كلية الزراعة – جامعة المثنى

علم الحياة الجزيئي

أ.م. د هادي عواد حسون

1. **تعريف علم البايولوجي الجزيئي *Molecular Biology* :**هو مزيج من علوم الحياة والكيمياء الذي يهتم بدراسة بدراسة تكوين وتركيب ووظيفة الجزيئات الخلوية الكبيرة Macromolecules كالاحماض النووية والبروتينات ودورها في الفعاليات البايولوجية المهمه كلتضاعف الخلوي وتناقل المعلومات الوراثية. ان مصطلح Molecular Biologyصيغ من قبل العالم الامريكي Warren Weaver مدير قسم العلوم الطبيعية في مؤسسة Rockefeller حيث صيغ كفكرة للتفسيرات الفيزياوية والكيمياوية للحياة.

2. **نبذة تاريخية عن علم البايولوجي الجزيئي:**

على الرغم من مكانته البارزة بين العلوم الحيوية الا ان علم البايولوجي الجزيئي هو علم حديث النشأة حيث ان بدايات نشوئه كانت في ثلاثينيات القرن التاسع عشر لكنه دخل حيز التطبيق الموؤسساتي وبدأ العمل به في اواسط خمسينيات وبداية ستينيات القرن التاسع عشر. ان نشوء هذا العلم نتج من تقارب وتداخل واندماج علم الوراثة والفيزياء والكيمياء التركيبية وعلى الرغم من قوانين مندل الوراثية الا انه الية تضاعف المادة الوراثية وحدوث الطفرات والتعبير الجيني بقيت غير معروفه[1]. ويمكن ايجازها بمايلي:

المرحلة الاولى: مابين 1900-1950 واهم الاحداث فيها هي:

- وضعت (فرضيةالجين كأساس للحياة) ودراسة تاثير الاشعة السينية كعامل مطفرمن قبل عالم الوراثه الامريكي Hermann J. Muller وعمد لدراسة تركيب الجين كذلك استنتج هذا العالم من دراساته المتعددة ان عالم الوراثه يكون عديم الفائدة مالم يعمل كفريق مشترك مع عالم الفيزياء والكيمياء لدراسة الجزيئات الخلوية الكبيرة ((حصل هذا العالم على جائزة نوبل في الطب والفسلجة عام 1946 لدراسته تاثير الاشعة السينية كعامل مطفر)) [2].

- تحديث(فرضيةالجين" والتي تنص على ان الجين هو وحدة التوارث) من قبل عالم الاجنة الامريكي Thomas Hunt Morgan وكذلك استخدام ذبابة الفاكهه *Drosophila* كموديل لدراسة العلاقة بين الجين والكرموسوم في عملية التوارث ((حصل على جائزة نوبل في الطب والفسلجة عام 1933 لاكتشافه دور الكرموسومات في التوارث)) [3].

- اكتشاف عاثيات البكتريا Phage من قبل علم الفيزياء الحيوية الالماني Max Delbrueck وعالم المايكروبايولوجي الايطالي Salvador Luria والامريكي Alfred Hershey عام 1945 ((حصلوعلى جائزة نوبل في الطب والفسلجةعام 1969لاكتشافهم عاثيات البكتريا Phage [4] .

- وضعت فرضية (جين واحد-انزيم واحد one gene-one enzyme hypothesis) من قبل الامريكيينGeorge Beadle و Edward Tatum في عام 1941 واللذين حصلا فيما بعد على جائزة نوبل في الطب والفسلجة عام 1958 نتيجة لهذه الفرضية) [5].

المرحلة الثانية: مابين 1950-2000 واهم الاحداث فيها هي:

- اكتشاف تركيب الجين من قبل المايكروبايولوجي الامريكي Alfred Day Hershey وعالم الوراثة الامريكي Martha Cowles Chase حيث اجرو تجارب مهمه على عاثيات البكتريا اثبتو فيها ان الجينات تتكون من deoxyribonucleic acid (DNA) بدلا من البروتين عام 1952 وعرف تجربتهم الشهيره فيما بعد بـ[6]Hershey-Chase experiment .

- اكتشاف التركيب الحلزوني المزدوج للـ DNAمن قبل عالم البايولوجيا الانكليزي Francis Crick و الامريكي James Watson عام 1953 ((حصلو على جائزةنوبل في الطب والفسلجةعام 1962 وذلك لاكتشافهم التركيب الحلزوني المزدوج للـ DNA)) وكذلك اكتشاف الشفرة الوراثية Genetic code ومن الجدير بالذكر ان الكيمياوي السويسريFriedrich Meischer هو اول من اكتشفت الـ DNA واسماه بـ[7]Nuclein.

- اكتشاف طريقة تحديد تتابع الاحماض الامينية في البروتينات من قبل الكيمياوي الانكليزي Frederick Sanger في 1952 والذي اكتشف فيما بعد طريقة انهاء السلسلة لتحديد تتابع القواعد النتروجينية في الاحماض النووية في 1977 والتي عرفت فيما بعد بـSangersequencing ((ومن الجدير بالذكر انه حصل مرتين على جائزة نوبل في الطبوالفسلجةعام 1958 وعام 1980)) [8].

- اكتشاف الطريقة الكيمياوية لتحديد تتابع القواعد النتروجينية في عام 1977من قبل الامريكيين Walter Gilbert و Allan Maxam وسميت الطريقة فيما بعد بـ Maxam-Gilbert sequencing[9].

- اكتشاف تقنية ال PCR من قب الكيمياوي الامريكي Kary Banks Mullis عام 1983 والذي حصل فيما بعد على جائزة نوبل في الكيمياء عام 1993[01].

- في عام 1990 تم وضع مشروع الجينوم البشري Human Genome Project (HGP) والذي يهدف الى معرفة تتابع القواعد النتروجينية لكل ال DNA المكون للجينوم البشري حيث اكتمل هذا المشروع في عام 2003 [11].
- استخدام الـ STR للتحري عن الضحايا والجرائم الجنائية واختبار الابوة[21].

المرحلة الثالثه: مابعد عام 2000 واهم الاحداث فيها هي:

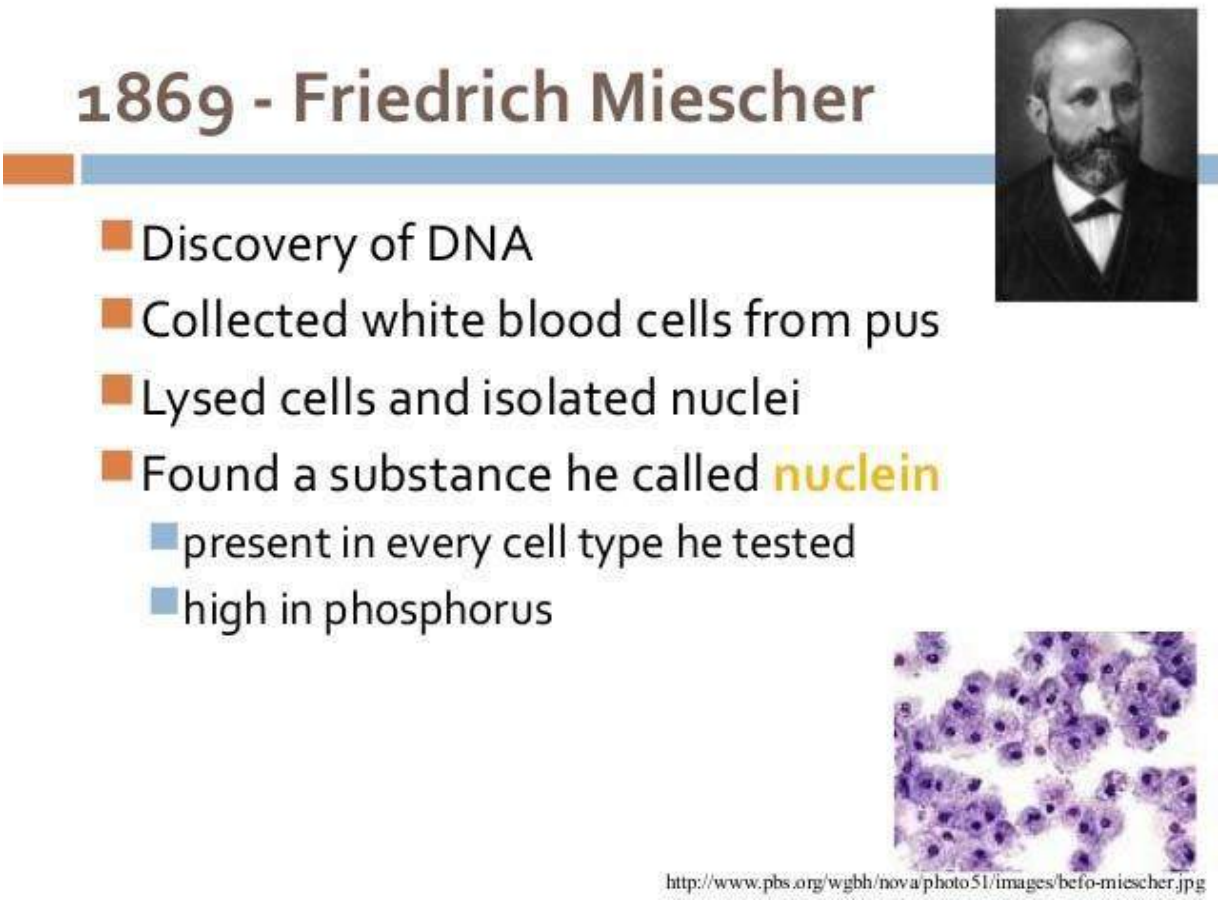
- العلاج الجيني
- استخدام تقنية ال CRISPR في التحوير الجيني.

المادة الوراثية *Genetic Material*

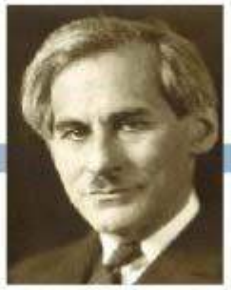
تعرف المادة الوراثية على أنها الجزيئات الحاملة للمعلومات والصفات الوراثية (Genotype) التي تشفر للصفات المظهرية (Phenotype) . بالنسبة للإحياء بدائية النواة (prokaryote) تكون المادة الوراثية إما حامض نووي رايبوزي منقوص الأوكسجين Deoxyribonucleic acid (DNA) او حامض نووي رايبوزي

الأوكسجين Ribonucleic acid (RNA) اما في حقيقية النواة فتكون بصورة حامض نووي رايبوزي منقوص الأوكسجين Deoxyribonucleic acid (DNA) فقط .

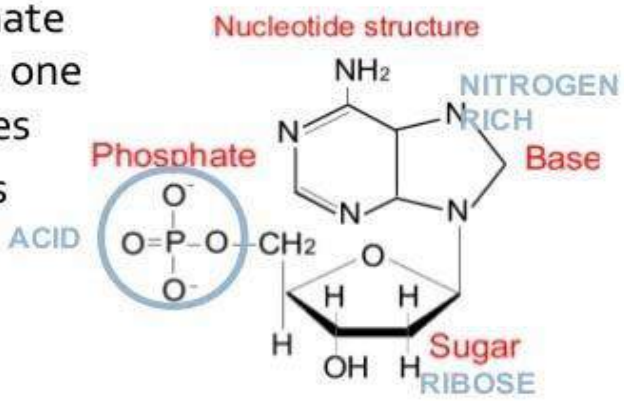
اكتشاف المادة الوراثية:



1909 – Phoebus Levene



- Determined correctly that:
  - DNA made up of chains of nucleotides
  - a nucleotide is a phosphate linked to sugar linked to one of four nitrogenous bases
  - nucleotides link in series phosphate to sugar

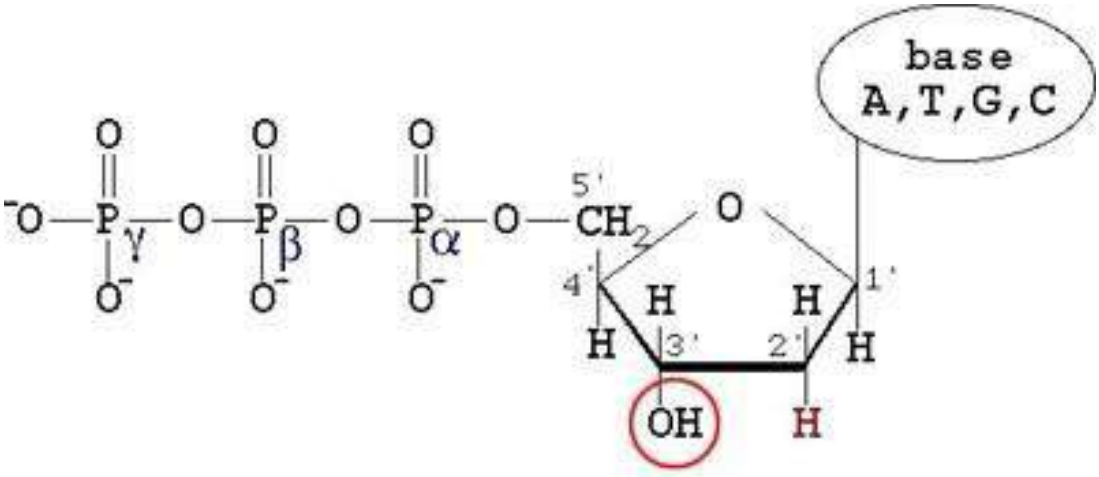


Phoebus Levene (1920's)

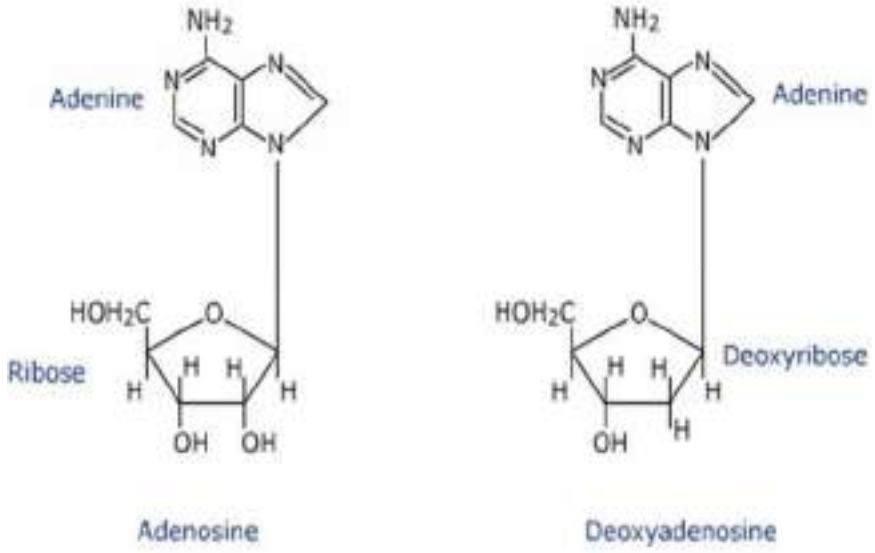
- identified the 3 components of DNA molecule
  - deoxyribose sugars
  - phosphate groups
  - nitrogenous bases
- 4 nitrogenous bases identified by 1949

تركيب ال *DNA & RNA*

- بصوره عامه تتكون هاتين الجريئتين (DNA & RNA) من متعدد النيوكليوتايد Polynucleotides
- النيوكليوتيدة هي اصغر وحدة بنائية للاحماض النووية.
- تتكون النيوكليوتيدة الواحدة من سكر خماسي + قاعدة نتروجينية + مجموعة فوسفات
- عندة ازالة مجموعة الفوسفات من النيوكليوتيدة تسمى نيوكليوسايد Nucleoside



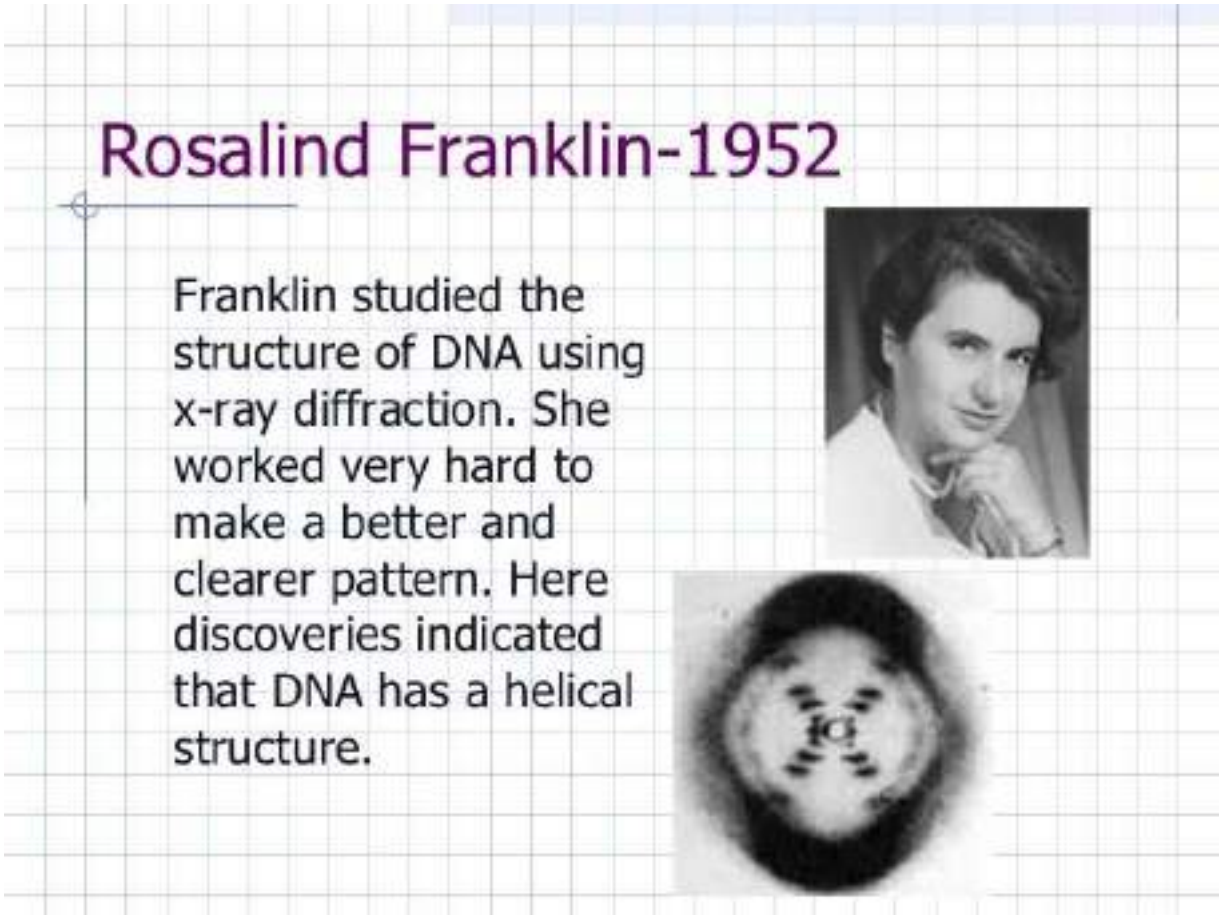
dNTP
deoxyribonucleotide triphosphate

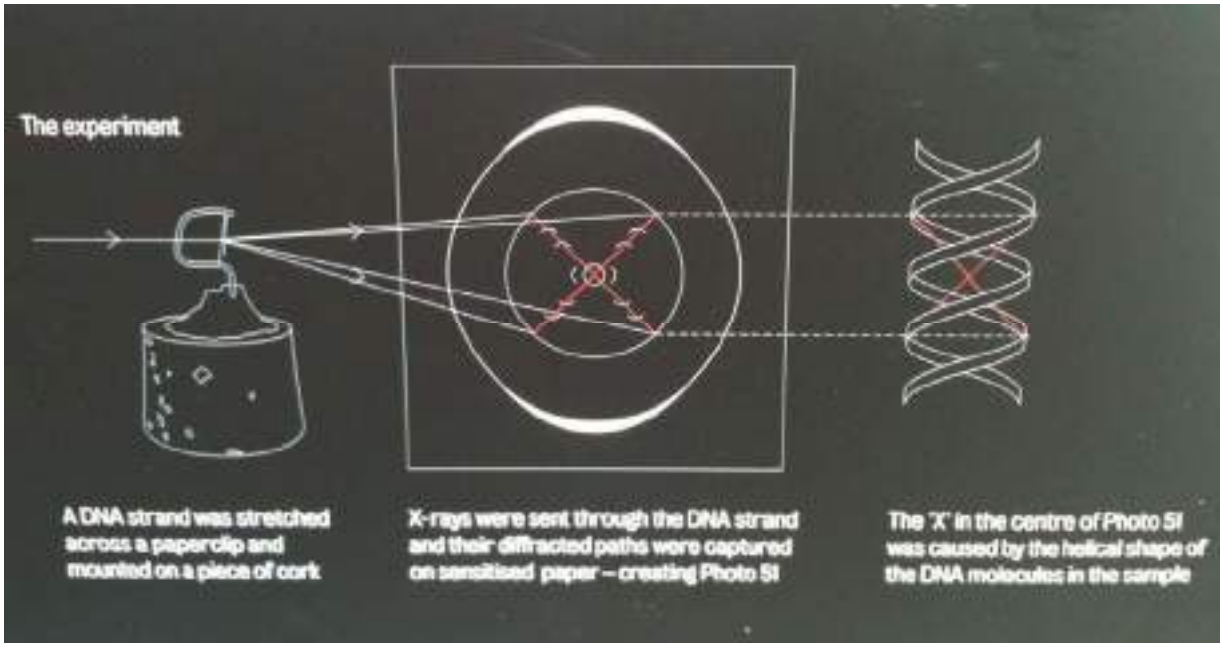


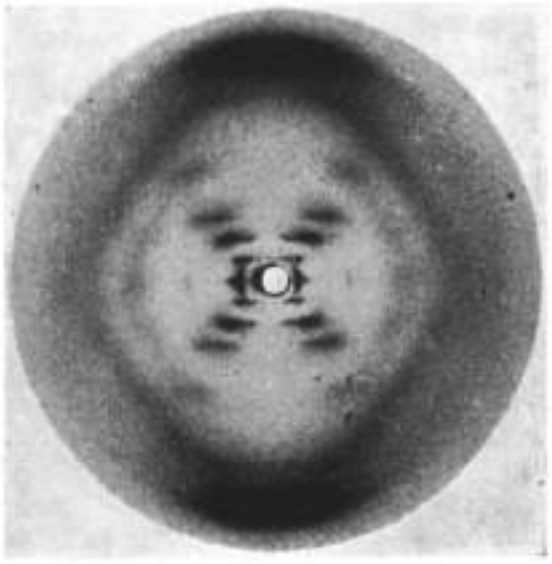
الصفات التركيبية والفيزياوية لل *DNA*

يتركب الDNA من النيوكليوتيدات ويكون ثنائي الشريط Double Strand ويسمى dsDNA (ماعدا بعض الفيروسات يكون في بعض الاحيان بشكل شريط منفرد Single strand ويسمى ssDNA) ومن مميزات جزيئة DNA :

1 - **Double helix** : إن أول من اكتشف تركيب الDNA بشكل Double helixهما العالمين واتسن وكرك عام 1953 (James Watson and Francis Crick) واللذين حصلا فيما بعد على جائزة نوبل في الطب والفسلجةعام 1962 لاجل هذا الاكتشاف . تم الحصول على هذه النتائج من خلال التجارب التي أجريت على DNA باستخدام الاشعه السينيه حيث تم الاستدلال على هذا التركيب من خلال قراءة انحراف الاشعة السينية

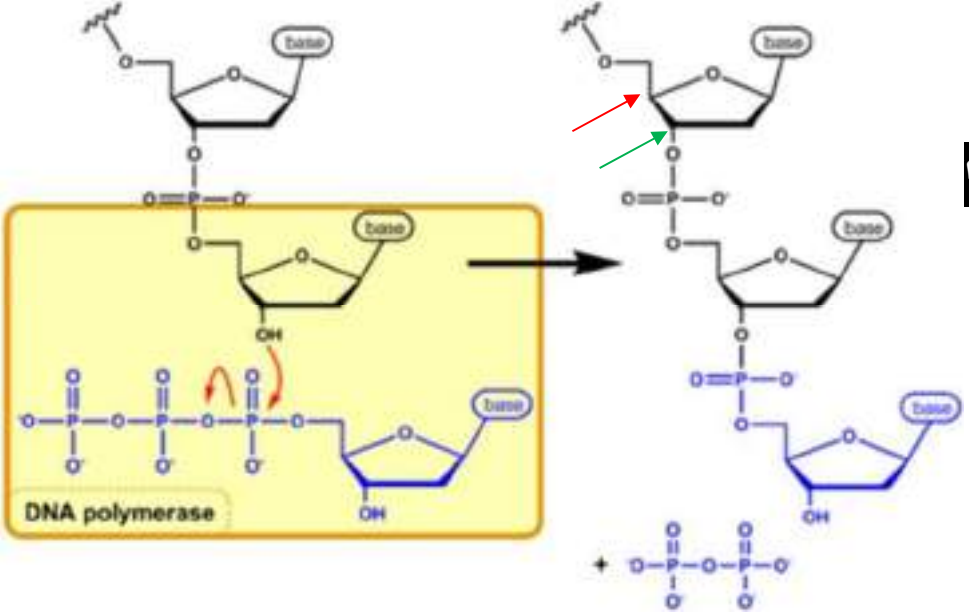


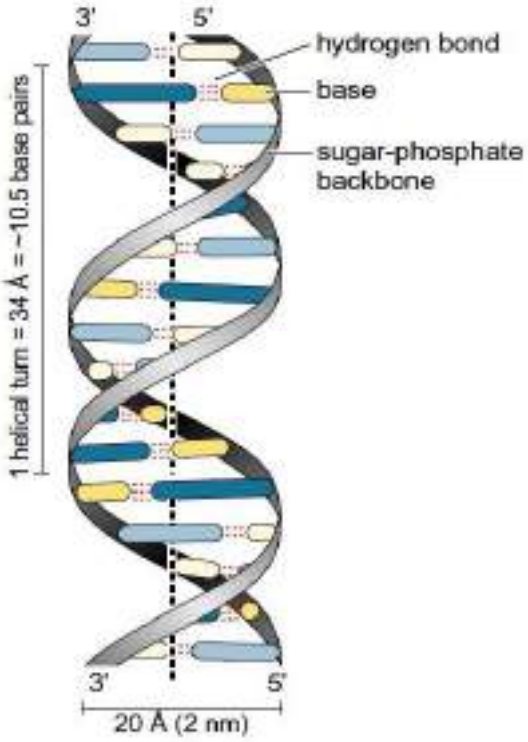




تجربة انحراف الأشعة السينية التي أجريت من قبل روزلاند فرانكلين

2 **5'-3' direction** : ويقصد ب هان شريط DNA ينى بالاتجاه '3-'5 حيث تمثل '5 موقع ذرة الكاربون لسكر الرايبوز منقوص الاوكسجين التي ترتبط بها مجموعة الفوسفات بينما **'3**موقع ذرة الكاربون لسكر الرايبوز منقوص الاوكسجين التي تضاف عندها نيوكليوتيده جديده وهذا يعني ان DNA يبنى بالاتجاه **'5-'3؟**





3 **A nti parallel** : التضاد ويقصد بها إن شريطي DNA جزيئية يلتفان حول بعضهما البعض باتجاهين متعاكسين.

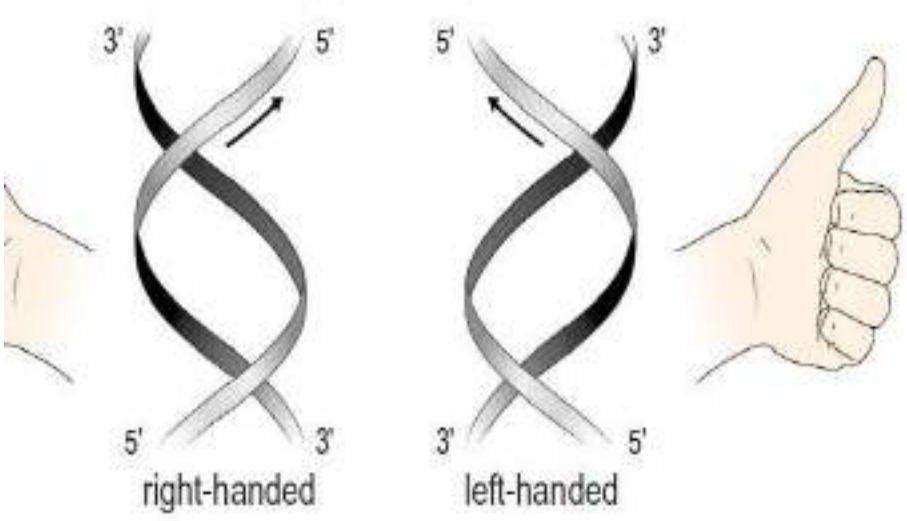
4 قطر جزيئة DNA هو 20 انكستروم في حين ان اللفه الواحده طولها 34 انكستروم

5 تتكون اللفه الواحده من DNA من 5.10 زوج قاعدي وبذلك يكون طول القاعده الواحده او الزوج القاعدي حوالي 3.3 انكستروم.

6 وزن الزوج القاعدي هو 660 دالتون

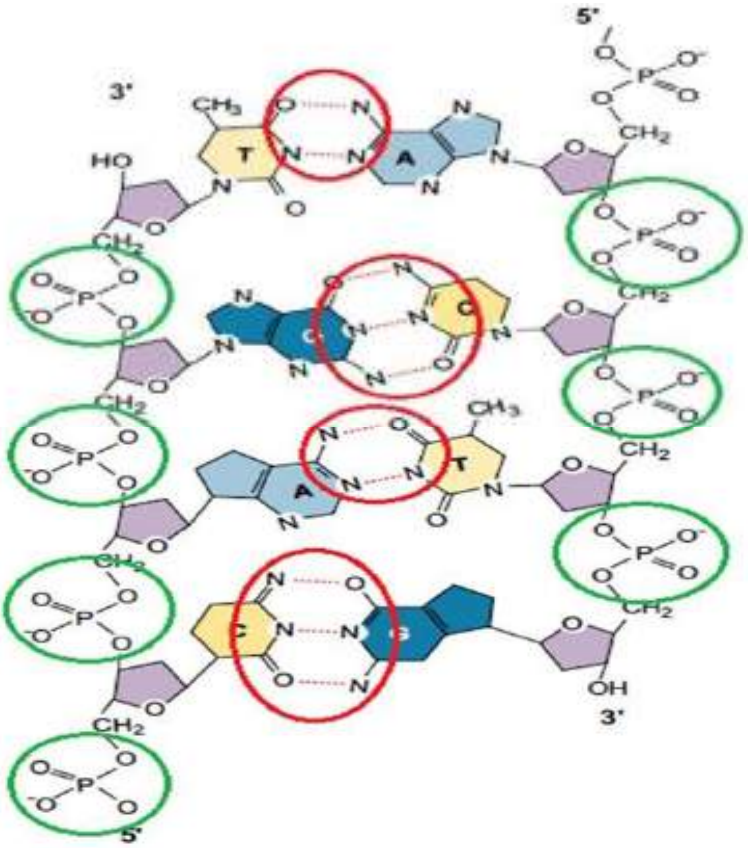
7 يكون اتجاه اللفه اما لليمين وتسمى right handed او لليسار وتسمى left handed أعداد

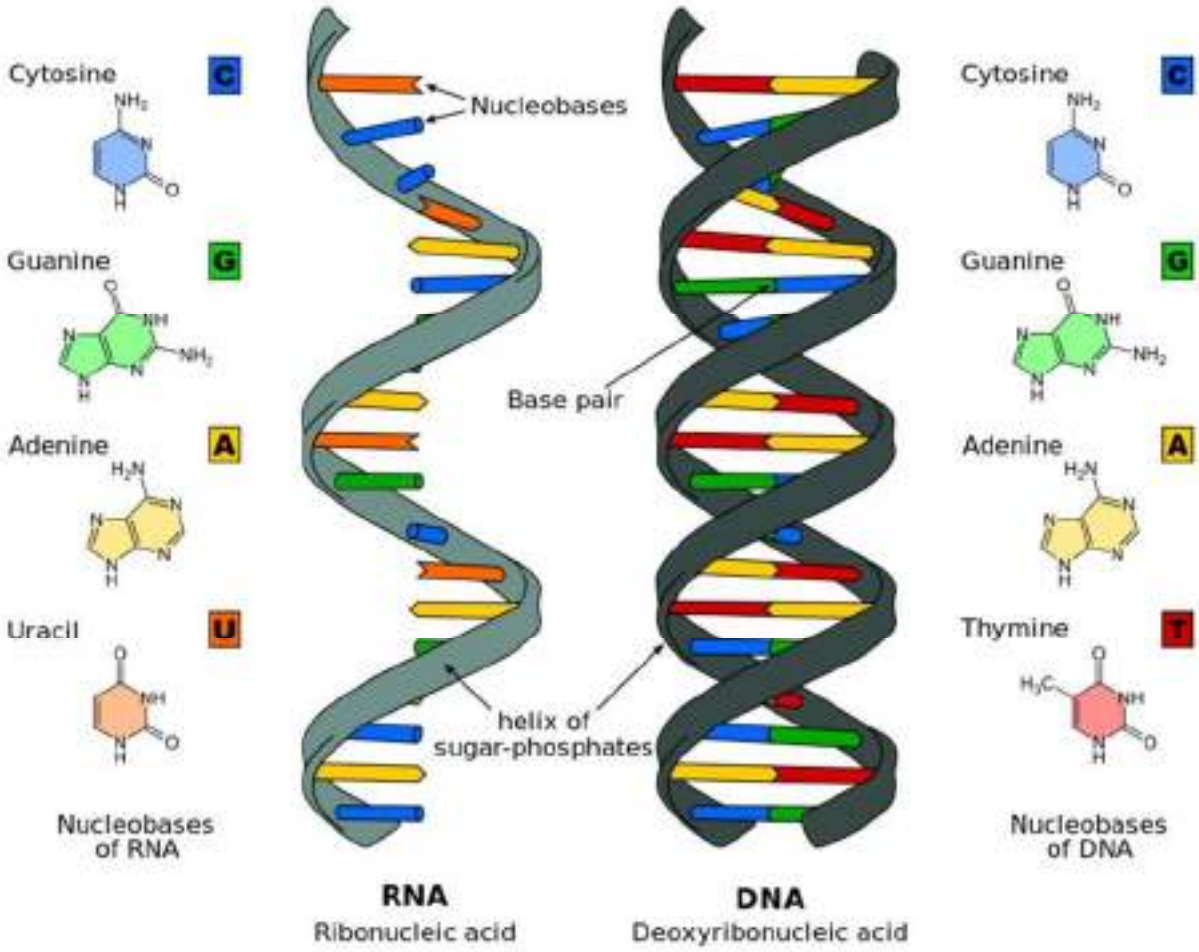
DNA
ثنائية



المزدوجه
الفوسفات

8- **Inter and intra strand bonds**: هنالك نوعين من الاواصر في جزيئةوهي الاصره الهايدروجينية مابين نيوكليوتيدات شريطي DNA والاصرهالتساهميه التي تربط بين نيوكليوتيدات الشريط الواحد وكما موضح ادناه:

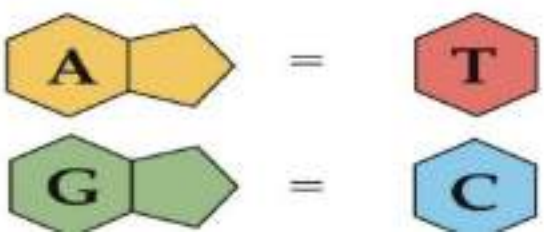


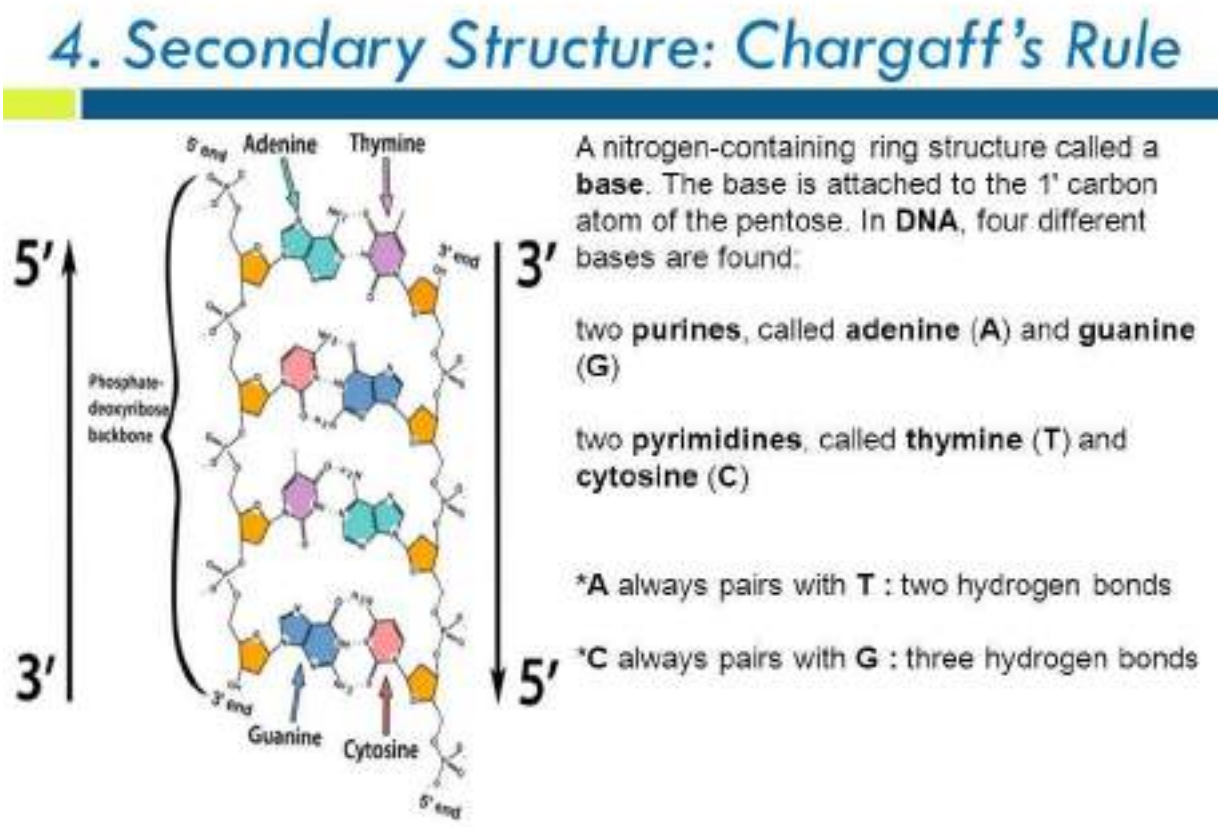


The People Behind

1. **1949:** Erwin **Chargaff** discovers the rules of base pairing

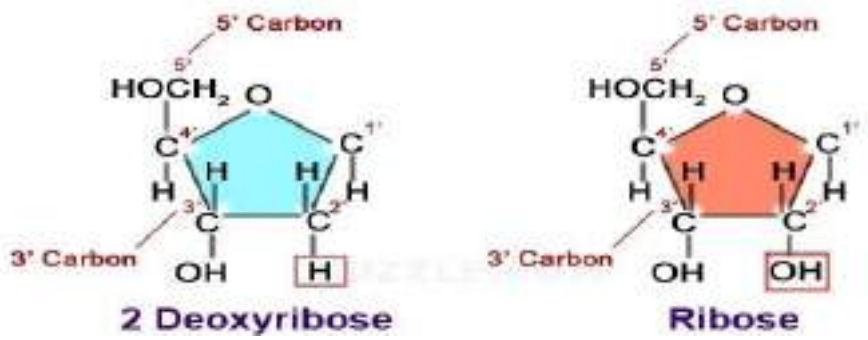
A-T C-G



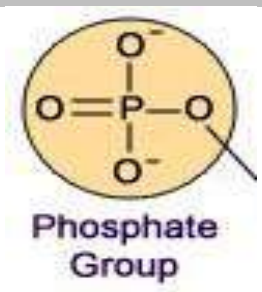


الفروقات بين ال *DNA* و *RNA* تركيبيا

1- كلاهما يحتوي على سكر الرايبوز (منقوص الأوكسجين في DNA) والرايبوز الاعتيادي (في RNA)

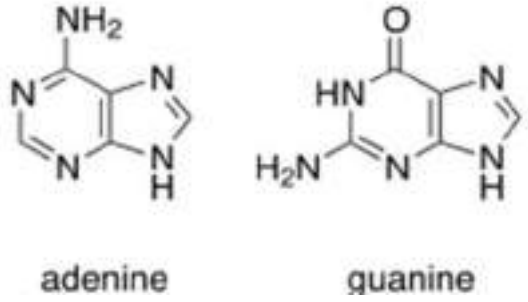


2- كلاهما يحتوي مجموعة الفوسفات والتي تكون بشكل (ثلاثي الفوسفات)



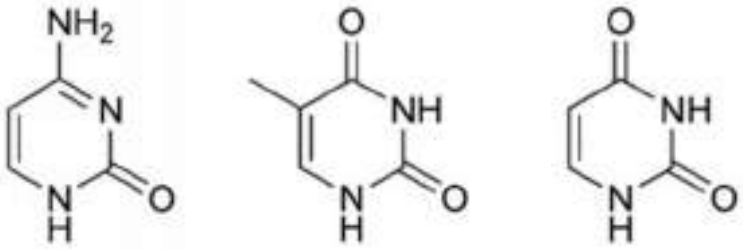
3- كلاهما يحتوي على القاعد النايتروجينية : هنالك مجموعتين من القواعد النايتروجينية وهي:

1- البيورينات Purines وهي مركبات ثنائية الحلقة وتشمل: Adenine and Guanine حيث ان كلتا القاعدتين تكون موجوده في DNA و RNA



2- البرميدينات Pyrimidine : وهي احادية الحلقة وتشمل ثلاث قواعد هي

- الثايمين Thymine (موجود فقط في DNA ولاتوجد في RNA)
- اليوراسيل Uracil(موجود فقط في RNA ولاتوجد في DNA)
- السايتوسين Cytosin (موجود في RNA و في DNA)



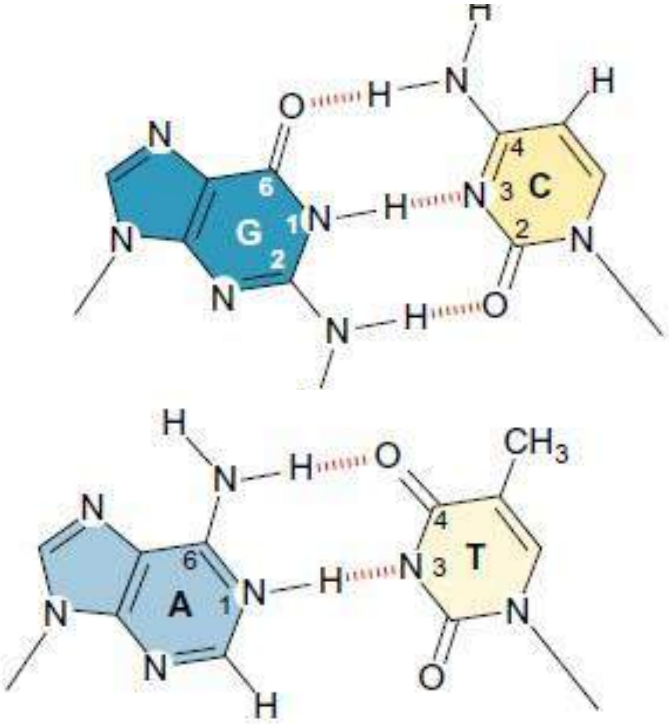
Uracil Thymine Cytosine

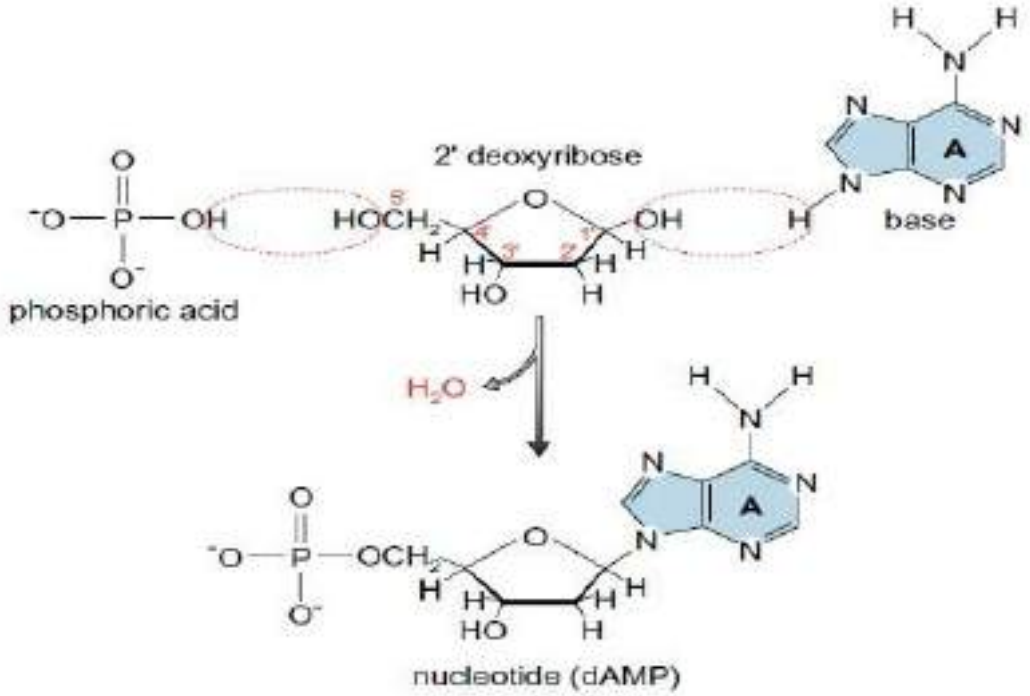
- تسمى الوحدة البنائية للحامض النووي بالنيوكليوتيده Nucleotide
- تتكون النيوكليوتيده من (سكر [الرايبوز الاعتيادي اومنقوص الاوكسجين]+ مجموعة فوسفات +قاعده نايتروجينيه
- النيوكليوتيده الحره تكون ثلاثية الفوسفات تسمى نيوكليوتيدات ال DNA

بمايلي: أعداد

Deoxyadenosin triphosphate (dATP)
Deoxythymidine triphosphate (dTTP)
Deoxyguanidine triphosphate (dGTP)
Deoxycytosine triphosphate (dCTP) :تسمى نيوكليوتيدات ال RNA بمايلي
Adenosin triphosphate (ATP)
Guanidine triphosphate (GTP)
Cytosine triphosphate (CTP)
Uracil triphosphate (UTP)

- عندما تسحب مجموعة الفوسفات من النيوكليوتايد تسمى نيوكليوسايد Nucleoside
- النيوكليوتيده المرتبطه داخل شريط DNA او RNA تكون احادية الفوسفات (المجموعتين الاخرى للنيوكليوتيده الحره تستهلك عند اضافة النيوكليوتيده الى الشريط الجديد.)
- ترتبط الكوانين بالسايتوسين بثلاث اواصر هيدروجينية . ولذلك يكون الزوج G+C اقوى ارتباطا واكثر استقرارا واثقل وزنا.
- ترتبط الادنين بالثايمين او اليوراسيل باصرتين هايدروجينية. ولذلك يكون الزوج A+T او A+U اضعف ارتباطا واقل استقرارا واخف وزنا.





1-Wilkins, Maurice (2003), *The Third Man of the Double Helix: The Autobiography of Maurice Wilkins*, New York: Oxford University Press.

2-Muller, Hermann J. ([1926] 1929), “The Gene as the Basis of Life”, Proceedings of the International Congress of Plant Science, 1: 897–921.

3-Morgan, Thomas H. (1926), The Theory of the Gene, New Haven: Yale University Press.

4- The Nobel Prize in Physiology or Medicine 1969". Nobel Foundation.Archived from the original on June 25, 2013.Retrieved June 25, 2013.

5- Beadle GW, Tatum EL (15 November 1941). "Genetic Control of Biochemical Reactions in Neurospora". PNAS 27 (11): 499–506.

6- Hershey, A. D. and Martha Chase. "Independent Functions of Viral Protein and Nucleic Acid in Growth of Bacteriophage." J. Gen. Physiol., 36 (1): 39-56. September 20, 1952.

7-Watson, J. D., & Crick, F. H. C.A structure for deoxyribose nucleic acid. Nature 171, 737–738 (1953).

8- Sanger, F. (1980), Nobel lecture: Determination of nucleotide sequences in DNA, Nobelprize.org, retrieved 18 October 2010.

9-Maxam AM, Gilbert W (February 1977). "A new method for sequencing DNA". Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 74 (2): 560–4.

10-Shampo, M. A.; Kyle, R. A. (2002)."Kary B. Mullis — Nobel Laureate for procedure to replicate DNA". Proceedings (Mayo Clinic) 77 (7): 606.

11- Barnhart, Benjamin J. (1989). "DOE Human Genome Program". Human Genome Quarterly 1: 1. Retrieved 2011-05-02.

12- National Commission on the Future of DNA Evidence (July 2002). "Using DNA to Solve Cold Cases" (pdf). U.S. Department of Justice. Retrieved 2006-08-08

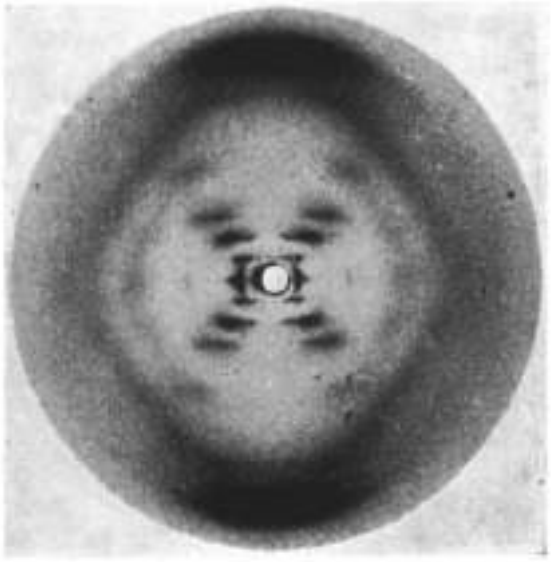
المحاضرة الثانية : تركيب وخصائص الأحماض النووية

اولا: تركيب الحامض النووي الرايبوزي منقوص الاوكسجين *DNA*

تم عزل الـ DNA من الخلايا القيحية WBCs لأول مره من قبل الطبيب السويسري Friedrich Meischer عام 1869والذي اسماه ب Nuclein لكنه لم يعرف على انه المادة الوراثية.

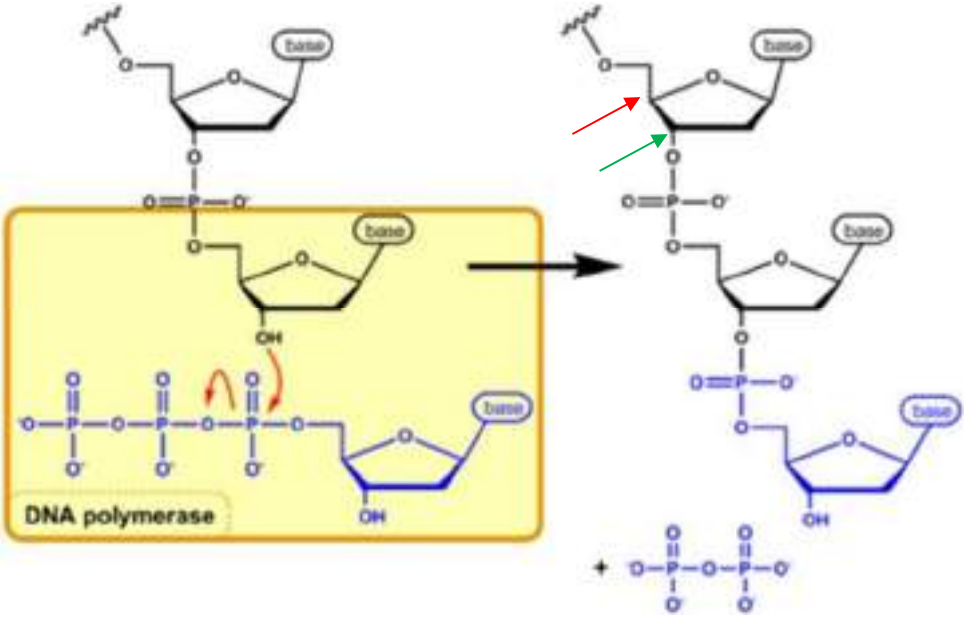
يتركب الـDNA من النيوكليوتيدات ويكون ثنائي الشريط Double Strand ويسمى dsDNA (ماعدا بعض الفيروسات يكون في بعض الأحيان بشكل شريط منفرد Single strand ويسمى ssDNA) ومن مميزات جزيئة DNA :

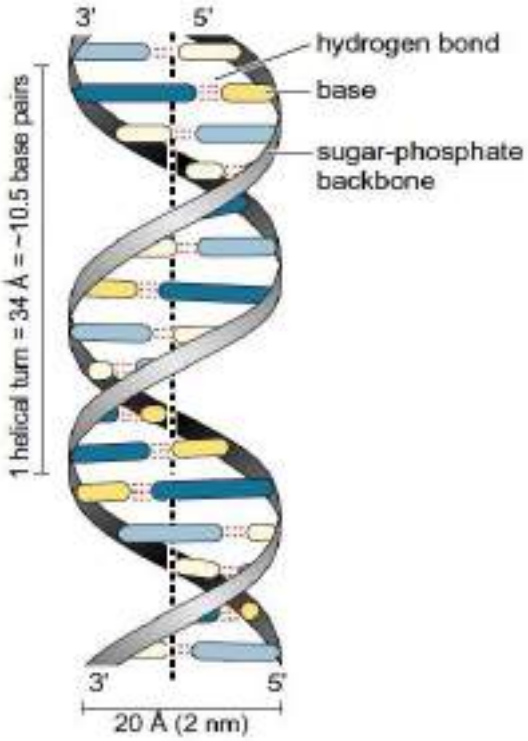
1 - Double helix : إن أول من اكتشف تركيب الDNA بشكل Double helixهما العالمين واتسن وكرك عام 1953 (James Watson and Francis Crick) واللذين حصلا فيما بعد على جائزة نوبل في الطب والفسلجةعام 1962 لاجل هذا الاكتشاف . تم الحصول على هذه النتائج من خلال التجارب التي أجريت على DNA باستخدام الاشعه السينيه حيث تم الاستدلال على هذا التركيب من خلال قراءة انحراف الاشعة السينية



تجربة انحراف الأشعة السينية التي أجريت من قبل روزلاند فرانكلين

2- direction 5'-3' : ويقصد ب هان شريط DNA ينى بالاتجاه 5'-3' حيث تمثل 5' موقع ذرةالكاربون لسكر الرايبوز منقوص الاوكسجين التي ترتبط بها مجموعة الفوسفات بينما **3'**موقعذرة الكاربون لسكر الرايبوز منقوص الاوكسجين التي تضاف عندها نيوكليوتيده جديده وهذا يعني ان DNA يبنى بالاتجاه **5'-3'؟**





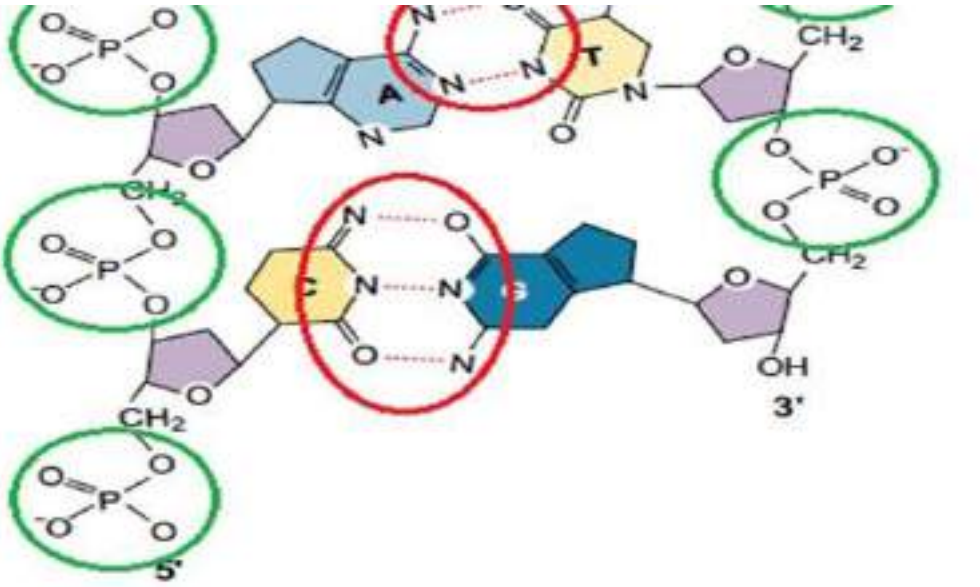
3- Anti parallel : التضاد ويقصد بها إن شريطي جزيئية DNA يلتفان حول بعضهما البعض باتجاهين متعاكسين.

4- قطر جزيئة DNA هو 20 انكستروم في حين ان اللفه الواحده طولها 34 انكستروم

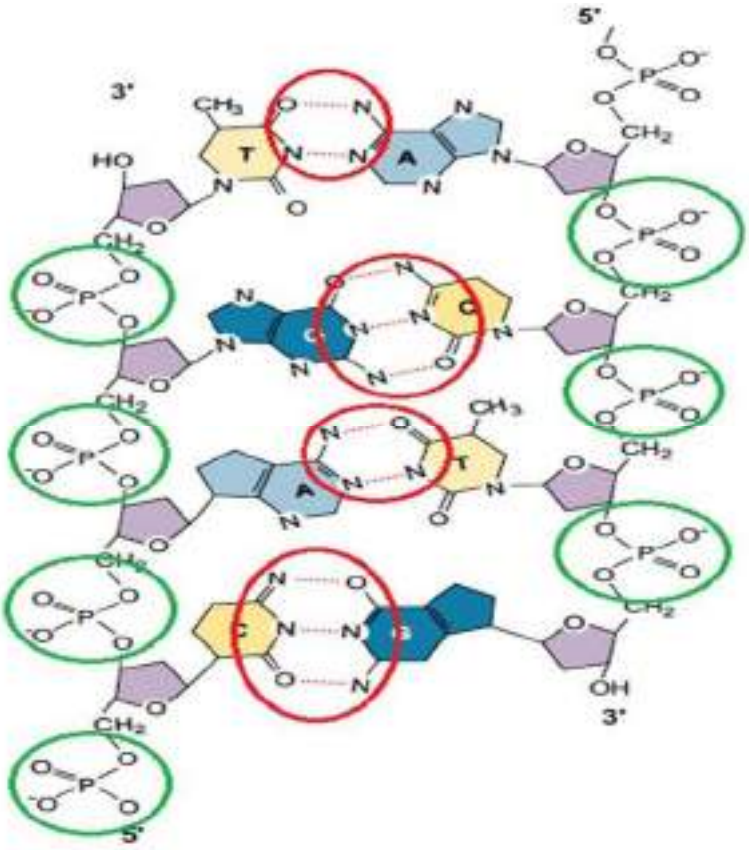
5- تتكون اللفه الواحده من DNA من 5.10 زوج قاعدي وبذلك يكون طول القاعده الواحده او الزوج القاعدي حوالي 3.3 انكستروم.

6- وزن الزوج القاعدي هو 660 دالتون

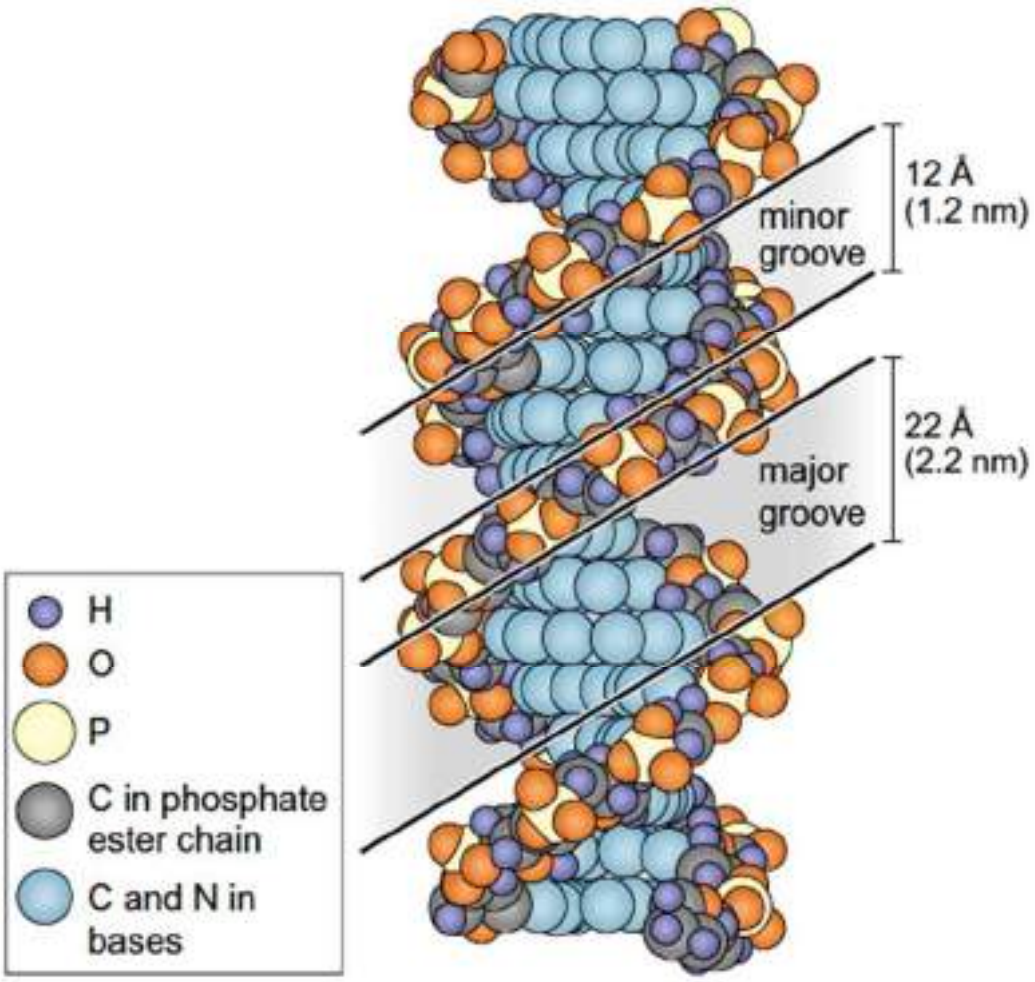
7- يكون اتجاه اللفه اما لليمين وتسمى right handed كما في جزيئة الدنا نوع A-form DNA وB-form DNA او لليسار وتسمى left handed كما في جزيئة الدنا نوع Z-form DNA.



8- Inter and intra strand bonds: هنالك نوعين من الأواصر في جزيئة DNA المزدوجة وهي الاصره الهايدروجينية مابين نيوكليوتيدات شريطي DNA الاصره ثنائية الفوسفات التساهميه التي تربط بين نيوكليوتيدات الشريط الواحد وكما موضح ادناه:



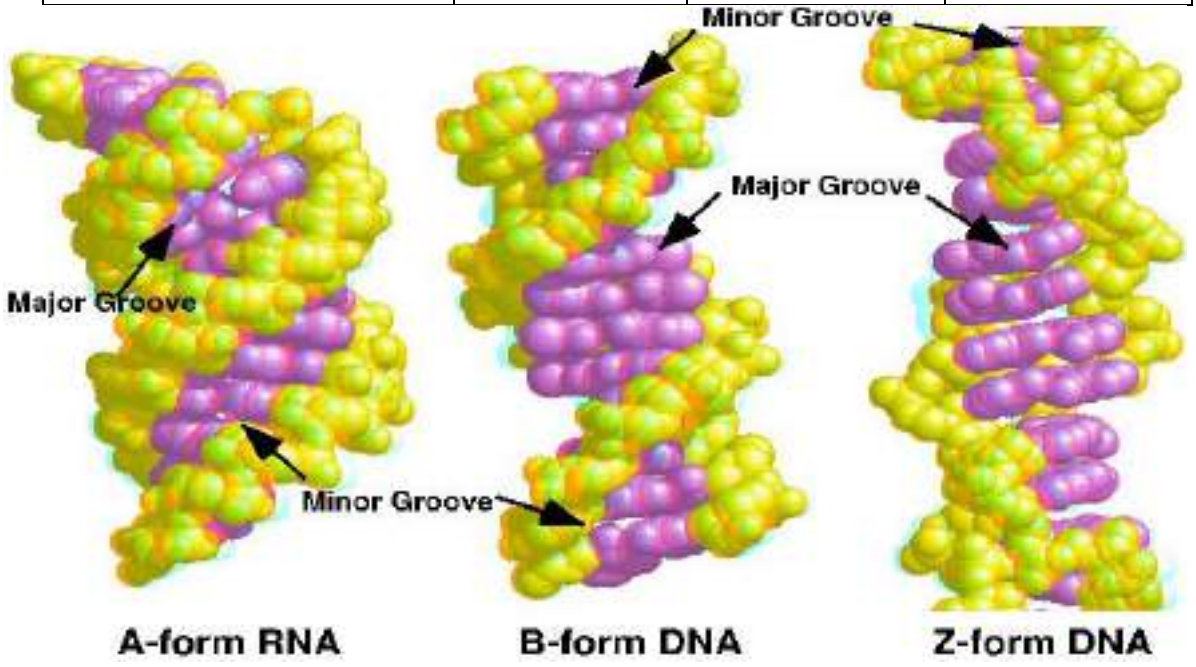
9- **الأخدود الأساسي Major groove والأخدود الثانوي Minor groove :** تتكون هذهالأخاديد نتيجة للشكل المزدوج المتضاد Anti parallel double helix لجزئية الدنا وللتركيبالفراغي للقواعد النتروجينية. وتكون هذه الأخاديد غير متساوية بالحجم. أن كل زوج قاعدي يلتوي او ينحرف عن مسار الزوج القاعدي الذي يسبقه بحوالي 36 درجه وبالتالي يصبح من السهل علينا معرفة عدد الأزواج القاعديه في اللفه الواحده من خلال معرفة ان اللفه الواحده تعني التواء او استداره بمقدار 360 درجه وبلتالي هنالك تقريبا عشرة ازواج قاعديه في اللفه الواحده.



10 - التركيب الأولى والثانوي للـ DNA: يتكون التركيب الأولي من الشريط المنفرد الذي يتألف من سلسلة من النيوكليوتيدات التي تبنى بالاتجاه 3'-5' وتمتاز بوجود أصره تساهمية فقط (Phosphodiester bond) اما التركيب الثانوي فيتألف من شريطي الدنا التي تمتاز بأنها Anti parallel double helix وتحتوي على الاصره الهايدروجينية التساهميه في تركيبها.

11 - أشكال الـ DNA : بصوره أساسيه هنالك ثلاثة أشكال للـ DNA يكمن إيجازها بالجدول التالي:

Characteristics	A-form	B-form	Z-form
esnes xileH(اتجاه الحلزون)	Right handed	Right handed	Left handed
Rotation degree التواء الحلزون لكل زوج قاعدي	33.6°	35.9°	60/2°
Mean bp/turn معدل ازواج القواعد لكل لفه	10.7	10.0	12
retemaiD(القطر)	26A	20	18 A
Medium طبيعة الوسط الذي يتواجد فيه	Found in dehydrated medium	Found in hydrated medium	Found in dehydrated medium
Commonalty العمومية	Less common than B and Z form	More commonly found in cell that A and z form	Rarely found in cell



12 - **في بدائية النواة** تكون جزيئة الدنا مزدوجة الشريط Double strand (dsDNA) كما فيالبكتريا وبعض الفيروسات وقد تكون مفردة الشريط Single strand (ssDNA) كما في بعض
الفيروسات مثل Parvovirus B19.

13 - يسمى الشريط ذو الاتجاه '3-'5 بـ sense اما ذو الاتجاه '5-'3 فيسمى بـ anti sense .

14 - يمكن فك ارتباط (denaturation) الشريط المزدوج للـ DNA بتعريضها لما يلي:

- ➲ High temperature (about 95 ˚C)
- ➲ High PH solution
- ➲ High salt concentration

ثانيا: تركيب الحامض النووي الرايبوزي *RNA* يشابه

في تركيبه للـ*DNA* مع بعض الاستثناءات وكما يلي:

1 - يكون مفرد الشريط عادتا Single strand (ssRNA) مع بعض الاستثناءات حيث يكون مزدوج الشريط Double strand (dsRNA) كما في الحامض النووي الرايبوزي الناقل tRNA وكذلك في بعض الفيروسات مثل Rotavirus. 2 - يحتوي في تركيبه على الرايبوز بدلا من الرايبوز منقوص الاوكسجين.
3 - لايحتوي في تركيبه على القاعدة النايتروجينيه الثايمين thymine بل يحتوي بدلا عنها على اليوراسيل Uracil . 4 - هنالك عدة أنواع من الـ RNA تختلف في وظائفها البيولوجية وهي:

mRNA=messenger RNA**(carry genetic information encoding for protein)** **tRNA**=transfer RNA **(transfer amino acid during translation)** **rRNA**=ribosomal RNA **(one component of ribosomes)** **snRNA**=small nuclear RNA (**one component of spliceosomes)** **exRNA**= Extracellular RNA (also known as exosomal RNA) found in boby fluid like blood, saliva, breast milk, urine, semen, menstrual blood, and vaginal fluid (**syntrophy**)

piRNA= Piwi-interacting RNA (gene silencing)

snoRNA= small nucleolar RNA (required for rRNA maturation)
miRNA=micro RNA (halt translation or degrade mRNA) **siRNA**=small interfering RNA (halt translation or degrade mRNA)

المحاضرة الثالثة : تعبئة الأحماض النووية *Nucleic Acid Packaging*

أن المقصود بتعبئة الأحماض النووية هي الشكل النهائي الذي يكون عليه الحامض النووي في الجزيئة الخلوية وهي تختص بالـDNA دون الـ RNA ؟ ومثال على ذلك الهيئة او التركيب الفراغي للـ DNA الموجود في الكرموسوم. ولتوضيح الفكرة نطرح السؤال التالي: اذا علمنا إن طول جزيئة الـ DNA البشري المتواجد في الكرموسوم يصل إلى 2 متر لكن في الحقيقة يكون الكرموسوم تركيب مجهري لايمكن رؤيته بالعين المجردة وبذلك يكون الجواب هو التعبئة الخاصة للـ DNA في الكرموسوم البشري.

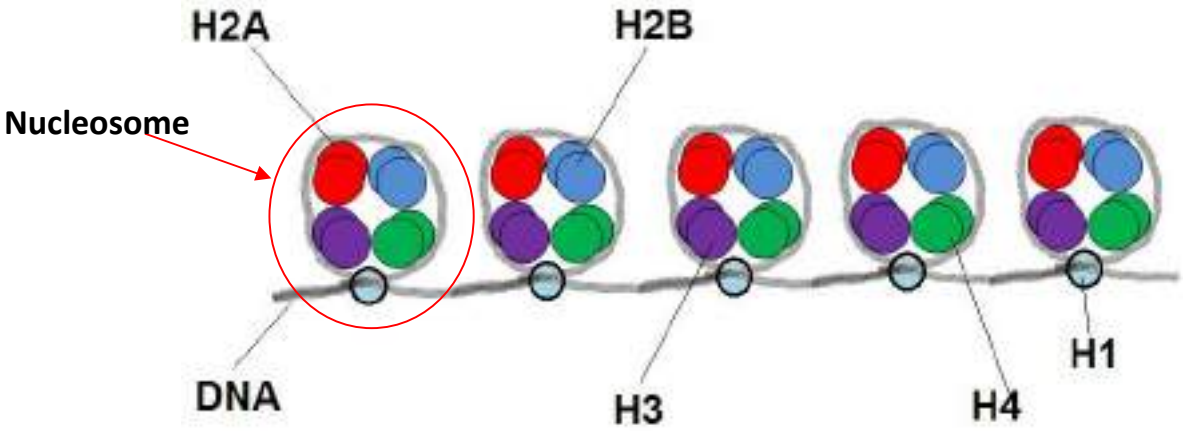
تركيب الكرموسوم البشري Human Chromosome Structure :

يتألف الكرموسوم من ذراعين وقطعه مركزيه. الذراع القصير Short arm ويسمى ب p arm والذراع الطويلLong arm ويسمى ب q arm وتسمى القطعة المركزية ب Centromere . كيميائيا يتركب الكرموسوم من حامض نووي منقوص الاوكسجين DNA وبروتين الهستون Histon. بالنسبة إلى تركيب الـDNA تطرقنا له بإسهاب في المحاضرة السابقة اما الهستون فهنالك خمسة أنواع من الهستون هي H1, H2A, H2B, H3, H5 يسمى كل من H2A, H2B, H3, H5 بهستون اللب Core Histon ؟ اما H1 يسمى بالهستون الرابط Linker Histon؟

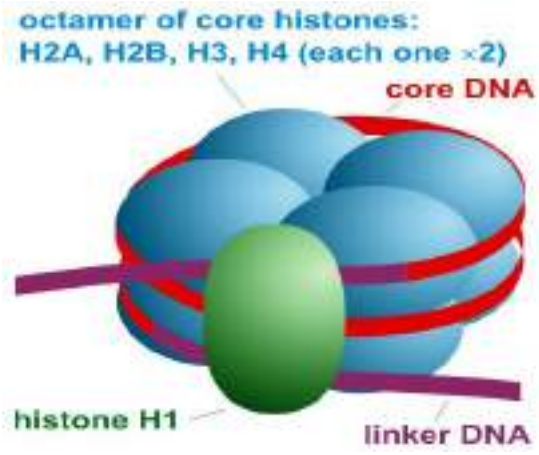
اولا: تعبئة الدنا *DNA* في كروموسوم حقيقية النواة *Eukaryote DNA packing*

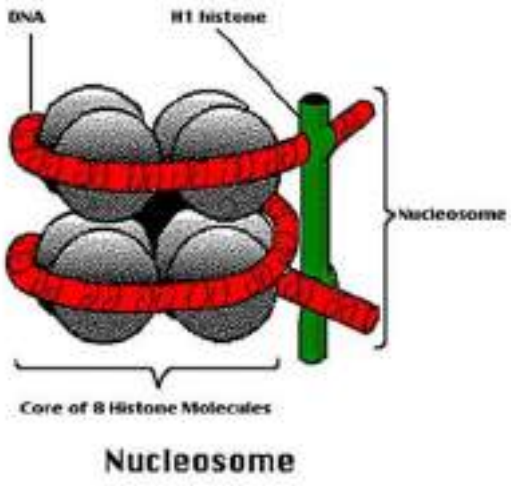
إن تعبئة الدنا (DNA) في كروموسوم حقيقية النواة تكون كمايلي:

1- تتجمع وحدتين لكل من H2A, H2B, H3, H5 وتكون مايسمى باللب Core ثم بعد ذلك تلتف جزيئة الدنا مزدوجة الشريط حول اللب وتغلق نقطتي تلاقي الدنا بالهستون الرابط H1 لتكون مايسمى بالنيوكليوسوم Nucleosome والذي يكون قطرها 10 نانوميتر و تكون بشكل حبات او خرزات المسبحة على جزيئة الدنا وكما موضح بالشكل ادناه:

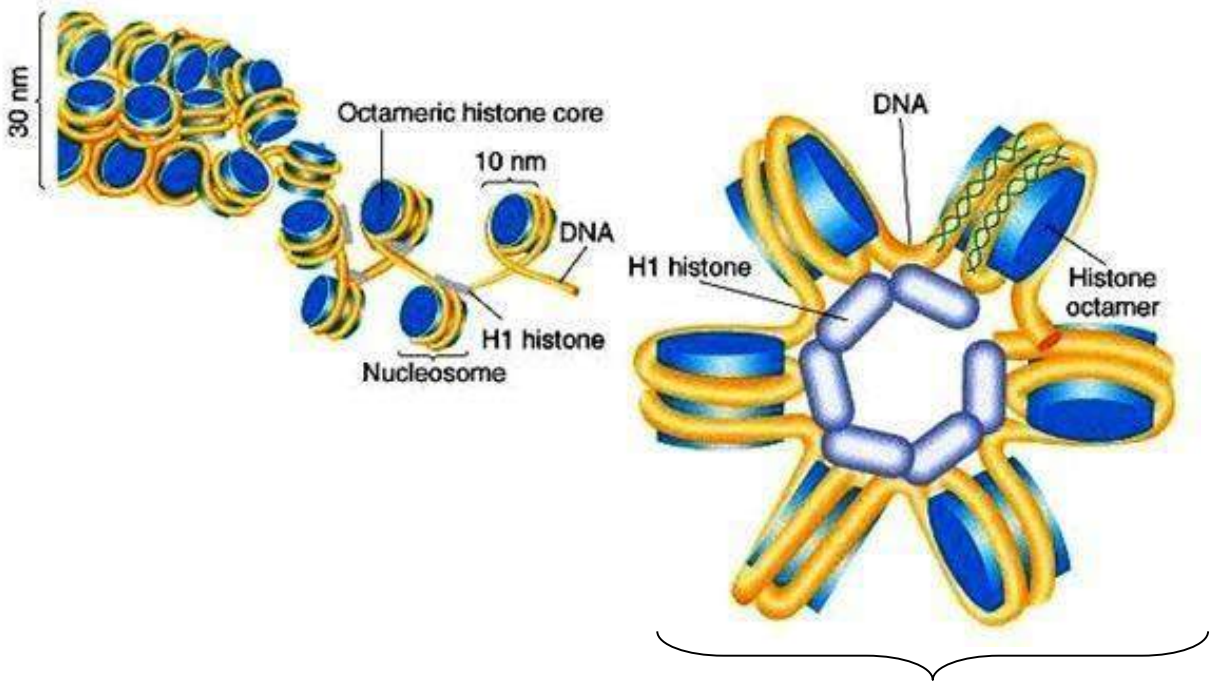


أعداد





2- تتجمع كل ستة نيوكليوسوم لتشكل شكل اسطواني يسمى بSolenoid structure والذي يكون قطرها 30 نانوميتر



Solenoid structure (30nm)

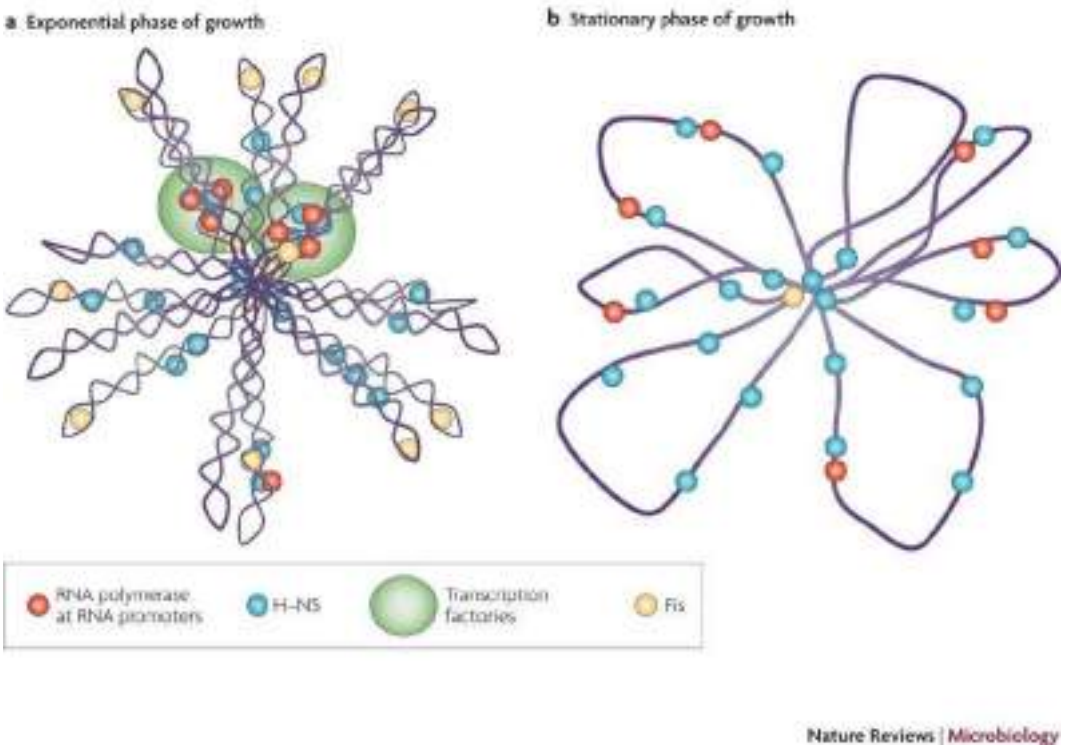
مما تقدم يتضح لنا جليا دور الهستون في عملية تعبئة Packing وحشد Condensation الدنا DNA بالنسبة إلى الكائنات حقيقية النواة Eukaryote اما بالنسبة إلى الكائنات بدائية النواة فهل هنالك تعبئة للدنا DNA ؟ والجواب يكون بنعم وكما سيأتي ذكره لاحقا.

ثانيا: تعبئة الدنا *DNA* في كروموسوم بدائية النواة ***Prokaryote DNA packing***

من الجدير بالذكر ان طبيعة المادة الوراثية في الكائنات بدائية النواة اقل تعقيدا مما في حقيقية النواة وفيما يخص تعبئة الدنا في بدائية النواة فانه يحصل لكن بدرجه اقل من التعقيد مما في حقيقة النواة حيث تتم العملية بارتباط بروتينات شبيهه بالهستون تسمى مجتمعة بـ Histon like protein كما في HU protein و-N HS وFIS وتسمى عملية التعبئة بالالتفاف الفائق Supercoiling حيث تتم بوجود بروتين HU وأنزيم التوبوايزوميريز الأول Topoisomerase I حيث تحدث هذه العملية بعد تضاعف الدنا DNA مباشرتا.

هنالك نوعين من الـ Supercoiling :

1- **بالالتفاف الفائق الموجب Positive Supercoiling : يحصل عندما يكون الالتفاف الفائق بنفس اتجاه الحلزون المزدوج للدنا DNA.**
2- **بالالتفاف الفائق السالب Negative Supercoiling : يحصل عندما يكون الالتفاف الفائق عكس اتجاه الحلزون المزدوج للدنا DNA.**



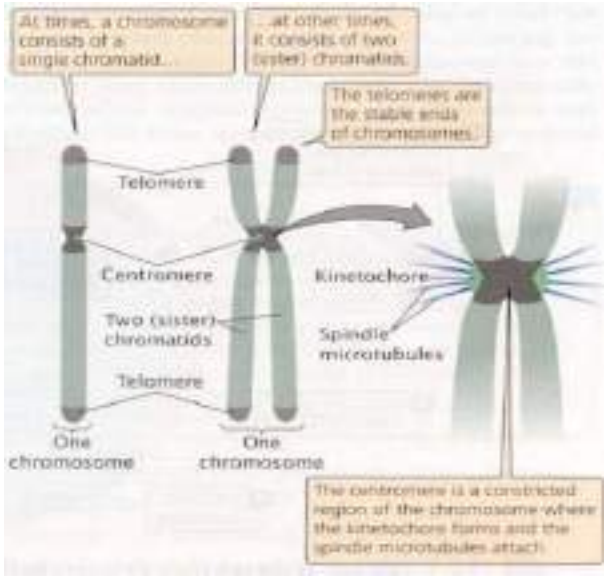
ويكمن تلخيص اهم الفروقات في المادة الوراثية لحقيقية النواة وبدائية النواة كما موضح في الجدول التالي:

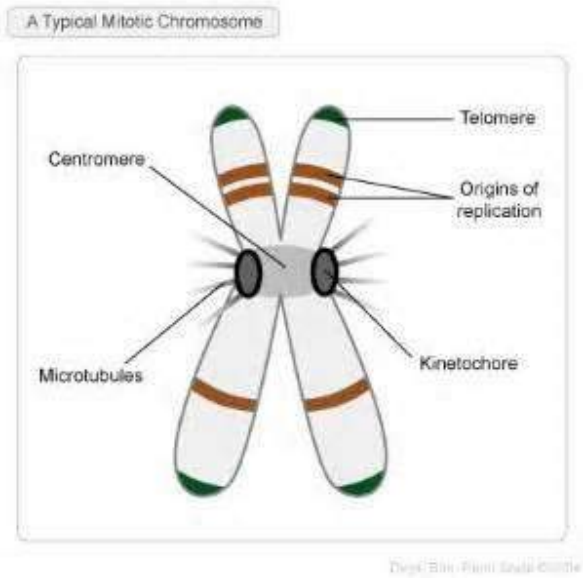
Prokaryotic Chromosomes	Eukaryotic Chromosomes
1-Many prokaryotes contain a single circular chromosome.	1-Eukaryotes contain multiple linear chromosomes.
2-Prokaryotic chromosomes are condensed in the nucleoid via DNA supercoiling and the binding of various architectural proteins.	2-Eukaryotic chromosomes are condensed in a membrane-bound nucleus via histones.
3-Because prokaryotic DNA can interact with the cytoplasm, transcription and translation occur simultaneously.	3-In eukaryotes, transcription occurs in the nucleus, and translation occurs in the cytoplasm.
4-Most prokaryotes contain only one copy of each gene (i.e., they are haploid).	4-Most eukaryotes contain two copies of each gene (i.e., they are diploid).
5-Nonessential prokaryotic genes are commonly encoded on extrachromosomal plasmids.	5-Some eukaryotic genomes are organized into operons, but most are not.
6-Prokaryotic genomes are efficient and compact, containing little repetitive DNA.	6-Extrachromosomal plasmids are not commonly present in eukaryotes.
	7-Eukaryotes contain large amounts of noncoding and repetitive DNA.

ثالثا: تركيب الموروثه فى حقيقية النواة *Eukaryote Gene Structure* :

تعرف الموروثه او الجين على إنها اصغر وحده تركيبه تحمل المعلومات الوراثية. اول من اكتشف الجين هو العالم جورج مندل بين سنة 1857 و 1864. تمتاز الكائنات حقيقية النواة بامتلاكها نسختين لكل جين وتسمى بالأليل Allele أي ان لكل جين أليليين احدهما يؤخذ من الأب والأخر من الأم وهذه بطبيعتها تكون اما سائدة Dominant ويرمز له بالحرف الكبير او متنحية Recessive ويرمز له بالحرف الصغير بالتالي تسمى جينات حقيقية النواة ب Diploid ويرمز له 2N. تكون الجينات محموله على الكرموسوم وبالنسبة للإنسان فهنالك 23 زوج كرموسومي (منها 22 زوج تسمى الكرموسومات الجسميه وزوج واحد يسمى بالكر موسومات الجنسية وهي X و Y). من حيث الشكل كل هذه الكرموسومات تكون بشكل غير حلقي او

ماتسمى خطية Linear وتحتوي في نهاياتها على تسلسلات متكرره repetitive sequence من الـ TTAGGG وتسمى هذه المنطقة بالتلومير Telomere. ماهي فائدة منطقة التلومير للكروموسوم؟





يتكون الجين من مناطق متعاقبه باستمرار تسمى بـ Exon وهي مناطق تحوي المعلومات الوراثية التي تشفر فيما بعد و Intron التي لاتشفر لكنها لها وظائف تنظيمية وتتكون الموروثة (الجين) في حقيقية النواة من المناطق التالية:

1- منطقة المحفز Promoter:

منطقة مميزة من الجين تحتوي على تسلسل خاص يرتبط عندها انزيم RNA polymerase II عند بدء عملية الاستنساخ Transcription تقع قبل منطقة المحفز منطقة تسمى منطقة التنظيم او السيطرة Control or Regulatory Gene وظيفتها تنظيم عملية بدا الاستنساخ ومنها المسرع Enhancer .

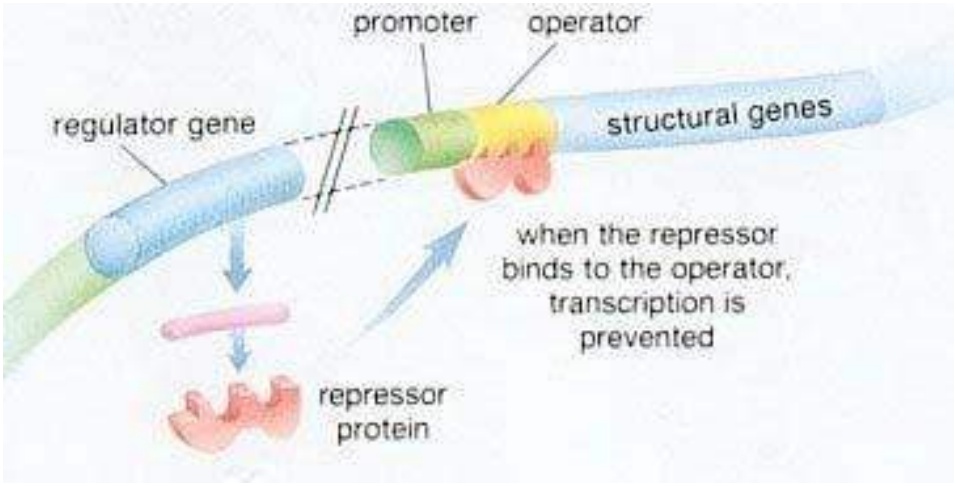
تحتوي منطقة المحفز على تسلسل يسمى ب TATA box وهو التسلسل الذي يرتبط عنده معقد انزيم RNA polymerase II لبدء استنساخ الدنا لتكوين الـ mRNA .

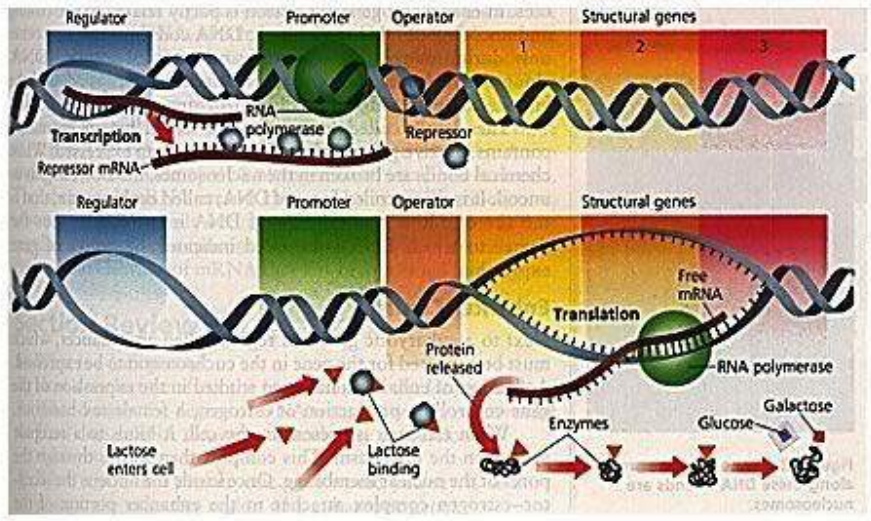
2- منطقة المشغل Operator:

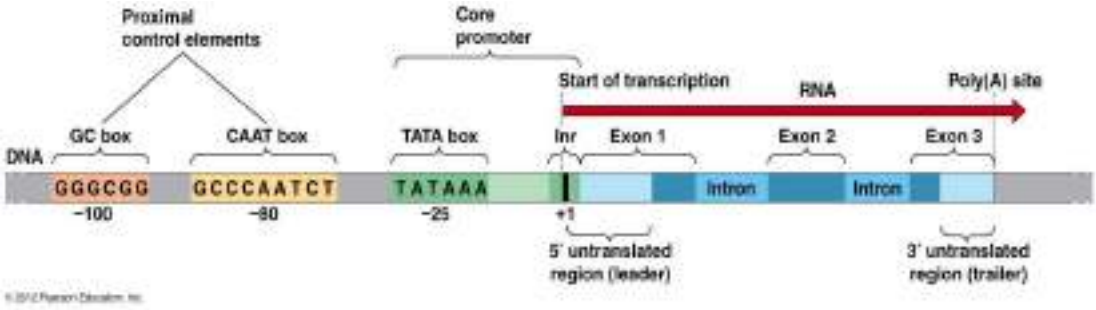
وهي المنطقة التي يرتبط عندها مثبت عملية الاستنساخ Repressor .

3- منطقة الجين التركيبي Structural Gene او تسمى التسلسل المشفر Coding sequence . وهي المنطقة التي تحتوي على المعلومات الوراثية التي سيتم استنساخها.

4- منطقة الإنهاء Terminator ولكل من هذه المناطق تسلسل خاص ووظيفة خاصه بها سياتي ذكرها لاحقا .







ثالثا: تركيب الموروثه في بدائية النواة ***Prokaryote Gene Structure*** :

من الجدير بالذكر ان تركيب الكرموسوم والجين في بدائية النواة يكون أسهل مما في حقيقية النواة كما سنوضحه لاحقا. تحتوي بدائية النواة على كروموسوم حلقي واحد circular. ويكون تركيب الجين مشابها لما في حقيقية النواة مع بعض الاستثناءات ومنها:

1- لايحتوي على الانترون Intron

2- منطقة المحفز تحتوي على تسلسل يسمى Pribnow box ذو تسلسل مميز TATAAT يرتبط

عنده معقد RNA polymerase.

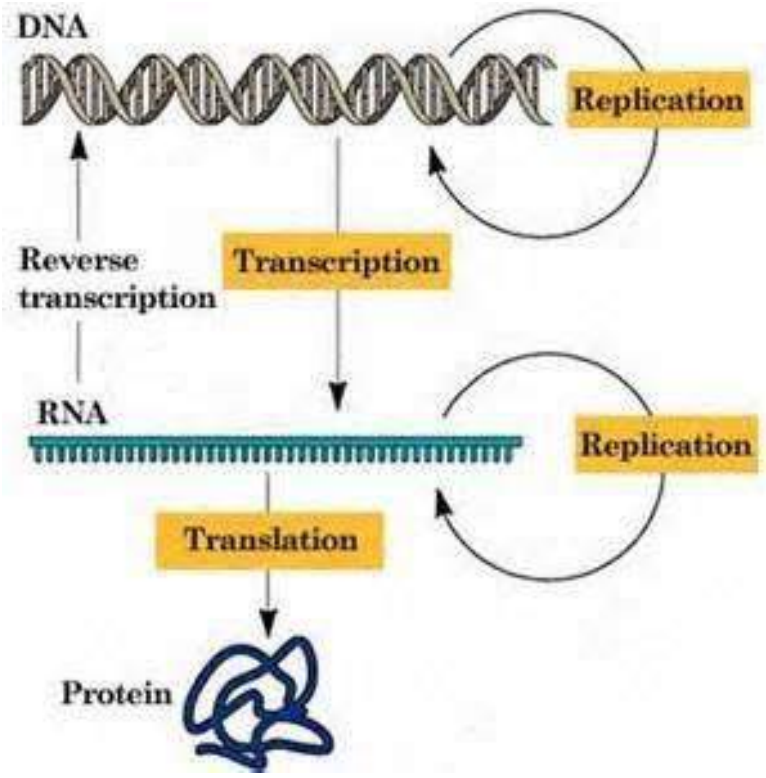
الفكرة المركزية للبيولوجي الجزيئي *Central Dogma of Molecular Biology*

تعرف الـ Central dogma على أنها توضيح او تفسير لانسياب المعلومات الوراثية خلال الأنظمة الحياتية وتشمل:

1- عملية تضاعف الحمض النووي الرايبوزي منقوص الاوكسجين DNA replication.

2- عملية استنساخ الحمض النووي الرايبوزي منقوص الاوكسجين DNA Transcription .

3- عملية صنع البروتين Translation. ويمكن توضح الـ Central dogma بالمخطط التالي:



وسنتطرق إلى هذه العلميات بالتفصيل وأولها عملية تضاعف الحمض النووي الرايبوزي منقوص الاوكسجين DNA replication وقبل الشروع في شرح هذه عملية لابد لنا من التذكير بشكل هذا الحمض في بدائية وحقيقية النواة .

في حقيقية وبدائية النواة يكون الدنا DNA معبأ بشكل كروموسوم وهذا الكروموسوم يكون خطي Linear في حقيقية النواة وحلقي Circular في بدائية النواة وكروموسوم المايتوكوندريا الذي يرمز له اختصارا بـ mtDNA وهذا يؤدي بالنتيجة إلى بعض الاختلافات في كيفية حدوث التضاعف وكما سيتم تبيانه لاحقا.

اولا: تضاعف الحمض النووي الرايبوزي منقوص الاوكسجين *DNA replication* في حقيقية النواة:

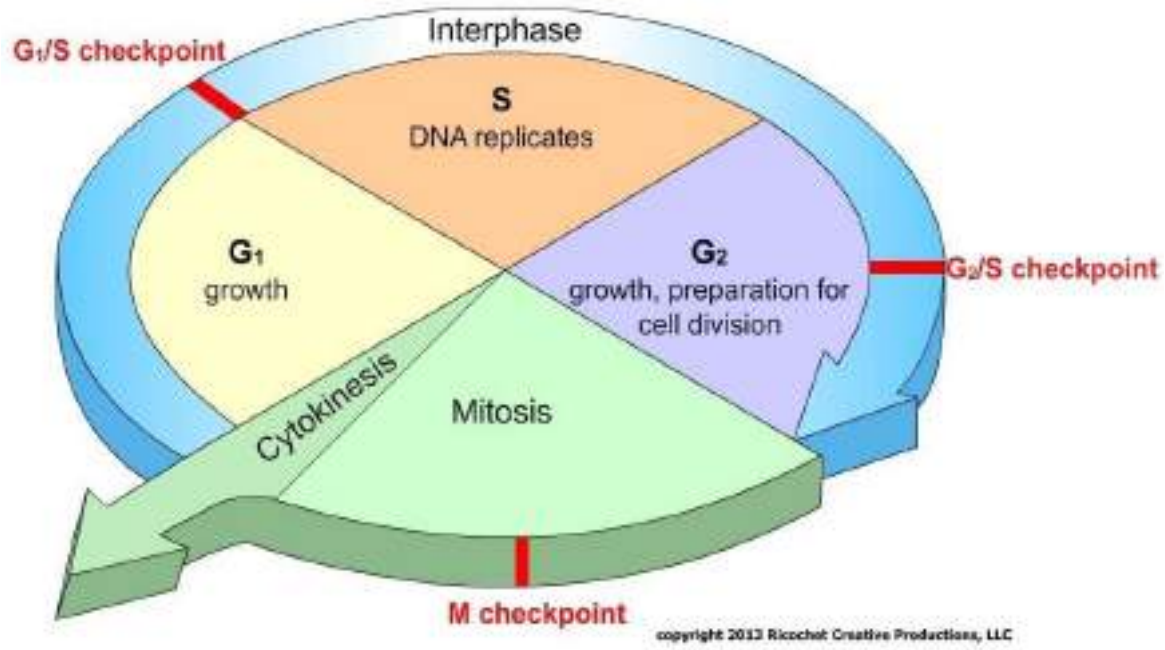
قبل البدء بالحديث عن هذه العملية يجب الإجابة على التساؤلات التالية:

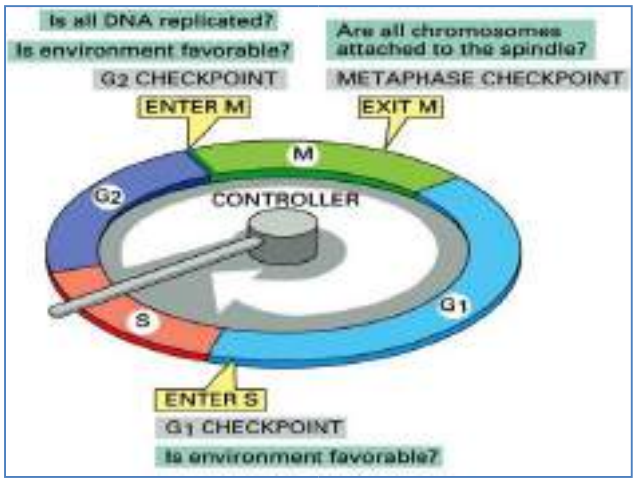
متى تحدث عملية التضاعف؟

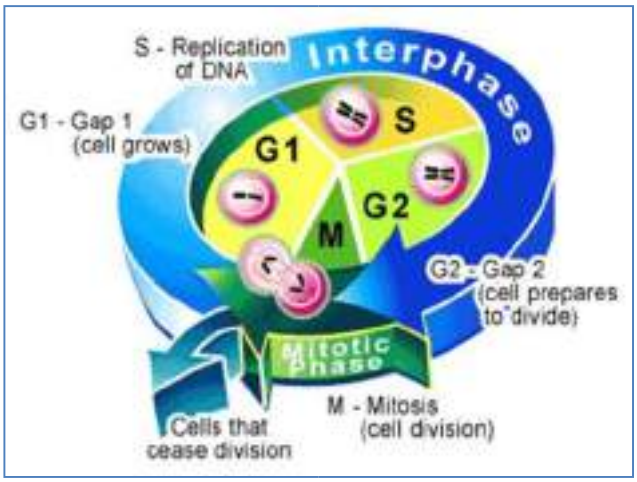
هل هي عملية عشوائية غير مسيطر عليها؟

أين تحدث هذه العملية؟

وللإجابة على هذه التساؤلات نقول: ان عملية التضاعف عملية منظمه تحدث بانتظام ودقة متناهيه . هنالك طورين أساسين لدورة حياة الخلية Cell cycle وهما الطور البيني Inter phase وطور الانقسام الخيطي Mitotic phase ولكل من هذين الطورين أطوار ثانوية والمهم هنا هو تبيان توقيت حدوث عملية تضاعف الدنا DNA حيث تحدث هذه العملية استعداد للانقسام الخلوي وتحدث في طور التصنيع Synthesis phase ويرمز له S phase وهو من الأطوار الثانوية للطور البيني وكما موضح بالمخططات ادناه:





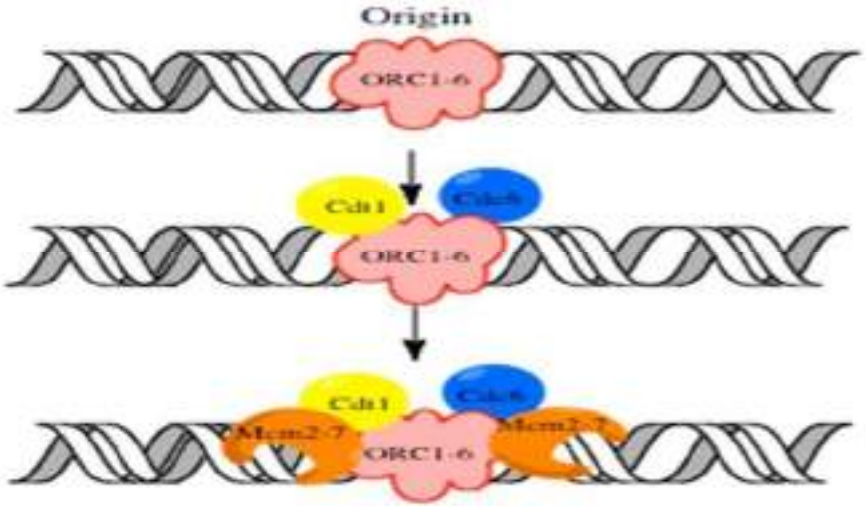


تحدث هذه العملية في النواة والمايتوكوندريا (في حقيقية النواة) وفي المنطقة النووية Nucleoid في بدائية النواة. ويمكن تلخيص خطوات عملية التضاعف بمايلي:

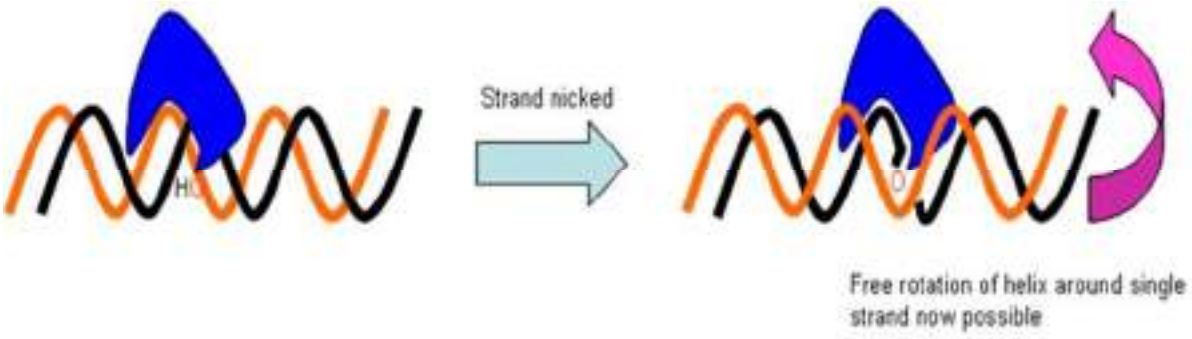
1- :Origin of Replication Recognition **تميز منشأ التضاعف**

تسمى المنطقة التي يبدا عندها التضاعف بـ Origin of Replication ويمز لها في الكروموسوم بـ OriC او اما في البلازميد فيرمز له بـ OriT حيث تميز هذه المنطقة من قبل معقد البدء Origin of Replication Complex ويرمز له ORC حيث يتكون هذا المعقد في حقيقية النواة من ستة وحدات هي ORC1, ORC2, ORC3,ORC4, ORC5, ORC6 وبعد ارتباط هذا المعقد ترتبط بروتينات اخرى مثل Cdc6 و Cdt1 و Mcm2-Mcm7 لتكون معقد البدء Initiator ويحدث هذا الارتباط في طور G1 بعد ذلك يطلب الإذن بالدخول الى طور S لبدء عملية التضاعف من خلال فسفرة معقد البدء Initiator وبعد هذه الخطوة تأتي خطوة الإرخاء relaxation.

من الجدير بالذكر ان هنالك العديد من OriC في حقيقة النواة على العكس من بدائية النواة التي تحتوي على OriC واحد فقط. من مميزات هذه المنطقه انها غنيه بالازواج القاعديه AT ؟

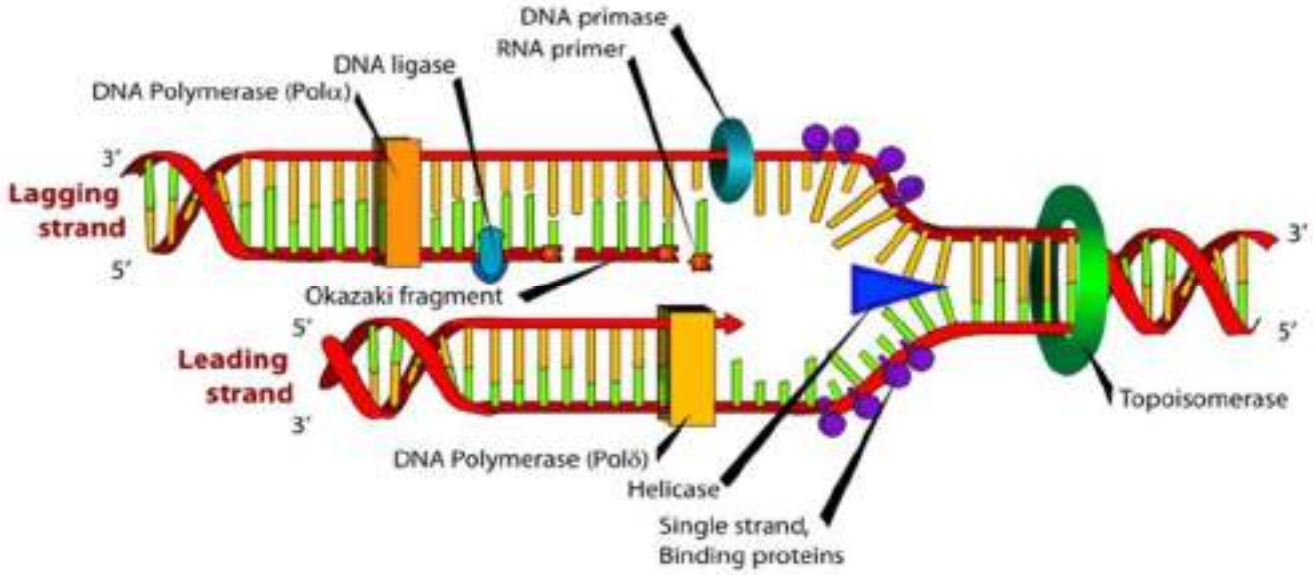

Origin
ORC1-6
Cdt1
Cdc6
ORC1-6
Cdt1
Cdc6
Mcm2-7
ORC1-6
Mcm2-7

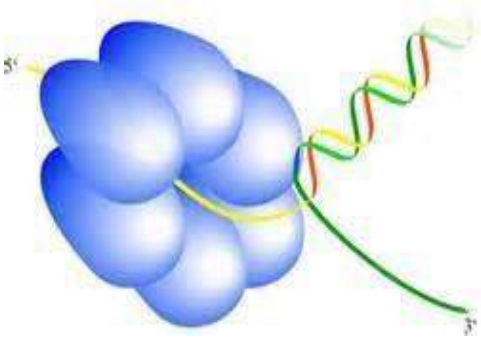
2- **عملية الإرخاء Relaxation**: حيث تتضمن هذه الخطوة فك الالتفاف الفائق Supercoiling من خلال انزيم Topoisomerase وهنالك نوعين من هذا الإنزيم هما Topoisomerase I (الذي يقوم بقطع احد الشريطين ليدور حول الثاني ومن ثم اعادة لصق الشريط) والثاني هو Topoisomerase II(الذي يقوم الشريطين لتدور حول جزيئة الدنا المزدوجة الأخرى ومن ثم اعادة لصقهما). وهنالك نوعين لكل منهما Topoisomerase IA و Topoisomerase IB و Topoisomerase IIA و Topoisomerase IIB وفي السابق كان يعتقد ان Topoisomerase IA موجود في بدائية النواة ولذلك سمى بـ (Prokaryotic Topoisomerase) اما Topoisomerase IB فكان يعتقد انه موجود في حقيقة النواة ولذلك سمى بـ (Euokaryotic Topoisomerase) اما في الوقت الحاضر فوجد ان كلاهما موجود في حقيقية وبدائية النواة. يمتاز Topoisomerase IA بأنه قادر على إرخاء الالتفاف الفائق السالب فقط Negative supercoiling اما Topoisomerase IB فيكون قادرا على إرخاء الالتفاف الفائق الموجب فقط positive supercoiling. اما آلية عمل انزيم التوبوايزوميريز فيمكن تلخيصها كلاتي: يقوم الأنزيم بعمل قطف في الدنا (احد الشريطين او كلاهما) وبالتالي تحصل عملية الإرخاء Relaxation ثم يعد غلق Reseal الشريط او الشريطين المقطوعة وهذا يؤدي الى الحصول على الحلزون المزدوج الجاهز لعملية بدء التضاعف وكما موضح في الشكل الاتي:

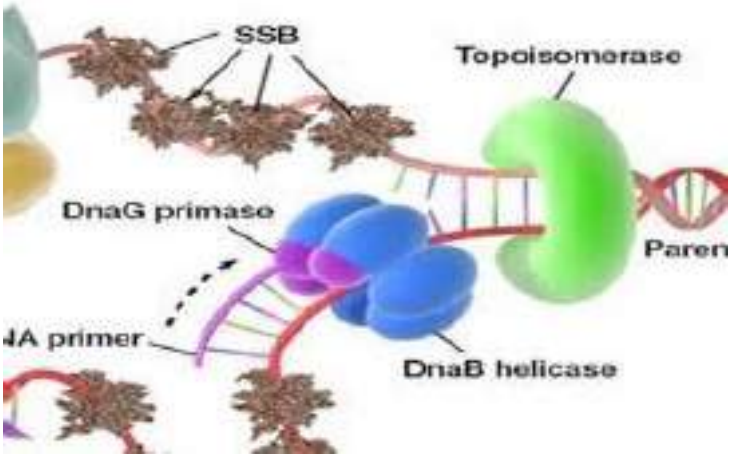


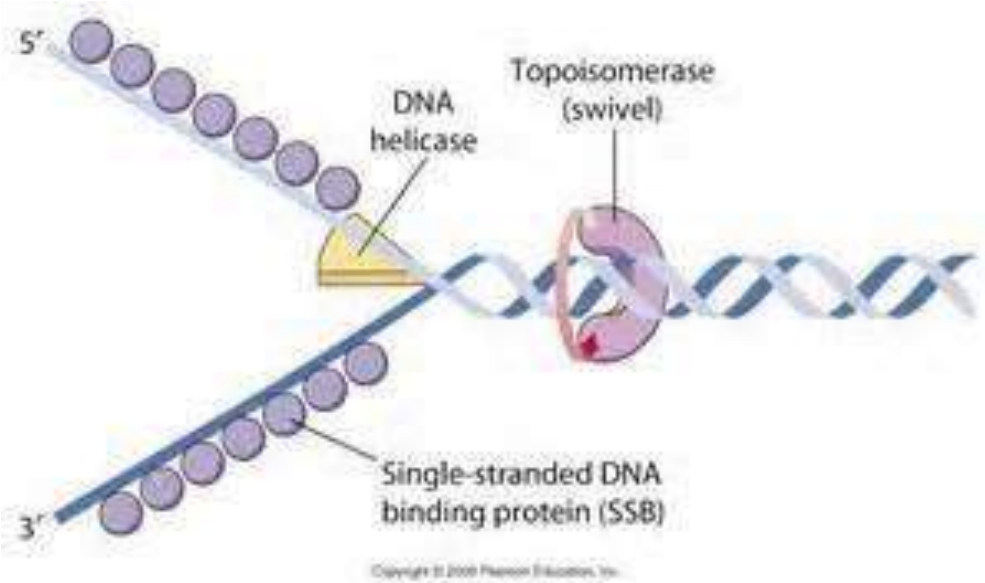
3- **عملية فتح المزدوج Double Helix Denaturation وارتباط بروتين الشريط المنفرد Single Starnd Biondng Protein(SSBP) :**

تحدث هذه العملية بكل من الاتجاهين لفتح المزدوج بواسطة انزيم Helicase وتتزامن معها ارتباط SSBP للشريط المزدوج . ان الغاية من ارتباط الـ SSBP هو لمنع اعادة ارتباط الشريطين وتكوين الحلزون المزدوج وكبح عملية التضاعف أي ان عمل الـ SSBP هو لضمان استقرار الشريطين المنفصلين لحين بدر تصنيع الشريط المتمم لكل منهما. وتسمى هذه المنطقة المفتوحة والمهيأة الى التضاعف بشوكة التضاعف Replication fork والتي تتجه بالاتجاهين . هنالك العديد من شوكة التضاعف تتكون في ان واحد في حقيقية النواة وشوكة تضاعف واحدة في بدائية النواة؟


DNA primase
RNA primer
DNA ligase
DNA Polymerase (Polα)
3'
Lagging strand
5'
Okazaki fragment
5'
Leading strand
3'
3'
5'
Topoisomerase
DNA Polymerase (Polδ)
Helicase
Single strand, Binding proteins



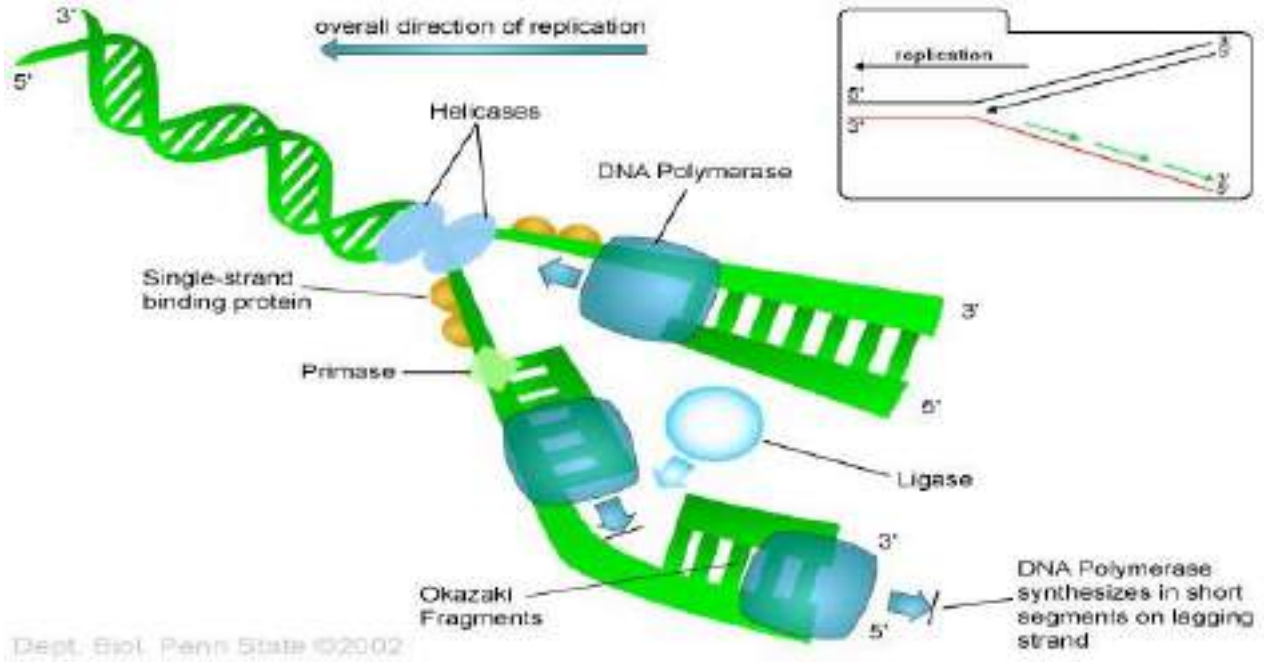

SSB
Topoisomerase
DnaG primase
Paren
NA primer
DnaB helicase


5'
DNA helicase
Topoisomerase (swivel)
Single-stranded DNA binding protein (SSB)
3'

4- **Primer Binding: ارتباط البادئ**

تعد خطوة ارتباط البادئ من الخطوات المهمة والأساسية في بدء عملية التضاعف وذلك لأنه يمثل الأساس لتصنيع الشريط المتمم الجديد. تنجز هذه الخطوة بواسطة انزيم Primase وهم احد أنواع انزيم RNA polymerase حيث يحفز هذا الأنزيم تصنيع قطعة صغيره من الرناRNA تسمى البادئ Primer ويزال هذا البادئ فيما بعد بواسطة احد أنواع انزيم تصنيع الدناDNA polymerase .

لماذا يجب إزالة البادئ ؟



5- **Polymerization and Strand Extension : البلمرة وإطالة الشريط**

تتم هذه العملية بواسطة انزيم DNA polymerase بالاتجاه 3'→5' حيث يقوم باضافة النيوكليوتيدات ثلاثية الفوسفات الى مجموعة الهيدروكسيل الحره للنيوكليوتيده السابقه ونحصل على الطاقة اللازمة من مجموعتي الفوسفات التي كانت في النيوكليوتيده الحره.

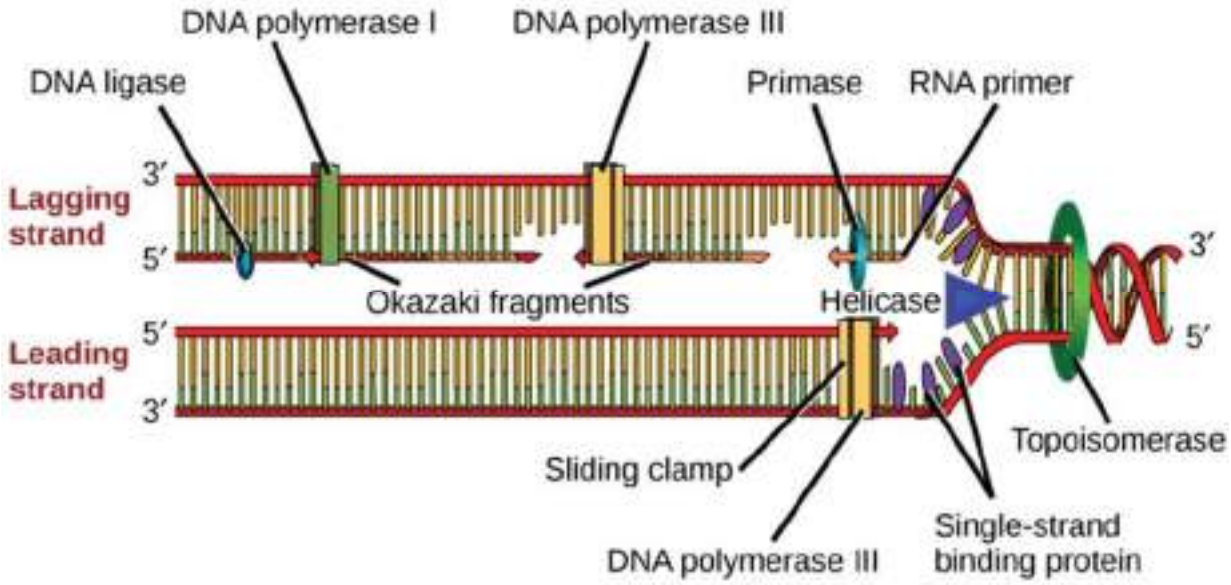
مانوع النيوكليوتيده الحره هل هي ثلاثية الفوسفات ام احادية الفوسفات؟

مانوع النيوكليوتيده المرتبطة هل هي ثلاثية الفوسفات ام احادية الفوسفات؟

في الشريط الجديد الذي يكون الشريط القالب (الاصلي الابوي) له بالاتجاه5'→3' يبنى هذا الشريط باستمرار ويحتاج الى قطعة برايمر واحده فقط ويسمى بالشريط القائد Leading Strand اما الذي يكون بالعكس فانه يحتاج الى عدة قطع من البرايمرات ويبنى بشكل منقطع غير مستمر ويسمى بالشريط المتأخر Lagging Strand وتسمى القطع الصغيرة بقطع اوكازاكي Okazaki Fragment.

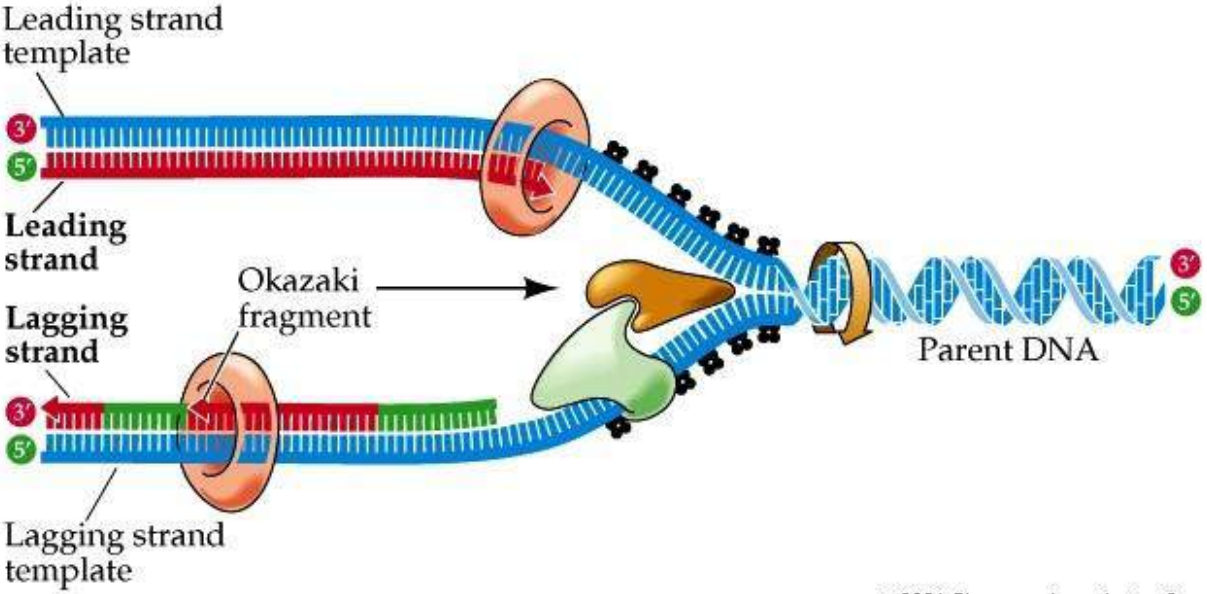
في حقيقة النواة هنالك عدة انواع من انزيم بلمرة الدنا DNA polymerase كل منها ينجز مهمه خاصه وكما يلي:

1- **بوليميريز الفا Pol α:** يعمل هذا الأنزيم على إضافة عدة نيوكليوتيدات الى البادئ (البرايمر) في كلا من الشريطين المتقدم Leading والمتأخر Lagging. ويقابله في بدائية النواة الانزيم Pol I (كذلك هذا الانزيم يقوم بازالة البوادئ الموجوده في قطع اوكازاكي.)
2- **بوليميريز ايبسلون Pol ε:** يعمل على اطالة الشريط المتقدم Leading بعد النيوكليوتيدات التي اضافها بوليميريز الفا (Pol α). ويقابله في بدائية النواة الانزيم Pol III
3- **بوليميريز دلتا Pol δ :**يعمل على اطالة الشريط المتأخر Lagging بعد النيوكليوتيدات التي اضافها بوليميريز الفا (Pol α) وكذلك يقوم بازالة البوادئ الموجوده في قطع اوكازاكي. ويقابله في بدائية النواة الانزيم Pol I

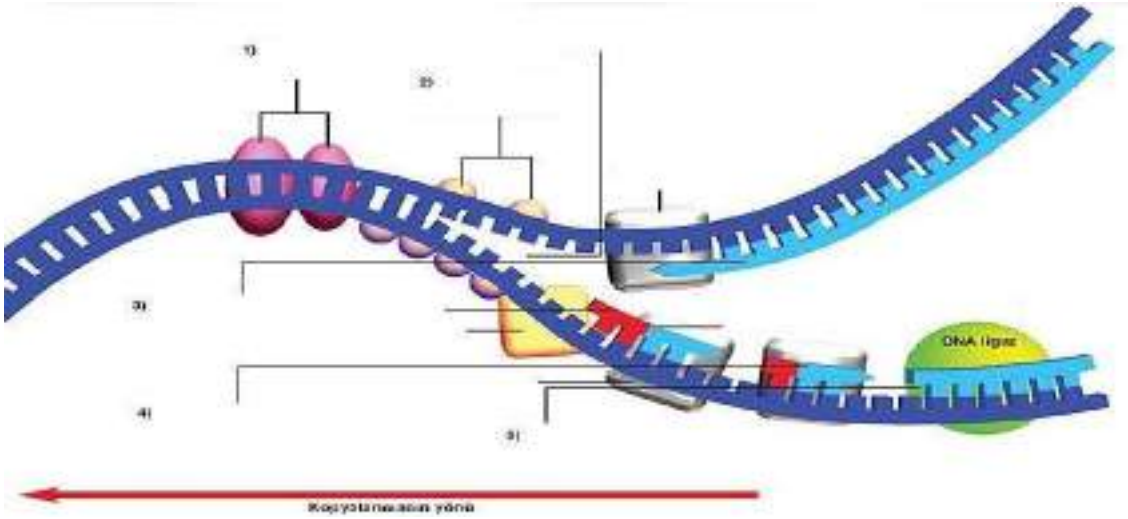


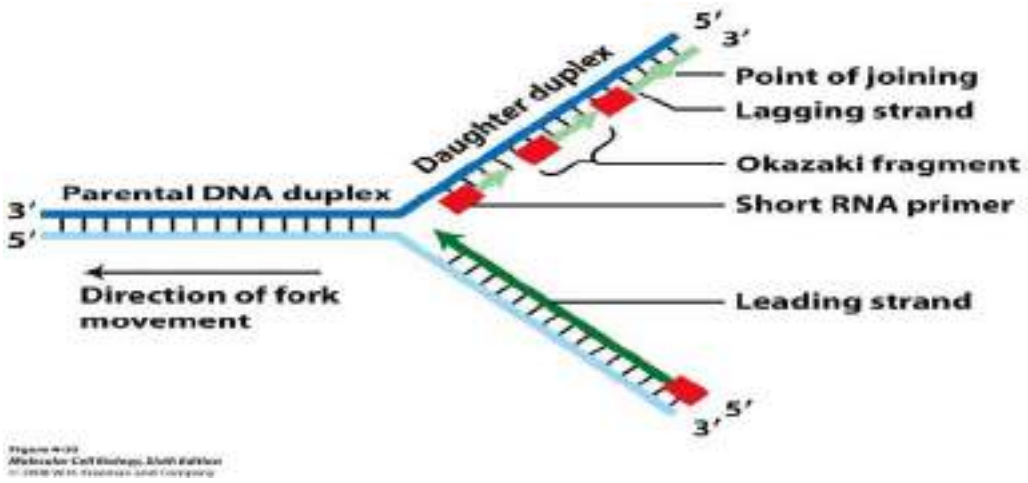
6- **Primer removing and Nick sealing : عملية إزالة البرايمر وغلق القطع**

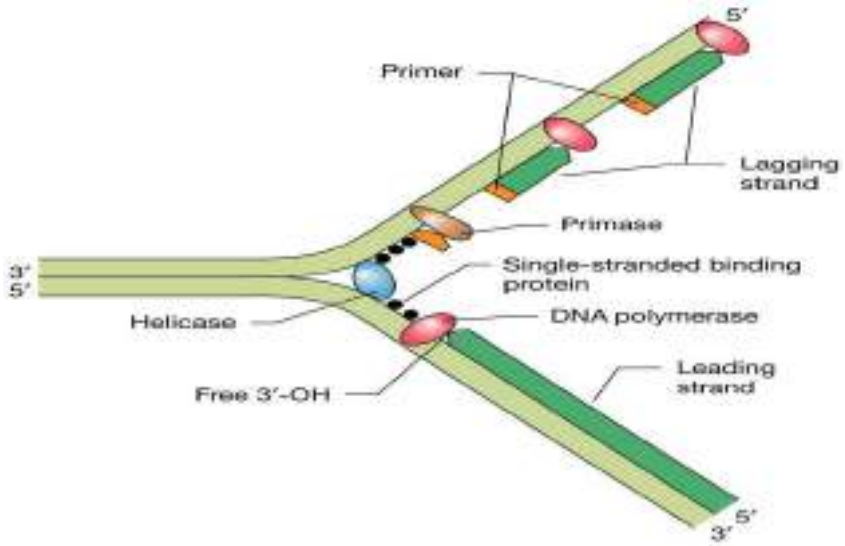
تعد من العمليات المهمة لإزالة البرايمر من الشريط الجديد وتتم بواسطة نوع خاص من انزيم الدنا DNA polymerase اما عملية غلق او لصق القطع الناتج فتتم بواسطة انزيم اللصق DNA Ligase.



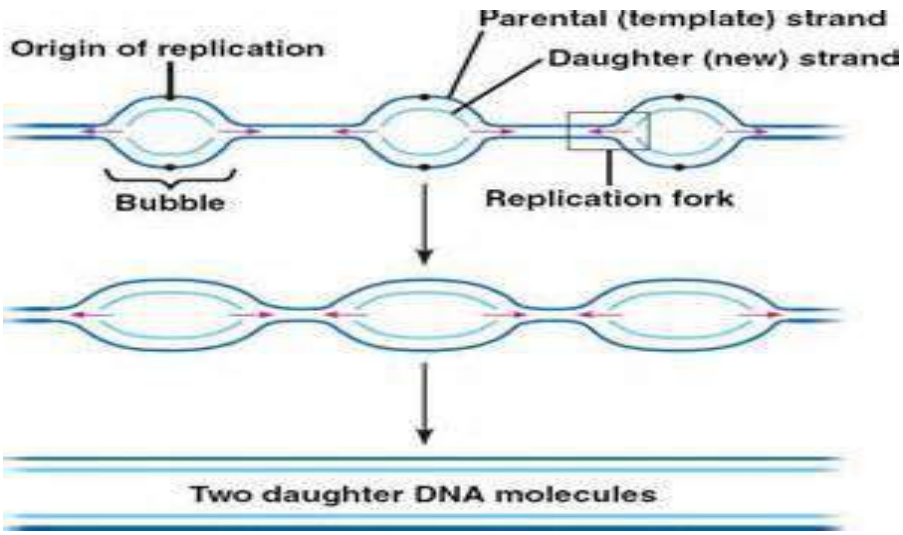
© 2001 Sinauer Associates, Inc.



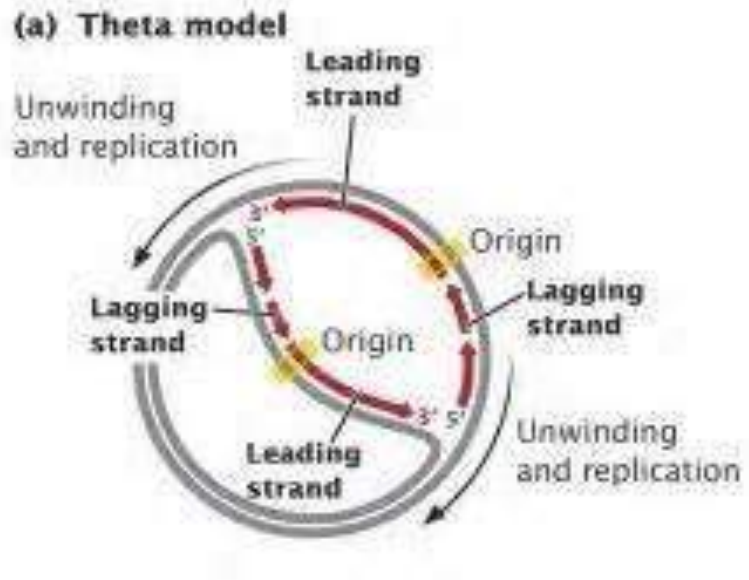




بما انه هنالك أكثر من شوكة للتضاعف على طول جزيئة الدنا DNA في حقيقية النواة لذلك سيتكون أشبه بالفقاعات Bubbles التي تقترب من بعضها البعض وتلتقي لتكوين جزيئة الدنا الجديدة. اما في بدائية النواة فهنالك شوكة تضاعف واحده ؟ تبدأ في مكان معين وتمتد على طول الدنا الكروموسومي الحلقي لتلتقي مرة اخرى.



في كل من بدائية وحقيقية النواة يكون اتجاه التضاعف ثنائي Bidirectional ماعدا تضاعف البلازميدات يكون أحادي الاتجاه Unidirectional .



7- عملية الإنهاء Termination:

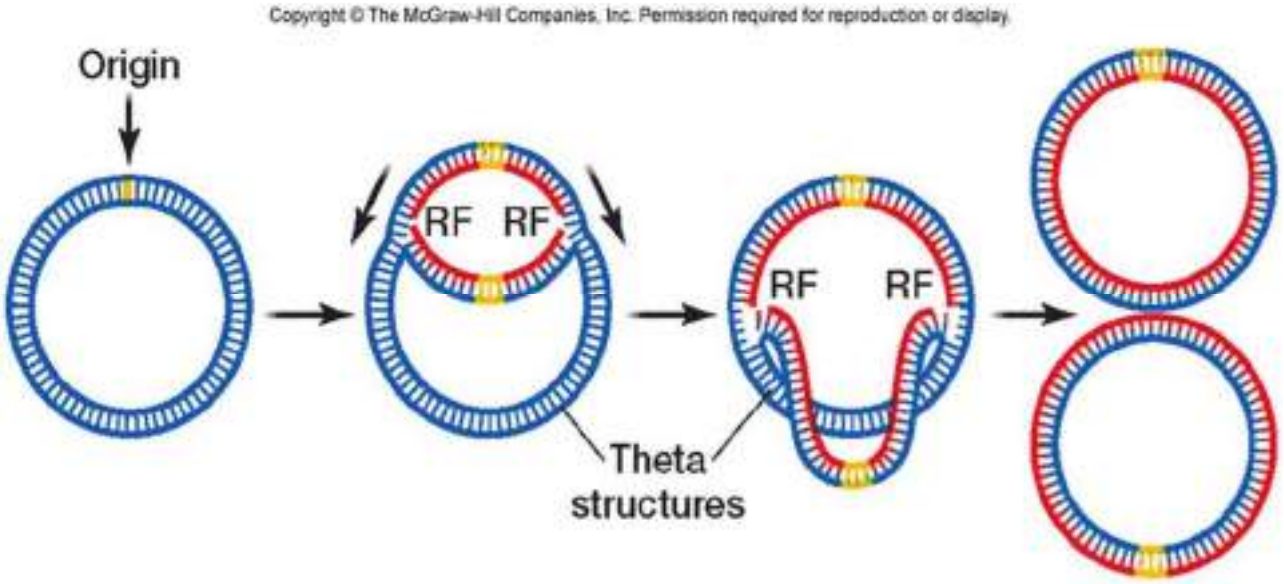
تحدث هذه العملية عند مناطق تسمى مناطق الإنهاء وتحدث عملية إنهاء التضاعف نتيجة لارتباط بروتينات الإنهاء بهذه المناطق. من الجدير بالذكر ان بدائية النواة فيها منطقة إنهاء واحده وبالتالي منطقة متبلمر واحده Replicon (وهي المنطقة المحصورة بين منطقة البدء والإنهاء) في حين هنالك عدة مناطق إنهاء وعدة متبلمرات في حقيقية النواة؟؟

بالتالي يتبادر للذهن الاتي اذا كانت عملية التضاعف في بدائية النواة وحقيقية النواه متشابه تقريبا فأين يكمن الاختلاف ؟ في البداية لابد من التعرف على كيفية تضاعف الدنا في بدائية النواة.

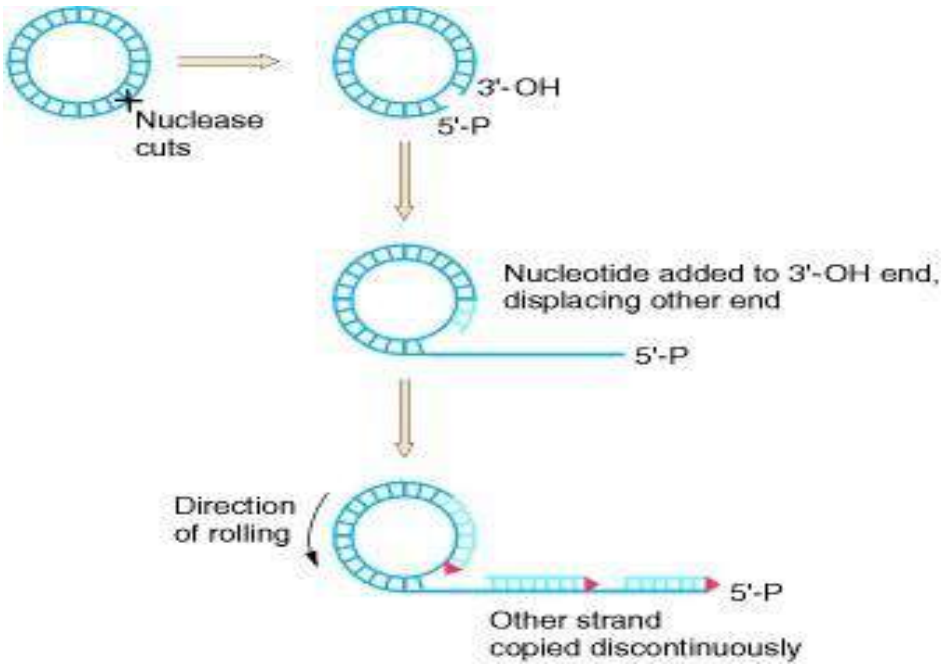
ثانيا: تضاعف الحمض النووي الرايبوزي منقوص الاوكسجين *DNA replication* في بدائية النواة:

كما أسلفنا سابقا هو مشابه لما في حقيقية النواة مع بعض الاختلافات. وهنالك نوعين من التضاعف في بدائية النواة وهي:

1- **التضاعف ثيتا Theta Shape replication:** وهذا يحدث في الكروموسوم الحلقي لبدائية النواة وكما موضح بالشكل ادناه:



2- تضاعف الحلقة المتدحرجه Rolling Circle Replication : يحدث هذا النوع من التضاعف في البلازميدات وكما موضح بالشكل ادناه:



ويمكن تلخيص الفروقات بين عملية تضاعف دنا DNA حقيقية النواة وبدائية النواة في الجدول الاتي:

ت	الصفة	حقيقية النواة	بدائية النواة
-1	عدد الـ OriC او OriT	متعدد ولايوجد OriT	واحد فقط
-2	اتجاه شوكة التضاعف	ثنائي Bidirectional	ثنائي Bidirectional في الكروموسوم أحادي Unidirectional في البلازميد
-3	عدد مناطق الإنهاء	متعددة	واحدة
-4	عدد الـ Replicon	متعددة	واحدة
-5	مكان حدوث التضاعف	النواة	المنطقة النووية
-6	الطور الذي يحدث فيه	S phase	بداية التضاعف
-7	انزيم الدنا DNA polymerase	Pol α Pol ε Pol δ	Pol I Pol II Pol III

عملية الاستنساخ ومابعد الاستنساخ *Transcription and Post transcription Processes*

تعد عملية الـ Transcription على إنها العملية الثانية الأساسية ضمن **الـ*central Dogma*** والتي تضمن نقل المعلومات الوراثية من الدنا الى الحامض النووي الرايبوزي المراسل mRNA لتترجم فيما بعد الى البروتين

عملية الاستنساخ *(Transcription)* :تعرف على إنها عملية تصنيع الحامض النووي الرايبوزي المراسل mRNA باستخدام الدنا DNA كقالب بوجود انزيم بلمرة الرنا RNA polymerase.

تتضمن هذه العملية الخطوات التالية:

1- البدء Initiation
2- الإطالة Elongation
3- الإنهاء Termination

وفيما يلي شرح مفصل لمجمل الأحداث التي تجري في كل خطوة.

الاستنساخ في حقيقية *Eukaryote* وبدائية النواة*Prokaryote* :

وتتضمن الأحداث التالية:

1- ارتباط انزيم .RNA pol (هنالك ثلاثة انواع) بتسلسل مميز يقع ضمن منطقة المحفز Promoter وتسمى هذه المنطقة بـ **TATA box** وتكون ذات تسلسل من 6 نيوكليوتيدة 5'-TATAAA-3' . في بدائية النواة تسمى المنطقة التي يرتبط بها .RNA pol بـ **Pribnow box** ذات تسلسل مكون من 6 نيوكليوتيده 5'-TATAAT-3'

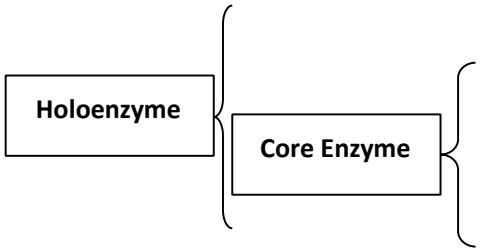
هنالك ثلاثة انواع من انزيم البلمره في حقيقية النواة وهي:

RNA Polymerase I ويستخدم لتصنيع الرنا الرايبوسومي rRNA

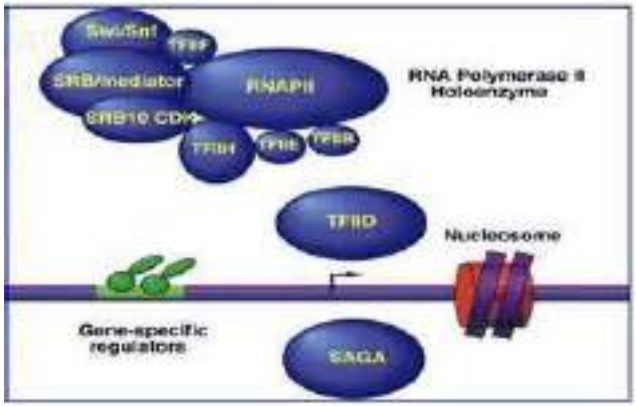
RNA Polymerase II ويستخدم لتصنيع الرنا المراسل mRNA RNA

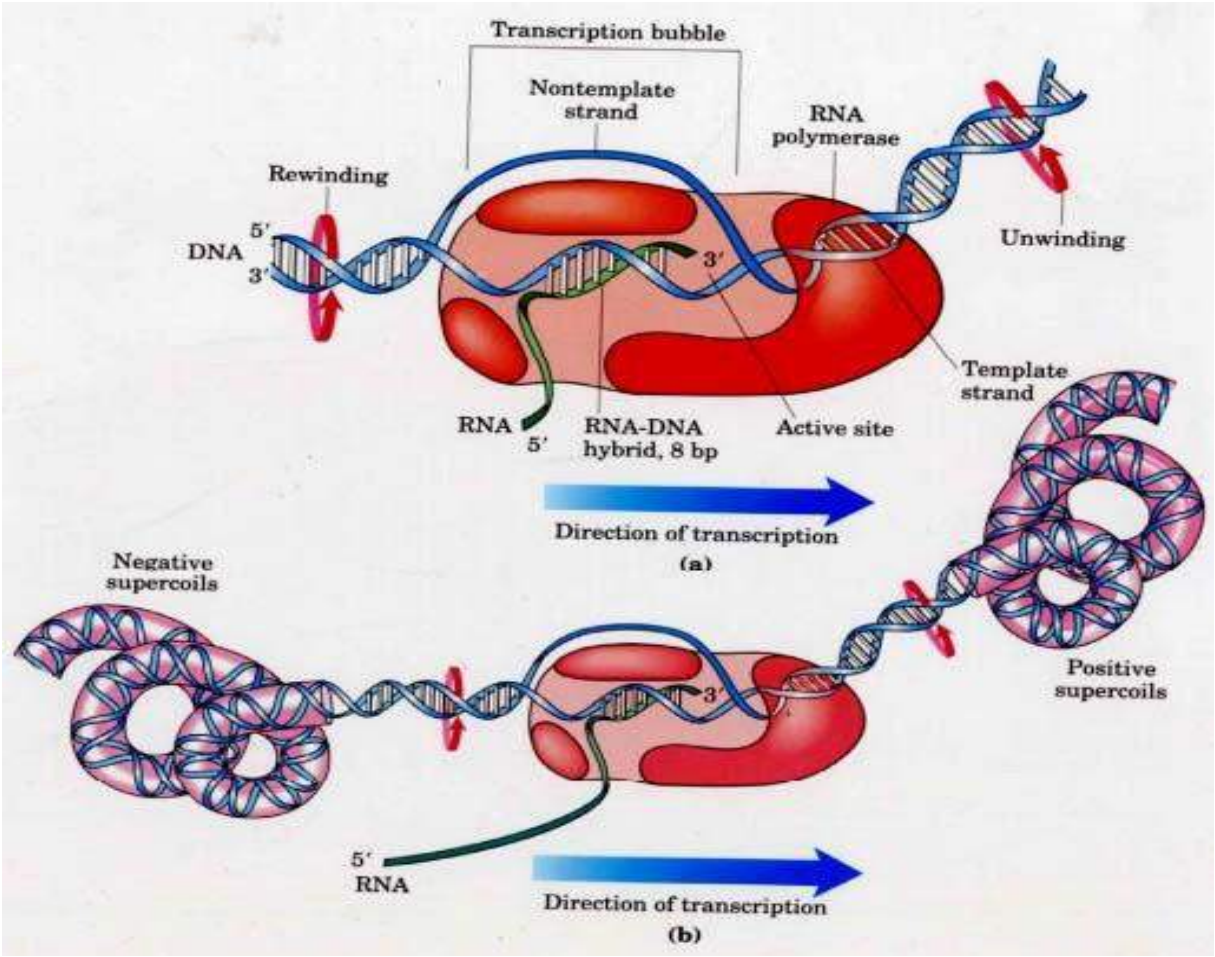
Polymerase III ويستخدم لتصنيع الرنا الناقل tRNA

اما في بدائية النواة فهنالك نوع واحد مكون من عدة وحدات وهي:



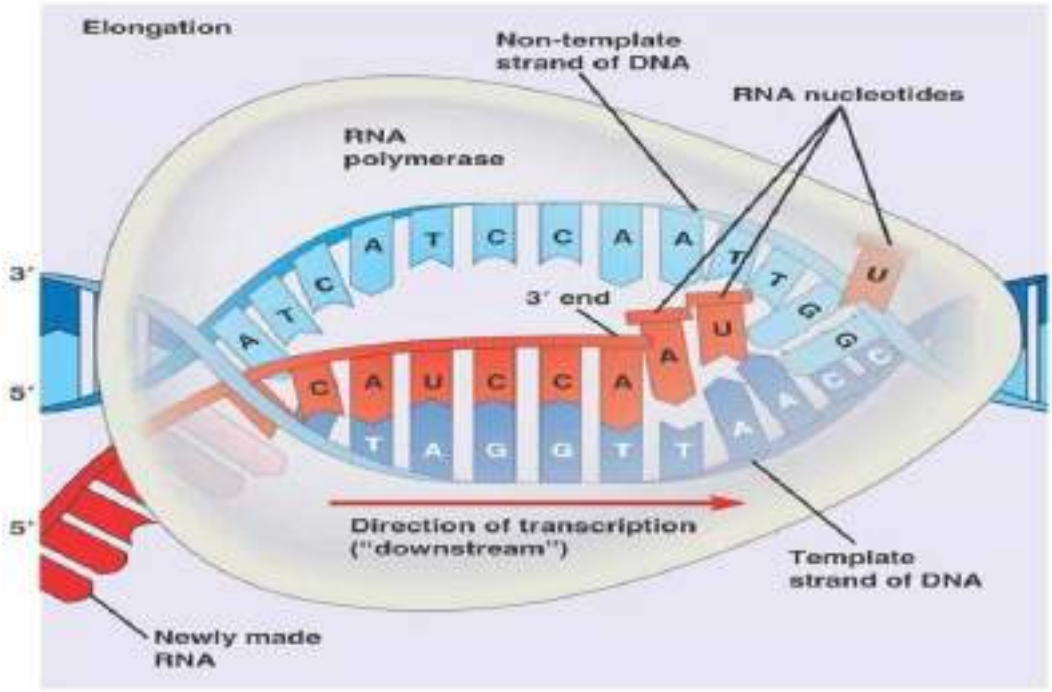
ان وظيفة عامل سكما هو فقط لبدء عملية الاستنساخ ثم بعد ذلك ترتبط بقية الوحدات لتشكل انزيم البلمره المتكامل Holoenzyme وتبدأ عملية الاستنساخ ثم ينفصل عامل سكما ويبقى مايسمى ب Core enzyme



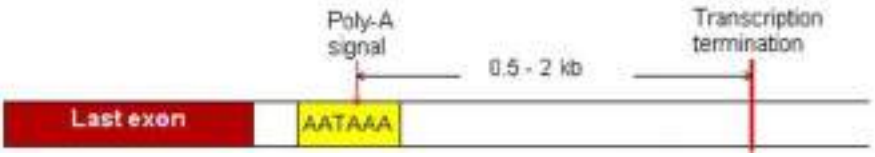


يستخدم شريط الدنا ذو الاتجاه'5←'3 لإنتاج شريط mRNA ذو الاتجاه '3←'5

2- الإطالة Elongation : وتتم بإضافة نيوكليوتيدات رايبوزية الى السلسلة المتنامية

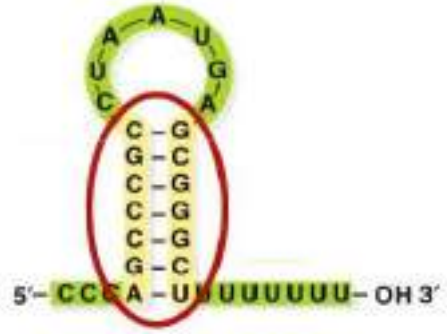


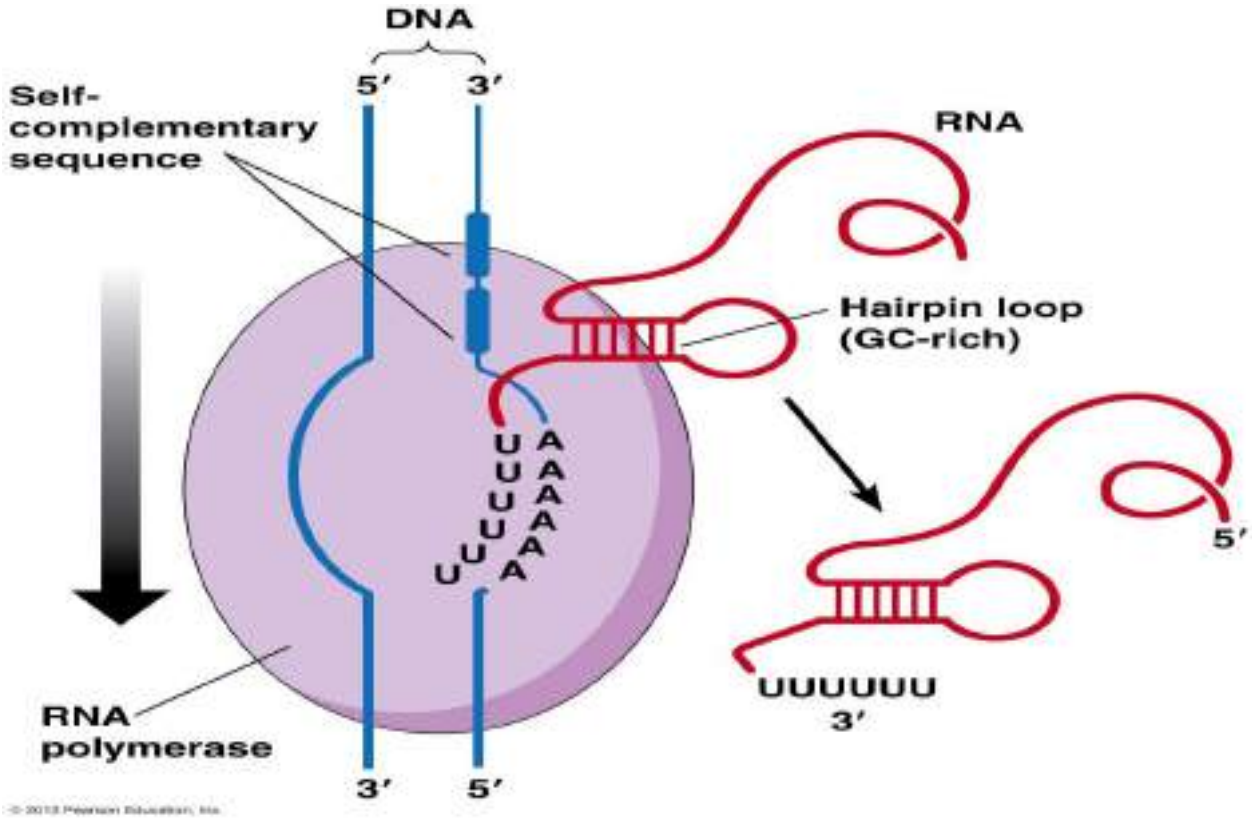
3- الإنهاء Termination : في حقيقية النواة يكون اما معتمد على بعض عوامل الانهاء التي تميز النهايه ذات المتعدد poly-A او غير معتمد ويتم بتكوين hairpin .



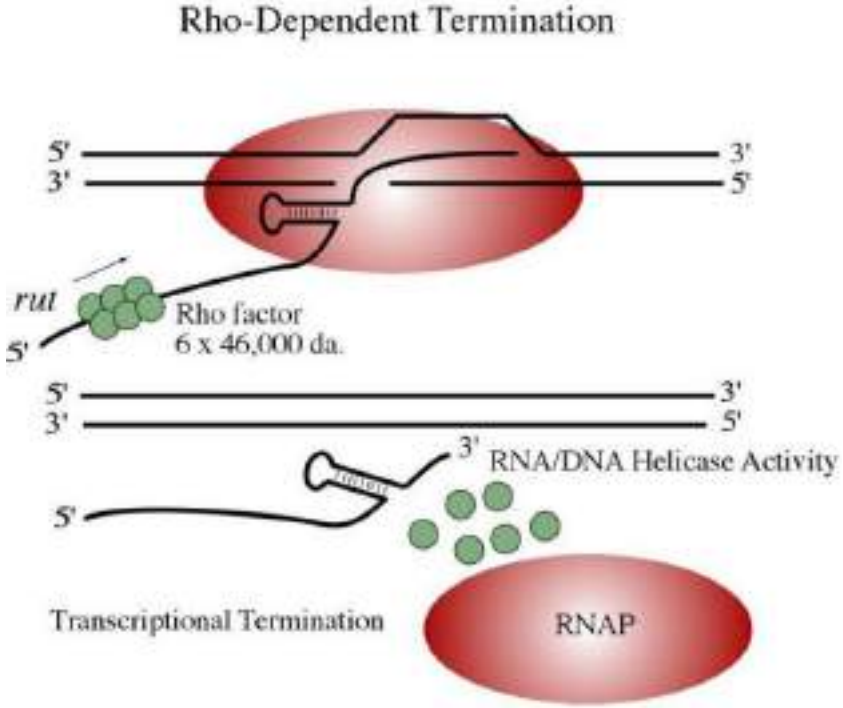
4- هنالك نوعين من عملية الانهاء في بدائية النواة وهي:

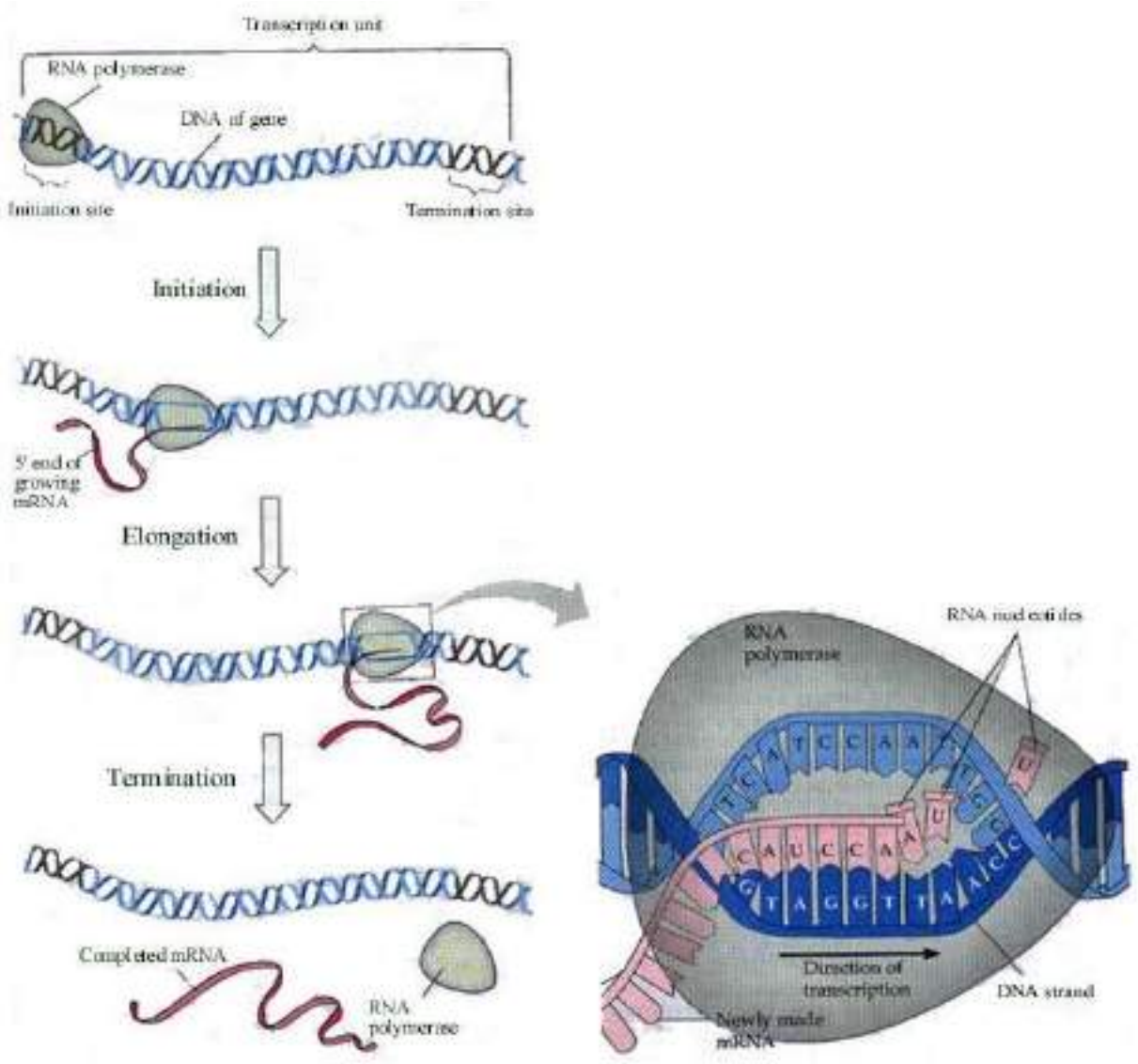
1-**Rho independent** : وتتم بتكوين G-C hairpin التي تعمل على انفصال شريط الرنا الجديد عن شريط الدنا القالب.





2- **Rho dependent:** وتتم بمساعدة بروتين الإنهاء المسمى Rho





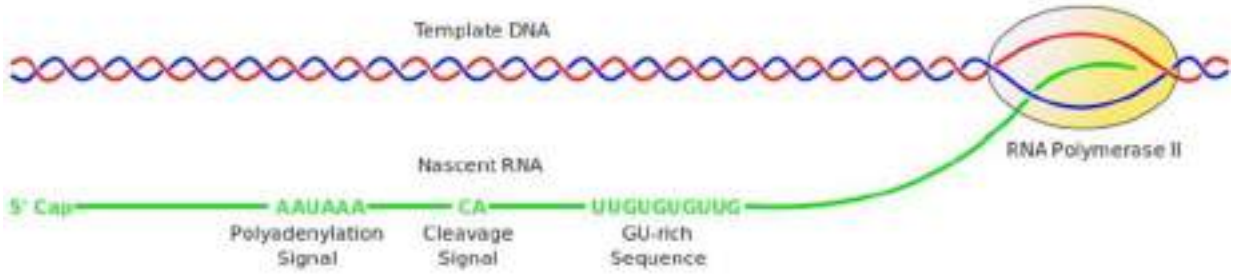
عمليات ما بعد الاستنساخ ***Post transcription processing*** :

ان الـmRNA 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 الفعالmature mRNA. وتشمل هذه العمليات التالية:

1- 5' capping
2- 3' polyadenylation
3- splicing

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

تتضمن عملية الـ 3' polyadenylation إضافة 250 نيوكليوتيده من الأدنين عند الطرف 3' لتكون ما يسمى بالذيل متعدد الأدنين Poly A tail .

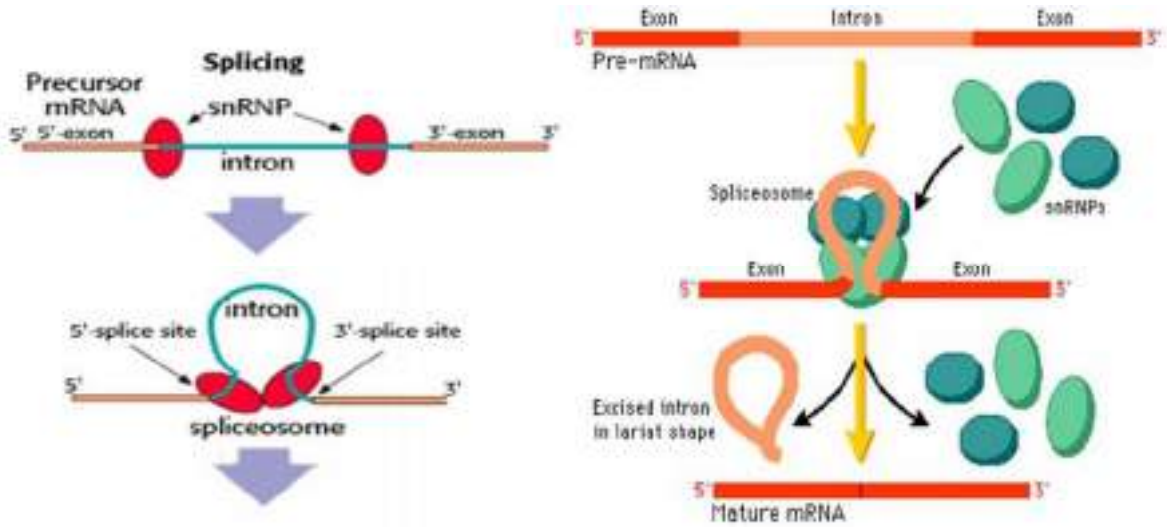


اما عملية الـ Splicing فتتضمن إزالة الانترونات introns و اعادة ربط الاكسونات Exons وتتم هذه العملية بواسطة مايسمى بـ Spliceosomes التي تتكون من بروتينات بالإضافة الى snRNA الذي يميز المنطقة التي يحدث عندها فصل الانترون.

يجدر الإشارة الى مايلي:

1- كل هذه العمليات تحدث فقط في حقيقية النواة Eukaryote ولاتحدث في بدائية النواة Prokaryote .

2- كل هذه العمليات تحدث في النواة.



الشفرة الوراثية وعملية صنع البروتين *Genetic Code and Translation*

كمقدمة لفهم عملية صنع البروتين Protein synthesis او ماتسمى بالـTranslation يجب التطرق الى ماهية الشفرة الوراثية Genetic code والتي تعرف على أنها تسلسل لثلاث نيوكليوتيدات تشفر الى حامض اميني واحد معين ويعد حدوث الطفرات في الشفرة الوراثية هو السبب الأهم في حدوث بعض الأمراض الوراثية.

تمتاز الشفرة الوراثية بمايلي:

1- **التخصص Specificity** : وتعني ان الشفرة الوراثية التي تشفر لحامض اميني معين لايمكن ان تشفر لحامض أخر فعلى سبيل المثال الشفرة الوراثية UUU تشفر للحامض الاميني فنيل الأنين لكنها لايمكن ان شفر لأي حامض أخر .

2- **العمومية Universality** : وتعني ان الشفرة الوراثية تكون متشابه عند كل الأحياء حقيقية وبدائية النواة مع بعض الاستثناءات أي ان الشفرة الوراثية UUU تشفر للحامض الاميني فنيل الأنين في الإنسان والحيوان والبكتريا والنبات. **أمثلة على الاستثناءات:**

في الحالة الطبيعية الشفرة AUA تشفر للحامض الاميني ايزوليوسين <u>لكن</u> وجد أنها في المايتوكوندريا وجد أنها تشفر للحامض الاميني المثيونين.

في الحالة الطبيعية الشفرة UGA لاتشفر لأي حامض الاميني (Stop codon) <u>لكن</u> وجد أنها في المايتوكوندريا وجد أنها تشفر للحامض الاميني التربتوفان.

في الحالة الطبيعية الشفرة AGA & AGG تشفر للحامض الاميني الارجنين <u>لكن</u> وجد أنها في المايتوكوندريا وجد أنها لا تشفر لاي حامض الاميني (Stop codon) .

3- **الوفرة او الترهل Redundancy :** وتعني ان الحامض الاميني ممكن ان تشفر له اكثر من شفرة وراثية واحدة وكما موضح في الشكل ادناه:

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

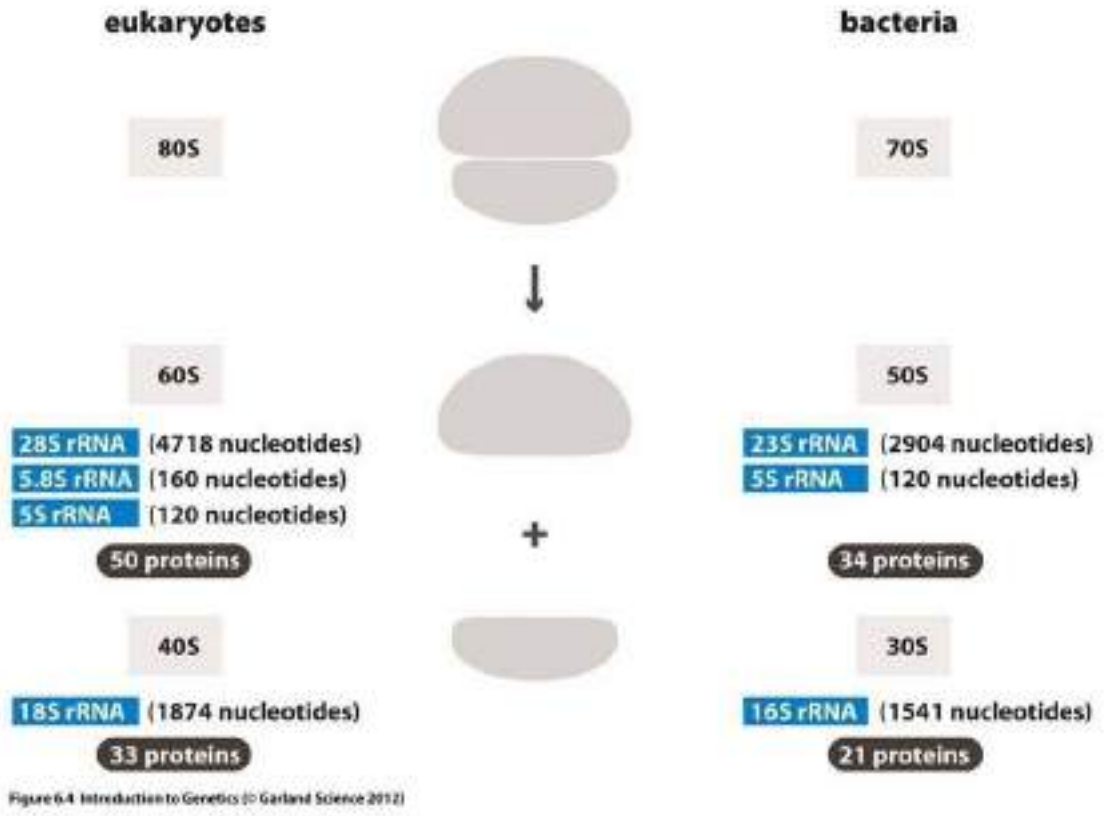
4- صفة او ظاهرة التذبذب wobble phenomenon وهي الصفة التي تتصف بها القاعدة الثالثة في الشفرة (third base of codon) المحمولة على mRNA والتي تقابل القاعدة الأولى في ضد الشفرة (first base of anticodon) المحمولة على tRNA وتسمى هذه القاعدة بـ wobble base حيث تتصف بعدم التخصص حيث وجد ان ممكن ان يحدث ارتباط غير طبيعي non traditional base pairing في القاعدة الثالثة من الشفرة والأولى من ضد الشفرة وكما مبين في الجدول ادناه:

Base pairing	**m RNA (Third base)**	**t RNA (first base)**
Traditional	G	C
Traditional	U	A
Traditional	A	U
Nontraditional	G	U
Traditional	C	G
Nontraditional	U	G
Nontraditional	U	I

Nontraditional	C	I
Nontraditional	A	I

تركيب الرايبوسوم في حقيقية وبدائية النواة:

بصوره عامه تتكون الرايبوسوم من وحدتين هم الصغيرة Small subunit و الكبيرة Large subunit وهذه الوحدات تتكون من بروتينات احماض نوويه رايبوسوميه rRNA وتختلف في حقيقة النواة عما في بدائية النواة وكما موضح بالشكل ادناه:

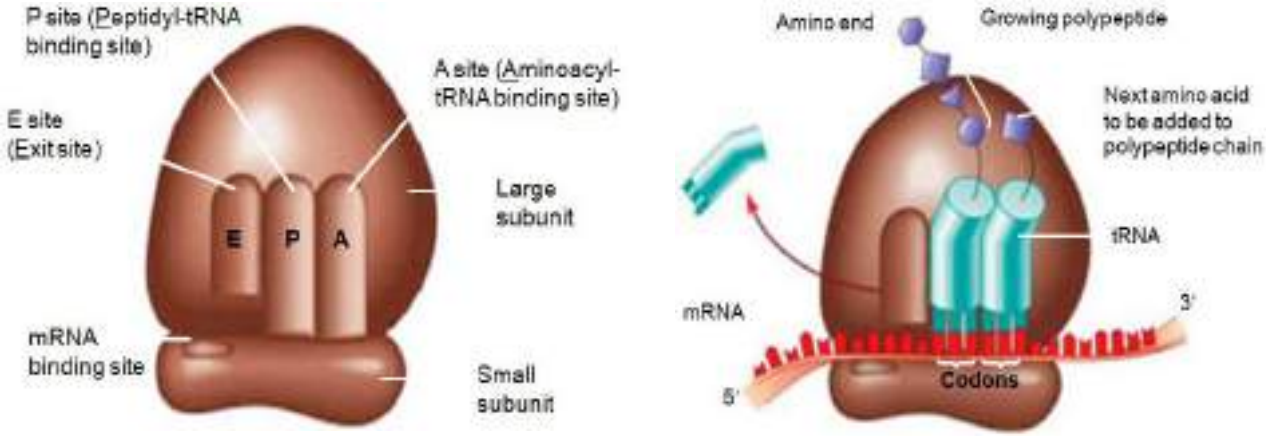


تحتوي الرايبوسومه المتكامله على ثلاث جيوب او مواقع تسمى بـ:

(E site) Exit site موقع الخروج الذي عن طريقه يخرج الـtRNA الفارغ .

(P site) Peptidyl-tRNA Binding site الموقع الذي يتموضع به tRNA المحمل بالحامض الاميني المرتبط بسلسلة الاحماض الامينية التي سبقته.وكما مبين ادناه

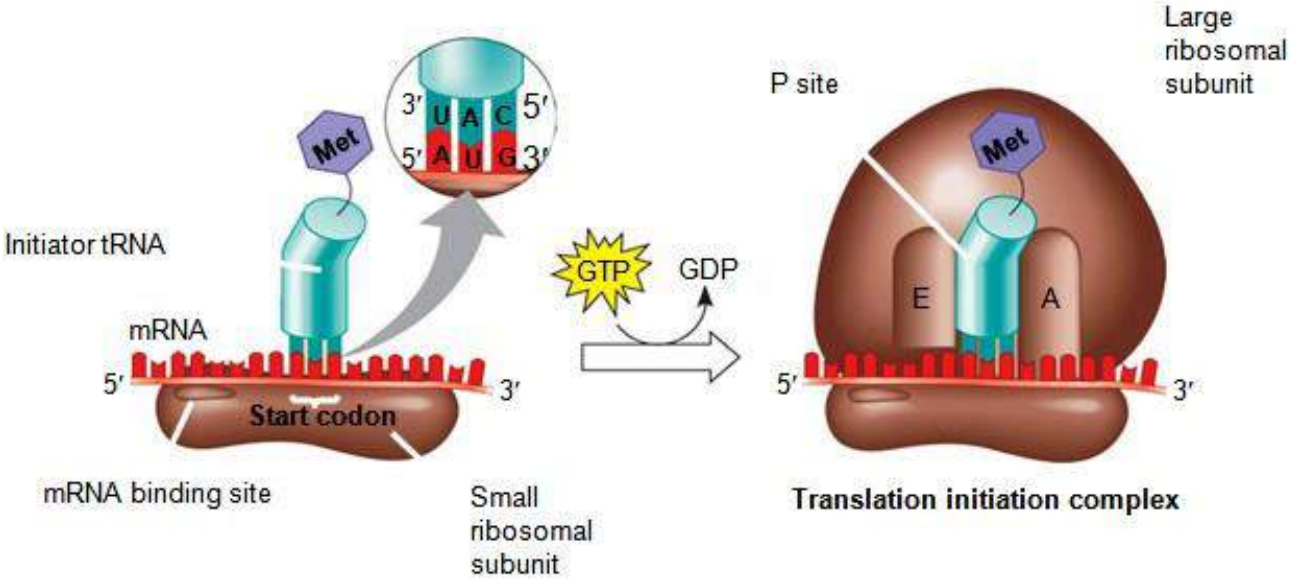
(A site) Aminoacyl-tRNA Binding site الموقع الذي يتموضع به tRNA المحمل بالحامض الاميني الجديد المنفرد. وكما مبين ادناه



عملية صنع البروتين ***Protein Synthesis (Translation)*** :

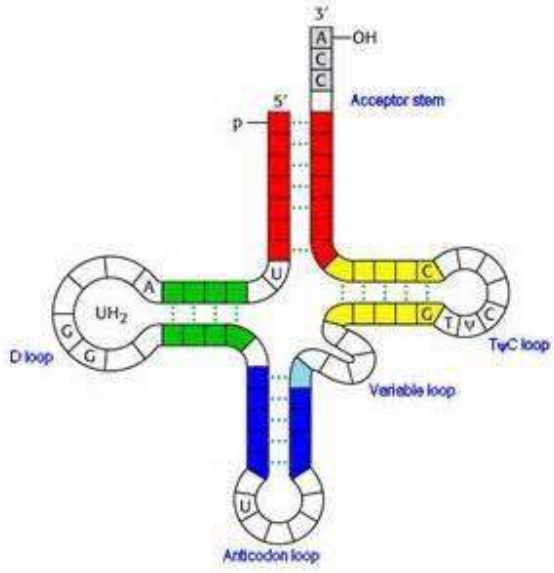
تحدث هذه العملية في منطقة السايتوبلازم في كل من حقيقية وبدائية النواة وتكتمل على ثلاث مراحل وكمايلي:

1- مرحلة البدء Initiation : وتتضمن ارتباط الوحدة الرايبوسومية الصغيرة مع mRNA ثم مع tRNA البدء (initiator tRNA) الذي يميز شفرة البدء الموجودة على الـ mRNA (AUG) حيث يحمل ضد الشفرة UAC حيث يحمل initiator tRNA الحامض الاميني المثيونين في حقيقية النواة (والفورميل مثيونين في بدائية النواة). حيث يتموضع Met-tRNA في الموقع P وليس A (كما يحدث في الاحماض اللاحقه). بعد ذلك ترتبط الوحده الكبيره لتكوين معقد البدء ومن الجدير بالذكر انه هنالك بروتينات تساعد حدوث هذه العملية وتسمى مجتمعة بـ Initiation Factors (IF) وكما موضح بالشكل ادناه:

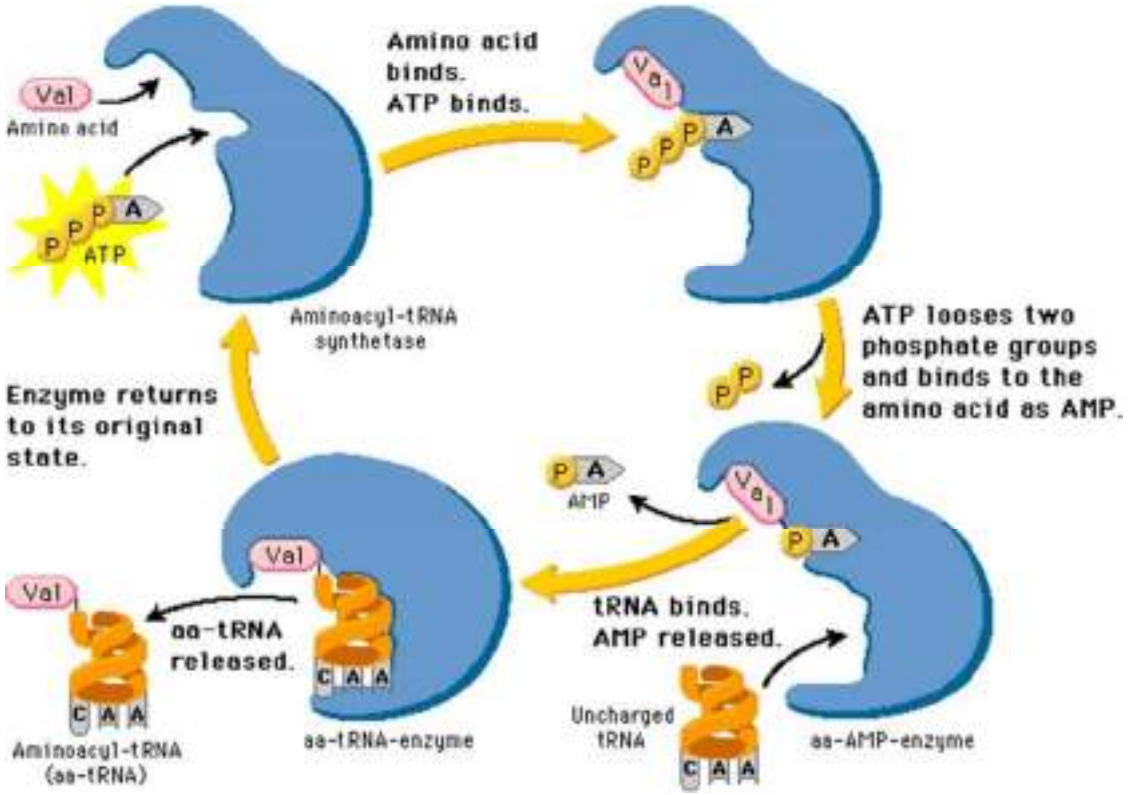

Large ribosomal subunit
P site
3′ U A C 5′
5′ A U G 3′
Met
Initiator tRNA
GTP
GDP
mRNA
5′
3′
Start codon
E
A
mRNA binding site
Small ribosomal subunit
Translation initiation complex

كيف يتم تحميل الحامض الاميني على الـ tRNA ؟

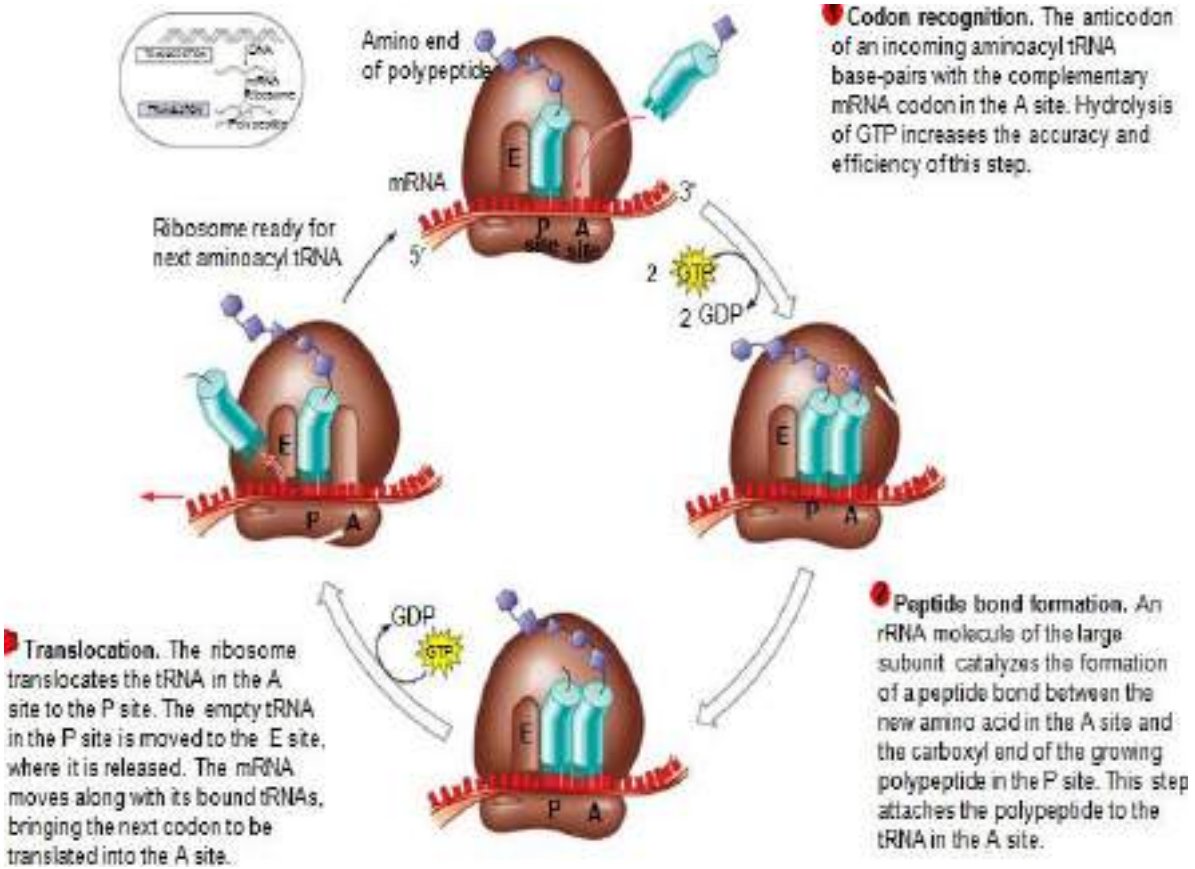
لابد في البدء من معرفة تركيب الـ tRNA ، انه حامض نووي رايبوزي مزدوج الشريط (وهو الحامض النووي الرايبوزي الوحيد الذي يكون مزدوج الشريط في حقيقية النواة) حيث يتكون من عدة التواءات Loops وكما مبين في الشكل ادناه:



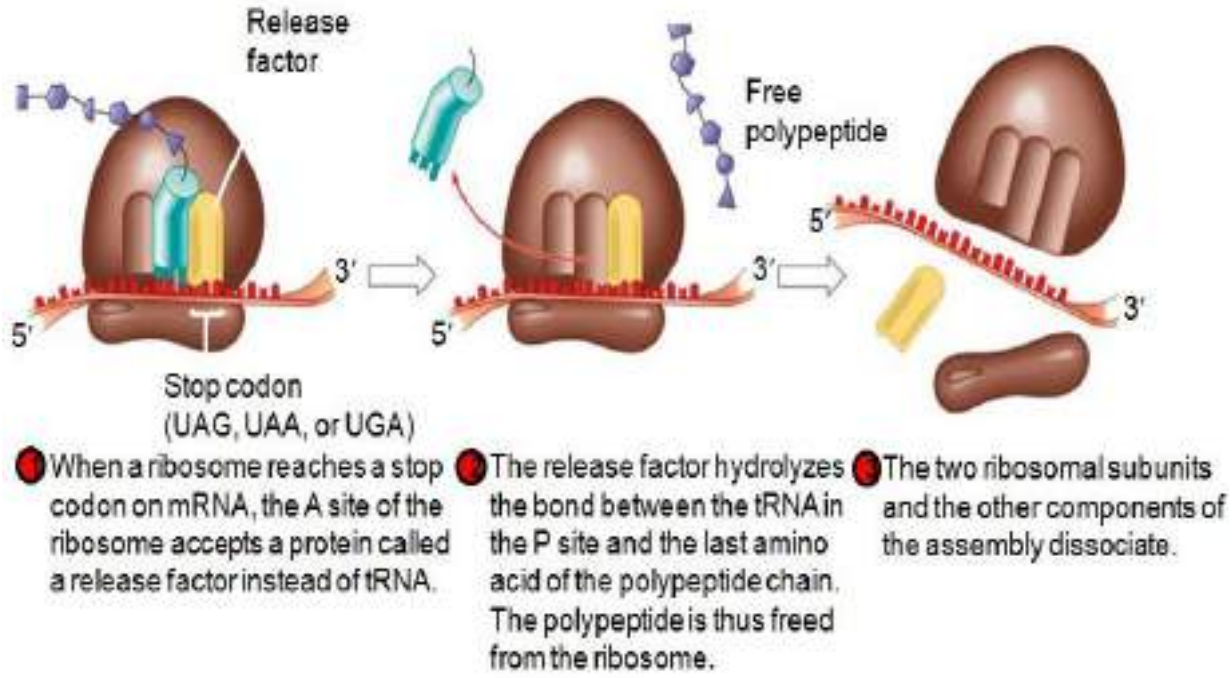
يتم تحميل الـ tRNA بالحامض الاميني بواسطة الأنزيم aminoacyl-tRNA synthetase وكما مبين بالشكل ادناه:



2- مرحلة الإطالة Elongation : بعد تموضع الـtRNA الثاني في الموقع A سوف تبدا عملية ربط الحامض الاميني السابق (الأول) بالحامض الاميني اللاحق (الثاني) من خلال تكوين أصره ببتيديه بينهما وبالتالي يكون الـ tRNA الثاني محمل بالحامض الاميني الأول والثاني وتتحرك الرايبوسوم خطوه واحده حيث ينتقل الـ tRNA الفارغ الى الموقع E ثم يخرج ليعاد تحميله وينتقل الـ tRNA المحمل بالسلسلة الى الموقع P ويصبح الموقع A فارغ ومهيأ لاستقبال tRNA جديد محمل بحامض اميني جديد وتسمى هذه الحركه بـ Translocation. تحتاج هذه العملية الى طاقه والى وجود بعض البروتينات التي تسمى بعوامل الاطاله Elongation factor (EF) وتستمر هذه العملية الى ان تصل الى شفرة الإيقاف (stop codon) . وكما موضح بالشكل ادناه:



3- مرحلة الإنهاء Termination : تبدأ هذه المرحلة عندما تصادف الرايبوسوم أي من شفرات الإنهاء stop codon حيث يستقبل الموقع A بعض عوامل الإنهاء Releasing Factors (RF) والذي بدوه يعمل على تحرير سلسلة متعدد الببتيد وفك ارتباط وحدات الرايبوسوم وتحرير الـ mRNA وكما موضح في المخطط ادناه:



Polyribosome : هو مجموعه من الرايبوسومات الموزعة على طول mRNA

وفيما يلي نوضح الفرق بين عملية صنع البروتين في حقيقية وبدائية النواة وكما مبين بالجدول ادناه:

ت	الصفة	حقيقية النواة	بدائية النواة
1	الرايبوسوم	80S	70S

2	tRNA البادئ	Met-tRNA	fMet-tRNA
3	عملية البدء	تحدث بعد ارتباط الوحدة الصغيرة 40s قربمنطقة 5' cap	تحدث بعد ارتباط16s RNA لمنطقة Shine-Dalgarno
3	عوامل البدء IF	اكثر من عشره ويرمز لها eIF (eIF-1 to eIF-6)	ثلاثه ويرمز IF لها (IF-1, IF-2, IF-3)
4	عوامل الاطالة EF	ثلاثه وهي: **eEF-1α** (هو انزيم GTPase ساعد على دخول الـtRNA المحمل الى الموقع الفارغ P or A) **eEF-1βγ** (ازالة ال GDP من eEF-1α **eEF-2** (يسهل عملية الـ Translocation)	ثلاثه وهي: **EF-Tu** (هو انزيم GTPase ساعد على دخول الـtRNA المحمل الى الموقع الفارغ P or A) **EF-Ts** (ازالة ال GDP من EF-Tu **EF-G** (يسهل عملية الـ Translocation)
5	عوامل الانهاء RF	ثلاثه يرمز لها eRF وهي: eRF-1 يميز شفرتي الانهاء UAA and UAG eRF-2 يميز شفرتي الانهاء UAA and UGA eRF-3 يسرع من عملية انفصال المعقد	ثلاثه يرمز لها RF وهي: RF-1 يميز شفرتي الانهاء UAA and UAG RF-2 يميز شفرتي الانهاء UAA and UGA RF-3 يسرع من عملية انفصال المعقد
6	عدد المناطق المشفره في Coding region of mRNA	واحده لكل mRNA يسمى monocistronic mRNA	متعدده ولذلك يسمى Polycistronic mRNA

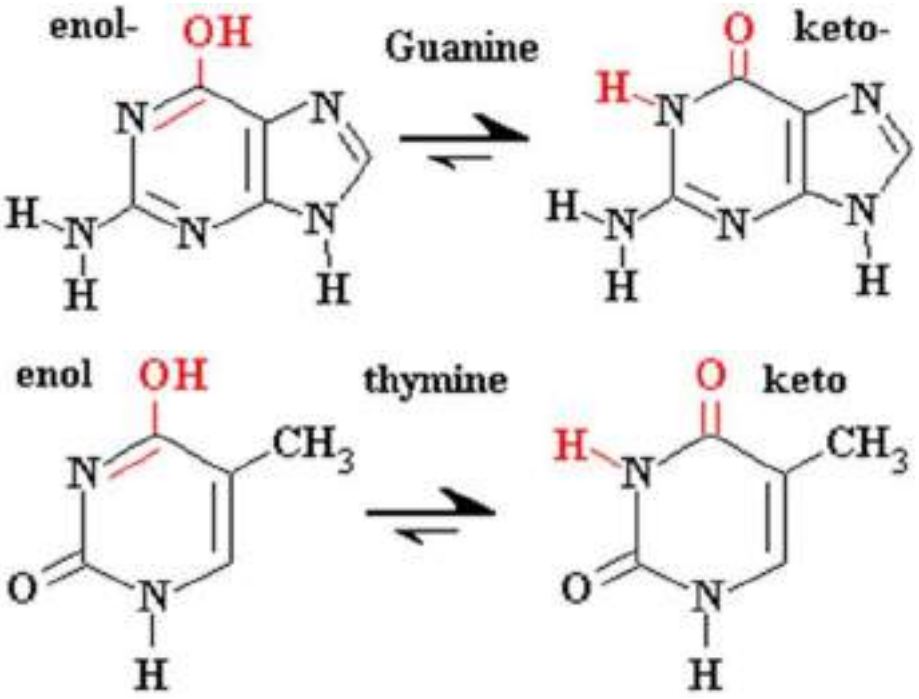
الطفرة الوراثية *Genetic Mutation*

تعرف الطفرة الوراثية على أنها التغير الحاصل في المادة الوراثية وتكون على مستوى الجين او الكروموسوم.

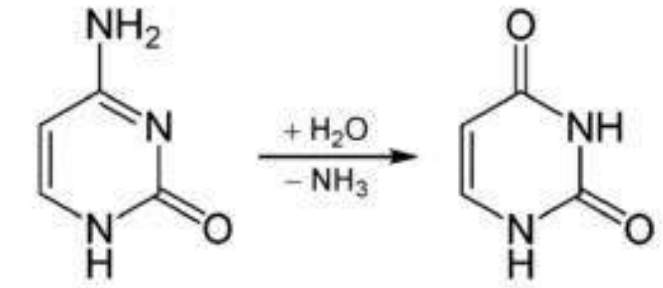
فعلى مستوى الجين تعرف الطفرة على أنها أي تغيير في القواعد النتروجينيه للدنا والتي بدورها تؤدي الى نتائج مؤذية (او في بعض الأحيان مفيدة)للصفة الوراثية. وتسمى العملية التي تؤدي الى حدوث الطفره **بالتطفير *Mutagenesis*** والتي تكون:

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

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



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



Cytosine Uracil

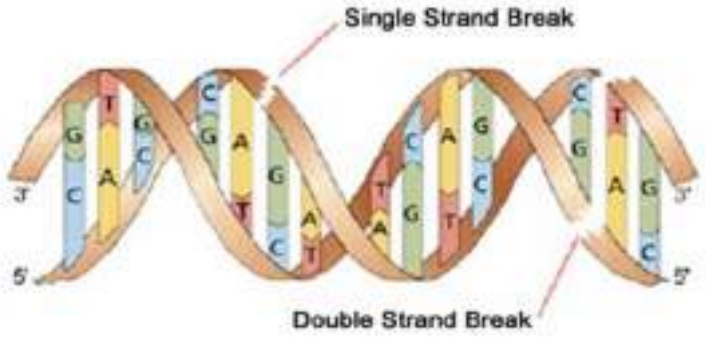
2-**مستحثة *Induced*** : والتي تحصل بشكل مقصود كما في بعض التجارب المختبرية التي تختبر القدرة التطفيرية لبعض المركبات او المؤثرات ومن العوامل التي تسبب الطفره المستحثة هي (تسمى العوامل المطفره بـ Mutagen) :

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

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

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

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



3- :Base Damage

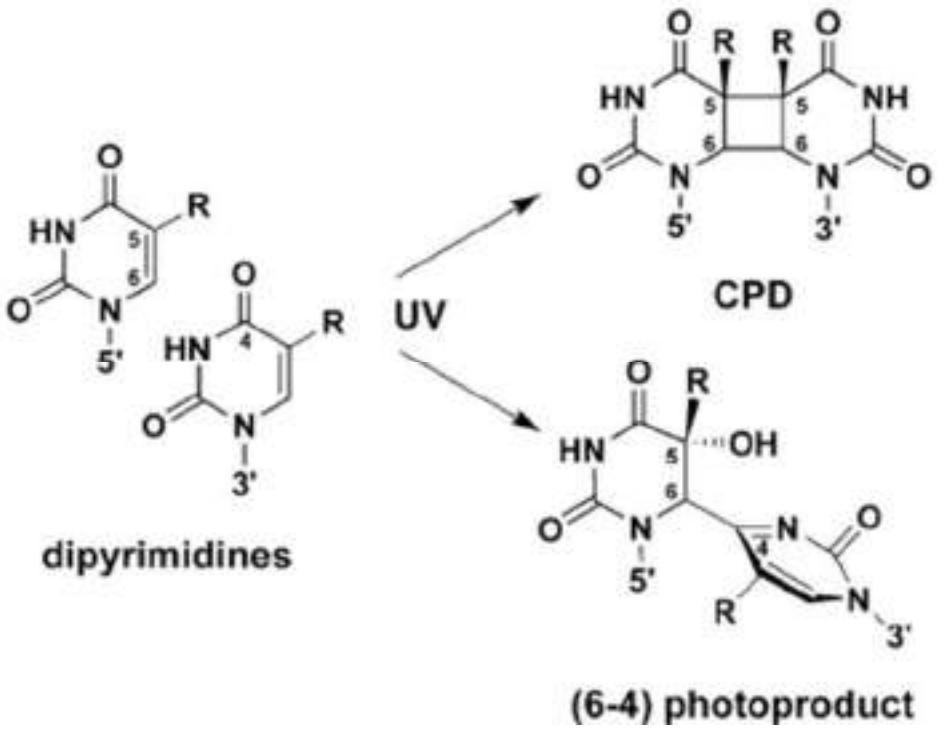
الأشعة الغير مؤينة non-ionizing Radiation: وأهمها الأشعة فوق البنفسجية UV-light : حسب منظمة الغذاء والدواء الأمريكية ووكالة ناسا هنالك ثلاثة انواع من الأشعة :

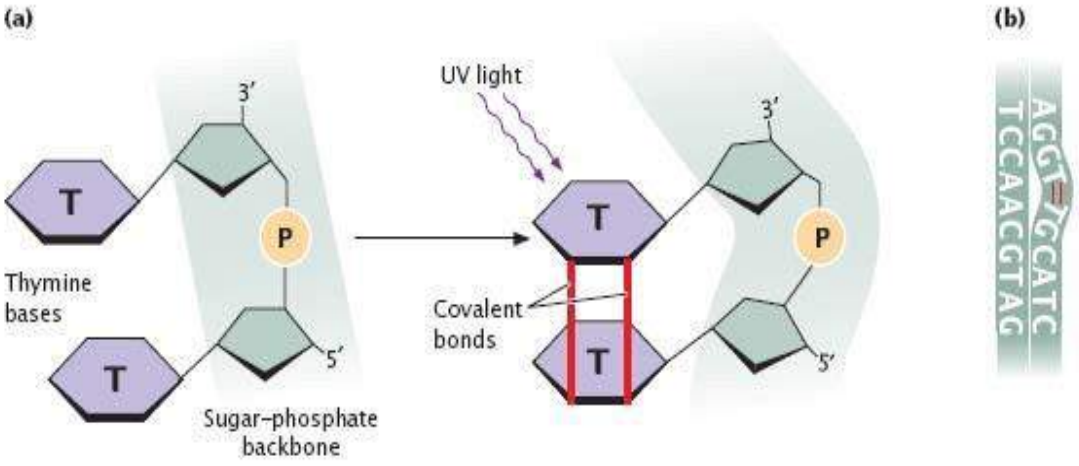
UV-A 400 nm - 320 nm
UV-B 320 nm - 290 nm
UV-C 290 nm - 100 nm

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

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

Cyclobutane pyrimidine dimer (CPD) e.g. Thymine Dimer
6-4 pyrimidine –pyrimidone



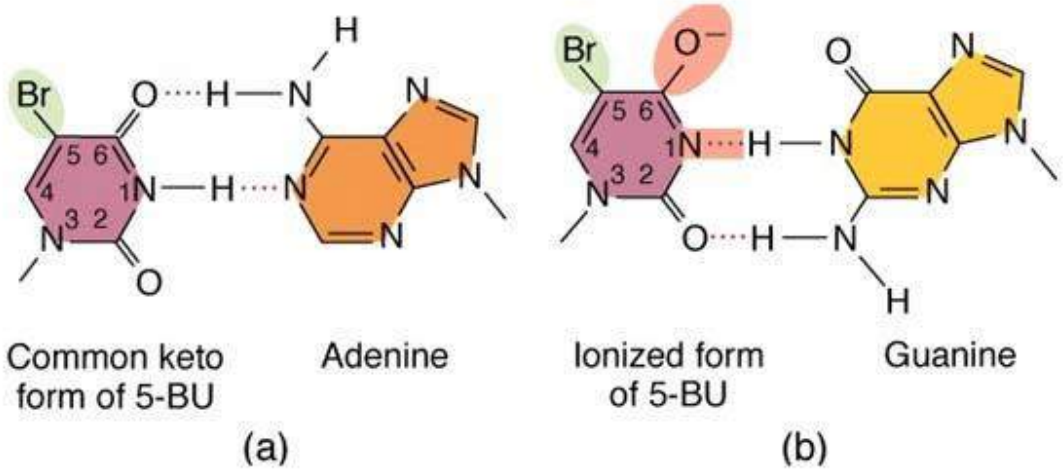


-2 استبدال قاعدة منفره او زوج قاعدي single-base or Double-base substitutions كما في استبدال السايتوسين بالثايمين.

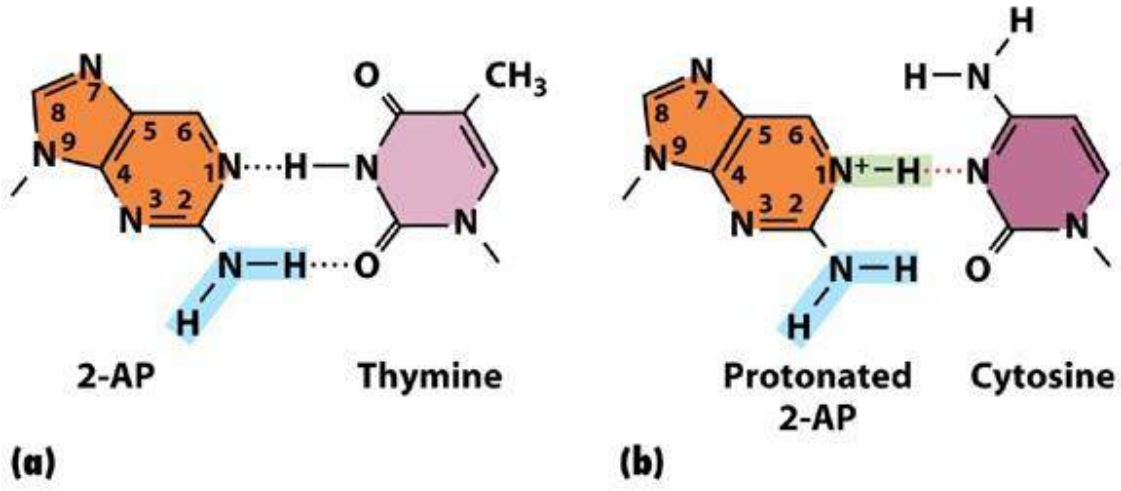
ثانيا: العوامل الكيمياوية: والتي تنقسم الى

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

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



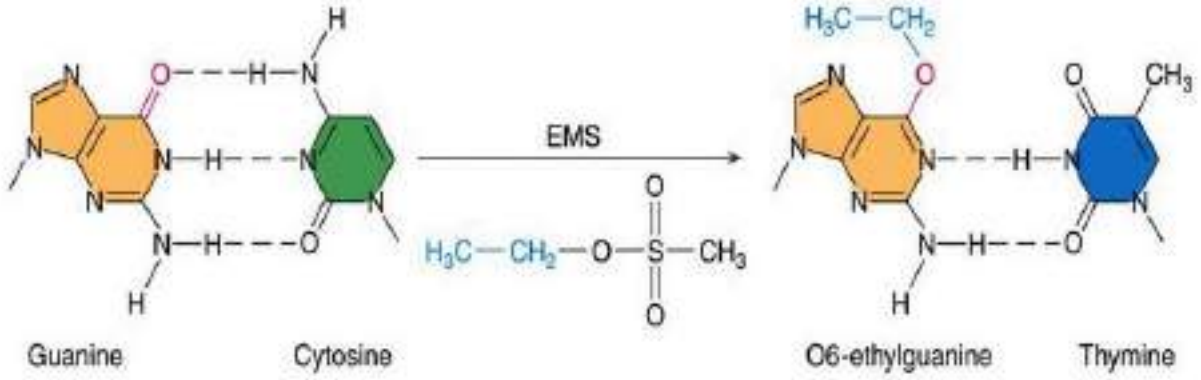
- **2-امينوبيورين 2-AP :** على العكس من **5-BU** لديه شكل كيتوني يشبه الادنين وبذلك ممكن ان يرتبط مع الثايمين وشكل اينولي يشابه الكوانين يمكنه من الارتباط مع السايتوسين.



2- عوامل الالكلة Alkylator : هذه العوامل تتفاعل مباشرتا مع القاعدة النتروجينية وتتسبب في تغييرها الى قاعدة اخرى مسببة خطا في الارتباط mispairing ومن هذه المواد:

Ethyl methane sulfonate (EMS)

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



Methyl methane sulfonate (MMS)

Diethylsulfate (DES)

Nitrosoguanidine (NTG, NG, MNNG)
Mastard gas

3- عوامل اخرى: وتشمل

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

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

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

ثالثا: العوامل البايولوجيه: والتى تنقسم الى:

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

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

اولا: حسب تأثيرها على الوظيفة: وتقسم الى

- **طفرات فقدان الوظيفة**: هذه الطفرات تحدث عندما تصبح وظائف نواتج الجينات غير مكتملة أو معدومة. عندما يفقد الأليل وظيفته بالكامل ، فإن الطفرة التي تسببت في ذلك غالباً يطلق عليها طفرة عديمة الشكلamorphic وعادةً تكون الأنماط الظاهرية المرتبطة بهذه الطفرات متنحية.
- **طفرات كسب الوظيفة**: طفرات تغير النواتج الجينية بحيث تكسبها وظائف جديدة وشاذة. هذه الطفرات عادة تكون مرتبطة بأنماط ظاهرية سائدة. وهي غالباً تسمى طفرات جديدة الشكل أو جديدة البنية neomorphic.

- **طفرات سالبة سائدة**: تسمى أيضاً طفرات مضادة للشكل antimorphic، تؤدي لأن تعمل النواتج الجينية المعدلة بشكل مناهض للألائل برية النمط. هذه الطفرات عادة ما تنتج وظائف جزيئية معدلة (عادة تكون غير نشطة). والأنماط الظاهرية المقرونة بها تكون سائدة.
- **الطفرات المميتة**: تؤدي لموت الكائن الحي الحامل لهذه الطفرة.
- **الطفرات الرجعية**: طفرات نقطية تسترجع التسلسلات الأصلية، ومن ثم النمط الظاهري الأصلي.

ثانيا: حسب تأثيرها على الصلاحية:وتقسم الى

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

ثالثا: حسب تأثيرها على البنية التركيبية او تركيب البروتين الناتج: وتقسم الى

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

↓

5'-AAT CGT GGC CCT ACC TCC AAA-3'

Wild type

3'-TTA GCA CCG GGA TGG AGG TTT-5'

Mutant type 5'-AAT CGT GAC CCT ACC TCC AAA-3'

(Transition) 3'-TTA GCA CTG GGA TGG AGG TTT-5'

5'-AAT CGT GGC CCT ACC TCC AAA-3'

Wild type 3'-TTA GCA CCG GGA TGG AGG TTT-5'

Mutant type 5'-AAT CGT GC C CCT ACC TCC AAA-3'

(Transversion) 3'-TTA GCA C GG GGA TGG AGG TTT-5'

وكنتيجه لهذه الطفره النقطية تكون واحده من الأنواع التالية:

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

Wild type DNA 5'-ATG CGT GGC CCT ACC TCC AAA-3'

3'-TAC GCA CCG GGA TGG AGG TTT-5'

Transcription

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

Translation

Wild type Protein Met Arg Gly Pro Thr Ser Lys

Wild type DNA 5'-ATG CGT GGC CCT ACC TCC AAA-3'

3'-TAC GCA CCG GGA TGG AGG TTT-5'

Mutant type DNA 5'-ATG CGT GGC CCT ACC TCC TAA-3'

(Transversion) 3'-TAC GCA CCG GGA TGG AGG ATT-5'

Transcription

Mutant type mRNA 5'-AUG CGU GGC CCU ACC UCC UAA-3'

Translation

Mutant type Protein Met Arg Gly Pro Thr Ser STOP

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

5'-ATG CGT GGC CCT ACC TCC AAA-3'

Wild type DNA

3'-TAC GCA CCG GGA TGG AGG TTT-5'

Transcription

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

Translation

Wild type Protein Met Arg Gly Pro Thr Ser Lys

5'-ATG CGT GGC CCT ACC TCC AAA-3'

Wild type DNA

3'-TAC GCA CCG GGA TGG AGG TTT-5'

Mutant type DNA 5'-ATG CGT GGC CGT ACC TCC AAA-3'

(Transversion) 3'-TAC GCA CCG GCA TGG AGG TTT-5'

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

Mutant type mRNA

Translation

Mutant type Protein Met Arg Gly Arg Thr Ser Lys

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

5'-ATG CGT GGC CCT ACC TCC AAA-3'

Wild type DNA

3'-TAC GCA CCG GGA TGG AGG TTT-5'

Transcription

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

Wild type mRNA

Translation

Met Arg Gly Pro Thr Ser Lys

Wild type Protein

5'-ATG CGT GGC CCT ACC TCC AAA-3'

Wild type DNA

3'-TAC GCA CCG GGA TGG AGG TTT-5'

Mutant type DNA 5'-ATG CGT GGC CCC ACC TCC TAA-3'

(Transition) 3'-TAC GCA CCG GGG TGG AGG ATT-5'

Transcription

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

Mutant type mRNA

Translation

Met Arg Gly Pro Thr Ser Lys

Mutant type Protein

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

لدينا الجملة THEBIGCATATETHERAT

بعد تقسيمها لثلاثيات تصبح كالتالي THE BIG CAT ATE THE RAT

عند حذف حرف تصبح الجملة THEIGCATATETHERAT

بعد تقسيمها لثلاثيات تصبح كالتالي THE IGC ATA TET HER AT

5'-ATG CGT GGC CCT ACC TCC AAA-3'

Wild type DNA

3'-TAC GCA CCG GGA TGG AGG TTT-5'

↓ Transcription

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

Wild type mRNA

Translation ↓

Met Arg Gly Pro Thr Ser Lys

Wild type Protein

↓ **Insert A**

Wild type DNA

5'-ATG CGT GGC CCT ACC TCC AAA-3'

3'-TAC GCA CCG GGA TGG AGG TTT-5'

Mutant type DNA (Transition)

5'-ATG CG**A** TGG CCC CAC CTC CTA A-3'

3'-TAC GC**T** ACC GGG GTG GAG GAT T-5'

↓

↓

Transcription

Mutant type mRNA

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

Translation

Mutant type Protein

Met Arg Trp Pro His Leu Leu

التشوهات او الاعتلالات الكروموسومية *Chromosome Aberration*

تكمله الطفرة الوراثية *Genetic Mutation*

ثالثا: حسب تأثيرها على البنية التركيبية او تركيب البروتين الناتج: وتقسم الى

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

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

Mutant type 5'-AAT CGT GAC CCT ACC TCC AAA-3'
(Transition) 3'-TTA GCA CTG GGA TGG AGG TTT-5'

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

Mutant type 5'-AAT CGT GC C CCT ACC TCC AAA-3'
(Transversion) 3'-TTA GCA C GG GGA TGG AGG TTT-5'

وكنتيجه لهذه الطفره النقطية تكون واحده من الأنواع التالية:

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

Wild type DNA 5'-ATG CGT GGC CCT ACC TCC AAA-3'

3'-TAC GCA CCG GGA TGG AGG TTT-5'

Transcription

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

Translation

Wild type Protein Met Arg Gly Pro Thr Ser Lys

Wild type DNA 5'-ATG CGT GGC CCT ACC TCC AAA-3'

3'-TAC GCA CCG GGA TGG AGG TTT-5'

Mutant type DNA 5'-ATG CGT GGC CCT ACC TCC TAA-3'

(Transversion) 3'-TAC GCA CCG GGA TGG AGG ATT-5'

Transcription

Mutant type mRNA 5'-AUG CGU GGC CCU ACC UCC UAA-3'

Translation

Mutant type Protein Met Arg Gly Pro Thr Ser STOP

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

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

Transcription

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

Translation

Wild type Protein Met Arg Gly Pro Thr Ser Lys

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

Mutant type DNA 5'-ATG CGT GGC CGT ACC TCC AAA-3'
(Transversion) 3'-TAC GCA CCG GCA TGG AGG TTT-5'

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

Mutant type mRNA

Translation

Mutant type Protein Met Arg Gly Arg Thr Ser Lys

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

5'-ATG CGT GGC CCT ACC TCC AAA-3'

Wild type DNA

3'-TAC GCA CCG GGA TGG AGG TTT-5'

Transcription

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

Wild type mRNA

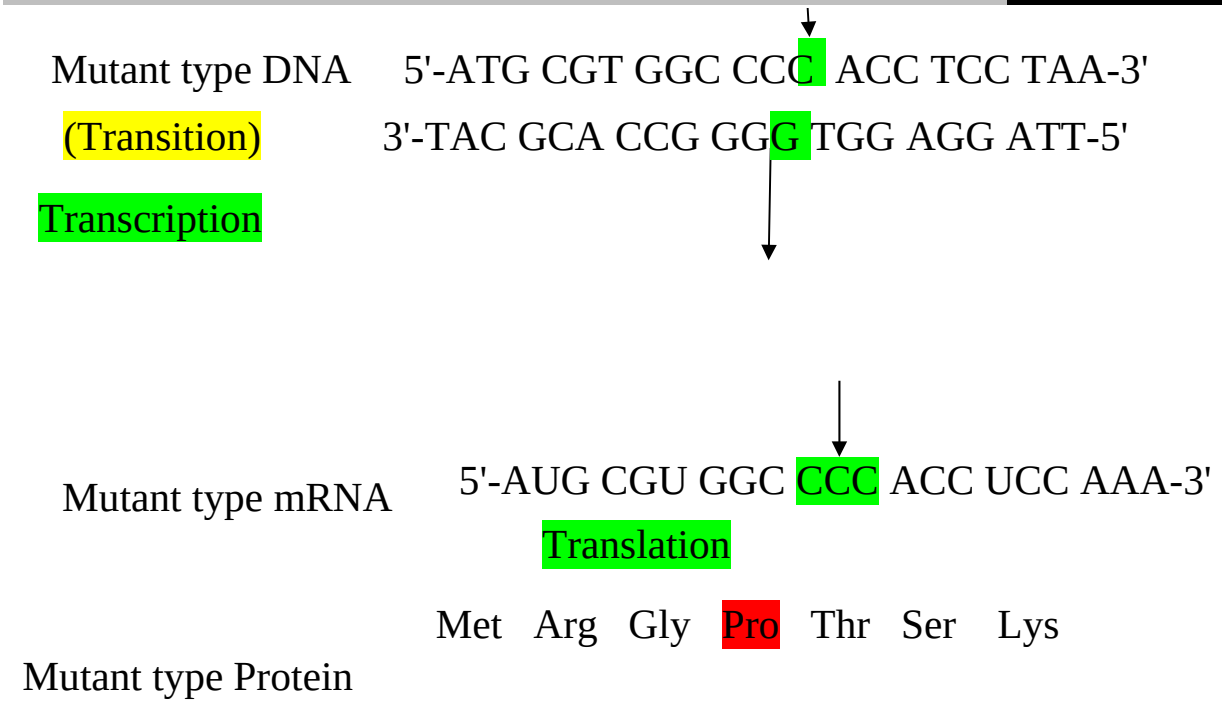
Translation

Met Arg Gly Pro Thr Ser Lys Wild type Protein

5'-ATG CGT GGC CCT ACC TCC AAA-3'

Wild type DNA

3'-TAC GCA CCG GGA TGG AGG TTT-5'



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

THEBIGCATATETHERAT لدينا الجملة

THE BIG CAT ATE THE RAT بعد تقسيمها لثلاثيات تصبح كالتالي

THEIGCATATETHERAT عند حذف حرف تصبح الجملة

THE IGC ATA TET HER AT بعد تقسيمها لثلاثيات تصبح كالتالي

Wild type DNA

5'-ATG CGT GGC CCT ACC TCC AAA-3'

3'-TAC GCA CCG GGA TGG AGG TTT-5'

↓ Transcription

Wild type mRNA

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

↓ Translation

type Protein

Met Arg Gly Pro Thr Ser Lys Wild

↓ **Insert A**

Wild type DNA

5'-ATG CGT GGC CCT ACC TCC AAA-3'

3'-TAC GCA CCG GGA TGG AGG TTT-5'

Mutant type DNA 5'-ATG CG**A** TGG CCC CAC CTC CTA A-3'

(Transition) 3'-TAC GC**T** ACC GGG GTG GAG GAT T-5'

Transcription

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

Mutant type mRNA

Translation

Met Arg Trp Pro His Leu Leu

Mutant type Protein

التشوهات او الاعتلالات الكروموسومية *Chromosome Aberration*

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

1- تشوهات او اعتلالات تركيبية Structural Abnormalities : وتعني التغيرات في تركيب الكروموسومات وهي على عدة انواع:
   - حذف قطعه من الكروموسوم Deletion:
   - إضافة قطعه من الكروموسوم Insertion:
   - استبدال قطعه من الكروموسوم Translocation:
   - عكس قطعه من الكروموسوم Inversion:
   - مضاعفة قطعه من الكروموسوم Duplication:
2- تشوهات او اعتلالات عدديه Numerical Abnormalities : وتعني التغيرات في عدد الكروموسومات ففي الحالة الطبيعية هنالك 23 زوج كروموسومي وتسمى بـ Disomy اما اذا حدث تغير في عدد الكروموسومات ضمن الزوج الواحد فمثلا إضافة كرموسومي فيصبح هنالك ثلاث كروموسومات بدلا من اثنين وتسمى هذه الحالة

Trisomy وعلى العكس لو فقد كروموسوم يبقى كروموسوم واحد وتسمى هذه الحالة Monosomy.

التشوهات او الاعتلالات الكروموسومية *Chromosome Aberration*

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

1- تشوهات او اعتلالات تركيبية Structural Abnormalities : وتعني التغيرات في تركيب الكروموسومات وهي على عدة انواع: حذف قطعه من الكروموسوم Deletion: إضافة قطعه من الكروموسوم Insertion: استبدال قطعه من الكروموسوم Translocation:

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

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

المتلازمات الوراثية *Genetic Syndrome* : ويقصد بها الظواهر او الأمراض الوراثية الناتجة عن الاعتلالات الكروموسومية التركيبية والعددية وأهمها:

1-Numerical Abnormalities:

When an individual is missing either a chromosome from a pair (monosomy) or has more than two chromosomes of a pair (trisomy). An example of a condition caused by numerical abnormalities is Down Syndrome, also known as Trisomy 21 (an individual with Down Syndrome has three copies of chromosome 21, rather than two). Turner Syndrome is an example of monosomy, where the individual - in this case a female - is born with only one sex chromosome, an X.

2-Structural Abnormalities:

When the chromosome's structure is altered. This can take several forms:

- **Deletions:** A portion of the chromosome is missing or deleted.
- **Duplications:** A portion of the chromosome is duplicated, resulting in extra genetic material.
- **Translocations:** When a portion of one chromosome is transferred to another chromosome. There are two main types of translocations. In a **reciprocal translocation**, segments from two different chromosomes have been exchanged. In a **Robertsonian translocation**, an entire chromosome has attached to another at the centromere.
- **Inversions:** A portion of the chromosome has broken off, turned upside down and reattached, therefore the genetic material is inverted.
- **Rings:** A portion of a chromosome has broken off and formed a circle or ring. This can happen with or without loss of genetic material.

Most chromosome abnormalities occur as an accident in the egg or sperm. Therefore, the abnormality is present in every cell of the body. Some abnormalities, however, can happen after conception, resulting in mosaicism, where some cells have the abnormality and some do not.

Chromosome abnormalities can be inherited from a parent (such as a translocation) or be "de novo" (new to the individual). This is why chromosome studies are often performed on parents when a child is found to have an abnormality.

How do chromosome abnormalities happen?

Chromosome abnormalities usually occur when there is an error in cell division. There are two kinds of cell division.

- Mitosis results in two cells that are duplicates of the original cell. In other words, one cell with 46 chromosomes becomes two cells with

  46 chromosomes each. This kind of cell division occurs throughout the body, except in the reproductive organs. This is how most of the cells that make up our body are made and replaced.

- Meiosis results in cells with half the number of chromosomes, 23 instead of the normal 46. These are the eggs and sperm.

In both processes, the correct number of chromosomes is supposed to end up in the resulting cells. However, errors in cell division can result in cells with too few or too many copies of a chromosome. Errors can also occur when the chromosomes are being duplicated.

Glossary of Terms

Acrocentric chromosomes - those chromosomes, specifically numbers 13, 14, 15, 21 and 22, that are able to take part in Robertsonian translocations.

de novo - a chromosome abnormality that occurred in the individual and was not inherited from the parents.

Mosaicism - abnormal chromosome division resulting in two or more kinds of cells, each containing different numbers of chromosomes (chromosome mosaicism).

Reciprocal translocation - when segments from two different chromosomes have been exchanged.

Ring chromosome - a portion of a chromosome has broken off and formed a circle or ring. This can happen with or without loss of genetic material.

Robertsonian translocation - when two chromosomes fuse, usually at the centromere, creating a translocation. Only certain chromosomes,

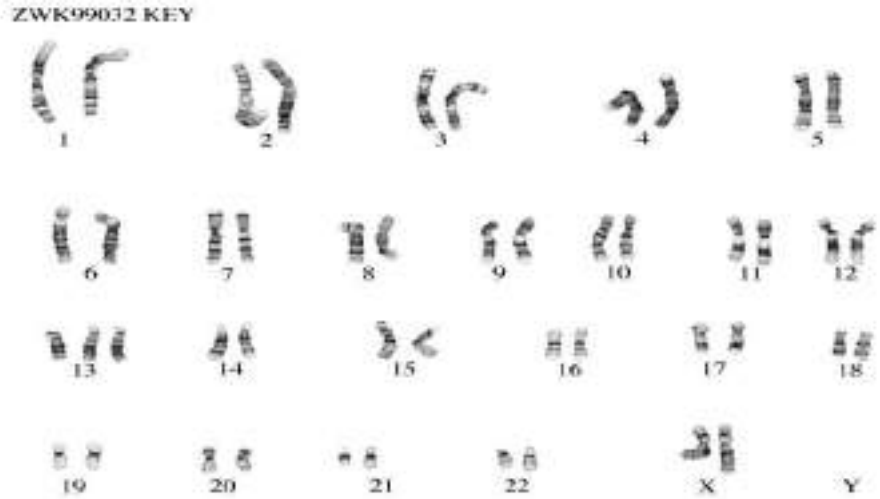
called acrocentric chromosomes, are capable of participating in this kind of translocation.

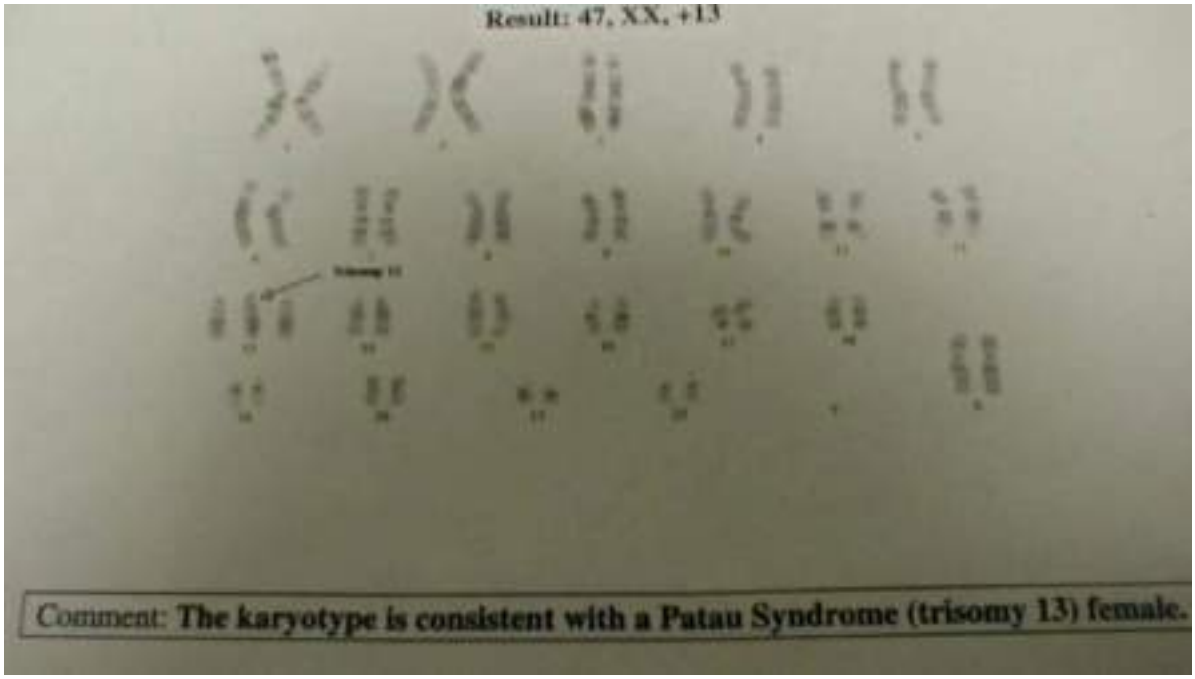
Examples of Genetic Disorders Resulted From Chromosomal Abnormalities:

1-Numerical Chromosomal Abnormalities: (Change in the No. of Chromosomes set not in structure) includes:

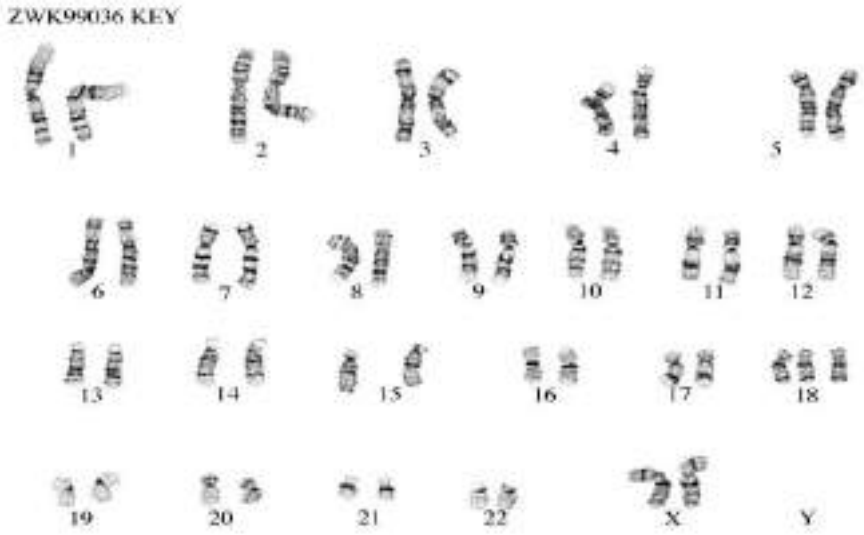
A. Autosomal Chromosome abnormalities:

- **Patau Syndrome**: also called D-Syndrome or trisomy13

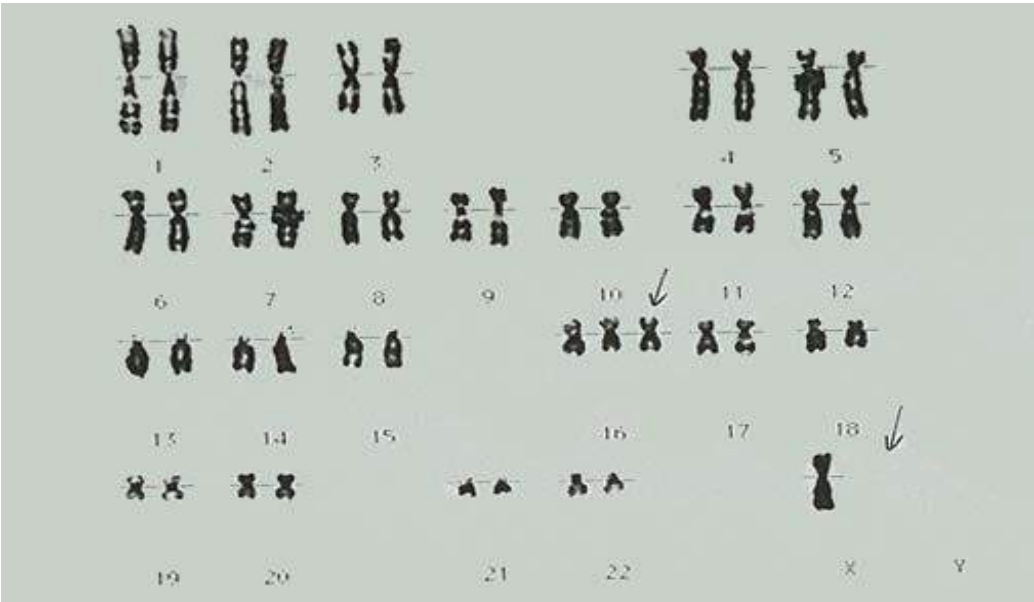

ZWK99032 KEY
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
X
Y


Result: 47, XX, +13
Comment: The karyotype is consistent with a Patau Syndrome (trisomy 13) female.

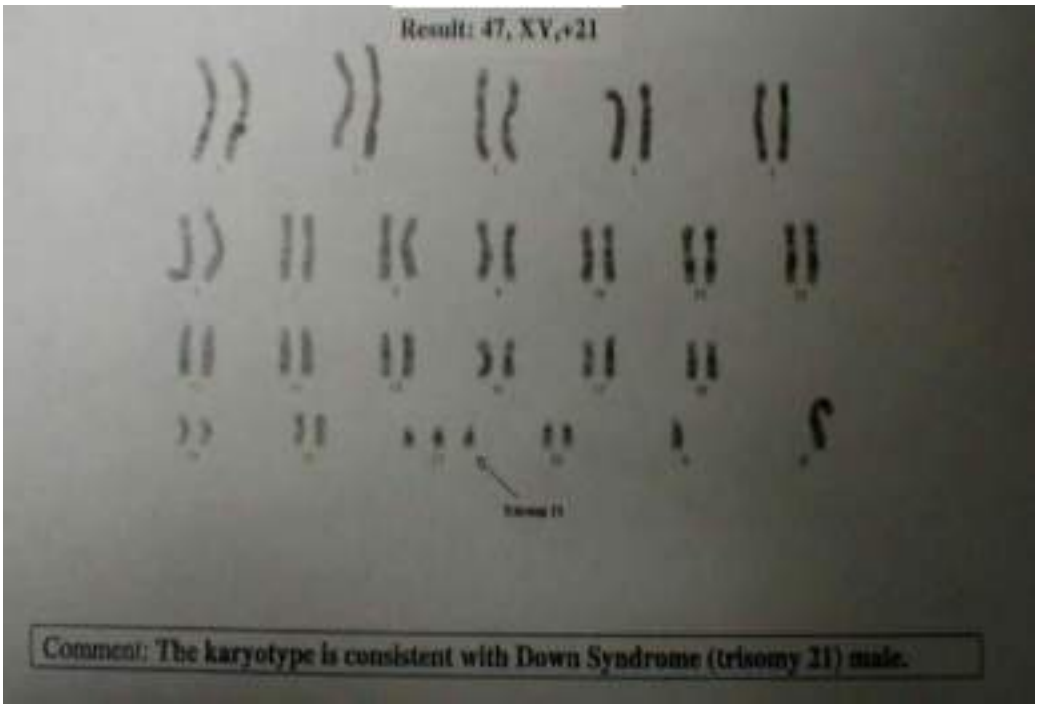
Edwards syndrome, or trisomy18



- **Trisomy 16** is a chromosomal abnormality in which there are 3 copies of chromosome 16 rather than two.[1] It is the most common trisomy leading to miscarriage and the second most common chromosomal cause of it, closely following X-chromosome monosomy. Like most chromosomal abnormalities, trisomy 16 usually causes miscarriage in the first trimester of pregnancy.

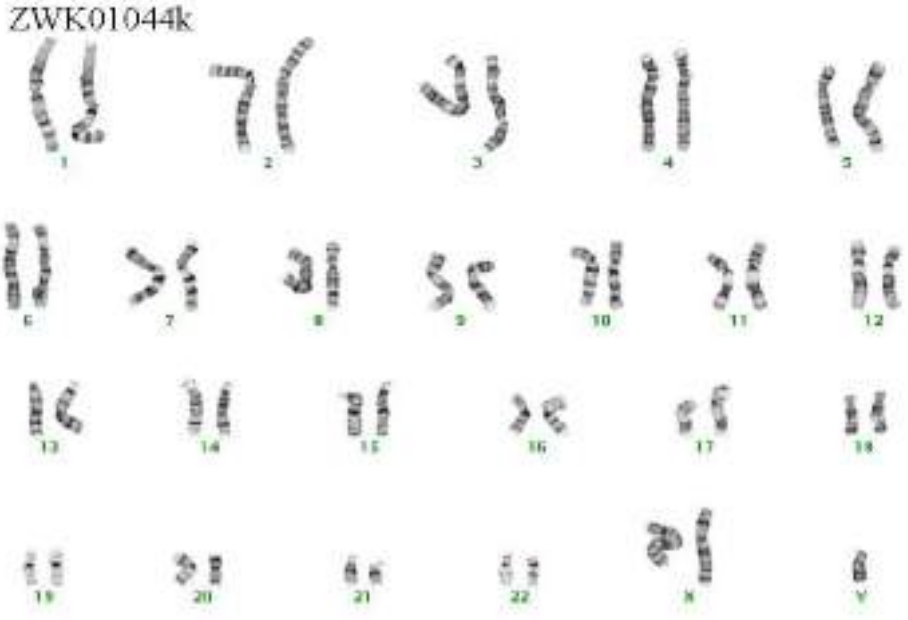


Down syndrome: or trisomy 21

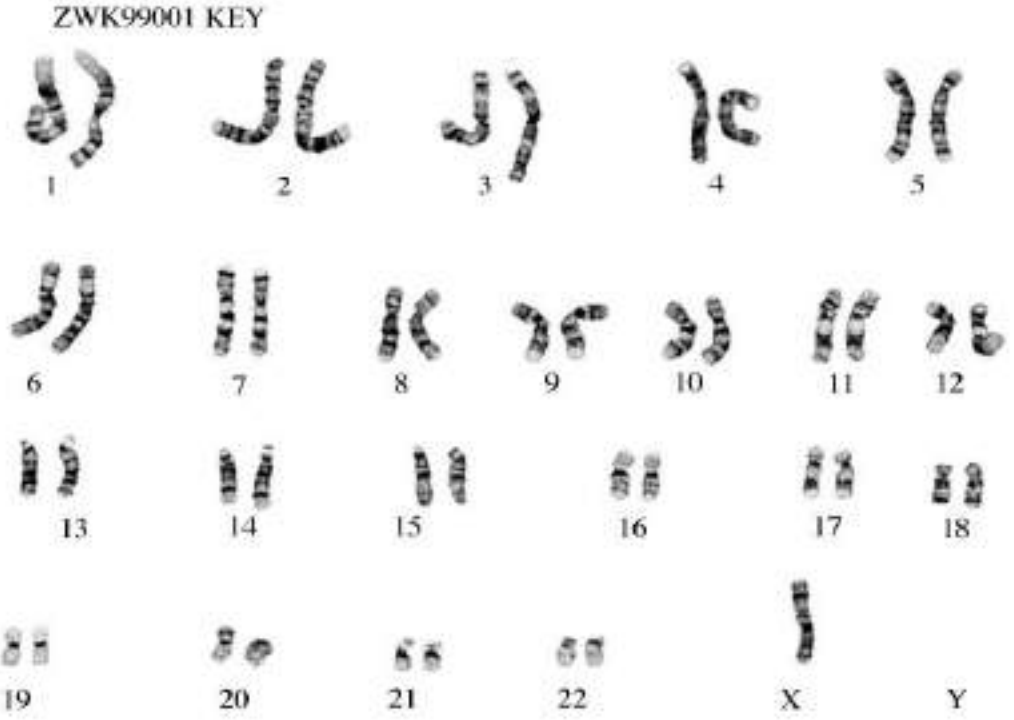


B. Sex Chromosome abnormalities:incudes

➲ **Klinefelter's syndrome**: trisomy XXY (supermale)



➲ **Turner's syndrome:** monosomy absence of Y chromosome (Female).

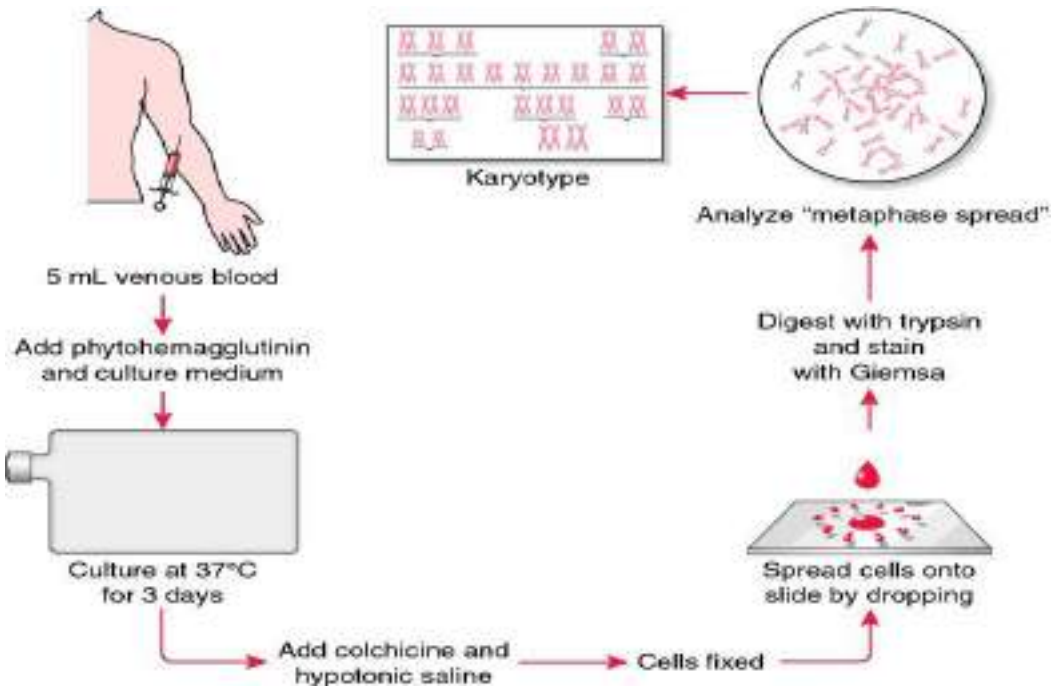


-2

Sructural Chromosomal Abnormalities: (Change in the structure of Chromosomes not in the No. of Chromosome) includes:

➲ **Cri-du-chat**: result from deletion of about half of the short arm of chromosome 5.

Karyotyping:



آليات إصلاح الدنا *DNA Repair*

مثلما هنالك آليات لحصول الطفره او العطب في الدنا فهنالك آليات مضادة لإصلاح هذه الأعطاب. يجدر الاشاره الى نظام الاستجابة الذاتي SOS حيث يعمل هذا النظام على تحفيز إي نوع من آليات الإصلاح وأهمها آلية إصلاح قص النيوكليوتيده Nucleotide Excision Repair . يحصل تحفيز لإنتاج بروتينات نظام الاستجابة الذاتي SOS من خلال تجمع

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

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

1- آلية إصلاح الارتباط الخاطئ Mismatch Repair 2- آلية إصلاح قص النيوكليوتيده Nucleotide Excision Repair

3- آلية إصلاح قص القاعدة Base Excision Repair

4- آلية الإصلاح بالتنشيط الضوئي المباشر Direct Photoreactivation Repair

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

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

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

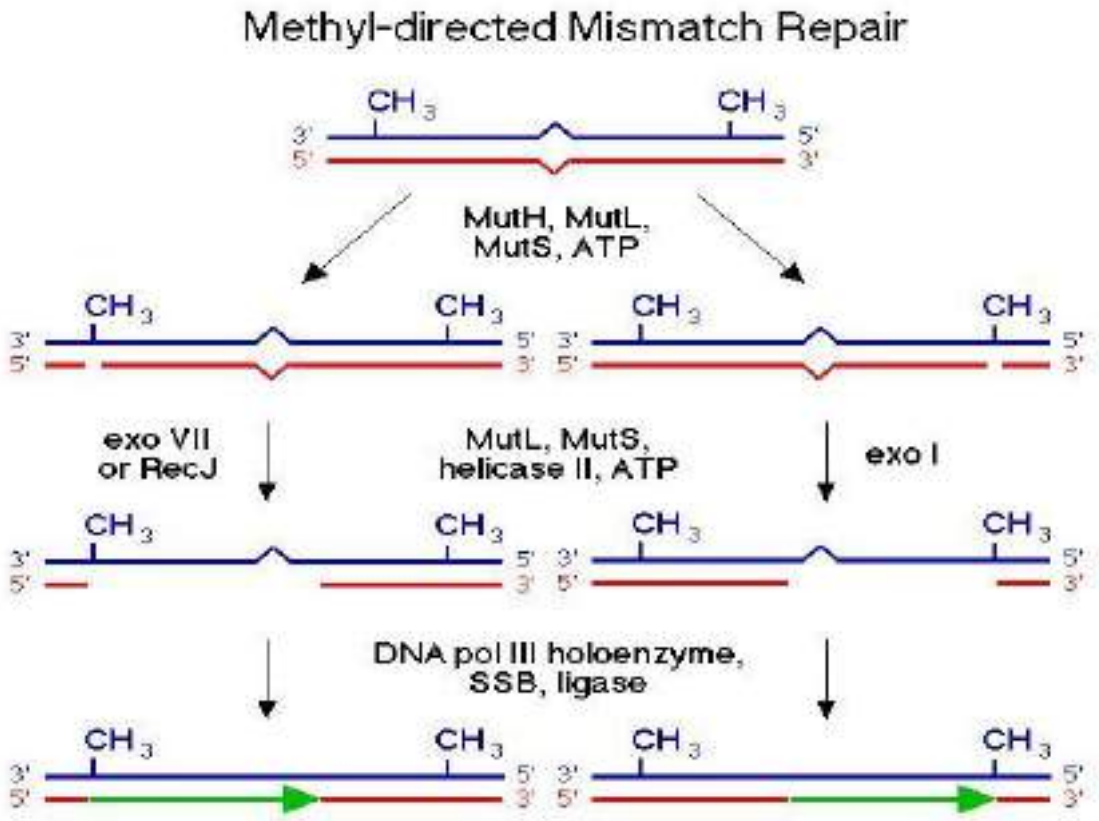
يمكن توضيح ميكانيكية عمل هذه الآلية في بدائية النواة Prokaryote كما يلي:

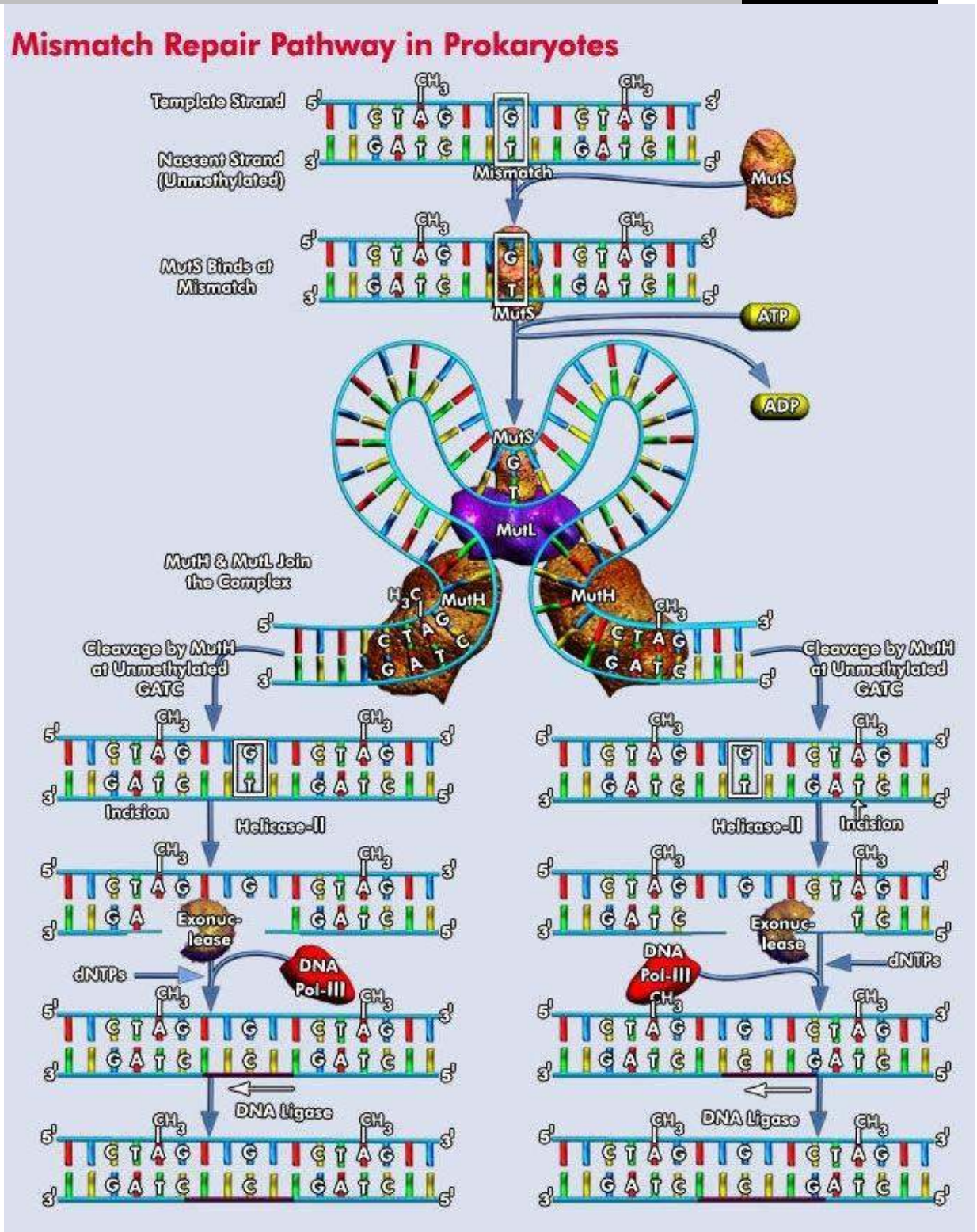
1- تميز الارتباط الخاطئ Mismatch Recognition وتتم من خلال انزيم MutS حيث يعمل هذا الأنزيم على تميز موقع الارتباط الخاطئ.

2- إزالة الارتباط الخاطئ Removing of Mismatch ويتم من خلال ارتباط MutLالذي يحفز ارتباط MutH وهذا الأخير بدوره يعمل قطع Nick من جهة '5 تقع على بعد عدة قواعد من منطقة Mismatch بعد ذلك يعمل انزيم الـ exonuclease بعمل قطع عند الجهة الأخرى من الارتباط الخاطئ '3 بعد ذلك

يعمل انزيم UvrD (an Helicase enzyme) على فك الارتباط بين الجزء المعطوب المقصوص والشريط الأم الصحيح

3- اعادة تصنيع الجزء المقصوص Resynthesis بواسطة انزيم DNA polymerase III واعاد الغلق بواسطة DNA ligase . ويوضح الشكل التلي مجمل العملية:




Mismatch Repair Pathway in Prokaryotes
Template Strand
Nascent Strand (Unmethylated)
Mismatch
MutS
MutS Binds at Mismatch
ATP
ADP
MutL
MutH & MutL Join the Complex
MutH
Cleavage by MutH at Unmethylated GATC
Incision
Helicase-II
Exonuc-lease
dNTPs
DNA Pol-III
DNA Ligase

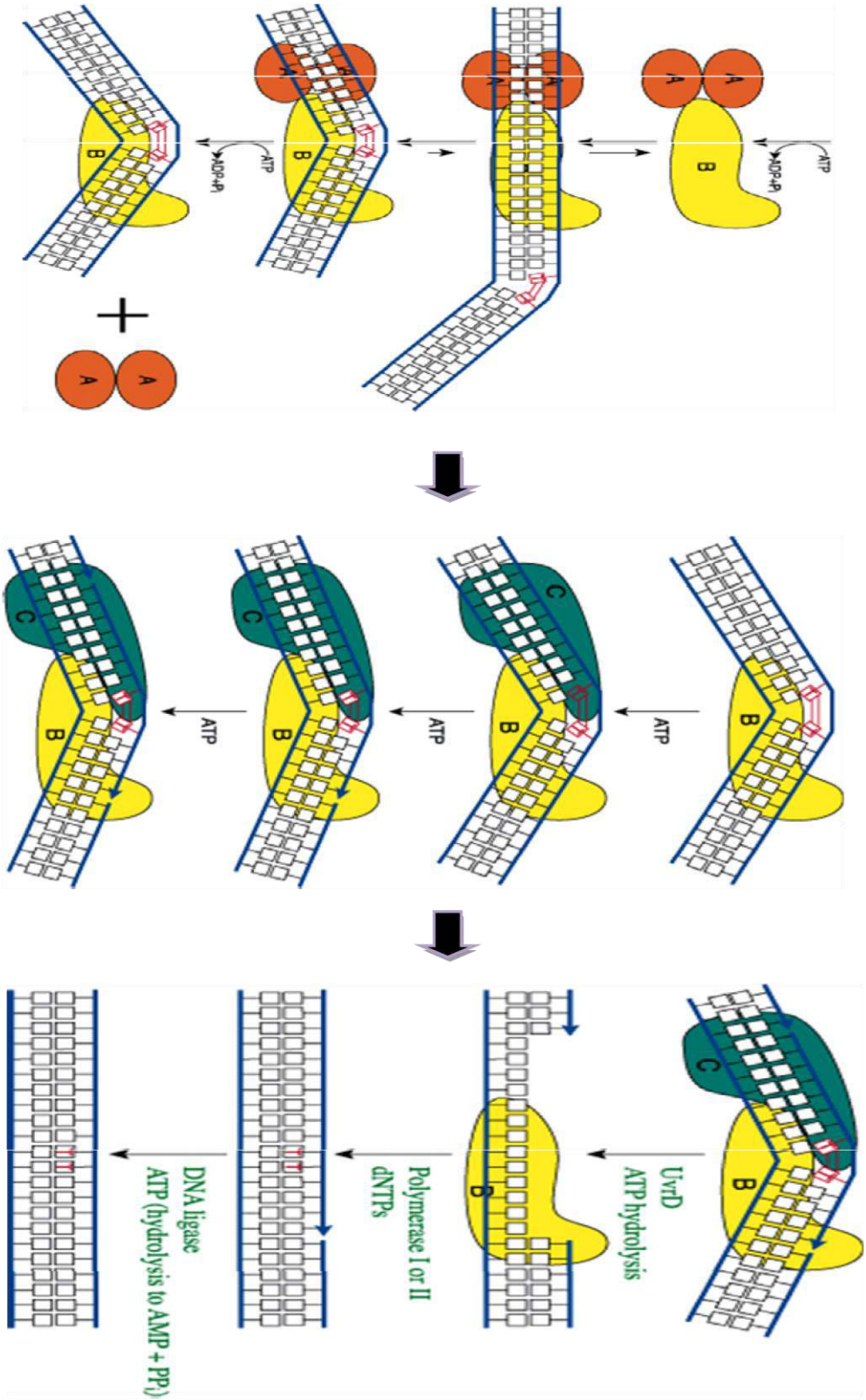
2 -<u>آلية إصلاح قص النيوكليوتيده(*Nucleotide Excision Repair (NER*):</u>

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

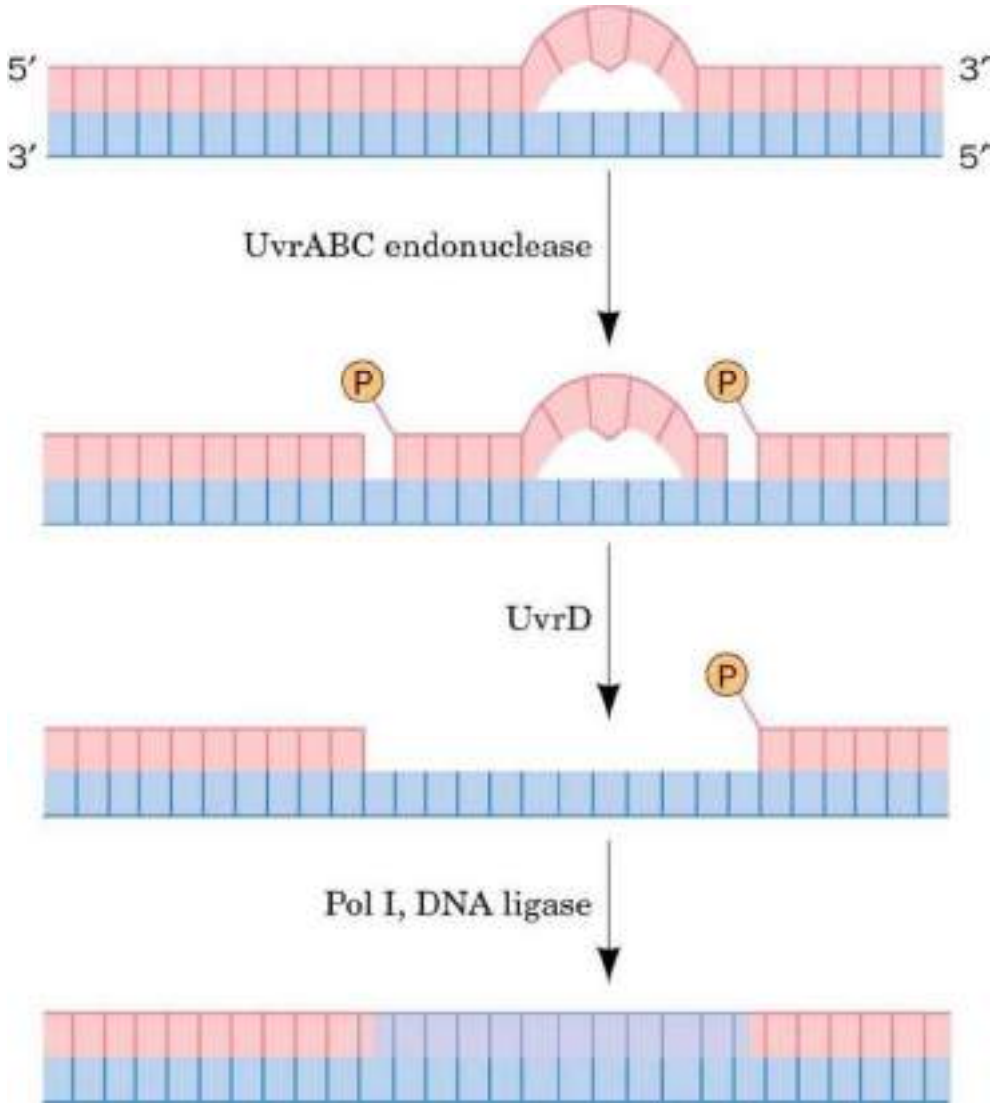
1-تميز ثنائي الثايمين Thymine Dimer Recognition ويتم ذلك من خلال ارتباط انزيم UvrA و Uvrb حيث يعمل معقد UvrAB على مسح مزدوج الدنا ويقف عند موقع Thymine dimer بعد ذلك ينفصل الـ UvrA.

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

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



ATP
ADP+Pi
ATP
ATP
ATP
UvrD
ATP hydrolysis
Polymerase I or II
dNTPs
DNA ligase
ATP (hydrolysis to AMP + PPi)



Xenoderma pigmentosum

- **skin cells cannot repair UV damage**
- **Individuals extremely sensitive to sun light**
- **skin tumors risk 2000-fold elevated**
- **cultured skin cells are defective in repairing tymidine dimers**

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

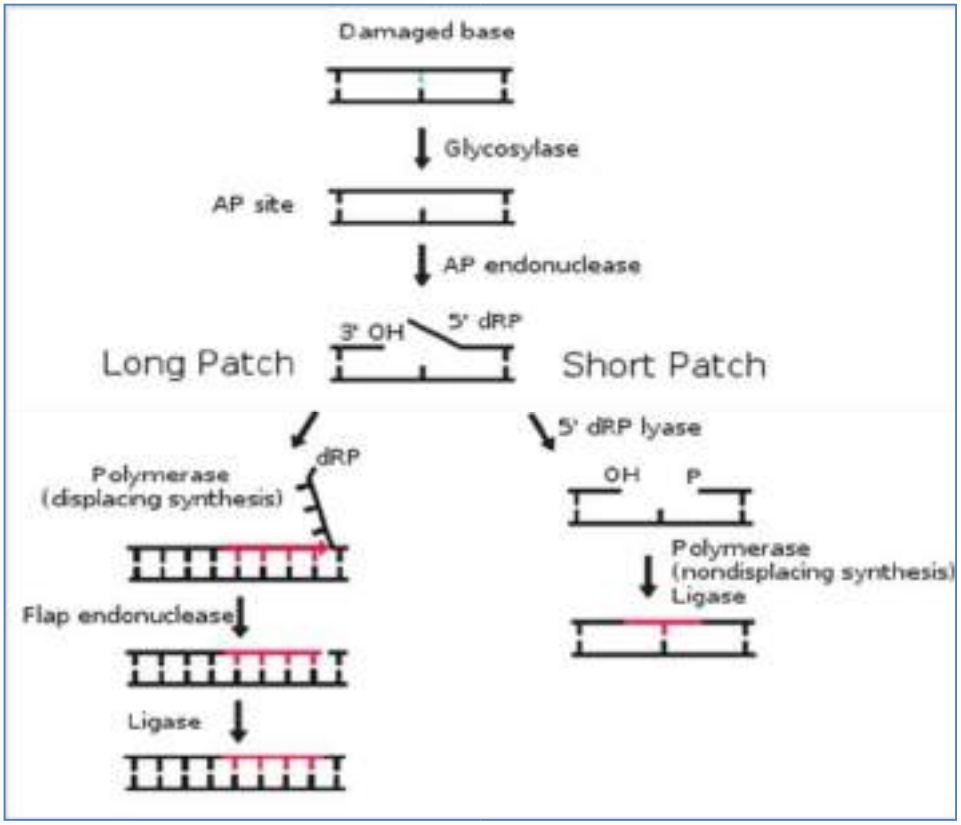
تستخدم هذه الآلية لإصلاح العطب البسيط Non bulky lesion الذي يحصل في قاعدة واحده فقط **ولا يؤدي الى خلل في الحلزون المزدوج** ومثالها الإعطاب التي تحصل في الدنا نتيجة لعمليات deamination, oxidation, and alkylation :

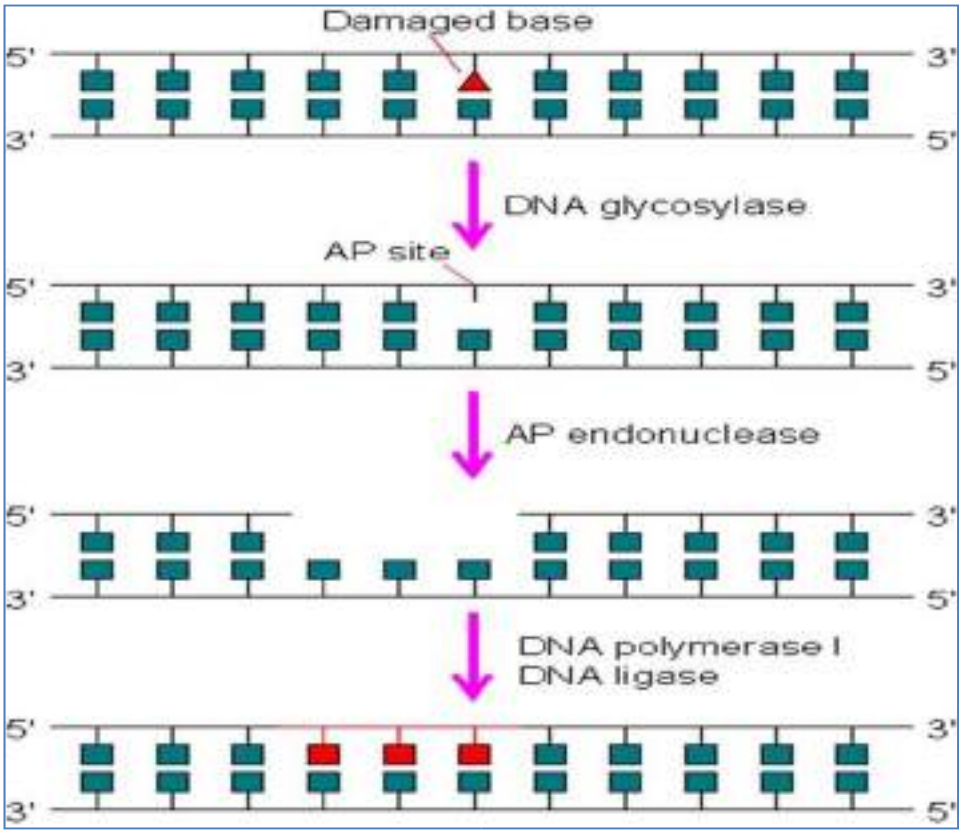
- Oxidized bases: 8-oxoguanine, 2,6-diamino-4-hydroxy-5formamidopyrimidine (FapyG, FapyA)
- Alkylated bases: 3-methyladenine, 7-methylguanine
- Deaminated bases: hypoxanthine formed from deamination of adenine. Xanthine formed from deamination of guanine. (Thymidine products following deamination of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

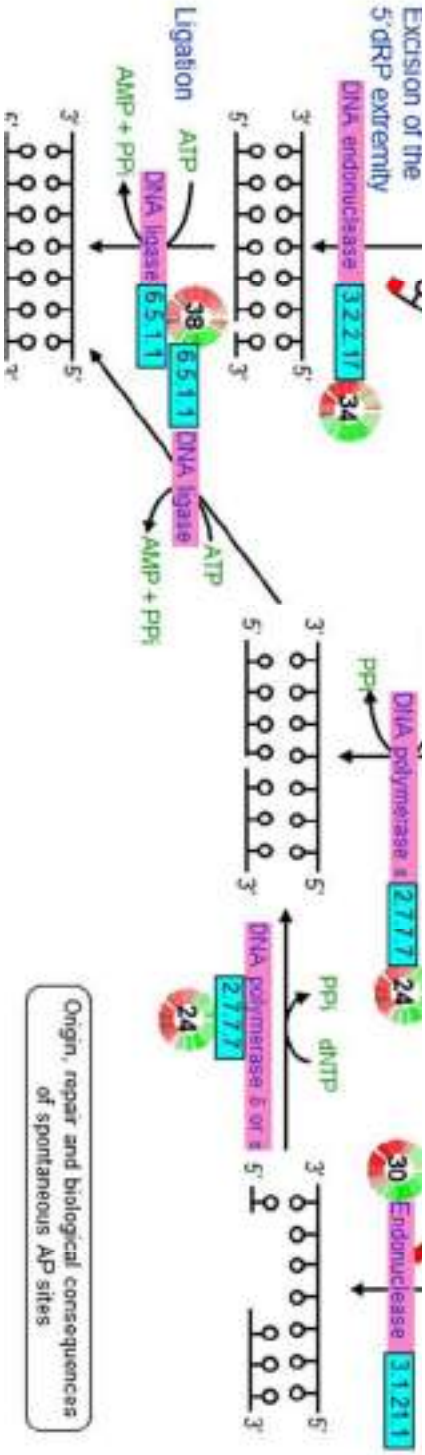
يسمى الأنزيم الأساسي الذي يقوم بإزالة القاعدة النتروجينيه الخطأ DNA glycosylase حيث يعمل على كسر الاصره الكلايكوسيديه بين القاعدة النتروجينيه وسكر الرايبوز منقوص الاوكسجين ليولد Apurinic or Apyrimidinic site (AP site) وهنالك آليتين لإصلاح هكذا إعطاب وهي:

1- **إصلاح الوجبة القصيرة Short-Patch Repair** وتحدث في الإعطاب التي تستجيب وتتحس لأنزيم pol β lyase كما في الإعطاب الناتجة عن عمليات أكسدة واختزال القواعد النتروجينيه وفي هذه الاليه يحدث استبدال للقاعدة في عدد من الخطوات اقل ممافي Long -Patch Repair

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


Damaged base
Glycosylase
AP site
AP endonuclease
3' OH
5' dRP
Long Patch
Short Patch
5' dRP lyase
dRP
Polymerase
(displacing synthesis)
OH
P
Polymerase
(nondisplacing synthesis)
Ligase
Flap endonuclease
Ligase


Damaged base
5'
3'
3'
5'
DNA glycosylase
AP site
AP endonuclease
DNA polymerase I
DNA ligase

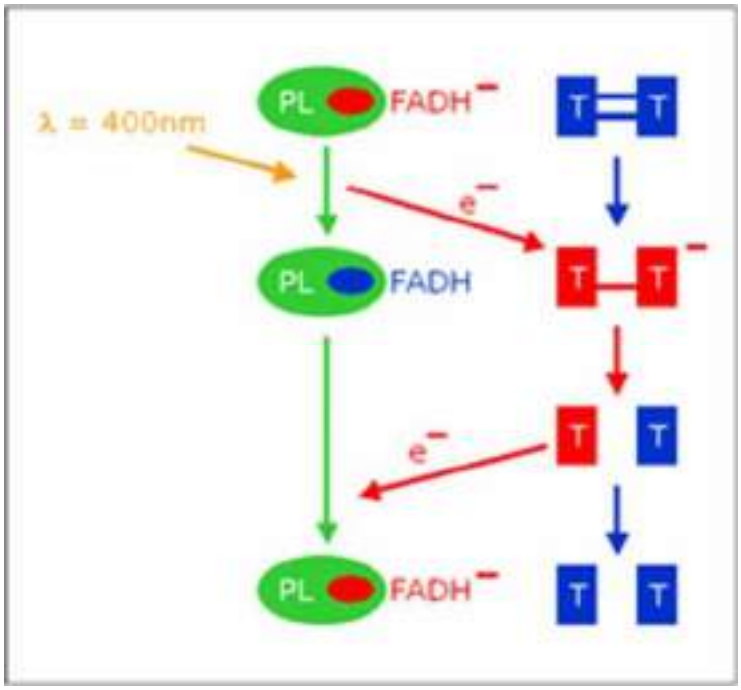


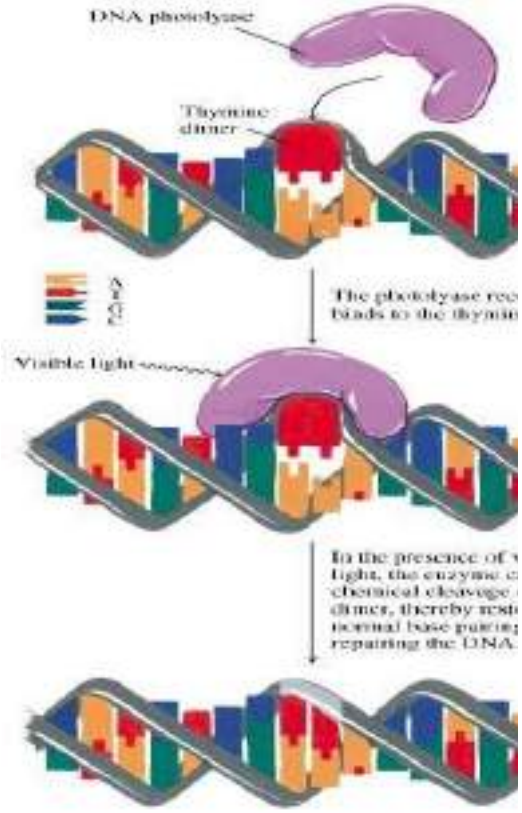
Excision of the 5'dRP extremity
DNA endonuclease
Ligation
ATP
AMP + PPi
DNA ligase
6.5.1.1
DNA ligase
ATP
AMP + PPi
DNA polymerase
2.7.7.7
PPi
dNTP
DNA polymerase
2.7.7.7
Endonuclease
Origin, repair and biological consequences of spontaneous AP sites

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

4 -آلية الإصلاح بالتنشيط الضوئي المباشر *Direct Photoreactivation Repair* :

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




DNA photolyase
Thymine
dimer
Visible light

آليات انتقال الجينات أفقيا ***Horizontal Gene Transfer (HGT)***

تتم عملية انتقال المعلومات الوراثية في الأحياء المجهرية (خصوصا البكتريا) بين أفراد السلالة نفسها ضمن نفس النوع او بين أفراد الأنواع والأجناس المختلفة. تسمى عملية انتقال الجينات من الآباء (Parent) الى الأبناء (Offspring) عن طريق الانتقال العمودي Vertical Gene Transfer اما اذا انتقلت الجينات بين الأنواع والأجناس المختلفة فتسمى بالانتقال الأفقي للجينات Horizontal Gene transfer ولهذه العملية أهمية كبيره في تطور الكثير من الأحياء.

تعد عملية الانتقال الأفقي للجينات Horizontal Gene transfer السبب الرئيسي وراء ظهور المقاومة لكثير من المضادات الحياتية وكذلك كان لها الفضل في تطور بعض البكتريا الى لها القابلية على تحطيم وتحليل المبيدات الحشرية وكذلك تطور وانتقال الكثير من عوامل الضراوة. تحدث عملية الانتقال العمودي للجينات Vertical Gene transfer بصوره طبيعية بواسطة الانشطار الثنائي للبكتريا Binary fission في حين تحتاج الانتقال الأفقي للجينات Horizontal Gene transfer الى مقومات خاصه سنخوض في تفاصيلها فيما بعد وتحدث عن بواسطة واحده من العمليات التالية:

1- Conjugation الاقتران
2- Transformation التحول
3- Transduction وسنتحدث في هذه المحاضرة عن الاقتران البكتيري Bacterial Conjugation .

الاقتران البكتيري ***Bacterial Conjugation*** :

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

اكتشف هذه العملية في عام 1946 من قبل Joshua Lederberg و Edward Tatum حيث أوضحوا ان عملية الاقتران تتضمن انتقال بلازميد او ترانسبوزون وتعود بالنفع على الخلية

المستلمة بالنفع مثل مقاومة المضادات الحياتية او العناصر الثقيلة وكذلك تمكينها من استهلاك بعض المغذيات .

تتلخص متطلبات الاقتران البكتيري بمايلي:

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

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

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

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

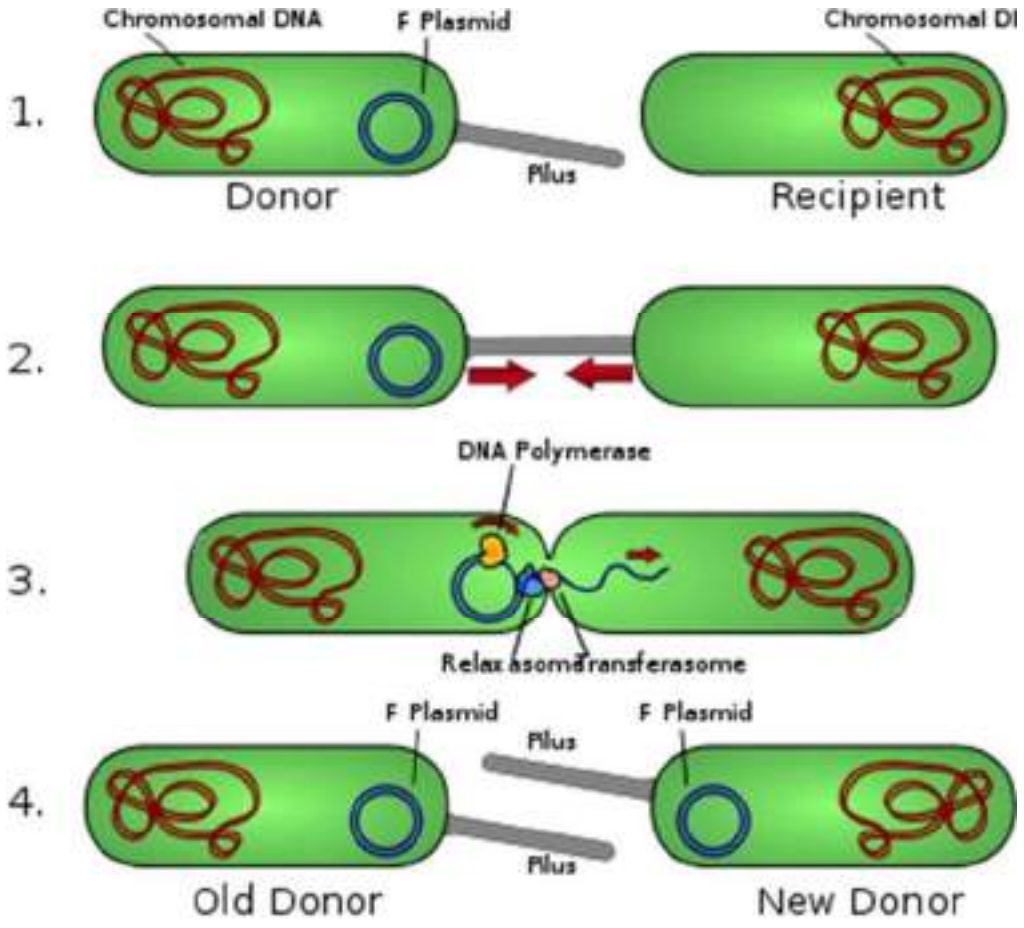
ومن الجدير بالذكر ان الوظيفة الأساسية للأهداب هو ضمان بدء الاقتران فقط.

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

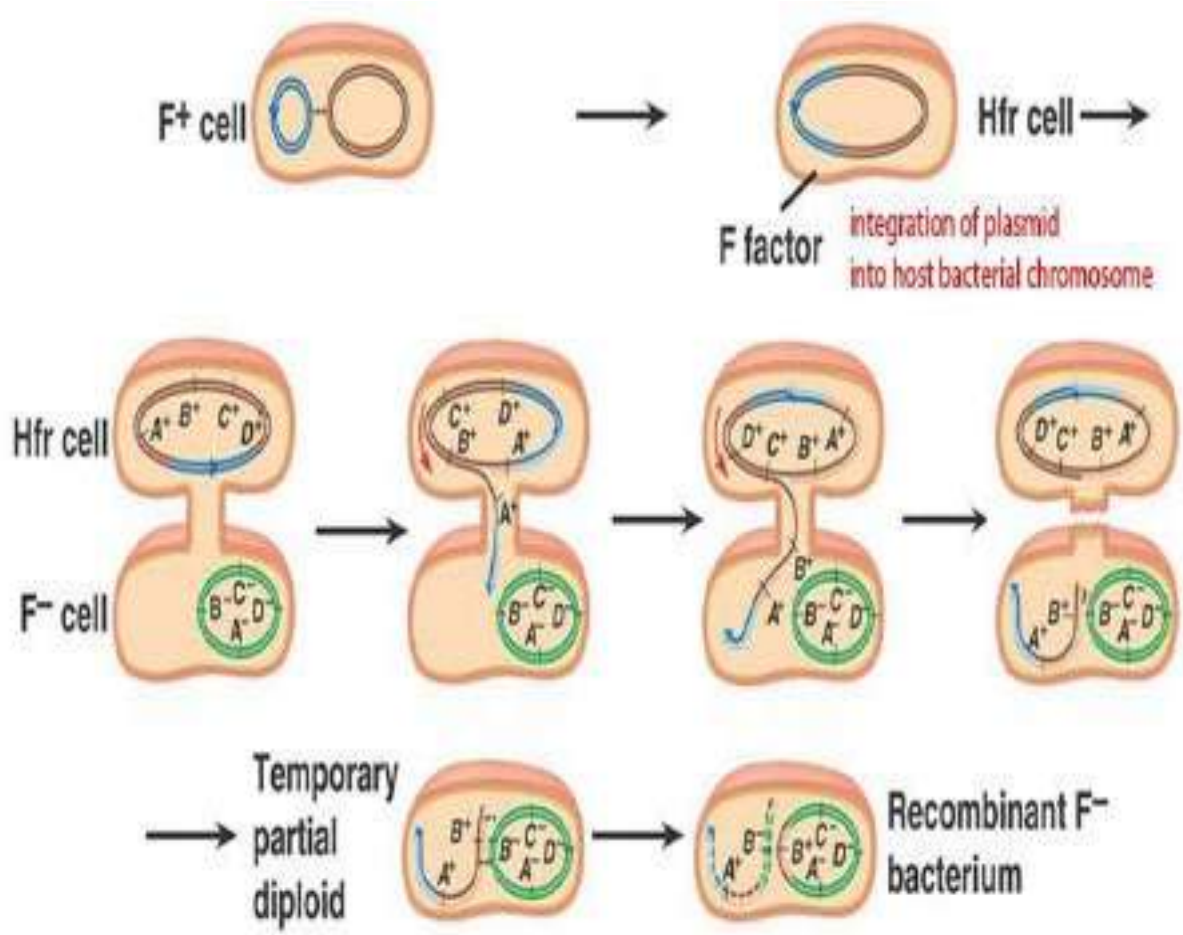
.the integrated host factor IHF

ويمكن تلخيص عملية الاقتران بمايلي:

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



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



(b) Conjugation and transfer of part of the bacterial chromosome from an Hfr donor to an F⁻ recipient, resulting in recombination

هل من الممكن ان يحدث الاقتران بين بدائية وحقيقية النواة؟

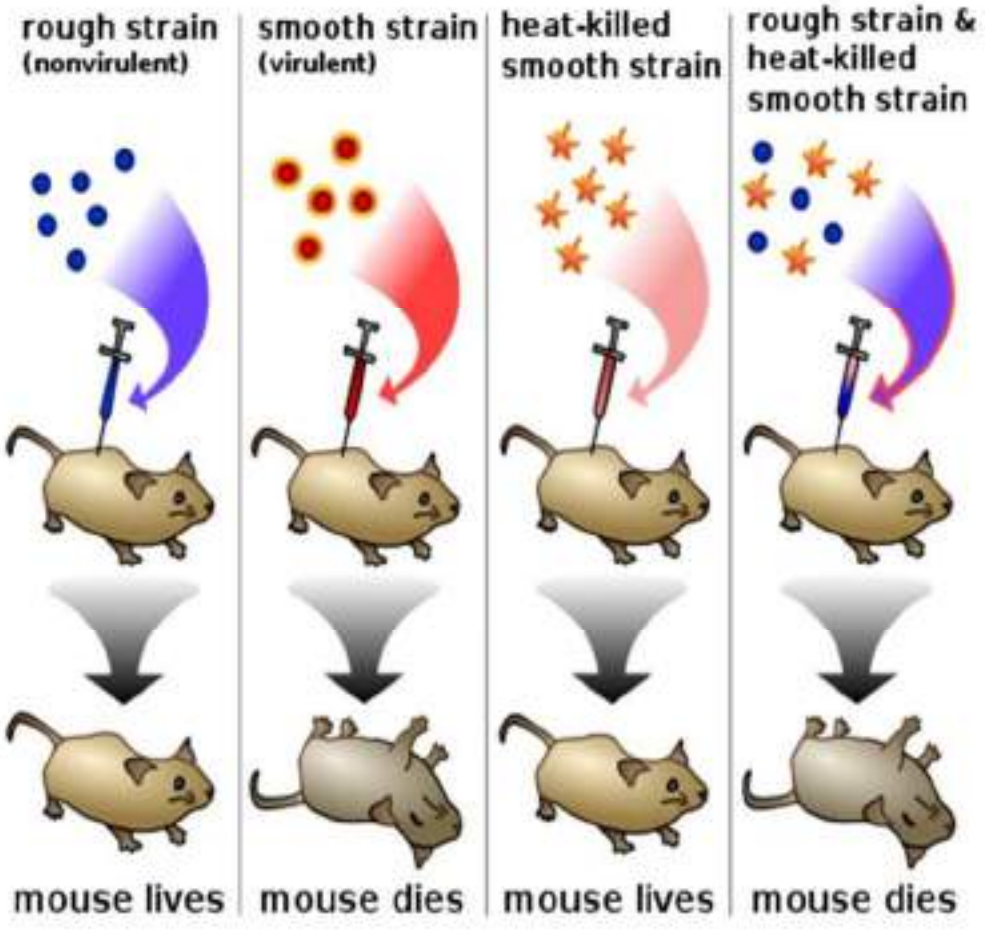
التحول البكتيري والتنبيغ بالعاثي ***Bacterial Transformation and Transduction***

تكلمنا في المحاضرة السابقة عن الاقتران البكتيري كآلية لانتقال الجينات أفقيا بين الأنواع او الأجناس المختلفة وفي هذه المحاضرة سنكمل حديثنا عن الآليات الأخرى .

التحول البكتيري ***Bacterial Transformation*** :

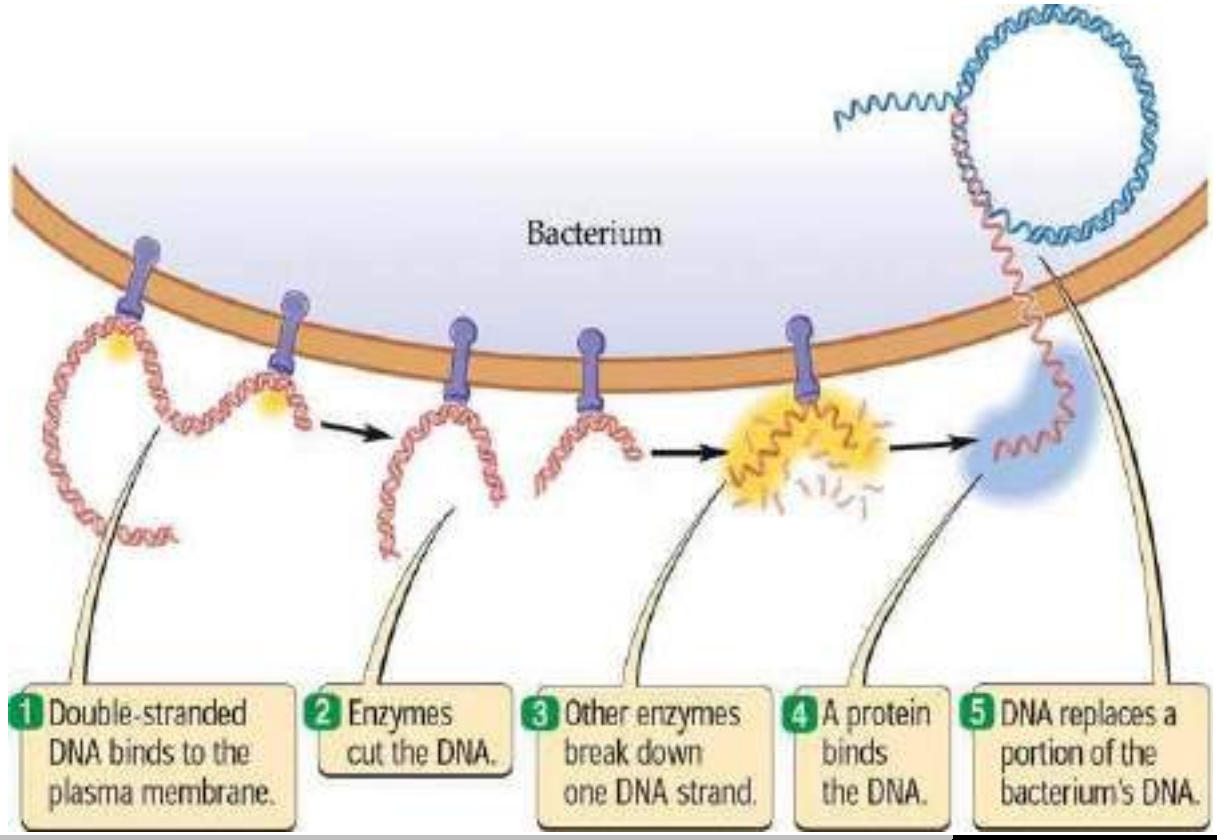
يعرف على انه التحول الوراثي الذي يحصل نتيجة لأخذ وتموضع مادة وراثية غريبه (من الوسط المحيط) ضمن كروموسوم الخلية المستقبلة منتجة بذلك نمط مظهري جديد . وتحدث هذه العملية اما بصوره طبيعية او في المختبر ممكن ان تحصل هذه العملية في الخلية حقيقية النواة لكن تسمى باسم مغاير هو Transfection .

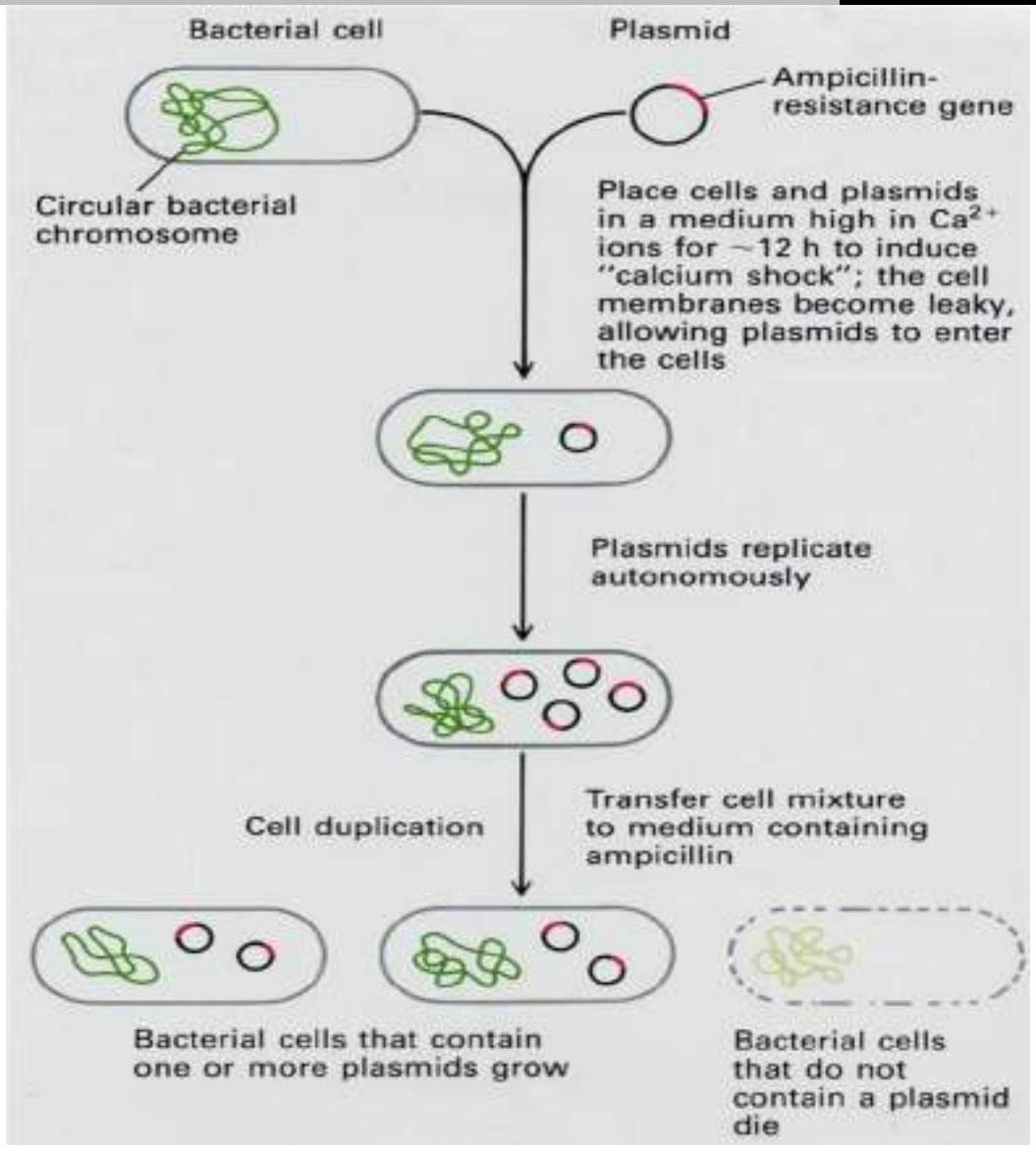
اكتشفت هذه العملية في عام 1928 بواسطة عالم البكتريا البريطاني Frederick Griffith من خلال تجاربه التي أجراها على مسبحيات ذات الرئة *Streptococcus pneumoniae* وكما موضح بالشكل ادناه:

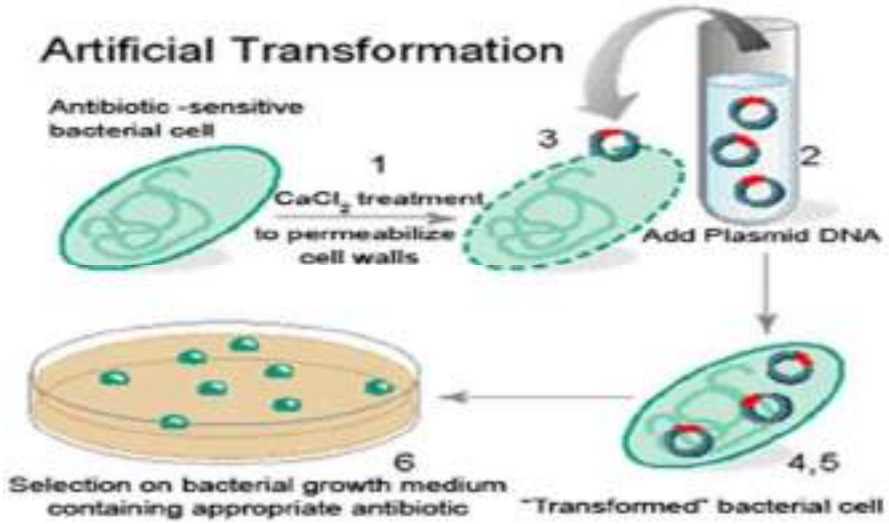


تتم هذه العملية بين الخلية البكتيرية المستقبلة والمهيأة لاستلام الدنا العاري وتسمى هذه الخلية ب competent cell . ويمكن تلخيص خطوات عملية التحول بمايلي:

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




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


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

Bacterial transformation

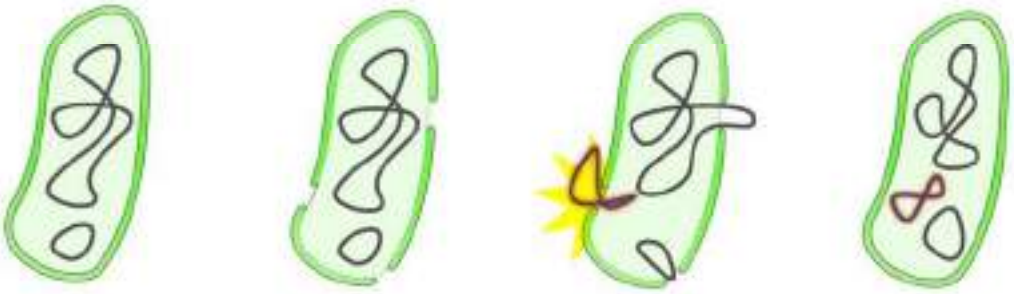
Getting a plasmid into a bacterium

Here is an *E. coli* bacterium in natural state. (Notice how bacterial DNA is circular!)

Extreme cold causes pores (small holes) to appear in the bacterial membrane.

Small DNA molecules like our plasmid can move through these holes!

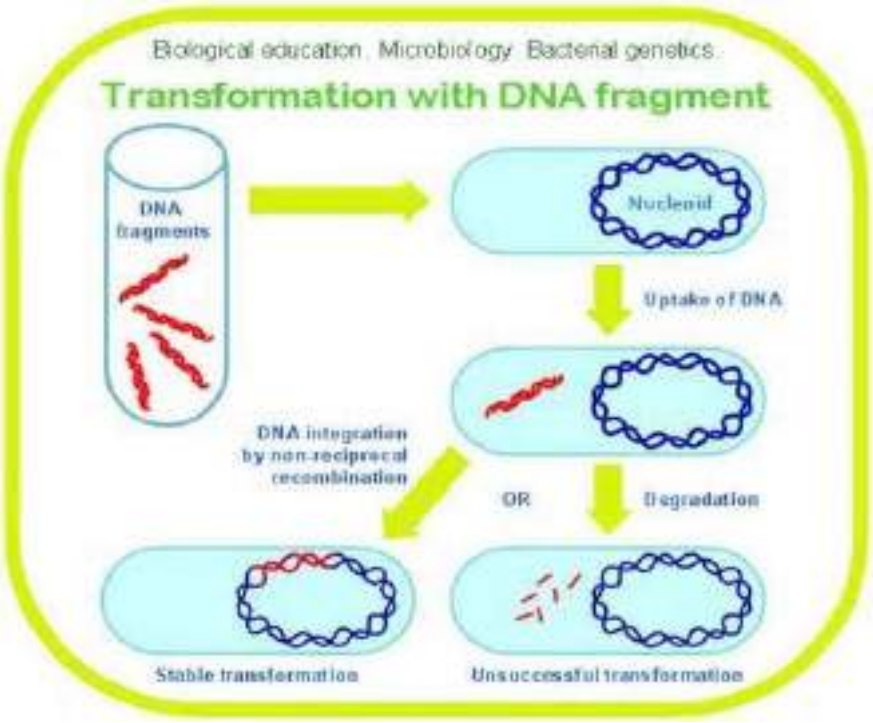
When the bacteria are heated again, some of them end up with our plasmid inside them! These are the *transformed* bacteria.



We can filter out the untransformed bacteria (the ones that got *no plasmid*) by growing all of the bacteria in an antibiotic-containing medium.

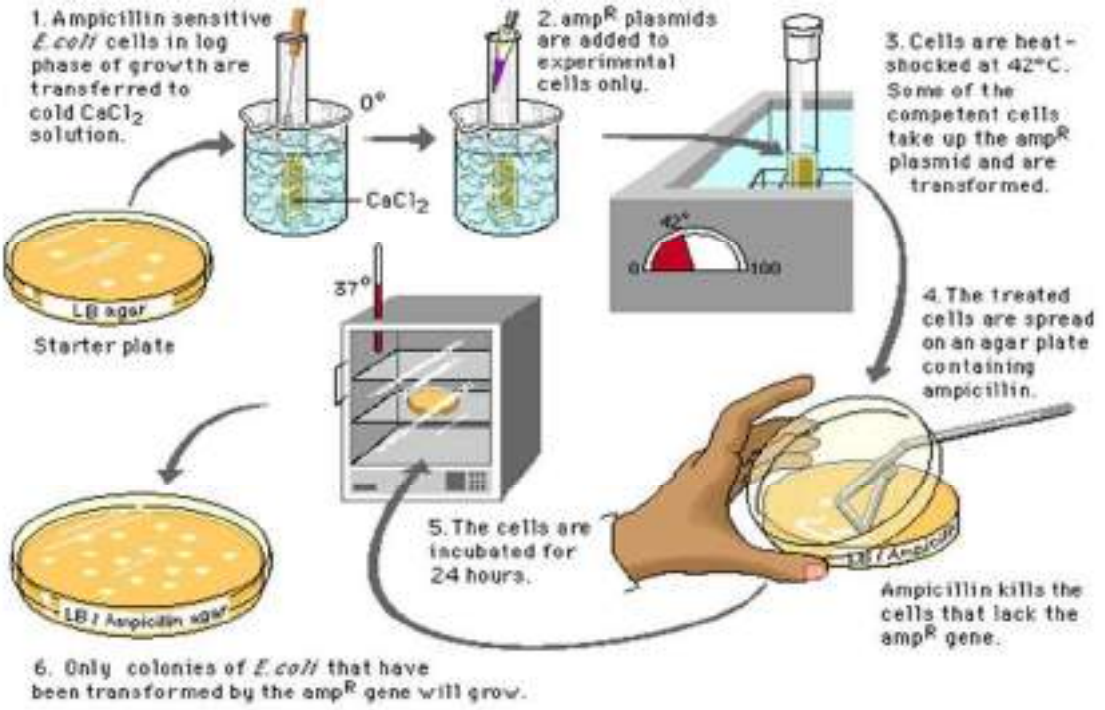
Untransformed bacteria are killed by the antibiotic in the medium. (They don't have the plasmid with the antibiotic resistance gene!)

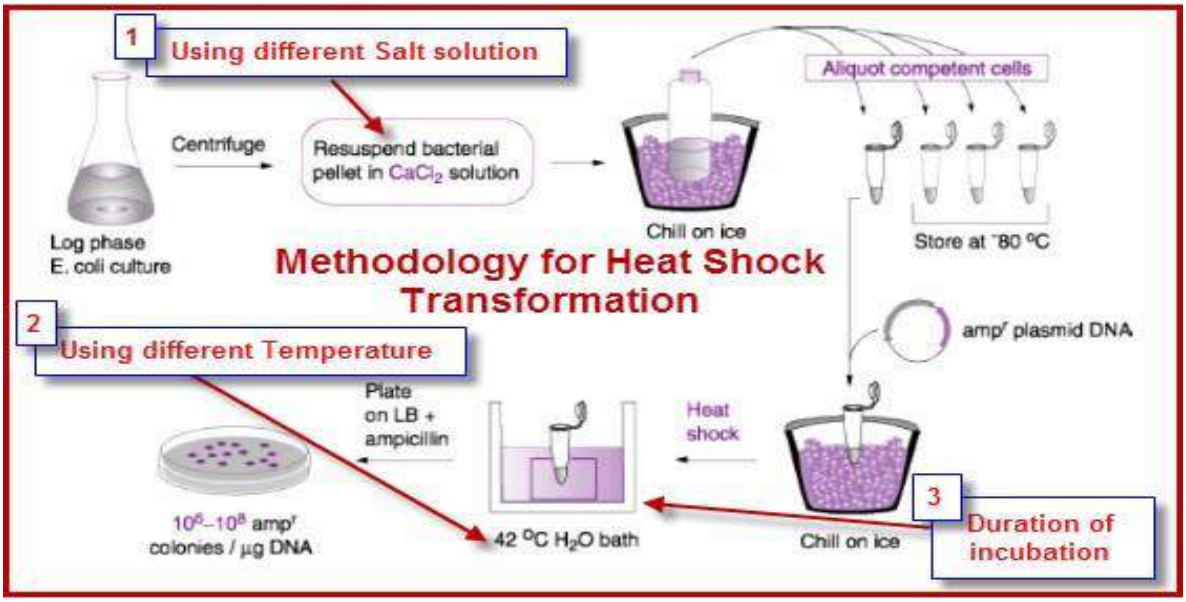
The transformed bacteria grow though! Now we can pick them off the plate and grow more if we want.



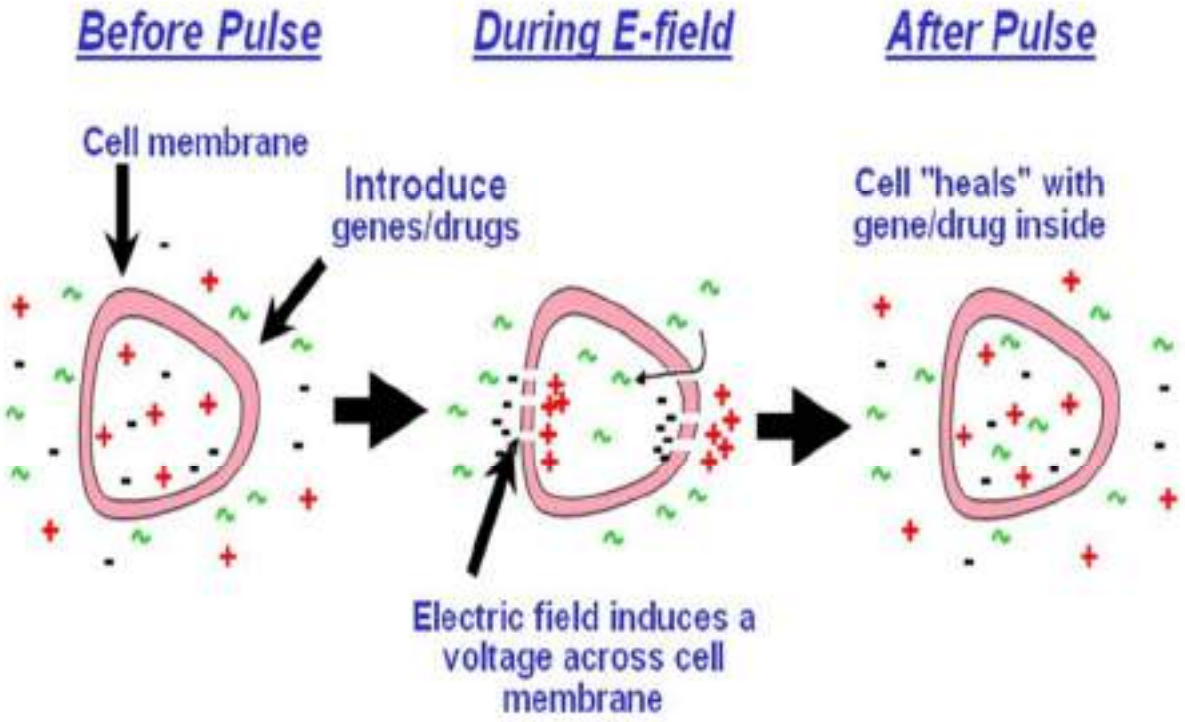
ممكن ان تحدث عملية التحول الوراثي طبيعيا او في المختبر. هنالك طريقتين لإحداث عملية التحول الوراثي بالمختبر:

1- التحول بواسطة التهيئة الكيمياويه والفيزياوية للخلية المستقبلة: وتتم من خلال معاملة الخلية بملح كلوريد الكالسيوم $CaCl_2$ بوجود البرودة والحرارة المتعاقبتين وكما موضح ادناه:





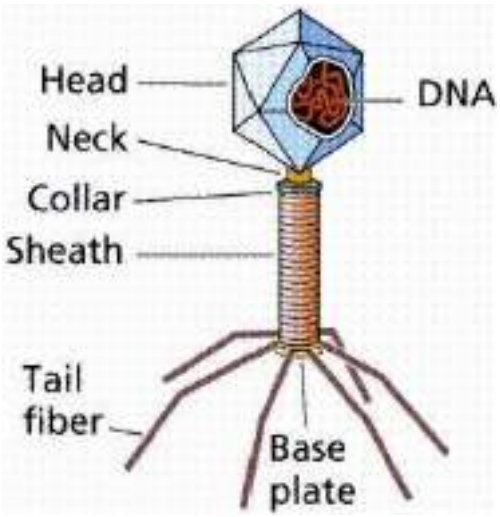
2- التحول بواسطة التهيئة الكهربائية(Electroporation) للخلية المستقبلة: وتتم من خلال معاملة الخلية بتيار كهربائي مقداره 10-20 kV/cm

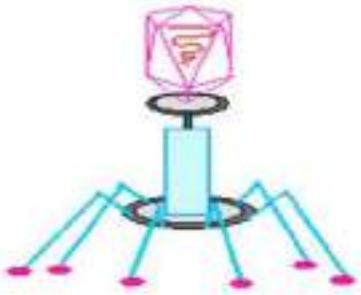


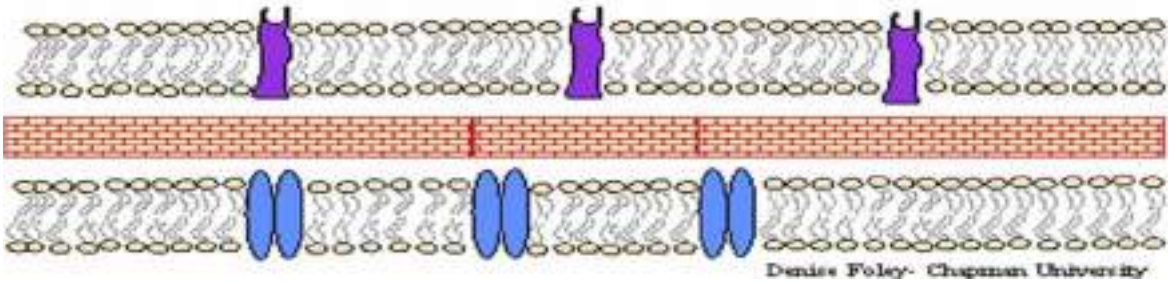
العاثيات والتنبيغ بالعاثي *Phage and Transduction*

سنتطرق في هذه المحاضرة الى الإلية الثالثة من آليات انتقال الجينات أفقيا وهي التنبيغ بالعاثي لكن قبل الولوج في التفاصيل يجب علينا معرفة العاثيات Pahge اولا.

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



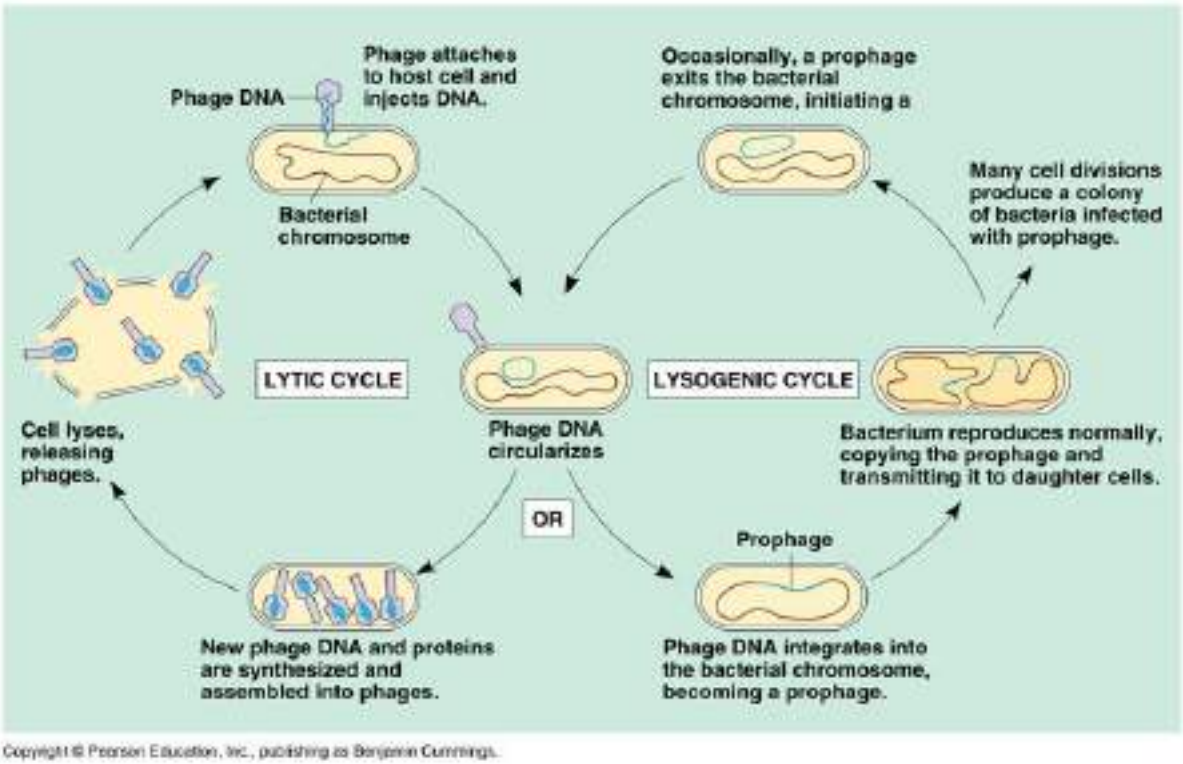




هنالك نوعين من العاثيات حسب دورة حياتها:

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

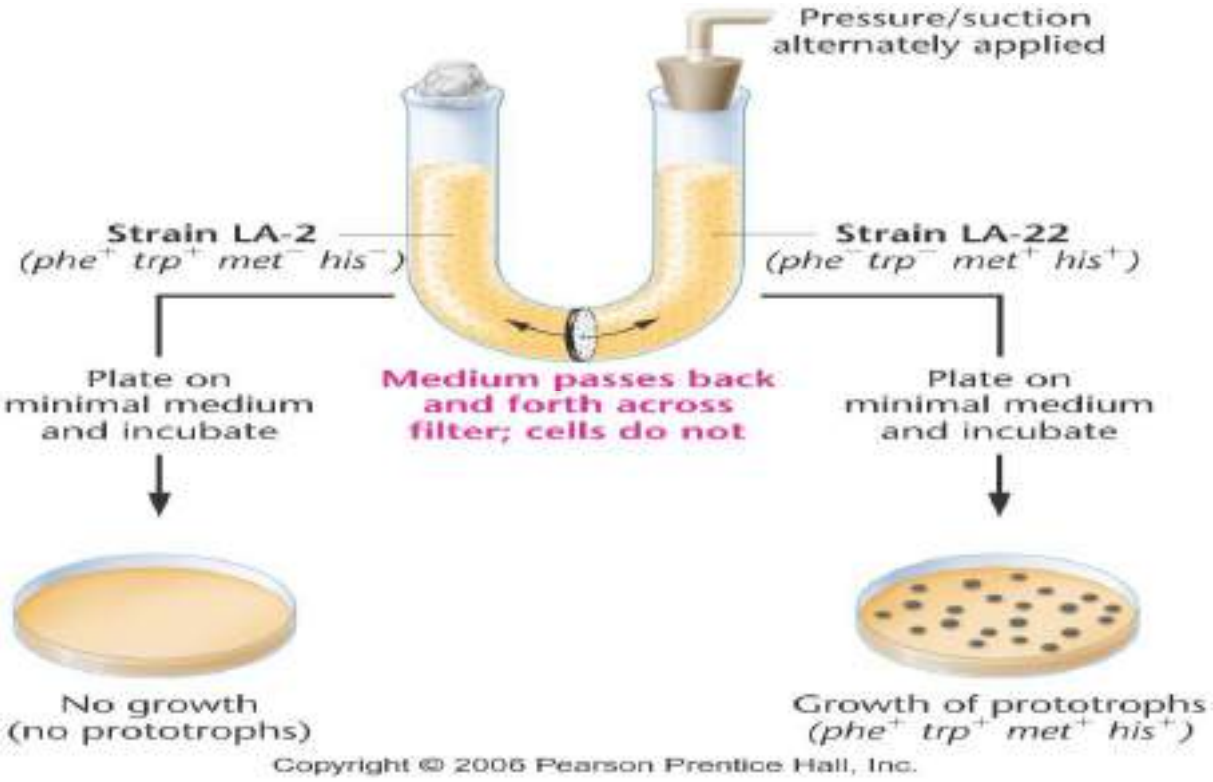
2- Lysogenic or temperate phage: وتسمى العاثيات الطارئة او الاندماجية فعند إصابة خلية بكتيرية جديدة لاتتحلل بل تندمج المادة الوراثية للعاثي مع كروموسوم الخلية البكتيرية المضيفة بواسطة اعادة الارتباط المتماثل Homologus recombination ويتضاعف معه ويبقى لفترات طويلة وعندما يستحث العاثي للانفصال وتكوين عاثيات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



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

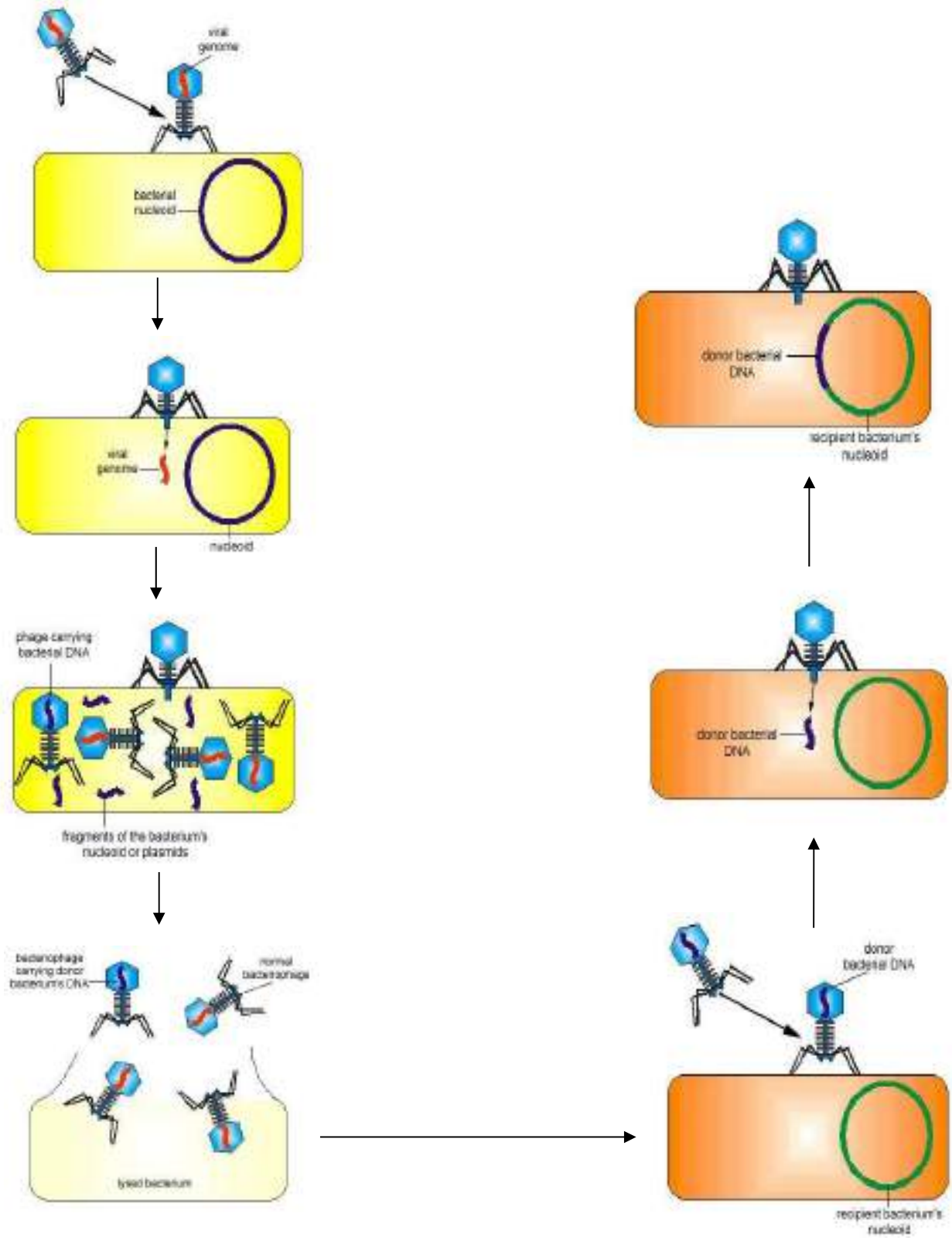
يعود فضل اكتشاف التنبيغ بالعاثي الى العالمين Joshua Lederberg and Norton

Zinder في عام 1952 من خلال تجاربهم على بكتريا Salmonella typhimurium وكما موضحه بالشكل التالي:

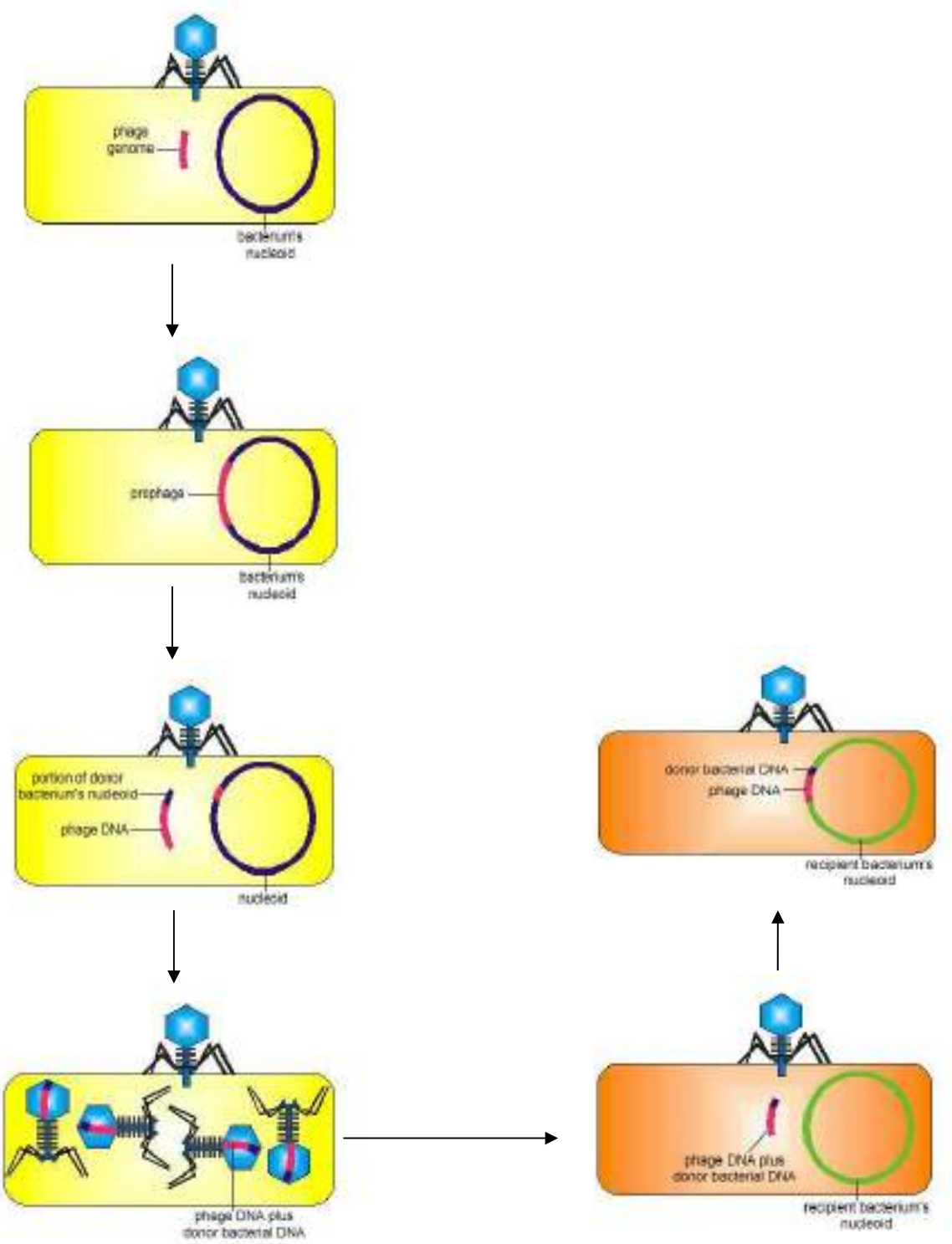


وهنالك نوعين من التنبيغ بالعاثي:

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


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

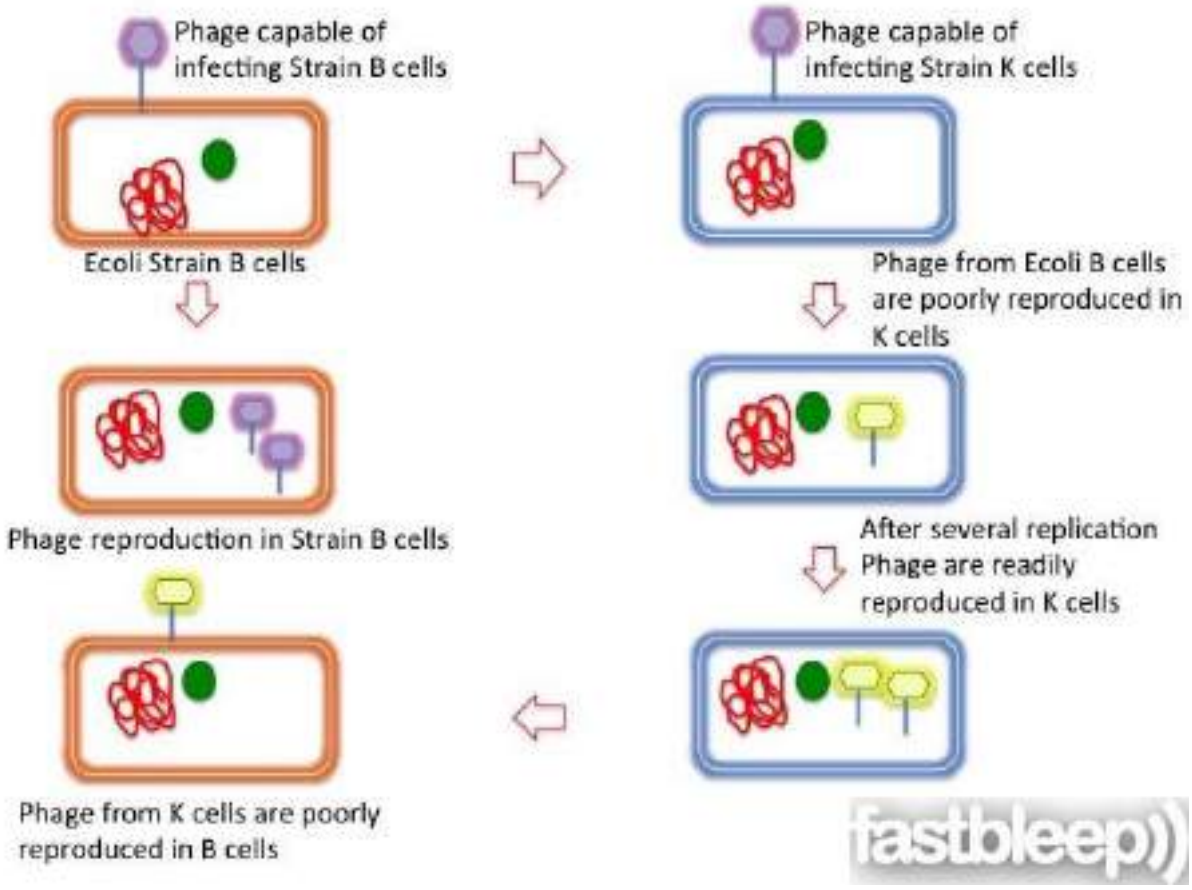
2- الخاص Specialized : ويتم بواسطة العاثي الاندماجي Lysogenic phage كما في β phage و λ phage وكما تم توضيحه سابقا حيث يتم اندماج الدنا المنقول من الخلايا البكتيرية المصابة الى الجديدة من خلال عملية اعادة الارتباط Recombination.


phage genome
bacterium's nucleoid
prophage
bacterium's nucleoid
portion of donor bacterium's nucleoid
phage DNA
nucleoid
phage DNA plus donor bacterial DNA
donor bacterial DNA
phage DNA
recipient bacterium's nucleoid
phage DNA plus donor bacterial DNA
recipient bacterium's nucleoid

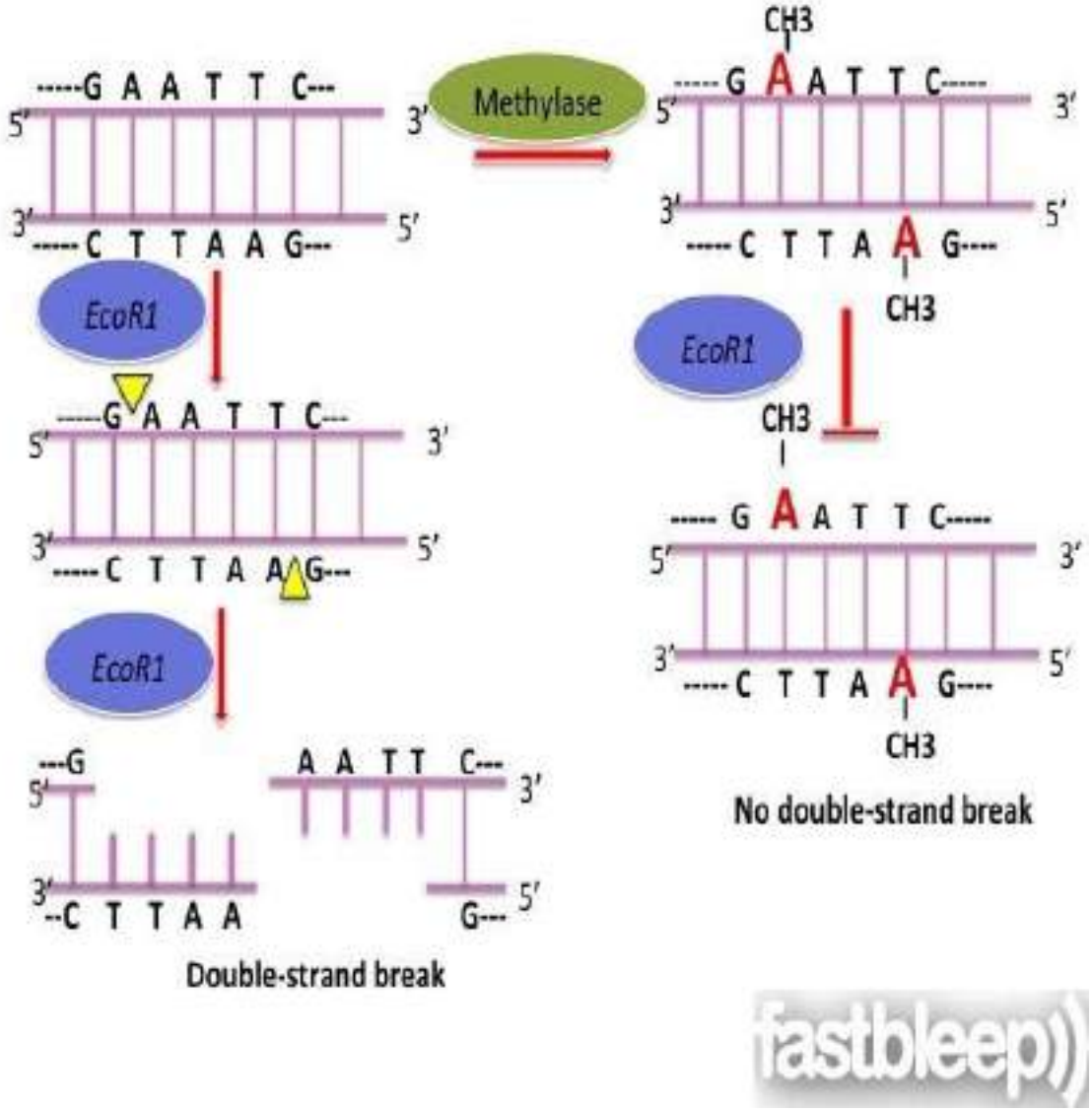
الانزيمات القاطعة *Restriction Enzymes* :

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

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



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



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

انواع الانزيمات القاطعة :

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

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

7- الوزن الجزيئي

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

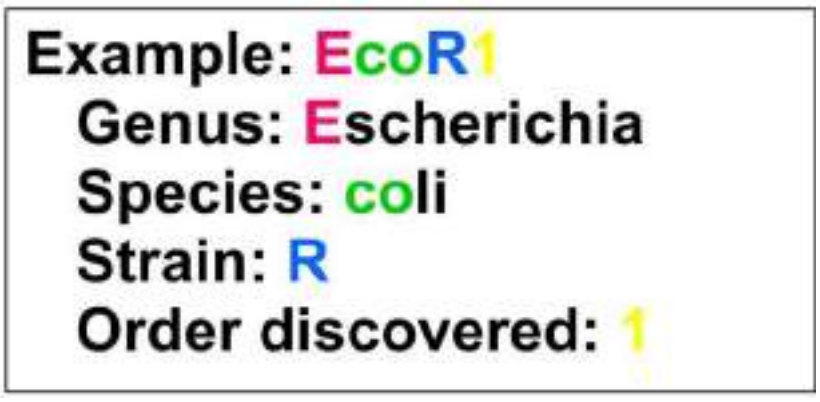
Ado-met = **S-Adenosyl methionin e**

تسمية الانزيمات القاطعة:

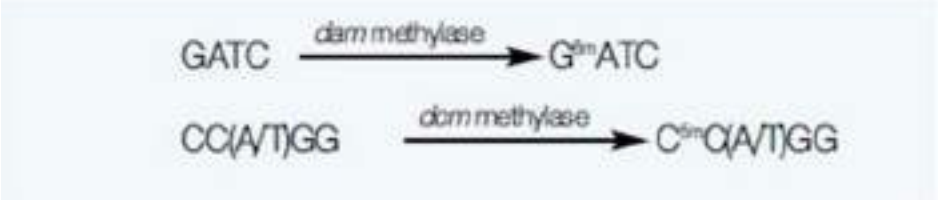
يتكون اسم الإنزيم القاطع من:

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

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

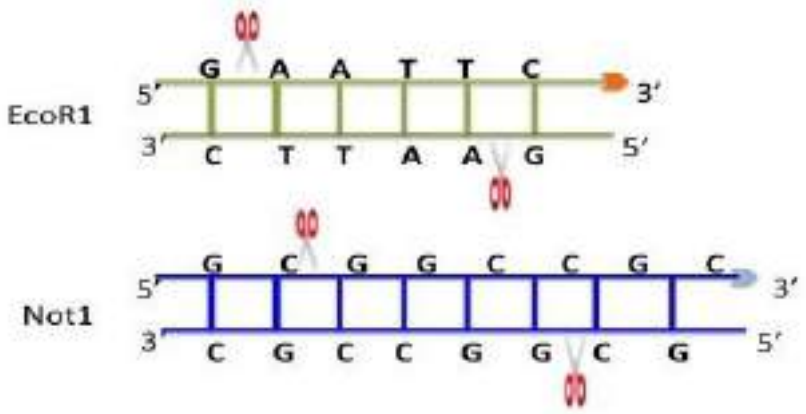


تتم عملية المثيلة بنقل مجموعة مثيل من S-Adenosyl methionine الى ذرة النتروجين السادسة ضمن الأدنين الموجود ضمن التسلسل GATC وتتم هذه العملية بواسطة انزيم المثيليز المشفر بواسطة الجين *Dam* اما المثيليز المشفر بواسطة الجين *Dcm* فانه يقوم باضافة مجموعة المثيل الى ذرة الكاربون الخامسة ضمن السايتوسين الموجود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

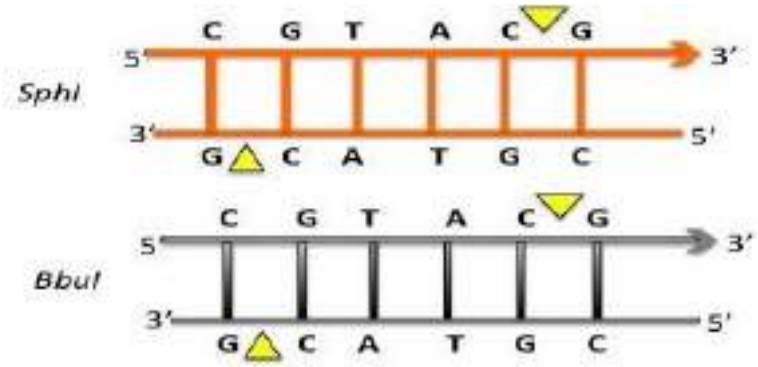


موقع التمييز *Recognition site* :

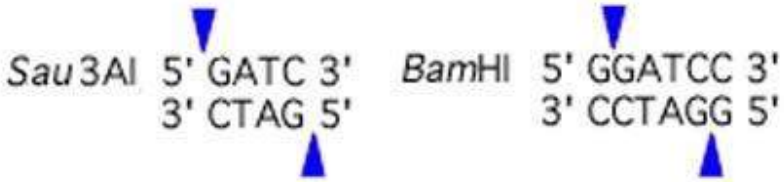
تختلف مواقع التميز في عدد قواعدها وتسلسلاتها من انزيم لأخر فمثلا انزيم *Eco*RI يميز التسلسل ذو الست قواعد بينما *Not*I يميز موقع ذو ثمان قواعد وكما موضح ادناه:



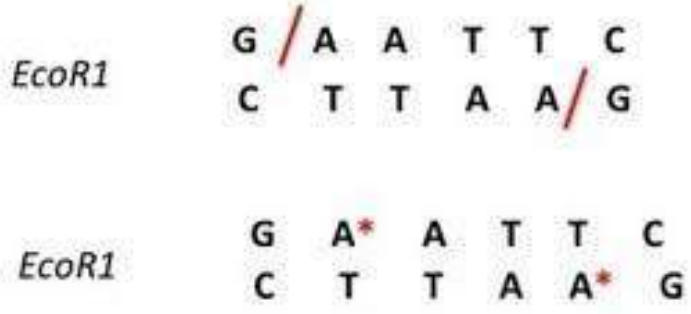
هنالك اكثر من انزيم لها نفس موقع التمييز وتسمى بـ isoschizomers ومثالها *Sph*I و *Bbu*I



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



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



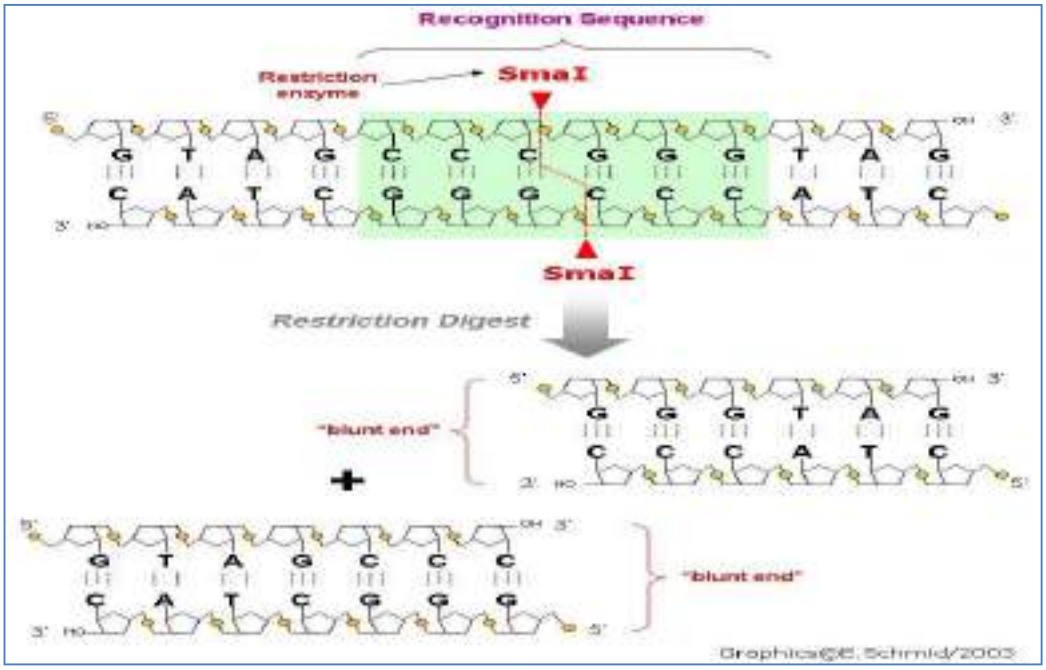
أنماط القطع *Cleavage Pattern* :

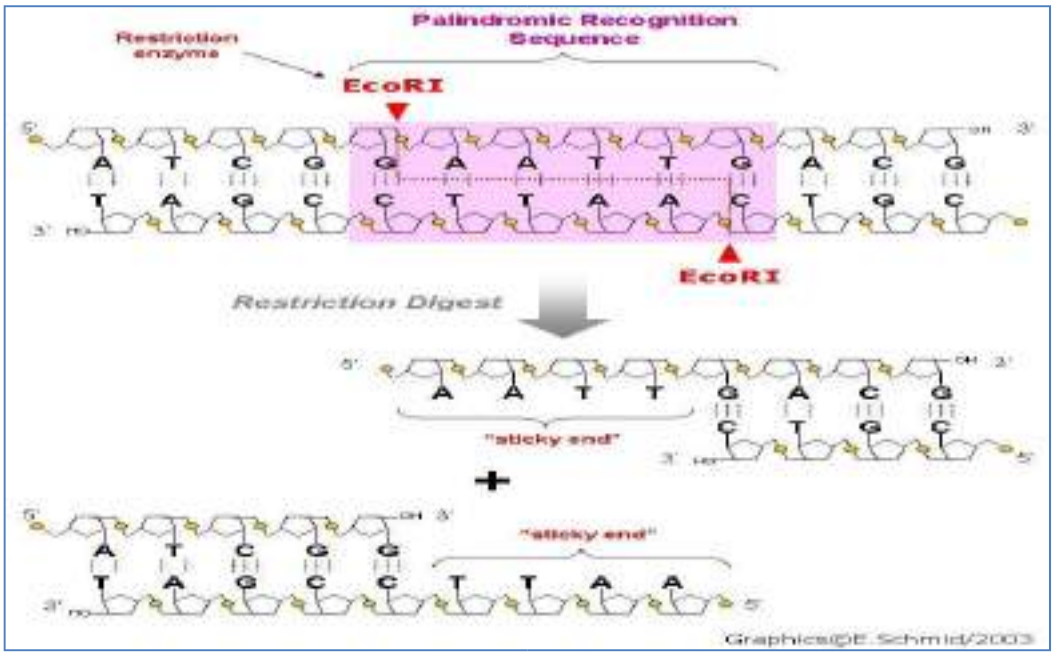
هنالك ثلاث أنماط من القطع هي:

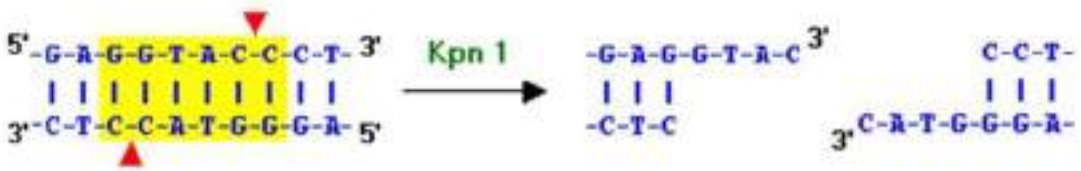
1- النهايات العمياء Blunt ends : تنتج من القطع عند نفس الموقع في كلا الشريطين كما في *Sma*I

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

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


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


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


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

الاوبرون *Operon* :

يعرف على انه مجموعة من المورثات (الجينات) تشترك بنفس عوامل السيطرة والتنظيمRegulatory and control elements .توجد الاوبرونات فقط في بدائية النواة .
يتكون الجين في بدائية وحقيقية النواة من العناصر التنظيمية Regulatory والجين التركيبي Structural gene.

تشتمل العناصر التنظيمية على مايلي:

المحفز Promoter (تقع الى الأمام Upstream من الجين التركيبي)

المشغل Operator (تقع الى الأمام Upstream من الجين التركيبي)

الإنهاء Terminator(تقع الى الخلف Downstream من الجين التركيبي.)

أما الجين التركيبي في بدائية النواة يكون على العكس مما موجود في حقيقية النواة حيث يتكون فقط من Exons ولايحتوي على Introns Exons: تشفر لأحماض امينية Intron: لاتشفر لأحماض امينية بل تشفر لعناصر السيطرة

تسمى التسلسلات أو المناطق التي تقع الى الأمام من المنطقة بدء الاستنساخ بـ Upstream أو 5' flanking region ودائما يرمز لها برقم مع إشارة السالب (مثلا 01-) أما التسلسلات أو المناطق التي تقع الى الخلف من مناطق الإنهاء تسمى بـ Downstream أو flanking 3' region ودائما يرمز لها برقم مع أشارة الموجب (مثلا 51+)

في حقيقية النواة لكل جين هنالك عناصر تنظيم وسيطرة خاصة به ولايمكن أن يشترك أكثر من جين بنفس عناصر التنظيم والسيطرة Single regulatory Machine for single Structural gene

في بدائية النواة لكل جين هنالك عناصر تنظيم وسيطرة ممكن أن يشترك أكثر من جين بنفس

عناصر التنظيم والسيطرة كما في Operon. Single regulatory Machine for الاوبرون more than one Structural gene

في هذه المحاضرة سنتطرق لأهم نوعين من الاوبرونات الموجودة في البكتريا وهي:

- اوبرون استهلاك اللاكتوز lac Operon (يعمل اللاكتوز كمحفز لاستنساخ وتشفير جينات هذا الاوبرون)وبالتالي يمثل Positive control mechanism
- اوبرون تصنيع التربتوفان trp Operon (يعمل التربتوفان كمثبط لاستنساخ وتشفير جينات هذا الاوبرون) وبالتالي يمثل Negative control mechanism

اوبرون استهلاك اللاكتوز *lac Operon*:

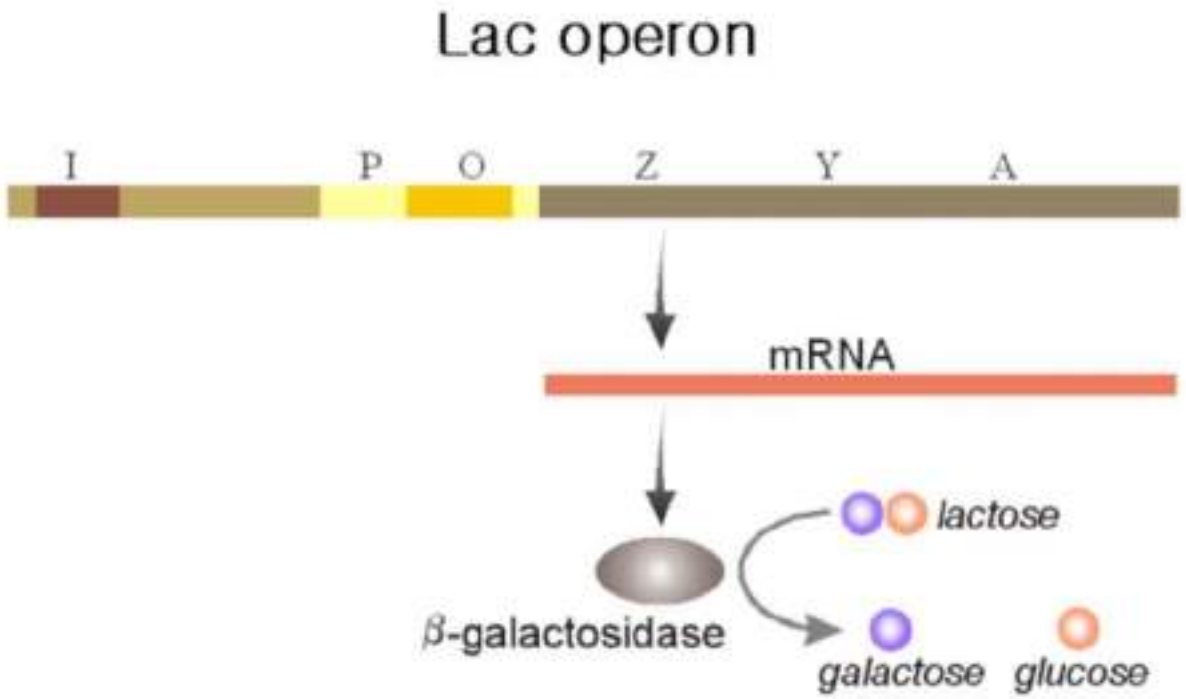
يتكون هذا الاوبرون من ثلاث جينات تركيبية هي :

*lac*Z: يشفر لأنزيم β-galactosidase حيث يحلل هذا الإنزيم جزيئة اللاكتوز الى كلوكوز وكلاكتوز.

*lac*Y: يشفر لأنزيم Permease الذي يسهل دخول اللاكتوز من الوسط الزرعي الى داخل الخلية البكتيرية.

*lac*A : يشفر لإنزيم Acetylase الذي يعمل على إزالة مايسمى بمشابهات اللاكتوز lactose-like compounds والتي لاتتحلل بفعل إنزيم β-galactosidase.

في الحالة الطبيعية (عدم وجود أو قلة في تركيز اللاكتوز) هنالك مايسمى بـالمثبط repressor الى يشفر من قبل مايسمى بـ Silencer or Repressor gene . تقع منطقة الـ Silencer الى الأمام Upstream وتشفر لبروتين التثبيط repressor الذي بدوره يرتبط مع منطقة المشغل operator وبالتالي تمنع عملية استنساخ الجينات سالفة الذكر(اللازمة لاستهلاك اللاكتوز)



في حالة وجود وفرة من اللاكتوز يعمر هذا السكر لمحفز حيث يرتبط مع البروتين المثبط مانعا ارتباطه مع منطقة المشغل وبالتالي تسهل عملية الاستنساخ والتشفير للأنزيمات اللازمة لكن يبقى سؤال هل يتم التشفير لجينات الـ lac Operon بمجرد وجود اللاكتوز؟؟

الجواب كلا بل تحتاج عملية الاستنساخ والتشفير الى المنشط activator وهو cAMP حيث يزداد تركيزه بغياب الكلوكوز وبالتالي يرتبط مع الـPromoter ويبدء الاستنساخ ثم التشفير (غياب الكلوكوز هو دليل على عدم تحلل اللاكتوز وغياب المثبط repressor هو دليل على وجود اللاكتوز وبالتالي سوف يعمل المنشط Activator على تنشيط بدء عملية استنساخ الجينات الثلاث وبالتالي استهلاك اللاكتوز

إما بوجود الكلوكوز يقل تركيز cAMP وبالتالي يتوقف استهلاك اللاكتوز (لأنه وجود الكلوكوز يعني انه تم استهلاك كميه من اللاكتوز تكفي لسد الحاجة) وبالتالي:

↑اللاكتوز يعتبر Inducer

↑الكلوكوز يعتبرSuppressor

↑cAMP يعتبر Activator

س/هل توجد مادة كيماوية تعمل عمل اللاكتوز؟

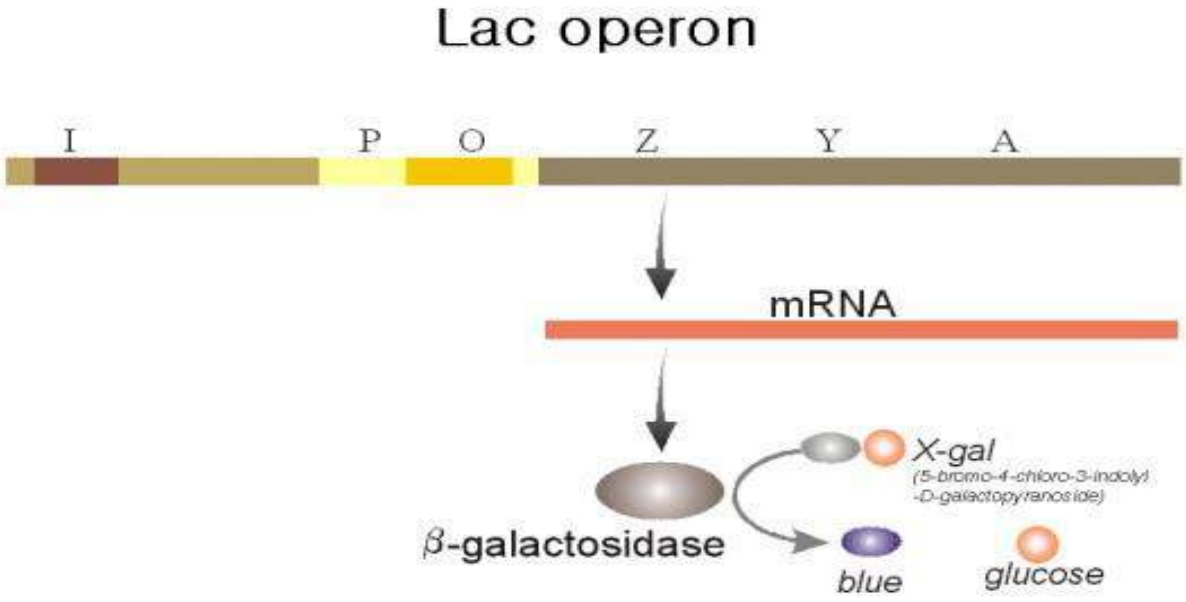
ج/نعم توجد وهي مادة (IPTG)

س/ ان تحويل اللاكتوز الى كالاكتوز وكلوكوز لايمكن رؤيته بالعين في الوسط الزرعي! في هذه الحالة كيف نستدل على وجود وصلاحية عمل الـ *lac* Operon ؟؟

ج/يمكن من خلال استخدام مادة X-gal حيث ان هذه المادة عند تحللها بفعل انزيم β-galactosidase سوف تعطي جزيئة كلوكوز وماده لونيه زرقاء وبالتالي تلون البكتريا التي تحمل الـ *lac* Operon الفعال باللون الأزرق على الوسط الحاوي على مادة الـ X-gal .

س/عند قطع جين lacZ إلى جزيئين هل يبقى فعال؟ بمعنى أخر هل تبقى له القابلية على تحويل مادة X-gal الى جزيئة كلوكوز وماده لونيه زرقاء؟

ج/ يفقد هذه الفعالية لان جين *lac* Z يشفر لوحدتي البروتين α +β وعند قطع الجين يحصل مايسمى بـ interruption وينتج فقط وحدة بروتين α او β .

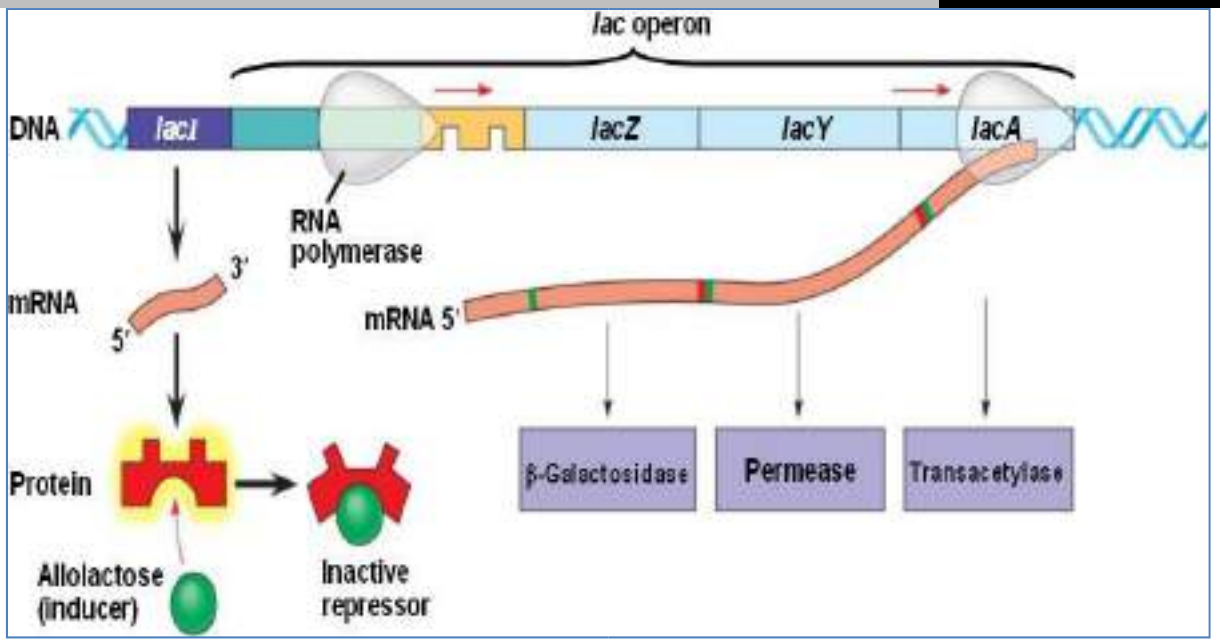


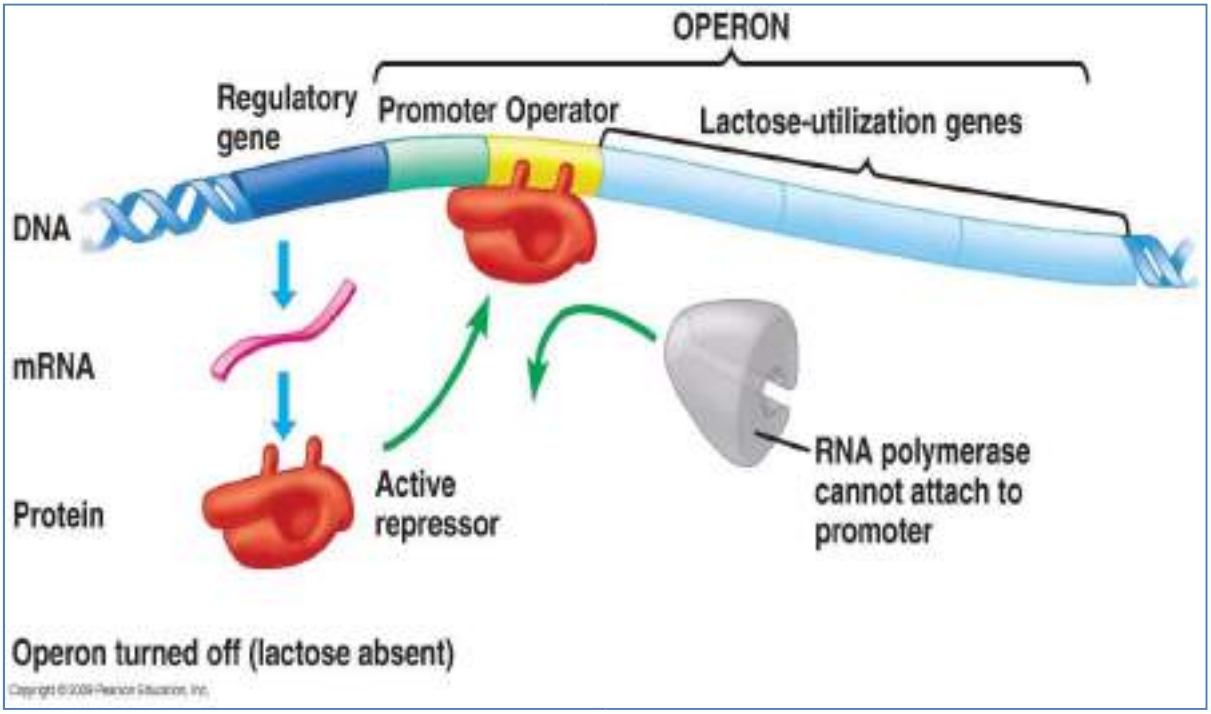
IPTG= isopropylthiogalactoside

X-gal= 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D- galactoside

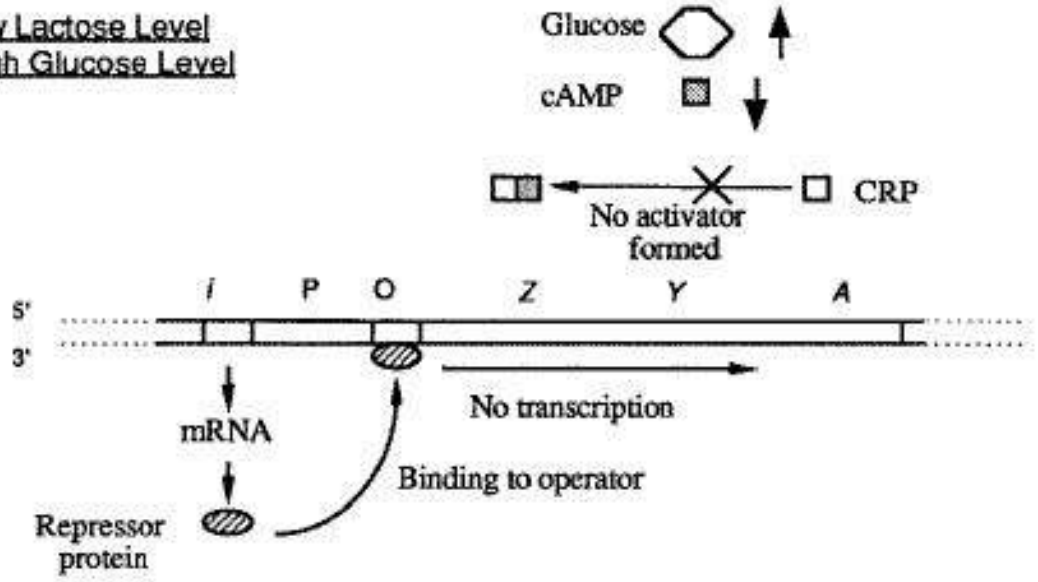
منطقة ارتباط RNA polymerase بـالـ promoter تسمى Pribnow box

منطقة ارتباط الرايبوسوم بـالـ mRNA تسمى Shine-Dalgarno

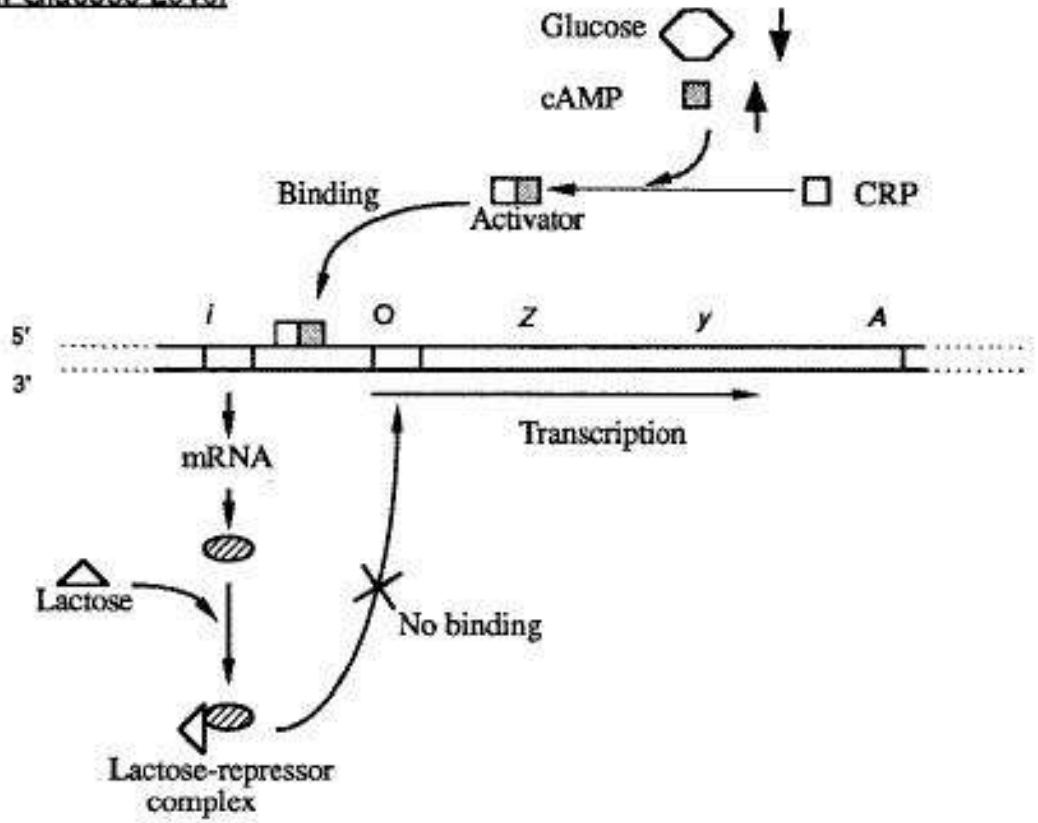

lac operon
DNA
lacI
lacZ
lacY
lacA
RNA polymerase
mRNA
3'
5'
mRNA 5'
Protein
β-Galactosidase
Permease
Transacetylase
Allolactose (inducer)
Inactive repressor


OPERON
Regulatory gene
Promoter
Operator
Lactose-utilization genes
DNA
mRNA
Protein
Active repressor
RNA polymerase cannot attach to promoter
Operon turned off (lactose absent)

(1) Low Lactose Level
High Glucose Level



(2) High Lactose Level
Low Glucose Level



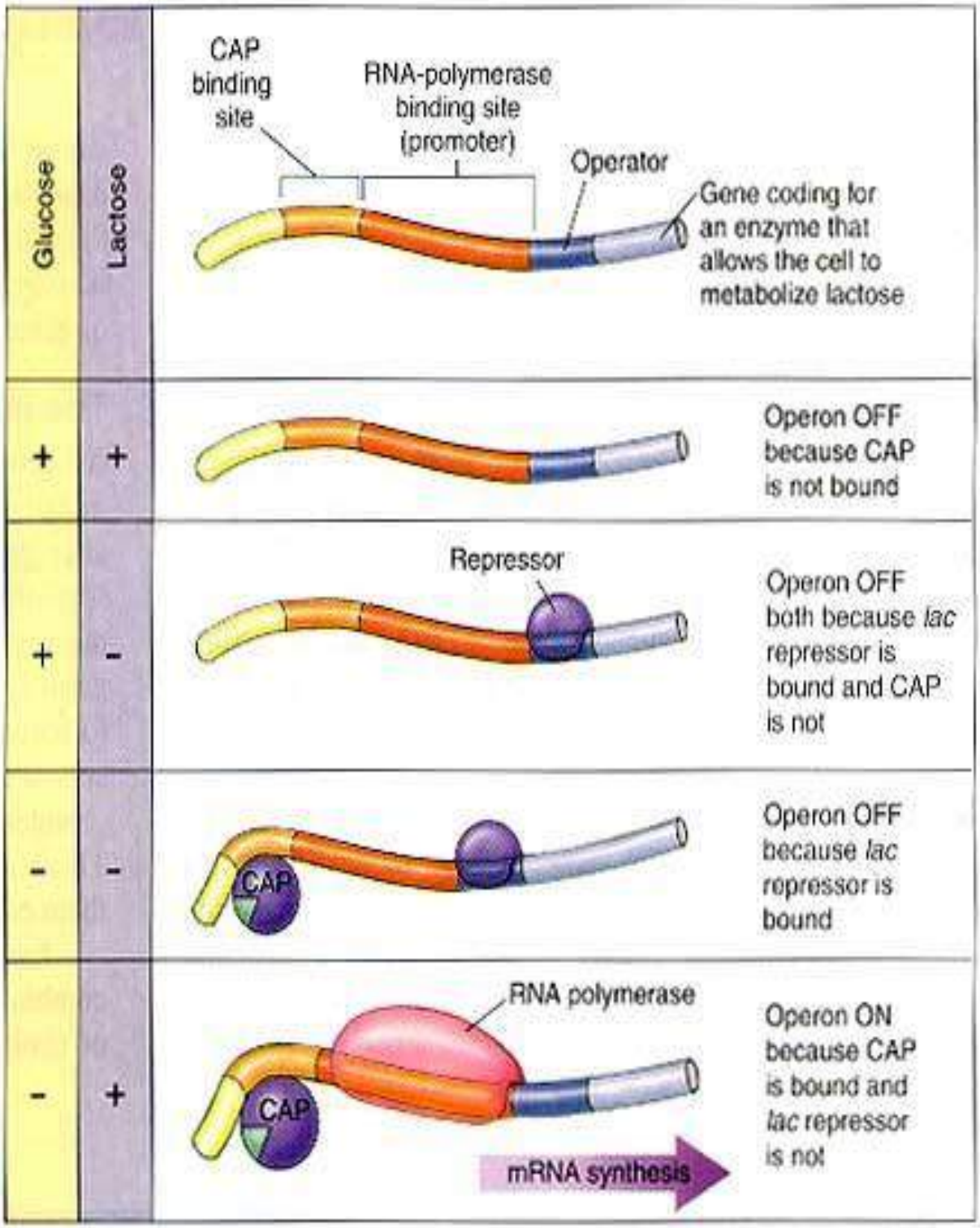


Figure Activators and repressors at the *lac* operon.

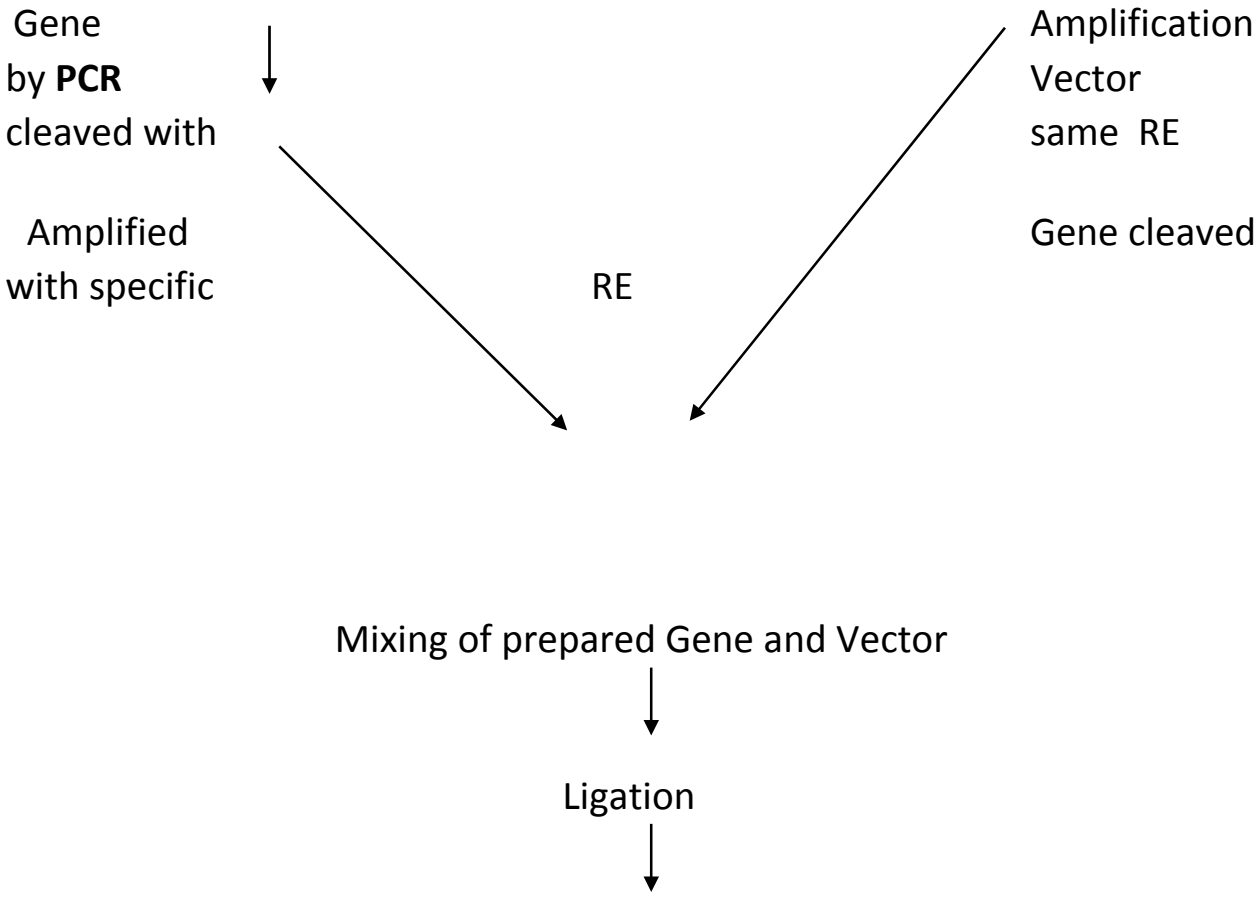
Together, the lac repressor and the activator called CAP provide a very sensitive response to the cell's need for and ability to use lactose-metabolizing enzymes.

الكلونة *Cloning*

أيضا تسمى بالاستنسال ويعرف على انه عملية لتصنيع نسخ متعددة من نفس الجين وبالتالي الحصول على كمية اكبر من المنتج لايمكن ان نحصل عليها في الحالة الطبيعية.

وممكن تلخيص هذه التقنية بالخطوات الآتية:

1- تضخيم الجين المراد استنساله بواسطة تقنية البلمره المتسلسل PCR .
2- تهيئة الجين المراد نقله (بعد تضخيمه) باستخدام انزيم قاطع معين.
3- تهيئة ناقل الكلونة بقطعه بنفس الإنزيم القاطع الذي عومل به الجين.
4- نقل الجين المهيئ الى ناقل الكلونة المهيئ وإتمام عملية اللحم ligation .
5- اختبار التأكد من نجاح عملية الكلونة.



↓

Testing the transformed Bacteria

مما تبين أعلاه ان العملية نظريا سهله لكن في الواقع نجاحها قد يكون صعبا ويعتمد على العناصر المشتركة في هذه العملية وهذه العناصر هي:

1- تضخيم الجين باستخدام تقنية Polymerase Chain reaction (PCR)
2- الانزيمات القاطعة.
3- نواقل الكلونة.
4- البكتريا المتحولة وكيفية الكشف عن التحول.

سنتطرق في هذه المحاضرة اولا عن نواقل الكلونة وتركيبها وماهي أنواعها اما الانزيمات القاطعة وتقنية الـ PCR فقد تم الحديث عنها في المحاضرات السابقة.

نواقل الكلونة *Cloning vectors*

تعرف على انها جزيئات دنا تستخدم لنقل الجينات الى خلايا المضيف (ميكروبات ، حيوانات ،نباتات) ولتوفير عناصر السيطرة على التضاعف والتعبير الجيني . وبصورة عامه تقسم نواقل الكلونة الى:

- نواقل الكلونة الى الخلايا البكتيرية Vector for Bacterial cell
- نواقل الكلونة الى الخلايا النباتية Vector for Plant cell
- نواقل الكلونة الى الخلايا اللبائن Vector for Mammalian cell

وسنركز في محاضرتنا هذه على نواقل الكلونة الى الخلايا البكتيرية Vector for Bacterial cell وتشتمل هذه على مايلي:

أولا: النواقل البلازميدية Plasmid Vectors

ثانيا: النواقل العاثية Bacteriophage Vectors

ثالثا: الكوزميدات Cosmids

رابعا: الفاجميدات او الفازميدات Phagemids or Phasmid

أولا: النواقل البلازميدية *Plasmid Vectors* :

تعد من اكثر نواقل الكلونة شيوعا وتكون هذه البلازميدات قادرا على حمل قطعة دنا تصل الى 15kb وتزداد كفاءة عملية الكلونة والتحول كلما قل الحجم الجزيئي البلازميد والعكس صحيح. تركيبا تتكون النواقل البلازميدية ممايلي:

- **منطقة بدء التضاعف وتعرف بـ OriV** :ومن الجدير بالذكر ان البلازميد قادر على التضاعف الذاتي ويسمى Replicon وكذلك قادر على الاندماج مع كروموسوم البكتريا المضيفة ويسمى Episome.
- **منطقة الكلونة Cloning site** :وهذا يتألف من منطقة ذات تسلسل مميز يتم تصنيعها وحشرها ضمن البلازميد وهذه المنطقة ممكن تميزها من قبل عدة أنواع من الأنزيمات القاطعة(تحتوي على مناطق قطع restriction or cleavage site للعديد من الانزيمات القاطعة) وتسمى هذه المواقع بـ multiple cloning sites (MCS). ماهي فائدة هذه المنطقة؟؟ إن الفائدة منها هو أنها تحتوي على مواقع قطع لعديد من الإنزيمات القاطعة وبالتالي يمكن معاملة قطعة الدنا المراد نقلها ومعاملة الناقل البلازميدي بنفس الإنزيم القاطع وحشر القطعة المراد نقلها ولحمها مع هذه المنطقة.
- **المعلمات الانتقائية Selectable Marker** : وتمثل هذه جينات مقاومة لبعض المضادات الحياتية مثل جين مقاومة الامبسيلين ويرمز له AmpR وجين مقاومة التتراسايكيلين TetR ماهو الغرض والفائدة من هذه المنطقة؟؟ إن الفائدة منها هو لاختيار الخلايا البكتيرية المتحولة (التي أخذت الناقل البلازميدي) حيث تنمو الخلايا المتحولة على وسط يحتوي على هذه المضادات في حين لاتنمو الخلايا الغير متحولة (التي لم تأخذ الناقل البلازميدي.)
- **منطقة الجين الدليل Reporter gene**: وهو جين مميز يمكن من خلاله معرفة نجاح او فشل الكلونه مثل جين *lac*Z .
- **منطقة المحفز Promoter region** (منطقة اختيارية توجد فقط في النواقل التعبيرية Expression vectors) وهذه المنطقة تقع عادتا الى الأمام Upstream من multiple cloning sites (MCS) ما الفائدة من هذه المنطقة ؟؟ إن الفائدة منها هو أنها تساعد على استنساخ وترجمة قطعة الدنا التي نقلت بواسطة البلازميد.
- **منطقة تسلسلات متعدد الهستدينPolyhistidine sequence** (منطقة اوتسلسل

اختياري مصنع مختبريا لكنه شائع جدا) ويتميز البروتين الناتج بأنه يحتوي على منطقه قصيرة من متعدد الهستدين. مالفائدة من هذه المنطقة؟؟ إن الفائدة منها هو لاستخلاص البروتين الناتج بسهوله حيث تستخدم أعمدة فصل النيكل حيث يتحد معها البروتين الناتج عن طريق هذه المنطقة وبالتالي نكون قد حصلنا على البروتين المطلوب بخطوه واحده.

بصورة عامه هنالك نوعين من البلازميدات هي:

البلازميدات ذات النسخ القليلة(Low Copy Number) : وتمثل البلازميدات التي توجد داخل الخلية البكتيرية وعددها 25-1 نسخة من البلازميد ومثالها pBR322 plasmid. متى يحبذ هذا النوع من النواقل؟؟ يحبذ استخدام هكذا نوع من النواقل اذا كان هنالك احتمال تسبب مضار للخلية البكترية التي نقل إليها البلازميد.

البلازميدات ذات النسخ الكثيره(High Copy Number) : وتمثل البلازميدات التي توجد داخل الخلية البكتيرية وعددها 100 نسخة فما فوق من البلازميد ومثالها pUC plasmid. متى يحبذ هذا النوع من النواقل؟؟ يحبذ استخدام هكذا نوع اذا اريد الحصول على عدد كبير من الدنا المنقول الى المضيف (اي منتوج اكبر.)

س/ كيف يمكننا ان نتحرى عن نجاح عملية الكلونة (اي نجاح نقل الجين المراد تكثيره بواسطة ناقل الكلونة البلازميدي؟؟

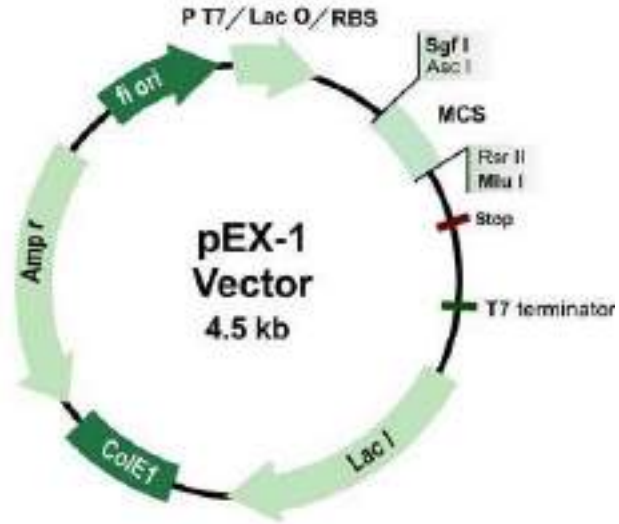
ج/يتم من خلال استخدام اما:

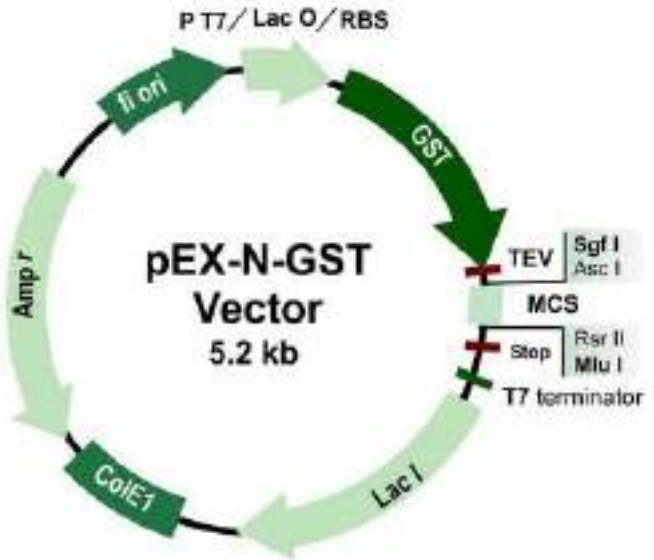
1- ناقل كلونه تعبيري؟؟؟
2- ناقل كلونه غير تعبيري؟؟

بصورة عامة تنقسم نواقل الكلونه البلازميدية الى:

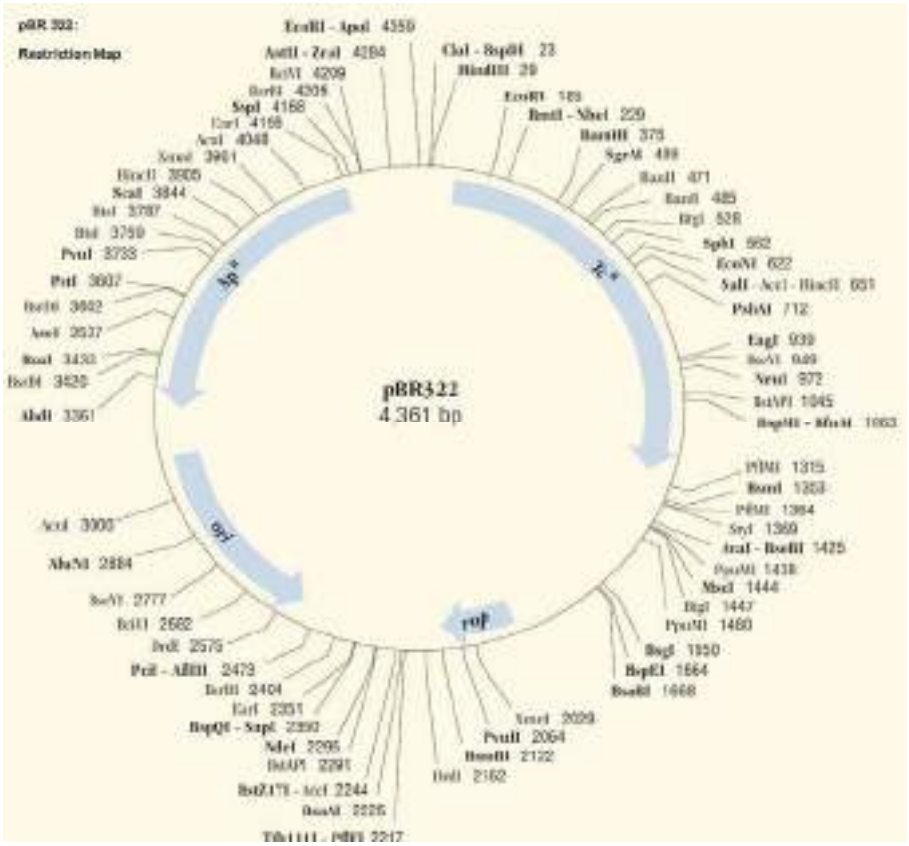
- **نواقل تعبيرية Expression vector**

ويقصد بها ان الجين المنقول بواسطة الناقل يحتوي على المحفز promoter وبالتالي ممكن ان يحصل صنع الـmRNA والتعبير (صنع البروتين) للمنتج الهدف. اي ان التحري عن نجاح عملية الكلونه هو بالتحري عن إنتاج البروتين للجين المنقول.

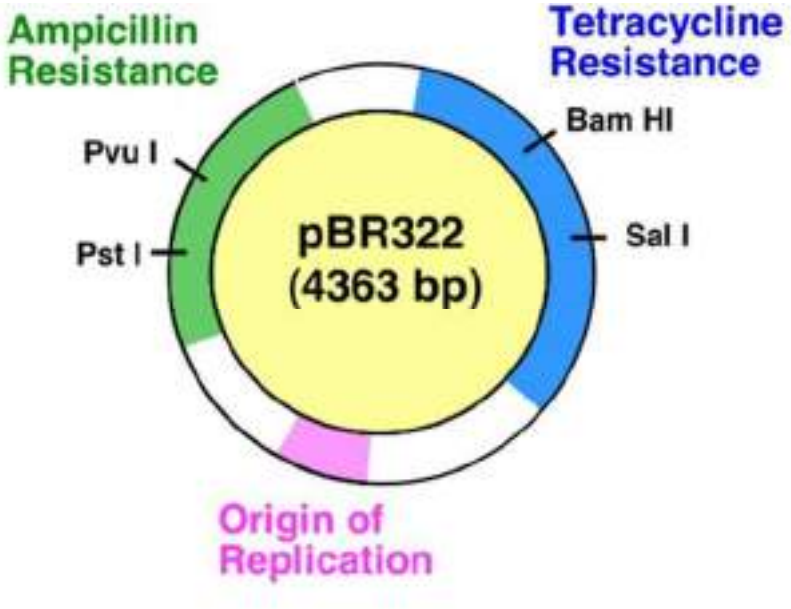




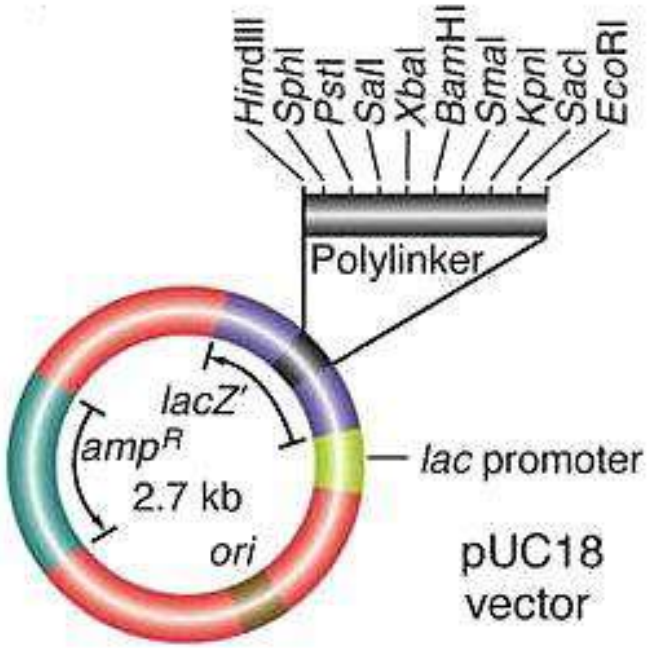
- **نواقل كلونة غير تعبيرية Cloning vector : مثل الناقل pBR322 حيث تحشر القطعة المراد نقلها ضمن منطقة *lacZ***

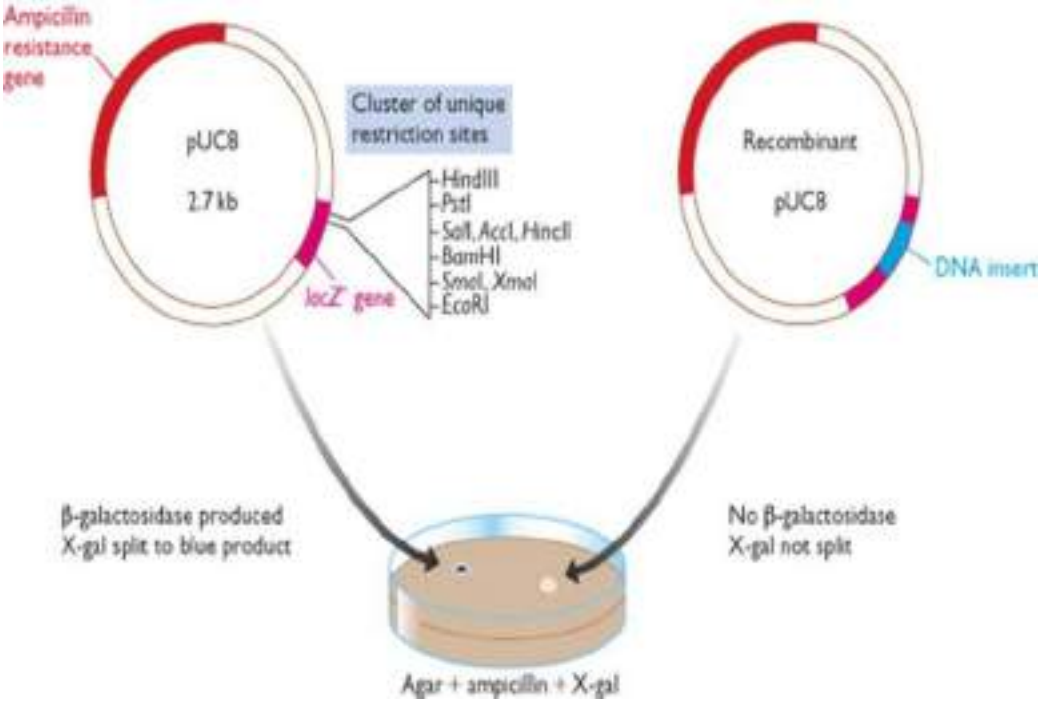


Restriction Map
pBR322
4 361 bp



Ampicillin Resistance
Tetracycline Resistance
Bam HI
Pvu I
Sal I
Pst I
pBR322
(4363 bp)
Origin of Replication

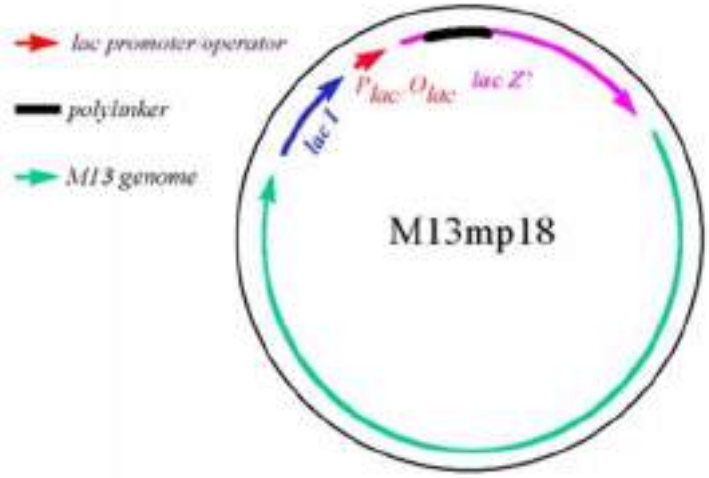




Bacteriophage Vectors:

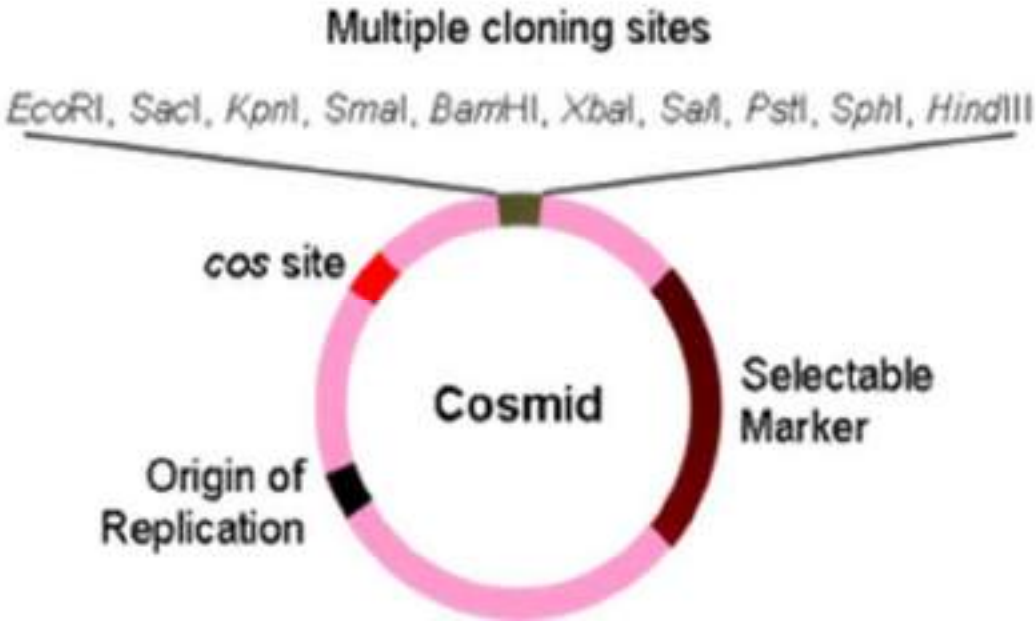
ثانيا: النواقل العاثية

تمتاز بقدرتها على حمل قطعة دنا تصل الى kb53 ومثالها phage λ و M13 phage



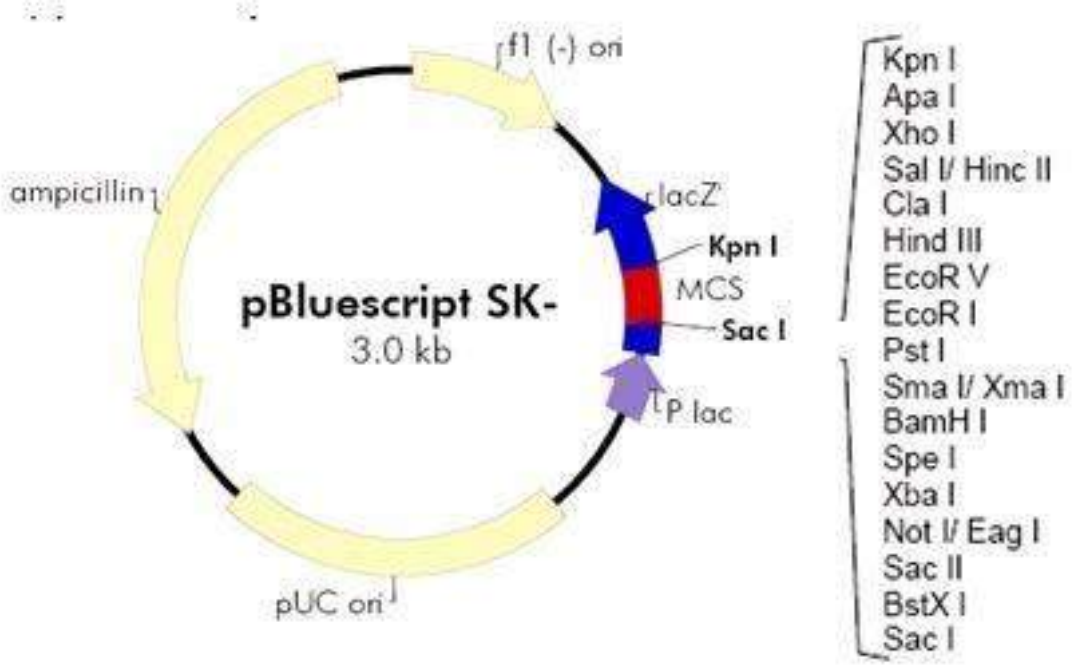
ثالثا: الكوزميدات *Cosmids*

وهي نواقل بلازميدية تحتوي على المناطق اللاصقه cohesive sit (cos site) الخاصه بـ phage λ تمتاز بقدرتها على حمل قطعة دنا تصل الى 45kb



رابعا: الفاجميدات او الفازميدات *Phagemids or Phasmid*

تمتاز بانها مكونة من ارتباط العاثيات الخيطية وبلازميد وتمتاز باحتوائها على موقعين للتضاعف احدهما للعاثي والأخر البلازميد كما في الناقل pBluescript حيث يحتوي على f1 ori من العاثي الخيطي f1 phage وعلى pUC ori من البلازميد pUC



المحاضرة الاولى : نبذه تاريخية عن علم الاحياء المجهريه الغذائية

تعريف علم الاحياء المجهرية الغذائية (ميكروبيولوجيا الأغذية):

هوالعلم الذي يهتم بدراسة الكائنات الحية الدقيقة التي تعيش في، او تخلق، أو تلوث ، او تسبب تلف المواد الغذائية او التسمم الغذائي.

قسم برجي المجاميع البكتيرية المهمة للاغذية الى ثمانية اقسام وهي:

1 -مجموعة البكتريا السالبة لصبغة كرام الهوائية: وتشمل العوائل والاجناس التالية

1-Pseudomonadaceae :

Pseudomonas spp.

2-Halobacteriaceae:

Halobacterium spp.

Halococcus spp.

2 -مجموعة البكتريا السالبة لصبغة كرام الهوائية الاختيارية : وتشمل العوائل والاجناس التالية

1-Enterobacteriaceae:

Escherichia spp.

Enterobacter spp.

Salmonella spp.

Shigella spp.

Serratia spp.

Erwinia spp.

2-Vibrionaceae :

Vibrio spp.

Aeromonas spp.

Pleasiomonas spp.

Photobacterium spp.

3 --مجموعة البكتريا السالبة لصبغة كرام اللاهوائية : وتشمل العوائل والاجناس التالية

1-Bacteroides

4 --مجموعة البكتريا السالبة لصبغة كرام العصوية-كروية: وتشمل الاجناس التالية

Moraxella spp. , Acinetobacter spp.

5 --مجموعة البكتريا الموجبة لصبغة كرام الكروية: وتشمل العوائل و الاجناس التالية

1-Micrococcaceae:

Micrococcus spp.

Staphylococcus spp.

2-Streptococcaceae :

Streptococcus spp.

Leuconostoc spp.

Pediococcus spp.

6 --مجموعة البكتريا الموجبة لصبغة كرام ،غير مكونة للسبورات عصوية وسالبة لفحص الكاتاليز : وتشمل العوائل و الاجناس التالية

1-lactobacillaceae:

Lactobacillus spp.

7 --مجموعة البكتريا الموجبة لصبغة كرام ، مكونة للسبورات عصوية: وتشمل الاجناس التالية

Bacillus spp., Clostridium spp., Desulfatomaculum spp.

8 --مجموعة البكتريا ذات الخلايا المتفرعة: وتشمل الاجناس التالية

Corynebacterium spp. , Microbacterium spp. , Propionibacterium spp.

العالم برجي صنف الاحياء المجهرية المهمة للاغذية الى ثمانية مجاميع حسب الصفات الفسلجية والتركيبية لهاوفيمايلي اهم العوائل والاجناس المهمة للاغذية:

اولا: عائلة عصيات الحليب *Lactobacillaceae*

تكمن اهمية هذه البكتريا فيما يلي:

1 -انتاج العديد من الاغذية ومنها الالبان المتخمرة والمخللات والاغذية المخمره. (فوائد)

2 -انتاج حامض اللاكتيك المستخدم في الصناعات الغذائية والطبية. (فوائد)

3 -اتلاف الاغذية الحامضية التي لاتتمكن البكتريا الاخرئ من النمو فيها. (مضار)

اما مصادر هذه البكتريا فهي:

انساني (امعاء الانسان)

حيواني (امعاء الحيوانات)

نباتي (من الفواكه والخضر)

تستخدم عصيا الحليب كـ *Bioassay* (دليل احيائي) للكشف عن بعض الفيتامينات والاحماض الامينية في بعض الاغذية وذلك لان هذه البكتريا تحتاج هذه العوامل للنمو اي انه عندما تنمو على بعض الاغذية فهذا دليل على المحتوى العالي من االفيتامينات والاحماض الامينية في هذه الاغذية والعكس صحيح.

من الجدير بالذكر ان هذه البكتريا تتحمل ان هذه البكتريا تطبعت لتمل الاملاح والسكريات لغاية ٢٠% وظروف حامضية لغاية *(Ph=3)*. لاتكون بكتريا الـ*Lactobacillus spp.* انزيم الكاتاليز ولا السايتوكروم وتعتمد على التخمر في الحصول على طاقتها وتفضل الظروف اللاهوائية اما في حالة تعرضا الى الاوكسجين فانها تكون انزيم الـ *Peroxidase* الذي يساعدها على التخلص من بيروكسيد الهيدروجين السام الذي يتكون نتيجة لتعرضها الى الاوكسجين وتكوين الجذور الحره ام ما تسمى ب *ROS*. من الاوساط التي تستخدم لعزل بكتريا الـ *Lactobacillus spp.* هي وسط الـ *Rogosa agar* و *MRS agar*.

انتاج حامض الاكتيك:

ان انتاج حامض الاكتيك بواسطة عصيات الحليب يتم من خلال تخمر سكر اللاكتوز (سكر الحليب) بطريقتين هما:

1 - التخمر المتجانس *Homofermentation* :وفيه ينتج حامض اللاكتيك بكميات كبيرة تصل ال
٨٥% . ويتم ذلك عن طريق مسار *Embden-Meyerhoff* التخمري.

2 - التخمر الغيرمتجانس *Heterofermentation* :وفيه ينتج حامض اللاكتيك بكميات قليلة تصل ال
٥٠% . ويتم ذلك عن طريق مسار *Hexose Monophosphate Shunt* التخمري.

تستطيع هذه البكتريا النمو بمدى واسع من درجات الحرارة (١٥-٤٥ درجة مئوية) وعلى اساس نوع التخمر ودرجة الحرارة المثلى للنمو تقسم عصيات الحليب الى ثلاثة مجاميع فسلجية موضحة بالجدول التالي :

المجموعة الفسلجية	صفاتها	الانواع المهمه
Thermobacterium	متجانسة التخمر تنمو عند ٤٥ درجة مئوية لاتنمو عند ١٥ درجة مئوية	*L. acidophilus* *L.bulgaricus* *L. lactis*
Streptobacterium	متجانسة التخمر لاتنمو عند ٤٥ درجة مئوية تنمو عند ١٥ درجة مئوية	*L. plantarum* *L. casei*
Betabacterium	غير متجانسة التخمر تنمو عند ٤٥ درجة مئوية تنمو عند ١٥ درجة مئوية	*L. fermenti*

فيما يلي نذكر بعض انواع الـ *Lactobaillus* المهمه للاغذية:

- *L. bulgaricus* : 1
يستخدم في صناعة الالبان بكميا كبيرة خلال ساعات وذلك الانتاجه كميات كبيرة من الحامض بوقت قصير ونموه بدرجات حرارة عالية.

- *L. acidophilus* : 2
يستخدم في انتاج لبن خاص لعلاج الاظطرابات المعوية يسمى الحليب المحمض *acidophilus milk*.

- *L.casei* : 3
يستخدم في تنضيج الاجبان لقابليته العالية على تحليل بروتين الحليب *casein* .

- *L. sanfrancisco* : 4
يستخدم في انتاج الخبز الحامضي *Sour dough bread*.

- *L. rogosa* : 5

يستخدم كدليل على تلوث الاغذية(*Bioassay*) بفضلات الانسان لانه يعيش بصورة لاهوائية اجبارية .

Filename: المحاضرة الاولى
Directory: D:\Food microbiology Lectures and syllebas
Template: C:\Users\Ghaider\AppData\Roaming\Microsoft\Templates\Normal.dotm
Title: الاحياء المجهرية الغذائية [food microbiology
Subject:
Author: Ghaider
Keywords:
Comments:
Creation Date: 10/4/2013 9:17:00 PM
Change Number: 62
Last Saved On: 10/18/2013 7:50:00 PM
Last Saved By: Ghaider
Total Editing Time: 310 Minutes
Last Printed On: 10/18/2013 7:53:00 PM
As of Last Complete Printing
Number of Pages: 4
Number of Words: 679 (approx.)
Number of Characters: 3,874 (approx.)

المحاضرة الثانية : الاحياء المجهرية المهمة في الاغذية

ثانيا: عائلة المسبحيات *Streptococcaceae*:

وتشمل هذه العائلة على ثلاثة اجناس مهمه يمنك التفريق بينها من خلال نوع التخمر اللاكتيكي ونوع حامض الاكتيك المنتج وكمايلي:

الجنس	نوع التخمر	نوع حامض اللاكتيك
Streptococcus	متجانسة التخمر	*L-Lactic acid*
Leuconostoc	غير متجانسة التخمر	*D-Lactic acid*
Pediococcus	متجانسة التخمر	*DL-Lactic acid*

فيما يلي نذكر بعض الانواع العائدة لعائلة المسبحيات والمهمه للاغذية:

- *Streptococcus lactis* : 1
يقوم بانتاج المضاد الحيوي الـ *Nisin* والذي يستخدم في حفظ الاغذية ضد بكتريا التسمم البوتليني *Clostridium botulinum* . لاينمو هذا النوع عند درجة ٤٥ مئوي وهو لايقاوم عملية البسترة.

- *Streptococcus thermophiles* : 2
يستخدم لصناعة الجبن السويسري لانه يتحمل درجات حرارة عالية تصل الى ٤٥ مئوي وهو يقاوم عملية البسترة.

- *Leuconostoc oenos* : 3
يستخدم في انضاج وتعتيق النبيذ من خلال قيامه بالتخمر المالولاكتيكي *Malolactic fermentation*.

- *Pediococcus cerevisiae* : 4
يسبب تلف للبيرة ويطلق علية *beer sarcina*.

ثالثا: العائلة المعوية *Enterobacteriaceae*:

ان الاجناس العائدة لهذه العائلة ليس لها دور في صناعة الاغذية كما في الاجناس التي ذكرناها سابقا بل على العكس من ذلك فهي تسبب تلف او تلوث الاغذية والتسمم الغذائي. وتشتمل على الاجناس التالية:

١- *E. coli* :

يسبب اسهال شديد نتيجة لافرازة سموم معوية عند تناول الاغذية الملوثه به. وجوده في الاغذية دليل على التلوث البرازي لهذه الاغذية.

٢- *Salmonella enterica* :

يسبب التسمم الغذائي السالمونيلي *Salmonellosis* نتيجه تناول الاغذية الملوثة بها.

٣- *Shigella dysentery* :

يسبب التسمم الغذائي الشيغلي *Shigellosis* نتيجه تناول الاغذية الملوثة بها.

٤-*Serratia marcescens* :

ينتج صبغات داخلية (*Endopigments*) تسمى *Prodigiosin* يتلف الخبز حيث حوله الى اللون الاحمر ويسمى *Red bread*.

رابعا: العائلة البكتيرية العصوية السبورية *Bacillaceae* :

ان من اهم الاجناس العئدة لهذه العائلة والتي لها اهمية كبيرة جدا للاغذية هي *Bacillus* و *Clostridium* حيث تمتاز هذه الاجناس بتكوينها سبورات داخلية *Endospores* والتي تمتاز بانها مقاومة لدرجات الحرارة المستخدمة في الصناعات الغذائية ولذلك تعتبر هذه البكتريا المسؤول الرئيس عن تلف الاغذية المعاملة حراريا ومنا الاغذية المعلبة *Canned food* .

يمكن التفريق بين جنسي *Bacillus* و *Clostridium* تحت المجهر الضوئي الاعتيادي من خلال حجم السبور نسبة الى حجم الخلية البكتيرية وكلاتي:

- حجم السبور اصغر من حجم الخلية البكتيرية (اي ان الخلية البكتيرية غير منتفخة وطبيعية الحجم) كما في الانواع العائدة لجنس الـ *Bacillus* . هذا الجنس يعيش بصورة هوائية مجبرة

- حجم السبور اكبر من حجم الخلية البكتيرية (اي ان الخلية البكتيرية تكون منتفخة) كما في الانواع العائدة لجنس الـ *Clostridium* . هذا الجنس يعيش بصورة لاهوائية مجبرة

فيما يلي نذكر بعض الانواع العائدة لعائلة البكتيريا العصوية السبورية والمهمه للاغذية:

1 - *B. anthracis* :

تسبب مرض الجمرة الخبيثة *Anthrax* وتنتقل منها الى الانسان نتيجة التلامس معها ام مع لحمها في معامل اللحوم والجلود والدباغة.

- *B. subtilis* : 2

تتلف الاغذية النشوية والسكرية والبروتينية لاحتوائها على انزيمات الاميليز والبروتينيز وتكون مواد لزجة على الاغذية النشوية وتسبب المطاطية فيه.

- *B. cereus* : 3

تسبب التسممات الغذائية في الاغذية النشوية المطبوخة في المطاعم كالرز والبطاطا عند تركها ساعات عديدية في جو المطبخ الحارويمتاز هذا النوع بانتاج انزيم الرنين الذ يخثر الحليب الخام.

- *B. stearothermophile* : 4

يستخدم هذا النوع كـ *Bioassay* للكشف عن كفاءة عمل المعقام *(Autoclave)* حيت تقاوم سبوراته درجة الغليان اي انها تقاوم الحرارة التي تستخدم في عملية التعليب وتسبب التلف الحامضي المسطح بدون غازات (اي انه العلية التالفة تكون طبيعية وغير منتفخه على العكس من التلف الحامض الغير مسطح مع غازات حيث تكون العلبة منتفخه). ان الدرجة الحرارية المثلى لنمو هذا النوع هي ٦٠-٧٠ درجة مئوية.

- ان البكتريا التي التي تسبب التلف الحامضي المسطح بدون غازات لاتحتوي على انزيم *Formic acid dehydrogenase* وبذلك لايتحول حامض الفورميك الى *Co2* و *H2* وبذلك لا تنتفخ العلبة نتيجة لعدم توليد غاز *Co2*.

- ان البكتريا التي التي تسبب التلف الحامضي الغيرمسطح مع غازات تحتوي على انزيم *Formic acid dehydrogenase* وبذلك يتحول حامض الفورميك الى *Co2* و *H2* وبذلك تنتفخ العلبة نتيجة لتوليد غاز *Co2*.

- *Cl. butyricum*: 5

هذا النوع مسؤول عن التخمر البيوتريكي *Butyric acid fermentation* حيث يتلف الاغذية السكرية ويخمرها وينتج حامض نتن جدا هو *Butyric acid*.

- *Cl. nigrificans* (وحديثا اعيد تسميته الى *Desulfatomaculun nigrificanse*): 6

يحلل ويتلف الاغذية البروتينية وينتج مركب كبريتيد الهيدروجين*H2S* (لاحتوائه على انزيم *Cysteine desulfurase*) الذ ي يتفاعل مع الحديد الموجودة في العلبة ويكون راسب اسود فيها وخاصة في الاغذي المعلبة مثل البازلياء والفاصولياء واللحوم المعلبة.

- *Cl. botulinum* : 7

يسبب التسمم الغذائي البوتيليني *Botulism* في الاغذية المعلبة .

- *Cl. Perfringense* : 8

تسبب التسمم في اللحوم والدواجن والاسماك والاجبان ويمتاز بنوع خاص من التخمر يسمى التخمر العاصف (*Stormy fermentation*) وذلك لانتاجه كميات هائلة من الغازات والحوامض.

خامسا: عائلة المكورات *Micrococcaceae* :

تمتاز الاجناس العائدة لهذه العائلة بانها واسعة الانتشار في الاغذية حيث تسبب تلف الاغذية او التسممات الغذائية نتيجة الافرازها سموم معوية (*Enterotoxines*) ومن اهم الاجناس العئدة لها هي :

- *Micrococcus varians* : 1

اهم مايميزة هم مقاومته للاشعة المستخدمة في الصناعات الغذائية واهمها اشعة كاما وتتلف الاغذية المبردة وتقاوم عملية البسترة ويسبب تلف الحليب المبستر ويكون بقعا صفراء في الحليب المبستر.

- *Micrococcus luteus* : 2

اهم مايميزة هم مقاومته للاشعة المستخدمة في الصناعات الغذائية واهمها اشعة كاما وتتلف الاغذية المبردة كاللحوم والاجبان ويكون بقعا صفراء عليها.

- *Micrococcus rosous* : 3

اهم مايميزة هم مقاومته للاشعة المستخدمة في الصناعات الغذائية واهمها اشعة كاما وتتلف الاغذية المبردة كاللحوم والاجبان ويكون بقعا وردية اوحمراء عليها.

٤- *Staphylococcus aureus* :

يمتاز بانه موجب لفحص مخثر البلازما *Coagulase* وقدرتة على تخمير سكر المانيتول وانتاج الغاز هوائيا ولاهوائيا وتكون مستعمراته صفراء ذهبية (ومنها جائت التسمية*aureus*).
ان اهم مايميزة هو انتاجه لسموم معوية (*Enterotoxines*) تقاوم عمليات الطبخ ودرجة حرارة الغليان لمدة نصف ساعة وتسبب التسمم الغذائي.

سادسا: عائلة الزوائف الزنجارية *Pseudomonadaceae* :

تمتاز الانواع العائدة لهذه العائلة بتعدد نشاطاتها وتحليليها لاعقد المركبات فهي تحلل وتتلف كل انواع الاغذية السكرية والبروتينية والدهنية وكذلك تحلل المركبات الهيدروكاربونية والمبيدات ووالمشتقات النفطية ةتمتاز بانها محبة للبرودة (*Psychrophile*) وبالتالي تسبب تلف الاغذية المبردة . كذلك تمتاز

بتكوينها صبغات خارجيه (*Exopigments*) تفرز خارج الخلية البكتيرية على الاغذية وبالتالي تعطي لون للاغذية ومنها:

الصبغة الزرقاء *Pyocyanin* وتنتج من قبل *Pseudomonas aeruginosa*

الصبغة الصفراء المخضرة *Fluorescein* وتنتج من قبل *Pseudomonas fluorescens*

الصبغة السوداء *Melanin* وتنتج من قبل *Pseudomonas nigrificans*
ومن الانواع العائدة لهذه العائلة والمهمة للاغذية هي:

- *Pseudomonas nigrificans* : 1
يحلل الدهون والبروتين في الاغذية المبردة ويسب تزنخها. كذلك يكون صبغات صفراء مخضرة على هذه الاغذية
- *Pseudomonas nigrificans* : 2
يكون صبغات سوداء على الاغذية المبردة خاصة الاجبان والزبد.

سابعا: عائلة الملحييات *Halobacteriaceae* :

يقتصر وجود انواعها في الاغذية المملحة لحاجتها الى تركيز عالي من الملح فتسبب تلف الاسماك والاجبان واللحوم المملحة وتحتاج الى مايقارب ٢٥% ملح وتموت وتتحلل خلاياها عند انخفاض تركيز الملح الى ١٠% وتشمل هذه العائلة جنس العصيات الملحية *Halobacterium* والمكورات الملحية *Halococcus*

ثامنا: البكتريا الهراوية *Corynebacterium* وبكتريا حامض البروبيونيك *Propionibacterium* وبكتريا حامض الخليك *Acetobacter* :

تمتاز بكتريا حامض البروبيونيك *Propionibacterium* بتخميرها السكريات وانتاج حامض البروبيونيك *propionic acid* ولهذا تستخدم بانتاج انواع من الجبن السويسري وكذلك تستخدم لانتاج هذا الحامض واستخدامه كمواد حافظة للاغذية.

اما بالنسبة لبكتريا حامض الخليك *Acetobacter* حيث تخمر السكريات لتنتج حامض الخليك *Acetic acid* وبذلك يستخدم في صناعة الخل بالاضافة الى انه يسبب تلف الاغذية التي ينمو فيها وذلك لتكوينه حامض الخليك.

فيما يخص البكتريا الهراوية وخصوصا النوع *Corynebacterium diphtheria* تمتاز بانها تكون مرض الخناق(*Diphtheria*) للاطفال نتيجة شرب الحليب الملوث بهذه البكتريا.

تاسعا: بكتريا متفرقة

- *Mycobacterium tuberculosis* : 1

تسبب مرض السل الرئوي نتيجة لشرب الحليب الملوث بها في حين يسبب النوع *Mycobacterium bovis* مرض السل البقري اما النوع *Mycobacterium leprae* فيسبب مرض الجذام وكل هذه الامراض سببها تلوث الحليب بهذه العصيات.

- *Vibrio cholera* : 2

يسبب مرض الكوليرا نتيجة لتواجده في الغذاء الملوث.

- *Brucella melitensis* : 3

تسبب مرض الحمى المتموجه او حمى مالطه(*Undulating fever or Malta fever)* نتيجة لاكل الجبن او اللبن اومشتقاتها الملوثة بهذه البكتريا.

- *Photobacterium phosphorum*: 4

تمتاز بانها بكتلايا ضوئية لامتلاكها انزيك *Luciferinase* الذي يوكسد يؤكسد مركب الـ *luciferin* فيولد الضوء وكذلك يسبب تلف الاسماك البحرية.

Filename:	المحاضرةالثانيه
Directory:	D:\Food microbiology Lectures and syllebas
Template:	C:\Users\Ghaider\AppData\Roaming\Microsoft\Templates\Normal.dotm
Title:	الاحياء المجهرية الغذائية [food microbiology
Subject:	
Author:	Ghaider
Keywords:	
Comments:	
Creation Date:	10/4/2013 9:17:00 PM
Change Number:	62
Last Saved On:	10/18/2013 7:51:00 PM
Last Saved By:	Ghaider
Total Editing Time:	309 Minutes
Last Printed On:	10/18/2013 7:53:00 PM

As of Last Complete Printing

Number of Pages:	6
Number of Words:	1,236 (approx.)
Number of Characters:	7,050 (approx.)

المحاضرة الثالثة:الفطريات المهمة للاغذية

الفطريات كائنات اما ان تكون احادية الخلية مثل الخمائر او متعددة الخلايا مثل الاعفان او تكون متغيرة ذات اشكال متعدده (dimorphic) (تكون تحت ظروف خاصة احادية الخلية وتتحول الى متعددة الخلايا في ظروف اخرى).

بشكل مبسط تتكون الفطريات المهمه للاغذية (الاعفان) من خيوط تسمى Hyphae والتي تكون مقسمه بحواز عرضية وتسمى (uninucleated septataed hyphae) او تكون غير مقسمه بحواز عرضية وتسمى (Multinucleated non septataed hyphae) تتفرع وتتشابك لتكون الغزل الفطري Mycelium ووالذي ينقسم الى قسمين :

Vegetative mycelium: يفور داخل الاغذية لكي يمتص العناصر الغذائية المهمة للنمو.

Reproductive mycelium: يرتفع الى الاعلى لكي يحمل التراكيب التكاثرية.

تتكاثر جنسيا ولاجنسيا باستخدام السبورات وهنالك انواع من السبورات اللاجنسية وهي:

1- السبورات المغلفه sporangiospore
2- السبورات العارية conidiospore
3- السبورات الكلاميدية Chlamydospore
4- السبورات المفصلية Arthrospore

اما السبورات الجنسية فهي:

1- السبورا الكيسية Ascospore
2- السبورات البازيدية Basidiospore
3- السبورات الاقحية Zygospore

تكمن اهمية الفطريات بالنسبة للاغذية الى كونها:

١-تسبب تلف الاغذية (مضار)

٢-تسبب تسممات غذائية (مضار)

٣-تدخل في بعض الصناعات الغذائية (فائدة)

تمتاز الاعفان التي تسبب تلفا للاغذية عن البكتريا المهمه للاغذية بما يلي :

١-نموها على الغذاء غزيز وكثيف جدا

٢-يكون على هيئة غزل قطني كثيف ذو الوان جذابه

٣-اكثر تحملا للجفاف والملوحه

يتم التعرف على الاعفان المهمة للاغذية من خلال فحص مايلي:

- لون المستعمره على الغذاء وشكلها
- تراكيب التكاثر اللاجنسية وتشمل لون وشكل وترتيب التراكيب الاجنسية

ان من اهم الاوساط المستخدمه في عزل الاعفات هي:

Malt extract agar

Gzapek Dox agar

Potato dextrose agar

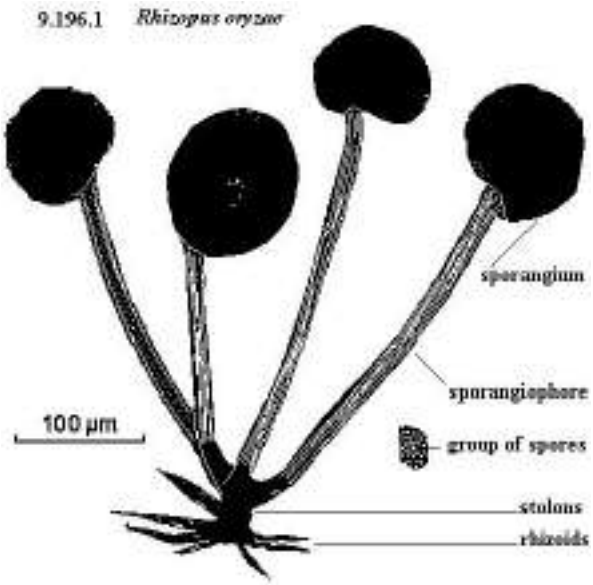
Sabouraud agar

اما الطريقة المثلى لتحضير شرائح الاعفان من الاغذية هي طريقة (Agar block slide culture).

وفيما يلي ندرج امثلة عديدة على الاعفان المهمة للاغذية:

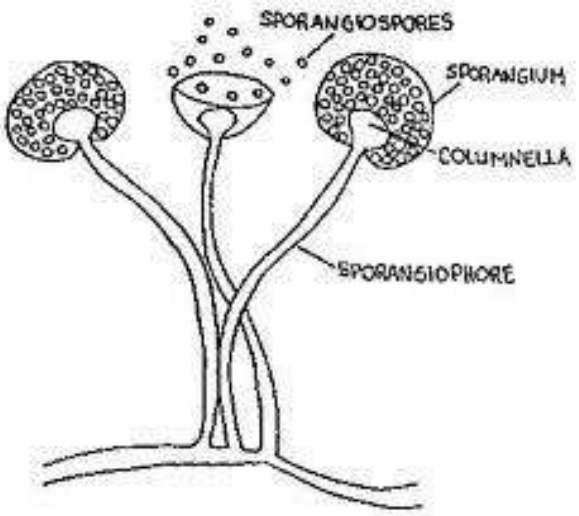
١ - *Rhizopus nigricans* :

يمتاز بتكوينه هايفات غير مقسمه (Multinucleated non septataed hyphae) ويتكاثر جنسيا بواسطة الـ zygospores . يكون ساق على الاغذية تنبعث منه اشباه الجذور Rhizoids داخل الاغذية لكي تمتص المغذيات حيث تنشا عند نقطة التقائها بالساق حوامل الحافظات sporangiophore التي تحمل الـ sporangium التي تحتوي بداخلها على الـ sporangiospore ذات اللون الاسود. ينمو على الفواكة والخضر التالفة ويسبب تلف المعجنات ويكون لون اسود عليها ويسمى عفن الخبز الاسود black bread mold.



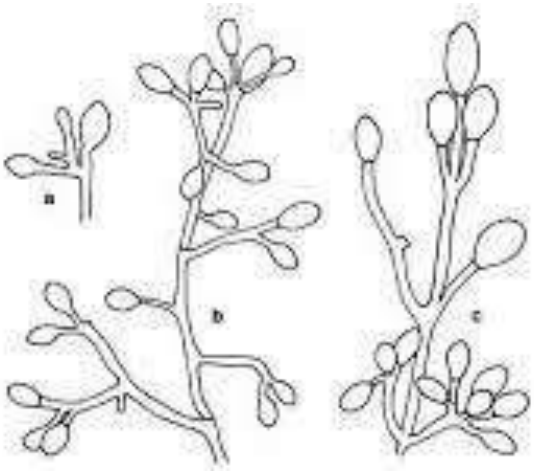
2- :*Mucor rouxii*

يعود الى عائلة الـ phycomycetes ويختلف عن جنس الـ *Rhizopus* الذي يعود لنفس العائلة بعدم وجود اشباة الجذور الـrhizoids ويستخدم هذا النوع في صناعة الاجبان.تتكاثر جنسيا بالـ zygospore ولاجنسيا بـsporangiospore .



3- :*Sporotrichum*

يمتاز بكون الهايفات تكون مقسمه (uninucleated septated hyphae) ويتكاثر لاجنسيا بواسطة السبورات العارية Conidiospore يكون مستعمرات بيضاء ويسبب تلف اللحوم المبردة .

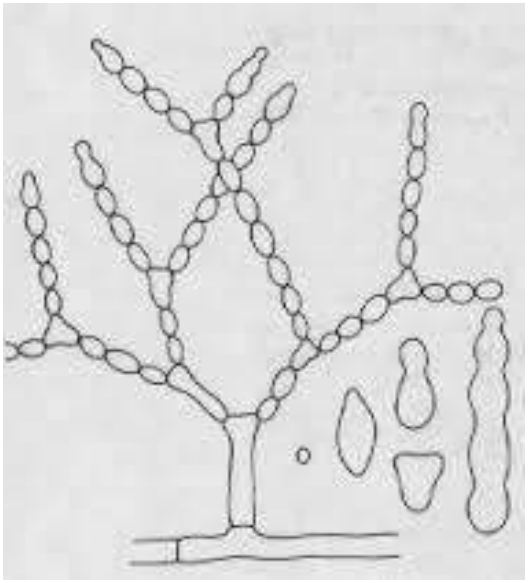


4- :*Botrytis*

يمتاز بكون الهايفات تكون مقسمه (uninucleated septated hyphae) ويتكاثر لاجنسيا بواسطة السبورات العارية Conidiospore وتترتب الكونيديات بشكل عناقيد العنب يكون لونها رصاصي لذا يسمى بالعفن الرصاصي Gray rot ويسبب تلف الفواكه والخضر واهمها العنب .

5- :*Monilia*

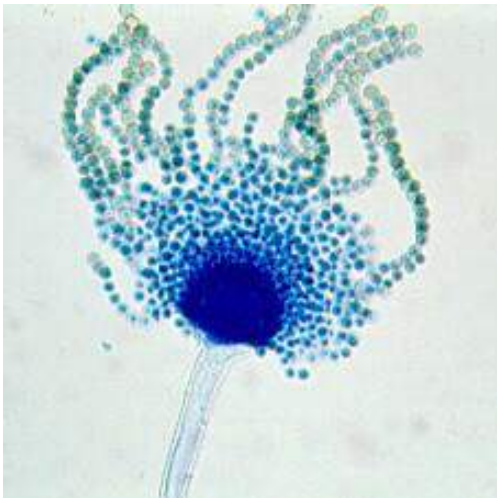
تمتاز بامتلاكها كونيديا متفرعة بسبب تبرعم الكونيديا ويتكاثر لاجنسيا بواسطة السبورات العارية Conidiospore وتكون هايفاتها مقسمه (uninucleated septated hyphae) ولون الكونيديا حمراء وتسبب تلف شرائح الخبز المكموره في اكياس النايلون ويحولها الى اللون الاحمر لذا يسمى غفن الخبز الاحمر red or bloody bread mold .



6- :*Aspergillus*

يتحمل كل المعاملات التي تجري على الاغذية كالتجفيف والملوحة والسكر والتشعيع ويتكاثر لاجنسيا بواسطة السبورات العارية Conidiospore وتكون هايفاتها مقسمه (uninucleated septated hyphae) . واهم انواعه:

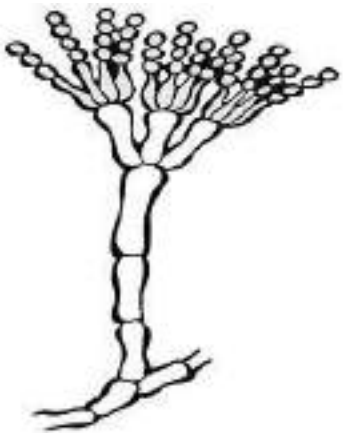
- *A. niger* : يكون كونيديا سوداء ويسبب تلف الاغذية الطازجة.
- A. flavus: يمتاز بانتاجه لسموم الـ < Aflatoxin



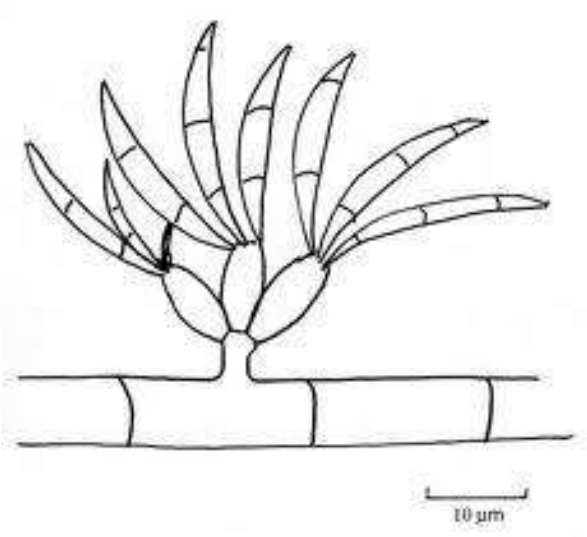
7- :*Penicillium*

يتكاثر لاجنسيا بواسطة السبورات العارية Conidiospore وتكون هايفاتها مقسمه (uninucleated septated hyphae) تمتاز حوامل الكونيديا بتفرعها وتكون مايشبه المكنسهالعادية وتكون مستعمرات مختلفة الالوان. ومن اهم انواعه:

- *P. expansum* : يصيب التفاح ويسبب تلفه ويكون مستعمرات زيتونية وينتج احد اخطر انواع السموم الفطرية وهي سموم Patulin.
- *P. camemberti*: يستخدم في انتاج الجبن الرصاصي Camembert.
- P. *roqueforti*: يستخدم في انتاج الجبن الازرق Roquefort.



8- *Fusarium*: يكون كونيديا كبيرة تشبه المغزل وردية اللون وسيبب تلف الفواكه.



Filename: المحاضرة الثالثة
Directory: D:\Food microbiology Lectures and syllebas
Template: C:\Users\Ghaider\AppData\Roaming\Microsoft\Templates\Normal.dotm
Title: الاحياء المجهرية الغذائية [food microbiology
Subject:
Author: Ghaider
Keywords:
Comments:
Creation Date: 10/4/2013 9:17:00 PM
Change Number: 68
Last Saved On: 10/18/2013 7:52:00 PM
Last Saved By: Ghaider
Total Editing Time: 488 Minutes
Last Printed On: 10/18/2013 7:53:00 PM
As of Last Complete Printing
Number of Pages: 6
Number of Words: 608 (approx.)
Number of Characters: 3,466 (approx.)

المحاضرة الرابعة: الخمائر المهمة للاغذية

كما اسلفنا في المحاضرة السابقة فان الاحياء المجهرية المهمة للاغذية اما ان يكون لها دور في صناعة الاغذية(فائدة) او دور في تلف الاغذية والتسممات الغذائية (مضار)، وهذا ينطبق ايضا على الخمائر حيث ان بعضها يستخدم في الصناعات الغذائية كصناعة الخبز والمعجنات والمشروبات والدهون وصناعة بروتين الخلية الواحدة (single cell protein) .اما المضار التي يسببها فهي تلف المواد الغذائية بمختلف انواعها.

الخمائر تكون احادية الخلية لكن في الاحيان وتحت ظروف معينه تتحول الى متعددة الخلايا خيطية كما في *Candida albicans* . تتكاثر الخمائر لاجنسيا بواسطة التبرعم وجنسيا بواسطة تكوين السبورات الكيسية. تكون الخمائر مايسمى بالمايسليوم الكاذب Pseudomycelium نتيجة لتبرعم الخمائر وبقائها متصلة مع الام.

التبرعم اما يكون طرفي Bipolar او على كل الخلية Multipolar.

يمنكن ان تقسم الخمائر الى قسمين على اساس التكاثر الجنسي الى:

- الخمائر الحقيقية True yeast وتسمى ايضا Ascosporogenous لانها تتكاثر جنسيا بتكوينها سبورات كيسية. ومثالها *Saccharomyces spp.*
- الخمائر الكاذبة False yeast وتسمى ايضا Asporogenous لانها لاتكون سبورات كيسية ولاتتكاثر جنسيا. ومثالها *Cryptococcus spp.*

كذلك يمكن ان تقسم على اساس العمليات الايضية الى:

- ✓ Oxidative yeast: وتسمى ايضا بخمائر القمه Top tyeast (لانها تفضل النمو على السطح) حيث تستخدم في صناعة البيرة الانكليزية وتمتاز بانتاجها كميات كبيرةمن Co2 وكميات قليلة من الكحول.
- ✓ Fermentative yeast: وتسمى ايضا بخمائر القعر Bottom tyeast (لانها تفضل النمو في القعر) حيث تستخدم في صناعة البيرة الـ lager وتمتاز بانتاجها كميات كبيرةمن الكحول وكميات قليلة من Co2.

وفيما يلي ندرج امثلة عديدة على الخمائر المهمة للاغذية:

١-*Endomyces* **:**تمتاز بامتلاكها True mycelium وسبورات كيسية ومفصلية (arthrospore) . استخدمت في الحرب العالمية الثانية لانتاج الدهون.

٢-Endomycopsis : خمائر تأكسدية تتلف الاغذية السكرية والفواكه وتعتبر خمائر غشائية لتكوينها اغشية على سطح السائل.(top yeast)

٣- *Saccharomyces*: خمائر تخمرية تستخدم في صناعة الخبز وتعتبر خمائر غيرغشائية لعدم تكوينها اغشية على سطح السائل.(bottom yeast) ٤-*Candida lipolytica* : يسبب تلف الزبدة والدهون.

٥- *Candida utilis* : يستخدم في صماعة بروتين الخلية الواحدة Single cell protein

٦-*Rhodotorula* : تنتج مستعمرات مختلفة الالوان وردية او حمراء اوبرتقالية صفراءعلى الاغذية ولذا تسمى بالخمائر المنتجة للصبغات Pigment producing yeast

Filename:	المحاضرة الرابعة
Directory:	D:\Food microbiology Lectures and syllebas
Template:	C:\Users\Ghaider\AppData\Roaming\Microsoft\Templates\Normal.dotm
Title:	الاحياء المجهرية الغذائية [food microbiology
Subject:	
Author:	Ghaider
Keywords:	
Comments:	
Creation Date:	10/4/2013 9:17:00 PM
Change Number:	74
Last Saved On:	10/19/2013 9:44:00 AM
Last Saved By:	Ghaider
Total Editing Time:	600 Minutes
Last Printed On:	10/20/2013 8:53:00 AM

As of Last Complete Printing

Number of Pages: 2

Number of Words: 328 (approx.)

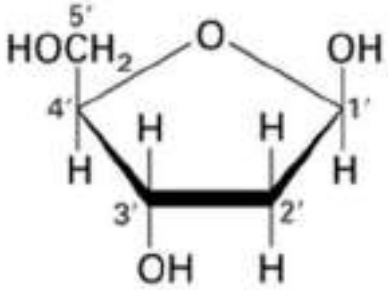
Number of Characters: 1,875 (approx.)

المختبر الاول

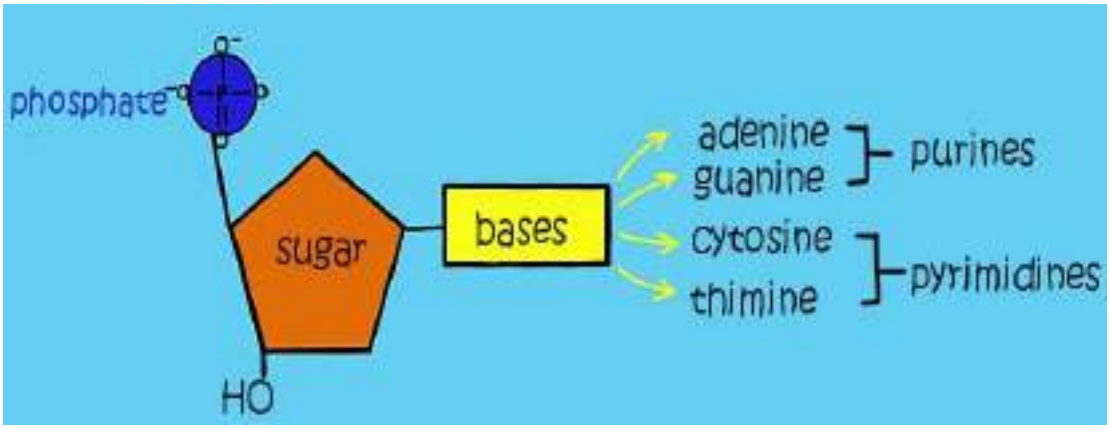
استخلاص الدنا DNA Extraction

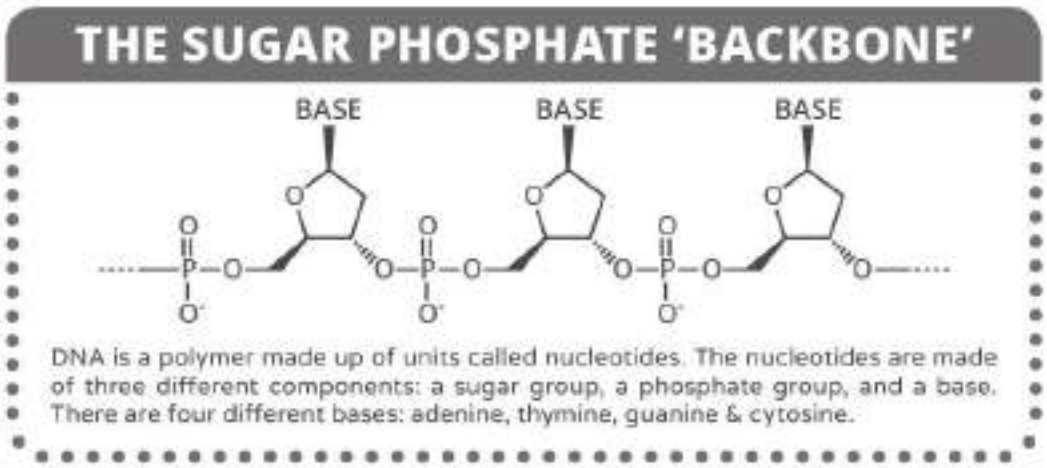
المقدمة:

يتركب الحمض النووي منقوص الاوكسجين DNA من سلسلة من الوحدات البنائية تعرف ب **نيوكلوتيد** اي ان الدنا هو polynucleotides . تتركب النيزكليوتيده بدورها من **سكر الرايبوز** الخماسي منقوص الاوكسجين (في ذرة الكاربون رقم 2) + **قاعده نتروجينية** (مرتبطة بسكر الريبوز في ذرة الكاربون رقم 1) + **مجموعة فوسفات** (مرتبطة بسكر الريبوز في ذرة الكاربون رقم 5) وكما مبين ادناه:



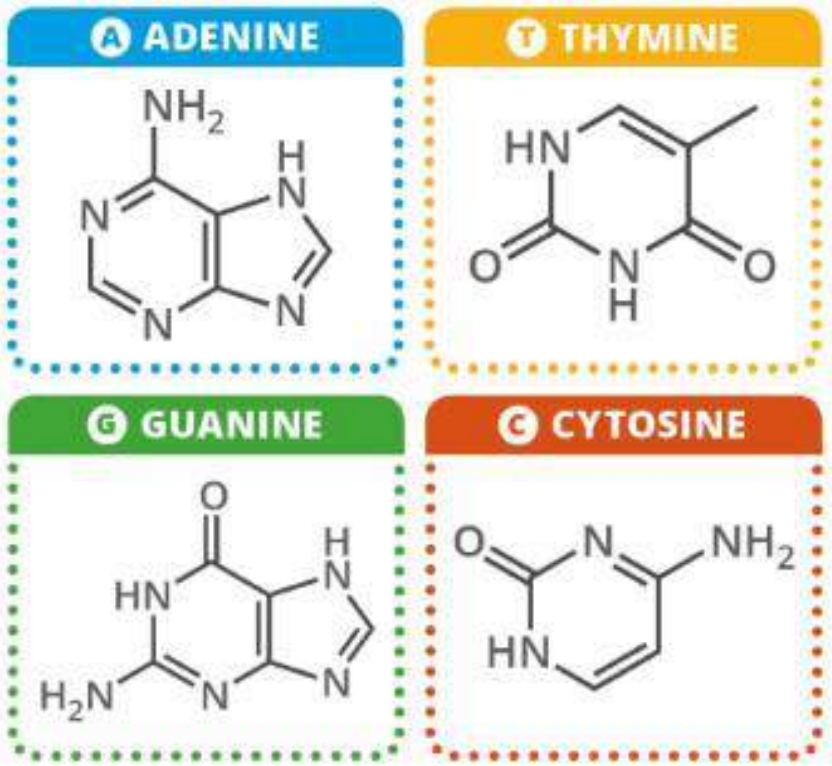
2-Deoxyribose

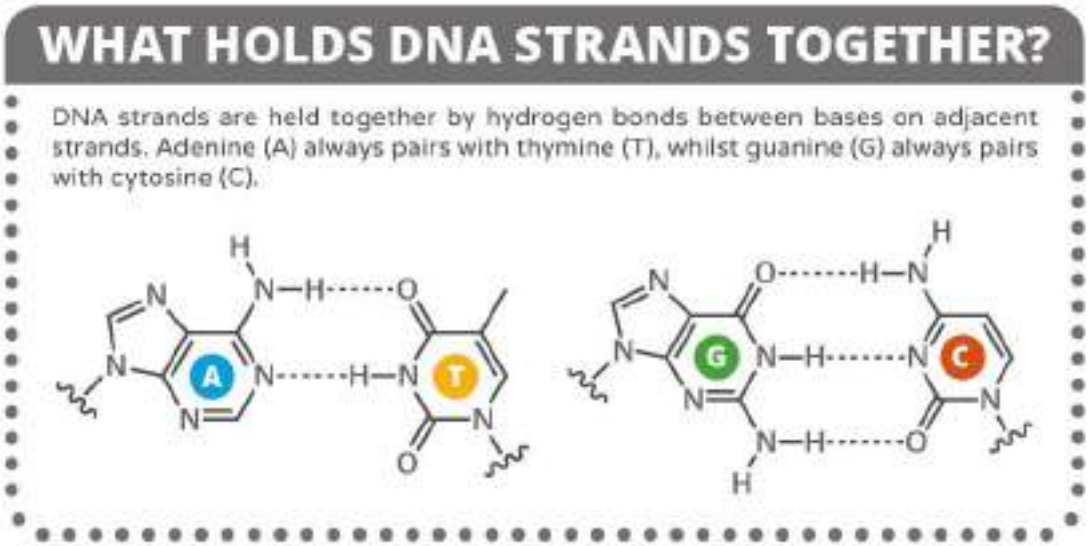




هنالك مجموعتين من القواعد النتروجينية وهي:

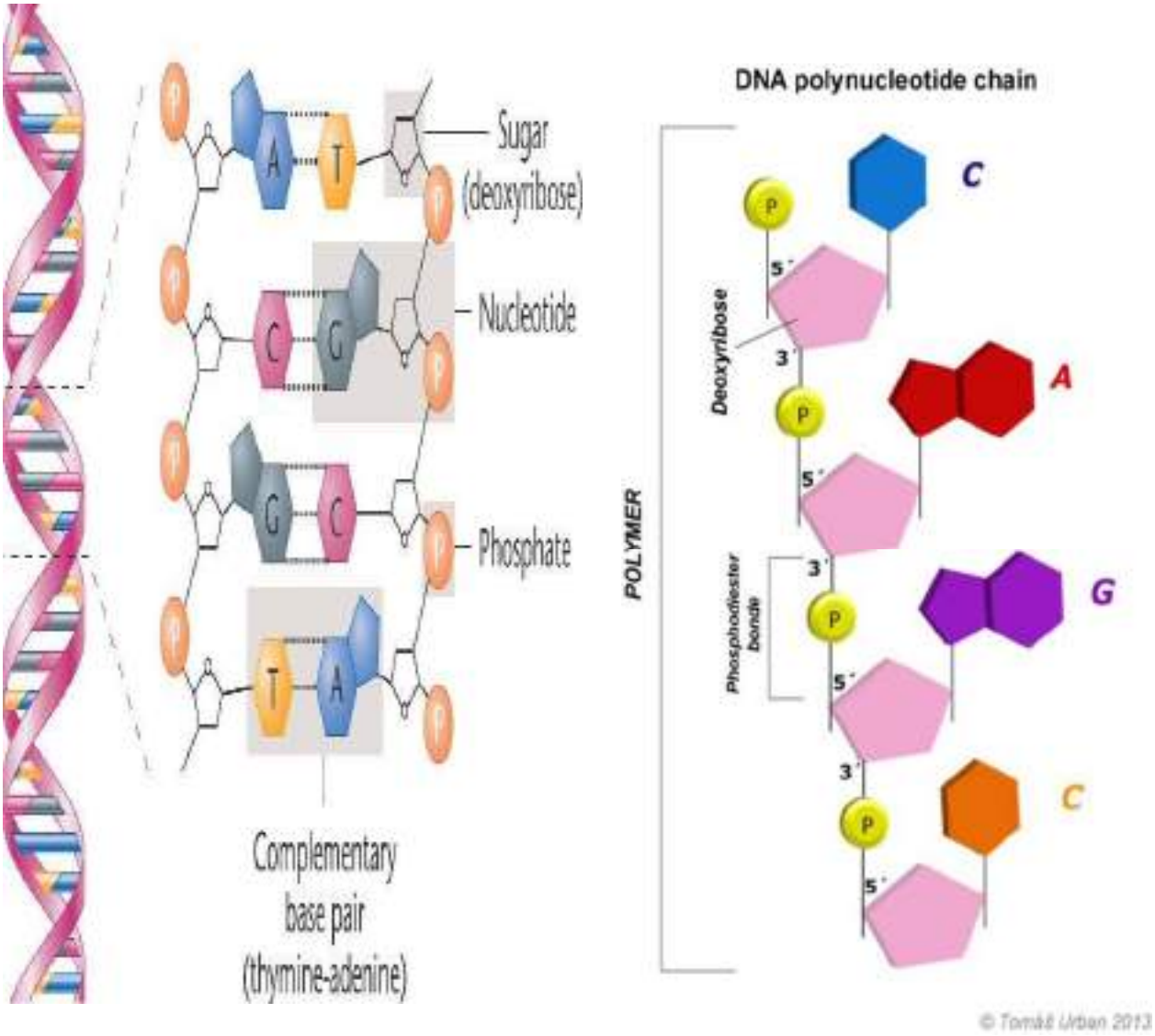
1- بيورينات purines وتكون ثنائية الحلقة وتشمل الادنين والكوانين
2- بيرميدينات pyrimidines وتكون احادية الحلقة وتشمل الثايمين و السايتوسين واليوراسيل





كما هو الحال للبروتين فان الدنا له:

تركيب اولي : ويمثل متعدد النيوكليوتيد في الشريط الواحد **تركيب ثانوي**: ويتمثل بالحلزون المزدوج للدنا **تركيب ثالثي**: ويتمثل بالالتفاف الفائق للدنا **تركيب رابعي** : ويتمثل بالدنا المنتظم في الكروموسوم



هنالك ثلاث انواع من الاواصر في جزيئة الدنا المزدوج DNA double helix:

1-اصره كلايكوسيديه ضمن النيوكليوتيده الواحده

2-اصره تساهمية بين النيوكليوتيدات في الشريط الواحد Phosphodiester bond

3-اصره هيدروجينية تربط بين شريطي الدنا

مما تقدم اعلاه يجب مراعاة الامور التالية عند استخلاص الدنا:

1-الحصول على اكبر كمية من الدنا بنقاوة عالية

2-ان يكون الدنا المستخلص سليم

المختبر الثاني

ان اي دراسة وراثيه للكائنات الحيه تتطلب استخلاص (استخراج) جزيئة DNA نقية من العينة البيولوجية لغرض استخدامها في الدراسات الوراثية المختلفة لذلك فقد قام العلماء والباحثين بتطوير عدد من الطرق لاستخلاص الدنا تختلف في اسسها ومتطلباتها ولكل منها محاسن ومساوئ وهي كمايلي

1 Organic solvent Method - طريقة المذيبات العضوية
2 Salting out Method - طريقة التمليح الخارجي
3 Silica Membrane Method - طريقه مرشحات السيليكا
4- طريقة المبادلات الايونية Chelix Method

مراحل عملية الاستخلاص: Basic Steps of DNA Extraction

بصوره عامه اي عملية استخلاص تمر بالمراحل التالية:

1 - تهيئة الخلايا او العينة Sample or Cell preparation

ان اي عينه بيولوجية يراد استخلاص الدنا منها يجب ان يتم تحضيرها وتهيئتها لعملية الاستخلاص وكما يلي:

***عينة الدم** : يتم من خلال سحب الدم في EDTA tube وليس heparin tube ؟
***عينة القشع**: تعامل معامله خاصه بمادة تسمى ب liquefier ومثالها (NaOH-NALC)لتفكيك المواد المخاطية مما يسهل ازالتها والتخلص منها.
***عينة البكتريا**: اذا كانت مستعمرات نامية على وسط صلب فيتم قشطها واعادة تعليقها بماده PBS ومن ثم تخلط. اذا كانت نامية في وسط لوريا Luria Broth فيتم عمل سنترفيوج لترسيب البكتريا واهمال الرائق واخذ راسب البكتريا المعلق بكمية من LB ومن ثم ينقل الى تيوب 1.5ml وعمل سنترفيوج واهمال الرائق.

(NaOH-NALC)= sodium hydroxide + N, acetyl L-cysteine

***عينة العظم**: يستخدم التنظيف الميكانيكي بأداة حاده ومن ثم يستخدم هايبوكلورات الصوديوم لإزالة المواد العالقة بالعظم ومن ثم يقص جزي من العظم ويطحن ونهيئ العالق باستخدام PBS

2 Cells Wash - غسل الخلايا

تغسل الخلايا باستخدام محلول PBS ؟ على الاقل ثلاث مرات ومن ثم نعمل سنترفيوج لإهمال الرائق واخذ الخلايا المترسبة. تمثل هذه الخطوة مع الخطوة السابقة عملية ال cell harvesting

3 Cell wall and membrane lysis - تحليل الجدار او الغشاء الحيوي

تعتمد هذه الخطوة على نوع الخلية المراد استخلاص الدنا منها حيث تختلف الخلايا البكتيرية عن الحيوانية وكذلك عن النباتية وبالتالي فان المواد المستخدمة تختلف .

#للخلايا صعبة التحلل مثل خلايا الحشرات والنبات والفطريات يفضل استخدام ال cooling shock باستخدام ال liquid nitrogen .
نتيجة لهذه الخطوة سنحصل على حلالة الخلايا cell lysate الذي يحتوي على كل المكونات الخلوية بضمنها ال DNA .

4- مسخ البروتينات والانزيمات و ازاله الشوائب Protein precipitation

للتخلص من كل المكونات الخلوية عدا الدنا يتوجب علينا مسخ البروتينات والتخلص من الدهون وتمتاز هذه الخطوة بانها عامة حيث تستخدم مواد معينه لك انواع العينات المستخدمة. ان مسخ البروتينات والفوسفوليبيد هو فقدان ذائبية هذه المواد وبالتالي يمكن ترسيبها وفصلها وبقاء الدنا ذائب في المحلول المائي وبالتالي تسحب الطبقة المائية الحاوية على الدنا للخطوات اللاحقة لترسيب الدنا .

5- ترسيب الـ DNA باستخدام الكحولات Dehydration

ويتم ذلك من خلال استخدام كحول الايثانول او الايزوبروبانول اوالكحول الايزواميلي والذي يعمل بدوره على عملية سحب الماء Dehydration وترسيب الدنا .

6- غسل جزيئات الحامض النووي Washing

ويتم ذلك من خلال استخدام كحول الايثانول او الايزوبروبانول اوالكحول الايزواميلي والذي يعمل بدوره على عملية سحب الماء Dehydration وبالتالي غسل الدنا.

7- اعاده جزيئات الحامض النووي الى حالتها الذائبة Rehydration

ويتم ذلك من خلال استخدام دارئ TE (pH 8.4) والذي بدوره يحافظ على الدنا بالهيئة الذائبة

فيما يلي سنذكر مميزات كل طريقه من الطرق الثلاث السابقة الذكر

اولا :طريقة المذيبات العضوية Organic Solvent Method

يستخدم خليط من المذيبات العضوية بعد عمليه تحطيم الخلايا لغرض التخلص من الاملاح والبروتينات التي تنفصل في طبقه المذيبات العضوية ويبقى الحامض النووي في الطبقة المائية ، من المحاليل العضوية المستخدمة الفينول والكلوروفورم والكحول الايزواميلي

<u>مساوئ هذه الطريقة</u> :

*استعمال كميات كبيره من مواد سامه (الفينول والكلوروفورم) التي يجب التخلص منها بطرق بيولوجية صحيحه.

*ان الحامض النووي المستخلص بهذه الطريقة يكون قليل النقاوة.

<u>محاسن هذه الطريقة</u> :

*غير مكلفة اقتصاديا (رخيصة.)

*ممكن الحصول على تراكيز عالية من الدنا.

المواد المستخدمة في هذه الطريقة:

1- دارئ TE :

يحضر بإذابة 10 ملي مولر من Tris-Hcl و 1 ملي مولر من EDTA في كمية من الماء المقطر وضبط الرقم الهيدروجيني الى 8 ثم اكمل الحجم الى لتر واحد بالماء المقطر وعقم بالمؤصدة. **يستخدم لإذابة الدنا ويحافظ عليه وممكن ان يحفظ لفترات طويله تحت درجه حراره تراوح من 4 الى 02- مئوي.**

2- محلول SDS بتركيز% 25 :

حضر بإذابة 25 غم من مادة SDS في 100 مليلتر من محلول Saline-EDTA وضبط الاس الهيدروجيني إلى 8. **يستخدم لمسخ البروتينات وتذويب الدهون Lipid Solublization وبالتالي تحطيم الاغشية الخلوية وخروج مكونات الخلية بضمنها الدنا.**

3- محلول 5 مولار كلوريد الصوديوم

حضر هذا المحلول بإذابة 5.282 غم من كلوريد الصوديوم في لتر من الماء المقطر وعقم بالمؤصدة بدرجة 121°م وضغط 15 باوند/انج2 لمدة 15 دقيقة.

4 - خليط المذيبات العضوية Organic Solvent Solution

تم تحضير هذا الخليط انياً بمزج الكلوروفورم والكحول الايزواميلي بنسبة(24 :1). **يستخدم هذا الخليط لتكون طبقتين معزولتين تماما الطبقة المائية الحاوية على الدنا وطبقة المذيبات العضوية الحاوية على بقية المكونات.**

طريقه العمل:

1) تلقيح 10 مل من الـ Lauria Bretani broth (LB) بمستعمرة مفردة نقيه وفتية من بكتريا الـ *E. coli*، وتحضن لمدة 18 ساعة بدرجة حرارة 37 م

2) يتم اجراء طرد مركزي للمزرعة البكتيرية بسرعة 6000 دورة / الدقيقة لمدة نصف ساعة ثم اهمل الراشح واخذ الراسب.

3) يغسل الراسب بـ 2 مل من دارئ TE ثم ينبذ بسرعة 6000 دورة / الدقيقة لمدة 15 دقيقة، تم تكرر عملية الغسل لمرتين او ثلاث مرات.

4) يضاف 600 مايكروليتر من محلول الـ SDS تركيزه 25% واختياريا 2 مايكروليتر من محلول الـ RNase ويوضع في حمام مائي بدرجة 55 م لمده ربع ساعه.

6) يضاف 2 ملليلتر من محلول كلوريد الصوديوم بتركيز 5مولاري ويتم تقليب الانبوبة مرتين او ثلاث مرات ثم تترك الانابيب بدرجة حرارة الغرفة.

7) يضاف (حجم/ حجم) من خليط الكلوروفورم – الكحول الايزواميلي(24:1) وتقلب الانابيب برفق لمدة نصف ساعة ،ثم تنبيذ الانابيب بالمنبذ المبرد بسرعة 6000 دورة/ الدقيقة لمدة نصف ساعة ، تكرر هذه الخطوة 2- 3 مرات . كنتيجة لهذه الخطوة ستتكون طبقتين عليا مائية حاويه على الدنا وطبقة المذيبات الى الاسفل منها حاوية على بقية المكونات.

8) يتم سحب الطبقة المائية الحاوية على الدنا بهدوء وتنقل الى انابيب نظيفة ومعقمة ،ثم يضاف لها كحول ايزوبروبانول و تقلب الانابيب بهدوء الى ان تظهر شبكه مرئية بيضاء(DNA).

9) ترفع شبكة الـ DNA المترسبة بواسطة ماصة باستور ذات نهاية معقوفة ومغلقة و تنقل الى انابيب ابندروف معقمة وتغسل بكحول الايثانول تركيزه 70% المبرد الى درجة 5 مئوي لمرتين الى 3 مرات ،ثم تترك الانابيب بدرجة حرارة الغرفة نصف ساعة لغرض تطاير الايثانول.

10) يذاب راسب الـDNA بأضافة 50 مايكروليتر من دارئ الـ TE ثم تحفظ بدرجة(- 20 م) لحين الاستعمال.

ملاحظه

- اذا كانت البكتريا موجبه لصبغه غرام يجب استخدام انزيم خاص(lysozyme) لغرض خلخله جدار الخليه قبل اضافه محلول الـ SDS وبالتالي سهوله تحطيمه
- يتم استخدام انابيب ابندروف او انابيب خاصه من البولي اثلين ولاتستخدم الانابيب الزجاجيه او انابيب البلاستيك الاعتياديه (لماذا)
- ان ماده الـ EDTA ماده مخلبيه chelating agent فادتها سحب الذرات الموجبه من جدار الخليه مما يسبب خلخلته وسهوله تحطمه
- ماده الـ SDS ماده منظفه detergent تستخدم لمسخ البروتينات
- يجب ان يكون الاس الهيدروجيني للمحاليل المستخدمه 8 (لماذا)

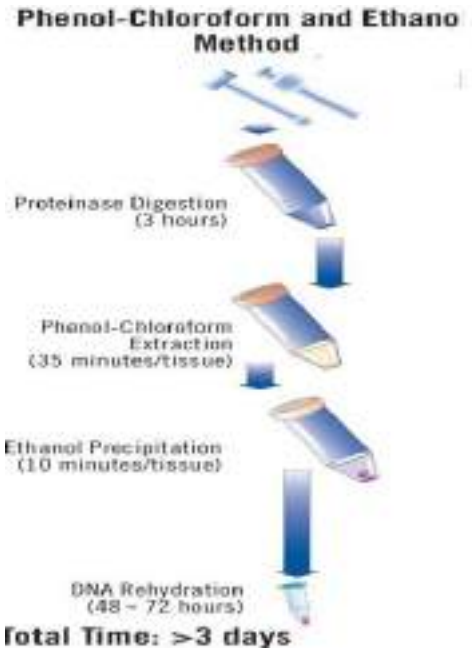
5 : (Loading buffer)- دارئ التحميل

حضر بإذابة 4 غم من مادة السكروز في 10 مل من الماء المقطر واضيفت اليه صبغة بروموفينول الازرق(Bromophenol blue) وحفظ بدرجة حرارة 4 م لحين الاستعمال.

6- دارئ TBE :

حضر بإذابة 089.0 مول من مادة Tris-base و 089.0 مول من حامض البوريك و002.0 مول من EDTA في كمية من الماء المقطر وعدل الرقم الهيدروجيني إلى 8 ثم أكمل الحجم إلى 1 لتر وعقم بالموصدة و فيما بعدحفظ بدرجة 4 م لحين الاستعمال

7- الايزوبروبانول يستخدم لترسيب الـ DNA
8- الايثانول يستخدم لغسل الـ DNA



طريقه التمليح الخارجي Salting-out methods

يستخدم في هذه الطريقه محاليل ملحيه عاليه التركيز مثل اسيتات البوتاسيوم واسيتات الامونيوم لغرض تحطيم الخلايا ومسخ البروتينات ،ثم تزال هذه الاملاح باجراء طرد مركزي ثم تضاف الكحولات لترسيب الـ DNA .هذه الطريقه غير كفوئه بسبب بقاء رواسب ملحيه من المحاليل المستخدمه مما يستدعي استخدام طرق تنقيه اخرى للتخلص من هذه الرواسب لذا تعتبر طريق مكلفه

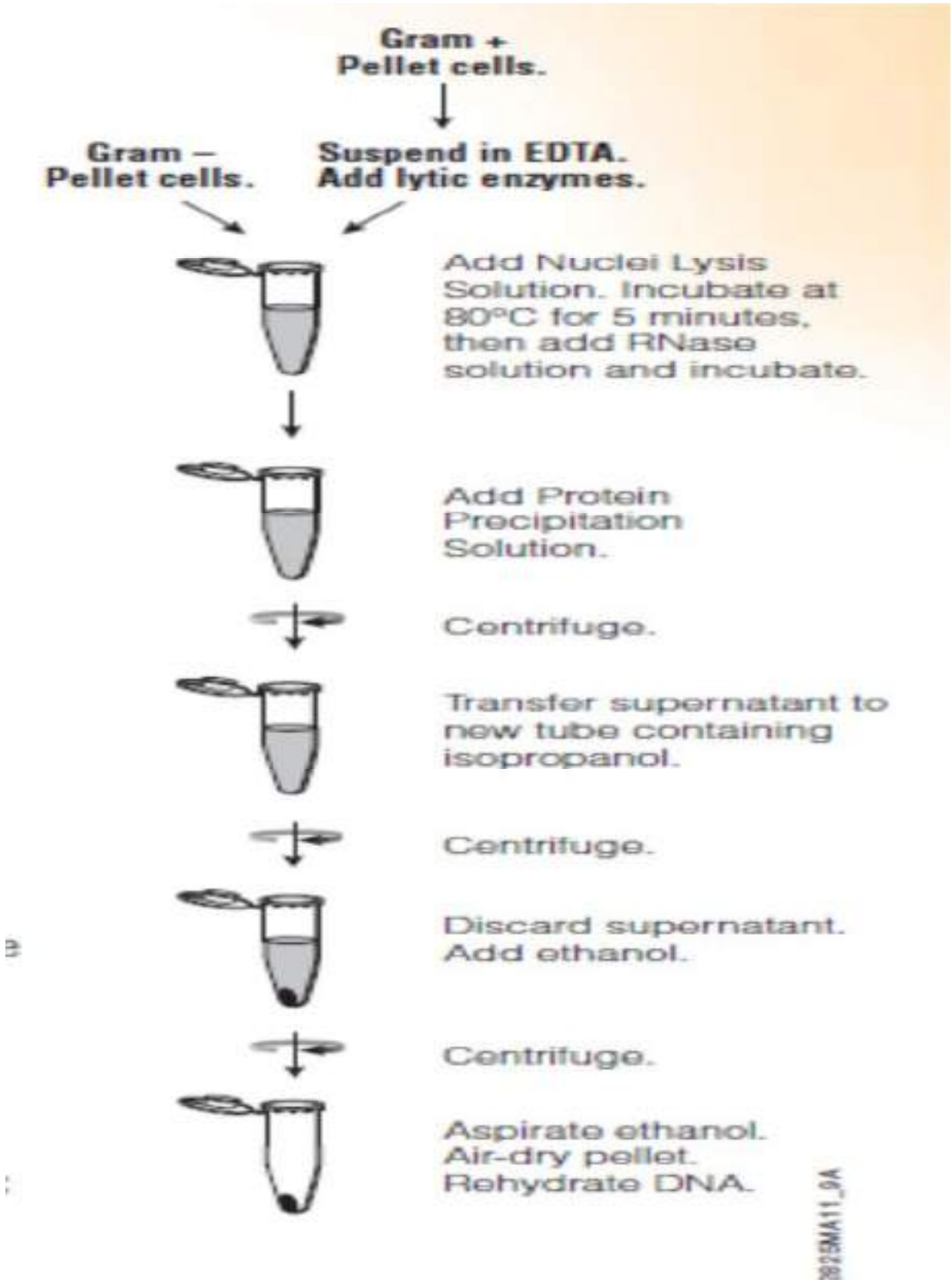
طريقه الكت Promega DNA extraction kit

تكون هذه الطريقه اسرع كما ان نقاوه الحامض النووي المستخلص عاليه الا ان كميته قليله وتتم باستخدام محاليل جاهزه هي: -

المحلول 1 - Cell lysis solution & Nuclei lysis solution المحاليل المحطمه لجدار الخليه
2 - Protein precipitation solution المرسب للبروتينات
3 - DNA rehydration solution محلول منظم يستخدم لاذابه الـ DNA
(ما الغرض من حفظ الـ DNA بصورته الذائبه)
4- الايزوبروبانول يستخدم لترسيب الـ DNA
5- الايثانول يستخدم لغسل الـ DNA

طريقه العمل

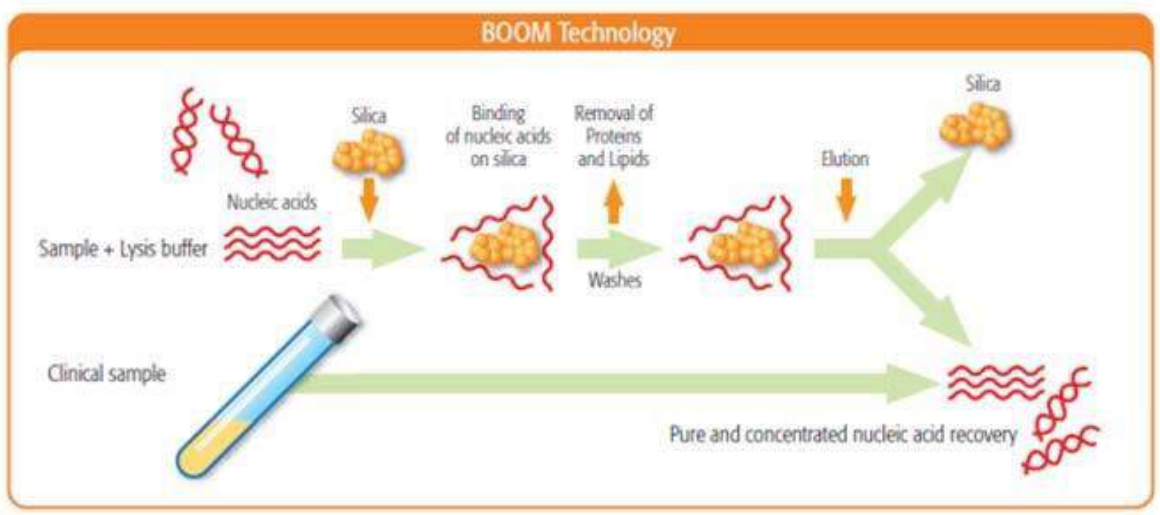
1- بعد ان يتم الحصول على الراسب الحاوي على الخلايا يضاف 600µl من محلول Nuclei lysis solution ، يخلط الراسب ثم تحضن الانابيب بدرجه 80℃ لمده 5 دقائق ثم تبرد الى درجه حراره الغرفه
2- يضاف 200µlمن محلول Protein precipitation solution ويخلط جيدا ثم يحفظ في الثلج لمده خمس دقائق بعدها تجرى عمليه طرد مركزي بسرعه 13000-16000دوره بالدقيقه لمده ثلاث دقائق
3- ينقل الراشح الى انبوبه ابندروف حاويه على 600µlايزوبروبانول وبعد ترسب الـ DNA تجرى عمليه طرد مركزي بسرعه 13000-16000دوره بالدقيقه لمده ثلاث دقائق يهمل الراشح
4- يضاف 600µlمن الايثانول الى الراسب يخلط جيدا لكن بهدوء (لماذا) ثم تجرى عمليه طرد مركزي بسرعه 13000-16000دوره بالدقيقه لمده ثلاث دقائق يهمل الراشح وتكرر هذه الخطوه 2-3 مره 5 - يهمل الايثانول وتترك انابيب ابندروف الحاويه على الـDNA المترسب مفتوحه في المختبر لضمان تطاير بقايا الايثانول
6 - يضاف 100µl من محلول DNA rehydration solution تترك بدرجه حراره الغرفه لليله كامله لغرض السماح لجزيئات الحامض النووي بالذوبان بصوره كامله.


Gram +
Pellet cells.
Gram –
Pellet cells.
Suspend in EDTA.
Add lytic enzymes.
Add Nuclei Lysis Solution. Incubate at 80°C for 5 minutes, then add RNase solution and incubate.
Add Protein Precipitation Solution.
Centrifuge.
Transfer supernatant to new tube containing isopropanol.
Centrifuge.
Discard supernatant. Add ethanol.
Centrifuge.
Aspirate ethanol. Air-dry pellet. Rehydrate DNA.

المختبر الثالث

الاستخلاص بطريقه مرشحات السيليكا Silica Membrane Method

تعد هذه الطريقة من افضل الطرق المستخدمة حاليا واكثرها شيوعا لكونها رخيصة نسبيا وكفؤة حيث يمكن الحصول على دنا نقي وبتراكيز جيده خلال ساعه واحده فقط. اساس عمل هذه الطريقة انها بعد طرح المكونات الخلوية بضمنها الدنا بعد تحلل الخلايا يرتبط الدنا بغشاء السيليكا (السيليكا موجبة الشحنة وبالتالي وضفت هذه الخاصية للارتباط بالدنا سالب الشحنة) الموجود في وسط عمود الفصل البلاستيكي ومن ثم تأتي خطوات غسل الدنا المتكرره للتخلص من بقايا البروتينات والمكونات الخلوية الاخرى ومن ثم نحصل على دنا نقي مرتبط بغشاء السيليكا بعد ذلك يتم فك هذا الارتباط باستخدام محلول TE buffer .



ويمكن تلخيص خطوات هذه الطريقة بمايلي:

Special Protocol: (For Bacteria) Step

1-Sample Preparation

-1 Transfer the appropriate number of bacterial cell (up to 1 x) to a 1.5ml microcentrifuge tube (not provided) and centrifuge at full speed (14,000 rpm or 10,000 x g) for 1 minute. Then discard the supernatant.

-2 Add 200 µl of FATG Buffer and resuspend the pellet by vortex or pipetting. Incubate for 5 minutes at room temperature.

Step 2 –Cell Lysis

-3 Add 200 µl of FABG Buffer to the sample and vortex for 5 seconds.

-4 Incubate for 10 minutes at 70ºC or until the sample lysate is clear. During incubation, invert the tube every 3 minutes.

-5 Preheat required Elution Buffer (for Step 5 DNA Elution) in a 70ºC water bath.

-6 (Optional Step): If RNA-free genomic DNA is required, add 5µl of 10 mg/ml RNase A to the sample and mix by vortex. Then incubate for 5 minutes at room temperature.

Step 3 – Binding

-7 Add 200µl ethanol (96~100%) to the sample and vortex for 10 seconds.

(Pipetting if there is any precipitate.)

-8 Place a FABG Column to a 2ml collection tube. Transfer the sample mixture (including any precipitate) carefully to FABG Column. Centrifuge for 5 minute at full speed (14,000 rpm or 10,000 x g) and discard the 2ml collection tube. Place the FABG Column in a new 2ml Collection tube.

Step 4 – Washing

-9 Wash FABG Column with 400µl W1 Buffer. Centrifuge for 30 seconds at full speed (14,000 rpm or 10,000 x g) and discard the flow-through.

-01 Place the FABG Column back in the 2ml Collection tube. Wash FABG Column with 600µl Wash Buffer (ethanol added). Centrifuge for 30 seconds at full speed (14,000 rpm or 10,000 x g) and discard the flow-through.

-11 Place the FABG Column back in the 2ml Collection tube. Centrifuge for an additional 3 min at full speed (14,000 rpm or 10,000 x g) to dry the column.

Step 5 – Elution

-21 Place the dry FABG Column to a new 1.5ml microcentrifuge tube.

-31 Add 100µl of Preheated Elution Buffer or TE to the membrane center of FABG Column. Stand FAGB Column for 3~5 min or until the buffer is absorbed by the membrane.

-41 Centrifuge for 30 seconds at full speed (14,000 rpm or 10,000 x g) to elute the DNA .

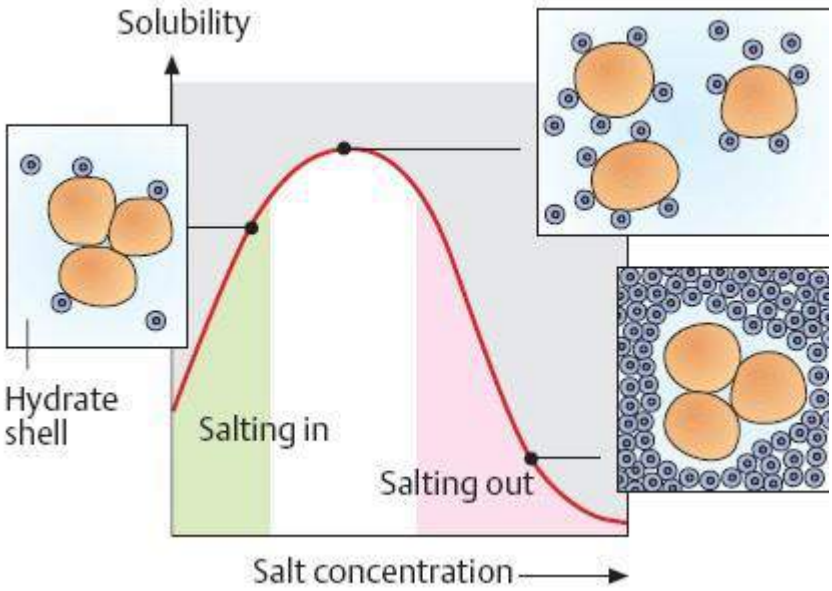
Step Final - Pure DNA

-51 Store the DNA fragment at 4ºC or -20ºC.

المختبر الرابع

الاستخلاص بطريقه التمليح الخارجي Salting out Method

تمتاز هذه الطريقة بكونها رخيصة واكثر امانا من بقية الطرق . اساس عمل هذه الطريقة يعتمد على ترسيب الدنا بواسطة الاملاح (كلوريد الصوديوم) حيث يعمل ايون الصوديوم الموجب على الارتباط بمجموعة الفوسفات السالبة مسببا ترسيب الدنا. يتم التخلص من الاملاح فيما بعد باستخدام الايثانول 70%. من مساوئ هذه الطريقة الى انها تحتاج الى وقت طويل يصل الى 48 ساعه .



ويمكن تلخيص خطوات هذه الطريقة بمايلي:

Equipment and Materials

- Polypropylene tubes 15ml
- Lysis buffer (10mM Tris-HCL,400mM NaCl, 2mM Na_2EDTA, pH 8.2)
- SDS 10%
- Proteinase K solution (1 mg proteinase K in 1% SDS and 2 mM Na_2 EDTA).
- Centrifuge
- Absolute ethanol
- TE buffer (10mM Tris-HCL, 0.2mM Na_2 EDTA, pH 7.5)
- Disposable gloves

- Gilson pipette

Procedure

.1 Resuspend the buffy coats of nucleated cells obtained from blood with anticoagulents (ACD or EDTA) with 3ml of nuclear lysis buffer.
.2 Digest the cell lysates, with 0.2 ml of 10% SDS and 0.5 ml of proteinase K solution, overnight at 37 °C.
.3 Add 1ml of saturated NaCl (6M) to each tube and shake vigorously for 15 seconds.
.4 Centrifuge for 15 minutes at 2500 rpm.
.5 Transfer the supernatant containing the DNA to another 15ml polypropylene tube, the precipitated protein pellet is left behind at the bottom of the tube.
.6 Add 2 volumes of absolute ethanol and invert the tubes several times until the DNA precipitates.
.7 Remove the precipitated DNA with a plastic spatula or pipette and transfer to a 1.5ml microcentrifuge tube containing 100-200 microliter TE buffer
.8 Dissolve the DNA for 2 hours at 37°C
.9 Store the tube at +4 or –20°C.
.01 Check quantity/quality of DNA (see QUALITY CONTROL OF DNA protocol)

Reference

Miller S.A, Dykes D.D, Polesky H.F : *A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells*. Nucleic Acids Research 1988;

V16 Number 3 : 1215

المختبر الخامس

تقدير تركيز ونقاوة الدنا DNA Concentration and Purity

بعد عملية استخلاص الدنا من اهم العمليات الواجب اجراءها لتقييم كفاءة عملية الاستخلاص هو تقدير تركيز الدنا ونقاوته والتي على اساسها نستمر بالعمليات اللاحقة التي من اجلها استخلص الدنا او يتم اعادة عملية الاستخلاص .

تيم تقدير تركيز الدنا من خلال تسجيل الامتصاصية للعينة على طول موجي 260 nm (A260) من خلال معلومة ثابته هي ان $O.D._{A260}=1$ تشير الى ان تركيز الدنا هو 50µg/ml pure dsDNA وبالتالي يمكن استخراج تركيز الدنا من خلال المعادلة التالية:

DNA Concentration (µg/ml) = A260 reading × 50µg/ml

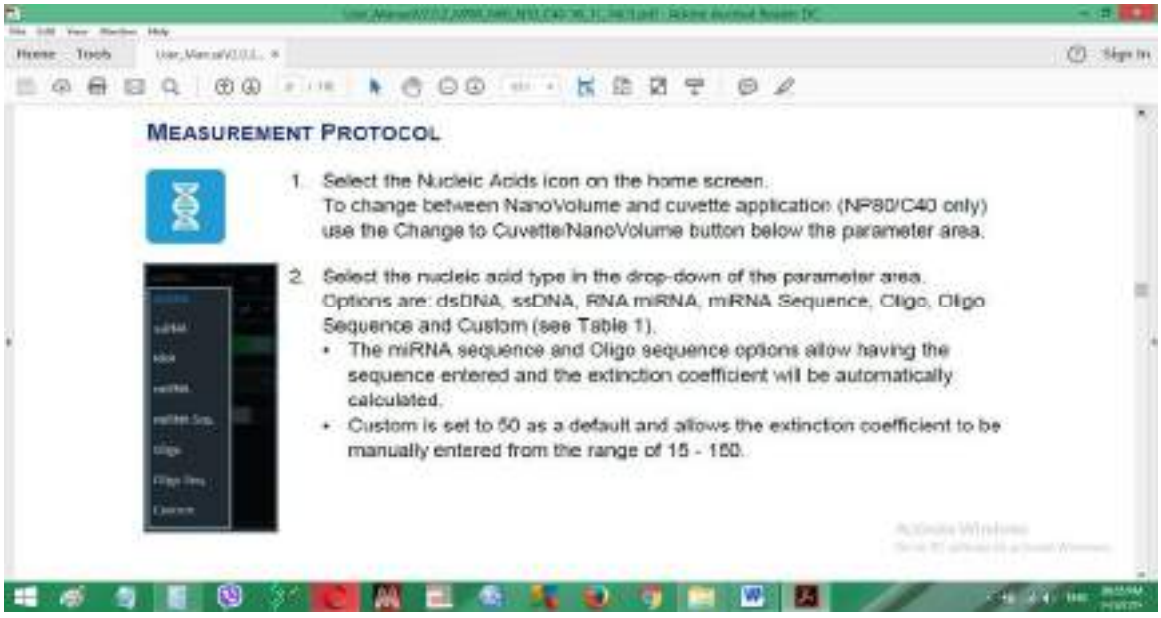
اما حاصل الدنا لكل عينة DNA yield يمكن حسابه من المعادلة التالية:

DNA yield (µg) = DNA concentration(µg/ml) × total sample volume (ml)

*عند A260 nm يعطي الدنا افضل امتصاصية في حين تعطي البروتينات والمركبات الاروماتية افضل امتصاصية عند A280 nm في حين تعطي الاملاح والفينولات افضل امتصاصية عند A230 nm ومن خلال هذه المعلومات بالتالي يمكننا معرفة مايلي:

- نقاوة الدنا وكمية الملوثات من خلال : A260/A280 كلما كانت هذه النسبة اكبر او تساوي 8.1 كلما كان افضل ويعني ان تركيز الدنا بالنسبة الى تركيز البروتين والملوثات الاخرى اكبر.
- نقاوة الدنا وكمية الاملاح من خلال : A260/A230 كلما كانت هذه النسبة اكبر او تساوي 5.1 كلما كان افضل ويعني ان كمية الاملاح في عينة الدنا قليلة.

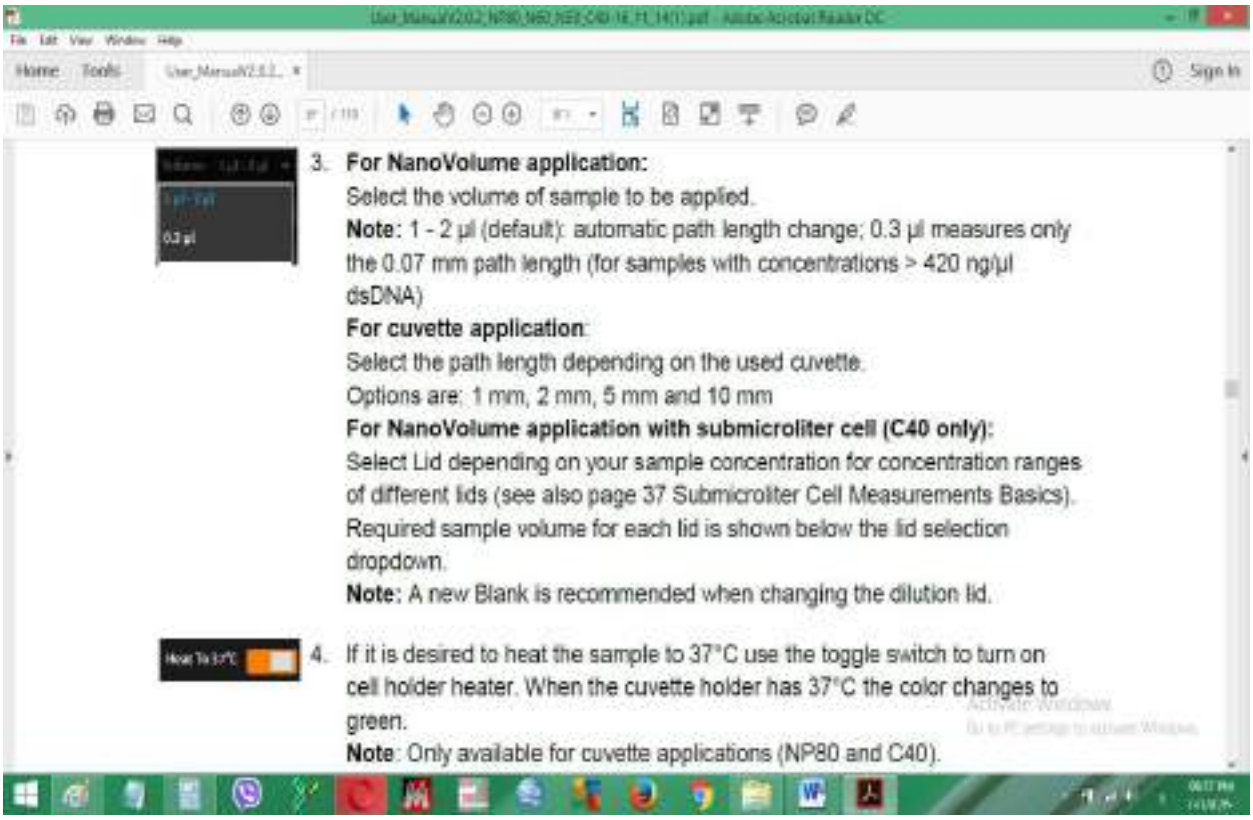
يمكن اجراء هذه القياسات بواسطة جهاز النانو دروب . ان الجهاز المستخدم في مختبراتنا هو من احدث الاجهزة المانية الصنع والذي يستخدم بكثرة في مراكز الطب العدلي وال FBI العالمية. ادناه الواجهة الرئيسة للجهاز:



MEASUREMENT PROTOCOL

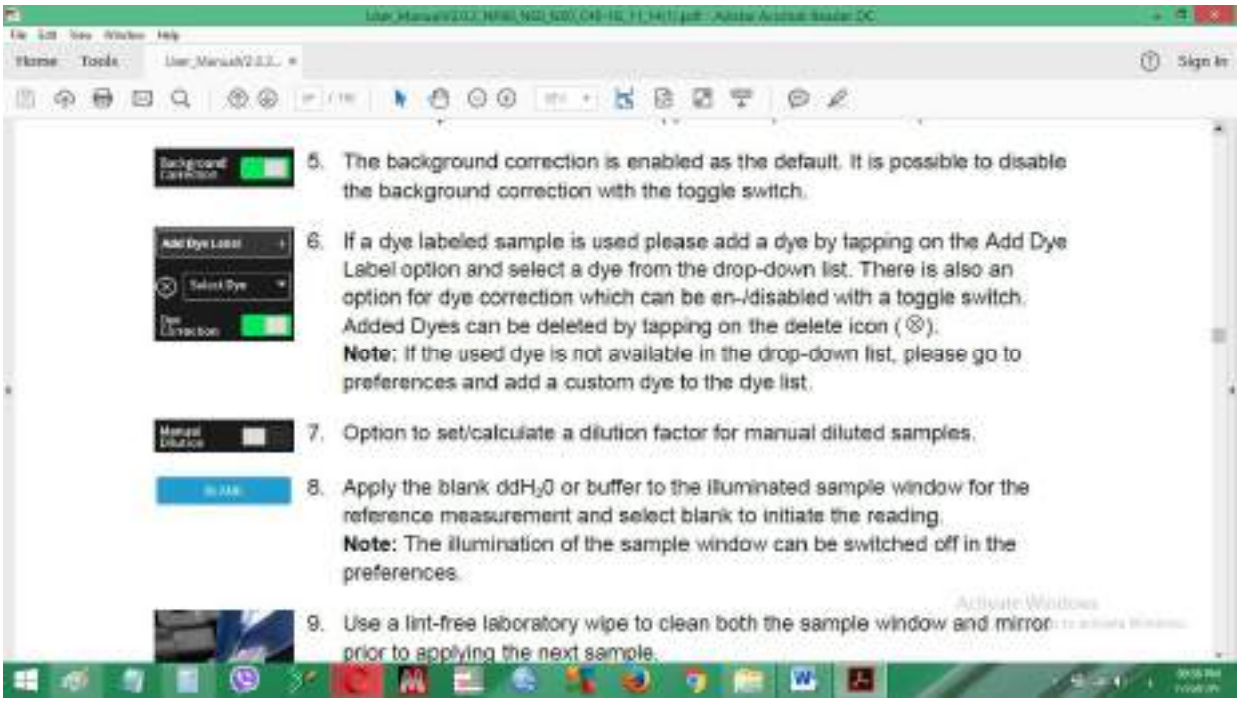
1. Select the Nucleic Acids icon on the home screen.
To change between NanoVolume and cuvette application (NP80/C40 only) use the Change to Cuvette/NanoVolume button below the parameter area.

2. Select the nucleic acid type in the drop-down of the parameter area.
Options are: dsDNA, ssDNA, RNA miRNA, miRNA Sequence, Oligo, Oligo Sequence and Custom (see Table 1).
- The miRNA sequence and Oligo sequence options allow having the sequence entered and the extinction coefficient will be automatically calculated.
- Custom is set to 50 as a default and allows the extinction coefficient to be manually entered from the range of 15 - 150.



3. **For NanoVolume application:**
Select the volume of sample to be applied.
Note: 1 - 2 µl (default): automatic path length change; 0.3 µl measures only the 0.07 mm path length (for samples with concentrations > 420 ng/µl dsDNA)
For cuvette application:
Select the path length depending on the used cuvette.
Options are: 1 mm, 2 mm, 5 mm and 10 mm
For NanoVolume application with submicroliter cell (C40 only):
Select Lid depending on your sample concentration for concentration ranges of different lids (see also page 37 Submicroliter Cell Measurements Basics).
Required sample volume for each lid is shown below the lid selection dropdown.
Note: A new Blank is recommended when changing the dilution lid.

4. If it is desired to heat the sample to 37°C use the toggle switch to turn on cell holder heater. When the cuvette holder has 37°C the color changes to green.
Note: Only available for cuvette applications (NP80 and C40).



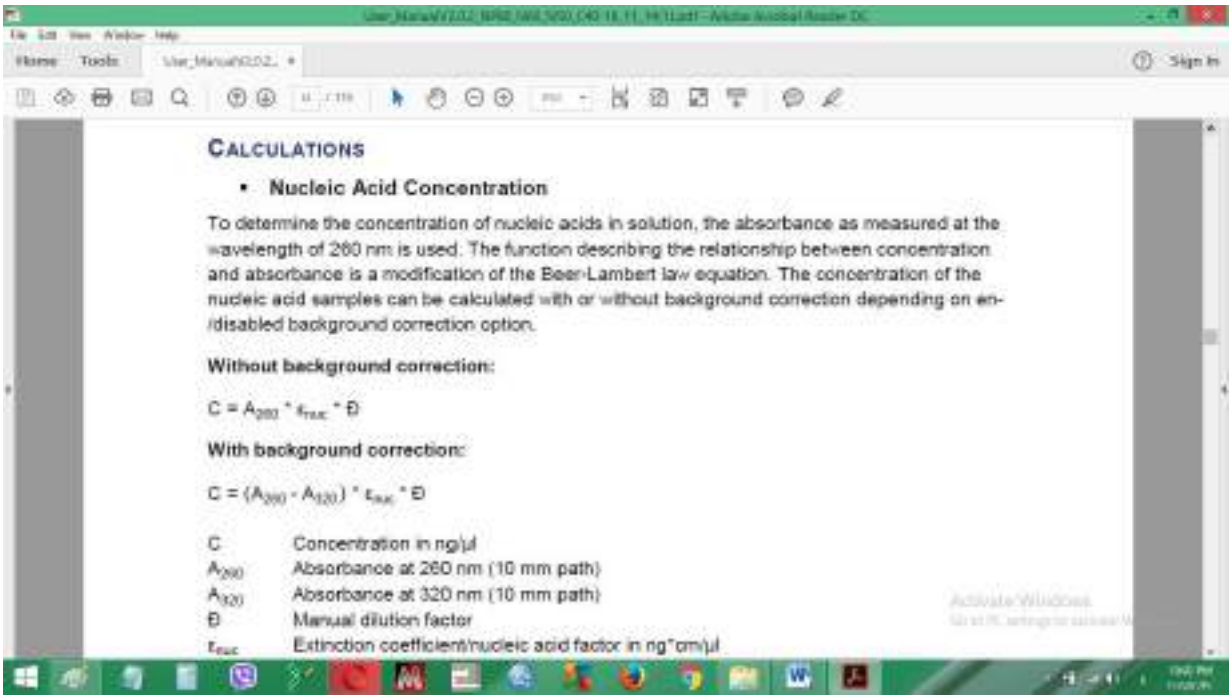
5. The background correction is enabled as the default. It is possible to disable the background correction with the toggle switch.

6. If a dye labeled sample is used please add a dye by tapping on the Add Dye Label option and select a dye from the drop-down list. There is also an option for dye correction which can be en-/disabled with a toggle switch. Added Dyes can be deleted by tapping on the delete icon (⊗).
Note: If the used dye is not available in the drop-down list, please go to preferences and add a custom dye to the dye list.

7. Option to set/calculate a dilution factor for manual diluted samples.

8. Apply the blank ddH_20 or buffer to the illuminated sample window for the reference measurement and select blank to initiate the reading.
Note: The illumination of the sample window can be switched off in the preferences.

9. Use a lint-free laboratory wipe to clean both the sample window and mirror prior to applying the next sample.



CALCULATIONS

- **Nucleic Acid Concentration**

To determine the concentration of nucleic acids in solution, the absorbance as measured at the wavelength of 260 nm is used. The function describing the relationship between concentration and absorbance is a modification of the Beer-Lambert law equation. The concentration of the nucleic acid samples can be calculated with or without background correction depending on en-/disabled background correction option.

Without background correction:

$C = A_{260} * \varepsilon_{nuc} * \Theta$

With background correction:

$C = (A_{260} - A_{320}) * \varepsilon_{nuc} * \Theta$

C	Concentration in ng/µl
A_{260}	Absorbance at 260 nm (10 mm path)
A_{320}	Absorbance at 320 nm (10 mm path)
Θ	Manual dilution factor
ε_{nuc}	Extinction coefficient/nucleic acid factor in ng*cm/µl

Table 1. Nucleic acids extinction coefficients (ε_{nuc})

Type	ε_{nuc}
dsDNA	50 ng*cm/µl
ssDNA	37 ng*cm/µl
RNA	40 ng*cm/µl
miRNA	33 ng*cm/µl
Oligo	33 ng*cm/µl
miRNA Seq.	calculated via extinction coefficient of constituent nucleotides entered
Oligo Seq.	calculated via extinction coefficient of constituent nucleotides entered
Custom	Option to enter any factor between 15 and 150 ng*cm/µl

المختبر السابع

الترحيل الكهربائي Gel Eletrophoresis

يعرف الترحيل الكهربائي بأنه حركه الايونات والجزيئات العملاقه المشحونه charged macromolecules مثل البروتينات والـ DNA والـ RNA خلال وسط معين(agarose or polyacrylamide) عند تسليط تيار كهربائي.

يوجد نوعان من المواد المستخدمه في الترحيل الكهربائي لكل ماده مواصفات خاصه واستخدامات خاصه تميزها عن الماده الاخرى 1 - هلام الاكاروز Agarose

ماده سكريه تستخدم بتراكيز من 5.0%- 2 فكلما كان حجم قطع الـ DNA المراد فصلها اصغر كلما ازداد تركيز الاكاروز (لماذا)،يعتبر الاكاروز اكثر استخداما بسبب رخص ثمنه وسهوله تحضيره وهو ماده غير سامه كما ان نسبه وضوح العينه المفصوله بواسطته تكون اقل وضوحا من النوع الاخرو يستخدم هذا الهلام لفصل جزيئات DNA يتراوح وزنها الجزيئي بين 200pbالى 50000pb

2 - **متعدد الاكريلمايد Polyacrylamide**

هو عباره عن بوليمر خليط من الاكريلامايد والـ bis-acrylamide يمتاز بكون ثقوب مادته اصغر من ثقوب الاكاروز لذا فهو يستخدم في فصل جزيئات الـDNA الاصغر من 500pb العينه تكون اكثر وضوحا من الاكاروز ويستخدم ايضا في فصل البروتينات والانزيمات الا ان طريقه تحضيره اكثر تعقيدا من الاكاروز وتعتبر ماده الاكريلاميد ماده سامه للاعصاب

العوامل التي تتحكم بحركه جزيئات الـ DNA في الاكاروز

1- الشحنه charge (ماهي شحنه الDNA وما اتجاه حركتها؟)
2- الحجم و الوزن الجزيئي للجزيئات (اي الجزيئات تتحرك اسرع؟)
3- حجم ثقوب الهلام (كلما كان حجم الثقوب صغيره كلما كان ذلك ملائما لفصل الجزيئات الصغيره)
4- قوه التيار الكهربائي (يستخدم التيار الكهربائي العالي للفصل السريع للجزيئات الصغيره بشكل عام ولكن على ان لا يكون عالي جدا لان هذا يؤدي الى تحطم الجزيئات ،اما التيار الواطئ فهو يستخدم لفصل الجزيئات الكبيره)

ان لشكل جزيئه الـ DNA اهميه في سرعه حركتها فالجزيئات العاليه الالتفاف covalently closed supercoiled (CCC) تكون اسرع من الجزيئات الخطيه linear (L) والتي تكون اسرع من النوع الحلقي المفتوح Opened circle (OC)

المواد و الاجهزه المستخدمه في الترحيل الكهربائي

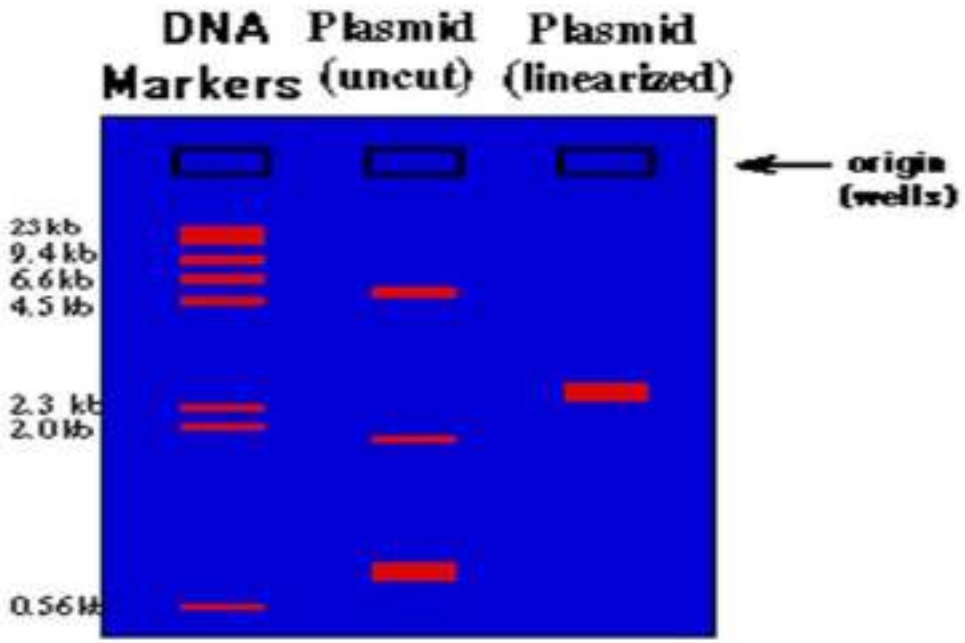
1 - جهاز الترحيل الكهربائي المؤلف من أ- مجهز الطاقه
power supply ب- وحده الترحيل الكهربائي
electrophoresis chamber
ت- وعاء صب الهلام gel casting tray مصنوع من بلاستيك شفاف يسمح بنفاذ الاشعه الفوق بنفسجيه، يجب غلق صرفي الوعاء بالسدادات المطاطيه الخاصه قبل صب الهلام (لماذا) ث- المشط combهو اداه تستخدم لعمل حفر لوضع عينه الـ DNA في الهلام ج- UV-transluminator جهاز الاشعه فوق البنفسجيه

2 - المواد المستخدمه

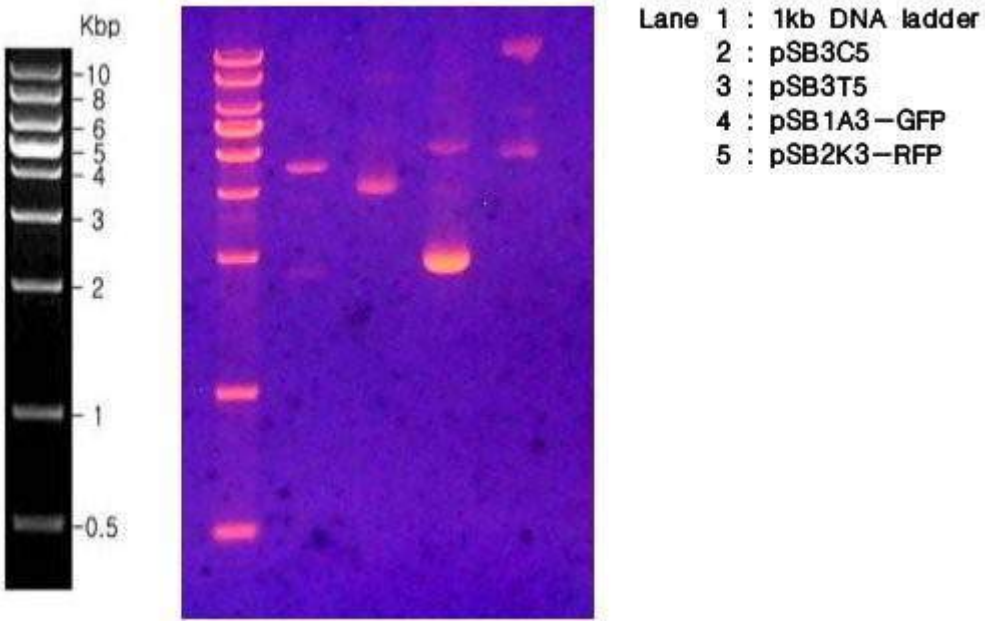
A. TBE buffer
B. Loading buffer (ماهي مكوناته ولماذا يستخدم)
C. صبغه الـ ethidium bromide هي عباره عن صبغه متفلوره تتداخل بين ازواج القواعد النايتروجينيه لشريطي الـ DNA وعند تعرض هذه الصبغه للاشعه فوق البنفسجيه فأنها يعطي منطقه مشعه برتقاليه او حمراء اللون . هذه الصبغة مسرطنة واستبدلت بصبغات امينة وغير مسرطنة مثل Simplsafe.
D. هلام الكاروز
E. عينه DNAنقيه

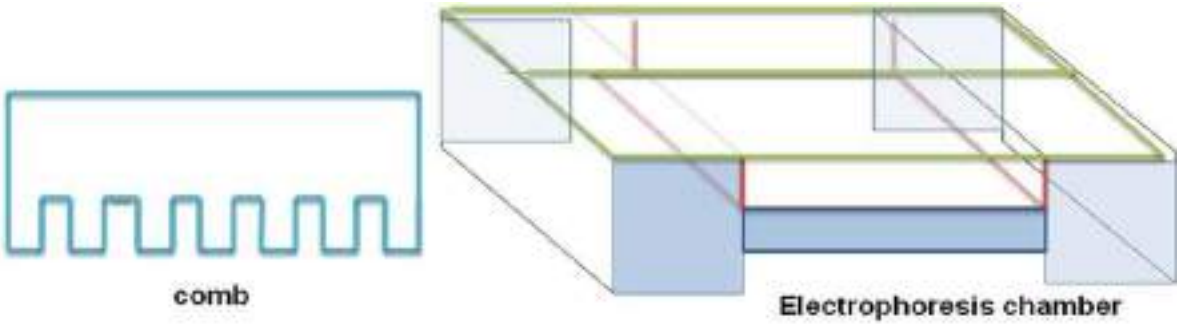
طريقه العمل

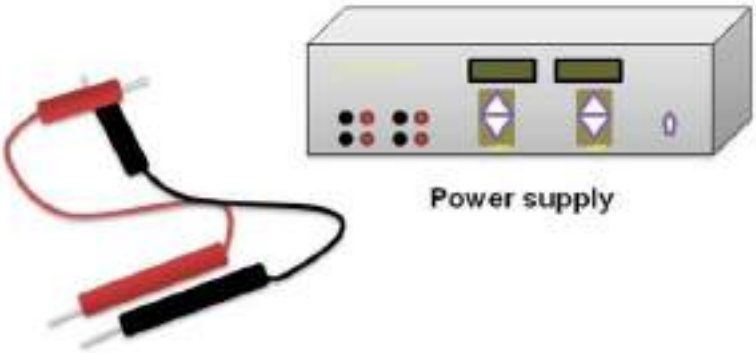
1- يتم إذابة 1 غم من الاكاروز في 100 مليلتر من درائ TBE بتركيز(5X.0) ورقم هيدروجيني 8 في الحمام المائي و بعدها يترك الهلام ليبرد لتصل حرارته الى 50 م. ثم يضاف 2 مايكروليتر من محلول بروميد الاثيديوم بتركيز 2 ملغم/مليلتر ويمزج جيدا.
2- يحضر قالب صب الهلام(Tray) وذلك باحاطة حافتي القالب بالقطع المطاطيه الخاصه ويثبت مشط تكوين الحفر(Comb) على بعد واحد سنتمتر من احدى حافتي القالب، ثم يصب الهلام داخل القالب الموضوع في وضع أفقي تماما وترك ليتصلب لمدة 30 دقيقة وفيما بعد رفع المشط القطع المطاطيه برفق ويوضع القالب داخل حوض الترحيل الكهربائي المحتوى على دارئ TBE بحيث يغمر هلام الاكاروز.
3- تجرى عملية تحميل عينات الدنا في حفر الهلام بعد مزج 10 مايكروليتر من محلول الدنا مع 3 مايكروليتر من دارئ التحميل(Loading buffer) .
4- يتم ترحيل العينات كهربائيا تحت فرق جهد قدره 4-3 فولت/سم وبمعدل مرور للتيار 20 ملي أمبير ولمدة 3-5.1 ساعة حسب التجربة.
5- تم فحص الهلام بواسطة جهاز UV- Transilluminator بطول موجي مقداره 256 نانوميتر، ثم يصور بوساطة الكاميرا(Canon) .

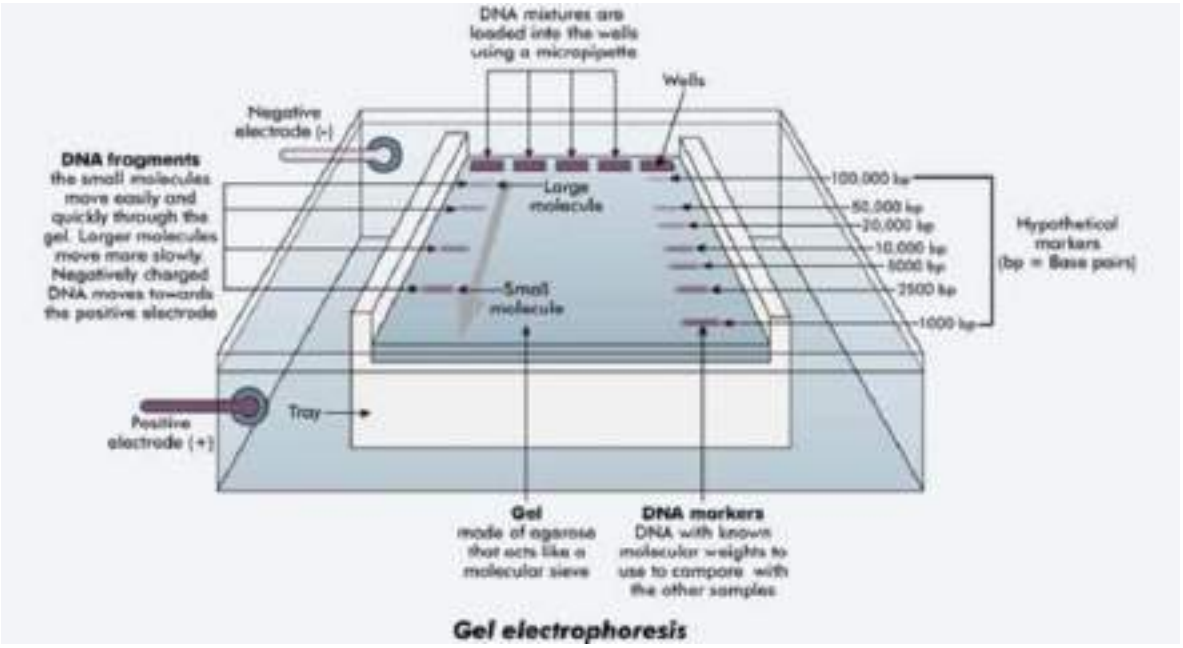

DNA Markers
Plasmid (uncut)
Plasmid (linearized)
origin (wells)
23 kb
9.4 kb
6.6 kb
4.5 kb
2.3 kb
2.0 kb
0.56 kb

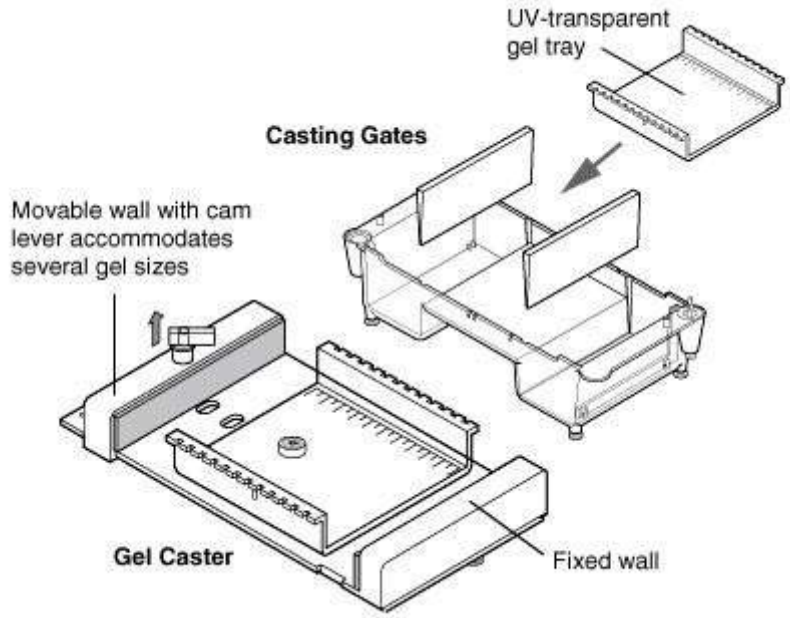
[Figure 1]


Kbp
10
8
6
5
4
3
2
1
0.5
Lane 1 : 1kb DNA ladder
2 : pSB3C5
3 : pSB3T5
4 : pSB1A3-GFP
5 : pSB2K3-RFP

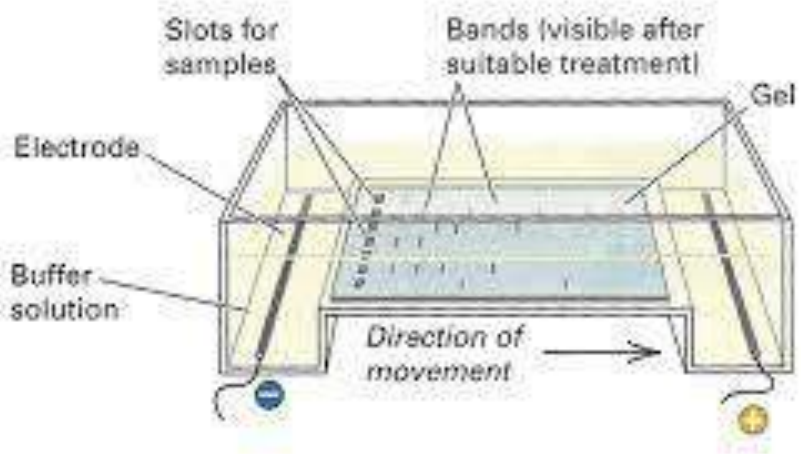

comb
Electrophoresis chamber

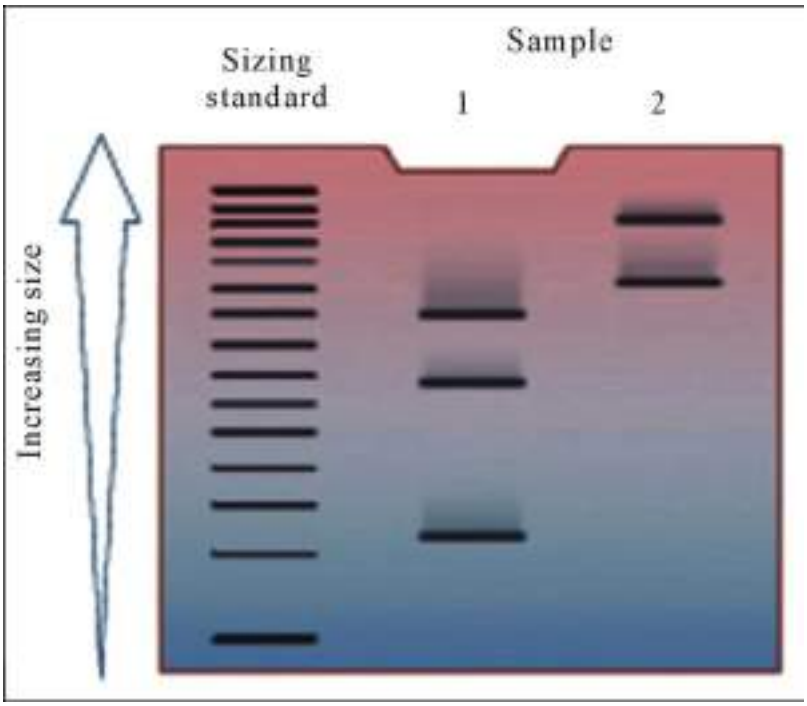

Power supply


DNA mixtures are loaded into the wells using a micropipette
Wells
Negative electrode (-)
DNA fragments the small molecules move easily and quickly through the gel. Larger molecules move more slowly. Negatively charged DNA moves towards the positive electrode
Large molecule
Small molecule
100,000 bp
50,000 bp
20,000 bp
10,000 bp
5000 bp
2500 bp
1000 bp
Hypothetical markers (bp = Base pairs)
Positive electrode (+)
Tray
Gel made of agarose that acts like a molecular sieve
DNA markers DNA with known molecular weights to use to compare with the other samples
Gel electrophoresis



Agarose gel electrophoresis of DNA




Sizing standard
Sample
1
2
Increasing size

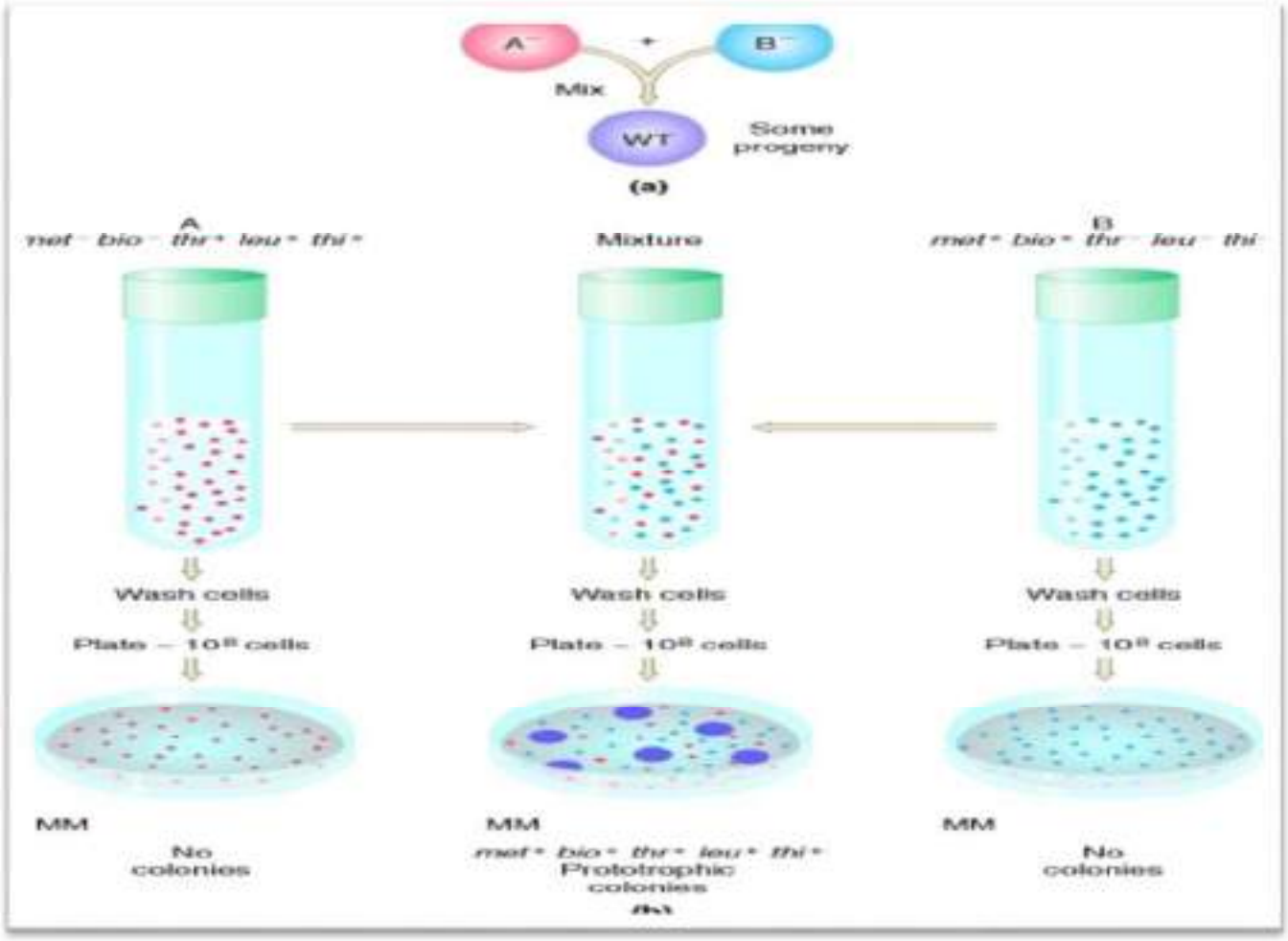
المختبر الثامن

الاقتران البكتيري Bacterial conjugation

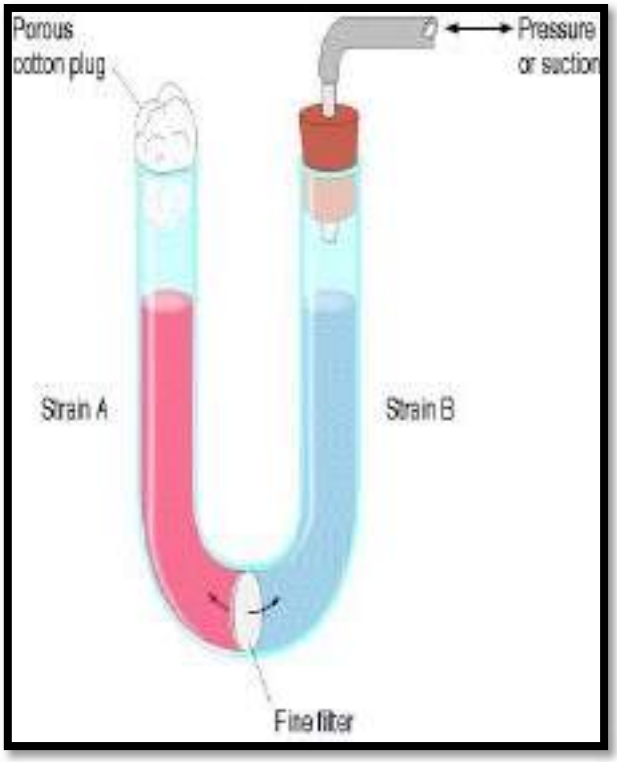
في هذا المختبر والمختبرات اللاحقه سنتناول طرق انتقال الجينات بين البكتريا. واول طريقه لانتقال الجينات هي الاقتران البكتيري بين نوعين بكتيريين مختلفي الصفه الوراثيه (ماالمقصود بذلك)

نظره تأريخيه عن الاقتران البكتيري

اكتشف الاقتران البكتيري لاول مره عام 1946 م من قبل العالمان ليدربيرك وتاتم من خلال عملهما على نوعين من بكتريا الـ E. coli مختلفتي المتطلبات الغذائيه، اذ تنمو البكتريا A على وسط غذائي حاوي على المثيونين والبايوتين اما البكتريا B فهو يحتوي وسط التنميه على الثريونين و الليوسين والثايونين ،قام العالمان بخلط النوعيين البكتيريين في وسط غذائي سائل ثم زرعت البكتريا من الوسط السائل على اطباق غير حاويه على اي مكمل غذائي من الاحماض التي تحتاجها الاسلاف وسميت هذه البكتريا بالبكتريا البريه Wild type بينما لم تظهر مستعمرات بكتيريه في الطبقين المزروعين باحد النوعين البكتيريين كما في الشكل ادناه



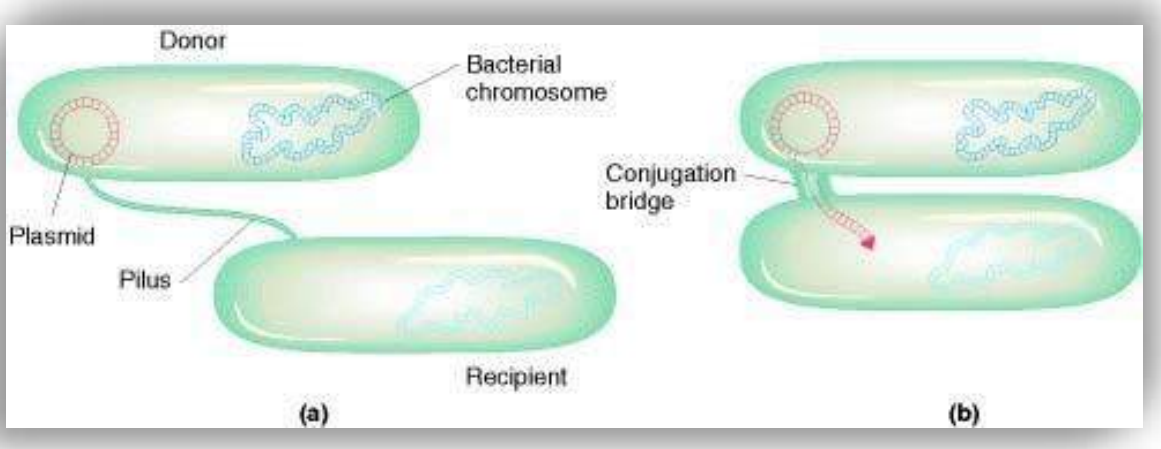
1

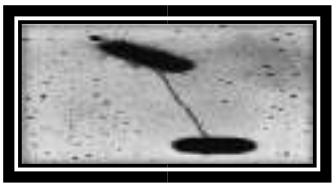


افترض العلماء في ذلك الوقت ان البكتريا التي استطاعت ان تنمو على الوسط غير الحاوي على مكملات غذائيه بسبب امتصاصها لهذه المواد وهو ليس انتقال حقيقي للجينات الا ان العالم دايفس اكد ظاهره انتقال الجينات بين البكتريا من خلال استخدام انبوبه على شكل حرف U يفصل بين الذراعين ورق ترشيح صغير الثقوب لايسمح بمرور البكتريا خلاله لكنه يسمح للمواد الذائبه فب الوسط بالعبور، كما في الشكل المجاور ،ووضع كل نوع بكتيري في احد ذراعي الانبوب وبعد فتره حضانه معينه لاحظ العالم دايفس ان اي نوع من البكتريا لم يستطع النمو لى الوسط الخالي من المكملات الغذائيه لذا افترض العالم دايفس ضروره وجود اتصال فيزيائي بين جنسي البكتريا لغرض حصول انتقال الجينات بينهما.

اكتشاف العامل F (Fertility factor)

في العام 1953 اكتشف العالم ويليم هيس بأن انتقال البكتريا يحصل باتجاه واحد ، اكتشف فيما بعد ان الخليه التي تقوم بنقل الجينات تمتلك جين معين يسمى الـ Fertility factor (F factor) وتسمى بالخليه الواهبه بينما تسمى الخليه الاخرى بالخليه المستلمه وبعد انتقال هذه الجينات اليها (الخليه المستلمه) تتحول بدورها الى خليه واهبه. كما في الشكل التالي



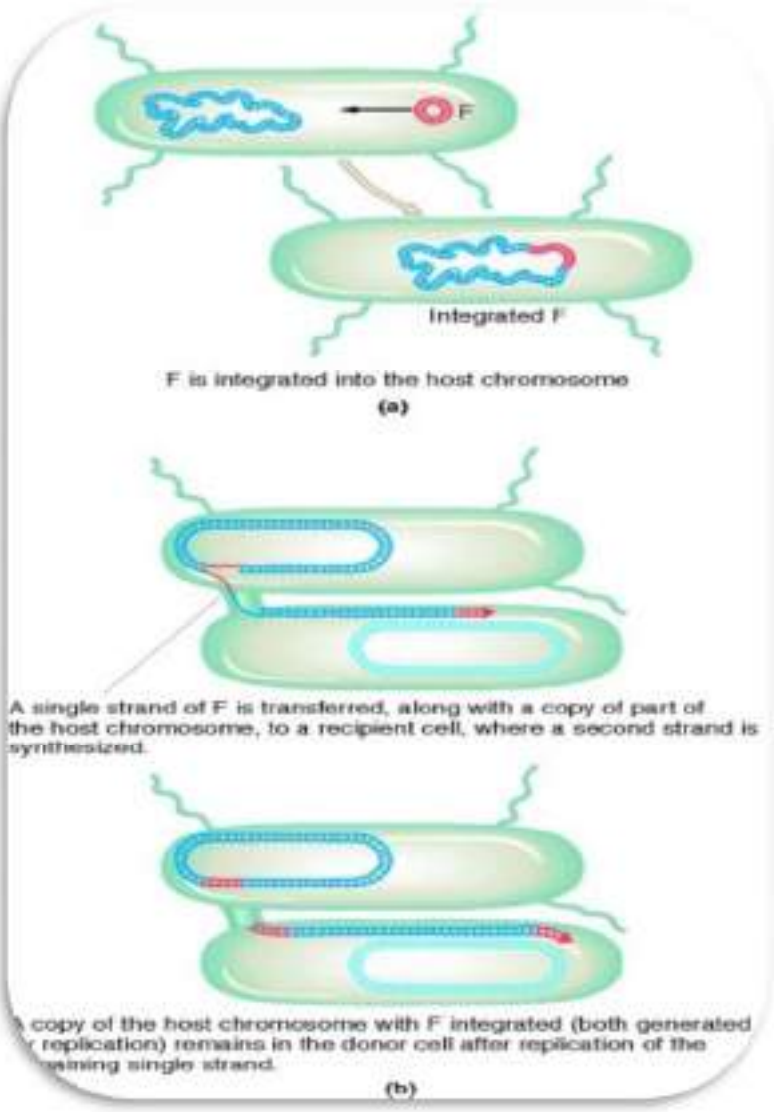


وان الاتصال بين الخليتين البكتيريتين يحدث بواسطه الشعيرات الجنسيه sex pili الموجوده على سطح الخلايا الواهبه والتي تستطيع تكون جسر سايتوبلازمي بين الخليتين الواهبه والمستلمه لغرض انتقال الجينات كما في الشكل المجاور

2

High frequency of recombination (Hfr) الخلايا الـ

يحدث في بعض الخلايا الحاويه الى الـ F factor ان يتحد الاخير مع كروموسوم الخليه البكتيريه وبالتالي تقوم هذه الخلايا بعمليه نقل جينات اكثر 1000 مره من الخلايا الاعتياديه الان الخلايا الناتجه لاتكون خلايا واهبه ولاخلايا Hfr بسبب الانتقال العشوائي للعامل F(عدم انتقال الجين F بصوره كامله) وفي حاله الـ Hfr يحدث انتقال لجزء من كروموسوم الخليه الواهبه ايضا كما في الشكل المجاور



المواد المستخدمه في التجربه

1- البكتريا القياسيه *E.coli* MM294 (السلاله المستلمه) تكون مقاومه للمضاد الحياتي الريفامبسين وتنمو في وسط حاوي على الثايمين

2- بكتريا الـ*E. coli* (السلاله الواهبه) يجب ان تكون البكتريا حساسه للمضاد الحياتي الريفامبسين (لماذا)

3- Nutrient agar وسط الـ

4- Nutrient broth وسط الـ

طريقه العمل

1- تزرع السلاله البكتيريه الواهبه على احد طرفي طبق بتري حاوٍ على الوسط المغذي الصلب المعقم، وتزرع بكتريا الـ *E.coli MM294* القياسية الخالية من البلازميدات كخلايا مستلمه على الطرف الاخر من الطبق ويخُلِط نوعا البكتيريا معا في وسط الطبق لاجراء الاقتران.
2- تحضن الاطباق بدرجه حرتره 37°م لمده 24 ساعه

3- يعلق مزيج الخلايا الواهبة والمستلمة لفصل الخلايا التي حصل فيها الاقتران في محلول التخفيف الفسلجي ثم ينشر 1.0 مليلتر منه في الوسط الانتقائي المحتوي على المضاد الريفامبسين ولا يحتوي على الثايمين لغرض تنمية الخلايا المقترنة فقط وحضنت الأطباق بدرجة حرارة 37 م ْ لمدة 24- 48 ساعة

4- تسجل الملاحظات و يتم حساب تردد الخلايا المقترنه من القانون التالي

3

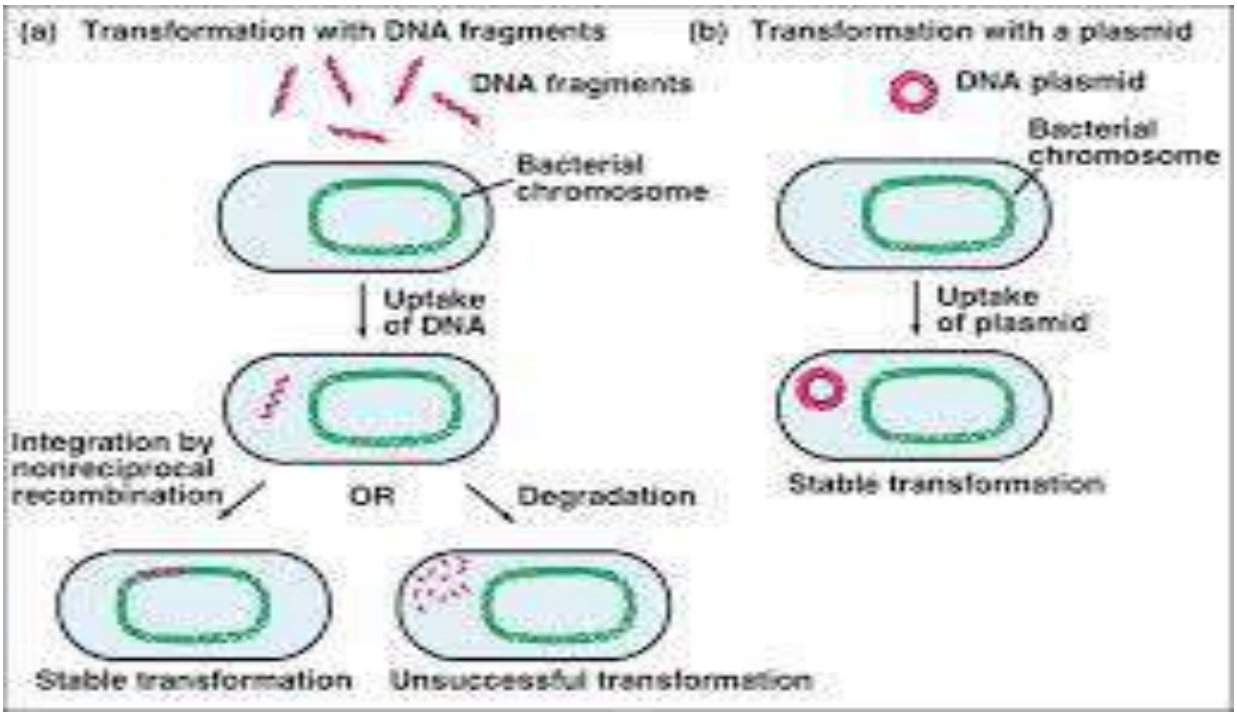
ردد الانتقال بالاقتران = دد ابكتر المنتره \ العدد اكلي ا لا المس تلمه

4

المختبر التاسع

التحول البكتيري Bacterial transformation

يقصد بالتحول البكتيري هي العمليه التي يتم بواسطتها ادخال جزيئه DNA غريبه الى خليه بكتيريه ،وان جزيئه الـ DNA يجب ان تكون محموله على ناقل كلونه مناسب Cloning vector (اذكر انواع نواقل الكلونه.)!!!



خطوات عمليه التحول يمكن تلخيصها بما يلي

تثبيت DNA على سطح الخلية البكتيرية

التعبير عنه داخلها

اما الظروف التي قد تؤثر على عمليه التحول فتشمل

الأجناس البكتيريه

الأس الهيدروجيني

درجة حرارة الحضن

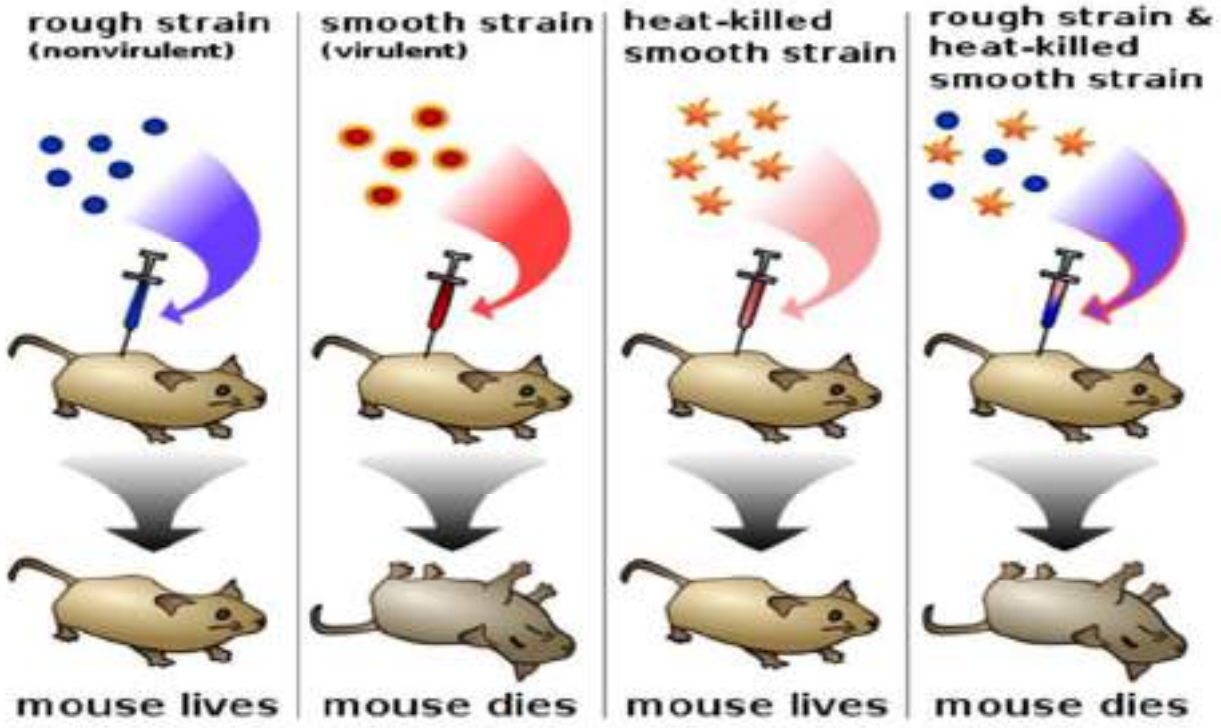
تركيز الـ DNA

التراكيز الأيونية، وتقدر المدة المتوسطة لها بحوالي 15 دقيقة ويمكن أن تستمر لأسبوع عند بكتيريا محفوظة في 40 م0 في الغليسيرول

ان اول من اكتشف التحول البكتيري كان العالم Griffith اذ قام باستخدام نوعين من بكتريا Streptococcus pneumone هما II-R لاتمتلك متعدد السكريد وهي غير ممرضه وIII-S التي تحيط نفسها بكبسوله من متعدد السكريد الذي يعطيها الملمس الناعم و يحميها من الجهاز المناعي للمضيف لذا فهي نوع قاتل.قام هذا العالم بقتل البكتريا الخشنه بالحراره واضاف بقاياها الي البكتريا الناعمه الحيه لاحظ ان الاخيره لم يتغير سلوكها الامراضي بينما اذا فعل

العكس اي قتل البكتريا الناعمه بالحراره واضاف بقاياها الى البكتريا الخشنه الحيه ثم حقنها في الفئران لاحظ ان الفئران تصاب بالمرض ومنها استنتج كرفث ان البكتريا الخشنه قد تحولت الى خلايا ناعمه من خلال عمليه تحولها(البكتريا الحيه الخشنه استقبلت جزيئه الـ DNA من بكتريا الناعمه المقتوله، وتحولت الى خلايا ناعمه) كما في الشكل التالي

ان عمليه التحول عمليه مهمه جدا بسبب القدره على ادخال العديد من الجينات حتى البشريه الى داخل خلايا بكتيريه وبالتالي الحصول على نواتج امنه (اذكر امثله على مواد تفيد البشر و تم نقل جيناتها الي البكتريا)



ان غالبيه البكتريا في لطبيعه ليس لها القدره على التحول بدون تدخل ومن امثله هذه البكتريا S.pneumoniae، B.cereus , Neisseria gonorrhae، Bacillus subtilis، S.sanguis ، لذا سعى العلماء في السنوات الماضيه الى الحصول على خلايا لها القابله على التحول دون اجراء تغيرات كثيره على قطعه الـ DNA المراد نقلها والخلايا الناتجه سميت بالخلايا المهيئه competent cell وتتم عمليه تهيئه الخلايا بطريقتين هما Electroporation تعريض الخلايا الى تيار كهربائي لغرض خلخله الجدار الخلوي مما يساعد على جعله اكثر نفاذيه لمرور جزيئه الـ DNA الغريبه خلاله

النقع في كلوريد الكالسيوم البارد ثم تعريض الخلايا الى صدمه حراريه كما سيجرى في المختبر .

طريقه العمل

يتم وضع 250µl من محلول كلوريد الكالسيوم في انابيب ابندروف معقمه.

توضع الانابيب في حمام ثلج لمده 2 min. .

توضع كميه من البكتريا (E.coli) بواسطه الـLoop الى الانابيب الاربعه المستخدمه في التجربه.

تضاف كميه من الـDNA البلازميدي الى اثنين من الانابيب السابقه وتترك الانبوبتين الاخريين بدون الـ DNA

توضع الانابيب الاربعه في حمام ثلجي لمده .10 min.

يتم تعريض الانابيب الاربعه لصدمه حراريه ،تنقل الانابيب الي حمام مائي بدرجه حراره 42c لمده 50 sec ثم تعاد مباشره الاى الحمام الثلجي.(مالفائده من هذه الخطوه؟)

يضاف لكل انبوبه 250µl من وسط الـ nutrient broth وتترك الانابيب بدرجه حراره الغرفه لمده .10 min .

انقل 100µl من الانابيب الاربعه الى اطباق بتري حاويه على وسط انتقائي حاوي على مضادي التتراسايكلين والامبسلين ،تحضن الاطباق لمده 4 -48 ساعه بدرجه 37c ثم تسجل النتائج.

المختبر العاشر

التحول البكتيري بالعاثي Transduction

تمتلك بعض العاثيات البكتيريه القدره على نقل جينات البكتريا من خليه الى اخرى .اول من اكتشف التحول البكتيري كان العالمان زندر وليدربيرك في العام 1951 م اثناء عملهما على بكتريا الـSalmonella typhimurum في محاوله لاجراء الاقتران البكتيري على غرار ماحدث مع بكتريا الـ E .coli الا ان العالمان عندما اجريا تجربه الفصل بين النوعين البكتيريين باستخدام الانبوبه U- shape حصلا على طراز بري للبكتريا وعند اجراء تجارب اضافيه اكتشفا ان العاثي البكتيري P22 هو المسؤول عن نقل الجينات بين النوعين البكتيريين وبالتالي الحصول على النوع البري .

ان عمليه نقل الجينات تحصل اثناء خطوه تعبئه الماده الوراثيه في رؤوس العاثي اذ قد يحصل احيانا ان تعبئ قطعه من الماده الوراثيه للبكتريا في رأس العاثي وتنتقل الى الخلايا الاخري عند اصابه العاثي للخلايا السليمه كما في الشكل التالي (ما المقصود بالـ transducing phage ؟؟؟)

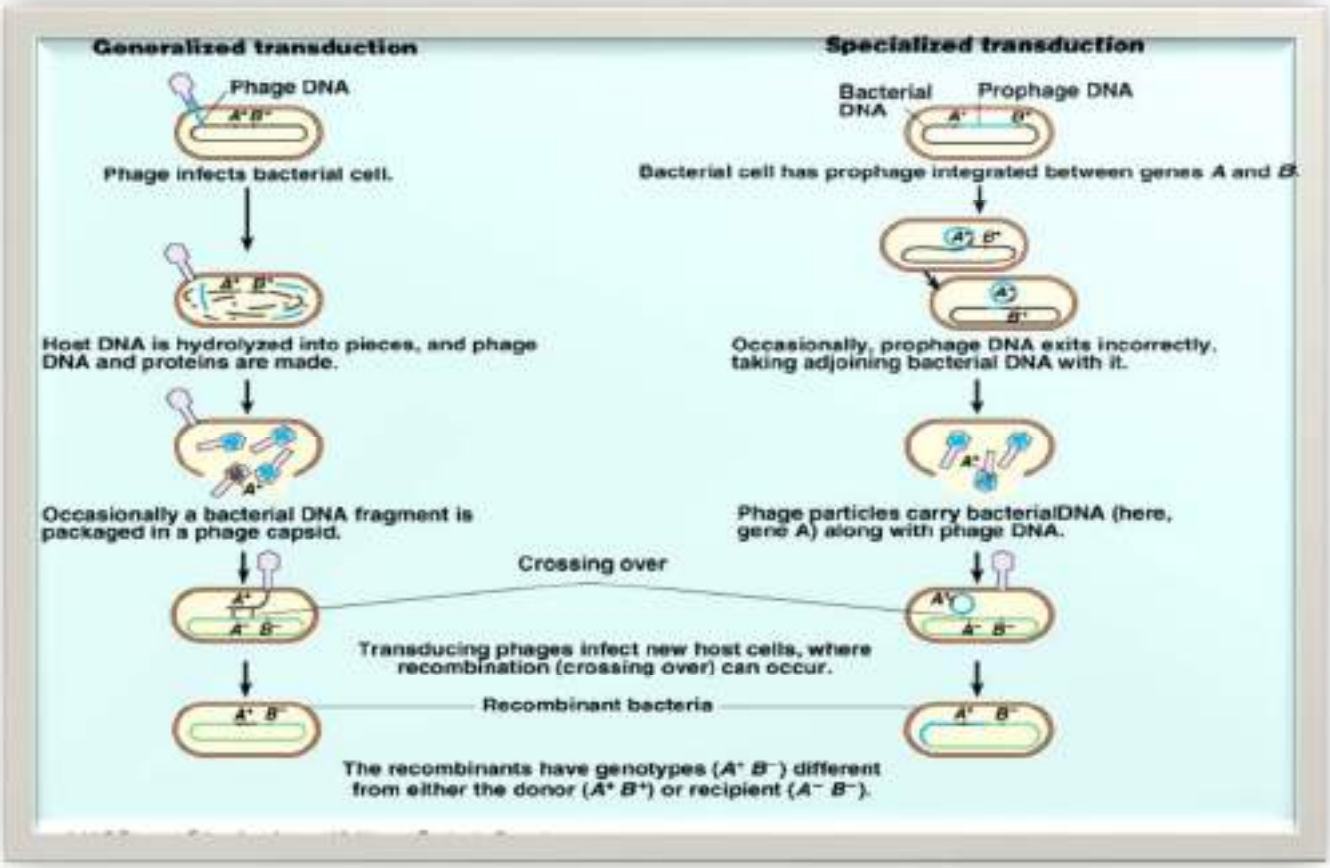
هناك نوعان من التحول بالعاثي هما التحول

العام Generalized transduction :

و يقصد به ان العاثي البكتيري قد يحمل اي قطعه جينيه من الماده الوراثيه للخليه المضيفه ومن الامثله على هذا النوع من العاثيات البكتيريه P1 & P22عاثيات تصيب السالمونيلا) . ان العاثي p22 له القدره على الاتحاد مع كروموسوم خليه المضيف اما العاثي P1 فيبقى حرا في السايتوبلازم. (ما المقصود باجمله الاخيره وكيف تحصل عمليه تضاعف الماده الوراثيه للعاثيان السابقا الذكر ؟)

التحول المتخصص Specialized transduction

ويعرف على انه قدره العاثي البكتيري على حمل قطعه معينه من الماده الوراثيه لخليه المضيف ومن اهم العاثيات على هذا النوع من العاثيات هو العاثي لمدا λ- phage ان عمليه الارتباط بين الماده الوراثيه للعاثي لمدا والكرموسوم البكتيري تحدث بأستخدام نظام انزيمي خاص وان اهميه هذا النظام تكمن في ضمان الارتباط الصحيح بين الماده



الوراثيه للعاثي مع كروموسوم البكتريا في موقع محدد.

الجينات القافزه Transposons

الجينات القافزه هي عباره عن سلسله من الـ DNA لها القدره على تغيير موقعها ضمن الجينوم وهي خالبا تسلسل غير مشفر من الـ DNA .تسبب الجينات القافزه طفرات وراثيه . قد تكون سببا لزياده او تقليل حجم الطفرات ، تساعد في اعاده ترتيب الجينوم و تساعد في تنظم التعبير الجيني

ان عالمة النباتات الامريكية Barbara McClintock كانت اول من قام بوصف ظاهرة الجينات القافزه وحصلت بفضل ذلك على جائزة نوبل عام 1983 .ان سبب اهتمامها نبع من ملاحظة ان نوع من عرانيس الذرة غالبا تملك حبوبها الوان متعددة على شكل الموزائيك .لقد ظهر ان الخلايا ، في الاصل، تحتوي على جين الملون الاحمر وبالتالي فالحبوب تكون في الاصل حمراء .ولكن احيانا يقوم الجين القافز بالقفز من مكانه والغاء التلوين لتصبح الحبة صفراء .
وكل مرة تقوم الخلية فيه بالانشطار يجري توريث المكان الجديد للجين القافز الى الخلية الابنة بحيث يُحافظ على اللون الاصفر والاحمر في الاجيال اللاحقة الى ان يقوم الجين بالقفز مجددا ليتبدل اللون من جديد .بهذا الشكل يظهر في خلال

فترة نمو وتشكل عرنوس الذرة تعدد موزائيكي في الوان حبات عرنوس واحد. وقد اكتشف ان حوالي 90% من جينوم الذره مكون من الجينات القافزه بينما جينوم الانسان يكون حاوي على حوالي 50% من هذه الجينات.

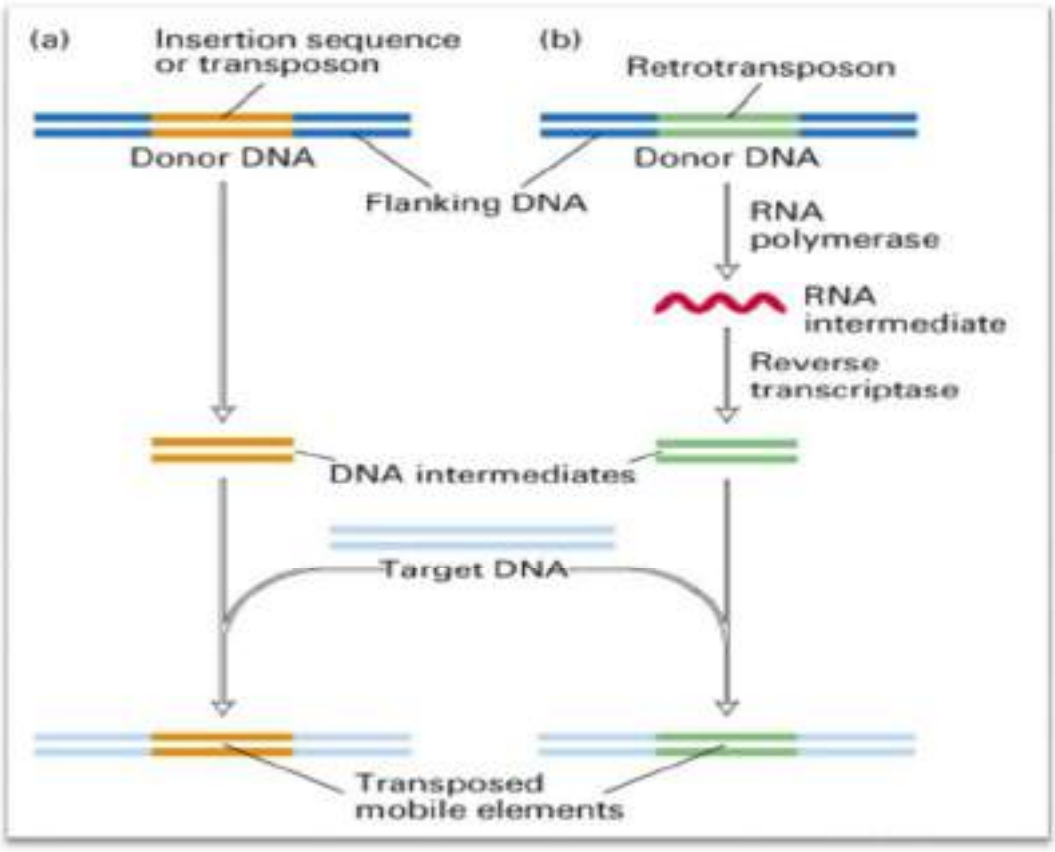
يوجد نوعان من الجينات القافزه اعتمادا على طريقه نقلها للجينات هما

النوع الاول Retrotransposons (استنساخ ولصق)

في هذا النوع يتم استنساخ الـ RNA من قطعه الـ DNA المراد نقلها ثم يعاد تكوين الـ DNA من الـ RNA وقطعه الـ DNA الناتجه يعاد ربطها في موقع اخر من الجينوم ، لاجل اتمم هذه العمليه يجب وجود انزيم reverse transcriptase وهذه العمليه مشابهه لما تقوم به مجموعه الـ retroviruses مثل (HIV)

النوع الثاني DNA transposon (قص ولصق)

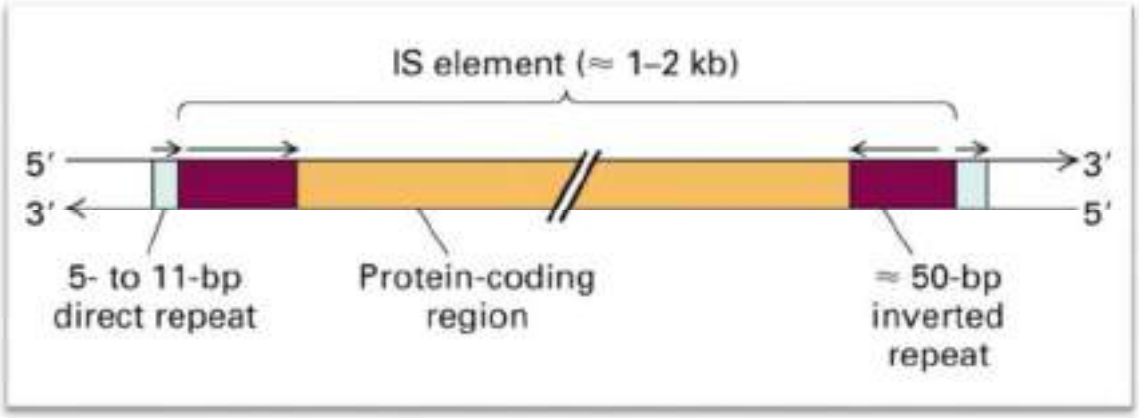
هذه الميكانيكيه لاتتضمن استنساخ الـ RNA و ان عمليه القفز تتم بعده انزيمات (transeposase enzyme) ،عمليه الانتقال تحدث من خلال قص قطعه الـ DNA المراد نقلها و بالتالي تتكون قطعه حامض نووي رايبوزي 5' or 3' معلقه (ذات نهايات دبقه ؟) القطقه التي تم قصها ستلحم في مكان اخر من الجينوم بواسطه انزيمات الـ ligase و يعوض مكانها بشريط جديد من خلال فعاليه الـ DNA polymerase



انواع الجينات القافزه البكتيريه

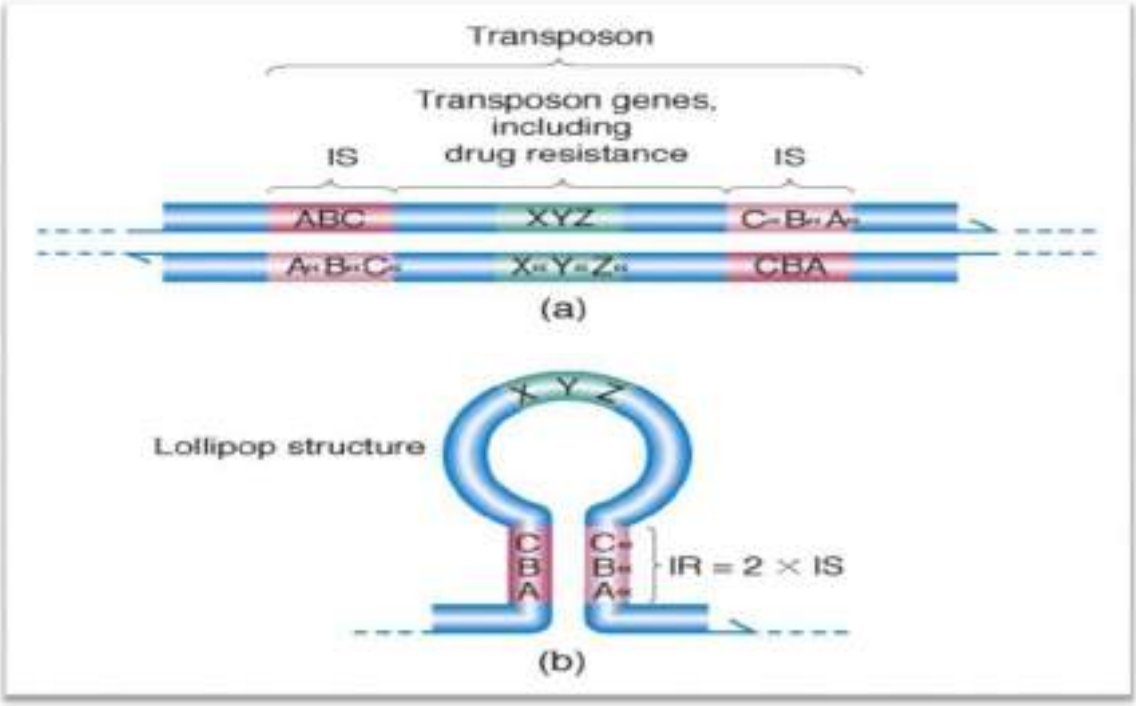
القطع الانحشاريه Insertion Sequence (IS)

وهي عباره عن تسلسلات قصيره من الحامض النووي منقوص الاوكسجين بحدود 50kb و من الامثله عليها IS1 &IS186 الموجوده في بكتريا الـ E. coli . الصوره ادناه تمثل شكل القطع الانحشاريه وهي مكونه من المنطقه الوسطيه تحتوي على واحد او اثنين من الجينات المشفره للانزيمات و قطعتين من التسلسلات القصيره التي تساعد على الدخول و الافلات من الجينوم.



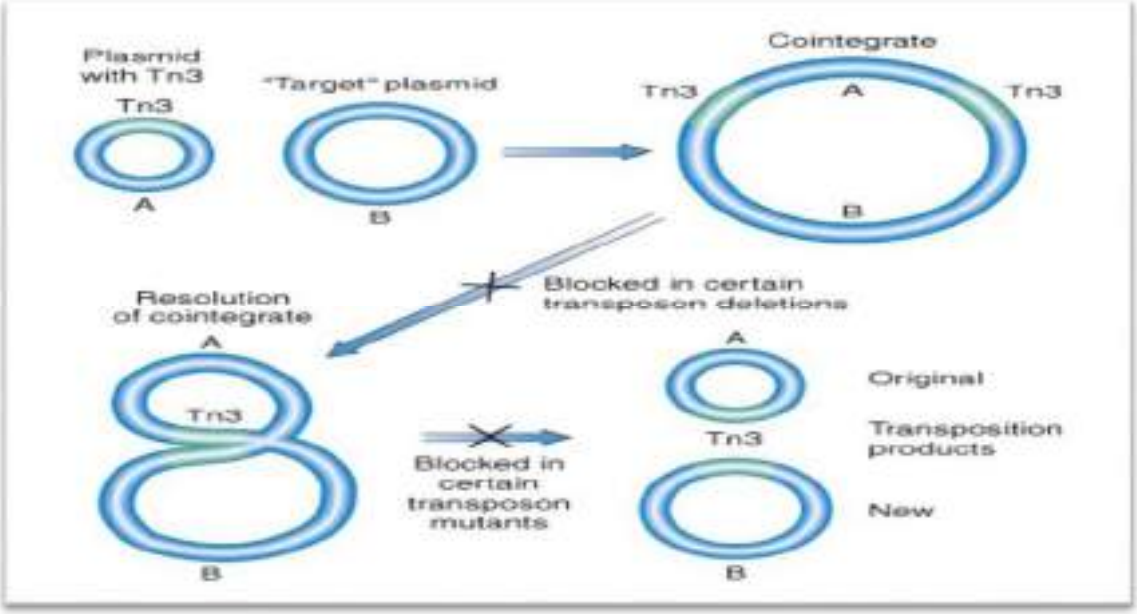
الجينات القافزه المركبه Composite transposon

هي عباره عن قطعتين انحشاريتين يحصرا بينهما واحد او اكثر من جينات المقاومه للمضادات الحياتيه مثل الـ Tn5 ,Tn9 & Tn10



عائله الجينات القافزه Tn3

وهي عباره عن تسلسلا حامض نووي رايبوزي منقوص الاوكسجين حجمها (5000bp) وهي تشفر لانزيمات الـ transposase , β- lactamase & resolvase(يعمل على السيطره على انتاج انزيم الـ , transposase) وتحتوي هذه العائله على التسلسلات النهائيه المعكوسه ITR مثل الـ Tn3



الفاجات القافزه transposable phage

هي عباره عن فايروسات بكتيريه يكون جزء من دوره الاصابه infectious cycle القدره على الانتقال ضمن الجينوم مثل الـ Mu phage وهذه الفايروسات مكونه من مناطق خاصه بالدخول الى خليه المضيف وتضاعف جيناتها فيه و الجينات المسؤوله عن تحلل خليه المضيف بعد انتهاء دوره الاصابه و الجينات المسؤوله عن الغلاف البروتيني للفايروس وهذه الجينات تكون محاطه بالـ ITR

المختبر الثاني عشر

نواقل الكلونه cloning vector

نواقل الكلونه هي قطع صغيره من الـ DNA لها القدره على البقاء ثابته عند ربطها مع قطعه DNA غريبه ،كما تبقى ثابته عند ادخالها الى خلايا المضيف (لاتتعرف عليها انزيمات الـ endonuclease) وهي تمثل قطع من بلازميد ،فايروس ، او جزء من كروموسومات الكائنات متعدده الخلايا (خميره،حيوان وانسان)

مواصفات نواقل الكلونه:

1-مواقع ربط وازاله قطع الـ DNA الغريبه cloning site وهذا الموقع يحوي على واحد او اكثر من مواقع قطع الانزيمات القاطعه restriction site

2-يحتوي ناقل الكلونه على صفات انتقائيه selectable marker هي عباره عن صفات يمكن ملاحظتها في خلايا المضيف مثل صفات المقومه للمضادات الحياتيه وبعض الصفات الشكليه وهي ضروريه لغرض تأكيد اخذ المضيف للناقل

3-بعض نواقل الكلونه تحتوي على جينات اضافيه تساعدها في البقاء و التعبير في الكائن الحي مثلا النواقل المستخدمه مع الـ E.coli تحتوي على منطقه تضاعف فعاله (ori)

4-تستخدم بعض نواقل الكلونه انزم الـ Topoisomeraseبدلا من الـ Ligase مما يمكنها من العمل بسرعه بدون الحاجه الى عمليه قطع الناقل وهذه العمليه تسمى Topocloning methods ففي هذه العمليه يمكن تفعيل الانزيم لربط ناقل خطي مباشره مع DNA المضيف او ربط الناقل مع احد منتجات الـ PCR ثم تحرير الانزيم (Topoisomerase) لاعاده تكوين الناقل الحلقي

ملاحظه ماهي اليه عمل انزيم الـ Topoisomerase ؟؟ Shuttle vector نواقل كلونه لها القدره على التضاعف في كائنين (بكتريا وخميره او خميره وخلايا حيوانيه) وتمتاز هذه النواقل باحتوائها على مناطق تضاعف و صفات انتقائيه مناسبه لكلا الكائنين ، الفائده منها انها تساعد على اختبار التعبير عن صفه معينه محمله عى ناقل واحد في اكثر من كائن

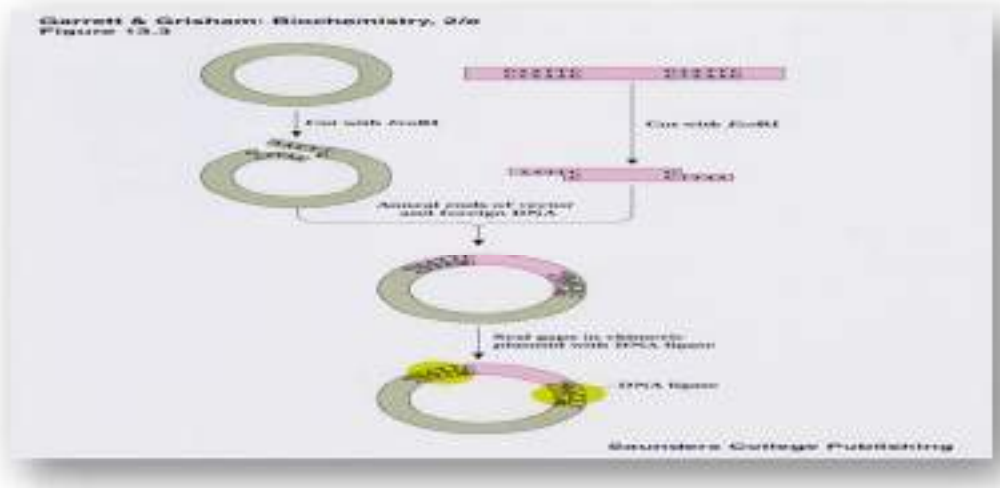
الخطوات الاساسيه للكلونه:

1-تهيئه ناقل الكلونه المناسب وقطعه الـDNA من خلال معاملتها بنفس انزيم التقطيع restriction enzyme وذلك لتكوين نهايات متكامله

2-لحم قطعه الـDNA الغريبه بالناقل باستخدام انزيم الـ ligase

3-نقل الـ DNA الى خلايا المضيف بواسطه عمليه الـ transformation

4-اختيار الخلايا التي تحتوي على قطع الـ DNA الغريبه من خلال التحري عن ظهور الصفات الانتقائيه الشكل التالي يوضح عمليه الكلونه

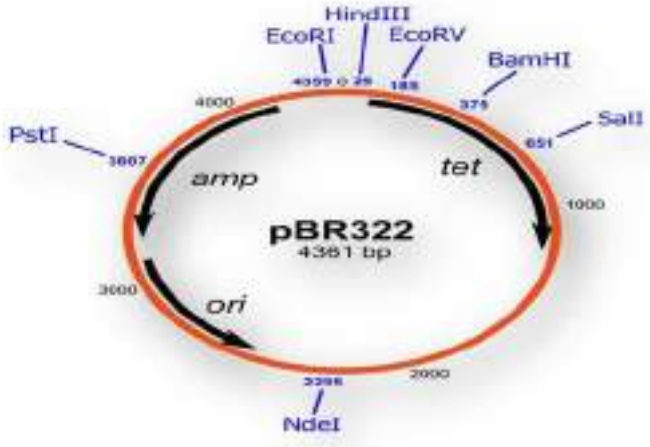


انواع نواقل الكلونه

اولا:- البلازميدات Plasmid

عباره عن قطع DNA حلقيه خارج الكروموسومات ذاتيه التضاعف، تعتبر نواقل كلونه قياسيه وواسعه الاستخدام يمكن اضافه قطع DNA بحجم (0-10Kb) توجد البلازميدات في الخلايا بعدد كبير وهذه الصفه مهمه في الحصول على عدد كبير من نسخ الجين المراد نقله الا ان بعض البلازميدات توجد بنسخ قليله وهو مفيد في بعض الحالات (متى؟؟؟)

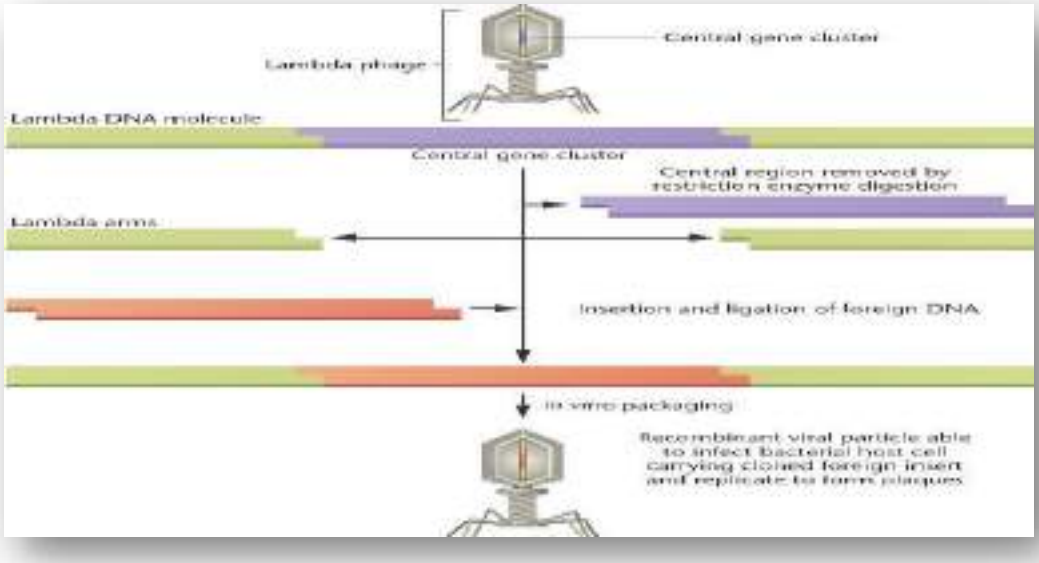
من اكثر الامثله شيوعا عن نواقل الكلونه البلازميديه هو بلازميد الـ PBR322 وهو يمتاز بكونه الاكثر شيوا للاستخدام مع بكتريا E. coli ويحتوي على الـ replicon (rep)مسؤول عن عمليه تضاعف البلازميد، ampR gene جين المقاومه للامبسلين، tetR gene جين مقاومه التتراسايكلين وهو يحتوي على عدد كبير من واقع القطع الانزيمي restriction sitesوان الشكل التالي يوضح البلازميد PBR322



ملاحظه عرف الـ non- replicative plasmid & replicative plasmid وايهما يفضل اكثر كناقل كلونه؟؟؟

ثانيا: - العاثيات البكتيريه Bacteriophage

ان العاثي لمدا والعاثي M13 من اكثر العاثيات البكتيريه استخداما كنواقل للكلونه اذ يجري تحويرها بازاله الجينات الغير اساسيه مثل اواله الجينات المسؤوله عن دوره الـ lysogeny cycle اة الجينات المسؤوله عن lytic cycle لاضافه قطع الـ DNA المراد نقلها وهذه النواقل يمكنها حمل قطع DNAبحجم يتراوح (0-24Kb) الشكل التالي يوضح طريقه حشر قطع الـDNA ضمن جينوم العاثي لمدا



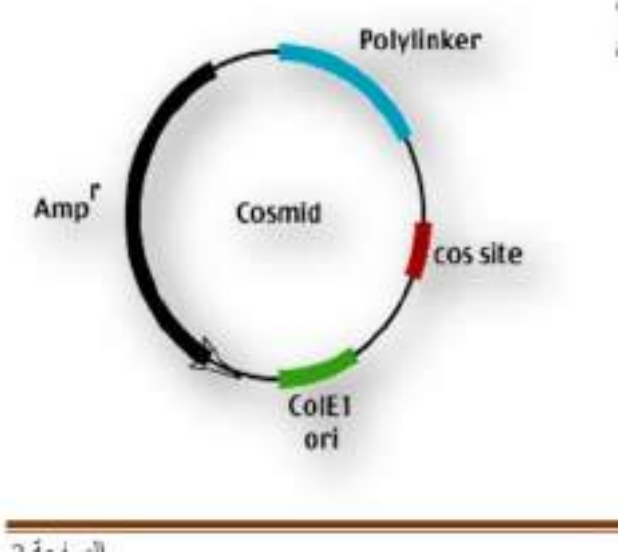
ثالثا:- الكوزميد Cosmid

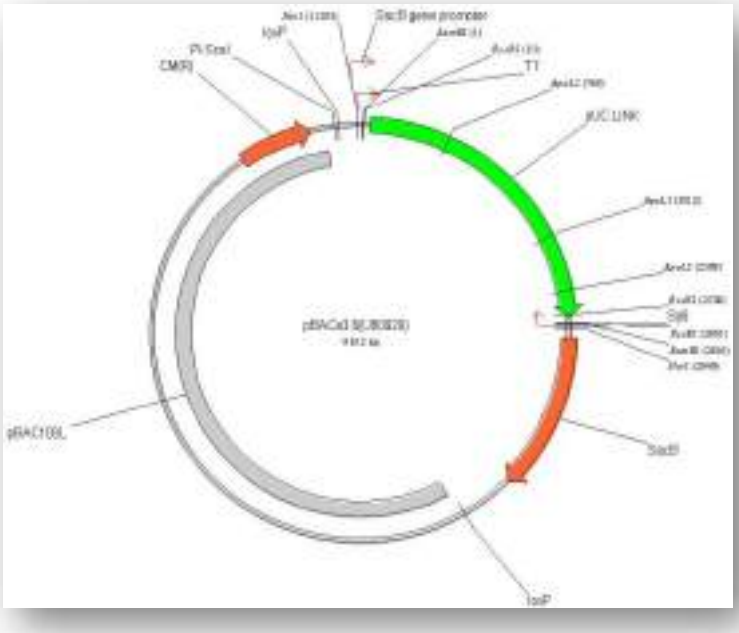
عباره عن بلازميد مضاف له قطعه من جين العاثي لمدا cos (cohesive end site) وهذه القطعه تحتوي على الجينات الخاصه بتعبئه العاثي . هذا النوع من النواقل له القدره على حمل قطعه DNA يتراوح حجمها بين 05-35)(Kb الشكل التالي يوضح ناقل الكلونه الكوزميد

Bacterial artificial chromosome (BAC)

رابعا:-

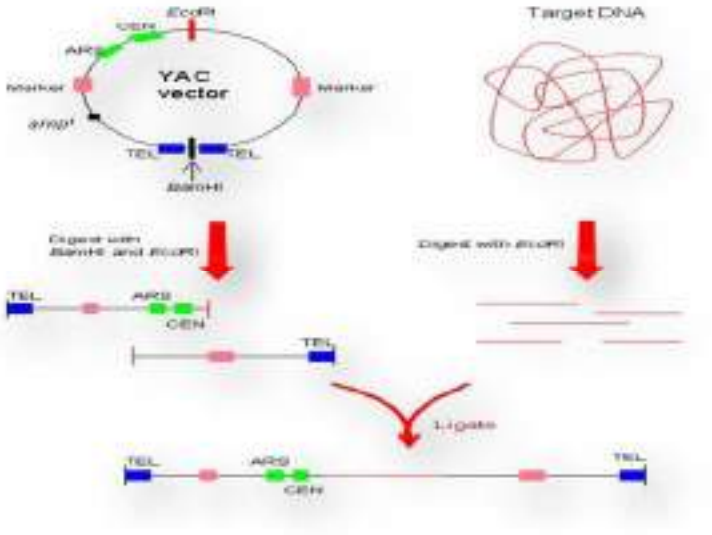
نواقل كلونه تعتمد على F-plasmid لها القدره على حمل قطع DNA بحجم (75-300Kb) والشكل التالي يوضح
الـ BAC





خامسا:- Yeast artificial chromosome (YAC)

عباره عن كروموسوم خميره محور يحتوي على الـ Telomer ومنطقه بدء التضاعف ori وسنترومير الخميره بالاضافه الى جينات تشفر لصفات انتقائيه يمكن ملاحظتها في خلايا الخميره ، هذه النواقل يمكنها حمل قطع DNA بحجم (100-1000Kb) الشكل التالي يوضح الـYAC cloning vector



المختبر الثالث عشر

تقنية البلمرة المتسلسلPolymerase chain reaction P RC

تعد هذه التقنيه واحده من التقنيات المهمه في علم البايولوجي الجزيئي ،في هذه التقنيه يتم مضاعفه نسخه مفرده او عدد قليل من نسخ الـ DNA الى عدد من النسخ يصل الى عده الالاف او عده ملايين نسخه بعدد قليل من الخطوات التي سيتم توضيحها لاحقا

نبذه تأريخيه

تم وصف تقنيه الـ PCR لاول مره عام 1971 في مقاله نشرت من قبل العالم Kleppe و زملائه ،اوضح فيها امكانيه تضاعف قطعه صغيره من الـ DNA مختبريا باستخدام نظام انزيمي و برايمرات (بادئات) معينه الا ان هذه المقاله لم تلق الاهتمام المطلوب حتى قام العالم Mullis عام 1983 بتطبيق هذه التقنيه بصوره عمليه و منذ ذلك الوقت اصبحت هذه التقنيه تستخدم بكثره في مجالات عديده منها الطب و الصيدله و الكيمياء الحياتيه وغيرها.

الخطوات الاساسيه لتقنيه الـ PCR

يمكن باستخدام هذه التقنيه مضاعفه قطع DNAبحجم يتراوح بين 0.1-10 Kbp الان ان بعض التقبيقات الحديثه لهذه التقنيه مكنت العلماء من مضاعفه قطع DNAبحجم يصل الى 40Kbp ويمكن تلخيص اساس العمل بمرحلتين اساسيتين هما

اولا:- الفصل الفيزياوي لشريطي الحامض النووي الرايبوزي منقوص الاوكسجين باستخدام حراره عاليه تسمى هذه العمليه اذابه الـ DNA (DNA melting)

ثانيا:- خفض درجه الحراره للسماح بانزيمات الـ DNA Polymerase من اعاده تصنيع اشرطه متممه لاشرطه الـ DNA الاصليه.

وفيما يلي تفصيل للخطوتين الاساسيتين اعلاه

خطوه البدء Initialization Step هي خطوه ابتدائيه تتطلب تسخين التفاعل لدرجه (94-96 or 98)ْم لمده 9-1) (min لغرض تنشيط انزيم الـDNA Polymerase

المسخ Denaturation step تتضمن هذه الخطوه حراره تصل الى (89-94)ْم لمده (20-30 sec) لغرض فك الارتباط الفيزيائي بين شريطي الـ DNA (تكسير الاواصر الهيدروجينيه)

الارتباط Annealing step في هذه الحاله يتم خفض درجه الحراره لغايه (05-56)ْم لمده (20- 40 sec) مما يسمح للبرايمر بالارتباط مع شريط الـ DNA المفرد ، ان درجه الحراره المثاليه مهمه جدا في هذه الخطوه لان الحراره العاليه قد لاتساعد على حصول الارتباط بين البرايمر و الشريط المفرد للـ DNA كما ان الحراره المنخفضه قد تؤدي الى ارتباط غير دقيق و غير كامل بين البرايمر وشريط الـ DNA لذا يجب ان تكون الحراره اقل من الحد الادنى لحراره البرايمر ب 3-5 درجات . بعد حصول الارتباط الدقيق يرتبط الـDNA Polymerase بالبرايمر و تبدأ عمليه تكوين الشريط المتمم Complementary strand of DNA

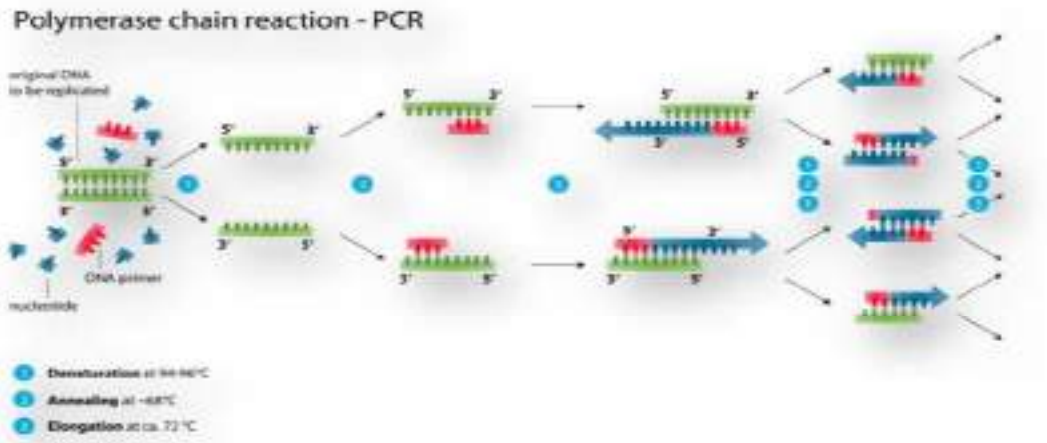
الاستطاله Elongation or Extension step ان درجه الحراره في هذه الخطوه تعتمد على نوع الـ polymerase المستخدم في التجربه ، فأذا كان الانزيم هو Taq polymerase فأن الحراره المثلى للفعاليه تكون بين (08 - 57)ْ م . يبدأ الـ DNA Polymerase في هذه المرحله بتصنيع الشريط المتمم لقالب الـ DNA باضافه dNTPs و باتجاه 5'-3' .ان الوقت الذي تستغرقه هذه الخطوه يعتمد على نوع الـ polymerase المستخدم و طول قطعه الـ DNA المراد مضاعفتها ،على فرض ثبات بقيه العوامل و عدم وجود مثبطات فأن انزيم الـ DNA Polymerase يستطيع بلمره الف زوج قاعدي في الدقيقه

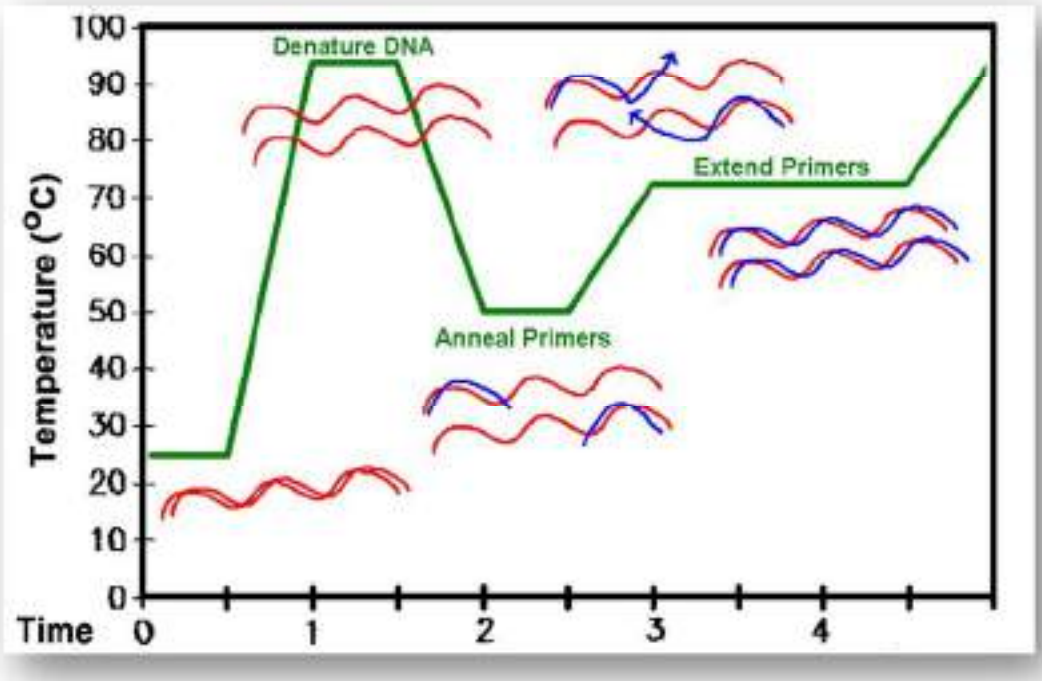
المثبطات التي تؤثر على وقت عمليه الاستطاله

1. قله الماده الاساس dNTPs
2. قله المواد المستخدمه في التفاعل
3. كميه الـ DNA الهدف المتضاعه

الاستطاله الاخيره Final elongation تجري هذه الخطوه بعد الدوره الاخيره من عمليه التضاعف ،اذ تكون درجه الحراره بين (47 -07) ْم لمده (5-15 min) الغرض منها التأكد من ان جميع اشرطه الـ DNA المفرده تم عمل اشرطه مكمله لها

الصور التاليه توضح خطوات هذه التقنيه





لغرض اتمام عمليه الـ PCR يجب توفر عدد من المكونات نذكر منها :

1. قالب الـDNA وهو قطعه حامض نووي رايبوزي منقوص الاوكسجين يحتوي على الجين المراد مضاعفته (target DNA)
2. زوج من البرايمرات التي تكون مكمله لقطعه الـ DNA الهدف و لكلا الشريطين
3. انزيم الـ Taq polymerase او انزيم بوليميريز اخر يتحمل درجه حراره عاليه تصل الى 70 °م
4. Deoxynucleoside triphosphate (dNTPs) قد تسمى احيانا deoxynucleotide triphosphate وهي عباره عن نيوكليوتيدات تحتوي على مجموعه ثلاثيه الفوسفات وهي الوحدات الاساسيه التي يستخدمها الـ DNA Polymerase لتصنيع اشرطه الـ DNA الجديده
5. محلول بفر يوفر بيئه مناسبه لغرض اعلى فعاليه وثبات لانزيم الـDNA Polymerase

ملاحظه ماهو الـTaq polymerase من اي كائن تم عزله و ماهي مواصفاته؟؟

من الاختبارات التي يستعمل فيها الـ PCR

1. تحديد الانماط الجينيه للفايروسات مثل فايروس التهاب الكبد الفايروسي نوع C
2. الكشف عن الامراض الوراثيه قبل ضهور الاعراض
3. الكشف عن الامراض الوراثيه عند الاجنه قبل الولاده
4. تشخيص الامراض السرطانيه بالكشف الجيني
5. تعيين الانماط النسيجيه HLC- tissue typing في مجال زراعه الاعضاء
6. تلعب دورا مهما في الطب الجنائي والشرعي.
7.

هناك عده انواع اخرى من الـ PCR التقليدي الذي تم توضيحه اعلاه و كل نوع يستخدم لهدف معين ذكر من انواع الـ PCR:

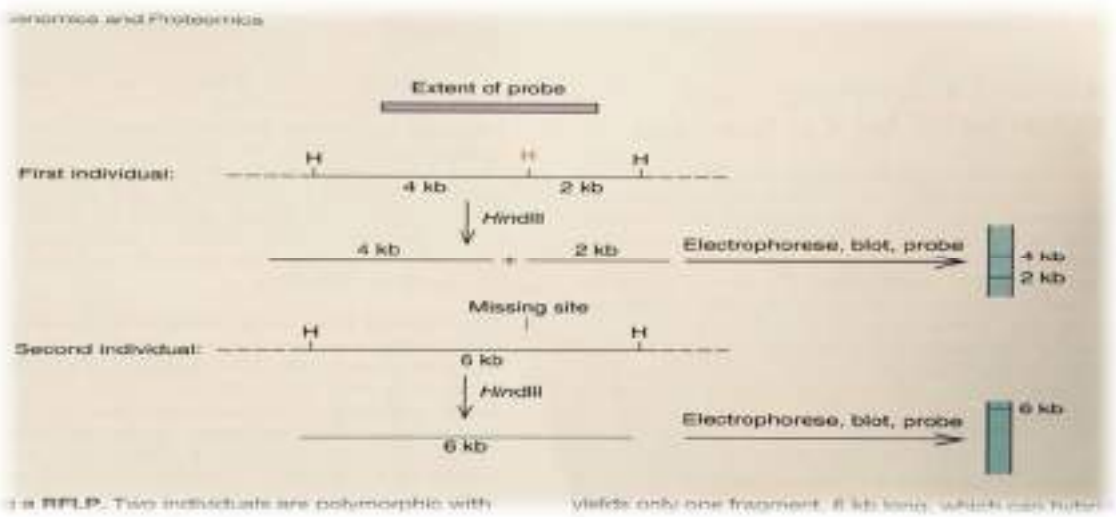
1. Conventional PCR
2. Real Time PCR
3. Quantitative PCR (qPCR)
4. Reverse transcription PCR (RT-PCR)

المختبر الرابع عشر

Restriction fragment length polymorphism (RFLP)

RFLP هي التغايرات في عدد قطع موقع جيني معين مهضوم بنفس الانزيم القاطع بين شخص واخر. ان استخدام هذه التقنيه في اواخر القرن العشرين كان بداعي الحصول على الخارطه الجينيه للجنس البشري الا انها لم تكن نافعه جدا(لماذا)

ان اساس العمل بهذه التقنيه هو احتواء الجينوم على عدد من مواقع القطع للانزيمات القاطعه لذا فأن استخدام هذه الانزيمات سيعطي عدد من القطع يختلف من شخص لاخر والاختلاف يكون بعدد القطع وحجمها بين الاشخاص لنفس الموقع الجيني ز لنفترض ان موقعا معينا يحتوي على تسلسل قطع لانزيم HindIII فأن القطع الناتجه من استخدام هذا الانزيم على شخصين مختلفين يعطي للشخص الاول قطعتين بحجم 2&4Kb بينما الشخص الثاني لايحتوي على موقع قطع في وسط الموقع الجيني لذا فأنه يعطي قطعه واحده بحجم 6Kb كما في الشكل التالي

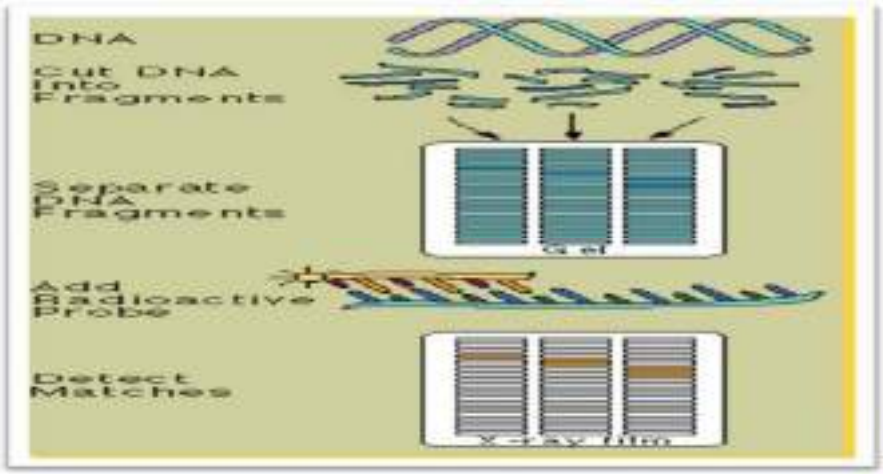


بما ان جينوم الكائنات الحيه يحتوي على مئات الالوف من مواقع القطع لكل انزيم قطع معين لذا كان لابد من وجود طريقه لتوضيح تسلسلات معينه لذا تم استخدام معلمات Radioactive probes مشعه لها القدره على الارتباط بمواقع معينه على الجينات لتوضيحها و في الوقت الحالي نستخدم البرايمرات وتقنيه الPCR للتحري عن عدد القطع الناتجه و مقارنتها مع الافراد الاخرى

الخطوات الاساسيه لتقنيه الـ RFLP:

1. هضم قطعه معينه من الـ DNA باستخدام الانزيمات القاطعه
2. فصل القطع الناتجه على اساس طولها وحجمها باستخدام الترحيل الكهربائي
3. نقل القطع المطلوبه من الهلام باستخدام تقنيه الـ Southern blot
4. استخدام معلم DNA probe مكمل لقطع الـ DNA الناتجه
5. البحث عن الفروقات الفرديه بين عدد القطع وحجمها

المختبر الرابع



استخدامات تقنيه الـ RFLP:

1. اثبات الابوه Paternity
2. التحري عن خط الاصابه بالامراض الجينيه
3. تحديد الجينات المسؤوله عن الاخطاء الوراثيه (genetic disorder)
4. التحري عن اصل الكائنات تامجهريه من المصادر المختلفه (genetic diversity)
5. الطب العدلي
6. Genetic fingerprinting