تتمة مقرر البيولوجيا الجزيئية

تضاعف الـ DNA

DNA replication

مقدمة:

لابد من المحافظة على المعلومات الوراثية في الـ DNA كما هي في كل مرة تنقسم فيها الخلية وبذلك نضمن أن المعلومات تنتقل إلى الخلايا الجديدة كما هي بدون تغيير، كما أن جزيئات الـ DNA يجب أن تبقى محفوظة لفترة طويلة بالمقارنة مع جزيئات الـ RNA والبروتين. إن الهيكل سكر- فوسفات لجزيء الـ DNA ذو بنية ثابتة جداً لأنه لا توجد مجموعات هيدروكسيل حرة على السكر (تكون كلها مستخدمة في الروابط إما مع الأساس أو مع الفوسفات) والأسس بحد ذاتها محمية من أية خطر كيميائي لأنها تتوضع داخل حلزون الـ DNA المضاعف. ومع ذلك فإن التغييرات الكيميائية (أو ما يسمى طفرات mutations) تحدث في جزيء الـ DNA ولذلك كان لا بد للخلايا من أن تطور آليات لتبقي الطفرات بحدها الأدنى. إن نظم إصلاح الطفرات أساسية لبقاء الخلية والتأكد من أن تسلسل الـ DNA الصحيح هو الذي ينتقل إلى الخلية البنت الجديدة (daughter cells)

يبين هذا القسم كيف تتشكل جزيئات الـ DNA الجديدة أثناء تضاعف الصبغيات وكيف تتصرف الخلية لتصلح تغيرات الأسس في الـ DNA.

تضاعف الـ DNA

أثناء تضاعف الـ DNA تنفتح السلاسل المضاعفة وتعمل كل سلسلة كقالب template لاصطناع سلسلة جديدة وتولد هذه العملية جزيئي DNA جديدين مضاعفي السلسلة وكل منهما مماثل للجزيء الأم ويكون

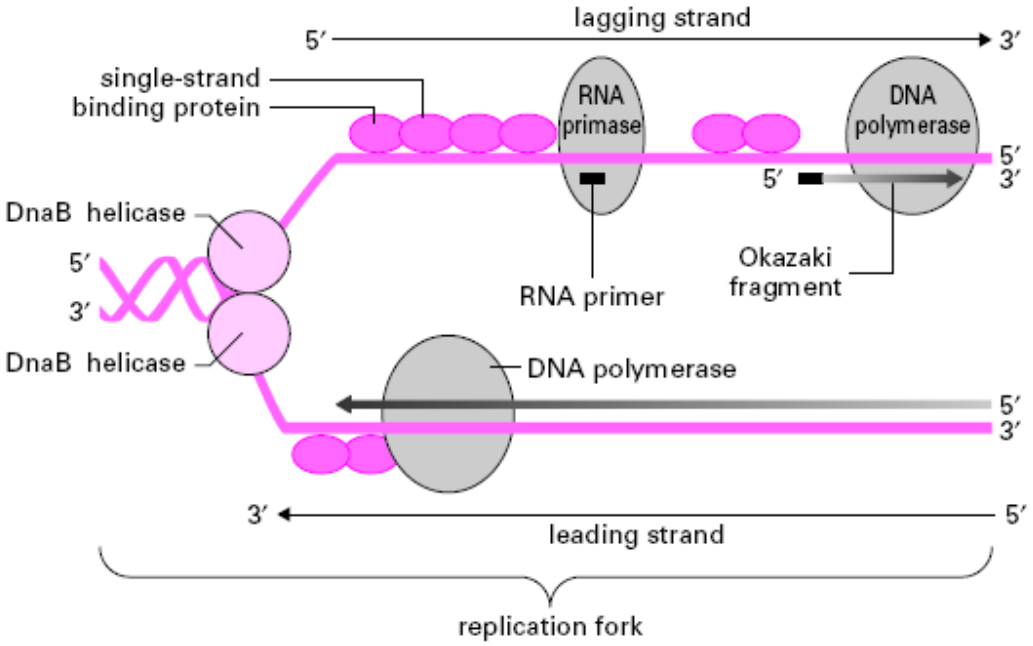
د. ظلال قطان 2017/2018

تسلسل الأسس في السلسة الجديدة مكملاً للتسلسل في السلسلة القالب template وهذا يعني أن الأسس C, A في السلسلة القديمة تقابل بالأسس G, T في السلسلة الجديدة.

شوكة تضاعف الـ DNA : The DNA Replication Fork

إن اصطناع نسخة جديدة من سلسلة الـ DNA (تضاعف الـ DNA) يبدأ في تسلسل محدد يسمى origin of replication، حيث يملك الصبغي الحلقي الصغير للـ E.Coli موقعاً واحداً من هذا النوع بينما يوجد العديد من هذه المواقع (كما ذكرنا اسمها origin of replication) في كروموزومات حقيقيات النوى والتي تكون أكبر.

عند كل موقع من الـ origin of replication تنفتح جديلة الـ DNA لتعطي بنية تسمى شوكه التضاعف replication fork كما هو موضح في الشكل الآتي، و إن ابتعاد سلستي الـ DNA عن بعضهما البعض يسمح لكل سلسلة أن تعمل كقالب لاصطناع سلسلة جديدة.



شكل يوضح تضاعف الـ DNA

DNA replication. The helicases, and the replication fork, are moving to the left.

إن بنية الحلزون المضاعف وطبيعة تضاعف الـ DNA تمثل مشكلة ميكانيكية: كيف تبتعد السلاسل عن بعضها وكيف تبقى بعيدة غير ملتفة على بعضها بحيث تعمل كقالب لاصطناع سلسلة جديدة.

- **البروتينات تفتح حلزون الـ DNA المضاعف خلال عملية التضاعف:**

لا بد من فتح جزيء الـ DNA قبل عملية التضاعف ولكن جزيء الـ DNA ذو بنية ثابتة جدًا ففي أنبوب الاختبار لا يمكن أن تتباعد السلاسل عن بعضها حتى يتم رفع درجه الحرارة إلى 90 درجه مئوية، ولكن داخل الخلية تتعاون العديد من البروتينات لفصل السلسلتين.

إن معظم المعلومات المتوفرة أتت من دراسة جرثومة الـ E.Coli ولكن تحدث نفس الآلية في المتعضيات الأخرى من حقيقيات وطليعيات النوى. تستخدم جرثومة الـ E.Coli البروتينات التالية لفتح جزيء الـ DNA أثناء التضاعف وهي: DnaA, DnaB, DnaC بالإضافة إلى بروتين يسمى Single-Strand binding protein (SSBP).

<u>بروتين Dna A :</u>

يكون هناك العديد من النسخ من هذا البروتين التي ترتبط إلى تسلسلات مكونة من 9 base pairs (9bp) تسع أزواج من الأسس الموجودة في الـ origin of replication (Ori C) في جرثومة الـ E.Coli وهذا ما يسبب بداية تباعد سلسلتي الـ DNA عن طريق إزالة الروابط الهيدروجينية في الـ DNA في الأماكن التي يرتبط فيها بروتين الـ DnaA، وهكذا يصبح الـ DNA في مرحلة تشكل المعقد المفتوح (open complex) وتم تحضيره للمرحلة التالية من التضاعف والتي سيتم فيها فتح حلزون الـ DNA بشكل أكبر.

<u>بروتين DnaB and DnaC :</u>

DnaB عبارة عن أنزيم الـ helicase والذي يتحرك على طول جديلة الـ DNA محطماً الروابط الهيدروجينية وبهذه العملية يزيل التفاف سلاسل الـ DNA الحلزونية. وتحتاج هذه العملية إلى جزيئتين من بروتين DnaB واحد لكل سلسلة من سلسلتي الـ DNA يتحرك أحدهما بالاتجاه (5'-3' direction) والآخر يرتبط بالسلسلة المتممة ويتحرك بالاتجاه (3'-5' direction). يتم إيصال البروتين DnaB إلى جزيء الـ DNA بمساعدة البروتين DnaC ولكن بعد إيصاله لا يلعب بروتين DnaC أي دور آخر في عملية تضاعف الـ DNA.

<u>البروتين الرابط للسلسلة المفردة: Single-Strand binding protein</u>

د. ظلال قطان 2017/2018

حالما تنفك سلسلتي الـ DNA الأصل (الأم) عن بعضهما تتم إحاطتهما بالبروتينات الرابطة للسلسلة المفردة single-strand binding proteins (SSBPs) وترتبط هذه البروتينات إلى مجموعات متجاورة من النكليوتيدات بطول 32 نكليوتيد ويكون الـ DNA المحاط بهذه البروتينات قاسياً بدون انحناءات أو انطواء وبهذا يمثل قالباً لاصطناع سلسلة الـ DNA كما هو مبين في الشكل السابق. تسمى البروتينات الرابطة للسلسلة المفردة أحياناً باسم آخر هو helix-destabilizing proteins أو البروتينات التي تزيل ثبات الحلزون.

- الكيمياء الحيوية لتضاعف الـDNA:

إن اصطناع جزيء الـ DNA الجديد يحفز بواسطة أنزيم الـ DNA polymerase III وإن ركيزة هذا الأنزيم (ركيزه =substrate) هي النكليوتيدات dATP, dCTP, dGTP and dTTP, حيث يحفز هذا الأنزيم اصطناع phosphodiester link بين هيدروكسيل 3'-OH من السكر في النكليوتيد الأول مع مجموعة الفوسفات 5' من النكليوتيد الثاني ويكون تسلسل الأسس في السلسلة الجديدة مكملاً للسلسلة الأم فمثلا إذا كان تسلسل القالب في السلسله الأم 5' CATCGA 3' فإن السلسلة البنت الجديدة تحوي التسلسل 5' GTAGCT 3'.

يستطيع أنزيم الـ DNA polymerase III إضافة نكليوتيد إلى مجموعة هيدروكسيل حرة على الكربون 3' وبذلك يصطنع سلسله الـ DNA في الاتجاه 3'-5' وبذلك فإنه يقرأ السلسلة القالب template strand بالاتجاه 5'-3'.

و لكن بما أن السلسلتين في جزيء الـ DNA متوازيتان بالتعاكس antiparallel فإنه لا يمكن أن يتم اصطناعهما بنفس الاتجاه، ولم يتم حتى الآن العثور على أنزيم DNA polymerase يمكنه اصطناع سلسلة الـ DNA في الاتجاه 5'-3'، أي أنه لا يوجد أنزيم يصل النكليوتيد إلى الطرف 5'-phosphate group ولهذا فإن اصطناع سلسلتي الـ DNA الجديدة (البنات) لا بد أن يتم بشكل مختلف (كما سنشرح الآن).

يكون هناك ما يسمى leading strand أو السلسلة الموجهة يتم اصطناعها بشكل مستمر بينما السلسلة الأخرى وتسمى lagging strand يتم اصطناعها بشكل متقطع. يستطيع أنزيم الـ DNA polymerase اصطناع سلسلتي الـ DNA الجديدتين ولكنه يصنع السلسلة المسماة lagging strand بشكل تسلسل من قطع قصيرة بالاتجاه 3'-5'

وهذه الأجزاء من الـ DNA (و تسمى Okasaki fragments) تنضم إلى بعضها البعض بواسطة أنزيمي DNA polymerase and ligase.

2017/2018 ظلال قطان

- يحتاج اصطناع الـ DNA برايمر من الـ RNA :DNA synthesis requires an RNA primer

لا يستطيع أنزيم الـ DNA polymerase بدء اصطناع الـ DNA لوحده بل يحتاج إلى مساعدة أنزيم آخر يسمى primase والذي يحفز تشكل اصطناع قطعة قصيرة من الـ RNA متممة لتسلسل الـ DNA في السلسلة القالب (انظر الشكل السابق) وإن سلسلة الـ RNA هذه – والتي تسمى primer – مطلوبة لبدء اصطناع سلسلة الـ DNA الجديدة. يقوم أنزيم الـ DNA polymerase III بتحفيز تشكل رابطة phosphodiester بين المجموعة الهيدروكسيلية في الطرف ´3 من الـ RNA primer (3'-OH of the RNA primer) وبين مجموعة الفوسفات ´5 (5'-phosphate groups) من النكليوتيد المناسب.

يتم اصطناع العديد من RNA primers على طول الـ lagging strand وكل منها يمتد بالاتجاه '3→' 5 بواسطة أنزيم الـ DNA polymerase III حتى يصل إلى النهاية '5 من قطعة الـ RNA primer التالية. ويوجد في طليعيات النوى RNA primer لكل حوالي 1000 نكليوتيد بينما يوجد في حقيقيات النوى RNA primer لكل حوالي 200 نكليوتيد في الـ lagging strand

إزالة RNA primers are removed : RNA primers

عندما يكتمل اصطناع قطع الـ DNA فإنه بالإمكان استبدال الـ RNA primers بالنكليوتيدات منقوصة الأوكسجين.

في طليعيات النوى يقوم أنزيم الـ- DNA polymerase I بإزالة النكليوتيدات باستخدام فعاليته الأنزيمية 5'→3' exonuclease activity ثم يقوم الـ DNA polymerase I بإضافة نكليوتيدات بالاتجاه '3→'5 باستخدام فعاليته الأنزيمية 5'→3' polymerizing activity وبهذه الطريقة يتم استبدال كامل تسلسلات الـ RNA primers بالـ DNA.

في السلسلة lagging strand يتم استكمال اصطناع الـ DNA باستخدام أنزيم DNA ligase والذي يصل قطع الـ DNA مع بعضها عبر تحفيز تشكل رابطة phosphodiester links بين القطع المتجاورة.

من المرجح أن تستخدم الخلية في حقيقيات النوى أنزيم يسمى ribonuclease H لإزالة الـ RNA primers ويقوم هذا الأنزيم بكسر الروابط phosphodiester بين نكليوتيدات الـ RNA (RNA primer في هذه الحالة) المرتبط بروابط هيدروجينية مع سلسلة الـ DNA.

د. ظلال قطان 2017/2018

الخلاصة:

1- أثناء تضاعف الـ DNA فإن كل سلسله DNA تعمل كقالب لاصطناع سلسله بنت جديدة ويكون تسلسل السلسلة البنت متمماً للسلسلة القالب.

2- يبدأ التضاعف في تسلسلات محددة تدعى origin of replication تنفك السلسلتين الملتفتين عن بعضهما لتشكيل ما يسمى شوكة التضاعف replication fork . يقوم أنزيم الـ helicase بإزالة التفاف الحلزون المضاعف بينما تحافظ البروتينات الرابطة للسلسلة الأحادية (الـ single strand binding proteins) عليه مستقيماً أثناء التضاعف.

يعمل أنزيم الـ DNA polymerase على اصطناع السلسلة leading strand بشكل مستمر بالاتجاه '5 - 3'بينما السلسلة lagging strand تصطنع بشكل متقطع على شكل قطع صغيرة بالاتجاه '3-'5 وترتبط هذه القطع مع بعضها بواسطة أنزيم الـligase.

الفيروسات الحاوية على الحمض النووي RNA

دراسات قديمة أكدت أن المادة الوراثية المسؤولة عن نقل المعلومات الوراثية عبر الأجيال هي الـ DNA، و لكن بعد اكتشاف الفيروسات التي تحتوي الحمض النووي الريبي الـ RNA كمادة وراثية عوضا عن الـ DNA، عاد الجدل بين علماء البيولوجيا الجزيئية و علماء الوراثة الجزيئية حول الطبيعة الكيميائية للمادة الوراثية.

عادت النظرية القائلة : أن البروتينات هي المسؤولة عن حمل و نقل المعلومات الوراثية عبر الأجيال. لبرهان العكس، أجرى الباحثون تجارب عديدة للتأكد من صحة هذه النظرية أو رفضها.

من الأمثلة على الفيروسات التي تملك المادة الوراثية الـ RNA:

- فيروس فسيفساء التبغ (TMV)
- فيروس الأنفلونزا
- فيروس النكاف

د. ظلال قطان 2017/2018

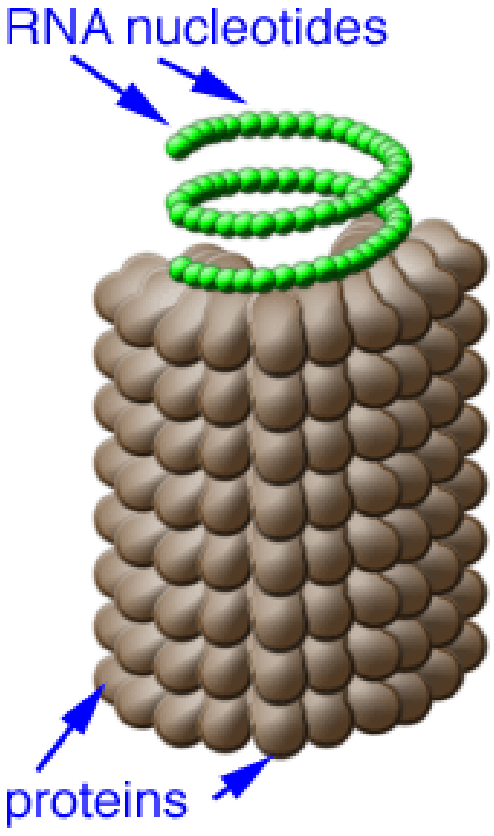
- فيروسات شلل الأطفال
- فيروسات جرثومية مثل فيروسات F2/ R17/ Q
- فيروسات اللوكيميا
- فيروس الإيدز AIDS

دراسة فيروس فسيفساء التبغ (TMV) :Tobacco Mosaic Virus

ينتمي إلى مجموعة فيروسات تبرقش الدخان، يتطفل على أوراق نبات التبغ.

يأخذ هذا الفيروس شكل أسطوانة صغيرة جوفاء، مؤلفة من غلاف بروتيني خارجي و من مادة وراثية تكون على شكل حمض نووي ريبي RNA. يكون هذا الأخير على شكل شريط حلقي أو حلزوني ملتف.

الغلاف البروتيني، لا يشبه الغلاف البروتيني للفيروسات التي تملك الـ DNA كمادة وراثية، فهو يتألف من نوع واحد فقط من الوحدات البروتينية، التي تتحد مع بعضها البعض لتشكل الغلاف البروتيني الخارجي للفيروس.



Tobacco Mosaic Virus (TMV) فسيفساء التبغ

أجريت الكثير من الأبحاث للتأكد من طبيعة المادة الوراثية للفيروسات الحاوية على الـ RNA، من أهمها أبحاث فرانكل كورنات التي أجريت على فيروس فسيفساء التبغ TMV.

د. ظلال قطان 2017

- لاحظ العلماء أنه يمكن فصل بروتينات الغلاف عن الـ RNA وذلك بنقع الفيروسات في مزيج من الماء و الفينول.

يعمل الفينول على تفكيك الارتباط ما بين الوحدات البروتينية و المادة الوراثية للفيروس. و هذا التفكك عكوس لأنه يعاد بناء هذه الفيروسات، بضم الوحدات البروتينية و الـ RNA في أنبوب اختبار لا يحتوي على مزيج الفينول و الماء.

- أكدت الدراسات التي أجريت على فيروسات فسيفساء التبغ، أنه يوجد عدة سلالات من هذا الفيروس.

تختلف عن بعضها البعض:

1- في نوع و خصائص البروتينات المكونة للغلاف البروتيني للفيروس.

2- نوع البروتين المميز الموجود في الغلاف البروتيني لهذه الفيروسات، و عن طريق هذا البروتين المميز يتم التعارف ما بين الفيروس و عائله المضيف.

تجربة فرانكل كورنات .Frankel corant et al (1955) :

- استخدم الباحثون سلالتين من فيروس فسيفساء التبغ سلالة A و سلالة B.
- نقعوا كل سلالة على حدا في مزيج من الماء و الفينول.
- فصلوا البروتينات عن المادة الوراثية، عن طريق التثفيل السريع جدا Ultra-Centrifugation.
- بعد مرحلة التثفيل تترسب الجزيئات البروتينية الثقيلة في قاع أنبوب التثفيل أما المادة الوراثية الـ RNA تبقى في المحلول الطافي.
- أجرى الباحثون تجربة التصالب العكسي، فتم الحصول على نوعين من الفيروسات الهجينة.

1- ضم الحمض النووي RNA للسلالة الأولى من الفيروسات A مع بروتينات السلالة الثانية من الفيروسات B.

2- ضم الحمض النووي RNA للسلالة الثانية من الفيروسات B مع بروتينات السلالة الأولى من الفيروسات A.

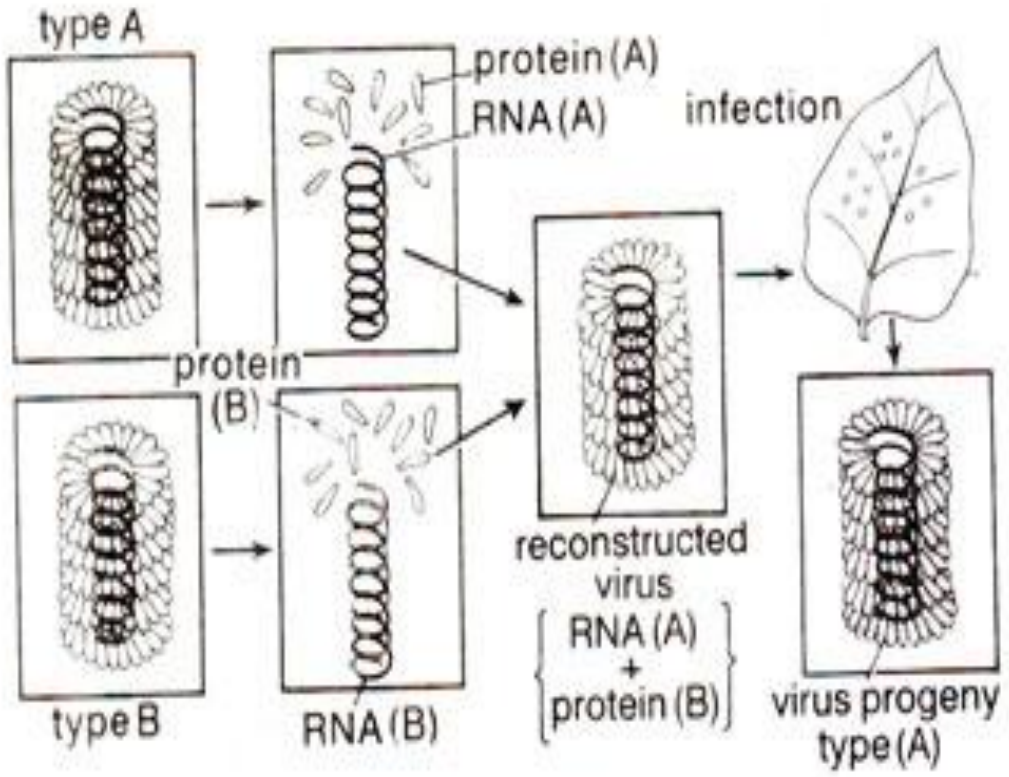
- و من ثم، ترتبط الوحدات البروتينية B مع بعضها البعض من جديد، و تشكل غلاف بروتيني حول المادة الوراثية للفيروس A، و ترتبط الوحدات البروتينية A مع بعضها البعض من جديد، و تشكل غلاف بروتيني حول المادة الوراثية للفيروس B.
- بعد الانتهاء من تشكيل الفيروسات الهجينة الجديدة، تحضن هذه الأخيرة مع أوراق نبات النبغ.
- تقوم الفيروسات الهجينة بدورة حياتها داخل خلايا أوراق التبغ، و بعد أن تكمل دورة حياتها. يقوم الباحثون بأخذ عينات من تلك الفيروسات الهجينة الجديدة و القيام بالتحاليل المطلوبة لمعرفة طبيعة بروتيناتها و حمضها النووي.

د. ظلال قطان 2017/2018

النتيجة:

تبين للباحثين أن طبيعة الغلاف البروتيني الذي يحيط بالأفراد الفيروسية الجديدة الناتجة من تجربة التصالب العكسي، يتبع نمط الفيروس الذي استخلص منه الحمض النووي RNA في بداية التجربة. أي المادة الوراثية من النمط A يحيط بها البروتينات من النمط A، و المادة الوراثية من النمط B يحيط بها البروتينات من النمط B.

و بذلك أثبتت هذه التجربة أن المادة الوراثية في هذه الفيروسات هو الحمض النووي RNA و ليس البروتينات.



تجربة فرانكل كورنات

2017/

دورة حياة الفيروسات الحاوية على الحمض النووي RNA

I- دورة حياة الفيروسات ذات السلسلة المفردة من الـ RNA:

تؤكد الدراسات المرجعية أن الفيروسات الحاوية على المادة الوراثية RNA تملك عد أقل و محدد من المورثات مقارنة مع الفيروسات الحاوية على المادة الوراثية DNA. لا يتجاوز عدد المورثات في الفيروسات RNA خمس مورثات.

مثال للدراسة، الفيروس آكل الجراثيم R17 الذي يتطفل على البكتريا المعوية E.Coli، يمتلك هذا الفيروس ثلاث مورثات هي:

1- المورثة الأولى A: هذه المورثة مسؤولة عن تشفير البروتين A، و هذا الأخير يدعى البروتين المميز و هو بروتين وظيفي و عن طريق هذا البروتين يتعرف الفيروس على مضيفه.

2- المورثة الثانية CP: و هي المورثة المسؤولة عن تشفير البروتين الذي يدخل في تركيب الغلاف البروتيني للفيروس.

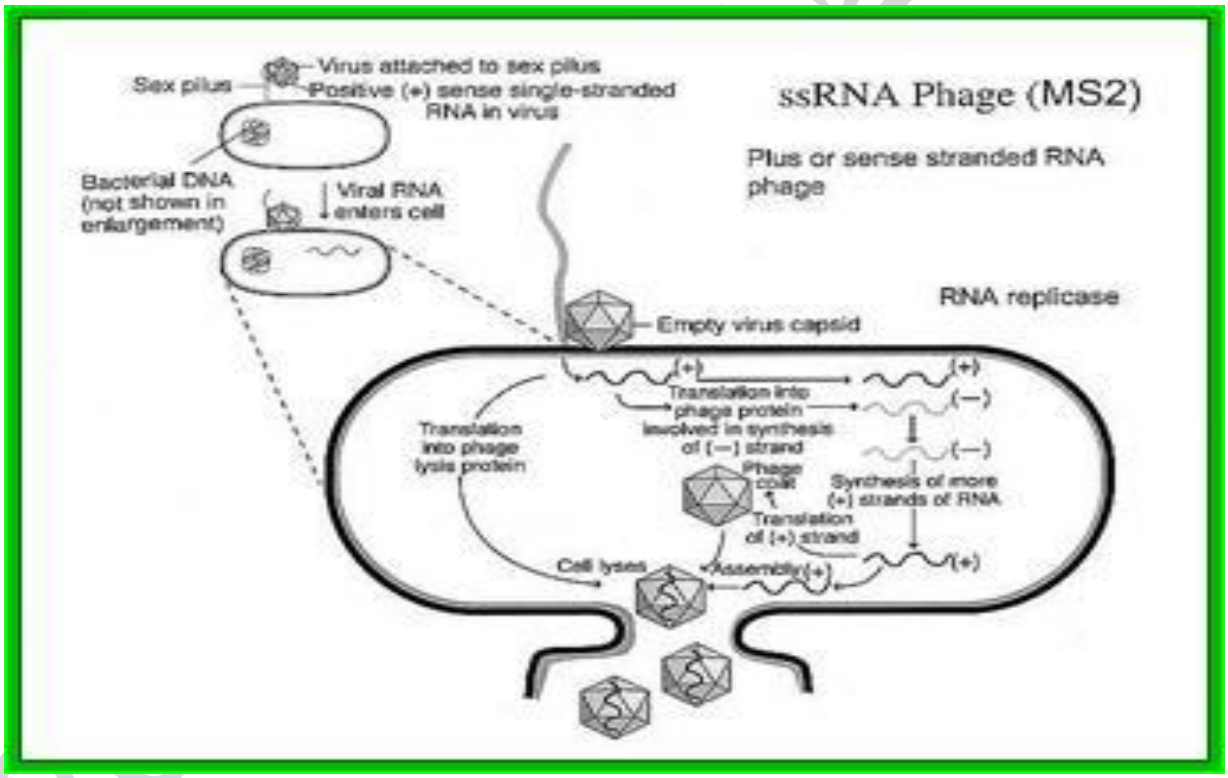
3- المورثة الثالثة SYN: التي تسيطر على تخليق أنزيم بلمرة الـ RNA الفيروسي الذي يدعى أيضا أنزيم نسخ الـ RNA الفيروسي RNA- Synthetase.

دورة حياة الفيروس آكل الجراثيم R17:

- يحمل الفيروس آكل الجراثيم R17 سلسلة مفردة من الـ RNA يقوم بغزو خلية E.Coli و يحقن مادته الوراثية بداخلها.
- عند دخوله سيتوبلاسما الخلية المضيفة، يلتصق بجسيماتها الريبية و يستخدم أنزيماتها و حموضها الأمينية لتركيب بروتيناته الخاصة به، البروتين A و البروتين CP و أنزيم RNA-Synthetase.
- حالما يتشكل RNA-Synthetase الفيروسي، يتجه و يرتبط مع RNA الفيروسي المسمى السلسلة (+). و هي السلسلة القالب أي السلسلة الأصلية و هذه الأخيرة تنفصل مباشرة عن ارتباطها بالجسيمات الريبية التابعة للخلية الجرثومية.
- مباشرة يقوم أنزيم RNA-Synthetase بعمله و ذلك بنسخ السلسلة المتممة (القالب العكسي)، و تدعى السلسلة السالبة (-).
- بعد ذلك تنفصل السلسلة الموجبة (+) عن السلسلة السالبة (-) و تصبح هذه الأخيرة السالبة كقالب لنسخ العديد من السلاسل الموجبة (+).

د. ظلال قطان 2017/2018

- قسم من السلاسل الموجبة المنسوخة الجديدة (+) يدخل في عملية تشكيل الأغلفة البروتينية للفيروسات الجديدة، أما القسم الثاني لتلك السلاسل تستخدم كمادة وراثية.
- في نهاية مرحلة العدوى، تتجمع المادة الوراثية الفيروسية داخل الأغلفة البروتينية، هذا الأمر يترافق مع تشكيل العديد من الأفراد الفيروسية الجديدة الفادرة على إحداث العدوى و الإصابة
- يتألف كل فرد فيروسي جديد من سلسلة مفردة من RNA وتدعى السلسلة الموجبة (+) و من غلاف بروتيني مماثل للأصل.
- عند وصول الخلية الجرثومية المصابة للانحلال بسبب تكاثر الفيروس فيها، تهاجم الأفراد الفيروسية الجديدة خلايا مضيفة أخرى و تعيد دورة حياتها من جديد.



دورة حياة آكل الجراثيم R17

II- دورة حياة الفيروسات ذات السلسلة المزدوجة من الـ RNA:

الفيروسات الحاوية على RNA على شكل سلسلة مزدوجة، واحدة منهما سلسلة موجبة (+) و الثانية سلسلة سالبة (-). لهذا السبب لا يتم تشكل القالب العكسي. دورة حياتها تبدأ بالتضاعف فورا بعد غزو الخلايا المضيفة، مما يؤدي إلى تحلل هذه الخلايا و تحرر أفراد فيروسية جديدة قادرة على إصابة خلايا مضيفة جديدة.

III- دورة حياة الفيروسات الإرتجاعية أو القهقرية Retroviruses:

في السبعينات من القرن العشرين اكتشفت آلية تضاعف جديدة، و هذه الآلية خاصة بالفيروسات الإرتجاعية.

ميزات الفيروسات الارتجاعية:

1- التي تتطفل فقط على خلايا حقيقيات النوى.

2- صغيرة الحجم.

3- المادة الوراثية مكونة من سلسلتين مفردتين منفصلتين و متشابهتين من الحمض النووي RNA.

4- تحوي على أنزيمات بلمرة تسمى أنزيمات النسخ العكسي Reverse Transcription التي اكتشفت لأول مرة عام 1972 على يد العالمين Temin و Baltimore.

تم عزل أول فيروس قهقري عام 1910 من قبل العالم Rous، و يسبب هذا الفيروس ظهور أورام سرطانية عند الطيور.

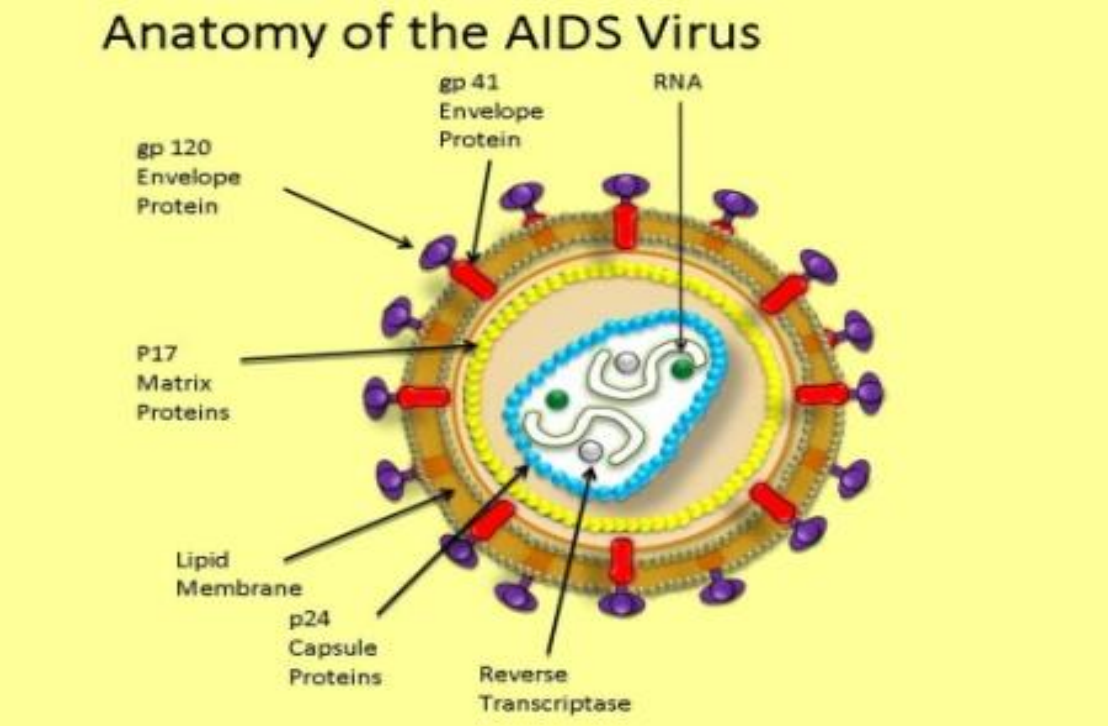
تم عزل أول فيروس قهقري يتطفل على البشر عام 1978 و يدعى فيروس مرض الإيدز AIDA الذي يسبب عند المصابين نقص المناعة المكتسبة.

مثال للدراسة فيروس مرض الإيدز AIDS:

صفاته:

- يبلغ قطر الفيروس 0.1 ميكرومتر.
- مادته الوراثية مكونة من سلسلتين مفردتين متشابهتين و توجد في منطقة المركز التي تدعى النوكليوئيد Nucleod.
- يتكون النوكليوئيد من نوعين من البروتينات تدعى p24 وزنها الجزيئي 24000 دالتون و p17 وزنها الجزيئي 17000 دالتون.
- يحاط النوكليوئيد بغلاف شحمي يضم بروتين سكري مكون من تحت وحدتين و هما على التوالي p120 و p41.
- يحتوي على أنزيم النسخ العكسي Reverse Transcription.

2017/2018 ظلال قطان



الشكل العام لفيروس الإيدز

- تتكون سلسلة الـ RNA من 9749 نكليوتيد، و تضم ثلاث مورثات :

1. المورثة gag: المورثة المسؤولة عن تشفير بروتين أولي طويل الحجم، هذا الأخير ينقسم إلى بروتينين صغيرين بتحفيز من أنزيم البروتياز. و هما p24 و p17.

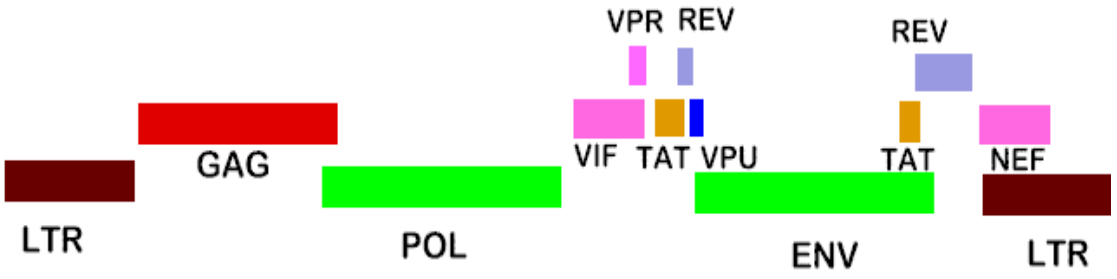
ملاحظة، يشفر البروتياز من قبل إحدى مورثات الفيروس.

2. المورثة pol: المورثة المسؤولة عن تشفير أنزيم النسخ العكسي Reverse Transcription.

3. المورثة env: المورثة المسؤولة عن تشفير البروتينات السكرية في الغلاف الشحمي للفيروس p41 و P120.

يتألف الطرفين النهائيين `3 و `5 للـ RNA الفيروسي، من تسلسلات نكليوتيدية مكررة يطلق عليها TRE5 و TRE3 أي مكرر نهائي `3 و `5.

2017/2018



HIV-1 GENOME 9749 NUCLEOTIDES

الذخيرة الوراثية لفيروس الإيدز

مرحلة (الإخماج)العدوى بفيروس الـ AIDS

I- طورالدخول:

- تبدأ مرحلة العدوى عند دخول الفيروسات داخل الكائن الحي بإحدى طرق العدوى أما عن طريق الدم أو الإفرازات المهبلية أو السائل المنوي أو حليب الأم.
- عندها يرتبط الفيروس بالخلية الهدف و هي الخلية اللمفاوية T4 التابعة للجهاز المناعي(من الخلايا ذات الأهمية الحيوية في الجهاز المناعي كونها المسؤولة عن إنتاج الأجسام المضادة) و التي تحمل على غشائها السيتوبلاسمي مستقبلات خاصة و هي البروتينات CD4 و CCR5.
- بعد التعارف ما بين البروتين السكري P120 الموجود على الغلاف الشحمي للفيروس و المستقبلات CD4 و CCR5 الموجودة على غشاء الخلية اللمفاوية T4، يحصل اندماج مابين الغلاف الشحمي الفيروسي و الغلاف الشحمي للخلية اللمفاوية T4.
- و من ثم يدخل النكليوئيد الفيروسي سيتوبلاسما الخلية الهدف T4، و تبدأ مرحلة النسخ العكسي لجزيئات الـ RNA الفيروسية بوساطة أنزيم النسخ العكسي. و ذلك بتحويل المادة الوراثية المكونة من سلسلتين مفردتين من الـ RNA إلى سلسلة مزدوجة الـ DNA الذي يحمل المعلومات الوراثية التي كانت محمولة على RNA.

د. ظلال قطان 2017/2018

II- آلية النسخ العكسي في فيروس الـ AIDS:

يتكون أنزيم النسخ العكسي Reverse Transcription، المستخلص من الخلايا التائية T4 للأشخاص المصابة بنقص المناعة المكتسبة الـ AIDS من وحدتين بروتينيتين، و يتميز باحتوائه على ثلاث فعاليات أنزيمية مختلفة، و هي على التوالي:

1. فعالية نسخ عكسي:

بعد دخول فيروس الإيدز الخلايا المضيفة T4، بفضل فعالية النسخ العكسي لأنزيم النسخ العكسي يتم نسخ الـ DNA المتمم cDNA انطلاقا من الـ RNA، حيث يقوم هذا الأنزيم أولا بنسخ السلسلة الأولى من الـ cDNA في الاتجاه `3 إلى `5 بالنسبة للـ RNA الفيروسي. ينشأ عن عملية النسخ هجين DNA- RNA.

2. فعالية محللة RNase H

بفضل الفعالية المحللة لأنزيم النسخ العكسي الفيروسي، تهضم الحمض النووي RNA الموجود في جزيئة الهجين DNA- RNA. تتم عملية الهضم في الاتجاهين `3 إلى `5 و `5 إلى `3.

3. فعالية مبلمرة للـ DNA:

بفضل فعالية البلمرة لأنزيم النسخ العكسي، يتم نسخ خيط الـ DNA في الاتجاه `5 إلى `3. عندها تتشكل جزيئة مزدوجة من الخيط و التي تمثل المادة الوراثية لفيروس الـ AIDS في الخلية المضيفة.

- آلية النسخ العكسي معقدة و من خلالها يتم:

- تحويل المعلومات الوراثية الموجودة على الشريط المفرد للـ RNA إلى شرسط مزدوج من الـ DNA.

- إحداث تسلسلات نكليوتيدية خاصة يطلق عليهاLTR(Long Terminal Repeats) على طرفي جزيئة الـ DNA. لهذه التسلسلات وظيفتين أساسيتين، من جهة تساهم في عملية اندماج الـ cDNA الفيروسي ضمن الذخيرة الوراثية للخلية المضيفة T4، و من جهة أخرى لها دور هام أثناء مرحلة نسخ cDNA من قبل أنزيمات الـ RNA بوليمراز الخاصة بالعائل المضيف.

للتذكرة:

تحتوي الفيروسات الرجعية عندما تكون خارج خلايا المضيف على مادة وراثية مؤلفة من سلسلتين مفردتين من الـ RNA، لكن بعد دخول تلك الفيروسات خلايا المضيف تتحول مباشرة إلى سلسلة مزدوجة من الـ DNA بفضل الفعاليات الثلاث المختلفة لأنزيم النسخ العكسي.

III-طور الكمون:

بعد مرحلة النسخ العكسي و تشكل الـ cDNA مزدوجة الخيط، تصبح هذه الأخيرة جاهزة للدخول إلى نواة الخلية المضيفة T4، لا يختصر فقط وجوده في نواة الخلية المضيفة بل تندمج جزيئة الـ cDNA داخل أحد صبغيات الخلية التائية المضيفة، عنده يصبح طفيليا ناجحا و الذي يحفز عملية الاندماج cDNA الفيروسي مع

د. ظلال قطان 2017/2018

أحد صبغيات الخلية المضيفة هو أنزيم Integrase الفيروسي، و بالتالي يتشكل طليعة الفيروس الذي يصعب الكشف عنه و القضاء عليه.

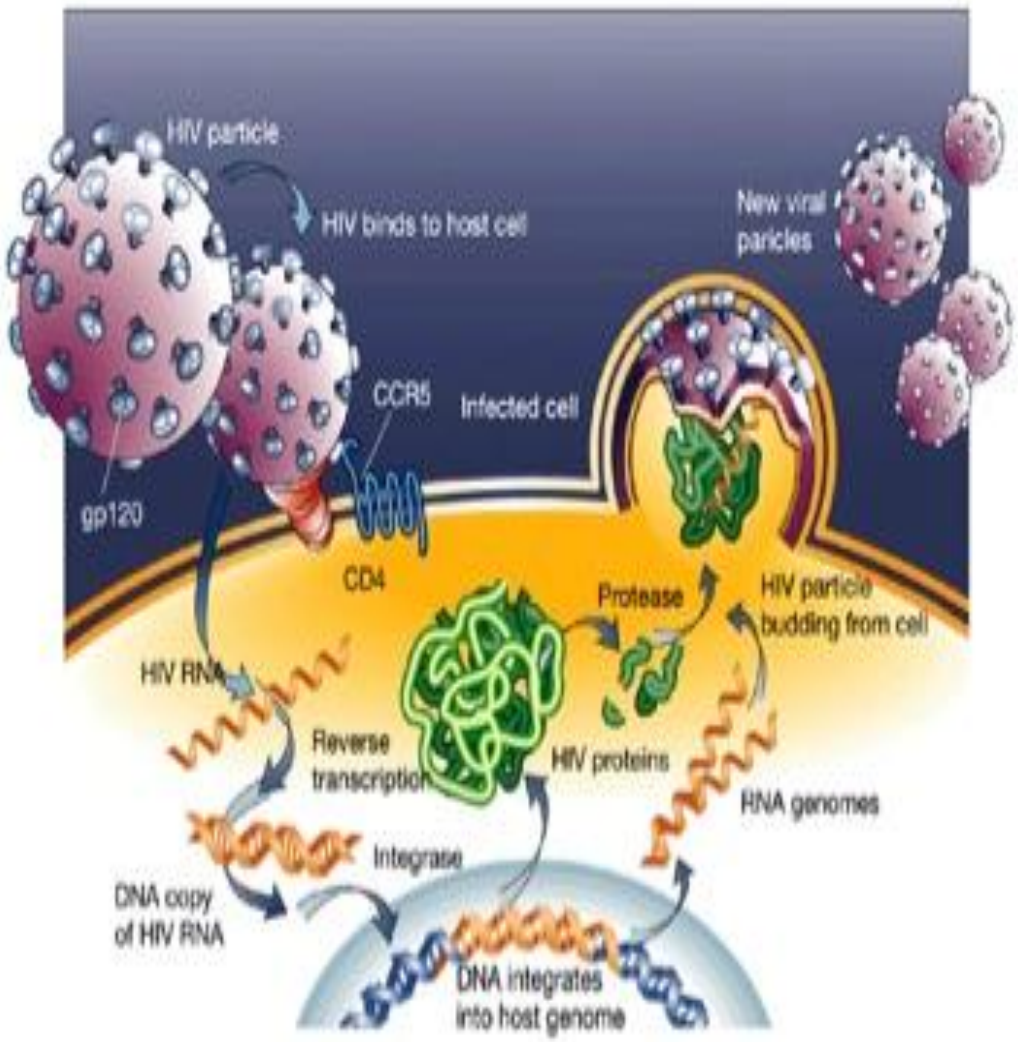
في هذه المرحلة لا تظهر على الشخص المصاب أعراضا مرضية، لكنه يستطيع أن ينقل خلايا مصابة بطليعة الفيروس إلى أشخاص أصحاء.

يمكن لطليعة الفيروس البقاء بشكل خامل لفترات زمنية طويلة.

IV- طور النشاط:

- لأسباب غير معروفة بعد، تتنشط المادة الوراثية لطليعة الفيروس، و هذا ما يحفز أنزيمات الـ RNA Polymerase الخاصة بالخلية اللمفاوية T4 بنسخ جزيئة cDNA مما يترافق مع ظهور كميات كبيرة من الـ RNA الرسول الفيروسي في سيتوبلازما هذه الخلايا.
- قسم من الـ RNA الرسول الفيروسي يترجم إلى بروتينات فيروسية وظيفية في سيتوبلازما الخلية المضيفة. أما القسم الآخر يستخدم كمادة وراثية.
- تتجمع الأفراد الفيروسية الجديدة الحاملة للـ RNA داخل الخلية المصابة T4.
- تغادر أعداد كبيرة من فيروسات الإيدز الجديدة الخلية المضيفة T4 بعد أن تأخذ معها قسما من مكونات الغشاء الخلوي للخلية اللمفاوية، تموت الخلية T4 نتيجة الإصابات المتكررة الناتجة عن فقدانها قسم من مكونات غشائها البلازمي.
- تتحرر الفيروسات الجديدة و تنتشر في كل العضوية، و تهاجم خلايا تائية جديدة. و يكمل فيروس الإيدز دورة حياته داخل هذه الخلايا، مما يؤدي إلى إبادتها.
- يتحطم الجهاز المناعي و يصبح غير قادر على حماية الكائن الحي من الأخ ماج الخارجية، بسبب انخفاض كمية الخلايا T4 في الدم.
- بعض الأشخاص المصابين بمرض الإيدز تتطور عندهم أحد أنواع السرطانات مثل سرطان Kaposi الذي يصيب الأنسجة الضامة.

201



دورة حياة فيروس الإيدز AIDS

السؤال الهام: لماذا يجد الجهاز المناعي صعوبة بالغة للتغلب على فيروس AIDS؟

الجواب: أن فيروس الإيدز يمتلك آليات تشويش للجهاز المناعي، مما يصعب التعرف عليها و القضاء عليه.

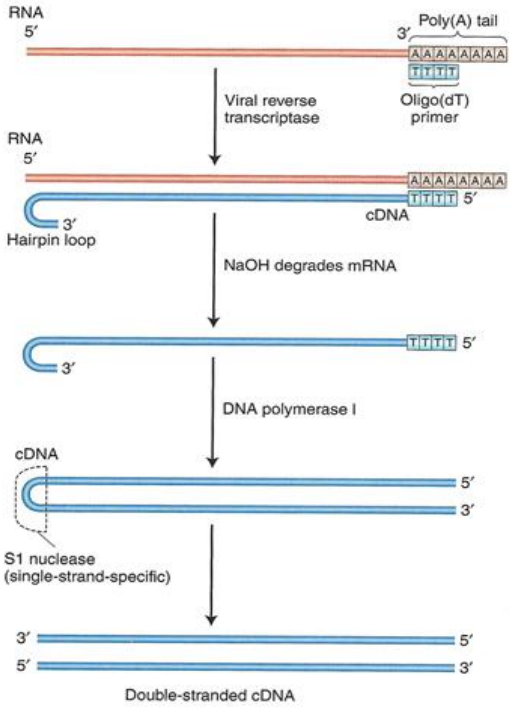
أهم هذه الآليات :

- تغيير تركيب الغشاء البروتيني للفيروس، فعند خروج الفيروس من الخلية التائية المصابة، يحاط بغشاء بروتيني مشابه للغشاء الشحمي لهذه الخلية. و هذا ما يجعل جهاز المناعة غير قادر على التعرف على الفيروس و الصعوبة في القضاء عليه.

- حدوث طفرات مستمرة على جينات الفيروس، هذا ما يجعل التغيير المستمر في بروتينات الغبلف الخارجي للفيروس، فيخدع الفيروس جهاز المناعة باستمرار.

2017/20

cDNA from mRNA



أخيرا: من الدراسات في مخابر الأبحاث العلمية لمحاربة فيروس الإيدز، بإجراء دراسات دقيقة عن الجينات المسؤولة عن تشفير أنزيمات الفيروس التي تلعب دور حيوي إصابة الخلايا التائية و تدميرها و منها: أنزيم البروتياز، و أنزيم النسخ العكسي، و أنزيم Integrase.

الأنزيمات المؤثرة على الـ DNA

تصنف الأنزيمات المؤثرة على جزيئات الـ DNA إلى أربعة صفوف أساسية و هي:

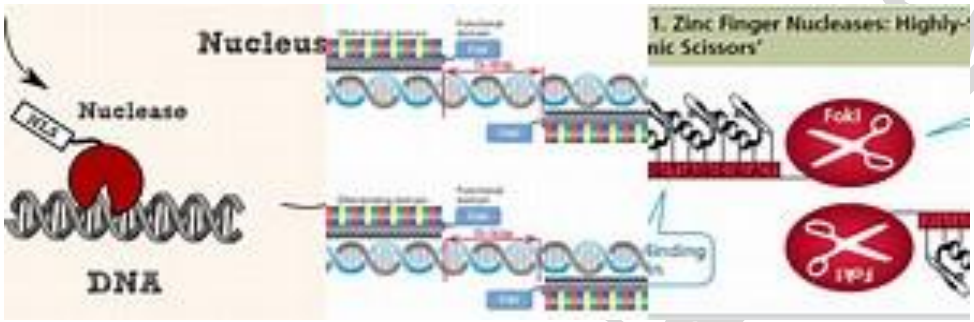
1- أنزيمات النوكلياز Nucleases: تقوم بالقطع و التقصير و أيضا تحلل جزيئات الأحماض النووية.
2- أنزيمات البلمرة (أنزيمات البوليميراز) Polymerase: و هي الأنزيمات التي تصنع نسخا من الحموض النووية.
3- أنزيمات التعديل Modifying Enzymes : هي الأنزيمات التي تلغي أو تضيف زمرا كيميائية.

2017/2018

4- الأنزيمات المماكبة الموضعية Topoisomerases: الأنزيمات التي تدخل أو تلغي التفافات من جزيئة الـ DNA الدائرية المغلقة.

أولا – أنزيمات النوكلياز:

آلية عمل تلك الأنزيمات تقوم بتحليل جزيئات الـDNA عن طريق كسر الروابط الفوسفاتية ثنائية الأستر الرابطة بين النكليوتيدات مع بعضها البعض في سلسلة الـ DNA (النكليوتيد هو الوحدة البنائية الأساسية لجزيء الـ DNA).



تتكون أنزيمات النوكلياز من نوعين :

1. أنزيمات النوكلياز الخارجي التي تلغي أو تزيل النكليوتيدات واحدا بعد الآخر انطلاقا من نهاية جزيئة الـDNA.

مثال : أنزيم النوكلياز الخارجي Exonuclease III المستخرج من جرثومة الـ *Escherichia coli* يعمل على هضم سلسلة واحدة فقط من جزيئات الـ DNA مضاعفة السلسلة. و نحصل في نهاية عملية الهضم على سلسلة واحدة فقط من الـ DNA.

2. أنزيمات النوكلياز الداخلي التي تكسر الروابط الفوسفاتية ثنائية الاستر الموجودة داخل جزيئة الـ DNA.

مثال : أنزيم النوكلياز الداخلي DNAase I (deoxyribonuclease I) المعزول من بنكرياس الأبقار. يستطيع هذا الأنزيم قطع سلاسل مفردة من الـDNA و يستطيع كذلك قطع جزيئات DNA مضاعفة السلسلة. و يعتبر هذا الأنزيم غير نوعي لأنه يهاجم الـ DNA في العديد من المواقع الداخلية بهضم الروابط الفوسفاتية ثنائية الاستر الداخلية. في المخبر عند استخدام أنزيم DNAase I لفترات حضن طويلة، يظهر في مزيج التفاعل مزيجا من النكليوتيدات الأحادية و سلاسل قصيرة جدا من متعددات النكليوتيدات.

ثانيا- أنزيمات البلمرة:

إن الكثير من أنزيمات البلمرة لها القدرة على تصنيع جزيئات DNA جديدة و تتصف في نفس الوقت باحتوائها على فعالية أنزيمية محللة مثل أنزيمات النوكلياز.

2017/2018

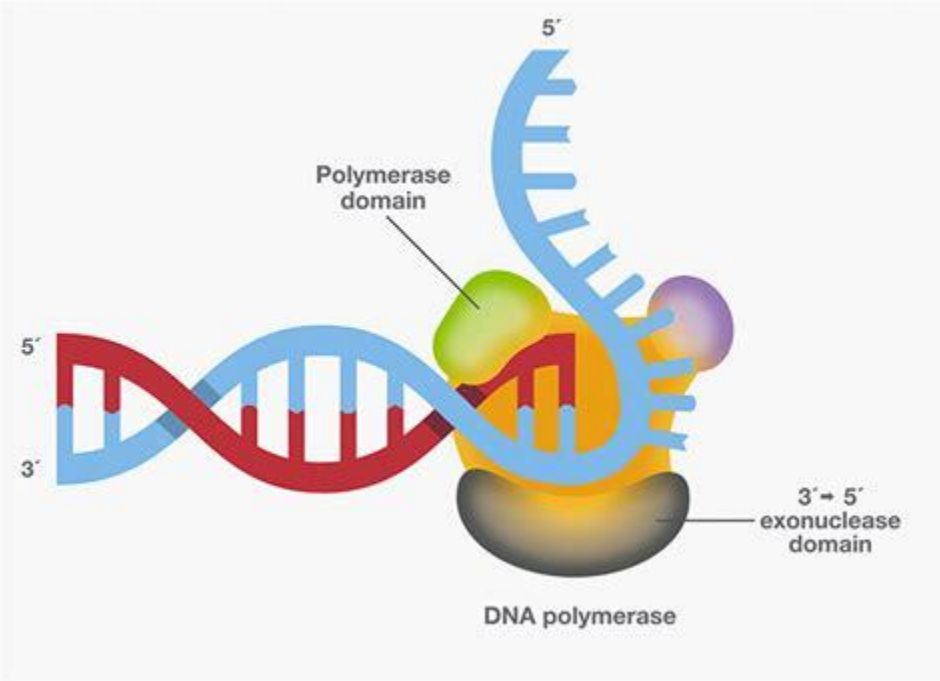
هناك أربع أنواع مختلفة من أنزيمات الـ DNA Polymerase المستخدمة بشكل روتيني في أبحاث الوراثة الجزيئية و الهندسة الوراثية و هي :

1- أنزيم الـ DNA Polymerase 1

2- قطعة Klenew

3- أنزيم النسخ العكسي

4- أنزيم Taq polymerase



❖ أنزيم الـ DNA Polymerase 1 :

تم التعرف ثلاثة أنماط مختلفة من أنزيم الـ DNA Polymerase مسؤولة عن تضاعف الـ DNA في الخلايا حقيقية النواة وهي I و II و III . يستخلص أنزيم الـ DNA Polymerase 1 من جرثومة الـE.coli .

من أهم تطبيقات هذا الأنزيم :

1- تحديد التسلسل النكليوتيدي للـ DNA.

2- إنتاج مسابير موسومة إشعاعيا.

3- بناء نواقل استنساخ انطلاقا من حمض نووي مفرد السلسلة.

4- اصطناع السلسلة الثانية من الـ cDNA.

ملاحظة : (cDNA و هو complementary DNA الذي يصنع اعتبارا من mRNA بواسطة أنزيم النسخ العكسي).

2017/20

❖ قطعة Klenew:

يتألف أنزيم الـI DNA Polymerase من 928 حمض أميني، و يحتوي على فعاليتين أنزيميتين محللتين، واحدة في الاتجاه ´5 إلى ´3 و الثانية في الاتجاه ´3 إلى ´5. أوضح العالم Klenew أن السلسلة الببتيدية لهذا الأنزيم يمكن أن تشطر إلى قطعتين، واحدة كبيرة و الأخرى صغيرة، و ذلك عند استخدام أنزيم الـ Trypsin أو subtilisen. القطعة الصغيرة يبلغ طولها 323 حمض أميني ولها فعالية محللة خارجية تعمل في الاتجاه ´5 إلى ´3. بينما القطعة الكبيرة المسماة Klenew لها فعالية مبلمرة في الاتجاه ´5 إلى ´3 و فعالية محللة في الاتجاه´3 إلى ´5.

❖ أنزيم النسخ العكسي Transcriptase Ensyme:

تعتبر أنزيمات النسخ العكسي و أنزيمات التقطيع من أهم الأنزيمات التي طورت علوم البيولوجيا الجزيئية، الوراثة الجزيئية، و الهندسة الوراثية.

حيث يستخدم أنزيم النسخ العكسي قالبا من الـ RNA لتصنيع الـ DNA المتمم له ويسمى بـ cDNA و يستخدم بشكل خاص أثناء تشكيل مكتبات الـ cDNA في المخبر، و يلاحظ في الفيروسات الحاوية على الـ RNA بدلا من الـ DNA كمادة وراثية، مثل فيروس الإيدز.

❖ أنزيم Taq DNA polymerase:

يستخدم هذا الأنزيم في تقنية تفاعل البوليمراز التسلسلي (PCR)، و هي تقنية تستخدم لتضخيم قطعة الـ DNA المراد دراستها ملايين المرات في جهاز مقاوم لدرجات الحرارة المختلفة.

يتم عزل هذا الأنزيم من جرثومة *Thermus aquaticus* التي تعيش في المياه الحارة. ويتميز هذا الأنزيم بأنه ثابت تجاه الحرارة وبالتالي سيكون مقاوما للتمسخ (فصل سلسلتي الـ DNA في الجهاز عند رفع درجة الحرارة إلى 94ºC).

ثالثا- أنزيمات التعديل أو التغيير :

هناك العديد من الأنزيمات التي تغير جزيئات الـ DNA من خلال إضافة أو إزالة زمرا كيميائية خاصة و من أهمها :

1- أنزيم الفوسفاتاز القلوي Alkaline phosphatase

يحفز هذا الأنزيم إزالة الزمرة الفوسفاتية الموجودة على النهاية ´5 لجزيئات الـ DNA مزدوج الخيط أو سلاسل الـ RNA. تستخلص أنزيمات الفوسفاتاز القلوي المستخدمة في أبحاث البيولوجيا الجزيئية و الهندسة الوراثية من الجراثيم أو الخلايا الظهارية المبطنة لأمعاء الحيوانات المجترة.

2- أنزيم الكيناز Polynucleotide kinase

يستخلص من الجراثيم *E.coli* المصابة بآكل الجراثيم T4. ولذلك يسمى T4 Polynucleotide kinase ويستخدم لنقل الفوسفات الموجودة في جزيئة الـ ATP وله استخدامات عديدة.

2017/2018 د. ظلال قطان

3- أنزيم النقل الطرفي Terminal transferase

يستخلص أنزيم النقل الطرفي من الغدة التيموسية للعجول، يحفز هذا الأنزيم إضافة نكليوتيدات ريبية منقوصة الأوكسجين على النهاية 3´OH الحرة لجزيئة الـ DNA.

رابعا- الأنزيمات المماكبة الوضعية Topoisomerases:

تستطيع الأنزيمات المماكبة الموضعية تغيير هيئة الـ DNA المغلق الدائري (على سبيل المثال جزيئات الـ DNA البلاسميدي) من خلال إضافة أو إزالة الالتفافات.

بعض تقانات البيولوجيا الجزيئية

لدراسة مورثة معينة يتوجب عزلها و تكثيرها بشكل إفرادي يالنسبة لبافي تسلسلات الجينوم و هناك طريقتان لتحقيق ذلك:

تقنية التنسيل Cloning

تقنية الـ PCR

تقنية الـ Cloning

يتم في هذه التقنية قص القطعة المستهدفة المراد دراستها من الجينوم بمقصات جزيئية (أنزيمات اقتطاع) ومن ثم إدخالها على الخلية ضمن ناقل Vector يحوي نقطة بدء تضاعف (ori). ندخل الناقل المحمل بالقطعة الهدف إلى خلية مضيفة (خلية جرثومية) وتترك الخلية لتتكاثر، فنحصل على نسخ عديدة من القطعة المرغوبة من الـ DNA محمولة على الناقل.

نجمع الخلايا المتكاثرة ثم نحل الغشاء الخلوي ونخرج مكونات الخلية ونستخلص نسخ الناقل الذي يحمل تسلسل الـ DNA المراد دراسته وبذلك نكون قد حصلنا على المورثة المطلوبة بكميات كبيرة.

من أجل انجاز هذه التقنية يجب إجراء التقنيتين التاليتين:

1- الـ Recombinant DNA

2- الـ Transformation

د. ظلال قطان 2017/2018

1- الـ Recombinant DNA: ويعرف باسم الـ DNA المأشوب والذي يشير إلى الـ DNA المعدل المرتبط بقطع والذي تم تجميعه من مصادر مختلفة أو تصنيعه.

وللحصول عليه:

- ❖ يجب عزل قطعة الـ DNA المراد دراستها من جينومها ومن أجل تحقيق ذلك لابد من قصها من شريط الجينوم بواسطة المقصات الجزيئية (أنزيمات الاقتطاع).
- ❖ يجب استخدام ناقل Vector ينقل القطعة المطلوبة إلى الخلايا المتكاثرة.

أ- أنزيمات الاقتطاع: إن اكتشاف أنزيمات الاقتطاع (Res) Restriction Endonucleases هو الذي فتح الباب أمام تقدم علم البيولوجيا الجزيئية، إذ كنا عاجزين عن التعامل مع المورثات قبل اكتشافها.

اكتشف في عام 1970 أن البكتريا تملك أنزيمات الـ nucleases التي تقوم بالتعرف على المواقع الصغيرة للنكليوتيدات في الحلزون المضاف للـ DNA وتقطع هذه المواقع في كلا الذراعين في الحلزون المضاعف و دعيت باسم Restriction Endonucleases RES أو بشكل أبسط دعيت Restrictions.Enzymes تنتج الخلايا الجرثومية هذه الأنزيمات من أجل التصدي لجينوم المعتدي والذي غالبا" ما يكون الفيروسات الملتهمة للجراثيم. وتحمي الجراثيم جينومها الخاص من خلال متيلة مواقع التعرف (متيلة: إضافة جذر المتيل (CH3) لأنزيمات الاقتطاع التي تنتجها السلالة.

عزلت الأنزيمات من عدد كبير من السلالات الجرثومية المختلفة، لذلك يدعى الأنزيم حسب السلالة الناتج عنها، فتشتق الأحرف المكونة لاسمه من جنس ونوع الجرثوم ومن السلالة المستخدمة.

بشكل عام هناك أكثر من 100 موقع نكليوتيدي تتعرف عليهم أنزيمات القطع، مختلف المواقع النكليوتيدية التي تعرف من قبل هذه الأنزيمات طولها يبلغ 4 إلى 6 نكليوتيد التي تتصف بتناظر داخلي خاص.

وتصنف أنزيمات الاقتطاع ضمن ثلاث عائلات رئيسية (ترقم I و II و III) وتشترك بصفات عامة مثل:

1- تتعرف على تسلسل معين من الـ DNA وترتبط بخيط الـ DNA عنده يدعى موقع التعرف (recognition site).

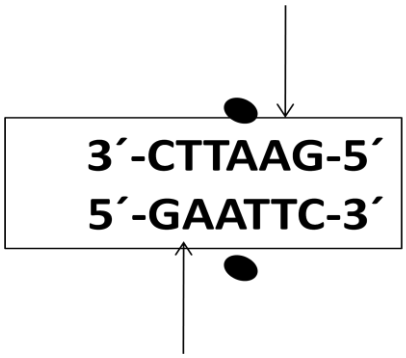
2- لديها موقع قطع تقوم عنده بقطع خيط الـ DNA.

تختلف طريقة القطع باختلاف العائلة. فأنزيمات العائلة الثانية REsII تتعرف وتقطع بنفس المكان دائما"، أما العائلتان الأولى والثالثة REsIII-REsI فيكون موقع التعرف مختلفا" عن موقع القطع كما ويكون موقع القطع فيها غير ثابت تماما" مما يجعل استخدامها غير موثوق به في تطبيقات البيولوجيا الجزيئية.

تتميز REsII بخاصية القطع المتناظر (تقوم بقطع الخيطين بشكل متناظر) يسمى هذا النوع من التناظر بالمعكوس *palindrome*. (أي نحصل على نفس التسلسلات إذا حاولنا قراءتها بالاتجاه ´5 إلى ´3 من الخيط الأول وبالاتجاه ´3 إلى ´5 للخيط الثاني).

د. ظلال قطان 2017/2018

مثال : الموقع الخاص الذي يعرف من قبل أنزيم الـ *Eco*R1 هو :

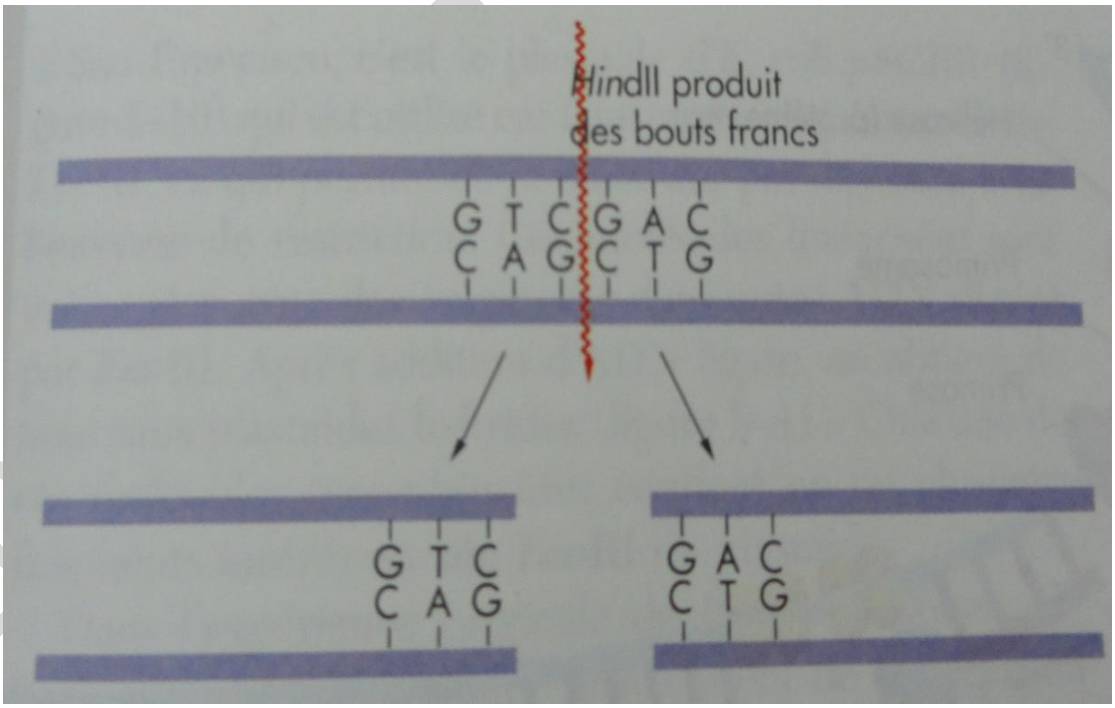


الموقع الخاص الذي يعرف من قبل أنزيم الـ *Eco*R1

عندما يهاجم أنزيم الـ EcoR1 هذا الـ*palindrome* يحطم ذراعي القطعة في نفس المنطقة فالقطع يحصل حسب الأسهم المشار إليهما على القطعة ويكون بين A و G، النقط السوداء المعلمة فوق القطعة تشير إلى الأسس التي أجريت لها عملية متيلة من أجل حماية القطعة من الهجوم الأنزيمي لـ DNA المضيف.

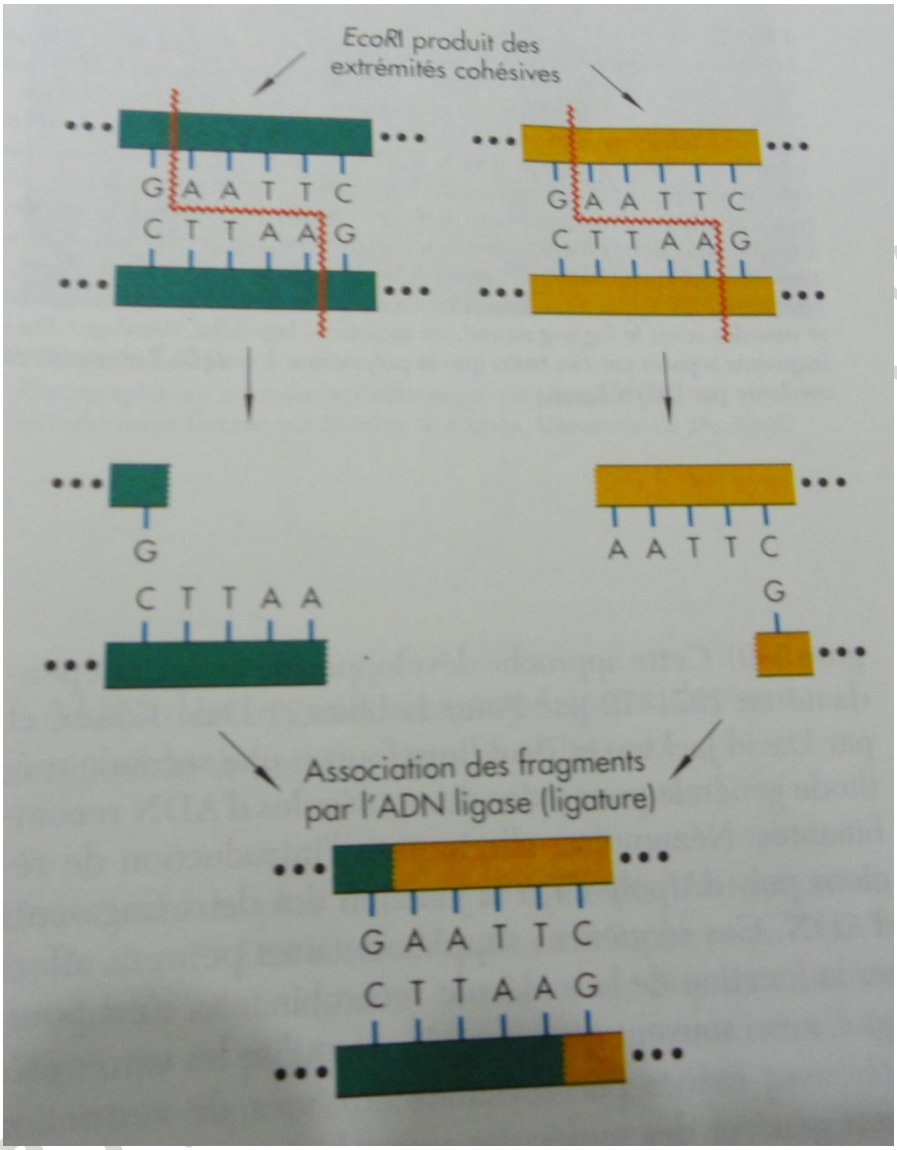
وبما أن العائلة REsII تتميز بخاصية القطع المتناظر هنا يكون لدينا احتمالين للقص:

1- يقوم الأنزيم بالقطع بشكل محوري (من المنتصف) مما يعطي نهايات كليلة Blunt ends.



أنزيم القطع HindII يقطع الـDNA في المنتصف ويعطي نهايات كليلة لا تملك القدرة على إعادة الارتباط

2- أو أنـه يقطـع مـن الأطـراف وينـتج لـدينا نهايـات سـائبة إمـا ´5 أو ´3 قـادرة علـى الارتبـاط (التتـام) مـع النكليوتيدات المقابلة إذا ما سنحت لها الفرصة، لذا تدعى بالنهايات الالتصاقية Sticky ends.



أنزيم *Eco*R1القطع يقطع موقع التعرف بشكل متناظر وينشىء عنه نهايات سائبة و التي لها القدرة على إعادة ارتباطها مع أي نهاية أخرى منتجة من قبل نفس الأنزيم

تقوم أنزيمات الاقتطاع بعملها بغض النظر عن مصدر الجينوم ولذلك بإمكاننا أن نقطع شريطي DNA من مصدرين مختلفين بنفس الأنزيم ومن ثم وصلهما فينتج لدينا شريط DNA جديد.

ب- الناقل Vector :

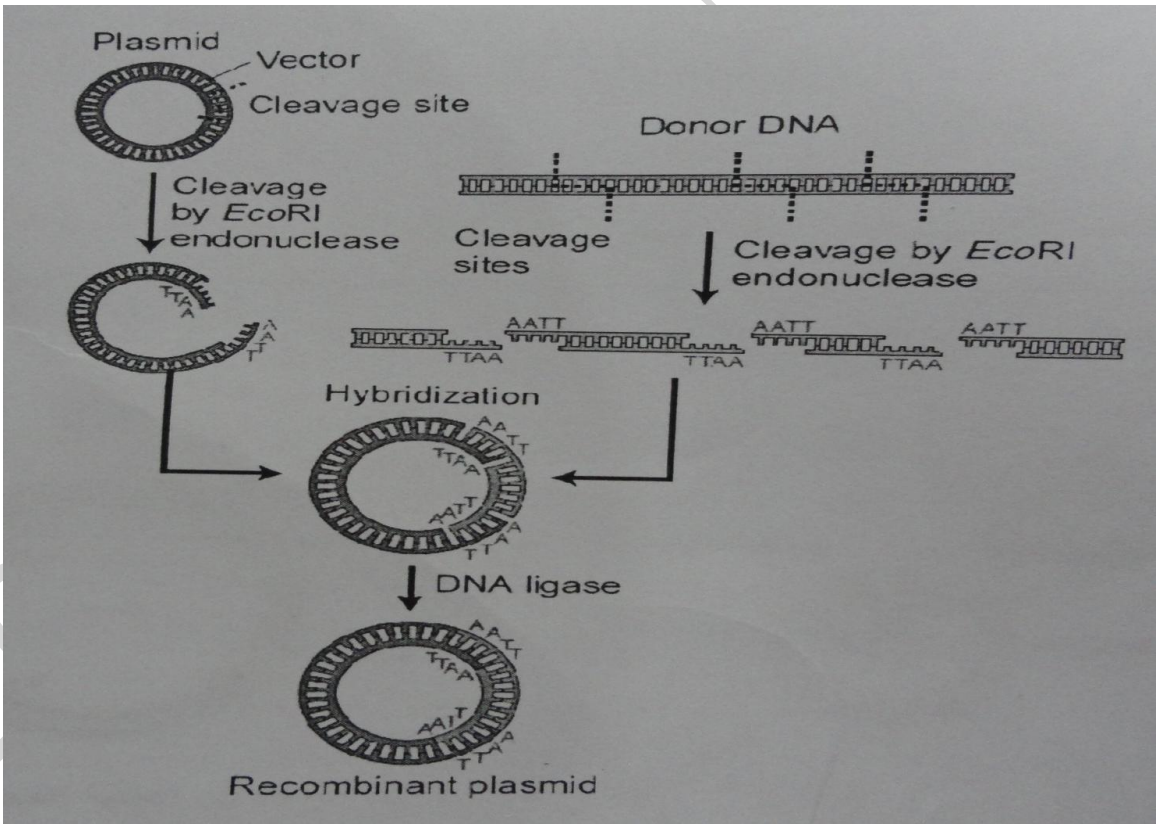
الذي يقوم ينقل القطعة المطلوبة إلى الخلايا البكتيرية المتكاثرة. ويجب أن يتمتع بالحفاظ على نفسه وقابليته للتضاعف في الخلية المضيفة من خلال امتلاكه نقطة بدء التضاعف ori .

تمتلك النواقل المشتقة من البلاسميدات هذه الصفات حيث تكون حلقية وتملك نقطة بدء التضاعف ori، و لا تستطيع أنزيمات exonuclease هضمها، أما أنزيمات الـ endonuclease تتمكن من أن تقتطعها هذ

الخاصية تفيد في إدخال قطع جديدة من الـ DNA التي تسمى inserts ويكون مصدرها من الـ DNA المعطي إلى الناقل.

من أجل إجراء عملية Cloning نقوم بقطع الـ DNA المعطي بأنزيم قطع معين فنحصل على تسلسلات مختلفة بالطول ولكنها متشابهة بالنهايات السائبة نقوم بقطع الناقل بالأنزيم ذاته، فينتج لدينا نهايات متشابهة ومتتامة مع بعضها فترتبط مع بعضها بروابط هيدروجينية ويقوم أنزيم الـ ligase بإنشاء روابط الفوسفو دي استر فنحصل على هجين من الناقل وقطعة الـDNA المعطي وهذا ما يدعى بالـ Recombinant DNA.

ولا تجري هذه العملية على خلية واحدة وناقل واحد وإنما تحتاج إلى عدد كبير من جزيئات الـ DNA المعطي وعدد كبير من جزيئات الناقل. ونتيجة لذلك نحصل بعد عملية التنسيل (Cloning) على عدد كبير من جزيئات الناقل الهجينة التي تحتوي الـ inserts.



عملية قص الناقل و إعادة لحمه مع القطعة المرغوبة

هناك أنواع عديدة من النواقل المستخدمة في عمليات البيولوجيا الجزيئية سندرس منها البلاسميد الجرثومي.

تم تصنيف النواقل البلاسميدية إلى عائلتين: pUC ,pBR

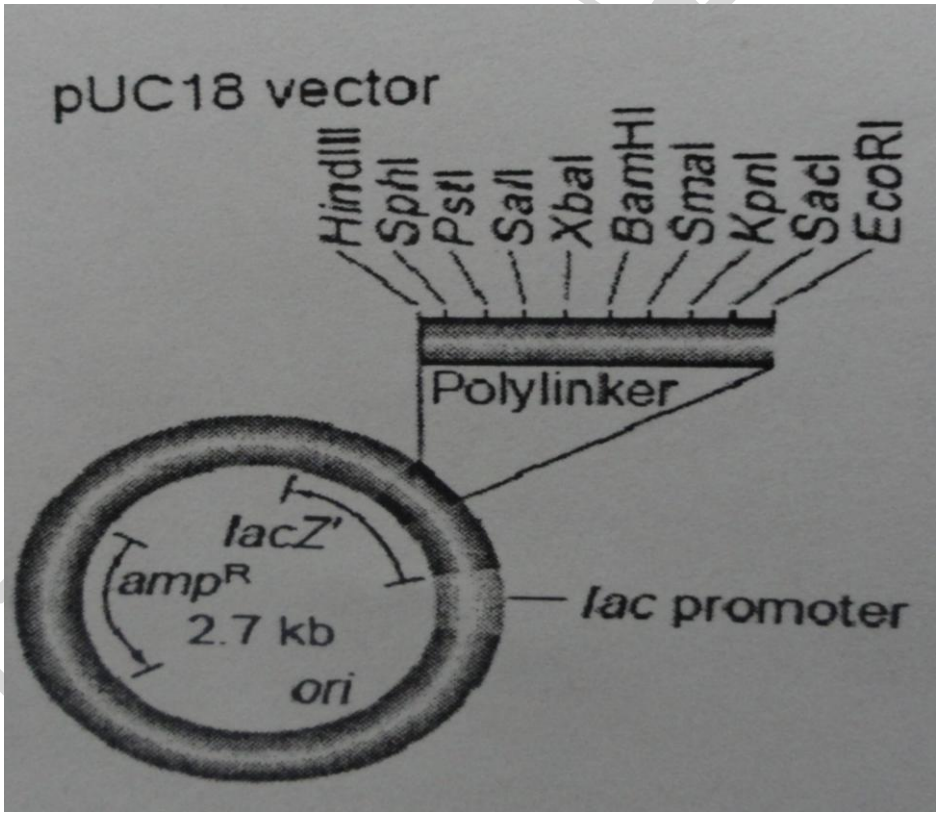
1- لكل منهما نقطة بدء التضاعف ori.

2- لكل منهما مواقع تعرف للعديد من أنزيمات الاقتطاع بحيث يكون لكل أنزيم اقتطاع موقع تعرف واحد فقط على طول البلاسميد.

3- المنطقة التي تحمل مواقع التعرف لأنزيمات الاقتطاع تدعى poly linker

أو Multiple Cloning Site (MCS)

4- توجد واصمات انتقائية (Selectable markers) كمؤشرات في عمليات التنسيل مثل مورثات المقاومة الصادات الحيوية ampR tetR. والواصمات عبارة عن مورثات من السهل اكتشاف نمطها الظاهري و يمكن أن نتتبعه بالعيان كإعطاء لون معين أو تنمو في وسط معين.....



الناقل PUC18

بعد وصل القطعة المطلوبة insert بالناقل يتم دخول الجزيء الهجين إلى الخلية المضيفة بعملية تدعى الـ Transformation.

2- الـ Transformation:

عملية الـ Transformation تعتمد على دخول قطعة الـ DNA (insert) المحملة على الناقل داخل الخلية الجرثومية عبر غشائها الخلوي، لا تحدث بشكل طبيعي إلا نادرا أما في المخبر تستخدم مواد كيميائية أو عوامل فيزيائية لإجبار الخلايا الجرثومية على أخذ الـ DNA وتسمى الخلايا الجرثومية الجاهزة مخبريا لأخذه بهذه الطريقة (competent cells) و ذلك بوضع الجراثيم بمحلول كلور الكالسيوم المركز.

إن قطع الـinsert و قطع الناقل و محاولة وصلهما معا ومن ثم إجراء عليهما عملية الـ transformation فنكون أمام 3 احتمالات:

1- عدم دخول الناقل الهجين إلى الخلية المضيفة.

2- ارتباط الناقل مع نفسه و دخوله للخلية بدون أن يحمل قطعة الـ DNA المرغوبة (INSERT).

3- ارتباط الناقل بالـINSERT ويدخل إلى الخلية المضيفة.

للتأكد من نجاح عملية الـ transformation يختلف الأمر باختلاف الناقل، نأخذ مثال على ذلك أحد أنماط البلاسميد pUC18 يملك ori و ampR و lacZ التي توجد بداخلها الـ Linker.

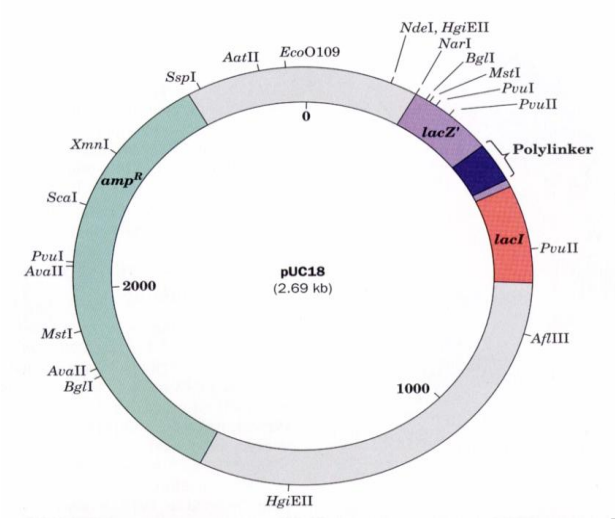
المورثتان ampR و lacZ تعتبر واصمات انتقائية تستخدم كل واحدة منهما لاستبعاد أحد الاحتمالات الثلاثة.

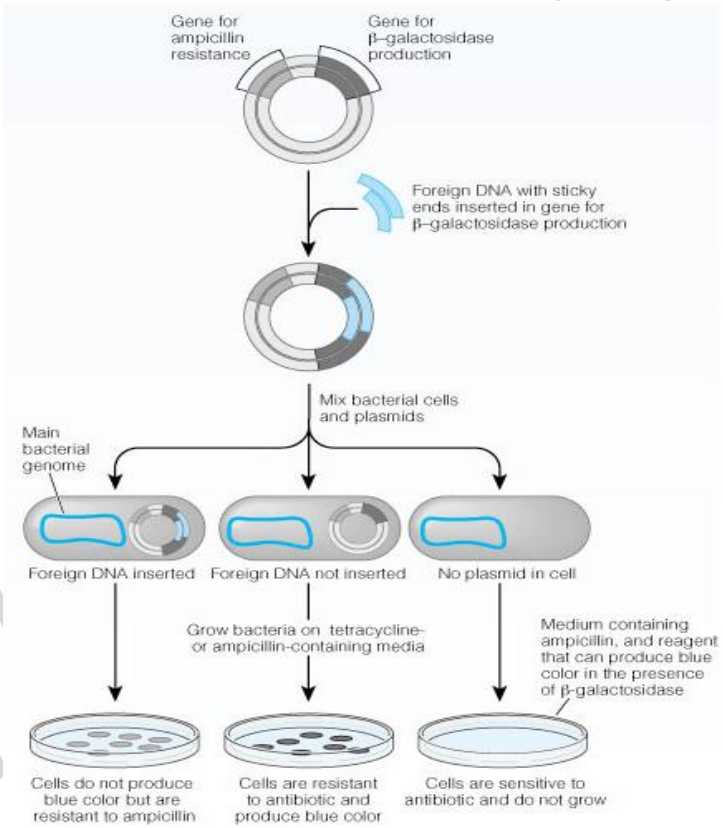
- تستخدم المورثة ampR لاستبعاد الاحتمال الأول حيث تزرع الخلايا على وسط يحوي الأمبيسلين فتنمو الخلايا المقاومة للأمبيسلين فقط وهذا يشير إلى دخول الناقل إلى الخلية المضيفة.

تستعمل الخلية المضيفة سكر اللاكتوز لحياتها ومن أجل هذا تحتاج إلى العديد من الأنزيمات منها أنزيم B-galactosidase الذي يعمل على ركائز طبيعية ويمكنه أن يعمل على ركائز صنعية مثل x-gal فيعطي نتيجة تفاعله مع الركازة مركب يلون أزرق والمورثة المسؤولة عن إنتاج هذا الأنزيم هي مورثة lacZ .

عند اختبار الخلايا بالركازة الصنعية أي إضافة x-gal إلى الوسط وإنتاج اللون الأزرق يشير هذا إلى وجود المورثة lacZ وعدم نجاح عملية إدخال الـ insert، أما إذا لم ينتج اللون الأزرق والحصول على مستعمرات بيضاء يشير هذا إلى غياب المورثة lacZ لأن الـ insert توضعت ضمنها وخربتها.

د.ظلال قطان 2017/2018





التحقق من عملية نجاح الـ Transformation

2017 د. ظلال

تقنية الـ PCR

تفاعل التسلسل البوليميري

أهم الأسباب التي تعيق تطبيق تقانات البيولوجيا الجزيئية هو ندرة الحموض النووية DNA و RNA في العينات المراد دراستها. و تقانة الـ PCR مكنت الباحثين من الحصول على كميات ضخمة من الحموض النووية مقدرة بعشرات إلى مئات النانوغرامات.

1. ما هو الـ PCR:

هو تقنية مخبريه تم اكتشافها عام 1983م تقريباً، تقوم على إكثار نسخ الحمض النووي (DNA) خارج النظام الحيوي. أي أنها طريقة لنسخ الحمض النووي في المختبر. و لذلك فهي تقنية حيوية لاستنساخ قطعة محددة من الحمض النووي و مضاعفة إنتاجها لكي يتسنى إجراء اختبارات و فحوصات إضافية عليها. وضعت هذه التقنية من قبل العالم كاري موليس Kary Mullis في عام 1983م والذي حاز على جائزة نوبل عام 1993.

إن المبدأ والشروط التجريبية التي تجري فيها هذه التفاعلات بسيطة، والهدف هو حصول سلسلة من تفاعلات تضاعف الـDNA ثنائي السلسلة وفي كل تفاعل يتم استخدام سلاسل أولية قليلة التعدد مؤلفة من عدد محدود من النكليوتيدات. الغاية من هذه العملية هو استخدام السلاسل الهجينة الناتجة في كل خطوة من خطوات الاصطناع كقالب من أجل الخطوة اللاحقة بدلا من إعادة السلاسل الأساسية في كل مرة.

2. متطلباتPCR :

لإنتاج الحمض النووي (DNA) بواسطة PCR يتطلب توفير :

1 - جهاز للتحكم بدرجات حرارة التفاعل بشكل دقيق و متتالي (الدورة الحرارية Thermocycle): ويقوم هذا الجهاز بتغير درجة الحرارة بشكل سريع، لأن تغير درجة الحرارة هو الأساس الذي تقوم عليه فكرة هذه التقنية.

2- القالب template: شريط من الـ DNA مضاعف السلسلة قد يكون الجينوم كله أو جزء منه.

3- أنزيم Taq polymerase

د. ظلال قطان 2017/2018

4- السلاسل البادئة primers: وهو قطعة صغيرة من الحمض النووي (DNA) ليتمكن الإنزيم من بدء البناء و النسخ عليها عند النهاية ´3.

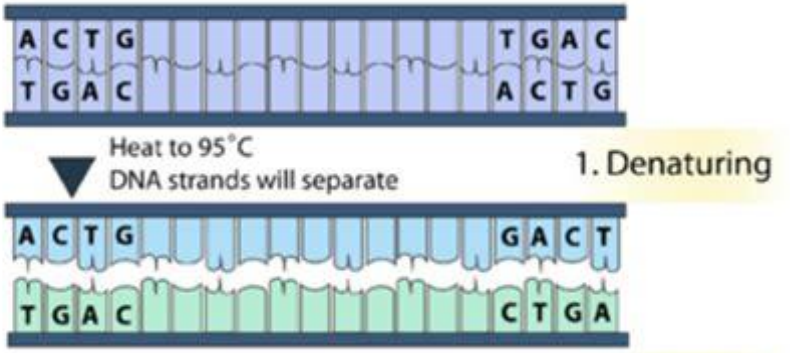
5- نكليوتيدات حرة dNTPs.

6- وقاء ليتم فيه التفاعل ويحوي شوارد المغنيزيوم.

تقوم عملية الـ PCR على عدة دورات (30-24) دورة تقريبا، وتتألف الدورة الواحدة من ثلاث مراحل:

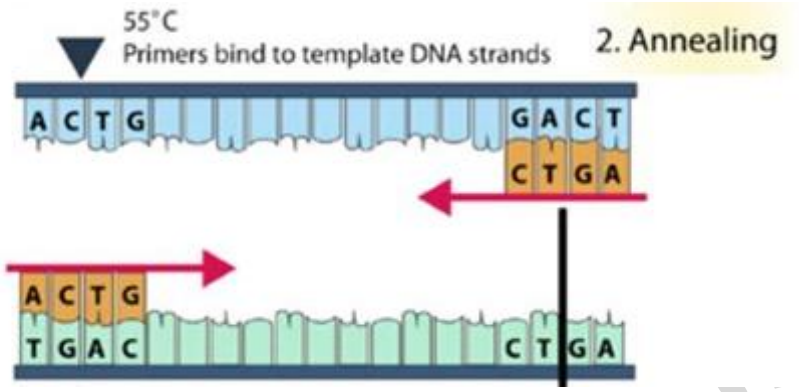
I. التمسخ أو الفصل (Denaturation):

يتم الفصل بين الـ DNA المتتامين للقالب بالحرارة التي تقارب (93-95) º م. تعتمد المدة اللازمة للفصل على مصدر الجينوم (عند طلائعيات النوى لا تحتاج لزمن طويل أما حقيقيات النوى ذات الجينوم الكبير والغنية بنكليوتيدات الـ C والـ G تحتاج لزمن أطول). تستمر هذه المرحلة ما يقارب دقيقة أو دقيقتين (وهو تقريبا الزمن الذي تأخذه كل من المراحل التالية).



II. مرحلة التهجين Hybridization (Anealing):

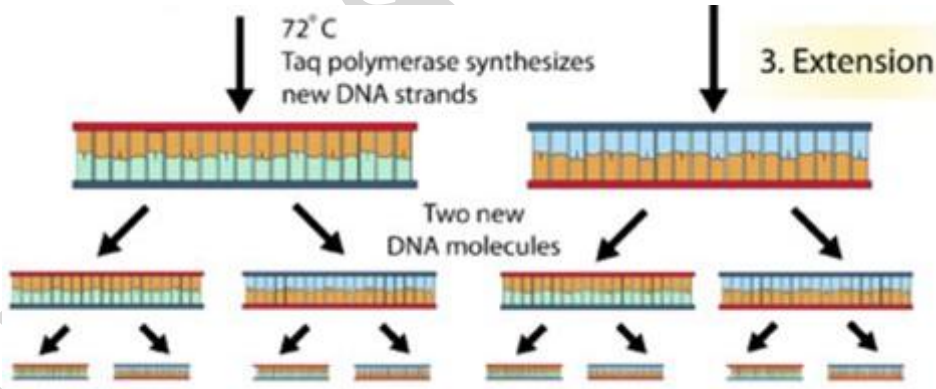
في هذه المرحلة تنخفض درجة الحرارة إلى ما يقارب (50 - 65) º م لتلتصق البوادئ مع متمماتها على الجينوم. وتعتمد درجة الحرارة اللازمة على تسلسل وطول البوادئ التي تضاف، فلكل بادئ درجة حرارة مناسبة لالتصاقه (فإذا انخفضت درجة الحرارة فوق اللازم سيلتصق البادئ بشكل عشوائي حتى أنه يمكن أن يلتصق مع نكليوتيدات لا تتممه، أما إذا ارتفعت درجة الحرارة كثيرا فلن يلتصق البادئ مع متممه).



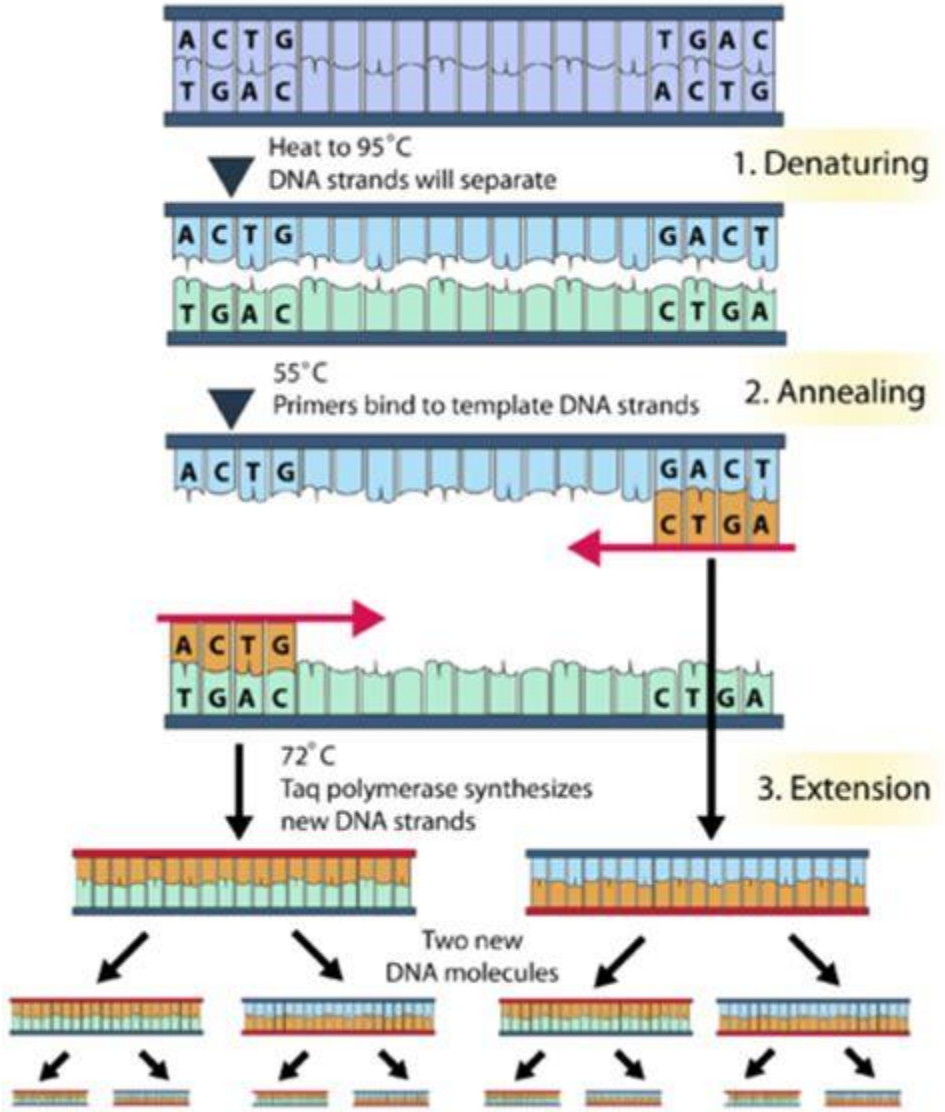
II. مرحلة الإطالة أو التصنيع Synthesis :

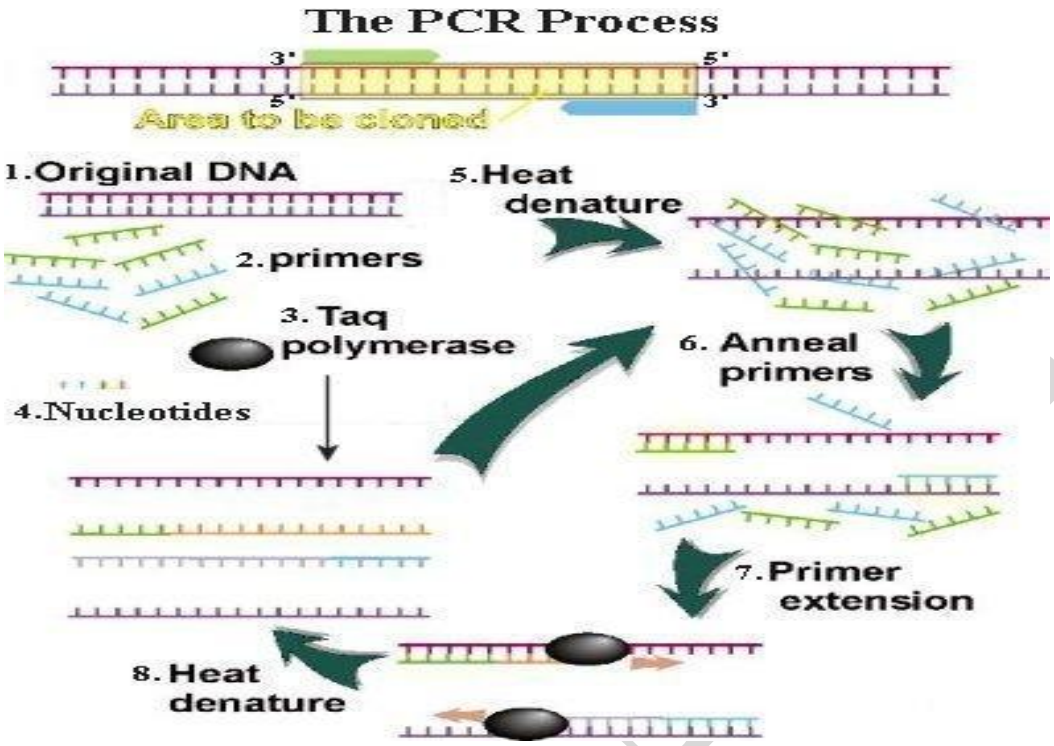
بعد أن يرتبط البادئ مع متتمه على القالب يأتي أنزيم الـ Taq polymerase ويتمم التسلسل على كل خيط فينتج عن كل خيط في النهاية خيط مضاعف من الـ DNA.

تكون درجة الحرارة في هذه المرحلة (72-75) ºم، أما الزمن يتفاوت حسب طول القطعة المراد دراستها.



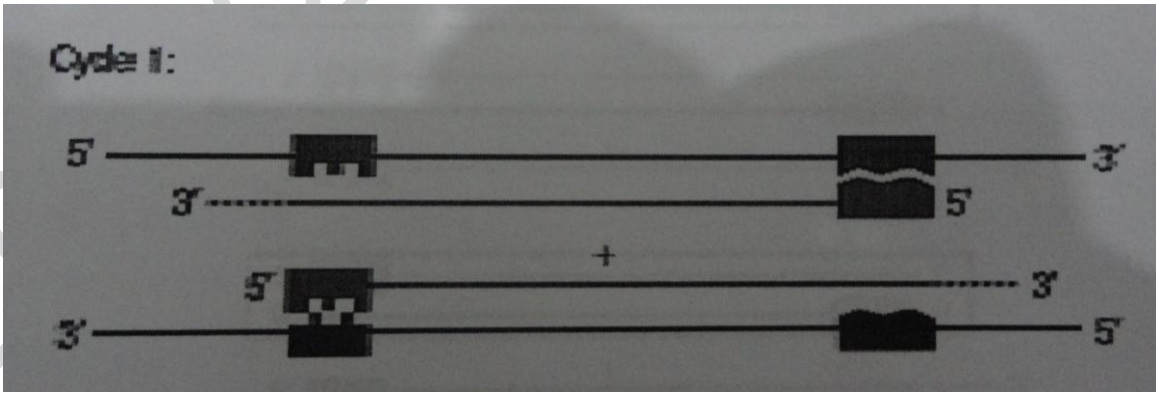
د. ظلال قطان 2017


A C T G
T G A C
T G A C
A C T G
Heat to 95°C
DNA strands will separate
1. Denaturing
A C T G
G A C T
T G A C
C T G A
55°C
Primers bind to template DNA strands
2. Annealing
A C T G
G A C T
C T G A
A C T G
T G A C
C T G A
72°C
Taq polymerase synthesizes
new DNA strands
3. Extension
Two new
DNA molecules

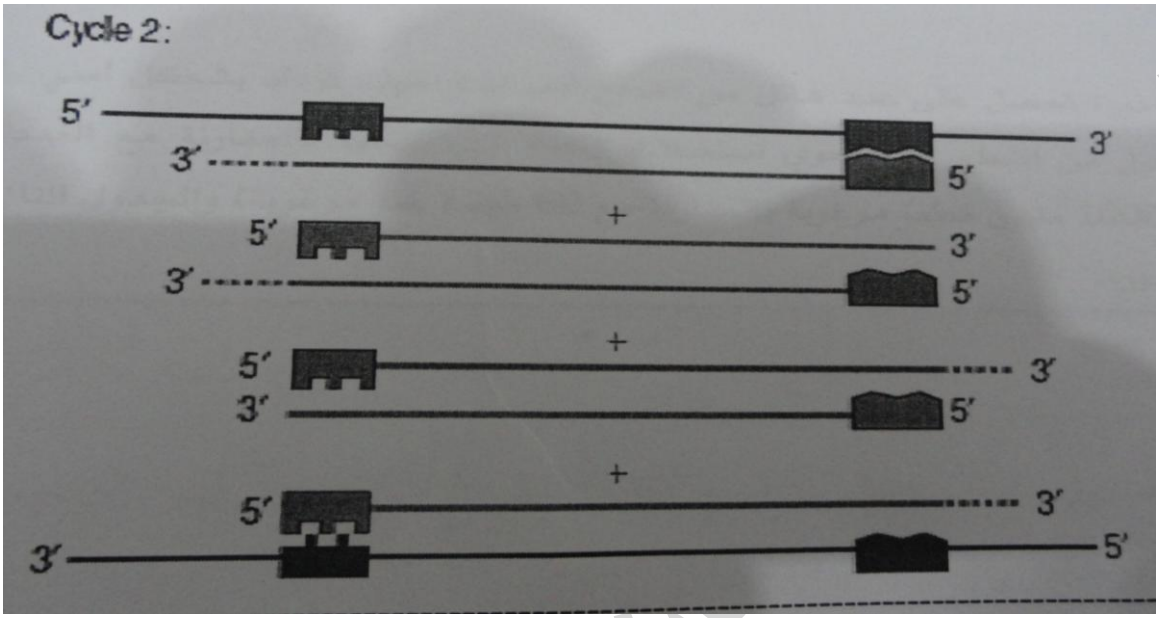


ماذا يحدث خلال دورات الـ PCR المتتابعة:

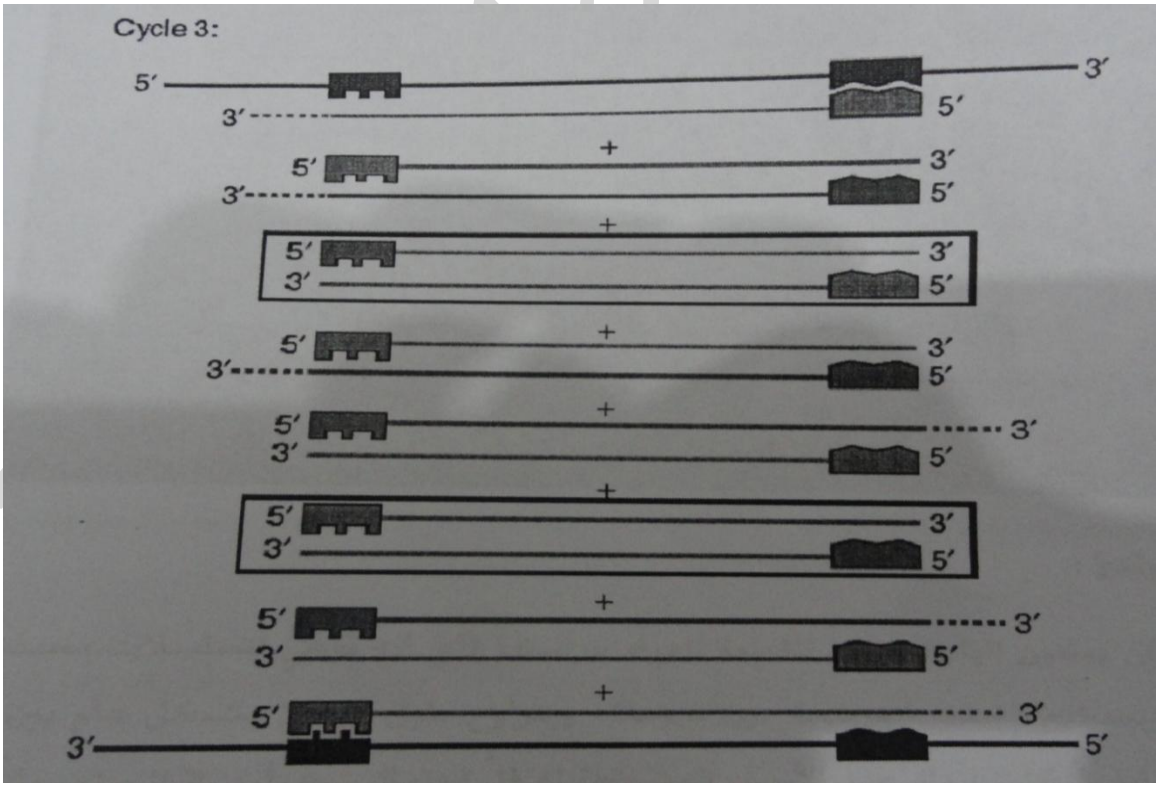
<u>بعد الدورة الأولى:</u> إن القطع الناتجة لا تحوي التسلسلات المرغوبة فقط، بل تكون التسلسلات التي يصطنعها الأنزيم أطول من السلسلة المطلوبة و ذلك لأن الأنزيم يتابع عمله على كل خيط من الخيطين ولا يتوقف عند نهاية السلسلة المطلوبة.



بعد الدورة الثانية: بعد فصل الخيطين المتتامين فإن الخيط المتشكل من الدورة الأولى سينتج عنه القطعة المرغوبة فقط وبشكل مفرد السلسلة و ذلك لأنها تقابل قطعة تحوي تسلسلات زائدة عن التسلسلات المرغوب بها، أما القطع الأصلية ينتج عنها ما ينتج في الدورة الأولى.



بعد الدورة الثالثة: ينتج أول سلسلتين مضاعفتين ومحدودتين تماما، لاحظ الشكل الموضوعتين بإطار.



وبعد حوالي 30 دورة نحصل على عدد هائل من القطع المرغوبة حيث تزداد بشكل أسي في كل دورة. بالمقارنة مع عدد قليل من القطع التي تحوي تسلسلات زائدة التي نهملها بالمقارنة مع العدد الهائل للقطع المرغوبة (ما يقارب 1000 مليون قطعة مرغوبة بالمقارنة مع 60 قطعة غير مرغوبة).

3. اختيار السلاسل الأولية (Primers)

إن اختيار السلاسل الأولية أو البادئات في تفاعلات التسلسل البوليميري يجب أن يكون دقيقا، هذه السلاسل تلعب دورا مضاعفا فهي تقوم عند تهجين سلسلة الـ DNA الأساسي (القالب) بتحديد الجزء المراد مضاعفته هذا من ناحية ومن ناحية أخرى فإنها تسمح ببدء بلمرة وتكثيف الـ DNA بواسطة النهاية الحرة لزمرة الهيدروكسيل على الموقع ´3.

إن السلاسل الأولية سيتم تهجينها عند نهايات سلاسل الـ DNA التي سيتم تضخيمها، لذلك فإنه من الضروري معرفة تسلسل النكليوتيدات عند نهايات هذه السلاسل.

من أجل تسهيل اختيار السلاسل الأولية، يوجد برامج تحليل السلاسل التي تسمح بالتأكد من النقاط التالية:

- مقارنة درجات الحرارة المستخدمة في التفاعلات حيث أن السلاسل الأولية يجب أن تكون قابلة للتهجين في نفس درجات الحرارة بالنسبة للسلاسل الأساسية (القالب).
- يجب أن لا تكون السلاسل الأولية متممة لبعضها البعض و خاصة عند النهاية ´3.
- أن لا تتضمن السلاسل الأولية سلاسل مكررة ومتعاكسة حتى لا يحدث وانطواء ضمن السلسلة نفسها.

4. درجات الحرارة المستخدمة في تفاعلات التسلسل البوليميري

إن المراحل الثلاثة من هذه التفاعلات التي تشكل حلقة الـ PCR تتم في درجات حرارة مختلفة وهذا يسمح بالتحكم بالنشاط الأنزيمي للأنزيمات المشاركة في هذه التفاعلات.

- المرحلة الأولى (تفكيك الـ DNA): تتم عادة في درجة حرارة (93-95) مئوية من أجل فصل سلسلتي الـ DNA.
- المرحلة الثانية (التهجين): يتم تحديد درجة الحرارة فيها حسب طبيعة السلسلة الأولية وهذه الحرارة تختلف بين (50 و 65) درجة مئوية و بالتالي تحدد مدى استقرار الجزيء الهجين الناتج عن ارتباط السلاسل الأولية والسلاسل الأساسية.
- المرحلة الثالثة (الإطالة أو تكثيف الـ DNA) : تتم في درجة حرارة (72-75) درجة مئوية وهي الدرجة المثلى لنشاط أنزيمات الربط وبالتالي بلمرة الـ DNA.

إن درجة حرارة التفكيك والتكثيف تبقى ثابتة بينما تتغير حرارة التهجين تبعا للسلاسل الأولية المستخدمة ومكوناتها من النكليوتيدات.

من أجل حساب درجة الحرارة اللازمة في عملية التهجين لسلسلة قليلة التعدد من النكليوتيدات (30 نكليوتيد) نستخدم العلاقة التالية :

2017/2018 د. ظلال قطان

$$Tm = 2\ (A+T) + 4\ (G+C)$$

حيث أن A، T، G ،C هو عدد كل من هذه الأسس في السلسلة الأولية قليلة التعدد.

5. سلسلتي الـ DNA الأساسي أو القالب

من الناحية العملية، نحتاج إلى عدة نسخ من الـ DNA الأساسي لكي نحصل على نتيجة جيدة.

ملاحظة : إذا كانت نوعية أو كمية الـ DNA الأساسي غير جيدة فإن ذلك قد يؤدي إلى تضخيم أجزاء غير نوعية من الـ DNA أي الأجزاء التي لا نبحث عنها وليست هي الهدف المنشود.هذا التضخيم غير النوعي يمكن تفسيره بوجود تلوث أو عدوى من العينات المستخدمة أو العناصر التفاعلية الأخرى المستخدمة في استخلاص الـ DNA.

6. أنزيم تكثيف الـ DNA (Taq -Polymerase)

تأتي هذه الأنزيمات من البكتيريا المقاومة لدرجات الحرارة المرتفعة و تدعى Thermus aquaticus هذه البكتيريا تعيش بشكل طبيعي في درجات حرارة مرتفعة تصل إلى أعلى من $90C^{o}$ مثل الينابيع المائية الحارة في أعماق المحيطات، وبالتالي فان أنزيمات تكثيف الـ DNA لا تتحطم في درجات الحرارة المستخدمة لتحطيم و تخريب جزيئات الـ DNA و أكثر الأنزيمات المعروفة هو Taq Polymerase.

7. المحلول الموقي

المحلول الموقى المستخدم من أجل تفاعلات التسلسل البوليميري تساعد على استمرارية ثبات PH المحلول في الوسط التفاعلي و أيضا تحفظ أنزيمات التكثيف من الإضاءة.(Tris-Hcl, PH = 8.5– 9)

هذا المحلول يحتوي على شوارد موجبة ثنائية التكافؤ وهي عوامل مساعدة لا غنى عنها في تفاعلات التسلسل البوليميري إلى جانب أنزيمات التكثيف. إن وجود شوارد موجبة ثنائية التكافؤ (Mg^{2+}) و أخرى أحادية التكافؤ $(NH_4^+ ; k^+)$ يعدل من الشحنات السالبة لمجموعات الفوسفات الموجودة في الـ DNA و أيضا تؤمن استقرار جزيئات ال DNA الهجينة.

8. تقنية PCR تطبيقات كثيرة في مجال أبحاث الحمض النووي (DNA) و الوراثة و منها

1. الكشف عن الطفرات الوراثية : وذلك عن طريق وضع بريمر خاص للطفرة لتكثير الجين الخاص بها ومنه نقوم بمعرفة المرض إذا كان على زوجين من الكروموزومات أو على احدهما (allele).
2. تعين البصمة الوراثية.
3. الكشف عن الفيروسات : وهذه الطريق هي الأدق في تحديد نوع وجنس الفيروس وكميته.
4. هو العملية الأساس في تحديد تتابع الأسس الآزوتية في الحمض النووي (DNA).
5. معرفة طول الحمض النووي (DNA).
6. تقنية الحمض النووي (DNA) المكمل.
7. تحديد الجين المطلوب من خليط من الجينات.

د. ظلال قطان 2017/2018

8. في مشروع الخارطة الجينية البشرية (human genome project).
9. تقنية ارتباط الحمض النووي (DNA) – بروتين (الحمض النووي (DNA) -Protein Interaction).
10. في مجال الطب الشرعي (اختبار الأمومة، حالات الاغتصاب، تحديد الهوية... الخ) .

وغيرها من التطبيقات المخبرية والبحثية .

9.محدودية عملية الـ PCR :

1- يجب معرفة التسلسلات المجاورة للقطعة المرغوبة لعمل بوادئ مناسبة. 2- قابليتها للتلوث، من أجل هذا يجب إجراء شاهد سلبي لكل عملية PCR (وهو أنبوب نضع فيه كل المكونات اللازمة باستثناء الـ DNA المدروس) ويجب أن لا يظهر فيه أية قطعة متضاعفة بعد انتهاء العملية.

3- أنزيم الـ Taq polymerase لا يصحح الأخطاء التي يرتكبها أثناء العمل، وذلك يؤثر على التجربة المجراة في حال كانت عملية الـ PCR تجرى لمعرفة تسلسل القطعة المدروسة، في هذه الحالة نلجأ إلى استخدام أنزيم آخر يصحح الأخطاء ولا يتخرب بالحرارة. أما إذا كانت التجربة من أجل تحديد طول القطعة فقط فالأخطاء التي تحدث لا تؤثر تأثيرا كبيرا على النتائج.

5- طول القطعة المضخمة عبر الـ PCR محدود.

مكتبة الـ DNA المتمم cDNA Library

يتم اللجوء إلى عمل cDNA لمجموع الـ mRNA في الخلية أو النسيج بدلا من إنشاء مكتبة لكامل الجينوم، و الـ cDNA الناتج لا يحوي إلا القطع المرمزة للبروتين في النهاية، فهو لا يحوي قطع غير مشفرة ولا قطع مسئوولة عن إعطاء tRNA و لا rRNA أي يحوي فقط الـ ORF الخالية من الانترونات.

لتحضير مكتبة cDNA يستخدم في البداية تسلسل poly T كبادئ primer يقابل poly A في الـ mRNA و يرتبط به بروابط هيدروجينية و يستخدم أنزيم النسخ العكسي فنحصل على حلزون هجين من الـ DNA و الـ RNA. و لفصل RNA عن DNA نطبق أنزيم نيوكلياز داخلي للـ RNA يقوم بإحداث فجوات في شريط RNA.

د. ظلال قطان 2017/2018

ثم نطبق أنزيم DNA Polymerase، و تعتبر قطع RNA المتبقية كبوادئ و يملأ الفراغات ويحلل القطع التي يصادفها أمامه بفعالية أنزيمية محللة من ´5 إلى ´3 أي بفعالية exonuclease، فنحصل في النهاية على حلزون مضاعف من cDNA و الذي يشكل نسخة لمجموع RNA الرسول في الخلية. عند معالجة قطع DNA المتمم الناتجة بنفس الخطوات سنحصل على مكتبة cDNA Library.

تقانات التبقيع Blotting Technologies

تشترك جميع تقانات التبقيع بالخطوات التالية:

- فصل الجزيئات المراد الكشف عنها بالرحلان الكهربائي.
- نقل الجزيئات من الهلامة إلى غشاء النايلون أو السللوز التي ترتبط به الجزيئات.
- تهجين غشاء النايلون أو السللوز مع كواشف نوعية موسومة للجزيء أو التتالي المراد كشفه.
- الكشف عن إيجابية التهجين عن طرسق كاشفات تتحرى إشارة الوسم في الغشاء.

1- Southern Blotting تبقيع ساوثرن:

طور العالم Ed Southern في عام 1975 تقنية مبتكرة عرفت باسم Southern Blotting والتي يمكن استخدامها للكشف عن جينات معينة. يتم عزل الـ DNA وهضمه (تقطيعه) بواحد أو أكثر من أنزيمات التحظير restriction enonucleases ويتم فصل القطع الناتجة وفق طولها عن طريق إجراء الرحلان الكهربائي على جل أغاروز. يتم نقع الجل في محلول قلوي لكسر الروابط الهيدروجينية بين سلسلتي الـ DNA ومن ثم يتم نقل الـ DNA إلى غشاء نايلون وبذلك يصبح الغشاء نسخة مماثلة لقطع الـDNA على جل الأغاروز.

يتم حضن غشاء النايلون مع قطعة DNA منسلة وموسومة بواسم مشع. يتم تسخين المسبار الجيني لفصل سلسلتيه مما يجعله مفرد السلسلة قبل إضافته إلى غشاء النايلون، وبهذا يمكن أن يتهجن hybridize مع الأسس المكملة له على قطع الـ DNA على الغشاء على مبدأ تكامل الأسس النكليوتيدية، وبما أن المسبار الجيني موسوم إشعاعياً فإنه يمكن الكشف عن التسلسلات التي تهجنت مع المسبار بعملية autoradiography.

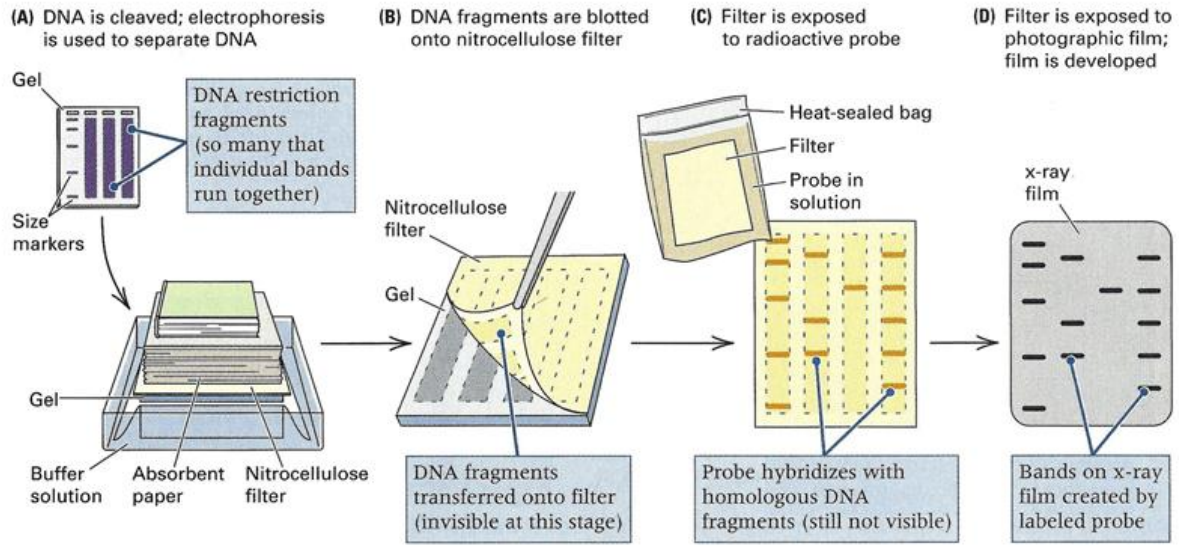
د. ظلال قطان 2017/2018

هناك تطبيقات عديدة لتقنية Southern Blotting حيث يمكن الكشف عن الطفرات التي تغير نمط قطع الـ DNA عن طريق تغيير الموقع الفعال لأنزيمات التحظير restriction endonucleases أو حذف جزء كبير من الجين. إن هذا يسمح باستخدام هذه التقنية لتحديد الأشخاص الحاملين لعيوب جينية أو إذا كان الجينين متماثل اللواقح homozygous لمرض معين، ولإجراء ذلك نحتاج لكمية صغيرة من الـ DNA من خلايا الدم البيضاء أما في حالة الجنين يتم أخذ عينة من السائل الأمنيوسي amniotic fluid المحيط بالجنين أو بإجراء الاعتيان المشيمي في المراحل الأولى من الحمل. من ناحية أخرى تستعمل المخابر الجنائية تقنية Southern Blotting لتوليد بصمات وراثية DNA fingerprints لعينات الدم أو السائل المنوي المتروك في موقع الجريمة. إن البصمة الوراثية DNA fingerprint مميزة لكل شخص وللحصول عليها يستخدم مسبار جيني gene probe يكشف عن تتالي الأسس التي تتكرر مرات عديدة في الجينوم البشري والتي تسمى microsattelite sequences. يحمل كل إنسان عدداً مختلفاً من هذه التسلسلات المتكررة ونظراً لتوضع هذه التسلسلات بشكل متجاور على الكروموزوم فإنها تسمى VNTRs (Variable number tandem repeats). عندما يتم هضم (تقطيع) الـ DNA الجينومي بأنزيمات التحظير restriction endonucleases يتم تحليل هذه القطع بتقنية Southern Blotting ويتم الحصول على نموذج معين للـ VNTRs في DNA الفرد ونادراً ما تكون هذه التسلسلات متشابهة بين الأشخاص باستثناء التوأم الحقيقي، وقد تم التقدير بأنه عند استعمل 8 أنزيمات تحظيرية فإن احتمال أن تكون قطع الـ VNTRs متماثلة لشخصين (إذا لم يكونا توأم حقيقي) هو 10^{30}.

هناك نوع خاص من الـ Southern Blotting يسمى Zoo Blot وهو يستخدم للكشف عن جينات متشابهة تم حفظها عبر التطور في أنواع مختلفة من الأحياء، وهي تشفر بروتينات مهمة جداً للعضوية. يتم الحصول على مسبار مكتبة DNA الجينومي ويستخدم لسبر DNA جينومي لأنواع مختلفة أخرى، وعندما يتم تهجين هذا المسبار مع DNA لعدد من الأنواع فإنه يمثل جزء من الجين الذي تم حفظ جزء أو كامل الجين عبر التطور.

2017/2018

Southern blot

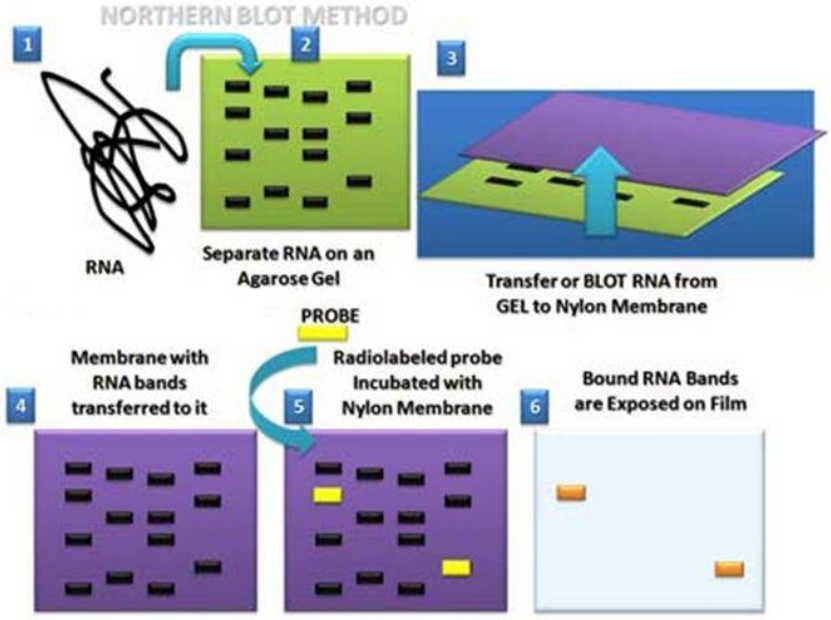


2- تبقيع نورثون Northern Blotting

تمكن هذه التقنية من تعيين حجم mRNA وتعطي فكرة كمية عن نمط التعبير عنه. في هذه التقنية يتم عملية RNA denaturation عن طريق تسخين الـRNA لإزالة أية روابط هيدروجينية في سلاسل الـRNA (ناتجة عن وجود تكامل للأسس داخل الجزيئة نفسها أو مع جزيئات RNA أخرى) ومن ثم يتم ترحيله على جل أغاروز agarose gel بدوره ذو طبيعة مخربة للروابط الهيدروجينية denaturing agarose gel، ويتم نقل الـRNA بعد ترحيله إلى غشاء نايلون، ويتم حضن الغشاء مع مسبار cDNA مفرد السلسلة وموسوم إشعاعياً أو مع مسبار antisense RNA وبعد أن يتم التهجين يغسل الفائض من المسبار عن الغشاء ويتم تعريض الغشاء إلى فيلم حساس لأشعة X، وبالتالي يظهر الـmRNA بعملية autoradiography نظراً لكونه مهجن مع المسبار الفعال إشعاعياً، وبشكل مشابه لتقنية Southern Blotting تسمى هذه التقنية Northern Blotting.

2017/2018

Northern blotting

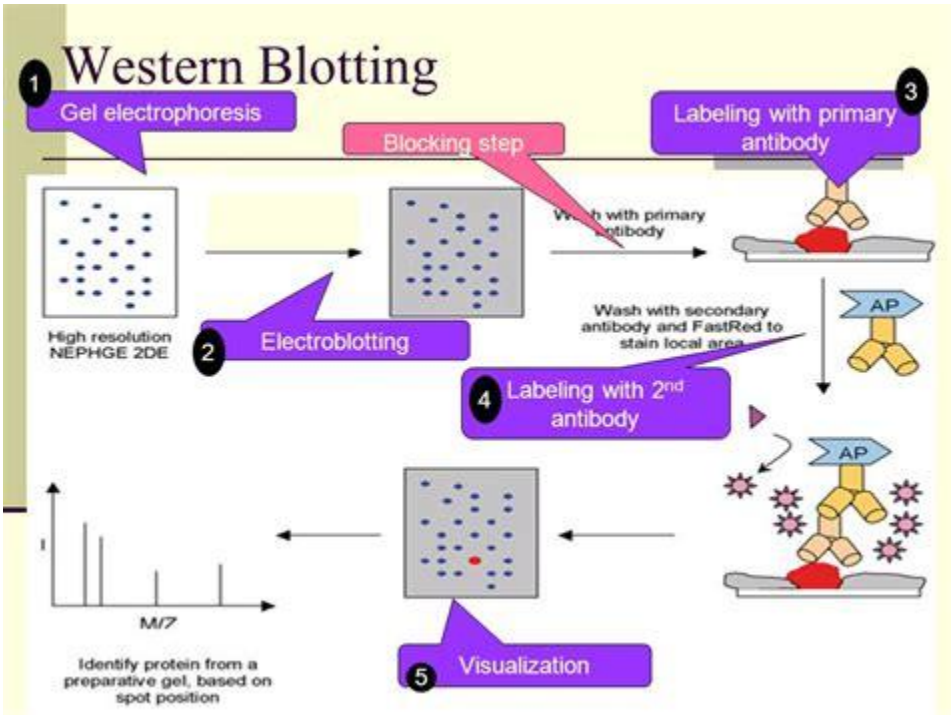


3- تبقيع ويسترن Western Blotting

يختلف تبقيع ويسترن عن التبقيعين السابقين بما يلي:

- يجري في تبقيع ويسترن ترحيل للبروتينات على هلام الأكريلاميد، إذ ترحل البروتينات وفقا لشحنتها و وزنها الجزيئي إلى القطب الموجب للرحلان.
- يستخدم غشاء من النتروسللوز و ليس من النايلون، حيث يحقق الأول قدرة ربط عالية للبروتينات المنتقلة من هلامة الرحلان إلى الغشاء.
- يجري التبقيع بالاستعانة بتيار كهربائي لنقل البروتينات من الهلام للغشاء و تثبيت البروتينات عليه، و تستخدم منظومة مختلفة عن تلك التي ذكرت في نوعي التبقيع الأخرين.
- لا يستخدم تبقيع ويسترن أي مسابير موسومة بل يجري التهجين باستخدام أضداد بروتينية موسومة ترتبط بشكل نوعي و إلفة عالية بالمستضد البروتيني المثبت على الغشاء و تكشف عن وجوده.

2017/2018



أهمية البيولوجيا الجزيئية في المجال الطبي و الصيدلاني

عام 2003 مرت الذكرى الخمسين لجائزة نوبل التي حاز عليها James Watson and Francis Crick لقيامهما بتوضيح بنية الـ DNA على شكل حلزون مضاعف السلسلة ومنذ ذلك الحين شهدت تقنيات البيولوجيا الجزيئية تقدماً هائلاً سمح للعلماء والأطباء باستخدامها للكشف عن الأمراض وإيجاد العلاج لها، ومن هذه التقنيات:

1- إيجاد نماذج عن الأمراض البشرية Models of human disease

لقد ساعدت الحيوانات كالفأر والجرذ والديدان والذباب على فهم الأمراض البشرية وذلك نظراً لوجود جينات مشتركة مع تلك الأحياء حفظت عبر التطور، وبالتالي يمكن للعلماء الآن أن يستخدموا العضويات كنماذج model organisms لدراسة الأمراض الجينية البشرية والتعرف على الجينات المسببة واختبار

د. ظلال قطان 2017/2018

العلاج الجيني لمثل هذه الأمراض والمعالجة المعتمدة على الدواء drug-based therapeutic approaches لتحديد فعاليتها

وأمانها في الدراسات ما قبل السريرية pre-clinical studies قبل استعمالها في الدراسات السريرية (على المرضى والأصحاء) لدى البشر.

2- الواسمات الحيوية للكشف عن الأمراض Biomarkers or disease detection

من الناحية النظرية يعد توفر الوسائل التشخيصية المناسبة وسيلة للكشف المبكر عن الأمراض في مراحلها المبكرة ففي بعض الأمراض ولا سيما مرض السرطان يعد الكشف المبكر عن المرض أساسياً لنجاح المعالجة وزيادة احتمال البقيا. إن إحدى طرق الكشف هي البحث عن واسمات حيوية biomarkers كمؤشرات على حدوث المرض؛ إن الواسمات الحيوية في عبارة عن بروتينات ينتجها النسيج المريض أو هي بروتينات يزداد إنتاجها عندما يصيب المرض النسيج، وتتواجد هذ الواسمات الحيوية في البول أو الدم كمنتج من الخلية المريضة (الخلايا الميتة أو التي في طريقها للموت كالخلايا المتوتة بالـ apoptosis) من الأمثلة عن الواسمات الحيوية المستضد النوعي للبروستات prostate-specific antigen (PSA) والذي يتحرر إلى الدوران الدموي عندما يحدث التهاب في غدة البروستات وترتفع تراكيز هذا البروتين في الدم عندما يحدث التهاب في البروستات أو سرطان.

3- الكشف عن الأمراض الجينية Detecting genetic diseases

لقد ثبت أن العديد من تقنيات البيولوجيا الجزيئية ذات قيمة عالية في الكشف عن العديد من الأمراض الجينية

اختبار الشذوذات الصبغية والجينات العطوبة Testing for chromosome abnormalities and defective genes مثل متلازمو داون.

4- Single nucleotide polymorphism

إن أحد أهم الاكتشافات من مشروع المجين البشري هو الكشف عن تغيرات خفية في الـ DNA تسمى single nucleotide polymorphisms (SNPs) وهي تلفظ snips وتمثل أحد أكثر الأشكال الشائعة للتغيرات الجينية بين البشر، ويمكن تعريفها على أنها تغيرات في نكليوتيد واحد في تسلسل الـ DNA تختلف بين شخص وآخر.

2017/2018 د. ظلال قطان

توجد الـ SNPs على كل الصبغيات البشرية ويقدر حدوثها بمعدل تغير SNP واحد كل 1000 إلى 3000 زوج أساس في الجينوم البشري وقد تم التعرف على أكثر من 1.4 مليون SNPs فإذا تم مقارنة قطعة DNA من أحد الصبغيات من شخصين مختلفين يكون حوالي 99.9% متماثلاً بين الشخصين في حين 80% تقريباً من نسبة الـ0.1% الباقية (المختلفة بينهما) تكون عبارة عن SNPs وإن معظم الـ SNPs لا تؤثر على الخلية كونها تحدث في مناطق غير مشفرة للبروتين (الانترونات) في الجينوم ولكن عندما يحدث الـ SNP في تسلسل جيني قد تسبب تغيراً في بنية البروتين مؤدية لحدوث مرض أو تؤثر على صفة بطرق مختلفة بما فيها زيادة القابلية لحدوث بعض الأمراض.

تمثل الـ SNPs تغيرات في تسلسلات الـ DNA التي تؤثر على استجابتنا للشدة والمرض وكان أو ل SNP مكتشف ذوعلاقة بمرض داء الدم المنجلي sickle-cell disease . نظراً لحدوث الـSNPs بكثرة عبر الجينوم لذلك يمكن استخدامها كواسمات جينية ذات قيمة في التعرف على الأمراض المرتبطة بالجينات، فبعض الـSNPs تستخدم للتنبؤ عن احتمال الإصابة بالأمراض المختلفة مثل السكتة والسكري والسرطان والأمراض القلبية والأمراض العاطفية وتلك المؤثرة على السلوك وغيرها من الأمراض ذات الأساس الجيني.

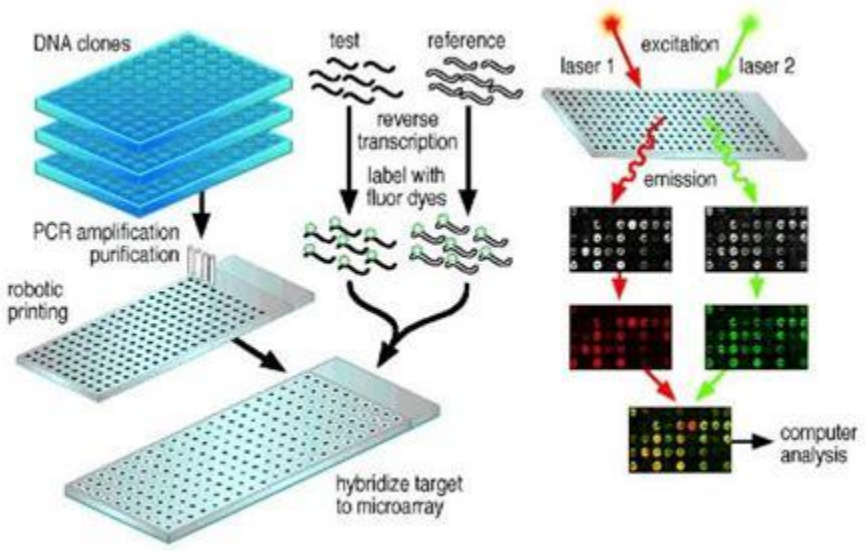
تمثل الـ SNPs أداة واعدة مما دفع العديد من الشركات الصيدلانية لصرف ملايين الدولارات في مشاركة ما يسمى HapMap project. تتجمع العديد من الـ SNPs على الصبغيات بشكل تجمعات تسمى haplotypes ومن هنا تستخدم السابقة Hap كاختصار لـhaplotype، ويمثل مشروع الـ HapMap مشروعاً عالمياً بين شركات ومؤسسات أكاديمية وأخرى خاصة يسعى للتعرف وتصنيف المواقع على الصبغيات chromosomal locations (loci) للـ SNPs التي يتجاوز عددها 1.4 مليون SNP والتي تتخلل الـ3 بليون زوج أساس في الجينوم البشري بهدف فهم دور الـ SNPs في تشخيص الأمراض وعلاجها.

5- التعرف على مجموعة من الجينات المرضية باستخدام تحليل microarray analysis:

تعتبر تقنية microarray من التقنيات الجديدة نسبياً لدراسة الجينوم والتي ستخدم كثيراً في الكشف عن الأمراض الجينية.

إن الـ DNA microarrays والذي يسمى أيضاً gene chips هي عبارة عن صفائح زجاجية مجهرية توضع عليها جينات بشكل نقاط ويمكن لـmicroarray واحد أن يحوي آلاف الجينات ويمكن استخدامه للاستقصاء عن أنماط جينية معينة عند المريض يتم التعبير عنها في بعض الأمراض ويمكن استخدام المعلومات الناتجة عن الـ Microarray من المريض لتحديد خطورة تطور أمراض مختلفة اعتماداً على عدد الجينات الموجودة عند المريض الخاصة بتلك الأمراض.

د. ظلال قطان 2017/2018



ملاحظة:

طلابي الأعزاء: تجدون ملحق للمحاضرات عن مقالة نشرت حديثا عن استنساخ قرود

Cloning of Macaque Monkeys by Somatic Cell Nuclear Transfer

In Cell Press -February 2018

مع تمنياتي لجميع أبنائي الطلبة بالنجاح و التفوق

الدكتورة ظلال قطان

د. ظلال قطان 2017/2018

د. ظلال قطان 2017/2018