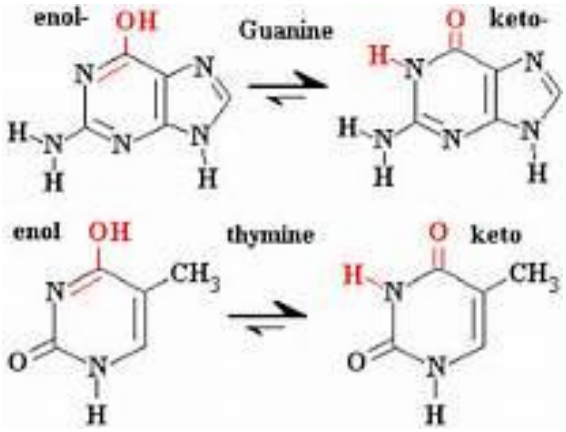
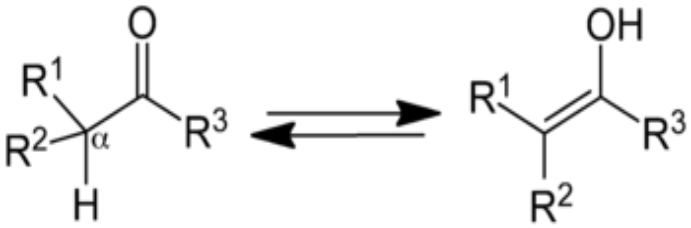
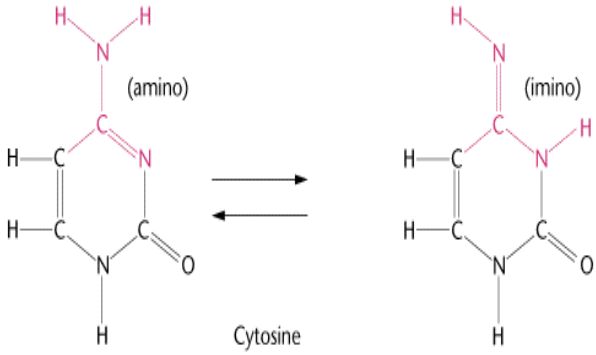
في الحالة الطبيعية تتواجد بنظام **الكيتو Keto** وفي الحالات النادرة بنظام **الإينول Enol**(شكل 44)، بينما السايتوسين والادينين في حالة الأمينو Amino وفي الحالات النادرة في حالة الإمينو Imino، حيث من المتوقع ان تبقى الحالات النادرة لأقل فترة زمنية ممكنة في صورة **النظام المشابه Tautomeric shifts**. ولكن في حالة وجود الشكل النادر اثناء فترة التناسخ سيؤدي إلى ظهور الاختلاف في تزاوج القواعد،A ممكن ان يتحد مع C و T ممكن ان يتحد مع G وما يتبعه من انعزال القواعد ذات الازدواج الخاطئ، وقد يكون الإستبدال على مستوى نوع القواعد بأن يكون T بدل A و C بدل G كنتيجة للإحلال الخطأ.

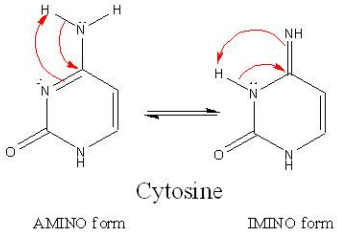


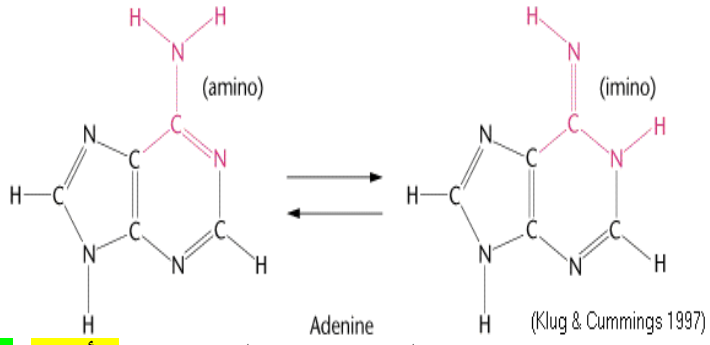


Keto–enol tautomerism.
Keto form (left); enol form (right).

شكل A ٤٤: شكل يوضح الكيتو والإينول







شكل B٤٤: شكل يوضح الأمينووالإمينو للسايتوسين والادينين

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

هناك عدة تأثيرات تنتج من طفرة الاستبدال ويمكن تقسيمها على أساس تأثيرها على النحو التالي:

١ ـ الطفرة الساكنة

٢ ـ طفرات القراءة خاطئة

٣ ـ طفرة ايقاف الترجمة

١. **الطفرة الساكنة:** طفرة استبدال قاعدة لينتج شفرة لنفس الحامض الأميني وتعرف **بالطفرة الساكنة silent mutation**. حيث تحدث على مستوى القاعدة الثالثة للشفرة دون أي تأثير على ترجمة الحامض الأميني :

…GGT… …GGG…

…CCA… …CCC…

pro Pro

٢. **طفرات القراءة الخاطئة:** طفرة استبدال قاعدة لينتج استنساخ شفرة حامض أميني إلى شفرة حامض أميني آخر وتعرف **بالقراءة الخاطئة missense** (Faux sens). وتكون **مرادفة أو غير مرادفة**.

a) **طفرات خاطئة غير مرادفة** (non synonyme missense):

هي التغير في قاعدة واحدة في مستوى الشفرة (الثلاثية) بحيث يؤدي إلى تغير في الحامض الأميني. ويكون هذا الأخير **مختلف كيميائيا** (حامضية، قاعدية، متعادلة)عن الحامض الأميني الأصلي :

…TTC… …CTC…

Lys AAG …GAG…

Glu

تحدث هذه الطفرة بصفة عامة في إحدى **القاعدتين الأولى أو الثانية** من الشفرة الثلاثية ، واحتمال حدوثها في القاعدة الثالثة ضعيف جدا لأن أغلب الأحماض الأمينة لها أكثر من شفرة ثلاثية تختلف فقط في القاعدة الثالثة.

b) **طفرات خاطئة مرادفة** (synonyme missense):

يحدث استبدال شفرة ثلاثية لحامض أميني بشفرة أخرى لحامض أميني آخر من **نفس المجموعة الكيميائية** (حامضية، قاعدية، متعادلة):

…TCT… …TTT…

Arg AGA AAA

Lys

الحامضين الأمينيين (Lys, Arg) من مجموعة الأحماض الأمينة القاعدية.

٣. ***طفرة ايقاف الترجمة***: طفرة استبدال قاعدة لينتج ظهور طفرة ايقاف الترجمة translation stop codon بتحويل شفرة الحامض الأميني إلى شفرة **ايقاف الاستنساخ** ويطلق عليها **الطفرة عديمة المعنى nonsense.**

…ACT… …ACG…

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

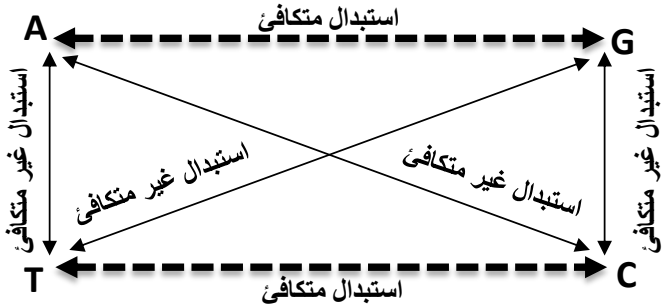
…UGC… UGA
Cys stop

كما ويمكن تقسيم طفرات الاستبدال على اساس طبيعة الطفرة إلى:

١- الإستبدال المتكافئ Transitions.
٢- الإستبدال غير المتكافئ Transversions.

١. الاستبدال المتكافئ:
إذ يتم استبدال قاعدة نيتروجينية بيورينية أو بيريميدية بقاعدة أخرى من نفس النوع مكافئة لها كميائيا حيث تبقى نسبة أنماط القواعد (بيورينية وبيريميدية) ثابتة داخل خيط DNA .

٢. الاستبدال غير المتكافئ:
وفيه تستبدل قاعدة بيورينية بقاعدة بيريميدية أو العكس كما في الشكل 43، مما يؤدي إلى **إختلال في نسبة أنماط القواعد داخل DNA**، بالإضافة إلى ذلك تحدث معظم الاستبدالات غير المتكافئة **تزاوجات خاطئة تخل كثيرا بتركيب وتجانس الحلزون المزدوج لـ DNA** . وعلى كل حال يوجد عدد قليل من المواد المطفرة تسبب هذه الاستبدالات.



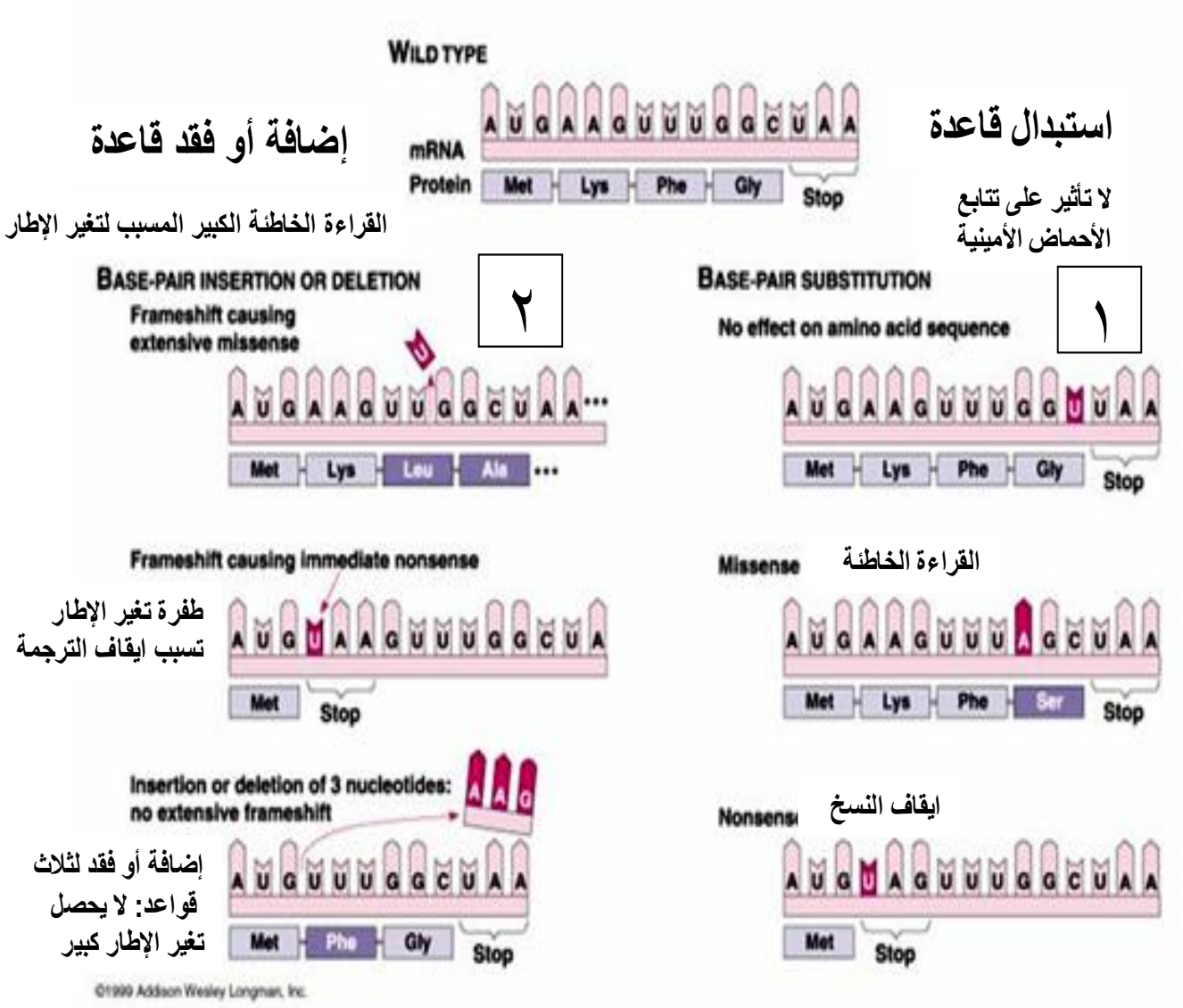
الشكل٤٣: الاستبدال المتكافئ وغير متكافئ بين قواعد DNA.

ثانيا:- طفرة إضافة أو فقد قاعدة واحدة او شفرة كاملة
(طفرة تغير الإطار Frame shift mutations)

يمثل هذا النوع من الطفرات نسبة كبيرة جداً من الطفرات التلقائية، حيث ينتج عن هذا النوع **إضافة أو فقد قاعدة واحدة** insertion or deletion one base بحيث يؤدي ذلك إلى تغيير في التتابع العام للأطار الجيني مما يترتب عليه اختلاف البروتين الناتج (شكل ٤٦، ٢)، ويمكن تقسيم تأثير أنواع طفرت تغير الإطار عن طريق :-

a) **طفرة فقد قاعدة** ينتج استنساخ شفرة حامض أميني إلى شفرة حامض أميني آخر وتعرف بالقراءة الخاطئة missense.
b) **طفرات ايقاف الترجمة** translation stop codon بتحويل شفرة الحامض الأميني إلى شفرة ايقاف الاستنساخ nonsense.
c) **طفرة فقد شفرة كاملة** مما ينتج عنة فقد لحامض اميني كامل في السلسلة الببتايديه (البروتين).

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



شكل٤٦ يوضح تأثير الأستبدال أو الأحلال (١) وتأثير النقص أو الإضافة (شفرة تغيير الإطار) (٢)

العوامل المطفرة:-

أولاً: العوامل الفيزيائية:-يمكن تقسيم جزء من الطيف الكهرومغناطيسي المتضمن طول موجات أقصر وذات طاقة أكبر من الضوء المرئي وتشمل :

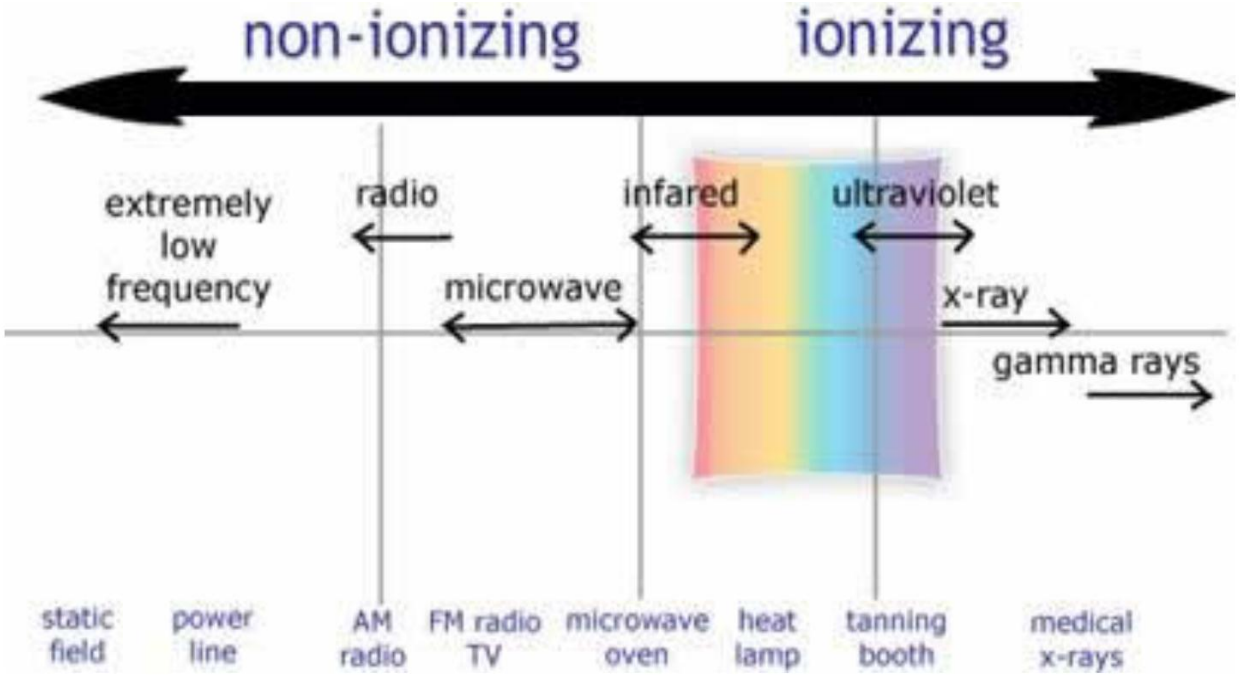
a) **أشعة إكس وأشعة كَاما والأشعة الكونية**:- وهي إشعاعات مؤينة Ionizing radiationsوتكون ذات طاقة عالية جدا، بحيث تمكنها من إختراق الأنسجة الحية فتؤثر على بعض جزيئات DNA وتؤدي إلى تغير في **بناءها الكيميائي** ويمكن ان تُحدِث أنواعاً مختلفة من التغيرات الكبيرة في تركيب الكروموسوم (الشذوذ الكروموسومية) والتي تنتج من حدوث كسور في الكروموسومات. ان للأشعة المؤينة تأثير بايولوجي مباشر أو غير مباشر، ويقصد **بالتأثير المباشر**هو الضرر الذي يلحق بالجزيئات المهمة بايولوجياً في الخلية الحية والتي تتأين مباشرة أو تصبح بحالة متهيجة وقد تؤدي إلى تلف جزيئات الحامض النووي والجزيئات الكبيرة في السايتوبلازم، أما **التأثير غير المباشر للإشعاع** يؤدي إلى ضرر لجزيئات الخلية بفعل الجذور الحرة (الجذور الطليقة Free

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

radicals) والتي تنشأ من تأين الجزيئات ولاسيما جزيئات الماء فهذا يؤدي إلى نشوء أيونات مختلفة مثل H_2O, H*, OH*, H_2*, H_3O, H_2O_2 والتي تتفاعل مع نواة الخلية والسايتوبلازم وتؤدي إلى تفكك الرابطة الكيميائية لذرات الكربون بسهولة فجرعة صغيرة من الأشعة المؤينة تؤدي إلى حدوث تغيرات في DNA وقد تؤدي إلى تلف DNA أو حصول تغيرات أو ضرر بالغ في بنية الكروموسوم.

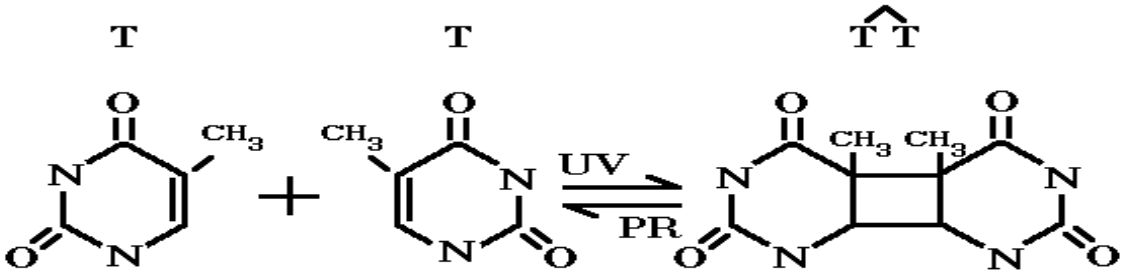
$$2H_2O \rightarrow H_2 + H_2O_2$$
$$H_2O \rightarrow H^* + OH^* \text{ جذور حرة}$$
$$OH^* + OH^* \rightarrow H_2O_2 \text{ Free radicals}$$
$$OH^* + H_2 \rightarrow H_2O + H^*$$

b) الأشعة فوق البنفسجية: هي موجة كهرومغناطيسية ذات طول موجي أقصر من الضوء المرئي لكنها أطول من الأشعة السينية سميت بفوق البنفسجية لأن طول موجة اللون البنفسجي هو الأقصر بين ألوان الطيف (شكل ٤٧). وطول موجتها يبدأ من ٤٠٠ نانومتر إلى ١٠ نانومتر. ولا تحتوي هذه الاشعة على طاقة تمكنها من إختراق الأنسجة الحية بحيث تؤدي إلى التأين، إلا إنها **تُمتص بواسطة القواعد الموجودة في الأنسجة السطحية لجسم الكائن الحي** (عديدة الخلايا)،**وينتج عن إمتصاص الإشعة نشاط القواعد مؤديا إلى تكون Dimers** (ارتباط بين جزيئات الثايمين المتجاورة على نفس الشريط)، وبالتالي لا تستطيع قواعد الثايمين تكوين أواصر هيدروجينية مع الأدنين وبالتالي يختل ترتيب أو تنظيم الخيط الحلزوني، وأكثرها شيوعاً ثنائيات الثايمين (شكل٤٨) وثنائيات الثايمين السايتوسين (شكل٤٩).

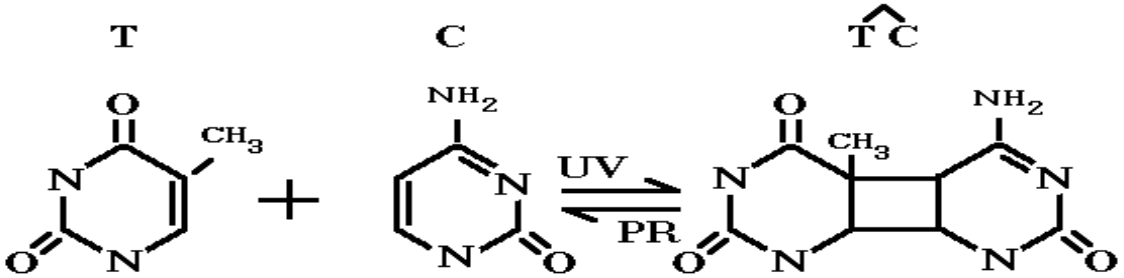


Assist.Prof. Dr.Ayoob Obaid Alfalahi
Molecular Genetic 4th Stage Field Crops Sciences

شكل٤٧ اجزاء الطيف الكهرومغناطيسي من أشعة إكس وأشعة كَاما والأشعة الكونية الأشعة فوق البنفسجية.



شكل٤٨ يوضح كيفية تكون ثنائيات الثايمين



شكل٤٩ يوضح كيفية تكون ثنائيات الثايمين والسايتوسين

ثانياً:-العوامل الكيميائية:-

هناك العديد من المواد الكيميائية لها القدرة على إحداث طفرات وراثية، ففي السنوات الأخيرة تم إكتشاف **العشرات** من تلك المواد التي لها القدرة على إحداث تغيرات وراثية اذا ما تعرضت لها الخلية أو النسيج أو الكائن الحي **وبتراكيز محددة ولفترة معينة من الزمن.تؤدي المطفرات الكيميائية إلى زيادة هائلة في معدل حدوث الطفرات، مما يعني إنها تتدخل بطريقة مباشرة في مسارات تناسخ المادة الوراثية**، وقد تعمل بطريقة مباشرة على جزئ المادة الوراثية مما يؤدي إلى ظهور طفرة تغير الإطار أو طفرات الاستبدال (الإحلال).ومن الأمثلة على هذه المطفرات الكيميائية **غاز الخردل** و**حامض النتروز** HNO_2 و**هيدروكسيل الأمين** NH_2OH **والعوامل الالكيلية** Alkylating agents حيث **تتفاعل هذه المواد مع مقاطع معينة من المادة الوراثية** ضمن الكروموسوم مسببة تغيراً في بنائه الوراثي، وقد يكون تأثير هذه المواد الكيميائية المطفرة **أخطر** من الأشعة المؤينة وذلك لقدرتها على النفاذ إلى داخل النواة والتفاعل مع المادة الوراثية فيها. كما ان هناك مواد كيميائية لها صيغة تركيبية تشبة بعض القواعد النايتروجينية تدعى **مشابهات القواعد Base analogs**. أن هذه المواد تختلف عن القواعد النايتروجينية الاعتيادية كونها تستطيع أن تزيد من احتمال حصول أخطاء

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

تزاوجية في حالة توفرها في الخلية أثناء مرحلة استنساخ (تضاعف) DNA وقد تؤدي إلى حصول تغيرات كروموسومية ومن أهم مشابهات القواعد:-

- ٥- بروموديوكسي يوراسيل (5-bromodeoxyuracil) الذي يشبه الثايمين Thymine.
- ٢- أمينوبيورين (2-aminopurine) الذي يشبه الأدنين.

ويمكن تقسم المطفرات الكيميائية إلى قسمين:-

١- المواد التي تعمل كمادة مطفرة على المادة الوراثية سواء كان متناسخاً أو غير متناسخ ومنها **المواد الالكيليه** و**حامض النتروز**.

٢- المواد التي تعمل على المادة الوراثية في حالته المتناسخة (المتضاعفة) فقط ومنها **صبغات الأكريدين** التي ترتبط بالمادة الوراثية اثناء التناسخ مؤدية إلى حدوث أخطاء اثناء عملية التناسخ، **ومشابهات القواعد** (Base analogs) المشابهة للقواعد العادية حيث تحل محل القواعد العادية اثناء التناسخ فيظهر تأثيرها باحداث طفرة معينة.

والشكل التالي يبين أهم المطفرات الفيزيائية والكيميائية المعروفة:-

المطفرات

المطفرات الفيزيائية	المطفرات الكيميائية
X ray, Beta ray	MethanesulfonateEthyleneimine
Gamma ray	**Diepoxybutane**
Ultra violet light	الأشعة فوق البنفسجية
Deuterons	الديترونات Nitrous acid (HNO_2)

ميكانيكيات إصلاح المادة الوراثية DNA Repair Mechanisms:

يعتبر تعدد ميكانيكيات الإصلاح في الكائنات الحية من الفيروسات وحتى الإنسان مؤشراً لأهمية حفظ الطفرات في كل من الخلايا الجسمية والجنسية على مستوى معتدل، ومن طرق إصلاح أضرار المادة الوراثية المحتوي على ثنائيات الثايمين التي تم دراستها في بكتيريا القولون هي :

١- الإصلاح بالتفاعل التنشيطي الضوئي Repair photo reactivation

يتضمن وجود **إنزيم** يقوم بكسر أو بشق ثنائيات الثايمين مباشرة دون استبعاد أي من النكليوتايدات المجاورة، هذا الإنزيم يعرف بأسم انزيم **الفوتوليز Photolyse** والذي يعمل على وصل ثنائيات الثايمين في الظلام ولكنه لا يستطيع أن يحدث كسر للروابط في ثنائيات الثايمين بدون وجود طاقة ضوئية خاصة الضوء المحتوي على **الطيف الأزرق**، حيث ينشط الأنزيم ويساعد على **حدوث تفاعل ضوئي كميائي** مؤدياً إلى كسر الرابطة بين الثنائيات (**ثنائيات الثايمين** ، **ثنائيات السايتوسين وثنائيات السايتوسين – الثايمين**) (شكل٥٠ أ).

٢- الإصلاح الاستئصالي أو بالإزالة Excision repair

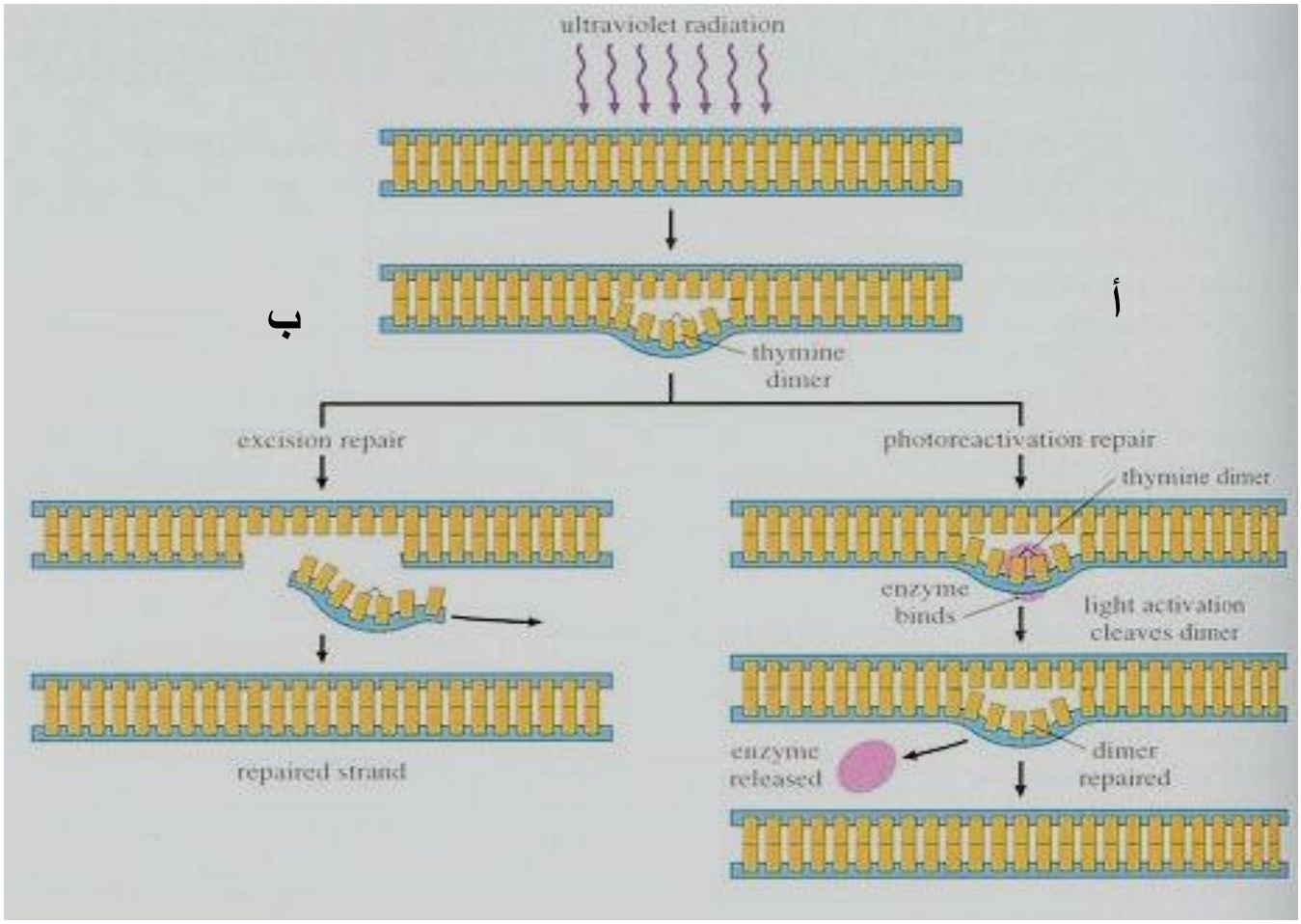
Assist.Prof. Dr.Ayoob Obaid Alfalahi
Molecular Genetic 4th Stage Field Crops Sciences

يتضمن عمل الاستئصال باستبعاد ثنائيات الثايمين من جزئ المادة الوراثية وإنتاج قطعة جديدة، وتتم عملية الاصلاح وبوجود إنزيمات هي:-

١) إندونيوكليز Endonuclease
٢) وإكسونيوكليز Exonuclease
٣) DNA polymerasnuclease II
٤) Ligase

حيث تتم الخطوة الأولى بحدوث **فصل** بواسطة انزيم endonuclease بعد التوصل لموقع ثنائيات الثايمين فيكسر الأنزيم **رابطة الفوسفو ثنائية الايستر** في العمود الفقري لخيط المادة الوراثية، ثم يأتي دور انزيم exonuclease حيث يعمل على **استبعاد** قطعة مجاورة على جانبي الثنائيات بعد ذلك يعمل انزيم DNA polymerasnuclease II **بسد الفجوه المتكونه** بأستخدام الخيط المكمل كقالب (شكل٥٠ ب).بعد الأنتهاء من سد الفجوة يعمل انزيم ligase على لحم الخيط بتكوين رابطة الفوسفوداي استر.

وقد تم التأكد من كون نشاط هذا الأنزيم (DNA polymerasnuclease II) لسد الفجوة هو ماتم ملاحظته في الخلايا الطافرة للجين المسئول عن تكوين DNA polymerase II حيث وجد ان كفاءتها في الأصلاح بالأستئصال تكون منخفضة جدا مما يؤكد دور هذا الأنزيم في عملية الإصلاح لملئ الفجوات الصغيرة، ولم يكن لأنزيم بلمرة DNA polymerase III دور نظرا لكبر حجمه ولضرورة ان يظل مرتبطا بشوكة التناسخ النامية لفترة طويله.



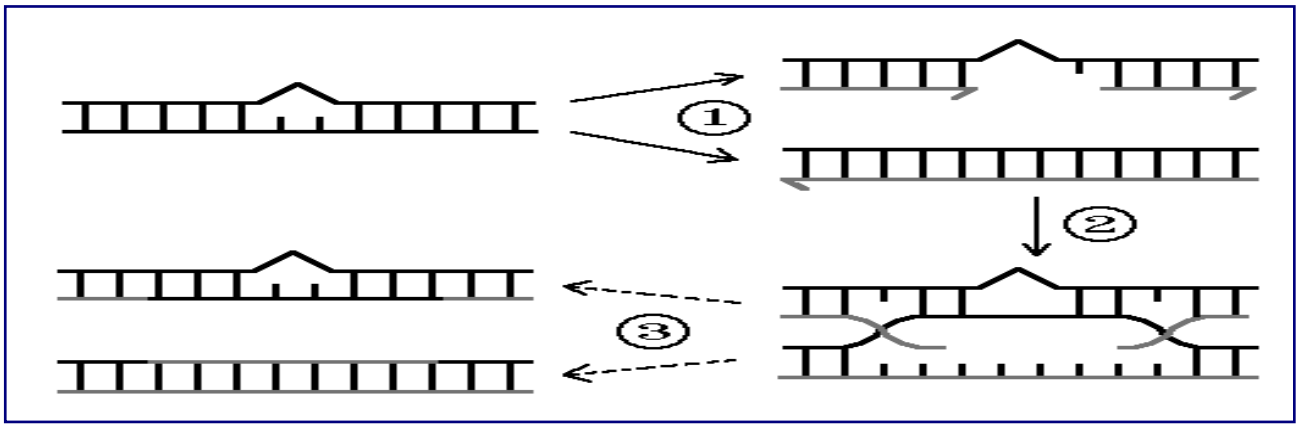
Assist.Prof.Dr.Ayoob Obaid Alfalahi
Molecular Genetic 4th Stage Field Crops Sciences

شكل٥٠: يوضح الأصلاح بالتنشيط الضوئي (أ) والإصلاح الإستئصالي (ب)

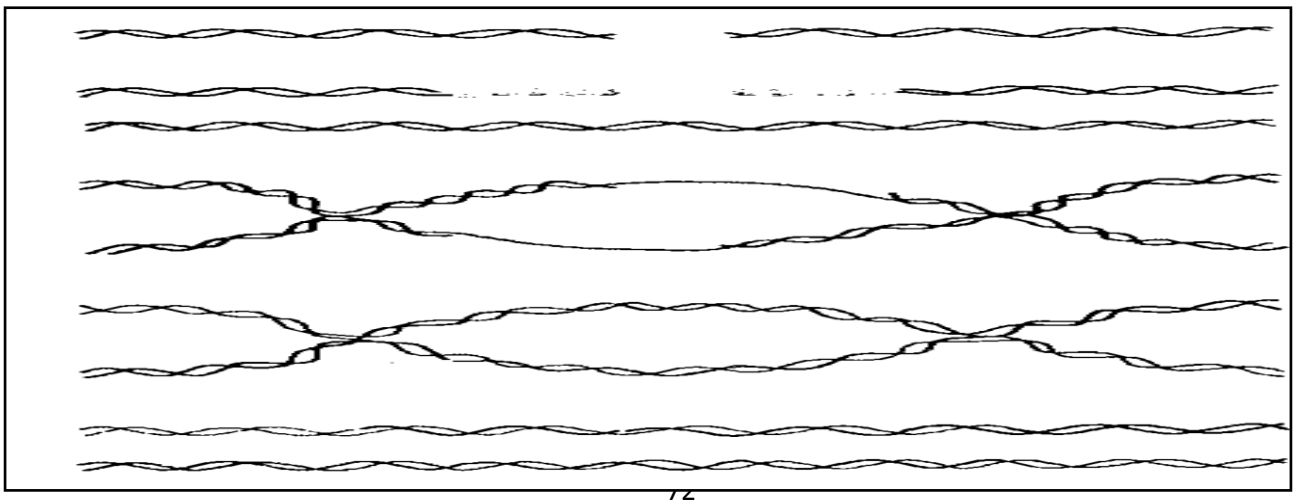
٣- إصلاح الإتحادات الجديدة Recombinational repair

قد يحدث تكون لثنائيات الثايمين، أو **كسر مستعرض** يشمل السلسلتين وما يصاحب الكسرمن فقد جزء من الحلزون المزدوج نهائياً، فنجد ان جميع المعلومات الأصلية والمكملة قد فقدت في مكان التلف، ولا يمكن إسترجاعها إلا عن طريق البحث عن **جزء آخر مناظر** في جزيء المادة الوراثية منفصل في الخلية نفسها ولكن متطابق مع الجزء التالف، يسمى هذا النوع **بالإصلاح الالي لعملية الإتحادات الجديدة**، وقد يحدث التلف في سلسلة مفردة، فيتم الإصلاح من السلسلة المكملة عند مرور شوكة التناسخ. ، وقد يحدث التلف لكلا السلسلتين في منطقة غير متناسخة فيلجأ للكروموسوم النظير

مثال : في بكتريا القولون وجد ان العنصر الأساسي في عملية التصحيح بالاتحادات الجديدة عبارة عن انزيم يقوم بأعادة الإتحاد annealing بين تتابعات كل من جانبي المنطقة التالفة والمنطقة المكملة لها في الجزئ السليم ، حيث يتم النشاط الإنزيمي عن طريق بروتين Rec A protein



شكل٥١: يوضح كيف يتم تناسخ المادة الوراثية في حالة تكون ثنائي الثايمين اثناء فترة التناسخ واستخدام الكروماتيدة الشقيقة كقالب لإصلاح الخلل



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

شكل٥٢: يوضح كيف يتم معالجة الكسر في الخيط المزدوج للمادة الوراثية واستخدام الكروموسوم النظير كقالب لإصلاح الخلل بسد الفجوات الناتجة عن الكسر المستعرض، والذي ينتج عنه وبحسب نوع وموقع الإرتباط إما ارتباط بدون عبورNon-crossing over حيث يتم استخدام الخيط السليم في الكروموسوم النظير كقالب ومن ثم انسحاب كل خيط للكروموسوم الأصلي، أو ارتباط وعبور crossing over وبعد الإنتهاء من سد الفجوات يتم كسر لجزء الخيط السليم وإعادة ارتباطه بخيط المادة الوراثية في الكروموسوم النظير وكذلك بالنسبة للخيط الآخر.

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