تركيب البروتين

Protein Synthesis

البروتينات هي جزيئات حيوية ضخمة تتكون من سلسلة أو أكثر من الأحماض الأمينية .تقوم البروتينات بوظائف كثيرة ومتنوعة داخل أجسام الكائنات منها :تحفيز التفاعلات الأيضية، تضاعف الدنا، الاستجابة للمنبهات، توفير بنية للخلايا والكائنات، ونقل الجزيئات من مكان لآخر. تختلف البروتينات عن بعضها أساسا حسب تسلسل أحماضها الأمينية الذي يحدده تسلسل نوكليوتيدات الجينات المشفرة لها. العديد من البروتينات هي إنزيمات تحفز التفاعلات الكيميائية الحيوية وهي أساسية لعملية الأيض .للبروتينات وظائف بنائية أو حركية مثل الأكتين والميوسين في العضلات والبروتينات في الهيكل الخلوي، والتي تشكل نظام سقالة يحافظ على شكل الخلية، بعض البروتينات الأخرى مهمة في نقل واستقبال إشارات الخلايا، الاستجابات المناعية، التصاق الخلايا، ودورة الخلية .من الضروري وجود البروتينات في غذاء الحيوانات والإنسان لتوفير الأحماض الأمينية الأساسية التي لا يمكن تخليقها. تفك عملية الهضم البروتينات لاستخدامها في الأيض إن دعت الحاجة.

وفرتها داخل الخلايا حيث تم تقدير أن البكتيريا المتوسطة الحجم تحتوي على حوالي مليوني بروتين في كل خلية مثل الإشريكية القولونية E.coli أما البكتيريا الصغيرة مثل المفطورة Mycoplasma فتحتوي عددا أقل يتراوح بين 50 ألف إلى مليون بروتين. في المقابل، خلايا حقيقيات النوى أكبر حجما وتحتوي على بروتينات أكثر، على سبيل المثال قُدّر أن خلايا الخميرة تحوي حوالي 50 مليون بروتين وأن خلايا الإنسان تحوي من مليار إلى ثلاث مليارات بروتين. ان اغلب البروتينات الطبيعية مكونة من عشرين حامضا امينيا مختلفا والتي تكرر في السلسلة الببتيدية (البروتينية) وبما ان جزيئة البروتين مكونة من 100- 1000 حامض- اميني فان عدد البروتينات المختلفة التي من المحتمل تكوينها يكون غير محدود.

الشفرة الوراثية Genetic code

• أن كل شيفرة codon تختص بحمض أميني معين يجب أن تتكون من ثلاثة نيوكليوتايدات، وبما ان هنالك اربع نيوكلوتيدات (A,T,C,G) إذن عدد الثلاثيات في هذه الحالة (4^3= 64) سيكون كافي لتشفير 20 نوعا من الأحماض الأمينية حيث سيكون لكل حامض اميني شفرة خاص به أي ان الشفرات الوراثية تتصف بكونها متخصصة specific وايضا تتصف بالغزارة او الوفرة

redundancy مثلا الحامض الاميني الارجنين يشفر من قبل ست شفرات وراثية وهكذا اغلب الاحماض الامينية لها اكثر من شفرة وراثية. وقد توصل العلماء إلى أن الكودونات هي عامة او عالمية universality في جميع الكائنات الحية فمثلا الكودونGUC الخاص بالحمض الأميني (فالين) يكون نفسه في خلايا الكائنات الحية جميعها ، مما يدل على وحدة خلق الكائنات الحية.

كما أن بعض الشفرات الوراثية تمثل شفرات توقف Stop codon ولا تعبر عن الأحماض الأميني وهي (UAA, UAG,UGA). تعتبر شفرات التوقف ذات أهمية بالغة فهي التي تفصل بين المورثات المختلفة أو بالأصح بين البروتينات المختلفة أثناء ترجمتها. كما يجب إدراك أن الشفرة الوراثية AUG الخاصة بالحمض الأميني (Met- Methione) تعتبر بمثابة شفرة البدء في عملية النسخ غالباً. وهذا يعني أن عملية بدء الترجمة وبناء البروتين تبدء غالبا بالحمض الأميني المثيونين Methione .

Second Letter

1st letter	U		C		A		G		3rd letter
U	UUU UUC UUA UUG	Phe Leu	UCU UCC UCA UCG	Ser	UAU UAC UAA UAG	Tyr Stop Stop	UGU UGC UGA UGG	Cys Stop Trp	U C A G
C	CUU CUC CUA CUG	Leu	CCU CCC CCA CCG	Pro	CAU CAC CAA CAG	His Gln	CGU CGC CGA CGG	Arg	U C A G
A	AUU AUC AUA AUG	Ile Met	ACU ACC ACA ACG	Thr	AAU AAC AAA AAG	Asn Lys	AGU AGC AGA AGG	Ser Arg	U C A G
G	GUU GUC GUA GUG	Val	GCU GCC GCA GCG	Ala	GAU GAC GAA GAG	Asp Glu	GGU GGC GGA GGG	Gly	U C A G

التعبير الجيني gene expression

ثانيا -الترجمة- Translation

ونعني بالترجمة هي استعمال المعلومات الوراثية المنقولة من الDNA بواسطة الmRNA وتحويلها الى منتجات وظيفية تستطيع الخلية استخدامها. وتتم عملية الترجمة بمساعدة الرايبوسومات التي تعمل كماكنة للترجمة وتعمل على تكوين اصرة ببتيدية بين الاحماض الامينية. وايضا بمساعدة الtRNA الذي يرتبط بالاحماض الامينية من جهة ويرتبد بالmRNA من الجهة الاخرة.

1- الانطلاق او البدا- Initiation

تتطلب ارتباط ال mRNA مع الرايبوسوم ويقوم ال tRNA يلعب دور الوسيط حيث يحمل الاحماض الأمينية والشفرات المضادة anticodon والتي ترتبط مع ال شفرة codon في ال mRNAحيث تكون شفرة الانطلاق هي AUG المشفرة للحمض الاميني" ميثيونين "في الرنا المرسال في موقع معين (أ) في الرايبوسوم .يتم توضع tRNA للحمض الأميني الثاني في الموقع (ب) للرايبوسوم وفق الشفرة الثانية على جزيء . mRNA يتم تكوين رابطة بيبتيدية بين الحمض الأميني الأول والثاني من قبل من انزيمات ligase ؛ فيتشكل لدينا ثنائي الببتيد .ينفصل الحمض الأميني الأول عن tRNA والذي ينفصل عن الموقع (أ) للرايبوسوم مما يعني تثبت ثنائي الببتيد على tRNA الموجود في الموقع (ب).

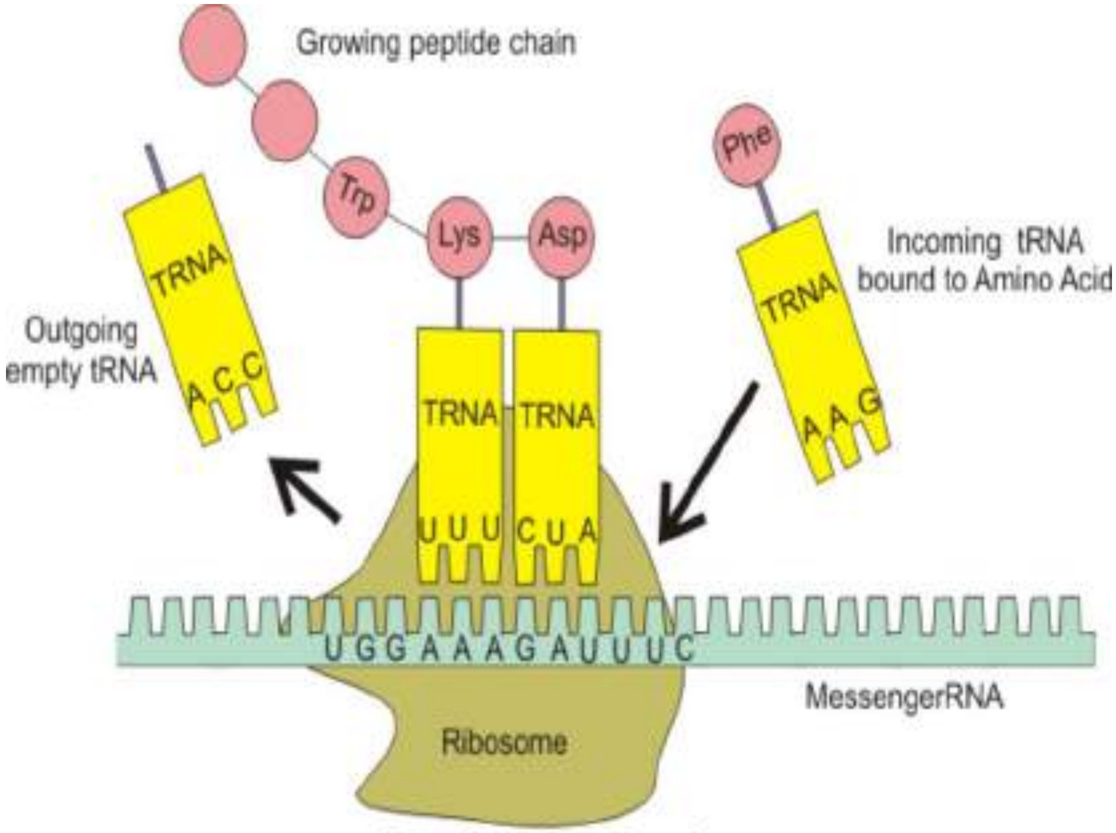
2- الاستطالة- Elongation

ينتقل الرايبوسوم إلى شفرة ثانية على mRNA وبما أن الموقع (أ) أصبح شاغرا لانفصال tRNA الأول عن الرايبوسوم، يصبح الموقع (أ) مستعدا لاستقبال tRNA حامل لحمض ببتيدي آخر فتبدأ دورة جديدة تؤدي إلى ربط حمض أميني ثالث وهكذا تستطيل السلسلة الببتيدية بمقدار حمض أميني واحد في كل مرة.

3- النهاية- Termination

حيث يصل الرايبوسوم إلى شفرة التوقف على m.RNA قد تكون UAA أو UAG أو UGA ؛ عند هذه المرحلة تنتهي جملة الشفرات وبالتالي تتوقف وحدتا الرايبوسوم عن ترجمة المعلومات ثم تتفككا عن بعضهما بعد إنتاج سلسلة ببتيدية (بروتين فتي).

تمر سلسلة الببتيد الاولية بسلسلة من العمليات التي تؤدي الى انطواء (folding) السلسلة باشكال مختلفة تعطي في النهاية الشكل ثلاثي الابعاد 3D للبروتين و الذي يكون الشكل النهائي والفعال للبروتين.



Peptide Synthesis

التعبير الجيني

Gene expression

التعبير الجيني هو العملية التي يتم فيها استخدام المعلومات الوراثية من الجينات في بناء منتجات الجينات الوظيفية. هذه المنتجات غالبا ما تكون البروتينات، ولكن هنالك جينات تشفر لمنتجات غير البروتين مثل جينات (t RNA أو r RNA).

يتم استخدام عملية التعبير الجيني من قبل جميع الأنماط الحياتية المعروفة - حقيقيات النوى (بما في ذلك الكائنات متعددة الخلايا)، بدائيات النوى (البكتيريا والعتيقة)، وتستخدم من قبل الفيروسات لتوليد الجزيئات الكبيرة (الية الحياة).

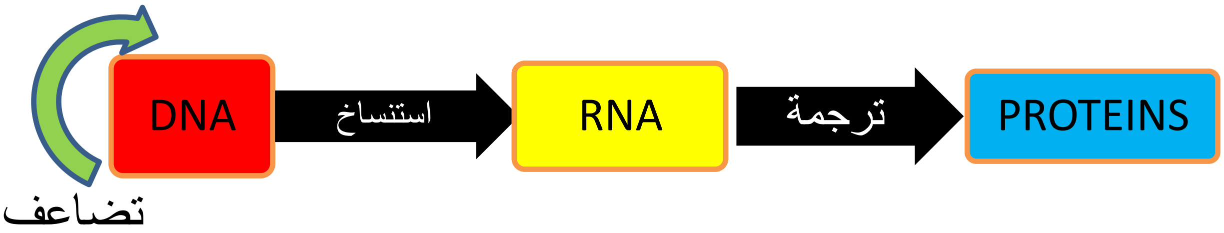
ان جميع البروتينات والانزيمات الموجودة في الخلايا هي نواتج لعملية تعبير الجينات . تترتب مكونات هذه البروتينات بشكل شفرات خاصة بتتابعات معينة تحملها الجينات وعند الحاجة الى نوع معين من البروتينات فان الجين المسؤول او الجينات المسؤولة تقوم بنسخ نفسها ضمن عملية معقدة هي التعبير الجيني ينتج عنها في النهاية البروتين المطلوب.

اي ان عملية التعبير الجيني تتم بخطوتين هما:

1 . **تدعى هذه العملية بالاستنساخ Transcription:** بناء نسخة مماثلة لتتابعات الجين على شكل شريط الحامض النووي الرايبوزي المرسال mRNA. وتحدث هذه العملية في النواة.

2. - **تدعى الترجمة Translation:** يتم خلالها تصنيع سلاسل الببتيدات المتعددة الخاصة بالبروتينات اعتمادا على ما يحمله mRNA من معلومات وتتم هذه العملية في الرايبوسومات المتواجدة في السايتوبلازم.

هذه السلسلة من العمليات الوراثية من التضاعف والاستنساخ والترجمة تعرف بالمبدأ الاساسي او العقيدة الاساسية للوراثة الجزيئية Central Dogma.



اولا- الاستنساخ Transcription

يتم استنساخ RNA في داخل النواة بواسطة انزيم بلمرة ال RNA Polymerase الذي يكون على ثلاث انواع في حقيقية النواة PolyI, PolyII, PolyIII و تختلف من ناحية الوظيفة حيث الانزيم الاول مسؤول عن استنساخ t.RNA الثاني مسؤول عن استنساخ m.RNA اما الثالث يكون مسؤولا عن استنساخ r.RNA.

ان منطقة بدا الاستنساخ تدعى موقع البدأ Initiation التي تحتوي على منطقة المحفز Promoter حيث يعتقد انها توفر المكان اللازم لارتباط انزيم RNA polymerase حيث ان كل جين يحتوي على محفز او Promoter في بدايته .

تبدأ عملية الاستنساخ وفق الخطوات التالية:

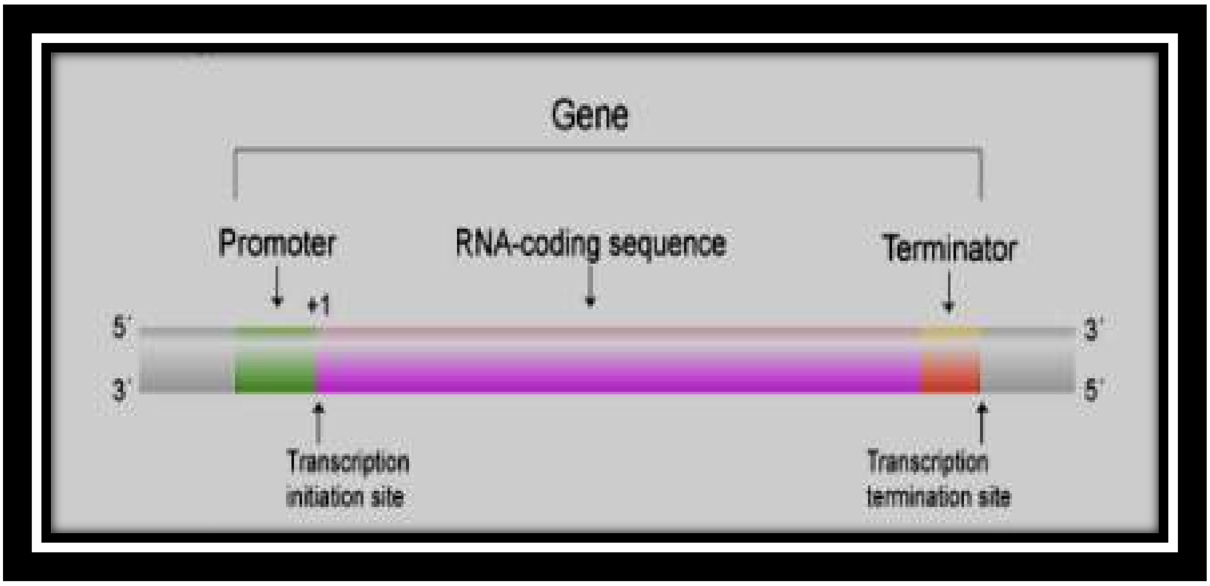
1- مرحلة البدأ initiation: يبدا النسخ بتعرف و ارتباط انزيم RNA polymerase الى المحفزpromoter حيث يعمل على فصل قطعة صغيرة من سلسلتي DNA المراد نسخها و تنفكك سلسلتي DNAعن بعضهما في موقع البدأ (أي قبل المنطقة المراد استنساخها).

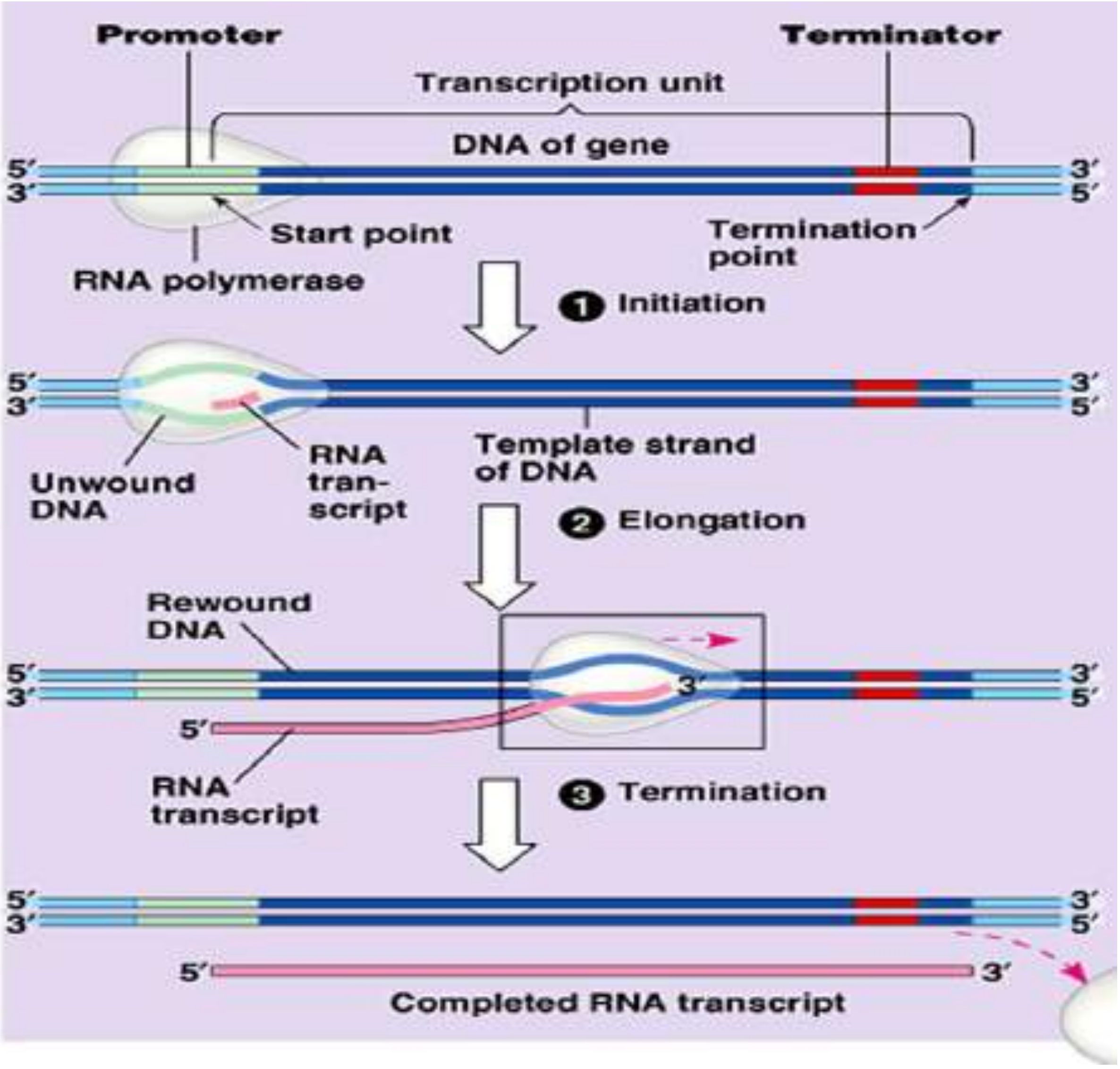
* يتميزRNA Polymerase عن DNA Polymerase بانه يستطيع البدأ بأضافة النيوكلوتيدات بدون الحاجة الى بادئ primer . وايضا بكونه يضيف اليوراسيل U بدل الثايمين T.

2- مرحلة الاستطالة elongation : تبدأ هذه المرحلة بتحرك ال RNA polymerase على شريط الDNA حيث ترتبط نيوكليوتايدات RNA الحرة في السائل النووي مع النيوكليوتايدات المتممة لها في سلسلة الشيفرة في الDNA التي تعمل كقالب حيث ان شريط واحد فقط من الDNA هو الذي يعمل كقالب. تؤدي حركة انزيم RNA polymerase على طول القالب الى نمو وتطاول RNA في الاتجاه 5 ⟵ 3 و اضافة النيوكلوتيدات.

*تبتعد سلسلة ال RNA عن القالب DNA ليعود الارتباط مرة أخرى بين سلسلتي DNA الدنا في موضع الانفصال.

3- مرحلة الانتهاء: Termination : تتوقف اضافة النيوكلوتيدات عند الوصول الى اشارة التوقف Terminator وعند الوصول الى هذه الاشارة مباشرة ينفصل انزيم البلمرة RNA poly عن الشريط القالب وعن شريط RNA الذي تم بناءه.


Gene
Promoter
RNA-coding sequence
Terminator
+1
5′
3′
3′
5′
Transcription initiation site
Transcription termination site


Promoter
Terminator
Transcription unit
DNA of gene
Start point
Termination point
RNA polymerase
1 Initiation
Unwound DNA
RNA tran-script
Template strand of DNA
2 Elongation
Rewound DNA
RNA transcript
3 Termination
Completed RNA transcript

عمليات ما بعد الاستنساخ Post transcription processing :

ان الـmRNA الناتج من عملية الاستنساخ مباشرة يكون غير ناضج ويسمى precursor mRNA (pre-mRNA) حيث يكون غير فعال ولا يتم ترجمته الى بروتين. يعاني pre mRNA عدد من التحويرات ليصل الى الشكل النهائي الفعال mature mRNA. وتشمل هذه العمليات التالية:

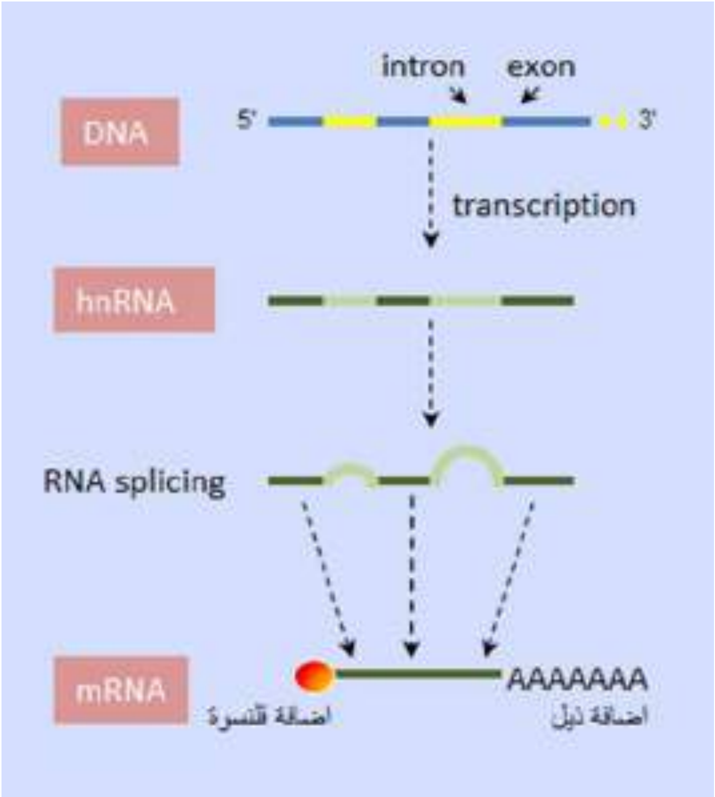
1- 5' capping اضافة قبعة او الغطاء او القلنسوة
2- 3' polyadenylation اضافة ذيل الادنين
3- splicing التوصيل (إزالة الانترونات)

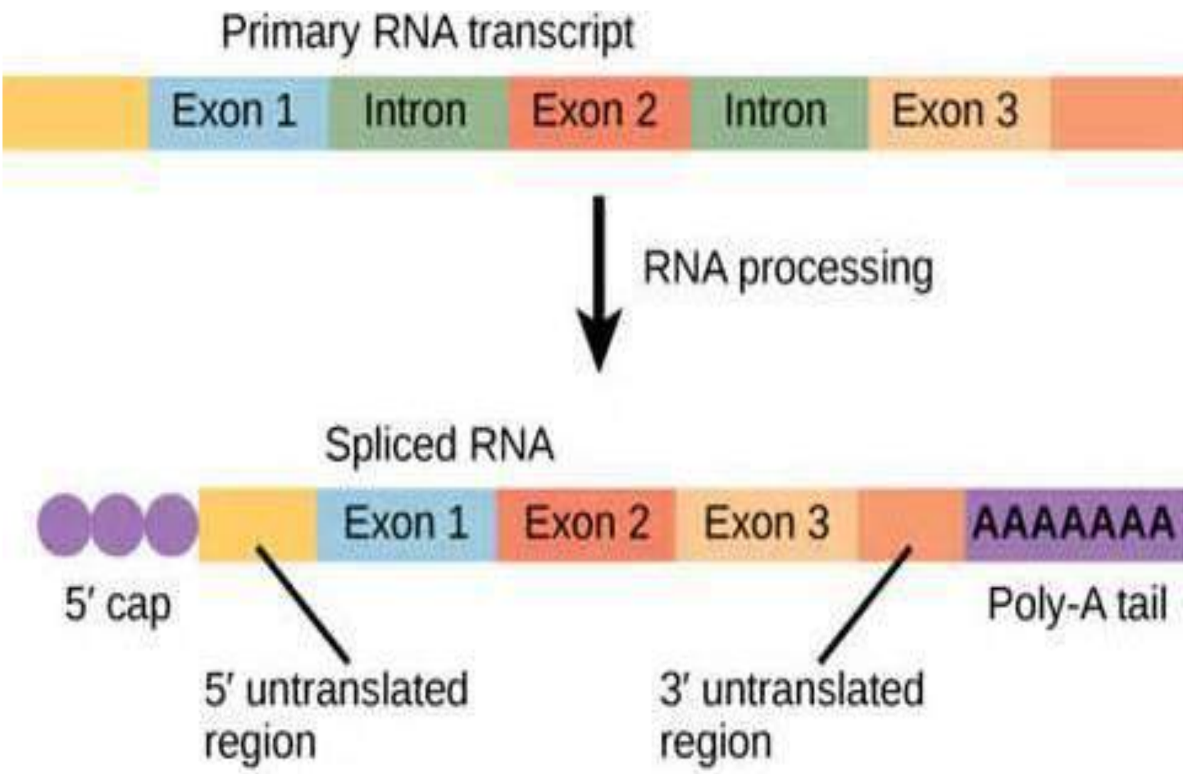
تتضمن عملية الـ 5' capping إضافة 7-methylguanosine الى بداية الـ mRNA عند الطرف 5'.

وتتضمن عملية الـ 3' polyadenylation إضافة 200- 250 نيوكليوتيده من الأدنين عند الطرف 3' لتكون ما يسمى بالذيل متعدد الأدنين Poly A tail . والفائدة من هذه الاضافات هي حماية الmRNA من التحلل بواسطة الانزيمات الحالة عند الخروج من النواة الى السايتوبلازم و تقوم هذه القلنسوة بتسهيل ارتباط جزيئات الـ mRNA حقيقية النواة بالرايبوسوم عند عملية بدء الترجمة.

يحتوي الحمض النووي غير الناضج على اكسونات Exons وهي المناطق المشفرة وانترونات Introns وهي مناطق غير مشفرة خلال عملية التوصيل splicing يتم ازالة الانترونات وربط الاكسونات المتجاورة مع بعضها البعض وهذه خطوة مهمة لإنتاج الحمض النووي الريبوزي الناضج. التوصيل يتم بالتزامن مع العمليتين السابقتين اضافة القبعة والتذييل).

وتتم هذه العملية بواسطة مايسمى بـ Spliceosomes التي تتكون من بروتينات بالإضافة الى snRNA الذي يميز المنطقة التي يحدث عندها فصل الانترون


intron
exon
DNA
5'
3'
transcription
hnRNA
RNA splicing
mRNA
AAAAAAA
اضافة قلنسوة
اضافة ذيل


Primary RNA transcript
Exon 1
Intron
Exon 2
Intron
Exon 3
RNA processing
Spliced RNA
Exon 1
Exon 2
Exon 3
AAAAAAA
5′ cap
Poly-A tail
5′ untranslated region
3′ untranslated region

الهندسة الوراثية Genetic Engineering

وتعرف ايضا بتقنية توليف الدنا recombinant DNA technology او الدنا المأشوب او التعديل الوراثي تعرف الهندسة الوراثية على أنها التلاعب انساني مباشر بالمحتوى الوراثي لكائن معين من اجل تغيير صفاته الوراثية، وأحيانا تعرف على أنها مصطلح علمي يعبر عن التقنية التي تستغل للتحكم في بعض مورثات الخلية لتغير صفاتها الوراثية وتحفيزها للعمل باستخدام الطرق المختبرية.

وهي لا تشمل التربية التقليدية للنباتات والحيوانات والتطفير وتتم باستخدام التقنيات البايلوجية والDNA الجديد يسمىRecombinant DNA او المعاد التركيب (هو شكل من أشكال الحمض النووي الصناعي الذي تم إيجاده عن طريق دمج سلسلتين أو أكثر لا يمكن تواجدهما في العادة معا) و يعتبر أي كائن حي يتم إنتاجه باستخدام هذه التقنيات كائنا معدلا وراثيا Genetically modified organism (GMO). كانت البكتيريا هي أول الكائنات التي تمت هندستها وراثيا في عام 1973 ومن ثم الفئران في عام 1974، وقد تم بيع الإنسولين الذي تنتجه البكتيريا في العام 1982 بينما بدأ بيع الغذاء المعدل وراثيا منذ العام 1994.

اهمية الهندسة الوراثية

1- السرعة في نقل المورثات من كائن الى اخر وذلك بمرور اسابيع قليلة ومحددة بدلا من الطريقة السائدة والتقليدية باستعمال التهجين والتربية والتي تحتاج الى سنوات.

2- نقل المورثات بطرق مباشرة ومضمونة النتائج ,حيث لا تسمح بنقل المورثات غير المرغوبة التي تنتقل بالطرق التقليدية.

3- نقل المورثات بوساطة الهندسة الوراثية قضى على البعد النوعي بين الكائنات حيث يمكن نقل صفة مرغوبة من بكتريا الى انسان او نبات.

4- انتاج نباتات ذات اصناف جديدة بصفات جديدة عالية الجودة و انتاج نباتات مقاومة للحشرات او مقاومة للظروف البيئية المختلفة او نباتات حاوية على قيمة غذائية عالية.

5- انتاج حيوانات محورة وراثيا للاغراض العلمية واجراء البحوث عليها كأن تكون ذات قابلية للإصابة بالامراض او زيادة هرمونات النمو فيها او غيرها من الابحاث المختلفة.

خطوات الهندسة الوراثية

1- اختيار وعزل الجينات المطلوبة

الجين المطلوب او الجين الغريب او الهدف (foreign, target) يتم تحديده من خلال تحديد الصفة المطلوب نقلها واي الكائنات تتواجد فيه هذه الصفة وبعد ذلك يتم تحديد الجين المسؤول عن الصفة. يتم استخلاص DNA الكائن الحاوي على الجين المطلوب وينقى من الشوائب (بروتينات او RNA) . يتم تقطيع ال DNA المستخلص بواسطة أنزيمات التقييد (القاطعة) الذي يقطع الحمض النووي إلى أجزاء ويكون الجين المطلوب في احدى القطع وبعد ذلك يتم تضخيم الجين باستخدام تقنية الPCR.

- يجب توفير وسيلة مناسبة لتقطيع جزيئة الـ DNA الغريبة للحصول على قطعة DNA صغيرة قابلة للتهجين وتحتوي على الجين المرغوب وكذلك لقطع الناقل مرة واحدة لجعله مناسبا لقطعة الدنا الغريبة. تستخدم انزيمات التقييد Restriction enzymes لهذا الغرض (كما تم شرحها سابقا).
- يجب توفير وسيلة مناسبة لربط قطع الدنا الغريبة مع الناقل لتكوين الجزيئة الهجينة Recombinant molecule. عملية الربط بواسط الانزيم الرابط DNA Ligase
- يستخدم الإنزيم الرابط (اللاحم) DNA Ligase المستخرج من العاثي T4 لربط قطع DNA و يتصف الأنزيم بقدرته على لحم الكسور في شريط الدنا عن طريق تكوين الأواصر الفوسفاتية ثنائية الاستر بين مجموعة 3´OH لأحد النيوكليوتيدات ومجموعة 5´P للنيوكليوتيدة المجاورة.

2- إدخال أو تحميل الجين المرغوب في حامل (ناقل) مناسب

يجب توفر ناقل Vector مناسب والحصول عليه بصورة نقية ليتم ربط قطعة الـDNA الغريبة بهذا الناقل. ويتميز كل نوع من النواقل بصفات تميزه عن النواقل الاخرى. وهنالك انواع مختلفة من النواقل المستخدمة لهندسة البكتريا ومنها البلازميدات Plasmids و النواقل المشتقة من العاثي لامدا Lambda phage و الكوزميدات Cosmids والليبوزوم (كريات شحمية liposome) حيث تستخدم لنقل الجينات من والى الكائنات المختلفة.

- **البلازميدات** (والتي تكون عبارة عن جزيئات DNA حلقية تحمل جينات في البكتيريا، وهي منفصلة عن الكروموسوم البكتيري وتكون قادرة على التضاعف الذاتي، وتكون حاوية على مناطق او مواقع التقييد التي تقطع عندها الانزيمات القاطعة وايضا تحتوى على جينات إضافية غير أساسية تساعد على تحسين صفات الكائن الدقيق و تعود بالنفع على بقاء الكائن الحي، على سبيل المثال تحمل البلازميدات جينات المقاومة للمضادات الحيوية وتساعد هذه الجينات الاضافية للبلازميد للتأكد من نجاح عملية نقل الجينات المرغوبة ام لا) وتعتبر البلازميدات من ابسط النواقل عند التعامل معها. مثل بلازميد pBR 322 الذي يحوي جينات المقاومة لكلا من الامبسلين والتتراسايكلين والعديد من مواقع التقييد. البلازميد بصورة عامة يستطيع حمل قطعة دنا تصل طولها 6-9 kp (كيلو قاعدة نايتروجينية).

- **العاثي لامدا λ bacteriophage**: فيروس بكتيري يستطيع حمل قطعة دنا ما بين 8-20 كيلو زوج قاعدة . مادته النووية عبارة عن جزيئه دنا خطية مزدوجة ذات طول 49 كيلو زوج قاعدة يمكن ان ينحشر بها الدنا المرغوب في عدة مواقع تقييد. ويحتوي على نهايات لاصقة Sticky ends (COS) حيث يوجد في كل نهاية نتوء قصير لأحد الخيطيين مكون من 12 نيوكليوتيدة وان تسلسل القواعد النتروجينية لهذين النتوئيين مكملان لبعضهما. وهو يحمل 50 مورثة (جين) نصفها ضروريا لنمو وتضاعف العاثي. اما الباقي

يمكن استبداله (المورثات الغير ضرورية في دنا العاثي) بقطعة دنا مرغوبة ومن ثم يمكن تنمية العاثي الهجين وتكثيره داخل الخلية البكتيرية، وعند دخوله إلى خلية المضيف ترتبط النهايتان اللاصقتان يبعضهما لتكوين ما يعرف بموضع اللصق Cohesive (cos) site. وتتميز العاثيات كنواقل بإمكانية خزنها لوقت طويل وبشكل ملائم وتحمل قطعة دنا يصل طولها الى 9-20 kp.

- **الكوزميدات Cosmids Vector** وهي عبارة عن ناقل كلونة هجين مشتقة من البلازميد البكتيري ودنا العاثي لمدا إذ يحتوي على موضع COS (نهايات لاصقة مشتقة من العاثي لمدا) وكذلك على صفة مظهرية واحدة ومنشأ للتضاعف وكذلك مواقع حساسة مفردة لعدد من الأنزيمات القاطعة وتتميز بصغر حجمها ويمكنها حمل جزيئة دنا مرغوبة حجمها 35-50 كيلو زوج قاعدة.
- **النواقل الكروموسومية الصنعية Artificial Chromosomes** يوجد نواقل مصممة على شكل كروموسوم وفيها القطع الأساسية لكي تعمل على شكل كرموسوم ومن هذه الأنواع ما يعرف بالياك (YAC) كرموسوم الخميرة الصنعي (Yeast Artificial Chromosome / YAC) ويحوي السنترومير والتيلومير وتمتلك كذلك مواقع لأنزيمات التقييد و واسمات وراثية بحيث يمكن تعقبها وانتقائها. حيث يقطع الانزيم القاطع بين السنترومير والتيلومير ليسمح بحشر قطعة الدنا الجديدة. والذي يستطيع نقل أكثر من 100-200 kp وبإمكانه ان يتضاعف بجانب الكروموسومات الحقيقية. كذلك الباك البكتيري (Bacterial Artificial Chromosome /BAC) الذي يستطيع حمل اكثر من 300 kp وهو تحوير للبلازميد المعروف (E. coli fertility plasmid – F factor).

3- ادخال الناقل في الخلايا المراد تعديلها

يجب توفر وسيلة يمكن من خلالها ادخال الجزيئات الهجينة الناتجة عن عمليات الربط الى خلايا الكائن المضيف ويمكن لهذه الجزيئات ان تديم نفسها في المضيف وتتوارث بثبات في الأجيال

المتعاقبة ومن اكثر الطرق المستخدمة هي طرق الانتقال الطبيعي المتواجدة في البكتيرية والفايروسات وكما ياتي:

أ- طريقة التحول Transformation وهي النقل الجيني الناتج من اخذ الدنا العاري (فقط الدنا) من قبل الخلية المستلمة يمكن ان يكون من خلايا اخرى لنفس النوع البكتيري او من انواع اخرى او من خلايا ميتة حيث من الممكن ان ينحشر الدنا الغريب في كروموسوم الخلية المستلمة. وتحدث هذه الظاهرة اما بصورة اعتيادية في بعض الخلايا البكتيرية او بواسطة استحثاثها ببعض المواد الكيميائية مثل اضافة كلوريد الكالسيوم الى الوسط الغذائي.

ب- طريقة التوصيل بالعاثي Transduction هو انتقال المادة الوراثية من البكتيريا الواهبة الى البكتيريا المستلمة عن طريق العاثيات البكتيرية.

ت- طريقة الاقتران conjugation (وهي طريقة نقل الدنا من الخلية البكتيرية الواهبة او الذكر الى الخلية البكتيرية المستلمة او الانثى) وتتم عملية الاقتران البكتيري من خلال بلازميدات الخصوبة F plasmid التي تكون حاوية على جينات خاصة لتكوين الاهلاب الجنسية في الخلية الواهبة والتي ترتبط مع الخلية المستلمة الفاقدة لهذه الاهلاب لافتقارها لبلازميد F plasmid.

ث- تستخدم طرق صناعية لنقل الجينات الى الخلايا المستلمة كالحقن المجهري و بندقية الدنا.

4- الكشف عن الكائنات المعدلة وراثيا

بعد ادخال الجزيئات الهجينة الى خلايا المضيف يجب توفر طريقة ملائمة لانتقاء الخلايا المستقبلة للجزيئة الهجينة الحاملة للجين المرغوب وتمييزها عن الاعداد الهائلة من الخلايا المستقبلة الاخرى التي فشل فيها ادخال الدنا المرغوب وهنا توجد حاجة لمعرفة الخلايا التي تحولت فعلا. وهنا تأتي فائدة الواسمات الوراثية كجينات المقاومة للمضادات الحياتية التي توجد في اغلب

النواقل.

5- تنمية الخلايا في الاوساط الزرعية

بعد الحصول على الخلايا الحاوية على الجين الهجين يمكن انمائها في وسط زرعي مناسب للحصول على اعداد هائلة منها. بمعنى اخر سوف يتم الحصول على الجين المرغوب باعداد هائلة و الذي يوجد بشكل نسخة واحدة في الكائن الاصلي وعندها سيكون من السهولة عزل الجين المرغوب من هذه الخلايا لاجراء الدراسات المختلفة عليه.

تنظيم التعبير الجيني

Regulation of gene expression

هو مجموعة متنوعة من الآليات المستخدمة من قبل الخلايا لزيادة أو إنقاص نواتج جينية محددة (بروتين أو رنا). ووجد ان الجينات لا تعبر في ان واحد وانما حسب حاجة الكائن الحي وما يتأثر به من مؤثرات داخلية وخارجية. والتنظيم الجيني مهم جدا لإعطاء كل خلية تخصص معين يختلف عن الخلايا الاخرى.

تنظيم التعبير الجيني في بدائية النواة :

تم دراسة سيطرة على التعبير الجيني او تنظيمه في بكتيريا القولون E.coli دراسة مكثفة من قبل العالمين Jacob وMonod ، وجد ان الجينات لا تعبر عن نفسها باستمرار اذا يمكن تنظيم تعبير أي جين عند مستويين اما عند مستوى الاستنساخ او عند مستوى الترجمة او ما بعدها أي ان هذه الجينات اما ان تشغل on او تتوقف off، في الغالب السيطرة في بدائية النواة تكون عند مستوى الاستنساخ أي يتم تنظيم التعبير الجيني في بدائية النواة عموما عن طريق السيطرة على عملية الاستنساخ أي تكوينmRNA .

ويمكن تقسيم الجينات الى ثلاثة أنواع حسب طبيعة تعبيرها الى:

أولا: الجينات ذات التعبير الاساسي Constitutive expression gene : وهي الجينات التي يعبر عنها بشكل مستمر وعلى مدى عمر الكائن الحي او الخلية، مثل الجينات التي تعبر عن انزيمات المسارات الايضية كمسار دورة كربس Krebs cycle لإنتاج الطاقة.

ثانيا: التعبير الجيني المستحث Inducible expression gene : وهي الجينات التي تحفز للتعبير عند توفر محفزات خارجية وتكون عادة مسؤولة عن الانزيمات للعمليات الايضية الهادمة catabolic enzymes مثل السكريات المعقدة والمتعددة والثنائية كاللاكتوز والسكروز كما في البكتريا.

ثالثا: التعبير الجيني الكابح Repressible expression gene : وهي الجينات التي تعطل عند توفر مثبطات داخلية وتكون مسؤولة عن الانزيمات للعمليات الايضية البنائية enzymes biosynthetic or Anabolic كما في الجينات التي تعبر عن الاحماض الامينية التربتوفان او الارجنين وغيرها.

وجد على شريط الـ DNA في بكتيريا القولون مواقع متعددة عنقودية اطلق عليها الاوبرون Operon،والتي تتكون من مجموعة من الجينات وتقع تحت سيطرة مشغل واحد operator site في نفس الشريط . وهذه الجينات ممكن ان تقسم الى :

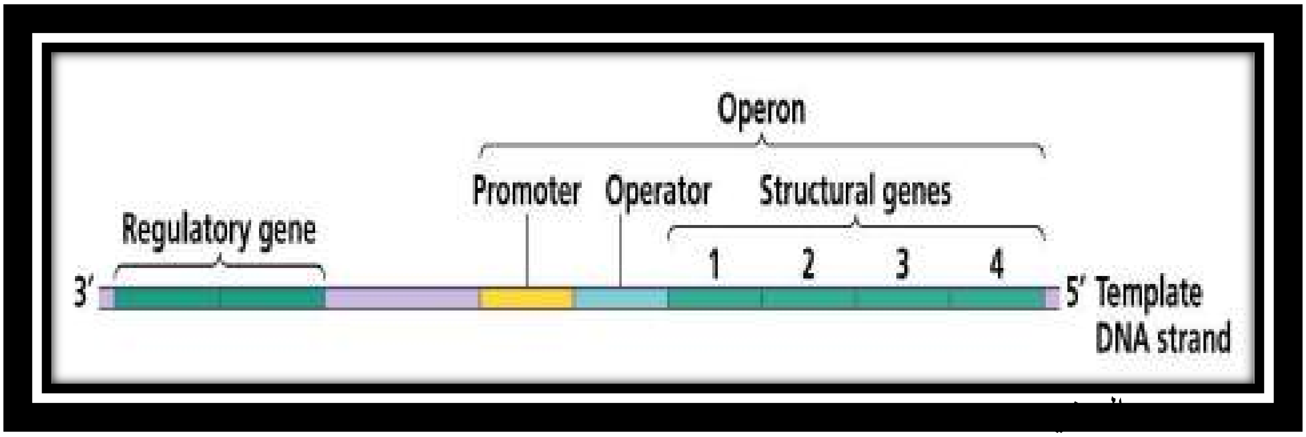
1- جينات تنظيمية Regulatory gene هذه الجينات تترجم بروتين الكبح Repressor protein او البروتين المنشط activator protein . الذي يرتبط بالمشغل.

2- جينات تركيبية Structural gene تترجم البروتينات المطلوبة للتفاعل الحيوي

وايضا يحتوي الاوبيرون على موقعين من مواقع السيطرة وهما

أ – المحفز Promoterموقع يرتبط به انزيمPolymerase RNA

ب - المشغل Operator موقع يرتبط به البروتين الكابح المنتج من قبل الجين المنظم.



التعبير الجيني المستحث Inducible expression gene

مثال عليه Lactose operon (Lac operon) والذي يكون فيه سكر اللاكتوز كإشارة محفزة inducer لعملية الاستنساخ ثم الترجمة. ان هذا الاوبرون مهم لنقل و استعمال اللاكتوز في العمليات الايضية لبكتيريا القولون والكثير من البكتيرية المعوية الاخرى حيث ان هذه البكتيريا تستخدم اللاكتوز كمصدر للكاربون عند عدم توفر الكلوكوز في الوسط.

مشغل نظام اللاكتوز lac operon

يتألف هذا النظام من ثلاث جينات تركيبيه (تشفر لبروتينات ضرورية للوظائف الطبيعية للخلية) هذه الجينات تشفر لمجموعه من الانزيمات الضرورية في ايض اللاكتوز وهي

*** lacZ يشفر لانزيم β- galactosidase الذي يعمل على شطر جزيئة اللاكتوز (سكر ثنائي) الى كلوكوز وكالكتوز.

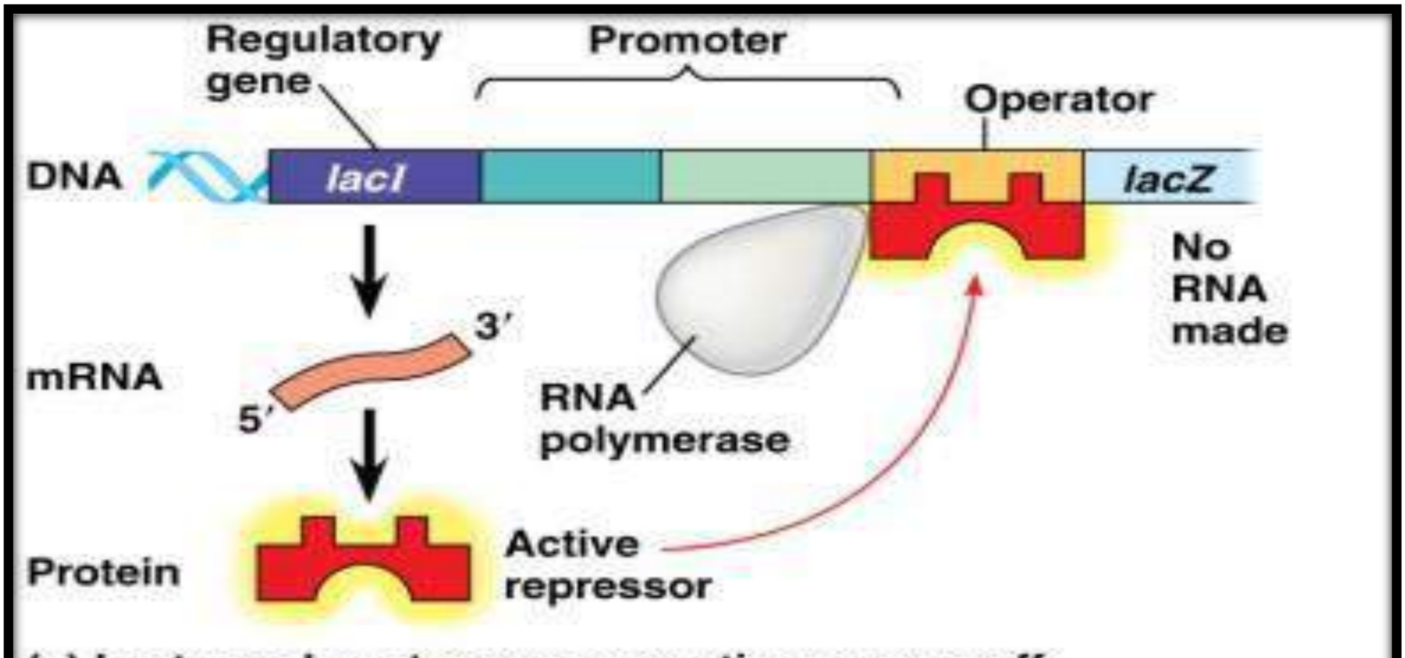
*** lacY ويشفر لبروتين B-galactoside permease يعمل على نقل اللاكتوز الى داخل الخلية البكتيرية

*** lacA ويشفر لانزيم thiogalactoside transacetylase الذي يعمل على ازالة سمية المواد الوسطية الناتجة من العمليات الايضية واخراجها خارج الخلية.

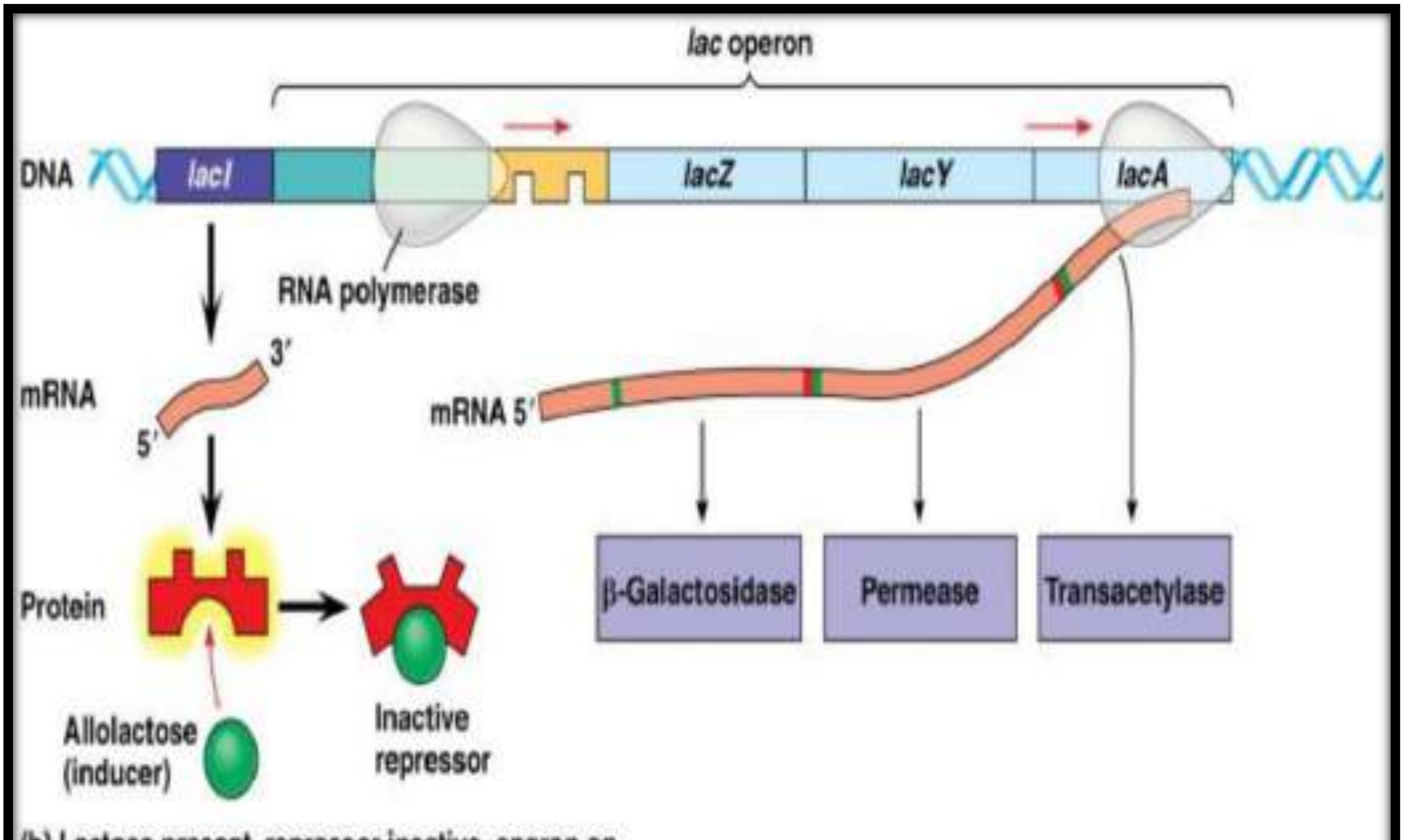
في حين تشفر المنطقة المنظمة الجينات المنظمة (lacI) بروتين يدعى بالكابح repressor الذي بدوره يرتبط مع تسلسل معين من القواعد النتروجينية على شريط الدنا والذي يدعى بالمشغل operatorوالذي يكون موقعه مجاور للجينات التركيبية. اما انزيم بلمرة الرنا polymerase RNAالذي يشرع في عملية الاستنساخ يرتبط بالمحفزpromoter .

-وهذا يتضمن حالتين: الحالة الاولى، في حالة غياب سكر اللاكتوز في الوسط الغذائي، يرتبط بروتين الكابح بالمشغل operator ويمنع ارتباط انزيم بلمرة الرنا بالمحفز promoter لعمل شريط mRNA. وبهذا يتوقف استنساخ جميع الجينات التركيبية (A,Z,Y).

اما الحالة الثانية، هي وجود سكر اللاكتوز(يعتبر الحاث inducer) وفيه يتحول اللاكتوز الى allolactose الذي يرتبط بالكابح ويمنع ارتباطه بالمشغل. حينها يتم استنساخ الجينات التركيبية بواسطة انزيم بلمرة الرنا positive regulation of the lac operon .



(a) Lactose absent, repressor active, operon off



(b) Lactose present, repressor inactive, operon on

© 2011 Pearson Education, Inc.

التعبير الجيني الكابحRepressible expression gene

مثال عليه اوبرون التربتوفان Tryptophan operon والذي يكون فيه الحامض الاميني التربتوفان عامل محفز للكبح يطلق عليه CO repressor أي يحول الكابح من خامل الى نشط وفعال في كبح انزيم RNA polymerase أي ان عملية السيطرة في هذا النوع من الاوبرون سلبية negative. مشغل نظام التربتوفان Tryptophan operon يحتوي خمس جينات تركيبية وهي

Trp A,

Trp B,

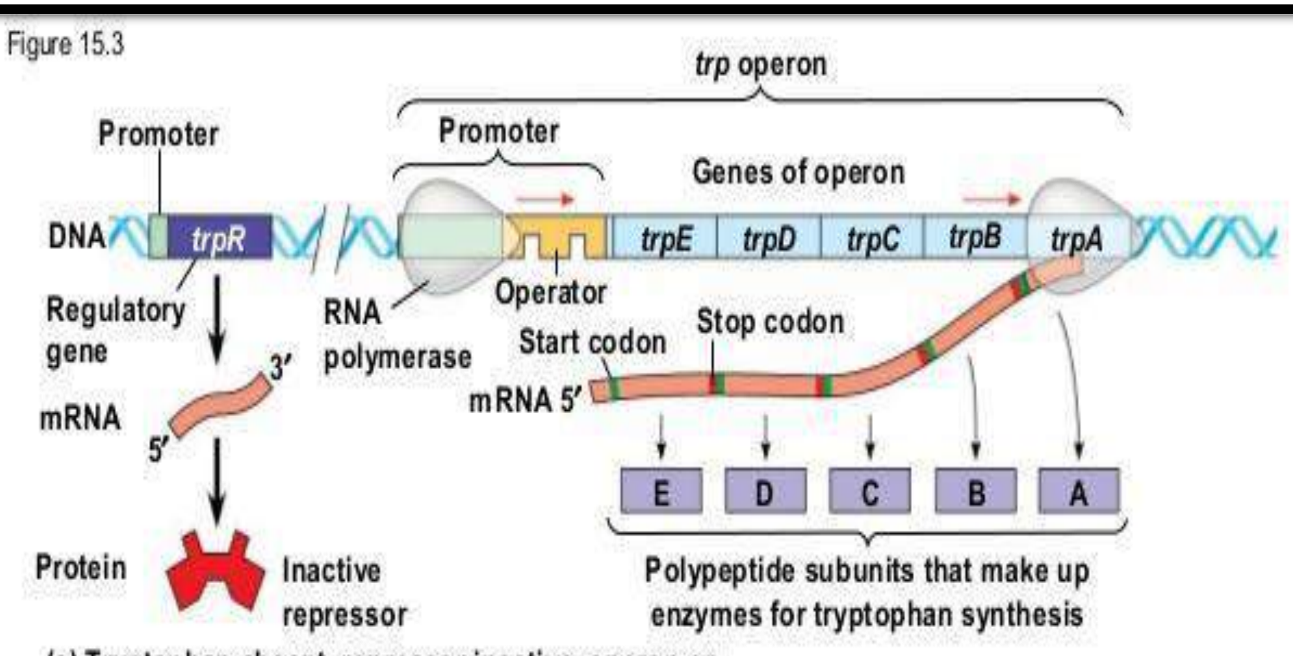
Trp C

Trp D

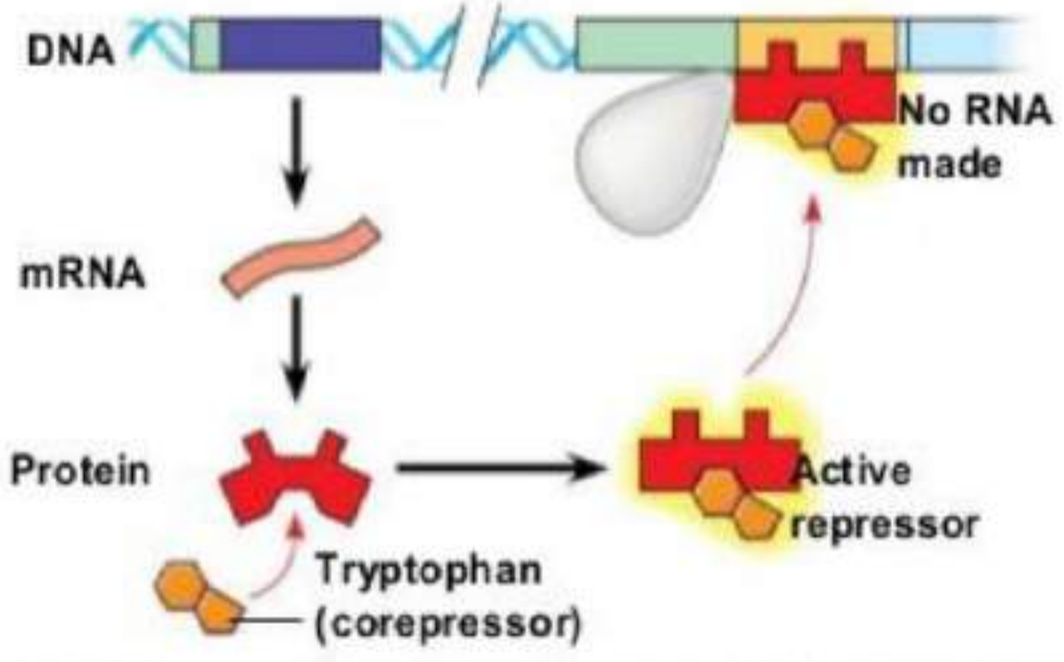
TrpE

تشترك هذه الجينات الخمس في انتاج ثلاث انزيمات تحول مركب ال chorismate الى تربتوفان . يقع المحفز في promoter اعلى الجينات التركيبية، يقع الجين التنظيمي Trp R المشفر لبروتين الكابح repressor على مسافه بعيدة عن المشغل . ويتم تنظيم التعبير الجيني في هذا المشغل من خلال الميكانيكية التالية :

اولا في حالة غياب التربتوفان ، يكون الكابح غير فعال وبذلك يرتبط انزيم بلمرة الرنا بموقع المحفز مستنسخا الجينات التركيبة والتي يتم ترجمتها الى انزيمات تحول ال chorismate الى تربتوفان . الحالة الثانية وهي وجود التربتوفان في الوسط، عندها يرتبط التربتوفان بالكابح وينشطه وبذلك يرتبط بالمشغل operator وبذلك يتوقف الاستنساخ.



(a) Tryptophan absent, repressor inactive, operon on



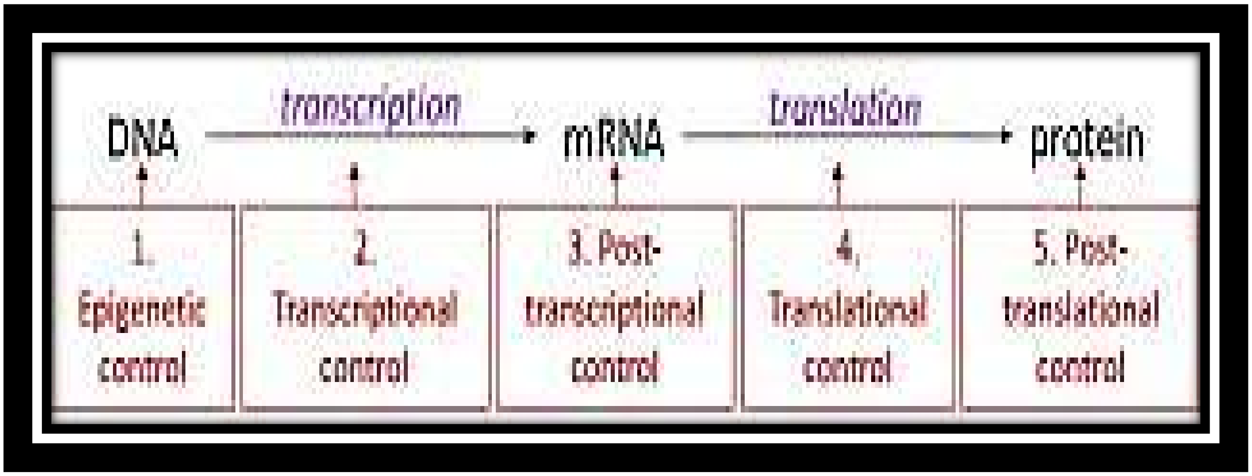
(b) Tryptophan present, repressor active, operon off

© 2014 Pearson Education, Inc.

تنظيم التعبير الجيني في الخلايا حقيقية النواة

يتم تنظيم التعبير الجيني في الخلايا المختلفة للكائنات حقيقة النواة باليات معقدة ومختلفة بين خلية واخرى ونسيج واخر. وايضا يحدث التنظيم الجيني بمستويات مختلفة كما موضح:

1- يحدث التنظيم على مستوى الDNA
2- يحدث التنظيم بالتحكم في الشروع بالاستنساخ من عدمه Transcription
3- التنظيم على مستوى التحكم بالmRNA واماكن التشذيب (Intron and Exons)
4- التحكم بالترجمة Translation أي هل الmRNA سيعطي ناتج وظيفي ام لا
5- التحكم بعمليات ما بعد الترجمة و التحورات التي تحصل للبروتين الفتي.



الحمض النووي الرايبوزي منقوص الأكسجين

Deoxyribonucleic acid (DNA)

هو أحد الجزيئات الحيوية والذي يحتوي على التعليمات الجينية او الوراثية التي تصف التطور البيولوجي للكائنات الحية ومعظم الفيروسات كما أنه يحوي التعليمات الوراثية اللازمة لأداء الوظائف الحيوية لكل الكائنات الحية. يعتبر وسيلة التخزين الطويل الأجل للمعلومات الوراثية وهي الوظيفة الأساسية لجزيئات الدنا بالإضافة إلى أنه يمكن من خلال هذه الجزيئات الحصول على المعلومات اللازمة لبناء البروتينات والحامض الريبوزي النوويRNA . كما ان لل DNA القدرة على نسخ نفسه وكذلك له القدرة على تصحيح الاخطاء ان حدثت بسرعة فائقة بواسطة عملية تعرف بالاصلاح repairing.

اكتشف الDNA في عام 1868 الا ان موقعه لم يكن معروفا حتى العام 1924 حيث نشرت طريقة صبغ الDNA اطلق عليها طريقة فولجين للصبغ حيث وضحت وجود الDNA في الكروموسومات (الصبغيات) والذي يسمى بالجينوم genome المحتوى الجيني أو الصبغي للخلية سواء كانت خلية حيوانية او نباتية او اي كائن حي اخر.

كما اظهر كمية منه تقع خارج نوى الخلايا على الاخص في الخلية البكتيريا حيث ظهر على هيئة حلقة تدعى البلازميدات وكذلك كميات تقع في المايتوكوندريا ويدعى يالmtDNA او المايتوكوندريي وايضا وجد في البلاستيدات ويدعى بالبلاستيدي plastid DNA.

هل ان الحامض النووي منقوص الاوكسجين هو المادة الوراثية ؟

تم التعرف على التركيب الكيميائي للحامض النووي منقوص الاوكسجين قبل اكثر من 100عام بعد فترة قصيرة من اكتشافه في عصارة نوى خلايا الكريات البيضاء عام 1868 من قبل العالم فريدريك ميستشير والذي اطلق آنذاك تسمية النيوكلين. لقد جذبت تلك العصارة الانتباه لما تمتلكه من محتوى عالي من الفسفور وطبيعتها الحامضية الا انها لم تجذب الانتباه الى دورها الوراثي حيث كان معظم الانتباه مركز في بداية هذا القرن على البروتينات.

التجارب التي اثبتت ان الحامض النووي هو المادة الوراثية

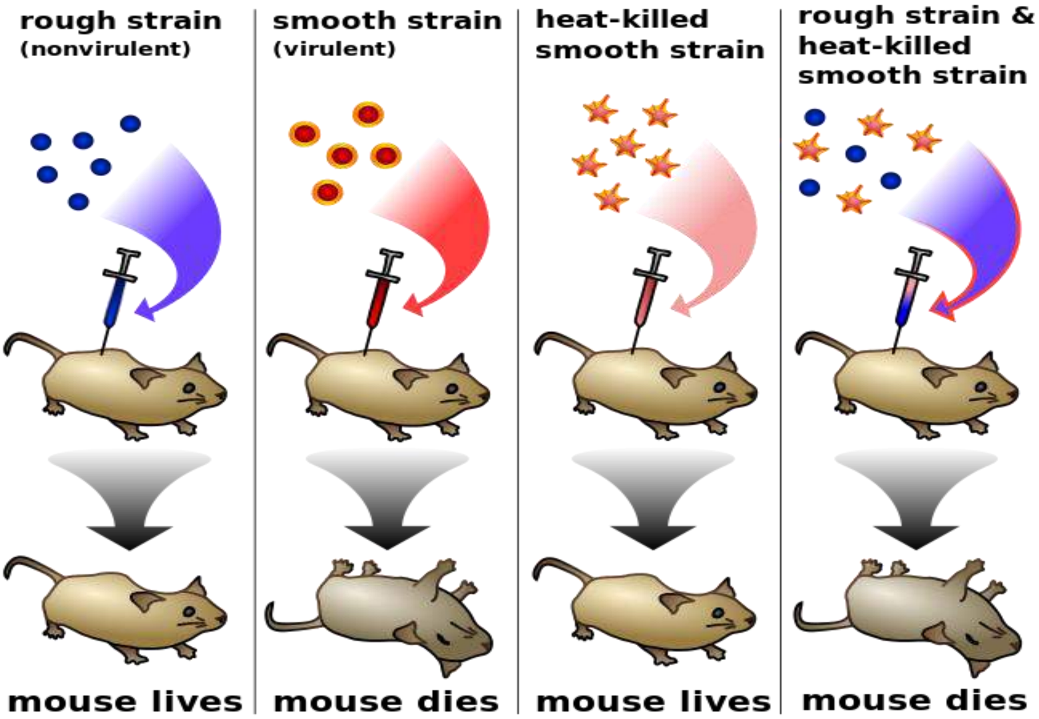
1- تجارب المكورات المسبحية لذات الرئة Streptococcus pneumonia (تجارب كرفثس Griffths)

من المعروف ان هذا النوع من المكورات يسبب اصابة الجهاز التنفسي للبائن بذات الرئة، هنالك نوعين من هذه المكورات

1- يدعى هذا الطراز بالطراز (Type S) ذات ضراوة عالية اي انها ذات إمراضية عالية تأتي هذه القابلية من احتواء هذه المكورات على الكبسولة المتعددة السكر التي تحيط بها، حيث تتميز مستعمراته بكونها ناعمة المظهرSmooth.

2- وتدعى بالطراز (Type R) هذا الطراز من المكورات تفتقد الى الكبسولة نتيجة طفرة وراثية اي انها غير قادرة على اصابة الحيوانات بذات الرئة اي انها غير ممرضة وتتميز مستعمراته بكونها خشنة المظهر Rough.

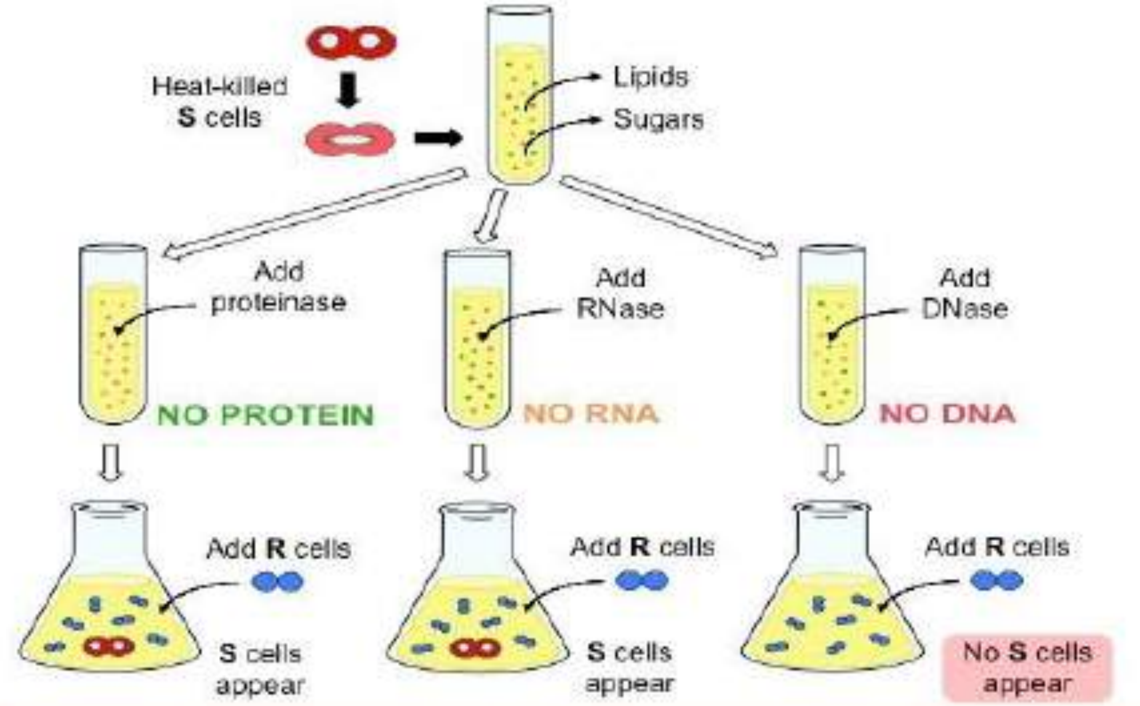
في عام 1928 وجد العالم كرفش بان حقن المكورات الحية من طراز R او المكورات الميتة بالحرارة من الطراز S في جسم الفئران ليس له تاثير على الاصابة بذات الرئة، الا ان حقنها بخليط من المكورات الحية للطرازR ومكورات ميتة من الطرازS ادى الى الاصابة بذات الرئة المرتبطة بالطرازS. ان الفحص الذي تم على البكتيريا المعزولة من دم الفئران اثبتت وجود المكورات ذات الكبسولة وهذه ليس ناتج من طفرة وراثية بسبب احتواء جميع المكورات المعزولة على كبسولة وليس اعداد قليلة فقط كما في الطفرات الوراثية وهو ما وضع الاساس لمبدأ التحول.Transformation principle بينت هذه النتائج بان المكورات الميتة من الطراز S عملت بطريقة ما على اكساب مكورات الطرازR الحية القابلية على مقاومة الجهاز المناعي للفئران والتكاثر واحداث الاصابة بذات الرئة وهذا معناه بان الطرازR امتلكت تغييرا وراثيا مكنها من المقاومة وكان هذا التغيير الوراثي قد جاء من المادة الوراثية للطرازS.



2- تجربة افري، ماكلويد وماكرثي 1944

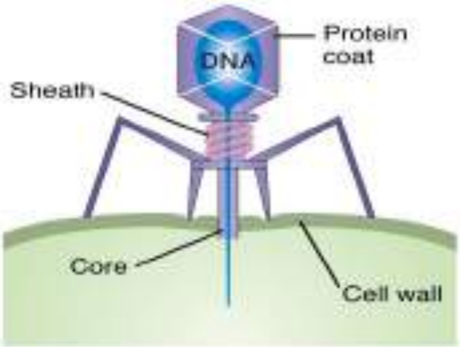
وكانت الخطوة المنطقية التالية هي عزل المادة المسؤولة عن التحول الوراثي في البكتيريا والتعرف عليها كيميائياً والتي كان يعتقد أنها مركب بروتيني إلا أنه لم يثبت أن أياً من البروتينات المعزولة من البكتيريا أدت للتحول الوراثي ، واستمر الحال كذلك حتى عام 1944م عندما تمكن العالم الأمريكي آفري Oswald Avery (وزميلاه مكارتي وماكلويد) من عزل مادة نشطة من سلالة البكتيريا المميتة لها القدرة على إحداث التحول البكتيري والتي أثبت التحليل الكيميائي والفيزيائي فيما بعد أنها عبارة عن حمض DNA .

وقد أثير في أول الأمر اعتراضا على أن DNA ليس هو المادة الوراثية على أساس أن الجزء من DNA الذي سبب التحول البكتيري لم يكن على قدر كاف من النقاوة ، والذي كان به كمية من البروتين هي التي سببت التحول ، إلا أن التجربة الحاسمة قد أجريت عندما تخلصوا من البروتينات بهضمها بإنزيمات محللة مثل التربسين ، وكذلك من RNA بواسطة إنزيم رايبونيوكليز الذي يحطمه ، وحقنوا الفئران بمزيج من DNA المستخلص من خلايا البكتيريا السلالة S مع خلايا حية من السلالة R فماتت الفئران ، وبذلك تأكد لديهم أن إزالة البروتين وRNA لم تأثر في عملية التحول البكتيري ، وهذا يثبت أن المادة التي سببت التحول الوراثي ليست بروتين ولا RNA وإنما هي DNA .



3- تجارب الفريد هيرشي ومارثا تشيس على العاثي T2

في عام 1952 تم نشر بحث يتضمن استخدام النظائر المشعة لدراسة الDNA واثبات كونه المادة الوراثية. قام الباحثان باستخلاص عاثيات (بكتريوفاج) T2 Phage التي تصيب بكتيريا القولون حيث يمسك بها بالياف الذيل ولوحظ أنه بعد حوالي 20 دقيقة من اتصال الفيروس بالخلية البكتيرية أنها تنفجر ويخرج منها حوالي 100 فيروس جديد مكتمل التكوين وعلى ذلك لابد أن المادة التي دخلت إلى البكتيريا تحتوي على جينات

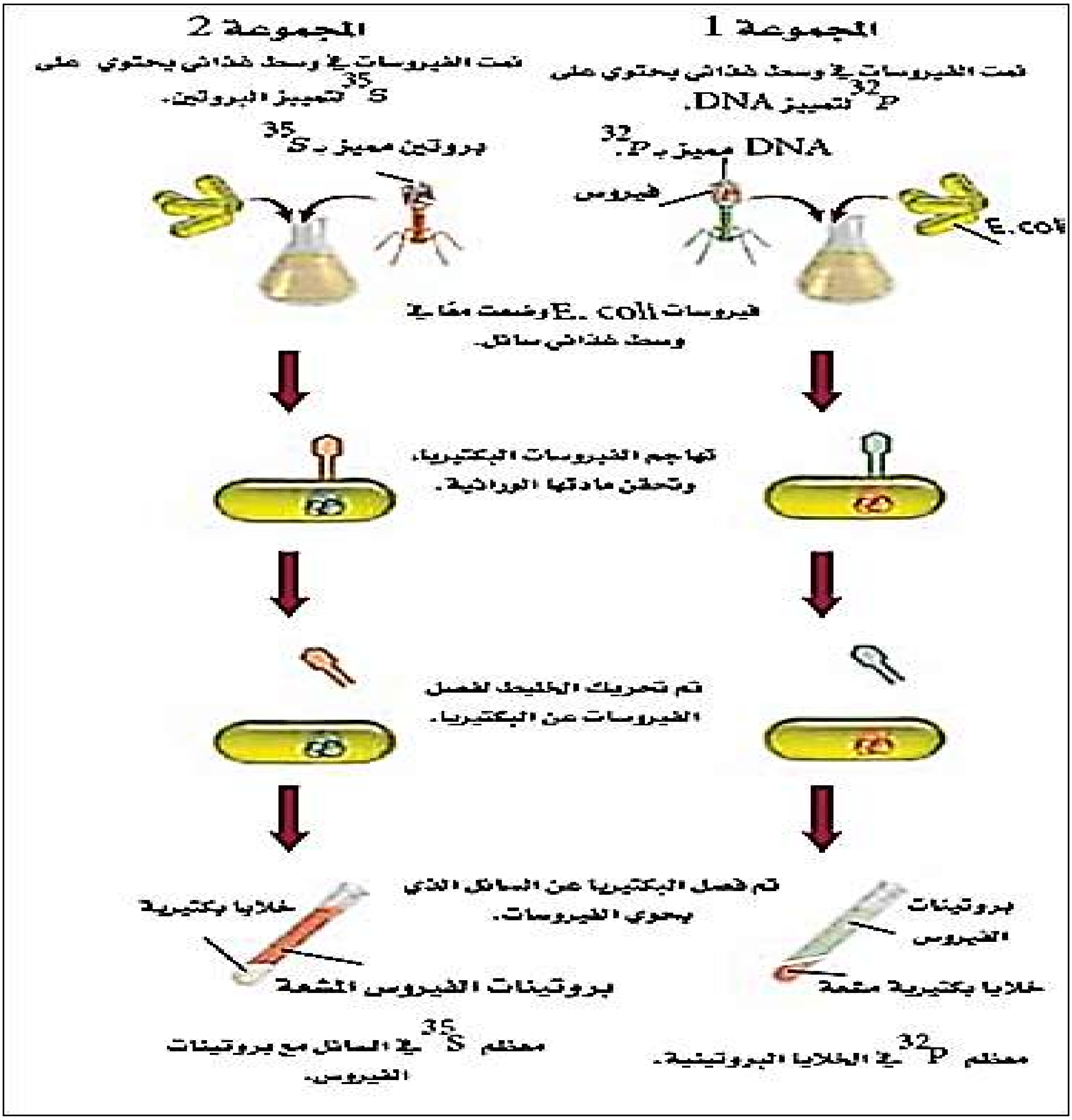


الفيروس، كما أن الغلاف البروتيني لفيروس T_2 لا يدخل البكتيريا . فقام العالمان بتنمية فيروس T_2على غذاء يحتوي على عناصر مشعة لتعليم العاثي حيث ان نظير الكبريت 35(S^{35}) يرتبط فقط مع البروتين لوجود

الكبريت في تركيبه، و نظير الفسفور 32 (P^{32}) الذي يرتبط فقط مع الحامض النووي لوجود الفسفور في تركيبه الكيميائي. ثم سمحا للفيروس بمهاجمة الخلية البكتيرية وبعد ذلك تم ازالة المواد العالقة بجدران الخلايا البكتيريا عن طريق الخلط مع وسط زرعي سائل دون الاضرار في خلايا البكتيريا ثم ترسيب البكتيريا بواسطة جهاز الطرد المركزي.

تم فحص الراشح والراسب فوجد ان الراشح يحتوي على نسبة عالية من بروتين العاثي وهو خالي من الحامض النووي اما الراسب فكان يحتوي على البكتيريا وكمية كبيرة من الحامض

النووي ، كما وجدوا ان الاجيال الجديدة للعاثي T2 الناتج من التجارب يحتوي فقط على DNA المعلم ولا اثر لاي نشاط اشعاعي لنظير الكبريت S^{35} حيث اثبتت هذه التجربة بما لا يقبل الشك ان ال DNA هو المادة الوراثية المسؤولة عن نقل الصفات.



مميزات المادة الوراثية

1- تكون ثابتة ومستقرة وان تنقل بصورة امينة من خلية الى اخرى ومن جيل الى اخر.
2- القدرة على حمل وتخزين المعلومات الوراثية الوظيفية الكافية لتحديد الخصائص المظهرية والتركيبية للكائن الحي.
3- القدرة على التعبير عن المعلومات الوراثية المخزنة لإنتاج الجزيئات الحيوية المهمة كالبروتينات والانزيمات..
4- إمكانية التضاعف الذاتي بشكل دقيق وتنقسم على نحو متساوي والانتقال من جيل لآخر.
5- القدرة على التباين والتنوع الكبير وهذا الشرط يبدو متناقض مع صفة الثبات حيث ان التطور يشترط ان تكون المادة الوراثية لها القدرة على التغيير حتى وان كان نادرا وهناك مصدرين للتغاير هما الطفرات والاتحادات الجديدة.

تركيب ال DNA

يتألف الDNA من عدد هائل من النيوكلويتيدات اي انه بوليمر للنيوكلوتيدات والتي تتكون بدورها من ثلاثة أجزاء هي:

1- قاعدة نتيتروجينية Nitrogen base.
2- سكر خماسي منقوص الاوكسجين Pentose sugar .
3- مجموعة الفوسفات Phosphate group (PO_4).

يوجد مجموعتين من القواعد النيتروجينية في الأحماض النووية هما:

أ- قواعد البيورين Purines ثنائية الحلقة وتشمل قاعدتي الأدنين Adenine (A) والجوانين Guanine (G).

ب- قواعد البيروميدين Pyrimidines أحادية الحلقة وتشمل ثلاث قواعد هي: الثايمين Thymine (T) والسيتوسين Cytosine (C) واليوراسيل Uracil (U).

يحتوي جزيء الDNA على أربع قواعد نيتروجينية هي الأدنين (A) والثايمين (T) والسيتوسين(C) والجوانين(G).

أن جزئ الدنا في الكائنات بدائية النواة Prokaryotic يختلف عن الدنا في الكائنات حقيقية النواة Eukaryotic في عدة نواحي يمكن إيجازها في النقاط التالية من الجدول التالي:

مقارن بين DNA بدائيات النواة وDNA حقيقيات النواة

DNA بدائيات النواة	DNA حقيقيات النواة
شريط حلزوني مزدوج دائري Circular double helix	شريط حلزوني مزدوج خطي Linear double helix
غير مدعوم ببروتينات نووية	مدعوم ببروتينات نووية histone
يكون الدنا جزئ وحيد كروموسوم واحد	يكون الدنا عديد الجزيئات عديد الكروموسومات
يحتوي على نيوكليوتيدات قليلة	يحتوي على نيوكليوتيدات كثيرة جداً
عدد المورثات قليل	عدد المورثات كبير جداً

إن التركيب الأساسي للدنا يتكون من تسلسل أو تتابع عدد كبير من النيوكليوتيدات (بوليمر) لكل من شريطي strands الدنا هذه السلسلتان ترتبطان مع بعض عبر اواصر هيدروجينية وحسب قواعد شاراجاف (Charagaffs rules) كالتالي:

1- ترتبط دائماً قاعدة الادنين (A) مع قاعدة الثايمين (T) برابطتين هيدروجينيتين (A = T).

2- ترتبط قاعدة السيتوسين (C) مع قاعدة الجوانين (G) بثلاث روابط هيدروجينية (G ≡ C).

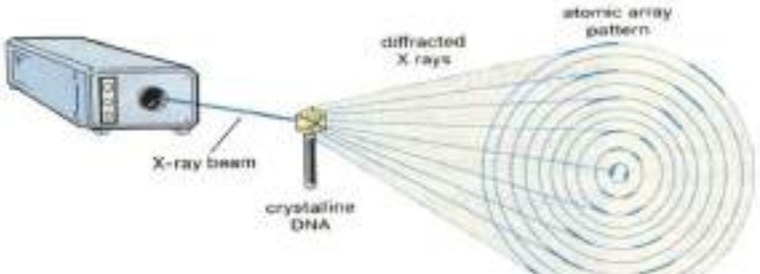
3- أن كمية الادنين تساوي كمية الثايمين (A = T) وكمية الجوانين تساوي كمية السيتوسين (G = C)

أن كمية الادنين والجوانين تساوي كمية الثايمين والسيتوسين

(A + G = T + C) أو 1 ≈ (A + G / T + C).

اكتشاف اللولب المزدوج (The Double Helix)

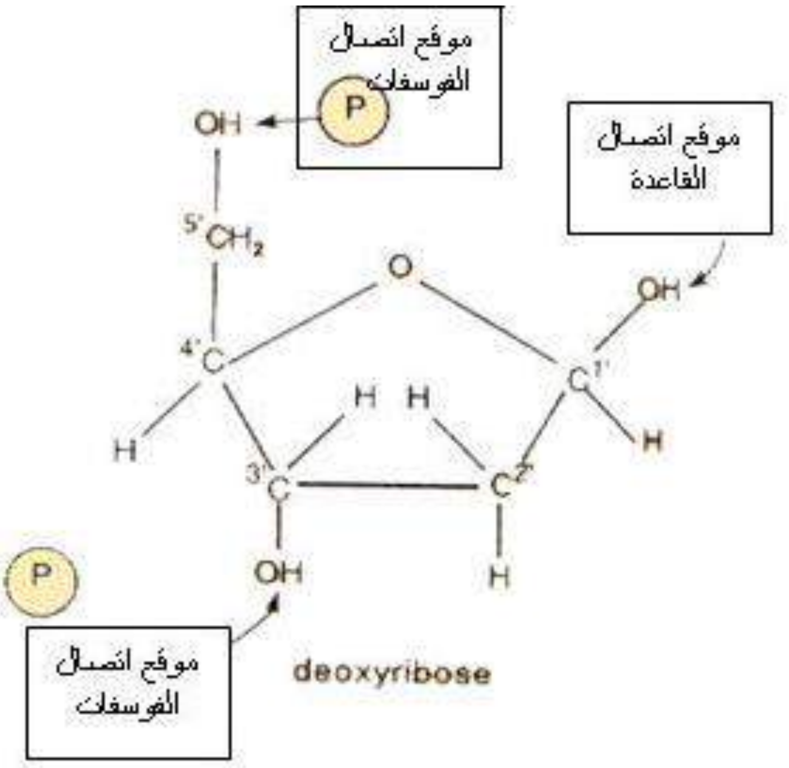
لقد جاء الدليل المباشر على تركيب DNA من دراسات قامت بها روزالين فرانكلين في عام 1952 حيث استخدمت تقنية حيود أشعة X في الحصول على صور لبلورات من DNA عالي النقاوة .

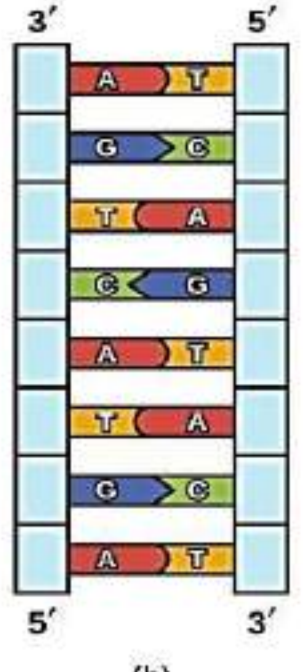


اعتمد واتسون وكريك في نموذجيهما لحمض DNA على البيانات التي استخلصاها من صورة حيود الأشعة X لفرانكلين ، وفسرا نمط البقع على صورة الأشعة حيث استنتجا أن عرض اللولب 2 نانومتر بحيث تكون القواعد متعامدة على طول الخيط ،كما وفرت هذه الصورة دليلاً على أن هيكل سكر- فوسفات يوجد في الجهة الخارجية من اللولب وتوجد القواعد النيتروجينية جهة الداخل ، كما أن قطر اللولب دل على أنه يتكون من سلسلتين من شريط من DNA والذي أصبح معروفاً باللولب المزدوج. ولعمل قطر2 نانومتر للولب المزدوج فالحل هو ازدواج بيورين مع بريميدين ، كما أن كل قاعدة نيتروجينية يمكنها تكوين روابط هيدروجينية مع الشريك المناسب لها .

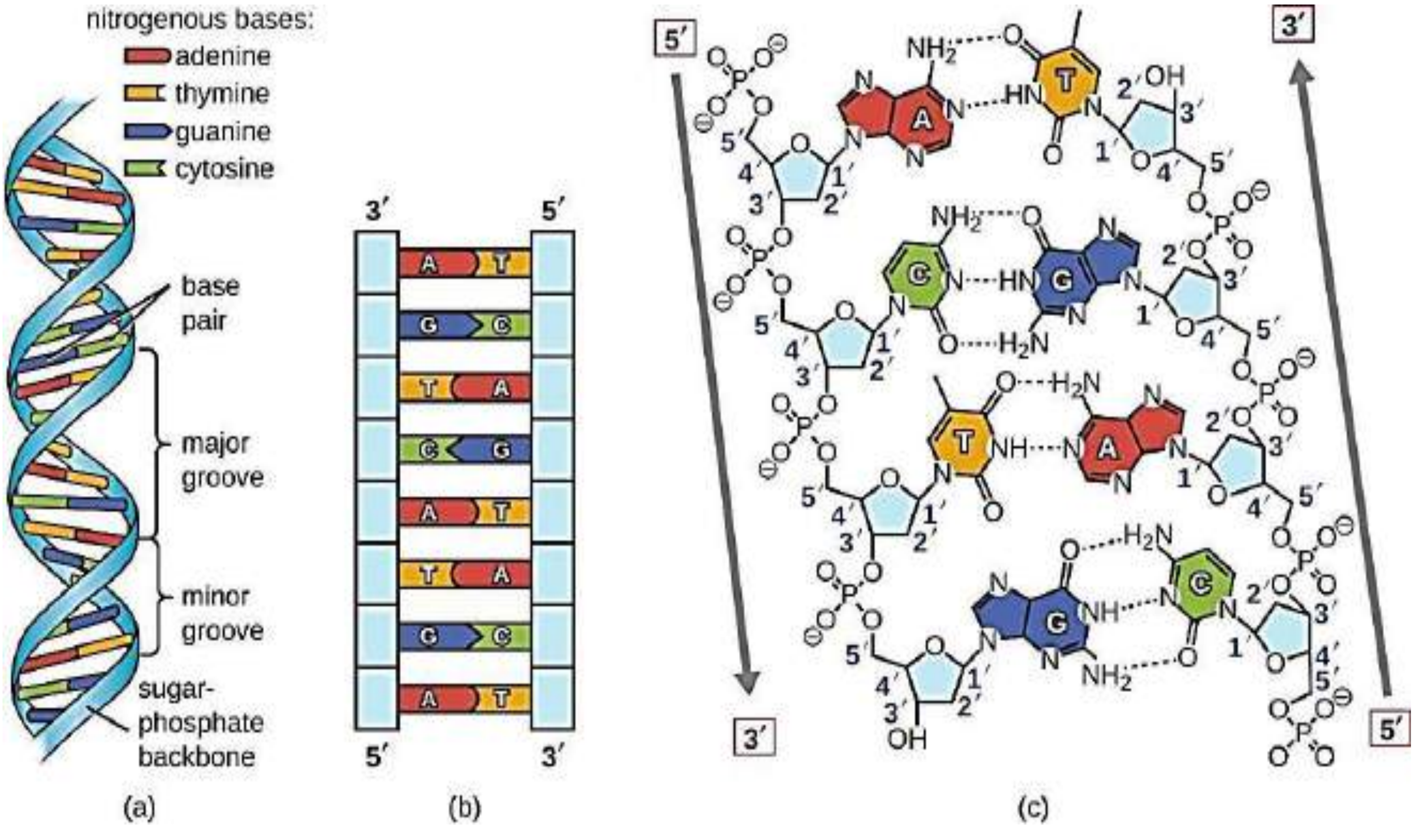
ولكي تتكون الروابط الهيدروجينية بشكل سليم بين زوجي القواعد النيتروجينية وحتى يتساوى قطر اللولب المزدوج رأى واتسون وكريك أن شريطي النيوكليوتيد في جزئ DNA يكون أحدهما معاكس للآخر بمعنى ان الكربون الطرفي في إحدى نهايتي هيكل السكر – فوسفات يرتبط مع مجموعة OH^- ويسمى النهاية '3 للسلسلة ، وفي الطرف المقابل ينتهي هيكل السكر – فوسفات بمجموعة فوسفات ترتبط مع الكربون '5 للنيوكليوتيد الآخر ويسمى النهاية '5 لسلسلة DNA في اللولب المزدوج ، وبذلك فمن الضروري أن يكون العمودان الفقريان لسلسلتي DNA مقلوبين بالنسبة لبعضهما ، اي ان السلسلتان تلتقيان بشكل متوازي وعكسي antiparallel حيث ان ال5 يقابلها 3. ويكون ملتف باتجاه عقارب الساعة.

وفي عام 1953م فاجأ واتسون وكريك العالم بمقالة موجزة في مجلة الطبيعةNature البريطانية أوضحا فيها نموذج جزئ جديد لحمض DNA اللولب المزدوج .والجيد في هذا النموذج أنه أقترح الآلية الأساسية لتضاعف DNA .



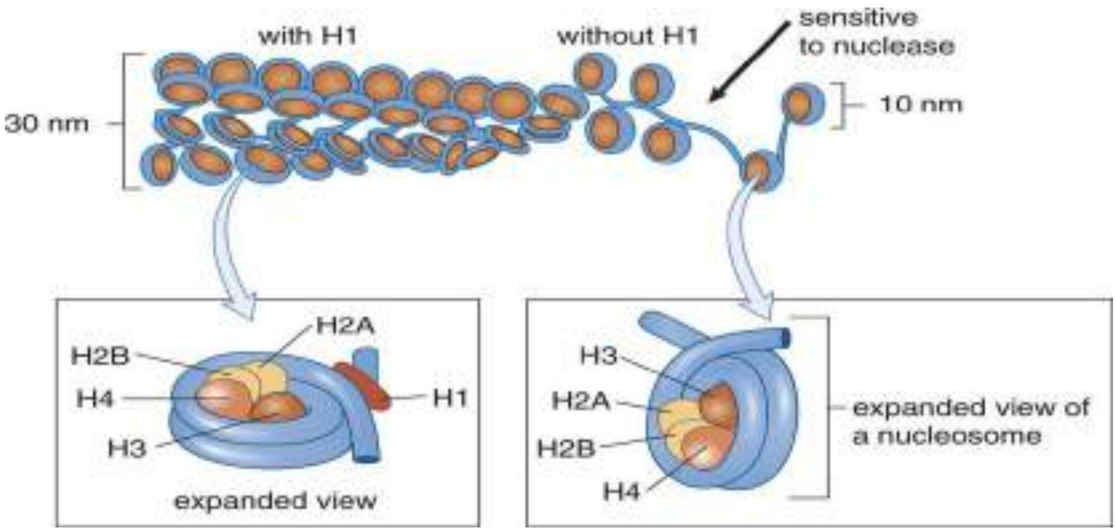


(b)



يقاس طول جزيء الدنا بالعدد الزوجي للقواعد النيتروجينية Base pair (bp) ، كما تعتبر 1000 قاعدة زوجية (bp 1000) مساوي لواحد كيلو قاعدة Kilobase (Kb) اما 1.000.000 قاعدة زوجية فتساوي واحد ميجا قاعدة Megabase (Mb).

حجم الدنا داخل كل خلية ضخم جدا لهذا لا تستطيع الخلية ان تستوعبه على وضعه الممتد فلذلك يرتبط الدنا ويلتف حول مجموعة من البروتينات التي تسمى الهستونات والتي تكون مشحونة بشحنة موجبة فيستطيع الإرتباط بالدنا ذو الشحنة السالبة فيكون تركيبات تسمى الكروموسومات chromosome،



التقنية الحيوية Biotechnology

مقدمة:

التقنية الحيوية علم يتعامل مع الكائنات الحية لإنتاج المواد المفيدة حسب حاجة الانسان وعليه فان جذوره تمتد مع جذور علوم الحياة، لهذا فان بداية هذا العلم هي مع بداية الانسان، وان علم التقنية الحيوية هو علم واسع جدا ويمكن ان يدخل في ادق مجالات الحياة ويعتمد على نوع الخلايا المستعملة سواء كانت خلايا حيوانية او نباتية او احياء مجهرية. ومما زاد من اهمية هذا العلم هو ان هذه الخلايا المستعملة في التقنيات الحيوية المختلفة لا تستعمل سوى 10% من مادتها الوراثية مما يجعل الباب مفتوحا لاستخدام او التلاعب ببقية مادتها الوراثية لغرض ادخال صفات وراثية جديدة اضافية.

تعاريف التقنية الحيوية:

1- هو الاستعمال الاساسي للكيمياء الحيوية وعلم الاحياء المجهرية و علم الهندسة للوصول الى التطبيق الصناعي لقابليات الاحياء المجهرية او الانسجة المزروعة.

2- هو العلم الذي يهتم بتطبيق واستعمال الانظمة الحيوية سواء كانت الخلايا بمختلف انواعها او بعض التراكيب الخلوية او الانزيمات في عمليات التصنيع لإنتاج العديد من المنتجات الحيوية التي يحتاجها الانسان او استعمال هذه الانظمة الحيوية في اداء خدمات اخرى.

ومن خلال هذه التعاريف نلاحظ ان هذا العلم هو متعدد الجوانب ويعتمد على الكثير من العلوم الاخرى وليس له وجود الا بوجودها مثل الكيمياء الحيوية ، علم الوراثة ، فسلجة الاحياء ، علم الانزيمات ، علم الاغذية ، علم الهندسة الكيمياوية ، علم الاحياء المجهرية وعلم الاحياء المجهرية الصناعية. فضلا عن العلوم الاقتصادية المهمة من خلال حسابات الجدوى الاقتصادية والكلفة اللازمة لنجاح هذه المشاريع وايضا علم

التسويق الذي يهدف الى ايجاد اسواق رائجة لمنتجات التقنية الحيوية من اجل ديمومة مثل هذه المشاريع.

مراحل تطور علم التقنية الحيوية

يمكن ان تقسم مراحل تطور علم التقنية الحيوية منذ بدايته الى الان الى عدة مراحل منها :

المرحلة الاولى

ومن اقدم التقنيات الحياتية هي زراعة النباتات وتربية الحيوانات من خلال عمليات الانتخاب الطبيعي والتهجين فهذه العمليات تعتبر من التقنيات الحياتية الاساسية التي ادت لتطور مفهوم تربية وتحسين النبات والحيوان. وتتمثل ايضا هذه المرحلة بما عرفه الانسان القديم مثل الفراعنة والسومريين والبابليين من تخمرات المواد الغذائية التي كانت تتم عن عدم معرفة مثل صناعة الخل واللبن الرائب والاجبان وغيرها، حيث كانت تستعمل الاغذية القديمة وتمزج مع الاغذية الطازجة لأجراء التحولات فيها، او تترك الاوعية مفتوحة لتتم التحولات وتتغير نكهة الاطعمة او تؤدي الى اطالة فترة حفظ المواد الغذائية. استمرت هذه المرحلة الى القرن السابع عشر الى حين اكتشاف ليفينهوك للأحياء المجهرية وكذلك اكتشاف ان اجسام الحيوانات والنباتات تتكون من حجيرات صغيرة سميت بالخلايا.

المرحلة الثانية

وهي المرحلة التي ادت الى تطور في علم التقنية بشكل كبير وابرز احداثها هو اكتشاف باستور لدور الاحياء المجهرية في عمليات التخمر التي تتم بغياب الاوكسجين (التخمر اللاهوائي) حيث وجد ان الخمائر تحول السكريات الموجودة في مادة عصير العنب الى كحول بغياب الهواء وعرفت هذه العملية بالتخمر Fermentation. وفيما بعد يتحول طعم النبيذ الى حامضي (حامض الخليك) نتيجة

وجود البكتيريا. ولتلافي ذلك اقترح باستور ان يسخن الكحول الى الحد الازم لقتل معظم الاحياء المجهرية بحيث لا يؤثر على طعم النبيذ وهذه العملية سميت فيما بعد بالبسترة وهي مستخدمة حتى الان. وقد ادى هذا التطور لتطور الصناعات المعتمدة على التخمر مثل انتاج المذيبات العضوية وصناعة مواد كيمياوية من خلال تحويل الكربوهيدرات النباتية. وقد تم في نفس الفترة انتاج الفطر Mushroom على نطاق تجاري بتنميتها على السليلوز النباتي.

المرحلة الثالثة

وتتمثل هذه المرحلة ببداية القرن العشرين وتميزت المرحلة بأن العديد من عمليات التصنيع الحيوي تطورت خلال احداث الحرب العالمية الاولى منها انتاج العلف الحيواني وكذلك انتاج الكليسرول من التخمر الكحولي للخمائر الذي يستخدم لصناعة المتفجرات وكذلك تم انتاجه من الطحالب وبكميات كبيرة. وكذلك الاسيتون المستخدم في الذخيرة والبيوتانول اللازم لصناعة المطاط الصناعي واللذان تم انتاجهما من *Clostridium acetobutylicum* وانتاج حامض اللبن والخل. كما تم استبدال عمليات انتاج حامض الليمون من الاعتماد على الحمضيات الى عمليات الانتاج المعتمدة على الفطريات *Aspergillus niger* الذي يقوم بتخمير السكريات وتحويلها الى حامض الليمون .

المرحلة الرابعة

تميزت هذه المرحلة باكتشاف البنسلين عن طريق الصدفة سنة 1928 ولهذا يطلع على هذه المرحلة عهد المضادات الحيوية. اذ تم انتاج البنسلين من الفطرمن *Penicillium notatum* من قبل فليمينك واستخدم البنسلين في علاج جرحى الحرب العالمية الثانية وبذلك ظهر سوق رائجة لعلاج الجرحى. واستعملت سلالات جديدة من الفطر *P. chrysogenum* بدلا من *P. notatum* بالإضافة الى اجراء عمليات تحسين وراثية على السلالات من خلال التلاعب الوراثي باستعمال المطفرات سواء كانت كيميائية او فيزيائية لاختيار السلالة المنتجة بصورة اكثر

للبنسيلين وايضا تعاد العملية مرة اخرى بتعريض الفطر للمطفرات واختيار السلالة ذات الانتاجية الاعلى. وبعد سلسلة من عمليات المسح والانتخاب، تم الحصول على سلالات تنتج حوالي 20غم من البنسلين / لترفي الوسط الغذائي مقارنة بالسلالات الاولى التي يصل انتاجها الى 2 ملغم / لتر.

تلت هذه الفترة عمليات البحث المستمر عن مضادات حيوية جديدة وقد تركزت عمليات البحث على الاكتينومايسيتات. وقد اسفرت هذه العمليات على اكتشاف الستربتومايسين الذي تنتجه Streptomyces griscus وقد ساهمت هذه المجموعة في انتاج 90% من المضادات المستعملة في الوقت الحاضر.

ان تطور العمليات الانتاجية للمضادات شجعت قيام صناعات اخرى منها انتاج المضافات الغذائية والحوامض الامينية والنيوكلوتيدات.

المرحلة الخامسة

سميت هذه المرحلة بمرحلة انتاج الايثانول او هندسة الايثانول حيث استعملت جميع المعلومات والتقنيات السابقة في انتاج الايثانول من السكريات المتعددة مثل النشأ، حيث بالامكان استخدام الايثانول كوقود حيوي بديل عن المشتقات النفطية. وتلت عمليات الانتاج المذكورة تطورات في استعمال المزارع المستمرة في انتاج بروتين الخلية الواحدة Single Cell Protein (SCP) حيث وصل انتاجه الى الالاف الاطنان سنويا باستعمال مواد اولية مختلفة مثل الميثانول والالكينات كمواد للكاربون.

كذلك ازدهرت في هذه الفترة انتاج الحوامض الامينية مثل حامض الكلوتاميك ويستعمل كمواد نكهة في صناعات الاغذية وايضا حامض اللايسين ليستعمل في تدعيم بعض الاغذية التي تفتقر اليه. وايضا اصبح بالإمكان انتاج الهرمونات والاجسام المضادة.

وايضا ظهرت تقنية تشكيل الحوامض النووية DNA Recombinant technology التي اصبحت قفزة في علم التقنية الحيوية. حيث اصبح بالإمكان تخليق كائنات حية تحمل صفات مرغوبة من خلال اضافة الجين الحامل للصفة. او بالإمكان حذف صفة ما او مرض ما من خلال حذف الجين الخاص بها.

التفاعلات الحيوية Metabolisms داخل الكائنات الحية

وتعتمد التقنيات الحيوية على نوعين من التفاعلات الحيوية التي تحدث داخل الكائنات الحية بشكل متوازن لضمان استمرار النظام الحيوي تحت الظروف الطبيعية. وهذه التفاعلات هي :

1- العمليات الهدمية catabolism:

والتي يتم فيها تكسير المركبات المعقدة الى وحدات بسيطة وتكون هذه التفاعلات منتجة للطاقة ويمكن ان تؤدي الى تغير العديد من صفات المواد والتي في اغلب الاحيان تتم بواسطة الانزيمات التي تفرز الى خارج الخلايا (خارج خلوية)

2- العمليات البنائية Anabolism:

وتسمى ايضا العمليات التخليقية ويتم تخليق مركبات حيوية ذات وحدات تركيبية كبيرة من وحدات بسيطة او صغيرة وعليه فالعمليات تحتاج الى صرف طاقة وتتم عن طريق انزيمات داخل خلوية.

اسباب تطور علم التقنية الحيوية

ان من اهم اسباب تطور علم التقنية الحيوية هو العامل الاقتصادي والسيطرة على الاسواق وذلك من خلال عدة اوجه:

1- ان التفاعلات الحيوية تتم تحت ظروف معتدلة من حيث درجات الحرارة والارقام الهيدروجينية والضغط الجوي، بينما تحتاج الصناعات الكيميائية الى الظروف المتطرفة وبالتالي تؤدي الى زيادة كلفة العملية التصنيعية.

2- ان التفاعلات الحيوية تكون متخصصة وكفؤة وتكاد تكون المواد الناتجة تقريبا نقية وتحتاج الى عمليات استخلاص و تنقية بسيطة في حين ان التفاعلات الكيميائية تنتج فيها العديد من المركبات الوسطية والتي قد يكون البعض منها غير مرغوب فيه، لذلك فان عمليات التنقية والاستخلاص ستؤدي الى زيادة كلفة المواد الناتجة.

3- ونظرا الى ان المواد المستعملة في التصنيع الحيوي تكون رخيصة وهي من المصادر المتجددة أي من نواتج المملكة النباتية، وخلال عملية التصنيع يتم الاستفادة وتحويل هذه المواد والتخلص من مشاكل تلويثها وتكدسها في البيئة.

فروع التقنية الحيوية

1- التقنية الزرقاء Blue biotechnology : ويشير هذا المصطلح الى استخدام المصادر البحرية لخلق منتجات وتطبيقات صناعية. مثل انتاج الوقود الحيوي باستخدام البناء الضوئي للطحالب المجهرية.

2- التقنية الخضراء Green biotechnology: وهي التقنية التي تستخدم في العمليات الزراعية. مثل انتاج نباتات محورة وراثيا مصممة للنمو في بيئات معينة بوجود او عدم وجود المبيدات الحشرية. او قد يطلق هذا المصطلح Green biotechnology على استخدام الاحياء المجهرية لتنظيف او تقليل النفايات.

3- **التقنية الحمراء Red biotechnology**: وتشير لاستخدام التقنية الحيوية في الصناعات الطبية والصيدلانية والعناية بالصحة. ويتضمن هذا الفرع صناعة اللقاحات والمضادات الحياتية والهرمونات والعلاجات المختلفة. وكذلك طرق تشخيص الامراض وصناعة الاعضاء الصناعية.

4- التقنية البيضاء White biotechnology : وهي التقنيات المستخدمة في العمليات الصناعية. مثل التقنيات المستخدمة في انتاج انزيمات خاصة تستخدم للتخلص من الملوثات الكيميائية.

5- التقنية الصفراء Yellow biotechnology: هي التقنيات المستخدمة في الصناعات الغذائية مثل صناعة الاجبان او النبيذ بواسطة التخمر.

6- التقنية السوداء Black biotechnology: وهي التقنيات المرتبطة بالإرهاب والاسلحة البيولوجية والتي تستخدم الاحياء المجهرية والسموم لتنتج امراض او تؤدي الى موت الانسان او الثروة الحيوانية او المحاصيل الحقلية.

7- التقنية البنفسجية Violet biotechnology: ويشير المصطلح الى الاعتبارات القانونية والاخلاقية والفلسفية المرتبطة بالتقنيات الحياتية.

8- التقنية الرصاصية Gray biotechnology: وتشير الى التطبيقات البيئية للتقنية الحيوية في المحافظة على التنوع الحيوي والقضاء على الملوثات.

الحمض الرايبوزي النووي

Ribonucleic acid (RNA)

عبارة عن سلسلة مؤلفة من ارتباط مجموعة من النيكليوتيدات. يلعب دورا اساسيا في العديد من الفعاليات البايولوجية الاساسية ويعتبر هو و ال DNA والبروتينات والكاربوهيدرات والدهون الجزيئات الحيوية الكبرى Macromolecules المهمة لجميع اشكال الحياة. تتميز نيكليوتيدات RNA عن نيكليوتيدات DNA بأنها تحوي حلقة سكر ريبوز كما تضم يوراسيل بدل الثايمين وال RNA يتكون من شريط واحد.

يتم تكوين RNA عن طريق عملية الاستنساخ بالاعتماد على الجينات المتواجدة في DNA التي تعمل كقالب لترجمة الجينات إلى بروتينات، وأيضا كناقل للحوامض الأمينية إلى الريبوسومات لتشكيل RNA البروتينات، وأيضا هو مكون أساسي في بنية الريبوسوم . ويعتبر ال RNA المادة الوراثية في بعض الفايروسات حيث اما ان تكون شريط واحد الفيروسات single strand (ss RNA) او يكون ثنائي الشريط double strand (ds RNA) .

مقارنة بين الحمضين النوويين DNA, RNA

DNA	RNA
يتكون من شريط حلزوني مزدوج	يتكون من شريط حلزوني مفرد
يحتوي على القواعد النيتروجينية A, T, G, C	يحتوي على القواعد النيتروجينية A, U, G ، C
يحتوي على سكر خماسي رايبوزي منزوع الأكسجين	يحتوي على سكر خماسي رايبوزي
يحمل جينات جميع الكائنات الحية وبعض الفيروسات	يحمل الجينات في بعض الفيروسات فقط
يوجد في النواة	يخلق في النواة ويخرج الى السيتوبلازم
نوع واحد	ثلاث انواع m.RNA, t.RNA, r.RNA
يوجد بشكل ثابت طوال حياة الكائن	يهدم ويعاد بناءه بشكل مستمر

هنالك ثلاث انواع من ال RNA وهي :

1 - الحمض النووي الريبوزي الرسول (Messenger mRNA):

يمثل جزء بسيط من الحمض النووي يتراوح 5 % وزنه الجزيئي عدة مئات الالاف وحتى مليون ويتناسب طوله طرديا مع كمية المعلومات الوراثية التي يحملها. يتم نسخه من احدى سلسلتي DNA بواسطة ال RNA Polymerase II

يصنع في النواة ثم يخرج الى السايتوبلازم حاملا المعلومات الوراثية التي تترجم تسلسل محدد من الاحماض الامينية مكونة البروتينات. يعتبر هذا الجزيء أطول أنواع RNA ويتكون من عدد كبير من النيوكليوتيدات وهو عاري غير مدعوم ببروتينات نووية ويحمل معلومات كاملة عن طبيعة البروتين المراد تكوينه.

2- الRNA الناقل (tRNA Transfer) :

يمثل % 15 من الحمض النووي الريبوزي ككل يحتوي على 70 - 90 نيوكلوتيدة يتم نسخ ال من احدى سلسلتي الDNA بواسطة ال RNA Polymerase III وال tRNA غير مدعوم بالبروتين لكنه جزيء متخصص جدا وظيفته تتمثل في حمل الاحماض الامينيه اثناء عملية تصنيع البروتين . ويملك طرفين أحدهما للتعرف والارتباط مع حمض أميني واحد ومحدد والموقع الآخر للتعرف والارتباط مع الشفرة . لذا يوجد رنا ناقل متخصص واحد لكل حمض أميني وقد يوجد أكثر من رنا ناقل لبعض الأحماض الأمينية والتي عددها 20 حامض اميني. فمثلا الرنا الناقل tRNA المتخصص لنقل الحمض الأميني الجلايسين Glycine لا ينقل إطلاقا إلا هذا الحمض الأميني وهذا يدل على وجود تخصصية موروثة ثابتة في نقل الأحماض الأمينية.

3- الRNA الرايبوسومي (يمثل Ribosomal rRNA) :

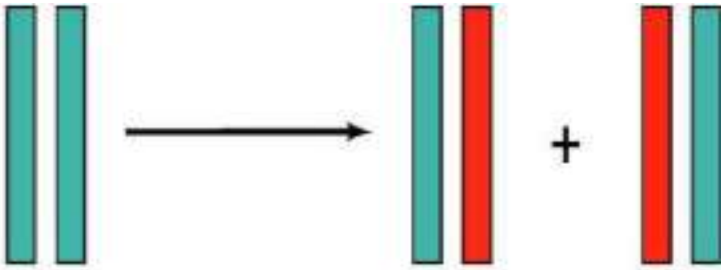
ويمثل80% من الحمض النووي الرايبوزي يعتبر rRNA من الجزيئات القصيرة المتخصصة والمدعوم بالبروتين ويساهم في ربط الأحماض الأمينية أثناء عملية Protein synthesis بناء البروتين. تستنسخ جزيئات rRNA من تتابعات نيوكليوتيدية متكررة ومتعاقبة تتراوح أطوالها بين 13000- 8000 نيوكليوتيدة توجد على شريط الDNA ويتم نسخه بواسطة RNA polymerase I . يطلق على البروتينات المتواجدة مع الrRNA ببروتينات الرايبوسوم لتكون معا الرايبوسوم الناضج والذي يبدو على هيئة حبيبية كمثرية الشكل.

mRNA	rRNA	tRNA
جزئ طويل	جزئ قصير	جزئ قصيرجدا
غير مدعوم بالبروتين (عاري)	مدعوم بالبروتين	غير مدعوم بالبروتين (عاري)
يشفر لبناء سلسلة عديد الببتيد (بروتين)	يساهم في تكوين الرايبوسوم وربط الأحماض الأمينية	متخصص في نقل الأحماض الأمينية
يحمل الشفرة الوراثية	---	يحمل الشفرة الضدية
يمثل 5% من ال RNA	يمثل 80% من RNA	يمثل 15% من الRNA

تضاعف او تكرارالDNA

DNA Replication (Duplication)

يعد تضاعف ال DNA من اهم العمليات الحيوية الخلوية ، فلولا التضاعف لماتت معظم الخلايا ،هي وسيلة التطور والتجديد والنمو. وتحدث هذه العملية البيولوجية في جميع الكائنات الحية وهي أساس الوراثة البيولوجية .حيث نحصل في نهاية العملية على نسختين متماثلتين متطابقتين من جزيء DNA أصلي واحد كل منهما يطابق تماما الجزء الاصلي ويمتلك بالضبط خواصه نفسها وتصبح الخليتان الجديدتان الناتجتان من انقسام الخلية ألام حاملين ايضا لنفس المعلومات الوراثية، كما انهما تنقلانها إلى وريثيهما ولهذا تسمى النسخ نصف محافظ semiconservative.



لانقسام الخلية، يجب أن يتضاعف أولا الحمض النووي . وتبدأ هذه العملية في S Phase يبدأ تكاثر DNA في الخلايا بدائية النواة كالبكتيريا من موقع واحد Single site بينما في الخلايا حقيقية النواة يبدأ تكاثر من عدة مواقع والتي قد تصل إلى 3000 موقع ويطلق على مثل تلك المواقع بنقاط التكاثر Replication points أو مواقع البدء Initiation sites او منشأ التضاعف origin of replication التي تستهدف من البروتينات البادئة.

تسلسل النيوكلوتيدات التي تستهدفها البروتينات البادئة تميل إلى أن تكون غنية بقواعد الأدينين والثايمين T- A ، لأنه زوج قاعدة A=T يحتوي اصرتين هيدروجين بدلا من ثلاثة اواصر في زوج C≡G و التي تكون أسهل لفك الالتفاف بمجرد ان يحدد المنشأ . تتم عملية تضاعف الدنا بدرجة عالية من الدقة ولتبسيط وفهم هذه العملية لابد من معرفة بعض السمات الهامة لهذه العملية ومن أهمها:

1- أن تزواج القواعد النيتروجينية يكون دائما متمما وحسب قواعد شاراجاف- .

2- أن شريطان الدنا متوازيان ومتعاكسان ,ولذا يتم االتضاعف في اتجاهين متعاكسين- .

3- تحتاج عملية تضاعف الدنا إلى قالب Template - يتم عليه بناء الشريط الجديد وتتم عملية التكاثر بظاهرة النصف محافظ Semiconservative.

4- تتم جميع التفاعلات تحت سيطرة إنزيمات البلمرة Polymerases - ومن الضروري كذلك تكون الرنا البادئ أو الممهد (البرايمر RNA primer)الذي تتوفر به مجموعة الهيدروكسيل (OH-) اللازمة لإضافة النيوكليوتيدات الجديدة .

لأن إنزيم DNA poly لا يستطيع أن يبدأ التصنيع سلسة دنا لكن يكمل البناء لهذا يجب أن تضاف النيوكليوتيدات إلى نهاية السلسة الموجودة سابقا ,وتسمى البادئ .

ويمكن إيجاز عملية تضاعف الدنا فيما يلي-:

1- يتم التعرف على موقع التكاثر من قبل أنزيم ال DNA helicase المسؤول عن فك حلزنة الدنا مكونا ما يشبه الفقاعة Bubble أو شوكة التكاثر Replication fork التي تكون على شكل حرف Y وتتسع بتقدم التضاعف.

2- نظرا لأن جزيء الدنا حلزوني الشكل وملتف بدرجة فائقة فإن ذلك يتطلب ضرورة تجزئة مناطق الالتفاف بواسطة إنزيم DNA topoisomerase ومن ثم فك الحلزنة أثناء عملية التضاعف.

3- عند بدء فك حلزنة الدنا لابد من منع شريطي الدنا من معاودة الالتفاف وذلك بتثبيتها بمساعدة بروتينات تعرف باسم بروتينات منع الارتباط أو الالتصاق بالدنا وحيد الخيط Single- stranded DNA binding proteins (SSBP) والحفاظ على تباعدهما حيث يثبت كل بروتين حوالي10- 20 نيوكليوتيدة.

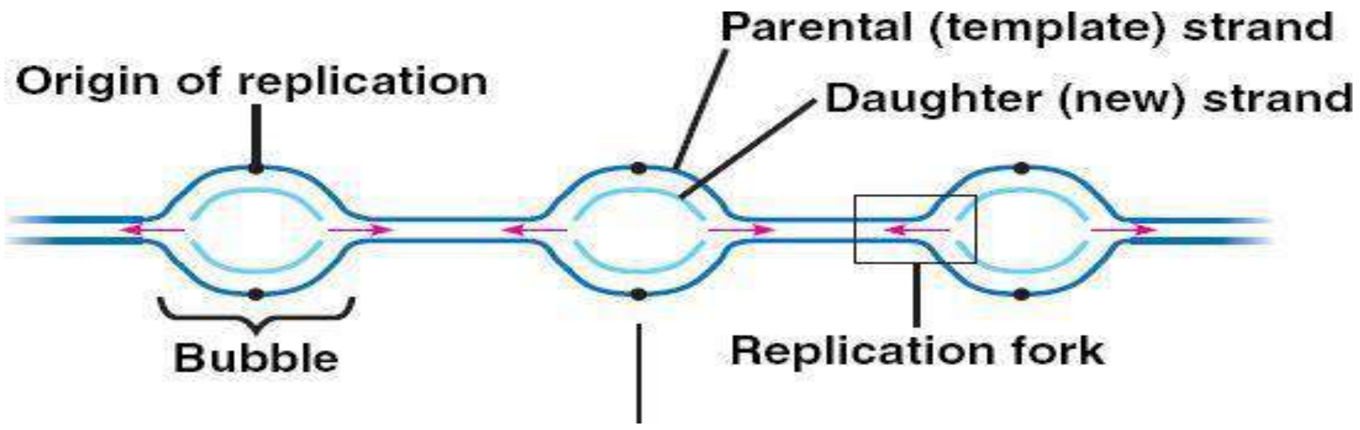
4- يقوم بعد ذلك إنزيم الدنا البلمرة DNA polymerase بإضافة النيكلوتيدات الجديدة لبناء الشريط الجديد مكملا للشريط القديم ذو الاتجاه 5→3 الذي يطلق عليه الشريط القائد Leading strand بشكل مستمر و سريع حيث أن أنزيم DNA poly لا يستطيع العمل الا في الاتجاه 5 → 3 فقط .

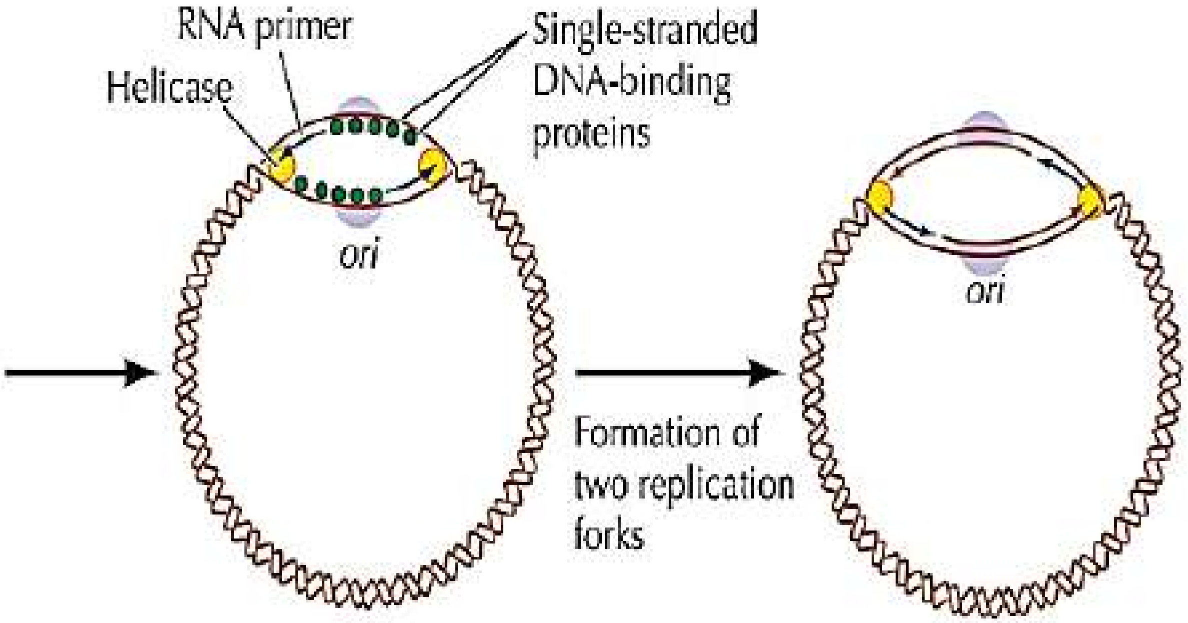
5- وتتم عملية بناء شريط الدنا القديم ذو الاتجاه 3→5 أو ما يعرف بالشريط المتباطئ lagging strand بطريقة متقطعة وبطيئة نسبيا وتكون قطع صغيرة من الدنا يتراوح طولها بين 1000 إلى2000 نيوكليوتيدة تعرف باسم شظايا أوكازاكي Okazaki fragments نسبة إلى مكتشفها العالم الياباني أوكازاكي.

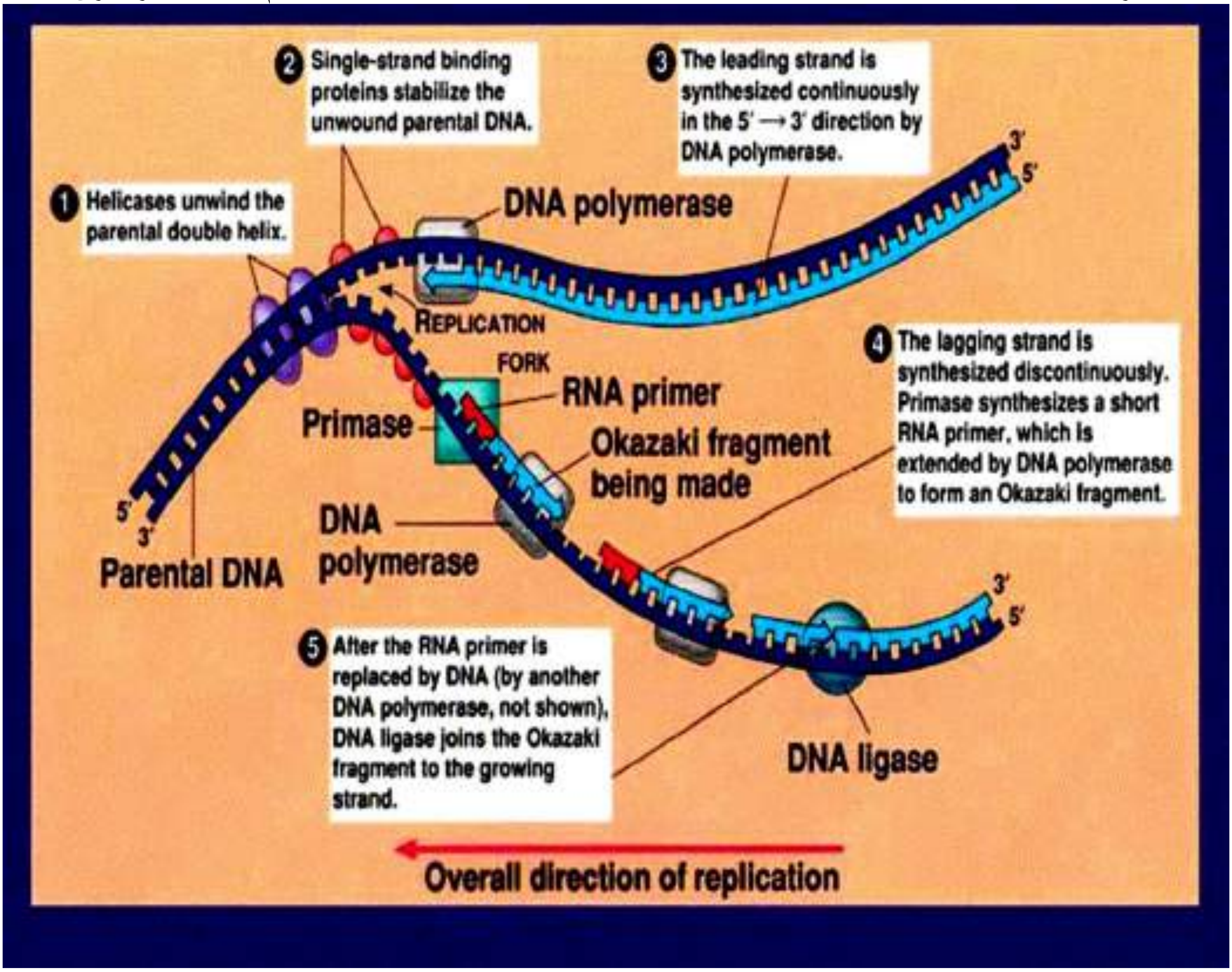
6- يتم تصنيع هذه السلسلة بشكل أكثر تعقيدا مقارنة بالسلسلة المتقدمة. تبدأ العملية أيضا بإضافة نيوكلوتيدات لا تتجاوز 10 نيوكلوتيدات عن طريق إنزيم رنا برايميز RNA primase وتدعى بالبادئات RNA primer لإضافة مجموعة هيدروكسيل حرة ليأتي بعدها إنزيم DNA poly لإضافة نيوكلوتيدات متممة لسلسلة الدنا الأصلية.

7- عندما يصل إنزيم DNA poly إلى سلسلة النيوكلوتيدات التي تم إنشاها بواسطة إنزيم رنا برايميز يتم يستبدل نيوكلوتيدات RNA بنيوكلوتيدات DNA ويتم وصل هذه بالسلسلة التي تسبقها بواسطة إنزيم دنا الرابط DNA ligase

8- يقوم انزيم اللاحم DNA ligase بربط النيوكلوتيدات الجديدة وذلك عن طريق إضافة مجموعة الفوسفات بين ذرتي الكربون الثالثة والخامسة.


Origin of replication
Parental (template) strand
Daughter (new) strand
Bubble
Replication fork


RNA primer
Helicase
Single-stranded DNA-binding proteins
ori
Formation of two replication forks
ori


1 Helicases unwind the parental double helix.
2 Single-strand binding proteins stabilize the unwound parental DNA.
3 The leading strand is synthesized continuously in the 5′ → 3′ direction by DNA polymerase.
DNA polymerase
3′
5′
REPLICATION FORK
4 The lagging strand is synthesized discontinuously. Primase synthesizes a short RNA primer, which is extended by DNA polymerase to form an Okazaki fragment.
RNA primer
Primase
Okazaki fragment being made
5′
3′
DNA polymerase
Parental DNA
3′
5′
5 After the RNA primer is replaced by DNA (by another DNA polymerase, not shown), DNA ligase joins the Okazaki fragment to the growing strand.
DNA ligase
Overall direction of replication

الحمض الرايبوزي النووي

Ribonucleic acid (RNA)

عبارة عن سلسلة مؤلفة من ارتباط مجموعة من النيكليوتيدات. يلعب دورا اساسيا في العديد من الفعاليات البايولوجية الاساسية ويعتبر هو و ال DNA والبروتينات والكاربوهيدرات والدهون الجزيئات الحيوية الكبرى Macromolecules المهمة لجميع اشكال الحياة. تتميز نيكليوتيدات RNA عن نيكليوتيدات DNA بأنها تحوي حلقة سكر ريبوز كما تضم يوراسيل بدل الثايمين وال RNA يتكون من شريط واحد.

يتم تكوين RNA عن طريق عملية الاستنساخ بالاعتماد على الجينات المتواجدة في DNA التي تعمل كقالب لترجمة الجينات إلى بروتينات، وأيضا كناقل للحوامض الأمينية إلى الريبوسومات لتشكيل RNA البروتينات، وأيضا هو مكون أساسي في بنية الريبوسوم . ويعتبر ال RNA المادة الوراثية في بعض الفايروسات حيث اما ان تكون شريط واحد الفيروسات single strand (ss RNA) او يكون ثنائي الشريط double strand (ds RNA) .

مقارنة بين الحمضين النوويين DNA, RNA

DNA	RNA
يتكون من شريط حلزوني مزدوج	يتكون من شريط حلزوني مفرد
يحتوي على القواعد النيتروجينية A, T, G, C	يحتوي على القواعد النيتروجينية A, U, G ، C
يحتوي على سكر خماسي رايبوزي منزوع الأكسجين	يحتوي على سكر خماسي رايبوزي
يحمل جينات جميع الكائنات الحية وبعض الفيروسات	يحمل الجينات في بعض الفيروسات فقط
يوجد في النواة	يخلق في النواة ويخرج الى السيتوبلازم
نوع واحد	ثلاث انواع m.RNA, t.RNA, r.RNA
يوجد بشكل ثابت طوال حياة الكائن	يهدم ويعاد بناءه بشكل مستمر

هنالك ثلاث انواع من ال RNA وهي :

1 - الحمض النووي الريبوزي الرسول (Messenger mRNA):

يمثل جزء بسيط من الحمض النووي يتراوح 5 % وزنه الجزيئي عدة مئات الالاف وحتى مليون ويتناسب طوله طرديا مع كمية المعلومات الوراثية التي يحملها. يتم نسخه من احدى سلسلتي DNA بواسطة ال RNA Polymerase II

يصنع في النواة ثم يخرج الى السايتوبلازم حاملا المعلومات الوراثية التي تترجم تسلسل محدد من الاحماض الامينية مكونة البروتينات. يعتبر هذا الجزيء أطول أنواع RNA ويتكون من عدد كبير من النيوكليوتيدات وهو عاري غير مدعوم ببروتينات نووية ويحمل معلومات كاملة عن طبيعة البروتين المراد تكوينه.

2- الRNA الناقل (tRNA Transfer) :

يمثل 15 % من الحمض النووي الريبوزي ككل يحتوي على 70 - 90 نيوكلوتيدة يتم نسخ ال من احدى سلسلتي الDNA بواسطة ال RNA Polymerase III وال tRNA غير مدعوم بالبروتين لكنه جزيء متخصص جدا وظيفته تتمثل في حمل الاحماض الامينيه اثناء عملية تصنيع البروتين . ويملك طرفين أحدهما للتعرف والارتباط مع حمض أميني واحد ومحدد والموقع الآخر للتعرف والارتباط مع الشفرة . لذا يوجد رنا ناقل متخصص واحد لكل حمض أميني وقد يوجد أكثر من رنا ناقل لبعض الأحماض الأمينية والتي عددها 20 حامض اميني. فمثلا الرنا الناقل tRNA المتخصص لنقل الحمض الأميني الجلايسين Glycine لا ينقل إطلاقا إلا هذا الحمض الأميني وهذا يدل على وجود تخصصية موروثة ثابتة في نقل الأحماض الأمينية.

3- الRNA الرايبوسومي (يمثل Ribosomal rRNA) :

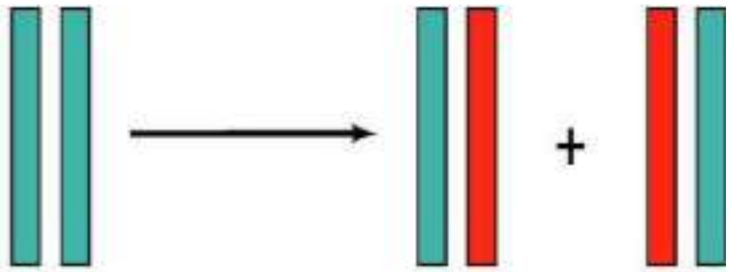
ويمثل80% من الحمض النووي الرايبوزي يعتبر rRNA من الجزيئات القصيرة المتخصصة والمدعوم بالبروتين ويساهم في ربط الأحماض الأمينية أثناء عملية Protein synthesis بناء البروتين. تستنسخ جزيئات rRNA من تتابعات نيوكليوتيدية متكررة ومتعاقبة تتراوح أطوالها بين 13000- 8000 نيوكليوتيدة توجد على شريط الDNA ويتم نسخه بواسطة RNA polymerase I . يطلق على البروتينات المتواجدة مع الrRNA ببروتينات الرايبوسوم لتكون معا الرايبوسوم الناضج والذي يبدو على هيئة حبيبية كمثرية الشكل.

mRNA	rRNA	tRNA
جزئ طويل	جزئ قصير	جزئ قصيرجدا
غير مدعوم بالبروتين (عاري)	مدعوم بالبروتين	غير مدعوم بالبروتين (عاري)
يشفر لبناء سلسلة عديد الببتيد (بروتين)	يساهم في تكوين الرايبوسوم وربط الأحماض الأمينية	متخصص في نقل الأحماض الأمينية
يحمل الشفرة الوراثية	---	يحمل الشفرة الضدية
يمثل 5% من ال RNA	يمثل 80% من RNA	يمثل 15% من الRNA

تضاعف او تكرارالDNA

DNA Replication (Duplication)

يعد تضاعف ال DNA من اهم العمليات الحيوية الخلوية ، فلولا التضاعف لماتت معظم الخلايا ،هي وسيلة التطور والتجديد والنمو. وتحدث هذه العملية البيولوجية في جميع الكائنات الحية وهي أساس الوراثة البيولوجية .حيث نحصل في نهاية العملية على نسختين متماثلتين متطابقتين من جزيء DNA أصلي واحد كل منهما يطابق تماما الجزء الاصلي ويمتلك بالضبط خواصه نفسها وتصبح الخليتان الجديدتان الناتجتان من انقسام الخلية ألام حاملين ايضا لنفس المعلومات الوراثية، كما انهما تنقلانها إلى وريثيهما ولهذا تسمى النسخ نصف محافظ semiconservative.



لانقسام الخلية، يجب أن يتضاعف أولا الحمض النووي . وتبدأ هذه العملية في S Phase يبدأ تكاثر DNA في الخلايا بدائية النواة كالبكتيريا من موقع واحد Single site بينما في الخلايا حقيقية النواة يبدأ تكاثر من عدة مواقع والتي قد تصل إلى 3000 موقع ويطلق على مثل تلك المواقع بنقاط التكاثر Replication points أو مواقع البدء Initiation sites او منشأ التضاعف origin of replication التي تستهدف من البروتينات البادئة.

تسلسل النيوكلوتيدات التي تستهدفها البروتينات البادئة تميل إلى أن تكون غنية بقواعد الأدينين والثايمين A -T ، لأنه زوج قاعدة A=T يحتوي اصرتين هيدروجين بدلا من ثلاثة اواصر في زوج C≡G و التي تكون أسهل لفك الالتفاف بمجرد ان يحدد المنشأ . تتم عملية تضاعف الدنا بدرجة عالية من الدقة ولتبسيط وفهم هذه العملية لابد من معرفة بعض السمات الهامة لهذه العملية ومن أهمها:

1- أن تزواج القواعد النيتروجينية يكون دائما متمما وحسب قواعد شاراجاف- .

2- أن شريطان الدنا متوازيان ومتعاكسان ,ولذا يتم االتضاعف في اتجاهين متعاكسين- .

3- تحتاج عملية تضاعف الدنا إلى قالب Template - يتم عليه بناء الشريط الجديد وتتم عملية التكاثر بظاهرة النصف محافظ Semiconservative.

4- تتم جميع التفاعلات تحت سيطرة إنزيمات البلمرة Polymerases - ومن الضروري كذلك تكون الرنا البادئ أو الممهد (البرايمر RNA primer)الذي تتوفر به مجموعة الهيدروكسيل (OH-) اللازمة لإضافة النيوكليوتيدات الجديدة .

لأن إنزيم DNA poly لا يستطيع أن يبدأ التصنيع سلسة دنا لكن يكمل البناء لهذا يجب أن تضاف النيوكليوتيدات إلى نهاية السلسة الموجودة سابقا ,وتسمى البادئ .

ويمكن إيجاز عملية تضاعف الدنا فيما يلي-:

1- يتم التعرف على موقع التكاثر من قبل أنزيم ال DNA helicase المسؤول عن فك حلزنة الدنا مكونا ما يشبه الفقاعة Bubble أو شوكة التكاثر Replication fork التي تكون على شكل حرف Y وتتسع بتقدم التضاعف.

2- نظرا لأن جزيء الدنا حلزوني الشكل وملتف بدرجة فائقة فإن ذلك يتطلب ضرورة تجزئة مناطق الالتفاف بواسطة إنزيم DNA topoisomerase ومن ثم فك الحلزنة أثناء عملية التضاعف.

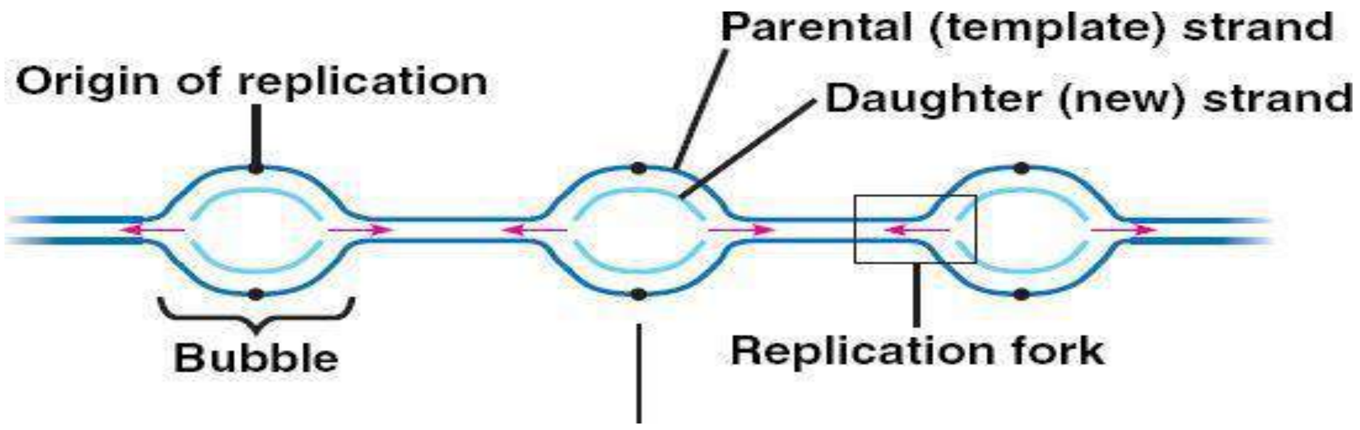
3- عند بدء فك حلزنة الدنا لابد من منع شريطي الدنا من معاودة الالتفاف وذلك بتثبيتها بمساعدة بروتينات تعرف باسم بروتينات منع الارتباط أو الالتصاق بالدنا وحيد الخيط Single- stranded DNA binding proteins (SSBP) والحفاظ على تباعدهما حيث يثبت كل بروتين حوالي10- 20 نيوكليوتيدة.

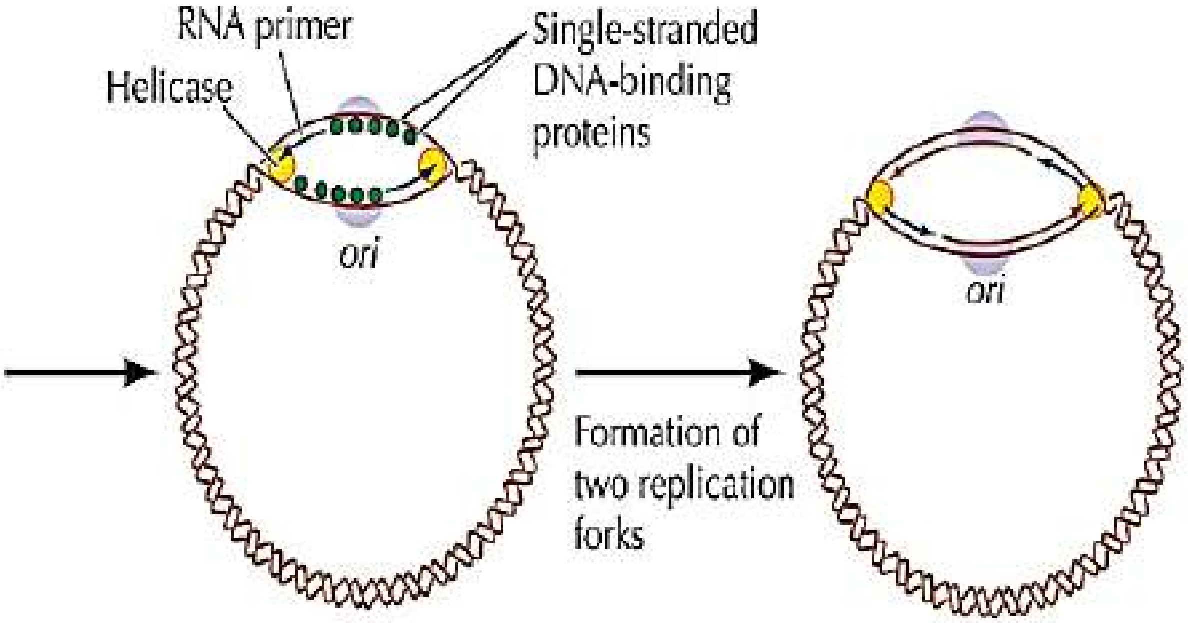
4- يقوم بعد ذلك إنزيم الدنا البلمرة DNA polymerase بإضافة النيكلوتيدات الجديدة لبناء الشريط الجديد مكملا للشريط القديم ذو الاتجاه 5→3 الذي يطلق عليه الشريط القائد Leading strand بشكل مستمر و سريع حيث أن أنزيم DNA poly لا يستطيع العمل الا في الاتجاه 5 → 3 فقط .

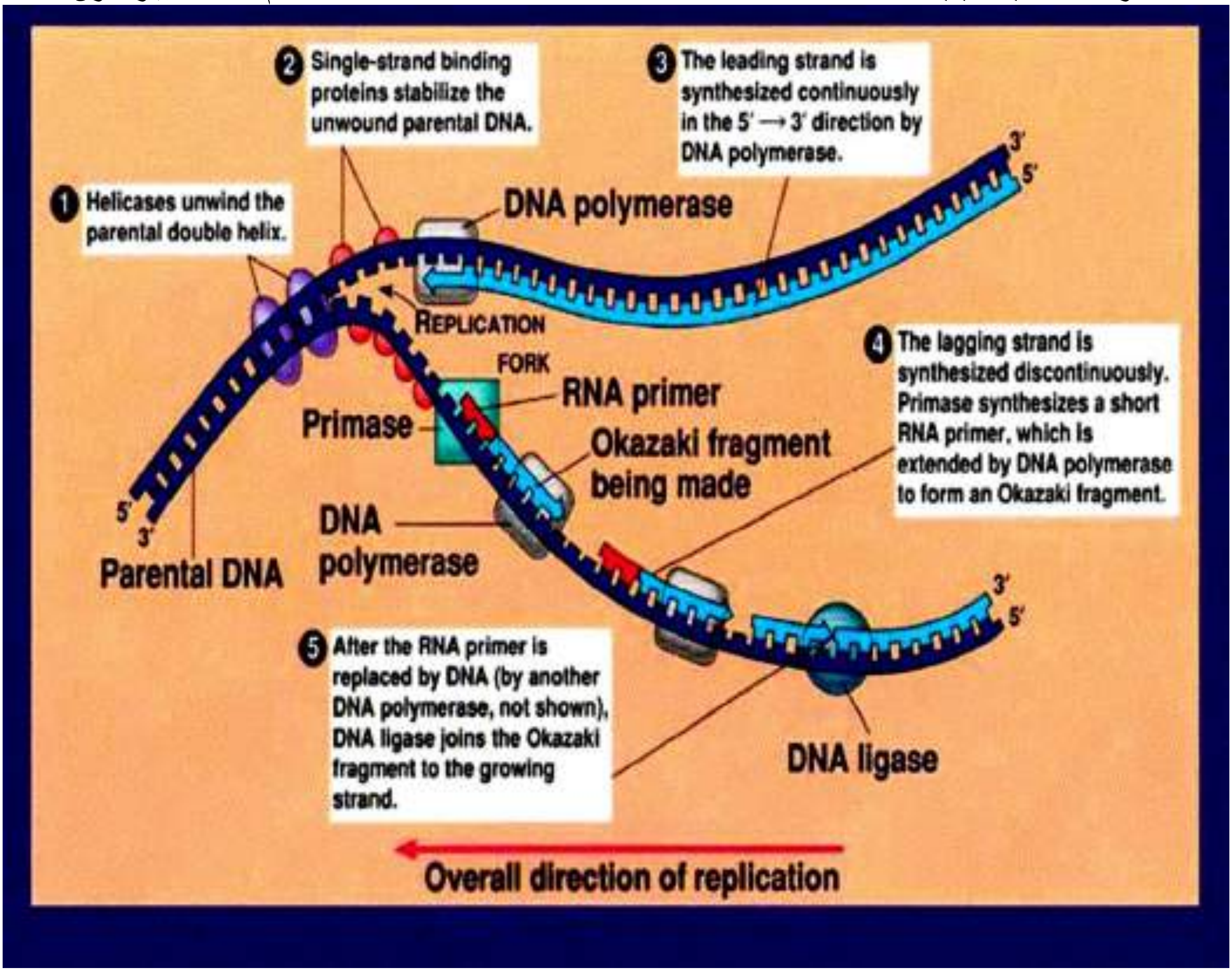
5- وتتم عملية بناء شريط الدنا القديم ذو الاتجاه 3→5 أو ما يعرف بالشريط المتباطئ lagging strand بطريقة متقطعة وبطيئة نسبيا وتكون قطع صغيرة من الدنا يتراوح طولها بين 1000 إلى2000 نيوكليوتيدة تعرف باسم شظايا أوكازاكي Okazaki fragments نسبة إلى مكتشفها العالم الياباني أوكازاكي.

6- يتم تصنيع هذه السلسلة بشكل أكثر تعقيدا مقارنة بالسلسلة المتقدمة. تبدأ العملية أيضا بإضافة نيوكلوتيدات لا تتجاوز 10 نيوكلوتيدات عن طريق إنزيم رنا برايميز RNA primase وتدعى بالبادئات RNA primer لإضافة مجموعة هيدروكسيل حرة ليأتي بعدها إنزيم DNA poly لإضافة نيوكلوتيدات متممة لسلسلة الدنا الأصلية.

7- عندما يصل إنزيم DNA poly إلى سلسلة النيوكلوتيدات التي تم إنشاها بواسطة إنزيم رنا برايميز يتم يستبدل نيوكلوتيدات RNA بنيوكلوتيدات DNA ويتم وصل هذه بالسلسلة التي تسبقها بواسطة إنزيم دنا الرابط DNA ligase
8- يقوم انزيم اللاحم DNA ligase بربط النيوكلوتيدات الجديدة وذلك عن طريق إضافة مجموعة الفوسفات بين ذرتي الكربون الثالثة والخامسة.


Parental (template) strand
Origin of replication
Daughter (new) strand
Bubble
Replication fork


RNA primer
Helicase
Single-stranded
DNA-binding
proteins
ori
Formation of
two replication
forks
ori


1 Helicases unwind the parental double helix.
2 Single-strand binding proteins stabilize the unwound parental DNA.
3 The leading strand is synthesized continuously in the 5′ → 3′ direction by DNA polymerase.
DNA polymerase
3′
5′
REPLICATION FORK
4 The lagging strand is synthesized discontinuously. Primase synthesizes a short RNA primer, which is extended by DNA polymerase to form an Okazaki fragment.
RNA primer
Primase
Okazaki fragment being made
5′
3′
DNA polymerase
Parental DNA
3′
5′
5 After the RNA primer is replaced by DNA (by another DNA polymerase, not shown), DNA ligase joins the Okazaki fragment to the growing strand.
DNA ligase
Overall direction of replication

من اهم الاجهزة المستخدمة في مختبر التقنيات الحياتية هي

ا- المجهر الالكترونيElectron microscope

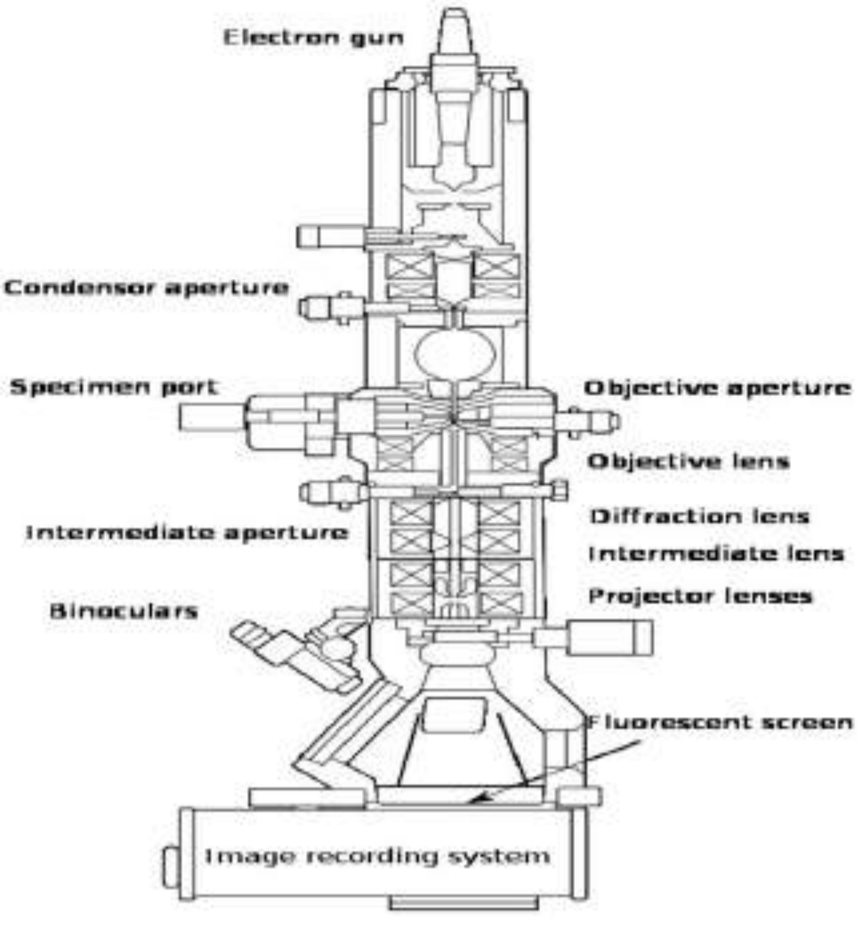
تمتاز هذه المجاهر بقوة تكبير عالية جداً قد تصل إلى أكثر من 10مليون مرة يعتمده العلماء للنظر داخل محتويات الخلايا او لفحص الفايروسات، بينما افضل قوة تكبير في المجاهر الاعتيادية هي اقل من 2000 مرة. كما أن مصدر الإضاءة فيها عبارة عن حزم من الالكترونات والعدسات المستخدمة فيها هي عدسات كهرومغناطيسية بدلا من العدسات الضوئية. يرجع الفضل في دقة وقوة تكبير الميكروسكوب الإلكتروني إلى الطول الموجي للإلكترون (0.0037 نانومتر)، والذي يكون أصغر ب100000 من الطول الموجي لفوتونات الضوء (400-700 نانومتر)، ويتضح من هنا العلاقة العكسية بين الطول الموجي وقوة التكبير والدقة وهذا النوع من المجاهر له قدرة تمييز عالية تصل الى 10 – 20 نانومتر وهنالك عدد من الانواع منها:

أ- المجهر الالكتروني النافذ (Transmission electron microscope TEM)

صمم إرنست روسكا(Ernst Ruska) أول مجهر إلكتروني بمساعدة ماكس نولز(Max Knolls) عام 1931م وبطاقة تكبير 400 مرة. وبعد تحسينات كبيرة في جودة تكبير المجهر، استطاع روسكا أن ينضم إلى شركة سيمنز الألمانية في أواخر الثلاثينيات كمهندس كهرباء، وهناك استطاع أن يساعدهم في تصنيع مجهره على نطاق أوسع.

يتكون المجهر الإلكتروني النافذ من المكونات التالية،

- مدفع الإلكتروناتElectron gun
- سلسلة من العدسات الكهرومغناطيسية
- غرفة مفرغة من الهواء
- منصة لتثبيت العينة
- شاشة فلورية وكاميرا
- جهاز كمبيوتر



يُعطي المجهر الإلكتروني صورًا بالأبيض والأسود ناتجة من التفاعل بين العينة المُجهزة والإلكترونات المحملة بالطاقة في الغرفة المفرغة. ويتم تفريغ الهواء للمحافظة على شدة شعاع الإلكترونات؛ حتى لا تمتصها جزيئات الهواء الجوي، وقد كان للTEM الدور الكبير في دراسة التركيب الدقيق للخلية واكتشاف العديد من عضياتها المتناهية في الصغر والتي كان من المتعذر رؤيتها بواسطة المجهر الضوئي حيث ان قوة تكبيره تصل الى 2.5 مليون مرة.

الية عمل الTEM

ويتكون المجهر الالكتروني النافذ من مصدر الكترونات والذي تنبعث منه حزمة مكثفة من الالكترونات تمر خلال مكثف ثم تخترق حزمة الالكترونات العينة المراد فحصها والتي يشترط أن يتراوح سمكها بين 100 نانومتر ثم تمر الالكترونات بالعدسات الكهرومغناطيسية الشيئية فالعدسات الكهرومغناطيسية العينية حتى تصل إلى المسرح وهو عبارة عن شاشة فلوروسنتية (Fluorescent screen) والتي تصطدم بها الالكترونات وعليها تظهر صورة العينة فالأجزاء الكثيفة من العينة والتي لم تخترقها الالكترونات يمكن رؤيتها بألوان داكنة أما الأجزاء الرقيقة والتي نفذت منها الالكترونات فيمكن رؤيتها بألوان فاتحة وهكذا فان درجة التباين والوضوح تعتمد على كمية الالكترونات النافذة خلال العينة و يمكن طبع صورة العينة على فيلم بواسطة كاميرا يقدم المجهر صور ثنائية الأبعاد عالية الدقة ومعلومات عن التركيب الكيميائي والبلوري، والشكل الداخلي للعينات. من سلبياته انه لا يمكن استخدامه لمشاهدة العينات وهي حية.

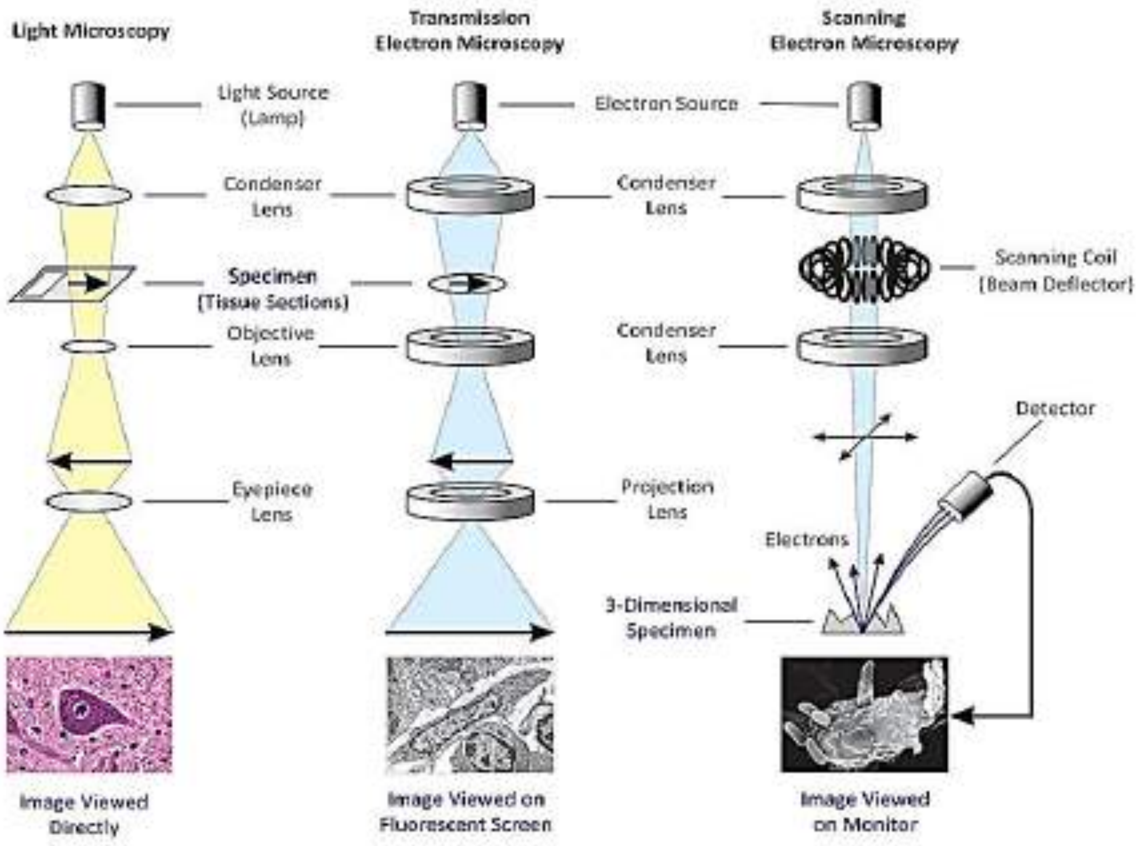
ب- المجهر الالكتروني الماسح (Scanning electron microscope SEM)

يستخدم المجهر الإلكتروني الماسح تقنية تعرف باسم المسح النقطي لإنتاج صور مكبرة للعينة. حيث يوجه شعاعًا إلكترونيًا مركزًا عبر العينة، يفقد الشعاع الطاقة أثناء مروره. ويتم تحويل هذه الطاقة إلى أشكال أخرى من الطاقة، مثل الحرارة والضوء والإلكترونات الثانوية والإلكترونات المتناثرة. ويمكن ترجمة هذه المعلومات لعرض تفاصيل العينة الأصلية وتكوينها.

المجهر الإلكتروني الماسح أقل دقة من المجهر الإلكتروني النافذ، لكنه مفيد جدًا لدراسة العينات الكبيرة والسميكة التي قد يصل سمك بعضها إلى عدة سنتيمترات حيث يعطي صورة مجسمة للعينة. وقوة تكبيره تصل الى 100000 مرة.

وتركيب المجهر الالكتروني الماسح يشبه المجهر الالكتروني النافذ من حيث مصدر الإضاءة والعدسات المستخدمة إلا أنه يختلف عن النافذ في كيفية إظهار الصورة ثلاثية الابعاد للعينة المطلية بطبقة رقيقة معدنية حيث يعتمد إظهار الصورة في هذا النوع من المجاهر الالكترونية على الالكترونات المرتدة من على سطح العينة لتظهر على شاشة تلفزيونية وعادة ما يستخدم SEM في دراسة العينة كاملة أو جزء منها الجهاز يستخدم لفحص العينات البيولوجية سواء الحيوانية أو النباتية وكذلك العينات غير البيولوجية مثل الحفريات والصخور والمعادن، وعلى ذلك فالجهاز يقدم خدمة لقطاع كبير من المتخصصين في الدراسات البيولوجية وغير البيولوجية. ايضا لا يستخدم لرؤية العينات الحية بسبب طاقة الالكترونات العالية.

فكرة عمل الميكروسكوب الإلكتروني الماسح
SEM
المدفع الإلكتروني
المدفع الإلكتروني
الانود
عدسة مجمعة
عدسة مجمعة
الشعاع الإلكتروني
عدسة
غرفة العينة
كاشف الاستطارة الخلفية
كاشف اشعة اكس
كاشف ثانوي
العينة
موقع الفيزياء التعليمي
www.hazemsakeek.com


Light Microscopy
Transmission Electron Microscopy
Scanning Electron Microscopy
Light Source (Lamp)
Electron Source
Condenser Lens
Condenser Lens
Scanning Coil (Beam Deflector)
Specimen (Tissue Sections)
Objective Lens
Condenser Lens
Detector
Eyepiece Lens
Projection Lens
Electrons
3-Dimensional Specimen
Image Viewed Directly
Image Viewed on Fluorescent Screen
Image Viewed on Monitor

استخدامات المجهر الإلكتروني

المجهر الإلكتروني هو تقنية للحصول على صور عالية الدقة للعينات البيولوجية وغير البيولوجية. يتم استخدامه في البحوث الطبية الحيوية لفحص البنية التفصيلية للأنسجة والخلايا و العضيات الجزيئات الكبيرة في الخلايا وأجسام الكائنات الحية مثل الحمض النووي .تنتج الدقة العالية لصور المجهر الإلكتروني عن استخدام الإلكترونات (التي لها أطوال موجية قصيرة جدًا). يتم استخدام الميكروسكوب الإلكتروني بالاقتران مع مجموعة متنوعة من التقنيات المساعدة (مثل التقسيم والتقطيع الرقيق للعينات والتجفيف والتلوين).

المجهر الإلكتروني له مجموعة متنوعة من التطبيقات والاستخدامات. إن القدرة على عرض التركيب المجهري للعينة بدقة أعلى مما هو ممكن عند الفحص بالمجهري الضوئي يمنحه دورًا مميزًا في البحث العلمي والتطبيقات الصناعية. ستناول العديد من هذه التطبيقات بمزيد من التفاصيل أدناه.

البحث علمي

تستخدم المجاهر الإلكترونية بشكل شائع في مختبرات الأبحاث والجامعات ومراكز تقنية النانو. في هذه المؤسسات، يمكن ملاحظة هيكل العينة بتفصيل كبير لتوفير معلومات حول وظيفتها. يمكن بعد ذلك بناء النتائج من مراكز البحث العلمي واستخدامها من قبل هيئات أخرى، مثل الشركات الصناعية.

على سبيل المثال، يمكن استخدام مجهر إلكتروني لتحليل الجسيمات أو وصف المواد في مختبر أبحاث. هذه المعلومات حول خصائص الجسيم أو المادة مفيدة في فهم دورها في النظام الذي تتم دراسته.

في علم الأحياء، يمكن استخدام المجهر الإلكتروني لاستكشاف الطبيعة الجزيئية وآليات المرض، وعرض البنية ثلاثية الأبعاد للأنسجة أو الخلايا البيولوجية، وتحديد بنية البروتينات ومراقبة الفيروسات ودراستها. يمكن بعد ذلك تمرير هذه النتائج إلى مراكز أبحاث الصناعة التي ستركز على استخدام المعلومات. على سبيل المثال، يمكن بعد ذلك استخدام المعلومات حول طبيعة المرض في تطوير الأدوية واللقاحات.

الصناعة

غالبًا ما يستخدم المجهر الإلكتروني للأغراض الصناعية والمساعدة في تطوير منتجات جديدة وخلال عملية التصنيع.

على سبيل المثال، تستخدم الصناعات الإلكترونية المجاهر الإلكترونية للتصوير عالي الدقة في عمليات تطوير وتصنيع أشباه الموصلات وغيرها من الإلكترونيات. الصناعات الأخرى التي قد تستخدم المجاهر الإلكترونية عادة كجزء من عملية إنتاجها هي صناعة الطيران والسيارات والملابس والصناعات الدوائية.

يمكن أيضًا استخدام المجهر الإلكتروني في تحليل وكشف الأخطاء الصناعية ومراقبة العمليات في الصناعات المتنوعة . كما يستخدم في مراقبة الجودة أثناء تصنيع أجهزة الكمبيوتر ورقائق السيليكون. تستخدم الشركات التصوير بالمجهر الإلكتروني للكشف عن العيوب والكسور الموجودة في المواد متناهية الصغر؛ وهذا بدوره يساعد في إصلاح المشاكل، وزيادة عمر وكفاءة هذه المواد.

الموارد الطبيعية

يمكن استخدام المجهر الإلكتروني لتوصيف وتحليل المواد العضوية، وهي معلومات ذات قيمة خاصة لشركات التعدين. ويمكن أن توفر المجاهر معلومات آلية وموضوعية وكمية عن البيئة بسرعة.

بالإضافة إلى ذلك، يمكن لشركات النفط والغاز مسح منطقة ما وجمع المعلومات عنها باستخدام هذه التقنية. يمكن أن يساعد ذلك في تقليل المخاطر المرتبطة باستكشاف واستخراج النفط والغاز. على سبيل المثال، يمكن الحصول على خصائص الحجم والفراغات المسامية لجزيئات التربة والصخور. يمكن أن يساعد المجهر الإلكتروني أيضًا في التحقق من صحة المدخلات للنماذج الجيولوجية التي تم إنتاجها من سجلات الزلازل.

علم الطب الشرعي

يستخدم المجهر الإلكتروني أيضًا على نطاقٍ واسع في علم الطب الشرعي، والذي ينطوي على تحليل العينات لتقديم أدلة للكشف عن الجريمة والمساعدة في تطبيق القانون .على سبيل المثال، يمكن استخدام مجهر إلكتروني لتحليل التفاصيل الدقيقة لعينة ذات صلة، مثل بقايا الطلقات النارية أو العينات التي قد يتركها المجرمون في مسرح الجريمة مقل بقايا الملابس أو الدم أو أي مادة بيولوجية أخرى.

الترحيل الكهربائي في هلام الاكاروز Gel electrophoresis

الترحيل الكهربائي تقنية تستخدم لعزل الايونات والجزيئات الكبيرة المشحونة (DNA, RNA, والبروتينات) حسب معدل حركتها تحت تأثير المجال الكهربائي. تعتمد هذه الطريقة على طبيعة جزيئات المواد المفصولة فإذا كان للجزيئة محصلة شحنة سالبة أو موجبة، فإنها سوف تهاجر في المجال الكهربائي – إن الجزيئة ذات الشحنة السالبة (الأنيون anion) تهاجر وتنجذب إلى القطب الموجب (الأنود anode)، والجزيئات ذات الشحنة الموجبة (الكاتايون cation) سوف تهاجر وتنجذب نحو القطب السالب (الكاثود cathode).

يتم الترحيل في هلام (gel) يتكون من ثقوب مجهرية دقيقة، ويقوم هذا الهلام بإعاقة حركة الجزيئات المختلفة من خلال التأثير المنخلي لثقوبه الدقيقة، حيث إن الجزيئات الصغيرة أو المدمجة تهاجر بشكل أسرع خلال الهلام من الجزيئات الأكبر أو غير المتناظرة، والتي تواجه مقاومة احتكاكية أثناء حركتها في شبكة الهلام الدقيقة. لذا تستخدم تقنية الترحيل الكهربائي بشكل واسع في علم الخلية cytology وفي الوراثة الجزيئية molecular genetics لفصل الجزيئات الكبيرة العملاقة macromolecules. يمكن معرفة حجم هذه الجزيئات المفصولة على الهلام من خلال مقارنتها بواسمات جزيئية قياسية standard molecular markers والتي ترحل بموازاة العينة الغير معروفة خلال الترحيل الكهربائي في الهلام.

تحمل جزيئات الـ DNA والـ RNA شحنة سالبة أصيلة بسبب عمودها الفقري المحتوي على الفوسفات. أما البروتينات، فإنها تحمل شحنات مختلفة على سطحها باختلاف شحنات الأحماض الأمينية الموجودة فيها. ولهذا وبالنسبة للبروتينات فقط، فان محصلة شحنة الجزيئات تلعب دورا مهما في حركتها في الهلام.

يوجد نوعان من الهلامات المستخدمة وهما الاكاروز Agarose ومتعدد الاكريلامايد polyacrylamide . الاكاروز هو مركب متعدد السكاريد ويستخلص من الطحالب البحرية ويتميز بانه مادة هشة ضعيفة وتتكسر بسهولة بالتسخين. وتستخدم لفصل قطع DNA, RNA حسب الطول وتحديد نقاوة الحامض النووي .

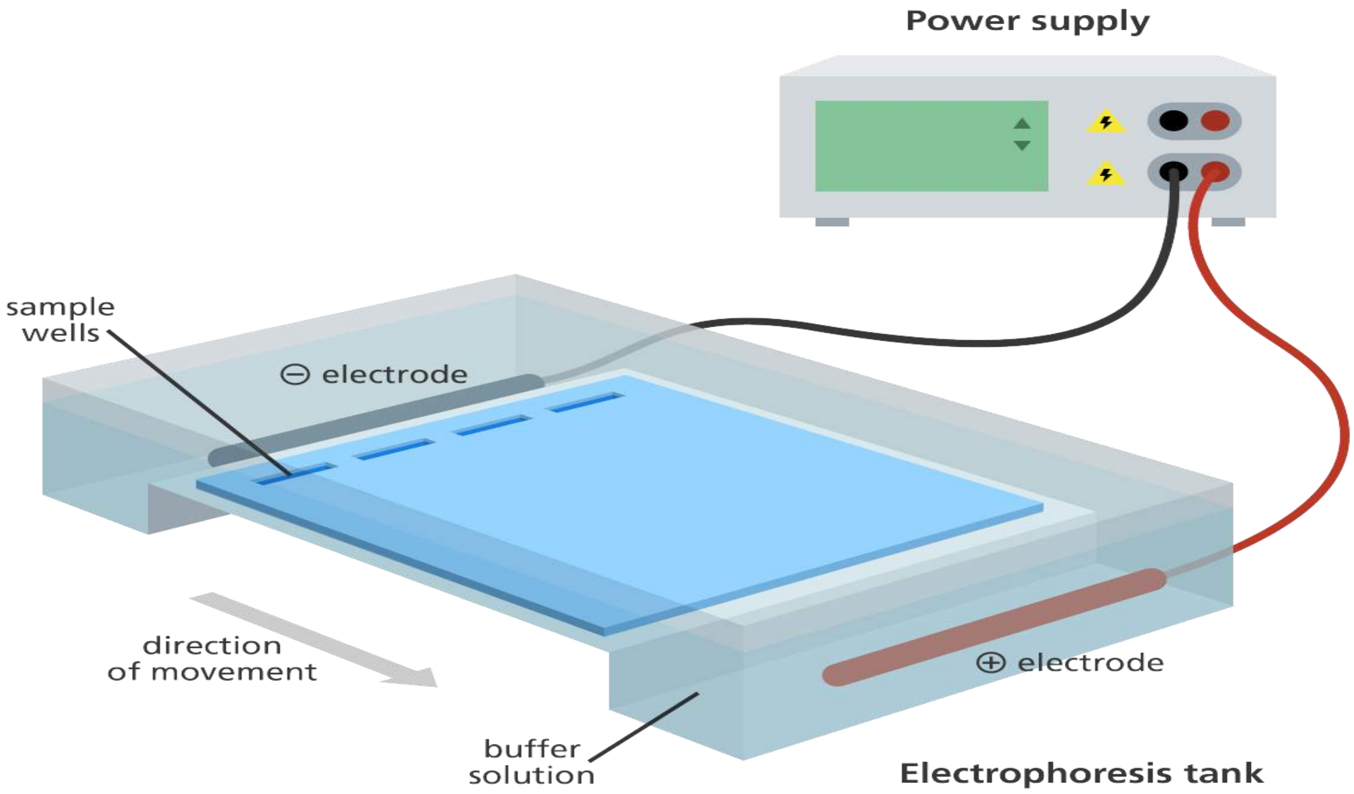
هلام الاكريلامايد يستخدم في عزل البروتينات او جزيئات صغيرة جدا من الاحماض النووية التي تختلف في الطول بقاعدة نيتروجينية واحدة فقط.

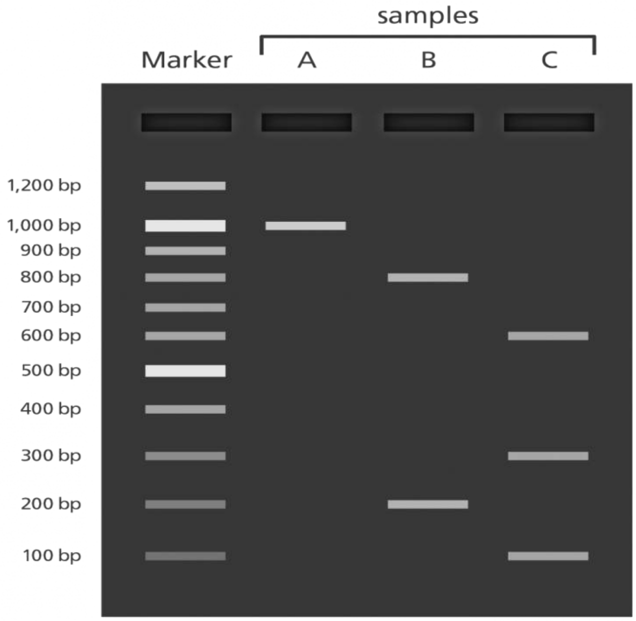
يمكن رؤية الحامض النووي المتواجد على الهلام بإضافة صبغة الاثيديوم بروومايد ethidium bromide حيث يظهر الDNA المفصول على الهلام كخطوط. يستمر الترحيل الكهربائي حتى وصول الصبغة الى نهاية الهلام وتظهر قطع الدنا ذا وميض وهاج فيسهل تعينها وتصويرها بالأشعة فوق البنفسجية UV.

- **العوامل التي تتحكم بحركة الجزيئات في الهلام:**

1. الشحنة charge (فيما إذا لو كانت سالبة أو موجبة)
2. حجمها أو وزنها الجزيئي formula weight (فالجزيئات الصغيرة تتحرك خلال الهلام بصورة أسرع من الجزيئات الكبيرة)

3. حجم الثقوب pore size (كلما كان حجم الثقوب صغيرا كلما كان ذلك ملائما لفصل الجزيئات الصغيرة والعكس بالعكس)
4. قوة التيار الكهربائي (يستخدم التيار الكهربائي العالي للفصل السريع للجزيئات الصغيرة بشكل عام ولكن على أن لا يكون عالي جدا لأن هذا يؤدي إلى تحطم الجزيئات عند تعرضها إليه. أما التيار الواطيء فيستخدم عادة لفصل الجزيئات الكبيرة التي تتشوه عند الارتفاع البسيط لقوة التيار، ولكن على أن لا يكون التيار واطيء جدا لأنه كلما كان التيار واطئا كان وقت الترحيل كبيرا، وكلما ازداد وقت الترحيل ازدادت نسبة تعرض حزم الجزيئات المرحلة إلى حالة الانتشار band diffusion والذي هو غير مرغوب أثناء عملية الترحيل في الهلام).
5. المسافة بين الالكترودين
6. لزوجة المحاليل (تركيز الهلام وحجم الثقوب)





خطوات الترحيل الكهربائي في هلام الأكاروز

1- تلحم حافات وعاء صب الهلام بشريط شفاف، أو بالماسكات الموفرة مع الوعاء من قبل الشركة المجهزة. وتجري عملية اللحم عادة لمنع تسرب الهلام خلال عملية التصلب. يوضع الوعاء بوضع أفقي على الطاولة. لاحظ اتزان المستوى الأفقي لطاولة من خلال الموازن balance.

2- تحضّر كميات كافية من البفرbuffer دارئ الترحيل الكهربائي، كما في داريء 0.5 X TBE، لمليء غرفة الترحيل الكهربائي ولتحضير الهلام. حيث تضاف كمية محسوبة من مسحوق الأكاروز إلى كمية محسوبة من داريء الترحيل الكهربائي في قارورة flask ذات سدادة.

ملاحظة: من المهم استخدام نفس الداريء في غرفة الترحيل الكهربائي وفي الهلام، حيث إن اختلافات بسيطة سواءً في القوة الأيونية أو في الأس الهيدروجيني pH تخلق جبهات على الهلام تؤثر تأثيراً كبيراً على حركة جزيئات الـ DNA.

3- اقفل فتحة القارورة برخاوة. يجب التأكد من رخاوة سداد القارورة. سخّن القارورة بحمام مائي بدرجة حرارة 100˚C (درجة حرارة الغليان) إلى أن يذوب الأكاروز.

4- برّد المحلول إلى درجة حرارة 60˚C، وإذا كان ذلك مرغوباً، تضاف صبغة بروميد الاثيديوم، وتمزج بشمولية.

ملاحظة: يمكن اضافة صبغة بروميد الاثيديوم إلى هلام الأكاروز قبل تصلبه، او ممكن ان تضاف الى عينة الدنا فقط.

5- يوضع المشط (يستخدم لعمر حفر في الهلام) بارتفاع 1.0 mm – 0.5 فوق وعاء صب الهلام لكي تتكون حفرة كاملة عند إضافة الأكاروز. وإذا كان المشط أقرب إلى صفيحة وعاء صب الهلام،

6- اسكب محلول الهلام الساخن على وعاء صب الهلام. يجب أن يكون سمك الهلام ما بين 3 mm إلى 5 mm. افحص لتطمئن عدم وجود فقاعات هوائية لأن وجود الفقاعات يعمل على تحطيم الـ DNA عند مروره بها.

7- بعد أن يتصلب الهلام بشكل كامل، (30 إلى 45 دقيقة بدرجة حرارة الغرفة)، يزال المشط بحذر وتبعد الماسكات (أو الشريط الشفاف) عن وعاء صب الهلام

8- تخلط العينات (عينات الـ DNA) مع نفس البفرbuffer .

9- وباستخدام micropipette مناسب، توضع العينات الممزوجة مع داريء التحميل في حفر العينات، ويوضع الوعاء في غرفة الترحيل الكهربائي.

10- أضف كمية كافية من داريء الترحيل الكهربائي إلى أن يرتفع الداريء بمقدار 1 mm فقط عن الهلام.

11- يوضع الغطاء lid على غرفة الترحيل الكهربائي، ثم يوضع القطبين الكهربائيين بحيث يهاجر الـ DNA نحو الأنود (القطب الأحمر). وإذا وصلت الأقطاب بشكل صحيح، فلابد من تولـّد الفقاعات عند قطبي الأنود والكاثود. وفي دقائق معدودة،.

12- بعد انتهاء الترحيل الكهربائي، يطفيء التيار الكهربائي، وتزال الأقطاب الكهربائية والغطاء من غرفة الترحيل الكهربائي. يرفع وعاء صب الهلام ويوضع في وعاء التصبيغ ببروميد الاثيديوم. باستخدام جهاز UV transluminator ، يتم مشاهدة عينات الـ DNA وهي مصبوغة بصبغة بروميد الاثيديوم، باستخدام طول موجي 300-360 nm.