المحاضرة الخامسة : وراثة احياء مجهرية (نظري) المرحلة الثالثة المرحلة المرحان

فحص وانتقاء الطفرات الوراثية

يتم الكشف عن وجود الطفرات الوراثية وحسابها باستخدام عدة صفات منها الكشف عن قدرتها على تميز السكريات ، او قدرتها على استخدام مصدر جديد للنتروجين او للكبريت ، او مقاومتها للادوية وللعاثيات phages وتمثل طريقة التطبيق المكرر replica plating وسيلة مفيدة في فحص الطفرات الوراثية سواء على وسط غذائي واحد او على اوساط مختلفة.

يتم عزل الطفرة الاوكزوتروفية بوساطة طريقة يستعمل فيها البنسلين او اي مادة تقتل الخلايا النامية فقط. ففي الوسط الغذائي الخلوي الحاوي على الحد الادنى من المواد الغذائية minimal meduim فأن الاوكزوتروف لاتستطيع ان تتمو فلا يؤثر فيها الدواء ولذلك تنمو في حين تنمو الخلايا غير مطفرة في هذا الوسط وبالتالي تتعرض الى تأثيره القاتل. هناك ما يعرف بالطفرات القاتلة المشروطة Conditionally Lethal Mutation فقسم من الطفرات تكون اوكز وتروفية في درجة حرارة ٣٥ – ٤٠ °م وليس في ٢٠ °م نتيجة لاحتوائها على انزيمات حساسة لدرجات حرارية معينة ، لذا تتحور بسرعة لدى حدوث اي هبوط في درجة الحرارة عن الحد المبين اعلاه .

ان هذا مثال على هذه الطفرات القاتلة المشروطة والتي يكون التأثير القاتل لها موجودا تحت ظروف خاصة . وعليه فيمكن تنمية مثل هذه الطفرات تحت ظروف تسمح بالنمو وتسمى nonpermissive conditions . وعلى هذا الاساس تعد الطفرات الغذائية طفرات قاتلة مشروطة باستثناء كونها من الممكن التعويض عن المادة الناقصة فيها من المحيط ومنع موتها .

الطفرات المقاومة للمضادات الحيوية:

صاحب اكتشاف مضادات الحياة كأدوية فعالة ضد البكتريا ظهور سلالات مقاومة من البكتريا لبعض هذه المضادات . فقد وجد انه عند تعريض زرع بكتيري الى مضاد معين فان هذا الزرع يتحول من حساس للمضاد resistant إلى مقاومة atibiotic - sensitive له وهذا يعني ان البكتريا لم تعد تتأثر بكمية مضاد الحياة التي تقتل الخلايا الاصلية الحساسة لها . وقد لوحظت هذه الظاهرة في البداية مع الاستعمال الشائع للبنسلين والستربتومايسين في الاربعينات من هذا القرن. وقد لوحظ ان هناك نوعين من الطفرات في هذا الجانب النوع الاول تتحول فيه البكتريا ابان تعريضها الى تركيز معين من مضاد الحياة الى مقاومة لذلك التركيز فقط أي انها تبقى حساسة الى التراكيز الاعلى منه كما في حالة تعرض بكتريا الحياة الى 500 مايكروغرام / مل من البنسلين penicillin فالذي يحدث هو ان معظم خلايا الزرع تموت نتيجة لقيام هذا المضاد بتثبيط احد الخطوات الهامة في خلق جدار الخلية مما يؤدي الى تحلل خلايا الزرع تموت نتيجة لقيام هذا المضاد بتثبيط احد الخطوات الهامة في خلق جدار الخلية مما يؤدي الى تحلل صلب حاو على تراكيز متباينة من البنسلين فأن عددا قليل من الخلايا سوف يعيش وان هذا العدد سيتناقص كلما ازدادا وتركيز المضاد في الوسط الزرعي واذا مالخذت احدى المستعمرات المعزولة في الخطوة الاولى فانها ستكون اكثر مقاومة الى تركيز المضاد في الوسط الزرعي واذا مالخذت احدى المستعمرات المعزولة في الخطوة الاولى فانها ستكون اكثر مقاومة المقاومة الى تركيز والمضاد في الوسط الزرعي واذا مالخذت احدى المستعمرات المعزولة في الخطوة الاولى فانها ستكون اكثر مقاومة المقاومة الى تركيز والمضاد في الوسط الزرعي واذا مالخذت احدى المستعمرات المعزولة في الخطوة الاولى فانها ستكون اكثر مقاومة المقاومة الى المضاد واعيد زرعها بنفس الطريقة الاولى فانها ستكون اكثر مقاومة المقاومة الى المضاد واعيد زرعها بنفس الطريقة الاولى فانها ستكون اكثر مقاومة المقاومة الى المضاد واعيد زرعها بنفس الموروغرام المناد واعيد زرعها بنفس الموروغرام المصاد واعيد زرعها بنفس الموروغرام الموروغرام الموروغرام المؤلى المصاد واعيد زرعها بنفس الموروغرام المورو

من الخلايا الام ، وان عدد المستعمرات المقاومة سيكون أكثر حتى ان بعضها سوف يقاوم الى حد تركيز مقداره ما ١٢٥٠ ميكروغرام / مل من المضاد . واذا ما أخذت مستعمرة مقاومة لهذا التركيز الاخير واعيد زرعها على سلسلة جديدة من الاطباق فأن البكتريا المعزولة من الخطوة الثانية second step isolate قد امتلكت مقاومة لتراكيز اعلى من المضاد وهكذا فانه بالامكان اعادة عملية الانتقاء والزرع هذه لعدة مرات لغرض الحصول على عزلات مقاومة لتراكيز اعلى واعلى من البنسلين الى ان يتم النوصل الى زرع بكتيري لايتأثر ابدا باي تركيز من المضاد الذي تم تعريضه له. وتسمى هذه المقاومة للبنسلين بالمقاومة التدريجية stepwise resistance . وعلى العكس من هذه المقاومة البنسلين هناك نوع آخر من المقاومة تسمى مقاومة الخطوة الانتقائية الواحدة single selective المقاومة لتراكيز متباينة من المضاد في خطوة واحدة كما في حالة مقاومة المضاد الستربتومايسين step resistance ففي حالة تعريض خلايا حساسة الى ١٠٠ ميكروغرام / مل من هذا المضاد فأن معظم الخلايا تموت نتيجة لتداخل المضاد مع عملية خلق البروتين فيها الا ان خلية واحدة من كل 10⁹ بامكانها ان تكون مستعمرة واذا ماتم انتقاء هذه الخلايا المقاومة وتم زرعها على سلسلة من الاطباق الحاوية على بامكانها ان تكون مستعمرة واذا ماتم انتقاء هذه الخلايا المقاومة وتم زرعها على سلسلة من الاطباق الحاوية على تراكيز متزايدة من المضاد سوف تظهر ذات ثلاثة أنواع من البكتريا المقاومة هى :

- ١- خلايا ذات مقاومة بسيطة ، اي انها لاتستطيع ان تقاوم أكثر من التركيز الاصلى للمضاد اي ١٠٠ ميكرو غرام / مل .
 - ٢- خلايا ذات مقاومة متوسطة ، اي انها بامكانها ان تقاوم المضاد الى حد ٥٠٠ميكروغرام / مل منه .
 - ٣- خلايا ذات مقاومة عالية ، اي انها تقاوم تراكيز عالية جدا من المضاد.

وبصورة عامة فإن هناك عدة أسباب لمقاومة البكتريا لمضادات الحياة هي مايأتي :

- ١- قيام البكتريا بافراز انزيمات تهاجم المضاد وتحور تركيبه الكيمياوي وتحوله الى تركيب مشلول عن التأثير
 ١١ القاتل كما في حالة افراز البكتريا العنقودية Staphylococci انزيمات البيتالاكتاميز ß- lactamase.
- ٢- تحوير الهدف Modification of target الذي يتحد معه المضاد داخل الخلية ويشله عن العمل ، لذا فأن
 تحوير هذا الهدف سوف يؤدي الى عدم اتحاد المضاد معه وبالتالى توقف فعله القاتل او المثبط لنمو الخلية .
- ٣- تحوير في نفاذية الخلايا للمضاد عبر جدارها وغشائها الخلوي مما يحول دون دخوله الى داخلها وبالتالي احداث تأثيره فيها .

ع ـ

انواع اخرى من الطفرات

هناك انواع اخرى من الطفرات:

- 1- الطفرات الامامية Forward mutation: وهي الطفرات التي تنتج عن مظهر Phenotype غير طبيعي ومختلف عن المظهر البري Wildtype نتيجة لفقدان وظيفة معينة داخله.
- ٢- الطفرات العكسية Reverse mutations : وهي الطفرات التي تبقى محتفظة بالمظهر البري رغم ان الخلية مطفرة اي انها تبقى محتفظة بالوظيفة المعينة التي حدثت فيها الطفرة والتي يتم فقدانها في حالة الطفرات الأمامية نهائيا .
- ٣- الطفرات القامعة او الكاتمة Supperssor mutation : وهي الطفرات التي تبقى محتفظة بالصفات البرية على الرغم من كون المظهر هو مظهر طفرة (اى انه مظهر مطفر mutant phenotype) بدون ان تحتفظ بالمورث المطفر.

معدل الطفرة الوراثية:

يعرف معدل الطفرة الوراثية Mutation rate على انه الفا ($\dot{\alpha}$) ويساوي عدد الطفرات ($\dot{\alpha}$). على عدد الانقسامات الخلوية ($\dot{\alpha}$) او ($\dot{\alpha}$ = m/D) اما معدل الطفرات التلقائية Spontaneous mutation rate فيعرف على انه احتمالية ظهور نوع معين من الطفرات الذي يبقى عادة ثابتا نسبيا في الانقسام الخلوي الواحد . ويكون معدل الطفرات ثابتا بالنسبة الى الخاص من الطفرات وتحت الظروف الثابتة . وفي حالة تنمية مجموع بكتيري من لقاح صغير فأن قيمة ($\dot{\alpha}$) أي الانقسامات الخلوية يساوي في الأساس عدد الخلايا النهائية الموجودة باعتبار ان العدد الاصلي قليل جدا لذا فأنه يهمل وان كل انقسام خلوي ينتج خلية اضافية .

اما تردد الطفرات Mutation frequency فأنه غير ثابت وهو عبارة عن العدد الكلي للطفرات للنوع الواحد وهو يمثل معدل الطفرات التي نتجت عبر الاجيال وخلال الانقسامات منذ بداية الزرع والى آخر جيل وعلى عكس غرار معدل الطفرات الثابت فأن تردد الطفرات يزداد كلما تأخر زمن حصاد الزرع المايكروبي .

تحوير المورث Gene Manipulation

اصبح بامكان التقنيات الحديثة استحداث صفات وراثية جديدة واصيلة لم يكن بامكان الخلية (بكتيرية او غيرها) من امتلاكها من قبل. ويتم ذلك عن طريق اعادة ترتيب المورثات داخل الخلية واحداث ربط بين قطع من دنا لم يكن بالامكان ربطها في السابق. كما اصبح بالامكان احداث تغيير وتلاعب في جزيئة دنا خارج الخلية in vitro مما اتاح طرقا بسيطة لاحداث التزاوج على الصعيد الجزيئي لجزيئة دنا وهو ما يعرف Melecular recombination او الربط المورثي gene splicing الذي بمقتضاه اصبح بالامكان ادخال قطع من دنا (من اي مصدر) الى دنا لمتضاعف كالبلازميد او العائي لغرض تكوين هجين بين الجزيئتين. ثم السماح لهذا الهجين بان يتضاعف اويتكلون (cloned) في خلية بكتيرية مضيفة مما يدخل اليها الصفة الوراثية التي تحملها قطعة DNA المدخلة وهذا مالم يكن بامكانها اظهاره من قبل. ان هذه الثورة العلمية الهائلة اتاحت الفرصة لفهم الكيفية التي يكون فيها تعاقب Sequencing المعلومات

المحاضرة الخامسة : وراثة احياء مجهرية (نظري) المرحلة الثالثة المرحلة الثالثة المرحان

جامعة الانبار كلية العلوم قسم التقنيات الاحيانية

الوراثية على جزيئة دنا وطريقة اظهار expression لهذه المعلومات وتنظيمها regulation بالاضافة الى الابعاد التطبيقية الهائلة المتوقع حدوثها في المستقبل على الاصعدة الصحية والزراعية والصناعية.

المصادر:

1- Dale, J. W. & Park, S. F. (2010). Molecular Genetics of Bacteria. 5TH Edition. Wiley – Blackwell.

١- الزيدي، حامد مجيد. (٢٠٠٠ م) علم الاحياء المجهرية (النظري). الطبعة الثانية، وزارة التعليم العالي والبحث العلمي / جامعة بغداد.