اسم المحاضرة : مدخل إلى علم الحياة الجزيئي

رقم المحاضرة : الاولى

المصادر :

1- **Watson, J.D.; Baker, T.A,; Bell, S.P.; Gann, A. (2004). Molecular Biology of the Gene. 5th Ed. Pearson edution.**
2- **Clark, D. (2006). Molecular Biology Understanding the Genetic Revolution. Elsevier Inc.**
3- **Santos, D.M. (2011). Genetic Engineering, Recent Developments in application. Apple Academic press.**

٤-عماش، هدى صالح مهدي.(١٩٩٤). مبادئ علم الحياة الجزيئي. كلية العلوم . جامعة بغداد.

٥-البكري ، غالب حمزة.(١٩٩٠). مبادئ الهندسة الوراثية. جامعة البصرة.

علم الحياة الجزيئي Molecular Biology

هو احد فروع علوم الحياة الذي بقوم بدراسة الأنظمة الحياتية المختلفة على المستوى الجزئيئ (DNA و RNA و Protein) حيث يتداخل هذا العلم مع علوم الكيمياء الحياتية والوراثة والأحياء المجهرية والفيزياء الحياتية. يتناول هذا العلم دراسة الجزيئات الكبيرة Macromolecules في الخلية (النظام الحيوي) والية عملها في الخلايا الحية المختلفة إضافة إلى الطبيعة الجزيئية للجين واليات تضاعفه والطفرات والتعبير الجيني .

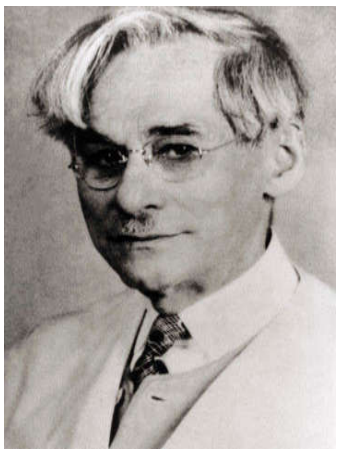
Gregor Mendel

راهبٌ وعالمٌ نمساوي، ومؤسس علم الوراثة الحديث. وضعت تجارب مندل على نبات البازلاء التي أجريت بين عامي ١٨٥٦ و ١٨٦٣ العديد من قواعد الوراثة ويشار إليها الآن باسم قوانين علم الوراثة المندلية. تعامل مندل مع سبع صفاتٍ لنباتات البازلاء وهي: طول النبات، شكل ولون الثمرة، شكل ولون البذور، موقع ولون الزهرة. لم يُفصَح بأهمية عمل مندل حتى مطلع القرن العشرين مع إعادة اكتشاف قوانينه حيث تم التحقق من النتائج من قبل العديد من الباحثين وبشكل مستقل وتم تاكيدها مما فتح الافاق للعصر الحديث لعلم الوراثة.

Thomas Morgan

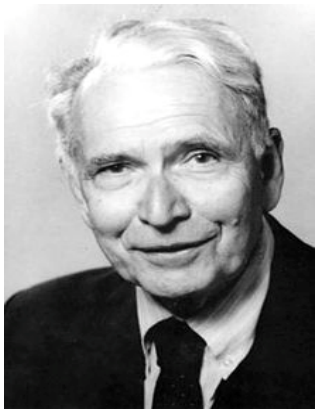
عالم أمريكي في علم الاجنة تحول اهتمامه البحثي إلى علم الوراثة ودرس الطفرات الوراثية في ذبابة الفاكهة *Drosophila melanogaster* اجرى العديد من الأبحاث على ذبابة الفاكهة توصل فيها إلى ان الجينات تكون محمولة على الكروموسومات وان هذه الجينات تكون هي المسؤولة عن الوراثة. حاصل على جائزة نوبل في الطب عام ١٩٣٣.

Phoebus Levene



عالم في الكيمياء الحياتية درس تركيب و وظيفة الـ DNA أدت أبحاثه إلى التوصل إلى إن الدنا يتألف من سكر خماسي وفوسفات وقاعدة نيتروجينية مرتبطة مع بعضها البعض وأطلق على هذا التركيب مصطلح Nucleotide وان شريط الدنا هو عبارة عن وحدات مكررة من النيوكليوتيدات وان الفوسفات هو العمود الفقري للشريط . اكتشف السكر الرايبوزي (١٩٠٩) والسكر الرايبوزي منقوص الاوكسجين (١٩٢٩) . وضع فرضية النيوكليوتيد الرباعي tetranucleotide hypothesis والتي تنص على ان الدنا متآلف من نسب متساوية من القواعد النيتروجينية الأربعة (A= G=C=T) وان الدنا لايمكن ان يكون هو الحامل للمعلومات الوراثية لأنه تركيب كيميائي بسيط للغاية وان البروتينات هي الأساس للوراثة في الكروموسومات .

Erwin chargaff



عالم في مجال الكيمياء الحياتية له إسهامات في مجال تحديد بنية المادة الوراثية . له قانونين في هذا المجال تسمى بـ Chargaff Rules :

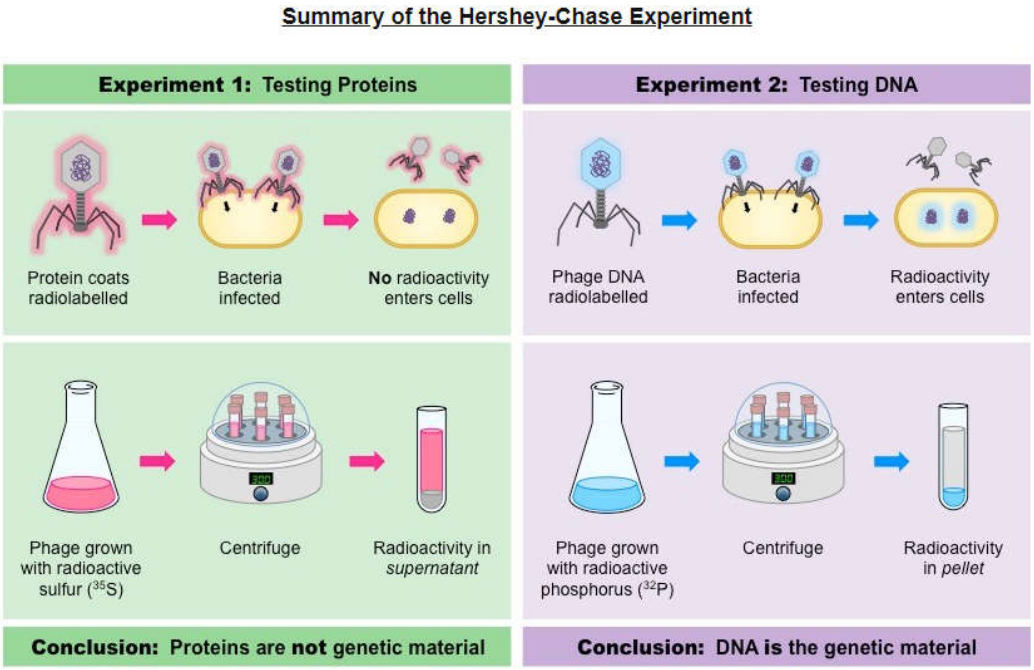
القانون الاول : ان نسبة الادنين تساوي نسبة الثايمين (A=T) في المادة الوراثية وان نسبة الكوانين تساوي نسبة السايتوين (G=C) وهذا القانون أعطى إشارة إلى نظرية الازدواج القاعدي في الدنا .

القانون الثاني : نتيجة للتغاير الوراثي Genetic Variation فان نسبة G:C و A:T في الدنا تختلف باختلاف الكائنات الحية وهذا أعطى إشارة الى إن الدنا هو المادة الوراثية للكائنات الحية وليس البروتين .

Percentages of Bases in Five Organisms				
Source of DNA	A	T	G	C
Streptococcus	29.8	31.6	20.5	18.0
Yeast	31.3	32.9	18.7	17.1
Herring	27.8	27.5	22.2	22.6
Human	30.9	29.4	19.9	19.8
E.coli	24.7	23.6	26.0	25.7

تجارب هيرشي وشاس Hershy – Chase Experiments

اجرى الفريد هيرشي و ماثا شاس عام ١٩٥٢ تجارب اظهرت نتائجها إلى ان الحامض النووي DNA هو المادة الوراثية من خلال تجاربهما على بكتريا E. coli والعاثيات T2. يتألف العاثي من رأس وذيل والياف الذيل ويكون مؤلف من ٥٠% تقريبا من البروتينات التي يتكون منها الراس والذيل و٥٠% من الأحماض النووية . يحتوي البروتين على الكبريت الذي لا يتواجد في الدنا ويكون الدنا حاوي على الفسفور الذي يكون مفقودا في البروتينات لذا تم التفريق بينهما باستخدام النظائر المشعة لكل من الفسفور والكبريت إذ تم تنمية بكتيريا E. coli في وسط يحتوي على النظير المشع للفسفور P^{32} والنظير المشع للكبريت S^{35} بعدها تم السماح للعاثي بإصابة خلايا البكتريا المعلمة اشعاعيا ومن ثم جمع العاثي الذي ظهر بعد تحلل خلايا البكتريا . حصل هيرشي وشاس على مجموعتين من العاثي الاولى تحتوي على حامض نووي DNA معلم بالفسفور المشع والثانية عاثيات تحتوي على بروتين معلم بالكبريت المشع ثم استخدمت هذه العاثيات في اصابة بكتريا E. coli غير معلمة . اظهرت نتائج هذه التجربة إلى انه عند إصابة البكتريا بالعاثي المعلم بالفسفور المشع وجد ان غالبية النشاط الاشعاعي كان داخل البكتريا إضافة إلى ذلك فانه بعد تحلل البكتريا كان هناك بعض الفسفور المشع في العاثيات الناتجة. وانه في نفس الوقت كانت العاثيات لا تحتوي على الكبريت المشع. ومن ناحية اخرى عندما استعمل العاثي المعلم بالكبريت المشع ظهرت كمية ضئيلة جدا من المادة المعلمة في البكتريا او في العاثيات المتكونة فقد بقيت اغلب المادة المشعة خارج الخلية في أغلفة العاثيات الموجودة على سطح البكتريا.



الـمـادة الـوراثية

أصبح من البديهي في الوقت الحاضر عند الحديث الوراثة او الجينات ان يتبادر الى الذهن ان الحامض النووي الرايبوزي منقوص الأوكسجين **Deoxyribonucleic acid (DNA)** الذي يعد المادة الحاملة للمعلومات الوراثية في كل الكائنات الحية باستثناء بعض الفايروسات التي تكون فيها جزيئات الحامض النووي الرايبوزي **Ribonucleic acid (RNA)** . لم تكن هذه البديهية بهذا الوضوح في بداية الأمر حيث كان الاعتقاد السائد ان البروتين هو المادة الحاملة والناقلة للمعلومات الوراثية إلا ان تراكم المعلومات لاحقا أثار الشكوك حول هذا الاعتقاد، فقد لوحظ إن الـ DNA يكون ثابت ومستقر في خلايا الكائنات الحية على العكس من البروتينات التي تتغير دائما مما أدى الى توجه الأنظار نحو الدنا باعتباره المادة التي تنقل المعلومات الوراثية . من التجارب الاولى التي أثبتت دور الدنا في نقل المعلومات الوراثية هي تجربة كرفث Griffith عام ١٩٢٨ التي اكتشف من خلالها التحول Transformation في البكتريا .

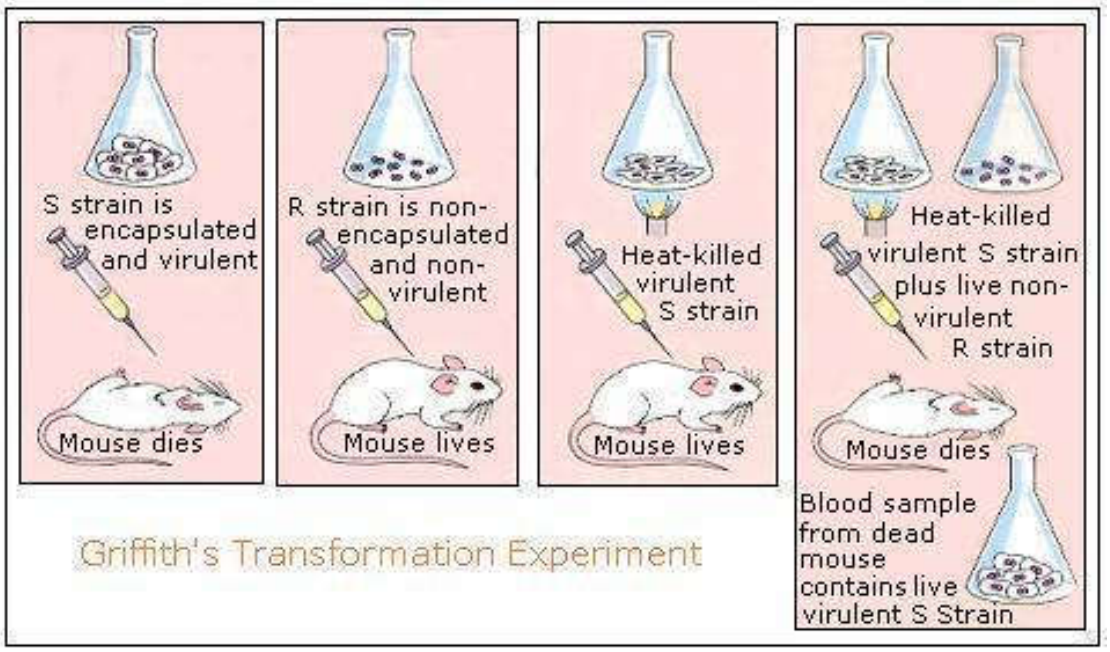
تجربة التحول في البكتريا

خلال التجارب التي قام بها العالم فريدريك كرفث للحصول على لقاح ضد بكتريا *Diplococcus pneumonia* المسببة لمرض ذات الرئة . كان هناك نمطان مختلفان من خلايا *D. pneumonia* تكون خلايا النمط الأول محاطة بمحفظة تعطي المستعمرات مظهرا ناعما وتسمى بالخلايا الناعمة **Smooth cells (S)** ويكون هذا النمط مرضيا بسبب وجود

المحفظة، اما النمط الثاني فيطلق عليها بالخلايا الخشنة **Rough cells (R)** لأنها تكون مستعمرات خشنة المظهر بسبب فقدانها للمحفظة وبذلك فهي غير مرضية.

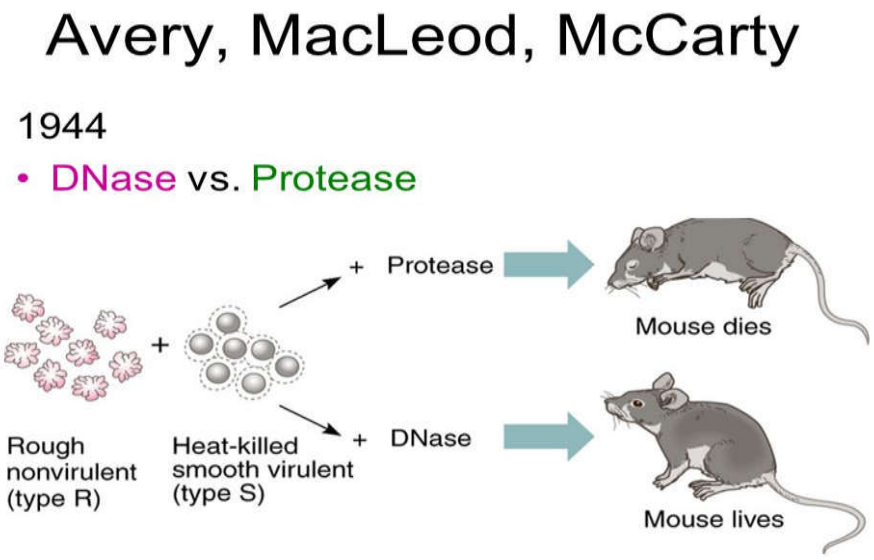
لوحظ انه عند حقن الفئران بالخلايا الناعمة يؤدي الى موتها بعد فترة نتيجة تكاثر هذه الخلايا وان قتل الخلايا الناعمة بالحرارة قبل الحقن يؤدي الى فقدان هذه الخلايا التأثير على الفئران. كما لم تظهر الخلايا الخشنة الحية إي تأثير مؤذ على الفئران لأنها غير مرضية.

تتلخص تجربة كرفث بحقن عدد من الفئران بخليط من عدد قليل من خلايا *D. pneumonia* الخشنة الحية وعدد كبير من خلايا السلالة الناعمة (S) المقتولة بالحرارة. ومما أثار الدهشة ظهور أعراض المرض الذي تسببه الخلايا الناعمة الحية على عدد من الفئران المحقونة وقد عزلت أعداد كبيرة من الخلايا الناعمة من نماذج الدم المأخوذة من الفئران المريضة فكان الاستنتاج المنطقي هو ان الخلايا الناعمة الميتة من السلالة (S) قد حولت الخلايا الخشنة الحية الى خلايا ناعمة مرضية من النوع (S) خلال تواجدهما معا في الفار.



تم الاستغناء في تجارب لاحقة عن الفئران ، حيث لوحظ إمكانية الحصول على خلايا حية ناعمة مرضية نتيجة خلط خلايا ناعمة مقتولة بالحرارة مع خلايا خشنة حية في أنبوبة الاختبار *in vitro* ، كما وجد العلماء في تجارب أخرى إن إضافة مستخلص الخلايا الناعمة المقتولة بالحرارة يكون فعالا في تحويل الخلايا الخشنة الحية الى خلايا ناعمة . عام ١٩٤٤ قام ايفري وماكلويد ومكارثي بتجارب اثبتوا فيها إن الدنا هو من يقوم لعملية التحول اذ قاموا بإضافة جزيئات من الدنا المحضرة بصورة نقية من الخلايا الناعمة من نوع S الى خلايا خشنة في أنبوبة اختبار ونتج عن هذا الحصول عل بعض الخلايا الناعمة. تأكد دور الدنا في عملية التحول بعد تنقية انزيم Deoxyribonuclease (DNase) الذي يعمل على تحطيم جزيئات الدنا فقد وجد ان معاملة الدنا بهذا الإنزيم قبل إضافتها الى الخلايا الخشنة قد أبطل نهائيا عملية

التحول قي حين ان معاملة الدنا بإنزيم Trypsin الذي يحطم البروتينات لم يكن له تأثير على عملية التحول.



اسم المحاضرة : تركيب الـ DNA

رقم المحاضرة : الثانية

المصادر :

4- Watson, J.D.; Baker, T.A,; Bell, S.P.; Gann, A. (2004). Molecular Biology of the Gene. 5th Ed. Pearson edution.

5- Clark, D. (2006). Molecular Biology Understanding the Genetic Revolution. Elsevier Inc.

6- Santos, D.M. (2011). Genetic Engineering, Recent Developments in application. Apple Academic press.

٤-عماش، هدى صالح مهدي.(١٩٩٤). مبادئ علم الحياة الجزيئي. كلية العلوم . جامعة بغداد.

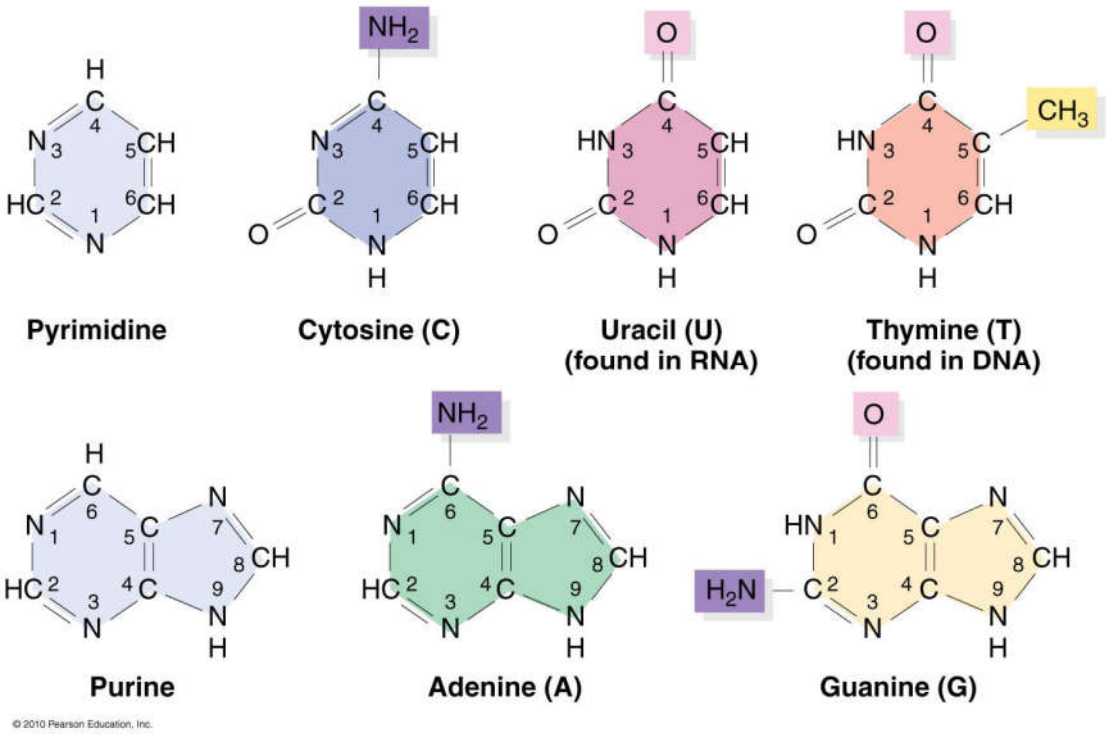
٥-البكري ، غالب حمزة.(١٩٩٠). مبادئ الهندسة الوراثية. جامعة البصرة.

بناء الدنا DNA Structure

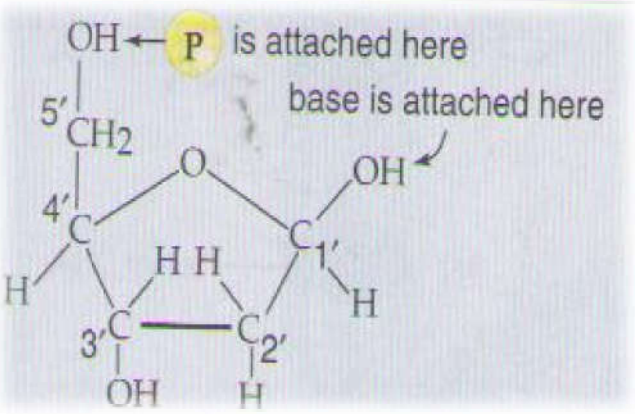
الحامض النووي الـ DNA عبارة عن سلسلة طويلة من الوحدات البنائية المسماة بالنيوكليوتيدات Nucleotides . تتكون كل نيوكليوتيدة من سكر خماسي رايبوزي منقوص الأوكسجين مرتبط بمجموعة فوسفات وقاعدة نيتروجينية. علما ان تسلسل القواعد النتيتروجينية في شريط الدنا هو الذي يحدد الطبيعة الوراثية المميزة لهذه الجزيئة ، تعود القواعد النتيتروجينية التي ادخل في تركيب الاحماض النووية الى مجموعتين رئيسيتين هما :-

١- البيورينات Purines وتشمل الادنين (**A**) Adenine و الكوانين (**G**) Guanine

٢- البيريميدينات Pyrimidines وتشمل السايتوسين (**C**) Cytocine و الثايمين Thymine (**T**)و اليوراسيل (**U**) Uracile



ترتبط البيورينات والبيريمدينات مع السكر الخماسي عن طريق اواصر كلايكوسيلية تتكون بين ذرة الكاربون رقم ١ للسكر الخماسي وذرة النيتروجين رقم ١ للبيريميدينات او ذرة النيتروجين رقم ٩ للبيورينات . تدعى الجزيئة الناتجة عن هذا الارتباط بالنيوكليوسايد Nucleoside .



ترتبط النيوكليوسيدة مع مجموعة الفوسفات لتكون الوحدة البنائية للأحماض النووية وهي النيوكليوتيدة Nucleotide . ترتبط النيوكليوتيدات المكونة للحامض النووي عن طريق أواصر كيميائية تتكون بين مجموعة الفوسفات المرتبطة مع ذرة الكاربون الخامسة للسكر الخماسي مع ذرة الكاربون الثالثة للسكر الخماسي للنيوكليوتيدة التالية وبهذا تتكون سلسلة من الأواصر القوية التي تدعى بالأواصر الفوسفاتية ثنائية الايستر Phosphodiester bond.

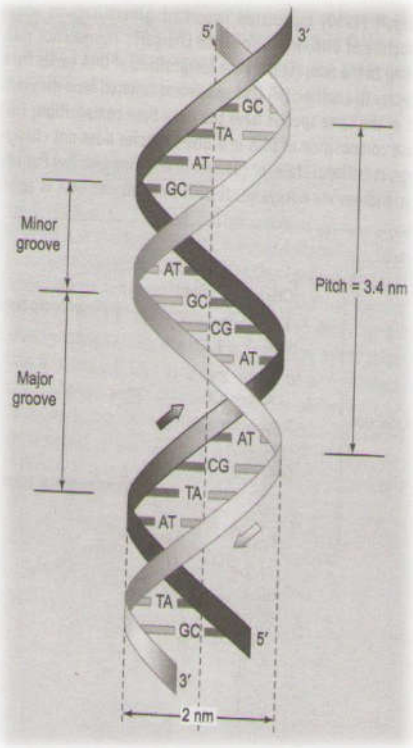
يكون السكر الخماسي ومجموعة الفوسفات العمود الفقري لسلسلة الدنا ، في حين تبرز القواعد النيتروجينية من هذا العمود الفقري الى الداخل وتكون مرتبة واحدة فوق الاخرى. ان طريقة ارتباط النيوكليوتيدات بواسطة الاواصر الفوسفاتية ثنائية الايستر يعطي لسلسلة الدنا صفة القطبية حيث يحمل احد طرفي السلسلة مجموعة فوسفات مرتبطة بذرة الكاربون رقم ٥ ('5-P) للسكر الخماسي في حين يحمل الطرق الاخر مجموعة هيدروكسيل مرتبطة مع ذرة الكاربون رقم ٣ ('3-OH) للسكر الخماسي .

نموذج الحلزون المزدوج لجزئية الدنا Double helical structure of DNA

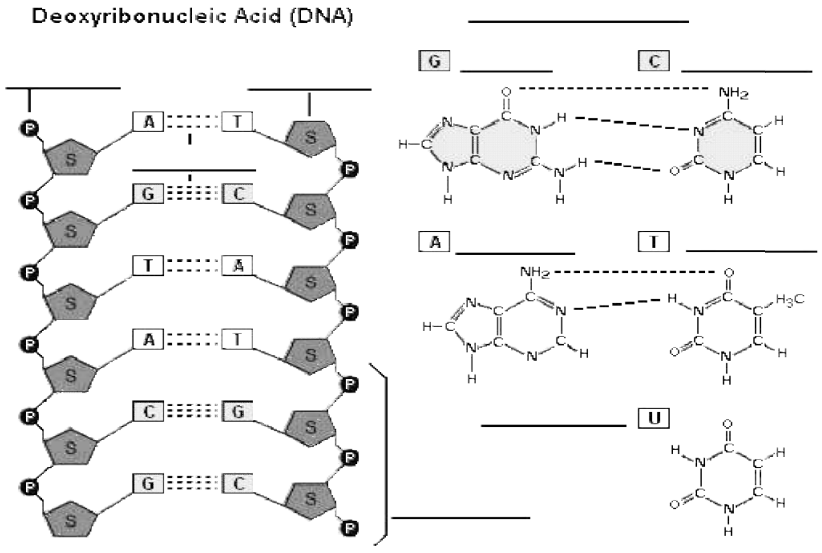
أوضح واطسن وكريك لأول مرة عام ١٩٥٣ التركيب الحلزوني المزدوج للدنا، اذ وجد العالمان من خلال دراستهما ان الدنا يتكون من سلسلتين متكاملتين تلتقيان مع بعضهما ليكونا حلزوناً مزدوجا منتظماً يبلغ قطره ٢٠ انكستروم، يشكل السكر الخماسي ومجموعة الفوسفات الجزء الخارجي في حين تبرز القواعد النيتروجينية الى الداخل وبمستوى عمودي على محور الحلزون ، وان المسافة الفاصلة بين قاعدة نيتروجينية وقاعدة اخرى يبلغ 3.4 انكستروم وان طول اللفة الواحدة للحلزون يبلغ 34 انكستروم واللفة الواحدة للخيط تكون مؤلفة من ١٠ نيوكليوتيدات وان اتجاه الالتفاف يكون باتجاه اليمين ويعرف هذا النوع من الدنا بالدنا من النوع B وهو النوع الشائع للدنا ،وهناك انواع اخرى من الدنا هي A و Z تختلف عن النوع الاول بعدد النيوكليوتيدات في اللفة الواحدة واتجاه الالتفاف.

ترتبط سلسلتا الحلزون مع بعضهما البعض عن طريق الأواصر الهيدروجينية المتكونة بين القواعد النيتروجينية. اذ يزدوج الأدنين مع الثايمين لاصرتين هيدروجينيتين والكوانين مع السايتوسين بثلاث أواصر هيدروجينية. وان هذا النوع من الارتباط القاعدي هو الترتيب الممكن

الوحيد حيث يحتاج ارتباط قاعدتين من البيورين الى مساحة واسعة تؤثر على انتظام الحلزون وان المساحة اللازمة لارتباط قاعدتين من البايرمدين تكون اقل مما يؤدي الى نفس التأثير على انتظام الحلزون .

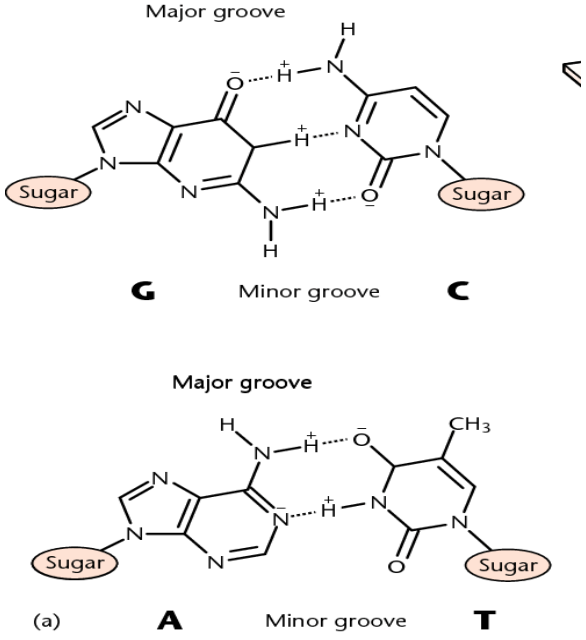


تعد خاصية الازدواج القاعدي من أهم صفات حلزون الدنا المزدوج حيث ينتج عنها علاقة تكاملية بين تتابعات القاعد في السلسلتين، فعلى سبيل المثال اذا كان التتابع لأحد شريطي الدنا هو ATGTCA فان التتابع على الشريط الأخر سيكون TACAGT ، وعلى هذا الأساس فان سلسلتي الحلزون ستكونان متخالفتين في القطبية اي انهما تتجهان باتجاهين متعاكسين احدهما باتجاه 5' ⟵ 3' والاخر باتجاه 3' ⟵ 5' . ويكفي احيانا كتابة القواعد لسلسلة معينة على اساس ان تتابع القواعد للسلسة الاخرى يمكن استنتاجه بسهولة اعتمادا على قاعدة واطسن وكريك.

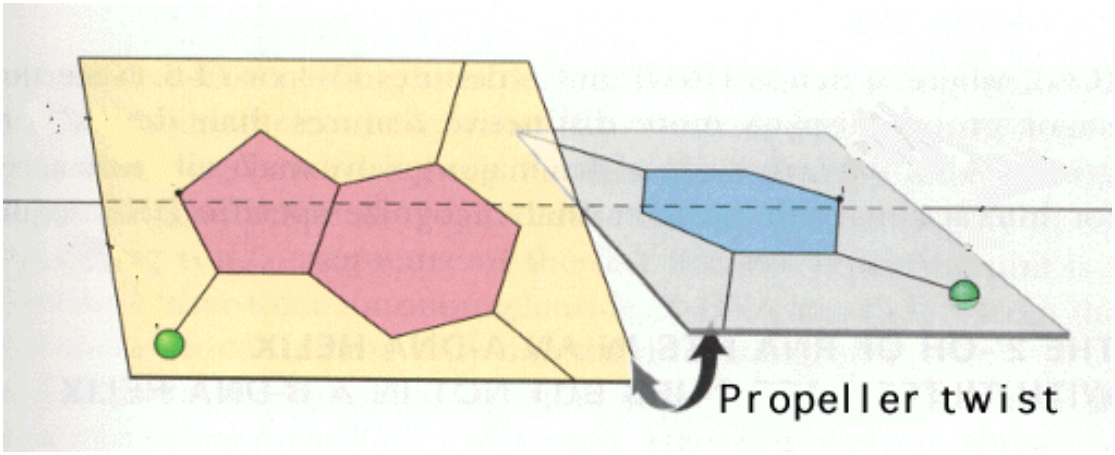


يترتب على قاعدة الازدواج القاعدي ان تكون كل من نسبة A الى T ونسبة G الى C متساوية في كل جزيئة الدنا، إلا إن نسبة (A+T) الى نسبة (C+G) تكون مختلفة بين جزيئات الدنا. تكون نسبة (A+T) اعلى من نسبة (G+C) في الحيوانات والنباتات الراقية وتكون هذه النسبة مختلفة في البكتريا والنباتات الواطئة. وتعد نسبة (A+T) الى نسبة (C+G) ذات أهمية تشخيصية في تصنيف الكائنات حسب درجة القرب والبعد لهذه النسبة.

من الصفات المهمة لجزيئة الدنا هو موقع ذرات الهيدروجين في البيورين والبايرميدين حيث تتحرك ذرات الهيدروجين بين ذرات الاوكسجين والنيتروجين المكونة للاصرة بين شؤيطي الحلزون بحركة تسمى **التبادل التوتوموري Tautomeric shift** ، تساهم هذه الحركة في المحافظة على اواصر هيدروجينية مستقرة جدا وهذا بدوره يساهم في استقرار جزيئة الدنا وضمان حدوث الازدواج بصورة صحيحة بين القواعد المتكاملة وبالتالي ضمان تكامل الشريطين مع بعضهما.



إن القاعديتن المتكاملتين (البورين والبايرميدين) لا تقعان على نفس المستوي السطحي وإنما تظهر ما يسمى بالالتواء المروحي propeller twist الذي يساهم في استقرار تركيب الشكل الحلزوني وان زاوية الالتواء هذه تتباين وقد تصل إلى ٤٥ درجة وذلك عن طريق حركتهما بشكل متعاكس واحدة إلى الأعلى والأخرى إلى الأسفل وبذلك تساهم في استقرار الشريط الحلزوني .



تقاس الأوزان الجزيئية للدنا بالدالتون Dalton وان معدل الوزن الجزئيئ لزوج من النيوكليوتيدات والذي يسمى بالزوج القاعدي Base pair (bp) هو 660 دالتون، اما طولها فيقاس بعدد الازواج القاعدية ، فطول قطعة الدنا المكونة من 10000 زوج قاعدي هي 10 كيلو زوج قاعدي 10Kpb حين ان الكيلو زوج قاعدي يساوي 1000 زوج قاعدي.

عند تعرض الحلزون المزدوج الى درجات حرارة عالية تقترب من ١٠٠ درجة مئوية تتكسر الأواصر الهيدروجينية بين القواعد النيتروجينية والتي تربط السلسلتان مع بعضهما ويبتعد الخيطان المتكاملان عن بعضهما وتسمى هذه العملية بالمسخ DNA Denaturation . وبما ان G ترتبط مع C بثلاث اواصر فان الحرارة اللازمة لفصل خيوط الدنا الغنية بـ (G+C) تكون اعلى من تلك الغنية بـ (A+T). لخيوط الدنا القدرة على إعادة الارتباط عند التبريد البطيء لمحلول الدنا الممسوخ حيث تسمح هذه العملية بالتقاء الخيوط المفردة المتكاملة ثم ارتباطها معاً عن طريق تكوين الأواصر الهيدروجينية بين الأزواج القاعدية لإعادة تكوين الحلزون المزدوج. يمكن استغلال هذه العملية في تصنيع جزئيات دنا هجينة Hybrid DNA عن طريق التبريد البطيء لخليط خيوط الدنا الممسوخة المشتقة من نوعين مختلفين من الكائنات الحية ويمكن بهذا الاستفادة من هذه التقنية في إيجاد التشابه الوراثي بين المجاميع التصنيفية المختلفة .

تكون جزئية الـ RNA مشابهة لجزيئة الـ DNA باستثناء بعض الاختلافات وهي :-

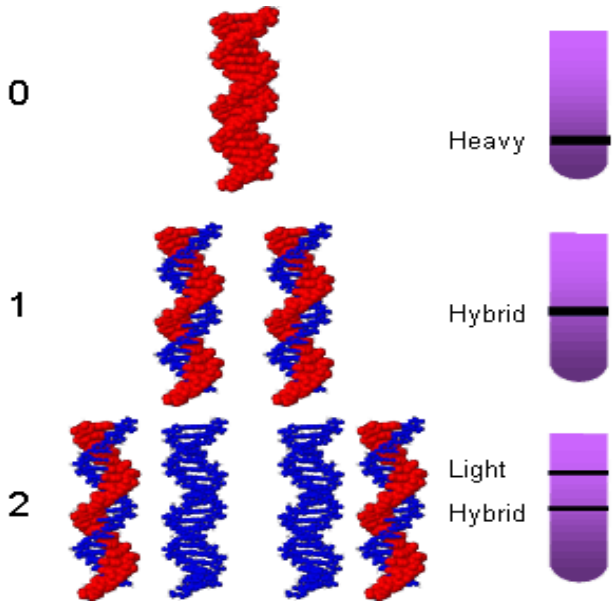
١- السكر الخماسي الذي يدخل في تركيب الـ RNA هو من النوع السكر الرايبوزي.
٢- يدخل اليوراسيل في تركيب النيوكليوتيدات بدلا من الثايمين.
٣- تكون جزيئة الـ RNA بصورة عامة على شكل خيوط منفردة .

تضاعف الدنا DNA Replication

من اجل ان تقوم جزيئه الدنا بنقل المعلومات الوراثية بصورة دقيقة لا بد لها ان تتضاعف بصورة غير قابلة للخطأ وبشكل يؤمن حصول الجيل اللاحق على نفس الكمية والنوعية من المعلومات الوراثية الموجودة في الجيل السابق (الآباء). وقد قدم واطسن وكريك مقترحا لطريقة تضاعف الدنا بعد شهر واحد من تقديمهم للنموذج الحلزوني المزدوج لجزيئة الدنا ، تفترض هذه النظرية على ان خيطي الدنا الاصلي ينفصلان عن

بعضهما البعض في بداية عملية التضاعف ويكون كل خيط قالبا لتخليق خيط جديد مكمل للخيط الأصلي حسب قاعدة الازدواج القاعدي لينتج عن ذلك خيطان حلزونيان مشابهان للخيط الحلزوني الأصلي ، يتكون كل منهما من خيط ابوي قديم (ابوي) وأخر جديد (بنوي) . سُميت هذه الطريقة بطريقة التكرار شبه المحافظ Semi-conservative replication . وتم إثبات هذه الفرضية عن طريق تجربة قام بها العالمان مسيلسون وستال عام ١٩٥٨ والتي اكدت على ان جزيئات الدنا ذات الكثافات المختلفة تكون حزماً في مواقع مختلفة تتناسب مع كثافاتها عند طردها مركزيا بسرعة فائقة في محلول متدرج الكثافة.

تضمنت التجربة تنمية بكتريا *E. coli* في وسط زرعي حاوي على النظير الثقيل للنيتروجين (N^{15})كمصدر وحيد للنيتروجين وبهذا ستكون كل مكونات الخلية بما فيها الدنا الخلوي الحاوية على النيتروجين اثقل من تلك التي تحتوي على نيتروجين عادي (N^{14}) حيث يمن التفريق بينهما باستخدام الطرد المركزي بسرعة ٤٥ ألف دورة في الدقيقة لمدة ٤٨ ساعة في محلول متدرج الكثافة من مادة كلوريد السيزيوم CsCl . قام الباحثان بتنمية البكتريا ولعدة اجيال في وسط زرعي يحتوي على كلوريد الامونيوم الذي يدخل في تركيبه النيتروجين الثقيل N^{15} وبهذا ستكون جزيئات الدنا في جميع الخلايا من النوع الثقيل وقد كونت الدنا المعزول من هذه الخلايا بعد طردها مركزيا في محلول كلوريد السيزيوم حزمة واحدة في المكان المتوقع للدنا الحاوية على N^{15} . بعد ذلك تم نقل البكتريا الى وسط زرعي حاوي على النيتروجين N^{14} مصدر وحيد للنيتروجين وبعد الجيل الاول (عملية تكرار واحدة) وتم عزل الدنا من بكتريا الجيل الاول وتم طردها مركزيا فكونت حزمة واحدة في محلول كلوريد السيزيوم تتوسط كثافتها بين N^{14} و N^{15} مما يدل على ان احد خيطي الحلزون المزدوج يحتوي على N^{14} والخيط الاخر يحتوي على N^{15} ، وان الدنا المعزول من الجيل الثاني للبكتريا النامية على الوسط الحاوي على N^{14} قد كونت حزمتين الاولى (وتمثل نصف الكمية) ذات كثافة مماثلة للدنا الهجينة ($N^{15} - N^{14}$) في حين كانت الحزمة الثانية ذات كثافة مشابهة لكثافة الـ N^{14} اما الدنا المعزول من الجيل الثالث فقد كونت حزمتين غير متماثلتين في السُمك ، أظهرت الاولى والتي تمثل ٢٥% من كمية الدنا كثافة مماثلة للدنا الهجينة ($N^{15} - N^{14}$) اما الثانية وتمثل ٧٥% فكانت مشابهة لكثافة الدنا N^{14} ، اثبتت هذه التجربة وبصورة قاطعة نظرية التكرار شبه المحافظ في عملية تضاعف الدنا وان كل المادة الوراثية لكل الكائنات تتضاعف بهذه الطريقة .


0
Heavy
1
Hybrid
2
Light
Hybrid

اسم المحاضرة : تضاعف المادة الوراثية

رقم المحاضرة : الثالثة

المصادر :

7- Watson, J.D.; Baker, T.A,; Bell, S.P.; Gann, A. (2004). Molecular Biology of the Gene. 5th Ed. Pearson edution.

8- Clark, D. (2006). Molecular Biology Understanding the Genetic Revolution. Elsevier Inc.

9- Santos, D.M. (2011). Genetic Engineering, Recent Developments in application. Apple Academic press.

٤-عماش، هدى صالح مهدي.(١٩٩٤). مبادئ علم الحياة الجزيئي. كلية العلوم . جامعة بغداد.

٥-البكري ، غالب حمزة.(١٩٩٠). مبادئ الهندسة الوراثية. جامعة البصرة.

تضاعف الدنا Replication of DNA

تعد عملية تضاعف الدنا DNA Replication من العمليات المعقدة التي تجري داخل الخلية الحية لانها تتضمن العديد من الخطوات التي تعتمد كل منها على العديد من الانزيمات التي تكون عالية التخصص لاتمام هذه العلمية المهة جدا بالنسبة للخلية وتختلف عملية تضاعف الدنا في الخلايا حقيقة النواة عنها في الخلايا بدائية النواة تبعا لتعقيد المادة الوراثية.

أوضحت الدراسات التي اجريت على بكتريا *E.coli* ، ان تكرار الدنا هي عبارة عن عملية انزيمية معقدة تشترك فيها العديد من الانزيمات والعوامل المساعدة لتضاعف جزئية الدنا الحلقية. وتمر عملية التكرار بثلاث مراحل هي .

١-مرحلة بدأ التكرار Initiation of Replicaion

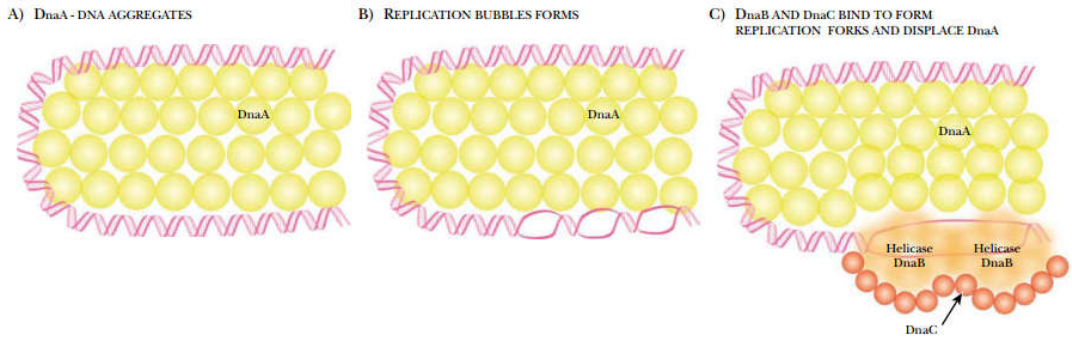
٢- مرحلة الاستطالة و التكرار Replication and Elongation

٣- مرحلة الانتهاء Termination

ان عملية بدأ تضاعف جزيئة الدنا هي ليست بالعملية العشوائية اذ يبدأ تكرار الكروموسوم البكتيري للـ *E.coli* دائما من نقطة ثابتة تدعى بمنشأ التكرار (اصل التضاعف) Origin of Replication (*ori* C) ، حيث ينفك خيطا الحلزون في هذه النقطة و يبتعدان عن بعضهما. تكون منطقة ori C مؤلفة من حوالي ٢٤٥ زوج قاعدي، تكون هذه المنطقة حاوية على منطقتين لتتابعات مكررة قصيرة Short Repeat sequences ، المنطقة الاولى مؤلفة من ٩ نيوكليوتيدات مكررة لخمسة مرات والثانية مؤلفة من ١٣ نيوكليوتيدة مكررة ثلاث مرات.

تكون المنطقة المؤلفة من ٩ نيوكلوتيدات هي موضع ارتباط بروتين يدعى Dna A يكون هذا البروتين مؤلف من ٣٠ وحدة ثانوية ترتبط مع بعضها البعض مكونة شكلا شبيه بالبرميل يرتبط مع المنطقة الاولى والثالثة والخامسة من التتابع المكرر (٩ نيوكليوتيدات). يكون ناتج هذا الارتباط حدوث فتحة في شريط الدنا (melts) في مناطق التكرار الثلاثة المؤلفة من ١٣ نيوكليوتيدة التي تكون غنية بـ A و T نتيجة ابتعاد خيطي الدنا عن بعضهما وتشير الدراسات إلى ان البروتين Dna A لا يملك فعالية انزيمية لاحداث تغيير في تركيب شريط الدنا وتحويله من شريط مزدوج إلى شريط مفرد وان عملية ابتعاد الشريطين عن بعضهما هو نتيجة للضغط الناتج من ارتباط البروتين مع الدنا.

يتم بعد ذلك ارتباط الدنا مع بروتين اخر هو Dna C في منطقة انفتاح الشريط والذي يعمل على تهيئة هذه المنطقة للارتباط ببروتين اخر هو انزيم Helicase والذي يعرف كذلك بـ Dna B



يقوم انزيم Helicase بفك الازدواج القاعدي لخيطي الدنا الابوية وتحويلها الى خيوط منفردة single strand وتبقى خيوط الدنا منفردة ولا تعود الى الازدواج نتيجة ارتباطها ببروتينات تسمى Single Strand Binding proteins التي تعمل على المحافظة على خيوط الدنا بشكل منفرد غير مزدوج .

يتكون نتيجة فعالية انزيم Helicase انفتاح في شريطي الحلزون المزدوج مكونة تركيب يشبه الشوكة يسمى بشوكة التضاعف Replication Fork وتسبق شوكة التضاعف عملية تحويل خيطي الدنا الحلزوني الى خيطين متوازيين نتيجة لفعالية انزيم Gyrase لتسهيل مهمة انزيم Helicase. تنتهي مرحة بدء التكرار بتكوين شوكة التضاعف لتبدأ بعدها مرحلة الاستطالة .

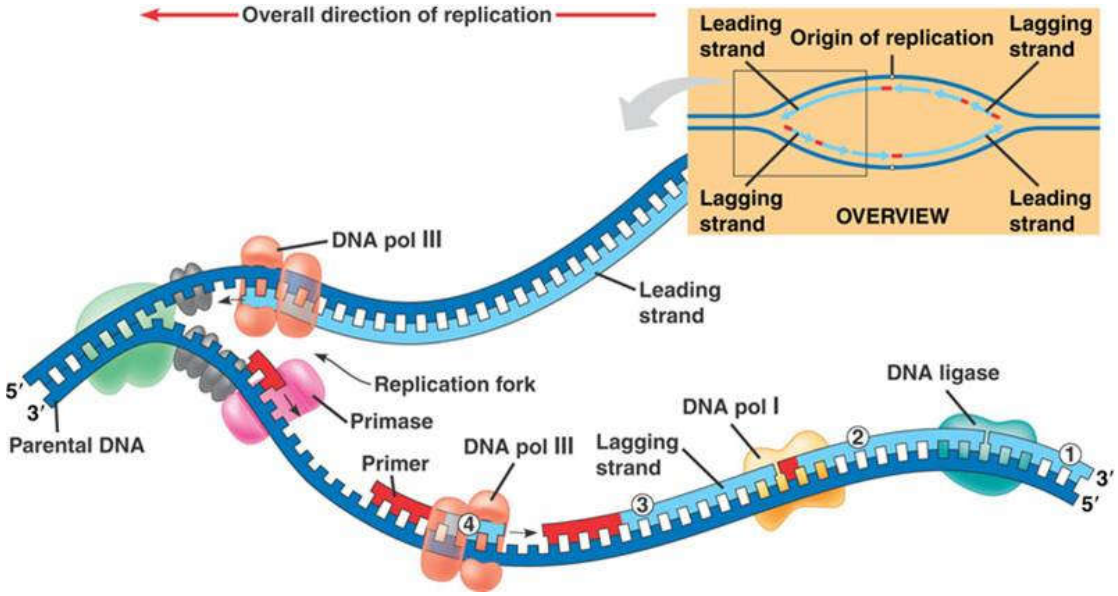
يمتلك الكروموسوم البكتيري منشأ تكرار واحد وتسمى عملية التكرار بالتكرار ثنائي الاتجاه Bidirectional Replication وذلك لحدوثه في اتجاهين مختلفين حيث يتم تخليق ٥٠% من الدنا الجديدة في كل اتجاه. اما في الخلايا حقيقة النواة فيلاحظ وجود اكثر من منشأ للتكرار عى سبيل المثال تملك الخمائر ٣٠٠ منشا للتكرار في حين يحتوي الانسان على ٢٠ الف منشأ للتكرار

مرحلة الاستطالة

يكون انزيم بلمرة الدنا DNA polymerase III هو الانزيم الرئيسي لعملية الاستطالة حيث يقوم ببناء الخيوط البنوية الجديدة اعتمادا على الخيوط الابوية المتباعدة والتي يستخدمها كقالب Tmplate لبناء الخيوط البنوية الجديدة حسب نظرية الازدواج القاعدي. يقوم انزيم DNA polymerase III ببناء خيوط الدنا الجديدة باتجاه 5' 3' فقط ولكن لا يمكن ان يبدأ هذا الانزيم عمله الا اذا توفرت نهاية 3-OH حرة لكي يبدأ هذا الانزيم بعمله في اضافة القواعد النيتروجينية لذا يقوم انزيم يسمى primase وهو من انزيمات RNA Polymerase ، بتخلق خيط قصير من RNA مؤلف من ٥-١٠ نيوكليوتيدات ذي تتابع مكمل لخيط الدنا الابوي تعمل كبوادئ primers لبدء فعالية انزيم بلمرة الدنا ، ترتبط قطعة RNAعن طريق الأواصر الهيدروجينية ببداية الخيط الابوي مكونة بادئا ذي نهاية3-OH حرة تستعمل لإضافة النيوكليوتيدات وتخليق الخيط البنوي الجديد.

تحدث الاستطالة بالاتجاه '5 ←— '3 على طول احد الخيطين الابويين مكونة خيط بنوي مستمر يسمى خيط البنوي القائد leading daughter strand . اما في الخيط الابوي الثاني فلا يمكن حدوث الاستطالة بهذه الصورة المستمرة لان الخيط الابوي يكون باتجاه '3 —← '5 ، لذا تتكون قطع دنا صغيرة متعاقبة مكونة ما يسمى بالخيط البنوي المتباطئ lagging daughter strand ، وكلما تباعد الخيطان الأبويان استمرت عملية استطالة الخيط القائد في حين تبدء عملية تخليق بادئ جديد مقابل الخيط السفلي لتكوين قطع دنا صغيرة اخرى . يطلق على القطع الصغيرة على طول الخيط المتباطئ اسم قطع اوكزاكي Okazaki fragment نسبة الى مكتشفها العالم الياباني Reiji Okazaki ويبلغ طول القطعة الواحدة ١٠٠٠ – ٢٠٠٠ نيوكليوتيدة في بدائية النواة في حين يكون طولها اقل من ٢٠٠ نيكليوتيدة في الخلايا حقيقية النواة .

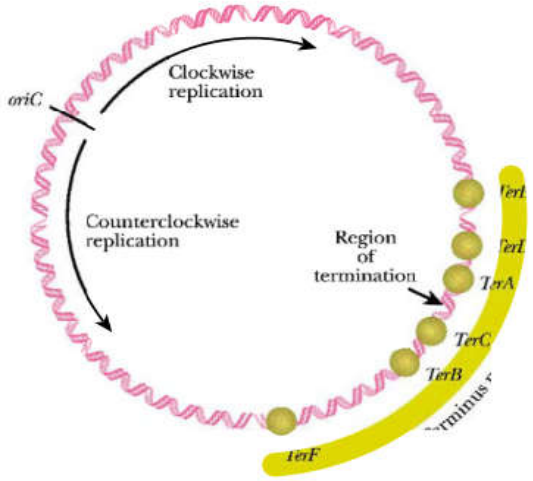
تستمر عملية التكرار لتكوين خيطين جديدين احدهما مستمر ويقابل الخيط الابوي العلوي والاخر عبارة عن قطع دنا صغيرة متتالية ترتبط كل واحدة منها بقطعة البادئ (RNA).بعدها يبدء انزيم اخر هو DNA Polymerase I بإضافة النيوكليوتيدات الى قطع وكزاكي ويقوم ايضاً بإزالة بوادئ ال RNA المرتبطة مع شريط الدنا وملئ الفراغ الناتج من عملية ازالة قطع RNA وذلك لان انزيم DNA polymerase III لا يمتلك فعالية لازالة القواعدة النيتروجينية للبوادئ المتكونة من RNA، بعد ذلك يأتي انزيم DNA Ligase ويعمل على ربط قطع الدنا المتكونة ،حيث يقوم هذا الانزيم بربط القواعد النيتروجينية بواسطة الاصرة الفوسفاتية ثنائية الاستر مما يؤدي الى تكوين خيط بنوي مستمر على طول الخيط الابوي السفلي.

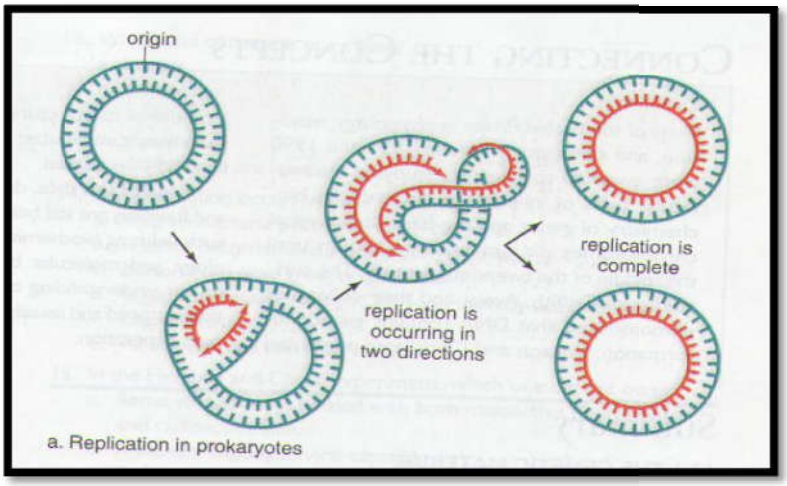


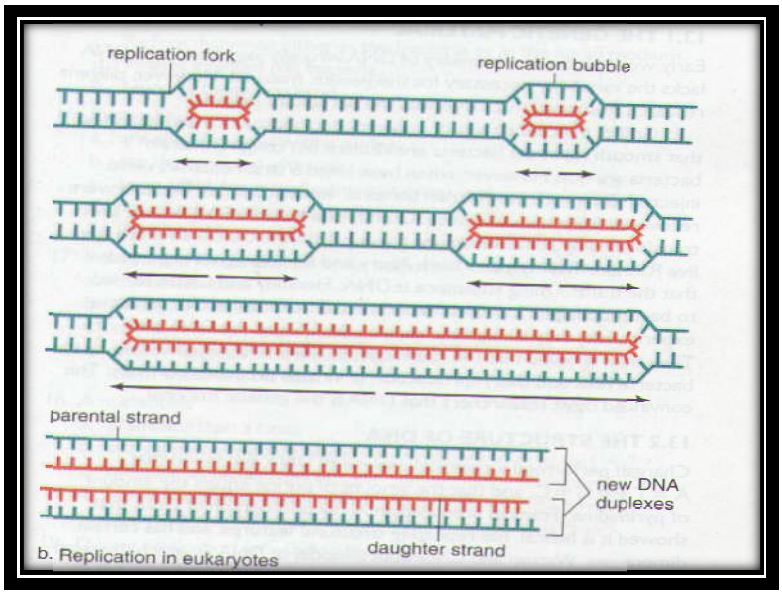
مرحلة الانتهاء

تنهي عملية التضاعف في نقطة محددة تقابل منشأ التكرار تسمى Terminator تصل اليها شوكة التضاعف من كلا الاتجاهين في نفس الوقت لان التضاعف يتم باتجاهين مختلفين. تتكون منطقة الانتهاء من سبعة تتابعات مكررة محددة تسمى Terminator sequences

تكون هذة التتابعات نقاط ارتباط مع بروتين يسمى tus Protein . ثلاثة من هذه التتابعات تكون على يمين نقطة الانتهاء تسمى (Ter A , Ter E , Ter D) وثلاثة على اتجاه اليسار هي (Ter F , Ter B , TerC) . يرتبط البروتين tus مع هذه التتابعات بشكل يسمح بمرور شوكة التضاعف باتجاه واحد فقط ويمنع شوكة التضاعف الاخرى من المرور بالاتجاه المعاكس ويتحدد هذا بطريقة الاتباط جزئية البروتين مع الشريط المزدوج فيسمح لانزيم Helicase بفتح الشريط المزدوج في منطقة الارتباط بالاتجاه المحدد فقط . وعند اكتمال التقاء شوكتي التكرار في نقطة التضاعف النهائية ينفصل الشريطان البنويان بواسطة فعالية انزيم Topoisomerase IV .







انزيمات تضاعف الدنا في الخلايا حقيقية النواة

درست عملية تضاعف الدنا في الخلايا حقيقية النواة وظهرت ان هناك انواع عديدة من انزيمات البلمرة التي تشترك في هذه اتمام هذه العملية التي تكون أكثر تعقيدا منها في بدائية النواة. ومن أهم هذه الإنزيمات هي:

١- DNA polymerase α : يقوم هذا الانزيم ببدء عملية تضاعف الدنا في حقيقة النواة حيث يقوم ببناء قطعة من RNA بطول ٥ نيوكليوتيدات (وفي بعض المصادر ١٠ نيوكليوتيدات) ومن ثم يبدأ باستطالة هذه القطعة بإضافة قطعة دنا بطول ٥ إلى ١٠ نيوكليوتيدات وبعدها ينفصل عن الشريط الأبوي لعدم امتلاك هذا الانزيم العوامل التي تجعله أكثر ثباتية على الشريط الابوي فيحل محله انزيم البلمرة الرئيسي ببناء الاشرطة البنوية الجديدة . تسمى القطعة التي يتم إضافتها من قبل انزيم DNA polymerase α بـ iDNA (initiator DNA) . هناك اعتقاد ان انزيم primase الذي يقوم بإضافة قطعة RNA هو متحد مع انزيم بلمرة الدنا الفا .

٢- DNA polymerase δ : هو انزيم البلمرة الرئيسي في الخلايا حقيقة النواة ويقابل الانزيم DNA polymerase III في بدائية النواة ، حيث يكون لهذا الانزيم القدرة على بناء الاشرطة البنوية الحديثة في كلا الاتجاهين وبثباتية عالية على القالب الابوي كما ان له القدرة على القراءة الصحيحة proofreading للاشرطة الابوية ومن ثم الاضافات الصحيحة للنيوكليوتيدات الجديدة .

٣- DNA polymerase γ : هو انزيم البملرة الرئيسي لتضاعف الدنا في المايتوكوندريا

٤- DNA polymerase β : يلعب دورا رئيسا في الحفاظ على استقرار الدنا .

٥- DNA polymerase ε : يلعب دورا رئيسيا في اصلاح الدنا لقدرته على القراءة الصحيحة ومل الفراغات الناتجة من حذف قطع الـ RNA المضافة في بداية التضاعف

اسم المحاضرة : الجينات Genes

رقم المحاضرة : الرابعة

المصادر :

10- Watson, J.D.; Baker, T.A,; Bell, S.P.; Gann, A. (2004). Molecular Biology of the Gene. 5th Ed. Pearson edution.

11- Clark, D. (2006). Molecular Biology Understanding the Genetic Revolution. Elsevier Inc.

12- Santos, D.M. (2011). Genetic Engineering, Recent Developments in application. Apple Academic press.

٤-عماش، هدى صالح مهدي.(١٩٩٤). مبادئ علم الحياة الجزيئي. كلية العلوم . جامعة بغداد.

٥-البكري ، غالب حمزة.(١٩٩٠). مبادئ الهندسة الوراثية. جامعة البصرة.

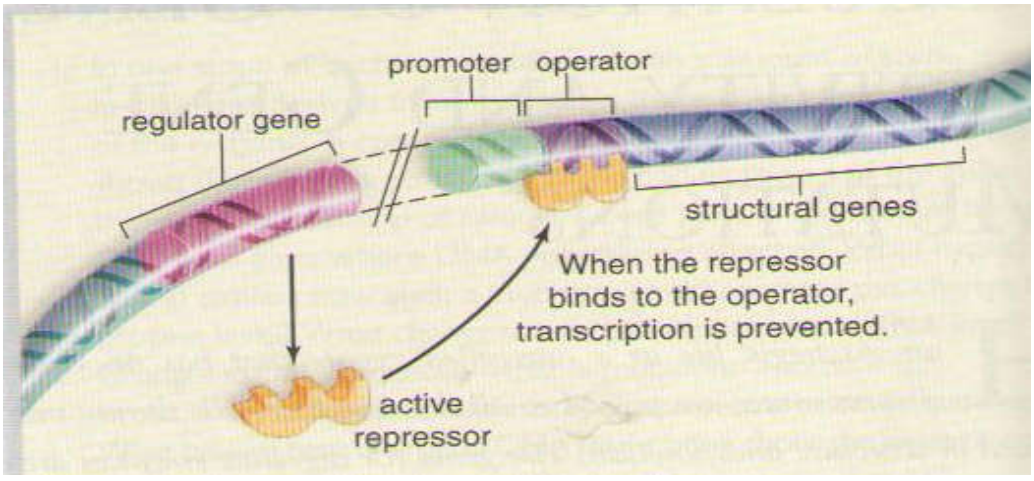
الجينات Gene

الجينات عبارة عن تتابعات معينة من النيوكليوتيدات (١٠٠٠ نيوكليوتيدة عل الاقل) الموجودة على جزيئة الدنا وهي تمثل الوحدة الوراثية للكائن الحي . ويمكن تحديد الجين على أساس وظيفته حيث يكون الناتج النهائي لكل جين تتابع معين من الأحماض الامينية ، اي عبارة عن بروتين ذو وظيفة محددة . هناك نوعان من الجينات هي الجينات البنائية structural genes والتي تمثل ٩٥% من مجموع الجينات والجينات المُنظِمة Regulator genes وهي الجينات التي تنظم عمل الجينات البنائية من خلال تكوين البروتينات المُنظِمة Regulator proteins .

مصطلح Gene استخدم لاول مرة في اللغة الانكليزية عام ١٩١١ وهي كلمة مشتقة من كلمة ألمانية pangen وهذا المصطلح أصله جاء من خلال اللغة الفرنسية القديمة ومن الحضارة الاغريقية من كلمة Genos بمعنى Birth .

الجينات البنائية Structural genes

تشكل حوالي ٩٥% من الجينات المحمولة على الكروموسوم وهو الذي يحدد تتابع الأحماض الامينية للبروتين . يرافق كل جين تركيبي تتابعات من النيوكليوتيدات تسمى العناصر المسيطرة Controlling elements لها أهمية في تنظيم عملية الاستنساخ TRANSCRIPTION من خلال تفاعلها مع انزيم RNA Polymerase والبروتينات المنظمة الاخرى .



العوامل المسيطرة المرتبطة بالجينات البنائية هي

الحفاز Promoter :- عبارة عن تتابع من النيوكليوتيدات يقع في بداية الجين وهو الجزء الذي يرتبط به انزيم RNA Polymerase لبدء عملية الاستنساخ وتمتاز هذه المنطقة بأنها غنية بتتابعات T=A . لقد بينت الدراسات وجود ثلاثة مناطق مهمة في الحفاز هي :-

١- منطقة -٣٥ (region 35-) وتتالف غالبا من التتابع TTGACA
٢- منطقة -١٠ (region 10-) **وتسمى صندوق بريبنو** Pribnow Box وتتالف من التتابع TATAAT
٣- منطقة -١

وتسمى هذه المنطقة بـ upstream وهي المنطقة التي لا يتم التشفير لها ولا استنساخها من قبل انزيم RNA polymerase وتسمى المنطقة التي يبدأ منها الاستنساخ بـ Downstream والتي يرمز لها بـ (+١و +٢ و +٣ .....). وتكون منطقة بدء الاستنساخ من البيورينات في كل الجينات وتكون اشارة البدء هي CAT او CGT حيث تكون القواعد A و G هي +١.

تكمن أهمية منطقة الحفاز في كونها تمثل موقع ارتباط إنزيم RNA Polymerase بالحفاز لبدأ عملية الاستنساخ حيث يتعرف الإنزيم على الحفاز بمنطقة -٣٥ ويبدأ بالارتباط بالدنا وفك شريطي الدنا عند المنطقة -١٠ وان حدوث طفرات في هذه المناطق يؤدي إلى إحداث تغيير في قواعد هاتين المنطقتين مما يؤدي إلى التأثير بشكل كبير على الاستنساخ.

أما في الكائنات حقيقية النواة فأن الحفاز يتكون من منطقة واحدة غنية بـ T=A تسمى TATA box او يطلق عليه اسم Goldberg Hogness box حيث يرتبط إنزيم بوليمريز الرنا في الكائنات حقيقية النواة بهذه التتابعات لبدأ عملية الاستنساخ .

المشغل Operator : - تتابع قصير من الدنا يقع بين الحفاز والجين البنائي، يرتبط عمل المشغل عن طريق ارتباط البروتين المُنظِم به و بالتالي يعمل على منع عملية الاستنساخ للجين (منع تكوين mRNA) .تتميز هذه المنطقة بوجود تعاقبات معكوسة تساهم في اعطاء المشغل مظهر متناظر ، هذا التناظر يسمح للبروتين الكابح المؤلف من وحدتين متناظرتين من الاتحاد في وقت واحد مع المشغل. حدوث طفرات في هذه المنطقة يؤدي إلى عدم الاتباط البروتين الكابح مع المشغل.

الفاصل Terminator :- تتابع من النيوكليوتيدات ترتبط بنهاية الجين البنائي يعمل على اعلام انزيم RNA polymerase بانه تتابع الجين البنائي قد انتهت وانفصاله عن تتابع الدنا . تكون هذه المنطقة غنية بـ G≡C .

- **الاوبرون Operon** :

هو عبارة عن مجموعة من الجينات البنائية والتي تكون لها علاقة مع بعضها وتشترك جميعها بحفاز واحد وفاصل واحد وتستنسخ هذه الجينات مرة واحدة وعلى شكل نسخة طويلة من mRNA وتسمى Polycistronic mRNA والتي تترجم بعد ذلك الى بروتينات مختلفة تتحدد فعاليتها بالجينات البنائية المكونة للاوبرون في حين

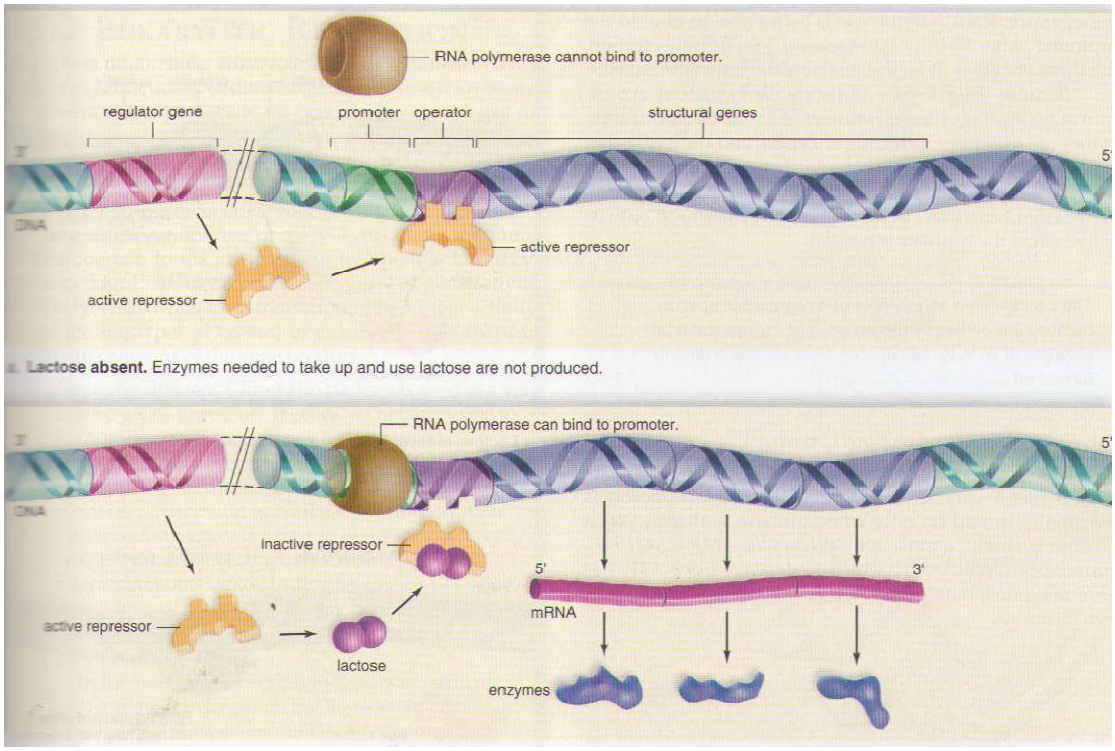
يسمى شريط mRNA الذي يشفر لبروتين واحد بـ monocistronic . عام ١٩٦١ اقترح جاكوب ومونود نظام الـ Operon لعمل الجينات في بكتريا *E. coli*

الاوبيرونات المحتثة Inducible Operon

وفيها لا تحدث عملية الاستنساخ ا لا إذا توفرت المادة التي تحثها وتعمل على تحفيزها وتسمى المحفزات **Inducer** . اي ان الاوبرون في الحالة الطبيعية يكون متوقف عن العمل نتيجة ارتباط البروتين المنُظم **Regulatory protein** بالمشغل **Operator** مما يؤدي الى منع ارتباط انزيم **RNA_Polymerase** بالحفاز ومن ثم إيقاف استنساخ الجين البنائي كما في اوبرون اللاكتوز (***lac* operon**) . وهذا النوع من الاوبرونات يحمل جينات غير ضرورية لبقاء الكائن الحي . وفي حالة وجود المحفز فسيتم الارتباط بين المحفز **Inducer** والبروتين المُنظم وينفصل هذا البروتين عن المشغل مما يسمح لإنزيم **RNA polymerase** بالارتباط بالحفاز وبدء عملية الاستنساخ

يتكون اوبرون اللاكتوز في بكتريا ***E. coli*** من ثلاث جينات بنائية هي ***lac* A, *lac* Y, *lac* Z** تقع متجاورة مع بعضها على كروموسوم البكتريا ، يكون الجين ***lac* Z** مسؤولا عن تحلل اللاكتوز من خلال التشفير لانتاج انزيم **β- galactosidase** الذي يعمل على تكسير اللاكتوز إلى الكلوكوز والكالكتوز ، عند نمو البكتريا في وسط حاوي على الكلوكوز يجعلها غير محتاجة لهذا الانزيم لانها تكتفي بالكلوكوز كمصدر وحيد للكاربون ولهذا يكون اوبرون اللاكتوز متوقفا عن العمل بواسطة البروتين المنظم الذي يرتبط بالمشغل المجاور للاوبرون مما يؤدي إلى منع ارتباط انزيم **RNA polymerase** بالحفاز ومن ثم ايقاف الاستنساخ للجينات البنائية للاوبرون.

وعند نقل الخلايا إلى وسط حاوي على سكر اللاكتوز كمصدر وحيد للكاربون فان جزيئات اللاكتوز الداخلة إلى الخلية سوف تقوم بتحفيز اوبرون اللاكتوز بالعمل عن طريق ارتباط بعض جزيئات سكر اللاكتوز مع البروتين المنظم وتحويله إلى بروتين غير فعال وفصله عن المشغل مما يفسح المجال لانزيم **RNA polymerase** من الارتباط بالحفاز وبدء عملية الاستنساخ. تستنسخ الجينات البنائية مرة واحدة لانتاج جزيئة **mRNA** تشفر للبروتينات الثلاثة. يستمر اوبرون اللاكتوز بالعمل طالما كانت هناك كمية من اللاكتوز يمكنها من الارتباط مع البروتين المنظم وتمنع ارتباطه بالمشغل .



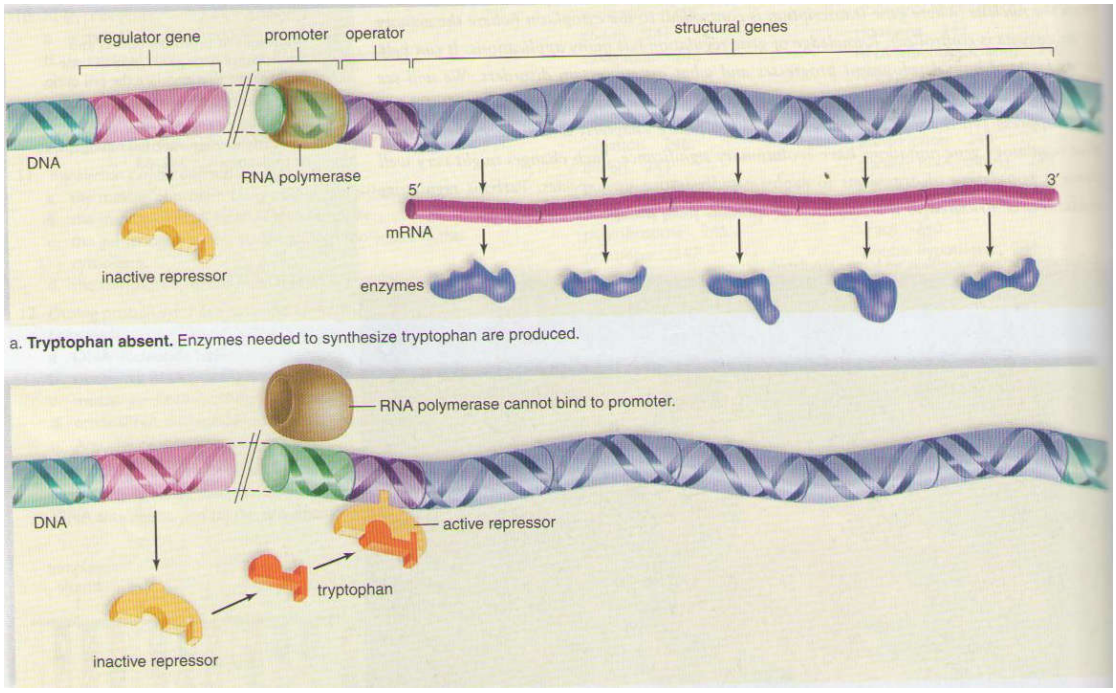
الاوبيرونات المعطلة Repressible operon

في هذا النوع من الاوبيرونات يكون في الحالة الاعتيادية مفتوح وعملية الاستنساخ مستمرة نتيجة الارتباط **RNA- polymerase** بالحفاز لان الجين المنظم يقوم بإنتاج بروتين غير قادر على الارتباط بالمشغل إلا في حالة توفر جزيئة تسمى بالمعطلات المشاركة **Co-repressible** التي تعمل على الارتباط بالبروتين المُنظم مكونة جزيئة ترتبط بالمشغل وبالتالي تمنع ارتباط **RNA- polymerase** بالحفاز وإيقاف عملية الاستنساخ . هذا النوع من الاوبيرونات يكون حامل الجينات ضرورية لبقاء الكائن الحي لان الخلايا تكون بحاجة ماسة لتلك البروتينات بصورة دائمة .ومثال على ذلك هو ***trp* Operon** .

يكون *trp* operon مؤلفا من خمسة جينات (*trp* A, *trp* B, *trp* C, *trp* D, *trp* E). تشترك في مراحل تخليق الحامض الاميني التربتوفان الذي يشارك في تخليق البروتينات في الخلية وعليه فان تخليق هذا الحامض الاميني يبقى مستمرا لاحتياج الخلية لهذا الحامض الاميني ولكن عندما يكون هناك تدفق للتبرتوفان في الاوساط الزرعية لنمو البكتريا فان البناء الحيوي لهذا الحامض الاميني يكون غير ضروري وعليه فان عملية

الاستنساخ سوف تتوقف لان عملية تكوين mRNA تتطلب طاقة عالية وعليه فان الخلية سوف توفر على نفسها البناء عندما تكون الانزيمات المشفرة لها غير مطلوبة .

يكون البروتين المنظم لهذا الاوبرون غير فعال ولا يتمكن من الارتباط بالمشغل، الا انه يتحول إلى بروتين منظم فعال عند ارتباطه مع الحامض الاميني التربتوفان وبعدها سيتمكن من الارتباط مع المشغل وايقاف عملية استنساخ الاوبرون والتشفير لبناء الحامض الاميني وعليه فان التربتوفان يعمل كـ كابح مشترك (معطلات مشتركة) corepressor ويستخدم كاشارة لغلق عملية الاستنساخ .



اسم المحاضرة : تركيب الـ RNA

رقم المحاضرة : الخامسة

المصادر :

13- Watson, J.D.; Baker, T.A,; Bell, S.P.; Gann, A. (2004). Molecular Biology of the Gene. 5th Ed. Pearson edution.

14- Clark, D. (2006). Molecular Biology Understanding the Genetic Revolution. Elsevier Inc.

15- Santos, D.M. (2011). Genetic Engineering, Recent Developments in application. Apple Academic press.

٤ـعماش، هدى صالح مهدي.(١٩٩٤). مبادئ علم الحياة الجزيئي. كلية العلوم . جامعة بغداد.

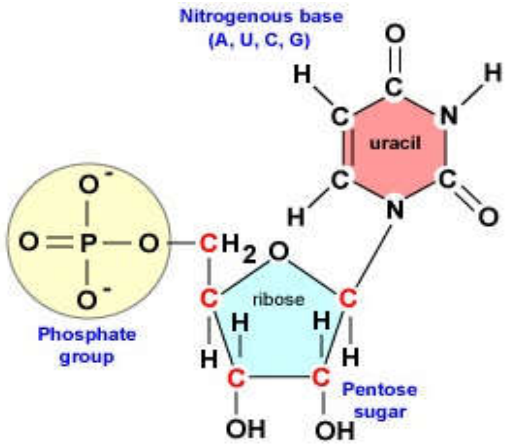
٥ـالبكري ، غالب حمزة.(١٩٩٠). مبادئ الهندسة الوراثية. جامعة البصرة.

تركيب الرنا Ribonucleic Acid RNA

بالاضافة إلى الحامض النووي الرايبوزي منقوص الاوكسيجين الحامل للمادة الوراثية يوجد هناك نوع من الحوامض النووية هو الحامض النووي الرايبوزي Ribonucleic acid والذي يسمى اختصارا RNA .

يكون تركيب الرنا مشابه إلى حد كبير للتركيب الكيماوي للدنا ، فهو عبارة عن جزيئة طويلة غير متفرعة حاوية على أربعة أنواع من النيوكليوتيدات هي الادنين والكوانين والسايتوسين واليوراسيل (U) ، ترتبط هذه الجزيئات مع بعضها بواسطة الاواصر الفوسفاتية ثنائية الاستر بين النهايات '5 و '3 ويختلف الرنا عن الدنا بالنقاط الآتية :-

١- استبدال اليوراسيل في الرنا بدلا من الثايمين الموجود في الدنا
٢- السكر الخماسي في جزيئة الدنا يكون مجرد من ذرة اوكسيجين المرتبطة بذرة الكاربون رقم '2 بينما يكون السكر الخماسي في الرنا سكر رايبوزي كامل ترتبط فيه مجموعة هيدروكسيل (OH) في نفس ذرة الكاربون .
٣- شريط الرنا يكون غالبا شريط منفرد في حين يكون شريط الدنا مزدوج .



تكون جزيئة الرنا جزيئة معقدة وتختلف في الشكل والتركيب حسب الوظيفة التي تؤديها داخل الخلية . وتوجد عدة انواع من جزيئات الرنا في الخلية اهمها :-

١- الرنا الرسول Messenger RNA (mRNA)

هي جزيئة الرنا التي تحمل المعلومات الوراثية من الدنا في النواة او المنطقة النووية إلى جهاز صنع البروتين في السايتوبلازم (الرايبوسومات) ، فهو يحمل الشفرة الوراثية من مصدرها إلى مكان التنفيذ . يكون mRNA حوالي ٤% من مجموع الرنا في الخلية ويكون على شكل جزيئات خيطية مفتوحة السلسلة بأطوال متباينة وذلك حسب طول الجين الذي يحمل المعلومات الوراثية والتي تم استنساخها بعملية الاستنساخ Transcription وعليه سوف يكون هناك اختلاف في الأوزان الجزيئية لشريط الرنا ويعتد على طول السلسلة الببتيدية التي يشفر لها وبواقع ٣ قواعد نيتروجينية لكل حامض اميني (الشفرة الثلاثية).

يتصل بجزيئة الرنا الرسولي تركيبان يدعى الأول بتعاقب القائد leader sequence وهو تسلسل معين من القواعد يتصل بالنهاية '5 والثاني يسمى بالتعاقب الذيلي tailer sequence

ويتصل بالنهاية '3 وتسمى هاتين المنطقتين بـ 5'-UTR و 3' – UTR على التوالي (UTR: Untranslated region) وتعني المنطقة التي يتم استنساخها ولا يتم ترجمتها من قبل الرايبوسومات إلى اي حامض اميني. ولكن اهمية هذه التعاقبات بانها تضمن قيام mRNA بوظيفته في نقل المعلومات بصورة صحيحة، وتختلف أطوال التعاقب القائد باختلاف الرنا الرسول داخل الخلية فعلى سبيل المثال يكون التعاقب القائد للرنا الرسول الذي يشفر لانزيم β-galactosidase في بكتريا *E. coli* بطول ٣٨ نيوكليوتيدة . في حين يكون طوال التعاقب القائد للرنا الرسول الذي يشفر للتربتوفان في نفس البكتريا مكون من ١٦٢ نيوكليوتيدة .

يختلف الرنا الرسول في الخلايا بدائية النواة عنه في حقيقة النواة ، فقد يشفر الرنا الرسول في كثير من الاحيان في البكتريا إلى اكثر من سلسلة ببتيدية واحدة كما في نظام الاوبرونات. اما في الخلايا حقيقة النواة فان الرنا الرسول سيتم استنساخه إلى رنا رسول اولي pre-mRNA لكونه حاوي على مقاطع غير مشفرة تسمى الانترونات يتم ازالتها لاحقا للحصول على خيط رنا رسول ناضج mature mRNA يخرج إلى السايتوبلازم لإكمال عملية الترجمة .

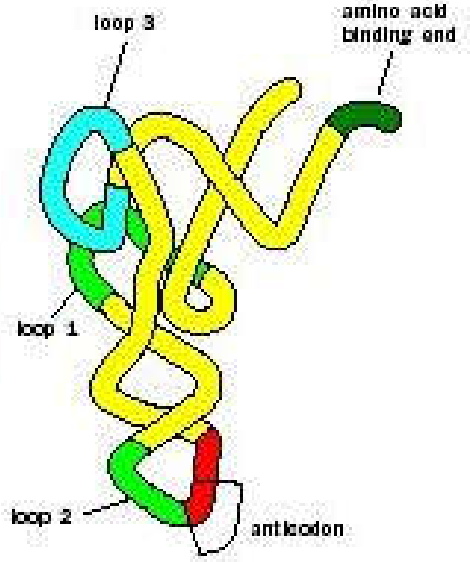
الرنا الناقل tRNA (Transfer RNA)

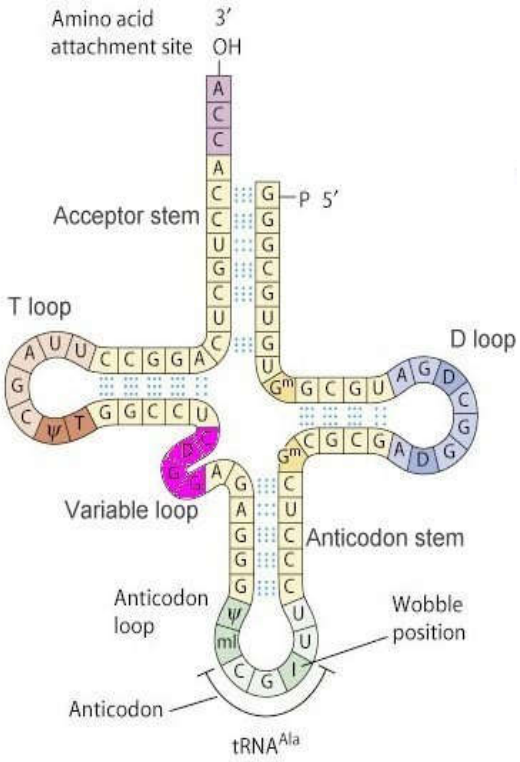
هي جزئية من الحامض النووي الرايبوزي تساهم في نقل الاحماض الامينية من مكان وجودها إلى ماكنة تصنيع البروتين (الرايبوسومات) ومن ثم ربطها مع بعضها لتكوين السلسلة الببتيدية التي يتكون منها البروتين. ويسمى الرنا الناقل كذلك باسم S-RNA (soluble or supernatant RNA) ويؤلف تقريبا ١٠% من مجموع الرنا داخل الخلية

الرنا الناقل عبارة عن جزيئة لها القدرة على الاتحاد مع mRNA بواسطة الاواصر الهيدروجينية ويختلف تركيبها باختلاف الاحماض الامينية التي ترتبط بها مما يسمح لكل نوع منها بالاتصال بشكل خاص مع الشفرة الخاصة بالحامض الاميني المحمول عليها وليس على شفرة اخرى مما يضمن سلامة ترجمة الشفرة الموجودة على الرنا الرسول .

يكون الرنا الناقل مكون من سلسلة مفردة من النيوكليوتيدات يتراوح طولها من ٧٤ إلى ٩٥ نيوكليوتيدة بوزن جزيئي ٢٥ إلى ٣٠ الف دالتون تتشكل على شكل يشبه ورقة البرسيم clover leaf وفيه توجد اذرع اربعة في نهاية ثلاثة منها حلقات loop وهي T-loop و D-loop و Anticodon loop . اضافة إلى إلى variable loop .

تكون نهاية 3'-OH هي موقع ارتباط الحامض الاميني بالناقل ويسمى tRNA اذا كان مرتبط بحامض اميني بالرنا الناقل المشحون charged tRNA ويكون التتابع 3'- ACC -5' هو نهاية الشريط للطرف 3' في حين تكون النهاية الاخرى وهي 5' تحمل مجموعة فوسفات وتنتهي بالقاعدة G وتكون اقصر من النهاية الاخرى.





ومما يميز جزيئة الرنا الناقل هو احتوائها على قواعد غير طبيعية تختلف عن القواعد الاخرى بوجود مجاميع مثيل اضافية (CH3) . وقد اثبتت التحاليل والتصوير باشعة X وجود اواصر هيدروجينية اخرى غير الاواصر التي تربط القواعد المتكاملة تعمل على التفاف وانحناء شكل ورقة البرسيم مما ينتج عنه تركيب ثلاثي يشبه حرف L .

عند تصنيع جزيئة الرنا الناقل فانه يتم التشفير لجزيئة كبيرة تسمى pre-tRNA يبلغ طولها ٦٤٠٠ نيوكليوتيدة تنشأ منها جزيئة الرنا الناقل اضافة إلى جزيئات rRNA .

الرنا الريبوزي rRNA

عند خروج الرنا الرسول حاملا معه الشفرة الوراثية المستنسخة من شريط الدنا فانه يتحد مع اجسام موجودة في السايتوبلازم تدعى الرايبوسومات Ribosomes وهي عبارة عن بروتينات متحدة مع نوع من جزيشات الرنا تدعى الرنا الرايبوزي rRNA ، ويوجدا هذا النوع بكثرة في الخلية وتبلغ نسبته حوالي ٨٠ – ٨٥ % من RNA الخلية وتزداد نسبته كلما كانت الخلايا نشطة في انتاج الروتينات مثل خلايا الكبد والبنكرياس. وتكون جزيئة الرايبوسوم في الخلية مؤلفة من وحدتين منفصلتين مختلفتين في الشكل والحجم تتحد مع بعض عند البدء بعملية تكوين البروتين وتنصلان عن بعضهما البعض بعد انتهاء عملية التصنيع . ويكون الرنا الرايبوزي داخل وحدات الرايبوسومات من سلاسل تختلف في الطول.

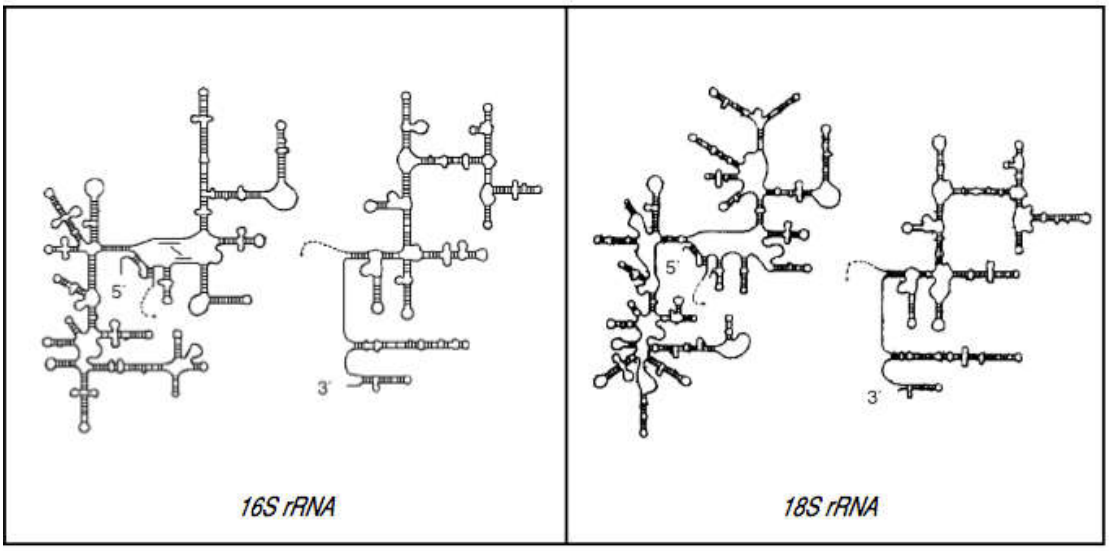
في رايبوسومات الخلايا البكتيرية يوجد نوعين من الرنا الرايبوزي الكبير ونوع ثالث صغير تكون متداخلة مع بعضها ومع البروتينات المكونة للرايبوسومات ولا يمكن الفصل بينها الا بتحطم الوحدات المكونة للرايبوسوم الحاوية لها . وتكون الانواع كالاتي

١- 16S rRNA يوجد في الوحدة التحتية الصغيرة small subunit للرايبوسوم ويتالف من ١٥٤٠ نيوكليوتيدة ويرتبط مع ٢١ بروتين (تسمى S21.....S3, S2,S1) ليكون الوحدة التحتية الصغيرة التي يبلغ وزنها الجزيئي حوالي ٩٠٠ كيلو دالتون ومعامل ترسيبها هي 30 S .

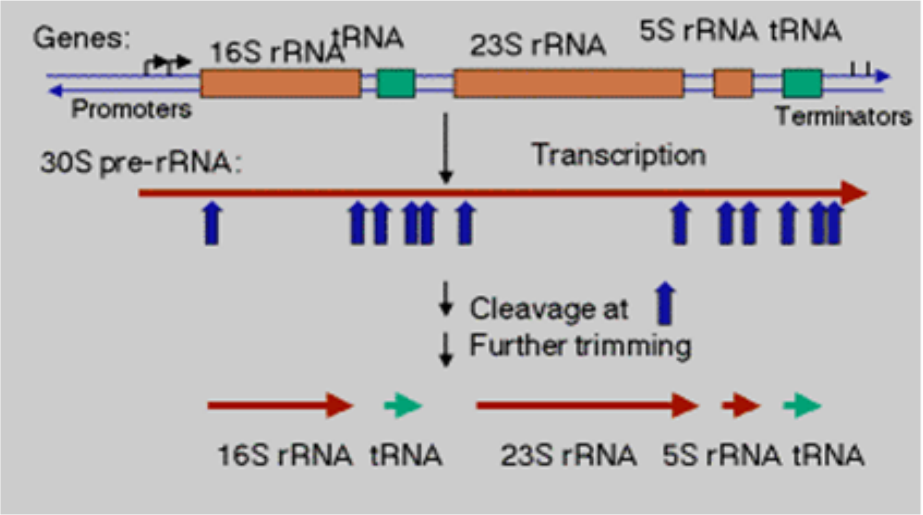
٢- 23S rRNA يوجد في الوحدة التحتية الكبيرة Large subunit للرايبوسوم ويتالف من ٢٩٠٠ نيوكليوتيدة ترتبط مع حوالي ٣٤ بروتين (تسمى L34 ..... ,L2,L1) لتؤلف الوحدة التحتية الكبيرة التي يبلغ وزنها الجزيئي ١٦٠٠ كيلو دالتون ومعامل الترسيب لها هو 50 S .

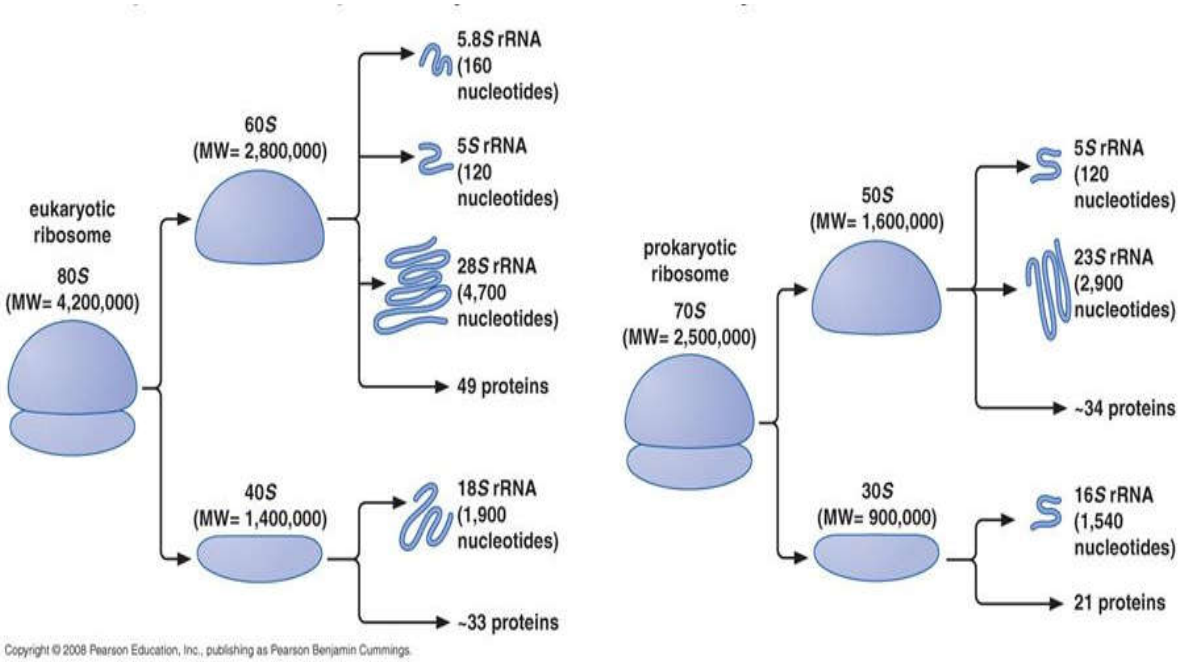
٣- 5 s rRNA ويوجد في الوحدة التحتية الكبيرة للرايبوسوم ويتالف من ١٢٠ نيوكليوتيدة

وتكون هذه الانواع عبارة عن جزيئات منفردة الشريط تحتوي على اذرع تتباين في اطوالها وتمثل مناطق ازدواج القواعد المتكاملة



يتم تكوين جزيئات الرنا الرايبوزي من التشفير لجزيئة كبيرة تسمى pre rRNA مع جزيئة الرنا الناقل tRNA يبلغ حجمها ٦٤٠٠ نيوكليوتيدة تنفصل لاحقا إلى انواع الرنا الرايبوزي المختلفة بفعل انزيمات ribonucleases





Copyright © 2008 Pearson Education, Inc., publishing as Pearson Benjamin Cummings.

اسم المحاضرة : التعبير الجيني- الاستنساخ

رقم المحاضرة : السادسة

المصادر :

16- Watson, J.D.; Baker, T.A,; Bell, S.P.; Gann, A. (2004). Molecular Biology of the Gene. 5th Ed. Pearson edution.

17- Clark, D. (2006). Molecular Biology Understanding the Genetic Revolution. Elsevier Inc.

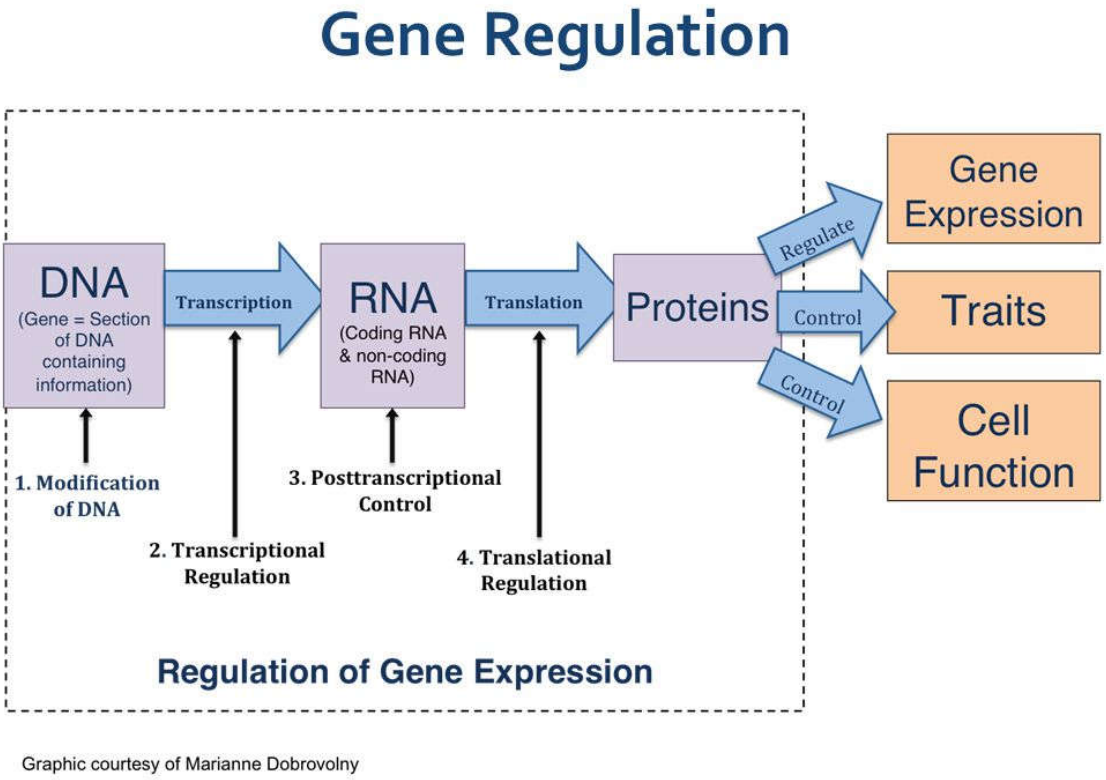
18- Santos, D.M. (2011). Genetic Engineering, Recent Developments in application. Apple Academic press.

٤-عماش، هدى صالح مهدي.(١٩٩٤). مبادئ علم الحياة الجزيئي. كلية العلوم . جامعة بغداد.

٥-البكري ، غالب حمزة.(١٩٩٠). مبادئ الهندسة الوراثية. جامعة البصرة.

التعبير الجيني Gene Expression

هي عملية تحويل المعلومات الوراثية المخزونة في الجين على شكل تتابعات من النيوكليوتيدات الى بروتين فعال ذو صفات محددة من خلال عمليتي الاستنساخ Transcription والترجمة Translation. تستنسخ المعلومات الوراثية في الدنا الى mRNA بواسطة انزيم RNA Polymerase وتتم ترجمة المعلومات من شريط mRNA الى بروتين بواسطة الريبوسومات. كما تشمل هذه العملية عددا من عمليات التحوير على البروتين الناتج عن الترجمة وذلك لاعطائه شكله النهائي الفعال.

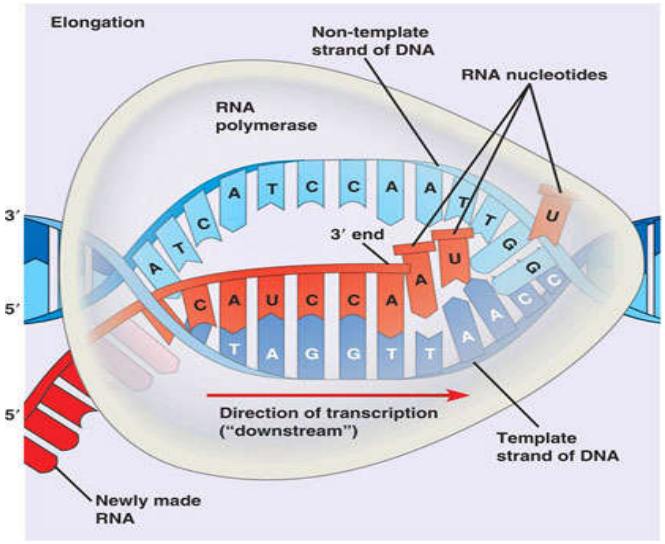


Graphic courtesy of Marianne Dobrovolny

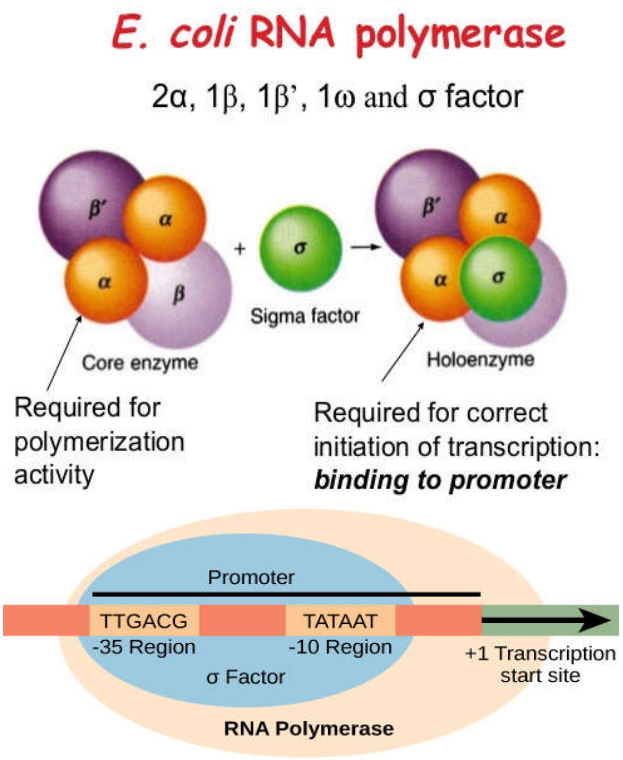
الاستنساخ Transcription

وهو عملية سماح الجينات بتحويل شريط الدنا الى شريط mRNA مع بقاء الجينات على الكروموسوم من دون تغير لتؤمن عملية تكرارها وانتقالها الى الجيل الثاني . حيث يتباعد خيطي الدنا في بداية عميلة الاستنساخ حيث يستخدم احد شريطي الدنا كقالب ويقوم انزيم RNA Polymerase باستنساخ الجين البنائي الى شريط منفرد من mRNA في عملية مشابهة لعملية تكرار الدنا وذلك من خلال اضافته للنيوكليوتيدات إلى خيط mRNA المتكون مستخدما احد خيطي الحلزون قالبا للتخليق وحسب قاعدة الازدواج القاعدي ولكن الاختلاف يكون باضافة اليوراسيل بدولا من الثايمين مقابل كل ادنين في قالب الدنا

تتم عملية الاستنساخ الدنا في شريط **mRNA** باتجاه **5** ←——— **3'** . شريط الدنا الذي يتم يكون حامل للشفرة الوراثية هو الشريط الحساس **sense strand** والخيط المقابل يسمى بـ **anti sense strand**. الذي يكون قالبا للشريط الحساس. ويتم الاستنساخ بمعدل (٤٠-٥٠) نيوكليوتيدة في الثانية الواحدة وتنتهي عملية الاستنساخ عند وصول إنزيم RNA Polymerase الى منطقة الفاصل او نهاية الجين . تتشابه عملية تكوين **mRNA** وعملية تكرار الدنا مع وجود بعض الفروقات بينهما.

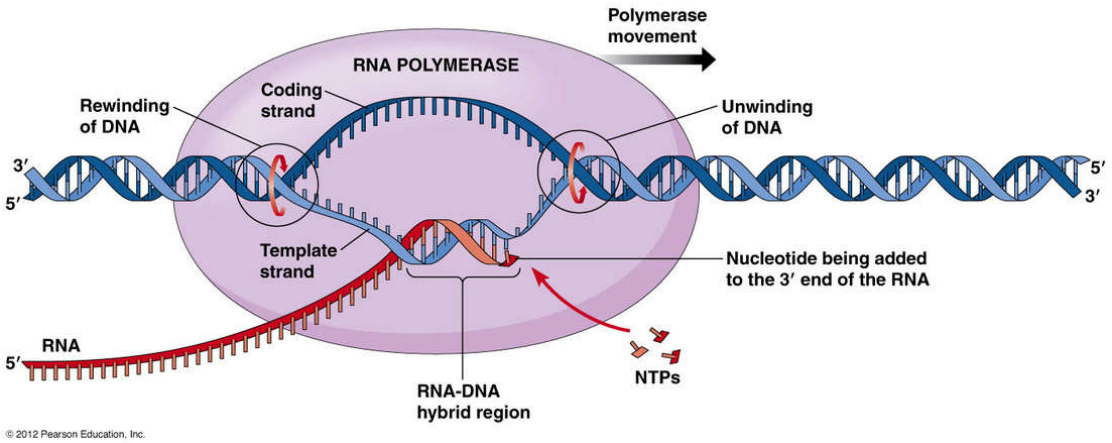


تكون جزيئة انزيم **RNA polymerase** معقدة التركيب، وتكون صيغته الفعالة بشكل يسمى بـ **Holoenzyme** وتحتوي على خمس سلاسل ببتيدية هي : بيتا **β** وبيتاَ **β'** وسلسلتين الفا **2 α** وسكما **σ** و اوميغا **Ω** . تتجمع مع بعضها باواصر ثانوية ، ويكون وزنه الجزيئي ٤٥٠ الف دالتون. تتم عملية الاستنساخ بتعرف إنزيم بوليميريز الرنا بالتعرف على تعاقب معين هو الـ **promoter** والجزء الذي يقوم بالتعرف على البوروموتر الصحيح هو الجزئية سيكما اذ بغيابه يتم التعرف على تعاقب غير صحيح من الدنا ويكون ارتباط الانزيم بالدنا ضعيف مما يؤدي الى عدم استنساخ الجين بشكل صحيح. يبدأ اتحاد إنزيم بوليميريز الرنا بالحلزون المزدوج من منطقة -٣٥ ويبدا الانزيم بفتح شريط الدنا من منطقة -١٠ ويبدا عملية الاستنساخ من منطقة (+١) . يغطي ارتباط انزيم بلمرة الرنا ٦٠ زوج قاعدي من شريط **DNA** ويكون حجم المنطقة التي يكون فيها شريطي الدنا متباعدين عن بعضهما (شريط منفرد) تبلغ ١٧ زوج قاعدي اللازمة لاتمام عملية الاستنساخ وتسمى هذه المنطقة ببالون الاستنساخ **Transcription Bubble** ، ومما يساعد على الانفتاح ان منطقة -١٠ تكون غنية بالقواعد **AT** .

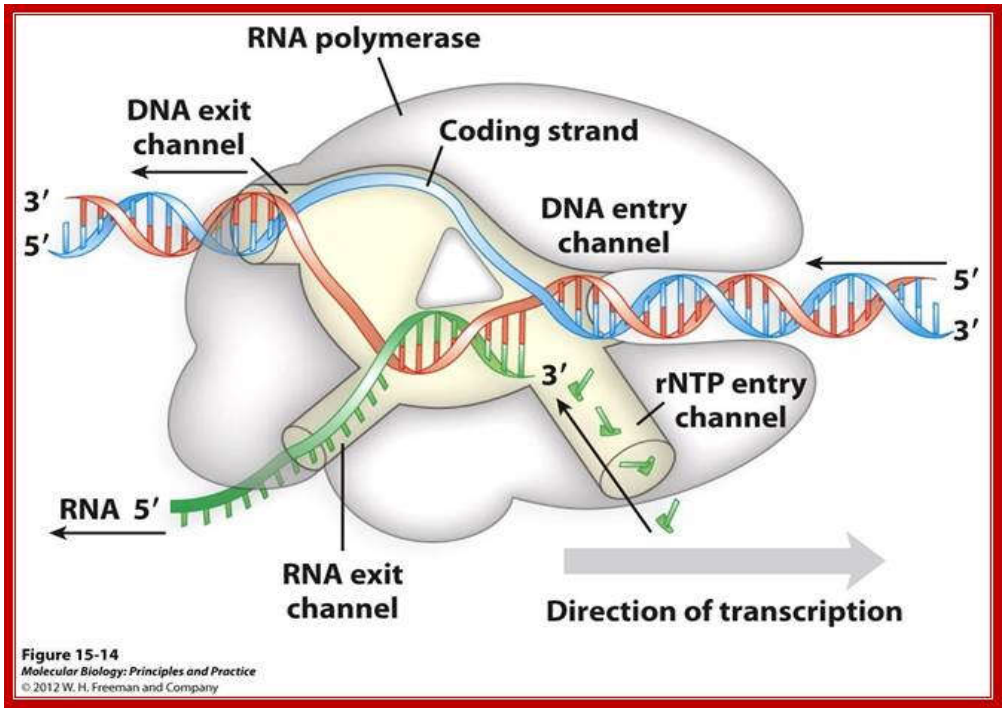


يستطيع انزيم بلمرة الرنا من اضافة النيوكليوتيدات الاولى إلى القالب بدون استخدام او الحاجة إلى البوادئ حيث يقوم باضافة اول نيوكليوتيدين وربطهما بالاصرة الفوسفاتية ثنائية الايستر **phosphodiester bond** . بعدها اول ٩ نيوكليوتيدات تتم اضافتها إلى شريط **mRNA** تتم بدون ان يتحرك الانزيم على قالب الدنا وعندها سوف يتكون معقد يطلق عليه **Ternary complex** (شريط الدنا القالب و انزيم بلمرة الرنا وشريط **mRNA**) تنتهي عندها مرحلة بداية الاستنساخ.

تبدا بعدها مرحلة الاستطالة عندها تبدا سلسلة الـ **mRNA** بالاستطالة وذلك باضافة القواعد النيتروجينية إلى السلسلة اعتمادا على قالب الدنا، ينفصل الجزء سكما من الانزيم تاركا الانزيم بدونه ويسمى الانزيم في هذه الحالة بـ **core enzyme** و تكون جزيئة سكما حرة وبامكانها البحث عن انزيم بلمرة رنا اخر للاتحاد معه وتحويله من **core enzyme** إلى **Holoenzyme** للبدء بعملية استنساخ جديدة.



يستمر انزيم بلمرة الرنا بحركته على قالب الدنا بعد انفصال جزيئة سكما عنه، مسببا بانفتاح الحرزون المزدوج واستطالة شريط **mRNA** ، يتحد الانزيم بهذه الحالة مع بروتين اخر يسمى **Nus A protein** ويبقى متحدا معه طيلة فترة تكوين شريط **mRNA** لزيادة ارتباط انزيم **RNA polymerase** مع القالب والتعرف على الفاصل لانهاء عملية الاستنساخ. وكلما انتهى الانزيم من منطقة معينة فان هذه المنطقة تعود فتلتف خلفه معيدة شكل الحلزون المزدوج الاصلي لها . بحيث تبقى المنطقة المفتوحة بمقدار ١٧ قاعدة فقط .



يستمر انزيم بلمرة الرنا بعملية استطالة شريط **mRNA** إلى ان يصل إلى منطقة تتابع الانتهاء **terminator sequence** (اشارة الانتهاء **stop signal**) في نهاية الجين البنائي الذي يتم استنساخه. تكون معظم تتابعات الانتهاء على شريط **mRNA** غنية بال **G** و **C** التي تتكامل مع بعضها لتكوين تركيب انشوطة الدبوس **Hairpin** في نهاية شريط الرنا الرسول ، يلي هذا

التركيب تتابع من اربع قواعد يوراسيل او اكثر . يعمل تركيب انشوطة الدبوس وتتابع **U** على ايقاف عمل انزيم بلمرة الرنا لكونه لا يستطيع استطالة السلسلة ويشمل كذلك انفصال الانزيم عن بروتين **Nus A** من ثم انفصاله عن شريط الدنا القالب.

قد تتطلب عملية انفصال انزيم بلمرة الرنا عن شريط الدنا القالب في بعض الحالات وجود بروتين يسمى عامل **Rho** (**ρ factor**) وهو بروتين مؤلف من ٦ وحدات ثانوية والذي يساهم في عملية انهاء عملية الاستنساخ عن طريق الارتباط مع شريط الرنا الرسول المستنسخ ويعمل على فك ارتباط انزيم البلمرة عن شريط الدنا باستخدام جزيئة **ATP** .

تسمى العملية التي تحتاج العامل **Rho** بـ **Rho dependent** اما عملية انهاء الاستنساخ التي لا تحتاج إلى العامل **Rho** بـٌ **Rho independent** .

الاستنساخ في الكائنات حقيقية النواة

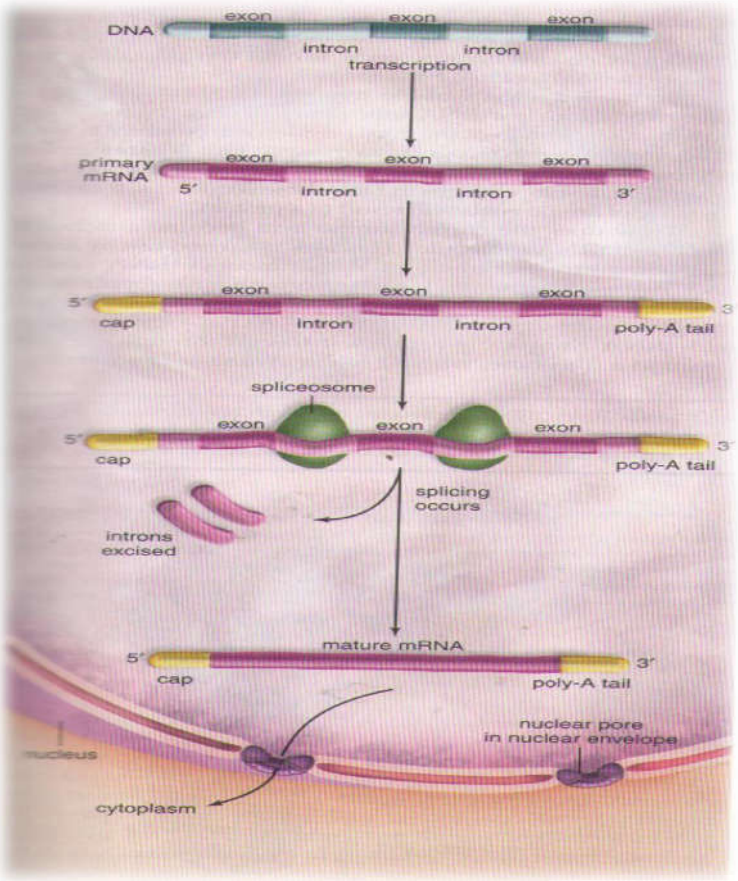
يحدث الاستنساخ في الخلايا حقيقة النواة بطريقة مشابهة لما يحدث في بدائية النواة الا نا الاختلاف يكمن في طبيعة جزيئة الدنا وان اهناك اكثر من نوع من انزيمات بلمرة الرنا في الخلايا حقيقة النواة .

تحوي الخلايا حقيقة النواة على ثلاث انواع من انزيمات بلمرة الرنا وهي :-

١- **RNA polymerase 1** : يشكل ٥٠ – ٧٠ % من **RNA** الخلية ويساهم في استنساخ **rRNA** الرئيسية (**28S , 18 S , 5.8 S**).
٢- **RNA polymerase 2** : يساهم هذا الانزيم في استنساخ **mRNA** .
٣- **RNA polymerase 3** : يساهم هذا الانزيم في استنساخ **5 S rRNA** و **tRNA** . ويشكل ١٠ % من رنا الخلية.

وجد العلماء ان ترتيب الجينات في الكائنات حقيقة النواة يختلف عن ترتيب الجينات في الكائنات بدائية النواة .حيث يتكون الدنا في حقيقة النواة من مناطق تسمى **Intron** ومناطق اخرى تسمى **Exon** .حيث تكون الاوكسونات هي التتابعات التي تحمل الصفات الوراثية والتي تشفر لانتاج البروتينات اما الانترونات فهي عبارة مقاطع جينية لاتحمل اي صفة وراثية . تختلف اعداد واطوال الاوكسونات من نوع الى نوع اخر وفي خلايا النوع الواحد وخلايا الانسجة المختلفة في نفس الكائن الحي .

ويتم الاستنساخ الجين بصورة كاملة اثناء عملية الاستنساخ الى شريط **mRNA** يسمى **Primary mRNA** بعدها يتم استئصال قطع الانترونات من شريط الـ **mRNA** بعملية تسمى **Splicing** وحذفها من شريط **RNA** بعدها يتم لصق قطع **mRNA** المتبقية لتكون شريط ال **mRNA** الناضج **mature mRNA** ، ليخرج بعدها هذا الشريط الى السايتوبلازم لإكمال عملية التعبير الجيني وانتاج البروتين بعملية الترجمة .



اسم المحاضرة : التعبير الجيني – الترجمة

رقم المحاضرة : السابعة

المصادر :

1- **Watson, J.D.; Baker, T.A,; Bell, S.P.; Gann, A. (2004). Molecular Biology of the Gene. 5th Ed. Pearson edution.**
2- **Clark, D. (2006). Molecular Biology Understanding the Genetic Revolution.** Elsevier Inc.
3- **Santos, D.M. (2011). Genetic Engineering, Recent Developments in application. Apple Academic press.**

٤-عماش، هدى صالح مهدي.(١٩٩٤). مبادئ علم الحياة الجزيئي. كلية العلوم . جامعة بغداد.

٥-البكري ، غالب حمزة.(١٩٩٠). مبادئ الهندسة الوراثية. جامعة البصرة.

الترجمة Translation

وهي عملية ترجمة المعلومات الوراثية المخزون في **mRNA** الى سلسة من الاحماض الامينية ومن ثم تكوين جزيئة بروتين فعال .

ان عمليتي الاستنساخ والترجمة هي عمليتان مرتبطتان مع بعضهما البعض بقوة حيث تعمل الرايبوسومات بسرعة على ترجمة mRNA الى بروتين وذلك بسبب تعرض شريط mRNA الى انزيمات القطع الموجودة في السايتوبلازم ، ويكون معدل حياة mRNA في ***E coli*** بحدود ٣ دقائق فقط اما في حقيقية النواة فيعتمد معدل حياة mRNA على خاصية التمايز للخلايا والنسيج فقد يكون معدل حياته قصير يتراوح من عدة ساعات او ايام او قد يصل الى عدة سنوات كما يحدث في حالات السبات لبعض البذور والنباتات .

يشترك كل من الـ **tRNA** والرايبوسومات في عملية الترجمة حيث ان للـ **tRNA** القدرة على التعرف والارتباط بالأحماض الامينية لتكون المعقد الناقل للاحماض الامينية ،وهناك حوالي ٦١ ناقل للاحماض الامينية (٦١ نوع من **tRNA**) اذ يوجد ناقل واحد او اكثر لكل حامض اميني .ويحتوي شريط **mRNA** على شفرات ثلاثية (مكونة من ٣ قواعد نيتروحينية) تسمى **Code** ترتبط مع **anti –Code** الموجود على **tRNA** والحامل للحامض الاميني . وهنالك ٦٤ شفرة وراثية تشفر للاحماض الامينية ، و٦١ شفرة منها لل٢٠ حامض اميني **amino acids** والشفرات الثلاثة الباقية تسمى بالشفرات عديمة المعنى، وتكتب الشفرة دائما باتجاه **5 ⟵ 3** .

تبدأ عملية الترجمة عن طريق ارتباط الوحدة الصغيرة small subunite للرايبوسوم مع شريط **mRNA** لتكوين معقد الابتداء بوجود ثلاث عوامل مساعدة (**Initiation factor IF**) هي **IF1** و **IF2** و **IF3** حيث يعمل **IF1** و **IF3** على منع ارتباط الوحدة الكبيرة للرايبوسوم مع الوحدة الصغيرة لحين ارتباط اول **tRNA** مع شريط **mRNA** ، في حين يعمل **IF2** على المساعدة في ارتباط الرنا الناقل الحامل لاول حامض اميني على الارتباط مع شريط **mRNA**. تكون شفرة البدء **Initiation Code** على شريط **mRNA** والتي هي **AUG** ترتبط بعدها الوحدة الكبيرة للرايبوسوم مع معقد الابتداء لتكوين الرايبوسوم الفعال ، وتمتلك الوحدة الكبيرة للرايبوسوم **Large subunite** ٣ مواضع هي (**amino acyl site (A site** و **pepitidyl site (P) site)** و **Empty site (E site)** وبذلك يصبح **mRNA** محصورا في الاخدود الناتج من ارتباط وحدتي الرايبوسوم وفي هذه الحالة

تصطف وتتقابل شفرة البدء للـ **mRNA** مع الشفرة المضادة لها على **tRNA** في موقع **(P site)** للرايبوسوم وهنا تثبت الشفرة التالية على المواقع **(A site)** حاملة الحامض الاميني الثاني في السلسلة الببتيدية . بعدما تحدث عملية إزاحة للحامض الاميني الموجود على الموقع **P** ويرتبط بالحامض الاميني الاخر الموجود بالمواقع **A** وهنا تتكون سلسلة بروتينية ثنائية الحامض . وفي هذه الخطوة تحدث الاستطالة للسلسلة البروتينية اذ يتكون او يحدث ما يعرف بالانتقال **Translocation** إذ تحدث هنا عمليتين في نفس الوقت:-

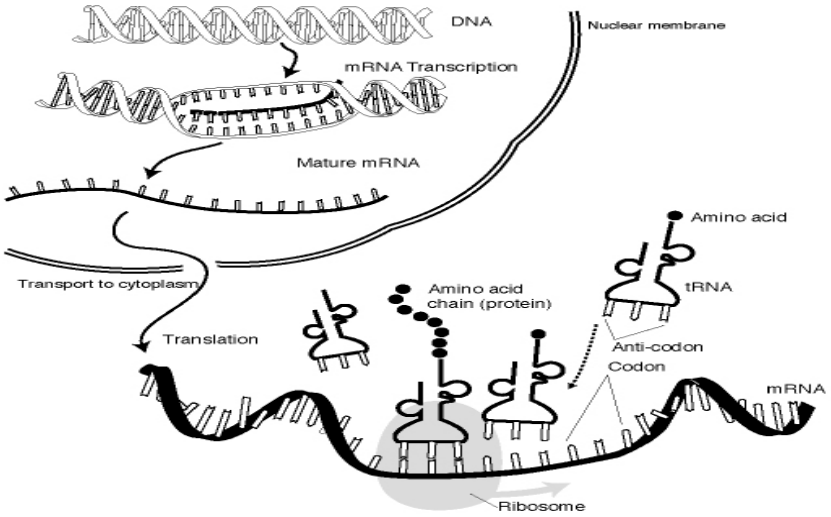
الاولى هي تحرك **tRNA** الحامل للسلسلة البروتينية الثنائية من موضع **A** الى الموضع **P** مزيحا الـ **tRNA** الاول الى الموضع **E** . **الحدث الثاني** هو تحرك الرايبوسوم بكامله على طول **mRNA** بمقدار ٣ قواعد نيتروجينة (شفرة واحدة).

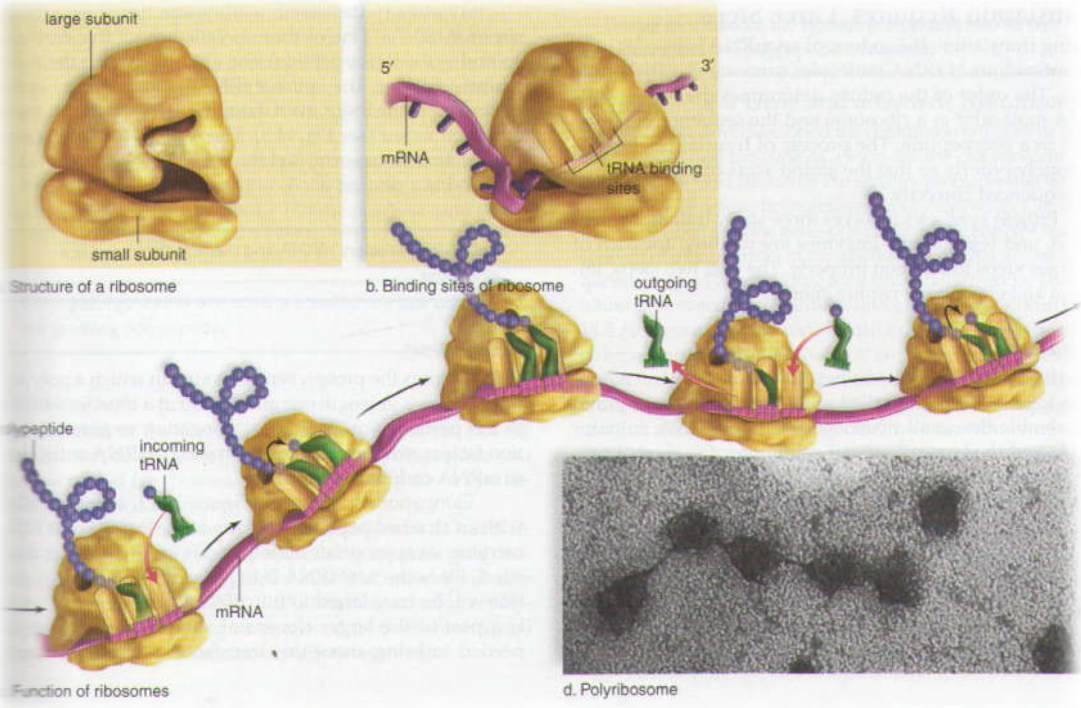
ويدخل حامض اميني اخر محمول على **tRNA** جديد الى موضع **A** ، وبذلك تعيد الخطوات نفسها ويتحرك الرايبوسوم بالاتجاه **5** ⟵ **3** على طول شريط **mRNA** . يندمج حوالي ٨ - ١٥ حامض اميني في السلسلة البروتينية الناتجة في كل ثانية وtRNA تجد شفراتها على شريط mRNA عن طريق التجربة والخطأ. تساهم في عملية الاستطالة عوامل مساعدة تسمى عوامل الاستطالة **Elongation Factors**هي **EF-Tu, EF-Ts** و **EF-G**

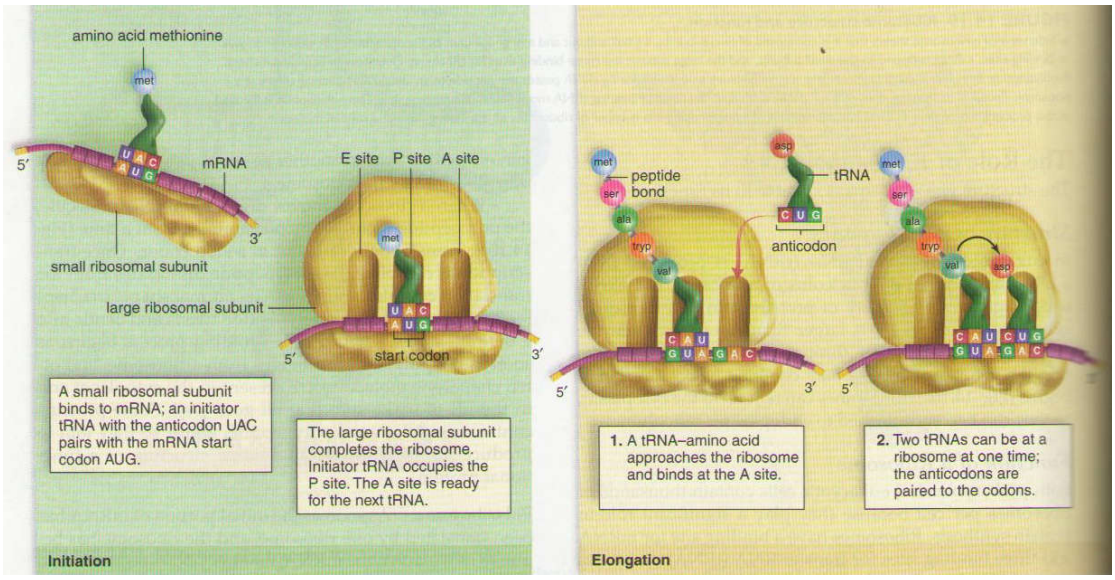
بعد قيام الرايبوسوم بترجمة ٢٥ شفرة **mRNA** يصبح الطرف **5** للـ **mRNA** حراً فيدخل رايبوسوم اخر في تكوين معقد ابتداء ثاني ويؤدي الى انتاج سلسلة بروتينية ثانية ويسمى التركيب الناتج بـ **polysome** والذي هو عبارة عن شريط **mRNA** واحد يُترجم في ان واحد بواسطة عدة رايبوسومات الى عدة سلاسل بروتينية. ويزداد عدد الرايبوسومات على طول شريط **mRNA** كلما طالت جزيئة الشريط . ان وجود الـ **polysome** يزيد من كفاءة الخلية في تخليق البروتين من عدد اقل من جزيئات **mRNA** .

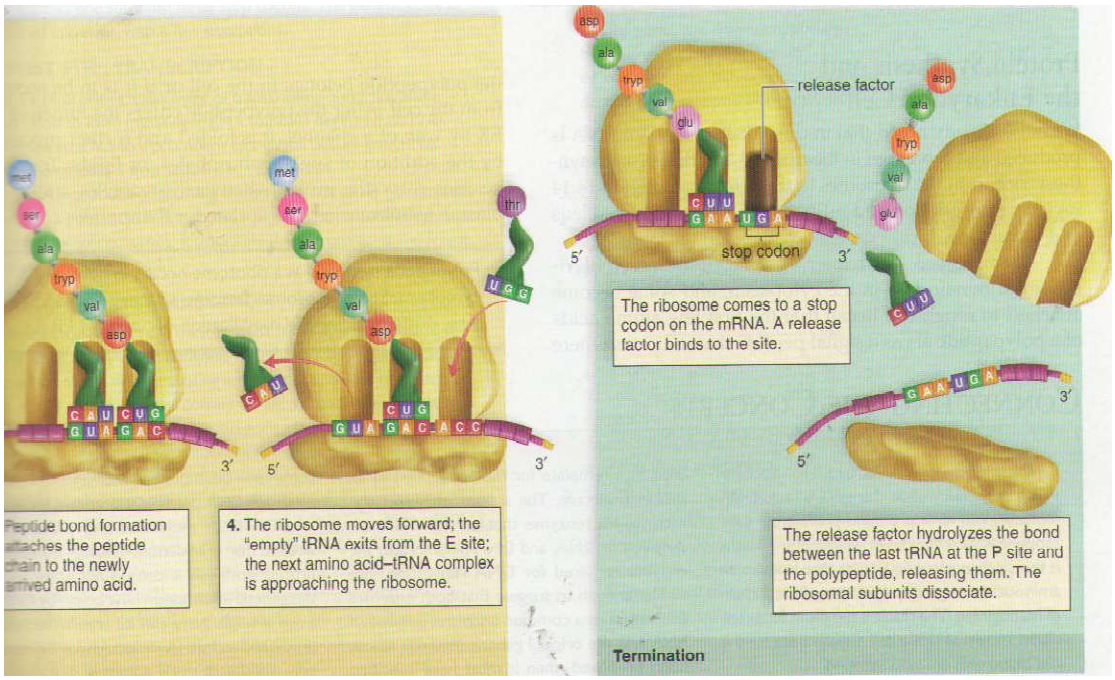
تنتهي عملية تصنيع البروتين عندما يصادف الرايبوسوم إشارة الانتهاء ويتم تحديد إشارة الانتهاء من قبل واحد او اكثر من شفرات الانتهاء وهي من الشفرات عديمة المعنى بحيث لا يستطيع اي **tRNA** من التعرف عليها وبالتالي وجود هذه الشفرة على الموقع **A** يمنع إضافة اي

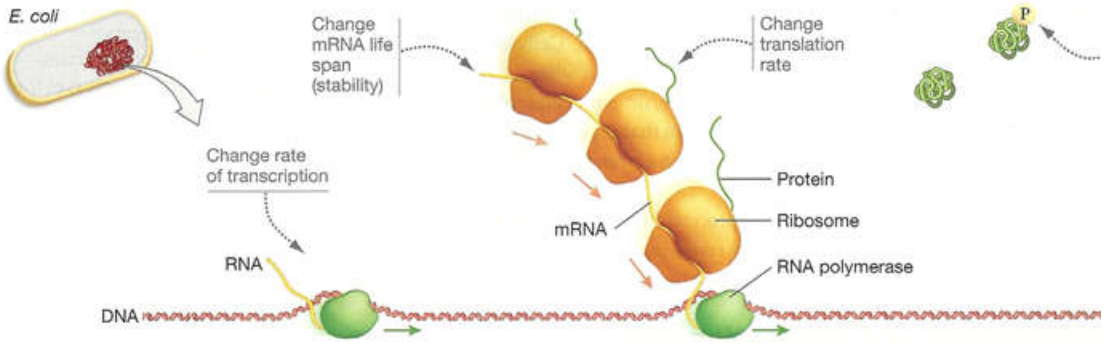
حامض اميني الى السلسلة ويحدث تداخل بين شفرة الانتهاء وعوامل الاطلاق **Release Factors** لتكوين معقد الإطلاق والذي يعمل على إيقاف السلسلة البروتينية . يوجد هناك نوعين من عوامل الاطلاق هما **RF1** و **RF2** . تبقى السلسلة البروتينية الكاملة مرتبطة مع الناقل **tRNA** في الموقع **P** ، بعدها ينكسر هذا الارتباط عن طريق التحلل المائي وتنطلق جزئية الناقل من الرايبوسوم ثم يدخل الرايبوسوم الى وحداته الثانوية الكبيرة والصغيرة وتكون حره لتكوين معقد اخر في شريط **mRNA** جديد.






amino acid methionine
met
mRNA
5′
3′
small ribosomal subunit
large ribosomal subunit
E site
P site
A site
start codon
A small ribosomal subunit binds to mRNA; an initiator tRNA with the anticodon UAC pairs with the mRNA start codon AUG.
The large ribosomal subunit completes the ribosome. Initiator tRNA occupies the P site. The A site is ready for the next tRNA.
Initiation
peptide bond
tRNA
anticodon
1. A tRNA–amino acid approaches the ribosome and binds at the A site.
2. Two tRNAs can be at a ribosome at one time; the anticodons are paired to the codons.
Elongation


Peptide bond formation attaches the peptide chain to the newly arrived amino acid.
4. The ribosome moves forward; the "empty" tRNA exits from the E site; the next amino acid–tRNA complex is approaching the ribosome.
release factor
stop codon
The ribosome comes to a stop codon on the mRNA. A release factor binds to the site.
The release factor hydrolyzes the bond between the last tRNA at the P site and the polypeptide, releasing them. The ribosomal subunits dissociate.
Termination


E. coli
Change mRNA life span (stability)
Change translation rate
P
Change rate of transcription
Protein
Ribosome
mRNA
RNA
RNA polymerase
DNA

اسم المحاضرة : كلونة الجين

رقم المحاضرة : الثامنة

المصادر :

1- **Watson, J.D.; Baker, T.A,; Bell, S.P.; Gann, A. (2004). Molecular Biology of the Gene. 5th Ed. Pearson edution.**
2- **Clark, D. (2006). Molecular Biology Understanding the Genetic Revolution. Elsevier Inc.**
3- **Santos, D.M. (2011). Genetic Engineering, Recent Developments in application. Apple Academic press.**

٤-عماش، هدى صالح مهدي.(١٩٩٤). مبادئ علم الحياة الجزيئي. كلية العلوم . جامعة بغداد.

٥-البكري ، غالب حمزة.(١٩٩٠). مبادئ الهندسة الوراثية. جامعة البصرة.

كلونة الجين Gene Cloning

هي عملية تكوين اتحادات وراثية جديدة عن طريق غرس جزيئات دنا غريبة او هجينة في ناقل كلونة مناسب Cloning Vector (بلازميد او فايروس) ليتسنى ادخالها الى كائن اخر لا يحتوي أصلا على مثل هذه الجزيئة بحيث يمكن لهذه الجزئية ان تتضاعف في المضيف الجديد وتنتقل الى الجيل التالي مع إمكانية إعطاء جزيئة الدنا الصفة التي تحملها عن طريق النجاح في التعبير الجيني في المضيف الجديد.

تعد كلونة الجين المحور الأساس في تقنية الهندسة الوراثية حيث تنقل خلال هذه العملية الجينات من كائن الى اخر ، والنجاح في اختراق حاجز النوع بحيث يمكن نقل جينات من كائن الى كائن اخر عائد الى نوع مختلف تماما والنجاح في إكثار جزئية الدنا الغريبة في المضيف الجديد الى ملايين النسخ

الخطوات الأساسية لكلونة الجين

لإكمال عملية كلونة الجين يجب توفر وسائل مختلفة يمكن من خلالها الوصول الى الهدف المنشود ، ومن اهم هذه الوسائل هي:-

١- عزل وتنقية جزيئات الدنا المرغوب كلونتها، ويطلق على هذه الدنا اسم الدنا الغريبة Foreign DNA او الدنا المسافرة Passenger DNA . وقد تم تطوير العديد من الطرق لعزل الدنا من الخلايا البكتيرية او الخلايا حقيقة النواة (النباتية او الحيوانية) وفصلها عن باقي المكونات الخلوية الاخرى بأتباع طرق مختلفة تضمن الحصول على جزيئات دنا نقية

٢- توفر ناقل كلونة مناسب والحصول عليه بصورة نقية ليتم ربط الدنا قطعة الغريبة بهذا الناقل . وهناك العديد من نواقل الكلونة حيث يمكن استخدام المناسب منها حسب نوع التجربة ومعظم هذه النواقل مشتقة من البلازميدات او الفايروسات.

٣-توفر وسيلة مناسبة لتقطيع جزيئة الدنا الغريبة للحصول على قطعة دنا قابلة للكلونة حاوية على الجين المرغوب وكذلك لقطع جزيئة ناقل الكلونة لجعله مناسبا لاستقبال جزيئة الدنا الغريبة، ويتم تقطيع جزيئات الدنا باستخدام إنزيمات التقييد **Restriction Enzyme** حيث تكون عملية التقطيع عملية مسيطر عليها بفضل إنزيمات التقييد اذ تتميز هذه الإنزيمات بقابليتها على التعرف على تتابعات معينة من النيوكليوتيدات في جزيئة الدنا ومن ثم تقطع الدنا بالقرب او داخل هذه التتابعات لإنتاج قطع دنا محددة الاطوال، مما يعني إمكانية التحكم في عملية تقطيع جزيئات الدنا من خلال اختيار الإنزيم المناسب.

٤- توفر وسيلة مناسبة لربط قطعة الدنا الغريبة مع ناقل الكلونة لتكوين جزيئة الدنا الهجينة Recombinant DNA. يستخدم إنزيم **DNA Ligase** في عملية بناء الآصرة الفوسفاتية ثنائية الايستر. مما يؤدي الى ربط الجزيئات مع بعضها البعض لتكوين جزيئات دنا هجينة.

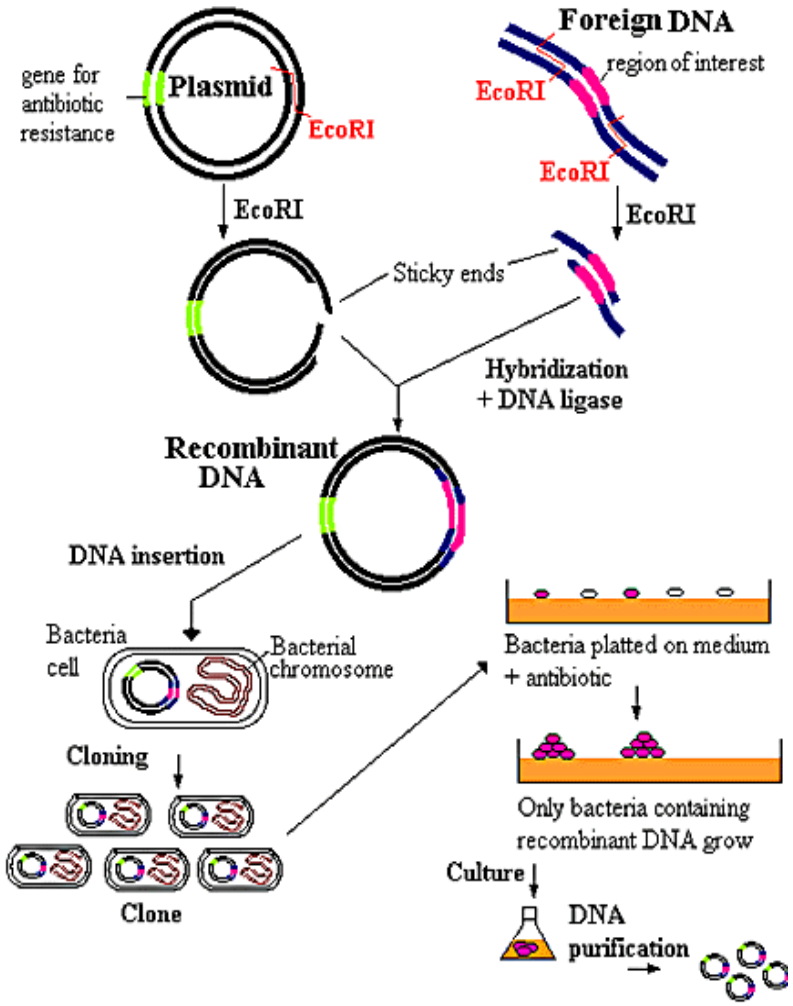
٥- توفر وسيلة مناسبة لمراقبة عمليات تقطيع وربط جزيئات الدنا وذلك لمعرفة فيما اذا كان إنزيم التقييد قادرا على تقطيع جزيئة الدنا ام لا قبل الاستمرار في تجربة الكلونة إضافة الى التأكد من ان عملية الربط قد تمت بين جزيئة الدنا وناقل الكلونة . وبما ان عملية القطع والربط تجري في انبوبة الاختبار ولا يمكن متابعتها بصريا لذا من الضروري وجود طرق اخرى لمتابعة سير التجربة، وتتم مراقبة عملية التقطيع والربط باستخدام الترحيل الكهربائي Electrophoresis في هلام الاكاروز **Agarose gel** او البولي اكريلامايد **Polyacrylamid gel**، حيث تضاف جزيئات الدنا الى طبقة

رقيقة من الهلام وبعد امرار التيار الكهربائي ستتحرك جزيئات الدنا المختلفة الى مسافات تتناسب مع أحجامها مكونة حزما منفصلة على الهلام يمكن تحديد أحجامها و أوزانها بسهولة .

٦- توفر وسيلة مناسبة يمكن من خلالها ادخال جزيئة الدنا الهجينة الى خلايا الكائن المضيف بحيث يمكن ان تديم الجزيئة الهجينة نفسها داخل الكائن المضيف وتتوارث بثبات في الأجيال المتعاقبة. من اكثر الطرق استخداما في ادخال جزيئات الدنا الهجينة الى المضيف هي طريقة التحول Transformation والتحول بالعاثي Transfection .

٧-بعد ادخال الجزيئة الهجينة الى خلايا المضيف يجب توفر طريقة مناسبة لانتقاء الخلايا المستقبلة للجزيئة الهجينة الحاملة للجين المرغوب وتمييزها عن الخلايا المستقبلة للجزيئات الهجينة الاخرى.

بعد الحصول على الخلايا الحاوية على جزيئات الدنا الهجينة او الجين المرغوب يمكن إنماء هذه الخلايا في أوساط مناسبة للحصول على أعداد هائلة منها وعندها سيكون من السهولة عزل الجين المطلوب من هذه الخلايا والحصول عليه بكميات كبيرة مناسبة لإجراء الدراسات اللازمة عليه.



Cloning into a plasmid

اسم المحاضرة : انزيمات التقييد

رقم المحاضرة : التاسعة

المصادر :

19- Watson, J.D.; Baker, T.A,; Bell, S.P.; Gann, A. (2004). Molecular Biology of the Gene. 5th Ed. Pearson edution.

20- Clark, D. (2006). Molecular Biology Understanding the Genetic Revolution. Elsevier Inc.

21- Santos, D.M. (2011). Genetic Engineering, Recent Developments in application. Apple Academic press.

٤-عماش، هدى صالح مهدي.(١٩٩٤). مبادئ علم الحياة الجزيئي. كلية العلوم . جامعة بغداد.

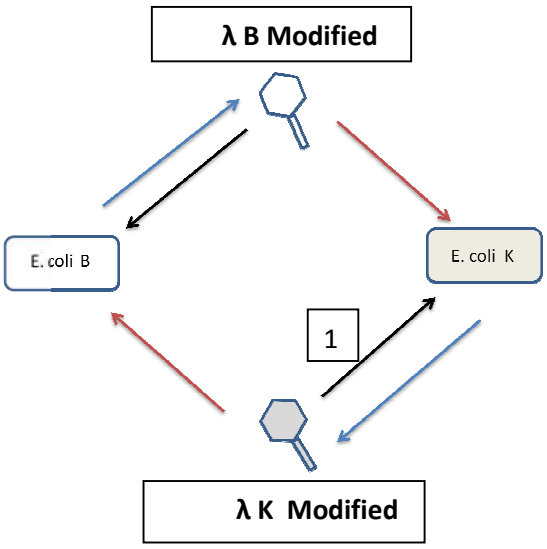
٥-البكري ، غالب حمزة.(١٩٩٠). مبادئ الهندسة الوراثية. جامعة البصرة.

إنزيمات التقييد Restriction Endonucleases

تُعرف إنزيمات التقييد بالإنزيمات القاطعة **Restriction enzyme** وهي إنزيمات موجودة بصورة طبيعية في البكتريا و تتعرف هذه الإنزيمات على تتابعات معينة من النيوكليوتيدات على شريط الدنا ومن ثم تعمل على قطع شريط الدنا خلال او قرب هذه التتابعات عن طريق كسر الآصرة ثنائية الايستر بين جزئية السكر الخماسي وبين مجموعة الفوسفات لتعطي نهاية 3-OH في طرف ونهاية 5- Phosohate من الطرف الأخر. وتعرف المنطقة التي يتم بها كسر الآصرة بالموضع الحساس للانزيم القاطع Restriction site . وعلى هذا الأساس أصبح من الممكن تقطيع المحتوى الجيني للكائن الحي Genome باستخدام هذه الإنزيمات لإنتاج قطع دنا صغيرة ومحددة مما ساعد كثيرا على تسهيل مهمة كلونة هذه الجينات وتحديد تتابع النيوكليوتيدات لها. وقد شكل اكتشاف واستخدام إنزيمات التقييد احد اهم العوامل التي ساهمت في تطوير حقل الهندسة الوراثية والوراثة الجزيئية.

تسمى الإنزيمات القاطعة كذلك بـالمقصات الجزيئية Molecular scissors او المشرط الجزيئي Molecular scalpels

كان العالم اربر وجماعته اول من لاحظ وجود إنزيمات التقييد في البكتريا في بداية الستينيات من القرن الماضي عندما كان يدرسون كفاءة العاثي لامدا (λ) في إصابة سلالات مختلفة من بكتريا *E. coli* . لاحظ الباحثون ان كفاءة العاثي لامدا المعزول من سلالة *E. coli* معينة في إصابة نفس السلالة تكون اكبر من كفاءتها في إصابة سلالة أخرى وقد اظهرت الدراسات اللاحقة ان سبب اختزال كفاءة العاثي في إصابة السلالة الاخرى يعود الى وجود أجهزة التقييد والتحوير .



اظهرت الدراسات ان عاثيات لامدا النامية على السلالة *E coli* B تكون اكثر كفاءة في اصابة نفس السلالة مقارنة بإصابتها للسلالة *E coli* K ، وهذا يعني ان العاثيات المعزولة من B قد قيدتها السلالة K وبهذا كانت كفاءة اصابتها وتحليلها لخلايا هذه السلالة واطئة جدا ، اي انها نجحت في إصابة اعداد قليلة جدا منها. ويعود سبب اختزال كفاءة العاثي لامدا المعزول من سلالة معينة في اصابة سلالة اخرى الى احتواء السلالة الثانية على إنزيمات تقييد تعمل على تقطيع دنا العاثي لمنعها من التكرار واحداث الإصابة . وعلى هذا الأساس فان دنا العاثيات المعزولة من الـ *E coli* B تقطع بواسطة انزيمات التقييد الموجودة في *E coli* K والعكس صحيح.

تحتوي البكتريا كذلك على نوع اخر من الانزيمات تدعى إنزيمات التحوير Modification enzymes التي تعمل على تحوير دنا البكتريا المنتجة للانزيمات القاطعة وذلك لحماية الدنا العائد لها من فعالية تلك الانزيمات ، ويتم التحوير بإضافة مجموعة مثيل ($-CH_3$) الى قواعد معينة من التتابعات الحساسة لانزيمات التقييد مما يجعل هذه التتابعات مقاومة لفعالية هذه الانزيمات. اي ان جهاز التقييد والتحوير يتكون من انزيمين يتعرفان على نفي التتابع من جزيئة الدنا ، احدهما يعمل على قطع الدنا في هذا التتابع في حين يعمل انزيم التحوير وهو من نوع المثيليز Methylase على اضافة مجاميع المثيل الى قواعد معينة في هذه التتابعات مما يجعلها مقاومة لانزيمات التقييد.

أوضحت الدراسات الوراثية الى وجود ثلاث جينات (*hsd M , hsd R, hsd S*) هي التي تكون مسئولة عن عن أجهزة التقييد والتحوير في بكتريا E coli . يعمل ناتج الجين *hsd M* على تحوير جزيئات الدنا باضافة مجاميع المثيل مما يجعلها مقاومة لانزيمات التقييد التي يشفر لها الجين *hsd R* . اما ناتج الجين *hsd S* فهو ضروري لعمل الانزيمين (التقييد والتحوير) .

نظر لأهمية إنزيمات التقييد في مجال الهندسة الوراثية فقد ازدادت جهود الباحثين في عزلها ودراسة خواصها ، فقد تم عزل العشرات من إنزيمات التقييد من مختلف الأحياء المجهرية .

تقسم انزيمات التقييد استنادا الى خصائصها الى ثلاث انواع رئيسية :-

- **إنزيمات التقييد من النوع الاول Type I Restriction Enzyme** : يشترط لعمل هذه الإنزيمات وجود عومل مساعدة مثل ايون المغنيسيوم Mg +2 و ATP ومادة S-adenosyl-methionine وتتسم طريقة قطع الحلزون بالتعرف على تتابع معين من حلزون الدنا ولكنها لا تقطع خلال هذا التتابع وانما تتحرك على طول جزيئة الدنا لمسافة تتراوح ١٠٠٠ – ٥٠٠٠ نيوكليوتيدة من موقع التتابع الحساس ومن ثم تقطع خيطا واحدا وبصورة عشوائية مكونة فجوة في ذلك الخيط طولها ٧٥ نيوكليوتيدة . اما قطع الخيط الثاني فيتطلب فعالية جزيئة ثانية من الإنزيم.

- **إنزيمات التقييد من النوع الثاني Type II Restriction Enzyme** : تتصف هذه الإنزيمات بقابليتها على التعرف على تتابع معين من النيوكليوتيدات في حلزون الدنا ثم تقطع الحلزون خلال او بالقرب من ذلك التتابع لإنتاج قطع محددة الاطوال من الدنا . يحتاج هذا النوع من الإنزيمات ايون المغنيسيوم فقط كعوامل مساعدة . يستخدم هذا النوع من الإنزيمات بصورة واسعة حاليا في مجال الهندسة الوراثية في تقطيع وانتاج القطع المطلوبة من الدنا.

- **إنزيمات التقييد من النوع الثالث Type III Restriction Enzyme** : تتميز هذه الإنزيمات بقابليتها على قطع الحلزون المزدوج في مواقع محددة ومعروفة وتتميز بحاجتها الى Mg +2 و ATP و S- adenosyl-methionine . وبهذا تكون صفات الانزيم وسطا بين صفات النوعين الاول والثاني .

تسمية انزيمات التقييد

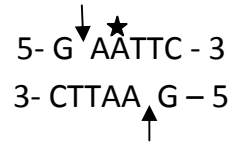
بالنظر لاكتشاف العديد من انزيمات التقييد كان لا بد من ايجاد نظام تسمية موحد تسمى على اساسه كل الانزيمات المكتشفة. قدم سمث وناثانس عام ١٩٧٣ اقتراحا لتسمية الانزيمات القاطعة،حسب هذا النظام تكون اسماء انزيمات التقييد القاطعة مكونة من ٣ احرف تكتب بصورة مائلة او يوضع تحتها خط ، فمثلا يطلق على انزيم التقييد المعزول من بكتريا *Escherichia coli* بـ *Eco* حيث يمثل حرف E الحرف الاول من اسم الجنس بينما يمثل الحرف c و o الحرفين الاول والثاني لاسم النوع. وغالبا ما يتبع الاسم الثلاثي حرفا يمثل الضرب او السلالة المستعملة كمصدر للانزيم. او قد يكون هذا الحرف يمثل العاثي او البلازميد الحامل لجين التقييد او التحوير

الكائن المجهري	اسم الانزيم	التتابع الحساس
Escherichia coli RY13	*Eco* RI	G AATTC
Haemophilus influenzae Rd	*Hin* d III	A AGCTT
Klebsiella pneumoniae OK	*Kpn* I	GGTAC C
Serratia marcescens	*Sma* I	CCC GGG
Streptomyces albus	*Sal* I	G TCGAC
Xanthomonas oryzae	*Xor* II	CGAT CG
Xanthomonas badrii	*Xba* I	T CTAGA

مواضع عمل انزيمات التقييد

تتعرف انزيمات التقييد على مواضع معينة من تتابعات الدنا لتقطع خلال او قرب تلك المواضع ، تختلف هذه الانزيمات في تعرفها على المواضع الحساسة التي تكون رباعية او خماسية او سداسية او سباعية النيوكليوتيدات .

- مثال : انزيم Eco RI يتعرف على التتابع سداسي النيوكليوتيدات



يقطع الانزيم التتابع الحساس في الموقع المؤشر بالاسهم منتجا قطع ذات نهايات ناتئة في الطرف 5- ، يمكن ان ترتبط القواعد النيتروجينية مع بعضها البعض مرة اخرى عن طريق الاواصر الهيدروجينية المتكونة بين القواعد النيتروجينية المتكاملة وعلى هذا الاساس يمكن ربط قطع الدنا المشتقة من الكائنات المختلفة اذا كانت حاوية على نهايات ناتئة حيث تتكامل القواعد النيتروجينية اولا مما يسهل عملية لحم ولصق الكسور المتبقية بواسطة انزيم DNA Ligase . وتسمى هذه النهاية بالنهاية اللاصقة Sticky ends .

عندما يحُور الموضع الحساس للانزيم Eco RI بأضافة مجموعة مثيل ($-CH_3$) الى قاعدة الادنين الداخلية (المؤشر بنجمة) في احد او كلا الخيطين، فأنه يصبح مقاوما للانزيم .

يوصف التتابع السداسي الحساس لانزيم *Eco* RI بأنه تتابع باليندرومي Palindromic sequence وذلك لانه يشبه الكلمة التي تعطي نفس القراءة عند قراءتها من الامام والخلف ، حيث ان خيطي هذا التتابع يقرأ بنفس الشكل من النهاية 5-

5- GAATTC - 3
3- CTTAAG – 5

علما انه توجد تتابعات اخرى توصف على انها باليندرومية مثل التتابع التالي

5- AGCCGA -3
3- TCGGCT -5

ان هذا التتابع غير متناظر المحاور وهو باليندرومي في خيط واحد فقط ، حيث يقرأ الخيط العلوي فقط بنفس الشكل من الطرفين 5- و 3-

لاتقتصر الاختلافات بين الانزيمات على طبيعة الموضع الحساس فقط الذي تتعرف عليه وانما على طريقة قطعها للتتابعات الحساسة كذلك . حيث تقطع بعض الانزيمات شريطي الدنا لتنتج نهايات مستوية Blunt ends ، كما في الانزيم *Sma*I

5- CCC ↓ GGG -3
3- GGG ↑ CCC -5

كما ان هناك بعض الانزيمات تتعرف على تتابعات خماسية مثل انزيم *Eco* RII ، اما في الانزيم *Hga*I فانه يتعرف على تتابع خماسي غير متناظر المحاور

5- GACGC -3

لكنه لا يقطع عند هذا التتابع وانما يتحرك على جزيئة الدنا لمسافة خمسة نيوكليوتيدات على احد الخيطين وعشرة نيوكليوتيدات على الخيط الاخر ثم يقطع الحلزون

5- GACGCNNNNN ↓
3- CTGCGNNNNNNNNNN ↑

عند معاملة جزيئة دنا كبيرة بعدد من الانزيمات المختلفة، كل واحد على حدة ، يلاحظ ان عدد مرات القطع تختلف من انزيم الى اخر ، ويعود السبب الى اختلاف تردد Frequency المواضع الحساسة للانزيمات المختلفة في تلك الجزيئة. بصورة عامة يمكن تقدير تردد المواضع الحساسة لانزيمات التقييد في جزيئة الدنا باستخدام معادلة بسيطة بفتراض ان انتشار المواضع الحساسة يكون عشوائيا في الجزيئة. والمعادلة هي

تردد الموضع الحساس = ١/٤ن

حيث تمثل ن عدد النيوكليوتيدات المكونة للموضع الحساس.

استنادا الى هذه المعادلة يمكن توقع تردد اي تتابع رباعي هو مرة كل ٤(٤) اي مرة كل ٢٥٦ زوج نيوكليوتيدي من جزئية الدنا في حين ان تردد اي تتابع سداسي هو مرة كل ٤(٦) اي مرة كل ٤٠٩٦ زوج نيوكليوتيدي. ان التردد الحقيقي للمواضع لحساسة لانزيمات التقييد لا يتطابق دائما مع التوقعات المبينة على اساس المعادلة اعلاه . كما اوضحت الدراسات ان انتشار المواضع الحساسة لانزيمات التقييد يميل الى التجمع عادة داخل او حول الجزيئات البنائية.

انزيمات التقييد المتناظرة

تتعرف انزيمات التقييد المختلفة عموما على تتابعات مختلفة في حلزون الدنا ، الا ان بعض الانزيمات المعزولة من مصادر مختلفة تشذ عن هذه القاعدة حيث تتعرف وتقطع نفس التتابعات . يطلق على مثل هذه الانزيمات بالانزيمات المتناظرة Isoschizomers ، التي قد تكون تامة التناظر Perfect isoschizomers مثل الانزيمين *Hin*d III و *Hsu* I اللذين يتعرفان على نفس التتابع ويقطعانه في نفس الموقع لانتاج قطع دنا متماثلة.

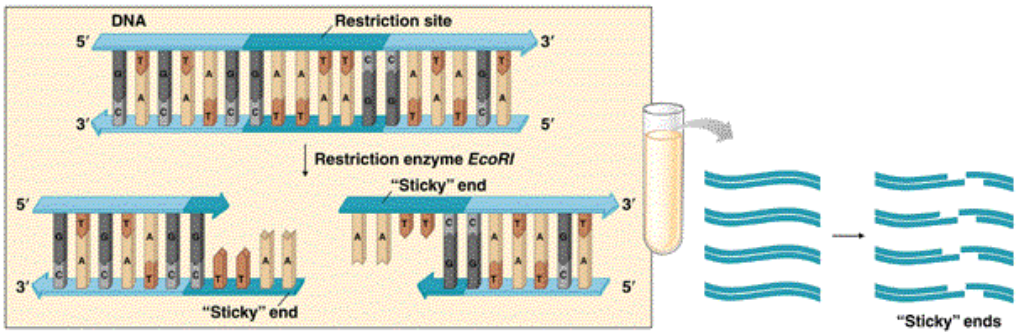
*Hin*d III A↓AGCTT

Hsu I A↓AGCTT

او قد تكون غير تامة التناظر Imperfect isoschizomers مثل الانزيمين *Sma* I و *Xma* I اللذين يتعرفان على نفس التتابع الا انهما يقطعانه في مواقع مختلفة مما يؤدي الى انتاج قطع دنا ذات نهايات غير متماثلة

Sma I CCC↓GGG

Xma I C↓CCGGG


DNA
Restriction site
5′
3′
3′
5′
Restriction enzyme EcoRI
"Sticky" end
5′
3′
3′
5′
"Sticky" end
"Sticky" ends

C.

اسم المحاضرة : ربط جزيئات الدنا

رقم المحاضرة : العاشرة

المصادر :

22- Watson, J.D.; Baker, T.A,; Bell, S.P.; Gann, A. (2004). Molecular Biology of the Gene. 5th Ed. Pearson edution.

23- Clark, D. (2006). Molecular Biology Understanding the Genetic Revolution. Elsevier Inc.

24- Santos, D.M. (2011). Genetic Engineering, Recent Developments in application. Apple Academic press.

٤-عماش، هدى صالح مهدي.(١٩٩٤). مبادئ علم الحياة الجزيئي. كلية العلوم . جامعة بغداد.

٥-البكري ، غالب حمزة.(١٩٩٠). مبادئ الهندسة الوراثية. جامعة البصرة.

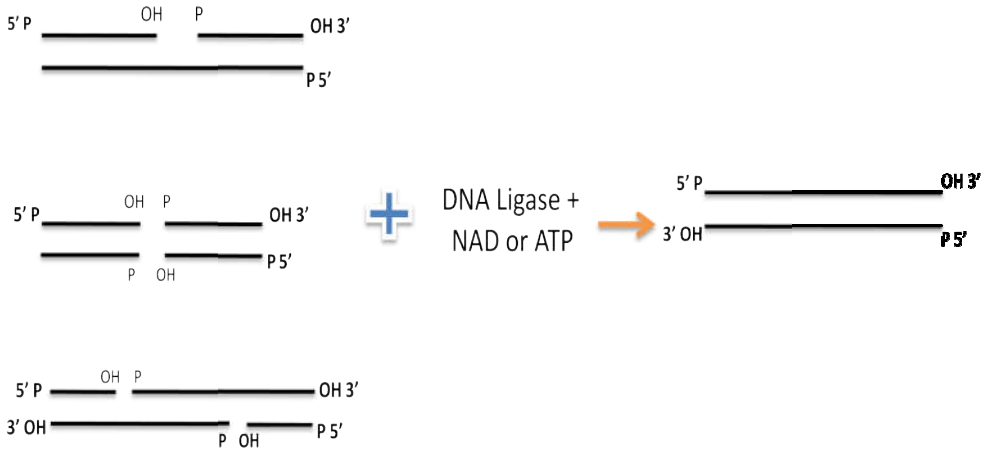
ربط جزيئات الدنا DNA Ligation

تعتمد فعالية ربط قطع الدنا على فعالية إنزيم DNA Ligase الذي يتصف بقابليته على لحم الكسور في العمود الفقري لجزيئه الدنا عن طريق إعادة تكوين الآصرة ثنائية الايستر بين مجموعة الهيدروكسيل (3- OH) لأحد النيوكليوتيدات ومجموعة الفوسفات (5- P) للنيوكليوتيدة المجاورة، ليعيد جزيئات الدنا المقطوعة الى حالتها الطبيعية.

إن قابلية هذا الإنزيم على إصلاح الكسور الموجودة في خيوط الدنا جعلت له دورا مهما في عمليات تخليق الخيوط الجديدة أثناء تكرار الدنا وفي إصلاح الجزيئات المعطوبة وكذلك في إعادة الارتباط Recombination . كما إن له أهمية كبيرة جدا في تقنيات الهندسة الوراثية لقابليته على ربط قطع الدنا ذات النهايات اللاصقة او المستوية.

تم عزل الإنزيم من عدة كائنات حقيقية وبدائية النواة وكذلك من الفايروسات وقد وجد ان جميع الإنزيمات لها القابلية على إصلاح الكسور الموجودة في خيوط الدنا. تركزت الدراسات بصورة خاصة حول الإنزيمين المعزولين من بكتريا الـ *E coli* (٧٥٠٠٠ دالتون) ومن العاثي T4 (٦٠٠٠٠ دالتون)، حيث يعمل هذين الإنزيمين بنفس الطريقة في إصلاح الكسور. يتميز انزيم T4 DNA Ligase بقابليته على ربط قطع الدنا ذات النهايات اللاصقة إضافة إلى النهايات المستوية ويستخدم بصورة أوسع في تجارب الكلونة ويفضل على الإنزيم المعزول من الـ *E coli* الذي يعمل أساسا على ربط النهايات اللاصقة. ويختلف الإنزيمان كذلك في حاجتهما الى العوامل المساعدة، اذ يحتاج الانزيم المنتج من قبل *E coli* الى +NAD كعامل مساعد بينما يحتاج الانزيم الذي ينتجه العاثي T4 الى ATP لاتمام عمله. اذ ينشطر العامل المساعد في كلا الحالتين ليكون معقدا من الانزيم و AMP الذي يرتبط بالثلمة (الكسر) الحاملة للمجموعتين 5-P و 3-OH ليقوم باعادة تكوين الاصرة الفوسفاتية ثنائية الايستر.

للحصول على انزيم T4 DNA Ligase بصورة واسعة فقد تم كلونة الجين المسؤول عن انتاجه في احد نواقل كلونة العاثي لامدا λ phage الذي تم ادخاله فيما بعد الى بكتريا E coli وبهذا اصبح ممكنا الحصول عليه بكميات كبيرة.



ربط قطع الـ DNA ذات النهايات اللاصقة

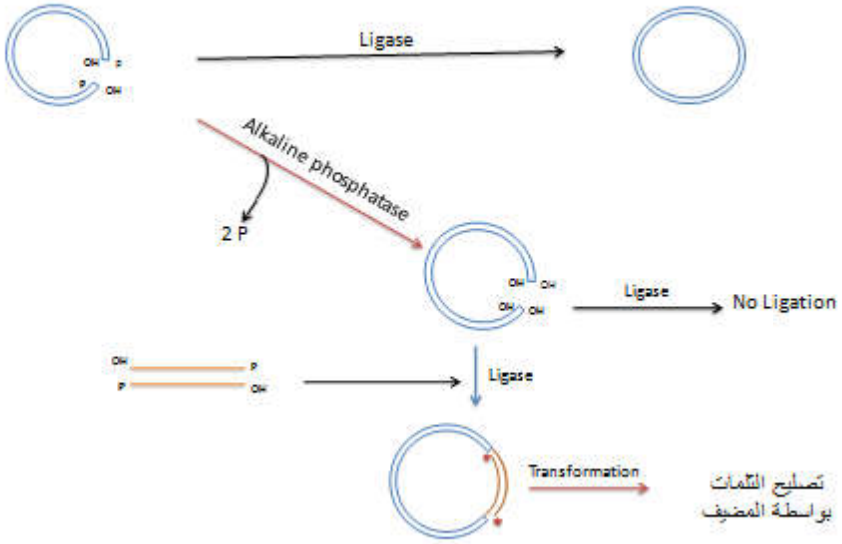
في تجارب الكلونة يفضل عادة ان يكون الإنزيم المستعمل من النوع الذي ينتج نهايات لاصقة متكاملة لسهولة ربط مثل هذا النوع من القطع بواسطة إنزيم DNA Ligase ، اذ تتحد اولا النهايات اللاصقة عن طريق ارتباط القواعد النيتروجينية المتكاملة بواسطة الأواصر الهيدروجينية الا ان هذا الاتحاد لا يكون قويا بالدرجة الكافية لحمل قطعتي الدنا معا بصورة ثابتة ولكنه يسهل عمل انزيم DNA Ligase الذي يعمل على إصلاح الكسرين الباقيين في العمود الفقري للخيطيين عن طريق تكوين الآصرة الفوسفاتية ثنائية الايستر مما يؤدي الى تكوين جزيئه دنا مستقرة يمكن إدخالها فيما بعد الى خلية المضيف. ان مناطق ارتباط النهايات اللاصقة المتكاملة ستكون حساسة لنفس الإنزيم الذي أنتجها أول مرة وبهذا سيكون من السهولة استخلاص قطعة الدنا الغريبة المكلونة مرة اخرى وذلك بمعاملتها بنفس الانزيم القاطع.

ان هدف عملية الكلونة هو ربط قطعة الدنا الغريبة الى ناقل الكلونة المناسب في انبوبة الاختبار ليتم ادخال جزيئة الدنا الهجينة الى الخلايا المضيفة. الا ان عملية خلط قطع الدنا الغريبة مع نواقل الكلونة (المعاملة كليهما بانزيمات التقييد) لتكوين جزيئات الدنا الهجينة ليس الاحتمال الوحيد الناتج لعملية الربط بواسطة الانزيمات اللاصقة، انما هناك احتمالات اخرى يمكن ان تحدث في انبوبة الاختبار فقد ترتبط نهايات ناقل الكلونة مع بعضها لتكوين جزيئة ناقل ثنائية Dimer لاتحتوي على قطعة الدنا الغريبة، او ترتبط نهايات ناقل الكلونة مع بعضهما في عملية اعادة ارتباط للناقل Re-ligation بدون الارتباط بقطعة الدنا الغريبة. تؤدي مثل هذه الارتباطات الى اختزال كفاءة عملية الكلونة لان الخلايا المتحولة سوف تكون غير حاوية على قطعة الدنا الغريبة، لذا وجب تهيئة كل الظروف الملائمة التي من شأنها زيادة احتمالية الحصول على جزيئات دنا هجينة، احد هذه العوامل هي اجراء التفاعل بوجود تركيز عالي من قطع الدنا الغريبة نسبة الى جزيئات الناقل (تكون النسبة ٣ : ١) لخفض نسبة التقاء او تصادم جزيئات الناقل مع بعضها وزيادة كفاءة عملية الكلونة.

من الطرق الاخرى المستخدمة لزيادة كفاءة عملية الكلونة هي معاملة نواقل الكلونة المقطوعة وقبل خلطها بالدنا الغريبة بانزيم الفوسفاتيز القاعدي Alkaline phosphatase المعزول من البكتريا او العجول الذي يعمل على ازالة مجاميع الفوسفات من الطرف '5 للنهاية اللاصقة مما يمنع تدوير النواقل او ارتباطها مع بعضها، وبهذا ستكون الطريقة الوحيدة لتدوير الناقل هي بربطها مع جزئية دنا غريبة وهنا سيعمل الانزيم اللاصق على اصلاح وربط الكسرين الحاويين على مجموعة فوسفات ويبقى كسرين في منطقة الارتباط بدون ربط وهذا لايؤثر كثيرا على عملية ادخال جزئية الدنا الهجينة الى داخل المضيف ويتم اصلاح هذين الكسرين داخل خلايا المضيف بواسطة اجهزة الاصلاح.

تكون درجات الحرارة المنخفضة هي المثلى لعمل انزيم DNA Ligase كذلك تكون الحرارة المنخفضة هي مثالية لتكوين الاواصر الهيدروجينية بين القواعد النيتروجينية للنهايات اللاصقة. وتكون درجة الحرارة المثلى هي ١٦°م .

- **ربط قطع الدنا ذات النهايات اللاصقة**



ربط قطع الـ DNA ذات النهايات المستوية

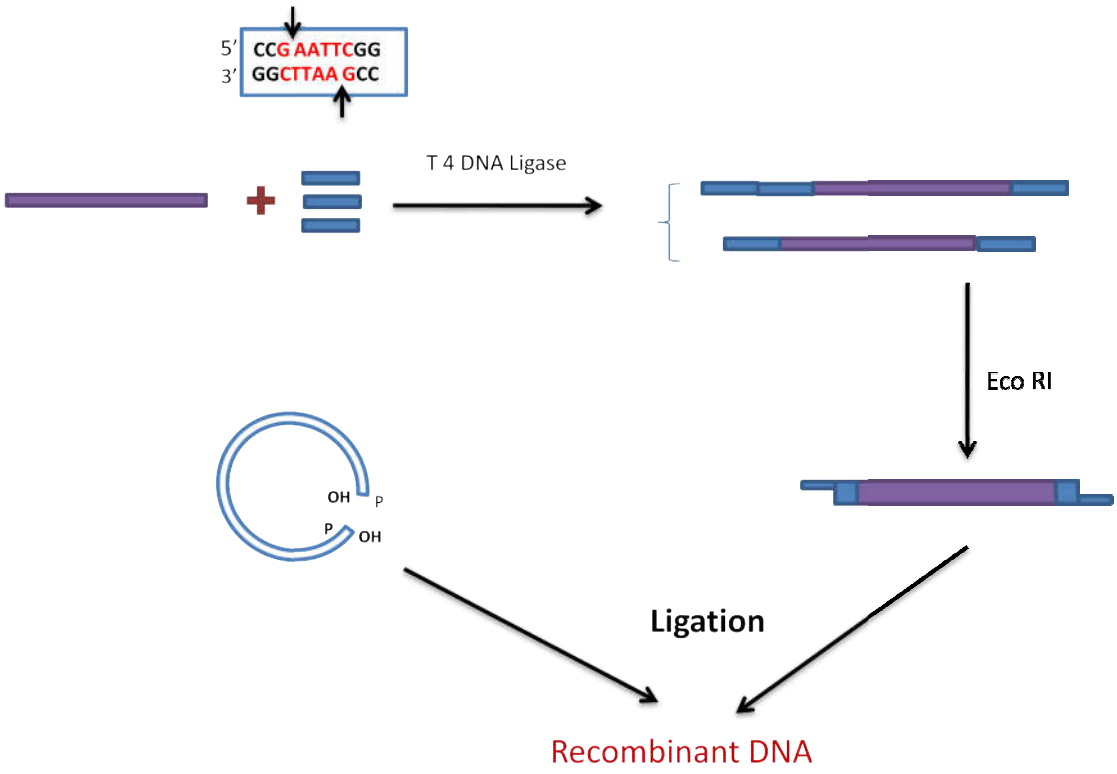
على الرغم من سهولة وكفاءة عملية ربط قطع الدنا ذات النهايات اللاصقة في عمليات الكلونة الا ان ذلك لا يعني عدم استخدام قطع الدنا ذات النهايات المستوية وخاصة في حالة عدم إمكانية استخدام انزيمات قاطعة تعطي نهايات لاصقة. لآجل ربط قطع الدنا ذات النهايات المستوية يتم استخدم إنزيم T4 DNA Ligase القادر على ربط هذه النهايات. ولكن عملية ربط النهايات المستوية تكون اقل كفاءة واكثر بطئاً من عملية ربط قطع الدنا ذات النهايات اللاصقة ، اذ تكون عملية ربط قطع الدنا ذات النهايات اللاصقة اسرع بـ ١٠٠ مرة من ربط قطع الدنا ذات النهايات المستوية، ويعود السبب الى عدم قدرة النهايات المستوية على الاتحاد مع بعضها كما في النهايات اللاصقة لتسهيل عمل الانزيم اللاصق، فلكي يقوم الانزيم اللاصق بعمله يجب ان تكون قطع الدنا قريبة جدا من بعضها البعض كي يتسنى للانزيم القيام بعمله وبما ان احتمالية التقاء قطع الدنا بهذا الشكل تكون قلية في مثل هذه الظروف وان حدث فانه يكون لفترة زمنية قصيرة جدا ، فأن تركيز الدنا في خليط التفاعل يجب ان يكون اعلى من ذلك المستخدم في ربط القطع ذات النهايات اللاصقة وذلك لزيادة فرص التقاء النهايات المستوية مع بعضها العض.

يحتاج التفاعل اللازم لربط قطع الدنا ذات النهايات المستوية على الاقل الى جزيئيتين من انزيم T4 DNA Ligase واحدة تعمل على حمل النهايتين المستويتين في موضع متقابل وتعمل الاخرى على تكوين الاصرة الفوسفاتية ثنائية الايستر لاتمام عملية الربط ، لذا فان تركيز الانزيم المطلوب في هذا التفاعل يكون اكثر بحدود ١٠ – ٣٠ مرة من تركيز الانزيم المستخدم للحصول على نفس معدل الارتباط في قطع الدنا ذات النهايات اللاصقة. في هذا النوع من التفاعل فان درجة الحرارة لا تلعب نفس الدور الي تلعبه في عملية ربط القطع ذات النهايات اللاصقة، عموما تتراوح درجة الحرارة المستعملة في ربط النهايات المستوية بين ٢٠ - ٢٥° م .

في عملية ربط قطع الدنا ذات النهايات اللاصقة، تكون النهايات منتجة بنفس انزيم التقييد وبهذا سيكون ممكنا اعادة قطعها واستخلاصها مرة اخرى بنفس الإنزيم المستخدم في عملية القطع، اما في حالة ربط النهايات المستوية فأن عملية الربط ممكنة سواء سواء أكانت هذه النهايات منتجة بنفس إنزيم التقييد او بأنزيمين مختلفين، وفي الحالة الثانية سيكون موضع الارتباط الناتج غير حساس لكلا الإنزيمين القاطعين مما يعني عدم إمكانية استخلاص الدنا المكلونة من جزيئة الناقل وهذا يمثل مشكلة في تجارب الكلونة. ولأجل تجاوز هذه المشكلة استنبطت وسائل يمكن خلالها زيادة كفاءة عملية الكلونة ومن اهم هذه الوسائل هي استخدام الجزيئات الرابطة **Linker molecules** او الوصيلات **Adaptors** .

١ـ استخدام الجزيئات الرابطة

الجزيئات الرابطة عبارة عن تتابعات قصيرة مكونة من ثمانية الى عشر أزواج من النيوكليوتيدات مصنعة مختبريا حاوية على واحد او اكثر من المواضع الحساسة لإنزيمات التقييد. تستخدم هذه الجزيئات في عمليات كلونة القطع ذات النهايات المستوية تسمح بإعادة استخلاصها مرة أخرى اذا دعت الحاجة الى ذلك.



٢- استخدام الوصيلات

الوصيلات عبارة عن قطعة صغيرة من تتابعات الدنا مصنعة مختبريا حاوية على نهاية لاصقة منزوعة الفوسفات في احد طرفيها ونهاية مستوية حاوية على مجموعة فوسفات في طرفها الثاني . يتم استخدم الوصيلات في حالة احتواء قطعة الدنا المراد كلونتها على موضع حساس لواحد او اكثر من الانزيمات القاطعة التي تستخدم لقطع الجزيئات الرابطة. ففي هذه الحالة سيتم قطع جزيئة الدنا الغريبة الى قطعتين او اكثر إضافة الى قطع الجزيئة الرابطة. لذا يتم اللجوء الى استخدام الوصيلات، وبما ان النهايات اللاصقة للوصيلات لا تحتوي على مجاميع فوسفات لذا فلن يكون هناك اي احتمال لارتباطها مع بعضها في محلول التفاعل. بعد اتمام ربط الوصيلات وقبل كلونة القطع الناتجة عن هذا الارتباط تتم إضافة مجاميع الفوسفات الى الطرف '5 من النهايات اللاصقة لتصبح جاهزة للكلونة.

اسم المحاضرة : نواقل الكلونة

رقم المحاضرة : الحادية عشر

المصادر :

25- Watson, J.D.; Baker, T.A,; Bell, S.P.; Gann, A. (2004). Molecular Biology of the Gene. 5th Ed. Pearson edution.

26- Clark, D. (2006). Molecular Biology Understanding the Genetic Revolution. Elsevier Inc.

27- Santos, D.M. (2011). Genetic Engineering, Recent Developments in application. Apple Academic press.

٤-عماش، هدى صالح مهدي.(١٩٩٤). مبادئ علم الحياة الجزيئي. كلية العلوم . جامعة بغداد.

٥-البكري ، غالب حمزة.(١٩٩٠). مبادئ الهندسة الوراثية. جامعة البصرة.

نواقل الكلونة

تعني الكلونة ادخال قطعة دنا غريبة داخل مضيف لا يتحتوي اصلا على مثل هذه القطعة بحيث يمكن ان تديم نفسها في المضيف الجديد وان تتوارث بثبات خلال الاجيال المتعاقبة وان عدم ديمومة الدنا الغريبة داخل خلايا المضيف كانت تمثل اهم معوقات نجاح تجارب الكلونة . ولاجل التغلب على هذه المشكلة اتجه التفكير إلى ربط الدنا الهذف إلى مكرر Replicon مناسب قبل ادخالها إلى المضيف بحيث يمكنها التكرار والتوارث بثبات مع هذا المكرر خلال الاجيال المتعاقبة وكان من البديهي ان تتجه الانظار نحو البلازميدات وبعض العاثيات لما هو معروف عنهما في قابليتها على التكرار المستقل عن الكروموسوم البكتيري لاحتوائها على منشا تكرار خاص بها.

نتيجة لتطور تقنيات الهندسة الوراثية وتشعب البحوث في هذا المجال فقد اصبح هناك حاجة لتطوير العديد من نواقل الكلونة اعتمادا على نوع المضيف والغرض المطلوب من عملية الكلونة .

انواع نواقل الكلونة :-

١- البلازميدات plasmids
٢- العاثي لامدا λ phage
٣- الكوزميدات Cosmids
٤- العاثيات مفردة الخيط

البلازميدات

هي عبارة عن قطع دنا داثرية لها القابلية على التكرار المستقل عن كروموسوم المصيف وهي تتوارث بثبات على شكل قطع منفصلة عن الكروموسوم Extrachromosomal DNA . اكتشفت البلازميدات لاول مرة عام في بداية الخمسينات من قبل Joshua Lederberg . تختلف البلازميدات في الحجم وهي عادة غير ضرورية لحياة المضيف إلا إن وجودها يعطي المضيف صفات إضافية تمكنه من العيش تحت ظروف استثنائية او إنتاج بعض المواد مثل الهيمولايسين و تخمير السكريات او مقاومة المضادات الحياتية او مقومة المعادن الثقيلة او غيرها من الصفات .

بالنظر لوجود اعداد كبيرة من البلازميدات المختلفة واستمرار اكتشاف بلازميدات جديدة فقد تم تقسيمها اعتمادا على نظم مختلفة من اجل تسهيل دراستها فقد قسمت إلى :-

١- البلازميدات الاقترانية conjugative plasmids : التي تحتوي على الجينات الناقلة والتي تسمى tra Gene والتي تعطي للخلية صفة الاقتران مع خلايا اخرى .
٢- البلازميدات غير الاقترانية non-conjugative plasmids : التي لاتحتوي على جين tra وبهذا تكون البكتريا الحاوية على هذه البلازميدات غير قادرة على البدء بعملية الاقتران .

وقد يعتمد تقسيم البلازميد على عدد النسخ الموجودة في المضيف وبهذا تقسم إلى نوعين :-

١- البلازميدات المسترخية Relaxed Plasmids : وهذه توجد باعداد كبيرة من النسخ داخل الخلية قد تصل إلى اكثر من ٢٠٠ نسخة .
٢- البلازميدات المتشددة Restricted Plasmids : وهي التي توجد بعدد قليل جدا من النسخ داخل المضيف

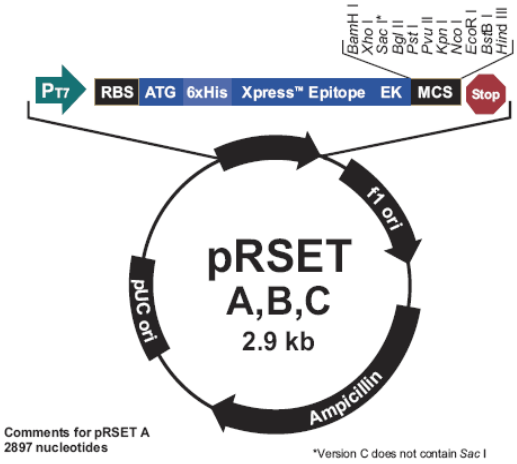
قد تكون البلازميدات متوافقة Compatible plasmid وهي البلازميات التي تعود إلى عائلتين مختلفتين من البلازميدات وتستطيع ان تتواجد في نفس المضيف حتى وان كانت تحمل نفس الجينات او قد تكون بلازميدات من نوع غير المتوافقة Incompatible plasmids وهذه النوع من البلازميدات لا يمكنه البقاء نفس المضيف كونه يعود إلى نفس العائلة البلازميدة ولا تحتفظ الخلية الا بنوع واحد منهما وتفقد الاخر حتى وان اكن البلازميدان يحملان جينات مختلفة.

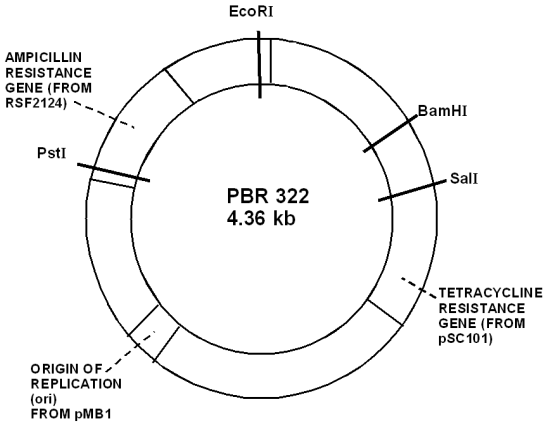
خصائص البلازميد المستخدم كناقل كلونة

١- ان يكون صغير الحجم (ذو وزن جزيئي قليل) ولهذا الخاصية فاوئد كثيرة منها سهولة التعامل معه حيث تكون البلازميدات الصغيرة اكثر مقاومة للاضرار الناتجة اثناء عملية استخلاصها وعادة تكون البلازميدات الصغيرة بشكل مسترخي مما يزيد من كفاءة عزلها اضافة إلى ان البلازميدات الصغيرة تكون اكثر كفاءة من البلازميدات الكبيرة في عملية التحول في تجارب الكلونة واخيرا ان صغر حجم البلازميد يقلل من فرص وجود مواضع حساسة متعددة لانزيم التقييد الواحد.
٢- ان تكون خصائصه مفروفة بشكل جيد بالنسبة لمواقع الجينات ومواقع المواضع الحساسة لانزيمات التقييد وان يكون تتابع نيوكليوتيداته معروفا .
٣- ان يكون من النوع المسترخي وله القابلية على التكاثر السريع .
٤- ان يحتوي على صفة انتقائية يمكن على اساسها انتقاء الخلايا المتحولة كان تكون صفة المقاومة لاحد المضادات الحياتية .
٥- تكون البلازميدات داخل الخلية بشكل ملتف حول نفسها مكونة جزيئات عالية الالتفاف supercoiled molecules وتبقى جزيئات البلازميد بهذا الشكل ما دام كلا خيطي الحلزون سليمين بدون كسر ويطلق عليها الجزيئات الدائرية المغلقة تساهميا covalently closed circular molecule (ccc) . وفي حالة تعرض احد خيطي الحلزون إلى كسر تفقد الجزيئة خاصية الالتفاف العالي مكونة جزيئة دائرية مفتوحة open circular (oc) اما في حالة قطع خيطي الحلزون بنفس المكان فستنتج جزيئة خطية Linear molecule (L) .

كان الاتجاه في اول الامر على البلازميدات الموجودة بصورة طبيعة في بكتريا E. coli خصوصا وقد تم بالقعل اختيار عدد منها واستدمت بنجاح كنواقل كلونة ويعتبر البلازميد ColE1 احد بلازميدات E.coli الطبيعية التي استخدمت في كلونة الجينات .وعلى الرغم من استعمال اللازميدات الطبيعية كنواقل كلونة الا انها تعاني من نقص كبير في بعض الصفات

المرغوبة منها قلة المواضع الحساسة المفردة لعدد من انزيمات التقييد وكبر حجم البلازميد وصعوبة الكشف عن صفته المظهرية وانخفاض عدد النسخ في خلايا المضيف . وكان الهدف هو الحصول على ناقل لكونة مثالي حاوي على جميع الصفات المرغوبة التي تؤهلها لتكون نواقل كلونة مثالية وكفوءة. ومع تطور تقنيات الهندسة الوراثية نجح الباحثون في بناء نواقل كلونة مهندسة وراثيا حاوية على كل الصفات المطلوبة وكان الناقل pBR322 اول ناقل كلونة مهندس وراثيا وكان من النوع المسترخي وذو حجم صغير (٤٣٦٣ زوج قاعدي) وكان تتابع نيوكليوتيداته معروف بشكل جيد وحاوي على مواضع مفردة لعدد من انزيمات التقييد .





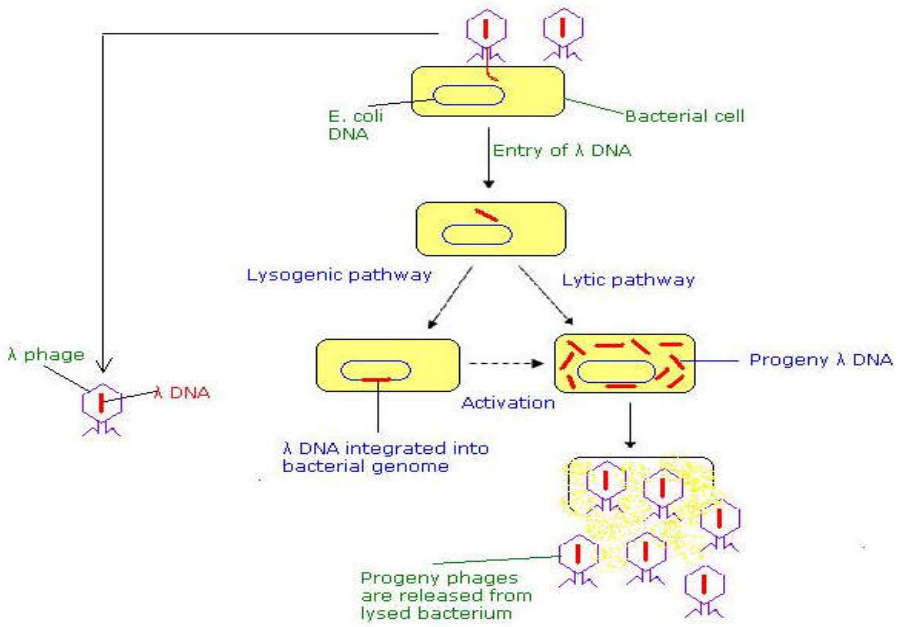
العاثي لامدا

يعد العاثي لاما من اكثر عاثيات *E.coli* المدروسة من الناحية الوراثية وادى هذا إلى تراكم المعلومات على المستوى الجزيئي لذلك اتجهت الانظار إلى العاثي لامدا لاستخدامه كناقل كلونة لبكتريا *E.coli* . ان دنا العاثي بشكله الطبيعي عبارة عن جزيئة خطية من الدنا مزدوجة الخيط يبلغ حجمها 48.5 كليو زوج قاعدي وتم تحديد تتابعاتها بالكامل وتتصف هذه الجزيئة باحتوائها على نهايات لاصقة ناتة على الجانبين بطول ١٢ نيوكليوتيدة وان التتابع لهذين النتوئين مكملين لبعضهما البعض وعند دخول دنا العاثي إلى الخلية المضيف ترتبط النهايتان مع بعضهما لتكوين ما يعرف بموضع اللصق cohesive (Cos) site مما يجعل الجزيئة تاخذ الشكل الدائري داخل المضيف.

بعد دخول دنا العاثي إلى داخل المضيف سرعان ما ترتبط النهايات الاصقة لتكون جزيئة دائرية وتسلك احد الطريقين للاصابة ، الاول يسمى بالدورة التحللية Lytic cycle حيث يبدا الدنا اولا بالتكرار ، حيث تتضاعف الجزيئة الدائرية بطريقة الدائرة المتدحرجة Rolling Circle Mode حيث تتكون سلسلة من الجزيئات الخطية المتصلة مع بعضها في مواضع cos يرافق عملية تكرار الدنا عملية تكوين رؤوس العاثيات وذيل العاثي من خلال التشفير لها من الجينات المتواجدة على يسار جزيئة الدنا للعاثي . تبا بعدها عملية تعبئة جزئيات الدنا في راس

العاثي بعد ان يتم فصل الجزيئات المتكونة عن بعضها بواسطة انزيم قاطع يسمى بروتين A ينتجه الجين a للعاثي لامدا ويستهدف هذا البروتين القاطع التتابع في الموضع cos . لينتج جزيئات خطية ذات نهايات مفردة الخيط. يرتبط بعدها ذيل العاثي بالراس لتكوين عاثيات ناضجة تتم بعدها عملية تحلل الخلية المضيف نتيجة لتكاثر العاثيات داخل الخلية .

اما الطريق الثاني الذي يسلكه العاثي لامدا هو الدورة التحلحلية Lysogenic cycle حيث تقوم جزيئة الدنا الدائرية بالندماج مع كروموسوم المضيف وبموقع معين (موقع att) وتصبح بذلك جزيئة دنا العاثي جزء من كروموسوم البكتريا . بعد اندماجه مع الدنا الكروموسومي يقوم العاثي بانتاج بروتين كابح يعمل على ايقاف جينات العاثي بصورة كاملة وبهذا يبقى العاثي متوقف عن العمل ويسمى العاثي المندمج بالعاثي الاولي Prophage ويبقى جزء ثابت من الكروموسوم البكتيري ويتضاعف معه عند الانقسام البكتيري وتملك الخلية المصابة بالعاثي الاولي مناعة من الاصابة بعاثي اخر . ويبقى العاثي جزء من الكرموسوم البكتيري الا اذا تعرضت الخلية إلى ظروف معينة تساعده على الخروج من كروموسوم البكتريا لتكوين جزيئة دائرية تدخل الدورة التحللية تؤدي إلى تحلل المضيف.



نواقل الكلونة المشتقة من العاثي لامدا

ان الدنا الطبيعية للعاثي لامدا لا تصلح بحد ذاتها ان تكون ناقل كلونة مناسب لوجود مشكلتين اساسيتين كان لابد تجاوزهما فلا ان يمكن استخدامه كناقل كلونة وهاتان المشكلتان هما :-

١- صغر حجم الدنا التي يمكن كلونتها في العاثي الطبيعي حيث كمية الدنا الدنا التي يمكن تحميلها على العاثي لا تتجاوز ٣ كيلو زوج قاعدي ، لان كمية الدنا المسموح بتعبئتها براس العاثي لا تتجاوز ٥٢ كيلو زوج قاعدي .

٢- وجود مواضع حساسة متعددة لانزيمات التقييد وهذا يعني ان معاملتها باي من هذه الانزيمات سيؤدي إلى تقطيعها إلى قطع صغيرة يصعب ربطها مرة اخرى وبنفس الترتيب .

تم تجاوز المشكلة الاولى من خلال استغلال المعلومات المتوفرة عن طبيعة جزيئة دنا العاثي حيث تم حذف المنطقة الوسطى من الخارطة الكروموسومية والتي لاتؤثر على فعالية العاثي في الاصابة والنمو وهذا سيؤدي إلى اختزال حجم دنا العاثي بحوالي ١٥ كيلو زوج قاعدي مما يعني امكانية كلونة دنا غريبة يصل طولها إلى حوالي ١٨ كيلو زوج قاعدي دون ان يزداد طول الدنا عن الحد المسموح به في عملية التعبئة.

اما بالنسبة لتعدد المواضع الحساسة لانزيمات التقييد فقد اتبعت عدة وسائل للحصول على عاثيات طافرة فاقدة لبعض هذه المواضع لتصبح مناسبة لعملية الكلونة ومنها الانتخاب الطبيعي .

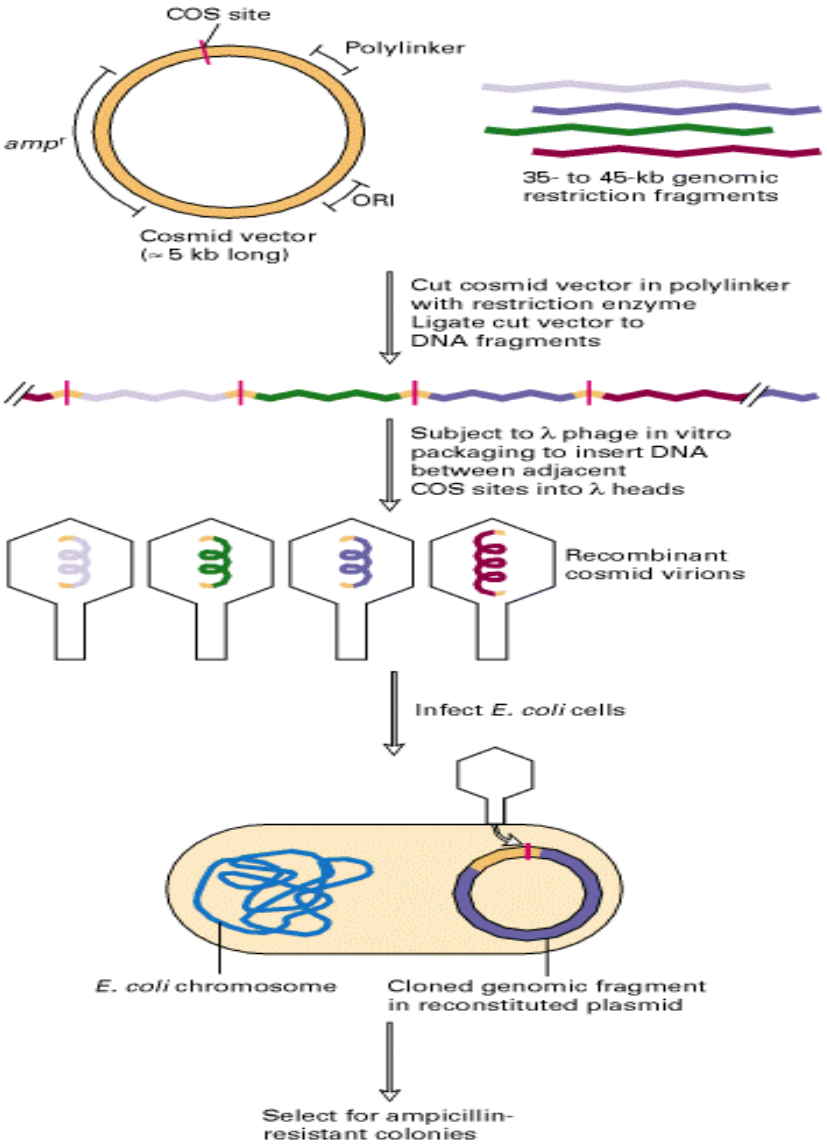
يمكن تقسيم نواقل الكلونة المشتقة من العاثي لامدا إلى ك-

١- نواقل الغرس Insertion vectors : وتتم عن طريق حذف المنطقة الوسطى من دنا العاثي ومن ثم اعادة ربط الطرفين الايمن والايسر مع بعضهما. تحوي هذه النواقل على موضع حساس منفرد لانزيم تقييد واحد على الاقل يمكن غرس الدنا فيه ويعتمد حجم قطع الدنا المكلونة في هذه النواقل على حجم قطعة الدنا المحذوفة من كروموسوم العاثي.
٢- نواقل الاستبدال Replacement vectors : يحتوي هذا النوع من النواقل على موضعبن حساسين لانزيم تقييد معين يحيطان قطعة دنا يمكن استبدالها اثناء الكلونة لقطعة الدنا الغريبة وغالبا ما تحتوي القطعة القابلة للاستبدال على مواضع متعددة لانزيم تقييد اخر بحيث يمكن تقطيعها اثناء عملية الكلونة إلى عدة قدع صغيرة لمنع اعادة غرسها مرة اخرى اثناء عملية اللطق

الكوزميدات

الكوزميد عبارة عن جزيئة هجينة مكونة من بلازميد يحتوي على الموضع cos المشتق من العاثي لامدا ويحتوي تتابع البلازميد في ناقل الكوزميد على منشا للتكرار ومواضع حساسة مفردة لعدد من انزيمات التقييد وصفة مظهرية واحدة .

اعتمدت فكرة بناء الكوزميد على طبيعة نظام التعبئة للعاثي لامدا ، حيث وجد ان اطوال الجزيئات التي يمكن تعبئتها براس العاثي تتروح بين ٣٧ إلى ٥٢ كيلو زوج قاعدي وهذا يعني عدم امكانية تعبئة جزئية الدنا الا اذا كانت مواضع كوس تبعد عن بعضها بالمسافة المذكورة اعلاه. وهذا يعني ان الكوزميدات متخصصة باستيعاب قطع دنا غريبة كبيرة قد يصل طولها إلى ٤٠ كيلو زوج قاعدي.



يوضح الشكل مخططا لكلونة باستخدام الكوزميد حيت يتم قطع الكوزميد بانزيم ملائم وخلطه مع الدنا الغريبة بوجود انزيم الـ Ligase وينتج عن عملية اللصق هذه تكوين انواع مختلفة من الجزيئات وبعد اتمام عملية اللصق يتم تقطيعها من منطقة cos site يعدها يتم تعيئتها في راس العاثس بطريقة التعبئة الخارجية in vitro packaging لتكوين العاثيات الناضجة . تستعمل العاثيات الهجينة لاصابة سلالات من E. coli حيث تعمل العاثيات على حقن الكوزميد الهجين إلى داخل الخلايا ، ترتبط النهايات الاصقة للكوزميد الهجين حال دخوله للخلية لتكوين جزيئة حلقية تبدا بالتكرار شانها شان اي بلازميد دون اظهار اي صفة من صفات العاثي. ويمكن انتقاء الخلايا الحاوسة على الكوزميدات الهجينة على اساس الصفة الانتقائية المظهرية التي يحملها الكوزميد .

العاثيات مفردة الخيط

تتطلب بعض تقنيات الهندسة الوراثية مثل تحديد تتابعات الدنا DNA Sequencing او التطفير خارج الخلايا in vitro mutagenesis لن تكون قطعة الدنا على شكل خيط مفرد وليس حلزون مزدوج ، وتتطلب هذه العملية معملات خاصة لتحويل الخيط المزدوج إلى خيط مفرد ، لذا عمد الباحثون إلى استخدام نواقل كلونة اكثر ملائمة من البلازميدات او العاثيات فكان الاختيار للعاثيات مفردة الخيط ومنها العاثي M13 الذي يتميز بكونه جزيئة مفردة الخيط صغيرة الحجم يبلغ طولها 6.4 كيلو زوج قاعدي تكون على شكل خيط مفرد داخل غلاف العاثي البروتيني ويتحول إلى شكل خيط حلقي عند دخول العاثي إلى داخل الخلية المضيف ويمكن استخدام العاقي كناقل كلونة في هذه الحالة (الشكل الحلقي) والذي يطلق عليه بالشكل المتكرر Replicative form (RF) .

يختلف العاثي M13 عن العاثي لامدا بانه لايوجد حد معين من الدنا الممكن تعبئتها في الغلاف البروتيني . ويتالف العاثي من ١٠ جينات ملتصقة مع بعضها ولا توجد مناطق غير ضرورية لتكرار ونمو العاثي ويكون المكان الوحيد لغرس الدنا الغريبة هو قطعة صغيرة يبلغ طولها ٥٠٧ نيوكليوتيدة تقع بين الجينات يطلق عليها تسمية Intergenic sequence (IS) علما ان هذا التتابع يكون حاوي على منشا التكرار للعاثي الذي يجب ان يبقى سليما اثناء عملية الغرس .