ا.د. احمد محمد تركي

الاقتران البكتيري Bacterial Conjugation:

تعد من اكثر عمليات الانتقال الأفقي للجينات Horizontal Gene transfer شيوعا ويعرف على انه انتقال الجينات او المعلومات الوراثية بين الأنواع او الأجناس البكتيرية من خلال الاتصال المباشر بين الخليتين المقترنتين احدهما تسمى المانحة Donor والتي تحتوي على البلازميد ويرمز لها F^+ (يسمى ب F plasmid) والأخرى تسمى المستلمة ولاتحتوي على بلازميد ويرمز لها F^- من خلال مد مايسمى بشعيرة الاقتران Sex pili اوجسر الاقتران Conjugation Bridge .

اكتشف هذه العملية في عام 1946 من قبل Joshua Lederberg و Edward Tatum حيث أوضحوا ان عملية الاقتران تتضمن انتقال بلازميد او ترانسبوزون وتعود على الخلية المستلمة بالنفع مثل مقاومة المضادات الحياتية او العناصر الثقيلة وكذلك تمكينها من استهلاك بعض المغذيات.

تتلخص متطلبات الاقتران البكتيري بمايلي:

1-البكتريا المانحة والتي يجب ان تحتوي على بلازميد الاقتران F plasmid or F factor وكذلك تحتوي على الأهداب الجنسية Sex or F pili ويرمز لها بـ F^+

1-البكتريا المستلمة والتي لا تحتوي على بلازميد الاقتران ولا على الأهداب الجنسية ويرمز لها بـ F^-.

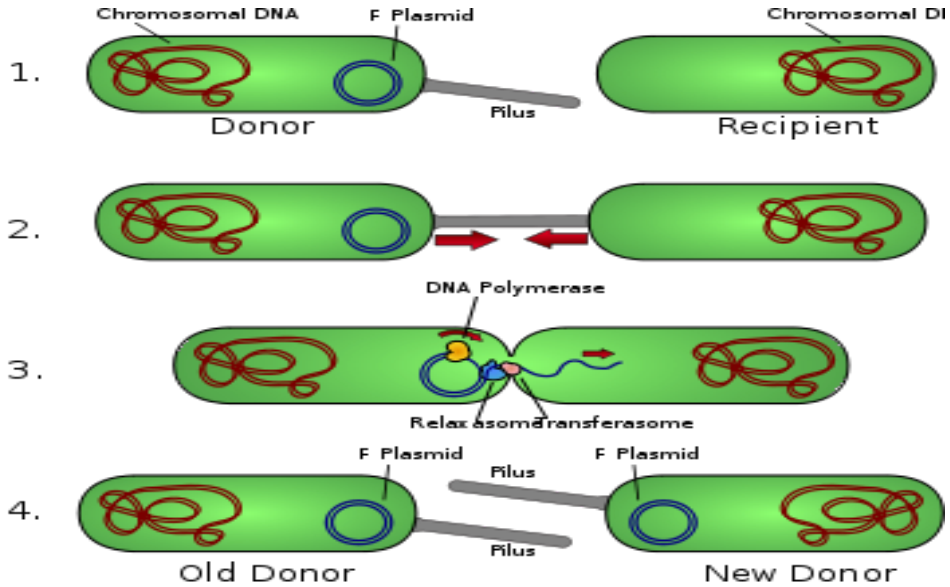
ويتصف بلازميد الاقتران او مايسمى بـ F plasmid or F factor بالمواصفات التالية:

- يكون قادرا على حشر نفسه ضمن كروموسوم البكتريا المانحة بواسطة اعادة الارتباط المتماثل homologous recombination. ويسمى بـ Episome
- ذو حجم جزيئي 100Kb تقريبا.
- قادرا على التضاعف الذاتي ويحتوي على موقع التضاعف OriV وموقع الانتقال OriT
- يحتوي على نظام *tra* and *trb* والذي يمثل مجموعه من الجينات (تقريبا 40 جين) الواجب توفرها لضمان عملية الاقتران وهذه الجينات تشمل:
  - جين الاهداب الجنسية والجينات المنظمة الأخرى *pilin* gene . ومن الجدير بالذكر ان الوظيفة الأساسية للأهداب هو ضمان بدء الاقتران فقط.

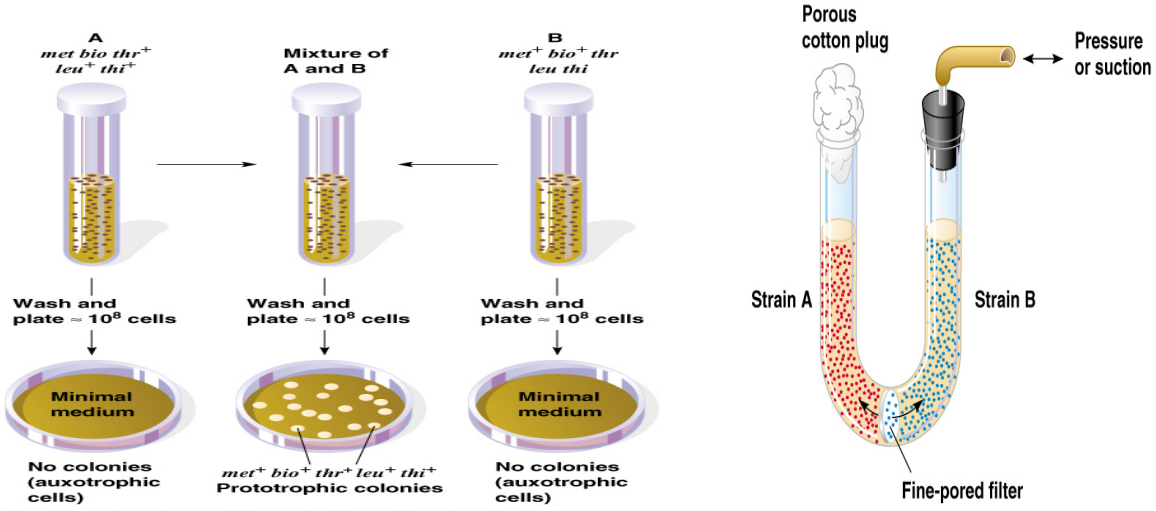
- جين انزيم الاختراق *traD* gene وهو الجين الذي يشفر الإنزيم TraD والذي يكون المسئول عن اختراق الجدار الخلوي للخلية المستلمة وبدء الاندماج الخلوي membrane fusion.
- جين انزيم الإرخاء *traI* gene حيث حيث يشفر الانزيم TraI والذي يعمل لوحده او مع مجموعة من البروتينات مكونا مايسمى بمعقد الارخاء relaxosome حيث يعمل على تكوين قطع في احد شريطي البلازميد الحلقي عند موقع الانتقال OriT. يتكون معقد الارخاء من عدة بروتينات تشمل TraI, TraY, TraM and the integrated host factor IHF.

ويمكن تلخيص عملية الاقتران بمايلي:

1- بدء الاتصال Contact initiation من خلال مد جسر الاقتران والذي هو عبارة عن اهداب Sex pili حيث يشفر جين الـ *pilin* لبروتينات هذه الأهداب.
2- اختراق الجدار الخلوي وبد الاندماج الغشائي حيث تحدث هذه العملية بواسطة انزيم الـ TraD .
3- تهيئة الـ F plasmid للانتقال الى الخلية المستلمة من خلال عمل قطع في Ori T بواسطة معقد الارخاء relaxosome .
4- بدء انتقال احد شريطي البلازميد والذي يصاحبها عملية تكوين الشريط المتمم للشريط الغير مقطوع (الباقي في البكتريا المانحه) بعملية تسمى بـ Conjugative replication والتي تكون مشابه لعملية الكرة المتدحرجة Rolling circle .
5- انتهاء عملية الانتقال وبدء تكوين الشريط المتمم للشريط المنتقل.



بعض البكتريا تحتوي على ***F plasmid*** له القابلية على حشر نفسه مع كروموسوم البكتريا وعندما ينفصل عنها يأخذ معه بعض الجينات الكروموسومية وتسمى هذه البكتريا بـ ***Hfr (high frequency of recombination)*** ومن الممكن ان يحدث اقتران بين *HFR* و F^- *وتكون كلا البكتريا الناتجة Hfr.*



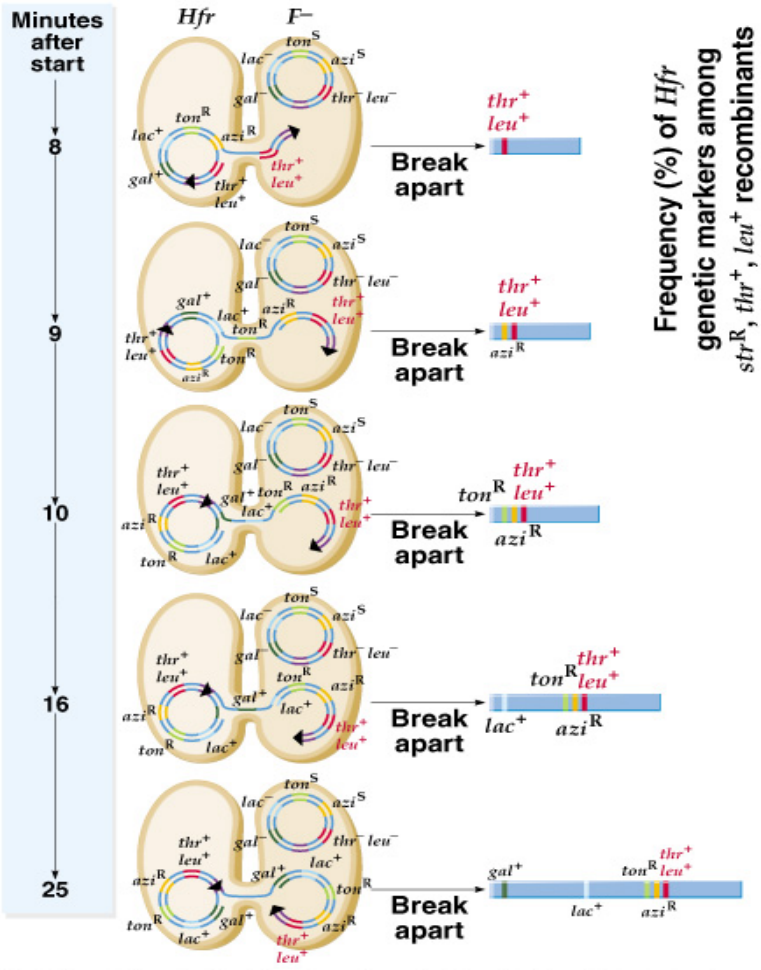
انبوبة ديفز لاجراء تجارب الاقتران وتجربة اقتران لصفات مختلفة

- في بعض الاحيان يندمج العامل F في كرورموسوم البكتريا لبعض الوقت ليكون Hfr ثم يعود لينفصل حاملا معه بعض جينات البكتريا الكروموسومية والخلية الناتجة تسمها F prime (F´) وهذه الخلية تكون Diploid لبعض الجينات و Haploid لجينات الاصل .
- يحدث انتقال الجينات لكروموسوم البكتريا من خلية F+ الى خلية F- بصورة طبيعية ولا ياخذ وقتا وتتحول كلا الخليتين الى F+
- ويمكن ان يحدث الانتقال بين خلية Hfr وخلية F- واذا تم الانتقال بالاقتران الكامل لمدة 100 دقيقة في بكتريا E. coli وتتحول كلا الخليتين الى Hfr ولكن هذا لاحدث الا نادرا بسبب الحركة البراونية في المحاليل بحيث ينفصل الهدب الجنسي بعد مرور فتره قصيرة كما يمكن لل F´ ان ينقل الجين الذي يحمله معه بسهوله كونه صغير الحجم ولا يحتاج وقت
- اصبح بالامكان رسم الخرائط الكرورموسومية للبكتريا المحتوية على الاهلاب الجنسية بسهولة لان F+ حينما يقترن بالكروموسوم البكتيري يتموضع في اماكن مختلفة حسب نوع وظروف البكتريا وبهذا اصبح بالامكان الحصول على العديد من سلالات Hfr تختلف فيما بينها بموقع F+ وبذلك فعند اقترانها ببكتريا F- يكون تسلسل دخول الجينات مختلفا حسب وقت الدخول وبهذا يمكن رسم خارطة جينية باعتماد وقت دخول الجين باستخدام الاقتران المتقطع interrupted matting

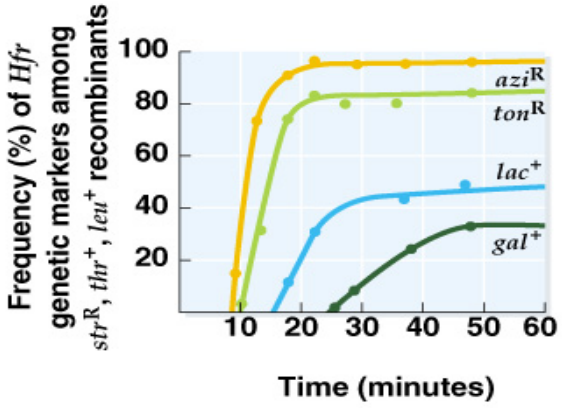
- 1. Conjugation experiments to map genes begin with appropriate Hfr strains selected from the progeny of F^+ X F^- crosses.

- 2. Jacob and Wollman (1950s) used Hfr donor strains with allelic differences from the F^- recipient strains, in interrupted-mating experiments.
- Donor: HfrH thr^+ leu^+ azi^R ton^R lac^+ gal^+ str^R.
- Recipient: F^- thr leu azi^S ton^S lac gal str^S.
- The 2 cell types are mixed in liquid medium at 37°C. Samples are removed at time points and agitated to separate conjugating pairs.
- Selective media are used to analyze the transconjugants. Results in this experiment:
- i. The 1^{st} donor genes to be transferred to the F^- recipient are thr^+ and leu^+, and their entry time is set as 0 minutes.
- ii. At 8 minutes, azi^R is transferred, and ton^R follows at 10 minutes.
- iii. At about 17 minutes lac^+ transfers, followed by gal^+ at about 25 minutes.
- Recombination frequency becomes less at later time points, because more pairs have already broken apart before the sample was taken.
- The transfer time for each gene is reproducible, indicating its chromosomal position. A map may be constructed with the distance between genes measured in minutes. (The *E. coli* chromosome map spans about 100 minutes.)

a) Progressive transfer of donor genes to recipient during *Hfr* × *F*⁻ conjugation



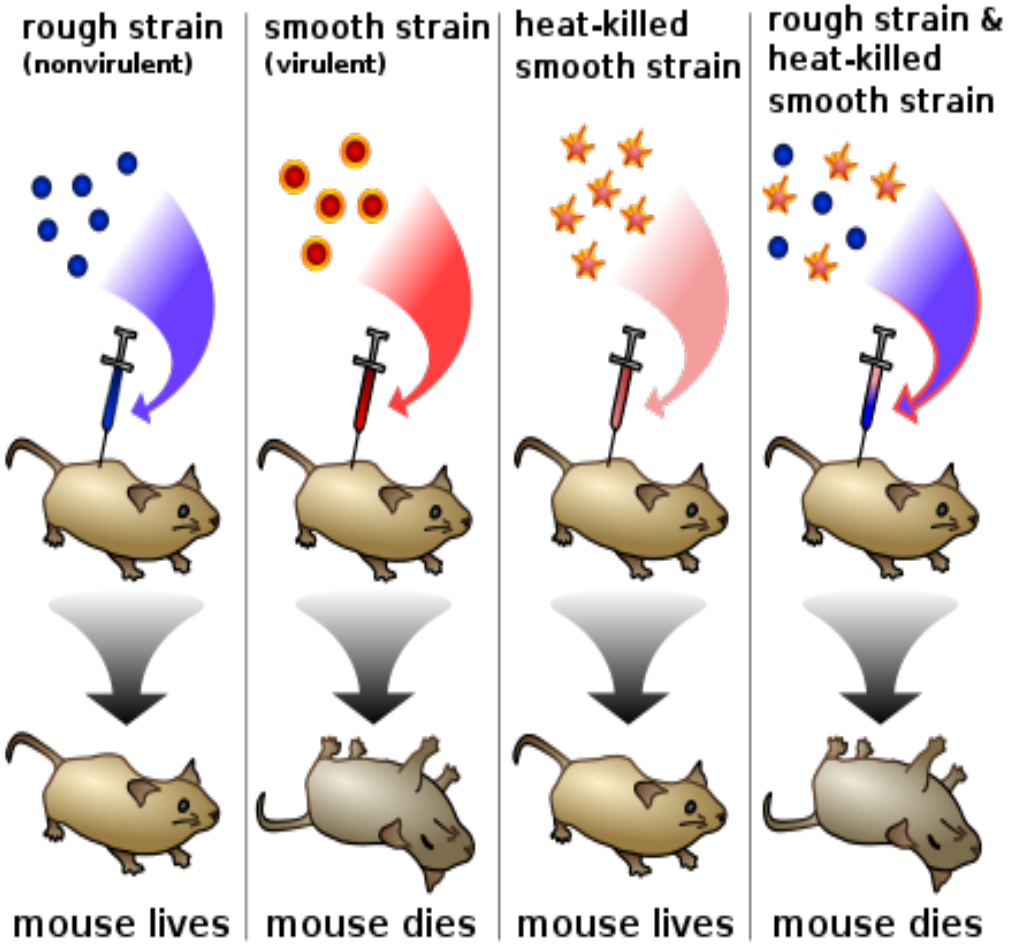
b) Appearance of donor genetic markers in recipient as a function of time



التحول البكتيرى Bacterial Transformation

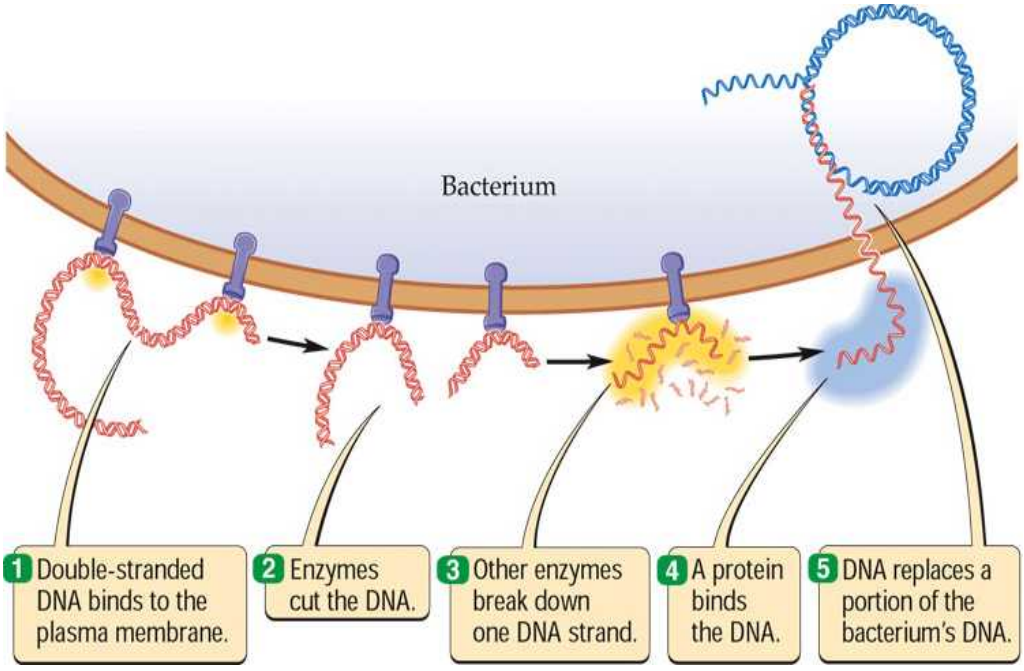
يعرف على انه التحول الوراثي الذي يحصل نتيجة لأخذ وتموضع مادة وراثية غريبه (من الوسط المحيط) ضمن كروموسوم الخلية المستقبلة منتجة بذلك نمط مظهري جديد. وتحدث هذه العملية اما بصوره طبيعية او في المختبر ممكن ان تحصل هذه العملية في الخلية حقيقية النواة لكن تسمى باسم مغاير هو Transfection .

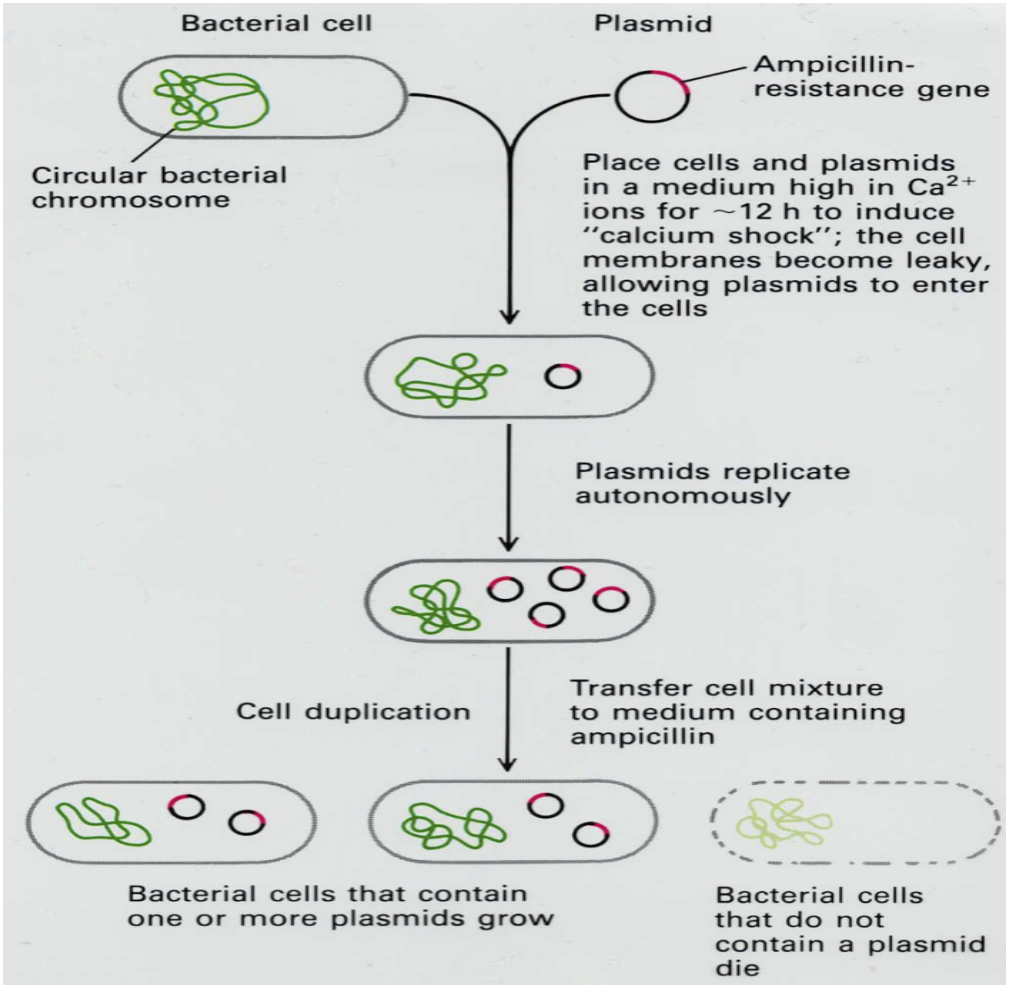
اكتشفت هذه العملية في عام 1928 بواسطة عالم البكتريا البريطاني Frederick Griffith من خلال تجاربه التي أجراها على مسبحيات ذات الرئة *Streptococcus pneumoniae* وكما موضح بالشكل ادناه:

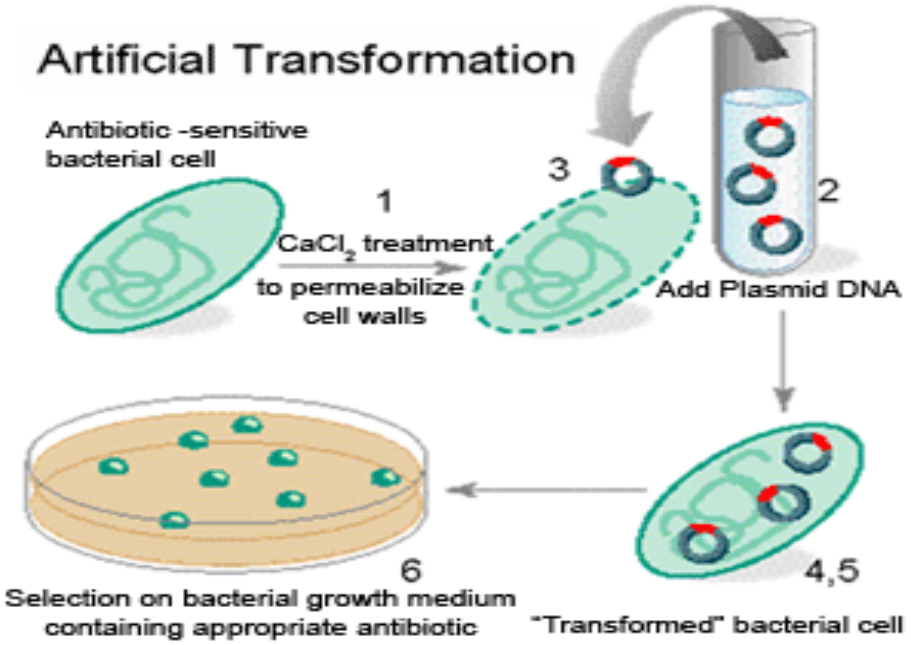


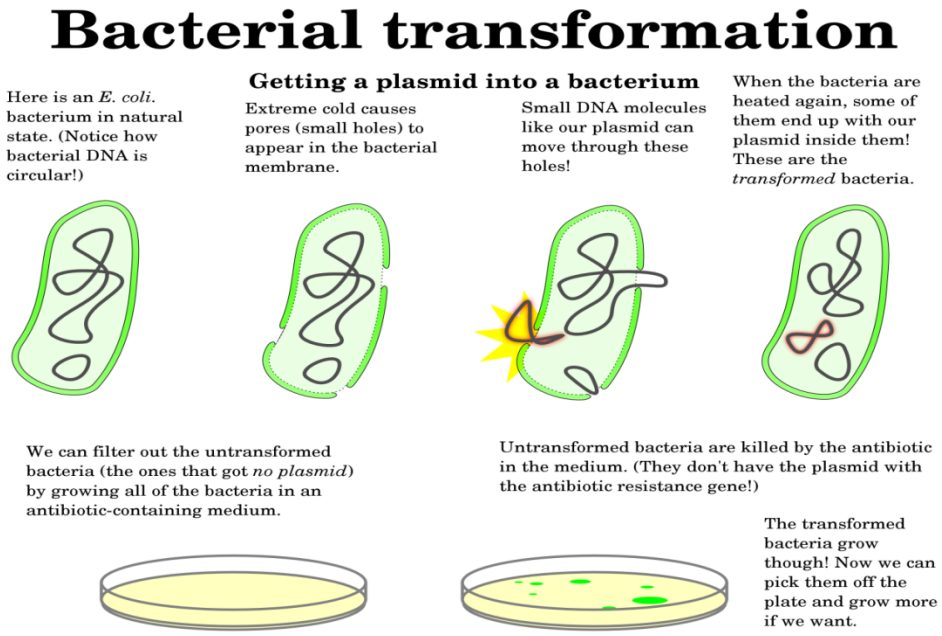
تتم هذه العملية بين الخلية البكتيرية المستقبلة والمهيأة لاستلام الدنا العاري وتسمى هذه الخلية ب competent cell . ويمكن تلخيص خطوات عملية التحول بمايلي:

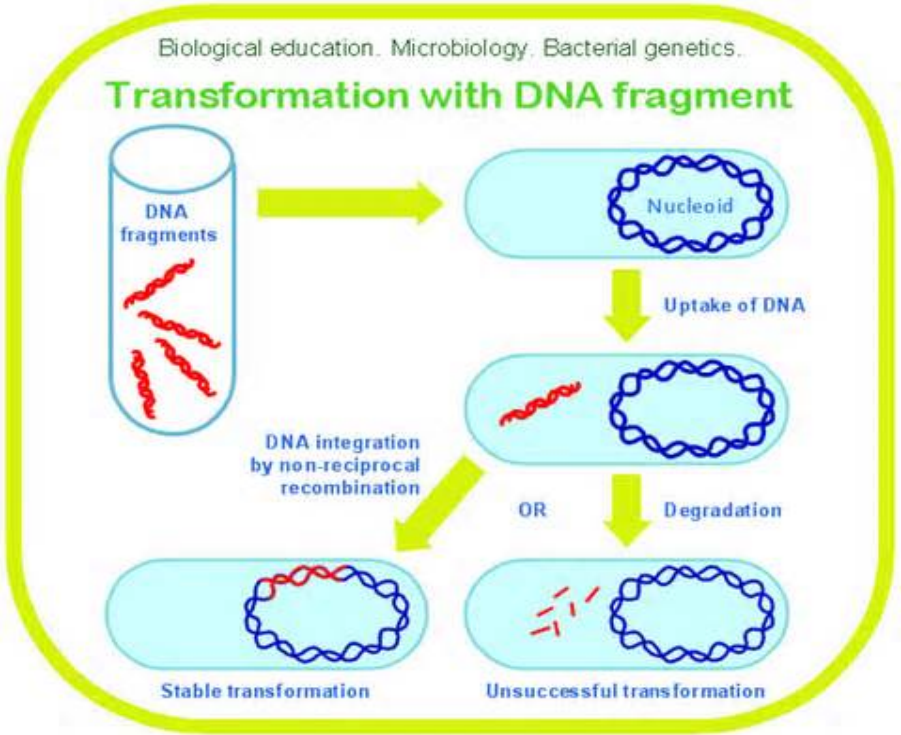
1- تهيئة الخلية المستقبلة: اما ان تكون الخلية مهيئة طبيعيا او في اصطناعيا
2- ارتباط الدنا العاري الى سطح الخلية المهيئة: ان دخول الدنا العاري سواء كان بلازميد او قطعة من الكروموسوم من خلال وجود مستقبل على سطح الخلية المهيئة. تسمى المناطق التي يرتبط عندها الدنا العاري بسطح الخلية المهيئة بـ zones of adhesion or Bayer's junction وتشترك عدة بروتينات بعملية اخذ الدنا العاري ومن أهمها translocase complex .
وتتضمن هذه الخطوة تحلل الشريط الثاني (الغير مرتبط بانتاج البروتينات)
3- نقل الدنا الى داخل الخلية وضمان عدم تحلله من خلال البروتينات المرتبطه به .
4- انحشار الدنا العاري ضمن كروموسوم الخلية المستقبله بواسطة اعادة الارتباط المتماثل homologous recombination .
5- تضاعف دنا الخلية المتحولة وراثيا وإنتاج نمط مظهري جديد. ويمكن توضيحها من خلال المخططات التالية :




Bacterial cell
Plasmid
Ampicillin-resistance gene
Circular bacterial chromosome
Place cells and plasmids in a medium high in Ca^{2+} ions for ~12 h to induce "calcium shock"; the cell membranes become leaky, allowing plasmids to enter the cells
Plasmids replicate autonomously
Cell duplication
Transfer cell mixture to medium containing ampicillin
Bacterial cells that contain one or more plasmids grow
Bacterial cells that do not contain a plasmid die

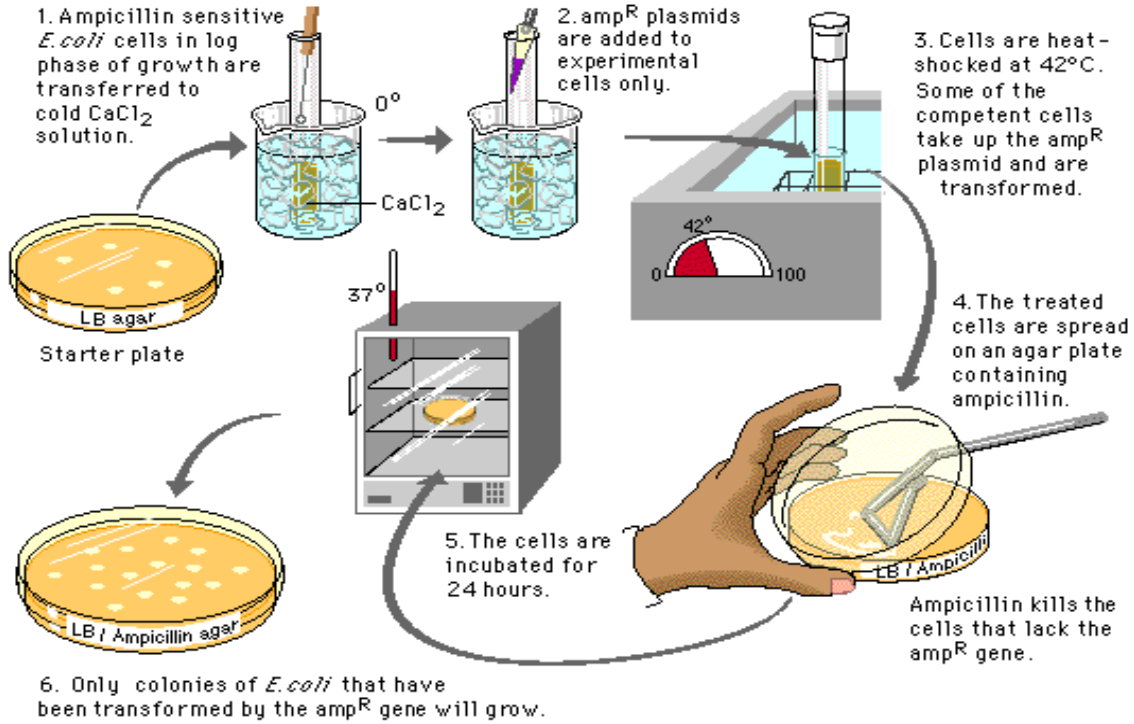

Artificial Transformation
Antibiotic -sensitive bacterial cell
1
$CaCl_2$ treatment
to permeabilize cell walls
2
3
Add Plasmid DNA
4,5
"Transformed" bacterial cell
6
Selection on bacterial growth medium containing appropriate antibiotic

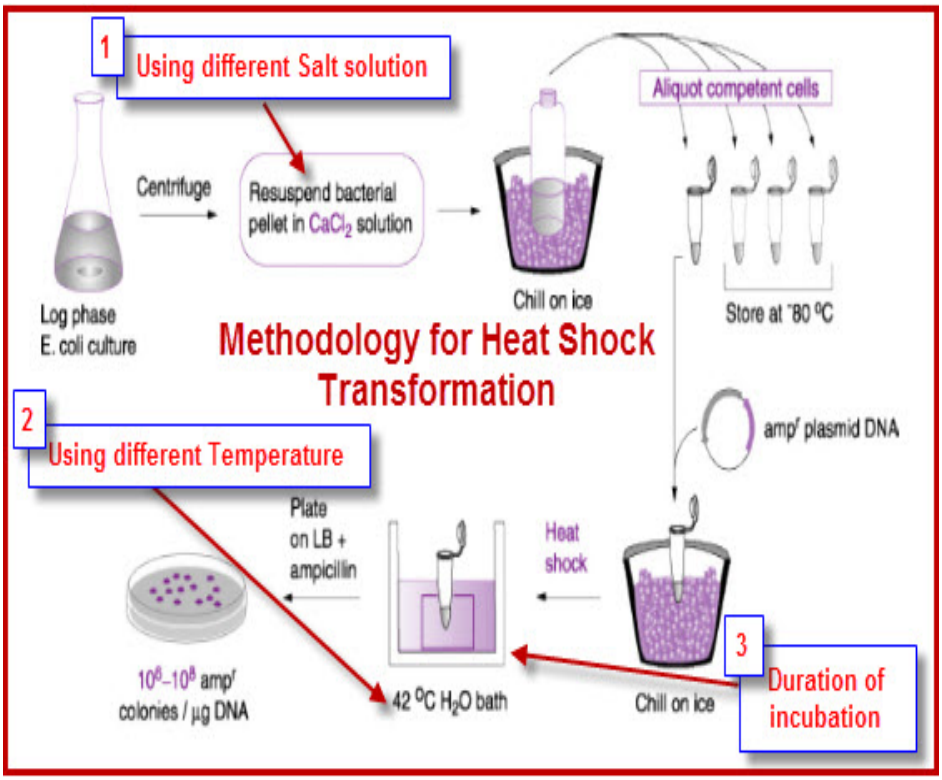




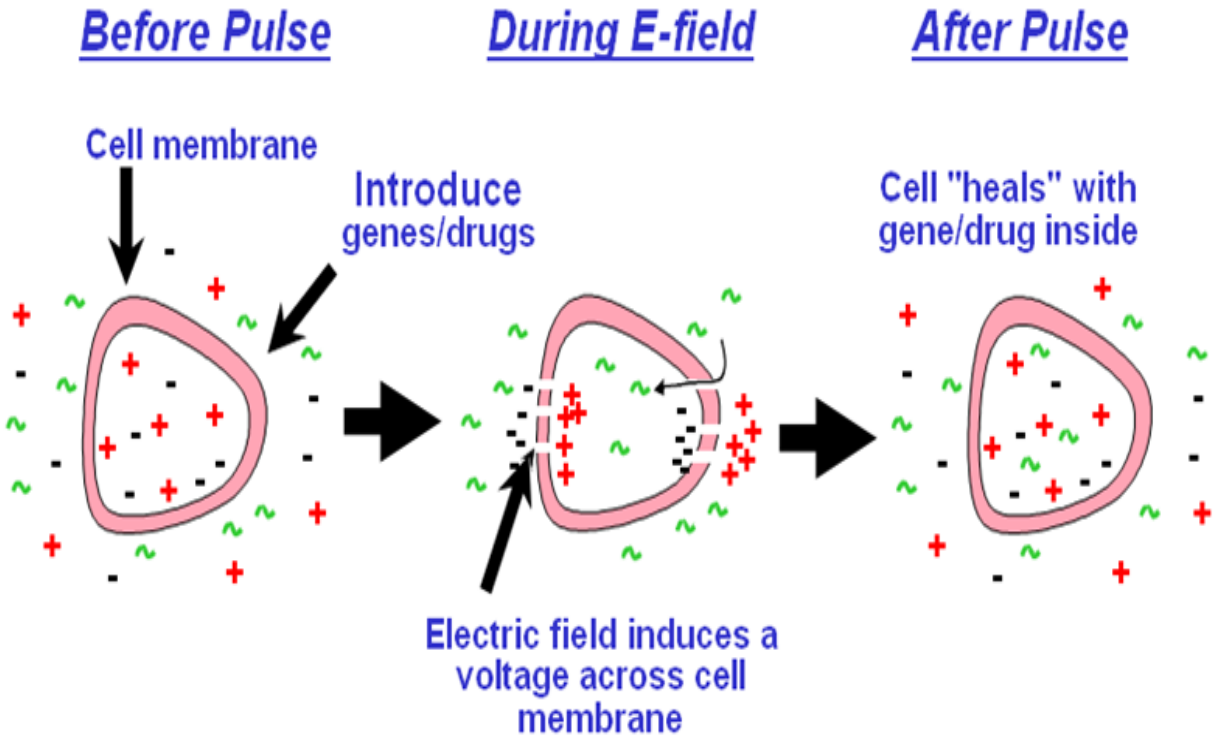
ممكن ان تحدث عملية التحول الوراثي طبيعيا او في المختبر. هنالك طريقتين لإحداث عملية التحول الوراثي بالمختبر:

1- التحول بواسطة التهيئة الكيمياويه والفيزياوية للخلية المستقبلة: وتتم من خلال معاملة الخلية بملح كلوريد الكالسيوم $Cacl_2$ بوجود البرودة والحرارة المتعاقبتين وكما موضح ادناه:





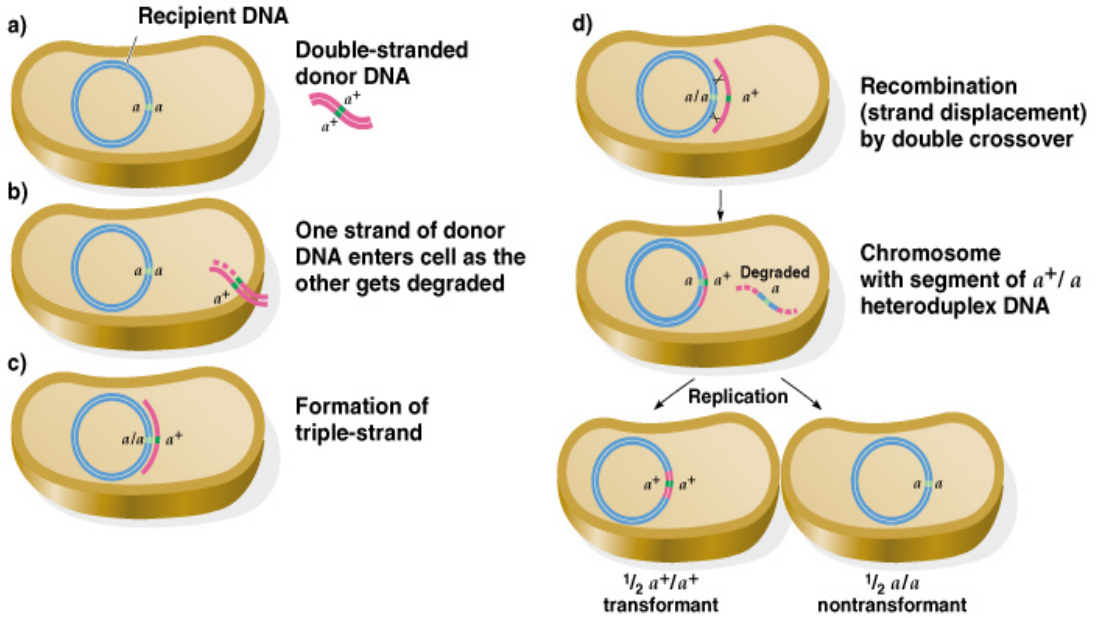
2- التحول بواسطة التهيئة الكهربائية(Electroporation) للخلية المستقبلة:
وتتم من خلال معاملة الخلية بتيار كهربائي مقداره 10-20 kV/cm



تاخذ الخليه البكتيريه الدنا الموجوده في بيئتها والذي يكون بحدود 50 kb او اكثر والمتحرر من الخليه الواهبه او الخلايا الميته . لجميع العمليات الانفة الذكر يحدث التكامل بين الماده الوراثيه المكتسبه وبين جينوم الخليه البكتيريه المستلمه. ان معرفة مواقع الجينات من خلال التحول الوراثي والنقل بالعاثي هي فقط لتحديد مواقع الجينات المتجاوره وذلك لصغر القطعه الوراثيه المكتسبه بتلك العمليات الوراثيه

يمكن استخدام التحول الوراثي لرسم الخارطه الكروموسومية عندما يكون رسمها بالاقتران والتنبيغ بالعاثي مستحيلا حيث يؤخذ الدنا للخلية الواهبه ويقطع الى قطع معروفة تعطي صفات لاتوجد في الخلايا المستقبلة, ففي حالة حدوث تحول يتم الكشف عنه باظهار الصفة المظهريه للخلايا الواهبة . وتاخذ بعض الخلايا الدنا الخارجي طبيعيا مثل *B. subtilis* فيما تحتاج خلايا اخرى الى تحفيز لاخذ الدنا الخارجي مثل *E. coli* ففي المثال ادناه بكتريا *B. subtilis* لاتحتوي على الجين a والبكتريا الواهبه تحتويه عليه a^+, اذا حدث تحلل لدنا البكتريا الواهبه نتيجة موت الخلايا قد يحدث ان يتكسر الدنا منتجا اليل كامل ل a^+ والذي يدخل الى الخلية المستلمة ويعمل اعادة تموضع في الموقع a^- منتج اولا شريط ثلاثي يتم هضم احد اشرطة

الخليه الاصلية وبذلك يصبح الجين الجديد جزء من كروموسوم البكتريا منتجا بذلك صفة جديدة يمكن ان يكشف عنها



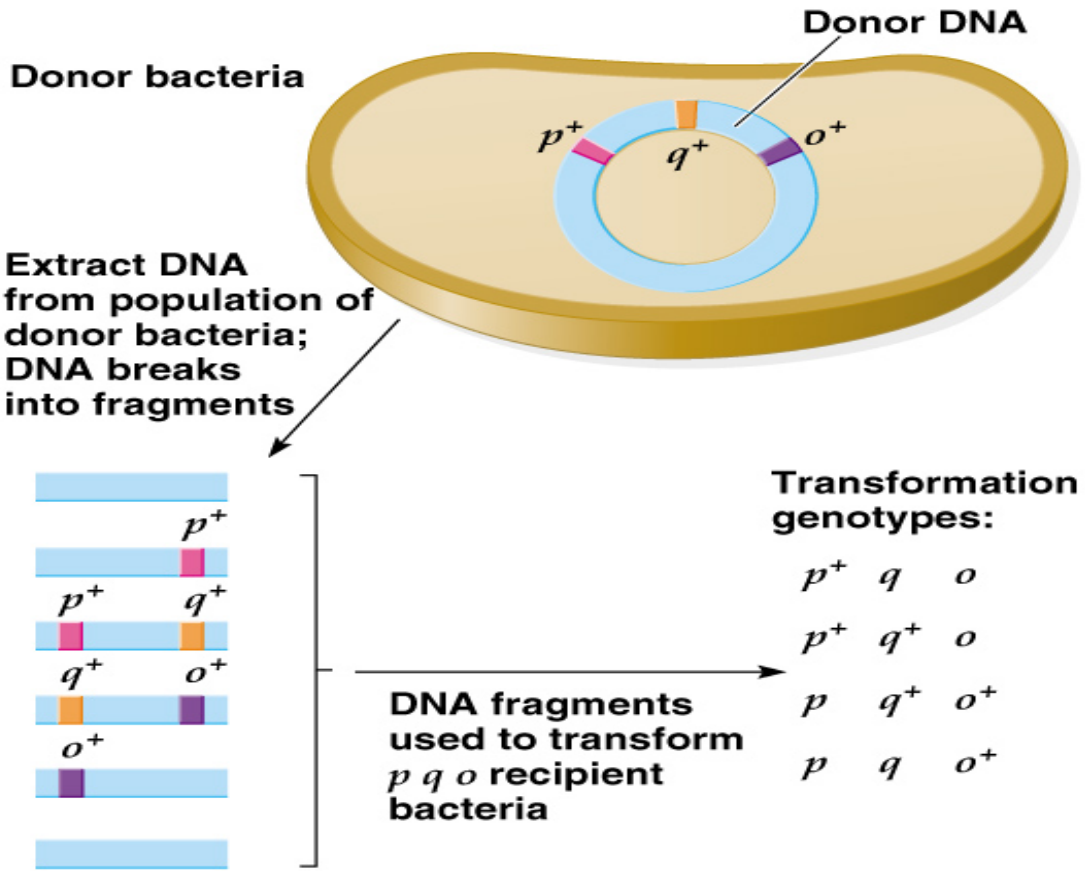
يمكن استخدام تجارب التحول للكشف عما اذا كانت الجينات مرتبطة (فيزيائيا قريبة من بعض في كروموسوم البكتريا) ويعمل التحول افضل مع القطع الصغيرة من الدنا التي تحمل عدد قليل من الجينات

-في حالة نقل اكثر من جين مرتبط مع بعض يطلق مصطلح التحول المساعد co-transformation والذي يمكن استثماره رياضيا , فاذا كانت نسبة التحول المساعد قريبه من نسبة التحول لكل جين على حدة هذا يعني ان الجينين مرتبطان مع بعض اما اذا كان تردد التحول في كل جين لوحده اكثر من تردده في الجينين معا يعني ان الجينات قريبه وليست مرتبطة.

-كما يمكن ان يستخدم التحول لمعرفة تسلسل الجينات فلو فرضنا ان لدينا جينين p and q وتحولا تحولا مساعدا سوية وبنفس نسبة تحولهما كل على حدة فهذا يعني ان الجينين مرتبطان, فاذا كان الجين q دائما يتحول تحولا مساعدا مع الجين o فهذا يعني انه مرتبط ايضا مع الجين o ولتحديد المسافة بين الجين p والجين o فيمكن عمل تحول مساعد لكليهما وقياس تردد التحول فاذا كان التردد نادر فترتيب الجينات سيكون p-q-o اما اذا كان التردد متكرر فيعني ان ترتيب الجينات p-o-q

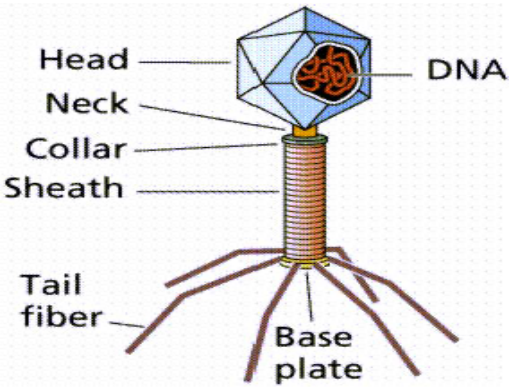
كما يمكن استخدام تردد التحول لقياس المسافة الافتراضية بين الجينات

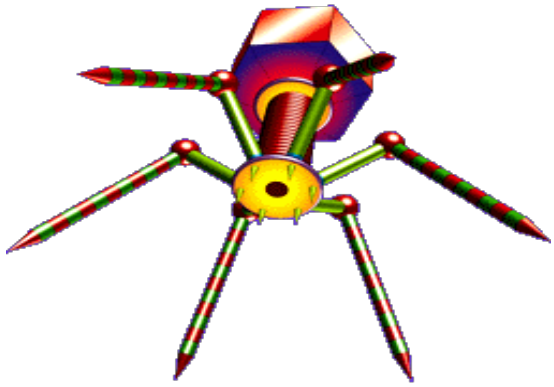
.

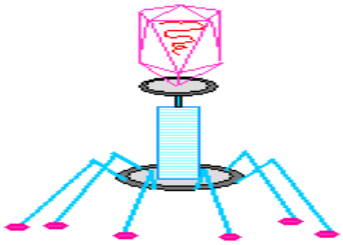

Donor DNA
Donor bacteria
p^+
q^+
o^+
Extract DNA from population of donor bacteria; DNA breaks into fragments
p^+
p^+ q^+
q^+ o^+
o^+
DNA fragments used to transform $p\ q\ o$ recipient bacteria
Transformation genotypes:
p^+ q o
p^+ q^+ o
p q^+ o^+
p q o^+

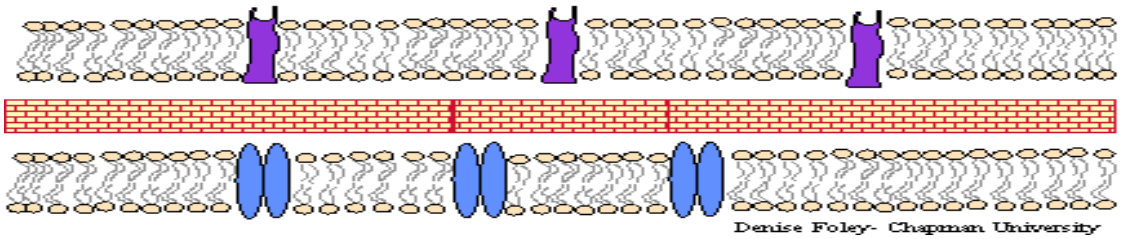
العاثيات والتنبيغ بالعاثي Phage and Transduction

العاثيات البكتيرية Bacteriophage : هي فيروسات لها القابلية على إصابة البكتريا وid جاءت هذه القابلية من خلال وجود مستقبلات على سطح البكتريا تسهل ارتباط هذه الفيروسات ومن هذه المستقبلات LPS وTiechoic acid . وتتركب هذه العاثيات بصورة عامه من رأس ذو تناظر icosahedral يحتوى على المادة الوراثية للفيروس ومنطقه وسطيهneck and collar يليها ساق Stalk وفي بعض الأحيان ذنب ذو زوائد للارتباط Tail and Spikes





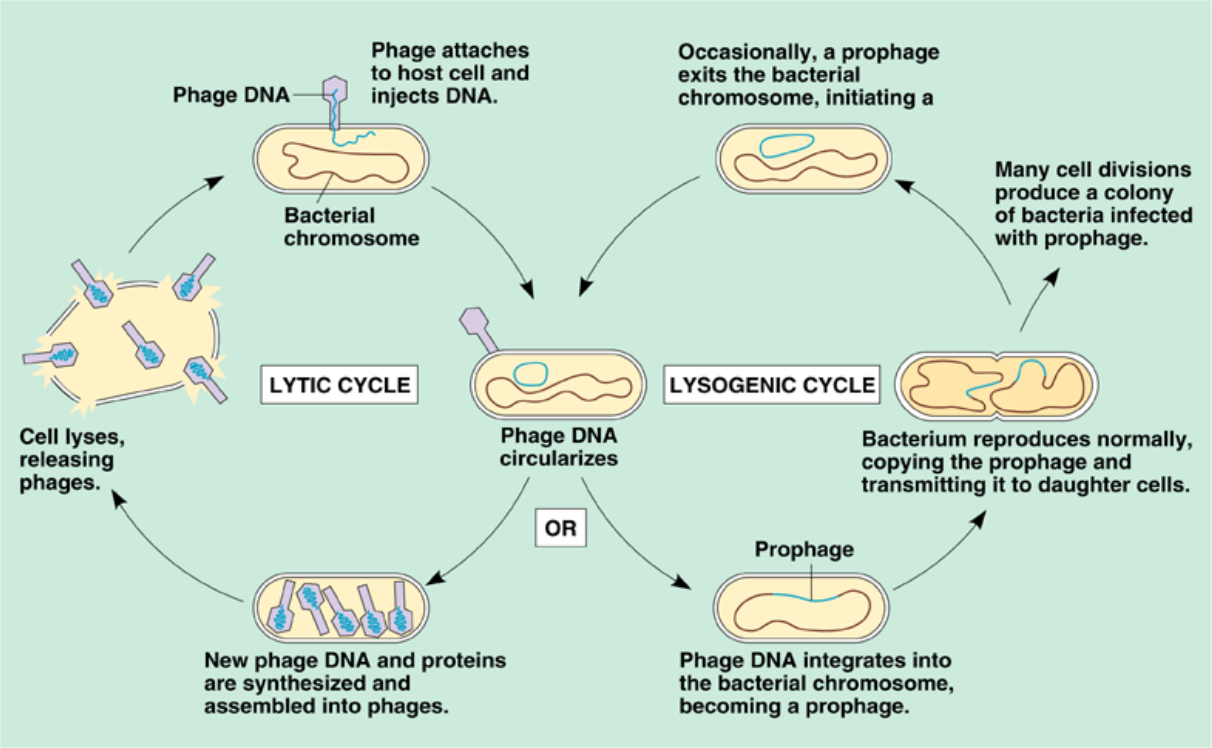




هنالك نوعين من العاثيات حسب دورة حياتها:

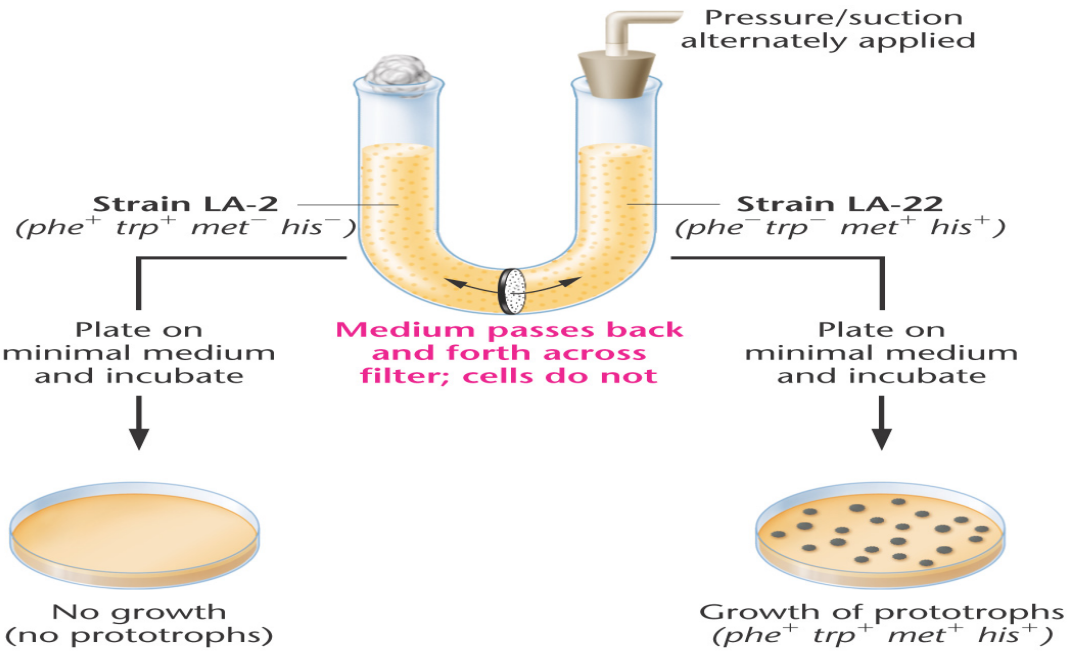
1- Lytic or virulent phage وتسمى الانحلالية او الضارية وتمتاز بأنها قابلة على إحداث الإصابة مؤدية الى تحلل وتحطم الخلية المضيفة فور دخولها وبدء صنع وتجميع العاثيات الجديدة.ومن الأمثلة عليها T4 phage . قد يحصل أثناء تجميع العاثيات الجديدة عملية تعبئة لجينات او جزء من كروموسوم البكتريا المضيفة وبالتالية فان العاثي الجديد يحمل قطعة كروموسوم غريبة وجديدة ممكن نقلها الى بكتريا اخرى أثناء الإصابات الجديدة.

2- Lysogenic or temperate phage: وتسمى العاثيات الطارئة او الاندماجية فعند إصابة خلية بكتيرية جديدة لاتتحلل بل تندمج المادة الوراثية للعاثي مع كروموسوم الخلية البكتيرية المضيفة بواسطة اعادة الارتباط المتماثل Homologus recombination ويتضاعف معه ويبقى لفترات طويلة وعندما يستحث العاثي للانفصال وتكوين عاثيات جديدة وانحلال الخلية المضيفة قد يحصل ان تأخذ المادة الوراثية للعاثي جزء معين (وليس عشوائي) من كروموسوم الخلية المضيفة وبالتالي تنتج عاثيات جديدة ذو جينات او قطعة من الكروموسوم معينه ممكن نقلها الى خلية مضيفة اخرى. ومن الأمثلة عليها β phage الذي يصيب بكتريا الخناق Corynebacterium diphtheria و λ phage الذي يصيب الاشريكيا القولونية.



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

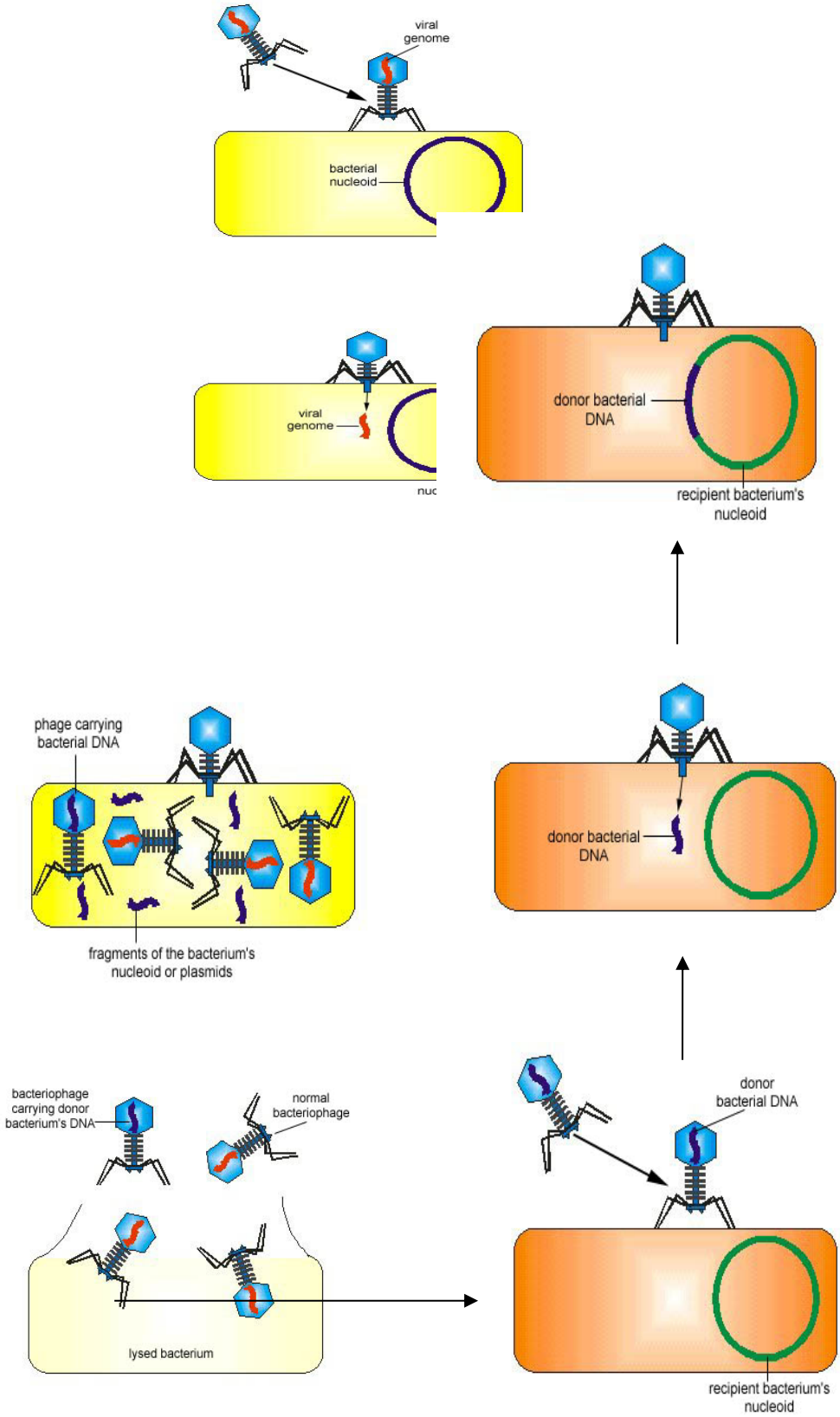
يعود فضل اكتشاف التنبيغ بالعاثي الى العالمين Joshua Lederberg and Norton Zinder في عام 1952 من خلال تجاربهم على بكتريا Salmonella typhimurium وكما موضحه بالشكل التالي:



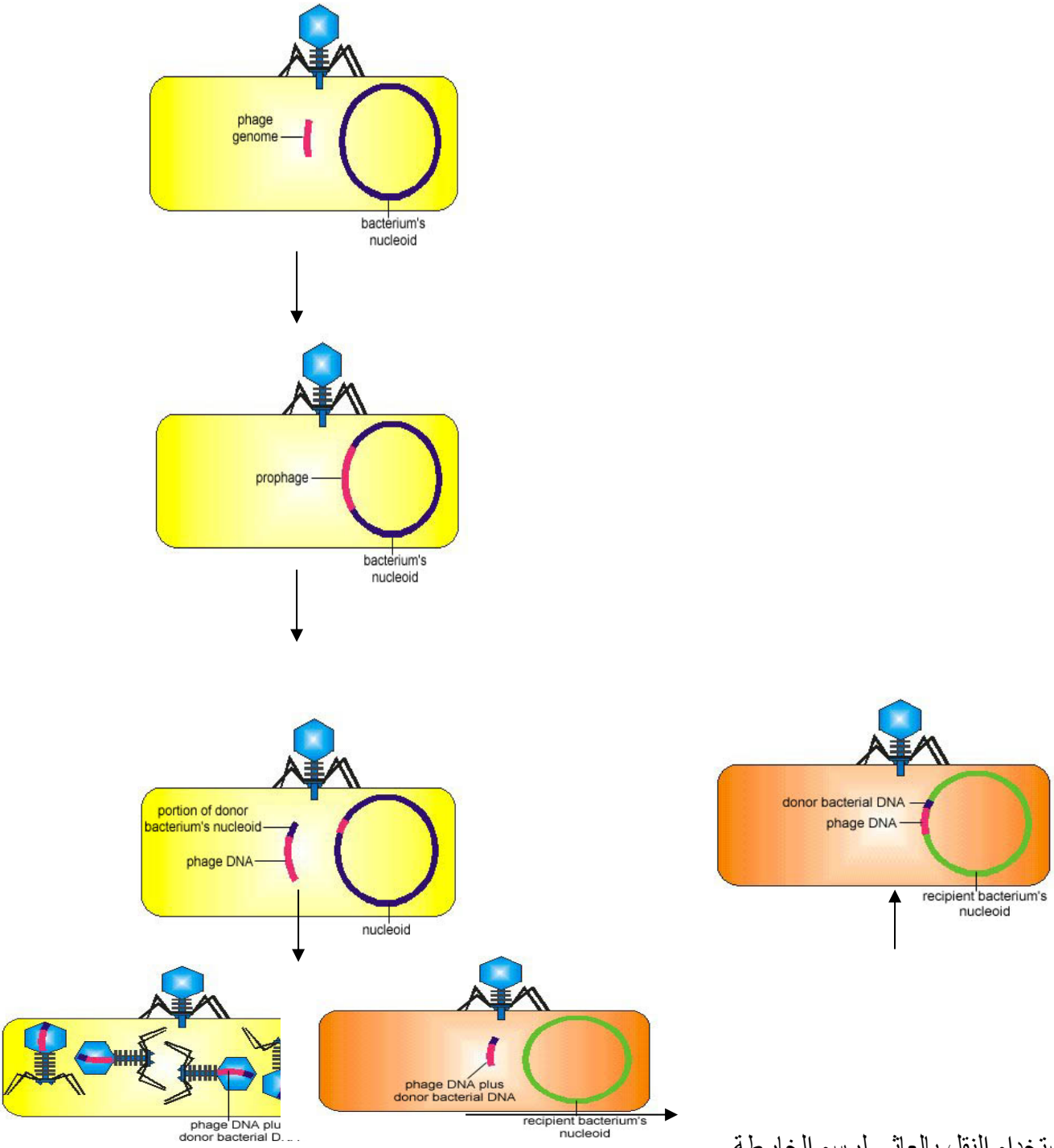
Copyright © 2006 Pearson Prentice Hall, Inc.

وهنالك نوعين من التنبيغ بالعاثي:

1- العام Generalized : ويتم بواسطة العاثي الانحلالي Lytic phage كما في T4 phage حيث وضحنا سابقا انه سوف يتم نقل قطعة من كروموسوم البكتريا المضيفة ونقله الى البكتريا الأخرى خلال الإصابات الجديدة وكما موضح ادناه:

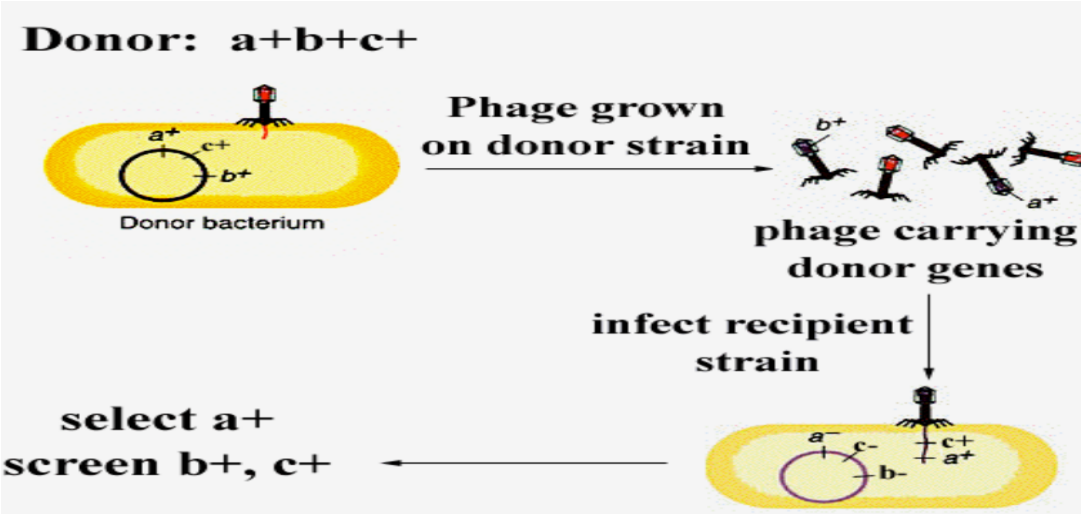

viral genome
bacterial nucleoid
viral genome
donor bacterial DNA
recipient bacterium's nucleoid
phage carrying bacterial DNA
donor bacterial DNA
fragments of the bacterium's nucleoid or plasmids
bacteriophage carrying donor bacterium's DNA
normal bacteriophage
donor bacterial DNA
lysed bacterium
recipient bacterium's nucleoid

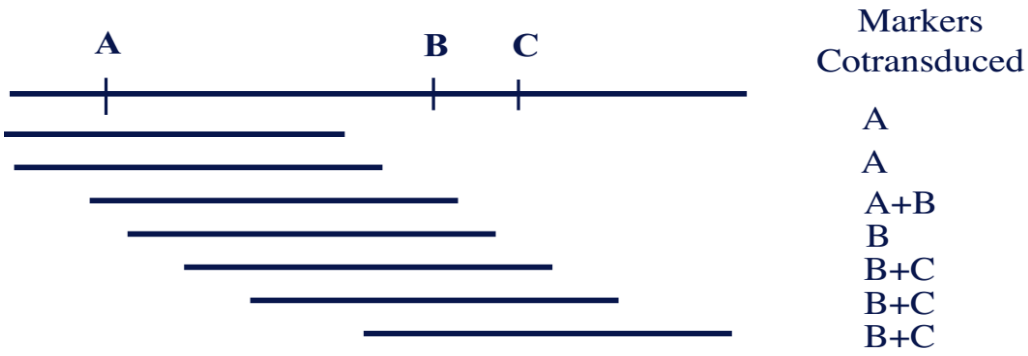
2- الخاص Specialized : ويتم بواسطة العاثي الاندماجي Lysogenic phage كما في β phage و λ phage وكما تم توضيحه سابقا حيث يتم اندماج الدنا المنقول من الخلايا البكتيرية المصابة الى الجديدة من خلال عملية اعادة الارتباط Recombination.



يمكن استخدام النقل بالعاثي لرسم الخارطة الكروموسومية للبكتريا حيث ان الجينات المرتبطة وقريبة جدا من بعض تنقل في جزيئة الفايروس والجينات البعيدة لايمكن نقلها مع بعض لمحدودية حجم جزيئة العاثي وبذلك يمكن حساب ترددات التحول بالعاثي لكل

جين او زوج من الجينات وبالتالي معرفة ترتيبها الاصلي في جينوم البكتريا , يحمل العاثي حوالي دقيقتين فقط cotransductedمن جينوم البكتريا لذلك فقط الجينات القريبة تتحول سويا

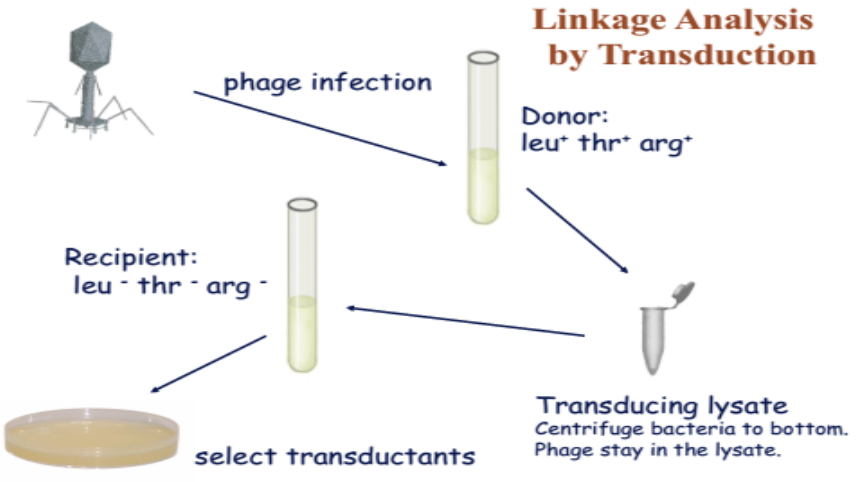


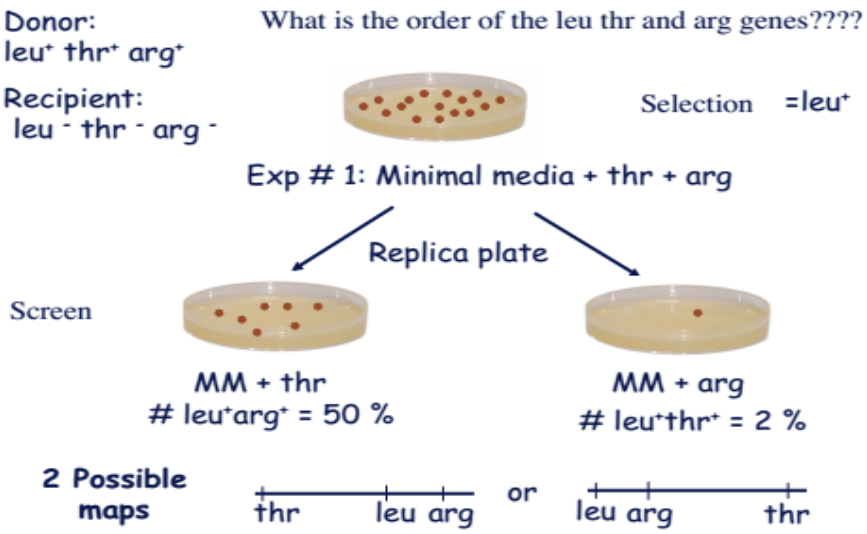


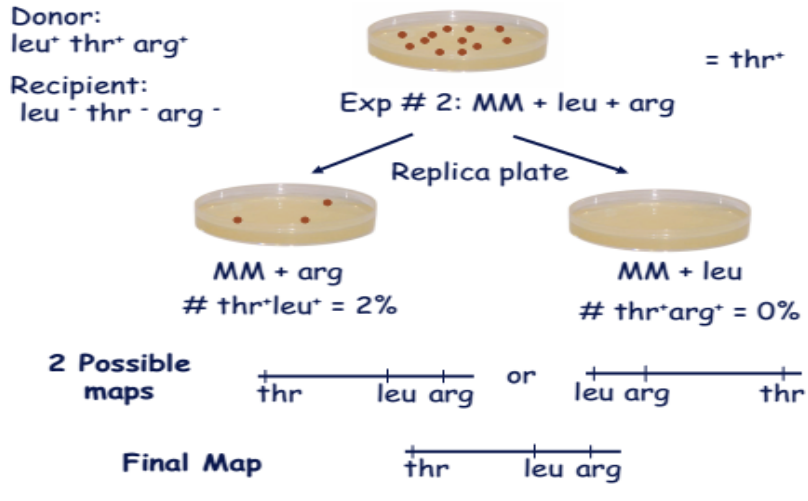
ويمكن حساب التردد للتحول بالعاثي وكما يلي للمثال اعلاه ولكل زوج جيني كما يلي

$$\text{A-B}= \frac{A^+B^+}{A^+} \text{ X 100 } = \text{ \% cotransduction}$$

ويمكن اخذ المثال التالي لمعرفة الخارطة الجينية لثلاث جينات


Linkage Analysis
by Transduction
phage infection
Donor:
leu+ thr+ arg+
Recipient:
leu - thr - arg -
Transducing lysate
Centrifuge bacteria to bottom.
Phage stay in the lysate.
select transductants


Donor:
leu+ thr+ arg+
What is the order of the leu thr and arg genes????
Recipient:
leu - thr - arg -
Selection =leu+
Exp # 1: Minimal media + thr + arg
Replica plate
Screen
MM + thr
leu+arg+ = 50 %
MM + arg
leu+thr+ = 2 %
2 Possible maps
thr
leu arg
or
leu arg
thr

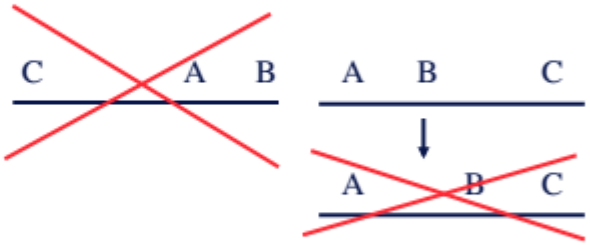

Donor:
leu+ thr+ arg+
Recipient:
leu - thr - arg -
= thr+
Exp # 2: MM + leu + arg
Replica plate
MM + arg
thr+leu+ = 2%
MM + leu
thr+arg+ = 0%
2 Possible maps
thr
leu arg
or
leu arg
thr
Final Map
thr
leu arg

Example = Cross is A+ B+ C+ X A- B- C-
donor recipient

Expt #1 Transductants

A+ = 60
A+B+ = 30
A+C+ = 0

What is the order of A B and C genes?



Expt #2

B+ = 60
B+C+ = 20
B+A+ = 30

What are the cotransduction frequencies?

A-B? = 30/60 X 100 = 50%

B-C? = 20/60 X 100 = 33%

A-C? = 0/60 X 100 = 0%

الطفرات المورثية

و اصلاح DNA

الطفرة MUTATION

في علم الوراثة الطفرة هي خطأ في نسخ المورثات عند قيام الخلية بإعادة استنساخ نفسها... و بصيغة أخرى هي أي تغيير مفاجئ يصيب المادة الوراثية ..

اهتم العلماء بدراسة الطفرات لأهميتها على الصعيد الطبي بسبب الأمراض التي يمكن أن تسببها كمرض السرطان و غيره ...

- قد تحدث الطفرات على مستوى الكر وموسومات فتسمى بالطفرات الكروموسومية chromosomal mutations ... قد يسبب هذه الطفرات تغيير في عدد الكروموزومات لدى الكائن الحي و قد تحدث بتغيير يطرأ على جزء من كروموسوم واحد ...

- و قد تحدث الطفرات على مستوى الـ DNA بتغيير زوج من النيوكليوتيدات او تبديل موضعها على الشريط ... و تسمى هذه الحالة من الطفرات بالطفرات المورثية او النقطية point mutations ..

للطفرات أسباب عديدة ..

تنتج بعض الطفرات عن الأخطاء التي تحدث عند تكوُّن نسخ من DNA أثناء الانقسام الخلوي. وتتسبب عوامل تسمى المطفرات في حدوث بعض الطفرات. وتشمل المطفرات بعض الكيميائيات وأشكال متنوعة من الإشعاع.

الطفرة المورثية Point mutation

كل مورث يصنع بروتين مختلفاً عن البروتين الذي يصنعه المورث الآخر ،لذلك على الخلية قراءة ما بداخل المورث لكي تصنع البروتين المناسب . إن خطوات تحضير البروتين من المورث مكتوبة بلغة خاصة بها تسمى الشفرة الوراثية و حروف هذه اللغة عبارة عن أجزاء كيميائية صغيرة متراصة جنباً إلى جنب كما هي الحال في حروف اللغة العربية كمثال. وتسمى هذه الجزيئات المتراصة بالأحماض نووية

و تختلف أنواع البروتينات عن بعضها البعض باختلاف ترتيب هذه الأحماض النووية . لذلك فان أي خلل يحصل في هذا الترتيب يؤدي لخلل في تكوين البروتين.ويسمى هذا الخلل بالطفرة .لذلك فإن تعريف الطفرة الوراثية هو حدوث خلل في ترتيب الأحماض النووية في المورث(أي خلل في ترتيب. وقد تحدث الطفرة في داخل خلية واحدة من الجسم وقد تكون في جميع الخلايا . وعند وجودها في جميع الخلايا فإنها توحي لنا أنها قد حدثت في وقت مبكرة عند تخلّقنا (عندما كان عدد الخلايا في جسمنا قليلة)، أو قد تكون الطفرة موجودة في البويضة أو الحيوان المنوي الذي خلقنا منه، لأن جميع خلايا جسمنا مستنسخة من خلية واحدة (التي هي البويضة الملقحة بالحيوان المنوي) .

لذلك فمن الممكن أن نرث طفرة من والدينا ، كما أنه من الممكن أن تحدث لنا طفرات جديدة في خلايانا ولم تكن موجودة عند والدينا لأنها ببساطة حدثت بعد أن بداء خلقنا أو أن تخّلقنا.لذا فالطفرات قد تكون موروثة (من أحد الوالدين) أو غير موروثة .

قد يكون كائن ما لديه عدد من الطفرات في بعض المورثات ولكن لم تسبب له مشاكل صحية . فليس كل الطفرات مؤذيه،وإلا لأصبنا بالأمراض منذ أن ولدتنا أمهاتنا. قد تكون الطفرة مؤذيه أو غير مؤذيه ، وإليك هاتين القاعدتين والتي في الغالب لا تكون فيه الطفرة طفرة مؤذية :

القاعدة الأولى : إذا حدثت الطفرة خارج حدود المورث .أي لم تحدث في المورث نفسه ولكن حدثت بجانبه في المكان الفاصل بين المورثات.

القاعدة الثانية : إذا حدثت الطفرة داخل حدود المورث ولكنها حدثت فقط في نسخة واحدة من المورث(ولنقل في النسخة التي ورثتها من أبوك)،ولم يصب المورث الأخرى(الذي ورثته من أمك) بأي عطب.

هذه قاعدة عامة ولكن هناك عدة استثناءات للقاعدة الثانية والتي تكون فيه الطفرة مؤذيه حتى وان كانت موجودة في نسخة واحدة من المورث .واليك بعضا منها :

1- عندما ينتج المورث المعطوب (المصاب بطفرة) بروتين غير طبيعي (معطوب) فيفسد هذا البروتين ،البروتين الطبيعي الموجود في الخلية والذي ينتجه المورث السليم.

2- عندما تكون الكمية التي ينتجها المورث السليم لا تكفي في سد النقص الحادث من عطب في المورث الثاني ، كأن تحتاج الخلية مثلا لكمية معينة(100 وحدة مثلاً) من البروتين المسمى ببروتين الفراكس ،مثلاً.،لذلك فإن المورث السليم لوحدة لا يستطيع أن ينتج المائة وحدة لوحدة لان طاقته الإنتاجية لا تتعدى 50 وحدة حد أقصى ،لذلك فالكمية في داخل الخلية تكون ناقصة،وهنا يحدث المرض.

3- قد تؤثر الطفرة على المورث بشكل عكسي،،فبدلاً من أن تقل الكمية التي ينتجها المورث المصاب بالطفرة حدث العكس وزادت الكمية المنتجة و المسموح به داخل الخلية وهذه الزيادة بطبع تؤذي الخلية و يحدث المرض.

تأثير الطفرات

كل خلية في الجسم كما ذكRNA يوجد فيها نفس عدد المورثات الموجودة في بقية الخلايا. فهل يعني أن وجود مورث معطوب في جميع خلايا الجسم يؤدي إلى إصابة جميع أعضاء الجسم بالمرض؟

الجواب لا ليس بالضرورة. إن الخلية التي لا تحتاج للمادة البروتين التي ينتجه هذا المورث لا تتأثر إطلاق بوجود هذه الطفرة لأنها ببساطة لا تحتاج هذا البروتين . ولنتخيل مثلا أن الرجل ما –مثلا- إحدى المورثات تالفة . هذا المورث مهم لخلايا العين بشكل خاص لذلك قد يحدث مرض في عينه، ولكن ليس حتميا أن تتأثر بقية الأعضاء بهذا التلف، لأنها كما قلنا ليست في حاجه للمادة التي ينتجها هذا المورث المعطوب.هذا من جهة، ولكن في بعض الأحيان قد يكون المورث مهم لعدة أعضاء في الجسم وليس عضو واحد، فمثلا من الممكن أن تكون هذه المادة مهمة للعين ، وللقلب والمخ .

مما يؤدي إلى أذية ومرض الخلايا الموجودة في هذه الأعضاء فتؤدي بأمراض في هذه الأعضاء الثلاثة. لذلك قد يصاب بعض الناس بمرض وراثي في بعض لأعضاء ناتج عن طفرة (تلف) في مورث واحد .يجعلهم يعانون من عدة مشاكل في أعضاء مختلفة من أجسامهم قد تبدوا لنا من أولى وهلة ليس بينها علاقة أو روابط.

مثلاً مرض الابيضاض الوراثي : يكون فيه الجلد شديد البياض والشعر فاتح اللون والعينين زرقاوان (يحدث نتيجة نقص بروتين خميرة) يحتاجه الجلد لتكوين الصبغة الجلدية ولكن هذا البروتين مهم أيضا لشعر وللعينين .ونظرا لان هذا البروتين غير مهم لخلايا الكبد والقلب –

مثلا–لا تتأثر هذه الأعضاء بالمرض حتى وان كان جميع خلايا الكبد والقلب فيها هذا المورث المعطوب.

كيف تحدث الطفرة المورثية

يمكن تقسيم الطفرات التي تطرأ في ال DNA بحسب نوع الضرر الذي تحدثه في الحمض النووي ...

1 – الطفرة بالتبديل (missense or Substitution) :

(**mutation**تتم هذه الطفرات بتبديل نيوكليوتيد معين من الشريط مما يؤدي الى تغيير نيوليوتيد الـ mRNA المنسوخ عنه ... قد يؤدي إلى تغيير حمض أميني واحد الأحماض الامينية الناتجة عن عملية تجميعها قبل تشكيل البروتين مما يغير خصائص هذا البروتين

هذه الصورة مقارنة بين الDNA السليم و DNA حدثت فيه طفرة بالتبديل كما نرى باللون الاصفر الحمض الاميني الجديد

مرض بروجيريا .. (اغتيال الطفولة)

مرض بروجيريا لا يعتبر وراثيا بالمعنى الصحيح إذ لا ينتقل إلى المريض من أحد الوالدين, بل ينتج عن طفرة بالتبديل جينية تجري في الجنين خلال الحمل .

وقد ظلت الموروثة المسؤولة عن هذا المرض مجهولة لمدة طويلة نظرا لصعوبات تقنية عديدة أهمها أن عدد المرضى المستهدفين للدراسة قليل و يتوزع في مناطق متباعدة, إلا أن العلماء

توصلوا مؤخرا لمعرفة السبب, فقد ألقى بعض الباحثين نظرة على المنظومة الجينية لعشرين مريضا بالبروجيريا وآبائهم ,فوجدوا أن **18** مريضا من هؤلاء يحملون التغاير نفسه في جين LMNAالموجود على (الكرموزوم رقم **1**). وكان الخلل هو استبدال لقاعدة DNAواحدة, مما أدى إلى استبدال الحمض الأميني غوانين بالحمض الأميني أدينين وظهور المرض .

الاعراض

يبدو ضحايا مرض "بروجيريا" طبيعيين عند ولادتهم, ولكن مع بلوغهم الشهر الثامن تظهر عليهم أعراض الشيخوخة المتسارعة، حيث تتجعد بشرتهم وتتخذ مظهر جلد قديم جدا، وتصبح العظام هشة, ويتساقط شعر معظم الأطفال المصابين ويصبحون صلعاً في سن الرابعة .

ولا ينمو طول الطفل ليزيد عن المتر الواحد وتشيخ أعضاؤه الداخلية, وحتى كمراهقين لا يزيد وزن الأطفال المصابين بالبروجيريا على **13**- **16**كيلوغراما.ويشكو المريض غالبا من أعراض تصيب أناسا متقدمين بالسن, مثل أمراض االقلب الوعائية الشديدة severe cardiovascular diseases, هذا بالإضافة إلى تصلب المفاصل, ويكون الرأس ضخما بالنسبة للوجه والفك السفلي, كما أن مظهر الأطفال عموما يكون متشابها بالرغم من اختلاف نسب الأطفال إلى العائلات أو العروق المختلفة.

2- الطفرة بالحذف أو الإضافة frameshift mutation :

تتم هذه الطفرة بحذف نيوكليوتيد من DNA – أو إضافته – .. مما

يؤدي إلى تغيير الأحماض الامينية من النيوكليوتيد المحذوف أو المضاف و حتى نهاية الشريط المنسوخ

وضرر هذا النوع من الطفرات يكمن في أنها تحدث تغييرا مستمرا في شفرة الـRNA المنسوخ ... كما نعلم أن شفرة الـ RNA يتم تقسيمها على شكل ثلاثيات كل ثلاثية معنية بحمض أميني محدد فعند إضافة أو حذف نيوكليوتيد ستنجرف جميعها كي تعطي بروتين مختلف كليا .

و هذه الجملة مثال للتوضيح ...

لدينا الجملة : THEBIGCATATETHERAT

بعد تقسيمها لثلاثيات تصبح كالتالي THE BIG CAT ATE THE RAT

عند حذف حرف تصبح الجملة THEIGCATATETHERAT

بعد تقسيمها لثلاثيات تصبح كالتالي THB IGC ATA TET HER AT

هكذا نرى أن حذف حرف واحد اثر على تشكيل باقي الكلمات ... و هذا ما يحدث في الشريط عند حذف أو إضافة نيوكليوتيد

طفرات التبديل و تأثيرها the effect of missense mutations

يوجد أنواع عديدة من طفرات التبديل ... هذه الطفرات قد لا تحدث أي تأثير على سلسلة الببتيدات المترجمة من شريط الـ mRNA و قد تحدث تأثيرات جذرية على السلسلة .. و فيما يلي سنعرض تقسيم طفرات التبديل بناءا على تأثيرها على السلسلة

هذا الجدول يعبر عن ما يلي

في السطر الأول شفرة الـ DNA الأصلية دون أن يطرأ عليها أي تغيير

في السطر الثاني شيفرة ال RNA المنسوخة عن ال DNAالذي يعلوها

و السطر الثالث يعبر عن الأحماض الاميلنية المترجمة من سلسلة RNA

TAC	GTG	ATA	CCA	AAG	TAG	ACT
AUG	CAC	UAU	GGU	UUC	AUC	UGA
Met	his	tyr	gly	phe	ile	-

1- الطفرة التبديلية المؤثرة Missense mutation

TAC	GTG	ATA	GCA	AAG	TAG	ACT
AUG	CAC	UAU	CGU	UUC	AUC	UGA
met	his	tyr	Arg	phe	ile	-

كما في الجدول مكان الطفرة محدد باللون البرتقالي , يتم تبديل ينولكليوتيد C بالنيوكليوتيد G من الـ DNA الأصلي مما يؤدي إلى تغيير في الـ RNA المنسوخ ... و هذا التبديل يغير في الثلاثية المسؤولة حمض الغلايسين فيتبدل هذا الحمض إلى الارجنين .. و ... هذه الطفرة أحدثت تبديل حمض إلى حمض أخر مختلف عنه كيميائيا مما يؤدي إلى تغيير البروتين الواجب تصنيعه ...

2- الطفرة التبديلية المحايدة Neutral Mutation

TAC	GTG	ATA	CGA	AAG	TAG	ACT
AUG	CAC	UAU	GCU	UUC	AUC	UGA
met	his	tyr	ala	phe	ile	-

في هذه الحالة نرى انه طرأ تبديل في سلسلة الـ DNA نتج عنه تبديل حمض الغلايسين بحمض الالانين ... هذا التبديل لن ينتج عنه تأثيرات كبيرة كما حدث في الحالة السابقة .. لأن حمض

الالانين لا يختلف كيميائيا بقدر يؤدي إلى إحداث فرق كبير في البروتين الناتج .. فكلا الحمضين غير قطبيين و هذا ما يجعل هذه الطفرة غير مؤثرة

عندما درس العلماء هذا النوع من الطفرات ذهلوا بسبب لأن إمكانية حدوثها كانت أعلى مما توقعوا و هي من أكثر الطفرات انتشارا

3- الطفرة التبديلية الصامتة Silent mutations

TAC	GTG	ATA	CCG	AAG	TAG	ACT
AUG	CAC	UAU	GGC	UUC	AUC	UGA
met	his	tyr	Gly	phe	ile	-

هذا النوع من الطفرات لا يؤثر على سلسلة الأحماض الامينية إطلاقا ..

فندما يتم تغيير نيوكليوتيد يعطي شفرة ثلاثية أخرى تعطي نفس الحمض الاميني .. و لذا سمي هذا النوع بالطفرة الصامتة

4- الطفرة التبديلية المثبطة Nonsense mutations

TAC	GTG	ATT	CCA	AAG	TAG	ACT
AUG	CAC	UAA	GGU	UUC	AUC	UGA
met	his	-	-	-	-	-

هذا النوع من الطفرات عبارة عن تغييرات في سلسلة DNA ينتج عند نسخ ال mRNA منها شفرة توقف .. و في هذه الحالة ينتج لدينا بروتين مثبَط لا وظيفة له

و هناك حالات أخرى يحدث فيها طفرات كـ طفرة المضاعفة Duplications mutations

التي تحدث خلال تكرر استنساخ احد فقرات المورث. فتُحدث نسخة إضافية من احد المورثات

هذا النوع من الطفرات لها خصائص تجعلها مفيدة بسبب:

1- عبر الزمن يمكن أن تكون واحدة من هذه الطفرات أساس لظهور وظيفة جديدة مميزة وبالتالي أساس للانتخاب الطبيعي.
2- عندما يبقى مورثين متوازيين متساوين في التتالي والوظيفة، فأن ذلك يبقى مستودعا احتياطي للتغييرات. هذا يوضح مبدأ المورث السائد والمورث المسود، حيث المسود يكون على المورث الموازي.

بعد طفرة استنساخية، نرى أن وبعد زمن من الأجيال يتشكل احد الأمرين:

ظاهرة في مجموعة الأحفاد تسلط الضوء على اختلاف عن بقية المجموعة الأصلية التي انفصلت عنها و لهذا تتميز بقدرتها على خلق حاجز بيولوجي بين المجموعة الأصلية، مما يعني ظهور فصيلة جديدة غير قادرة على التزاوج مع الأصل.

احتمالات حدوث الطفرة وضرورتها

الطفرة يجب أن تحدث في المادة الوراثية المشاركة بالعملية الجنسية للتكاثر، حتى يمكنها الانتقال إلى الأجيال اللاحقة والبقاء في الحوض الوراثي. وعلى عكس الانتخاب الطبيعي، الذي يقلل كمية التنوع في الحوض الوراثي. نرى الطفرات تزيد التنوع عبر إدخال مورثات جديدة إلى الحوض الوراثي .

عملية نسخ الـ DNA عالية الدقة، والأخطاء في النسخ تتراوح بين خطأ واحد من مليار، حتى واحد من بليون حرف. غير أن احتمال إصابة الجين بالطفرة لا يزيد عن 1\100000 إلى 1000000. ومن حيث أن الإنسان يملك 30000 جين، فمن المتوقع أن تصاب ستة جينات على الأقل بطفرة واحدة لكل منها، مما يجعل الطفرة ظاهرة طبيعية شائعة. حسب ما نعرف اليوم فأجزاء كبيرة من شريط الـ" DNA عاطلة" وراثيا، أي أنها تنسخ من جيل

لآخر، ولكنها ليست "فعالة"، أي لا يتم تركيب البروتينات بناء على معلوماتها، وبالتالي لا تدخل في تحديد صفات الكائن الحي.

جزء كبير من الطفرات يحصل في الأجزاء العاطلة من المادة الوراثية التي لا تحتوي على مورثات فعالة. ولذلك تعتبر معظم الطفرات "محايدة" بالنسبة للانتخاب الطبيعي. أي أنها لا تزيد فرص حياة الكائن ولا تنقصها و لا تزيد احتمالية ظهور صفات جديدة

عدد الطفرات هو المحدد الأساسي لسرعة التطور، لأن الطفرات هي ما يدخل التنوع إلى الحوض الوراثي. ولكن على المدى القصير، يمكن للحوض الوراثي أن يتطور بسرعة نسبيا من الطفرات "المخزنة" في المادة الوراثية العاطلة. ولكن طريق الطفرة حتى تصبح ميزة تجاه الانتخاب الطبيعي لا يزال طويلا.

-كما قلنا الكثير من الطفرات تصب في الأجزاء العاطلة من المادة الوراثية

-في الكائنات التي تتكاثر عن طريق التزاوج، يأتي نصف المادة الوراثية من أحد الزوجين، وبالتالي فقد تبقى الطفرة في الجزء الذي لم يستخدم.

-الكثير من الصفات الوراثية يتكون من زوج من الصفات، واحدة مسيطرة والأخرى ضعيفة، وكثيرا ما تكون الطفرة في الصفة الضعيفة. وبالتالي لا تتفعل الطفرة في حياة الكائن الحي في هذا الجيل. وتبقى الطفرة كامنة حتى يصبح هناك عدد كاف من الأفراد يحملون الصفة الضعيفة قبل أن يتشكل أفراد يحملون الطفرة بشكل مضاعف.

-معظم الطفرات التي تظهر بشكل مورثات فعالة تؤدي إلى حصول أخطاء في عمل المادة الوراثية (أمراض أو تشوهات وراثية)، وبالتالي فالأفراد الذين يحملون هذه الصفات تتم تصفيتهم عبر الانتخاب الطبيعي، فيموتون في عمر مبكر دون أن يورثوا الطفرة للأجيال القادمة .

اسباب الطفرات:

هناك عدة أسباب لنشوء الخطأ، أهمها خطأ بسبب النقل من النواة إلى الناقل RNA أو من الناقل إلى البلازما. كما يمكن أن ينشئ الخطأ في عملية انقسام الخلية بسبب التأثر بالمواد الكيماوية أو الإشعاعية أو بسبب فيروس. في الكائنات المتعددة الخلايا يمكن للطفرة أن تحدث عند استنساخ احد الخلايا المتعددة، مما يعني أن كثرة الخلايا تزيد من فرصة الإصابة بالطفرة. الأمر الذي من الممكن أن يؤثر على احد الوظائف للكائن، ليؤدي إلى المرض أو الموت أو أفضلية أو لا شئ على الإطلاق، ولكنها على كل الأحوال تنضم إلى حوض التغييرات الوراثية الكامنة أي الحيادية. الطفرات الحيادية جزء من نظرية Punctuated equilibria التي عوضت عن خطأ في نظرية داروين والتي يمكن اختصارها محتواها بالعرض التالي:

الطفرات التي حفظت في حوض الطفرات الكامنة قد تستخدم في المستقبل عند حدوث تغيرات تضع الكيان الحي أمام اختبار القدرة على المقاومة من اجل البقاء .وعلى عكس الانتخاب الطبيعي، الذي يقلل كمية التنوع في الحوض الوراثي. نرى الطفرات تزيد التنوع عبر إدخال مورثات جديدة إلى الحوض الوراثي

إصلاح الدي ان اي DNA Repair

إن الحمض النووي في الخلية خاضع للعديد من التغييرات الكيميائية , و لكي تبقى الشفرات المرمزة في شريط الDNAفعالة فيجب على هذه التغيرات الكيميائية أن تصحح و أي فشل في هذا التصحيح يؤدي الى ظهور الطفرة .ان النشرة الأخيرة للجينوم البشري أوضحت وجود **130** مورث تساهم منتجاتها في عملية تصليح ال DNAداخل الخلية

العوامل التي تؤدي إلى ضرر ال DNA

- الإشعاعات ذات طول موجي محدد.مثل إشعاعات التأين (gamma rays and x-rays) أشعة غاما و أشعة x و أشعة UV-C "الفوق بنفسجية" ذات الطول الموجي (~260 nm) التي تنغمس بشدة في ال DNA , و أيضا الأشعة فوق البنفسجية ذات الطول الموجي الأكبر UV-B التي تؤثر أيضا على غلاف الأوزون

- الاوكسيجين الراديكالي ذو النشاط الكيميائي المرتفع الذي ينتج عن العمليات الحيوية داخل الخلايا

- المواد الكيميائية المتواجدة في البيئة .. كبعض الهيدروكربونات كالمتواجدة في السجائر و بعض المنتجات الميكروبية أو النباتية .. كالالفاتوكسين
- بعض الكيماويات المستخدمة في علاج الامراض كالسرطان مثلا

أنواع الضرر في ال DNA

1- أضرار تخص الأربع قواعد في ال DNA (A, T, C, G) فيمكن أن تتحور او تساهميا و توضع بأماكن مختلفة أو يمكن حدوث عدم توافق في ارتباط النيوكليوتيدات المتقابلة.و من أكثر الحالات انتشارا تبديل زمرة امينية (أي القيام بعملية ("deamination") لتؤدي الى تغيير نيوكليوتيد .. C إلى T مثلا . و يمكن عدم التوافق بين النيوكليوتيدات بسبب فشل تفسيرو قراءة ال DNAأثناء التصنيع المثل الأكثر انتشارا : اندماج البيرميدين يو pyrimidine U المتواجد في الRNA بشكل طبيعي بدلا من T

2- الكسر في شريط الأساس

يمكن أن يقتصر على كسر في شريط واحد من الDNAليسمى ب كسر شريط وحيد (a single-stranded break, SSB) .و يمكن أن يكسر كلا الشريطين ليسمى بكسر شريط مضاعف (a double-stranded break (DSB) يمكن أن يسببه الإشعاعات التأينية , و المنتجات الأيونية تقوم به بشكل أفضل

3- الارتباط العبوري Crosslinks الذي يمكن أن يتشكل بين القواعد

قد يحصل بين قواعد الشريط الواحد .. أو في القواعد المتقابلة لكلا الشريطين

يسببه الأدوية الكيميائية

تصليح القاعدة المتضررة

القواعد المتضررة أو غير المتوافقة يمكن أن تصلح بعدة طرق

- **العكس الكيميائي المباشر .. (بعكس التفاعل الذي أدى اليها)**
- **تصليح القطع المتضررة : تزال فيه القاعدة أو القواعد المتضررة و تستبدل بقاعدة صحيحة في موضع الخلل الذي حدث في ال DNA**

هناك 3 أنماط لتصليح القطع المتضررة و لكل طريقة تختص مجموعة من الأنزيمات

1- **تصليح قطع القواعد** Base Excision Repair (BER)

2- **تصليح قطع النيوكليوتيدات** Nucleotide Excision Repair (NER)

3- **تصليح عدم التوافق** Mismatch Repair (MMR)

1- العكس المباشر للضرر الأساسي

إن أكثر سبب لحدوث الضرر في ال DNA و الطفرات الجينية عند الإنسان هو الإضافة التلقائية للمجموعة الميتيلية (-CH3) كمثال لعملية الالكلة (نزع زمرة الكينية) .. لحسن الحظ معظم هذه التغييرات تُصلح بفعل انزيمات تسمى بالغلايكوسيلاز glycosylases .. **فعندما يحدث عدم توافق اثر تبديل C ب T اثر عملية الالكلة ... تقوم هذه الانزيمات بإصلاح عدم التوافق الحاصل بإعادة T إلى C و هذا يتم بدون الحاجة إلى تكسير الDNAو كسر الأشرطة .**

بعض العقاقير المستخدمة لعلاج السرطان chemo **تحدث ضررا في الDNAعبر الالكلة بعض زمر الاكيل يمكن أن تزال بفعل بروتين ناتج عن الجين** MGMT , **هذا البروتين قادر على القيام بهذه العملية مرة واحدة فقط لذا فإزالة كل الزمر تتطلب جزيئات إضافية من البروتين آليات العكس المباشر للضرر تعاني من بعض المشاكل و اهمها ان هذه الاليات تعتبر مبذرة جدا !!!**

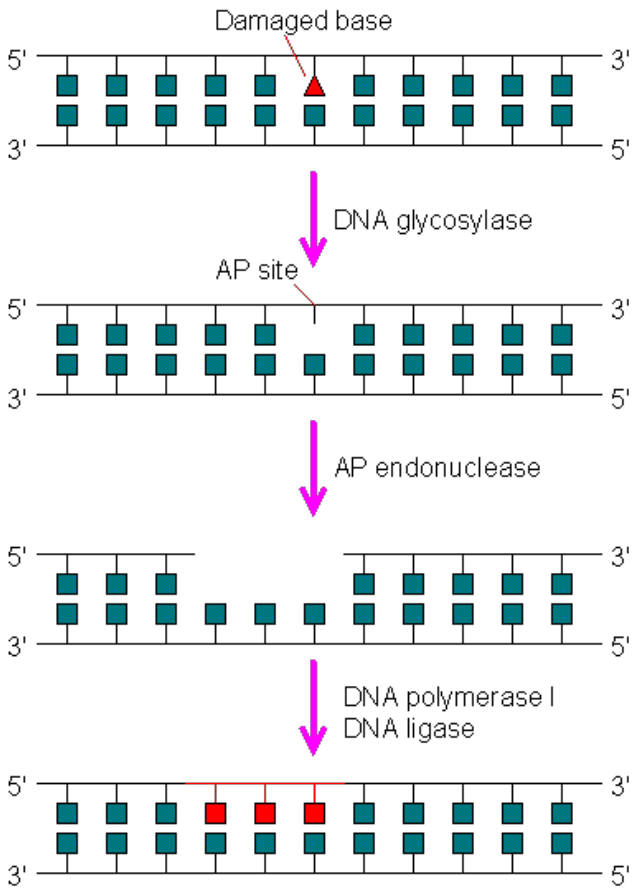
التبديلات التي تحدث في ال DNAلا تعد و لا تحصى و كل تبديل على حدى يحتاج لالية مخصصة لذا تحتاج الخلية لاليات اكثر عمومية قادرة على تصحيح كل انواع الضرر الكيميائي مع عدة عمل محددة ... هذه الحاجة تقابل باليات التبديل للقطع المتضرر

2- آليات تصليح القطع المتضررة

1- تصليح قطع القواعد Base Excision Repair (BER)

.. يمكن تلخيص العملية فيما يلي فيما يلي :

- إزالة القاعدةِ المتضرّرةِ (و تحدث تقريبا **20,000** مرة في خلايا جسمنا يوميا) عبر أنزيم DNA glycosylase , يوجد لدينا على الأقل **8** مورثات تشفر DNA glycosylase مختلف عن الأخرى و كل أنزيم مسئول عن إزالة خطأ معين من الضرر الذي يصيب القواعد
- ثم يقوم نفس الإنزيم بإزالة الريبوز و الفوسفات المتعلقة بهذه القاعدة من شريط الDNA.. مخلفة بعد ذلك فجوة , يوجد لدينا جينان مسئولان عن تشفير أنزيمات لهذه الوظيفة ... يقوم بهذه العملية أنزيم AP endonuclease لدى بكتيريا E.coli ... المقصود ب (AP) .. الموقع المصاب .. "AP site" أو "abasic site"



- إعادة وضع النيوكليوتيد الصحيح .. و هذه العملية تعتمد على DNA polymerase beta, .. و هو واحد من **11** DNA

polymerases مشفرة في جيناتنا

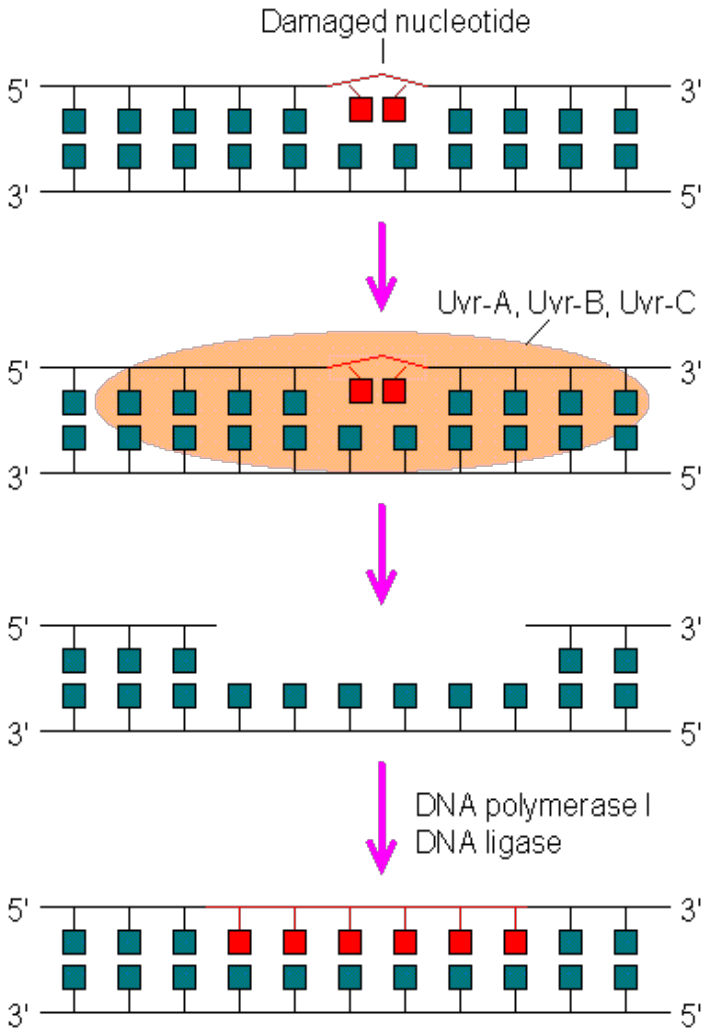
- ثم إعادة تغليف الكسر في سلسة ال DNA .. يوجد إنزيمان يستطيعان القيام بهذه العملية .. في بكتيريا E.coli هما DNA polymerase I و DNA ligase و كلاهما يحتاجان ال ATP لتأمين الطاقة اللازمة

2- تصليح قطع النيوكليوتيدات Nucleotide Excision Repair (NER)

يختلف الNER عن الطريقة الأولى بعدة نقاط

1- تستخدم أنزيمات مختلفة

2- في حالة وقوع ضرر لدى قاعدة واحدة فقط تقوم هذه العملية بإزالة مكان واسع حول المنطقة المتضررة حتى في حال سلامة النيوكليوتيدات المحيطة .. فهذه الطريقة تزيل رقعة كبيرة حول الضرر



الطريقة :

- الضرر يتم التعرف عليه من قبل مجموعة من العوامل البروتينية (أو عامل واحد فقط) ... و تتجمع

جميع هذه العوامل حول المنطقة المتضررة

- الDNAيرخى و يتفكك معطي فقاعة . و مجموعة الإنزيمات التي تقوم بهذا العمل هي عوامل النسخ IIH, TFIIH .. وهي تقوم أيضا بوظيفة في تصنيع الDNA
- التفككات و التقطيعات تحدث في طرفي المكان المتضرر (**3'** و **5'**) ... و بهذا يمكن إزالة المنطقة التي تحتوي على الضرر
- يتم تصليح الأضرار بتبديل النيوكليوتيدات بوجود الأنزيم polymerase delta و polymerase epsilon
- يقوم ال DNA ligase بإعادة وصل قطع الDNAبربطها تساهميا في كل سلسة على حدا في بكتيريا E.Coli ... البروتينات UvrA, UvrB, UvrC مسؤولة عن إزالة النيوكليوتيدات المتضررة و ما حولها .. و يتم ملئ الثغرات بمساعدة DNA polymerase I و DNA ligase و في الخميرة ... بروتينا شبيهة بروتينات Uvr تسمى RADxx ... RAD تعود لكلمة radiation أي إشعاع .. من الأمثلة عليها .. RAD3, RAD10

من أقوى الأمثلة عن الأمراض التي تحدث بسبب فشل هذه العملية

مرض تشقق الجلد Xeroderma Pigmentosum (XP)

هذا المرض هو مرض وراثي يصيب البشر .. و هو نادر الحدوث ...

يسبب هذا المرض مشاكل جلدية كجروح و بقع ذات ألوان تتدرج بين البني و الأحمر و الوردي أحيانا لدى التعرض للشمس .. و هو أشبه بحالة متفشية من سرطان الجلد

إن هذا المرض تسببه طفرة تقع في بضع جينات .. جميعها لها دور في Nucleotide Excision Repair منها :

- XPA الذي يشفر البروتين الذي يربط المواقع المتضررة و يساعد على تجميع بروتين آخر يلعب دور في نفس عملية التصليح ذاتها

- XPB و XPD ... هما جزء من TFIIH و بعض الطفرات التي تطرأ في XPBو XPD تتسبب في الشيخوخة المبكرة ..
- XPF , الذي يقص السلسة من طرف **5'** من الضرر
- XPG , الذي يقص السلسة من طرف **3'** من الضرر

- **يوجد نوع من تصليح** الDNAبطريقة **NER**... **تسمى الآلية ب** Transcription-Coupled.. **أوالية تصليح النسخ المضاعف ..**

هذه الآلية تقوم بالتصليح بشكل سريع جدا و فعال

و تحدث في الخلايا التي تتضاعف و تنسخ جيناتها بشكل سريع .. و لسلسة الDNAالذي **يعمل أساس لعملية النسخ**

يحدث هذا التصليح على XPB, XPD **و بعض الجينات الأخرى .. بشكل أساسي و البروتينات التي تقوم بالوظيفة الفعالة هي بروتينات** CSA **و** CSB **...** ***(الطفرات فيها تسبب فوضى في الكروموزومات تؤدي لمتلازمة كوكاين*** Cockayne's syndrome)

يساهم منتج CSB **في النواة مع** RNA polymerase II **... المسئول عن تشكيل** الRNA **الرسول** (mRNA) **ليشكل وصلة بين في النسخ و التصليح لدوره المشترك في العمليتين**

يمكن اختصار جميع ما ذكرت فيما يلي :

إذا قام, RNA polymerase II **بالمرور على السلسلة المنسوخ منها في** الDNAو **التقى مع قاعدة متضررة .. يمكن أن يوظف بروتين آخر ... مثل البروتينات** CSA**و**CSB .. **ليقوم البروتين المستدعى بالتصليح الفوري للقاعدة المتضررة قبل إنهاء النسخ**

3- تصليح عدم التوافق Mismatch Repair (MMR)

يحدث هذا التصليح في النيوكليوتيدات السليمة تركيبيا ..لكن التي تعاني من أخطاء في الاقتران ... تنافي ما وضعه واستون و كريك Watson-Crick بخصوص اقتران النيوكليوتيدات .. (A>><<T, C >><<G)

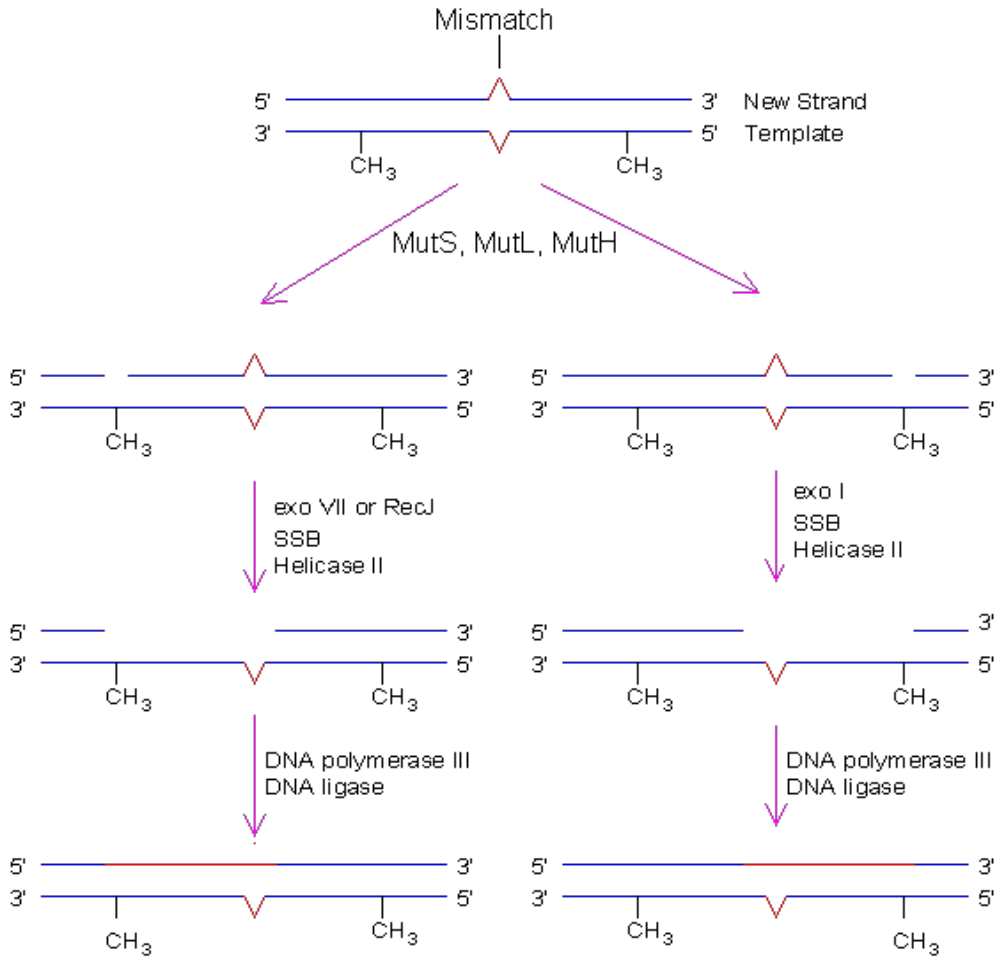
و هذه الطريقة قد تستخدم إنزيمات مستعملة في العمليتين لسابقتين (BER) و (NER) .. و أيضا استعمال إنزيمات أخرى لم تدخل في العمليتين مختصة لهذه الوظيفة

التعرف على مكان عدم التوافق يتطلب بعض البروتينات من ضمنها بروتين مشفر في الجين MSH2.و قص عدم التوافق يتطلب بروتينات اخرى مختلفة و تتضمن البروتين المشفر في الجين MLH1.إن نقص الجينات MLH1و MSH2 يؤدي إلى سرطان كولون موروث .. إذ يعتبر هذان الجينان مخمدات للتورم

الآلية المحددة للتعرف على عدم التوافق في الDNAالبشري غير مكتشفة حتى الان .. اما في بكتيريا E.coli فيتم التعرف عن طريق methylase (مفكك لمركبات ميثيل) يدعى "Dam methylase" الذي يستطيع أن يُميثلَ كُلّ الأدينين الذي يقع ضمن سلسلة GATC('5), بعد تصنيع ال DNAيتميثل الشريط المنسوخ منه .. أما الشريط المنسوخ (اي الجديد) لم تتم ميثلته , هكذا يمكن أن يحدث اختلاف بين الشريط الأصلي و المنسوخ

- تبدأ عملية التصنيع بالبروتين MutS الذي يرتبط بالثنائيات الغير متوافقة .. ثم يقوم البروتين MutL بربط هذا المعقد و ينشط عمل بروتين آخر هو MutH ليقوم بنفس المهمة
- تفعيل MutH ينتج عنه شق السلسلة GATC عند السلسة المنسوخ منه الDNA
- ثم تتم ازالة القطعة المشقوقة في السلسلة ذات عدم التوافق بفعل إنزيم exonuclease و بمساعدة helicase II و بروتين SSB ...

- إذا حدث الشق عند الطرف 3' من عدم التوافق ستتم هذه الخطوة بفعل إنزيم exonuclease I الذي يقوم بإنزال السلسة الوحيد فقط في الجهة 3' نحو الجهة 5'
- أما إذا حدث الشق عند الطرف 5' من مكان عدم التوافق فتحدث العملية بفعل انزيم exonuclease VII أو RecJ
- و تقوم الأنزيمات polymerase III و DNA ligase بإملاء الثغرة التي تخلفها الخطوات السابقة
- المسافة بين طرف GATC و نقطة عدم التوافق قد تتعدى على 1000 زوج قاعدي لذا فيعتبر تصليح عدم التوافق غير مجدي



تصليح عدم التوافق في حقيقيات النوى قد يكون قريب جدا منه في بكتيريا E.Coli , و قد اكتشف وجود MutS و MutL في الخميرة و في الثديات و في حقيقيات نواخرى ,

MSH1 و **MSH5** مماثلات ل **MutS** و **MLH1** و **PMS1** و **PMS2** مماثلات أيضا ل **MutL**

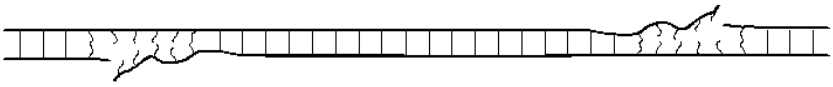
هذا الجدول مقارنة بين الإنزيمات المستخدمة في آليات تصليح الDNA

Repair System	Enzymes/proteins	Repair System	Enzymes/proteins
Base excision	DNA glycosylase	Mismatch	Dam methylase
	AP endonuclease		MutS, MutL, MutH
	DNA polymerase I		Exonuclease
	DNA ligase		DNA helicase II
Nucleotide excision	Uvr-A, Uvr-B, Uvr-C		SSB protein
	DNA polymerase I		DNA polymerase III
	DNA ligase		DNA ligase

كسر سلاسل ال DNA و تصليحها

الإشعاعات و المواد الكيميائية قد تؤدي إلى كسر احد أو كلا سلاسل الDNA

كسر في سلسلة واحدة



كسر مضاعف (في السلسلتين)

1- الكسور في السلسة الواحد Single-Strand Breaks (SSBs)

يتم تصليح هذه الكسور باستخدام نفس الانزيمات المستخدمة في نظام تبديل القاعدة التضررة (BER).

2-الكسور المزدوجة في كلا السلستين Double-Strand Breaks (DSBs)

هناك اليتان تحاول فيها الخلية تصليح الكسور المكتملة في جزيئة الDNA

- **خاصا (يدعى Ku) للتعرف على المناطق المسورة و الارتباط بالنهايات المسكورة و وصلها ببعضها مرة أخرى. هذا الأمر سيتم بشكل أفضل إن وجدت النيوكليوتيدات المكملة .. لكن يمكن أن يتم بدونهم ... هذا النوع من الانضمام يسمى أيضا Nonhomologous End-Joining (NHEJ)... أي ارتباط النهايات غير المتماثلة ...**

- **الخطأ في الارتباط قد يسبب أخطاء في الترجمة مما يؤدي إلى الكثير من المشاكل الوراثية و الطفرات**
- **إعادة التجميع المتماثل : هنا تصلح النهايات المكسورة باستخدام معلومات على الجزء السليم**

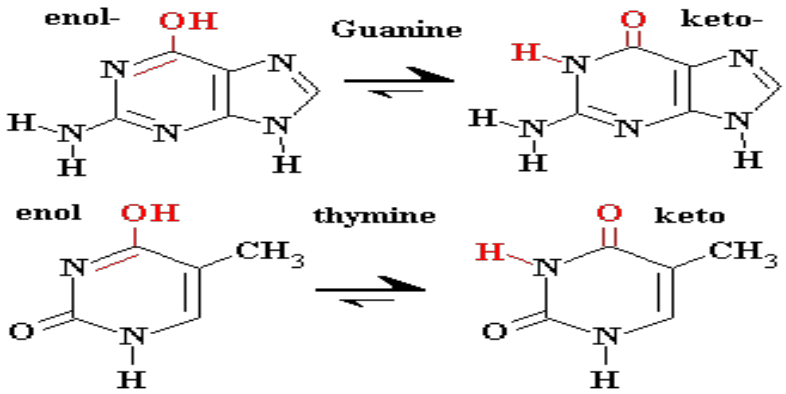
الطفرة الوراثية *Genetic Mutation*

تعرف الطفرة الوراثية بأنها تغير مفاجئ وكابت في الصفات الوراثية للكائن الحي، والذي يحتفظ به خلال عملية إعادة تركيبه أو تضاعفه،على ألا يكون هذا التغير في التركيب الوراثي ناتجا عن اتحادات وراثية أو انتقال الحامض النووي منقوص الأكسيجين (DNA) من خلية إلى أخرى.

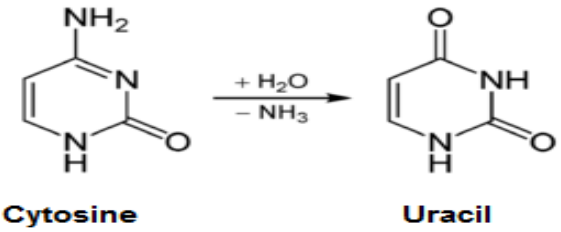
تحدث الطفرة نتيجة تغير في ترتيب القواعد النيتروجينية بالفقد أو الاضافة أو الإستبدال، مما يؤدي إلى تغير في تركيب المورثة وبالتالي تغيير في تكوين البروتين الذي تشفره، فينتج عنه تغيرفي الصفات مثل عدم القدرة على تخليق بعض الأحماض الأمنية أو الفيتامينات أو ظهور حساسية أو مقاومة تجاه المضادات الحيوية أو الملتهمات، أو تغير في الخصائص الأنزيمية. قد تكون الطفرات في الخلايا البكتيرية تلقائية (Spontaneous mutation) وهي التي تحدث طبيعيا بدون سبب معلوم أما الطفرات المستحدثة (Induced mutation) التي تحدث نتيجة معاملة البكتيريا بالعوامل المطفرة مثل الأشعة أو الحرارة أوبعض المواد الكيميائية التي تتفاعل مع المادة الوراثية.تقسم الطفرات الى:-

1- ***طبيعية Natural*** : بفعل العوامل المطفره في الطبيعة ومن اهم أسبابها او عواملها:

- الصنوانية Tautomerism: تغيير قاعدة عن طريق إعادة تموضع ذرة هيدروجين، وذلك بتعديل نمط ترابط الهيدروجين لتلك القاعدة، مما يؤدي لازدواج نوكليوتيدات خاطئ أثناء التضاعف وكما موضح في الشكل ادناه:



- نزع البيورينات Depurination: فقدان قاعدة بيورين لتشكيل موقع منزوع البورين Apurinic Site (AP site) والذي يحدث نتيجة لازالة قاعده بيورينيه اثناء عمليات اصلاح الدنا.
- نزع الأمينات Deamination: نزع مجموعة أمين والتي تؤدي لتبدل قاعدة عادية الى اخرى مثلا تبديل السايتوسين الى يوراسيل كما موضح ادناه:



2- ***مستحثة Induced*** : والتي تحصل بشكل مقصود كما في بعض التجارب المختبرية التي تختبر القدرة التطفيرية لبعض المركبات او المؤثرات.

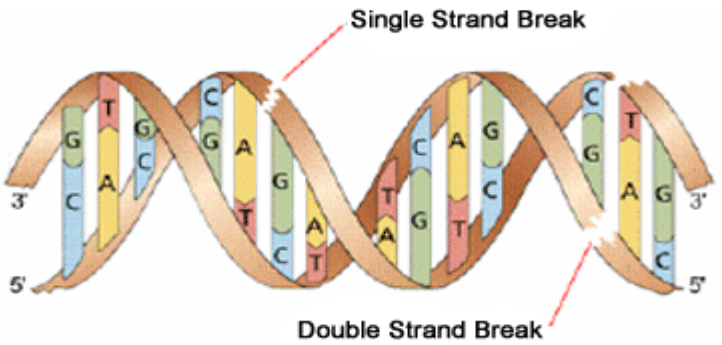
■ من العوامل التي تسبب الطفره المستحثة هي (تسمى العوامل المطفره بـ Mutagen) :

<u>اولا: العوامل الفيزياوية: وأهمها الأشعة والتي تنقسم الى:</u>

- **الأشعة المؤينة Ionizing Radiation** : وأهمها الأشعة السينية X-ray وأشعة كاما γ-ray حيث تعمل على عطب الدنا من خلال مايلي:

1- القطع في احد الشريطين Single Strand Breaks من خلال تحطيم الاصره بين السكر والقاعده النتروجينيه او الاصره ثنائية الفوسفات (Phosphodiester bond) . ويتم ذلك من خلال تكوين الجذور الحره للاوكسجين.

2- القطع في كلا الشريطين Double Strand Breaks من خلال تحطيم الاصره بين السكر والقاعده النتروجينيه او الاصره ثنائية الفوسفات (Phosphodiester bond) . . ويتم ذلك من خلال تكوين الجذور الحره للاوكسجين.



3- Base Damage:

- **الأشعة الغير مؤينة non-ionizing Radiation: وأهمها الأشعة فوق البنفسجية UV-light** : حسب منظمة الغذاء والدواء الأمريكية ووكالة ناسا هنالك ثلاثة انواع من الأشعة :

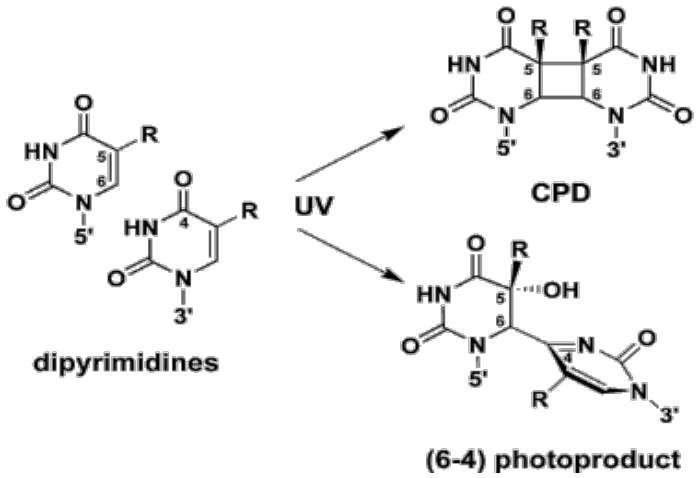
UV-A 400 nm - 320 nm
UV-B 320 nm - 290 nm
UV-C 290 nm - 100 nm

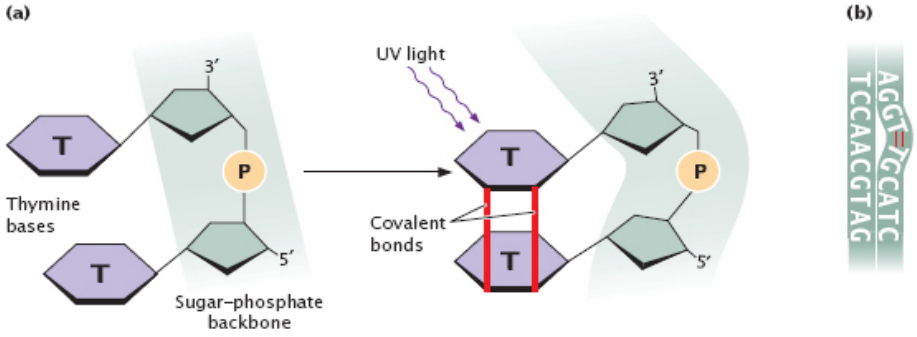
ان اخطر هذه الأنواع هي UV-B حيث تعمل على عطب الدنا من خلال :

1- تكوين مركبات ضوئية photoproducts حيث تمتص الفوتونات المتأتية من الـ UV-B من قبل الدنا وتؤدي الى حالة من عدم الاستقرار وإعادة ترتيب الالكترونات مكونة هذه المركبات الضوئية وأهمها:

Cyclobutane pyrimidine dimer (CPD) e.g. Thymine Dimer

6-4 pyrimidine –pyrimidone



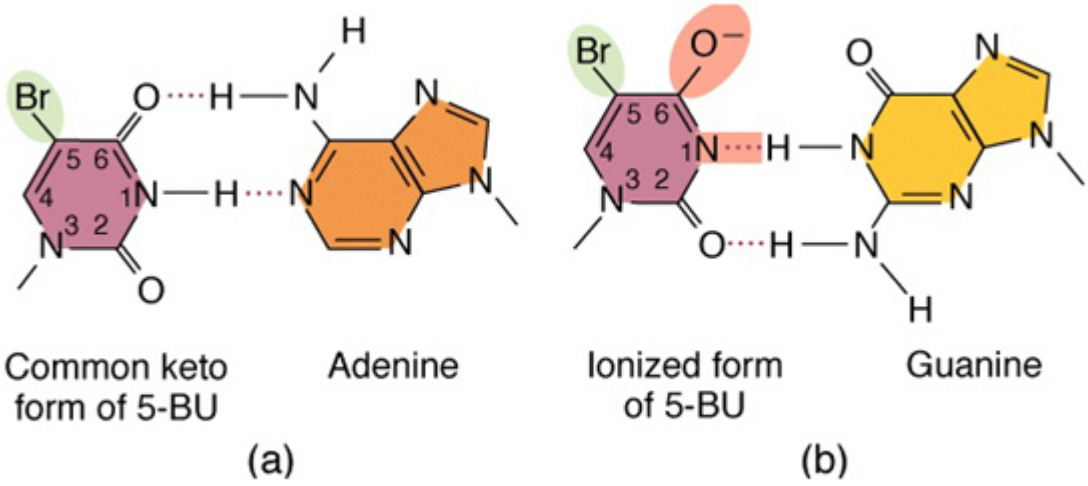


2- استبدال قاعدة منفرده او زوج قاعدي single-base or Double-base substitutions كما في استبدال السايتوسين بالثايمين.

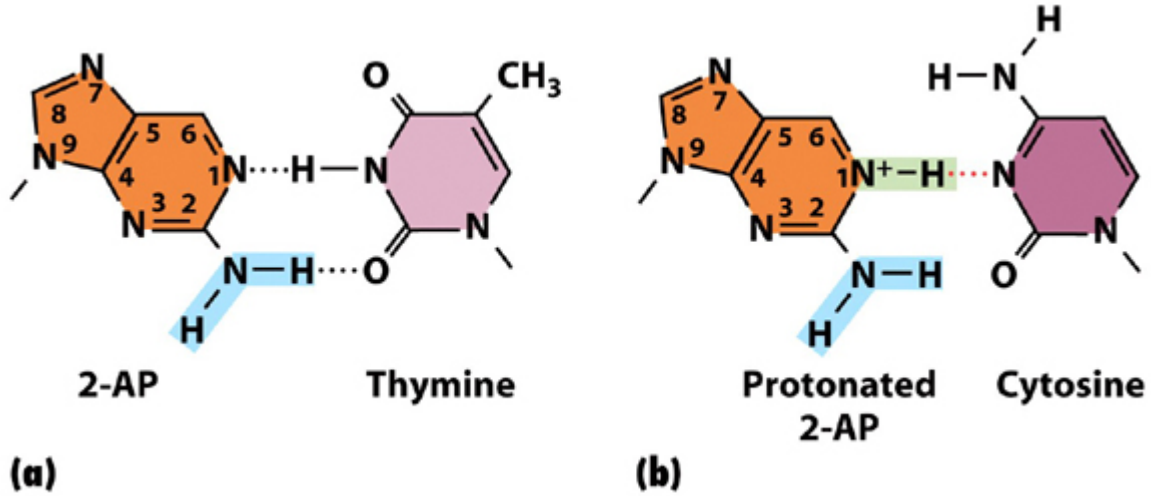
ثانيا: العوامل الكيمياوية: والتي تنقسم الى

- **مشابهات القواعد Base analogue mutagens** : وهي مواد كيمياويه تشبه الى حد كبير القواعد النتروجينيه الاعتيادية(البيورينات والبرميدينات) وتمتاز بأنها ممكن ان ترتبط مع اكثر من نوع من القواعد النتروجينيه مسببة الطفره ومن هذه المواد:

- **5-بروموبوراسيل 5-BU :** لديه شكل كيتوني يشبه الثايمين وبذلك ممكن ان يرتبط مع ِ الأدنين وشكل اينولي يشابه الستيتوسين يمكنه من الارتباط مع الكوانين.



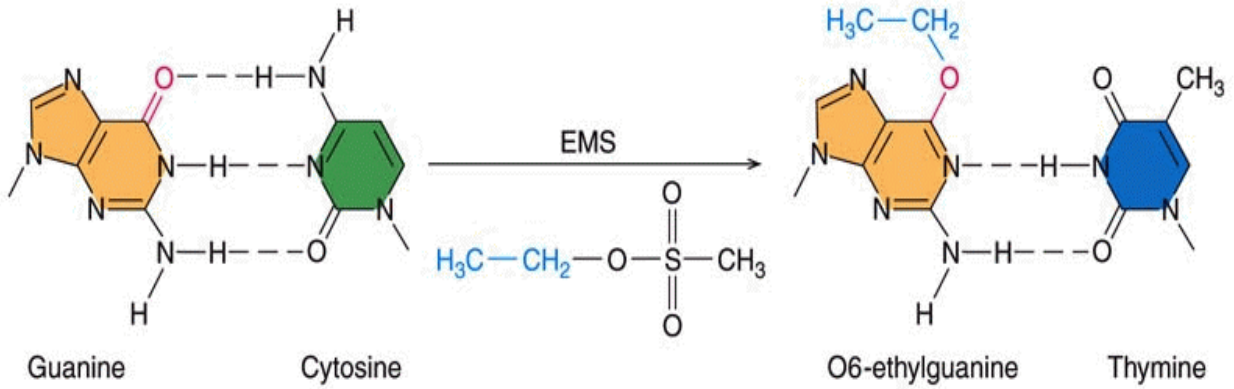
- **2-امينوبيورين 2-AP :** على العكس من **5-BU** لديه شكل كيتوني يشبه الادنين وبذلك ممكن ان يرتبط مع ِ الثايمين وشكل اينولي يشابه الكوانين يمكنه من الارتباط مع السايتوسين.



1- عوامل الالكلةAlkylator : هذه العوامل تتفاعل مباشرة مع القاعدة النتروجينية وتتسبب في تغييرها الى قاعدة اخرى مسببة خطا في الارتباط mispairing ومن هذه المواد:

Ethyl methane sulfonate (EMS)

حيث تعمل على تحويل الكوانين الى 6-اثيل كوانين (تشابه الادنين) والتي ترتبط بدورها مع الثايمين اي ان هذه الماده تحول الارتباط G:C الى A:T



Methyl methane sulfonate (MMS)
Diethylsulfate (DES)
Nitrosoguanidine (NTG, NG, MNNG)
Mastard gas

2- **عوامل اخرى:** وتشمل

- **الهيدروكسيل امين** الذي يحول مجموعه الامين في السايتوسين الى هيدروكسيل امين وبذلك يحول السايتوسين الى هيدروكسي يوراسيل الذي يرتبط بالادنين بدلا من الكوانين اي ان هذه الماده تحول الارتباط G:C الى A:T
- **حامض النتروز** الذي يعمل على سحب مجموعة الأمين من القواعد حيث يؤدي الى:

تحويل الادنين الى هايبوزانثين الذي يرتبط بالسايتوسين اي ان هذه الماده تحول الارتباط A:T الى G:C

تحويل السايتوسين الى اليوراسيل الذي يرتبط بالادنين اي ان هذه الماده تحول الارتباط G:C الى A:T

<u>ثالثا: العوامل البايولوجيه: والتي تنقسم الى:</u>

1- سلاسل الدمج IS (insertion sequence) التي يمكن ان تكون وحيدة أو مركبة تحتوي على مورثة أو عدة مورثات كتلك الخاصة بمقاومة المضادات الحيوية ومثالها IS10 و IS1.
2- العوامل المتوضعه (الترانسبوزون) Transposones : ومثالها Tn3.
3- العاثيات البكتيرية الاندماجية Lysogenic bacteriophage.

انواع الطفرات: تقسم الطفرات الى عدة انواع رئيسه والتي تضم بدورها انواع ثانوية وتقسم الى مايلي:

<u>اولا: حسب تأثيرها على الوظيفة: وتقسم الى</u>

- **طفرات فقدان الوظيفة**: هذه الطفرات تحدث عندما تصبح وظائف نواتج الجينات غير مكتملة أو معدومة. عندما يفقد الأليل وظيفته بالكامل ، فإن الطفرة التي تسببت في ذلك غالباً يطلق عليها طفرة عديمة الشكلamorphic وعادةً تكون الأنماط الظاهرية المرتبطة بهذه الطفرات متنحية.
- **طفرات كسب الوظيفة**: طفرات تغير النواتج الجينية بحيث تكسبها وظائف جديدة وشاذة. هذه الطفرات عادة تكون مرتبطة بأنماط ظاهرية سائدة. وهي غالباً تسمى طفرات جديدة الشكل أو جديدة البنية neomorphic.
- **طفرات سالبة سائدة**: تسمى أيضاً طفرات مضادة للشكل antimorphic، تؤدي لأن تعمل النواتج الجينية المعدلة بشكل مناهض للألائل برية النمط. هذه الطفرات عادة ما تنتج وظائف جزيئية معدلة (عادة تكون غير نشطة). والأنماط الظاهرية المقرونة بها تكون سائدة.
- **الطفرات المميتة**: تؤدي لموت الكائن الحي الحامل لهذه الطفرة.
- **الطفرات الرجعية**: طفرات نقطية تسترجع التسلسلات الأصلية، ومن ثم النمط الظاهري الأصلي.

<u>ثانيا: حسب تأثيرها على الصلاحية:وتقسم الى</u>

- **الطفرة الضارة**: هي طفرة تأثيراتها على النمط الظاهري تكون سلبية، وبذلك تحط من صلاحية الكائن الحي.
- **الطفرة النافعة**: هي طفرة تعزز صلاحية الكائن الحي، أو تدعم صفاته المرغوبة. وتأثيراتها على النمط الظاهري تكون إيجابية.
- **الطفرة المحايدة:** تُعَرَّف على أنها طفرة لا يترتب عليها تأثيرات ضارة أو نافعة. هذه الطفرات تحدث بمعدل ثابت.
- **الطفرة شبه المحايدة**: تُعَرَّف على أنها طفرة قد تكون مؤذية أو مفيدة بشكل طفيف، هذا ومع أنَّ معظم الطفرات شبه المحايدة تكون مؤذية قليلاً.

<u>ثالثا: حسب تأثيرها على البنية التركيبية او تركيب البروتين الناتج: وتقسم الى</u>

1- الطفره النقطية (Point mutation) : سميت بالنقطية لأنها تتضمن استبدال قاعدة نتروجينية واحده فقط وتسمى بالاستبدال المتكافئ (Transition substitution) اذا حدث استبدال لبيورين ببيورين او بايرميدين ببايرميدين (من نفس المجموعه) في حين تسمى بـالاستبدال الغير المتكافئ (Transversion substitution) اذا حدث استبدال لبيورين ببايرميدين والعكس صحيح (من مجاميع مختلفه) وكما موضح ادناه:

Wild type

5'-AAT CGT GGC CCT ACC TCC AAA-3'
3'-TTA GCA CCG GGA TGG AGG TTT-5'

Mutant type (Transition)

5'-AAT CGT GAC CCT ACC TCC AAA-3'
3'-TTA GCA CTG GGA TGG AGG TTT-5'

Wild type

5'-AAT CGT GGC CCT ACC TCC AAA-3'
3'-TTA GCA CCG GGA TGG AGG TTT-5'

Mutant type (Transversion)

5'-AAT CGT GCC CCT ACC TCC AAA-3'
3'-TTA GCA CGG GGA TGG AGG TTT-5'

وكنتيجه لهذه الطفره النقطية تكون واحده من الأنواع التالية:

- ✓ **الطفرات النقطية الغير متحسسة Non sense** :وتنتج عندما يحدث استبدال لقاعدة ضمن شفره تشفر الى واحده من شفرات ***الايقاف*** ومثالها:

Wild type DNA

5'-ATG CGT GGC CCT ACC TCC AAA-3'
3'-TAC GCA CCG GGA TGG AGG TTT-5'

Transcription

Wild type mRNA

5'-AUG CGU GGC CCU ACC UCC AAA-3'

Translation

Wild type Protein

Met Arg Gly Pro Thr Ser Lys

Wild type DNA

5'-ATG CGT GGC CCT ACC TCC AAA-3'
3'-TAC GCA CCG GGA TGG AGG TTT-5'

Mutant type DNA
(Transversion)

5'-ATG CGT GGC CCT ACC TCC TAA-3'
3'-TAC GCA CCG GGA TGG AGG ATT-5'

Transcription

5'-AUG CGU GGC CCU ACC UCC UAA-3'

Mutant type mRNA

Translation

Mutant type Protein

Met Arg Gly Pro Thr Ser STOP

✓ **الطفرات النقطية خاطئة التحسس Missense** :وتنتج عندما يحدث استبدال لقاعدة ضمن شفره تشفر الى ***حامض اميني مختلف*** تماما عن الأصلي:

Wild type DNA

5'-ATG CGT GGC CCT ACC TCC AAA-3'
3'-TAC GCA CCG GGA TGG AGG TTT-5'

Transcription

Wild type mRNA

5'-AUG CGU GGC CCU ACC UCC AAA-3'

Translation

Wild type Protein

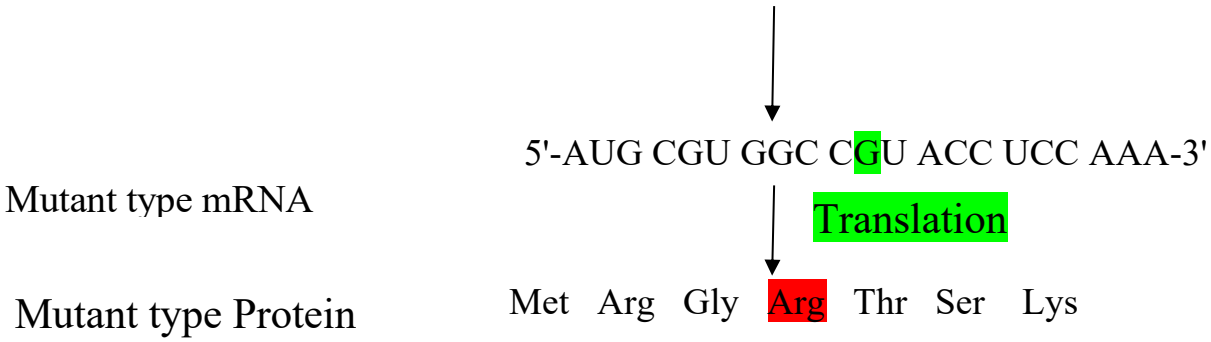
Met Arg Gly Pro Thr Ser Lys

Wild type DNA

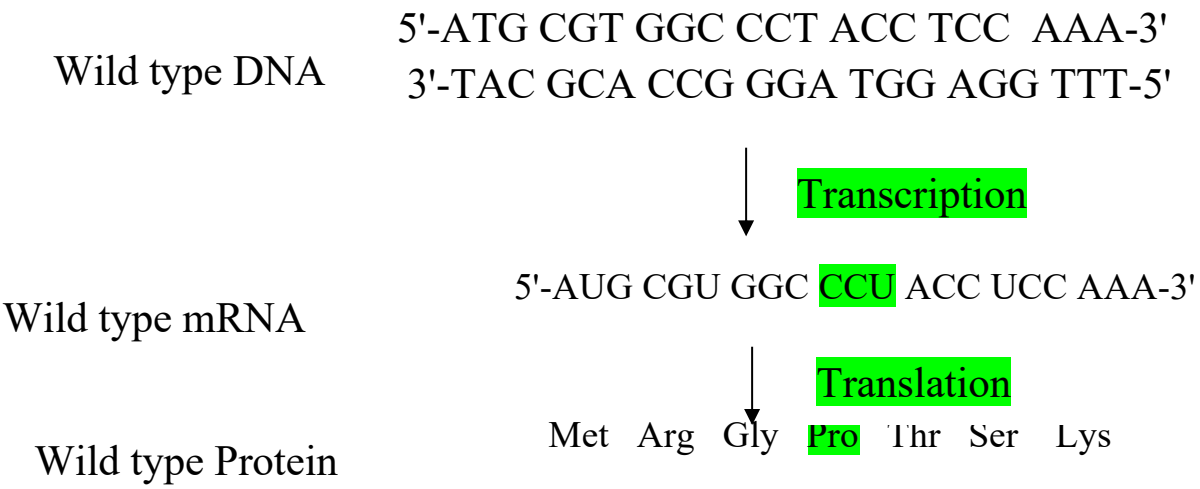
5'-ATG CGT GGC CCT ACC TCC AAA-3'
3'-TAC GCA CCG GGA TGG AGG TTT-5'

Mutant type DNA
(Transversion)

5'-ATG CGT GGC CGT ACC TCC AAA-3'
3'-TAC GCA CCG GCA TGG AGG TTT-5'



✓ **الطفرات النقطية الصامتة Silent**: وتنتج عندما يحدث استبدال لقاعدة ضمن شفره تشفر الى ***نفس الحامض الاميني*** الأصلي:



Mutant type DNA (Transition)

5'-ATG CGT GGC CCC ACC TCC TAA-3'
3'-TAC GCA CCG GGG TGG AGG ATT-5'

Transcription

Mutant type mRNA

5'-AUG CGU GGC CCC ACC UCC AAA-3'

Translation

Mutant type Protein

Met Arg Gly Pro Thr Ser Lys

2- طفرة إزاحة الإطار (Frameshift Mutation) : وتشمل الحذف Delete او الاضافة Insert لقاعدة نتروجينية او اكثر وسميت بهذا الاسم لأنها تغير في شكل كل التسلسلات التي تليها وكما موضح في المثال التالي:

THEBIGCATEATTHERAT	لدينا الجملة
THE BIG CAT EAT THE RAT	بعد تقسيمها لثلاثيات تصبح كالتالي
THEIGCATATETHERAT	عند حذف حرف تصبح الجملة
THE IGC ATA TET HER AT	بعد تقسيمها لثلاثيات تصبح كالتالي

Wild type DNA

5'-ATG CGT GGC CCT ACC TCC AAA-3'
3'-TAC GCA CCG GGA TGG AGG TTT-5'

Transcription

Wild type mRNA 5'-AUG CGU GGC CCU ACC UCC AAA-3'

Translation

Wild type Protein Met Arg Gly Pro Thr Ser Lys

Insert A

Wild type DNA 5'-ATG CGT GGC CCT ACC TCC AAA-3'
3'-TAC GCA CCG GGA TGG AGG TTT-5'

Mutant type DNA (Transition) 5'-ATG CGA TGG CCC CAC CTC CTA A-3'
3'-TAC GCT ACC GGG GTG GAG GAT T-5'

Transcription

Mutant type mRNA 5'-AUG CGA UGG CCC CAC CUC CUA A-3'

Translation

Mutant type Protein Met Arg Trp Pro His Leu Leu

Chromosome Aberration التشوهات او الاعتلالات الكروموسومية

ويقصد بها الطفرات او الاعتلالات الغير طبيعية التي تحدث على مستوى الكروموسوم وهي على نوعين:

1- تشوهات او اعتلالات تركيبية Structural Abnormalities : وتعني التغيرات في تركيب الكروموسومات وهي على عدة انواع:

- حذف قطعه من الكروموسوم Deletion:
- إضافة قطعه من الكروموسوم Insertion:
- استبدال قطعه من الكروموسوم Translocation:

- عكس قطعه من الكروموسوم Inversion:
- مضاعفة قطعه من الكروموسوم Duplication:

2- تشوهات او اعتلالات عدديه Numerical Abnormalities : وتعني التغيرات في عدد الكروموسومات ففي الحالة الطبيعية هنالك 23 زوج كروموسومي وتسمى بـ Disomy اما اذا حدث تغير في عدد الكروموسومات ضمن الزوج الواحد فمثلا إضافة كرموسوم فيصبح هنالك ثلاث كروموسومات بدلا من اثنين وتسمى هذه الحالة Trisomy وعلى العكس لو فقد كروموسوم يبقى كروموسوم واحد وتسمى هذه الحالة Monosomy.

آليات إصلاح الدنا DNA Repair

بالرغم من أن لإنزيمات بناء DNA (DNA polymerases) نشاطية تصليح تكمن في إزالة النيوكليوتيدات الخاطئة إلا أن البعض من الأزواج القاعدية الشاذة الناتجة تفلت من نظام التصليح هذا، بالإضافة إلى ذلك يحدث خطأ التزاوج من الطفرات التلقائية (tautomerisation) للقواعد النيوكليوتيدية، لا تؤدي كل هذه الأخطاء حتما إلى ظهور طفرات في الخصائص، لأن الخلية تمتلك أنظمة تسمح لها بإزالة هذه الأخطاء تسمى بأنظمة التصليح أخطاء التزاوج .

كما يتعرض DNA داخل الخلية إلى أنواع مختلفة من الأضرار ، فقد تهدمه انزيمات هاضمة أو يتعرض لكسور مختلفة أثناء الانقسام، كما يمكن للعوامل الخارجية مثل المركبات الكيميائية والاشعاعات (X, ...UV) أن تحدث الكثير من الأضرار في DNA لذلك يتطلب تصليح التشوهات الناتجة لابقاء أي طابع وراثي في صورته السليمة الموروثة عن الأباء .

يجدر الاشاره الى نظام الاستجابة الذاتي SOS حيث يعمل هذا النظام على تحفيز إي نوع من آليات الإصلاح وأهمها آلية إصلاح قص النيوكليوتيده Nucleotide Excision Repair . يحصل تحفيز لإنتاج بروتينات نظام الاستجابة الذاتي SOS من خلال تجمع ssDNA ويثبط عندها DNA polymerase ويقوم انزيم RecA بتكوين خيوط حول الـ ssDNA الأمر الذي يؤدي الى تحفيز الـ RecA وتثبيط المثبط LexA repressor حيث يعمل هذا المثبط على منع تشفير جينات نظام الاستجابة الذاتي SOS وعندما يحفز RecA يعمل على إزالة التثبيط ويتم استنساخ وتشفير جينات نظام الاستجابة الذاتي SOS وبالتالي يؤدي الى تحفيز آليات الإصلاح وأولها آلية إصلاح قص النيوكليوتيده Nucleotide Excision Repair .

حسب نوع العطب الموجود في الدنا هنالك عدة آليات تستخدم لإصلاح الدنا يمكن توضيحها كمايلي:

1- آلية إصلاح الارتباط الخاطئ Mismatch Repair
2- آلية إصلاح قص النيوكليوتيده Nucleotide Excision Repair
3- آلية إصلاح قص القاعدة Base Excision Repair
4- آلية الإصلاح بالتنشيط الضوئي المباشر Direct Photoreactivation Repair
5- نظام SOS

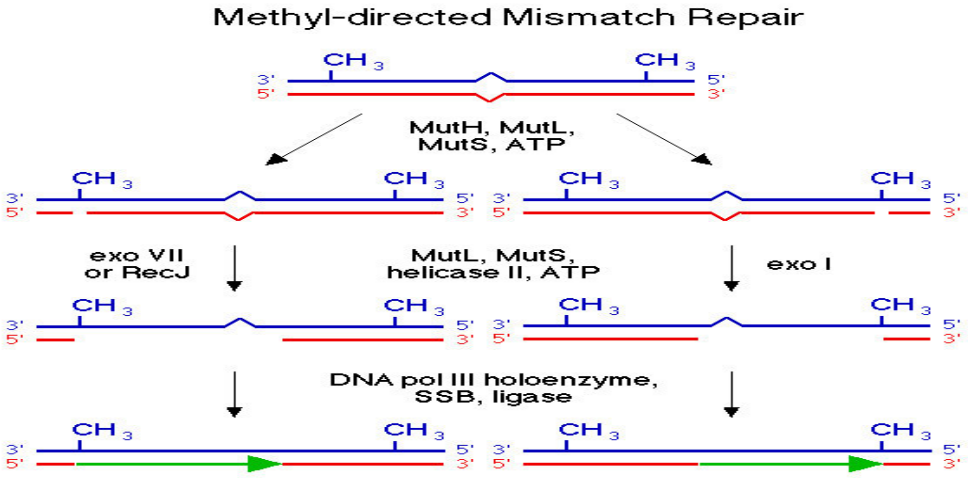
1- آلية إصلاح الارتباط الخاطئ Mismatch Repair (MMR):

تستخدم هذه الآلية لفك الارتباط الخاطئ الذي يحصل بين القواعد الغير متوافقة وخصوصا الارتباط الخاطئ الذي يحصل بين الأدنين Adenine وغيرها من القواعد الغير متطابقة. في الحالة الطبيعية يقوم انزيم يسمى Dam methylase باضافة مجموعة مثيل الى الأدنين الموجود ضمن التسلسل GATC (عندما تكون مرتبطة بالثايمين) اما اذا ارتبط الأدنين ارتباطا خاطئا mismatch مع احد القواعد الأخرى فان انزيم Dam methylase لايضيف مجموعة المثيل الى الأدنين.

تستخدم هذه الآلية لإصلاح الارتباط الخاطئ الذي يحدث نتيجة للطفرات النقطية بنوعيها(Transition و Transversion) وطفرات تغير الإطار Frame shift أي ان هذه الآلية تستخدم لإصلاح العطب البسيط Simple lesions والعطب الكبير Bulky lesions .

يمكن توضيح ميكانيكية عمل هذه الآلية في بدائية النواة Prokaryote كما يلي:

1- تميز الارتباط الخاطئ Mismatch Recognition وتتم من خلال انزيم MutS حيث يعمل هذا الأنزيم على تميز موقع الارتباط الخاطئ.
2- إزالة الارتباط الخاطئ Removing of Mismatch ويتم من خلال ارتباط MutLالذي يحفز ارتباط MutH وهذا الأخير بدوره يعمل قطع Nick من جهة '5 تقع على بعد عدة قواعد من منطقة Mismatch بعد ذلك يعمل انزيم الـ exonuclease بعمل قطع عند الجهة الأخرى من الارتباط الخاطئ '3 بعد ذلك يعمل انزيم UvrD (an Helicase enzyme) على فك الارتباط بين الجزء المعطوب المقصوص والشريط الأم الصحيح
3- اعادة تصنيع الجزء المقصوص Resynthesis بواسطة انزيم DNA polymerase III واعاد الغلق بواسطة DNA ligase . ويوضح الشكل التالي مجمل العملية:



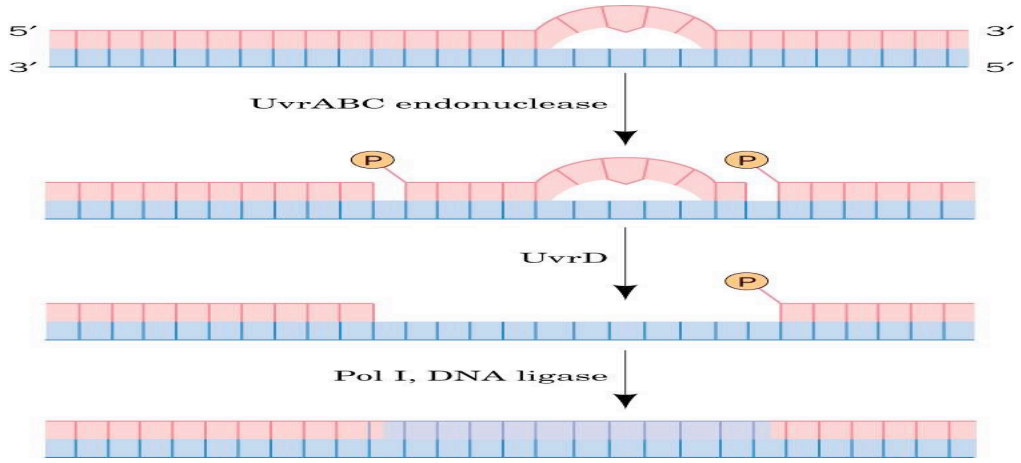
2-آلية إصلاح قص النيوكليوتيده (Nucleotide Excision Repair (NER:

تستخدم هذه الآلية لاصلاح العطب الكبير Bulky lesion الذي يحصل في اكثر من قاعدة **ويؤدي الى خلل في الحلزون المزدوج** ومثالها Thymine Dimer وكمايلي:

1-تميز ثنائي الثايمين Thymine Dimer Recognition ويتم ذلك من خلال ارتباط انزيم UvrA و Uvrb حيث يعمل معقد UvrAB على مسح مزدوج الدنا ويقف عند موقع Thymine dimer بعد ذلك ينفصل الـ UvrA.

2-ازالة Thymine dimer ويتم من خلال ارتباط الـUvrC حيث يعمل معقد UvrBC على عمل قطع nick على جانبي الـ Thymine dimer من ثم يرتبط UvrD الذي يعمل على فك الارتباط ومن ثم تزال القطعه الحاويه على Thymine dimer .

3-اعادة تصنيع الجزء المعطوب Resynthesis بواسطة انزيم DNA polymerase I واعاد الغلق بواسطة DNA ligase . ويوضح الشكل التالي مجمل العملية:



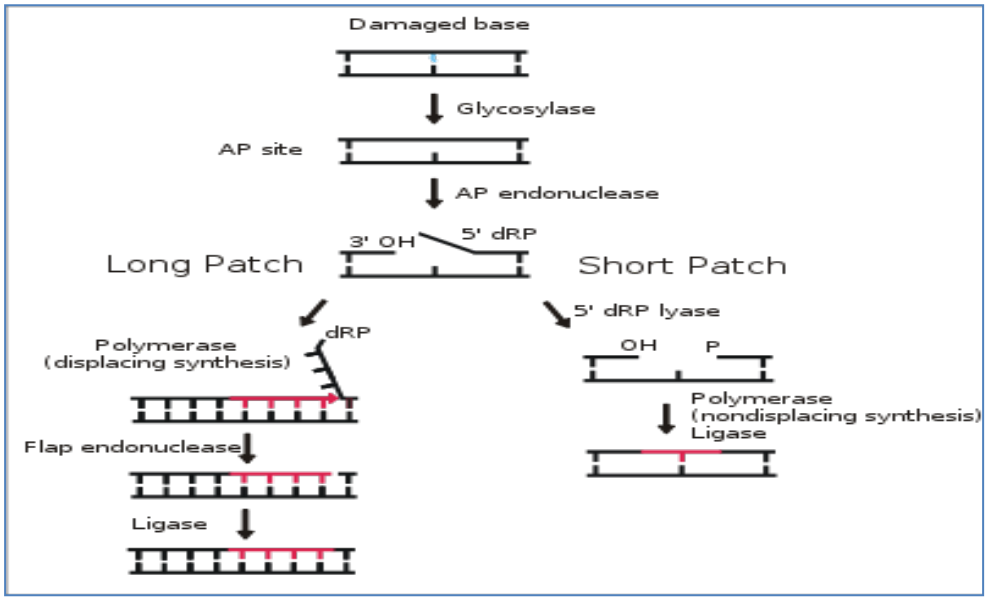
3-آلية إصلاح قص القاعدة النتروجينيه (Base Excision Repair (BER :

تستخدم هذه الآلية لإصلاح العطب البسيط Non bulky lesion الذي يحصل في قاعدة واحده فقط **ولا يؤدي الى خلل في الحلزون المزدوج** ومثالها الإعطاب التي تحصل في الدنا نتيجة لعمليات deamination, oxidation, and alkylation :

- Oxidized bases: 8-oxoguanine, 2,6-diamino-4-hydroxy-5-formamidopyrimidine (FapyG, FapyA)
- Alkylated bases: 3-methyladenine, 7-methylguanine
- Deaminated bases: hypoxanthine formed from deamination of adenine. Xanthine formed from deamination of guanine. (Thymidine products following deamination of 5-methylcytosine are more difficult to recognize, but can be repaired by mismatch-specific glycosylase)
- Uracil inappropriately incorporated in DNA or formed by deamination of cytosine

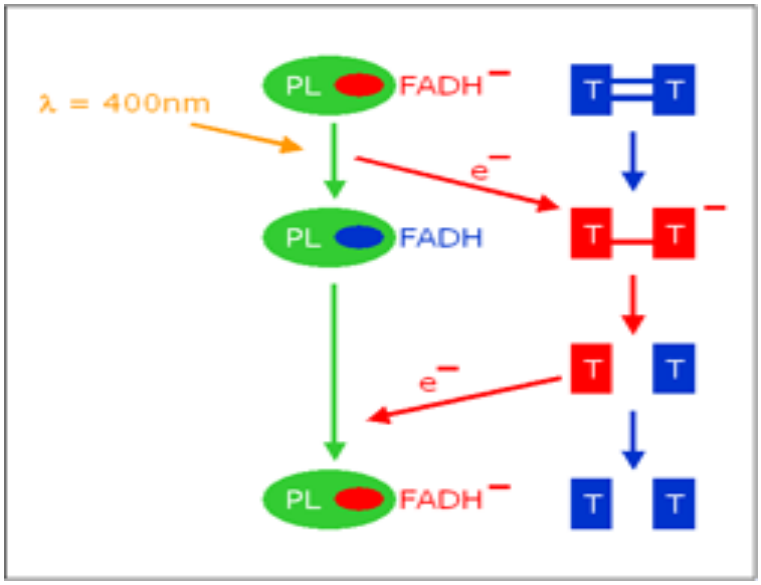
يسمى الأنزيم الأساسي الذي يقوم بإزالة القاعدة النتروجينيه الخطأ DNA glycosylase حيث يعمل على كسر الاصره الكلايكوسيديه بين القاعدة النتروجينيه وسكر الرايبوز منقوص الاوكسجين ليولد Apurinic or Apyrimidinic site (AP site)وهنالك آليتين لإصلاح هكذا إعطاب وهي:

1- **إصلاح الوجبة القصيرة Short-Patch Repair** وتحدث في الإعطاب التي تستجيب وتتحس لأنزيم pol β lyase كما في الإعطاب الناتجة عن عمليات أكسدة واختزال القواعد النتروجينيه وفي هذه الاليه يحدث استبدال للقاعدة في عدد من الخطوات اقل ممافي Long -Patch Repair
2- **إصلاح الوجبة الطويلة Long -Patch Repair** وتحدث في الإعطاب التي لاتستجيب ولاتتحس لأنزيم pol β lyase كما في الإعطاب الناتجة عن عمليات الألكله ونزع مجموعة الأمين للقواعد النتروجينيه وفي هذه الاليه يحدث استبدال للقاعدة في عدد من الخطوات اكثر ممافي Short -Patch Repair



4-آلية الإصلاح بالتنشيط الضوئي المباشر Direct Photoreactivation Repair :

وهي الالية التي تستخدم الاصلاح اعطاب الدنا المتكونه بسبب الاشعه فوق البنفسجيه UV-B و UV-C والتي تؤدي الى تكوين نواتج ضوئيه Photoproducts ومثالها Thymine Dimer . تتلخص هذه الاليه بمايلي: يقوم انزيم الـ Photolyase بامتصاص الضوء المرئي ويقوم بنقل الالكترونات الى FADH ومنها الى Thymine Dimer وتؤدي الى حل Thymine Dimer .



تصليح الإغاثة: SOS

يعتبر التصليح SOS عملية معقدة تسمى بالتصليح غير الوفي لأنه يسمح بمواصلة التضاعف رغم وجود أضرار في حلزون DNA الناتج عن ثنائية التايمين، فهو نظام يولد أخطاء في التسلسل ولا يزيلها. يبدأ هذا النظام في العمل عندما لا يستطيع نظام التصليح الاستئصالي ولا التصليح بعد التضاعف إزالة الأضرار الكثيرة والخطيرة بعد توقف عملية التضاعف، يظهر إذن كحل إغاثة لمنع موت الخلايا.

لا تعرف بالتحديد آلية نظام الإغاثة إلا انه عند E.coli يرتبط هذا النظام على الأقل بثلاث مورثات هي Rec A التي تلعب دورا رئيسيا في عملية إعادة التشكيل الوراثي و Umu C وUmu D.

- حث النظام SOS:

عندما تكون الأظرار خطيرة بمقدار كاف لتوقف بناء DNA، يحث استنساخ مجموعة من المورثات المهمة تسمى مورثات SOS، يسبب توقف التضاعف و تظهر سلاسل DNA أحادية الخيط، فيتم التعرف عليها بواسطة إنزيم Rec A، لهذا الأخير عدة أدوار:

- المساهمة في إعادة الاتشكيل الوراثي من جهة.
- تخريب البروتين Lex A الكابح الرئيسي لمورثات نظام الاستغاثة SOS.

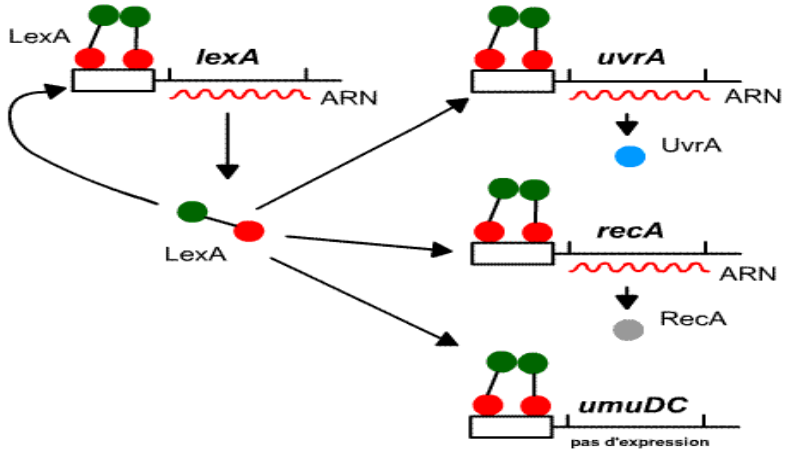
يحث إنزيم Rec A بذلك استنساخ حولي 20 مورثة كل منها دور هام في عملية تصحيح DNA.

في الظروف المثالية للنمو البكتيري يكبح Lex A مورثات نظام التصليح فلا يستنسخ أو يترجم البعض منها بصفة جد ضعيفة فقط. تنتج البروتينات Lex A و Rec A و Uvr A عاديا بتراكيز منخفضة، تكون كمية Lex A الموجودة كافية لكبح بقية مورثات SOS كليا، لكن عندما تتضرر جزئية DNA بفعل الأشعة فوق البنفسجية مثلا، تظهر مناطق DNA أحادية الخيط فتجذب البروتين Rec A ثم الكابح Lex A الذان يرتبطان بها ، يخريب Rec A المرتبط البروتين Lex A . يؤدي اختفاء هذا الأخير إلى الترجمة العالية لبروتين Rec A وبقية مورثات SOS، من بينها نواتج ضرورية لتصليح DNA .

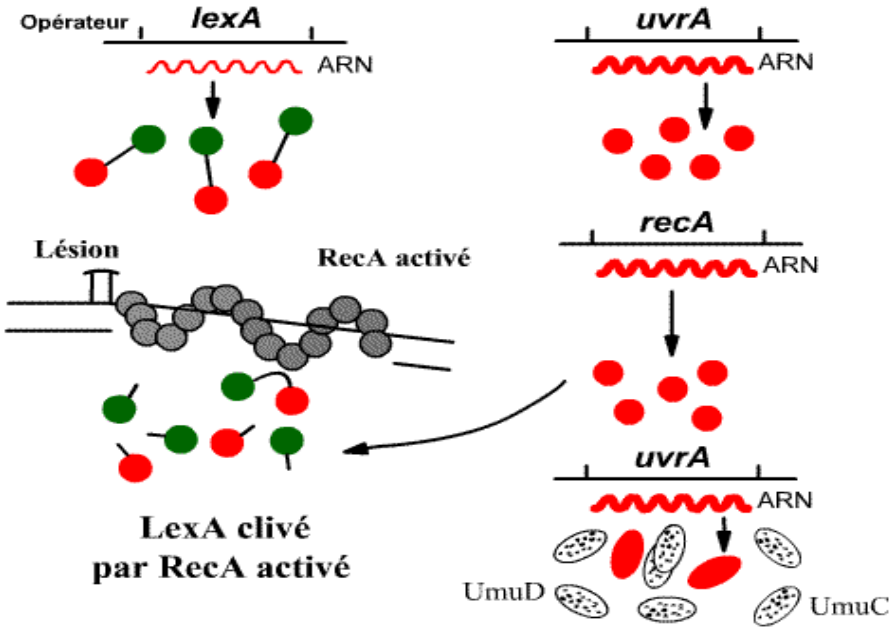
- تخريب Lex A وتنشيط نظام SOS:

يحيط Rec A خيط DNA الأحادي على شكل حلزون ليكون الشكل النيوكليوبروتيني ، ثم يرتبط بروتين Lex A ويهدمه. يعتبر هذا الهدم إشارة إغاثة، وتترجم مورثات الإغاثة العشرون التي تتدخل في مختلف عمليات التصليح، كل منها بحركية خاصة .

يصبح نظام الإغاثة ممكنا بعد تدخل مركب مكون من نواتج المورثتين Umu C و Umu D، في الوهلة الأولى،وبعد إنتاج كميات كبيرة من البروتينات Umu C و Umu D يعمل البروتين RecA على إنضاج هذه البروتينات بالقطع، تجتمع جزيئتين من Umu D مع جزيئة Umu C لتكون المركب Umu D'2C (المركب المطفر)، ثم يرتبط هذا الأخير بإنزيم DNA polymerase فيغير نوعيته إذ يصبح متسامحا إتجاه قانون تطابق القواعد فيجعله قادرا على تخطي التلف الموجود بالإضافة العشوائية للنيوكليوتيدات. في هذه الحالة الطارئة يتجاهل مركب التضاعف (DNA polymerase – Umu D'2C) الضرر الموجود على الخيط الأبوي لينتج خيطا مقابلا له، يتعلق التضاعف الوفي إذن مؤقتا لتبقى الخلية حية ولو بثمن فساد المعلومة الوراثية .



تنظيم استنساخ الجينات المسؤولة عن التصحيح SOS



الشكل20: العوامل المؤثرة على نظام SOS

انواع اضرار DNA وطريقة الاصلاح

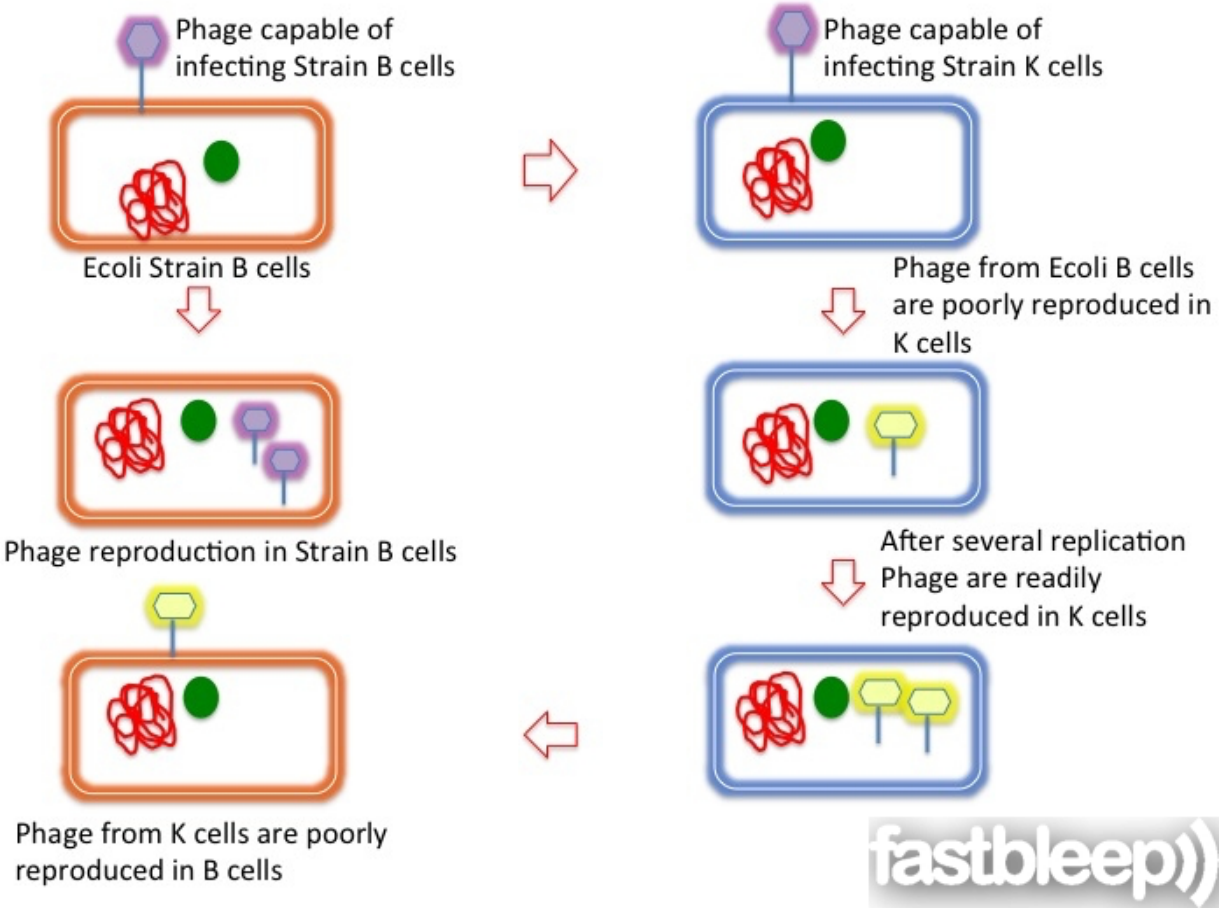
طريقة العمل	المورثة المسؤولة ووظائفها	نوع الضرر المصلح	الآلية
الإزالة المباشرة للضرر	Alkyltransferase	0-6 Alkylguanine	تغير المجموعات الأكيلة في 0-6 Alkylguanine لبقية السيستين للترونس فيران
	Photolyase	Photoproduct 6-4	كسر الروابط 6-4 يحفظ ويصلح القواعد العادية
		ثنائي البيريمدين الناتج عن UV	قطع dimeres في وجود الضوء الأبيض
القطع المعمم	النظام Excinulease المشفر بالمورثات (uvrABC)	ثنائي البيريمدين الناتج عن UV	يتم القطع بواسطة Endonucleolytiques إلى قطع وهناك أخطاء والنتيجة تكون التصحيح بـ DNApolymerase و DNAligase
القطع النوعي	Endonucleases AP		يتم القطع Endonucléolytiques
	DNAglycosylase	مواقع منقوصة البيريمدين أو اليوراسيل أو الهيوكزاتين والقواعد المتغيرة	تنزع القواعد وتصصح الأخطاء بـ EndonucleasesAp
التصليح بعد البناء التضاعف	تصحيح أخطاء التزاوج بواسطة المورثات (mut.L, mut.S) Endonucleases (mut.H) Helicase (mut.U)	قواعد مرتبطة بصفة خاطئة	نعلم أن سلسلة DNA الجديدة Y تكشف جزيئات الأدينين غير الممثيلة في السلسلة 3 GATC 5 تقطع بعد ذلك قواعد السلسلة الجديدة عندما تكشف الثنائيات.

	- تحديد موقع الأزواج G :T وإزالته بواسطة (mut.L, mut.S…)	أزواج G :T الناتجة عن إزالة NH_2 من $5CH_3$Cytosine	
	- التصليح بإعادة التشكيل الوراثي (RecA, Ruv)	وجود ثغور في خيوط DNA الجديد في مستوى الأضرار في DNA الأب	
	- التصليح بإعادة التشكيل الوراثي (RecA, RecN)	كسر ثنائي الخيط	
	- نظام SOS (RecA, umu D,umu C)	وجود ثغور في خيط DNA الجديد 4 مستوى الأضرار في DNA الأب => تضاعف غير وفي للسلسلة المتضررة	- استمرار التضاعف رغم وجود الأضرار.

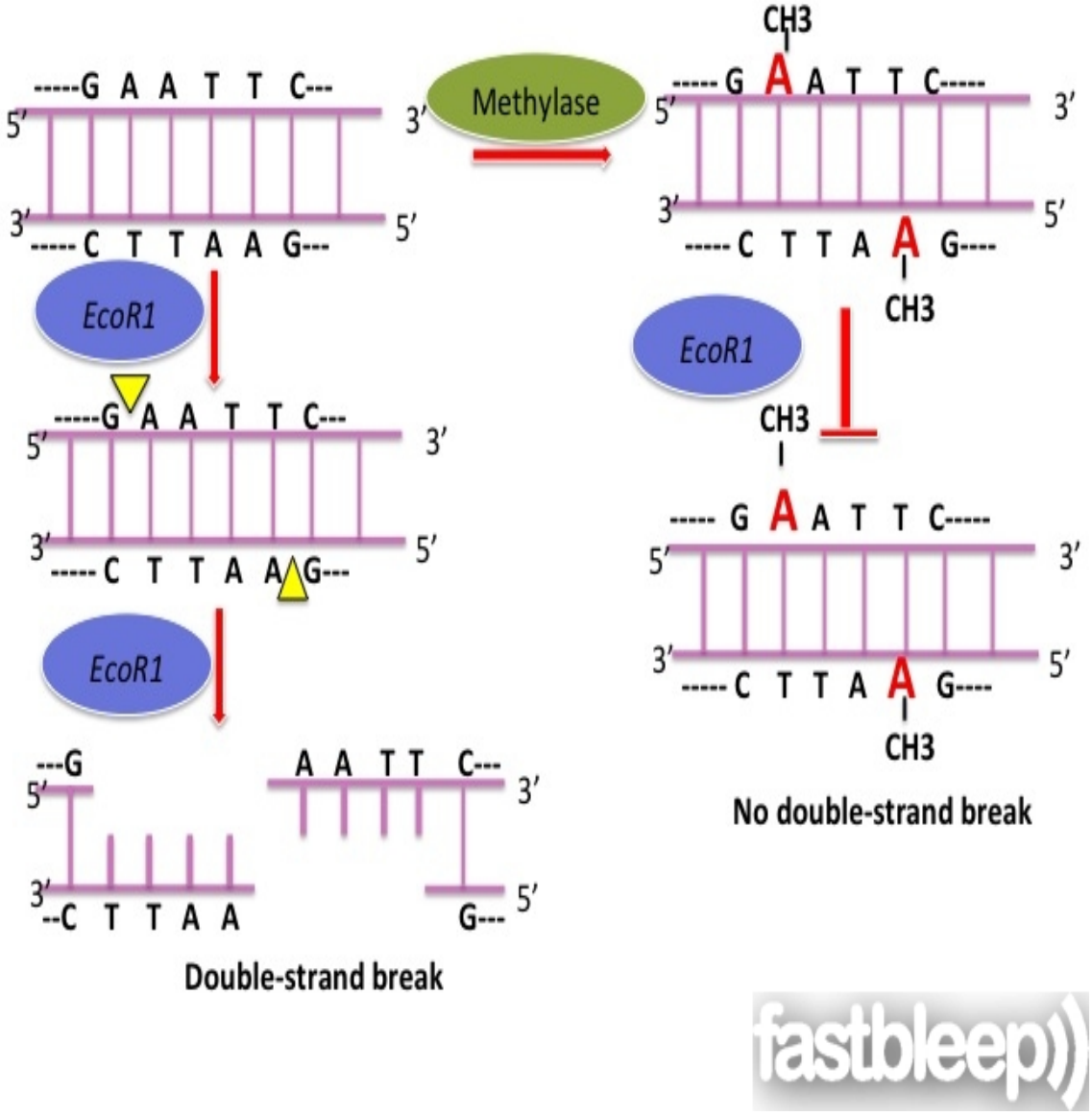
الإنزيمات القاطعة Restriction Enzymes :

تعرف أيضا بالمقص الجزيئي (Molecular Scissors) وهي الإنزيمات التي لها القابلية على قطع جزئية الدنا في موقع محدد من النيوكليوتيدات يسمى بموقع التميز Recognition site وقد يقطع عند نفس الموقع او بعيدا عنه ويعرف موقع القطع بـ Cleave or restriction site . وتوجد 3-5 أنواع منها تختلف بالتركيب وموقع القطع ونوع القطع الذي تحدثه.

اكتشفت الانزيمات القاطعة في خمسينيات القرن المنصرم 1950 بواسطة Salvador Luria and Giuseppe Bertani من خلال دراستهم على عاثيات البكتيريا نوع لأمدا λ phage حيث لاحظوا ان هذا العاثي يصيب احد سلالات بكتريا الاشريشيا القولونية ويتكاثر بحرية في حين تقل نسبة الإصابة من نفس العاثي لسلالات اخرى من بكتريا الاشريشيا القولونية وفيما بعد فسر هذا على أساس ان قلة الاصابة ناتجة من ان الاشريشيا القولونية قليلة الاصابة تنتج أنزيمات قاطعه تقوم بقطع وتدمير المادة الوراثية للفيروس لكن ما السبب في عدم قطع وتدمير دنا الاشريشيا القولونية نفسها ؟



ان السبب في ان دنا البكتريا المنتجة للإنزيم القاطع لايتأثر بهذا الأنزيم التي تنتجه هو لوجود نظام حماية لدنا البكتريا المنتجة وهو عبارة عن انزيم يقوم باضافة مجموعة مثيل عند قاعدة الأدنين ويسمى هذا الإنزيم بـ DNA methyletransferease وعند دمج هذين النظامين ينتج نظام جديد متناسق سمي بنظام القطع والتحوير restriction-modification system وان الغرض الأساسي من هذا النظام هو لحماية المادة الوراثية للبكتريا التي يوجد فيها من المادة الوراثية الدخيلة والغريبة ومن الجدير بالذكر ان هذا النظام يوجد في كل من Eubacteria and Archea.



fastbleep))

على الرغم من وجود هذا النظام إلا انه بعض العاثيات البكتيرية تكون مقاومة لفعل الكثير من الانزيمات القاطعة؟ ويعود السبب الى انه بعض العاثيات تحتوي على بعض الأنظمة المشابه لـ restriction-modification system ومثالها hydroxymethyltransferases or glucosylases والتي تمكنها من المقاومة.

انواع الانزيمات القاطعة :

ان أول انزيم قاطع تم اكتشافه كانت في عام 1970 من قبل Hamilton O. Smith, Thomas Kelly and Kent Wilcox وهو انزيم *Hin*dII الذي تم عزله من بكتريا *Haemophilus influenzae* *وبصوره عامه تقسم الانزيمات القاطعة الى عدة انواع بالاعتماد على:*

1- عدد الوحدات الثانوية المكونة للإنزيم subunits
2- العوامل المساعدة cofactors
3- ميكانيكية عمل الإنزيم
4- موقع التمييز Recognition site
5- موقع القطع cleavage or restriction site
6- موقع اضافة المثيل
7- الوزن الجزيئي

Character	Type I	Type II	Type III
Nature of the enzyme	single multifunctional enzyme	Endonuclease and methylase	single multifunctional enzyme
Molecular weight	450kDa	20-30kDa	200kDa
Protein conformation	3 different subunits	2 proteins	2 different subunits
Cofactors	Ado-met, ATP, Mg2+	Mg2+	Ado-met, Mg2+, ATP
Cleavage site	1000bp from recognition site	Within recognition site	24-26bp to 3' recognition site
Site of methylation	Recognition site	Recognition site	Recognition site

Ado-met = **S-Adenosyl methionine**

تسمية الانزيمات القاطعة :

يتكون اسم الإنزيم القاطع من:

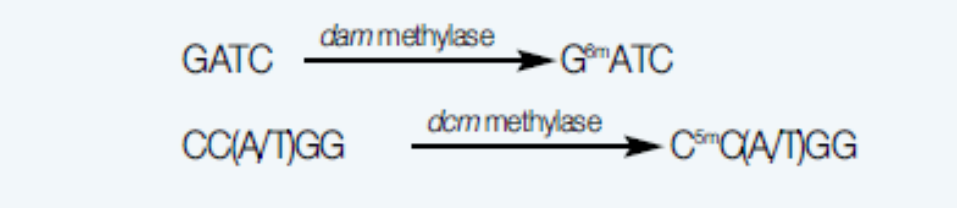
1- الحرف الأول للجنس البكتيري ويكتب بالحرف الكبير ومائل
2- الحرفين الأولين للنوع ويكتبان بالحرف الصغير ويكونان أيضا مائلين
3- الحرف الاول من اسم السلاله ويكتب بالحرف الكبير عادي (غير مائل)
4- رقم ويمثل ترتيب السلاله ضمن الاكتشاف

ويمثل الجدول التالي مثالا واضحا على التسمية:

Derivation of the EcoRI name		
Abbreviation	**Meaning**	**Description**
E	**Escherichia**	**genus**
co	**coli**	**species**
R	**RY13**	**strain**
I	**First identified**	**order of identification in the bacterium**

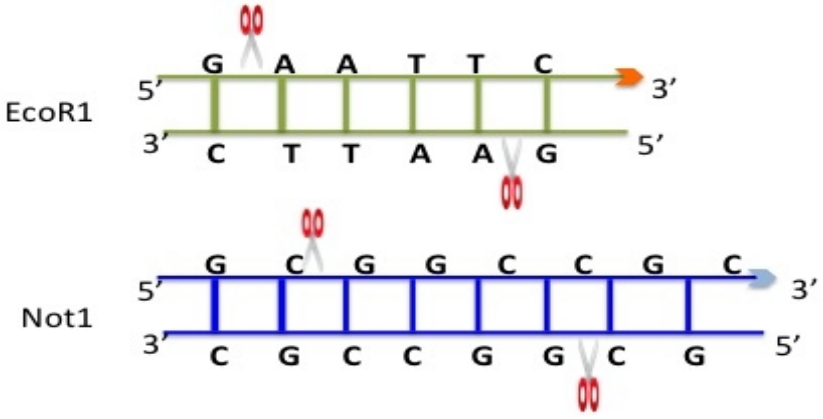
تتم عملية المثيلة بنقل مجموعة مثيل من S-Adenosyl methionine الى ذرة النتروجين السادسة ضمن الأدنين الموجود ضمن التسلسل GATC وتتم هذه العملية بواسطة انزيم المثيليز المشفر بواسطة الجين *Dam* اما المثيليز المشفر بواسطة الجين *Dcm* فانه يقوم باضافة

مجموعة المثيل الى ذرة الكاربون الخامسة ضمن السايتوسين الموجود ضمن التسلسل CCTGG

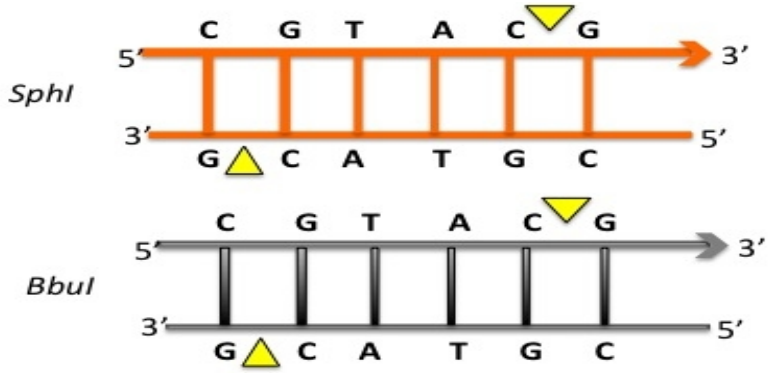


موقع التمييز Recognition site :

تختلف مواقع التميز في عدد قواعدها وتسلسلاتها من انزيم لأخر فمثلا انزيم *Eco*RI يميز التسلسل ذو الست قواعد بينما *Not*I يميز موقع ذو ثمان قواعد وكما موضح ادناه :



هنالك اكثر من انزيم لها نفس موقع التمييز وتسمى بـ isoschizomers ومثالها *Sph*I و *Bbu*I



هنالك انزيم يميز موقع يحتوي على موقع تميز لانزيم اخر (موقع داخل موقع) ومثالها انزيم *Bam*HI الذي يحتوي في موقعه على موقع قطع لانزيم *Sau*3AI

يتصف موقع التمييز بأنه ذو تسلسل متناوب Palindromic sequences ويقصد انها تقرا بنفس القراءة في كلا الاتجاهين

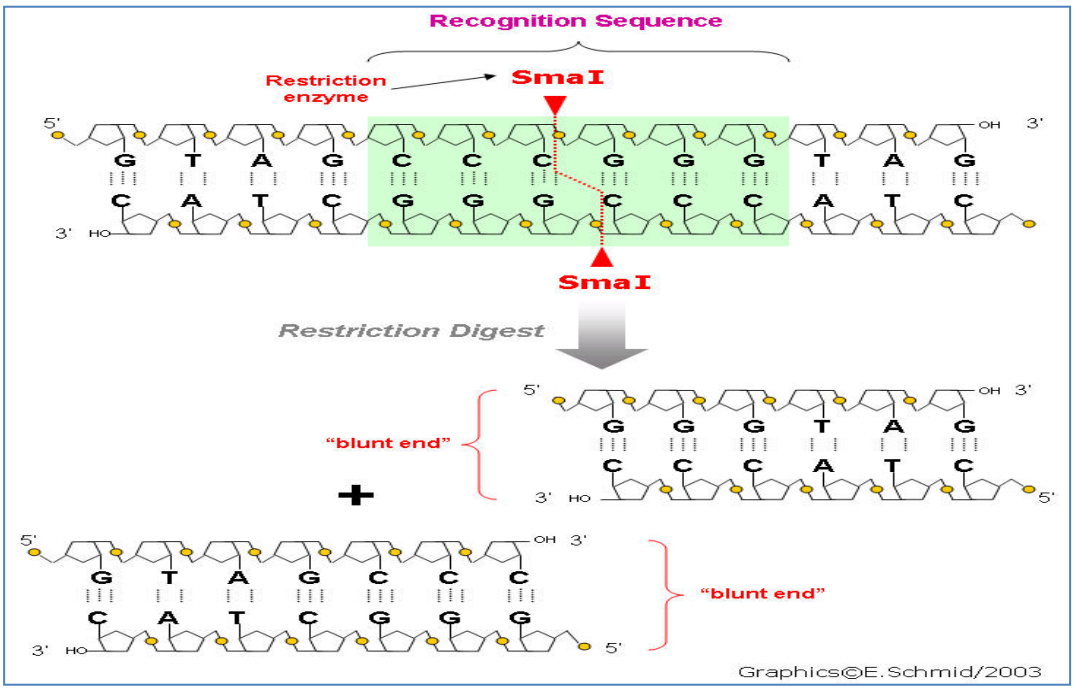
أنماط القطع Cleavage Pattern :

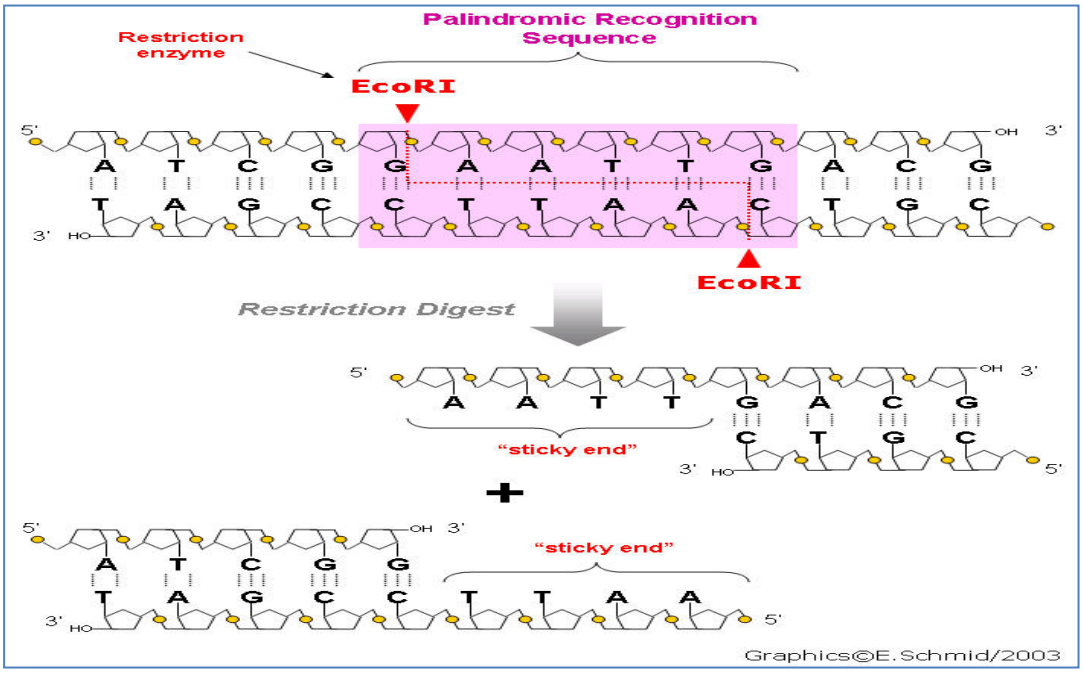
هنالك ثلاث أنماط من القطع هي :

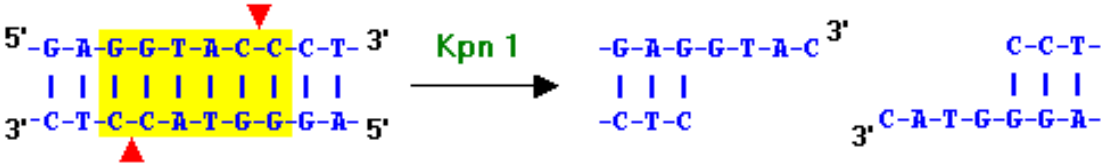
1- النهايات العمياء Blunt ends : تنتج من القطع عند نفس الموقع في كلا الشريطين كما في *Sma*I

2- النهايات اللاصقه Sticky ends : وتنتج عندما يقطع الإنزيم الشريطين بصوره غير متناظرة مخلفا بذلك قطعة قصيره معلقة عند الطرف '5 او عند الطرف '3 وبذلك يكون على نوعين:

- **5' overhangs كما في القطع الذي يحدثه الأنزيم *Eco*RI**
- **3' overhangs كما في القطع الذي يحدثه الأنزيم *Kpn*I**


Recognition Sequence
Restriction enzyme
SmaI
SmaI
Restriction Digest
"blunt end"
"blunt end"
Graphics©E.Schmid/2003


Palindromic Recognition Sequence
Restriction enzyme
EcoRI
EcoRI
Restriction Digest
"sticky end"
"sticky end"
Graphics©E.Schmid/2003


5'-G-A-G-G-T-A-C-C-C-T-3'
3'-C-T-C-C-A-T-G-G-G-A-5'
Kpn 1
-G-A-G-G-T-A-C 3'
-C-T-C
C-C-T-
3' C-A-T-G-G-G-A-

المعلمات الجزيئية في دراسة مجين الاحياء المجهرية

ان تنوع وانتشار اعداد كبيرة من الاحياء المجهرية بمختلف صنوفها دعا العلماء الى ايجاد طرق لتصنيف ودراسة مجين هذه الاحياء وايجاد مؤشرات وراثية لكل نوع بما يميزه عن النوع الاخر ويسهل عملية تشخيصه والتعامل معه وقسمت هذه المؤشرات الى

1- المؤشرات المظهرية Morphological Markers:

تعد المؤشرات المظهرية هي الطريقة الأسهل والأقل تعقيدا للتمييز بين الإفراد وتعد أول وأقدم طريقة لدراسة التنوع الوراثي ولا يمكن الاستغناء عنها إذ تعتمد على إيجاد التباينات بين الأفراد بالاستناد إلى الصفات المظهرية مثل اللون أوطبيعة النمو او كمية الانتاج، ولكن تأثر هذا النوع من المؤشرات بالظروف البيئية بشكل كبير حيث يختلف المظهر الخارجي لنفس النوع باختلاف ظروف النمو الخارجية، كما إن أعداد تلك المؤشرات قليلة أي إنها تمثل عدداً قليلاً من المواقع (loci) في المجين Genome فضلاً عن أن بعض الصفات المظهرية يتحكم بها اكثر من جين مما يجعل من الضرورة استخدام مؤشرات أكثر ثباتاً اتجاه العوامل الخارجية.

2- المؤشرات الإنزيمية Isozyme Markers

يمكن تعريف الـ Isozyme بأنه الشكل الآخر لإنزيم معين يشبه ذلك الإنزيم بالوظيفة لكنه يختلف عنه في تسلسل الأحماض الامينية فيه وبذلك يمكن فصلها عن بعض باستخدام الهجرة الكهربائية، ويتميز أفراد النوع الواحد بثبات عدد تلك الإنزيمات لذلك فباستخدام التحليلات أعلاه يمكن تمييزها عن بعض وأول من طور هذه الطريقة هو Bartels (1971) وتصنف ضمن المؤشرات الجزيئية Molecular Markers لان البروتين ناتج عن تعبير الجين ويتم ترحيل هذه الانزيمات المتناظرة على هلام الـ Polyacrylamide او النشا ويعرف خط توزيع الحزم للعينة المرحلة بأنها بصمة الإنزيمات المتناظرة لذلك الفرد او الصنف fingerprint Isozyme ويتم إظهار هذه الحزم بتصنيفها ومقارنة أنماط توزيع الحزم للفرد وإيجاد التباينات المطلوبة.

• إلا أن هذه المؤشرات لها العديد من المساوئ منها أن التعبير الجيني غالبا ما يتأثر بالظروف البيئية ونوع النسيج المستخدم لهذه التحليلات ومرحلته العمرية فضلاً عن أن عدد المتناظرات الإنزيمية يكون قليلاً او محدوداً.

3-مؤشرات الدنا DNA Markers:

تعرف مؤشرات الدنا بأنها تتابعات من الدنا يمكن الاستدلال بها على موقع معين على الكروموسوم او الجين، وتستخدم لدراسة العلاقات الوراثية بين الأفراد وإيجاد البصمة الوراثية لكونها تعكس الاختلافات في المعلومات الوراثية المخزونة فيهم وهذه الاختلافات تكون ناتجة أما من الحذف Deletion، او الإدخال Insertion، او اعادة الترتيب Rearrangement للنيوكليوتيدات في مجين الأفراد المدروسة لأي سبب كان كالطفرات الوراثية لذلك اعتمدت في دراسات التصنيف الجزيئي Molecular taxonomy والدراسات التطورية Evolutionary studies وفي بناء الخرائط الوراثية Genetic Mapping ، كما أصبحت من الأدوات المهمة لدراسة التنوع الوراثي Diversity Genetic، اذ تعد الاختيار الذي لا بديل له في تطوير الخطط الملائمة لحفظ الأنواع، وبما ان هذه المؤشرات تعكس الاختلافات مباشرة على مستوى القواعد المكونة للدنا ونظرا لان مجين الكائنات الحية الراقية يحتوي على الملايين من هذه القواعد لذلك فان اعداد هذه المؤشرات كبيرة جداً .وبالتالي فان لها القدرة على الكشف عن مئات المواقع Loci ولعدة أليلات للموقع الواحد.

ميزاتها:

تمتاز هذه المؤشرات مقارنة بالمؤشرات السابقة بمزايا عديدة ومن ابرز هذه المميزات إنها تظهر التغاير الذي يحدث على مستوى الدنا مباشرة و كما هو معروف فان الدنا هو المادة الوراثية المستقرة التي لا تتأثر بالبيئة لذا امتازت هذه المؤشرات بالاستقرارية Stability بعكس المؤشرات الوراثية المعتمدة على الصفات المظهرية التي تتأثر بشكل كبير بالظروف البيئية، وكذلك تمتاز هذه المؤشرات بكونها تعتمد على مادة الدنا الموجودة في جميع خلايا الكائن وبشكل متساوٍ لذا فان تحليل أي جزء من ذلك الكائن وفي أي مرحلة عمرية سوف يعكس بالنتيجة حالة الكائن الوراثية وعلى نحو دقيق مما يمنح هذا النوع من المؤشرات الشمولية ويجعلها تتفوق على المؤشرات المعتمدة على تحليل المحتوى البروتيني لذلك الكائن او حتى على ما تمثله هذه البروتينات من متناظرات إنزيمية.

•ومن المميزات الاخرى لمؤشرات الدنا هي قدرتها على كشف أعداد كبيرة من التباينات Numerous Polymorphic مما جعلها قادرة على إيجاد أي اختلاف مهما كان

طفيفاً وبين أقرب الأفراد فضلاً عن قدرتها على تتبع التغيرات الوراثية عبر الأجيال كونها تستند إلى قوانين مندل في التوارث، كما تبرز أهمية مؤشرات الدنا من خلال تطبيقاتها الواسعة وفي شتى المجالات ومن أهمها في ايجاد البصمة الوراثية (DNA Fingerprinting) والتمييز والتشخيص المبكر للممرضات وتنوعها ومقاومتها للمضادات الحيوية

أنواع مؤشرات الدنا :

•نتيجة لميزات هذه المؤشرات و مجالات تطبيقاتها الواسعة وبسبب التطور السريع في مجالات علم الأحياء الجزيئي فقد تم استحداث وإيجاد العديد من أنواع مؤشرات ألدنا فقد تم حديثاً تصنيف هذه المؤشرات الى نوعين أساسيين اعتماداً على نوع التقانة المستخدمة في إيجادها والكشف عنها وهي :

أولاً : مؤشرات الدنا المعتمدة على التهجين الجزيئي :

ظهرت أولى مؤشرات الدنا المعتمدة على التهجين الجزيئي بعد اكتشاف إنزيمات التقييد Restriction enzymes عام 1968 و وصمة سوذرن Southren عام 1975 ببناء أول تقانه أطلق عليها تباين أطوال قطع التقييد (RFLP) وتعرف على أنها توارث الاختلافات في مواقع القطع الإنزيمي الذي يتسبب في ظهور أطوال مختلفة من قطع الدنا على الأكاروز.

ان منهجية الـ RFLP تعتمد على الاختلافات في طرز التقطيع الذي يحدث بسبب طفرة نيوكليوتيدية واحدة عن موقع القطع او بوساطة القطع المضافة او المحذوفة او المستبدلة عن تلك المواقع مما يؤدي الى تباين اطوال القطع الناتجة وبوجود المجس probe المعلم اما بمواد مشعة او مواد كيميائية يمكن التعرف على القطع المتباينة بارتباط المجس مع التسلل المكمل ولقد استخدمت هذه المؤشرات في بناء الخارطة الوراثية للإنسان وفي مجال تحسين النبات.

ثانياً : مؤشرات الدنا المعتمدة على تفاعل PCR

وصف التفاعل التضاعفي لسلسلة الدنا (PCR) لأول مرة من قبل الباحث Kary Mullis في عام 1985على أساس أن عمل هذه التقانة هو مضاعفة قطعة معينة من الدنا المنتجة من المجين

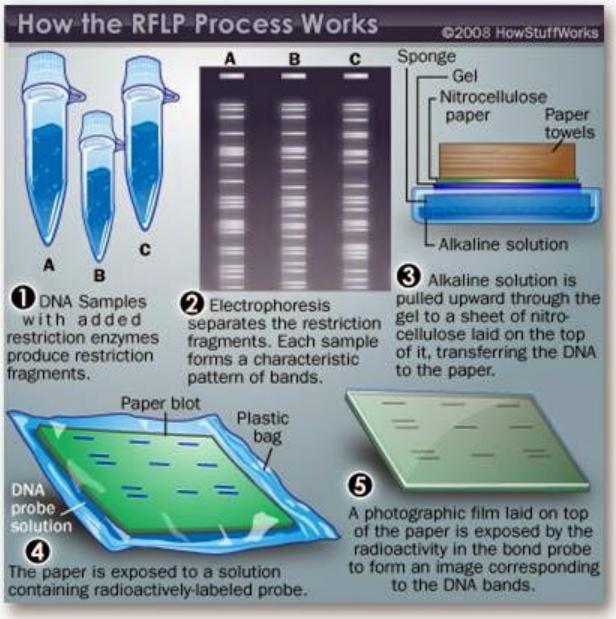
الكلي أنزيمياً وخارج الجسم الحي *in vitro* بوجود البادئات Primers والتي تربط بالتتابع المكمل لها على شريط الدنا القالب Template DNA

أهمية المؤشرات التي تعتمد على PCR:

تكمن أهمية تفاعل الـPCR بتفردها بعدة مميزات كالدقة والخصوصية والحساسية العالية في الكشف عن قطعة دنا معينة ضمن الآلاف من القطع لذلك أصبحت لا يمكن الاستغناء عنها في دراسات الوراثة الجزيئية ، فضلاً عن أنها طريقة عمل سهلة نسبياً وسريعة وخاصة عند الاحتياج لتحليل عينات عديدة. لذلك فقد أصبح لهذا التفاعل تطبيقات واسعة منها دراسة التنوع الوراثي وإيجاد البصمة الوراثية وفي مجال تشخيص الأمراض المختلفة كالأمراض الوراثية والوبائية وذلك بالاستناد إلى المبادئ الأساسية لهذه التفاعلات .

•وتجري حالياً باستخدام تقانة الـ PCR تشخيص الإصابات الفيروسية للإنسان ، كفيروس التهاب الكبد والأنفلونزا والحصبة وفيروسات نقص المناعة المكتسبة الإيدز (HIV)، وفيروسات أنفلونزا الطيور مثل الفايروس (H5N1)، والأمراض السرطانية، كذلك أصبحت من التقانات التي يعتمد عليها في تحديد الأبوة الشرعية ومجال التحقيق الجنائي والطب العدلي Forensic medicine.

•مما تقدم تظهر الأهمية الكبيرة لهذه التقانة واستخداماتها الواسعة مما دعا الباحثين الى العمل الدوؤب والمستمر لإيجاد أنواع جديدة من مؤشرات الدنا المعتمدة على هذه التقانة فضلاً عن العدد الكبير الذي تحقق منها.


How the RFLP Process Works
©2008 HowStuffWorks
A
B
C
Sponge
Gel
Nitrocellulose paper
Paper towels
Alkaline solution
1 DNA Samples with added restriction enzymes produce restriction fragments.
2 Electrophoresis separates the restriction fragments. Each sample forms a characteristic pattern of bands.
3 Alkaline solution is pulled upward through the gel to a sheet of nitrocellulose laid on the top of it, transferring the DNA to the paper.
Paper blot
Plastic bag
DNA probe solution
4 The paper is exposed to a solution containing radioactively-labeled probe.
5 A photographic film laid on top of the paper is exposed by the radioactivity in the bond probe to form an image corresponding to the DNA bands.

نقل الجيناتGene Cloning

أن عملية نقل الجينات هي الحجر الاساس للهندسة الوراثية واغلب عمليات الوراثية الجزيئية وسهل نقل الجينات عملية تحليل مجين الكائنات بدائية وحقيقية النواة.

يمكن تقسيم عملية نقل الجينات الى خطوات رئيسية وكما يلي:-

1- عزل وتقسيم ال DNA قيد الدراسة والمستهدف من عملية النقل ويمكن ان يكون هذا DNA مادة وراثية كاملة او جين معاد تصنيعه من قالب RNA بواسطة reverse transcriptase او جين مضاعف باستخدام تفاعل البلمرة المتسلسل او جين مصنع كليا في المختبر , في حالة كون المصدر DNA كامل للخلية يمكن تقطيع القطعة المناسبة باستخدام الانزيمات القاطعة
2- ربط قطعة DNA المستهدفة في النقل الى ناقل كلونة مناسب باستخدام انزيم الربط DNA ligase.

نواقل الكلونة هي عبارة عن عناصر وراثية صغيرة الحجم تتضاعف ذاتيا باستقلالية عن الخلية وتستخدم لمضاعفة الجين ونقله وغاليا ماتكون بلازميدات او فايروسات. تصمم نواقل الكلونة لتسمح بادخال قطع مرغوبة من DNA فيها في المختبر في مواقع قطع معينة بحيث لاتؤثر على تضاعفها الذاتي . في كثير من الاحوال يتم قطع DNA المراد نقله وناقل الكلونة بواسطه نفس الانزيم القاطع وهذا يسهل عملية النقل واللحم بازدواج النهايات اللاصقةsticky end الناتجة من انزيم القطع اما النهايات الحادة Blunt end فيمكن لصقها باستخدام قطعة رابطة linker او قطعة محورة adaptor ويستخدم انزيم DNA ligase لربط الاصرة الفوسفاتية ثنائية الاستر .

3- ادخال وحفظ القطعة المكلونة في الكائن المضيف. وفي هذه العملية يتم ادخال القطعة في مع ناقل الكلونة المناسب والتي تم صنعها في المختبر الى كائن حي بواسطة التحول على سبيل المثال وفي الكائن الحي يتم مضاعفة القطعة الجديدة.

ان عملية نقل قطع DNA المرغوب الى كائن جديد وخصوصا في البكتريا عادة ماينتج متحولات عديدة clones والتي تختلف فيما بينها باختلاف مواقع ادخال الجين الجديد وبهذا ينتج لدينا مكتبة خاصة لكل بكتريا من حيث الجينات المدخلة ومواقع دخولها genetic library . وهذا يساعد في تحليل وضائف الجينات ورسم الخرائط الكروموسومية للعديد من الكائنات فضلا عن البكتريا .

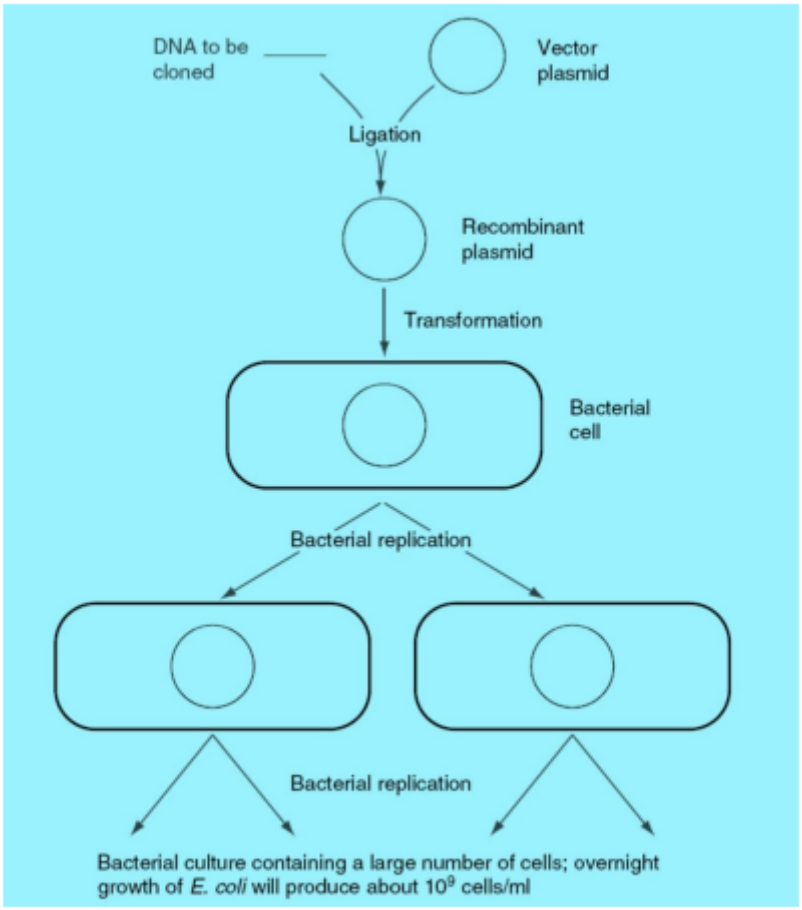


Figure 35: Basic outline of gene cloning [Dale and von Schantz,2002]

نواقل الكلونة

اولا:- البلازميدات

من اكثر نواقل الكلونة استخداما هي البلازميدات. وهي كما مر سابقا قطع صغيره من DNA تتواجد في مختلف انواع البكتريا ولها وضائف مختلفة, من اهم صفات البلازميدات هي امتلاكها لاصل التضاعف او نقطة بدء التضاعف origin of replication والتي تلعب دور في تضاعف وصنع عدة نسخ من البلازميدات وتوزيع البلازميدات على الخلايا البنوية الناتجة .

ان الجين المراد ادخاله ونقله هو عبارة عن قطعة من DNA لذا فان عملية ادخاله الى بلازميد مناسب يضمن انه يتضاعف بتضاعف البلازميد تحت ضروف خاصة او اثناء عملية تكاثر الخلايا.

هناك صفات اخرى للبلازميدات اعطتها الاهلية لتكون نواقل كلونه مناسة والاكثر استخداما في الهندسة لوراثية. في العادة البلازميدات تكون كبيرة نسبية more than 100kb ولكن البلازميدات المستخدمة في عمليات الكلونة تكون صغيرة نسبية less than 10kb وبذلك يسهل التعامل معها وتنقيتها بصوره كاملة. كما تحتوي البلازميدات المستخدمة في الكلونة صفات اختيارية عادة ماتكون مقاومة لمضاد حياتي معين وهذا يعني اننا نستطيع ان نعرف اي بكتريا تحتوي على البلازميد المرغوب والذي يحتوي على الجين المراد نقله بنشر البكتريا بعد ادخال البلازميد اختباريا على وسط اكار يحتوي على مضاد حياتي , وبذلك فالبكتريا الحاوية على

البلازميد تنمو والبكتريا التي لاتحتوي البلازميد لاتستطيع النمو لانها لاتقاوم المضاد الذي عمل هنا كصفة اختيارية للبكتريا المهندسة وراثيا.
في هذه الحالة يجب ان تكون البكتريا اصلا غير مقاومة للمضادات الحياتية وتوجد عدة انواع بكتريا قياسية غير حاويه على مقاومة مضادات معينة.
اكثر البلازميدات استخداما في عملية الهندسة الوراثية هو بلازميد pBR322 والذي يعمل كناقل كلونة لبكتريا *E. coli* وهو بلازميد ممحور من هذه البكتريا له عدة صفات جعلته مؤهلا كناقل كلونة مناسب ومن هذه الصفات :-

1- صغير الحجم نسبيا حوالي4631bp
2- مستقر في البكتريا العائل E. coli وبعدد كبير نسبيا 20-30 نسخة لكل بكتريا طبيعيا
3- يمكن مضاعفة اعداده بشكل كبير جدا 1000-3000 نسخة لكل خلية وهو مايشكل حوالي 40% من الجينوم الكلية باستخدام مثبط لصناعة البروتين مثل مضاد الكلورومفنيكول
4- يمكن عزله بسهولة من الخلية بشكلة الملتف الفائق supercoiled باستخدام طرق متعددة
5- يمكن ادخال كميات معقولة من الDNA الى هذا البلازميد على الرغم من انه الاحجام الكبيرة اكثر من 10000 قاعدة يمكن ان تؤدي الى عدم استقرار البلازميد وفقده من الخلية
6- كل تسلسل القواعد لهذا البلازميد معروفة وبذلك فان كل مواقع القطع معروفة وهذا يعطي حرية في اختيار القاطع المناسب ومكان الادخال المناسب
7- هناك مواقع قطع متفردة على هذا البلازميد لانزيمات متعددة مثل *PstI, SaII, EcoRI, HindIII, and BamHI* , ان وجود مواقع متفرده مهم جدا في عمليات نقل المادة الوراثية , حيث ان وجود مثل هكذا مواقع يتيح الحرية في قطع ناقل الكلونة في مكان واحد وتحويله لشكل خطي بدل من تقطيعه الى عدة قطع بوجود اكثر من موقع قطع.
8- لهذا البلازميد صفتين اختياريتين يوفرهما للمضيف وهي مقاومة مضاد الامبسلين ومقاومة التتراسيكلين,هذا يعطي حرية في اختيار البكتريا الحاوية على البلازميد المهندس وراثيا بوجود مقاومة كلا المضادين كما ان وجود مواقع مختلفة للقطع داخل جينات المقاومة تسهل عملية النقل بتخريب احد جينات المقاومة وبذلك يمكن بسهولة اختيار المتحولات .
9- يمكن ادخال هذا البلازميد بسهولة الى البكتريا بالتحول الحر او الصناعي

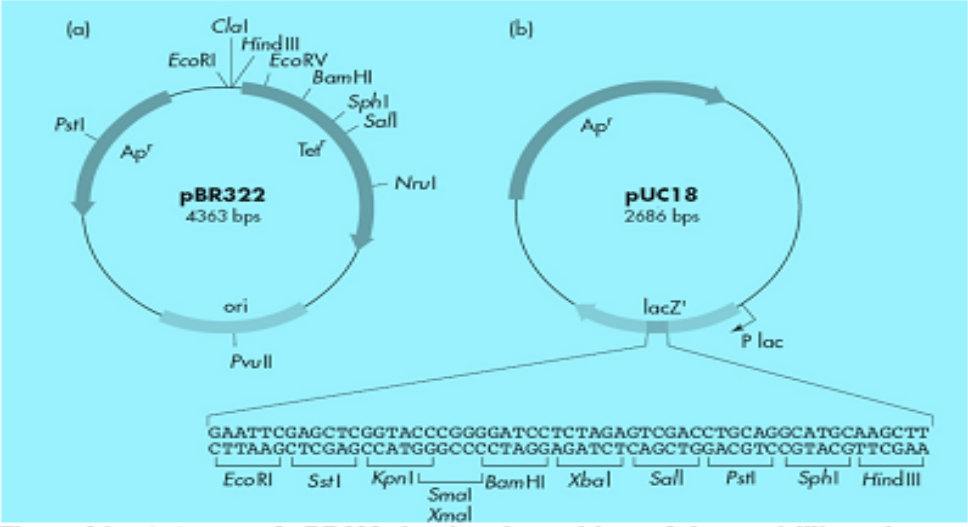


Figure 36 : a) A map of pBR322 showing the positions of the ampicillin resistance (Apr) and tetracycline resistance (*Tet*) genes b) A map of pUC18 showing the position of the ampicillin resistance [Lodge et al.,2007] .

يمكن استخدام بلازميد pBR322 في عملية نقل الجينات الى بكتريا E. coli , من خلال الخارطة الجينية لهذا البلازميد الموضحه اعلاه يمكن ملاحظة احتواء جين مقاومة التتراسيكلين على موقع قطع *BamH1* بينما يحتوي جين مقاومة الامبسيلين على موقع قطع *PstI*, في حالة نقل الجين قيد الدراسة الى موقع التتراسيكلين بقطعة باستخدام الانزيم القاطع *BamH1* وقطع البلازميد بنفس الانزيم ومن ثم لحمه وادخاله الى الخلية . في عملية النقل هذه ستفقد البكتريا صفة المقاومة للتراسيكلين وتحتفظ بصفة مقاومة الامبسيلين وهذا يدعى عملية التثبيط بالادخال insertional inactivation , يتم اختيار المتحولات باستخدام تقنية replica plating بزرع الناتج من عملية التحول في طبق لايحوي اي مضاد ومن ثم طبع هذا الطبق الى طبقين احدهما يحوي التتراسيكلين والاخر يحوي الامبسلين . وبذلك فاي مستعمرة تنجح في النمو على طبق الامبسيلين وتفشل في النمو على طبق التتراسيكلين يعني ان المستعمره ناشئه من خليه اكتسبت الجين قيد الدراسة.

ثانيا :-العاثيات كنواقل كلونة(lambda bacteriophage)

للعاثيات البكتيرية القدرة على اخذ جزء من جينوم المضيف اثناء النقل العام او المتخصص وبذلك فهي ملائمة للعمل كنواقل كلونة.

احد اكثر العاثيات استخداما في عمليات نقل الجينات هو العاثي لامدا, فخلال عملية النقل المتخصص يمكن استغلال العاثي لامدا كناقل كلونة, وقد جاء استخدامه من خلال معرفة صفاته الكاملة وتسلسله الكامل , وهو جدا مفيد من ناحية قدرته على حمل DNA جديد باحجام كبيرة نسبيا تصل الى 20kb وهي اكبر من ضعف قدرة البلازميدات وايضا يمكن تصنيع وتعبئة الفاج في المختبر وهذا يسهل عملية نقل الجينات الجديدة اليه. ويمكن استخدام العاثيات المحورة لاصابة بكتريا جديدة وكفاءه الاصابة اعلى كثيرا من كفاءه التحول البكتيري.

يحتوي الفاج لامدا على جين تصنيع B-galactosidase وهذا الجين يشطر جزيئة اللاكتوز ويعطي لون معين على وسط الاكار الخاص بهذا الكشف فعند استخدام هذا الوسط لتمنية بكتريا lac- E. coli واصابتها بالعاثي لامدا سوف يظهر لون نتيجة انتاج هذا الانزيم بواسطة النقل

المتخصص للعاثي , اذا تم ادخال الجينات المرغوبة داخل هذا الجين واصابة البكتريا فسيتم اصابة البكتريا وانتاج plaques الخاصة بالعاثي ولكن من دون احداث تغيرات خاصة بانتاج الانزيم وبذلك يتم ضمان نجاح عملية ادخال الجينات المرغوبة.

Cloning with lambda replacement vectors involves the following steps

1.Isolating the vector DNA from phage particles and digestion with the appropriate restriction enzyme.

2.Connecting the two lambda fragments to fragments of foreign DNA using DNA ligase.

3. Packaging of the DNA by adding cell extracts containing the head and tail proteins and allowing the formation of viable phage particles to occur spontaneously.

4. Infecting E. coli and isolating phage clones by picking plaques on a host strain.

5. Checking recombinant phage for the presence of the desired foreign DNA sequence using nucleic acid hybridization procedures, DNA sequencing,or observation of genetic properties.

<u>الكوزميدات Cosmids</u>

وهو مزيج من البلازميدات والعاثيات حيث يمكن تعريفه على انه نقال كلونة بلازميدي يحتوي على DNA المراد نقله معه جين *Cas* المشفر للنهاية اللاصقة اللازمة لتعبئة الجينوم في راس العاثي .وبذلك يمكن لهذا الكوزمد التكاثر في البكتريا باعتبار له نقطة تضاعف البلازمد ويمكن ايضا تعبئته في راس العاثي virion لانه يحوي جين cas ولهذا الكوزمد صفات خاصة من حيث قدرته على حمل احجام كبيرة من DNA المراد نقله او دراسته حيث يصل الحجم المعبأ في الكوزميد الى 50kb وهذا يسهل عملية انتاج مكتبة جينية للكائن المراد دراسته كما يسهل عملية النقل المتخصص للجينات باستخدام العاثي transduction والتي تكون اكثر كفاءة من عملية transformation.

يمكن استغلال الكوزميدات لعملية حفظ الجينات لفترات طويله بتعبئتها في الكوزميدات وتحويلها الى virion ومن ثم حفظها لفترات طويلة وهي طريقة اكثر كفاءه من حفظها بشكل بلازميدات كونها اقل استقرارا من العاثيات .

د. احمد محد تركي

د. احمد محمد تركي

تحديد التتابعات للاحماض النووية كاحد طرق دراسة وراثة الاحياء المجهرية

ان القدرة على تحديد تتابعات الاحماض النووية يعتبر الجزء الاساسي في دراسة علم الحياة الجزيئي والوراثة حديثا,ويوفر مايمكن اعتباره التركيب والتصور النهائي لشكل وتركيب الحامض النووي.

هناك طريقتين رئيسيتين في تحديد تتابعات الاحماض النووية اولهما اكتشفت من قبل العالمين Allan Maxam and Walter Gilbert والذين استخدموا المواد الكيميائية لقطع جزيئة DNA في اماكن معلومة منتجين بذلك مجموعة قطع تختلف بمقدار قاعدة نيتروجينية واحدة, نفس هذه النتيجة يمكن الحصول عليها بساتخدام الطريقة الثانية لكشف التتابعات والتي طورت بواسطة Fred Sanger and Alan Coulson والتي تعتمد على تصنيع الحامض النووي انزيميا بحيث ينتهي التصنيع عند قاعدة محورة. تحليل النتيجة لكلا الطريقتين يتضمن الترحيل الكهربائي متبوعا بالتصوير الاشعاعي للنظائر المشعة اذا كان مستخدم نظائر مشعة في التصنيع. حديثا الطريقة الانزيمية هي الاكثر استخداما وشيوعا في المختبرات والشركات العالمية لكشف التتابعات على الرغم من استخدام طريقة التحلل الكيميائي في بعض المواقف لتاكيد النتيجة خصوصا في تجارب نقل الجينات المهمة.

اولا:- طريقة Maxam-Gilbert... طورت هذه الطريقة من قبل العالمين ماكزام وجلبرت في اواخر السبعينات من القرن المنصرم وهي اول طريقة لكشف تتابعات الاحماض النووية التي تتعدى حجم bp500 . تتضمن الطريقة تحليل الDNA كيمياويا عند مختلف القواعد لاربعة لقطع من DNA معلمة عند النهاية 5 .

تعتمد الطريقة على تعليم شريط DNA ب P^{32} عند النهاية 5 لكلا الشريطين ثم فصله بالحرارة وتنقيته وبذلك ينتج لدينا مجموعه كبيرة من الاشرطة المعلمة مهيئة لتفاعل كشف التتابعات.

يتم القطع الكيميائي عند قواعد محددة لاشرطة DNA في اربع انابيب منفصلة كل انبوب يشمثل تحوير يخص قاعدة نيتروجينية محددة وبذلك في العادة ينتج لدينا نسخة واحدة مقطوعة عند كل قاعدة نيتروجينية ويتجاوز نفس القطعة ليقطع عند التالية في نسخة اخرى وذلك لان القاعدة المحورة تزال من طرف السكر لها في الشريط ويستمل الهضم الكيمياوي ليقطع عند القاعدة التالية من نفس المجموعة وبذلك تنتج لدينا قطع مختلفة لنفس التفاعل حسب نوع التسلسل الموجود يومكن توضيع ذلك بالشكل التالي

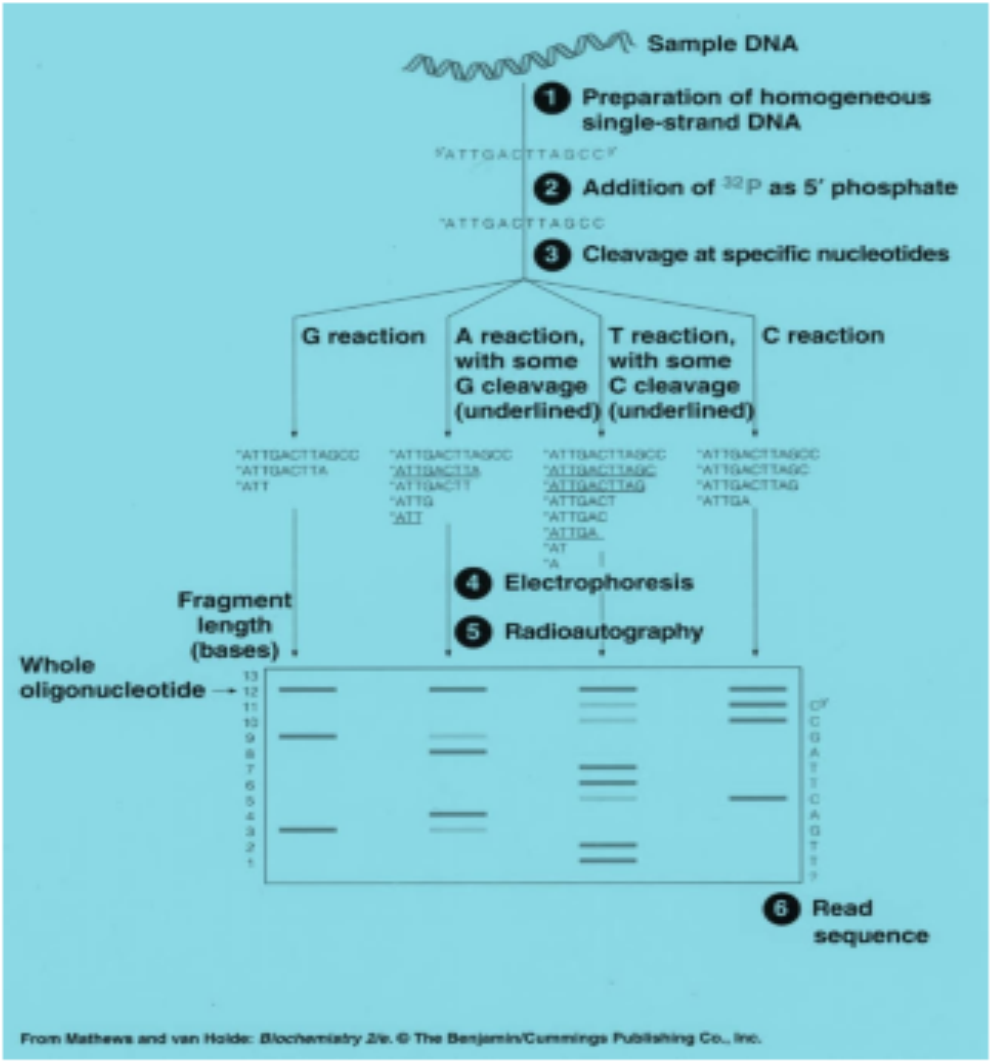


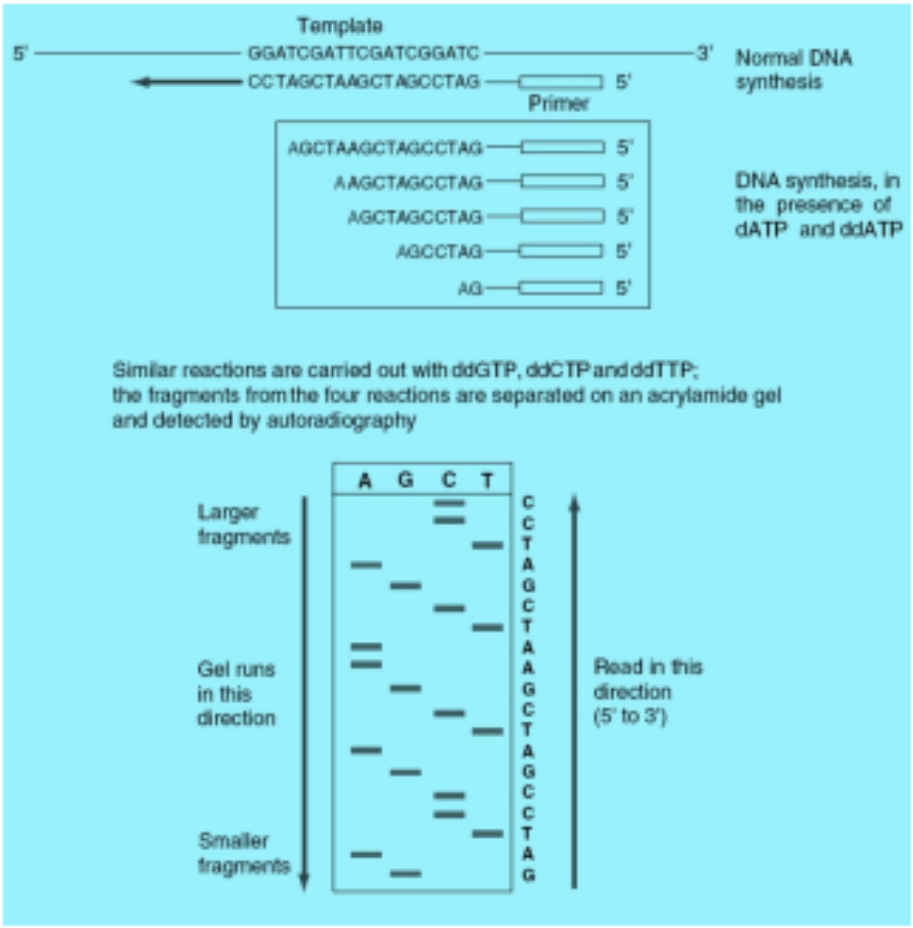
Figure 37 : The double-stranded fragment to be sequenced is labeled at the 5 ends . The label is removed from one end, and the fragment then is denatured. Four identical samples of the prepared fragment are subjected to four different sets of chemical reactions that selectively cut the DNA backbone at G, G + A, C + T, or C residues. The reactions are controlled so that each labeled chain is likely to be broken only once.[Agarwal ,2003].

ثانيا:- طريقة Sanger–Coulson (dideoxy or enzymatic)...على الرغم من تشابه طرق تحليل النتيجة النهائية للكشف عن التتابعات مع طريقة ماكزام وجلبرت آنفة الذكر الا ان طريقة سانكر تختلف كليا في مبدأ العمل ففيها يتم تخليق شريط جديد لقطعة DNA المراد كشف تتابعاتها باستخدام قطعة كلينو للانزيم المبلمر ل DNA Klenow fragment of DNA polymerase .

في هذه الطريقة يتم فصل اشرطة DNA الى اشرطة مفردة ومن ثم يتم استخدام باديء مناسب لتوفير نهاية 3 لبدء عملية تخليق شريط جديد من DNA اعتمادا على الشريط القالب , يتم تصنيع قطع مختلفة من شريط DNA باستخدام قواعد محورة DNTPs في كل تفاعل وهذه القواعد تفتقر لمجموعة الهيدروكسيل في الطرف 3 للسكر الخماسي منقوص الاوكسجين والذي يكون ضروري لعملية استطالة السلسلة اثناء عملية تخليق شريط الحامض النووي . هذا التحوير يطلق عليه dideoxynucleoside triphosphates (ddNTPs) . يتم صنع اربعة تفاعلات كل

تفاعل خاص بنوع معين من القواعد النيتروجينية (A, G, T, and C forms) وكل تفاعل بهذه الحالة يحوي اربعة قواعد صحيحة لتفاعل البلمرة وقاعدة واحدة من Dideoxy لايقاف التفاعل ويكون تركيزها محسوبا بحيث يرتبط في مرة ويترك التفاعل يكمل في مرة اخرى وبهذه الحالة فان التفاعلات الاربعة لمختلف القواعد النيتروجينية تنتج لنا قطعا مختلفة من الشريط المبني يمكن بعد قراءته استنتاج تسلسل القواعد النيتروجية للشريط القالب .

ان تفاعل انهاء استطالة السلسلة يستخدم حاليا لمعرفة التتابعات وهو اكثر شيوعا من طريقة الهضم الكيميائي ويمكن لضمان نتيجة دقيقة للتتابعات كلونة القطعة المراد معرفة تسلسلها في ناقل كلونة مناسب وهناك كثير من نواقل الكلونة المتوفرة لهذا الغرض



الترحيل الكهربائي وقراءة التتابعات:-

فصل القطع الناتجة من عملية كشف التتابعات يتم باستخدام هلام الاكرلمايد المتعدد poly acrylamide gel electrophoresis و في المختبرات البحثية والتجريبية يمكن فصل التتابعات لقطع صغيره باستخدام عملية ترحيل واحدة ويفضل استخدام متعدد الاكرلمايد بتركيز 6-20% مع اليوريا بتركيز 6 مولاري التي تعمل كماسخ لاشرطة DNA ليمنع تكوين التراكيب الثانوية ل DNA . ان عملية الترحيل على متعدد الاكرلمايد مهمة لانه يفصل القطع

المختلفة بمقدار قاعدة نيتروجينية واحدة وبذلك يمكن قراءه وتحليل التتابعات ولهذا فان استعمال اليوريا مهم كما ان عملية الترحيل تتم بفولتيه عاليه والجل يكون رقيق جدا لذا فان حرارته ترتفع وبهذا يحافظ على الاشرطه مفصولة وبدون ان تتكون تراكيب ثانوية تعطي نتائج خاطئة. وفي بعض الاحيان يتم تحميل نموذجين لنفس العينة على نفس الجل بمختلف الاوقات لزيادة كمية المعلومات الناتجة من عملية السيكونس وبذلك ايجاد نتائج اكثر دقة .

يتبع عملية الترحيل الكهربائي عملية ازالة الهلام من الجهاز ويمكن تجفيفة باستخدام ورق خاص ليسهل التعامل معه ومن ثم يصبغ باستخدام صبغة silver stain ويمكن تصويره شعاعيا باستخدام X-ray اذا استخدمنا عناصر مشعة ويمكن نقل النتيجة لجهاز حاسب الي ليتم معرفة السيكونس ومواقع القطع وترجمته الى بروتين ومعرفة البروموتر لهذه القطعة من DNA

ان عملية التعامل مع كميات كبيرة من العينات يكون مكلف ويحتاج وقت كبير لذا طور العلماء طريقة capillary sequencing والتي تدار بواسطة روبوتات خاصة لكشف التتابعات للعديد من قطع DNA وقت واحد كما ان التطور الجديد في هذا المضمار حدث في عملية Next generation sequencing والتي تتيح لمعرفة الجينوم لكل الكائن الحي دفة واحدة باستخدام جهاز خاص لكشف التتابعات.

د.احمد محمد تركي

نقل الجيناتGene Cloning

أن عملية نقل الجينات هي الحجر الاساس للهندسة الوراثية واغلب عمليات الوراثية الجزيئية وسهل نقل الجينات عملية تحليل مجين الكائنات بدائية وحقيقية النواة.

يمكن تقسيم عملية نقل الجينات الى خطوات رئيسية وكما يلي:-

1- عزل وتقسيم ال DNA قيد الدراسة والمستهدف من عملية النقل ويمكن ان يكون هذا DNA مادة وراثية كاملة او جين معاد تصنيعه من قالب RNA بواسطة reverse transcriptase او جين مضاعف باستخدام تفاعل البلمرة المتسلسل او جين مصنع كليا في المختبر , في حالة كون المصدر DNA كامل للخلية يمكن تقطيع القطعة المناسبة باستخدام الانزيمات القاطعة
2- ربط قطعة DNA المستهدفة في النقل الى ناقل كلونة مناسب باستخدام انزيم الربط DNA ligase.
نواقل الكلونة هي عبارة عن عناصر وراثية صغيرة الحجم تتضاعف ذاتيا باستقلالية عن الخلية وتستخدم لمضاعفة الجين ونقله وغاليا ماتكون بلازميدات او فايروسات. تصمم نواقل الكلونة لتسمح بادخال قطع مرغوبة من DNA فيها في المختبر في مواقع قطع معينة بحيث لاتؤثر على تضاعفها الذاتي . في كثير من الاحوال يتم قطع DNA المراد نقله وناقل الكلونة بواسطه نفس الانزيم القاطع وهذا يسهل عملية النقل واللحم بازدواج النهايات اللاصقةsticky end الناتجة من انزيم القطع اما النهايات الحادة Blunt end فيمكن لصقها باستخدام قطعة رابطة linker او قطعة محورة adaptor ويستخدم انزيم DNA ligase لربط الاصرة الفوسفاتية ثنائية الاستر .
3- ادخال وحفظ القطعة المكلونة في الكائن المضيف. وفي هذه العملية يتم ادخال القطعة في مع ناقل الكلونة المناسب والتي تم صنعها في المختبر الى كائن حي بواسطة التحول على سبيل المثال وفي الكائن الحي يتم مضاعفة القطعة الجديدة.
ان عملية نقل قطع DNA المرغوب الى كائن جديد وخصوصا في البكتريا عادة ماينتج متحولات عديدة clones والتي تختلف فيما بينها باختلاف مواقع ادخال الجين الجديد وبهذا ينتج لدينا مكتبة خاصة لكل بكتريا من حيث الجينات المدخلة ومواقع دخولها genetic library . وهذا يساعد في تحليل وضائف الجينات ورسم الخرائط الكروموسومية للعديد من الكائنات فضلا عن البكتريا .

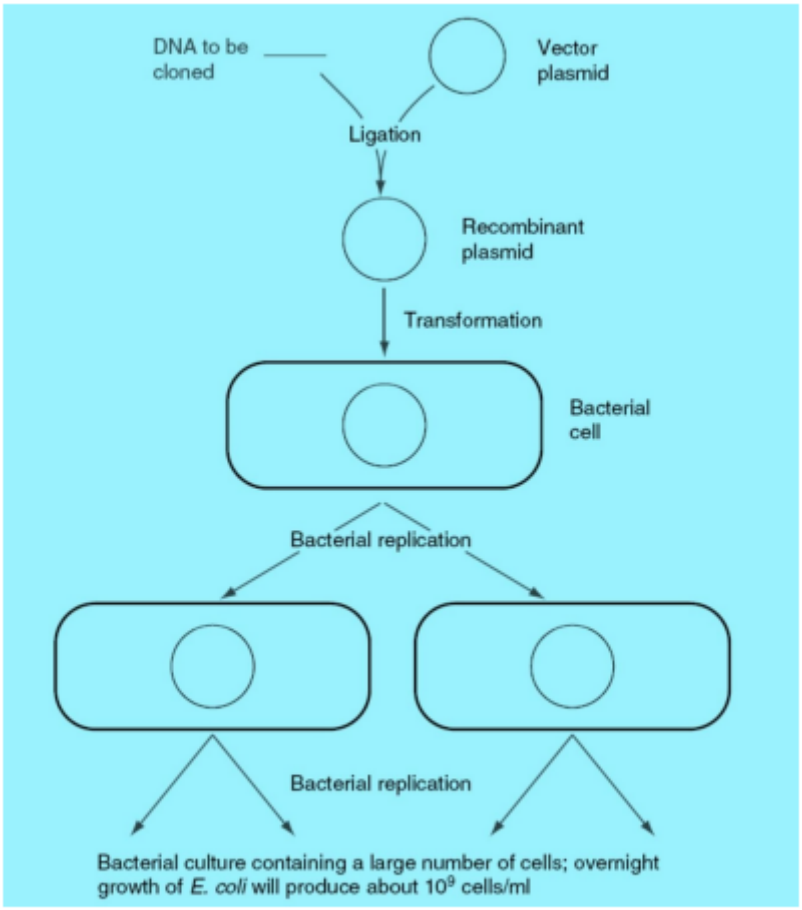


Figure 35: Basic outline of gene cloning [Dale and von Schantz,2002]

نواقل الكلونة

اولا:- البلازميدات

من اكثر نواقل الكلونة استخداما هي البلازميدات. وهي كما مر سابقا قطع صغيره من DNA تتواجد في مختلف انواع البكتريا ولها وضائف مختلفة, من اهم صفات البلازميدات هي امتلاكها لاصل التضاعف او نقطة بدء التضاعف origin of replication والتي تلعب دور في تضاعف وصنع عدة نسخ من البلازميدات وتوزيع البلازميدات على الخلايا البنوية الناتجة .

ان الجين المراد ادخخاله ونقله هو عبارة عن قطعة من DNA لذا فان عملية ادخاله الى بلازميد مناسب يضمن انه يتضاعف بتضاعف البلازميد تحت ضروف خاصة او اثناء عملية تكاثر الخلايا.

هناك صفات اخرى للبلازميدات اعطتها الاهلية لتكون نواقل كلونه مناسة والاكثر استخداما في الهندسة لوراثية. في العادة البلازميدات تكون كبيرة نسبية more than 100kb ولكن البلازميدات المستخدمة في عمليات الكلونة تكون صغيرة نسبية less than 10kb وبذلك يسهل التعامل معها وتنقيتها بصوره كاملة. كما تحتوي البلازميدات المستخدمة في الكلونة صفات اختيارية عادة ماتكون مقاومة لمضاد حياتي معين وهذا يعني اننا نستطيع ان نعرف اي بكتريا تحتوي على البلازميد المرغوب والذي يحتوي على الجين المراد نقله بنشر البكتريا بعد ادخال البلازميد اختباريا على وسط اكار يحتوي على مضاد حياتي , وبذلك فالبكتريا الحاوية على

البلازميد تنمو والبكتريا التي لاتحتوي البلازميد لاتستطيع النمو لانها لاتقاوم المضاد الذي عمل هنا كصفة اختيارية للبكتريا المهندسة وراثيا.
في هذه الحالة يجب ان تكون البكتريا اصلا غير مقاومة للمضادات الحياتية وتوجد عدة انواع بكتريا قياسية غير حاويه على مقاومة مضادات معينة.
اكثر البلازميدات استخداما في عملية الهندسة الوراثية هو بلازميد pBR322 والذي يعمل كناقل كلونة لبكتريا *E. coli* وهو بلازميد ممحور من هذه البكتريا له عدة صفات جعلته مؤهلا كناقل كلونة مناسب ومن هذه الصفات :-

1- صغير الحجم نسبيا حوالي4631bp
2- مستقر في البكتريا العائل E. coli وبعدد كبير نسبيا 20-30 نسخة لكل بكتريا طبيعيا
3- يمكن مضاعفة اعداده بشكل كبير جدا 1000-3000 نسخة لكل خلية وهو مايشكل حوالي 40% من الجينوم الكلية باستخدام مثبط لصناعة البروتين مثل مضاد الكلورومفنيكول
4- يمكن عزله بسهولة من الخلية بشكلة الملتف الفائق percoiled باستخدام طرق متعددة
5- يمكن ادخال كميات معقولة من الDNA الى هذا البلازميد على الرغم من انه الاحجام الكبيرة اكثر من 10000 قاعدة يمكن ان تؤدي الى عدم استقرار البلازميد وفقده من الخلية
6- كل تسلسل القواعد لهذا البلازميد معروفة وبذلك فان كل مواقع القطع معروفة وهذا يعطي حرية في اختيار القاطع المناسب ومكان الادخال المناسب
7- هناك مواقع قطع متفردة على هذا البلازميد لانزيمات متعددة مثل *PstI, SaII, EcoRI, HindIII, and BamHI* , ان وجود مواقع متفرده مهم جدا في عمليات نقل المادة الوراثية , حيث ان وجود مثل هكذا مواقع يتيح الحرية في قطع ناقل الكلونة في مكان واحد وتحويله لشكل خطي بدل من تقطيعه الى عدة قطع بوجود اكثر من موقع قطع.
8- لهذا البلازميد صفتين اختياريتين يوفرهما للمضيف وهي مقاومة مضاد الامبسلين ومقاومة التتراسيكلين,هذا يعطي حرية في اختيار البكتريا الحاوية على البلازميد المهندس وراثيا بوجود مقاومة كلا المضادين كما ان وجود مواقع مختلفة للقطع داخل جينات المقاومة تسهل عملية النقل بتخريب احد جينات المقاومة وبذلك يمكن بسهولة اختيار المتحولات .
9- يمكن ادخال هذا البلازميد بسهولة الى البكتريا بالتحول الحر او الصناعي

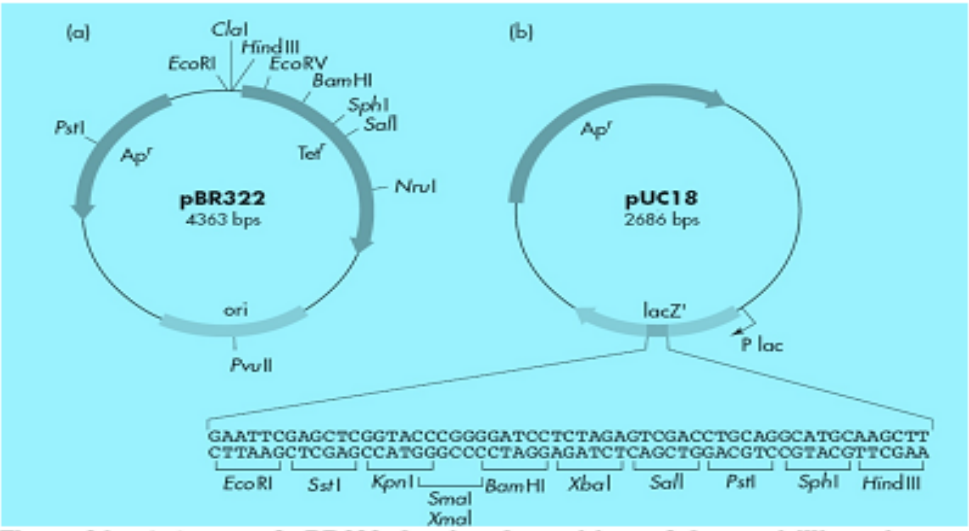


Figure 36 : a) A map of pBR322 showing the positions of the ampicillin resistance (Apr) and tetracycline resistance (*Tet*) genes b) A map of pUC18 showing the position of the ampicillin resistance [Lodge et al.,2007] .

يمكن استخدام بلازميد pBR322 في عملية نقل الجينات الى بكتريا E. coli , من خلال الخارطة الجينية لهذا البلازميد الموضحه اعلاه يمكن ملاحظة احتواء جين مقاومة التتراسيكلين على موقع قطع *BamH1* بينما يحتوي جين مقاومة الامبسيلين على موقع قطع *PstI*, في حالة نقل الجين قيد الدراسة الى موقع التتراسيكلين بقطعة باستخدام الانزيم القاطع *BamH1* وقطع البلازميد بنفس الانزيم ومن ثم لحمه وادخاله الى الخلية . في عملية النقل هذه ستفقد البكتريا صفة المقاومة للتراسيكلين وتحتفظ بصفة مقاومة الامبسيلين وهذا يدعى عملية التثبيط بالادخال insertional inactivation , يتم اختيار المتحولات باستخدام تقنية replica plating بزرع الناتج من عملية التحول في طبق لايحوي اي مضاد ومن ثم طبع هذا الطبق الى طبقين احدهما يحوي التتراسيكلين والاخر يحوي الامبسلين . وبذلك فاي مستعمرة تنجح في النمو على طبق الامبسيلين وتفشل في النمو على طبق التتراسيكلين يعني ان المستعمره ناشئه من خليه اكتسبت الجين قيد الدراسة.

ثانيا :-العاثيات كنواقل كلونة(lambda bacteriophage)

للعاثيات البكتيرية القدرة على اخذ جزء من جينوم المضيف اثناء النقل العام او المتخصص وبذلك فهي ملائمة للعمل كنواقل كلونة.

احد اكثر العاثيات استخداما في عمليات نقل الجينات هو العاثي لامدا, فخلال عملية النقل المتخصص يمكن استغلال العاثي لامدا كناقل كلونة, وقد جاء استخدامه من خلال معرفة صفاته الكاملة وتسلسله الكامل , وهو جدا مفيد من ناحية قدرته على حمل DNA جديد باحجام كبيرة نسبيا تصل الى 20kb وهي اكبر من ضعف قدرة البلازميدات وايضا يمكن تصنيع وتعبئة الفاج في المختبر وهذا يسهل عملية نقل الجينات الجديدة اليه. ويمكن استخدام العاثيات المحورة لاصابة بكتريا جديدة وكفاءه الاصابة اعلى كثيرا من كفاءه التحول البكتيري.

من خلال دراسة جينوم العاثي لامدا وجد ان ثلث الجينوم للعاثي غير مهم في عملية التعبئة والاصابة وتقع هذه المنطقه بيني جيني J and N في جينوم العاثي مما مكن العلماء من استبدال هذه المنطقة بالجينات الغريبة التي يراد ادخالها.

يحتوي الفاج لامدا على جين تصنيع B-galactosidase وهذا الجين يشطر جزيئة اللاكتوز ويعطي لون معين على وسط الاكار الخاص بهذا الكشف فعند استخدام هذا الوسط لتمنية بكتريا lac- E. coli واصابتها بالعاثي لامدا سوف يظهر لون نتيجة انتاج هذا الانزيم بواسطة النقل المتخصص للعاثي , اذا تم ادخال الجينات المرغوبة داخل هذا الجين واصابة البكتريا فسيتم اصابة البكتريا وانتاج plaques الخاصة بالعاثي ولكن من دون احداث تغيرات خاصة بانتاج الانزيم وبذلك يتم ضمان نجاح عملية ادخال الجينات المرغوبة.

Cloning with lambda replacement vectors involves the following steps

1.Isolating the vector DNA from phage particles and digestion with the appropriate restriction enzyme.

2.Connecting the two lambda fragments to fragments of foreign DNA using DNA ligase.

3. Packaging of the DNA by adding cell extracts containing the head and tail proteins and allowing the formation of viable phage particles to occur spontaneously.

4. Infecting E. coli and isolating phage clones by picking plaques on a host strain.

5. Checking recombinant phage for the presence of the desired foreign DNA sequence using nucleic acid hybridization procedures, DNA sequencing,or observation of genetic properties.

الكوزميدات Cosmids

وهو مزيج من البلازميدات والعاثيات حيث يمكن تعريفه على انه نقال كلونة بلازميدي يحتوي على DNA المراد نقله معه جين *Cas* المشفر للنهاية اللاصقة اللازمة لتعبئة الجينوم في راس العاثي .وبذلك يمكن لهذا الكوزمد التكاثر في البكتريا باعتبار له نقطة تضاعف البلازمد ويمكن ايضا تعبئته في راس العاثي virion لانه يحوي جين cas ولهذا الكوزمد صفات خاصة من حيث قدرته على حمل احجام كبيرة من DNA المراد نقله او دراسته حيث يصل الحجم المعبأ في الكوزميد الى 50kb وهذا يسهل عملية انتاج مكتبة جينية للكائن المراد دراسته كما يسهل عملية النقل المتخصص للجينات باستخدام العاثي transduction والتي تكون اكثر كفاءة من عملية transformatiom.

يمكن استغلال الكوزميدات لعملية حفظ الجينات لفترات طويله بتعبئتها في الكوزميدات وتحويلها الى virion ومن ثم حفظها لفترات طويلة وهي طريقة اكثر كفاءه من حفظها بشكل بلازميدات كونها اقل استقرارا من العاثيات .