٨- الخصائص الجزيئية Molecular Characteristics وتشمل :- يتبع المحاضرة السابقة //٦

a. المحتوى الأساسي للحامض النووي Nucleic Acid Base Composition

ان المحتوى الجيني للميكروبات ممكن ان يستخدم بشكل مباشر في مقارنة الكائنات وكشف التشابه والتقارب التصنيفي بينها.

كما هو معلوم , فأن شريط الـ DNA يتكون من اربع قواعد منpurine and pyrimidine والتي هي adenine (**A**), guanine (**G**), cytosine (**C**), thymine (**T**) , في الشريط المزدوج يتم ارتباط الـ **A** with **T**, and **G** with **C** . ان النسبة المئوية للقاعدتين المرتبطتين ضمن الشريط المزدوج للـ DNA تحسب من خلال الآتي :

$$Mol\ \%\ G + C = \frac{\mathbf{G + C}}{\mathbf{G + C + A + T}}\ \mathbf{x\ 100}$$

المحتوى الأساسي للـ DNA يمكن ان يحدد بعدة طرق. وعلى الرغم من ان الكشف عن المحتوى للـ G +C يمكن ان ينجز من خلال طرق سهلة منها التحليل المائي hydrolysis لشريط الـ DNA بواسطة جهاز high-performance liquid chromatography - (**HPLC**), والطرق الفيزيائية, إلا ان نسبة الـ G + C غالباً ما تحدد من خلال طريقة التليين الحراري لشريط الـ DNA, (T_m) melting temperature .

كما هو معلوم , في شريط الـ DNA ترتبطان الـ GC بأصرة هيدروجينية ثلاثية. بينما الـ AT ترتبطان بأصرة هيدروجينية ثنائية. لذلك فأن الشريط الذي يحوي نسبة عالية من الـ G + C يكون ذو نسبة عالية من الأصرة الهيدروجينية وبالتالي فأنه يتطلب درجة حرارة اعلى لفصلهما عن بعضهما. بعد عملية الفصل يتم وضع عينة الـ DNA في جهاز المطياف الضوئي Spectrophotometer حيث ان امتصاصية هذا الجهاز للـ DNA عند الطول الموجي 260nm تزداد عندما يكون شريط الـ DNA منفصلان عن بعضهما. هذا الازدياد في الامتصاصية ناتج عن ازدياد في انفصال الأصرة الهيدروجينية لكلا الشريطين. وتستمر الامتصاصية بالارتفاع الى ان تصل الى مستوى الخـــط الأفقـــي المستقيم, دلالة على الانفصال الكامل لكلا السلسلتين, وكما هو موضح في الشكل ادناه.

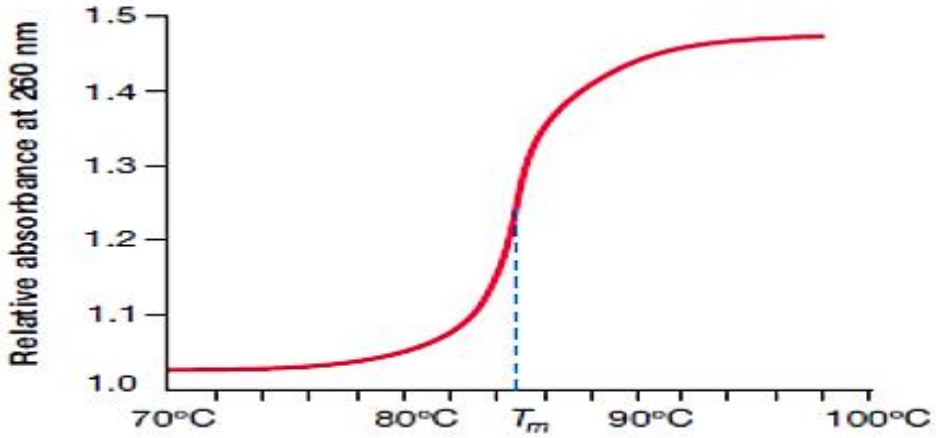


Figure 19.8 A DNA Melting Curve. The T_m is indicated.

وعند عمل مقارنة سنحدد الكمية الاجمالية للـ G + C في عينة الـ DNA ويعبر عن ذلك بنسبة مئوية وعند طرح هذه النسبة من ١٠٠ سنحصل على النسبة المئوية للـ A – T لنفس العينة. على سبيل المثال: اذا كانت عينة DNA تحتوي على ٦٠% من G + C معنى ذلك انها تحتوي على ٤٠% من A – T. لكن المحتوى القاعدي base composition يحدد فقط الكمية الاجمالية لكل قاعدة نيكلوتيدية بالمئة , ولا يعطي أي مؤشر او دلالة على تسلسل القواعد النيكلوتيدية.

هناك عدت دراسات للمحتوى القاعدي اشارت الى ان محتوى G + C في البكتريا يتراوح بين 23 -75% وعلى الرغم هذه التباين الكبير بينها , نجد ان نسبة G + C بين السلالات strains ضمن النوع الواحد species تكون ثابتة, واشارت هذه الدراسات ايضاً الى ان هناك انواع معينة من البكتريا مثل *Staphylococcus aureus* and *Clostridium tetani* تكونان متشبهتان بشكل كبير في النسبة المئوية للـ G + C , لكن بكتريا *Pseudomonas aeruginosa* تختلف عنهما اختلاف كبير, وبناءاً على ذلك فأن هناك احتمال بأن تكون *S. aureus* and *C. tetani* مرتبطتان بعلاقة وثيقة مقارنتاً بـ *P. aeruginosa*. لكن ان التشابه في النسبة المئوية لا يبرهن على ان الكائنات الحية مرتبطة بعلاقة وثيقة, وذلك لان تسلسل القواعد قد يكون مختلف تماماً بينهما. وعلى سبيل المثال : الانسان وبكتريا *Bacillus subtilis* متطابقات تقريباً في النسبة المئوية للـ G + C . تعتبر قاعدة البيانات حول محتوى الـ G + C مفيدة جداً وذلك يعود الى سببين:

الأول : يمكن من خلال هذه المعلومات التـــأكـد من تطور المخطط التصنيفي للكائنات. ففي حالة كون هناك احياء تقع ضمن نفس المستوى التصنيفي (Taxon) ولكنها ذات محتوى مختلف ومتباين من الـ G + C في هذه الحالة يتحتم وضعها في مستويات تصنيفية مختلفة.

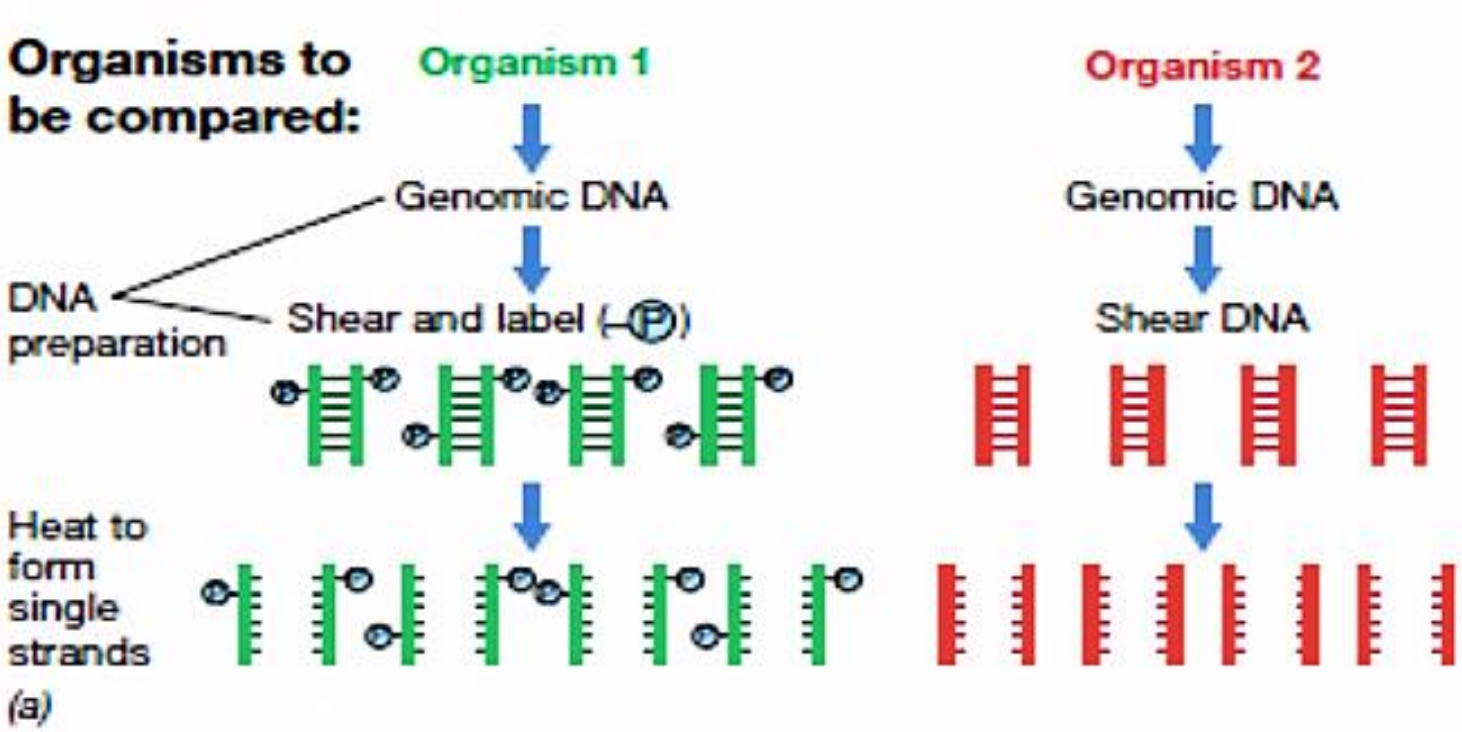
والثاني : تعتبر نسبة الـ G + C مهمة في توصيف أجناس بدائية النواة Genera بسبب ان التباين ضمن الجنس الواحد يكون اقل من ١٠% . وبالرغم من ذلك فأن المحتوى قد يتباين كثيراً بين الأجناس, فعلى سبيل المثال: بكتريا Staphylococcus تحتوي ٣٠ الى ٣٨ % من G + C , بينما بكتريا Micrococcus تحتوي نسبة ٦٤ الى ٧٥% من G + C , رغم ذلك فأن كلا الجنسين ضمن بكتريا Gram positive cocci لهما صفات اخرى مشتركة وشائعة بينهما.

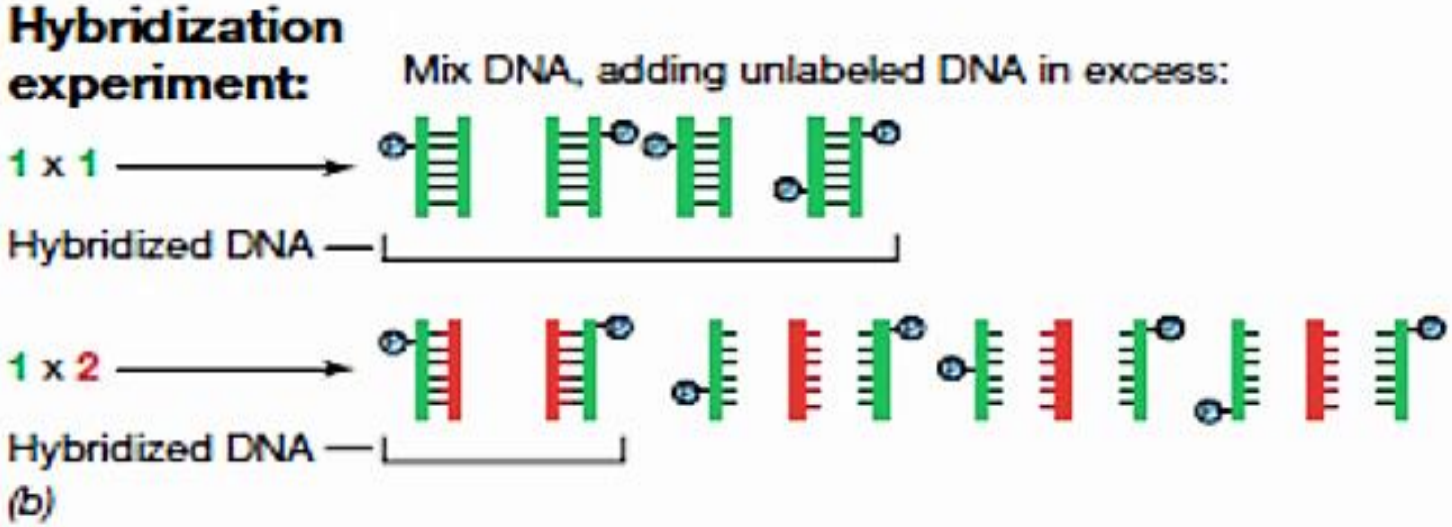
b. Nucleic acid Hybridization

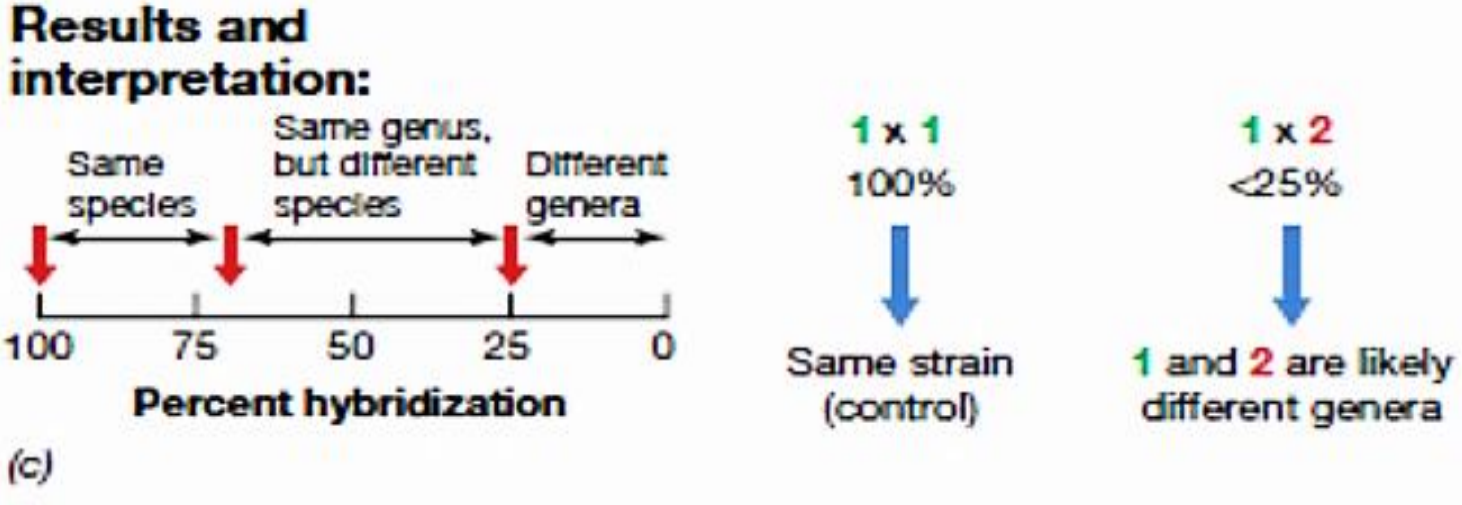
من الممكن مقارنة التشابه بين جينوم الأحياء بشكل مباشر من خلال دراسة (تهجين الحامض النووي) Nucleic acid Hybridization. ففي حال وضع خليط من سلاسل مفردة من DNA (single stranded DNA –ssDNA) لكائنين مختلفين, الغرض من ذلك معرفة مدى التقارب التصنيفي بينهما. حيث يمكن الحصول على ssDNA من خلال تسخين الشريط المزدوج للـ DNA كما اشرنا اليه انفاً. وبعد الحصول على السلاسل المفردة يمكن خفض درجة الحرارة الى حوالي ٢٥ م او اقل من ذلك ليتسنى للقواعد النيكلوتيدية في كلا الشريطين من التكامل مع بعضها البعض لتشكيل شريط مزدوج هجين Hybrid. بينما السلاسل غير المتكاملة ستبقى بشكل منفرد ولا يمكنها الازدواج مع السلسة الأخرى. ولكون ان هناك سلاسل الـ DNA متشابه لكنها غير متطابقة identical , فأن ذلك يؤدي الى ارتباط كلا السلسلتين (المتشابهين غير المتماثلتين) لكنها تكون اقل استقراراً حرارياً من تلك المتطابقة كلياً. لذلك فأن تحضين هذين السلسلتين بدرجة حرارة اقل من T_m بـ ٣٠-٥٠ م يؤدي الى اعادة الهجين المتكون الى حالته الأولى التي هي ssDNA. بينما الهجين المتطابق identical Hybrid فمن الممكن ان يحضن بـ ١٠-١٥ م اقل من درجة T_m.

احد الطرق الواسعة الاستخدام في تقنية التهجين هي طريقة (**nylon filters**) والتي غالباً ما تستخدم لمعرفة درجة القرابة بين الكائنات التي ترتبط بعلاقة تصنيفية وثيقة فقط. في هذه الطريقة يتم ربط سلسلة مفردة للـ DNA غير معلمة بمادة مشعة بالـ nylon filters ثم تحضن مع السلسلة الثانية من الـ DNA المعلمة بأحد النظائر المشعة ^{32}P, ^{3}H , ^{14}C . وبعد ان تحدث عملية التهجين بين السلسلتين يتم غسلها للإزالة السلاسل غير المرتبطة من الخليط. ثم يقاس مقدار الاشعاع المتبقي. كمية

الاشعاع تعكس مقدار التهجين الحاصل بين السلسلتين وهذا يعكس مقدار التشابه بين تسلسلات الـ DNA. درجة التشابه او الـ Homology يعبر عنها بالنسبة المئوية لمقدار الـ DNA المشع المتبقي على الفلتر مقـــــارنتاً مع النسبة المئوية لمقدار الـ DNA لسلسلتين متطابقتين تحت نفس الظروف.


Organisms to be compared:
Organism 1
Organism 2
Genomic DNA
Genomic DNA
DNA preparation
Shear and label (P)
Shear DNA
Heat to form single strands
(a)


Hybridization experiment:
Mix DNA, adding unlabeled DNA in excess:
1 x 1
Hybridized DNA
1 x 2
Hybridized DNA
(b)


Results and interpretation:
Same species
Same genus, but different species
Different genera
100
75
50
25
0
Percent hybridization
1 x 1
100%
Same strain (control)
1 x 2
<25%
1 and 2 are likely different genera
(c)

من جانب اخر, في حال ان هناك كائنات متباعدة تصنيفياً بشكل كبير فمن الممكن استخدام طريقة DNA-RNA Hybridization. في هذه الحالة يستخدم شريط tRNA او rRNA المعّلم بنظائر مشعة. حيث يمكن تحديد العلاقة بين الكائنات المتباعدة بهذه الطريقة وذلك لكون جينات rRNA و tRNA توجد فقط في جزء صغير من جينوم الـ DNA, وكذلك لكونه جزء غير قابل للتطور بشكل سريع كما في معظم اجزاء الـ DNA. هذه التقنية مشابهة لتقنية DNA-DNA Hybridization انفة الذكر حيث تربط السلسلة المفردة من الـ DNA غير المعلمة بمادة مشعة بالفلتر ويحضن مع الـ rRNA المعلم بمادة مشعة ثم يغسل ويقاس نسبة الاشعاع. وبشكل اكثر دقة في قياس مقدار التشابه بين السلسلتين Homology يتم ايجاد درجة الحرارة المطلوبة لعزل او ازالة نصف شريط الـ rRNA المشع من الفلتر. وكلما زادت درجة الحرارة دلالة على زيادة الترابط والتشابه بين السلسلتين.

Determining DNA and RNA Sequences .c

في عام ١٩٧٧ قام عدد من العلماء وهم كل من (*Alan Maxam and Walter Gilbert*) بالإضافة الى طريقة العالم *Frederick Sanger* والاخيرة تعتبر الاكثر شيوعاً وتعرف بأسم العالم نفسه Sanger DNA Sequencing , قاموا باستحداث طريقة جديدة لتحديد التسلسل النيكلوتيدي لشريط الـ DNA . حالياً تستخدم تقنيات متطورة لمعرفة وتحديد تسلسلات القواعد النيكلوتيدية للـ DNA and RNA. حيث تستخدم تقنية PCR وتقنية DNA synthesizer.

Protein Profiles and Amino Acid Sequences .d

جميع البروتينات تتكون من تسلسل معين من الاحماض امينية ولكل بروتين شكل خاص به. تعتبر هذه الطريقة من الطرق المختبرية الحديثة التي تسمح لمقارنة خلايا الكائنات الحية وفقاً لخصائص بروتيناتها. وعلى الرغم من التباين بين بروتينات الخلايا فان تطبيق هذه التقنية يكون صعباً على الكائنات متعددة الخلايا. لذلك فأن هذه التقنية اقتصر استخدامها على الكائنات وحيدة الخلية. ان تحليل البروتين protein profile هو التهيئة المختبرية للبروتينات الموجودة في الخلية. ولكون ان جميع البروتينات هي نواتج للجينات المشفرة, فأن خلايا كل نوع يصنع بروتينات فريدة في تركيبها عن الأخر ومتميز كالبصمة الوراثية في البشر (**حيث ان بعض الأحماض الأمينية يشفر لها اكثر من كود**).

يتم تحليل البروتينات باستخدام طريقة Polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) والتي تفصل البروتينات بناءاً على الوزن الجزيئي. في هذه الطريقة يتم اخذ البروتينات بعد تحليل الخلية بواسطة مواد حالة, ثم توضع البروتينات في حفر wells الألواح الرقيقة لـ polyacrylamide gel بعد ذلك توضع الألواح في حجرة الجهاز المملوءة بالمحلول البفر Buffer (الدارئ). بعد ذلك يمرر التيار الكهربائي خلال الجل لفترة معينة. يعمل التيار على هجرة جزيئات البروتين الى النهاية المناظرة للجل. جزيئات البروتين الكبيرة تتحرك بشكل ابطء من تلك الصغيرة. بعد انتهاء فترة الهجرة للبروتينات يتم ايقاف التيار الكهربائي ومن ثم تصبيغ الجل, حيث تعمل الصبغة على توضيح موقع كل بروتين. الحزم التي تقع في نفس المكان على الجل والتي تعودان لنوعين مختلفتين من الخلايا دلالة على انهما بروتين متشابه.

إن تحديد تسلسل الأحماض الامينية في البروتينات يعطي فكرة عن التشابه والاختلاف بين الاحياء. وغالباً ما تستخدم بروتينات معينة, مثل Cytochromes والتي تساهم في عملية الأكسدة الايضية في بعض الاحياء , وكذلك الـ histones, heat-shock proteins, transcription and transport proteins في دراسة تسلسل الاحماض الامينية. وقد جرت العادة على ان يحدد تسلسل الاحماض الامينية لنفس البروتين الموجود في عدة احياء. وكما في تقنية DNA-Hybridization فأن مدى انسجام تسلسل الاحماض الامينية في البروتينات دلالة على الترابط بين الاحياء.

ان المحتوى البروتيني للخلية يحدد من خلال شريط الـ DNA للكائن. لذلك فأن تحليل البروتينات وتحديد تسلسل الأحماض الأمينية للبروتينات كلاهما مفيد في قياس مدى الترابط بين الأحياء كما في DNA-Homology .

٩- Properties of Ribosomes

تعتبر الريبوسومات اماكن صنع البروتين في خلايا بدائية وحقيقية النواة. الـ RNA في الريبوسومات يمكن فصلها الى عدة انواع وفقاً لحجمها. ان الوحدة 16S rRNA تعتبر ذو اهمية كبيرة في دراسة العلاقة التطورية للأحياء لكون الطفرات الوراثية تكون نادرة الحدوث في هذا الجزء وبالتالي فأن تطور الريبوسومات يكون بطيء جداً.

ان درجة التشابه بيت تسلسلات الـ 16S rRNA لكائنين يعطي دليل على وجود علاقة تطورية بينهما, ففي حال كون التشابه بين التسلسلات كان كبير جداً فهذا دليل على كون الكائنين مرتبطان بعلاقة تطورية وثيقة جداً.