وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

جامعة القادسية

الاحماض النووية وتقنية تفاعل البلمرة المتسلسل(PCR)

بحث مقدم الى :

مجلس كلية العلوم / قسم الكيمياء كجزء من متطلبات نيل شهادة بكالوريوس علوم / قسم الكمياء

من قبل الطالب:

صادق سوادي هاني

مرتضى جابر غزاي

بأشراف :

م . م نوال خنطيل جبار

كلمة شكر

الحمدوالشكر لله رب العالمين على النعم الكثيرة التي من بها علي والصلاة والسلام على سيدنا محمد وعلى اله واصحابه ومن دعا بدعوته الى يوم الدين .

يسرني ان اتقدم بالشكر والتقدير للاستاذ المشرف لتفضله بالاشراف على البحث ومتابعته المستمرة التي ساعدباخراجه بشكله الحالي ولايفوتني ان اتقدم بالشكر الى اساتذتي في قسم علوم الكمياء لما قدموه من معرفة علمية واخيرا شكري وتقديري الى جميع من ساعدني في اعداد هذا البحث وفاتني ذكر اسمهم.

صادق سوادي هاني

مرتضى جابر غزاي

بسم الله الرحمن الرحيم

وَيَسْأَلُونَكَ عَنِ الرُّوحِ ۖ قُلِ الرُّوحُ مِنْ أَمْرِ رَبِّي وَمَا أُوتِيتُمْ مِنَ الْعِلْمِ إِلَّا قَلِيلًا ﴿٨٥﴾

صدق الله العظيم

سورة الاسراء

الاية(٨٥)

الاهداء

الى من غرسا الايمان والحق وحب الخير في اعماق نفسي يامن تعجز عن وصفهم الكلمات وكل الكلمات .....امي وابي حبا وتقديراً و الى اخوتي محبة واعتزاز .الى كل من قدم لي النصح والعون.....عرفانا واحتراماً

المحتويات

ت	الفصل الاول	الصفحات
١	المقدمة	١
٢	**الفصل الثاني**	٤
١- ٢	الاحماض النووية	٤
٢-١-١	انواع الاحماض النووية	٤
٢-١-٢	مكونات الاحماض النووية	٥
٢-١-٣	السكر الخماسي	٦
٢-١-٤	البيورينات والبيرميدينات	٦
٢-١-٥	مجموعة الفوسفات	٨
٢-١-٦	تركيب حامض ال RNA	٩
٢-٢-١	تتابع النيوكليوتيدات	٩
٢-٣-١	نسخ ال RNA	١١
٢-٤-١	صور تبين التركيب الكيميائي للدنا	١٢
٢-٤-٢	صور توضح الرنا مع قواعده النتروجينية في اليسار والدنا في اليمين	١٣
٢-٥	الانزيمات وتضاعف ال DNA	١٤
٢-٥-١	انزيمات البلمرة DNA polymerase إنزيمات الربط Ligase DNA	١٤
٢-٥-٢	اصلاح عيوب ال DNA	١٥
٢-٥-٣	عوامل حدوث تلف جزيئة ال DNA	١٥

٢-٥-٤	كيفية عمل الانزيمات للربط	١٥
٢-٥-٥	الانزيمات المساهمة في تضاعف ال DNA	١٥
٢-٦	الطفرة الوراثية	١٧
٢-٦-١	عوامل حدوث الطفرة الوراثية	١٧
٣	الفصل الثالث	١٨
٣-١	التفاعلات البوليمرية المتسلسلة PCR	١٨
٣-١-١	متطلبات ال PCR	١٩
٣-١-٢	عملية النسخ	١٩
٣-١-٣	تطبيقات ال PCR	٢١
٣-١-٤	انواع ال PCR	٢٢
٣-٢	التطبيقات السريرية المتقدمة لتكنلوجيا ال PCR في الوراثة الجزيئية والسرطان	٢٣
٣-٢-١	التعرف على الروامز الوراثية – تعيين تسلسل الدنا DNA sequencing	٢٤
٣-٢-٢	تفاعلات البوليميرايز polymerase chain reaction(PCR)	٢٤
٤	الفصل الرابع	٢٤
٤-١	المصادر	٢٥

الخلاصة

الاحماض النووية هي التي تسبب الاختلاف بين البشر من حيث الشكل و اللون وغيرها من الصفات والشكل الاساسي للحمض النووي الذي يؤدي للتعرف على الكثير من المعلومات حول كيفية تخزين وحفظ المعلومات الوراثية وكيفية نقلها من جيل الى اخر والاحماض النووية تتركب من وحدات كيميائية تسمى النيوكليتيدات ويتكون كل نيوكليوتيد من ثلاث مكونات رئيسية.

*DNA الحامض النووي الرايبي منقوص الاوكسجين ويتالف من سلسلتين من النيوكليتيدات تلتفان حول بعضهما بشكل حلزوني

*RNA الحامض النووي الرايبوزي ويتألف من سلسلة واحدة من النيوكليوتيدات

* يؤدي حدوث أي خطأ في ترتيب او تسلسل القواعد الى تغيير معلومات DNA النتروجينية في جزيئة وراثية فينتج عن ذلك ما يسمى الطفرة .

* الجينات في كروموسومات الانسان تحتل فقط ما يقارب ٥% من حجم الكروموسوم تقريبا في حين ٩٥% من المساحة المتبقية ليس فيها جينات والتي تحمل معلومات وراثية (DNA) تسمى قطع الدنا ب Genes يمكن ترجمتها لبروتينات بالموروثات

كما ان الانزيمات تساهم في تضاعف DNA حيث هنالك مجموعة من الانزيمات تشارك بشكل اساسي في نسخ (مضاعفة) تربط DNA المفرد لتخليق شريط مفرد مقابله بنائا على القاعدة الاستكمالية

*توجد تقنية مختبرية تقوم على اكثار ونسخ الحامض النووي (DNA) تعرف بتقنية PCR

المقدمه

تعود أول ملاحظة للدنا في العلم الحديث للطبيب السويسري فريدريك ميسشر في سنة ١٨٦٩ عندما استطاع استخلاص مادة مجهريه من القيح واسمها نووين (نيوكلين) بسبب وجودها داخل النواة. وفي سنة ١٩٢٩ استطاع فيبي ليفني من اكتشاف مكونات الوحدة الأساسية للدنا وهي النوويدات وبين أن الدنا ما هو إلا تكرار لهذه الوحدة.

في سنة ١٩٤٣ أجرى أوزوالد أفري تجربة بمزج بكتيريا نيموكوكس (الاسم العلمي **(Pneumococcus** ميتة وتحمل خاصية السطح الناعم مع بكتيريا حية من نفس النوع ولكنها ذات سطح خشن. نتائج التجربة كانت انتقال خاصية السطح الخشن إلى البكتيريا ذات السطح الناعم. وسمي الدنا بالعامل الناقل.

و في سنة ١٩٥٣ وبالاعتماد على الصور السينية المأخوذة بواسطة روزاليند فرانكلين والمعلومات المتوفرة عن القواعد وطريقة ارتباطها ببعضها، طرح كل من جيمس واتسون وفرانسيس كريك نموذجهما (اللولبي المزدوج)و نشروا تجاربهم في مجلة الطبيعة. وفي سنة ١٩٥٧ وضح كريك العقيدة الأساسية لعلم الأحياء الجزيئي ووضح العلاقة ما بين الدنا والرنا والبروتينات. وبين كريك لاحقا أن الكودونات تتكون من ٣ قواعد مما ساعد علماء آخرين على فك الشيفرة الوراثية وتحديد الكودونات المشفرة للأحماض الأمينية. وفي سنة ١٩٥٨ أوضح العالمان ميليسون وستال طريقة تناسخ الدنا ووصفاها بالشبه محافظة.

هي من التقنيات الحديثة التي ومع التطور في مجال التكنولوجيا الحيوية والذي يقوم على التعامل مع الحمض النووي (DNA) بشكل أساسي ، استدعى ذلك العلماء على أن يبحثوا عن طريقة أو تقنية تقوم على مضاعفة كمية الحمض النووي (DNA) بشكل كبير ، فكان هناك عدة محاولات لتنشيط الخلية على الانقسام المستمر بإضافة عوامل النمو growth factors ، ولكن هذه الطريقة لم تكن ذات جده لدى العلماء لأسباب عدة مع العلم ان الخلية تقوم بمضاعفة كمية الحمض النووي وقت انقسام الخلية بشكل تلقائي و بشكل سريع مع وجود نظام تصحيح للأخطاء خلال النسخ. و تبلغ سرعة النسخ والمضاعفة إلى 1000 قاعدة نيتروجينية بالثانية داخل النظام الحيوي (الخلية) وهذا يحدث في الخلية في وقت التكاثر والانقسام فقط . لذا اجريت عدة تجارب للاستنساخ خارج الخلية لكنها فشلت جميعها .

استطاع العالم Dr. Kerry Mullis في عام 1985 (و قد حصل على جائزة نوبل في الكيمياء عام 1993) بحل مشاكل الاستنساخ بنشر اختراعه لتقنية PCR فكانت هذه التقنية بوابة لكثير من التطورات المتسارعة في مجال التكنولوجيا الحيوية ، من أهم الأسباب التي ساعدت هذه التقنية على الانتشار عدم اعتمادها على النظام

الحيوي(أي الخلية) و التحكم بكمية الحمض النووي (DNA) و وسرعة في الإنتاج ولكن كان من عيوب هذه التقنية عدم وجود نظام إصلاح أخطاء.

الأحمـــــــــاض النووية Nucleic Acids

الأحماض النووية هي عبارة عن جزيئات صغيرة توجد في جميع الخلايا الحية في صورة طليقة أو متحدة مع البروتين ، وبدأ علماء (الكيمياء الحيوية) أبحاثهم على الأحماض النووية منذ حوالي مائة عام مضت حين أستطاعوا فصلها من أنوية الخلايا فالأحماض النووية توجد في كل الخلايا الحية حيث أنها ليست فقط مسؤولة عن حمل وانتقال التعليمات الجينية (الصفات الوراثية) ولكنها تتحكم أيضاً في ترجمة هذه التعليمات عند تكوين البروتينات المختلفة بالخلايا وذلك بتحكمها في ترتيب وتتابع الأحماض الأمينية لكل بروتين يتكون بكل خلية والأحماض النووية لها وزن جزيئي مرتفع وهي عبارة عن نيوكلتيدات (بولي نيوكلتيدات) وحداتها البنائية هي النيوكلتيدات.

وكانت الدراسات الكيميائية في بادئ الأمر تجري على أحماض النيوكليك من مصدرين : أحدهما الخميرة، ووجد أنها تحتوي على سكر ريبوز ولذلك سميت بأحماض الريبو نيوكليك (RNA) والثاني من الغدة التيموسية بالعجول ووجد أنها تحتوي على سكر دي – أوكسي – ريبوز ، ولذلك سميت بأحماض الدي – أوكسي – ريبونيوكليك (DNA) مما أدى إلى الإعتقاد لبعض الوقت بأن الحمض الأول خاص بالنباتات والثاني خاص بالحيوانات ، ثم اتضح أن (DNA) موجود بالنواة وأن(RNA) موجود في السيتوبلازم. ونتيجة للدراسات الحديثة بطرق التحليل المحسنة أمكن العثور على كميات صغيرة من (DNA) في الميتوخندريات والبلاستيدات الخضراء كما أمكن التعرف على (RNA) في النواة متصلاً بالنوية.

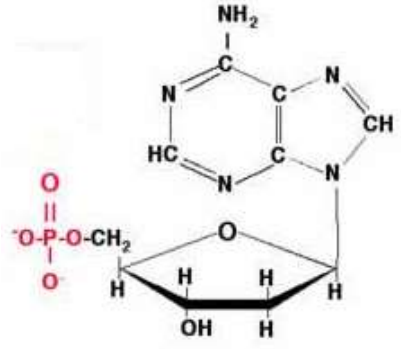
أنواع الأحمـــــاض النووية:

يوجد نوعين من الأحماض النووية كما تقدم هما :-

أ. الحمض الرايبونيوكلتيدي Ribonucleic Acid (RNA)

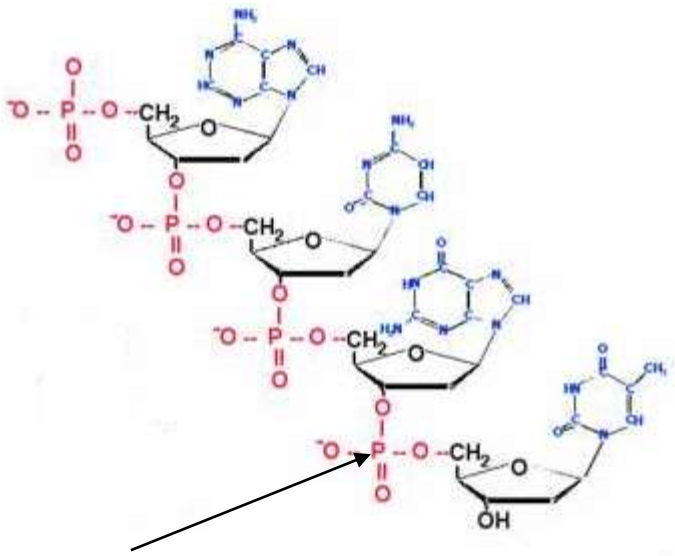
ب. الحمض الديؤكسي رايبونيوكلتيدي Deoxyribonucleic Acid (DNA)

ويتكون البناء الأساسي لهذه الأحماض من سلاسل بها جزيئات حمض فسفوريك وسكر بالتبادل ويتصل بكل جزيء من جزيئات السكر قاعدة نيتروجينية إما من نوع البيورين أو البيرميدين ، والسكر الموجود بجزيء الحمض الرايبونيوكلتيدي (RNA) هو سكر الرايبوز بينما في جزيء الحمض الديؤكسي رايبونيوكلتيدي (DNA) فهو سكر الديؤكسي رايبوز....شكل (١) ، شكل (٢)



شكل (١) يوضح هيكل بناء الـ(DNA): مكون من حامض الفوسفوريك والسكر والقاعده النيتروجينيه.

شكل (٢) يوضح هيكل بناء الـ (**DNA**) أو الـ(**RNA**): تسلسل النيكليئوتيدات في الخيط



قاعده نيتروجينيه

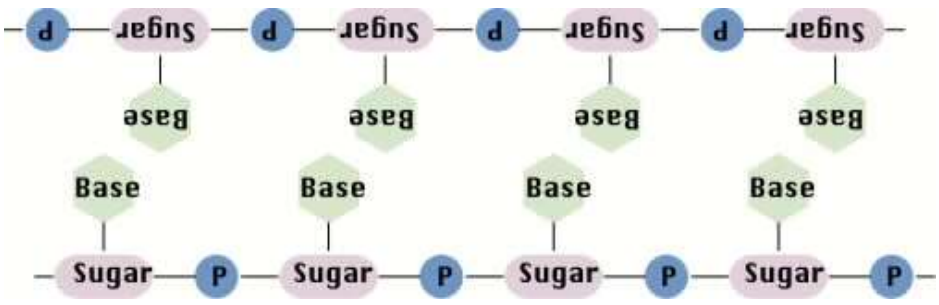
سكر خماسي

مجموعه فوسفاتيه ——— رباط استيري بين نيكليئودسن

مكونات ألاحماض النوويه :

يتكون حمض النووي من ثلاثة أنوع من المركبات كما ذكرنا:

- حمض الفسفوريك.
- سكر خماسي الكربون وهو سكر الرايبوز أو دي – أوكسي – رايبوز.
- وقواعد نيتروجينية تتبع البيورينات أو البيرميدينات .

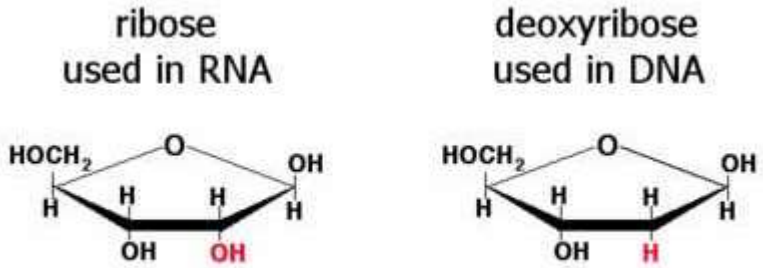


الشكل(٣) يبين بناء الاحماض النوويه

السكر الخماسي Pentose Sugar

يوجد بألاحماض النوويه نوعان من السكر الخماسي ، أحدهما هو ***رايبوز*** ويوجد في الـ (RNA) ، والثاني ديؤكسي رايبوز ويوجد في حمض (DNA) ، شكل (٤). ومن الخصائص الهامة للسكر الخماسي هو قدرة المجموعات الهيدروكسيلية (OH) على تكوين إسترات مع حمض الفسفوريك

شكل (٤) يوضح سكر الرايبوز والديؤكسي رايبوز



البيورينات والبيرميدينات Pruines & Pyrimidine

١/قواعد بيورينية :

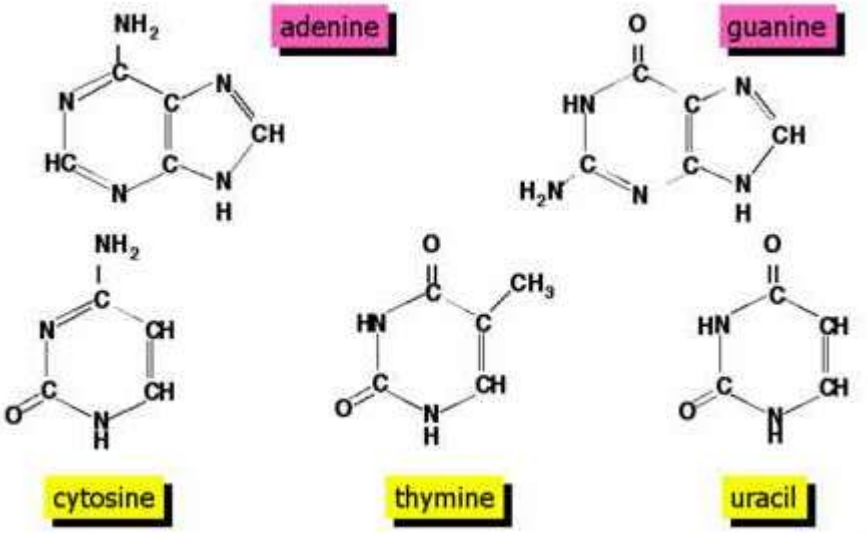
- ☒ أدينين Adenine
- ☒ جوانين Guanine

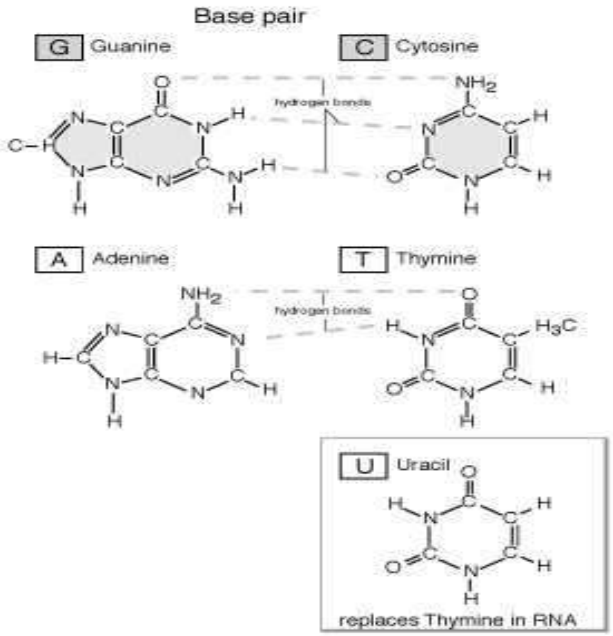
٢/ قواعد بيرميدينية : وهذه القواعد مشتقة من البيرميدين بإستبدال ذرات الهيدروجين

- ☒ سيتوزين Cytosine
- ☒ يوراسيل Uracil
- ☒ ثايمين Thymine

ويحتوي كلاً من الحمضيين النوويين DNA و RNA على القاعدتين الآزوتيتين من البيورين وهما الأدينين Adenine والجوانين Guanine ونجد أيضاً أن كلاً من الحمضيين النوويين DNA و RNA يحتوي على قاعدة نيتروجينيه من نوع البيرميدين وهي سايتوزين Cytosine ولكنهما يختلفان في القاعدة النيتروجينيه الثانية من نوع البيرميدين فبينما يحتوي الحمض النووي RNA على القاعدة النيتروجينيه يوراسيل Uracil يحتوي الحمض النووي DNA على القاعدة النيتروجينيه ثايمين Thymine شكل (٥)

شكل (٥): يوضح كل من القواعد النيتروجينية (البيورينية والبيرميدينية)



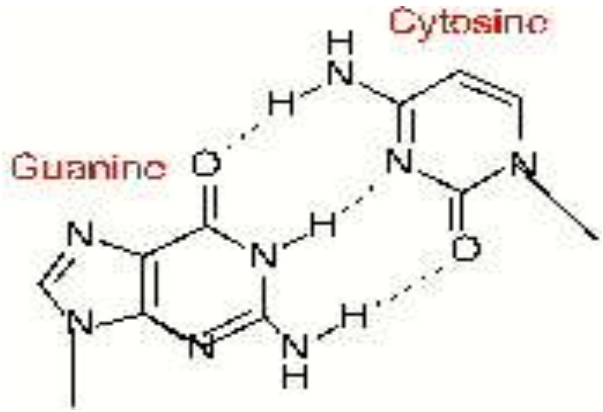


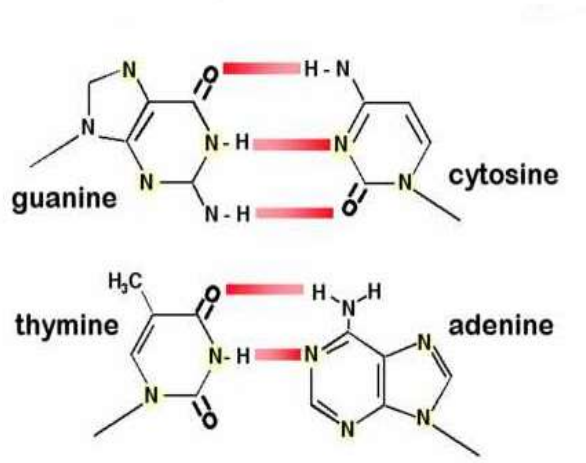
مجموعة الفوسفات Phosphate Group

ترتبط مجموعة الفوسفات بين مجموعات السكر الخماسية في سلاسل كل من الحمضين (DNA) و (RNA)

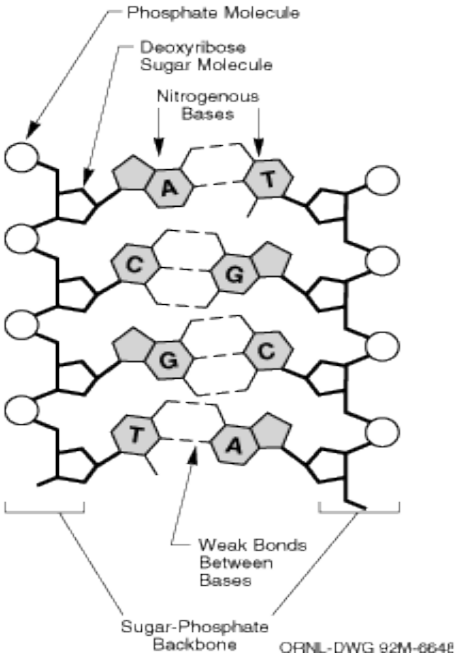
ويلاحظ أن السلسلتين المكونتين للشكل الحلزوني في الحمض النووي DNA متوازيتان ولكنهما معكوستان (Antiparallel) والقواعد الازوتية بهما مزدوجة (Paired) بنظام A مع T و G مع c وهذا التخصص في الازدواج يعتمد على الروابط الهيدروجينية بين القواعد الازوتية فنجد ثلاثة روابط هيدروجينية لكل زوج G - C ورابطتين هيدروجينيتين لكل زوج A – T . انظر شكل (٦) و شكل (٧)

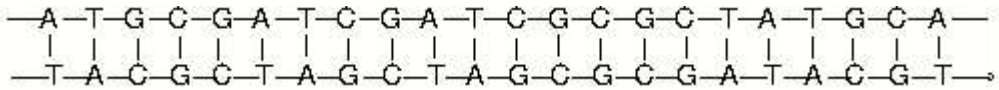
شكل (٦) نظام الروابط الهيدروجينية





شكل (٧) يوضح الترتيب الذي تسير عليه القواعد النيتروجينية





تركيب حامض RNA:

يكون الـ (RNA) بين ٥-١٠% من الوزن الكلي للخلية وهناك ٣ أنواع رئيسية من هذا الحامض النووي :

- RNA الرسول (Messenger RNA) يقوم بنقل الشفرة الوراثية من الجينات في النواة الى الرايبوسومات .
- RNA الرايبوسومي (Ribosomal RNA) يستخدم في انتاج الرايبوسومات في النوية داخل نواة الخلية .
- RNA الناقل (Transfer RNA) يقوم بنقل الحوامض الحوامض الامينية الى الرايبوسومات لاستخدامها في عملية بناء البروتينات .

ولكل نوع من الأنواع الثلاثة وزن جزيئي وتركيب خاص به من القواعد النيتروجينية. ويحتوي كلاً من الحمضيين النوويين DNA و RNA على القاعدتين النيتروجينيتين من البيورين وهما الأدينين Adenine والجوانين Guanine ونجد أيضاً أن كلاً من الحمضيين النوويين DNA و RNA يحتوي على قاعدة نيتروجينيته من نوع البيرميدين وهي سايتوزين Cytosine ولكنهما يختلفان في القاعدة النيتروجينية الثانية من نوع البيرميدين فبينما يحتوي الحمض النووي RNA على القاعدة النيتروجينيته يوراسيل Uracil يحتوي الحمض النووي DNA على القاعدة الآزوتية ثايمين Thymine.

ونتيجة الدراسات العديدة على أحماض النيوكليك بالأنسجة المختلفة وفي الكائنات الحية المتنوعة اتضح أن كمية DNA الموجودة في نويات الأنسجة المختلفة بأي كائن حي تكون ثابتة ولكنها تختلف من كائن لآخر ، ولم يلاحظ استثناء في هذه القاعدة إلا فيا لخلايا الجنسية التي تكون فردية الكروموسومات وفي هذه الحالة نجد أن كمية DNA الموجودة بها تكون نصف الكمية الموجودة بالخلايا الجسمية ، وفي الخلايا المتعددة الكروموسومات نجد أن كمية DNA تزداد تبعاً لتضاعف العدد الكروموسومي.

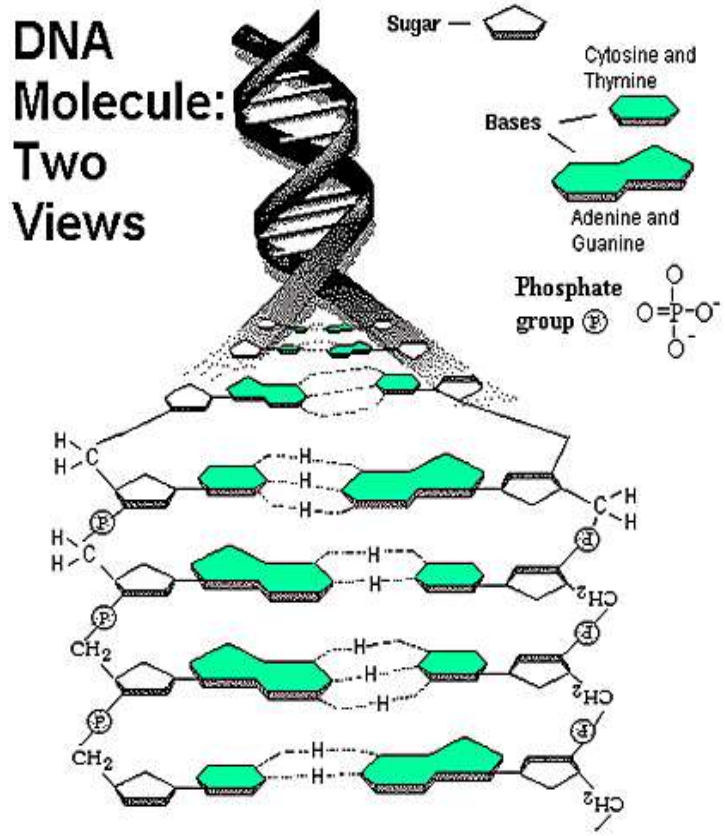
وعن طريق التحلل المائي وإستخدام طرق الكروموتوغرافيا المختلفة أمكن فصل القواعد النيتروجينية وتقدير كمية كل منهما ، كما استخدمت طرق أخرى، مثل تحليل منحنى الإنصهار وكثافة الطفو في تقدير كمية الجوانين والسيتوزين معاً ومن هذه الدراسات أمكن تقدير كمية كل من القواعد النيتروجينية في عدد كبير من أحماض الديؤكسي ريبو نيو كليك الموجودة بالكائنات الحية المختلفة.

تتابع النيوكليتيدات:

تعتبر طرق تقدير أنواع النيوكليتيدات وكمية كل منها في حمض DNA أسهل بكثير من طرق معرفة تتابع النيوكليتيدات أي ترتيبها في جزئ DNA ويحاول كثير من الباحثين التوصل إلى معرفة تتابع النيوكلتيدات في أحماض النيوكليك المختلفة لما لذلك من أهمية فائقة في فهم الكثير من طرق تنظيم العمليات الحيوية وما يؤدي ذلك إلى إمكان التحكم فيها أو تغييرها. وقد أستخدم في ذلك محموعة من طرق التحلل المائي الحمضي

والقاعدي وكذلك التحليل المائي باستخدام أنزيمات مختلفة التخصص ، ومن أهم الطرق المستخدمة في الوقت الحاضر طرق تعتمد على تحليل الجار الملاصق وطرق تعتمد على التهجين مما يوضح البناء الأولي للجزئ.

شكل(٨): يوضح تشكيل جزئ الـ DNA

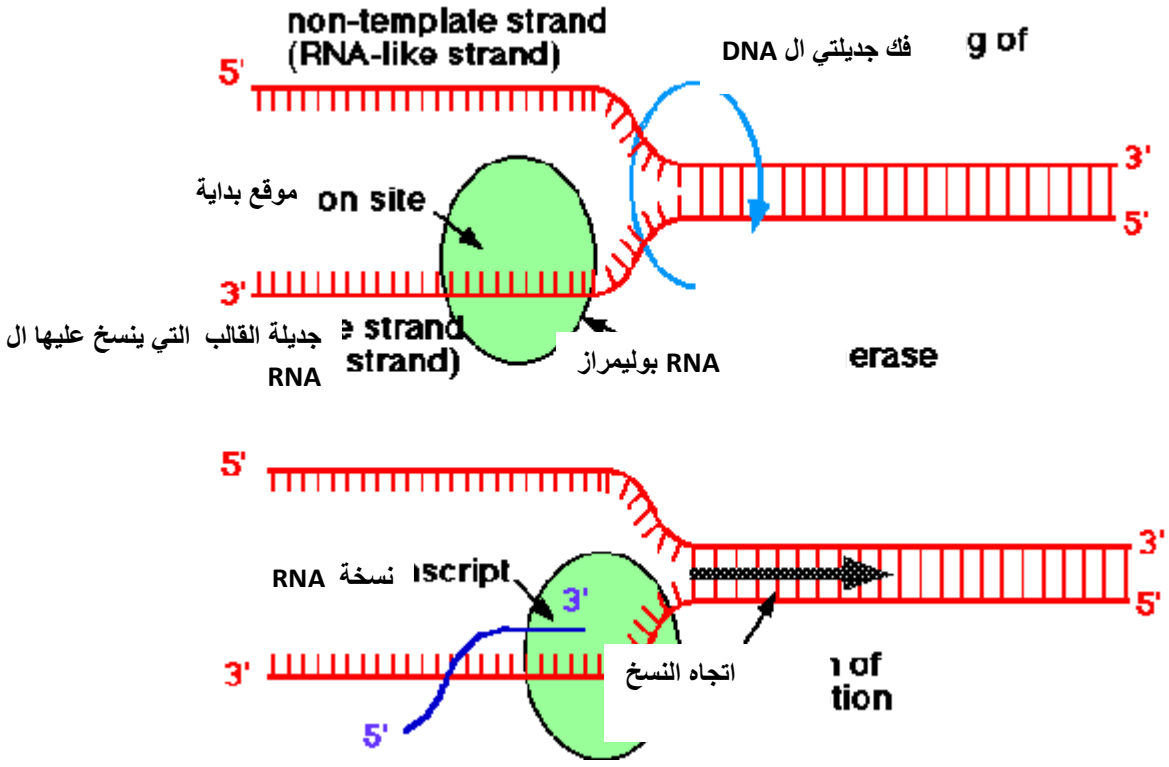


نسخ أل RNA عن الجين المعيّن يتم على النحو التالي:

١- إنزيم DNAase يفك سلسلتي أل DNA المؤلفتين للجين.

٢- إنزيم RNA بوليميراز يقوم بربط نوكلئوتيدات حرة إلى النوكلئوتيدات الموجودة في إحدى السلسلتين ، بحيث أنّ C يتحد مع G وأنّ U يتحد مع A . يقوم هذا الإنزيم بنسخ الجين من بدايته وحتى نهايته مكوناً جزيئات RNA فيها تسلسل من النوكلئوتيدات شبيه بالتسلسل الموجود في الجين مع اختلاف واحد هو أنّ القاعدة النيتروجينية U تأتي بدل القاعدة النيتروجينية T . هذا الإختلاف لا يغيّر من المعلومات الوراثية لأن أنظمة الخلية "تقرأ" هذين الرمزين وكانهما رمز واحد.

٣- تنفصل جزيئات ال RNA عن ال DNA وتنتقل إلى السيتوبلازما.



الإنزيم الذي ينسخ الجين يعرف أين يبدأ وأين يُنهي! فهنالك ثلاثيات من النوكلئوتيدات تشكل للإنزيم **موقع بداية لعملية النسخ (promotor)** وهنالك ثلاثيات تشكل للإنزيم **موقع نهاية لعملية النسخ (stop)**.

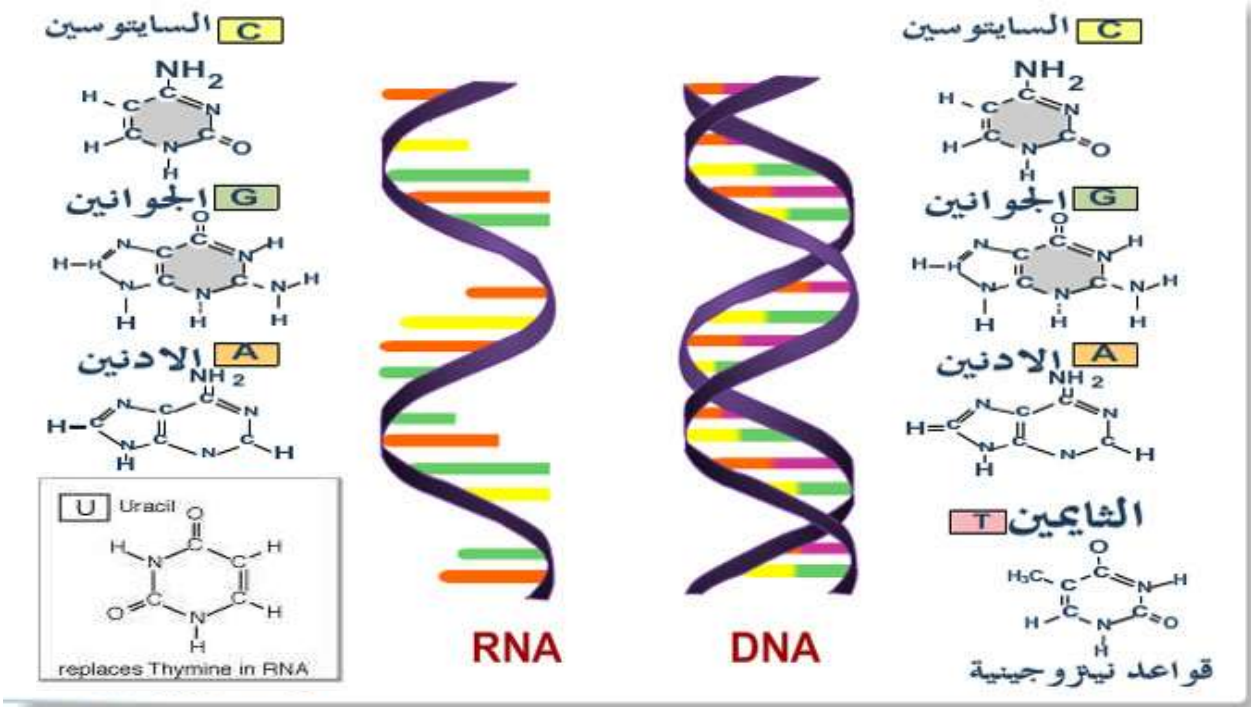
تحصل عمليةالنسخ على إحدى جديلتي ال DNA فقط.

صورة تبين التركيب الكيميائي للدنا.

يتكون الحمض النووي الريبي منقوص الأكسجين من سلسلتين متوازيتين تنتظمان على هيئة سلم ملتف لولبيا .(Double Helix) يتكون جانبا السلم اللولبي من تعاقب السكر خماسي وقاعدة الفوسفات بينما تتصل القواعد النيتروجينية من الداخل. تتكون الوحدة الأساسية لبناء جزيئة الدنا، والتي تسمى بالنيوكليوتيد من ثلاثة أجزاء، وهي:
.1السكرالخماسي)ريبوز) منقوص الأكسجين .
.2مجموعة فوسفات .
.3قاعدة (تخزن المعلومات في الدنا باستخدام هذه القواعد) وهي من نوعان :
.1اثنتان من البيورينات (Purines) وهما :
.1أدينين Adenine وتختصر A
.2جوانين Guanine وتختصر G
.2اثنتان من البايريميدينات (Pyrimidines) وهما :
.1الثايمين Thymine وتختصر T
.2السايتوسين Cytosine وتختصر C
ترتبط جزيئات السكر في الدنا برابطة فوسفاتية ((Phosphodiester Bond :في كل من ذرات الكربون الثالثة والخامسة، بينما ترتبط القاعدة النيتروجينية بذرة الكربون الأولى للسكر الخماسي. ترتبط القواعد ببعضها برابطة هيدروجينية (Hydrogen : .(Bondترتبط القواعد مع بعضها بشكل منظم بحيث ترتبط القاعدة أدينين مع القاعدة ثايمين في السلسلة المقابلة برابطة هيدروجينية ثنائية، بينما يرتبط الكوانين مع السايتوسين برابطة هيدروجينية ثلاثية.
تسمى أحد سلسلتي الدنا بالنهاية الخامسة (ويرمز لها ٥') وذلك لعدم ارتباط ذرة الكربون الخامسة بسكر خماسي، بينما السلسلة الأخرى تسمى بالنهاية الثالثة (٣') ولنفس السبب السابق. وتلتقي السلسلتان بشكل متواز و عكسي (بالإنجليزية : (Antiparallel، بحيث أن ٥' يقابلها على السلسلة المتوازية ٣'.
يلتف الدنا (DNA) حول نفسه التفافاً لولبياً و هو ما يعرف باسم الالتفاف المفرط وقد يكون هذا الالتفاف بنفس اتجاه التفاف سلسلتي الدنا مما يجعل القواعد قريبة من بعضها بشكل كبير ويسمى التفافاً مفرطاً إيجابياً. أما إذا كان هذا الالتفاف بعكس اتجاه التفاف سلسلتي الدنا فيسمى التفافاً مفرطاً سلبياً وتكون القواعد متباعدة عن بعضها ومعظم الخلايا تظهر هذا النوع من الالتفاف المفرط.

صوة توضح الرنا مع قواعده النتروجينية في اليسار. والدنا في اليمين.

الحمض الريبي النووي أو الحَرْن(Ribonucleic acid :، اختصاره رنا RNA أو آر إن إيه) عبارة عن بوليمر حمضي نووي مؤلف من ارتباط تكافؤي لمجموعة من النيكليوتيدات . تتميز نيكليوتيدات الرنا عن نيكليوتيدات الدنا بأنها تحوي حلقة ريبوز كما تضم يوراسيل، في حين تحوي نيكليوتيدات الدنا ريبوز منقوص الأكسجين (بالإنجليزية (Deoxyribose : وثايمين. يتم تخليق الحمض الووي الريبي عن طريق عملية النسخ الوراثة اعتماداً على بنية المورثات في الدنا بوساطة أنزيمات تدعى رنا بوليميراز ثم تجرى عليها تعديلات أخرى بوساطة انزيمات أخرى. تعمل الرنا كقالب لترجمة الجينات إلى بروتينات، وأيضا كناقل للحموض الأمينية إلى الريبوسومات لتشكيل البروتينات، وأيضا هو مكون أساسي في بنية الريبوسوم.



الانزيمات وتضاعفDNA

يتطلب نسخ DNA تكامل نشاط عدد من الأنزيمات والبروتينات فى الخلية . ولكى يتم النسخ يتعين حدوث ما يلى:

1- ينفك التفاف اللولب المزدوج.

2-تتحرك أنزيمات اللولب DNA- helicases على امتداد اللولب المزدوج فاصلة الشريطان عن بعضهما البعض وذلك بكسر الروابط الهيدروجينية الموجودة بين القواعد المتزاوجة فى الشريطين وتتحرك انزيمات اللولب فى اتجاه النهاية َ٣ لأحد الشريطين والنهاية َ٥ للشريط الأخر وذلك لأن شريطى لولب DNAA المزدوج متوازيان عكسيا أى أن احدهما يكون فى اتجاه َ٥ إلى ً٣، بينما الشريط المتزاوج معه يتوجه فى الاتجاه المعاكس أى فى اتحاه َ٣ إلى َ٥.

3-يبتعد الشريطان بعضهما عن بعض لتعريض القواعد لتتمكن من تكوين روابط هيدروجينية مع نيوكليوتيدات جديدة.

4- بالنسبة للشريط القالب َ٣ - َ٥ ليست هناك مشكلة حيث أن أنزيم البلمرة يتبع أنزيم اللولب مباشرة مضفيا نيوكليوتيدات جديدة إلى النهاية َ٣ . إلا أن ذلك لا يحدث بالنسبة للشريط الآخر المعاكس وذلك لأن انزيم البلمرة لا يعمل فى اتجاه َ٣ - َ٥ ولذا فأن هذا الشريط يتم بناؤه على شكل قطع صغيرة فى اتجاه َ٥ - َ٣ بواسطة إنزيم البلمرة ثم ترتبط هذه القطع الصغيرة مع بعضها بواسطة أنزيم الربط Ligase – DNA

إنزيمات البلمرة DNA Polymerase إنزيمات الربطLigase DNA

1-يكون الشريط الجديد بإضافة نيوكليوتيدات واحدة بعد الأخرى من َ٥ إلى َ٣ للشريط الجديد.

2-يعمل فى نفس اتجاه إنزيمات اللولب.

3-يتبع أنزيم اللولب مباشرة -1 .يكون الشريط الجديد بربط قطع صغيرة من النيوكليوتيدات من َ٥ إلى َ٣ للشريط الجديد.

إصلاح عيوبDNA

كل المركبات البيولوجية التى توجد على شكل بوليمرات (مركبات طويلة تتكون من وحدات بنائية متكررة كالنشا والبروتين ، والأحماض النووية)معرضة للتلف

عوامل حدوث تلف جزئ: DNA

١- البيئة المائية فى داخل الخلية.
٢-المركبات الكيميائية.
٣- الإشعاع
٤- حرارة الجسم حيث يقدر أن حوالى ٥٠٠٠ قاعدة بيورينية (أدينين وجوانين) تفقد كل يوم من DNA الموجود فى الخلية البشرية . وذلك لأن الحرارة تعمل على كسر الروابط التساهمية التى تربط السكريات الخماسيه.

كيفية عمل انزيمات للربط:

١-تعمل فى تناغم للتعرف على المنطقة التالفة من جزئ. DNA
٢-تستبدل النيوكليوتيدات التالفة بنيوكليوتيدات جديدة تتزاوج مع تلك الموجودة على الشريط المقابل فى الجزء التالف

الانزيمات المساهمه في تضاعفDAN

مجموعه انزيمات تشارك بشكل اساسي في نسخ (تضاعف) شريط ال DNA

المفرد لتخلق شريط مفرد مقابله بناء على قاعده الاستكماليه ان ال DNApolymerase في حقيقيات النووي يشارك في عمليات تضاعف الصبغات

اصلاح الصبغات اعادة التشكيل ومضاعفة DNAالمصورات الحيويه

الDNApolymeraseأنزيم متخصص في نسخ شريط RNAالمفرده حيث

يضيف النكليوتيدات العاديه الى النهايه ٣ التابعه لشريط RNAالجديد النامي.

يتم ذلك عن طريق rNTP أي الريبونكليوتيد ثلاثي الفوسفات كركيزه اوليه.

للRNA polmerase. ثلاثة انماط

*RNA polymeraseIوهو متخصص في تخليق نمط واحد من الRNA الاولي

*RNA IIوهو متخصص في عمليات استنساخ الDNA(التعبير)

*RNA polymerase IIIوهو متخصص في انتاج جزيئات الRNA الصغيره

كRNAt الناقل وRNAr الريبوزومي

DNAases: الاننزيمات التي تقوم بتفكيك الDNA.

RNAases: الانزيمات التي تقوم بتقكيك الRNA

الطفرة الوراثية

يؤدي حدوث أي خطأ في ترتيب أو تسلسل القواعد النيتروجينية في جزيء DNA إلى تغيير المعلومات الوراثية، فينتج عن ذلك بما يسمى بالطفرة، كما يؤدي هذا التغير في الخلايا الجسدية إلى خلل لدى الفرد الذي حدث له ذلك التغيير، وفي حالة حصول الطفرة الوراثية في الخلايا الجنسية يصبح بالإمكان نقل هذه الطفرة من جيل لاخر، وذلك يؤدي إلى ظهور الأمراض الوراثية.

عوامل حدوث الطفرة الوراثية

١. عوامل داخلية: أثناء عملية التضاعف يقوم إنزيم التضاعف بوضع النيوكليوتيدات في غير موضعها الصحيح، وتنتج الطفرة عند عدم قدرة الخلايا على إصلاح كافة الأخطاء الناتجة عن ذلك.
٢. عوامل خارجية: كالإشعاعات المختلفة، وبعض المواد الكيميائية، أو بعض أنواع الفيروسات التي تؤدي إلى إحداث تغيير في تركيب القواعد النيتروجينية لجزيء DNA.

و تكمن خطورة هذه الطفرات عند حصولها في الجينات الموجودة على الكروموسومات، مما يؤدي إلى التأثير على عملها أو إيقاف عملها بشكل تام، فيسبب ذلك حدوث الاختلال في الوظائف المتربطة بهذه الجينات وظهور لعديد من الأمراض.

التفاعلات البوليميرية المتسلسلة(تقنية PCR)

هي تقنية مخبريه تم اكتشافها عام ١٩٨٣م 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 من محددة من الحمض النووي و مضاعفة إنتاجها لكي يتسنى إجرى عليه اختبارات و فحوصات إضافية

شكل (9) انواع من الاجهزة المستعملة في تقنية PCR

ما هي متطلباتPCR :

لتقوم بإنتاج الحمض النووي (DNA) بواسطة PCR يتتطلب عليك توفير :

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

٢. البوليمريز : وهو الإنزيم الذي يقوم ببناء وترتيب القواعد النيتروجينية (حدات الحمض النووي (DNA)) ، ويجب أن يكون هذا الإنزيم مقاوم للحرارة العالية ليتمكن من العمل . و قد اكتشف انزيم مقاوم للحرارة و اسم تاج Tag

٣. مجموعة متفرقة من القواعد النيتروجينية: (A T C G) ليتمكن الإنزيم من ترتيبها في مواقعها أثناء عملية نسخ الحمض النووي (DNA) .

٤. بريمر Primer : وهو قطعة صغيرة من الحمض النووي (DNA) ليتمكن الإنزيم من بداء البناء و النسخ عليها .

٥. والشيء الأهم هو وجود نسخة من الحمض النووي (DNA) المراد نسخه .

٦. بالإضافة إلى محلول أو وسط ليتم به التفاعل : وهذا المحلول يختلف بين تفاعل و أخر

عملية النسخ :

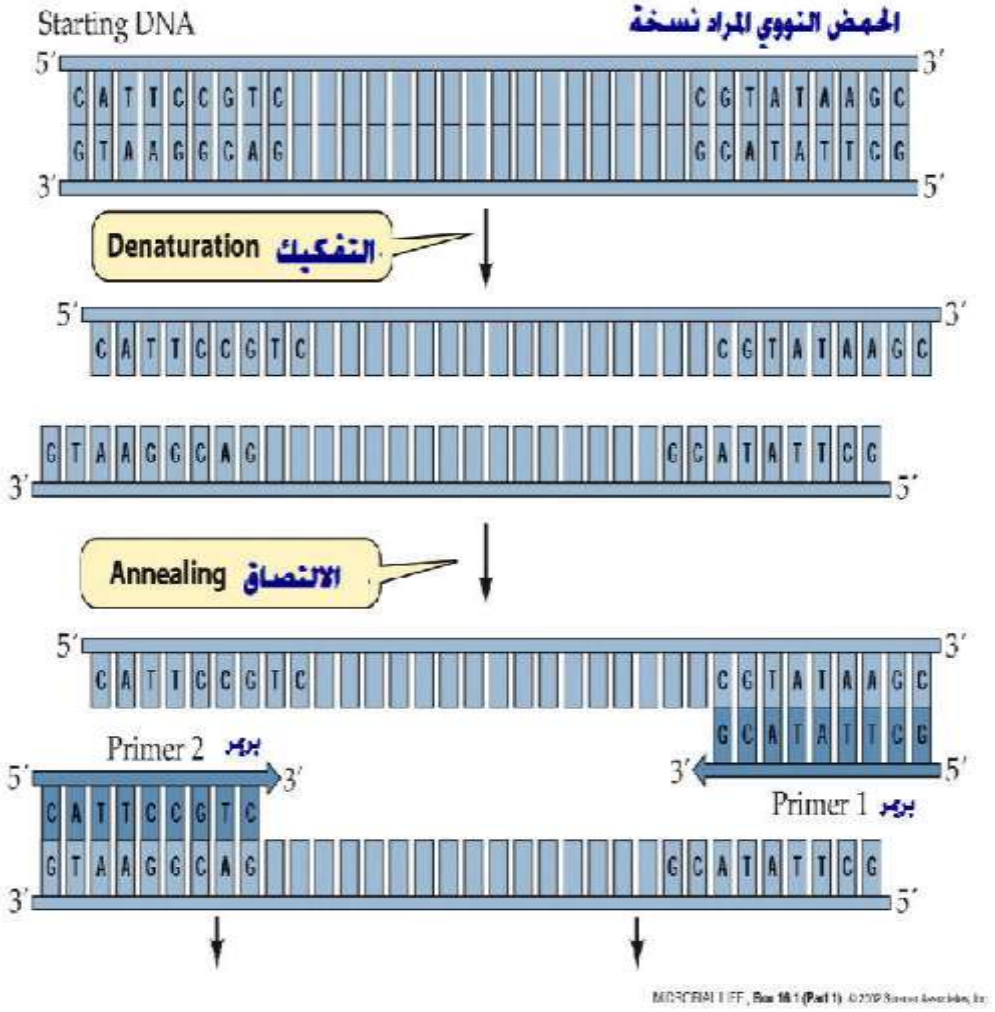
بعد وضع الحمض النووي المراد نسخة مع البريمر و و إنزيم البوليمريز و مجموعة مع الأحماض النووية في أنبوب داخل جهاز التحكم الحراري فان هناك ٣ مراحل منفصلة تمر بها عملية النسخ:

١. مرحلة التفكيك Denature : رفع الحرارة إلى ٩٤ ْم وذلك لفك الحمض النووي (DNA) الأصل .

٢. مرحلة الالتصاق anneal : إنزال الحرارة إلى ما بين ٥٥-٦٠ ْم ليقوم البريمر بالألتزاق فيزيائياً بواسطة الروابط الهيدروجينية مع الحمض النووي (DNA) الأصل .

٣. مرحلة الامتداد extend : ثم يقوم برفع درجة الحرارة إلى ٧٥ ْم ليقوم البلمريز بعمله في بناء الحمض النووي (DNA) الجديد .

وهذه المراحل الثلاث تعتبر دورة كاملة وفيها يصبح الحمض النووي (DNA) الأصل قد تضاعف ، وتعتمد كمية ناتج الحمض النووي (DNA) على عدد الدورات (والصورة التالية توضح العملية) .



تطبيقات PCR :

لتقنية PCR تطبيقات كثيرة في مجال أبحاث الحمض النووي (DNA) و الوراثة ومنها

١. الكشف عن الطفرات الوراثية : وذلك عن طريق وضع بريمر خاص للطفرة لتكثير الجين الخاص بها . ومنه نقوم بمعرفة المرض إذا كان على زوجين الكروموسومات أو على احدهما (allele) .

٢. تعين البصمة الوراثية .

٣.الكشف عن الفيروسات : وهذه الطريق هي الأدق في تحديد نوع وجنس الفيروس وكميته.

٤. هو العنصر الأهم في عملية التجميع الجيني (Recombinant الحمض النووي (DNA)) : حيث نقوم بتكثير الجين المراد إدخاله على البلازمد أو الحمض النووي (DNA) المضيف .

٥. استخدامه في تغير نهايات الجين لتصبح متوافقة مع إنزيمات القطع (Restriction enzyme) .

٦. هو العملية الأساس في تحديد تتابع القواعد النيتروجينية في الحمض النووي (DNA) (الحمض النووي (Sequencer (DNA) .

٧. معرفة طول الحمض النووي (DNA) .

٨. تقنية الحمض النووي (DNA) المكمل (cالحمض النووي (DNA)) .

٩. تحديد الجين المطلوب من خليط من الجينات .

١٠. يستخدم في تقنية (microarrays).

١١. في مشروع الخارطة الجينية البشرية (human genome project) .

١٢. الساوثرين بلوت (southern plot) .

١٣. تقنية ارتباط الحمض النووي (DNA) – بروتين (الحمض النووي (- (DNA Protein Interaction) .

١٤. في مجال الطب الشرعي (اختبار الأمومة ، حالات الاغتصاب ، تحديد الهوية ... الخ) .

أنواع PCR : هناك نوعان من PCR :

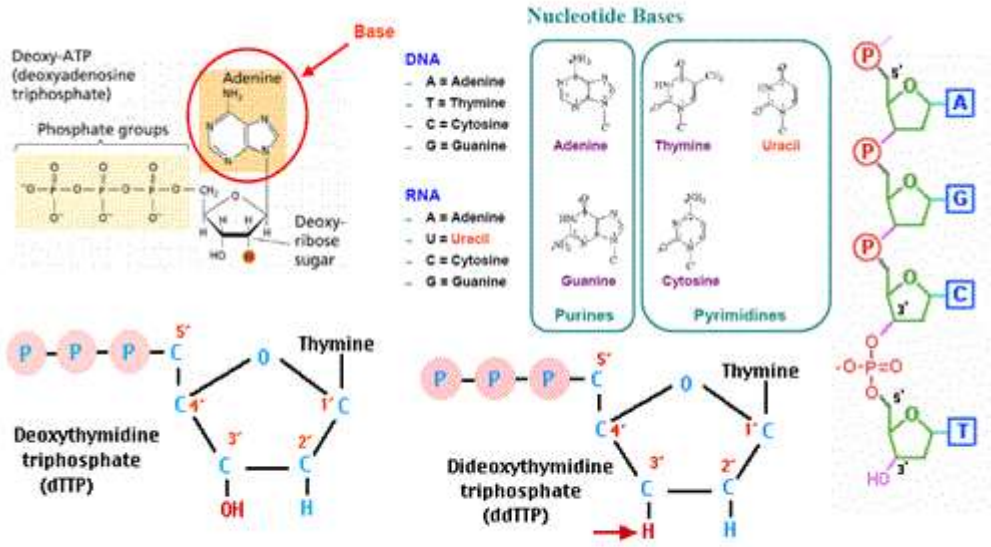
١. PCR العادي : وهو ما تم شرحه والتطرق اليه في الخطوات السابقة .

٢. rtPCR : وهو اختصار لـ (Real Time PCR) : وهذا النوع يقوم على نفس المبدأ ولكن الخلاف الوحيد يكون مربتط الجهاز بكمبيوتر لتحديد الوقت الحقيقي لبدا التفاعل ومن ثم الكمية الحقيقية لعدد نسخ الحمض النووي (DNA) ويعتمد ذلك على وجود قواعد نيتروجينية حرة مشعة لتحديد ذلك . مما يسهل على الباحثين الوقت لتحدد وجود الجين المطلوب أو لا ، وكمية الجين بدون الوصول إلى نهاية الدورات الحرارية المحددة .

التطبيقات السريريه المتقدمه لتكنلوجيه ال pcr في الوراثه الجزيئيه والسرطان

مع دخولنا الألفية الجديدة سيكون لتطبيقات تقانات الدنا (DNA) (موضح تركيبه في الشكل ١) في مجال الوراثيات الجزيئية مردود عظيم في خدمة الإنسانية، لا سيما مع ظهور تطبيقات المُعالَجَةُ الجِينيَّةgene therapy على الإنسان، وخاصةً في مجال تحري الطفرات المسببة للأمراض، والذي طُبق عملياً حتى قبل الولادة، وتنفيذ التحري الوراثي أيضاً على الأفراد قبل ظهور الأعراض بهدف كشف العوامل الممرضة المعدية بحساسية عالية، لا سيما الفيروسات وتعيين نمطها الجيني، مما يسهل تحديد مسار المعالجة بنجاعة.

حالياً نحى العلم الجزيئي باتجاه تحري الأمراض الناجمة عن طفرات جينات عدة، كما هو في السرطانات، وكذلك تعيين هوية أعداد متزايدة من الأمراض الوراثية الناجمة عن تعدد الأشكال النُوكْلِيُوتيدية المفردة (SNPs) single nucleotide polymorphisms



الشكل 1: تركيب الأحماض الريبية النووية.

سنعرض في هذه المراجعة لأهم التطبيقات الحديثة للطرق الوراثية الجزيئية:

١-التعرف على الرَوامز الوراثية- تعيين تسلسل الدنا DNA sequencing:

تتمثل الإجابة في أربع نقاط:
١- لإيجاد الجينات بطريقة أسرع وأسهل؛
٢- لمعرفة عمل هذه الجينات ومدى ارتباطها مع بعضها البعض وتداخلها معاً؛
٣- بما أن مناطق الجينات تمثل أقل من ٢٥% من حجم المجين البشري، فإن معرفة الروامز كاملة ستمكننا من دراسة المناطق المحيطة بالجينات، مما قد يسهل معرفة سبل تنشيط الجينات وإيقاف عملها؛
٤- لمساعدة الأطباء في تشخيص أكثر دقة للتركيبة الوراثية للمريض.

٢. تفاعل سلسله البوليميراز Polymerase chain (PCR) Reaction

ساهمت طريقة الـ PCR منذ اكتشافها بإحداث ثورة في البحوث التطبيقية، ففي عام ١٩٩٣ مُنح Mullis جائزة نوبل في الكيمياء لتطويره هذه الطريقة، ولقد أدى إدخال إنزيم البوليميراز من جرثومة الينابيع الحارة Thermus Aquaticus وتطوير أجهزة مؤتمتة، تؤدي تحاليل دقيقة إلى جعل تفاعل الـ PCR نوعياً جداً. ولاحقاً أدى استخدام تقانة الـ) PCR الشكل ٣) في تضخيم مكان معين من المجين البشري إلى إدخالها في طرق لها استخدامات واسعة في مجال البحث العلمي تتضمن: تشخيص الأمراض الوراثية البشرية، تعيين الهوية البيولوجية، تشخيص الأمراض المعدية وتدبيرها، تشخيص الأمراض الدموية وتحديد مراحلها، واختبارات تقصي اختطار الإصابة بالسرطان.
على الرغم من أن العديد وربما غالبية تقانات تحري الطفرات تعتمد على طريقة التفاعل سلسلة البوليميراز للـ(DNA (PCR ، إلا أن الغالبية العظمى من الطرق، وحتى الـPCR ، لا يمكن أن تكشف الطفرة الفعلية (كتتالي نوكليوتيدات). على كل حالٍ هنالك طرق تقوم على تعديل الـ PCR يمكن اعتمادها كنظام تحري طفرات أولي، حيث يختلف تصميم نظم التحليل باختلاف درجة التغايرية Heterogeneity الأليلية أو الاختلاف في عدد الطفرات للجين الواحدة.

المصادر:

1. ^ "deoxyribonucleic acid". Merriam-Webster Dictionary.
2. ^ Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P (2014). Molecular Biology of the Cell (6th ed.). Garland. p. Chapter 4: DNA, Chromosomes and Genomes. ISBN 9780815344322.
3. ^ Purcell A. "DNA". Basic Biology.
4. ^ Nuwer R (18 July 2015). "Counting All the DNA on Earth". The New York Times. New York: The New York Times Company. ISSN 0362-4331. Retrieved 2015-07-18.
5. ^ "The Biosphere: Diversity of Life". Aspen Global Change Institute. Basalt, CO. Retrieved 2015-07-19.
6. ^ Russell P (2001). iGenetics. New York: Benjamin Cummings. ISBN 0-8053-4553-1.
7. ^ Mashaghi A, Katan A (2013). "A physicist's view of DNA". De Physicus. **24e** (3): 59–61. arXiv:1311.2545v1. Bibcode:2013arXiv1311.2545M.
8. ^ Saenger W (1984). Principles of Nucleic Acid Structure. New York: Springer-Verlag. ISBN 0-387-90762-9.
9. ^ [a] [b] Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Peter W (2002). Molecular Biology of the Cell (Fourth ed.). New York and London: Garland Science. ISBN 0-8153-3218-1. OCLC 145080076.
10. ^ Irobalieva RN, Fogg JM, Catanese DJ, Catanese DJ, Sutthibutpong T, Chen M, Barker AK, Ludtke SJ, Harris SA, Schmid MF, Chiu W, Zechiedrich L (October 2015). "Structural diversity of supercoiled DNA". Nature Communications. **6**: 8440. doi:10.1038/ncomms9440. PMC 4608029. PMID 26455586.

11.^ [a] [b] [c] Watson JD, Crick FH (April 1953). "Molecular structure of nucleic acids; a structure for deoxyribose nucleic acid" (PDF). Nature. **171** (4356): 737–8. Bibcode:1953Natur.171..737W. doi:10.1038/171737a0. PMID 13054692.

12.^ Mandelkern M, Elias JG, Eden D, Crothers DM (October 1981). "The dimensions of DNA in solution". Journal of Molecular Biology. **152** (1): 153–61. doi:10.1016/0022-2836(81)90099-1. PMID 7338906.

13.^ Gregory SG, Barlow KF, McLay KE, Kaul R, Swarbreck D, Dunham A, et al. (May 2006). "The DNA sequence and biological annotation of human chromosome 1". Nature. **441** (7091): 315–21. Bibcode:2006Natur.441..315G. doi:10.1038/nature04727. PMID 16710414.

14.^ Watson JD, Crick FH (April 1953). "Molecular structure of nucleic acids; a structure for deoxyribose nucleic acid" (PDF). Nature. **171** (4356): 737–8. Bibcode:1953Natur.171..737W. doi:10.1038/171737a0. PMID 13054692.

15.^ [a] [b] [c] Berg J., Tymoczko J. and Stryer L. (2002) Biochemistry. W. H. Freeman and Company ISBN 0-7167-4955-6

16.^ Abbreviations and Symbols for Nucleic Acids, Polynucleotides and their ConstituentsIUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclature (CBN). Retrieved 3 January 2006.

17.^ [a] [b] Ghosh A, Bansal M (April 2003). "A glossary of DNA structures from A to Z". Acta Crystallographica. Section D, Biological Crystallography. **59** (Pt 4): 620–6. doi:10.1107/S0907444903003251. PMID 12657780.

18.^ Created from PDB 1D65

19.^ Yakovchuk P, Protozanova E, Frank-Kamenetskii MD (2006). "Base-stacking and base-pairing contributions into thermal stability of the DNA double helix". Nucleic Acids Research. **34** (2): 564–74. doi:10.1093/nar/gkj454. PMC 1360284. PMID 16449200.

20.^ Burton E. Tropp - "Molecular Biology"- Jones and Barlett Learning, ISBN 978-0-7637-8663-2

21.^ "Watson-Crick Structure of DNA - 1953". Steven Carr. Memorial University of Newfoundland. Retrieved 13 July 2016.

22.^ Verma S, Eckstein F (1998). "Modified oligonucleotides: synthesis and strategy for users". Annual Review of Biochemistry. **67**: 99–134. doi:10.1146/annurev.biochem.67.1.99. PMID 9759484.