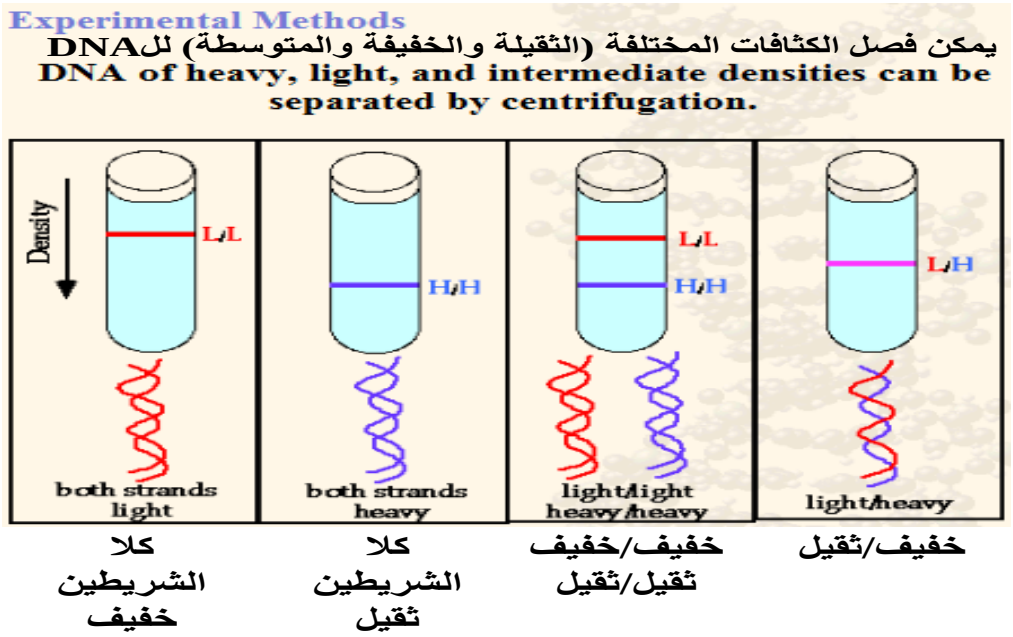
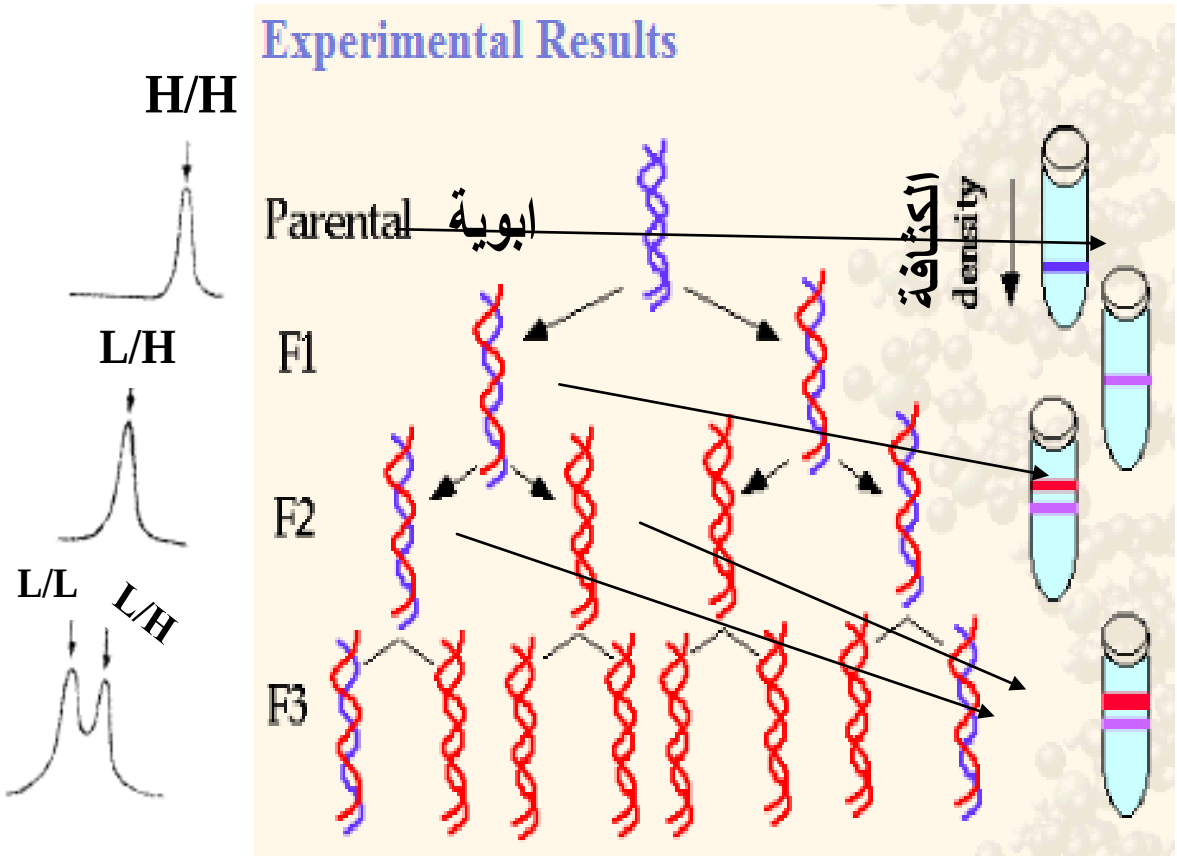
الثقيل (النظير المشع) N^{15} في تنمية المزرعة البكتيرية لعدة اجيال حتى يتأكد من أن كل ذرات النيتروجين في جزيء DNA معلمة بالنيتروجين الثقيل، وبعد ذلك تم نقل الخلايا البكتيرية إلى مزرعة تحتوي على النيتروجين العادي (الخفيف) N^{14}. ثم استخلص DNA من الخلايا على مُدَدْ زمنية مختلفة وتم اذابة DNA من كل مدة زمنية في محلول **كلوريد السيزيوم**(Cesium chloride)وهو محلول **ملحي ثقيل** حيث يتم تقدير كثافته بواسطة الطرد المركزي الفائق السرعة **Ultracentrifugation في هذا المتدرج الكثافي (Density gradient) من محلول كلوريد السيزيوم** Cesium chloride (شكل 34).

وقد تبين انه بعد اول دورة (جيل) من الانقسام ظهرت قمة واحدة تمثل جزيء هجين ثقيل\خفيف (L/H) (Light/Heavy) نتيجة لتكوين الجزيء من سلسلة أصلية ثقيله وسلسلة مكملة حديثة التكوين خفيفة. وفي الجيل الثاني ظهرت قمتين لجزيئات DNA واحدة تمثل الهجين(Light/Heavy) والأخرى تمثل الخفيف فقط (Light/Light) (L/L) كما في الشكل 35). يعكس ذلك بوضوح حتمية انفصال السلسلتين الأصليتين ثم استعمال كل سلسلة كقالب لبناء استنساخة جديدة عليها.



شكل ٣٤: يمكن فصل الكثافات المختلفة باستخدام **محلول كلوريد السيزيوم** Cesium chloride

Assist.Prof. Dr.Ayoob Obaid Alfalahi
Molecular Genetic 4th Stage Field Crops Sciences

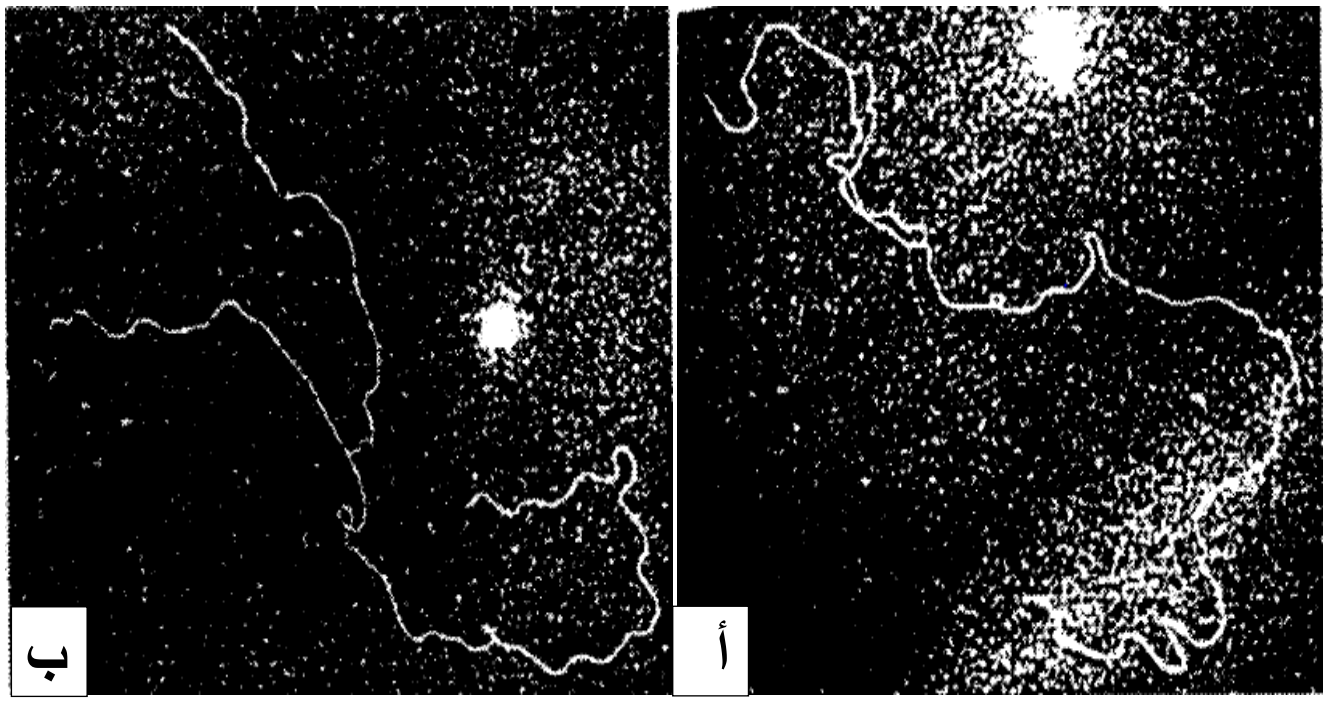


شكل٣٥: الطريقة شبة المحافظة لتناسخ DNA في بكتريا القولون وفي كروموسومات الخلايا حقيقية النواة. قام ميسيلسون وشتال بتعليم سلسلتي DNA الأبوية لبكتريا القولون بالنيتروجين الثقيل وتم تحليل النتائج بتقنية الكثافة المتدرجة لمحلول كلوريد السيزيوم.

منشأ التناسخ Replication origin:

يكون بدء التناسخ من نقطة محددة تسمى منشأ التناسخ وتختلف نقطة بدء التناسخ تبعاً لنوع الكائن، فعلى سبيل المثال عند عزل الجزيء الخطي لـDNA على فترات اثناء عملية التناسخ لفايروس الفاج T_7 وفحصه تحت المجهر الالكتروني كان المتوقع أن تبدأ عملية التناسخ عند إحدى النهايتين أو عندهما معاً حيث أنه من السهل تخيل أن يبدأ انفصال السلسلتين عند الأطراف وليس في المناطق الداخلية للحلزون المزدوج.إلا أنه تبين أن التناسخ يبدأ في الحقيقة من الداخل ومن نقطة معينة تسمى **نقطة منشأ التناسخ** وقد وجد انه بالنسبة لهذا الفايروس تكون على مسافة حوالي ١٧% من بداية النهاية اليسرى للجزيء كما في الشكل 36 أ.وبمجرد أن يبدأ بناء جزيء DNA يستمر البناء في الاتجاهين مما يعطي شكل العين (-O-) التي لا تلبث أن تنمو لتأخذ شكل حرف Y(شكل 36ب)(ومن هنا جاءت تسميتها **شوكة التناسخ Replication fork**). وتظل عملية التناسخ مستمرة حتى تصل الشوكة إلى نهاية جزيء DNA.

Assist.Prof. Dr.Ayoob Obaid Alfalahi
Molecular Genetic 4th Stage Field Crops Sciences



شكل ٣٦ : تناسخ جزيء DNA للفاج T_7 . (أ) صورة بالمجهر الالكتروني لجزيء DNA للفاج T_7الذي بدأ للتو في التناسخ والذي تظهر به **نقطة منشأ التناسخ** صغيرة تقع على مسافة ١٧% من النهاية اليسرى للخريطة الوراثية. (ب) مرحلة متقدمة من تناسخ الجزيء الذي يظهر فيه شكل حرف Y نتيجة لوصول شوكة التناسخ إلى نهاية الشوط.

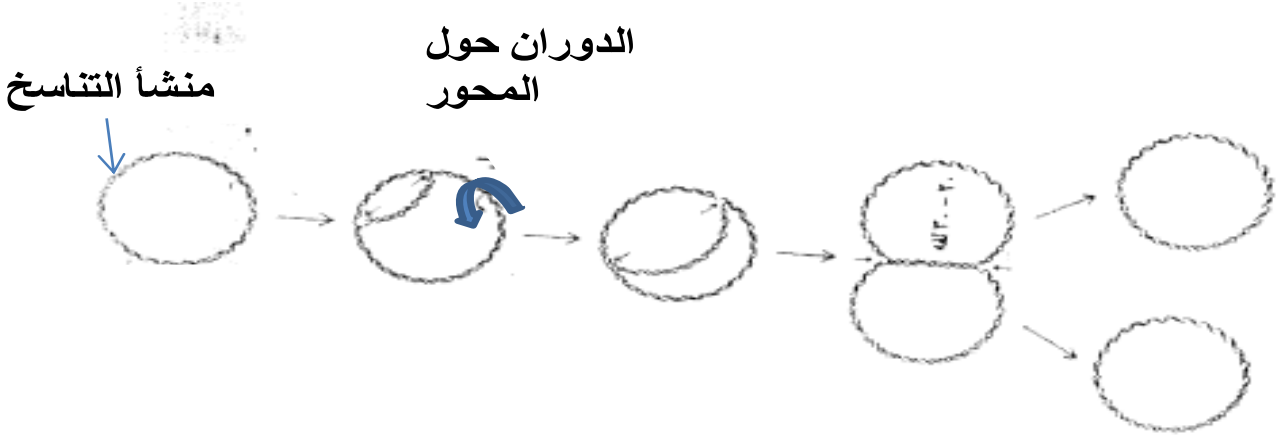
أما في حالة **جزيء DNA الحلقي** كما في **بكتريا القولون** لا يتحتم أن يتحول الجزيء الحلقي إلى جزيء خطي (مستقيم) ولو بصورة مؤقتة. على العكس من ذلك وجد عند دراسة المراحل الوسطية لتناسخ الكثير من الجزيئات الحلقية من DNA **أن السلاسل الأبوية تحافظ على الشكل الحلقي طول فترة التناسخ**. تظهر في مثل هذه الجزيئات أثناء تناسخهما شكل (θ ثيتا) عندما تبدأ في تكوين **نقطة منشأ التناسخ** (فقاعة التناسخ) عند نقطة البداية كما في شكل ٧3.تنمو الفقاعة (الشوكة) في الاتجاهين المتضادين

ولكن كيف يتسنى لجزيء حلقي مقفول من DNA أن تنفك حلزنته أثناء التناسخ؟

وللاجابة على هذا السؤال:-

أمكن اكتشاف مجموعة من الانزيمات يطلق عليها **Topoisomerases** تقوم بعملية فتح/غلق (nicking/closing) أو (كسر/ لحام) لجزيء DNA بحيث تساعد إما على ازدياد درجة الحلزنة أو استرخاء الحلزون حسب طبيعة المرحلة التي يمر بها الجزيء (شكل ٣٧).

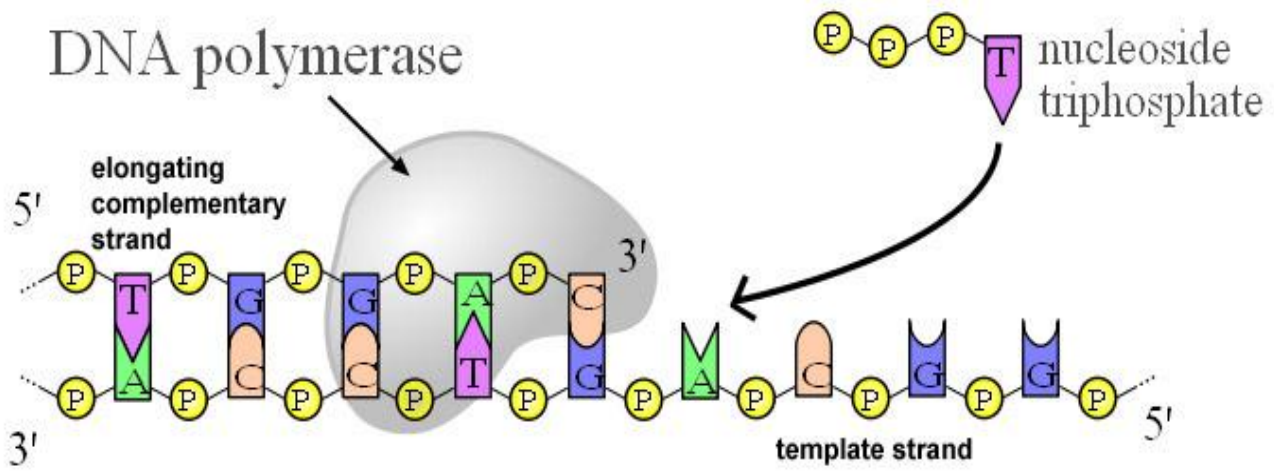
Assist.Prof. Dr.Ayoob Obaid Alfalahi
Molecular Genetic/4th Stage Field Crops Sciences



شكل ٣٧: شكل مبسط للتناسخ ثنائي الإتجاه لجزيء DNA الحلقي.

إتجاه التناسخ:

يكون إتجاه التناسخ من 5'←3' على كلا السلسلتين: سبق وان ذكرنا ان السلسلتين المشاركتين في جزيء DNA تكونان متضادتين في الإتجاه Antiparallel ويعني ذلك ان كلا السلسلتين الجاري بناؤهما على كل من شوكتي التناسخ لابد أن يكونا في اتجاهين متضادين أيضاً، وعلى ذلك فلابد أن يكون الاتجاه العام لنمو السلسلة في الاتجاه 5'←3' لإحدى السلسلتين بينما المفروض أن يكون النمو للسلسلة المضادة في الإتجاه 3'←5' إلا أن جميع انزيمات بلمرة DNA (DNA polymerase) المعروفه حتى الآن والتي تشارك في إضافة وحدات النكليوتايدات يمكنها إضافة ونمو وإستطالة السلسلة في الإتجاه 5'←3' فقط نظراً لأن التفاعل الكيميائي الذي تساعد فيه هذه الانزيمات يسمح للنيوكليتيدة الثلاثية الفوسفات للتفاعل فقط مع مجموعة الهيدروكسيل في النهاية 3'OH للسلسلة النامية كما في الشكل ٣٨.



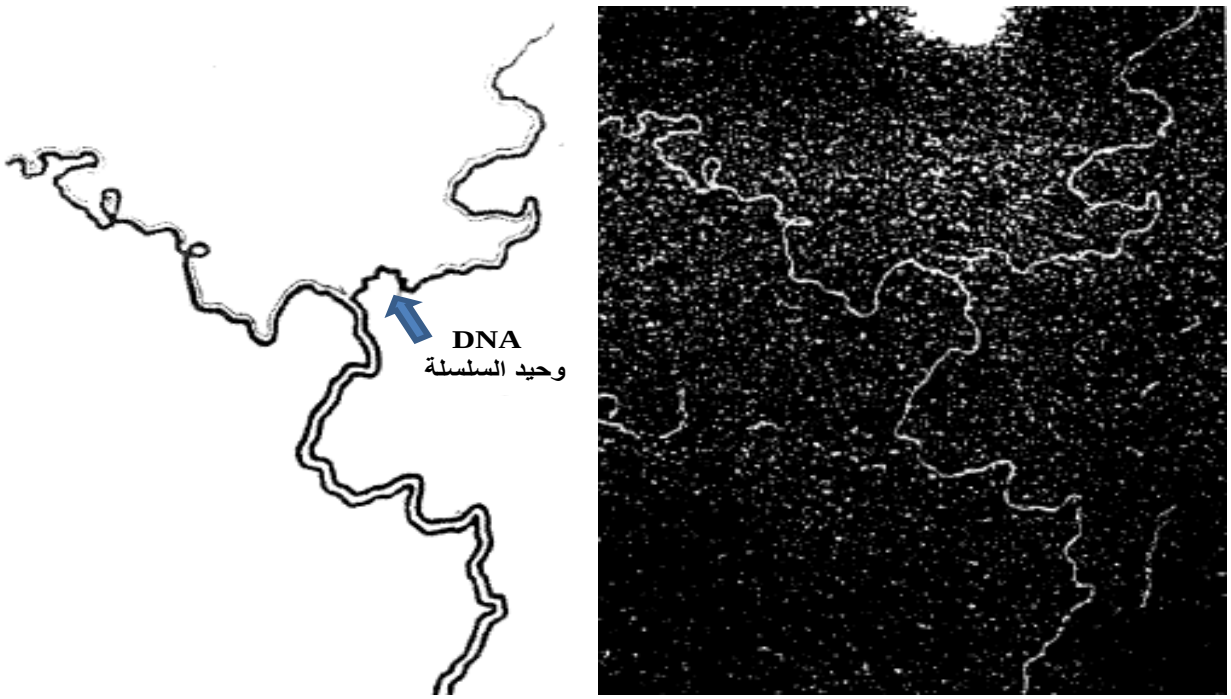
شكل٣٨ :إضافة ونمو وإستطالة السلسلة في الإتجاه 5'←3'

ولحل هذه المشكلة، تمكن أوكازاكي Okazaki عام ١٩٦٩ من اكتشاف قطع قصيرة متقطعة من DNA يتم بناؤها في الإتجاه 5'←3' على الخيط القالب المضاد لاتجاه البناء الطبيعي للسلسلة. وقد توصل إلى ذلك بعد تعريضه بكتريا القولون للثايميدين المشع **^{3}H-Thymidine لمدة ثواني قليلة**

Assist.Prof. Dr.Ayoob Obaid Alfalahi
Molecular Genetic 4th Stage Field Crops Sciences

حيث ظهرت له قطع من DNA قصيرة بطول حوالي ١٠٠٠ ـ ٢٠٠٠ نيوكليتيدة معلمة بالاشعاع، سميت هذه القطع القصيرة شظايا أوكازاكي Okazaki fragments نسبة إلى مكتشفها (تكون طول هذه الشظايا في خلايا الكائنات الحقيقية النواة بطول ٢٠٠ نيوكليتيدة فقط وقد يكون لذلك علاقة بطول شريط الـ DNA (الملتف حول النيوكليوسوم) توصل هذه القطع القصيرة ببعضها بفعل انزيم لحام DNA (DNA ligase)

وقد تأكد الآن أن شظايا أوكازاكي عبارة عن نواتج أولية لإحدى السلسلتين فقط وهي التي تأخذ الإتجاه 3'←5' والتي تسمى السلسلة المتلكئة (**lagging strand**). **أما السلسلة ذات الإتجاه** 5'←3' والتي تسمى بالسلسلة **القائد** (**leading strand**) **فإنها تبني أو يتم تناسخها على شكل خيط مستمر وغير متقطع من البداية. وهي لذلك تكون عادة اسرع في معدل بنائها وتسبق في ذلك** السلسلة **المتقطعة مما أدى إلى تسمية هذا** السلسلة بالسلسلة **القائد** (**leading strand**) **في حين سمي الخيط المتقطع** بالسلسلة **المتلكئة** (**lagging strand**). **يؤدي الفرق في سرعة البناء بين الخيطين إلى ظهور منطقة صغيرة من DNA الأبوي في صورة أحادية السلسلة عند شوكة التناسخ (لاحظ الشكل ٣٩) ثم تصبح مزدوجة السلسلة عند بدء شظية أوكازاكي في الظهور والتي يستمر بناؤها حتى تصل إلى نهاية الشظية السابقة لها والتي لا تلبث أن تلتحم بها. يبدأ بناء شظايا أوكازاكي عند نقط محددة على طول قالب السلسلة البطيئة وتحدد المسافة بين هذه النقاط متوسط طول شظايا أوكازاكي المتكونة أثناء تناسخ جزيء معين من DNA.**



الشكل ٣٩: يؤدي اختلاف سرعة الحركة بين السلسلة **القائد** (**leading strand**) **و** السلسلة **المتلكئة** (**Lagging strand**) **إلى ظهور منطقة صغيرة وحيدة السلسلة في جزيء DNA الأبوي عند شوكة التناسخ.**

آلية عمل الجين Gene Mechanism:

Assist.Prof. Dr.Ayoob Obaid Alfalahi
Molecular Genetic 4th Stage Field Crops Sciences

الآن يأتي السؤال الهام وهو كيف يمكن لعلماء البيولوجيا الجزيئية فهم كيفية عمل الجينات؟ لذا إستخدم مهندسو الوراثة تقنية سميت **إستبدال الجين المستهدف أو استهداف الجين Gene targeting** وفيه **يتم استحداث طفرة في جين معين واستبداله بالجين السوي داخل احدى الخلايا الجذعية المشتقة من الجنين** (Embryo-derived stem cells) من اجنه الفئران ثم ادخالها في خلايا جنين الفأر فتكون لذلك اجنة **معطلة الجين المستهدف (Knockedout gene)** فإذا ادى ذلك إلى إحداث تشوه في مخ الفأر كان ذلك دليل على مسؤلية هذا الجين عن تكوين المخ. **ولقد اصبحت تقنية الاستهداف الجيني تقنية مثيرة وهامه عندما إستخدم في مشروع الجينوم البشري لكشف أسرار الجينات المسؤولة عن الامراض الوراثية** حيث أن دراسة تسلسل النكليوتايدات للجين لا يفسر وظيفته في حياة الكائن الحي.

على أيه حال تبدأ التقنية **بعزل** الجين المراد دراسة وظيفته من الخلايا المشتقة من الجنين Embryo-derived stem cells (ES). ثم **يحور** ذلك الجين لانتاج جين طافر ثم يتم **استبداله** بالجين السوي ويتم الاستبدال **بعد اجراء بعض الخطوات المهمة** لضمان عملية الاستبدال بالجين السوي ويكون ذلك عن طريق **إيلاج** جزء (جين) آخر معه مقاوم للنيومايسين neomycin resistant (neo r)، وتكون الإضافة في وسط الجين وذلك لتسهيل امر العثور عن الخلايا التي تم الإيلاج فيها ويسمى هذا الجزء من الجين **بالواسم الموجب**، كما يضاف للجين جزء آخر يسمى بجين الثايميدين كاينيز (Tk) (Thymidine kinase) ويعتبر واسم ثاني ويعرف **بالواسم السلبي** حيث ان هذا الجين يسبب حساسية للخلايا الحاضنة له ضد المضاد الحيوي الكَانسيكلوفير (Ganciclovir). وبعد تصميم الجين الطافر هذا يتم **تحميله على ناقل مناسب** مثل **بلازميد القولون** حيث يتم ادخال الناقل إلى خلايا جنين الفأر الجذعية (ES) فيقوم البلازميد الناقل إما:

١- **بنقل الجين الطافر بدلا من الجين السوي (المستهدف)** على كروموسوم من كروموسومات خلايا الفأر الجنينية وفي هذه الحالة سوف يتم استبدال الجين السوي بجين مشابه مع احتوئه على الجزء الخاص بجين neo r في منتصفه دون الجزء الخاص بال Tk وذلك لان انزيم القطع المحدد سوف يتعرف على الجين المستهدف فقط بمعنى معرفة تسلسل البداية والنهاية له فقط.

٢- أو **بنقل الجين المستهدف بطريقة عشوائية** ويتم نقل الجين الطافر كله أي بالواسمة الثانية والخاصة بالـTk.

٣- أو **لا يتم الايلاج أصلا في الخلايا**.

ولعزل الخلايا التي تحمل الطفرة المستهدفة يتم وضع الخلايا كلها في وسط يحتوي على عقارين أحدهما **مضاد النيوميسين** المعروف باسم G418 والثاني مضاد الكانسيكلوفير فيقوم المضاد الاول بقتل الخلايا التي لا تحتوي على الجين الطافر فيقضي على الخلايا التي لم يحدث لها انتقال للجين المستهدف (الحالة الثالثة) أما العقار الثاني فهو مميت للخلايا التي أنتقل إليها الجين الطافر عشوائيا والحاوي على القطعة الثانية الخاصه بالجين Tk والمسببة للحساسية للمضاد الحيوي الثاني (الحالة الثانية).وعليه يتم الحصول على الخلايا المطلوبة (الحالة الأولى) والتي هندست وراثيا.

Assist.Prof. Dr.Ayoob Obaid Alfalahi
Molecular Genetic 4th Stage Field Crops Sciences

فإذا كانت مأخوذة من فأر **بني اللون**، يتم إيلاج تلك الخلايا داخل خلايا جنينية وهي في طور الكيسية الأريمية (blastocyst) لأنثى فأر **أسود اللون** ثم ننقل الخلايا الجنينية إلى رحم أم بديلة حيث تنمو وتكون النسل (شكل ٤٠). وتفحص الفئران للحصول على الفأر المحتوي على ظلال بنية ممزوجه باللون الاسود لتشير تلك الصفة على أنه الفأر المطلوب والحاوي على خلايا ES المهندسة وتعرف تلك الفئران بالفئران الكيميرية (الخليطة) Chimeras، وبعد ذلك يتم تزاوج الذكور الكيميرية

References

1. Kary B. Mullis. 1990. The Unusual Origin of the Polymerase Chain Reaction. 262(4): 56-65.
2. Kenshi Hayashi, Kary B. Mullis, François Ferré, Richard A. Gibbs. 1994. The Polymerase Chain Reaction Birkhäuser Basel. P, 464.
3. Zahra M Alkhafaji and Hassan M Abu-Almaali. 2013. PCRing and Primer Design. University of Baghdad, Baghdad. P, 304.
4. Mahmood M. Refaat and Saad B. Aloutabi. 2008. Introduction to Biotechnology. The General Egyptian Association of International Books and Documents, Cairo. P, 312
5. Elsahookie, M.M., and Ayoob O. Alfalahi. 2008. Polyploidy and its relationship with plant breeding and adaptation. The Iraqi J. Agric. Sci. 39(6):49-71.
6. Elsahookie, M.M., and Ayoob O. Alfalahi. 2008. TILLING: Modern technique combines traditional mutagenesis and functional genomics. The Iraqi J. Agric. Sci. 40(1):1-25.

Assist.Prof. Dr.Ayoob Obaid Alfalahi
Molecular Genetic 4th Stage Field Crops Sciences