جامعة الملك فيصل

١٣٩٥ ١٩٧٥

اقرأ وربك الأكرم

KING FAISAL UNIVERSITY

مقرر الوراثة الجزيئـة

(0816- 401)

للأستاذ الدكتور / أمينة أحمد حسن حسن

الأستاذ المشارك بجامعة الملك فيصل

كلية العلوم – قسم علوم الحياة

محتويات مقرر الوراثة الجزيئية

١- تاريخ وتطور الوراثة الجزيئية .

٢-التجارب التى أثبتت أن **DNA** هو مادة الوراثة.

٣-التركيب الكيميائى لمادة الوراثة.

٤- تضاعف مادة الوراثة.

٥- إتجاه المعلومات من **DNA** الى البروتين(تخليق البروتين-النسخ والترجمة).

٦- تقنية الـ **PCR**.

٧- تقنية الإنزيمات القاطعة.

٨- الإستنساخ (إستنساخ الجين، الخلايا ، الكائن).

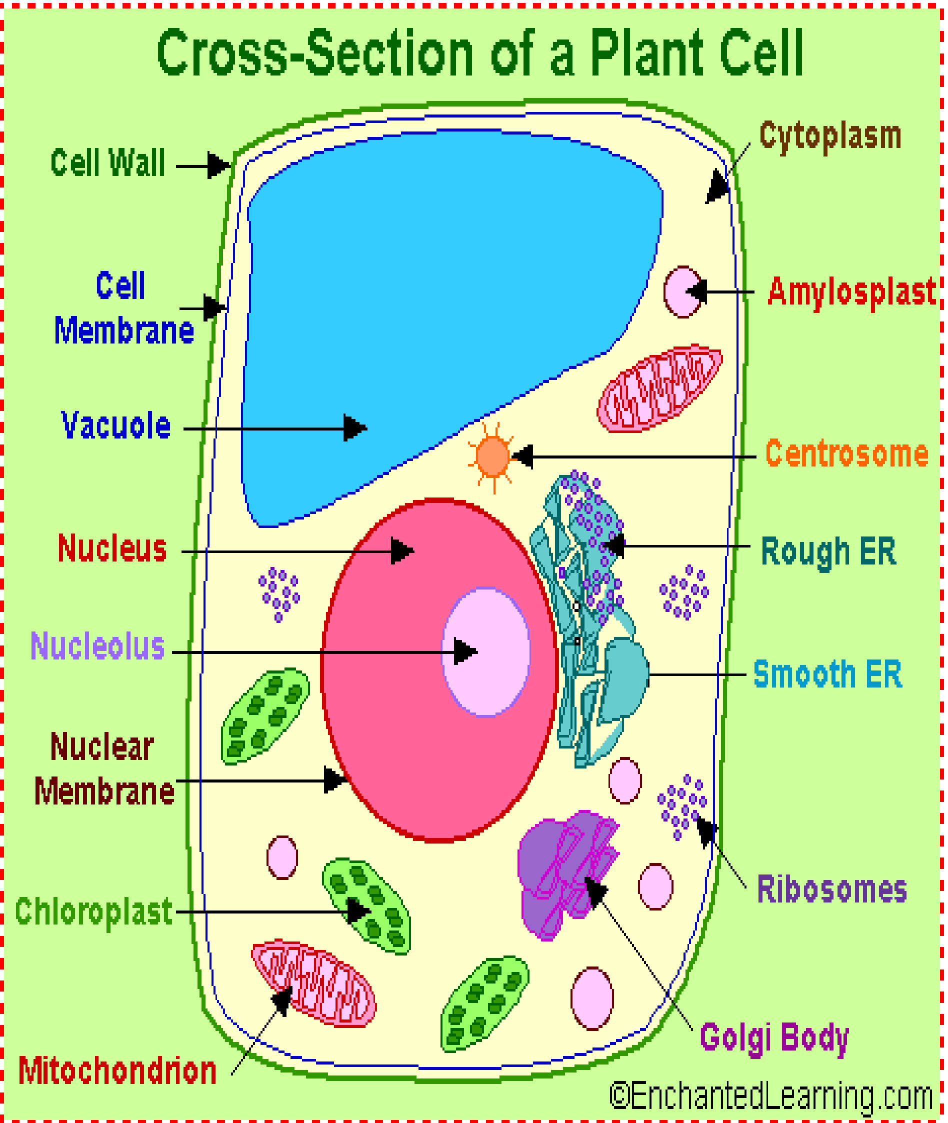
٩- الهندسة الوراثية وتطبيقاتها.

الوراثـــة الجزيـئـيـة

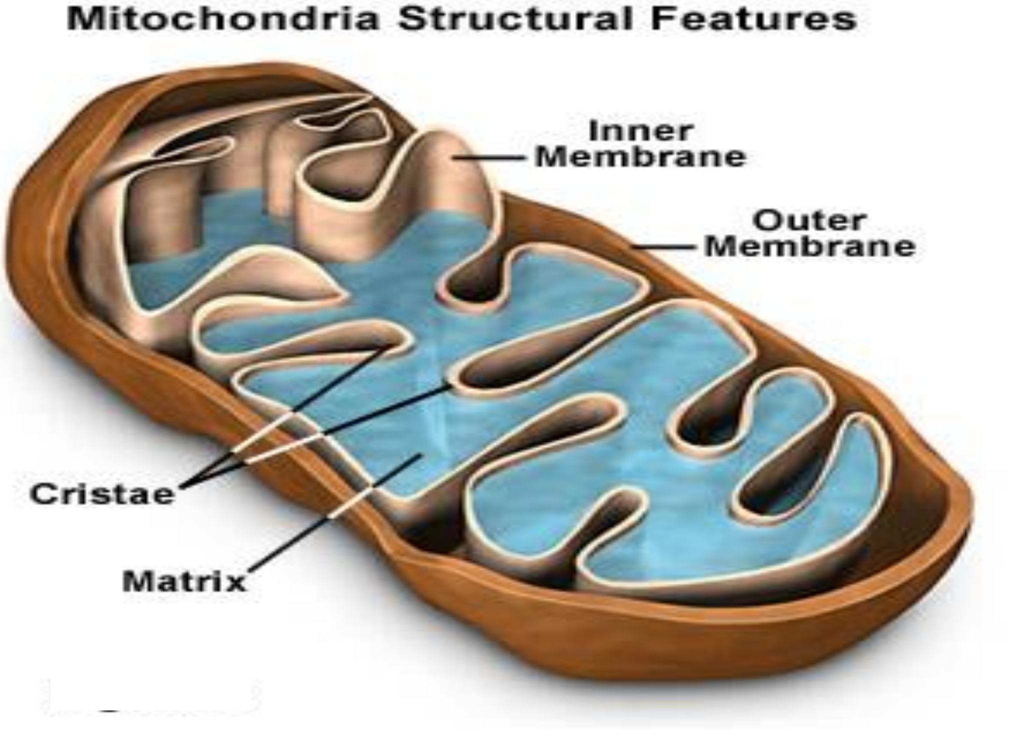
Molecular Genetics

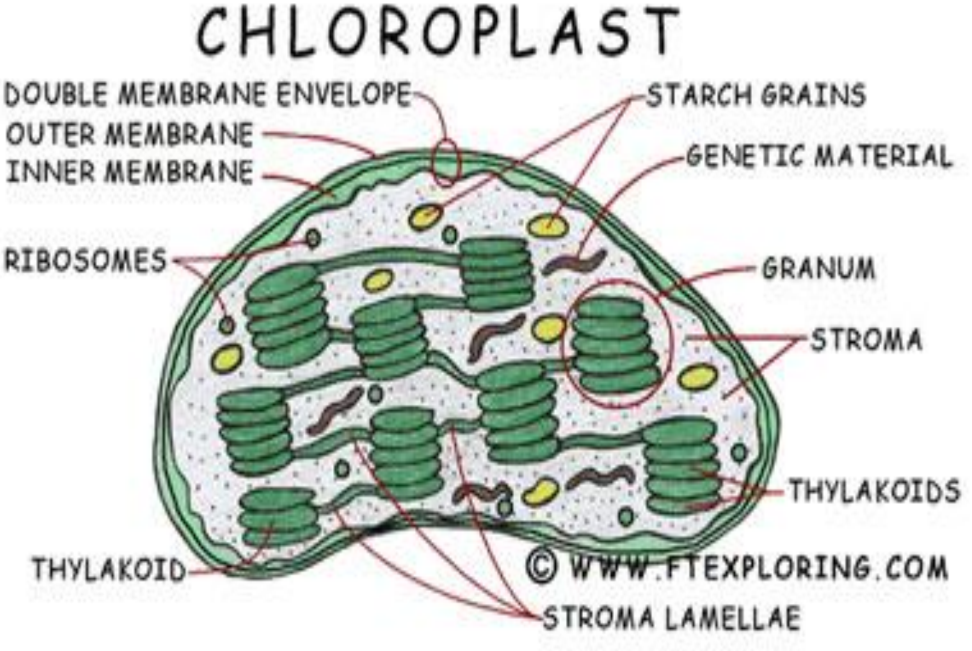
هى أحد فروع علم الوراثة والذى يهتم بدراسة المادة الوراثية من حيث التركيب والتكرار والتعبير.

أين تقع المادة الوراثية من الخلية



- تحتوى الخلية على مخزون من المادة الوراثية لتأدية عملها فى **النواة**





كما تحتوى على بعض من المادة الوراثية خارج النواة وذلك فى بعض عضياتها وهى **الميتوكونديريا** **والبلاستيدات**

عندما نذكر الآن المصطلح (مادة وراثية) فإن أول ما يتبادر الى ذهننا على الفور هو حمض الدي أوكسي ريبونيوكليك DNA

الذي يعرف بأنه المادة الكيميائية الحاملة للمعلومات الوراثية

ويؤدى حمض الريبونيوكليك (RNA) نفس الوظيفة في بعض الفيروسات

تاريخ وتطور علم الوراثة الجزيئية

- عند استعراض تاريخ الوراثة كعلم ، فإننا نجد أن DNA قد أصبح محور الإهتمام منذ وقت حديث نسبياً .
- الفترة من ١٩٤٤م حتى يومنا الحاضر تمثل مرحلة الوراثة الجزيئية بدءا من أن DNA هو المادة الوراثية حتى وقتنا الحاضر باستخدام recombinant DNA technology

- في عام ١٩٤٤م قام Avery , Macleod McCarty, بإثبات أن DNA هو مادة الوراثة
- في عام ١٩٥٣م درس كل من Watson and Crick تركيب DNA .
- في الفترة بين ١٩٦٨ و١٩٧٣م اكتشف كل من W. Arber, H. Smith and D. Nathans إنزيمات التجزئة الداخلية restriction endonucleases وهي الأنزيمات التي فتحت المجال لتطويع DNA .

- في عام ١٩٧٢م كان P. Bery هو أول من صنع recombinant DNA molecule
- ومنذ عام ١٩٧٢م قام علماء الوراثة بهندسة العديد من الجينات وتكوين الكائنات المهندسة وراثياً .
- في عام ١٩٩٧م حدث استنساخ لأول نعجة سميت Dolly.
- في عام ٢٠٠٠م تم تحديد تتابع الجينوم البشري واستعمال تلك المعلومات التي أدت لظهور علم Genomics وهو عبارة عن The study of the complete genetic complement of an organism

(DNA) والـ (RNA)
كمادة للوراثة
DNA and RNA
as the genetic material

- الأحماض النووية هي مواد عضوية ذات جزيئات كبيرة تتألف من وحدات يطلق عليها اسم النيكليوتيدات Nucleotides.
- سميت الأحماض النووية بهذا الاسم لأنها اكتشفت لأول مرة في النواة من قبل العالم ميشر Miescher عام ١٨٦٩م ، إلا أنها ظهرت فيما بعد في عضيات سيتوبلازمية أخرى مثل الميتوكندريا والبلاستيدات الخضراء.

- يوجد نوعان من الأحماض النووية هما:
- أ - الحمض النووي الريبوزي منزوع الأكسجين Deoxyribonucleic acid (DNA)
- ب- الحمض النووي الريبوزي Ribonucleic acid (RNA)
- وتعتبر الأحماض النووية من أهم المركبات العضوية الحيوية على الإطلاق وفيها يكمن سر الحياة.

- فهي المسئولة والمسيطرة على جميع ما يتم في النظام الحيوي من نشاطات حيوية كتخليق Synthesis البروتينات ومنها الإنزيمات التي تلعب دوراً رئيسياً في عمليات الأيض الخلوي والهرمونات المسئولة عن تحفيز الخلايا للقيام بوظائفها الحيوية....الخ.

- وتعتبر الأحماض النووية أساس المادة الوراثية والتي تمتاز بعدة **خصائص فريدة** من أهمها:
- ١- القدرة على حمل وتخزين المعلومات الوراثية.
- ٢- القدرة على التعبير عن المعلومات الوراثية المخزنة لإنتاج الجزيئات الحيوية.
- ٣- إمكانية **التضعاف** الذاتي Self duplication **والإنتقال** من جيل لآخر.
- ٤- القدرة على التباين والتنوع الكبير.

التجارب التي تشير وتثبت أن DNA و RNA هما المادة الوراثية

Experiments indicating DNA and RNA as the genetic material

بحلول عام ١٩٥٣ كان واضحاً أن الـ DNA هو المرشح الأقوى كمادة للوراثة على حساب البروتينات التي ظلت لفترة طويلة يعتقد أنها هي المادة الوراثية وذلك لعدة أسباب .

فقد لاحظ Shoenheimer, 1938 أن DNA الخلية ثابت للغاية وذلك بمقارنته بالبروتينات سريعة التبدل .

- كما وقد أوضح Mirsky and Ris, 1949 أنه في حين أن جميع خلايا الكائن الحي تحتوي على كميات متساوية من الـ DNA فإن الخلايا المختلفة تحتوي على كميات ونوعيات مختلفة تماما من البروتين ومن ثم فإن ثبات الـ DNA نوعياً وكمياً جعله يحظى بكونه المادة الوراثية .

- علاوة على ذلك تؤكد تجارب عديدة إلى أن الـ DNA بمفرده يمكنه أن ينقل المعلومات الوراثية من جيل لأخر .
- وسوف نتناول بعض من هذه التجارب ويتضمن بعضها الذي تم إجراؤه بعد عام ١٩٥٣ .

أولاً : تجارب التحول
Transformation experiments

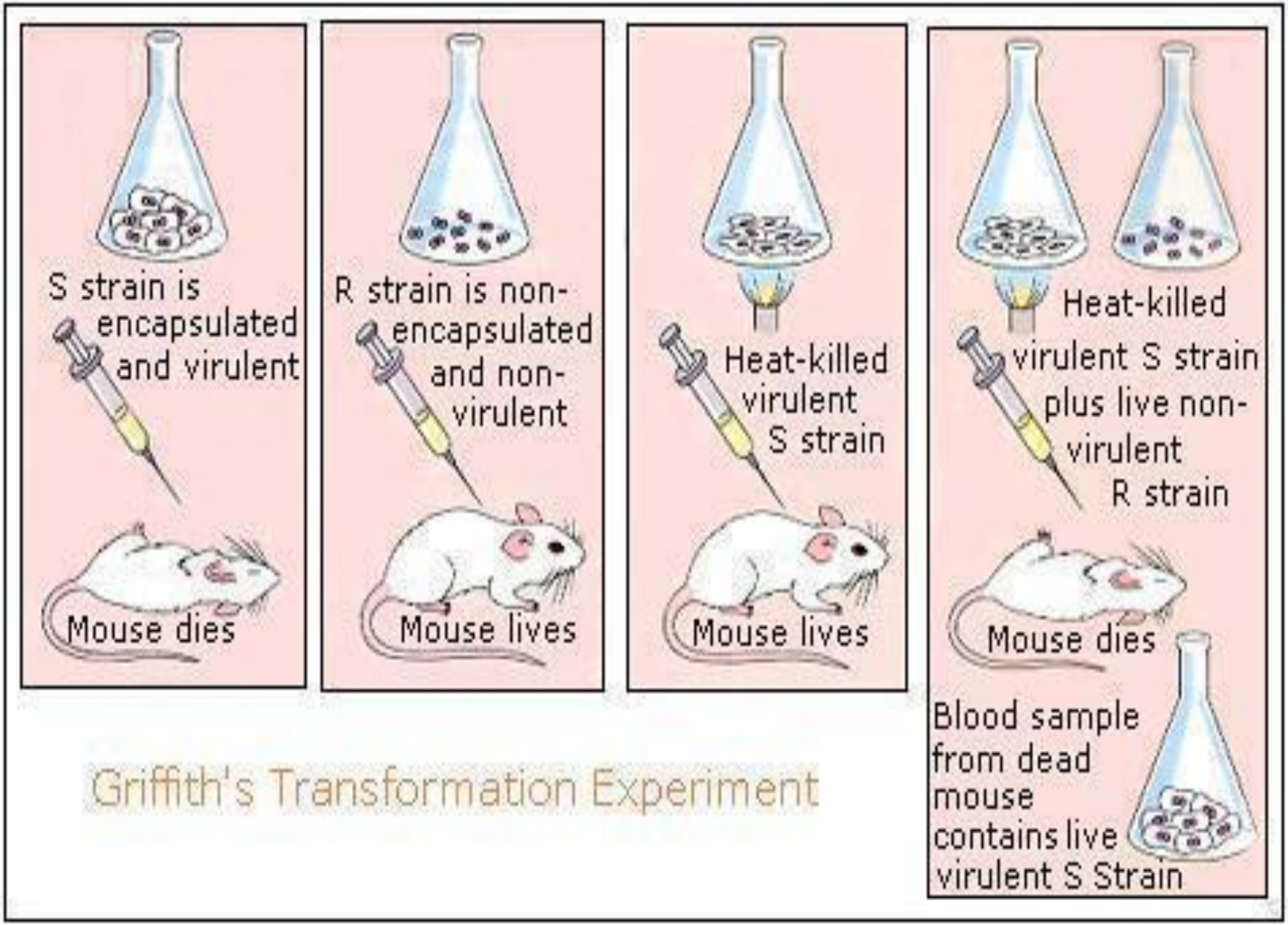
استعملت بكتريا الإلتهاب الرئوي *Diplococcus pneumonia* في مجموعة من التجارب التي تشير إلى أن الـ DNA هو المادة الوراثية ، و أولى هذه التجارب كانت بواسطة العالم Griffith عام ١٩٢٨ .

- توجد بكتيريا الإلتهاب الرئوي في شكلين : خلايا ملساء (S) Smooth تكون محاطة بواسطة كبسوله من polysaccharide والتى تحمى البكتريا من جهاز مناعة الحيوان ولذلك تتمكن البكتريا من إحداث المرض ولذلك تكون ممرضة (pathogen)،
- الشكل الآخر التى تكون خلاياه خشنة Rough (R) وغير محاطة بغلاف وهي غير ممرضة (non pathogen).

- فى عام 1928 لاحظ Griffith أن الفئران التي حقنت بكل من خلايا R حيه أو خلايا S مقتولة بالحرارة ظلت سليمة وتتمتع بالصحة .
- ولكن الفئران التى حقنت بخليط محتوى على عدد قليل من خلايا R حيه وعدد كبير من خلايا S مقتولة بالحرارة قد أصيبت بالالتهاب الرئوى وماتت .

- البكتيريا التى عُزلت من عينات دم الفئران الميته أنتجت pure S cultures محتويه على كبسوله مطابقه تماماً لخلايا S المقتوله بالحرارة .
- يظهر بوضوح أن خلايا S الميته استطاعات بطريقه ما أن تمد خلايا R الحيه بالقدره على الصمود أمام جهاز مناعة الفئران ثم تضاعفت (تكاثرت) وأحدثت المرض.

- النتيجة النهائية حينئذ هى أن بعض الخلايا الميتة من طراز S قد قامت بإحداث تحول لخلايا R الحية وذلك بانتقال المادة الوراثية من S الى R، وبالتالى تحولت خلايا R الى خلايا S.



Griffith's Transformation Experiment

- فى عام 1944 قام كل من Avery , Macleod and Maccarty بعمل تجربه خطيره والتى قادتنا الى فهم هذه الظاهره ، حيث قاموا بعزل وتنقيه DNA من خلايا S ثم قاموا بإضافة كميات قليله من هذا DNA الى مزرعة نامية من خلايا R وكانت النتيجة هى إنتاج smooth colonies والتى إحتوت على النوع S.

- عينات DNA كانت تحتوى على آثار من البروتين ، RNA إلا أن transformating activity لم يتغير بالمعامله الإنزيميه التى تكسر البروتين أو المعامله بـ RNase إلا أنها هدمت تماماً بالمعاملة بـ DNases ، هذه التجربه وغيرها من التجارب التى تلتها أوضحت أن الماده المسئوله عن Genetic Transformation كانت DNA من خلايا donor(S) ومن هنا ثبت أن DNA هو ماده الوراثة

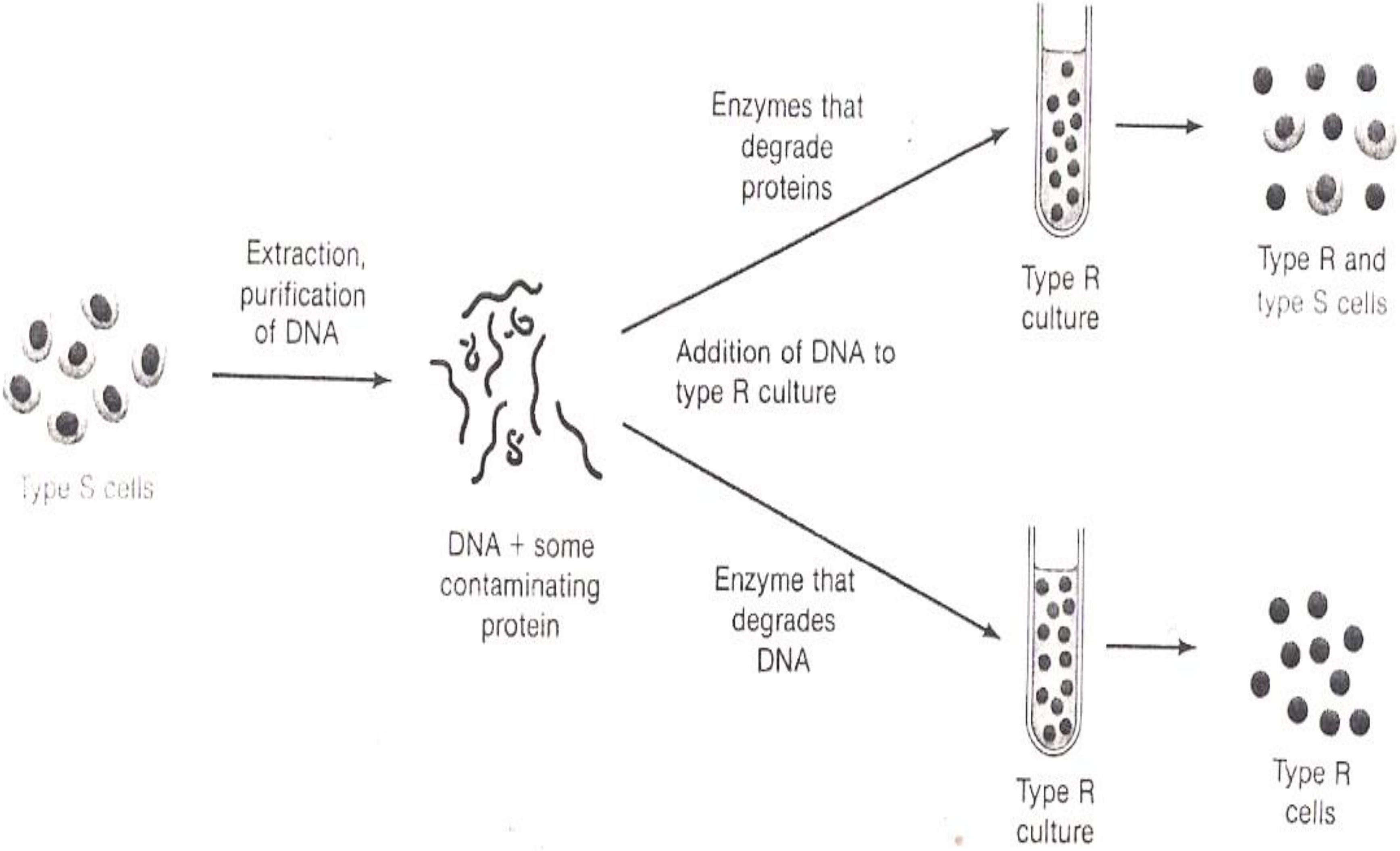


Figure 13-2. A diagram of the experiment that demonstrated that DNA is the active material in bacterial transformation.

ثانيا: تجارب هيرشي – تشيس
Hirshey-Chase experiments

- قام كل من هيرشي وتشيس في عام ١٩٥٢ بنشر تجارب تشير بطريقة مباشرة إلى أن الـ DNA هو المادة الوراثية في الفيروسات كذلك.
- وقد إستعملا في تجاربهما البكتريوفاج T_2 وهو فيروس يستطيع التكاثر داخل بكتيريا *E. coli* فقط .

- ومن المعروف أن فاجات T_2 تتركب من كميات متساوية تقريباً من الـ DNA والبروتين وحيث أن الـ DNA يحتوى على الفوسفور دون الكبريت ، في حين أن معظم البروتينات لا تحتوي على الفوسفور و أنها في العادة تحتوي على بعض الكبريت ، فيمكن اذن أن نميز بإستعمال النظائر المشعة الفوسفور والكبريت.

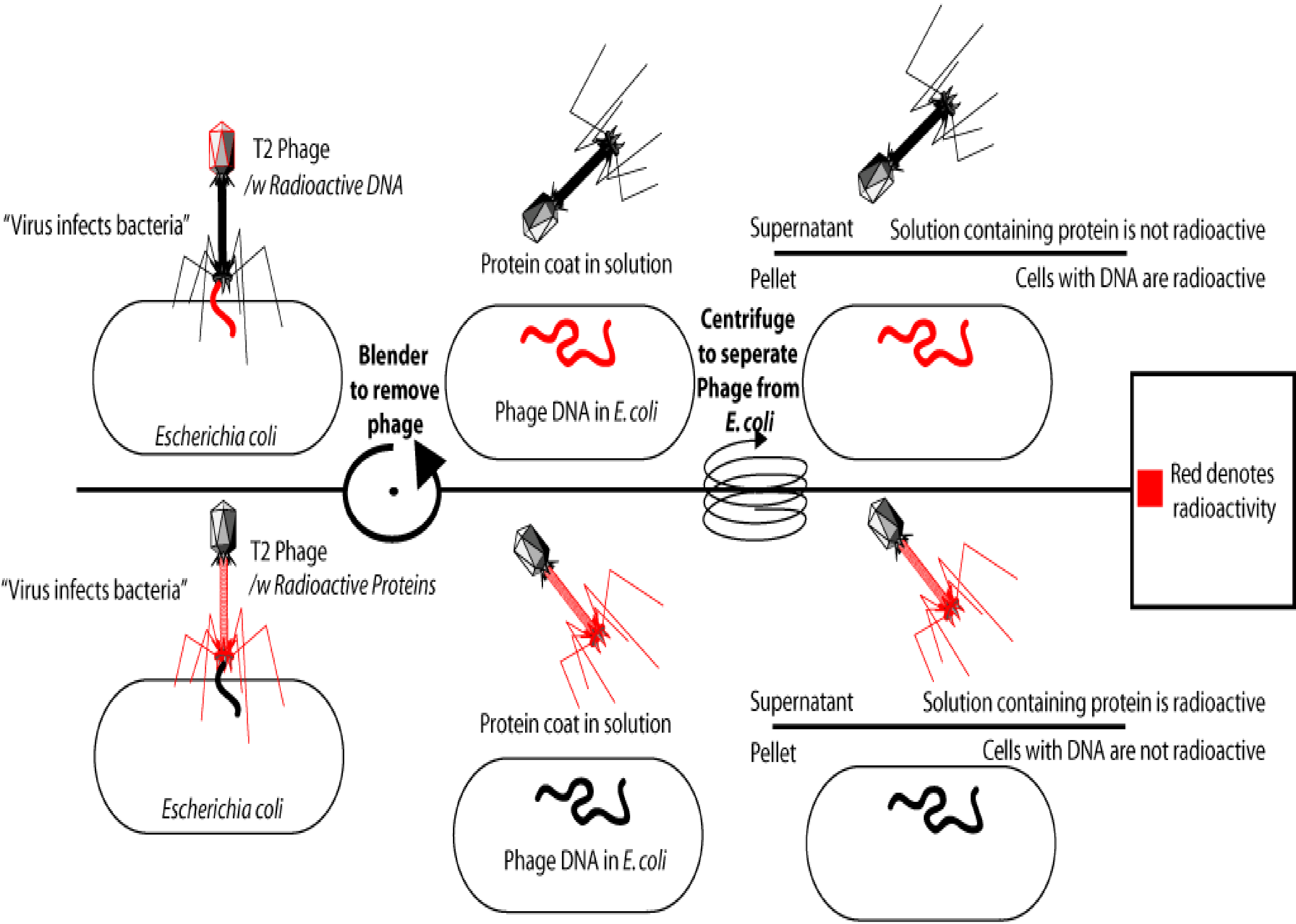
- ومن ثم فقد نمى هيرشي وتشيس بكتريا *E. coli* في بيئة تحتوي إما على النظير المشع للفوسفور(P_{32}) أو النظير المشع للكبريت (S_{35})
- وبعدئذ سمحا لفاجات T_2 أن تصيب خلايا العائل المعلمة وتتكاثر داخلها
- وعندما جمعت فاجات النسل الذي ظهر بعد تحلل خلايا البكتريا وجد أنها معلمة كذلك

- وبهذه الطريقة تحصل هيرشي وتشيس على سلالتين لفاجات T_2 المشعة ، الأولى تحتوى على DNA معلم بالـ P_{32} ، والأخرى تحتوي على بروتين معلم بـ S_{35} .
- وقد استعملت الفاجات المعلمة بعدئذ لإصابة خلايا من بكتريا القولون (*E. coli*) غير المعلمة وأمكن الحصول على نتيجة هامة .

- عندما تمت الإصابة بالفاجات المعلمة بالـ P_{35} وجد أن الغالبية العظمي من النشاط الإشعاعي في داخل البكتريا العائلة ، علاوة على ذلك فقد ظهر في نسل الفاجات بعد تحلل البكتريا جزء من المادة المشعة .

- وعندما استعملت الفاجات المعلمة بالـ S_{35} ظلت أغلب المادة المشعة في خارج البكتريا مدمصة على السطح الخارجي للخلية البكتيرية .

- ومن ثم فقد أتضح أنه خلال عملية الإصابة ينفصل DNA الفاج عن بروتينه وأن DNA يدخل خلية العائل ويسعى لاتمام تضاعف الفاج .
- في حين أن الوظيفة الأساسية للغلاف البروتيني هي تسهيل عملية الإدمصاص السطحي . وهذا يثبت بالدليل القاطع أن الـ DNA هو مادة الوراثة حتى في الفيروسات


T2 Phage
/w Radioactive DNA
"Virus infects bacteria"
Escherichia coli
Blender
to remove
phage
Protein coat in solution
Phage DNA in E. coli
Centrifuge
to seperate
Phage from
E. coli
Supernatant
Solution containing protein is not radioactive
Pellet
Cells with DNA are radioactive
Red denotes
radioactivity
T2 Phage
/w Radioactive Proteins
"Virus infects bacteria"
Escherichia coli
Protein coat in solution
Phage DNA in E. coli
Supernatant
Solution containing protein is radioactive
Pellet
Cells with DNA are not radioactive

تجارب على فيروسات RNA

- في عام ١٩٥٧ أتضح بالدليل القاطع أن الـ RNA هو المادة الوراثية في الفيروسات التي تحتوي على RNA فقط وليس بها DNA،
- كانت أول التجارب التى أثبتت ذلك هى تلك المعروفة بتجارب اعادة التكوين Reconstitution التى قام بها Conrat and singer باستخدام فيروس موزايك الدخان(التبغ) TMV .
- يتميز هذا الفيروس باحتوائه على جزئ واحد من RNA محاط بغلاف بروتينى.

باستخدام المعاملات الكيميائية يمكن فصل الغلاف البروتينى لهذا الفيروس عن الـ RNA ، علاوة على ذلك فان هذه العملية عكسية بمعنى أنه عند خلط البروتينات و RNA تحت ظروف مناسبة يمكن اعادة تكوين وحدات فيروسية TMV كاملة.

قاما Conrat and singer بفصل الغلاف البروتينى عن RNA فى سلالتين مختلفتين من هذا الفيروس ،

- ثم قاما بخلط البروتين الخاص بالسلالة الأولى مع RNA السلالة الثانية ،
- وبروتين السلالة الثانية مع RNA السلالة الأولى ، وعندما استخدمت الفيروسات الناتجة من عملية الخلط فى عملية عدوى لأوراق التبغ كان نسل الفيروسات الناتج مطابقا ظاهريا ووراثيا للسلالة الأبوية التى أخذ منها RNA معنى ذلك أن المعلومات الوراثية فى TMV تخزن فى RNA وليس فى البروتين.

أولاً:- الحمض النووي الريبوزي منزوع الأكسجين

Deoxyribonucleic acid (DNA)

مقدمة:-

يعتبر جزئ DNA هو سيد الجزيئات الحيوية، فعلية تترتب الجينات Genes .

- كما ينتج جزئ RNA أثناء عملية حيوية مهمة تعرف بإسم النسخ RNA transcription
- وهذا الجزئ المنسوخ يقوم بتنفيذ الأوامر التي تلقاها من جزئ DNA ليكون البروتينات المطلوبة في عملية حيوية أخرى مهمة تعرف بإسم ترجمة البروتين Protein translation

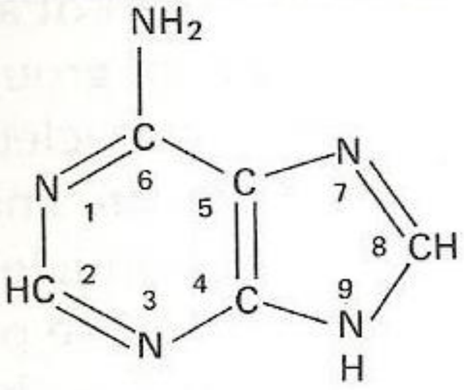
DNA Structure

- يتكون الـ DNA من عدد هائل من النيوكليوتيدات والتي تتكون بدورها من ثلاثة أجزاء هي:
- ١ـ قاعدة نيتروجينية Nitrogen base.
- ٢ـ سكر خماسي Pentose sugar.
- ٣ـ مجموعة الفوسفات Phosphate group (PO_4).

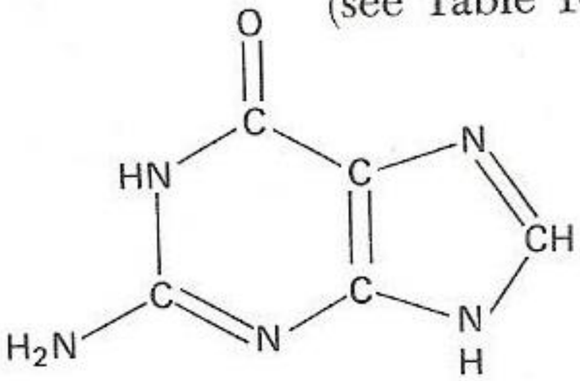
- القواعد النيتروجينية يوجد منها مجموعتين في الأحماض النووية هما:
- أ- قواعد البيورينات Purines bases ثنائية الحلقة وتشمل قاعدتي الأدنين Adenine (A) والجوانين Guanine (G).
- ب - قواعد البيريميدينات Pyrimidines bases أحادية الحلقة وتشمل ثلاث قواعد هي: الثايمين Thymine (T) والسيتوزين Cytosine (C) واليوراسيل Uracil (U).

Purine and pyrimidine bases. Molecular weights (mw) are given in dalton units (see Table 1-2).

PURINES

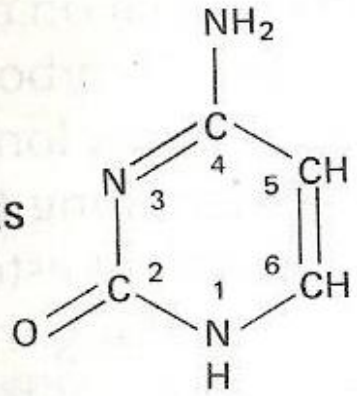


Adenine
mw = 135.13

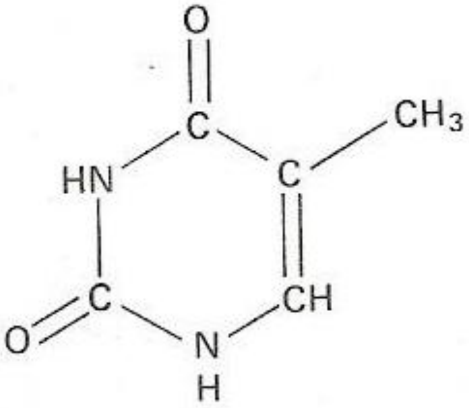


Guanine
mw = 151.13

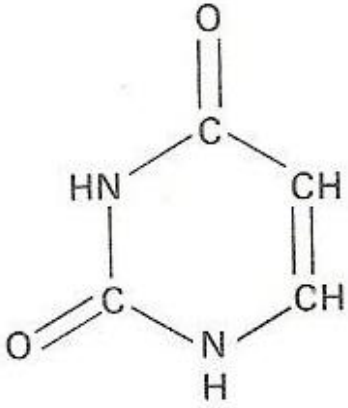
PYRIMIDINES



Cytosine
mw = 111.10



Thymine
mw = 126.12



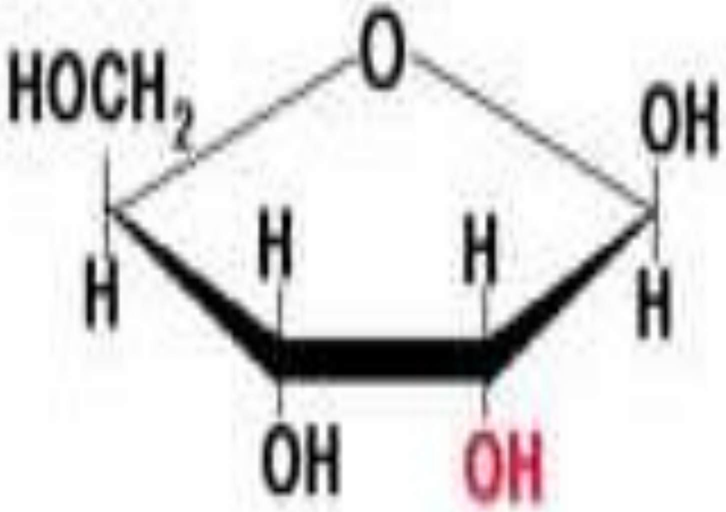
Uracil
mw = 112.09

شكل يوضح قواعد البيورين والبيريميدين

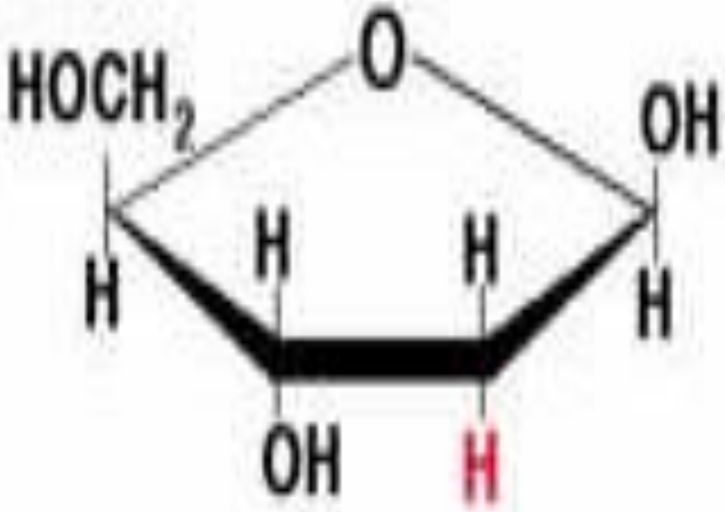
- يحتوي جزئ DNA على أربع قواعد نيتروجينية هي الأدنين (A) Adenine والثايمين (T) Thymine والسيتوسين Cytosine (C) والجوانين (G) Guanine
- كذلك جزئ RNA ماعدا أن الثايمين يستبدل باليوراسيل (U) Uracil أي أن الأول يتميز بقاعدة الثايمين والثاني يتميز بقاعدة اليوراسيل.

- السكر خماسى الكربون(pentose)
- يكون السكر دي أوكسي ريبوز فى DNA ولذلك يسمى دى أوكسى ريبونيوكليك أسد.
- بينما في الـ RNA يكون السكر هو الريبوز الذي يحتوي على ذرة أكسجين إضافية في الموقع ٢ لهذا يعرف باسم ريبونيوكليك أسد

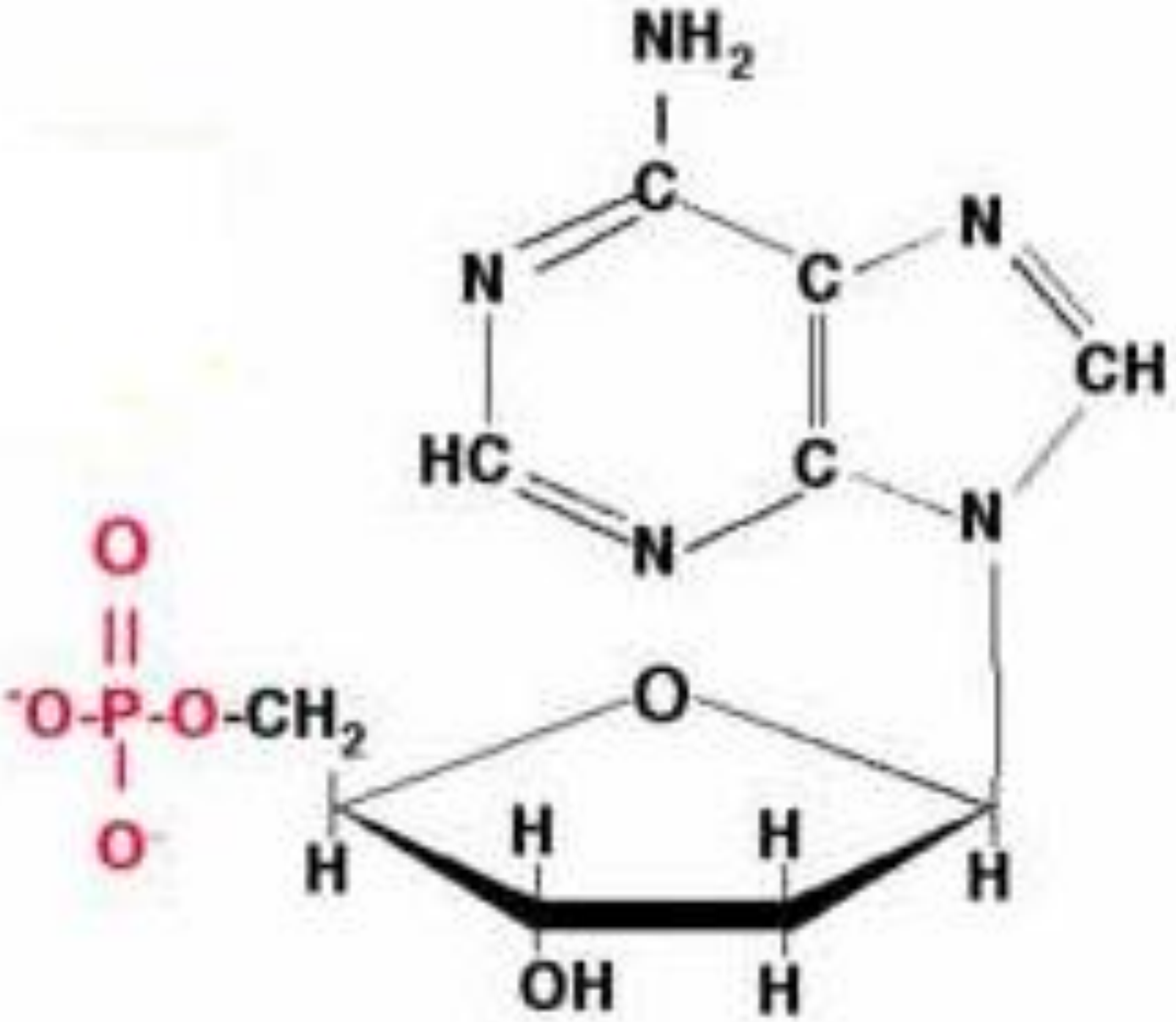
ribose
used in RNA



deoxyribose
used in DNA

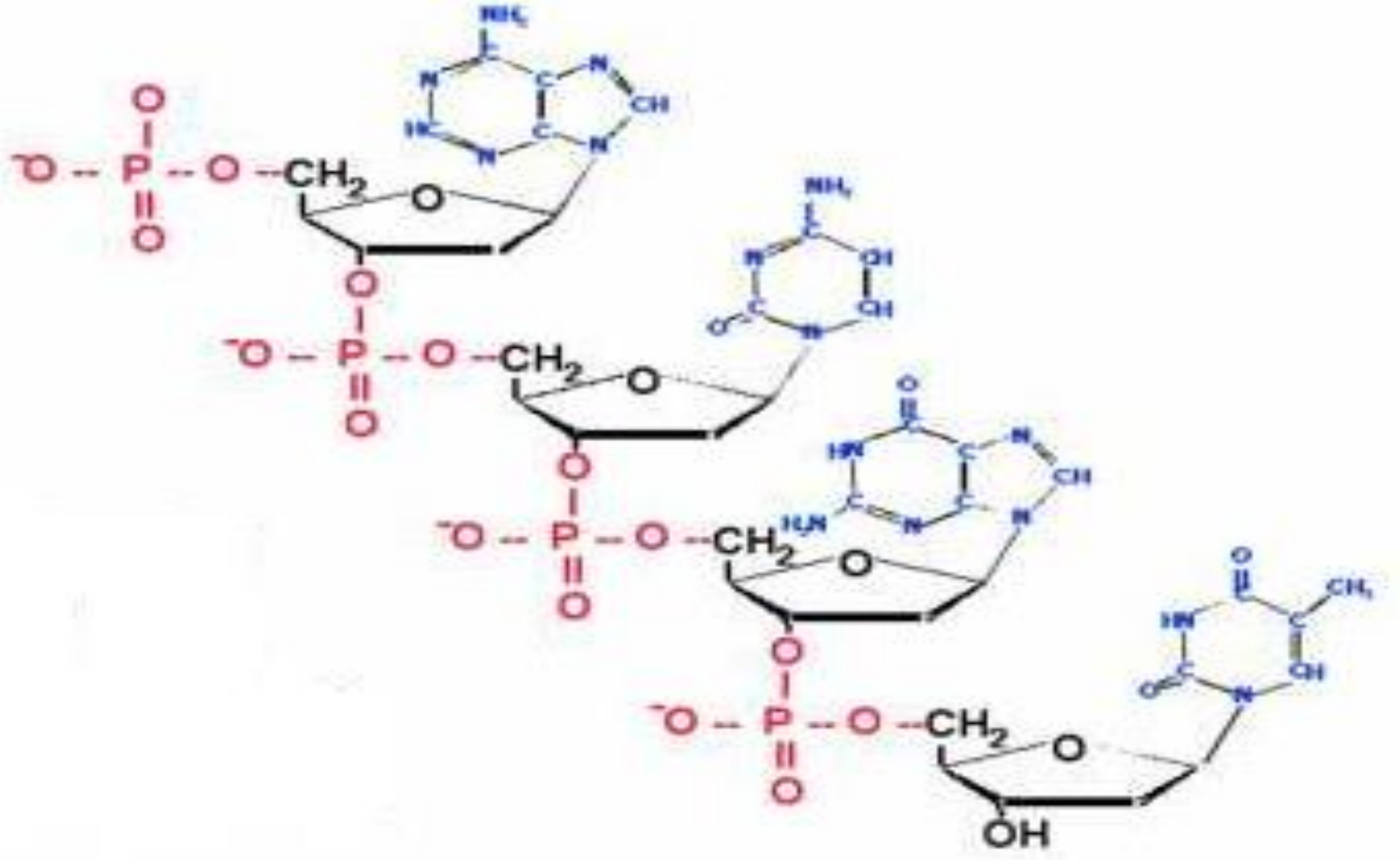


- تستطيع القواعد النيتروجينية أن تكون روابط كيميائية مع سكر pentose ، الجزيئات الناتجة تعرف باسم Nucleosides
- ويلزم للـ Nucleosides قبل أن تصبح جزءاً من جزئ الـ DNA أو الـ RNA أن تتحد مع مجموعة فوسفات لتكون Nucleotide



- شكل يوضح تركيب النيوكليوتيدة

- مجموعة الفوسفات ترتبط بذرة الكربون رقم ٥ لسكر البنتوز في نيوكليوتيدة ما وبذرة الكربون رقم ٣ من السكر الموجود في النيوكليوتيده التالية.



- يمثل السكر والفوسفات العمود الفقرى للحامض النووى وبمجرد تكوين العمود الفقري من السكر والفوسفات فإن موضع القواعد البيورينية والبيريميدينة في حمض نووي ما يكون ثابتاً تماماً .
- فتكون كل قاعدة مرصوصة فوق التالية ، والمسافة بين القاعدة وجارتها ٣.٤ أنجستروم وتصبح ذرة الكربون ١ في السكر مرتبطة بذرة النتروجين في الموقع ١ بالبيريميدين أو بذرة النيتروجين فى الموقع ٩ للبيورين.

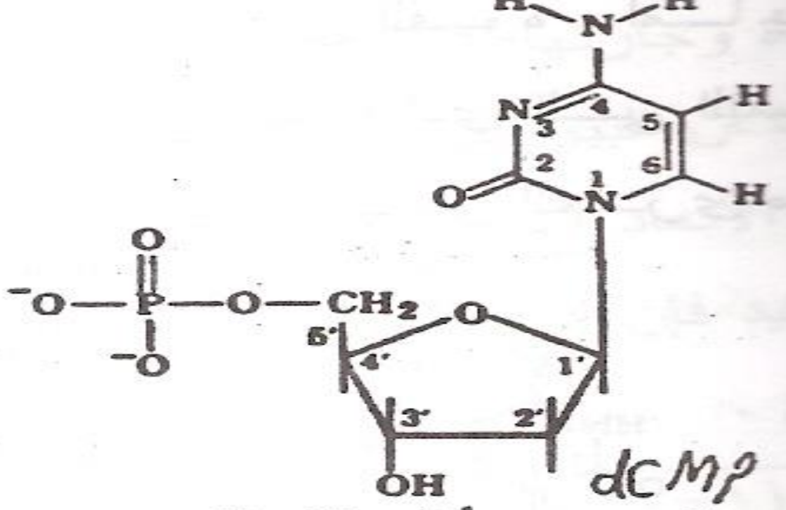
وحدات الطول

الطول	الوحدة	القيمة
١	انجستروم (A)	= ١٠$^{-٨}$ سم تقريباً قطر نواة ذرة هيدروجين
١	نانوميتر (nm)	= ١٠ أنجستروم
١	ميكرون (μ)	= ١٠٠ نانوميتر
١	ملليمتر (mm)	= ١٠٠٠ ميكرون
١	متر (m)	= ١٠٠٠ ملليمتر

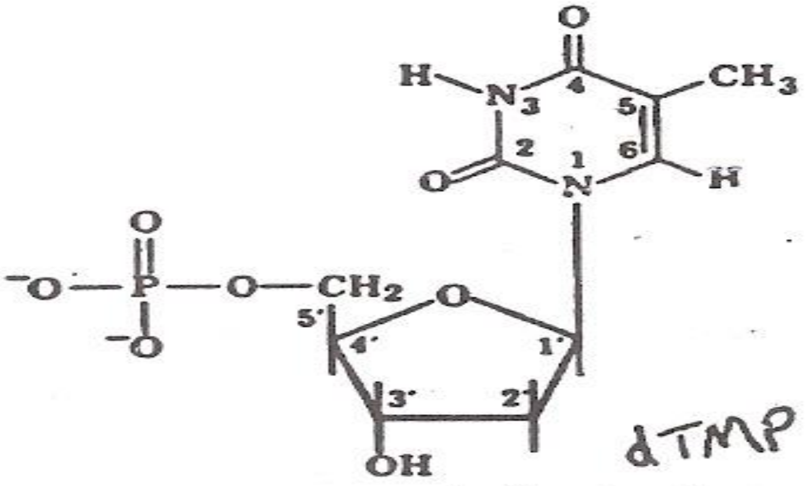
Names of Nucleosides and Nucleotides

Base	Nucleosides	Nucleotides
RNA		
Adenine (A)	Adenosine (A)	Adenosine 5'-monophosphate (AMP)
Guanine (G)	Guanosine (G)	Guanosine 5'-monophosphate (GMP)
Cytosine (C)	Cytidine (C)	Cytidine 5'-monophosphate (CMP)
Uracil (U)	Uridine (U)	Uridine 5'-monophosphate (UMP)
DNA		
Adenine (A)	Deoxyadenosine (A)	Deoxyadenosine 5'-monophosphate (dAMP)
Guanine (G)	Deoxyguanosine (G)	Deoxyguanosine 5'-monophosphate (dGMP)
Cytosine (C)	Deoxycytidine (C)	Deoxycytidine 5'-monophosphate (dCMP)
Thymine (T)	Deoxythymidine (T)	Deoxythymidine 5'-monophosphate (dTMP)

نيوكليوتيدات بيروميدينية

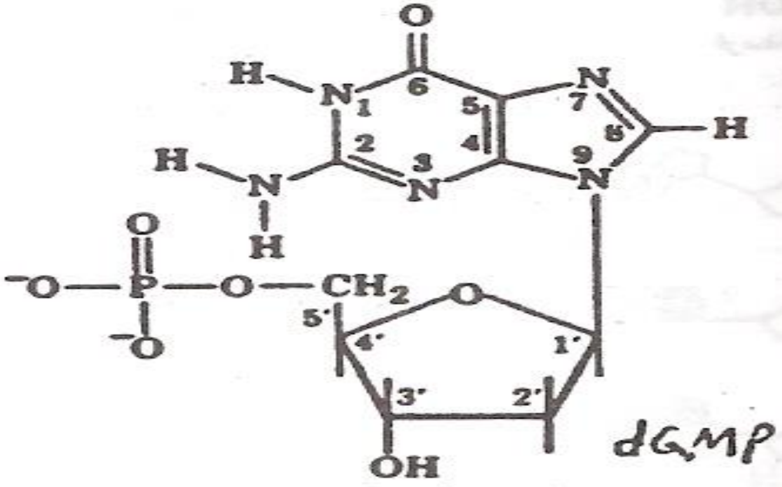


ديوكسى سيتيدين أحادى الفوسفات

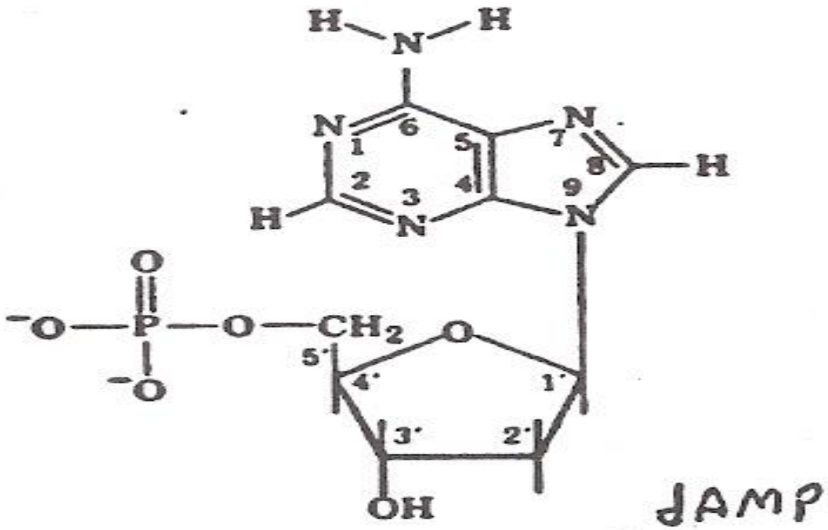


ديوكسى ثيميدين أحادى الفوسفات

نيوكليوتيدات بيورينية



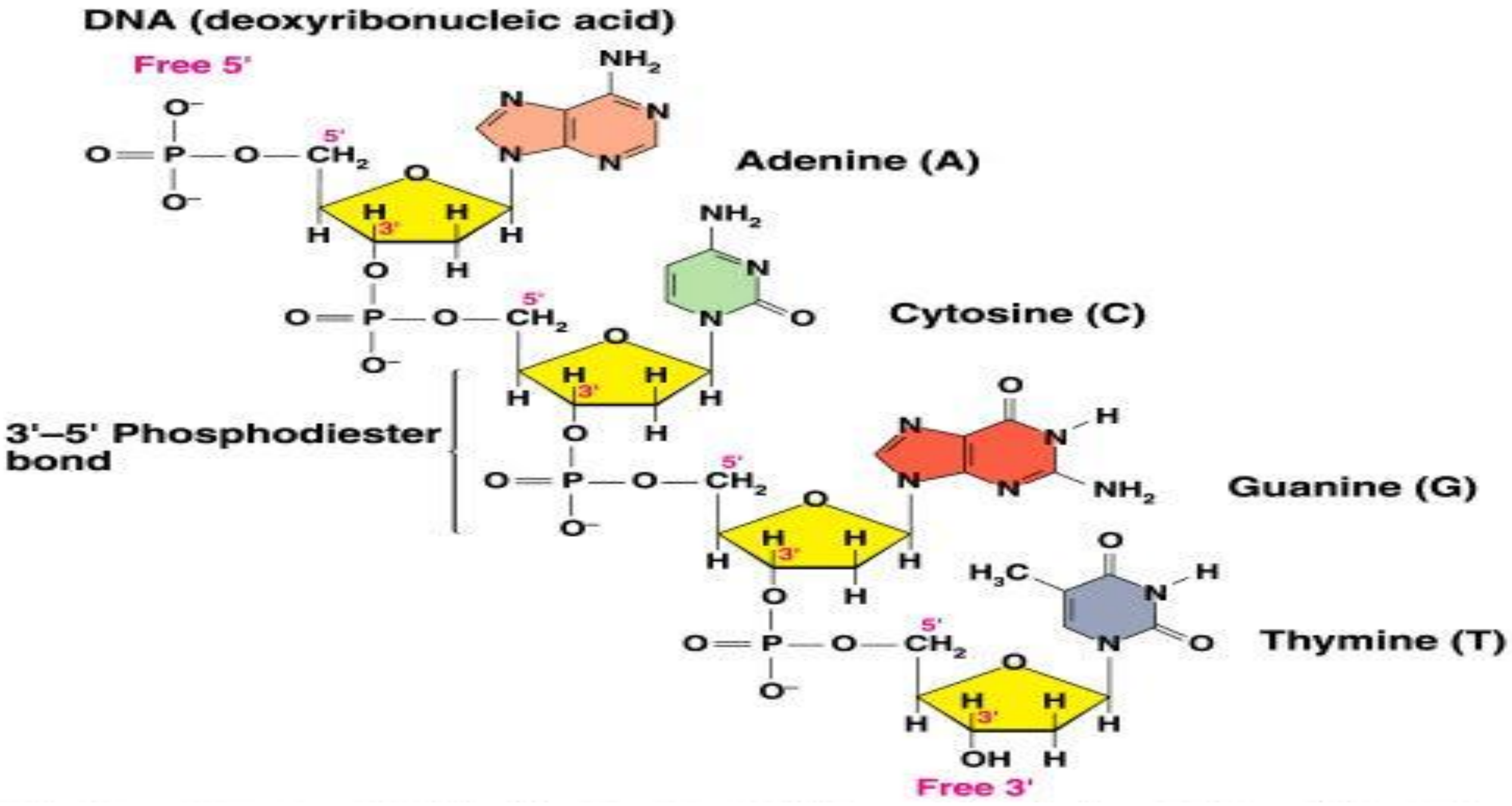
ديوكسى جوانيسين أحادى الفوسفات



ديوكسى أدينوسين أحادى الفوسفات

Example of DNA Primary Structure

- In DNA, A, C, G, and T are linked by 3’-5’ ester bonds between deoxyribose and phosphate



Secondary Structure: DNA Double Helix

- In DNA there are two strands of nucleotides that wind together in a **double helix**

- the strands run in opposite directions

- the bases are arranged in step-like pairs

- the **base pairs** are held together by hydrogen bonding

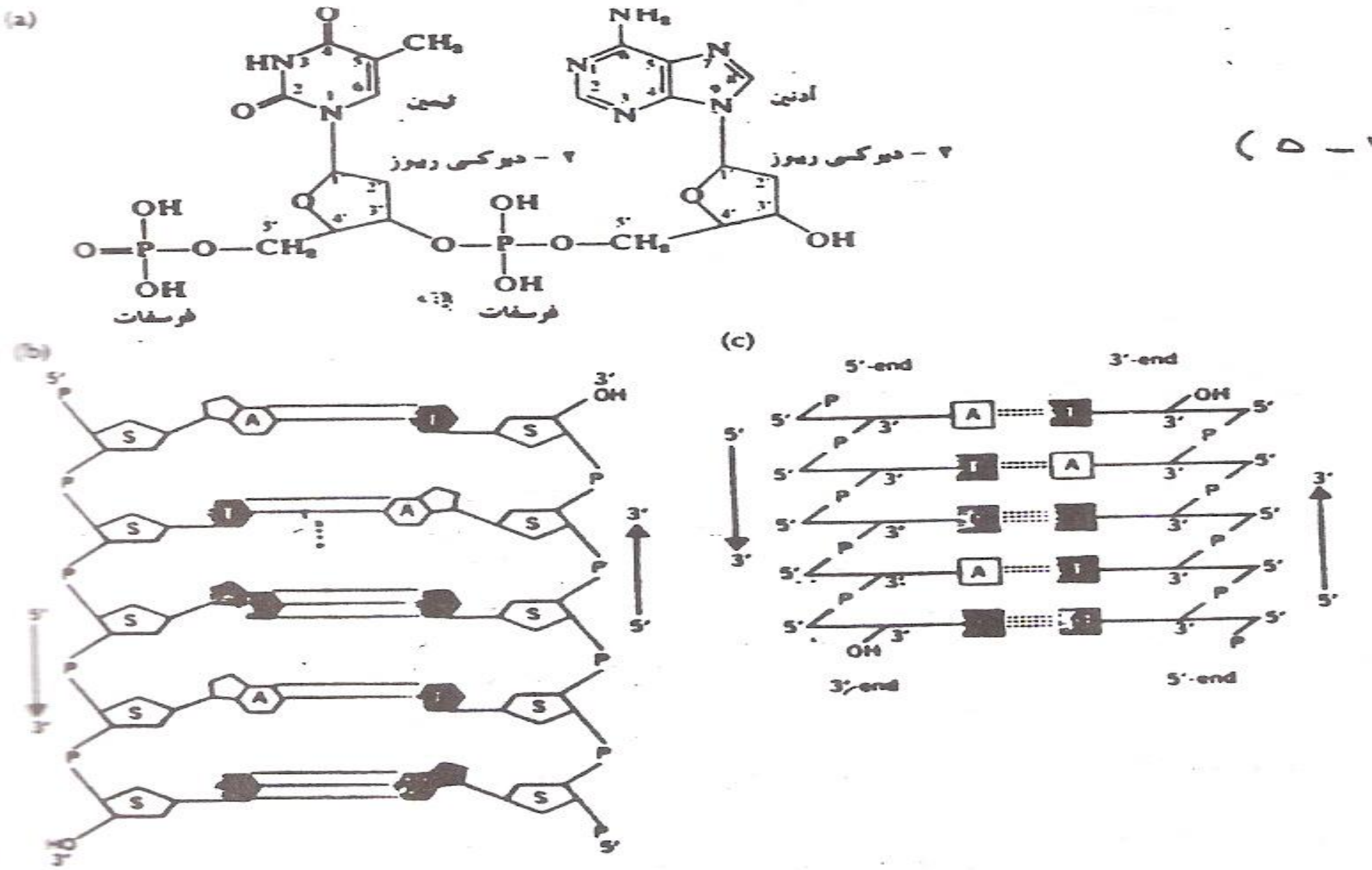
- The pairing of the bases from the two strands is very specific

- The **complimentary base pairs** are **A-T** and **G-C**

- two hydrogen bonds form between A and T

- three hydrogen bonds form between G and C

- Each pair consists of a purine and a pyrimidine, so they are the same width, keeping the two strands at equal distances from each other



التركيب الجزيئى للـ **DNA** يوضح التركيب الاساسى للاعمدة الفقارية التى تتكون من السكر والفسفور فى السلسلة وطبيعتها ذات الاتجاة المضاد

الحلزون المزدوج
The Double Helix

- أقترح واطسون وكريك في عام ١٩٥٣ أن الـ DNA يوجد أغلبه في صورة حلزون مزدوج مكون من سلسلتين ونالا على ذلك جائزة نوبل عام ١٩٦٢م.
- استند هذان العالمان على دليلين علميين مكناهما من استنباط التركيب الحلزوني المزدوج للـ DNA هما:

١٠- معرفتهما لقواعد شارجاف لإزدواج القواعد.

٢٠- تحليلهما لصور أخذت لبلورات جزيء DNA بواسطة أشعة إكس X-rays من قبل ولكنز وفرانكلين Wilkins and franklin

Charagaffs rules قواعد شاراجاف

- ١- ترتبط دائماً قواعد الأدنين (A) مع قواعد الثايمين (T) برابطتين هيدروجينيتين (A = T).
- ٢- ترتبط قواعد السيتوسين (C) مع قواعد الجوانين (G) بثلاث روابط هيدروجينية (G ≡ C).
- ٣- أن كمية الأدنين تساوي كمية الثايمين(A = T)
- وكمية الجوانين تساوي كمية السيتوسين(G = C)

- ٤- أن كمية الأدنين والجوانين تساوي كمية الثايمين والسيتوسين ($A + G = T + C$)
- أو $(A + G / T + C = 1)$.
- كما أنه ليس شرطاً أن كمية الأدنين والثايمين تساوي كمية السيتوسن والجوانين وإنما تختلف باختلاف النوع.

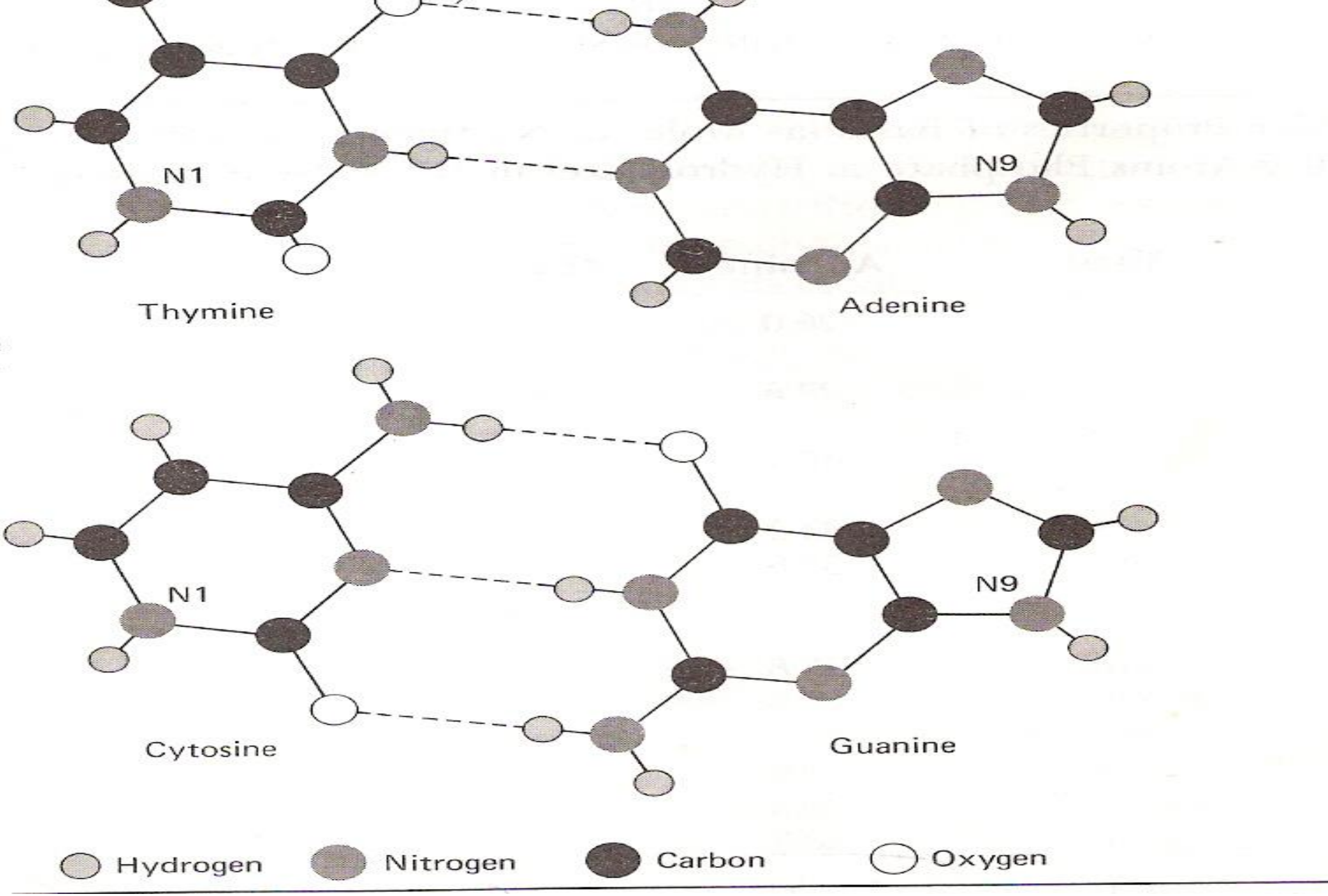
- تتصف هيئة الحلزون المزدوج نوع (B) بمقاييس ثابتة على النحو الأتي:-

–انه يميني الدوران ويمتاز بمرور محور عمودي من خلاله.

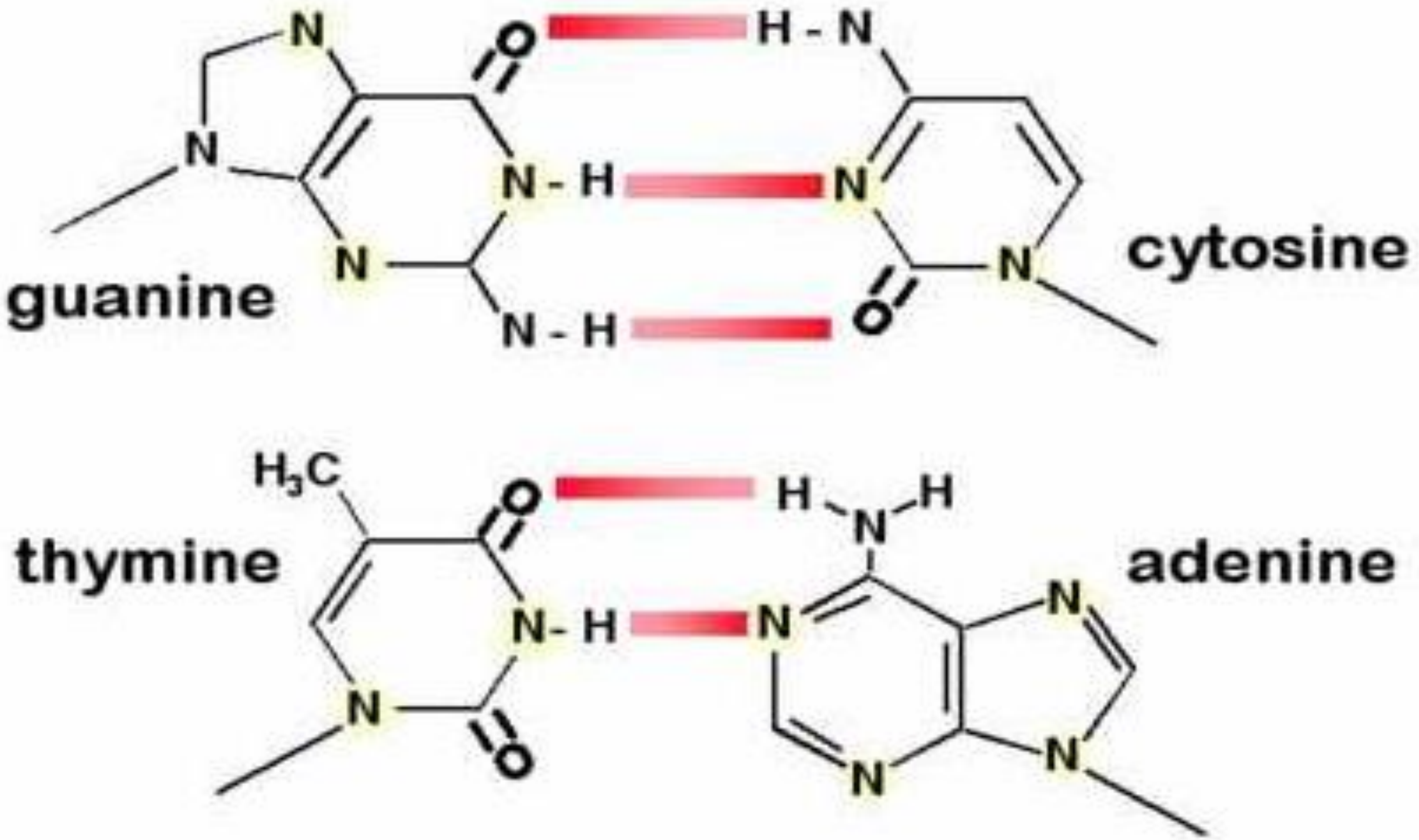
–عدد النيوكليوتيدات في الدورة الواحدة = ١٠

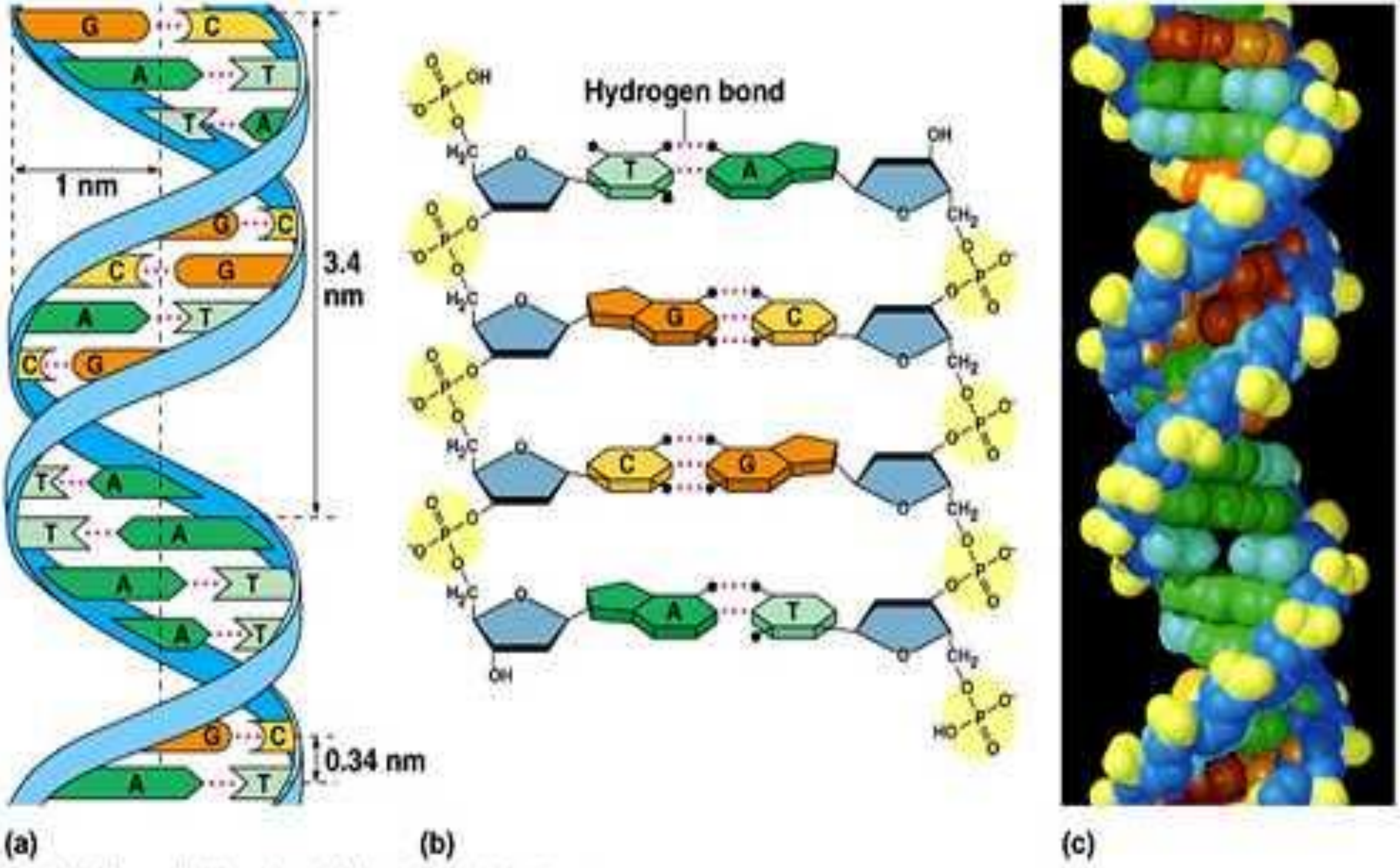
–المسافة بين قاعدة والقاعدة التي تليها في اللفة الواحدة = A° ٣.٤ وعليه فان طول اللفة الواحدة يكون: ٣٤A°

–يبلغ قطر الـ DNA = A° ٢٠



الروابط الهيدروجينية ما بين القواعد


N
O
H - N
N
N - H
N
N
guanine
N - H
cytosine
N
O
H₃C
O
H
N
H
thymine
adenine
N
N - H
N
N
N
O
N



Copyright © Pearson Education, Inc., publishing as Benjamin Cummings.

شكل يوضح وصف واطسون وكريك للحلزون المزدوج

- خيطى DND يكونان متوازيتان ومتضادان أى أن إرتباط الفوسفات مع السكر يكون فى الإتجاه (3→5) فى أحد الخيطين وفى الإتجاه المعاكس (5→3) فى الخيط الآخر
- وإذا أمكن معرفة التتابع النيوكليوتيدي في أحدهما عرف التتابع النيوكليوتيدي في الخيط الثاني وذلك بسبب خاصية تزاوج القواعد النيتروجينية لهذا يقال أن خيطي DNA مكملان لبعضهما Complementry

- يلتف كذلك الخيطان (الشريطان) التفافا حلزونياً يمينياً (باتجاه عقارب الساعة) حول محور مركزي وهمي ليكونا ما يعرف DNA الحلزوني المزدوج DNA double helix حيث يشكل السكر والفوسفات السلم بينما تشكل القواعد درجات السلم

- يقاس طول جزيء DNA بالعدد الزوجي للقواعد النيتروجينية Base pair (bp) ،
- كما تعتبر ١٠٠٠ قاعدة زوجية (1000 bp) مساوي لواحد كيلو قاعدة Kilobase (Kb)
- اما ١.٠٠٠.٠٠٠ قاعدة زوجية فتساوي واحد ميجا قاعدة Megabase (Mb)،
- ولقد قدر طول DNA في نواة خلية الحيوان المنوي للإنسان والتي تحتوي على 1nm بـ ٣٠٠٠ ميجا قاعدة أي 3000 Mb أو ٣× ١٠ ^٩^ قاعدة زوجية أي 3×10^9 bp

ثانياً:- الحمض النووي الريبوزي RNA

Ribonucleic acid (RNA)

- يتم نسخ جزيء RNA من جزيء DNA من خلال عملية حيوية مهمة تعرف بعملية النسخ Transcription.
- لذا فإن جزئ RNA يشبه إلى حد كبير جزئ DNA الذي نسخ منه فهو جزئ عديد النيوكليوتيدات Polynucleotides إلا أن هناك بعض الفروق الرئيسية بينهما

- يوجد ثلاثة أنواع مختلفة من جزيئات RNA وهي:
- ١- RNA الرسول (m RNA) Messenger أو حامل الشفرة الوراثية.
- يعتبر هذا الجزئ أطول أنواع RNA ويتكون من عدد كبير من النيوكليوتيدات ويحمل معلومات كاملة عن طبيعة البروتين المراد تكوينه.
- يوجد في داخل النواة ويقدر طوله بحوالي ٨٠٠٠ إلى ٥٠٠٠٠ نيوكليوتيدة عند مرحلة تكوينه الأولى. وقبل خروجه من النواة إلى السيتوبلازم على شكل mRNA ناضج تتم معالجته وتحويره .

- ٢- RNA الريبوسومي Ribosomal RNA (rRNA)
- يعتبر rRNA من الجزيئات القصيرة المتخصصة ، يساهم في ربط الأحماض الأمينية أثناء عملية بناء البروتين Protein synthesis.
- تنسخ جزيئات rRNA من تتابعات نيوكليوتيدية متكررة ومتعاقبة تتراوح أطوالها بين ٨٠٠٠ إلى ١٣٠٠٠ نيوكليوتيدة توجد على شريط DNA في المناطق المعروفة باسم المناطق المنظمة للنوية Nucleolus organizer (NORs) regions

- ٣- RNA الناقل (tRNA) Transfer RNA

- RNA الناقل tRNA عبارة عن جزئ قصير يقدر طوله بحوالي ٧٣ إلى ٩٣ نيوكليوتيدة وهو جزئ متخصص جداً ويملك موقعين أحدهما للتعرف والإرتباط مع حمض أميني واحد ومحدد والموقع الآخر للتعرف والإرتباط مع الشفرة الوراثية على mRNA.

Cellular “total” RNA

- **Messenger RNA (mRNA): 1-5%**

Serves as a template for protein synthesis

- **Ribosomal RNA (rRNA): >80%**

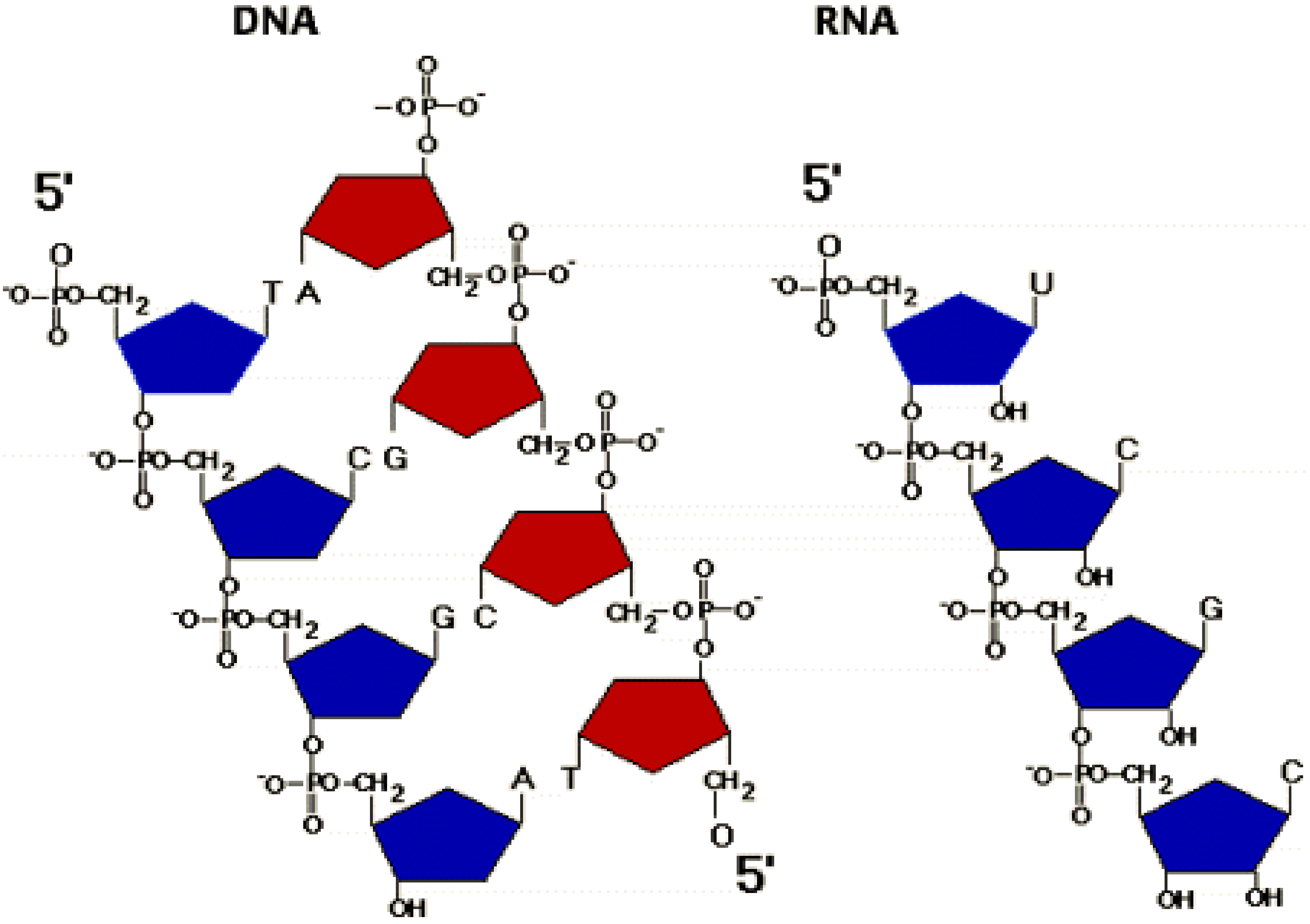
Structural component of ribosomes

- **Transfer RNA (tRNA): 10-15%**

Translates mRNA information into the appropriate
amino acid

مقارنة بين الحمضين النوويين DNA , RNA

DNA	RNA
يتكون من شريط حلزوني مزدوج	يتكون من شريط حلزوني مفرد
يحتوي على القواعد النيتروجينية A, T, G, C	يحتوي على القواعد النيتروجينية A, U, G, C
يحتوي على سكر خماسي ريبوزي منزوع الأكسجين	يحتوي على سكر خماسي ريبوزي
يحمل الجينات فى جميع الكائنات الحية وبعض الفيروسات	يحمل الجينات في بعض الفيروسات فقط
يوجد في النواة	يوجد في النواة والسيتوبلازم
طويل جداً مقارنة بـ RNA	قصير جداً مقارنة بـ DNA


DNA
RNA
5'
T A
C G
G C
A T
5'
5'
U
C
G
C
OH

- أذكرالخصائص المطلوبة للمادة الوراثية؟
- تجارب التحول الوراثى أثبتت أن الـ DNA هو المادة الوراثية. وضح ذلك؟
- كيف أمكن اثبات أن الـ DNA هو المادة الوراثية في الفيروسات؟
- ما المقصود بقاعدة شارجاف؟
- قارن بين كلا من:

Nucleoside and Nucleotide

DNA and RNA

- وحدة بناء الـ DNA هى ....
- العمود الفقرى لل DNA .... & .... بينما تمثل .... درجات السلم من الداخل
- عند تكوين النيكلوتيدة ترتبط ذرة الكربون رقم ..... في السكر بذرة النتروجين في الموقع .... بالبيريميدين أو بذرة النيتروجين في الموقع .... للبيورين بينما ترتبط ذرة الكربون رقم ..... بمجموعة الفوسفات
- عند تكوين الجزئ المتبلمر فان مجموعة الفوسفات التي ترتبط بذرة الكربون رقم .... من سكر البنتوز في نيوكلوتيدة ما ترتبط كيميائياً بذرة الكربون رقم ...... من السكر الموجود في نيوكلوتيده أخرى
- خيط الحلزون المزدوج من الـ DNA يلتف لفة كاملة كل ...... قواعد اى كل ...... أنجستروم .

انتظام وتشكل الـ DNA في الكروموسومات

The organization of DNA in chromosomes

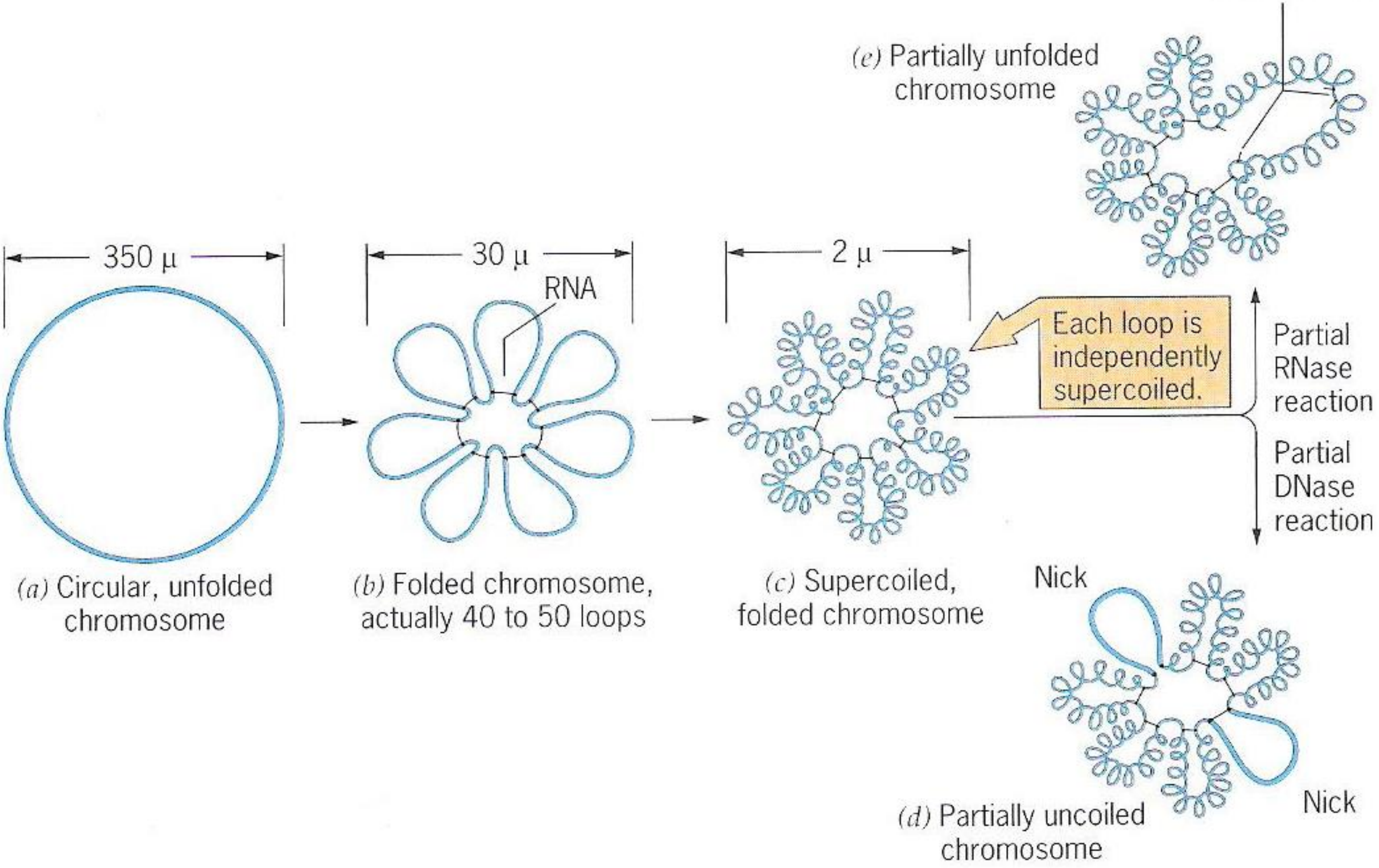
أولاً : تركيب نيكلويد الكائنات أولية النواة

Prokaryote nucleoid structure

الكائنات أولية النواة أحادية المجموعة الكروموسومية وهي تحتوي فقط على مجموعة واحدة من الجينات (نسخة واحدة من الجينوم) .

الكرموسومات البكتيرية الفعالة أو النيكلويد تسميتها بالنيكلويد أفضل من النواة حيث أنها غير محاطة بغشاء نووي

- وكمثال للكائنات بدائية النواة فإن بكتريا الـ *E.coli* يبلغ طول محيط جزىء الـ DNA الحلقي فيها حوالي ١١٠٠ ميكرون هذا الطول يشتمل على bp ٤.١×١٠^{٦}.
- وحيث أن خلية الـ *E.coli* يبلغ طولها حوالي ١ ميكرون وعرضها حوالي ٠.٥ ميكرون فإنه من الواضح أن الكرموسوم لا بد أن يوجد في شكل شديد التحلزن داخال الخلية .



مراحل تكون الشكل النهائي للنيوكلويد وتركيبه في حالة التفكك والتحلزن الفائق .

- الإنزيمات المسئولة عن الحلزنة الفائقة السابقة تسمى أنزيمات (Topoisomerases)
- ومنها Topoisomerase II المسئول عن تكوين الحلزنة الفائقة ويسمى أيضاً (DNA gyrase) ومسئول عنه جينين هما Gyr A , Gyr B
- بينما أنزيم Topoisomerase I مسئول عن الاسترخاء أو فك الحلزنة ومسئول عن تكوينه جين (Top A).

- الكروموسوم مقسم إلى ٧ عروات بواسطة روابط من RNA (الرسم السابق)
- في الحقيقة يوجد من ٤٠ - ٥٠ عروة لكل كروموسوم في الحالة الحية ، أوضحنا ٧ فقط للتبسيط .
- كل عروة مستقلة في الحلزنة الفائقة وإستحداث قطع في خيط مفرد بمعاملة الجينومات المنثنية بأنزيم الأندونيوكليز يحدث فك للحلزنة في العروات التي حدث بها قطع فقط بينما تبقى العروات الأخرى فائقة التحلزن .

- ٤- يؤدي أنزيم RNase إلى فك الأنثاء في الجينوم جزئياً مع أن هذا الأنزيم لا يؤثر على الحلزنة الفائقة.
- عند عزله بصورة غير منثنية (غير فائق التحلزن) يكون عبارة عن جزىء حلقى مقفل من الـ DNA.
- ٥- وهذا الكروموسوم البكتيري يحتوي على معظم الـ DNA.

- بالإضافة الى النيوكلويد يوجد بالخلية البكتيرية كروموسومات صغيرة الحجم، تحتوى الخلية البكتيرية على واحد أو أكثر منها وتعرف بالبلازميد **Plasmid**
- وهو يحتوى على ٠.٢ إلى ٠.٥% من حجم الـ DNA بالخلية البكتيرية
وهو كروموسوم حلقي الشكل أيضاً ولعب دوراً هاماً في تقدم الهندسة الوراثية وتم إستخدامه كناقل للجينات (Gene vector)

ثانياً : تركيب كرموسوم الكائنات حقيقة النواة

Eukaryote chromosome structure

- على العكس من الكائنات الأولية فإن معظم الحيوانات الراقية وكثير من النباتات الراقية تكون ثنائية المجموعة حيث تملك مجموعتين كاملتين من الجينات ، واحدة من كل من الأبوين
- كثير من النباتات الراقية متعددة المجموعة أي تحمل عدة نسخ للجينوم.

- إن الكائنات حقيقية النواة لا تحتوي فقط على كميات من DNA أكبر بكثير مما في الكائنات أولية النواة ولكنها تتميز أيضاً بأن هذا DNA يتجمع في عدة كروموسومات وأن كل كروموسوم يتواجد في نسختين (ثنائي المجموعة) أو أكثر (عديد المجموعة)
- فنجد مثلاً أن طول محيط الهيئة الكروموسومية الاحادية أو الجينيوم في الإنسان يصل إلى حوالي ١٠٠٠ مم من الـ DNA (أو حوالي ٢٠٠٠ مم لكل خلية ثنائية المجموعة الكروموسومية) يوزع هذا المتر الطولي للـ DNA بالطبع بين ٢٣ كروموسوم مختلفين في الحجم والشكل . ويحتوي كل كروموسوم على ١٥-٨٥ مم من الـ DNA

التركيب الجزيئي لكروموسومات الكائنات حقيقية النواة .

- أوضح التحليل الكيماوي للكروماتين المعزول أنه يشتمل أساسا على DNA وبروتينات وكمية ضئيلة من الـ RNA .

- **Chromatin:** is the combination of DNA and proteins that make up the contents of the nucleus of a cell.

- تنقسم البروتينات إلى نوعين رئيسين:
- (١) بروتينات قاعدية (تحمل شحنه موجبة عند pH المتعادل) وتسمى بالبروتينات الهستونية أوالهستونات
- (٢) مجموعة غير متجانسة من البروتينات غالباً حامضية (محملة بشحنة سالبة ويطلق عليها البروتينات غير الهستونية) .

- تشمل الهستونات في جميع النباتات الراقية والحيوانات خمسة أنواع بروتينية رئيسية ويطلق على هذه الأنواع الهستونية الخمسة الرئيسية على التوالي H1, H2A, H2B, H3 and H4
- وهي توجد في جميع طرز الخلايا (فيما عدا بعض الحيوانات المنوية حيث تستبدل بأنواع أخرى من البروتينات القاعدية الصغيرة تعرف بالبروتامينات .

- تتشابه بدرجة كبيرة جداً أربعه هستونات من الخمسة في كل الكائنات حقيقية النواة (H2A, H2B , H3 and H4) هذا الثبات الكبير للهستونات H4, H3, H2b, H2a في جميع طرز خلايا الكائن الواحد وحتى بين الأنواع المتباعدة يتمشى مع الاعتقاد السائد بأهمية الهستونات :-

- ١- في تركيب الكروماتين (تجميع الـ DNA) حيث أن لها الدور الرئيسي في إنتظام تركيب الـ DNA في كروموسومات الكائنات الراقية.
- ٢- وأنها مشتركة لاتخصيصاً في تنظيم تعبير الجين

- تكون الهستونات الخمسة (H1, 2H2A, 2H2B, 2H3 and 2H4) تركيب معقد مع الـ DNA مما يؤدي إلى إنتاج الوحدات التركيبية الأساسية للكروماتين .
- التى تظهر في صورة "حبيبات" بيضاوية تعرف بالنيوكليوسومات nucleosomes

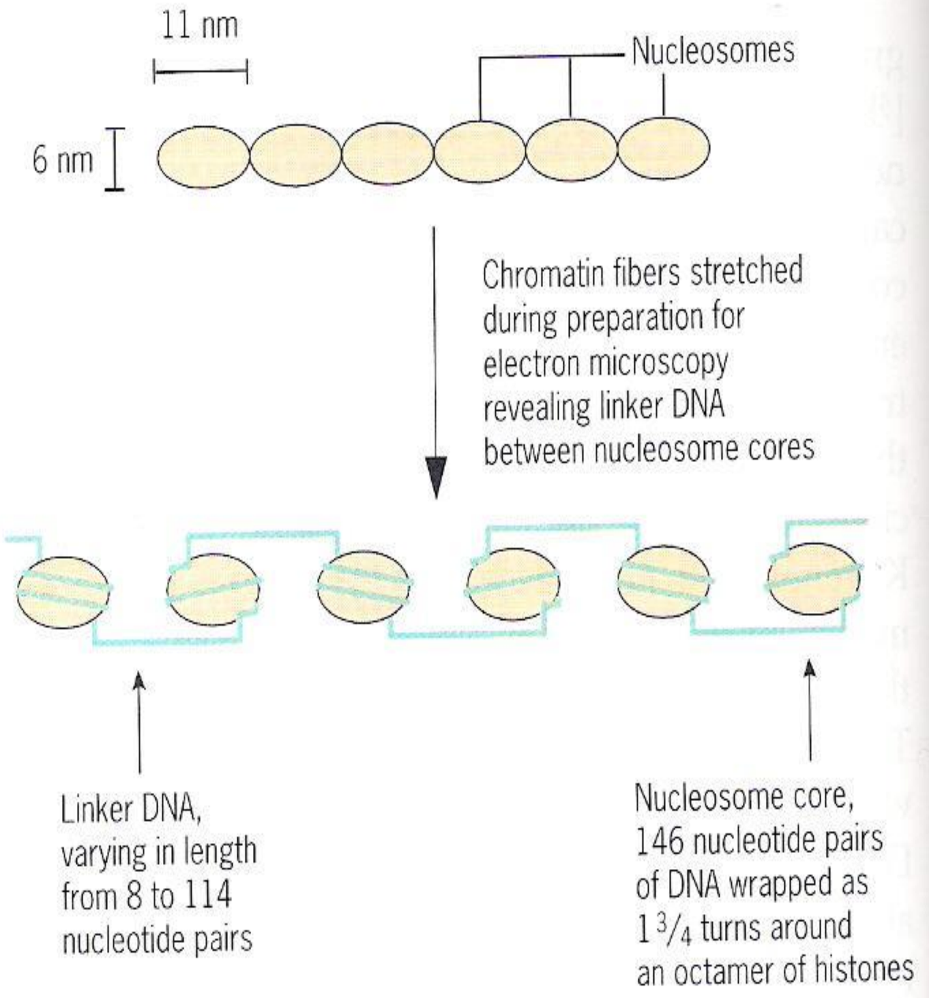
- ومن جهة أخرى نجد أن الجزء الغير الهستوني في الكروماتين يتكون من عدد كبير من البروتينات غير المتجانسة.
- بالإضافة إلى ذلك يختلف تكوين وتركيب جزئيات البروتينات غير الهستونية الكروموسومية إختلافاً كبيراً بين الطرز المختلفة لخلايا نفس الكائن .
- لذلك فإن هناك إحتمال كبير في قيام البروتينات غير الهستونية بدور في تنظيم تعبير جينات معنية أو مجموعة معينة من الجينات .

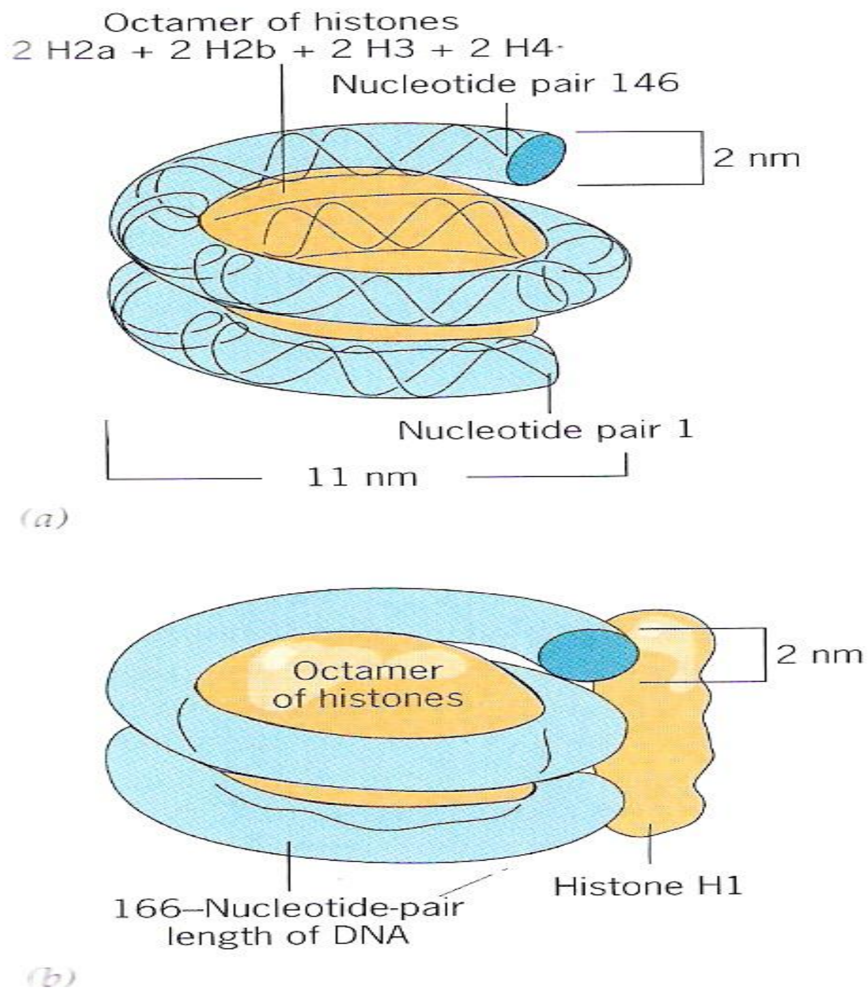
تركيب النيوكلوسوم Nucleosome structure

- عند عزل الكروماتين وفحصه بالميكروسكوب الإليكتروني وجد أنه يتكون من سلسلة من الحبيبات البيضاوية (قطرها حوالي ١١٠ أنجستروم ، وارتفاعها ٦٠ انجستروم) متصلة بواسطة خيوط رفيعة، تعرف هذه الحبيبات بالنيوكلوسوم.

- كل نيوكلوسوم يتكون من:
- ١- لب النيوكلوسوم ويحتوى على ١٤٦ زوج من النيوكليوتيدات و ٢ جزئ من كل نوع من الهستونات H2A , H2B , H3 and H4 هذا، التركيب ثابت لا يتغير فى كل الكائنات مميزة النواة وهو مقاوم لأنزيمات النيوكليز.
- ٢- يتصل لب النيوكلوسوم بالآخر بأجزاء من DNA طولها يتراوح بين ٨- ١١٤ زوج من النيوكليوتيدات حساسة للنيوكليز تسمى DNA الرابط وهى تختلف فى الحجم من نوع الى آخر ومن طراز خلوى الى آخر .

- ٣- يرتبط جزىء واحد من الهستون H1 بطريقة ما بالنيوكلوسوم أو الرابط
- وعلى ذلك فالوحدات الكاملة المتكررة تتكون من حوالي ٢٠٠ زوج نيكلوتيدي من الـ DNA و ٩ جزيئات هستونية في الحالة الحية .





تركيب النيوكلوسوم

- أذكر ما تعرفه عن:

Nucleosome & Topoisomerases & Plasmid

- قارن بين البروتينات الهستونية & البروتينات غيرالهستونية

- .... هو الانزيم المسئول عن تكوين الحلزنة الفائقة ويسمى أيضاً (DNA gyrase) بينما أنزيم .... مسئول عن فك الحلزنة .
- أوضح التحليل الكيماوي للكروماتين المعزول انه يشتمل أساسا على .... & .... وكمية ضئيلة من ....
- الوحدات التركيبية الأساسية للكروماتين تعرف باسم ....

تضاعف DNA

DNA Replication

يتضاعف DNA تضاعفاً ذاتياً لنقل المعلومات الوراثية من خلية الى أخرى و من الآباء إلى الأبناء وتكون هذه العملية دقيقة للمحافظة على الثبات الوراثى.

- إن جزيء DNA يتضاعف في فترة محددة من الطور البيني Interphase وهى مرحلة S-phase من دورة الخلية Cell cycle.
- والغرض هو المحافظة على المحتوى الوراثي للخلايا بعد كل عملية انقسام خلوي.
- يبدأ تضاعف DNA في الخلايا بدائية النواة كالبكتيريا من موقع واحد Single site.

- بينما في الخلايا حقيقية النواة يبدأ من عدة مواقع Multiple sites والتي قد تصل إلى ٣٠.٠٠٠ موقع ويطلق على مثل تلك المواقع بنقاط التضاعف Replication points أو مواقع البدء Initiation sites.

- تتم عملية تضاعف DNA بدرجة عالية من الدقة ولتبسيط وفهم هذه العملية لابد من معرفة بعض السمات الهامة الخاصة بها

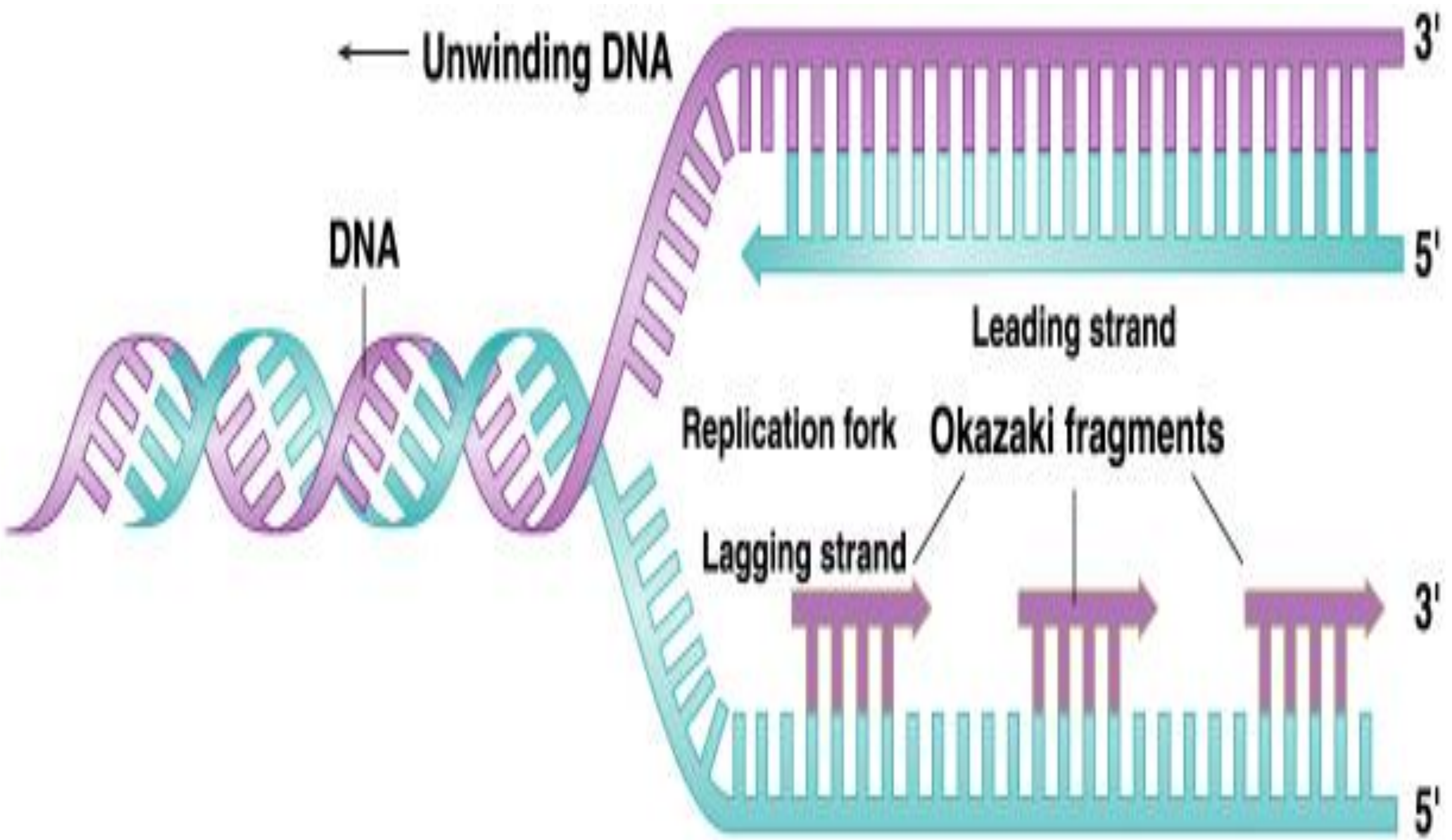
ومن أهمها:

- ١- أن تزواج القواعد النيتروجينية يكون دائماً متكاملاً Complementary وحسب قواعد شارجاف.

- ٢- أن خيطى DNA متوازيان ومتعاكسان ولذا يتم التكرار في اتجاهين متعاكسين Bi-directional replication.
- ٣- تحتاج عملية تضاعف DNA إلى قالب Template يتم عليه بناء الخيط الجديد.
- ٤- تتم عملية التضاعف بالطريقة شبه المحافظة Semiconservative.
- ٥- تتم جميع التفاعلات تحت سيطرة إنزيمات البلمرة Polymerases

- ٦- من الضروري كذلك تكون RNA البادئ (RNA primer) الذى يوفر مجموعة الهيدروكسيل (3`-OH) اللازمة لإضافة النيوكليوتيدات الجديدة.
- ٧- لأن إنزيم بلمرة DNA لا يستطيع أن يبدأ تصنيع سلسة DNA جديدة ولكنه يضيف نيوكليوتيدات إلى نهاية سلسة موجودة سابقا.

- ٨- يتم بناء أحد الخيطين بشكل مستمر ويسمى الخيط القائد Leading strand، بينما يبنى الخيط الآخر بشكل غير مستمر أو متقطع ويسمى الخيط المتلكأ lagging strand.
- ٩- يلزم بادئ واحد فقط لإنزيم بلمرةDNA ليبدأ تصنيع السلسلة القائدة أما في السلسلة المتقطعة فيجب البدء في كل قطعة بـ RNA بادئ جديد.


Unwinding DNA
DNA
3'
5'
Leading strand
Replication fork
Okazaki fragments
Lagging strand
3'
5'

تضاعف الـ DNA في البكتريا

- دورة خلية البكتريا
- تتكون دورة خلية *E.coli* عند معدلات النمو البطيئة (أكثر من ٦٠ دقيقة للجيل الواحد) من ثلاث مراحل :
- التحضير لبدء تضاعف الـ DNA
- تضاعف الـ DNA
- مرحلة تقع بين نهاية تضاعف الـ DNA وانقسام الخلية .
- أما عند معدلات النمو السريعة (١٨-٢٠ دقيقة) ، فقد تبدأ جولة ثانية من تضاعف الـ DNA قبل الانتهاء من الجولة الأولى .

- لذا فإن المراحل الثلاث تصبح غير واضحة المعالم ، ويمكن أن يقال أن تخليق الـ **DNA** مستمر .
- الكيفية التي ينعزل بها الكروموسوم أثناء انقسام البكتريا غير معروفة .
- ولما كان انقسام الخلية يصحبة نمو داخلى من جدار البكتريا يسمى الميزوسوم **Mesosome** فإن أبسط نموذج لإنعزال كروموسوم البكتيريا يشير إلى أن الكروموسوم يتصل بالجدار في بداية التناسخ عن طريق نقطة الاتصال **Attachment point**

- ثم يتم تخليق نقطه اتصال شقيقة أخرى أثناء عملية التضاعف .

يستمر نمو الميزوسوم تجاه الداخل حتى يفصل بين نقطتي الاتصال هذه لتنعزل الكروموسومات الشقيقة إلى خلايا شقيقة.

يعزز هذا النموذج تقارير تبين أن DNA لبكتريا *E.coli* يرتبط بالفعل بنوعية خاصة من بروتينات الجدار عند تضاعفة.

تضاعف DNA شبه المحافظ
Semiconservative DNA replication

- اقترح واطسون وكريك أنه عند إعادة إنتاج اللولب المزدوج فإن كل جزيء من DNA يتكون من سلسلة قديمة من الجزيء الأصلي وسلسلة جديدة. وهذا النموذج **هو شبه محافظ Semiconservative model**. وقد أثبت هذا النموذج العالمان ميسلسون Messelson و ستال Stahl

تجربة ميسلسون وستال Messelson and Stahl Experiment

- في عام ١٩٥٨ عزز Meselson and stahl بالتجربة نموذج واطسون و كريك لتضاعف DNA
- وقد إستغلا حقيقة أنه إذا نميت خلايا بكتيرية في بيئة تحتوي على النظير الثقيل للنيتروجين فإن DNA الخلايا سيصبح أثقل من DNA الطبيعي وأن هذا الإختلاف في الكثافة يمكن تمييزه بالطرد المركزي في محلول كلوريد السيزيوم .

- عندما ترك ميسلسون وستال بكتريا *E.coli* لتنمو لعدة أجيال في النظير حصلا على عشيرة من الخلايا جزيئاتها جميعا معلمة بالـ N 15 . وقد إتضح أن الـ DNA من هذه الخلايا يظهر كثافة الترسيب المتوقعة من DNA المعلم بـ N 15 .
- وبعدئذ تم نقل الخلايا لبيئة تحتوي على N14 فقط كمصدر للنتيروجين وقد وجد أنه عقب دورة واحدة من التضاعف أن الـ DNA في الخلايا الشقيقة لا يظهر الكثافة الخاصة بـ N15 الأصلي ولا بـ N14 النقي ولكنه يظهر الكثافة الوسطية للهجين N14 N15 . وهذا بالضبط ما كان متوقع من نموذج التضاعف المقترح من قبل واطسون – كريك .

- وتعتبر تجربة ميسلسون – ستال ذات أهمية خاصة كبرى ، ليس فقط لأنها أكدت الطريقة التي يتناسخ بها الـ DNA ولكن لأنها كذلك استبعدت احتمالات حدوث طرق أخرى .
- على سبيل المثال ، فقد يظن أن التناسخ يتم بالطريقة المحافظة Conservative model، بمعنى أن الجزئ المزدوج الأصلي يعمل كقالب لجزئ مزدوج جديد على أن يبقى كاملا أي أنه سوف نحصل في نهاية الدورة الأولى من التناسخ على جزيئين مزدوجين أحدهما قديم والآخر جديد ولا يمكن في هذه الطريقة أن يتكون جزئ الـ DNA الهجين ، ونتائج التجربة تعارض ذلك .

• كما وأن هذه التجربة تستبعد أيضاً الطريقة التشتتية Dispersive model لتناسخ الـ DNA و التى تقترح أن خيوط الـ DNA الأبوي تتكسر عشوائياً خلال عملية التناسخ بطريقة ما حتى أن جزئيات الـ DNA المزدوجة في الخلايا الجديدة تحتوي على كميات متباينة من كل من الـ DNA الأبوي والجديد . وفي هذه الحالة نتوقع أن نشاهد مجالا واسعاً من كثافات الـ DNA بعد دورة واحدة من التناسخ بدلا من نوعية واحدة من الجزئ.

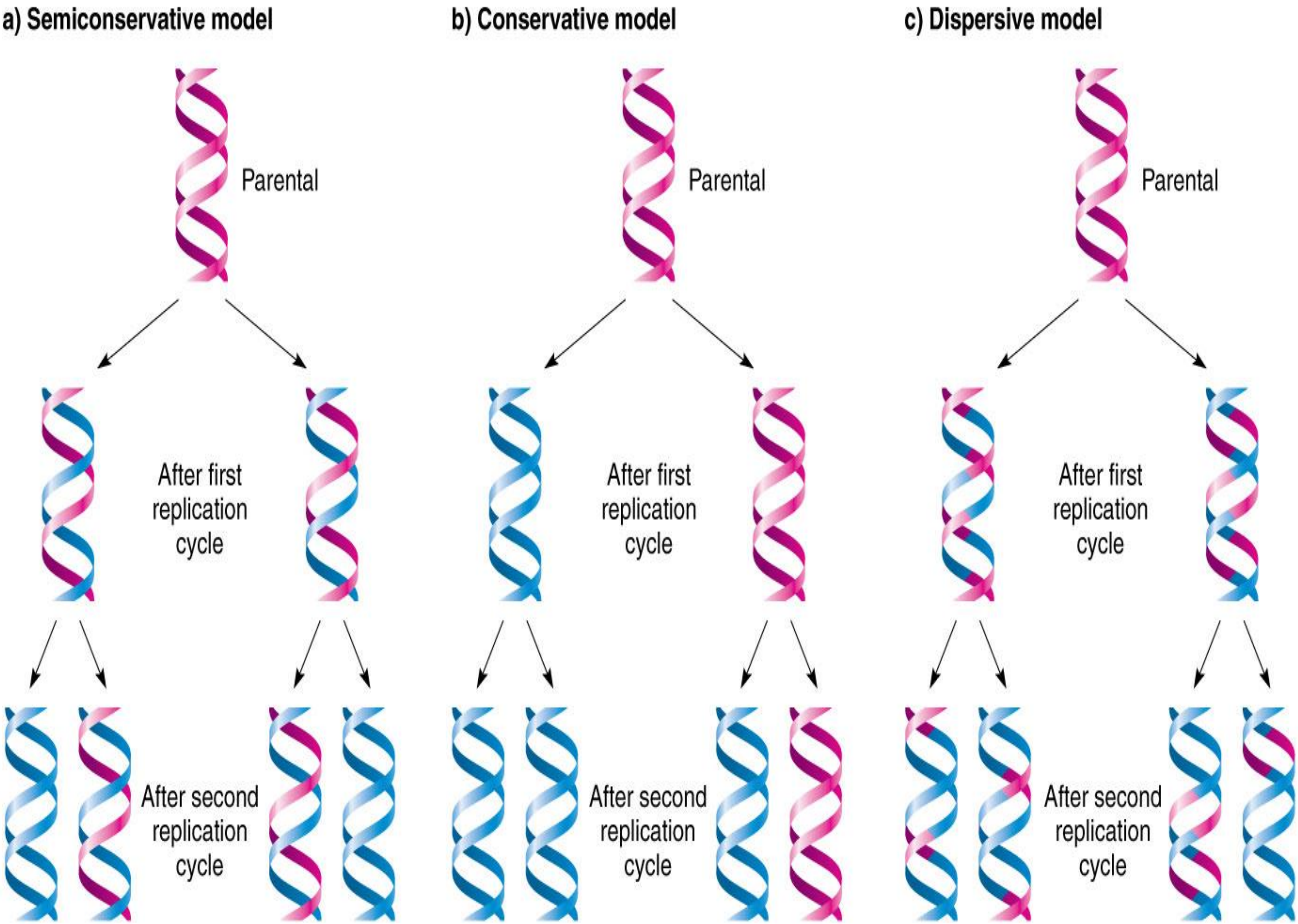
- ويطلق الاصطلاح شبه المحافظة على الطريقة التي يتناسخ بها الـ DNA لتشير إلى أن الخيوط الأبوية للـ DNA يحافظ عليها (بعكس الطريقة التشتتية)

Semiconservative replication describes the mechanism by which DNA is replicated in all known cells. This mechanism of replication was one of three models originally proposed for DNA replication:

Semiconservative replication would produce two copies that each contained one of the original strands and one new strand.

Conservative replication would leave the two original template DNA strands together in a double helix and would produce a copy composed of two new strands containing all of the new DNA base pairs.

Dispersive replication would produce two copies of the DNA, both containing distinct regions of DNA composed of either both original strands or both new strands.



© 2010 Pearson Education, Inc.

Moleculor Details of DNA Replication

- بداية التضاعف **Initiation of DNA Replication**
- يبدأ كروموسوم ***E.coli*** تضاعفة ثنائي الاتجاه دائماً من نفس الموقع الفريد المسمى منشأ التضاعف **Replication origin**
- The origin of replication (also called the **replication origin**) is a particular sequence in a genome at which replication is initiated
- و يسمى **ori** وهو حوالي ٢٤٥ زوج نيوكلوتيدي
- ١- وتبدأ أحداث البداية بارتباط بروتين الابتداء **initiation protein** بمنشأ التضاعف **(ori)** .

• ٢- انفراج الحلزون الأبوي

separating two annealed nucleic acid strands

ويقوم بهذا العمل أنزيم **DNA helicas**

• ٣- بناء البادئ اللازم لعملية التضاعف **(primer)** والذى يتطلب فعل أنزيم **DNA primase** .

• **DNA primase** is an enzyme involved in the replication of DNA. DNA primase is, in fact, a type of RNA polymerase which creates an RNA primer

- ٤- ارتباط أنزيمي **DNA helicase** و **primase** يكونا معا معقد بروتينى يعرف بـ **primosome** حيث يتكون بادئ من **RNA** قصير جدا يوفر نهاية حرة **3`-oH** أي يتم بناءه في الاتجاه ٥ ← ٣ أيضاً .

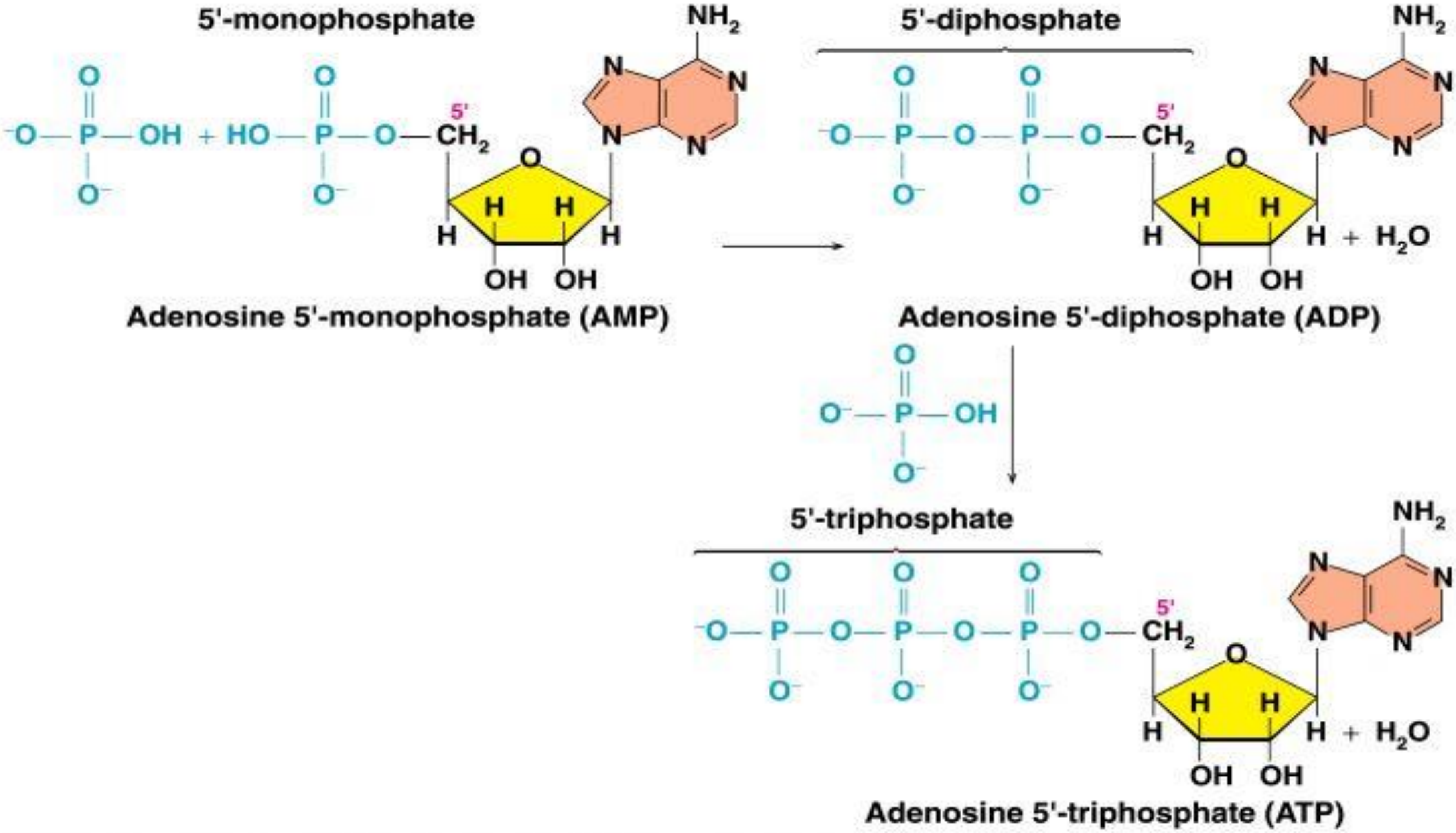
primosome : is a protein complex responsible for creating RNA primers on single stranded DNA during DNA replication.

- حيث يقوم **DNA helicase** بتنشيط أنزيم الـ **primase** ليقوم بتخليق الـ **primer** .

الاستطالة و الإنزيمات المشاركة في استطالة السلسلة

- أنزيم DNA polymerase III يعتبر هذا الأنزيم هو أنزيم التضاعف الرئيسي في *E.coli* والذى يتكون من ١٠ تحت وحدات من سلاسل عديد الببتيد ولذلك يتحكم في بناءه ١٠ جينات ولهذا فهو بروتين ضخم الحجم .
- يتعرف الأنزيم على قاعدة ضمن القالب الخاص بخيط الـ DNA ثم يختار من السيتوبلازم نيوكلوتيدة ثلاثية الفوسفات ومكملة للقاعدة المقابلة في الخيط القالب طبقا لنموذج واطسون – كريك لاتحاد القواعد ، ثم يربط بين النيوكلوتيدة والخيط الجديد بواسطة رابطة phosphodiester bond 3` → 5` وينتج جزئ بيروفوسفات والذي يتحلل لجزيئين فوسفات.

AMP, ADP and ATP



- وهناك خاصيتان لأنزيم تضاعف DNA في *E.coli* لهما دلائل هامة لطريقة تضاعف الـ DNA
- الخاصية الأولى هى أن جميع أنزيمات تضاعف الـ DNA حتى الآن ليس لها القدرة على بدء تخليق الـ (denovo) DNA بمعنى أن هذه الأنزيمات بوسعها فقط أن تضيف نيوكليوتيدات إلى طرف خيط محتوى على 3`-oH والمرتبط برابطة هيدروجينية بالخيط القالب .

- وقد تم حل هذه المشكلة باكتشاف إنزيم **primase** الذي يقوم ببناء **primer** وهو عبارة عن RNA وليس DNA (بطول ١٠-٦٠ نيوكليوتيدة في بدائية النواة ، و ٦ - ١٠ في مميزة النواة) وبالتالي تتوفر نهاية حرة 3`-oH يتم البناء عليها (الاستطالة) بمعرفة أنزيمات بلمرة الـ DNA .
- أما **الخاصية الهامة الثانية** المميزة لجميع أنزيمات تضاعف الـ DNA فهي قدرتها على إضافة نيوكليوتيدات فقط إلى الطرف oH - `3 للبادئ المرتبط بروابط هيدروجينية وليس على الطرف 5`- P .

- أنزيم DNA polymerase I و له ثلاثة أنشطة أنزيمية
- يعمل على بلمرة سلاسل الـ DNA من بوادئ -`3 oH ، ولو أن معدله أبطأ من أنزيم DNA poly III
- و له أثنين من أنشطة الأكسونيوكليز(Exonuclease) ، أولهما تسمح بتحليل خيوط الـ DNA في اتجاه `3→`5 ويستخدم هذا النشاط في التخلص من البادئ المكون من RNA ويقوم بإحلالها بنيوكليوتيدات DNA وربطها ببعضها في الاتجاه `3→`5

- وثانيهما تساعد في التحلل فى الاتجاه `5→`3 ويستخدم هذا النشاط كمراجع لعمل أنزيم DNA poly III الذي يعمل بسرعة تصل إلى ٤٥٠٠٠ نيوكلوتيدة في الدقيقة اى حوالى ١٥ ميكرون لكل دقيقة .
- أنزيم DNA poly II هذا الإنزيم يقوم بإصلاح (Repair) التالف من DNA بنشاط الهدم في الاتجاه `5→`3 والبناء في الاتجاه `3→`5 .

إنزيمات بلمرة الـ DNA في الكائنات أولية النواة

Enzyme	Function
DNA Polymerase I	Remove of RNA primers
DNA Polymerase II	Repair
DNA Polymerase III	The major replication enzyme

- **يمكن إيجاز عملية تضاعف DNA فيما يلي:-**
- **١- يتم التعرف على موقع التكرار من قبل بروتين الابتداء و أنزيم الـ DNA helicase المسئول عن فك حلزنة DNA مكوناً ما يشبه الفقاعة Bubble والتى تسمى شوكة التكرار Replication fork و تكون على شكل حرف Y وتتسع بتقدم التضاعف.**

The replication fork:

The point at which the two strands of DNA are separated to allow replication of each strand moving from the 3’ to the 5’ end of the parental sense strand .

- **٢- يقوم أنزيم Topoisomerase والمسمى بأنزيم الاسترخاء relaxing enzyme بالتخلص من اللفائف فوق الحلزونية الكبيرة .**

- ٣- عند بدء فك حلزنة DNA لابد من منع شريطي DNA من معاودة الالتفاف وذلك بتثبيتها بمساعدة بروتينات تعرف باسم بروتينات منع الارتباط بـ DNA وحيد الخيط **Single- stranded DNA binding proteins (SSBP)** والحفاظ على تباعدهما
- ٤- يقوم بعد ذلك إنزيم البلمرة **DNA polymerase** ببناء شريط DNA مكملاً للشريط القديم ذو الاتجاه **5→3** الذي يطلق عليه الشريط القائد **Leading strand** بشكل مستمر حيث أن أنزيم البلمرةلا يستطيع العمل إلا في الاتجاه **3→5** فقط.

• ٥- وتتم عملية بناء شريط DNA القديم ذو الاتجاه 3→5 أو ما يعرف بالشريط المتباطئ أو المتلكأ lagging strand بطريقة متقطعة بتكوين قطع صغيرة من DNA يتراوح طولها بين ١٠٠٠ إلى ٢٠٠٠ نيوكليوتيدة تعرف باسم قطع أوكازاكي Okazaki fragments نسبةً إلى مكتشفها العالم الياباني أوكازاكي عام ١٩٦٩م

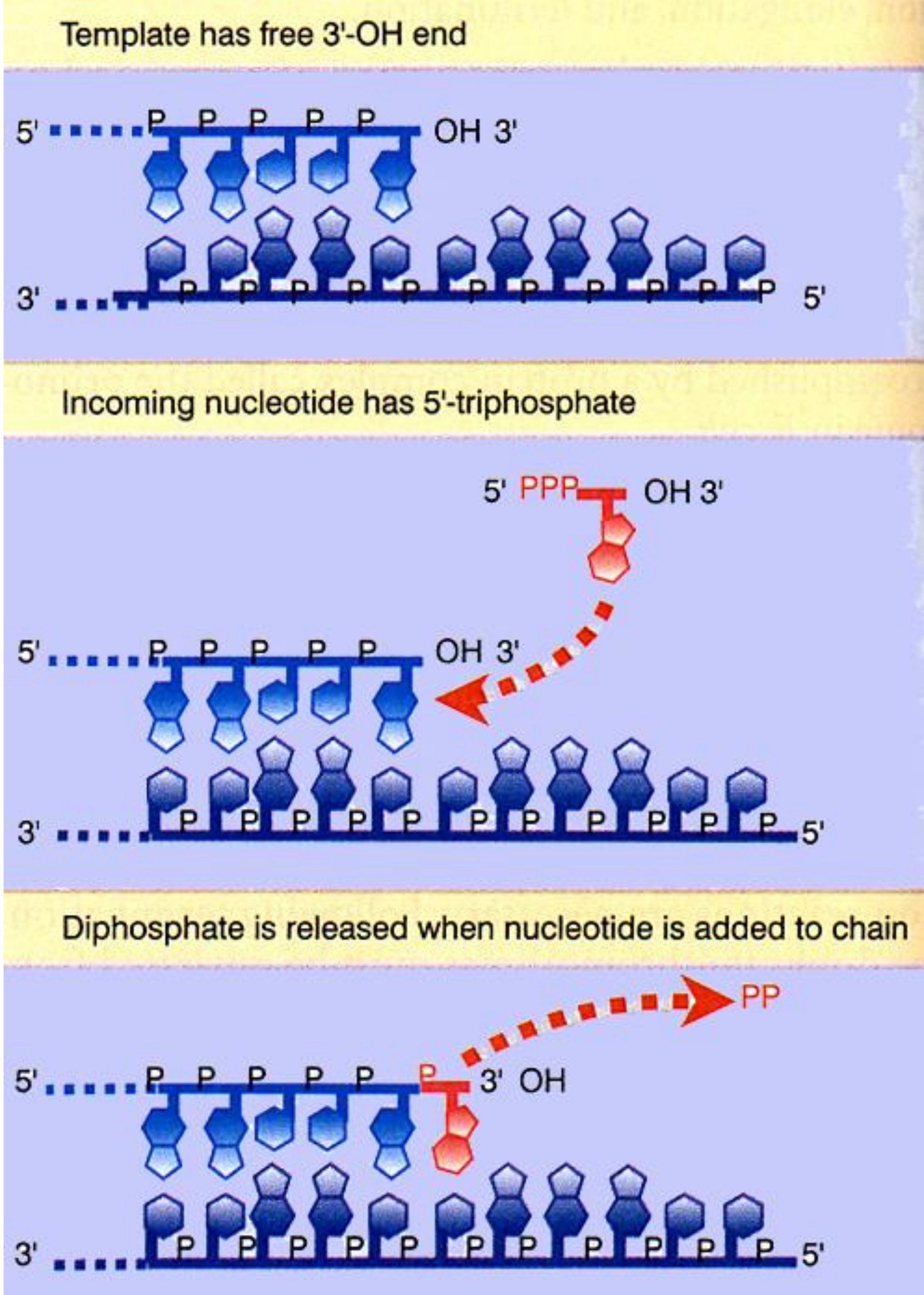
ويبدأ بناء هذا الشريط المتقطع ذو الاتجاه 3→5 بتخليق قطعة صغيرة جداً لا تتجاوز ١٠ نيوكليوتيدات من RNA البادئ (primer RNA) الذي يتم بناءه عند رأس شوكة التضاعف وبتحفيز من إنزيم RNA primase ويتكررذلك مرات عديدة .

- ٦- إستبعاد RNA Primers
حيث يقوم أنزيم DNA polymerase1 بازالة البادئ RNA Primer واستبداله بنيوكليوتيدات مكملة للشريط القديم من DNA .
- ٧- يتم بعد ذلك الربط بين قطع أوكازاكي بانزيم DNA ligase .

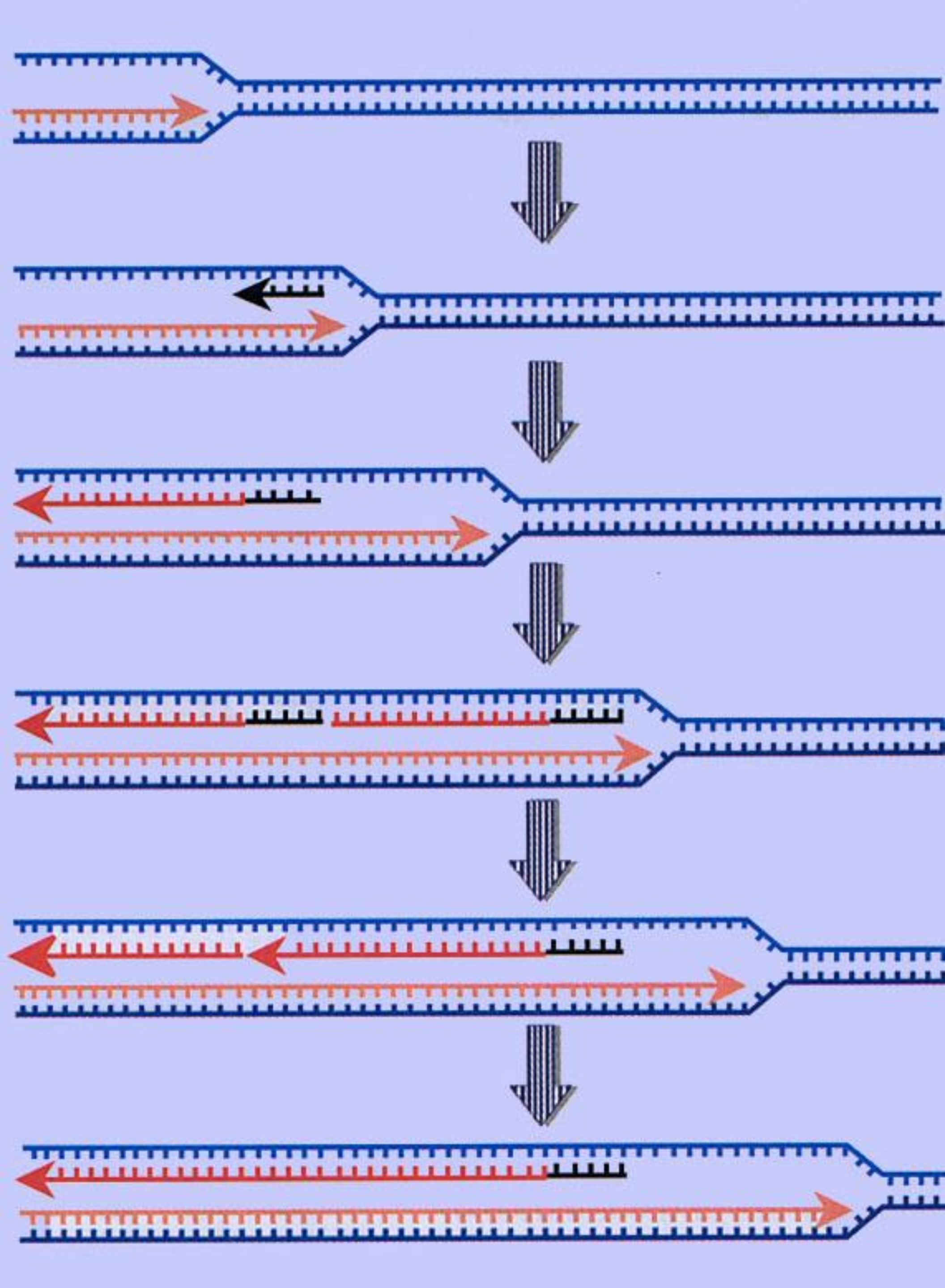
- قانون مناظرة القواعد يحدد القاعدة ثلاثية الفوسفات التي يجب أن تضاف

- بدء بناء DNA يتطلب ان تكون 3-OH غير مغطاة

- كل الانزيمات (polymerases) تبني DNA في اتجاه 5الى 3



- يقوم انزيم Primase ببناء RNA “primer” (بادئ) على السلسلة المتأخرة
- يقوم DNA Polymerase III بتطويل RNA primer ليكون ما يعرف بـ Okazaki fragment
- تكرر العملية مرات أخرى
- يقوم DNA polymerase I باستبدال RNA primer بـــ DNA
- لصق القطع مع بعضها بأنزيم ligase

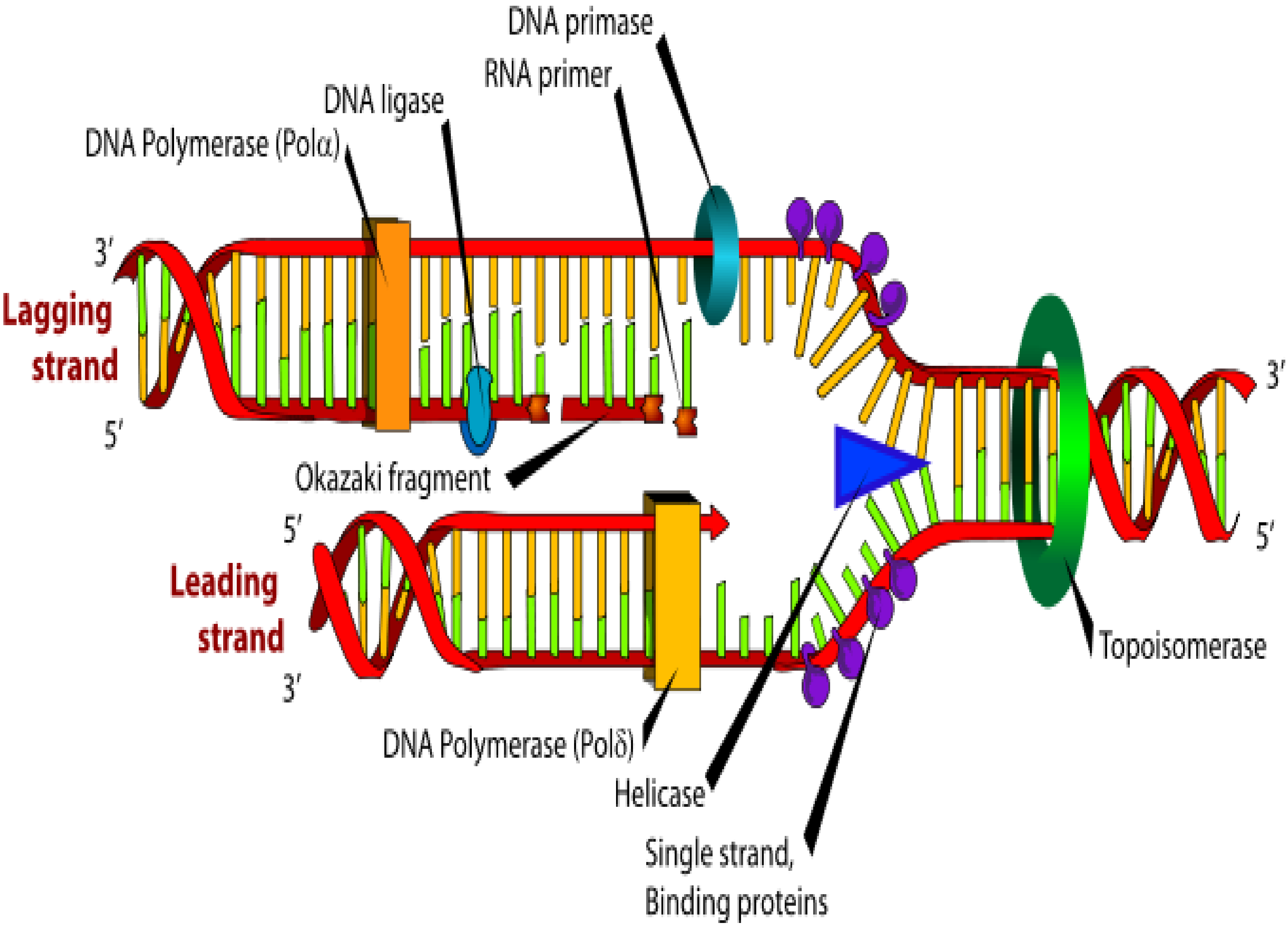


- تم إثبات أن نموذج التضاعف شبه المحافظ هو النموذج العام لتضاعف DNA في النباتات والحيوانات الراقية أيضا.
- إنزيمات بلمرة الـ DNA في الكائنات مميزة النواة:
- تم اكتشاف حتى عام ٢٠٠٣ تسع أنواع مختلفة من إنزيمات بلمرة الـ DNA بدلاَ من ثلاثة أنواع فقط في الكائنات بدائية النواة ، وهذه الإنزيمات أكثر تعقيداً.

أنزيمات بلمرة DNA فى الكائنات مميزة النواة

Enzyme	Function
DNA Polymerase α (ألفا)	Replication of nuclear DNA chromosome on lagging strand.
DNA Polymerase β (بيتا)	Repair of nuclear DNA chromosome.
DNA Polymerase γ (جاما)	Replication of mitochonderial DNA.
DNA Polymerase δ (دلتا)	Replication of nuclear DNA chromosome on lagging strand and leader strand.
DNA Polymerase ε (إبسيلون)	Repair.

- وقد ثبت أن جميع أنزيمات البلمرة تستطيع البناء فقط في الإتجاه `3→`5 ولذلك يلزم نهاية حره 3`-oH
- كذلك يوجد نشاط الهدم في الاتجاه `5→`3 وذلك للإصلاح وإزالة الأخطاء
- ولكن لم يثبت وجود نشاط الهدم في الاتجاه `3→`5 (الذي يقوم باستئصال البادئ) في أي من الإنزيمات وعلى العكس ثبت أن الأنزيم الذي يقوم باستئصال بادئ الـ RNA في الكائنات مميزة النواة هو إنزيم الـ RNase.


DNA primase
RNA primer
DNA ligase
DNA Polymerase (Polα)
3′
Lagging strand
5′
Okazaki fragment
3′
5′
5′
Leading strand
3′
Topoisomerase
DNA Polymerase (Polδ)
Helicase
Single strand, Binding proteins

Proofreading New DNA

- DNA polymerase initially makes about 1 in 10,000 base pairing errors
- Enzymes proofread and correct these mistakes
- The new error rate for DNA that has been proofread is 1 in 1 billion base pairing errors

- قد يحدث أحيانا بعض الأخطاء أثناء عملية التضاعف DNA replicationحيث يقوم إنزيم التضاعف بوضع النيوكليوتيدات في غير موضعها الصحيح و تنتج الطفرة .
- إلا أن معظم هذه الأخطاء تصحح بواسطة نشاط 3→5 exonuclease لأنزيمات DNA polymerases بعملية تسمى Proofreading حيث يتم إزالة النيوكليوتيدات الخاطئة ثم استبدالها بأخرى سليمة وصحيحة تتطابق مع نيوكليوتيدات الشريط المقابل .
- ربط أو لحام Ligation النيوكليوتيدات الجديدة والصحيحة بواسطة إنزيم الربط Ligase enzyme مع النيوكليوتيدات القديمة على شريط DNA.

- وضح كيف أن تجربة Meselson and stahl أكدت الطريقة التي يتناسخ بها الـ DNA واستبعدت احتمالات حدوث طرق أخرى للتناسخ؟
- عرف عملية التناسخ وما هى متتطلباتها؟
- ما هى الخواص العامة لانزيمات تناسخ الـ DNA
- قارن بين عملية التناسخ فى كلا من الكائنات الأولية و الكائنات حقيقية النواة؟
- وضح دور كلا من التالى فى تناسخ الـ DNA

DNA primase & DNA polymerase III & DNA polymerase I & DNA ligase & Topoisomerase & Helicase & SSBP

- عرف كلا من

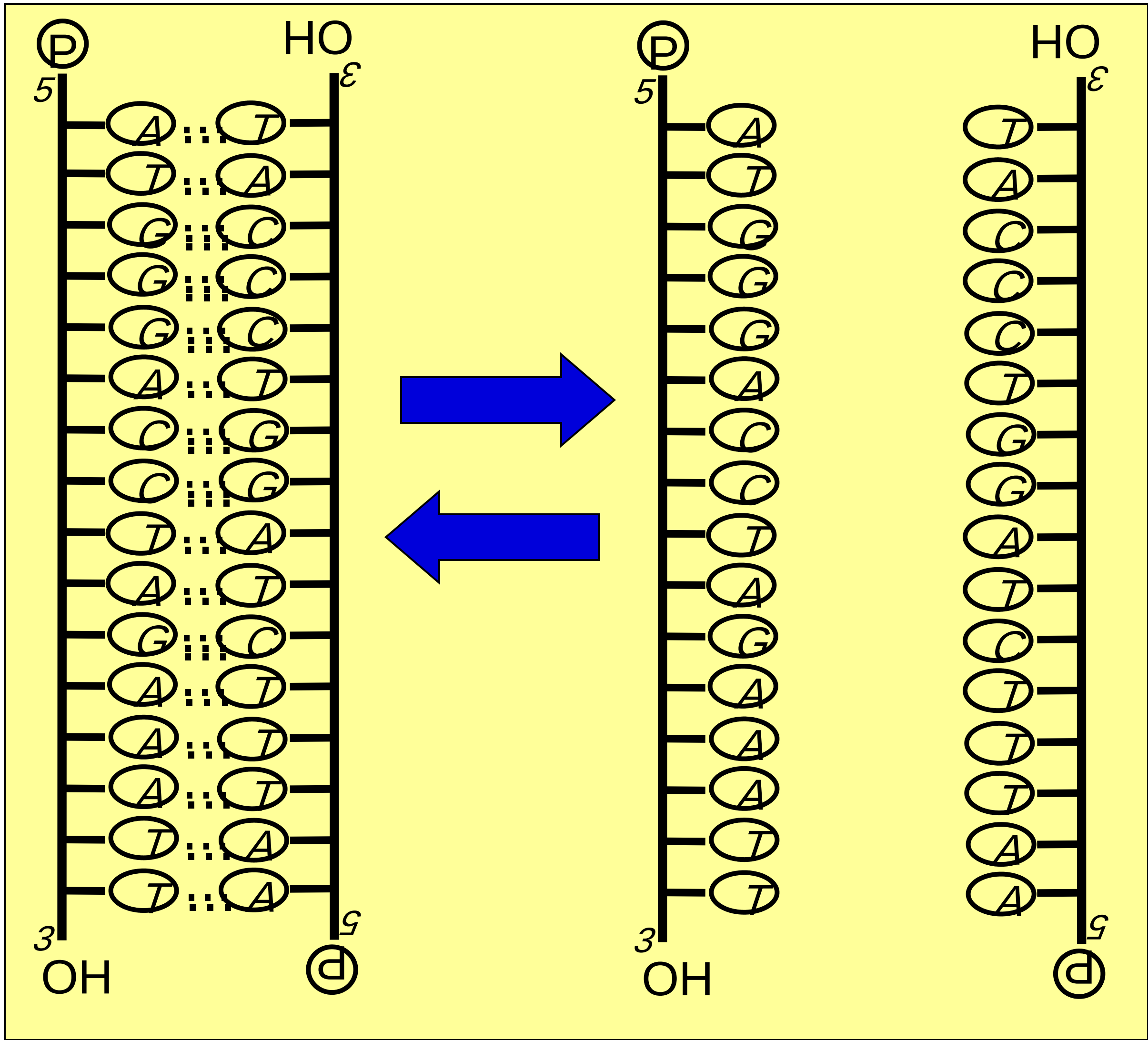
Primer & okasaki fragments & primosome & RNase & Ori

- .... يعتبر انزيم التناسخ الرئيسي في E. coli بينما يعتبر .... انزيم المراجعة الرئيسى
- في الكائنات مميزة النواة نجد ان إنزيمات البلمرة .... & .... هما الإنزيمين الحقيقيين للتناسخ يقابلا إنزيم .... في البكتريا وإنزيم البلمرة .... يقابل إنزيم poly I في البكتريا بينما يوجد إنزيم البلمرة .... في الميتوكندريا والبلاستيدات

فك الأرتباط و اعادة الأرتباط

Denaturation and Renaturation

الروابط الهيدروجينية التي تربط السلسلتين مع بعضهما تكسر و تعيد التكوين بسهولة



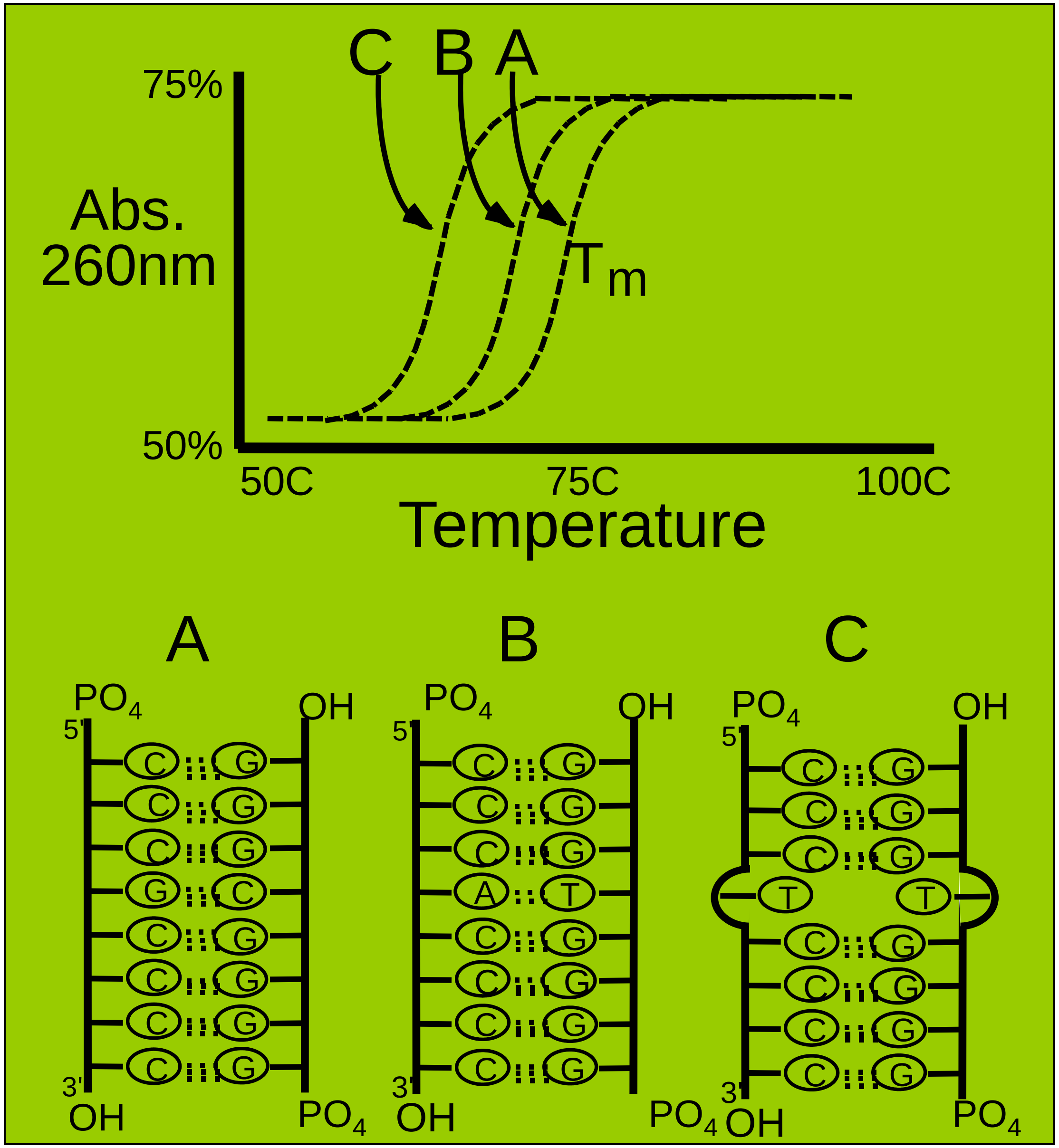
العوامل المؤثرة :

درجة الحرارة

NaOH

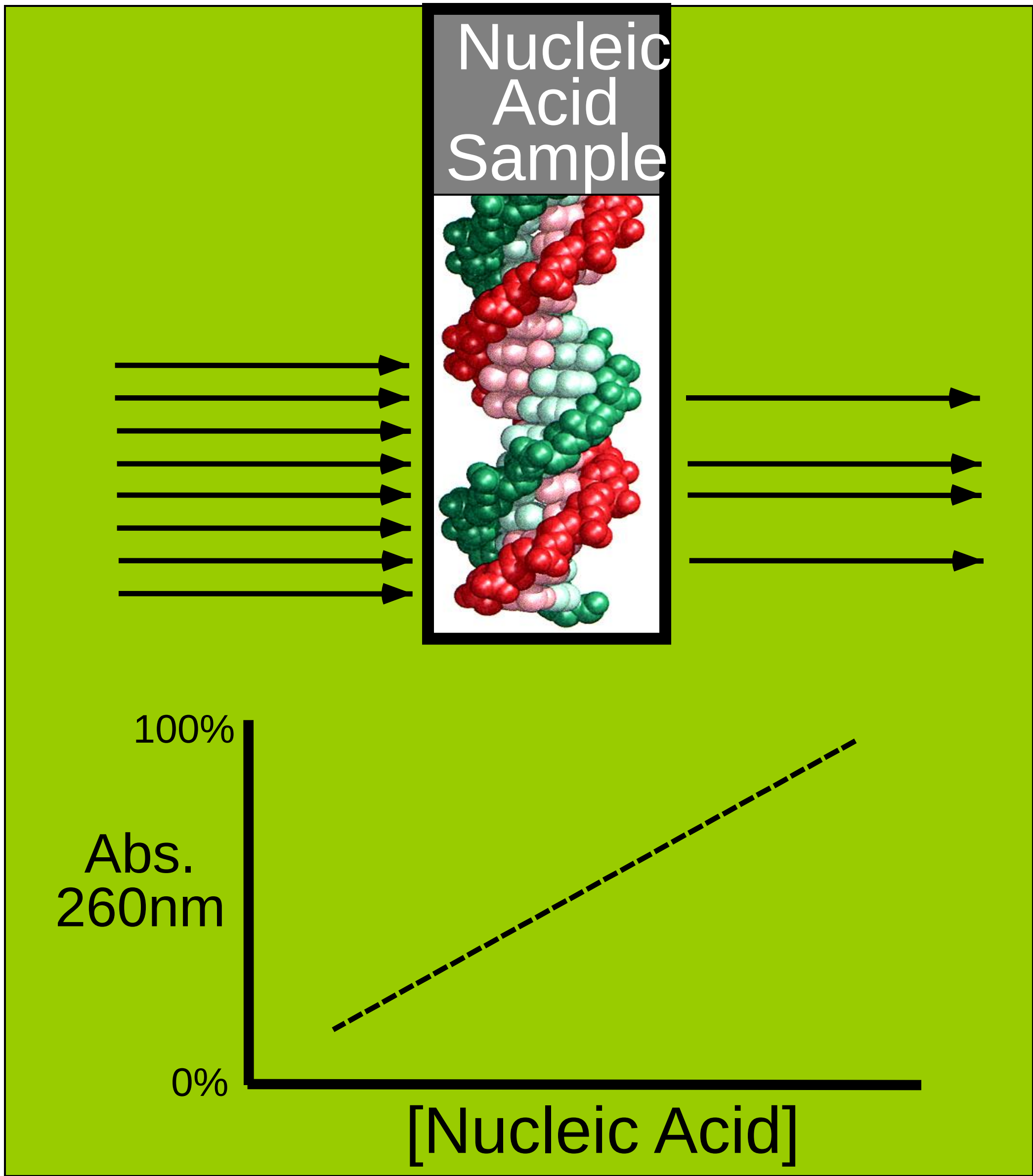
Formaldehyde

- اذا كان DNA يحتوي على نسبة أعلى من GC فانه يتطلب درجة حرارة أكثر من DNA الغني بـ AT



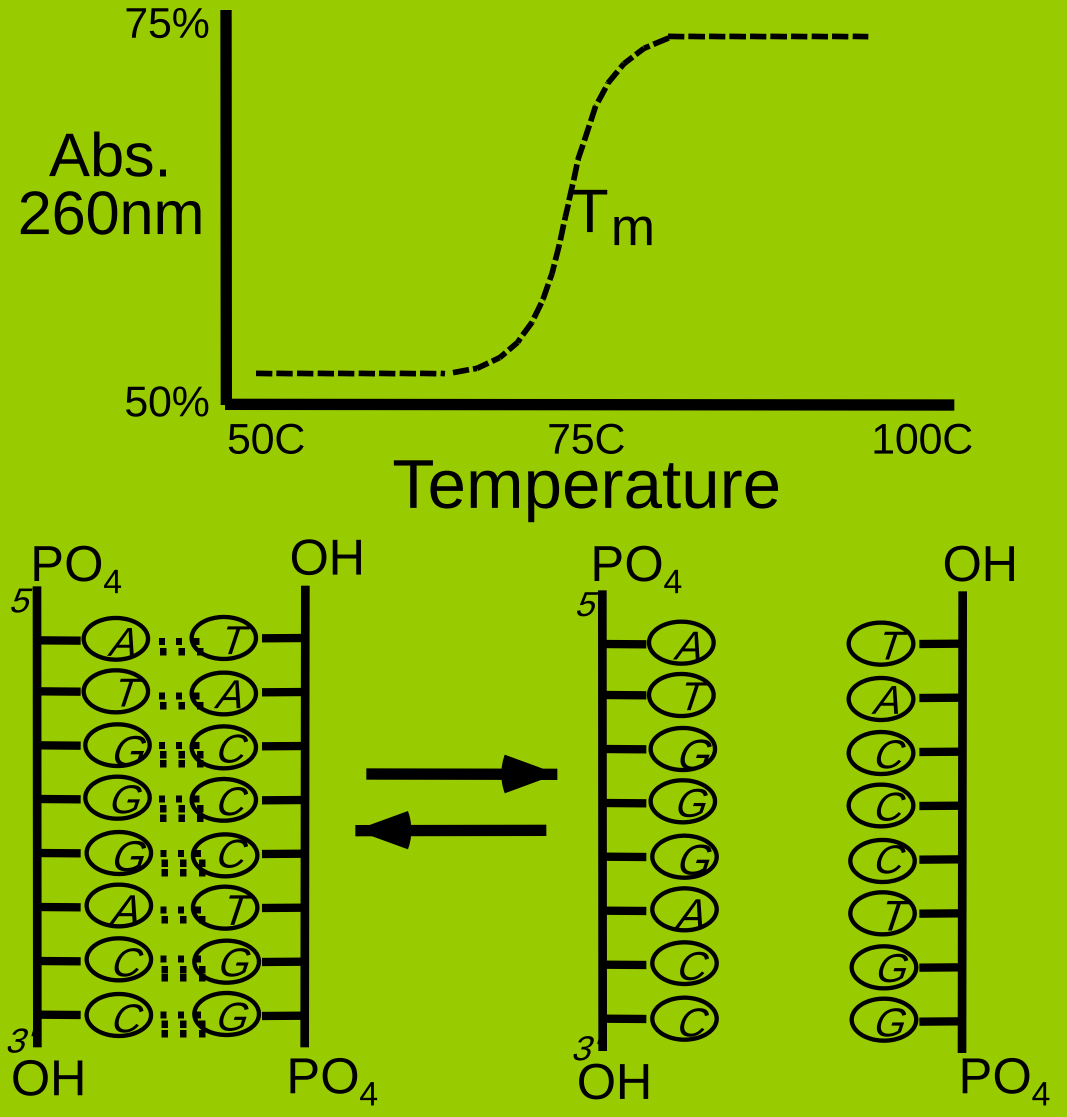
الكثافة الضوئية لـ DNA

- يمتص DNA الأشعة فوق البنفسجية عند طول ٢٦٠ nm
- كمية الضوء الممتص تتناسب طرديا مع كمية DNA



- الأمتصاص يعتمد على شكل DNA

- سلسلة واحدة (ssDNA) تمتص ضوء أكثر من سلسلتين

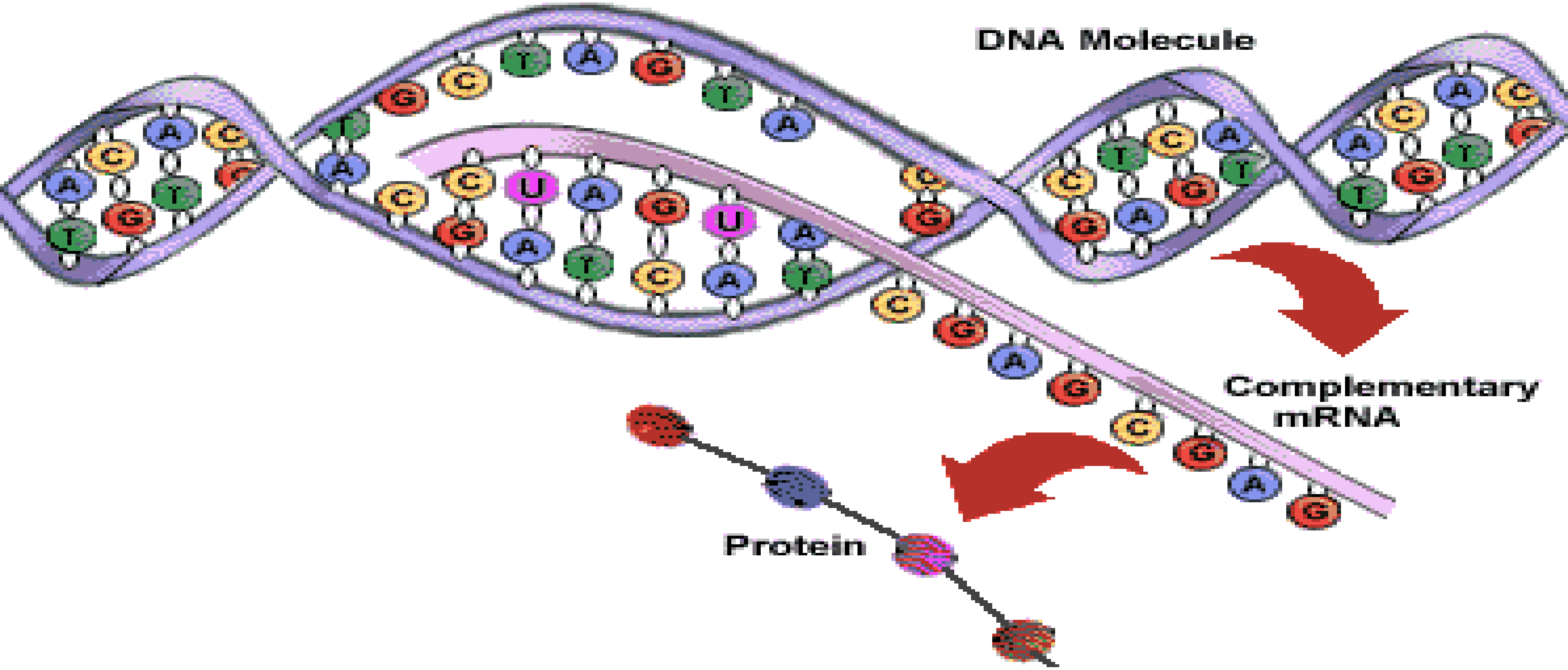


تعبير الجين
Gene Expression

- كيف تمارس الجينات تأثيراتها على الشكل الظاهري للخلية أو الكائن؟
- الجين :- هو عبارة عن مقطع من DNA يحمل معلومات عن تتابع الأحماض الأمينية لبروتين معين.

- تخزن المعلومات الوراثية فى الجين فى صورة تتابع من أزواج النيوكليوتيدات ، تنتقل بواسطة عملية تسمى النسخ Transcription الى جزئ مفرد الخيط من RNA هو RNA الرسول Messenger RNA(mRNA)
- الذى يحمل هذه المعلومات من الجينات فى الكروموسوم الى أماكن تواجد الريبوسومات Ribosomes (السيتوبلازم) حيث تقوم بتحويلها الى تتابعات أحماض أمينية للبروتين الناتج من الجين فى عملية تسمى الترجمة Translation

DNA Transcription → **RNA** Translation → **Prptein**



إذن تمارس أغلب الجينات تأثيراتها على الشكل المظهرى من خلال البروتينات (الإنزيمات و الهرمونات والبروتينات التركيبية) وهى جزيئات كبيرة معقدة تظهر درجة عالية من التخصص الوظيفى.

الجينات التى يكون الناتج النهائى لها بروتين تسمى جينات تركيبية .

- يعرف الجين التركيبي structural gene بأنه تتابع من النيوكلوتيدات يحدد تتابع الأحماض الأمينية لعديد ببتيد.

- هناك نوع آخر من الجينات لا تستخدم نسخها من RNA كوسيط لحمل الشفرة الوراثية ولكن كنواتج نهائية لتعبير الجين. وتتضمن الجينات التي تحدد جزئيات rRNA , tRNA وتسمى هذه الجينات بالجينات الوظيفية Functional genes

تخليق البروتين
Protein Synthesis

- عملية تخليق البروتين ما هى إلا إنتقال المعلومات الوراثية من DNA إلى RNA الى البروتين
- وهى تتضمن :-
- ١- النسخ Transcription
- ٢- الترجمة Translation

أولا النسخ Transcription

- إن نسخ الجينات مماثل ظاهريا لتناسخ (تضاعف) الـ DNA حيث يوفق إنزيم بلمرة ما نيوكلوتيدة تكاملية على طول جزئ الـ DNA القالب طبقاً لنموزج واطسون وكريك لتكامل القواعد .
- ثم بعد ذلك تتبلمر القواعد لتكون نسخة من عديد النيوكليوتيدات والتى عادة ما تكون خيوطاً فردية من جزيئات الـ RNA

- الإنزيم الذي يكون هذه النسخ يسمى إنزيم بلمرة الـ RNA المعتمد على الـ DNA ويختصر إلى RNA polymerase
- وتكون النيوكليوتيدات ريبوزية وليست دى أوكسي ريبوزية هي المواد الأولية لتفاعل البلمرة والقاعدة يوراسيل U تحل محل الثايمين T في الـ RNA
- وكما فى الـ DNA فإن عملية البلمرة تكون في إتجاه ٥ ← ٣ وتكون النسخة ذات قطبية عكسية للقالب

تركيب الجين

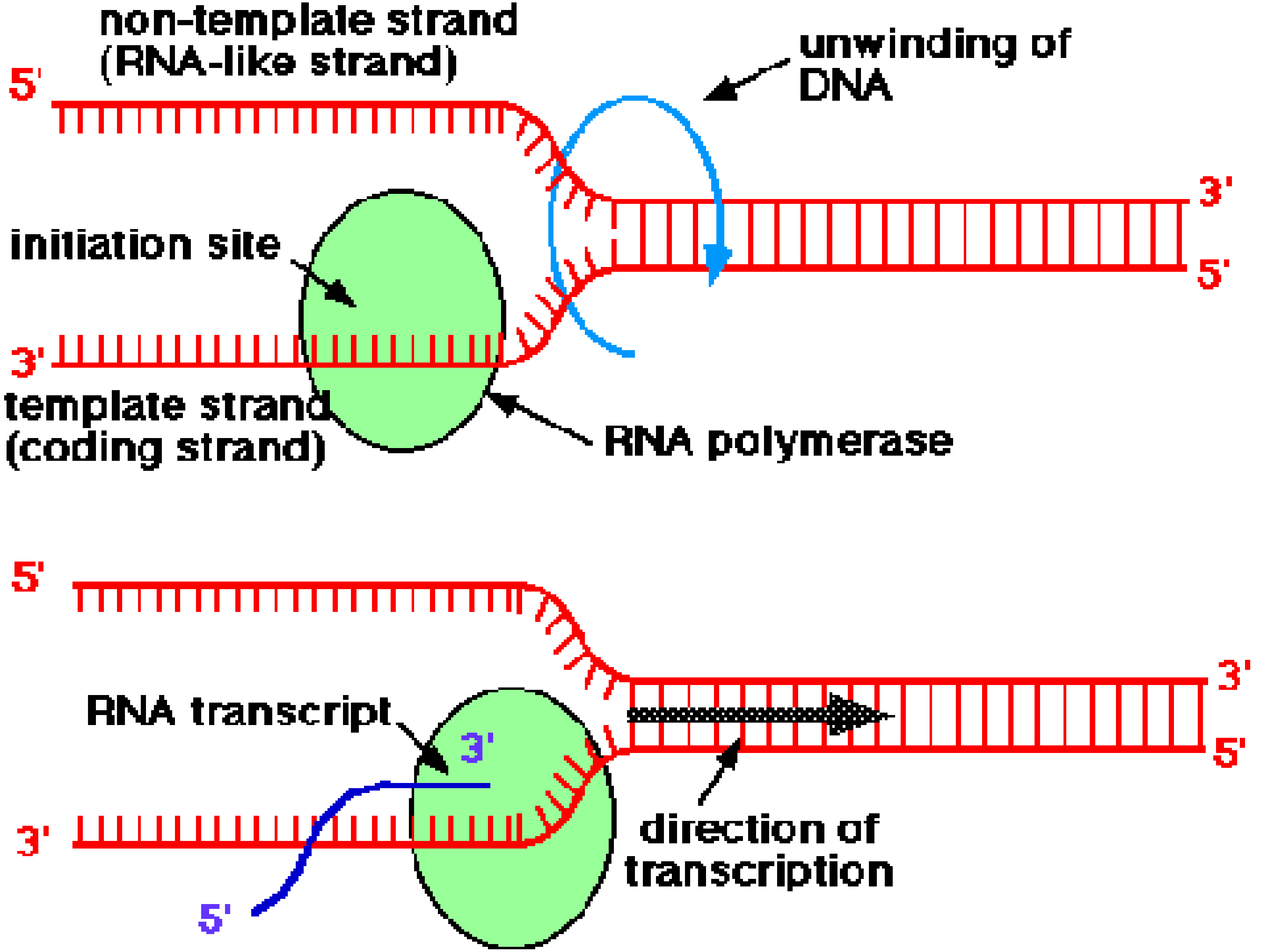
- يرتبط ببداية ونهاية كل جين تتابعات نيوكليوتيدية تعرف بالعناصر المنظمة Regulator elements وهي تنظم عملية النسخ
- ويكفى هنا أن نذكر وجود نوعين من هذه العناصر هما:
- ١- التتابع المحفز promoter sequence وهو يمثل المكان الذى يرتبط به إنزيم بلمرة الـ RNA ليبدأ النسخ.
- ٢- تتابع فاصل terminator sequence يعطي إشارة بأن إنزيم بلمرة الـ RNA يجب أن ينفصل عن القالب و ينهى عملية النسخ.

3 فاصل جين محفز 5

3 ٥

فاصل مضاد جين مضاد محفز مضاد

- عندما يرتبط RNA Polymerase بـ DNA فإنه ينسخ خيط واحد فقط هوالخيط الفعال أو المعنى sense strand
- أما الخيط الآخر عادة لا ينسخ ويسمى بالخيط مضاد الفعالية أو مضاد المعنى Antisense strand


non-template strand
(RNA-like strand)
unwinding of
DNA
5'
3'
5'
initiation site
3'
template strand
(coding strand)
RNA polymerase
5'
3'
RNA transcript
3'
5'
3'
direction of
transcription
5'

أنزيمات بلمرة الـ RNA
RNA polymerase

- إنزيم البلمرة RNA polymerase فى الـ *E. coli* يحتوى على:
- ستة من عديدات الببتيد و هى وحدتين من ألفا α ، واحدة من بيتا β ، واحدة من `β ، واحدة من أوميجا ω ، واحدة من سجما σ .
- الوحدة الفرعية σ تدخل فقط فى بداية عملية النسخ حيث أنها تقوم بالتعرف و إرتباط RNA polymerase بالتتابع المحفز Promoter وبعد بداية نسخ السلسلة فإنها تتحرر ، وإستطالة السلسلة تتم بمساعدة قلب الأنزيم (باقى الوحدات عدا سجما)

- أما فى الكائنات مميزة النواة فإن إنزيمات بلمرةالـ RNA
- يوجد منها ثلاثة أنواع هى RNA poly. I, II, III
- RNA Polymerase I يوجد فى النوية ويحفز نسخ rRNA
- RNA Polymerase II يوجد فى النيكليوبلازم وهو ينسخ كل mRNA كما أنه مسئول عن بناء RNA النووي غير المتجانس

Heterogeneous nuclear RNA (hn RNA)

- RNA Polymerase III يوجد فى النيوكليوبلازم وهو ينسخ tRNA وجزيئات RNA صغيرة الحجم.

تركيب خيط فعال ونسخته

structure of a sense strand and its transcript

DNA : 3- Promoter- Antileader – Gene – Antitrailer – Terminator -5

mRNA : 5- Leader – Gene – Trailer -3

- الـ DNA ينسخ في الإتجاه ٥ ← ٣ الى mRNA و بالتالى فان بداية الجين سوف تقع عند الطرف ٣ من التتابع الشفري وأن نهاية الجين سوف تقع عند الطرف ٥ من التتابع الشفري.
- أول حمض أميني في سلسلة عديد الببتيد يكون عادة المثيونين ويحدد بالتتابع \`5 AUG 3\` على الـ m RNA.

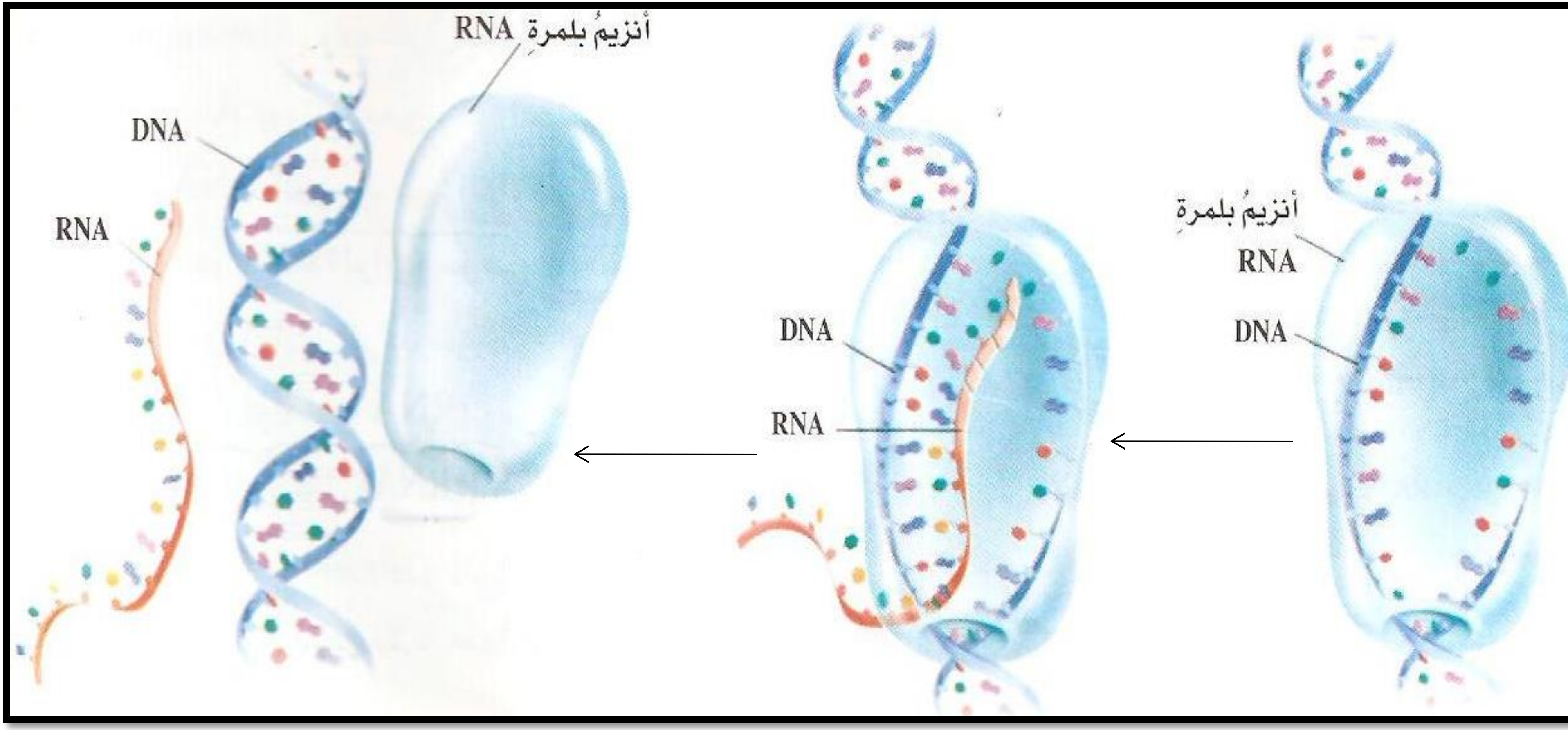
- النيوكلوتيدات التي تقع بين النهاية `5 والـ AUG على الـ mRNA تكون ما يسمى بالتتابع القائد leader sequence
- وبالطبع فإن تتابعا تكامليا مضادا للتتابع القائد Antileader sequence سوف يكون موجودا في الـ DNA.
- التتابع المقطور Trailer Sequence هو تتابع يوجد بين نهاية الجين و التتابع الفاصل

خطوات النسخ

- ١- يرتبط إنزيم بلمرة RNA بالتتابع المحفز. ينفك إلتفاف سلسلتي DNA و تنفصلان عن بعضهما فى مكان النسخ فقط (الجين الذى يتم نسخة).
- ٢- يقوم إنزيم بلمرة RNA بربط نيوكليوتيدات RNA الحرة بجانب النيوكليوتيدات الموجودة في الخيط القالب.

- بحيث أن C يتحد مع G وأن U يتحد مع A .
- يقوم هذا الإنزيم بنسخ الجين من بدايته وحتى نهايته مكوناً جزئ RNA فيه تسلسل من النيوكليوتيدات شبيه بالتسلسل الموجود في الجين مع إختلاف واحد هو أن القاعدة النيتروجينية U تأتي بدلا من القاعدة النيتروجينية T . هذا الإختلاف لا يغيّر من المعلومات الوراثية لأن أنظمة الخلية تقرأ هذين الرمزين وكأنهما رمزا واحدا.
- و عندما يغادر أنزيم بلمرةRNA هذه المنطقة، يلتف خيطى DNA مرة أخرى.

• ٣- يصل إنزيم RNA إلى إشارة الإنتهاء، و هو تتابع معين من النيوكليوتيدات يحدد نهاية الجين .عند بلوغه هذه الإشارة، فإن الإنزيم يحرر RNA الناتج حديثا و DNA.



ثانيا الترجمة Translation

- يتم ترجمة تتابع النيوكليوتيدات للـ mRNA الى تتابع من الأحماض الأمينية والتى تعتبر هى الوحدات الفرعية الأساسية للبروتينات وعددها عشرين في البروتينات الطبيعية .
- العملية التى تترجم بها المعلومات الوراثية من جزيئات mRNA الى تتابع الأحماض الأمينية طبقا للشفرة الوراثية هى بالقطع عملية معقدة وتحتاج الى توظيف عدد كبير من الجزيئات الكبيرة .
- فى الكائنات الأولية حيث لا يوجد غشاء نووى وأن حياة جزئ الـ mRNA في *E.coli* في حدود ٣ دقائق فقط فان عمليتا النسخ والترجمة تكونا متلازمتين .

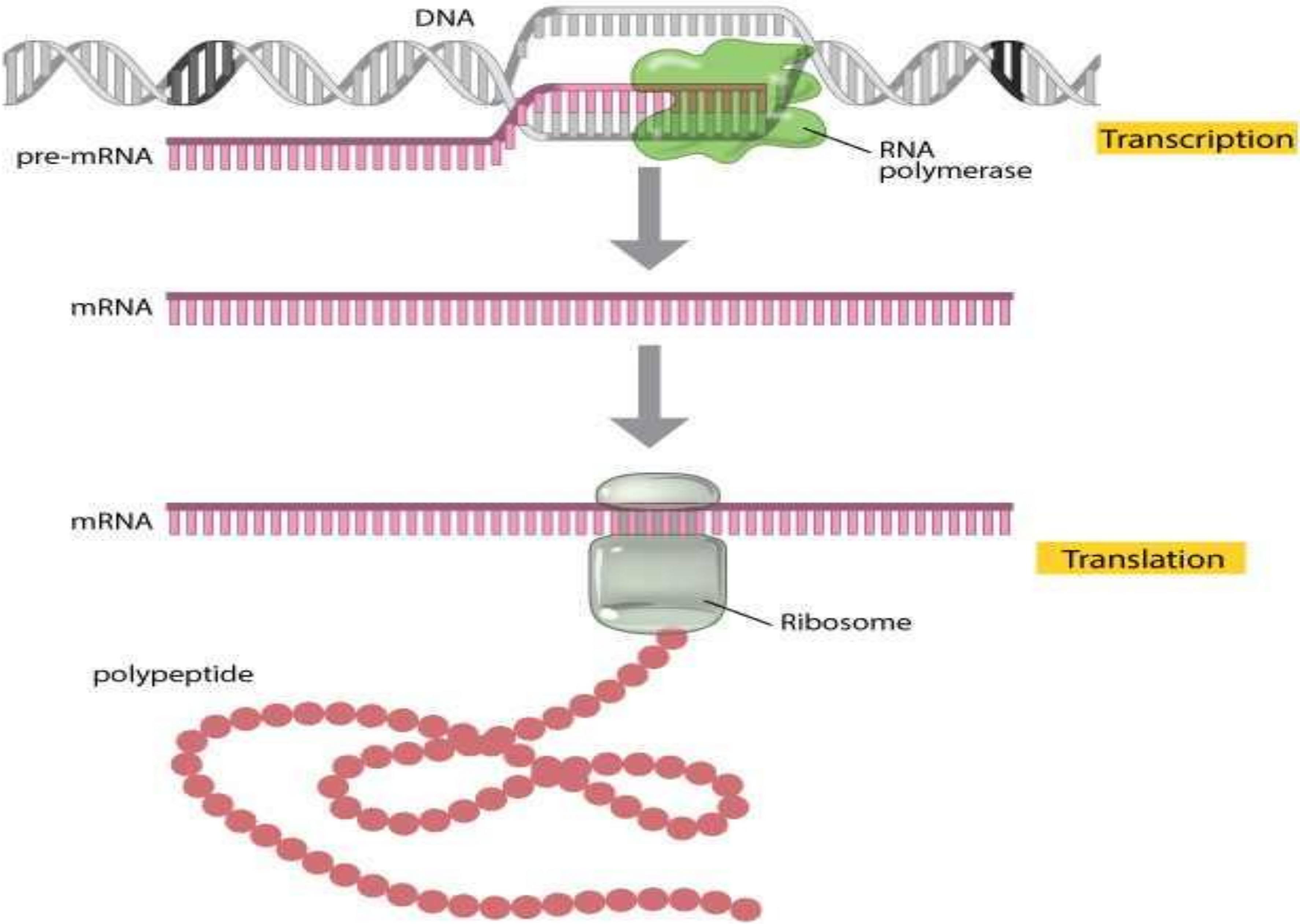
- أما في الكائنات مميزة النوى تعتمد فترة حياة mRNA على حالة التكشف للخلية .
- فبالنسبة لخلايا الهيلا (Hela) الآدمية المنقسمة في مزارع الآنسجة ، على سبيل المثال ، فإن حوالي ١/٣ الـ mRNA يحظى بفترة نصف عمر قدرها ٧ ساعات والثلثين الباقيين يحظيان بفترة نصف عمر قدرها ٢٤ ساعة .
- ومن ثم ، فإن m RNA فى الكائنات مميزة النواة أكثر ثباتا عن زميله الخاص بـ *E.coli*.

- خلايا (هنريتا لاكس) الخالدة [المرأة الأهمّ في تاريخ الطبّ]

بعد معاناة هنريتا لاكس (المرأة الأمريكيّة من أصول أفريقيّة والمولودة سنة ١٩٢٠) من مشاكل صحّية في رحمها مطلع عام ١٩٥١، زارت مستشفى جون هوبكنز الذي قام بارسال عيّنة من ورم اكتُشف في رحمها إلى معمل الدكتور جورج أوتو.

- حيث لاحظ الدكتور أوتو في مختبره أنّ خلايا هنريتا لاكس قد نمت وانقسمت في المختبر، وذلك على غير ما هو معروف عن الخلايا البشريّة.
- تبيّن أنّ هنريتا مصابة بسرطان عنق الرحم، وتوفّيت بعد ذلك بعدّة أشهر.. لكنّ خلاياها بقيت حيّةً لتنقذ حياة الكثير من البشر، ولتُسهم -دون علمها وقصدها- بتقديم أجلّ الخدمات للبحوث العلميّة (على الأرض)، ودراسة اللقاحات؛ ما جعلها بلا منازع أهمَّ امرأة في تاريخ الطبّ.
- خلايا هيلا Hela Cells
- صورة لخلايا هيلا في طور الإنقسام أطلق على هذه الخلايا المزروعة اسم خلايا هيلا، مشتقةً من أوائل حروف اسمها Henrietta Lacks، وقد قام الدكتور جورج أوتو بالتبرع بها للكثير من المعامل وعرضها على العلماء متيحًا لهم الاستفادة منها ودراستها، يُقدّر كميّة ما استنسخ إلى ٥٠ مليون طنًّا من خلايا هيلا استُخدمت في الأبحاث العلمية ودراسة اللقاحات:

- تحدث عملية الترجمة على الريبوسومات وهى جزيئات كبيرة معقدة التركيب مكونة من وحدتين أحدهما كبيرة و الأخرى صغيرة وتوجد فى السيتوبلازم .
- تتضمن الترجمة ثلاثة أنواع من RNA جميعها تنسخ من DNA القالب وهى :-
- mRNA (حامل الشفرة الوراثية) ،
- rRNA (من ٣ – ٥ جزيئات) ،
- tRNA (من ٤٠ – ٦٠ جزئ)


DNA
pre-mRNA
RNA
polymerase
Transcription
mRNA
mRNA
Translation
Ribosome
polypeptide

الشفرة الوراثية Genetic code

- الشفرة الوراثية: هي تتابع القواعد النيتروجينية في mRNA التي تحدد تتابع الأحماض الأمينية في البروتينات التي سيتم بناؤها في الريبوسومات.

خواص الشفرة الوراثية

- ١- الشفرة الوراثية ثلاثية حيث أن كل ثلاثة نيوكليوتيدات متجاورة في mRNA تحدد حمضا أمينيا في عديد الببتيد.
- كل تتابع لثلاث نيوكليوتيدات في mRNA سواء يحدد حمضا أمينيا أو يشير إلى بداية أو إيقاف الترجمة يطلق عليه اسم كودون Codon.

الطبيعة الثلاثية للشفرة

The triplet nature of the code

- إن الذين يحاولون استنتاج طبيعة الشفرة الوراثية سيجدون وبسرعة أنه إذا كانت نيوكلوتيدة واحدة في جزئ الـ **mRNA** تحدد حمضاً أمينيا واحدا في بروتين ما ، لتمكنت من البروتينات من احتواء أربعة أحماض أمينية فقط (٤١) في حين أنها في الحقيقة تحتوي عشرين .
- وبالمثل ، فإن شفرة ثنائية مكونة من جميع احتمالات أثنتان معا من النيوكلوتيدات الأربع يمكن أن تولد ستة عشر من التوافيق (٤٢) وهذه بدورها مازالت غير كافية لتحدد الأحماض الأمينية العشرين . ومن ثم ، فإن أبسط الشفرات والتي يمكن تصورها كأداة طيعة للنظام البيولوجي هي الشفرة الثلاثية triplet code

- ٢- مرونة الشفرة The degeneracy of the code
- عندما تعد جميع التوافيق الثلاثية للنيوكلوتيدات الأربع (٤^٣) أو ٦٤ نكون قد أعددنا التتابعات المختلفة أو الشفرات الممكنة . وحيث أنه من المفترض أن ٢٠ (شفرة) فقط تكون ضرورية ، فقد كان الاحتمال المطروح أن شفرة الوراثة مرنة بمعنى أن حمضاً أمينيا واحدا يمكن أن يحدد بواسطة أكثر من وحدة ثلاثية واحدة أى أن كل حمض أمينى له أكثر من شفرة.
- ٣- شمولية الشفرة Universality of the code

نفس الأسلوب للشفرة الوراثية يوجد فى كل الكائنات الحية سواء كانت مميزة أو غير مميزة النواة أى أن الشفرة الوراثية عامة فى كل الكائنات الحية.

الجدول يبين الكودونات الـ 64 في mRNA و الأحماض الأمينية التي تحددها هذه الكودونات في معظم الكائنات الحية.

First base	U	C	A	G	Third base
U	UUU Phe	UCU Ser	UAU Tyr	UGU Cys	U
	UUC Phe	UCC Ser	UAC Tyr	UGC Cys	C
	UUA Leu	UCA Ser	UAA Stop	UGA Stop	A
	UUG Leu	UCG Ser	UAG Stop	UGG Trp	G
C	CUU Leu	CCU Pro	CAU His	CGU Arg	U
	CUC Leu	CCC Pro	CAC His	CGC Arg	C
	CUA Leu	CCA Pro	CAA Gln	CGA Arg	A
	CUG Leu	CCG Pro	CAG Gln	CGG Arg	G
A	AUU Ile	ACU Thr	AAU Asn	AGU Ser	U
	AUC Ile	ACC Thr	AAC Asn	AGC Ser	C
	AUA Ile	ACA Thr	AAA Lys	AGA Arg	A
	AUG Met start	ACG Thr	AAG Lys	AGG Arg	G
G	GUU Val	GCU Ala	GAU Asp	GGU Gly	U
	GUC Val	GCC Ala	GAC Asp	GGC Gly	C
	GUA Val	GCA Ala	GAA Glu	GGA Gly	A
	GUG Val	GCG Ala	GAG Glu	GGG Gly	G

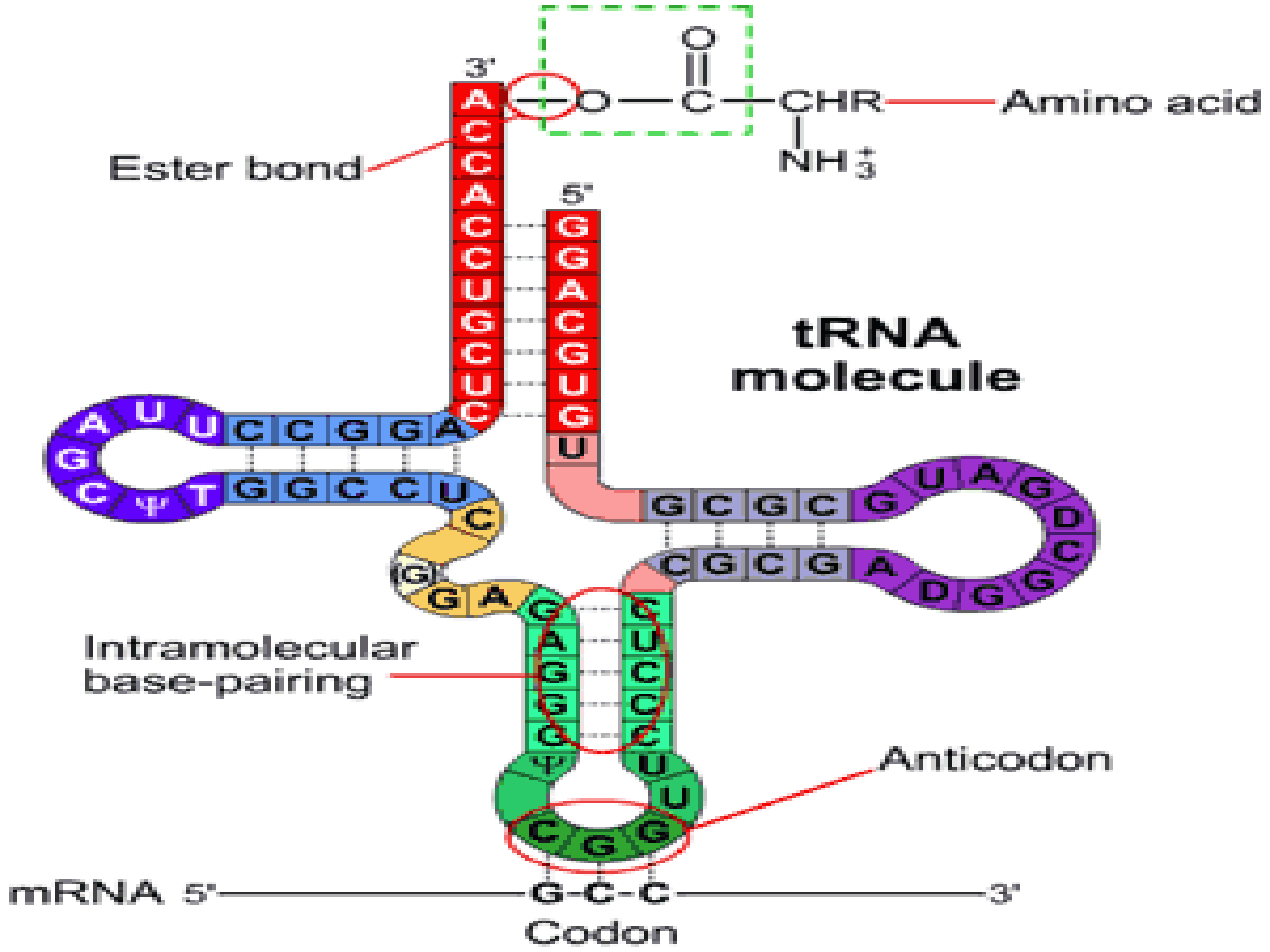
(Second base: U, C, A, G)

- غالبا ما تختلف هذه الكودونات، الواحد عن الآخر، في نيوكليوتيد واحد فقط، إلا أن الكودون الواحد لا يحدد إطلاقا أكثر من حمض أميني واحد. ولكن تحدد بعض الأحماض الأمينية بواسطة كودونين مختلفين أو أكثر.
- هناك كودون خاص هو AUG يعمل ككودون بدء start codon وهو للحمض الأميني المثيونين.
- كودون البدء هذا هو تتابع للنيوكليوتيدات في mRNA يشير إلى الموقع الذي يجب أن تبدأ عنده الترجمة.
- أما الكودونات (UAG-UGA-UAA) ، تسمى كودونات إيقاف Stop codons و هى لا تحدد أحماضا أمينية، بل تشير إلى نهاية الترجمة .
- يبدأ ترجمة الـ mRNA من الطرف 5\` منتهيا بالطرف 3\` .

دور الـ RNA الناقل في تخليق البروتين

Role of transfer RNA in protein synthesis

- تلعب جزيئات tRNA دوراً أساسيا في تخليق البروتين ، كل منها يحظى بالقدرة على أن يتحد على وجه الخصوص بحمض أميني واحد فقط في تفاعل يساعد فيه مجموعة إنزيمات خاصة بالأحماض الأمينية تسمى أنزيمات تخليق الأمينو أسيل aminoacyl- tRNA synthesi ، غالبا ما يوجد أكثر من نوع من tRNA لكل حمض أميني .
- وبمجرد أن تشحن جزيئات الـ tRNA بأحماضها الأمينية المناسبة فإنها تهاجر لمواقع محددة على الريبوسوم وتتداخل مع الـ mRNA المرتبط .
- كل شفرة على الـ mRNA يتم التعرف عليها بواسطة تتابع تكاملي من ثلاث نيوكلوتيدات يسمى الشفرة المضادة (Anti codon) في جزىء tRNA .


3'
O
C
CHR
Amino acid
NH_3^+
Ester bond
5'
tRNA
molecule
Intramolecular
base-pairing
Anticodon
mRNA 5'
G-C-C
3'
Codon

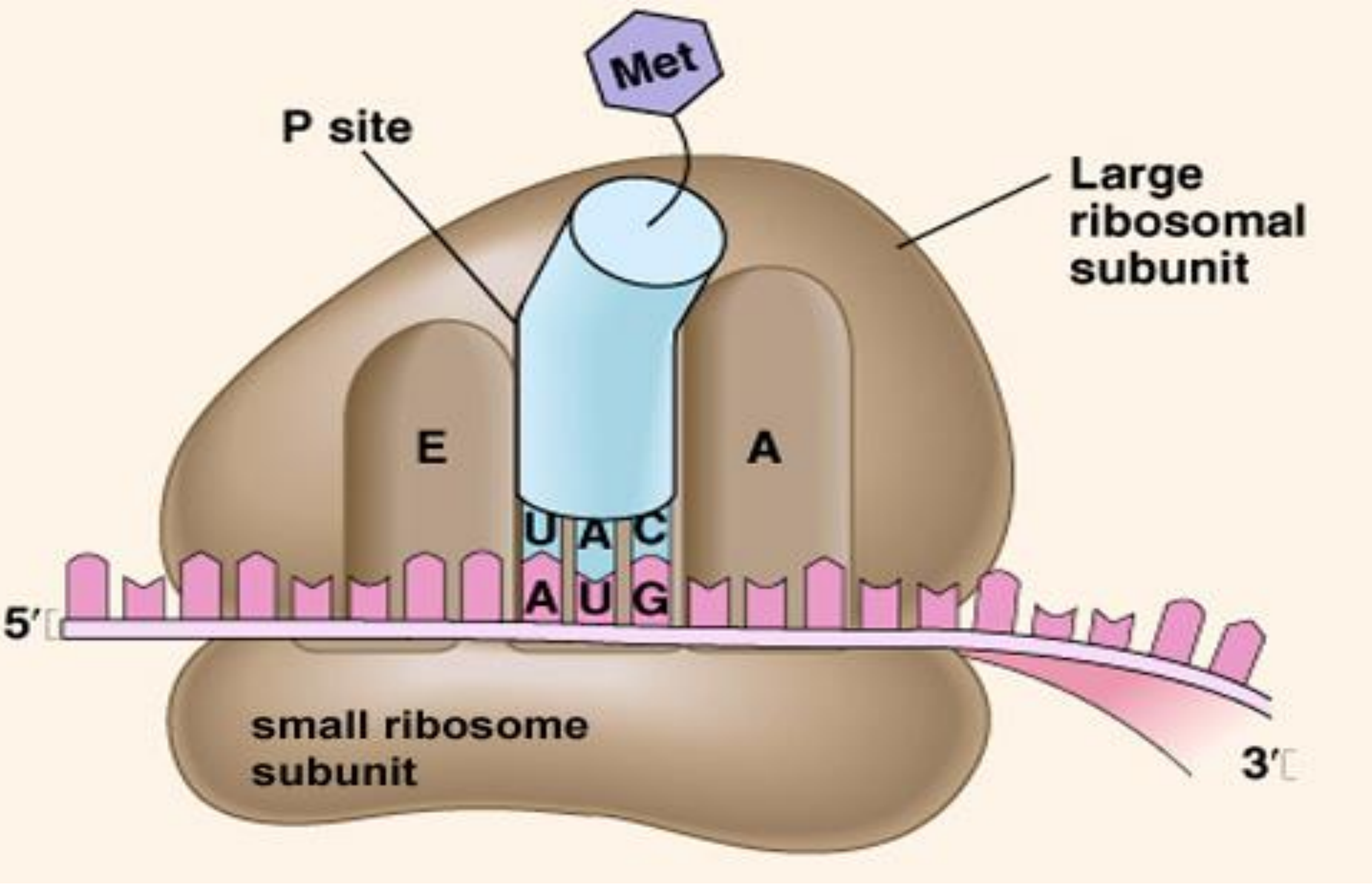
دور الـ rRNA الريبوسومي في تخليق البروتين

Role of ribosomal RNA in protein synthesis

- تحتوى خلية الكائنات بدائية النواة على ثلاثة أنواع من الـ rRNA (16 S, 23 S, 5 S) وفي الكائنات مميزة النواة ٤ أنواع (28 S, 5.8 S, 5 S, 18 S)
- يتداخل مع حوالي ٥٠ نوعا من البروتين الريبوسومي ليتكون ما يعرف بالوحدات الريبوسومية الكبيرة والصغيرة وعند الوقت الذي يبتدئ فيه تخليق البروتين تتحد الوحدات الكبيرة والصغيرة لتكون ريبوسوماً كاملاً

دور الريبوسوم فى تخليق البروتين

- أثناء تخليق البروتين يتوسط الريبوسوم في التعرف على الشفرة والشفرة المضادة
- وهو أيضاً يسمح بتكوين روابط ببتيدية بين الأحماض الأمينية
- يساعد في حركة الـ mRNA بحيث تكون شفراته مواجهة لشفرات الـ tRNA المضادة بطريقة متتابعة



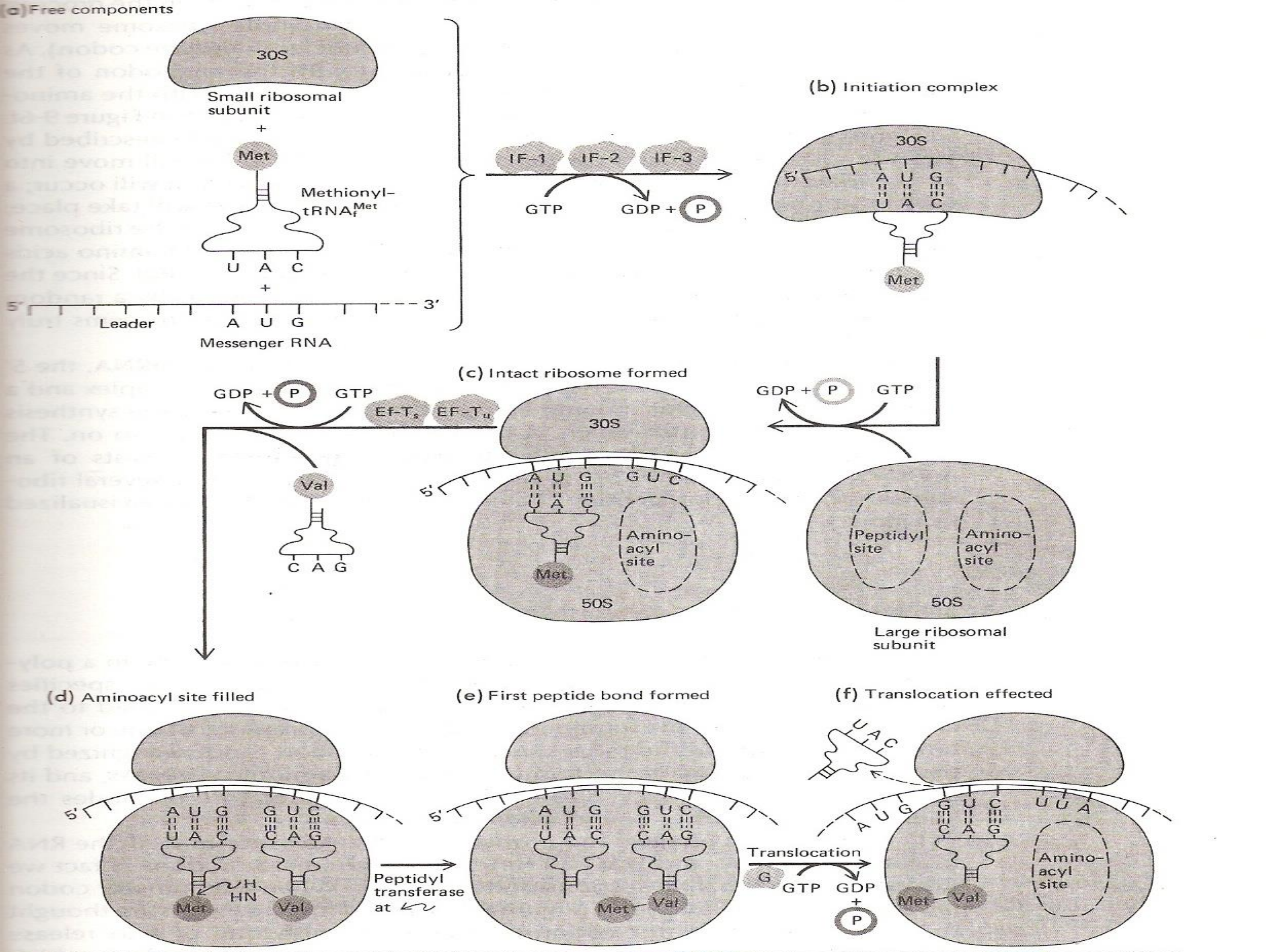
Met
P site
Large ribosomal subunit
E
A
U A C
A U G
5′
3′
small ribosome subunit

الريبوسوم

خطوات الترجمة

- ١- البدء :- ترتبط الوحدتان البنائيتان للريبوسوم و mRNA و tRNA الذي يحمل المثيونين.
- حيث تتداخل أولا وحدة فرعية ريبوسومية صغيرة ، tRNAFmet والشفرة البادئة AUG لتكون مركبا يسمى معقد الابتداء initiation complex وهذا التفاعل يتطلب على الأقل ثلاثة عوامل لبدء تخليق البروتين يرمز لها IF1, IF2 , IF3.
- يشترك معقد الابتداء بمجرد تكونه مع وحدة فرعية ريبوسومية كبيرة ليكون ريبوسوما فعالا من فئة الـ 70S فى بدائية النواة (أو الـ 80S في مميزات النوى) وتشمل الوحدة الفرعية الكبيرة موقعين هما موقع ببتيديل وموقع أمينو أسيل

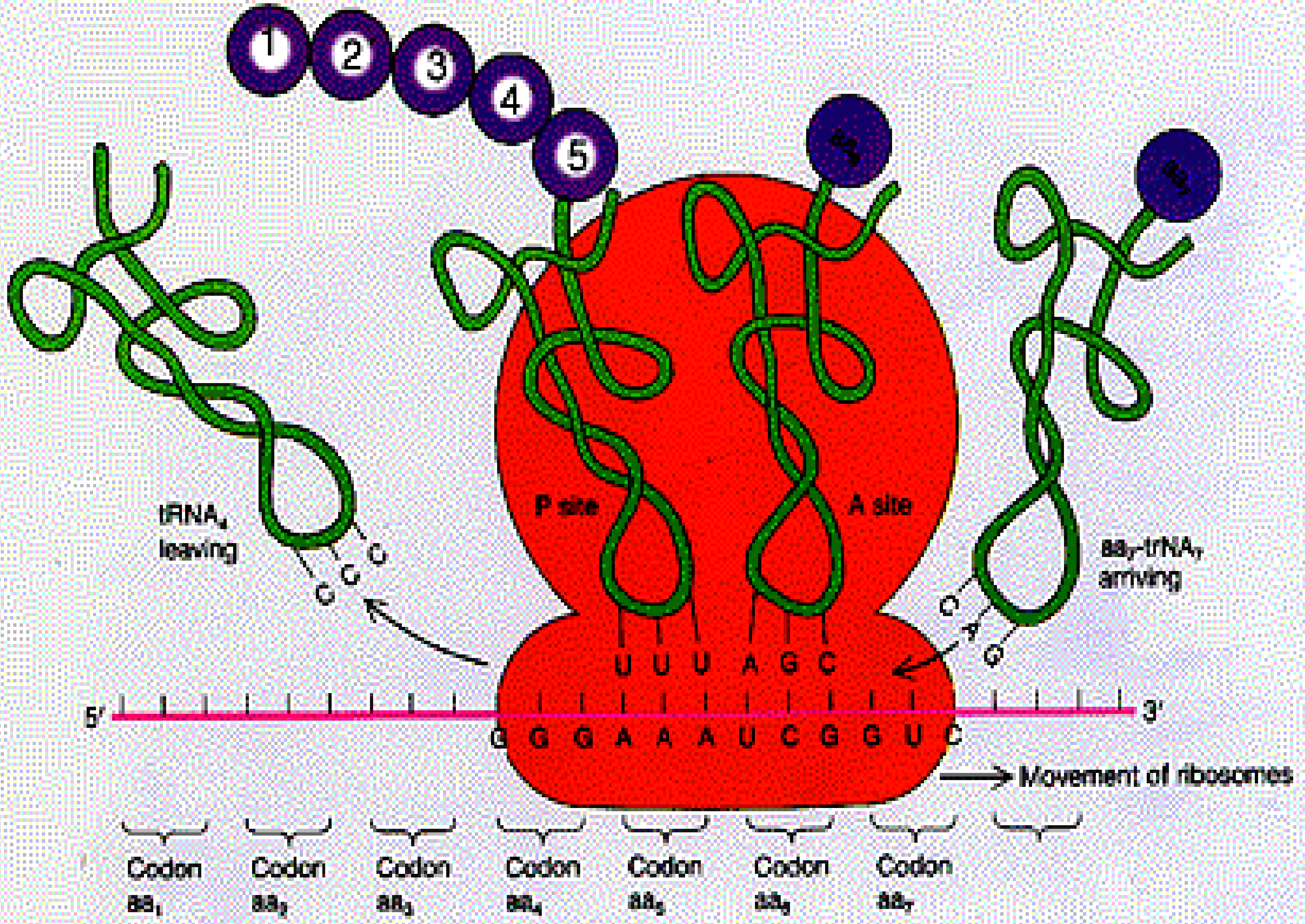
- ٢- الإستطالة:- يرتبط tRNA الذي يحمل الحمض الأميني بالكودون التالي في mRNA وتتكون رابطة ببتيدية بين الأحماض الأمينية المتجاورة .
- فعندما يكون tRNA الأول فى موقع الببتيديل نرى أن الـ tRNA للحمض الأمينى التالى يرتبط عند موقع الأمينو أسيل ويتزاوج كذلك بشفرة الـ mRNA ،ويحتاج هذا الترابط إلى الجمع بين عاملين لاستطالة البروتين هما EFS , EFU
- ثم تتكون رابطة ببتيدية بين الحمض الأمينى مثيونين والحمض الأمينى التالى.



(a) Free components
30S
Small ribosomal subunit
+
Met
Methionyl-tRNA$_f^{Met}$
U A C
+
5′ 3′
Leader
A U G
Messenger RNA
IF-1
IF-2
IF-3
GTP
GDP + P
(b) Initiation complex
30S
5′
A U G
U A C
Met
(c) Intact ribosome formed
GDP + P
GTP
Ef-T$_s$
EF-T$_u$
Val
C A G
30S
5′
A U G
G U C
U A C
Amino-acyl site
Met
50S
GDP + P
GTP
Peptidyl site
Amino-acyl site
50S
Large ribosomal subunit
(d) Aminoacyl site filled
5′
A U G
G U C
U A C
C A G
H
HN
Met
Val
Peptidyl transferase at
(e) First peptide bond formed
5′
A U G
G U C
U A C
C A G
Met
Val
Translocation
G
GTP
GDP
+
P
(f) Translocation effected
U A C
A U G
G U C
U U A
C A G
Amino-acyl site
Met
Val

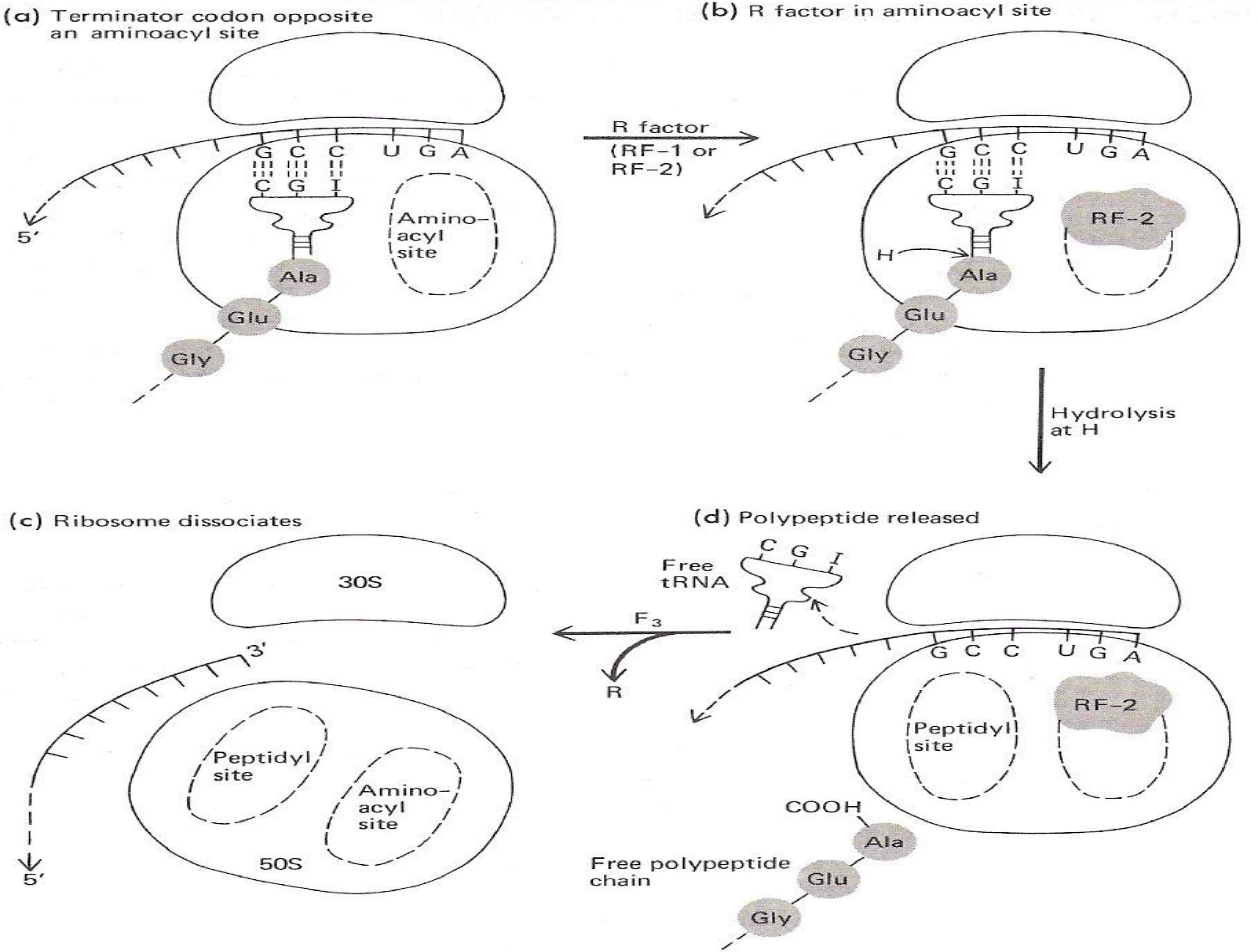
* ٣- إستمرارية الإستطالة

* ينفصل tRNA الأول و يترك حمضه الأميني ، يتحرك الـ tRNA ثنائي الببتيديل من موقع الأمينوأسيل إلى موقع الببتيديل ليصبح موقع الأمينوأسيل معدا لاستقبال tRNA جديد محمل بحمض أمينى أخر ، يتحرك الريبوسوم على mRNA إلى الكودون الذي يليه وتتحرك شفرة جديدة لتسجل بموقع الأمينو اسيل والتى تحدد الحمض الأميني التالى ثم تكرر الدورة بالخطوات نفسها . وهكذا تستمر قراءة التسلسل الموجود في جزئ mRNA. وبتوالي تحرك الريبوسوم في اتجاه `3→`5 وعلى طول خيط الـ mRNA سيتم انضمام ٨ – ١٥ حمض أميني كل ثانية إلى الببتيدة المتعددة الأخذة في النمو.

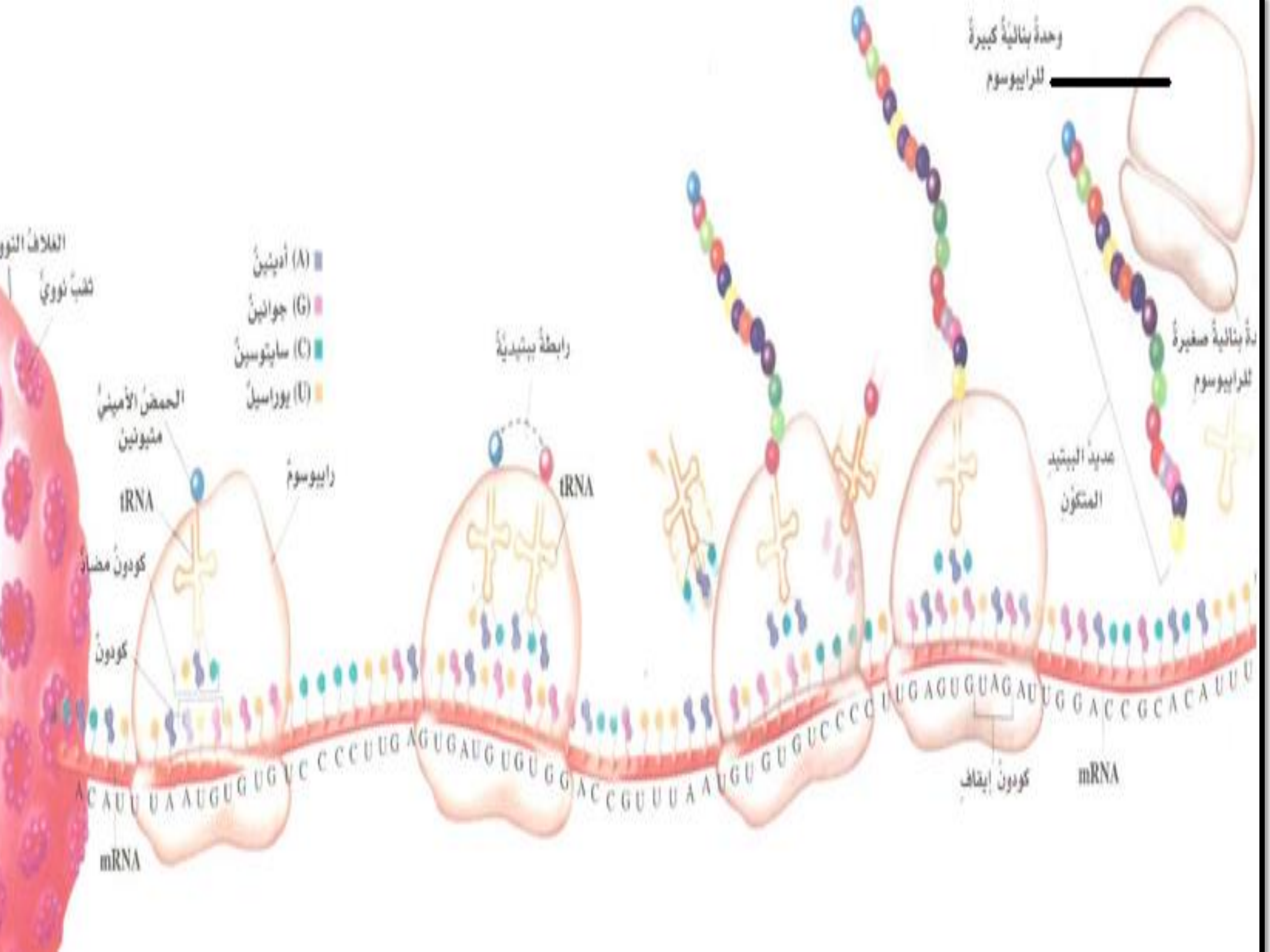


1
2
3
4
5
P site
A site
$tRNA_4$
leaving
C
C
C
aa_7-$tRNA_7$
arriving
C
A
G
U U U A G C
5′
3′
G G G A A A U C G G U C
Movement of ribosomes
Codon aa_1
Codon aa_2
Codon aa_3
Codon aa_4
Codon aa_5
Codon aa_6
Codon aa_7

- ٤- الإنـهاء
- تنتهي العملية عند بلوغها كودون إيقاف (لا يتوفر له tRNA) وهى عبارة عن واحدة من شفرات الاختتام Non-sense codon في الـ mRNA وتعمل الوحدات الثلاثية UGA ، UAG ، UAA جميعها كشفرات اختتام، حيث تتفاعل شفرة الاختتام مع أحد عوامل الإنـهاء RF-1 أو RF-2 والمعقد الناتج من عامل الانـهاء وشفرة الاختتام والريبوسوم يعوق أية استطالة أخرى للسلسلة .
- ٥- الانفصال
- انطلاق كلا من جزئ الـ tRNA حرا وعديد الببتيدات من الريبوسوم . وعندئذ يتفكك الريبوسوم إلى مكوناته من وحدات فرعية كبيرة وصغيرة وبذلك تكون الوحدات الفرعية المفككة هذه حرة في تشكيل معقدات إبتداء جديدة وفي الاشتراك في جولة أخرى لتخليق عديدات الببتيدات .



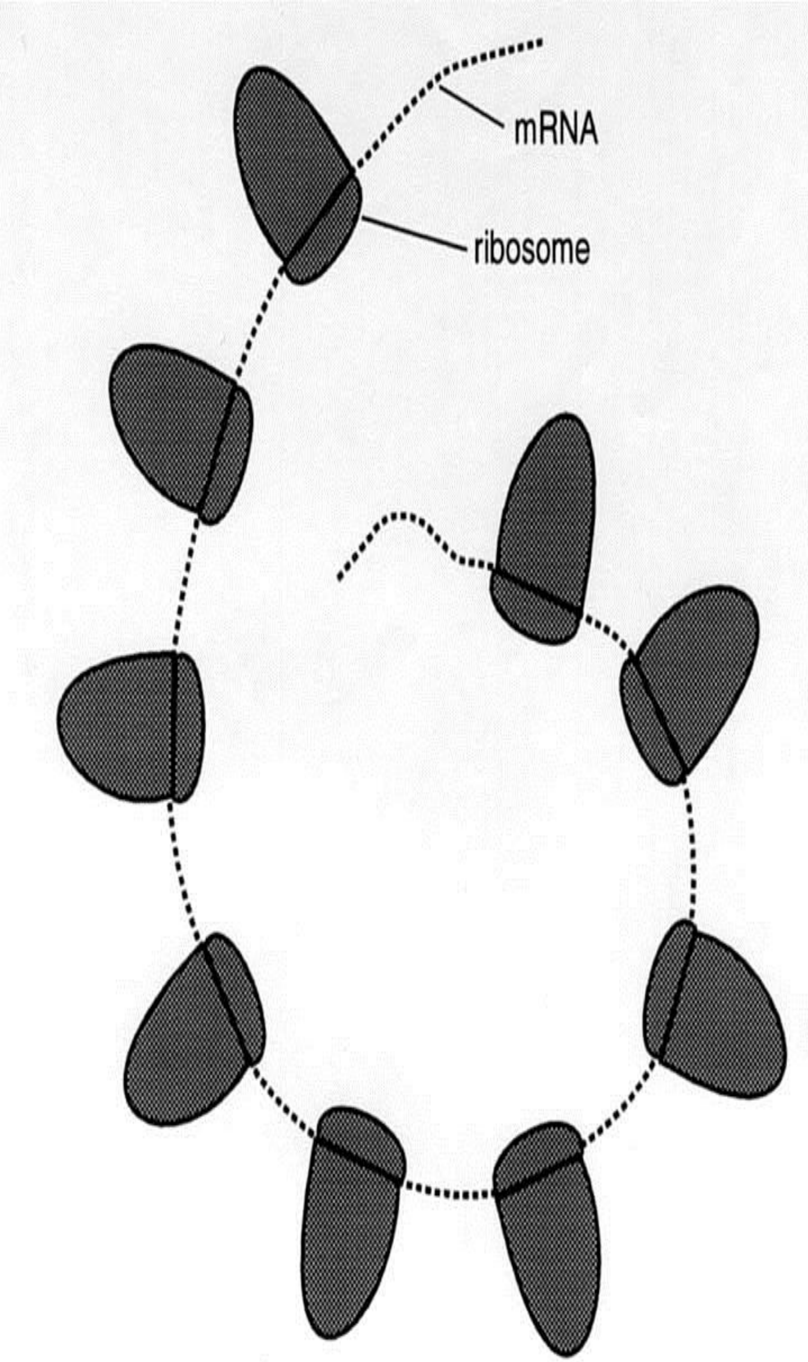
(a) Terminator codon opposite an aminoacyl site
G C C U G A
C G I
5′
Amino-acyl site
Ala
Glu
Gly
R factor
(RF–1 or RF–2)
(b) R factor in aminoacyl site
G C C U G A
C G I
RF–2
H
Ala
Glu
Gly
Hydrolysis at H
(c) Ribosome dissociates
30S
3′
Peptidyl site
Amino-acyl site
50S
5′
F_3
R
(d) Polypeptide released
Free tRNA
C G I
G C C U G A
RF–2
Peptidyl site
COOH
Ala
Glu
Gly
Free polypeptide chain

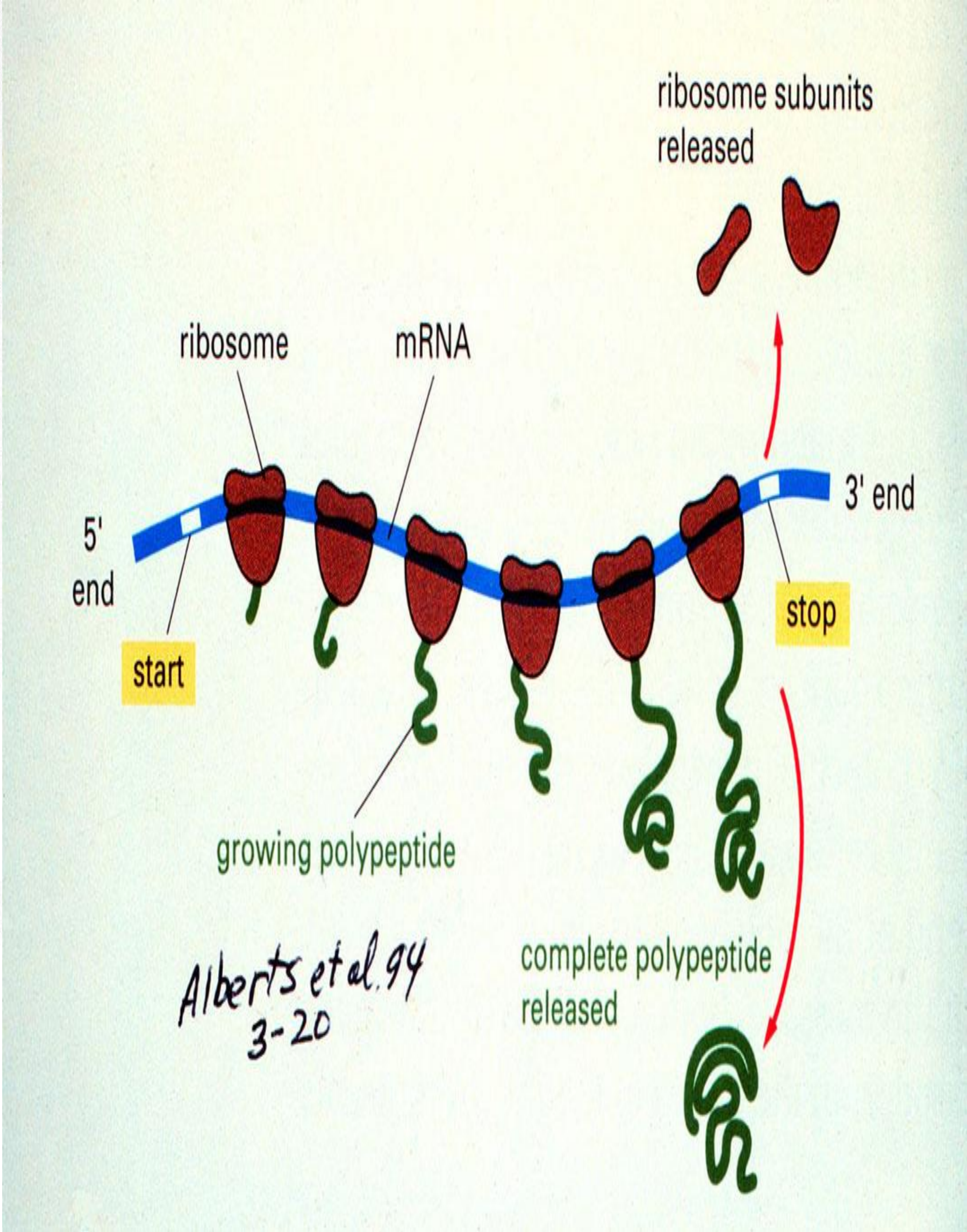


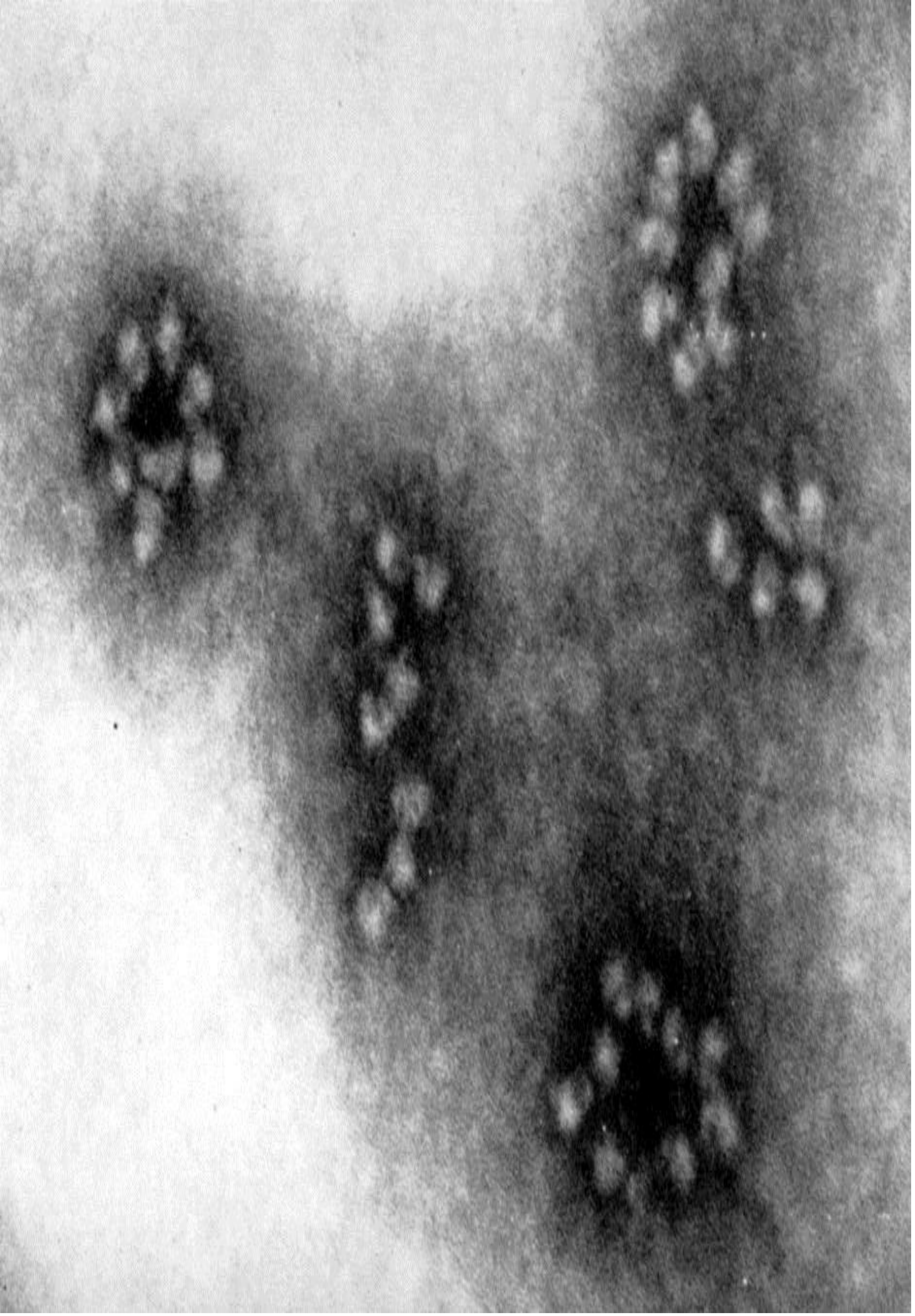
الغلافُ النو
ثقبٌ نوويٌ
(A) أدينينٌ
(G) جوانينٌ
(C) سايتوسينٌ
(U) يوراسيلٌ
الحمضُ الأمينيُّ مثيونين
tRNA
رايبوسومٌ
كودونٌ مضادٌ
كودونٌ
mRNA
رابطةٌ ببتيديةٌ
tRNA
وحدةٌ بنائيةٌ كبيرةٌ للرايبوسوم
دةٌ بنائيةٌ صغيرةٌ للرايبوسوم
عديدُ الببتيدِ المتكوّن
كودونُ إيقافٍ
mRNA

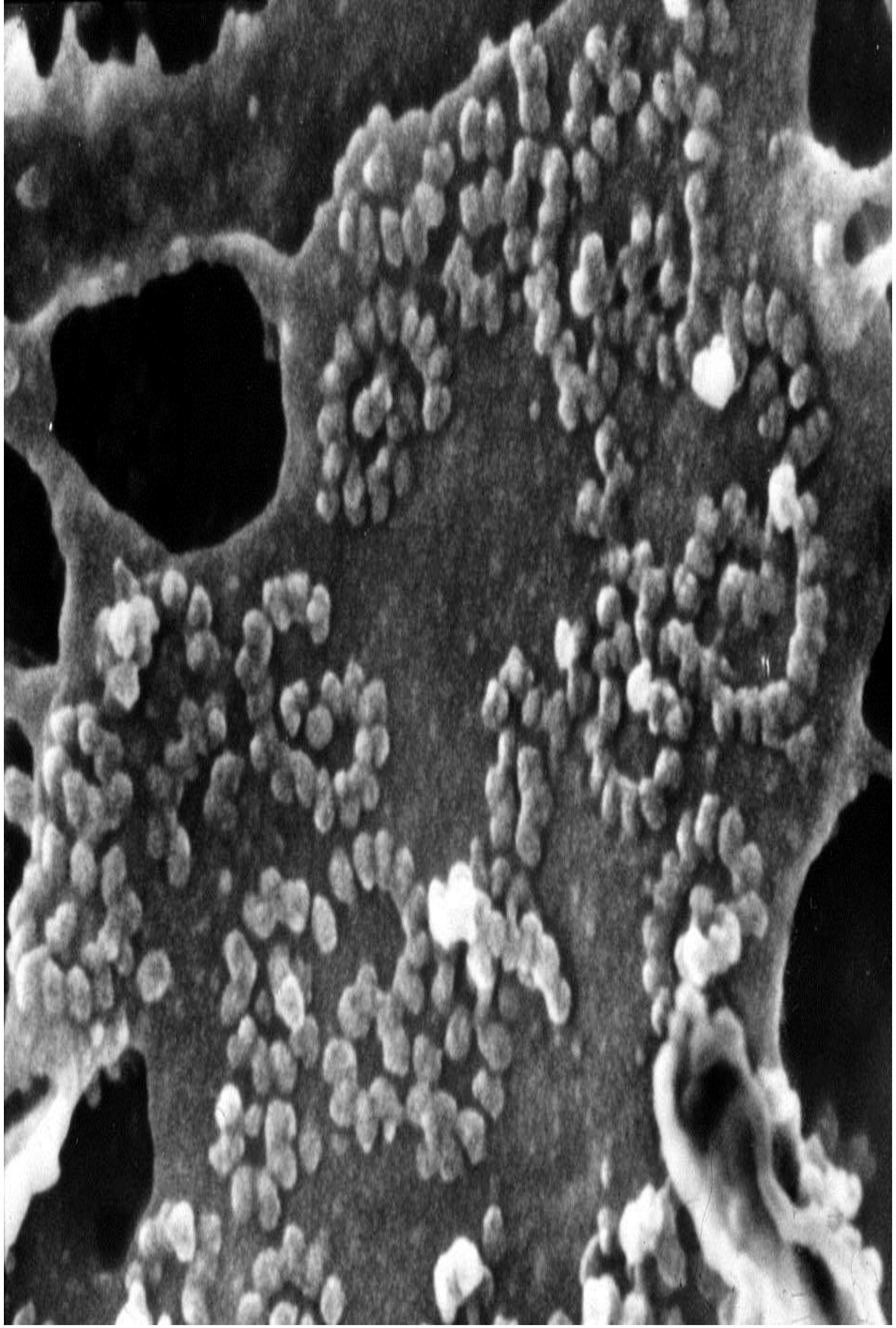
- بعد أن يتم الريبوسوم ترجمة حوالي ٢٥ شفرة من جزئ mRNA ، يصبح الطرف `5 حرا ليكون معقدا أخر للابتداء ويبدأ ريبوسوم ثان في التحرك بطول الـ mRNA محفزاً لتخليق سلسلة ثانية من متعددة الببتيدات . ويحذو ريبوسوم ثالث حذو سابقية وهلم جرا . ويكون البناء الناتج والمسمى **متعدد الريبوسوم أو البوليسوم polysome** مكونا من جزئ من الـ mRNA والذي تجرى ترجمته – في نفس الوقت – بواسطة عدة ريبوسومات إلى عدة سلاسل متعددة الببتيدات .

Polyribosomes (or **polysomes**) also known as **ergosomes** are a cluster of ribosomes, bound to a mRNA molecule.


mRNA
ribosome


ribosome subunits
released
ribosome
mRNA
5'
end
3' end
start
stop
growing polypeptide
complete polypeptide
released
Alberts et al. 94
3-20





أنواع المركبات البروتينية

تنقسم الى نوعين رئيسيين:

١-البروتينات التركيبية: Structural Proteins

هي البروتينات التي تدخل في تراكيب محددة في الكائن الحي مثل:

-الكيراتين: الذي يكون الاغطية الواقية : كالجلد والشعر والحوافر والقرون والريش وغيرها

-الاكتين والميوسين: الذين يدخلان في تركيب العضلات وغيرها من اعضاء الحركة

- الكولاجين: الذي يدخل في تركيب الانسجة الضامة

٢- البروتينات التنظيمية: Regulatory proteins

هي البروتينات التي تنظم العديد من عمليات وانشطة الكائن الحي، وهي تشمل:

-الانزيمات: والتي تدخل في كل العمليات الكيميائية بالخلايا الحية

-الاجسام المضادة

-الهرمونات

-عوامل التجلط في الدم

وغيرها من البروتينات

* يوجد ٢٠ نوع من الاحماض الامينية هي الوحدات البنائية للبروتين ولها جميعا تركيب اساسي واحد

- قارن بين عملية النسخ و عملية التناسخ؟
- عرف عملية النسخ وما هى متتطلباتها؟
- أذكر خصائص انزيمات بلمرة الـ RNA
- أذكر ما تعرفه عن:

structural gene & leader sequence & promoter sequences & Terminator sequences

- وضح فى جدول إنزيمات بلمرة الـ RNA فى الكائنات مميزة النواة؟
- وضح فى شكل تخطيطى تركيب الخيط الفعال للـ DNA ونسخته من الـ mRNA
- وضح دور كلا من tRNA , rRNA , mRNA في تخليق البروتين؟
- تعرف النسخة النهائية لنسخ جين تركيبي بـ ....
- توجد انواع عديدة من الجينات تنسخ و لا تترجم منها .... & ....
- إنزيم البلمرة RNA polymerase فى الـ *E. coli* يحتوى على عدد .... متعددات ببتيدية و الوحدة الفرعية δ مهمه جدا فى ....
- أثناء عملية النسخ ينسخ فقط خيط واحد من خيطى الجين يطلق عليه .... بينما الخيط الاخر يطلق عليه ....
- أول حمض أميني في سلسلة متعدد الببتيد يكون عادة .... ويحدد بالتتابع الشفرى .... على الـ mRNA

- أذكر فقط المراحل المختلفة لبناء سلسلة متعددة الببتيدات؟
- تشترك العديد من العوامل البروتينية فى تخليق البروتين. أذكرها موضحا أدوارها؟
- عرف الشفرة الوراثية موضحا خواصها؟
- ما المقصود بالــ polysome
- تعتبر .... هى الوحدات الفرعية الأساسية للبروتينات وعددها .... في البروتينات الطبيعية .
- .... هو دائماً أول حمض أميني مؤسس للببتيدة المتعددة وشفرته الوراثية ....
- يقصد بشفرات الاختتام في الـ mRNA بأنها .... وتتضمن .... & .... & ....

تنظيم التعبير الجيني
Regulation of gene expression

- مقدمه
- الاختلاف في شكل الخلايا للكائن الواحد و التي تحتوي على نفس مجموعة الجينات وصورها المختلفة **alleles** يرجع إلى أن هذه الجينات تعبر عن نفسها في أوقات مختلفة ، بمعنى أن هناك تنظيم لعمل الجينات اما في حالة تشغيلها أو عدم تشغيلها في الخلايا المختلفة و في الأوقات المختلفة .

- لذلك التعبير الجيني يتم تنظيمة أساساً على مستويات نسخ المادة الوراثية و بناء النسخة الجديدة من الـ mRNA و كذلك على مستويات الترجمة التي تتحكم في عملية الأيض metabolism للكائنات الحية .

- في بدائية النواة غالبا مايحدث التنظيم عند بدء استنساخ mRNA.
- اما في حقيقية النواة استنساخ mRNA يكون اكثر تعقيدا وعليه توجد اكثر من ميكانيكيه لعملية التنظيم.

- هنالك ميكانيكيه خاصه في حقيقية النواة وهو الاستنساخ المتخصص بنوع الخلايا وهذا يتحقق من خلال المعالجه الاختياريه او البديله alternative processing لشريط mRNA الأولي غير الناضج وتكوين خيوط مختلفه من mRNA وبالتالي ترجمته الى بروتينات مختلفه متعلقه بوظيفة تلك الخليه.
- وبالرغم من ذلك فان تنظيم النسخ في حقيقية وبدائية النواة يحدث من خلال ارتباط بروتينات مع تتابع معين على جزئ الـ DNA ينتج اما زياده او نقصان في معدل النسخ.

- تنظيم عملية نسخ mRNA في بدائية النواة

- تحدث عملية تنظيم التعبير الجيني في البكتريا من خلال تنظيم عملية بدء النسخ ومن الأمثلة المهمة لتوضيح ميكانيكة تنظيم الجينات في الكائنات غير مميزة النواة هي الاستحثاث والتثبيط

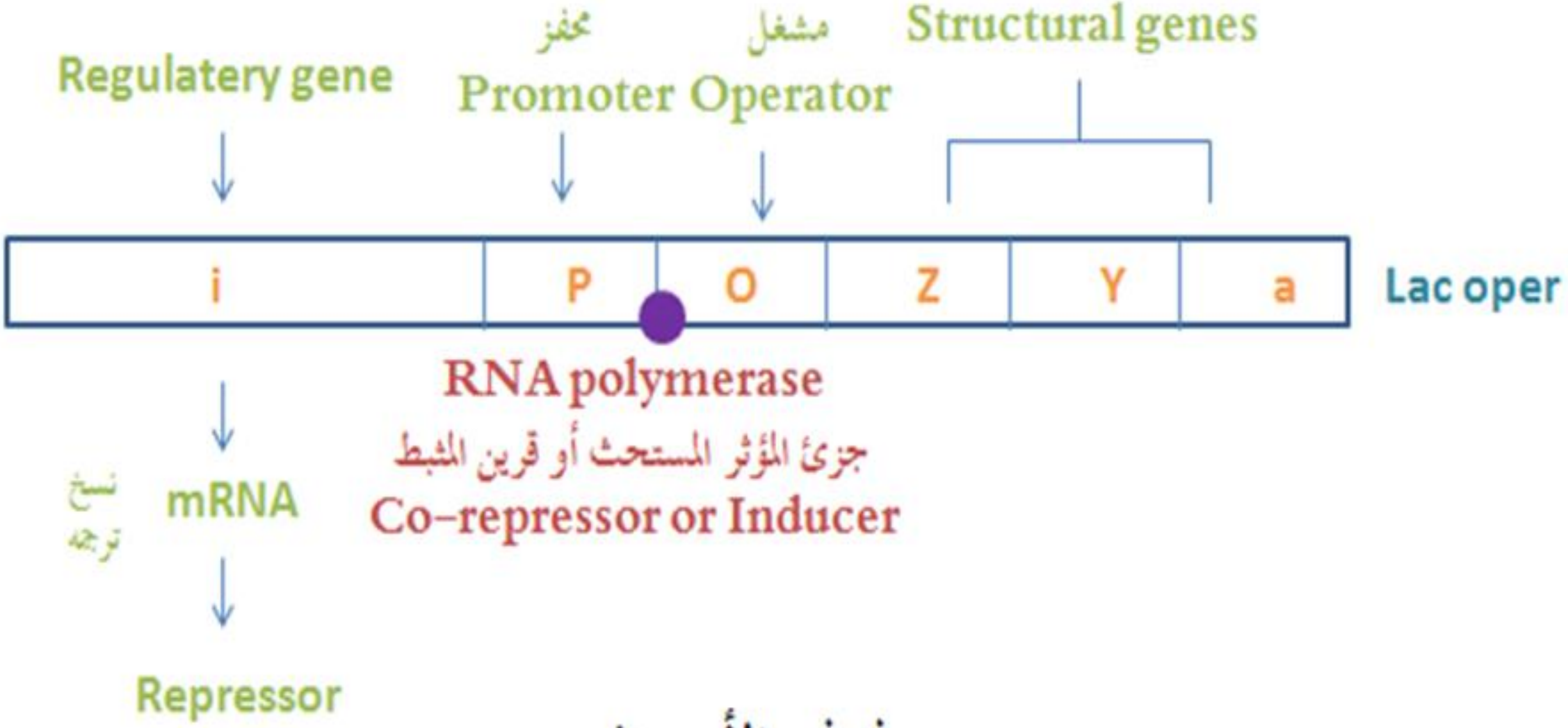
Inducation and Repression

• نموذج الأوبرون The Operon Model (Lac Operon)

- وصفت ميكانيكية الاستحثاث و التثبيط بعمل نموذج يعرف بالـ Operon الذي صمم على يد Jacab and Monod عام ١٩٦١ ،
- هذا النموذج يوضح تنظيم عمل الجينات التي تشفر للإنزيمات التي تحتاجها البكتيريا لتكسير سكر اللاكتوز.

- النموذج افترض الآتي :
- نسخ مجموعة من الجينات التركيبية (جينات تشفر لسلاسل عديد الببتيد) الممثلة لصفة واحدة يحدث له تنظيم لعاملين أساسين هما :
- ١- الجين المنظم regulator gene وهو يشفر تحت ظروف معينة لبروتين يسمى repressor .
- ٢- المشغل operator (o): وهو عبارة عن تتابع من النيوكليوتيدات يرتبط مع ناتج الجين المنظم (repressor) ويكون ملاصقاً للجينات التركيبية التي يشترك في تنظيم تعبيرها .

- عندما يكون repressor مرتبطاً مع التتابع المشغل (o) فإن نسخ الجينات التركيبية لا يمكن أن يحدث و ذلك بسبب عدم قدرة انزيم RNA polymerase على الارتباط مع التتابع المحفز (P) promoter(موقع ارتباط RNA poly) والذى يكون ملاصق لـ (o) و أحياناً متداخل معه و تعرف هذه المجموعة بالأوبرون .
- اذن يمكن القول أن الأوبيرون هو : مجموعة من الجينات التركيبية مسئولة عن صفة واحدة ويشترك فى تنظيمها promoter واحد و operator واحد وأيضا Terminator واحد.



نموذج الأوبرون

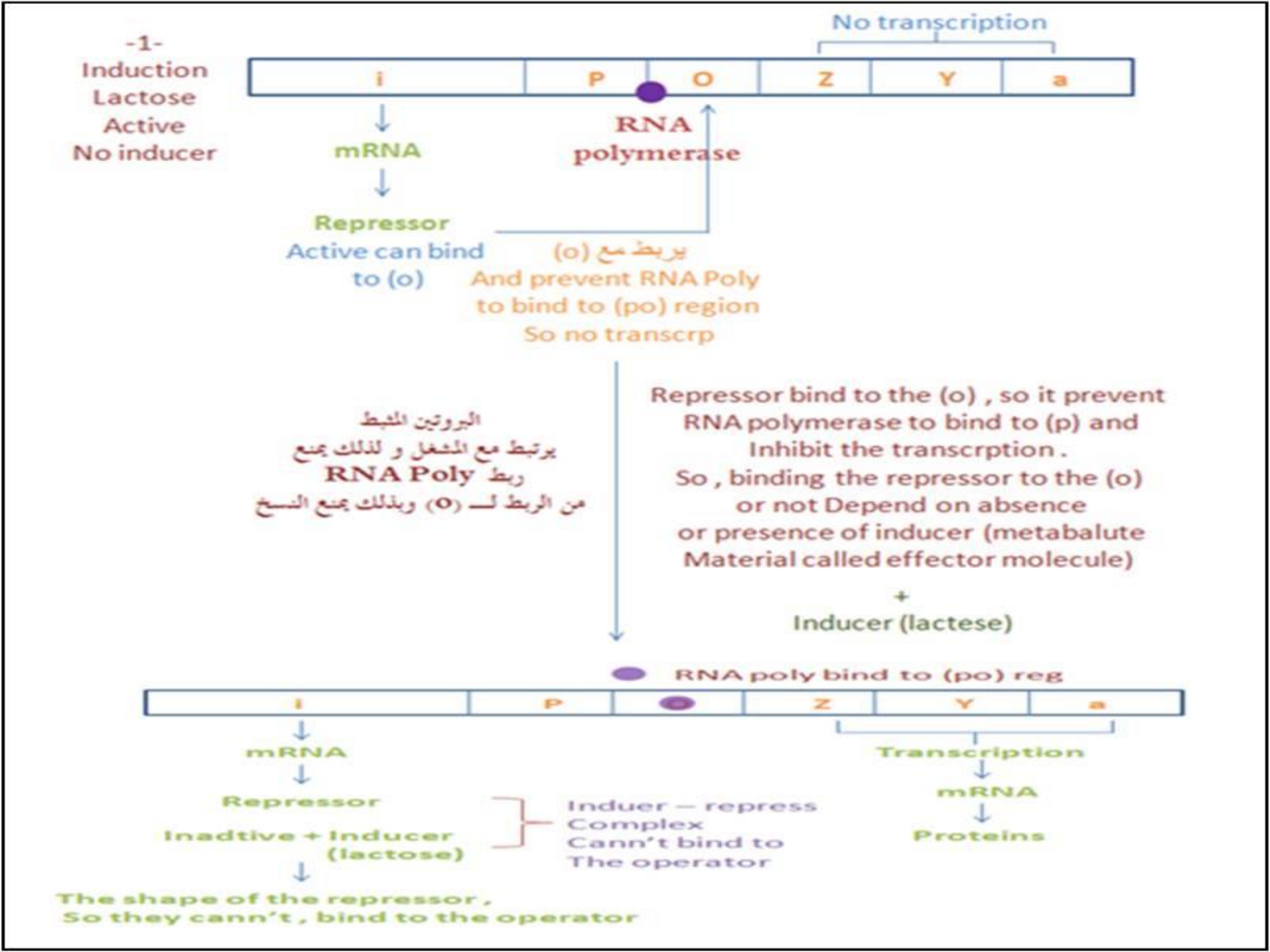
Operon

أولا الاستحثاث Inducation

- عندما تنمو الخلايا في بيئة بها سكر اللاكتوز كمصدر وحيد للكربون ينتج ثلاثة أنواع من الإنزيمات :
- β - galactosidase (z)
- β - galactoside permease (y)
- β - galactoside transacetylase (a)

وبالتالى وجود اللاكتوز (أو أي مصدر كربوني) في بيئة نمو البكتيريا يسبب ميكانيكة تنظيم جيني لانتاج الإنزيمات اللازمة لهدم هذه المواد الكربوهيدراتية و تسمى هذه العملية بالاستحثاث Inducation .

الجينات التي يتم تنظيم التعبير عنها تعرف بالجينات المستحثة Inducible genes و تسمى نواتج هذه الجينات بالإنزيمات المستحثة Inducible enzyme أما الكربوهيدرات (مواد الإستحثاث) تسمى Inducer .

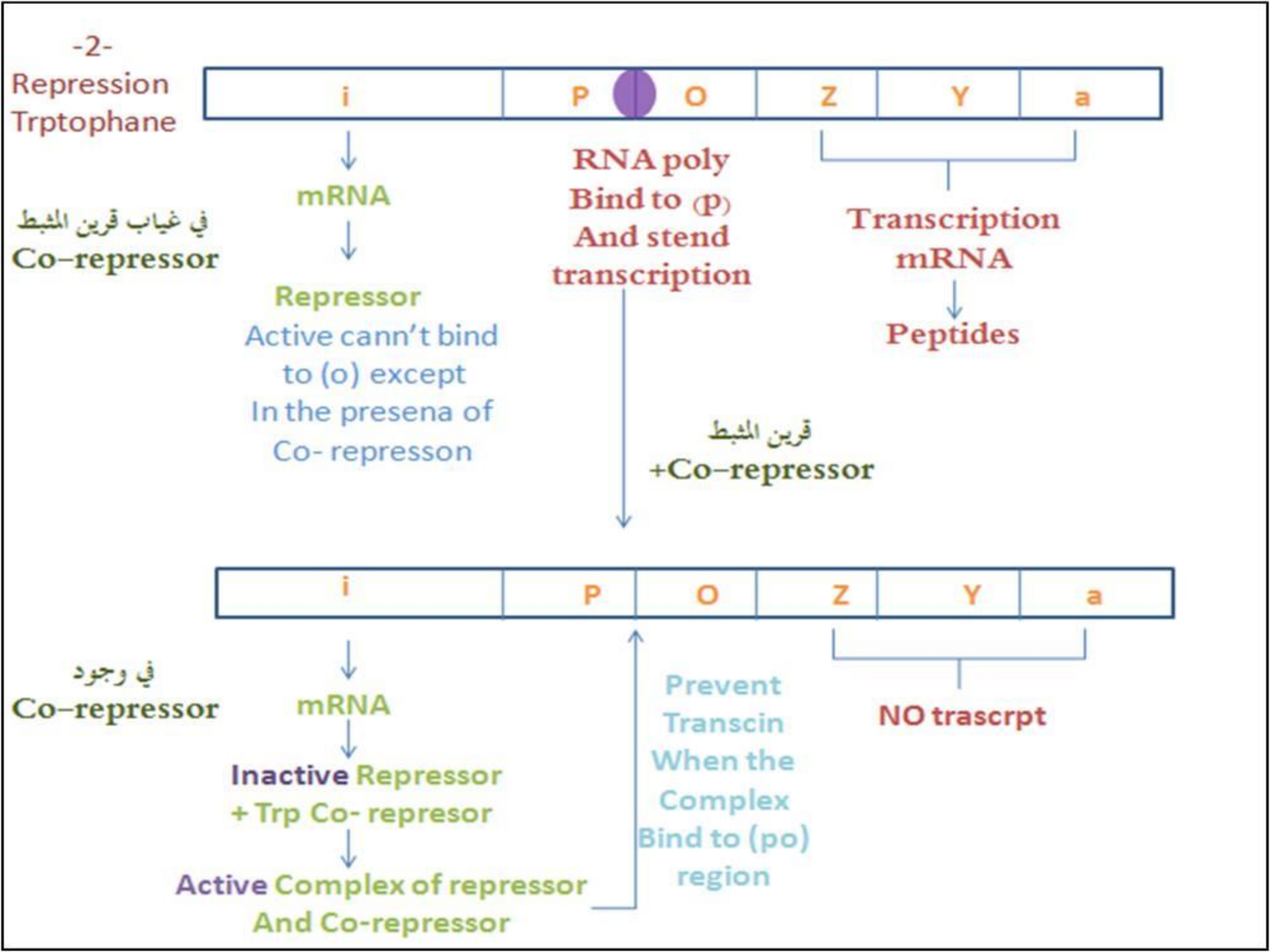


No transcription
-1-
Induction
Lactose
Active
No inducer
i
P
O
Z
Y
a
mRNA
RNA
polymerase
Repressor
Active can bind
to (o)
يربط مع (o)
And prevent RNA Poly
to bind to (po) region
So no transcrp
البروتين المثبط
يرتبط مع المشغل و لذلك يمنع
ربط RNA Poly
من الربط لـــ (O) وبذلك يمنع النسخ
Repressor bind to the (o) , so it prevent
RNA polymerase to bind to (p) and
Inhibit the transcrption .
So , binding the repressor to the (o)
or not Depend on absence
or presence of inducer (metabalute
Material called effector molecule)
+
Inducer (lactese)
RNA poly bind to (po) reg
i
P
Z
Y
a
mRNA
Repressor
Inadtive + Inducer
(lactose)
The shape of the repressor ,
So they cann't , bind to the operator
Induer – repress
Complex
Cann't bind to
The operator
Transcription
mRNA
Proteins

ثانيا التثبيط Repression

يوجد في بكتيريا القولون ٥ جينات تشفر للإنزيمات التي تحتاجها لإنتاج التربتوفان Tryptophan (حامض أميني) . لا بد أن يتم التعبير عن هذه الجينات الخمسة في خلايا بكتيريا نامية في بيئة خالية من التربتوفان و ذلك لكي تستطيع هذه الخلايا توفير كميات مناسبة من هذا الحامض الأميني لبناء البروتين .

وعندما تتواجد الخلايا في بيئة بها تربتوفان فإن بناء الإنزيمات التي تدخل في الإبتناء الحيوي للتربتوفان يكون مضيعة للطاقة لأن هذه الخلايا تستطيع أن تأخذ التربتوفان من البيئة و تسمى عملية إيقاف التعبير عن الجينات بعملية Repression


-2-
Repression
Trptophane
i
P
O
Z
Y
a
في غياب قرين المثبط
Co–repressor
mRNA
Repressor
Active cann't bind
to (o) except
In the presena of
Co- represson
RNA poly
Bind to (p)
And stend
transcription
Transcription
mRNA
Peptides
قرين المثبط
+Co–repressor
i
P
O
Z
Y
a
في وجود
Co–repressor
mRNA
Inactive Repressor
+ Trp Co- represor
Active Complex of repressor
And Co-repressor
Prevent
Transcin
When the
Complex
Bind to (po)
region
NO trascrpt

Induction , Repression الفرق بين

في حالة Induction

When repressor free – it will bind to (o) , So No transcription .

When repressor + Inducer . This complex will be inactive , so can not bind to (o) , so will be transcript.

في حالة Repression

Repressor free – it can not bind to (o) , so will be transcription .

Repressor + corepressor (Trp.) will form an active complex and will bind to (o) and prevent transcription.

تنظيم عملية التعبير الجينى في حقيقيات النواة

- عملية تنظيم التعبير الجيني في حقيقية النواة أكثر تعقيدا مما عليه في بدائية النواة وتشمل:-
- ١- تنظيم عملية بدء الاستنساخ
- ٢- المعالجه الاختياريه أو البديله
- ٣- تنظيم عملية بدء الترجمه

- تنظيم عملية بدأ النسخ Regulation of the initiation of transcription
- في حقيقية النواة هنالك عوامل النسخ (transcription factors) تساهم في تكوين معقد البدء والذي يسمح بارتباط انزيم البلمرة RNA polymerase II.
- وهناك عوامل نسخ متخصصه (Specific transcription factors) لها القدره على الارتباط بتتابعات منظمه على جزئ DNA تسمى Enhancer أو Silencer والتي تعمل على تحوير في تكوين معقد البدء وهكذا تنظم معدل النسخ.

- **أ-عوامل النسخ (Transcription factors)**
- هي بروتينات ترتبط بتتابعات منظمه regulatory sequence على جزئ DNA ، بالاضافه الى امكانية ارتباطها بانزيم بلمرة RNA وبعوامل نسخ اخرى .
- **ب-تتابعات Enhancer and Silencer**
- هي تتابعات معينه من القواعد النتروجينيه على شريط DNA ترتبط بها عوامل النسخ الخاصه والتي من خلالها يتم تنظيم عملية النسخ .
- Enhancer تعمل على زيادة معدل النسخ ، أما Silencer يعمل على تثبيط النسخ.

mRNA Processing

- تشتق جزيئات RNA الرسول من النسخ الأولية للجين بواسطة العديد من عمليات التجهيز المتنوعة والتى تتضمن :-
- ١- تكسير RNA الرسول الابتدائى (pre-mRNA) الى جزيئات أصغر.
- ٢- اضافة مجاميع ٧-ميثايل جوانوزين 7-methyl guanosine groups (غطاء RNA الرسول 5' GTP cap) للأطراف `5 .
- ٣-اضافة حوالى ٢٠٠ نيوكليوتيدة متتابعة من الأدينين (Poly A tails) للطرف `3.
- ٤-ازالة التتابعات القائدة leader sequences وهى تتابعات من الطرف `5 حتى كودون ابتداء الترجمة.
- ٥- ازالة التتابعات الغير شفرية والتى تسمى بالأنترونات Introns والتى تقع بين التتابعات الشفرية (الأكسونات exons).

The 5' GTP cap and the poly-A tail that are added to immature mRNA during processing, before the mRNA leaves the nucleus. They serve three major purposes:
Both the 5' cap and polyA tail share the same dual function.

(A) Both are recognized by a complex of proteins that protects the mRNA from nucleolytic degradation

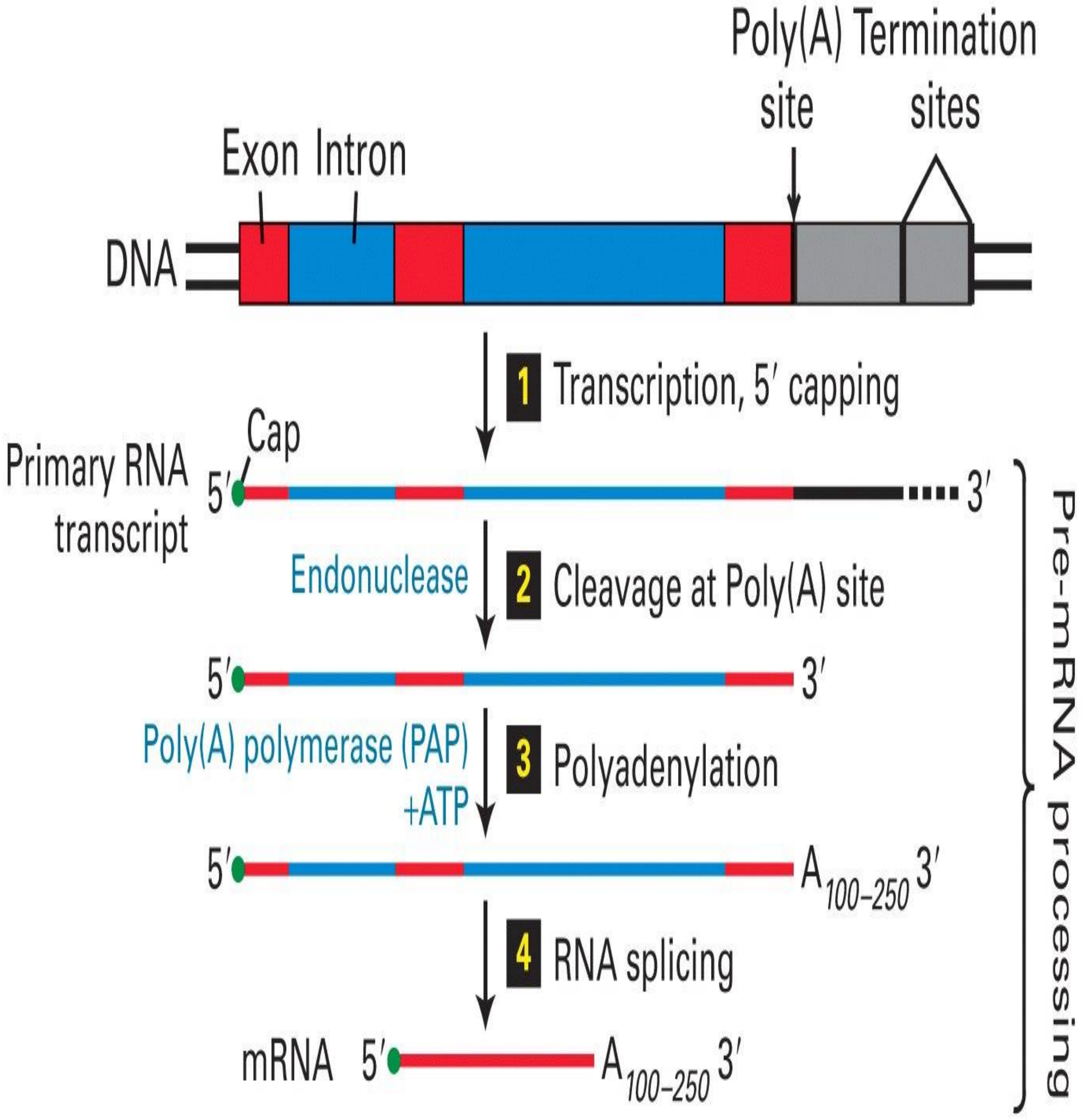
(B) promotes binding of the mRNA by ribosomes

(C) The 3' poly A tail assists the mRNA strand in leaving the nucleus.

Without either of these structures added to mRNA, it would have difficulty leaving the nucleus and would be attacked and degraded by enzymes in short order. In other words, genes would never be translated and eukaryotic life as we know it would be impossible.

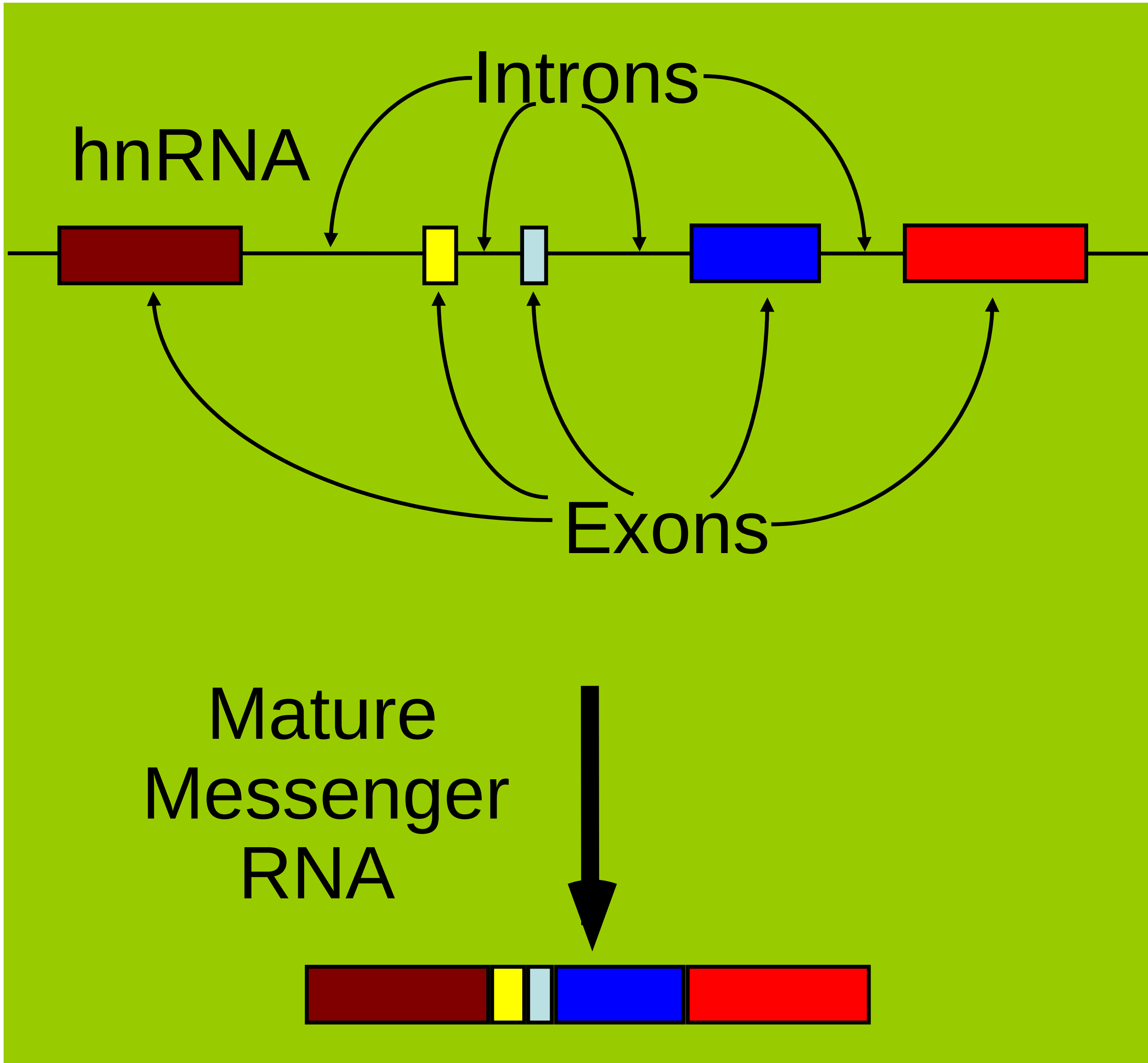
Coding sequence accounts for only a small fraction of all genomic DNA

mRNA processing eliminates the "junk" sequence from heterogeneous nuclear RNA (hnRNA).



mRNA Splicing

- Protein coding sequence is contained only in exons.
- Introns are intervening sequences considered to be “junk” and must be spliced out prior to translation



The Splicesome -almost as large as a ribosome and just as dependent on RNA

Machinery consists of five 100 -300 bases nRNAs(U1, U2, U4, U5, U6)

and the proteins they are complexed with

Together these comprise the snRNPs, although there are a few RNA-free

proteins as well (e.g., BBP, mRNA annealing factors, DEAD-box helicases)

SnRNPs are responsible for 3 primary functions:

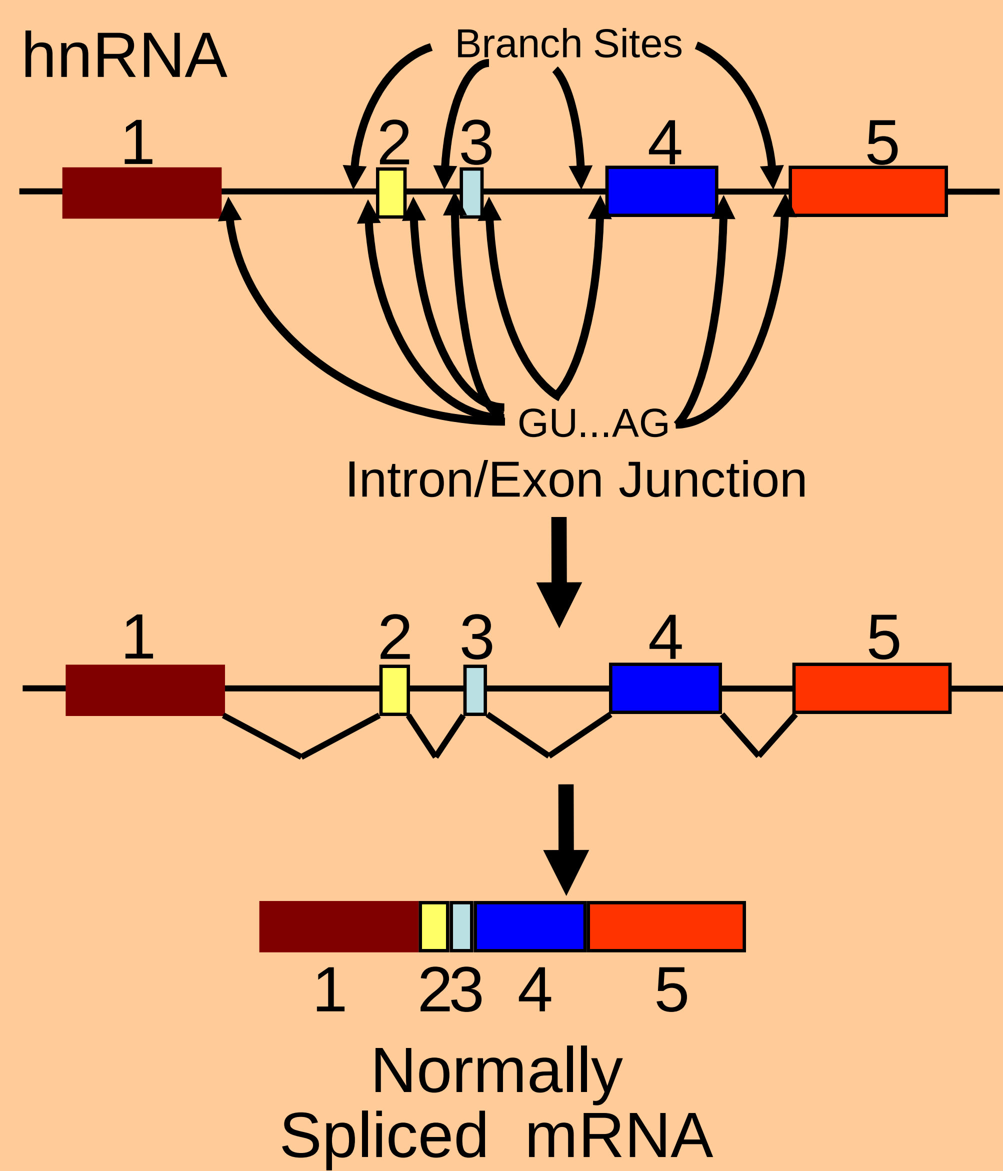
Recognize sites (splice site and branch point site)

Bring these sites together

Catalyze cleavage reactions that involve the sites

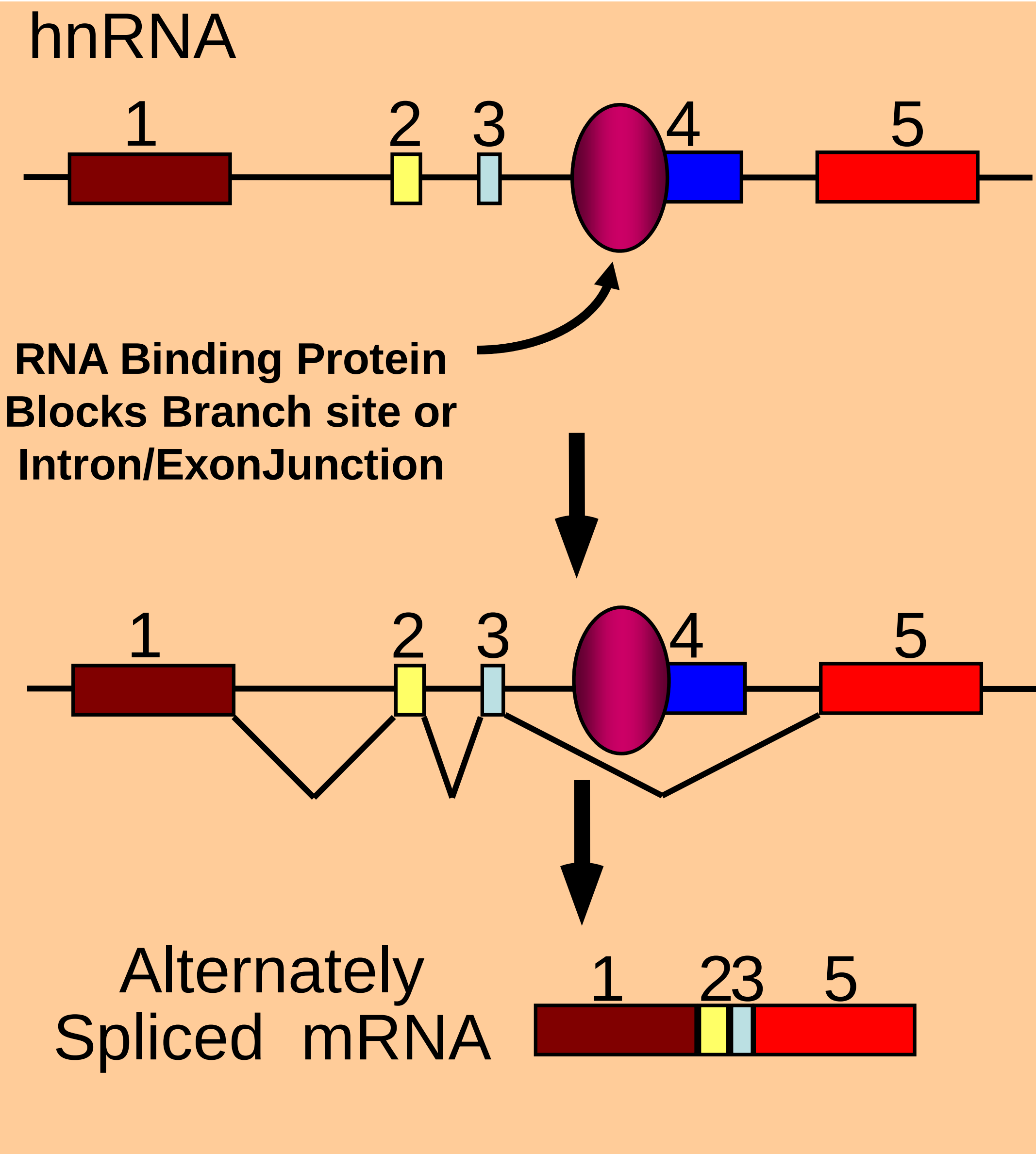
Alternate mRNA Splicing

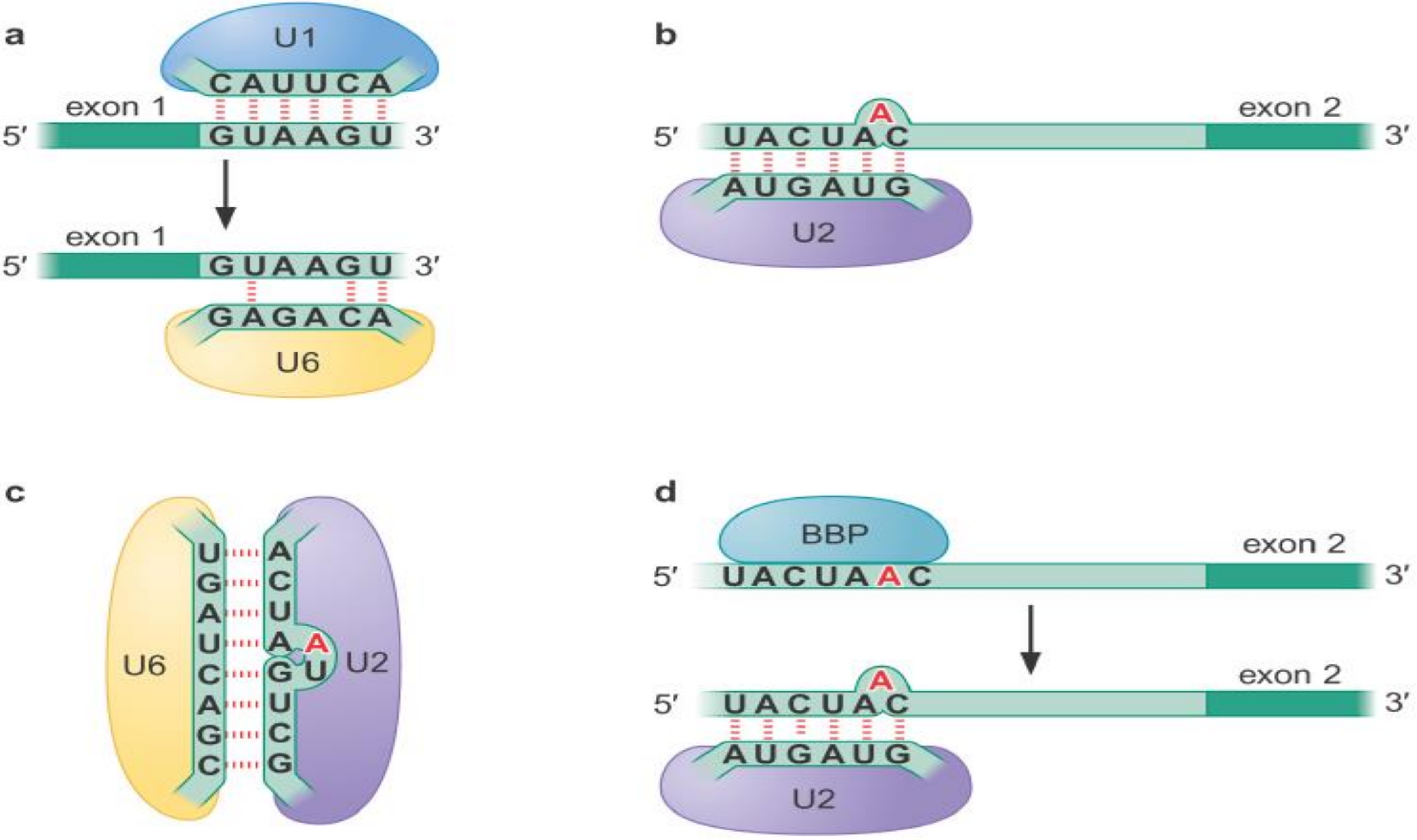
- **Exons are spliced sequentially since the snRNP U1 bound at each donor splice site scans the mRNA for the nearest snRNP U2 (*i.e.*, the branch site in the same intron).**



Alternate mRNA Splicing

- Blockage of a branch sequence by a *trans*-acting factor causes snRNP U1 to skip to the branch sequence of the next intron.
- Subsequent splicing eliminates the intervening exon.





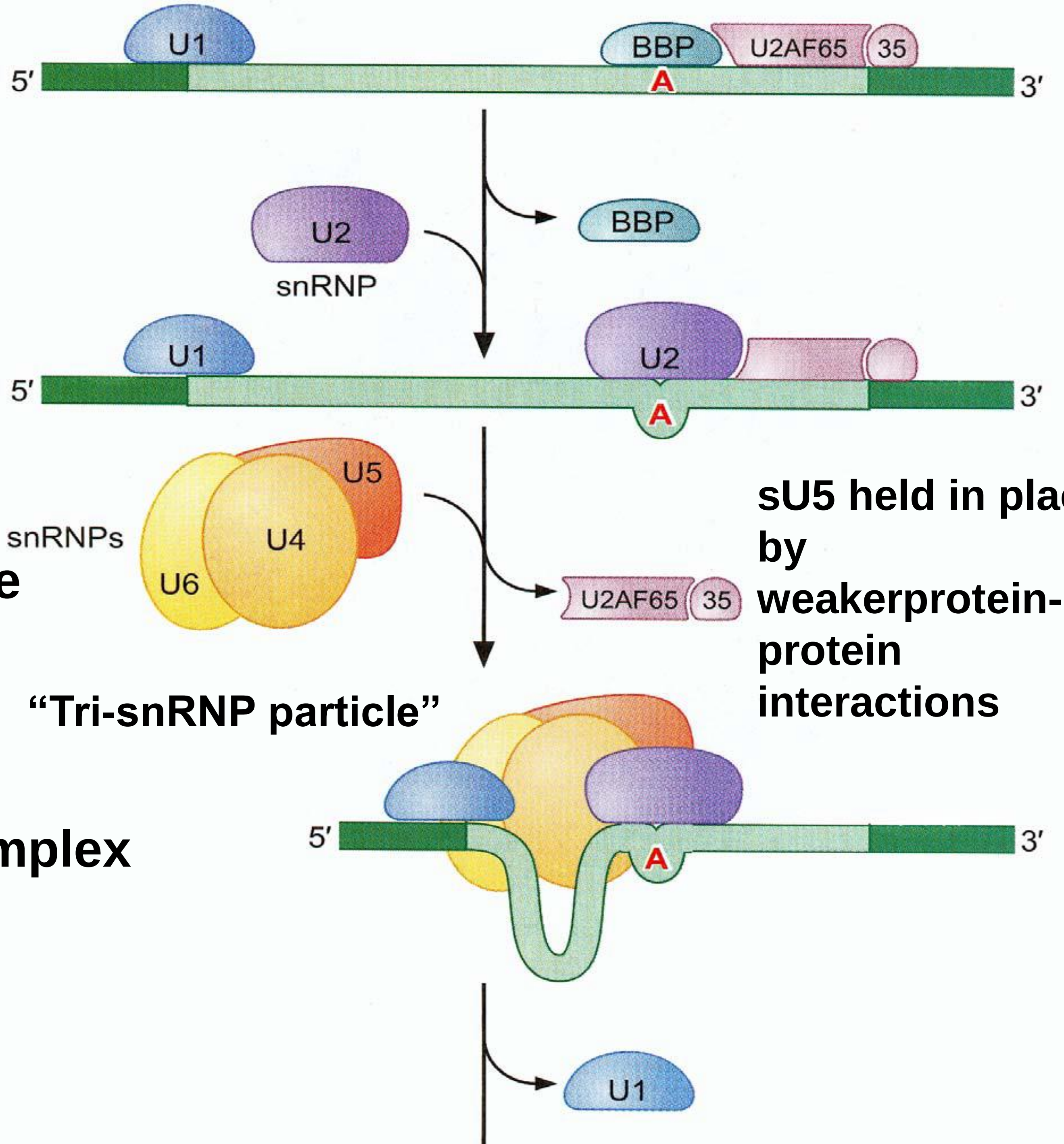
Copyright © 2004 Pearson Education, Inc., publishing as Benjamin Cummings

site Interactions among snRNP components of the splicesome involving RNA-RNA hybrids

E -complex

A -complex

U4-U6 held together by base pairing of RNA components



“Tri-snRNP particle”

sU5 held in place by weakerprotein-protein interactions

B -complex

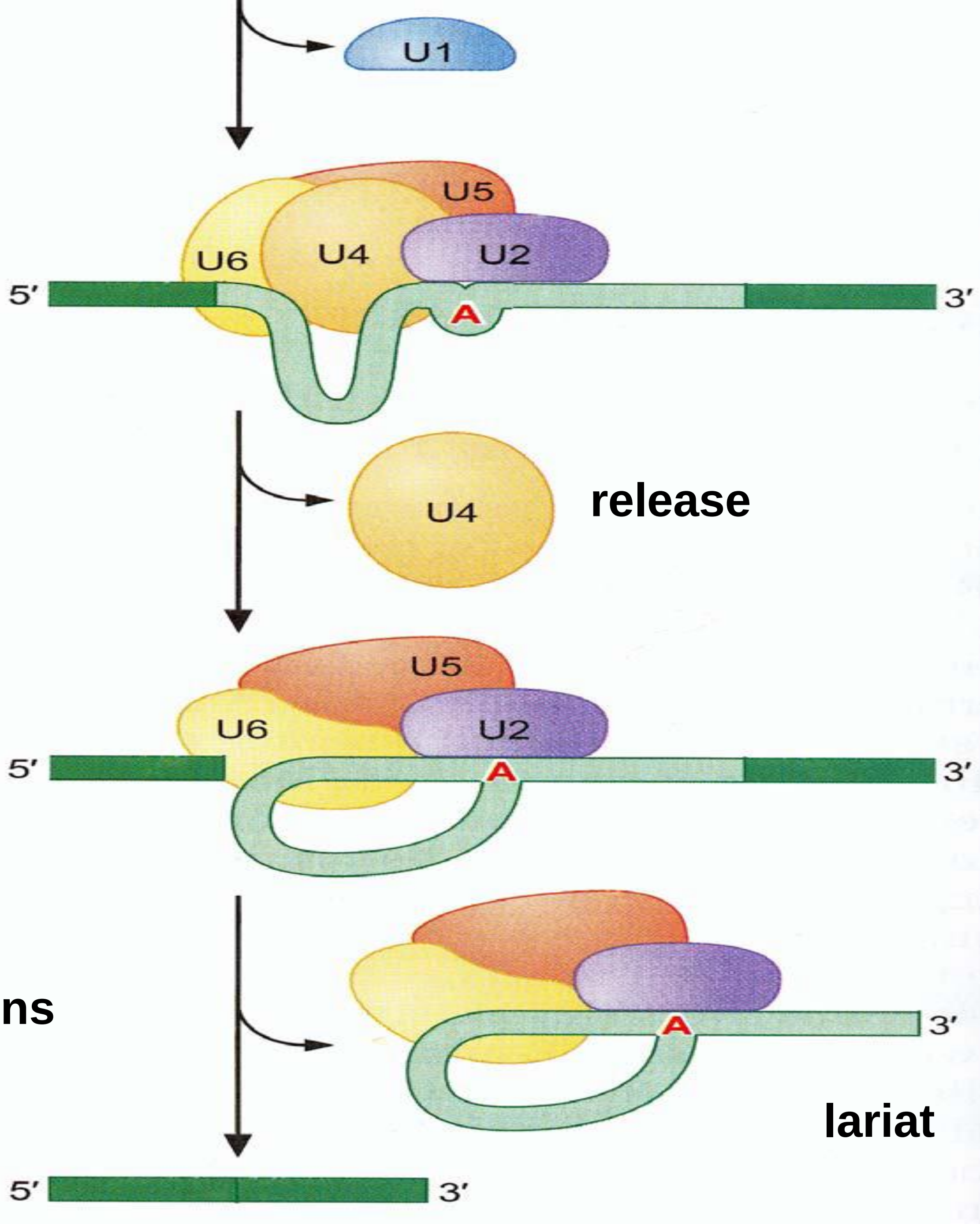
U1 replaced by U6

Assembly of splicesome is complete

C complex (U2 contacts U6 to form active site)

2 transesterification reactions

Spliced mRNA



تنظيم عملية بدء الترجمة

Regulation of the initiation of translation

- آلية ترجمة المعلومات الوراثيه الى بروتين تنظم من خلال السيطره على عملية بدء الترجمه والمسؤول عنها بروتينات منظمه لها القدره على الارتباط بتتابعات معينه على شريط mRNA .
- تخضع عملية بدء تخليق البروتين فى Eukaryotes الى ميكانيكيتين:-

- ١- Cap – dependent

- والتى تتطلب التركيب 5′ ^{m7}GTP cap ويتم التعرف عيه بواسطة eIF4F complex, المكون من the cap-binding protein (eIF4E), protein (eIF4G), and helicase (eIF4A).
- تحت الوحدة الريبوسومية 40 S تمد الطرف 5` بمعقد يسمى 43S preinitiation complex (PIC) والذى يتكون من:-
- 40S ribosomal subunit , the multifactor complex (MFC: eIF1, eIF1A, eIF3, eIF5) , complex [eIF2, GTP, and Met-tRNA$_i$ ^{Met}]).

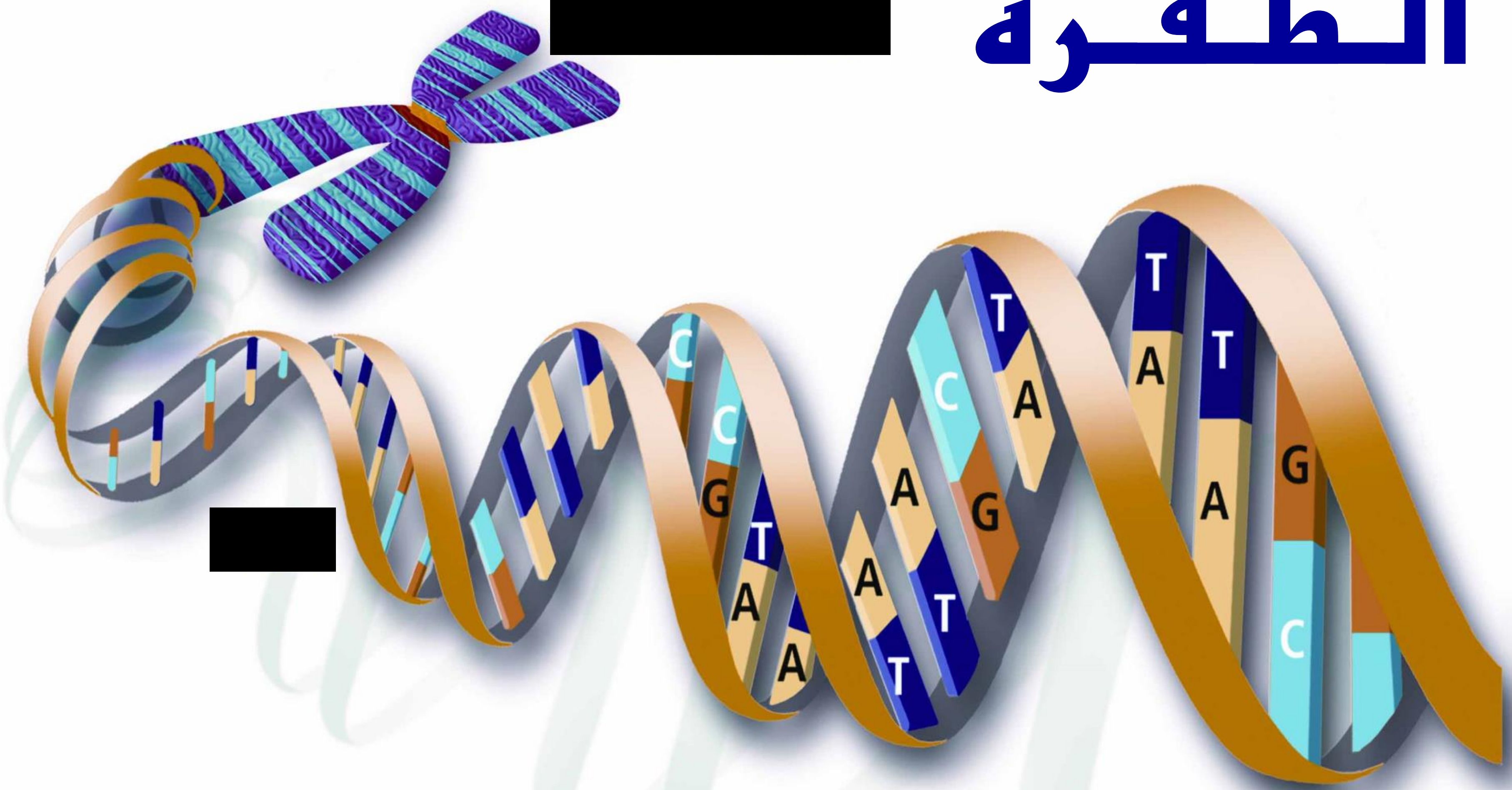
- يقوم PIC بعمل Scan على mRNA حتى يصل الى شفرة الابتداء start codon ، عند هذه النقطة يحدث ازدواج بين Met-tRNA والثلاثية AUG الخاصة بالحامض الأمينى مثيونين ثم يحدث تحلل لـ eIF2-GTP وينطلق eIF2-GDP مع عوامل أخرى.
- ثم يقوم eIF5B-GTP , بتنشيط تحت الوحدة الريبوسومية 60 S بالارتباط وينطلق eIF5B-GDP and eIF1A وينتج معقد الترجمة النشط 80 S .

- ٢- Cap –independent

- والتى تتطلب موقع داخلى للريبوسوم internal ribosome entry site (IRES)
- الا انه لا يوجد الا القليل من المعرفة عن هذه الميكانيكية
- ففى بعض الحالات تحتاج IRESالى بعض عوامل ابتداء الترجمة مثل eIF2, eIF3, eIF4A وغيرها ،
- وفى حالات أخرى فان IGR IRESs , تكون قادرة على ربط تحت الوحدة الريبوسومية 60 S ، 40 S لتكوين معقد 80 S.

Stage	Factor	function
Initiation factor	eIF3 eIF4c eIF6 eIF4B eIF4F eIF2B eIF2 eIF5	Bind to ribosome submits Bind to mRNA Initiator tRNA delivery Displacement of other factors
Elongation factor	eEF1α eEF1βγ eEF2	Aminoacyl tRNA delivery Recycling of EF-Tu or eEF1α Translocation
Termination factors	eRF	Polypeptides Chain release

الـطـفـرة [redacted]



[redacted]

Mutation

Mutation الطفرة

مقدمة :

يعتمد التوارث على الجينات التي تنتقل بدقة من الآباء إلى النسل في عملية التكاثر و التي تعتبر مقاطع من DNA توجد على كروموسومات الكائن ، و يتمثل محتواها الشفري في تتابعات من أزواج القواعد التي تتكرر بدقة خلال عملية التضاعف شبه المحافظ .

و تشتمل إنزيمات بلمرة DNA على نشاط Exonuclease الذى يقوم بهدم DNA من طرفه في الاتجاه ´3 إلى ´5 مما يمكنها من مراجعة جزيئات DNA الناتجة وتصحيح الأخطاء الحادثة خلال تفاعل البلمرة .

- أي أن هناك ميكانيكات قد نشأت لتسهيل النقل الصحيح للمعلومات الوراثية من جيل إلى آخر
- ومع ذلك تحدث بعض التغيرات في مادة الوراثة و التي تؤدى الى الاختلافات الوراثية.
- هذه التغيرات المفاجئة و المتوارثة في مادة الوراثة تسمى بالطفرات Mutations و مصطلح طفرة Mutation يشير إلى كل من التغيرات الحادثة في المادة الوراثية و العملية التي تحدث عن طريقها هذا التغير .
- و الكائن الذي يبدي شكلاً مظهرياً جديداً نتيجة لوجود الطفرة يسمى بالطافر mutant

تعريف الطفرة

تعرف كلمة طفرة بأنها : التغير الفجائي المستمر في التركيب الوراثي للكائن .

أهمية الطفرة

- ترجع أهمية الطفرات إلي :
- (١) هى المصدر الأساسي لجميع الاختلافات الوراثية .
- (٢) لولا الطفرة لوجدت كل الجينات فى صورة واحدة وبالتالي لما وجدت الأليلات ولما كان التحليل الوراثي ممكنا .
- (٣) الطفرة تؤدي إلي قدر من التباين يسمح للكائنات بالتكيف مع البيئات الجديدة.
- (٤) توفرالمادة الخام اللازمة لحدوث التطور .

- و بذلك لولا وجود الطفرة لوجدت كل الجينات في صورة واحدة و بالتالي لما وجدت الأليلات و لما كان التحليل الوراثي ممكناً .
- و الأهم من ذلك ما كانت الكائنات قادرة على التطور evolve و التكيف مع التغيرات البيئية .
- و على ذلك فالطفرة تعتبر ظاهرة هامه لأن وجودها سيؤدي إلى التابين الوراثي و يسمح للكائنات بالتكيف مع البيئات الجديدة
- و في نفس الوقت قد يؤدي ازدياد معدل الطفور إلى عدم انتظام انتقال المعلومات الوراثية بدقة من جيل إلى آخر .

التأثيرات المظهرية للطفرات

- تسبب الطفرة عادة بعض التغيرات المظهرية التى يمكن اكتشافها حتى يتسنى التعرف على وجودها وهناك بعض التغيرات شديدة الصغر بحيث لايمكن اكتشافها إلا بطرق وراثية وبيوكيماوية خاصة .
- البعض الآخر يكون كبير لدرجة قد تؤدي الى موت الأفراد الحاملة لهذا التغير .

- وكما نعلم فالجينات عبارة عن تتابع معين من أزواج النيوكليوتيدات لنوع خاص من السلاسل عديدة البيتيد ، وأي طفرة تحدث فى جين معين تنتج بالتالي شكلا جديدا أو أليلا جديدا لهذا الجين .
- وبسبب مرونة شفرة الوراثة ، لا تؤدي بعض التغيرات فى أزواج القواعد إلي تغير الناتج البروتيني الذي تشفر له الجينات .
- بينما تؤدي طفرات أخري إلي فقد كامل فى نشاط الناتج الجيني مما يؤدي الى موت الفرد إذا ما حدثت فى جينات أساسية لازمة للحيوية .

أنواع الطفرات

اولا : الطفرات من حيث المنشأ :

١- طفرات تلقائية Spontaneous Mutations:

وهي عبارة عن التغيرات التي تنشأ تلقائياً (طبيعياً) في المادة الوراثية دون سبب معروف ودون تدخل الإنسان. ويمكن أن تحدث لأي حين وفي أي خلية وفي أي وقت . وهي تغيرات عشوائية نادرة الحدوث.

وتتراوح بين واحد في المائه ألف إلى واحد في العشرة مليون ، وتختلف من جيل إلى آخر .

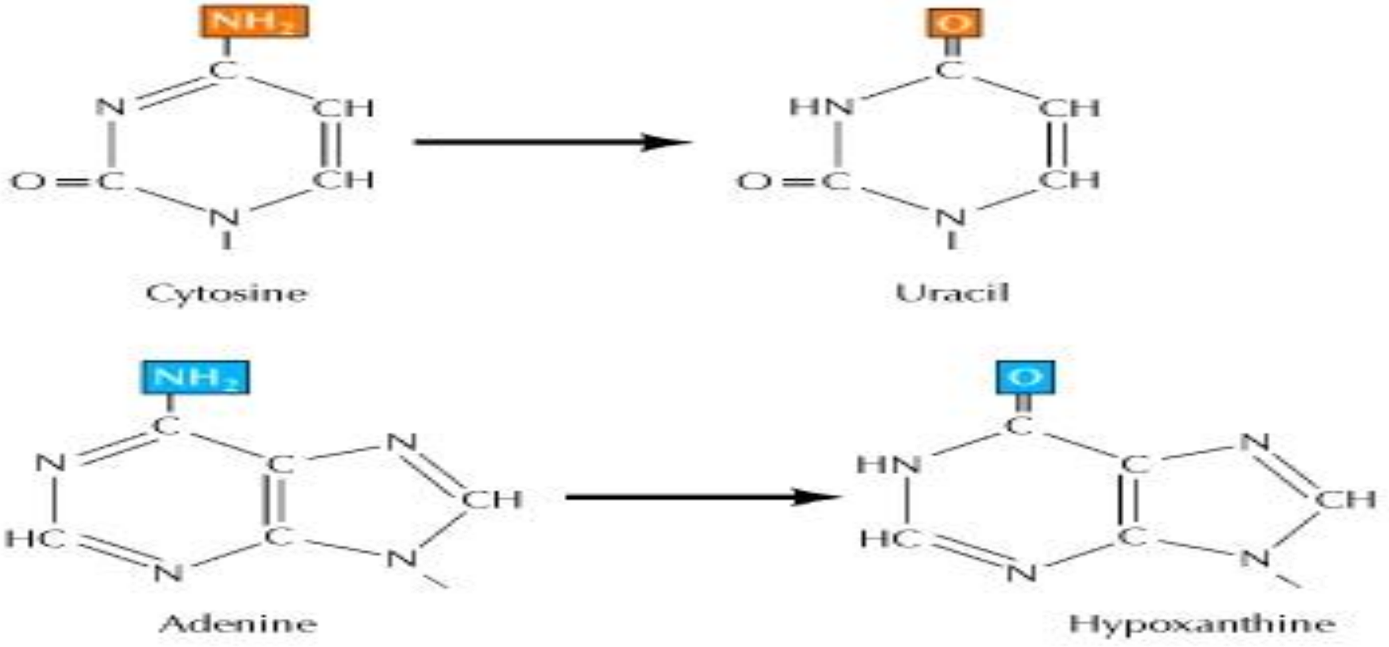
وأسباب حدوثها بإيجاز:

أ- أخطاء خلال عملية تضاعف لـ DNA (كاستبدال زوج من النيوكليوتيدات مكان زوج آخر)

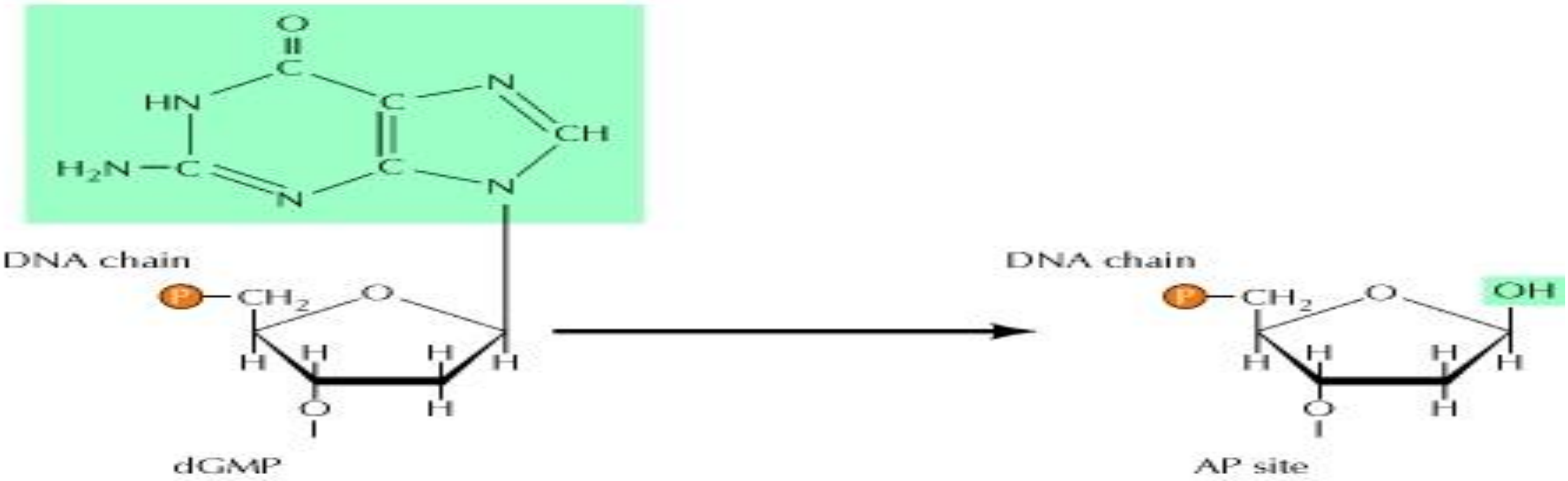
ب- تغيرات كيميائية في الـ DNA . اشهرها ما يعرف بالـ depurination أي إزالة A و G عند تكسر الرابطة الموجودة بينها وبين السكر، و Deamination اي إزالة مجموعة أمين من القاعدة النيتروجينية المعينة وخاصة C وتحولها إلى U .

ج- قد تنشأ نتيجة لما يسمى بالعناصر الوراثية المتنقلة .

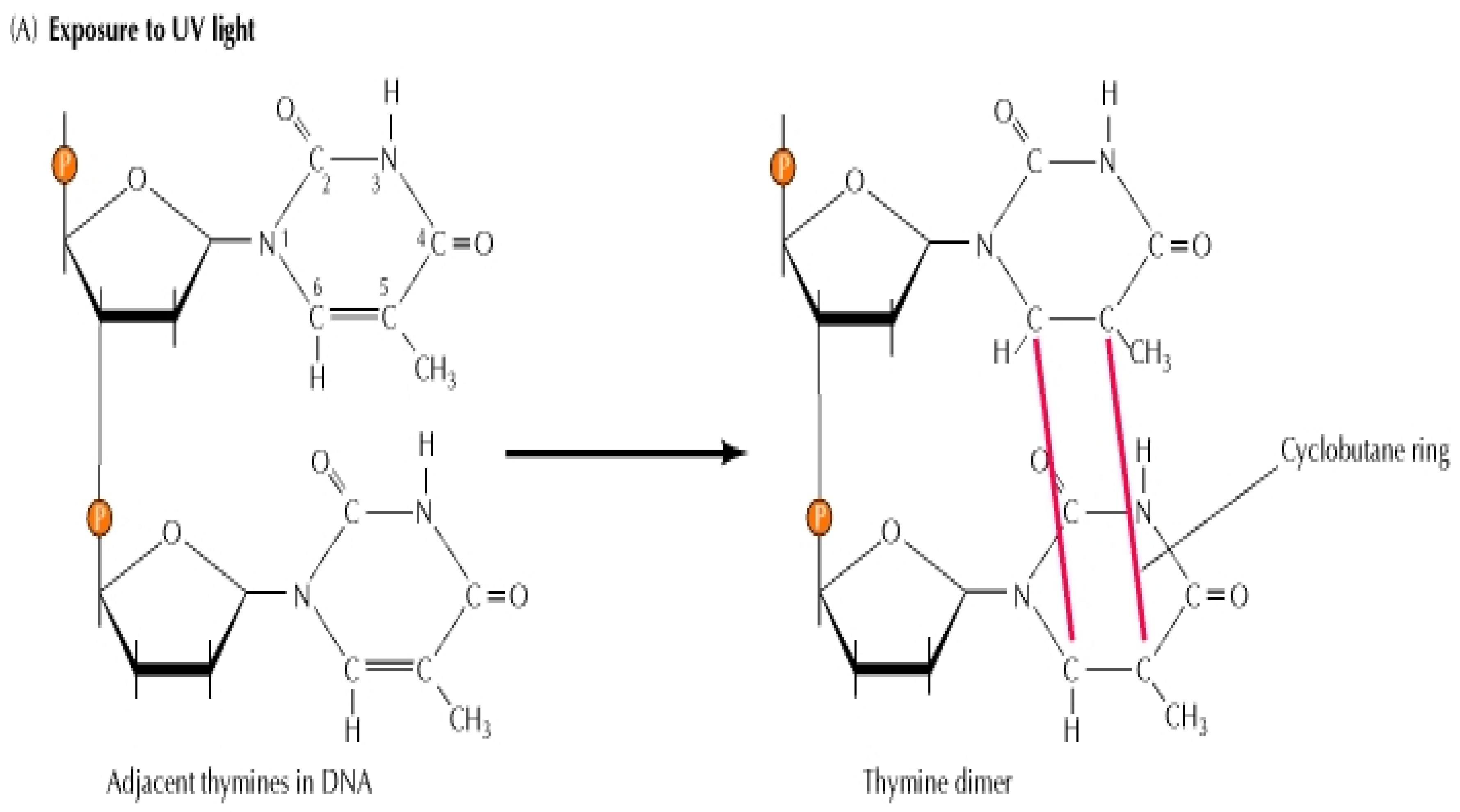
(A) **Deamination**



(B) **Depurination**



- ٢- الطفرة المستحدثة Induced Mutations
- وهى التى تنتج عن تعرض الكائن الحي لعوامل مطفرة كالأشعة المؤينة (α , β , δ) والأشعة فوق البنفسجية ومختلف الكيماويات مثل(مركبات الحديدوز – أملاح المنجنوز – الخردل – الفورمالدهيد - الكولشيسين – إيثيل يوريثين وغيرها) التى تتفاعل مع مادة الوراثة ،
- ومن المستحيل إثبات أن طفرة معينة قد حدثت تلقائيا أو أن طفرة أخري قد أستحدثت بواسطة عامل ما .



أحد الأضرار الحادثة بفعل الـ UV وهى ثنائيات الثيمين

ثانيا: الطفرات من حيث طراز الخلية :

١ . طفرات جسدية Somatic mutations:

وهي عبارة عن الطفرات التي تحدث في الخلايا الجسم غير التناسلية . لاتورث بصفة عامه . التأثير قد يكون بسيط وغير مرئي أو قد يكون شديداً .

٢. طفرات مشيجية Gametic mutations:

وهي عبارة عن الطفرات التي تحدث في الخلايا التناسلية أو النسيج المكون لهذه الخلايا. وهى تورث إلى النسل

- ثالثاً : الطفرات على أساس حجمها :

١ . طفرات جينية Gene or point Mutations:

ويقصد بها تلك التغيرات التي تحدث على مستوى الجين ، أي التغيرات التي تحدث فى أزواج القواعد النيتروجينية للجين.

٢ . طفرات كروموسومية Chromosomal mutaions:

ويقصد بها تلك التغيرات التي تحدث على مستوى الكرومسومات سواءً أكان من الناحية التركيبية أو العددية:

أ- طفرات كروموسومية تركيبية : مثل الانتقاص والاضافة والانتقال والانقلاب .

ب- طفرات جينومية : تغيرات في أعداد الكروموسومات في الكائن الحي.

و يستعمل الآن مصطلح طفرة للدلالة على **التغييرات الجينية** أي داخل الجين نفسه .

رابعاً : الطفرات من حيث اتجاهها :

١ . طفرات تقدمية أو أمامية **Forward mutations**

هي الطفرات التي تستحدث تغيراً من الطراز المظهري البري إلى طراز مظهري غير بري (طافر) . مثالها :

$vg^+ \longleftarrow vg$ أو $e^+ \longleftarrow e$

٢. طفرات رجعية أومرتدة **Reverse mutations**

وهي الطفرات التي تحدث تغيرا من الطراز المظهري غير العادي (الطافر) إلى الطراز المظهري البري . مثالها:

$vg \longrightarrow vg^+$ أو $e \longrightarrow e^+$

خامساً : الطفرات من حيث مقدار التأثير :

١. طفرات مرئية أو شكلية : Morphological mutations

وهي الطفرات التي تؤثر على الطراز المظهري للفرد ومن السهل التعرف عليها وتحديدها . الأمثلة عديدة منها الطفرات المسببة للأجنحة المختزلة أو عديمة الأجنحة في حشرة الدروسفيلا.

٢ . طفرات العوز الغذائي أو الطفرات الكيموحيوية:

Nutritional or biochemical mutations

وهي الطفرات التي تؤدي إلى شل قدرة الكائن الحي على إنتاج مادة معينة (حمض أميني أو فيتامين معين) أو أكثر مهمه جداً لعمليات نمو الكائن. درست دراسة مستفيضة في البكتيريا والخمائر.

٣ . طفرات مميتة : Lethal mutations

وهي الطفرات التي تؤدي إلى موت الافراد الحاملة لها قبل سن البلوغ أو خلال مرحلة معينة من مراحل التكوين الجنيني.

٤. طفرات السلوك: Behavior mutations

وهي تلك الطفرات التي تؤثر على سلوك الكائن الحي . مثالها : الطفرات التي تؤثرعلى سلوك التزاوج في ذبابة الخل.

٥. طفرات شرطية : Conditional mutations

وهي الطفرات التي تؤثر على الطراز المظهري أو حيوية الفرد الذي يمتلكها تحت ظرف نمو مقيدة ولكنها ليست ذات تأثير تحت ظروف نمو مجيزة .

٦ . طفرات مقاومة : Resistance mutations

هي تلك الطفرات التي تكسب الخلايا أو الكائنات الحية الطافرة القدرة على النمو في وجود بعض المثبطات الخاصة (مثل : Cycloheximide أو كائن حي ممرض a pathogen)

مثل هذه الطفرات قد تم استخدامها وبطريقة مكثفة كمعلمات (واسمات markers) وراثية لسهولة التعرف عليها وانتخابها .

Gene mutation الطفرة الجينية

- الجين عبارة عن مقطع معين من تتابع نيوكليوتيدي مميز يحتوي على الأربع قواعد T , G , C , A .
- أي تغير يحدث في الجين الواحد ينتج عنه صورة أخرى لهذا الجين يتبادل معه الوجود في الأفراد المختلفة و هذه الطريقة هي الوسيلة الوحيدة للحصول على الأليلات المختلفة للجين الواحد .
- تعرف هذه التغيرات بالطفرات mutation
- و التغير في الجين يعرف بالطفرة الجينية Point mutation وهي تغيرات داخل الجين intra-cistronic changes .

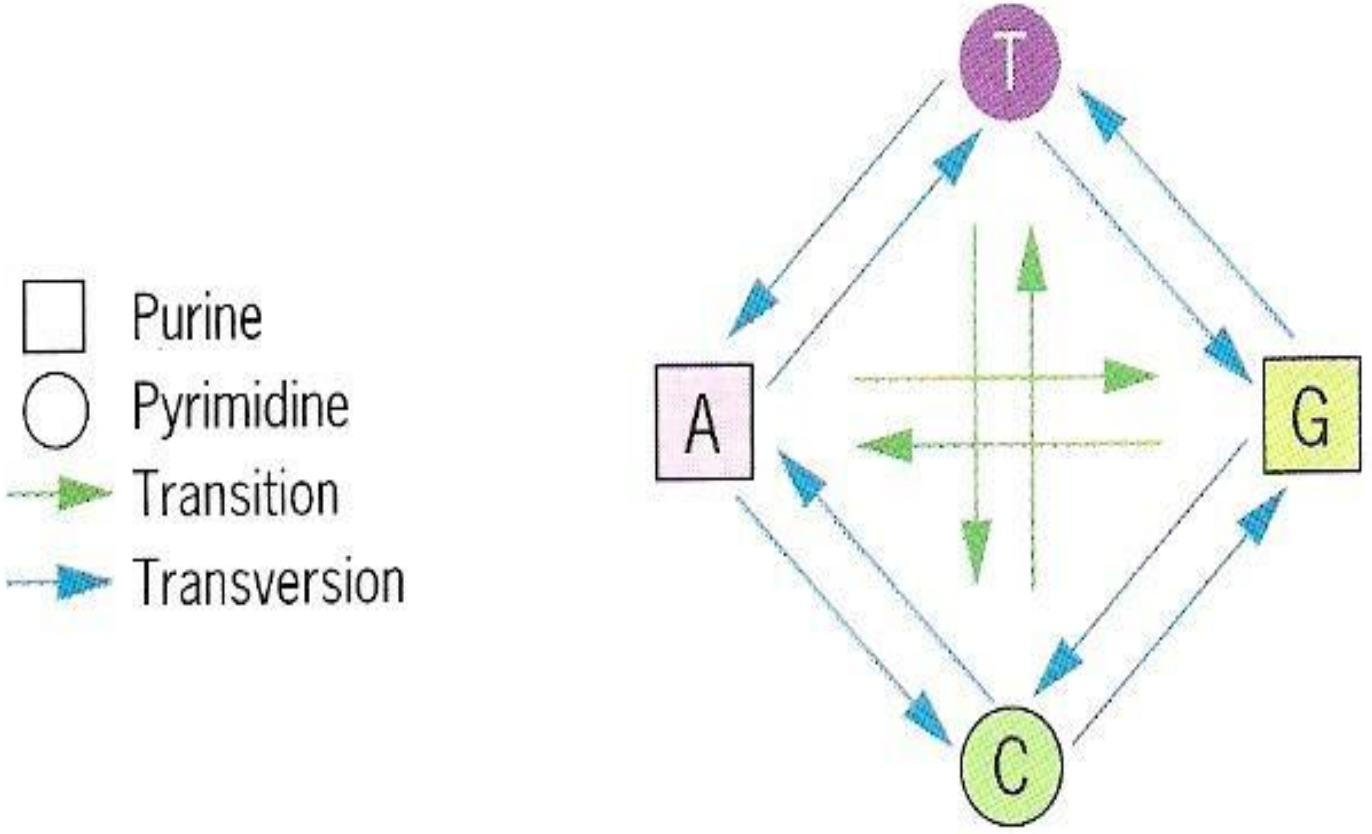
تنقسم الطفرات الجينية إلى عدة أنواع

١- الإحلال القاعدي Base Substitution :

- يوجد نوعان من الإحلال القاعدي .

١. احلال قاعدة من نوع البيورين (A , G) بآخر من البيورين أو احلال البيرميدين(T , C) بقاعدة أخرى من البيرميدين و يطلق عليه اسم احلال متكافئ Transition

٢. احلال قاعدة بيورين ببيرميدين أو العكس ويسمى احلال أو استبدال متعاكس أو غير مكافئ Trasversions



طفرات الاستبدال

أنواع طفرات الإحلال القاعدي

١. طفرات خاطئة Missense mutation :

يحدث الاحلال القاعدي الذي يسبب احلال حامض أميني محل حامض أميني آخر فى سلسلة عديد الببتيد .

مثال :

UGG → UGU

Tryptophane → Cystine

٢-طفرات عديمة المعنى Nonsense mutation

يؤدي الاحلال القاعدي إلى تغير الشفرة الوراثية إلى واحد من الشفرات الثلاثة و التي تقوم بانهاء عملية الترجمة في بناء البروتين و تسمى Stop Codon و هذه الشفرات لا تترجم إلى أحماض أمينية بل مهمتها انهاء ترجمة البروتين .

وهذه الشفرات الثلاث هى : UAG , UAA , UGA

مثال ذلك : استبدال القاعدة G بالقاعدة A في الموقع الثاني لشفرة الحمض تربتوفان UGG و تحويلها إلى شفرة الأمبر

. Amber mutation (UAG)

٣- طفرات صحيحة Samesense mutation:

تحدث نتيجة الإحلال القاعدي لأحد القواعد النيتروجينية في الشفرة و لكنها لا تؤدي إلى تغير نوع الحامض الأميني و يعود ذلك إلى ظاهرة مرونة الشفرة degeneracy حيث أن للحامض الأميني الواحد أكثر من شفرة . مثال :

Valine ↓ CAA

G _ CAG

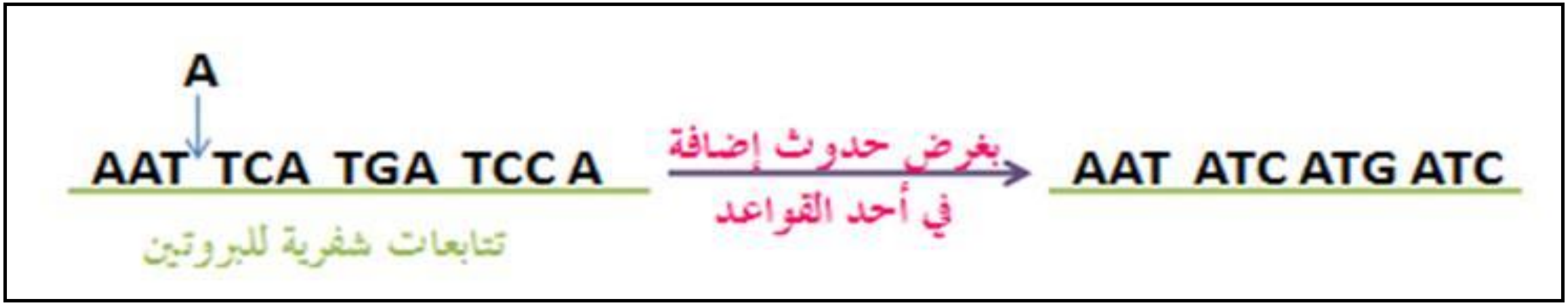
T _ CAT

C _ CAC

٢- طفرات تغيير الايطار Farm-shift mutation

(إضافة أو نقص قاعدة أوعدد من القواعد)

هي تشمل الطفرات الناتجة من النقص أو الإضافة لزوج واحد أو عدد قليل من أزواج القواعد وهذه الطفرات تؤدي إلى تغير ايطار القراءة داخل بعض التتابعات الشفرية للبروتين مسببه احلال كامل في عملية بناء ذلك البروتين و تسمى هذه الطفرة طفرة تغيير الايطار farm shift mutation .



- التسلسل الجديد يصبح مختلف نتيجة إضافة A وتظهر صفة مظهرية جديدة نتيجة الإضافة .
- نفس التأثير ينتج من نقص أو ازالة قاعدة أو قواعد من السلسلة .

الطفرات و الإنسان

- التوارث ما هو إلا عملية تكاثر للجينات، و لا يحمل الأطفال جينات آبائهم بل يحملون نسخاً منها.

* الجينات تنشأ من جينات، و رغم دقة عملية تكاثرها إلا أنه قد يحدث أحياناً خلل ما (فقد – إنتقال – إنقلاب – تكرار) يجعل النسخة الجديدة تختلف عن الأصل، و يستمر الجين المعدل في التكاثر فتنشأ صفات مغايرة.

* يمكن حدوث الطفرات في أي طور من أطوار تكوين الفرد (أُنقسام – تكوين الجاميطات – مرحلة تمايز خلايا الزيجوت) خاصة في الأشهر الثلاثة الأولى.

قد يكون للطفرة قيمة إيجابية في حالة النباتات و الحيوانات المستأنسة،

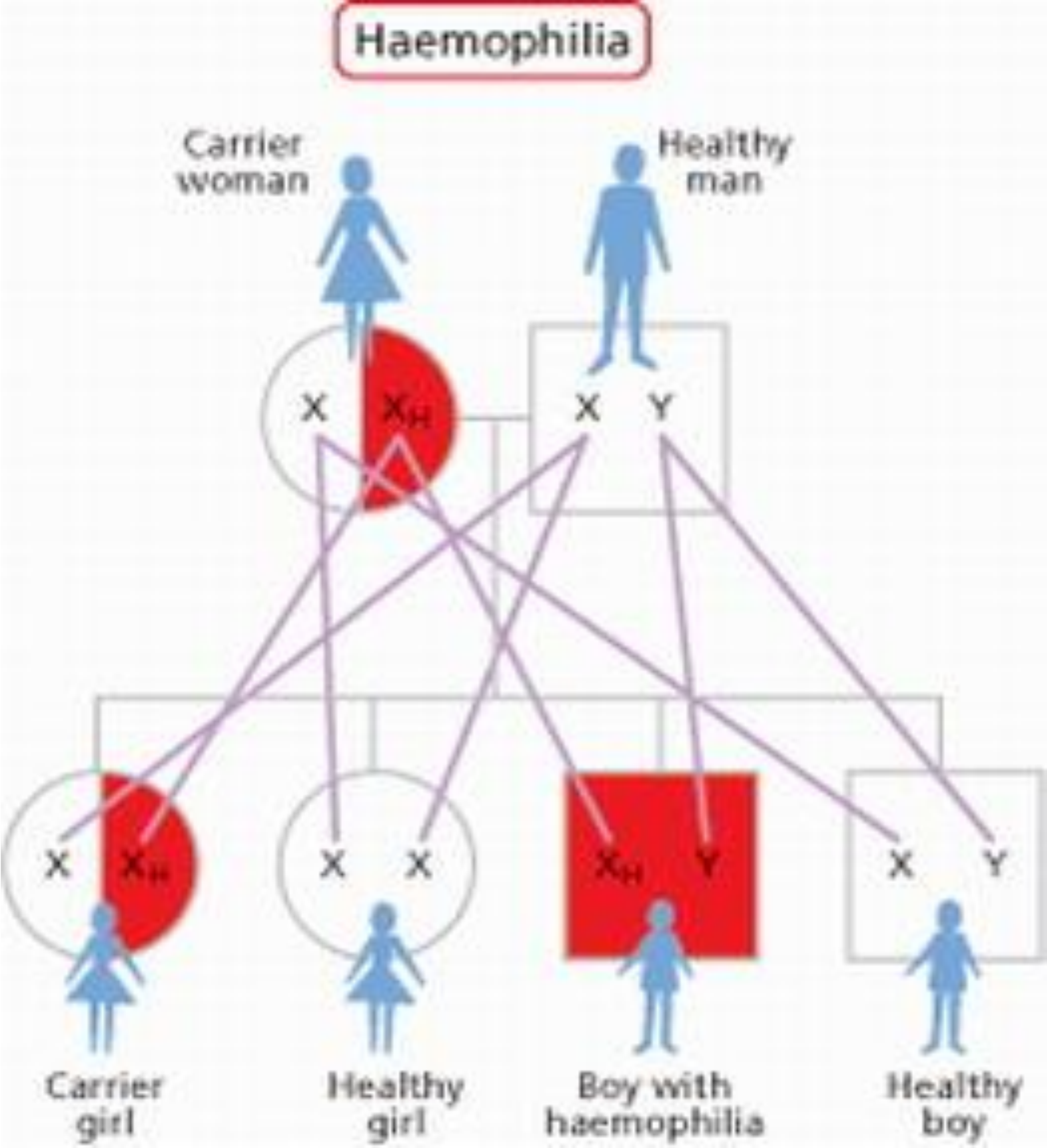
و تكون على النقيض بالنسبة للإنسان، لذا فمن المستحسن تجنب تعريض الجنس البشري للمؤثرات الطافرة التي يستدل على وجودها من ظهور التشوهات و الأمراض الوراثية والتى يوجد منها مايزيدعلى أكثر من ٥٠٠٠ مرض وراثى ما بين المحمولة على كروموسومات جسمية (السائدة والمتنحية) وكذلك المرتبطة بالجنس.

- بعض الأمثلة
- - مرض الهيموفيليا أوعدم تجاط الدم **Hemophilia:**
- وهو عدم تجلط الدم عند الجروح ولوكان بسيطاً . يكثر في الذكور ويقل في الإناث
- – هو مرض متنحي من الأمراض المرتبطة بالجنس أى أن الجينات المسببة تكون محمولة على الكروموسوم X. يؤدي إلى موت معظم الأشخاص المصابين .
- - مرض أنيميا الخلايا المنجلية أو مرض فقر الدم المنجلى
- الانيميا المنجلية هي من اشهر أمراض الدم الوراثية الانحلالية والتي تصيب كريات الدم الحمراء وتسبب تكسر هذه الخلايا مما يؤدي ذلك الى فقر الدم. لقد سمي هذا المرض بالمنجلية وذلك لان كريات الدم الحمراء تحت المجهر تأخذ شكل مقوس كالمنجل اوالهلال.
- ويحدث هذا المرض نتيجة خلل في الجين الذي يصنع مادة البيتا جلوبين التى تدخل فى تركيب الهيموجلوبين. ومسؤول عنه جين متنح يوجد على كروموسوم X

عمى الألوان

- هو عدم القدر على التمـيـيز بين اللونين الأحمر والأخضر . ويكثر عند الذكور ويقل عند الإناث ويسببه جين متنحى ويوجد على كروموسوم (X) .

- Cystic fibrosis، Phenylketonuria (PKU) ، Galactosemia ، Al zheimer’s



Haemophilia
Carrier woman
Healthy man
X
X_H
X
Y
X
X_H
X
X
X_H
Y
X
Y
Carrier girl
Healthy girl
Boy with haemophilia
Healthy boy

الأمراض البشرية الناتجة عن الشذوذ في عدد الكرموسومات

المرض	الشذوذ	الأعراض
مرض داون	زيادة في عدد الكرموسوات الجسدية (٤٧كرموسوم)	انخفاض مستوى الذكاء، الجسم غير متناسق ، مقطع العين المائلة
مرض تيرنر	عدد الكرموسومات ٤٥ نقص كرموسوم X يظهر في الاناث	قصر القامة ، تأخر عقلي وعدم نضج جنسي ،
مرض كلاينفلتر	زيادة الكرموسومات الجنسية (٤٧) ويظهر في الذكور فقط (YXX)	تأخر عقلي ، عقيمين ، ندرة الشعر زيادة في طول الاذرع والسيقان .

صور توضيحية لبعض الطفرات

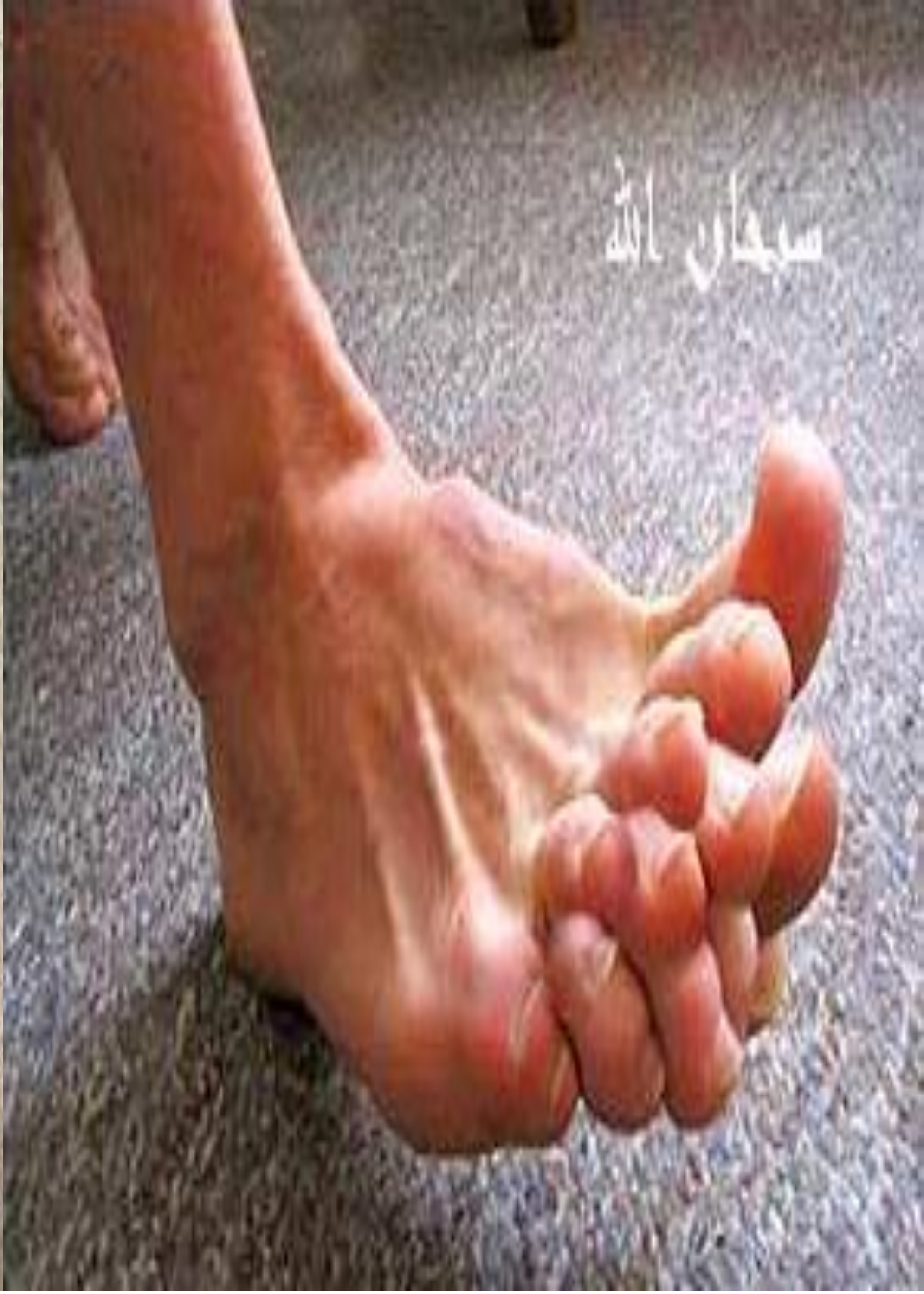
- أشعة الشمس تعد أحد أسباب الطفور وهي عنصر تستحيل الحياه بدونه . ومن حسن الحظ أن الأشعة فوق البنفسجية فى ضوء الشمس ذات طاقة منخفضة جدا ولا تستطيع النفاذ بدرجة كافية فى الأنسجة وبالتالى لا تتعرض الغدد والخلايا الجنسية فى الكائنات الراقية للتأثيرات الطفرية الضارة.
- فالضوء فوق البنفسجي مطفر فقط لخلايا جلد الأنسان ، وبالتالي فهو غير ملائم للأفراد الذين يعانون من المرض الوارثى المعروف الجفاف الجلدي الملون xeroderma pigmentosum حيث يصابون بسرطان الجلد بعد تعرضهم لأشعة الشمس وعلي ذلك فالعديد من الطفرات التى تبدو تلقائية إن لم يكن أغلبها قد تكون فى الواقع مستحدثة بواسطة أحد العوامل الطبيعية والكيماوية

مرض الجفاف الجلدي الملون (سرطان الجلد)

xeroderma pigmentosum

الناتج عن التعرض لأشعة الشمس

www.alriyadh.com


سبحان الله

SCIENCEphotoLIBRARY

سبحان الله

- الحمد لله الذى عافانى مما ابتلى به غيرى وفضلنى على كثير ممن خلق تفضيلا.

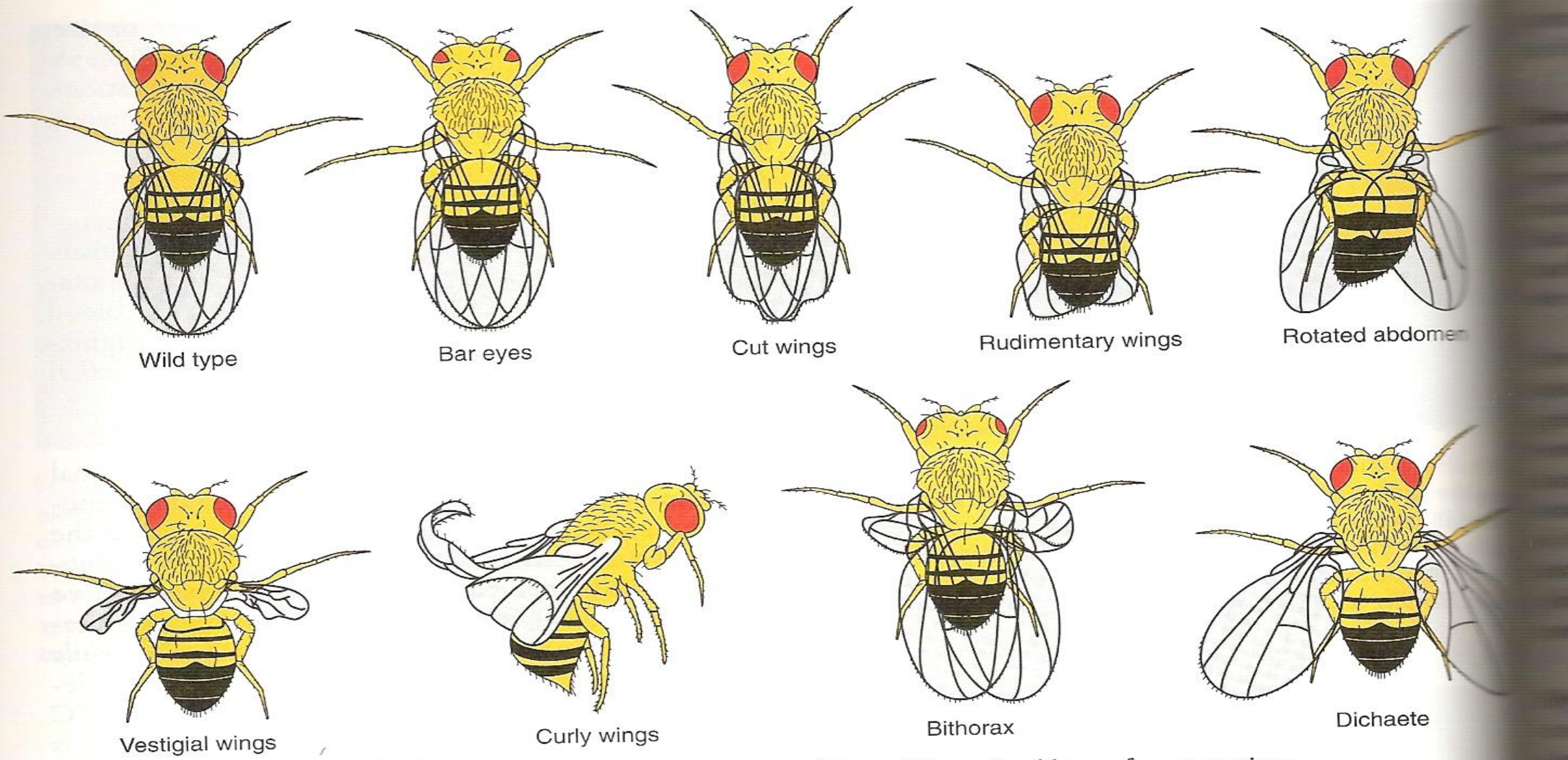


Figure 7-7 Eight morphological mutations of *Drosophila,* and wild type for comparison. Most of the mutant phenotypes are self-explanatory; bithorax is an abnormality of the thorax featuring small wings instead of balancers; the most prominent feature of dichaete is that the wings are held at 45 degrees to the body.

طفرة فى الجين المسئول عن شكل الجناح فى حشرة الدروسوفيلا

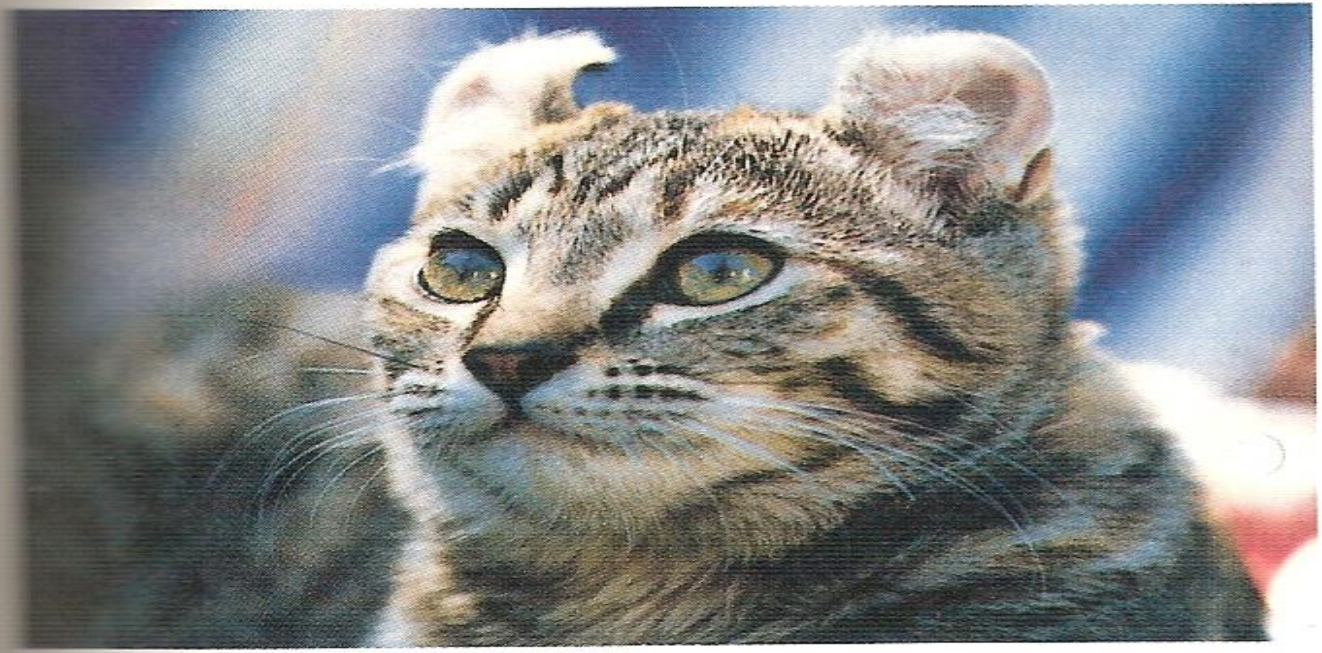
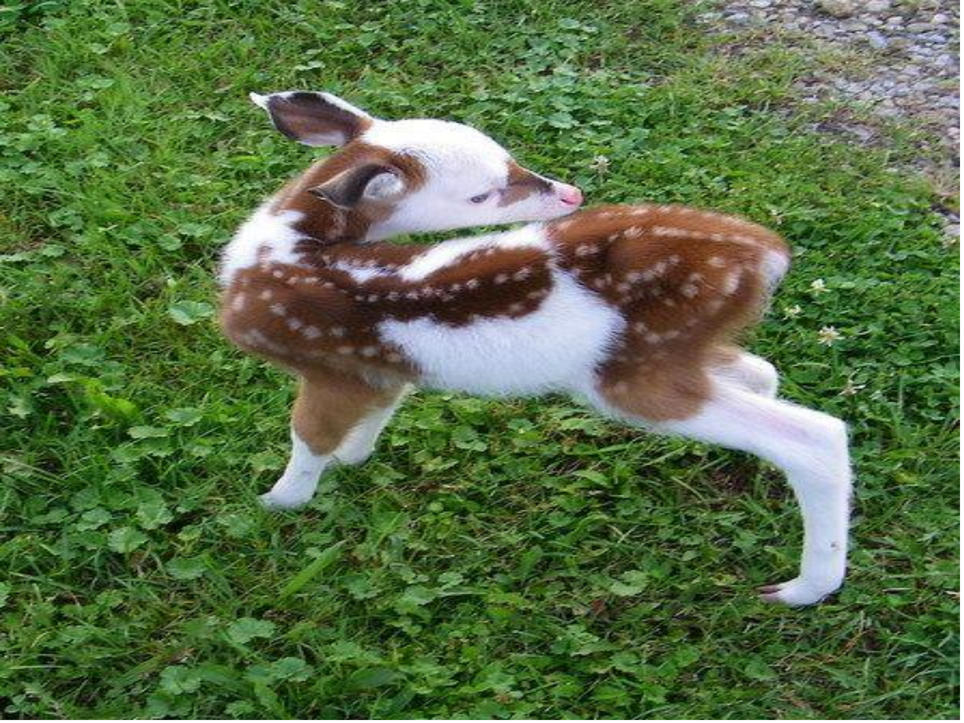


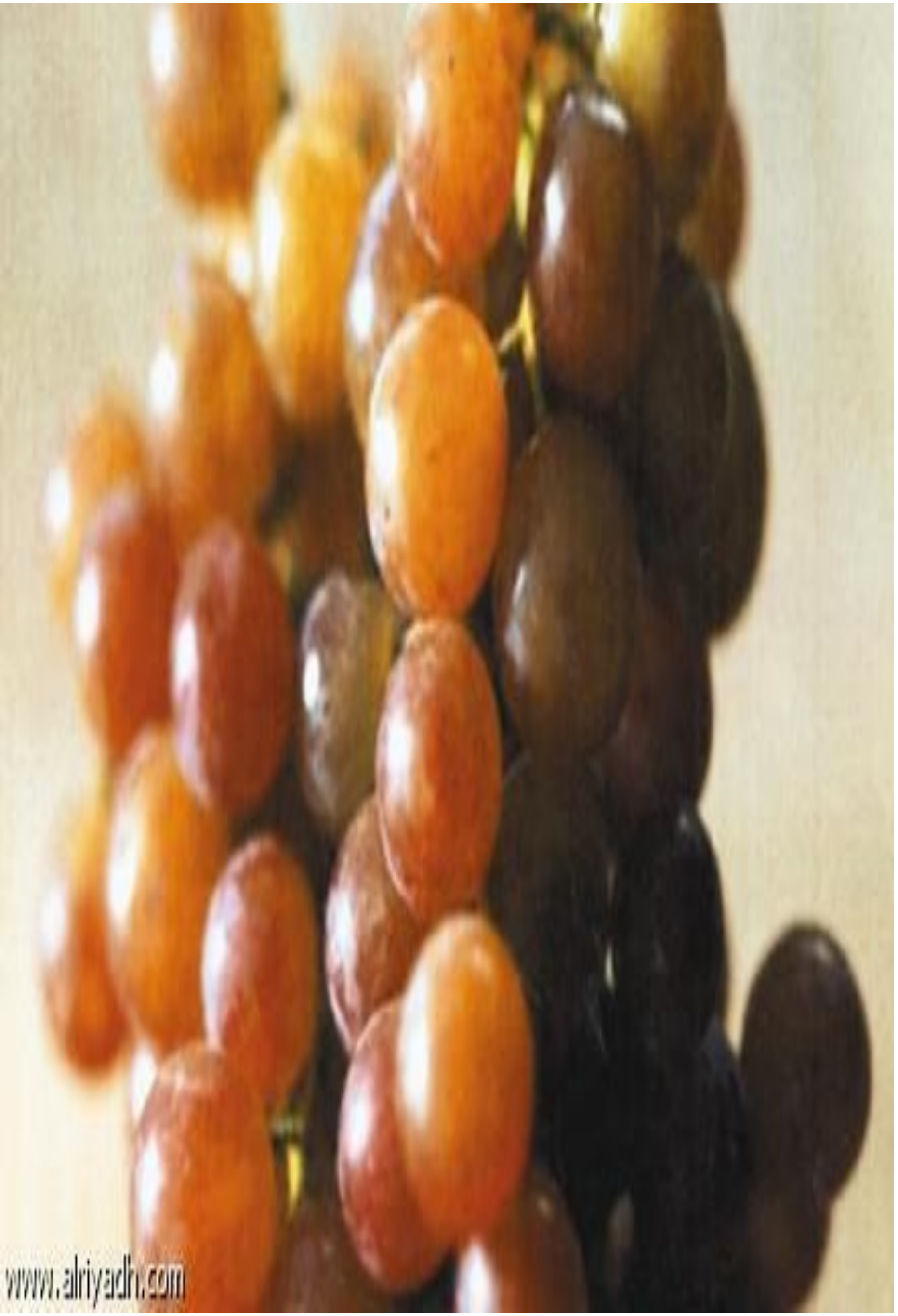
Figure 7-6 A mutation to an allele determining curled ears arose in the germ line of a normal straight-eared cat, and was expressed in progeny such as the individual shown here. This mutation arose in a population in Lakewood, California, in 1981, and it is an autosomal dominant. (From R. Robinson, *Journal of Heredity* 80, 1989, 474.)

(أذن مجعدة)

طفرة في اليل الجين المسئول عن شكل الأذن

Ms.RoRY




www.alriyadh.com

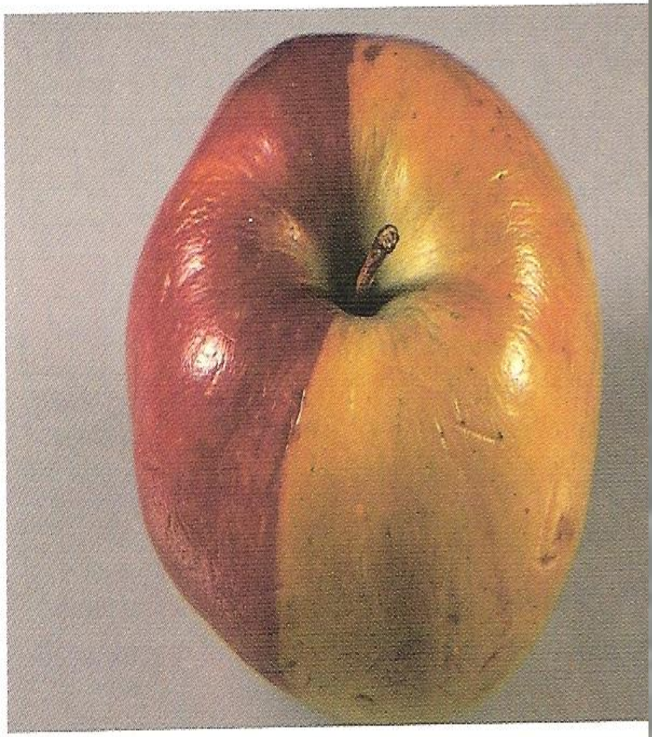


Figure 7-3 Somatic mutation in the red delicious appl
mutant allele determining the golden color arose in a flo
ovary wall, which eventually developed into the fleshy p
the apple. The seeds would not be mutant, and would gi
to red-appled trees. (Note that, in fact, the golden delici
apple originally arose as a mutant branch on a red delicio
tree.) (Anthony Griffiths)

ميكانيكيات إصلاح المادة الوراثية

DNA Repair Mechanisms

DNA repair is a collection of processes by which a cell identifies and corrects damage to the DNA molecules that encode its genome

DNA repair : هى مجموعة من العمليات والتى بواسطتها تقوم الخلية بالتعرف على واصلاح الضرر لجزيئات الـ DNA

تقسم ميكانيكيات اصلاح الـ DNA الى قسمين:

١- Direct Reversal of DNA Damage: يحدث اصلاح مباشر للقواعد التى بها الضرر لارجاعها الى ما كانت عليه قبل الضرر.

٢- Excision Repair: حيث يحدث ازالة للقواعد التى بها الضرر واحلال قواعد صحيحة مكانها.

معظم أضرار الـ DNA يتم اصلاحها عن طريق ازالة القواعد التى بها الضرر واحلال قواعد صحيحة محلها .

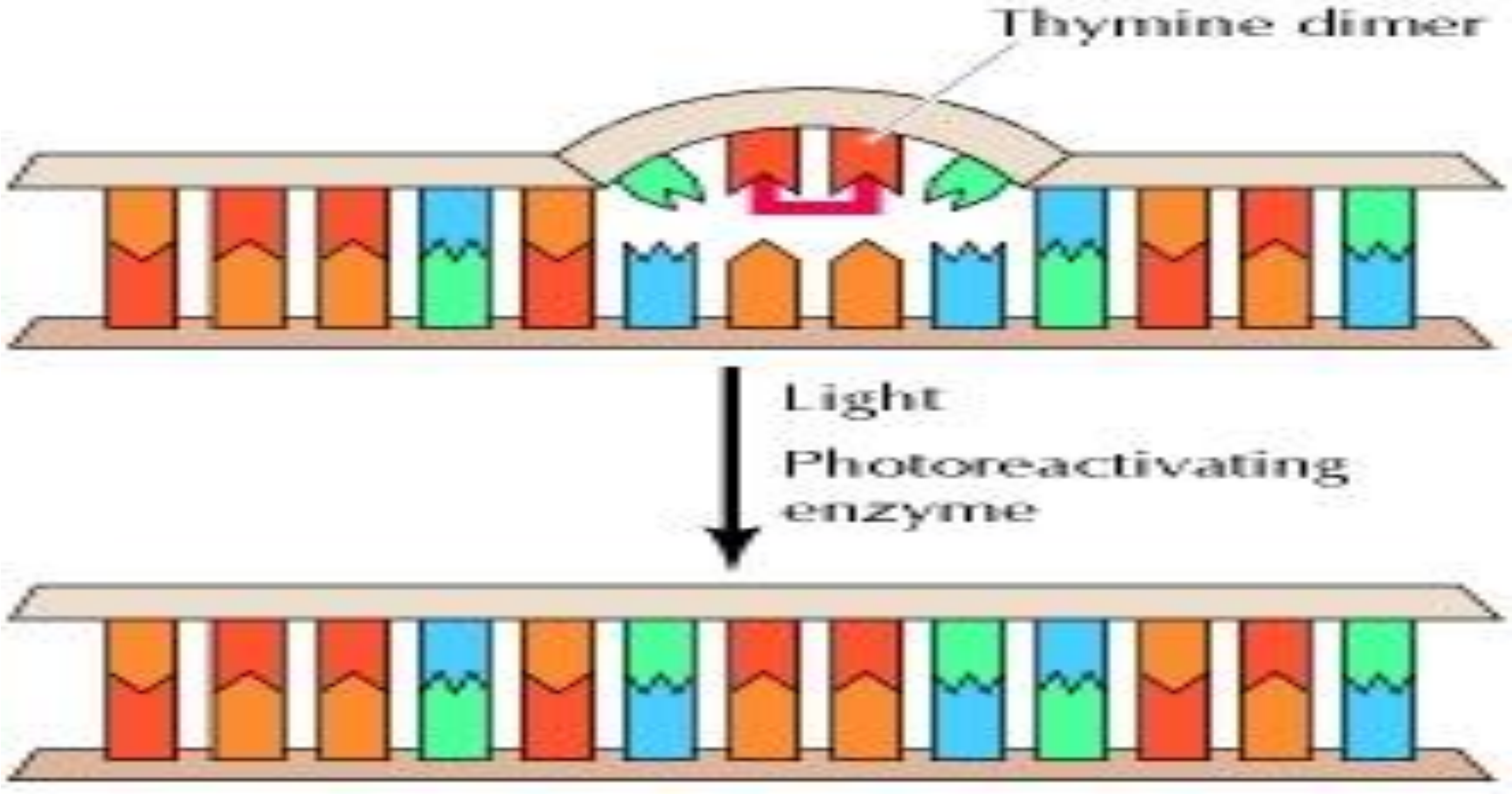
هناك بعض الأضرار التى يتم الاصلاح عليها مباشرة ولكن قليل من الأضرار التى تصحح بهذه الطريقة وخاصة ثنائيات البيرميدين **pyrimidine dimers** الناتجة من التعرض لأشعة الـ UV وذلك بتكوين روابط بين قواعد البيريميدين المتجاورة على نفس الخيط ، مثل هذا التركيب يخرب من تركيب الجزئ و يعوق عملية الـ Transcription , Replication ، الميكانيكية التى تقوم باصلاح هذا النوع تسمى **Photoreactivation** وذلك لأن الطاقة المنبعثة من الضوء المرئى تستخدم فى كسر هذه الروابط وتظل قواعد البيريميدين الأصلية فى الجزئ.

- **هذه الميكانيكية موجودة فى كثير من الكائنات من أوليات النواة وحقيقيات النواة مثل الخميرة وبعض النباتات والحيوانات الراقية ، الا أنها عير موجودة فى البعض الآخر بما فيها الانسان.**

- التفاعل التنشيطي الضوئي - photoreactivation
- يتضمن وجود إنزيم يقوم بكسر أو بشق ثنائيات الثيمين مباشرة دون استبعاد أي من النيوكليتدات المجاورة ، ويعرف هذا الإنزيم باسم انزيم الفوتوليز Photolyase والذي يعمل على كسر الروابط في ثنائيات الثيمين فى وجود طاقة ضوئية خاصة الضوء المحتوي على الطيف الأزرق ، حيث ينشط الأنزيم ويساعد على حدوث تفاعل ضوئي كميائي مؤدياً إلى كسر الرابطة بين الثنائيات

(ثنائيات الثيمين ، تنائيات السيتوزين و ثنائيات السيتوزين – الثيمين)

-



Direct repair of thymine dimers

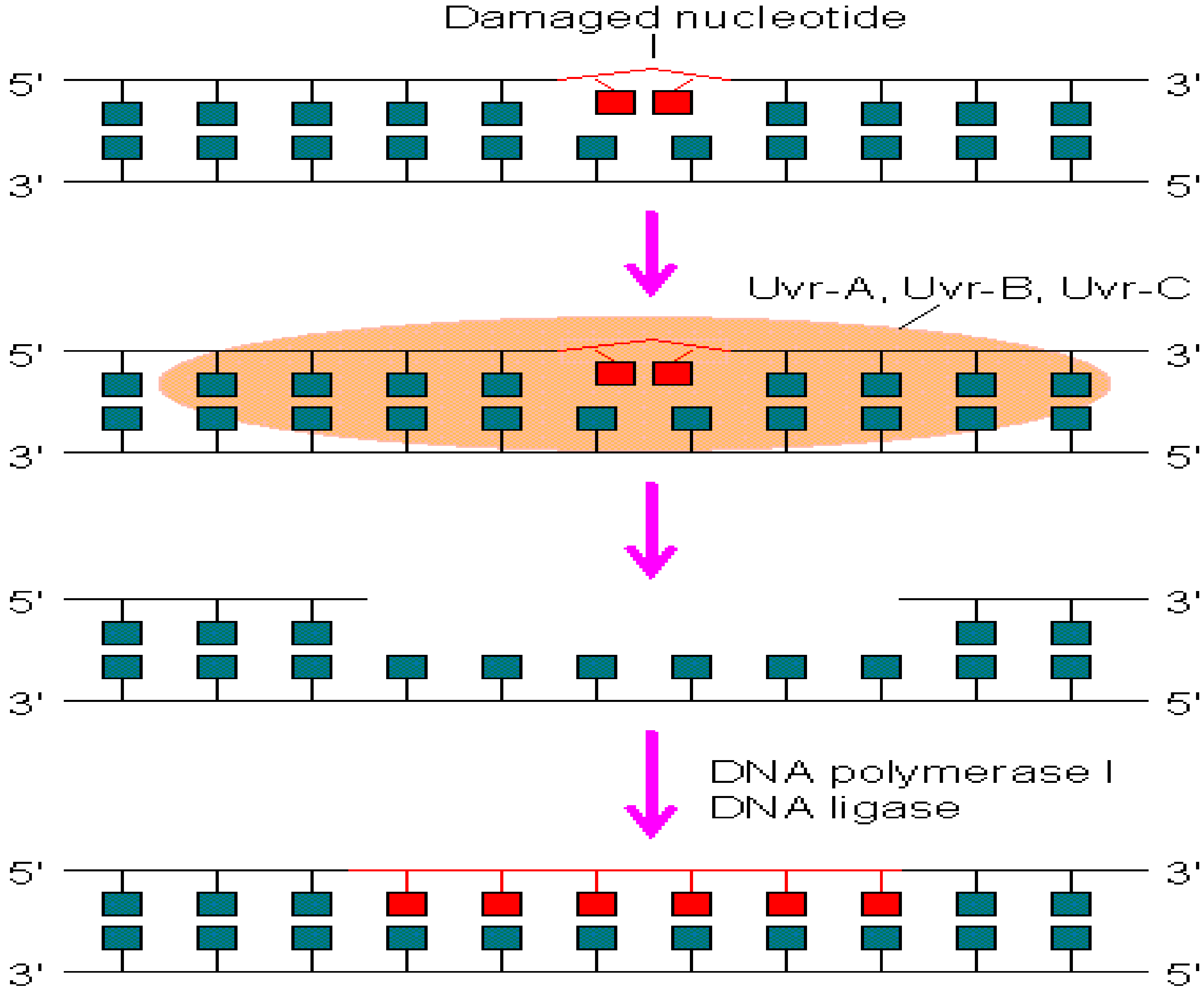
• الإصلاح الاستئصالي أو الإزالة - excision repair

• يتضمن الاصلاح الاستئصالى عدة خطوات متتالية من العمل الانزيمى يتم خلالها استبعاد ثنائيات الثيمين وتخليق قطعة جديدة من DNA

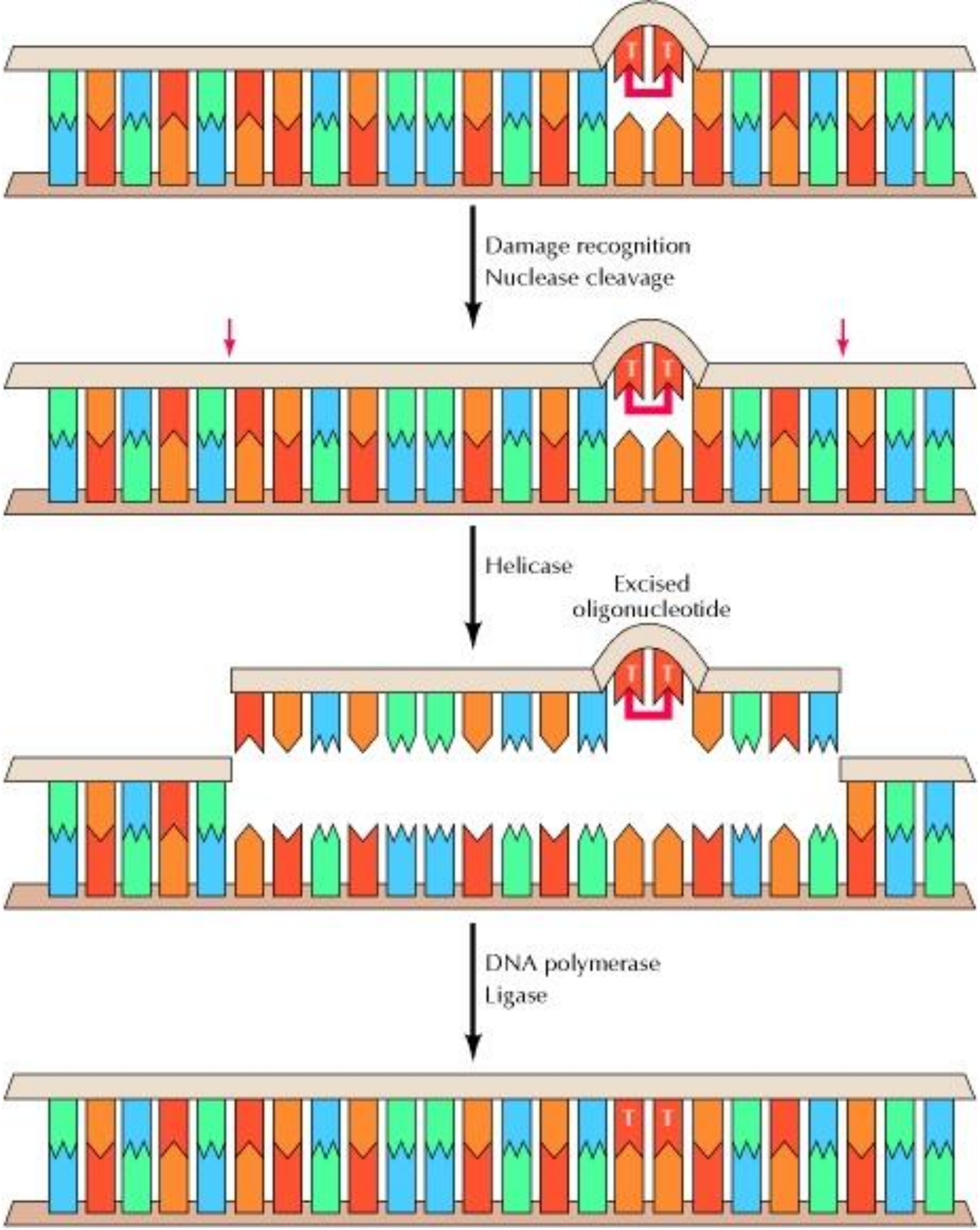
• يحدث التفاعل الاستئصالى بفاعلية في الظلام كما يحدث في وجود الضوء الأزرق،

تتم الحطوة الأولى بحدوث فصل بواسطة انزيم endonuclease بعد التوصل لموقع ثنائيات الثيامين فيكسر الأنزيم رابطة الفسفوداي استر في العمود الفقري لخيط المادة الوراثية، ثم يأتي دور انزيم exonuclease حيث يعمل على استبعاد قطعة مجاوره على جانبي الثنائيات ،

بعد ذلك يعمل انزيم DNA polymerase II بسد الفجوه المتكونه باستخدام الخيط المكمل كقالب ، بعد الانتهاء من سد الفجوة يعمل انزيم ligase على لحم الخيط بتكوين رابطة الفسفوداي استر بين النيوكليوتيدات المتجاورة.

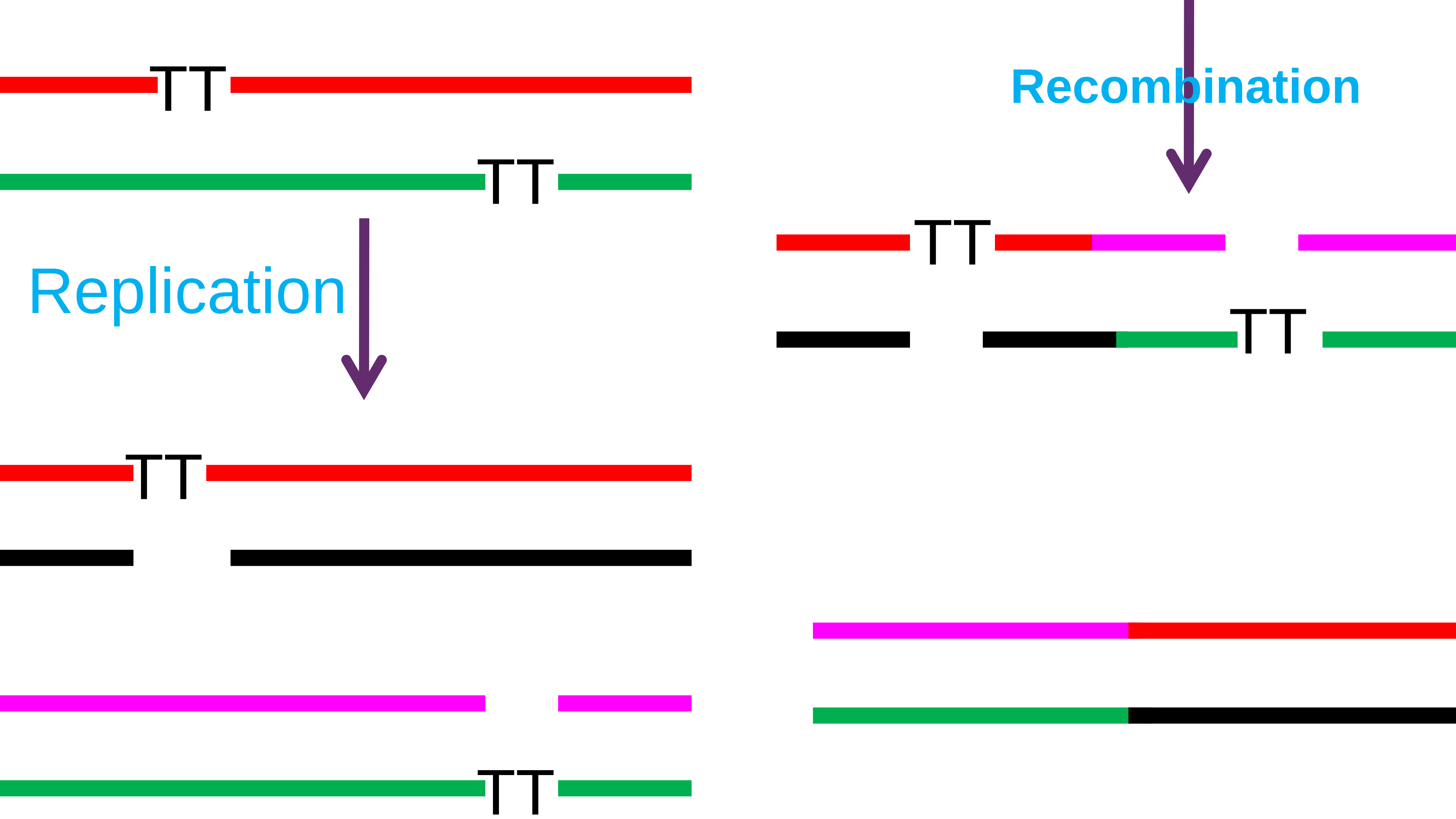


يوضح الية اصلاح DNA بحذف النيوكليوتيدات المتضرره


T T
Damage recognition
Nuclease cleavage
T T
Helicase
Excised
oligonucleotide
T T
DNA polymerase
Ligase
T T

- اصلاح الضرر ما بعد التضاعف postreplication repair
- تعتمد هذه الآليه على مبدأ اعادة التشكيل الوراثي المتجانس genetic recombination homologous لتحل قطعة DNA المتكاملة او الصحيحه محل قطعة DNA المتضرره عند تضاعف جزيئ DNA المحتوي على ثنائية الثايمين thymine dimmer (lesion)

- يقوم انزيم بلمرة DNA باستئناف عمله أسفل منطقة الضرر فيكون هنالك فجوة في شريط الدنا الجديد مقابل ثنائية الثايمين، وبعد تضاعف DNA يتكون جزيئتين DNA أحدهما متكامل والآخر محتوي على منطقه غير متزاوجه مع القواعد النتروجينيه في منطقة الضرر.
- تستبدل المنطقه غير المتزاوجه unpairing region في جزيئ DNA المتضرر بتسلسل مماثل من النيوكليوتيدات لشريط DNA الأصلي من الجزيئ الثاني. وهكذا يتم الحصول على جزيئتين DNA أحدهما يحتوى على ثنائية الثايمين وفجوة وجزىء آخر صحيح



رسم يوضح الاصلاح بعد التضاعف

أهمية الوراثة الجزيئية

- **مقدمة**

- أدى زيادة المعرفة وتطور طرق البحث العلمي وإبتكار الأدوات والأجهزة المتطورة إلى إحداث ثورة حقيقية في مجال علم الوراثة؛ فشهد هذا العلم تقدما كبيراً ليصل في أواخر القرن العشرين إلى هندسة الجينات (الهندسة الوراثية).

Genetic Engineering
الهندسة الوراثية

- Recombinant DNA technology
- Gene cloning
- DNA manipulation
- Genetic engineering

- تعتمد هندسة الجينات على التحكم بالجينات بطريقة تسمح بظهور صفات جديدة مفضلة في كائن لم يكن يمتلكها؛ أو أنها تزيل صفات غير مرغوبة كانت موجودة لدى الكائن؛ أو تسمح بالاستفادة منها لتحقيق أهداف مميزه في مجالات مختلفة مثل: إنتاج البروتينات المفيدة بطرق جيدة، إنتاج النباتات و الحيوانات المحورة وراثياً.

ما هى الهندسة الوراثية

- هي إحدى الفروع التطبيقية لعلم الوراثة، و تختص بمعالجة المادة الوراثية بإستخدام تقنيات خاصة يمكن من خلالها قطع جزيئات حمض DNA في مكان محدد بدقة بالغة ، و وصلها مع قطع أخرى (يمكن تسميتها بـ التطعيم الجيني).

متطلبات الهندسة الوراثية

١- التصميم Genetic Design: معرفة تامة بالجينات وعملها في الكائنات ، سواء في الخلايا أو أنابيب الاختبار.

٢- البناء Genetic Construction : يتطلب الأدوات المناسبة للتحكم في المادة الوراثية بحيث يمكن التحكم في كامل العملية.

The tools of the trade أدوات المهنة

Enzymes

Restriction enzymes

DNA ligases

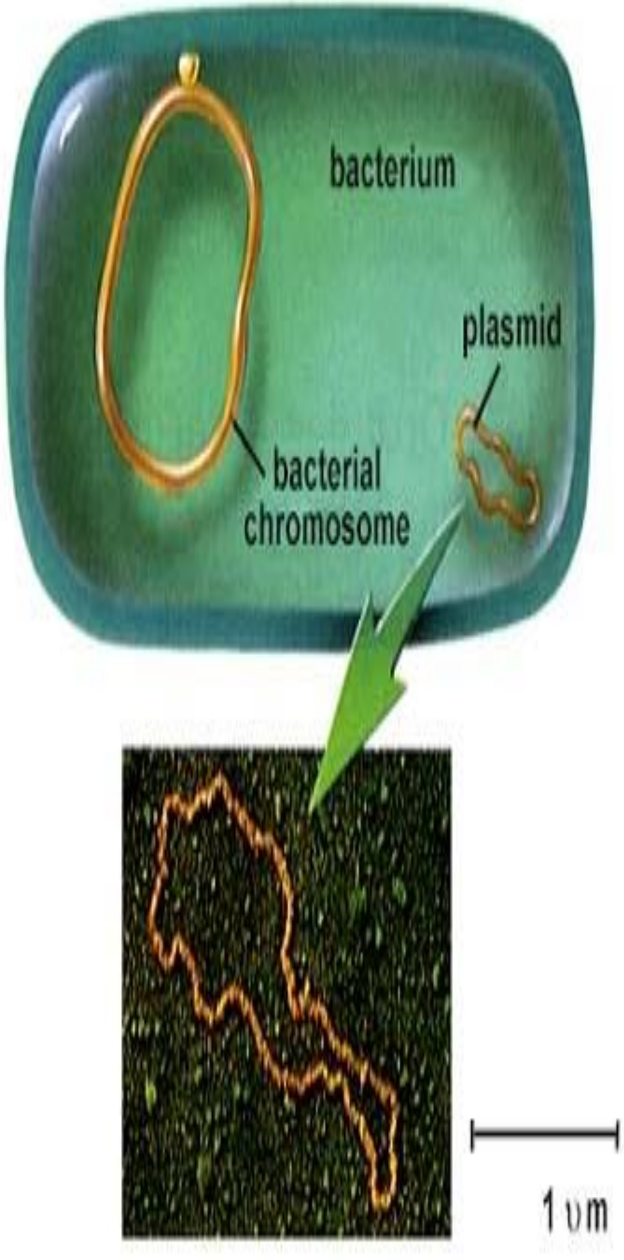
DNA polymerases

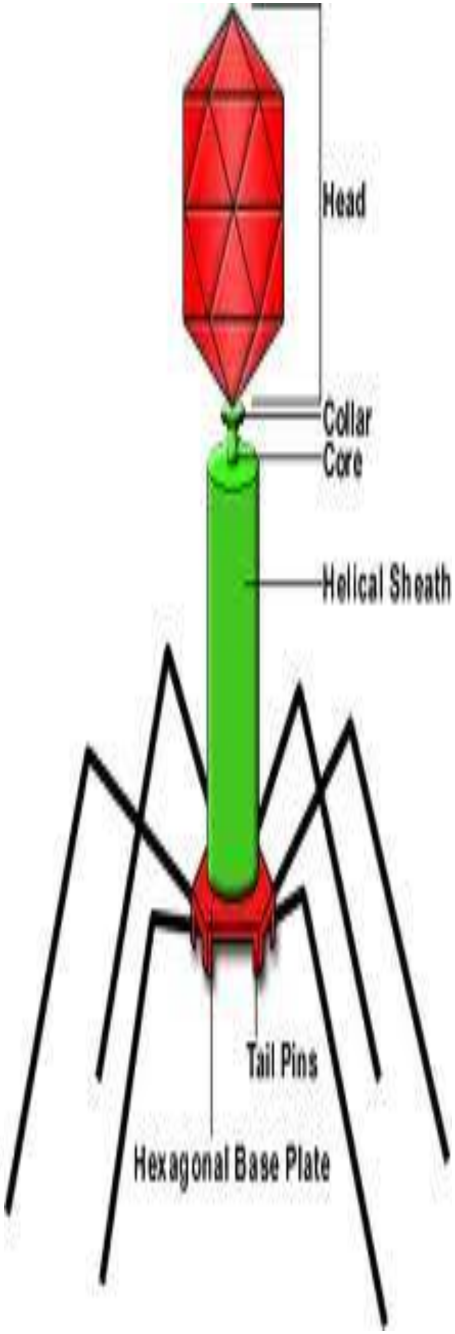
Reverse transcriptases

Terminal transferases

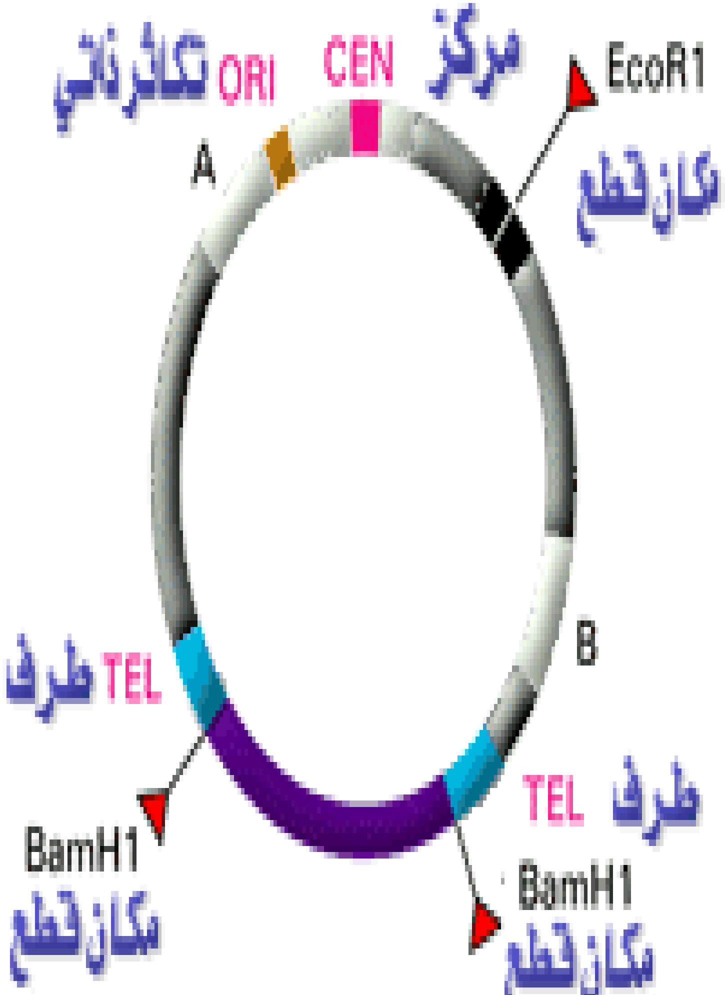
Vectors

- Plasmids
- Viruses
- phagemids
- Cosmids
- Bacterial artificial chromosome (BAC)
- Yeast episomal plasmids(YEPs).
- Yeast centromeric plasmids(YCPs) or mini-chromosome
- Yeast artificial chromosomes (YACs)





كروموسوم الخميرة الصناعي YAC



Plasmid vectors

Plasmid vectors are double-stranded, circular, self-replicating, extra-chromosomal DNA molecules.

Advantages: •

Small, easy to handle –

Straightforward selection strategies –

Useful for cloning small DNA fragments –
(< 10kbp)

Disadvantages: •

Less useful for cloning large DNA fragments –
(> 10kbp)

Plasmid vector for cloning

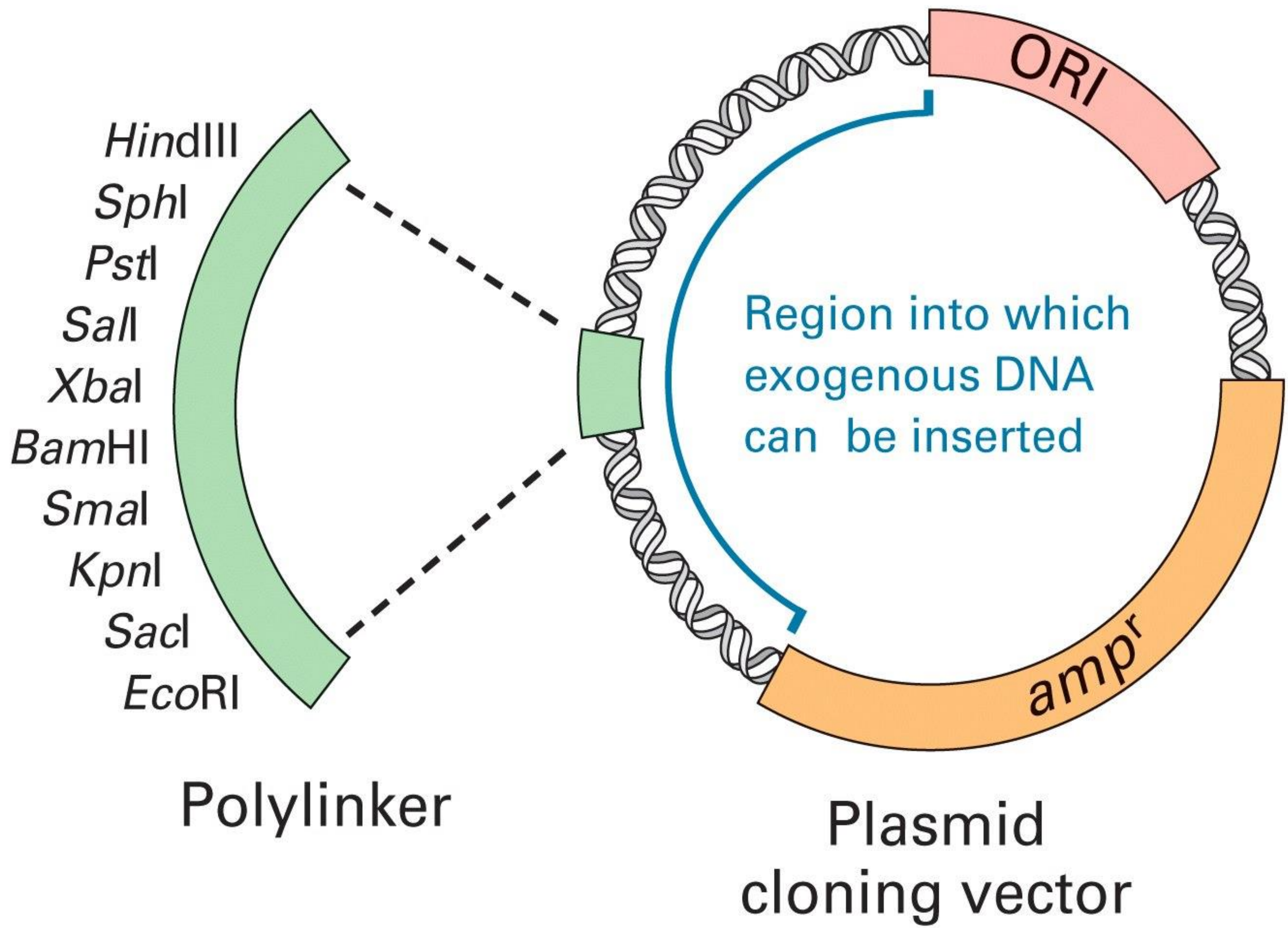
1 -Contains an origin of replication, allowing for replication independent of host's genome.

2- Contains Selective markers: Selection of cells containing a plasmid

- **twin antibiotic resistance**
- **blue-white screening**

3- Contains a multiple cloning site (MCS)

4- Easy to be isolated from the host .


HindIII
SphI
PstI
SalI
XbaI
BamHI
SmaI
KpnI
SacI
EcoRI
ORI
Region into which exogenous DNA can be inserted
ampr
Polylinker
Plasmid cloning vector

Bacteriophage vectors

Advantages: •

Useful for cloning large DNA fragments –

(10 - 23 kbp)

Inherent size selection for large inserts –

Disadvantages: •

Less easy to handle –

λ vectors

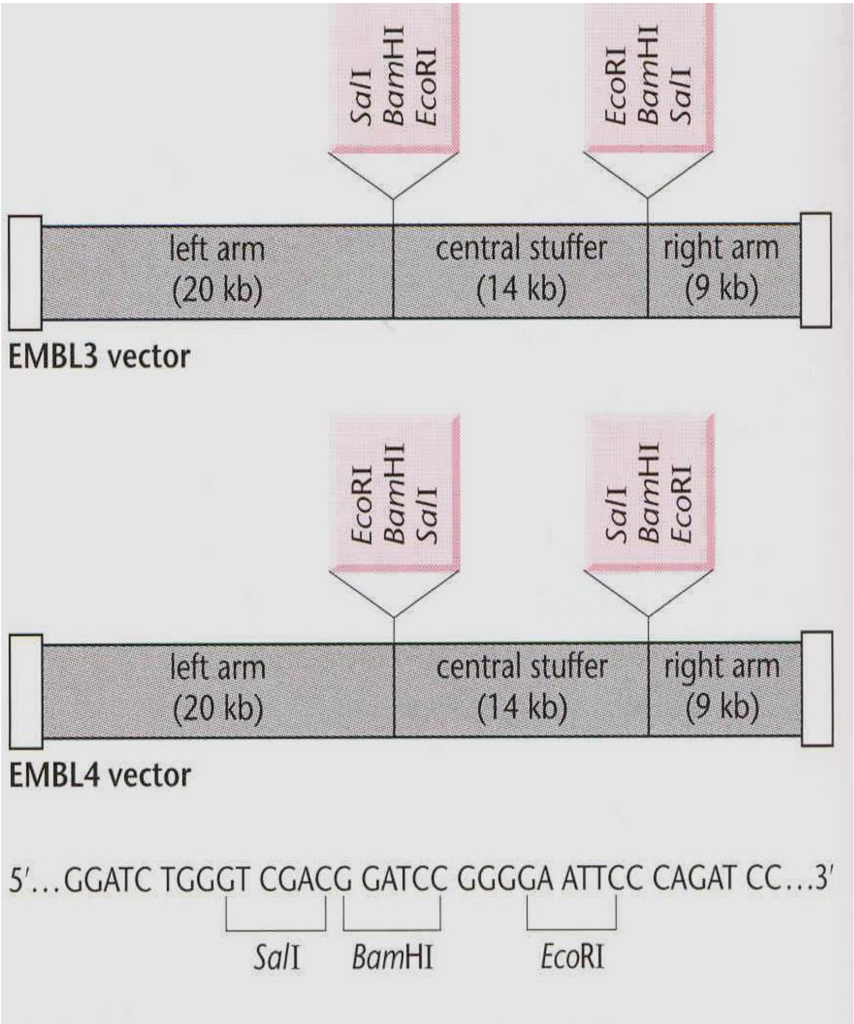
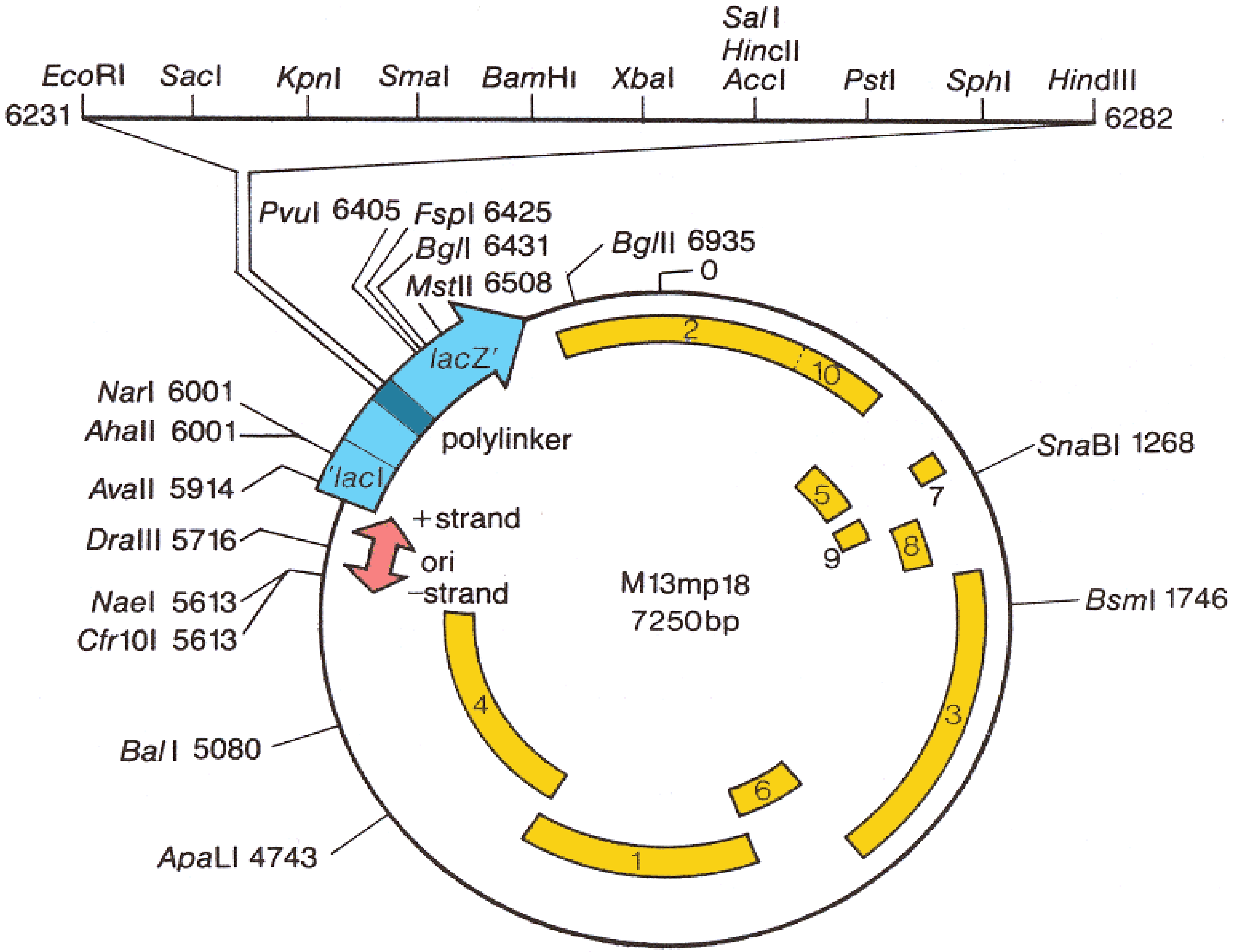


Fig. 4.13 The structure of bacteriophage λ cloning vectors

- ***Left arm*:**
  - **head & tail proteins –**
- ***Right arm*:**
  - **DNA synthesis –**
  - **regulation –**
  - **host lysis –**
- ***Deleted central region*:**
  - **integration & excision –**
  - **regulation –**



EcoRI
SacI
KpnI
SmaI
BamHI
XbaI
SalI
HincII
AccI
PstI
SphI
HindIII
6231
6282
PvuI 6405
FspI 6425
BglI 6431
MstII 6508
BglII 6935
0
lacZ'
NarI 6001
AhaII 6001
polylinker
AvaII 5914
'lacI
+strand
DraIII 5716
ori
−strand
NaeI 5613
Cfr10I 5613
M13mp18
7250bp
SnaBI 1268
BsmI 1746
BalI 5080
ApaLI 4743
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10

Cosmid vectors

Combine the properties of plasmid vectors with the useful properties of the l *cos* site

Advantages: •

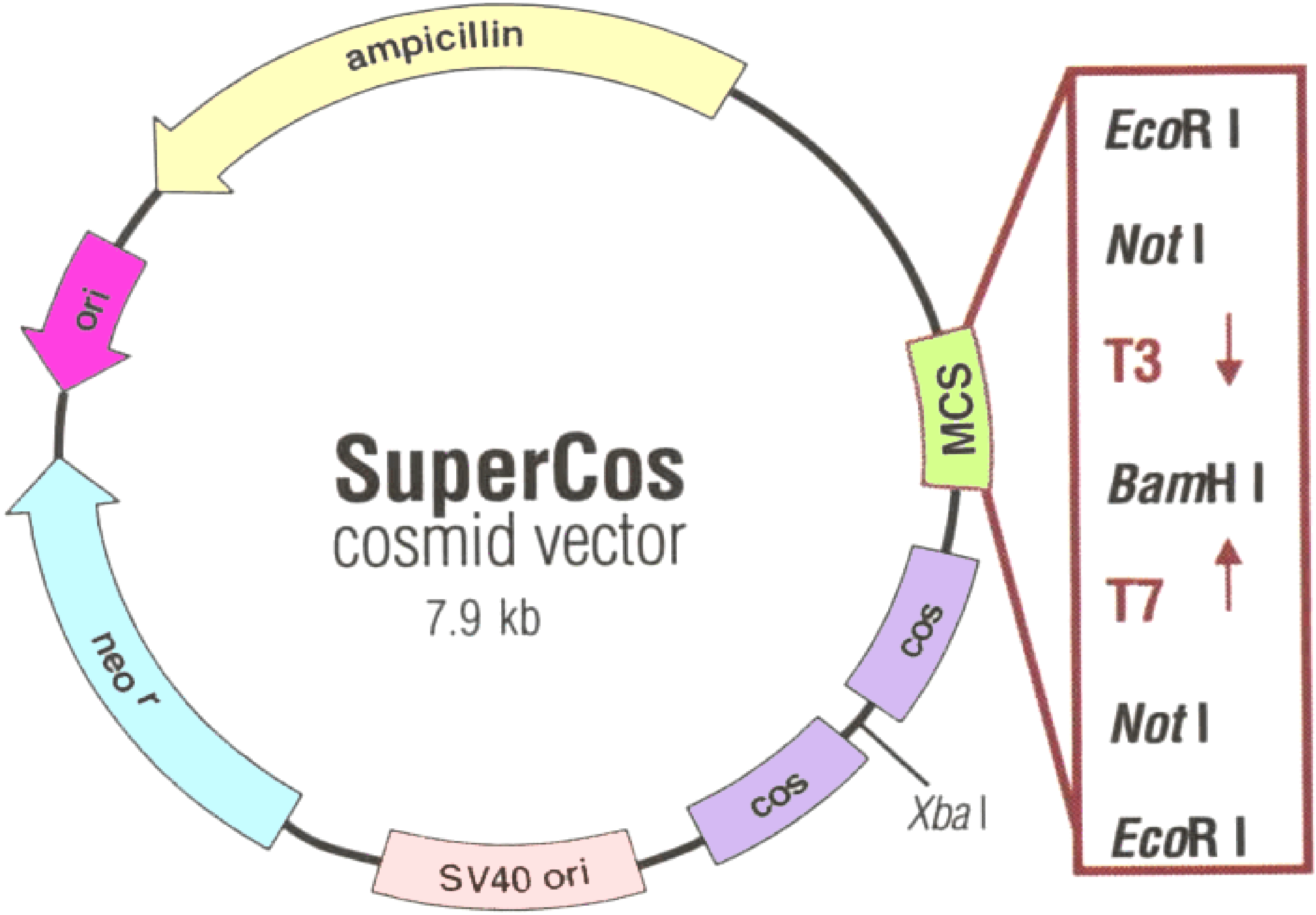
Useful for cloning very large DNA fragments –
(32 - 47 kbp)

Inherent size selection for large inserts –

Handle like plasmids –

Disadvantages: •

Not easy to handle very large plasmids –
(~ 50 kbp) –



ampicillin
ori
neo r
SV40 ori
cos
cos
Xba I
MCS
SuperCos
cosmid vector
7.9 kb
EcoR I
Not I
T3
BamH I
T7
Not I
EcoR I

BACs and YACs

Advantages: •

Useful for cloning extremely large DNA fragments –
(100 - 2,000 kbp)

This is very important for genome sequencing –
projects

Disadvantages: •

Not easy to handle extremely large DNA –
molecules

BAC vector

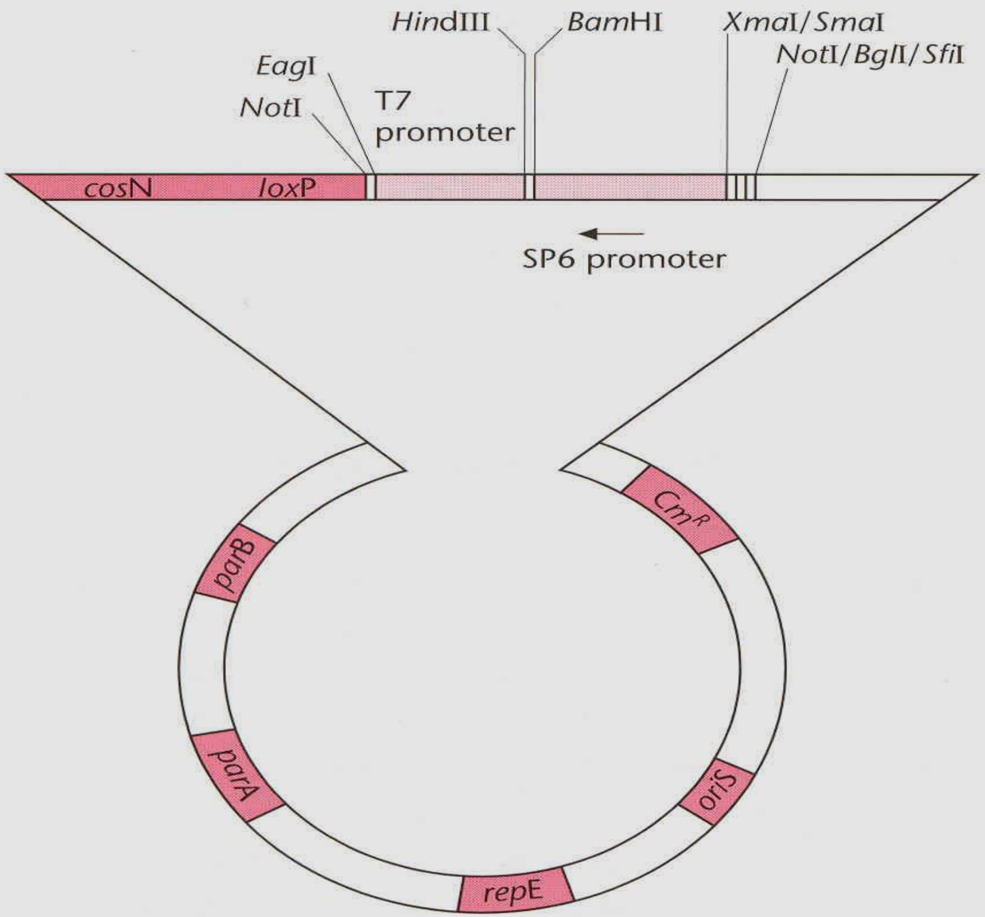
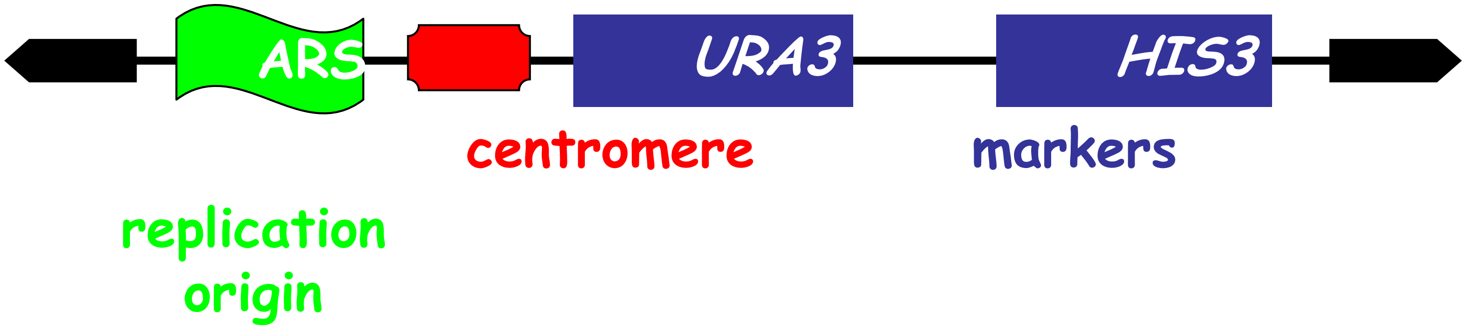


Fig. 5.5 Structure of a BAC vector derived from a mini-F plasmid. The *ori*S and *rep*E genes mediate the unidirectional

- ***ori*S and *ori*E mediate replication**
- ***par*A and *par*B maintain single copy number**
- **Chloramphenicol^R marker**

YAC vector

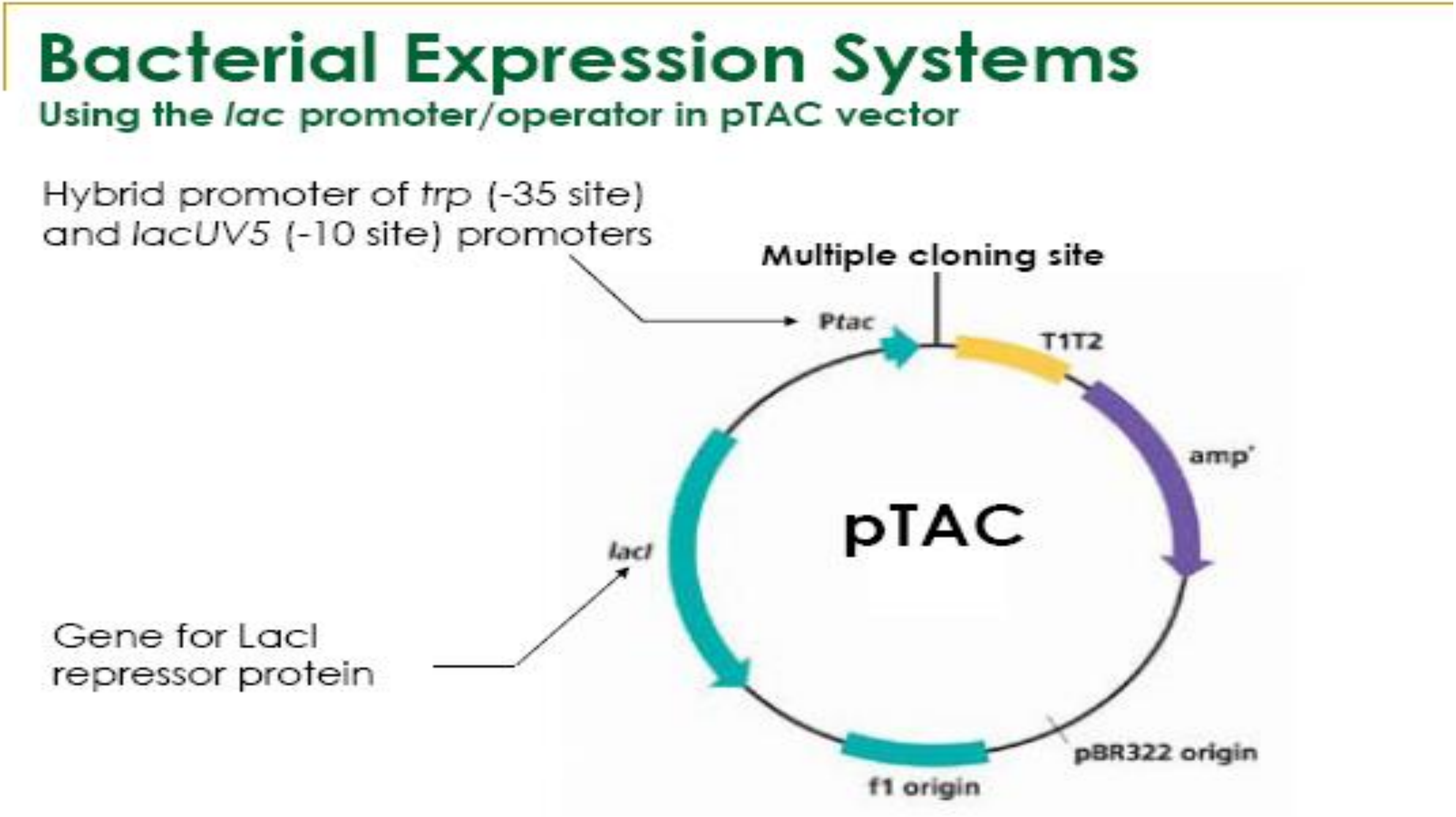


Capable of carrying inserts of 200 - 2000 kbp in yeast •

Table 5.1 Maximum DNA insert possible with different cloning vectors.

Vector	Host	Insert size
λ phage	*E. coli*	5–25 kb
λ cosmids	*E. coli*	35–45 kb
P1 phage	*E. coli*	70–100 kb
PACs	*E. coli*	100–300 kb
BACs	*E coli*	≤ 300 kb
YACs	*Saccharomyces cerevisiae*	200–2000 kb

Expression vector

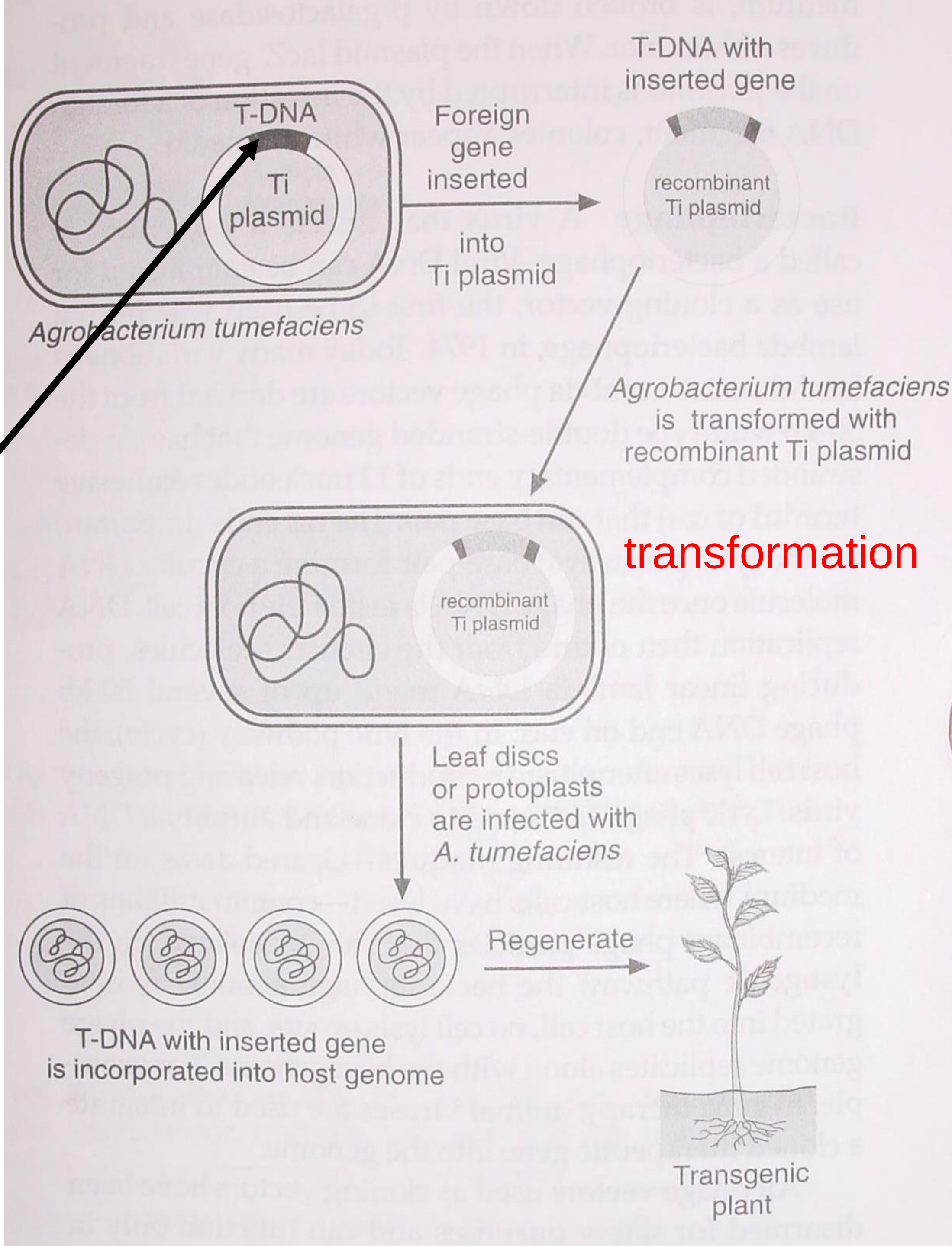


Cloning

Plasmids serve •
as cloning
vectors

T”umor-”i”nducing
DNA **(Ti plasmid)**
contains 8 tumor-•
inducing genes

Use this •
plasmid to
introduce a new
gene into a plant
chromosom



العائل Host

نوع خلية العائل المستخدم تعتمد على الهدف من التجربة ،فاذا كان الهدف هو عزل جين لتحليلة ومعرفة تركيبة فان العائل المستخدم يجب أن يكون بسيط وسهل الاستخدام .

أما اذا كان الهدف هو تعبير المعلومات الوراثية فى الكائنات الراقية مثل النبات فان ذلك يتطلب نظام أكثر تخصص.

عموما فان هناك نوعين رئيسيين من خلايا العائل:

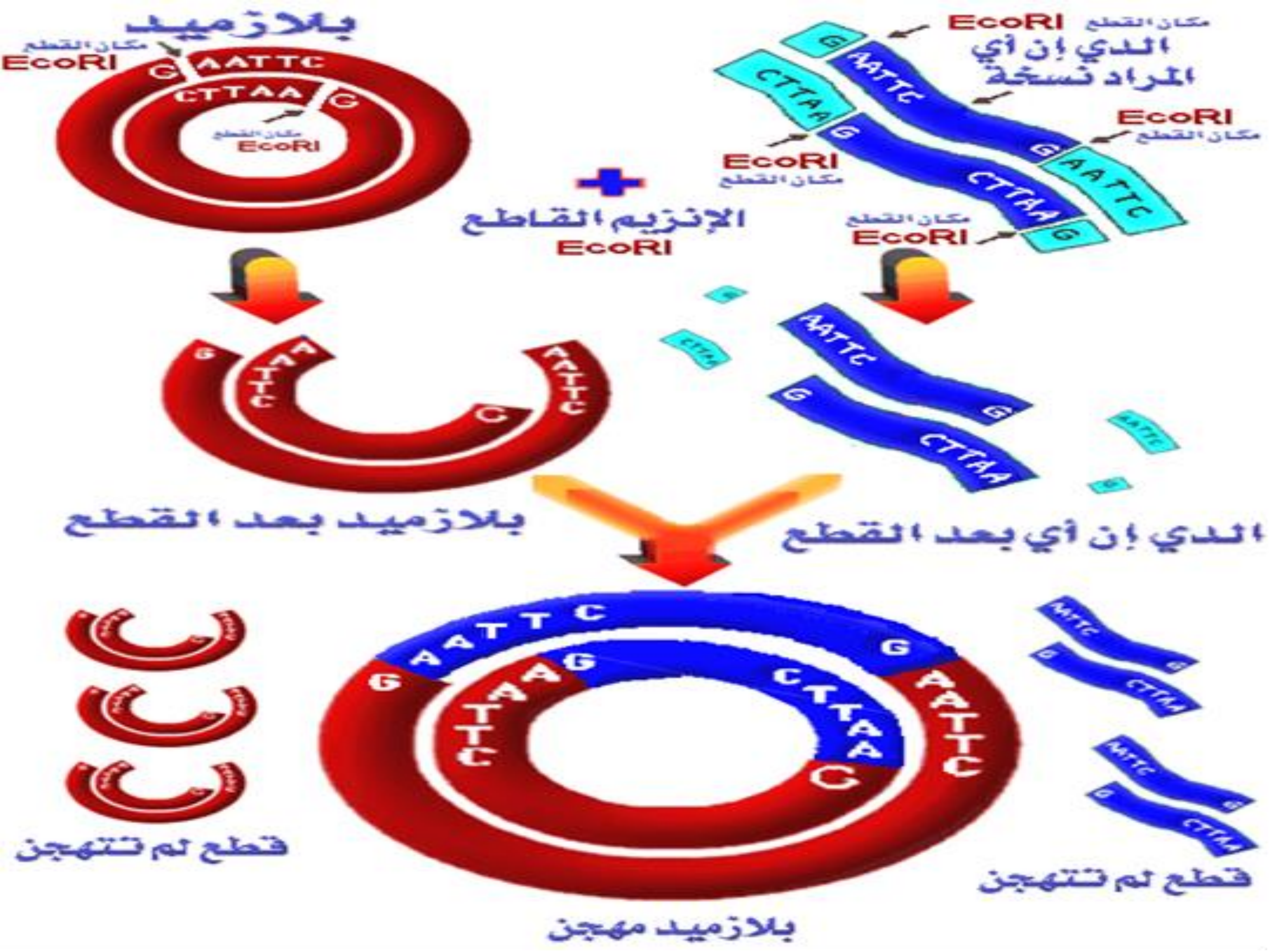
١- prokaryotic hosts مثل *E. coli*

٢- eukaryotic hosts مثل *Saccharomyces cerevisiae*

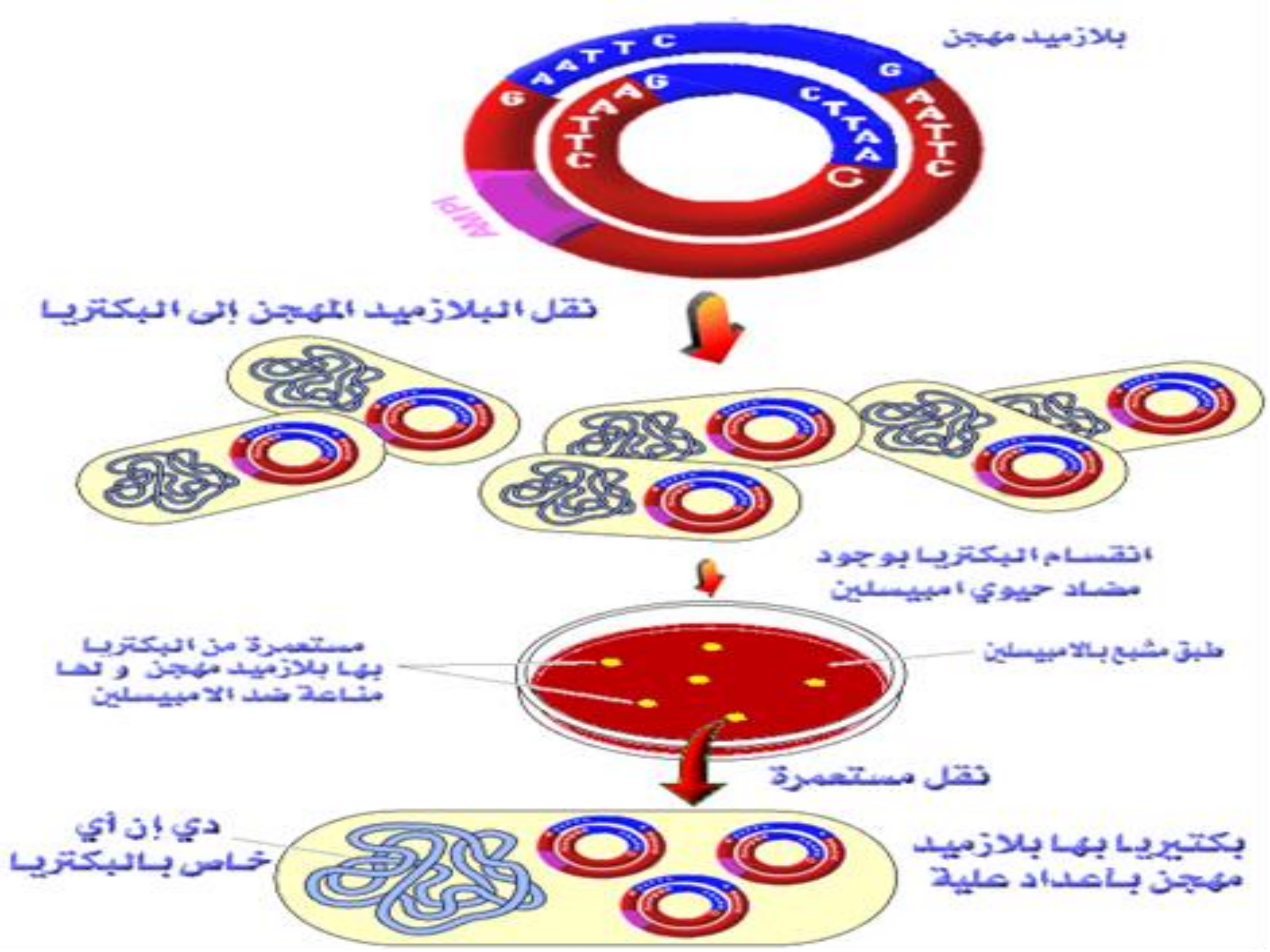
التجربة الأساسية في الهندسة الوراثية

- إدخال قطع الـ DNA الغريبة إلى البكتيريا:
- في عام ١٩٧٣م إستطاع كل من العالمين الأمريكيين " Herbert Boyer" و "Stanly Cohen" إجراء تجربة هى الأساس فيما عرف بالهندسة الوراثية ، و ملخصها كالتالي:
- ١- إستخدام إنزيمات القطع لكسر شريط الـ DNA إلى قطع صغيرة.
- ٢- إختيار الناقل Vector المناسب لنقل الجين إلى الخلية الجديدة (غالباً ما يكون الـ Plasmid).
- ٣- فتح البلازميد الناقل بإستخدام نفس إنزيم القطع Restriction enzyme المستخدم مع شريط DNA.

- ٤- خلط قطع الـ DNA المراد نقله مع DNA البلازميد.
- ٥- لحم قطع الـ DNA المراد نقله مع DNA البلازميد بإستخدام إنزيمات اللحم Ligases لإنتاج DNA مولف Recombinant DNA.
- ٦- السماح للناقل بإصابة مجموعة كبيرة من الخلايا المطلوب إدخال الـ DNA إليها (كالبكتيريا).
- ٧- تنمى الخلايا في بيئة صناعية للكشف عن مدى نجاح التجربة.



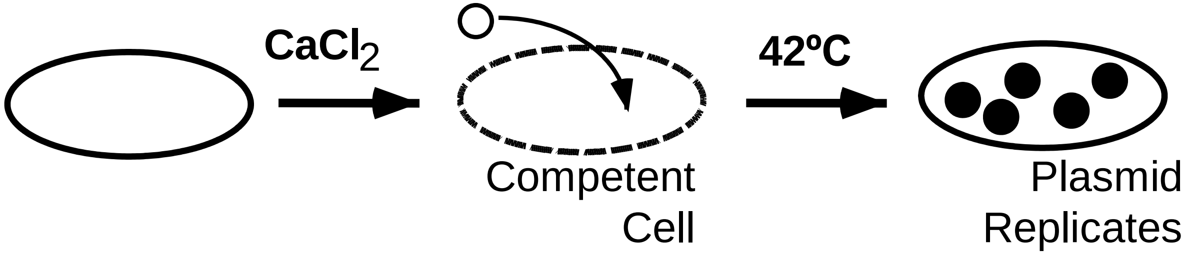
بلازميد
مكان القطع
EcoRI
GAATTC
CTTAAG
مكان القطع
EcoRI
مكان القطع
EcoRI
الدي إن أي
المراد نسخة
مكان القطع
EcoRI
مكان القطع
EcoRI
مكان القطع
EcoRI
الإنزيم القاطع
EcoRI
بلازميد بعد القطع
الدي إن أي بعد القطع
قطع لم تتهجن
قطع لم تتهجن
بلازميد مهجن


بلازميد مهجن
G A A T T C G
G A A T T C
C T T A A G
C T T A A G
AMPI
نقل البلازميد المهجن إلى البكتريا
انقسام البكتريا بوجود
مضاد حيوي اميسلين
مستعمرة من البكتريا
بها بلازميد مهجن و لها
مناعة ضد الاميسلين
طبق مشبع بالاميسلين
نقل مستعمرة
دي إن أي
خاص بالبكتريا
بكتيريا بها بلازميد
مهجن باعداد علية

ادخال DNA البلازميد

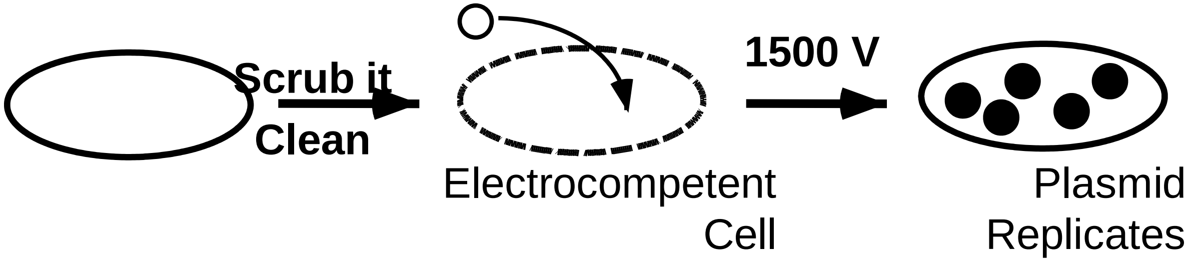
Heat-Shock Transformation:

يحدث فجوات في جدار الخلية تسمح بدخول DNA
ثم تغلق



Electroporation:

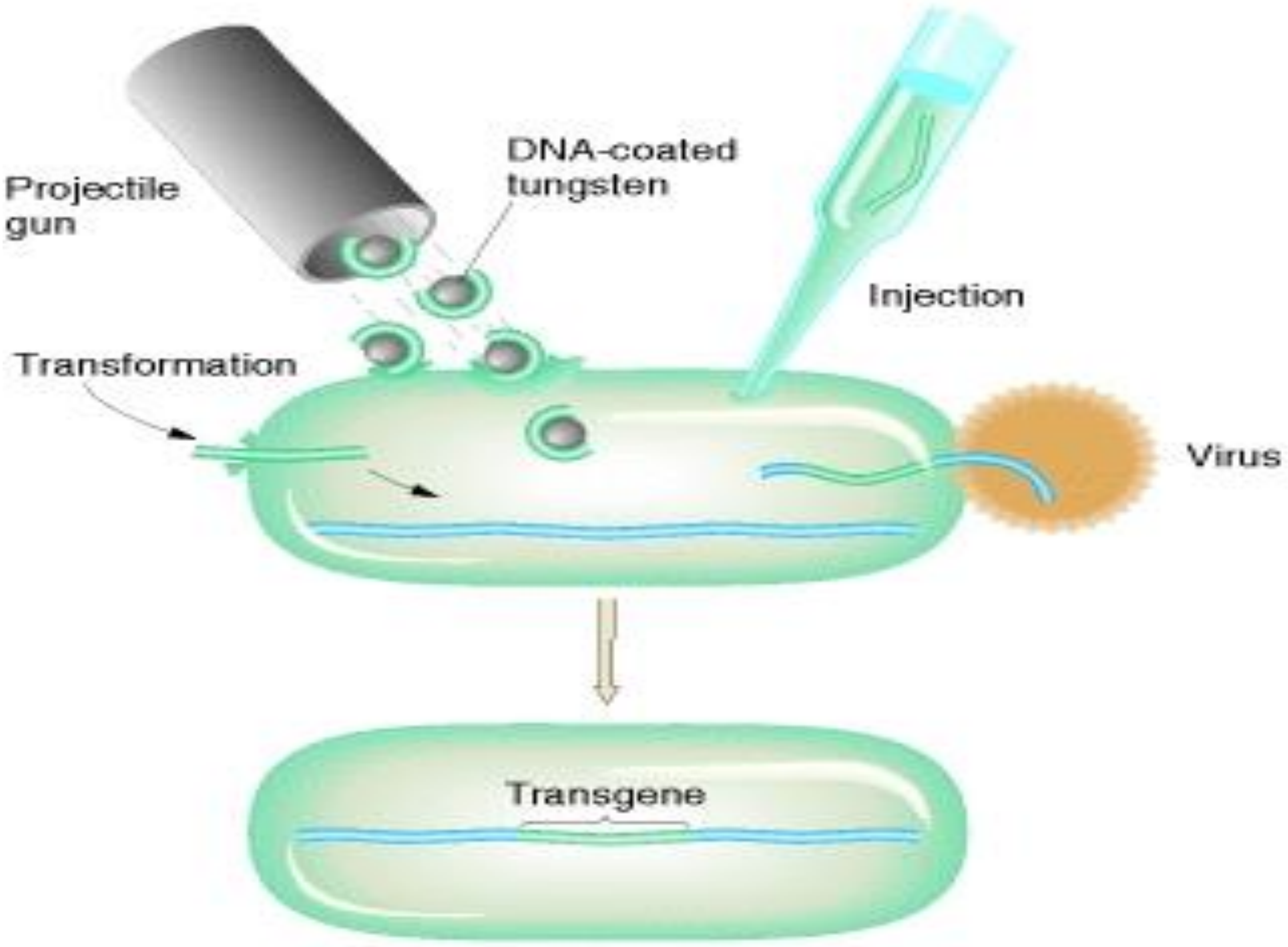
تيار عالي (1500 V) لمدة قصيرة تسمح بدخول DNA

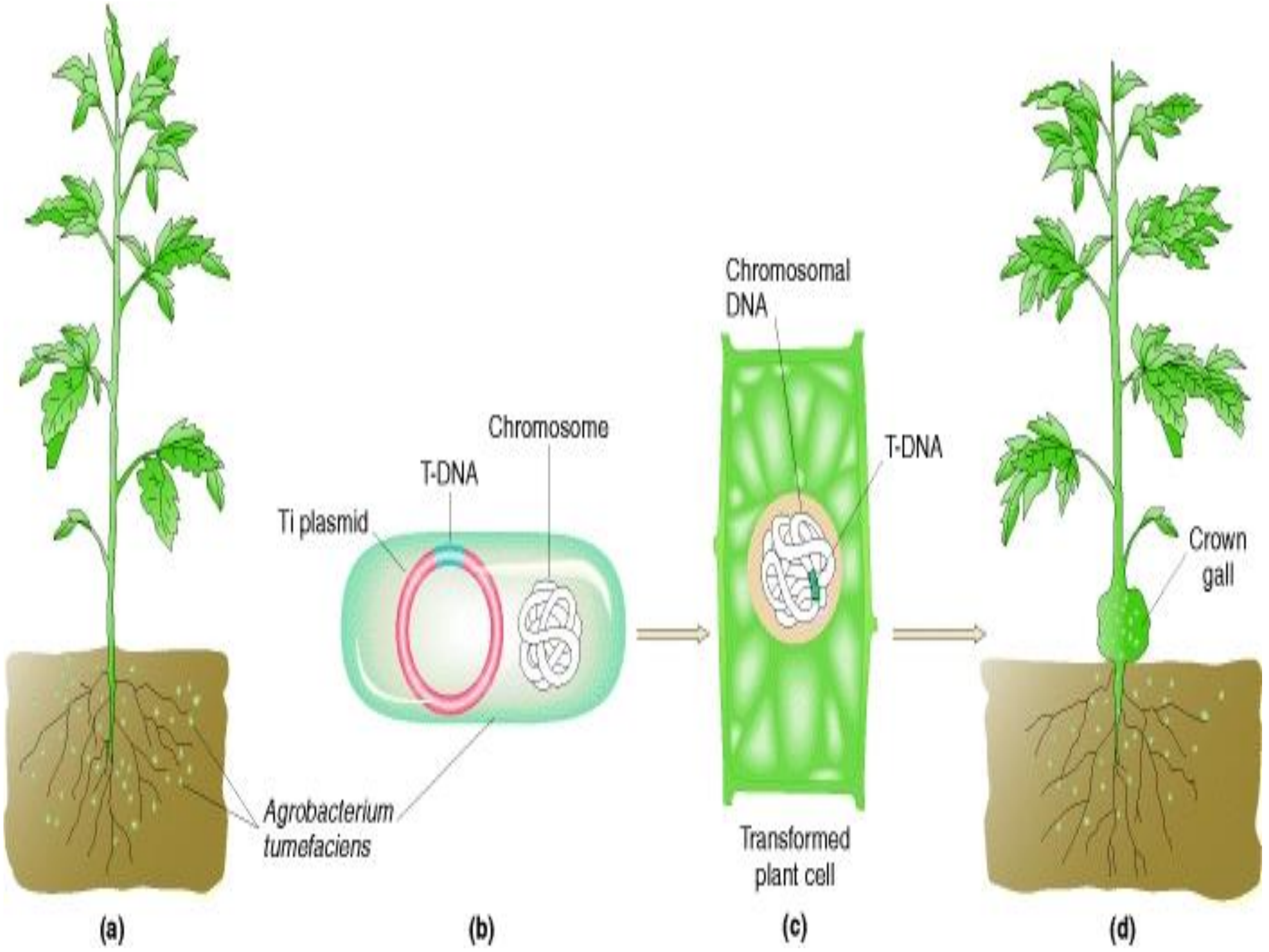


طرق أخرى لإدخال DNA الى الخلايا

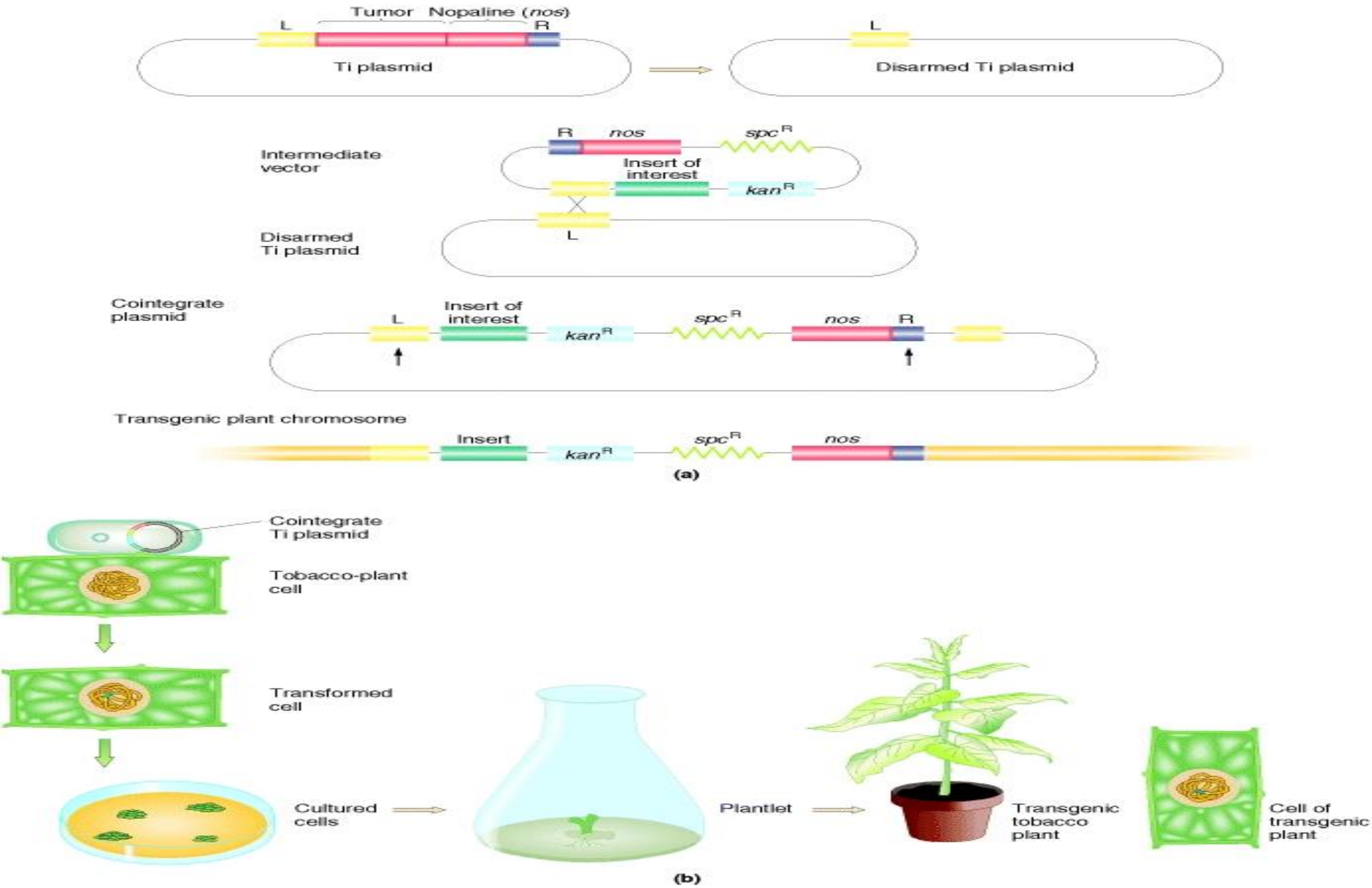
- **Liposome-Mediated Transformation:**
  DNA is encased in lipid vesicles which fuse with the cell membrane and release DNA into the cytoplasm.

- **Biolistic-Mediated Transformation:**
  Gold beads are coated with DNA and blasted into cells using compressed helium or gun powder.

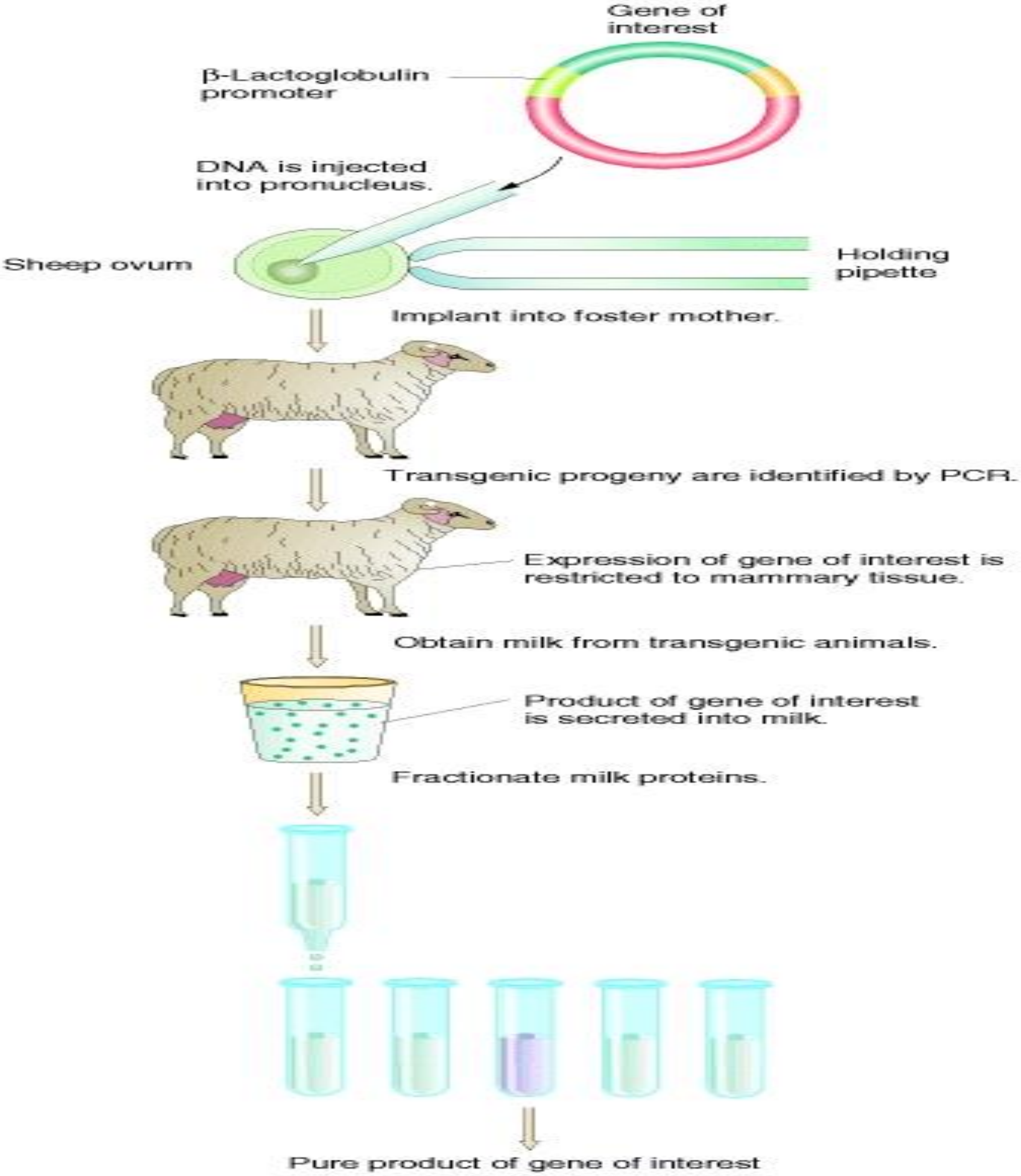

Projectile
gun
DNA-coated
tungsten
Injection
Transformation
Virus
Transgene



Chromosome
T-DNA
Ti plasmid
Agrobacterium tumefaciens
Chromosomal DNA
T-DNA
Transformed plant cell
Crown gall
(a)
(b)
(c)
(d)



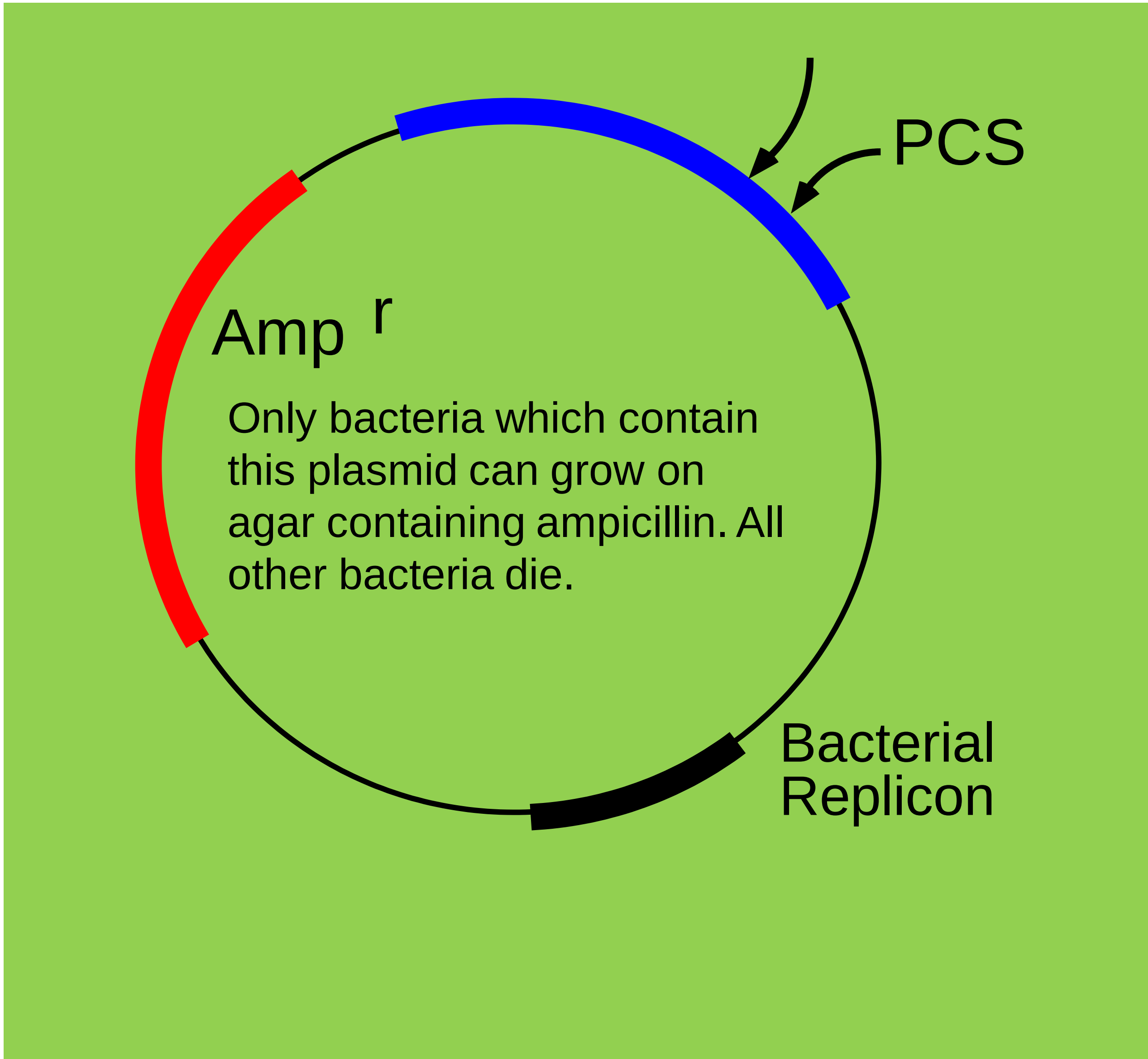
Plant transformation


Gene of interest
β-Lactoglobulin promoter
DNA is injected into pronucleus.
Sheep ovum
Holding pipette
Implant into foster mother.
Transgenic progeny are identified by PCR.
Expression of gene of interest is restricted to mammary tissue.
Obtain milk from transgenic animals.
Product of gene of interest is secreted into milk.
Fractionate milk proteins.
Pure product of gene of interest

البحث عن البلازميد الحامل لـ DNA

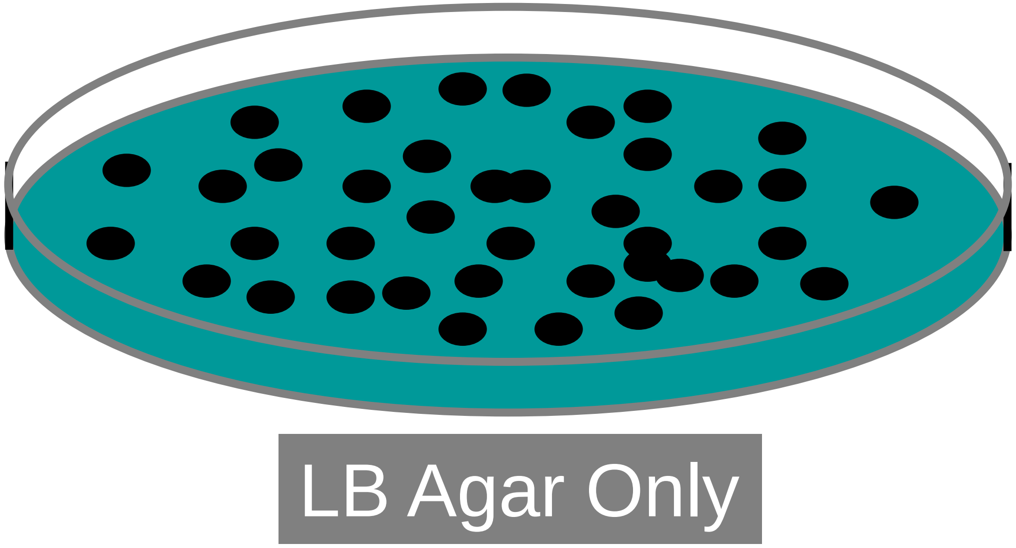
Negative Selection:

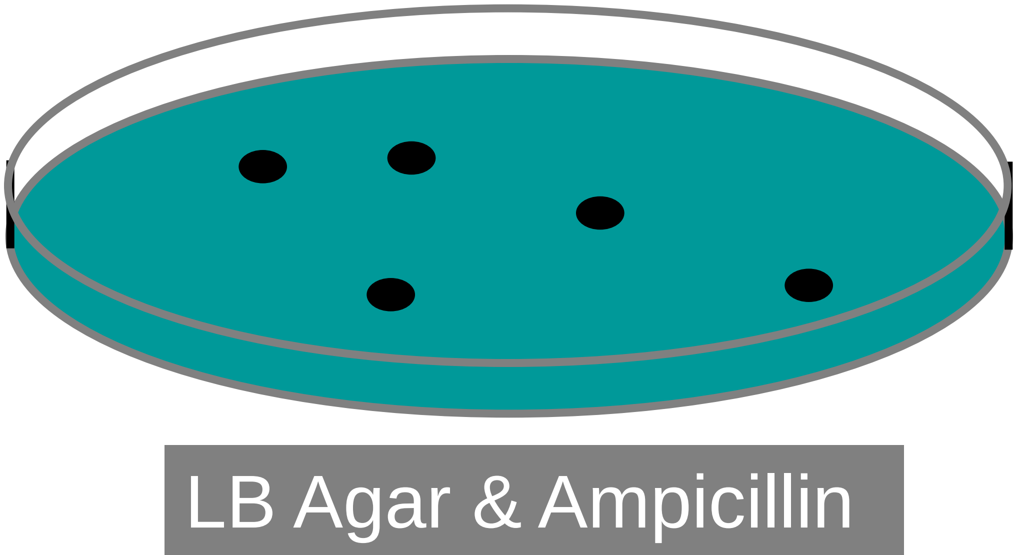
- **Plasmids of interest (i.e., those with foreign DNA) must be visually identified and then separated from empty plasmids.**



وجود بيئة انتخابية تسمح بالاختيار

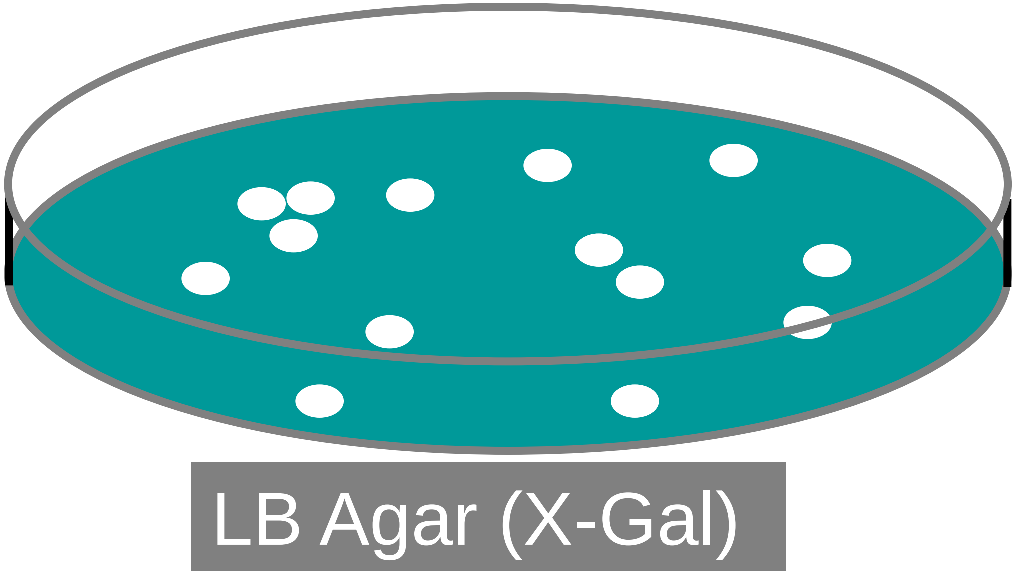
- في غياب المضاد الحيوى تنمو كل الخلايا
- في وجود المضاد الحيوى Ampicillin تنمو الخلايا التى بها البلازميد فقط

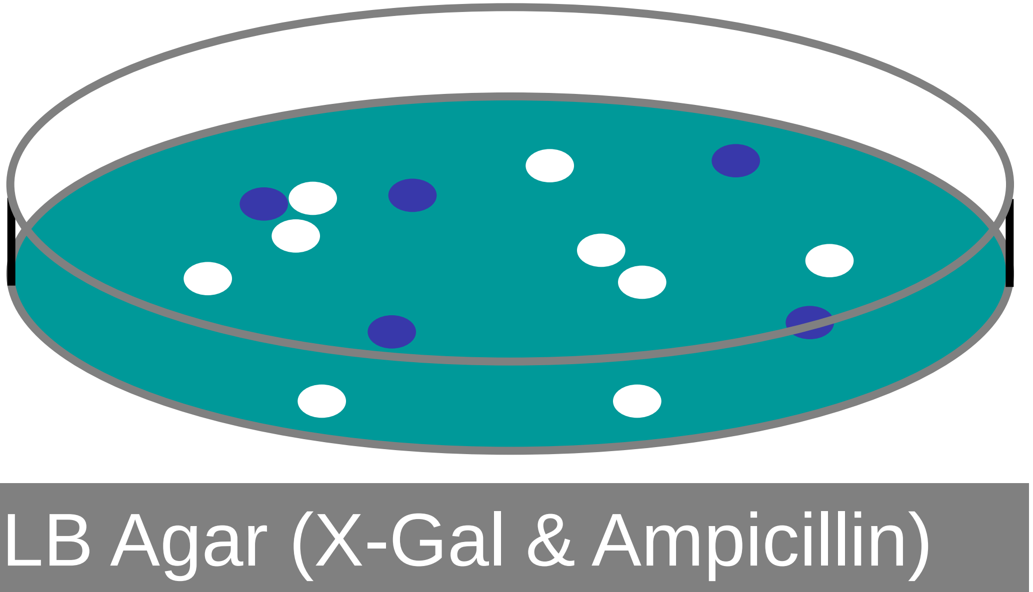




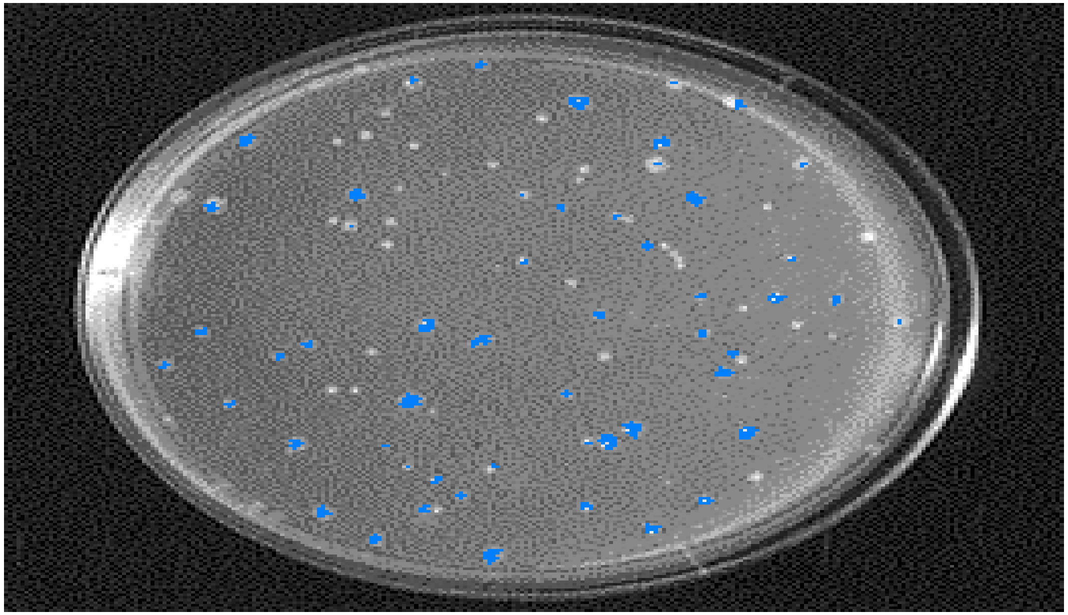
وجود بيئة انتخابية تسمح بالاختيار

- في غياب وسط اختياري ، كل الخلايا تنمو و الخلايا الحاملة **transformed** تتخلص من البلازميد
- في وجود وسط اختياري ومادة **X- Gal**، فقط الخلايا الحاملة يكون لونها أبيض وغير الحاملة يكون لونها أزرق





Selecting Colonies with Recombinant Plasmids



Colony plating test for successful cloning:

lacZ(+) colonies are blue:
the polylinker is intact => no insert.
lacZ(-) colonies are white:
disruption of polylinker => cloned insert

DNA analysis

- DNA extraction
- DNA digestion
- DNA electrophoresis
- DNA blotting
- DNA probing
- DNA amplification
- DNA sequencing

الإنزيمات القاطعة

Restriction Nucleases

- مقدمة:-
- توجد الجينات على الكروموسومات على شكل حبات متصلة ببعضها البعض و ليست على شكل قطع منفصلة.
- وهذا التسلسل و الترابط في الجينات جعل عملية فصل و عزل و إستخلاص جين محدد من بقيه الجينات مهمة صعبة إن لم تكن مستحيلة قبل عام ١٩٧٠.

- ولكن إكتشاف الإنزيمات القاطعة Restriction Nucleases ساعد في عملية إستخلاص الجينات و قطع DNA و نسخه.

- لا شك أن كل كائن حي لديه طرق دفاع مختلفة تحميه من الأعداء و هجوم المعتدين،
- و البكتيريا هي إحدى هذه الكائنات و لها أعداء من أهمها الفيروسات.
- و لقد قاومتها بعض من البكتيريا بإنتاج إنزيمات تقوم بتدمير الفيروسات.
- و من هذه الإنزيمات الإنزيمات القاطعة أو (Restriction Nucleases) و تقوم هذه الإنزيمات بقص الحمض النووي للفيروس و بذلك يبطل مفعولة.

- و بما أن DNA موجود بشكل طبيعي في البكتيريا كما هو الحال في الفيروسات و الكثير من الكائنات الحية فان هذه الإنزيمات قد تشكل خطرا على البكتيريا نفسها في قصها لـ DNA الخاص بها.
- ولكن هذا لا يحدث و السر في ذلك هو قيام البكتيريا بتحوير أجزاء من DNA الخاص بها عن طريق إضافة مجموعة الميثيل Methyl إلى بعض من الحمض النووي (الأدنين أو السيتوزين Methylation at an A or C residue فلا تستطيع الإنزيمات قص الحمض النووي الخاص بالبكتيريا.

- عند إكتشاف هذه القواطع في السبعينيات الميلادية بدأ العلماء في إستخدامها كمقصات لقص DNA.و ساعدتهم هذه المقصات في عملية التحكم في DNA .

وتمتاز هذه الإنزيمات بقدرتها على قطع الحامض النووي عند مواقع معينة من DNA تسمى Restriction sites

هذه المواقع توجد داخل تتابع مكون من عدد من النيوكليوتيدات يتراوح بين ٤-٦ نيوكليوتيدات تعرف بتتابعات التعرف Recognition Sequences بحيث أنها تتعرف عليها و تقوم بالقطع فى Restriction sites

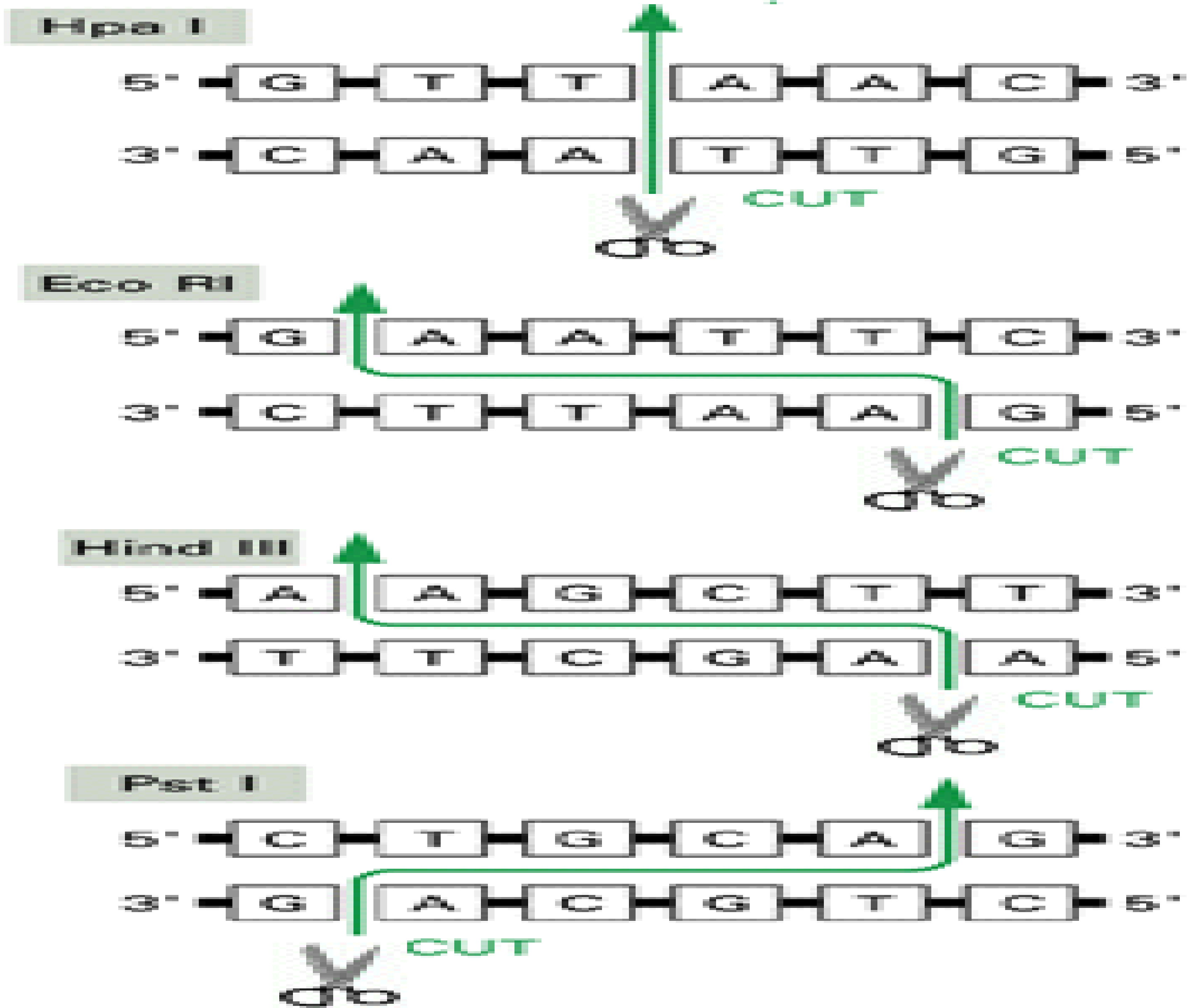
أنواع الـ Restriction Enzymes

- يوجد حاليا أكثر من مائه نوع من هذه المقصات .
- و تقسم هذه المقصات إلى نوعين رئيسيين:-
- النوع الأول يقص DNA المزدوج بشكل مستقيم أو مستوى (Blunt ends) ويعود إنتاج هذه النهايات إلى أن مكان القطع على سلسلتي الحامض النووي المزدوج يكون متناظر .
- مثال:-

5GTTAAC3	Hpa1	5GTT	+	AAC3
3CAATTG5	→	3CAA		TTG5

- و النوع الثاني يقص بشكل متعرج أو غير مستوى **(Sticky ends)** وبالتالى تكون هذه النهايات متكاملة **Complimentary** ، موقع القطع لها يكون غير متناظر .
- مما يجعل طرفي **DNA** المقطوع مادة قابلة للصق قطعة غريبة من **DNA** فيها داخل الفراغ الناتج من القطع و ينتج قطعة مركبة من قطعتين مختلفتين من **DNA** و هذه القطعة تسمى **DNA** مولف أو (***Recombinant DNA***)

5 CTGCAG 3	**Pst1** →	5 CTGCA		G 3
3 GACGTC 5		3 G	+	ACGTC 5


Hpa I
5' G T T A A C 3'
3' C A A T T G 5'
CUT
Eco RI
5' G A A T T C 3'
3' C T T A A G 5'
CUT
Hind III
5' A A G C T T 3'
3' T T C G A A 5'
CUT
Pst I
5' C T G C A G 3'
3' G A C G T C 5'
CUT

تسمية الإنزيمات

- نظراً للأعداد الكبيرة التي إكتشفت من هذه الإنزيمات فإنه تم اقتراح نظام تسمية وضعه العالمان سميث وناثان عام ١٩٧٣ م (Smith and Nathan 1973)

على النحو التالي:

أ- الحرف الأول من اسم الإنزيم يرمز للحرف الأول لجنس الكائن الذي اكتشف فيه الإنزيم

ب- و الحرف الثانى والثالث من إسم الإنزيم يرمزللحرف الأول و الثانى لنوع الكائن

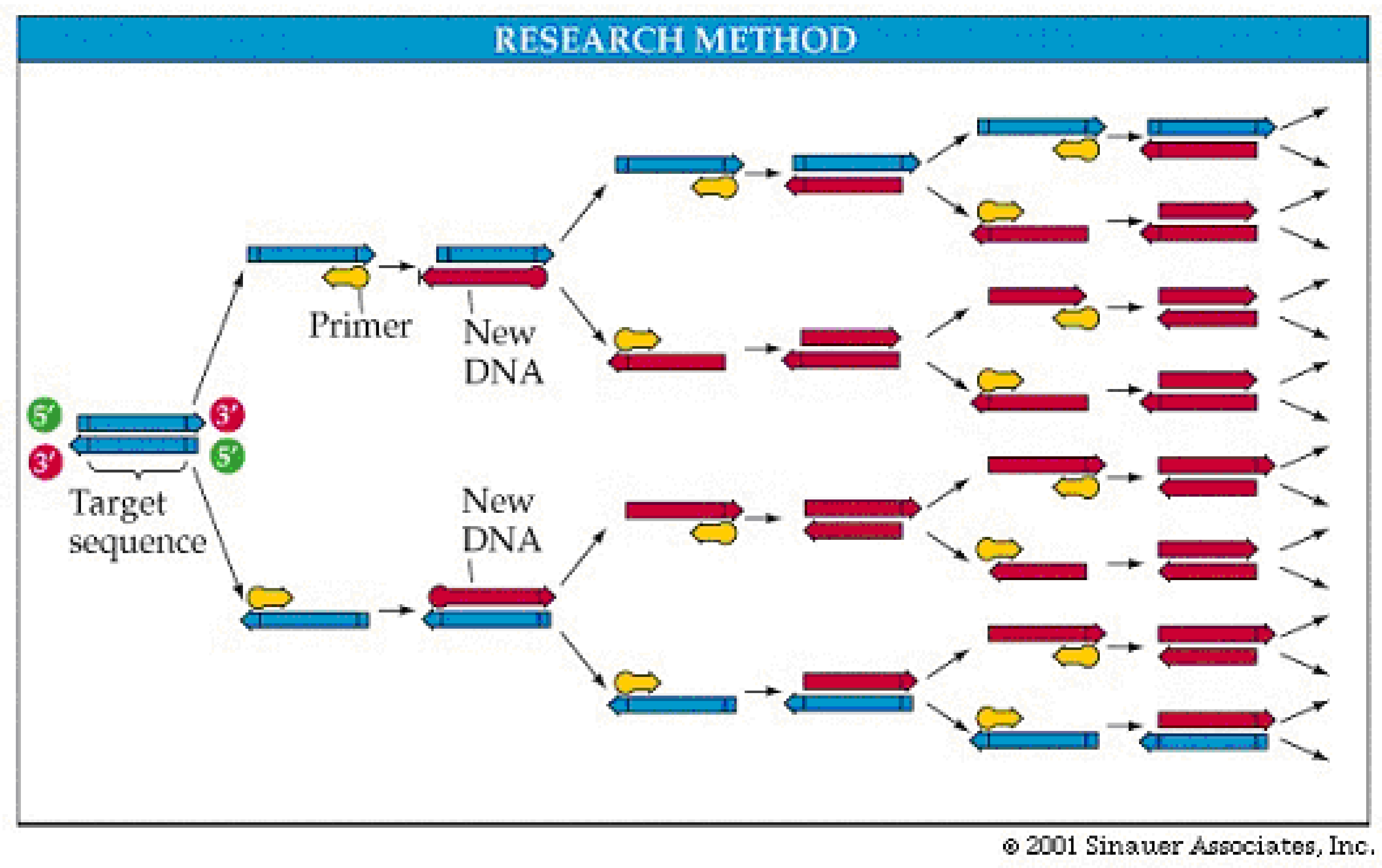
- فمثلاً الإنزيم المسمى Eco مأخوذ من البكتيريا *Eschericia coli* وكذلك الحال بالنسبة للإنزيم Hpa مأخوذ من اسم البكتيريا *Haemophilus parainfluenza* وهكذا فى باقى الإنزيمات
- ج- فمثلاً في حالة الإنزيم Eco المشتق من إسم البكتيريا *E. coli* المحتوية على البلازميد RI فإن إسم الإنزيم يصبح EcoRI
- د- في حالة وجود أكثر من إنزيم لنفس النوع من البكتيريا تستخدم الأرقام الرومانية بعد نهاية الإسم كما هو الحال في الإنزيمات

EcoRI ,EcoRII ,HindI, HindII ,HindIII

تكنيك الـ PCR
(Polymerase chain reaction)

- كثيراً ما يقتضى الأمر دراسة جزء معين من جزئ DNA ، لذا يستلزم الأمر مضاعفة هذا الجزء المطلوب دراسته مرات عديدة خارج الجسم حتى يسهل إستخدامه بعد ذلك فى الدراسة المطلوبة ، وتسمى عملية المضاعفة هذه باسم (إكثار DNA amplification)
- ولإجراء عملية مضاعفة الجزئ يلزم فك شريطى الجزئ عن بعضهما البعض ، ثم تكوين شريط جديد أمام كل شريط قديم باستخدام أنزيم البلمرة DNA- polymerase

- وبتكرار هذا الإجراء عدة مرات يتكون لدينا بمتوالية هندسية عدد كبير من جزيئات الحمض تشبه كلها الجزىء الأصلى الذى بدأنا به .



Cycle 1 = 1

Cycle 2 = 2

Cycle 3 = 4

Cycle 4 = 8

Cycle 5 = 16

Cycle 10 = 512

Cycle 15 = 16,384

Cycle 20 = 524,288

Cycle 25 = 16,777,216

Cycle 30 = 536,870,912

Cycle 32 = 2,147,483,648

Copies of the target DNA flanked by PCR primers increase exponentially

إذن الـ PCR هو تكنيك لزيادة عدد نسخ DNA بالتضاعف بعيدا عن الخلية داخل جهاز يتحكم فى درجات حرارته

إذن يمكن القول بأن تفاعل البلمرة المتسلسل هو عبارة عن:

عملية تكرار الحمض النووي تتم في أنبوبة إختبار

PCR is DNA replication in a test tube

متطلبات تفاعل الـ PCR

- ١- قالب Template عبارة عن خيط مزدوج من الـ DNA

- ٢-البادئات Primers

CCGAATGGGATGC
GGCTTACCCTACG

وتكون نوعان (تقدمى Forward و عكسى Reverse)

وهي تسلسل قواعد نيتروجينيه في شريط واحد قصير(20-25 bp) مكمل لبداية الجزء المراد تضخيمه في الحمض النووي.

-3- إنزيم البلمرة Polymerases

- وهو مستخلص من سلالة بكتيريه تسمى ***Thermus aquaticus*** التي تعيش في مياه حارة **Taq polymerase** .

Taq—faster and better at amplifying long genes

Error prone and not have proofreading activity

Pfu—slow but provides proofreading

Used for mutagenesis primarily

Taq:Pfu mix—qualities of both

- **٤- قواعد نيتروجينية دى أوكسى ريبوزية (G,C,A,T)**
- **٥- محلول منظم**
- **٦- ماء منزوع الأيونات**
- **٧-Thermal Cycler, Rapid Cycler**

Thermal Cycler, Rapid Cycler

Basic Thermal Profile

Initial Melt 94ºC

Denature 94ºC

Anneal Tm (40- 65ºC)

Extension 72ºC

سير عملية التفاعل

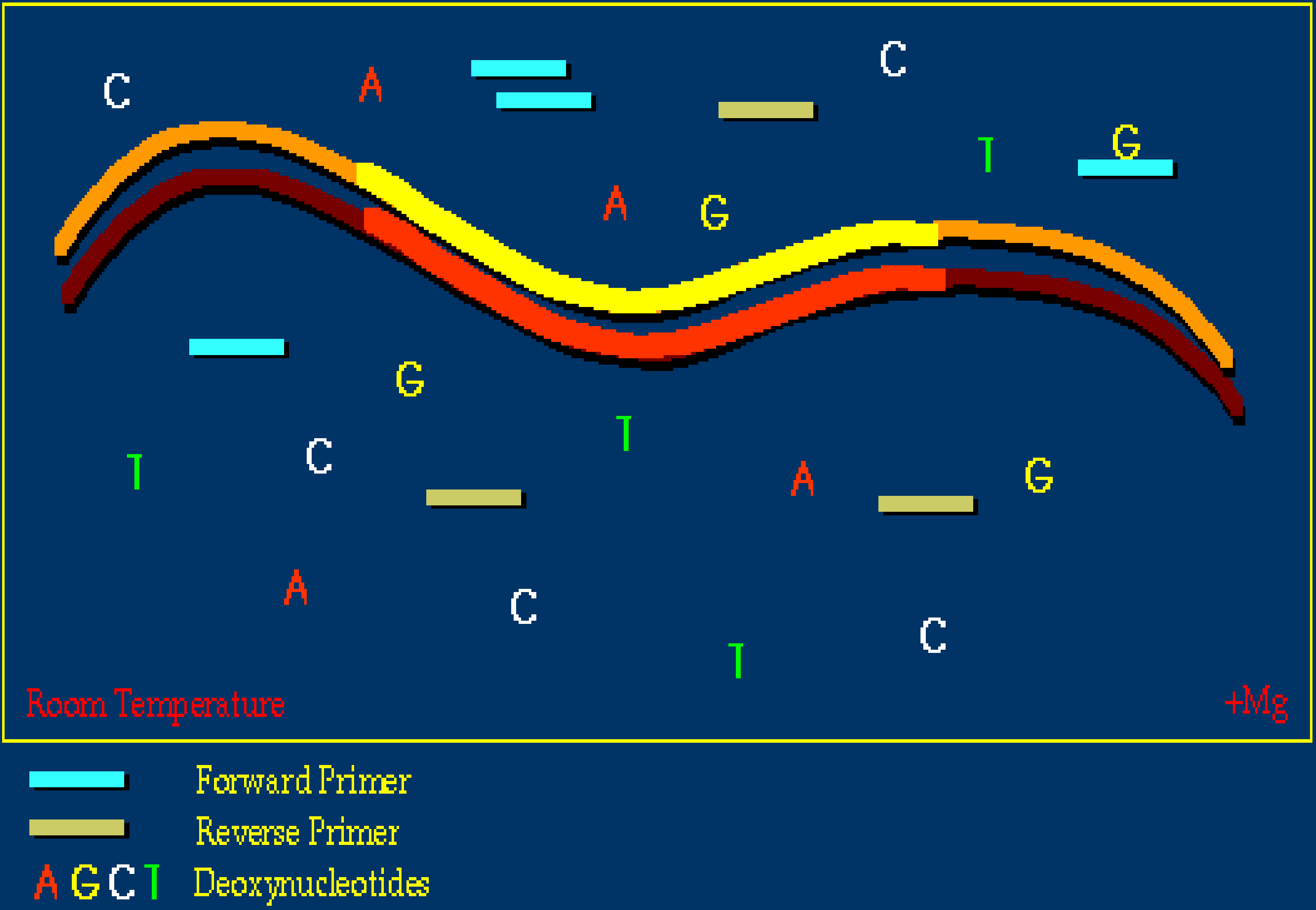
هناك ثلاث خطوات مهمه والتي يقوم الجهاز بإعادتها تلقائيا بعد برمجته وهي:

١- (denatuer) مباعدة(فصل) خيطي الحمض النووي عن بعضهما (عند ٩٤°C)

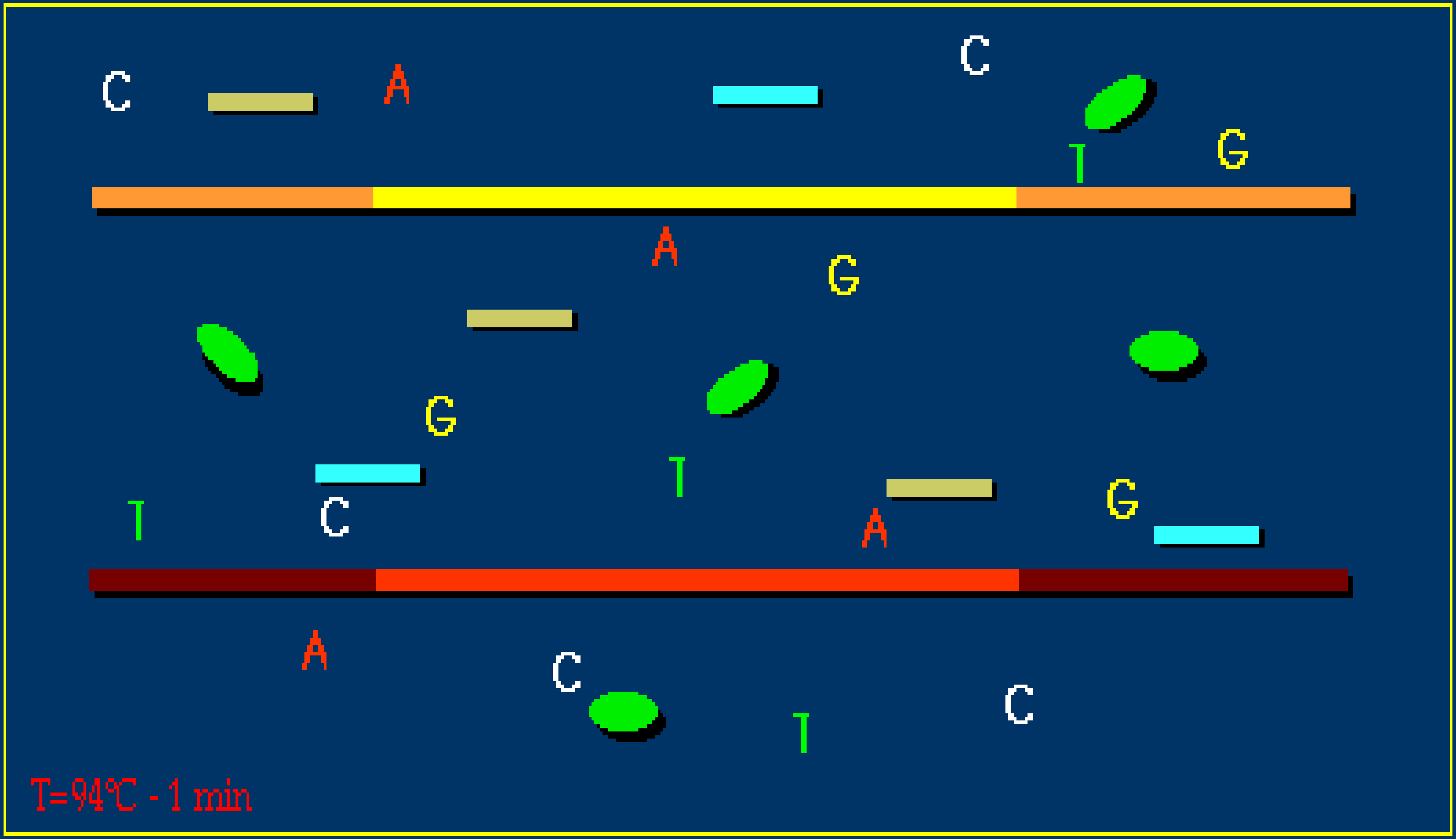
٢- (anealing) ارتباط البادئ بخيط الحمض النووي (عند °C ٦٠)

٣- (extension) استثارة الإنزيم لبدء التفاعل (عند °C ٧٢)

Initial Mix

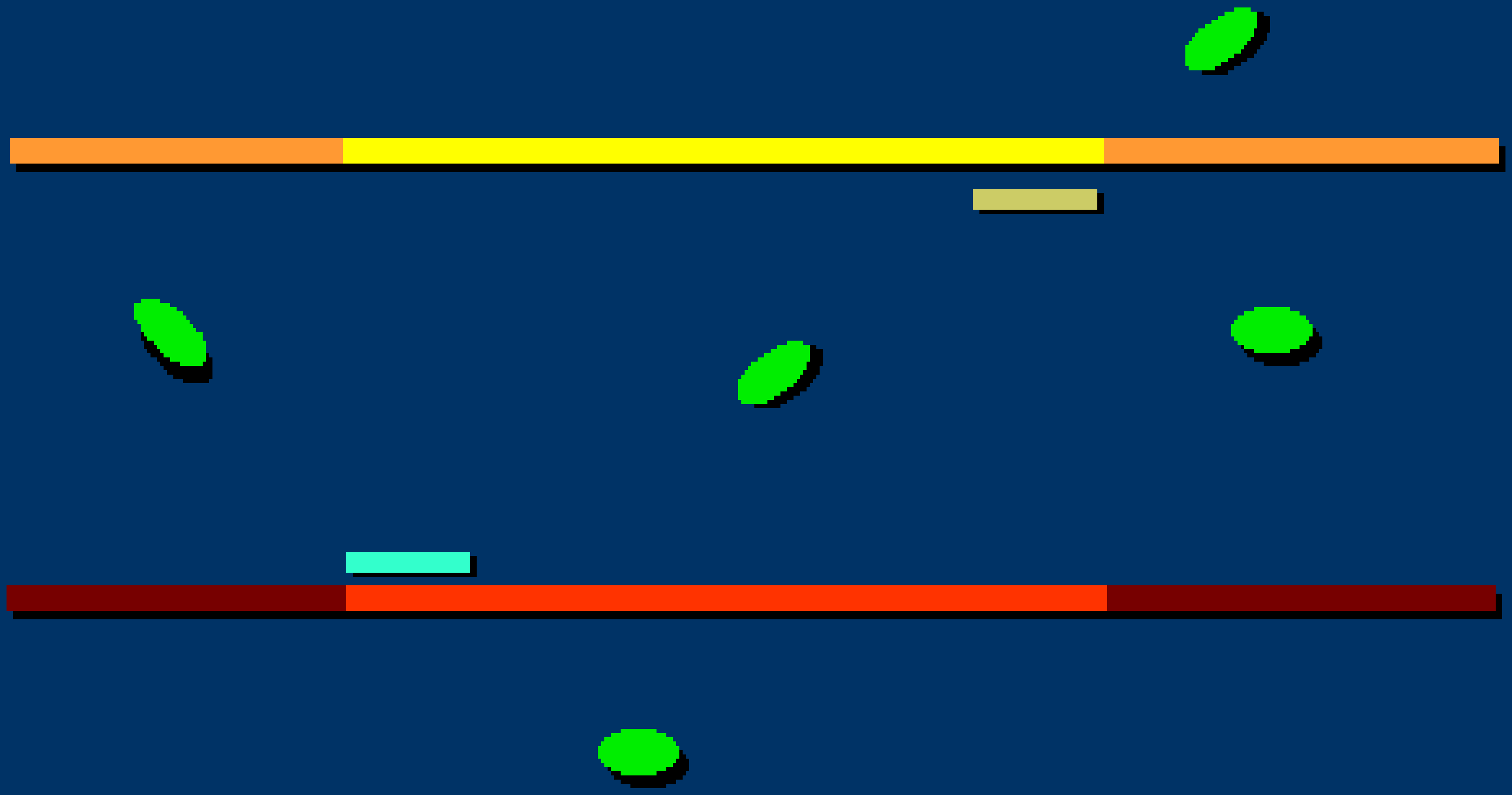

Room Temperature
+Mg
Forward Primer
Reverse Primer
A G C T Deoxynucleotides

1st cycle - Denaturation Step



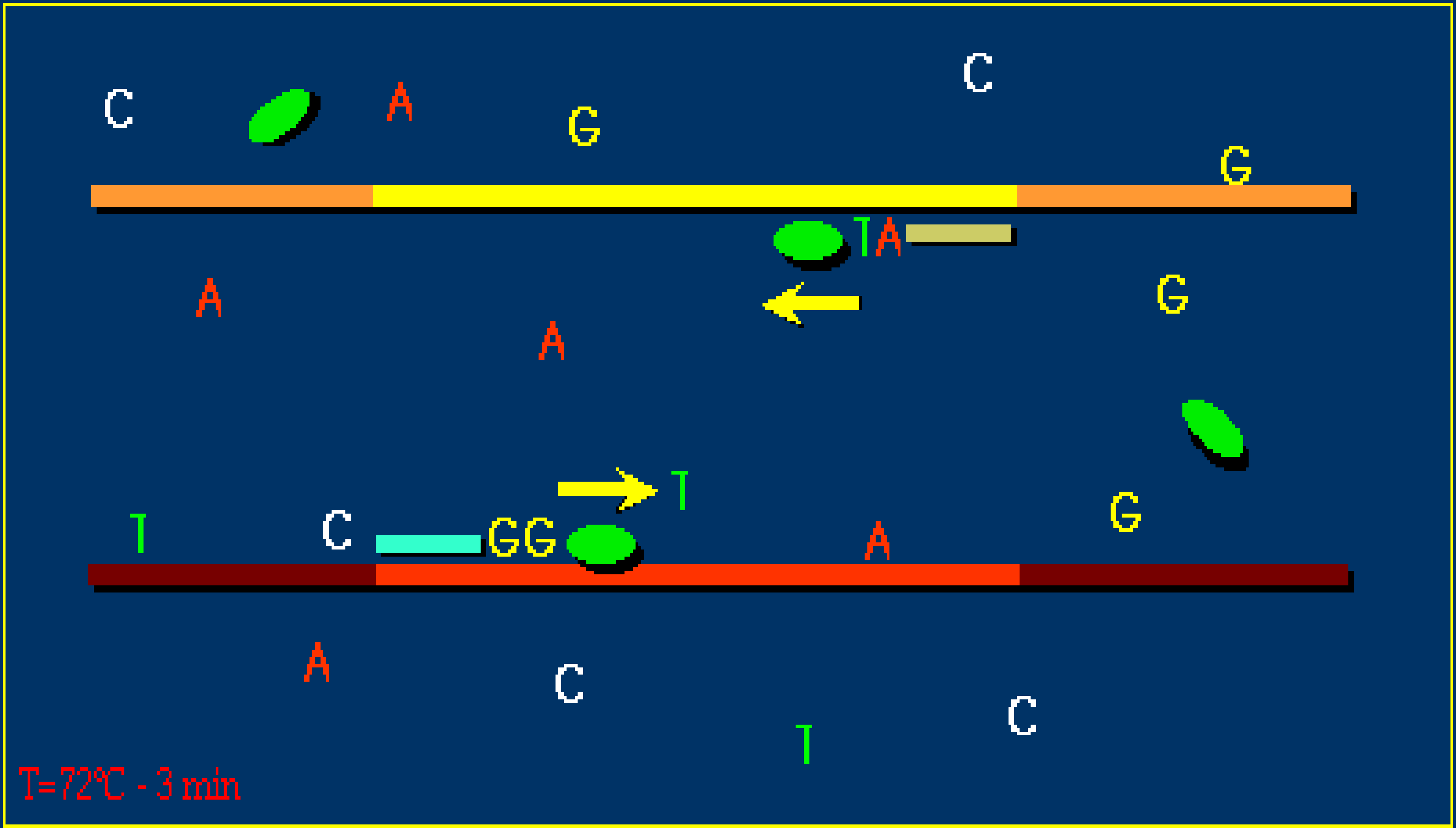
Taq DNA polymerase

1st cycle - Annealing Step

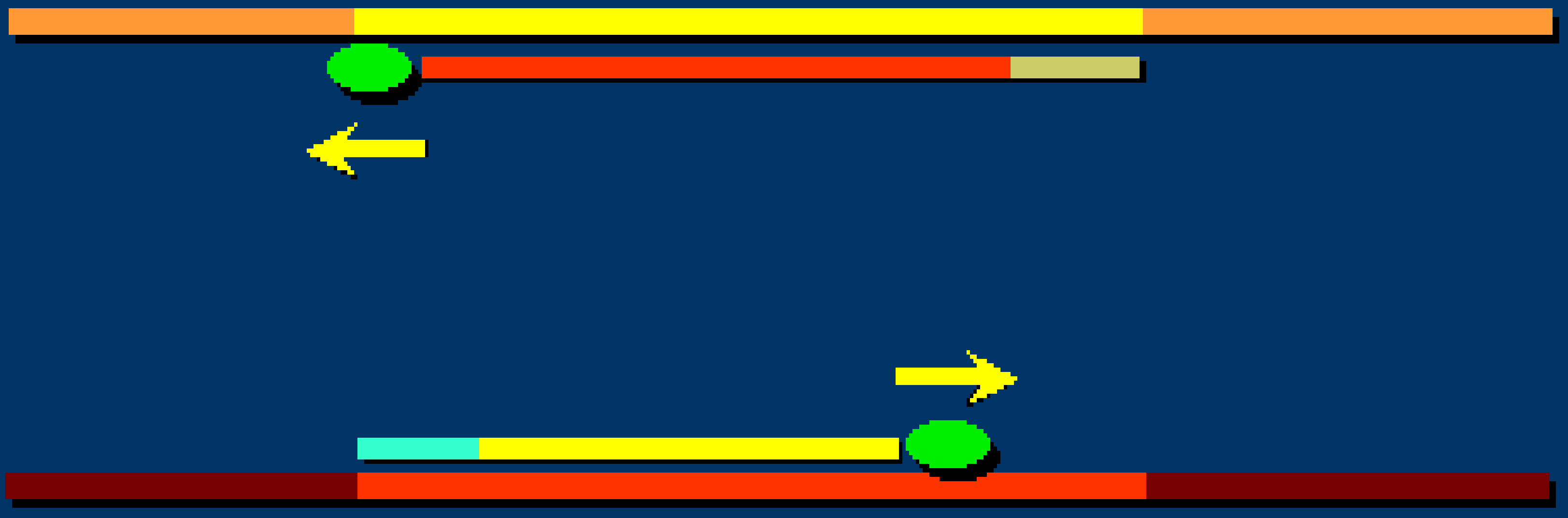


T=55°C - 1 min

1st cycle - Elongation Step



1st cycle - Elongation Step



T=72°C - 3 min

Types of PCR

Touchdown PCR

- وفيه يتجنب الـ primer اكثار أى تتابعات غير متخصصة .
- يستخدم فيه برنامج يسمى Touchdown يقوم بضبط درجة حرارة الـ Annealing بحيث تكون مساوية أو أعلى (عادة ١ أو ٢ درجة) عن Tm primer ثم يتم خفضها 1 - 0.5 درجة مئوية كل دورة حتى تصل الى 10 - ٥ درجات أقل من Tm
- يستخدم فى حالات معينة مثل Mutagenesis

1- Primers will avoid amplifying nonspecific sequences.

2- The annealing temperature during a polymerase chain reaction determines the specificity of primer annealing.

3- The melting point of the primer sets the upper limit on annealing temperature. At temperatures just below this point, only very specific base pairing between the primer and the template will occur.

4- Touchdown PCR uses a cycling program annealing temperature is gradually reduced (e.g. 1-2°C /every second cycle).

5- The initial annealing temperature should be several degrees above the estimated T_m of the primers.

6-The annealing temperature is then gradually decreased until it reaches the calculated annealing temperature of the primers or some degrees below. Amplification is then continued.

Colony PCR

- 1- PCR screening of bacterial (E Coli) and yeast transformants containing cloned inserts
- to determine insert size and/or orientation in the vector.
- 2- The presence of an insert and its size can be determined by growing each colony in liquid
- 3- Plasmid purified by a boiling or alkaline preparation protocol,
- 4- Digestion of the plasmid with restriction enzyme(s) that excises the insert
- 5- separation by agarose gel electrophoresis

Colony PCR- the screening of bacterial (E.Coli) or yeast clones for correct ligation or plasmid products.

Pick a bacterial colony with an autoclaved toothpick, swirl it into 25 µl of TE autoclaved dH2O in an microfuge tube.

Heat the mix in a boiling water bath (90-100C) for 2 minutes

⇓

Spin sample for 2 minutes high speed in centrifuge.

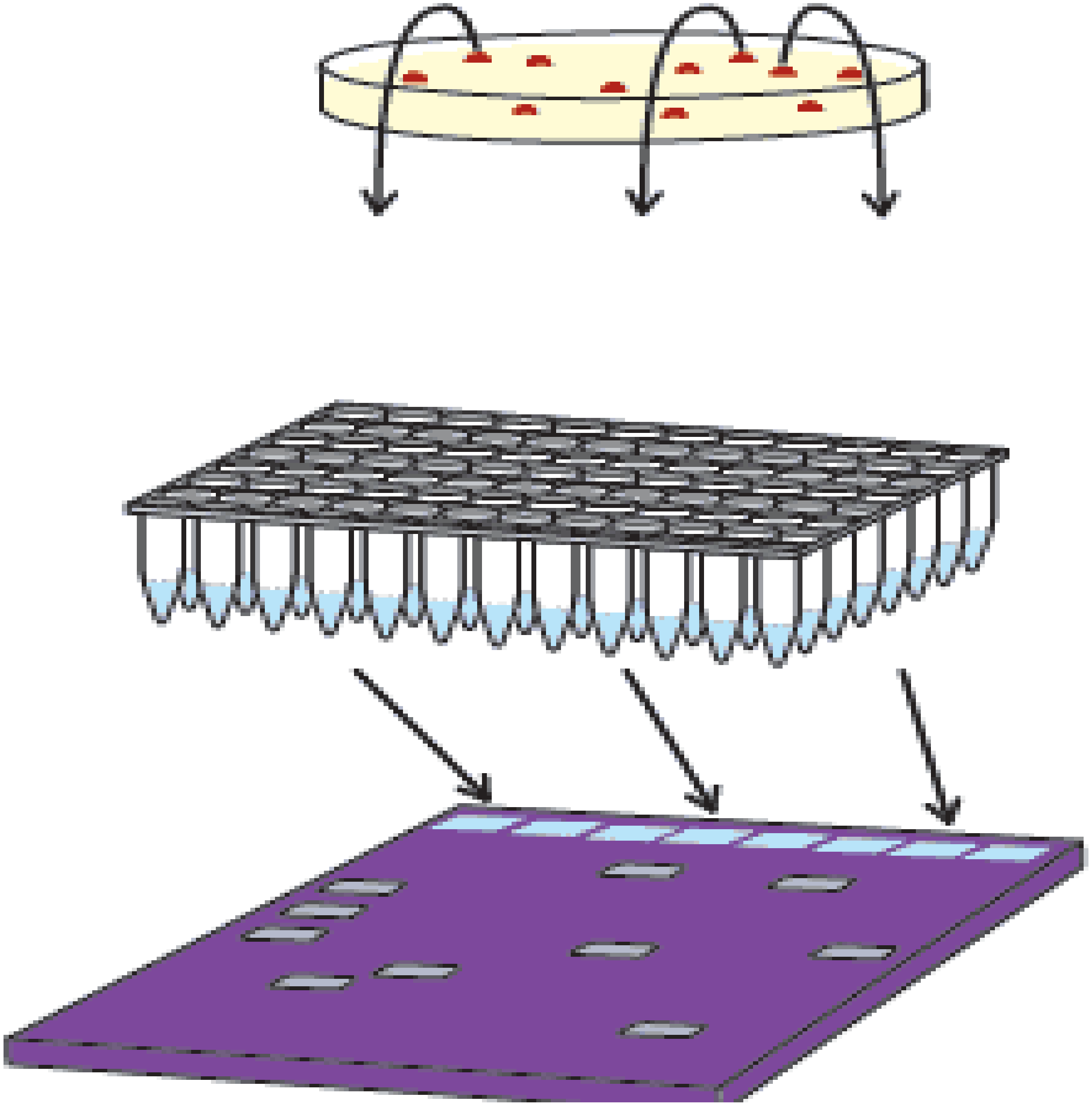
⇓

Transfer 20 µl of the supernatant into a new microfuge tube

⇓

Take 1-2 µl of the supernatant as template in a 25 µl PCR standard PCR reaction.

⇓



1. Pick colony into a microcentrifuge tube or microtiter well.
2. Add PCRLyse™ Solution, vortex, heat 5 min at 99°C.
3. Perform PCR using an aliquot of the lysed cells.
4. Analyze by gel electrophoresis.

Hot Start PCR

- وفيه يتم تجنب اكثار DNA غير مرغوب فيه ،وذلك بتثبيط أنزيم Taq polymerase على درجات الحرارة المنخفضة .
- حيث يتم تسخين العينات وذلك لفصل سلسلتى DNA ثم يتم خفض درجة الحرارة فجأة الى ٥٥ درجة مئوية وعندها يضاف أنزيم Taq polymerase ، primer مع اضافة أجسام مضادة تعمل على تثبيط الأنزيم عند درجة الـ Annealing .
- وعند ارتفاع درجة الحرارة الى ٧٢ وهى درجة الاستطالة فان الأجسام المضادة تنفصل عن الانزيم وتبدأ الاستطالة بدرجة عالية من التخصص.
- يلاحظ أن فى PCR العادى يتم اضافة كل محتويات مخلوط التفاعل مع بعضها مرة واحدة .
- أما فى هذا النوع لا يحدث ذلك

- Hot Start PCR avoids non-specific amplification of DNA by inactivating the taq polymerase at lower temperature.
- dsDNA is denatured by heating the sample at its denaturing temperature and then the temperature is suddenly reduced to 55 degree C at which primer and Taq-polymerase is added

- specific antibodies are used to block this Taq-polymerase at annealing temperature.
- When the temperature raises for amplification to 72 degrees, the specific antibody detaches from Taq-polymerase and the amplification with greater specificity starts.

Nested PCR

- فى هذا النوع يستخدم مجموعتين من الـ primers لمضاعفة قطعة DNA معينة.
- المجموعة الأولى تصمم كما فى الـ PCR العادى.
- المجموعة الثانية تسمى Nested primer وهى ترتبط بتتابعات داخل القطع المتكونة بواسطة المجموعة الأولى ،وبالتالى فهى تعمل اكثار للنواتج الأولى للـ PCR لتعطى النواتج الثانية والتى تكون أقصر من النواتج الأولى.
- وبالتالى عند تكوين قطع خطأ فان احتمال مضاعفتها بالمجموعة الثانية من البادئ يكون قليل ويتم الحصول على نواتج متخصصة.

- **Two pairs (instead of one pair) of PCR primers are used to amplify a fragment.**

- **First pair -amplify a fragment similar to a standard PCR.**

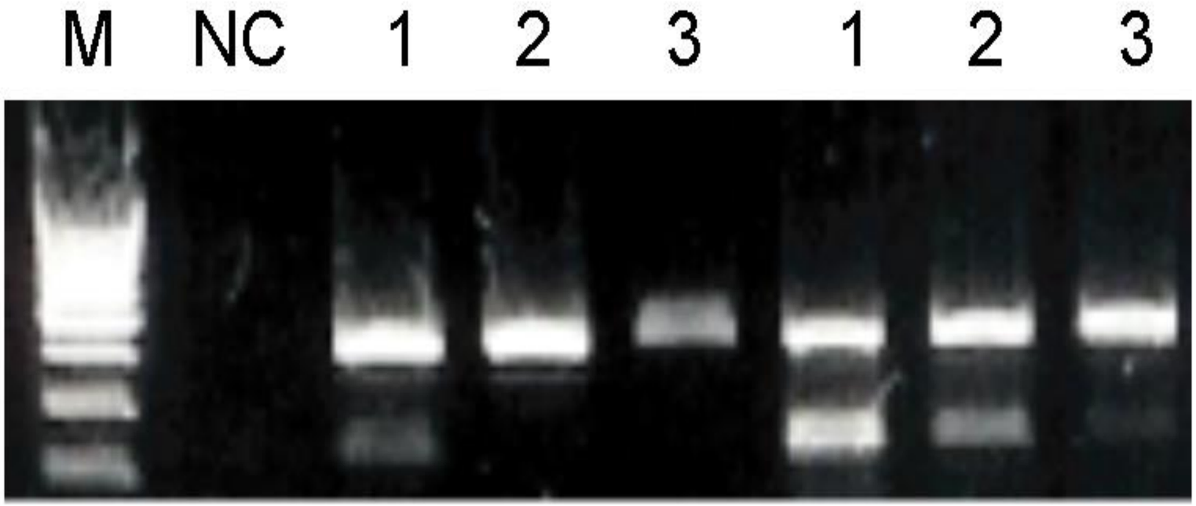
Second pair of primers-nested primers (as they lie / are nested within the first fragment) bind inside the first PCR product fragment to allow amplification of a second PCR product which is shorter than the first one.

- **Advantage- Very low probability of nonspecific amplification**

Multiplex PCR

وهو يمكن من اكثار عدة قطع مستهدفة من DNA فى تفاعل واحد

Multiplex PCR is a variant of PCR which enabling simultaneous amplification of many targets of interest in one reaction by using more than one pair of primers.



Inverse PCR

- Inverse PCR (Ochman et al., 1988) uses standard PCR (polymerase chain reaction)- primers oriented in the reverse direction of the usual orientation.

- The template for the reverse primers is a restriction fragment that has been selfligated

- Inverse PCR functions to clone sequences flanking a known sequence. Flanking DNA sequences are digested and then ligated to generate circular DNA.

Application

- Amplification and identification of flanking sequences such as transposable elements, and the identification of genomic inserts.

Long PCR

- Extended or longer than standard PCR, meaning over 5 kilobases (frequently over 10 kb).

- Long PCR is useful only if it is accurate. Thus, special mixtures of proficient polymerases along with accurate polymerases such as Pfu are often mixed together.

- Application- to clone large genes

Reverse Transcriptase PCR

- **Based on the process of reverse transcription, which reverse transcribes RNA into DNA and was initially isolated from retroviruses.**
- **First step of RT-PCR - "first strand reaction“-Synthesis of cDNA using oligo dT primers (37°C) 1 hr.**
- **“Second strand reaction“-Digestion of cDNA:RNA hybrid (RNaseH)-Standard PCR with DNA oligo primers.**
- **Allows the detection of even rare or low copy mRNA sequences by amplifying its complementary DNA.**

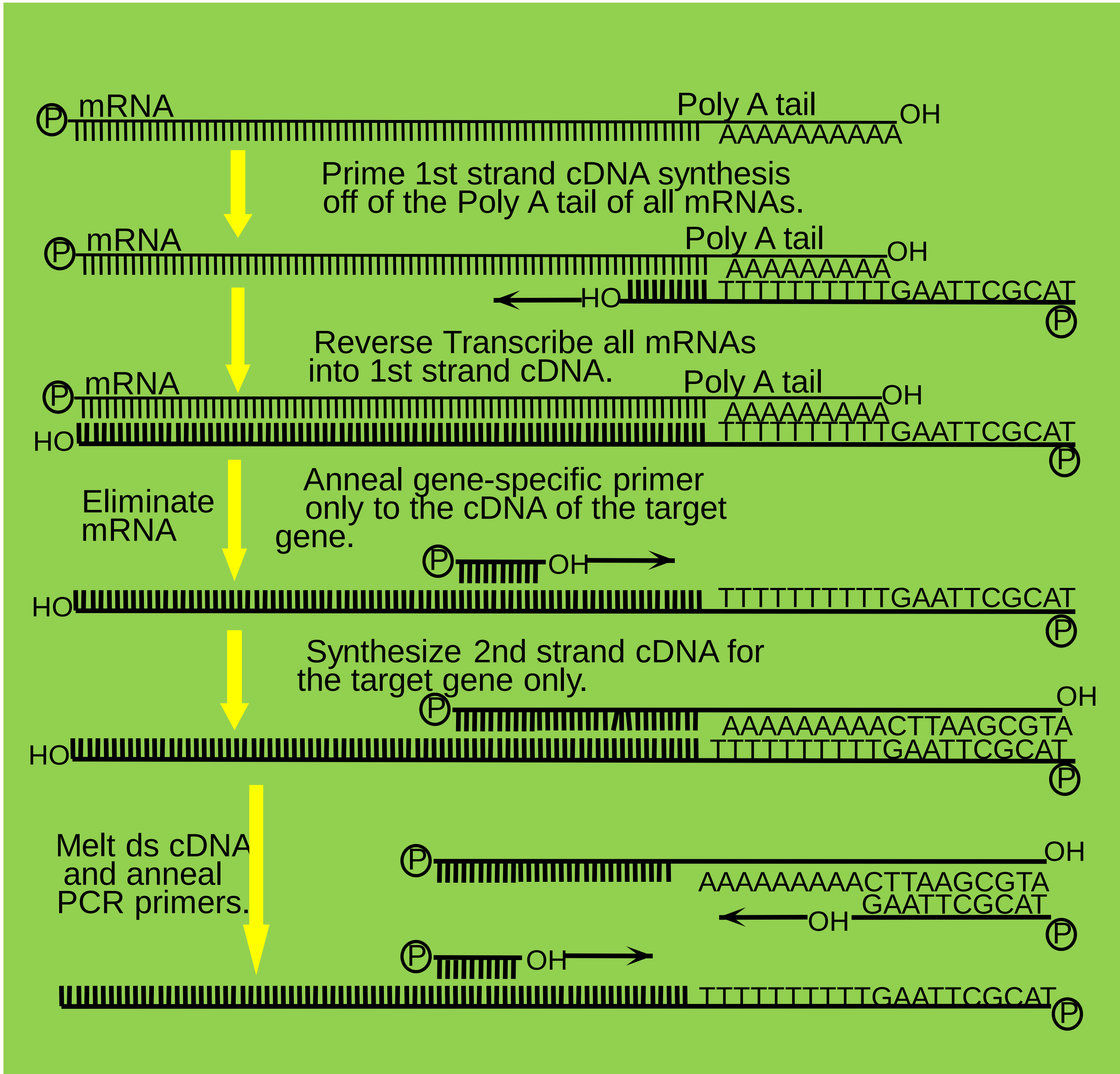
3' RACE PCR

Rapid
Amplification
of **c**DNA
Ends

Primers:

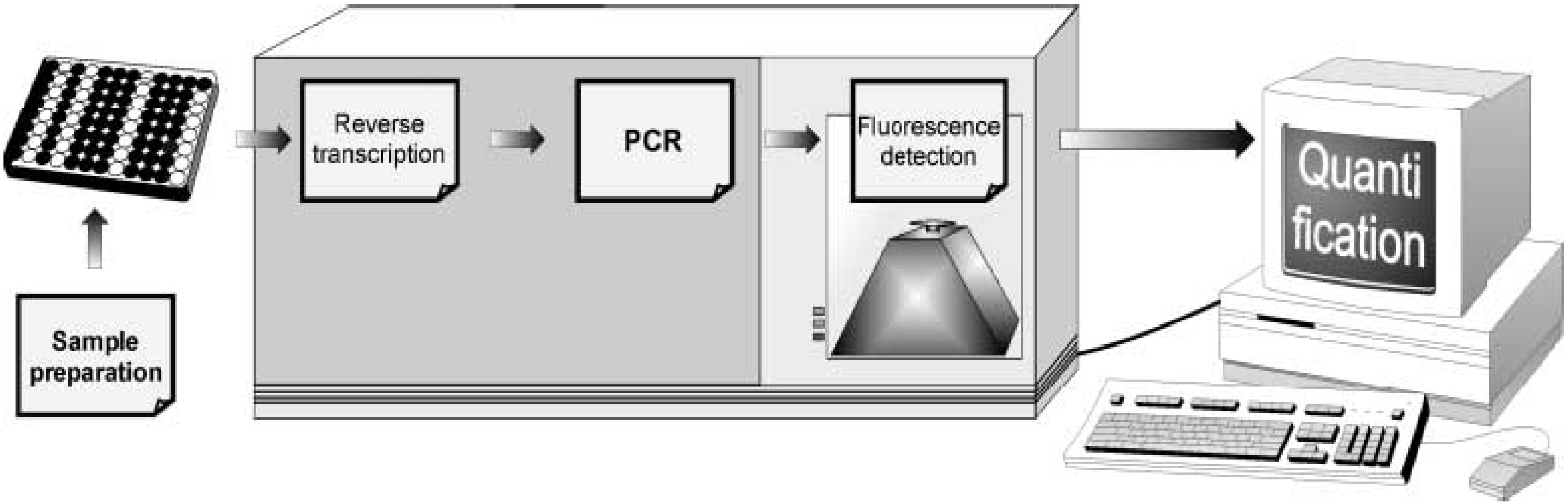
Gene-specific Primer (1)

Generic Anchor Primer(1)



Real-Time PCR

Real-time PCR monitors the fluorescence emitted during the reaction as an indicator of amplicon production at each PCR cycle (in real time) as opposed to the endpoint detection



****Traditional PCR has advanced from detection at the end-point of the reaction to detection while the reaction is occurring (Real-Time).**

****Real-time PCR uses a fluorescent reporter signal to measure the amount of amplicon as it**

****This kinetic PCR allows for data is generated.**

collection after each cycle of PCR instead of only at the end of the 20 to 40 cycles.

Why real time PCR ?

QUANTITATION OF mRNA

****northern blotting**

****ribonuclease protection assay**

****in situ hybridization**

****RT-PCR**

most sensitive

can discriminate closely related mRNAs

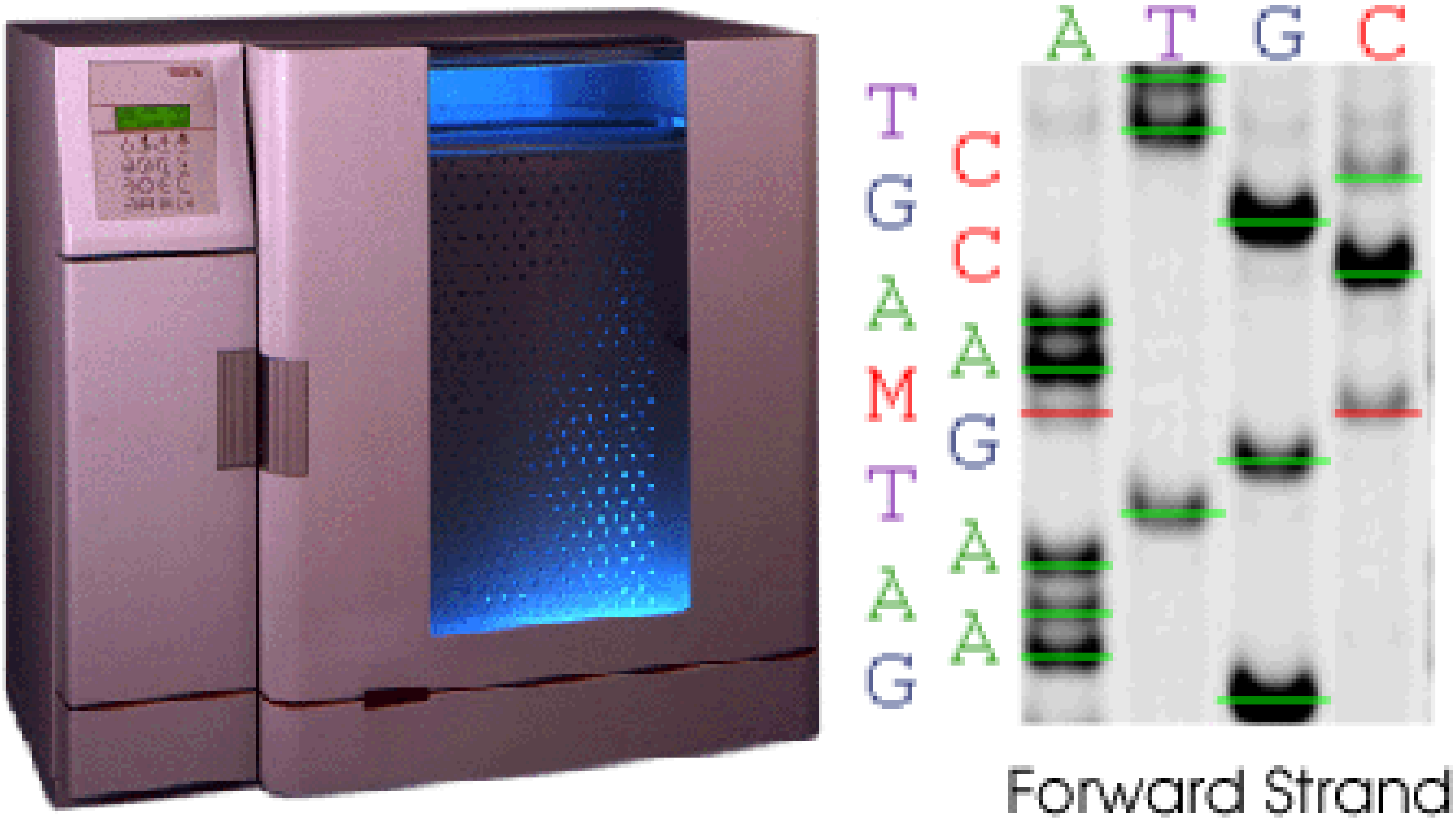
technically simple

but difficult to get truly quantitative results using conventional PCR

Applications of PCR

1- Classification of organisms
2- Genotyping
3- Molecular archaeology
4- Mutagenesis
5- Mutation detection
6- Sequencing
7- Cancer research
8- Detection of pathogens
9- DNA fingerprinting
10- Drug discovery
11- Genetic matching
12- Genetic engineering
13- Pre-natal diagnosis

DNA Sequencing



معرفة تسلسل DNA
(DNA Sequencing)

- لا شك أن العلماء يحتاجون إلى معرفة التركيب التسلسلي لكل جين و هذا يمكنهم من معرفة المزيد عن البروتين الذي يصنعه ذلك الجين وعن التركيب التنظيمي لعمل الجين و قد يصلون على ضوءه إلى معرفة الأمور التي تتحكم في عمله.
- كما أنه بمعرفة التسلسل للجين يمكن مقارنته بالجينات التي سبق إكتشافها و هذا قد يعطي معلومات غزيرة عن وظيفة هذا الجين و يختصر الكثير من الابحاث

هناك طريقتان أساسيتان لمعرفة تسلسل لأي قطعة من DNA

- الأولى تسمى بالطريقة الإنزيمية (Enzymatic method)
- الثانيةتسمى بالطريقة الكيميائية (Chemical method)

و لقد طغت الطريقة الأولى حتى أصبحت هي الطريقة الأكثر إستعمالا.

الطريقة الإنزيمية Enzymatic method

يطلق على هذه الطريقة أيضا طريقة سنجر (Sanger procedure) نسبة إلى فريدريك سنجر و الذي أسس هذه الطريقة.

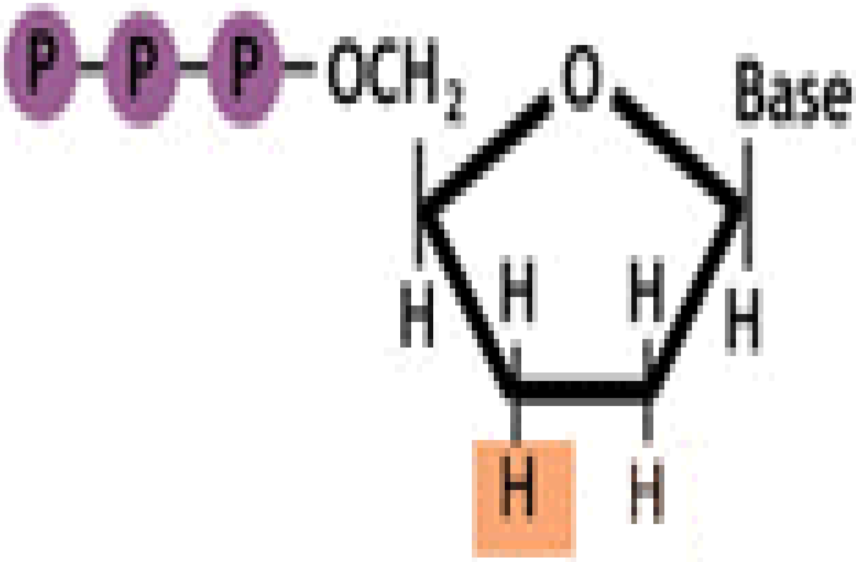
كما أنها أيضا تعرف بالتسلسل عن طريق دي دوكسي (dideoxy sequencing)

- و تبنى هذه الطريقة على مفهوم أن شريط DNA في الأساس مبنى من جزيئات من الدى أوكس نيوكلويتيد deoxynucleotides (dNTPs)
- يوجد على الموقع الثالث من حلقة سكر الريبوزي مجموعة هيدروكسيل (OH) ، هذا االموقع يرتبط بالموقع الخامس من النيوكليوتيدة التى تليها و هكذا يتم الترابط لتكوين شريط طويل من DNA

- ولقد قام سنجر بالإستفادة من هذه الخاصية عن طريق إضافة دي دوكسي نيوكلوتيد (بها H بدلا من OH)(ddNTPs)

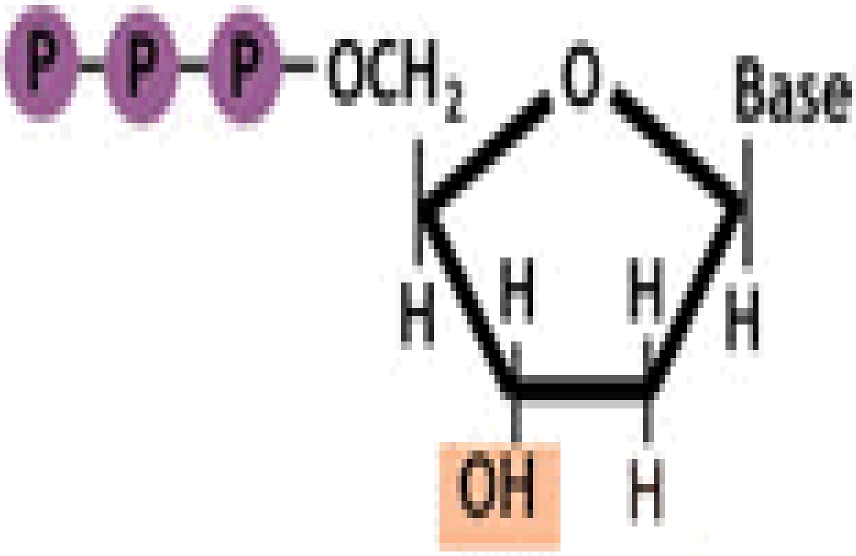
بدلا من ديوكسي نيوكلوتيد (dNTPs)

يلاحظ أن مجموعة 3`-OH تغيب من ddNTPs وبالتالى فهى تضاف الى سلسلة نامية أثناء البلمرة ولكن لا يضاف اليها أى قاعدة أخرى.



dideoxynucleotide (ddNTP)

دي ديوكسي نيوكليتيد



deoxynucleotide (dNTP)

ديوكسي نيوكليتيد

الخطوات الأساسية للقيام بهذا الإختبار

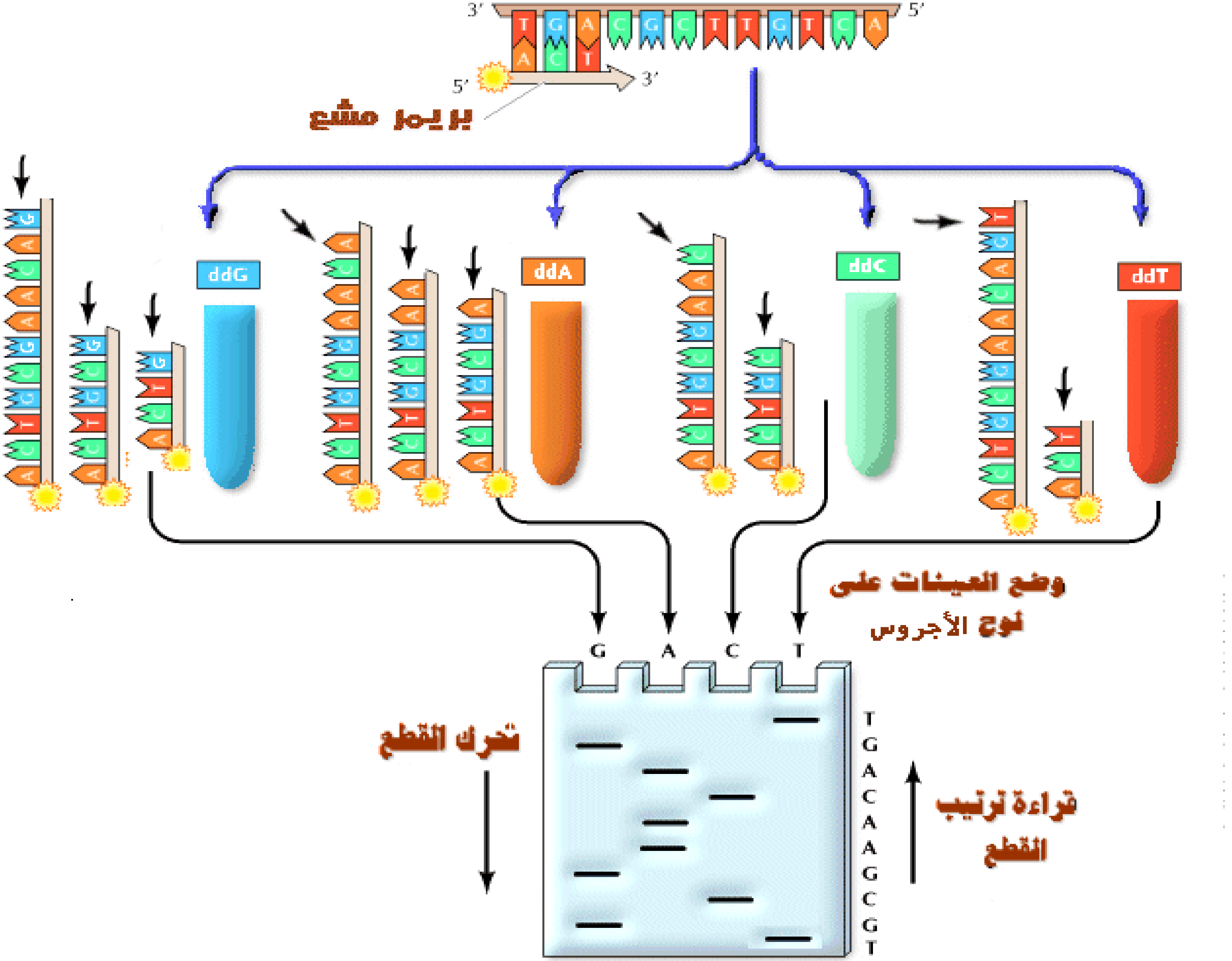
- ١- القيام بنسخ DNA و ذلك على النحو التالي:
- أ- أضف إلى عينة DNA قطع من بادئ متخصص (specific primer) يعرف أنه سوف يلتصق بالـ DNA المراد نسخة ومعلم (ملتصق بطرفة بعنصر مشع.
- ب- قسم العينة إلى أربع أنابيب إختبار و كل أنبوبة أكتب عليها االبيانات التالية (dGTP, dATP, dCTP, and dTTP)

- ج- أضف إنزيم DNA polymerase
- د- أضف إلى كل أنبوبة نوع واحد من ddNTP حسب إسم الأنبوبة ، و أضيف معه كمية من دى أكسي نيوكليوتيد.
- سوف يحدث التفاعل و يبدأ البريمر ببناء و تركيب و رص هذه النيوكليوتيدات على Primer.

وعند إضافته ddNTP فإن الشريط يتوقف عند هذه النقطة.

- ثم يحدث تفاعل أخر لنسخ شريط أخر و عند إضافة دي ديوكسي نيوكليتيد يتوقف التفاعل و هكذا تستمر العملية و ينتج في النهاية قطع منسوخة و متفاوتة الطول في كل أنبوبة إختبار.
- ٢- أضف كمية من كل الأربعة أنابيب في حقل خاص على لوح الأجروس ثم أمرر تيار كهربائي و من ثم تظهر على طول اللوح القطع المنسوخة و المتفاوتة الأطوال .
- ٣-عرضها للأشعة (Autoradiography) لكي يتسنى رؤية DNA و الذي عليه مادة مشعة.

- ٤- إبدأ بقراءة لوح الأجروس من أسفل إلى أعلى.
- وكل ما مر على نسخة من DNA إعرف ترتيب و نوع الدى دوكسي نيوكليوتيد الذي في طرفة و إستمر في القراءة إلى أن ينتهي لوح الأجروس.

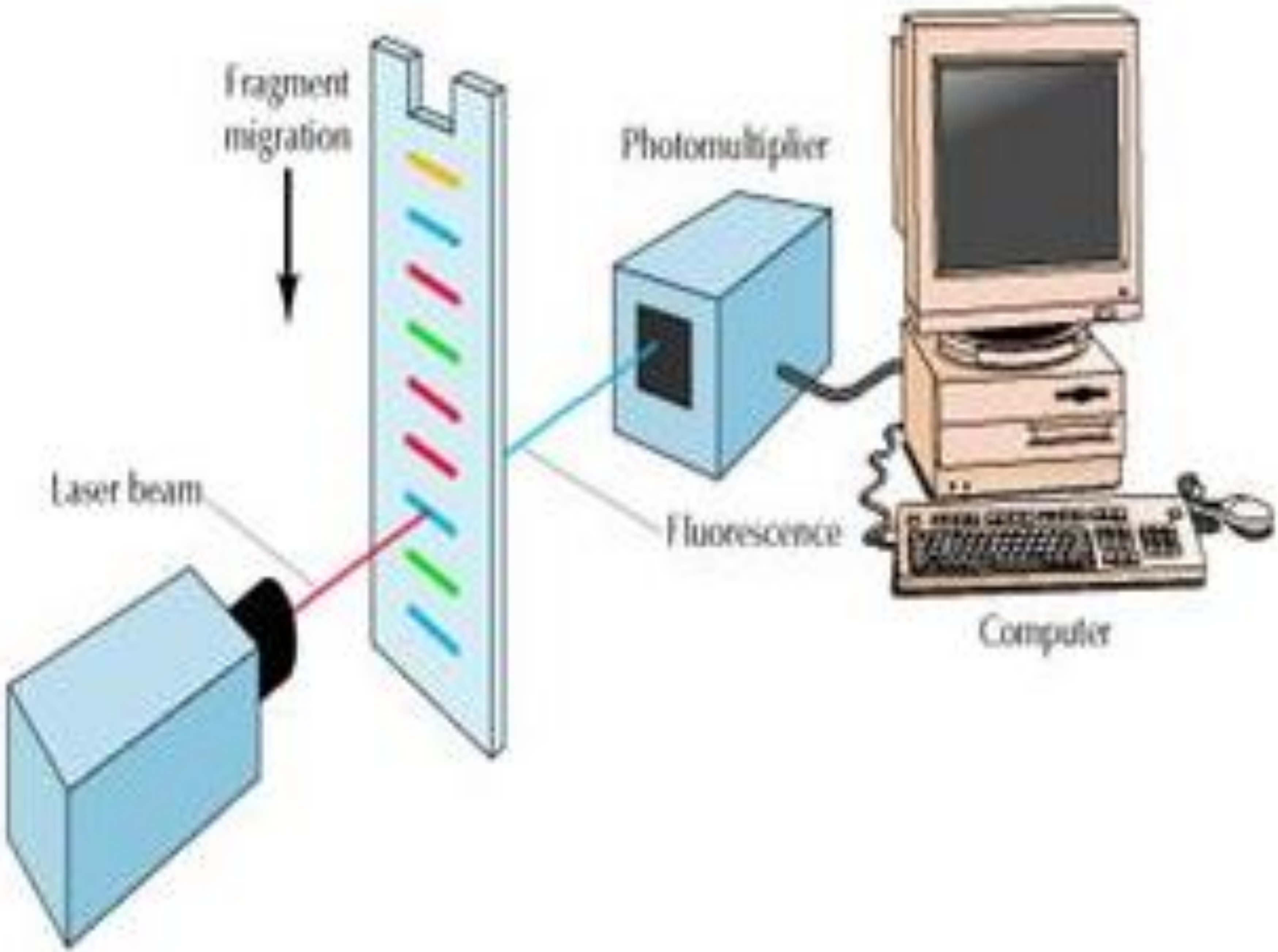


برايمر مشع
ddG
ddA
ddC
ddT
وضع العينات على
لوح الأجروس
G
A
C
T
تحرك القطع
قراءة ترتيب
القطع
T
G
A
C
A
A
G
C
G
T

- و لتسهيل عملية القراءة إستخدم الكمبيوتر لكي يقرأها بشكل آلي و ذلك بتعريض لوح الأجروس إلى أشعة ليزر و عن طريق وحدة إستشعار و مضخم للنبضات (photomultiplier) يستطيع الكمبيوتر أن يحدد نوع الدي دوكسي نيوكليوتيد و يرتبها و يطبعها و يعطيك رسماً بيانياً لأماكن كل حمض نووي و بالألوان

- لا تستخدم المواد المشعة في القراءة الآلية بالكمبيوتر بل يستعاض عنها بمادة مضيئة (fluorescent) توضع على البريمر على أن يكون لكل دي دوكسي نيوكليوتيد لون مختلف عن الآخر(أي أربعة ألوان من المادة المضيئة) و بذلك يمكن أن تمر جميع القطع في ممر واحد كما هو واضح في الرسم .

- و نظرا لأن جهاز الكمبيوتر قابل للخطأ فإنه يلزم التدقيق و المراجعة لتفادي حدوث الأخطاء.و لقد قامت أجهزة كمبيوتر عملاقة تعمل على مدار الساعة و تحت مظلة مشروع الجينوم البشري بالكشف الكامل(٩٩% تقريباً) لتسلسل لجميع DNA الموجود في الإنسان و قد سبق ذلك الكشف عن تسلسل DNA لكثير من الكائنات الحية و العمل جاري لمعرفة المزيد.


Fragment
migration
Photomultiplier
Laser beam
Fluorescence
Computer

الفصل الكهربى على الجل

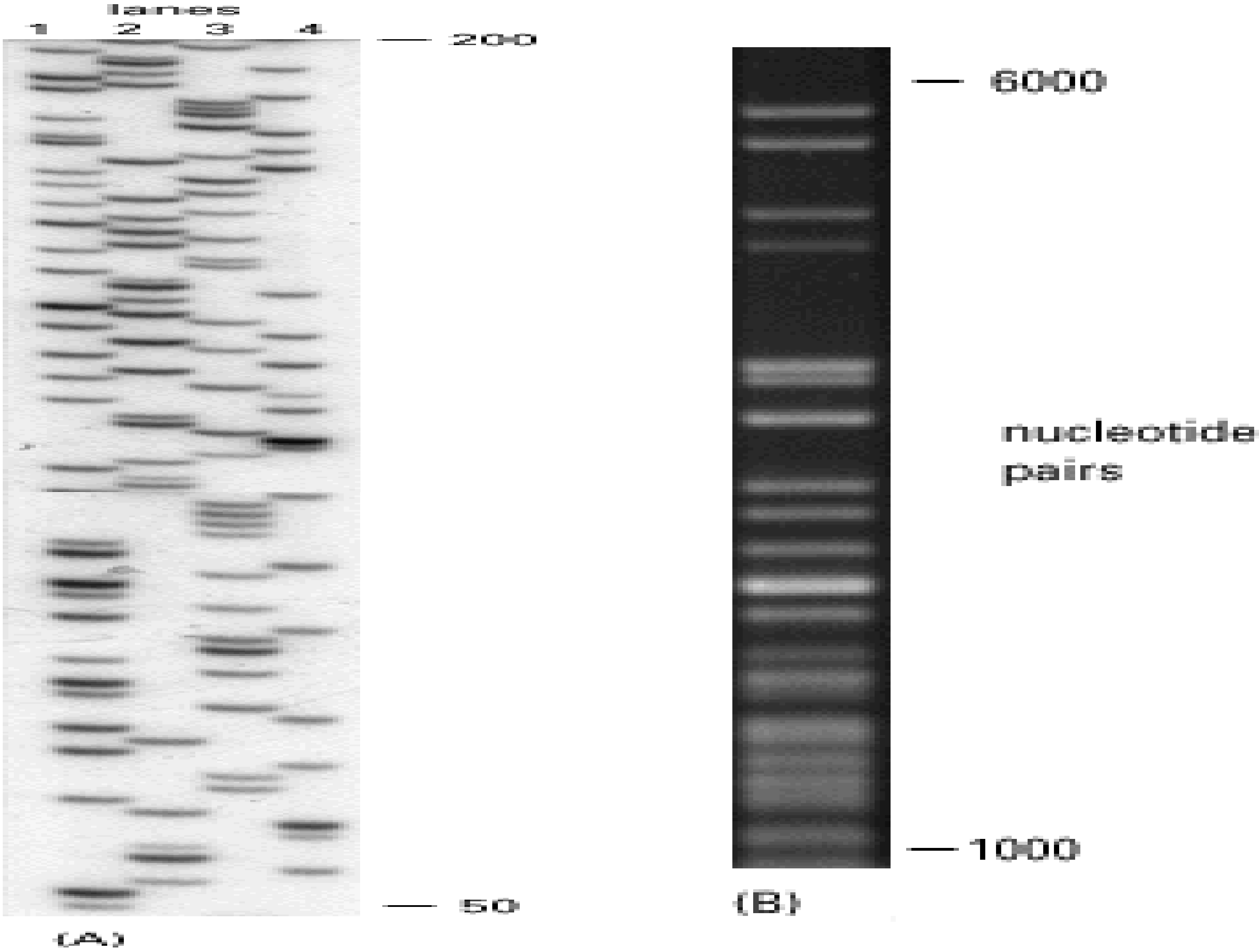
Gel Electrophoresis)

- من المعروف أن الحمض النووي يحمل **شحنة سالبة** و لذلك فعند و ضع بعض من DNA في طرف من أطراف لوح الجيل ثم تعريضها لتيار كهربائي بحيث يكون القطب السالب عند الطرف الذي وضعنا فيه DNA و القطب الموجب عند الطرف الآخر من ألواح **فان DNA ينتقل تلقائيا فى إتجاه الطرف الذي فيه القطب الموجب** .

- و تتوقف حركة قطع DNA على حسب أحجامها ، فالقطع الصغيرة تتحرك لمسافة أكبر من القطع الكبيرة. و بذلك يمكن فصل هذه القطع عن بعضها البعض.
- و يمكن تحديد الحجم الفعلي لكل قطعة عن طريق إضافة قطع معروفة الحجم من DNA والتي تكون مقياس يرجع إليه لإستنتاج أحجام القطع.

هناك نوعان أساسيان من الجيل

- الأول يسمى بجيل الأجروس (Agarose gel)
- و الثاني بجيل البولي اكريليميد(Polyacrylamide gel)
- و نظرا لصغر الفراغات التي بين البولي اكريليميد فانه يستخدم لفص القطع الصغيرة الحجم من DNA و في العادة التي تكون اصغر من bp ٥٠٠ و التي تتفاوت بين بعضها البعض بجزيء أو جزيئين (انظر الرسم A)
- بينما يستخدم الأجروس للأحجام الأكبر من DNA. و التي يتراوح حجمها بين ٣٠٠ إلى 10000 bp(انظر الرسم B)

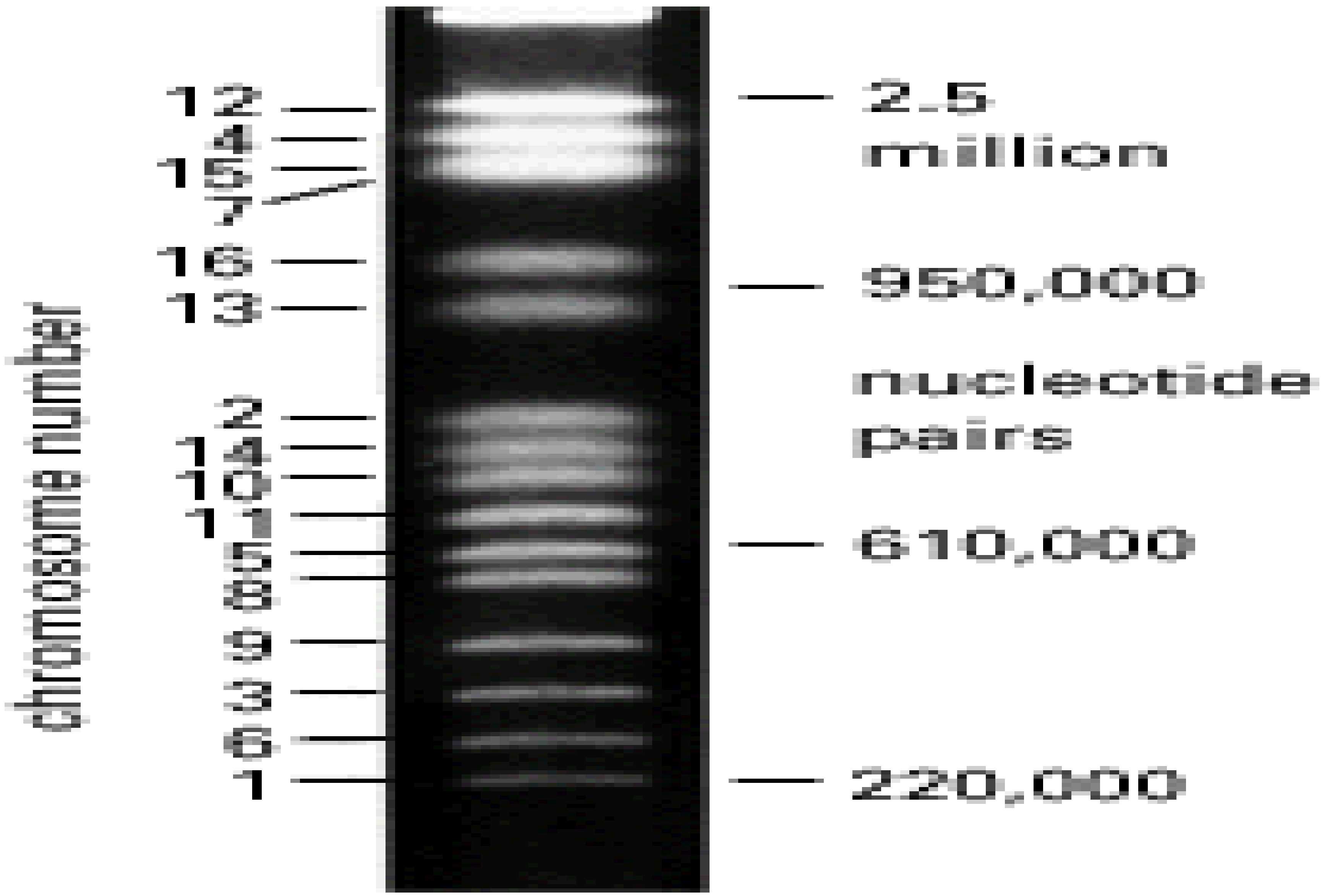

lanes
1
2
3
4
200
50
(A)
6000
nucleotide pairs
1000
(B)

- ومادة الأجروس هي مادة سكرية مستخرجة من الطحالب و عند تحضيرها فإنها تشبه في قوامها الجيلاتين الذي نأكله و لكنها أقوى في قوامها بعض الشيء و لكنها قابلة للتهتك أو الانقطاع عند نقلها بغير حرص.

- و لقد واجهه العلماء صعوبات في فصل القطع الكبيرة من DNA و ذلك لأن هذه القطع عند وضعها على جيل الأجروس و بعد تسليط التيار الكهربائي عليها تتوقف لأنـها تتمدد بشكل متعرج على شكل ثعبان ملتوي طرف باتجاه القطب السالب و الأخر باتجاه القطب الموجب.
- و لقد حلت هذه المشكلة عن طريق تعريض جل الأجروس إلى مستويات متفاوتة من القوة الكهربائية .

- و بذلك فان قطعة DNA الطويلة عندما تتعرض إلى تيار كهربائي مختلف يجعلها تعدل من تمددها المتعرج قبل أن تدخل في التيار الكهربائي الجديد و يستمر هذا التفاوت في التيار و التعديل في قوام القطعة حتى تصل إلى المكان الذي يجب أن تقف فيه حسب حجمها.
- و يسمى هذا النوع من الفصل بالفصل عن طريق المجال الكهربائي المتردد (Pulsed-field gel electrophoresis).

- ولقد مكنت هذه التقنية من فصل قطع كبيرة من DNA وحتى فصل قطع من الكروموسومات على الجل و تتراوح القطع التي يمكن فصلها بهذه الطريقة بين ٢٢٠٠٠٠ إلى ٢.٥ مليون زوج نيوكليوتيدى(انظر الرسم C)


chromosome number
12
4
15
7
16
13
2
14
10
11
5
8
9
3
6
1
2.5 million
950,000
nucleotide pairs
610,000
220,000
(C)

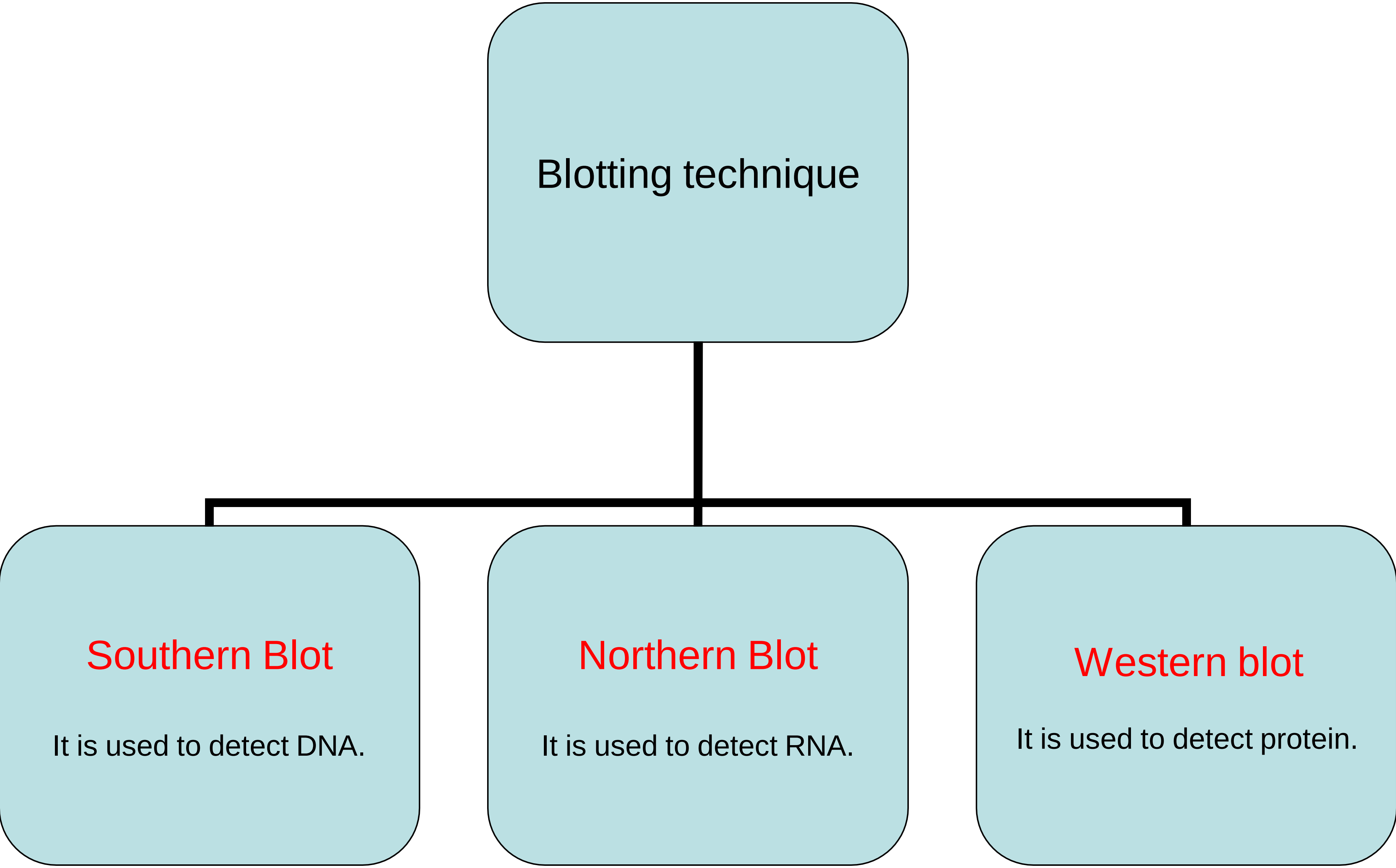
- لا تكون القطع المفصولة بالبولي أكريليميد و الأجروس واضحة للعيان و لذلك فإن لوح الجيل يعرض إلى مادة لصباغة DNA ، و أشهر هذه المواد هو مادة Ethidium Bromide و التي تلمع عند تعريضها للأشعة فوق البنفسجية.

Blotting techniques

What is blotting?

Blots are techniques for transferring DNA , RNA and proteins onto a carrier so they can be separated, and often follows the use of a gel electrophoresis.

TYPES OF BLOTTING TECHNIQUES



SOUTHERN BLOTTING

Professor Sir Edwin Southern, Professor of Biochemistry and Fellow of Trinity developed this method in 1975.

Professor Sir Edwin Southern

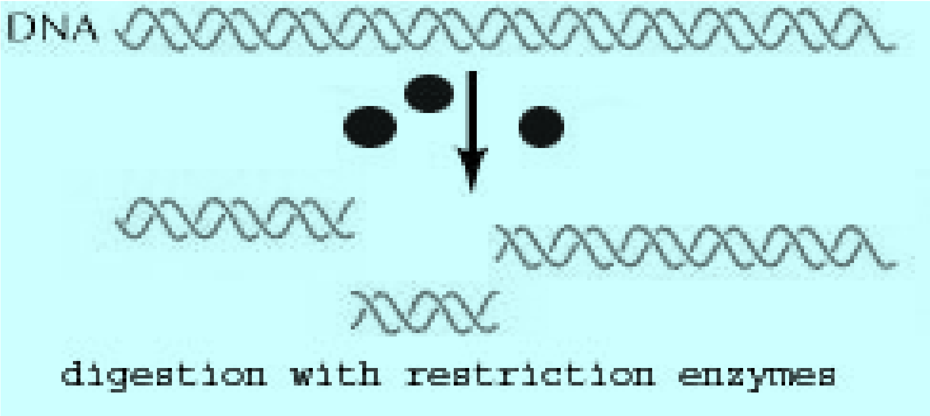
This method Involves separation, transfer and hybridization.

It is a method routinely used in molecular biology for detection of a specific DNA sequence in DNA samples. The DNA detected can be a single gene, or it can be part of a larger piece of DNA such as a viral genome.

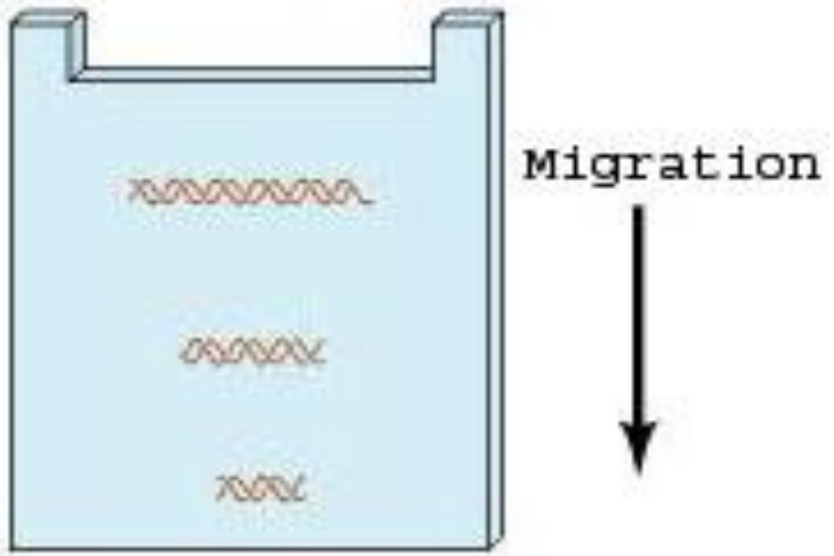
- **Southern blotting combines agarose gel electrophoresis for size separation of DNA with methods to transfer the size separated DNA to a filter membrane for probe hybridization.**
- **Hybridization: - Process of forming a double-stranded DNA molecule between a single-stranded DNA probe and a single-stranded target patient DNA.**

Steps in southern blotting

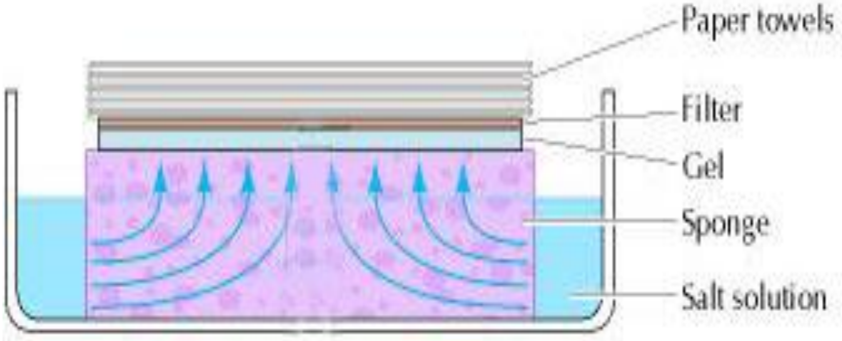
1. Digest the DNA with an appropriate restriction enzyme.



2.The complex mixture of fragments is subjected to gel electrophoresis to separate the fragments according to size.

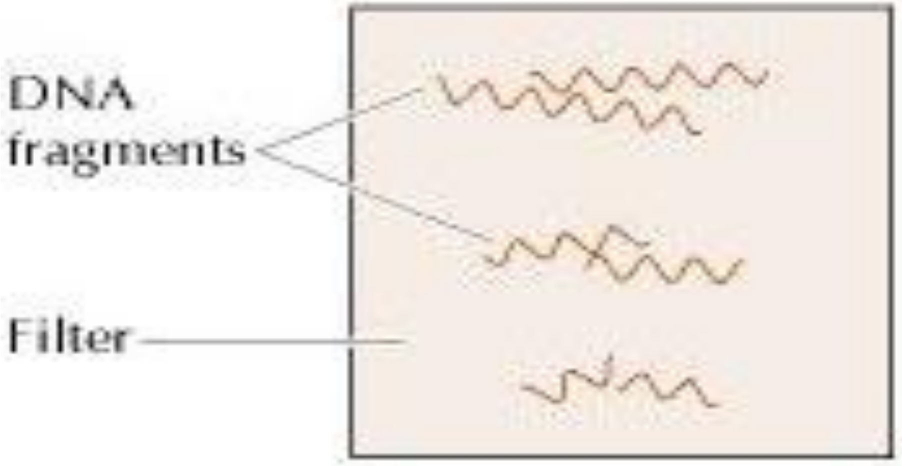


3.The restriction fragments present in the gel are denatured with alkali and transferred onto

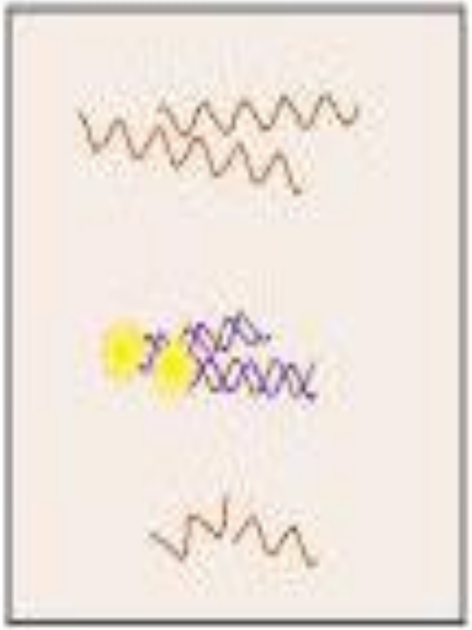


4. a nitrocellulose filter or nylon membrane by blotting.

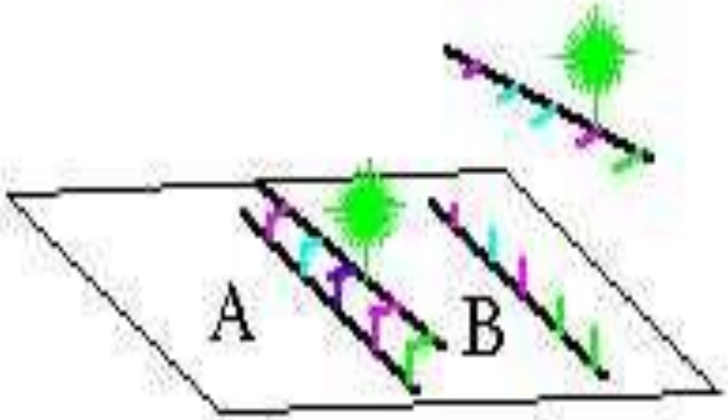
- **This procedure preserves the distribution of the fragments in the gel, creating a replica of the gel on the filter.**



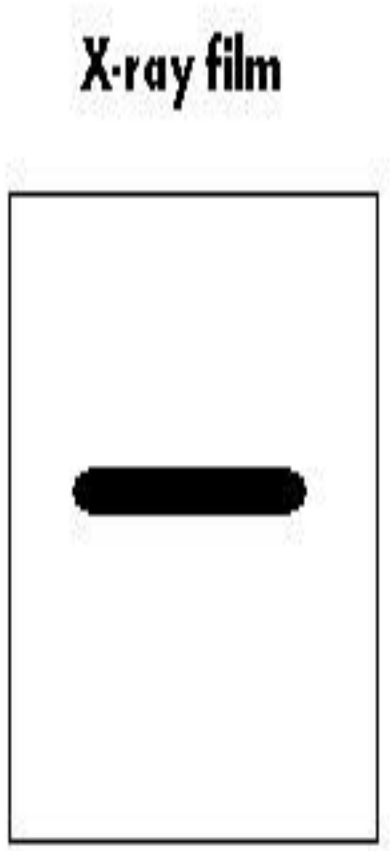
5.The filter is incubated under hybridization conditions with a specific radiolabeled DNA probe.

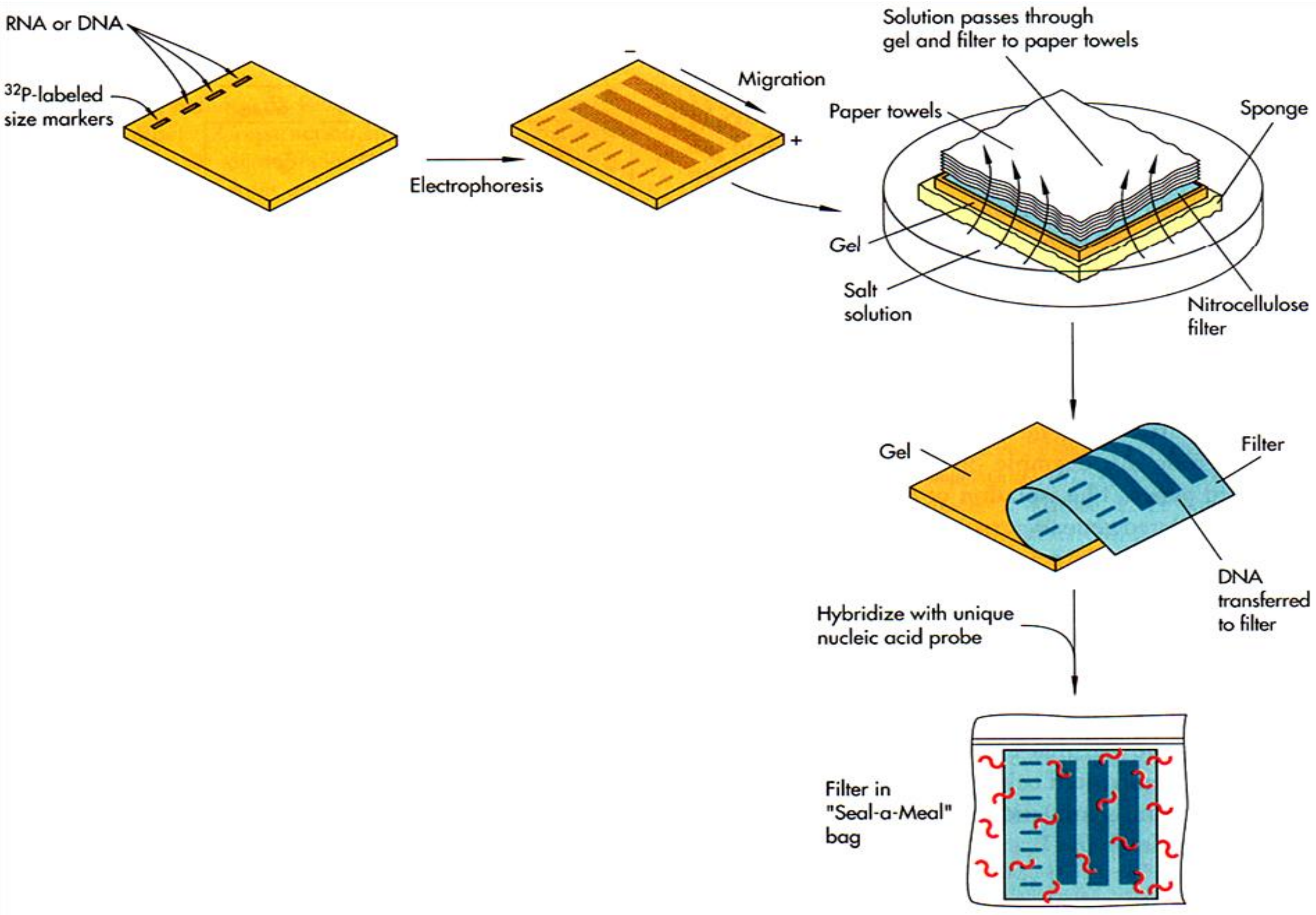


The probe hybridizes to the complementary DNA restriction fragment.



6.Excess probe is washed away and the probe bound to the filter is detected by autoradiography, which reveals the DNA fragment to which the probe hybridized.





RNA or DNA
32P-labeled size markers
Electrophoresis
–
Migration
+
Solution passes through gel and filter to paper towels
Paper towels
Sponge
Gel
Salt solution
Nitrocellulose filter
Gel
Filter
DNA transferred to filter
Hybridize with unique nucleic acid probe
Filter in "Seal-a-Meal" bag

Northern Blotting

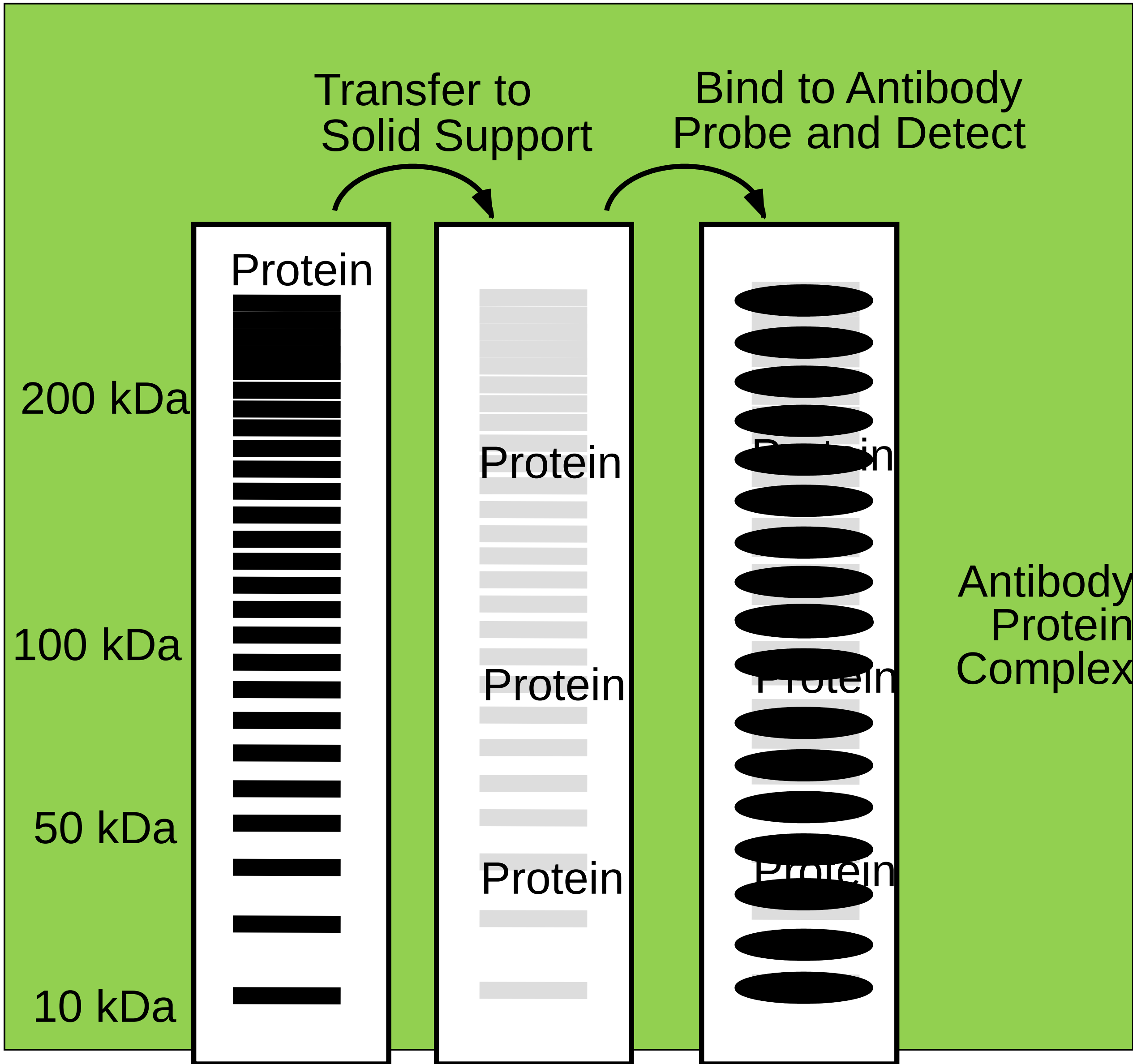
Northern blotting is a technique for detection of specific RNA sequences. Northern blotting was developed by James Alwine and George Stark at Stanford University (1979) and was named such by analogy to Southern blotting

Western Blotting

Proteins are fractionated on an SDS-PAGE gel.

The protein is electroblotted to a nylon membrane.

An antibody probe is used to localize the target protein.

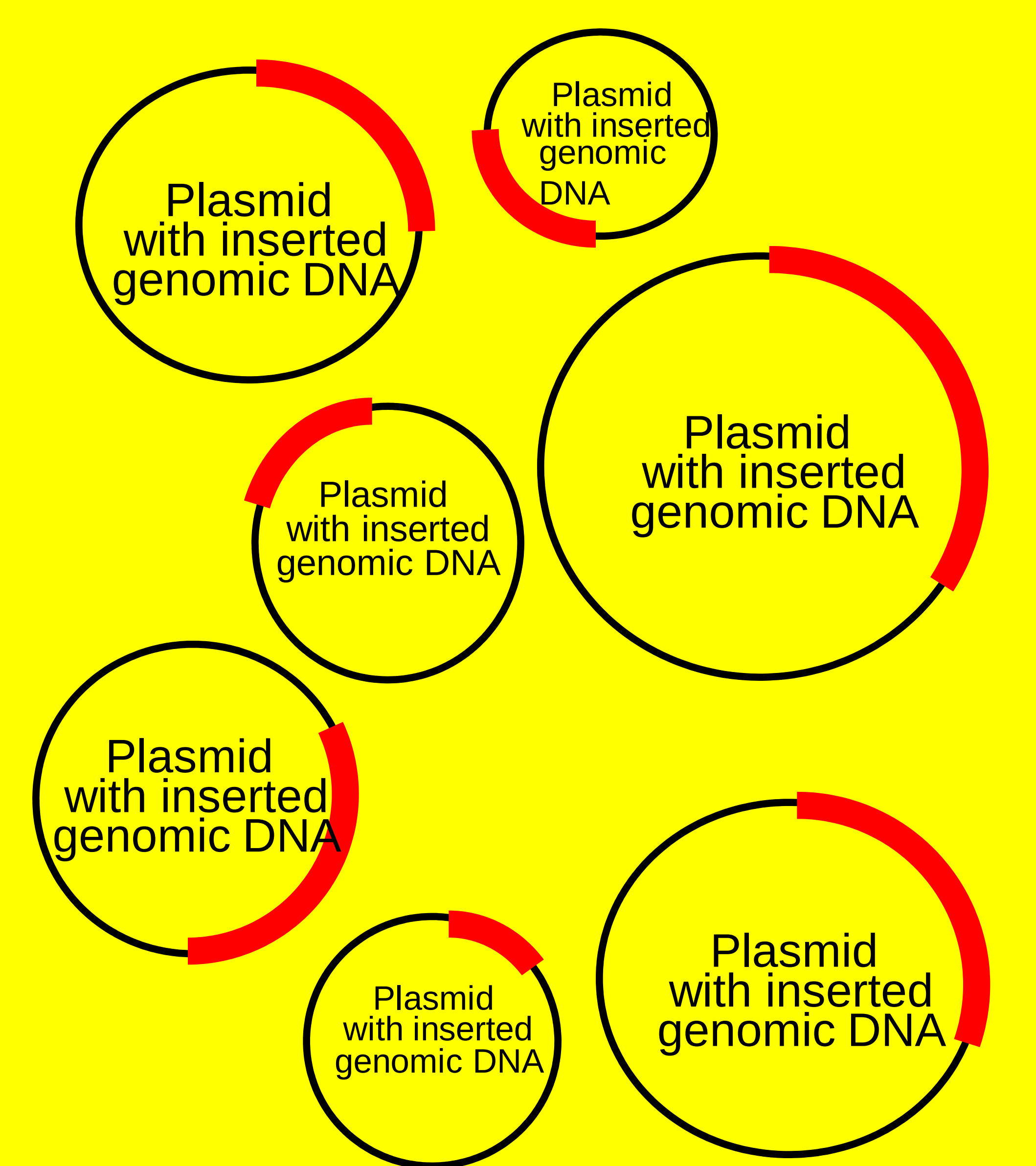


المكتبية الجينومية Genomic library

- عند دراسة جين معين أو قطعة معينة من DNA وعند عزل المحتوي الوراثي Genomic DNA للكائن الحي وتقطيعه بواسطة إنزيمات القطع ثم أخذ كل قطعة من DNA وعمل استنساخ لها بواسطة Cloning vector ففي هذه الحالة نحصل علي مايسمى بالمكتبية الجينومية للمحتوي الوراثي للفرد Genomic library وهي مجموعة من المستنسخات Clones التي تمثل الحامض النووي لحيوان أو كائن محدد. وتستخدم الـ Genomic library في عمليات عزل ودراسة أي جين.

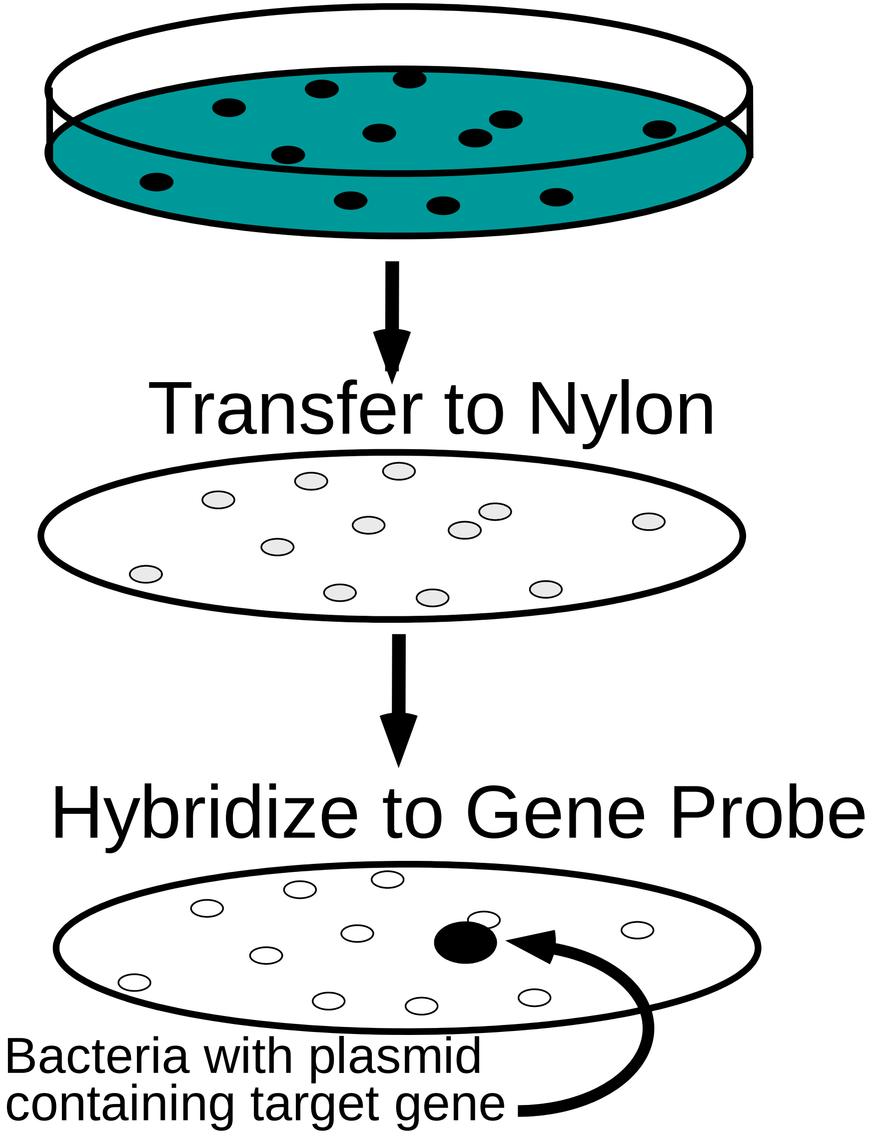
Genomic Library

- Genomic Libraries
تحتوي معلومات وراثية غير مختصرة
"unabridged"
- الحمض النووي DNA المدخل الى البلازميد مختلف الأحجام ، وبما أنه هضم جزئيا فهذا يضمن تداخل OVERLAP لكامل أجزاء الجينوم



Genomic Library (Library of All DNA)

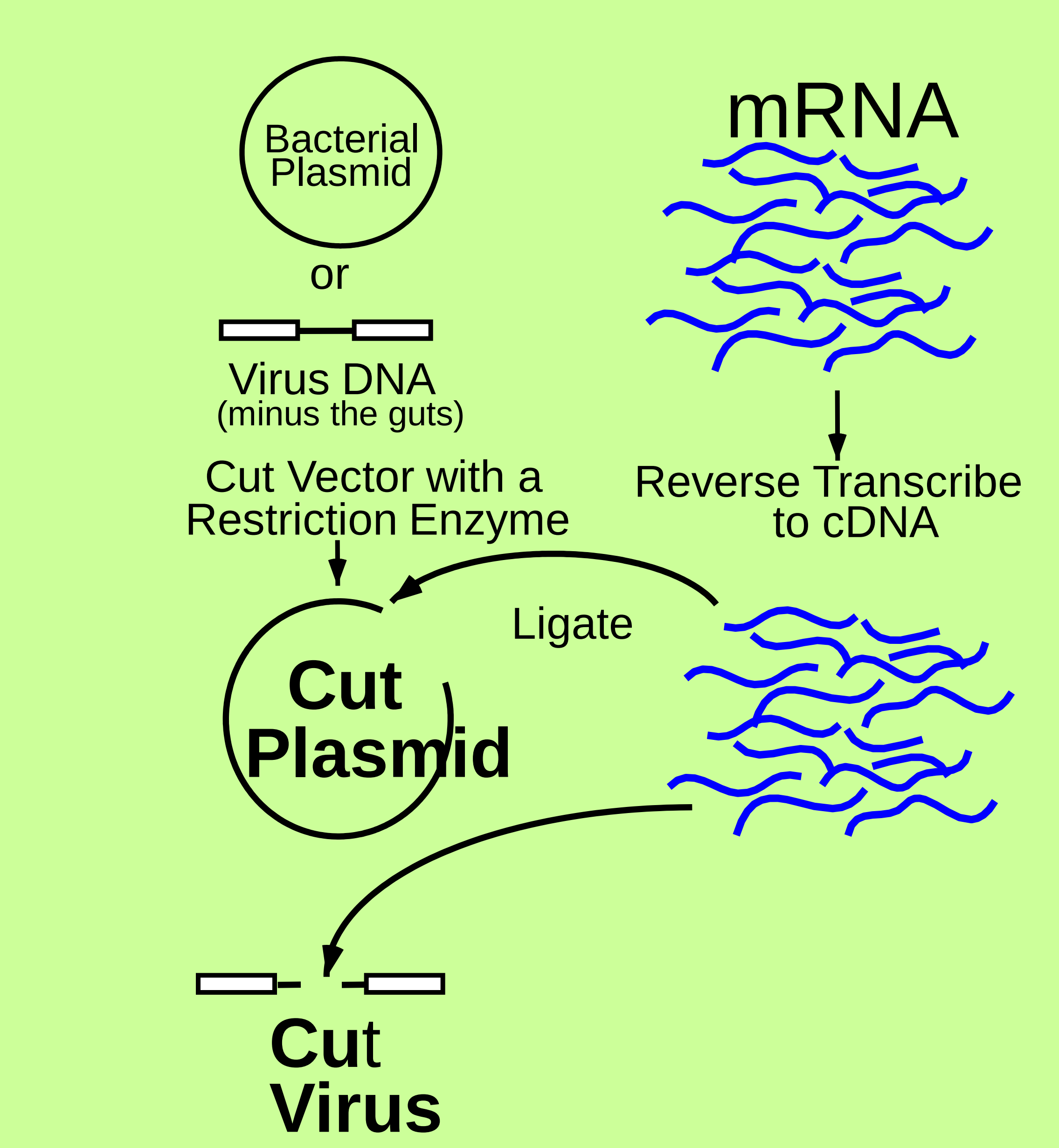
- استعادة المعلومات من مكتبة الجينوم يتطلب تحديد مستعمرة بكتيرية تحتوي على البلازميد المرغوب
- عمليا يشبه
- southern blotting ولكن هنا مستعمرات بدلا bands



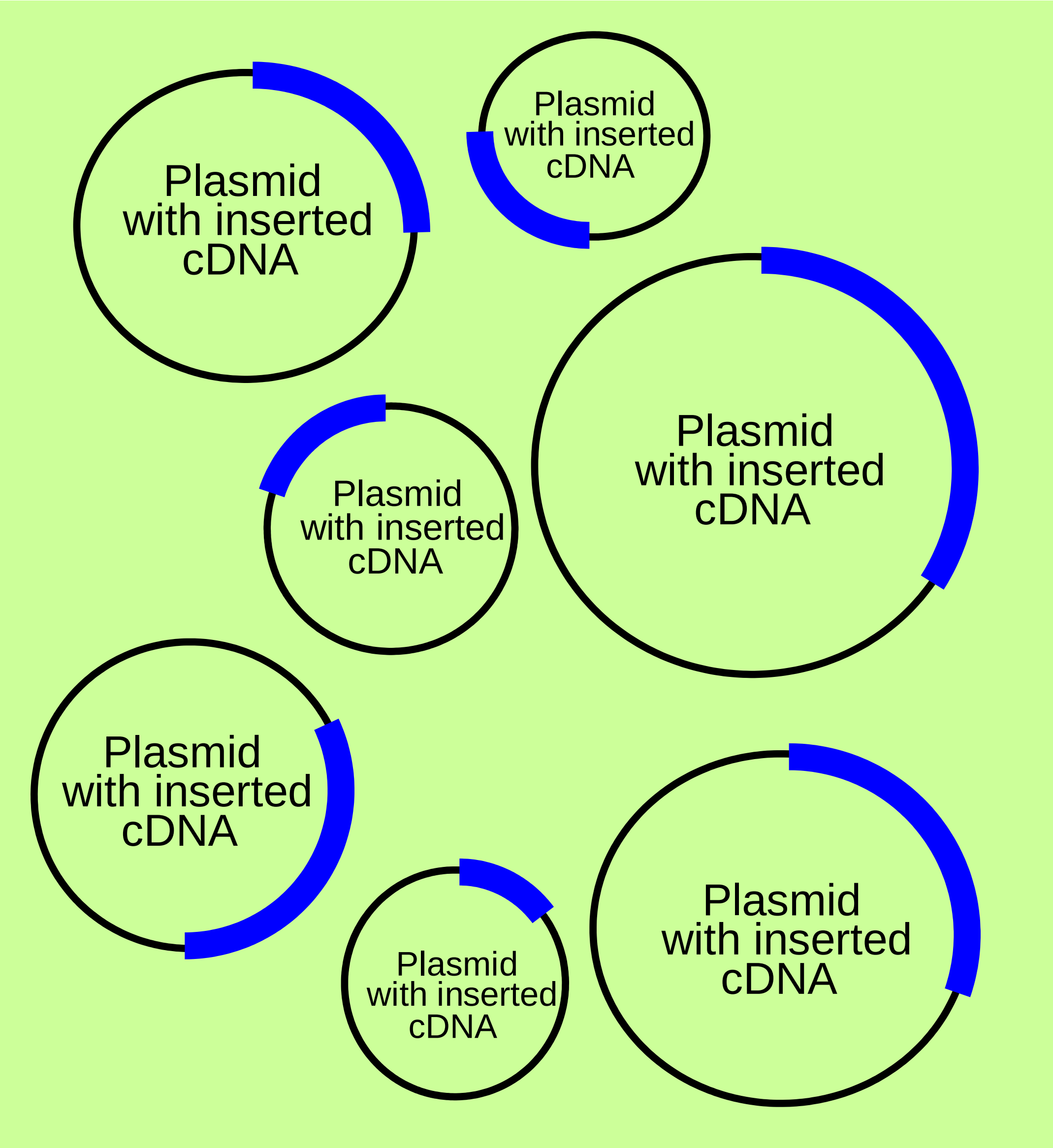
cDNA Library

معظم الجينوم = لا يحتوي شفرات ولا تعرف وظيفته
non-coding DNA of unknown function .
الجزء المشفر = mRNA

مكتبة cDNA عبارة عن نسخة مختصرة abridged للكائن في أنبوب الأختبار



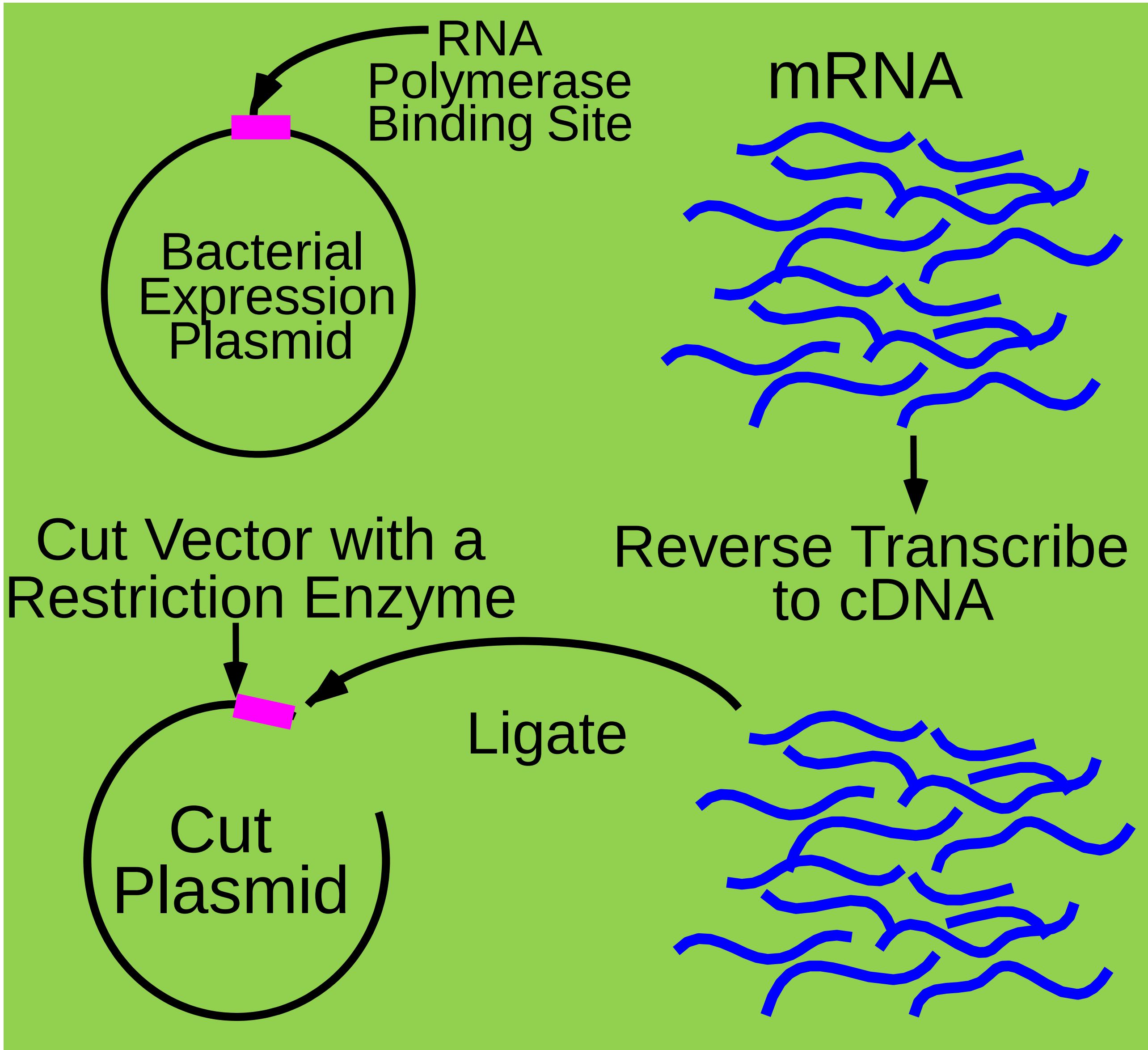
cDNA Library



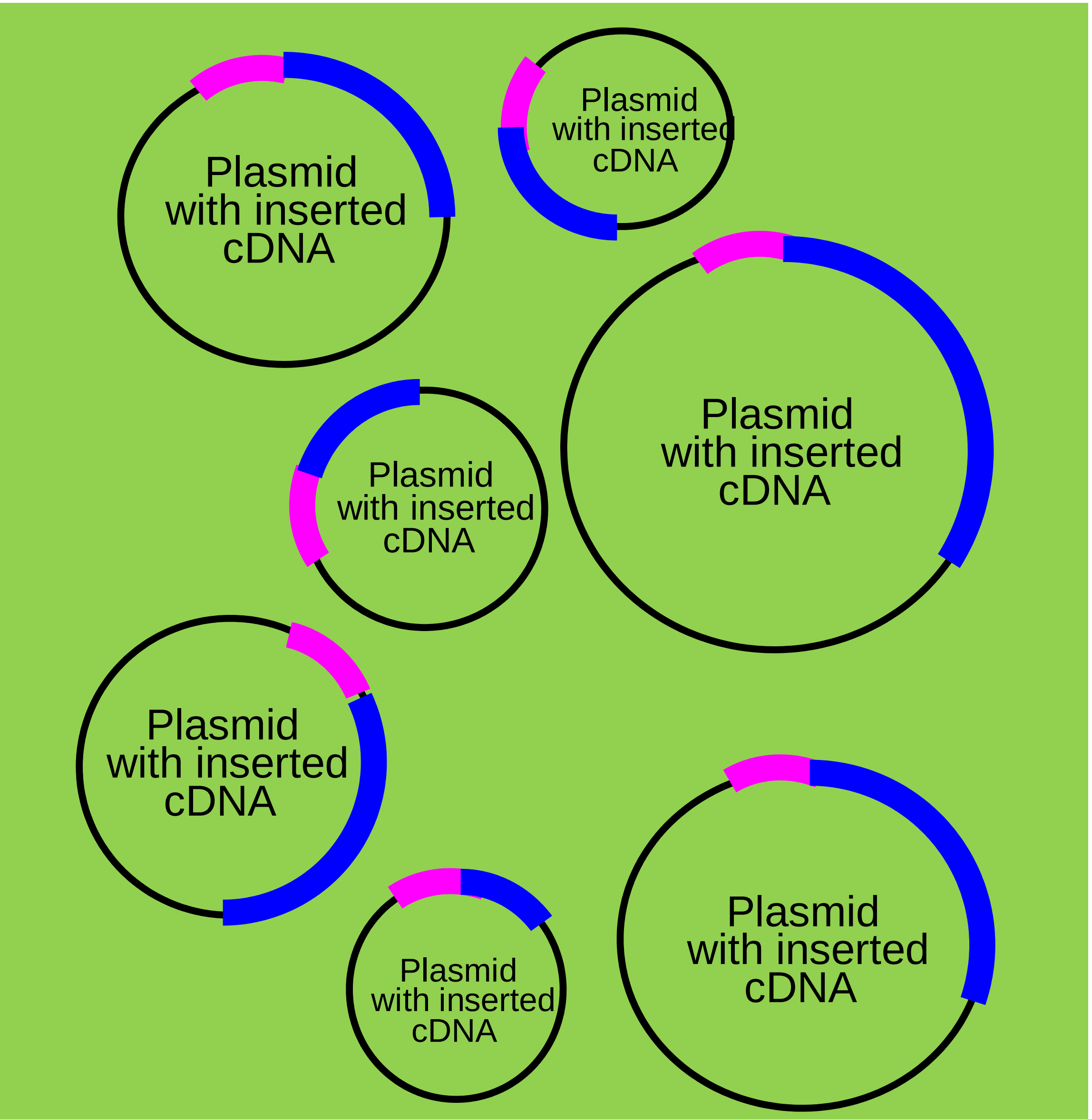
- بشكل عام ، أكثر من نسخة من الجزء الذي يحتوي شفرات من الجينوم يوجد في **plasmid/viral vectors**
- المكتبة **cDNA library** يمكن أن تنسخ عدة مرات
- مكتبة **cDNA library** يمكن أن تصمم بحيث تمثل الجينات المستنسخة لنسيج معين أو لمرحلة زمنية معينة **temporal stages**

cDNA Expression Library

- cDNA Expression = Libraries cDNA libraries ، باستثناء ان كل التتابعات sequences تترجم الى بروتين
- البروتينات عادة تتجمع داخل الخلية



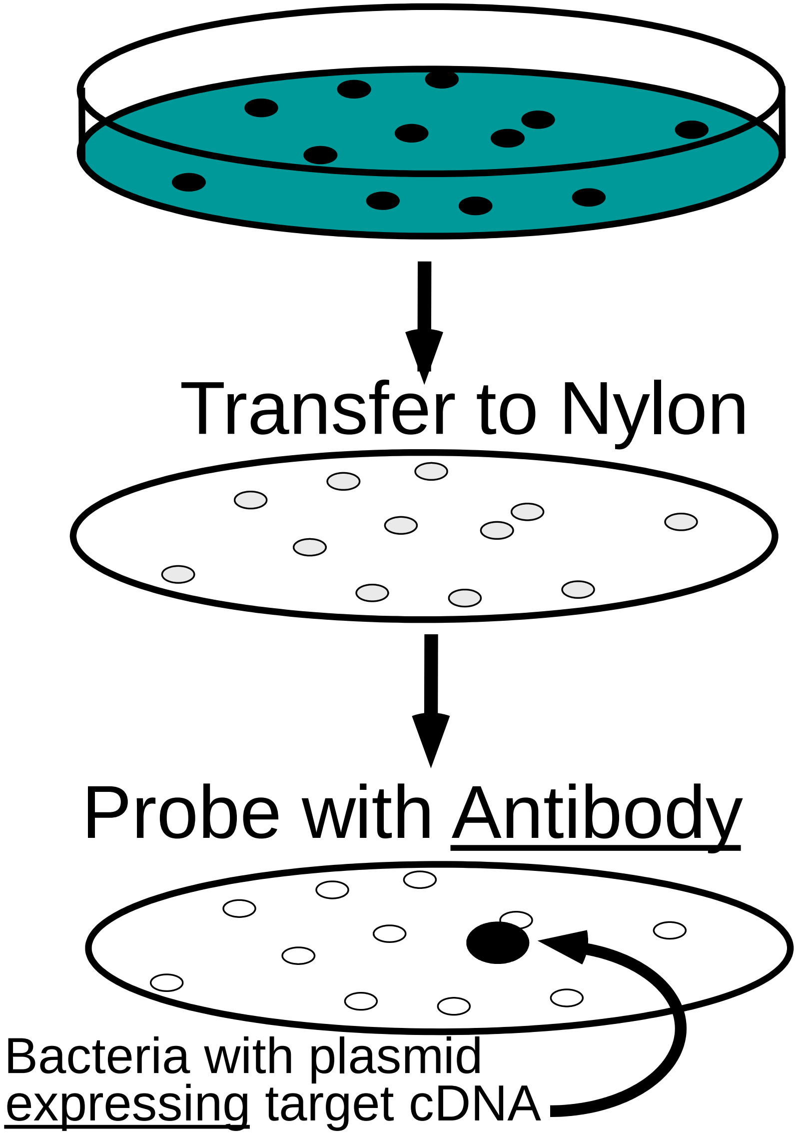
cDNA Expression Library



- بروتينات ممثلة لكل الجينات (الشفرات coding) لنسيج معين أو لمرحلة عمرية معينة يمكن انتاجها
- بعض البروتينات قد تكون سامة للخلية المضيفة وبالتالي لن توجد في المكتبة.

cDNA Expression Library

- استعادة المعلومات من مكتبة **cDNA expression** يتطلب تحديد مستعمرة بكتيرية تنتج البروتين المرغوب
- **Antibodies** مضادات حيوية تستخدم هنا بدلا من مسبار مكون من حمض نووي.



الإستنساخ Cloning

تعريف الإستنساخ

كلمة Cloning أو استنساخ تعني عمل نسخه جينيه طبق الأصل للنسخه الجينيه الأصليه لأي كائن سواء من النباتات أو الحيوانات.

مقدمة

- منذ بلايين السنين وحتي الآن يتم في الطبيعه عمليات كثيره للاستنساخ بدون تدخل الانسان. فمثلاً بعض الحيوانات مثل اللافقريات الصغيره من الديدان وبعض أنواع الأسماك و السحالي و الضفادع تحدث لها في الطبيعه عمليات استنساخ. إن البويضات الغير مخصبه لهذه الحيوانات يمكن لها تحت ظروف معينه في الطبيعه أن تنمو لتكون الحيوان الكامل و بذلك تعتبر نسخه "Clone" من الانثي التي وضعت البويضات.وأيضاً في عالم النباتات تحدث عمليات استنساخ طبيعيه لبعض النباتات مثل الفراوله و البطاطس و البصل. فعندما ينمو جزء من الجذع يمكن له أن يمتد بجوار النبات الأصلي و يتكون له جذور ثم يتحول إلي نبات كامل جديد يعتبر نسخه طبق الأصل من النبات الأصلي.

- وقد إستفاد الإنسان من هذه الظاهرة الطبيعيه منذ آلاف السنين حيث يقوم بتقطيع جزء من النبات و زراعته لينمو نبات جديد هو نسخه طبق الأصل من النبات الذي قطع منه هذا الجزء.
- والجدير بالذكر أنه في نهاية الجزء المقطوع تنمو كتله من الخلايا الغير متخصصه تسمي "Callus" وهي قادره علي النمو عندما تزرع لتنتج خلايا متخصصه لتكون اجزاء النبات المختلفه مثل الساق والجذور.

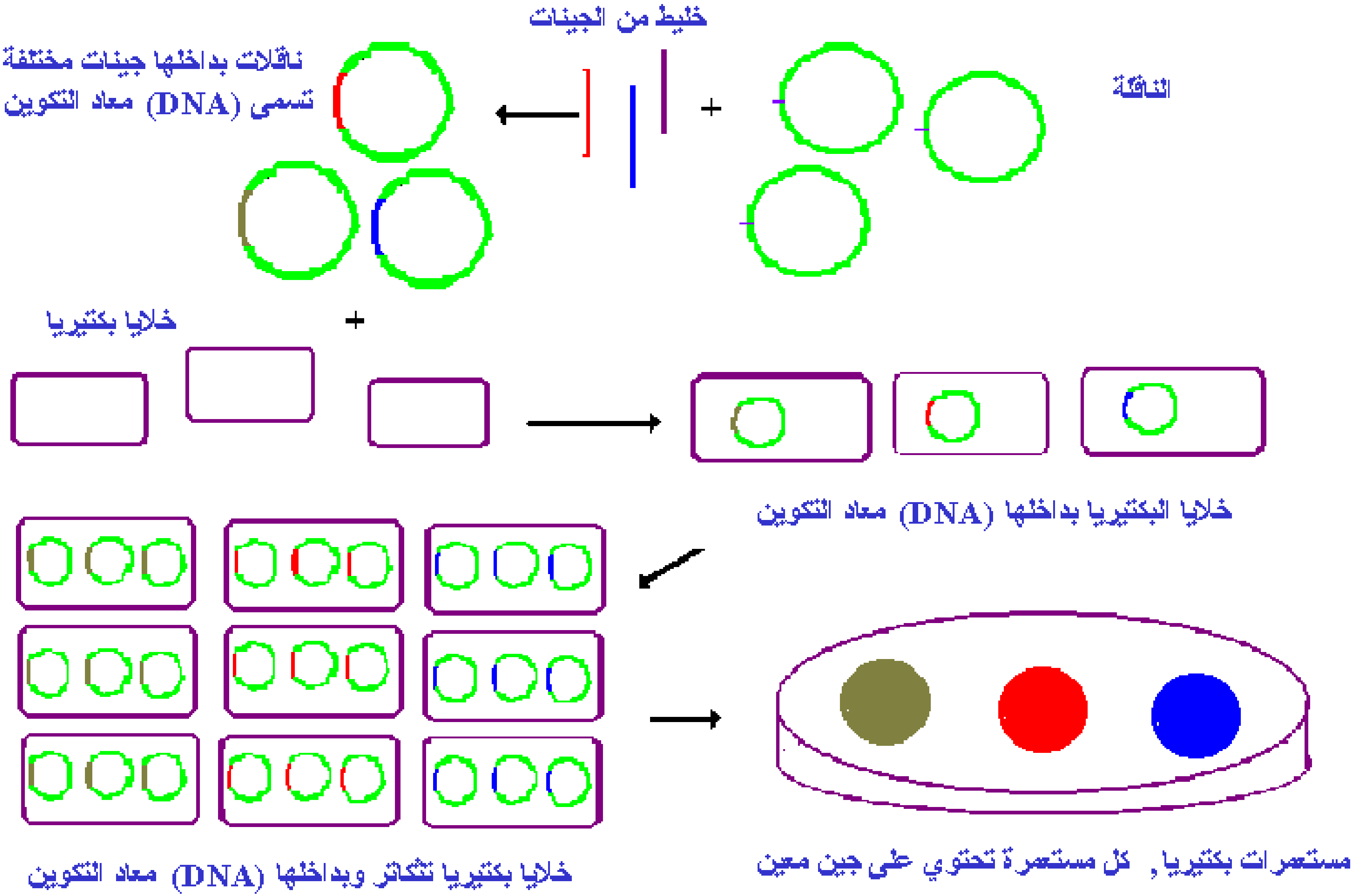
- أما ظاهرة الإستنساخ الطبيعيه في الإنسان فهي موجوده بيننا و مألوفه للناس منذ قديم الأزل ألا وهي التوأم المتطابقه. إن التوأم المتطابق هو نسخه طبق الأصل من بعضها من حيث الموروث الجيني لكل منهما و لذلك يعتبر كل منهما "Clone" أو نسخه للآخر. وهذه الظاهرة الطبيعيه تحدث نتيجة إنقسام الجنين في مراحله الأولي (عدة أيام فقط بعد اخصاب البويضه بالحيوان المنوي). و ينتج عن ذلك أن الجنين الواحد بعد تكوينه و استكمال الطبعه الجينيه الكامله له يتم إنقسامه إلي اثنين فيصبح كلا الجنينين الناتجين نسخه طبق الأصل لبعضهما من حيث نفس المكونات الجينيه للخلايا و ينعكس ذلك علي التشابه الكبير بينهما من حيث الشكل ووظائف الجسم.

والإستنساخ إما أن يكون إستنساخ الجين ، إستنساخ الخلايا أو إستنساخ الكائن الحي.

أولا : إستنساخ الجين Gene Cloning

- الخطوات الأساسية في تقنية إستنساخ الجينات
- ١) يتم إدخال قطعة الـ (DNA) المحتوية على الجين المراد إستنساخه في قطعة (DNA) دائرية كبيرة تسمى الناقل أو الحامل (Vector). وهذا الناقل يساعد على إدخال الجين داخل خلية بكتيرية.
- ٢) داخل الخلية البكتيرية، يبدأ الناقل في التضاعف، منتجا أعداد كبيرة من النسخ المطابقة له ومتضمنة قطعة الـ (DNA) المحتوية على الجين الذي تم نقله.

- ٣) عندما تنقسم الخلية البكتيرية، تنتقل نسخ من الناقل المحتوي على الجين إلى الخلايا البكتيرية الجديدة ويتضاعف الجين من جديد.
- ٤) بعد أن تتكاثر البكتيريا عدة مرات، يتم إختيار المستعمرة المحتوية على الجين المطلوب بواسطةعملية الغربلة (Screening). وبهذا نكون قد حصلنا على نسخة نقية من الجين المطلوب.



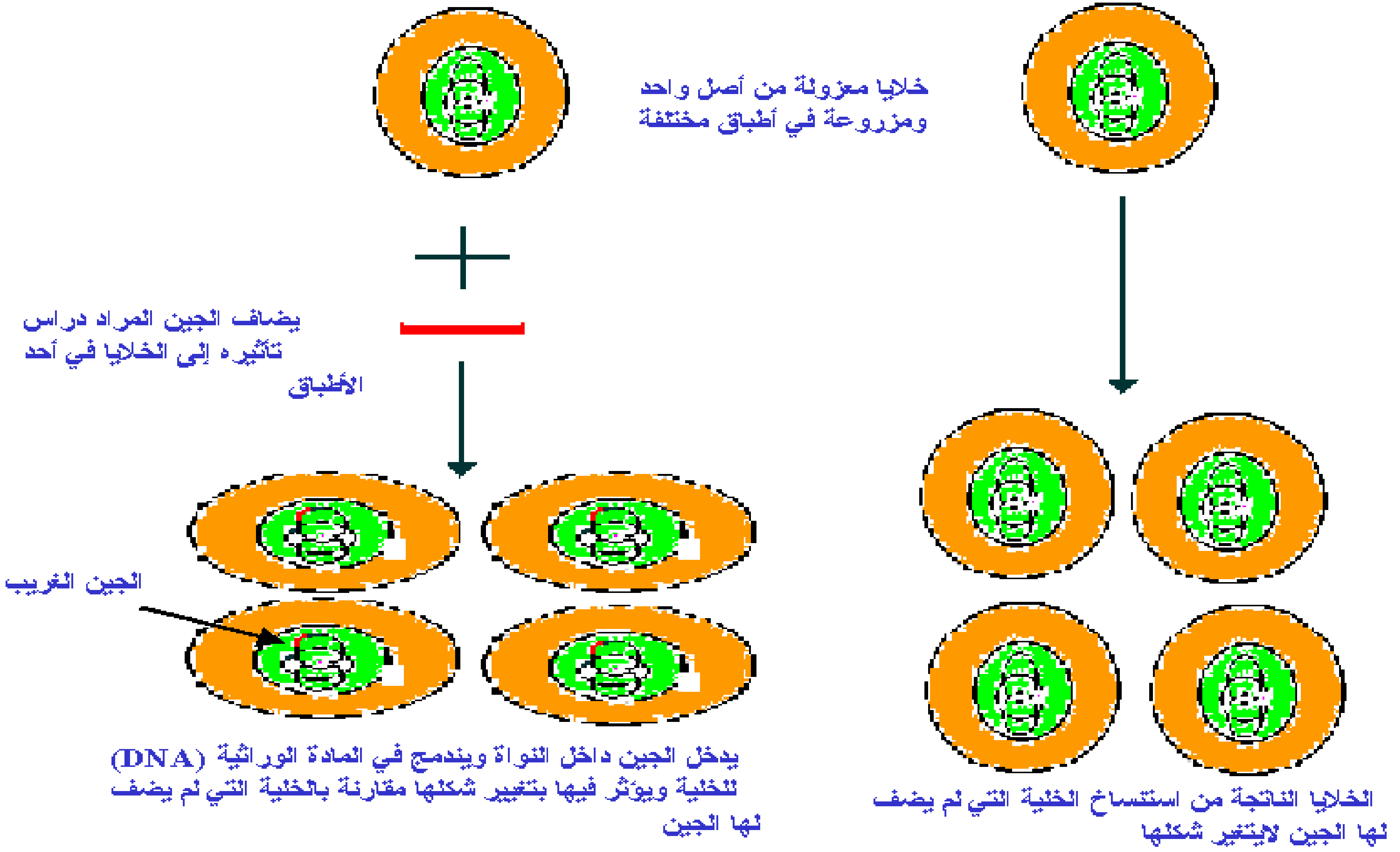
إستنساخ الجين

ثانيا: إستنساخ الخلايا

ماذا يقصد بإستنساخ الخلايا:

- يقصد بإستنساخ الخلايا، إنتاج عدد كبير من الخلايا من خلية واحدة.
- أحياناً يحتاج العلماء دراسة نوع معين من الخلايا أو تأثير بعض الجينات في خلايا معينة. ولإنجاز هذا الهدف يتم عزل الخلية المراد دراستها وإستنباتها في المعمل لتنقسم وتعطي عدد كبير من الخلايا المطابقة لها وراثياً، أي أنها تحمل نفس الصفات الوراثية.

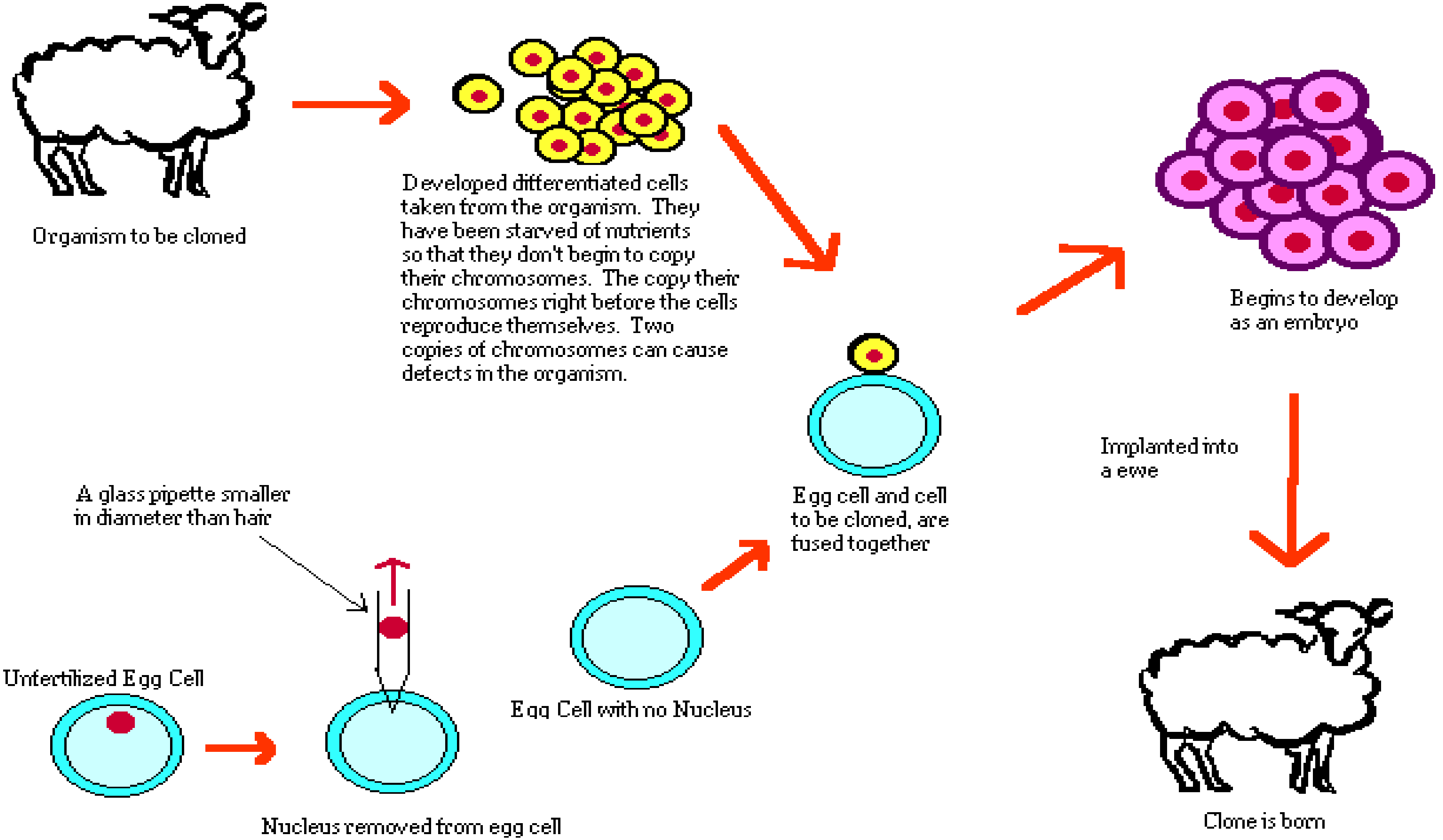
- وفي بعض الأحيان يراد دراسة تأثير جين معين على وظائف نوع من الخلايا، فيتم إدخال نسخة من ذلك الجين (جين غريب) في خلية وإكثارها ومقارنتها بخلايا لا تحتوي على ذلك الجين .
- بالإضافة لما سبق، فإن هذا النوع من الإستنساخ يستعمل في إنتاج الأجسام المضادة لإستخدامها كعلاج وكمواد تشخيصية.



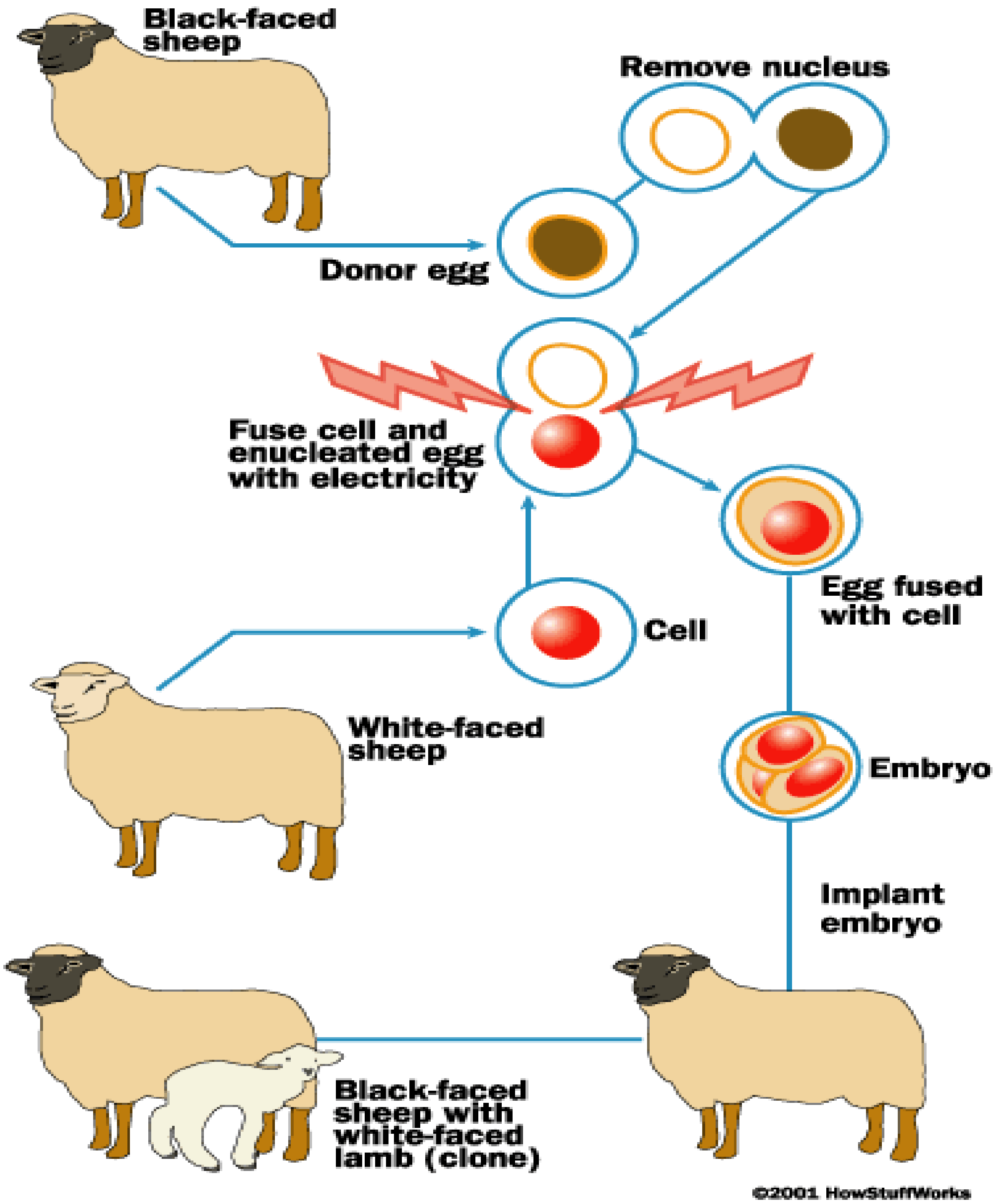
إستنساخ الخلايا

إستنساخ كائن حي

- أول من نجح في ذلك هو الدكتور إيان ويلموت(Dr.Ian Wilmut's)وفريقه البحثي بالتعاون مع شركة(PPL Therapeutics) في إسكوتلندا.
- حيث أنه في شهر فبراير من عام (١٩٩٧) أعلن فريق وليموت عن ولادة دوللي (Dolly) وهي نعجة لها نفس التركيب الجيني الذي تحمله أمها.
- والذي يميز دوللي أنها كانت أول مخلوق حي يستنسخ من خلية متخصصة (خلية أخذت من ضرع نعجة أي أنها خلية ثديية متخصصة).



Nuclear Transfer Technology



رسم توضيحي يبين بالأسهم عملية إستنساخ النعجة البريطانية دوللي من ثلاث نعجات

بعض تطبيقات الهندسة الوراثية

- ## أهم التطبيقات في مجال الصناعات الدوائية
- في الأعوام العشرة الأخيرة من القرن العشرين، تزايد الاهتمام بتطبيقات هندسة الجينات في الصناعات الدوائية، خاصة بعد أن عرفت مواقع جينات عدّة في كائنات حية مختلفة ومِنْ ثمّ أصبح ممكناً عزلها وهندستها جينياً ونقلها إلى كائنات جديدة.
- أحدث إنتاج الأنسولين البشري عام ١٩٨٢، عن طريق الكائنات الدقيقة بعد إدخال جين الأنسولين إلى داخلها ، ثورة كبيرة في علاج مرض السكر .
- وبإستخدام التكنولوجيا نفسها، أمكن إنتاج علاجات لكثير من الأمراض المستعصية والخطيرة التي كان يصعب علاجها .

أمثلة على المنتجات الدوائية

- ١- الأنسولين Insulin لعلاج مرض السكر.
- ٢- هرمون النمو Human Growth Hormon لعلاج قصور النمو عند ألاطفال.
- ٣- فولتروبين بيتا Follitropin beta : للتبويض عند الإناث.
- ٤- ثيروتروبين Thyrotropin : لعلاج سرطان الغدة الدرقية.
- ٥- التبليز Alteplase لعلاج الجلطات الدموية.
- ٦- ابوتين الفا Epoetin alfa لعلاج فقر الدم الناتج عن العلاج الكيميائي.
- ٧- أفاستين Avastin لعلاج سرطان القولون.
- ٨- إنترفيرون ألفا: Interferon alfa-2a لعلاج بعض انواع سرطان الدم.

- ٩- عوامل تجلط الدم: Blood Clotting Factors لعلاج مرض نزف الدم.
- ١٠- إنتاج الأمصال المختلفة مثل: الكبد الوبائي ، الإنفلونزا وغيرها.
- ١١- على صعيد هندسة الأنسجة:
- - بناء أنسجة غضروفية للذين يعانون من تآكل الغضروف في الركبة.Cartilage Damage in Knees
- - بناء أنسجة عظمية
- - بناء أنسجة جلدية Skin Grafting لعلاج التشوهات الناتجة عن الحروق والحوادث والعمليات الجراحية.

أهم إنجازات التقنيات الحيوية والهندسة الوراثية في المجال الطبي

- ١- إستخدام جهاز تفاعل سلسلة البوليميرز لتشخيص بعض الأمراض الوراثية التي تنتج عن خلل في الحمض النووي مثل مرض الثلاسيما Thelasemia ومرض الكبد الوبائي Hepatitis؛ إضافة إلى إمكانية اكتشاف بعض الأمراض في مراحل أولية مـــن عمليـــة تكويـــن الجنين فـــي الرحم.Pre-implanting diagnosis
- 2- تطبيقات هندسة الجينات في مجال الطب الشرعي : حيث يتم التعرّف على مرتكبي الجرائم من خلال تحليل مادة الحمض النووي في الدم أو الحيوانات المنوية أو خلايا الشعر وغيرها ، خاصة أنّ هنالك احتماليةً ضئيلة جداً لتوافق مادة الحمض النووي لشخصين مختلفين.

٣- العلاج الجيني : Gene therapy

- في الأعوام العشرة الأخيرة من القرن العشرين، دخل العلاج الجيني مرحلة متطورة جداً فأمكن إدخال الجينات السليمة إلي الخلايا المصابة، وإستبدال الجينات السليمة بالجينات غير السليمة . إن إدخال الجينات السليمة إلى خلية مصابة ليس بالإمر السهل؛ حيث تتم العملية بشكل عشوائي وبإستخدام أساليب إدخال مختلفة، منها:
- أ- تطوير فيروسات حاملة للجينات ، يحمل هذا الفيروس الجين المراد إدخاله، ويهاجم الخلايا المصابة، ويدخل الجين المطلوب إلى داخل الخلية المصابة، (الفيروس مهندس جينياً كي لا يسبب أمراضاً أو أى مشاكل صحية للمريض.

- ب. وضع الجين (الحمض النووي) داخل حويصلات دهنية Liposomes وإدخالها إلى الخلايا المصابة، حيث تساعد في دخول الجين إلى الخلايا المصابة وإستبدال الجين الطبيعي أو السليم Normal gene.
- ج. إذا كان الخلل الوراثي في خلايا الدم مثلا، يمكن أخذ هذه الخلايا إلى خارج جسم المريض وإجراء التغيير الجيني فيها؛ ثم إرجاعها إلى داخل جسم المريض ثانية.
- د. حقن المريض بمادة الحمض النووي مباشرة، حيث يستهدف الحمض النووي الخلايا المصابة التي تحتوي على مستقبِلات خاصة له.

أهمية التقنيات الحيوية والهندسة الوراثية في المجال الزراعي

- يمكن تعريف المحاصيل المحورة (المعدلة) وراثيا بأنها تلك المحاصيل المطورة عن طريق إدخال جينات غريبة إليها لتحسين صفاتها الوراثية مثل :-
- ١- إنتاج أنواع جديدة من النباتات و البذور القادرة على مضاعفة الإنتاج، و تحمل الظروف البيئية (ملوحة – جفاف – صقيع).
- ٢- تحسين صفات النبات لإكسابه مناعة ضد الأمراض و القدرة على مقاومة اللآفات للحد من إستخدام المبيدات و زيادة الإنتاج.

- ٣- تحوير النبات لينتج البلاستيك في بلاستيداته الخضراء.
- ٤- تعديل صفات الثمار لتحسين القيمة الغذائية، و تحمل ظروف النقل و التخزين.
- ٥- إنتاج مركبات الطعم و النكهة و الأصباغ من الطحالب

- وقد تم إطلاق المحاصيل المحورة وراثيا في عام ١٩٩٦.
- وشهد عام ٢٠٠٦ زيادة هائلة في المساحات المزروعة بالمحاصيل المحورة وراثيا
- ومن أهم المحاصيل المنتجة بالتكنولوجيا الحيوية:
- ١- فول الصويا حيث يزرع في العالم حاليا حوالي ٥٨.٦ مليون هكتار
- ٢- الذرة حيث تبلغ المساحة المزروعة ٢٥.٢ مليون هكتار
- ٣- ايضا يزرع نحو ١٣.٤ مليون هكتار بالقطن المحور وراثيا.
- ٤- بالاضافة الى ذلك هناك مساحات صغيرة تزرع فيها البطاطا و البابايا التي أدخلت فيها جينات لتأخير النضج ومقاومة الفيروسات

أهمية التقنيات الحيوية والهندسة الوراثية في المجال البيئي

- إستخدام التقنيات الحيوية والكائنات الدقيقة المحورة وراثيا للمساهمة في تقليل التلوث البيئي عن طريق تحليل المواد السامة وغيرها من المواد الملوثة للتربة والمياه و في مقدمتها البترول ومشتقاته.

أهمية التقنيات الحيوية والهندسة الوراثية في المجالات العسكرية

بعد ثورة إنتاج القنابل الذرية، تتسابق الدول الكبرى لإنشاء مراكزأبحاث النظم الجينية تعتمد على جمع الكائنات الدقيقة من مصانع الأسلحة و مستودعات الذخيرة (بكتريا تحلل الديناميت – بكتيريا تدمير الهيدروكربونات) ثم تنميتها في المعامل لعزل و تحليل النظم الوراثية لها

و كذا للكائنات البيولوجية (الممرضة - المدمرة - عوامل مطفرة)، وبإستخدام "نظم الحاسبات" تنتج قنابل بيولوجية تحمل على الصواريخ لتفتك بالبشر دون وازع من ضمير و تحقق بذلك بعض الدول مصالحها من خلال ما يعرف بـ (حرب الجينات).

- * إنتاج بكتيريا مطعمة بجينات من فيروسات ممرضة، فتتكاثر البكتيريا مكونةً أجيال ممرضة، يتم تحميلها داخ كبسولات خاصة، ثم إطلاقها في مجتمع ما فتخرج البكتيريا و تتكاثر و تغزو أجسام الكائنات الحية لتفتك بها (إحداث موت بطيء للمجتمع بأكمله).
- * إنتاج حبوب قمح مطعمة بجينات ممرضة لإصابة الطاقم الوراثي البشري، أو بجينات تسمح بإكثار الآفات .
- * تطوير أسلحة بيولوجية تستخدم لمهاجمة جماعات عرقية محددة، أو لمهاجمة جزء معين من جسد الإنسان.
- * إنتاج أدوية ذات تأثيرات سيئة.

المراجع

1-The Cell, 2nd edition A Molecular Approach, Geoffrey M Cooper.Boston University Sunderland (MA): Sinauer Associates; 2000.ISBN-10: 0-87893-106-6

2-Genetics and Molecular Biology, second edition

Robert Schleif. The Johns Hopkins University Press,1993.

3- An introduction to genetic engineering, Desmond S.T.Nicholl.

- **٤- مبادئ علم الوراثة - ا.ج.جاردنر - ترجمة: ا.د.أحمد شوقى ،ا.د/فتحى محمد عبدالتواب وغيرهم - الدار العربية للنشر والتوزيع ١٩٨٧**
- **٥- البيولوجيا الجزيئية للجينوم. ا.د/فتحى محمد عبدالتواب – المكتبة الأكاديمية ٢٠٠٧**
- **٦- البيولوجيا الجزيئية للخلية – ا.د/فتحى محمد عبدالتواب –الدار العربية للنشر والتوزيع ٢٠٠٩**
- **٧- كتاب الوراثة –اعداد قسم الوراثة – كلية الزراعة –جامعة الزقازيق مصر**

THANK YOU