جامعة تكريت
كلية العلوم
قسم علوم الحياة
المرحلة الرابعة
فرع المايكرو / صباحي ومسائي

المادة: وراثة احياء مجهرية نظري

اسم الطالب:

المحاضرة الأولى

الطبيعة الوراثية للحامض النووي منقوص الاوكسجين DNA

المقدمة:

لم يحض الحامض النووي منقوص الاوكسجين بالاهتمام لاعوام كمادة وراثية لعقود طويلة امتدت منذ التعرف على موقعه في الخلية العقد السابع من القرن الثامن عشر. وطغى الاهتمام بالبروتينات لما تتميز به من صفات جعلت الكثير يعتقد بأنها المادة الوراثية المسؤولة عن انتقال الصفات والمعلومات الوراثية، وساهم ذلك الكم الكبير من البحوث العلمية حول تركيب وصفات البروتينات. لم يكن من السهولة الحديث عن الحامض النووي كمادة وراثية لغياب العديد من المعلومات والأدلة التي يمكن من خلالها اثبات انه المادة الوراثية. الا ان المعلومات اللاحقة التي تراكمت حول الحامض النووي اثارت الشكوك حول دور البروتينات كمادة وراثية، وساهمت بحوث العلماء جرفس عام 1928 وافري وجماعته عام 1944 وغيرهم في ابراز دور الحامض النووي منقوص الاوكسجين كمادة وراثية. وازاحت التجارب والبحوث اللاحقة اللثام على حقيقة الحامض النووي ودوره بما لايقبل الشك وسقطت بذلك دعاوى دور البروتينات كمادة وراثية. ويعتبر ظهور نموذج الحلزون المزدوج وما رافقته من حقائق تتويج حقيقي للحامض النووي اذ اصبح المادة الوراثية حقيقة لا يختلف عليها اثنان.

هل ان الحامض النووي منقوص الاوكسجين هو المادة الوراثية؟

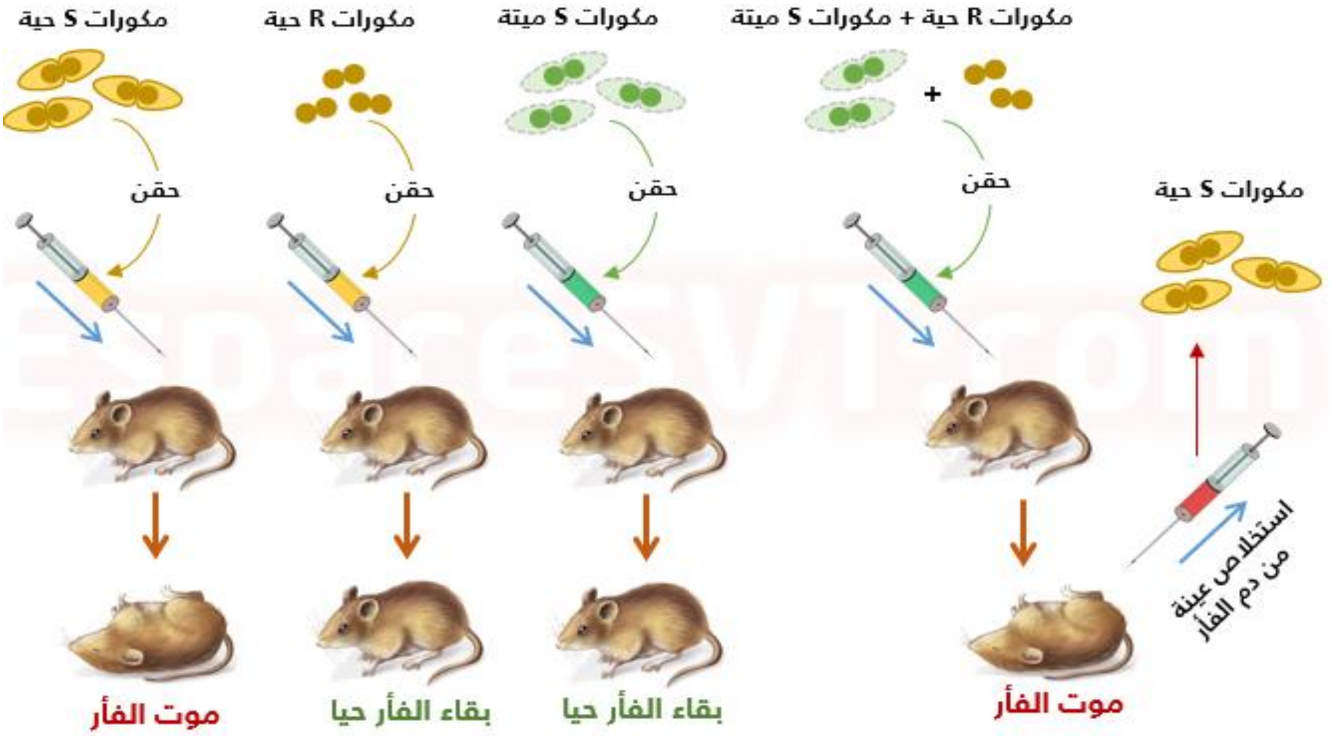
تم التعرف على التركيب الكيميائي للحامض النووي منقوص الاوكسجين من قبل أكثر من مئة عام بعد فترة قصيرة من اكتشافه في عصارة **نوى خلايا الكريات البيضاء** عام **1871** من قبل العالم فريدريك **Friedrch Miescher** والذي أطلق عليه آنذاك تسمية النيوكلين **Nucleine**. لقد جذبت تلك العصارة الانتباه لما تمتلكه من **محتوى عالي من الفسفور وطبيعتها الحامضية** الا انها لم تجذب الانتباه الى دورها الوراثي حيث كان معظم الانتباه مركز في بداية هذا القرن على البروتينات. إلا انه في الفترة من عام **1928** وحتى عام **1952** نشر العديد من الأبحاث العلمية التي سلطت الضوء على الطبيعة الوراثية لهذا الحامض وليس على البروتينات كما كان معتقدا آنذاك.

تجارب المكورات المسبحية لذات الرئة *Streptococcus pneumonia*:

من المعروف بأن ها النوع من المكورات المسبحية له قابلية على إصابة الأجهزة التنفسية للبائن بذات الرئة. تأتي قابلية هذه المكورات على الإصابة المرضية من الكبسولة المتعددة السكر **Polysaccharides capsule** والتي تحيط بها. تمنع هذه الكبسولة الجهاز المناعي للحيوانات من التأثير على المكورات. يدعى هذا الطراز من المكورات بالطراز (Type S). كما ان هناك طراز آخر من هذه المكورات تفتقد الى الكبسولة نتيجة لفقدانها الانزيم الضروري لتصنيع هذه الكبسولة (طفرة وراثية) وبالتالي فانها غير قادرة على إصابة الحيوانات بذات الرئة. يدعى هذا الطراز بالطراز (Type R). وتتميز مستعمراته النامية بخشونة مظهرها الخارجي **Rough** بينما تتميز مستعمرات S بكونها ناعمة المظهر **Smooth**. كما يطلق على الطراز المرضي من هذه المكورات بالطراز المرضي **Virulent** وعلى الطراز الثاني الغير مرضي **Avirulent**. في عام **1928** وجد العالم جرفث **Fredrick Griffiths** بأن حقن المكورات الحية من الطراز **R** او المكورات الميتة بالحرارة من الطراز **S** في جسم الفئران ليس له تأثير على الإصابة بالامراض التنفسية. إلا ان حقنها بخليط من المكورات الحية للطراز **R** ومكورات ميتة من الطراز **S** أدى الى ظهور الامراض التنفسية المقترنة بالاصابة بالطراز **S**. ان الفحص الذي تم اجراءه على البكتيريا المعزولة من دماء حيوانات التجارب اثبت وجود المكورات ذات الكبسولة والتي تميز الطراز **S**. اثبتت هذه التجربة بأن تحول المكورات من الطراز **R** الى الطراز **S** ليس ناتجا عن طفرة وراثية (التي تحدث بمعدل خلية واحدة لكل 10^7 خلايا)

بسبب احتواء جميع المكورات المعزولة على كبسولة وليس على اعداد قليلة جدا كما هو الحال في الطفرات الوراثية. بينت هذه النتائج بأن المكورات الميتة من الطراز **S** عملت بطريقة ما على اكساب مكورات الطراز **R** الحية القابلية على مقاومة الجهاز المناعي للفئران والتكاثر وإحداث الإصابة بذات الرئة، وهذا معناه بأن مكورات الطراز **R** امتلكت تغييرا وراثيا مكنها من المقاومة وكان هذا التغيير الوراثي قد جاء من المواد الوراثية للطراز **S**.

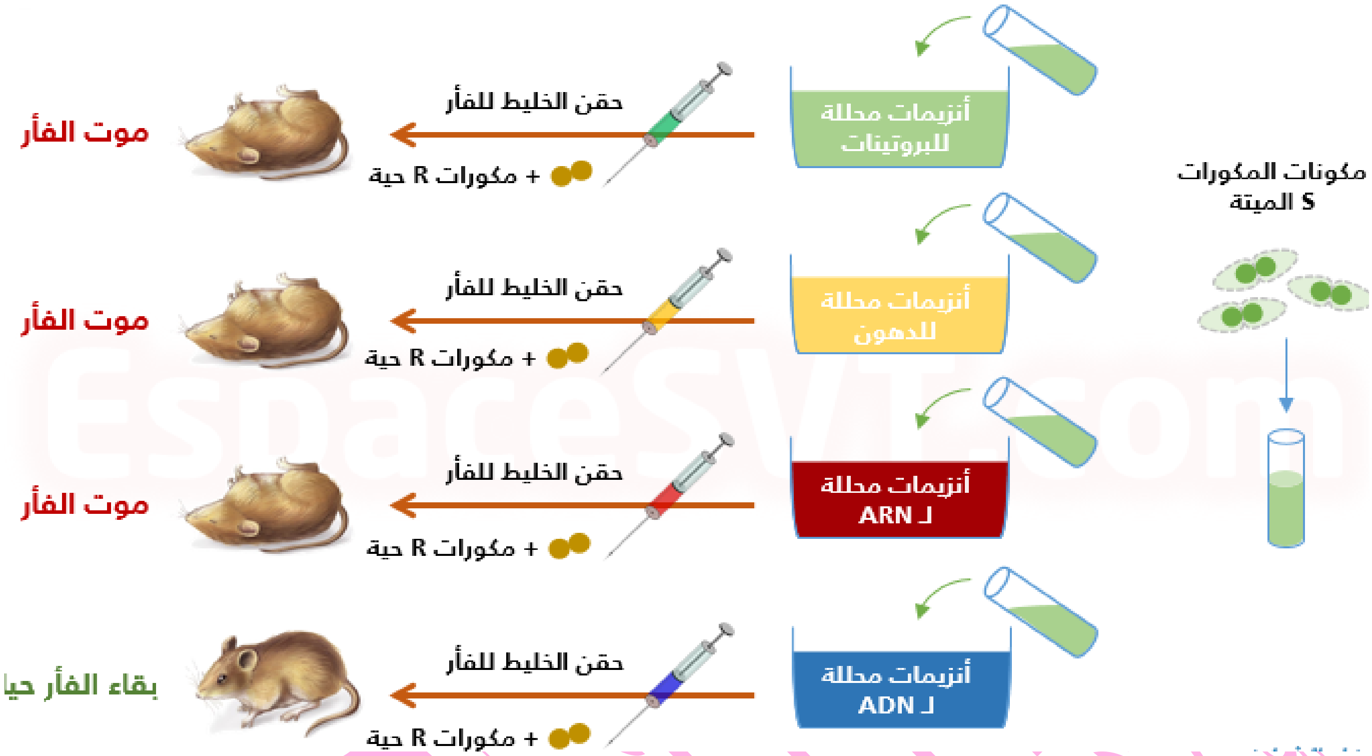
الشكل أعلاه تجربة فريدرك جرفش التي اثبت من خلالها الطبيعة الوراثية للحامض النووي، اثبتت التجربة قدرة البكتيريا المرضية المقتولة على تحويل البكتيريا غير الممرضة الى بكتيريا ممرضة.



تجارب المكورات الثنائية لذات الرئة Diplococcus pneumonia:

في عامي 1914 و 1952 نشر بحثان سلطت نتائجهما الضوء على **الحامض النووي منقوص الاوكسجين DNA كمادة مسؤولة عن توارث الصفات.**

اجري البحث الأول من قبل العالم افري، ماكلويد وماكرثي 1944 (Avery,Macleod,McCarty,1944). لقد دلت نتائج هذا البحث بأن الحامض النووي منقوص الاوكسجين المنقى من السلالة **S** من هذه المكورات (التي لها قابلية أيضا على إصابة الجهاز التنفسي للبائن بمرض ذات الرئة) قادرا على تحويل السلالة **R** غير المرضية الى السلالة **S** لها القابلية على الإصابة بذات الرئة. لقد تكررت القدرة على التحويل عندما اضيف الحامض النووي منقوص الاوكسجين المستخلص من السلالة الجديدة الى سلالة **R** ثالثة غير مرضية حيث أدى الى تحويلها الى سلالة **S** المرضية كما في الشكل (2-2)

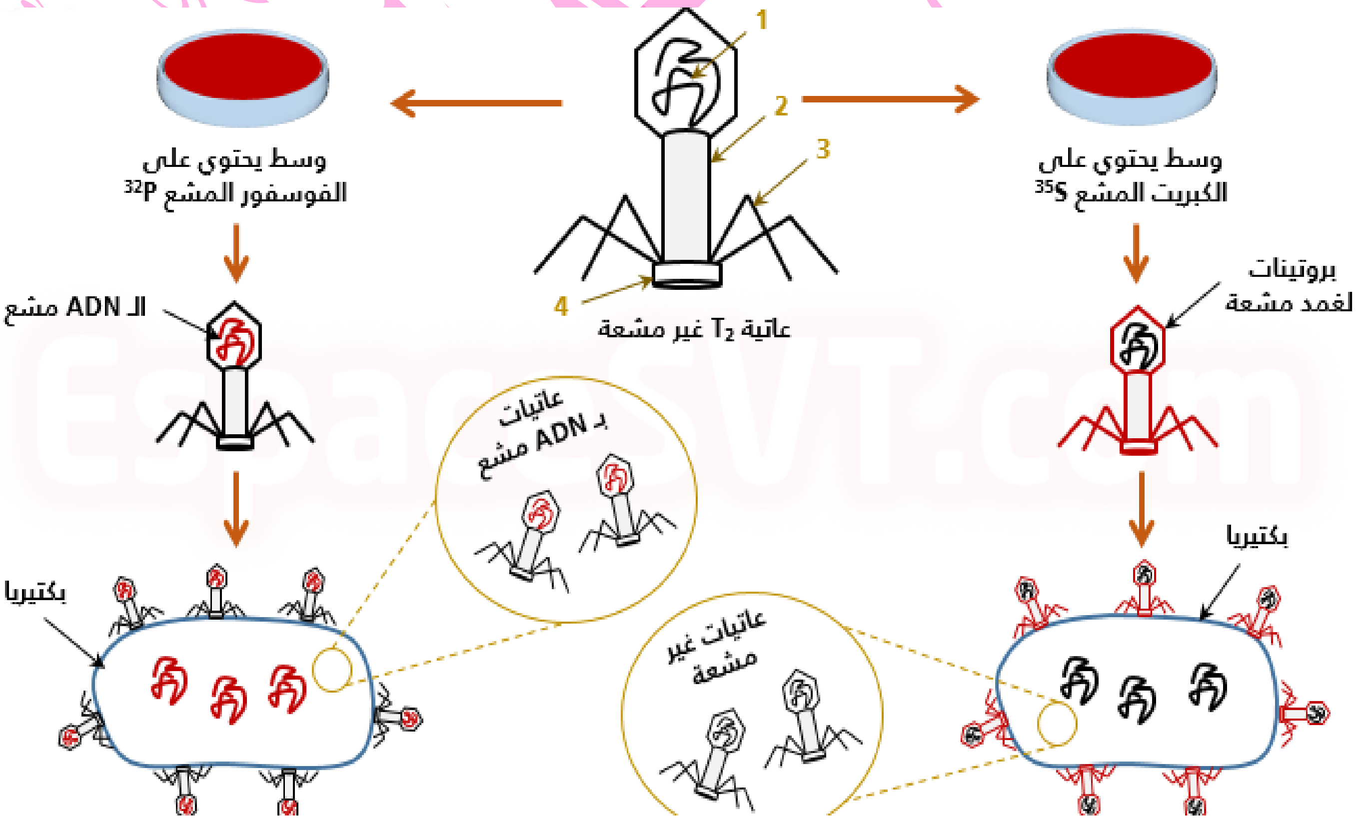


ولاجل اثبات مسؤولية الحامض النووي منقوص الاوكسجين دون الحامض النووي الرايبوزي في نقل الصفات الوراثية الجديدة قام هؤلاء العلماء بمعاملة الحامض النووي منقوص الاوكسجين المستخلص من المكورات من الطراز S مرة بالانزيم المحطم للحامض النووي الرايبوزي **Ribonuclease – Rnase** لاجل التخلص من الحامض النووي الريبوزي الذي يمكن وجوده مع الحامض النووي منقوص الاوكسجين (من الصعب آنذاك فصل الحامض النووي منقوص الاوكسجين بصورة نقية تماما كما هو الحال عليه الان, وغالبا ما يكون ملوثا بالحامض النووي الرايبوزي) ومـــرة ثانية بالانزيم المحطم للحامض النووي منقوص الاوكسجين **Deoxyribonuclease-DNase** الذي يؤدي الى تحطيم الحامض النووي منقوص الاوكسجين. عند إعادة التجارب السابقة مع نماج الحامض النووي منقوص الاوكسجين المعامل بالانزيمات وجد بأن عملية تحويل السلالة **R** الى السلالة **S** لم تحدث عند معاملة السلالة **R** مع الحامض النووي المعامل بالانزيم المحطم للحامض النووي منقوص الاوكسجين. بينما تحولت هذه السلالة الى السلالة **S** عند معاملتها بنموذج الحامض النووي المعامل بالانزيم المحطم للحامض النووي الرايبوزي. اكدت نتائج هذه التجارب مسؤولية الحامض النووي منقوص الاوكسجين على ظهور الصفات الوراثية الجديدة وتحول مكورات السلالة **R** الى السلالة **S**.

في الشكل (2-2): تجربة افري وجماعته التي اثبتت ان الحامض النووي منقوص الاوكسجين هو المسؤول عن ظهور الصفات الجديدة وتحول البكتيريا الى سلالة مرضية.

تجارب هيرشي وشاس على العاثي T_2:

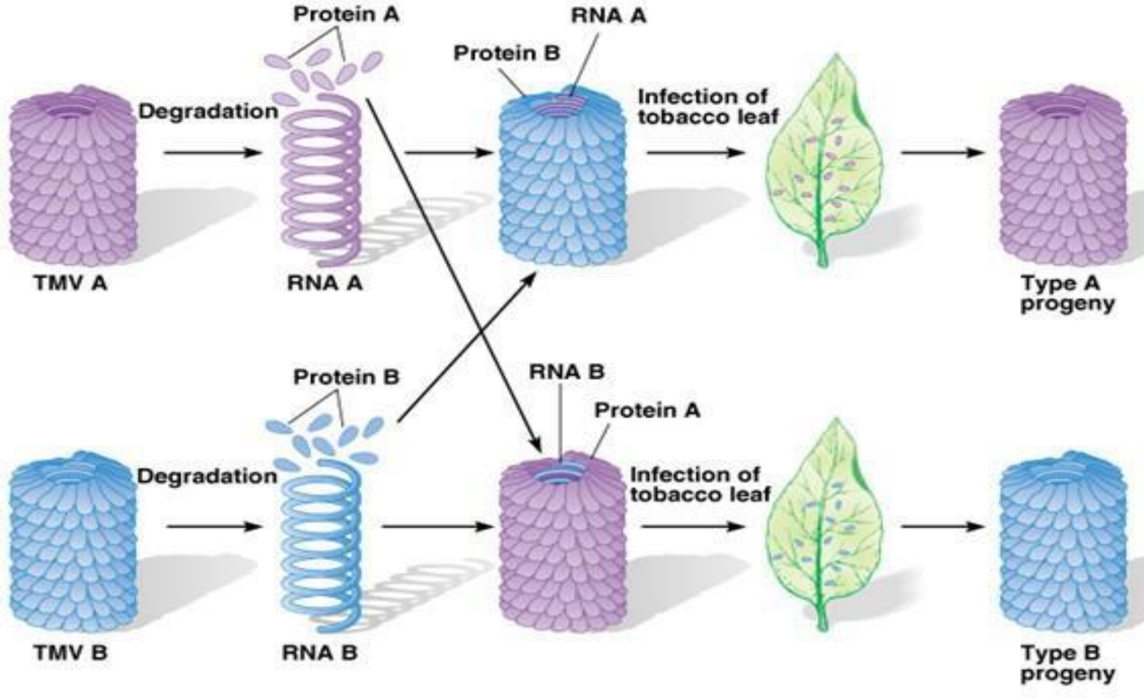
اما البحث الثاني والذي نشر عام **1952** من قبل هيرشي وشاس (**Hershey and Chase ,1952**) فقد تضمن استخدام النظائر المشعة التي ظهرت في نهاية الاربعينات لدراسة الحامض النووي منقوص الاوكسجين لاثبات كونه المادة الوراثية. قام الباحثان باستخلاص عاثيات **T_2 Phage** معاملة اما بنظير الكبريت **35** (**S^{35}**) الذي يرتبط فقط مع البروتين لوجود الكبريت في تركيبه الكيميائي او بنظير الفسفور **32** (**P^{32}**) الي يرتبط فقط مع الحامض النووي لوجود الفسفور في تركيبه الكيميائي. لقد تم عزل هذه العاثيات المعاملة بالنظائر المشعة عن طريق تنمية بكتيريا القولون ***E. coli*** المصابة بالعاثي **T_2** ولعدة أجيال على أوساط زرعية تحتوي اما على نظير الكبريت **35** فقط او على نظير الفسفور **32** فقط. لقد استخلص البروتين المعلم والحامض النووي منقوص الاوكسجين المعلم من هذه العاثيات واستخدمت هذه بعدها بثلاث تجارب تحول **Transformation** مع بكتيريا القولون. في التجربة **الأولى** تم إصابة البكتيريا بخلاصة من البروتين المعلم بنظير الكبريت **35** والحامض النووي منقوص الاوكسجين المعلم بنظير الفسفور **32** فقط **والثانية** بخلاصة من الحامض النووي منقوص الاوكسجين **DNA** المعلم بنظير الفسفور **32** فقط **والثالثة** بخلاصة من **البروتين** المعلم بنظير الكبريت **35** فقط. ثم بعدها تم إزالة المواد الزائدة العالقة بجدران البكتيريا عن طريق الخلط مع وسط زرعي سائل دون الاضرار في خلايا البكتيريا ثم ترسيب البكتيريا بواسطة جهاز الطرد المركزي **Centrifuge**. فحص الراشح الحاوي على بقايا البروتين والحامض النووي منقوص الاوكسجين التي لم تدخل البكتيريا والراسب الي يمثل البكتيريا المصابة في التجارب الثلاثة ووجد بان الراشح يحتوي على نسبة عالية من بروتين العاثي **T_2** ويكاد يكون الحامض النووي منقوص الاوكسجين معدوما بينما احتوت البكتيريا (الراسب) على كمية كبيرة من الحامض النووي منقوص الاوكسجين ونسبة ضئيلة جدا من البروتين الشكل (**2-3**). كما وجد بأن الأجيال الجديدة من العاثيات **T_2** الناتجة من التجارب تحتوت فقط الحامض النووي منقوص الاوكسجين معلم ولا أثر لاي نشاط اشعاعي لنظير الكبريت **35**. لقد **اثبتت هذه التجارب بشكل لايقبل الشك بأن الحامض النووي منقوص الاوكسجين هو المادة الوراثية المسؤولة عن نقل الصفات**.



شكل (2-3): مخطط لتجربة هيرشي وشاس لاثبات ان الحامض النووي هو المادة الوراثية. ثم في هذه التجربة تعليم بروتين اغلفة العاثي T_2 والـ DNA بنظير الكبريت 35 والفسفور 32 على التوالي وبعد إصابة البكتيريا بهذا العاثي لوحظ انتقال الحامض النووي DNA الى البكتيريا دون الاغلفة وتم تكوين جيل جديد من العاثيات معلم بنضير الفسفور 32.

تجارب كونرات وسانجر على راشح التبغ الموزائيكي:

في السنوات القليلة التي تلت إجراء التجارب السابقة وجد بأن هناك بعض الاستثناءات كما هو الحال في معظم الرواشح الحاوية على الحامض النووي الرايبوزي فقط، وحيث ان الحامض النووي منقوص الاوكسجين غير موجود في هذه الرواشح فإن نتائج التجارب المجراة على هذه الرواشح أعطت تنائج مشابهة مما دفع الباحثين الى دراسة العلاقة بين الحامض النووي الرايبوزي والحامض النووي منقوص الاوكسجين وكيفية حصول التحول عن طريق الحامض النووي الرايبوزي للراشح. استخدم كونرات وسانجر (Conrrat and Singer,1957) في تجاربهما ضروبا عديدة من راشح مزائيك التبغ (TMV) Tobacco mosaic virus الذي يتالف من بروتين وحامض نووي رايبوزي. تم فصل بروتينات هذه الضروب عن الحامض النووي الرايبوزي العائد لها وتم دمج بروتين مع ضرب حامض نووي ريبوزي مـــع ضرب اخـــر لتخليق ضـــروب جديـــدة ذات بروتين مختلف شكل (2-4) وعند إصابة أوراق التبغ بتلك الضروب الجديدة انتجت إصابة ونسل وراثي مماثل للضروب الابوية التي اخذ منها الحامض النووي الريبوزي. لقد اكدت هذه التجارب بأن المادة الوراثية في هذا الرواشح هي الحامض النووي الريبوزي وليس البروتين. اثبتت الأبحاث الحديثة حول هذه الرواشح ورواشح أخرى بأن الحامض النووي الريبوزي يتحول الى حامض نووي منقوص الاوكسجين بعد دخوله خلايا المضيف ليكمل دورته داخل المضيف لتكوين ذرية جديدة حاوية على الحامض النووي الرايبوزي. لقد اثبتت النتائج هذه التجارب وتجارب أخرى عديدة أجريت فيما بعد بأن ما كان يعتقده العلماء في بداية هذا القرن من ان البروتينات هي العوامل الوراثية بسبب امتلاكها ما يعرف بالتباين الكيميائي Chemical diversity والذي لم يكن معروفا في الحامض النووي المنقوص الاوكسجين والضروري للمادة الوراثية كان خطأ كبيرا وخصوصا بعد ما نشر العالمان واطسون وكريك عام 1953 نموذجا محتملا للتركيب الجزيئي للحامض النووي الريبوزي المنقوص الاوكسجين الذي فتح الافاق الحقيقية لدراسة الوراثة الجزيئية وعلوم الحياة الجزيئي.



شكل (2-4): تجارب كونرت وسانجر لاثبات دور المادة الوراثية حيث قاما بفصل بروتينات اغلفة العديد من سلالات راشح التبغ **TMV** عن الحامض النووي ثم دمج بروتين سلالة مع **RNA** سلالة أخرى حيث ان السلالة الناتجة كانت تشبه السلالة التي تم اخ الحامض النووي منها.

مميزات المادة الوراثية:

هناك ثلاث مميزات لاعتبار المادة الحامض النووي منقوص الاوكسجين هو المادة الوراثية وهي مميزات توفرت بشكل فريد فيه دون غيره من البوليمرات، وهذه المميزات هي:

١- ان المادة الوراثية يجب ان تحمل جميع المعلومات الضرورية لادارة تنظيم محدد ودقيق.

تتمكن المورثات من التعبير عن نفسها **Expression** من خلال تصنيعها للبروتينات الخاصة بكل منها. ان هذه البروتينات هي أيضا بوليمرات مكونة من عدة مئات من النسخ المكررة لعشرين وحدة جزيئية مختلفة تدعى الاحماض الامينية. تتضمن تتابعات هذه الاحماض الامينية جميع الصفات الكيميائية والفيزيائية للبروتينات. ولابد للمادة الوراثية من تنظيم بداية ونهاية عملية تصنيع هذه البروتينات. ان التتابع الكامل لكل حامض اميني من الاحماض الامينية المكونة للبروتين المنتج يحتاج الى شفيرة **Code** من المونوميرات المختلفة مثبته في المادة الوراثية. ولو ان المادة الوراثية مكونة من وحدة مكرره مفردة مثل الادنين المتعدد **Polyadenine** او أي وحدة مكررة مفردة مثل تتابع **AGCTAGCTAGCT** فإنها لاتتضمن المعلومات الكاملة بل معلومات قليلة جدا بسبب محدودية التتابع المكررة ولكن بما ان القواعد الأربعة المكونة للحامض النووي يمكن ترتيبها بأي تتابع وبما ان التتابع يمكن ان يختلف من جزء من الجزيئة الى آخر ومن كائن الى آخر فإنه يمكن ان يتضمن على تتابعات فريدة عديدة يمكن ان يكون أي منها هو مورث مفرد. وبذلك فإن عملية انتاج البروتينات يمكن ان تتم وتدار من خلال سلسلة طويلة من الحامض النووي. والسؤال الذي يخطر بالبال من خلال هذا التوضيح هو انه كيف تتمكن سلسلة مكونة من اربعة قواعد من انتاج عدة مئات من تتابعات الاحماض الامينية ومن خلال استخدام 20 حامض اميني لانتاج سلسلة من متعدد الببتيدات؟

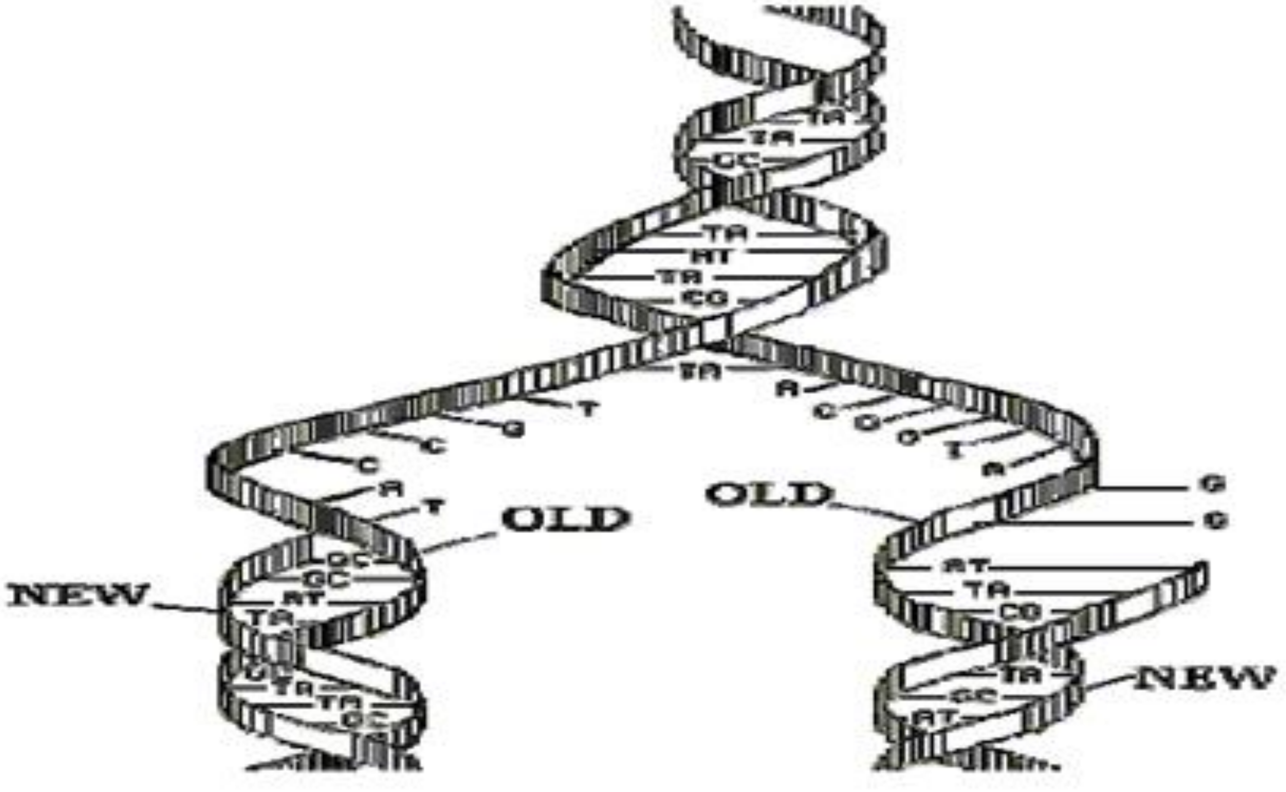
يتم ذلك مـن خـلال عمليـة بسيطـة وذلك بقـراءة تتابعات قواعـد الأوامر **Orders** على الحامض النووي (يتم ذلك بقراءة كل ثلاث قواعد سوية) ومن ثم ترجمتها الى تتابعات لحامض اميني معين وتدعى تتابعات قواعد الأوامر (أي كل ثلاثة قواعد) بالشفرة الوراثية **Genetic code**

٢- يجب على المادة الوراثية ان تتضاعف بشكل دقيق جدا فإن جميع المعلومات التي تحتويها سوف تنتقل بالضبط الى الخلايا الجديدة Daughter cell. ان التضاعف المضبوط لجزيئة الحامض النووي يكمن في تكامل **Complementary** ازواج القواعد النايتروجينية **AT** والـ **GC** في اشرطة النيوكليوتيدة. وعن طريق فصل اشرطة الحامض النووي عن بعضها البعض يمكن ان يخدم كل شريط كقالب لصناعة شريط جديد مما ينتج في النهاية زوجان من الأشرطة المحلزنة المتشابهه تماما الشكل (**2-5**)

٣- ان المادة الوراثية يجب ان تكون قادرة على ظهور طفرات وراثية آنية والتي تنتقل وراثيا الى الأجيال القادمة.

ان الخصوصية في ازدواج **Pairing** قواعد البيورينات والبرمدينات في تركيب الحامض النووي يحتاج الى موقع ثابت لذرات الهيدروجين في القواعد. ولكن ان تحصل حركة انتقالية لهذه الذرات أحيانا. فمثلا الادنين والسايتوسين لايمكن ان ينتقلا لتكوين زوج قاعدي ولكن زحف ذرة الهيدروجين من الموقع **6 – amino** في الادنين الى الموقع **N-1** سوف يسمح للهيدروجين بأن يرتبط بين تلك القواعد الشكل (2-6). فإذا ما حدث مثل هذا الازدواج النادر

خلال عملية تضاعف الحامض النووي فإن أحد اشرطة الحامض سوف يحمل سايتوسين بدلا من الثايمين في تلك النقطة ويؤدي ذلك الى تغيير قاعدة نيتروجينية واحدة في شفرة وراثية معينة بحيث تتغير المعلومات التي تحملها هذه الشفرة. مثل هذه المقدرة على تغيير موقع الهيدروجين في القواعد تدعى **بالانحراف التاتوميري Tatomeric shitt** وتكون في العادة نادرة وتترافق مع ثبوتية المعلومات الوراثية.

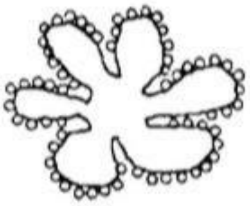


إلى الموقع 1-Nitrogen مما يولد الطفرة الوراثية .

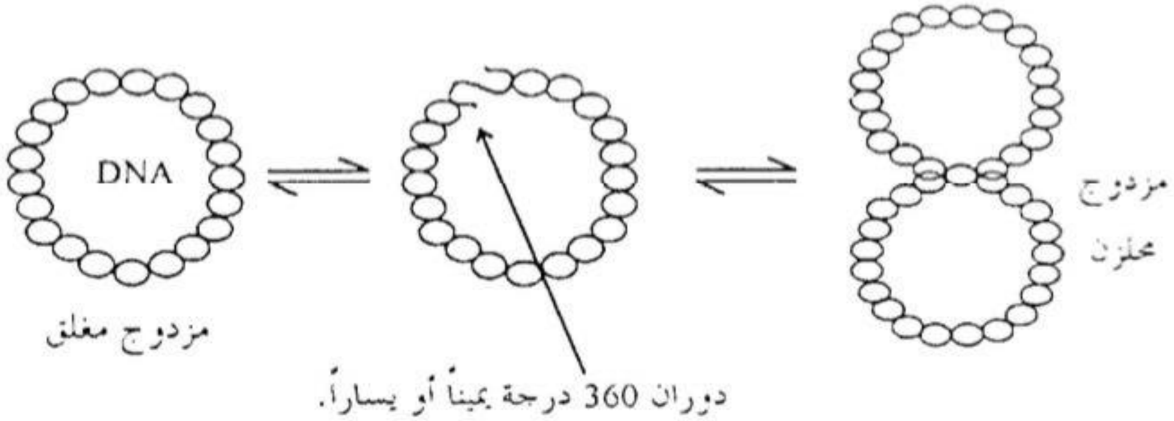
الشكل 2-5 تضاعف الحامض النووي DNA طبقا لنموذج الحلزون المزدوج

تركيب صبغي الاحياء بدائية النواة:

تعتبر بكتيريا القولون من أكثر الاحياء بدائية النواة التي تم دراستها في هذا المجال. يتألف الصبغي البكتيري الي يدعى أيضا بالنيوكليود **Nucleoid** او الصبغي الملتف **Folded Chromosome** من حامض نووي ريبوزي منقوص الاوكسجين مكثف على هيئة حلقة يبلغ محيطها حوالي **1100** مايكرون. تقع هذه الحلقة في منطقة خلوية تدعى بالمنطقة النووية **Nuclear region** يترتب الحامض النووي في صبغي البكتيريا على شكل طيات تمتد الى الخارج وتمتد من هذه الطيات طيات ثانوية أخرى، وهذا ما يمكن الحامض النووي البكتيري من ان يكون شديد الانطباق بحيث يتمكن من اشغال حيز صغير جدا من قطر الخلية البالغ **1 – 2** مايكرون. ويدعى مثل هذا الحامض الشديد الانطباق بالحامض النووي الريبوزي منقوص الاوكسجين فائق الحلزنة **Superciild DNA** الشكل (**7 – 2**). هناك نوعين من الحلزنة الأولى وهي الحلزنة الفائقة او تدعى بالحلزنة الموجبة، والثانية قليلة الحلزنة وتدعى بالحلزنة السالبة. ويمكن ملاحظة حصول الحلزنة الموجبة والسالبة عند كسر أحد خيوط المزدوج المحلزن حيث انه فيما إذا تحرر الخيط المكسور واخذ بالدوران بعكس اتجاه الحلزنة فإنه سيكون ذو التفاف سالب وإذا حصل العكس فإنه سيكون والتفاف موجب. ويمكن لحلقة الحامض النووي منقوص الاوكسجين المغلقة بأن تتجه لتصبح الحلزنة الفائقة فيما يكون لانزيم تكسير الحامض النووي الريبوزي منقوص الاوكسجين **DNase** دور معاكس الشكل (**8 – 2**).

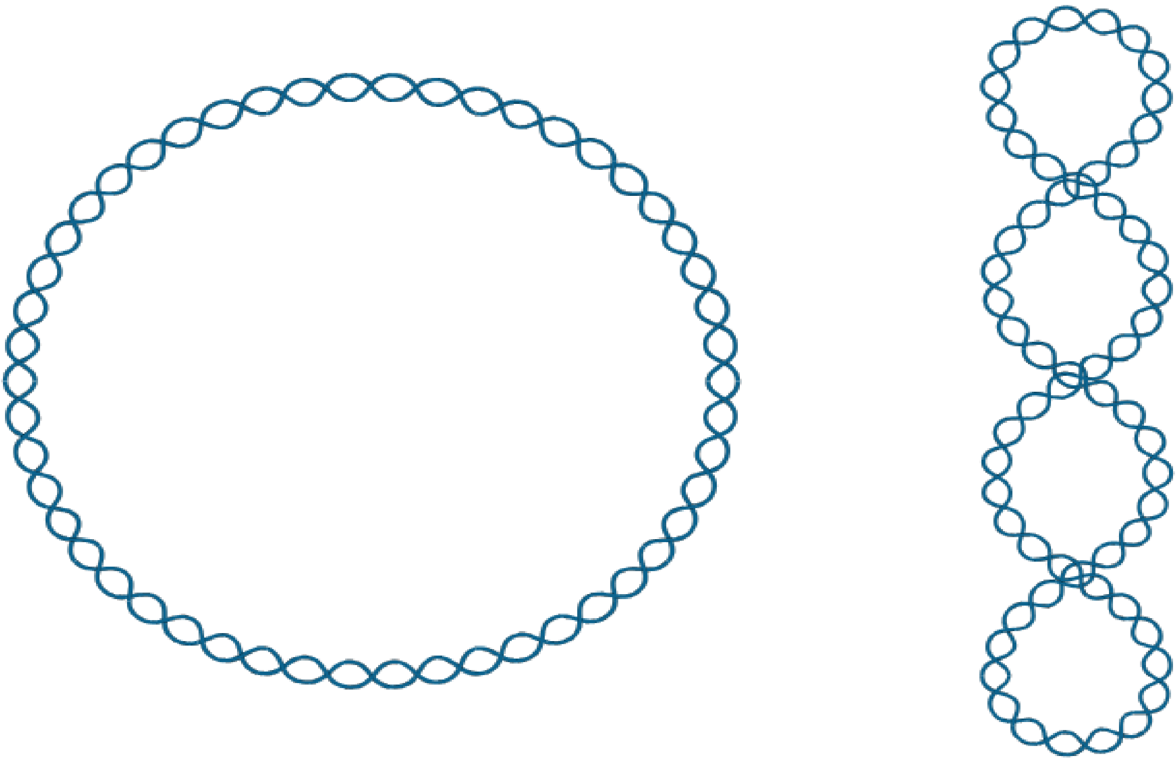


شكل (2 - 7) تركيب صبغي بكتريا القولون ويلاحظ الطيات السبع الرئيسية والطيات الثانوية (50 - 40 طية) .



شكل (2 - 8) ميكانيكية دوران خيط مفرد من حلقة حامض نووي ونماذج لحلقة حامض نووي ومحلزن .

يعتقد بأن لانزيم تحطيم الحامض النووي **DNase** أهمية كبيرة في عملية تضاعف الحامض النووي حيث انه لابد من فك الحلزنة أولا ويعمل الانزيم الثاني الجايريز على تحقيق الحلزنة مرة أخرى بعد اكتمال التضاعف الشكل (**9-2**)



شكل (**9-2**): عمل انزيم الجايريز في حصول الحلزنة الفائقة ويعتمد حصول الحلزنة الفائقة السالبة على حصول كسر في مزدوج الحامض النووي المحلزن ومن ثم التحامه بعد مروره بأتجاه اليمين.

في حال وجود أي خطا علمي او لغوي او خطأ مطبعي يرجى ابلاغي على حساب التلي كرام على الرقم ٠٧٨١٣٨٣٢٨٨٢
ولكم جزيل الشكر
وضاح جاسم

المحاضرة الثانية

التوليف الكيميائي للحامض النووي Nucleic acid structure

المقدمة:

تم التعرف على التركيب الكيميائي للحامض النووي منذ نهاية العقد الثالث ومطلع العقد الرابع من هذا القرن. عرف الحامض النووي بأنه مؤلف من سلسله عديدة البوليمرات وانه يتألف من نيوكليوتيدات تتألف من سكر خماسي مرتبط مع مجاميع فوسفات وقواعد نايتروجينية. كما وجد بأن هناك أربعة قواعد نيتروجينية مختلفة في هذه النيوكليوتيدات. لقد اتاحة تقنية الترحيل الورقي **Chromatography** التي استخدمت عام **1940** والتي استخدمت في تحليل بوليمرات البروتينات فرصة لتحليل الحامض النووي. اثبت من خلالها العالم تشارجاف عام **1949** حقائق أخرى غير معروفة عن الحامض النووي. أهمها في ان النيوكليوتيدات لاتختلف فقط في القواعد النيتروجينية بل ان نسبة هذه القواعد مختلفة أيضا. وان النسبه تختلف من حامض نووي لنوع معين في الاحياء الى نوع اخر. كما انه في عام **1950** استخدم المجهر الالكتروني لدراسة الحامض النووي ووجد بانه جزيئات غير اعتيادية مؤلفة من وحدات تمتد الى الالاف من الانكسترومات ويبلغ سمكها 20 انكستروم. اتاحت هذه الدراسة الفرصة امام الباحثين في الخوض عميقا في كنة الحامض النووي. واظهرت صور اشعة X اخذت لبلورة حامض نووي بين عامي 1952 – 1950 من قبل فرانكلين وجو سلنك روزيلند بان الحامض النووي عباره عن حلزون مزدوج او ثلاثي الأشرطة. وفي عام 1952 اكتشف علماء الكيمياء العضوية في حامعة كامبرج بان النيوكليوتيدات المؤلفة للحامض النووي ترتبط مع بعضها بواسطة روابط فوسفاتية ثنائية الاستر مشكلة العمود الفقري. توجت هذه المعلومات جميعا بنضرية نموذج الحلزون المزدوج التي وضعها واطسن وكريك عام 1953 والتي اثبتت بأن الحامض النووي عو عباره عن شريطين يتحلزنان مع بعضهما وتترتب النيوكليوتيدات في هذا النموذج بطريقة خاصة تسمح بتوفير الخصائص المهمة اللازمة باعتباره المادة الوراثية.

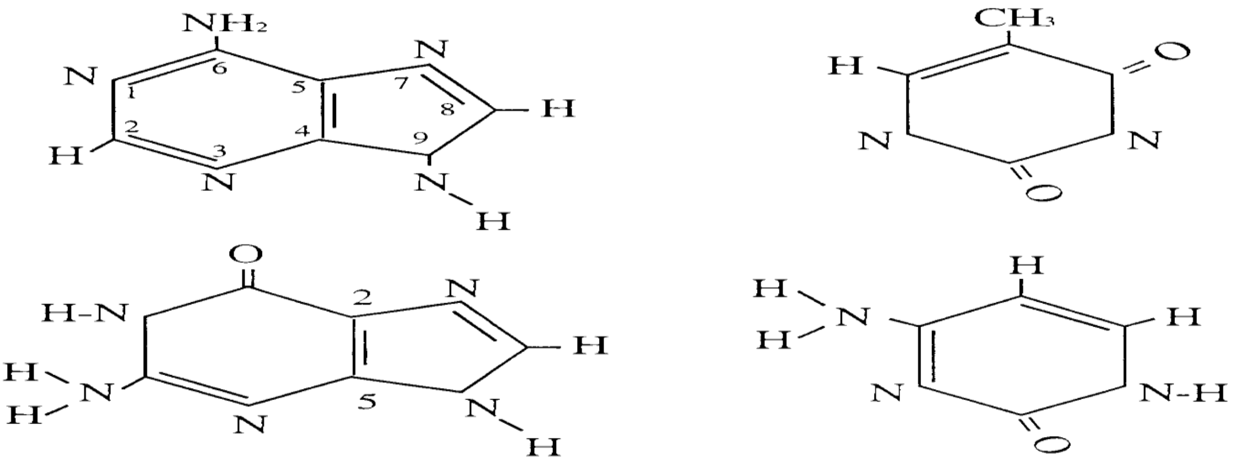
التركيب الكيميائي للحامض النووي منقوص الاوكسجين

الحامض النووي الريبوزي منقوص الاوكسجين هو عبارة عن جزيئات مكونة من وحدات وتكرره Poymers تدعى بالنيوكلوتيدات، تتألف هذه النيوكليوتيدات من سكر خماسي الكاربون ومجموعة فسفور وأربعة قواعد نايتروجينية. اثنان من هذه القواعد هما الرميدينات Pyrimidines التي تحتوي على حلقة بنزين واحده هما الثايمين Thymin والسايتوسين Cytosin. اما القاعدتين النتروجينيتين الاخرين فهما البيورينات Purines التي تحتوي على حلقتي بنزين وهم الادنين Adenin والكوانين Guanine الشكل (3 – 1) كما ان هناك اشكال محورة من هذه القواعد وبكمية قليلة في بعض الاحياء. عندما ترتبط القاعدة النيتروجينية مع السكر منقوص الاوكسجبن Deoxribose فإنها تكون مركبا يدعى النيوكليوسايد Nucloside وعند ارتباط سكر النيوكليوسايد مع مجموعة الفوسفور يتكون ما يدعى بالنيوكليوتايد Nucleotide الشكل (3 – 2). ونضرا لوجود أربعة قواعد نيتروجينية فإن الحامض النووي يحتوي على أربعة أنواع من النيوكليوتيدات وهي الـ

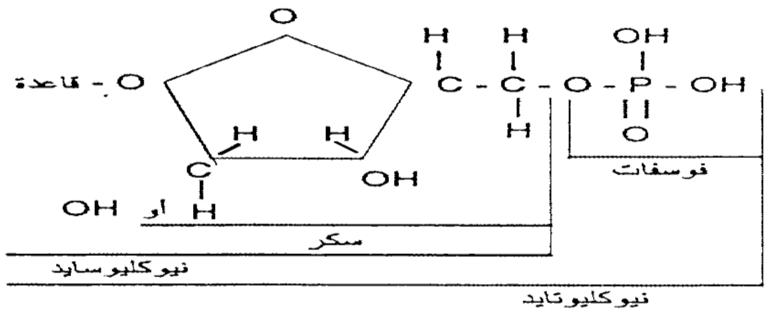
- ♣ deoxyadenylic acid الناتج من ارتباط الادنين
- ♣ deoxyguanylic acid الناتج من ارتباط الكوانين
- ♣ ymidylicacid الناتج من ارتباط الثايمين
- ♣ deoxy cytidylic acid الناتج من ارتباط السايتوسين

ان الاختلاف الوحيد بين هذه النيوليوتيدات هو في ارتباط القاعدة النيتروجينية مع السكر. كما يطلق على هذه النيوكليوتيدات التسميات التالية: -

- (deoxyadenosine 5-Monophosphate) (d-AMP)
- (deoxyguansine 5-Monophosphate) (d-GMP
- (deoxythymine 5- Monophosphate) (d-TMP
- (deoxycytosine 5Monophosphate) (d-CMP

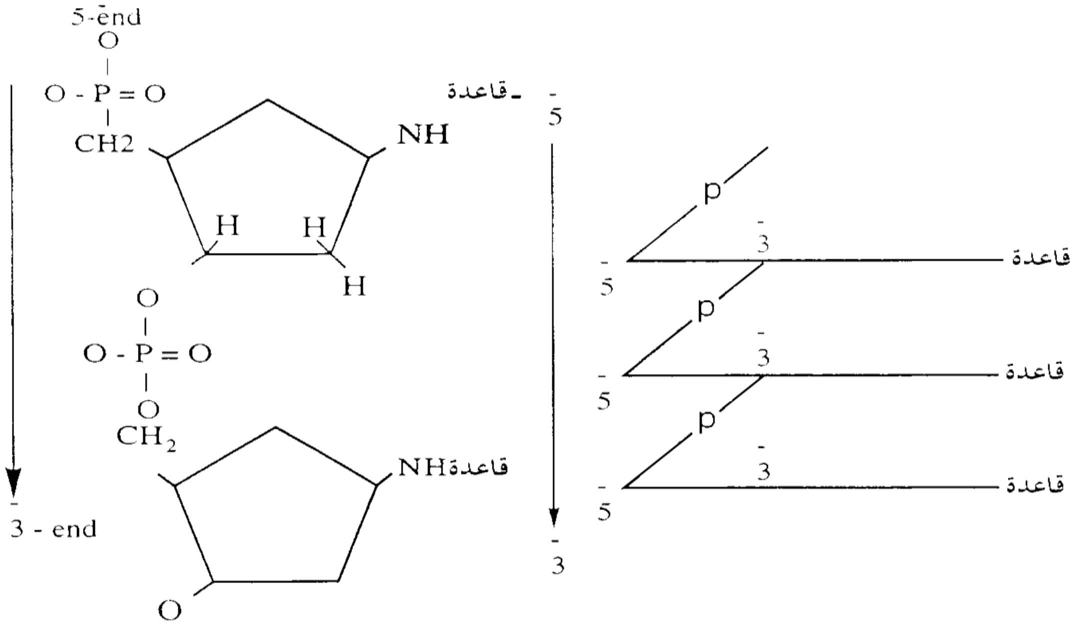


شكل (3 - 1) : القواعد النيتروجينية في الحامض النووي الريبوزي منقوص الأكسجين.



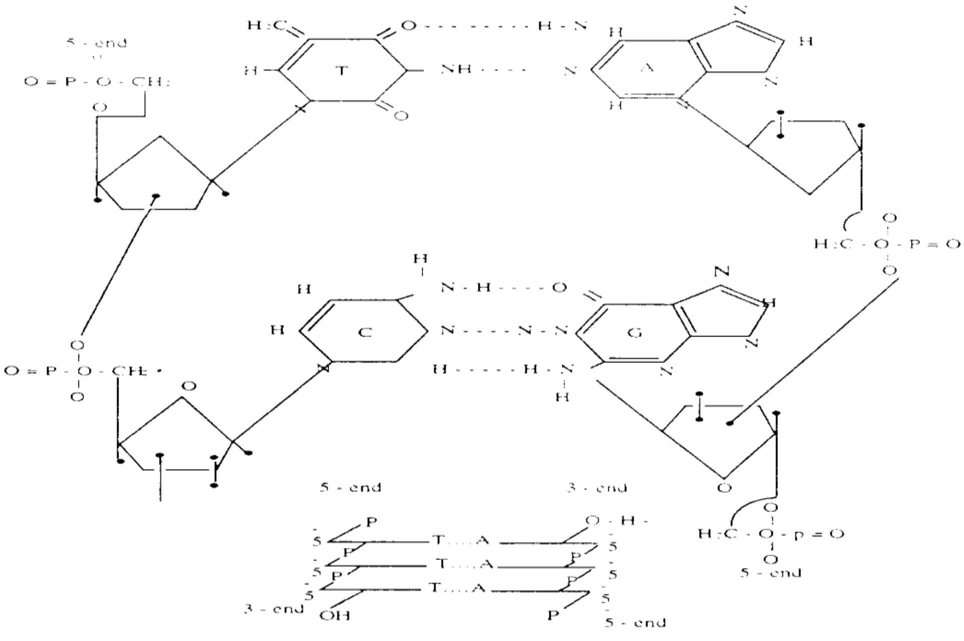
شكل (3 - 2) : تركيب النيوكليوتيد.

ترتبط النيوكليوتيدات في الحامض النووي لتكون شريط متعدد النيوكليوتيدات حيث ان المجموعة الفسفورية المرتبطة مع ذرة الكاربون الخامسة لسكر النيوكليوتيدة ترتبط مع ذرة الكاربون الثالثة للسكر في النيوكليوتيد الاخر الشكل (3-3)



شكل (3 - 3) : ارتباط النيوكليوتيدات في سلسلة متعددة النيوكليوتيدات حيث أن المجموعة الفسفورية لذرة الكربون الخامسة لسكر نيوكليوتيد ترتبط مع ذرة الكربون الثالثة لسكر نيوكليوتيد آخر .

تدعى تلك الروابط بين الفسفور والسكر بروابط الفسفور ثنائية الاستر Phosphodiester bonds. ان اتجاهات ارتباط ذرة الكاربون الخامس للسكر في النيوكليوتيدة مع رة الكاربون الثالثة لنيوكليوتيدة أخرى تستمر على طول الشريط – 5 – 3 – 5 مما يولد قطبية Polarity معينة تعتبر مهمه جدا في التضاعف والوظيفة الوراثية. ويلاحظ فـي اتجـاه الارتباط بـان المجموعـة النهائية لكـل شريط متعـدد النيوكليوتيدات هـي مجموعـة 5- فوسفوريل [(5-P) -Phosphoryl] حيث ترتبط ذرة الكاربون الخامسة لنيوكليوتيدة مع مجموعة الفوسفور لتكوين هذه النهاية فيما تقع مجموعة 3- هيدروكسيل (3-OH) (Hydroxyl) 3 في النهاية الثالثة. تترتب نهايات شريطي الحامض النووي باتجاهات متعاكسة حيث يبدأ الشريط الأول بالنهاية الخامسة لينتهي بالنهاية الثالثة بينما يبدأ الشريط



شكل (3 - 4) : الاتجاهات المتعاكسة لأشرطة الحامض النووي حيث تمثل أواصر الفوسفور ثنائي الإستر العمود الفقري للأشرطة بينما تمثل مجموعة P – 5 المجموعة النهائية لكل شريط .

الثاني بالنهاية المجاورة لبداية الشريط الأول بالنهاية الثالثة لينتهي بالنهاية الخامسة وهو ما يطلق عليه التوازي المتضاد Antiparallel الشكل (3 – 4)

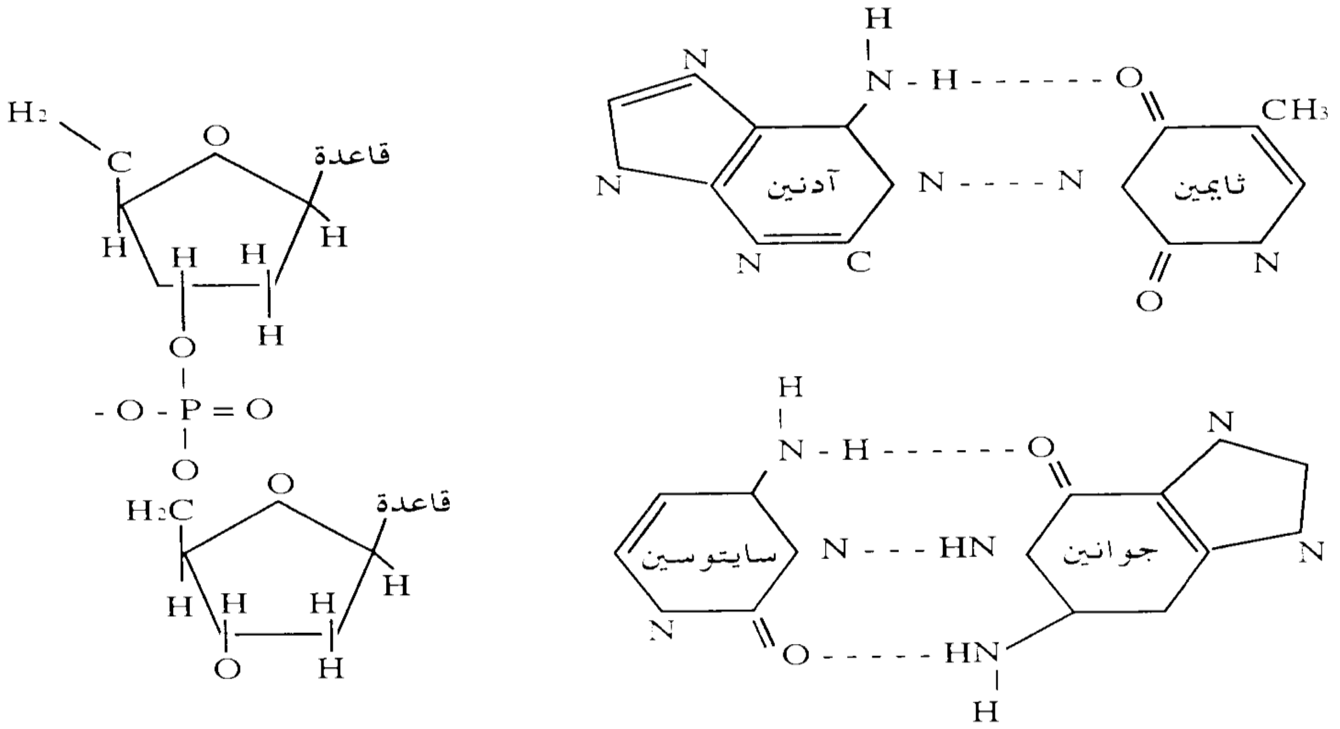
ثبات التركيب الكيميائي للحامض النووي الرايبوزي منقوص الاوكسجين

جزيئات الحامض النووي DNA تكون ثابتة تماما في الوسط الخلوي ويعود ذلك الى ثلاثة أنواع من الروابط الكيميائية الموجوده في تركيب البوليمرات هذه الروابط الثلاثة هي:

١- **الروابط المكافئة Covalent bonds:** وهي التي ترتبط بالذرات الداخلة في تركيب وحدات النيوكليوتيد مع الاخر من خلال الجسور الفوسفورية (3- Phosphodiester bridge). تبدأ هذه الروابط من ذرة الكاربون الثالثة من سكر خماسي للنيوكليوتيدة المجاورة تكون هذه الروابط القوية العمود الفقري لكل شريط وتعمل على تقوية الأشرطة متعددة النيوكليوتيدات لمقاومة الاضرار المحتملة خصوصا الكسور الشكل (3 – 5أ)

٢- **الروابط الهيدروجينية الضعيفة Hydrogen bonds:** وتترتب هذه الروابط بطريقة لاتتكسر فيها الرابطة الا إذا ماحصل عدة كسورات في نفس الوقت وهو ما يحتاج الى طاقة حرارية عالية تصل الى 100^0 وهو مالم يتوفر في الخلية ولكنه متوفي في المعمل المختبر. ويساعد في ذلك في فصل اشرطة الحامض النووي عن بعضها لتكوين اشرطة مفردة او أحادية Single strand DNA حيث تدعى عملية فصل الاشرطة عن بعضها باستخدام الحرارة العالية للمسخ Denaturation او Melting الشكل (3-5) ان فصل اشرطة الحامض النووي وفر الامكانية على تشخيص الاختلاف في تركيب القواعد النايتروجينية بي الأنواع المختلفة من الاحماض النووية وبين اشكال جزيئية أخرى مختلفة من المورثات. بالإضافة الى الروابط الهيدروجينية بين اشرطة الحامض النووي فان الروابط الهيدروجينية موجودة أيضا بين سلاسل السكر – فوسفور والجزيئات المحيطة بها.

٣- الروابط غير المحبة للماء Hydrophobic interactions بين السطوح الملساء



شكل (3 - 5) : أ. الروابط المكافئة والهيدروجينية بين القواعد النيتروجينية التي تحافظ على استقرارية الحامض النووي.

ب . رابطة الفوسفور ثنائي استر.

للقواعد النيتروجينية التي تلتصق عموديا على طول الشريط حيث تعمل على زيادة ثبوتية الشكل الجزيئي للحامض النووي كما ترتبط هذه مع الماء المحيط بالشريط بواسطة روابط هيدروجينية لزيادة ثبوتية الشريط ولمنع الماء من الدخول كمنافس مع القواعد النيتروجينية لتكوين روابط هيدروجينية مع بعضها البعض دون الماء. ان جميع هذه الروابط تتدال مع بعضها البعض لتعمل على إعطاء ثبوتية الحامض النووي والمحافظة على صفاته الجزيئية والوظيفيه تحت الظروف الفسلجية في الخلية. بالإضافة لهذه الروابط فإن هناك العديد من الايونات الموجبة مثل ايون الصوديوم Na^{+} وايون البوتاسيوم K^{+} وايون الكالسيوم Ca^{++} الموجوده في السائل المحيط تعادل الشحنة السالبة لمجموعة الفوسفات حيث بدون هذه الايونات فان التيار الكهربائي التابع يؤدي الى انحراف سلسلة السكر – فوسفور وبالتالي عدم استقرارها.

النموذج ثلاثي الابعاء للحامض النووي منقوص الاوكسجين او الحلزون المزدوج

لم تكن نظرية النموذج الثلاثي الابعاد التي وضعها واطسون وكريك عام **1953** هي اول محاولة لبناء نموذج للحامض النووي، بل سبقته محاولة واحدة ترجع الى عام **1951** حيث وضعت نظرية لبناء نموذج حامض نووي على هيئة حلزون الفا من قبل العلماء كوثران وكريك وفاند. كانت الغاية من هذه النظرية هو توفير طريقة سهله لاختبار احتمالية حصول خطأ في ارتباط القواعد النيتروجينية. لقد استفاد كريك من محاولته مع زملائه حيث أعاد بالاتفاق مع واطسون تشكيل النوذج اللازم مستندا الى الحقائق الكثيرة التي توفرت حول الحامض النووي، وتكللت جهودهما في وضع نظرية النموذج الثلاثي الابعاد. وبعد مضي سنين طويلة على اكتشاف الحلزون المزدوج فإننا نعتقد الان بان تركيب الحامض النووي ليس بالسهولة التي افترضت فيه اول الامر، حيث اثبتت البحوث العلمية

المنشورة حول الحامض النووي الى يومنا هذا بان هناك اشكال تشذ عن النموذج الأصلي. فهناك العديد من الرواشح التي تتألف مادتها الوراثية من شريط مفرد وان البعض الاخر مؤلف من حامض نووي رايبوزي. كما ان بعض الاحياء تتألف مادتها الوراثية من مزدوج تلتف اشرطته نحو اليسار وليس نحو اليمين كما في نموذج الحلزون المزدوج. بالإضافة الى ان بعض جزيئات الحامض شريطية والأخرى حلقية وقد تنتظم هذه بطريقة معقدة كما هو الحال في الالتفاف الفائق وغير ذلك. وعلى الرغم من انه تم تفسير جميع هذه الاشكال الا انها بقيت امثله للشذوذ عن النموذج الأصلي. استند نموذج الحلزون المزدوج الذي وضعه العالمان واطسون وكريك الى العديد من المعلومات الكيميائية والفيزيائية التي نشرت حول الحامض النووي. حيث ان التعرف على التركيب الاولي لشريط متعدد النيوكليوتيد المفرد والتي من خلاله ازداد الظن بوجود الحامض النووي كاشرطة متعددة النيوكليوتيدات وتداخلة مع بعضها. الا ان الشكل الذي ظهر من خلال صورة اشعة **X- Ray** الذي اخذ لبلورات من الحامض النووي من قبل العالمان فرانكلين وروزيلند جوسلنك **Franklin and Gosling 1953** يبين ما يلي: -

أ مكونات الحامض النووي موزعة بطريقة منظمة تنظيما دقيقا جدا.
ب ان كل جزيئة حامض نووي مؤلفه من شريطين او أكثر بشكل حلزون.
ج ان الأشرطة تلتف في حلزنة من اليمين.

كانت هذه النتائج بحق اول اللبنات الأساسية لصياغة نموذج الحلزون المزدوج. كما ان نتائج الدراسات البايوكيميائية حول التحلل الكيميائي المائي للحامض النووي التي قام بها العالم شارجاف (Chargaff, 1059) والتي أظهرت بان هناك نسبة مئوية معينة من القواعد النيتروجينية خاصة لكل نوع من الحوامض حسث تختلف هذه النسبة من حامض نووي لكائن الى حامض نووي لكائن اخر. وجد تشارجاف بان الحامض النووي بشكل عام يحتوي على كمية من الادنين مساوية لكمية الثايمين A=T وكمية من الكوانين مساوية لكمية السايتوسين G=C ولكن كمية الادنين والثايمين معا A+T والكوانين والسايتوسين معا G+C تختلف من مصدر حامض نووي الى اخر. ان ذلك يوضح بان نسبة الادنين الى الثايمين والجوانين الى السايتوسين متساوية G:C او A: T ولكن نسبة كلا من الادنين والثايمين معا (AT) تختلف عن نسبة الكوانين والسايتوسين معا (GC). كان على واطسن وكريكالاستفادة من هذه المعلومات التفصيلية في بناء نموذج الجزيئي بطريقة منطقية وعلمية. كان ابسط نموذج يمكن ان يبنى من سلاسلعديد النيوكليوتيدات هو ان ترتبط سلسلتانمع بعضهما بحيث تكون روابط الفوسفور ثمائي الاستر التي تربط النيوكليوتيدات نحو الخارج بينما ترتبط القواعد من الداخل. وظهر الحلزون المزدوج بعد ان تم التأكد بان قواعد الثايمين والكوانين لابد ان تدخل في النموذج بصورة كيتو Keto وليس اينول Enol وهكذا تم ربط الادنين والثايمين والكوانين مع السايتوسين لبظهر في النهاية نموذج الحلزون المزدوج الذي تلتف اشرطته نحو اليمين وهو ما يؤكد ما ظهر من اشعة X التي اخذت سابقا للحامض النووي. لقد وجد بأن قطر الحلزون المزدوج والذي يفي بارتباط الادنين والثايمين A – T والجوانين والسايتوسين G – C خلال الفراغ بين سلاسل السكر – فوسفور وهو 2 نانوميتر (120 انجستروم) حيث كانت نسبة الادنين الى الثايمين والكوانين الى السايتوسين في هذه النموذج 1:1. ومع ظهور هذه النموذج فانه أصبح النموذج الرسمي العالمي لتركيب الحامض النووي. وليس هناك من طريقة لاثبات صحة التفاف السلاسل نحو اليمين وان الروابط الهيدروجينية في التي تربط ازواج القواعد من هذا التركيب. لقد جاءت الإجابة على ذلك بعد أكثر من 25 عاما من ظهور النموذج حيث تمكن علماء في الكيمياء العضوية من بناء سلاسل قصيرة معروفة التتابع من الحامض النووي مختبريا. دعيت هذه بالنيوكليوتيدات القليلة Oligonucleotides. وجد بان خليط النيوكليوتيدات القليلة مع أخرى متممة أدى الى تكوين حلزونات مزدوجة وتم الحصول على هذه بهيئة بلورية يمكن استخدامها في التقاط صورة باشعة X. أكد تحليل هذه الصورة بأن الحلزونات المزدوجة ذات التفاف يميني وان ازواج القواعد ترتبط مع بعضها بطريقة يكون فيها أحد القواعد منحرفا عن الثاني. اثبتت هذه الصورة أيضا بان جزيئة الحامض النووي لاتترتب بشكل حلزون مزدوج منتظم تماما. لاحظ واطس وكريك من خلال نموذجهما

للتركيب الجزيئي للحامض النووي منقوص الاوكسجين بأنه يمتلك صفات يمكن ان تساهم في توضيح اربعه أمور مهمه للمادة الوراثية وهي:

١- الثبوتية خلال العمليات الايضية المختلفة.
٢- تضاعف محكم
٣- تنوع جزيئي
٤- سعة كافية لحصول طفرات وراثية.

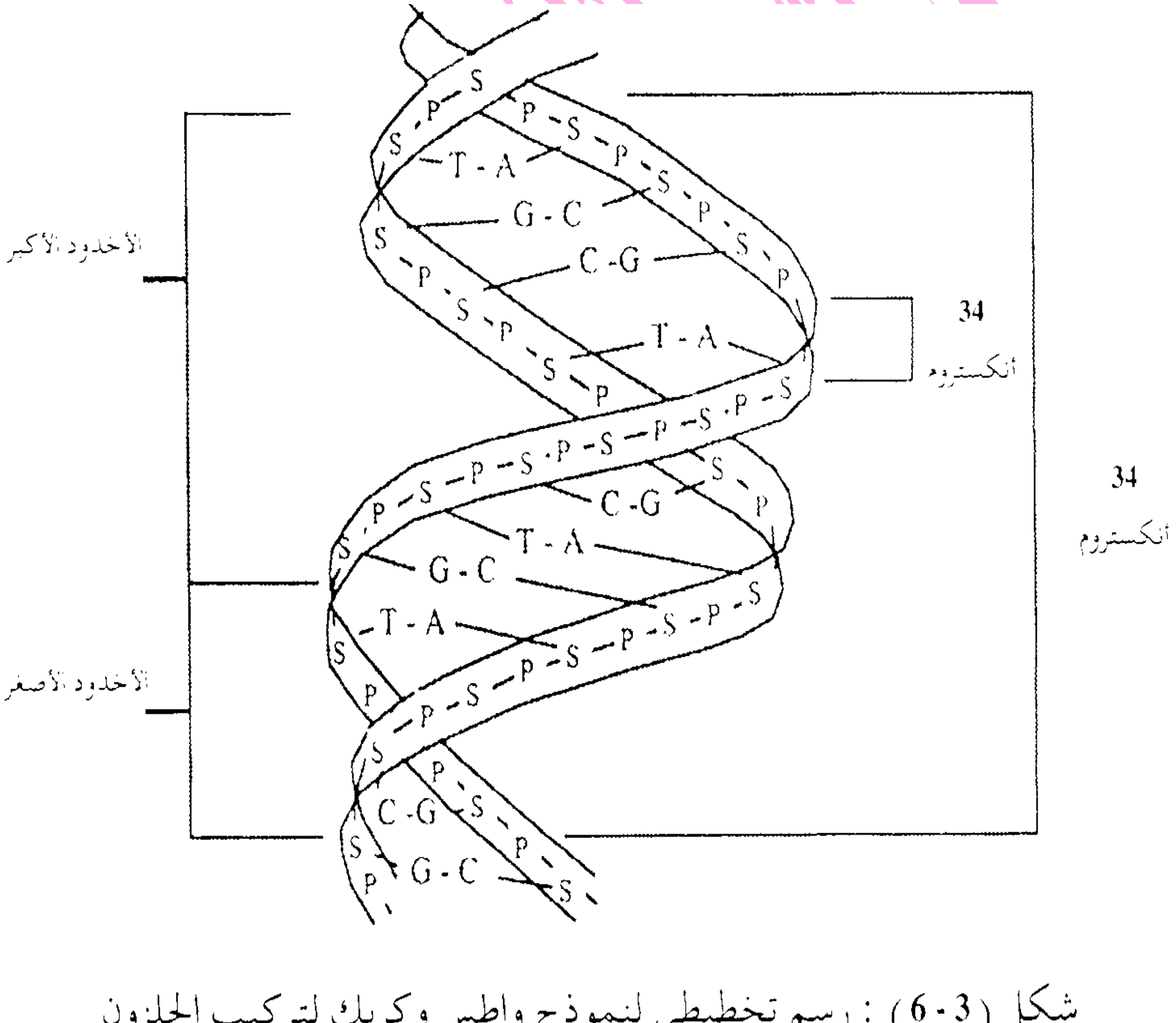
هذه الصفات المهمه للحامض النووي هي:

أولا- ان الحامض النووي لايتبدل خلال العمليات الايضية المختلفة داخل الخلية على الرغم من تحلل واندثار عدد من الجزيئات الأخرى داخل الخلية خلال حياة الخلية

ثانيا- ان كل من اشرطة الحلزون داخل المزدوج للحامض النووي يمكن ان يخدم كقالب Template لتصنيع نسخه مطابقة تماما للخيوط الابوية وهو ما ساعد على تفسير كيفية انتقال الصفات من خليه الى أخرى.

ثالثا- جزيئات الحامض النووي مطابقة تماما للاحتياجات الوراثية للتباين وعلى الرغم من محدودية ازواج القواعد النايتروجينية في الجزيئات الا ان الترتيب المستقيم للقواعد او الأزواج القاعدية غير محدود. ان مع وجود أربعة قواعد نيتروجينية او أربعة ازواج من القواهد في أي طول من المزدوج فإن العدد النظري مختلف الجزيئات سيكون 4^n فإذا كان معدل حجم المورث هو 500 زوج قاعدي (bp) فإنه سكيون هناك 4^{500} من التتابعات المختلفة أو المورثات. هذا يعني أننا سنتمكن من بناء 4^{500} مورث أو تتابع من 500 زوج قاعدي في كل تتابع محتمل (Permuted sequence) للقواعد أو الأزواج القاعدية الأربعة. وهو ما يؤكد بأن للحامض النووي تنوع كاف لاعتباره المادة الوراثية.

٥- إن الطفرات الوراثية يمكن أن تحصل عن طريق استبدال القواعد Bases subsitution خلال عملية التضاعف حيث يمكن أن ترتبط قاعدة نيتروجينية مع أخرى غير ملائمة مثل ارتباط الادنين والسايتوسين A-C بدلاً من الأدنين والثايمين A-T كما هو طبيعي بطريق الخطأ. وينتقل هذا الخطأ عبر الأجيال الجديدة (راجع الفصول الأخرى). إن النموذج الثلاثي الأبعاد الذي وضعه العالمان واطس وكريك للحامض النووي بين أنه مؤلف من شريطين متعددي النيوكليوتيدات ملتفين على بعضهما لإعطاء حلزون مزدوج متناظر. إن كل شريط يلتوي من الجهة اليمنى بإتجاه عقارب الساعة كل 34 النجستروم (34-Å) وتشغل القواعد النيتروجينية مسافة 3.4 انجستروم بين واحدة وأخرى على طول الشريط. هذا معناه بأن هناك عشرة قواعد نيتروجينية بعد كل استداره للشريط أي أن هناك عشرة قواعد تتقابل مع بعضها البعض في الشريط المزدوج لغاية الاستدارة. ترتبط كل قاعدتين متقابلتين برابطة هيدروجينية لتتمكن في النهاية من ربط الشريطين مع بعضهما، يظهر من خلال التواء الأشرطة الحدود يدعى الأخدود الأصغر (Minor groove) بينما يدعى الأخدود الذي يليه بالأخدود الأكبر Major groove شكل (3-6)



شكل (3-6) : رسم تخطيطي لنموذج واطس وكريك لتركيب الحلزون المزدوج في الحامض النووي (DNA)

التركيز المولاري للقواعد النيتروجينية في الحامض النووي

إن التحلل المائي للحامض النووي والذي أوضح نسب القواعد النيتروجينية إلى بعضها فيه برهن على أن التركيز المولاري للقواعد والذي عنه بالقوسين [ ] يمتلك ثلاث صفات هي :

١. إن تركيز قواعد البيورينات مساوي لقواعد البيرميدينات[C] +[T] = مجموع البارميدينات [A+G] مجموع البيورينات.
٢. إن تركيز الأدنين والثايمين متساوي كما هو الحال في تركيز الجوانين والسايتوسين. [G]=[C]و [A]=[T]
٣. تركيب القاعدة يمكن أن يعبر عنه بالمعادل التالية: - $\frac{[G]+[C]}{[G]+[C]+[A]+[T]}$

ويطلق عليه أيضاً بنسبة الجوانين والسايتوسين وهي نسبة ثابتة في أفراد النوع الواحدة ولكنها تختلف من نوع إلى آخر جدول (3-1). إن التساوي في نسب البيورينات والبيرميدينات لا يكون مضبوطاً تماماً بسبب عدم دقة الأجهزة الحالية مما يوجد فروقاً بسيطة في هذه النسبة حيث لوحظ بأن الحيوانات والنباتات تحتوي على نقص في نسبة G+C مقارنة مع نسبة T+Aفي الحامض النووي حيث تكون نسبة G+C فيها تساوي 38 و47. وتظهر البكتريا والرواشح فروقاً معنوية تتراوح بين 31 (نسبة G+C) إلى 72 وتكون هذه النسب متقاربة أو متشابهة بين الأنواع ذات العلاقات التطورية.

جدول (3-1): نسب القواعد النيتروجينية في الحامض النووي لاحياء مختلفة.

الكائن	A	T	G	C	نسبة G+C
العاثي T7	26	24	24	24	48
بكتيريا القولون	24.7	23.6	26	25.7	51.7
مكورات ذات الرئة	30.3	29.5	21.6	18.7	40.3
الخميرة	31.7	32.6	18.3	17.4	35.7
الحنطة	27.3	27.1	22.7	22.8	45.7
حيمن بشري	30.7	31.2	19.3	18.8	38.1

الحامض النووي الريبوزي Ribonucleic acid

كان يعتقد لسنوات بعد إكتشاف الأحماض النوويه بأن الحامض النووي الريبوزي موجودا في الخلايا النباتية فقط فيما يوجد الحامض النووي منقوص الأكسجين في الخلايا الحيوانية. لكن بعد تطور الأدوات والطرق العلمية وجد بأن كلا الحامضين موجودين في جميع الخلايا. يمثل الحامض النووي الريبوزي 10% من مجموع الأحماض النووية في الخلية. ولا يختلف تركيبه الكيميائي كثيرا عن الحامض النووي منقوص الأكسجين، فهو مؤلف من جزيئة مفردة طويلة غير متفرعة وتمثل النيوكليوتيدات وحداته التي تحتوي على اربعة قواعد نيتروجينية، ترتبط النيوكليوتيدات مع بعضها برابطة الفوسفات ثنائية الاستر. يختلف هذا الحامض عن الحامض النووي منقوص الأكسجين كيميائياً في نقطتين، الأول هو أن السكر الخماسي للنيوكليوتيدات هو ريبوز (يحتوي على مجموعتي هيدروكسيل) فيما يكون هذا السكر منقوص الأكسجين (ذو مجموعة هيدروكسيل واحدة) في الحامض النووي منقوص الأكسجين النقطة التالية هو أن الحامض النووي الريبوزي لا يحتوي على ثايمين ويحل محله اليوراسيل (قاعدة شبيهة بالبرميدينات) شكل (3 - 7). كان يعرف بعد سنوات قليلة من إكتشاف الحامض النووي الريبوزي بأن لهذا الحامض علاقة في

عملية تصنيع البروتينات، كان ذلك استناداً إلى التشابه الكبير بين الأحماض النووية والبروتينات حيث أن كلا منهما مؤلف من سلسلة عديدة الوحدات وأن هذا الوحدات تتكرر في السلسلة ولكن يختلف موقع الوحدة في الترتيب في السلسلة، ولكن الذي لم يعرف هو كيفية نشؤ الحامض النووي الريبوزي وآلية قيامه ببناء البروتينات. بعد الإنتهاء من وضع نموذج الحلزون وضع كريك عام 1956 فرضيته حول كيفية بناء الحامض النووي الريبوزي والتي أطلق عليه Central dogma، نصت هذه على أن الحامض النووي الريبوزي يبنى من قالب حامض نووي منقوص الأكسجين بعملية تدعى بالاستنساخ وأنه ينفصل بعد ذلك من القالب ليقوم بدوره في بناء البروتين ولم يترك كريك الموضوع سائباً عند هذا الحد بل أشار إلى فرضيته الأولى التي وضعها قبل ذلك بعام واحد والتي تحدث فيها على أن الحامض النووي الريبوزي لا يقوم ببناء البروتين مباشرة بل إن هناك جزيئات أخرى أطلق عليها اسم الموصلات Adaptors ترتبط معها الأحماض الأمينية أولاً ثم ترتبط معقدات الموصلات مع مناطق متخصصة على الحامض النووي الريبوزي . وفي الحقيقة كان العمل على اكتشاف هذه الجزيئات جاريا قبل وضع هذه الفرضية. حيث قام العالم زامخنيك Zamecnik وجماعته عام 1953 بدراسة احتمالية وجود مثل هذه الموصلات عن طريق استخدام النظائر المشعة في تتبع بناء البروتينات. وفي عام 1958 نشر هؤلاء العلماء بحوثهم حول الموضوع وأكدوا وجود مثل هذه الجزيئات وأثبتوا بأنها نوع من الأحماض النوويه الريبوزيه أطلقوا عليها اسم الحامض النووي الريبوزي الناقل Trainsfer RNA (tRNA). ولم تنتهي قصة الحامض النووي الريبوزي والبروتين عند هذا الحد بل امتدت للبحث عن إحتمالية وجود أنواع أخرى من جزيئات الحامض النووي الريبوزي في الرايبوسومات أطلق عليها الحامض النووي الريبوزي الريبوسومي [Ribosomal RNA) (rRNA)]. وبعد تحليل الريبوسومات وجد بأنه يمثل نسبة كبيرة منها. كما وجدت الدراسات التالية بأن هذا النوع من الأحماض النووية الريبوزية يمثل 58% من مجموع الأحماض النووية الرايبوزية. وكنتيجة لاكتشاف الانواع المختلفة من الأحماض النووي الريبوزية فقد أطلق على الحامض النووي الريبوزي المستنسخ من قالب الحامض النووي منقوص الأكسجين بالحامض النووي المرسال [Messenger RNA) (mRNA)]. ولاجل المزيد من التفاصيل حول أدوار هذه الأنواع راجع فصل تعبير المورثات

تضاعف الحامض النووي (DNA Replication) :-

النسخ المتماثل للحامض النووي هي عملية هامة ومعقدة للغاية، و احدى العمليات التي تعتمد عليها جميع الحياة.
سنناقش أولا النمط الشامل لبناء الحمض النووي ثم نقوم بفحص آلية النسخ المتماثل للحامض النووي في عمق أكبر.

أنماط تخليق الحمض النووي (Patterns of DNA synthesis) :-

واتسون وكريك (Watson andCrick) وصفوا هيكل وتركيب DNA في شهر نيسان سنه 1953 وبعد مايقارب شهر واحد ظهر بحث اخر اقترحوا فيه كيف يمكن تكرارDNA حيث تنفك خيوط الحلقتين المزدوجتين ثم تفصل عن بعضها البعض تصطف الان ثنائيات الفوسفات الحرة (deoxy nucleoside triphosphates) على طول شريطي الأبوين الأصلية خلال تكاملها بازدواج قاعدي الادنين مع الثايمين والكوانين مع سايتوسين عندما ترتبط هذه النيوكلوتيدات ببعضها بواسطة واحد او اكثر من الأنزيمات ينتج عن كل منها نسختان متماثلتان تحتوي كل منهما على شريط دنا جديد حديث التكوين لقد اثبتت الأبحاث التي اجريت في السنوات التالية ان فرضية واتسن وكريك صحيحه . ان أنماط تضاعف تختلف قليلا الى حد ما في حقيقه النواة عن بدائية النواة على سبيل المثال عندما يشارك DNA الكروموسوم الحلقي في بعض (E.Coli) يبدا النسخ المتماثل في نقطة واحدة الأصل البناء (synthesis) يبدا من شوكة تضاعف (replication fork) وهو المكان الموجود في المزدوج الحلزوني بالدنا يعمل على أزالة او التخلص من المزدوج الحلزوني ويتم استبداله بالأشرطة المفردة التي تبدا بالتضاعف تنتقل شوكتي التضاعف تتحرك الى الخارج من الاصل حتى نقوم بنسخ النسخة كاملة (Replicant)هذا الجزء من الجينيوم تحتوي على اصل ويتم تكراره كوحدة عندما تتحرك شوكات التضاعف حول الدائرة يتم تشكيل هيكل على شكل الحرف اليوناني ثيتا وأخيرا عندما كان الكروموسوم البكتيري عبارة عن نسخة مفرده (single replicon) فان شوكة التضاعف تلتقي من الجانب الآخر واثنين من كروموسومات سوف تتحرر.

DNA الحمض النووي للحقيقة النواة خطي وأطول بكثير مقارنة مع بدائية النواة لبكتريا القالون مثلا (E. Coli) حوالي (1.300 µm) طواله بينما (46) كروسوم في نواة الانسان بطوال1.8m اي 1400مرة أطوال من كروموسوم بكتريا القولون (E.coli) العديد من شوكات التضاعف يجب ان تقوم بنسخ الحمض النووي في حقيقة النواة بالتزامن اي في وقت واحد و لذلك الجزئية تستطيع ان تتضاعف في وقت قصيرة نسبياً والعديد من (Replicon) تكون موجودة وهناك نقطة اصل حوالي من10الى 100 um على طوال الحمض النووي شوكة التضاعف تتحرك بعيداً للخارج من هذه المواقع وعادة تلتقي بشوكات التضاعف أستنسخت من حزم الحمض النووي المجاورة .وفي هذا النمط الجزيئات الكبيرة تستنسخ بسرعة.

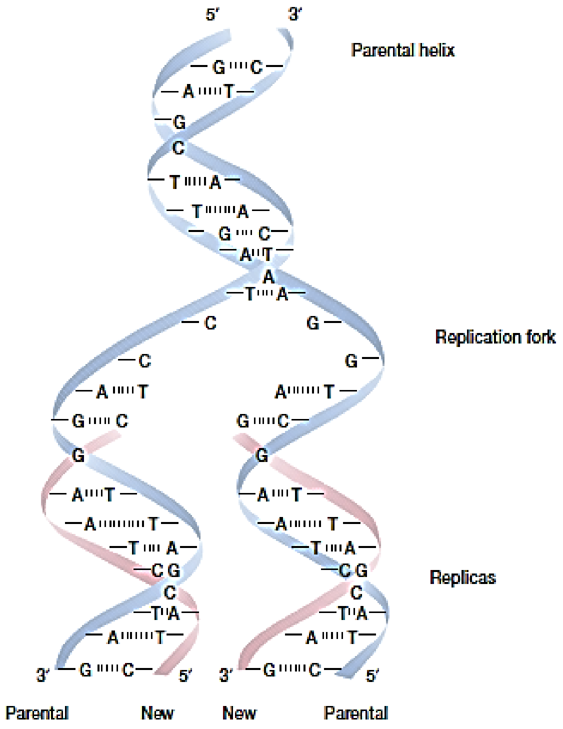


Figure 11.11 Semiconservative DNA Replication. The replication fork of DNA showing the synthesis of two progeny strands. Newly synthesized strands are in maroon. Each copy contains one new and one old strand. This process is called semiconservative replication.

الشكل 11.11 ، استنساخ الحمض النووي شبه المحافظ. شوكة التضاعف للحمض النووي تظهر تخليق نسلين. خيوط صنعت حديثا في المارون. كل نسخة تحتوي على واحد جديد وواحد شريط قديم وتسمى هذه العملية النسخ المتماثل شبه المحافظ

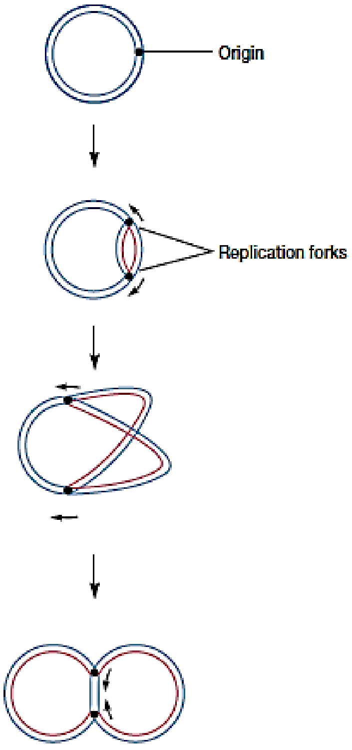


Figure 11.12 Bidirectional Replication. The replication of a circular bacterial genome. Two replication forks move around the DNA forming theta-shaped intermediates. Newly replicated DNA double helix is in red.

شكل 11.12 تكرار ثنائي الاتجاه. استنساخ جينوم بكتيري دائري. يتحرك اثنان من شوكات التكاثر حول الحمض النووي لتشكيل وسيطات على شكل ثيتا. اللولب المزدوج للحمض النووي المنسوخ حديثًا باللون الأحمر.

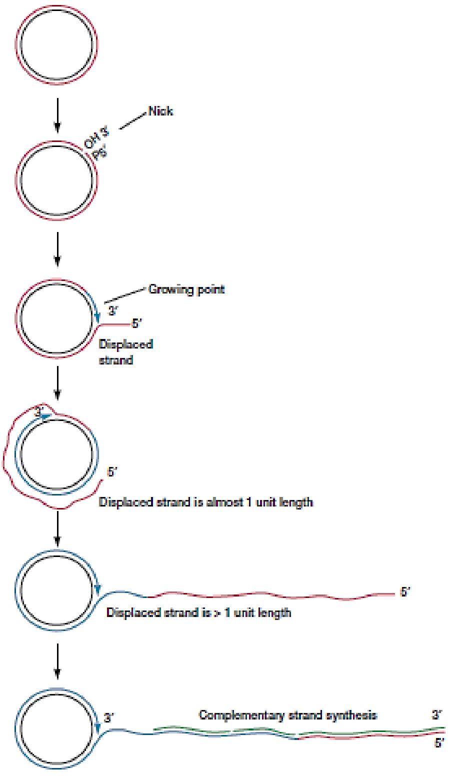


Figure 11.13 The Rolling-Circle Pattern of Replication. A single-stranded tail, often composed of more than one genome copy, is generated and can be converted to the double-stranded form by synthesis of a complementary strand. The "free end" of the rolling-circle strand is probably bound to the primosome.

شكل 11.13 نموذج التكرار لدائرة التدحرج. يتم إنشاء ذيل مفرد ، غالبًا ما يتكون من أكثر من نسخة جينوم ، ويمكن تحويله إلى شكل مزدوج الجدائل عن طريق توليف خيط تكميلي. من المحتمل أن تكون "النهاية الحرة" لحبل الدائرة الدوارة مرتبطة بالـ primosome

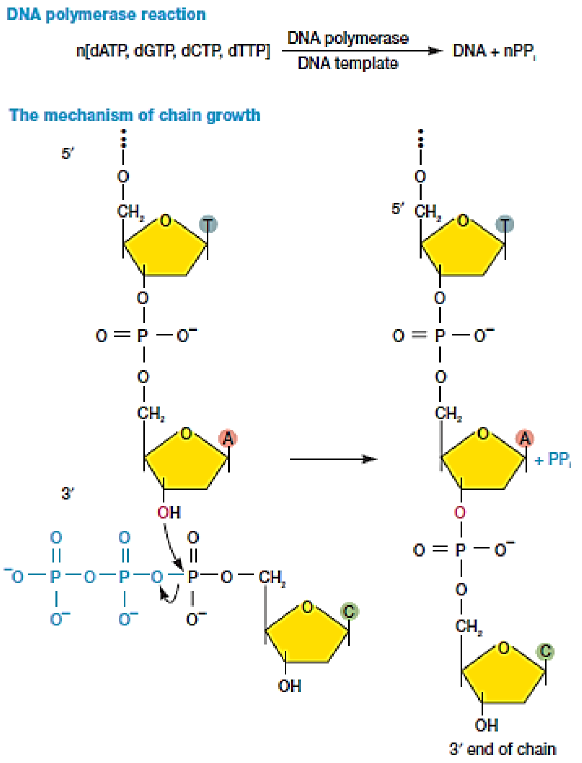


Figure 11.15 The DNA Polymerase Reaction and Its Mechanism. The mechanism involves a nucleophilic attack by the hydroxyl of the 3′ terminal deoxyribose on the alpha phosphate group of the nucleotide substrate (in this example, adenosine attacks cytidine triphosphate).

الشكل 11.15 تفاعل البلمرة DNA وآليته. تتضمن الآلية هجومًا نوويًا من قبل الهيدروكسيل لـ 3 ' طرفية deoxyribose على مجموعة ألفا فوسفات من ركيزة النيوكليوتيد (في هذا المثال ، هجمات الأدينوزين سيتدين ثلاثي الفوسفات).

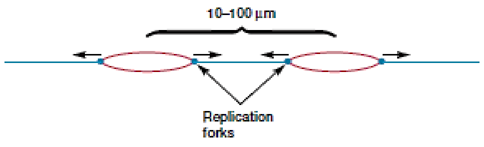


Figure 11.14 The Replication of Eucaryotic DNA. Replication is initiated every 10 to 100 µm and the replication forks travel away from the origin. Newly copied DNA is in red.

الشكل 11.14: تكرار الحمض النووي لكائنات حقيقية النواة. يتم بدء النسخ المتماثل كل 10 إلى 100 مايكرومتر وتنتقل شوكات النسخ بعيدًا عن الأصل. الحمض النووي المنسوخ حديثًا باللون الأحمر.

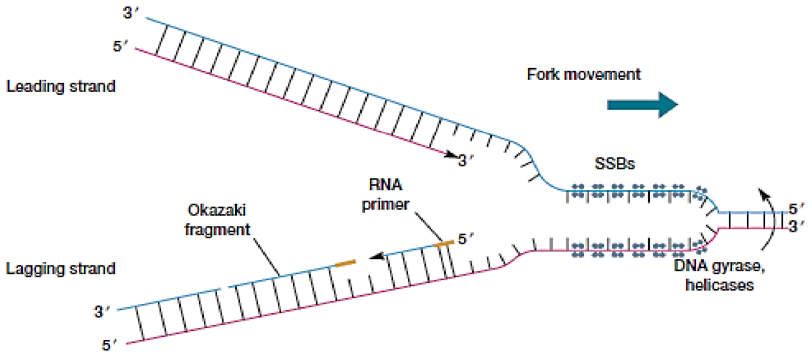


Figure 11.16 Bacterial DNA Replication. A general diagram of the synthesis of DNA in *E. coli* at the replication fork. Bases and base pairs are represented by lines extending outward from the strands. The RNA primer is in gold. See text for details.

شكل 11.16 استنساخ DNA البكتيري. رسم تخطيطي عام لتصنيع DNA في الإشريكية القولونية عند شوكة النسخ. يتم تمثيل القواعد وأزواج القاعدة بخطوط تمتد للخارج من الخيوط. برايمر RNA باللون الذهبي.

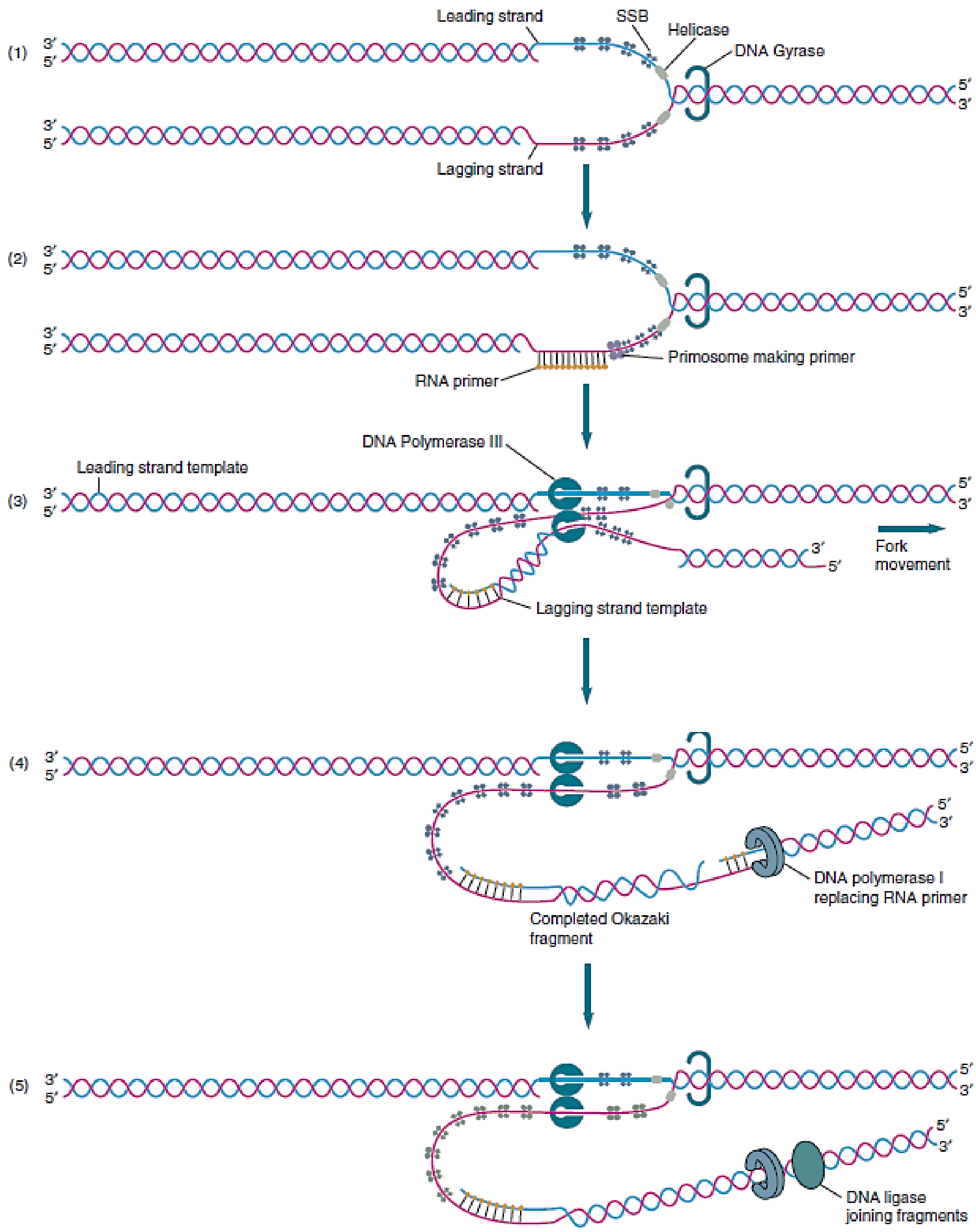


Figure 11.17 A Hypothetical Model for Activity at the Replication Fork. The overall process is pictured in five stages with only one cycle of replication shown for sake of clarity. In practice, all these enzymes are functioning simultaneously and more than one round of replication can occur simultaneously; for example, new primer RNA can be synthesized at the same time as DNA is being replicated. (*1*) DNA gyrase, helicases, and single-stranded DNA binding proteins (SSBs) unwind DNA to produce a single-stranded stretch. (*2*) The primosome synthesizes an RNA primer. (*3*) The replisome has two DNA polymerase III complexes. One polymerase continuously copies the leading strand. The lagging strand loops around the other polymerase so that both strands can be replicated simultaneously. When DNA polymerase III encounters a completed Okazaki fragment, it releases the lagging strand. (*4*) DNA polymerase I removes the RNA primer and fills in the gap with complementary DNA. (*5*) DNA ligase seals the nick and joins the two fragments.

آلية تضاعف الحمض النووي (Mechanism of DNA replicaton) :-

لأن عمليه تضاعف DNA هي عمليه اساسيه للكائن هناك قدر كبير من الجهود المبذوله لفهم هذه الميكانيكيه. عملية تضاعف DNA في E. coli ربما هي الأفضل ومحور الاهتمام في هذا القسم. العمليه في حقيقية النواة يعتقد انها مماثله. تضاعف DNA يبدأ من موقع (oriC locus). حيث يرتبط بروتين (Dna A) بالـoriC أثناء تحلل ATP. وهذا يقود إلى البدء بفك التفاف شريطي DNA المزدوجين في موقع البدء. يحدث المزيد من الفك خلال احتكاك بروتين(DnaB) , ويسمى (helicase).

الـ(E.coli) لديها ثلاث انزيمات مختلفة من (DNA polymerase) كل منها يحفز بناء الحمض النووي بأتجاه من 5'الى←3' بينما قراءة قالب الحمض النووي تكون في الاتجاه من 3'الى← 5'

Polymerases يتطلب نيوكليوسيدات رايبوزية منقوصة الاوكسجين ثلاثية الفوسفات مثل dcTp ,dGTp,dATp, dTTp كمواد اساس وقالب DNA للاستنساخ .

تتم اضافة النيوكليوتيدات الى نهاية 3' من السلسلة النامية عندما تقوم مجموعة oH-3 الحرة الموجوده على السكر الرايبوزي منقوص الاوكسجين بمهاجمة مجموعة الفوسفات الاولى او الالفا من الماده الاساس لتحرير بايروفوسفات.

DNA polymerase ||| يلعب دور رئيسي في التضاعف كذلك من المحتمل ان يكون بمساعدة الـ | polymerase ويعتقد ان ال | polymerase و || polymerase يشاركون في اصلاح الحمض النووي التالف .

خلال تضاعف الحلزون المزدوج للحامض النووي (DNA) يجب فكه ليولد سلاسل مفرده منفصله. ويحدث الفك بسرعة كبيرة يمكن ان تدور الشوكة بسرعة تصل (75-100) دوره في الثانية الواحدة. انزيمات الهليكيز (Helicases) هي المسؤولة عن فك السلسلة المزدوجة للDNA .

ولكي نحافظ على هذا الانفصال وعدم عودة الارتباط بين السلسلتين ترتبط كل سلسلة من سلسلتي الDNA ب (SSBS) single stranded DNA binding protein.

هذه البروتينات تمنع التفاف الـDNA مرة اخرى الفك السريع يؤدي الى شد او تتشكيل لف فائق في الحلزون كالفصل السريع من السلسلتين من الحبل الى عقدة وعملية الفك تخفف التوتر بواسطة انزيمات تعرف بـ (Topoisomerases)

وهي انزيمات تغيرتركيب الDNA عن طريق كسر عابر لسلسلة او سلسلتين في طريقه لتغير بس الشكل ماتأثر على التركيب ومثال عليها هو (DNA gyrase) هو (Topoisomerase) في ال Ecoli الذي يزيل الالتفافات الفائقة التي تنتج خلال التضاعف.

بعد ان يتم فك الحلزون المزدوج يتطلب حل لمشكلتين:-

الاولى // بناء (Polymerase DNA) لنسخة جديدة من الDNA فقط بينما تتحرك من الاتجاه 5الى3 الشكل 11.6 ان تخليق ال (lagging strand) في نفس الاتجاه يتطلب تخليقا من 3الى←5 وهذا امر غير ممكن ونتيجة الى ذلك يتم تصنيع نسخة من الشريط المتقاطعة لل (lagging strand) بشكل متقطع في الاتجاه 5 الى← 3 كسلسلة من الاجزاء يتم بعدها ربط القطع في الاتجاه 5 الى← 3 ليشكل نسخة كاملة .

المشكلة الثانية // بسبب عدم قدره (DNA polymerase) على البدء بنسخة جديدة من نقطة الصفر ولكن يجب ان تبنى على خيط قائم بالفعل الشكل 11.6 توجد بالفعل نسخة من الشريط القائد (leading strand) ومع ذلك قطع ال lagging strand يجب ان تبنى بدون شريط الDNA وفي هذه الحالة يتم بناءRNA ءالبادئ بشكل مستمر في نهايته 3 حيث يكون الحامض النووي على هذا الاساس للبناء .

1) يعمل انزيم (helicase) على فك الاشرطة الحلزونية بمساعده انزيمات (Topoisomerases) مثل (DNA gyrase). يظهر في الشكل 11.6 بأن بروتينات DnaB هي اكثر انزيمات فك الحلزون دورا ونشاطا في عملية التضاعف replication. ولكن بروتين n` قد يشارك ايضا في عملية فك الالتفاف. وتبقى السلاسل المفردة منفصلة عن بعضها البعض بسبب وجود SSBs.

2) عادةً ما يتم تضاعف ال DNA بشكل مستمر عن طريق انزيم (DNA Polymerase III) عند استنساخ السلسله القيادية(leading strand). اما السلسلة المتعرجة (lagging strand) فإنها تتضاعف بشكل متقطع، حيث يتم البناء بالاتجاه من 5 الى← 3 كما هو الحال عليه في بناء السلسلة القيادية (القائدة).

اولا : يبدأ انزيم (RNA Polymerase) خاص يدعى (primase) بصنع سلسلة قصيرة من الRNA يبلغ طولها حوالي (10) نكليوتيدات وتكون متممة لل DNA تدعى بالبادئ (primer). (انظر الشكل 11.16 الخطوة ٢).

يتطلب عديد من بروتينات مساعدة مختلفة، ومعقد من (primase) مع بروتينات مساعدة ويسمى (primosome). (DNA Polymerase lll holoenzyme)يصنع متممDNA في نهايه 3 من (RNA primer). كل من شريط قائد ومتلكئ يصنع بامكان ان يظهر بتزامن مع معقد متعدد بروتيني مفرده مع اثنان من جانب تحفيزي(catalytic sides).

وان كل من (leading and lagging strand) يمكن ان يتم بنائها في وقت واحد على معقد ال (multiprotein complex) مع اثنين من المواقع التحفيزية في هذه الحالة فان قالب ال (lagging strand template)

يجب ان يلتف حول المعقد (complex) القطعة النهائية يكون طولها في البكتريا حوالي 1000 الى 2000 نيوكليوتيدة اما في خلايا حقيقية النواة فيكون طولها حوالي 100 نيوكليوتيدة وهذه القطع تسمى قطع اوكازاكي نسبة الى العالم الذي اكتشفها (Reiji Okazaki).

3) بعد ان تم مضاعفة معظم الشريط المقطع (Lagging strand) بواسطة تكوين قطع (okazaki) ال DNA polymerase اوRNAse Hيزيل الRNA primer.الـ l polymerase يقوم بتصنيع الحمض النووي المكمل ليسمك الفراغ الحاصل من أزالة الRNA.الpolymerase يبدو انه يقوم بازالة نيوكليوتيدات البادئ primer في كل مره نيوكليوتيدة واحده يزيل واحدة في وقت محدد ويستبدلها ب (deoxy ribonucleotide) متمم مناسب holoenzyme. lll polymerase كذلك قد يكون قادر على ملئ الفراغ.

4) أخيرا القطع ترتبط بواسطة إنزيم DNA Ligase الذي يكون إصرة فوسفاتية ثنائية الاستر (phospho diester bond)بين مجموعة الهيدروكسيل OH-3 للشريط النامي (growing strand) وبين الفوسفات P-5 في قطع اوكزاكي.بكتريا الLigase تستعمل اصرة (Pyrophosphate) من NAD^+ كمصدر للطاقه والعديد من ال (Ligase) تستعمل الATp.

الـ (DNA polymerase lll holoenzyme) هو معقد إنزيمي الذي يصنع معظم نسخ الDNA وهو وحدة كبيرة جدا يحتوي على (DNA polymerase lll) او العديد من البروتينات الاخرى. The Y complex and B subunit من الholoenzyme تربطه مع قالب الDNA والPrimer.الفا subunit تحمل تفاعلات البلمرة الحقيقية .يبدو ان معظم او كل بروتينات التضاعف من معقد هائل ام معمل تضاعف يدعى Replisome وهو ثابت مستقر نسبيا ومن المحتمل ان يكون مرتبطا للغشاء البلازمي الDNA يمر خلال هذا المعمل ويستنسخ وينتج عنه اثنين من الكروموسومات البنوية المتشابهة. في البكتريا التي تنمو ببطئ يبدو ان هناك مصنعين Factories يقعان في مركز الخلية او قريبا منه اما الخلايا التي تنمو بسرعة ربما تملك اربع من المصانع.

تضاعف ال DNA يتوقف عندما معقد ال (polymerase) يصل الى موقعه النهائي (termination site) في ال DNA في ال E.coli. يرتبط البروتين Tus بموقع Ter ويوقف عملية التضاعف .

في العديد من بدائية النواة التضاعف يتوقف عشوائياً عند التقاء شوكتي التضاعف (forks meets).

تضاعف ال DNA هو عملية معقدة غير تقليدية تتطلب على الاقل 30 بروتين لتضاعف كروموسوم ال E.coli.

وهذا التعقيد ضروري للتأثير في دقة نسخ ال DNA .حيث يعتقد انه من الخطير جداً لآي كائن حي ان يرتكب عدة اخطاء خلال التضاعف لأنه عدد كبير من الطفرات (mutation) التي قد تحصل تكون مميتة.

في الحقيقة ال E.coli تكون نسبة الاخطاء قلية خلال التضاعف بتردد خلية واحدة لكل **(10^{-9})** او **(10^{-10})** لكل زوج قاعدي متكرر او حوالي **(10^{-6})** لكل جين ولكل سلالة (generation).

وان هذا المعدل المنخفض لحدوث الخطأ في النسخ يعود لعملية النسخ نفسها. على اية حال فإن DNApolymeraseIII, و DNApolymeraseI يمكن ان يدقق عملية التضاعف اي انه يدقق الحامض النووي المتمم المتشكل حديثاً.

ان انزيم البلمرة DNApolymerase يتحرك على طول شريط الحامض النووي DNA المصنع حديثاً حيث يتعرف على اية اخطاء ناتجة من ارتباط غير صحيح بين القواعد النتروجينية وذلك من خلال عملية (hydrolytically) لازالة النيوكليوتيدات في الموقع الخاطيء من خلال نشاط انزيم (Exonuclease) الذي يعمل بالاتجاه ‘3 الى ‘5 والذي يكون موجود في الوحدة ابسيلون ثم يتراجع الانزيم ويقوم بوضع النيوكليوتيد المناسب في مكانه المناسب.

انزيم البلمرة polymerase يحذف الخطأ ويضيف النيوكليوتيدات الصحيحة.على الرغم من التعقيد والدقة فإن عملية التضاعف تحدث بسرعة كبيرة في البدائيات (procaryotic) بمعدل (750الى1000) زوج قاعدي في الثانية , ويكون التضاعف في حقيقيات النواة (Eucaryotic) ابطأ حيث يكون حوالي (50الى100) زوج قاعدي في الثانية الواحدة وان سبب هذا البطئ ليس غريباً لأن تضاعف حقيقية النواة ايضاً يتضمن فك الDNA من (nucleosome) "اي انه يجب ان يفك عن الهستون ثم يبدأ التضاعف ".

المحاضرة الثالثة

تضاعف الحامض النووي منقوص الاوكسجين DNA replication

المقدمة:

إن من أهم الصفات التي من المفترض توفرها في جزئية المادة الوراثية **هو قدرتها على نقل المعلومات الوراثية بصورة أمينة ودقيقة للأجيال الجديدة**. كان هناك شك قبل ظهور نموذج الحلزون المزدوج وقبل ظهور تفاصيل التركيب الكيميائي للأحماض النووي والأمينية فيما إذا كان الحامض النووي يقوم بمهمة قالب لبناء بروتين معين يؤدي هذا دوره كقالب لبناء جزئية حامض نووي متممة أهمل هذا الاعتقاد دور البروتينات في تضاعف الحامض النووي مباشرة بعد تقديم نموذج الحلزون المزدوج في هذا النموذج افترض بأن كل من سلسلتي الحلزون تعمل كقالب لبناء سلسلة متممة جديدة وأثبت علماء الأنزيمات بأن الحامض النووي يعمل كقالب لبناء السلاسل الجديدة دون أن يكون للبروتينات دوراً في عملية تكوين الأجيال الجديدة من السلاسل كما كان يعتقد سابقاً.

وما بقي في موضوع تضاعف الحامض النووي هو كيفية حصول هذا التضاعف والأنزيمات ذات العلاقة وإثبات بأن ما جاءت به نظرية الحلزون المزدوج حول التضاعف شبه المحافظ هو حقيقة ثابتة في جميع الأحياء. في هذا الفصل والفصل القادم سنتحدث عن التضاعف شبه المحافظ في الأحياء المختلفة وآلية حصوله وكذلك التجارب العملية التي أجريت حوله في مختلف المجاميع الحياتية، فيما سيتم الحديث عن آلية البناء والأنزيمات اللازمة في الفصل اللاحق.

الشكل العام لتضاعف الحامض النووي منقوص الأكسجين (DNA)

إن عملية تضاعف الحامض النووي هي ببساطة فيها كل شريط منفصل من أشرطة الحلزون كقالب لتصنيع نسخة جديدة من الشريط شكل (4 - 1). تحتاج هذه العملية تحطيم روابط الهيدروجين الموجود بين القواعد لفصل الشريطين عن بعضهما وتوفر النيوكليوتيدات الاربعة لغرض ربطها لتشكيل أزواج مع الشريط الأصلي (القالب). إن الروابط الهيدروجينية التي تربط شريطي الحامض النووي ذات نوعية خاصة لكنها ضعيفة وسهلة الكسر بواسطة العديد من العوامل. هذه الروابط تتكون بشكل آلي عند توفر ظروف معينة ولكن في ظروف الخلية فإن عملية تحطيم وبناء تلك الروابط يخضع للعديد من الأنزيمات والبروتينات. وعند تلائم نيوكليوتيدات حرة مع أقرب نيوكليوتيدات أبوية مناسبة (من شريط القالب) (كان يكون A مع T أو C مع G) فإن النيوكليوتيدات الحرة تترتب بطريقة يتم معها ربط مكوناتها من السكر والفوسفات مع تلك الموجودة في الشريط الأبوي. هكذا يستمر ربط النيوكليوتيدات الحرة على طول الشريط الأبوي حتى اكتمال الشريط الجديد شكل (4-1). ويقال عن مثل هذا التضاعف بأنه تضاعف شبه محافظ Semiconservative repliation أي أن شريط واحد أبوي يبقى دائماً مع كل مزدوج حلزوني جديد. شخص العالم ارثر كورنبرج (Kornberg 1980) عددا من القواعد الأساسية التي تسيطر على عملية تضاعف الحامض النووي في أي نظام حياتي وهذه القواعد هي: -

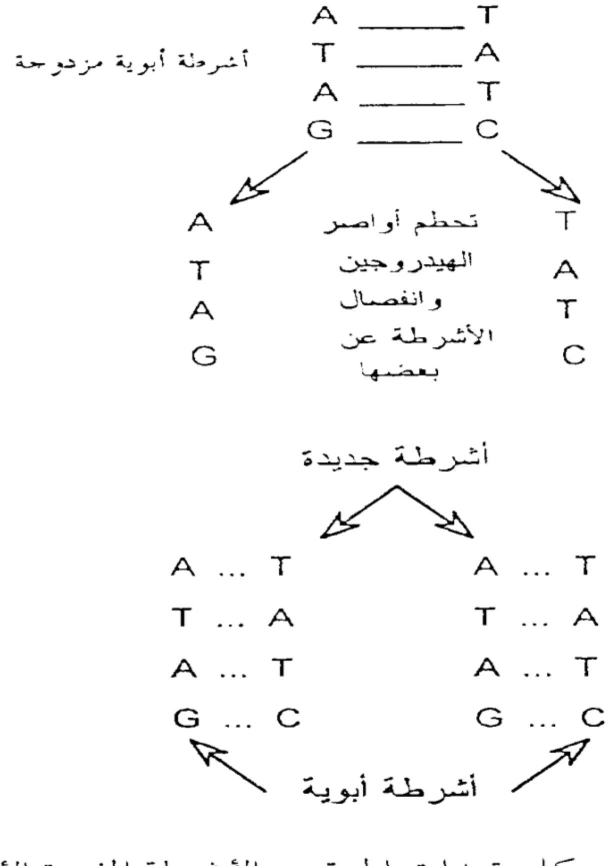
1- إن عملية التضاعف هي عملية شبه محافظة.
2- إن كلا من شريطي الحامض النووي تتضاعف عن طريق إضافة النيوكليوتيدات من النهاية الخامسة إلى النهاية الثالثة 3 ⟵ 5
3- تضاعف الحامض النووي يحدث بشكل **مستمر Continuous** في أحد الاشرطة الذي يدعى الدال Leading strand بينما يكون متقطعاً في الشريط الثاني الذي يدعى بشريط التحميل

Lagging Strand

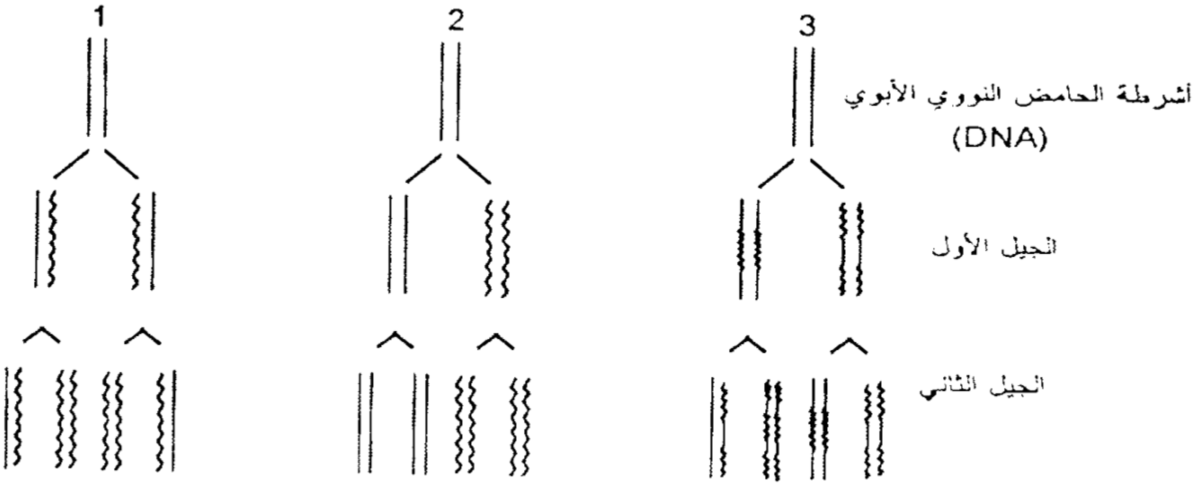
4- إن عملية التضاعف في قطع صغيرة تحتاج لبدئها قطعة من الحامض النووي تعمل كبادئة **(Primer)** لعملية التضاعف

5- إن التضاعف يبدأ من موقع يدعى بالأصل **(Origin)** وقد تحتوي جزئية الحامض النووي على موقع أصل واحد أو أكثر.

6- يبدأ التضاعف من موقع الأصل بإتجاه واحد أو إتجاهين وهو الغالب.. إن كل واحد من هذه القواعد الأساسية جاء من خلال جملة أبحاث علمية أجريت خلال الأربعين سنة الماضية وذلك ابتداءاً من افتراض واطسون وكريك والقاضي بأن كل شريطين من أشرطة مزدوجة الحامض النووي تعمل كقالب لتضاعف شريط جديد لتنتهي العملية بزوج جديد من الأشرطة ولم تنتهي هذه القصة لحد الآن وخصوصاً بعد اكتشاف أن هناك العديد من المورثات المسؤولة عن هذه العملية. قبل ظهور الأدلة العلمية حول تضاعف الحامض النووي شبه المحافظ والتي افترضها واطسون وكريك ظهر افتراضان ينص الأول والذي يدعى بالتضاعف المحافظ **(Conservative Replication)** على أن كلا الشريطين المرتبطين يعملان كقالب لإنتاج زوج جديد من الأشرطة بينما الافتراض الثاني الذي يدعى بالتضاعف التشتتي **(Dispresive Replication)** على أن قطع وثلم من الحامض النووي المصنع حديثاً تلتئم مع ثلم وقطع من الحامض النووي الأبوي لتكوين شريطين جديدين شكل **(4 - 2)**



شكل (4 - 1) : ارتباط النيوكليوتيدات الحرة مع الأشرطة المفردة الأبوية لتكوين سلاسل جديدة.



شكل (4 - 2) : افتراضات طرق تضاعف الحامض النووي.

1. التضاعف شبه المحافظ 2. التضاعف المحافظ 3. التضاعف التشتتي.

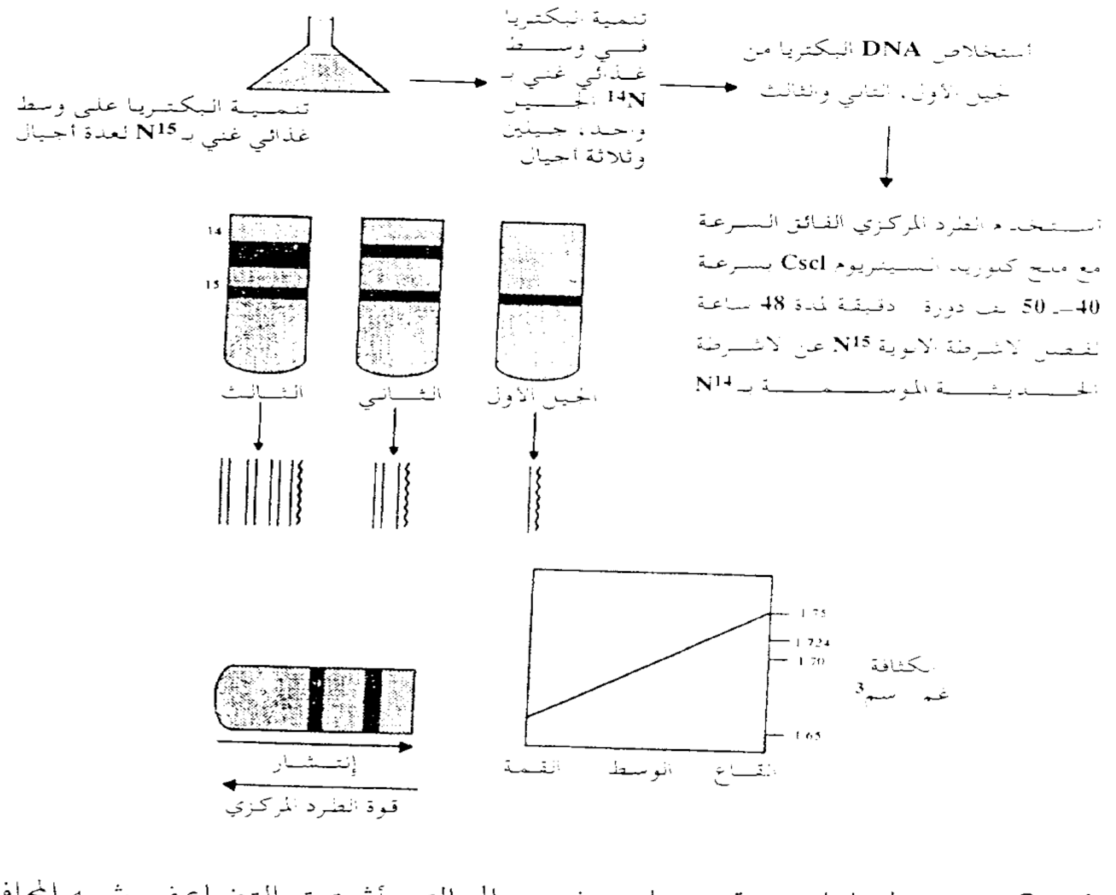
التضاعف شبه المحافظ في الأحياء

التضاعف شبه المحافظ استناداً إلى نظرية الحلزون المزدوج هو أن أشرطة الحلزون تنفصل عن بعضها حيث يقوم كل شريط مفرد بدور قالب لبناء نسخة متممة شبيهة تماماً لنسخة القالب أو الشريط الأبوي. تنتهي هذه العملية بتكوين زوجين من الأشرطة المزدوجة. يحتوي كل زوج على شريط أبوي وشريط جديد مماثل له أثبتت التجارب العملية التي أجريت المعرفة تضاعف الحامض النووي حصول مثل هذا النوع من التضاعف في جميع الأحياء.

التضاعف شبه المحافظ للحامض النووي في البكتريا

تمت الإشارة ولأول مرة لمثل هذا النوع من التضاعف عام **1958** من قبل العالمان ميسلسون وستال **(Meselson & Stahl,1958)** وذلك من خلال تجربة استخدما فيها النيتروجين **14 & 15(N14,N15)** لتمييز الأشرطة الأبوية عن الأشرطة الجديدة فيزيائياً. تم في هذا التجربة تنمية بكتيريا القولون على وسط غذائي يحتوي على نظير النيتروجين **(15)** الثقيل **(N15)** كمصدر وحيد للنيتروجين لغرض تعليم الحامض النووي الأبوي بعدها نقلت البكتيريا إلى وسط زرعي يحتوي على نظير النيتروجين **15 (N14)** لغرض تعليم الحامض النووي المصنع حديثا. تركت البكتريا لتنمو لدورة جيلية واحدة تم بعدها استخلاص الحامض النووي. لقد تم فصل الحامض الأبوي المعلم بنظير النيتروجين **15 (N15)** مـن الحامض النووي المصنع حديثا والمعلم بنظير النيتروجين **14 (N4)** عن طريق الطرد المركزي التوازني **(Equilibrium centrifugation)** باستخدام محلول مركز من ملح السيزيوم **(CsCI)** (المولارية **5,6 M**) يتم في طريقة الفصل التوازني خلط الحامض النووي مع تركيز عالي من ملح السيزيوم في أنبوبة سليلوز خاصة معاملة بمادة **(EDTA)** وبعد ذوبان جميع الملح يتم التخلص من الهواء المتبقي في الأنبوبة بواسطة إضافة البرافين السائل حيث تغلق الأنبوبة غلق محكماً ويتم بعدها استخدام جهاز الطرد المركزي فائق السرعة **(Ultracentrifuge)** لمدة **24** ساعة شكل **(4-3)** . إن جزيئات الحامض النووي تمتلك نفس كثافة التركيز الملحي العالي للسيزيوم حيث أن كثافة كلوريد السيزيوم عندما تكون مولاريته **5,6** هي

1,7**غم / سم3**. بينما تبلغ كثافة الحامض النووي الحاوي على نظير النيتروجين 14 حوالي **1,708**غم / سم3 .
إن استبدال نظير النيتروجين 14 بنظير النيتروجين الثقيل 15 يعمل علـــى زيادة كثافـــة الحامض النووي إلى **1,722**غم /سم3. خلال عملية الطرد المركزي الفائق السرعة فإن أيونات السيزيوم CS^{+} تترسب تدريجياً بإتجاه قاع الأنبوبة. هذه الحركة تترافق مع حركة عشوائية الجزئيات المذيب مما يعيق الترسب الكلي لأيونات السيزيوم. وبعد حوالي 48 ساعة فإن عملية ترسب الأيونات وانتشار الجزيئات تتوازن في المحلول ولا يحدث بعدها أي حركة انتقال للايونات بإتجـــاه القـــاع حيث نحصـــل بعدهـــا علـــى مدرج من تراكيز أيونات السيزيوم يبدأ من القاع (الأكثر تركيزا) بإتجاه السطح (الاقل تركيزا). إن تركيز المحلول في السطح يبلغ **1,65** غم / سم بينما يبلغ في القاع **1,75**سم3/غم إن الحامض النووي المخلوط مع محلول ملح السيزيوم يتحرك أيضاً بإتجاه الأعلى والاسفل تماماً مثل حركة أيونات السيزيوم حتى يستقر في مستوى معين يتناسب مع تركيزه بالضبط، وبعد تلوين المحلول بإستخدام بروميد الاثيديوم **Ethidium bromide (EthBr)** الذي يعمل على تلوين حزم الحامض النووي باللون الأحمر ويمكن ملاحظة وجود حزمتين أحداهما تعود للحامض النووي المعلم بنظير النيتروجين 14 وتكون قريبة من السطح لكونها أخف والأخرى قريبة من القاع وتعود للحامض النووي المعلم بنظير النيتروجين 15. في تجربة ميسلسون وستال فإن بكتريا القولون تم تنميتها أولاً ولعدة أجيال على وسط غذائي يحتوي على نظير النيتروجين 15 بعدها تنقل البكتريا على وسط غذائي يحتوي على النيتروجين 14 وجيل واحد فقط (جولة واحدة من التضاعف) حيث تنقسم البكتريا إلى الضعف، ولذلك فإن جميع الحامض النووي الناتج من جولة واحدة



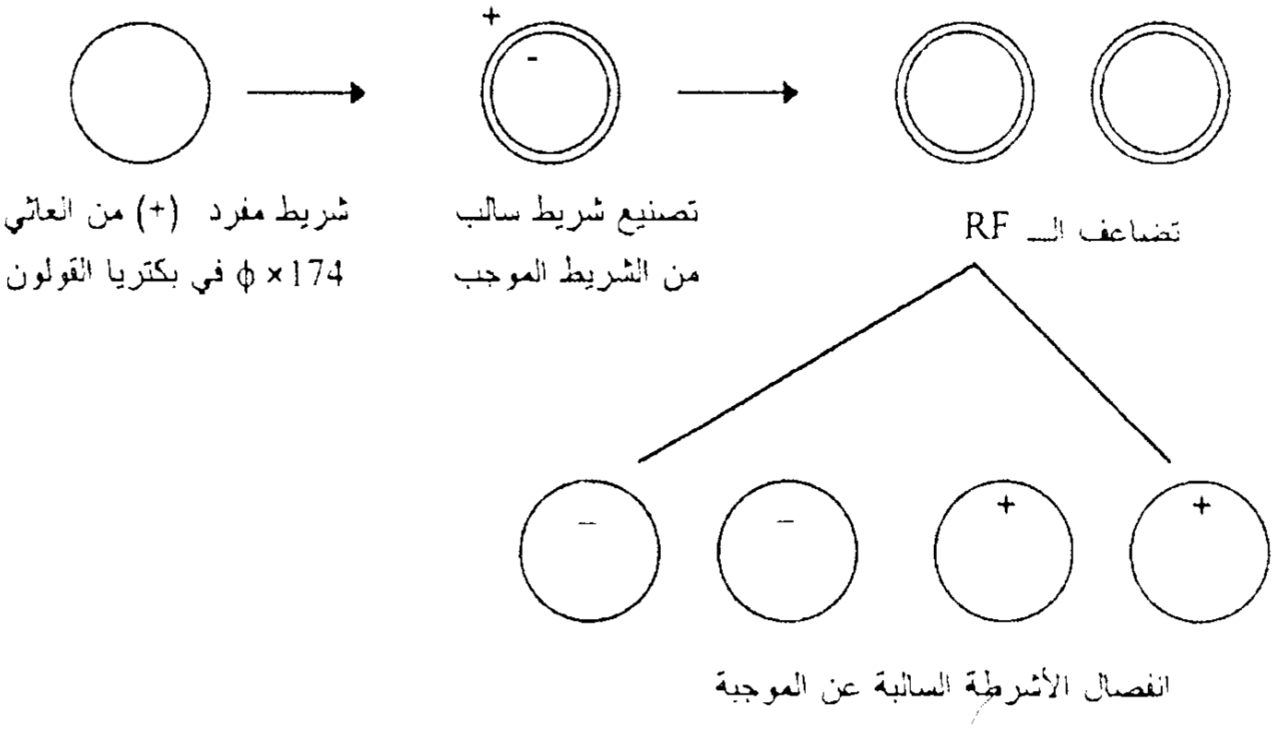
شكل (4 - 3) : تخطيط لتجربة ميسلسون وستال التي أثبتت التضاعف شبه المحافظ للحامض النووي. عند استخدام الطرد المركزي الفائق بوجود ملح كلوريد السيزيوم فإنه يتكون مدرج كثافة يبدأ من القاع حيث الكثافة العالية 56.1 غم/سم3 . ينفصل الحامض الأبوي N15 عند كثافة 1.724 غم/سم3 بينما ينفصل الحامض الجديد N^{14} عند كثافة 1.710 غم/سم3 .

من التضاعف يمتلك كثافة هي وسط بين كثافة الحامض النووي المعلم بنظير النيتروجين 15 والحامض النووي المعلم بنظير النيتروجين 14. إن ذلك يدل على أن الحامض النووي الحديث يحتوي على كمية متساوية من نظائر النيتروجين 15، 14 لاحظ العالمان بأن الحامض النووي المستخلص من البكتريا بعد جيلين من النمو في وسط غذائي يحتوي على نظير النيتروجين 14 له كثافتين مختلفتين حيث وجدا بأن نصفه له كثافة الحامض النووي المعلم بنظير النيتروجين 14 ولكلا شريطي الحامض بينما النصف الآخر له كثافة وسط بين كثافة الحامض المعلم بنظير النيتروجين 14 والحامض المعلم بنظير النيتروجين 15. كما وجدا بأنه عند ترك البكتريا لتنمو الجيل ثالث على وسط غذائي يحتوي على نظير النيتروجين 14 فإن ثلاثة أرباع الحامض النووي له كثافة مساوية لكثافة الحامض المعلم بنظير النيتروجين 14 والربع المتبقي هو وسط بين كثافة الحامض النووي المعلم بنظير النيتروجين 14 والمعلم بنظير النيتروجين 15 توزيع ذرات نظير النيتروجين 14 في هذه التجربة يؤكد الافتراض الذي وضعه واطسون وكريك حول التضاعف شبه المحافظ للحامض النووي. إن التضاعف شبه المحافظ في التجربة الثانية والممثلة بأشرطة الحامض النووي ذات الكثافة والوسط يدل على أن الحامض النووي لا بد أن يحتوي على شريط أبوي واحد معلم بنظير النيتروجين 15 وآخر جديد معلم بنظير النيتروجين 14. وعندما تفصل تلك الأشرطة عن بعضها (بواسطة غلي أنبوبة محلول الحامض النووي في ماء لمدة عشر دقائق وثم تبريده بدرجة حرارة الغرفة) وتطرد مركزيا بسرعة فائقة مع محلول كلوريد السيزيوم فإنه يتم الحصول على موضعين للحامض النووي وبكميات متساوية، الأول مساوي الكثافة الحامض المعلم بنظير النيتروجين 14، والثاني مساوي لكثافة الحامض المعلم بنظير النيتروجين 15 مثلما توقعت نظرية التضاعف شبه المحافظ. إن البحوث التي أجريت على أنواع مختلفة من الحامض النووي المأخوذ من الرواشح والبكتريا والأحياء حقيقية النوى أثبتت بأن هذا النوع من التضاعف هو طريقة عامة.

التضاعف شبه المحافظ في الرواشح والعاثيات

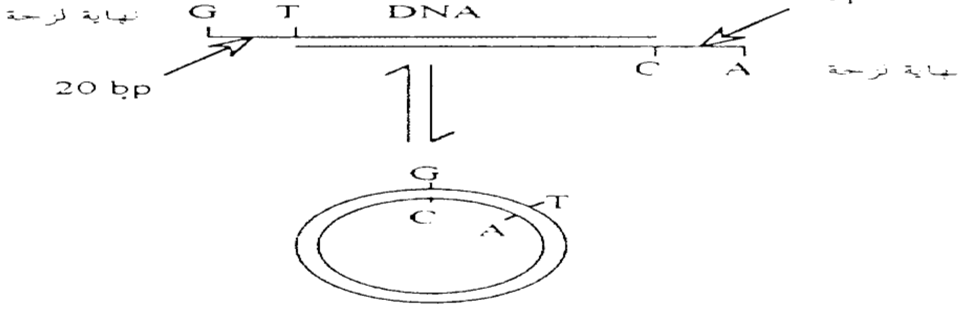
إن هناك بعض الفروقات في تضاعف الرواشح والعاثيات حيث أن هناك رواشح وعائيات تتألف مادتها الوراثية من الحامض النووي منقوص الأكسجين مفرد الشريط. والبعض الآخر مزدوج الشريط. بينما تتألف المادة الوراثية الرواشح وعاثيات أخرى من الحامض النووي الريبوزي مفرد الشريط أو مزدوج. ولأجل معرفة تلك الفروقات فإنه لا بد من الخوض عميقاً في الاختلافات بين هذه الكائنات. إن أفضل الأحماض النووية (DNA) المدروسة في هذا المجال هو الحامض النووي منقوص الأكسجين للعائي ϕX174 الذي يصيب بكتريا القولون. عندما يصيب العائي البكتريا فإن الشريط المفرد للحامض النووي ينتقل إلى البكتريا حيث يتضاعف ويصبح بشكل لفة مزدوجة (Circular DNA) (Double strand) ويدعى عندئذ هيئة التضاعف Replication Form. أن شريط الحامض النووي (DNA) الأبوي يدعى بالشريط الموجب (+) ويعمل كقالب لتصنيع الشريط الثاني والذي يدعى بالشريط السالب (-) حيث يدعى الشريطان عندئذ بهيئة التضاعف. (RF). ويعمل هيئة التضاعف في المرحلة الثانية كقالب لإنتاج أشرطة موجبة (+) حيث يتم استخدامها وتعبئتها لتكوين رواشح جديدة تخرج بعد تحلل خلايا البكتريا شكل (4-4). في مثل هذا النظام فإن كلا الشريطين يخدمان كقائب لإنتاج الأشرطة الجديدة والاختلاف الرئيسي في عملية تضاعف هذه الرواشح هو في الأنزيم المستخدم في هذه العملية. بعض هذه الرواشح تقوم بتشفير أنزيمها لجعله ملائم في نوع معين من البكتريا والبعض الآخر يقوم بتشفيره بطريقة يعمل مع مورثات الكائن المضيف حيث تقوم أنزيمات المضيف على العمل على تضاعف الرواشح اما في الراشح السميان 40(sv40) فإن مادته الوراثية مؤلفة من زوج من أشرطة الحامض النووي منقوص الأكسجين. يتضاعف الحامض النووي لهذا الراشح عن طريق استخدام أنزيمات خلايا المضيف لعدم وجود مورثات مشفرة لهذه الأنزيمات في مادته الوراثية. أما في العاثي لامبدا الذي تتألف مادته الوراثية من حلقة من الحامض النووي منقوص الأكسجين فإن الحامض النووي يتحول من الحلقي إلى الشكل الخطي أو المستقيم ويرتبط مع الحامض

النووي البكتيري. يدعى العاثي في هذه المرحلة بالمرحلة التمهيدية (**Prophase state**) ويدعى الحامض النووي بالحامض المستقيم **Linear DNA**. وعند تضاعف الحامض النووي البكتيري فإنه يتم تضاعف الحامض النووي الخاص بالعاثي المرتبط معه، وعند إكتمال التضاعف ينفصل الحامض النووي الخاص بالعائي عن



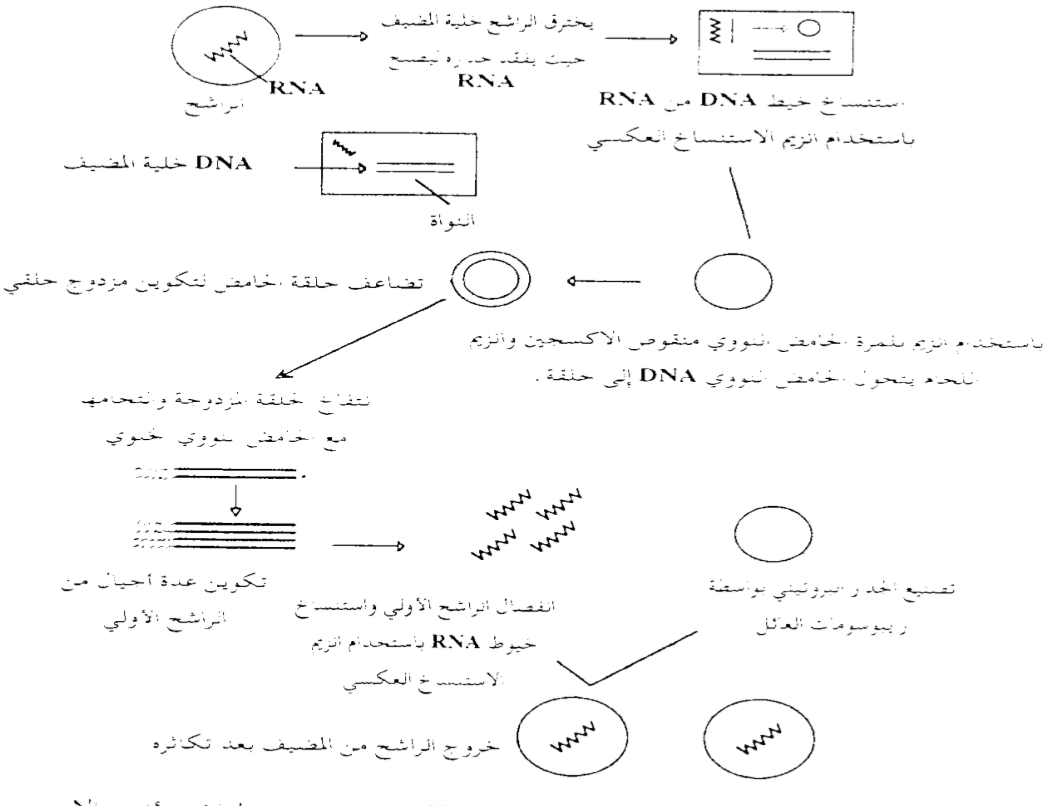
شكل (4 - 4) : تضاعف الحامض النووي العاثي 174×ϕ .

البكتيري ويتحول إلى الشكل الحلقي. ولذا فإن الحامض النووي لهذه العاثيات يوجد بصورتين داخل المضيف. إن قدرة الحامض النووي على تشكلية هيئتين (حلقي ومستقيم) يعود الوجود النهايات اللزجة التي تمكنه من الالتحام والانفصال شكل (**4-5**).



شكل (4 - 5) : قدرة العاثي لامبدا على تكوين حامض حلقي أو مستقيم بواسطة النهايات اللزجة .

أما الرواشح التي تتألف مادتها الوراثية في الحامض النووي الريبوزي مفرد الشريط أو مزدوج فإن عملية التضاعف فيها تتم بواسطة انزيم بلمرة الحامض النووي الريبوزي **RNA Ploymerase** إن أحسن التفصيلات حول عملية التضاعف هذا الحامض في هذه المجموعة من الرواشح تم دراستها في رواشح السرطان المفردة الشريط مثل راشح سرطان العضلات الذي يصيب الطيور **Avian (Rous) Sarcoma Virus (AS)**. يتألف الراشح **ASY** من حامض نووي ريبوزي محاط بالبروتين. وعندما يبدأ الراشح بإضافة خلايا المضيف فإن الحامض النووي ينفصل عـــن البروتين ثم يبدأ الحامض بإختراق جدران خلايا المضيف ليستقر بداخلها حيث يتحول إلى شريط حامض نووي منقـوص الأكسجين متمـم **(Complementary DNA)** بواسطـة أنزيـم الاستنســاخ العكسي **Reverse transcriptase** وله القابلية على استنساخ شريط حامض نووي منقوص الأكسجين من حامض نووي ريبوزي أو العكس ويعمل الحامض الريبوزي كقالب لتصنيع شريط حامض نووي منقوص الأكسجين شكل **(6-4)**



شكل (4 - 6): دورة تضاعف راشح سرطان العضلات **ASV**. يستخدم الراشح أنزيم الاستنساخ العكسي للتحول إلى نسخة حامض نووي منقوص الأكسجين بدلاً من حامض نووي ريبوزي ليتضاعف ثم يتحول إلى حامض نووي ريبوزي ليخرج بعدها الراشح من المضيف.

إن المعلومات التي توفرت عن هذا الراشح عملت على تغيير الكثير من الأمور التي كانت معروفة حول المعلومات الوراثية، حيث إنه في معظم الكائنات يتم استنساخ شريط حامض نووي ريبوزي من الحامض النووي منقوص الأكسجين وتذهب هذه إلى الريبوسومات لتصنيع البروتين أما الآن. فإن دراسات رواشح الحامض النووي الريبوزي أثبتت بأنه من الممكن تصنيع حامض نووي منقوص الأكسجين من نسخة حامض نووي ريبوزي. كما أنها أثبتت بإمكانية تصنيع البروتين مباشرة من الحامض النووي الريبوزي الخاص بالرواشح. إن الحامض النووي منقوص الأكسجين المصنع بواسطة أنزيم الاستنساخ العكسي يعمل على مضاعفة نفسه لتكوين مزدوج حلقي حيث تخدم الحلقة الأولى كقالب لبناء حلقة ثانية. يدعى المزدوج الحلقي بالراشح الأولي **(Provirus)** يلتحم الراشح الأولي مع الحامض النووي للمضيف بطريقة متشابهة لما يحدث مع العائي لامبدا عند إصابته لبكتريا القولون. بعد اكتمال التضاعف تنفصل الرواشح الأولية ثم يتم تصنيع نسخ عديدة من الحامض النووي الريبوزي الخاص

بالـــراشح عـــن طــريق استخــدام أنزيـم بلمـــرة الحامــض النـــووي الريبوزي الثانـــي الخـاص بالمضيف RNA polymerase11. إن بعض الحامض النووي الريبوزي المنتج يتحول إلى حامض نووي ريبوزي مرسال يستخدم لتصنيع بروتينات راشحية تستخدم لإنتاج أجيال جديدة من الرواشح يتم إطلاقها فيما بعد من الخلايا.

التضاعف شبه المحافظ للحامض النووي في حقيقيات النوى

تـــم إثبات وجـــود التضـــاعف شبـــه المحـــافظ في حقيقيات النـــوى من قبل العلماء تايلور وودز وهاك عـــام Taylor, woods & Hughes 1957. قـــام هـــؤلاء العلماء بتنمية القمم النامية لجذور الباقـــلاء Vica faba على وسط غذائي يحتوي علـــى الثايميدين الموسم أو المعلم بنظير الهيدروجين (Tritium) ولفترة أقـــل من دورة خلوية (8-5 ساعات).. حيث أن الثايميدين موجود فقط في الحامض فإنه من السهولة عندئذ تعقب وتشخيص موقع الثايميدين على صبغيات خلايا القمم النامية وذلك من خلال تعقب النشاط الإشعاعي للثايميدين على الصبغيات عبر شريط فوتوغرافي حساس للإشعاعات التي يبعثها نظير الهيدروجين الثالث (H3). بعد تعليم الخلايا بالثايميدين المشع تنقل القمم النامية للجذور بعد غسلها بالماء جيداً إلى وسط غذائي يحتوي على الثايميدين الاعتيادي ومادة الكولسين Coliehcine مادة كيميائية تعرقل تكوين خيوط المغزل مما يمنع الصبغيات الشقيقة من الدخول في الطور الانفصالي (Anaphase) ومـــن ثم الحصول على خلايا ذات صبغيات مكررة فـــي دورة خلوية واحـــدة (6 صبغيات ثنائيـــة الكـــروماتيدات) ويسمـــح للخلايا بالنمـــو فـــي هـــذا الوسط الدورة خلوية واحدة (Cycle of doubling) تنقل بعدها الخلايا إلى شرائح زجاجية نظيفة معقمة حيث يتم تثبيت الخلايا .

تضاعف الحامض النووي منقوص الاوكسجين DNA replication

تضاعف الحامض النووي DNA Replication

النسخ المتماثل للحامض النووي هي عملية هامة ومعقدة للغاية وإحدى العمليات التي تعتمد عليها جميع الحياة. سنناقش أولا النمط الشامل لبناء الحمض النووي ثم نقوم بفحص آلية النسخ المتماثل للحامض النووي في عمق أكبر.

أنماط تخليق الحامض النووي Patterns of DNA synthesis

واتسون وكريك (Watson andCrick) وصفوا هيكل وتركيب DNA في شهر نيسان سنه 1953 وبعد مايقارب شهر واحد ظهر بحث اخر اقترحوا فيه كيف يمكن تكرار DNA حيث تنفك خيوط الحلقتين المزدوجتين ثم تفصل عن بعضها البعض تصطف الان ثنائيات الفوسفات الحرة (deoxy nucleoside triphosphates على طول شريطي الأبوين الأصلية خلال تكاملها بازدواج قاعدي الادنين مع الثايمين والكوانين مع سايتوسين عندما ترتبط هذه النيوكلوتيدات ببعضها بواسطة واحد او اكثر من الأنزيمات ينتج عن كل منها نسختان متماثلتان تحتوي كل منهما على شريط دنا جديد حديث التكوين لقد اثبتت الأبحاث التي اجريت في السنوات التالية ان فرضية واتسن وكريك صحيحه . ان أنماط تضاعف تختلف قليلا الى حد ما في حقيقه النواة عن بدائية النواة على سبيل المثال عندما يشارك DNA الكروموسوم الحلقي في بعض (E.Coli) يبدا النسخ المتماثل في نقطة واحدة الأصل البناء (synthesis) يبدا من شوكة تضاعف replication fork وهو المكان الموجود في المزدوج الحلزوني بالدنا يعمل على أزالة او التخلص من المزدوج الحلزوني ويتم استبداله بالأشرطة المفردة التي تبدا بالتضاعف تنتقل شوكتي التضاعف تتحرك الى الخارج من الاصل حتى نقوم بنسخ النسخة كاملة (Replicant) هذا الجزء من الجينيوم تحتوي على اصل ويتم تكراره كوحدة عندما تتحرك شوكات التضاعف حول الدائرة يتم تشكيل هيكل على شكل الحرف اليوناني ثيتا وأخيرا عندما كان الكروموسوم البكتيري عبارة عن نسخة مفرده (single) replicon فان شوكة التضاعف تلتقي من الجانب الآخر واثنين من كروموسومات سوف تتحرر.

DNA الحمض النووي للحقيقة النواة خطي وأطول بكثير مقارنة مع بدائية النواة لبكتريا القالون مثلا (E. Coli) حوالي (1.300) um) طواله بينما (46) كروموسو في نواة الانسان بطول m1.8 اي 1400 مرة أطوال من كروموسوم بكتريا القولون (E.coli) العديد من شوكات التضاعف يجب ان تقوم بنسخ الحمض النووي في حقيقة النواة بالتزامن أي في وقت واحد و لذلك الجزئية تستطيع ان تتضاعف في وقت قصيرة نسبياً والعديد من (Replicon) تكون موجودة وهناك نقطة اصل حوالي من 10 الى 100 um على طوال الحمض النووي شوكة التضاعف تتحرك بعيداً للخارج من هذه المواقع وعادة تلتقي بشوكات التضاعف أستنسخت من حزم من الحمض النووي المجاورة وفي هذا النمط الجزيئات الكبيرة تستنسخ بسرعة

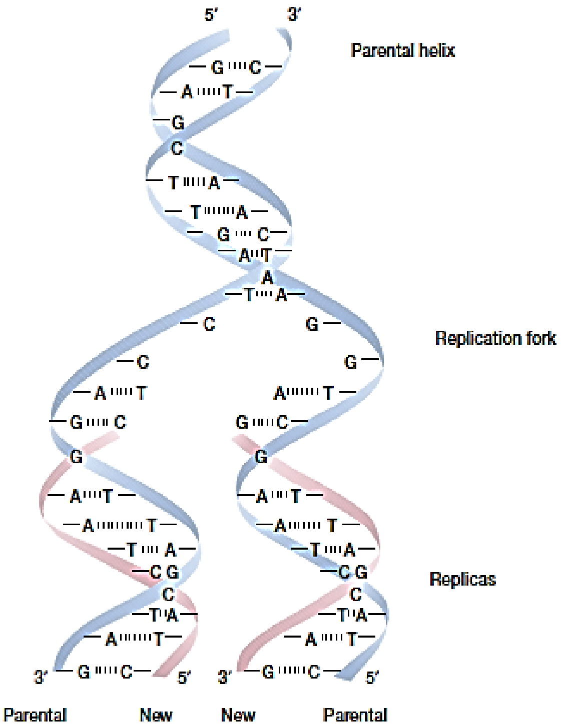


Figure 11.11 Semiconservative DNA Replication. The replication fork of DNA showing the synthesis of two progeny strands. Newly synthesized strands are in maroon. Each copy contains one new and one old strand. This process is called semiconservative replication.

الشكل 11.11 ، استنساخ الحمض النووي شبه المحافظ. شوكة التضاعف للحمض النووي تظهر تخليق نسلين. خيوط صنعت حديثا في المارون. كل نسخة تحتوي على واحد جديد وواحد شريط قديم وتسمى هذه العملية النسخ المتماثل شبه المحافظ

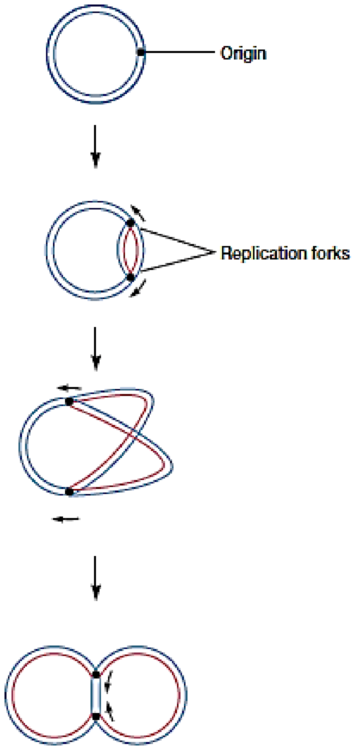


Figure 11.12 Bidirectional Replication. The replication of a circular bacterial genome. Two replication forks move around the DNA forming theta-shaped intermediates. Newly replicated DNA double helix is in red.

شكل 11.12 تكرار ثنائي الاتجاه. استنساخ جينوم بكتيري دائري. يتحرك اثنان من شوكات التكاثر حول الحمض النووي لتشكيل وسيطات على شكل ثيتا. اللولب المزدوج للحمض النووي المنسوخ حديثاً باللون الأحمر.

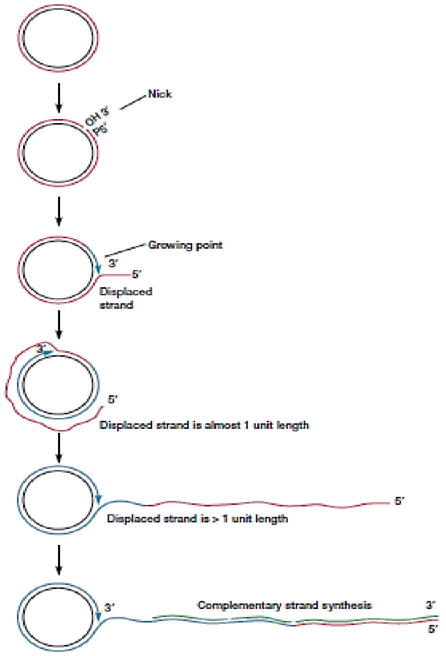


Figure 11.13 The Rolling-Circle Pattern of Replication. A single-stranded tail, often composed of more than one genome copy, is generated and can be converted to the double-stranded form by synthesis of a complementary strand. The "free end" of the rolling-circle strand is probably bound to the primosome.

شكل 11.13 نموذج التكرار لدائرة التدحرج. يتم إنشاء ذيل مفرد ، غالبًا ما يتكون من أكثر من نسخة جينوم ، ويمكن تحويله إلى شكل مزدوج الجدائل عن طريق توليف خيط تكميلي. من المحتمل أن تكون "النهاية الحرة" لحبل الدائرة الدوارة مرتبطة بالـ primosome

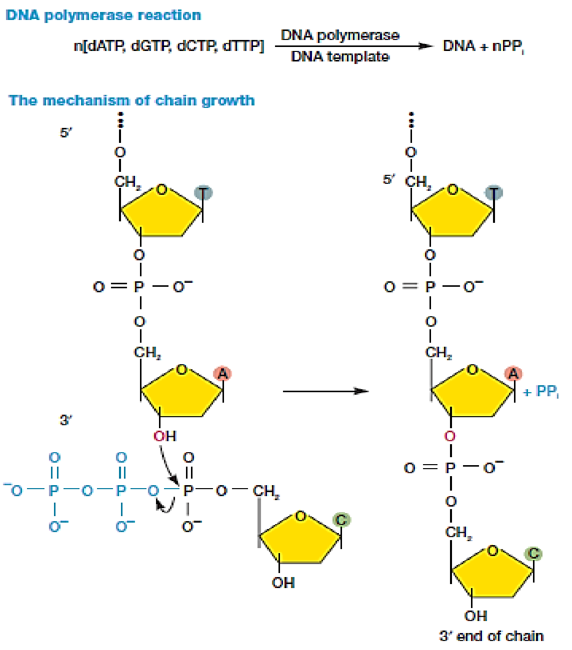


Figure 11.15 The DNA Polymerase Reaction and Its Mechanism. The mechanism involves a nucleophilic attack by the hydroxyl of the 3′ terminal deoxyribose on the alpha phosphate group of the nucleotide substrate (in this example, adenosine attacks cytidine triphosphate).

الشكل 11.15 تفاعل البلمرة DNA وآليته. تتضمن الآلية هجومًا نوويًا من قبل الهيدروكسيل لـ 3 ' طرفية deoxyribose على مجموعة ألفا فوسفات من ركيزة النيوكليوتيد (في هذا المثال ، هجمات الأدينوزين سيتدين ثلاثي الفوسفات).

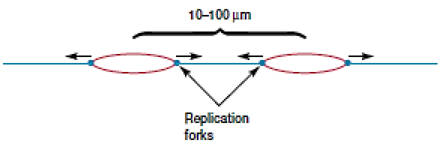


Figure 11.14 The Replication of Eucaryotic DNA. Replication is initiated every 10 to 100 µm and the replication forks travel away from the origin. Newly copied DNA is in red.

الشكل 11.14: تكرار الحمض النووي لكائنات حقيقة النواة. يتم بدء النسخ المتماثل كل 10 إلى 100 مايكرومتر وتنتقل شوكات النسخ بعيداً عن الأصل. الحمض النووي المنسوخ حديثًا باللون الأحمر.

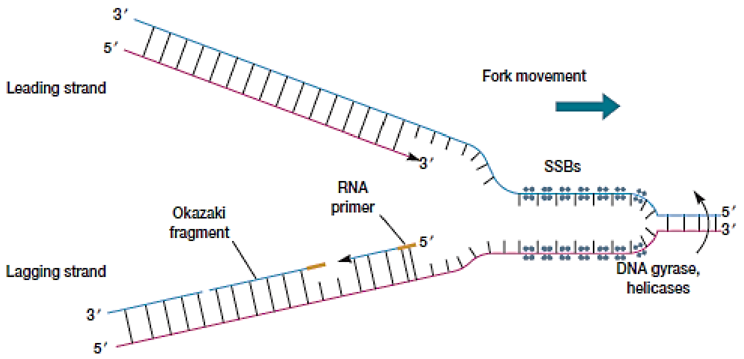


Figure 11.16 Bacterial DNA Replication. A general diagram of the synthesis of DNA in *E. coli* at the replication fork. Bases and base pairs are represented by lines extending outward from the strands. The RNA primer is in gold. See text for details.

شكل 11.16 استنساخ DNA البكتيري. رسم تخطيطي عام لتصنيع DNA في الإشريكية القولونية عند شوكة النسخ. يتم تمثيل القواعد وأزواج القاعدة بخطوط تمتد للخارج من الخيوط. برايمر RNA باللون الذهبي.

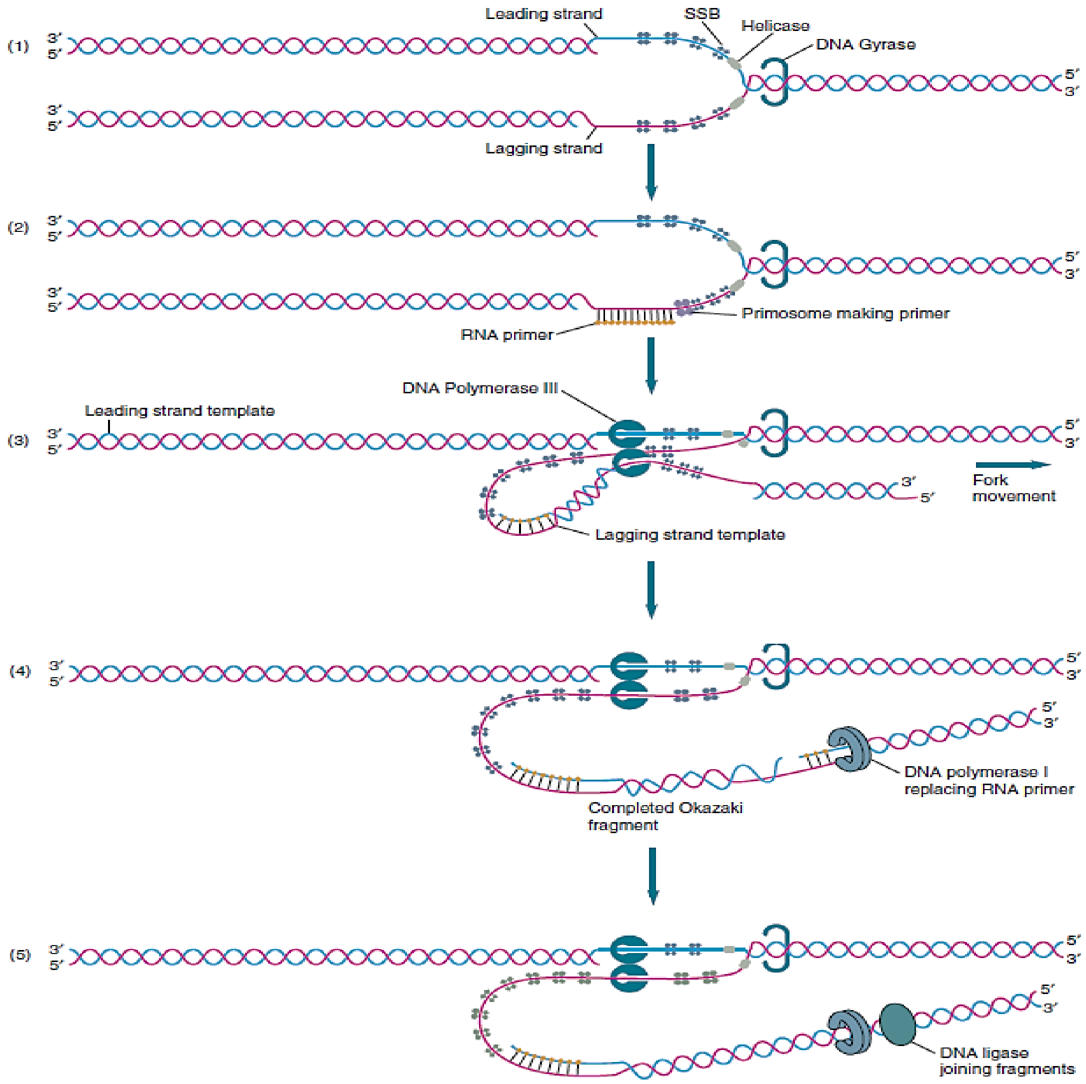


Figure 11.17 A Hypothetical Model for Activity at the Replication Fork. The overall process is pictured in five stages with only one cycle of replication shown for sake of clarity. In practice, all these enzymes are functioning simultaneously and more than one round of replication can occur simultaneously; for example, new primer RNA can be synthesized at the same time as DNA is being replicated. (*1*) DNA gyrase, helicases, and single-stranded DNA binding proteins (SSBs) unwind DNA to produce a single-stranded stretch. (*2*) The primosome synthesizes an RNA primer. (*3*) The replisome has two DNA polymerase III complexes. One polymerase continuously copies the leading strand. The lagging strand loops around the other polymerase so that both strands can be replicated simultaneously. When DNA polymerase III encounters a completed Okazaki fragment, it releases the lagging strand. (*4*) DNA polymerase I removes the RNA primer and fills in the gap with complementary DNA. (*5*) DNA ligase seals the nick and joins the two fragments.

آلية تضاعف الحمض النووي (Mechanism of DNA replicaton):-

لأن عمليه تضاعف DNA هي عمليه اساسيه للكائن هناك قدر كبير من الجهود المبذولة لفهم هذه الميكانيكيه. عملية تضاعف DNA في *E. coli*. ربما هي الأفضل ومحور الاهتمام في هذا القسم. العمليه في حقيقية النواة يعتقد انها مماثله تضاعف DNA يبدأ من موقع (oric locus) حيث يرتبط بروتين (Dna A) بالـ oriC أثناء تحلل ATP وهذا يقود إلى البدء بفك التفاف شريطي DNA المزدوجين في موقع البدء يحدث المزيد من الفك خلال احتكاك بروتين (DnaB)، ويسمى (Helicase). الـ (*E. coli*) لديها ثلاث انزيمات مختلفة من (DNA polymerase) كل منها يحفز بناء الحمض النووي بأتجاه من 5' الى 3' بينما قراءة قالب الحمض النووي تكون في الاتجاه من **3'→ 5' Polymerases** يتطلب نيوكليوسيدات رايبوزية منقوصة الاوكسجين ثلاثية الفوسفات مثل dATp,dgtp.dcgtp.dTTp كمواد اساس وقالبdna للاستنساخ تتم اضافه النيوكليوتيدات الى النهاية 3' من السلسلة النامية عندما تقوم 3-oH الحرة الموجودة على السكر الرايبوزي المنقوص الاوكسجين بمهاجمة مجموعة الفوسفات الاولى او الالفا من ماده الاساس لتحرير بايروفوسفات DNA polymerase III يلعب دور رئيسي في التضاعف كذلك من المحتمل أن يكون بمساعدة الـ polymerase I ويعتقد ان الـ polymerase I و polymerase II يشاركون في اصلاح الحمض النووي التالف. خلال تضاعف الحلزون المزدوج للحامض النووي (DNA) يجب فكه ليولد سلاسل مفرده منفصلة. ويحدث الفك بسرعة كبيرة يمكن ان تدور الشوكة بسرعة تصل (75-100) دوره في الثانية الواحدة. انزيمات الهليكيز (Helicases) هي المسؤولة عن فك السلسلة المزدوجة للـDNA . ولكي نحافظ على هذا الانفصال وعدم عودة الارتباط بين السلسلتين ترتبط كل سلسلة من سلسلتي الـ DNA بـ single stranded DNA binding protein (SSBS).هذه البروتينات تمنع التفاف الـ DNA مرة اخرى الفك السريع يؤدي الى شد او تتشكيل لف فائق في الحلزون كالفصل السريع من السلسلتين من الحبل الى عقدة وعملية الفك تخفف التوتر بواسطة انزيمات تعرف بـ (Topoisomerases) وهي انزيمات تغير تركيب الDNA عن طريق كسر عابر لسلسلة أو سلسلتين في طريقه لتغير في الشكل ماتأثر على التركيب ومثال عليها هو (DNA gyrase) هو (Topoisomerase) في ال *Ecoli* الذي يزيل الالتفافات الفائقه التي تنتج خلال التضاعف بعد ان يتم فك الحلزون المزدوج يتطلب حل لمشكلتين: -

الأولى / بناء Polymerase DNA لنسخة جديدة من الـ DNA فقط بينما تتحرك من الاتجاه الى 3' الشكل 11,6 ان تخليق ال (lagging strand) في نفس الاتجاه يتطلب تخليقا من 3'← 5' وهذا أمر غير ممكن ونتيجة الى ذلك يتم تصنيع نسخة من الشريط المتقاطعة لل (lagging strand) بشكل متقطع في الاتجاه 5' ← 3' كسلسلة من الاجزاء يتم بعدها ربط القطع في الاتجاه 5' ← 3' ليشكل نسخة كاملة

الثانية / بسبب عدم قدره (DNA polymerase) على البدء بنسخة جديدة من نقطة الصفر ولكن يجب ان تبنى على خيط قائم بالفعل الشكل 11,6 توجد بالفعل نسخة من الشريط القائد leading strand مع ذلك قطع الـ lagging strand يجب ان تبنى بدون شريط الـ DNA وفي هذه الحالة يتم بناء RNA ء البادئ بشكل مستمر في نهايته 3' حيث يكون الحامض النووي على هذا الأساس للبناء.

(1) يعمل انزيم (**Helicase**) على فك الاشرطة الحلزونية بمساعده انزيمات (**Topoisomerases**) مثل **DNA gyrase** يظهر في الشكل 11,6 بأن بروتينات **DnaB** هي أكثر انزيمات فك الحلزون دورا ونشاطا في عملية التضاعف **Replication** ولكن بروتين **'n** قد يشارك ايضا في عملية فك الالتفاف. وتبقى السلاسل المفردة منفصلة عن بعضها البعض بسبب وجود **SSBS**

(2) عادة ما يتم تضاعف الـ DNA بشكل مستمر عن طريق انزيم (**DNA Polymerase III**) عند استنساخ السلسله القيادية (leading strand). اما السلسلة المتعرجة lagging strand فإنها تتضاعف بشكل متقطع، حيث يتم البناء بالاتجاه من '5 ← '3 كما هو الحال عليه في بناء السلسلة القيادية (القائدة). **اولا**: يبدأ انزيم **RNA Polymerase** خاص يدعى (Primase) بصنع سلسلة قصيرة من الـ RNA يبلغ طولها حوالي (10) نكليوتيدات وتكون متممة للـ DNA تدعى بالبادئ. (Primer). (انظر الشكل 11,16 الخطوة 2). يتطلب عديد من بروتينات مساعدة مختلفة ومعقد من (Primase) مع بروتينات مساعدة ويسمى (**Primosome**) (DNA Polymerase III) . holoenzyme يصنع متمم DNA في نهايه '3 من (RNA primer). كل من شريط قائد ومتلكئ يصنع بامكان ان يظهر بتزامن مع معقد متعدد بروتيني مفردة مع اثنان من جانب تحفيزي **Catalytic sides** وان كل من **leading and lagging** strand يمكن ان يتم بنائها في وقت واحد على معقد الـ (Multiprotein complex) مع اثنين من المواقع التحفيزية في هذه الحالة فان قالب الـ **lagging strand template** يجب أن يلتف حول المعقد (Complex) القطعة النهائية يكون طولها في البكتريا حوالي 1000 الى 2000 نيوكليوتيدة اما في خلايا حقيقية النواة فيكون طولها حوالي 100 نيوكليوتيدة وهذه القطع تسمى **قطع اوكازاكي** نسبة الى العالم الذي اكتشفها (Reiji Okazaki)

(3) بعد ان تم مضاعفة معظم الشريط المقطع (Lagging strand) بواسطة تكوين قطع (Okazaki) الـ **DNA polymerase** او **RNAse H** يزيل الـ RNA primer. الـ Polymerase I يقوم بتصنيع الحمض النووي المكمل ليسمك الفراغ الحاصل من أزالة الـ Polymerase RNA يبدو انه يقوم بازالة نيوكليوتيدات البادئ Primer في كل مره نيوكليوتيدة واحدة يزيل واحدة في وقت محدد ويستبدلها **Polymerase lll holoenzyme** كذلك قد يكون قادر على ملئ الفراغ

(4) أخيرا القطع ترتبط بواسطة إنزيم **DNA Ligase** الذي يكون إصرة فوسفاتية ثنائية الاستر (Phospho diester bond) بين مجموعة الهيدروكسيل OH-3 للشريط النامي (Growing strand) وبين الفوسفات P-5 في قطع اوكزاكي بكتريا الـ Ligase تستعمل اصرة (Pyrophosphate) من NAD^{+} كمصدر للطاقة والعديد من الـ (Ligase) تستعمل ATP الـ (DNA polymerase III holoenzyme) هو معقد إنزيمي الذي يصنع معظم نسخ الـ DNA وهو وحدة كبيرة جدا يحتوي على (DNA polymerase III) او العديد من البروتينات الأخرى. The Y complex and B subunit من الـ Holoenzyme ترتبط مع قالب الـ DNA و الـ Primer الفا Subunit تحمل تفاعلات البلمرة الحقيقية. يبدو ان معظم او كل بروتينات التضاعف من معقد هائل ام معمل تضاعف يدعى Replisome وهو ثابت مستقر نسبيا ومن المحتمل ان يكون مرتبطا للغشاء البلازمي الـ DNA يمر خلال هذا المعمل ويستنسخ وينتج عنه اثنين من الكروموسومات البنوية المتشابهة في البكتريا التي تنمو ببطئ يبدو ان هناك مصنعين Factories يقعان في مركز الخلية او قريبا منه اما الخلايا التي تنمو بسرعة ربما تملك أربع من المصانع. تضاعف الـ DNA يتوقف عندما معقد الـ (Polymerase) يصل الى موقعه النهائي Termination site في الـ DNA في الـ *E. coli* يرتبط البروتين Tus بموقع Ter ويوقف عملية التضاعف. في العديد من بدائية النواة التضاعف يتوقف عشوائياً عند التقاء شوكتي التضاعف (Forks meets). تضاعف الـ DNA هو عملية معقدة غير تقليدية تتطلب على الاقل 30 بروتين لتضاعف كروموسوم الـ *E. coli*. وهذا التعقيد ضروري للتأثير في دقة نسخ الـ DNA حيث يعتقد انه من الخطير جداً لأي كائن حي ان يرتكب عدة اخطاء خلال التضاعف لأنه عدد كبير من الطفرات (Mutation) التي قد تحصل

تكون مميتة. في الحقيقة الـ *E. coli* تكون نسبة الاخطاء قلية خلال التضاعف بتردد خلية واحدة لكل 10^{-9} او 10^{-10} لكل زوج قاعدي متكرر او حوالي 10^{-6} لكل جين ولكل سلالة (**Generation**). وان هذا المعدل المنخفض لحدوث الخطأ في النسخ يعود لعملية النسخ نفسها. على اية حال فإن **DNApolymeraseIII** و **DNApolymerase I** يمكن ان يدقق عملية التضاعف اي انه يدقق الحامض النووي المتمم المتشكل حديثاً. ان انزيم البلمرة **DNA Polymerase** يتحرك على طول شريط الحامض النووي **DNA** المصنع حديثاً حيث يتعرف على آية اخطاء ناتجة من ارتباط غير صحيح بين القواعد النتروجينية وذلك من خلال عملية (**Hydrolytically**) لازالة النيوكليوتيدات في الموقع الخاطيء من خلال نشاط انزيم **Exonuclease** الذي يعمل بالاتجاه **3'**→ **5'** والذي يكون موجود في الوحدة ابسيلون ثم يتراجع الانزيم ويقوم بوضع النيوكليوتيد المناسب في مكانه المناسب. انزيم البلمرة **Polymerase** يحذف الخطأ ويضيف النيوكليوتيدات الصحيحة. على الرغم من التعقيد والدقة فإن عملية التضاعف تحدث بسرعة كبيرة في البدائيات (**Procaryotic**) بمعدل **750** الى **1000** زوج قاعدي في الثانية. ويكون التضاعف في حقيقيات النواة (**Eucaryotic**) ابطأ حيث يكون حوالي (**50** الى **100**) زوج قاعدي في الثانية الواحدة وان سبب هذا البطئ ليس غريباً لأن تضاعف حقيقية النواة ايضاً يتضمن فك الـ**DNA** من (**Nucleosome**) اي انه يجب ان يفك عن الهستون ثم يبدأ التضاعف ."

Components of DNA Replication in Bacteria

DNA gyrase: انزيم يكسر مؤقتا خيوط الـ DNA, ويخفف الشد الناجم عن فك خيوط الـ DNA helix.

DNA ligase: انزيـم يربط اثنين مـن الـ DNA fragment عن طريق تكوين رابطة تساهميه بين الـ sugar-phosphate residues

DNA polymerases: الانزيمات التي تصنع الـ DNA, يستخدم خيطا واحدا من الـ DNA كقالب لانشاء الشريط المتمم. لايمكن إضافة النيوكليوتيدات الا الى النهاية 3' من الـ Primer, لذلك يحدث التصنيع دائما في الاتجاه 5' ← 3'

Helicases: الانزيمات التي تفكك الـ DNA helix قبل الـ Replication fork.

Okazaki fragment: يتـم انشاء جـزء مـن الحمض النووي اثناء التضاعف المتقطع discontinuous replication للـ lagging strand of DNA.

Origin of replication: نتطقة مميزة لجزئ DNA يبدأ عندها الـ Replication.

Primase: انزيم يصنع أجزاء صغيرة من الـ RNA ليكون بمثابة Primer لتخليق الـ DNA.

Primer: جزء من الحمض النووي الذي يمكن الـ DNA polymerase ان يضيف اليه نيوكليوتيدات (يمكن للانزيم إضافة نيوكليوتيدات فقط الى النهاية 3' من الـ Primer

GENE EXPRESSION IN BACTERIA

يتضمن التعبير الجيني عمليتين منفصلتين لكن مترابطتين ، الاستنساخ والترجمة.
الاستنساخ Transcriptionهو عملية تصنيع الـRNA من قالب الـDNA.
والترجمة Translation ، يتم فك شفرة المعلومات المشفرة على الـmRNA transcript لتكوين بروتين .

Transcription

يحفز إنزيم (**RNA polymerase**) عملية الـTranscription ، مما ينتج عنه single-stranded RNA يكون متمم ومعاكس للاتجاه complementary and antiparallel مع قالب الـDNA .

(الشكل [redacted]). لوصف شريطي الـDNA في منطقة يتم نسخها إلى RNA ، تُستخدم أحيانًا المصطلحات **Plus (+) strand** و **minus (–) strand** [redacted] يُطلق على الشريط الذي يعمل كقالب لتصنيع الـRNA اسم minus (–) strand ، في حين أن مكمله يسمى Plus (+) strand .

أن قوانين الـ(base-pairing) للـDNA والـRNA هي نفسها ، باستثناء أن الـRNA يحتوي على اليوراسيل بدلاً من الثايمين. لذلك ، نظرًا لأن الـRNA مكمل للـstrand (–) ، فإن تسلسل النيوكليوتيدات الخاص به هو نفس strand (+) ، باستثناء أنه يحتوي على اليوراسيل بدلاً من الثايمين.
وبالمثل ، فإن الـRNA transcript لها نفس الاتجاه من '5 إلى '3 ، أو القطبية ، مثل الـstrand (+) .

في الـProkaryotes ، يمكن لجزيئة الـ mRNA أن يحمل المعلومات لجين واحد أو عدة جينات. يُطلق على النسخة التي تحمل جينًا واحدًا اسم **monocistronic** (cistron مرادف للـGene). تلك التي تحمل جينات متعددة تسمى **Polycistronic**. بشكل عام ، البروتينات تشفر على polycistronic message وتشارك جميعها في مسار كيميائي حيوي واحد. يمكّن هذا الخلية من التعبير عن الجينات ذات الصلة بطريقة منسقة.

يبدأ الـTranscription عندما يتعرف RNA polymerase على تسلسل نوكليوتيد على DNA يسمى الـ **Promoter** . ما هوعمله؟

- يحدد منطقة الـDNA التي سيتم نسخها إلى الـRNA.
- يوجه الـ RNA polymerase في أحد الاتجاهين المحتملين. هذا يحدد أي من خيوط الـDNA يستخدم كقالب (الشكل 7.8).

✓ مثل الـ DNA polymerase ، يمكن أن يضيف الـ RNA polymerase فقط نيوكليوتيدات إلى النهاية '3من السلسلة ، وبالتالي يصنع الحامض النووي في اتجاه '5 إلى '3 .
✓ على عكس الـ DNA polymerase ، يمكن أن يبدأ الـ RNA polymerase في التصنيع بدون الـ Primer .

يمكن استخدام جزيء RNA كنقطة مرجعية لوصف الاتجاه على الـDNA المماثل (analogous DNA).
يشير الـ**Upstream** إلى الاتجاه نحو نهاية '5 نهاية (+) من DNA ، بينما يشير الـ**Downstream** إلى الاتجاه نحو النهاية '3 . وهكذا ، فإن (Promoter is upstream of a gene)

Table [redacted] Components of Transcription in Bacteria	
strand (–)	هو شريط الـDNA الذي يعمل كقالب (template) لتخليق الـRNA ؛ وتكون جزيئة الـRNA الناتجة مكملة (complementary) لهذا الشريط (-) .
strand(+)	شريط الـ DNA مكمل للذي يعمل كقالب (RNA){ يعني مكمل لـ(-)Strand } ؛ تسلسل جزيئة الـRNA الناتجة مشابه لهذا الـ(+) Strand.
Promoter	تسلسل النوكليوتيدات الذي يرتبط به الـ RNA polymerase لبدء الـtranscription .
RNA polymerase	إنزيم يصنع الـ RNA باستخدام single-stranded DNA كقالب ؛ يحدث التصنيع دائمًا في الاتجاه من '5 إلى '3 .
Sigma (σ) factor	من مكونات الـ RNA polymerase الذي يتعرف على مناطق الـPromoter. قد تحتوي الخلية على أنواع مختلفة من العوامل التي تتعرف على الـPromoters المختلفة. يمكن التعبير عن هذه في مراحل مختلفة من نمو الخلية ، مما يمكن الخلية من نسخ مجموعات متخصصة من الجينات حسب الحاجة.
Terminator	التسلسل الذي يتوقف عنده تخليق الـRNA ؛ يسقط الـ RNA polymerase من قالب الـDNA ويحرر الـRNA المصنع حديثًا .

Initiation of RNA Synthesis

يبدأ النسخ بعد أن يتعرف الـ RNA polymerase على Promoter موجود على الـ double-stranded DNA ويرتبط به. يذوب الارتباط جزءًا قصيرًا من الـDNA ، مما يخلق منطقة من النيوكليوتيدات المكشوفة التي تعمل كقالب لتخليق الـRNA .

في البكتيريا ، تتعرف وحدة فرعية معينة من الـRNA polymerase على منطقة الـPromoter قبل بدء الـtranscription . يمكن أن تنفصل هذه الوحدة الفرعية ، **Sigma (σ) factor** ، عن الإنزيم بعد وقت قصير من بدء الـtranscription . هذا يترك الجزء المتبقي من الـRNA polymerase ، المسمى بالـ**core enzyme** ، لإكمال الـtranscription . يمكن أن تحتوي الخلية على أنواع مختلفة من العوامل التي تتعرف على الـPromoters المختلفة. يمكن التعبير عن هذه في مراحل مختلفة من نمو الخلية ، مما يمكن الخلية من نسخ مجموعات متخصصة من الجينات حسب الحاجة. الـ RNA polymerase للخلايا حقيقية النواة والـ archaea تستخدم **Transcription factors** للتعرف على الـ Promoters .

Elongation

في مرحلة الاستطالة ، يتحرك الـRNA polymerase على طول شريط الـ DNA القالب ، ويصنع جزيئة single-stranded RNA المكملة.

يتم تصنيع جزيء الـRNA في اتجاه '5 إلى '3 حيث يضيف الإنزيم النيوكليوتيدات إلى النهاية '3 من سلسلة النمو. يتقدم الـ Core RNA polymerase على طول الـDNA ، ويذوب امتدادًا(مسافة stretch) جديدًا ويسمح للامتداد السابق بالإغلاق [redacted] يؤدي هذا إلى كشف منطقة جديدة من القالب ، مما يسمح باستمرار عملية الاستطالة .

بمجرد أن تمضي الاستطالة بعيدًا بدرجة كافية حتى يتمكن الـRNA polymerase من مسح الـPromoter ، يمكن لجزيء آخر من الـRNA polymerase الارتباط ، مما يؤدي إلى بدء جولة جديدة من الـTranscription . وبالتالي ، يمكن نسخ جين واحد عدة مرات في فترة زمنية قصيرة جدًا .

Termination

مثلما يحدث بدء الـTranscription في موقع مميز على الـDNA ، كذلك يحدث الـ Termination. عندما يصل الـ RNA polymerase الى الـ **Terminator** ، فإنه يسقط من قالب DNA ويطلق الـRNA المصنع حديثًا.

الـ Terminator عبارة عن سلسلة من النيوكليوتيدات في الـ DNA ، والتي ، عند استنساخها ، تسمح لازدواج قواعد (base-pair) لـ (two complementary regions) لـ RNA الناتج ، وتشكيل(hairpin loop structure) لأسباب غير مفهومة حتى الآن [redacted] يتسبب هذا في توقف الـRNA polymerase ، مما يؤدي إلى تفككه عن قالب الـDNA وإطلاق الـRNA.

Translation

الترجمة هي عملية فك تشفير المعلومات التي يحملها الـ mRNA لتخليق البروتين المحدد. تتطلب العملية ثلاثة مكونات رئيسية - mRNA ، و Ribosomes ، و tRNAs - بالإضافة إلى بروتينات ملحقة مختلفة [redacted].

TABLE 2 Components of Translation in Bacteria

Anticodon	تسلسل ثلاثة نيوكليوتيدات في جزيئة الـtRNA مكمل لكودون معين في الـmRNA . يسمح الـAnticodon لـ tRNA بالتعرف على الـ Codon المناسب والربط به
mRNA	نوع من الـ RNA molecule الذي يحتوي على المعلومات الجينية التي يتم فك تشفيرها أثناء الـ Translation
Polyribosome (polysome)	ريبوسومات متعددة مرتبطة بـجزيئة mRNA واحدة
Reading frame	تجميع امتداد من النيوكليوتيدات في (sequential triplets) ؛ يحتوي جزيء mRNA على ثلاثة إطارات للقراءة (Reading frame) ، ولكن يتم استخدام إطار واحد فقط في الـTranslation

Ribosome	الهيكل الذي يسهل انضمام الأحماض الأمينية أثناء عملية الترجمة ؛ يتكون من البروتين و Ribosomal RNA. رايبوسوم بدائية النواة (70S) تتكون من الوحدات الفرعية (50S) و(30S)
Ribosome-binding site	تسلسل النيوكليوتيدات في الـmRNA الذي يرتبط به الريبوسوم ؛ في المرة الأولى التي يظهر فيها كودون الميثيونين (AUG) _Start codon_ بعد هذا الموقع ، تبدأ الترجمة بشكل عام.
rRNA	Type of RNA molecule present in ribosomes
Start codon	الكودون الذي تبدأ فيه الترجمة ؛ عادة ما يكون أول AUG بعد موقع ربط الريبوسوم (Ribosome-binding site).
Stop codon	كودون الذي ينهي الترجمة ، ويشير إلى نهاية البروتين ؛ هناك ثلاثة أكواد توقف. (UAA , UAG , UGA)
tRNA	نوع من الـ(RNA molecule) الذي يعمل كمفاتيح لتفسير الشفرة الجينية ؛ يحمل كل جزيء tRNA حمض أميني معين.

The Role of mRNA

الـ RNA هو نسخة مؤقتة من المعلومات الجينية ؛ يحمل تعليمات مشفرة لتخليق Polypeptide معين ، أو في حالة الـ(Polycistronic message) فينتج مجموعة محددة من Polypeptides. يتم فك شفرة هذه المعلومات باستخدام الـgenetic code ، الذي يرتبط كل سلسلة من ثلاثة نيوكليوتيدات ، (Codon) ، بحمض أميني واحد [redacted] الـgenetic code عالمي عمليا ، مما يعني أنه يتم استخدامه بالكامل تقريبًا من قبل جميع الكائنات الحية.

نظرًا لأن الـCodon هو سلسلة من أي مجموعة من النيوكليوتيدات الأربعة ، فهناك 64 كودونًا مختلفًا ($4^3 = 64$). ثلاثة منها هي Stop codon . الـ 61 المتبقية تترجم إلى 20 نوعًا من الأحماض الأمينية المختلفة. هذا يعني أن أكثر من كودون يمكن أن يرمز لحمض أميني معين. على سبيل المثال ، يقوم كل من ACA و ACG بتشفير الحمض الأميني Threonine. بسبب هذا التكرار ، يقال أن الشفرة الجينية (degenerate). لاحظ ، مع ذلك ، أن الأحماض الأمينية المختلفة لا يتم ترميزها أبدًا بواسطة نفس الكودون .

جانب مهم بنفس القدر من mRNA هو أنه يحمل المعلومات التي تشير إلى <u>مكان بدء</u> منطقة التشفير بالفعل. هذا أمر مهم لأن الشفرة الجينية تُقرأ كمجموعات من ثلاثة نيوكليوتيدات. وبالتالي ، فإن أي تسلسل له ثلاثة **(reading frames)** محتملة ، أو طرق يمكن من خلالها تجميع الـ Triplets (الشكل 7.11). إذا حدثت الترجمة في reading frames خاطئ ، فسيتم تصنيع Polypeptide مختلف تمامًا وغير وظيفي بشكل عام.

The Role of Ribosomes

تعمل الريبوسومات كمواقع للترجمة ؛ هيكلها يسهل انضمام حمض أميني إلى آخر. يجلب الريبوسوم كل حامض أميني إلى مكان مفضل بحيث يمكن للإنزيم أن يحفز تكوين (peptide bond) بينهما.

كما أنه يساعد في تحديد تسلسل علامات الترقيم الرئيسية (key punctuation sequences) على جزيئ الـmRNA ، مثل النقطة التي ينبغي عندها بدء تخليق البروتين. يتحرك الريبوسوم على طول mRNA في الاتجاه من '5 إلى '3 ، ويقدم كل كودون بترتيب تسلسلي لفك التشفير ، مع الحفاظ على الـ reading frame الصحيح.

يتكون الريبوسوم بدائية النواة (الـ 70S) من **30S** subunit و **50S** subunit، يتكون كل منها من البروتين والـrRNA (الشكل[redacted] ؛ يرمز الحرف "S" إلى وحدة Svedberg ، وهي مقياس للحجم.

بعض مكونات الريبوسوم مهمة في جوانب أخرى من علم الأحياء الدقيقة أيضًا. على سبيل المثال ، تلعب مقارنة تسلسل النوكليوتيدات لجزيئات الـrRNA دورًا بارزًا في إنشاء الارتباط الجيني للعديد من الكائنات الحية. من الناحية الطبية ، تعتبر الـribosomal proteins و الـrRNA مهمة لأنها أهداف لعدة مجموعات من الأدوية المضادة للميكروبات.

The Role of Transfer RNA

الـ tRNA عبارة عن (segments of RNA) قادرة على حمل أحماض أمينية محددة ، وتعمل كمفاتيح لتفسير الشفرة الجينية genetic code. الـ tRNA يتعرف ويعمل (base-pair) مع كودون محدد وفي العملية يسلم الحمض الأميني المناسب لذلك الموقع. أصبح هذا الإدراك ممكنًا لأن كل tRNA يحتوي على **Anticodon** (ثلاثة نيوكليوتيدات مكملة لكودون معين في الـmRNA). يتم تحديد الأحماض الأمينية التي تحملها كل tRNA من خلال الـanticodon الخاص بها والـ genetic code (الشكل[redacted]).

خطوات الترجمة

-1 Initiation of Translation

في الـ Prokaryotes ، تبدأ الترجمة مع استمرار تصنيع الـ mRNA . ((يعني تبدأ الترجمة والـ mRNA لا يزال قيد التصنيع))(الشكل[redacted]).
ترتبط الـ 30S subunit للرايبوسوم بتسلسل في mRNA يسمى (Ribosome-binding site). في المرة الأولى التي يظهر فيها كودون الميثيونين (AUG) بعد هذا الموقع ، تبدأ الترجمة بشكل عام. لاحظ أن AUG يعمل كـ(start codon) فقط عندما يُسْبَقْ بالـRibosome-binding site ؛ في مواقع أخرى ، يقوم ببساطة بتشفير الميثيونين. يعد موضع أول AUG أمرًا بالغ الأهمية ، لأنه يحدد الـreading frame المستخدم لترجمة ما تبقى من هذا البروتين.

في أول AUG ، يبدأ الريبوسوم في التجمع. أولاً ، يتشكل الـ(initiation complex). يتكون هذا من:

- ✓ 30S ribosomal subunit
- ✓ tRNA الذي يحمل شكلًا معدلاً كيميائيًا من الحامض الاميني الميثيونين ، N-formylmethionine أو **f-Met**
- ✓ البروتينات التي تسمى **initiation factors**.

بعد ذلك بوقت قصير ، تنضم الـ 50S subunit للريبوسوم إلى هذا المركب وتغادر **initiation factors** ، ويتشكل 70S ribosome. ثم تبدأ مرحلة الاستطالة (elongation phase)

2- Elongation

يحتوي الـ 70S ribosome على موقعين يمكن أن ترتبط بهما الـ tRNA الحاملة للأحماض الأمينية (الشكل7.15). أحدهما يسمى **P-site** (Peptidyl site) ، والآخر يسمى **A-site** (Aminoacyl site) ، يشار إليه عادة باسم Acceptor site).

- يرتبط الـ initiating tRNA ، الذي يحمل f-Met ، بالـ P-site.
- الـ tRNA (الذي يتعرف على الكودون التالي على الـmRNA) يملأ الـ A-site الغير المشغول.
- يقوم الإنزيم بعد ذلك بإنشاء الـ Peptide bond بين مجموعة الكربوكسيل للـ f-Met الذي يحمله الـtRNA في الـP-site والمجموعة الأمينية للحامض الأميني الذي يحمله الـtRNA الذي دخل للتو في الـ A-site. هذا ينقل الحامض الأميني من الـ initiating tRNA إلى الحامض الأميني الذي يحمله الـincoming tRNA .
- ثم يتقدم الريبوسوم ، أو **Translocates** ، مسافة كودون واحد ، ويتم إطلاق الـtRNA الذي يحمل الـ f-Met عبر موقع مجاور يسمى الـ **E-site** (**exit site**).
- يتطلب النقل (Translocation) عدة بروتينات مختلفة ، تسمى **Elongation factors**.
- نتيجة للانتقال ، الـremaining tRNA ، والذي يحمل الآن سلسلة الأحماض الأمينية الثنائية ، يحتل الـ P-site ؛ بينما الـ A-site يكون شاغر مؤقتًا.
- يقوم الـ (tRNA) - الذي يتعرف على الكودون التالي - بملء الـ A-site الفارغ بسرعة ، وتتكرر العملية.

بمجرد أن تتقدم الترجمة بدرجة كافية حتى يتمكن الريبوسوم من مسح الـ Ribosome-binding site وأول AUG ، يمكن أن يرتبط ريبوسوم آخر ، ويبدأ جولة أخرى من تخليق بولي ببتيد المشفر. وهكذا ، في أي وقت ، يمكن أن تترجم الريبوسومات المتعددة جزيئة mRNA واحدة . هذا يسمح بالتعبير الأقصى للبروتين من الـ single mRNA template.

يسمى تجميع العديد من الريبوسومات المرتبطة بجزيء mRNA واحد باسم **polyribosome** أو **polysome**.

Termination -3

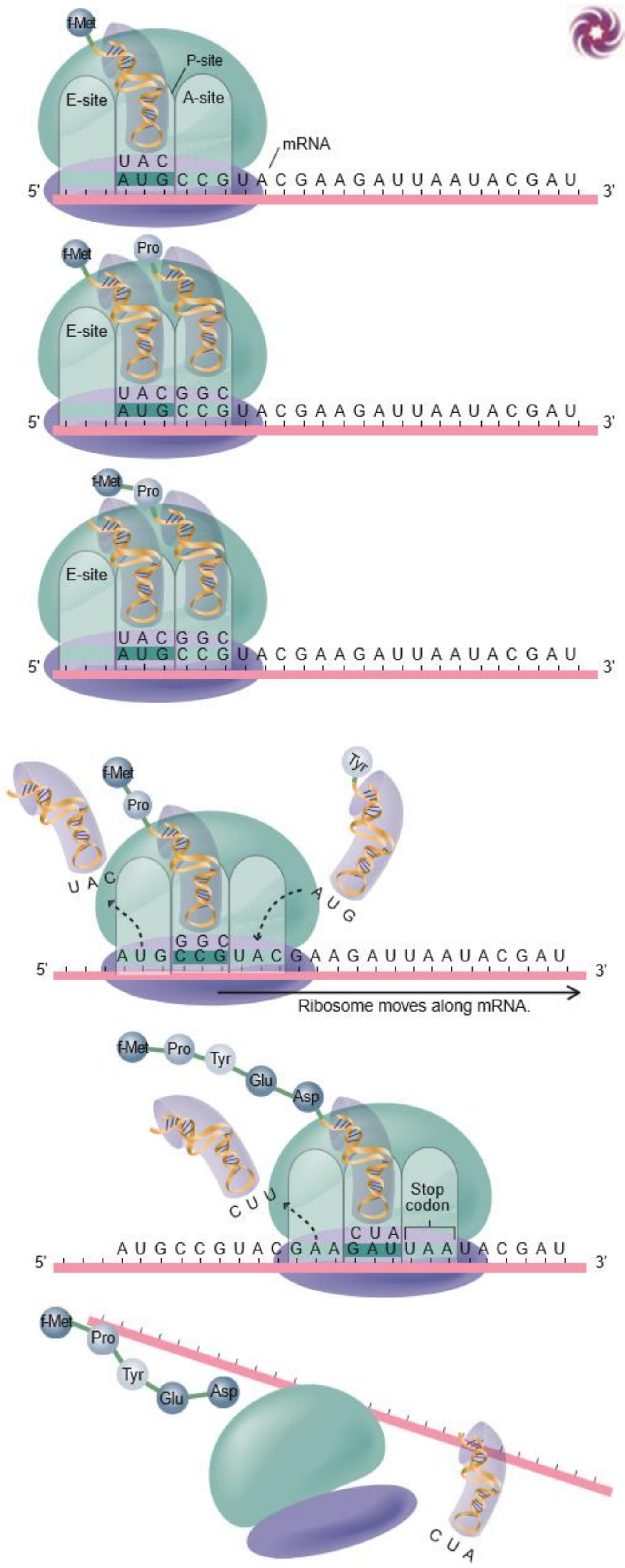
ينتهي استطالة الـ Polypeptide عندما يصل الريبوسوم إلى الـ Stop codon ، وهو كودون لا يشفر لحامض أميني ولا يتعرف عليه الـ tRNA. في هذه المرحلة ، تقوم الإنزيمات التي تسمى release factors بتحرير الـ Polypeptide عن طريق كسر الرابطة التساهمية التي تربطه بالـ tRNA. يسقط الريبوسوم من mRNA وينفصل إلى وحدتين فرعيتين مكونتين ، 30S و 50S. يمكن بعد ذلك إعادة استخدامها لبدء الترجمة في مواقع أخرى .

Post-Translational Modification -4

غالبًا ما يجب تعديل الـPolypeptides بعد تصنيعها من أجل الحصول على خصائصها الوظيفية. على سبيل المثال ، يجب طي بعضها في شكلها الوظيفي النهائي ، وهي عملية تتطلب مساعدة بروتين يسمى الـ **Chaperone**.

يجب أيضًا تعديل الـPolypeptides المخصصة للنقل خارج الغشاء السيتوبلازمي. هذه لها سلسلة مميزة من الأحماض الأمينية الكارهة للماء ، signal sequence ، في نهايتها الطرفية الأمينية ، والتي "تضع علامة" عليها لنقلها عبر الغشاء. يتم إزالة الـsignal sequence أثناء النقل .

FIGURE 1 The Process of Translation



Initiation

الـ initiating tRNA ، الذي يحمل الحمض الأميني f-Met ، يعمل(base-pair) مع start codon ويحتل الـ P-site

⇩

و الـtRNA الذي يتعرف على الكودون التالي يملأ الـ A-site.

⇩

يرتبط الحمض الأميني الذي يحمله الـtRNA في الـP-site تساهميًا مع الحمض الأميني الذي يحمله الـtRNA في A-site

⇩

Elongation

- ينتج عن الـ Translocation تقدم الريبوسوم مسافة كودون واحد. إن الـtRNA الذي شغل P-site يخرج من خلال الـ E-site .
- والـ tRNA الموجود في الـA-site ، والذي يحمل الآن سلسلة الأحماض الأمينية الثنائية ، يحتل الـ P-site.
- الـtRNA الذي يتعرف على الكودون التالي يملأ بسرعة الـ A-site الفارغ.

⇩

Termination

تستمر العملية حتى يقوم الـstop codon بإنهاء العملية.
لا تتعرف جزيئات الـ(tRNA) على الـstop codon

⇩

تتفكك المكونات، وتطلق الـpolypeptide المتشكل حديثًا

علم وراثة االاحياء المجهريه

التركيب البنائي لل DNA

1-تمهيد

2-التركيب الاولي للDNA

3-التركيب الثانوي للDNA

4-ليونة الحلزون المزدوج

5-التركيب Z-DNA

تمهيد: يتالف الدنا من وحدات بنائيه تعرف بالنيوكليوتيدات اي بمعنى اخر ان الدنا هو عباره عن بوليمر من نيوكليوتيدات تشارك في الية نقل المعلومات الوراثيه ، وعند التحلل الكامل للنيوكليوتيدات نحصل على قاعده نتروجينيه وسكر وحامض الفوسفوريك. التركيب الذي اقترحه واتسن وكريك ليس بالنموذج الكامل والصحيح تماما لجميع جزيئات الدنا وهو النموذج B-DNA في حين النموذج الاكثر حداثه هو Z-DNA ايضا هنالك نمذج قيد الدراسه مثال ذلك : F,Q,U,V و Y-DNA

تركيب النيوكليوتيد المتعدد

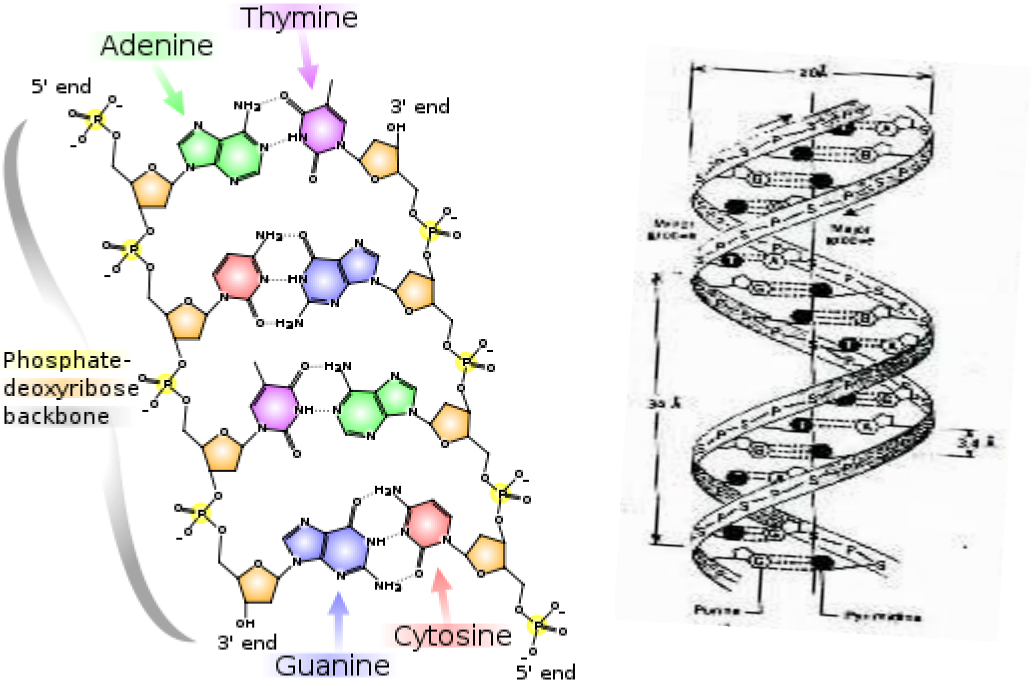
1- **التركيب الاولي primary structure** : لسلسلة النيوكليوتيد المتعدد بعض الظواهر المهمه وهي : اولا ، ان هذه السلسله تكون ذات اتجاه محدد حيث ان الاصره الفوسفاتيه ثنائية الاستر هي دائما تكون بين ذرة الكاربون 3 من احد النيوكليوتيدات وكاربون 5 من النتيوكليوتيده التي تليها وهكذا يمكن تمييز نهايتي السلسله وهي النهايه 5 التي تحمل مجموعة فوسفات والنهايه 3 التي تحمل مجموعة الهيدروكسيل غير متفاعله . ثانيا ان لسلسلة متعدد النيوكليوتيد ذات خصوصيه فرديه تتعين بواسطة تسلسل القواعد النتروجينيه nucleotide sequence وهذا التسلسل يعرف بالتركيب الاولي للحامض النووي

2- **التركيب الثانوي secondary structure** : يتكون هذا التركيب من سلسلتين مختلفتين الاتجاه من متعدد النيوكليوتيد ترتبط بها القواعد الادنين مع الثايمين باواصر هيدروجينيه ثنائيه والسايتوسين مع الكوانين باواصر هيدروجينيه ثلاثيه . وهذا التركيب ثنائي السلسله يكون بشكل حلزون مزدوج تكون فيه القواعد النتروجينيه مرتبه الى الداخل من الحلزون المزدوج ويتكو ن التركيب من سلسلتين حلزونيتين من النيوكليوتيد المتعدد ملتفين حول محور لتكوين حلزون مزدوج ويكون اتجاه الحلزون

ناحية اليمين حيث ياتف اثنان من سلاسل متعدد النيوكليوتيد بعضها حول بعض ويوجد في كل التفافه للحلزون عشرة ازواج من القواعد وللحلزون المزدوج اخدودان احدهما رئيسي والاخر ثانوي . وان هاتين السلسلتين غير متوازيين وكونهما ان الجسر الفوسفاتي ثنائي الاستر 5-3 بين النيوكليوتيدات يسير باتجاهين متعاكسين .

3- ليونة الحلزون ال.مزدوج

التركيب الذي اقترحه واتسن وكريك ليس بالنموذج الكامل والصحيح تماما لجميع جزيئات الدنا ، فلقد تم التعرف على العديد من التراكيب الاخرى المختلفه للحلزون المزدوج . اذ التركيب الذي اقترحه واتسن وكريك هو B-DNA اما النموذج الذي يكون اكثر حداثه من B-DNA هو النموذج الذي اعتمد على معلومات جديده توفرت اضافه الى معلومات التي اقترحها واتسن وكريك . فلقد وجد بان القواعد لاتكون عموديه تماما على محور الحلزون وانا تكون مبتعده عنه بحدود 60 انكستروم . ومن التراكيب الاخرى هي A-DNA, C- DAN, E-DNA, P-DAN , S-DNA, Z-DNA,
وهناك تراكيب قيد الدراسه وهي: F,Q,U,V و Y-DNA

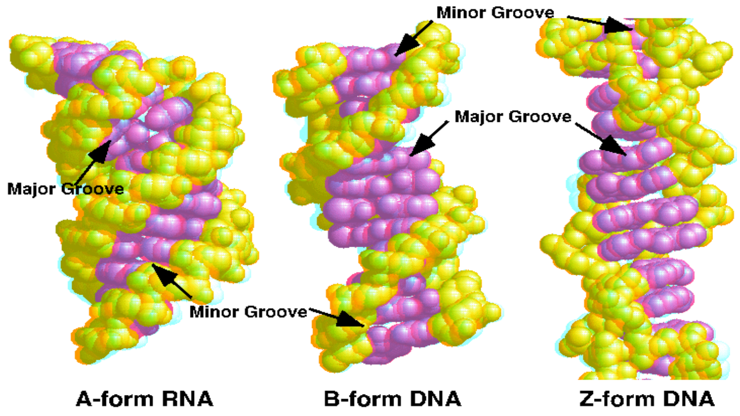


DNAرسم تخطيطي يوضح شكل اللولب المزدوج لجزئ الدنا

جدول المعالم التركيبيه لل A, B, Z- DNA

	A	B	Z
Helix sense اتجاه الحلزون	Right handed	Right handed	Left handed
Rotation /bp التواء الحلزون لكل زوج قاعده	33.6	35.9	60/2
Mean bp/turn معدل ازواج القواعد لكل لفه	10.7	10.0	12
Inclination of bp to axis ميل ازواج القواعد على المحور	+19	-1.2	-9
Rise/bp along axis ارتفاع ازواج القواعد عن بعضها على طول المحور	2.3A	3.32A	3.8A
Pitch/turn of helix درجة الانحدار لكل لفة حلزون	24.6A	33.2A	45.6A
Glycosyle angle زاوية الاصره الكلايكوسيديه	Anti	Anti	C-anti, G- syn
Major groove الاخدود الرئيسي	Narrow &depth	Wide &depth	Flattened
Minor grooves الاحدود الثانوي	Wide &flattened	Narrow &depth	Narrow &depth
Diameter القطر	26A	20	18 A

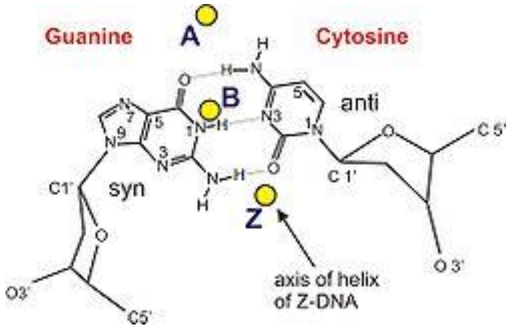
هنالك اختلاف ايضا بالنسبه لسطح الحلزون حيث يوجد اخدودان مميزان مختلفان احدهما يدعى بالاخدود الرئيسي major groove والاخر يدعى بالاخدود الثانوي secondary groove وهذه الاخاديد مهمه في التفاعلات للدنا مع جزيئات اخرى مثل البروتينات



شكل يوضح الاخدود الرئيسي والثانوي لجزيئة الدنا بانواعه الثلاثه

التركيب Z (Z-DNA)

بعد اكثرمن 25 عام استطاع Alexander Rich وجماعته في 1979 من اكتشاف تركيب اخر يكون في التركيب الحلزوني باتجاه اليسار وسمي بالجزيء Z-DNA. من الظواهر المميزه لهذا التركيب هو وجود اتجاهين ثابتين للقواعد النتروجينيه نسبه الى حلقة اليوكسي رايبوز وتمى بالمضاد anti ومع syn. ففي كلا من A,B-DNA تكون جميع القواعد ثابته بوضع المضاد .اما في الشكل Z-DNA فتكون قواعد البيورين دائما بوضع مع ، اما البريميدينات بوضع المضاد وبما ان Z-DNA يكون فيها تعاقب البيورينات والبريميدينات في كل سلسله وهذا التعاقب هو الذي اعطى الشكل المتعرجZigzag للفوسفيت ومن هنا جاءت التسميه لهذا النوع ،وقد افترض لهذا الشكل وظيفه بايولوجيه في عملية تنظيم التعبيير الجيني



شكل يوضح فيه اتجاه المضاد والمع (anti, syn)للقواعد النتروجينيه في تركيب Z-DNA

جدول [redacted] Components of DNA Replication in Bacteria

DNA gyrase: إنزيم يكسر مؤقتًا خيوط الـDNA ، ويخفف الشد الناجم عن فك خيوط الـ DNA helix.

DNA ligase: إنزيم يربط اثنين من الـDNA fragment عن طريق تكوين رابطة تساهمية بين الـsugar-phosphate residues للنيوكليوتيدات المجاورة.

DNA polymerases: الإنزيمات التي تصنع الـDNA ؛ يستخدمون خيطًا واحدًا من الـDNA كقالب لإنشاء الشريط المتمم. لا يمكن إضافة النيوكليوتيدات إلا إلى النهاية '3 من الـPrimer ، لذلك يحدث التصنيع دائمًا في الاتجاه '5 إلى '3 .

Helicases: الإنزيمات التي تفكك الـDNA helix قبل الـReplication fork.

Okazaki fragment: يتم إنشاء جزء الحمض النووي أثناء التضاعف المتقطع (discontinuous replication) للـ lagging strand of DNA.

Origin of replication: منطقة مميزة لجزيء DNA يبدأ عندها الـReplication.

Primase: إنزيم يصنع أجزاء صغيرة من الـRNA ليكون بمثابة Primer لتخليق الـDNA.

Primer: جزء من الحمض النووي الذي يمكن الـDNA polymerase أن يضيف إليه النيوكليوتيدات (يمكن للإنزيم إضافة نيوكليوتيدات فقط إلى النهاية '3 من الـPrimer)

تركيب الجين :- Gene Structure

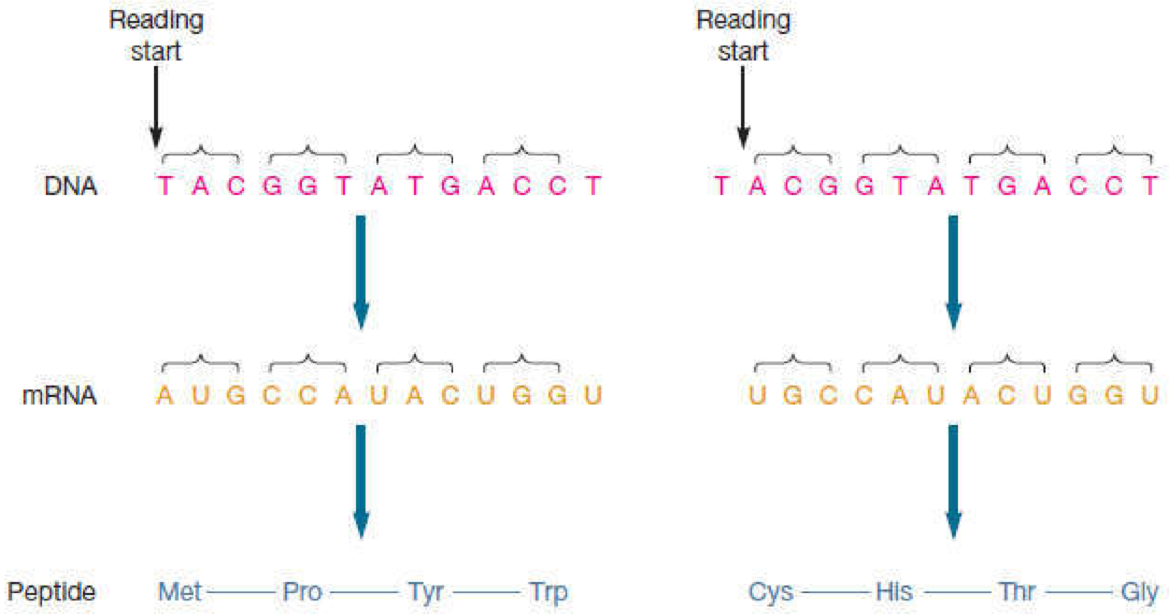
تم تعريف الجين بعدة طرق ففي البداية اعتبر علماء الوراثة أنه الكيان Recombination المسؤول عن منح الصفات للكائن الحي وأيضا الكيان الذي يمكن أن يخضع لإعادة التركيب. وتتضمن إعادة التركيب تبادل الحمض النووي من مصدر مع مصدر آخر وهو المسؤول عن توليد الكثير من التنوع الجيني الموجود في الفيروسات والكائنات الحية. الجينات سميت نموذجياً لبعض الطافرات أو الأنماط المظهرية المتغيرة (الكائنات التي فيها تغييرات مظهرية) Phenotype. مع اكتشاف وتوصيف الحمض النووي ، حيث تم تعريف الجين بشكل أكثر دقة بانه تسلسل خطي من النيوكليوتيدات أو الكودونات (هذا المصطلح استخدام للحمض النووي RNA اضافةً الى ال DNA) مع نقاط بداية ونهاية ثابتة.

في بادئ الامر كان يعتقد بأن الجين يحتوي على معلومات لبناء انزيم واحد ، نظرية (جين واحد -انزيم واحد) وهذه تحورت فيما بعد الى نظرية (جين واحد – متعدد ببتيد مفرد) وذلك بسبب وجود انزيمات وبروتينات اخرى تتألف من إثنين او أكثر من السلاسل متعددة الببتيد المختلفة والتي تشفر بواسطة جينات منفصلة .ان القطعة التي تشفر لمتعدد ببتيد مفرد بعض الاحيان تسمى cistron .اظهرت نتائج حديثة جدا بأنه حتى هذا الوصف مبسط جدا. لا تشتمل عملية بناء البروتين على جميع الجينات فبعضها تشفر لل rRNA و tRNA بدلا من ذلك. لذلك يمكن ان يعرف الجين بأنه تتابع من البولي نيوكليوتيدات الذي يشفر لناتج وظيفي (بمعنى متعدد ببتيد او tRNA او rRNA) .بعض علماء الوراثة اعتقدوا بانه قطعة من الحامض النووي والتي تستنسخ لتعطي ناتج RNA. اغلب الجينات تتألف من تتابعات منفصلة من الكودونات التي تقرأ بطريقة واحدة لتنتج ناتج واحد أي ان الشفرة لا تتداخل وهناك نقطة بدأ واحدة ذات اطار قراءة واحد أو طريقة يتم بها تجميع او تصنيف النيوكلويتيدات بشكل كودونات . لذلك فأن الكروموسومات تتألف عادة من تتابعات جينية لا يتداخل بعضها فوق البعض الاخر .على اي حال هناك استثناءات لهذه القاعدة .فمثلا بعض الفايروسات مثل العاثي OX174 يحتوي على جينات متداخلة وجزء من الجينات تتداخل في بعض جينومات البكتريا .

التركيب الجيني للفايروسات والكائنات بدائية النواة يختلف بشكل كبير عنه في حقيقية النواة . ففي انظمة البروكاريوتيك والفايروسات، عادةً ما تكون المعلومات المشفره في ال cistron مستمرة (تحتوي بعض الجينات البكتيرية على إنترونات) ؛ وعلى اية حال ، في الكائنات حقيقية النواة العديد من الجينات تحتوي على معلومات مشفره (exons) تنفصل او تتقطع بشكل دوري بواسطة تتابعات غير مشفرة (introns). والاستثناء المثيرة للاهتمام لهذه القاعدة هي جينات الهيستون في حقيقيه النواه ، التي تفتقر للانترونات. ولكون انظمة البروكاريوتك والفايروسات وصفت بشكل جيد ، فإن الوصف الأكثر تفصيلاً لبنية الجينات الذي سيتم التركيز عليه فيما يلي هو لجينات الإشريكا القولونيةE. coli.

الجينات التي تشفر لتكوين البروتينات Gene That code for protein :-

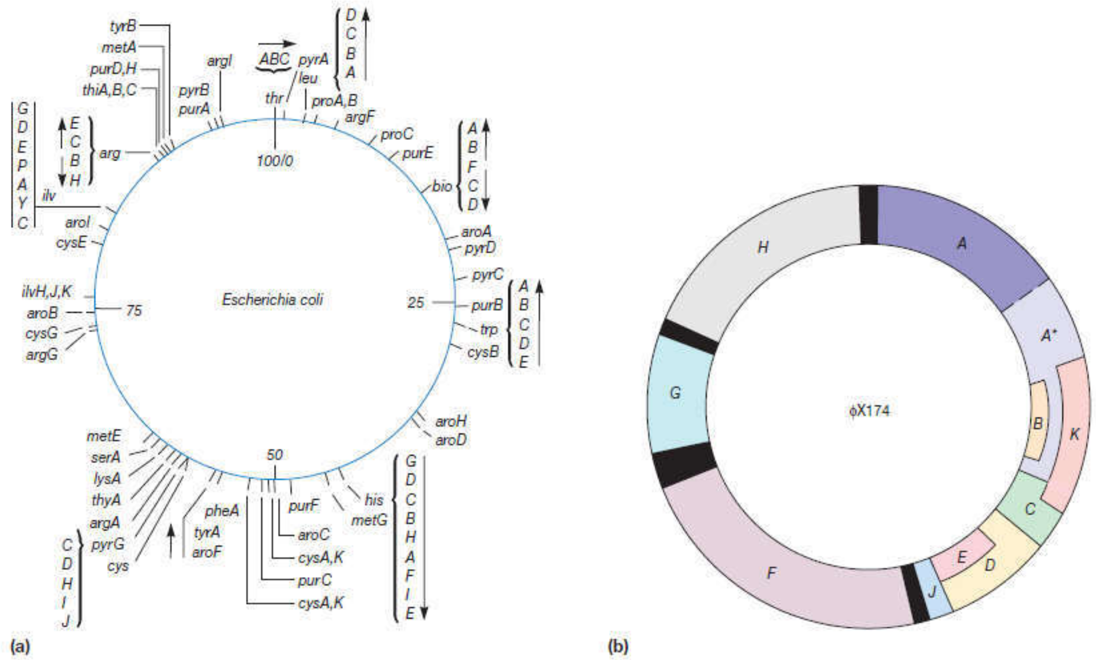
نستذكر من مناقشة عملية الاستنساخ أنه على الرغم من ان الحمض النووي (DNA) مزدوج الشريطين ، الا ان شريط واحد فقط يحتوي على المعلومات الخاصة بالتشفير والتي توجه بشكل مباشر تخليق او بناء الحمض النووي الريبي RNA. ويطلق على هذا الشريط بالقالب template ، والشريط الاخر يعرف بالشريط المكمل (المتمم) غير قالب nontemplate . ولأن الـmRNA انتج من الاتجاه 5′ إلى 3′ ، فإن قطبية الشريط القالب لل DNA تكون من الطرف 3′ إلى 5′. لذلك تكون بداية الجين في النهاية 3′ للشريط القالب (وأيضًا الطرف 5′ للشريط غير القالب). يقع في بداية الجين موقع تعرف او تمييز / ربط وتنظيم RNA polymerase يعرف باسم بروموتر ← promoter).



شكل : يوضح إطارات القراءة وأهميتها. ويحدد المكان الذي تبدأ فيه قراءة تسلسل الحمض النووي والطريقة التي يتم بها تجميع النيوكليوتيدات معًا في مجموعات من ثلاثة (الموضحة بأقواس) ، وهذا يحدد كودونات mRNA والمنتج هو الببتيد . في المثال ، وينتج عن تغيير في إطار القراءة بواسطة نوكليوتيد واحد mRNA مختلف تمامًا وببتيد نهائي.

الحفاز(promotor):- هو سلسله منDNA الذي عاده تقع upstream من المنطقة المشفرة او منطقة الاستنساخ. اي ان الحفاز يقع قبل او upstream من المنطقة المشفرة بالإشارة الى اتجاه الاستنساخ (اتجاه الاستنساخ يشار له downstream مع التيار). الجينات المختلفة لها حفازات مختلفة وكذلك فان الحفازات تختلف في التتابع بين البكتريا.

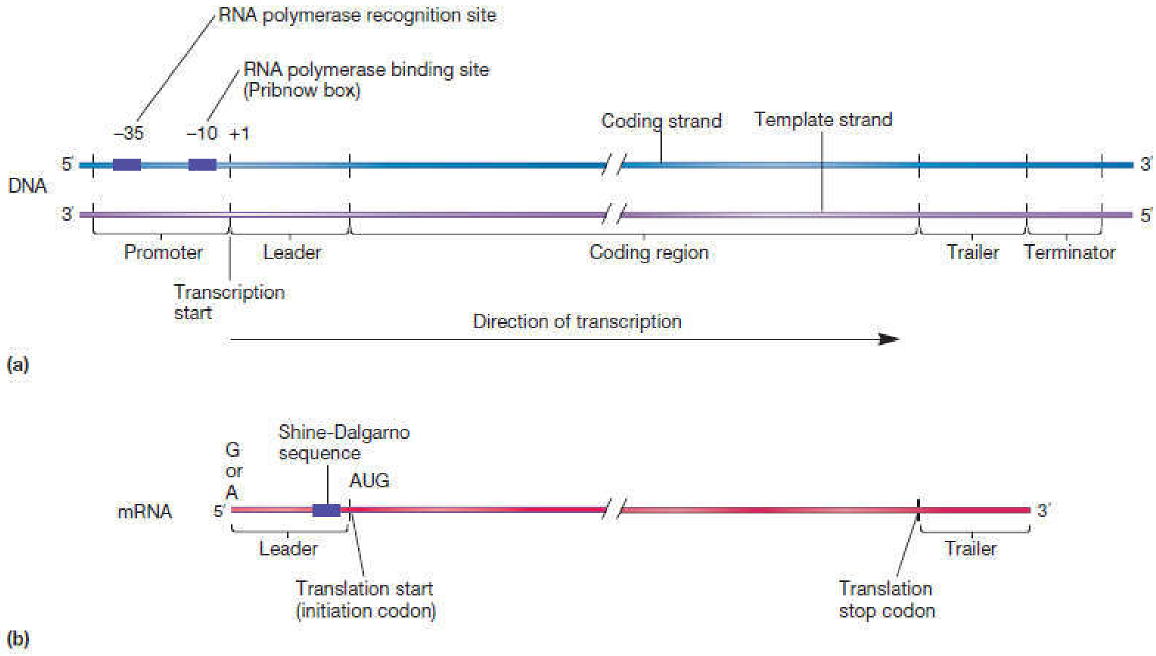
في E.coli الحفاز له وظيفتين مهمتين واللتان تتعلقان بقطعتين متخصصتين ضمن الحفاز . وعلى الرغم من ان تلك القطعتين تختلفان قليلا بين السلالات البكتيرية والجينات البكتيرية .الا انها تكون ثابتة تماما وربما ممثلة بتتابعات متفق عليها أو مجمع عليها.



الشكل ۔ [redacted] ۔ منظومة الكروموسومات في البكتريا والفيروسات.

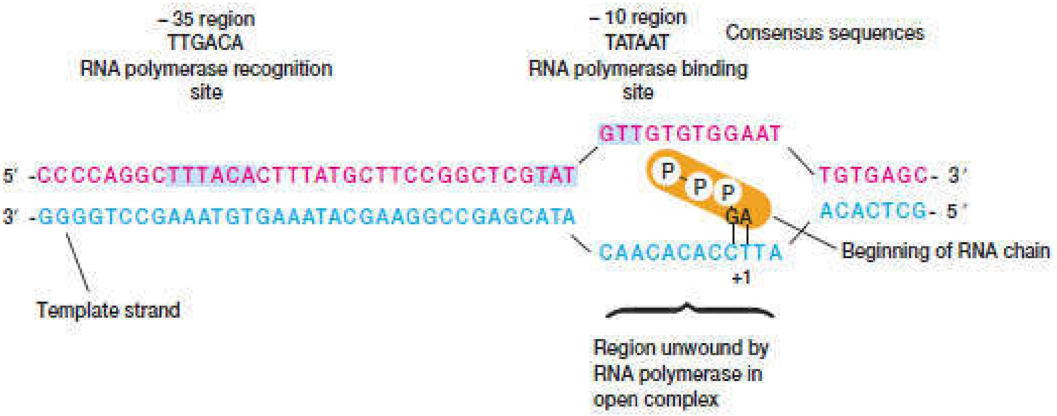
(أ) الخريطة الوراثية المبسطة للإشريكية القولونية. حيث تنقسم خريطة E. coli إلى 100 دقيقة.

(ب) تُظهر خريطة phage X174 تداخل الجين B مع A و K مع A و C و E مع D. المناطق الصلبة عبارة عن مساحات تقع بين الجينات. يتكون البروتين A * من الجزء الأخير من البروتين A وينشأ عن إعادة النسخ في الجين A.



شكل . جينات هيكلية البكتريا ومنتجها mRNA. (A) تنظيم الجين الهيكلي النموذجي في البكتيريا. يتم تضمين تسلسل الزعيم والمقطورة على الرغم من أن بعض الجينات تفتقر إلى واحد أو كليهما. يبدأ النسخ في الموضع 1 في DNA ويستمر إلى اليمين كما هو موضح. وتتم قراءة النموذج في الاتجاه من 3 إلى 5..

(B) منتج Messenger RNA للجين الموضح في الجزء أ. عادة ما يكون النوكليوتيد الأول المدمج في mRNA هو GMP أو AMP ، ويبدأ ترجمة mRNA بكود بدء AUG. لا يتم عرض المواقع التنظيمية.



A Bacterial Promoter. The lactose operon promoter and its consensus sequences. The start point for RNA synthesis is labeled +1. The region around −35 is the site at which the RNA polymerase first attaches to the promoter. RNA polymerase binds and begins to unwind the DNA helix at the Pribnow box or RNA polymerase binding site, which is located in the −10 region.

هذه هي تسلسلات مثالية مؤلفة من القواعد الموجودة غالبا في كل موقع عند مقارنة هذه التسلسلات في البكتيريا المختلفة. موقع التعرف على او تمييز ال RNA polymerase ، بتسلسل مجمع او متفق عليه 'TTGACA3- '5على السلسله غير القالب في Ecoli. بكتريا القولون ، يتمركز حوالي 35 زوجًا قاعديا قبل (منطقة - 35) .نقطة البداية النسخية (المسماة + 1) لبناء RNA . يبدو أن هذا التسلسل هو موقع الارتباط الأولي ل RNApolymerase مع DNA. موقع ربط RNA polymerase ، والمعروف أيضًا باسم صندوق Pribnow box ، يتمركز في منطقة -10 ولديه تسلسل مجمع عليه `TATAAT5 ´3 في E. coli (تسلسل مفضل لموقع فك ال DNA). هذا هو المكان الذي يبدأ فيه RNA polymerase في فك الحمض النووي من أجل اجراء الاستنساخ في نهاية المطاف. الجزء الذي تم نسخه في البداية من الجين ليس بالضرورة ان يكون مادة مشفره. في الواقع ،سلسلة قائدة (leader) يمكن ان تبنى أولاً. وعادةً ما تكون السلسلة القائدة (leader) عبارة عن تسلسل غير قابل للترجمة والذي له أهمية في بدء الترجمة وأحيانًا يدخل في في تنظيم الاستنساخ.

السلسلة القائدة leader في الخلايا بدائية النواة عادة تحتوي على تسلسل إجماعي او مجمع عليه يعرف بتسلسل Shine-Dalgarno,5’AGGA3 النسخة طبق الاصل عنه تتمم تسلسل على rRNA16S في الوحدة الفرعية الصغيرة من الرايبوسوم . ارتباط السلسلة القائدة لل mRNA مع rRNA16S من المحتمل انه يوجه ارتباط mRNA في الرايبوسوم . السلسلة القائدة كذلك تنظم في بعض الاحيان الاستنساخ بعملية التوهين (التخفيف) . Downstream مع التيار وبعد السلسلة القائدة هناك الجزء الاكثر اهمية في تركيب الجين ، منطقة التشفير .

منطقة التشفير في الجينات التي توجه تخليق البروتينات عادة تبدأ بتسلسل قالب DNA 3’TAC 5. هذا ينتج شفرة بدء الترجمة 3AUG’ لل RNA الذي يشفر ل N- formylmethionine .

هذه الصيغة المحورة من المثيونين هو اول حامض اميني مندمج او تشتمل علية عملية الترجمة في معظم بروتينات بدائية النواة .الجزء المتبقي من منطقة التشفير الجيني يتكون من تتابع من الشفرات التي تحدد تسلسل الاحماض الامينية لهذا البروتين المعين .

عملية الاستنساخ لا تتوقف عند شفرة انهاء الترجمة لكن بدل من ذلك تتوقف عند تتابع الانهاء terminator sequence

المنهي terminator عادةً يقع بعد تتابع غير قابل للترجمة trailer sequence الذي يقع اسفل المجرى او مع التيار downstream من منطقة التشفير

The trailer sequence -:هو مثل القائد leader يكون ضروري او نحتاجه للتعبير الصحيح والمناسب لمنطقة تشفير الجين .

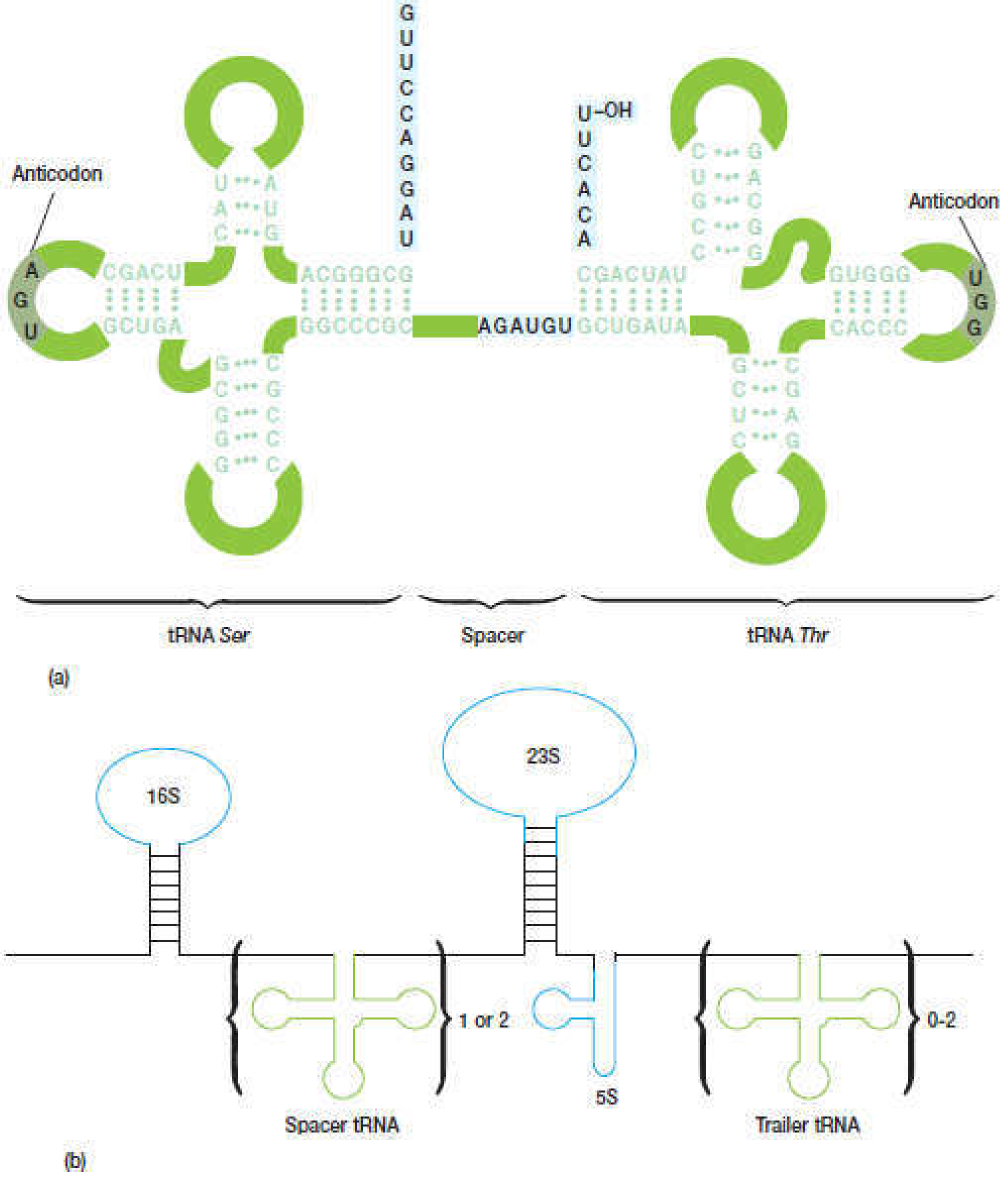
الى جانب المكونات الاساسية التي ذكرت اعلاه مثل trailer, coding region , leader , promoter و terminator فأن العديد من جينات بدائيات النواة تمتلك العديد من مواقع التنظيم.

تلك المواقع التي يرتبط فيها البروتينات المنظمة المميزة لل DNA لتحفز او تمنع التعبير الجيني .

مواقع التنظيم عادةً ذات علاقة او مرتبطة بوظيفة الحفاز والبعض يعتبرها جزء من الحفازات الخاصة.

من الامثلة على المواقع التنظيمية هي موقعين الاول المشغل operator والثاني هو موقع ارتباط ال CAP

بالتأكيد ليس كل شي معروف عن الجينات وتركيبها. مع توفر تقنية تحديد تتابعات ال DNA والجينات المستنسخة المنقاة purified cloned genes ، اكتشافات كبرى مستمرة في هذه الساحة او في هذا الصدد.



tRNA and rRNA Genes. (a) A tRNA precursor from *E. coli* that contains two tRNA molecules. The spacer and extra nucleotides at both ends are removed during processing. (b) The *E. coli* ribosomal RNA gene codes for a large transcription product that is cleaved into three rRNAs and one to three tRNAs. The 16S, 23S, and 5S rRNA segments are represented by blue lines, and tRNA sequences are placed in brackets. The seven copies of this gene vary in the number and kind of tRNA sequences.

علم وراثة الاحياء المجهريه

الشفرات الوراثيه Genetic code

مقدمه :ان المحتوى الوراثي للكائن الحي يدعى بالجينوم Genome وهو اما ان يكون DNA او RNA كما في حالة بعض الفايروسات . ان جزء المحتوى الوراثي (الجينوم) والذي يشفر للبروتين يدعى بالجين ، وتتالف الجينات من مجموعه من وحدات ثلاثية النيوكليوتيدات Tri-nucleotide unit تدعى بالشفرات الوراثيه

اذن يمكن تعريف الشفرات الوراثيه ،بانها مجموعه من القوانين يتم بواسطتها ترجمة المعلومات الوراثيه المتواجده في الدنا اوالرنا الى بروتين في الخلايا الحيه، وتتالف من تسلسلات ثلاثية النيوكليوتيدات تحدد نوع وتسلسل الاحماض الامينيه في البروتين ،اذ ان كل شفره وراثيه تتخصص بحامض اميني واحد مع وجود بعض الاستثناءات كما سنلاحظ لاحقا.ان الشفرات الوراثيه لاتمثل كل المحتوى الوراثي للكائن الحي ،اذ ان دنا جميع الكائنات الحيه تحتوي على تسلسلات منظمه Regulatory sequence بالاضافه الى مناطق وراثيه واقعه بين الجينات Inergenic segment

خصائص الشفرات الوراثيه:

١- **Degeneracy الانحلاليه** : وتعني ان اغلب الاحماض الامينيه يمكن ان تشفر او تقدم باكثر من شفره وراثيه واحده على سبيل المثال الاحماض الامينيه الارجنينArgenine وسيرين Serine وليوسين Leucineكل واحده من هذه الاحماض الامينيه تشفر بواسطة ست شفرات وراثيه مترادفه Synonymous codon. هذه الشفرات على الرغم من امتلاكها الخصوصيه في تشفير نفس الحامض الاميني الا انها تختلف في احد النيوكليوتيدات وغالبا ماتكون تانيوكليوتيده الثالثه من الشفرات .هذه المرونه في تسلسل الشفرات الوراثيه المترادفه ربما يقلل من اثر اخطاء التضاعف او تقلل الاضرار الناتجه من الطفرات الوراثيه.

٢- **Non-Overlapping غير متداخله:** وتعني ان نيوكليوتيدات الشفره الوراثيه الواحده لاتشترك في تكوين شفره وراثيه اخرى

٣- **Ambiguity الالتباس** : وتعني ان الشفره الوراثيه يمكن ان تشفر لاكثرمن حامض امني واحد ،على سبيل المثال UUU codon غالبا ماتشفرللحامض الاميني الفنيل الانينPhenyalanine

ولكن في بعض الظروف مثل وجود Streptomycin بالاضافه الى الفنيل الانين تشفر ايضا الالليوسين او الايزوليوسين او السيرين

٤- **Commaless غير مفصوله** : وفيها تكون الشفرات الوراثيه متسلسله وغير مفصوله

٥- Initiation codon شفرات البدء : شفرةAUG تدعى شفرة بدء السلسله ، اذ عندها تبدا عمليةالترجمه الببتايد من خلال تشفيراول حامض اميني في السلسله وهو الميثيونين.

٦- **Non-sense codons الشفرات غير المحسوسه(Stopping codons)**: وهي على ثلاثة انواع: UAA وتعرف Ocher وUAG وتعرف Amber وUGA وتعرف Opal وسميت بالشفرات غير المحسوسه لانها لاتشفر لاي حامض اميني وتعمل على انهاء عملة الترجمه الى البروتين

٧- **Universality** الشموليه: وتعني بان نفس الشفره تستخدم في جميع انواع الانظمه الحياتيه وقد اثبتت هذه الحقيقه من خلال عدد من التجارب على سبل المثال ، mRNA المنقى من Polio virus يتم ترجمته الى بروتين فايروسي بواسطة خلايا الانسان .

RNA codon tableللاطلاع

		2nd base							
		U		**C**		**A**		**G**	
1st base	**U**	UUU	(Phe/F) Phenylalanine	UCU	(Ser/S) Serine	UAU	(Tyr/Y) Tyrosine	UGU	(Cys/C) Cysteine
		UUC	(Phe/F) Phenylalanine	UCC	(Ser/S) Serine	UAC	(Tyr/Y) Tyrosine	UGC	(Cys/C) Cysteine
		UUA	(Leu/L) Leucine	UCA	(Ser/S) Serine	UAA	Ochre (*Stop*)	UGA	Opal (*Stop*)
		UUG	(Leu/L) Leucine	UCG	(Ser/S) Serine	UAG	Amber (*Stop*)	UGG	(Trp/W) Tryptophan
	C	CUU	(Leu/L) Leucine	CCU	(Pro/P) Proline	CAU	(His/H) Histidine	CGU	(Arg/R) Arginine
		CUC	(Leu/L) Leucine	CCC	(Pro/P) Proline	CAC	(His/H) Histidine	CGC	(Arg/R) Arginine
		CUA	(Leu/L) Leucine	CCA	(Pro/P) Proline	CAA	(Gln/Q) Glutamine	CGA	(Arg/R) Arginine
		CUG	(Leu/L) Leucine	CCG	(Pro/P) Proline	CAG	(Gln/Q) Glutamine	CGG	(Arg/R) Arginine
	A	AUU	(Ile/I) Isoleucine	ACU	(Thr/T) Threonine	AAU	(Asn/N) Asparagine	AGU	(Ser/S) Serine

	AUC	(Ile/I) Isoleucine	ACC	(Thr/T) Threonine	AAC	(Asn/N) Asparagine	AGC	(Ser/S) Serine
	AUA	(Ile/I) Isoleucine	ACA	(Thr/T) Threonine	AAA	(Lys/K) Lysine	AGA	(Arg/R) Arginine
	AUG[A]	(Met/M) Methionine	ACG	(Thr/T) Threonine	AAG	(Lys/K) Lysine	AGG	(Arg/R) Arginine
G	GUU	(Val/V) Valine	GCU	(Ala/A) Alanine	GAU	(Asp/D) Aspartic acid	GGU	(Gly/G) Glycine
	GUC	(Val/V) Valine	GCC	(Ala/A) Alanine	GAC	(Asp/D) Aspartic acid	GGC	(Gly/G) Glycine
	GUA	(Val/V) Valine	GCA	(Ala/A) Alanine	GAA	(Glu/E) Glutamic acid	GGA	(Gly/G) Glycine
	GUG	(Val/V) Valine	GCG	(Ala/A) Alanine	GAG	(Glu/E) Glutamic acid	GGG	(Gly/G) Glycine

المحاضرة العاشرة
إصلاح الدنا DNA Repair

بما ان خطا التضاعف والعديد من المطفرات يمكن ان تغير تسلسل النيوكليوتيدات , فيجب على الكائن المجهري ان يكون قادرا على اصلاح التغيرات في التسلسلات التي قد تكون قاتلة . الحمض النووي يمكن اصلاحة من خلال العديد كم الاليات الى جانب تدقيق القراءة **Proofreading** بواسطة انزيمات التضاعف (فأنزيم **DNA Polymerase**) يمكن ان يزيل أي نبزكليوتيد غير صحيح او خاطئ على الفور بعد اضافته الى النهاية النامية للسلسلة. الإصلاح في الـ ***E.coli*** هو الأكثر فهما ومشروح بايجاز في هذا الفصل .

الإصلاح بالاستئصال Exision Repair:-

هـــو عبـــارة عن نظـــام اصـــلاح عـــام يصحـــح الضرر الذي يسبب تشوهات في الحلزون المزدوج. حيث يزيل انزيم الإصلاح **Endonuclease** او **UvrABC Endonuclease** القواعد التالفة او المحطمة مع بعض القواعد على جانبي الآفة الفراغ احادي السلسلة الناتج الذي يبلغ طوله حوالي 12 نيوكليوتيدة يتم ملئه بواسطة انزيم **DNA Polymerase I** ويعمل الـ **DNA Ligase** على ربط القطع. يمكن لهذا النظام إزالة ثنائيات الثامين **Thymin dimers** وإصلاح أي ضرر او اذى اخر ينتج تشوهات قابله للكشف في الحامض النووي **DNA**. بجانب هذا النظام العام للإصلاح (الإصلاح بالاستئصال)، فإن نسخ او إصدارات خاصة من النظام تستأصل مواقع محددة على الحمض النووي **DNA** والتي يكون فيها العمود الفقري للسكر والفوسفات سليم لكن القواعد تم ازالتها لتكـــون مـــواقع **Apurinic** او **Apyrimidic** ومختصـــرهـا **AP sites**. انـــدو نيوكليـز خاصة تسمى **AP endonucleases** تتعرف على هذه المواقع وتشق العمود الفقري في هذه المواقع. وثم يأتي الإصلاح بالاستئصال، والذي يبدأ باستأصال امتداد قصير من النيوكليوتيدات.

نمط اخر من الإصلاح بالاستئصال باستخدام انزيمات الـ **DNA Glycosylases**. هذه الانزيمات تزيل القواعد التالفة او غير الطبيعية وينتج عن لك مواقع **AP sites** والتي يتم إصلاحها بعد ذلك كما تم اصضاحه مسبقا، ولا يتم اصلاح جميع أنواع القواعد التالفة بهذه الطريقة، ولكن تم اكتشاف أنواع جديدة من النزيمات الـ **Glycosylases** وقد تكون عملية الإصلاح ذات أهمية أكثر عمومية مما يعتقد في البداية.

أزالة الافات (الاضرار) Removal of lesions: -

غالبا مـــا يتم اصلاح ثنائيات الثايمين **Thymine dimers** والقواعد التي أضيفت لها مجموعة الكيل **Alkylated bases** بشكل مباشر.

التنشيط الضوئي **Photoreactivation** يقوم بإصلاح الـ **Thymine dimers** عن طريق فصلهما بمعزل عن بعضهما الى ثايمين بمساعدة الضوء المرئي بتفاعل كيميائي ضوئي يحفز بواسطة انزيم الـ **Photolyase** ولان آلية الإصلاح هذه لاتزيل ولا تستبدل النيوكليوتيدات فانها خالية من الأخطاء. في بعض الأحيان يتم اصلاح الأخطاء او الاضرار الناتجة عن إضافة مجاميع الالكيل **Alkylation** مباشرة أيضا. يمكن إزالة مجموعة المثيل وبعض مجاميع الكيل الأخرى التي تمت اضافتها الى الموقع **6 – O** من الكوانين بمساعدة النزيم يعرف بانزيم **Alkyltransferase** او **Methylguanine methyltransferase**. وبالتالي فان الاضرار التي لحقت بالكوانين من المطفرات مثل **Methylnitrosoguanidine** يمكن ان تصحح مباشرة.

الإصلاح ما بعد التضاعف Postreplication Repair: -

على الرغم من دقة عمل انزيم البلمرة **DNA polymerase** والتدقيق المستمر للقراءة، الا ان الأخطاء مستمرة بالحصول اثناء تضاعف او تكرار الحامض النووي. القواعد غير المتطابقة المتبيقية والاخطاء الأخرى عادة ما يتم الكشف عنها واصلاحها بواسطة نظام اصلاح عدم التطابق في القواعد **Mismatch repair system** في ***E. coli***. يقوم انزيم تصحيح عدم المطابقة بمسح وتفحص الـ **DNA** المنسوخ والمضاعف حديثا للبحث عن ازواج النيوكليوتيدات غير المتطابقة ويزيل امتداد من الحامض النووي المبني حديثا حول منطقة عدم التطابق. ثم يستبدل انزيم الـ **DNA polymerase** النيوكليوتيدة المستأصلة، ويتم اغلاق الثلمة او الشق الناتج بفعل انزيم الـ **ligase**. يعد الإصلاح بعد التضاعف أحد أنواع الإصلاح بالاستئصال. يعتمد الإصلاح الناجح بعد التضاعف على قدرة الانزيمات على التمييز بين خيوط الحمض النووي القديمة والمنسوخة او المضاعفة حديثا. هذه التمييز ممكن لان خيوط الحمض النووي المنسوخة حديثا تفتقر الى مجموعات الميثيل على قواعدها، في حين خيوط الحمض النووي القديمة تمتلك مجموعات ميثيل على مواعدها لكلا شريطي الـ **DNA**. **DNA methylation** يتم تحفيز عملية مثيلة خيوط الحامض النووي البنوية او إضافة مجموعة المثيل **DNA methylation** بواسطة انزيمات

DNA methyltransferases لتنتج عن ذلك ثلاث نواتج مختلفة:

N6-methyladenine و **5-methylcytosine** و **N4-methylcytosine**.

بعد بناء السلسلة، فان **DNA adenine methyltransferase (DAM)** في بكتيريا الـ ***E. coli*** يضيف مجموعة المثيل الى قواعد الادنين في التسلسلات **d (GATC)** لتكوين **N4-methylcytosine**. ولفترة وجيزة بعد مرور شوكة التضاعف واكتمال عملية التضاعف، فان السلسلة تفتقر لمجاميع المثيل بينما سلسلة القالب تكون حاوية على مجموعة المثيل. يقطع نظام الإصلاح القواعد غير المتطابقة او المزدوجة بشكل خاطئ من السلسلة غير الحاوية على مجموعة المثيل **Unmethylated**.

الإصلاح بإعادة التركيب Recombination Repair: -

في نظام الإصلاح بإعادة التركيب، يتم استعادة الـ **DNA** التالف او المحطم الذي لم يبقى له قالب ليتم استعادته. ينشأ هذا الوضع إذا كانت كلتا قاعدتي زوج القواعد مفقودة او تالفة او ذات فجوة او فراغ **Gap** مواجه او مقابل للافة. في هذا النوع من الإصلاح يقطع بوتين **recA** قطع من القالب **DNA** من الجزيئة الشقيقة ويضعه في الفجوة او الفراغ **Gap** او يستخدمها لتحل محل الشريط التالف. على الرغم من ان البكتيريا أحادية المجموعة الكروموسومية، **Haploid**, فان نسخه أخرى من الجزء التالف غالبا تكون متوفرة اما لانها تم تكرارها مؤخرا او ان الخلية تنمو بسرعة ولديها أكثر من نسخه من **Chromosome**. وبمجرد وضع القالب في مكانه يمكن تصحيح الضرر المتبقي بواسطة نظام تصلاح اخر.

يشارك بروتين **recA** أيضا في نوع من إعادة الإصلاح قابل للحث او التحفيز يسمى **SOS repair**. في هذه الحالة يكون تلف **DNA** كبير جدا بحيث يتوقف التصنيع **Synthesis** تماما، تاركا العديد من الفجوات او الفراغات الكبيرة. **recA** سوف يرتبط بالفجوات ويشرع بعملية تبادل الأشرطة. وفي نفس الوقت يقوم بوظيفة تحلل البروتينات التي تدمر او تحطم البروتين الكابح **lexA**, الذي ينظم العديد من الجينات المشتركة في اصلاح وتصنيع الـ **DNA** وكنتيجة فان العديد من النسخ من هذه الانزيمات يتم انتاجها، مما يسرع من عمليات التضاعف والإصلاح. يستطيع هذا النظام اصلاح الاضرار الشديدة التي تسببها عوامل مثل اشعة **UV** بسرعة، لكنها عرضه للخطأ وتنتج طفرات. على أي حال، من المؤكد فان وجود بعض الطفرات في الـ **DNA** أفضل من عدم تضاعف **DNA** على الاطلاق.

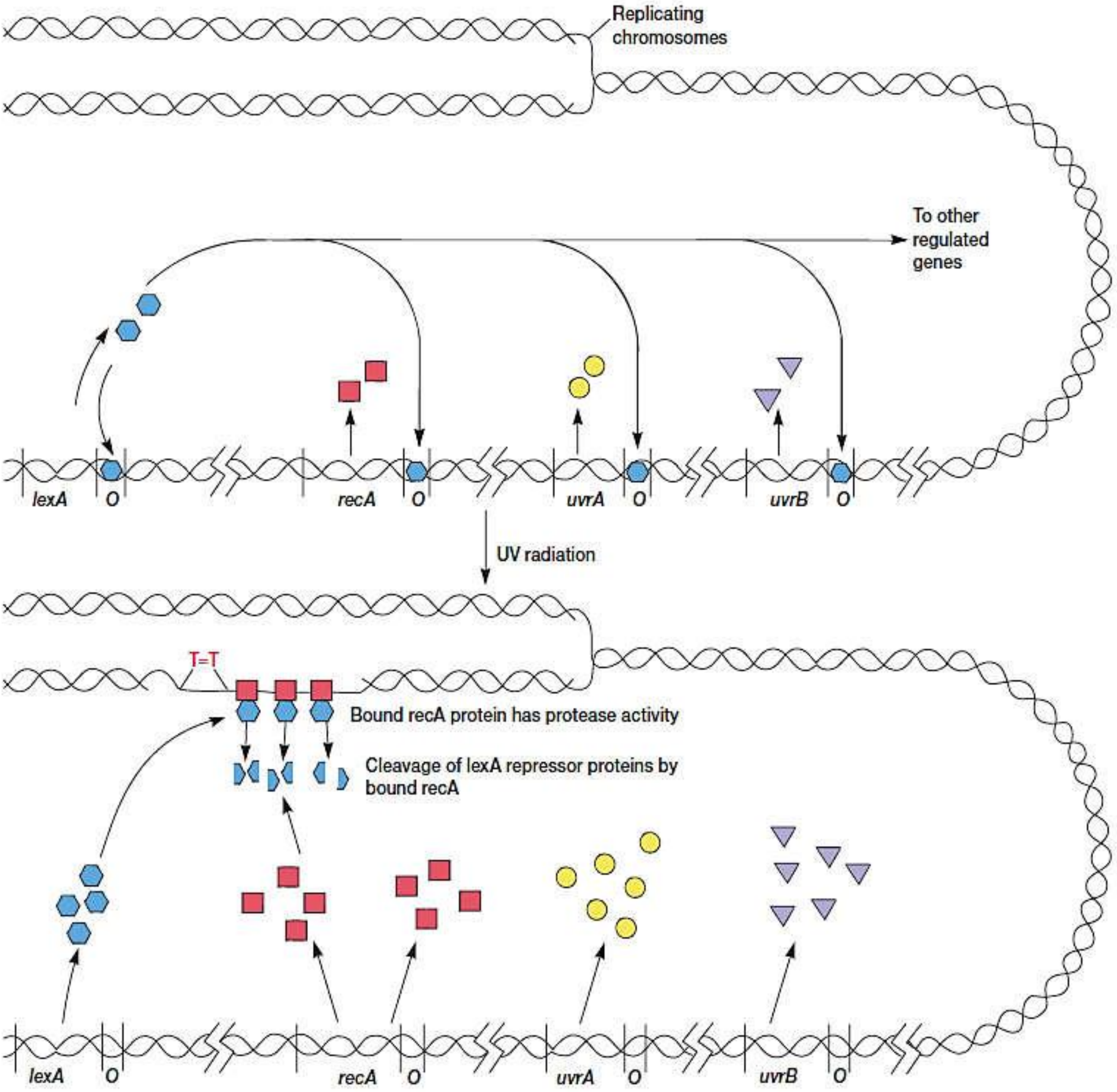


Figure 11.35 The SOS Repair Process. In the absence of damage, repair genes are expressed in *E. coli* at low levels due to binding of the lexA repressor protein at their operators (*O*). When the recA protein binds to a damaged region—for example, a thymine dimer created by UV radiation—it destroys lexA and the repair genes are expressed more actively. The *uvr* genes code for the repair endonuclease or uvrABC endonuclease responsible for excision repair.

في حال وجود أي خطا علمي او لغوي او خطأ مطبعي يرجى ابلاغي على حساب التلي كرام على الرقم ٠٧٨١٣٨٣٢٨٨٢ ولكم جزيل الشكر

وضاح جاسم

علم وراثة الاحياء المجهريه

البلازميدات The plasmids

المقدمه: البلازميد هو جزيئه دنا ثنائية الشريط double strands DNA molecules غالبا ماتكون حلقية الشكل ، تتراوح احجامها من ١-١٠٠٠ kbp ، وهي تمثل كوحده وراثيه خارج كروموسوميه ، تتواجد طبيعيا في البكتريا وفي بعض انواع الخمائر مثل Saccharomyces cervisiae يتميز اللازميد بانه ذاتي التضاعف autonomous replication اي انه يتضاعف بشكل مستقل عن تضاعف الروموسوم البكتيري. لاتعتبر البلازميدات شكل من اشكال الحياة تشبه بذلك الفايروسات ولكنها تختلف عنها من ناحية انها لا تشفر لبروتينات احتواء الماده الوراثيه مثل protein coat ،مع انها تشفر لبعض البروتينات مثل الاهلاب الجنسيه sex pili

الخصائص العامه للبلازميدات General characteristics of the plasmids

١-توجد البلازميدات باشكال مختلفه ، النوع السائد هو هو جزيئة دنا حلقية الشكل واحيانا توجد بشكل خطي linear DNA molecule

٢- البلازميدات هي جزيئات صغيرة الحجم تتراوح احجامها من ١-١٠٠٠kbp

٣- على الرغم من انه يتضاعف بشكل مستقل عن تضاعف الروموسوم البكتيري autonomous replication الا انه يعتمد على انزيمات الخليه لانجاح عملية التضاعف والاستنساخ. ولكن عملية بدا التضاعف وتوزيع نسخ البلازميدات في الخليه البنويه يتم تنظيمها من خلال جينات البلازميدات

٤- كل بلازميد يحتوي واحده على الاقل من منطقة اصل التضاعف origin of replication

٥- اكثر البلازميدات تحتوي على جينات مسوؤله عن ابراز الطراز المظهري الخاص بالكائن الحي ، مثل صفة المقاومه للمضادات الحياتيه

٦- بعض الخلايا البكتيريه تحتوي على نسخة واحده اوعدد قليل منها ، اثناء حدوث انقسام الخليه وتكوين الخلايا البنويه ، هنالك احتماليه انتاج خلايا بنويه فاقده لذلك النوع من البلازميد

٧- بعض اللازميدات تشتمل ح addiction system او مايدعى postsegregation killing (psk) ونعني بها ان الخلايا البنويه الفاقده للبلازميد تعاني من الموت او اختزال في معدل النمو في حين تبقى الخلايا المحتفظه بنسخة البلازميد حيه

٨- توجد عدة نسخ لكل نوع من البلازميد داخل الخليه الواحده تتراوح من نسخه واحده لعدة الاف من النسخ تحت ظروف خاصه

٩-احتوائها على cloning site وهو منطقة الهضم بواسطة الانزيمات القاطعه المحدده التي عندها يتم اضافة القطعه الوراثيه المراد استنسالها

انواع البلازميدات Types of plasmid

تختلف اسس تصنيف البلازميدات الى انواع مختلفه بالاعتماد على :

١- التوافق compatibility
٢- الاندماج مع الكروموسوم البكتيري integration with bacterial chromosome
٣- امكانية انتقاله الى الخليه البكتيريه الاخرى ability to transfer to another bacteria
٤- الوظيفه function

تدعى البلازميدات التي ترافق الخليه البكتيريه حتى بعد تضاعفها وانتقالها الى الخلايا البنويه بالبلازميدات المتوافقه compatible plasmid في حين تدعى البلازميدات التي بالامكان فقدانها من الخليه البنويه اثناء الانقسام بالبلازميدات غير المتوافقه incompatible plasmid

كذلك توجد البلازميدات بشكل حر في السايتوبلازم غير مندمج مع الكروموسوم تدعى بالبلازميدات غير المندمجه nonintegrated plasmid او انه يكون متحد مع الكروموسوم البكتيري ويدعى في هذه الحاله Episome

Episome : بعض البلازميدات لها القابليه على الاندماج مع البلازميدات الاخرى او مع الكروموسوم البكتيري وتدعى الحاله الاخيره بال Episome وبعبارة اخرى الابيسوم هو بلازميد بكتيري او دنا فايروسي بامكانه الاندماج بالدنا الكروموسومي لخليه المضيف ، يتضاعف بتضاعف الماده الوراثيه الكروموسوميه ويصبح جزء من المحتوى الوراثي لتلك الخليه. يمكن اكتساب الايبيسوم بواسطة الاصابه infection او بواسطة الاقتران البكتيري bacterial conjugation ومن الامثله على اللايبيسوم هو التسلسلات المنحشره insertion sequence (IS) والترانسبوزون Transposone ودنا الفايروسات التي بالامكان جينومها الاندماج مع كروموسوم الخليه المضيف

ومن الاسس المعتمده في تصنيف البلازميدات هو امكانية انتقالها الى الخليه البكتيريه الاخرى عن طريق الاقتران البكتيري . وتدعى البل زميدات المنتقله الى الخليه المستلمه بالبلازميدات الاقترانيه conjugative plasmid وتكون هذه البلازميدات حاويه على Tra genes المسوؤله عن عملية انتقال الماده الوراثيه البلازميديه ، اما البلازميدات غير الاقترانيه nonconjugative plasmid

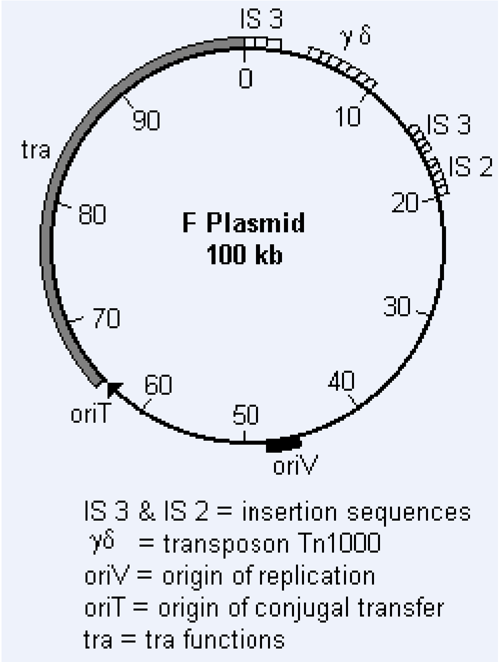
فهي غير قادره على الانتقال الى الخليه البكتيريه المستلمه لانها لا تحتوي على المعلومات الوراثيه الازمه لانجاز عملية الاقتران

وهنالك بلازميدات تدعى Mobilizable plasmid ، وهي بلازميدات تكون حالة وسط بين الصنفين السابقين ، اذ تحتوي على بعض الجينات المتطلبه لعملية انتقاله الى الخليه الاخرى ، اذ تقوم بعملية التطفل على بلازميدات الاقتران وبذلك يمكن ان تنتقل الى الخليه المستلمه

ويمكن ايضا تصنيف البلازميدات بالاعتماد على الوظيفه الى:

١-عامل الخصوبه fertility factor or F plasmid

وهو بلازميد ينظم عملية النقل الجنسي (الاقتران البكتيري) للماده الوراثيه بين الخلايا البكتيريه . يحتوي F plasmid على مجموعه من الجينات مسؤوله عن عملية التضاعف الذاتي ، وعن عملية تكوين الاهلاب الجنسيه sex pili ، وعن عملية تكوين الجسور السايتوبلازميه ، وايضا يحتوي على على Tra genes المسوؤله عن عملية نقل البلازميد اثناء الاقتران البكتيري



شكل يمثل F plasmid

٢- بلازميد مقاومة المضادات الحياتيه Resistant plasmid (R plasmid)

يحتوي هذا النوع من البلازميد على مجموعه من الجينات المسؤوله عن مقاومة البكتريا للمضادات الحياتيه او السموم البكتيريه . تتالف مثل هذه البلازميدات من منطقتين من الدنا احدهما تدعى عامل نقل المقاومه resistant transfer factor وهي مسوؤله عن عملية نقل بلازميد المقاومه وعن عملية التضاعف، والمنطقه الاخرى تدعى محددات المقاومه (R- determinant) وهي جينات تشفر لمواد تعادل فعل المضادات الحياتيه او السموم البكتيريه . بلازميدات المقاومه هي من البلازميدات الاقترانيه والتي تنقل من بكتريا الى اخرى بواسطة الاقتران البكتيري ، اذ انها تحتوي على Tra genes

٣- Col –plasmid

هذه البلازميدات تحتوي على جينات تشفر للسموم البكتيريه والتي تدعى بالبكتريوسين bacteriocin التي تعمل على قتل السلالات المختلفه لنفس الجنس البكتيري . تدعى السموم المفرزه من بكتريا *E coli* بال colicin ومن هذا جاءت التسميه ، والمفرزه من بكتريا *Pseudomonas aeruginosa* بال pyocin. بعض Col plasmid هي بلازميدات اقترانيه اذ يمكن انتقالها الى الخليه المستلمه اثناء عملية الاقتران مثل Col B وبعضها غير اقترانيه مثل Col E

٤-انزيمات التحلل او التفسخ Degradative plasmid

تحتوي هذه البلازميدات على جينات تجهز البكتريا مثل بكتريا Peudomonas باللانزيمات المتخصصه التي يمكن البكتريا من هضم بعض المشتقات النفطيه والمركبات الهيدروكاربون الاروماتيه . Xyl-plasmid الذي يساهم في تحلل الزايلين Xylene و Toleune

٥-بلازميدات الضراوه Virulence plasmid

بعض اجناس البكتريا مثل *Shigella flexneri* تمتلك عوامل ضراوه Invasin و Interotoxin محموله على البلازميد، haemolysin لبكتريا E.coli. مثل هذه البلازميدات تدعى بلازميدات الضراوه

٦- بلازميدات المتخفيه Cryptic plasmid

وهي البلازميدات التي لا تمتلك جينات وظيفيه functional genes وبالتالي فهي لا تساهم في ابراز الطراز المظهري phenotype للكائن الحي

٧- بلازميدات المقاومه للعناصر الثقيله Heavy metal resistant plasmid

هذه البلازميدات تكسب البكتريا صفة المقاومه لبعض العناصر الثقيله مثل الزئبق والنيكل والرصاص مثال على بكتريا P.aeruginosa, E.coli P. florescens.

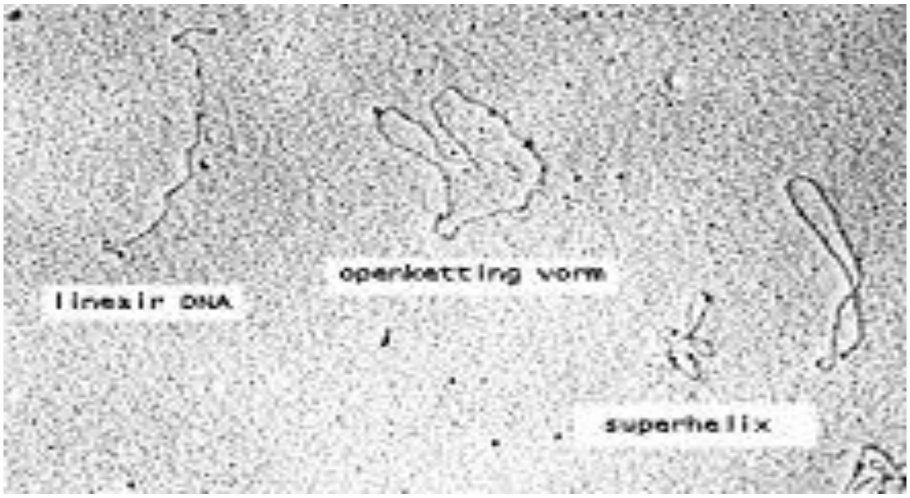
٧- النواقل Vectors

تدعى البلازميدات المستخدمه في الهندسه الوراثيه بالنواقل وتستخدم في عملية نقل الجينات من احد الكائنات الى الكائن الاخر وتكون على الاغلب حاويه على معلمات وراثيه genetic marker مثل المقاومه للمضادات الحياتيه التي يمكن انتقاءها مختبريا . مثل هذه البلازميدات تحتوي على منطقه تدعى cloning site وهي منطقة الهضم بواسطة النزيمات المحدده Restriction enzyme وبالتالي تسمح لقطعة الدنا المراد تنسيلها بالاندماج في منطقة القطع لذلك البلازميد ، ثم بعد ذلك يتم ادخال جزيئة الدنا البلازميدي في الخليه البكتيريه بطريقة التحول الوراثي ، بعد ذلك يتم انتقاء البكتريا المتحوله عن طريق تنميتها على وسط حاوي على المضادات الحياتيه ،بعدهايتم استخلاص البلازميدات بطريقة التحلل القاعدي

اشكال البلازميدات plasmid shapes

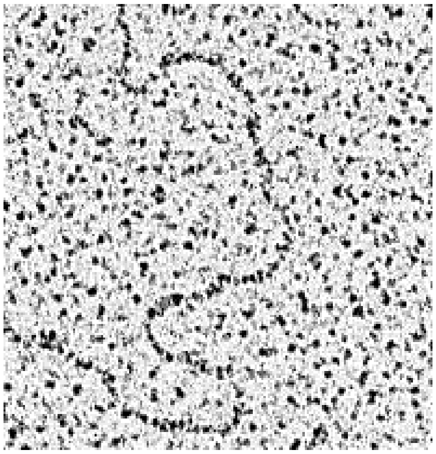
يتم التعرف على احجام قطع الدنا البلازميدي من خلال معاملة البلازميدات بانزيمات القطع المحدده او المقيده Restriction enzyme ومن ثم تحديد اوزانها من خلال عملية الترحيل الكهربائي بالمقارنه مع المعلمات الحجميه DNA size marker . وعلى الرغم من ذلك فان البلازميدات غير المعامله بانزيمات القطع يمكن تحديد اشكالها ايضا ، تظهر جزيئة البلازميد باحد خمسة اشكال مختلفه والتي تسلسلها بالاعتماد على سرعتها في هلام الكاروز من الابطأ الى السرع

١- Nicked open circular . وفيها تمتلك جزيئة الدنا شق في احد اشرطتها DNA has one strand cut



٢- جزيئة دنا خطيه linear DNA molecule وتكون لهذه الجزيئه نهايات حره ، كلا الشريطين مقطوعين

٣- الشكل المستريح لجزيئة الدنا الحلقيه Relaxed circular DNA molecule : جزيئة دنا كامله لاتمتلك نهايات حره



٤- جزيئة دنا فائقة اللف Supercoiled DNA molecule تكون جزيئة الدنا كامله ونهاياتها غير حره مع امكانية التفاف الجزيئه على نفسها وتكوين الشكل ثلاثي الابعاد Tertiary structure

جزيئة دنا فائقة اللف الممسوخه Denatured supercoiled DNA molecules : تكون شبيهه بجزيئة دنا فائقة اللف مع وجود مناطق غير متزاوجه unpaired region

تطبيقات البلازميدات البكتيريه

١- استخدامها في مختبرات الهندسه الوراثيه والتقنيات الحياتيه كناقل لبعض الجينات المراد استنسالها

٢- تستخدم البلازميدات لتصنيع كميات كبيره من البروتينات ، في هذه الحاله يتم تنمية البكتريا الحاويه على البلازميد الحامل لجين يشفر لبروتين معين (مثال الانسولين) باعداد كبيره

٣- من خلال استخدام تقنيات الهندسه الوراثيه اصبح بالامكان جعل البكتريا قادره على تحليل المواد السامه وكوسيله ايضا لمعلجة فضلات المياه

٤- يستخدم في العلاج الجيني gene therapy تستخدم البلازميدات كوسيله لادخال الجين الناقص والمسوؤل عن الحاله المرضيه في جسم الانسان او الحيوان لمعالجة بعض الامراض

GENE TRANSFER AS A MECHANISM OF GENETIC CHANGE

بالإضافة إلى الطفرة ، يمكن تغيير المعلومات الجينية في الخلية إذا اكتسبت الخلية جينات من خلايا أخرى ، وهو أمر شائع في عالم الميكروبات. تسمى حركة او انتقال الـDNA من خلية ، المانحة (Donor) ، إلى أخرى ، المتلقية (Recipient) ، بالنقل الجيني الأفقي أو الجانبي (Horizontal, or lateral, gene transfer). آلية التغيير الجيني هذه مسؤولة إلى حد كبير عن الانتشار السريع لمقاومة المضادات الحيوية ، مثل الموصوفة سابقًا في S. aureus في هذا الفصل.

لا يمكن دراسة الـ(Gene transfer) إلا في حالة وجود اختلافات جينية بين الخلايا المانحة والمتلقية ، وهذا هو أحد الأسباب التي تجعل علماء الوراثة البكتيرية يعزلون الطفرات بشكل متكرر. هذه الاختلافات تجعل من الممكن تحديد ما إذا كان قد حدث إعادة التركيب الجيني (genetic recombination) ، أو الجمع بين الـDNA أو الجينات من خليتين مختلفتين. يمكن التعرف على إعادة التركيب الجيني بسهولة لأن الخلايا الناتجة ، المسماة الـ(Recombinants) ، لها مجموعة من الخصائص لكل من السلالات الأصلية.

[redacted] كيف يمكن توضيح ذلك. يتم خلط سلالتين من البكتيريا ، لا يمكن أن ينمو أي منهما على (Glucose-salts medium) بسبب متطلبات عوامل النمو المتعددة.

- ✓ تتطلب **السلالة A** هيستيدين (- His) والـ Tryptophan (- Trp) ، وهي مقاومة للـ Streptomycin (Str^R)
- ✓ لا تتطلب **السلالة B** الهيستيدين أو التريبتوفان ، ولكنها تتطلب الليوسين (- Leu) وثريونين (- Thr) ، ويتم قتلها بواسطة الستربتومايسين (Str^S).

من غير المحتمل أن يؤدي أي من المجموعتين إلى ظهورطفرة تلقائية يمكن أن تنمو على (Glucose-salts medium) لأن الطفرات المتزامنة المتعددة في نفس الخلية ستكون مطلوبة.

بعد خلط السلالات ، يتم زرعها على الـ(Glucose-salts medium) الذي يحتوي على الـStreptomycin . لكي تنمو الخلايا وتشكل مستعمرات على هذا الوسط ، يجب أن تكون (prototrophic) ومقاومة للـ Streptomycin. لذلك يجب أن يكتسبوا الجينات من السلالة الأخرى.

بعد نقل الجينات ، يجب أن يتضاعف الـDNA المنقول ليتم نقله إلى الخلايا الابنة (daughter cells) ومنحها معلومات وراثية جديدة. لذلك ، يجب أن يحتوي الDNA المنقول على (منطقة أصل التضاعف origin of replication).
إذا لم يحدث ذلك ، يجب أن يصبح جزءًا من جزيء DNA مثل الكروموسوم أو البلازميد الذي يمكن أن يتضاعف وينتقل إلى جميع الـdaughter cells . يُطلق على هذا الجزيء اسم (**Replicon**) [redacted].

تنتقل الجينات في الطبيعة بين البكتيريا بثلاث آليات مختلفة:

1. **DNA-mediated transformation**, in which DNA is transferred as "naked" DNA.
2. **Transduction**, in which bacterial DNA is transferred by a virus that infects bacterial cells.
3. **Conjugation**, in which DNA is transferred directly from one bacterium to another when the cells are in contact with one another.
حيث يتم نقل الحمض الـDNA من بكتيريا إلى أخرى عندما تكون الخلايا على اتصال مع بعضها البعض.

للكشف عن الـ(gene transfer) ، من الأنسب اختيار الـ(recombinants) مباشرة عن طريق تلقيح خليط الخلايا على وسط تنمو فيه البكتريا الـrecombinants فقط وتكون مستعمرات. نظرًا لأنه يمكن زرع عدة مليارات من البكتيريا على أجار في طبق بتري واحد ، يمكن اكتشاف عدد قليل من الـ recombinants المكونة للمستعمرات بسهولة وملاحظة أحداث نادرة جدًا.

DNA-MEDIATED TRANSFORMATION

يتضمن الـ(DNA-mediated transformation) ، الذي يشار إليه عادةً باسم الـ(**Transformation**) ، امتصاص او اخذ الـ "Naked DNA " بواسطة الخلايا المتلقية (Recipient cells).

الـ(Naked DNA) هو ببساطة DNA حُر في البيئة المحيطة ؛ لا يتم احتواؤه داخل خلية أو فيروس.

يمكن إثبات حقيقة أن الـDNA حر او عاري عن طريق إضافة إنزيم DNAse ، وهو إنزيم يحطّم الـDNA خارج الخلية. نظرًا لأن DNAse يمنع الـ(DNA-mediated transformation) ، يجب أن تتضمن هذه العملية نقل الـ(Naked DNA).

أحد مصادر الـ(Naked DNA) في بعض الأجناس هو الخلايا المتحللة في مجموعة من البكتيريا. عندما تنفجر الخلايا ، تتفكك جزيئات الـ(long chromosomal DNA) التي يتم حشرها بشدة في الخلايا إلى مئات القطع أثناء انفجارها عبر جدران الخلايا المكسورة. تفرز أجناس أخرى من البكتيريا أجزاء صغيرة من الـDNA ، ويفترض أنها وسيلة لتعزيز الـ(Transformation).

من أجل اخذ الـ(Naked DNA) ، يجب أن تكون الخلية المتلقية مؤهلة **Competent** - وهي حالة فسيولوجية محددة تسمح للـDNA بدخول الخلية. بمجرد دخول الخلية ، يمكن أن يندمج الـDNA في جينوم المستلم.

أكثر من 40 نوعًا يتمتعون بالكفاءة الطبيعية naturally competent ، ولكن يمكن للخلايا أيضًا أن تمتص او تأخذ الـDNA إذا عولجت بمواد كيميائية معينة أو تيارات كهربائية تغير نفاذية جدرانها الخلوية.

Natural Competence

من بين الأنواع التي يمكن أن تصبح مؤهلة بشكل طبيعي (Naturally competent)، فإن القدرة على اخذ الـDNA هي حالة فسيولوجية مسيطر عليها بإحكام ، وتختلف آلية التحكم.

بعض الأنواع دائمًا ما تكون (competent) ، في حين أن البعض الآخر يصبح كذلك فقط في ظل ظروف محددة ، كما هو الحال عندما يصل المجموع البكتيري إلى كثافة حرجة أو في ظل ظروف غذائية معينة. في حالة *Bacillus subtilis* ، يتعرف النظام التنظيمي المكون من عنصرين (Two-component regulatory system) على إمداد محدود (قلة في الامداد) من النيتروجين أو الكربون في البيئة وينشط مجموعة من الجينات المطلوبة لـ Competent state.

تتطلب الكفاءة أيضًا أن يكون تركيز البكتريا مرتفعًا ، وهي وظيفة من وظائف نظام استشعار النصاب (quorum sensing). من المفترض أن التركيز العالي للخلايا يضمن أن الـDNA الموجود في الوسط سيتصل بالـ(Competent bacteria). ومع ذلك ، حتى في ظل الظروف المثلى ، فان 10٪ فقط من المجموع البكتيري يصبحون Competent .
ربما تطلق الـ(non-competent cells) الحمض النووي الذي يمكن أن تأخذه الـ(Competent cells). هذا يعني أن الخلايا التي يُفترض أنها متطابقة في مجتمع ما يمكن أن تختلف في خصائصها الفسيولوجية. حقيقة أن بعض أنواع البكتيريا تصبح مؤهلة (competent) فقط في ظل ظروف بيئية دقيقة تسلط الضوء على القدرة الرائعة لهذه الخلايا التي تبدو بسيطة على الإحساس بمحيطها وتعديل سلوكها وفقًا لذلك.

Entry of DNA

ترتبط جزيئات الـ(Double-stranded DNA) بمستقبلات محددة على سطح الـ(Competent cells) [redacted] يدخل خيط واحد فقط من شريط الـDNA إلى الخلية ؛ وذلك لان انزيم الـ(Nucleases) على سطح الخلية يحلل الشريط الاخر. معظم الـ(Competent bacteria) تأخذ الـDNA بغض النظر عن أصله ، لكن البعض لا يقبل إلا الـDNA من الأنواع ذات الصلة الوثيقة. تتعرف الخلايا على الـDNA ذات الصلة من خلال تسلسل النيوكليوتيدات المميزة الموجودة في جميع أنحاء الجينوم.

Integration of Donor DNA

بمجرد أن يكون الـDonor DNA داخل الخلية المتلقية ، فإنه يندمج في الجينوم من خلال عملية (homologous recombination) ، والتي يمكن أن تحدث فقط إذا كان الـDonor DNA متشابهًا في التسلسل ، أو متماثلًا ، مع منطقة في جينوم الخلية المتلقية. وبالتالي ، يحدث الـ(Transformation) فقط بين الأنواع وثيقة الصلة.
يصبح الـ(single-stranded donor DNA) موضوعًا بجوار المنطقة التكميلية للـ(Recipient DNA). ثم يشق انزيم الـ(Nuclease) خيطًا واحدًا من الـDNA للخلية المتلقية على جانبي مكان محاذاة الـDonor DNA . يتم تحرير هذا الجزء من الـDNA وسوف يتحلل بواسطة الـ(Nucleases). ثم يستبدل الـDonor DNA بدقة خيطًا واحدًا من الـRecipient DNA .

Multiplication of Transformed Cells

في المختبر ، يمكن بسهولة اكتشاف تحول الـ(DNA) إذا كانت الخلايا المحولة (Transformed cells) يمكن أن تتضاعف في ظل ظروف انتقائية لا تستطيع فيها الـ(non-transformed cells) النمو وتشكيل المستعمرات.

على سبيل المثال ، إذا كانت الـDonor cells هي (Str^R) والخلايا المتلقية (Recipient cells) هي (Str^S) ، فإن الخلايا المحولة إلى (Str^R) ستنمو على وسط يحتوي على الستربتومايسين. نظرًا لأن خيطًا واحدًا فقط من الـDNA للخلية المتلقية يتم تحويله مبدئيًا إلى مقاومة الستربتومايسين ، فإن نصف الـ(daughter cells) فقط ستكون مقاومة للستربتومايسين. النصف الآخر سيكون حساسًا للستربتومايسين ويموت في الوسط الذي يحتوي على الستربتومايسين [redacted] على الرغم من أن العديد من جينات المتبرع الأخرى إلى جانب (Str^R) سيتم نقلها ودمجها في كروموسوم الخلايا المتلقية ، فإن هذه الـ(transformants) لن يتم اكتشافها لأن خلايا المتبرع والمتلقي متطابقة في هذه الجينات الأخرى.

Artificial Competence

على الرغم من أن البكتيريا لا تصبح جميعها Naturally competent ، إلا أنه يمكن إدخال الـDNA المزدوج والمفرد في معظم الخلايا ، بما في ذلك تلك الموجودة في البكتيريا والحيوانات والنباتات ، من خلال معالجة خاصة للخلايا المتلقية (recipient cells). في تقنية واحدة تسمى **(Electroporation)** ، يتم خلط البكتيريا والـDNA معًا ويتم تعريض الخليط لتيار كهربائي [redacted] يبدو أن التيار يصنع ثقوبًا في جدار الخلية البكتيرية والغشاء السيتوبلازمي الذي يدخل من خلاله الـDNA.

TRANSDUCTION

الفيروسات البكتيرية ، التي تسمى العاثيات (Bacteriophages) أو ببساطة (Phages) ، يمكنها نقل الجينات البكتيرية من المتبرع (donor) إلى المتلقي (recipient) من خلال عملية تسمى (**Transduction**). لفهم هذه العملية ، عليك أن تعرف شيئًا عن العاثيات وكيف تصيب الخلايا البكتيرية. تتكون العاثيات من مادة وراثية ، إما DNA أو RNA ، محاطة بغلاف بروتيني.

- ✓ تصيب البكتيريا عن طريق الالتصاق بسطحها ثم حقن حمضها النووي في تلك البكتريا.
- ✓ تقوم الإنزيمات المشفرة بواسطة جينوم العاثي (Enzymes encoded by the phage genome)بتحطيم الـDNA البكتيري.
- ✓ بعد ذلك ، تقوم إنزيمات البكتريا بتضاعف الحمض النووي للعاثية وتصنيع البروتينات التي تشكل اغلفة العاثية الفارغة (phage coat).

ثم يدخل الـ(Phage nucleic acid) الى داخل الـ(Phage coat) والمكونات المختلفة لتجميع العاثي لإنتاج جزيئات العاثي الكاملة ، والتي يتم إطلاقها ، عادة نتيجة لتحلل الخلية المضيفة. ثم تلتصق جسيمات العاثي (Phage particles) بالخلايا البكتيرية الأخرى ، لتبدأ دورات جديدة من العدوى.

ينتج الـ(Transduction) عن أخطاء نادرة تحدث أثناء دورة العدوى ، مما يؤدي إلى ظهورphage progeny التي تحمل الجينات البكتيرية بدلاً من جينات العاثي داخل الغلاف . عندما تصيب هذه السلالات البكتيريا الأخرى ، فإنها تنقل الجينات البكتيرية عن غير قصد إلى بكتيريا أخرى.

هناك نوعان من الـ(Transduction):

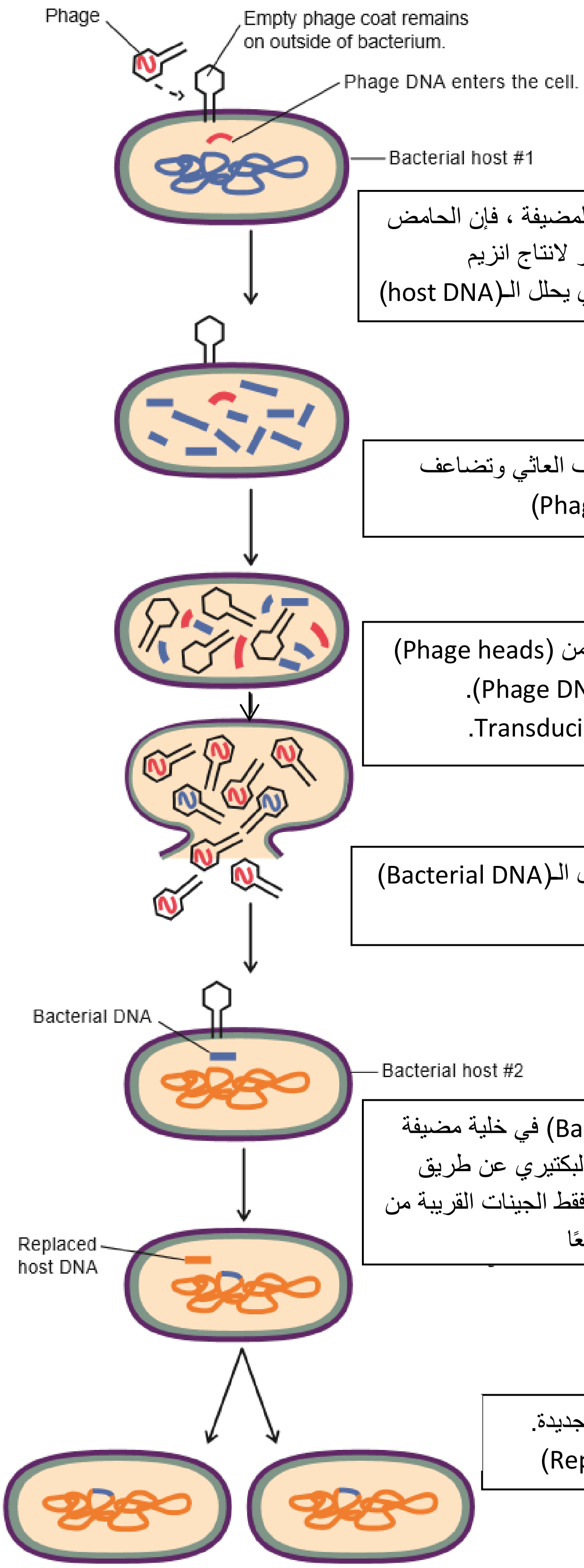
- ✓ Generalized transduction
- ✓ Specialized transduction

في الـgeneralized transduction ، يمكن نقل أي جينات من الـ(Donor cell). ينتج عن خطأ أثناء بناء العاثي داخل الخلية المصابة ؛ تم استبدال جزء من الـDNA البكتيري عن طريق الخطأ بالحمض النووي للعاثي داخل غلاف البروتين [redacted].

يشار إلى المنتج باسم الـ(Transducing particle). ومع ذلك ، مثل العاثي ، فإن الـ(Transducing particle). سوف يلتصق بالبكتيريا ويحقن الحمض النووي داخلها .

داخل البكتريا ، يجب أن يندمج الحمض النووي المحقون مع الكروموسوم عن طريق (Homologous recombination) إذا كانت الخلية البكتيرية تريد الحفاظ عليه.

في الـ(Specialized transduction) ، يمكن فقط نقل عدد قليل من الجينات المحددة.



عندما تصيب العاثي الخلية المضيفة ، فإن الحامض النووي الداخل يشفر لانتاج انزيم Deoxyribonuclease الذي يحلل الـ(host DNA)

يتم تصنيع بروتينات غلاف العاثي وتضاعف ال(Phage DNA)

أثناء بناء (نضوج maturation) جسيمات الفيروس ، فأن قليل من (Phage heads) قد تغلف أجزاء من الـ(Bacterial DNA) بدلاً من الـ(Phage DNA). فقط الـ(Bacterial DNA) موجود في الـ Transducing particles.

يصيب العاثي الذي يحمل الـ(Bacterial DNA) خلية أخرى ، وينقل الـ(Bacterial DNA) إلى الخلية الجديدة

عندما يتم إدخال هذا الـ(Bacterial DNA) في خلية مضيفة جديدة ، فإنه يندمج في الكروموسوم البكتيري عن طريق (Homologous recombination). فقط الجينات القريبة من بعضها سيتم نقلها معًا

تتضاعف البكتيريا بمواد وراثية جديدة. يتحلل الـ(Replaced host DNA)

[redacted] Transduction (Generalized) يمكن نقل أي قطعة من الـ(Chromosomal DNA) للخلية المانحة في هذه العملية. جميع جزيئات الـDNA للـ(Bacterial virus) والبكتيريا تكون مزدوجة الشريط Double-stranded.

CONJUGATION

آلية مهمة وشائعة لنقل الجينات في كل من البكتيريا موجبة الجرام وسالبة الجرام هو الاقتران (conjugation). تختلف العملية تمامًا في المجموعتين ولكننا سننظر فقط في الاقتران في البكتيريا سالبة الجرام. يتطلب الاقتران الاتصال بين خلايا المتبرع (**Donor**) والمتلقي (**Recipient**). يمكن إظهار ذلك من خلال التجربة التالية.

إذا تم وضع نوعين مختلفين من طفرات التغذية (Auxotrophic mutants) على جانبي المرشح filter الذي يمكن للسوائل ، وليس البكتيريا ، المرور من خلالها ، لا يحدث إعادة التركيب الجيني (genetic recombination). ومع ذلك ، إذا تمت إزالة المرشح ، مما يسمح بالاتصال بين الخلية والخلية ، يحدث إعادة التركيب الجيني.
يمكن نقل كل من الـ(Plasmids) والـ(Chromosomal DNA) عن طريق الاقتران (conjugation). هذه العملية معقدة والعديد من الجوانب غير مفهومة على الرغم من أنها لوحظت لأول مرة في E. coli منذ أكثر من 50 عامًا.

Plasmid Transfer

نقل البلازميدات إلى الخلايا الأخرى يتم عن طريق الاقتران. البلازميدات المقترنة (**Conjugative plasmids**) توجه نقلها الخاص من الخلايا المانحة Donor إلى الخلايا المتلقية Recipient.

نظرًا لأن البلازميدات عبارة عن replicons مع منطقة اصل التضاعف (origin of replication) ، فيمكنها التكاثر داخل الخلايا مستقلة عن الكروموسوم او لاتعتمد عليه. أكثر الأمثلة التي تمت دراستها بدقة هو (F (fertility) plasmid) لـ E.coli. على الرغم من أن هذا البلازميد لا يشفر أي خصائص بارزة بخلاف تلك المطلوبة للنقل ، إلا أن البلازميدات المقترنة الأخرى تشفر مقاومة لمضادات حيوية معينة ، وهو ما يفسر كيف يمكن لمثل هذه المقاومة أن تنتشر بسهولة بين مجموعة من الخلايا البكتيرية.

الـ E.coli التي تمتلك F plasmid سميت بـ($\boldsymbol{F^+}$) ، في حين أن البكتريا التي لا تحتوي على F plasmid هي ($\boldsymbol{F^-}$).

يشفر F plasmid العديد من البروتينات اللازمة للاقتران ، بما في ذلك **F Pilus** ، ويشار إليه أيضًا باسم (**Sex pilus**). يرتبط هذا الـPilus بالخلية المتلقية Recipient

يمكن تقسيم نقل البلازميد إلى أربع خطوات

<u>الخطوة 1:</u> Contact between donor and recipient cells: الاتصال بين خلايا المانحة Donor والمتلقية Recipient. يتعرف الـ F pilus للخلية المانحة على مستقبل معين على جدار الخلية المتلقية ويرتبط به. بعد الارتباط ، يعمل F pilus كخطاف (grappling hook) ، يجمع الخليتين معًا.

<u>الخطوة 2: Mobilization or activation of DNA transfer</u> تعبئة أو تفعيل نقل الـ DNA . يتم تعبئة البلازميد للنقل عندما الـ (Plasmide encoded enzyme) ، والذي هو **Endonuclease** ، يشق خيطًا واحدًا من البلازميد في تسلسل نوكليوتيد معين ، وهو الـ(origin of transfer). ينتج عن هذا تكوين جزيئة (single-stranded DNA) مع endonuclease متصل بالنهاية.

<u>الخطوة 3: Plasmid transfer</u> نقل البلازميد. في غضون دقائق من اتصال الخلية F^+ بالخلية F^- ، يدخل خيط واحد من F plasmid مع الـ endonuclease المتصل بنهايته إلى الخلية F^-. يستغرق هذا النقل حوالي دقيقتين. تشير الأبحاث الحديثة إلى أن الحمض الـ DNA يمر عبر F Pilus.

<u>الخطوة 4:Synthesis of a functional plasmid inside the recipient and donor cells</u> تخليق بلازميد وظيفي داخل الخلايا المانحة والخلايا المتلقية. بمجرد دخول الخلية المتلقية ، يتم تصنيع خيط من DNA مكمل للـDNA المنقول أحادي السلسلة. وبالمثل ، يتم تصنيع خيط مكمل للـDNA البلازميدي أحادي السلسلة المتبقي في الخلية المانحة. وبالتالي ، فإن كلا من خلايا المانحة والمتلقية هي الآن F^+ ويمكن أن تعمل كمانحين للـ F plasmid .

Chromosome Transfer

يعتبر نقل الـ(Chromosomal DNA) أقل شيوعًا من نقل البلازميد ويشمل الـHfr strains (مما يعني ارتفاع معدل إعادة التركيب high frequency of recombination). هذه هي السلالات التي يتكامل او يندمج فيها الـ(F plasmid) مع الكروموسوم في مواقع محددة (insertion sequences)، والذي يحدث أحيانًا

مثل الـcells F^+ ، فإن الـ Hfr cells تنتج الـF pilus، ويوجه نقل الـ(F plasmid DNA) إلى الخلية المتلقية. ومع ذلك ، نظرًا لأن الـ(F plasmid DNA) مدمج في الكروموسوم ، يتم أيضًا نقل الـ(chromosomal DNA) كـ(single stranded DNA molecule)
لا يتم نقل الكروموسوم بأكمله بشكل عام لأنه سيستغرق حوالي 100 دقيقة حتى يحدث هذا ، وهو حدث غير مرجح لأن الاتصال بين الخليتين من المحتمل أن ينقطع قبل هذا الوقت.
على عكس الـ(F plasmid) ، فإن الـ(chromosomal DNA) المنقول ليس (Replicon) ، ولذلك يجب أن يتكامل ويندمج مع كروموسوم الخلية المتلقية من خلال (homologous recombination) للحفاظ عليه.

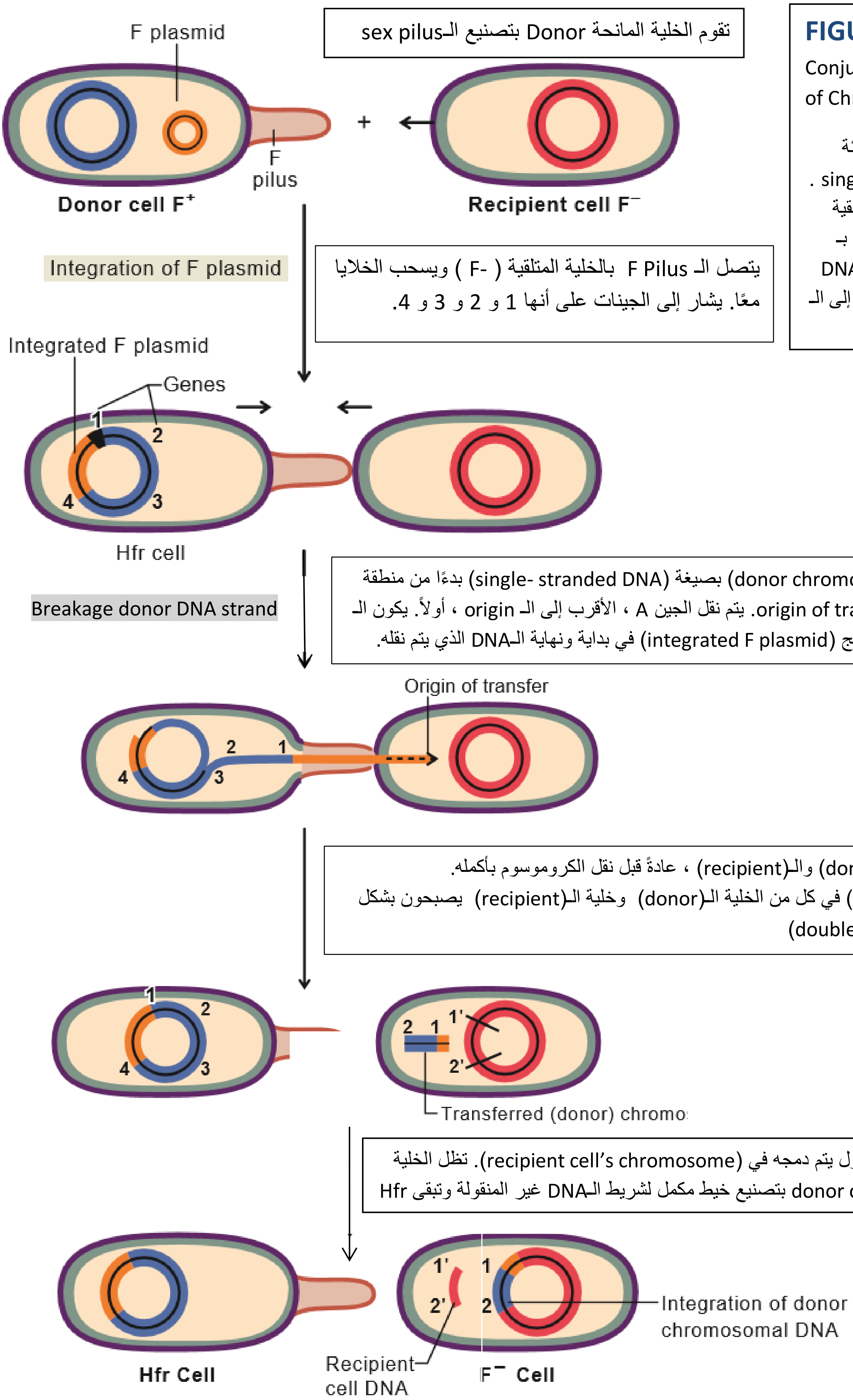
F' Donors

يمكن استئصال الـ(F plasmid) في الـ(Hfr strains) من الكروموسوم لأن عملية اندماج الـ(F plasmid) في الكروموسوم قابلة للعكس. في بعض الحالات ، يحدث خطأ في عملية الاستئصال ، ويتم دمج قطعة صغيرة من الكروموسوم البكتيري في الـ(F plasmid) مع كروموسومه المدمج (F plasmid) يسمى هذا الـ بـ(F' (F prime))، ومثل الـ(F plasmid)يتم نقله بسرعة وكفاءة إلى الخلايا F^- في المجموع المايكروبي.
وبالتالي ، يتم ايضا نقل الـ (chromosomal genes) المدمجة مع الـ(F plasmid). عادةً ما يظل الـ(F plasmid) بهيئة "Extrachromosomal " - أي أنه يظل مستقلاً عن كروموسوم الخلية المتلقية. ومع ذلك ، في حالات نادرة ، يمكن أن يندمج في كروموسوم الخلايا المتلقية ، والتي تصبح بعد ذلك Hfr لأنها تحتوي على الـ(F plasmid) مدمج في الكروموسوم.

FIGURE 8.25

Conjugation-Transfer of Chromosomal DNA

يتم نقل الـDNA كجزيئة single-stranded DNA . يتم تعيين الجينات المتلقية (recipient genes) بـ prime ('). يفتقر الـDNA المقابل في الـdonor إلى الـ prime (').



تقوم الخلية المانحة Donor بتصنيع الـsex pilus

يتصل الـ F Pilus بالخلية المتلقية (F-) ويسحب الخلايا معًا. يشار إلى الجينات على أنها 1 و 2 و 3 و 4.

يتم نقل الـ(donor chromosome) بصيغة (single- stranded DNA) بدءًا من منطقة أصل النقل origin of transfer. يتم نقل الجين A ، الأقرب إلى الـ origin ، أولاً. يكون الـ F plasmid المندمج (integrated F plasmid) في بداية ونهاية الـDNA الذي يتم نقله.

تنفصل خلايا الـ(donor) والـ(recipient) ، عادةً قبل نقل الكروموسوم بأكمله. الـ(single strand) في كل من الخلية الـ(donor) وخلية الـ(recipient) يصبحون بشكل مزدوج (double-strande)

الـ(donor DNA) المنقول يتم دمجه في (recipient cell's chromosome). تظل الخلية المتلقية F- . تقوم الـ donor cell بتصنيع خيط مكمل لشريط الـDNA غير المنقولة وتبقى Hfr

The three mechanisms of DNA transfer are compared in

Comparison of Mechanisms of DNA Transfer

Mechanism	Main Features	Size of DNA Transferred	Sensitivity to DNase addition*
Transformation	Naked DNA transferred	About 20 genes	Yes
Transduction	DNA enclosed in a bacteriophage coat	Small fraction of the chromosome	No
Conjugation			
Plasmid transfer	Cell-to-cell contact required	Entire plasmid	No
Chromosome transfer	Cell-to-cell contact required; only certain cells can be donors (Hfr)	Variable fraction of chromosome	No

*DNase is an abbreviation of deoxyribonuclease, an enzyme that degrades DNA.

THE MOBILE GENE POOL

كشفت التطورات في علم الجينوم عن تباين مفاجئ في الـgene pool (مجموع كل الجينات) حتى نوع واحد. على سبيل المثال ، يشير تحليل تسلسل النيوكليوتيدات للعديد من سلالات الـE.coli إلى أن حوالي 75٪ فقط من جينات السلالة توجد في جميع سلالات تلك الأنواع. هذه تشكل الجينوم المحفوظ **(conserved)** أو الأساسي **(core genome)** لهذه الانواع. تختلف الجينات المتبقية ، التي لم يتم حفظها ، بشكل كبير بين السلالات المختلفة ، وترتبط بالعديد من الـ plasmids ، والـtransposons ، ومناطق من الـDNA تسمى الـ genomic islands. الـ Phage DNA ، موجودة أيضًا في هذه المجموعة. والمثير للدهشة ، أنه عند النظر في جميع مكونات الجينوم غير المحفوظة لسلالات الـE.coli ، فإن هذه التسلسلات تفوق عدد التسلسلات في

الجينوم الأساسي. العديد من مكونات الجينوم غير المحفوظ هي عناصر جينية متحركة (mobile genetic elements) ، مما يعني أنها تشفر نقلها الخاص ، إما داخل جينوم الخلية أو بين الخلايا.

Plasmids

تعد البلازميدات شائعة في العالم الميكروبي وتوجد في معظم أعضاء البكتيريا والاركيا ، بالإضافة إلى الـ *Eucarya*.

مثل الكروموسومات ، فإن معظم الـ**(Plasmids)** عبارة عن جزيئات double-stranded DNA تمتلك منطقة اصل التضاعف (origin of replication) ، وبالتالي يمكن تضاعفها بواسطة الخلية قبل انقسامها.

يتم توفير الآلية المطلوبة للـreplication بواسطة الخلية التي يتواجد فيها البلازميد. ومع ذلك ، لا تقوم البلازميدات عمومًا بتشفير أي معلومات ضرورية لنمو الخلايا.

<u>تختلف البلازميدات في العديد من خصائصها</u> ؛ بعضها يحمل القليل من الجينات ، والبعض الآخر يحمل الكثير. <u>تختلف البلازميدات أيضًا في عدد النسخ الموجودة في الخلية.</u>

- ✓ الـ**(Low-copy-number plasmids)** تتواجد في نسخة واحدة فقط أو بضع نسخ لكل خلية ،
- ✓ بينما الـ**(High-copy-number plasmids)** تتواجد في نسخ عديدة ، ربما 500 نسخة.

معظم البلازميدات ، التي يطلق عليها **Narrow host range** ، يمكن أن يتضاعف في نوع واحد فقط. ومع ذلك ، فإن عددًا قليلاً ، يسمى **Broad host range** ، يمكن أن يتضاعف في العديد من الأنواع المختلفة.

تنقسم البلازميدات إلى مجموعات توافق مختلفة (Different compatibility groups) ويمكن فقط لأعضاء مجموعة توافق مختلفة أن يتعايشوا في نفس الخلية

يتم نقل العديد من البلازميدات البكتيرية بسهولة عن طريق الاقتران (conjugation). تحمل البلازميدات المقترنة أو ذاتية الانتقال (**Conjugative**, or **self-transmissible**) جميع المعلومات الجينية اللازمة للنقل ، بما في ذلك الـ(origin of transfer).

في المقابل ، الـ**(Mobilizable plasmids)** تشفر الـ(origin of transfer) ولكنها تفتقر إلى المعلومات الجينية الأخرى اللازمة لنقلها.

يمكن أن يساعد الـ(Conjugative plasmids) في نقل الـ(Mobilizable plasmids) الموجود في نفس الخلية.

يمكن لبعض البلازميدات ، التي يطلق عليها البلازميدات المختلطة **(Promiscous plasmids)** ، أن تنتقل بين الأنواع غير ذات الصلة وحتى بين البكتيريا موجبة الجرام وسالبة الجرام. يمكن حتى نقل بعض البلازميدات إلى الخلايا النباتية. يتم سرد بعض السمات المشفرة بواسطة البلازميدات في الجدول

Some Plasmid-Coded Traits

Trait	Organisms in Which Trait is Found
Antibiotic resistance	*Escherichia coli*, *Salmonella* sp., *Neisseria* sp., *Staphylococcus* sp., *Shigella* sp., and many other organisms
Pilus synthesis	*E. coli*, *Pseudomonas* sp.
Tumor formation in plants	*Agrobacterium* sp. **(see Perspective 8.2)**
Nitrogen fixation	*Rhizobium* sp.
Oil degradation	*Pseudomonas* sp.
Gas vacuole production	*Halobacterium* sp.
Insect toxin synthesis	*Bacillus thuringiensis*
Plant hormone synthesis	*Pseudomonas* sp.
Antibiotic synthesis	*Streptomyces* sp.
Increased virulence	*Yersinia enterocolitica*
Toxin production	*Bacillus anthracis*

ليس فقط يمكن للخلية أن تكتسب البلازميدات فحسب ، بل يمكن أيضًا أن تضيع من الخلية.
من حين لآخر ، تنقسم الخلية دون توزيع بلازميداتها على الـdaughter cell . إذا تمكنت الخلية من التضاعف بشكل أسرع نتيجة لفقدان البلازميد ، فإن نسل الخلية سيسود في النهاية. في المختبر ، يمكن أن تنمو الخلايا في ظل ظروف تزيد من احتمالية فقدان البلازميد. تم علاج (cured) المجموعة المايكروبية الناتجة من البلازميد.

Resistance Plasmids

Resistance, or **R, plasmids** ، تمنح مقاومة للعديد من الأدوية المضادة للميكروبات والمعادن الثقيلة المستخدمة على نطاق واسع ، مثل الزئبق والزرنيخ. العديد من هذه البلازميدات تكون conjugative وتتكون من جزأين:

- ✓ **resistance, or R, genes** : التي تشفر سمات المقاومة (resistance traits).
- ✓ **resistance transfer factor** او **RTF** الذي يشفر الخصائص المطلوبة للاقتران

ربما تكون أهم ميزة لـ(conjugative R plasmids) هي أن نقلها يمنح مقاومة متزامنة للعديد من مضادات الميكروبات المشفرة بواسطة R genes . علاوة على ذلك ، فإن العديد من R plasmids لها (broad host range) ويمكن أن تتضاعف في مجموعة متنوعة من الأجناس سالبة الجرام المختلفة ، بما في ذلك الـShigella ، Salmonella ، Escherichia ، Yersinia ، Klebsiella ، Vibrio ، Pseudomonas.

يمكن أن يؤدي نقل البلازميدات المختلطة (Promiscous plasmids) إلى ظهور مجموعة واسعة من الكائنات الحية المقاومة للعديد من مضادات الميكروبات المختلفة. يمكن لأعضاء الكائنات الحية الدقيقة الطبيعية ، مثل الـE.coli ، أن تعمل كمستودع لـR plasmids ، والتي يمكن بعد ذلك نقلها إلى الكائنات الحية المسببة للأمراض.

هذا هو أحد أسباب مقاومة العديد من الكائنات الحية المختلفة في بيئة المستشفى لمجموعة متنوعة من مضادات الميكروبات.

Transposons

بالإضافة إلى التسبب في حدوث طفرات ، يمكن أن توفر الـ(transposons) آلية لتعبئة الجينات (mobilizing genes) للنقل. يمكن أن تنتقل الـ(transposons) إلى (replicons) أخرى في نفس الخلية دون أي خصوصية. توجد عدة أنواع من الـ(transposons) ، تختلف في تعقيد بنيتها.

أبسطها ، **insertion sequence (IS)**، يشفر فقط إنزيم الـ**Transposase** ، وهو المسؤول عن التحويل (transposition) تحيط بالجين (الجين الذي يشفر لانزيم تراسبوسيز) سلاسل قصيرة ، عادة ما يكون طولها من 15 إلى 25 زوجًا قاعديًا ، وتكون متطابقة وعادة ما تكون موجهة في اتجاهين متعاكسين. هذه تسمى التكرارات المقلوبة **(inverted repeats)**. يُقال إن منطقتين من الـDNA تصبح inverted repeats عندما يكون تسلسل النيوكليوتيدات في شريط واحد في منطقة واحدة ، عند قراءته في الاتجاه 5 "إلى 3" ، هو نفسه التسلسل في الشريط الآخر المعاكس ، عندما يُقرأ ايضا في الاتجاه 5 " إلى 3 ".

Composite transposons (المسماة Tn1 و Tn2 وما إلى ذلك) تتكون من جين واحد على الأقل يمكن التعرف على منتجه بسهولة في كثير من الأحيان ، مثل الترميز الجيني لمقاومة مضادات الميكروبات , محاطًا بـ **ISs** [redacted] اي هو. (Antibiotic-resistance locus flanked by two insertion elements)
يمكن أن تتحرك الـ(Composite transposons) ، مثل (insertion sequence) ، في نفس الـ(replicon) أو من واحد إلى آخر في الخلية. يتبع حركتهم بسهولة منتج الجين الذي يسهل التعرف عليهم. يندمجون في موقعهم الجديد من خلال **Non-homologous recombination** ، وهي عملية لا تتطلب تسلسلًا مشابهًا في منطقة الـrecombination.

إذا تم إدخال الـcomposite transposon في conjugative plasmid ، فيمكن نقله إلى خلايا أخرى. من الناحية النظرية ، يمكن لأي جين أو مجموعة من الجينات أن تنتقل إلى موقع آخر إذا كانت مقيدة من قبل **IS** ، ولكن تلك التي تحمل جينات مقاومة المضادات الحيوية لها أهمية خاصة من الناحية الطبية.

Genomic Islands

Genomic Islands هي نوع اخر من الـ(mobile gene pool). وهي عبارة عن أجزاء كبيرة من الـDNA في جينوم الخلية يعتقد أنها نشأت في أنواع أخرى. يعتمد هذا الافتراض على حقيقة أن تركيبها الأساسي يختلف تمامًا عن بقية التسلسلات الجينومية للخلية. بشكل عام ، لكل نوع بكتيري نسبة مميزة من أزواج القواعد G: C ، لذا فإن جزءًا كبيرًا من الـDNA الذي له نسبة G: C مختلفة جدًا يشير إلى أن الجزء نشأ من مصدر غريب وتم نقله إلى الخلية من خلال (Horizontal gene transfer).

تشمل الخصائص المشفرة بواسطة الـGenomic Islands :

- ✓ Utilization of specific energy sources استخدام مصادر طاقة محددة
- ✓ Acid tolerance تحمل الحامض
- ✓ Development of symbiosis تطوير التعايش
- ✓ Ability to cause disease القدرة على التسبب في المرض

الـ Genomic islands التي تشفر الأخيرة تسمى Pathogenicity islands.

يتم تلخيص بعض أعضاء الـ(mobile gene pool) في الجدول

Mobile genetic elements		
Name	**Composition**	**Properties**
Transposon		ينتقل إلى مواقع مختلفة في الـDNA في نفس الخلية
→ Insertion Sequence (IS)	Transposase gene flanked by short repeat sequences	
→ Composite Transposon	يمكن التعرف على الجين الذي تحيط به ISs	Same as insertion sequence
Plasmid	Circular double-stranded DNA replicon; smaller than chromosomes	Generally codes only for non-essential genetic information
Genomic Island	قطعة كبيرة من الـDNA في كروموسوم أو بلازميد	تشفر للجينات التي تسمح للخلية باحتلال مواقع بيئية محددة