وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
جامعة بغداد – كلية الزراعة مدرس المادة .
قسمعلومالاغذيةرقم المحاضرة :.
المرحلةالعام الدراسي :. 2017/2016

المحاضرات النظرية

الفصل الأول

مفهوم علم الحياة الجزيئي ومحاور إهتماماته

مفهوم علم الحياة الجزيئي ومحاور إهتماماته

Molecular Biology; Concept and Interests

علم الحياة الجزيئي Molecular Biology علم يُمهّد الطريق لفهم الظواهر البايولوجية (البايولوجية) بجزئياتها ودقائقها من خلال دراسة **الأنظمة الحيوية** على المستوى الجزيئي، من حيث التركيب والخواص والوظيفية. لكن هذا التعريف لا يُعدّ محدداً لماهية هذا العلم على وجه الدقة، ولا يُسلط الضوء على واقع إهتماماته الحقيقية، بل يجعله صورة أخرى لعلم الكيمياء الحيوية Biochemistry. من هنا فإن الباحثين يؤكدون على تحديد هذا التعريف بإهتمامات هذا العلم الحقيقة والمتمثلة بدراسة تركيب المادة الوراثية والجينات، أو المورثات، ووظائفها وكل ما يتعلق بها، وعلى المستوى الجزيئي، دون التراكيب أو الأجزاء الأخرى من الأنظمة الحيوية، إلاّ في الحدود التي تخدم هذه الجوانب.

الأنظمة الحيوية:

(تتمثل الأنظمة الحيوية) والأنظمة الحيوية تتمثل بجميع الكائنات الحية الموجودة في الطبيعة، وبمختلف أنواعها، والتي تقسم على مستوى البناء إلى كائنات خلوية cellular وأخرى ما دون الخلية acellular.

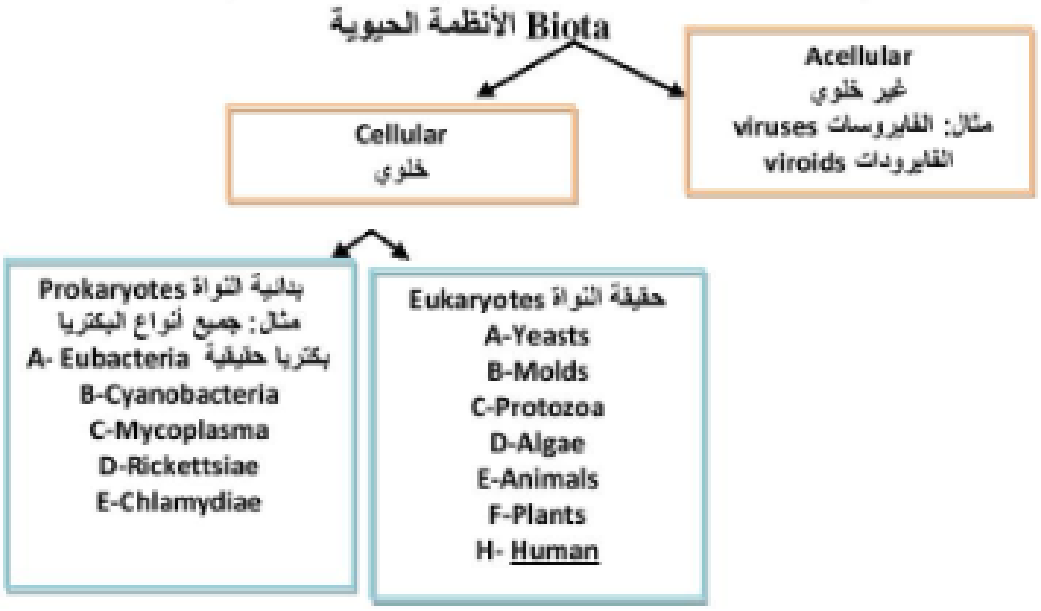
فالاولى: تتضمن جميع الكائنات الحية التي تتألف من خلية مفردة واحدة Monocellular، كما هو الحال مع البكتريا ومعظم أنواع الخمائر ، أو من خلايا متعددة Multicellular كما هو الحال مع الكائنات الخلوية الأخرى بدءاً من الفطريات وإنتهاءً بالإنسان الذي يقف في قمة هرم الأنظمة الحيوية من حيث درجة التعقيد وقوة الإدراك.

والثانية: لا تتمثل بالخلية وتعقيداتها، وإنما تتألف من مادة وراثية تحاط بغطاء بروتيني لحماية تلك المادة الوراثية مثل الفايروسات Viruses والعاثيات Bacteriophage، أو أنها مؤلفة من مادة وراثية فقط كما هو الحال مع الفايرودات Viroids.

ويذكر أن الكائنات الخلوية تقسم، هي الأخرى، إلى كائنات حقيقية النواة Eukaryotes أو كائنات ذات خلايا حقيقة النواة Eukaryotic cells (والتي تشتمل على الخلايا النباتية والحيوانية وبعض الاحياء المجهرية مثل الاعفان والخمائر والطحالب والابتدائيات) ، والى كائنات بدائية النواة Prokaryotes أو كائنات ذات خلايا بدائية النواة Prokaryotic cells والأخيرة (والتي) تشتمل على البكتريا بأنواعها (المختلفة) كافة. على أن

المجموعة التي تدعى بحقيقية النواة تتضمن جميع الكائنات الحية الخلوية الأخرى بدءاً من الفطريات وإنتهاء بالإنسان. أما الفايروسات فلها نظامها الوراثي الخاص بها (الشكل: 1-1).

أستعمل مصطلح علم الحياة الجزيئي لأول مرة من قبل الباحث William Astbury عام 1945 كإشارة إلى المجال الذي يُعنى بدراسة التراكيب الكيميائية والفيزيائية للجزيئات الضخيمة (الكبيرة) الحيوية Biological Macromolecules. وقد شهدت دراسة مثل هذه الجزيئات تطوراتٍ مذهلة باستخدام الأنظمة الحيوية البسيطة كالبكتريا والفايروسات. تمخضت، فيما تمخضت، عن التعرف على تركيب المواد الوراثية، وكيفية التعبير عن الصفات الوراثية، بتفاصيلها الدقيقة، والتي إنعكست مردوداتها الإيجابية على إستخدام هذه المعلومات في مجالات تطبيقية كالتقنية الحيوية Biotechnology والهندسة الوراثية Genetic Engineering. لذلك فإن علم الحياة الجزيئي يعد أساساً لهذه العلوم. على أن علم الحياة الجزيئي نفسه يقوم على قاعدة فهم علم الوراثة Genetics وعلم الكيمياء الحيوية Biochemistry وعلم بايولوجيا (بايولوجيا) الخلية Cell Biology والكيمياء الفيزيائية الحيوية Biophysical Chemistry وهو بمثابة رابط بين الجوانب المختلفة لهذه العلوم، بمعنى أنه لا يمكن تصور هذا العلم بمعزل عن العلوم الأخرى المذكورة.



شكل (1-1): الأنظمة الحيوية المتمثلة بالكائنات الحية وتوزيعها على أساس تكوينها للخلية وطبيعة إنتظام مادتها الوراثية.

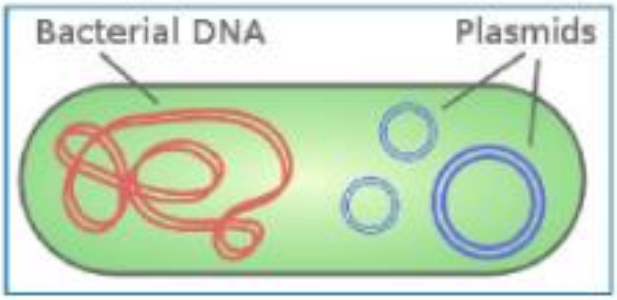
تحتوي أية خلية على العديد من الجزيئات الضخمة أو الكبيرة، تتقدمها البروتينات والسكريات المتعددة والحوامض النووية وغيرها. ولأن الحوامض النووية تلعب الدور المحوري في حياة الخلية فان الجهد الأكبر من علم الحياة الجزيئي ينصب على دراسة هذه الجزيئة المسؤولة عن حمل ونقل الصفات الوراثية، والتعبير عنها عبر عمليتي الإستنساخ transcription والترجمة translation ، وكيفية إنتقال المعلومات الوراثية المحمولة عليها عبر الأجيال، بأمان ودقة، بحيث تبقى الكائنات الحية جميعها تحتفظ بخواصها المميزة لها في الطبيعة، دونما إختلاط هذه الخواص مع خواص غيرها من الكائنات، وعبر عملية تعرف بالتضاعف أو التكرار Replication.

يشترك (تشترك) جميع الأنظمة الحيوية، الخلوية منها تحديدا، في طبيعة المادة الوراثية وتركيبها مع وجود إختلافات طفيفة في بعض التفاصيل الدقيقة، على مستوى نقل هذه الصفات والتعبير عنها بين الكائنات حقيقية النواة و بدائية النواة. كما أن ثمة إختلاف في الكيفية التي توجد عليها المادة الوراثية و طريقة إنتظامها بين هاتين المجموعتين، (على إن) إن المادة الوراثية في جميع هذه الانظمة هي مادة **DNA** التي (، و) سوف نختصر لها في هذا الكتاب بالـ (**دنا**)، (وانها) و تمتلك التركيب نفسه. بيد أنها تنتظم في بدائية النواة بطريقة مختلفة مقارنة مع حقيقة النواة.

الدنا في بدائية النواة:

توجد جزيئة الدنا في بدائية النواة بنسخة واحدة بشريطين ملتفين على بعضهما على نحو ظفيرة وبنظام دقيق سنتعرف عليه في أحد الفصول القادمة، يسمى الحلزون المزدوج Double helix. وهذه الجزيئة دائرية، مغلقة بأرتباط نهايات الأشرطة ببعضها تساهمياً، لذلك توصف بأنها Covalently Closed Circular DNA، ويرمز لها إختصاراً بـ (cccDNA). وهي خالية من الهستونات Histones، وترتبط في جزء منها بالغشاء السايتوبلازي (السايتوبلازمي). للخلية، بعد أن تتخذ شكلا يتمثل بالألتواء الفائق Supercoiled، يضمن لها أن تشغل مساحة صغيرة داخل الخلية، ذلك لأن جزيئة الدنا من الجزيئات العملاقة ، بل أنها أكبر جزيئة في الخلية، إذ أنها أطول من الخلية نفسها بحوالي عشرة الآف مرة عند وجودها (وجود الجزيئة) بحالة الإسترخاء Relax. إذ يقدر طول جزيئة الدنا البكتري حوالي ملليمتر واحد، ويتألف من عدة ملايين من القواعد النتروجينية، بينما يقدر طول الخلية البكترية ما بين 1-2 مايكرومتر. ويسمى الموضع الذي تتجمع فيه الدنا في بدائية النواة بـ **nucleoid** او شبيه النواة، ذلك لأنها تخلو من

غشاء يحيط بها، كتلك الموجودة في خلايا حقيقية النواة، والذي يسمى بالغشاء النووي. ورغم صعوبة رؤية الدنا في بدائية النواة، إلاّ بعد تصبيغها بصبغات خاصة مثل Feulgen stain وباستخدام المجهر الضوئي المركب، أو ethidium bromide وDAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole , dihydrochloride) وباستخدام المجاهر المتطورة fluorescence microscopy – (والصبغة الأخيرة تتميز بقدرة ارتباطها في المواقع الغنية بالادنين و الثايمين من الدنا)- إلاّ أنها تُرى على نحو واضح للغاية بالمجهر الألكتروني الذي أستخدم في التعرف على حقيقة كونها دائرية مغلقة النهايتين.



شكل (1-2): خلية بكتيرية تتوضح فيها الدنا البكتري وعدد من البلازميدات

ولابد من الإستدراك للقول، أن هناك دلائل من الدراسات العلمية الأخيرة، أن الدنا في بعض أنواع بدائية النواة، قد تكون خطية وليست دائرية حلقية، وقد تكون بأكثر من قطعة واحدة أو نسخة (جزيئة) واحدة.

وإلى جانب الدنا الرئيسي فإن بعض أنواع بدائية النواة، ولا سيما البكتيريا الحقيقية، تحتوي على جزيئة إضافية او أكثر من الدنا، دائرية مغلقة النهايتين أيضاً، يطلق عليها البلازميدات plasmids (الشكل 1-2) تضفي على البكتيريا صفات وراثية إضافية غير تلك المحمولة على الدنا الرئيسي. ومثل هذه الجزيئات من الدنا، نادراً ما توجد في حقيقية النواة، بأستثناء بعض أنواع الخمائر.

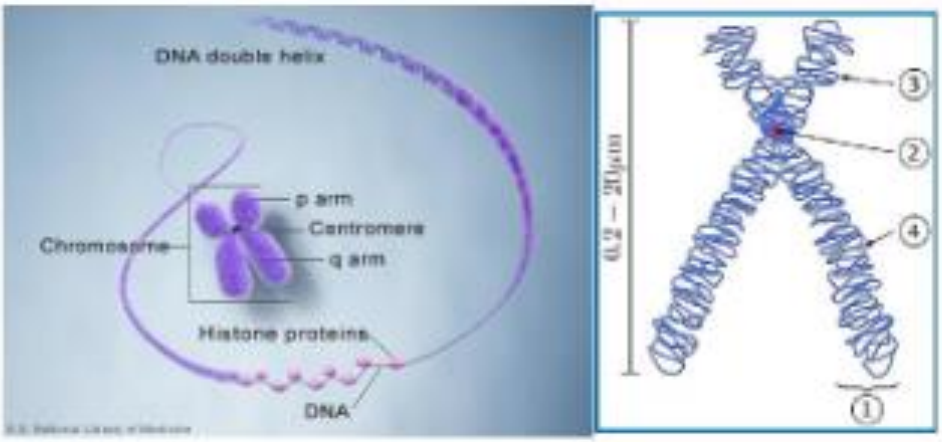
الدنا في حقيقة النواة:

توجد الدنا في حقيقية النواة في موضع من الخلية تعرف بالنواة. وهو موضع محاط بغشاء، يشبه إلى حد بعيد الغشاء السايتوبلازمي، ويعرف بالغشاء النووي. من هنا فإن النواة تعد عضية داخل الخلية. إذ أن جميع أجزاء الخلية المحاطة بالغشاء، توصف بالعضية كالبلاستيدات الخضراء (في النباتات)، والمايتوكوندريا (بيوت الطاقة)، فضلاً عن النواة.

والدنا في حقيقية النواة، ليست بنسخة واحدة، كما أنها ليست دائرية مغلقة النهايتين، وإنما خطية تنتظم على نحو تعرف بالكروموسومات chromosomes، عبر إلتفافها على بروتينات كروية التركيب تسمى الهستونات Histones.

ويذكر أن كلاً من المايتوكوندريا و البلاستيدات الخضراء، وهما عضيتان في خلايا حقيقية النواة، كما سبق معنا، محيطتان بغشاء يعزلهما عن بقية إجزاء الخلية، ويجعل منهما مكونين مستقلّين الى حد بعيد، فإنهما يمتلكان مادتيهما الوراثيتين الخاصيتن بهما، على صورة دنا مشابهة للدنا في بدائية النواة، من حيث أنها دائرية مغلقة النهايتين وبنسخة واحدة، وليست على شكل كروموسوم كما في النواة.

والكروموسومات تراكيب قضيبية، لا تتوضح على صورتها هذه، الاّ في الطور التمهيدي prophase من إنقسام الخلية، حيث تظهر قبل هذا الطور على نحو خيوط رفيعة متداخلة تعرف بالشبكة الكروماتينية chromatin network. توجد الكروموسومات بهيئة أزواج Diploid. ينفصل زوجا الكروموسومات أثناء الانقسام الاختزالي، فيؤدي إلى تكوين الخلايا الجنسية (كالحيوانات المنوية والبويضات في الانسان) أو ما تسمى الأمشاج. عليه فالأمشاج تحتوي على العدد الفردي Haploid من الكروموسومات. وتعود الكروموسومات لتزدوج ثانية عند إندماج خليتين جنسيتين عند الاخصاب. ولكل نوع من الكائنات الحية عدد ثابت من الكروموسومات يختلف بإختلاف النوع species. إذ يبلغ هذا العدد 23 زوجاً في الخلايا الجسمية و23 فرداً في الخلايا الجنسية للانسان.



شكل (1-3): مخطط للكروموسوم وفيه يظهر الكروماتيدين بذراعيها القصيرة p والطويلة q والقسيم المركزي centromere كما يوضح إلتفاف جزيئة الدنا على الهستونات

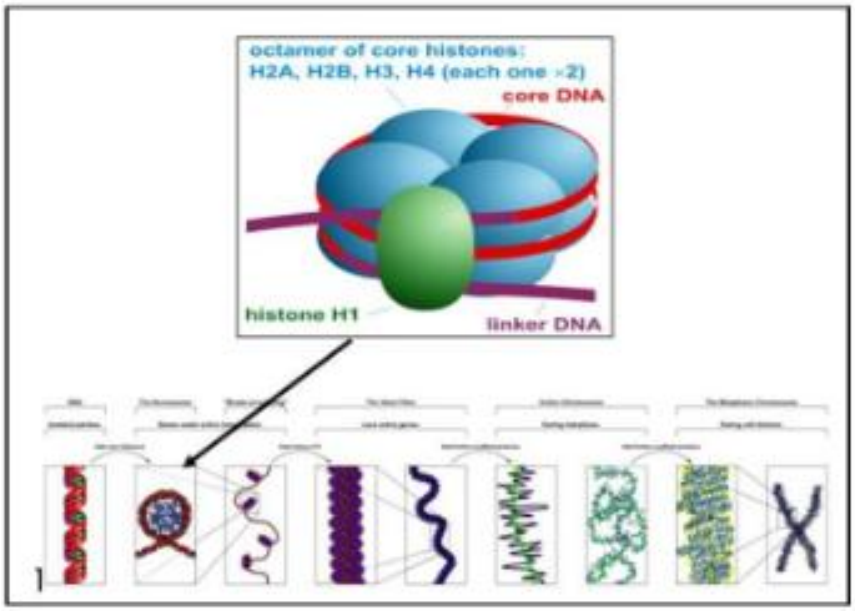
وتتألف الكروموسومات من قطعتين متناظرتين الى حد كبير، تسمى الواحدة منهما الكروماتيد chromatid. ترتبط ببعضها عند نقطة قرب المركز تسمى القسيم المركزي centromere. ولكل كروماتيد، ومن نقطة القسيم المركزي، ذراعان أحداهما قصيرة ويرمز لها بـ (p) والأخرى طويلة ويرمز لها بـ (q). أما نهايات الكروماتيدات فتسمى التيلوميرات Telomeres. ويعطي موقع القسيم المركزي للكروموسوم شكله المميز، اذ يكون هذا الموقع إما في المركز metacentric أو قريباً منه submetacentric أو طرفياً acrocenteric أو في نهاية الكروموسوم telocentric ويمكن الاستعانة به في تصنيف الكروموسومات وتحديد مواقع بعض الجينات عليها.

وعلى المستوى الجزيئي فان عدد جزيئات الدنا في اية خلية يعادل عدد الكروماتيدات. (الشكل:1-3). وجزيئات الدنا في الكروماتيدات تلتف على بروتينات غنية بالاحماض الامينية القاعدية ذات تراكيب كروية تعرف بالهستونات. والهستونات على خمسة انواع تختلف من حيث الحجم أو الوزن الجزيئي ومن حيث محتواها من الأحماض القاعدية المتمثلة باللايسين lysine والأرجينين Arginine ويرمز لها بـ H1 و H2a وH2b و H3 و H4 (الجدول 1-1) ويساهم وجود نسب عالية من الأحماض الأمينية القاعدية في الهستونات على إضفاء شحنات موجبة عليها، الأمر الذي يساعد على إرتباطها بجزيئات الدنا ذات الشحنات السالبة الناجمة عن إحتوائها على مجاميع الفوسفات الحامضية.

جدول (1-1): أنواع الهستونات وأوزانها الجزيئية و محتواها من الأحماض الأمينية القاعدية

نوع الهستون	الاحماض الأمينية القاعدية		الوزن الجزيئي للهستون (كيلو دالتون)
	اللايسين %	الارجنين %	
H1	29	1	23000
H_2a	11	9	13960
H_2b	16	6	13774
H_3	10	13	15342
H_4	11	14	11282

إن إرتباط الدنا بالهستونات يتسم بدرجة عالية من التعقيد، أذ تلتف 146 زوج من القواعد النتروجينية من جزيئة الدنا، وبدورتين، حول كتلة هستونية تسمى لب الهستون الثماني octamer core histone لأنها تتألف من زوجين من H2A وH2B وH3 وH4 فتكون معاً، وبمساندة الهستون H1 من الجهة الخارجية، تركيباً حبيباً يطلق عليه النيوكليوسوم nucleosome. ويبلغ قطر النيوكليوسوم الواحد 100 انكستروم. تترتب النيوكليوسومات مع بعضها، وعلى عدة مراحل، وبنظام دقيق، مكونة الكروماتيد (الشكل:1-4).



شكل (1-4). إلتفاف الدنا على لب الهستون الثماني لتكوين النيوكليوسوم ومراحل إنتظام النيوكليوسومات لحين تكوين الكروماتيد.

إن هذا النظام هو ما يضمن لجزيئات الدنا المؤلفة من عدد هائل من القواعد النتروجينية، فرصة إشغال مساحة صغيرة داخل الخلية، والتي تعرف بالنواة. فعدد القواعد النتروجينية في دنا الخلية الواحدة للإنسان يقدر بأكثر من 3 مليارات، أذ تتألف الدنا في اقصر كروموسوم في الانسان من 10^6X50 قاعدة نتروجينية تقريباً، وبطول يبلغ حوالي 1.7 سم. أما في أطول كروموسوم فإن عدد القواعد يربو على 10^6 X250 قاعدة نتروجينية،

وبطول يقدر بحوالي 8.5 سم. واذا ما أمكن فرد تلك الجزيئات من خلية واحدة وتوصيلها ببعضها، لبلغ طولها نحو 1.5 متراً أو ما يقارب معدل طول الانسان. بيد أن وجود الدنا بهذه الصيغ التركيبية يساعد في إختزل حجمها بنحو 8 آلاف مرة عما يكون عليه في الطور البيني interphase.

وينغي الإشارة الى أن ثمة بروتينات أخرى تساهم في زيادة ضغط النيوكليوسومات وإندماج الدنا ضمن تركيب الكروموسومات، تسمى البروتينات غير الهستونية، يعتقد أن معظمها عبارة عن عوامل تساهم في عملية الإستنساخ transcription factors

الدنا في الفايروسات:

ليس بالضرورة أن تكون جزيئة الدنا بشريط مزدوج دائماً في جميع الكائنات الحية، ولاسيما تلك التي تكون أكثر بدائية، مثل بعض أنواع الفايروسات. فقد تكون خطية وبشريط مفرد Linear Single Stranded، أي مفتوح النهايتين. ويمكن لهذه الجزيئة المفردة الشريط أن تتحول إلى شكل دائري (مفرد دائما) من خلال تكوين آصرة فوسفاتية ثنائية الاستر Phosohodiester bond بين نهايتي الشريط المفرد 5' و 3' بواسطة أنزيم Ligase. أو قد تكون من النوع الذي يعرف بـ Linear double stranded أيضاً، كما في الكائنات حقيقة النواة . وقد يختزن بعض الفايروسات معلوماتها الوراثية في جزئية الرنا، بدلاً من الدنا، والتي تكون بإحدى الصورتين السابقتين، إما بشريط مفرد أو مزدوج، وعلى نحو جزيئة خطية أو دائرية مغلقة النهايتن (الجدول:1-2).

أن طبيعة المادة الوراثية في الفايروسات هي إحدى المعايير المهمة التي يعتمد عليها في تصنيف الفايروسات ذات التنوع العالي، ليس على مستوى مادتها الوراثية فحسب، وإنما من حيث الكائنات الحية التي تصيبها، وتتكاثر فيها، والتي تسمى المضايف، والتي تتراوح بين البكتريا والنباتات والحيونات. وعادة ما تسمى الفايروسات التي تهاجم البكتريا اللاقمات أو العاثيات البكترية Bacteriophage .

والفايروسات ليست كائنات حية من وجهة النظر البايلوجية الصرفة، لإنها لا تأتي بأي فعل من الأفعال الحيوية وهي طليقة في الطبيعة، وإنما بعد أن تلوج في الخلية التي تتخصص بإصابتها. والجزء الذي يدخل من الفايروس الى الخلية يقتصر على مادته الوراثية وحدها، فيما تبقى أجزاء الفايروس الأخرى والمتمثلة ببروتين الغلاف خارجاً. وأذا ما كانت هذه المادة الوراثية من النمط رنا RNA، فسرعان ما تتحول الى الدنا DNA داخل الخلية، بآلية تعرف بالإستنساخ العكسي، وبواسطة أنزيم تحمل المادة

الوراثية للفايروس الجين الذي يشفر له، ذلك هو أنزيم الاستنساخ العكسي Reverse transcriptase . عندئذ يدخل الفايروس المرحلة الأولى من دورة حياته. وثمة دورتان لحياة الفايروسات داخل المضيف، تسمى الأولى الدورة الإنحلالية أو التحللية Lytic cycle والثانية بالتحللية Lysogenic، لهما خصائصهما، يتعلق البعض منها بالفايرسات (بالفايروسات) نفسها، والبعض الآخر بالظروف المحيطة.

جدول (1-2): حجوم المادة الوراثية لبعض الكائنات الحية وعدد الجينات التي تحملها.

الكائن (الإسم العلمي)	عدد الجينات	كمية الدنا (زوج قاعدة)	عدد الكروسومات
الفايروسات Viruses			
Bacteriophage MS2	4	3600	1 (ssRNA)*
Tobacco Mosaic Virus	4	6400	1 (ssRNA)*
FX174 bacteriophage	11	5387	1 (ssDNA)
Influenza	12	13500	8 (ssRNA)
T4 bacteriophage	200	165000	1
Poxvirus	300	187000	1
Bacteriophage G	680	498000	1
بدائية النواة Prokaryotes وعضيات حقيقية النواة organelles			
Mitochondrion (human)	37	16569	1
Mitochondrion (Arabidopsis)	57	366923	1
Chloroplast (Arabidopsis)	128	154478	1
Nanoarchaeum equitans	550	490000	1
Mycoplasma genitalium	480	580000	1
Methanococcus	1,500	1,7 Mbp	1
Escherichia coli	4000	4,6 Mbp	1
Myxococcus	9000	9,5 Mbp	1
Eukaryotes (haploid genome) كائنات حقيقية النواة (أحادية المجين أو أحادية المجموعة الكروموسومية)			
Encephalitozoon فطر	2000	2,5 Mbp	11
خميرة *Saccharomyces*	5,700	12,5 Mbp	16
ديدان خيطية *Caenorhabditis*	19000	100 Mbp	6
ذبابة *Drosophila*	12000	140 Mbp	4
الانسان *Homo sapiens*	25000	3,300 Mbp	23
نبات *Arabidopsis*	25000	115 Mbp	5
نبات *Oryza sativa* (Rice)	45000	430 Mbp	12

*ssRNA = single stranded RNA; ssDNA = single stranded DNA; all other genomes consist of double stranded DNA.

ولأن الفايروسات لا تمتلك الإمكانات التي تؤهلها أن تمارس أيّ فعل حياتي خارج الخلايا التي تصيبها، وأن دورها في الخلية يقتصر على التضاعف أو التكاثر فيها، مستغلةً قدرة الخلية على إنتاج الطاقة والتعبير عن الصفات الوراثية وبناء البروتينات، عليه فإنها تعد من الطفيليات المجبرة Obligate parasite. والطفيليات المجبرة مصطلح يطلق على تلك المجموعة من الأحياء التي لا تستطيع إنتاج الطاقة اللازمة لفعالياتها الحيوية، أو لا تستطيع بناء بعض من المغذيات التي تحتاجها، أو أنها لا تمتلك الأدوات التي بإمكانها أن تستعين بها لبناء مكوناتها وأجزائها، فتعتمد في ذلك على المضيف الذي تحل فيه. وتعد الفايروسات من أبرز الأمثلة عليها، لا لشيّ وإنما، لأنها تفتقر الى كل ذلك. على أن الريكتسيا Rickettsia التي تعد من الطفيليات المجبرة أيضاً، تستطيع إنتاج الطاقة والتكاثر بنفسها دون الإعتماد على المضيف، إلاّ في جانب محدد، وهو توفير بعض إحتياجاتها من المغذيات الأساسية التي لا تستطيع الحصول عليها إلاّ من ذلك المضيف.
وجميع تلك الحالات من العجز، نابعة عن القصور في المادة الوراثية. فالفايروسات لا تمتلك من الجينات على مادتها الورثية، إلاّ عددا محدوداً، قد لا يتجاوز أربعة جينات فقط، بينما يصل عدد الجينات في بعض أنواع البكتريا إلى عدة الآف.

الفايرودات:

إلى جانب الفايروسات ثمة مجموعة أخرى من الأنظمة المحيرة تصنيفياً، تسمى الفايرودات Viroids. وهذه تتألف من جزئية رنا وتخلو من الغطاء البروتيني، تصيب بعض النباتات وتتكاثر في خلاياها، ثم تغادرها، بعد تدميرها وتحليلها، باحثة عن خلايا جديدة لإصابتها. بخلاف البلازميدات التي لا تتسبب في تدمير الخلايا التي تحل فيها وإن تمكنت من الإنتقال منها الى خلايا جديدة.
ومن العناصر الوراثية التي ينبغي الإشارة إليها، ونحن نتحدث عن الدنا، مجموعة يطلق عليها بالقافزات Transposons او العناصر القافزة Transposable elements. وهي جزيئات من الدنا مزدوجة الأشرطة، لا تمتلك القدرة على التضاعف الذاتي، لذا فإنها تحشر نفسها في جزيئات أخرى من الدنا، وغالباً دنا الكائنات الخلوية، أو بلازميداتها، لتؤمن لنفسها التضاعف معها. ولهذه العناصر الوراثية قدرة التنقل ما بين جزيئات الدنا في خلية المضيف، إذا ما كانت الخلية تحتوي على أكثر من جزيئة واحدة، أو الإنتقال من موقع الى آخرضمن الجزيئة نفسها، وبآلية فريدة أحياناً، تضمن بقاء نسخة منها في الموقع

الذي تغادره، مما تتيح لها فرصة الإنتشار إلى جانب التضاعف، وبالتالي إنتشار الصفات الوراثية التي تحملها.

الخلية Cell:

سبق وأن ذكرنا أن الخلية عبارة عن وحدة البناء والوظيفة في جميع الكائنات الحية الخلوية بدءاً من البكتريا وإنتهاءً بالإنسان. ومعظم أنواع البكتريا عبارة عن خلية مفردة واحدة . بمعنى أن البكتريا، ككائن حي، وبكامل مقوماته، تتمثل بهذه الخلية. أما الكائنات الأخرى فهي متعددة الخلايا. والخلايا مهما تنوعت في حجومها وأشكالها، وإختلفت في مكوناتها وأجزائها، وتباينت في تخصصها، فإنها لا بد أن **تحتوي على الغشاء البلازمي أو السايتوبلازمي**، والذي يُعدّ الحد الفاصل بينها وبين محيطها أوما يجاورها. **كما تحتوي على الرايبوسومات** التي تدعى ببيوت تخليق البروتينات اومواضع للتعبير عن الصفات الوراثية، فضلاً عن **المادة الوراثية وهي الدنا** التي تختزن المعلومات الوراثية الخاصة بجميع ما لتلك الخلية من خواص تركيبية، وما عليها من وظائف. وإذا كانت هذه الأجزاء الثلاثة (الغشاء السايتوبلازمي و الرايبوسومات و المادة الوراثية) هي ما تجعل من الخلية مكوناً حيوياً مستقلاً، فإن الخلايا لا تخلو من أجزاء أخرى، وحسب درجة تعقيدها وتمايزها والتي تحددها تخصصها، وما هو مُوكّلٌ بها من مهام في حياة الكائنات الحية، ولا سيما متعددة الخلايا منها.

إن مجموعة من الخلايا المتشابهة في التركيب والوظيفة، في الكائنات متعددة الخلايا، تشكل ما تدعى بالنسيج Tissue.. وهذا يعني ضمناً أن الخلايا، كوحدات بناء ، تختلف من نسيج إلى آخر، أو من كائن إلى آخر، من حيث التركيب والوظيفة. وهذه الحقيقة نعرفها من خلال دراستنا الأولية... على أن جميع الخلايا وفي أي **نوع** من الكائنات، تحتوي على الأنواع والأعداد نفسها من الكروموسومات.

النوع Species :

النوع مصطلح يراد به أصغر وحدة، أو أدنى مستوى من مستويات التصنيف. إذ أن الأفراد الذين ينتمون إلى النوع الواحد بإمكانهم التزاوج فيما بينهم لإنتاج أجيال خصبة، لأفرادها القدرة على التزاوج فيما بينها أيضا. وهذه القدرة على التزاوج ناجمة عن إحتواء الأفراد من النوع نفسه، على عدد بعينه من الكروموسومات، وتشابه هذه الكروموسومات ليس على مستوى الشكل والتركيب وإنما على مستوى جزيئة الدنا الموجودة في كل كروموسوم . على أن أفراد النوع الواحد لا يتشابهون في جميع صفاتهم تشابها كلياً

ومطلقاً، بحيث يبدو الواحد منهم مطابقاً للآخر، بل أن هناك درجة من التباين تعود إلى إختلافات طفيفة في تتابعات القواعد النتروجينية للدنا في الكروموسومات.

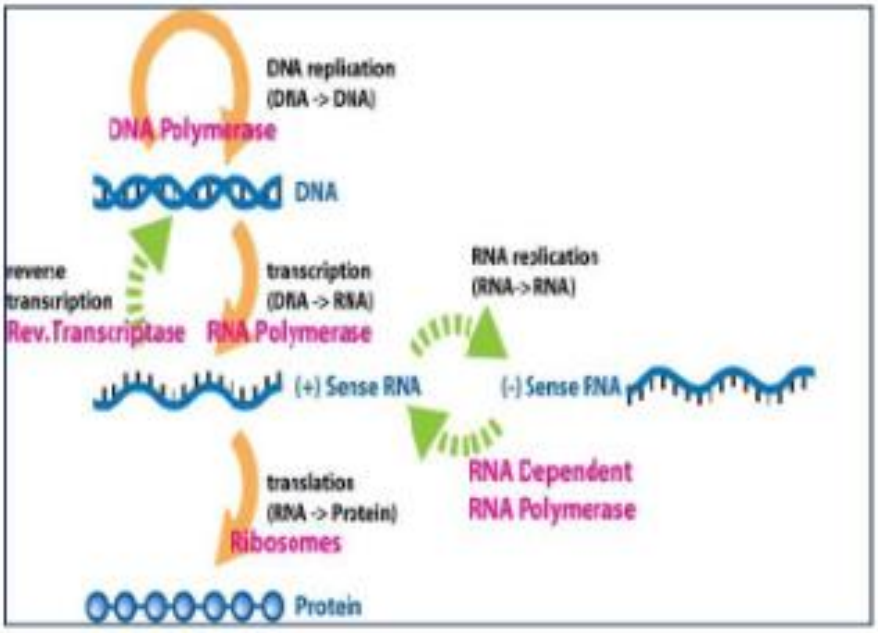
وجدير بالإشارة أن الخلايا تُقسّم من ناحية أخرى إلى خلايا جنسية Germ Cell (كالبيوض والحيامن في الإنسان) وإلى خلايا جسمية Somatic Cell . فالأولى تحتوي على عدد فردي من الكروموسومات، أي على نسخة واحدة من كل كروموسوم، لذلك تسمى بأحادية المجموعة الكروموسومية Haploid. أما الخلايا الجسمية فتحتوي على عدد زوجي من الكروموسومات لذلك تسمى بثنائية المجموعة الكروموسومية Diploid. وهناك كائنات تحتوي في خلاياها الجسمية على أكثر من نسختين من كل كروموسوم، وهي حالة نادرة تلاحظ في بعض النباتات، مثل Durum wheat والتبغ Cultivated tobacco التي تحتوي على أربع نسخ من كل كروموسوم وتسمى tetraploid ، و حنطة الخبز Bread wheat و التي تحتوي على ست نسخ من كل منها فهي hexaploid .

ولأن البكتريا تحتوي على جزيئة دنا مفردة واحدة، فهي، وعلى هذا الأساس، من النوع الأحادي Haploid. ويمكن تسمية الدنا البكتيري بالكروموسوم مجازاً، وإن كان هذا الكروموسوم (!) يختلف عن كروموسومات الكائنات الأخرى من حيث التركيب كما سبق آنفاً. إن مجمل المواد الوراثية في خلية ما تسمى أحياناً المجين او الجينوم Genome.

القضية المحورية لعلم الحياة الجزيئي:

(وفي العودة الى البداية) عوداً على البدء نقول، أن القضية المحورية التي يتناولها علم الحياة الجزيئي أو ما يعرف (مايعرف) بـ Central Dogma of Molecular Biology، أو (التي) تقع ضمن موضع إهتماماته، هي المادة الوراثية الموجودة في الكائنات الحية بالصور التي تطرقنا إليها، والمتمثلة بالدنا في الخلوية منها، وبالدنا أو الرنا في غير الخلوية، من حيث التركيب والخواص والوظيفة، ومن حيث التضاعف Replication والانتقال عبر الأجيال، والتعبير عن الصفات الوراثية المحمولة عليها، على نحو تعرف بالمورثات او الجينات، عبر عمليتي الإستنساخ transcription والترجمة translation، وما تطرأ عليها من تغييرات جراء عوامل خارجية أو داخلية محدثة ما تعرف بالطفرات الوراثية Mutations .

ويذكر أن مصطلح Molecular Biology قد وضع موضع الإستعمال، وعلى النحو الذي يتم تداوله في الوقت الحالي، من قبل فرنسيس كريك عام 1958 في محاضرة ألقاها حول تخليق البروتينات protein biosynthesis في الأنظمة الحيوية. والتي أوضح فيها أن المعلومات الوراثية تنتقل من الدنا (DNA) الى الرنا (RNA) ومن ثم الى البروتين. وإن إنتقال أو إنسياب هذه المعلومات يكون باتجاه واحد (الشكل: 1-5). بمعنى أن البروتينات نفسها لا يمكن ان تكون مصدر معلومات وراثية أو مصدراً لتخليق الرنا أو الدنا. وقد يثبت هذه الفكرة صحيحة حتى مجئ David Baltimore و Haward Temin اللذان أثبتا، وعلى الانفراد، وفي عام 1970، أن بعض الفايروسات التي تحتوي على الرنا كمادة وراثية، تقوم بتخليق الدنا من الرنا في الخلايا التي تتخصص بإصابتها. وتسمى هذه العملية بالإستنساخ العكسي Reverse transcription ، كما هو الحال مع فايروسات رتترو Retroviruses مثل HIV، وهو فايروس نقص المناعة المكتسبة المسبب لمرض الإيدز. وثبت لاحقاً أن الإستنساخ العكسي يحدث في كائنات حقيقية النواة أيضاً، كما هو الحال في حالة ناقلات رتترو Retrotransposons، وفي بناء التيلوميرات Telomere



شكل (1-5): مخطط يوضح النضية المركزية لعلم الحياة الجزيئي Central Dogma of Molecular Biology أو الجانب الأكبر من محاور إهتمام هذا العلم، والتي تتمثل

بالمواد الوراثية وباتجاهات إنسياب المعلومات الوراثية منها لحين التعبير عنها على نحو بروتينات فعالة تخدم الفعاليات الحيوية المختلفة للكائنات الحية.

ملاحظة : اعتقد ان الجملة التي تحتها خط في الشكل (1-5) غير ضرورية لان سبق وان تم الاشارة الى هذا الكلام اثناء الحديث عن هذه الفقرة .

The Structure of Nucleic Acids

الحوامض النووية:

مركبات كيميائية معقدة موجودة في خلايا جميع الكائنات الحية وبدون استثناء وهي على نوعين **Deoxyribonucleic acid (DNA)** و **Ribonucleic acid (RNA)** وتسميهما إختصاراً بـ (الرنا) و (الدنا) وعلى التوالي.

إن كمية الحوامض النووية في خلايا الأحياء المجهرية ، وبخاصة البكتريا ، تصل إلى حوالي 1% من وزنها الجاف ، بينما تحتوي الخمائر Yeast على 4% من الحوامض النووية من وزنها الجاف. ومن الأنسجة الغنية بالحوامض النووية الغدة الزعترية Thymus gland وتحتوي على 4% من وزنها الجاف أيضاً.

التركيب البنائي لجزيئة الدنا:

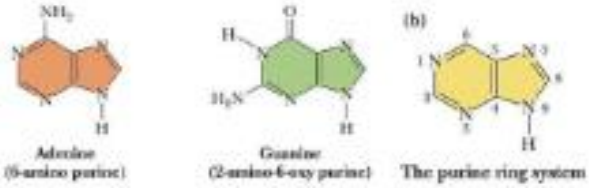
الحامض النووي الدنا عبارة عن بوليمر Polymer بوزن جزيئي عال . ووحدات البناء في هذه البوليمرات هي النيوكليوتيدات Nucleotides .

يتكون كل نيوكليوتيد **من سكر خماسي هو رايبوز منقوص الاوكسجين Deoxyribose مرتبط بمجموعة الفوسفات وقاعدة نتروجينية** . وترتبط النيوكليوتيدات مع بعضها فتكون سلسلة طويلة تعرف بشريط الدنا. علماً بان تسلسل القواعد النتروجينية في هذا الشريط هو الذي يحدد الطبيعة الوراثية المميزة لهذه الجزيئة . ويذكر ان النيوكليوتيدات تتواجد في خلايا الكائنات الحية بصورة مفردة أيضاً ، أي خارج تركيبة جزيئة الدنا حيث تؤدي دورا مهماً في العمليات الأيضية ومن أبرز الأمثلة عليها Adenosine Triphosphate (ATP) والتي تعرف بالعملة المتداولة للطاقة داخل الخلايا .

تصنف القواعد النتروجينية التي تدخل في تركيب الأحماض النووية الى مجموعتين رئيستين هما:

1. البيروينات Purines: وتشمل الادنين Adenine ويرمز له (A)

والكوانين Guanine ويرمز له (G).

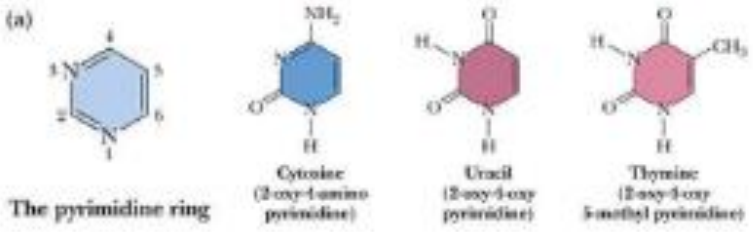


2. البريميدينات Primidines: وتشمل على السايتوسين Cytosine ويرمز له (C)

والثايمين Thymine ويرمز له (T)

فضلاً عن Uracil ويرمز له (U)

وهذا الأخير يدخل في تركيب جزيئات الرنا بأنواعها الثلاثة دون الدنا.

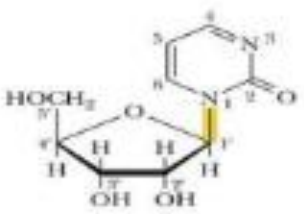


وان كانت الأنواع المذكورة من القواعد النتروجينية أعلاه هي الشائعة في جزيئة الدنا ولاسيما A و G و C و T غير أن هنالك العديد من القواعد النتروجينية المحورة او غير الاعتيادية **unusual** في جزيئات الرنا ولاسيما في الرنا الناقل **tRNA** كما سنأتي إلى توضيح ذلك وبيان أسبابه فيما بعد .

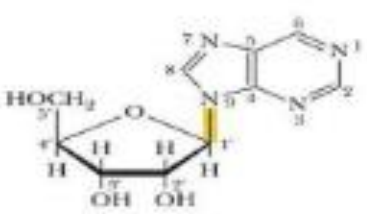
كما تختلف جزيئات الرنا عن الدنا في إحتواءها على سكر الرايبوز **Ribose** الخماسي بدلا من الرايبوز منقوص الأوكسجين **Deoxyribose**. وفي أدناه التركيب الكيميائي لسكر الرايبوز الخماسي منقوص الأوكسجين وسكر الرايبوز الاعتيادي .

ورغم تأكيدنا على أن القواعد النتروجينية المحورة <u>لا</u> تتواجد في تركيب جزيئات الدنا الكروموسومي بقدر وجوده في بعض أنواع الرنا، إلاّ أنه قد اكتشفت مؤخرا وجود مثل هذه القواعد مثل **5-methyl cytosine** في دنا الغدد اللبنية للحيوانات ، وفي مصادر نباتية أوفي بعض الفايروسات مثل **T-even** التي تصيب بكتريا *E.coli* . ومن القواعد الشاذة في **tRNA** مشتقات البرميدين **4-thiouracil** و **Pseudouridine** و **dihydrouracil** (لاحظ الجداول في نهاية هذا الفصل للتعرف على مزيد من القواعد الشاذة او المحورة).

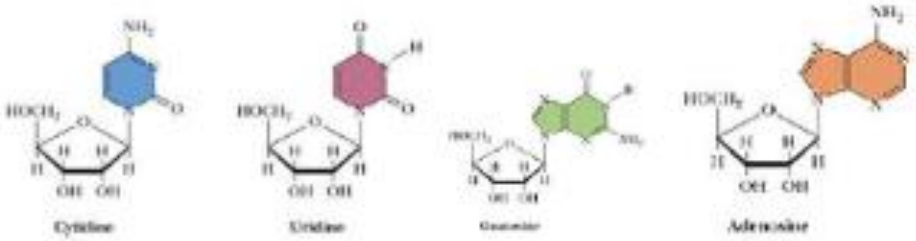
ترتبط البيورينات والبريميدينات مع السكر الخماسي عن طريق أواصر تعرف بأواصر كلايكوسيدية من النوع N-β-glycosidic bond . تتكون هذه الأواصر بين ذرة الكاربون C_1 للسكر الخماسي وذرة النتروجين N_1 او ذرة النتروجين N_9 للبريميدينات والبيورينات على التوالي، وكما هو موضح في الاشكال الأتية



β-N1-glycosidic bond in pyrimidine ribonucleosides

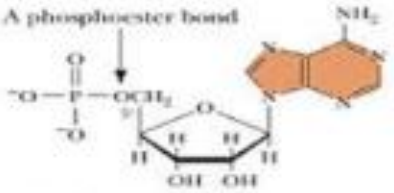


β-N9-glycosidic bond in purine ribonucleosides



Cytidine Uridine Guanosine Adenosine

وتدعى الجزيئة الناتجة عن هذا الارتباط بالنيوكليوسايد Nucleosides. وهذا الأخير لا يدخل في تركيب الحوامض النووية ما لم يرتبط بمجموعة الفوسفات ليتحول الى ما يعرف بالنيوكليوتيد Nucleotides.



Adenosine 5'-monophosphate (or AMP or adenylic acid)

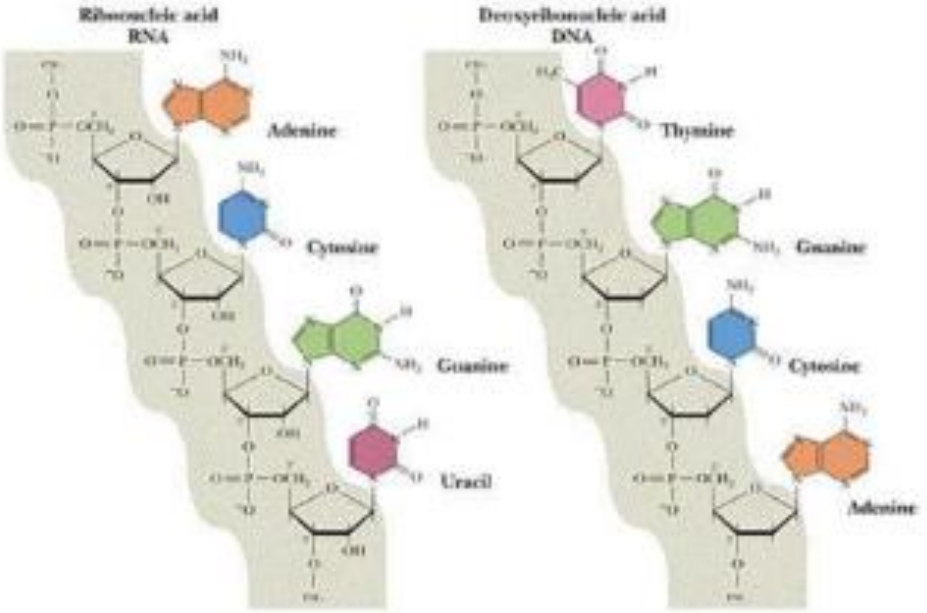
وتعتمد تسمية النيوكليوتيدات على نوع السكر الخماسي الموجود من جهة وعلى نوع القاعدة النتروجينية من جهة اخرى، فضلاً عن عدد مجاميع الفوسفات المرتبطة والتي تتراوح من مجموعة واحدة الى ثلاثة مجاميع. يوضح الجدول الآتي تسمية القواعد النتروجينية و النيوكليوسيدات والنيوكليوتيدات في كل من الرنا و الدنا...

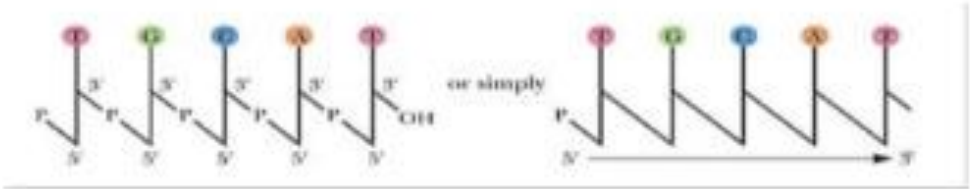
The nucleosides and their mono-, di-, and triphosphates				
Base	**Nucleoside**	**Nucleotides**		
Adenine (A)	Deoxyadenosine	dAMP	dADP	dATP
Guanine (G)	Deoxyguanosine	dGMP	dGDP	dGTP
Cytosine (C)	Deoxycytidine	dCMP	dCDP	dCTP
Thymine (T)	Deoxythymidine	dTMP	dTDP	dTTP
Adenine (A)	Adenosine	AMP	ADP	ATP
Guanine (G)	Guanosine	GMP	GDP	GTP
Cytosine (C)	Cytidine	CMP	CDP	CTP
Uracil (U)	Uridine	UMP	UDP	UTP

ويذكر أن ارتباط الفوسفات بالنيوكليوسايد يتم عبر آصرة إسترية ester bond تنشأ بين الكاربون رقم 5 في السكر الخماسي وأحدى مجاميع الهيدروكسيل في جزيئة الفوسفات.

هذه هي الصور العامة للنيوكليوتيدات المختلفة الداخلة في تركيب الحوامض النووية او التي تكَون وحدات البناء الاساسية فيها .

وعادة ما ترتبط النيوكليوتيدات المكونة للحوامض النووية مع بعضها البعض بواسطة اصرة كيميائية تتكون بين مجموعة الفوسفات المرتبطة مع ذرة الكاربون رقم 5 للسكر الخماسي لاحد النيوكليوتيدات وبين ذرة الكاربون رقم 3 للسكر الخماسي للنيوكليوتيد التالي. وبهذا تتكون سلسلة من الاواصر القوية التي تدعى بالاواصر الفوسفاتية ثنائية الاستر Phosphodiester bond تحمل النيوكليوتيدات مع بعضها على طول شريط الدنا او الرنا.





يكون السكر الخماسي ومجموعة الفوسفات العمود الفقري back bound لسلسلة النيوكليوتيدات في شريط الدنا في حين تجنح القواعد النتروجينية من هذا العمود الفقري الى الخارج . وبما ان جزيئات القواعد النتروجينية مسطحة لذلك فانها تكون مرتبة واحدة فوق الاخرى، بطريقة أشبه ما تكون بقطع نقدية مرتبة فوق بعضها . ان طريقة ارتباط النيوكليوتيدات بواسطة الاواصر الفوسفاتية ثنائية الاستر تعطي سلسلة الدنا صفة القطبية ، حيث ينتهي أحد طرفي السلسلة بمجموعة الفوسفات مرتبطة بذرة الكاربون 5 ، وتسمى هذه النهاية بـ (5 -P) Five prime في حين ينتهي الطرف الاخر بمجموعة هيدروكسيل مرتبطة مع ذرة الكاربون 3 وتسمى هذه النهاية بـ (3 -OH) (Three prime للسكر الخماسي. واعتمادا على النهايات المميزة لجزيئات Polynucleotides هذه ، تقرأ الجزئية إما باتجاه 5 الى 3 أو باتجاه 3 الى 5 .

ويمكن ان تكون النيوكليوتيدات المتعددة Polynucleotides والناتجة من ارتباط جزيئات النيوكليوتيدات المختلفة عبر اواصر Phosphodiester bond طويلة للغاية تصل اطوالها الى عدة الاف من النيوكليوتيدات كما هي في الدنا . ويمكن ان نتصور ان جزيئات الدنا في الطبيعة من معرفتنا ان الاختلاف الاساس بين النيوكليوتيدات هي القواعد النتروجينية الاربعة . وبان تتابع هذه القواعد في سلسلة النيوكليوتيدات المعقدة لايخضع لقانون او قاعدة معينة غير قاعدة او قانون تحديد طبيعة المعلومات الوراثية التي تحملها او تعبر عنها. ففي أي نقطة من نقاط سلسلة النيوكليوتيدات المتعددة يمكن ان تكون القاعدة النتروجينية إما A او C او T او G . ونتوقع ان يكون التنوع في تتابعات القواعد النتروجينية في سلسلة نيوكليوتيدية متعددة حوالي 576 1048 اذا افترضنا ان طول هذه السلسة يتالف من عشرة قواعد نتروجينية (او عشرنيوكليوتيدات) فقط وذلك حسب فرضية الإحتمالات:

إذ ان عدد أنواع القواعد النتروجينية (النيوكليوتيدات) هي4 وهي بالطبع (A وT وG وC)

وبما أن طول السلسلة =10 نيوكليوتيداً مختلفاً

عليه فإن: $4^{10} = 1048\ 576$

ومن الامثلة على هذا التنوع في تتابع النيوكليوتيدات (القواعد النتروجينية)

A-T-A-G-A-A-C-A-G-G

A-A-A-G-A-A-C-A-G-G

A-T-I-G-A-A-C-A-G-G

A-T-A-I-A-A-C-A-G-G وهكذا

مستويات بناء جزيئة الدنا:

تتكون جزيئة الدنا من سلسلتين من Polynucleotides متقابلتين متعاكستين في الاتجاه. فاحداها باتجاه 5 الى 3 والثانية باتجاه 3 الى 5 . تزدوج في هاتين السلسلتين القواعد النتروجينية حسب نظام يعرف بنظام ازدواج القواعد النتروجينية Base Pairing مؤداه ترتبط قاعدة نتروجينية بيورينية في سلسلة، بقاعدة نتروجينية بيريميدينية مقابلة لها في السلسلة الثانية ، عبر اواصر هيدروجينية . وحسب هذا النظام فان A يقابل او يزدوج مع T وان G يزدوج مع C دائماً . وعدد الاواصر الهيدروجينية التي ترتبط A بـ T

هو امسرتين و G بـ C هو ثلاثة اواسر . وتؤدي الاواسر الهيدروجينية الى التفاف السلسلتين حول بعضهما البعض لتكوين تركيب يعرف الحلزون المزدوج Double helix.

وتم بأت هذا التصور الدقيق والصحيح معاً عن جزيئة الدنا الحلزوني كما اوضحه العالمان James Watson و Francis Crick في عام 1953 الا بعد تجارب مضنية للتعرف على كيفية تواجد او دور القواعد النتروجينية الاربعة (النيوكلتيدات الاربعة) في تكوين جزيئة الدنا. والذي مهد السبيل لرسم التركيب الفراغي الصحيح لجزيئة الدنا تلك التجارب التي أجراها Erwin Chargoff اروين جاركوف من جهة و تجارب حيود الاشعة السينية الجزيئة الدنا من جهة اخرى .

تجارب Chargaff جاركوف:

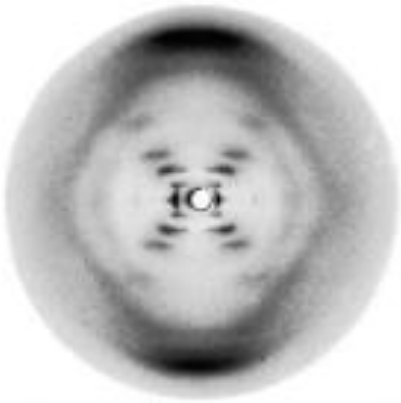
Erwin Chargaff من جامعة كولومبيا الامريكية قام باجراء تحليلات مسهبة على التركيب الكيمياوي للدنا. فقد استخدم جاركوف مع زملائه E. Vischer و S. Zamenhof تقنية كانت حديثة في حينها وتتسم بحساسيتها ، تلك هي تقنية كروماتوكرافيا الورقة paper chromatographic techniques في تعيين كمية القواعد النتروجينية في نماذج من الدنا اخذت من انسجة وكائنات مختلفة وتم تنقيتها حد التجانس. فكانت النتائج التي تم التوصل اليها جديرة بالاهتمام. وضعت هذه النتائج في صيغ رياضية بسيطة توضح علاقة بين هذه القواعد .اذ تبين ان كمية A في أي نموذج من الدنا المأخوذة من أي كائن او نسيج تساوي كمية T وان كمية G تساوي كمية C وبناءً عليه فان كمية البيورين تساوي كمية البريميدين أي ان :

A+G = T+C or purine = pyrimidine وإن **G = C** و **A = T**

لكن جاركوف لم يبن آمالاً كبيرة على هذه النتائج معتقداً أن الضرورة تقتضي إجراء مزيد من التحاليل الكمية الدقيقة على دنا نماذج أخرى للاقرار بصحة هذه النتائج وتعميمها. وتسمى الملاحظات التي إنتهى اليها جاركوف والموضحة أعلاه بنسب قواعد جاركوف Chargoff base ratios ولعل من الاستنتاجات المهمة لتجارب جاركوف ذلك الاستنتاج أن محتوى GC (GC content) لجزيئات الدنا يختلف باختلاف الأنواع Species (يختلف من كائن الى اخر). ويوضح الجدول الآتي مكونات الدنا من القواعد النتروجينية الاربعة ونسبها الى بعضها البعض في الانسجة و الاحياء المجهرية:

Nitrogen base	Human Sperm		Thymus	Liver Carcinoma	Tubercle Bacilli	Yeast		Thymus			Bovine Spleen	
	#1	#2				#1	#2	#1	#2	#3	#1	#2
A:	0,29	0,27	0,28	0,27	0,24	0,3	0,12	0,26	0,28	0,3	0,25	0,26
T:	0,31	0,3	0,28	0,27	0,25	0,29	0,11	0,25	0,24	0,25	0,24	0,24
G:	0,18	0,17	0,19	0,18	0,14	0,18	0,28	0,21	0,24	0,22	0,2	0,21
C:	0,18	0,18	0,16	0,15	0,13	0,15	0,26	0,16	0,18	0,17	0,15	0,17
Recovery:	0,96	0,92	0,91	0,87	0,76	0,92	0,77	0,88	0,94	0,94	0,84	0,88

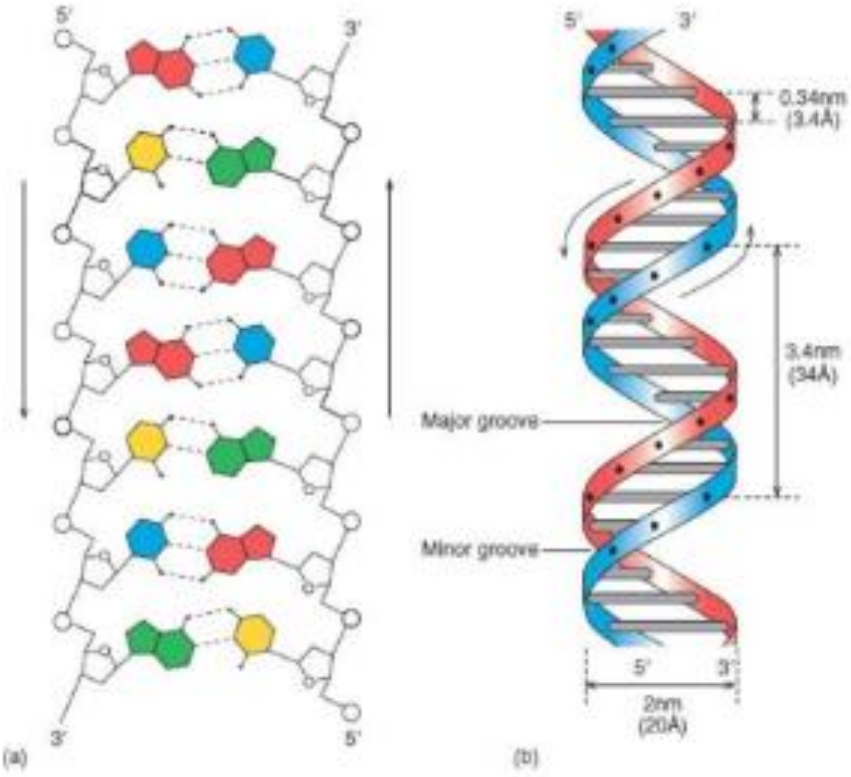
تجارب حيود الأشعة السينية X-ray diffraction

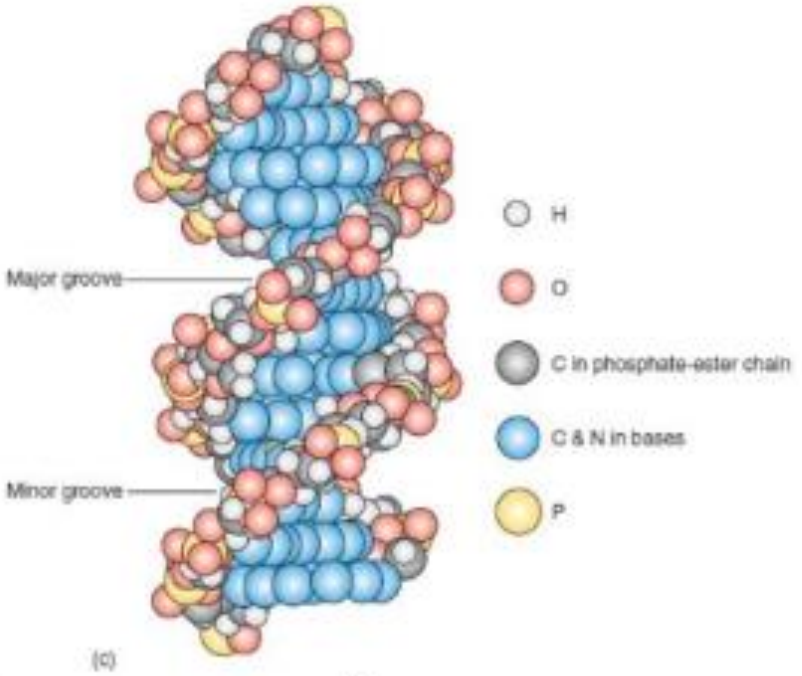


كان Maurice Wilkins و Rozalind Franklin و زملائهما في الكلية الملكية في لندن Kings College قد تمكنوا، من جانب آخر، من إلتقاط صورة للدنا بالأشعة السينية وتحديد مقدار حيود هذه الاشعة الساقطة عليها بغية التعرف على التركيب ثلاثي الأبعاد Three dimensional structure لها. وكان هذا، وما تزال، من الأساليب المتبعة في تعيين التركيب الفراغي للبروتينات. واستخدموا في تجاربهم كمية من الدنا مركزاً، تم تلقيتها حد التجالس، تشكل كتلة كثيفة ولزجة يمكن إلتقاطها بسلك رفيع بسهولة، ويمكن بلورتها تحت رطوبة نسبية معقولة. وكانت الصورة من الوضوح بمكان بحيث أمكن تفسيرها دون عناء. إذ بدى فيها مجموعة من البقع موزعة على نحو مرتب ومنتظم وبشكل حرف X ، مما يشير أن التركيب الفراغي لجزيئة الدنا يتسم ببساطة أكثر بكثير من التركيب الفراغي للبروتينات، إذ أن الصور الملتقطة للبروتينات وبالإسلوب نفسه، تظهر البقع موزعة بطريقة عشوائية ومشتتة وحسب التركيب الفراغي للبروتين. وإن التوزيع المتجانس للبقع على الصورة يبين أن جزيئة الدنا جزيئة منتظمة على نحو ما، و يحتمل أن يكون على شكل بريمة او لولب (حلزون) .

نموذج الحلزن المزدوج لجزيئة الدنا:

لقد تمكن واطسن وكريك عام 1953 من وضع نتائج الدراسات الكمية لـلدنا والملاحظات التي خرج بها جاركوف ونتائج تحليل حيود الاشعة السينية للباحثة Fracklin في إطارها الصحيح من التفسير باقتراح نموذج الحلزون المزدوج لجزيئة الدنا (DNA double helix model) وهذا النموذج يوضح ان الدنا يتكون من سلسلتين او شريطين Two strands من النيوكليوتيدات ، تلتفان حول بعضهما ليكونا حلزوناً مزدوجاً منتظماً يبلغ قطره 20 A° (عشرون انكستروم) وتشكل فيه وحدات Deoxyriboses ومجاميع الفوسفات الحرة، الجزء الخارجي للحلزون (او اللولب)، في حين تبرز القواعد النتروجينية من العمود الى الداخل وبمستوى عمودي على محور دوران الحلزون. وتكون المسافة الفاصلة بين قاعدة نتروجينية واخرى 3.4A° . مما يعني أن كل سلسلة تحتوي على عشر نيوكليوتيد في كل لفة كاملة (او دورة كاملة). وترتبط السلسلتان او الشريطان باواصر هيدروجينية التي تتكون بين القواعد النتروجينية القابلة للازدواج وهي اصرتين مابين A و T وثلاثة اواصر مابين C و G ...


5'
3'
3'
5'
(a)
5'
3'
0.34nm
(3.4Å)
3.4nm
(34Å)
Major groove
Minor groove
5'
3'
2nm
(20Å)
(b)


Major groove
Minor groove
H
O
C in phosphate-ester chain
C & N in bases
P
(c)

closed circular ويرمز له cccDNA وذلك بارتباط نهايتي 5' و 3' ولكلا الشريطين بواسطة الانزيم Ligase أيضا.

Comparison of A, B, and Z form of DNA

	A form	B form	Z form
Helical sense	Right handed	Right handed	Left handed
Diameter	26 A	20 A	18 A
Base pairs per helical turn	11	10	12
Helix rise per base pair	2.6 A	3.4 A	3.7A
Base tilt normal to the helix axis	20^0	6^0	7^0
Sugar pucker conformation	C-3' endo	C-2' endo	C-2' endo for pyrimidines and C-3'endo for purines
Glycosyl bond conformation	Anti	Anti	Anti for pyrimidine and syn for purines

جدول( ): حجوم المادة الوراثية لبعض الكائنات الحية

الكائن	عدد الجينات	كمية الدنا (bp)	عدد الكروسومات
Viruses الفايروسات			
Bacteriophage MS2	4	3600	1 (ssRNA)*
Tobacco Mosaic Virus	4	6400	1 (ssRNA)*
FX174 bacteriophage	11	5387	1 (ssDNA)
Influenza	12	13500	8 (ssRNA)
T4 bacteriophage	200	165000	1
Poxvirus	300	187000	1
Bacteriophage G	680	498000	1
Prokaryotes بدائية النواة			
Mitochondrion (human)	37	16569	1
Mitochondrion (Arabidopsis)	57	366923	1
Chloroplast (Arabidopsis)	128	154478	1
Nanoarchaeum equitans	550	490000	1
Mycoplasma genitalium	480	580000	1
Methanococcus	1,5	1,7 Mbp	1
Escherichia coli	4	4,6 Mbp	1

إن إتجاه حركة دوران الشريطين في نموذج الحلزون هو بإتجاه اليمين right handed (أي الى الأعلى صعودا) وهنالك نماذج اخرى تختلف في نظام دورانها سنأتي عليها لاحقا.

تقاس الاوزان الجزيئية للدنا بالدالتون Daltons ويقدر معدل الوزن الجزيئي لزوج من القواعد النتروجينية (النيوكليوتيدات) Base pair بـ 660 دالتون. اما اطوال جزيئات الدنا فتقاس عادة بعدد ازواج القواعد النتروجينية (أزواج النيوكليوتيدات) فطول قطعة دنا تتألف من 10.000 زوج من القواعد النتروجينية يساوي 10 كيلو زوج قاعدة Kilobase ويرمز له (Kb) حيث كيلو زوج قاعدة = 1000 زوج قاعدة... يوضح الجدول التالي عدد ازواج القواعد النتروجينية Base pairs وطول جزيئة الدنا (عدد ازواج القواعد النتروجينية مضروبا في المسافة بين قاعدة واخرى وهي $3.4\ A^{0}$) والحجم النسبي لهذه الجزيئة في عدد من الكائنات الحية.

أنواع البنية الفراغية للحلزون المزدوج Helix Conformations:

هنالك حسب رأي الباحثين عدة أشكال فراغية لجزيئة الدنا الحلزون المزدوج:

1. **B-DNA:** وتنطبق مواصفات هذا النوع على النموذج الذي وضعه واطسن وكريك حيث يكون اتجاه دوران الشريطين الى جهة اليمين صعودا right handed، ويلاحظ تكون هذا التركيب الفراغي في الظروف الفسيولوجية ويحتاج الى نسبة رطوبة 92% لتكونه خارج الجسم الحي.

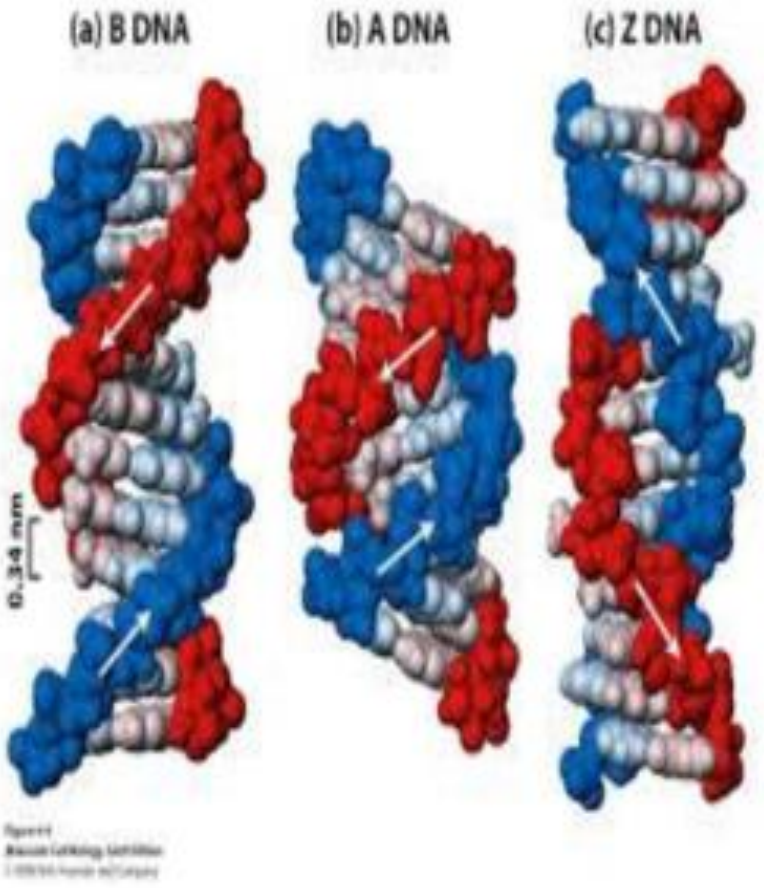
2. **A-DNA:** تتحول البنية الفراغية لجزيئة DNA من نوع B الى A عند انخفاض نسبة الرطوبة الى 75% ويتصف هذا الحلزون بان ازواج القواعد النتروجينية لا تكون عمودية على محور الدوران وانما تميل بزاوية مقدارها 20أنكستروم وينشأ عن ذلك هبوط في دورة الحلزون من 3.4 انكستروم الى 2.8 أنكستروم، ويتصف هذا النوع بإحتواءه على أحد عشر زوجاً من القواعد النتروجينية في الدورة الكاملة (اللفة الواحدة) مع بقاء إتجاه الدوران يميناً.

3. **Z-DNA:** أكتشف هذا النموذج سنة 1979 ويكون إتجاه الدوران فيه الى جهة اليسار left handed، وكل دورة او لفة تحتوي على 12 زوجاً من القواعد النتروجينية ويكون backbone فيه غير منتظمة او خاضعة لنظام معين، بل يكون متعرجا Zig Zag ومن هنا تسمية هذا النموذج بـ Z .. وجدت هذه الصيغة الفراغية لجزيئة DNA في الغدة اللعابية Salivary gland لذبابة الخل Drosophila . كما وجد أن قطع الدنا المزدوج او المصنع مختبرياً من GC فقط سوف تتخذ أشكالاً فراغياً من نوع Z. ويعتقد ، على هذا الاساس، أن جزيئات الدنا الغنية GC في مواقع معينة فان تلك المواقع ربما تتخذ الهيأة الفراغية من نوع Z أيضا داخل الخلية مع الهيأة الفراغية من نوع B-DNA . وعموماً فان البنى الفراغية للدنا الحلزوني المزدوج تخضع لإعتبارات تسلسل أزواج القواعد النتروجينية ولإعتبارات تتعلق بالبيئة المحيطة بها.

وليس بالضرورة أن تكون جزيئة الدنا موجودة بالشكل المزدوج دائماً في جميع الكائنات الحية ولاسيما تلك التي تكون اكثر بدائية مثل بعض انواع الفايروسات. فقد تكون خطياً وبشريط مفرد Linear Single Stranded أي مفتوح النهايتين و يمكن لهذه الجزيئة المفردة الشريط ان تتحول الى شكل دائري (مفرد دائما) من خلال تكون اصرة فوسفاتية ثنائية الاستر Phosohodiester bond بين نهايتي الشريط المفرد 5ˋ ، 3ˋ بواسطة انزيم Ligase، اوتكون من نوع Linear double stranded كما هو الحال في الكائنات حقيقة النواة . أما في بدائية النواة مثل البكتريا، وبعض انواع الفايروسات، فان الشريط المزدوج يكون مغلق النهايتين. عليه فان جزيئة الدنا تتخذ شكلا دائريا حلقيا Double stranded covalently

Myxococcus	9	9,5 Mbp	1
Eukaryotes (haploid genome) (حقيقية النواة (أحادية المجين أو المجموعة الكروموسومية)			
Encephalitozoon	2	2,5 Mbp	11
Saccharomyces	5,7	12,5 Mbp	16
Caenorhabditis	19	100 Mbp	6
Drosophila	12	140 Mbp	5
Homo sapiens	25	3,300 Mbp	23
Arabidopsis	25	115 Mbp	5
Oryza sativa (Rice)	45	430 Mbp	12

*ssRNA = single stranded RNA; ssDNA = single stranded DNA; all other genomes consist of double stranded DNA.



الفصل الرابع

الخواص الفيزيائية للحوامض النووية

الخواص الفيزيائية للحواض النووية

Physical Properties of Nucleic Acids

تمتلك الحوامض النووية من الدنا والرنا، شأنها شأن المواد العضوية الأخرى، عدداً من الخواص الفيزيائية المميزة التي يمكن الإستعانة بها أو الأستفادة منها في العديد من المجالات المختبرية والتطبيقية. ومن هذه الخواص:

الإمتصاصية Absorbance:

تتميز المركبات الحاوية على أواصر مزدوجة بقدرتها على إمتصاص الأشعة الكهرو-مغناطيسية. وتتوقف قدرة المركب على امتصاص الاشعة على تركيبه الالكتروني او تركيب الجزيئة وعدد الأواصر المزدوجة فيها ومواقعها. وتمتاز القواعد النتروجينية، التي هي من وحدات البناء المهمة لكل من الدنا والرنا، بإمتصاصها للاشعة في المجال فوق البنفسجي Utraviolet . ويقع أعلى إمتصاصية لهذه الأشعة من قبل القواعد النتروجينية في الطول الموجي 260 نانومتر. بينما يكون أعلى إمتصاصية للاشعة من قبل البروتينات (الاحماض الامينية الحلقية) في 280 نانومتر. يستفاد من خاصية تباين قدرة الحوامض النووية (الدنا والرنا) والبروتينات في إمتصاص الاشعة فوق البنفسجية في أطوال موجية مختلفة، في التعرف على نقاوة مستخلصات الدنا والرنا. إذ يعد مستخلص الدنا بنقاوة 50% أو أكثر متى ما كانت نسبة امتصاصيته على الطولين الموجيين المذكورين (A_{260} / A_{280}) لا تقل عن 1.8 (الجدول: 4-1).

ويذكر أن معامل الإنطفاء extinction coefficient في 260 نانومتر لكل من الدنا و الرنا هي كالآتي:

شريط مزدوج من الدنا double-stranded DNA 0.020 $(\mu g/ml)^{-1}$ cm^{-1}

شريط مفرد من الدنا single-stranded DNA 0.027 $(\mu g/ml)^{-1}$ cm^{-1}

شريط مفرد من الرنا single-stranded RNA 0.025 $(\mu g/ml)^{-1}$ cm^{-1}

وهذا يعني ان المستخلصات التي تعطي إمتصاصية مقدارها 1 تحتوي على الدنا بشريط مزدوج بتركيز 50 مايكروغرام/مل.

ويذكر أن وجود بعض الملوثات مثل الفينول، الذي عادة ما يستخدم في إستخلاص الدنا، غالباً ما يؤثر في دقة تقدير تركيز الدنا في مستخلصاتها. فوجود الفينول تتسبب في زيادة الإمتصاصية للمحلول مما يوهم بوجود الدنا بتركيز عال.

جدول (4-1): إمتصاصية محاليل تحتوي على نسب مختلفة من الحوامض النووية والبروتينات

% Protein	% Nucleic Acid	$OD_{260}:OD_{280}$	% Protein	% Nucleic Acid	$OD_{260}:OD_{280}$
100	0	0.57	45	55	1.89
95	5	1.06	40	60	1.91
90	10	1.32	35	65	1.91
85	15	1.48	30	70	1.94
80	20	1.59	25	75	1.95
75	25	1.67	20	80	1.97
70	30	1.73	15	85	1.98
65	35	1.78	10	90	1.98
60	40	1.81	5	95	1.99
55	45	1.84	0	100	2.00
50	50	1.87			

ويفضل في حالة وجود الملوثات في محاليل الاستخلاص بتراكيز عالية، او في حالة وجود الدنا نفسها بتراكيز ضئيلة، إعتماد قياس كثافة التفلور fluorescence intensity بإضافة صبغات خاصة الى المستخلصات مثل بروميد الأثيديوم الذي يتميز بإرتباطه النوعي بالأحماض النووية. وعادة ما تحتاج العملية الى اجهزة قياس التفلور الضوئي fluorescence photometer. وتستخدم المادة نفسها في التعرف على حزم الدنا عند ترحيلها كهربائياً على الأكاروز، من حيث الموقع والتركيز بالمقارنة مع الحزم القياسية.

التأثرات او التداخلات الأيونية Ionic interaction:

في وضعها او هيأتها الحلزونية المزدوجة تكون جزيئات الدنا في سطوحها الخارجية حاملة لشحنات سالبة بكثافة عالية بسبب وجود أعداد عائلة من مجاميع الفوسفات. عليه فإن جزيئات الدنا تمتلك القدرة على الإرتباط مع جزيئات ذات شحنات موجبة كإرتباطها ببعض البروتينات القاعدية مثل الهستونات والتي تشكل مع الدنا ما يعرف بالكروموسومات في خلايا كائنات حقيقة النواة.

المسخ Denaturation:

من المعروف أن الشريطين المزدوجين في جزيئة الدنا ذات الشكل الحلزوني، يرتبطان ببعضهما البعض بواسطة أواصر هيدروجينية. وتعد الأواصر الهيدروجينية من الأواصر الضعيفة مقارنة بالأواصر التساهمية مثلاً، والتي تربط أجزاء أو مكونات النيوكليوتيدات المختلفة مع بعضهما. عليه فهي سريعة التأثر بالحرارة، وهذا يعني إحتمال إنفصال شريطي الدنا عند تعرضها الى المعاملة الحرارية في محاليل بتراكيز معينة.

ليست الحرارة وحدها بل أن بعض العوامل الكيمياوية، كالحوامض والقواعد والمواد التي تسبب زيادة في ذائبية المجاميع غير المستقطبة (مثل القواعد النتروجينية) كاليوريا والفورمالديهايد وغيرها، تؤدي الى تغير الشكل الحلزوني لجزيئة الدنا. وتسمى هذه الظاهرة بالمسخ Denaturation. وتؤثر عمليات المسخ في البنية او الهيأة الفراغية للدنا وفي الخواص الفيزيائية-الكيميائية لها، كالكثافة واللزوجة وطيف إمتصاص الأشعة Absorption Spectra . فعملية المسخ ترافقها زيادة في الكثافة الضوئية الممتصة من قبل محلول الدنا الممسوخ، بسبب إنفصال الشريطين عن بعضهما، أي زيادة إمتصاص الأشعة فوق البنفسجية على طول موجي 260 نانومتر.

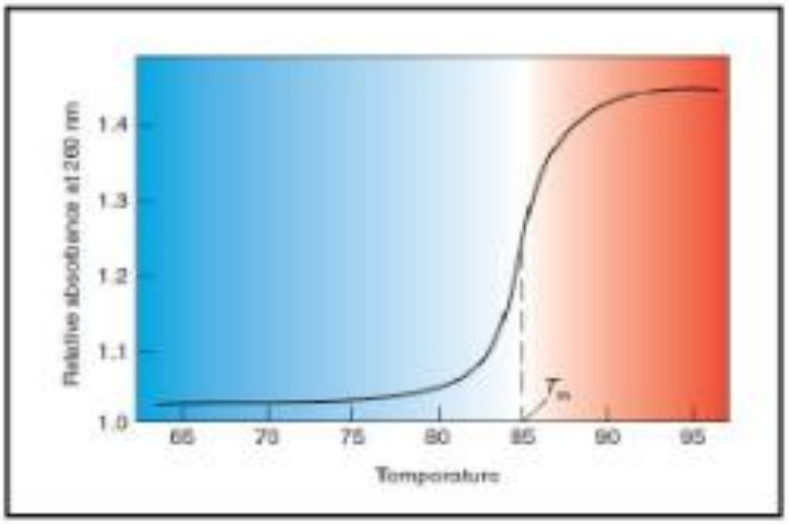
تتوقف سرعة إنفصال الشريطين في الدنا بفعل الحرارة، على عدد الأواصر الهيدروجينية الرابطة بين أزواج القواعد النتروجينية المكملة لبعضها في الشريطين المتقابلين، والذي يعكس بطبيعة الحال، كمية G≡C و A=T فيه. وتسمى ظاهرة زيادة إمتصاصية الضوء في 260 نانومتر لمحلول من الدنا نتيجة رفع درجة حرارته تدريجياً بظاهرة Hyperchrmic shift. والتي تبلغ حدودها القصوى بإنفتاح الشريطين وتباعدهما عن بعضهما بالكامل. وتسمى درجة الحرارة التي تبلغ عندها هذه الظاهرة نصف قيمتها القصوى، بدرجة الذوبان أو الإنصهار Melting Temperature (T_m) ، والتي تختلف بإختلاف مصدر الدنا وبإختلاف النسبة المئوية لـ (%C+G)، حيث تزداد قيمة T_m بزيادة هذه النسبة (الشكل:4-1).

ويمكن إستخراج %G+C بمعرفة قيمة (T_m) بالإعتماد على المعادلة الآتية:

$$\%G+C = 2.44\ (T_m-69.3)$$

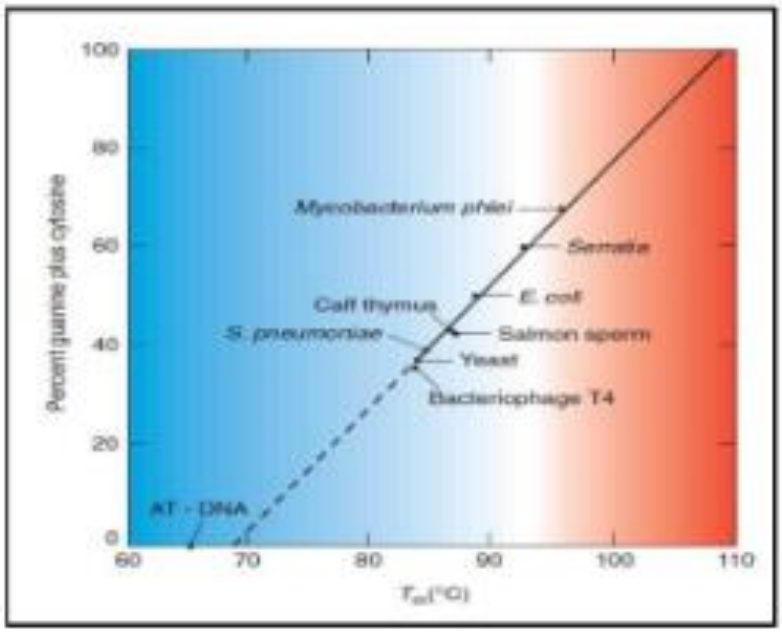
وذلك عند إجراء المعاملة الحرارية للدنا في محلول كلوريد الصوديوم بتركيز 0.2 مولاري. وتمثل النسبة المذكورة في المعادلة، النسبة المولارية للقاعدتين النتروجينتين.

ويذكر أن هذه النسبة في الأحياء المجهرية شديدة القرب فيما بينها وراثيا، تكون متقاربة أو متشابهة. عليه أعتمدت هذه النسبة كأساس في تصنيف البكتريا على وجه الخصوص في وقت من الأوقات. لكن التشابه في هذه النسبة لا تدل على التقارب على مستوى التصنيف دائماً. فالإنسان وبكتريا ***Penumonococcus*** مثلا ، يمتلكان نفس النسبة من G+C % تقريبا وهي 40%. فالتشابه هنا لايقود الى الاستنتاج من أن الانسان وهذه



شكل(4-1): منحنى ذوبان الدنا المستخلص من بكتريا *Streptococcus pneumoniae* ويتوضح عليه قيمة T_m وتعادل 85^0 C

البكتريا مرتبطان مع بعضهما بصلة وراثية وثيقة. إذ أن التطابق في محتوى %G+C هنا محض صدفة ، ولايقرر شيئا عن تتابع القواعد النتروجينية في دنا هذين الكائنين، ذلك التتابع الذي يختلف إختلافاً بيناً، والذي يعني بدوره إختلافاً واضحاً في الصفات الوراثية.



شكل (4-2): العلاقة بين درجة ذوبان الدنا ومحتواها من نسبة الكوانين و السايتوسين

على أن معرفة نسب القواعد النتروجينية في الدنا تؤشر بعض الحقائق الهامة عنها. وعادة ما تتراوح نسبة مجموع الكوانين والسايتوسين بين 22% الى 75% للكائنات الحية المختلفة (الجدول:4-2). وعموما تعد الكائنات ضمن المجموعة التصنيفية الواحدة، كالبكتريا مثلاً، والتي تُظهر إختلافا في نسبة %G+C بمقدار يزيد على 10% ، كائنات غير قريبة الصلة من بعضها وراثياً.

جدول (4-2): النسبة المئوية لمجموع الكوانين والسايتوسين في دنا الكائنات الحية المختلفة.

مصدر DNA	% (G + C)
Dictyostelium (slime mold)	22
Streptococcus pyogenes	34
Vaccinia virus	36
Bacillus cereus	37
B. megaterium	38
Hemophilus influenzae	39
Saccharomyces cerevisiae	39
Calf thymus	40
Rat liver	40
Bull sperm	41
Streptococcus pneumoniae	42
Wheat germ	43
Chicken liver	43
Mouse spleen	44
B. subtilis	44
T1 bacteriophage	46
Escherichia coli	51
T7 bacteriophage	51
T3 bacteriophage	53
Neurospora crassa	54
Sarcina lutea	72
Micrococcus lysodeikticus	72
Mycobacterium phlei	73

ولابد من الإشارة أيضاً أن إنخفاض درجة حرارة محاليل الدنا وبصورة تدريجية، سوف تعيد أو تتيح الفرصة للشريطين المنفصلين بالعودة الى الإرتباط مع بعضهما البعض reossocition أو annealing يرافق ذلك إنخفاض في إمتصاص الأشعة فوق البنفسجية على الطول الموجي 260 نانومتر ويعرف ذلك بتأثير قلة الإمتصاص Hypochromic effect.

ونظراً لأن تفاعل إعادة الإرتباط annealing يتطلب توفر مبدأ تكامل شريطي الدنا حتى يغدو بالإمكان إعادة تكوين الحلزون المزدوج، لذا كان بالإمكان إستخدام الطريقة نفسها لتحديد مدى تشابه تتابعات القواعد النتروجينية في دنا مأخوذة من كائنين يرتبطان مع بعضهما بصلة وراثية.

وفي هذه الحالة تمزج أشرطة الدنا مفردة من كائنين مختلفين، فان كانا ذو صلة وراثية وثيقة كانت تتابعات القواعد النتروجينية في دنا هذين الكائنين مكملة لبعضها ، الأمر الذي يؤدي الى إرتباط الأشرطة المفردة لتكوين جزيئة دنا مزدوج الشريط. وقد تستخدم الرنا مع الدنا او الرنا مع الرنا لهذا الغرض. وتعرف هذه الطريقة بتهجين الحامض النووي Nucleic acid hybridization او Hybridization إختصاراً، وهي من الطرق المباشرة و الفعالة لتحديد القرابة بين الكائنات حقيقة النواة كالفطريات مثلاً. ويمكن تطبيقها في النباتات والحيوانات أيضاً. وهذا النوع من التصنيف يعرف ايضاً بالتصنيف الوراثي Genetic clasification.
كما تستخدم طريقة تهجين الأحماض النووية للكشف عن قطع من الدنا بعينها، أو للتعرف على أي تغيير حاصل في تتابعات القواعد النتروجينية جراء طفرة او غيرها وبتقنيات خاصة كتقنية وصمة ساوثرن Southren blotting.

ومن العوامل المهمة التي تؤثر في قيمة T_m تركيز المحاليل التي يتم تعليق الدنا فيها. فعند تعليق الدنا في محلول كلوريد الصوديوم بتركيز 0.15 مولاري فانه يزيد من ثباتية الدنا لتكوينه تداخلات و تأثرات مع مجاميع الفوسفات السالبة والمتوزعة على مدى السطح الخارجي، أو طول الجزئية من الجهة الخارجية. عليه فإن قيمة T_m للدنا في هذا المحلول الملحي يكون أعلى بحوالي 20 م° مقارنة مع قيمتها المقدرة في محلول دارىء الفوسفات بتركيز 0.01 مولاري. على أن الماء النقي يسبب المسخ للدنا في درجة حرارة الغرفة. كما أن الأرقام الهيدروجينية المتطرفة تؤدي الى سرعة المسخ ولاسيما المحاليل القاعدية، إذ

أنها تؤدي الى سرعة إنفصال الأشرطة المزدوجة في الدنا دون تحللها الى وحداتها من النيوكليوتيدات، بخلاف الرنا التي تتحلل الى وحداتها من mononucleotides- 2` بتأثير المحاليل القاعدية وعلى نحو كامل. كما أن بعض المركبات العضوية مثل اليوريا و Formamide ، تتسبب في إنخفاض درجة حرارة المسخ وتمنع إعادة أزواج القواعد في الأشرطة المفصولة عند التبريد ، لقدرتها على تكوين أواصر هيدروجينية مع القواعد النتروجينية تنافس تلك التي يفترض أن تتكون بين القواعد المكملة لبعضها في الأشرطة المتقابلة.

وتؤدي المركبات التي تزيد من ذائبية القواعد النتروجينية مثل الميثانول، او التي تؤدي الى تشتيت الماء من المنطقة المحيطة بها، مثل Trifluoroacetate، الى إنخفاض التداخلات الهيدروفوبية بين القواعد النتروجينية مما تتسبب في إنخفاض درجة حرارة المسخ أو قيمة T_m. غير أن معظم التداخلات بين البروتين و الدنا تزيد من ثباتية هذا الاخير.

اللزوجة Viscosity والكثافة Density:

تقصد باللزوجة مقاومة السائل للإنسياب. واللزوجة ناتجة أساساً من إحتكاك الجزيئات ببعضهما البعض في السوائل.

تمتاز محاليل الدنا بلزوجتها العالية، وتزداد اللزوجة مع زيادة طول جزيئات الدنا. وإن الدنا الحلزوني المزدوج تمتلك لزوجة أكبر من الدنا ذات الأشرطة المفردة. أما كثافة محاليل الدنا فيعتمد على تركيز المحلول و على شكل الدنا البنائي أو هيأتها الفراغية وفيما إذا كان مفرداً أو مزدوجاً أو دائرياً مغلقاً أو مفتوحة النهايتين أو فائق الألتواء Super coiled.

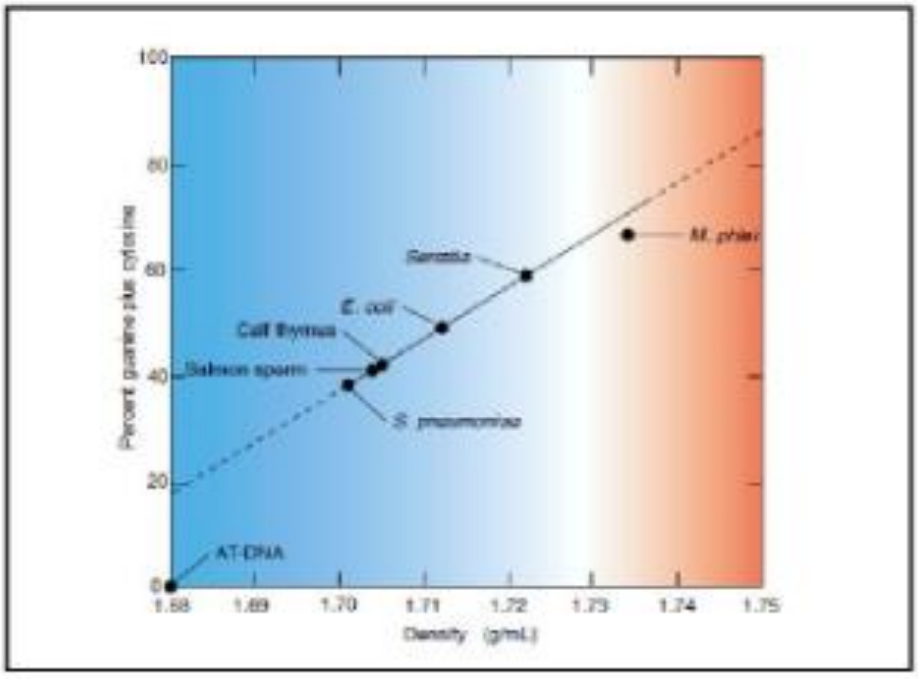
ويمكن إستخراج كثافة الدنا بالطرد المركزي الفائق Ultracentrifugation في محاليل متدرجة الكثافة gradient density من كلوريد السيزيوم C_sCl_2 ، حيث تتحرك جزيئات الدنا بإتجاه القوة الطاردة المركزية وتستقر في موقع محدد معين من هذا المحلول تساوي كثافته كثافة جزيئات الدنا، أي عند النقطة التي تتعادل فيها كثافة المحلول مع كثافة الدنا والتي تسمى بـ Isopycnic density او Buoyant density ويمكن تحديد مواقع تجمع جزيئات الدنا بقياس إمتصاص الضوء على الطول الموجي 260 نانومتر للأجزاء متدرجة الكثافة لمحلول كلوريد السيزيوم. وتتركز الكثافة العالية لكلوريد السيزيوم بإتجاه القوة الطاردة المركزية.

كما يمكن إستخدام CsCl, Cs_2SO_4, or Cs Formate و Sodium bromide (NaBr) لغرض تحضير محاليل متدرجة الكثافة وذلك بوضع هذه المحاليل في أنبوبة الطرد المركزي وعلى سرعة 30,000 دورة/ دقيقة لفترة طويلة قد تصل الى عدة أيام حيث تتدرج خلالها مكونات المحلول من الاعلى الى الاسفل. ويفيد تعيين الكثافة الطافية buoyont density للدنا في المجالات الاتية:

1- معرفة محتواها من %G+C وذلك حسب المعادلة الآتية:

$$\{ gm / cm^3 \} \text{ (الكثافة) } P = 1.66 + 0.001 (\%G+C)$$

وهذا يعني ضمناً أنه يمكن فصل الجزيئات المختلفة في محتواها من %G+C باستعمال الطرد المركزي الفائق في محلول كلوريد السيزيوم متدرج الكثافة (الشكل:4-3 والجدول: 4-3).



شكل (4- 3): العلاقة بين الكثافة الطافية ونسب القاعدتين النتروجينيتين الكوانين و السايتوسين للدنا في عدد من البكتريا.

2- يمكن التمييز بين أشكال الدنا (ذات الأشرطة المفردة عن المزدوجة، والدائرية عن غير الدائرية، وذات الإلتواءات الفائقة عن جزيئات الدنا المعاملة بالأنزيمات **Topoismerases** أو الأنزيمات القاطعة **Restriction enzymes**)

جدول (4-3): العلاقة بين الكثافة الطافية لدنا بعض انواع البكتريا ومحتواها من القاعدتين النتروجينيتين الكوانين والسايتوسين

0 G+C%	**1.679 g / cm^3**	***A-T polymer***
40 G+C%	**1.700 g / cm^3**	***Strepf. Pneumonia***
50 G+C%	**1.710 g / cm^3**	***E. coli***
59 G+C%	**1.718 g / cm^3**	***Serratia marcescens***
73 G+C%	**1.732 g / cm^3**	***Mycobacterium phlei***

3- كما يمكن فصل DNA العاثيات أو البلازميدات عن الدنا البكتيري (كمضيف أو عائل للعاثيات).
4- تستعمل هذه الطريقة أيضاً في تنقية الحوامض النووية من الشوائب كالبروتينات أو فصل الدنا عن الرنا.
5- أستخدمت هذه الطريقة للتعرف على العديد من الحقائق المتعلقة بتركيب الدنا وآلية تكراره (لاحظ فصل تضاعف الدنا) وغيرها من العمليات الحيوية المتعلقة بهذه الجزيئة. كما سنأتي الى تلك الإستخدامات كلاً حسب موضعهُ.

النبذ المركزي وبعض إستخداماته في علم الحياة الجزيئي:
للطرد أو النبذ المركزي، ولاسيما تلك التي تتميز بسرعتها الفائقة، إستخدامات عديدة في علم الحياة الجزيئي، بل يمكن القول أن الجانب الأكبر من التطورات التي شهدها هذا العلم يعود الى إبتكار أجهزة الطرد المركزي وما رافقتها من تحسينات. إذ أن العديد من خواص الجزيئات الكبيرة كالأحماض النووية والجسيمات الصغيرة كالرايبوسومات، يمكن تعينها بالإعتماد على عملية الترسيب بالطرد المركزي فائق السرعة، والتي تصل الى حوالي 700 000 g (700 000 مرة بقدر جاذبية الكرة الأرضية).
إن النسبة بين سرعة حركة جزيئة في محلول ما الى قوة الطرد أو النبذ المركزي تسمى بمكافئ الترسيب Sedimentation coefficient ويعبر عنه بالثواني seconds

ويرمز له بـ (s). وغالباً ما تكون هذه القيمة ثابتة في العديد من المحاليل المستخدمة لفصل الجزيئات الكبيرة أو الجسيمات الصغيرة. عليه يمكن إعتبارها قيمة تعبر عن خاصية ثابتة، وهي في الغالب خاصية وصفية، تجمع بين صفتي الشكل والحجم معاً فضلاً عن الكتلة. بمعنى أن أيّ تغيير يطرأ على هذه الجزيئات الكبيرة أو تلك الجسيمات (بالأنزيمات أو بفعل عوامل فيزيائية) فأنها تنعكس على قيمة (s) .

إن قيمة (s/ حرف صغير) لمعظم الجزيئات الكبيرة أو الجسيمات الصغيرة تتراوح ما بين 1×10^{-13} الى 100×10^{-13}. وقد إعتبر Svedberg (العالم السويدي Theodor Svedberg الحائز على جائزة نوبل 1926) الذي يعود إليه الفضل في إبتكار أجهزة الطرد المركزي فائقة السرعة، الرقم 10^{-13} وحدةً لقياس مكافئ الترسيب، أسماها بوحدة سويد برج، ورمز لها بالحرف (S / حرف كبير). عليه فعند وصف IgG بـ 7S (أي أن هذه الجزيئة تقطع مسافة مقدارها 7 مايكرومتر/ ثانية) فهذا يعني أن مكافئ ترسيب بروتين المناعة هذا، يبلغ $7x10^{-13}$ s .

ويتم إستخراج قيمة (s) بطريقة الطرد المركزي الموقعي Zonal centrifugation وفيه يستخدم سكروز متدرج الكثافة (او الكليسرول أحياناً). و يحضر السكروز متدرج الكثافة بمزج محلولين منه، أحدهما بتركيز عال والثاني بتركيز واطيء، في حاوية مزلفة من مقطعين موصولين ببعضهما من الأسفل بحيث يسمح بإنسياب المحلولين وإمتزاجهما بالتدريج إعتماداً على لزوجتهما. يتم إستقبال المزيج المتدرج في أنبوبة الطرد المركزي.

توضع العينة على سطح محلول السكروز متدرج الكثافة وتخضع للطرد المركزي فائق السرعة لمدة معينة. تتحرك الجزيئات والجسيمات الموجودة في العينة بسرع متباينة، إعتماداً على كتلها وحجومها أو أشكالها، ومدى مقاومتها للزوجة محلول السكروز وتستقر في النقطة التي تكون فيها كثافتها الطافية مساوياً لكثافة محلول السكروز في تلك نقطة. الأمر الذي يؤدي الى أبتعادها و إنفصالها عن بعضها البعض.

يتم توزيع محتويات أنبوبة الطرد المركزي وبكميات محددة في أنابيب إختبار من خلال ثقب صغيرة يتم فتحها أسفل أنبوبة الطرد المركزي. وبقياس امتصاصية المحاليل في أنابيب الأختبار يمكن التعرف على موقع العينة لتحديد المسافة التي قطعتها (x) خلال فترة الطرد المركزي (t)، أي سرعتها داخل محلول السكروز متدرج الكثافة وبتأثير من القوة الطاردة المركزية. وبالإعتماد على المعادلة التالية يمكن إستخراج قيمة (s):

$$s = \frac{dx}{dt} \cdot \frac{1}{wr2}$$

حيث :

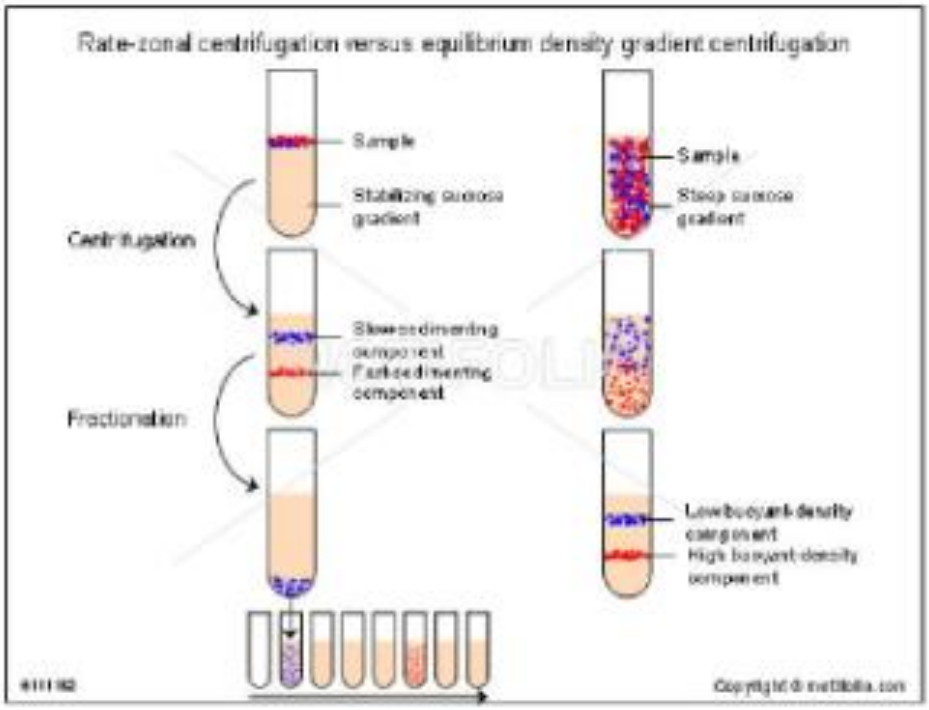
$\frac{dx}{dt}$ = سرعة الترسيب (سرعة حركة الجزيئة) في مجال الطرد المركزي

w= السرعة الزاوية (نصف قطر الدوران / ثانية)

r^2 = مربع المسافة بين العينة ومحور الدوران (سم^2)

ويمكن التعبير عن قيمة (s) بوحدة سويد برج (S). وتستخدم هذه الطريقة لإستخراج مكافئ ترسيب الجسيمات الصغيرة.

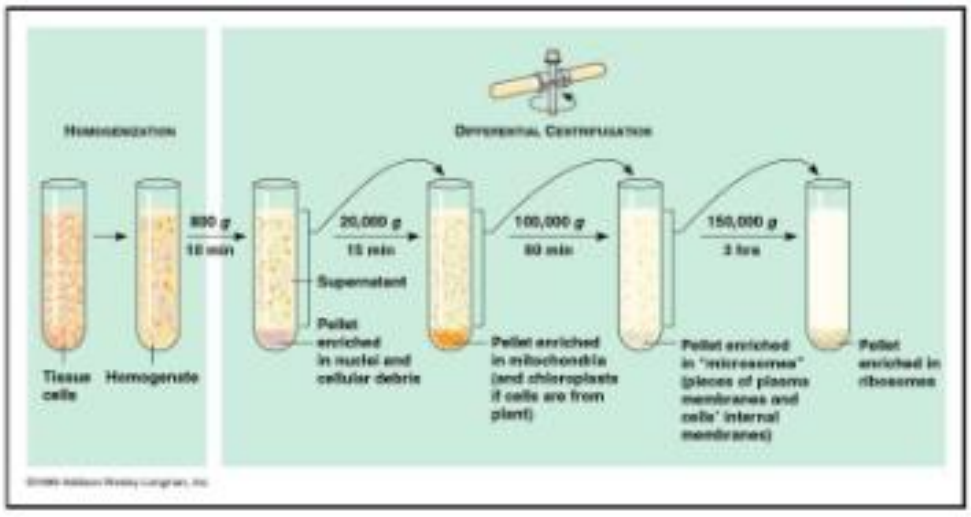
ثمة طريقة أخرى تدعى بالطرد المركزي متدرج الكثافة المتعادل Equilibrium Density-Gradient Centrifugation وفيه يتم تعليق الجزيئات الكبيرة مثل الحوامض النووية أو دقائق الفايروسات في محلول كلوريد السيزيوم CsCl . يعتمد إختيار تركيز كلوريد السيزيوم على حجم الجزيئات الكبيرة وشكلها وبالتالي على كثافتها الطافية **Buoyant density**.



شكل (4-4): النبذ المركزي الموقعي zonal والنبذ المركزي متدرج الكثافة density gradient

وخلال عملية الطرد المركزي تعيد جزئيات كلوريد السيزيوم ترتيب نفسها جراء قوة الطرد المركزي المسلطة عليها، فيكوّن محلولاً متدرج الكثافة داخل الأنبوبة من الأعلى (أقل كثافة) الى الأسفل (أكثر كثافة). ومع تكون التدرج المذكور في محلول كلوريد السيزيوم تبدأ مكونات العينة بالحركة الى المواقع التي تضمن لها الإستقرار، أو المواقع التي تكون فيها كثافة كلوريد السيزيوم مساوية لكثافة مكونات العينة الطافية كلا على حده كما في الشكل (4-4).

وبذلك تنفصل هذه المكونات (الجزئيات) عن بعضها البعض. والتي تشكل في مواقعها حزماً، تزداد درجة وضوحها مع إطالة فترة الطرد المركزي التي قد تستغرق يوماً كاملاً. ويتم التعرف على مواقع الحزم بطريقة مماثلة لما ذكر أعلاه. وكما سبق فإن لهذه الطريقة إستخدامات واسعة في فصل الدنا والتعرف على محتواها الكمي من القواعد النيتروجينية وفصل الرنا. ويستخدم في تجارب فصل جزيئات الدنا ، محلول كلوريد السيزيوم بتركيز 0.2 مولاري في الغالب، والذي يكوّن تدرجاً في الكثافة يتراوح من 1.1 الى 1.8 غم/ سم^3.



شكل (4-5): النبذ المركزي التفريقي لفصل مكونات خلايا الأنسجة وعلى مراحل تستخدم في كل مرحلة قوة طاردة أكبر مع زمن أطول عن المرحلة السابقة.

ومن المفيد هنا الإشارة أن ثمة طريقة أخرى للنبذ المركزي تسمى النبذ المركزي التفريقي Differential centrifugation وفيها يتم فصل المواد أو الدقائق العالقة في محلول ما

إعتماداً على حجمها بالدرجة الأساس. وتستخدم لفصل الأجزاء والمكونات الخلوية عن بعضها بعد سحق الخلايا أو هرس الأنسجة لتحرير محتوياتها، وذلك في دارىء بمواصفات معينة أو في الماء المقطر، حسب الهدف من العملية. ويتم إخضاع الخليط أو المستخلص، بعد ذلك الى الطرد المركزي بقوة واطئة ولزمن قصير، حيث تترسب المواد العالقة الكبيرة، يتم فصل الراشح منها لإعادة إخضاعه الى الطرد المركزي ثانية وبإستخدام قوة أكبر مع زمن أطول، لترسيب المواد العالقة الأصغر وهكذا (الشكل: 4-5).

وعادة ما يتم التعبير عن سرعة الطرد المركزي بعدد الدورات للدقيقة الواحدة Revolutions Per Minute ويرمز له إختصاراً RPM والتي تختلف بإختلاف نصف قطر حاوية أنابيب الطرد المركزي. ويمكن تحويل عدد الدورات في الدقيقة الواحدة الى ما تسمى بالقوة الطاردة المركزية النسبية Relative centrifugal Force (RCF) التي تعني قوة الطرد المركزي نسبة الى الجاذبية الارضية (x g) وبالمعادلة الآتية.

$$RCF = 11.18 \times r \times (RPM/1000)^2$$

أو $RCF = 1.118 \times 10^{-5} \times r \times RPM^2$

حيث يمثل(r) نصف قطر الدوران مقدراً بالسنتيمتر..