وقل رب زدني علما
جامعة دمشق
Damascus University

# علم الوراثة الجزيئي و الهندسة الوراثية

1

السنة: الثالثة

القسم: أحياء دقيقة

منشورات جامعة دمشق
كلية العلوم

# علم الوراثة الجزيئي و الهندسة الوراثية

الدكتور
عصام قاسم
أستاذ في قسم البيولوجيا الحيوانية

جامعة دمشق
1431 – 1432هـ
2010 – 2011م

وقل رب زدني علما
جامعة دمشق
Damascus University

# فهرس


| الموضوع | الصفحة |
|---|---|
| المقدمة | 11 |
| **الجزء الأول الوراثة الجزيئية**<br>**الفصل الأول** | 13 |
| **1-DNA** المادة الوراثية | 16 |
| 1-1- التحول الجرثومي | 16 |
| 1-2-التحول الانتقالي | 19 |
| 1-3- الـ RNA والمادة الوراثية | 23 |
| 2- المادة الوراثية في الكائنات مميزة النوى | 24 |
| 2-1- الإثباتات غير المباشرة | 25 |
| أ- توزع الـ *DNA* | 25 |
| ب- حدوث الطفرات | 27 |
| جـ- الثبات الاستقلابي | 27 |
| د- ترافق DNA مع الكروسومات | 27 |
| 2-2- الإثباتات غير المباشرة | 28 |
| 3- التركيب الكيميائي للمادة الوراثية | 29 |
| أ- الحمض الريبي النووي منقوص الأوكسجين | 29 |
| ب- البنية الأولية | 31 |
| جـ- البنية الثانوية | 32 |
| 4- بعض خواص جزيء الـ DNA | 40 |
| أ- ثبات التناظر | 41 |
| ب- الدنترة وإعادة الاتحاد | 42 |
| 5- الـ *DNA* كجزيء حامل للمعلومات الوراثية | 47 |
| 6- تضاعف الـ DNA | 48 |

| الموضوع | الصفحة |
| --- | --- |
| 7- الحمض الريبي النووي الـ RNA | 53 |
| أ- أنماط الـ RNA | 55 |
| - الـ RNA الرسول | 55 |
| - الـ RNA الناقل | 56 |
| - الـRNA الريبوزومي | 59 |
| ب- نسخ الـ RNA | 61 |
| 8- تركيب البروتين (الترجمة) | 65 |
| 8-1- مسألة الشفرة الوراثية | 65 |
| 8-2- عملية ترجمة الـ *RNA* الرسول | 70 |
| أ- مرحلة البدء | 70 |
| ب- مرحلة الاستطالة | 71 |
| جـ- مرحلة النهاية | 72 |
| 9- البروتينات وبنيتها | 74 |
| 10- البروتوم | 78 |
| 11- تنظيم عمل الجين | 79 |
| 11-1- عند طليعات النوى | 80 |
| 11-2- عند حقيقيات النوى | 82 |
| 11-3- الهستونات ودورها في تنظيم عمل الجين | 84 |
| 12- الـ DNA الميتوكوندري(DNA mt) تركيبه ووظيفته | 85 |
| 13- تحديد مفهوم المورثة | 86 |
| 13-1- المورثة | 86 |
| 13-2- السيسترون | 86 |
| 14- الطفرة: | 88 |
| 14-1- أنماط الطفرات | 89 |
| أ- طفرات مورثية | 89 |
| ب- طفرات كروموزومية تركيبية | 90 |
| جـ- طفرات كروموزومية عددية | 90 |

| الموضوع | الصفحة |
|---|---|
| 14-2- العوامل المطفرة | 91 |
| 15- المادة الوراثية في الفيروسات | 94 |
| **الجزء الثاني: الهندسة الوراثية** | 97 |
| **الفصل الثاني** | 99 |
| **الأنزيمات المستعملة في الهندسة الوراثية** | |
| 1- انزيمات هدم الاحماض النووية | 101 |
| 2- انزيمات الربط | 114 |
| 3- انزيمات بلمرة الأحماض النووية | 117 |
| 4- انزيمات تحوير الحمض النووي | 120 |
| 5- انزيمات فك الحلزنة | 121 |
| **الفصل الثالث** | |
| **العمل بالأحماض النووية** | |
| 1-عزل الـ *RNA* والـ*DNA* | 123 |
| 2- التعامل مع الأحماض النووية وقياسها | 126 |
| 3- تشعيع الأحماض النووية | 127 |
| 3-1- المساير | 128 |
| 3-2-1- استخدام المساير في الدراسات الوراثية | 130 |
| 3-3 - طرائق اصطناع المساير | 131 |
| أ- تشعيع النهايات | 131 |
| ب- الترجمة التممة | 132 |
| جـ- التشعيع عن طريق البادئ | 134 |
| 3-4- مساير الـ *RNA* | 136 |
| 4- تهجين الأحماض النووية | 137 |
| 5- الرحلان الكهربائي | 139 |
| 6- تحديد متتاليات الـ *DNA* | 143 |
| 6-1- طريقة مكسام وجيلبرت | 144 |
| 6-2- طريقة سانجر وكولسون | 146 |

| الموضوع | الصفحة |
|---|---|


6-3- الرحلان الكهربائي 150

## الفصل الرابع
## أحياء الهندسة الوراثية

1- العوائل 153
أ- العوائل بدائية النوى 153
ب- العوائل حقيقية النوى 154
2- النواقل 155
2-1- البلاسميدات 156
أ- البلاسمييبيدات التزاوجية 157
ب- البلاسميدات اللاتزاوجية 157
جـ- أنماط البلاسميدات 158
د- المميزات النموذجية للبلاسميدات كنواقل 158
2-1-1- طرق استعمال البلاسميدات كنواقل 159
أ- بلاسميدات الغرس التثبيطي 159
ب- بلاسميدات الغرس اللاتثبيطي 170
2-2- الفاجات (آكلات الجراثيم) 1173
2-2-1- الفاجات كنواقل 180
أ- الغرس التثبيطي 180
ب- الغرس اللاتثبيطي(الطبيعي) 182
2-2-2- أهم الفاجات المستعملة في الهندسة الوراثية 184
أ- الفاج لمبدأ $\lambda$ 184
ب- الفاج ميو MU 192
جـ- الفاج M13 193
د- الفاج QX174 196
2-3- الكوسميدات 197

| الموضوع | الصفحة |
|---|---|
| 2-4- الفيروسات | 199 |
| أ- فيروس القرنبيط | 200 |
| ب- فيروس جيميني | 200 |
| جـ- فيروس السيميان | 200 |
| د- فيروس البابيلوما البقري | 201 |
| 3- النواقل في الخلايا حقيقية النوى | 201 |
| 4- إدخال الـ *DNA* في الخلايا | 203 |
| 4-1 – التحول والعدوى المباشرة | 203 |
| 4-2- تعليب الحمض النووي للفاج مخبرياً | 204 |
| **الفصل الخامس**<br>**طرائق التنسيل** | 205 |
| 1- التنسيل من الـ RNA الرسول | 207 |
| 1-1- بناءالـ DNA المكمل(DNAc) | 208 |
| 1-2- تنسيل الـ DNAc في نواقل بلاسميدية | 212 |
| 1-3- تحوير النهايات العمياء لقطع الـDNA | 212 |
| أ- الروابط | 213 |
| ب- التوصيلات | 213 |
| جـ- التذييل بالبولمير المتجانس | 215 |
| 2- تنسيل الـDNA من الذخيرة الوراثية | 218 |
| 2-1- المكتبات المورثية(الجينومية) | 218 |
| 2-2- بناء المكتبات الجينومية | 219 |
| 2-2-1- تحضير قطع الـ DNA المناسبة لبناء المكتبة الجينية | 219 |
| 2-2-2- استخلاص قطع الـ DNA من الهلام | 225 |
| 2-2-3- اختيار الناقل المناسب | 228 |
| 2-2-4- بناء المكتبة الجينية وتعليبها وتضخيمها | 228 |
| 2-2-5- التنسيل في الكروموزومات الصناعية | 229 |
| 3- التفاعل السلسلي للبوليميراز(P.C.R) | 230 |

| الموضوع | الصفحة |
|---|---|

## الفصل السادس

## تطبيقات الهندسة الوراثية


| | |
|---|---|
| 1- تحليل البينة ووظيفة الجين | 233 |
| 2- تميز الجينات | 235 |
| 3- هندسة البروتينات | 236 |
| 4- الهندسة الوراثية والتقانة الحيوية | 237 |
| 4-1- تركيب الهرمونات البشرية | 237 |
| 5- النباتات المحورة وراثياً | 240 |
| 5-1- إنتاج أرز غني بفيتامين A. | 244 |
| 5-2- إنتاج نباتات مقاومة لمبيدات الأعشاب. | 244 |
| 5-3- إنتاج نباتات مقاومة للحشرات. | 245 |
| 5-4- تطوير نباتات ذات مقاومة أكبر للفيروسات والبكتيريا | 245 |
| 5-5- تطوير النباتات لإبطاء نضج الثمار | 246 |
| 6- تطبيقات الهندسة الوراثية لدى الحيوانات | 246 |
| 7- تطبيقات الهندسة الوراثية في الطب | 249 |
| 7-1- تشخيص الأمراض الوراثية | 249 |
| 7-2- العلاج الجيني | 253 |
| 8- التطبيقات لتحديد النسب والأدلة الجنائية | 255 |
| 9- الاستنساخ | 257 |
| - مدلول المصطلحات | 261 |
| **المصطلحات العلمية** | 279 |
| **قائمة المراجع** | 291 |

# مُقَدِّمَة

يعد علم الوراثة من العلوم الحديثة إلى حد ما، بالمقارنة مع المجالات البيولوجية الأخرى، حيث بدأ في نهاية القرن الثامن عشر مع المعطيات التي قدمها ماندل عن الهجونة الأحادية والثانوية، والتي دعيت فيما بعد بقانوني مندل الأول والثاني أو بالمندلية، ولكن ورغم ذلك فقد حظي بالاهتمام بشكل متسارع نظراً إلى ما يعول عليه من فائدة للإنسان، وكانت من المراحل الهامة تلك التي مر بها هذا العلم هو المعطيات التي وضحت بنيته الكيميائية وخواصه وآلية عمله، وكان لفرضية واتسون وكريك أكبر الأثر في الوصول إلى فهم عميق لمجمل هذه الأمور.

يتناول هذا المقرر موضوعين رئيسيين: يتعلق الأول بالمعطيات الجزيئية للمادة الوراثية نبين فيه طبيعتها وخواصها الكيميائية والفيزيائية، ومن ثم طريقة قيامها بعملها، في حين يغطي الجزء الثاني الطرائق التي يمكننا استعمالها للتعامل مع هذه المادة وإلى إحداث التغيرات فيها، والتي تهدف إلى إضافة بعض الصفات التي تمنح إلى الكائن الحي مميزات جديدة تجعله أكثر تكيفاً أو أكثر مقاومة وأفضل إنتاجية، أو تهدف إلى علاج بعض الأمراض الوراثية الناتجة من مورثات طافرة لا تقوم بالعمل المتوجب عليها، أو أن تكون وسيلة لإنتاج بعض العقاقير والمركبات الهامة، وكذلك لإنتاج بعض المواد غالية الثمن المستعملة في الصناعة بتكاليف زهيدة وبكميات كبيرة.

وبذلك فإن علم الوراثة والهندسة الوراثية من العلوم الهامة الواعدة، والتي يمكن أن تمثل أسلوباً لمعالجة الكثير من المعضلات التي يعيشها العالم حالياً من المجالات الطبية والصيدلانية والزراعية والصناعية والاجتماعية، وهذا ما دفع العاملين في هذه المجلات إلى الاهتمام بهذا العلم في محاولة للاستفادة منه إلى أقصى الحدود.

وقل رب زدني علما
جامعة دمشق
Damascus University

# الجزء الأول

# الوراثة الجزيئية

وقل رب زدني علما
جامعة دمشق
Damascus University

وقل رب زدني علما
جامعة دمشق
Damascus University

# الفصل الأول

# المادة الوراثية وآلية عملها

تتطلب المادة الوراثية امتلاك عدد من الخصائص لتمكنها من نقل المعلومات الوراثية والتعبير عن نفسها، وتؤمن المادة الوراثية للكائن الحي عدداً من الصفات الهامة، والتي يمكن إجمالها في:

1 – الحفاظ على بقاء الكائن الحي، من خلال إنتاج المادة الوراثية للأنزيمات اللازمة للإشراف على التفاعلات الحيوية اللازمة لعمليات الهدم والبناء عند الكائن الحي، إضافة إلى قدرتها على منح هذا الكائن إمكانية التكيف مع شروط الوسط الذي يعيش فيه ومتغيرات هذه الشروط.

2 – الحفاظ على النوع، من خلال قدرة المادة الوراثية على الانتقال بدقة عبر الأجيال، ويتم هذا من خلال ظاهرتين: الأولى هي إنتاج الأعراس بعد مرورها بالانقسام المنصف واختزال عدد الكروموسومات إلى النصف، والثانية هي الإلقاح الذي يؤدي إلى ترميم عدد الكروموزومات، وإلى تحريض البيضة الملقحة لبدء انقساماتها.

أما عن خصائص المادة الوراثية فيمكن إجمالها بما يلي:

1 – اشتمالها على معلومات حيوية نافعة وثابتة.

2 – قدرتها على التضاعف والانتقال بدقة منظمة من خلية إلى أخرى أثناء الانقسام العادي ومن جيل إلى آخر.

3 – قدرتها على العمل والتعبير عن نفسها.

4 – إمكان حدوث التغير في هذه المادة الوراثية، ولو بشكل نادر كضرورة للتنوع والتطور من خلال ظاهرة الطفرة Mutation.

سوف نستعرض فيما يلي البنية الكيميائية والخواص الفيزيائية وآلية عمل المادة الوراثية قبل الانتقال إلى الأمور المتعلقة بالهندسة الوراثية.

## 1 – DNA المادة الوراثية

### إثبات أن DNA هو المادة الوراثية

### 1- في الكائنات طليعيات النوى: Prokaryotes

ساهمت الكثير من الظواهر الحيوية في التعرف على ماهية المادة الوراثية وطبيعتها الكيميائية، وفي فهم آلية عمل هذه المادة، ومن هذه الظواهر التي ساهمت في ذلك:

### 1-1 التحول الجرثومي Transformation in bacteria:

تعد التجربة التي قام بها غريفث (Griffith 1928) الخطوة الأولى للتعرف على طبيعة المادة الوراثية، بين غريفث من خلال تجربته إمكان انتقال جزء من المادة الوراثية من خلية جرثومية معطية إلى أخرى آخذة، ودمجها ضمن مادتها الوراثية، وانتقالها إلى الأجيال التالية.

استخدم غريفت في تجربته المكورات الرئوية Pneumococcus المسؤولة عن الالتهاب الرئوي لدى الثدييات، والتي نميز منها سلالتين هما:

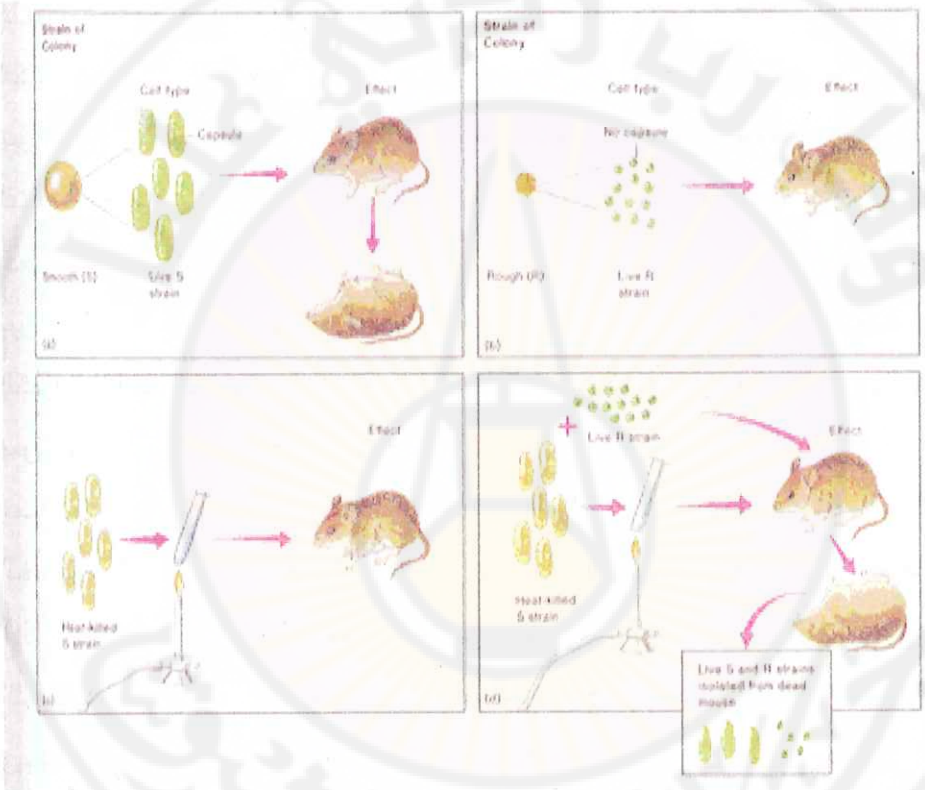
1- نمط سام (S) ذو مظهر أملس يمتلك محفظة متعددة السكاكر تحميه من بلعمة الكريات البيض.

2 – نمط غير سام (R) خشن المظهر، لعدم امتلاكه لمحفظة متعددة السكاكر، وهو نمط طافر عن النمط السام (S).

– تعتمد التجربة على حقن لفئران بهذه المكورات، حيث لم يؤد حقن الفئران بالمكورات الرئوية السامة (S) المقتولة بالحرارة إلى إصابتها وموتها، في حين أدى حقن الفئران بالمكورات السامة المقتولة بالحرارة مع النمط غير السام (R) إلى

إصابة الفئران، وبالتالي إلى موتها، وتبين لدى تفحص دمها أنها تحتوي على الجرثوم ذي النمط السام (S).

يعني هذا أن النمط السام (S) قد ساهم في تحويل النمط غير السام إلى السام، رغم قتل الجراثيم السامة بالحرارة، وأن عامل التحويل الذي منح صفة السمية لم يتخرب بالحرارة، وقد انتقل من السلالة السامة إلى السلالة غير السامة (شكل1).



(شكل1) يبين تجربة غريفت، والتي تشرح ظاهرة التحول الجرثومي
Transformation in becteria

و للتعرف على ماهية و طبيعة هذا العامل فقد قام ألوي عام 1933، ALLOWY بتنقيته و التعرف على طبيعته، من خلال إنجاز هذه الظاهرة في

الوسط الصنعي (*in vitro*)، ولقد لوحظ أن ظاهرة التحول لا تتم عندما تعالج خلاصة السلالة السامة المقتولة بالحرارة بالأنزيم المخرب للـ DNA، في حين أن ظاهرة التحول تتم عندما تعالج خلاصة السلالة S المقتولة بالحرارة بواسطة الأنزيمات الحالة للبروتين، أو تلك الحالة للـ RNA ، مما يعني أن العامل المحول هو من طبيعة حمضية ريبية نووية منقوصة الأوكسجين (DNA).

لا يقتصر التحول الجرثومي في فعله على نقل صفات السمية فقط، بل قد ينقل الكثير من الصفات المفيدة من سلالة جرثومية أخرى ضمن النوع الواحد، ونادراً من نوع إلى آخر، وقد بينت الدراسات أن مقاومة المضادات الحيوية أومقاومة التسمم بالمعادن الثقيلة كالرصاص و الزئبق والزرنيخ هي أكثر الصفات انتقالاً بفعل هذه الظاهرة.

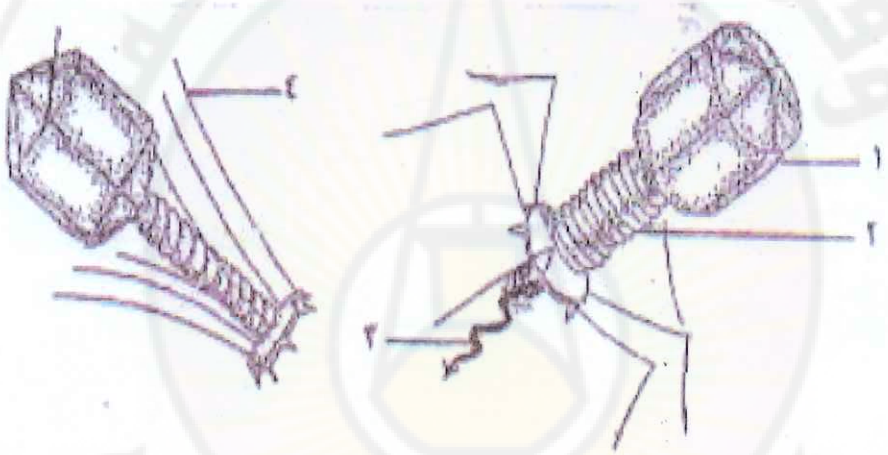
بيّن التثقيل الفائق للمادة المُحولة أنها تمتلك وزناً جزيئياً عالياً، وكما بيّن الرحلان الكهربائي لهذه المادة أنها ذات قدرة عالية على الحركة في أوساط الهجرة، والذي يعود إلى شحنته الحمضية المرتفعة.

ومن حيث امتصاصه للأشعة فوق البنفسجية U.V فقد طابق امتصاصه ذلك الخاص بالـ DNA وهو 260 nm، في حين أن البروتين يمتص طول الموجة 280 nm، كما بيّن أن التحليل الكمي الكيميائي للعناصر وجود عنصري الفوسفات و الآزوت من حيث الكم متناسباً تماماً مع ما هو موجود في الـ DNA ويختلف عما هو موجود في البروتين الفقير بالفوسفات.

تبيّن أن تخليص المادة المحولة من البروتين بنسبة عالية تصل إلى 0.02% لا يعيق عملية التحول، مما يعني أن البروتين لا يدخل بأي شكل من الأشكال في عملية التحول الحاصلة عند الجراثيم.

### 1 – 2- التحول الانتقالي: Genetic transduction

نطلق تعبير الفاجات أو آكلات الجراثيم bacteriophages على الفيروسات المتطفلة على الجراثيم لإنها تؤدي إلى تدمير هذه الجراثيم وتخريبها أثناء تكاثرها، تتركب هذه الفاجات من الـ DNA كمادة وراثية ومن البروتين كمحفظة وغلاف، وهي لا تحتوي على غشاء بلاسمي كسائر الفيروسات ولا على سيتوبلاسما ولا على نواة شكل 2، فهذه الفيروسات VIRUS غير قادرة على التكاثر بشكل حر، ويتطلب ذلك تتطفلها على جرثوم مضيف نوعي.

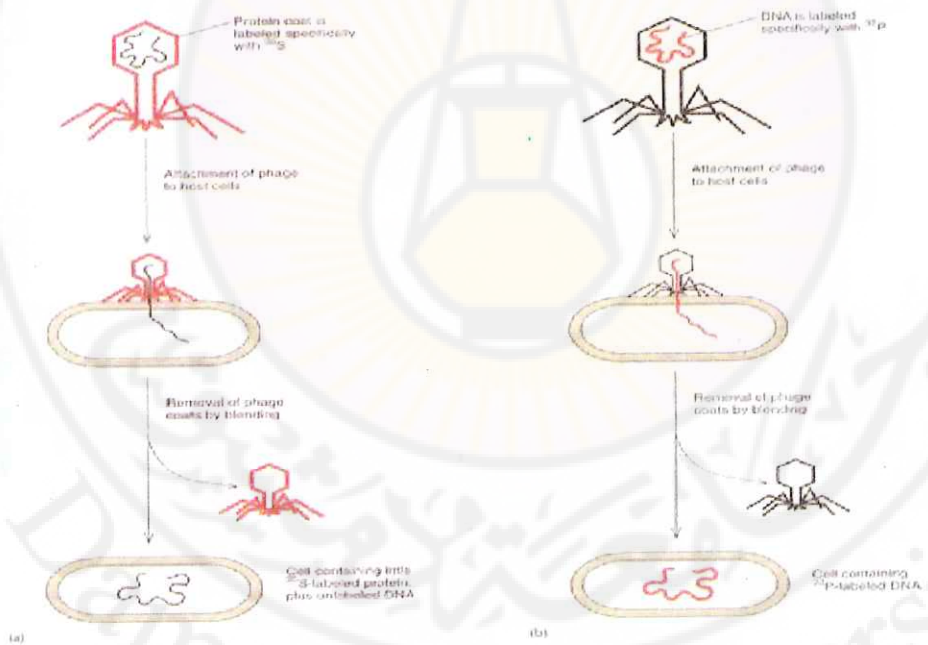



(شكل 2) تخطيط لآكل الجراثيم Bacteriophage إلى اليسار آكل جراثيم حر، إلى اليمين آكل جراثيم في مرحلة تثبته وحقنه للمادة الوراثية في المضيف.

1- رأس آكل الجراثيم 2- الذيل 3- المادة الوراثية 4- الليفيفات البروتينية الذيلية

درس كل من ليدبيرغ وزيندر 1953 أثر التطفل لآكلات الجراثيم على مضيفاتها من الجراثيم، وقد أظهرت هذه الدراسة إمكان قيام الفاجات بعمل كوسيط ناقل لبعض الجينات من جرثوم إلى جرثوم آخر مما يؤدي إلى إكساب هذه الجراثيم صفات جديدة.

تتم العدوى بهذه الفاجات بعد تعرفها على مضيفها الخاص والنوعي، والذي يتم بواسطة الليفات البروتينية الذيلية عن طريق مستقبلات نوعية تسمح بالتعرف على المضيف، وبالتالي بالتثبت السريع و الامتزاز على جدار الجرثوم، ومن ثم حقن المادة الوراثية عبر الثقب الذي يتم إحداثه في جدار الجرثوم إلى داخل المضيف، في حين يبقى الغلاف البروتيني للفيروس (للفاج) خارجاً على شكل قشور وأشباح.
أثبتت تقنية الوسم والتعليم للبروتين بواسطة الكبريت $S^{35}$ وللـ DNA بالفوسفات $P^{32}$، كما يوضح ذلك (الشكل 3)، أن الغلاف البروتيني للفيروس، والذي يمثل 50% من الفيروس، يبقى خارجاً على سطح الجرثوم المضيف، في حين أنDNA يدخل إلى الجرثوم ليسيطر على الآلية الوراثية للمضيف (شكل3).

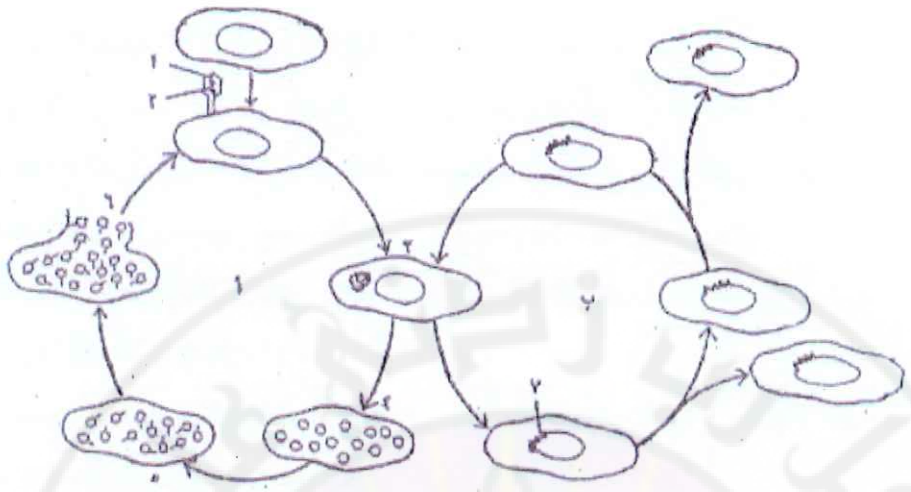



(شكل3): يبين أن الطبيعة للمادة الوراثية في الفيروسات هي الـ DNA من خلال عملية الوسم للـ DNA بواسطة الفوسفات المعلم للبروتين الغلافي بواسطة الكبريت المشع.

تستخدم المعلومات الوراثية (DNA) الفيروس من أجل اصطناع الأنزيمات اللازمة لتضاعفه وإعطاء عدد من النسخ المماثلة، ويتم وفقاً لهذه المعلومات الوراثية أيضاً اصطناع البروتينات التي تشكل الغلف للفاجات المركبة، والتي تكون مشابهة تماماً للفاج الغازي، وتتحرر هذه الفاجات الناتجة بعد اكتمالها، بعد أن يتم إفراز الأنزيمات الحالة التي تؤدي إلى تفجير الخلية المضيفة، تدعى هذه المراحل بالدورة الانحلالية (شكل 4).

لا تؤدي الإصابة بالفاجات بشكل دائم إلى دخولها في دورة انحلالية، كما هو الحال للنمط المعتدل، كما هو الحال بالنسبة للفاج ليمدا (λ).

يمكن لهذا النمط من الفاجات أن تتوغل ضمن الجراثيم، وتبقى كامنة دون أن تدخل في دورة انحلالية، وتبقى كواحدة من عضياتها دون أن تؤثر في نشاطاتها الخاصة، وبحيث يقوم الجرثوم بالانقسام بشكل عادي، ويشكل الـ DNA للفاج والمتحد مع الـ DNA الجرثومي ما ندعوه بطليعة الفاج prophage. ونطلق على الجرثوم اسم الخلية مولدة الانحلال lysogene، ويمكن لطليعة الفاج أن تعود طليقة لتدخل من جديد في دورة انحلالية.



الشكل ٤ ـ دورة حياة آكل الجراثيم ٨ الذي يتطفل على E. colie
يوضح القسم أ الدارة الانحلالية و ب الدارة الكمونية .
١ ـ غلاف بروتيني لآكل الجراثيم، ٢ ـ صبغي آكل الجراثيم ،
المضيف ، ٣ ـ دخول آكل الجراثيم ، ٤ ـ تكاثر صبغي الآكل ،
٥ ـ احاطة الصبغيات الفيروسية بأغلفة بروتينية مركبة من جديد ،
٦ ـ انحلال الجرثوم المضيف وتحرر الفيروسات المركبة
٧ ـ طليعة آكل الجراثيم، ٨ ـ انقسام الخلية المضيفة المتلمح صبغيتها
مع صبغي آكل الجراثيم بنفس معدل الانقسام للبكتريا العادية .

شكل الدارة الانحلالية

(شكل4) يبين الدارة مراحل الدارة الانحلالية والكمونية للفاجات عند العدوى على الجراثيم .

ويمكن أن يتم الارتباط بين الـ DNA للفاج مع كروموزوم الجرثوم، ويمكن لهذا الضم أن ينفك مرة أخرى عن طريق تعرض الخلايا مولدة الانحلال للأشعة فوق البنفسجية (U.V)، أو عن طريق تعرضها لبعض المواد الكيميائية مثلاً.

تعمل الفاجات المعتدلة كوسيط لنقل المادة الوراثية من جرثوم إلى آخر عن طريق هذه البنية المندمجة التي يشكلها مع كروموزوم الجرثوم. يشغل DNA للفاج غالباً موضعاً ثابتاً لا يتغير ضمن الكروموسوم الجرثومي، وعندما تستحث طليعة الفاج لترك موقعها من هذه البنية المندمجة، يمكن أن يحدث خطأ عن طريق المصادفة، تؤدي عملية الفك التي تتم في مواقع غير موافقة لمواقع الضم إلى احتواء DNA

الفاج الناتج من جين أو أكثر من جينات الجرثوم مشكلة بنية هجينية، ويكون المجين الخاص بالفاج الناتج ناقصاً أو غائباً تماماً.

وغالباً ماتساوي الخسارة في الـ DNA للفاج كمية الـ DNA الجرثومي المحمولة. ولا يزيد ما يمكن للفاج حمله على (1 – 2)% من الـ DNA الجرثومي. ويتم ضم الجينات الجرثومية المنقولة إلى مجين الجرثوم الجديد الذي يمكن أن ينتمي إلى سلالة أخرى يؤدي هذا إلى إكسابه صفة جديدة نتيجة للمورثات المندمجة، وبهذا فإن الفاجات الناقلة لمورثات من أحد الجراثيم للسلالة A تستطيع أن تنقلها بعد العدوى إلى أفراد من السلالة B مثلاً، مما يؤدي إلى الحصول على سلالة جديدة تعطي أنسالاً تمتلك صفات من السلالة B الآخذه، وأخرى من السلالة A المعطية مؤدية إلى إعطاء سلالة جديدة، و يمكن أن تتناول عملية النقل هذه أي جزء من الـ DNA الجرثومي. تساهم ظاهرة التحول الانتقالي كما هو الحال بالنسبة للتحول الجرثومي، وكذلك ظاهرة الاقتران الجرثومي في الحصول على سلالات جرثومية هجينة وبصفات جديدة، مما يشكل معضلة فيما يتعلق مثلاً بمقاومة الجراثيم للمضادات الحيوية، ومن الأمثلة على ذلك أن تغدو سلالة جرثومية ماغير مقاومة لمضاد حيوي ما مقاومة له، إثر اكتسابها هذه الصفة عن طريق هذه الظواهر الحيوية.

ساهمت هذه الظواهر الحيوية في تأكيد طبيعة المادة الوراثية، وساهمت في فتح المجال أمام العديد من التطبيقات العملية في مجال الهندسة الوراثية.

### 1-3 – الـ RNA والمادة الوراثية

رغم أن الـ DNA هو المادة الوراثية لكل الكائنات الحية على مختلف مستوياتها، إلا أنه قد كُشف عن الكثير من الحالات للفيروسات التي تمتلك الـ RNA كمادة وراثية، وأول ما لوحظ هذا الأمر كان لدى نباتات التبغ المصابة بالتبرقش: ونتيجة

للحقن بواسطة RNA نقي مأخوذ من فيروس فسيفساء التبغ (T. M.V)، حيث يمكن الفصل بين البروتين والـ RNA الفيروسي عن طريق معاملته بالماء والفينول، استُحدثت فيما بعد سبلٌ لإعادة تركيب الفيروسات، بحيث تحتوي على بروتين من سلالة طافرة والـ RNA من سلالة أخرى أو العكس. وقد تركت هذه الفيروسات الهجينة أمراضاً تصيب أوراق التبغ. تبين لدى فحص الأنسال الناتجة من الإصابة أنها وفي جميع الحالات مشابهة للأب الذي أخذ منه RNA، وهذا ما يثبت أن الـ RNA يمثل المادة الوراثية في هذه الفيروسات.

ومن الفيروسات التي تحتوي على الـ RNA كمادة وراثية، فيروسات الزكام والحمى الصفراء والنكاف وشلل الأطفال وفيروس ورم النسج الضامة والفيروس المسبب لمرض نقص المناعة المكتسب(الإيدز) والفيروس المسبب لحمى الوادي المتصدع، يعد الفيروسان الأخيران من الفيروسات القهقرية (Retrovirus) بحيث يمثل الـ RNA في هذا النمط من الفيروسات، المادة الوراثية خارج المضيف، في حين يمثل الـ DNA المادة الوراثية داخل المضيف، ويتم نسخ هذا الـ DNA عن طريق النسخ العكسي بدءاً من الـ RNA الفيروس، يستعمل هذا DNA كقالب لصنع نسخ متعددة من الـ RNA الفيروس، أما تضاعف الـ RNA في الفيروسات غير القهقرية، فيتم عن طريق تركيب سلسلة من الـ RNA سالبة ومتممة للـ RNA الفيروس، والتي تستخدم كقالب لاصطناع سلاسل مماثلة لـ RNA الفيروسي، أما الفيروسات التي تمتلك جزيئاً مضاعفاً من الـ RNA فإنه يتضاعف بشكل مماثل للـ DNA.

**2- إثبات أنDNA هو المادة الوراثية في الكائنات مميزة النواة: Eukaryotes**

تعد التجارب التي أجريت على اختبار طبيعة المادة الوراثية في الكائنات طليعيات النوى غير مناسبة في الكائنات حقيقية النوى، وهناك إثباتات مباشرة وغير مباشرة

تبرهن جميعها، ودون أن تترك أدنى شك أن الـ DNA هو من يمثل المادة الوراثية في جميع الكائنات سواء حقيقيات النوى أم طليعيات النوى.

### 1-2 الإثباتات غير المباشرة:

**أ . توزيع DNA:**

العلاقة الدقيقة الموجودة بين كمية الـ DNA لكل خلية وعدد المجاميع الكروموسومية:

فعلى سبيل المثال إن معظم الخلايا الجسمية في الكائنات الثنائية تحتوى على كمية من DNA مساوية لضعف الموجودة في أعراس النوع نفسه. فضلاً عن أن التركيب الجزيئي لحمض DNA متشابه في كل أنواع خلايا الكائن الحي، بينما يختلف تركيب حمض DNA والبروتينات كمياً ووضعياً في طرز الخلايا المختلفة [جدول 1 ، 2].

(جدول1): يبين كمية الـ DNA في أنماط الخلايا عند الدجاج .

| نوع الخلية | عدد المجاميع الكروموسومية | DNA (بيكو جرام) |
|---|---|---|
| حيوان منوي | N | 1.26 |
| نورموبلاست* | n2 | 2.49 |
| خلايا الطحال | n2 | 2.55 |
| خلايا البنكرياس | n2 | 2.61 |
| خلايا القلب | n2 | 2.45 |
| خلايا الكلية | n2 | 2.20 |
| خلايا الكبد | n2 | 2.66 |

(* خلايا النورموبلاست هي الخلايا التي تتكون في المرحلة السابقة لتكوين كرات الدم الحمر).

يوضح (الجدول –1–) مقارنة بين كمية الـ DNA التي توجد في خلايا الدجاج المختلفة، وهناك علاقة وطيدة بين كمية الـ DNA (بالبيكوجرام، 1 بيكوجرام = $10^{-12}$ جرام) وإعداد أزواج الكروموزومات الموجودة في نواة خلايا الدجاج.

(جدول2): يبين كمية الـ DNA في أنماط خلوية مختلفة عند عدد من الكائنات.

| الفصيلة | (n) حيوان منوي | n2 نورموبلاست | n2 خلايا كبدية |
|---|---|---|---|
| دجاج | 1.26 | 2.49 | 2.66 |
| سمك المبروك | 1.65 | 3.49 | 3.33 |
| سمك نيلي | 0.91 | 1.97 | 2.01 |
| الإنسان | 1.85 | 3.85 | 4.20 |

أما (الجدول2) فيبين العلاقة المتشابهة في البيانات التي تم الحصول عليها من أربعة كائنات أخرى وتشمل الإنسان. الاختلاف الوحيد لهذه العلاقة هو الظاهر في البيانات المتحصل عليها من خلايا الكبد في الإنسان، والتي تحتوي على ثلاثة أمثال DNA تقريبا من تلك الموجودة في الخلايا المنوية، ويعود ذلك إلى أن خلايا الكبد في الإنسان تختلف عادة في عدد الكروموسومات، حيث إنه من الممكن أن تكون بالصيغ 3n, 4n, 5n, 6n، وعلى هذا فإن كمية DNA في الخلايا الكبدية يمكن أن تكون أكثر من القدر الموجود في الخلايا المنوية بمرتين، ولا توجد مثل هذه العلاقة بين الأعراس والخلايا الجسدية في الأقسام الرئيسية الأخرى للمركبات العضوية الأخرى مثل البروتينات والدهون و الكربوهيدرات، توضح هذه النتائج بطريقة غير مباشرة أن DNA هو المادة الوراثية.

**ب . حدوث الطفرات :**

تعد الأشعة فوق البنفسجية (U.V) واحدة من العوامل الكثيرة التي تمتلك القدرة على إحداث الطفرات للمادة الوارثية، و من الممكن للبكتريا والكائنات الأخرى البسيطة التي تتعرض للإشعاع بأطوال أمواج مختلفة من الأشعة فوق البنفسجية، ويتحدد تأثير طول كل موجة بعدد الطفرات التي يحدثها، وقد تم الحصول على البيانات و رسمها نتيجة لتأثير مختلف هذه الأشعة وأطوالها، نتيجة لتأثير الأشعة كعامل مسبب لحدوث الطفرات، وعندها تمت مقارنة هذا التأثير مع قدرة امتصاص أي جزيء من المحتمل أن يكون المادة الوراثية، ومن المتوقع أن الجزيء الذي يحمل الصفات الوراثية يمكن أن يمتص عند طول الموجة التي تحدث الطفرة.

وقد بينت المعطيات أن الأشعة فوق البنفسجية (U.V) التي طول موجتها 260 nm(نانوميتر) هي من أهم محدثات الطفرات، وقد وجد أن DNA وRNA هي من يمتص هذه الأشعة بقوة شديدة عند طول الموجة 260 nm ، وعلى الجانب الآخر فالبروتينات تمتص بشدة عندَ 280 nm، تؤكد هذه النتائج وتدعم أن الـ RNA والـ DNA هما المادة الوراثية وتستثنى البروتينات.

**جـ . الثبات الاستقلابي:**

يتميز الـ DNA، وبعكس البروتينات والكاربوهيدرات والليبيدات وغيرها من الجزيئات الأخرى الموجودة في الخلية، بثبات استقلابي Metabolically stable بمعنى أنه لا تجرى له عملية بناء و هدم بسرعة، و بمجرد أن تتم عملية بنائه في الخلية فإنه يظل فيها محتفظاً بخواصه مادام أن الخلية تنمو نمواً طبيعياً.

**د . ترافق DNA مع الكروموسومات:**

توجد المادة الوراثية حيث تعمل في النواة كجزيء من الكروموزومات مرتبطة بالبروتينات، ولا وجود لهذه المادة في السيتوبلاسما باستثناء ما هو موجود في

الميتوكوندري والصانعات، والتي تؤدي دوراً وراثياً مكملاً للجينوم النووي، أما البروتينات فتنتشر أيضاً بكثرة في السيتوبلازم والنواة على السواء.

وعلى هذا فإن الـ DNA يوجد فقط في المكونات التي تقوم بالوظائف الوراثية الأولية، وعلى عكس هذا فالبروتينات توجد في كل أجزاء الخلية، وتعد هذه الظواهر دليلاً قوياً على أن الـ DNA هو المادة الوراثية وليست البروتينات.

**2-2 الإثباتات المباشرة:**

تعد الهندسة الوراثية Recombinant DNA technology من أهم الإثباتات المباشرة على أنDNA هو المادة الوراثية.

والهندسة الوراثية هي من أحدث وسائل التطويع الوراثي للكائنات، والتي تتطلب الكثير من الخطوات التي يجب القيام بها، والتي يمكن أن نلخصها بالتالي:

أ- التعرف ومن ثم عزل المادة الوراثية المرغوبة بطريقة دقيقة ونقية.

ب - إدخالها إلى الخلايا بعد أن يتم وضع هذه الجينات في نواقل مناسبة.

ج - تعبر المادة الوراثية الجديدة عن ذاتها في الخلايا المتلقية، أي أن تكون الجين المنقولة فعالةً Functional بعد إدماجها في المجموع الوراثي للخلايا المتقبلة.

د - التأكد من ثبات وتناسخ المادة الوراثية التي تم إضافتها.

هـ - التأكد من توريث المادة الوراثية المتجددة عبر الأجيال.

يتم من خلال هذه التقانة تركيب جزيئات DNA محتوية على مادة وراثة مصدرها من نفس النوع أو من أكثر من النوع. يتم ذلك بالحصول على جين طبيعية، يغرس هذا الجين في ناقل خاص، غالباً ما يتم الحصول عليها من الخلايا البكتيرية، وهي مكونة من DNA أيضاً تسمى بالبلاسميدات، وتستخدم في عملية الغرس أنزيمات متخصصة في قطع تتابعات معينة من الـ DNA وأنزيمات أخرى لوصل الجين المندمجة، يتم بعد هذه الخطوة إدخال البلاسميد ثانية في الخلية

ليعبر عن نفسه في المزارع البكتيرية الناتجة من انقسام هذا الخلية، بهذه الطريقة أمكن مثلاً نقل جين الأنسولين البشري إلى البكتريا، والحصول على هذه المادة كثيرة الأهمية لمرضى السكري في مزارع البكتريا، ثم تنقيتها واختبار صلاحيتها للاستخدام العلاجي، لتكون بديلا الأنسولين الحيواني المستخدم الآن، والذي يتسبب في كثير من الآثار الجانبية.

ونذكر فيما يلي بعض التطبيقات الفعلية التي اعتمدت على تقنية DNA المكون، وسوف نتناول شرح بعضها في النقاط التالية:

(*) إنتاج بكتريا بها جينات تسمح بتخليص البيئة من التلوث الكيماوي (التلوث البترولي للمياه مثلاً).

(*) إنتاج ما يسمى بالعامل الثامن Factor VIII اللازم لمرض النزيف الدموي بحالة نقية، وذلك خوفاً من عمليات نقل الدم التي تؤدي في الوقت الحالي إلى نقل أمراض خطيرة، كالالتهاب الكبدي والأمراض الجنسية القاتلة كالهربس وفقدان المناعة المكتسبة (الإيدز).

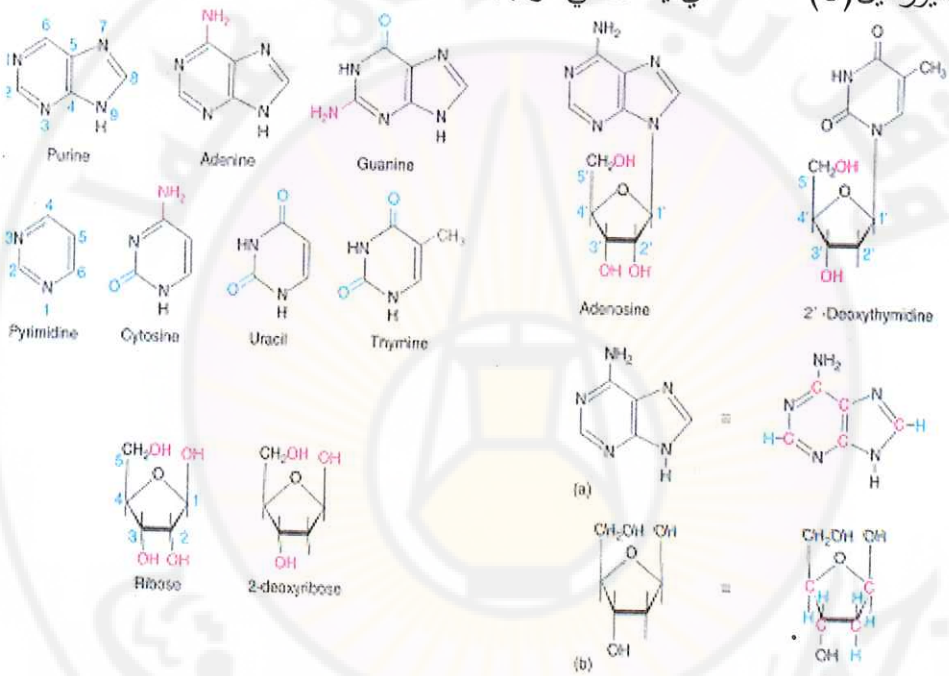
(*) عزل الجينات المسؤولة عن تحول الخلية العادية إلى خلية سرطانية، وغرسها في البكتريا لمعرفة نواتجها، والفرق بين هذه النواتج في الخلايا الطبيعية والخلايا المتحولة.

### 3- التركيب الكيميائي للمادة الوراثية

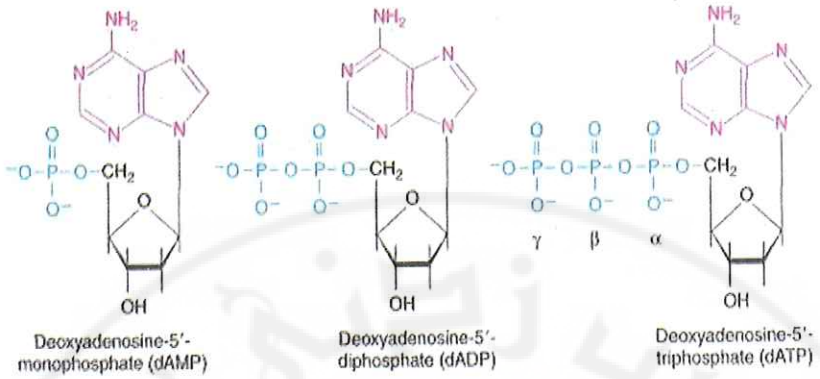
أ- **الحمض الريبي النووي منقوص الأوكسجين**Deoxyribonucleic acid (DNA)

يمثل النيكلوتيد منقوص الأوكسجين الوحدة الأساسية في تركيب الـ DNA، يتألف كل نيكلوتيد من اجتماع و ارتباط سكر خماسي منقوص الأوكسجين وحمض الفوسفات وأساس آزوتي. يرمز لذرات الكربون في السكر ب '1، '2، '3، '4، '5 في حين يعطي حمض الفوسفات الصفة الحمضية للجزيء، أما عن الأسس فنميز

منها أربعة (الشكلان 5-6)، اثنين مشتقين من هيكل البيورين والناتج من التحام هيكل البنزن مع هيكل الأميد أزول خماسي الحلقة، مع استبدال بعدد من ذرات الكربون لأخرى آزوتية، ويُشتق من هيكل البيورين كل من الجوانيين (G) والأدينين (A) وآخرين مشتقين من هيكل البيرميدين، والذي يشتق من هيكل البنزن، هما الثيمين (T) والسيتوزين (C)، هذا وتجب الإشارة إلى أنه يشتق من الهيكل اليورسيل(U) نفسه الذي يدخل في تركيب الـ RNA.




(شكل5): يبين الصيغة الكيميائية للأسس الآزوتية ولسكر الريبوز ولأنماط من النيكلوزيدات.

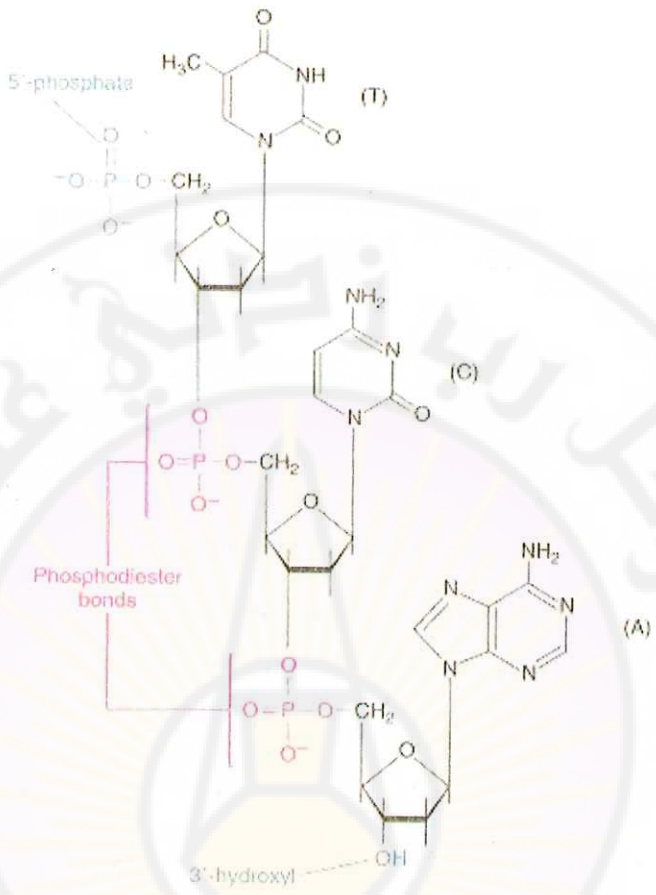



(شكل6):يبين الصيغة الكيميائية لنيكلوتيدالادينين منزوع الأوكسجين(ATP-ADP-AMP) d.

## ب- البنية الأولية لـ Primary structure of DNA

تتمثل البنية الأولية لجزيء الـ DNA بارتباط النيكلوتيدات منقوصة الأوكسجين مع بعضها لتشكل بنية خطية، ترتبط هذه الوحدات بفعل مجموعة الفوسفات التي تربط بشكل دائم بين ذرتي الكربون '3 و'5 لنيكلوتيدين متجاورين. يتألف العمود الفقري لجزيء DNA من تتالي السكر منقوص الأوكسجين والفوسفات، في حين ترتبط الأسس الآزوتية بالريبوز منقوص الأوكسجين في المواقع '1 بشكل هامشي. استعملت سلاسل الـ DNA المفردة كمادة وراثية في بعض الفيروسات. وقد أمكن التعرف على خمسة أنواع من الفيروسات التي تحتوي كروموسوماتها على خيوط مفردة من الـ DNA، غير أن الأكثر شيوعاً هو الـ DNA مضاعف السلسلة (شكل7).

تتميز البنية الأولية لـ DNA بقطبية محددة، حيث تنتهي إحدى النهايتين 5 والثانية 3، ويمثل تتالي سكر الريبوز منقوص الأوكسجين والفوسفات العامود الفقري لهذه السلسلة، أما العنصر المتبدل فهو الأسس الآزوتية الذي يكون مؤلفاً من تتالي الأسس الأربعة A-T-C-G. وهي التي تعطي للجزيء نوعيته.




(شكل 7) يبين نمط ارتباط النيكلوتيدات لتعطي البنية الأولية لجزيء الـ DNA، من خلال تشكيل الروابط الفوسفاتية ثنائية الأستر.

### جـ – البنية الثانوية للـ Secondary structure DNA

بالرغم من أن البنية الأولية للـ DNA، والمتمثلة بسلسة مفردة متعددة النيكلوتيد، كانت معروفة بشكل مبكر نسبياً إلا أنه كان يسود اعتقاد أن الـ DNA الطبيعي –على الأغلب– لا يوجد على شكل سلاسل مفردة، ويبدو أن سلسلتين أو أكثر

ترتبط بطريقة ما مع بعضها البعض، وقد وجد أنها جزيئات ضخمة تتميز بالطول والثبات والشحنة ورفعها إلى درجة كثافة الماء عند وجودها فيه.

اقترح كل من واطسون وكريك 1953 أن الـ DNA يوجد على شكل حلزون، وقد وضعا فرضية الحلزون المضاعف، توصلا إلى هذا الاقتراح اعتماداً على الكثير من المعطيات الفيزيائية والكيميائية بالغة الأهمية، والتي أيدتها أبحاث متعددة، ومن المعطيات التي أُعتمدت للوصول إلى هذا التصور المعطيات التالية:

من بين الذين أسهموا في هذا المجال العالم تشاركوف CHARGAFF (1950) الذي أجرى تحليلاً كيميائياً كمياً للـ DNA من مصادر مختلفة من الكائنات الحية، وقد تبين نتيجة ذلك أن كمية هياكل البيورين تساوي كمية هياكل البيرميدين، وان الكمية الإجمالية للأدينين (A) الناتجة من التحليل تساوي دائماً الكمية الإجمالية للثيمين T ( A = T)، وبالمثل فإن الكمية الإجمالية للغوانيين تساوي دائماً تلك الخاصة بالسيتوزين (C = G)، غير أنه قد وجد أن كمية A+T مختلفة عن كمية الـ C+G، و أن النسبة بينهما لا تساوي الواحد، وان قيمة هذه النسبة تتباين من نمط DNA إلى آخر، وقد تبين أن نسبة الـ C-G تتراوح بين 22% و73%، وتكون هذه النسبة ثابتة في النوع الواحد وتميزه عن الأنواع الأخرى (الجدولين 3 و4).

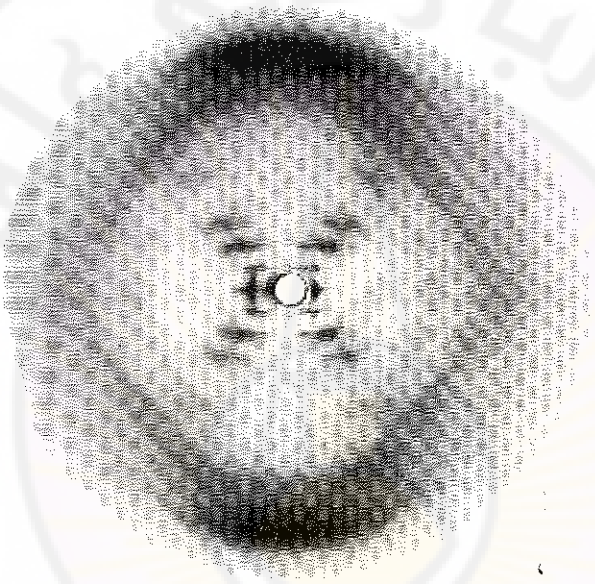
(جدول3): يبين نتيجة التحليل الكمي، و يظهر نسبة وجود القواعد الآزوتية في أنماط الـ DNA تعود إلى خلايا مأخوذة من الإنسان والخميرة ونمط جرثومي ومن الأبقار.

| | Human | | | | | | Avian Tubercle Bacilli | Bovine | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | Sperm | | Thymus | Liver Carcinoma | Yeast | | | Thymus | | | Spleen | |
| | #1 | #2 | | | #1 | #2 | | #1 | #2 | #3 | #1 | #2 |
| A | 0.29 | 0.27 | 0.28 | 0.27 | 0.24 | 0.30 | 0.12 | 0.26 | 0.28 | 0.30 | 0.25 | 0.26 |
| T | 0.31 | 0.30 | 0.29 | 0.27 | 0.25 | 0.29 | 0.11 | 0.25 | 0.24 | 0.25 | 0.24 | 0.24 |
| G | 0.19 | 0.17 | 0.19 | 0.18 | 0.14 | 0.18 | 0.38 | 0.21 | 0.24 | 0.22 | 0.26 | 0.21 |
| C | 0.18 | 0.18 | 0.16 | 0.15 | 0.13 | 0.15 | 0.36 | 0.16 | 0.18 | 0.17 | 0.15 | 0.17 |
| Recovery | 0.96 | 0.92 | 0.91 | 0.87 | 0.76 | 0.92 | 0.77 | 0.88 | 0.94 | 0.94 | 0.84 | 0.88 |

(جدول4): يبين نسبة القواعد الآزوتية G-C في أنماط مختلفة من الكائنات، وهي تتراوح بين 22-73%

| Sources of DNA | Percent (G + C) |
|---|---|
| *Dictyostelium* (slime mold) | 22 |
| *Streptococcus pyogenes* | 34 |
| Vaccinia virus | 36 |
| *Bacillus cereus* | 37 |
| *B. megaterium* | 38 |
| *Haemophilus influenzae* | 39 |
| *Saccharomyces cerevisiae* | 39 |
| Calf thymus | 40 |
| Rat liver | 40 |
| Bull sperm | 41 |
| *Streptococcus pneumoniae* | 42 |
| Wheat germ | 43 |
| Chicken liver | 43 |
| Mouse spleen | 44 |
| Salmon sperm | 44 |
| *B. subtilis* | 44 |
| T1 bacteriophage | 46 |
| *Escherichia coli* | 51 |
| T7 bacteriophage | 51 |
| T3 bacteriophage | 53 |
| *Neurospora crassa* | 54 |
| *Pseudomonas aeruginosa* | 68 |
| *Sarcina lutea* | 72 |
| *Micrococcus lysodeikticus* | 72 |
| Herpes simplex virus | 72 |
| *Mycobacterium phlei* | 73 |

– درس فرانكلين FRANKLIN وآخرون والمعاصرون لواتسون وكريك نمط انعراج أشعة × عبر جزيئات معزولة من الـ DNA، وبينت صور هذا الانعراج أن الـ DNA يتألف من جزيئات منتظمة في ترتيبها، وقد قادت هذه الصور للاستنتاج أن سلسلتين أو أكثر تساهم في تركيب جزيء الـ DNA، وبحيث يتحلزن أحدهما مع الآخر في شكل لولبي منتظم( شكل 8).



(شكل8) يبين الصورة الناتجة من تعريض جزيئات الـ DNA للأشعة السينية، كما بينها العالم فرانكلن.

أخذ واتسون وكريك في محاولتهما لتوضيح شكل هذا الجزيء الضخم فرضية بسيطة هي: أن السلسلتين متعددتي النيوكليوتيدات تشكلان حلزوناً مزدوجاً أو جزيئاً مزدوجاً.

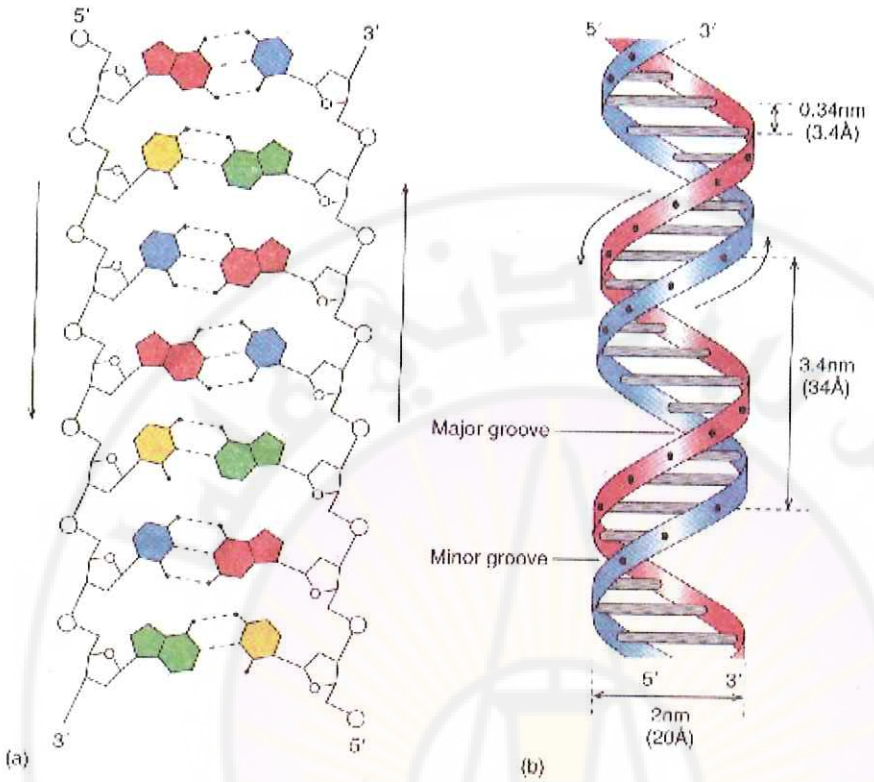
وفي محاولة لتجسيم هذا الجزيء فقد افترضا أن العمود الفقري لهاتين السلسلتين والمؤلف من تتالي السكر والفوسفات واقع إلى الخارج، وأن الأسس الآزوتية تقع في الناحية الأنسية من الحلزون (شكل9)، وتبين عند وضع هاتين السلسلتين قبالة بعضهما أن الأسس للسلسلتين تكون بمحاذاة بعضها، وهذا ما أثار ملاحظة واتسون وكريك وأدركا أن البناء الحلزوني الثابت يمكن أن يتكون نتيجة للتقابل بين A و T والتقابل بين الـ G وC، وتسمح البنية الجزيئية للحالة الأولى بإقامة ارتباط هيدروجيني ثنائي ( و الرابطة الهيدروجينية هي رابطة تساهمية بين الذرة الآخذه والمعطية لتقاسم ذرة هيدروجين واحدة) تكون الرابطة بين الأدنين والغوانين، في حين تسمح البنية الجزئية للسيتوزين والجوانيين بإقامة رابطة هيدروجينية ثلاثية (شكل – 10) تعمل هذه الروابط على تدعيم الجزيء الحلزوني وتساعد على فهم الخواص الكيميائية والفيزيائية لجزيء الـ DNA.

استطاع واتسون وكريك– بافتراضهما للشكل الحلزوني المزدوج لجزيء الـ DNA والمدعم بروابط هيدروجينية بين الأسس بشكل نوعي– الوصول إلى نموذج متناسق ذي قطر 20 $A^{\circ}$ (انغستروم)، يتم الجزيء لفة واحدة كل 34 انغستروم يتطابق في كل لفة عشرة أزواج من الأسس المرتبطة ببعضها، بحيث يشغل كل زوج من النيكلوتيدات 3.4 $A^{\circ}$ انغستروم، و تمتلك سلسلتا جزيء الـ DNA المضاعف قطبية معاكسة، وقد لاحظا أن تجاور الأسس البيورينية سوف يحتاج إلى مسافة أكبر من تلك الموجودة بين محوري السلسلتين، في حين أن تجاور أساسين بيرميدنيين سوف يبقيهما متباعدين، ولا يمكن في كلتا الحالتين تشكيل الروابط الهيدروجينية بين هذه الأسس بمحاولة ربط الأدينين مع السيتوزين، والغوانيين مع الثيمين، فإن البنية الحلزونية تصبح مشوهة لعدم إمكان حدوث الروابط الهيدروجينية أيضاً بسبب تماثل الزمر المتقابلة لدى الأسس المتقابلة، وبالنتيجة أصبح واضحاً تماماً أن الازدواج لا يمكن أن يتم إلا بين الـ A - T من ناحية،

وبين الـ G - C من ناحية أخرى وهي التي تستطيع فقط أن تؤمن التوافق، والقادرة على الوصول إلى بنية ثابتة من خلال الروابط الهيدروجينية بأبعادها الصحيحة في جزيئي حلزوني ذي قطر ثابت يبلغ 20 انغستروماً، يؤدي نمط الالتفاف الحلزوني المعاكس اليميني لهذا الجزيء إلى تشكل نمطين من الأخاديد كبيرة وأخرى صغيرة على سطحه والتي تظهر بشكل متتالٍ كما يبين (الشكل 11) .

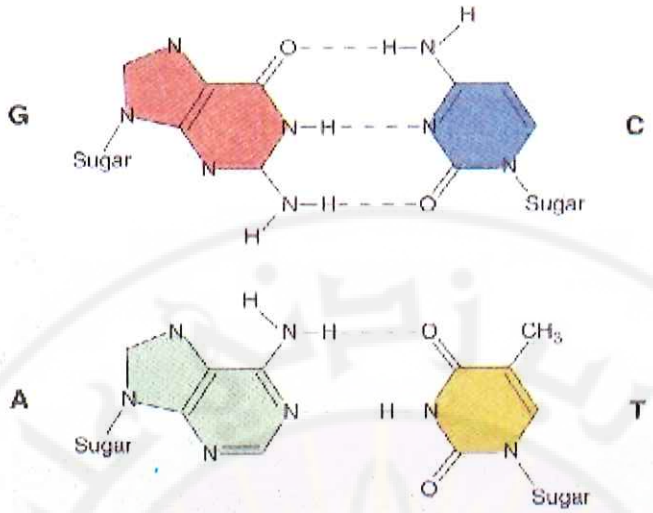
يتوافق هذا التصور مع معطيات تشاركوف التي سبق شرحها، والتي بينت أن كمية هياكل البيورين تساوي دائماً لكمية هياكل البيرميدين، وأن كمية الأدينين تساوي كمية التيمين، وكذلك الأمر بالنسبة للسيتوزين والغوانين .

و الأمر الهام أن هذه الفرضية استطاعت أن تشرح الخواص المختلفة لجزيء الـ DNA لاشتماله على معلومات مفيدة مسجلة من خلال تتالي الأسس الآزوتية، وكذلك في قدرة هذا الجزيء على التضاعف الذاتي، بالإضافة إلى قدرته على التغير والطفور.

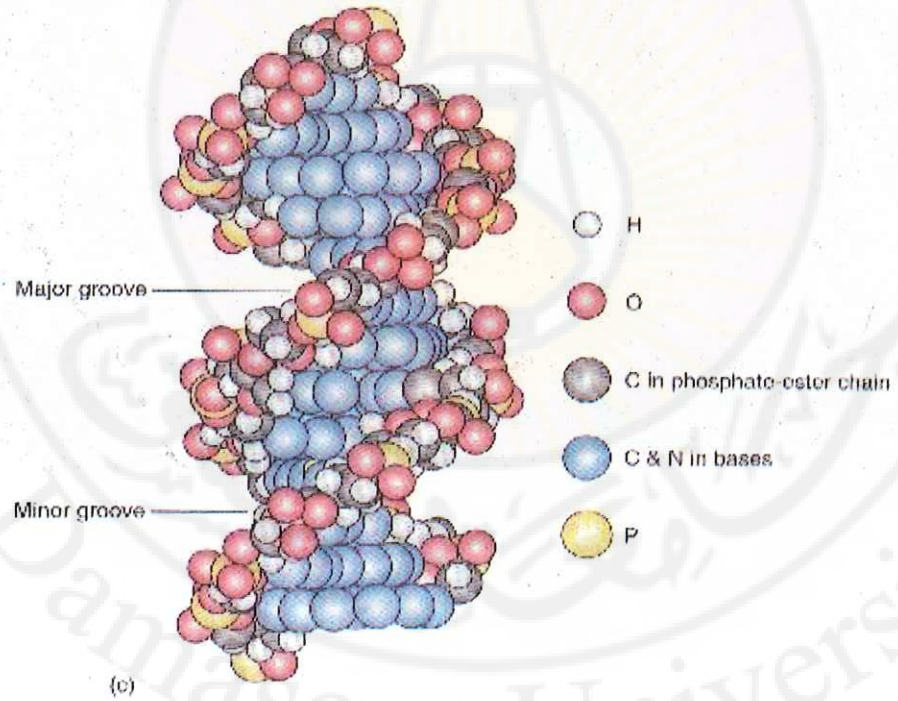



(شكل 9) يبين في الجزء الأيمن منه البنية الحلزونية لجزيء الـ DNA، والذي يلتف التفافاً حلزونياً يمينياً معاكساً ومنتظماً، ويبين الجزء الأيسر نمط الارتباط بين السلسلتين بالروابط الهيدروجينية.

Damascus University



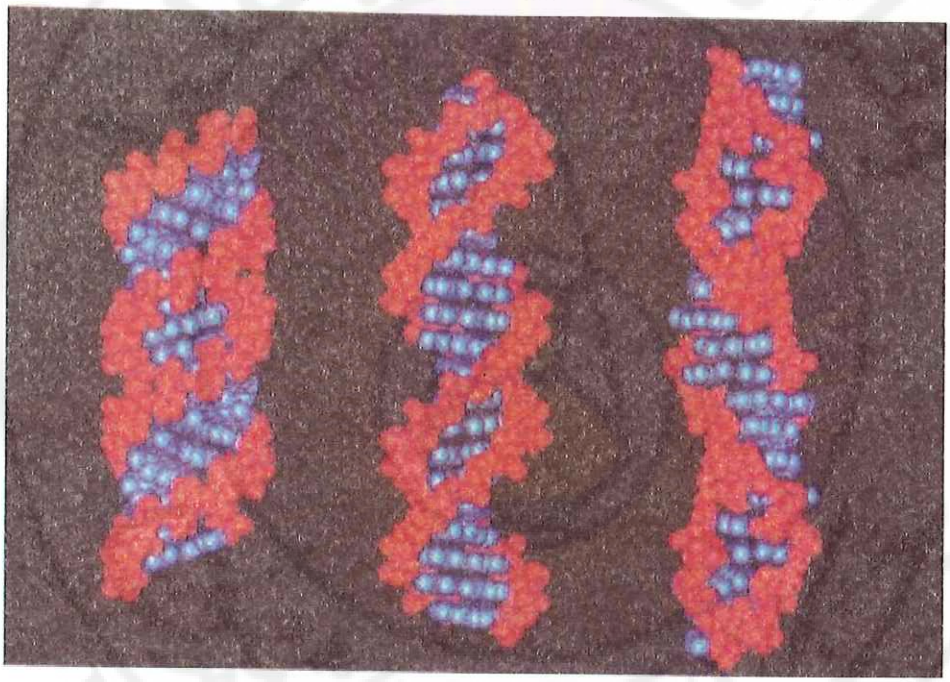

(شكل10): يبين الروابط الهيدروجينية بين الأسس الآزوتية التي تدخل في تركيب البنية الثانوية لجزيء الـ DNA. وهي ثلاثية بين السيتوزين و القوانين بين الأدينين و التيمين.




(الشكل 11) يبين البنية الفراغية لجزيء الـ DNA كما تم تمثيلها من خلال الحاسب، بعد الأخذ بالحسبان المواصفات التي حددها نموذج واتسون وكريك.

بينت العديد من الدراسات وجود أنماط تركيبية ثلاثة من الـ DNA:

- النمط A وهو يتميز بأن له نمط التفاف يميني، ولا يظهر على سطحه سوى أخدود عرض.
- النمط B وهو النمط الذي وصف من قبل واتسون وكريك، والذي يتصف بالتفافه اليميني، ويوجد أخدودان على سطحه كبير وصغير.
- النمط Z وهو ذو التفاف يساري، و الأخدود على سطحه وحيد وعريض، وهو أقل انتظاماً من النمطين السابقين (شكل12).



(شكل12): يبين الأنماط المختلفة للـ DNA: A في اليسار –B في الوسط – Z في اليمين

## 4- بعض خواص جزيء DNA

يتصف الـ DNA الغني بالـ A - T بصفات تميزه عن الـ DNA الغني بالـ G –C ، حيث يتطلب الـ DNA الغني C = G كمية أكبر من الطاقة لإحداث الدنترة

Denaturation (فك الروابط الهيدروجينية بين الأسس في السلسلتين، والعودة إلى البنية الأولية المتمثلة بالسلاسل المفردة)، يمكن إحداث ذلك من خلال التسخين إلى درجة حرارة أعلى من 100 مئوية لدقائق عدة أو عن طريق المعاملة الأيونية، ولا تؤدي هذه المعاملات إلى تخريب، إلا الروابط الهيدروجينية بين أسس السلسلتين، في حين تبقى السلاسل المفردة سليمة، أي إن الروابط الفوسفاتية ثنائية الأستر لا تنفصم بهذه الحرارة.

تؤدي عملية التبريد البطيء للسلاسل المفردة الناتجة من عملية الدنترة إلى عودة هذه السلاسل لتشكل جزيئات مزدوجة Renaturation.

أما التبريد السريع فيبقى على هذه السلاسل بشكلها المفرد. تترافق عملية الدنترة بزيادة في الكثافة، يمكن الكشف عنها بطريقة استعمال مقياس الطيف الضوئي SPECTROPHOTOMETER، كما تتوافق مع زيادة في قدرتها على امتصاص الأشعة فوق البنفسجية (U. V).

يمكننا استعمال هذه الظاهرة لدراسة درجة التشابه والقرابة بين الأنواع المختلفة، والتي تعتمد على قياس مدى الاختلاف بين الجينات، والذي يمكن تحديده من خلال كمية الأسس المزدوجة بين سلسلتي النوعين، فكلما كان النوعان متشابهين للجين نفسه كانت نسبة التوافق كبيرة، كما أنه يمكن استعمال تقانة التهجينDNA-DNA أو RNA-DNA بهدف تحديد مواقع المورثات على الكروموسومات، والذي يمكن القيام به من خلال التهجين بين جينات معلمة والـ DNA الدنترة في خلية ما، بحيث يكون موقع الجين هو الموقع المتألق من خلال التعليم الناتج من التهجين الحاصل مع الجين على الكروموزوم.

**أ- ثبات التناظر: Stability of Tautameric form**

تبين أن ذرات الهيدروجين المرتبطة بالأوكسجين أو النيتروجين في الأسس البيورينية أو البيرميدينية تفضل صوراً ارتباطية معينة، كما تميل إلى البقاء في

أماكن معينة ولا تنتقل بين ذرات الأوكسجين أو النيتروجين في تلك القواعد إلا في حالات نادرة، ويقال في هذه الحالة إن تلك الذرات ثابتة أو مستقرة التناظر Tautamerically stable حيث يكون الوضع الطبيعي أن يكون النيتروجين في الصورة الأمينية Amino form ($NH_2$) بينما الوضع النادر تكون في الصورة الأيمينية Imino form (NH) كما أن ذرة الأوكسجين المرتبطة بذرة $C_6$ في الجوانين والثايمين تكون عادة في الصورة الكيتونية Keto form (C=0) ونادراً ما تأخذ الشكل الإينولي Enol (COH) ويعد هذا الاستقرار مهما جداً حتى يمكن لجزيء DNA أن يقوم بوظائفه البيولوجية بصورة منتظمة.

فلو كانت ذرات الهيدروجين حرة الحركة وليست ثابتة في موقعها، لأصبح من الشائع أن تتمكن الأدنين (A) من التزاوج مع السيتوسين (C) في حين تتزاوج الغوانين (G) مع الثيمين (T)، وسوف يؤدي ذلك إلى اختلال في تتابع الأسس بين السلسلتين بحيث تفقد صفة التكامل الأساسية، وبالتالي يفقد جزيء DNA أهم صفة من خصائصه وهي القدرة على التضاعف الذاتي Self replication بدون أخطاء، إذ إنه لو سمح للصور النادرة أن تزداد فسيؤدي ذلك إلى زيادة كبيرة وغير مرغوبة في الأخطاء (الطفرات) مما يؤثر سلباً على نمو وانقسام الخلية، وبالتالي على الوظائف التي تقوم بها الخلية.

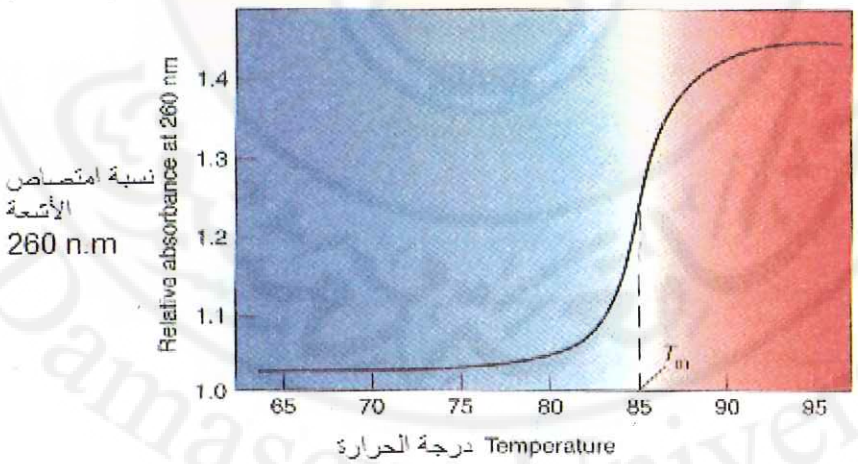
### ب- الدنترة وإعادة الاتحاد Denaturation and Annealing

من الخصائص الهامة لجزيء DNA قدرة السلسلتين الداخلتين في تركيبه على الانفصال والابتعاد عن بعضهما، تحت ظروف معينة فيما يعرف بعملية الدنترة Denaturation، وذلك عند تعريض الحلزون المزدوج لدرجة حرارة أعلى من درجة الحرارة الطبيعية (أي حوالي 100°م)، ويحدث ذلك نتيجة لكسر الروابط الهيدروجينية، وهي روابط ضعيفة وسهلة الكسر بطبيعتها، والتي تربط أزواج

الأسس الآزوتية في السلسلتين، ونتيجة لارتباط C مع G بثلاث روابط هيدروجينية فإنه يلزم في حالة الجزيئات الغنية بالـ G -C درجة حرارة أعلى من تلك التي ترتفع فيها نسبة A-T، حيث إن الأخيرة تكون مرتبطة برابطتين هيدروجينيتين فقط، أي إن درجة حرارة الدنترة، ويطلق عليها نقطة الانصهار melting temperature (Tm)، تعتمد على نسبة G + C / A+T بحيث ترتفع بزيادة هذه النسبة.

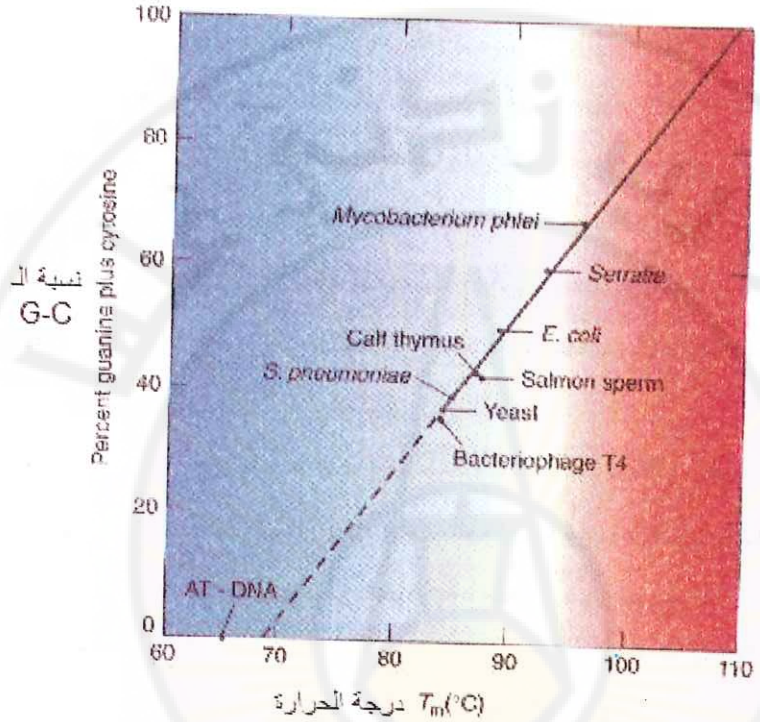
ومن الجدير ذكره أن عملية الدنترة يمكن أن تحدث بطرق غير الحرارة، يمكن الوصول إلى ذلك عن طريق المعاملة ببعض الأملاح العضوية، ويمكن ذلك عن طريق المعاملة بواسطة الـ PH المرتفع، كما يمكن أن يؤدي إنقاص تركيز الأملاح المعدنية إلى الدنترة بفعل إزالة الشحنات المعدلة للشحنات السالبة، مما يؤدي إلى تنافر سلسلتي جزيءDNA بسبب نقص في الشرسبات.

وقد وجدت علاقة بين درجة الحرارة الموجود فيها الـ DNA وكمية امتصاصه للأشعة بطول موجة تبلغ nm260، وهي الموجة الخاصة بالـ DNA، يعود هذا الامتصاص إلى البنية الإلكترونية الخاصة للأسس في جزيء الـ DNA، وتزداد درجة الامتصاص للأشعة بمقدار 60-40% مع اكتمال حادثة الدنترة (شكل13).



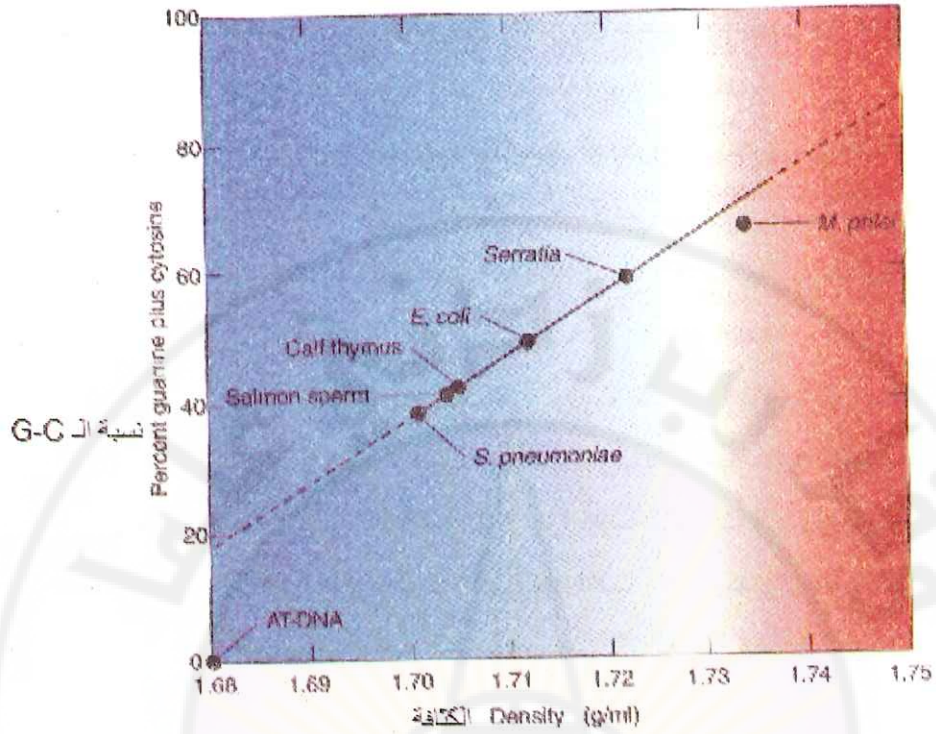

(شكل 13): يبين العلاقة بين درجة الحرارة الموجود فيها الـ DNA وكمية امتصاص الأشعة بطول موجة مقدارها nm 260.

وقد تبين وجود ثمة علاقة بين محتوى الـ DNA من الـ C-G ودرجة الـ TM ، حيث تبين أن درجة الحرارة اللازمة للوصول إلى درجة التفكك ترتفع مع زيادة المحتوى من الـ C-G طبعاً بسبب الروابط الهيدروجينية الأكثر غزارة (شكل14).




(شكل14): يبين العلاقة بين محتوى الـ DNA من السيوزين غوانين ودرجة الحرارة التي تحدث عندها الدنترة(Tm ).

وقد وجد بشكل مماثل علاقة خطية بين نسبة وجود الـ C-G في الـ DNA والكثافة للمحلول الموضوع فيه، حيث يمكننا القيام بقياس الكثافة للأحماض النووية عن طريق التثفيل الفائق Ultracentifigation أو بواسطة مقياس الطيف الضوئي ، يعود هذا التباين في الكثافة إلى أن الحجم المولي لـ A-T أكبر من الحجم المولي لـ C-G (شكل15).




(شكل15): يبين العلاقة بين محتوى الـ DNA من السيتوزين غوانين، والكثافة المقيسة بالغرام في الميللتر في مصادر مختلفة من الـ DNA .

يؤدي التبريد البطيء لجزيء DNA المدنتر إلى إعادة اتحادها، و تسمى هذه العملية Annealing أو Renaturation حيث تتجاذب أزواج الأسس، وترتبط بروابط هيدروجينية حسب قاعدة تشاركوف، وبذلك يستعيد الجزيء التركيب الحلزوني الأصلي.

تعد خاصية إعادة الاتحاد ذات فائدة كبيرة في البيولوجيا الجزيئية (تقدير حجم الجينوم، عدد النيوكلتيدات لكائن ما)، فقد وجد أنه عندما تتم عملية إعادة الاتحاد تحت ظروف قياسية فإن الجينوم الأكبر حجماً سيأخذ وقتاً أطول لإعادة الاتحاد من الجينوم صغير الحجم، ويرجع ذلك إلى أن تتابعات الأسس تأخذ وقتاً أطول

للتوصل إلى التتابع المكمل الصحيح (إذ كلما زاد حجم الجينوم زادت فرص التصادم بين التتابعات غير الصحيحة (غير المكملة) بين الجزيئات.

أدت دراسات إعادة الاتحاد إلى اكتشاف التتابعات المتكررة في جزيء DNA في الكائنات مميزة النواة، فعندما تكون تتابعات معينة في الجزيء عالية التكرار Highly repetitive فإن إعادة الاتحاد بينها سيكون أسرع بكثير عما في التتابعات الممثلة بنسخ وحيدة.

وقد وجد أن عملية إعادة الاتحاد بين سلسلتي جزيء الـ DNA تتم بشكل أمثل، عندما تكون درجة الحرارة 25 تحت درجة الـ Tm، وهذه الدرجة كافية لإضعاف الروابط المؤقتة الشاذة التالية للتفكك، وهي غير كافية لإحداث الدنترة، كما أن لتركيز سلاسل الـ DNA دوراً في إعادة الروابط، فكلما زاد التركيز ارتفعت نسبة عودة الارتباط، كما أن للزمن أهمية في ذلك حيث إن العملية تحتاج إلى وقت كاف.

يمنع التبريد السريع عودة الاتحاد، في حين أن التبريد البطيء يسمح بإعادة الربط، ولضمان استمرار الدنترة نضع المحلول في الثلج لإحداث عملية الإخماد Quenching.

يمكن الحصول على هجين بين سلسلة DNA المفردة الناتجة من الدنترة، وبين سلسلة من جزيء RNA المكملة لها (DNA / RNA) وتعد عملية التهجين الجزيئي Molecular Hybridization من التقنيات الهامة في معرفة العلاقات التطورية بين الأنواع على المستوى الجزيئي، كما أنه يفيد جداً في معرفة مصدر الـ RNA، حيث لا يتم انجذابه وتهجينه إلا مع الـ DNA الذي تم نسخه عليه.

يمكن أيضاً الاستفادة من عملية الدنترة لجزيء DNA في عمل خريطة مادية لجزيء DNA فيمايعرف بعملية رسم خرائط الدنترة الجزيئية Partial denaturation تعتمد هذه التقنية على حقيقة أن المناطق الغنية بأزواج الأسس A-T تنفصل –كما

سبق القول- بمعدل أسرع وأسهل عن G-C. يمكن التعرف على هذه المناطق تحت المجهر الالكتروني على شكل عروات Loops أو فقاعات Bubbles، يمكن قياس المسافات بين العروات ونهاية جزيء DNA.

**5- الـ DNA كجزيء حامل للمعلومات الوراثية:**

يشتمل الـ DNA على المعلومات الوراثية عن طريق حمله للشفرة الوراثية، والتي تتمثل بتتابع الأسس الآزوتية الأربعة على طول السلسلة متعددة النيكلوتيدات.

ويختلف ترتيب النيكلوتيدات من نمط DNA إلى آخر، وتغير الأسس هو الذي يحدد نمط السلسلة الببتيدية المصطنعة انطلاقاً منه، وبحيث يتوافق كل تتابع في الأسس بإنتاج سلسلة ببتيدية محددة بتتالٍ معين للحموض الأمينية اليسارية العشرين، التي وجد أنها تدخل في تركيب البروتين عادة في كل العالم الحي.

تدل الدراسات المختلفة أن الكروموسومات لدى طلائعيات النوى تضم تتاليات نيكلوتيدية غير متكررة في الكروموسوم نفسه، أما في حقيقيات النوى فقد لوحظ الكثير من المتتاليات التي تتكرر بنسب مختلفة، وبهذا نستطيع أن نميز لدى حقيقيات النوى ثلاثة أنماط من المتتاليات:

1 - متتاليات كثيرة التكرار يصل تكرارها أكثر من 100 ألف مرة في الخلية الواحدة.

2- متتاليات متوسطة التكرار، والتي يتراوح تردد وجودها في الخلية الواحدة بين 10000 و 1000 مرة.

3 - متتاليات وحيدة التكرار وهي تمثل الجينات البنيوية الخاصة ببناء معظم البروتينات والأنزيمات، تختلف نسبة تكرار هذه الأنماط الثلاثة من متعضية إلى أخرى.

تتوضع جينات النمط الأول عادة في المناطق القريبة من الجزء المركزي للكروموسومات. تعد المورثات الخاصة بالـ RNA الريبوزومي من النمط الثاني.

### 6- تضاعف الـ DNA Replication DNA:

تتطلب عملية الانقسام الخلوي المنصف أو الخيطي تضاعف المادة الوراثية، بحيث يؤمن المادة الوراثية للخلايا البنات، ويجب أن تتم هذه العملية بدقة بحيث تحتوي الخلايا الناتجة على نسخة مماثلة من المادة الوراثية لتلك الموجودة في الخلية الأم.

يتطلب إنجاز عملية التضاعف هذه تأمين عدد من العوامل الضرورية وهي التالية:

1- النيكلوزيدات ثلاثية الفوسفات منقوصة الأوكسجين (dNTP)

.d ( ATP. GTP .CTP ATP)

2 – إيونات المغنزيوم الثنائية ($Mg^{++}$) الضرورية لتنشيط العمل الأنزيمي.

3 – أنزيم تضاعف الـ DNA DNA Polymerase.

4 – DNA أولي يستعمل كقالب تتم وفقاً له عملية بناء سلسلة DNA مقابلة.

يمكن بوجود العناصر السابقة أن يتم تضاعف جزيء DNA ما صناعياً in vitro يؤدي نفاد أحد النيكوزيدات ثلاثية الفوسفات منقوصة الأوكسجين إلى إيقاف عملية التضاعف، وتجب الإشارة إلى أن النيكلوزيدات أحادية الفوسفات لاتدخل في تركيب الأحماض النووية، قبل أن يتم تنشيطها بفعل أنزيمات الكيناز KINASES وبوجود الجزيئات الغنية بالطاقة ATP وفقا لما يلي:

نيكلوزيد ثنائي الفوسفات + ATP $\xrightarrow{\text{kinase}}$ نيكلوزيد أحادي الفوسفات +ADP

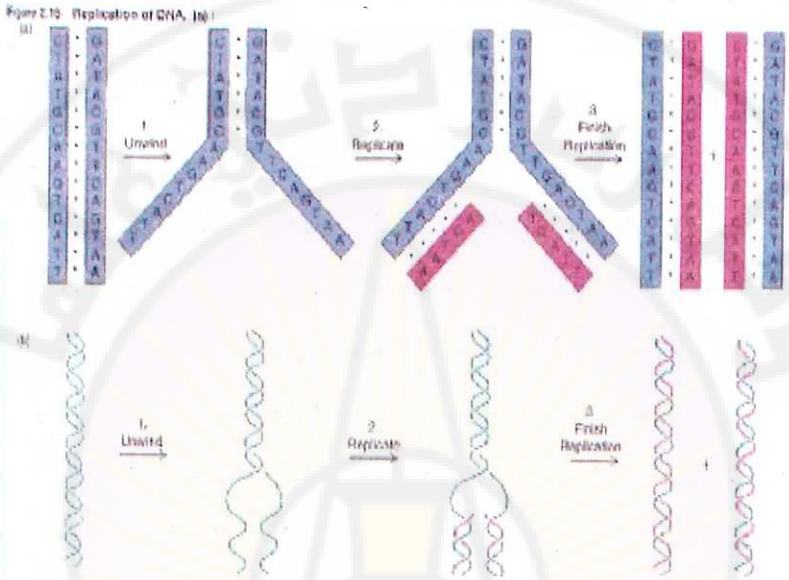
نيكلوزيد ثلاثي الفوسفات + ATP $\xrightarrow{\text{kinase}}$ نيكلوزيد ثنائي الفوسفات + ADP

تمتلك سلسلة جزيء الـ DNA المضاعف قطبية معاكسة، وتكفي معرفة نمط تتالي الأسس الآزوتية في سلسلة لمعرفة نمط ترتيب الأسس في السلسلة المقابلة.

يتميز جزيء الـ DNA بقدرته على التضاعف الذاتي، يبدأ التضاعف من مواقع التناسخ ORIGIN OF REPLICATION، وتتألف هذه المواقع من تتال معين لبعض النيكلوتيدات التي يتعرف عليها أنزيم تضاعف الـ DNA POLYMERASE. يستلزم حدوث هذا التضاعف فك الحلزنة عن طريق الالتفاف المعاكس، والذي يتم من خلال فصم الروابط بين الفوسفات والريبوز بواسطة أنزيمات Topoisomirase، يحصل في الوقت ذاته فك الروابط الهيدروجينية بين سلسلتي جزيء الـ DNA المضاعف في منطقة البلمرة بفعل آلية أنزيمية وأخرى أيونية، والتي تؤدي إلى المباعدة بين السلسلتين لتبدأ عملية التضاعف، وتلعب البروتينات النووية التي ترتبط بالـ DNA دوراً هاماً، فابتعاد هذه الهستونات الأساسية يؤدي إلى تنافر السلسلتين للـ DNA حيث تقوم الهستونات عادة بمعادلة الشحنة، يقوم أنزيم تضاعف الـ DNA إثر ذلك بتركيب سلسلة متممة لكلتا سلسلتي الـ DNA الأصلية التي تعمل كمرصاف أو قالب، بحيث يتم تقابل الـ A مع T والـ C مع G، ومن الجدير ذكره هنا أن بدء عملية التضاعف تبدأ دائما بسلسلة قصيرة من الـ RNA ، والتي تشكل بنية هجينة مع الـ DNA القالب، وتتم إزالة هذه القطع بعد الانتهاء من التركيب بواسطة أنزيمات القطع الخارجي، وقد بينت المعطيات أن طول هذا البوادئ من الـ RNA تبلغ من 10-60 نيكلوتيد لدى طليعيات النوى، أما لدى حقيقيات النوى فتبلغ حوالي 10، ويبدو أن الفيروسات قد توصلت إلى آليات مختلفة لبداية بناء الـ DNA.

تتقدم عملية التضاعف وتشكل الروابط الهيدروجينية، بين السلسلة المصطنعة والسلسلة الأصلية اللتين تعودان إلى الالتفاف الحلزوني مرة أخرى.

تتم عملية تضاعف سلسلتي جزيء الـ DNA بشكل متواقت، بحيث نحصل على جزيئين متشابهين للجزيء الأصلي (الشكل16) أما عن سرعة التضاعف فتبلغ عند E.COLI (العصية القولونية) على سبيل المثال 100.000 زوج من النيكلوتيدات في الدقيقة الواحدة.



(شكل16): تخطيط يوضح آلية تضاعف الـ DNA الذي يبين نمط التضاعف المتواقت لسلسلتي الجزيء بإشراف أنزيم التضاعف DNA POLYMRASE، والذي يتم وفقاً لنمط التضاعف نصف المحافظ كما بينت المعطيات كلها.

يقوم في حالة الـ DNA أنزيم الريدكتاز REDUCTASE بنزع ذرة الأوكسجين من الموقع 2′ للريبوز محولاً إياه إلى الريبوز منقوص الأوكسجين.

كشف كورنبرغ عن أنزيم DNA Polymerase عند E.colie واستطاع مع مساعديه عام 1957 تخليق الـ DNA مخبرياً بعد أن تم عزل هذا الأنزيم والذي دعي بأنزيم كورنبرغ، والذي يعرف حاليا باسم أنزيم DNA Polymerase I.

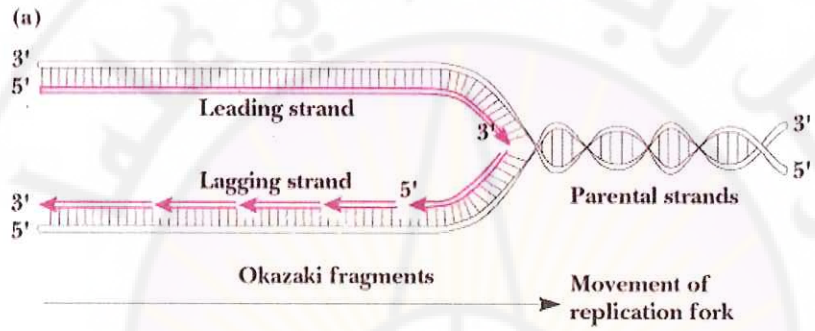
ومنذ اكتشاف كورنبرغ هذا فقد تم عزل عدد كبير من أنزيمات البلمرة لل DNA عند عدد من الكائنات المختلفة، وقد تم تحديد ثلاثة أنواع منه لدى E.colie هي (I-II-III) وهي تختلف عن بعضها من حيث الوزن الجزيئي، ومن حيث الوظيفة التي تؤديها في عملية التضاعف، وقد تم الكشف عن أنماط أخرى عند حقيقيات النوى منها ما كشف في خلايا الغدد التيموسية للعجل، ومن نقي العظم لدى الأرنب.

وقد وجد أن أنزيم البلمرة III عند E.colie هو أنزيم البلمرة الرئيسي والأكثر فعالية في عملية التضاعف، وأن الأنزيم الأول هو المسؤول عن عملية التصحيح والترميم للتلف الحاصل عن تعرض الـ DNA للعوامل المخربة كالأشعة فوق البنفسجية مثلاً، كما وجد أنه الأنزيم الذي يقوم باستئصال بادئ الـ RNA المستخدم في تخليق الـ DNA.

أما أنزيم الـ DNA Polymerase II فهو يقوم بإصلاح التلف في غياب الأنزيمين الأول والثالث. تُظهر معظم أنزيمات البوليميراز لدى حقيقيات النوى إنها تستطيع أن تقوم بنشاط البناء بالاتجاه من ′5 إلى ′3، وأنها تقوم بنشاط هدمي عن طريق قطع نيكلوتيدات أحادية طرفية بالاتجاه من ′3 ⟵ ′5 وتفيد هذه الأنزيمات من خلال خاصية الهدم في عملية قطع النيكلوتيدات الخطأ، وبالتالي تصحيحها من خلال قدرته على البناء، وقد بينت الدراسات أن أنزيمات البلمرة لدى طليعيات النوى نشاط هدم من ′5 إلى ′3 حيث تساهم في استبعاد الأجزاء التالفة بفعل العوامل المخربة للـ DNA، وكذلك لاستبعاد البوادئ من الـ RNA الموجودة في بداية سلاسل الـ DNA المركبة.

تطرح القطبية المعاكسة لسلسلتي جزيء DNA مشكلة خاصة، ذلك أن الأنزيم يقوم بعملية التركيب باتجاه محدود هو من '5 إلى '3، أي إن إضافة أي نيكلوتيد جديد يتم إلى النهاية '3 من السلسلة المركبة.

وقد بين العالم أوكازاكي R. OKASAKI باستخدام تقانة الوسم بالنظائر المشعة أن تضاعف الـ DNA يبدأ في مناطق متعددة من جزيء الـ DNA من التي تدعى بأصول التضاعف Origine of repliction، والتي يتعرف عليها أنزيم البلمرة ليبدأ بالبناء، بحيث يتم تركيب قطع صغيرة (تدعى بشظايا أوكازاكي) Okazaki fragments بالاتجاه من '5 إلى '3 يقوم بعد ذلك أنزيم الربط LIGASE بوصل قطع أوكازاكي ببعضها لإعطاء السلسلة الكاملة المتممة للقالب شكل17.




(شكل17) يبين الآلية التي يتم من خلالها تضاعف الـ DNA بشكل متواقت لكلتا السلسلتين بتركيب لشظايا أوكازاكي بالاتجاه '5 إلى '3 .

بينت مختلف التقنيات أن الـ DNA يتضاعف وفقا للنمط نصف المحافظ أي تقوم كلتا سلسلتي جزيء الـ DNA الحلزوني بالعمل كمرصاف (أو قالب) لبناء سلسلة مقابلة لها، وبحيث يتقابل الأدنين (A) مع الثيمين (T) والسيتوزين (C) مع الغوانيين (G)، وبذلك يتشكل جزيئان من الـ DNA يتألف كل منها من سلسلة قديمة وأخرى حديثة (جزيئات هجينة) .

وقد تم تأكيد حصول هذا النمط من التضاعف من خلال استعمال الآزوت الثقيل في جزء من الـ DNA خلال أجيال عدة في E.colie، وبنقل هذه الجراثيم إلى

وسط يحتوي على الآزوت الطبيعي $N^{14}$ فإننا نرى أن الجيل الأول يحتوي على جزيئات هجينية بالكامل، أما في الأجيال التالية فنجد أن عدد الجزيئات يبقى ثابتاً ويساوي اثنتين، في حين أن كل الجزيئات الجديدة المركبة حديثاً لا تحتوي على $N^{14}$ (شكل18). بينت الدراسات المختلفة أن نمط تضاعف الـ DNA هو من النمط نصف المحافظ Semi-conservative method مع وجود بعض التبدلات المتمثلة بحدوث العبور الكروموسومي الذي يؤدي إلى انتقال بعض القطع الكروموسومية من كروموسوم إلى آخر.

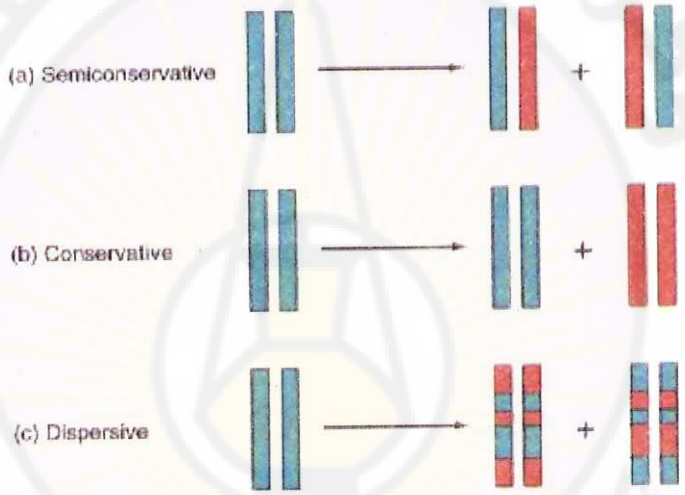



Figure 3.21 Three hypotheses for DNA replication.

(شكل 18): تخطيط يوضح طريقة تضاعف DNA وفقاً للنمط نصف المحافظ a والنمط المحافظ b والنمط غير المحافظ c.

## 7- الحمض الريبي النووي الـ Ribonucleic acid RNA :

يوجد الـ RNA بشكل أساسي في السيتوبلاسما، وقليل منه في النواة، في حين يتركز DNA بشكل عام في النواة.

يتميز الـ RNA عن DNA باحتوائه على الريبوز عوضاً عن الريبوز منقوص الأوكسجين، وبأن اليوراسيل U يحل محل الثيمين T، ورغم الانثناءات البسيطة فإن الـ RNA يتألف عادة من سلسلة وحيدة، ولهذا فان قاعدة تشاركوف القائلة بتساوي كمية اليوراسيل (U) والأدنين (A) من ناحية، وتساوي كمية (C) السيتوزين مع الغوانيين (G) من ناحية أخرى غير منطبقة، وللسبب نفسه فإن عملية التسخين لا تؤدي إلى تغيير يذكر في كثافة المحلول الموجود، وإنه لازيادة في القدرة على امتصاص الأشعة فوق البنفسجية عند التسخين، لأنه لا وجود لظاهرة الدنترة.

يعد الـ RNA نسخة متممة لأجزاء من الـ DNA تدعى هذه المناطق بمورثات الـ RNA، كما يمثل الـ RNA المادة الوراثية لعدد غير قليل من الفيروسات.

يشكل النيوكلوتيد الوحدة الأساسية في تركيب جزيء الـ RNA. يتألف كل نيوكلوتيد من سكر الريبوز وحمض الفوسفات، وأحد الأسس الأربعة وهي الادينين (A) واليوراسيل (U) والسيتوزين (C) والغوانين (G) ، ترتبط النيكوتيدات ببعضها بواسطة الروابط الفوسفاتية ثنائية الاستر بالأسلوب ذاته الذي رأيناه في الـ DNA، كما أن لسلاسل الـ RNA قطبية محددة.

رغم أن فرضية واتسون وكريك قد اهتمت بجزيء الـ DNA، إلا أنه قد تبين منذ فترة زمنية بعيدة أن بعض الفيروسات المحتوية على RNA كمادة وراثية تكون فيها جزيئات الـ RNA مزدوجة السلسلة على شكل حلزون، بحيث يتقابل الـ A مع U والـ C مع G، بالإضافة إلى ذلك فإن معظم جزيئات الـ RNA مفردة السلسلة يمكن أن تشتمل على بعض المناطق التي تكون فيها السلسلة منثنية على نفسها، لتشكل مواقع صغيرة مزدوجة على شكل حلزون.

وعندما يكون الـ RNA كحلزون مزدوج السلسلة، ويعمل كمادة وراثية كما هو الحال بالنسبة لبعض الفيروسات، فإن ما ذكرناه من البنية الثانوية لـ DNA ينطبق تماماً

على الـ RNA ماعدا أن الأدينين يتقابل مع اليوراسيل (U) بدلاً عن الثيمين (T) وأن الريبوز منقوص الأوكسجين يستبدل به الريبوز الـ RNA.

**أ – أنماط الـ RNA :**

نميز وجود ثلاثة أنماط من الـ RNA التي يتم نسخها بدءاً من جينات محددة لكل منها، والتي تساهم في إنجاز عمل المادة الوراثية لإتمام تركيب البروتين (الترجمة).

**RNAm الرسول Messenger:**

يمثل RNA الرسول نسخة متممة لإحدى الجينات المسؤولة عن تركيب بروتين محدد ويتم نسخها بدءاً من إحدى سلسلتي الـ DNA دون الأخرى، والتي يمكن أن تمثل جينات أخرى.

يوجد الـ RNAm بشكل أساسي في السيتوبلاسما، ويمثل حوالي 5 % من مجموع الـ RNA في الخلية. يتوضع في السيتوبلازم على سطح الجسيمات الريبية، وقد وجد أن الـ RNA الرسول المنسوخ هو أكبر بكثير من الـ RNAm الناتج الذي تتم ترجمته.

تتم خلال عملية النضوج (Mutration) للـ RNAm الرسول إزالة الأجزاء عديمة المعنى، أو غير القابلة للترجمة، أو ما يدعى بالإنترونات introns، في حين يتم الإبقاء على الأجزاء القابلة للترجمة، أو ما يدعى بالإكسونات exones، يقوم بهذه العملية أنزيمات القطع الداخلي التي تتعرف على هذه الأجزاء، وتقوم بتقطيعها ومن ثم تقوم أنزيمات الليغاز بوصلها مرة أخرى .

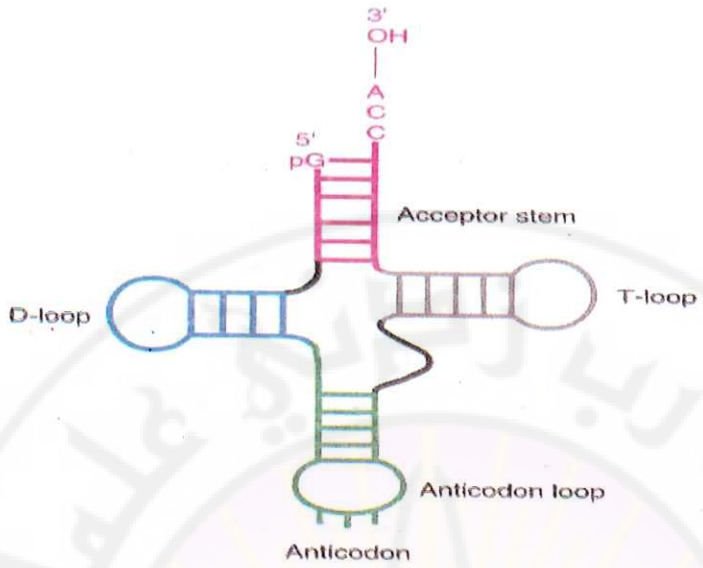
يتم وصل القطع المتبقية لتعطينا الـ RNA الرسول الناضج الذي يهاجر إلى السيتوبلازم، حيث تتم عملية الترجمة إلى بروتين معين. يحمل الـ RNA الرسول

في النهاية الرأسية النيوكلوتيد 7 ميثيل غوانوزين ثلاثي الفوسفات، في حين أن النهاية الذيلية 3′ تحمل متعدد الأدينين غير القابل للترجمة. يتميز الـ RNA بوزن جزيءي يتناسب مع قطعة الـ DNA المنسوخة، ويعد طول عمره قصيراً نسبياً بالمقارنة مع أنماط الـ RNA الأخرى.

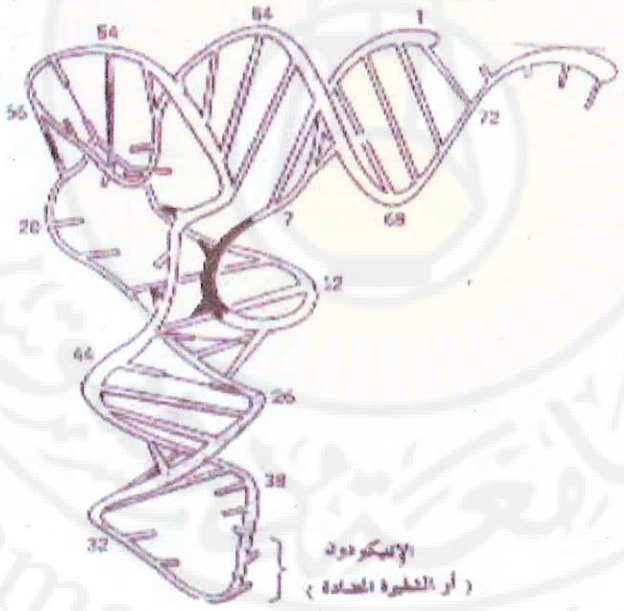
**- الـ RNAt الناقل TRANSFER:**

أطلق على هذا الجزيء هذه التسمية نظراً إلى الوظيفة التي يقوم بها، وهي ربط الأحماض الأمينية المنشطة ونقلها إلى RNA الرسول، حيث تتم عملية تركيب البروتين على الجسيمات الريبية. يمثل الـ RNA الناقل نحو 15 % من الـ RNA في الخلية، ويتألف كل جزيء من نحو 75 نيكلوتيداً، يتم نسخها الـ RNA الناقل بدءاً من المورثات الخاصة. والـ RNA المنسوخ أكبر من RNA الناضج. يحتوى الـ RNA الناقل الأولي على سلاسل إضافية رأسية وأخرى ذيلية وثالثة تقع في مركز الجزيء والتي تعد انترونات لافائدة من وجودها، تتم خلال مراحل نضوجه عملية إزالة لهذه السلاسل، وإضافة إلى عدد من النيكلوتيدات غير العادية.

ونتيجة للتقابلات الثانوية بين الأسس الآزوتية التي تتشكل بينها روابط هيدروجينية (C- G و A –U) بين أجزاء من هذا الجزيء من ناحية ولوجود النيكلوتيدات غير العادية والمعدلة التي تعيق تشكل هذه التقابلات من ناحية أخرى. يأخذ هذا الجزيء شكل ورقة البرسيم (النفل)، ويتألف هذا الجزيء من عُرى متعددة ومن ذراع حامل للحمض الأميني، كما يوضح الشكلان(19 و 20).




(شكل19): يبين البنية الثانوية لجزيء الـ RNAt الناقل لحمض الفينيل يبين الأجزاء المختلفة له .




(شكل20): يبين البنية الفراغية للRNAt

وهكذا يمكننا أن نميز في الحمض الناقل الأجزاء التالية:

1- الذراع الحامل للحمض الأميني وهو ناتج من اللقاء بين النهاية الرأسية بالنهاية الذيلية، والمنتهي بزمرة OH لحمض الأدينيل، وبتتالٍ في النهاية الذيلية بالثلاثية (A-C-C) غير المزدوجة توجد هذه الثلاثية لدى كل أنماط الـ RNA الناقلة، وتقوم بحمل الحمض الأميني المنشط.

2- العروة الأولى( d ) تعرف بعروة اليوراسيل ثنائي الهيدروجين وتعود أهمية هذه العروة إلى أنها تقوم بالتعرف على أنزيم تنشيط الأحماض الأمينية (Aminoacyl-RNA synthetase) أمينو آسيل RAN سينتيتاز والضروري لتعرف الحمض الناقل على الحمض الأميني الموافق وارتباطه به بوجود الجزيئات الغنية بالطاقة الـATP.

3- العروة الثانية هي عروة الأنتيكودون (ANTICODON) يتمثل الأنتيكودون بالثلاثية المتوضعة في النهاية المنثنية لهذه العروة، يتمكن الـ RNAt من خلال الأنتيكودون من قراءة الكودون CODON على مستوى RNAm.

4- العروة الثالثة و تدعى بالعروة الإضافية و تتراوح عدد النيكوتيدات فيها من 3-18، وهي متغيرة من نمط RNA ناقل إلى آخر.

5- العروة الرابعة ( T ) وتعرف بعروة اليوريدين الكاذب، وتعود أهمية هذه العروة إلى أنها تقوم بربط معقد RNAt الحامل للحمض الأميني المنشط على سطح الريبوزوم.

وقد استطاع العلماء التعرف على تتالي النيكلويتدات لكل الأحماض النووية الناقلة ومن ثم تم اصطناع أغلبها مخبرياً، وتجب الإشارة إلى أنه يمكن أن يكون للحمض الأميني أكثر من حمض ناقل واحد وأنه يوجد أكثر من أربعين نمطاً من هذا الحمض، ويمكننا أخيراً أن نلخص الوظائف الأساسية لجزيء الـ RNAt بالتالي:

1 – يقوم بربط الحمض الأميني النوعي المنشط بواسطة الذراع الخاص بذلك.

2 – يقوم بقراءة الكودون بالتقابل مع الأنتيكودون الخاص به.

3 – يتعرف على المكان المخصص على سطح الريبوزوم ويرتبط عليها عندما تتم عملية بناء البروتين.

وقد تبين أن لكل حمض أميني أكثر من نمط من الـ RNA الناقل والتي يتم نسخها بدءاً من مورثاتها الموزعة على الكروموسومات.

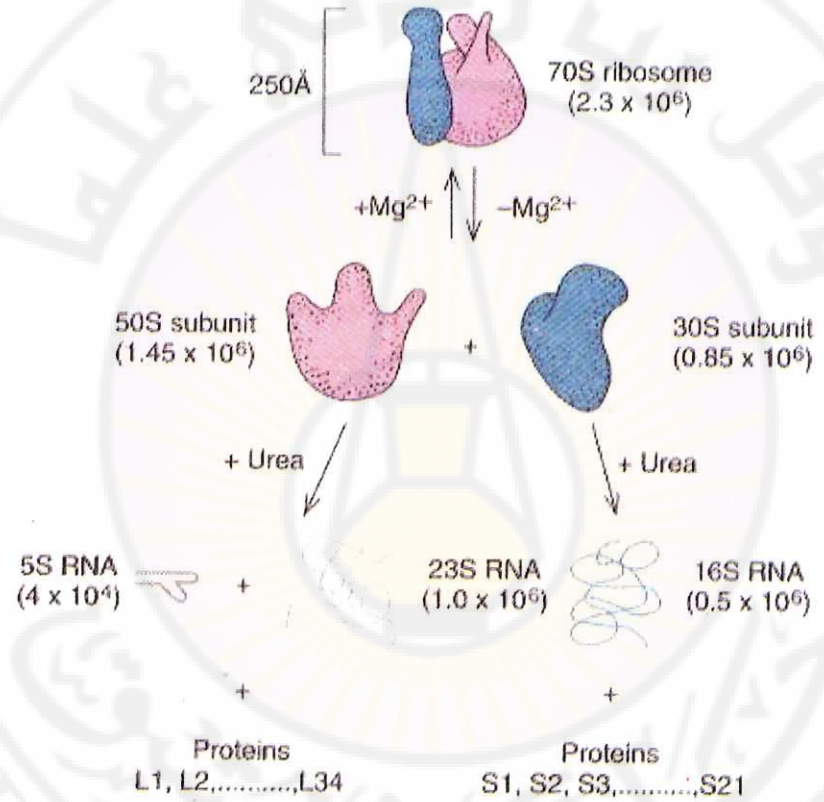
**-rRNA الريبوزومي RIBOSOMAL:**

يشكل الـ RNA الريبوزومي نحو 80 % من مجموعة الـ RNA في الخلية، ونميز من خلال الوزن الجزيئي وجود ثلاثة أنماط من RNA الريبوزومي عند طليعيات النوى هي: خفيفة 5S ومتوسطة 16S وثقيلة 23S (تمثل S ثابت التسديم ويدل على الموقع الذي يتوضع فيها الجزيء بعد إجراء ما فوق التثفيل Ultracenrifigation وهو على علاقة مع الوزن الجزيئي والكثافة)، يتألف كل من هذه الأنماط من سلسلة وحيدة تنثني في بعض مناطقها، وترتبط هذه الجزيئات مع بعض البروتينات لتعطي الوحدات الأولية المشكلة الريبوزوم RIBOSOME.

يعطي ارتباط الأنماط 5S و 23S مع نحو ثلاثين جزيئاً بروتينياً ما ندعوه بالوحدة الكبرى، وهي ذات ثابت تسديم 50S، أما ارتباط الـ 16S RNA مع نحو عشرين جزيئاً بروتينياً فيعطي ما يعرف بالوحدة الصغرى. يؤدي ارتباط الوحدتين الصغرى والكبرى لبعضهما أثناء عملية الترجمة (بناء البروتين) إلى ما يعرف بالجسيم الريبي ذي ثابت التسديم70S.

أما لدى حقيقيات النوى فإن ارتباط أنماط الـ RNA ذات الأنماط 5S. 7S. 28S مع حوالي 34 جزيئاً بروتينياً فيؤدي إلى الوحدة الكبرى 60S، أما ارتباط نمط الـ 18S RNAt مع نحو 24 جزيئاً بروتينياً فيعطي ما ندعوه بالوحدة الصغرى 40S، يعطي ارتباط هاتين الوحدتين الجسيم الريبي ذا ثابت التسديم 80S (شكل21).

تعد أنماط الـ rRNA المختلفة نسخة متممة عن مورثات RNA الريبوزومي التي تتوضع في النوية أو ما ندعوه بالمنظم النووي، يحتوي هذا المنظم على عدد كبير من النسخ الخاصة بكل نمط من مورثات الـ rRNA. تخضع هذه الجزيئات –بشكل مماثل لباقي أنماط الـ RNA– إلى معالجة قبل عبورها إلى السيتوبلازم، حيث تتم إزالة الأجزاء غير الهامة الإنترونات والإبقاء على الأجزاء الهامة (الإكسونات).




(شكل21): يبين بنية الريبوزوم لدى طليعيات النوى :عند *E. coli*

تقوم البروتينات الريبية التي تدخل في تركيب الوحدة الريبية الصغرى والكبرى بعمل أنزيمي، بالإضافة إلى أنها تدخل في إعطاء البنية ومن مكونات البروتينات الريبية أنزيم الببتيديل ترانسفيراز الذي يعمل على تركيب الرابطة الببتيدية أثناء

عملية تركيب البروتين، والذي يعد أحد بروتينات الوحدة الريبية الكبرى، وكذلك بروتين الريبوفورين الذي يعمل على تثبيت الوحدة الريبية الكبرى على الشبكة الاندوبلاسمية، والذي يتيح لها الحركة كونه أحد البروتينات المتكاملة مستفيداً من لدونة غشاء الشبكة الإندوبلاسمية .

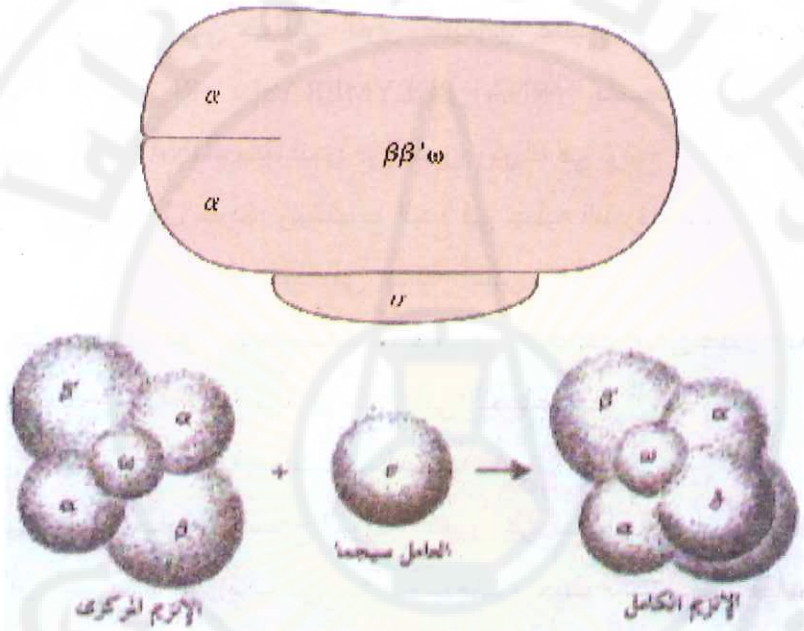
**ب- نسخ الـ RNA:** Transcription of RNA

يماثل نسخ المورثات، في حقيقيات النوى وطليعاتها عملية تضاعف الـ DNA يقوم أنزيم تركيب الـ RNA (RNA POLYMERASE) باصطناع سلسلة متممة لإحدى سلاسل الـ DNA، طبقاً لنموذج واتسون وكريك في تزاوج الأسس على طول القالب ليعطي سلاسل مفردة، وليستطيع البدء في عملية البلمرة يتعرف الأنزيم على المحضض Promoter الموجود في بداية الجين، وكما ذكرنا سابقا تستعمل النيكلوتيدات بدلاً من النيكلوتيدات منقوصة الأوكسجين، ويستبدل بالثيمين اليوراسيل. تتم عملية النسخ كما هو الحال في التضاعف في الاتجاه من 5' إلى 3' و تكون النسخة ذات قطبية معاكسة للقالب.

إن الهدف من النسخ هو السماح للمورثة التعبير عن نفسها بعيداً عنها، علماً بأنه لا بد أن تبقى هذه المورثات في الكروموسومات، حيث يمكن تضاعفها ونقلها، ومع ذلك لا بد أن تكون قادرة على السيطرة على النشاط الخلوي، وبخاصة تركيب البروتين، لذلك فهي تكون نسخاً تهاجر بعيداً عن الكروموسومات وتتفكك بمجرد أن تنقضي فائدتها الوظيفية بواسطة أنزيمات الريبونكلياز.

تتم عملية النسخ بإشراف أنزيم بلمرة الـ RNA الذي يبلغ وزنه490000، وتبين أنه يتألف عند E.colie من 6 وحدات اثنتين من النمط ألفا، وثالثة من النمط بيتا، ورابعة من النمط بيتا فتحة، والخامسة من النمط ابسيلوم، يؤلف مجموع السلاسل الخمس السابقة ما ندعوه بأنزيم اللبCore enzyme، أما الوحدة السادسة فهي

الوحدة سيكما، والتي تعد أساسية لبدء الأنزيم في قيامه بعمله (شكل22) وتنفصل هذه الأخيرة عن الأنزيم بعد البدء بعملية البلمرة، حيث تحفز الوحدة سيكما أنزيم اللب على الارتباط في منطقة المحضض Promoter التي تسبق الجين، وبدون العامل سيكما يمكن لأنزيم اللب أن يبدأ عملية البلمرة من أي منطقة من الجين، أي إن النسخ عند ذلك لايكون لكامل الجين، ويتم بشكل عشوائي كما أوضحت الدراسات التي تناولت هذه المسألة.



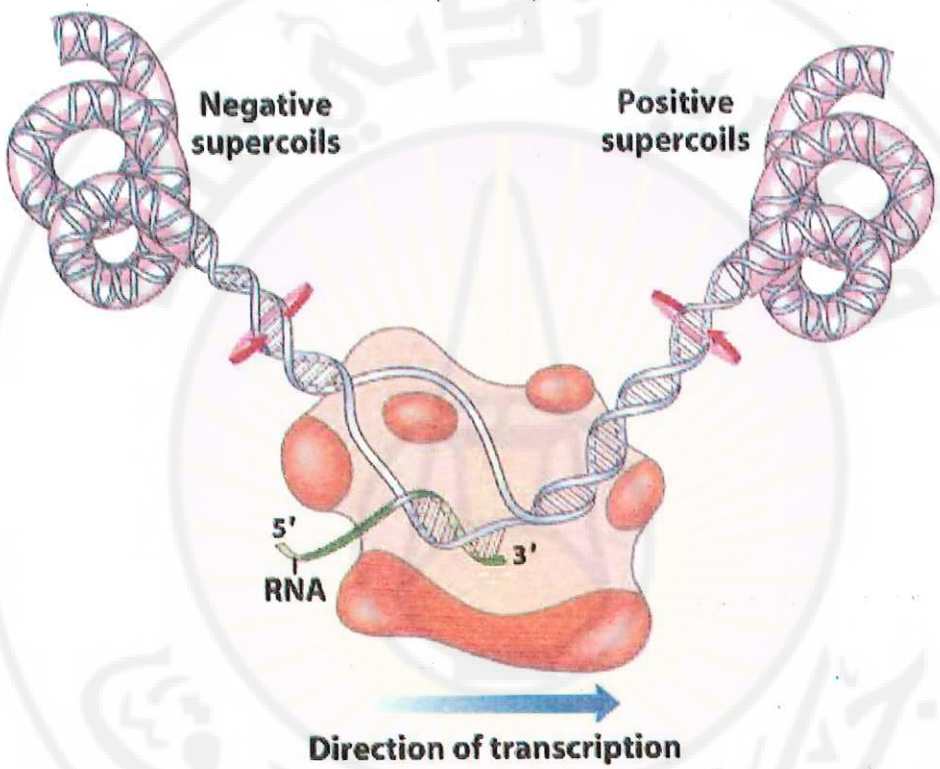

(شكل 22 ) يبين تخطيطاً لأنزيم RNA Polymerase والمؤلف من ست وحدات

تم التمييز لدى حقيقيات النوى بوجود ثلاثة أنماط من الأنزيم RNA Polymerase I هي:

الأنزيم الأول RNA Polymerase I يقوم بنسخ الأنماط المختلفة من الـ RNAr الريبوزومي، أما النمط الثاني RNA Polymerase II فيقوم بنسخ الجينات التركيبية أي أنماط الـ RNAm، بالإضافة إلى أنماط الـ RNA صغيرة الحجم،

أما النمط الثالث RNA Polymerse III فيقوم بشكل أساسي بنسخ أنماط الـ RNAt، بالإضافة إلى بعض أنماط الـ RNA الإضافية صغيرة الحجم.

وبمجرد أن تبدأ عملية تركيب الـ RNA يبدو أنه يستمر بمعدل منتظم من40-50 نيكلوتيداً في الثانية عند E.COLIE في الدرجة 37 مئوية، ويكون نمو السلسلة كما أسلفنا دائماً بالاتجاه $5' \leftarrow 3'$ (شكل23).




(شكل23): يبين آلية نسخ الأنماط المختلفة من الـ RNA بدءاً من الـ DNA .

تتوقف عملية النسخ عندما يصل الأنزيم إلى التتالي الفاصل عند نهاية المورثة. ينتهي الـ RNA في معظم الأحيان بخيط مكون من 4 – 12 زوجاً من الأسس G - C والمتبوعة بخيط من الأزواج A.–T ، يتعرف على هذه النهاية عامل بروتيني هو P والذي يتثبت على إحدى سلسلتي جزيء الـ DNA أو كلتيهما

مانعاً تقدم أنزيم النسخ ومحرراً أنزيم النسخ والـ RNA المنسوخ الذي يتحرك لدى حقيقيات النوى إلى السيتوبلازم بعد معالجته، في حين يترجم الـ RNAm مباشرة على الجسيمات الريبية لدى طليعيات النوى.

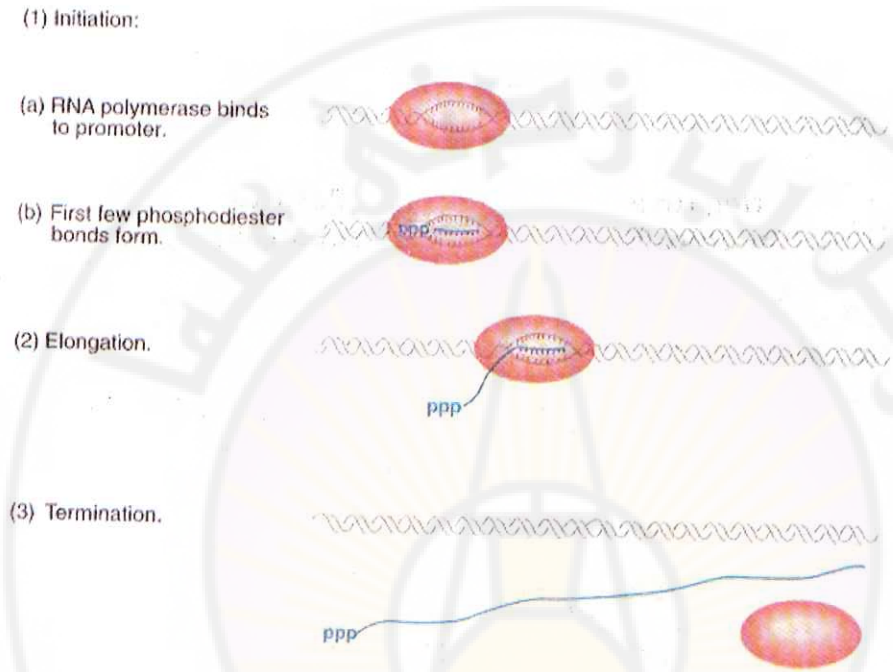



**Figure 3.14 Transcription.**

(شكل 24): يبين المراحل المختلفة لعملية نسخ الـ RNA بدءاً من الجينات

تبدأ عملية النسخ بتعرف أنزيم الـ RNA Polymerase على موقع المشغل Promoter الذي يقع قبل الجين من حيث الموقع، ويتطلب إتمام عملية النسخ وجود النيكليوزيدات ثلاثية الفوسفات، وتبدأ عملية النسخ ببناء متتاليات من الـ A و G، وتتم استطالة السلسلة عن طريق إضافة نيكلوتيدات جديدة إلى النهاية '3 تزدوج أسس الـ RNA المنسوخ مع أسس الـ DNA القالب، وتعود سلاسل الـ DNA لتزدوج مع بعضها بعد انتهاء عملية النسخ (شكل 24).

## 8- تركيب البروتين (الترجمة ) Translation:

يتمثل عمل المورثة بعملية تركيب البروتين، بحيث تقوم كل مورثة بالإشراف على تركيب سلسلة ببتيدية من خلال مرحلتين أساسيتين هما النسخ والترجمة.

تتم عملية النسخ للمورثة وفقاً لما سبق استعراضه، بحيث يتم نقل المعلومات الوراثية عبر جزيئات وسيطة هي RNAm التي تحمل المعلومات الخاصة ببناء البروتين الخاص بالمورثة، يساهم في عملية الترجمة الأنماط الثلاثة، من الـ RNAt. RNAr. RNAm بالإضافة إلى عدد كبير من الأنزيمات والعوامل الأخرى والجزيئات الغنية بالطاقة، والتي تؤمن الطاقة اللازمة لهذه العملية.

يتم في مرحلة سابقة لعملية الترجمة تنشيط الأحماض الأمينية بواسطة أنزيمات تنشط نوعية ذات قدرة اصطفائية عالية للأحماض الأمينية اليسارية (L)، تتطلب عملية التنشيط هذه وجود الجزيئات الغنية بالطاقة ATP، لكل حمض من الأحماض الأمينية العشرين أنزيم تنشيط خاص.

يشكل الحمض الأميني معقداً مع الأنزيم المنشط النوعي ( Aminoacyl RNA synthtase) ويرتبط بالـ AMP ويتحرر البيروفوسفات (P –P).

يرتبط في المرحلة التالية الحمض الأميني بالـ RNAt الخاص، ويتحرر الـ AMP والأنزيم المنشط، يستطيع جزيء الـ RNAt المرتبط بالحمض الأميني النوعي أن يتعرف على مكانة على سطح الريبوزوم ويتقابل الأنتيكودون مع الكودون في الـ RNAm.

### 8-1- مسألة الشفرة الوراثية Genetic code:

سيجد من يحاول فهم مسألة الشفرة الوراثية وطبيعتها بسرعة أنه لايمكن للشفرة أن تتمثل بنيكلوتيد واحد، لأن هذا سوف يعني أن البروتينات الناتجة من ترجمة الـ RNAm سوف تكون مؤلفة من تتالٍ لأربعة أنماط من الأحماض الأمينية، في

حين أن البروتينات كما نعلم تتألف من سلاسل ببتيدية لأنماط من الأحماض الأمينية العشرين.

وبشكل مماثل فإن الشفرة الثنائية من النيكلوتيدات الأربعة صالحة لإعطاء شفرات عددها $16 = (4)^2$ وهي تقابل 16 حمضاً أمينياً تدخل في تركيب البروتين، وهي أيضاً غير كافية، وكان أبسط الشفرات التي تم تصورها هي الشفرة الثلاثية، والتي يمكن أن تعطي عدداً أكبر من الشفرات الوراثية تبلغ:

$$64 = (4)^3$$

وهي تمثل الشفرات الممكنة، وهذا يعني أن هناك مرونة في موضوع الشفرة بمعنى أن حمضاً أمينياً واحداً يمكن أن يحدد بواسطة أكثر من ثلاثية واحدة.

ولتحديد الشفرة الوراثية الخاصة بكل حمض أميني فقد تم استعمال تقانة خاصة، تعتمد على اصطناع سلاسل متعدد نيكلوتيدي لنوع أو نوعين أو ثلاثة أنواع من الأسس المختلفة، نضيف هذا المتعدد، والذي يعمل كـ RNAm إلى خلاصة خلوية بعد أن يتم استنفاد الـ RNAm الموجود فيها، وتهديم ما تحتوي عليه من DNA لمنع أي عملية نسخ جديدة، تحتوي هذه الخلاصة على كل العوامل الأساسية اللازمة لتركيب البروتين من جزيئات غنية بالطاقة، أحماض ناقلة وريبوزومات وأنزيمات منشطة للحموض الأمينية وجزيئات غنية بالطاقة.

نقوم بعد ذلك بإضافة المتعدد المصنوع مثل UUU إلى الخلاصة، والذي يترافق مع إضافة الأحماض الأمينية العشرين على أن يكون أحدها موسوماً، تتطلب بداية عملية تركيب البروتين تشكيلاً معقداً بين الريبوزوم والـ RNAt الناقل، والحمض الأميني و RNAm الرسول.

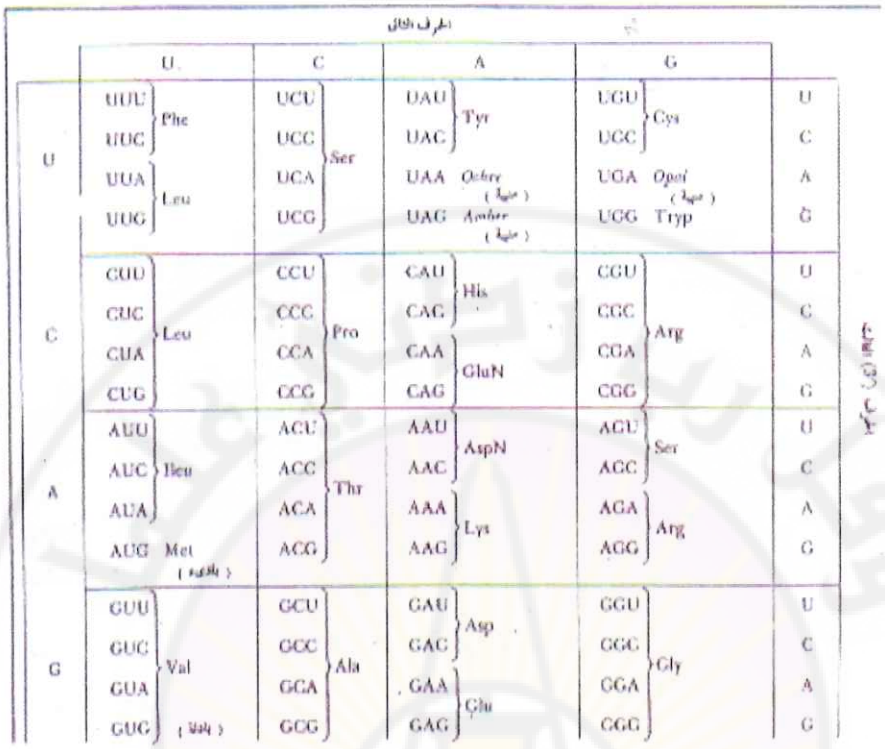
وبسبب حجم هذا المعقد فإنه لن يستطيع العبور عبر حاجز بثقوب محددة، في حين يسمح للمكونات السابقة منفردة بالمرور، فإذا بقيت المادة الموسومة في الرشاحة فهذا يعني أن الثلاثية المضافة كـ RNAm هي الخاصة بالحمض

الأميني الموسوم، وإلا فإننا نقوم بإعادة التجربة وبوسم حمض أميني آخر، وبتكرار هذه العملية عدد كبير من المرات نستطيع أن نتعرف على الشفرات الوراثية لمختلف الأحماض الأمينية، وقد تبين نتيجة ذلك أنه لدينا 61 ثلاثية تشفر للأحماض الأمينية، وأن هناك ثلاث شفرات فقط بدون معنى لاتشفر لأي حمض أميني، تستعمل كمتتاليات لإنهاء تركيب البروتين وتدعى بشفرات توقف. إن هذا العدد من الشفرات الوراثية (61) يعني أن الكثير من الأحماض يتحدد بواسطة أكثر من شفرة واحدة (جدول 5)، يتركز وجود الثلاثيات الخاصة بإنهاء تركيب البروتين في نهاية السلسة كإشارة لاختتام عملية الترجمة، وهذه الثلاثيات هي (UAG-UGA- UAA) حيث يوجد واحد أو أكثر من هذه الثلاثيات في نهاية سلسلة الـ RNAm ككودونات فاصلة.

وقد تبين أيضاً أن الثلاثية AUG تستعمل كوحدة بادئة، وهي تشفر الحمض الأميني (الميثيونين الفورميلي) وهي موجودة في بداية أي جزيء RNAm.

يجب الإشارة إلى عمومية موضوع الشفرة الوراثية في كل المتعضيات على اختلاف سويتها التطورية.

(جدول 5): الشفرة الوراثية Genetic Code والأحماض الأمينية الموافقة




* كل تتابع ثلاثي النيوكليوتيدات أو كودون يشير إلى تتابع النيوكليوتيدات في mRNA ( وليس DNA ) وهو يحدد إدماج الحامض الأميني أو إنهاء ترجمة السلسلة عديدة الببتيد .

## الشيفرة الوراثية والتطور:

أوضحت المعطيات الحديثة حول القواعد التي تتحكم فيها الأسس الآزوتية في كيفية تشفيرها للبروتينات أن الأمر فيه الكثير من التعقيد، وهو يهدف إلى الحماية من الأخطاء وإلى تسريع سيرورة التطور.

أوضحت الدراسات التي تمت في التسعينيات قدرة الشفرات، ولافتراض أنها عديمة المعنى، على تركيب البروتين في المختبر، وقد بينت الدراسات وجود 16 اختلاف موزعاً على مختلف السلالات التطورية، غير أن النظام الأساسي يبقى واحد وهو أن الكودونات ثلاثية النيكلوتيدات تترجم إلى أحماض أمينية، ففي حين أن معظم

الكائنات الحية تقرأ الكودون CUG في الـ RNA مشفرة الحمض الأميني الليوسين، فإنه يشفر في بعض الأنواع مثل المبيضات candida حمض السيرين. كما أن للميتوكونري نظاماً تشفيرياً خاصاً فمثلاً: يشفر الحمض الأميني الثيرونين بأربع شفرات من أصل ست شفرات، خاصة في الحالة السوية بالحمض الأميني الليوسين.

وبهذا فقد غدا واضحاً أن الكود الوراثي غير متجمد على الإطلاق، وأنَّ بوسعه أن يتطور، مما يعني أنه من حيث الاحتمال قد تطور فعلا، لذلك فإن المقولة المتمثلة بكودون _ حمض أميني والتي نقحت واحتفظ بها خلال بلايين السنين لم تكن مصادفة، وفي الحقيقة فإن تراتب الكودونات يعمل بكفاءة عالية في تخفيضه إلى الحد الأدنى تأثير المصادفات .

بينت الدراسات أن الكودونات التي تتشارك في أساسين من أصل ثلاثة تنزع إلى أن تشفر حموضاً أمينية ذات تماثل كبير، وذلك فيما يتعلق بمدى كراهيتها أو محبتها للماء، والتي تعد هامة فيما يخص الوظيفة النهائية للبروتين.

تبين المظاهر الاستثنائية للشفرة الوراثية أنه عندما يحصل خطأ يتناول نيكلونيداً واحداً فإن كراهية الماء للحمض الأميني الأصيل والبديل غالباً ما تكون متشابهة.

يخفض الكود الطبيعي تأثيرات الأخطاء الجينية إلى الحد الأدنى (الطفرات التي تصيب الجينات أو الأخطاء أثناء الترجمة) عن طريق إعطاء تسلسل للأحماض الأمينية، وفي حال غرز حمض أميني مغلوط فإن تراتب الكود يضمن أن يكون الحمض البديل مشابهاً كيميائياً للحمض الأميني الأصيل وأن لايؤدي نسبياً إلى تغير في البروتين النهائي، وهنا لابد من التذكير بالاستثناءات فاستبدال أساس آزوتي واحد أدى إلى حدوث مرض للأنيميا المنجلية .

مثال: للأرجينين 6 كودونات تنزع الكودونات البشرية إلى محاباة الكودونين AGA-AGG، أما عند E colie فإنها لاتستعملها إلا نادراً، وغالباً ما يحدث خطأ في قراءة وترجمة الكودون AGA.

**8-2- عملية ترجمة الـ mRNA الرسول: Translation of mRNA:**

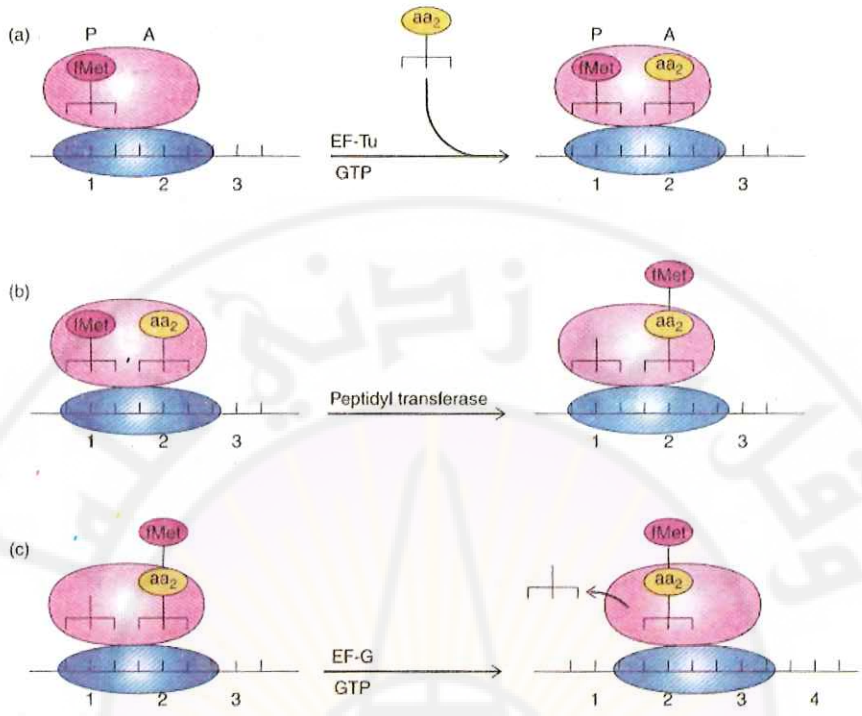
تعد عملية الترجمة أو تركيب البروتين عملية متكاملة ومستمرة، ولكن يمكن أن نقسمها بهدف التوضيح إلى ثلاث مراحل هي:

**أ- مرحلة البدء:**

بعد أن تتم عملية نسخ الـ mRNA الرسول وانتقاله إلى السيتوبلازم، وبعد أن تتم عملية تنشيط الأحماض الأمينية ارتباطها بواسطة RNA الناقل الخاص بكل منها تبدأ عملية الترجمة من خلال تدخل عدد كبير من العوامل، وتعد هذه العملية معقدة وسوف نحاول تبسيطها من خلال تقسمها إلى ثلاث مراحل.

يعد حمض الميثونين الفورميلي الحمض الأميني الأول وهو محدد بالشفرة AUG في كل السلاسل الببتيدية المركبة. يؤدي إضافة جذر الفورميل إلى تعطيل فصائله الأمينية مما يؤدي إلى توجيه نمو السلسلة الببتيدية يعود هذا الحمض الأميني إلى الانفصال عن السلسة الببتيدية بعد الانتهاء من الترجمة، كما ترتبط النهاية '5 من الـ mRNA، بالوحدة الصغرى، ومن ثم يتوضع الـ RNA الناقل لحمض الميثونين الفورميلي بحيث يتم التطابق بين الأنتيكودون والكودون.

تتقدم بعد ذلك الوحدة الريبية الكبرى لترتبط بالوحدة الصغرى مشكلة الجسيم




Summary of translation elongation.

(شكل25): يبين المراحل المختلفة لمرحلة الترجمة ( بناء البروتين )

الريبي الكامل، يمتلك هذا الجسيم على سطحه موقعين يمكن أن يشغلهما جزيئان من الـ RNA الناقل الحاملتين للحموض الأمينية، يشغل الموقع الأول والذي يدعى بالموقع P (موقع البتيديل) بواسطة tRNA الأول والحامل لحمض الميثونين الفورميلي، ويحتل الموقع الثاني A (موقع الأمينواسيل) في مرحلة ثانية tRNA ناقل آخر حامل لحمض أميني ثانٍ يتوافق الأنتيكودون الخاص به مع الكودون الثاني من جزيء ال mRNA الذي تتم عملية ترجمته (شكل 25).

**ب – مرحلة استطالة السلسلة:**

يقوم الريبوزوم بالتحرك على طول الـ RNAm مترجماً إياه حتى نهايته إلى سلسلة ببتيدية، مؤلفة من تتالي الحموض الأمينية المرتبطة ببعضها بواسطة روابط ببتيدية

فبعد أن يُشغل الموقع A في الجسيم الريبي بـ RNAt الحامل للحمض الأميني الثاني يتم الربط الببتيدي بواسطة أنزيم ببتيديل ترانسفير-PEPTIDYL TRANSFERASE وهو أحد بروتينات الوحدة الريبية الكبرى، بين الحمضين الموجودين في الموقعين الأمينواسيل Aminoacyl (A) والببتيديل (P) peptidyl، وتتشكل الرابطة الببتيدية بين الزمرة الأمينية للحمض الأميني الموجود في الموقع A، والزمرة الكربوكسيلية للحمض الأميني الموجود في الموقع P ويصبح الحمض الأميني الموجود في الموقع A حاملاً لحمضين أمينيين، يتحرر بعد ذلك الـ RNAt الموجود في الموقع P ويغادر الموقع. يتحرك إثر ذلك الريبوزوم بمقدار ثلاثة أسس على طول الـ RNAm بالاتجاه من $3' \rightarrow 5'$، وهذا ما يجعل الـ RNAt الموجود في الموقع A والحامل للسلسة الببتيدية يتحرك إلى الموقع P ويصبح الموقع A شاغراً.

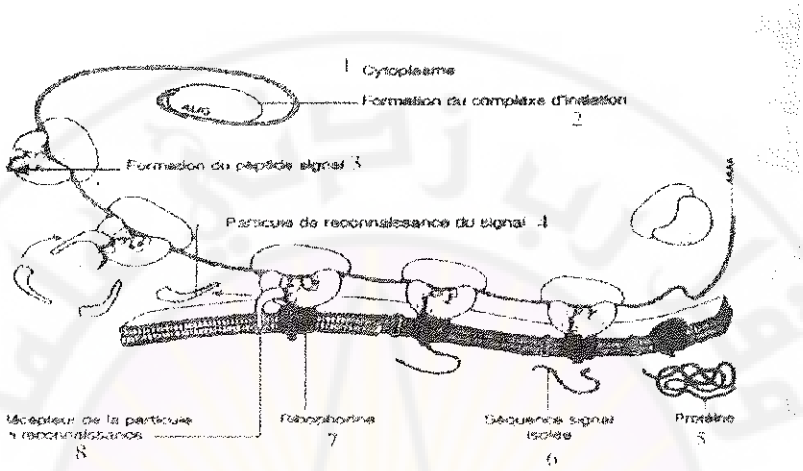
يتقدم عند ذلك معقد ثالث من RNAt الحامل لحمض أميني ثالث، والذي يؤمن التقابل مع الكودون من خلال الأنتيكودون ليتوضع في الموقع A، يتم الربط الببتيدي مرة أخرى بين الحمضين 2 – 3، وهكذا تتقدم عملية الترجمة وتستطيل السلسلة الببتيدية (شكل 25).

**ج – مرحلة النهاية:**

ينتهي جزيء الـ RNAm في الموقع '3 بعدد من الشفرات غير القابلة للترجمة وهي ( UAG- UAA - UGA)، والتي لا ترمز إلى أي حمض أميني، مما يؤدي إلى توقف عملية نمو السلسلة الببتيدية، ويتحرر أثر الريبوزوم والسلسلة الببتيدية التي تم بناؤها. كما تنفصل وحدتا الريبوزوم عن بعضهما مرة أخرى.

تعد عملية الترجمة ظاهرة سريعة، حيث يتم ربط نحو 150 حمضاً أمينياً في الدقيقة الواحدة. يتوضع الـ RNAm في آن واحد على مجموعة من الريبوزومات

تتراوح بين 3–5 ويدعى مجموعهما بالبوليزوم (Polysome). وتجب الإشارة هنا إلى أنه يتم اصطناع عدد من السلاسل الببتيدية في آن واحد يساوي عدد الريبوزومات المرتبطة بالـ RNAm (شكل 26).




التركيب البروتيني

١ ـ هيولى ٢ ـ تشكيل المعقد البدئي ٣ ـ تشكيل الببتيد الإشاري ٤ ـ جزيئة معرفة للإشارة ٥ ـ بروتين
٦ ـ انعزال التتالي الإشاري ٧ ـ ريبوفورين ٨ ـ مستقبل جزيئة التعرف

(شكل 26): يوضح بنية البوليزوم Polysme أثناء عملية تركيب البروتين المؤلف من الـ RNAm وعدد من الريبوزومات.

ونشير هنا إلى أن عمليتي النسخ والترجمة تتمان لدى طليعيات النوى في المكان نفسه والزمان نفسه، وبحيث تبدأ عملية الترجمة للـ RNAm وهو في طور النسخ، في حين تتم هاتان العمليتان لدى حقيقيات النوى بفاصل زمني ومكانين مختلفين، حيث تتم عملية النسخ أولاً في النواة وتليها عملية الترجمة في السيتوبلازم.

تجب الإشارة أخيراً إلى أن دورة تركيب البروتين على درجة عالية من التعقيد ويتدخل فيها أكثر من 140 نمطاً مميزاً من الجزيئات الضخمة من ضمنها 60 نمطاً على الأقل من الـ RNAt، وعشرون طرازاً من الأنزيمات المنشطة (أمينواسيل RNA سنتيناز) وثلاثون بروتيناً تدخل في تركيب الوحدة الكبرى من

الجسيمات الريبية وحوالي 19 نمطاً من البروتينات المركبة للوحدة الصغرى، وثلاثة أنماط من الـ RNAr الريبوزومي وتسعة عوامل للبدء والاستطالة والانتهاء منها F1. F2. F3. T1 . T2 ، كما يتطلب إتمام هذه الدورة توفر الجزيئات الغنية بالطاقة. ATP. GTP. يلزم هذه المكونات المتعددة أن تتوافق مع بعضها البعض، وتتفاعل بصورة دقيقة للغاية لأن الطفرات المؤثرة في تراكيب كثيرة من هذه المكونات غالباً ما تكون ضارة بشدة أو مميتة بمعنى أن الخلايا تفقد قدرتها على الترجمة الدقيقة لجزيئات الـ RNAm لترجمتها إلى بروتين.

تعد البروتينات نواتج نشاط المادة الوراثية وهي انعكاس لنوعية المورثات، وتعطي عملية الترجمة للـ RNAm سلسلة خطية وحدتها الحمضي الأميني.

يدخل في تركيب البروتين 20 حمضاً أمينياً يسارياً (L)، وبحيث يرتبط كل حمضين متجاوبين بواسطة رابطة ببتيدية بين الزمرة الكربوكسيلية لحمض والزمرة الأمينية للحمض الآخر (شكل 27).

(شكل 27): يبين الرابطة الببتيدية المشكلة بين حمضين آمينين.

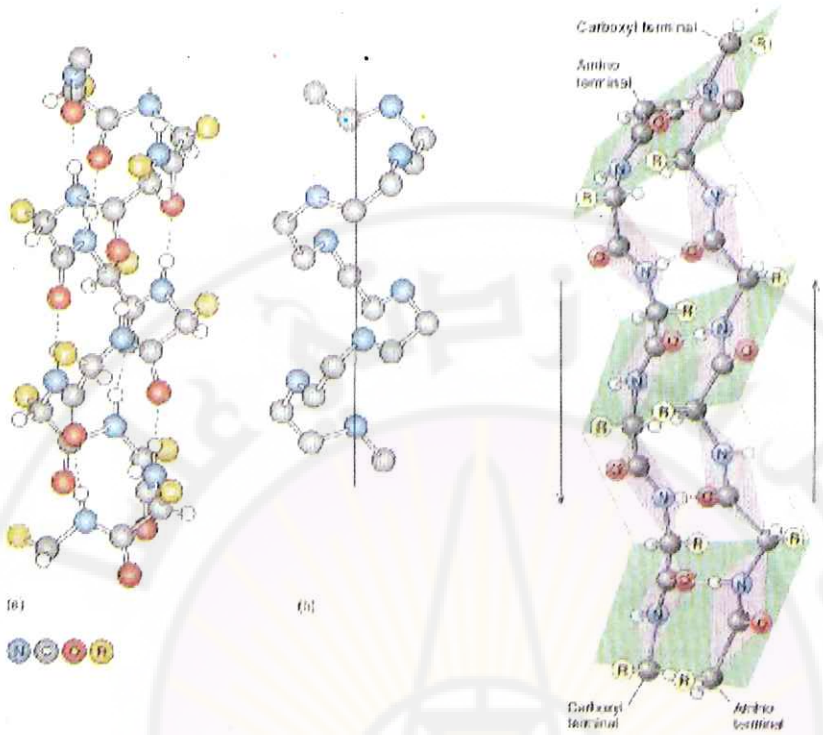
**9- البروتينات وبنيتها**

تمثل السلسلة الببتيدية البنية الأولية للبروتين، يقتصر الاختلاف بين الأحماض الأمينية على الجذر R المتوضع بشكل جانبي، في حين تحتل الزمرتان الأمينية

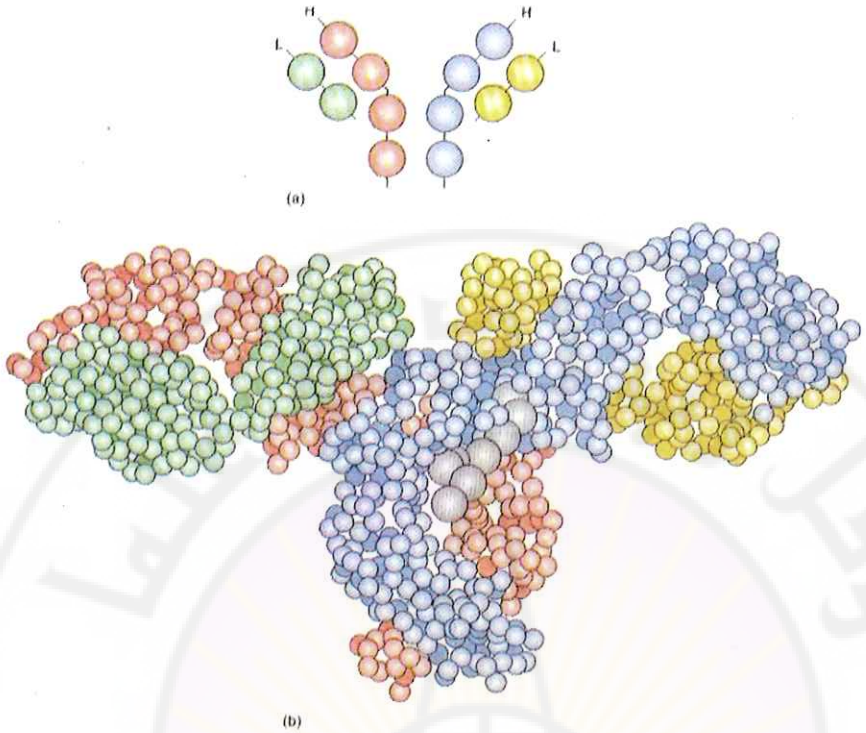
والكربوكسيليه الموقع نفسه دائماً، وبهذا فإن الاختلاف بين السلاسل الببتيدية ينتج من الاختلاف في تتالي الأحماض الأمينية، وهذا ما تحدده المعلومات الوراثية كما رأينا في الفقرة السابقة. يمتلك الجذر لبعض الأحماض الأمينية على الشحنة السالبة وفي بعض الأحماض الأخرى على شحنة موجبة، يقود هذا إلى أن لكل بروتين شحنة كهربائية كلية مميزة له، وهي الحصيلة لمجموع الشحنات الكهربائية للحموض الأمينية المركبة لهذه السلسلة.

تمكننا الاستفادة من هذه الخاصة للكشف عن الطفرات الوراثية، حيث تؤدي الطفرات في الغالب إلى سلاسل ببتيدية مختلفة في الشحنة، يمكننا استعمال هذه الظاهرة في الكشف عن التغيرات الوراثية التي تنعكس باختلاف في الشحنة الكهربائية للبروتين، وبالتالي فإن هجرة هذه البروتينات تكون متباينة، وتفيدنا هذه الخاصة أيضاً في عملية تفريد وتنقية البروتينات عن طريق تقانة (الرحلان الكهربائي electrophoresis) التي تجرى على هلام الأميدون أو الأكريلاميد أو الأغار.

تتمثل البنية الأولية للبروتين بالتتالي الخطي للحموض الأمينية المركبة للسلسلة الببتيدية، أما البنية الثانوية فهي ناتجة من الانثناءات لهذه السلسلة والمدعمة بروابط هيدروجينية بين الجذور غير المتجاورة، يمكن أن يتم تشكيل البنية الثانوية بين الأجزاء المختلفة للسلسلة الببتيدية نفسها كما هو الحال في النمط ألفا، ويمكن أن يتم في أحيان أخرى من التقابل بين سلسلتين متماثلتين كما هو الحال في النمط بيتا (شكل28). يؤدي الانطواء الحلزوني للبنية الثانوية للبروتين وبتشكيل روابط فاندرفالس والروابط الملحية والروابط ثنائية الكبريت S– S إلى إعطاء البنية الثالثة (شكل 29).




(شكل 28): يبين تخطيط البنية الثانوية للبروتين من النمطين ألفا α (الجزء الأيسر) ومن النمط بيتاβ (الجزء الأيمن).




(شكل 29): يبين البنية الرابعية للبروتين (للأمينوغلوبلين ) والمؤلف من أربعة أنماط من السلاسل الببتيدية، بعد أخذها للشكل الثانوي، ومن ثم الثالثي.

تتجمع هذه السلاسل ذات البنية الثالثة مع بعضها لتعطي بروتيناً معقداً ضخماً قادراً على القيام بوظيفته، وبهذا فإن البروتينات المعقدة تنتج من عدد من المورثات يساوي عدد السلاسل الببتيدية المركبة لهذا البروتين كما هو الحال بالنسبة للهيموغلوبين، يمكن لهذه البروتينات أن تقوم بوظائف مختلفة كأن تكون بروتينات بنيوية أو أنزيمات أو أضداداً أو هرمونات أو هستونات، وبهذا فهي تنظم وتسيطر على جميع الأفعال والنشاطات في العضوية، من حيوية وتكاثرية ومناعية وتكيفية.... الخ.

## 10- البروتوم Proteomics:

يطلق على مجموع البروتينات التي يركبها الكائن الحي بالبروتوم Proteome وتعطي دراسة هذه البروتينات صورة أدق عن التعبير الجيني عن تلك التي تعكس عمليات النسخ .

وقد أهتم العاملون في مجال البيولوجيا الجزيئية بدراسة التعبير الجيني على مستوى البروتينات، بالرغم من أنهم قد قاموا بالتحري عن التعبير الجيني بواسطة متابعة معدل انتساخها، غير أن أكثر من 50% من الـ RNA الذي يتم نسخه عند الإنسان لايرمز إلى أي بروتين ويدعى Noncoding RNAs وترجمتها لايؤدي إلى إنتاج أي بروتين، رغم أن معدل النسخ يعطي فكرة أولية عن مستوى التعبير، إلا أن نسبة كبيرة من الـ RNAm يفكك بسرعة أويتم ترجمته بصورة غير كاملة، مما يؤدي إلى كميات قليلة من البروتين، كما أن الـ RNA المنسوخ يمكن أن يعطي نتيجة للتعديلات أنماط مختلفة من البروتينات، لكل هذه الأسباب فإن دراسة التعبير الجيني يجب ألايغفل دراسة البروتينات وتفاعلها فيما بينها.

وللقيام بدراسة البروتينات يجب القيام أولاً بعزل البروتينات عن طريق استخدام تقانة (الرحلان الكهربائي ثنائي البعد Bidimensional electrophoreses) والذي يتم على مرحلتين يعتمد الأول على نقطة التعادل الكهربائي، ويعتمد الثاني على الحجم باستخدام الـ SDS. تؤدي هذه العملية إلى الفصل بين بروتينين يختلفان بشحنة حمض اميني واحد، وللوصول إلى تحليل أفضل لبروتينات الخلية، فإننا نلجأ إلى تحليل كل عضية من الخلية بشكل منفصل عن العضيات الأخرى، ويتم تحليل البروتينات بعد عملية الاستخلاص من الهلام، وتقطيعها بواسطة أنزيمات تحليل البروتين باستخدام المطياف الكتلي لتحديد تتابع هذه الببتيدات.

**- تفاعل البروتينات:**

يتشارك العديد من البروتينات لإنجاز وظيفة واحدة، والهدف من دراسة البروتوميك هو تحديد البروتينات التي تتفاعل مع بعضها للوصول إلى القيام بوظيفة محددة .

وقد درس التفاعل بين البروتينات في الخميرة بواسطة تحليل هجينين، والذي يعتمد على استخدام جين موسوم منشط لمراقبة التفاعلات، وقد أظهرت الدراسات وجود شبكة من التفاعل بين البروتينات، وتتصف هذه الشبكة بشيء من التعقيد، وتؤمن هذه التفاعلات التعبير الجيني.

**11- تنظيم عمل الجين:**

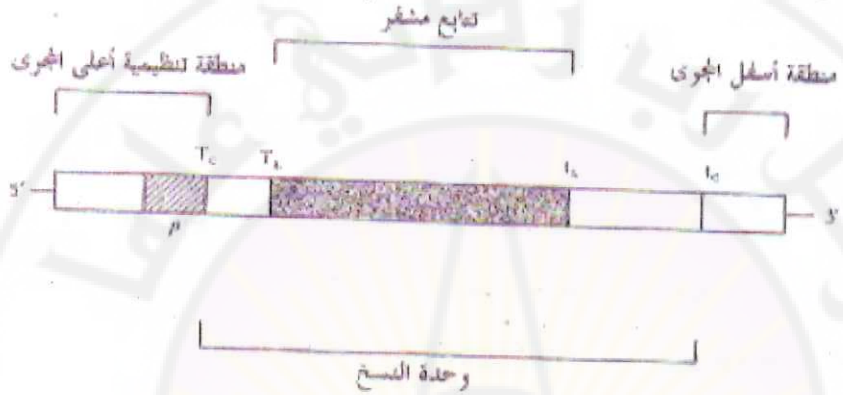
يخضع عمل المورثة إلى نظام دقيق يضمن عملها المنظم خلال المراحل الاستقلابية، ومراحل التشكل والنمو، من خلال إنتاج الأنزيمات والبروتينات اللازمة للإشراف على التفاعلات الاستقلابية الخاصة بالنمو، واللازمة للإبقاء على الكائن حياً، يساهم هذا التنظيم في الحفاظ على التوازن الحيوي للخلية والعضوية.

مع أن هناك بعض الكائنات التي تتألف مادتها الوراثية من سلسلة وحيدة، وهي تمثل المعلومات اللازمة لتشفير البروتينات، إلا أن الأمر مختلف عند الكائنات التي تمتلك مادتها الوراثية على سلسلتين، حيث تمثل السلسلة الخاصة بالتشفير coding أو غير المشفرة non coding وأحيانا ندعوها بالقالب tempate ومقابل القالب non template والتي لاتحتوي على أية وظيفة تشفيرية .

ويوجد بالإضافة إلى الجينات التي يتم نسخها تتابعات تنظيمية على علاقة مع الجينات، حيث من الضروري وجود موقع يحدد موقع بدء النسخ يدعى بالمحضض promoter يرتبط به أنزيم بلمرة الـ RNA (RNA polymerase)، وكذلك لابد من موقع يتوقف عنده النسخ stop site، وتدعى المسافة الواقعة بين

هذين الموقعين بوحدة النسخ Transcriptional unit وهي تمثل المنطقة من الـ DNA التي تنسخ إلى RNA .

وقد يوجد ضمن وحدة النسخ مواقع تنظيمية للنسخ تدعى بإشارات بدء النسخ Tl وأخرى لوقفها Kl، كما يمكن أن توجد متتاليات أخرى تشارك في التنظيم منها ما يمكن أن يسبق الجين ومنها ما يمكن أن يليها (شكل 30).




(شكل 30) يبين مختلف المواقع التي تدخل في عملية تنظيم عمل الجين وهي:

موقع بدء النسخ Tc – موقع نهاية النسخ tc – موقع بدء التتابع القابل للترجمة Tl – موقع نهاية التتابع القابل للترجمة th

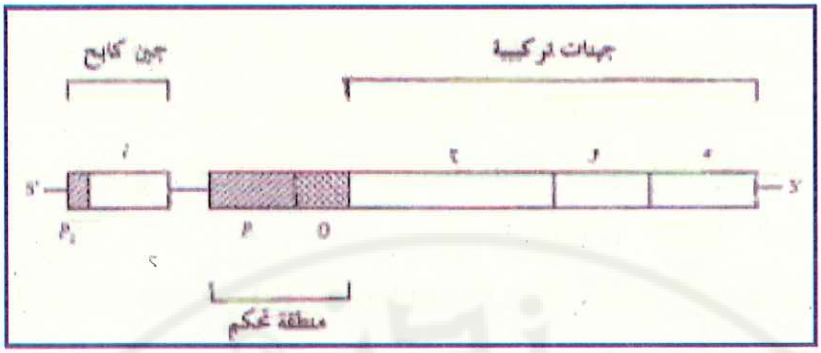
### 11-1- لدى طليعيات النوى:

تكون الجينات في الخلايا طليعية النوى كما هو الحال في الجراثيم مجتمعة على شكل أوبيرونات operones، يتألف الأوبيرون من مجموعة من الجينات التي تكون مسؤولة عادة عن إنتاج الأنزيمات اللازمة لتأمين خط استقلابي معين، يكون لهذه الجينات جهاز تنظيمي واحد، ومن الأمثلة المعروفة وكثيرة الدراسة الأوبيرون الخاص باستقلاب اللاكتوز، حيث يحتوي هذا الأوبيرون على ثلاث جينات هي:

lac z وهي بإنتاج أنزيم بيتا غلاكتوسيدايز galactosidase والجين المشفرة لأنزيم غلاكتوسيديز بريميز galactosidase primease والجين الثالثة مسؤولة عن تركيب الأنزيم ترانس اسيتليز transacetylase. يسبق هذه الجينات الثلاث منطقة تحكم، والتي تضم كما يوضح (الشكل31) منطقة المحضض promoter(p) والمشغل opertator(o)، وهو يمثل الموقع الذي يرتبط عليه البروتين الرادع repressor proteine، والذي يتم إنتاجه من خلال نشاط الجين الكابحة repressore gene والتي تعد مسؤولة عن التحكم بعملية التعبير للجينات التركيبية عن طريق منع ارتباط أنزيم نسخ الـ RNA.

كما يمكن أن تتم عملية التحكم أيضاً وفقاً للنموذج المقترح من قبل جاكوب ومونود، إضافة إلى منع ارتباط أنزيم بلمرة الـ RNA على بداية الجين عن طريق منع انفصال الـ RNA المنسوخ، والذي يشكل بنية هجينة مع الجينات، وبالتالي تعطيل أي عملية نسخ جديدة، كما يمكن أن تتم عملية الردع عن طريق منع ارتباط الوحدة الريبية الكبرى للجسيم الريبي مع الوحدة الصغرى، وبالتالي يتم تعطيل عملية تعبير الجين عن نفسها.

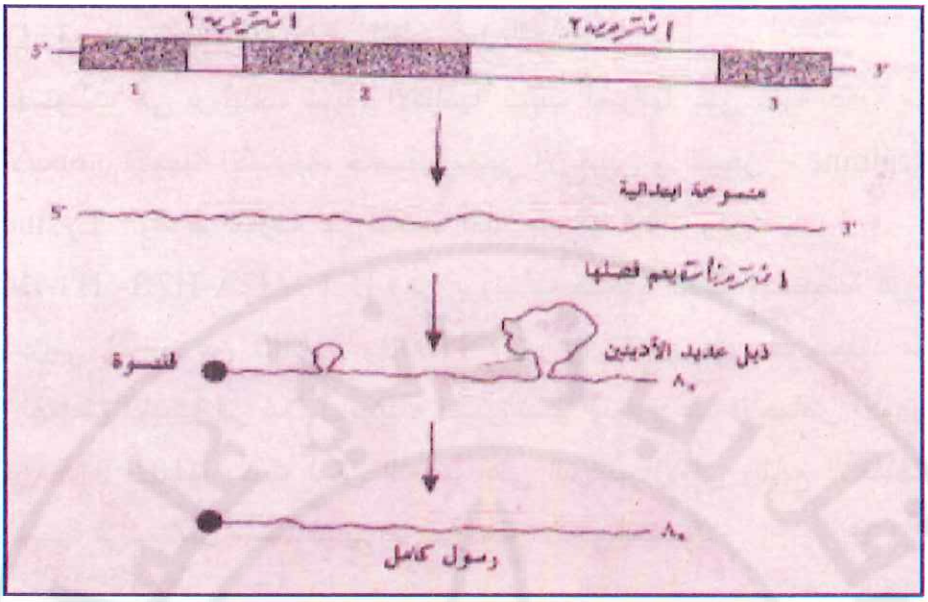
يمكن لهذه الجينات أن تعود إلى نشاطها أي السماح بعملية انتساخها، وبالتالي ترجمتها عن طريق وقف إنتاج البروتين الكابح، أو عن طريق تدخل عامل نوعي مع هذا البروتين، وبالتالي منعه من القيام بدوره الكابح لهذه الجينات (شكل 31).




(شكل 31): يبين مثال عن الأوبيرون lac الذي يشفر لبروتين الغليكوسيذايز، والذي يتألف من ثلاث جينات متجاورة هي: z-a y بالإضافة إلى منطقة تحكم يسبقها الجين الكابحة.

### 11-2- لدى حقيقيات النوى:

يعد التعبير الجيني عند حقيقيات النوى أكثر تعقيداً منه لدى طليعيات النوى، نظراً إلى أن عملية النسخ تتم في النواة، أما عملية الترجمة فهي تتم في السيتوبلاسما، أضف إلى ذلك وجود الـ DNA في بعض العضيات في السيتوبلاسما، كما هو الحال في الميتوكوندري والصانعات الخضر، والتي تحتوي على جينومها الخاص الذي يؤمن جزءاً من الأنزيمات اللازمة لعمليات الاستقلاب فيها، كما أنه من المعروف أن الجينات في حقيقيات النوى تشتمل على أجزاء من الـ DNA التي لايوجد ما يقابلها في الـ RNAm الذي تتم ترجمته، أي إن هذه المناطق لاتشارك في عملية التشفير تدعى هذه المناطق بالإنترونات introns في حين أن المناطق القابلة للترجمة، والتي تبقى في الـ RNAm المترجم بالإكسونات exons وقد تكون الإنترونات في بعض الأحيان أكبر من الإكسونات في جين ما (شكل32).




(شكل 32): يبين مخططاً لجين بيتا غلوبلين، والتي كما يبين الشكل مؤلفة من قطعتين تمثل انترونين تفصل بين ثلاث قطع تمثل الإكسونات، وبين التحويرات التي تتم على المنطقة الرأسية والذيلية ليصبح الـ RNAm ناضجاً وقابلاً للترجمة.

يستدعي وجود هذه الإنترونات أن يمر جزيء الـ RNAm بعملية نضج mutration في النواة قبل خروجه إلى السيتوبلاسما يتم خلالها إزالة هذه الإنترونات، كما ويتم خلالها إضافة سلسلة رأسية عند النهاية 5 ونهاية ذيلية في 3 والتي تتألف من تتالٍ لعدد من نيكلوتيدات الأدنين، تعد هذه التغيرات هامة وضرورية ليصبح الـ RNAm وظيفياً.

إن معظم المعلومات التي نعرفها عن آلية تنظيم عمل المورثة هي لدى طليعيات النوى، والقليل من هذه المعلومات لدى حقيقيات النوى، والتي تعد أكثر تعقيداً كما ذكرنا آنفاً.

**11-3- الهستونات ودورها في تنظيم عمل الجين:**

الهستونات هي بروتينات شديدة الأساسية بسبب احتوائها على نسبة عالية من الأحماض الأمينية الأساسية، خاصة حمضي الأرجينين و الليسين – Arginine Lysine وقد تم التعرف على خمسة أنماط من الهستونات وهي:

H 1 –H2A-H2B- H3-H4 وهي بروتينات صغيرة الحجم ومنخفضة الوزن الجزيئي (تتراوح بين 21000 و11000 دالتون)، وتتكون من عدد محدود من الأحماض الأمينية في سلاسل ببتيدية قصيرة نسبياً (يتراوح عدد الأحماض الأمينية بين 215-102)، بحيث أمكن التعرف على التركيب الأولي وتتابع الأحماض الأمينية في سلاسل متعدد الببتيد لكل من هذه الأنواع الخمسة.

ومن أهم مايميز هذه الأنماط من البروتينات هو الثبات الذي بقي خلال الفترات التطورية، حيث إنه لم يسجل تباين يذكر في تركيب الهستونات المستخلصة من كائنات سلكت مسارات تطورية متباعدة تماماً.

فقد وجد على سبيل المثال أن الهستون H4 المستخلص من نواة البقر لم يختلف عن نوع الهستون نفسه المستخلص من نواة حبة البازلاء، إلا بحمضين أمينيين فقط على الرغم من مرور فترة تطورية تزيد على 600 مليون سنة، وهذا يدل دون أدنى شك على الدور المهم والأساسي والمتماثل في المساهمة في عمل المادة الوراثية، وتنظيم ذلك في جميع الكائنات حقيقية النوى، حيث من المعروف كما اسلفنا دور البروتينات النووية في بناء الكروموزومات وعملها كشرسبات معدلة لحموضة الحمض النووي منزوع الأوكسجين.

ومن الجدير ذكره أيضاً وجود نمط حامضي من البروتينات النووية يطلق عليها البروتومينات والتي كشف عن عدد كبير من أنماطها يفوق بكثير ما هو موجود لدى الهستونات وهي على العموم تدخل كبروتين تركيبي كتلك التي تساهم في تكثف وحلزنة الكروموزومات، و تقوم أحياناً بعمل أنزيمي، كما هو الحال بالنسبة

لأنزيم RNA polymerase وأنزيمات أخرى تعمل في تنظيم عملية النسخ للـ RNA.

**12- DNA الميتوكوندري(DNAmt) تركيبه ووظيفته:**

يتميز الميتوكوندري بامتلاكه لجينومه الخاص، وهو مؤلف من شريط قصير جداً بالمقارنة بالـ DNA النووي، ويوجد عادة على شكل حلقي في مادة الماتركس ويمكن أن يوجد منه عدد من النسخ في الميتوكوندري الواحد ,وهي تتراوح بين نسختين وست نسخ، وقد تتشابك حلقات الـ DNA على شكل يشبه السلسلة.

يقوم الـ DNAmt ( الميتوكوندري ) بأدوار مماثلة للـ DNAn (النووي) في الخلايا حقيقية النوى، بحيث يكون باستطاعته نسخ أنماط الـ RNA المختلفة (RNAr, RNAt , RNAm) كما يمكن ترجمة الـ RNAm إلى بروتين داخل الميتوكوندري.

ورغم هذا التشابه إلا أن النواتج متباينة تماماً، وكذلك يعتمد الجينوم الميتوكوندري على الجينوم النووي، بينما تعتمد الخلية في أداء وظائفها على الميتوكوندري في الحصول على الطاقة اللازمة لها.

يحتوي الـ DNAmt عند الخميرة مثلاً على جين واحدة لكل نمط من الـ RNAr وحوالي عشرين جيناً من RNAt، ومن الممكن أن يحتوي الـ DNAmt على جميع الجينات الخاصة بالـ RNAt اللازمة لقراءة جميع شفرات الـ RNAm البالغة 61، بالإضافة إلى ذلك يحتوي الـ DNAmt على المعلومات الوراثية اللازمة لإنتاج الوحدات المركبة للبروتينات، والتي تدخل في تركيب العديد من الأنزيمات الهامة اللازمة للتفاعلات الحاصلة في الميتوكوندري، ومنها تلك التي تدخل في معقدات سلسلة نقل الإلكترونات ETS، حيث نجد أنها تتكون من نواتج مصدرها كل من الـ DNAn و DNAmt.

## 13- تحديد مفهوم المورثة:

### 13-1- المورثة - Gene

وضع تعبير الجين للدلالة على الوحدة الأساسية في الوراثة كما بينتها التهجينات المندلية، وقد وصف مورغان الجين بأنها: وحدة وراثية غير قابلة للتجزؤ من خلال التبادل الكروموزومي.

تحدد الجين حالياً بقطعة من الـ DNA مؤلفة من عدد من النيكلوتيدات المتتالية والتي تشرف على تركيب سلسلة ببتيدية من خلال وسيط هو الـ RNAm كناقل للمعومات الوراثية، تمثل هذه السلسلة الببتيدية على الأغلب أنزيماً أو جزءاً من أنزيم يتوسط في التفاعلات الاستقلابية، وتعرف كل الجين بالوظيفة التي تقوم بها من خلال إنتاج السلسلة الببتيدية التي تشرف على إنتاجها، وهكذا لا يتوافق المفهوم الجزيئي للمورثة مع ظاهرة السيادة والتنحي، حيث يتعلق الأمر بالقدرة على إنتاج الأنزيم وجرعته وقدرته على القيام بوظيفته المحددة له، وقد ساهم المفهوم الحديث للجين في نفي مفهوم جين – أنزيم، وهكذا يتطلب تحديد الجين وتعريفها وتوضيح مفهومها الوقوف عند ثلاث صفات هي التالية:

1 – المورثة عبارة عن وحدة فيزولوجية تساهم في تحديد نمط شكلي معين لدى الفرد.

ب – المورثة عبارة عن واحدة بنائية، وحدتها النيوكلوتيد منقوص الأوكسجين لأحد الأسس الآزوتية الأربعة، ولا يمكن تجزئتها بعملية التبادل الكروموسومي.

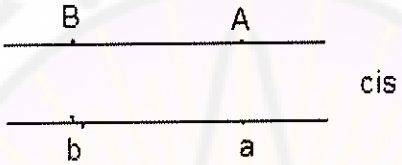
جـ – يمكن للمورثة أن تكون عرضة لحدوث تغيرات في مواقع متعددة منها، تدعى هذه التغيرات بالطفرات الوراثية MUTATIONS.

### 13-2 – السيسترون CISTRON:

نطلق تعبير السيسترون على مجموعة الجينات التي تشرف على تركيب بروتين نوعي قادر على القيام بوظيفة ما وقد أطلق بنزر (BENZER 1975) هذا

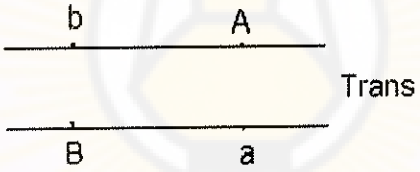
التعبير (السيسترون) على مجموع الاختبارين التجاور CIS والتنافر TRANS، يمثل الأول حال تجاور الجينين السائدتين على كروموسوم واحد والجينين المتنحيتين على الكروموزوم المقابل، أما عندما تكون إحدى الجينين المتجاورتين سائدة والأخرى متنحية فنقول إن الجينين في وضع تنافر، كما هو الحال في السيسترون المسؤول عن تحديد لون العيون عند ذبابة الفاكهة:

يؤدي تركيب التجاور cis إلى اللون الأحمر العاتم للون العيون عند ذبابة الفاكهة:




يؤدي إلى لون أحمر عاتم

أما تركيب التنافر trans فهو يؤدي إلى اللون المشمشي الفاتح للون العيون




يؤدي إلى لون مشمشي فاتح

مادامت الجينان B و A سائدتين والجينان a و b متنحيتين

يتباين الطابع الظاهر في حالة التجاور عنه في حالة التنافر، ويعود هذا التباين إلى الاختلافات في التركيب الناتج بإشراف هذه الجينات بأوضاعها المختلفة.

ونستطيع تحديد وجود السيسترون من خلال متابعتنا للطابع الظاهر لكل من وضعي التجاور والتنافر، ففي حال اختلاف الطابع الظاهر بين حالتي التنافر

والتجاور للجينات، فهذا يعني وجود سيسترون واحد، في حين يكون لدينا سيسترونان في حال تشابه الطابع الظاهر لحالتي التجاور والتنافر. ومن الأمثلة المعروفة: السيسترون الذي يحدد لون العيون لدى ذبابة الفاكهة كما أوضحنا سابقاً.

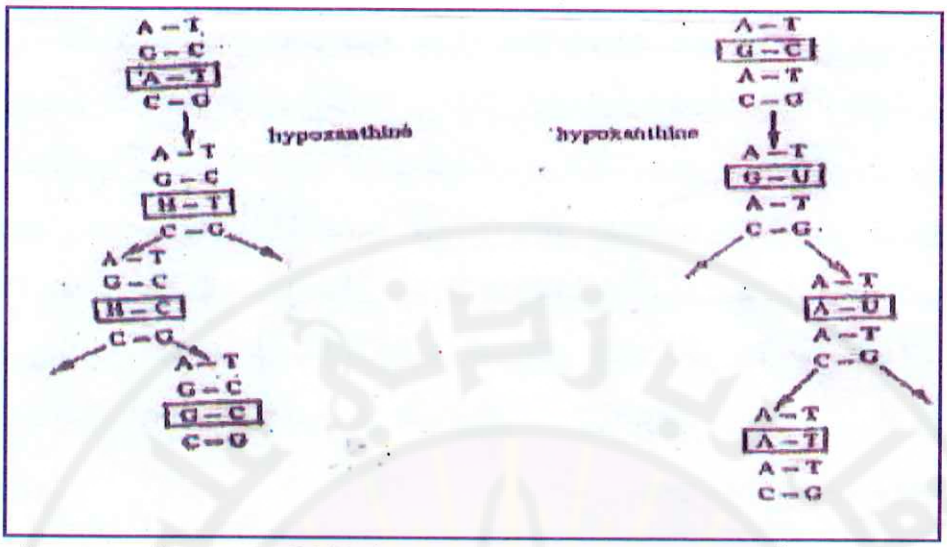
ويمكن الانتقال من حالة تجاور إلى تنافر أو بالعكس، من خلال ظاهرة العبور الكروموزومي كما هو معروف عند دراسة هذه الظاهرة.

وقد أقترح لتفسير هذه النتائج، أنه يتم نسخ RNA رسول واحد لجينات السيسترون، وهذا يؤدي إلى تركيب سلسلتين ببتيديتين ترتبطان فيما بعد لإعطاء بروتين وظيفي واحد، وبما أن الـ RNAm المنسوخ يشتمل على المعلومات الكاملة للجينين السائدتين في حالة التجاور، فإن البروتين الناتج يكون كاملاً ووظيفياً خلافاً للنمط الآخر الناتج من حالة عن التنافر الذي يكون أقل وظيفية، ذلك أن البروتين المتشكل (الهجين) يمتلك سلسلة ببتيدية كاملة (ناتجة من المورثة السائدة) وسلسلة ببتيدية ناقصة (ناتجة من الجين المتنحية).

ومن الأمثلة المعروفة عن السيسترون ذلك الخاص بإنتاج الغلوبين المؤلف من المورثة $\alpha$ ومن المورثة $\beta$.

### 14- الطفرة Mutation:

تتميز المادة الوراثية بإمكانية حدوث تغير فيها، من خلال حدوث خطأ ما خلال عملية تضاعف الـ DNA في ازدواج الأسس التي ترتبط معاً، وفقاً للنموذج الذي درسناه والذي يتلخص بالتقابل النوعي بين الادينين (A) والثيمين (T) من ناحية وبين السيتوزين (C) والغوانين (G) من ناحية أخرى ضمن جزيء الـ DNA، وبحدوث هذا الخطأ باقتران الادينين مع السيتوزين، فإن النتائج التي تتبع هذا الخطأ يمكن أن توضح بالشكل كما يلي:




(شكل 33): الأثر المطفر لحمض النتريت على جزيء الـ DNA يقوم حمض النتريت بتحويل الأدينين إلى هيبوكزانتين ويحول السيتوزين إلى يورسيل، وبهذا يستبدل الشفع A-T من جزيء الـ DNA بعد التضاعف بالشفع G-C إلى اليسار، ويستبدل الشفع G-C بالـ T-A في الجزء الأيمن من الشكل.

وهكذا نرى أنه قد تم استبدال بالزوج A = T الزوج C = G. والطفرة بالتعريف هي تغير نادر الحدوث مفاجئ في المادة الوراثية، ينتقل إلى الأجيال التالية.

### 14-1- أنماط الطفرات:

أ- **طفرات مورثية:** وهي الطفرات التي تتناول بالتغير بنية المادة الوراثية، وهي التي تؤدي إلى تغير في تتالي النيكلوتيدات للجين والذي ينتج منه إعطاء جين مقابلة مختلفة. يمكن أن تنتج هذه الطفرة عن تغير في نيكلوتيد واحد أو أكثر، ولا يمكن الكشف عن الطفرات المورثية عن طريقة دراسة الكاريوتايب karyotype أو الكروموزومات، إنما يمكن أن يتم ذلك بطرائق أخرى.

**ب- طفرات كروموزومية تركيبية:** وهي تتمثل بتغيرات عميقة وأساسية في بنية واحد أو أكثر من الكروموزومات، من خلال زيادة لقطعة كروموزومية أو نقصان، مما يؤدي إلى تغيرات كمية في المعلومات الوراثية، ويمكن أن يحدث مثل هذا التبدل عن طريق انتقال قطعة من كروموزوم إلى آخر، مما ينعكس على الناحية الاستقلابية عند الفرد، من خلال حصول تبدلات في الأنزيمات نوعياً أحياناً وكمياً أحياناً أخرى مؤدياً إلى مظاهر مرضية، ويمكن الكشف عن مثل هذه التبدلات عن طريق دراسة الكاريوتيب وعن طريق التهجين في الموقع.

**جـ- طفرات كروموسومية عددية:**

ويمكن هنا التميز بين نمطين من هذه التبدلات الأولى المتمثلة بزيادة أو نقصان أحد الكروموزومات، والذي يؤدي غالباً إلى موت الفرد، وفي أحيان أخرى يؤدي إلى متلازمات نعرف العديد منها كمتلازمة تيرنر وداون وكلينفلتر....

والنمط الآخر يتمثل بتغير في عدد مجموعة الكروموزومات، كالمرور مثلاً من حال 2N إلى 4N أو 6N أو 8N وهذه الأنماط هي عادة من النمط المميت عند الكائنات الحيوانية، غير أنها لاتمثل حالة مميتة عند النباتات، وهي مستعملة كطريقة للحصول على أنواع جديدة محسنة وراثياً، ومن الطبيعي الكشف عن هذه الطفرات عن طريق دراسة الكاريوتيب.

والطفرات المميتة في الكائنات ثنائية الصيغة الكروموزومية (2N) لها قدرة على قتل الكائن مباشرة، أو تمنعه من التكاثر وإعطاء أجيال أخرى(موت وراثي) والكائنات الأخيرة غالباً ما تعرف بأنها عقيمة. والطفرة السائدة المميتة في كائن ثنائي الصيغة الكروموزومية لا يمكن أن يحتفظ بها لأكثر من جيل واحد، إلا أن هذا غير صحيح بالنسبة للجينات المميتة المتنحية، حيث يمكن الاحتفاظ بالعامل المميت المتنحي إلى ما لا نهاية على شكل حالات متخالفة (هجينة)، ولا يظهر

الأثر إلا عند اجتماع الجينين المتنحيتين المميتتين في فرد واحد، نتيجة لتزاوج بين فردين متخالفي اللواقح.

ويمكننا أيضاً أن نميز بين نمطين من الطفرات الأول هو الطفرات الانتقالية التي يستبدل فيها أساس بيوريني بآخر بيوريني، أو يستبدل فيها أساس بيرميديني آخر بيرميديني، والثاني هي الطفرات الانقلابية والتي يستبدل فيا أساس بيوريني آخر بيرميديني أو العكس، وتكون عملية التصحيح في حالة الطفرات الانتقالية ممكنة على عكس الطفرات الانقلابية.

يمكن للطفرة أن تحدث نتيجة لإضافة نيكلوتيد جديد ضمن السلسلة، أو نتيجة لحذف نيوكلوتيد منها أو لاستبدال نيوكلوتيد آخر، أو نتيجة لعكس في ترتيب عدد من النيكلوتيدات ضمن السلسلة تقود مجمل هذه الظواهر إلى تغير في تتالي الأسس وبالتالي إلى الطفرة.

يمكن للطفرة أن تحدث في بعض الأحيان دون أن ينعكس ذلك على الشيفرة الوراثية، وبالتالي على البروتين، والسبب أن أغلبية الأحماض الأمينية تشفر بأكثر من شفرة تدعى هذه الطفرات بالصامتة أو الساكتة، وقد بينت الدراسات الحديثة أن الكثيرين من الطفرات الصامتة تؤدي إلى بعض أمراض على عكس ماكان يظن سابقاً.

### 14-2- العوامل المطفرة: Mutation Factors

يمكن للطفرة أن تحدث بشكل تلقائي أو نتيجة لعوامل خارجية محرضة ومخربة للمادة الوراثية محدثة تبدل في بنيتها، مما يؤدي إلى تغيرات في عملها وناتجها، من هذه العوامل ماهو من طبيعة فيزيائية كما هو الحال بالنسبة للأشعة فوق البنفسجية (U. V)، أو أشعة X ويتعلق تواتر الطفرات الناتجة منها إلى حد كبير

بجرعة الأشعة، حيث تبين أن نسبة هذه الطفرات تزداد بارتفاع الجرعة المعرض لها الكائن.

كما أن للعديد من العوامل الكيميائية الأثر المطفر على الـ DNA والـ RNA كما هو الحال بالنسبة لبعض أنماط المضادات الحيوية كالمايتومايسين C ، و كذلك الحمص الآزوتي $HNO_2$ والـ pH المرتفع، وأيونات المنغنيز Mn++ والبروموبيورسيل والمبيدات الحشرية ومبيدات الأعشاب والمعدن الثقيلة وغيرها كثير، ومن الجدير ذكره أن هناك علاقة كبيرة بين ما هو مطفر للحمض النووي وبين ما هو مسرطن.

كما أن لبعض العوامل البيولوجية أثرها المطفر على الـ DNA و RNA كما هو الحال بالنسبة للعديد من الفيروسات كفيروس الحصبة.

وبسبب أن أغلب المورثات الطافرة هي من النمط المتنحي فهي تبقى مختفية، ولا يظهر أثرها إلا في حالة تماثل اللواقح، ومن الأمثلة على الأمراض الوراثية الناتجة من طفرة مورثية: الأنيميا المنجلية، والناتجة من طفرة في الجين التي تشرف على تركيب السلسلة الببتيدية β والتي تؤدي إلى الاستبدال بحمض الغلوماتيك حمض الفالين في الموقع السادس من هذه السلسلة، ويحدث ذلك نتيجة للطفرة التي تغير الشفرة من CTC إلى CAC. يسبب هذا التبدل عجزاً في قدرة الهيموغلوبين على نقل الأوكسجين.

ويمكن التعرف على وجود بعض الجينات الطافرة المتنحية – في حالة تخالف اللواقح عن طريق تقنية الرحلان الكهربائي– بالاستفادة من خاصة الاختلاف في الشحنة الكهربائية بين البروتين الطبيعي والبروتين الطافر، وهذا ما يطبق في حالة مرض الأنيميا المنجلية للتعرف على حملة هذا المرض، حيث يهاجر البروتين الطبيعي بسرعة مختلفة عن البروتين الطافرعلى الهلام بوجود الحقل الكهربائي.

تكون هذه الطفرات مميتة عندما تقود إلى عجز الجين عن تكوين النوع الفعال من البروتين، والذي لا يمكن الاستغناء عنه، كونه يؤمن تفاعلاً استقلابياً هاماً بالنسبة

للكائن، وهذا يعني في الكائنات أحادية الصيغة الكروموسومية (N) الطافر نفسه أو نسله الناتج مباشرة بالانقسام العادي أنه لن يكون قادراً على الحياة.

تؤدي الطفرة كما ذكرنا في كثير من الأحيان إلى غياب أنزيم، أو إلى أن يكون هذا الأنزيم غير قادر على القيام بوظيفته، يؤدي ذلك إلى توقف سلسلة من التفاعلات الاستقلابية مما يؤدي إلى تراكم المداد لهذا الأنزيم وفي الوقت نفسه عوز في ناتج نشاط الأنزيم, يقود هذا الأمر إلى اضطراب استقلابي ينعكس كمرض يصيب حامل هذه الطفرة، وهكذا نرى أن الأمراض الوراثية التي تصيب الفرد عديدة جداً ومتنوعة جداً وفقا للمرحلة التي يتوسط عندها الأنزيم، تمثل هذه الطفرات ما ندعوه بالحاجز الوراثي block genetic.

يمكن أن تتناول الطفرة كما ذكرنا أياً من جينات الفرد، وتتعلق أهمية هذه الطفرة بأهمية الجين وطبيعة الطفرة الحاصلة، وللطفرات نتائج مختلفة على عمليات تضاعف الـ DNA ونسخ الـ RNA وترجمة الـ RNAm نتيجة للتغيرات الحاصلة على بنية الجينات المسؤولة عن إنتاج الأنزيمات المشرفة على العمليات آنفة الذكر، وعلى العكس تماماً فإن طفور جين الـ RNAr الريبوزومي لا يؤدي إلى أي تأثير ظاهري واضح لأن إنتاج الـ RNAr يتم عن طريق نسخ لجينات متعددة متماثلة موجودة غالباً في النوية.

تجب الإشارة إلى أن الطفرة يمكن أن تكون مفيدة عندما تمنح الفرد قدرة أكبر على التكيف، مع شروط البيئة ومع متغيرات هذه الشروط.

وتخضع أي طفرة وراثية إلى عامل الاصطفاء الطبيعي NATURAL SELECTION الذي يعمل على الإبقاء على ما هو مفيد وإزالة ما هو ضار، وبذلك تعد الطفرة العامل الأهم المحدد للتوجه التطوري عند الفرد متفاعلاً -طبعاً- مع الاصطفاء الطبيعي.

كما أن للطفرة أهمية كبيرة في الوصول إلى التنوع الوراثي القائم بين جماعات النوع، وكذلك فيما يتعلق بالتعدد الشكلي في أفراد هذه الجماعات.

يبلغ تواتر الطفرات التلقائية في النوع البشري (دون وجود للمؤثرات الخارجية)، كما هو الحال لدى الجراثيم وذبابة الفاكهة ($10^{-5}$)، وهذا يعني حصول طفرة واحدة في جيل من الموروثات من كل 100.000 حالة.

**15- المادة الوراثية في الفيروسات:**

تعد المادة الوراثية في الفيروسات المكون الأساسي لها، وتتركب الفيروسات على العموم من المادة الوراثية، والتي هي على الأغلب من الـ DNA، بالإضافة إلى البروتين الذي يشكل الغلاف لهذه الفيروسات. وكما ذكرنا سابقاً فإن الـ RNA يمثل المادة الوراثية عند العديد من الفيروسات، والذي يمكن أن يكون وحيد السلسلة أوثنائي السلسلة.

تحدد المادة الوراثية في هذه الفيروسات كل الصفات لها، وتكون قادرة على تأمين تضاعفه من ناحية، وكذلك إعطائه خاصة القدرة على العدوى.

تتميز الفيروسات بإمكانية حدوث تغيرات في مادتها الوراثية مما يعطي سلالات جديدة (Strains) مختلفة عن النوع الأصلي لجين أو أكثر، ويؤدي هذا إلى تغير في صفات بمافيها الأمراضية Pathogenicity وكذلك مدى العوائل Host-reng والأعراض الناتجة من الإصابة به.

تحدث عادة هذه التغيرات نتيجة للطفرات، وهذا ما يفسر قدرة بعض سلالات فيروس أنفلونزا الطيور على امتلاك القدرة على إصابة الإنسان، ومن المحتمل أن تحدث طفرات أخرى لدى هذا الفيروس تجعله قادراً على الانتقال من إنسان إلى آخر، ومن الأمثلة الأخرى فرضية إصابة فيروس الأيدز للإنسان القائلة إن هذا

الفيروس يتطفل على الفرود، غير أن ظهور سلالات جديدة أعطته القدرة على إصابة الإنسان.

تعد هذه الطفرات ذات فوائد عديدة منها: معرفة التحليل الوراثي للفيروس الأصلي، وكذلك لإنتاج اللقاح، وكذلك لتحليل العيوب الناتجة من إصابة الخلية بطفرة من فيروس وتحليل التفاعلات الوراثية، والتعرف على مجين الفيروس وتركيبه وخريطته الوراثية.

ومهما كان نمط المادة الوراثية للفيروسات فهي تعطيها القدرة على التضاعف، لتعطي أنماطاً جديدة مماثلة للفيروس الأصلي، وتنتقل إلى الأجيال التالية، يمكن لهذه الطفرات أن تحدث تلقائياً بتواتر يصل إلى 1 من 100000، مما يؤدي إلى ظهور سلالات جديدة قادرة على التضاعف والانتشار.

أما عن أنماط الطفرات فمنها النقطي Point mutation وهي تغيرات تنتج من الاستبدال بشفع من القواعد الآزوتية بشفعاً آخر مكانه، مما يؤدي إلى تبدل في التتابع للنيكلوتيدات ولا يؤثر ذلك على حجم الجين، ويمكن لهذه الطفرات أن تكون معكوسة وبالتالي العودة إلى النمط الأصلي .

أما طفرات التبدل فهي ناتجة من إضافة Addition أو حذف Deletion لأحد النيكلوتيدات، وهذا يؤدي إلى تبدل كبير في نمط قراءة الثلاثيات من القواعد الآزوتية، وبالتالي إلى تبدل عميق في بنية السلسلة الببتيدية الناتجة. يمكن أن تعود هذه الطفرة إلى الوضع الطبيعي عن طريق إعادة النيكلوتيد الناقص أوحذف النيكلوتيد الإضافي. إن حصول فقد لكميات كبيرة من المتتاليات في جين الفيروس يؤدي إلى فيروسات ناقصة وغير قادرة على إنجاز دورتها الخاصة في المضيف.

يؤدي إحلال تتابعات كبيرة إلى تغيرات عميقة في جين الفيروس، وقد تمكن بعض العاملين في هذا المجال من إحداث مثل هذه الطفرات في العديد من الفيروسات، كتلك الخاصة بفيروس تبرقش أوراق التبغ، وفيروسات الـ RNA المسببة للأورام،

ويعد العودة إلى الوضع الطبيعي أمراً صعب التحقق، وهناك طفرات نوعية تؤدي إلى عيب في جين ما أو في مجموعة من الجينات.

**- الخريطة الوراثية للفيروسات:**

يتم التعبير عن مواقع الجينات على طول الكروموزوم بتعبير الخريطة الوراثية، والذي يحدد مواقع الجينات والمسافة الفاصلة بينها، ويمكن لهذه الجينات أن تكون متجاورة ويمكن أن تكون مفصولة بمسافات واسعة، ومن المعروف أن الفيروس يمتلك على كروموزوم واحد، ولذلك فإن جيناته تمثل مجموعة مترابطة، وعلى العموم فإن عدد الجينات محدود عند الفيروس، ويمكن ببساطة الوصول إلى وضع الخريطة الوراثية لها. وتعد الوراثة عند الفيروسات هامة في المجال الطبي والثروة الحيوانية وفي مجال البيوتكنولوجي، كما يتم استعمالها كنواقل للجينات بهدف التنسيل.

Damascus University

# الجزء الثاني

# الهندسة الوراثية

# Genetic engineering

Damascus University

وقل رب زدني علما
جامعة دمشق
Damascus University

## الفصل الثاني
## الأنزيمات المستعملة في الهندسة الوراثية

ظهر تعبير الهندسة الوراثية لأول مرة ليصف التقانات العلمية المعاصرة التي بُدئ باستعمالها، و التي تتناول المادة الوراثية عند الكائنات الحية في محاولة لإحداث تغيير أهداف عديدة، وقد أُطلقت تعبيرات مرادفة أخرى لوصف هذه التقانة مثل: التقانة الوراثية Manipulations gene أوالتوليف الوراثي Gene recombination والتحوير الوراثي Genetic modification والتنسيل الوراثي Genes Cloning.

وتهدف هذه التقانات بشكل أساسي إلى التحكم بالصفات الوراثية عند الكائن الحي، عن طريق نقل الجينات من فرد إلى آخر من النوع نفسه أو إجراء النقل من نوع إلى آخر للوصول إلى تركيبات وراثية جديدة ناتجة من نقل الجينات، وأن تكون قادرة على القيام بعملها والتعبير عن نفسها.

ومن العوامل التي ساهمت في تقدم هذه التقانات هو ما عُقد عليها من آمال للوصول إلى أنماط من الكائنات المحورة وراثياً، تهدف إلى تحسين الإنتاج كماً ونوعاً في الأنواع الحيوانية والنباتية، وكذلك لأغراض صناعية وطبية وصيدلانية.

وقد أثار تطبيق هذه التقانة جدلاً كبيراً مازال قائماً حتى الآن، بين مؤيد ينظر إلى الفوائد الكبيرة لهذه التقانة في المجلات المختلفة من طبية وزراعية وصناعية وغيرها وإلى معارض يتخوف من سلبيات ناتجة عن ما يمكن أن تحدثه هذه التقانات من تغيير في النظم البيئية، وتغيير في محتوى المواد المنتجة من طريق الهندسة الوراثية، وبالتالي جهلنا لنتائج استهلاكنا هكذا مواد، أضف إلى ذلك المخاطر الممكن حصولها نتيجة لاستعمال الكائنات الدقيقة من بكتريا وفيروسات كمادة للبحث العلمي، وما ينطوي ذلك من احتمال تحويلها إلى كائنات خطرة على الإنسان.

اعتمد ظهور هذه التقانات على المعارف المتراكمة حول العديد من المظاهر الحيوية، خاصة تلك التي تتصف بها الكائنات الدقيقة كالتحول الجرثومي transformation in bacteria والتحول الانتقالي والاقتران الجرثومي.

وقد كان لعزل أنزيمات الربط DNA ligase الذي يربط سلاسل DNA أهمية كبيرة في تطور هذه التقانة. كذلك كان للكشف عن أنزيمات القطع nucleases، والذي يمثل عاملاً أساسياً بنمطيها الداخلي والخارجي، والتي تستعمل كأدوات للقطع دوراً بالغ الأهمية في تطور هذه التقانات.

وقد تمت أول عملية ربط لقطعة من الحمض النووي عام 1973 مع أحد البلاسميدات والذي يعد عنصراً وراثياً زائداً عند الجراثيم، وهي قادرة على التضاعف ضمن الجراثيم وتقوم بعملها كمادة وراثية.

كما ساهم في تقدم وتطور الهندسة الوراثية العديد من التقانات مثل التفاعل التسلسلي للبوليميراز Polymerase chains reaction (PCR) والرحلان الكهربائي Electrophoreses وتقانة التهجين Hybridiziton والوسم radiolablling.

# الفصل الثاني

# الأنزيمات المستعملة في الهندسة الوراثية

تتطلب تقانة الهندسة الوراثية توفر العديد من الأنزيمات الضرورية لاستخدامها، للحصول على قطع من الـ DNA وعزلها، وإجراء التحويرات اللازمة بهدف دمجها مع الحمض النووي للمضيف، وكذلك بهدف إزالة الأجزاء غير الضرورية. ولهذا تعد هذه الأنزيمات من الأدوات الهامة والضرورية في الهندسة الوراثية ويعد التعرف عليها وعلى آلية عملها أمراً ضرورياً وأولياً، من أجل انطلاقة تقانة الهندسة الوراثية مع الأخذ بالحسبان أن مصدر هذه الأنزيمات هو الكائنات الحية المختلفة، وقد قسمت هذه الأنزيمات إلى:

1- أنزيمات هدم الأحماض النووية Nucleases
2- أنزيمات اللحام Ligases
3- أنزيمات البلمرة Polymerases
4- أنزيمات التحوير Modifying enzymes
5- أنزيمات فك الحلزنة Topoisomirases

## 1-1- أنزيمات هدم الأحماض النووية Nucleases

تستهدف هذه الأنزيمات بالقطع وهدم الروابط الفوسفاتية ثنائية الأستر التي تربط النيكلوتيدات ببعضها، والتي تعطي البنية الأولية للأحماض النووية في الـ DNA و الـ RNA، تعمل هذه الأنزيمات بشكل معاكس لأنزيمات البلمرة التي تعمل على تشكيل الروابط الفوسفاتية ثنائية الأستر بين النيكلوتيدات، ويمكننا من حيث المبدأ تقسيم هذه الأنزيمات إلى:

– أنزيمات القطع الداخلي Endonucleases وهي الأنزيمات التي تمارس القطع داخل السلسلة، مؤدية إلى تقطيع الجزيء إلى قطع أصغر.

– أنزيمات القطع الخارجي Exonucleases وهي التي تهاجم سلاسل الـ DNA والـ RNA من أطرافها مؤدية إلى تحرير نيكلوتيدات أحادية أو ثنائية أو ثلاثية وأحيانا أكثر من ذلك.

**1– أنزيمات القطع الخارجي** DNA ase: EXONUCLEASES

تقوم هذه الأنزيمات كما أسلفنا بتحطيم الروابط الفوسفاتية ثنائية الأستر في الـ DNA، وقد تم عزل وتمييز ثلاثة أنماط منها في العصية القولونية E. colie (I-II-III) من النمط خارجي الهدم.

يقوم الأنزيم الأول بتحطيم الروابط الاستيرية للسلاسل المفردة للـ DNA والـ RNA مما يؤدي إلى تحرير وحدات ثلاثية النيكلوتيد من النهاية 3′، أما النمط الثاني فهو يقوم بمهاجمة السلاسل المزدوجة من حمض الـ DNA في النهاية 3′ أيضاً، أما النمط الثالث فهو يؤثر بالنمط السابق في الحلزون المضاعف لجزيء الـ DNA في بعض المناطق الداخلية للجزيء.

وقد وجدت أنماط أخرى من أنزيمات القطع الخارجي القادرة على قطع وحدات لايتجاوز طولها أربعة نيكلوتيدات تقطع من النهاية 5′، أما الأنزيم DNAase المستخلص من الطحال والتيموس لبعض الحيوانات، فيقوم بإنتاج قطع يبلغ طولها مالا يزيد عن 6 نيكلوتيدات ويعمل أيضاً في النهاية 5′.

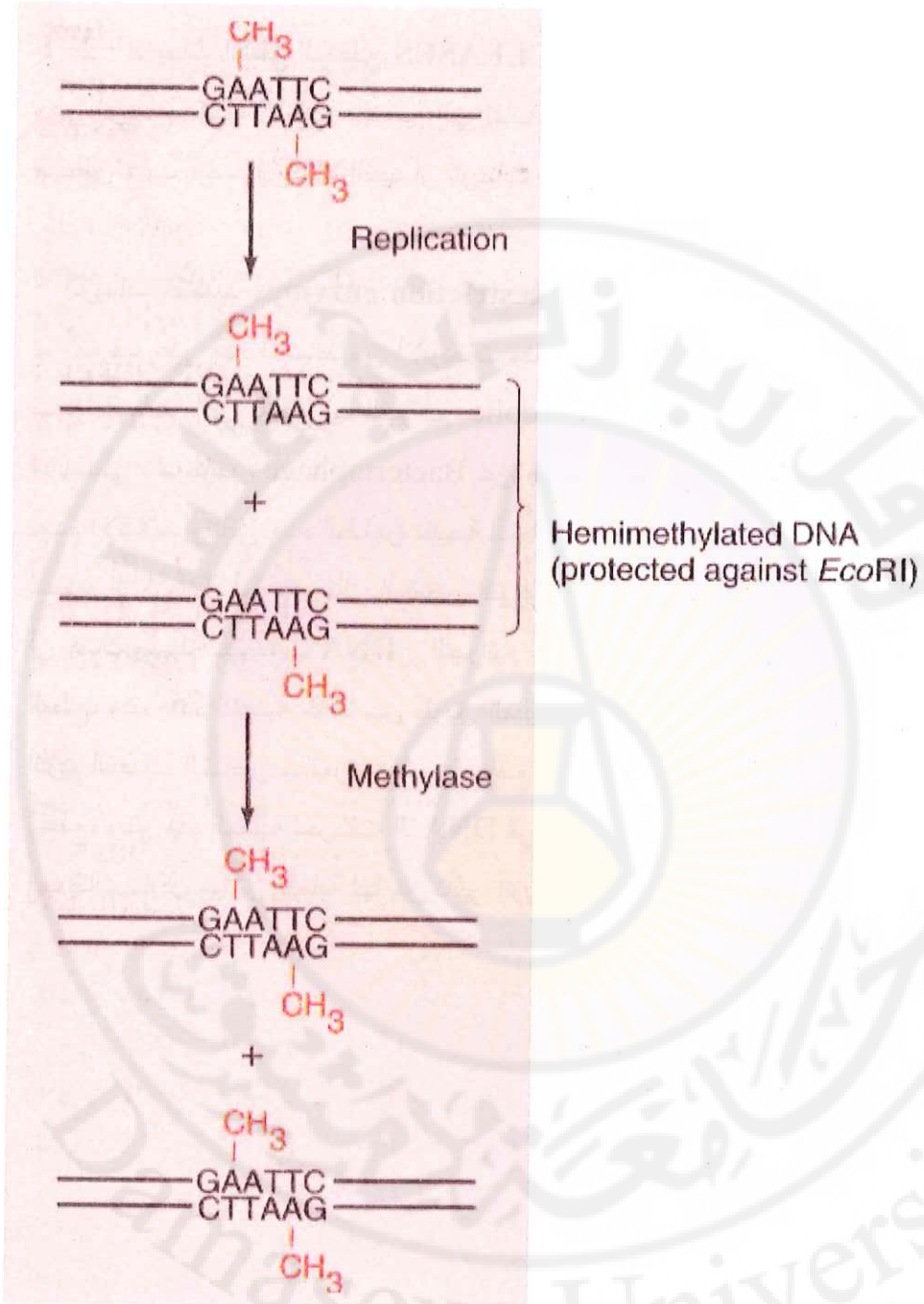
تم بالإضافة إلى ذلك عزل العديد من الأنزيمات التي تمارس القطع داخلياً في سلاسل الـ DNA ، ودعيت بأنزيمات التحديد أو التقيد Restrictions enzymes وهي بالغة الأهمية في مجال الهندسة الوراثية.

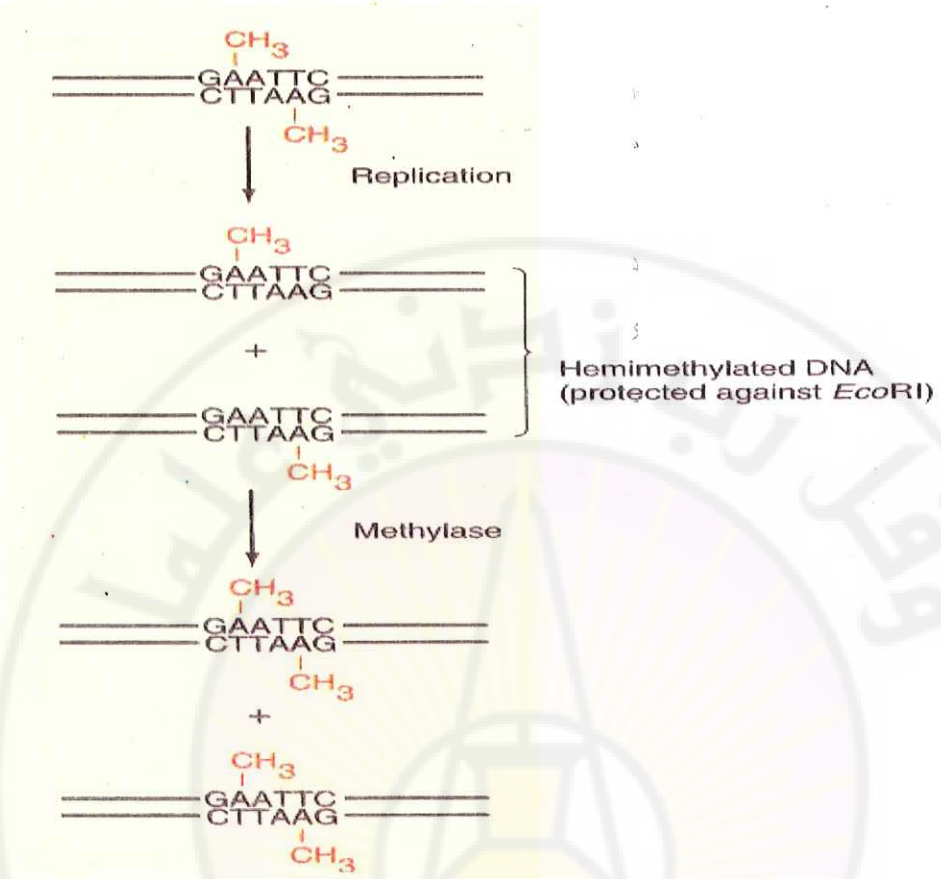
## 1-2- أنزيمات القطع الداخلي ENDONUCLEASES

وهي أنزيمات كبيرة الأهمية بالنسبة إلى تقانة الهندسة الوراثية، ومن أهم أنماطه مايُطلق عليها أيضاً أنزيمات التقيد أو أنزيمات التحديد.

### - أنزيمات التحديد Restriction enzymes

تم التعرف على هذه الأنماط من الأنزيمات منذ عام 1962، عندما تم البحث في ظاهرة المناعة التي تتمتع بها الجراثيم E. colie في مواجهة آكلات الجراثيم أو ما يسمى بالفاجات Bacteriophages عن طريق تحطيم وتخريب المادة الوراثية لهذه الآكلات وتأتي هذه الظاهرة نتيجة لنشاط عدد من الأنزيمات القادرة على تحطيم الـ DNA، أما عدم تأثر الحمض النووي للجراثيم بهذه الأنزيمات فيعود إلى أن هناك وسيلة حماية لـ DNA الجراثيم عن طريق إجراء تحوير في مواقع القطع، وتتم هذه العملية عادة عن طريق المتيلة لبعض الأسس، بحيث لايستطيع أنزيم التحديد الخاص بالتعرف على المواقع الخاصة به، وبالتالي لاتتم عملية القطع، وتتم هذه العملية لجزيئات الـ DNA في مرحلة تالية لعملية التضاعف لهذه الجزيئات بشكل مباشر حماية لها من تأثير أنزيمات القطع الداخلي (شكل 34).


CH3
GAATTC
CTTAAG
CH3
Replication
CH3
GAATTC
CTTAAG
+
GAATTC
CTTAAG
CH3
Hemimethylated DNA
(protected against EcoRI)
Methylase
CH3
GAATTC
CTTAAG
CH3
+
CH3
GAATTC
CTTAAG
CH3




(شكل 34): يبين ظاهرة المتيلة Metlylation لأحد المواقع الخاصة بأحد أنزيمات التحديد، والتي تتم مباشرة بعد عملية تضاعف الـ DNA بهدف حمايتها من عمل أنزيم التحديد.

وهكذا نرى أن أنزيمات التحديد تعمل على منح مناعة للجراثيم، وقد تمت معرفة آلية عمل هذه الأنزيمات لأول مرة عام 1970، وتم الكشف عن عدد كبير منها وصل إلى أكثر من 300، وهي قادرة على القطع في أكثر من 100 موقع من الـ DNA.

**أ- أنواع أنزيمات التحديد:**

تم وفقاً لقدرة هذه الأنزيمات على القطع وللمتطلبات الكيميائية اللازمة لعملها تقسيم هذه الأنزيمات إلى ثلاثة أنماط:

- **النمط الأول:** ويضم الأنزيمات التي تم استخلاصها من العصية القولونية E-colie من السلالة K وE المصابة بالآكل لمبدا، وتقوم هذه الأنزيمات بالقطع عشوائيا لجزيء الـ DNA، ترتبط هذه الأنزيمات في مواقع القطع ثم تقوم بهدم السلاسل المزدوجة في اتجاه واحد لمسافة تتراوح بين 1000و 5000 نيكلوتيد. تبدأ بعدها بتحطيم سلسلة واحدة لمسافة أخرى ثم تتوقف عن العمل، يتطلب عمل هذه الأنزيمات وجود شوارد المغنيزيوم الثنائية $Mg^{++}$ و الـ ATP والأدينوسيل ميثونين.

- **النمط الثاني:** وهي الأكثر استعمالاً في مجال الهندسة الوراثية، كونها تقطع في مواقع محددة Restrictions sites، بحيث تؤدي إلى عدد محدد من القطع لكل نمط من أنماط الـ DNA عند الأحياء.

تمارس هذه الأنزيمات فعلها على متتاليات محددة، ويقوم أنزيم القطع بعمله في كل المواقع التي يتعرف عليها، والتي تتمثل بتتالي محدد لعدد من النيكلوتيدات ويتباين عدد هذه المواقع التي يتم التعرف عليها من أنزيم القطع من نمط DNA إلى آخر (جدول6).

وقد تم الكشف عن عدد كبير من هذه الأنزيمات، وتم وضع نظام محدد لتسمية هذه الأنزيمات وفقاً لما يلي:

- يرمز لجنس الكائن الذي كشف لديه الأنزيم بالحرف الأول أما الحرفان الثاني والثالث فيُرمز بهما إلى النوع، مثل Eco وهو الموجود في العصية القولونية E.

colie وكذلك بالنسبة لـ Hin الموجود لدى Haemophilus influenza وهكذا.

– وفي حال وجود أكثر من بلاسميد أو ناقل في الجرثوم نفسه، فمن اللازم إضافة اسم البلاسميد أوالعائل مثال EcoR، حيث إن الجرثوم يحتوي على البلاسميد R.

تضاف الأرقام الرومانية في حال وجود أكثر من أنزيم في النوع نفسه من الجراثيم والتي تقطع في أكثرمن نمط من البلاسميدات عند الجرثوم نفسه كما هو الحال في:

EcoRI ,EcoRII, HindI , HindII

– **النمط الثالث:** وهي أنزيمات تمتلك على صفات كل من النمطين السابقين، ويحتاج عملها إلى وجود شوارد المغنيزيوم MG++، وإلى الجزيئات الغنية بالطاقة ATP، وإلى أدينيلات الميثونين بشكل غير دائم.

– (جدول6): يبين المتتاليات التي يقطع عندها بعض أنزيمات التحديد Restriction enzymes، كما يبين المواقع التي يتم عندها القطع.

| Enzyme | Recognition Sequence* |
|---|---|
| *Alu*I | A G ↓ C T |
| *Bam*HI | G ↓ G A T C C |
| *Bgl*II | A ↓ G A T C T |
| *Cla*I | A T ↓ C G A T |
| *Eco*RI | G ↓ A A T T C |
| *Hae*III | G G ↓ C C |
| *Hin*dII | G T Py ↓ Pu A C |
| *Hin*dIII | A ↓ A G C T T |
| *Hpa*II | C ↓ C G G |
| *Kpn*I | G G T A C ↓ C |
| *Mbo*I | ↓ G A T C |
| *Pst*I | C T G C A ↓ G |
| *Pvu*I | C G A T ↓ C G |
| *Sal*I | G ↓ T C G A C |
| *Sma*I | C C C ↓ G G G |
| *Xma*I | C ↓ C C G G G |
| *Not*I | G C ↓ G G C C G C |

*Only one DNA strand, written 5′ → 3′ left to right is presented, but restriction endonucleases actually cut double-stranded DNA as illustrated in the text for *Eco*RI. The cutting site for each enzyme is represented by an arrow.

**ب- مواقع عمل أنزيمات التحديد:**

تمارس أنزيمات التحديد من النمط الثاني القطع في مواقع محددة من جزيء الـ DNA، غير أنها تتباين في طبيعة موقع القطع ومكانه ونواتجه، ومن هذه التباينات:

1- تؤدي بعض هذه الأنزيمات إلى الحصول على نهايات لزجة Stick ends أي إلى نهايات غير متساوية، ويؤدي البعض الآخر إلى نهايات عمياء Blunt ends أي نهايات متساوية كما في الأمثلة التالية :

يقوم الأنزيم Bam HI بالقطع وفقاً لما يلي:

$$\begin{array}{l} 5'\text{-}GGATCC \\ 3'\text{-}CCTAGG \end{array} \longrightarrow \begin{array}{l} 5'\text{-}G \\ 3'\text{-}CCTAG \end{array} + \begin{array}{l} GATCC \\ G \end{array}$$

وكذلك يقوم أنزيم EcoRI بالقطع وفقاً لما يلي:

$$\begin{array}{l} 5'\text{-}GAATTC \\ 3'\text{-}CTTAAG \end{array} \longrightarrow \begin{array}{l} 5'\text{-}G \\ 3'\text{-}CTTAA \end{array} + \begin{array}{l} AATTC \\ G \end{array}$$

الأنزيم PistI فإنه يميز مواقع مختلفة، ويقطع على النحو التالي:

$$\begin{array}{l} 5'\text{-}CTGCAG3' \\ 3'\text{-}GACGTC5' \end{array} \longrightarrow \begin{array}{l} 5'\text{-}CTGCA \\ 3'\text{-}G \end{array} + \begin{array}{l} G \\ ACGTC \end{array}$$

تؤدي عملية القطع الناتجة في الأمثلة السابقة إلى نهايات تتميز بقدرتها على الالتحام بسهولة مرة أخرى، ولذلك تدعى بالنهايات اللزجة Stick ends، ويعود إعطاء هذه النهايات إلى أن موقع القطع في سلسلتي الـ DNA يكون غير متناظر كما أظهرت الأمثلة السابقة.

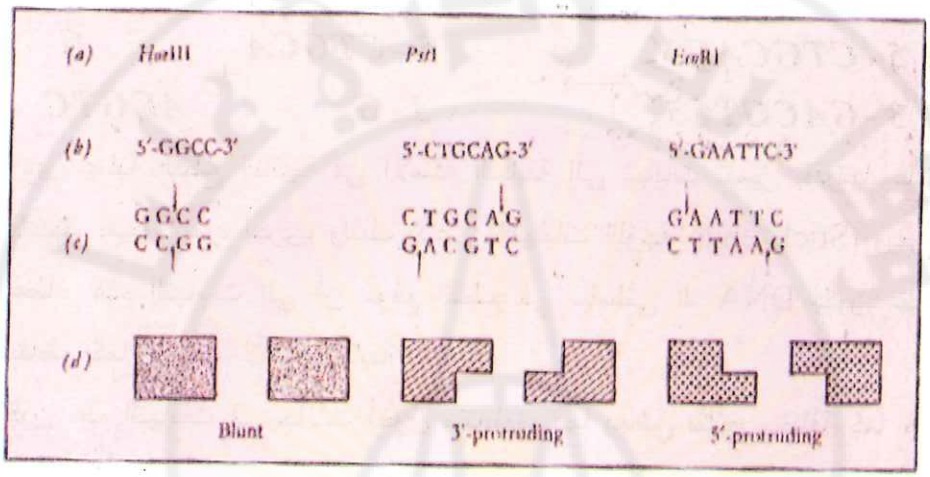
تكون هذه النهايات في حالات أخرى متناظرة، مما يعطي نتائج مختلفة كما هو الحال بالنسبة لأنزيمات آخرى مثل HapI, HaeIII, SamI كما هو وارد فيمايلي:

$$\begin{array}{l} 5'\text{-}GG\downarrow CC3' \\ 3'\text{-}CCGG5' \end{array} \longrightarrow \begin{array}{l} 5'\text{-}GG \\ 3'\text{-}CC \end{array} + \begin{array}{l} CC3' \\ GG5' \end{array}$$

$$\begin{array}{l} 5'\text{-}GTTAAC3' \\ 3'\text{-}CAATTG5' \end{array} \longrightarrow \begin{array}{l} 5'\text{-}GTT \\ 3'\text{-}CAA \end{array} + \begin{array}{l} AAC3 \\ TTG5 \end{array}$$

نلاحظ في الحالتين السابقتين وجود تكامل في النهايات للقطع الناتجة، وتدعى بالنهايات العمياء (Blunt ends)، وما يميز هذه النهايات هو عدم إمكانية وصلها مع أخرى دون إجراء تعديلات محددة عليها.

2- هناك تباين في الاتجاه للقطع الناتجة من عمل بعض الأنزيمات التي تعمل على إعطاء النهايات اللزجة، حيث إن بعضها يمتد من النهاية الثالثة كالناتجة من عمل الأنزيم EcorI وبعضها من النهاية الخامسة كالقطع الناتجة من عمل الأنزيم PistI (شكل35).






(شكل 35): يبين أنواع النهايات المتولدة من عمل أنزيمات تحديد مختلفة، ويبين نوع الأنزيم المستخدم، ويوضح تحديد التتابع مع موقع القطع المعرفة على التوالي ونمط النهايات.

3- تتباين الأنزيمات في عدد نيكليوتيدات الموقع الذي تتعرف عليه، وكذلك فبعض الأنزيمات تميز مواقع مؤلفة من أربعة نيكلوتيدات وتقطع بعدها أو قبلها أو خلالها، كما هو الحال في:

***MboI `5 - GA↓TC - 3      HaeIII `5 - GG¯CC      Sau3A `5 -↓ GATC***

تميز بعض الأنزيمات مواقع محددة بخمسة نيكلوتيدات، كما هو الحال بالنسبة للأنزيم AvoII الذي يميز التسلسل *`5 – G↓GTCC – `3* والأنزيم EcorII الذي يميز الموقع *`5 –↓ CCAGG – `3*.

أما الأنزيمات التي تميز مواقع محددة بمتتاليات لستة نيكليوتيدات فهي الأكثر انتشاراً.

4 – تقوم بعض هذه الأنزيمات بالتعرف على الموقع، ومن ثم القطع بعد عدد من النيكلوتيدات من هذا الموقع، فالأنزيم Hag I يميز الموقع 3` – *GACA* – 5` ويقوم بالقطع بعد خمسة نيكلوتيدات في السلسلة الأولى وقبل عشرة نيكلوتيدات في السلسلة المقابلة:

$$5' - GACGC(N)_5$$
$$3' - (N)_{10}CAGCG$$

وكذلك الأمر بالنسبة للأنزيم BbvI والذي يقوم بالقطع بعد ثمانية نيكلوتيدات من موقع التحديد في السلسة الأولى وقبل 12 نيكلوتيداً في السلسلة المقابلة:

$$5' - GCAGC(N)_8$$
$$(N)_{12} - CGTCG - 5'$$

5– تتصف معظم المتتاليات التي يتم التعرف عليها بواسطة أنزيمات التحديد بإمكانية قراءتها بالاتجاه نفسه في كلتا السلسلتين، وهذا ما يدعى بالترددات الندرومية Plandormes، فمثلاً يمكن قراءة التتالي 3` – *GAATTC* – 5` لموقع الأنزيم Ecor I بالاتجاه نفسه في سلسلتي الحمض النووي.

$$5' - G\downarrow AATTC - 3'$$
$$3' - CTTAA\uparrow G - 5'$$

هذه الصفة غير موجودة في الموقع الخاص بالعديد من الأنزيمات، كما هو الحال بالنسبة للموقع الذي يتعرف عليه الأنزيم BinI، والذي يقطع بعد 4 نيكلوتيدات من التتالي.

$5'-CGAT(N)_4$ في السلسلة الأولى، وبعد 5 نيكلوتيدات من متتالية الموقع في السلسلة المقابلة $5'-CTAGC-(N)_5-3'$.

6- تتميز معظم أنزيمات التحديد بثبات موقع القطع، وبذلك فإن القطع الناتجة ذات نهايات ثابتة ومعروفة، غير أنه في بعض الحالات، كما هو الحال بالنسبة للأنزيمات HindI و Asu I تكون النهايات الناتجة من القطع مختلفة، فمثلاً الأنزيم Dde I الذي يميز المتتاليات لمواقع قطع مختلفة، ويقطع الأنزيم فيها كما يلي:

$$5'-C\downarrow TTAG-3' \longrightarrow 5'-C + TTAG-3'$$

$$5'-C\downarrow TGAG-3' \longrightarrow 5'-C' + TGAG-3'$$

$$5'-C\downarrow TCAG-3' \longrightarrow 5'-C + TCAG-3'$$

$$5'-C\downarrow TAAG-3' \longrightarrow 5'-C' + TAAG-3'$$

وبنتيجة القطع فإننا نحصل على سلاسل بنهايات مختلفة، ويبدو دائماً أن الاختلاف في النيكلوتيد المتوسط مع ثبات موقع القطع بين السيتوزين والتيمين.

7- تتصف بعض أنزيمات التحديد بإمتلاكها لمواقع تحديد مشتركة، أي إنها تقطع في الموقع نفسه وتدعى هذه الأنزيمات بالأنزيمات المتناظرة Isoenzymes ، وقد يكون هذا التناظر كاملاً أوتاماً عندما يكون مكان القطع متشابهاً، كما هو الحال لدى الأنزيمات XhoI , BamH I , HsuI , Hind III.

ومن الأمثلة:

***XhoI , Bam HI : 5'-GGATCC-3'***

***Hind III , HSUI : 5′ - AAGCTT - 3′***

8- تكون بعض الأنزيمات غير كاملة التناظر، حيث تتماثل في موقع التعرف على القطع، ولكن الأختلاف في موقع القطع، كما هو الحال في المثال التالي:

***Sam I : 5′ - CCC ↓GGG - 3′***

***Xam I : 5′ - C ↓CCGGG - 3′***

***Hind II : 5′ - GTC ↓GAC - 3′***

***Sal I : 5′ - G ↓TCGAC - 3′***

**جـ- خرائط مواقع أنزيمات التحديد لجزيئات الـ DNA:**

أثبتت الدراسات أن احتمال تكرار موقع تحديد ما على علاقة مع عدد النيكلوتيدات المؤلفة للموقع، فكلما كان عدد النيكلوتيدات أكبر كان احتمال تكراره أقل، وهذا يتوافق مع قوانين الاحتمال.

تعد الخرائط التي تحدد مواقع عمل أنزيمات التحديد لجزيء الـ DNA من الأمور الهامة، حيث يؤدي كل أنزيم تحديد إلى إعطاء عدد محدد ومعروف من قطع الـ DNA لكل نوع، ويمكن لعدد هذه القطع أن يتغير في حال حصول طفرة في أحد المواقع الخاصة بأنزيم معين. يمكن لهذه الطفرة أن تؤدي إلى اختفاء أحد هذه المواقع، وقد تؤدي إلى ظهور موقع جديد، وتسهل معرفة مواقع عمل أنزيمات التحديد في التعرف على مواقع الجينات، وكذلك في اختيار الأنزيمات المناسبة لعملية العزل للجينات وهندستها.

ويمثل الرحلان الكهربائي Electrophoreses على الهلام طريقة مناسبة لتحديد الأوزان الجزيئية والأحجام للجزيئات الناتجة من عملية معاملة الـ DNA بأنزيمات القطع التحديدية، وكذلك وسيلة لعزل وتنقية هذه القطع.

ويتطلب وضع مثل هذه الخريطة إجراء سلسلة من التفاعلات الأنزيمية المنفردة، ومعرفة حجم قطع الـ DNA الناتجة منها باستعمال الرحلان الكهربائي ومقارنتها مع نماذج معروفة الحجم.

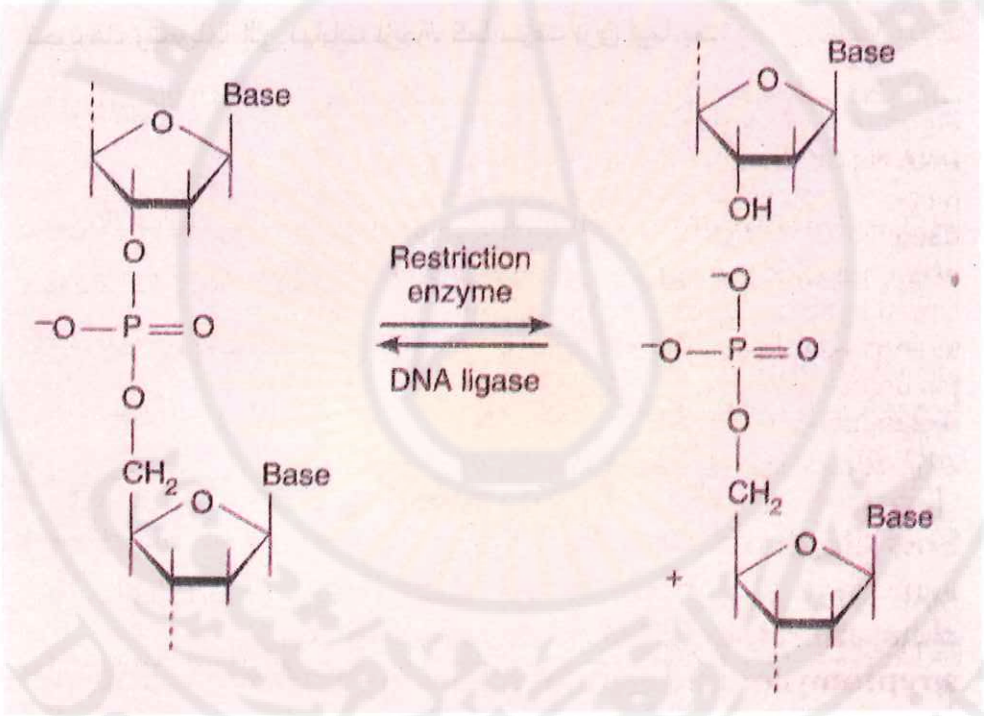
ويتم بعد إجراء التفاعلات الأنزيمية المزدوجة، والتي يشترك فيها أنزيمان في كل مرة، والذي يتم في أنبوب واحد، مقارنة نتائج التفاعلات المزدوجة مع نتائج التفاعلات المنفردة، ممايمكننا أن نضع الخريطة الأنزيمية لمواقع التحديد لهذين الأنزيمين، وبتطوير هذه التجارب يمكننا أن نضع الخريطة الكاملة لكل أنزيمات التحديد شائعة الاستعمال.

**2 – أنزيمات الربط Ligases enzymes**

تعمل هذه الأنزيمات على إعادة الربط بين قطع من الـ DNA، عن طريق إعادة تشكيل الروابط الفوسفاتية ثنائية الأستر بين نيكلوتيدين، أي إن هذه الأنزيمات تعمل بشكل معاكس للأنزيمات القاطعة، وقد تم تمييز نمطين من هذه الأنزيمات والتي تم عزلها عن كائنات مختلفة (شكل 36).

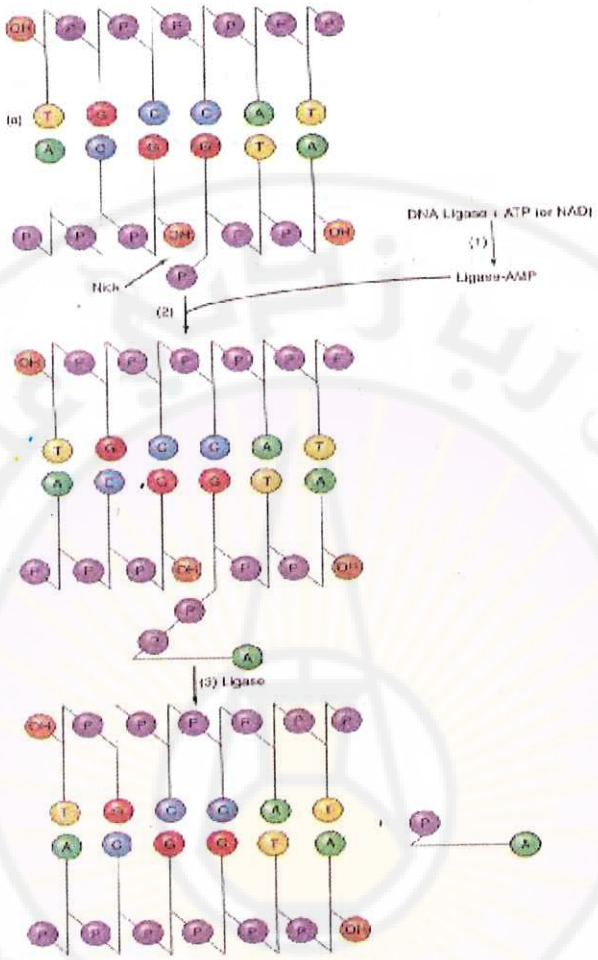
– الأول المعزول من آكل الجراثيم T4 بعد إصابته E.Colie، وما يميز هذا الأنزيم هو قدرته على وصل قطع الـ DNA ذات النهايات اللزجة والعمياء على حد سواء، وهو يحتاج إلى العامل المساعد ATP لإتمام عمله. وقد أصبح هذا الأنزيم متاحاً، وهو أكثرها استعمالاً مخبرياً، وأكثرها توفراً نظراً إلى عزل جيناتها وتحضيرها عن طريق الهندسة الوراثية شكل (37).

– النمط الثاني وهو المعزول من كائنات مختلفة، ويعمل على إعادة ارتباط قطع الـ DNA ذات النهايات اللزجة فقط، ويتطلب عمله وجود عامل مساعد هو NAD+. تقوم أنزيمات الربط Ligases بربط زمرة الهيدروكسيل في النهاية 3′ مع الفوسفات من النهاية 5′ للنيكلوتيدات المتجاورة، وبذلك تتكون روابط فسفورية ثنائية الأستر أثناء تضاعف الـ DNA وكذلك أثناء عملية الإصلاح والترميم، تعمل هذه الأنزيمات بوجود عوامل إضافية مساعدة دائمة مثل AMP، والذي يرتبط بالأنزيم محفزاً إياه.




(شكل 36): يبين الآلية المتعاكسة لعمل أنزيمات التحديد وأنزيمات الربط، حيث تؤدي الأولى إلى فصم الروابط الفوسفاتية ثنائية الأستر، وتؤدي الثانية إلى تشكيلها .

لاتعمل أنزيمات الربط على النيكليوتيدات التي تكون أسسها مرتبطة بروابط هيدروجينية، ولا تقوم هذه الأنزيمات بالعمل إلا بعد التقاء النهايات الصحيحة، وهذا ما يتم حصوله بالمصادفة ولهذا فإننا نستخدم تركيزاً عالياً من الـ DNA في عمليات الربط لزيادة احتمال حصول الالتحام، وخاصة عندما تكون النهايات من النمط العمياء، وتكون فرصة اللقاء للنهايات اللزجة أكبر، إذ تساعد الروابط الهيدروجينية بين الأسس المتقابلة على توفير هذه الفرص، وهكذا فان لتركيز أنزيم الربط وتركيز قطع الـ DNA ونوع النهايات دوراً هاماً في سرعة هذه العملية، ويمكن التغلب على مشكلة صعوبة الربط بين النهايات العمياء عن طريق تحويرها، وتحويلها إلى نهايات لزجة، كما سوف نرى فيما بعد.




(شكل 37) يبين آلية عمل أنزيم الربط(الليغاز) في تشكيل الروابط الفوسفاتية ثنائية الاستر التي تلي مباشرة عملية تضاعف الأحماض النووية DNA.

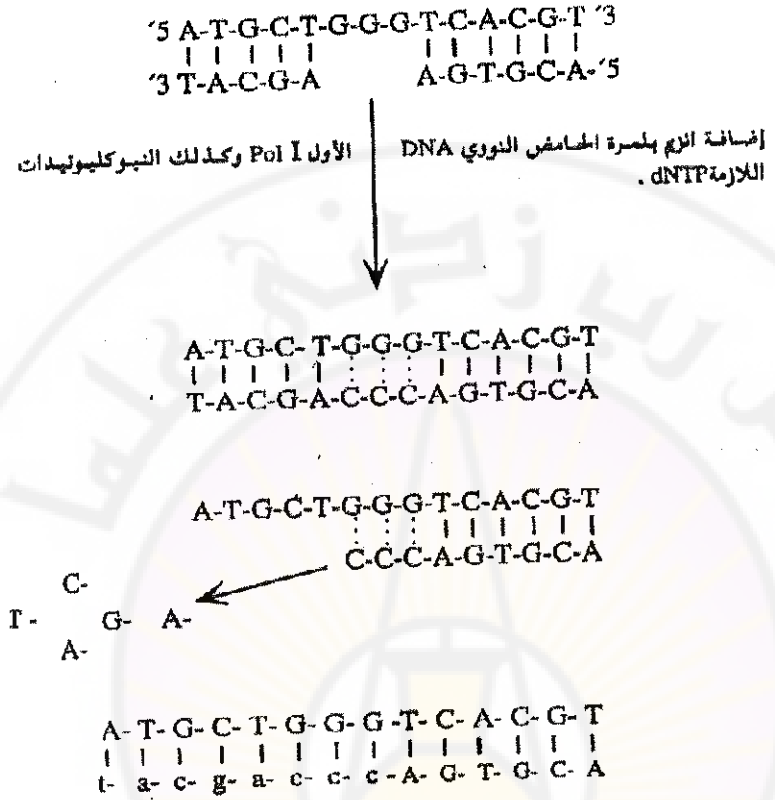
### 3-أنزيمات بلمرة الأحماض النووية Nucleic acids polymerase:

تقوم أنزيمات البلمرة بتركيب سلاسل من الـ DNA وفقاً لقالب غالباً ماينتج من جزيئات مزدوجة، وبعد استعمال هذه الأنزيمات محدوداً في مجال الهندسة الوراثية.

تم عزل وتحديد ثلاثة أنماط من الأنزيم DNA polymerase في حقيقيات النوى وطليعياتها، وتم بالمقابل تحديد ثلاثة أنماط من الأنزيم RNA polymerase في حقيقيات النوى ونمط واحد في طليعيات النوى.

ومن أهم أنزيمات البلمرة المستخدمة في الهندسة الوراثية هو النمط DNA polymerse I، والذي يدعى أيضاً بأنزيم كورنبرغ Korinberg وقد تم عزله من E.colie وهو يعمل على ترميم الفراغات الموجودة في إحدى سلسلتي الجزيء المزدوج ويعمل بدءاً من الجهة 3′ مستخدماً السلسلة المقابلة كقالب، يعمل هذا الأنزيم بالهدم في الوقت نفسه للسلسلة من الجانب الآخر، وبالتالي استكمال بناء السلسلة الجديدة.

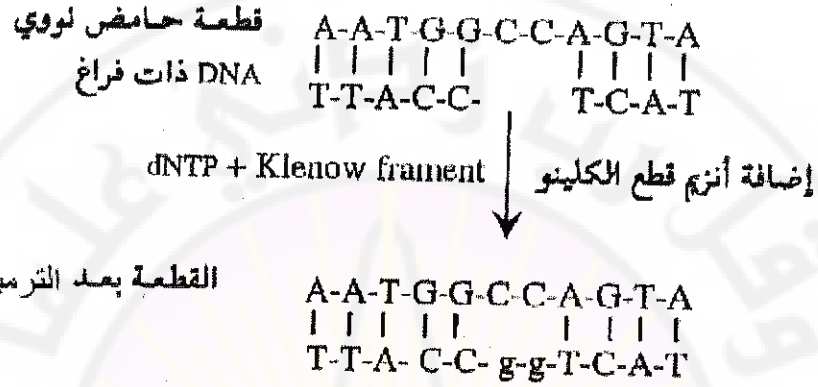
يستخدم هذا الأنزيم مخبرياً لبناء سلسلة DNA باستعمال سلسلة أخرى كقالب، ولكن بوجود بادئة قصيرة primer ذات نهاية هيدروكسيلية، إضافة إلى شوارد المغنيزيوم الثنائية والنيكلوتيدات المستعملة في البناء d(NTP) كما يوضح (الشكل38).




(شكل38): نشاط البناء و الهدم لدى أنزيم بلمرة الحامض النووي DNA Polymerasel ، ويلاحظ بأن الأنزيم استخدم سلسلة كقالب، و استخدم قطعة قصيرة من السلسلة المقابلة كبادئة من أجل البناء بدءاً من النهاية الثالثة بينما ابتدأ نشاط الهدم من النهاية الخامسة.

يعود نشاط البناء والهدم لهذا الأنزيم إلى أنه يتألف من ثلاث وحدات: الأولى هي المسؤولية عن البناء، والتي تدعى بقطعة كلينو Klenow fragment وتستخدم بكثرة لبناء سلاسل الـ DNA. أما الوحدة الثانية فهي خاصة بعملية الهدم، في حين أن وظيفة الوحدة الثالثة هو تنظيم هذه الأنشطة وتسيير عملية الهدم والبناء بالاتجاه $5' \leftarrow 3'$.

يقوم أنزيم كورنبرغ أيضاً بدور هام لإصلاح وترميم المواقع التي يحصل عندها نقص في جزيء الـ DNA، من خلال وحدة البناء klehow fragment كما يوضح الشكل(39).




(شكل 39): آلية ترميم قطع الحامض النووي DNA باستخدام نشاط البناء لأنزيم بلمرة الحامض النووي DNA POL I

ومن الأنزيمات كثيرة الاستعمال في الهندسة الوراثية أنزيم النسخ العكسي Reverse transcriptase (T.R)، والذي تم عزله من الفيروسات القهقرية Retrovirus، ويستخدم بكثرة في الهندسة الوراثية في عملية تركيب جزيء من الـ DNA (جين) انطلاقاً من جزيء من الـ RNAm كقالب.

## 4- أنزيمات تحوير الحمض النووي DNA Modifying enzymes

نحتاج في تقنية الهندسة الوراثية إلى إجراء تعديل في الحمض النووي، بإضافة أو حذف لبعض النيكلوتيدات أو إلى إضافة أو حذف بعض الزمر الكيميائية، ومن هذه الأنزيمات:

- الفوسفاتيز القلوي phosphates Alkaline : يستطيع هذا الأنزيم، والذي تم عزله من E . collie حذف مجموعة الفوسفات من النهاية 5′ للـ DNA، يعمل هذا الحذف على تقليل احتمال اللصق عند هذه النهاية بعد إجراء القطع بواسطة أنزيمات القطع.

- أنزيم الكيناز متعدد النيكليوتيد Polynucleotide kinase: يستطيع هذا الأنزيم إضافة مجموعة فوسفات إلى النهاية 5′ من الـ DNA، أي إن هذا الأنزيم يقوم بوظيفة معاكسة لأنزيم الفوسفاتيز القلوي، مما يسهل عملية لحم نيكلوتيدات جديدة على هذه النهاية.

- أنزيم الترانسفيراز الطرفي Terminal deoxynucleotidal transferase : وهو يقوم بإضافة نيكلوتيد أو أكثر إلى النهاية 3′ لقطع الـ DNA.

**5- أنزيمات فك الحلزنة Topoisomirase:**

تعمل هذه الأنزيمات على فك الالتفاف في الجزيء المضاعف للـ DNA، وعملية فك الحلزنة أو الالتفاف ضرورية من أجل إنجاز عملية التضاعف والنسخ، وقد تم الكشف عن نوعين من هذه الأنزيمات IوII، تقوم هذه الأنزيمات بفك الحلزنة عن طريق كسر الروابط سكر فوسفات، وبالتالي التحرك بعكس اتجاه الانفتال وعند الانتهاء من هذا الأمر يقوم أنزيم آخر يدعى الجيراز Gyrase بلحام نهايات الشريط مرة أخرى، وتتم عمليات اللحام في المواقع نفسها التي تم فيها الكسر.

وقل رب زدني علما
جامعة دمشق
Damascus University

# الفصل الثالث

# العمل بالأحماض النووية

من الضروري الوقوف عند بعض التقانات النوعية الخاصة بالأحماض النووية التي تتناول طرائق الحصول عليها وقياسها وتحليلها وتهجينها. يتطلب العمل بالأحماض النووية وجود نماذج نقية منه، ونظراً إلى اختلاف مصادر الـ DNA فقد تنوعت طرائق استخلاصها والتعامل معها، وسوف يتم التطرق إلى طرق عزل الـ DNA والـ RNA وتشعيعها وتهجينها وتنقيتها والتعرف على تتابعاتها.

## 1- عزل الـ DNA والـ RNA : Isolation of DNA and RNA

يتطلب العمل بالجينات للحصول عليها من مصادرها المناسبة من الأحماض النووية، ولهذا فإنه من الضروري استعمال الطريقة المناسبة لعزله من الخلايا وبعد تفكيك المادة الأولية من فيروسية أو جرثومية أو نباتية أو حيوانية أمراً أساسياً، بحيث يتم تحطيم جدران الخلايا بشكل لطيف، ونتبع لذلك طريقة أنزيمية خاصة بالنسبة للخلايا الحيوانية والتحليل بالمنظفات للأغشية الخلوية.

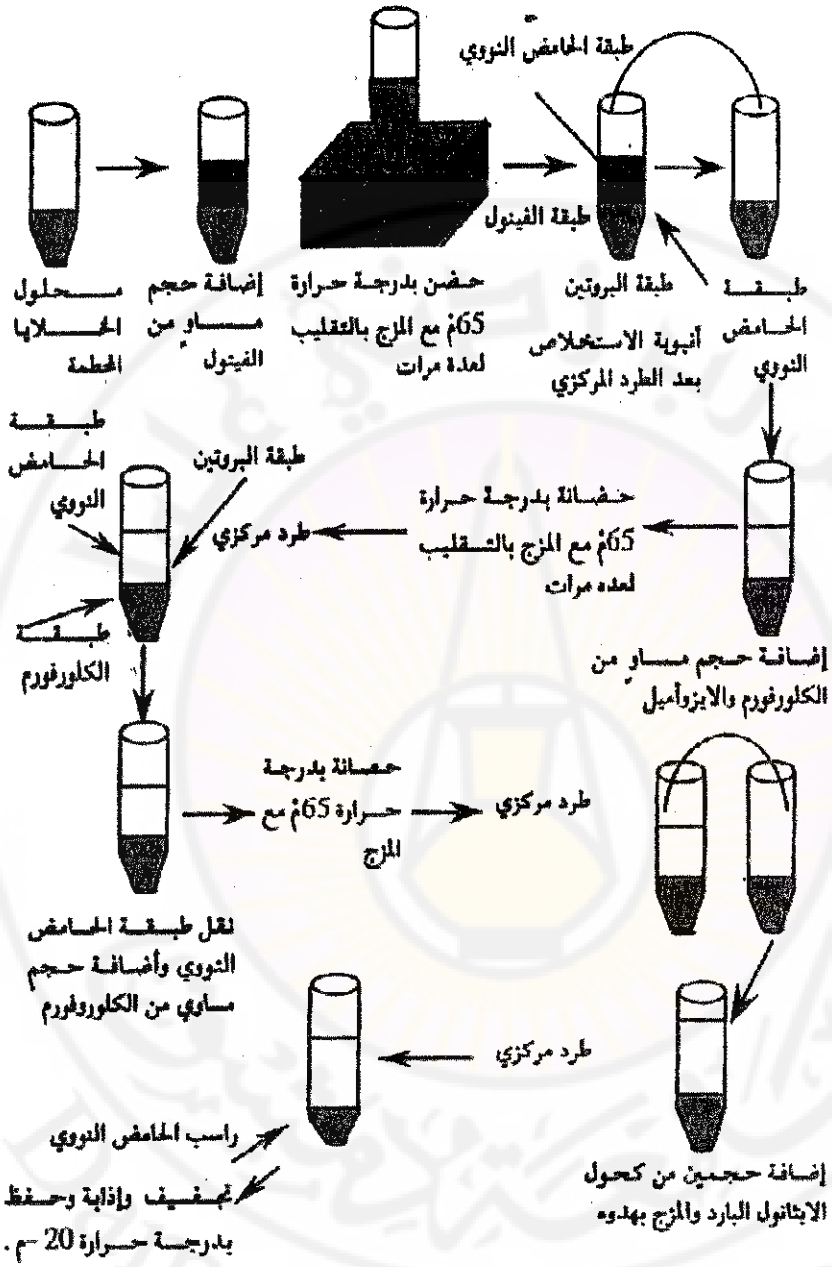
ويتم في بعض الأحيان استعمال طرائق أكثر عنفاً بالتكسير الميكانيكي، كما هو الحال في بعض أنواع مادة الخلايا النباتية، التي تتميز بوجود الغلاف الخلوي الذي يدخل في تركيبه السللوز.

يتم في مرحلة تالية إزالة البروتينات من الخلاصة الخلوية، ويجري ذلك بأكثر من طريقة، والأكثر استعمالاً هي المعالجة بخليط من الفينول كلوروفورم الذي يؤدي إلى تشكيل مستحلب، تتم معاملته بالتثفيل بحيث يتوضع البروتين في الطور الفينولي وعند السطح البيني، أما الأحماض النووية فإن غالبيتها تبقى في الطور المائي، ويمكن ترسيبها عن طريق استعمال الأيزوبروبانول أو الأيثانول، كما يمكن

تجفيفها ومن ثم إذابتها وحفظها في درجة حرارة منخفضة تبلغ -20 إلى حين استعمالها (شكل40).

وعندما يكون المطلوب هو تحضير الـ DNA فإننا نقوم بالمعاملة بواسطة أنزيمات الـ RNA ase الذي يحلل الـ RNA، أما عندما نريد الإبقاء على الـ RNA فقط فإننا نعامل الخلاصة بواسطة أنزيمات تحليل الـ DNA (DNAase)، أما إذا كان المطلوب هو استخلاص الـ RNAm بهدف تركيب(DNAc) المكمل فإننا نستخدم السليلوز المرتبط بقليل التيميدين والذي يرتبط بقليل الأدينين الموجود في نهاية جزيئات الـ RNAm في الكائنات حقيقية النوى. تعطي هذه الطريقة كمية وافرة من الـ RNAm بعد التخلص من السليلوز ومن شوائب الـ DNA و RNAr و RNAt.

وإذا كان الهدف تحضير الـ DNA البلاسميدي، فإنه من المفضل استخدام تقنية التثفيل التدريجي Gradient centrifugation بحيث نضيف إلى الخلاصة كلوريد السيزيوم، والمعاملة بالطرد المركزي الفائق لمدة طويلة تصل إلى حوالي 48 ساعة وبسرعات فائقة، نحصل بنتيجة ذلك على تدرج في الكثافة، ويمثل الحمض النووي البلاسميدي (DNAP) بحزمة عند موضع محدد في أنبوبة الطرد المركزي، يمكن بعد ذلك فصل هذه الحزمة، ومن ثم استخلاص الـ DNA البلاسميدي بشكل نقي ليصار إلى استعماله في مراحل مختلفة من تقانات الهندسة الوراثية.




(شكل 40): يبين الطريقة التي يتم من خلالها عزل الـ DNA وتنقيته بشكل تفصيلي بواسطة الفينول والكلوروفورم والأيزوبربينول

## 2- التعامل مع الأحماض النووية وقياسها

نحتاج في أغلب الأحيان عند العمل بالأحماض النووية إلى كميات ضئيلة، منها (ميكروغرامات – أونانوغرامات – أوبيوغرامات) لاستعمالها في عمليات التنسيل Cloning ويعد هذا الأمر غير يسير وصعب التحديد، ولذلك فإننا نجري القياسات في أغلب الأحيان على المحاليل المائية التي تحتوي على الـ DNA و الـ RNA. ويمكننا قياس تركيز محلول الحمض النووي عن طريق قياس مقدار امتصاص الموجة 260 nm (تعد هذه الموجة خاصة بالـ DNA والـ RNA)، وتتم عملية القياس باستعمال مقياس الطيف الضوئي Spectrophotometer

إن الامتصاص عند طول الموجة nm260 بمقدار 1 يعادل 50 ميكروغرام لكل مل بالنسبة للخيط المزدوج من الـ DNA، ويعادل 40 ميكروغراماً لكل مل بالنسبة للخيط المفرد من الـ DNA أو الـ RNA.

أما تقدير نسبة الملوثات فيتم عن طريق قياس نسبة الامتصاص للموجة nm280، وهو طول الموجة التي تمتصها البروتينات. (وتشير نسبة الامتصاص عند الموجة 260 nm على الامتصاص عند الموجة nm280 إلى مقدار التلوث). ويجب أن تكون هذه النسبة مساوية أو أكثر من 1.8 عند تحضير الـ DNA وتساوي إلى 2 عند تحضير RNA.

كما يمكننا تقدير تركيز الـ DNA بواسطة بيان الوميض لبروميد الايثيديوم المرتبط بأسس الـ DNA، والذي يبث وميضاً برتقالياً عندما يتعرض لأشعة فوق البنفسجية (U.V)، وبمقارنة وميض العينة مع الشاهد والمعياري فإنه يمكن تقدير التركيز حتى كميات صغيرة (1- 5 نانوغرام )، وتستعمل هذه الطريقة بشكل خاص عندما تعيق الملوثات امتصاص الأشعة فوق البنفسجية.

يعد ترسيب الأحماض النووية الطريقة الأساسية التي يمكن استخدامها والمرسبات الأكثر استعمالاً هي الأيزوبروبانول والإيثانول ويفضل الثاني، وهو يتم عن طريق إضافته إلى محلول الـ DNA بنسبة 1/2 بالحجم بوجود 0.2 عياري من الملح.
يسبب الإيثانول خروج الـ DNA من المحلول، ويتم ذلك في درجة الصفر المئوية، ويتم استرجاع الحمض النووي بعد الترسيب بالنبذ المركزي، حيث يترسب الحمض النووي في قاع الأنبوب، يجفف بعدها الراسب ويعاد توزيعه في المحلول المناسب وحفظه في الشروط المناسبة ليعود ويستخدم في مرحلة تالية.

**3- تشعيع الأحماض النووية Radiolablling of nucleic :**

تعد مواصلة الحفاظ على الكميات الضئيلة من الأحماض النووية عند إجراء عمليات التنسيل من المشاكل الهامة، التي يجب معالجتها بسبب حصول فقد أثناء العمل عقب كل خطوة من خطوات العمل، وتعد عملية التشعيع إحدى أهم الطرق المتبعة لهذا الغرض من خلال النشاط الإشعاعي الذي تبثه المادة المشعة والذي يكون من خلال النكليوزيدات ثلاثية الفوسفات ويتم عادة تشعيع الـ DNA باسطة التيميدين المعلم بالتريتيوم H3 أو بواسطة الفوسفور المشع P32، وبهذا يمكننا تقدير كمية الحمض النووي الموجود عن طريق قياس كمية الإشعاع.
أما التطبيق الآخر للتشعيع فهو إنتاج أحماض نووية لاستعمالها في تجارب التهجين Hybridization وتسمى هذه الجزيئات بالمجسات Probes، والتي تستعمل للعديد من الأغراض كتشخيص العديد من الأمراض الوراثية، أو للتعرف على مواقع الجينات على الكروموزومات وغيرها من الأغراض.
يكفي النشاط الإشعاعي المنخفض عندما يكون القصد منه التعقب، أما بالنسبة للمجسات فإن النشاط النوعي العالي يكون ضرورياً، وغالباً ما تكون المادة المشعة

المستعملة في تحضير المجس باعثة لدقائق عالية الطاقة (بيتا) للفوسفات المشع P32.

### 3-1- المسابر Probes:

تعد المسابر أو ما يدعى بالمجسات من الأدوات الهامة، التي أسهمت إلى حد بعيد في تطوير العديد من المجالات في البيولوجيا الجزيئية، كما وساهمت في الكشف عن العديد من الأفعال الحيوية التي تجري ضمن الخلية الحية، يتم في هذه المسابر استبدال أحد العناصر مثل الكربون أو الآزوت أو الهيدروجين أو الفوسفات بإحدى نظائرهم المشعة مثل نظير الهيدروجين H3، وهو التريتيوم أو نظير الفوسفات P32 أو نظائر الآزوت N14, N15 أو الكربون C14 بدلاً عن العناصر الطبيعية، حيث إن الهدف من المسبار هو تتبع حركة المركبات والتفاعلات الحيوية، كما ويمكن أن تستعمل بهدف تشخيص العديد من الأمراض عن طريق متابعة هذه المواد الموسومة في جسم الكائن الحي.

استخدمت المسابر أيضاً في مجال البيولوجيا الجزيئية والهندسة الوراثية، في التعريف مثلاً على سلوك الكروموزومات وجزيئات الـ DNA أثناء التضاعف، كما تم من خلالها على سبيل المثال التأكد من أن نمط التضاعف للمادة الوراثية (هو من النمط نصف المحافظ).

يعتمد استخدام المسابر الموسومة إشعاعياً على خاصة عدم الذوبان للبروتينات والأحماض النووية في حمض الخل ثلاثي الكلور Tricloractic acid (TCA) في حين أن الأحماض الأمينية والنيكلوتيدات المفردة قادرة على الذوبان. وبهذا يمكن للنيكلوتيدات أو الأحماض الأمينية المستعملة كوحدات في عملية البلمرة، والتي يمكن أن يكون أحد أنماطها موسوماً، أن يدخل في عملية التركيب للجزيء الجديد، ونقوم بعد ذلك بإضافة حمض الخل ثلاثي الكلور الذي يذوب فيه كل

النيكلوتيدات أو الأحماض الأمينية البسيطة التي لم تدخل في عملية البلمرة نلجأ فيما بعد إلى التخلص منها، باستعمال عامود هلام أو ورق ترشيح، والتي تسمح بتمرير النيكلوتيدات أو الأحماض الأمينية في حين تبقى الجزيئات في عامود الهلام أو أوراق الترشيح.

تتميز العناصر المستعملة في عملية الوسم بخطورتها، كما هو الحال بالنسبة لنظير الفوسفات P32 وهو مصدر إشعاع قوي نسبياً، وتنطلق منه بعض الإشعاعات التي تمثل خطراً كما هو الحال بالنسبة للأشعة بيتا وجما وألفا وغيرها. من جهة أخرى هناك عناصر غير خطرة، كما هو الحال بالنسبة لنظير الهيدروجين H3، وكذلك بالنسبة لنظائر الآزوت والكربون.

ويتطلب العمل بالنظائر المشعة في جميع الأحوال اتخاذ إجراءات مناسبة للوقاية من المواد المشعة المستعملة، وكذلك إلى تخصيص المواقع للعمل معزولة، على أن تكون مطلية من الداخل بصباغ لماع سهل التنظيف، وكذلك استعمال طاولات خشبية مصقولة وغير معدنية، وكذلك الإقلال من استعمال الأدوات الزجاجية بسبب قدرتها العالية على العكس، ومن الواجب تزويد الطاولات بحاجز بلاستيكي علوي مهمته عزل مرور الإشعاعات، وغالباً ما يكون هذا الحاجز بسمك يزيد عن 10 ملم.

ومن المتوجب أيضاً أن توضع النفايات المشعة في أكياس النفايات والقوارير، وتحفظ جميعها في صناديق من الرصاص لمدة 3 إلى 4 أشهر، وهذه المدة تعادل ثماني مرات ضعف نصف العمر للنظير P32، يمكن بعد ذلك طرحها مع النفايات العادية.

ومن الضروري عند التعامل مع المواد المشعة حمل أفلام الكشف عن الإشعاعات، والتي يجب أن توضع في الجيب الصدري، كما أنه من الضروري قراءة مقدار الإشعاع عن طريق العداد الخاص بذلك عند البدء بالعمل وعند الانتهاء منه.

### 3-2- استخدام المسابر في الدراسات الوراثية:

يمكن الاستفادة من المسابر في الأحماض النووية للعديد من الأغراض ومنها:

**أ - عزل الجينات:**

تستخدم في هذه الحالة بهدف الكشف وعزل الجينات، ويمكن باستعمالها التعرف على وجود بعض الجينات المغروسة في النواقل بهدف استخلاص الأحماض النووية للنواقل المجهزة عن طريق الهندسة الوراثية، ومن ثم تثبيتها على المرشحات أو النايلون، ومن ثم إحداث الدنترة، ويتم بعد ذلك إضافة المسبر الموسوم إلى الجين الهدف. وبذلك يرتبط المسبر على الجين يتم بعد ذلك تظهير هذه المواقع بالمعاملة بأشعة x وعندها تظهر على شكل نقطة سوداء، وبهذا يتم تحديد الناقل الذي يحتوي الجين. كذلك يمكن استعمال هذا التهجين في الرحلان الكهربائي، ومن ثم نقله على الورق بهدف كشف وتحديد الجينات.

يمكننا استعمال المسابر أيضاً لتحديد مواقع الجينات على الكروموزومات، ويتم ذلك عن طريق زراعة الخلايا على الشرائح الزجاجية، ومن ثم معاملتها بالكولشيسين لوقف الانقسام في مرحلة الصفيحة الاستوائية، تتم بعد ذلك عملية التثبيت باستعمال الكحول وخليط من حمض الخل والميثانول، نضيف بعد ذلك المسبر الموسوم بواسطة H3 وتطلى الشريحة بطبقة جيلاتينية وتحفظ الشرائح في الظلام، ثم تُظهر وتفحص وتبدو مواقع الجينات على شكل بقع سوداء.

**ب- متابعة التفاعلات:**

ونهدف من ذلك إلى متابعة آلية التفاعلات للأحماض النووية ومتابعة مراحل التركيب الـ DNAc، كما ويمكن استعمالها للتعرف على أحجام و أوزان الجزيئات للحمض النووي من خلال تقانة الرحلان الكهربائي Electrophorese.

**ج- تحديد تركيب الجين:**

يمكننا استعمال النيكلوتيدات الموسومة للتعرف على تسلسلات الأسس في قطعة من الحمض النووي، ومن ثم نستطيع التعرف على تركيب الجين عن طريق استعمال تقانة الرحلان الكهربائي.

**3-3- طرائق اصطناع المسابر:**

يمكننا اصطناع المسابر بطرائق مختلف نذكر منها:

**أ- تشعيع النهايات End labelling :**

يتم من خلال هذه الطريقة وسم النهاية 3′ أو النهاية 5′ عن طريق الهدم والبناء باستعمال نيكلوتيدات معلمة، ويجب الإشارة إلى أن هذه المسابر تكون عادة منخفضة الإشعاع، ومن الطرق لتحقيق ذلك:

- وسم النهاية 5′:

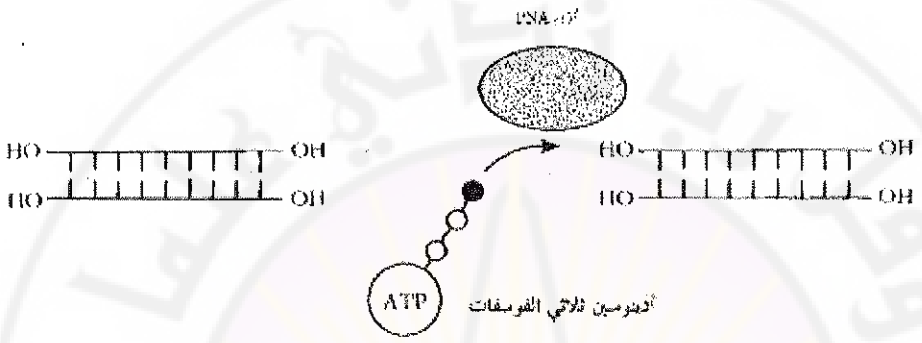
يتم إنجاز ذلك بمعاملة الـ DNA بواسطة أنزيم قطع للحصول على قطع صغيرة، والتي نعاملها بعد ذلك بأنزيم الفوسفتاز القلوي Alkalin phosphatase بوجود الأدنين ثنائي الفوسفات ADP حيث تتم إزالة الفوسفات من النهاية 5′ ونقله إلى الأدنين ثنائي الفوسفات، ثم تتم إضافة أنزيم Polynucleotide kinse الذي يقوم بفسفرة النهاية 5′.

- وسم النهاية 3′:

تتم عملية الوسم باستخدام قطع من الـ DNA و إضافة أنزيم Terminal transfirase(TDT) dioxynucleotide وهو أنزيم بلمرة يعمل دون الحاجة إلى قالب، ويقوم بإضافة نيكلوتيدات إلى النهاية 3′ سواء كانت النهايات لزجة أم

عمياء. وبوجود النيكلوتيدات الموسومة فإنه يتم ضمها، مما يؤدي إلى نهايات معلمة مؤلفة من عدد من النيكلوتيدات بمقدار إشعاعي جيد.

ونشير هنا إلى أن طريقتي وسم النهايات يمكن أن تتما على السلاسل المفردة والمزدوجة على السواء، غير أنها أسهل إنجازاً على السلاسل المفردة (شكل41).




(شكل 41) يبين طريقة تشعيع النهايات عن طريق استعمال أنزيم Polynucleotide kinase(PNK)

**ب-الترجمة المتممة Nike translation:**

تستخدم هذه الطريقة لوسم الـ DNA لغرض التهجين، وهي تعتمد على قدرة أنزيم DNA Polymerase I (كورينبرغ) على القيام بالبناء في مواقع الفراغات الناتجة عن الهدم وإزالة النيكلوتيدات ويقوم بإضافة نيكلوتيدات جديدة معلمة، وبذلك نحصل على مسبر مشع، ويتميز هذا المسبر بالنشاط الإشعاعي العالي، مما يمكننا من استعمله في الكشف عن الجينات، باستعمال تقانة التهجين في الموقع على سبيل المثال.

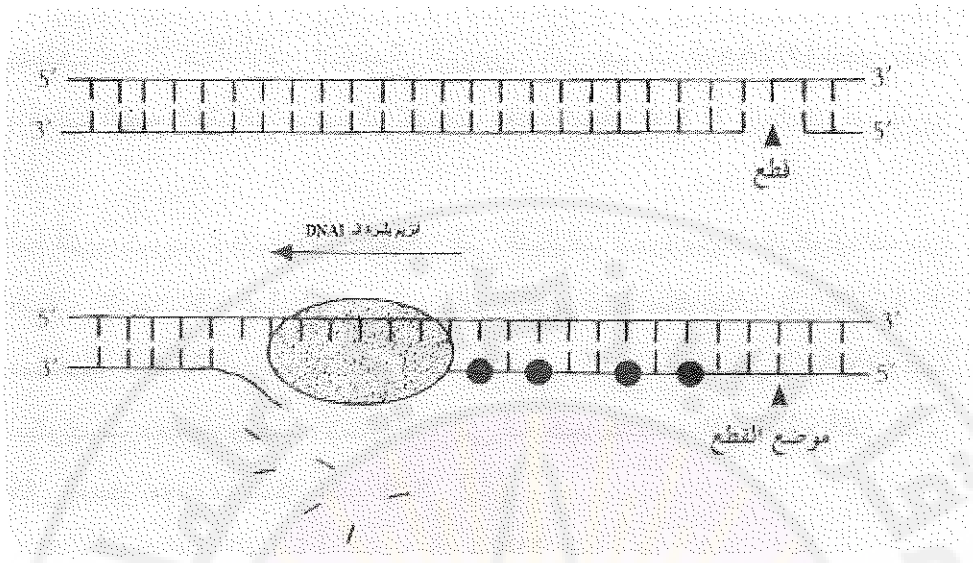
يتطلب إنجاز هذا الأمر استعمال أنزيمين الأول هو الـ DNAase الذي يقوم بإحداث القطع العشوائي مؤدياً إلى نهايات هيدروكسيلية حرة 3′ ونهايات فوسفورية 5′.

أما أنزيم كورينبرغ فإنه يقوم بالعمل على النهايات الحرة مزيلا النيكلوتيدات من النهاية 3′ من كلتا السلسلتين، ويقوم ذات الأنزيم بربط نيكلوتيدات إلى النهاية 3′ مستخدماً السلسلة المقابلة كقالب، وبهذا فإنه يقوم ببناء سلسلة من الـ DNA فيها نيكلوتيدات معلمة، ويجب الإشارة هنا إلى أنه كلما كانت مواقع القطع أكثر عدداً كان المسبر موسوماً بشكل أكبر (شكل 42).

يتطلب إنجاز هذه العملية أن يكون الـ DNA نقياً وغير ملوث، وخاصة بالمواد المستخدمة في عملية استخلاصه، مثل الفينول والكلوروفورم وكذلك بالبروتينات، تقوم هذه الملوثات بتثبيط أنزيم كورينبرغ ومنعه من القيام بعمله.

تجب الإشارة أيضاً إلى أنه لابد أن يكون تركيز الأنزيمات المستعملة محدداً ومضبوطاً دون زيادة أو نقصان، كما ويحتاج هذا التفاعل إلى تأمين الحرارة المناسبة، والتي تبلغ 15 درجة وارتفاع هذه الدرجة يؤدي إلى كثافة في مواقع القطع، وكذلك يؤدي إلى تقطيع المسبر بعد الانتهاء من القالب، وكذلك لابد من أن تتم هذه العملية خلال زمن محدد يتراوح بين 0.5 و5 ساعات، إن أي اختلاف في هذه الشروط يؤدي إلى مسابر غير قابلة للاستعمال.

إن من مصاعب هذه الطريقة احتياجها إلى تراكم كم كبير من الـ DNA، وكذلك الحاجة إلى ضبط دقيق لشروط درجة الحرارة والزمن والسيطرة على عمل الأنزيمات المستعملة، وكذلك إن هذه العملية لا تتم إلا على سلاسل مزدوجة، وعادة ما يتم ضبط هذه الشروط عن طريق الخبرة التي يكتسبها الباحث خلال القيام بعمله.




(شكل 42): يبين طريقة تشيع جزيء الـ DNA عن طريق الترجمة المتممة باستعمال أنزيم كورينبرغ.

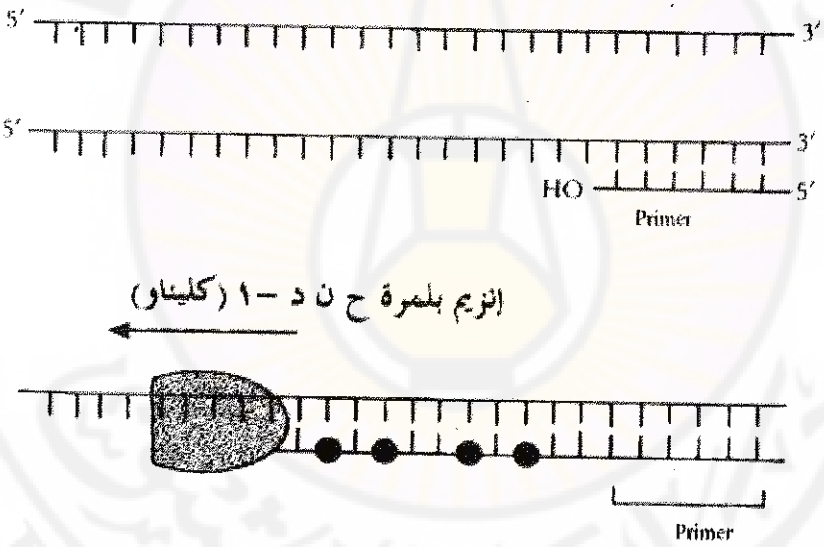
**ج- التشعيع عن طريق البادئ primer extension :**

نستخدم في هذه الطريق قليل النيوكلوتيد Oligonucleoteides (Primers) وهي عادة جزيئات سداسية النيكلوتيد تستعمل كبوادئ لعملية تركيب سلاسل الـ DNA بواسطة أنزيم البلمرة، ولتتم عملية التشعيع بهذه الطريقة لا بد من تعريض جزيئات الـ DNA للتسخين لإحداث الدنترة، ثم يتم بعد ذلك ربط البوادئ أو قليل النيوكلوتيد بالسلسلة المفردة، ويقوم أنزيم كلينو Klenow والذي يبلغ وزنه الجزيئي 76000 دالتون، وهو يمثل وحدة البناء من أنزيم كورنبيرغ، بتركيب نسخة من القالب تبدأ من مجموعة الهيدروكسيل 3′ من قليل النيكلوتيد. يؤدي استعمال النيكلوتيدات المعلمة (dNTP) في عملية البلمرة إلى بناء سلسلة الـ DNA ذات نشاط إشعاعي خلال ثلاث ساعات وفي درجة حرارة مثلى تبلغ 25 درجة، وتؤدي

هذه العملية إلى مسابر ذات نشاط إشعاعي عالٍ، ومن ميزات هذه الطريقة هي إمكانية حدوثها في درجة حرارة تفوق 35. (شكل 43).

يمكننا أيضاً أن نقوم بتصنيع مسبر باستخدام أنزيم النسخ العكسي Revese transcriptase والذي يستخدم الـ RNA كقالب. تتطلب هذه العملية إضافة بادىء متعدد التيمين، بالإضافة إلى النيكلوتيدات الموسومة، علماً بأن هذه العملية تتم في درجة حرارة 37 مئوية ويؤدي ذلك إلى صنع مسبر عالي التركيز.

تؤدي هذه الطريقة عموماً إلى مسابر نقية وبتراكيز جيدة ويجب الإشارة إلى إمكانية استخدام هذه الطريقة لتصنيع مسابر للفاجات الحلقية وحيدة السلسلة مثل M13.




(شكل 43): يبين الطريقة المستعملة لبناء المسابر بطريقة التشعيع عن طريق البادىء باستعمال الأنزيم كلينو.

ولفصل الـ DNA عن النيكلوتيدات غير المرتبطة في خليط التفاعل نقوم بإجراء الترشيح على الهلام على نطاق بسيط، ويمكن أن تتم العملية عن طريق ممصة

باستور حيث يخرج الـ DNA أولاً من العامود تتبعه النيكلوتيدات الحرة، ويمكن بعد ذلك تجميع الأجزاء وقياس نشاطها الإشعاعي، وبالتالي حساب النشاط الكلي للـ DNA والنشاط النوعي والنسبة المئوية للمشع الداخل في التركيب.

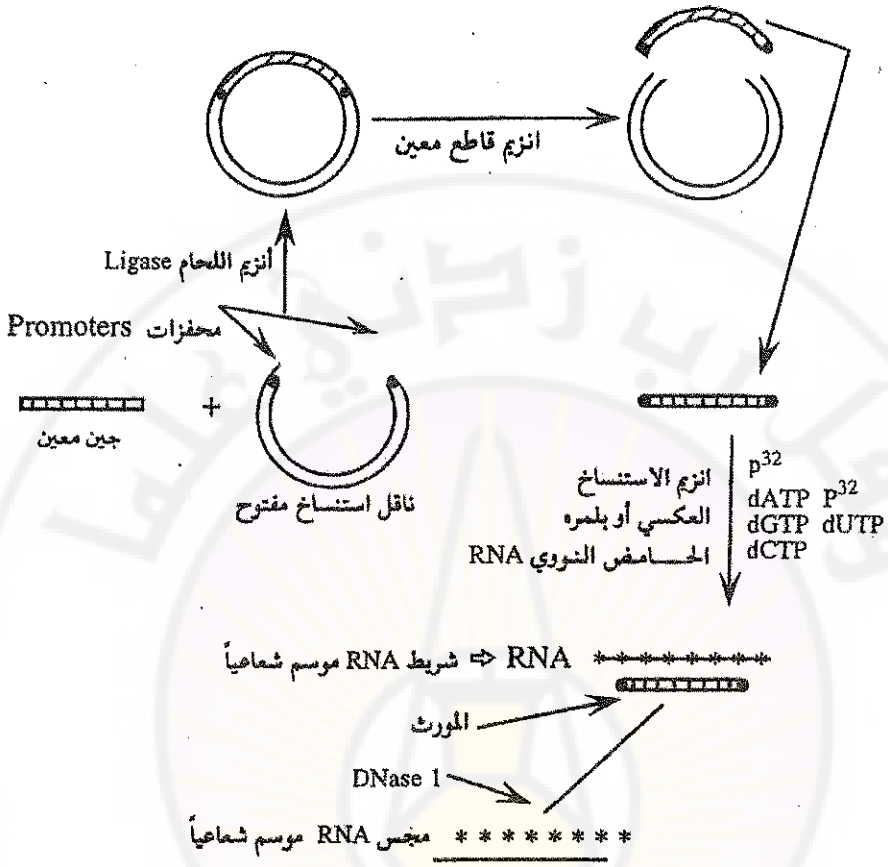
### 3-4- مسابر الـ RNA:

يتم اصطناع هذه المسابر باستخدام أنزيم RNA Polymerase، ويحتاج ذلك إلى محفز Promoter لبدء عملية البناء، غير أن استعمال هذه المسابر يتطلب أن يتم غرس الجين في ناقل Vectors، وبحيث تكون محدودة ضمن الناقل بمحفزين، وهذا ما يمكن الحصول عليه خلال عملية التنسيل.

يتم في مرحلة تالية قطع الجين التي نريد غرسها، وهي محاطة بمنطقي تحفيز وبوجود النيكلوتيدات الموسومة وأنزيم RNA Polymerase يتم بناء سلسلتين متممتين من الـ RNA الموسومتين، وليتم الحصول على الـ RNA (المسبر) نقياً يتم التخلص من الـ DNA بواسطة الـ DNAase وتعد هذه المسابر ذات حساسية عالية.

يمكن لهذه الطريقة أن تتم أيضاً على سلاسل الـ DNA المفردة بكفاءة أكبر خاصة عندما يكون حلقياً في الفاج M13 (شكل 44).

هناك طرق أخرى من الوسم المناعي والتي تهدف إلى البحث عن العيوب في الجينات، أو عن البروتينات غير الطبيعية، تستعمل هذه التقانة على سبيل المثال للكشف عن بعض العيوب التي تؤدي إلى بعض الأمراض، كما هو الحال بالنسبة للانتقال الكروموزومي بين الكروموزومين 22 و9 الذي يؤدي إلى سرطان الدم (اللوكيميا)، ويتم ذلك عن طريق الكشف مناعياً عن البروتين الذي يرتبط بالكروموزوم فلديلفيا.




(شكل 44): يبين طريقة تحفير مجس الـ RNA بدءاً من قالب من الـ DNA، ويتطلب ذلك استخدام محفزات خاصة وفقاً لنوع الأنزيم المستخدم.

### 4- تهجين الأحماض النووية Nucleic acid hybridization :

تعد الصفة التكاملية للأسس الآزوتية التي تدخل في تركيب الأحماض النووية من النواحي المفيدة، و تستخدم كميزة لإجراء العديد من التطبيقات على الأحماض النووية.

تتم عادة إعادة جزيء الـ DNA من البنية الثانوية إلى الأولية عن طريق التسخين، ومن المعروف أن هذه السلاسل تعود إلى الشكل مزدوج السلسلة عند التبريد البطيء.

يتطلب عزل ومتابعة الجينات والكشف عنها – ولكن بشروط خاصة– عن طريق استعمال المسابر الموسومة، والتي تمنحنا الفرصة لمعرفة عدد نسخ جين ما في الجينوم، وكذلك التعرف على التبدلات في بنية الجين.

يمكننا استعمال هذه الخاصة للوصول إلى المعلومات عن تتابع الـ DNA، حيث تقوم المتتاليات لكل جين بالعودة إلى الارتباط ببعضها بشكل أسرع من المتتاليات الموجودة في نسخ مفردة فقط، وقد أظهر التحليل باستعمال هذه التقانة وجود أربعة أصناف للـ DNA في حقيقيات النوى هي:

1– سلاسل الـ DNA المفردة التي تنطوي على بعضها مشكلة عروة دبوس، وهي تتشكل بسرعة بعد حصول عملية الدنترة، وتحتوي هذه السلاسل على متكررات عكسية.

2– أما الصنف الثاني فهي تمثل المتتاليات عالية التكرار والموجودة لمرات عديدة في المادة الوراثية.

3– يمثل النمط الثالث المناطق من الـ DNA متوسطة التكرار.

4– والنمط الأخير يمثل المناطق التي تحتوي على متتاليات مفردة التكرار وهي نادرة.

وقد تطورت تقنية التهجين بشكل كبير وتعددت استخداماتها وتطبيقاتها:

4–1– **تهجين الأغشية** : يتم هذا النمط من التهجين باستخدام أوراق السللوز أو النايلون، التي يمكنها الحفاظ على الأحماض النووية بعد نقلها إليها وتثبيتها عليها على شكل عصائب مفردة، ومن الطرق المعروفة لهذا التهجين:

– طريقة وذمة ساوثرن Southren blotting:

المبدأ في هذه الطريقة هو معاملة الحمض النووي بواسطة أنزيم تحديد، ومن ثم إجراء عملية الرحلان الكهربائي بواسطة محاليل، ثم النقل إلى غشاء من الطبيعة السللوزية أو من النايلون.

- وزمة نورثرن Northern blotting :

تعد الطريقة السابقة غير ملائمة لنقل الـ RNA، لذلك وضعت هذه الطريقة بحيث يصبح الورق المستخدم في النقل من طبيعة كيميائية ليصبح ملائماً لنقل الـ RNA، ونقوم في هذه الطريقة – كما في سابقتها– باستخدام مسبر نووي، ولكن في هذه الحالة هو من الـ DNA أو من الـ DNAc.

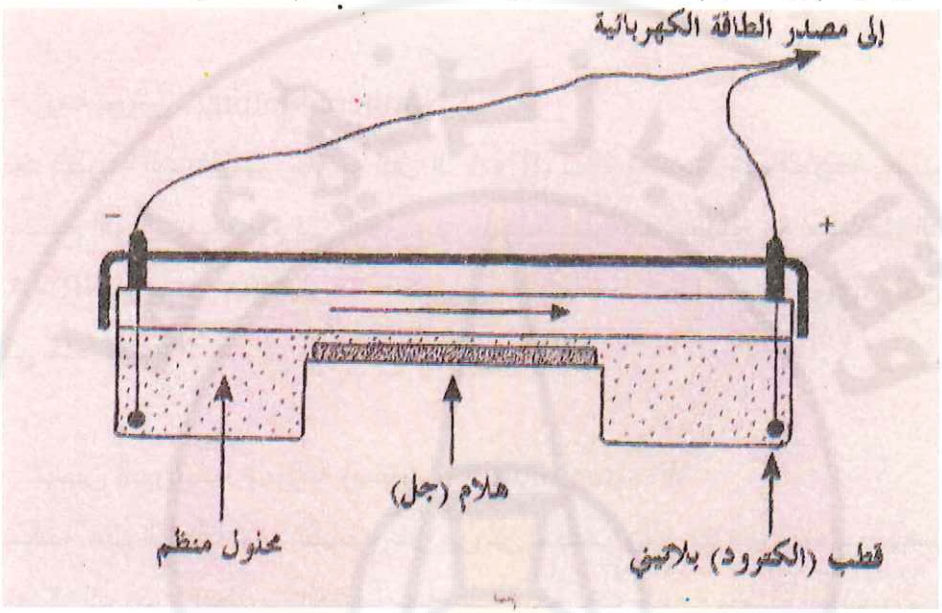
- تهجين البروتينات أو وزمة ويسترن Westren blotting :

تمكننا هذه الطريقة من الكشف عن بروتين محدد، وهي تتلخص بوضع جسم مضاد للبروتين المطلوب الكشف عنه على ورقة ذات طبيعة متعددة البوليميرات، ثم يضاف خليط من البروتينات على الورقة وبحيث يرتبط الجسم المضاد مع البروتين الخاص به، ويلتصق بقوة على سطح الورقة، ويتم بعد ذلك إزالة المواد غير المتفاعلة. يتم تقدير كمية البروتين عن طريق قياس مقدار الإشعاع المنبعث من العينة المفحوصة.

**5-الرحلان الكهربائي Electrophoreses :**

هي من التقانات الأساسية كثيرة الاستعمال في الهندسة الوراثية، وهي الوسيلة التي يتم من خلالها ترحيل الأحماض النووية، والمبدأ فيها هي أن الأحماض النووية عبارة عن مركبات متعددة الشحنة السالبة في درجة الـ PH المتعادلة، بمعنى أنها تحمل على شحنات سالبة عديدة نتيجة لوجود مجموعات الفوسفات على هيكل

ثنائي استر الفوسفات من سلسلة الـ DNA، وهذا يعني أن هذه الجزيئات السالبة سوف تهاجر إلى القطب الموجب عند وضعها في حقل كهربائي، وتتم هذه العملية على الهلام وبذلك يتم فصل هذه الجزيئات وفقاً لحجمها (شكل45).

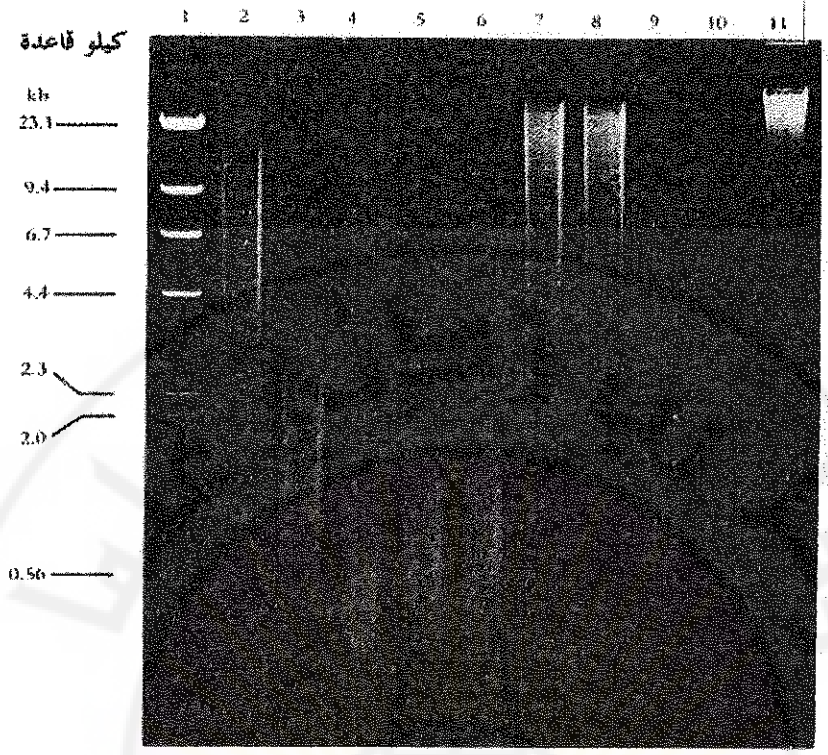



(شكل 45) نموذج الرحلان الكهربائي على هلام الاغاروز agorse gel electrophoresis حيث يغمر الهلام بمحلول المنظم، ويتم ترحيل الأحماض النووية باتجاه القطب الموجب بدءاً من القطب السالب، كما يمكن أن يستخدم الجهاز ذاته في ترحيل البروتينات

ولطبيعة وسط الفصل أهمية في قوة الفصل، والتي تعتمد بدورها على مسامية المادة الهلامية، ونميز نمطين من الهلام الشائعي الاستعمال وهما الأغاروز Agarose والبولي أكريلاميد Polyacrilamides ، يستخلص الأغاروز من طحلب بحري وهو متوفر في الأسواق على شكل مسحوق جاف يوضع في المحلول المنظم بتركيز مناسب 0.3- 2% (وزن/حجم ) ويأخذ شكلاً هلامياً بعد التبريد.

يستعمل البولي أكريلاميد عادة لفصل جزيئات الحمض النووي الصغيرة، وفي بعض التطبيقات مثل عمل المتتاليات للـ DNA، وتختلف مجالات الفصل المفيدة على هلام كل من الاغاروز والبولي أكريلاميد.

يتم إجراء الرحلان الكهربائي بوضع عينات الأحماض النووية مع الصبغة في بداية صفيحة الهلام، ثم يمرر تيار كهربائي ونراقب عملية الهجرة التي تستمر حتى وصول الصبغة المعلمة، والتي هي عادة البروموفينول الأزرق، إلى نهاية الهلام، ونرى الأحماض النووية بواسطة الصبغ ببروميد الايثيديوم Ethidium bromide ومن ثم فحصها باستعمال الأشعة فوق البنفسجية (u.v)، وتظهر الأحماض النووية كحزم برتقالية يمكن تصويرها ودراستها (شكل 46).




(شكل 46) يمثل صورة ضوئية بالأبيض و الأسود هلام الاغاروز ملونة بصبغة بروميد الايثيديوم تحت الأشعة فوق البنفسجية (u.v) تظهر عينات الـ DNA كمسحات برتقالية يبدو في المسار (1) الـ DNA للفاج $\lambda$ المعامل بأنزيم التحديد HindIII، أما باقي المسارات فتمثل أنماطاً من الـ DNA معاملة بواسطة أنزيمات تحديد مختلفة.

تستخدم النتائج في تقدير وقياس أحجام القطع المجهولة، عن طريق رسم منحنٍ قياسي باستخدام أصول مرجعية معلومة الحجم، وذلك اعتماداً على أن الهجرة للأحماض النووية على الهلام تتناسب عكساً مع اللوغارتم العشري لعدد الأزواج للأسس الآزوتية، ويعد هذا مفيداً في عمل الخرائط لأنزيمات التحديد.

يتم في هذه الطريقة صبغ الهلام بعد الانتهاء من الهجرة الكهربائية وقياس المسافات، وتثبيت لوغارتم أوزانها الجزيئية على محاور المنحني القياسي. ويتم في

النهاية تحديد المسافات التي قطعتها كل حزمة من الحمض النووي المجهول وبالتالي تحديد أحجامها بالمقارنة مع المنحني القياسي.

تعد تقانة الرحلان الكهربائي أيضاً مفيدة في تفريد وعزل البروتينات والأحماض النووية، وتعتمد هذه التقانة في البروتينات على التباين في الشحنة الكهربائية الكلية للبروتين والناتجة من الشحنات الكهربائية للأحماض الأمينية، والتي يمكن أن تكون سالبة أو موجبة أو حيادية، كما وتعتمد على التباين في الأوزان الجزيئية لهذه البروتينات.

### 6- تحديد متتاليات الـ DNA: DNA sequencing

تعد عملية التعرف على التسلسلات للأسس في جزيء الـ DNA من الأمور الأساسية والهامة في مجال البيولوجيا الجزيئية، وقد تم من خلالها التعرف على المتتاليات للجينات لدى العديد من الكائنات ومنها الإنسان، حيث تم التعرف حالياً على المتتاليات لكامل الجينوم البشري، والذي تم من خلال إنجاز مشروع الجينوم البشري الذي كشف عن وجود حوالي ثلاثين ألف جين لدى الإنسان.

وقد تطورت طرائق تحديد هذه المتتاليات بشكل كبير خلال السنوات الأخيرة، وعلى العموم فإنه يستعمل طريقتين رئيستين، وضعت الأولى من قبل ماكسام وولتر جيلبرت وهي تستخدم المواد الكيميائية لشطر الـ DNA في مواقع معينة، بحيث تعطي مجموعة من القطع التي تختلف عن بعضها بنيكلوتيد واحد، أما الثانية فوضعها سانجر وكولسون وهي تعتمد على تركيب قطع من الـ DNA أنزيمياً وتنتهي هذه القطع بنيكلوتيدات محورة، وتستعمل كلتا الطريقتين الرحلان الكهربائي والبيان الإشعاعي الذاتي لقراءه النتائج وتعد الطريقة الأنزيمية أكثر استعمالاً، وسنستعرض فيما يلي الطريقتين:

### 6-1- طريقة مكسام وجيلبرت Maxam et Gilbert:

يتطلب إنجاز هذه الطريقة استخدام قطعة DNA محددة كبادئ ومن غير الضروري تنسيلها. يتم العمل في هذه الطريقة على سلاسل مفردة موسومة النهاية. يتم التشعيع غالباً بواسطة P32 عند الطرف 5′ من كل سلسلة، نحدث بعد ذلك إحداث الدنترة للسلاسل لتعطي مجموعات من السلاسل المفردة مشعة النهاية. نقوم في مرحلة تالية بإجراء تحوير كيميائي للأسس في خيط الـ DNA، ويتم ذلك في سلسلة من 4-5 تفاعلات مختلفة النوعية، ويتم وفقاً لذلك في المتوسط تحوير أساس واحد في كل نسخة من نسخ الـ DNA.

يتم شطر سلسلة في مواقع عند أحد النيكلوتيدات الأربعة بصورة تفاضلية عن طريق المعاملة بمواد كيميائية خاصة، مما يؤدي إلى سلاسل مختلفة تبدأ بنهاية موسومة وتنتهي بأساس محدد.

يتم إنتاج هذه السلاسل المتباينة بطولها عن طريق المعالجة بمواد كيميائية نوعية تمكننا من إزالة نيكلوتيد بذاته. تتم إزالة البيورينات (غوانين والأدنين) عن طريق إضافة سلفات ثنائي الميتيل Dimethyl sulfat الذي يضيف مجموعة ميتيل CH3 إلى ذرة الآزوت السابعة من الغوانين والثالثة من الأدينين. يتم التخلص من الأساس الآزوتي الممتيل بالتسخين في وسط الـ PH المعتدل، وتبين أنه يمكن استعمال التسخين المائي إلى أن تتم عملية فصم نيكلوتيدات الغوانين، وبذلك يمكننا الحصول بشكل منفصل على سلاسل من الحمض النووي التي تنتهي به، وبشكل منفصل عن تلك المنتهية بأساس الأدينين.

أما بالنسبة لبيريميدينات (السيتوزين والتيمين) فتتم إضافة زمرة الميتيل باستعمال مادة الهيدرازين Hudrazine ومن ثم تتم إزالة البيريميدينات بالمعاملة بمادة البيبيريدين Piperidine ويبدو أن كلا الأساسين يستجيبان بالشدة نفسها، ولذلك يتم إزالتهما معاً، وللتمييز بين السلاسل المنتهية بالسيتوزين وتلك المنتهية بالتيمين

فإن المعاملة بواسطة ملح كلور الصوديوم عيار N2 يثبط عملية المتيلة للتيمين، وبالتالي لا نحصل في هذه الحالة إلا على السلاسل التي تنتهي بالسيتوزين.

إن هذه العملية سوف تعطي – مع الأعداد الكبيرة للسلاسل والتفاعلات المختلفة – مجموعة من القطع التي تنتهي بأسس مختلفة في طولها بنيكلوتيد واحد، يمكننا أن نميز بينها عن طريق الرحلان الكهربائي (شكل 47).

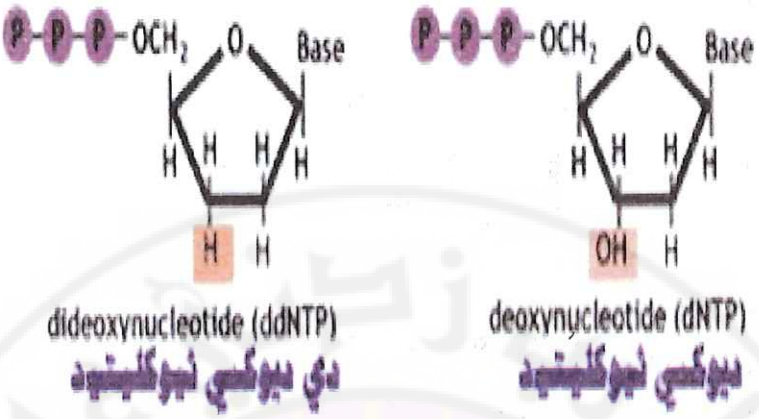
(شكل 47) يبين طريقة ماكسام وجيلبرت (الطريقة الكيميائية ) في الحصول على القطع المعششة بهدف السلسلة.

### 6-2- طريقة سانجلر وكولسون Sanger et coulson :

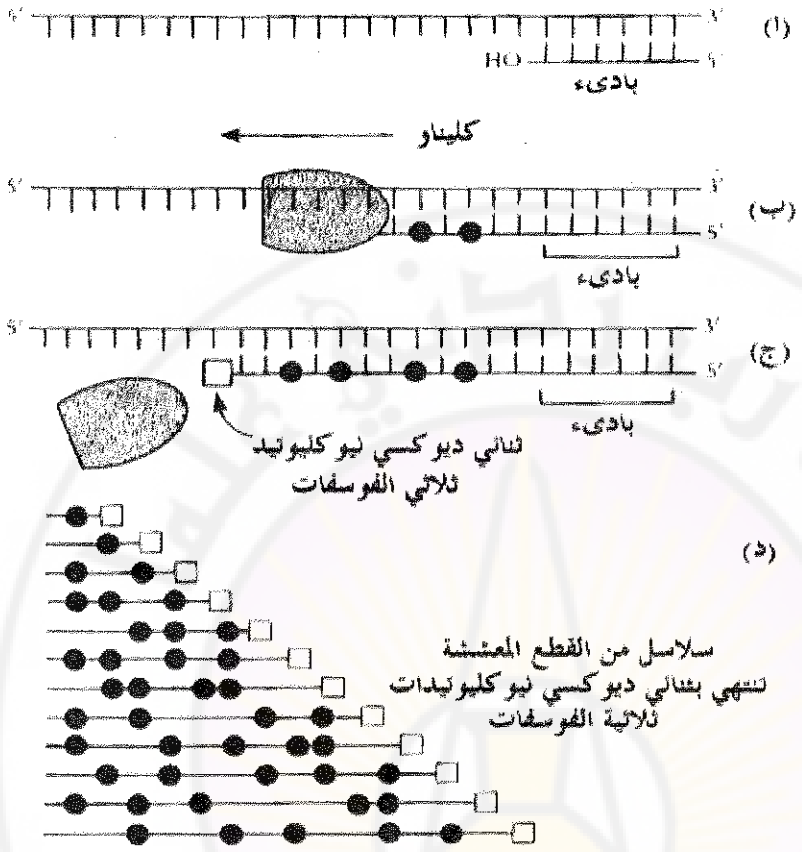
تعتمد هذه الطريقة على استخدام نيكلوتيدات ثنائية منقوص الأوكسجين (2′-3′) يمكنها أن تدخل في تركيب الـ DNA بشكل طبيعي عن الطريق النهاية الهيدروكسيلية 3′. يتم في هذه الطريقة تركيب سلسلة الـ DNA التي نود الوصول إلى متتاليتها بواسطة وحدة كلينو من أنزيم DNA Polymerase الأول. تتم هذه العملية باستعمال سلسلة من الـ DNA كقالب، بالإضافة إلى استخدام بادئ Primer الذي يتقابل مع النهاية 3′ لتبدأ عملية البلمرة.

يتم إنتاج القطع المعششة عن طريق إجراء العمل في أربع مجموعات، يتم في كل منها وضع وحدات البناء dNTP، ويتم في كل منها أيضاً وضع أحد أنماط النيكلوزيدات ثنائية منقوصة الاوكسجين (ddATP-ddTTP-ddCTP- ddGTP) (شكل48)، ويتم أثناء البلمرة ضم هذه النيكلوتيدات ثنائية منقوصة الأوكسجين، ويؤدي هذا إلى إيقاف نمو السلسلة في مواقع مختلفة وعند نيكلوتيد محدد في كل من مجموعات التجربة ومع الأعداد الكبيرة للجزيئات، فإنه يتم الحصول على قطع معششة تختلف عن بعضها بنيكلوتيد واحد. إن لتركيز النكلوتيدات ثنائية منقوصة الاوكسجين أهمية في الحصول على الكم اللازم والكافي من القطع المعششة لمتابعة عملية السلسلة في مرحلة تالية (شكل49).

تشعع قطع الـ DNA المصنعة بإدخال نيكلوتيدات منقوصة الاوكسجين مشعة مختلطة مع التفاعل، مما يسهل عملية القراءة على الهلام للتعرف على التتابع.



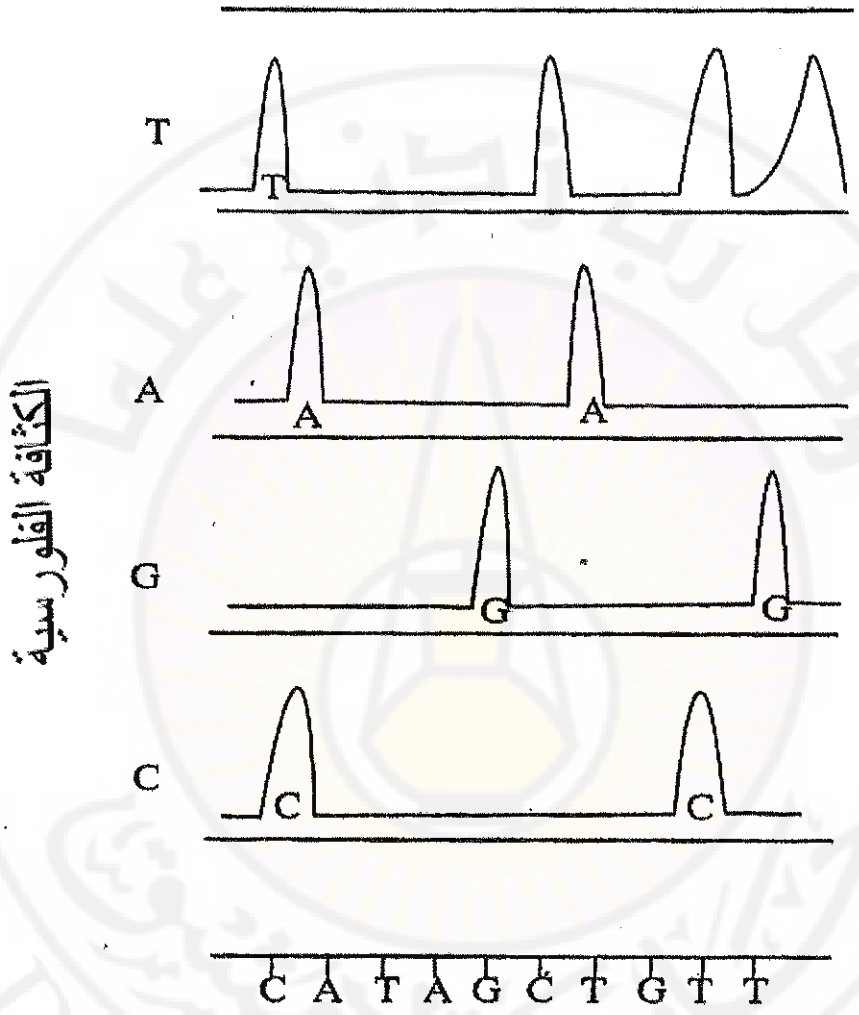

(شكل 48): يوضح الصيغة الكيميائية للنيكلوتيدات ثنائية منقوصة الأوكسجين.




(شكل49): يوضح طريقة سانجر وكولسون في الحصول على القطع المعششة أنزيميا بهدف إنجاز عملية السلسلة لقطعة من الـ DNA.

وقد طُورت لهدف التنسيل طرق أخرى كتلك التي وضعها سميث عام 1980، والمبدأ فيها وجود نهاية مضيئة (فلورسنسي) في البادئة، ويكون لكل طرف إضاءة مختلفة عن التفاعلات الأخرى، تخلط التفاعلات جميعها في أنبوب واحد وتفرد السلاسل كهربائياً، ومن ثم يتم فحص الهلام بطريقة الفحص الفلورنسيسي المعروف ابتداء من نهاية الهلام حيث يبدأ أول نيكلوتيد، وقد طورت هذه الطريقة

لتتم بطريقة أتوماتيكية، بحيث يعطي الجهاز خطوطاً بيانية ملونة حسب لون الطرف المضيء المستخدم في التفاعل (شكل50).




(شكل50) يمثل طريقة الفحص الفلورسنسي لقراءة تسلسل نيكلوتيدات الحمض النووي DNA معين. يحتوي كل تفاعل على طرف مضيء ذي لون معين، اعتماداً على الأساس الآزوتي المستخدم في الوسم، و تقرأ هذه النتائج بواسطة الحاسب.

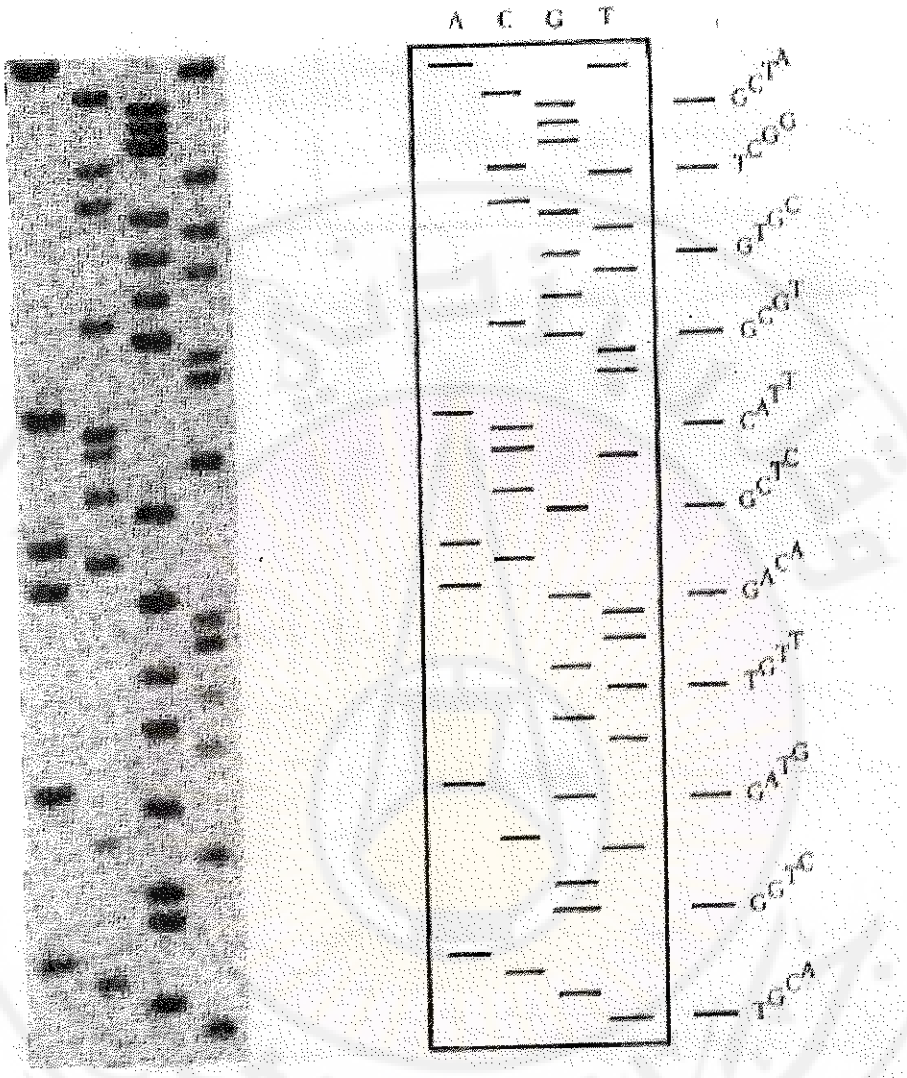
### 6-3- الرحلان الكهربائي Electrophoreses وقراءة المتتاليات:

تتم عملية الفصل للقطع المعششة التي نحصل عليها من خلال المراحل الأولى عن طريق تهجيرها على هلام البولي أكريلاميد، والتي تحتوي على 6-20 % من البولي أكريلاميد و7% عياري من اليوريا، والتي تعمل على منع تأثير الـ DNA مضاعفة السلسلة، وتتصف صفيحة الهلام بسمك يبلغ 0.5 مم يمرر فيها تيار كهربائي، والذي يؤدي إلى رفع درجة الحرارة للهلام، مما يساهم في الإبقاء على تفكك سلاسل الـ DNA.

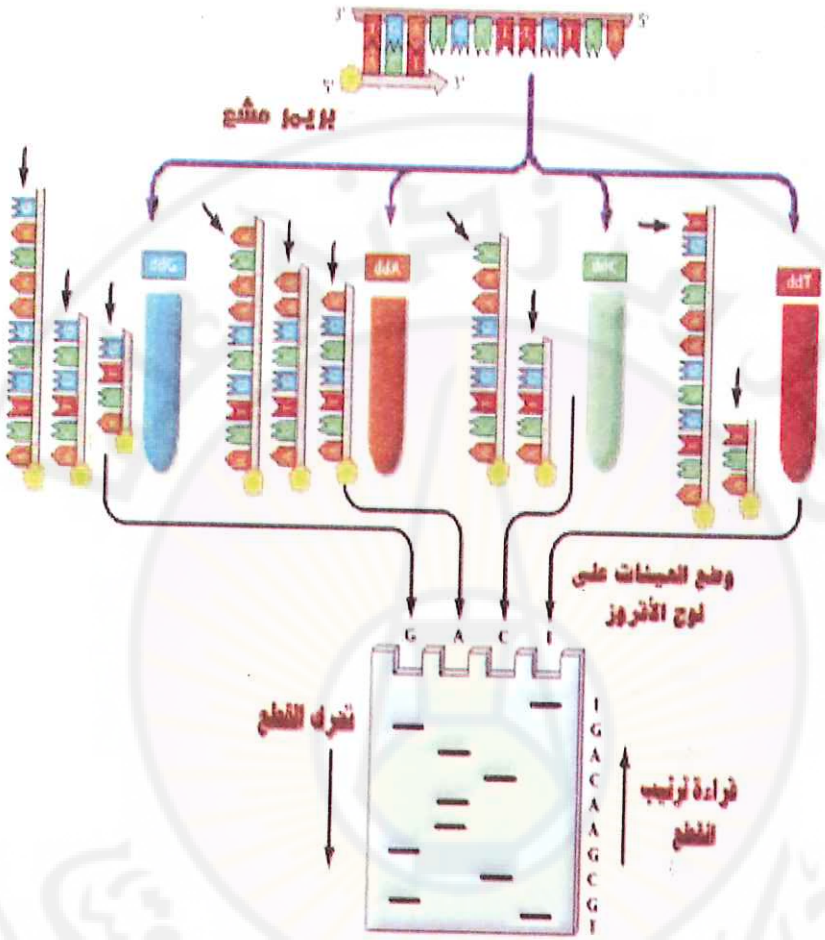
يجفف الهلام بعد نهاية الفصل على ورق النشاف، ثم يعرض بعد ذلك لفلم من الأشعة السينية (X) تحسس هذه الأشعة حبيبات الفضة التي تتحول إلى اللون الأسود عند تظهير الفلم.

يتم إثر ذلك قراءة الإشعاع الذاتي مستقيماً من الأسفل إلى الأعلى، حيث من المعروف أن القطع الأصغر تهاجر إلى مسافة أكبر، وبهذا يمكننا قراءة التتابعات حتى مئات عدة من النيكلوتيدات.

ويتم عادة استعمال برامج حاسوبية لقراءة الشكلين (50-51).




(شكل51-أ) يظهر طريقة قراءة تتابع سلاسل الـ DNA عن طريق تطبيق الرحلان الكهربائي يبين القسم الأيسر صورة للهلام، ويبين الأيمن تخطيطاً لهذا الرحلان.




شكل(51-ب) يبين تفصيلاً لكيفية استعمال القطع المعششة في الرحلان الكهربائي، ومن ثم قراءة السلسلة.

# الفصل الرابع
# أحياء الهندسة الوراثية

يتم عادة بعد تجهيز الـ DNA المؤشب في المختبر عزل التتابع المقصود والذي يتحقق عادة من خلال مراحل عدة هي:

- فصل وعزل الجينات المؤشبة Recombienant molecules
- تكثير هذه التتابعات للحصول على كمية كافية للتحليل.
- انتخاب تتابعات المؤشبات.

- يتم في معظم التجارب الحصول على مئات الآلاف من قطع الـ DNA، وبعد عزل تتابع معين أمراً في غاية الصعوبة، و هي تبدو كالبحث عن إبرة في كومة قش، ورغم ذلك فإنه توجد طرائق فيزيائية تمكننا من تحقيق العزل، ومن ثم التكثير والانتخاب وصولاً إلى إجراء عملية التنسيل.

## 1- العوائل The hosts:

يحدد نوع العائل وفقاً للغاية من عملية التنسيل التي يتم إنجازها، فإذا كان الهدف منها هو عزل جين لإجراء التحليل، فإن ذلك يتطلب نظاماً بسيطاً يسهل استخدامه. أما إذا كان الهدف هو التعبير عن المعلومات الوراثية عند حقيقيات النوى فإن الأمر يحتاج إلى نظام أكثر نوعية، وعلى العموم غالباً ما يستخدم عائل ابتدائي بسيط من أجل عزل تتابع ما، ومن أنواع العوائل المستخدمة:

### أ- العوائل بدائية النوى Prokaryotic hosts:

إن أفضل الخلايا المستعملة كعائل هي تلك سهلة الاستخدام والقادرة على التكاثر، وذات السلالات المتنوعة والمعروفة وراثياً والقادرة على قبول النواقل Vectors.

تتميز الجراثيم بالخواص السابقة اللازمة لتنفيذ مراحل التنسيل الجيني، وأكثر الأنواع الجرثومية استعمالاً في هذا المجال هي العصية القولونية E.colie، وقد عزل منها سلالات عديدة عن طريق وراثة الأحياء الدقيقة. تمثل العصية القولونية E.colie خلايا بكتيرية سالبة صبغة غرام بكروموزوم وحيد حجمه حوالي 4 ملايين من أشفاع النيكلوتيدات bp.

تتم عملية نسخ الـ RNAm اللازم لتعبير الجين لدى بدائيات النوى بشكل أبسط منه في حقيقيات النوى، حيث لا وجود لعملية النضج التي تتم للـ RNAm عند حقيقيات النوى.

وتستخدم هذه الخلايا في معظم عمليات التنسيل الجيني في المختبرات، كخلايا مضيفة وسلالات متباينة وراثياً وملائمة للتطبيقات النوعية.

وبالإضافة إلى ذلك تستخدم خلايا جرثومية من أنواع الأجناس Bacillus, Pseudomonas, Streptomyces، ورغم ذلك فإنها قليلة الملائمة للاستخدام، خاصة في مرحلة الإدخال المباشر للـ DNA المؤشب إلى الخلايا المضيفة.

ويكون أحياناً من المفضل إجراء التنسيل المبدئي في الـ E.colie، ثم عزل التتابع المطلوب، وبعد ذلك يتم إدخال الـ DNA المنقى في الخلايا الهدف، وبشكل خاص حينما تستطيع النواقل أداء مهمتها في المضيف المعني.

**ب- العوائل حقيقية النوى Eukaryotic hosts:**

من العيوب الرئيسة لاستخدام الجرثوم E.colie في عمليات التنسيل أنها من بدائيات النوى وبالتالي لا وجود للغشاء النووي، بالإضافة إلى غياب عضيات أخرى موجودة في حقيقيات النوى، وهذا يعني أن هناك بعض الجينات التي لاتستطيع القيام بوظيفتها في E.colie كما لو أنها في وسطها الطبيعي، مما يعيق عزلها بواسطة آلية الاختيار التي تعتمد على آلية التعبير الجيني، حيث إنه من

غير المضمون أن يصل التعبير الجيني لجين من حقيقيات النوى إلى تركيب بروتين وظيفي لدى بدائيات النوى.

تتنوع الخلايا حقيقية النوى من الأحياء الدقيقة مثل الخميرة والطحالب وحيدة الخلية والكائنات كثيرة الخلايا مثل الإنسان، علماً بأن خلايا الأحياء الدقيقة تتصف بالعديد من صفات الجراثيم من حيث سهولة زراعتها ووفرة الطفرات، أما الكائنات حقيقية النوى الراقية فانها صعبة التناول في مجال الهندسة الوراثية، وتتطلب معاملة خاصة، حيث يكون الهدف من تجربة التنسيل عند النبات أو الحيوان هو الوصول إلى تحوير وراثي للكائن وليس لعزل جين للتحليل أو لإنتاج كمية كبيرة من بروتين معين.

كما تستعمل خميرة البيرة (الخبز) ساكارومايسيزسيريفيسي Saccharomyces cerivisiae في الهندسة الوراثية، وهي مدروسة جيداً وقابلة للاستخدام في التحاليل الوراثية العادية، وهي غنية بالطفرات وتحتوي على 13,5 مليون زوج من الأسس الآزوتية، أي يصل إلى ثلاثة أضعاف ما يحتويه E.colie. ومن الكائنات الأخرى المستعملة الآسبرجيلس والنيوسبورا، كما ويمكننا أيضاً استخدام خلايا النبات والحيوان كعوائل ضمن ظروف خاصة.

تتصف الطحالب وحيدة الخلية بامتلاكها لصفات الكائنات الحية الدقيقة، إضافة إلى التنظيم الوظيفي والتركيبي للخلايا النباتية، ولهذا فقد أزداد استعمالها في المعالجات الجينية، ولا تستعمل عادة خلايا الكائن الحي النباتي والحيواني بالكامل، إنما تستعمل المزارع الخلوية والتي يكون تناولها أكثر سهولة.

### 2- النواقل Vectors:

تتميز النواقل المستعملة في مجال الهندسة الوراثية بعدد من الصفات، منها أنها من طبيعة حمضية نووية منزوعة الاوكسجين، صغيرة الحجم، سهلة العزل، كما

ويجب أن تحتوي على أصل تضاعف Origin of replication يمكنها من التضاعف، وبالتالي استمرار وجودها في العائل عند انقسامه، ويجب أن يتصف بامتلاكه لعلامات اصطفائية Selectable markers والضرورية للكشف عن وجود الناقل، ومن الأمور الضرورية أيضاً هو امتلاكه على موقع واحد على الأقل للتعرف من قبل أنزيم تحديد من أنزيمات القطع الداخلي، واللازمة لدمج جزء من الـ DNA به، وبالتالي إعطاء الـ DNA المؤشب وسوف نستعرض بعض أنماط هذه النواقل.

**2-1- البلاسميدات Plasmids:**

نجد البلاسميدات بشكل طبيعي في الجراثيم وبعض أنماط الخمائر، والبلاسميدات هي جزيئات من الـ DNA حلقية صغيرة مقارنة مع الكروموزوم الجرثومي.

والبلاسميدات غير ضرورية لحياة الجرثوم وتكاثره، إلا أنها تمنح الجرثوم صفات إضافية مثل مقاومة المضادات الحيوية، ويمكن لهذه الصفات أن تستعمل في عمليات الاصطفاء للبلاسميدات الناقلة للجينات الإضافية. تتضاعف البلاسميدات داخل الخلايا بواسطة الأنزيمات الخلوية مع أن مورثاتها هي التي تسيطر على عملية التضاعف هذه. تتحد بعض البلاسميدات مع الـ DNA النووي لتستطيع التضاعف لتعطي ما ندعوه بالإبسومات Episomes، وغالباً ما تمتلك البلاسميدات الكبيرة أنزيماتها الخاصة.

يختلف عدد البلاسميدات من خلية إلى أخرى، والذي يمكن أن يصل إلى 50 في الخلية الواحدة، كما هو الحال بالنسبة للبلاسميد PBR322. ويمكن أن تمثل هذه البلاسميدات بنسخة واحدة أو اثنتين وخاصة بالنسبة للبلاسميدات الكبيرة، ويمكن الحصول على عدد كبير من الإبسومات عن طريق التحريض والمعالجة مثلاً بمثبطات إنتاج البروتين مثل الكلور مفينيكول التي تضاف إلى الوسط الغذائي.

هذا ويمكن للخلايا الجرثومية أن تحتوي على أكثر من نمط من البلاسميدات وللبلاسميدات على العموم أهمية تطبيقية كبيرة بسبب امتلاكها جينات هامة، وكانت أول أنماط النواقل استعمالاً في مجال الهندسة الوراثية.

ويمكننا على العموم نميز نمطين من البلاسميدات:

**أ- البلاسميدات التزاوجية Conjugative:**

وتدعى أيضاً بالبلاسميدات الخصوبة أو بلاسميدات الجنس، وقد توجد مترافقة مع البلاسميدات اللاتزاوجية في خلية واحدة أو أن تكون منفصلة، ويمكن للبلاسميد الاقتراني الانتقال إلى الخلية الجرثومية الثانية، وتتم السيطرة على التزاوج بين الجراثيم من خلال مجموعة من الجينات التي تدعى بالجينات الناقلة Transfer genes ويرمز لها بـ Tra.

توجد هذه الجينات في البلاسميدات التزاوجية فقط، ويمكن لبعض البلاسميدات غير التزاوجية تحت بعض الظروف الانتقال من خلية إلى أخرى، ويرمز للخلايا التي تحتوي على البلاسميدات التزاوجية بالموجبة F. ويلتحم عادة البلاسميد مع الـ DNA الجرثومي، بعد أن يتم قطعهما ليتم تحويلهما من الشكل الحلقي إلى الشكل الخطي.

**ب- أما البلاسميدات اللاتزاوجية** فإنها تتضاعف داخل الخلية الجرثومية بصورة مستقلة عند تضاعف الكروموزوم الجرثومي، أو عن طريق الاندماج مع الـ DNA للمضيف كأيبسونات، ويتم هذا الاندماج بوجود عناصر خاصة بذلك.

وتكون البلاسميات اللاتزاوجية أكثر عدداً و أصغر حجماً بالمقارنة مع بلاسميدات الخصوبة.

**جـ- أنماط البلاسميدات:**

يتم تصنيف البلاسميدات وفقاً لطبيعة الجينات المحمولة إلى الأنماط التالية:

- بلاسميدات الخصوبة F-plasmids وهي البلاسميدات التي تضم ضمن مادتها الوراثية الجينات tra التي تشرف على عملية الاقتران بين جرثومين.

- بلاسميدات المقاومة R- plasmids وهي التي تحتوي ضمن مادتها الوراثية على جين أو أكثر مقاومة للمضادات الحيوية.

- بلاسميدات الكوليسين col- plasmids وهي البلاسميدات التي تمتلك بين جيناتها على الجين الخاص باصطناع الكوليسين.

- البلاسميدات التحليلية degradative – plasmids وهي البلاسميدات التي تمتلك على الجينات اللازمة لتمثيل الجزيئات غير العادية مثل التولوين وحمض السيليسيليك (حمض الصفصاف).

- البلاسميدات الممرضة virulence – plasmids وهي البلاسميدات التي تسبب مرضاً لخلايا المضيف مثل البلاسميد Ti الذي يؤدي إلى إصابة النباتات ذوات الفلقتين بمرض الثلائيل التاجية.

**د- المميزات النموذجية للبلاسميدات كنواقل:**

تعد البلاسميدات ملائمة للاستعمال في الهندسة الوراثية، إذا امتلكت بعض الصفات الأساسية والتي يمكن أن نوجزها بما يلي:

- أن يكون البلاسميد بالحجم المناسب من 10 -20 kb، وأن تكون عديد النسخ في الخلايا المضيفة وأن يكون من السهل التعامل معها، غير أن العيب في مثل هذه البلاسميدات هو أنها لاتستطيع حمل قطعة كبيرة من الـ DNA، ولايتجاوز في حال من الأحوال من 10 kb.

– أن تكون الخريطة الوراثية معلومة للبلاسميد، وأن يكون موقع الجينات معروفاً وكذلك موقع عمل أنزيمات التحديد.

– أن يمتلك على صفة انتقائية خاصة من خلال وجود جين مقاومة للمضادات الحيوية، أو العوز الغذائي أو العيش في ظروف خاصة، لاستعمالها في مرحلة تالية في عملية الغربلة.

– أن يكون قادراً على التضاعف داخل المضيف والانتقال من جيل إلى آخر، ويتم ذلك عن طريق امتلاكه – على الأقل– على أصل تضاعف يسمح للبلاسميد بالتضاعف مستقلاً عن كروموزوم المضيف.

– أن يتميز بالاستقرار داخل المضيف لا يضيع ولا يفقد عند الانقسام.

– أن يحتوي على موقع أو أكثر من أنزيمات التحديد القاطعة.

### 2-1-1- طرق استعمال البلاسميدات كنواقل:

تم استعمال العديد من البلاسميدات الطبيعية في مجال الهندسة الوراثية كنواقل. ويشار عادة إلى البلاسميد بالحرف P، ويشير الحرفان التاليان إلى اسم العالم الذي اكتشف أو ركب هذا البلاسميد، ونستعمل أحياناً الأرقام في عملية التمييز، ويمكننا هنا أن نميز بين نمطين من البلاسميدات:

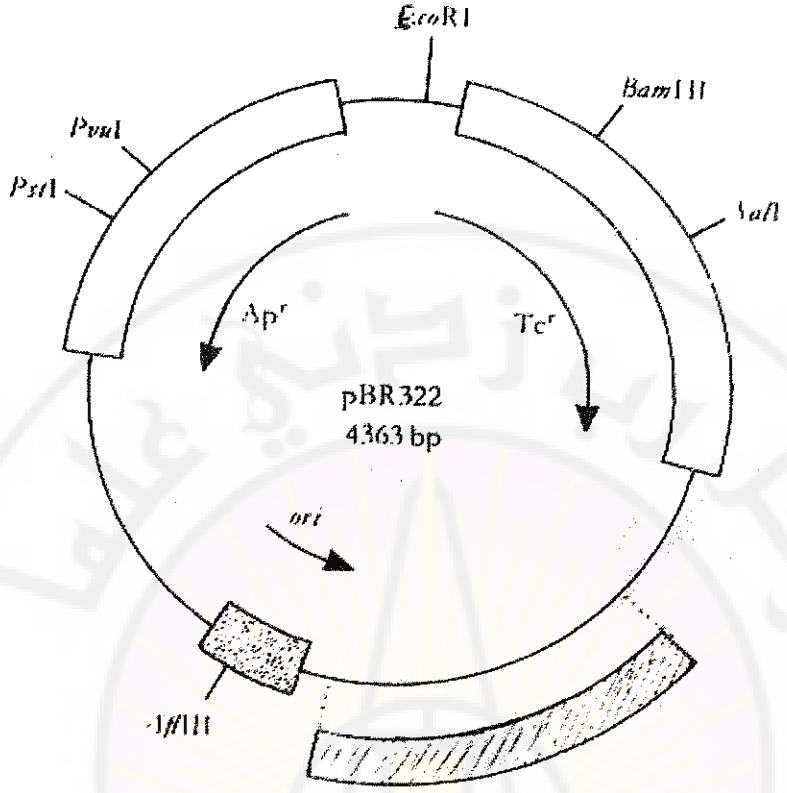
#### أ- بلاسميدات الغرس التثبيطي: Insertional Inactivation

تمتلك هذه البلاسميدات على صفات انتقائية كمقاومة المضادات الحيوية، حيث يتم غرس قطعة الـ DNA المراد إضافتها ضمن الجين التي تعطي هذه الصفة، وبالتالي تؤدي هذه العملية إلى تثبيط الجين وتخريبها، وبالتالي اختفاء الصفة المسؤولة عنها هذه الجين، وبالتالي يمكن عزل البلاسميدات المحورة وراثيا عن طريق غربلة الخلايا التي تختفي عندها هذه الصفة.

ومن الأمثلة على ذلك البلاسميد PBR322 الذي يحتوي على جينين انتقائيتين الأولى لمقاومة الأمبسلين، والثانية لمقاومة التتراسكلين، وما يميز هذا البلاسميد أيضاً هو أنه يمتلك على مواقع مفردة للعديد من أنزيمات التحديد، حيث يمكن استعمال الأنزيم BamHI الذي يقطع ضمن جين التتراسكلين، وبالتالي ضم قطعة DNA إليها مما يؤدي إلى تلف الجين والحصول على بلاسميدات غير قادرة على مقاومة التتراسكلين و مقاومة للأمبسلين، أما البلاسميدات المقاومة للأمبسلين والتتراسكلين فهي التي لم يغرس فيها الـ DNA الغريب، وبالتالي يمكن استعمال هذه الخاصة للتمييز بين النمط المحور والنمط غير المحور (شكل52).

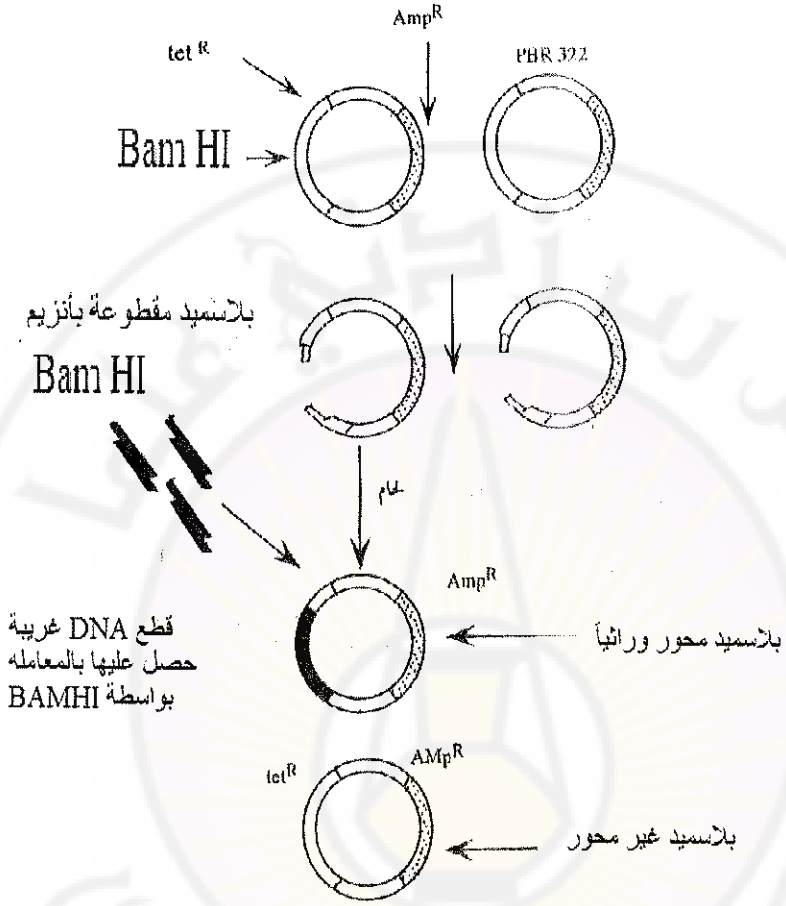
لا تنجح عملية القطع في بعض الأحيان بأنزيم التحديد، ومن ثم فإن إضافة الـ DNA لايؤدي إلى حصول الالتحام، وبالتالي تعود البلاسميدات إلى طبيعتها، ولذلك نرى أن هذه العملية سوف تؤدي إلى بلاسميدات محورة وأخرى طبيعية.

إن زرع خليط الجراثيم التي تحتوي على البلاسميدات الطبيعية والمحورة على وسط يحتوي على الامبسلين لفترة زمنية من 24-48 ساعة، يؤدي إلى نمو الجراثيم الحاوية على البلاسميدات الطبيعية والمحورة تنمو معطية على السواء نمطين من المستعمرات، التي تحتوي أفرادها، إما على البلاسميد المحور، أو على البلاسميد غير المحور، شكلان (53-54).

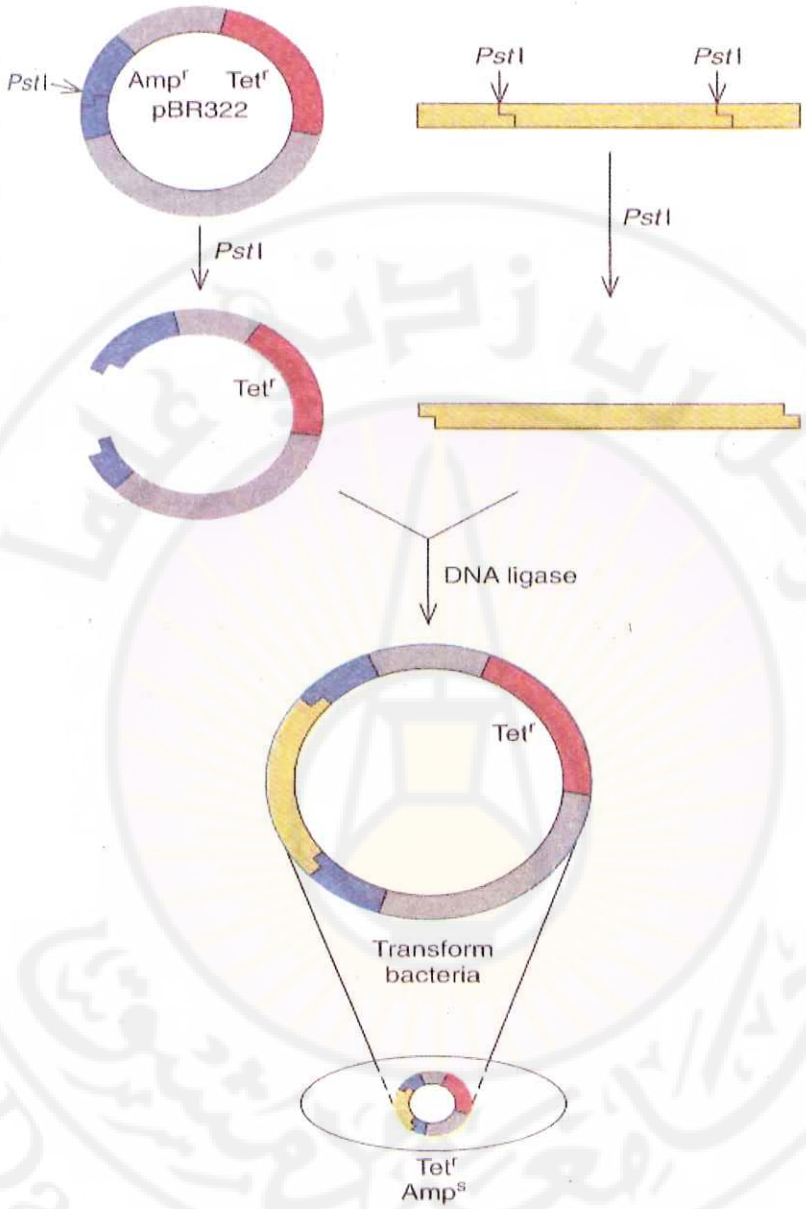



(شكل 52) يبين الخريطة الوراثية للبلاسميد PBR322 والذي يبين وجود كل من جين مقاومة الامبسلين و جين مقاومة التتراسكلين، و أصل التضاعف بالإضافة إلى مواقع القطع لعدد من أنزيمات التحديد.

Damascus University



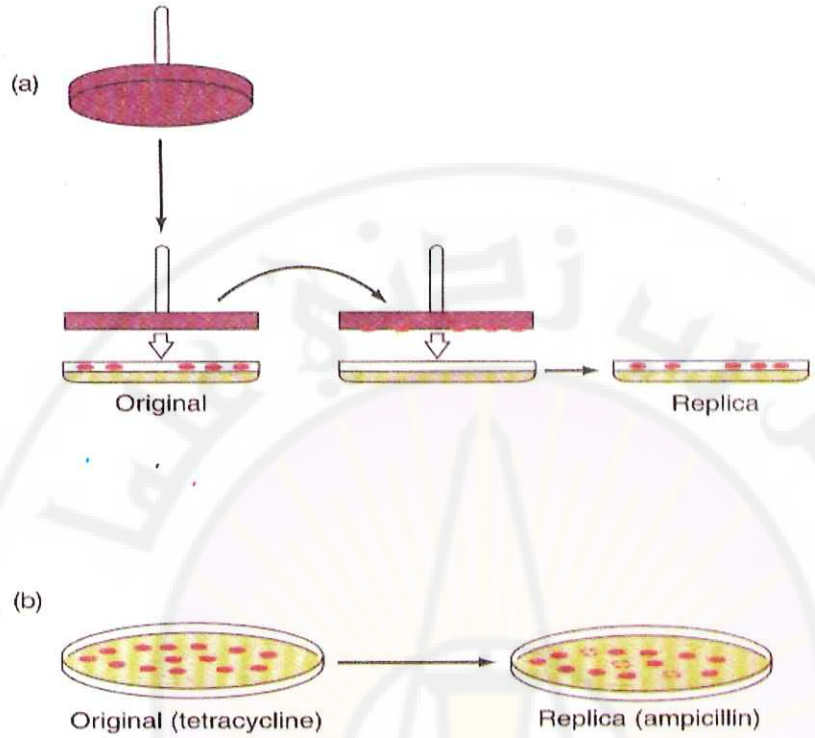

(شكل 53) يبين طريقة الغرس التثبيطي في جين التتراسكلين عند البلاسميد PBR322.




(شكل54): يمثل تخطيطاً يبين طريقة الغرس التثبيطي لجين مقاومة الامبسلين عند البلاسميد PBR 322.

وعملياً فإن غرس قطع الحمض النووي الغريب يتم عشوائياً. وقد يفشل في كثير من الأحيان، مما يستدعي إيجاد طريقة يتم من خلالها تمييز وغربلة هذه الأنماط عن بعضها البعض.

وللتمييز بين المستعمرات التي تحتوي البلاسميدات الهجينة وتلك الطبيعية، فإنه يتم نقل مستعمرات الجراثيم بواسطة ورق الترشيح المعلم، على أن تحتوي هذه الأطباق مع الوسط على التتراسكلين، والذي تنمو فيه تحتوي المستعمرات غير الهجينة الحاوية على البلاسميدات التي فشلت في ضم قطع الـ DNA، بينما تفشل المستعمرات الهجينة في النمو بسبب عدم قدرتها مقاومة المضاد الحيوي التتراسكلين، بسبب تخرب الجين الخاص به في البلاسميدات، يتم بعد ذلك العودة إلى المستعمرات الأصلية المَزروعة على وسط الأمبسلين لعزل المستعمرات الهجينة وتكثيرها، كما يمكن استخدام جين مقاومة الأمبسلين في هذا الناقل، لإجراء عملية النقل بالغرس التثبيطي الشكل55.




**Screening bacteria by replica plating. (a)**

(شكل 55): يوضح الطريقة التي يتم من خلالها تمييز وغربلة المستعمرات التي تحتوي أفرادها على البلاسميدات المحورة، عن تلك التي تحتوي أفرادها على البلاسميدات غير المحورة بهدف عزلها واستعمالها في مراحل التنسيل التالية.

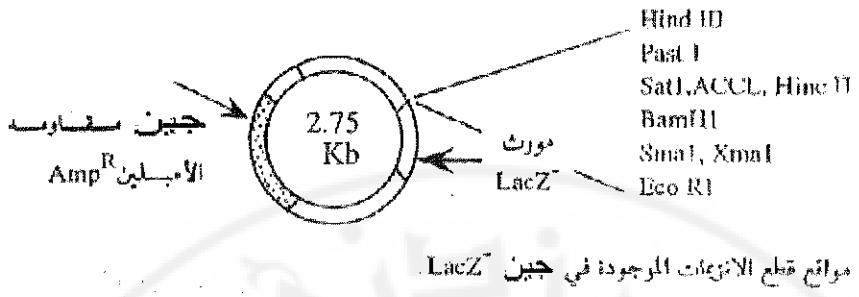
ونظراً إلى الأهمية الكبيرة للبلاسميد PBR322 فقد اشتق منه عدد من البلاسميدات بهدف زيادة إمكانياته، عن طريق إضافة جينات جديدة بهدف استخدامه بالغرس التثبيطي بحيث يتم غرس جين الكلورفينيكول، وبذلك نحصل على البلاسميد PBR325 والذي تحتوي عليه هذه الجين، بالإضافة إلى الجينات

الأخرى التي يمتلكها البلاسميد PBR322، يعطي هذا البلاسميد إمكانيات إضافية لأحداث الغرس التثبيطي.

كما تم اشتقاق بلاسميدات أخرى عن طريق حذف جزء من البلاسميد، فقد أمكن الحصول على البلاسميد PAT153 عن طريق حذف 700 زوج قاعدي.

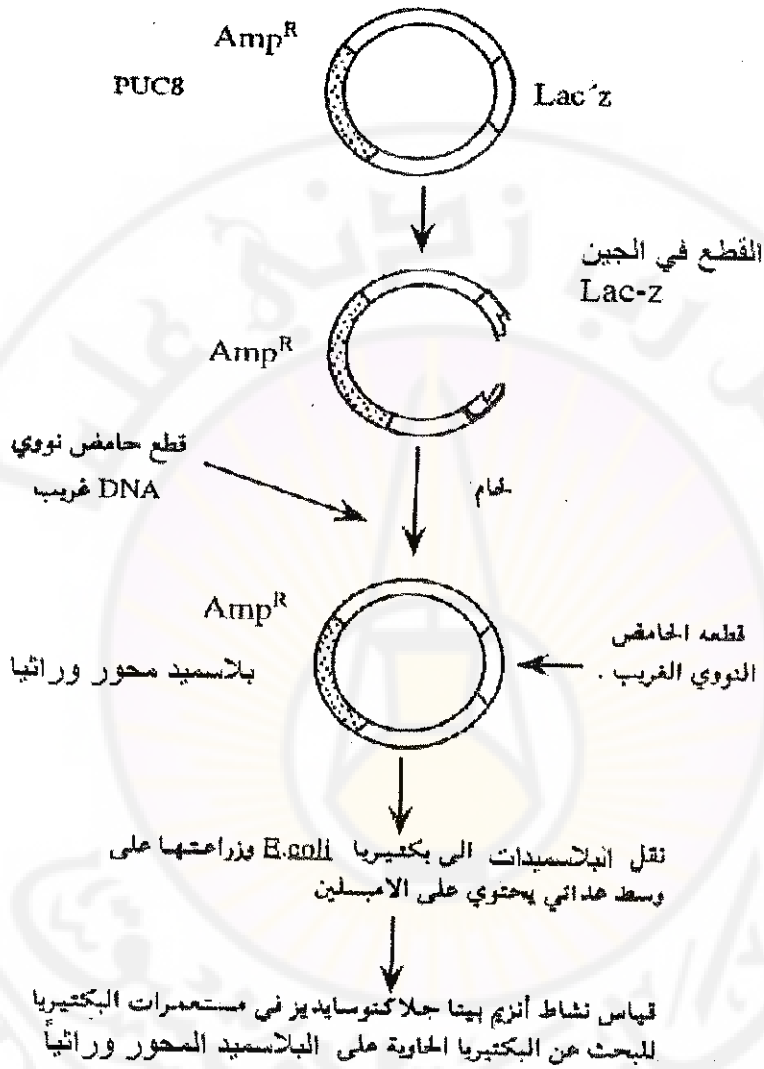
كما يمكن الحذف والإضافة في الوقت نفسه، كما هو الحال بالنسبة للبلاسميدات PUC8 وPUC9 اللذين تم إعدادهما عن طريق حذف جزء من البلاسميد PBR322 وإضافة الجين Lac-z المسؤول عن إعطاء جزء من أنزيم بيتا غلاكتوزيداز، وتتميز هذه الجين بامتلاكها لموقع قطع وحيد لأنزيم التحديد BamHI ولأنزيمات أخرى، وبذلك يمكن استعمالها في الغرس التثبيطي بهدف إجزاء عملية الغربلة اللازمة لمراحل التنسيل التالية، هذا ومن المفيد الإشارة إلى أنه قد تم اشتقاق العديد من البلاسميدات الأخرى بطرق مختلفة.

كما ويمكن استعمال طريقة الغرس التثبيطي أيضاً على البلاسميدات التي تحتوي على جين واحدة مقاومة لمضاد حيوي، وأخرى خاصة بأنزيم غذائي وهذا هو حال البلاسميد PUC8 الذي يضم جيناً خاصة بمقاومة الأمبسلين وجين Lac-z المسؤولة عن إنتاج أنزيم بيتا غلاكتوزيدايز b galactocidase ، وهو الأنزيم الذي يعمل على تحويل اللاكتوز إلى غلوكوز وغالاكتوز، ونجد هذا الأنزيم عادة عند E.colie (شكل56).



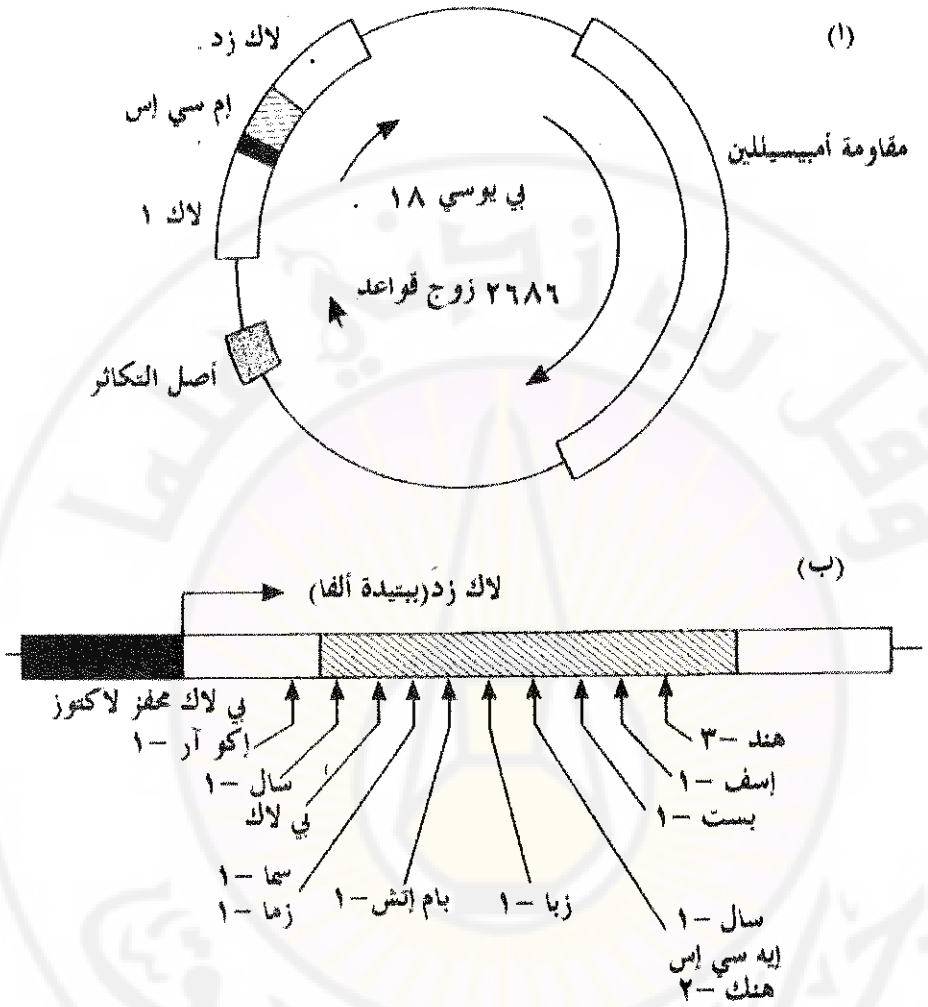

(شكل56): يوضح الخريطة الوراثية للبلاسميد PCU8 المشتق من البلاسميد PBR322، والذي يحتوي على الجين الخاصة بمقاومة الامبسلين والجين Lac z المسؤولة عن إعطاء البيتيدة الفا من أنزيم بيتا غلاكتوزيداز.

يؤدي غرس قطعة من الحمض النووي ضمن الجين Lac-z والمقطوعة بواسطة أنزيم التحديد Bam.HI إلى تثبيط هذه الجين، وبما أن عملية الالتحام عشوائية فإننا سوف نحصل على خليط من البلاسميدات الهجينة والطبيعية، ويجب – بعد نقلها إلى الجراثيم– التمييز بين المستعمرات التي تحتوي على البلاسميدات الطبيعية والبلاسميدات الهجينة، ويتم ذلك بزراعة الجراثيم في وسط غذائي يحتوي على الأمبسلين وتحضن الجراثيم إلى حين ظهور المستعمرات، ثم نجري عليها قياساً لنشاط أنزيم بيتا– غلاكتوزيداز. تتميز الجراثيم التي تحتوي على البلاسميد المحور(الهجين) بكونها مقاومة للأمبسلين، وبعدم قدرتها على استقلاب اللاكتوز لعجزها عن إنتاج الأنزيم اللازم لذلك. بعكس المستعمرات التي تحتوي على البلاسميدات الطبيعية: وهي القادرة على استقلاب اللاكتوز (شكل57).
ويتم –عادة– قياس نشاط أنزيم بيتا غلاكتوزيداز باستخدام طرائق كيميائية.




(شكل 57) يبين طريقة الغرس التثبيطي في البلاسميد Pcu 8 في الجين Lac–z، والتي تؤدي إلى تثبيط هذه الجين، وبالتالي إلى عدم تركيب الأنزيم بيتا غلاكتوزيداز مما يؤدي إلى عدم قدرة الجراثيم على استقلاب اللاكتوز، وبالتالي استعمال هذه الصفة للتمييز بين الجراثيم التي تحتوي على البلاسميد المحور عن تلك التي لاتحتويه.

ومن أهم البلاسميدات التي أثبتت وجودها هي مجموعة PUC، حيث تمتلك هذه البلاسميدات عدداً من مواقع القطع التحديدي، وتعرف هذه المنطقة بالموقع عديد التوصيل أو عديد التنسيل Multiply cloning sites (MCS) يتم عن طريقها غرس الـ DNA الغريب، وتمتلك هذه البلاسميدات – إضافة إلى ذلك– جين بيتا غلاكتوزيدايز (Lac-z ) الذي يشرف على إنتاج السلسلة الببتيدية ألفا. ويؤدي غرس الـ DNA الغريب في هذه الجين بالتالي إلى تثبيطها منطلقاً إلى الانتخاب (شكل 58).




(شكل58): يوضح في قسمه العلوي الخريطة Pcu8، وفي قسمه السفلي الموقع متعدد التوصيل MCS مبيناً أنماط الأنزيمات التي تقطع فيه.

**ب- بلاسميدات الغرس اللاتثبيطي:**

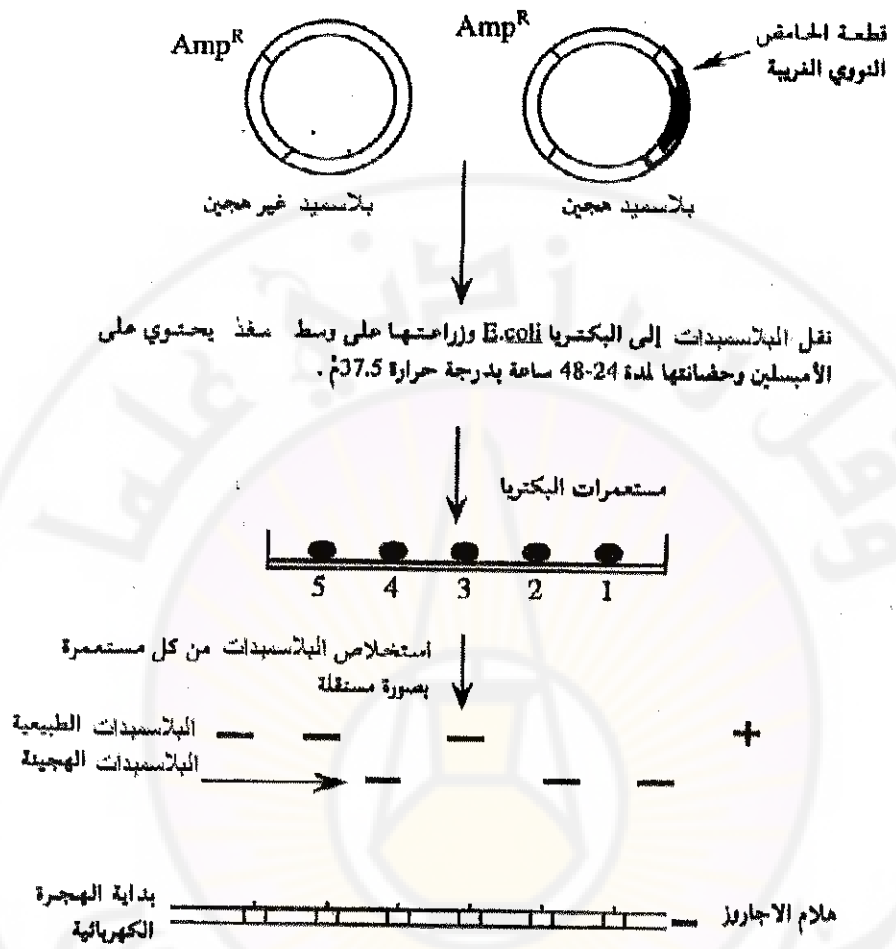
يمكن لبعض أنماط الغرس أن تكون غير تثبيطية، وهو ما يدعى أيضاً بالغرس الطبيعي، وهو أسلوب قليل الاستعمال، ونستعمل في هذه الحالة بلاسميدات ذات

صفة انتقائية واحدة كالمقاومة لمضاد حيوي معين، وهذه الطريقة ملائمة بالنسبة للتعامل مع جينات يؤدي وجودها إلى إعطاء صفات لونية، أو تؤدي إلى تغير في شكل المستعمرة مقارنة مع لون وشكل المستعمرة التي تحتوي على بلاسميدات غير محورة أو طبيعية، وهكذا يمكن تمييز هذه المستعمرات عن طريق النظر أو عن طريق استخدام كواشف كيميائية.

ومن أنماط هذه البلاسميدات PSP65 و PAM19 والتي تضم الجين المقاوم للامبسلين، حيث يتم غرس قطعة الحمض النووي التي نريد إضافتها بعيداً عن الجين الانتقائية، يتم فيما بعد نقل هذا البلاسميد إلى الجراثيم التي يتم استنباتها في وسط مغذ صلب يحتوي على الأمبسلين.

تعزل بعد ذلك المستعمرات عشوائياً إفرادياً، وتوضع في وسط مغذ سائل لمدة 24 ساعة ثم تنقل وتنمى في وسط غذائي جديد، يتم بعدها استخلاص البلاسميدات من كل زرع، ويطبق عليها تقنية الرحلان الكهربائي مع وجود الشاهد، ثم تحلل النتائج بعد التلوين ببروميد والإثيديوم الأشعة فوق البنفسجية.

ويمكن تمييز البلاسميدات الهجينة عن طريق مقارنة الأوزان الجزيئية لنماذج البلاسميدات المهجرة على الهلام، وقد لوحظ أن البلاسميدات الطبيعية غير الهجينة تسبق دائماً في هجرتها البلاسميدات الهجينة، ويعود ذلك إلى الاختلاف في الوزن الجزيئي (شكل59).




(شكل 59): يبين طريقة التمييز بين البلاسميدات المحورة وراثياً وغير المحورة، عن طريق الرحلان الكهربائي، وبالتالي عزلها، مستفيدين من التباين في الأوزان الجزيئية.

إن العيوب التي تتصف بها البلاسميدات كنواقل هو أن حجم القطعة من الحمض النووي التي تستطيع حملها محدودة وتبلغ كحد أقصى kb5، علماً بأنه في بعض الحالات عند إنشاء المكتبة المورثية Genomic library والتي تمثل كل المتتاليات لجينوم كائن ما، تتطلب وجود أعداد كبيرة جداً من هذه البلاسميدات

ولتقليل عدد النواقل لابد من اللجوء إلى نواقل ذات استيعاب أكبر، ومن الأمثلة على هذه النواقل الفاجات، والتي سوف نستعرضها فيما يلي:

### 2-2- الفاجات (آكلات الجراثيم) Bacteriophages:

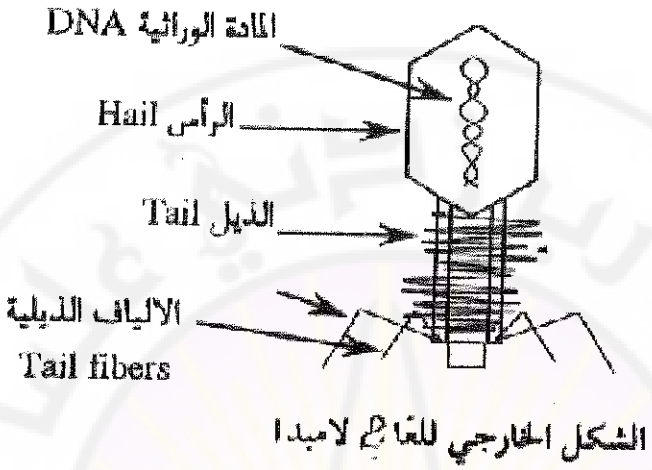
تعد آكلات الجراثيم أو الفاجات أحياء مستقلة إجبارية التطفل، وتغلف الفاجات بأغلفة بروتينية يتوضع داخلها الحمض النووي، والذي يتراوح حجمه بين 6 – 50 Kb تغادر الفاجات المضيف بعد تضاعفها، وقد تترك بضعة من أفرادها بهدف استمرار التضاعف، كما هو الحال عند الفاج M13.

من الصفات التي تميز الفاجات كنواقل في الهندسة الوراثية، هو قدرتها على حمل قطعة من الـ DNA يتراوح حجمها بين 15- 25 kb، وهو أكبر بكثير من حالة البلاسميدات. كما وتتميز الآكلات بأن الـ DNA الخاص بها – وكذلك البروتين- يمكن الحصول عليها بشكل منفصل، مما يعطينا إمكانية تخليق الفاج مخبرياً من خلال مزج الحمض النووي مع البروتين.

تعد الفاجات إحدى مجموعات الفيروسات، وتنتمي إلى مجموعتي الفيروسات المعقدة والمتحلزنة، وتقسم الآكلات تركيبياً إلى ثلاث مجموعات: الأولى عديمة الذيل، والثانية ذات رأس وذيل، والثالثة خيطية، وقد تكون المادة الوراثية من الـ DNA أو من الـ RNA مفردة أو مزدوجة الخيط، والأخيرة هي الأكثر انتشاراً، وتمثل المادة الوراثية حوالي 50% من كتلة الفاج (شكل 60).

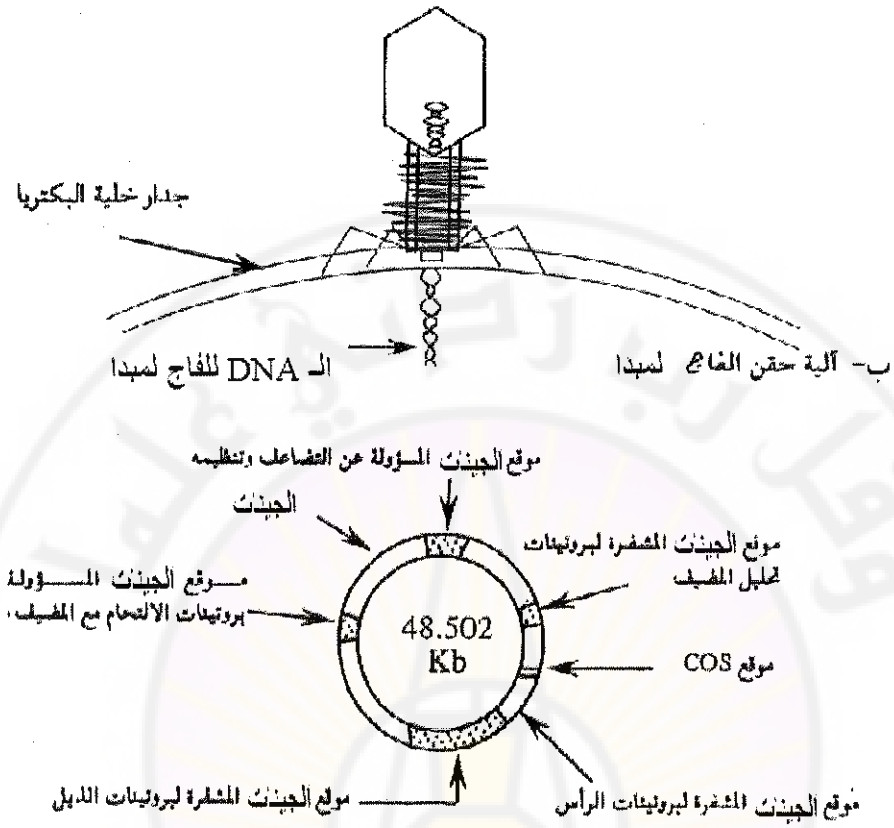
فالفاج لمبدا $\lambda$ هو أحد الفيروسات المعقدة، ويتألف من رأس وذيل وملحقات أخرى ذات بنية بروتنية ويستقر الحمض النووي المزدوج في الرأس، يبلغ حجم الحمض النووي فيه 49 kb وهي تشفر حوالي 46 جيناً. يغزو الفاج عن طريق ارتكاز اللفيفات الذيلية لديه على سطح الخلية، من خلال مستقبلات يقوم بعدها بثقب

جدار الجرثوم، ومن ثم حقن الـ DNA في الداخل، ويبقى الغلاف البروتيني في الخارج (شكل61).




الشكل الخارجي للفاج لامبدا

(شكل 60) وهو يمثل شكلاً تخطيطياً للفاج لمبدا $\lambda$



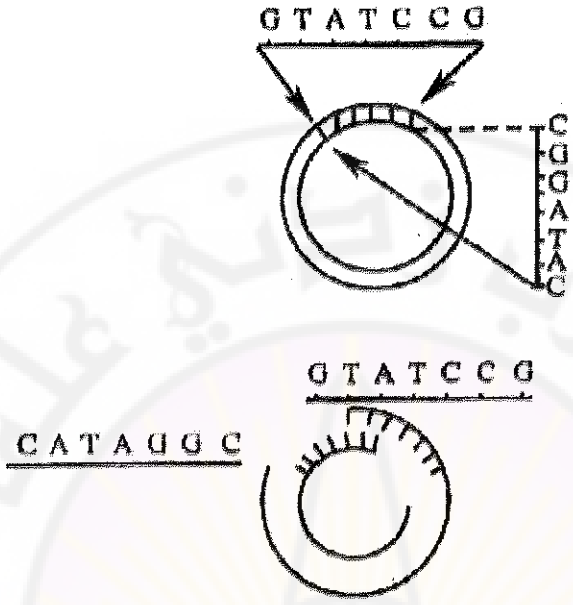

(شكل 61) يبين في الجزء العلوي الشكل العام للفاج لمبدا طريقة العدوى، وفي الجزء السفلي الخريطة الوراثية لهذا الفاج

أما الفاج M13 فينتمي إلى مجموعة الفيروسات المتحلزنة الخيطية، وهو ذو شكل عصوي، وتتميز بروتيناته الغلافية بأنها على هيئة اسطوانة مجوفة يتوضع في داخلها الـ DNA مفرد الخيط الذي يبلغ حجمه حوالي 6.4 kb، وهو ذو شكل حلقي. يعمل هذا الفاج – بإصابة الجرثوم عن طريق تحريض سطحها الخارجي– على تشكيل أنبوب يتم عن طريقه حقن المادة الوراثية للفاج في داخل الجرثوم.

تستطيع أغلب الفاجات تشكيل أيبسومات عن طريق الالتحام مع الـ DNA للجرثوم يعود ذلك إلى وجود متتاليات الاندماج. بالخلاصة نستطيع تمييز نوعين من الفاجات: الأولى مادتها الوراثية مزدوجة السلسلة للحمض النووي، كما هو الحال عند الفاج لمبدا، والأخرى تتألف مادتها الوراثية من سلسلة DNA مفردة، كما هو الحال عند الفاج M13.

كما نميز من تلك الفاجات تلك التي تدعى بالحالّة، والتي لاتدوم دورتها في الخلية أكثر من عشرين دقيقة تؤدي في نهايتها إلى تحليل جدار الخلية. تتضاعف المادة الوراثية لهذه الفاجات دون أن تلتحم بالمادة الوراثية للجرثوم، وتصبح هذه الفاجات مجبرة على مغادرة الجرثوم بعد تضاعفها.

يتم في المرحلة التي تسبق تضاعف المادة الوراثية للفاج تحوله من الشكل الخيطي إلى الشكل الحلقي، عن طريق التحام النهايتين باستخدام النهايات اللزجة، حيث تحتوي كلتا النهايتين على متتاليات متممة للأسس الآزوتية. يتضاعف الـ DNA بعد ذلك بطريقة التضاعف نصف المحافظ (شكل 62).

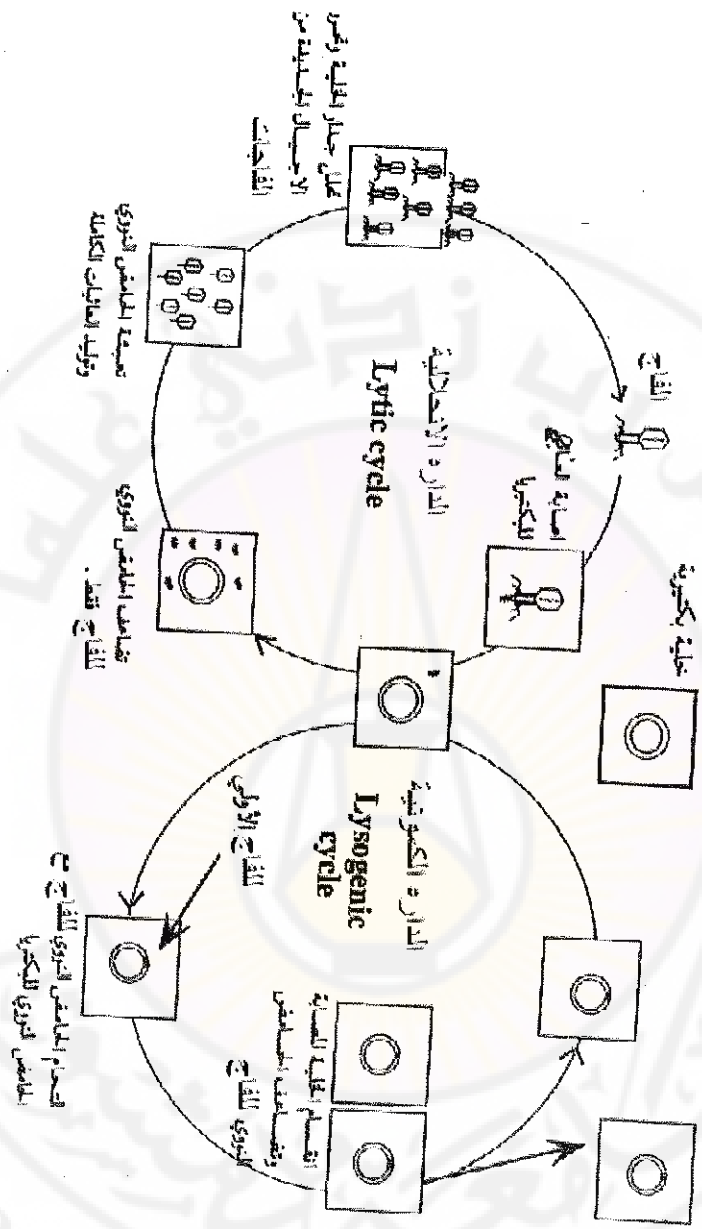



(شكل 62) يوضح آلية تحول الفاج لمبدا من الشكل الحلقي إلى الشكل الخطي، والذي يسبق عملية تضاعفه من خلال التحام النهايات اللزجة به.

يتم بعد نهاية التضاعف العودة إلى الشكل الخيطي عن طريق فتح الحلقة من منطقة الالتحام نفسها، ومن ثم يتم توزيع هذه النماذج من الـ DNA للفاج على الغلف البروتينية لتعطي فاجات جديدة تخرج بعدها من الجرثوم، وقد وجد أن هذه الفاجات تستخدم إحدى جيناتها، والذي يرمز له بـ A وهو مسؤول عن إعطاء أنزيم القطع الذي يقوم بتحويل البنية الحلقية إلى خيطية، أما النوع الثاني من الفاجات فهو يتميز بأن المادة الوراثية له قد تبقى داخل الخلية المضيفة لعدد كبير من الانقسامات. تلتحم المادة الوراثية الفاج مع المادة الوراثية للجرثوم عندما تكون بشكل خيطي لتشكل الأيبسونات، وتدعى هذه الفاجات بالأولية Prophages،

تمر بعدها بفترة كمون، وتستمر حالة الكمون هذه من خلال إنتاج بروتين كابت يبقي على هذه الحالة. يمكن بين الحين والآخر أن ينفصل الفاج الأولي ليعمل كفاج مُحل ويمكن للفاج لمبدا أن يعمل كمُحل وكامن في آن واحد.

أما الفاج M13 فلا حاجة مادته الوراثية إلى أن تندمج مع الـ DNA الجرثومي بهدف التضاعف، وهو لا يُدخل الخلية الجرثومية بدارة انحلالية، ويمكن للأفراد الجديدة الناتجة من التضاعف أن تترك الخلية المضيفة، وتخرج منها دون أن يسبب ذلك قتل الخلية الجرثومية، التي تبقى مصابة بهذا الفاج بشكل دائم (شكل63).




(شكل 63) شكل تخطيطي يبين دورة حياة الفاج بنمطيه:
الدارة الانحلالية و الدارة الكمونية

### 2-2-1- الفاجات كنواقل:

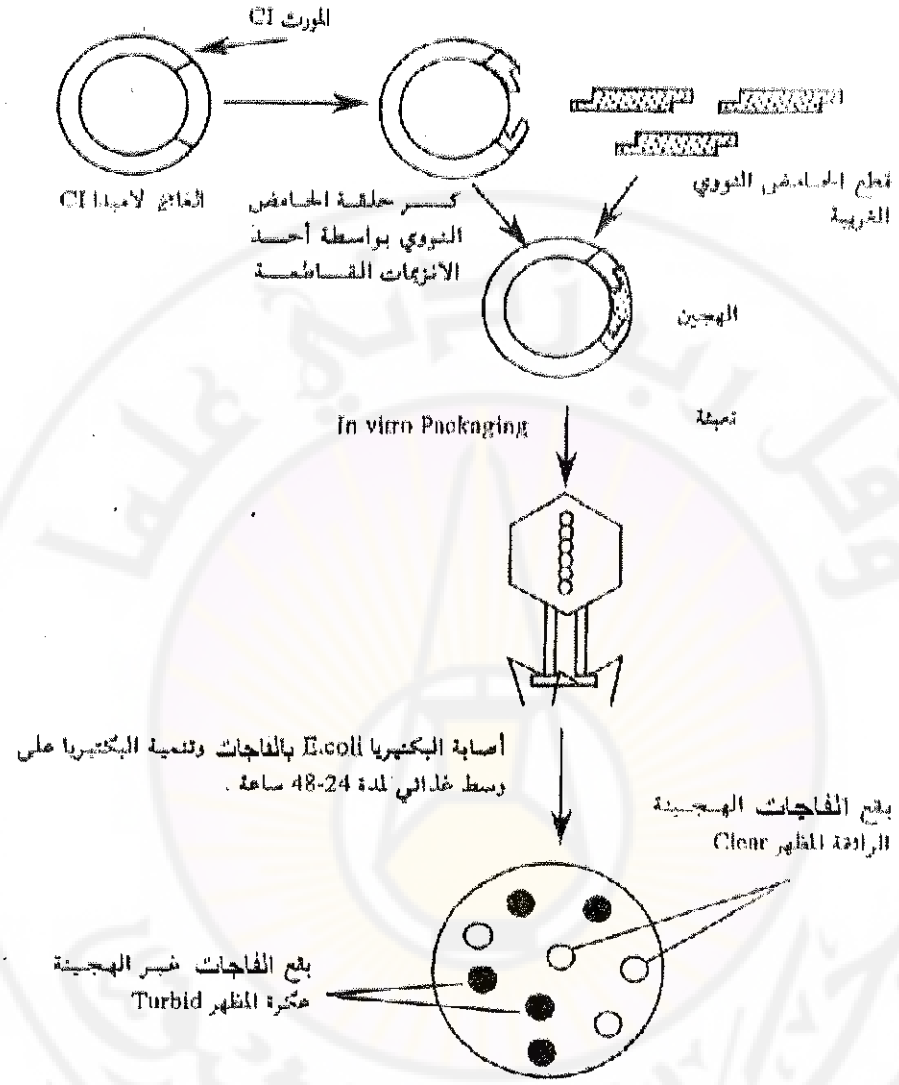
تتميز الفاجات بسهولة التعامل معها كنواقل وراثية، بالإضافة إلى سرعة تضاعفها وامتلاكها لمواقع وحيدة لعدد من أنزيمات التحديد، ومن أهم هذه الفاجات الفاج لمبدا ومشتقاته والمستعملة في مجال الهندسة الوراثية، أما الفاج M13 فهو من أهم النواقل المستعملة في قراءة متتاليات الـ DNA، كما وتتميز هذه الفاجات بقدرتها على إحداث العدوى بسهولة بفضل قدرتها في التطفل على الجراثيم.

تستخدم الفاجات كنواقل بشكل مماثل لما يتم في حالة البلاسميدات، حيث يمكن أن يتم إما بالغرس التثبيطي والغرس بدون تثبيط أو الطبيعي.

**أ- الغرس التثبيطي:Insertional inactivation:**

يتم في هذه الحالة غرس قطعة من الـ DNA الغريب داخل الجين المسؤولة عن إحدى الصفات الانتقائية، مما يؤدي إلى تثبيط ظهور هذه الصفة، وبذلك يتم تمييز الجراثيم التي تحتوي على الفاجات المحورة، عن تلك الطبيعية، والتي فشلت فيها عملية الغرس، ومن الأمثلة على ذلك الفاج M13 وبعض الفاجات المشتقة من الفاج لمبدا والتي تحتوي على الجين Lac-z والذي يمكن تثبيطها بغرس قطعة الحمض النووي فيها.

ومن الأمثلة عن الغرس التثبيطي تلك العملية التي تتم في إحدى الفاجات المشتقة من الفاج لمبدا، والذي يمتلك على الجين CI، حيث يؤدي الغرس فيها إلى تثبيط هذه الجين، وبالتالي يمكننا تمييز الجراثيم التي تحتوي على الفاج المحور بحيث تبدو مستعمراته رائقة، بعكس المستعمرات التي تحتوي أفرادها على الفاج غير المحور والتي تبدو عكرة (شكل 64).

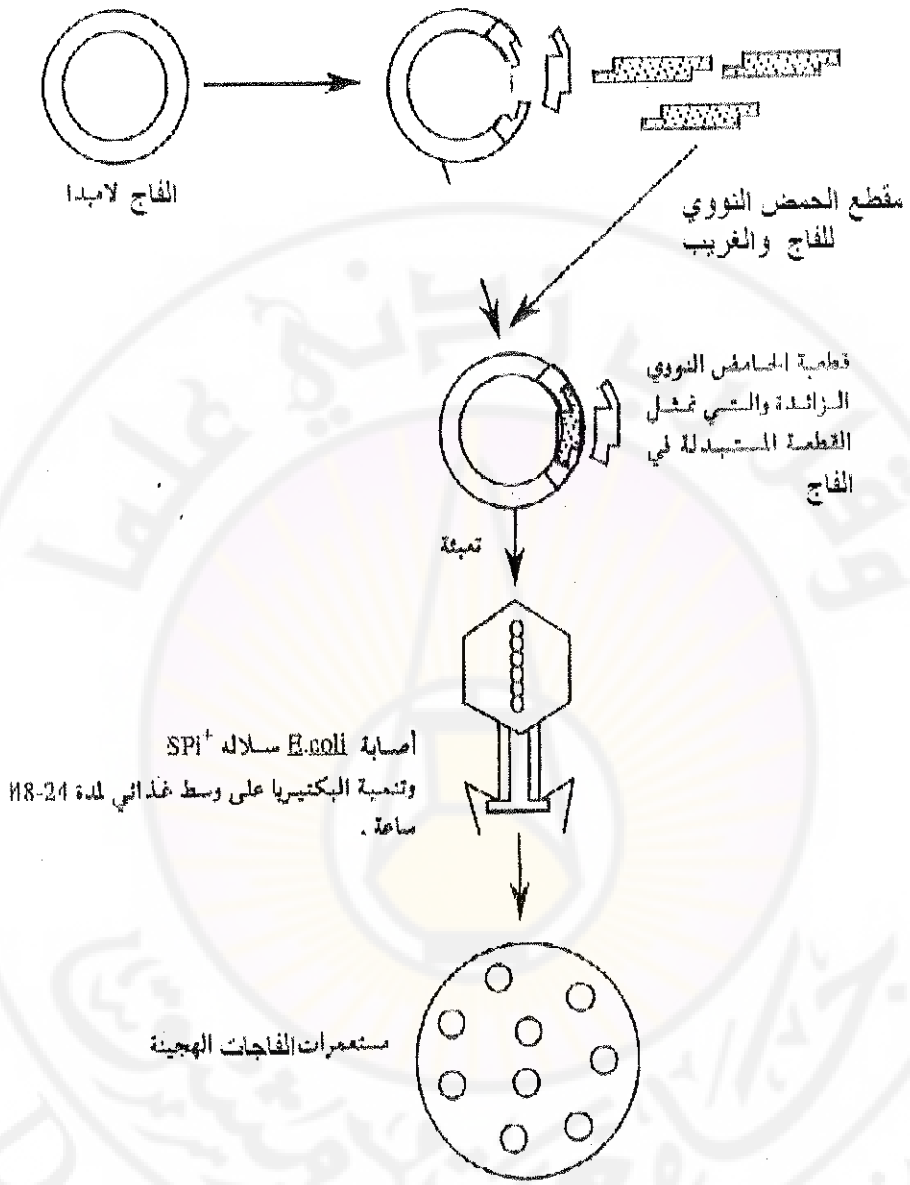



(شكل 64) يبين طريقة الغرس التثبيطي في الفاج لمبدا CI، حيث يؤدي هذا الغرس إلى تغير في مظهر المستعمرات والتي تبدو رائقة في حال احتوائها على الفاجات المحورة، وعكرة في حال احتوائها على الفاجات غير المحورة.

**ب – الغرس اللاتثبيطي (الطبيعي):**

لا يؤدي الغرس في هذه الحالة إلى ضرر في الجينات للناقل، ويتم تمييز الفاجات المحورة بطرائق أخرى، فمثلاً لا يتمكن الفاج لمبدا من إصابة E.colie مادامت المادة الوراثية للجرثوم محتوية على البلاسميد P2، ويرمز إلى هذه الفاجات بـ +SPi. لقد تم إعداد مثل هذه الفاجات بحيث إنه عند اندماج قطعة الـ DNA الغريب فإنها تتحول إلى –Spi، ولذلك فإن الكائنات المحورة ستتمكن من إصابة الجراثيم الحاوية على البلاسميد P2، بينما لا تتمكن من ذلك الفاجات غير المحورة، و– تستخدم عادة– ما تستخدم هذه الجراثيم عند استخدام هذه النواقل (شكل 65).

ويمكن أيضاً استخدام طرق أخرى لتمييز الفاجات المحورة وراثياً، بالاعتماد على حجم المادة الوراثية للفاج، حيث إن معظم الفاجات المشتقة للفاج لمبدا تفتقد إلى قطعة من الـ DNA بحجم 37 kb، ولا تتمكن هذه الفاجات من إعطاء فاجات ناضجة عند التحام أذرعها مع الـ DNA الغريب ذي الحجم أقل من kb37، ولكن يمكن الحصول على فاجات ناضجة فقط عند هندسة حمض نووي لا يزيد حجمه عن 37 kb ولا يقل عن 32 kb، ولذلك فإنه يمكن تمييز الفاجات المحورة (ذات القطع 37– 52 kb) عن غير المحورة من النمو.




(شكل 65): يوضح طريقة استعمال E colie من سلالة +Spi الموجبة لتنمية الفاجات الهجينة، علماً بأن الفاجات غير الهجينة لاتستطيع إصابة الجرثوم، بسبب اندماج البلاسميد P2 مع المادة الوراثية للجرثوم.

## 2-2- أهم هذه الفاجات المستعملة في الهندسة الوراثية:

### أ- الفاج لمبدا λ:

وهو من الفاجات مزدوجة السلسلة من الـ DNA، وهو ذو بنية خطية ويعد من الفيروسات كبيرة الحجم والذي يبلغ kb49، ويضم العديد من الجينات المسؤولة عن التضاعف وتركيب البروتين، بالإضافة إلى العديد من المناطق غير الضرورية والتي يمكن الاستغناء عنها، ويغير هذا الفاج شكله من الخطي إلى الحلقي قبل تضاعفه ويعود بعد إنهاء التضاعف إلى الشكل الخطي.

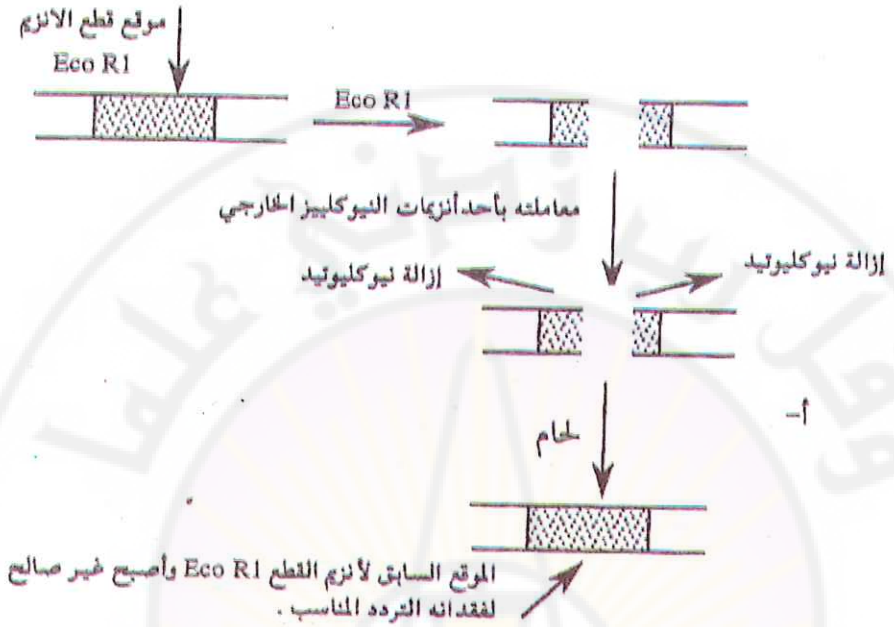
وتعود أهمية هذا الفاج إلى الأنماط المشتقة منه نتيجة التحويرات التي تمت عليه. أما الفاج لمبدا الطبيعي فإن استعماله غير عملي نظراً إلى امتلاكه العديد من مواقع القطع التحديدي للأنزيمات، غير أنه يمكن استخدامه في هندسة قطع الـ DNA الصغيرة والتي لا يتجاوز حجمها kb3.

### - الفاجات المشتقة من الفاج لمبدا:

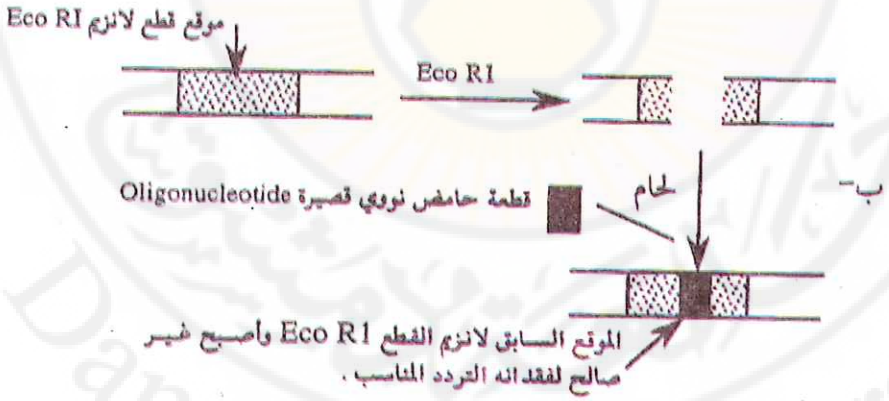
لقد تم بهدف تحسين إمكانيات الفاج لمبدا إشتقاق عدد من الأنماط من الفاج الطبيعي، عن طريق الهندسة الوراثية بإزالة بعض القطع غير الضرورية من الحمض النووي، بحيث يصبح حجمه أصغر، مما يرفع من إمكانية استخدامه في الهندسة الوراثية، وقد تم في حالات أخرى إزالة بعض المواقع المتكررة لأنزيمات القطع التحديدي، مما يؤدي إلى ترك موقع قطع تحديدي واحد بالإضافة إلى مواقع جينات التضاعف وإنتاج البروتين، وقد تم بهدف الاشتقاق إزالة حوالي 18 kb من الفاج الطبيعي، مع الإبقاء على خواصه من حيث القدرة على التضاعف والعدوى للجراثيم وإلى زيادة استيعابه من الحمض النووي التي يمكن أن يحملها، والتي يمكن أن تصل إلى 15 kb مقارنة بمقدرة الفاج الطبيعي والتي تصل إلى kb3.

وما يميز الفاجات المحورة هو فقدانها لعدد من الجينات التي تجعل من التحام

حمضها النووي مع كروموزوم الجرثوم أمراً غير ممكن مما يجعلها غير قادرة على الدخول في دارة انحلالية شكل 66.




أ- تغيير تردد موقع قطع أنزيم عن طريق استخدام أنزيمات النيوكليز الطارجية .




ب-تغيير تردد موقع قطع أنزيم عن طريق استخدام قطعه حامض نووي قصيره .

(شكل 66) يوضح بعض الطرق المستعملة لاشتقاق الفاجات من الفاج لمبدا λ.

يوجد مثلاً في الفاج الطبيعي 6 مواقع للأنزيم BG III و5 للأنزيم Bam HI واثنين للأنزيم Sal I، ويتم التخلص من هذه المواقع المتكررة والزائدة باستخدام التطفير خارج الخلايا أو الاصطفاء الطبيعي، كأن يتم تغيير أساس آزوتي واحد في موقع القطع.

فمثلاً في الموقع الخاص بـ Bam HI فإن التتالي المعني GGATCC يمكن أن يصبح GGTTCC باستبدال الأدنين بالتيمين، كما يمكن عزل قطع المتتاليات الخاصة بالأنزيم نفسه، عن طريق قطعها وإزالتها وتعامل بإحدى أنزيمات النيوكليز الخارجي حيث تتم إزالة أساس آزوتي من نهاية القطعة، ثم يتم لحم القطع مرة أخرى، وبذلك يتم التخلص من موقع الأنزيم.

كما يمكن غرس قطعة من الحمض النووي المصنعة مخبرياً Oligonucleotide في موقع قطع الأنزيم بعد إحداث قطع فيه، ثم إعادة الربط، مما يؤدي إلى تعطيل موقع التعرف لهذا الأنزيم.

أما الحصول على المشتقات بالاصطفاء الطبيعي، فيعتمد على عزل سلالات من الفاجات، التي حدث فيها طفرة وراثية في موقع واحد أو أكثر من موقع لقطع الأنزيمات.

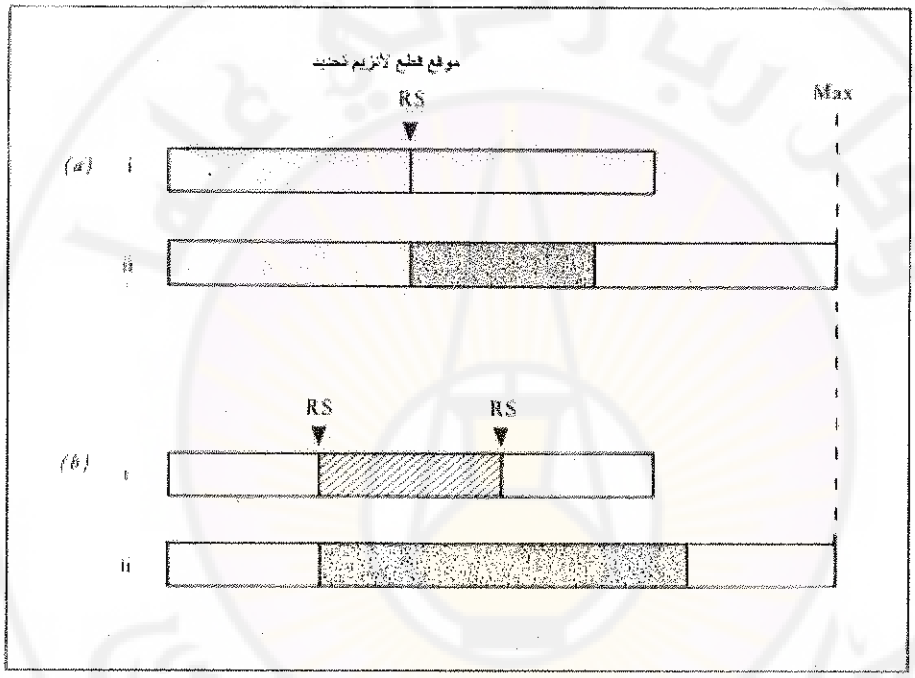
وبمعاملة الفاجات التي تصيب الجراثيم بأنزيمات القطع التحديدي فإنه سوف يتم تخريب وتدمير الفاجات الطبيعية، وتبقي الفاجات الطافرة التي حصل موقع القطع فيها على تغير، وبذلك نكون قد حصلنا على فاجات محورة وراثياً تتميز بفقدانها للعديد من مواقع القطع، وبالتالي تنقيتها وعزلها عن باقي الفاجات غير المحورة.

ويمكن التمييز بين نمطين من الفاجات المؤسسة على الفاج لمبدا هما:

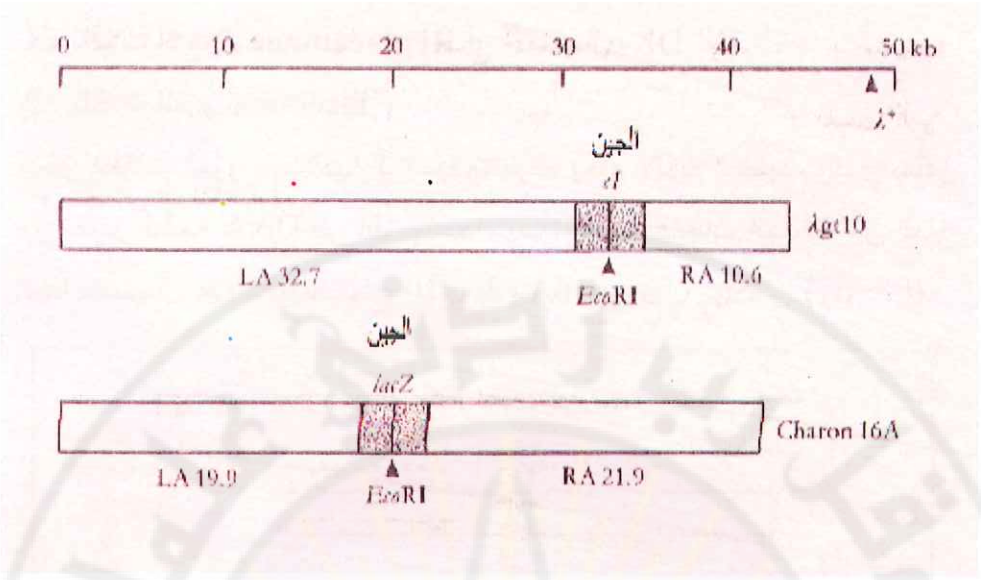
**1- ناقلات الإحلال Replacement أو الاستبدال**

**2- ناقلات الغزو insertion**

تتميز ناقلات الغزو بامتلاكها إلى موقع تعرف وحيد لأنزيم التحديد، والذي يمكن من غرس قطعة DNA في الفاج لمبدا، ومن أنماط الفاجات المشتقة من الفاج لمبدا باستعمال هذه الطريقة الفاج λ gt10 وcharon16A الشكلان (67-68).




(شكل 67) يوضح في الجزء العلوي أحد فاجات الغزو، وهو يحتوي على موقع قطع وحيد أما الجزء السفلي فيمثل أحد فاجات الازاحة والإحلال، وهو يمتلك موقعين للقطع بأنزيمات التحديد ونلاحظ في الوقت ذاته الكفاءة الأكبر لفاجات الإزاحة و الإحلال بالمقارنة مع فاجات الغزو و قدرتها على قبول قطعة من الـ DNA الأكبر حجماً.

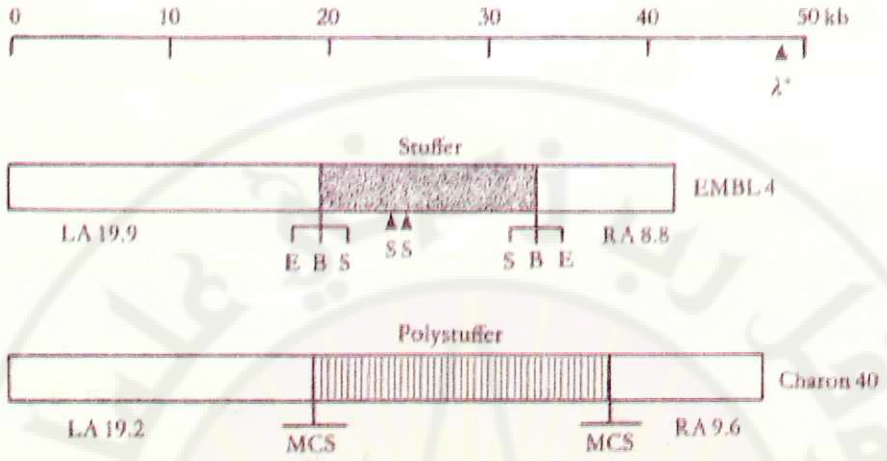



(شكل68) يبين نمطين من الفاجات المشتقة من الفاج لمبدا λ عن طريق غرس لجينات جديدة، وهما الفاج لمبدا λ gt10 والفاج charon 16A

أما فاجات الإحلال فتتميز بوجود موقعين للقطع أنزيم القطع نفسه، وتتميز فاجات الإحلال بقدرة أكبر على النقل من فاجات الغزو، من حيث طول قطعة الحمض النووي التي يمكن حملها، ومن الأمثلة على فاجات الإحلال والمشتقة من الفاج لمبدا كلّ من الفاج EMBL4 والفاج Charon 40، يحتوي الأول والذي يبلغ حجمه 41.9 kb على قطعة حشو يبلغ طولها 13.2kb ،وهو محدد من الجانبين بتتابع لعدد من مواقع القطع للعديد من أنزيمات التحديد من بينها EcoRI ويمكن غرس الـ DNA في أي من مواقع التنسيل العديدة.

أما الفاج شارون 40 فإن قطعة الحشو Stuffer فيه، وهي من النمط متعدد التكرار كما يوضح الشكل، ويعرف باسم الحشوة المتعددة Polystuffer ولهذا ميزة حيث إن الأنزيم القاطع سوف يقوم بقطع الحشوة المتعددة إلى أجزائها وهذا ما يزيد من فرص الاختيار لأنزيمات التحديد التي يمكن استخدامها في غرس الـ

DNA المراد إضافته، ويكون حجم قطع الـ DNA التي يمكن تنسيلها في شارون 40 مشابها لما في EMBL40 (شكل 69).




(شكل 69) يبين نمطين من فاجات الإزاحة و الإحلال المشتقة من الفاج لمبدا λ، وهما الفاج charon 40 والفاج EMBL4.

ومن الفاجات المشتقة من الفاج لمبدا والكثيرة الاستعمال:

**أ- الفاج لمبدا gt10 λ:**

وهو من ناقلات الغزو حجمه حوالي 43 kb غرس فيه الجين CI، والتي يقطع فيها الأنزيم ECORI مع ذراعين، الأيمن يبلغ kb15.6 والأيسر 32.7 kb.

**ب- الفاج شارون 16 A و Charon 16A:**

هو من مشتقات الفاج لمبدا يستخدم الآلية التثبيطية، تم إنتاجه عن طريق حذف المنطقة المركزية للفاج الطبيعي، ويبلغ حجم هذه المنطقة 18 kb، وتستبدل هذه المنطقة بالجين Lac-z الذي يتضمن موقعاً فريداً للأنزيم EcoRI.

يستطيع هذا الفاج حمل قطعة من الحمض النووي تبلغ حوالي kb15، ويتم ضم هذه القطعة ضمن الجين Lac-z باستعمال الأنزيم EcoRI، ويتم انتخاب الفاجات المحورة وراثياً عن طريق استخدام الشبيه الكيميائي لسكر اللاكتوز x-gal والمحفز Iptg وبالحضانة لمدة 24-48 ساعة بدرجة حرارة 37.5 مئوية.

تظهر المستعمرات التي تحتوي على الفاج الطبيعي غير المحور بلون أزرق، أما المستعمرات التي تتلون بالأبيض فهو نتيجة لعدم وجود نشاط أنزيمي نظراً إلى تخريب الجين Lac-z بسبب حصول التغير في الفاج الذي حُور وراثياً.

**جـ- الفاج لمبدا NM607:**

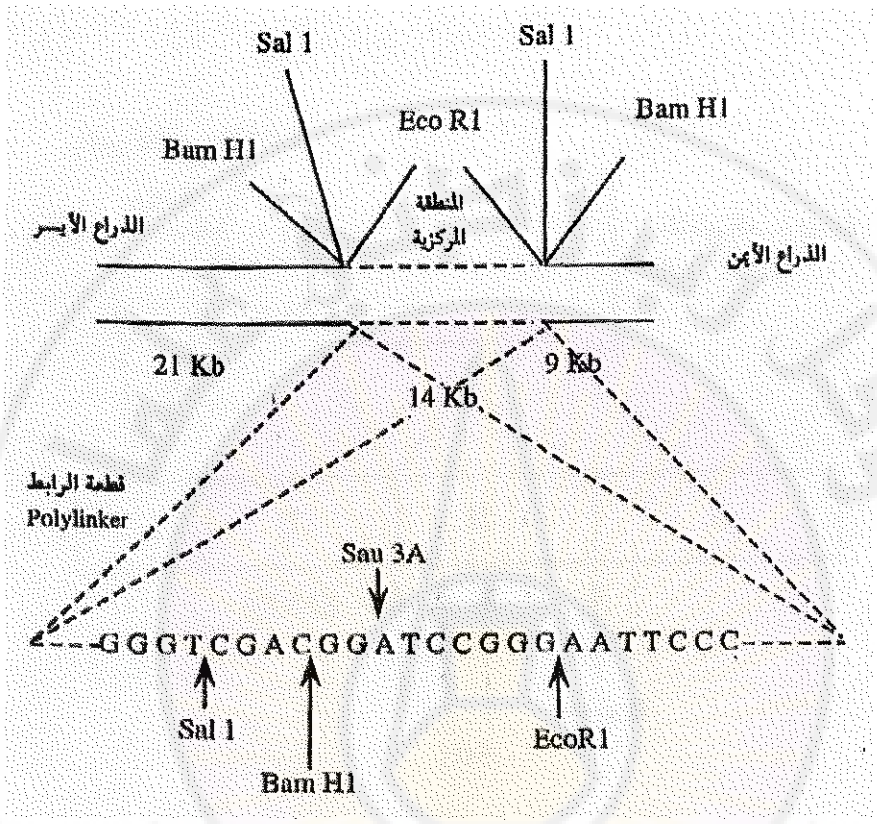
ينتج هذا الفاج عن طريق إزالة المنطقة المركزية من الفاج الطبيعي، ومن ثم إضافة الجين CI والذي يحتوي على موقع فريد للأنزيم القاطع EcoRI، وهو مثل الفاج السابق من نواقل الغرس التثبيطي، ويمكن لهذا الفاج أن ينقل قطعة من الحمض النووي يبلغ حجمها kb12.

يتم غرس قطعة الـ DNA الغريب في وسط الجين CI بعد معاملتها بالأنزيم EcoRI، ويتم تمييز الفاجات المحورة عن طريق اللون الرائق للمستعمرات الجرثومية.

**د- الفاجات EMBL4 -EMBL5 :**

وهي من فاجات الاستبدال وقد تم اشتقاقهما عن طريق إزالة المنطقة المركزية للفاج الطبيعي، ومن ثم وصل القطعة المركزية بتوصيلات أو روابط، والتي تحتوي على مواقع وحيدة لعدد من أنزيمات التحديد هي EcoRI و BamHI و SalI، و تمكننا هذه المواقع إلى قطع الفاج إلى ثلاث قطع، ويتم بذلك غرس قطعة الحمض

النووي مكان القطعة المركزية، ويمكن لهذه الفاجات أن تستوعب أكثر من 23 kb (شكل 70).

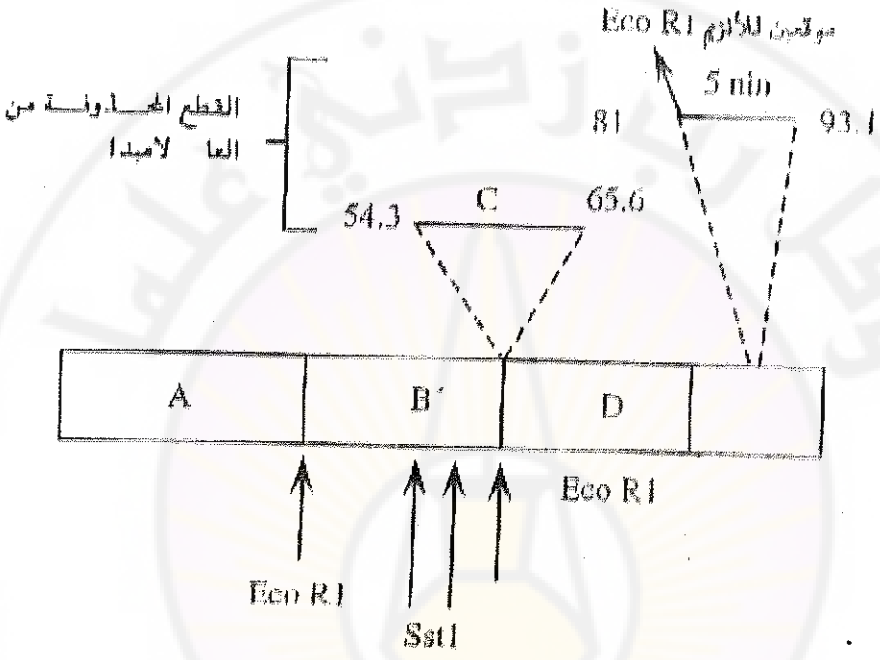



(شكل 70) الناقل EMBL4 والمركب من ثلاث قطع مع التوصيلات المرتبطة بالجزء المركزي، والتي تحتوي على عدد من المواقع لأكثر من أنزيم تحديد.

**هـ- الفاج لمبدا λ WES B:**

نحصل على هذا الفاج من الفاج الطبيعي لمبدا، نتيجة إزالة حوالي 17% منه، وبحذف الموقعين C و5nin، وكذلك إزالة المواقع الطرفية للأنزيم EcoRI، كما تمت إزالة القطعة B عن طريق استخدام موقع القطع للأنزيم EcoRI التي تحيط

بهذه القطعة (B)، وتمثل هذه المنطقة والتي يتم بدلاً عنها غرس قطعة من الـ DNA (شكل 71).




(شكل71): الخريطة الوراثية للفاج لمبدا WESB λ والذي ينم اشتقاقه من خلال حذف القطعة C والموقع 5nin، ويحتوي الفاج الناتج على موقعين للأنزيم EcoRI واللذين يحدان القطعة B التي ارتبطت بشكل معكوس في هذا الفاج .

**ب- الفاج ميو MU:**

يتميز هذا الفاج بامتلاكه لـ DNA مزدوج السلسلة، وهو يتطفل على E.colie السلالة K، وهو فاج محلل ويحتوي في مادته الوراثية على جزء جرثومي، ولهذا فإن لهذا الفاج أهمية في وضع الخرائط الوراثية للجراثيم.

تم اشتقاق فاج واحد من هذا الفاج وهو Mud، ويمكن لهذا الفاج أن يستوعب قطعة من الحمض النووي يتجاوز حجمها kb15.

**جـ- الفاج M13:**

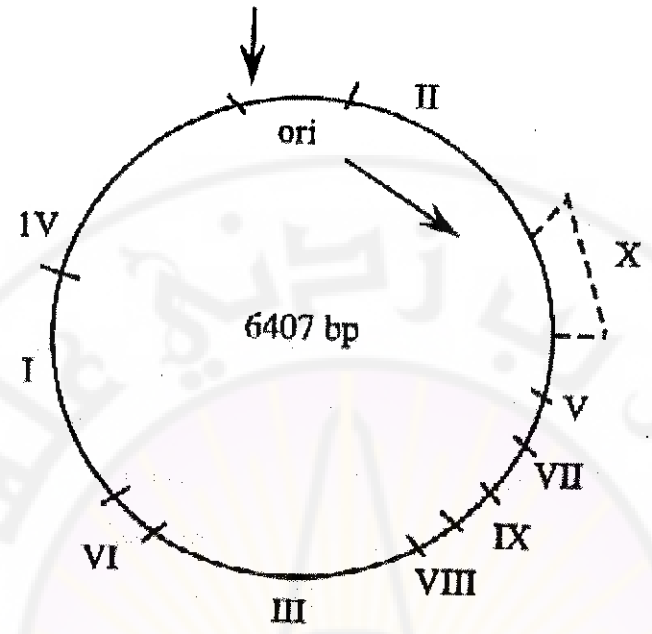
وهو من الفاجات التي تحتوي على سلسلة مفردة من الـ DNA شكله حلقي ومؤلف من 6407 نيكلوتيد ويمتلك حوالي 10 جينات، ويتميز هذا الفاج بعدد من الخواص التي تجعله هاماً في مجال الهندسة الوراثية. وهذه الخواص:

1- حجمه نموذجي وهو أقل من 7 kb و ذو شكل حلقي.

2- يصبح حمضه النووي مزدوجاً بعد حصول العدوى، ويسلك أسلوباً مشابهاً للبلاسميد داخل الخلية الجرثومية.

3 - من السهولة عزله وإعادة إحداث العدوى، أضف إلى ذلك أنه لايحتوي على أي جينات غير ضرورية يمكنه الاستغناء عنها، بعكس الفاج λ الذي يحتوي على مناطق يمكن الاستغناء عنها.

4 - يمكن أن نغرس فيه جينات مفردة الشريط، وهي ضرورية لدراسة ترددات الحمض النووي والتطفير خارج الخلايا (شكل 72).




(شكل72): يبين الخريطة الوراثية للفاج M13 المستعمل كناقل في الهندسة الوراثية، يبين مواقع الجينات المسؤولة عن بناء البروتينات الغلافية و تضاعف الحمض النووي.

وقد تم إشتقاق عدد من النواقل بدءاً من هذا الفاج منها: الفاج M13mp والذي ينتج عن طريق إضافة الجين Lac-z في الموقع S1 الذي يتألف من 507 نيكلوتيد، وعلى خلاف الفاج لمبدا فإن الفاج M13 لا يملك أي جينات غير أساسية باستثناء الـ 507 زوج من الأسس الآزوتية في المنطقة الواقعة بين الجينات.

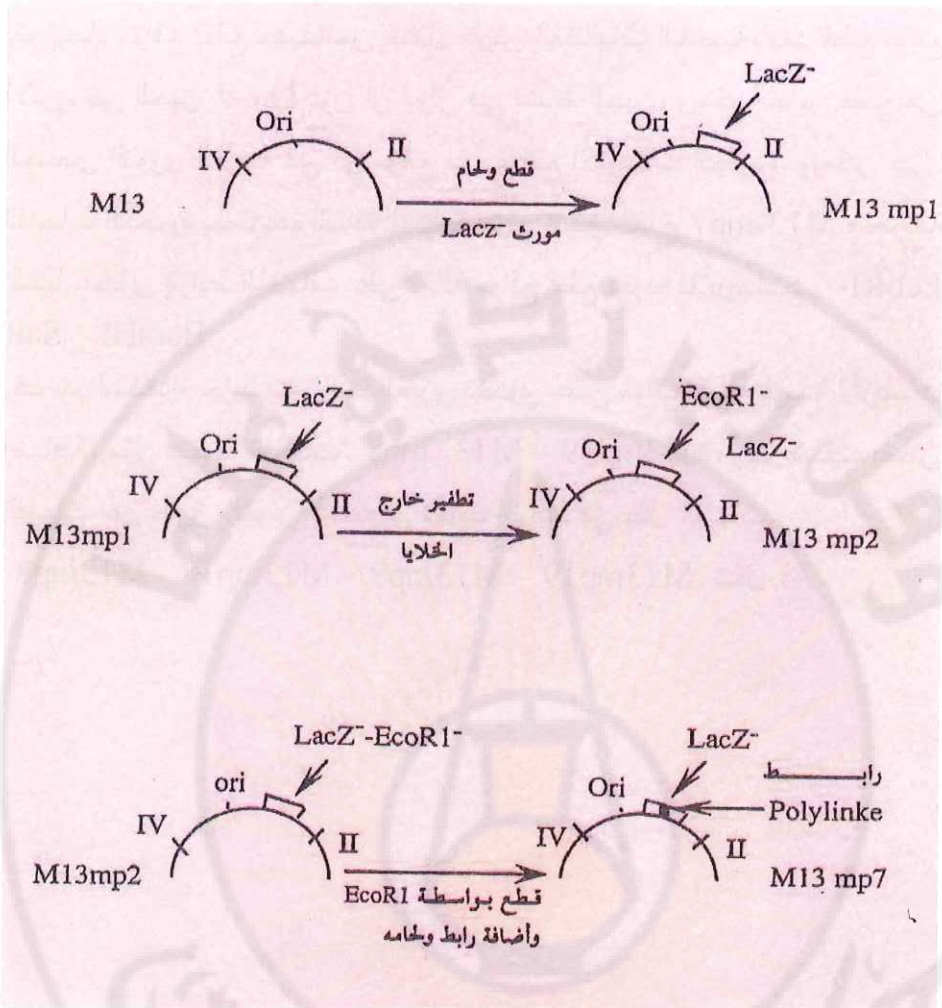
وقد اشتق من الفاج M13 عدد من الفاجات الجديدة، من خلال إضافة مواقع جديدة إلى القطع ولأنزيمات جديدة، إضافة إلى موقع الأنزيم EcoR-I بهدف زيادة قدرة الفاج على النقل.

يتم إيجاد مواقع قطع جديدة من خلال غرس المتتاليات الخاصة، بعد قطع موقع الأنزيم في الجين Lac-z دون أن يؤثر في نشاط الجين، ويمكن غرس قطع من الحمض النووي الغريبة في أي موقع من مواقع الأنزيمات الجديدة، ويمكن عزل الفاجات المحورة بمساعدة المادة X-gal، وقد اشتق الفاج M13-mp7 بالطريقة نفسها واحتوى الرابط المضاف على ثلاثة مواقع قطع مفردة للأنزيمات: EcoRI- BamHI _ SalI.

وقد تم استخدام جزيئات روابط آخرى تحتوي على مواقع قطع فريدة لأنزيمات إضافية، مثل سلسلة الفاجات: M13mp19 – M13 mp8، وقد اشتقت بعض الفاجات عن طريق الغرس المعكوس لجزيئه الرابط في حال الفاجات:

M13mp19 – M13mp9 – M13mp18 - M13mp8 شكل 73.

Damascus University




(شكل 73): يبين المشتقات المختلفة من الفاج M13 عن طريقة إضافة الرابط إلى الفاج، مما أعطى احتمالاً أكبر في استخدام أنزيمات قطع إضافية.

### 4- الفاج Qx 174:

هو من الفاجات وحيدة السلسلة ويتألف من 5373 نيكلوتيداً، ويحتوي على 10 جينات، وهو من أوائل الفاجات التي تم التعرف على خريطتها الوراثية، وله أهمية

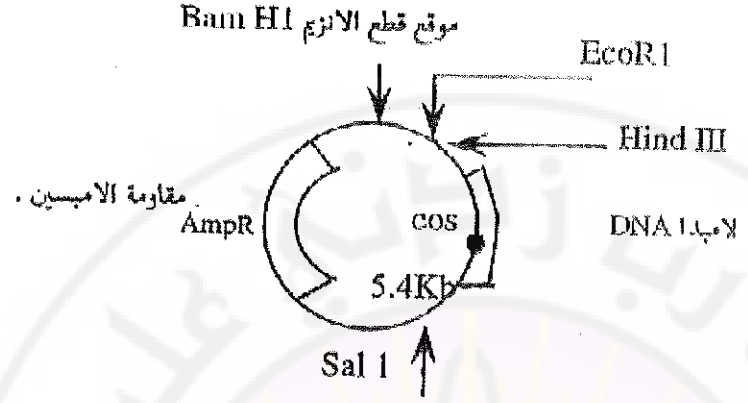
الفاج M13 إلا أنه من الصعب اشتقاق فاجات أخرى منه، لامتلاكه على جينات متداخلة، وكذلك لوجود جينات مسؤولة عن تضاعفه، ولكنه يستعمل بغزارة في أبحاث ترميم الحمض النووي.

### 2-3- الكوسميدات Cosmids:

الكوسميد هو هجين بين الـ DNA للفاج والبلاسميد وقد تم تصميم الناقل عن طريق الاستفادة من خاصة تعبئة الحمض النووي للفاج في الغلاف البروتيني والذي يعتمد على وجود الموقع Cos الموجود في حمضه النووي وقد استخدم ذلك في تصميم ناقل يمتلك متتاليات البلاسميد ملتحمة في الموقع Cos من الفاج لمبدا بشرط أن تحمل هذه القطعة من الحمض النووي على المواقع اللزجة والتي يفصل بينها 37 -52 kb، ولهذا فإن الكوسميد هو عملياً بلاسميد يحتوي على مواقع لزجة مناسبة لعملية الغرس بصورة سهلة.

وتتميز هذه الكوسميدات بحجمها الصغير الذي يتراوح بين 4-6 kb، كذلك بقدرتها على نقل قطعة كبيرة من الحمض النوويْ التي يمكن أن تصل إلى 47 kb، وبما أنه لا يملك أياً من جينات الفاج، فهو يسلك سلوك البلاسميد عند دخولها إلى الجرثوم عند العدوى، ويبدو أن الكوسميد يمثل نظاماً مثالياً لإيلاج الـ DNA المؤشب إلى داخل المضيف، وتكون كفاءة التنسيل أكثر مرتين من الناقل لمبدا وبالإضافة إلى ذلك فإنه من الضروري وجود موقع جين انتقائي - مثل مقاومة الامبسلين- بالإضافة إلى أصل التضاعف.

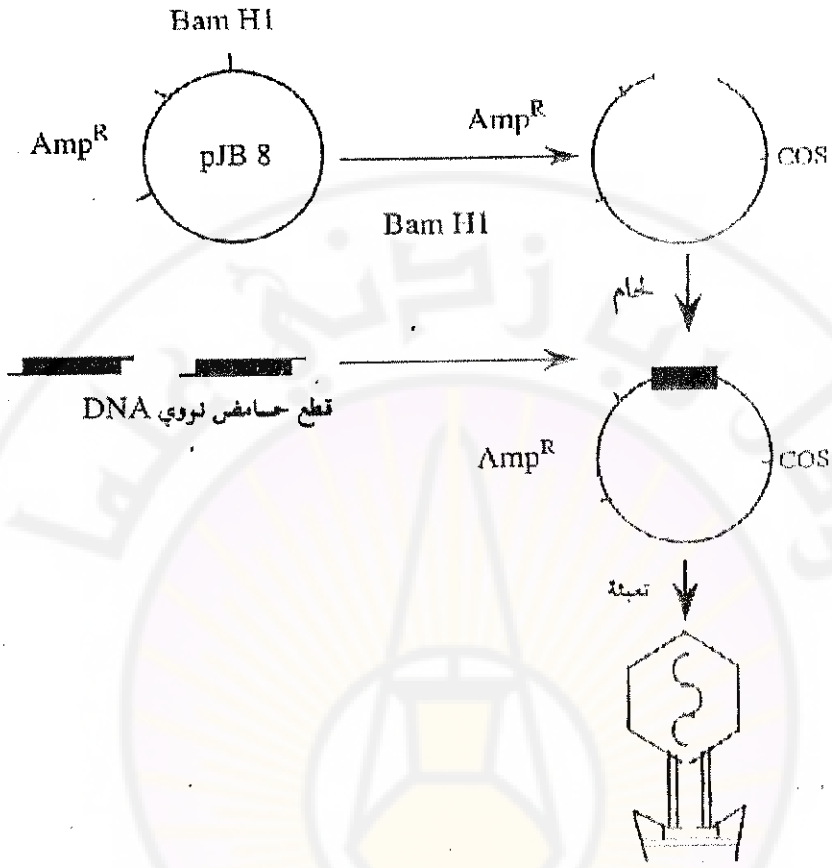
وأهم الكوسميدات تلك المشتقة نتيجة للدمج بين الفاج لمبدا λ والبلاسميد PBR322، ويدعى بالكوسميد PJB8 (شكل 74).




(شكل 74): يبين الخريطة الوراثية للكوسميد PJB8 والمشتق من البلاسميد PBR22 والفاج λ.

يمكن استخدام الكوسميد كناقل عن طريق إحداث قطع بواسطة أنزيم محدد، وبالتالي غرس قطعة الـ DNA الغريبة، والتي يمكن الحصول عليها عن طريق الهضم الجزئي للحمض النووي بواسطة أنزيم قطع معين، حيث يؤدي الهضم الكلي إلى تقطيع الـ DNA إلى قطع صغيرة غير صالحة للاستعمال في الهندسة الوراثية، يتم بعد الغرس تعبئة الـ DNA المؤشب في البروتين لإنتاج فاج يستخدم لإصابة الجراثيم التي يتم استنباتها على وسط مغذ يحتوي على الامبسلين، وتظهر على هذا الوسط المستعمرات التي تحتوي على الكوسميدات المحورة، في حين لا تظهر المستعمرات الأخرى وتعود أهمية الكوسميد إلى أنه يستوعب قطعاً من الحمض النووي كبيرة الحجم تصل إلى40 kb، وهو أكبر بكثير من استيعاب البلاسميدات و الفاجات (شكل75).

يمكننا أحياناً الدمج الكامل بين الـ DNA للفاج والبلاسميد ليعطي ما يسمى بالفاسميدات، ومن أهم الكوسميدات المستعملة في الهندسة الوراثية C2XB و PJB8.




(شكل 75): يبين الطريقة التي تتم بها عملية التنسيل باستخدام الكوسميد كناقل.

### 2- 4- الفيروسات Viruses:

وهي أقل الكائنات الدقيقة استعمالاً كنواقل في مجال الهندسة الوراثية ويعود ذلك إلى نوعيتها من ناحية و إلى التعقيدات التي تتصف بها مادتها الوراثية إضافة إلى الأخطار التي يمكن أن تنتج من إجراء تحويرات وراثية أخرى من خلال الهندسة الوراثية، ورغم ذلك فقد تم استخدام فيروس القرنبيط Cam v والسيمان SV40 وفيروس جيميني Gemini.

**أ- فيروس القرنبيط Caulimo virus cam v:**

وهو فيروس نباتي يتطفل على عدد من النباتات، يبلغ حجم الـ DNA فيه 8 kb ويضم ست جينات بالإضافة إلى قطعة متوسطة، خريطته الوراثية معروفة وقد استخدم كناقل في الهندسة الوراثية عن طريق غرس قطعة الـ DNA الغريبة في القطعة المتوسطة، وهذا لايؤثر على صفات الفيروس، ومن ميزات هذا الفيروس سهولة التعامل معه وتكاثره السريع، غير أن من عيوبه هو ضرورة تعبئة الـ DNA الفيروسي في البروتين، كما هو الحال بالنسبة للفاج لمبدا ولهذا فانه لا يمكن أن يغرس فيه أكثر من 300 نيكلوتيد، والعيب الآخر هو أنه لا يصيب إلا عدداً محدوداً من النباتات، وتجري محاولات لتحسينه من خلال زيادة قدرته الاستيعابية وزيادة الأنواع التي يمكن أن يتطفل عليها.

**ب- الفيروس جيميني Gemini virus:**

تتألف مادتها الوراثية من جزيئين مفردي السلسلة من الـ DNA يبلغ حجمها حوالي 3.5 kb، وهو يصيب بعض النباتات الراقية، خريطته الوراثية غير معروفة بشكل تام، وكذلك بالنسبة لمواقع الجينات ووظيفتها وأصول تضاعفها. كل ذلك جعل استعمالها في الهندسة الوراثية محدوداً، مع أنه يُنتظر استعمالها لاحقاً عند استكمال التعرف عليها بشكل دقيق.

**جـ- الفيروس السيميان 40- Sv40:**

وهو من الفيروسات التي تتطفل على الثدييات، ويبلغ حجمها 5.2 kb، قدرته الاستيعابية محدودة بسبب صغر حجمه ووجود مواقع عديدة لتضاعفه، لا تزيد عن 300 نيكلوتيد، وقد جرى العديد من المحاولات لزيادة قدرته الاستيعابية، من خلال

اشتقاق عدد من النواقل من أهمها SVGT-5، والذي تم الحصول عليه من خلال إزالة الترددات الواقعة بين موقعي القطع للأنزيمين Hind III و Bam HI.

**د- فيروس البابيلوما البقري:BOVINE PAPILLOMA v (BPV)**

هو فيروس يصيب العديد من الحيوانات، مادته الوراثية حلقية حجمه حوالي Kb8. يسلك هذا الفيروس سلوك البلاسميد لدى دخوله إلى الخلايا التي يمكن أن يصل عددها في الخلية المضيفة إلى 100 دون أن يؤدي ذلك إلى موتها، ينقل الفيروس إلى الخلايا الأخرى عن طريق الانقسام الخلوي.

لايمثل هذا الفيروس ناقلاً نموذجياً بسبب صعوبة التعامل معه، وقد تمت محاولات لدمجه مع البلاسميد PBR322 لجعله قادراً على التطفل على E.colie وعلى زيادة سعته الاستيعابية، بحيث يمكن أن تصل إلى أكثر من kb 10، وينتظر استعماله على نطاق واسع في مجال الهندسة الوراثية مستقبلاً.

**3- النواقل في الخلايا حقيقية النوى:Vectors in eukaryotic cells**

إن المتطلبات للنواقل تصبح أكثر تعقيداً عندما نستعمل خلايا حقيقية النوى كعوائل، ذلك إن الخلايا حقيقة النوى تمتلك كروموزومات متعددة موجودة داخل النواة، وكذلك التنوع الواسع للكائنات حقيقية النوى، ولذلك فإنه ليس من الغريب أن تكون الناقلات أكثر تخصصية ونوعية، وقد طُور عدد من النواقل في خلايا الخميرة، وقد أسست بلاسميدات الخمائر والمسماة yeast episomal (YEPS) plasmids على أساس الوجود الطبيعي لبلاسميد الخميرة، والتي يمكنها أن تتضاعف بشكل مستقل أو أن تتكامل مع موقع كروموزومي.

وقد صممت بلاسميدات التكامل في الخميرة (YEPS) لتتكامل مع الكروموزوم بطريقة بلاسميدات YEPS نفسها، وتبقى بلاسميدات الخميرة المتكررة

كبلاسميدات مستقلة ولا تتكامل، وتعرف البلاسميدات التي لا تحتوي على تتابعات من حول الجزء المركزي للكروموزومات ببلاسميدات السنترومير Yeast centomer plasmids (YCPS) وتسلك هذه البلاسميدات ككروموزومات صغيرة، وتحتوي الكروموزومات الصنيعة في الخميرة Yeast artificial chromosome معظم النواقل المنسوبة إلى الخميرة.

تحوي هذه الكروموزومات على مناطق مركزية وأخرى طرفية، يمكن استعمالها في عملية التنسيل لقطع كبيرة جداً من الحمض النووي، ويزداد ثبات هذه القطع طرداً مع زيادة حجمها خلافاً للنواقل الأخرى.

وتختلف مشكلات إدخال جزيئات الحمض النووي المؤشبة إلى الكائن عند حقيقيات النوى كونها عديدة الخلايا، كما هو الحال لدى النباتات والحيوانات، ويمكن تلخيص أهداف الهندسة الوراثية لدى حقيقيات النوى بما يلي:

1- إدخال الحمض النووي المؤشب إلى خلايا النبات أو الحيوان في مزرعة نسيجية لأهداف بحثية، لدراسة تعبير الجين عن نفسها، أو بهدف إنتاج بروتين عالي القيمة سواءٌ من الناحية الصناعية أم العلاجية.

2- تبديل التركيبة الوراثية للكائن والوصول إلى كائن محور وراثياً، والذي سوف تحمل كل خلاياه هذا التبدل الوراثي، ويترافق ذلك مع العديد من التعقيدات التقنية، حيث يلزم إدخال الحمض النووي المؤشب بشكل مبكر للانتشار في كل الكائن الحي.

كما ويمكن إدخال النواقل المستعملة لخلايا النبات والحيوان مباشرة، بواسطة آلية دخول بيولوجية، عندما تكون على شكل فيروسات أو على شكل عوامل إصابة أخرى كالجراثيم.

### 4- إدخال الـ DNA في الخلايا:

يتم إنتاج الجزيئات المؤشبة في أنبوب الاختبار باستعمال الناقل والحمض النووي المغروس، ويجب بعد ذلك إدخاله في الخلية المضيفة حتى يحصل التكاثر، وتعد هذه العملية حرجة وصعبة، خاصة عندما تكون جزيئات الحمض النووي المؤشبة كبيرة ومن الطرق المستعملة:

#### 4-1- التحول والعدوى المباشرة : Transformation and transfection

وهي طريقة بسيطة ويعتمد التحول على أخذ الـ DNA البلاسميدي ووضعه في الوسط الجرثومي، مما يؤدي إلى نجاح عبور بعضها إلى داخل الجراثيم، وأول من تحدث عن التحول العالم غريفت عام 1928. غير أن الجراثيم لا تستطيع التحول بسهولة، ولكي يتم التحول يجب جعل الخلايا متنافسة، ويتحقق ذلك بواسطة وضع الخلايا في محلول مبرد من كلوريد الكالسيوم، ويتم التحول المنافس من خلال وضع خلايا وDNA البلاسميد، ثم يحضن لمدة 20 -30 دقيقة، ثم تعطى صدمة حرارية (42 درجة مئوية) والتي تمكن الـ DNA من الدخول إلى الخلايا، ثم تحضن الخلايا في وسط مغذ سائل عند الدرجة 37 مئوية لمدة 60 -90 دقيقة لتأسيس البلاسميدات ولتعبر عن نفسها مظهرياً. تزرع الخلايا على أطباق فيها أوساط غذائية اصطفائية لإكثارها.

ويعد التحول عملية غير مجدية من حيث إن الخلايا التي تصبح محولة صغيرة، ورغم هذا العيب فإن التحول يعد طريقة أساسية، أما العدوى العابرة فهي عملية مشابهة للتحول والفرق بينها هو أن الـ DNA الفاج هو المستعمل بدلاً من الـ DNA البلاسميدي، وهي عملية أيضاً غير كفء، وطريقة التعليب في المختبر هي الأكثر كفاءة.

### 4-2- تعليب الحمض النووي للفاج مخبرياً:

يتم أثناء الدارة الانحلالية تضاعف الـ DNA للفاج ليعطي سلسلة طويلة جداً من جينوم الفاج لمبدا المتكررة والمرتبطة ببعضها بواسطة المواقع اللاصقة (مواقع Cos) يتم بعد ذلك القطع في المواقع كوز، ومن ثم يتم تعليب الحمض النووي الخاص بكل فاج، وبذلك تتكون فاجات ناضجة تمتلك القدرة على العدوى، وهذا ما يتم عادة في الكائن الحي، ومن الممكن أن تتم هذه العملية في الزجاج مع حمض نووي مؤشب، والذي يولد جزيئاً متكرراً يمكن تعليبها -بعد ذلك- في الفاج.

ولتتم عملية التعليب لابد من توفر مكونات الغطاء لامبدا ولذلك يمكن استخدام سلالتين من الجراثيم لإنتاج ما يسمى بمستخلص التعليب، الذي تحاط مع الحمض النووي المؤشب بشروط خاصة، وبذلك يتكون الفاج الذي نستعمله بعد ذلك لإصابة الـ E.colie التي تزرع في الأوساط المغذية.

# الفصل الخامس

# طرائق التنسيل

# Cloning methods

Damascus University

تم في الفصول السابقة توضيح مسألتين جوهريتين في الهندسة الوراثية، تناولت الأولى إمكانية القطع والتحوير والربط لجزيئات الحمض النووي مخبرياً، وتناولت الثانية النواقل التي يمكنها حمل الـ DNA وتنسيله، ولا بد للعامل في مجال الهندسة الوراثية من القدرة على إتمام أربع خطوات هامة، بهدف إنجاز عملية التنسيل، وهذه الخطوات هي الحصول على قطع من DNA وربطها مع الناقل، وتكثيرها في الخلية المضيفة وأخيراً اختبار المتتاليات المرغوبة.

وسوف نقوم فيما يلي بتوضيح بعض الطرق التي تكمل الخطوات السابقة، وخاصة تنسيل الـ DNA في حقيقيات النوى في جرثوم (E.colie).

يعتمد اختبار تجربة تنسيل ما على عاملين هامين:

- الأول الغرض من عملية التنسيل.
- الثاني مصدر الـ DNA المعزول والمستعمل في عملية التنسيل.

تكون خطوات عزل الـ DNA بهدف تحديد متنا ليتها في E.colie مختلفاً وأقل تعقيداً عنه في حالة أن يكون الهدف منه إنتاج بروتين في كائن حي حقيقي النوى عبر الجينات المضافة، وهكذا فإنه لكل عملية تنسيل مشكلات وتعقيدات وفقاً للهدف منها.

وعلى العموم فإنه عندما يتم التعامل مع الكائنات الحية حقيقية النوى، فإن أول ما نبدأ به هو الـ RNAm أو الـ DNA الجينوم، وبما أن الـ DNA يحتوي على أجزاء غير مشفرة وهي الأنترونات Introns ومناطق السيطرة Control regions والمتتاليات المتكررة Repetetive sequences وهذه العوامل تؤدي أحياناً إلى صعوبات خاصة عندما يكون الجينوم كبيراً، والهدف هو عزل جين واحد.

أما إذا كان الهدف هو دراسة التعبير الجيني، فإنه يتوجب عزل متتاليات السيطرة، وبذلك يبقى الـ DNA الجينوم هو الخيار الوحيد فقط.

يعد الـ RNAm هو المفضل عن الجينوم كمصدر لمادة العمل بسبب:

1- انه يمثل المعلومات الوراثية Genetic information التي يمكن تنشيطها بواسطة نوع آخر من الخلايا، وهو لا يمثل كل الـ DNA للجينوم ضمن الـ RNAm وهذا ما يعطيه قوة.

2- له أفضلية لدراسة المتتاليات بدون انترونات، والتي يتم إزالتها أثناء عملية النضج التي يخضع لها جزيء الـ RNAm بعد نسخه.

ورغم أن المصدرين الأساسيين للـ DNA المنسل هما من الـ DNA الجينوم وRNAm فإن بناء الـ DNA مخبرياً -بدءاً من معرفتنا للبروتين ولنمط تتالي الأحماض الأمينية فيه- يمكن أن يكون مفيداً في كثير من الأحيان.

وبعد أن يتم تحديد مصدر الـ DNA نبدأ بالبحث عن الناقل المناسب ليتم التنسيل في الجراثيم كخلايا مضيفة، وهنا يجب التفكير بطريقة ربط الـ DNA مع الناقل، ومن ثم طريقة إدخالها إلى الخلايا المضيفة، ومن طرائق التنسيل المستعملة:

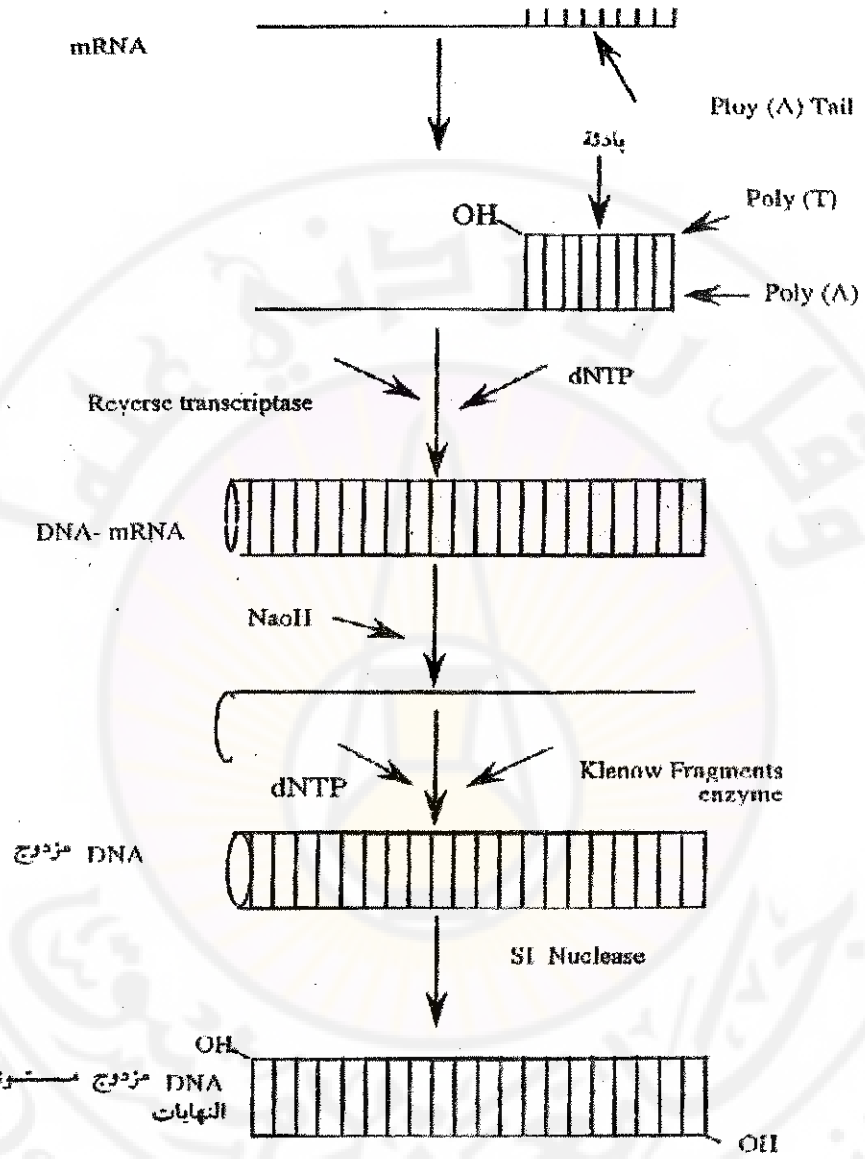
**1- التنسيل من الـ RNAm الرسول:**

تنتج جميع أنواع الخلايا جزيئات من الـ RNAm والذي يعد عاملاً أساسياً لتعبير الجينات عن نفسها وإنتاج البروتينات اللازمة للاستقلاب، ونظراً إلى تمايز الخلايا فإنها تنتج بروتينات مختلفة، وهذا ناتج من اختلاف في أنماط الـ RNAm مما يؤدي إلى تباين في البروتينات التي يتم إنتاجها، وهكذا فإن بعض أنماط الـ RNAm تكون متباينة في وفرتها من نمط خلوي إلى آخر، مما يسهل عملية عزلها بعد اختيار المصدر الخلوي للحمض النووي.

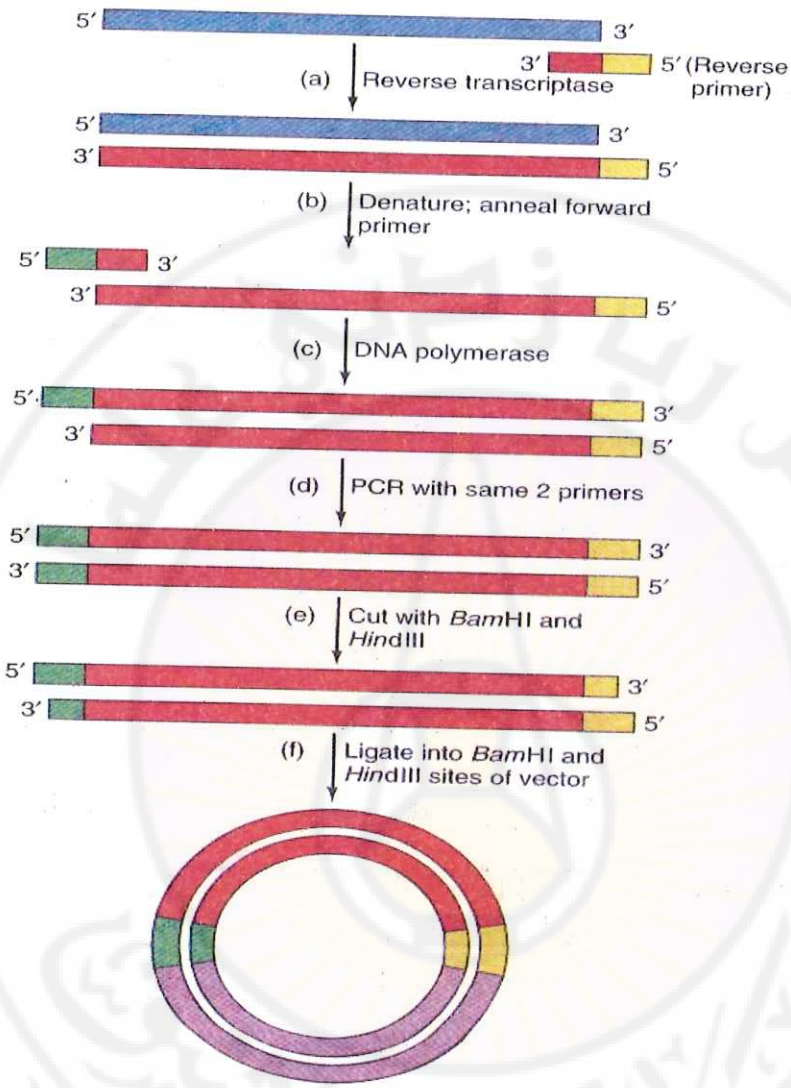
**١ – بناء الـ DNA المكمل Complementary DNA (DNAc) :**

من المعروف أنه لايمكن تنسيل الـ RNAm إنما يلزم تحويله إلى الـ DNA قبل أن يغرس في الناقل المناسب، ونستخدم لذلك أنزيم النسخ العكسي Revers transcriptase (RTase ) لتركيب الـ DNA المكمل.

والطريقة التقليدية لبناء الـ DNAc هي الاستفادة من القطعة متعددة الأدينين Poly A الموجودة في النهاية 3' لجزيء الـ RNAm، والتي يتم ربطها ببادئ Oligo dT، والتي تزود بالمجموعة OH للنهاية 3' واللازمة لعمل أنزيم النسخ العكسي (RTase) الشكلان(76-77).




(شكل 76) يوضح طريقة تركيب جزيء الـ DNA مزدوج السلسلة المكمل بدءاً من جزيء الـ RNA الرسول عن طريق النسخ العكسي، و باستعمال أنزيم النسخ العكسي وأنزيم كلينو.




**Using RT-PCR to clone a single cDNA.**

(شكل 77) يبين طريقة تركيب جزيء DNA بدءا من الـ RNAm عن طريق النسخ العكسي، ومن ثم استخدام التضخيم باستعمال الـ PCR والغرس في الناقل بعد ذلك.

يستطيع أنزيم النسخ العكسي أن يبني سلسلة من الـ DNAc هجينة مع الـ RNAm عند توفر النيكلوزيدات الأربعة منقوصة الأوكسجين ثلاثية الفوسفات (dNTP ) يتم بعد ذلك إزالة الـ RNAm بواسطة الإماهة القلوية، ليتم بعد ذلك تحتويل الـ DNAc إلى جزيء مزدوج باستخدام أنزيم DNA Polymerase ويتم الحصول من السلسلة الثانية من جزيء DNA على مواقع قصيرة تشبه رأس الدبوس، يتم في مرحلة تالية بواسطة أنزيم S1 nuclease تشذيب الخيط المكمل ليعطي جزيئة ذات نهاية مستوية نشيطة قابلة للتنسيل في الناقل ومن المشكلات التي تصادفنا خلال عملية تخليق الـ DNAc:

1- قد يكون الـ DNAc الذي تم تركيبه غير مكمل تماماً للـ RNAm، خاصة عندما يكون الأخير طويلاً نسبياً، وهذا العيب نتيجة أن الـ DNAc لا يمثل كامل الترميز في الجين، وتميل مناطق 3′ من الـ RNAm إلى أن تكون موجودة بغزارة ضمن مجاميع الـ DNAc.

2- يمكن لأنزيم S1 nuclease أن يزيل بعض المتتاليات المهمة من النهاية 5′ أثناء عملية تشذيب الـ DNAc.

و قد يتم التغلب بواسطة طرق حديثة على هذه الصعوبات، وتتضمن الطرق استخدام ما يدعى بقايا Olygo (dG) المنتجة للسلسلة الثانية من الـ DNAc حيث يضاف الذيل (dC) إلى النهايات 3′ للـ DNAc باستعمال أنزيم Terminal transferase، مما يجعل النهاية 3′ سهلة المنال. يعمل توليد الذيل على تسهيل الحصول على الطول التام لجزيئة الـ DNAc والتي تكون فيها النهاية 3′ غير متقابلة تماماً مع الـ RNAm والتي نتجت من استعمال الأنزيم S 1 Nuclease مما يعزز أمر الحصول على الـ DNAc كامل الطول.

كما يعد استخدام الـ Poly A في جزيء الـ RNAm لبناء سلسلة الـ DNAc غير ملائمة في بعض الحالات، ففي بعض الأحيان لا يكون الـ RNAm مذيلاً

بعديد الأدينين، عندها يمكن استعمال بادئات من قليل النيكلوتيد عشوائي للبدء في بناء الـ DNAc عن طريق اصطناع RNA الرسول الخاص بهذا البروتين وبالتالي الانطلاق منه إلى الـ DNAc الذي يمكن تنسيله في أحد النواقل المناسبة. إضافة إلى استعمال التفاعل السلسلي للبوليميراز (PCR) لتضخيم التتابع المرغوب مخبرياً، وعند الحصول على قطع الـ DNAc فإن المباشرة في عملية التنسيل تصبح ممكنة.

**1-2- تنسيل الـ DNAc في نواقل بلاسميدية:**

يعطي الكثير من العاملين في الهندسة الوراثية للفاجات أولوية كنواقل، إلا أن البلاسميدات تبقى المستخدمة في الغالب، خاصة عندما يكون الـ DNAc المعزول يحتوي على عدد قليل من المنسلات، ويتم ربط الـ DNAc مع الناقل بواحدة من ثلاثة طرق والتي يتم من خلالها إجراء تحوير في النهايات، وبحيث يصبح من الممكن ربط هذه القطع مع الحمض النووي للناقل باستعمال أنزيمات الليغاز Ligase، والذي يعود إلى تشكيل الروابط الفوسفاتية ثنائية الاستر لتشكيل جزيئات الـ DNA المؤشب، ولهذا الغرض تستعمل تراكيز عالية من الجزيئات بهدف زيادة فرص لقاء الأطراف بين الجزيئات.

**1-3- تحوير النهايات العمياء لقطع الـ DNA:**

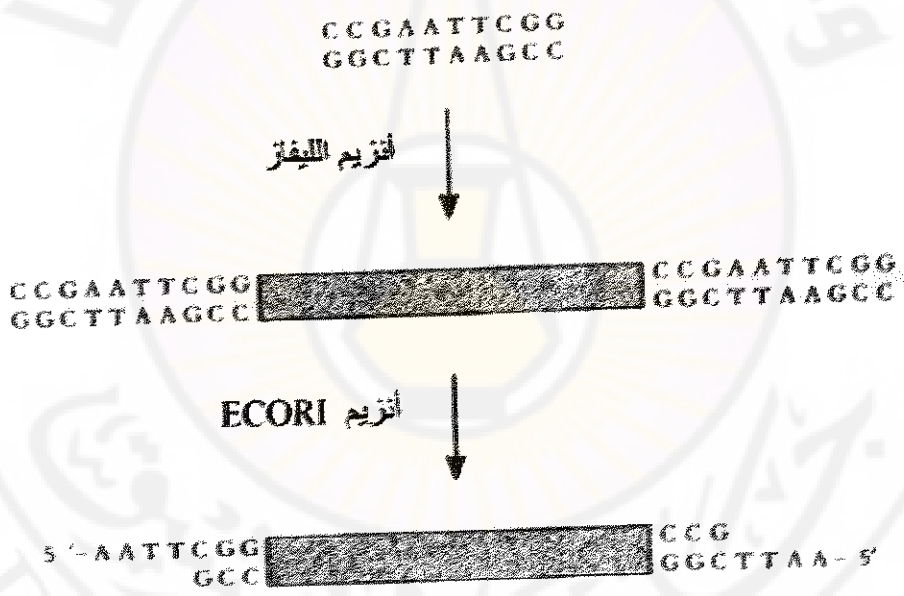
تؤدي معالجة الـ DNA إلى الناقل وإلى القطع المراد دمجها بنفس أنزيم التحديد إلى نهايات متناظرة سهلة الوصل، غير أن ذلك غير ممكن دائماً، حيث يمكن أن تكون النهايات للناقل لزجة ونهايات الـ DNA المراد دمجها عمياء وأحياناً العكس، لذلك فإنه من الضروري إجراء تعديل وتحوير النهايات العمياء لجعلها متجانسة مع تلك الخاصة بالناقل، ومن أهم طرق التحوير المستعملة:

أ- الروابط **Linkers**:

وهي قطع من الـ DNA المصنعة مخبرياً وذات طبيعة مزدوجة نهايتها عمياء، والتتالي لهذه القطع هو الخاص بأحد أنزيمات التحديد.

توضع هذه الروابط مع قطع الـ DNA العمياء مع أنزيم الليغاز، ويؤدي ذلك إلى ربط قطع الروابط مع النهايات العمياء لقطعة الـ DNA.

يتم بعد ذلك تنقية هذه القطع، ومن ثم معاملتها بأنزيم التحديد الذي يعمل على قطع جزء من هذه الروابط بصورة غير متناظرة مؤدياً إلى نهايات لزجة قابلة للاستعمال واللصق لاحقاً كما هو موضح في (الشكل 78).




(شكل 78) يوضح طريقة استخدام الروابط في عملية تحوير النهايات، بهدف جعلها أكثر قدرة على الالتحام مع النواقل المستعملة عن طريق تحويل النهايات من مستوية إلى لزجة.

ب- التوصيلات **Adaptors**:

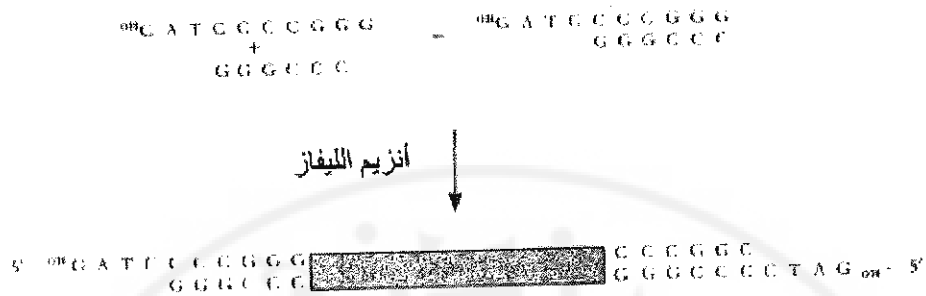
إن السيئة في استخدام الروابط هو أنه من الممكن أن تحتوي قطعة الـ DNA، التي نريد القيام بغرسها على المتتاليات الخاصة بأنزيم التحديد المستعمل نفسه في

التعامل مع الروابط التي يتم لحمها في نهايتي قطعة الـ DNA، وتزداد هذه المشكلة بزيادة طول قطعة الـ DNA والتي يمكن أن تحتوي على العديد من مواقع التحديد وهذا ما يدفعنا إلى البحث عن وسائل أخرى ومنها التوصيلات Adaptores.

والتوصيلات كالروابط هي قطع من الـ DNA مزدوجة ومركبة صنعياً عن طريق صناعة المتتاليات الخاصة بأحد أنزيمات التحديد، ومن ثم القيام بقطعها قبل لحمها.

وهي تتميز بأنها تمتلك نهايات عمياء تلتحم مع النهايات العمياء لقطعة الـ DNA ونهاية لزجة تتصف بأنها لا تحمل مجموعة فوسفات نهائية 5′، مما يقلل من احتمال التحامها مع القطع العمياء لقطع أخرى.

وهكذا فإنه يجب إضافة مجموعة فوسفات إلى النهايات اللزجة للتوصيلات بعد الانتهاء من عملية التحوير، ومن الصعوبات في هذه الطريقة أيضاً هو احتمال وجود مواقع لأنزيم التحديد المنتج للنهايات اللزجة للتوصيلات مع قطع الـ DNA المحور للنهايات، بحيث يصبح من الصعب استخلاص التوصيلات من قطع الـ DNA المحورة مع ناقل، لذلك فقد تم تصميم توصيلات تحتوي على مواقع تحديد لأنزيمات أخرى إضافية للأنزيم المنتج للنهايات اللزجة، مما يسهل استخلاصها، (شكل 79).




(شكل 79): يوضح طريقة استعمال التوصيلات في تحوير النهايات العمياء، وتحويلها إلى نهايات لزجة، لجعلها أكثر قدرة على الالتحام مع النواقل المستعملة في الهندسة الوراثية.

**جـ- التذيل بالبوليمر المتجانس Homopolymer tailing :**

وهي عبارة عن متتاليات متشابهة لنيكلوتيد واحد ويبلغ عددها من 5- 50 يتم تركيبها صنعياً، عن طريق استخدام أنزيم الترنسفيراز الطرفي Terminal transferasee (TdT) والذي يعمل على إضافة نيكلوتيدات إلى النهاية 3′، ولتتم هذه العملية تتم معاملة قطع الـ DNA ذات النهاية العمياء بأنزيم النيوكليز الخارجي المعزول من الفاج لمبدا وهو يقوم بإزالة النيكلوتيدات من النهاية 5′، مما يؤدي إلى إعطاء نهايات هيدروكسيلية بارزة جاهزة لعمل أنزيم (TdT).

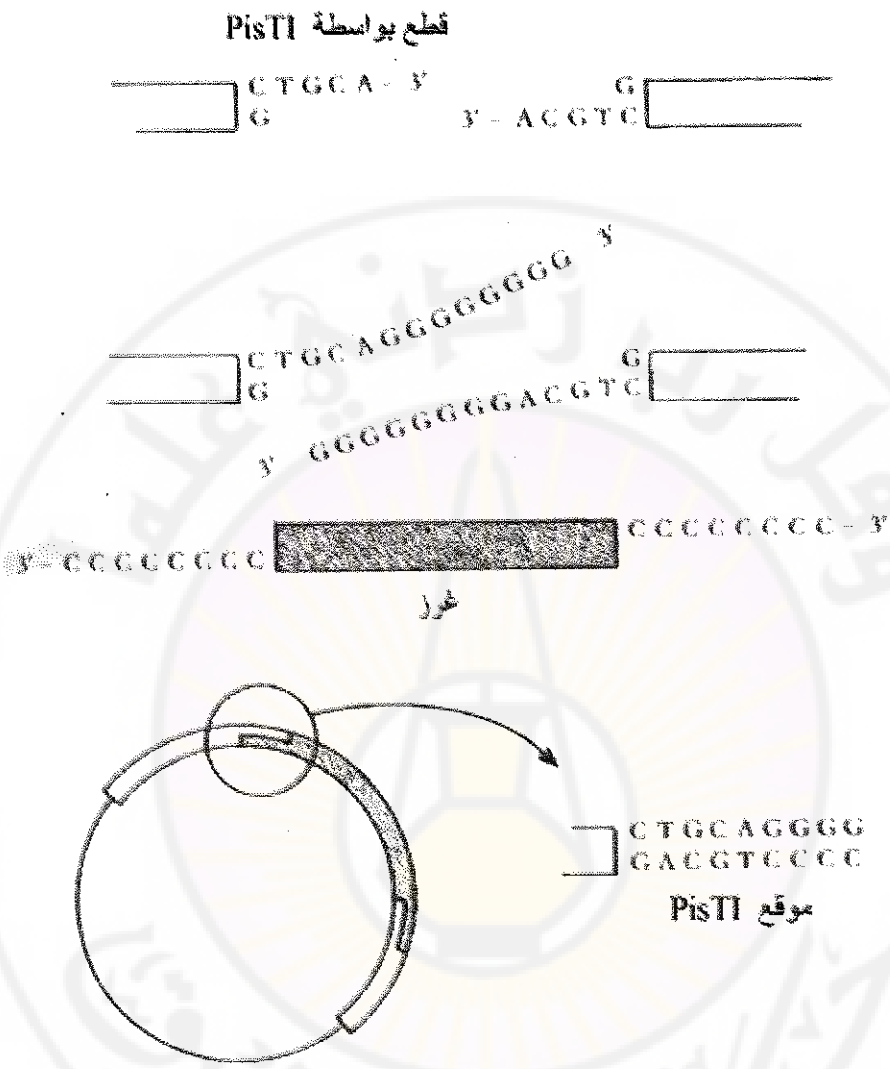
يتم بعد ذلك إضافة نيكلوتيدات الأدينين مثلاً والتي ترتبط لتشكل ذيولاً أدينينية.

وتتم معاملة الناقل بالطريقة نفسها في هذه المرة بإضافة نيكلوتيدات التيمين. إن لعدد النيكلوتيدات في هذه الذيول أهمية فكلما كانت أكثر عدداً كانت أكثر استقراراً.

وفي حال وجود تباين في عدد نيكلوتيدات الذيول، فإنه يجب استعمال أنزيم كلينو Klenow لترميم الفراغات بعد استعمال أنزيم الليغاز Ligase، أما إذا كانت

الفراغات الناتجة صغيرة وأصغر من 20 نيكلوتيداً فإن أنزيمات الخلايا المضيفة كفيلة بإجراء الترميم لهذه الفراغات (شكل 80).

رغم أن البلاسميدات هي المستخدمة بكثرة في عمليات التنسيل للـ c DNA المكمل، إلا أنه يوجد العديد من الحالات التي لا تكون مناسبة للاستعمال، كما هو الحال عند قلة غزارة الـ RNA الرسول المطلوب تنسيله، عند ذلك نستخدم الفاجات كنواقل إضافية للاستفادة من خاصة التعليب، والذي يزيد من كفاءة عملية التنسيل بالإضافة إلى سهولة الحفظ والتخزين، ومن حيث المبدأ فإن تنسيل الـ DNA المكمل في الفاجات يماثل ما استعرضناه في البلاسميدات.




(شكل 80): يبين طريقة تحوير النهايات عن طريق التذيل بالبوليميراز المتجانس homopolymer tailing بهدف تحوير النهايات العمياء، وتحويلها إلى لزجة لتسهيل عملية الالتحام بين الناقل والجين.

**2- تنسيل الـ DNA من الذخيرة الوراثية:**

لا يمثل تنسيل الـ DNAc (بدءاً من الـ RNAm) الأسلوب المثالي دائماً عند التعامل مع الهندسة الوراثية، خاصة أنه لا يعكس وجود أو عدم وجود الأنترونات خاصة عندما يرغب الباحث دراسة تتابعات التحكم المسؤولة عن التعبير الجيني وهي غير موجودة في جزيء الـ RNAm المجهز، ويجب في مثل هذه الحالات عزل نسائل مولدة عن الـ DNA المورثي، ويطرح هذا الأمر صعوبات أخرى ويتطلب سياسة تنسيل مختلفة.

**2-1- المكتبات المورثية (الجينومية): Genomic library**

يؤدي تنسيل الحمض النووي بأية طريقة إلى تكوين مجموعة من جزيئات الـ DNA المؤشبة في ناقلات بلاسميدية أو فاجية أو فيروسية، ويتم الحفاظ عليها في خلايا جرثومية، ويطلق على أي تجمع مستقل من النسائل مصطلح بنك نسائل Clone bank أو مكتبة Library.

ويستخدم مصطلح مكتبة وراثية Genomic library ليصف مجموعة النسائل الممثلة لكامل الجينوم عند أي كائن، ويكون إنتاج مثل هذه المكتبة هو أول خطوة في عزل تتابع من جينوم الكائن.

ومن الأمور التي تؤخذ في الحسبان في بناء المكتبة الوراثية:

1 - **حجم الجينوم:** يتطلب الجينوم - كلما كان كبيراً - عدداً أكبر من النسائل، فمثلاً الحجم الصغير لجينوم E.colie يتطلب عدداً أقل من النسائل، مما هو مطلوب لجينوم الإنسان والذي يعد أكثر تعقيداً.

2 - **نوع ناقل** المستخدم والذي يحدد حجم القطع التي يمكن تنسيلها، حيث تتباين استعابية النواقل كما أوردنا سابقاً.

ويمكن حساب حجم المكتبة ببساطة على أساس احتمالية تتابع معين، ليكون ممثلاً في المكتبة، وبأخذ جميع العوامل بالحسبان ويمكن حساب عدد النسائل الخاصة بجينوم ما (شكل81).

يؤدي تقطيع الجينوم إلى قطع كبيرة ضمن مجموعة القطع، ويتطلب تنسيل هذه القطع الكبيرة اختيار نواقل مناسبة من حيث قدرتها الاستيعابية العالية كالكوسميدات، أما بالنسبة للقطع الصغيرة من 5-10 kb فإنه يكفي لتنسيلها البلاسميدات كما هو الحال عند الإحياء الدقيقة، أما الأحياء الراقية فإن القطع تكون فيها أكبر 20 -40 kb، مما يتطلب استعمال الفاجات المعدلة أو الكوسميدات.

## 2-2- بناء المكتبات الجينومية:

نهدف من إنشاء مكتبة جينومية إلى ما يلي:

ا – تمثيل وعزل جينات كائن ما على شكل قطع منفصلة، لتسهيل دراستها وتحليلها واستعمالها في عمليات التأشيب المختلفة.

ب – استخدامها كمصدر لعزل جينات محددة لأغراض مختلفة، سواء لدراسة العلاقات التطورية والأبوة وفي دراسة الأدلة الجنائية.

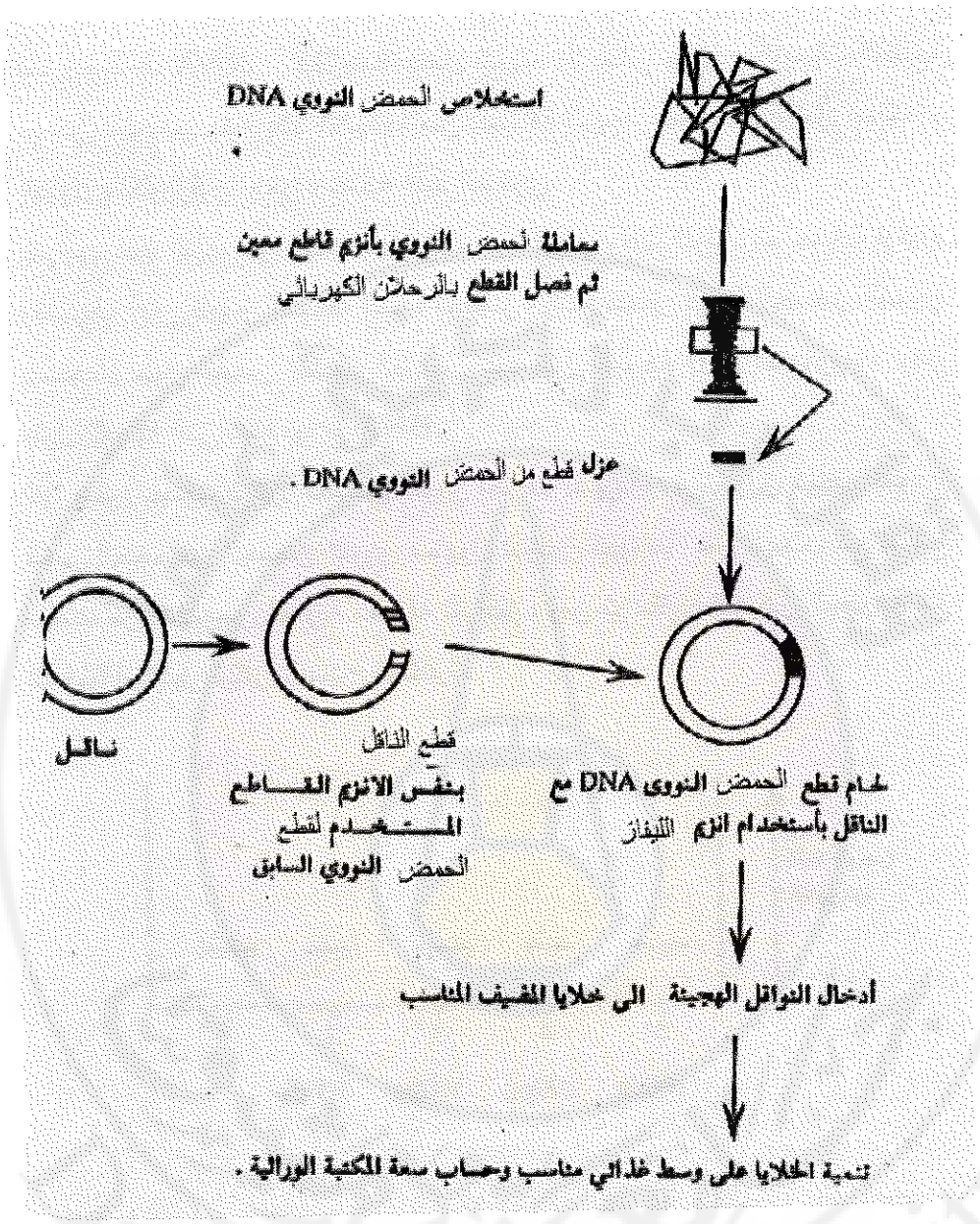
ج – تحديد مواقع الجينات بهدف وضع خريطة جينية لكائنات المختلفة.

يتم إعداد المكتبة الجينومية على مراحل:

2-2-1- يتوجب تحضير قطع الـ DNA المناسبة لبناء المكتبة الجينية في بداية الأمر استخلاص الـ DNA بشكل نقي وكامل خال من الكلوروفورم، أو الفينول أو أملاح السيزيوم المستعملة أثناء تحضير الـ DNA .

يتم بعد ذلك فحص الحمض النووي للتأكد من عدم تخربه بأنزيمات الهدم أثناء استخلاصه، ويتم ذلك عن طريق أخذ عينة صغيرة وترحيله كهربائياً على هلام الأغاروز حتى يظهر كحزمة واحدة، أما إذا كان الحمض النووي محطماً فإنه يظهر كمسحة ضبابية من موقع بداية الهجرة نحو القطب الموجب، إذا ما كان الحمض النووي معقداً، كما هو الحال عند الجراثيم أو الفطور أو النباتات أو الحيوانات.

أما إذا كان النموذج يخص حمضاً نووياً صغير الحجم، كالبلاسميدات أو الفاجات أو الميتوكوندري أو غيرها فإنها تظهر عند الرحلان كحزمٍ عدة.

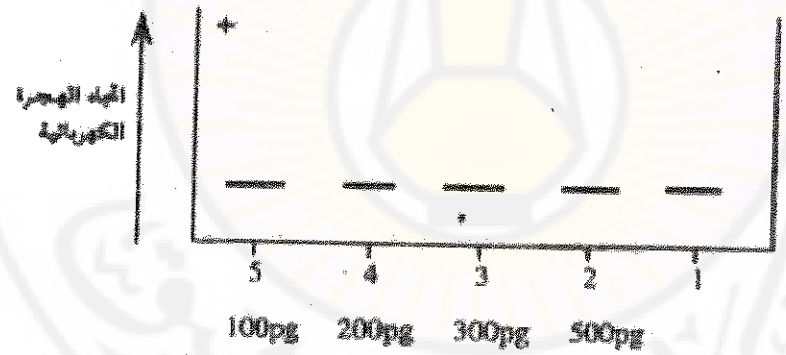



(شكل 81) يبين المراحل التي يتم من خلالها إعداد المكتبة الجينية، والتي تبدأ بتحضير الحمض النووي، ومن ثم إجراء العزل من خلال الرحلان الكهربائي، وفي مرحلة تالية تتم عملية غرس مختلف القطع في النواقل المناسبة .

أما وجود الـ RNA فلا يعد عامل تلوث، ولا يتأثر وجوده بأنزيمات القطع، ويمكن التخلص منه عند الاستخلاص بإضافة أنزيم RNAase قبل استخدام الفينول والكلوروفورم وإجراء عملية النبذ المركزي.

يتم بعد ذلك التأكد من عدم تكسر الحمض النووي وعدم تلوثه، ثم حساب تركيزه وضبطه عن طريق إضافة الماء المقطر، ويتم تقدير كمية الحمض النووي باستخدام جهاز مقياس الطيف الضوئي عند طول الموجة 260 انغستروماً، وهو طول الموجة التي يمتصها الـ DNA.

كما يمكن حساب تركيز الحمض النووي بطريقة تقديرية، عن طريق تهجير نموذج معين الحجم من الحمض النووي مجهول التركيز كهربائياً عبر الهلام، مع نماذج متعددة من الحموض النووية معروفة التراكيز، ومن ثم مقارنة التراكيز المعلومة مع المجهولة لتقدير تركيز النماذج المختبرة.

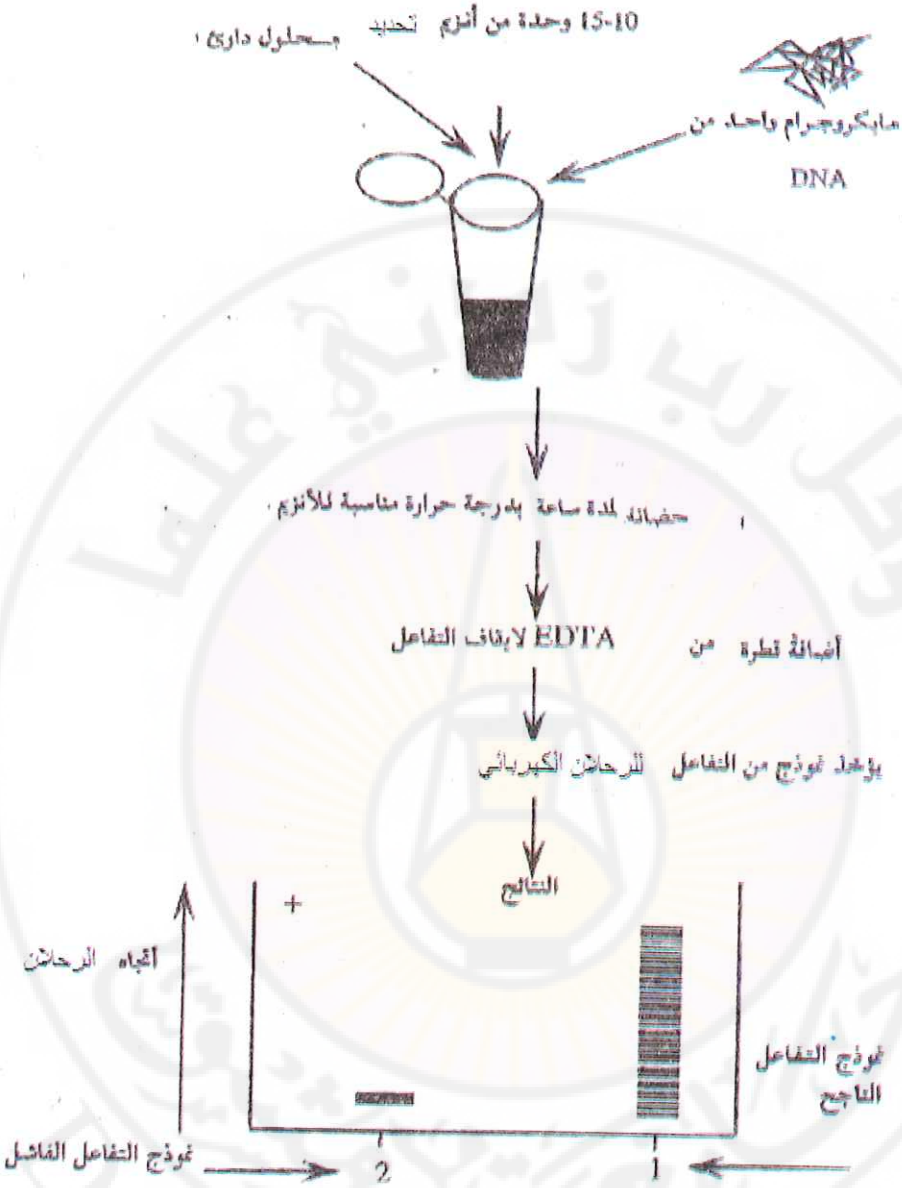



(شكل 82): توضح طريقة استخدام الرحلان الكهربائي على هلامة الأغاروز، لتقدير تركيز الحمض النووي DNA المجهولة بالمقارنة مع تراكيز معروفة
1- تركيز مجهول ، 2-3-4-5- تراكيز معروفة.

نقوم بعد التأكد من صلاحية الحمض النووي ومعرفة تركيزه باختيار أنزيمات التحديد المناسبة لعملية التنسيل وأهدافها، ثم نضيف تركيزاً مناسباً من الحمض النووي في أنبوبة التفاعل، نضيف بعد ذلك محلولاً دارئاً (واقياً) خاصاً بالأنزيم، ويجب أن يحتوي هذا الدارئ على شوارد المغنيزيوم mg++ وعامل مختزل مثل الديثايوثيروتول Dithiothreitol لإبقاء الأنزيم مستقراً ومنع تثبيطه، وكذلك لتوفير الـ PH المناسب.

يتم بعد ذلك إضافة الأنزيم بالتركيز المناسب (وحدة لكل ميكروغرام من الحمض النووي) ويتم الحضن في الدرجة 37.5 لمدة ساعة أو أكثر قليلاً، مع إضافة كمية زائدة من الأنزيم لضمان نجاح التفاعل.

يتم إيقاف التفاعل بإضافة قطرات صغيرة من محلول EDTA الذي يثبط شوارد المغنيزيوم ويوقف دورها. نقوم بعد ذلك بالتأكد من نجاح التفاعل عن طريق أخذ 1 ميكروليتر من محلول التفاعل وتهجيره كهربائياً على هلام الاغاروز، حيث يعد وجود مسحة ضبابية طويلة (في حال الحمض النووي المعقد) أو حزم عدة (في حال الحمض لنووي البسيط) نجاحاً للتفاعل (شكل 83).




(شكل 83) يبين الطريقة التي يتم من خلالها التأكد من نجاح عملية التقطيع بواسطة أنزيمات التحديد، قبل القيام بعزل قطع الحمض النووي قبل تنسيلها في النواقل المناسبة، بهدف إنشاء المكتبة الجينية.

تؤدي عملية الهضم إلى قطع صغيرة ناتجة من تقطيع بعض الجينات، وهو أمر لايناسب ما ننتظره في الكائنات الراقية، ولذلك فإن أفضل طريقة للحصول على المطلوب هو تهيئة التفاعل ليحصل جزئياً، وذلك بإضافة كمية قليلة من الأنزيم أو بحضن التفاعل إلى مدة وجيزة، لعدم إعطاء الأنزيم الفرصة الكافية لتقطيع الحمض النووي كلياً، وبذلك يتم الحصول على نماذج من قطع الحمض النووي DNA مختلفة الحجم.

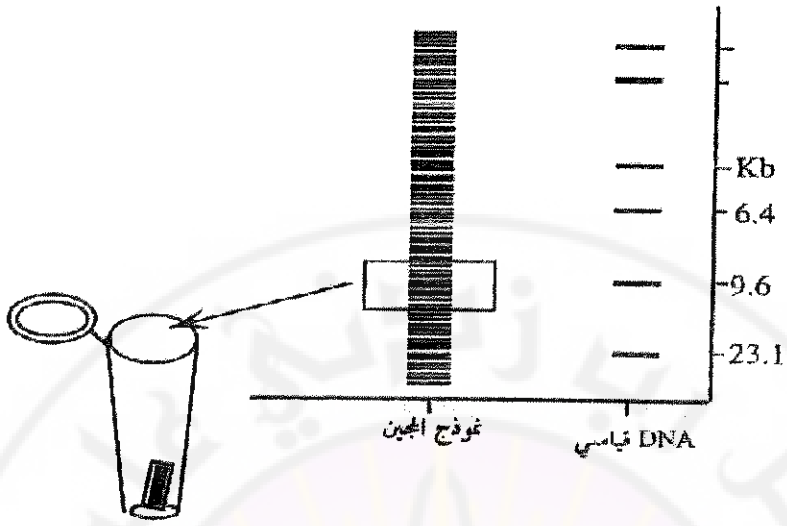
يتم بعد هذه المرحلة إجراء الرحلان الكهربائي على الهلام لعزل الـ DNA وفقاً لوزنها الجزيئي، وبوجود قطع حمض نووي معلومة الوزن الجزيئي بهدف المقارنة، ولفترة زمنية كافية لفصل الجزيئات وفقاً لوزنها الجزيئي.

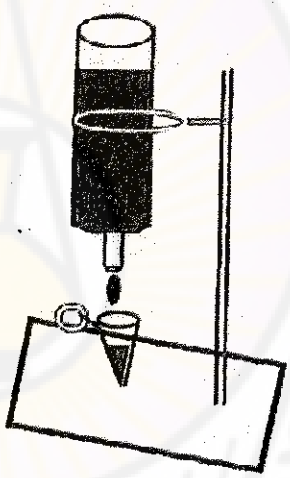
يتم بعد ذلك بصبغ الهلام ببروميد الاثيديوم (50 ميكروغرام / ليتر) لنصف ساعة ثم يفحص الهلام بالأشعة فوق البنفسجية لتحديد موقع قطع الـ DNA المناسبة.

### 2-2-2- استخلاص قطع الـ DNA من الهلام:

تتم عملية عزل قطع الـ DNA المناسبة بإحدى الطرق التالية:

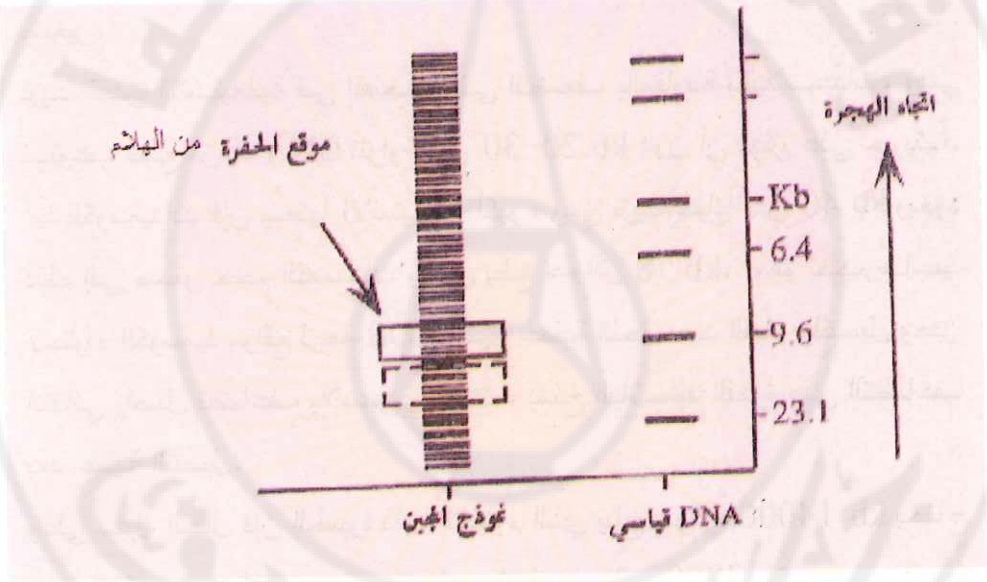
1- قطع أو قص موقع الهلام الذي يحتوي على قطعة الـ DNA المطلوبة، ومن ثم نقله إلى أنبوبة، ثم إضافة أنزيم الاغاروز Agarose إلى الأنبوبة للتخلص من الهلام، ثم تستخلص قطع الـ DNA المطلوبة باستخدام عمود السفيدكس G50 أو عن طريق الجين كلين، ويترسب الحمض النووي باستخدام الإيثانول المثلج (شكل84).



(شكل 84) يبين طريقة استخلاص قطع الحمض النووي عن طريق قص قطعة الهلام، التي تحتوي على الجزيء المختار وتقطيعها، مع إضافة المحلول الواقي، ومن ثم استعمال عامود الفيدكس G50 لفصل الحمض النووي عن المحلول، ويتم في البداية غسل العامود بمحلول ملحي ثم يوضع النموذج وتترك القطرات الأولى يتم بعدها جمع الحمض النووي، ومن ثم يتم إضافة الكحول الايتيلي المثلج بهدف ترسيب الحمض النووي، ومن ثم عزله بعد التثقيل والتجفيف والحل بالماء المقطر.

2 – يمكن أن تتم عملية العزل عن طريق عمل حفرة أمام قطعة الحمض النووي المطلوبة، ومن ثم ملؤها بالمحلول ET يتم بعد ذلك استئناف الرحلان لمدة قصيرة، بحيث يتم وصول القطع المراد جمعها في المحلول الموجود في الحفرة، يتم بعد ذلك أخذ المحلول للحصول على القطع المطلوبة، وتتم بعد ذلك عملية تنقية المحلول من بروميد الاثيديوم والأملاح، ثم ترسب القطع بإضافة الكحول المثلج. يتم بعد ذلك حساب تركيز قطع الحمض النووي بعد ترسيبها وتجفيفها وإذابتها بميليلترات عدة من محلول ET أو الماء المقطر (شكل 85).




(شكل 85) يبين الطريقة التي يتم من خلالها استخلاص قطعة من الحمض النووي ذات وزن جزيئي محدد، والذي يتم من خلال صنع حفرة في الهلام تقع بعد الحزمة التي نريد عزلها، يضاف إلى الحفرة محلول TE، ويتم من ثم متابعة الرحلان لمدة محددة يتم إثرها جمع المحلول من الحفرة، والذي يحتوي على قطع الحمض ذات الوزن الواحد , يمكننا متابعة الرحلان لعزل القطع التالية بشكل مماثل، والتي يمكن استعمالها في بناء المكتبة الجينية.

**2-2-3- اختيار الناقل المناسب:**

يتعلق خيار الناقل إلى حد كبير بحجم جزيء الـ DNA التي نريد غرسها، نظراً إلى تباين السعة الاستيعابية للنواقل، فالبلاسميدات لاتستطيع أن تحمل القطع التي يزيد حجمها عن 10 kb. وغرس قطعة أكبر في البلاسميد يؤدي إلى فقدان استقراريته مع زيادة في احتمال انحلال البلاسميد، ويمكن استخدام البلاسميدات لبناء مكتبة جينية للإنسان، ولكن شرط ألا يغرس في كل بلاسميد أكثر من 10 kb وبذلك فإننا نحتاج إلى نصف مليون بلاسميد منسل لاستيعاب كامل الجينوم أو معظمه. لذلك فإن البلاسميدات تكون أكثر ملاءمة عندما يكون الجينوم للكائن صغير.

تزيد القدرة الاستيعابية في الفاجات إلى الضعف بالمقارنة بالبلاسميدات، وهي تستوعب قطع من الـ DNA تتراوح بين 30-20 kb دون أن يؤثر على حيويتها. أما الكوسميدات فإن سعتها الاستيعابية أكبر، وهي تزيد أحياناً عن 40 kb ويعود ذلك إلى صغر حجم الكوسميد، والذي يبلغ حوالي 8 kb، وهو حجم مناسب لاحتواء الكوسميد مواقع لزجة COS تسهل عملية اللحام عند القيام بالتنسيل وجين انتقائي واصل تضاعف بلاسميدي المنشأ، يمنح البلاسميد القدرة على التضاعف بعد عملية التنسيل.

وعلى سبيل المثال فإن الخميرة ذات الجينوم الذي يبلغ حوالي 14000 kb يحتاج حتى نتمكن من تمثيل جميع جيناته في مكتبة جين إلى 3000 بلاسميد من النمط PBR322 أو 1000 من الفاج لمبدا أو 300 كوسميد، وذلك عند استخدام قطع من الـ DNA 10 – 20 – 30 kb على التوالي.

**2-2-4- بناء المكتبة الجينية وتعليبها وتضخيمها:**

بعد أن تتم عملية تقطيع الحمض النووي وتفريده باستعمال التثفيل الفائق أو بواسطة الرحلان الكهربائي، يتم اختيار القطع المحددة ليتم لحمها في الناقل

المناسب الذي يتم تحضيره بما يتناسب مع النهايات الموجودة في قطع الحمض النووي التي نريد غرسها.

يتم من خلال عملية اللحام هذه الحصول على جزيئات الحمض النووي المؤشب، والتي تكون جاهزه للتعليب مخبرياً وبذلك يتم الحصول على المكتبة الجينية الأولية أو الابتدائية، والتي تتكون من فاج مؤشب مفرد يتم غربلته، ومن ثم تضخيمه بواسطة زرع الفاج المعلب في علب بتري تحتوي على سلالة العائل المناسب من العصية القولونية E.colie يتم فيما بعد تعليق الروائق بالغسل اللطيف بمحلول منظم، ويمكن أن نخزن المعلق إلى فترات زمنية طويلة لحين الاستخدام.

### 2-2-5- التنسيل في الكروموزومات الصناعية:

أصبح حالياً متاحاً استخدام الكروموزومات الصناعية في عملية تنسيل قطع الـ DNA الكبيرة ( كما هو الحال بالنسبة لكروموزومات الخميرة الصناعية ) في عمليات التنسيل، وهذا ما يؤدي إلى إختزال عدد النسائل اللازمة لإنتاج المكتبة الجينية لكائن ويقود إلى تبسيط في وضع الخريطة الوراثية لها.

إن العديد من الجينات لدى حقيقيات النوى كبيرة، وهي أطول من 40 kb وهذا ما يجعل من عملية تنسيلها في البلاسميدات والفاجات والكوسميدات أمراً غير ممكن وبالتالي يكون من الصعوبة تحديد تركيب الجين، مما يستدعي استعمال نواقل أكثر استيعاباً، وبالتالي استعمال الناقلات الكروموزومية الصناعية.

يتم تجهيز الناقل الكروموزومي عن طريق المعاملة بواسطة الهضم التحديدي الثنائي، الذي يحرر متتاليات الناقل الموجودة في التيلوميرات (النهايات الطرفية للكروموزومات)، وهذا ما يؤدي إلى شطر الناقل عند موقع التنسيل محولاً إياه إلى ذراعين، ومن ثم يتم لحم قطعة الـ DNA الكبيرة التي نريد غرسها بعد تحضيرها

عن طريق لحمها في موقع التنسيل، وتستعمل الصفات الانتخابية الموجودة في الذراعين لاختيار الكروموزومات صحيحة البناء، ومن ثم انتخابها وتكثيرها.

**3- التفاعل السلسلي للبوليميراز Polymerase chain reaction (P.C.R )**

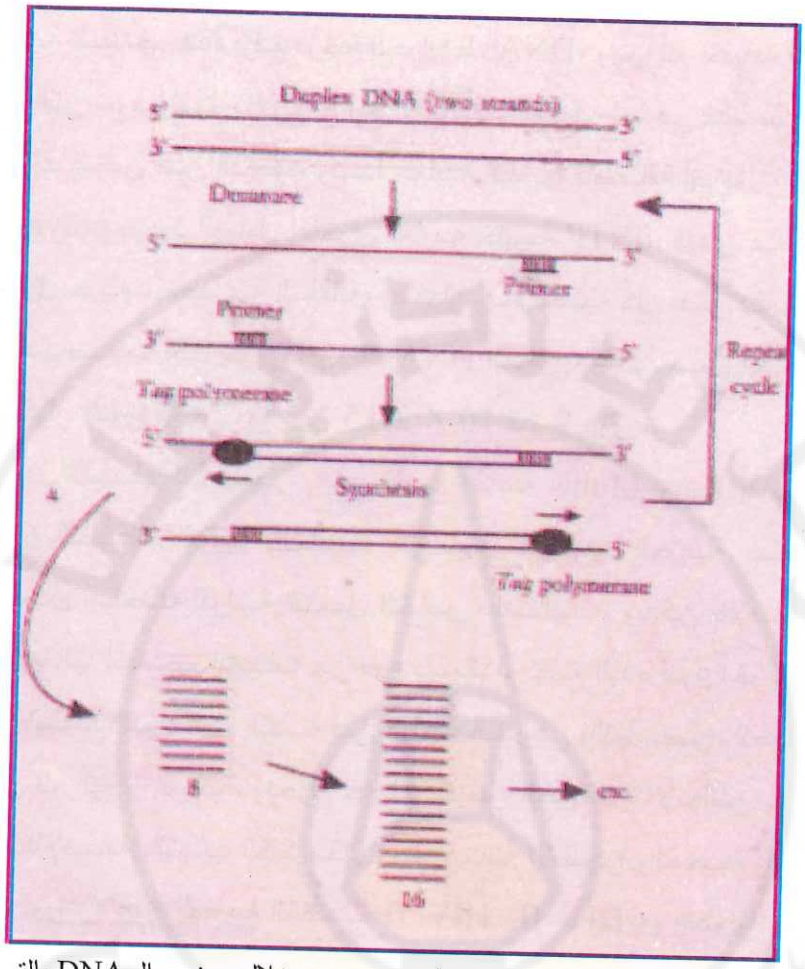
كان لوضع هذه التقانة أهمية كبيرة، وقد شكلت ثورة في عالم البيولوجيا الجزيئية، حيث مكنت من التضخيم Amplification الاصطفائي لسلاسل من الحمض النووي DNA. والمبدأ في حصوله إلى حد ما بسيط، ويعتمد على إحداث الدنترة لجزيء DNA وتحويله إلى سلسلتين مفردتين، ومن ثم اصطناع سلاسل متممة لكل من هذه السلاسل المفردة، وبتكرار العملية عدد من المرات فإنه يمكن الوصول إلى زيادة في أعداد النسخ لهذه السلسلة، بحيث نصل إلى أعداد ضخمة جداً.

إن تطبيق الاصطفائية في تضخيم جزيء ما يعتمد على استعمال البادئ المناسب، وبالتحديد بادئان بحيث يكون لكل سلسلة بادئ نوعي خاص، ومن المعروف أن البادئة Primer هو عبارة عن قليل نيكلوتيد Oligonucleotides، ويجب توفر هذه البادئات بالكم المناسب عقب كل مرحلة دنترة Denaturation، ومن المعروف أن أنزيم بلمرة الـ DNA لايعمل إلا بوجود هذه البادئة التي تتكامل مع بداية السلسلة 3`، وبحيث يتم تركيب السلسلة بالاتجاه 5` ← 3`.

كما يتطلب حصول التضخم وجود أنزيم البلمرة الذي يمكن أن يتخرب (كباقي البروتينات) عند ارتفاع درجة الحرارة عند الدنترة، ولتفادي إضافة هذا الأنزيم بشكل متكرر فقد تم استعمال أنزيم DNA Polymerase الموجود في الجراثيم المحبة للحرارة Thermus aquaticus والتي تعيش في الينابيع الحارة، ويدعى هذا الأنزيم بـ Taq polymerase ويعد هذا الأنزيم مقاوماً للحرارة ولا يتخرب بارتفاعها.

تتم عملية التضخم هذه برفع درجة الحرارة للـ DNA، ومن ثم إضافة البادئات النوعية التي سوف تقوم بالازدواج مع المتتاليات المكملة لها في كلتا سلسلتي الـ DNA الناتجتين من الدنترة، وتبدأ عملية البلمرة بإضافة أنزيم Taq polymerase بوجود العوامل الأخرى اللازمة خاصة dNTP. تؤدي هذه العملية إلى تشكيل جزيئات مضاعفة السلسلة، وبتكرار هذه العملية كل عشر دقائق نصل إلى أعداد ضخمة جداً من جزيء الـ DNA المعني، وعلى سبيل المثال فإننا نصل بتكرار الدورة ثلاثين مرة على 2.15 X 10 قوة 9 جزيء.

إن للتفاعل السلسلي للبوليميراز والذي وضع أساسه Kary-Mullis عام 1985 العديد من التطبيقات البحثية والتطبيقية في مجال البيولوجيا الجزيئية. يمكن على سبيل المثال استعماله لدراسة التنسيل الخاص بالمتتاليات. ويمكن بالإضافة إلى ذلك استعمالها لتضخيم الجينات من نوع باستخدام تتابع البدء لنوع آخر. وكذلك يمكن الاستفادة من هذه التقانة في الطب الشرعي والتشخيص للعديد من الأمراض الوراثية و الوبائية. ويجري حالياً تشخيص العديد من الأمراض عبر هذه التقانة: كالإصابة بالتهاب الكبد مثلاً ، وفيروسات الانفلونزا والحصبة والفيروس المسبب لمرض عوز المناعة المكتسب (HIV I, HIV II ) و انفلونزا الخنازير وأمراض السرطان المختلفة (شكل86).




(شكل 86): تفاعل P.CR وهو يتم كما هو مبين من خلال جزيء الـ DNA بالتسخين ليعطي سلاسل مفردة، ومن ثم إضافة البوادئ و أنزيم Taq Polymerase و النيكلوتيدات d(NTP) ليتم بناء سلاسل متممة، عن طريق إطالة البادئ وتكرار العملية لعدد من الدورات وفقاً لكمية السلاسل المطلوب اصطناعها.

Damascus University

# الفصل السادس

# تطبيقات الهندسة الوراثية

تعد التطبيقات العديدة والهامة التي شهدتها تقانة الهندسة الوراثية من أهم عوامل تقدمها بشكل سريع يفوق ما كان متوقعاً، وقد كانت سبباً في فهمنا للعديد من الظواهر الحيوية لدى الكائن الحي، حيث مكنتنا هذه التقانة من التعرف على دقائق الأفعال التي تتم داخل الخلايا، وقد أصبح من الطبيعي أن نستمع في كل يوم إلى أخبار عن توصل العلماء إلى كشف جديد ذي أهمية في المجالات المختلفة.

تعد هذه التقانة بما تقدمه من تطبيقات ثورة حقيقية، سواء كان ذلك في مجال الزراعة أم الصناعة أم في الجوانب الطبية التشخيصية أو العلاجية، بالإضافة إلى مساهمتها في فهم الآلية التطورية.

ويعول كثيراً في هذه الفترة على هذه التقانة في حل الكثير من المعضلات التي تواجة البشرية، ومنها المشكلات الغذائية التي تتفاقم في العالم مع التزايد السكاني الكبير، وتزداد يوماً بعد يوم الأنواع المحورة وراثياً النباتية منها والحيوانية التي يتم وضعها موضع الاستعمال، والتي يبدو أنه لامناص من اللجوء إليها عاجلاً أم آجلاً، ومن الأمور التي استعملت فيها البيولوجيا الجزيئية، والتي أعطت نتائج هامة:

**1- تحليل البنية ووظيفة الجين.**

إن لمعرفة تركيب الجين وطريقة التعبير عنها دوراً هاماً، وقد ساهمت تقانات البيولوجية الجزيئية والوراثة الجزيئية دوراً هام في التعرف على بنية هذه الجينات، ومعرفة متسلسلها ومتسلسل المناطق التي تدخل في تنظيمها، وتفيدنا معرفة هذه

المتتاليات للجينات في مقارنتها من ناحية مع النمط الطبيعي، مما يساهم في التعرف على الطفرات الموجودة من ناحية أخرى، و يعطينا فرصة للمقارنة بين نماذج هذه الجين في الأنواع المختلفة، كذلك يمكننا من خلال هذا التحليل التعرف على المناطق المهمة في الجينات، ومن أهم العوامل التي يجب التعرف عليها هو ما يتعلق بالتفاعل بروتين DNA، أي التعرف على مناطق الجين التي يرتبط بها البروتين (كأنزيم بلمرة RNA – أو البروتين الكابح وبعض البروتينات التنظيمية الأخرى ) ويمكن كشف هذه المناطق عن طريق استخدام تقانات خاصة تعتمد على وجود هذه البروتينات المرتبطة على الجين، والتي تمنع عمل الأنزيم المحلل لـ DNA من الوصول إليها، على عكس المناطق الأخرى التي تكون عرضة لهذه الأنزيمات.

أما دراسة التعبير الجين فيمكن أن تتم عن طريق: إما تحويرها بعد عزلها وتوصيفها، ومن ثم التعرف على التغيرات الحاصلة نتيجة ذلك، أو عن طريق استعمال المسابر التي تم الحصول عليها من المتتاليات المنسلة في تقدير الـ RNA للبروتين في الظروف المختلفة، أدت هذه الدراسات إلى توصل العلماء إلى فهم أفضل لآلية تعبير هذه الجينات عن نفسها، وطريقة عملها في مختلف أنماط الخلايا.

ومن الطرائق المستعملة لتحديد المناطق الأكثر أهمية في التعبير الجيني هو إجراء الحذف لبعض مناطق الجين، باستعمال أنزيم القطع الخارجي (Exonmcleose III)، ومن ثم دراسة أثر هذه الحذوفات على التعبير الجيني، مما يؤدي بالتالي إلى معرفة المناطق التي يزداد أو ينقص فيها النسخ، حيث يعد مقدار كمية الحمض الريبي النووي الرسول مقياساً لقدرة المورثة على التعبير عن نفسها، ويمكننا ذلك إما عن طريق المسبار الخاص بالـ DNAc المكمل أو المسبار الخاص بالـ RNAm.

## 2- تمييز الجينات:

من الممكن أن نميز الجينات وأن نحدد موقعها على الكروموزوم عن طريق المعاملة بأنزيمات القطع الداخلي، ومن ثم تطبيق الرحلان الكهربائي بوجود مسبار معلم، الذي يقوم بالتهجين على قطعة الحمض النووي، التي تحتوي على الجين المعنية بشكل كلي أو جزئي.

كما يمكن أن يتم هذا التهجين خارج الخلية In situ Hybrigation، والذي يمكن إنجازه عن طريق تحضير الانقسامات على الشرائح بالطريقة نفسها التي تطبق للحصول على الكروموزومات اللازمة لدراسة الطابع النووي Karyotype، باستعمال مادة الكولشيسين Colchesin التي تؤدي إلى إعاقة إتمام الانقسام، وتجميع الكثير من الخلايا في المرحلة الاستوائية من الانقسام بسبب تخريب خيوط المغزل المسؤولة عن سحب الكروموزومات وتوزيعها على خلايا الجينات.

يتم بعد نشر الخلايا على الشرائح وتثبيتها، بواسطة الكحول وحمض الخل الثلجي، إحداث الدنترة لجزئيات الـ DNA باستعمال الحرارة العالية مثلاً، يتم بعد ذلك حضن الشرائح مع محلول التهجين الذي يحتوي على المسبار المعلم لمدة /24/ ساعة، يتم إثر ذلك إزالة المواد الفائضة عن التهجين بواسطة الغسل المتكرر.

تقوم في مرحلة تالية تغطية الشرائح بالهلام الفوتوغرافي، ووضعها في مكان مظلم، ويتم الاحتفاظ بها في هذا المكان في الدرجة $70^{\circ}$ لمدة تبلغ حوالي عشرة أيام. تصبغ الشرائح بعد ذلك بالملون غمزاً، وتفحص تحت المجهر للبحث عن المواقع التي يقع بها الجزء المعلم على الكروموزومات، وهو يمثل موقع الجين وهو الموقع الذي تكامل مع المسبار المعلم.

تظهر هذه المواقع عادةً على شكل بقع سوداء فضية على الهلام مناظرة لموقعها على الكروموزومات، وبهذه الطريقة يمكننا أن نحدد موقع هذه الجينات، ولا بد هنا من الإشارة إلى وجود مواقع غير صحيحة لهذه البقع، ويجب التعرف عليها و

تمييزها عن تلك الصحيحة عن طريق إحصاء جميع البقع الفضية لكل كروموزوم وتحليلها في عينات عديدة وإجراء تحليل إحصائي يمكننا من التعرف على المواقع الأكيدة للجين.

وللتعرف على جين بشري ما مثلاً يؤخذ الـ DNA البشري المستخلص من خلايا الدم البيض الذي نعامله بواسطة أنزيم تحديد مثل ECOR-I، وتطبق عليه بعد ذلك الرحلان الكهربائي على هلام الأغاروز، نقوم بعد ذلك بعزل حزم الحمض النووي بمعاملة الهلام بمحلول أساسي، لفصل حزم الحمض النووي الذي يثبت على ورقة النتروسللوز أو النايلون وفقاً لطريقة وذمة ساوثرن، ومن ثم تثبيت حزمة الـ DNA الهدف على الورقة باستعمال الحرارة $80^{\circ}$، ويضاف بعد ذلك محلول التهجين الذي يحتوي على المسبار النوعي، وبعد 18- 24 ساعة نغسل الورقة من المواد الفائضة، وتغطى بفلم أشعة X وتحفظ في غلاف خاص عند الدرجة $70^{\circ}$ لمدة عشر ساعات، يظهر الفلم بعدها وتحلل النتائج.

### 3- هندسة البروتينات:

من الأمور الهامة التي شغلت العاملين في مجال الهندسة الوراثية هو السعي إلى التغيير في بنية الجين، الذي أصبح متاحاً عن طريق تقانة التطفير Mutagenesis في المخبر، وهذا ماجعلنا أكثر فهماً للأحماض الأمينية الرئيسة في البروتين، والتي يمكن أن تمثل موقعاً للتطفير، وبالتالي تغيير خواص البروتين من الناحية الغذائية لبروتين تخزيني، أو تحسين الثبات لبروتين صناعي أو المستخدم لأغراض طبية.

## 4- الهندسة الوراثية والتقانة الحيوية:

تمثل الهندسة الوراثية عاملاً هاماً في تقدم التقانة الحيوية، التي تطورت بشكل مثير، وقد أدت الهندسة الوراثية إلى الوصول إلى أحياء دقيقة محورة قادرة على تصنيع بروتينات محددة ذات أهمية طبية أو صيدلانية، يتم صنعها عادةً من قبل بعض الحيوانات بكميات محدودة، وقد أضحى من الممكن تصنيع هذه البروتينات بكميات تجارية كبيرة وبكلفة ضئيلة، بالاعتماد على الأحياء الدقيقة المحورة وراثياً، ومن الأمثلة على ذلك:

### 4-1- تركيب الهرمونات البشرية:

يعود الكثير من الأمراض عند الإنسان إلى غياب أو نقص لأحد البروتينات الهامة، وغالباً ما يؤدي هذا النقص إلى اضطراب وظيفي، ومن الأمثلة على ذلك مرض السكري والذي يعود إلى غياب هرمون الأنسولين ذي الطبيعة البروتينية، والذي يتم إفرازه عادة من الجزء الأصم في البنكرياس.

يقوم هرمون الأنسولين عادة بتنظيم مستوى الغلوكوز في الدم ليبقى عند حدود معينة، ويقوم الأنسولين بذلك عادةً عن طريق تنظيم مرور الغلوكوز إلى الخلايا عبر أغشيتها، وهكذا يؤدي نقص هذا الهرمون إلى ارتفاع نسبة السكر في الدم، ويقود إلى اضطرابات عديدة تؤثر في مختلف الوظائف عند المريض، ويتم علاج المصابين بمرض السكري عن طريق تعويضه عن الأنسولين الناقص لديهم. والأنسولين المستعمل لهذا الغرض هو المستخلص من بنكرياس بعض الحيوانات كالأبقار والخنازير، غير أن هذه الهرمونات يمكن أن تكون غير مناسبة للعديد من المرضى نتيجة للتباين في التركيب بين الأنسولين البشري و الحيواني، بالإضافة إلى ارتفاع في احتمال التلوث أثناء عملية الاستخلاص ببعض العوامل الحيوية كالفيروسات مثلاً، لذلك فإن الأسلوب الأمثل هو صنع واستعمال الأنسولين

البشري، والذي أصبح متاحاً من خلال تقانة الهندسة الوراثية من قبل الكائنات الدقيقة، خاصة أنه لا يجري أي تحوير على بروتين الأنسولين بعد تركيبه الذي يتم من خلال عملية الترجمة.

والجدير ذكره أن الأنسولين هو بروتين يتألف من سلسلتين ببتيديتين مرتبطتين بجسور كبريتية، تتألف السلسلة الأولى (ألفا) من 21 حمضاً آمينياً أما السلسلة الثانية (بيتا) فهي مركبة من 30 حمضاً أمينياً.

يتم عادة تركيب الأنسولين في الخلايا البنكرياسية بيتا، حيث يتم تركيب السلسلتين ألفا وبيتا اللتين ترتبطان بسلسلة ثالثة من النمط C، وبعد أن تتشكل الجسور الكبريتية بين السلسلتين ألفا وبيتا تتم إزالة السلسلة C، وبذلك يتم إنتاج الأنسولين الطبيعي.

يركب هرمون الأنسولين بإشراف جينين معروفتي التتالي سهلتي العزل والتشخيص بواسطة المسابر الخاصة وأصبحت هذه الجينات متاحة للشراء في الأسواق، بهدف استعمالها في تقانات الهندسة الوراثية، حيث يمكن أن نقوم بتضخيمها باستعمال تقانة تفاعل السلسلي للبوليمراز ( P.C.R)، يتم فيما بعد غرس هذه الجينات في النواقل المناسبة التي تحتوي على مواقع التحفيز Promoters الجرثومية.

يجري فيما بعد ذلك إدخال النواقل المحورة إلى الجرثوم E.colie بطريقة التحول، ونقوم بعد ذلك بتنمية هذه الجراثيم على الأوساط الغذائية المناسبة، يجري بعد ذلك استخلاص السلاسل الببتيدية من وسط الزراعة و تخليصها من أنزيم بيتا غلاكتوزيداز المرتبط بها، عن طريق المعالجة بمادة بروميد السياتوجين.

وتتشكل بين السلسلتين ألفا وبيتا روابط كبريتية بشكل تلقائي، ليصبح – بعد التأكد من عدم وجود قطع من أنزيم بيتاغلاكتوزيدز – فعالاً وقابلاً للاستعمال.

وقد استعملت تقانة الهندسة الوراثية في اصطناع عدد كبير من الهرمونات، ومنها الهرمونات البشرية المنظمة للنمو، كما هو الحال بالنسبة لهرمون السوماتوتروبين

Somatotropin الذي يعمل على إطالة العظام البشرية، وهرمون السوماتوستاتين الذي يعمل بشكل معاكس للهرمون السابق، أي انه يعيق النمو الطولي للعظام ولهذين الهرمونين أهمية كبيرة، حيث يستخدم الأول لعلاج التقزم، في حين يستخدم الثاني لمعالجة الطول المفرط.

يبلغ هرمون السوماتوستاتين من 14 حمضاً آمينياً، في حين يبلغ طول هرمون السوماتوتروبين من حوالي 191 حمضاً آمينياً، أي يشفر بجين كبيرة الحجم، ونظراً إلى ذلك فإنه يتم استخدام الـ DNAc المكمل المستخلص من المكتبة الجينية من المستعمرات المجهزة لذلك، أما عملية تصنيع هرمون السوماتوستاتين فيتم بالتقنية نفسها التي يتم بها إنتاج هرمون الأنسولين في جرثوم الـ E.colie، وقد تم باستعمال تقانات مماثلة تقريباً إنتاج أنماط مختلفة من الهرمونات كالانترفيرون وغيره.

تؤدي الاختلافات التركيبية الموجودة بين الجينات البشرية والأحياء الدقيقة إلى صعوبات كبيرة في عملية إنتاج الهرمونات، حيث من المعروف -كما ذكرنا سابقاً- أن الجينات البشرية تحتوي على الأنترونات مع الأكسونات، في حين أن الأمر مختلف لدى الكائنات الدقيقة التي لا تحتوي جيناتها سوى على الأكسونات لذلك تفشل الجراثيم أحياناً في عملية نسخ الـ RNA الرسول ناضج الخاص بالجينات البشرية، ولهذا فان استعمال الجراثيم قد اقتصر فقط على إنتاج الهرمونات البشرية، من خلال استعمال الجينات المصنعة أو باستخدام الـ DNAc، أما الحيوانات الراقية فتستطيع وبسهولة التخلص من الأنترونات بعد عملية نسخ الـ RNA نظراً إلى امتلاكها النظام الأنزيمي الخاص بذلك.

لهذا فان الحيوانات الراقية اللبونة قد أصبحت هدفاً باستعمالها لإنتاج هذه الهرمونات، وغالباً ما يتم ذلك عن طريق غرس الجين البشري المعني بناقل مناسب في النواة الأولية الذكرية أو الأنثوية لبيضة حديثة، عن طريق الحقن

المجهري، ومن ثم وضعها في رحم أنثى حاضنة، وقد سجل أول استخدام لهذه الحيوانات لإنتاج هذه الهرمونات عام 1980، عندما استخدمت الفئران لإنتاج هرمون السوماتوتروبين البشري وتم فيما بعد تطبيق التقانات نفسها على الأنماط الأخرى من الحيوانات كالخراف والخنازير والدجاج.

كما استخدمت الحيوانات للأغراض العلاجية وزراعة الأعضاء لإنتاج عوامل تخثر الدم اللازمة لعلاج مرض الهيموفيليا، وقد طورت بعض السلالات الحيوانية التي يمكن استخدامها في عملية زرع الأعضاء عند الإنسان، دون أن تشكل خطراً لرفضها مناعياً.

**5- النباتات المحورة وراثياً:**

لقد عمل البشر، ومنذ قديم الزمان، على تحسين الأنواع عن طريق التربية الصحيحة، وقد سجل ذلك نجاحاً واضحاً في تحسين الأنواع الزراعية، وقد تم ذلك بشكل دائم عن طريق التهجين بين أنواع أفراد مصطفاة ومختارة من أفراد النوع الواحد.

غير أن تقانة الهندسة الوراثية قد منحتنا إمكانية أكبر اعتماداً على نقل جينات من فرد إلى آخر من النوع نفسه أومن نوع آخر، والتي تهدف إلى إحداث تغيرات تؤدي إلى تحسين إنتاجية المحاصيل من الناحية الكمية والناحية النوعية، كما ويمكن أن يكون الهدف من ذلك زيادة مقاومة الأمراض، أو زيادة المقاومة لمبيد حشري أو مقاومة لحشرة أو لفيروس، وقد يكون الهدف تحسيناً لتحمل البرد أو تحمل الجفاف أو تحمل في زيادة ملوحة التربة، وقد تهدف العملية إلى زيادة كفاءة المحافظة على الطاقة، أو إلى إكساب النبات قدرة أكبر على تثبيت الآزوت الجوي، كما يمكن أن يكون بهدف زيادة القيمة الغذائية، عن طريق تحسين القيمة الغذائية للبروتينات المخزنة، كما طورت بعض عمليات التحسين التي تهدف إلى

زيادة عمر التخزين لبعض أنماط الفواكهه والخضروات، وكذلك التحسينات الهادفة إلى جعلها أكثر جاذبية للمستهلك عن طريق تحسين لونها وشكلها وحجمها وغيرها من الصفات التي تعطى صفات إيجابية أخرى.

تم العديد من عمليات تحوير النبات عن طريق البلاسميدات Ti كناقلات لخلايا النبات.

تعد عملية إدخال DNA منسل في الخلايا النباتية أمراً كثير التطبيق، ويتم ذلك بطرائق عديدة من أهمها: مايتم بواسطة ناقل محدد، وأكثر هذه الناقلات استعمالاً هو البلاسميد Ti Plosmicl الموجود في أكزوبكتريوم Agzobcterium Tumifacieus وهي من جراثيم التربة التي تؤدي عادة إلى التدرن التاجي (في قمة النبات)، وتتم الإصابة به عبر جروح في الساق، ويعد البلاسميد Ti بما يحتويه من جينات هو المسؤول عن إحداث هذه الأورام، ويعد هذا البلاسميد كبير الحجم إذ يتراوح بين 140- 235 Kb، ويحدث الورم نتيجة لانتقال جزء من هذا البلاسميد إلى كروموزومات النبات، يحتوي هذا البلاسميد على منطقة خاصة بإحداث العدوى وثانية مسببة للسرطان في النبات T-DNA، وهي ترتبط مع محفز الأوبين أو النوبالين أو الأكروبين، وهي خاصة بإنتاج مشتقات أحماض أمينية غير عادية.

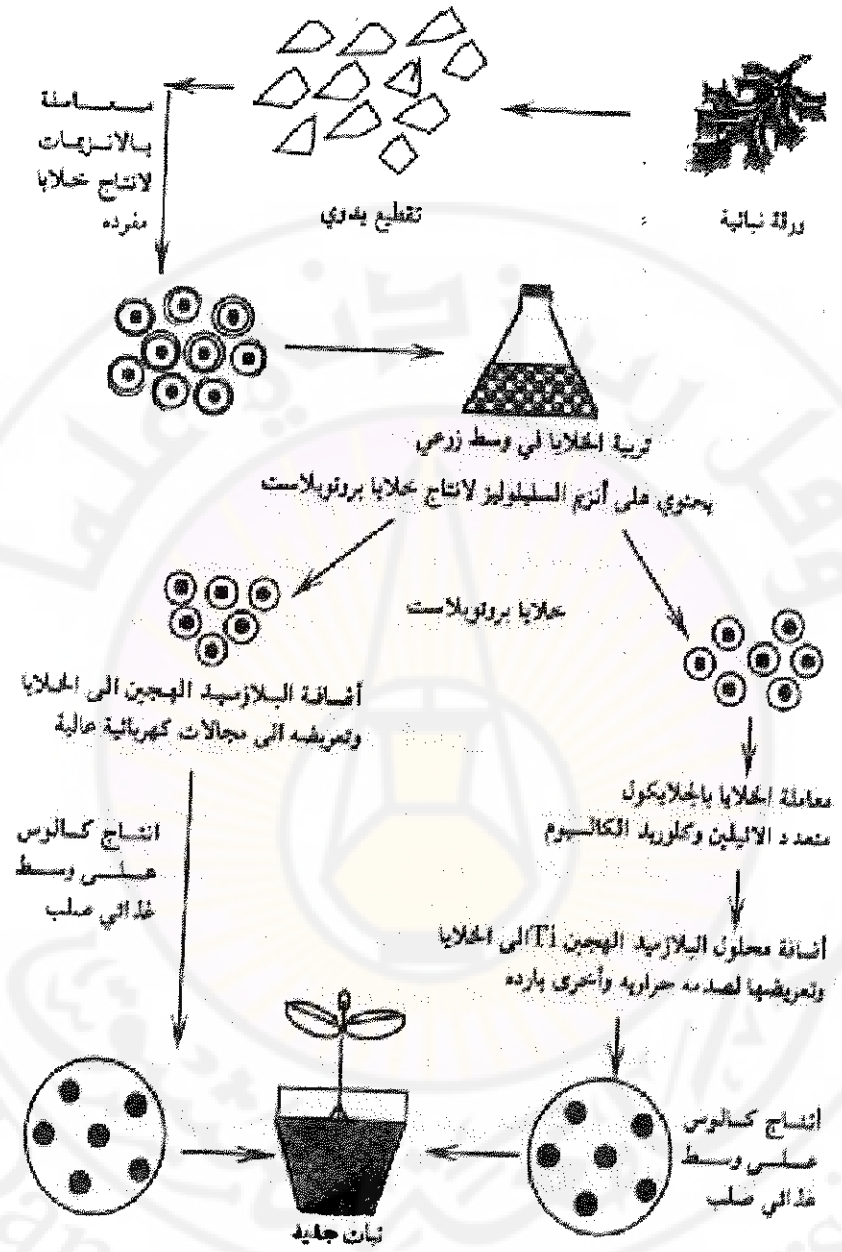
تعود أهمية البلاسميد Ti إلى قدرته على حمل جين ما مع القطعة T-DNA وبالتالي نقله إلى النبات. وقد تم تطوير هذا البلاسميد عن طريق إزالة الجين المسببة للورم بالأنزيمات القاطعة، وترك المناطق الأخرى الخاصة بالارتباط، وقد تم اشتقاق عدد من البلاسميد من Ti.

ولاستخدام هذا البلاسميد لغرس جين في نبات معين يتم بداية عزل وتنقية هذه الجين من أحد أنواع النبات التي يمتلك الصفة الهدف، ومن ثم الربط بالبلاسميد

الذي ينقل إلى جراثيم الأكروبكتريوم الذي يستعمل في إصابة النبات الذي نود أن نضم إليه هذه الصفة.

وقد تم استخدام هذا البلاسميد لتحسين إنتاج العديد من النباتات مثل: القمح والشعير والذرة وغيرها من النباتات الهامة اقتصادياً، وقد تم فيما بعد تطوير الأمر، بحيث يتم إدخال البلاسميد المحور مباشرة إلى الخلايا النباتية، دون استعمال جرثوم الأكروبكتريوم.

لقد استطاع العاملون في مجال الهندسة الوراثية وضع تقانة هامة، تعتمد على استخدام جراثيم الأكروبكتريوم المحور بجين معينة مضافة إلى البلاسميد Ti، حيث يتم تقطيع الأوراق النباتية وخلطها مع الجراثيم المحورة، تزرع هذه القطع بعد ذلك على أوساط غذائية مناسبة، أدت هذه المحاولات إلى إنتاج العديد من النباتات المحورة التي تميزت بصفات اقتصادية هامة مثل: منح النباتات القدرة على تثبيت الآزوت الجوي كسماد طبيعي وغيرها العديد من الصفات (شكل 87).




(شكل 87): يظهر الطريقة المستعملة للحصول على نبات **محور وراثياً**، من خلال إضافة البلاسميد المهجن إلى الخلايا التي تستعمل للحصول على نبات جديد محور وراثياً.

ومن التطبيقات المسجلة عند النباتات بهدف تحسين المحاصيل الزراعية:
نعرض على سبيل المثال:

**5-1- إنتاج أرز غني بفيتامين A:**

من المعروف أن الأرز ليس غنياً بالفيتامين A، وهذا ما يمثل مشكلة في مناطق واسعة من آسيا، حيث يعد الأرز الغذاء الرئيس لسكانها، ويؤدي العوز بالفيتامين A إلى العمى المبكر لذلك عمد الباحثون إلى نقل الجين الخاصة بإنتاج الفيتامين A إلى الأرز من أنواع أخرى، مما ساهم في حل هذه المشكلة، ويعمل الباحثون أيضاً من أجل الوصول إلى نوع محسن من الأرز الغني بالحديد، والذي يشكل عوزه إلى مشكلات خاصة كفقر الدم، حيث من المعروف أن الأرز يحتوي على مادة الفيتات Phytate والتي تتصف بمنعها امتصاص الحديد.

**5-2- إنتاج نباتات مقاومة لمبيدات الأعشاب:**

تمثل الأعشاب الضارة التي تنمو إلى جانب المحاصيل ضرراً كبيراً لهذه المحاصيل، عن طريق المنافسة للماء والغذاء، بالإضافة إلى أنها تشكل مأوى للأمراض والآفات، لذلك تم الوصول إلى نباتات مقاومة لمبيدات الأعشاب، مما يقلل كلفة المحصول وزيادة الإنتاج، ويتم ذلك عن طريق نقع البذور في المبيد العشبي قبل زراعتها، مما يؤدي إلى موت الأعشاب المحيطة، وقد تم تطوير نباتات عن طريق الهندسة الوراثية قادرة على مقاومة مبيد حشائش معين، غير ضار للحيوانات وسريع التحلل، وقد تم عزل الجينات الخاصة بذلك، ومن ثم إدخالها إلى العديد من النباتات.

### 5-3- إنتاج نباتات مقاومة للحشرات:

تم تطوير العديد من النباتات عن طريق إدخال جينات تشرف على إنتاج بروتينات Bt قاتلة للحشرات، تقوم هذه البروتينات بالارتباط على أعشية الأمعاء للحشرات بحيث تعطل تغذية الحشرات وبالتالي يؤدي إلى موتها، وقد تم من خلال هذه التقانة وقاية نبات القطن والتبغ والقرنفل من الحشرات، ويؤدي هذا التحسين إلى تخفيض استعمال المبيدات الحشرية بنسبة تصل إلى 60%، وبالتالي التقليل من أضرارها على الإنسان والحيوان والبيئة، كما تم تصميم جين فعالة ضد خنفساء كلورادو التي تصيب البطاطا، وأخرى ضد البعوض الناقل للملاريا.

وقد أكدت كل الإختبارات أن البروتينات Bt آمنة بيئياً نظراً إلى كمها الضئيل في النباتات المحورة، وهي لا تتعدى 0.1% من مجمل البروتين، بالإضافة إلى أن هذا البروتين يتحلل كباقي البروتينات في الأمعاء.

### 5-4- تطوير نباتات ذات مقاومة أكبر للفيروسات والبكتريا:

تمثل الفيروسات التي تصيب النباتات ضرراً كبيراً عليها، مؤدية إلى خفض الإنتاج وأحياناً إلى موت النبات كلياً، وقد استطاع العاملون في هذا المجال في جامعة واشنطن على سبيل المثال من نقل الجين المسؤولة عن إنتاج الغلاف الخارجي لفيروس تبرقش أوراق التبغ TMV إلى نبات البندورة، حيث عبرت الجين عن نفسها وأدى وجودها إلى زيادة القدرة على مقاومة الفيروسات، وقد عممت هذه الطريقة على نباتات أخرى مثل القرع والبطاطا وغيرها.

تمكن العاملون في مجال الهندسة الوراثية أيضاً من تطوير مقاومة الأنواع النباتية للفطريات والبكتريا، والتي تمثل عوامل قد تؤدي إلى تدمير المحصول بشكل كامل، وقد قام على سبيل المثال العاملون في هذا المجال بنقل جين مقاومة للفطر من نبات البرسيم إلى البطاطا، مما منح هذه الأخيرة قدرة على مقاومة الفطور.

### 5-5- تطوير النباتات لإبطاء نضج الثمار:

يتميز الكثير من الثمار بنضجها السريع بعد جنيها، والتي تبدأ بالتلف مباشرةً، بحيث تكون صعبة الحفظ لفترة زمنية طويلة بالإضافة إلى صعوبة نقلها، ومن ثم تصديرها إلى مناطق بعيدة وقد تم تطوير العديد من هذه النباتات، بحيث تصبح ثمارها مقاومة للتلف عن طريق إضافة جينات مضادة إلى الجينات المسؤولة عن النضج، والتي تقوم بإنتاج الايتلين، ويتم ذلك عن طريق اصطناع الجينات المضادة للنضج عن طريق اصطناع بروتينات ترتبط مع الـ RNA المسؤول عن إنتاج الإيتلين، وبالتالي منع اصطناعه، وقد طورت طريقة أخرى لتأخير النضج عن طريق دمج جين تعمل على تفكيك الإيتلين الذي يسبب سرعة النضج. كما تم على سبيل المثال إجراء تحوير وراثي، يساهم في الإقلال من استخدام المخصبات، كأن يتم نقل الجينات المسؤولة عن تثبيت الآزوت والمأخوذة من الجراثيم التي تتعايش مع جذور البقوليات إلى نباتات أخرى بحيث تصبح قادرة على تثبيت الآزوت، كما تم وبالطريقة نفسها نقل جينات تؤدي إلى تسريع نمو بعض النباتات كما حدث في نبات الأرز، وكذلك من أجل رفع كفاءة تمثيل ثاني أكسيد الكربون وبالتالي زيادة الإنتاج، وكذلك استعملت تقانة الهندسة الوراثية من أجل تخفيف سمية التربة، عن طريق جينات قادرة مثلاً على انتزاع مركبات الألمنيوم أو الزرنيخ من التربة، وأحياناً غرس بعض الجينات القادرة على زيادة تحمل النباتات للملوحة.

### 6- تطبيقات الهندسة الوراثية لدى الحيوانات:

تعد عملية إنتاج حيوانات محورة وراثياً من الأمور المعقدة نسبياً تقنياً وتشريعياً، ويعده الكثير من الأشخاص أمراً غير مقبول أخلاقياً وخاصة عند الثدييات، ومن

المسائل التي لقيت الاهتمام هي دراسة تركيب الجين وأسلوب تعبيرها في الخلايا الحيوانية.

ويجب التذكير هنا أن الوصول إلى حيوانات محورة وراثياً هو أمر شديد التعقيد بالمقارنة مع الخلايا المزروعة والجراثيم والنباتات، وقد تم تطبيق الأمر على أنواع من الحيوانات مثل البرمائيات والأسماك والفئران والخنازير والأغنام.

أما عن الهدف من إنتاج الحيوانات المحورة وراثياً، فهي عديدة منها: إجراء البحوث الأساسية والتطبيقات التقنية الحيوية، وكذلك مِن أجل إضافة الصفات المرغوبة والهامة إقتصادياً، سواء من أجل تسريع النمو أم زيادة في الإنتاج أم تسريع التكاثر لديها، وقد حققت الأبحاث في هذا المجال الكثير من التقدم.

وبما أنه يجب أن تحتوي كل خلايا الفرد المحور على الجين الجديد، لذلك من المفترض أن تتم إضافة الجين إلى الخلية الأساسية ( الخلية البيضية الملقحة)، وإذا تم ذلك في مراحل تالية فإن ما يمكن أن نحصل عليه فهو حالة فسيفسائية، لا تؤدي إلى النتيجة المتوخاة من عملية التحوير، وهناك طرق عديدة متبعة لإدخال هذه الجينات إلى الأجنة، مثل الإصابة الإجبارية أو الإصابة بفيروس عكسي أو بالحقن الدقيق للـDNA في البيضة الملقحة أو الأجنة، وهي الطرق الأكثر استعمالاً وكانت هي الطريقة التي أدت إلى إنتاج الفأر الفائق في أوائل الثمانينيات، والتي تمت من خلال إدخال الجين الخاصة بهرمون النمو ( G.H ) للجرذ مرتبطة مع بلاسميد مؤشب يحمل تتابعيات الجين المندمجة، وقد نمت هذه الفئران بشكل أسرع من الفئران الأصلية بمرتين أو ثلاث مرات، ومن حيث الحجم أصبحت أضخم مرتين من الحجم الأصلي.

تترافق الصفات الناتجة من التحوير الوراثي لبعض الحيوانات بمظاهر غير مرغوب فيها، وعلى سبيل المثال فإن الخنازير التي تحمل الجين الخاصة بنمو الأبقار تتصف بتغذية أكبر، وكذلك تمتلك كمية دهون أقل تحت الجلد، غير أنها

اتصفت بضخامة في القلب، وزيادة في نسبة حدوث التقرح في المعدة و الالتهابات الجلدية وأمراض الكلى والتهابات المفاصل، وحقيقة الأمر فإن الوصول إلى إضافة الصفات الإيجابية فقط دون أية صفة سالبة هو أمر صعب، ويحتاج إلى فهم أعمق. وهنا يجب أن نذكر بأن الوصول إلى صفة ماهو نتيجة لمجموعة كبيرة من العوامل الوراثية منها والبيئية، والتي ليس من السهولة تأمينها دائماً.

لقد بينت الكثير من البحوث أن الفأر هو أكثر الأنماط فائدة لدراسة التعبير الجيني للجينات المنقولة، وقد استخدمت الجين Lac-z كوسيلة للكشف عن التعبير الجيني للجين النوعية موضوع العمل.

ومن الأمثلة على تطبيقات الهندسة الوراثية في الإنتاج الحيواني مثلاً تسريع نمو الأسماك، مثل سمك السلمون الذي يستغرق نموه الكامل ثلاث سنوات وخاصة في المياه الباردة، وقد تم نقل جين من سمك البوط الذي يعيش في المياه الباردة. يعمل هذا الجين على تشغيل جين هرمون النمو، وقد أدى هذا التحوير إلى الوصول إلى سمك السلمون بسرعة نمو ثلاث مرات عن الأصلي.

كما تم بالطريقة نفسها الوصول إلى إنتاج العديد من أنواع الحيوانات الأهلية سريعة النمو، أو إلى زيادة قدرتها على إدرار الحليب، وتحسين كمية اللحم أو تحسين نوعية الصوف و زيادة مقدارها، أو على زيادة عدد التوائم الناتجة من عملية الحمل، وكذلك من أجل زيادة قدرتها على مقاومة الأمراض خاصة الفيروسية منها.

يمكن استعمال الأجنة الناتجة عن عملية التحوير وقبل تمايزها للحصول على أعداد كبيرة من الخلايا، والتي تمثل خلايا جذعية جنينية يمكن حقنها في البيوض وبالتالي الحصول على أفراد محورين وراثياً، تستعمل هذه الطريقة حالياً بهدف الحصول على قطعان من الحيوانات الأهلية، والتي تكون مماثلة تماماً للجنين الذي أخذت منه هذه النوى، والتي يمكن أن تكون محسنة لصفة ما كإنتاج اللحوم

مثلاً، أو لإنتاج الحليب وغيرها من الصفات وتعد هذه الطريقة نمطاً من أنماط الاستنساخ.

## 7- تطبيقات الهندسة الوراثية في الطب:

تمت الاستفادة من الهندسة الوراثية في الطب لأهداف مختلفة، من بينها التشخيص والعلاج.

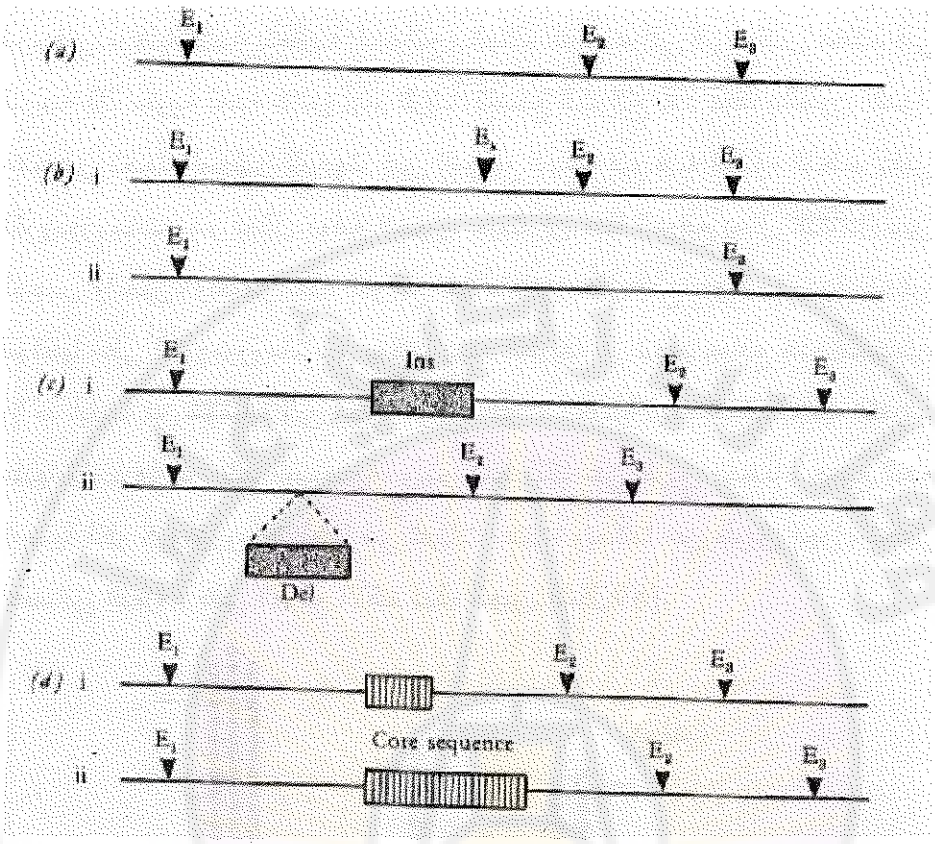
### 7-1- تشخيص الأمراض الوراثية:

يعد تشخيص الأمراض باستعمال البيولوجيا الجزيئية و الهندسة الوراثية أحد االتطبيقات الهامة كثيرة الاستعمال في هذه الآونة، وقد تم التعرف على آلاف الأمراض الوراثية ذات الأصل الوراثي، وقد وضعت التقانات الجزيئية الكفيلة بتشخيص العديد من هذه الأمراض جزيئياً، عن طريق تحليل الـ DNA، وإحدى الطرق المستعملة لذلك هو استخدام القطع التحديدية متعددة الأشكال Restriction Frogment Length Polymorphismes( RFLPs ) كعلامات وراثية لإجراء التشخيص لبعض الأمراض، وتعتمد هذه الطريقة على أطوال القطع من الـ DNA الناتجة من معاملته بأنزيم تحديد معين (شكل88)، التي يمكن أن تتبدل نتيجة للطفرة التي يمكن أن تسبب تغيراً في مواقع القطع لأنزيمات التحديد، وتؤدي أحياناً إلى إلغاء الموقع، وأحياناً يمكن أن تكون على العكس سبباً في تشكيل موقع قطع جديد، كما أن حذف أحد النيكلوتيدات أو إضافتها يمكن أن يكون سبباً في إحداث تغيير في مواقع القطع وبالتالي يؤدي إلى تغيير في أطوال القطع الناتجة من المعاملة بأنزيم التحديد.

فإذا كان طول القطع متعددة الأشكال (RFLPs ) يقع قريباً أو بين الجين التي تسبب المرض، فإنه يمكن تعقب ومتابعة الجين المرضية، عن طريق متابعة طول

القطعة التحديدية متعددة الأشكال باستخدام تقنية شف ساذرن طبعاً بوجود المجس Probe النوعي، وقد تم باستعمال هذه التقانة تشخيص العديد من الأمراض مثل هنتيكتون Huntington disease.والتليف الحويصلي وفقر الدم المنجلي وورم خلايا الشبكية والزهايمر.

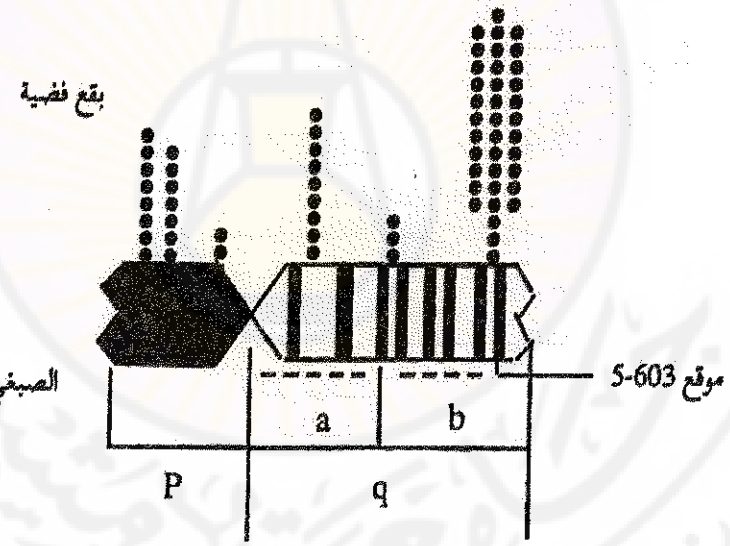
كما يمكننا تمييز الجينات المرضية وتحديد مكانها على الكروموزوم، عن طريق المعاملة بأنزيم تحديد، ومن ثم إخضاعها إلى الرحلان الكهربائي وبوجود مجس معلم قادر على أن يتهجن مع هذه الجين كلياً أو جزئياً، ويتم هذا التهجين خارج الخلية in silu Hybridiztion، ويتم هذا الأمر عن طريق تحضير الانقسامات على الشرائح بالطريقة نفسها التي تستعمل للحصول على الكروموزومات المستعملة في دراسة الطابع النووي بإعاقة و إتمام الانقسام، وبالتالي تجميع الانقسامات في المرحلة الإستوائية نظراً إلى تخريب خيوط المغزل التي تقوم عادة بسحب وتوزيع الكروموزومات بين خلايا النبات بشكل دقيق.




(شكل 88): تخطيط يبين طريقة القطع التحديدية متعددة الأشكال (RFLPs) باستعمال ثلاثة مواقع لأنزيم E1,E2,E3)ECORI)، وبالتالي تأثير الطفرة في (b) و الإضافة أو الحذف (c) وقلب التتابع (d) تؤدي مجمل هذه التغيرات في أطوال قطع التحديد بواسطة تبقع سوثيرن باستخدام مسبار مناسب.

يتم تثبيت الخلايا بعد وضعها على الشرائح باستعمال الكحول وحمض الخل الثلجي، ومن ثم تجري الدنترة للـDNA باستعمال الحرارة مثلاً، يتم بعد ذلك حضن هذه الشرائح مع محلول التهجين الذي يحتوي على المجس المعلم لمدة حوالي 24 ساعة، تجري بعد ذلك إزالة الفائض من المجس بالغسل المتكرر.

نقوم في مرحلة تالية بتغطية الشرائح بالهلام الفوتوغرافي في مكان مظلم في الدرجة 70 مئوية لمدة عشرة أيام تقريباً، تصبغ الشرائح بعد ذلك بالملون غمزاً، وتفحص تحت المجهر للبحث عن الموقع الذي يقع فيه الجزء المعلم على الكروموزومات وهو يمثل موقع الجين، حيث إن هذا الموقع يمثل التكامل بين المجس والجين، وتظهر هذه المواقع عادة على شكل بقع سوداء فضية مناظرة لموقعها على الكروموزومات، و يمكننا بهذه الطريقة أن نحدد مواقع هذه الجينات، ولا بد أيضاً من الإشارة إلى وجود مواقع غير صحيحة لهذه البقع، يجب التعرف عليها وتمييزها عن تلك الصحيحة، ويتم عادة ذلك عن طريق إحصاء جميع البقع الفضية لكل كروموزوم وتحليلها في عينات عديدة ويمكننا عن طريق إجراء تحليل إحصائي التعرف على الموقع الأكيد لهذه الجين (شكل89).




(شكل 89): يبين مثالاً عن تحديد موقع الجين N-RAS على الكروموزوم 12. من خلال توزع البقع الفضية على طول الكروموزوم و قراءة النسبة المئوية لتوزعها.

وللتعرف على جين بشري ما مثلاً نأخذ الـ DNA البشري المستخلص من خلايا الدم البيض نعامل الـ DNA بواسطة أنزيم تحديد مثل EcoRI، ونطبق عليها الرحلان الكهربائي على هلام الأغاروز، نقوم بعد ذلك بعزل حزم الحمض النووي بمعاملة الهلام بمحلول أساسي، لفصل حزم الحمض النووي على ورقة نتروسليلوز أو النايلون وفقاً لطريقة وذمة ساوثرن، ومن ثم يتم تثبيت حزمة الـ DNA الهدف على الورقة باستعمال الحرارة 80مْ، يضاف بعد ذلك محلول التهجين إلى الورقة الذي يستمر مدة حوالي 24 ساعة، يتم بعد ذلك إزالة الفائض بالغسل، ومن ثم يغطى بفلم أشعة X وتجفف بدرجة حرارة 70مْ لمدة حوالي 8.5 يوم، نقوم بعد ذلك بتحميض الفلم و إظهار النتائج كحزمة أو حزم، وبالتالي يمكن تحديد الجين المعنية.

يمكننا أيضاً استعمال تقانة الPCR بهدف التشخيص الجيني، والذي يتم كما رأينا سابقاً عن طريق تضخيم الجين الممرضة، عن طريق إضافة البادىء إلى هذه الجين، ومن ثم تتم عملية الكشف عن وجودها، عن طريق تقانة الرحلان الكهربائي وطبعاً بوجود نموذج شاهد.

### 7-2- العلاج الجيني:

يعتمد العلاج الجيني على فكرة نقل الجين السوي إلى الخلية، وبالتالي إلى الكائن الذي يحتوي على الجين المعيب ويمكن أن نَعد العلاج الجيني نمطاً من أنماط التحوير الجيني ( genetically modified or ganisme (GMO، وتجب الإشارة إلى أن عملية التحوير الجيني تتم على الخلايا الجنسية، وبالتالي على البيوض الملقحة، في حين أن العلاج الجيني يتم من خلال إحداث تحوير في الخلايا الجسمية المتخصصة.

يتم -عادة- غرس الجين والمحضض الخاص بها ( Promoter ) والذي يحفز عملية النسخ لهذه الجين، وتتم عملية الغرس هذه كما رأينا في ناقل Vecto الذي قد يكون بلاسميد أو فاجاً أو كوسميداً أو فيروساً، كما يمكن أن تتم عملية النقل أحياناً باستعمال الـ Lyposome، ويجب الإشارة أيضاً إلى أن عملية تحميل الجين العلاجية في DNA الفيروس، يجب أن تترافق مع تعطيل لجينات الفيروس التكاثرية، للحيلولة دون تضاعف هذا الفيروس في الخلايا المضيفة.

يتم نقل الجين أحياناً عن طريق الدم مباشرةً، أو يتم إدخالها إلى الخلايا عن طريق البلعمة الخلوية، أو بتمريرها عبر الغشاء البلاسمي بعد إحداث ثقوب فيه عن طريق المعالجة الكهربائية، كما يمكن ذلك عن طريق تحميل الجين على دقائق الذهب ومن ثم إدخالها إلى الخلية عن طريق المسدس الجيني، وكذلك يمكن أن تعطى الجين بالحقن المباشر في الأنسجة المستهدفة.

تؤدي عمليات الغرس بهدف العلاج الجيني في بعض الأحيان إلى نتائج سيئة حيث يؤدي على سبيل المثال غرس الجين في أكسونات جين رادعة لورم ما إلى إفلات هذه الجين من حالها، مما يؤدي إلى حدوث السرطان، كذلك فإن غرس جين ما في المكان غير الطبيعي بالنسبة للمخضض لايؤدي إلى تنشيط الجين وأحياناً إلى تثبيط عملية النسخ، وبالتالي يؤدي إلى نتائج غير طبيعية، ويمكن في بعض الأحيان أن تؤدي عملية الغرس إلى تعطيل بعض الجينات المنظمة للدورة الخلوية، مما يقود إلى نتائج سيئة غير مرغوبة.

تعد عملية العلاج الجيني أمراً معقداً إلى حد ما، والنتائج حتى الآن محدودة، ويوجهها كما رأينا الكثير من العقبات، وهي تحتاج إلى المزيد من البحث والدراسة.

## 8- التطبيقات لتحديد النسب، وفي الأدلة الجنائية:

نطلق على ما يميز الفرد من حيث ما يحتويه من مادة وراثية بالبصمة الوراثية DNA Fingerprent، والتي تختلف من فرد إلى آخر، وهي تتماثل بين التوائم الحقيقية.

يعتمد تحديد ذلك على وجود متتاليات وحيدة من الـ DNA في الفرد مختلفة عما يمتلكه الآخرون وتدعى المتتاليات التابعية Satelite DNA وهي موجودة في توابع الكروموزمات، يتم الحصول على هذه المتتاليات نتيجة لمعاملة الـ DNA للفرد بأنزيمات تحديد معينة، مما يؤدي إلى الحصول عليها وبالتالي معاملتها بالرحلان الكهربائي، مما يتيح الكشف عنها لدى الفرد ومقارنتها مع النماذج الأخرى.

وقد تم تحديد أكثر من عشرة أنماط من أنزيمات التحديد التي يمكن استعمالها للحصول على هذه المتتاليات الفريدة، لاستعمالها كمجسات لأغراض البحث عن الأدلة الجنائية، وتستخدم هذه التقانة حالياً وبكثافة في عمليات الكشف عن الجرائم وحالات الشك في النسب.

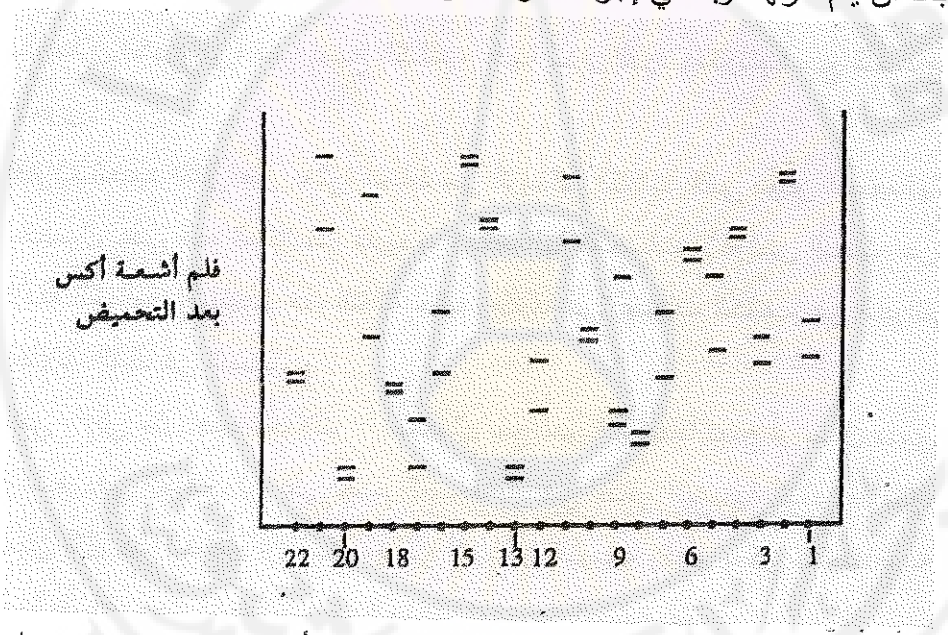
يكفي – في مثل هذه الحالات – استعمال بقع دموية أو بقايا نسج أو سائل منوي أو شعر في الموقع، أو على جسم الضحية أو في أظافر الضحية أثناء مقاومته، يمكن لكل هذه العوامل أن تمثل مصدراً للحمض النووي، والذي يمكن الاحتفاظ به لفترة طويلة، ومن ثم مقارنتها مع العينات المأخوذة للمشتبه بهم.

ويمكن أن يتم ذلك من خلال الحصول على عدد قليل من خلايا قد لايزيد عن العشرة، أو حتى من بقعة دم جافة، حيث يتم في مرحلة تالية تضخيم الـ DNA عن طريق تقانة التفاعل السلسلي للبوليمراز P.C.R، يتم إثر ذلك معاملة الـ DNA بأنزيمات التحديد، ومن ثم يتم تطبيق الرحلان الكهربائي عليها، وبإجراء المقارنة مع الـ DNA المأخوذ من المشتبه بهم يمكن التعرف على صاحب الـ DNA الذي

تم الحصول عليه في الموقع، وبالتالي يمكن التعرف على الجاني الحقيقي (شكل90).

ويمكننا القيام بهذه العملية مباشرة عن طريق إضافة البادئات إلى هذه المتتاليات، والتي أصبحت متوفرة في الأسواق، بالإضافة إلى مستلزمات عملية تضخيم الـ DNA مما يؤدي إلى تضخيم هذه المتتاليات، وبالتالي إلى الكشف عنها ومقارنتها مع العينات المشكوك فيها.

يتم حالياً الذهاب إلى أبعد من ذلك، وبحيث تتم سلسلة هذه المتتاليات لهذه القطع بعد أن يتم عزلها، وبالتالي إجراء مقارنة أكثر دقة.

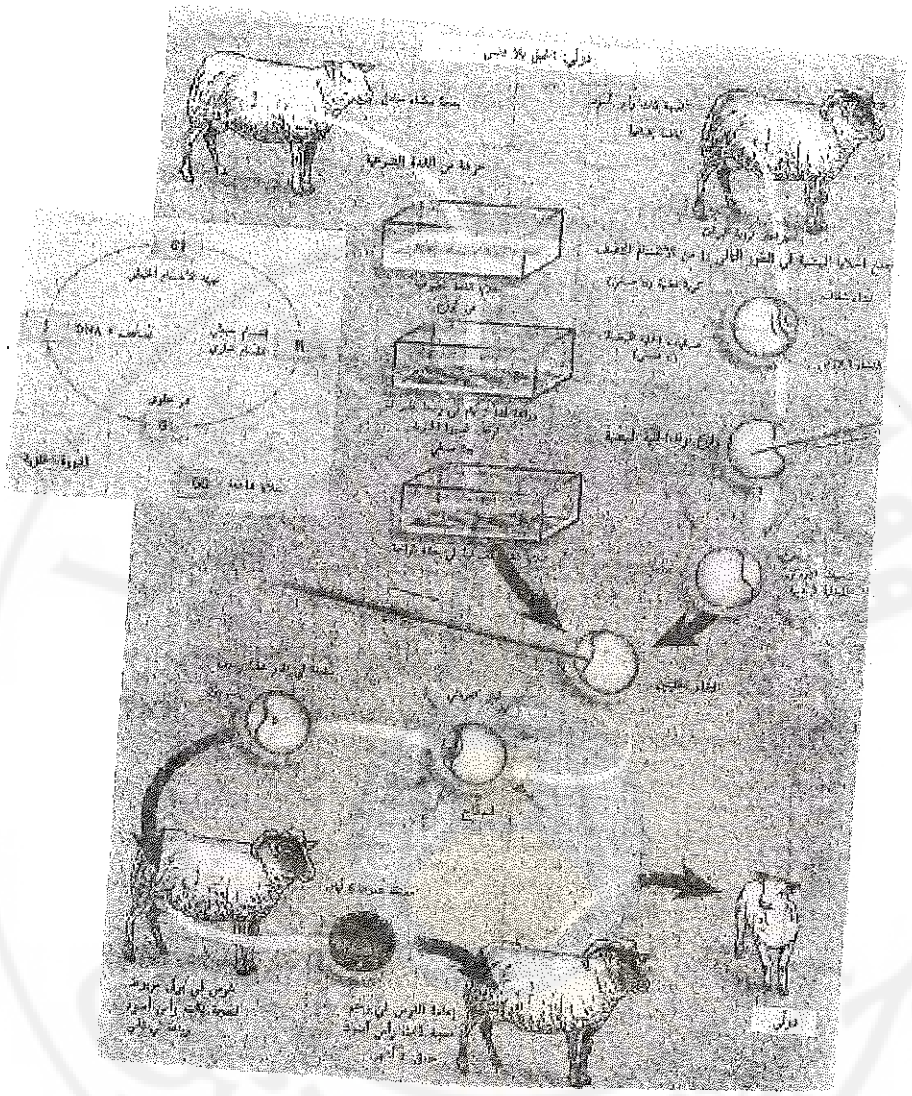



(شكل 90): يبين الشكل نماذج من الحمض النووي المعاملة بأنزيم تحديد معين بعد تهجينها بمسبار، بهدف تحديد البصمة الوراثية. تعود النماذج من 3-22 لأشخاص موضع شك، في حين يعود النموذج 1 إلى الحمض النووي الذي يعود إلى الفاعل. ويلاحظ هنا التماثل بين النموذجين 13 و 20 و اللذين يعودان إلى الشخص نفسه و لا يوجد تشابه بين النموذج رقم 1 أي من النماذج الباقية مما يدل على أن أياً منهم ليس هو الفاعل، مما يستدعي أخذ عينات أخرى للتحري من الفاعل.

## 9- الاستنساخ Cloning:

يمثل الاستنساخ، فضلاً عن التشخيص والمعالجة الجينية والخلايا الجذعية، جانباً هاماً كان وما زال محل بحث من قبل العاملين في مجال البيولوجيا الجزيئية. يهدف الاستنساخ إلى إيجاد كائن حي بصفات وراثية محددة مسبقاً، ويتم ذلك على العموم من خلال إدخال نواة خلية من كائن مكان نواة الخلية البيضية ذات المصدر المختلف، وبذلك تصبح الخلية البيضية مماثلة تماماً – من حيث محتواها الوراثي – لخلايا الكائن الذي أخذت منه النواة التي تم إدخالها. وقد تم منذ فترة طويلة إنجاز هذا الأمر عن طريق استعمال نوى مصدرها خلايا جنينية، غير أن الأمر الذي أحدث ضجة هو استعمال نوى لخلايا متمايزة، وكان السبق في ذلك هو استنساخ النعجة دولي 1997، وهذا يعني أن نواة الخلية المتمايزة قد استطاعت العودة عن تمايزها، وبالتالي تدخل في انقسامات متتالية تعطي الجنين القادر على التطور إلى فرد بالغ.

ورغم أن أمر استنساخ دولي قد تمّ بصعوبة وبنسبة ضئيلة من المحاولات، إلا أنه يعد سابقة هامة وفتحاً جديداً في مجال الاستنساخ، وقد دفع الأمر الكثيرين إلى التفكير في العديد من التطبيقات، منها استنساخ الإنسان، وما يمكن أن يترافق مع هذا الاستنساخ من فوائد (شكل 91).



(شكل 91): يمثل المراحل المختلفة التي تم اتباعها للوصول إلى تنسيل النعجة دولي، والذي مثل سابقة في عملية الاستنساخ باستعمال نواة لخلية متمايزة.

أثارت تقانة الاستنساخ فضول الكثيرين، وبدأ التفكير بالاستنساخ العلاجي والاستنساخ الولادي عند الكائنات ومنها الإنسان، وقد أثار الاستنساخ الولادي الكثير من الرفض وعدم القبول نظراً إلى المحاذير الأخلاقية والتشريعية، وقد ذهب

الكثير من هذه المواقف إلى التحريم المطلق لها. أما الاستنساخ العلاجي فهو رغم قبوله من البعض فهو محل رفض من آخرين، وهو ما زال يثير الجدل.

ويرتكز الاستنساخ على استبدال بنواة الخلية البيضية نواة خلية متمايزة (كخلية من نسيج طلائي مثلاً)، وبالتالي تحريض الخلية البيضية لبدء تقسمها من خلال تعريضها إلى صدمة كهربائية، أو عن طريق إحداث تبدل في تركيز الشوارد وحضن البيضة في وسط مغذٍ وشروط مناسبة خاصة من حيث الحرارة، لتبدأ بالانقسام لمدة خمسة أيام لتصل إلى مرحلة حوالي 150 خلية، تعرف هذه المرحلة بالبلاستوسيت blastocysts والتي تتألف من طبقة خلوية خارجية صغيرة الحجم بالإضافة إلى كتلة خلوية داخلية تشغل جزءاً من السطح الداخلي للطبقة الخارجية. وهذه الطبقة الداخلية هي التي سوف تتقسم وتتطور لتعطي الجنين، في حين أن الطبقة الخارجية للبلاستوسيت هي التي تتغرس في جدار الرحم وتشكل المشيمة. تمثل الكتلة الخلوية الداخلية الخلايا الجذعية الجنينية، والتي تملك قدرة عالية على التمايز إلى جميع أنماط الخلايا، وهي تضم على العموم نمطين خلويين أرومة علوية وأخرى سفلية، ومن الممكن استعمال هذه الخلايا في العلاج لأمراض مختلفة مثل: باركنسون – الزهيمير – وترميم القطع في النخاع الشوكي ومرضى السكري وغيرها.

تعود المحاذير في اللجوء إلى الاستنساخ إلى أسباب عديدة منها أن البلاسوسيت هي كائن حي يمتلك كل الإمكانيات ليتطور ويعطي فرداً بالغاً، فضلاً عن ذلك هو وجود بدائل للحصول على الخلايا الجذعية من البالغ، ومن المريض ذاته الذي نريد معالجته، ولذلك من الأحرى بالعاملين في هذا المجال السعي إلى تطوير إمكانية العلاج عن طريق استعمال الخلايا الجذعية البالغة.

أما عن أسباب التشوهات والمتاعب التي تحصل لدى الأفراد المستنسخة، وهذا ما لوحظ لدى النعجة دولي مثلاً، والتي أصيبت بالتهابات رئوية وأخرى مفصلية

وغيرها فهو يمكن أن يعزى في جانب منه إلى ما يحصل من تخريب في سيتوبلاسما البيضة، أثناء نزع نواتها وحقن النواة البديلة، إضافة إلى أن ثمة تخريباً وتآكلاً في التيلميرات لكروموزومات النواة المغروسة، والناتجة أثناء الانقسامات التي تمت إلى حين وصولها إلى مرحلة التمايز، أضف إلى ذلك أنعملية الاستنساخ هذه تتطلب من النواة المغروسة العودة عن برمجة قائمة وإعادة قيام برمجة أخرى، وهذا ما يعقد الأمر ويجعل من حصول الأخطاء أمراً أكثر احتمالاً، ولهذا فإن الكثير من الجهات ذات العلاقة تدفع باتجاه استعمال الخلايا الجذعية البالغة، بدلاً عن الخلايا الجذعية الجنينية رغم التعقيد والصعوبات التي تواجه مثل هذا الأمر، غير أن التقدم العلمي الكبير في مجال التقانات تجعلنا متفائلين في الوصول إلى نتائج خلال الأعوام القادمة.

| المصطلحات | |
|---|---|
| Adaptor | توصيلة وهي سلسلة مفردة مؤلفة من عدد محدود من النيكلوتيدات تستخدم لتحويل النهايات المستوية إلى لزجة لقطعة من الـ DNA ثنائي السلسلة. |
| (A) Adenin | الأدينين: أساس آزوتي مشتق من هيكل البيورين يدخل في تركيب الـ DNA والـ RNA. |
| Agasose | الآغار وهو هلام مستخلص من طحالب بحرية، تستخدم في الرحلان الكهربائي للبروتينات والأحماض النووية. |
| Alkaline Phosphotase | أنزيم الكالين فوستفاز وهو يقوم بإزالة فوسفات من الموقع 5` من نهاية سلسلة من الـ DNA، وبالتالي يعيق ضم أي نيكلوتيد جديد إلى هذه النهاية. |
| Allel | مورثة مقابلة (صنوه). |
| Ampicillin | الامبسلين مضاد حيوي. |
| .(A)Aminoacyl | موقع على سطح الريبوزوم يُشغل من قبل الحمض الناقل الثاني. |
| antibody | ضد وهو بروتين مناعي ينتج رداً على مولد ضد معين ويرتبط به. |
| anticodom | أنتيكودون وهي ثلاثية من الأسس الآزوتية يقع في عروة الأنتيكودون من الـ RNA الناقل. يتقابل مع الكودون في الـ RNA الرسول يساهم في عملية الترجمة(تركيب البروتين). |
| antigen | مولد ضد يقع على سطح الخلايا، وهو بروتين متعدد السكاكر يحث الاستجابة المناعية. |

| | |
|---|---|
| Bacteriophage | آكل الجراثيم (الفاج) وهو فيروس يتطفل نوعياً على الجراثيم. |
| Aminoacyl RNA thentitage | أنزيم الأمينوأسيلRNA سينتيتاز، وهو الأنزيم الذي تتم عليه عملية تنشيط الحمض الأميني وربطه بالـ RNA+T |
| Blunt ends | النهايات العمياء: وهي نهايات من جزيء DNA مستوية، بحيث تكون نيكلوتيدات السلسلتين مرتبطة بروابط هيدروجينية. |
| Capsid | الغلاف البروتيني للفيروس، ويمثل محفظة تحتوي على المادة الوراثية. |
| c DNA | الـ DNA المكمل وهو جزيء من الـ DNA يتم تركيبه باستخدام الـ RNA الرسول كقالب باستعمال أنزيم النسخ العكسي. |
| C DNA-Library | وهو يمثل مجموعة نسائل مجهزة اعتبار الـ RNA من الرسول لخلية ما، وهي تمثل مجمل الجينوم لها. |
| c-Terminus | الطرف الكربوكسيلي لسلسلة بيتيدية، ويرتبط بواسطتها من زمرة أمينية لتشكيل الرابطة البيتيدية. |
| Chromosome | كروموزوم (صبغي) وهو مؤلف من جزيء DNA ويحمل عدداً من الجينات، ويدخل في تركيب الكروموزوم البروتينات النووية. |
| Cistron | المورثة الوظيفية ويتألف من جين أو أكثر، وهي تشفر لبروتين قادر على القيام بوظيفة محددة. |
| Clone | مستعمرة من الكائنات متطابقة، وتستخدم للإشارة إلى |

| | |
|---|---|
| | خلية تحتوي على الـ DNA مؤشب. |
| Clon bank | مكتبة الـ DNA المكمل (المكتبة المورثية). |
| Coding | يشار به إلى أنه يشفر لأحماض أمينية. |
| Codon | الكودون وهو ثلاثية من الأسس الآزوتية في الـ RNA m وهي تشفر لحمض أميني نوعي عند عملية الترجمة. |
| Conesise ends | النهايات اللزجة وهي جزيئات من الـ DNA، والتي تمتلك نهاياتها على تتابعات زائدة يمكن أن تستعمل في عملية اللحام مع قطع DNA أخرى. |
| Complementry DNA | الـ DNA المكمل والذي يتم تركيبه عن طريق النسخ العكسي باستعمال الـ RNA الرسول كقالب. |
| Cop | قلنسوة وهو تحوير كيميائي يضاف إلى النهاية 5` من جزيء الـ RNA m لحقيقات النوى بعد عملية النسخ. |
| Conjvgation | بلاسميد الخصوبة وهو يمنح الجرثوم القدرة على التكاثر الجنسي، نتيجة لامتلاكه على الجينات الناقلة. |
| Cos | وهو يرمز إلى النهاية المولدة عندما ترتبط معاً النهايات اللزجة لجزيء الـ DNA لدى الفاج لمبدا $\lambda$ |
| Cosmid | الكوسميد وهو ناقل يستعمل في الهندسة الوراثية، وينتج مخبرياً عن طريق التهجين بين بلاسميد وفاج. |
| Cytosine | (c)السيتوزين وهو أساس آزوتي يدخل في تركيب النيكلوتيدات في الأحماض النووية. |
| denaturation | الدنترة وهي تشير إلى عملية المباعدة بين سلسلتي جزيء الـ DNA، من خلال فك الروابط الهيدروجينية بين الأسس المتقابلة. |

| | |
|---|---|
| Deletion | الحذف وهو يمثل تغير في بنية المادة الوراثية ناتج عن إزالة نيكلوتيد أو تتابع نيكلوتيدي من الحمض النووي. |
| Doulele helix | الحلزون المزدوج هو ما يميز البنية الثانوية لجزيء الـ DNA. |
| d(NTP)Deoxyn ucleotid triphosphate | نيكلوتيد ثلاثي الفوسفات منقوص الأوكسجين، وهي جزيئات غنية بالطاقة وتمثل وحدات البناء للـ DNA. |
| dd(NTP) | نيكلوتيدات ثنائية منقوص الأوكسجين تستخدم في عملية تحديد تتالي النيكلوتيدات لقطعة من الـ DNA (عملية السلسلة). |
| diploid | ثنائية الكروموزومات والتي تتوزع على شكل أشفاع. |
| DNA se | وهو أنزيم قادر على تحليل الحمض النووي منقوص الأوكسجين للبنية الأولية. |
| DNA sequencing | سلسلة الـ DNA وهي عملية يتم من خلالها التعرف على نمط تتالي الأسس لقطعة من الـ DNA. |
| DNA Fingerprinting | البصمة الوراثية وهو يمثل التتابعات في جزيئات الـ DNA المميزة للنوع أو للفرد. |
| DNA Ligase | أنزيم الربط للـ DNA من خلال تشكيل الروابط الفوسفاتية ثنائية الأستر. |
| DNA Ligase | أنزيم الربط وهو يقوم ببناء الرابطة الفوسفاتية ثنائية الأستر بين نيكلوتيدين بين الموقعين 3` – 5`. |
| DNA Polymesrase | أنزيم بلمرة الـ DNA يقوم ببناء السلسلة، وفقاً لسلسلة متممة كقالب وله العديد من الأنواع. |
| Electrophorese | الرحلان الكهربائي وهي تقانة يتم من خلالها تهجير |

| | |
|---|---|
| | جزيئات الأحماض النووية أو للبروتينات على هلام، تحت تأثير حقل كهربائي بهدف الكشف عنها وتفريدها. |
| Electroporation | وهي تقنية تستعمل بهدف إدخال الـ DNA إلى الخلايا عن طريق استعمال تيار كهربائي مؤقت. |
| End Labelling | تشعيع النهاية وتتم خلالها ربط نهاية الجزيء بنيكلوتيد معلم. |
| Endonuclease | أنزيمات القطع الداخلي وهي تقوم بقطع جزيء الـ DNA بعيداً عن النهاية، ويتم ذلك عن طريق فصم الروابط الفوسفاتية ثنائية الأستر. |
| Ethidium bromide | بروميد الاثيديوم وهو جزيء يرتبط بالـ DNA. ويقوم بالوميض عندما ينظر إليه تحت الأشعة البنفسجية. |
| Enzyme | أنزيم وهو بروتين يعمل على توسط التفاعلات الحيوية في البناء أو الهدم التي تتم في الكائن الحي. |
| Eukaryotic | حقيقات النوى وهي الكائنات التي تحتوي خلايا على نواة تعزل المادة الوراثية عن السيتوبلاسما. |
| Exon | إكسون وهي مناطق من الجينات يتم الاحتفاظ بها في الـ RNA m الناضج، ويمكن أن تترجم إلى بروتين. |
| Exonucleases | أنزيمات القطع الخارجي وهي تقوم بقطع نيكلوتيد أو أكثر من نهايات جزيء الـ DNA عن طريق هدم الروابط الفوسفاتية ثنائية الاستر. |
| βGalactosidase | أنزيم بيتا غلاكتوزيداز يتم تركيبه بإشراف الجين Lac-Z، وهو قادر على هضم سكر اللاكتوز وتحويله إلى غلوكوز وغالاكتوز. |

| | |
|---|---|
| Gamete | عروس خلية جنسية ذكرية أو أنثوية تتصف بالصيغة الصبغية الفردية للمادة الوراثية. تندمج هذه الأعراس لإعطاء البيضة الملقحة. . |
| Gel electrophosesis | هلامة الرحلان الكهربائية من الأميدون أو الاغار أو الاكريلاميد أو البولي أكريلاميد، يتم تهجير الحمض النووي أو البروتين عليها. |
| Gene | الجين (المورثة) وهي تمثل جزءاً من سلسلة الـ DNA تشفر لسلسلة ببتيدية التي يمكن أن تمثل بروتيناً أو جزءاً من بروتين. |
| Genethics | أخلاقيات الوراثة، ويطلق ليصف المشكلات الأخلاقية لعلم الوراثة الحديث. |
| Gene bank | بنك الجينات وهو يمثل مجموعة النسائل التي تضم الذخيرة الوراثية الخاصة بكائن حي ما. |
| Gene cloning | تنسيل الجين: وهي تمثل بعزل الجينات وتركيبها، ومن ثم تنسيلها في خلية مضيفة من خلال ناقل للحصول على نسيلة. |
| Gene Therapy | العلاج الجيني عن طريق استخدام الجينات المنسلة بهدف معالجة مرض وراثي المنشأ. |
| Genetic code | الشفرة الوراثية وتتمثل بتتالٍ لثلاثة أسس آزوتية في الجين، والتي تقابل حمضاً أمينياً محدداً عند عملية الترجمة. |
| Gene expression | التعبير الجيني الذي يتم من خلال نجاح خطوتين: الأولى هي النسخ و الأخرى هي الترجمة. |

| | |
|---|---|
| Genome | المجين أو الجينوم أو الذخيرة الوراثية، وهي تمثل مجموع الجينات التي تمتلكها الخلية في الكائن الحي. |
| Genomi Library | وهو يمثل مجموع النسائل التي تضم الذخيرة الوراثية لكائن حي. |
| Genotype | النمط الوراثي لكائن ما، ويحد من خلال الجينات التي يمتلكها. |
| Germ Line | خط مولد للخلايا الجنسية و الأنثوية. |
| (G) Guanine | القوانين وهو أساس آزوتي يدخل في تركيب النيكلوتيدات في الأحماض النووية. |
| Host | المضيف وفي مجالنا فهو يمثل خلية تستخدم بهدف مضاعفة جزيئات الـ DNA المركبة. |
| Hybzidization | التهجين ويتم بين جزيئات الـ DNA مختلفة المصدر، أو بين سلاسل من الـ DNA وأخرى من الـ RNA عن طريق تقابل الأسس الآزوتية المتممة لها. |
| insertion vector | ناقل غرس وهو ناقل يمتلك على موقع تنسيل واحد لأحد أنزيمات التحديد يتم فيه غرس قطعة من الـDNA |
| Intron | مسلسلات من الـ DNA تقع ضمن الجين، وهي غير قابلة للترجمة، ويتم عادة حذفها أثناء نضج الـ DNA. |
| In-vitro | (في الزجاج): وهي الاختبارات والتجارب التي تتم في الأدوات الزجاجية في المختبر. |
| Kilobase | (kb) وهو يمثل $10^3$من الأسس أو أزواج الأسس، وهي وحدة قياس لطول جزيء الـ DNA أو الـ RNA. |
| Klenow- | وهي إحدى الوحدات المركبة لأنزيم كورنبرغ -DNA) |

| | |
|---|---|
| Fragment | Polymerase I) وهذه الوحدة مسؤولة عن البناء. |
| Linker | رابط وهي قطعة من الـ DNA قليل النيكلوتيد، ثنائي السلسلة يمتلك على التتالي الخاص نفسه بأحد أنزيمات التحديد، تستعمل لتحويل النهاية العمياء إلى لزجة. |
| Locus | موقع وراثي وهو مؤلف من جينين (allels) يمكن أن تكونا متماثلتين أو مختلفتين. |
| Lysogenic | وهي تمثل إصابة الجرثوم بفاج، دون أن يدخل الجرثوم بدارة انحلالية. |
| Lytic | إصابة البكتيريا بفيروس أو فاج، والتي تؤدي إلى دخول الخلية بدارة انحلالية. |
| m RNA | وهو الحمض الريبي النووي الرسول، وهو يمثل نسخة متممة للجين يترجم إلى سلسلة ببتيدية عند الترجمة. |
| Micro(u) | ميكرو وهو يمثل $10^{-6}$ من المتر. |
| melting Temperatur | (M.T) وهي درجة الحرارة التي عندها تحويل كامل جزيء الـ DNA مزدوج السلسلة إلى مفرد. |
| Microinjection | وهي عملية الحقن الدقيق يتم خلالها حقن الـ DNA في النواة أو السيتوبلاسما بشكل مباشر. |
| Mosaic | فسيفساء وهو يمثل كائناً لا تحمل خلاياه جينات متطابقة. |
| Multiple clning site(M.C.S) | موقع متعدد التنسيل، ويتميز بامتلاكه لعدد كبير من المواقع لأنزيمات التحديد، والتي يمكن استعمالها في عملية التنسيل. |
| Mutant | طافر وهي تمثل كائناً يحمل طفرة وراثية. |

| | |
|---|---|
| Mutation | طفرة وتمثل تبدلاً في بنية الجين، والتي تحدث بسبب إضافة أو استبدال أو حدث في الأسس الآزوتية التي تؤدي إلى تبدل في الشفرة الوراثية، وبالتالي تغير في بنية البروتين. |
| Non Template | سلسلة مقابلة لسلسلة القالب. |
| Mutagenesis | وهي عملية التحفيز التي تؤدي إلى إحداث الطفرة في المادة الوراثية، وقد تكون من طبيعة كيميائية أو فيزيائية وأحياناً حيوية. |
| Non Transcriled | السلسلة غير قابلة للنسخ. |
| Nick Traslation | وهي عملية الوسم التي تتم من خلال إحداث قطع في جزيء الـ DNA ومنه ثم إضافة نيكلوتيدات معلمة. |
| Nested Fragment | قطع معششة وهي سلاسل من الحمض النووي والتي تختلف عن بعضها نيكلوتيد أو أكثر تستعمل في عملية السلسلة. |
| Northern blotting | وهي عملية يتم فيها شف ونقل جزيئات الـ RNA عن طريق الأغشية، بهدف الكشف عن التتابعات باستعمال التهجين. |
| N-Terminus | وهي النهاية الأمينية للأحماض الأمينية أو لسلسلة الببتيدية. |
| Nuclease | أنزيمات النيوكلياز وهي أنزيمات إماهة يقوم بتحطيم الروابط الفوسفاتية ثنائية الأستر في الحموض النووية. |
| Nucleoid | نيوكليويد وهي منطقة من الخلية الجرثومية تقع فيها |

| | |
|---|---|
| | المادة الوراثية الخاصة بها. |
| Nucleoside | النيكلوزيد وهو جزيء مؤلف من سكر خماسي و أساس آزوتي. |
| Nucleatide | نيكلوتيد: وهو نيكلوزيد مرتبط بحمض فوسفات، وهو يمثل وحدة البناء في الأحماض النووية. |
| Non coding | يشير إلى متتاليات لا تشفر لأي حمض نووي. |
| Nucleus | النواة وهي منطقة محددة بغشاء في حقيقيات النوى، تقع في داخلها المادة الوراثية. |
| oligo | القليل: وتستعمل للإشارة إلى العدد القليل، كما هو الحال في قليل النيكلوتيدات أو قليل الببتيد. |
| oliganucleatide | قليل نيكلوتيد كما هو الحال في البادئ المستعمل لبدء عملية النسخ والتضاعف. |
| Oigine of replicotion | أصل التضاعف وهو موقع في المادة الوراثية يتعرف عليها أنزيم التضاعف وبُدئ منها عملية البناء لمضاعفة الجزيء. |
| oprator | وهي منطقة المشغل تجاور المحفز، يرتبط بها البروتين الكابح الذي يمنع أنزيم النسخ من القيام بنسخ الجين. |
| Operon | الاوبيرون وهو مجموعة الجينات لدى الجراثيم، والتي تتم السيطرة عليها من خلال موقع منظم واحد. |
| phosphodister bond | الرابطة الفوسفاتية ثنائية الأستر، وهي التي تربط بين نيكلوتيدين في الموقعين 5` – 3` |
| palindrome | الندروميه وتتصف بتتالٍ لسلسلتين متقابلتين ومرتبطتين بروابط هيدروجينية يمكن قراءتهما بالطريقة نفسها من |

| | |
|---|---|
| | النهايتين، كما في مواقع القطع لأنزيمات التحديد. |
| peptid | وحدة من البروتينات المكونة للأنزيم بيتا غلاكتوزيد، ويشفر لها من خلال الجين Lac-z |
| Peptidyl-Transfesase | أنزيم ببتيديل ترانسفيراز وهو أنزيم الربط الببتيدي يقوم بعمله أثناء عملية الترجمة، وهو من البروتينات المكونة للوحدة الريبية الكبرى. |
| Phage | فاج: وهو فيروس يتطفل على الجراثيم يمكن أن يكون "من النمط المعتدل" أو "من النمط السام". |
| Piptidil Trausferase | أنزيم الربط البتيدي يقوم بتشكيل الرابطة الببتيدية بين حمضين أمينيين. |
| Phenatype | النمط الظاهري وهي النمط الشكلي المشاهد عند الكائن الحي. |
| Plasmid | بلاسميد وهو جزيء من الـ DNA حلقي إضافي في الجراثيم غير ضروري يمنح الجرثوم صفات إضافية، يستعمل كناقل في الهندسة الوراثية. |
| Phasmid | فازميد وهو ناقل يحتوي على تتابعات بلاسميد وفاج. |
| (P) Piptidyl | موقع الببتيديل يقع على الريبوزوم يشغل من قبل الحمض الأميني الأول. |
| Polyacrylamide | بولي أكريلاميد: مادة تستعمل في اصطناع نمط من الهلام الخاص بالرحلان الكهربائي. يرحل إليها الأحماض النووية والبروتينات. |
| Polymer | بوليمير: وهو يمثل تتابع طويل من جزيئات أحادية monomer |

| | |
|---|---|
| Polymerase | أنزيم يتوسط في بناء الأحماض النووية. |
| (P.C.R) Polymesrase chain reaction | التفاعل السلسلي للبوليمراز، وهي تقانة يتم من خلالها تضخيم جزيئات الـDNA. |
| Polynucleotide | عديد نيكلوتيد جزيء مؤلف من عدد كبير من النيكلوتيدات المرتبطة ببعضها. |
| Polynucleotide Kinase | أنزيم الفسفرة عديد النيكلوتيد (PNK) وهو يتوسط عملية ضم زمرة فوسفات إلى النهاية من سلسلة DNA. |
| Polystuffer | حشوة متعددة موجودة في بعض أنماط النواقل، يمكن حذفها عند غرس قطع DNA. |
| Primary Transcript | منسوخ ابتدائي ويمثل جزيئاً من الـ RNA الرسول المنسوخ قبل أن يمر بمرحلة النضج. |
| Probe | مجس أو مسبار وهو عبارة عن سلسلة من الحمض النووي معلم، يجري تهجينه مع المادة الوراثية لأغراض عديدة. |
| Prokaryotic | طليعي نوى وهي خلايا غالباً بدائية لا وجود للغلاف النووي لديها، وبذلك تكون المادة الوراثية ممتزجة مع السيتوبلاسما. |
| Promoter | محفز يقع قبل الجين يرتبط عنده أنزيم النسخ. |
| Pronucleus | نواة أولية وهي نواة في البيضة قبل حصول اندماج الأعراس. |
| Prophage | طليعة الآكل وهي المرحلة التي تكون المادة الوراثية للفاج، مرتبطة مع كروموزوم الجرثوم دون أن يدخل الجرثوم بدارة انحلالية. |

| | |
|---|---|
| Restriction sites | مواقع التحديد وتشير إلى المواضع التي تعمل فيها أنزيمات التحديد. |
| Protein | البروتين وهو سلسلة مؤلفة من ارتباط لأحماض آمينية بروابط ببتيدية. |
| Punine | البيورين هيكل مؤلف من حلقتين يشتق منه الأساسين الآزوتين الأدنين والعنوانين. |
| Pyrimidine | البيرميدين: هيكل وحيد الحلقة سداسي تشتق منه الأسس الآزوتية: السيتوزين، التيمن واليورسيل. |
| Pyrimidine | إعادة الارتباط بين سلسلتين الـ DNA اللتين يتم فصلهما من خلال عملية الدنترة. |
| Renaturation | إعادة الارتباط بين سلسلتي DNA للجزيء نفسه في حالة الدنتره |
| Recombinant DNA | DNA مؤشب ناتج من الدمج بين نمطين من الـDNA |
| Regulatory gene | جين تنظيمية وظيفتها التحكم في التعبير الجيني. |
| Repetitine Sequence | وهي متتاليات عالية التكرار في المادة الوراثية. |
| Replacement vector | فاج إحلال وإزاحة وهو الفاج التي تتم فيه عند التنسيل إزاحة قطعة من الـ DNA واستبدالها بقطعة أخرى تمثل الجين التي تزيد إضافتها. |
| Replication | التضاعف للمادة الوراثية في الخلايا. |
| Restriction enjyne | أنزيم تحديد أو أنزيم تقيد وهو من أنزيمات القطع الداخلي يقطع في مواقع محددة بتتالٍ محدد من الأسس في جزيء الـ DNA. |

| | |
|---|---|
| Respressor gene | جين الكبح وهي المسؤولة عن إعطاء العامل الذي يمنع نسخ أو عمل جين التركيب. |
| Restriction fragment | قطع التحديد وهي القطع الناتجة من عملية التقطيع التي يقوم بها أنزيم التحديد في جزيء من الـDNA |
| (RFLP) Restriction fragment polymorphism | تقانة تعمل من خلال التباين في المواقع التحديدية المحددة لمنطقة معينة من الـ DNA، مثل القطعة التي تحدد بواسطة مواقع تحديدية إذ إنها تكون مختلفة الأطوال بين الأفراد. |
| restriction mapping | خريطة مواقع القطع تهدف إلى التعرف على مواقع القطع والأنزيمات التي يمكن أن تقوم بذلك. |
| Retrovirus | الفيروسات القهقرية، مادتها الوراثية هي من الـ RNA وتتضاعف عن طريق النسخ العكسي بأنزيم R.T. |
| Reverse Transciptase | (R.T) أنزيم النسخ العكسي وهو أنزيم بلمرة لسلسلة من الـ DNA مستعملاً سلسلة RNA كقالب. |
| RNAse Ribonuclease | وهو من أنزيمات تقوم بتحطيم الروابط الفوسفاتية ثنائية الأستر في جزيء الـ RNA محرراً نيكلوتيدات. |
| (RNA) Ribonucleic | الحمض الريبي النووي وهو مؤلف من نيكلوتيدات مرتبطة بروابط فوسفاتية ثنائية الأستر، وهو عبارة عن سلاسل مركبة كمتممات للـDNA. |
| Ribosomal RNA | وهو الحمض الريبي النووي الريبوزومي يدخل في تركيب الريبوزومات. |
| Ribophorine | بروتين متكامل يدخل في تركيب الوحدة الريبية الكبرى يثبت من خلالها الريبوزوم على الشبكة الاندوبلاسمية. |

| | |
|---|---|
| Ribosome | الريبـوزوم وهـو الجـسيم الريبـي مؤلـف مـن RNAr وبروتين ريبي مؤلف من وحدتين صغرى وكبرى وهي المواقع التي يتم عليها تركيب البروتين. |
| Sequence | تسلسل ويشار بها إلى ترتيب متتالي الأسس الآزوتية للحمض النووي. |
| RNA Processing | وهي عملية النضج وتمثل تحويل الـ RNA إلى وظيفي من خلال إزالة الأنترونات، وإضافة متعدد الادنين للنهاية الذيله. |
| S1 Nuclease | وهو أنزيم قطع وحلمهة سلسلة مفردة من الـ RNA. |
| Screening | الغربلة وهي تهدف إلى التعرف على النسيلة في مكتبة جينية أو DNAc مكمل عن طريق التميز بين مختلف النسائل. |
| Selection | الاصطفاء وهي عملية اختيار صفة ما عن طريق الاستفادة من الـ DNA المؤشب، وتميزه عن غيره من الـ DNA غير المؤشب. |
| Structural gene | جين تركيبية وهي قابلة للنسخ على شكل RNAm وتترجم في مرحلة تالية إلى سلسلة ببتيدية. |
| Stuffer fragment | قطعة حشوة موجودة في الناقل يمكن إزاحتها وغرس قطعة من الـ DNA مكانها. |
| Substitution vector | ناقل إحلال يعمل من خلال إزاحة قطعة غير ضرورية، ومن ثم إحلال قطعة DNA غريبة مكانه. |
| Tandem repeat | تكرار متتابع: وهو يتكون من مجموعة من التتابعات المتكررة المتجاورة في الاتجاه نفسه. |

| | |
|---|---|
| Terminal Transferase | وهو أنزيم يقوم بإضافة نيكلوتيدات "إلى النهاية من سلسلة الـ DNA. |
| Template | سلسلة قالب وفقاً لها يتم تركيب سلسلة من الحمض النووي المتمم. |
| Temperate | معتدل أو غير شرس، وهو يشير إلى الفاجات التي لا تدخل الخلية في دارة انحلالية. |
| Transcribed | السلسلة القابلة للنسخ. |
| tetracycline | التتراسكلين وهو مضاد حيوي. |
| (T) Thymine | أساس آزوتي (التيمين) يدخل في تركيب الـ DNA. |
| Transcription | النسخ وهي عملية بناء للـ RNA باستعمال سلسلة DNA كقالب. |
| Transfection | إصابة تسمية وهي عملية إدخال الفاج أو الفيروس إلى الخلية المضيفة. |
| Transformation in bacteria | التحول الجرثومي وهي ظاهرة حيوية يكتسب من خلالها جرثوم لصفة جديدة عن طريق ضمه لقطعة من الـ DNA من جرثوم معطٍ. |
| RNA Transfer | *RNA. الحمض الريبي النووي الناقل يحمل الحمض الأميني ليدخل في تركيب البروتين. |
| Transformant | وهي خلية تحولت من خلال DNA خارجي. |
| Transformation | التحول وهي تتم من خلال إدخال DNA في الخلايا. |
| Transgenic | وهو الكائن الحي الذي يحمل تتابعات من الـ DNA غير العادية في ذخيرتها الوراثية. |
| Translation | الترجمة وهي عملية تركيب البروتين عن طريق قراءة الـ |

| | |
|---|---|
| .RNAm | |
| (U) Uracil | اليورسيل: أساس آزوتي يدخل في تركيب الحمض الريبي النووي (RNA). |
| Vector | ناقل وهو جزيء من الـ DNA قادر على قبول متتاليات من الـ DNA يستعمل في عملية التنسيل. |
| Virulent | شرس وهي تشير إلى الفاجات التي تؤدي إلى إدخال الخلية في دارة انحلالية. |
| Virus | فيروس وهو عامل بسيط إجباري التطفل مؤلف من مادة وراثية وبروتين غلافي. |
| YAC | كروموزوم خميرة صناعية ناقل يستعمل لتنسيل قطعة كبيرة من الـ DNA في الخميرة. |
| Zygote | بيضة ملقحة ناتجة من اندماج العروسين الذكرية والأنثوية تمثل الخلية الأولى لتعطي الجنين، وبالتالي الكائن البالغ. |

وقل رب زدني علما
جامعة دمشق
Damascus University

| -A- | |
|---|---|
| Adaptor | توصيلة |
| Adenine | أدينين |
| Allele | مورثة مقابلة |
| Anticodon | انتيكودون |
| Antibodies | أجسام مضادة |
| Monoclonal antibodies | أجسام مضادة وحيدة النسيلة |
| Polyclonal antibodies | أجسام مضادة عديدة النسائل |
| Antigen | مولد ضد |
| Agarose | الآغار |
| Antibody | ضد |
| -B- | |
| Bacillus amyloliquifaciens | باسيللاس أميلوليكويفاشيانس (بكتيريا) |
| Bacteriophages | بكتيريوفاجات(فيروسات بكتيرية- ملتهمات البكتيريا) |
| Baculovirus | فيروس باكيولو(عصوي الشكل يصيب الحشرات) |
| Bal 31 nuclease | أنزيم نووي بال 31 |
| Base- pairing | ازدواج الأسس |
| Biolistic | قاذفة أحيائية |
| Blotting techniques | تقنيات التنشيف(الشف) |
| Blunt ends | نهاية مستوية |

| Blunt-end ligation | لحام الأطراف غير المستوية |
|---|---|
| -C- | |
| C terminus | الطرف الكاربوكسيلي من الحامض الأميني |
| c DNA | DNA مكمل |
| c DNA library | مكتبة DNA المكمل |
| Cap | قلنسوة توجد على الطرف 5′- من DNA الرسول |
| Capsid | محفظة |
| Central dogma | قانون أساسي(معادلة مركزيةDNA-RNA) |
| Chromosome | صبغي- كروموزوم |
| Clone | نسيلة |
| Cloning | تنسيل |
| Clone bank | بنك النسائل=الكتبة المورثية أو مكتبة DNAالمكمل |
| Coding strand | سلسلة التشفير |
| Codon | شفرة |
| Cohesive ends | نهايات (أطراف) لاصقة (لزجة) |
| Competent | متنافس |
| Complementary | مكمل |
| Complementary DNA (c DNA) | DNA مكمل |

| | |
|---|---|
| Complementation | تكميل |
| Concatemer | سلسلة من جزيء متكرر |
| Conjugation | اقتران |
| Consensus sequence | تتابع واحد متكرر (تتابع الاتفاق) |
| Cistron | مورثة وظيفية |
| Copy number | عدد النسخ (للبلازميد في الخلية) |
| Cosmid | كوسميد |
| Cytosine (C) | سيتوزين |
| -D- | |
| Deletion | حذف |
| Deoxyribose | سكر ريبوز منزوع الأوكسجين |
| Deoxyribonucleic acid | حامض نووي ريبي منزوع الأوكسجين |
| DNA | حامض نووي ريبوزي منزوع الأوكسجين |
| DNA ase | أنزيم محلل DNA |
| DNA fingerprinting | بصمة DNA |
| DNA footprinting | طبعة أثر DNA |
| DNA ligase | أنزيم لحام DNA |
| DNA polymerase | أنزيم بلمرةDNA |
| Dot- blotting | النقطة |
| -E- | |
| Electrophoresis | رحلان كهربائي |
| Electroporation | التنقيب الكهربائي |
| Endonuclease | أنزيم داخلي |

| | |
|---|---|
| Ethidium bromide | بروميد الاثيديوم |
| Exon | أكسون |
| Extrachromosomal element | عنصرزائد عن الكروموزوم |
| -F- | |
| Flush ends | نهايات غير مستوية |
| Foldback DNA | DNAمطوي على نفسه |
| Fusion protein | بروتين دمج |
| -G- | |
| β-Galactosidase | أنزيم بيتا- جالاكتوسيديز |
| Gamete | عروس |
| Gel electrophoresis | فصل كهربائي على الهلام |
| Gene | مورثة |
| Gene bank | بنك الجينات |
| Gene cloing | تنسيل الجين |
| Gene therapy | العلاج بالجينات |
| Genetics | علم الوراثة |
| Genetic code | شفرة وراثية |
| Genetic engineering | هندسة وراثية |
| Genetic fingerprinting | البصمة الوراثية |
| Genetic mapping | وضع الخرطنة الوراثية |
| Genetic marker | علامة وراثية |
| Genome | مجين جينيوم- ذخيرة وراثية |
| Genomic library | مكتبة جينومية |

| | |
|---|---|
| Genotype | نمط وراثي |
| Germline | خط مولد للخلايا |
| Guanine | جوانين |
| -H- | |
| Heterologous | متباين |
| Homologous | متماثل |
| Homopolymer | بوليمر متماثل |
| Host | عائل (مضيف) |
| Hybrid- arrest translation | إيقاف ترجمة الهجين |
| Hbrid- release translation | تحرير ترجمة الهجين |
| Hybridisation | تهجين |
| -I- | |
| Insertion vector | ناقل غرز |
| Intervening sequence | تتابع متداخل |
| Intron | انترون |
| Inverted repeat | تكرار مقلوب |
| In vitro | في الزجاج (في المختبر) |
| In vivo | في الحي |
| -K- | |
| Kilobase (kb) | كيلو قاعدة($10^3$) |
| Klenow fragment | قطعة كليانو |
| -L- | |
| Lactose | سكر لاكتوز(سكر اللبن) |

| | |
|---|---|
| Lactose operon | مشغل (أوبيرون) لاكتوز |
| Lactose repressor | كابح (كابت) لاكتوز |
| Lambda phage | فاج لامدا أو لامدا |
| Ligation | لحام |
| Linker | رابط |
| Locus | موقع- محل |
| Lysogenic phage | فاج مولد التحليل |
| Lytic | تحللي |
| -M- | |
| Mega=$10^6$ | ميجا تعني $10^6$ |
| Messenger RNA (m RNA) | إن أيه RNA الرسول |
| Micro | ميكرو يعني $10^{-6}$ |
| Milli | ميللي تعني $10^{-3}$ |
| Monomer | جزيء أحادي |
| Mosaic | فسيفسائي |
| Multiple cloning site | موقع تنسيل متعدد |
| Mutagenesis | تطفير |
| Mutant | طافر |
| Mutation | الطفرة |
| -N- | |
| N terminus | طرف أميني(في الحامض الأميني) |
| Nano | نانو يعني $10^{-9}$ |
| Nitrogenous bases | أسس نيتروجينية |

| | |
|---|---|
| Native protein | بروتين طبيعي |
| Nested fragments | قطع معششة |
| Nick translation | ترجمة القطع |
| Northern blotting | التنشيف الشمالي |
| Nuclease | أنزيم نووي |
| Nucleic acid | حامض نووي |
| Nucleoid | نيوكليويد |
| Nucleoside | نيكليوزيد(قاعدة نيتروجينية+سكر) |
| Nucleotide | نيوكلوتيد |
| Nucleus | نواة |
| -O- | |
| Oligo (d T) | قليل التيمين منقوص الأوكسجين |
| Oligo nucleotides | النيوكليوتيدات |
| Operon | أوبيرون(مشغل) |
| Operator | مشغل |
| -P- | |
| Palindrome | ندروميه |
| Phage | فاج=بكتيريوفاج |
| Phasmide | فازميد (ناقل يتكون من تتابعات من فاج وبلازميد) |
| Phenotype | نمط مظهري أو شكلي |
| Phosphodiester bond | رابطة فوسفات ثنائي الإستر |
| Pico | بيكو يعني $10^{-12}$ |

| | |
|---|---|
| Plaque | رائقة |
| Plasmid | بلازميد |
| Poly (A) tail | ذيل عديد أدنين |
| Polylinker | عديد الروابط |
| Polymerase | أنزيم بلمرة |
| Polymerase chain reaction (PCR) | التفاعل السلسلي للبوليمراز |
| Polyuncleotide | عديد النيوكليوتيدات |
| Polyuncleotide kinase | أنزيم مفسفر عديد النيكلوتيدات |
| Polystuffer | حشوة عديدة |
| Primer | بادىء |
| Primer extension | امتداد البادىء |
| Probe | مجس– مسبار |
| Pomoter | محفز |
| Pronucleus | بدائية نواة |
| Prophage | فاج أولي |
| Purine | بيورين |
| Pyrmidine | بيريميدين |
| -R- | |
| Recombinants | مؤشب |
| Recombinant DNA | DNA مؤشب |
| Regulatory gene | جين تنظيمية |
| Repititive sequences | تتابعات تكرارية |

| | |
|---|---|
| Replacement vector | ناقل إحلال |
| Replication | تضاعف |
| Repressor | كابح- كابت |
| Restriction enzymes | أنزيمات تحديد |
| Restriction fragment | قطعة تحديدية |
| Restriction mapping | عمل خريطة تحديد |
| Reto virus | فيروس قهقري |
| Reverse transcriptase | أنزيم النسخ العكسي |
| Ribo nuclease (RN ase) | أنزيم محلل الحامض النووي الريبي |
| Ribonucleic acid (RNA) | حامض نووي ريبي |
| Ribosomal RNA (r RNA) | ريبوزومي |
| Ribosome binding site | موضع ارتباط بالريبوزوم |
| -S- | |
| S1 nuclease | أنزيم نووي إس1 |
| Saccharomyces cerivisiae | ساكارومايسيز سيريفيسي(الاسم العلمي للخميرة) |
| Screening | غربلة |
| Selection | اصطفاء |
| Southern blotting | شف ساذرن |
| Sticky ends | نهايات لاصقة |
| Structural genes | جينات تركيبية |
| Stuffer fragment | قطعة حشو |

| | |
|---|---|
| Substitution vector | ناقل إحلال |

| | |
|---|---|
| -T- | |
| Tandem repeat | تكرار تراد في (متتابع) |
| Template strand | سلسلة قالب |
| Terminal transferase | أنزيم قالب طرفي |
| Tetracycline (T c) | تتراسكلين (مضاد حيوي) |
| Thymine (T) | تيمين |
| Ti plasmids | بلاسميدات Ti |
| Transcription | نسخ |
| Transfection | إصابة قسرية |
| Transfer RNA (tRNA) | RNA ناقل |
| Transformant | كائن متحول |
| Transformation | تحول |
| Transgenic | كائن محور وراثياً |
| Translation | ترجمة |
| -U- | |
| Uracil (U) | يوراسيل |
| -V- | |
| Vector | ناقل |
| Virulent | شرس ممرض |
| -W- | |
| Western blotting | شف غربي |

| -Y- | |
|---|---|
| ياك اختصار الكروموزوم الصناعي للخميرة | Yac |
| -Z- | |
| لاقحة (زيجوت) | Zygote |

Damascus University

وقل رب زدني علما
جامعة دمشق
Damascus University

# المراجع

## المراجع العربية:


- الفيصل عبد الحسين 1999. الهندسة الوراثية- دار الشروق للنشر والتوزيع - عمان- الأردن.

- الفيصل عبد الحسين1999. التقنيات المعملية في الهندسة الوراثية -الدار الأهلية للنشر والتوزيع- عمان- الأردن.

- كيفلس ودانييل وليري هود. 1997، الشفرة الوراثية للإنسان، القضايا العلمية والاجتماعية لمشروع الجينوم البشري- ترجمة د. أحمد مستجير، عالم المعرفة- الكويت.

- معارج- محمد-1999. مقدمة في الهندسة الوراثية منشورات جامعة دمشق- كلية الطب البشري.

## مراجع الأجنبية


1-ALCAMO, E.A.1994 DNA TECHNOLOGY. THE AWESOM SKILL.C.BROW,DUBUQVE,1A.

2-BENYAMIN, LEWIN, Genes, Genes VI.1997. Oxford university press.

3-Brown.T.A.1990.Gene cloning-an introduction. 2nd.CHAMAN and hall, London.U.K.

4-BRUCE,A.WHITE. 1993.PCR Products-Current Methods and APPLICATION. HUMAN PRESS INC.

5-MICHEL S,Gunnars 1997. Arapid and Reliable PCR Based methad far detecting the Blood coagution factor. Biochemica NO.3.

6-O. Bogasra,T. Seshamma,J. Hamsen et al.1997 Application of in situ PCR Methods in Molecular Biology.

7-Peters P.1992. Biotechnology-Aguide to GeneticEnginering.W.C.Brown, Dubuque,U.S.A.

8-Lewin.B.1994 Genes.oxford university press,usa.

9-Nicholas, F.W 1996. Introduction to veterinary genetics, oxford university press.USA.

10-Sanger . F. Nicklen, s,and coulsoni, A,R .1997.DNAsequencing with chain- terminating inlibitors, pros. NATR. Acod. sci,USA.74.5463-5467

11-Desmond S.T.Nicholl.1994.AN introduction to genetic engineering. Combridge university press.

12-Anthony J. and all. 1999 genetic analysis .W .H.REEMAN NEW YORK.

13-Sylvias. Mader. 2007.Biology. Higher Education.

14-Harvey lodish and .all.1999. Moleculor Education.

Media conmected. W.H.Freeman and company.

15-WILLIAMS. KLVG, MICHAELR. CUMMHNGS. 1994. CONCEPTS OF Genentic. Macmillam college publishing company.

Damascus University

وقل رب زدني علما
جامعة دمشق
Damascus University

**المدقق اللغوي:**

د. ماجد أبو ماضي

حقوق الطبع و الترجمة والنشر محفوظة لمديرية الكتب و المطبوعات

وقل رب زدني علما
جامعة دمشق
Damascus University