم شجرة القرابة بين الأنواع وداخلها، كما استخدمت في دراسة التنوع الوراثي لسلالات الماعز وفي دراسة الاختلافات بين سلالات الأبقار الأوربية عن طريقة البصمة الوراثية.وفي رسم الخرائط الجينية في بعض سلالات الخيول، وأيضا في دراسة التنوع الوراثي لسلالات الدواجن الصينية ومقارنتها مع السلالات الفرنسية. كما تم استخدام البصمة الوراثية بواسطة واسمةAFLP في دراسة التباين الوراثي بين نوعين من الأسماك وتم استخدامها كمؤشر للتعرف على الجنس في بعض سلالات الأسماك الصينية.

Molecular Biology Dr. Ismail Al-Mohamed

الفصل السابع

البيولوجيا الجزيئية وتقانة النانو الحيوية

Molecular biology and Bio-nanotechnology

1- مقدمة

يتم إنشاء الأنظمة البيولوجية (biological systems) من بُنى هرمية hierarchical structures مُركّبة من كتل بناء في مستوى النانو. ويتم تجميع هذه المركبات ذات المستوى النانوي لتكوين بُنى في المستوى الميكروي microscale structures ذات شكل ووظيفة محددين. وتوفر تقنية النانو أداة جديدة لتصنيع وقياس وفحص هذه الأنظمة البيولوجية والتفاعل معها في المستويات الذرية والجزيئية atomic and molecular levels التي تتراوح عادةً ما بين 1 إلى 100 نانومتر. تتيح هذه القدرة التحكم الدقيق بعدد من الخصائص الفيزيائية والوظيفية، والتي تعتبر فريدة من نوعها لتطبيقات محددة. بما في ذلك الخصائص الميكانيكية والفيزيائية والكيميائية والكهربائية للمواد. ومن المحتمل أن تكون للمواد المنتجة باستخدام تقنية النانو مستويات قياس وخصائص مهندسة لتتفاعل بطرق يمكن التحكم بها مع المواد البيولوجية المناظرة لها؛ مما يؤدي في النهاية إلى تعزيز التوافقية الحيوية (biocompatibility) والتخصيص أو التحديد الوظيفي (Functionality).

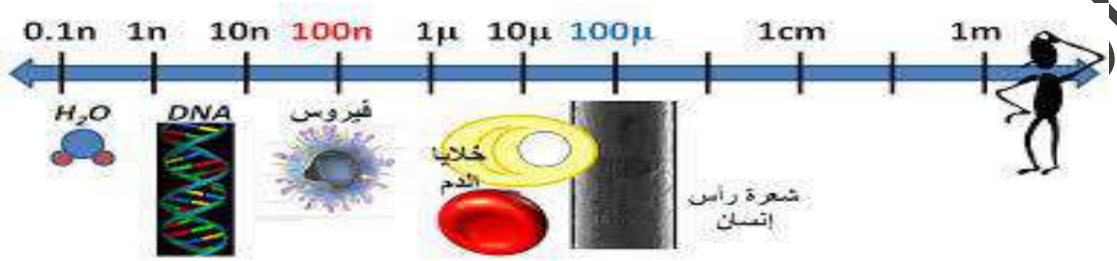
أن تقنية النانو هي تطوير المواد والأجهزة والأنظمة التي تعرض وبشكل ملحوظ خصائص معدلة وجديدة وذلك عن طريق التحكم بالمستوى الذري (atomic level) والمستوى الجزيئي (molecular level) والمستوى فوق الجزيئي (supramolecular level) لقد أحدثت هذه التقنية ثورة في العديد من المجالات بما في ذلك الكائنات الحية؛ فعندما يتم تقليل الأبعاد التقليدية للمادة إلى مستوى النانو، تحدث بعض التغييرات غير العادية في الخصائص الفيزيائية الكيميائية (physiochemical properties). ويمكن أن يعزى ذلك إلى الحجم (أي توزيع الحجم (size distribution)) والتركيب الكيميائي (chemical composition) (أي النقاء (purity) والتبلور(crystallinity) والخصائص الإلكترونية (electronic properties) والبنية السطحية (surface structure) (أي التفاعلية (reactivity) والمجموعات السطحية (surface groups)) والذوبان أو القابلية للذوبان (solubility) والشكل (shape) وتكَدُّس وتجمّع (aggregation) المواد في المستوى النانومتري مقارنة بالمواد في المستوى المايكروي. وبالرغم من أن مختلف الخبراء يعرفون ''المادة النانوية''(nanomaterial) بطرق مختلفة، إلا أن التعريف الأكثر قبولاً هو أن المادة النانوية هي مادة ذات وحدة بنيوية أساسية في المجال من 1 إلى 100 نانومتر. وعلم النانو، بالمعنى العام حيوياً؛ هو أحد ركائز علم البيولوجيا الجزيئية كون أن أحجام العديد من العضيات organelles أو الكيانات الحية التي نتعامل معها (مثل الأحماض النووية RNA وDNA، والبروتينات، والأنزيمات، والفيروسات) تقع ضمن نطاق النانو من 1-100 نانومتر.

ربما لم تلحظ أي تقانة سابقة باهتمام وترقب كمثل الذي حظيت به تقانة النانو؛ التي تُعد وبحق تقانة القرن الحادي والعشرين. وبهذا أضحت تقانة النانو بحر علمي مترامي الأطراف تمتزج مياهه الساخنة بالإنجازات العلمية المثيرة، بالمياه العذبة لينابيع العلوم الأساسية والهندسية والطبية ومنها علم الأحياء، وما تفرع عنه من علوم وعلى رأسها علم البيولوجيا الجزيئية، ليشكلا ما يسمى اليوم تقانة النانو الحيوية Bio-nanotechnology.

Molecular Biology Dr. Ismail Al-Mohamed

2- اللبنات الجزيئية الحيوية لتقنية النانو

تُعد السايكلودكسترينات Cyclodextrins، والجسيمات الدهنية Liposomes والأجسام المضادة الأحادية النسيلة Monoclonal antibodies من اللبنات الجزيئية الحيوية (MBBS) Biological Molecular Building Blocks of Nanotechnology هذه التراكيب النانوية لديها تطبيقات خاصة في النظم الحيوية؛ حيث أن احجام العديد من الكيانات الحية التي نتعامل معها (كالأحماض النووية RNA، DNA، البروتينات، الأنزيمات والفيروسات) تقع ضمن نطاق النانو من 1-100 نانومتر، (شكل 7-1).



شكل7-1. الأبعاد النانوية لبعض المكونات الحيَّة (فيروس، حمض نووي) مقارنة مع أبعاد لمواد أكبر حجماً

2-1- الجزيئات النانوية Nanoparticles

في التقنية النانوية الدقائق الناعمة جداً في الحجوم 1-100 نانومتر يطلق عليها الجزيئات النانوية. والبحث في الجزيئات النانوية هي منطقة بحث كثيف لكون هذه الجزئيات تمتلك خصائص مميزة ومحسنة وذات نغمة معينة وذات إمكانية للاستعمال والتطبيق في مجالات علوم عدة فيزيائية وكيميائية وحيوية وصحية وزراعية. الاستعمالات الحديثة للمواد النانوية في المحاصيل الزراعية بينت أن هذه المواد يمكن أن تحسن من نمو النبات ويمكن أن تستعمل في إيصال الحمض النووي DNA إلى النباتات أو ما يطلق عليه بالهندسة الوراثية. وفي إيصال الهرمونات واللقاحات. وكشف المسببات المرضية كمتحسسات. ولذا تحديات زراعية عالمية كنقص الغذاء والمتغيرات المناخية ومحدودية جاهزية العناصر المغذية للنبات (مثل الفوسفور والبوتاسيوم) يمكن أن تحل بمساعدة هذه المواد.

2-1-1- التكوين الحيوي للمواد النانوية

عملية التركيب الحيوي، أو ما يطلق عليها بالتكنولوجيا الخضراء يمكن استعمالها للحصول على البنى النانوية المستقرة من الموارد الحيوية. وهناك كائنات حية مختلفة (بدائيات النوى وحقيقيات النوى) يمكن استعمالها لتجميع المواد النانوية. وفيما يتعلق بهذا النوع من الكائنات الحية، فإن المزارع المختلفة للعزلة سوف تستعمل. وتستعمل المضادات الحيوية للفطريات (مثل النيستاتين Nystatin) لعزل البكتريا، والمضادات الحيوية للبكتريا (مثل الكلورامفينيكول Chloramphenicol) التي تستعمل لعزل الفطريات. ثم يتم فصل الكتلة الحيوية بوساطة الطرد المركزي. هذه الكتلة الحيوية يمكن استعمالها كموارد لتركيب المواد النانوية.

Molecular Biology Dr. Ismail Mohamed

وبشكل عام تعد التراكيب الحيوية النانوية أفضل من طرائق التركيب الكيميائي والفيزيائي للأسباب الأتية:

1- سيكون لتركيب المواد النانوية بيولوجيا قدر أكبر من الجدوى التجارية وتوفير كبير في تكاليف الطاقة وارتفاع معدل الإنتاج بالمقارنة مع الأساليب التقليدية.
2- الإنتاج الواسع بالطرائق الكيميائية والفيزيائية عادة يمكن أن يؤدي إلى انتاج جسيمات نانوية أكبر بعدة ميكرومترات من الاعتيادي في حين أن التركيب الحيوي يمكن أن يستعمل وعلى نطاق واسع لانتاج الجسيمات النانوية الصغيرة الحجم.
3- طريقة نظيفة وغير سامة، وصديقة للبيئة.
4- الطرائق الفيزيائية تحتاج درجات حرارة عالية والطرائق الكيميائية تحتاج إلى ضغوط عالية وهي أوضاع صعب تقديمها.

- **البناء الحيوي للمواد النانوية بوساطة البكتريا**

البكتريا هي كائنات حية دقيقة بدائية النواة، لديها بنية بسيطة وعدم وجود نواة في الخلية. ومن بين الكائنات الحية الدقيقة أخذت البكتريا قدر من الاهتمام في المجال التركيب الحيوي للمواد النانوية. أحد المميزات الرئيسة للبكتريا في تركيب المواد النانوية هو سهولة التعامل معها؛ حيث يمكن تعديلها وراثياً، باستخدام تقنيات الهندسة الوراثية. في الوقت الراهن، هناك المزيد من الاهتمام في تطوير بروتوكولات (طرائق عمل) لتركيب مواد نانوية مختلفة باستعمال البكتريا.

- **البناء الحيوي للمواد النانوية بوساطة الفطريات**

تُعد الفطريات كائنات حية حقيقية النواة، تنتج الأبواغ وغير حاوية على الكلوروفيل Achlorophyllous، وعادة ما تكون خيطية بتراكيب وهياكل جسديةٍ somatic structures متفرعة، مع هيفات تحيطها جدران الخلايا. والتخليق الفطري للمواد النانوية، أو تكنولوجيا النانو الفطرية تشمل تطبيقات جديدة ومثيرة لعلم واسع المجالات نظراً لتنوع الفطريات وتباينها الوراثي الواضح. ولكون الفطريات ذات طيف واسع من حيث التباين الوراثي، ولكونها تفرز كميات ملحوظة من الأنزيمات ولسهولة التعامل معها في المختبر (ولهذا السبب للستربتومايسين Streptomycetes التي لها سمات مشتركة بين البكتريا والفطريات لديها إمكانات عالية لإنتاج الجسيمات النانوية). ويستغل اليوم ما يطلق عليه مصانع النانو الفطرية myconanofactories لتخليق البنى النانوية من الفضة، الذهب السيليكا، التيتانيوم، الحديد والبلاتينيوم ....إلخ

3- التصنيع الجزيئي

أن كثير من الوظائف المهمة في حياة الكائنات الحية تحدث وفق المقياس النانوي، فأجسامنا البشرية وأجسام جميع الكائنات الأخرى مهما كان تصنيفها التطوري بسيطا أو معقدا، تستخدم مواد طبيعية ذات مقياس نانوي، فالأحماض النووية ذات أبعاد نانوية وهي التي تتحكم في كثير من أنظمة وعمليات جسم الكائن الحي وما يترجم منها على شكل بروتينات، فالبروتين النموذجي (مثل الهيموجلوبين) الذي يحمل الأكسجين خلال مجرى الدم يبلغ قطره تقريباً خمسة نانومتر أو خمسة أجزاء من بليون من المتر.

أقترح العالم ايرك دريكسلر فكرة التصنيع الجزيئي لأي منتج منذ بداية ثمانينات القرن الماضي، ضمن أعمال مؤتمر أكاديمية العلوم الوطنية بالولايات المتحدة الأمريكية؛ تلك الفكرة

Molecular Biology Dr. Ismail Al-Mohamed

القائمة على فلسفة تكنولوجيا النانو الحيوية في الإنتاج والتصنيع القائم على ذرات وجزيئات المادة. وقد بين في بحثه كيف أن آلات تصنيع الجزيئات Molecular Machinery الموجودة في النظم الحية Living Systems تثبت بوضوح جدوى القيام بمحاكاة تلك الماكينات عن طريق تقنيات الهندسة الجزيئية المتقدمة Advanced Molecular Engineering التي تمكننا من انتاج ماكينات اصطناعية Artificial مشابهة، نستطيع بواسطتها تنفيذ أدق وأعقد التصميمات الجزيئية المرغوب في إنتاجها، وبدقة النانومتر الواحد. وقد أعطى دريكسلر في عرضه هذا تصميما لجزيئات البروتين المصنع، اعتبره الطريق إلى تصميم وتنفيذ جميع التركيبات الجزيئية الاصطناعية لجميع المواد، بما فيها الخلايا الحية. والبداية الحقيقية للتلاعب في ذرات وجزيئات المادة بهدف تشكيل هياكلها الذرية أو الجزيئية بدقة متناهية.

فمن المعروف أن الأنظمة الحيوية في جسم الإنسان تقوم بتصنيع بعض الأجهزة الصغيرة جدًّا، والتي تصل إلى حدود مقياس النانو؛ فالخلايا الحية تعتبر مثالا مهما لتقنية النانو الطبيعية، فالخلية الحية تُعدُّ مستودعا لعدد كبير من الآلات الحيوية بحجم النانو تسمى «ريبوسومات»، تقوم بتصنيع البروتينات داخل الخلية على شكل خطوط مجتمعة، يتم تشكيلها بوساطة جهاز نانوي آخر يسمى «أجسام جولجي» كما أن الإنزيمات ذاتها تُعد آلة نانوية تقوم بتحفيز التفاعلات الكيميائية حسب حاجة الخلية؛ وبالتالي يمكن للآلات النانوية المصنعة أن تتفاعل داخل الخلية وتؤدي وظائفها المختلفة؛ مثل تحليل محتويات الخلية، أو إيصال الدواء إليها، أو إبادتها عندما تصبح مؤذيَة.

إن الحجم الصغير والمساحة السطحية الكبيرة لهذه المواد يزيد من فرصة اجتيازها لأغشية الخلايا. كما أن تشابه حجم الجسيمات النانوية مع مكونات الخلية (مثل الريبوسوم) قد يؤدي إلى تداخلها فراغيًّا مع البروتينات والأحماض النووية. إن هذه التداخلات يمكن أن تعرقل العمليات الحيوية في الجسم، كما أن زيادة النشاطية الكيميائية، الناتجة عن المساحة السطحية الهائلة للمواد النانوية، يمكن أن تجعل من هذه المواد ناقلة للملوثات.

4- الحبيبات الكمومية (النقاط الكمية)

إن استخدام تقنية النانو في تمييز (وسم)(labeling) أو مراقبة الحالات والمعالجات البيولوجية واعدٌ؛ لأن المواد النانوية (nanomaterials) غالبًا ما تتمتع بـــــميزات تألُّقيّة (fluorescence characteristics) فريدة. فتمتلك البلورات النانوية (nanocrystals) للنقاط الكَمّية (Quantum Dot – QD) في أشباه الموصلات (semiconductor) ذات الأحجام التي تتراوح من 2 إلى 8 نانومترات خصائص تألُّقيّة مستقرة(stable fluorescent properties) بدرجةٍ عالية.

يتيح تناهي صغر مقاييس أقطار تلك البلورات النانوية (الحبيبات الكمومية)، التي تتراوح بين 2 و 10 نانومترات في أن تحصر داخل هذا الحيز الحجمي الصغير، عدداً من الذرات يتراوح مابين10و – 50 ذرة، على الأكثر، لذا فهي تسلك سلوك الذرة الأحادية single atom من المادة وهذا التركيب غير المألوف للحبيبات الكمومية، وغير المتوافر في أي مواد نانوية أخرى، قد أهلها بأن تحتكر لنفسها عدداً كبيراً من الخواص الفريدة. وقد جذبت هذه المواد اهتمام الباحثين والعلماء منذ أن تعرفوا على بعض من خواصها، البصرية غير المسبوقة. فقد وجدوا أن بتعريضها لمصدر خارجي من الضوء، مثل الأشعة فوق البنفسجية، فأن ذراتها تمتص هذا الضوء ثم تطلقه ولكن في صورة ألوان مختلفة، عند أطوال موجية Wavelengths معينة. وقد اكتشفوا أيضاً أن هذا الضوء المنبعث منها يعتمد اعتماداً كلياً على مقاييس أقطار هذه الحبيبات إلى جانب اعتماده على هوية

Molecular Biology Dr. Ismail Al-Mohamed

ونسب العناصر الداخلة في تركيبها. ومن الطريف أن يذكر هنا، أن زيادة أبعاد أقطار تلك الحبيبات، تؤدي إلى انبعاث اللون البنفسجي منها (نهاية الطول الموجي من ألوان الأطياف المرئية) هذا في الوقت الذي تزداد فيه زرقة هذه الحبيبات مع تناقص مقاييس أبعاد أقطارها.

يمكن استخدام الميزات والخواص الفريدة للنقاط الكمية في عمليات إدارة الأمراض النباتية، والآفات الزراعية الأخرى، إما عن طريق التحكم في الجزيئات الكيميائية الوظيفية المستهدفة في خلية الكائن الحي الممرض أو عن طريق استخدامها كوسيلة تشخيص دقيق للكشف عن الأمراض. حيث تمثل الحبيبات الكمومية بما تحتويه من خصائص تألُّقيّة مستقرة، أداة وسم للكائنات الممرضة بدقة متناهية، حيث يمثل التشخيص الدقيق المبكر حجر الزاوية في عمليات إدارة الآفات الزراعية. وتبعاً للتقدم في خصائص المواد النانوية، ظهرت النقاط الكمية كأداة محورية في تتبع مسببات الأمراض والآفات النباتية من خلال وسمها بيولوجيا؛ حيث انها تمتاز بحساسية بصرية ومزايا تألقيه بالإضافة إلى تناهي حجمها الصغير بخلاف المواد النانوية التقليدية تمكنها من الولوج إلى ادق المكونات الخلوية وتتبعها والكشف عنها بدقة متناهية.

5- تكنولوجيا النانو في قطاع الزراعة

- **الكيماويات الزراعية**

أضحت المبيدات المستخدمة في مقاومة الآفات الزراعية أحد أهم المواضيع المثيرة للجدل في العصر الراهن، وذلك بعد أن أثبتت البحوث والدراسات تأثيراتها الضارة على صحة الإنسان والحيوان، وآثارها المدمرة للبيئة. ويستخدم العالم كميات ضخمة من تلك المبيدات تصل إلى ملايين الأطنان سنوياً، مما يؤدي إلى تلوث التربة والمياه والمحاصيل الزراعية. ويسفر ذلك عن ارتفاع نسب حالات التسمم في الإنسان والحيوان. وتسبب المياه المستخدمة في ري أو في عمليات غسل التربة إلى حمل تلك المياه نسباً عالية من المبيدات الموجودة في التربة، التي تنفذ من خلالها إلى الطبقات السطحية السفلية من التربة حيث تتخللها، متسربة في ذلك إلى الطبقات القريبة من المياه الجوفية أو إلى المياه الجوفية ذاتها.

وقد دخلت تكنولوجيا النانو بالفعل في تصنيع حبيبات الكيماويات الزراعية المستخدمة في مكافحة الحشرات والفطريات وغيرها من مسببات الأمراض والآفات الزراعية الأخرى. وتتميز تلك الحبيبات بارتفاع مساحة أسطحها، مما يعني ترشيد استخدامها وتخفيض الكميات المستخدمة منها، وبالتالي تقليل الآثار البيئية المترتبة.

وتقوم الشركات المنتجة للكيماويات الزراعية بإنتاج أنواع أخرى من الحبيبات النانوية تقل أقطارها عن 100 نانومتر حيث تستخدم في صناعة المحاليل والمستحلبات الكيماوية الخاصة بتسميد التربة وتغذية النباتات الزراعية. وللغرض نفسه وتماشيا مع السياسات العالمية الخاصة بحماية البيئة. بدأ الاتجاه نحو تعبئة الحبيبات النانوية النشطة المستخدمة في مجال تخصيب وتسميد التربة الزراعية بداخل كبسولات صغيرة من البوليمرات، تتميز بتحللها عند تعرضها لعوامل خارجية مثل أشعة الشمس أو عند تعرضها لوسط قلوي. وعند تحلل تلك الكبسولات، تنطلق منها الحبيبات النانوية الموجودة بداخلها لتقوم بدورها في تخصيب التربة الزراعية.

وقد فتحت تكنولوجيا النانو بذلك آفاقاً جديدة في هذا المجال المهم. حيث تقوم شركات الكيماويات الزراعية بإنتاج أنواع أخرى من الكبسولات يتم التحكم في ابعاد أقطار مسامها كي تسمح بخروج حبيبات المواد الكيماوية المغذية للتربة والنبات، أو الحبيبات المقاومة للآفات الزراعية والحشرات، بمعدلات زمنية مدروسة ومحسوبة، مما يوفر التغذية والحماية للنبات بصفة

Molecular Biology Dr. Ismail Al-Mohamed

دائمة ويخفض من كمية المواد الكيميائية المستخدمة. هذا وتقوم بعض الشركات بإنتاج حبيبات نانوية تتألف من أسمدة مواد كيميائية مضاف لها مبيدات مكافحة الآفات بحيث يتم تعبئيها معاً داخل تلك الكبسولات السالف ذكرها، مما يجعلها تقوم بأداء وظيفتين مختلفتين في وقت واحد.

- **الري المستدام للمحاصيل الزراعية**

تمثل الطرق التقليدية المتبعة في ري المحاصيل الزراعية فقداً هائلاً للمياه التي يتبخر جزء كبير منها ، قد يصل إلى 50% وأكثر في المناطق شديدة الحرارة، مما ينجم عنه ارتفاع في نسبة ملوحة التربة يؤدي بالتالي إلى انخفاض خصوبتها. ولم يغب عن علماء تكنولوجيا النانو التفكير في وضع حلول مبتكرة لحل هذه المشكلة حيث ابتكروا طريقة فريدة تعمل على تخفيض سرعة تدفق المياه إلى التربة والتحكم في معدل تبخرها إلى أدنى حد ممكن. وتعتمد هذه الطريقة على توظيف معدن الزيوليت أحد المعادن البلورية الموجودة في الطبيعة، الذي يتكون من ثلاثة عناصر هي السيليكون والألمنيوم والأوكسجين. وقد سمح التركيب الاسفنجي لهذا المعدن، المؤلف من مسام دقيقة وفجوات نانوية الأبعاد في أن يمتص السوائل بما يعادل نصف حجمه؛ لذا فقد استُغلت هذه الخاصية المهمة وتوظيفها في مجال ري النباتات والمحاصيل الزراعية، حيث توضع تلك الحبيبات في التربة فتخزن جزءاً كبيراً من مياه الري المستخدمة داخل هياكلها المسامية، لتقوم بعد ذلك بإخراجها بمعدلات بطيئة، تؤمن استدامة ري الأراضي الزراعية.

وبالإضافة إلى ما توفره طريقة الري هذه من مزايا متعددة، تتمثل في تخفيض كميات مياه الري المستخدمة مع تخفيض المفقود من هذه الكميات نتيجة التبخر أو التسرب إلى داخل التربة، فإنها تحقق المزايا التالية:

- نمو جيد للمحاصيل الزراعية.
- تحسين كفاءة الأسمدة المستخدمة في تغذية التربة.
- زيادة في إنتاجية المحصول.
- تحسين جودة التربة ونوعيتها على المدى الطويل.
- تقليل فقدان العناصر الغذائية الطبيعية الموجودة بالتربة الزراعية.

- **إعادة ترتيب المورثات**

سعى علماء علم الأحياء الجزيئي (البيولوجيا الجزيئية Molecular Biology)، عقوداً طويلة لمحاولة الهيمنة على المورثات النباتية والحيوانية، ومحاولة إعادة ترتيبها لصياغتها على النسق الذي يتيح إضافة خواص متعددة إلى النباتات والحيوانات المستخدمة في مجال صناعة المنتجات الغذائية. لكن وعلى الرغم من تلك المحاولات الجادة فإنها كانت تصطدم بكثير من العقبات والقيود التقنية والفنية. ومع بزوغ فجر تقانة النانو والتحامها مع التقانة الحيوية، توافرت عدة أدوات وتقنيات جديدة وقوية كانت كفيلة بتحويل تلك الأحلام إلى أرض الواقع. فقد أتاحت تقانة النانو مجموعة من التقنيات والأدوات الجديدة الخاصة للتعامل مع جينات النباتات أو الحيوانات والتلاعب بها، وذلك من خلال توظيف الحبيبيات والألياف النانوية وكذلك الكبسولات في نقل المورثات المراد توصيلها إلى خلية ما بصورة مباشرة، بدلاً من استخدام الفيروسات كناقلات Viral Vectors. وقد أدى استخدام المواد النانوية كناقلات جينية إلى زيادة في كمية المورثات أو المواد الكيميائية المنقولة إلى الخلايا. وذلك بالإضافة إلى إتاحة إمكان السيطرة على الحمض النووي، الذي يتم الإفراج عنه وخروجه من الكبسولات داخل المكان المستهدف فقط من هيكل النبات.

Molecular Biology Dr. Ismail Al-Mohamed

وقد أتاحت تكنولوجيا النانو التعامل المباشر مع مورثات المحاصيل الزراعية وإعادة ترتيبها على النحو الذي يضمن إنتاجية أكبر وإضافة بعض الصفات المرغوب فيها.

- **تكنولوجيا النانو والغذاء**

تعد تطبيقات تكنولوجيا النانو المتمثلة في تحسين منتجات الصناعات الغذائية ورفع قيمتها للإنسان وسلامته وحمايته من الأمراض والمخاطر الناجمة عن عشوائية تناول الطعام. حيث كثر في الآونة الأخيرة استخدام مصطلح الغذاء النانوي Nanofood في حياتنا اليومية، وتعددت أشكاله المستخدمة، ويقصد بالغذاء النانوي أي غذاء انتج ، أو عولج في أي مرحلة من مراحل انتاجه، المتعلقة بزراعته، وتجهيزه أو تأهيله، باستخدام تقنيات تكنولوجيا النانو المتنوعة. وتندرج تحت هذا المسمى أيضاً تلك الأغذية المحتوية على إضافات مكونة من مواد نانوية، مثل الحبيبات النانوية للعناصر الفلزية الحرة من الحديد والزنك والكبسولات الجيلاتينية ذات المسام النانوية المحتوية على تركيزات عالية من زيوت الأسماك الشهيرة أوميجا 3 (Omega 3) ومواد الإنزيمات المصاحبة لها، التي تعمل على تشغيل تلك الأنزيمات بكفاءة ويسر مثل الكيو 10 (Q10). وقد تزايدت المنتجات التكنولوجية المتاحة بالأسواق والمرتبطة بقطاع الغذاء النانوي بصورة مضطردة في السنوات الأخيرة.

تستخدم تكنولوجيا النانو كذلك في حفظ المنتجات الغذائية الطازجة مثل اللحوم، الفواكه والخضروات، وكذلك منتجات الألبان، والحلويات، والخبز، بالإضافة الى الوجبات السريعة وذلك عن طريق معالجة اسطحها الخارجية وتغطيتها بطبقة رقيقة شفافة لا ترى بالعين المجردة، يقل سمكها عن 5 نانومترات. وتعد هذه التقنية أحد أهم التقنيات واسعة التطبيق والاستخدام في مجال حفظ الأطعمة الطازجة وإطالة فترات الصلاحية لها في التخزين، حتى بعد فتح العبوة. وتمنع الطبقات النانوية المغلفة للأسطح الخارجية للأطعمة والمنتجات الغذائية، تسرب الغازات إلى سطح الأطعمة، لذلك يضمن وجودها عدم تأثر الأطعمة بالعوامل الخارجية المحيطية، مثل الرطوبة والاشعاعات، والتي تؤدي دائماً إلى فساد الغذاء أو تلوثه.

وتتميز الطبقات الواقية المضادة للأكسدة، بكونها عناصر لمواد نانوية آمنة غير سامة، متوافقة حيوياً مع الإنسان، لذا فلا تلزم إزالتها عند تناول المنتج الغذائي، وتعد الحبيبات النانوية المكونة لتلك الطبقات الرقيقة، مثل فلز الفضة وبعض أكاسيد الفلزات مثل ثاني أكسيد التيتانيوم TiO_2، وأكسيد الزنك ZnO وأكسيد النحاس CuO، هي المواد الأكثر شيوعاً واستخداماً في هذا المجال. وتتميز حبيبات تلك الأكاسيد بقدرتها على تحليل الملوثات من المواد العضوية والبكتريا، ومقاومة ودحر الميكروبات التي قد تتراكم على الأسطح الخارجية للمنتجات الغذائية خلال فترة الحفظ. وتجدر الإشارة إلى أن حبيبات فلز الفضة التي لا تتعدى أبعاد أقطارها عن 100 نانومتر تتمتع بشراهة كبيرة في التفاعل الكيميائي، وذلك لتضاعف أعداد وجود ذراتها الحرة على أسطح حبيباتها الخارجية، مما يساعد في تحولها إلى أيونات فضة عالية السمية، شديدة الفتك للبكتيريا والميكروبات.

- **مجال الاستزراع السمكي وتربية الأحياء المائية**
  - **تخليص مياه المزارع من الطحالب الضارة**

تُعَد تربية الأحياء المائية واستزراع الأسماك، والمحار أو النباتات المائية من أهم وأنجح المشروعات التي يزداد نموها عاما من بعد الآخر. وتشير التقديرات إلى أن نحو 20% من الحجم الكلي للأسماك والأحياء المائية المطروحة في الأسواق التجارية قد تمت تربيتها في المزارع

Molecular Biology Dr. Ismail Al-Mohamed

السمكية. ومن المتوقع أن تستمر زيادة الطلب على الأغذية البحرية لتصل نسبتها إلى أكثر من 70% في السنوات العشرين القادمة. وعلى الرغم من هذه المؤشرات المشجعة، فما زال الكثير من المزارع السمكية تعاني من بعض الأمراض وزيادة التلوث الكيميائي في مياهها. ويعتقد الباحثون أن تكنولوجيا النانو سوف يكون لها الدور الأكبر في توفير مزارع سمكية آمنة وخالية من الأمراض والتلوث.

ويعمل الباحثون على استخدام عقار مكون من مواد نانوية لتستخدم في تنظيف مياه المزارع السمكية. ويتكون هذا العقار من حبيبات نانوية لمركبات وسبائك عنصر اللنثانوم La التي لا تتعدى أبعاد أقطارها 40 نانومتراً تتم إضافتها بنسب معينة إلى مياه الأحواض السمكية. وقد أشارت النتائج أن تلك الحبيبات بما لها من مساحة أسطح كبيرة قد نجحت في تخليص مياه المزارع السمكية من الفوسفات الموجود بها والذي يعد السبب الرئيس لنمو الطحالب بمياه المزارع بالإضافة إلى التلوث بالنترات الذي يسبب ظاهرة الـ Eutrophication؛ وهي عملية تشجع نمو الطحالب والنباتات في المسطحات المائية نتيجة لزيادة المحتوى الغذائي للمياه. ويواصل الباحثون الجهود من أجل تخفيض تكلفة العقار والتأكد من عدم تعرض الأسماك المستزرعة لأي ضرر من جراء استخدامه بمياه المزارع السمكية.

وتتجه الدراسات الحديثة إلى اجراء لقاح الحمض النووي لتطعيم الأسماك المستزرعة؛ وذلك عن طريق استخدام الموجات فوق الصوتية Ultrasound waves وتقنية لقاح الحمض النووي المعبأ في كبسولات. وتتلخص هذه الطريقة في في تجهيز كبسولات تعبأ بأشرطة قصيرة من الحمض النووي الخاص باللقاح. ثم إضافة تلك الكبسولات إلى مياه المزرعة. وبمجرد وجود كبسولات اللقاح داخل مياه المزرعة، تُعرض المياه لموجات فوق صوتية تعمل على تكسير وفتح الكبسولات، مما يؤدي إلى تسرب الحمض النووي الموجود داخلها، ومن ثم تبدأ خلايا الأسماك في امتصاصه.

6- تكنولوجيا النانو الحيوية لتنقية المياه

إن العجز في توفير مصادر آمنة ونظيفة للماء، لن يؤدي فقط الى تدمير صحة الإنسان، وإنما سوف يؤدي إلى تدمير الحياة كلها على سطح هذا الكوكب الذي نحيا عليه. ومما لا شك فيه، أنه أدت عمليات صرف المخلفات غير المُعالجة، الناتجة عن العمليات الصناعية، إلى المصادر المائية التي نعتمد عليها في توفير احتياجات استخداماتنا اليومية من الماء إلى زيادة مخيفة في أعداد المصابين بأمراض الكبد والفشل الكلوي. وقد اعُتبِرَت تلك المخلفات أحد الأسباب الرئيسة للإصابة بمرض السرطان، حيث أنه من المعروف أن تلك المخلفات الصناعية تحتوي على نسب عالية التركيز لفلزات المعادن الثقيلة مثل الزئبق، الزرنيخ والرصاص، بالإضافة إلى ما تحتويه مكونات تلك المخلفات غير المُعالجة على مركبات كيميائية ضارة.

وقد أدت عمليات صرف المياه المستخدمة في ري المزروعات التي تتسم باحتوائها على نسب عالية من تراكيز المبيدات السامة، والأسمدة ومخصبات التربة، صرفها إلى التربة أو إلى الأنهار وتسربها إلى مصادر المياه الجوفية، في زيادة نسب تلوث المياه، مما يُصَعب من مهام عمليات تنقية المياه ومعالجتها. هذا بالإضافة إلى التلوث البكتيري والميكروبي للبيئة المائية الناجم عن عمليات الصرف المباشر لمياه محطات الصرف الصحي غير المعالجة أو نصف المعالجة، وكذلك مخلفات المنازل وحظائر الطيور والحيوانات الداجنة.

Molecular Biology Dr. Ismail Al-Mohamed

وخلال الثلاثة عقود الأخيرة من هذا القرن، ومع زيادة الاهتمام بالمواد النانوية والتعرف على خواصها واستخداماتها المستقبلية ولا سيما الحبيبات الكمومية Quantum Dots، أظهرت حبيبات بعض العناصر الفلزية، وبعض عناصر أشباه الفلزات ذات التكافؤ الصفري Zero-valence Metals، وعلى الأخص فلز الحديد صفري التكافؤ Fe^0 قدرة كبيرة على معالجة المياه الملوثة، وذلك عند تدني مقاييس أقطارها إلى أقل من عشرة نانومترات. ويتيح تصغير الحبيبات لذرات الحديد القابعة داخل الحبيبة أن توجد بصورة مكثفة على سطح الحبيبة، مما يعظم من نشاطها. وتقوم حبيبات الحديد النانوية بمهام تخليص المياه من مركبات الهالوجينات السامة كمركبات الكلور، مثل رباعي كلوريد الكربون CCl_4، وذلك عن طريق تكسير جزيئات المركب ونزع عنصر الكلور منه، وتحويل المركب إلى مركبات عضوية بسيطة غير ضارة بالبيئة. كما تقوم حبيبات الحديد النانوية بانتزاع عنصر الأوكسجين من جميع أكاسيد النيتروجين السامة الموجودة بالمياه الملوثة وتحريرها من عنصر النيتروجين الذي ينطلق في صورة نيتروجين جوي يماثل نظيره الموجود بالهواء الجوي تماماً. ولا يقتصر دور حبيبات الحديد النانوية على ما سبق فقط، بل يمتد دورها الحيوي إلى تنقية المياه الملوثة من عناصر الفلزات الثقيلة، مثل الزرنيخ As، وأكسدته وتحويله إلى صورة كيميائية غير ضارة.

واستخدمت أيضاً، تقانة النانو الحيوية Bio-nanotechnology لتنقية المياه من الملوثات والشوائب من خلال العمل على تطوير بوليمرات مشتقة من مواد طبيعية غير مضرة بالبيئة، حيث تم تطوير بوليمر يستطيع إزالة الشوائب بشكلٍ آني. وذلك من خلال تطوير مادةٍ مشتقةٍ من مصادر طبيعية، ورخيصة، وتم فيه تطوير بوليمراً ابتداءً من مادة الديكسترين الحلقي أو السايكلوديكسترين Cyclodextrin، وهي مادةٌ سكرية طبيعية، مشتقة من نشاء الذُّرة، ورخيصة الثمن، ومتوافرة بكثرة في الطبيعة. بالإضافة إلى أن هذه المادة معروفةٌ منذ حوالي مئة عام، وتُستخدم في العديد من المنتجات الغذائية والدوائية ومستحضرات التجميل. وبالتالي فهي مادةٌ غير مُضرةٍ بالإنسان، وصديقة للبيئة. والأهم من هذا، أن هذه المادة تمتلك خصائص مميزة بقدرتها على الارتباط بالمركبات العضوية في الماء بشكل قويٍ جداً.

وبالتالي، اجري العمل على تصنيع بوليمر ذو مساحة سطحية عالية ومسامات نانوية من السايكلوديكسترين، وهي مادةٌ عضويةٌ بوليميرية، ذاتُ مسامات نانوية. إنَّ ميزة بوليمر السيكلوديكسترين المُعدَّل الذي توصّل اليه، أنه قادرٌ على إزالة الشوائب العضوية من المياه بسرعة تفوق مئات الأضعاف سرعة جميع المواد المستخدمة حاليًا في معالجة المياه بالعالم. إضافةً لكونها أرخص ثمناً مقارنة بالمواد الأخرى المستخدمة لإزالة الشوائب. وتمتاز أيضاً بإمكانية إعادة تدويرها بسهولة كبيرة؛ فبمجرد تمرير مادة الكحول الطبية عبرها تصبح جاهزةً للاستخدام مرةً أخرى. مما يعني أنه يُمكننا أن نستخدمها لفترات زمنية طويلة، على نقيض المواد الحالية والتي تُستخدم لبضعة أشهرٍ فقط، ثم تُصبح عديمة الفائدة وتُرمى، فمن مزاياها أن استخدامها ممكنٌ في ظل مختلف الظروف والشروط، فمثلًا يمكن أن تكون فعالةً عند درجات الحرارة المنخفضة والمرتفعة نسبيًا؛ فقد أثبت مخبريًا أنها ذات ثباتيَّة جيدة حتى عند درجات الحرارة التي قد تصل إلى مئتين وخمسين درجةً مئوية، ما يجعلها قابلةً للاستخدام في بيئاتٍ متعددةٍ.

Molecular Biology Dr. Ismail Al-Mohamed