الأكاديمية العربية الدولية
Arab International Academy

# علم البيولوجيا الجزيئية

# Molecular Biology

---


سرحان محمد

كلية الصحة – علم التغذية

# المحاور

- المقدمة
- تاريخ علم الأحياء الجزيئي
- العلاقة بعلوم الأحياء الأخرى على المستوى الجزيئي
- تقنيات الأحياء الجزئية
- الخلايا
- DNA
- الكرموسوم

# المحاور

- البروتينات
- RNA
- الاحماض الامينية
- قياس DNA
- PCR
- الرحلان الكهربائي
- روابط خارجية
- المراجع

# المخرجات المتوقعة من الدرس

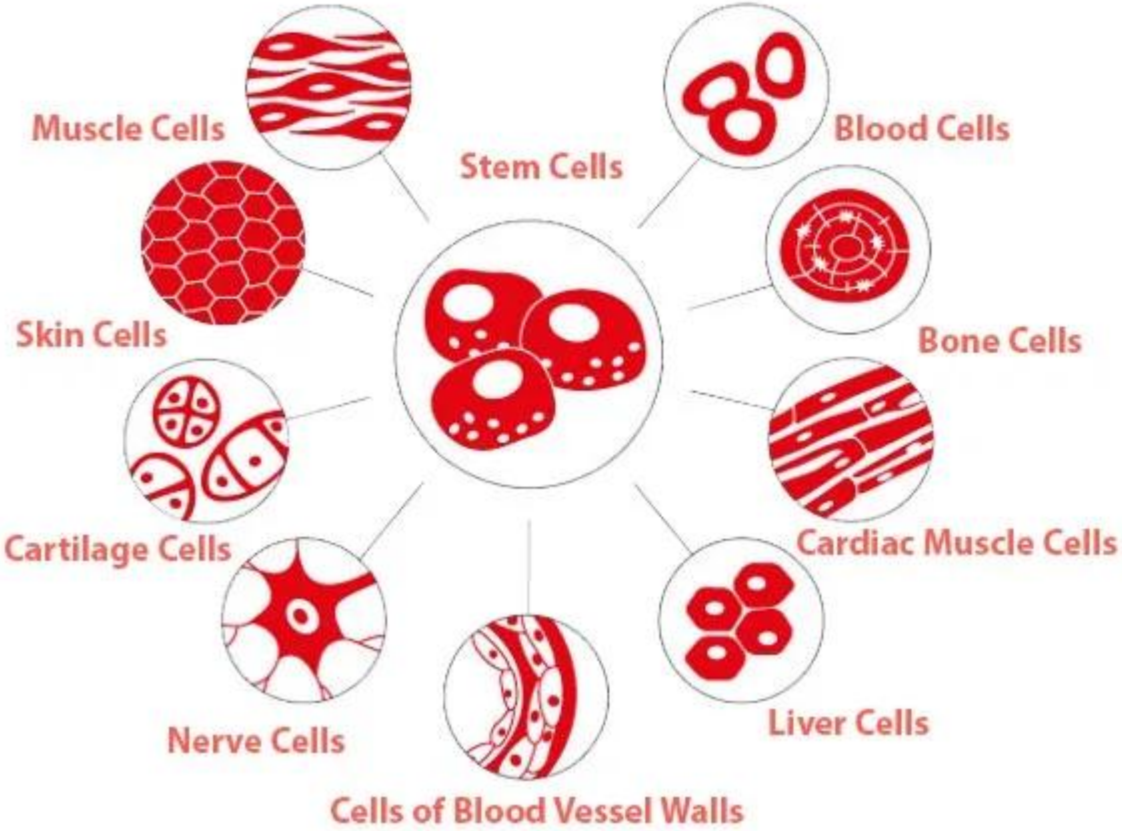
- التعرف على النقاط الاتية:

1. الكرموسوم
2. RNA
3. DNA
4. PCR
5. الاحماض الامينية

# الخلايا Cells

تمثل وحدات العمل الرئيسية في جميع نظم الحياة.

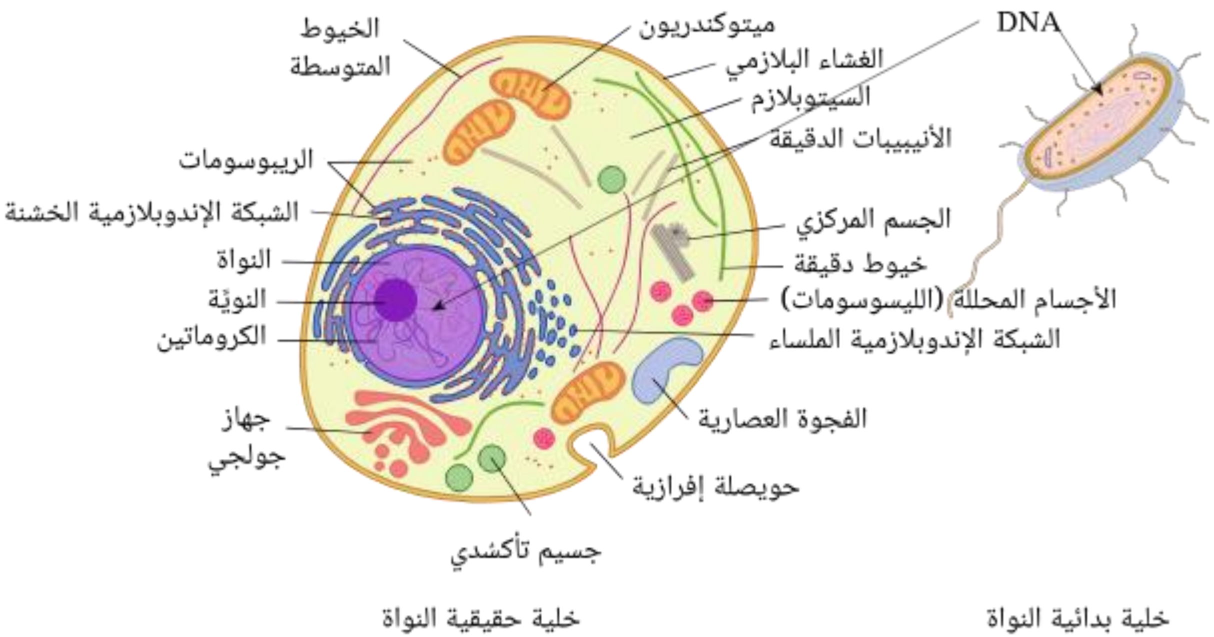
كل كائن حي يمتلك نوعا معين من الخلايا يختلف جذريا عن باقي الخلايا الأخرى.



# الخلايا Cells

- أنواع الخلايا

1. خلايا بدائية النواة ( prokaryotic cells) تمثل الكائنات البدائية النواة Mycoplasma
2. خلايا حقيقية النواة ( eukaryotic cells) تحتوي على الحمض النووي داخل النواة تمثل الكائنات حقيقة النواة




**الشكل 1**: شكل يوضح التركيب الأساسي للخلية حقيقية النواة والخلية بدائية النواة مع تمييز موقع الحمض النووي (DNA) في كل منها.

# الخلايا Cells

- الصفات المشتركة بين الكائنات الحية

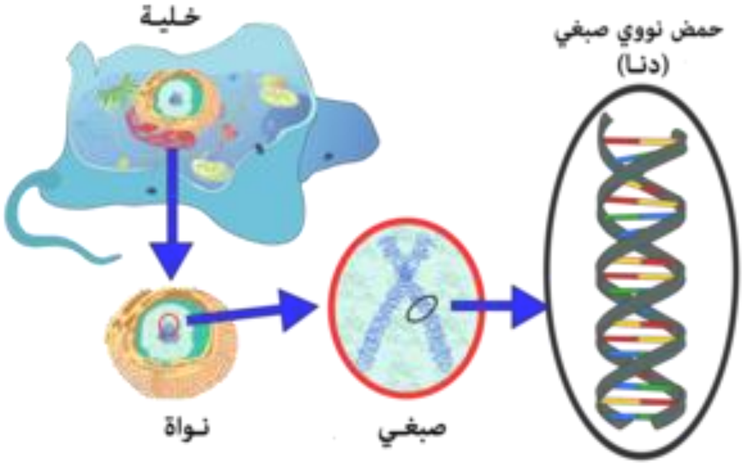
I. الطاقة الكيميائية تكون مخزونة على شكل ATP.
II. المعلومات الوراثية تكون مشفرة بواسطة DNA.
III. تتم عملية نقل المعلومات الوراثية من خلال RNA.
IV. تتضمن الرايبوسومات في علمية الترجمة.
V. تكون طرق التمثيل الغذائي مشتركة.
VI. تكون البروتينات متشابهة بين الكائنات الحية المختلفة.

# الخلايا Cells

- تقوم الحياة على 3 جزيئات

1- DNA (Deoxyribonucleic acid) يضم معلومات عن كيفية عمل الخلية.

2- RNA (Ribonucleic acid) يعمل على ترجمة المعلومات المخزونة في DNA الى بروتين من خلال نسخ هذه المعلومات ثم تحويلها الى بروتين.




3- البروتينات (Proteins) تكون الأنزيمات التي تعمل على ارسال إشارات إلى خلايا أخرى وتنظم نشاط الجينات وكذلك تكون اجسامنا التي تعتبر اكبر كتله بروتينية.

# DNA

- تركيب الحمض النووي DNA

- يتكون DNA من هيكل حلزوني مزدوج والذي يتركب من

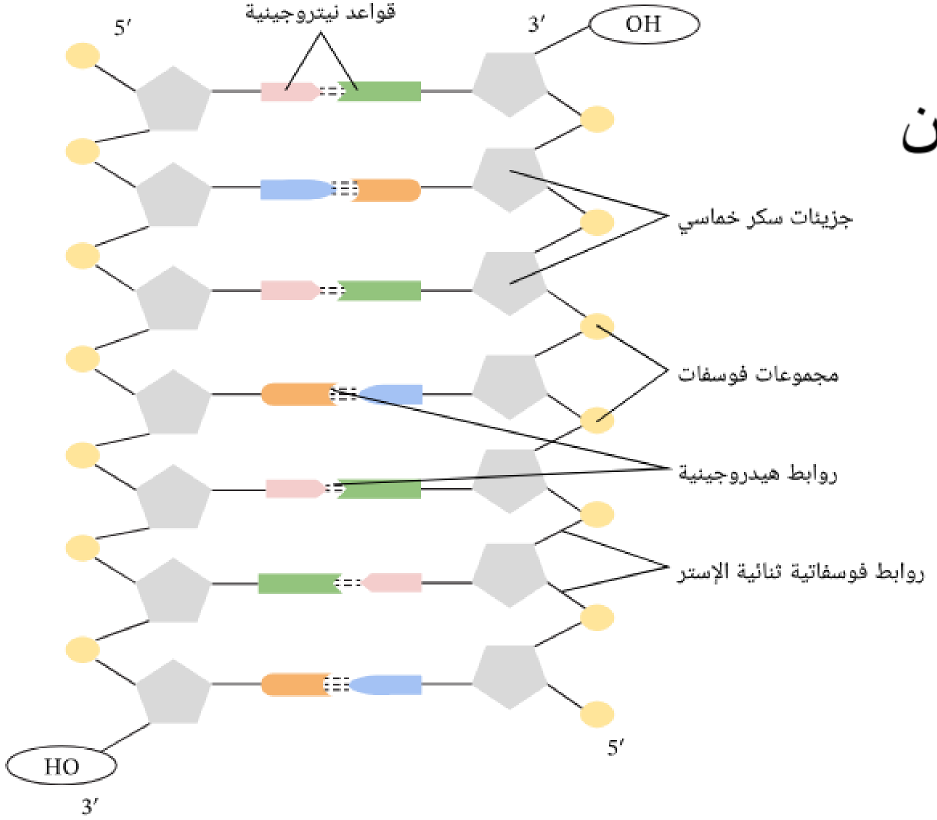
✓جزيئة سكر

✓مجموعة فوسفات

✓قاعدة ناتروجينية

نستطيع قراءة سلسلة الحمض النووي من 5 الى 3

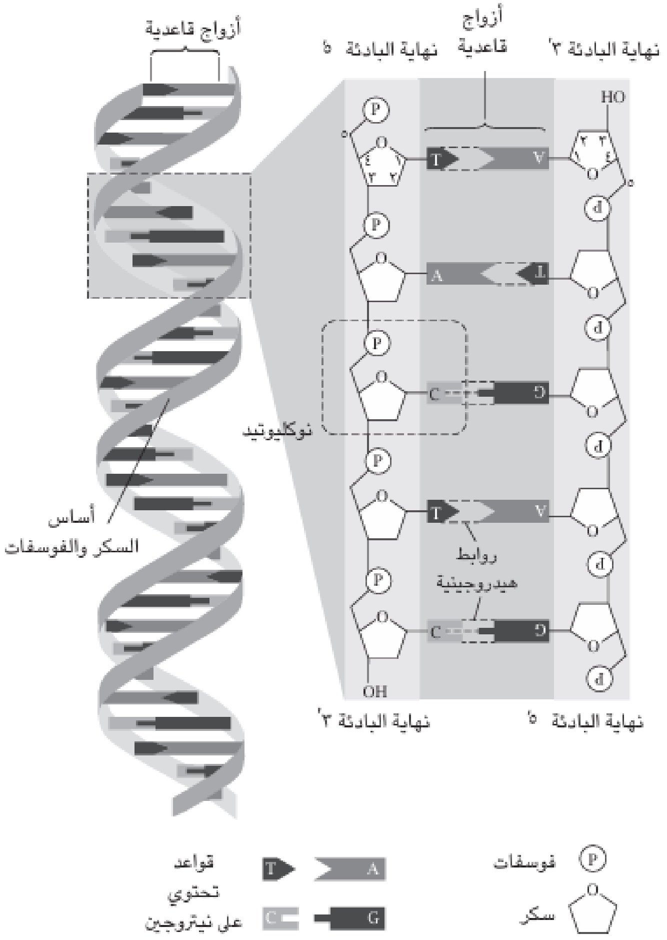
- 5’ ATTTAGGCC 3’
- 3’ TAAATCCGG 5’




**شكل 9**: شكل يوضّح تركيب جزيء الحمض النووي (DNA).

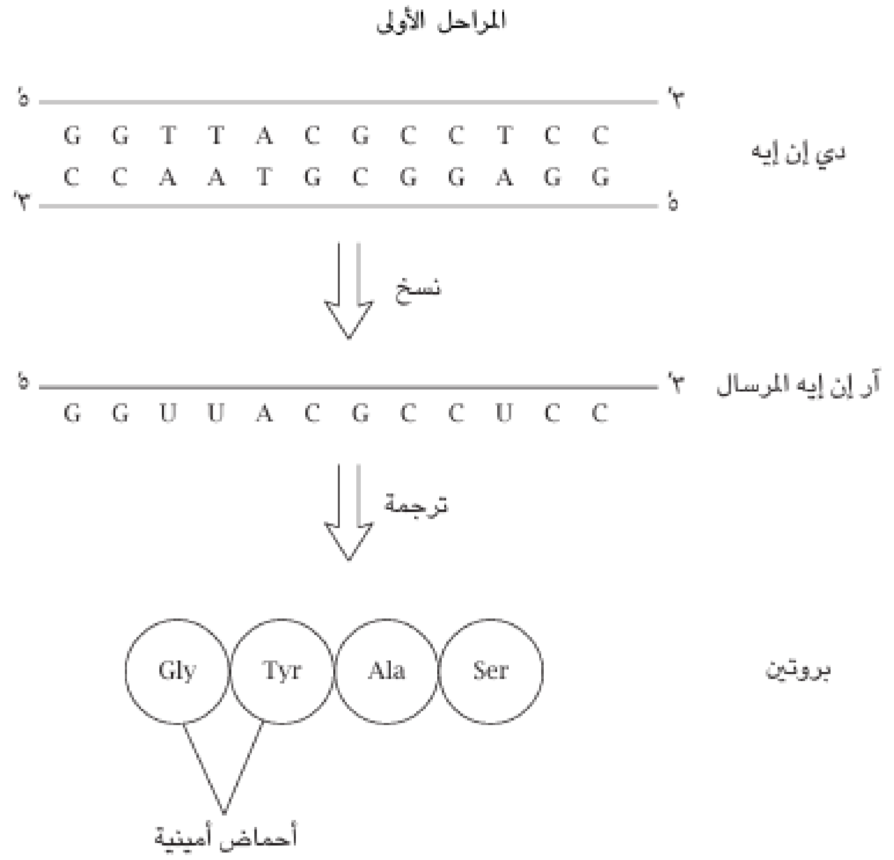
# DNA

- تركيب الحمض النووي DNA



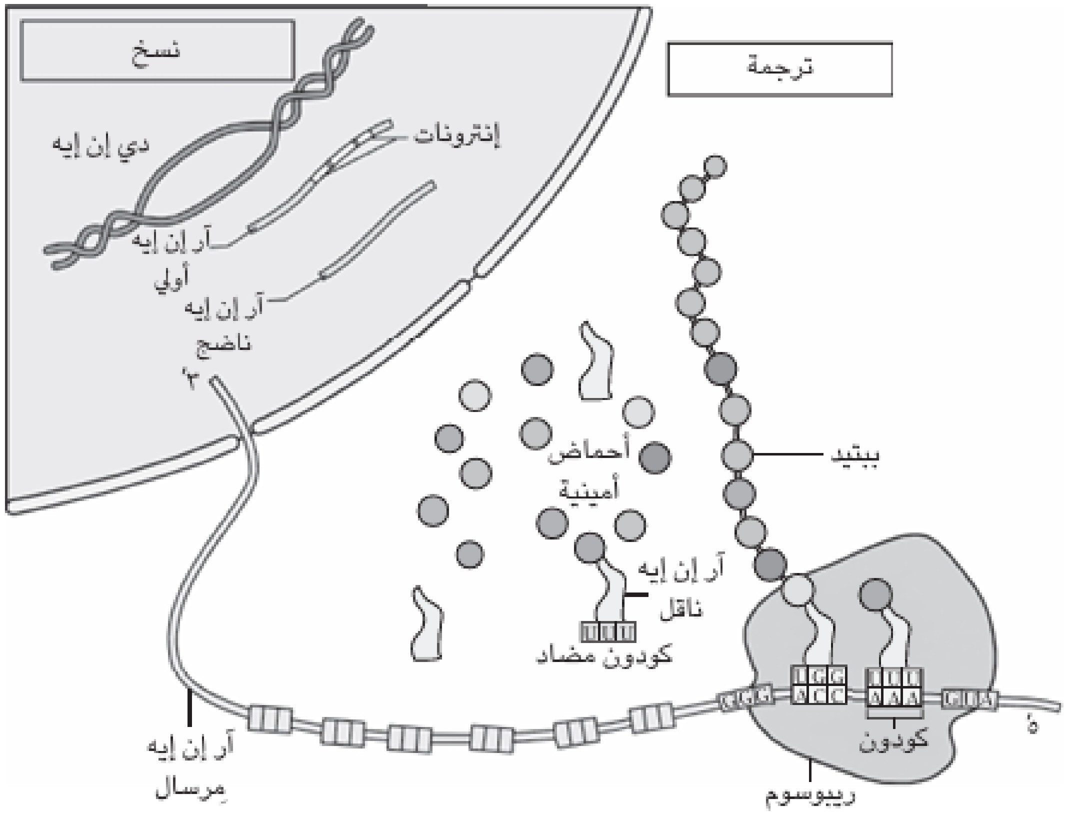
# DNA

- مساهمة DNA في تخليق البروتين



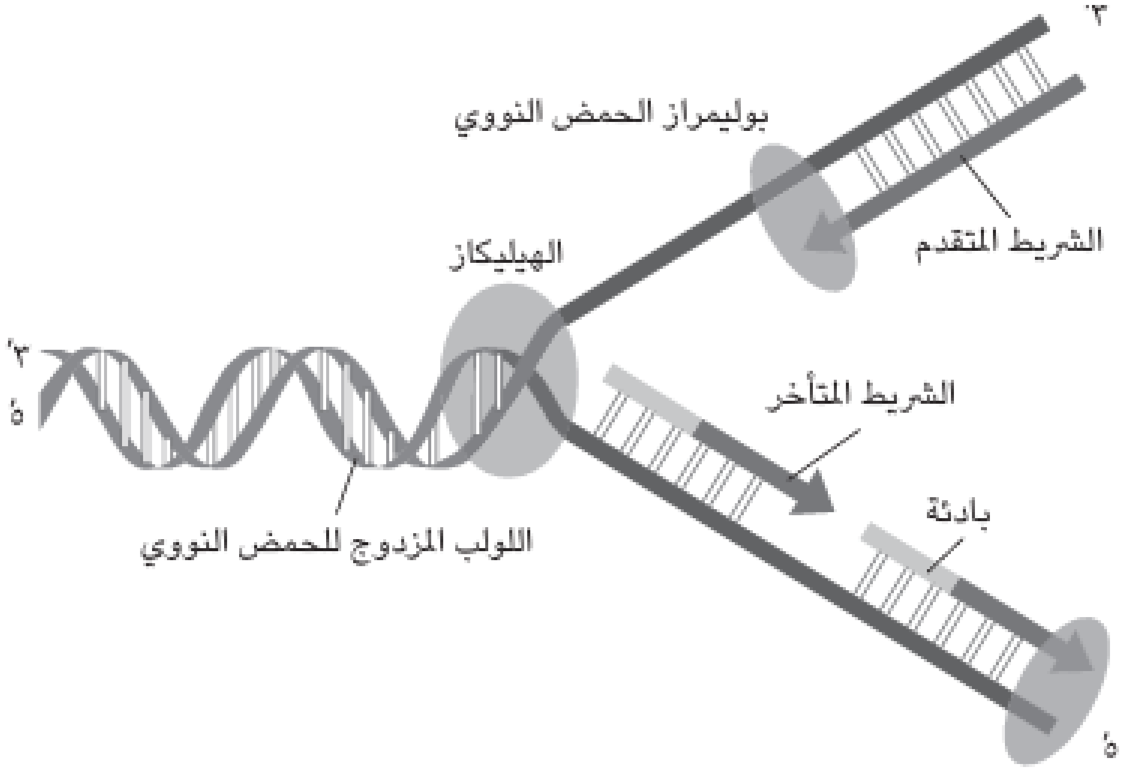
# DNA

- مساهمة DNA في تخليق البروتين



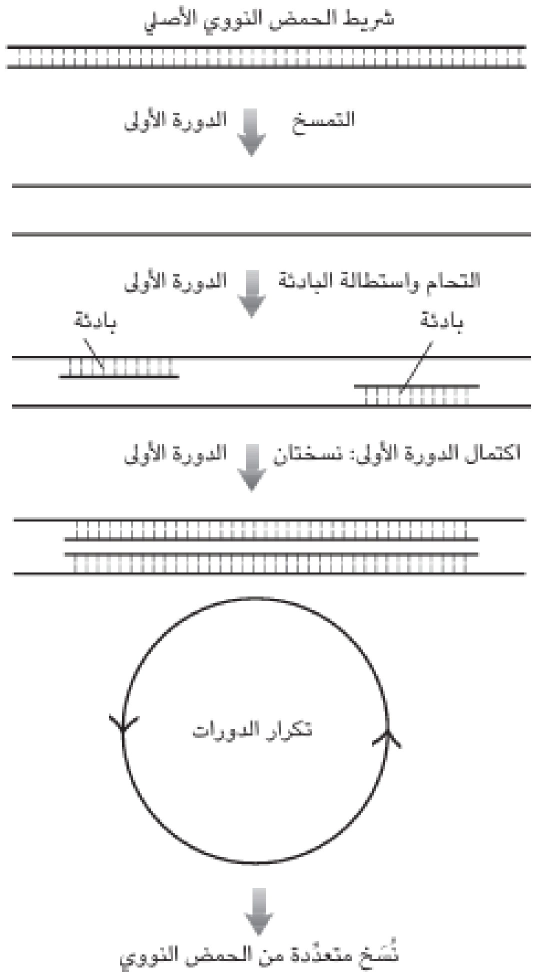
# DNA

- تناسخ الحمض النووي بواسطة انزيم البوليمراز



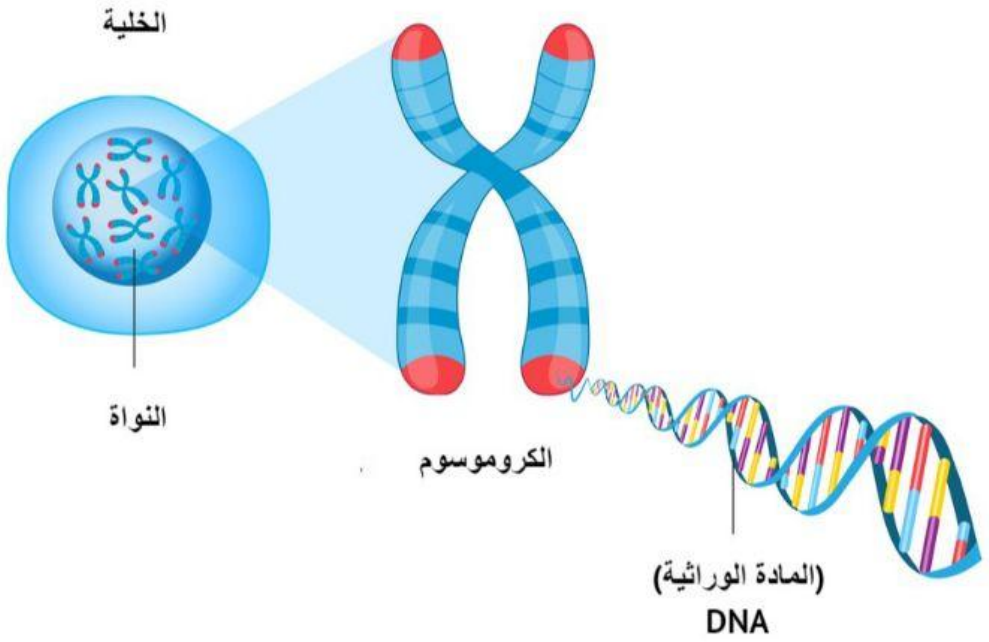
# DNA

- تكاثر الحمض النووي



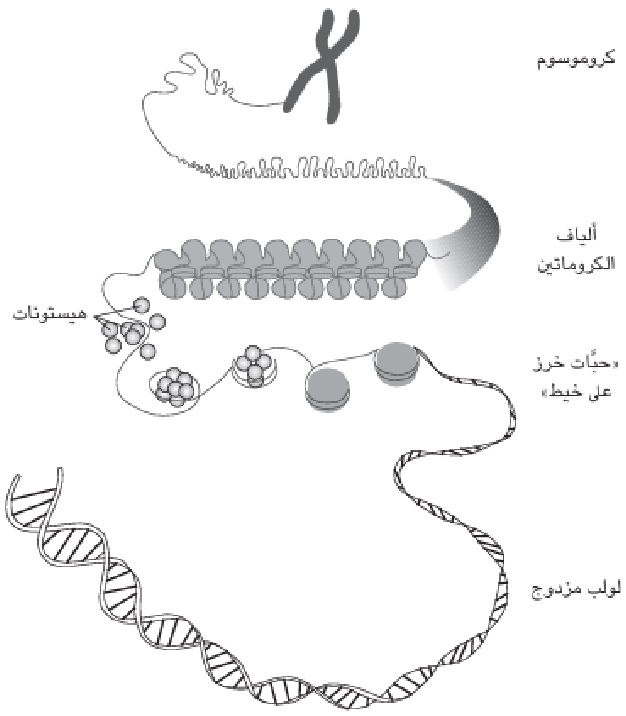
# الكروموسوم

- الكروموسوم عبارة عن شرائط منظمة من DNA بالإضافة لجزيئات أخرى، إذ إن DNA يترتب بطريقة معينة ليشكل الكروموسوم.



# الكروموسوم

- الكروموسوم عبارة عن شرائط منظمة من DNA

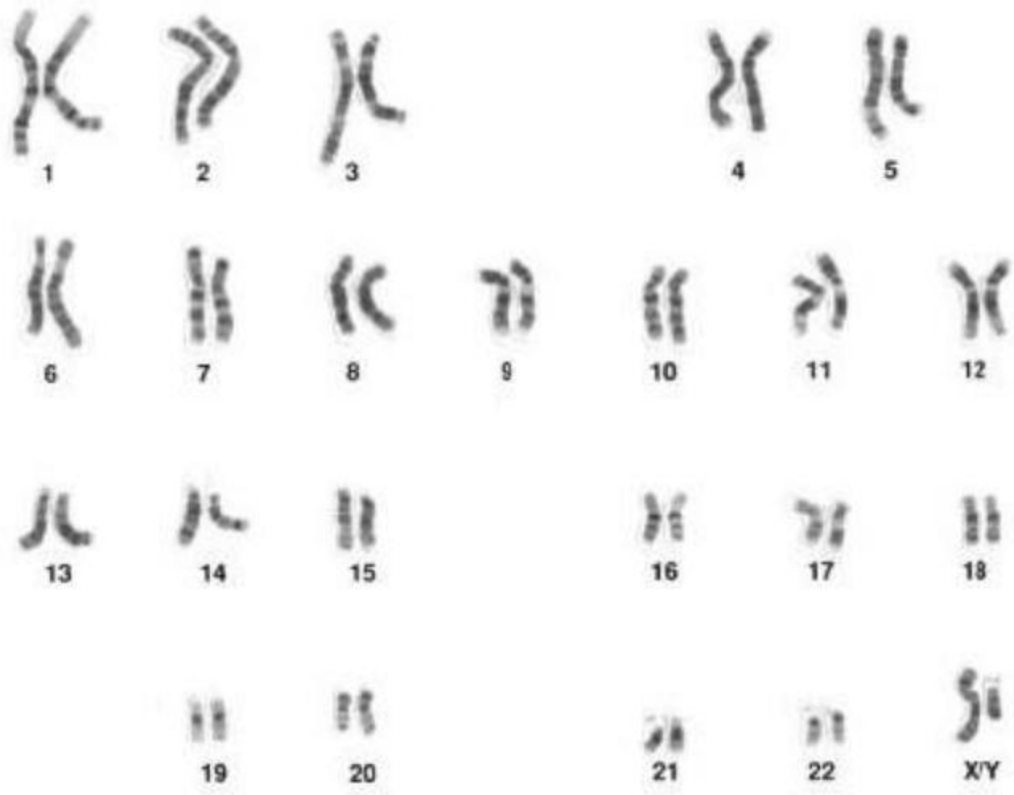


# الكروموسوم

- في الكائنات حقيقة النواة eukaryotesتكون على شكل حزم خطية لتشكل الكروموسوم.
- في بدائية النواة prokaryotes يكون شكل المادة الوراثية DNA عبارة عن حلقة مفردة وتعرف على انها كروموسوم دائري او بكتيري.

# الكروموسوم

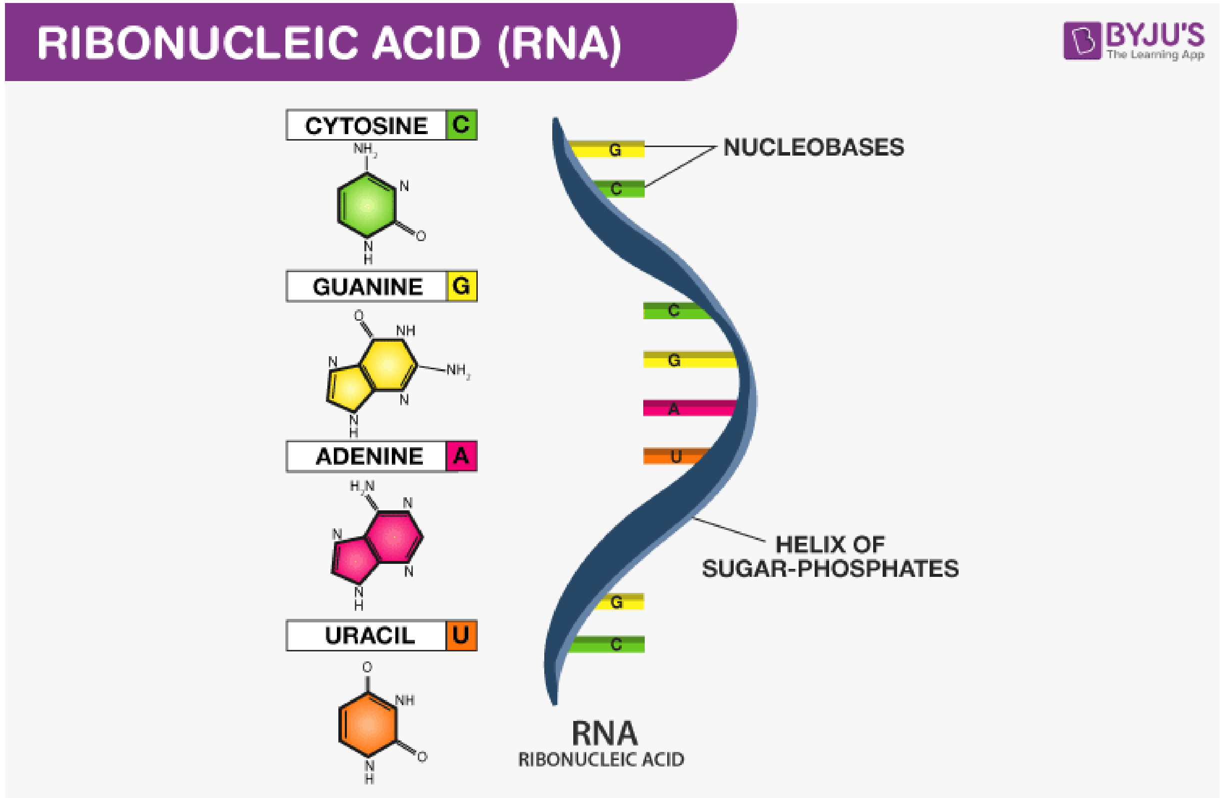
- يوجد في الخلايا الجسمية (جميع الخلايا، وماعدا الخلايا الجرثومية) للانسان زوجين من مؤلفة من ٢٢ كروموسوم بالاضافة الى XX (للاناث) و XY (للذكور) لتكون ٤٦ كروموسوم.




- الخلايا الجرثومية تحتوي على ٢٢ كروموسوم + X او Y = ٢٣ كروموسوم

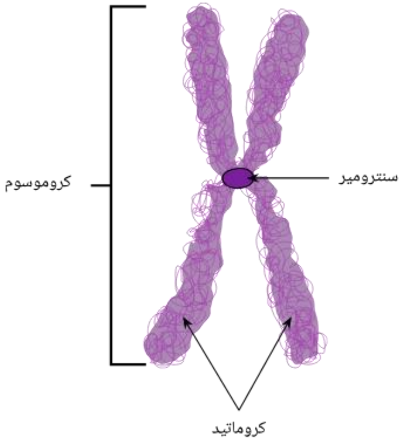
# RNA

- يشبه الحمض النووي الريبي RNA الحمض النووي DNA كيميائيا يكون ضفيرة واحد فقط.
- يعوض من خلاله الثايمين باليوراسل.
- توجد انواع مختلفة من RNA للقيام بالعديد من الوظائف المختلفة.

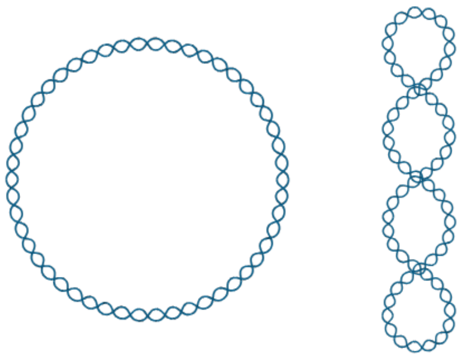


# الكروموسوم

- في الكائنات حقيقة النواة (eukaryotes) تكون على شكل حزم خطية لتشكل الكروموسوم.
- في بدائية النواة prokaryotes يكون شكل المادة الوراثية DNA عبارة عن حلقة مفردة وتعرف على انها كروموسوم دائري او بكتيري.



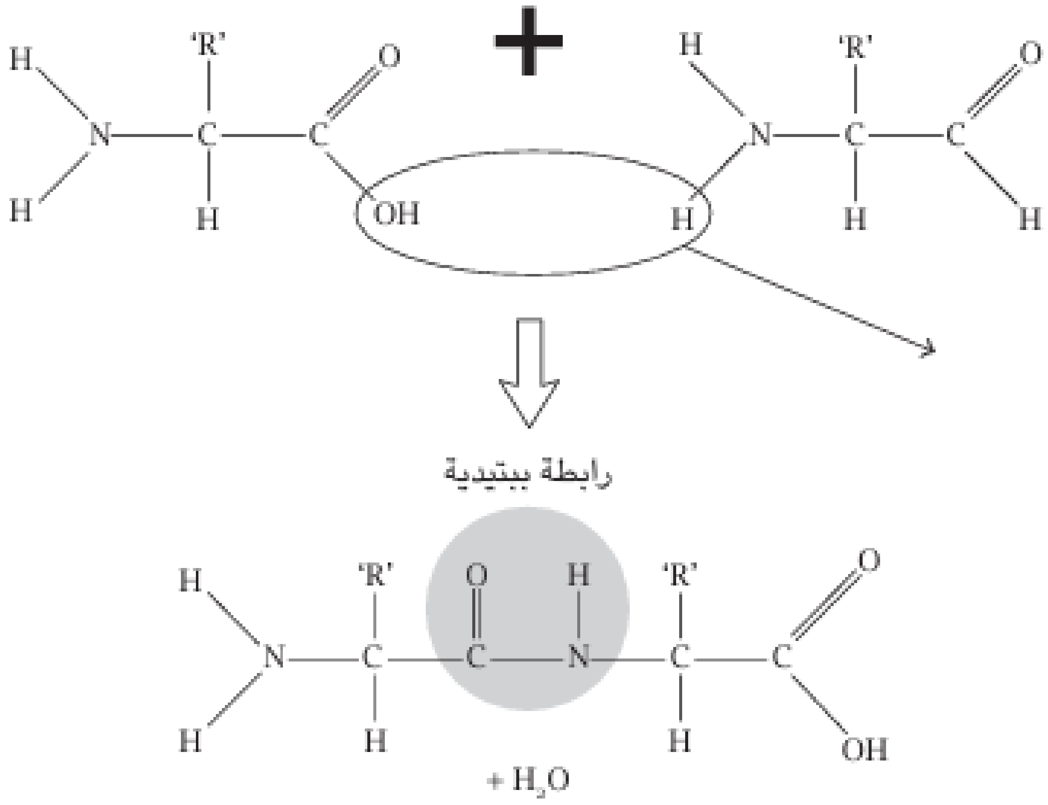

**الشكل 3**: شكل يوضّح كروموسومًا مكونًا من كروماتيدين شقيقين بعد تضاعُف الحمض النووي وتكثيف الكروماتين في مرحلة مبكرة من الانقسام الميتوزي.
ينفصل هذان الكروماتيدان أثناء المراحل الأخيرة من الانقسام الميتوزي.



**الشكل 2**: رسمٌ يوضّح الحمض النووي (DNA) الكروموسومي في بدائيات النوى، مضغوطًا عن طريق لفِّه.
يمكن أن يلتف الحمض النووي (DNA) الكروموسومي المزدوج الشريط على اليسار (غير ملفوف) عدة مرات لكي يتم ضغطه (كما في الرسم على اليمين).

# البروتينات

- تشكل البروتينات من ارتباط حمضين أمينيين بواسطة رابطة ببتيدية



# الاحماض الامينية

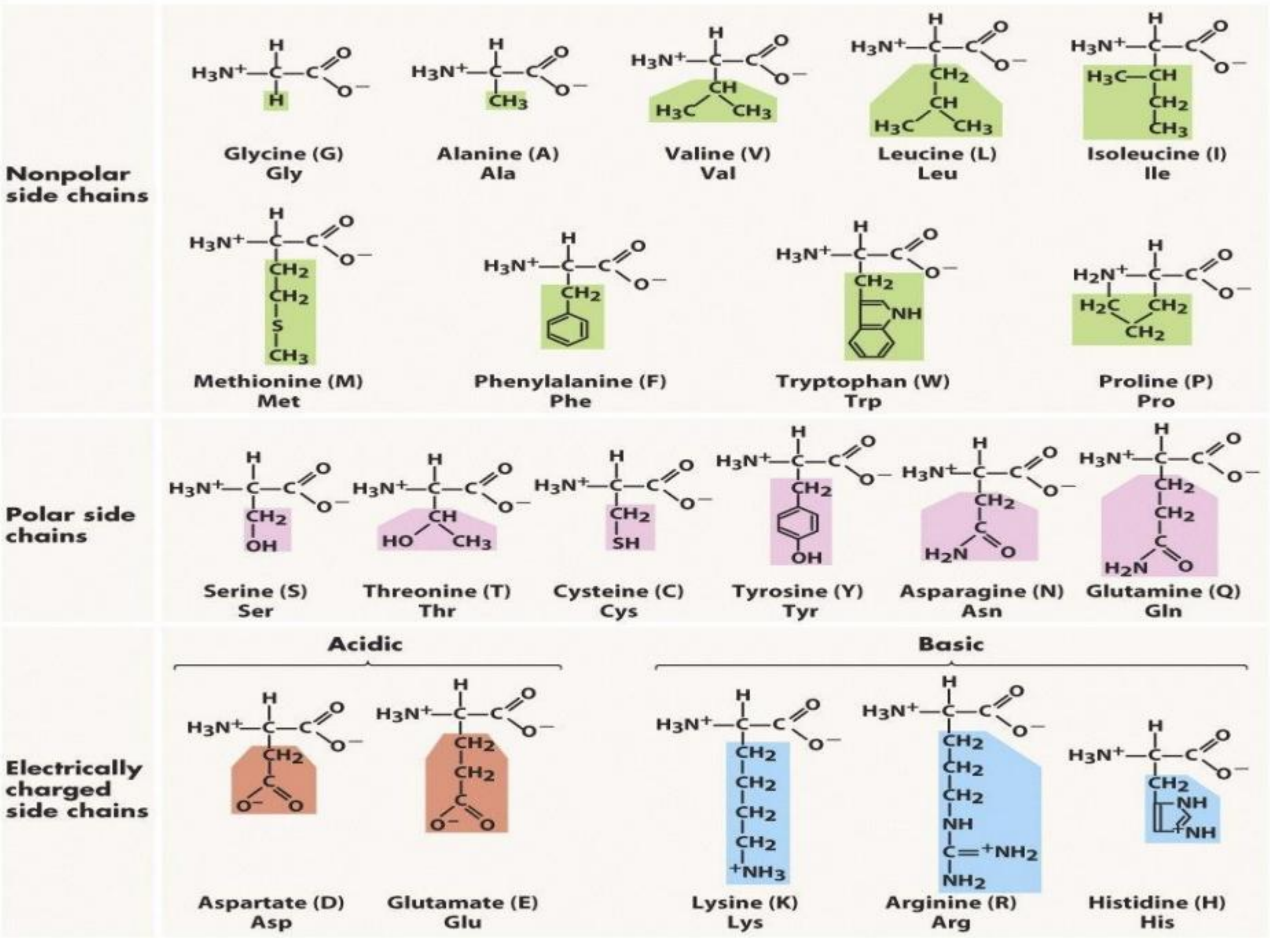



Figure 3-5 Biological Science, 2/e

© 2005 Pearson Prentice Hall, Inc.

# قياس DNA

١. طريقة المطياف الضوئي Spectophotometric Method

- لقياس DNA او RNA (٢٦٠ نانومتر) اما في حالة قياس تركيز البروتين (٢٨٠ نانومتر) وتكون نسبة النقاوة (٢٨٠\٢٦٠).
- نسبة (٢٨٠\٢٦٠) تعطي مؤشر على نقاوة العينة بالتالي فان المحاليل النقية DNA او RNA بقيمة الكثافة الضوئية للطولين الموجيين ٢٦٠ مقسوم على ٢٨٠ وهي ١.٨ DNA و ٢ RNA وتقل القيمة في حالة وجود ملوثات لعينة الحامض النووي كالبروتينات وغيرها عن تلك القيم.

٢. طريقة NanoDrop

- احدث نسخ موجودة لهذا الجهاز NanoDrop 2000/2000c NanoDrop 8000, NanoDrop Lite بمعدل تركيز (2 ng/µL – 15,000 ng/µL dsDNA) بدون تخفيف للعينة.

٣. طريقة Agarose Gel Electrophoresis

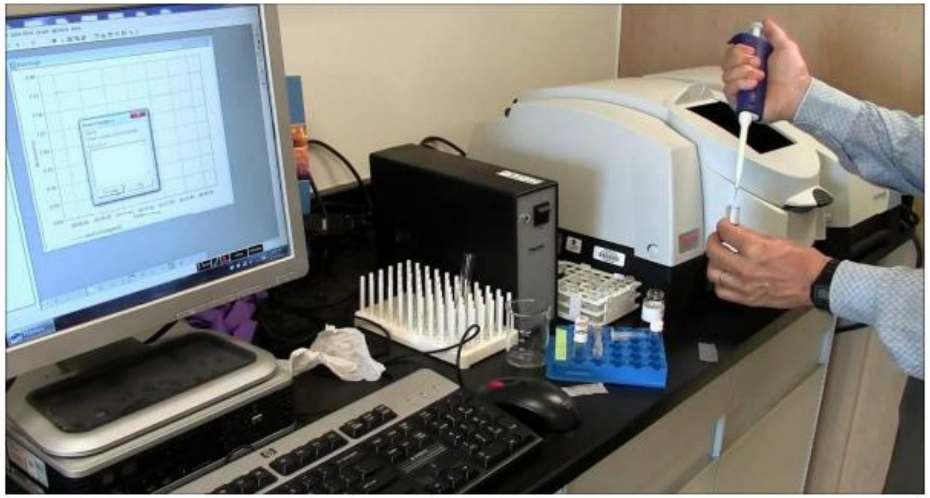
وهي طريقة تستخدم لفصل الأحماض النووية بناءً على حجمها تحت تأثير التيار الكهربائي وبما أن الأحماض النووية تحمل مشحنة سالبة عند تطبيق المجال الكهربائي تنتقل من الكاثود Cathode إلى الأنود Anode اعتمادًا على حجم جزيئة الحمض النووي المطلوب تحليله الذي يمكن تحضير تركيز جل مناسب يعمل كمنخل sieve لفصل الأحماض النووية بناءً على حجمها.

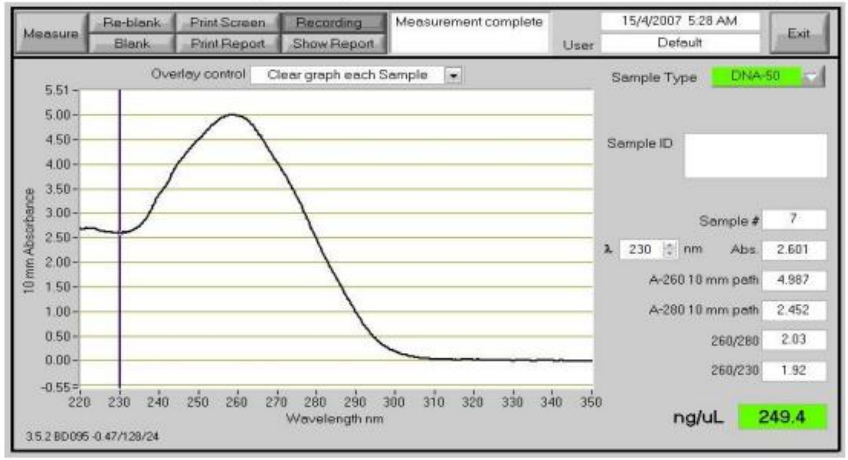
٤. طريقة القياس باستخدام Agarose Gel

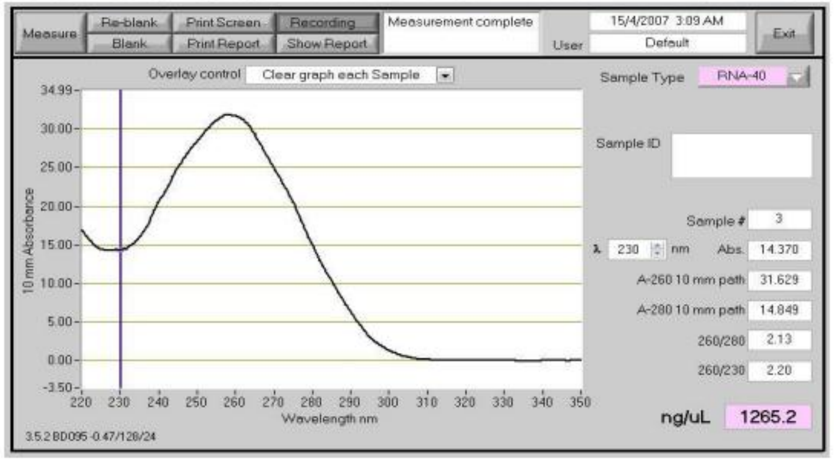
يمكن تحليل نقاء العينة باستخدام هذه الطريقة حيث يمكن إزالة الملوثة من DNA / RNA في بعض الاحيان.

# قياس DNA

NanoDrop 2000/2000c





# PCR

- يُضخم تفاعل البوليميراز المتسلسل مناطق محددة من شريط الدنا (الدنا الهدف).
- تضخم معظم طرائق تفاعل البوليميراز المتسلسل شظايا الدنا التي يتراوح طولها بين 0.1 و10 كيلو زوج قاعدي kbp، رغم أن بعض التقنيات تسمح بتضخيم للشظايا يصل إلى 40.
- تُحدد كمية الناتج المُضخم بواسطة الركائز المتاحة في التفاعل، التي تصبح محدودة مع تقدم التفاعل.

# PCR

- يتطلب إعداد تفاعل البوليميراز المتسلسل العديد من العناصر والكواشف، بما فيها:
  - قالب دنا يحتوي على الدنا المُستهدف المراد تضخيمه
  - بوليميراز الدنا، وهو إنزيم يبلمر شرائط الدنا الجديدة؛ يشيع استخدام بوليميراز المستحرة المائية المقاوم للحرارة أيضًا، لأنه يبقى سليمًا في الغالب خلال عملية تمسخ الدنا عالية الحرارة.

# PCR

- اثنان من مشرعات الدنا التي تُعتبر نيكليوتيدات مكملة للنهاية '3 (ثلاثة مشرعات) لكل من المناطق الحساسة وغير الحساسة للدنا الهدف (يمكن لبوليميراز الدنا فقط أن يرتبط بمنطقة ثنائية الشريط من الدنا ويتطاول منها، ودون المشرعات لن تكون هناك منطقة ثنائية الشريط من الدنا ليرتبط بها البوليميراز)؛ تُختار المشرعات المحددة المكملة للمنطقة الهدف من الدنا مسبقًا، وغالبًا ما تُصنع بشكل مخصص في المختبر أو تُشترى من موردي المواد الكيميائية الحيوية التجاريين.

# PCR

- نيوكليوسيدات منقوصة الأكسجين ثلاثية الفوسفات، أو dNTPs تُسمى أحيانًا «نيوكليوتيدات منقوصة الأكسجين ثلاثية الفوسفات»؛ هي نيوكليوتيدات تحتوي على مجموعة ثلاثي الفوسفات)، وهي الدعائم الأساسية التي يصنع منها بوليميراز الدنا شريطَ دنا جديدًا.

# PCR

- محلول منظم يوفر بيئة كيميائية مناسبة لتحقيق النشاط والثبوتية الأمثلَين لبوليميراز الدنا.
- كاتيونات ثنائية التكافؤ، عادةً ما تكون أيونات المغنسيوم $Mg^{2+}$ أو المنغنيز $Mn^{2+}$؛ المغنسيوم ثنائي التكافؤ هو الأكثر شيوعًا، ولكن يُستخدم المنغنيز في تطفر الدنا المتواسط بتفاعل البوليميراز المتسلسل، إذ إن تركيز المنغنيز الزائد يرفع معدل الخطأ في أثناء تصنيع الدنا. بالإضافة إلى الكاتيونات أحادية التكافؤ مثل أيونات البوتاسيوم

# PCR

- يُجرى التفاعل عادةً بحجم 10-200 ميكرولتر في أنابيب تفاعل صغيرة (0.2-0.5 مليلتر) في جهاز تدوير حراري. يسخّن جهاز التدوير الحراري أنابيب التفاعل ويبردها لتحقيق درجات الحرارة المطلوبة في كل خطوة من خطوات التفاعل (انظر أدناه). تستخدم العديد من أجهزة التدوير الحرارية الحديثة التبريد الكهروحراري الذي يتيح تسخين الكتلة الحاملة لأنابيب تفاعل البوليمراز المتسلسل وتبريدها ببساطة من خلال عكس التيار الكهربائي.

# PCR

- تسمح أنابيب التفاعل ذات الجدران الرقيقة بالتوصيل الحراري المناسب للسماح بالموازنة الحرارية السريعة. تحتوي معظم أجهزة التدوير الحرارية على أغطية ساخنة لمنع التكثف في الجزء العلوي من أنبوب التفاعل. تتطلب أجهزة التدوير الحرارية القديمة التي تفتقر إلى غطاء ساخن طبقةً من الزيت فوق خليط التفاعل أو كرة من الشمع داخل الأنبوب.

# PCR

- يتكون تفاعل البوليميراز المتسلسل عادةً من 20-40 تغير متكرر في درجة الحرارة، وتُسمى هذه التغيرات الدورات الحرارية، وتتكون كل دورة عادةً من قياسين أو ثلاثة قياسات منفصلة لدرجات الحرارة (انظر الشكل أدناه). غالبًا ما يسبق الدورة خطوة درجة حرارة واحدة عند درجة حرارة عالية جدًا (> 90 درجة مئوية (194 درجة فهرنهايت)) ويتبعها انتظار واحد في النهاية لتمديد المنتج النهائي أو التخزين القصير.

# PCR

- تعتمد درجات الحرارة المستخدمة وطول مدة تطبيقها في كل دورة على مجموعة متنوعة من الثوابت، بما في ذلك الإنزيم المستخدم في تخليق الدنا، وتركيز الأيونات ثنائية التكافؤ و dNTPs في التفاعل، ودرجة حرارة انصهار ( Tm) المشرعات. الخطوات الشائعة لمعظم طرق تفاعل البوليميراز المتسلسل هي على النحو الآتي:.

# PCR

- التهيئة: هذه الخطوة مطلوبة فقط لبوليميرازات الدنا التي تتطلب التنشيط الحراري عن طريق تفاعل البوليميراز المتسلسل البادئ الساخن. وتتكون من تسخين حجرة التفاعل إلى درجة حرارة 94-96 درجة مئوية (201-205 درجة فهرنهايت)، أو 98 درجة مئوية (208 درجة فهرنهايت) إن استُخدمت مشرعات عالية الحرارة، والتي يُحتفظ بها بعد ذلك لمدة 1-10 دقائق.

# PCR

- الإفساد: هذه الخطوة هي أول حدث تدوير منتظم، وتتكون من تسخين حجرة التفاعل إلى 94-98 درجة مئوية (201-208 درجة فهرنهايت) لمدة 20-30 ثانية. يؤدي هذا إلى ذوبان قالب الدنا ثنائي الشريط، أو إفساده، عن طريق كسر روابط الهيدروجين بين الأسس المكملة، ما يُنتج جزيئَي دنا أحادي الشريط

# PCR

- التصلب: في الخطوة التالية، تنخفض درجة حرارة التفاعل إلى 50–65 درجة مئوية (122-149 درجة فهرنهايت) لمدة 20-40 ثانية، ما يسمح بتصليب المشرعات لكل من قوالب الدنا أحادي الشريط. يتضمن خليط التفاعل عادةً اثنين من المشرعات: واحد لكل من المكملات أحادية الشريط التي تحتوي على المنطقة الهدف. المشرعات هي تسلسلات أحادية الشريط بحد ذاتها ولكنها أقصر بكثير من المنطقة الهدف، تكمل بذلك تسلسلات قصيرة جدًا في النهاية '3 لكل شريط.

# PCR

- من الضروري تحديد درجة حرارة ملائمة لمرحلة التصليب لأن الكفاءة والخصوصية تتأثران بشدة بدرجة حرارة التصليب. يجب أن تكون درجة الحرارة هذه منخفضة بما يكفي لتسمح بتهجين المشرع إلى الشريط، وعالية بما يكفي ليكون هذا التهجين محددًا، أي يجب أن يرتبط المشرع بجزء محدد مكمل من الشريط لا في أي مكان آخر

# PCR

- إن لم تكن درجة الحرارة كافية، فإن المشرع سيرتبط بصورة شاذة. وإن كانت مرتفعة جدًا، فقد لا يرتبط المشرع أساسًا. درجة الحرارة المثلى للتصليب هي 3-5 درجة مئوية وهي أقل من درجة حرارة المشرعات المستخدمة.
- لا تتكوّن روابط الهيدروجين المستقرة بين الأسس المكملة إلا عندما يكون تسلسل المشرعات متطابقًا مع تسلسل القالب. خلال هذه الخطوة، يرتبط البوليميراز بقالب المشرع الهجين ويبدأ تشكيل الدنا.

# PCR

- التمديد/الإطالة: تعتمد درجة الحرارة في هذه الخطوة على بوليميراز الدنا المستخدم؛ درجة حرارة النشاط المثلى لبوليميراز الدنا المستقر حراريًا لبوليميراز المستحرة المائية هي 75-80 درجة مئوية (167-176 درجة فهرنهايت) تقريبًا، مع أن درجة الحرارة التي يشيع استخدامها مع هذا الإنزيم هي 72 درجة مئوية (162 درجة فهرنهايت). في هذه الخطوة، يصنّع بوليميراز الدنا شريط دنا جديدًا مكملًا لقالب شريط الدنا عن طريق إضافة dNTPsحرة من خليط التفاعل المكمّل للقالب في الاتجاه من 5' إلى 3'، ما يكثف مجموعة 5'-فوسفات من dNTPsمع مجموعة 3'-هيدروكسيل الدنا الناتج (الممدد). يعتمد الوقت الدقيق المطلوب للتمديد على بوليميراز الدنا المستخدم وعلى طول منطقة الدنا الهدف المراد تضخيمها.

# PCR

- كقاعدة عامة، عند درجة الحرارة المثلى، فإن معظم بوليميراز الدنا يبلمر ألف أساس نيوكليوتيدي في الدقيقة.
- في ظل الظروف المثلى (على سبيل المثال، إذا لم تكن هناك قيود متعلقة بنقص الركائز أو الكواشف)، يتضاعف عدد تسلسلات الدنا المستهدف في كل خطوة من التمديد/الإطالة. مع كل دورة ناجحة، تصبح أشرطة القالب الأصلية بالإضافة إلى جميع الأشرطة المنتجة حديثًا أشرطة قالب للدورة التالية من التمديد، ما يؤدي إلى تضخيم أسي (هندسي) لمنطقة الدنا المستهدف المحددة.

# PCR

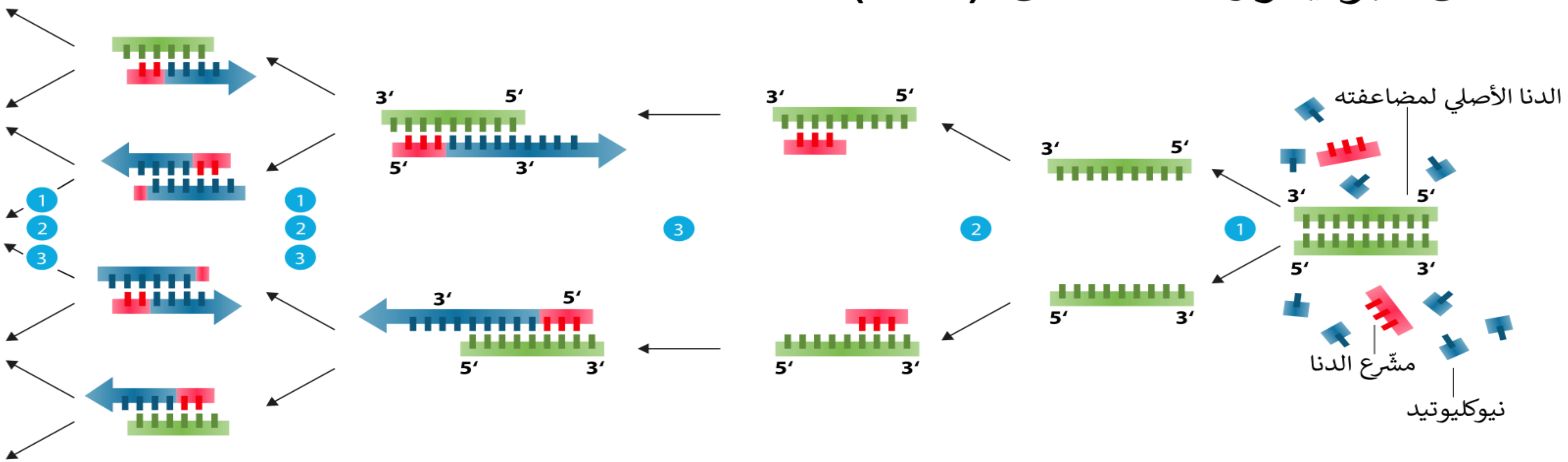
- تشكل عمليات الإفساد والتمديد والتصليب دورة واحدة. تحصل الدورات المتعددة عندما يستوجب تضخيم منطقة الدنا المستهدف إلى ملايين النسخ. الصيغة المستخدمة لحساب عدد نسخ الحمض النووي المتشكلة بعد عدد معين من الدورات هي n2، حيث n هو عدد الدورات. ومن ثم فإن التفاعل الذي يحصل على 30 دورة ينتج عنه 230، أو 1073741824، نسخة من منطقة الدنا ثنائي الشريط المستهدف.

# PCR

- الاستطالة النهائية: هذه الخطوة اختيارية، ولكنها تُنفذ عند درجة حرارة 70-74 درجة مئوية (158-165 درجة فهرنهايت) (نطاق درجة الحرارة المطلوب للنشاط الأمثل لمعظم البوليمرات المستخدمة في تفاعل البوليميراز المتسلسل) لمدة 5-15 دقيقة بعد دورة تفاعل البوليميراز المتسلسل الأخيرة للتحقق من أن أي دنا أحادي الشريط متبقٍّ قد مُدد بالكامل.
- الانتظار الأخير: يتم من خلال الخطوة الأخيرة تبريد حجرة التفاعل إلى 4-15 درجة مئوية (39-59 درجة فهرنهايت) لفترة غير محددة، ويمكن استخدامها للتخزين قصير المدى لنواتج تفاعل البوليميراز المتسلسل.

# PCR

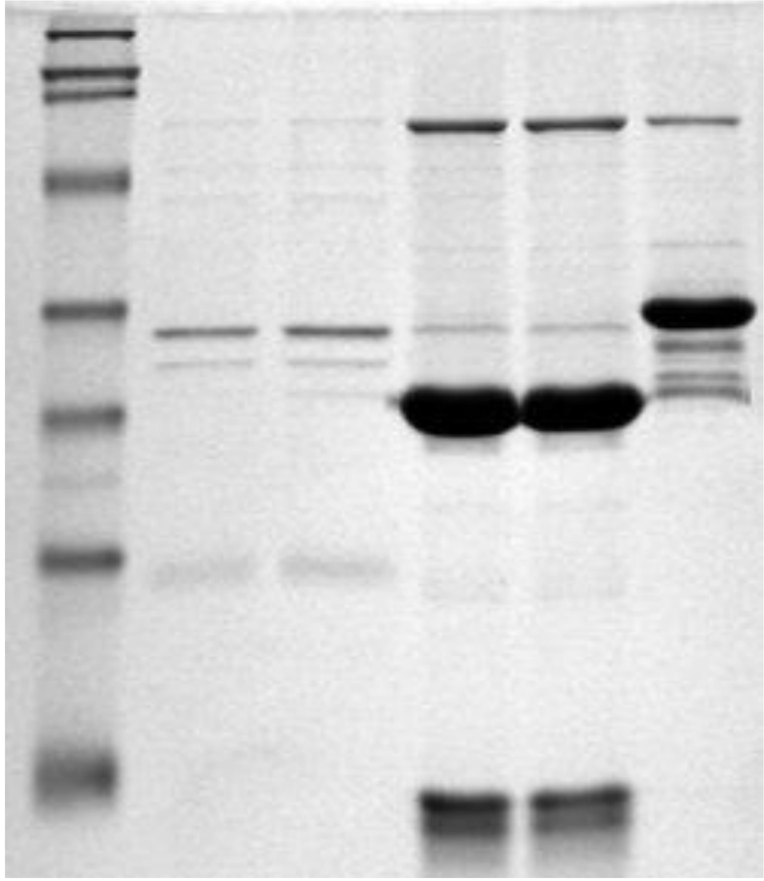
## تفاعل البوليمراز المتسلسل (PCR)




1 **إفساد** على 94-96 سْ
2 **تصلب** على~68 سْ
3 **استطالة** على 72 سْ

* الدنا أو الحمض النووي الريبوزي منقوص الأكسجين (DNA)

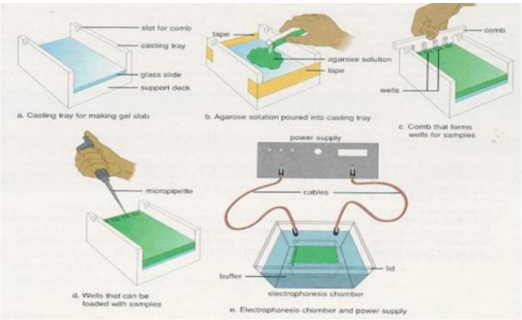
# الرحلان الكهربائي



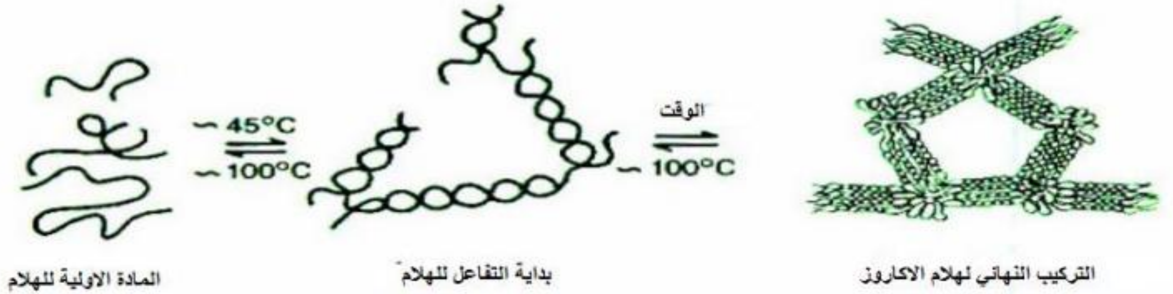
- الرحلان الكهربائي باستخدام عديد الاكريلاميد هو أداة قوية تستخدم لتحليل عينات الحمض النووي الريبي.
- عندما يتم تغيير طبيعة هلام عديد الأكريلاميد بعد الرحلان الكهربائي ، فإنه يوفر معلومات عن تكوين عينة من أنواع الحمض النووي الريبي.
- صورة تمثل الرحلان الكهربائي باستخدام عديد الأكريلاميد .

# الرحلان الكهربائي

## أنواع الهلام المستخدم في الترحيل الكهربائي Types of Gel Using in Gel Electrophoresis



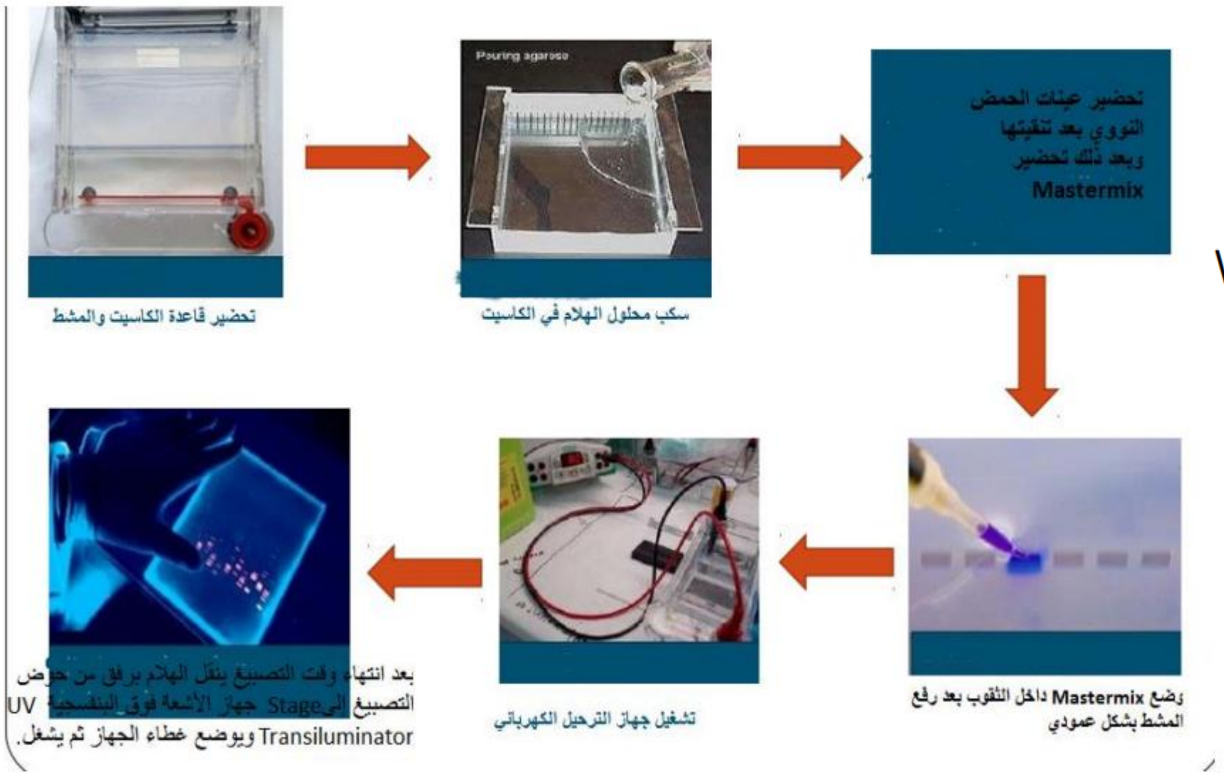

هلام الأكاروز Agarose Gel يستخدم بشكل واسع في هذه التقنية عبارة عن سلسلة متشابكة من السكريات المتعددة المكونة من الكالكتوز ومشتقاته والمرتبطة مع بعضها بأواصر هيدروجينية لتكوين شبكة معقددة Complex Net تعتمد فتحاتها Poresعلى تركيز الاكاروز فكلما كان التركيز عاليا كلما كانت الفتحات اصغر والعكس صحيح، يتضح من ذلك ان قابلية الهلام على فصل القطع تعتمد على تركيزه فكلما زاد التركيز كلما زادت قابلية الفصل. إن تركيز هلام الاكاروز يتراوح بين ٠.٥ – ٢ % وبطول ١٢ سم ، والأكثر استخداما" هو ٠.٧ – ١ % والذي يستخدم لفصل قطع DNA كبيرة الوزن الجزيئي 200bp –20Kbp



# الرحلان الكهربائي

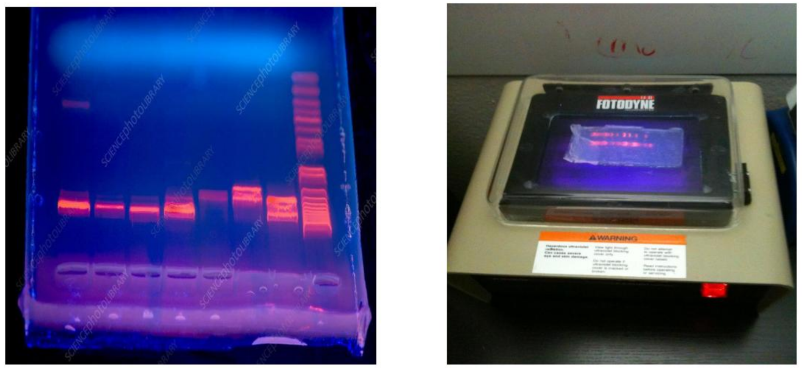
## تشغيل الجهاز الترحيل Electrophoresis

- يوضع غطاء الخزان بالشكل الصحيح لضمان الترحيل من القطب السالب الى القطب الموجب ويتم تشغيل مجهز القدرة Power Supply على فولتية 45 V وامبيرية ١٨٠ Mili-amber ولمدة ١٥ دقيقة كمرحلة اولى.
- بعد انتهاء ال ١٥ دقيقة نسمع صوت المنبه من مجهز القدرة، نعدل الفولتية الى ٨٠ V وامبيرية ١٨٠ Mili-amber ولمدة ساعة.
- يتم مراقبة سير الترحيل من خلال حركة صبغة ال Bromophenol blue كمؤشر

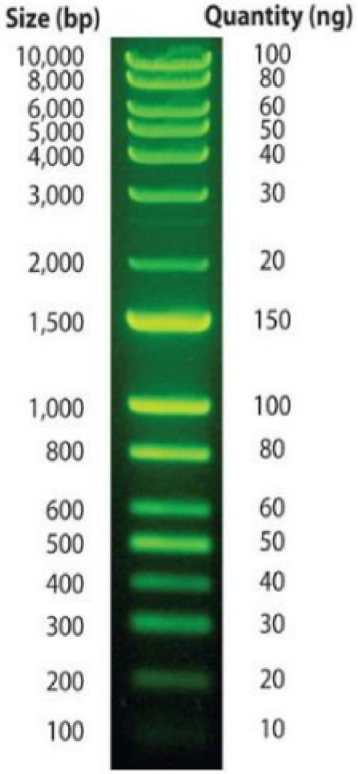


# الرحلان الكهربائي

- عبارة معيار لقياس أطوال مختلفة لجزيئات DNA
- يتألف DNA Ladder من أحجام (size) DNA معروفة تُستخدم لتحديد حجم عينة DNA المراد دراستها.
- عادة ما يحتوي سلم الحمض النووي على عينات ذات حجم متباعد بانتظام والتي عند تشغيلها على هلام الاكاروز والتي تبدو مثل السلم



Agarose gel with DNA ladders on a UV transilluminator



# الرحلان الكهربائي

# روابط خارجية

| الرابط | عنوان الفيديو |
|---|---|
| https://www.youtube.com/watch?v=1sZVL32aAZU&ab_channel=%D8%AF.%D8%A3%D8%AD%D9%85%D8%AF%D8%A7%D9%84%D8%AC%D9%88%D9%87%D8%B1%D9%8A-AhmedElGohary | البيولوجيا الجزيئية |

# المراجع

- علم الاحياء الجزيئي

# شكرا لكم