

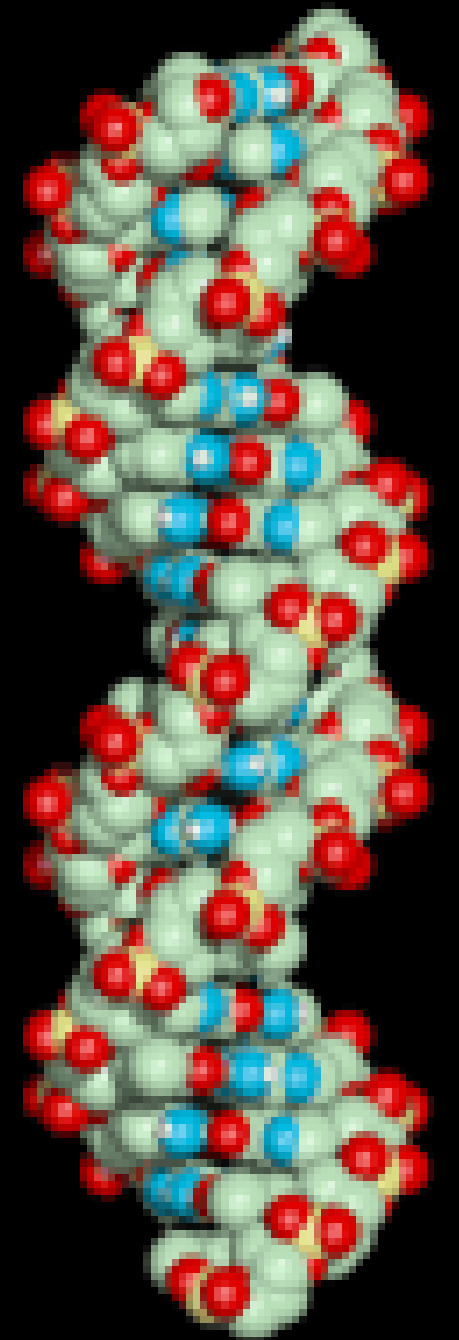
Kafrelsheikh University
Faculty of Agriculture
Genetics Department



- *The* Principals of Genetic Lectures

Dr. Abdel-Hamid Ali •

Prof. Of Cyto-bichemical Genetics & Plant Biotechnology •



المحاضرة الثالثة

DNA هو مادة الوراثة

DNA is the genetic material

1- تقديم للمحاضرة

نتذكر دائما

- The sentence "This structure has **novel features** which are of considerable biological interest" may be one of science's most famous understatements.

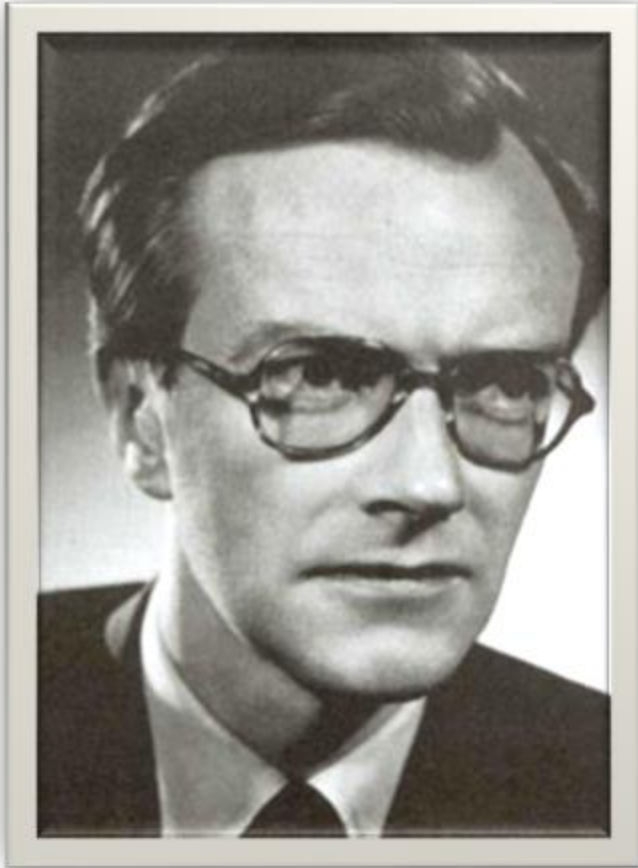
قد تكون الجملة "هذه التركيب له سمات جديدة ذات أهمية بيولوجية كبيرة" واحدة من أشهر الاستنتاجات العلمية.

"It appeared in April 1953 in the scientific paper where James Watson and Francis Crick presented the structure of the DNA-helix, the molecule that carries genetic information from one generation to the other".

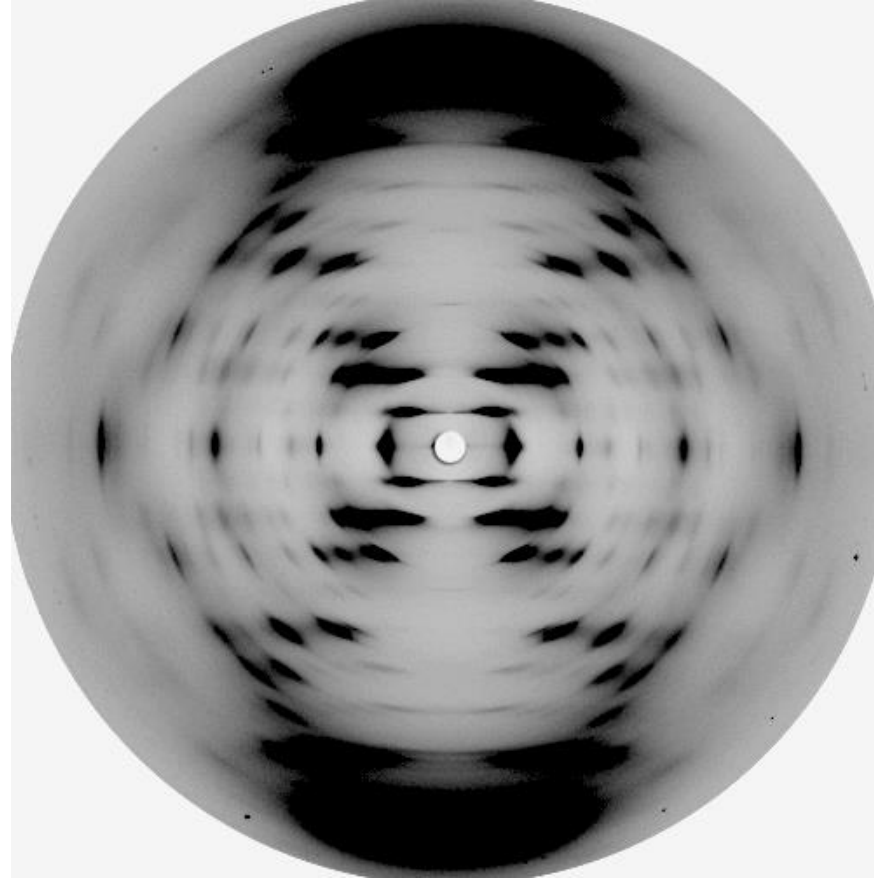
"ظهر في أبريل 1953 في النشرة العلمية المقدمة من جيمس واتسون وفرانسيس كريك لتركيب DNA-helix، أنه الجزيء الذي يحمل المعلومات الوراثية من جيل إلى آخر".

The Race to Discover DNA's Structure

السباق لاكتشاف بنية الحمض النووي



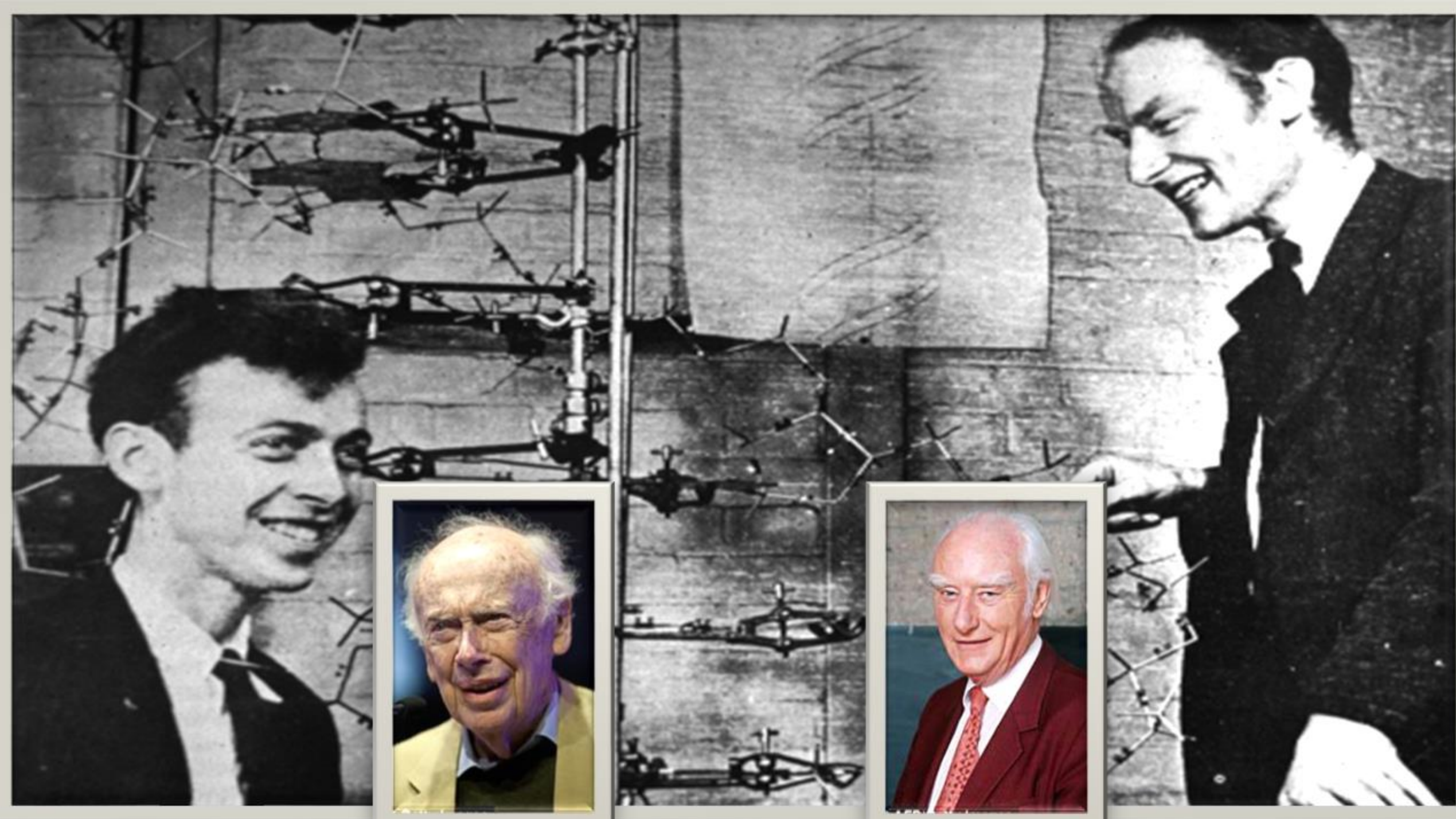
Maurice Wilkins



X-Ray diffraction image of DNA
taken by Franklin in 1951



Rosalind Franklin



Nobel Prize in Physiology or Medicine

- Nine years later, in 1962, they shared the Nobel Prize in Physiology or Medicine with Maurice Wilkins, for solving one of the most important of all biological riddles.
- Half a century later, important new implications of this contribution to science are still coming to light.
- بعد تسع سنوات ، في عام 1962 ، تقاسموا (واتسون وكريك) جائزة نوبل في علم وظائف الأعضاء أو الطب مع موريس ويلكينز ، لحل واحدة من أهم الألغاز البيولوجية.
- بعد نصف قرن ، لا تزال الآثار الجديدة الهامة لهذه المساهمة في العلم تظهر للعيان.

1962: Nobel Prize in Physiology and Medicine

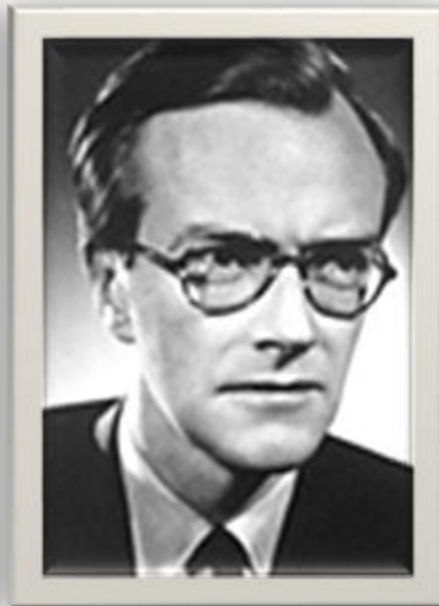
Watson, J.D. and F.H. Crick, “Molecular Structure of Nucleic Acids: A Structure for Deoxynucleic Acids”. *Nature* 171 (1953), p. 738.



**James D.
Watson**



**Francis H.
Crick**



**Maurice H. F.
Wilkins**

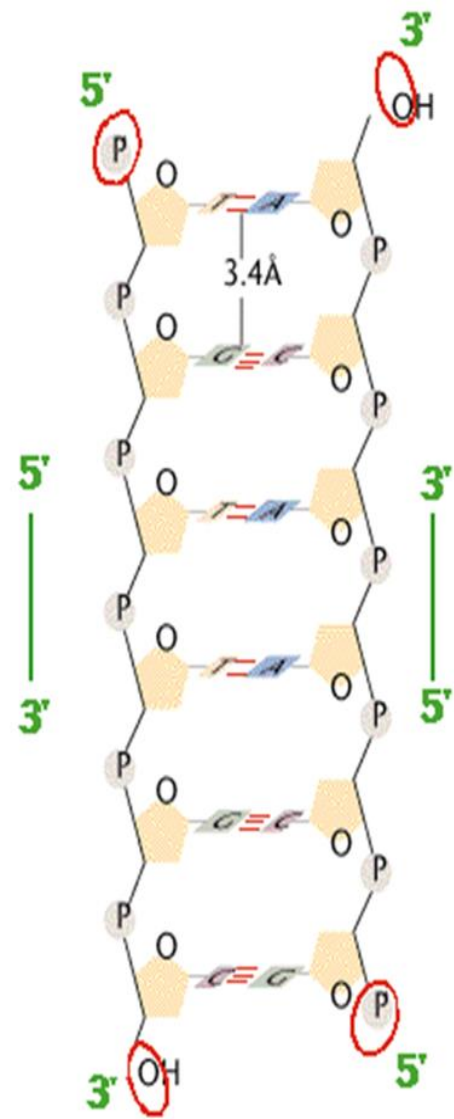


What about?
Rosalind Franklin

• روزاليند فرانكلين ، وجيمس واتسون ، وفرانسيس كريك (أبريل 1953 ، Nature)

• روزاليند فرانكلين: علم البلورات بالأشعة السينية للحمض النووي ، في محاولة لتحديد بنية الجزيء. وضع عمل فرانكلين الأساس لواتسون وكريك. توفيت عام 1958 بسبب مرض السرطان.

• جيمس واتسون وفرانسيس كريك: حددوا البنية الدقيقة ثلاثية الأبعاد للحمض النووي كحلزون مزدوج متماسك بواسطة روابط هيدروجينية. فازا بجائزة نوبل عام 1962.



• تعريف DNA في ماحده واتسون وكريك

• DNA هو حلزون مزدوج مضاد للتوازي *antiparallel* : يتم إقتران النهاية 5' من سلسلة مع النهاية 3' من السلسلة الأخرى.

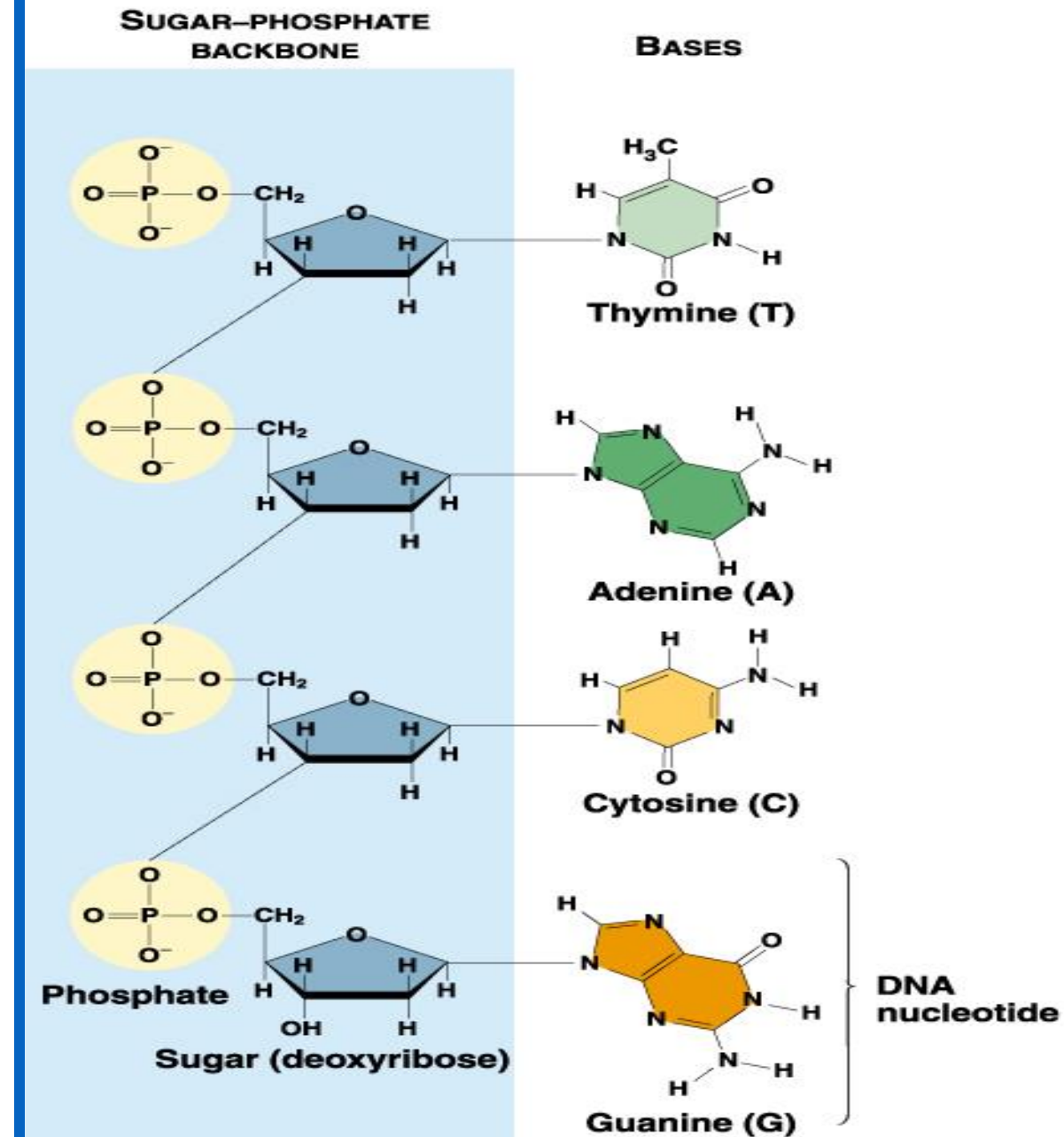
• ويتم إقتران A & T و G & C بواسطة روابط هيدروجينية

• والشريطان مكملان لبعضهما البعض.

• إذا كنت تعرف تتابع سلسلة واحدة ، يمكنك تحديد تتابع الأخرى.

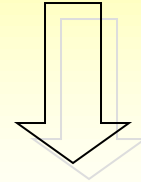
The Structure of DNA

- DNA is composed of **يتكون من** four nucleotides, each containing **تحتوي**: adenine, cytosine, thymine, or guanine.
- The amounts of $A = T$, $G = C$, and purines = pyrimidines [Chargaff's Rule **قاعدة شارجاف**].
- DNA is a double-stranded helix with antiparallel strands [Watson and Crick].
- Nucleotides in each strand are linked by 5'-3' phosphodiester bonds
- Bases on opposite strands are linked by hydrogen bonding: A with T, and G with C.

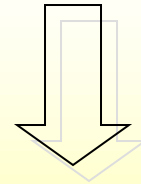


Scientists call this the:

DNA



RNA



Protein

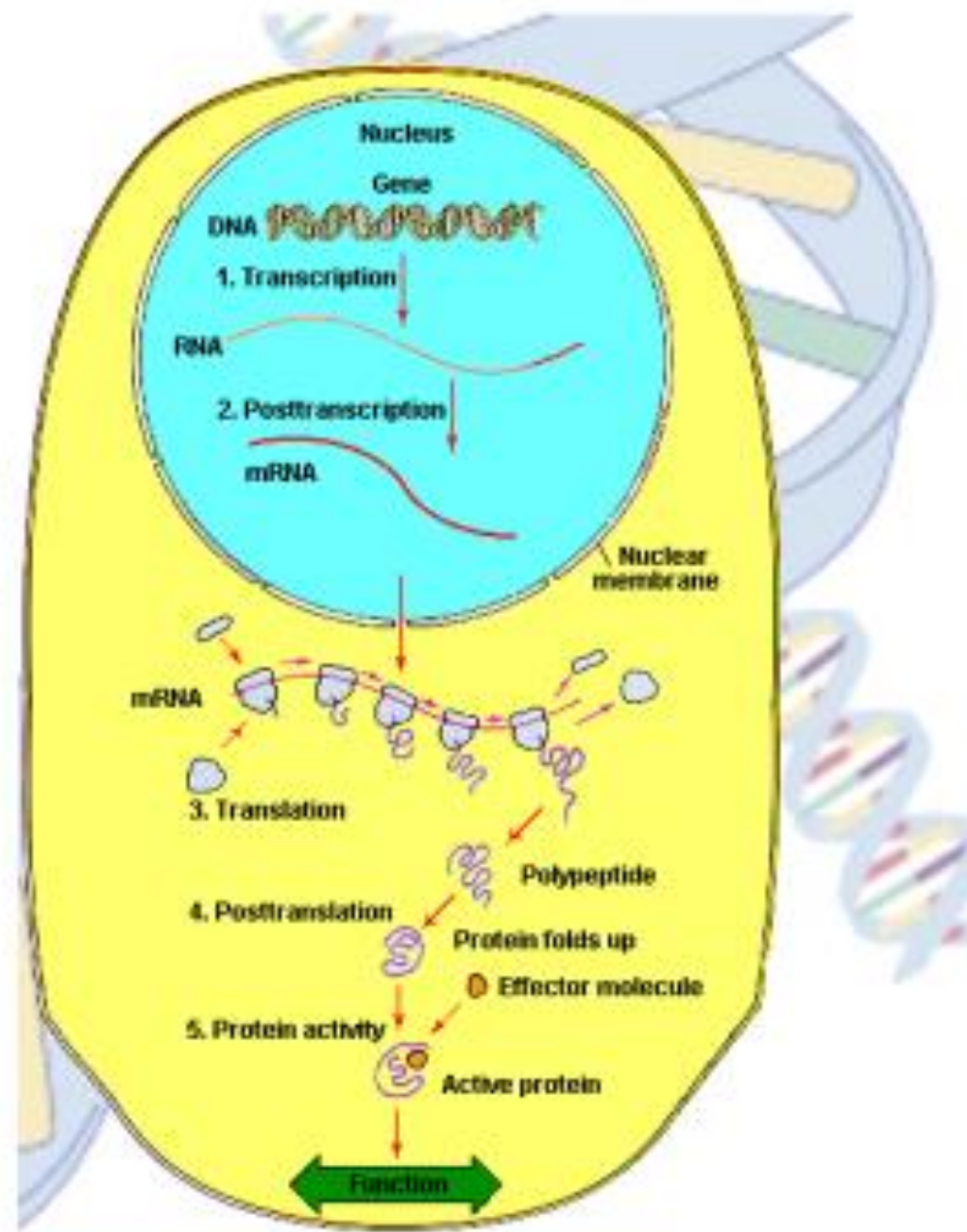
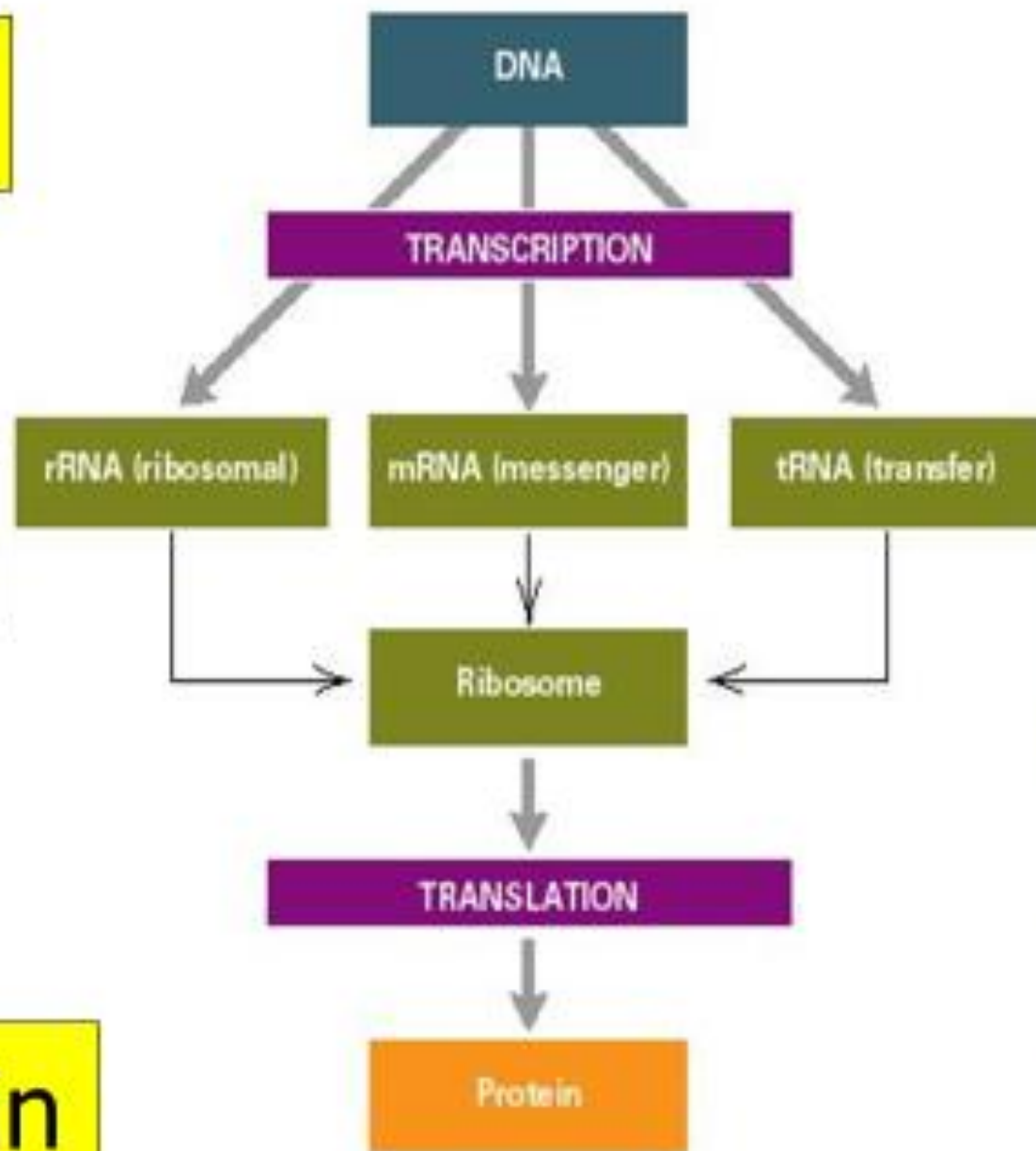
**Central
Dogma of
Molecular
Biology!**

Proposed by Francis Crick 1958

DNA

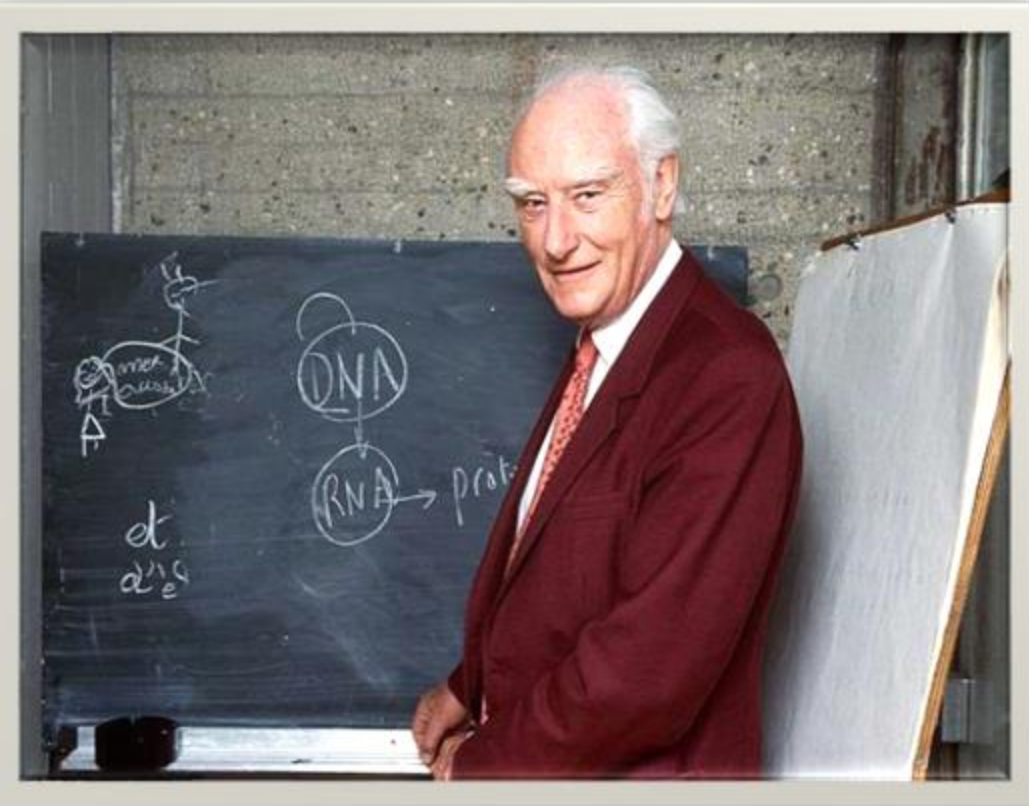
RNA

Protein

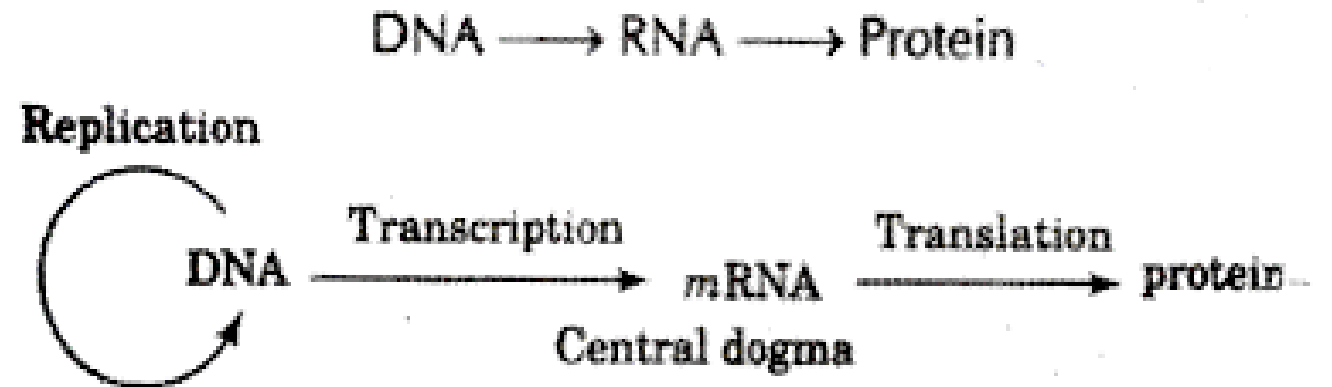


The Central Dogma Proposed by Francis Crick 1958

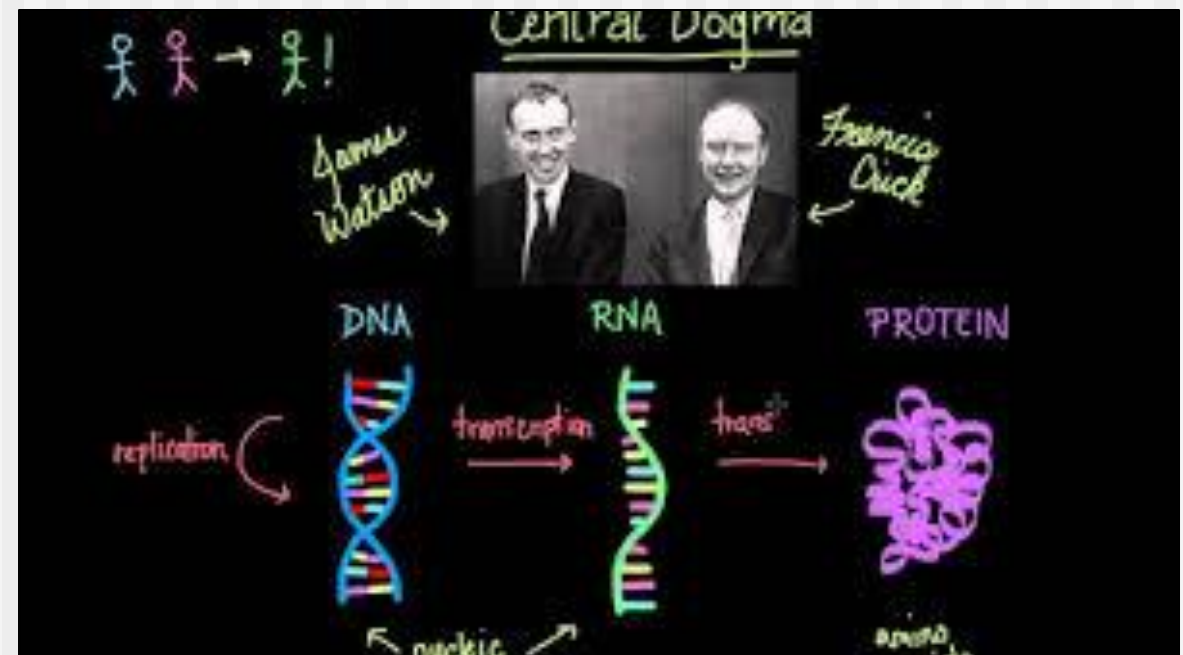
اقترحت بواسطة فرانسيس كريك 1958 لتصف التعبير الجيني



- يتم التعبير الجيني Gene expression بنقل المعلومات الوراثية من جزيئات الحامض النووي الـ DNA إلى جزيئات الحامض النووي الـ RNA، ثم من الـ RNA إلى جزيئات البروتين .



The Central Dogma



DNA هو مادة الوراثة

DNA is the genetic material

What is DNA?

ما هو DNA

- The work of many scientists paved the way **الطريق** for the exploration of DNA. Way back in 1868, almost a century before the Nobel Prize was awarded to Watson, Crick and Wilkins, a young Swiss physician named Friedrich Miescher **ميشر** , **يُدعى فريدريك** isolated something no one had ever seen before from the nuclei of cells. He called the compound "nuclein." This is today called nucleic acid, the "NA" in DNA (deoxyribo-nucleic-acid) and RNA (ribo-nucleic-acid).

- **مهد عمل العديد من العلماء الطريق لاستكشاف الحمض النووي.** في عام 1869 ، قبل ما يقرب من قرن من منح جائزة نوبل لواتسون وكريك وويلكنز ، وهو طبيب سويسري شاب **يُدعى فريدريك ميشر** ، **قام بعزل شيء لم يره أحد من قبل من نوى الخلايا** . أطلق على المركب اسم "نوكلين" "nuclein" . وهذا ما يسمى اليوم بالحمض النووي nucleic acid ، و "NA" في DNA (deoxyribo-nucleic-acid) و RNA (ribo-nucleic-acid).

• الأدلة التي تثبت أن المادة الوراثية هي DNA

• هناك كثير من الأدلة التي تثبت أن المادة الوراثية في معظم الكائنات الحية هي الـ DNA وفي حالة غياب هذا الحمض النووي في بعض الكائنات فإن الحمض النووي الثانى RNA يكون هو مادة الوراثة. ولقد قسمت هذه الأدلة إلى أدلة غير مباشرة وأدلة مباشرة.

• أولاً: الأدلة غير المباشرة

• هذه الأدلة مبنية أساساً على وجود تشابه بين الخواص الواجب توافرها في المادة الوراثية

وخصائص الحمض النووي DNA

• 1- أظهرت النتائج أن معظم الـ DNA يوجد في الكروموسومات بينما يوجد الـ RNA والبروتينات في السيتوبلازم.

• 2 - العلاقة الدقيقة الموجودة بين كمية الـ DNA لكل خلية وعدد الكروموسومات أو المجاميع الكروموسومية بها. فمثلاً معظم الخلايا الجسمية في الكائنات الثنائية تحتوي على كمية من الـ DNA ضعف الموجودة في جاميطات نفس النوع.

- 3- التركيب الجزيئي molecular structure للحمض النووي DNA متشابه في كل أنواع خلايا الكائن الحي (فيما عدا بعض الاستثناءات النادرة) بينما يختلف تركيب الحمض النووي RNA والبروتينات كميا ووضعا في طراز الخلايا المختلفة.
- 4- بافتراض أن جميع خلايا الكائن الواحد تشتمل على نفس المعلومات الوراثية فإن التركيب الكيميائي للمادة الوراثية يجب أن يكون متطابقا في كل أنسجة الكائن ، وبناء على هذا الأساس فإن نسبة القواعد البيورينية Purines للقواعد البريميدينية Pyrimidines المكونة للـ DNA يجب أن تكون ثابتة في كل أنسجة الكائن الواحد.



ثانيا: الأدلة المباشرة

- التحول الوراثي في البكتيريا: Bacterial Transformation
- اكتشفت هذه الظاهرة في البكتيريا المسببة للإلتهاب الرئوى في الإنسان *Diplococcus pneumoniae*

أول من اكتشف هذه الظاهرة هو العالم جريفت F. Griffith عام 1928 فى هذا النوع من البكتيريا ولكن تجاربه لم تقدم أى دليل على أن الـ DNA يلعب دور فى التوريث إلا أن تجاربه هذه قد فتحت المجال لتجارب ثلاثة من العلماء هم أفرى O.T. Avery، ماكلويد C.M. Macleod، ومكارثى M. McCarthy عام 1944 لإثبات أن المادة الوراثية فى البكتيريا هى الـ DNA وليست RNA أو البروتينات حيث أثبتوا أن المكون الخلوى المسئول عن ظاهرة التحول Transformation فى البكتيريا هو الحمض النووى DNA.

التحول: Transformation

- التحول Transformation هو نظام من الاتحادات الجديدة recombinations (تبادل أو انتقال معلومات وراثية بين الكائنات أو من كائن إلى آخر) الذى يحدث فى عديد وليس فى كل أنواع البكتيريا. وهذا التحول لا يتضمن الاتصال المباشر بين الخلايا البكتيرية أو وجود وسيط مثل الفيروس.
- ومن أهم الصفات المظهرية التى استخدمها جريفت لتتبع ظاهرة التحول:
- أ- وجود أو غياب الكبسولة المحيطة بالخلية البكتيرية والتى تتكون من سكريات عديدة Polysaccharides.
- ب- نوع الكبسولة: أى التركيب الجزيئى الموجود فى كبسولة عديدة السكر.

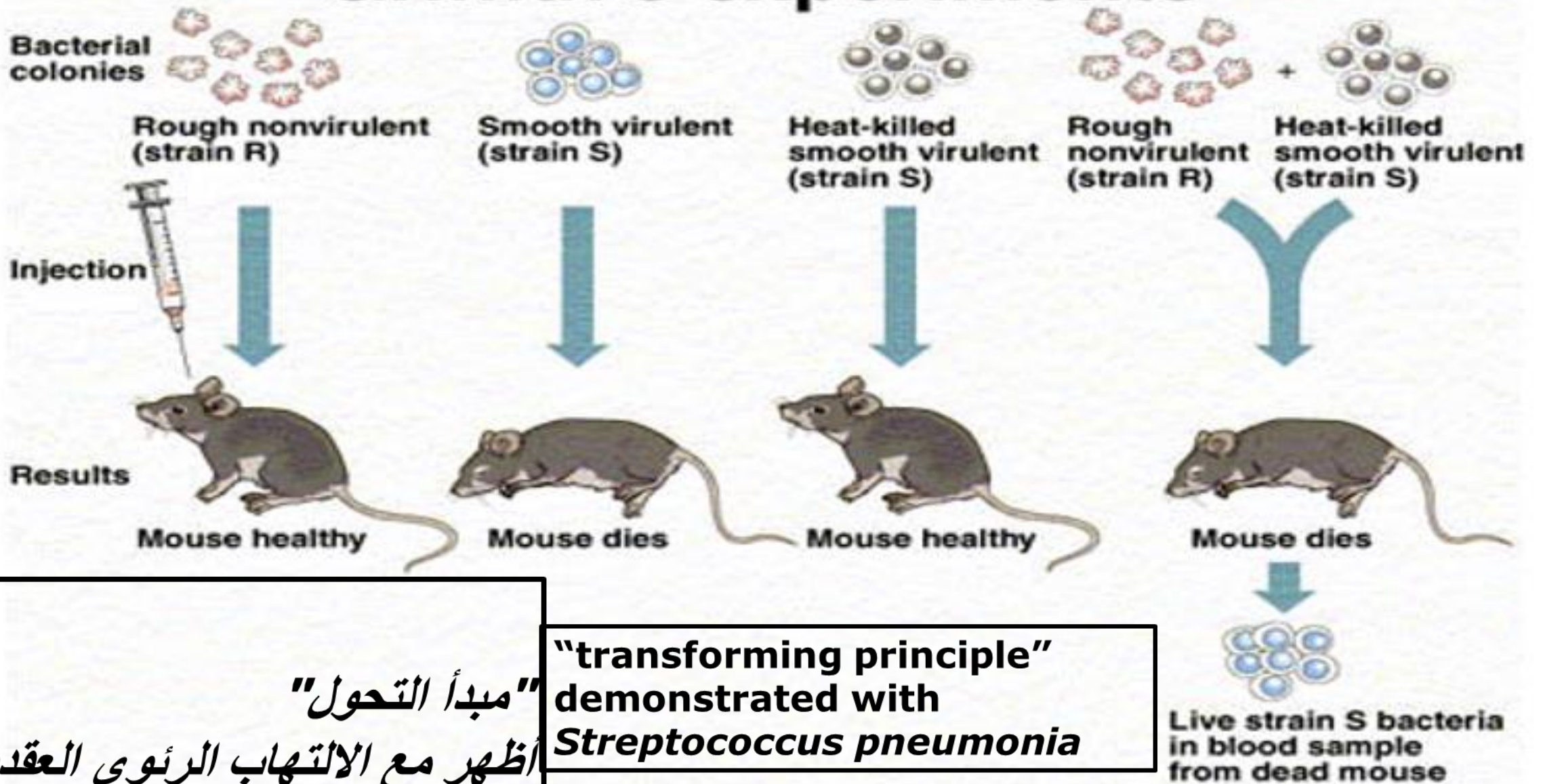
ويمكن تلخيص تجربة جريفت فى الآتى

- عند إنماء البكتيريا فى بيئة مناسبة فى أطباق بترى فإن البكتيريا ذات الكبسولة تكون مستعمرات كبيرة وملساء يرمز لها بالرمز Smooth Strain (S) هذا الطراز عادة ما يكون ممرضا Virulent لمعظم الثدييات (يسبب الالتهاب الرئوى فى الإنسان) كما أنه يمكن أن يطفّر إلى مستعمرات صغيرة خشنة يرمز لها بالرمز Rough Strain (R) وهى عادة غير ممرضة A virulent.

النتيجة المبهرة لجريفت

- والبكتيريا ذات الكبسولة (S) يمكن تقسيمها إلى نوعين من الانتيجينات Two antigens أو الطرز (طراز II، طراز III) وذلك بناء على التركيب الجزيئي النوعي للكبسولة عديدة التسكر وأيضا وفقا للتركيب الوراثي للخلية.
- وجد جريفت شيئا غير متوقعا ، فعندما حقن الفئران ببكتريا من الطراز S III بعد قتلها بالحرارة (هذه السلالة تسبب الإصابة عندما تكون حية) بالإضافة إلى الطراز الحى II R (غير الممرض) أصيبت كثيرا من الفئران بالالتهاب الرئوى وأمكن استخلاص بعض خلايا الطراز S III حية من أجساد الفئران الميتة.

Griffith's experiments



"مبدأ التحول"

أظهر مع الالتهاب الرئوي العقدي

"transforming principle" demonstrated with *Streptococcus pneumonia*

Griffith hypothesized that the transforming agent was a "IIIS" protein. But this was only a guess, and Griffith turned out to be wrong.

افترض جريفيث أن العامل المحوّل هو بروتين "IIIS" لكن هذا كان مجرد تخمين ، واتضح أن جريفيث كان على خطأ.

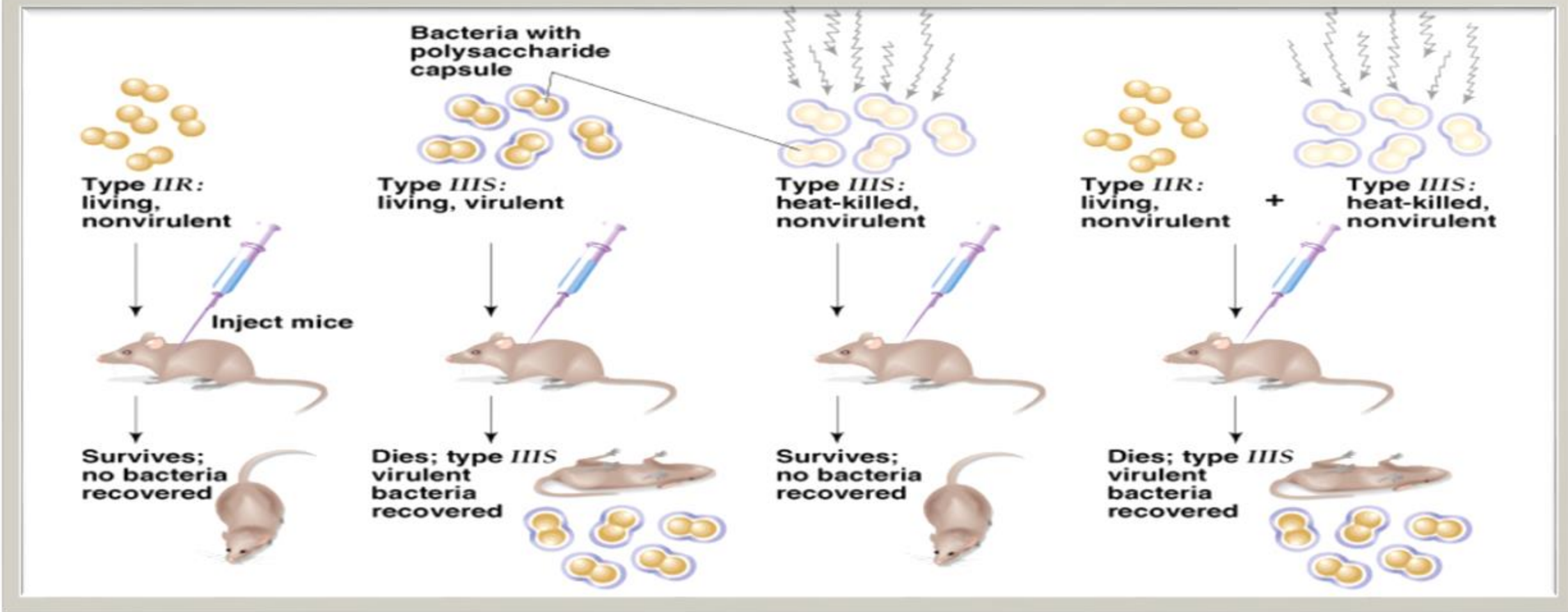
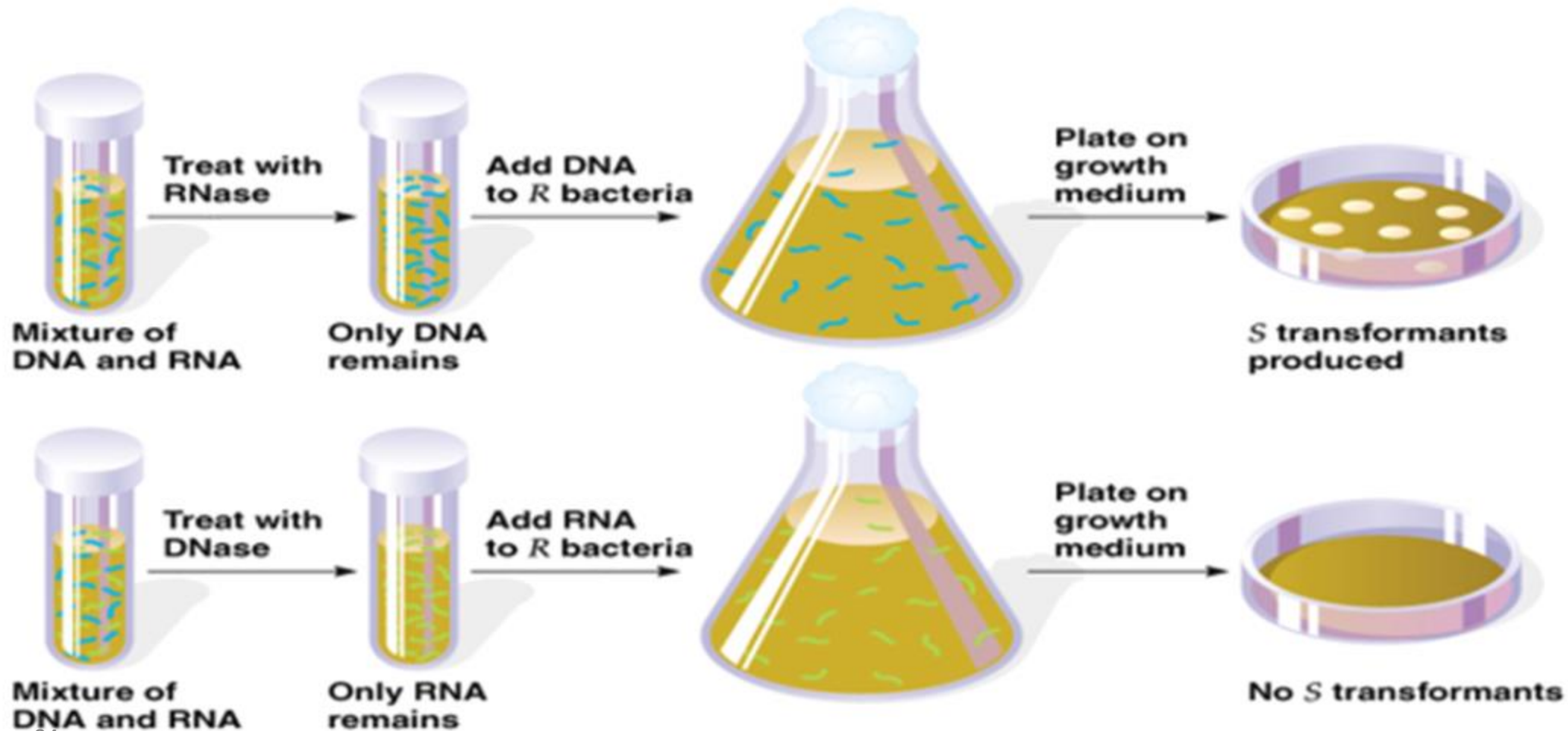


Fig. Frederick Griffith's Transformation Experiment - 1928

Oswald T. Avery's Transformation Experiment - 1944

Determined that "IIIS" DNA was the genetic material responsible for Griffith's results (not RNA).



DNA Replication

فرضية تضاعف DNA

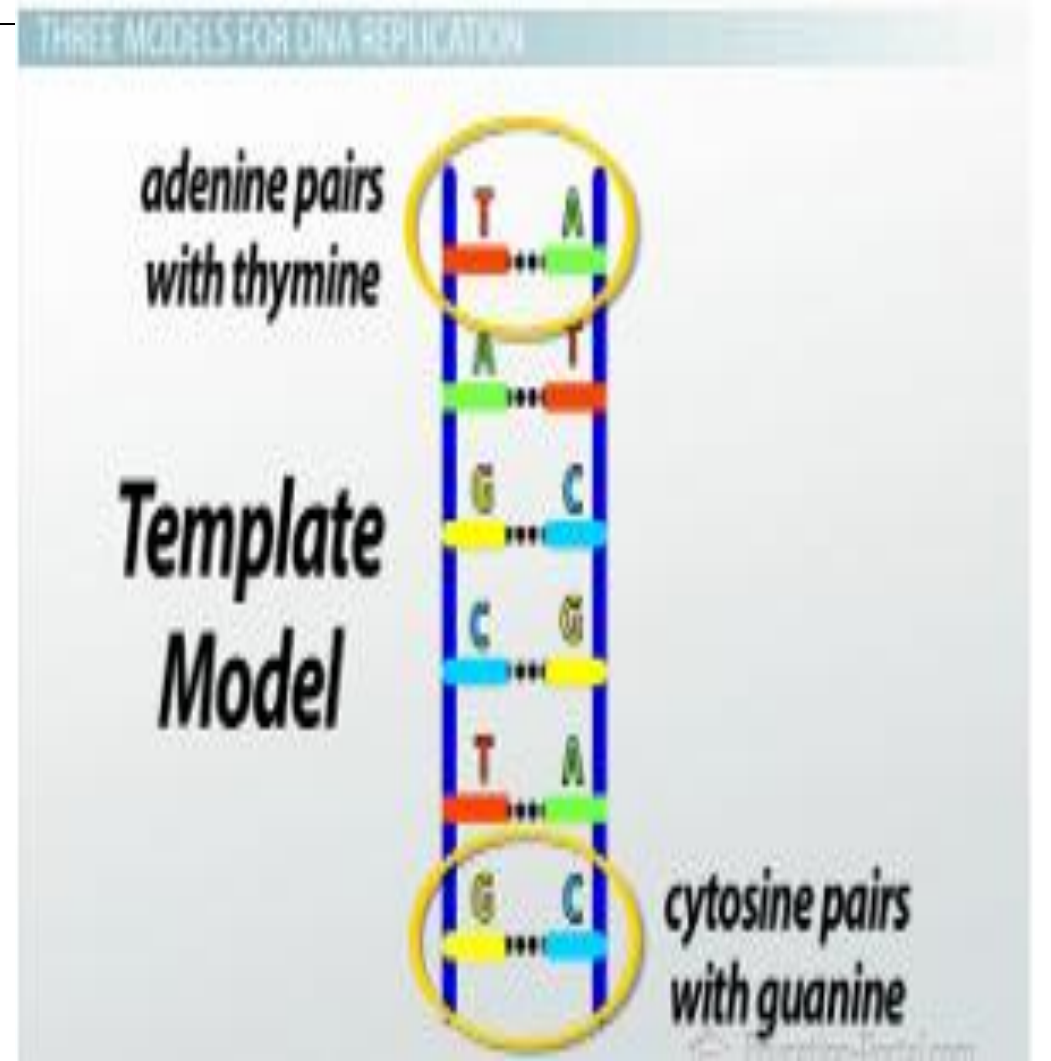
- قدما العالمان واتسون وكريك فرضا يقول أنه قبل بداية التضاعف أو أثناءه تتكسر الروابط الأيدروجينية التي تربط بين سلسلتى الـ DNA فى الجزئ الواحد وتتفكك الحلزنة ثم تبدأ السلسلتان المكونتان للجزئ فى الانفصال عن بعضهما عند نقطة أو أكثر لتقوم كل سلسلة منها بتوجيه بناء سلسلة جديدة مكمله لها Complementary وتتمشى أو تسير عملية تجميع (البلمرة) السلاسل الجديدة مع عملية انفصال السلاسل القديمة أولا بأول وينتهى الأمر بوجود جزيئين متماثلين مكان الجزئ الواحد.

التضاعف Replication

- أشار واتسون وكريك أن القواعد النتروجينية المتكاملة على شريطي DNA تتيح لكل شريط منفرد بناء شريط مقابل له ومتكامل معه.

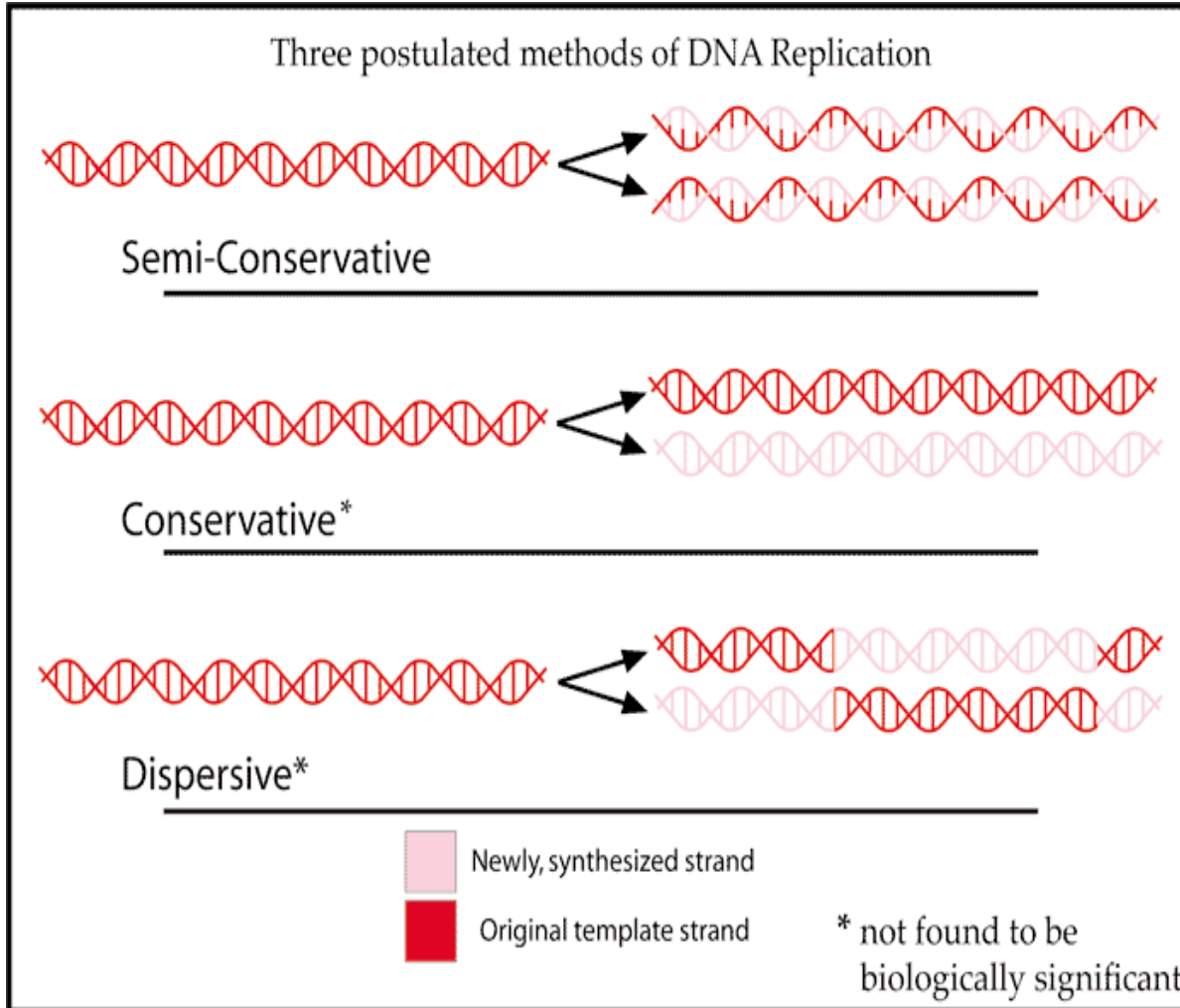
أي أن كل شريط DNA قديم يعمل كقالب

لبناء شريط DNA جديد.



والطرق المحتملة لتضاعف الـ DNA

- تدرج تحت ثلاث نماذج مختلفة مقترحة لذلك:



- 1) Semiconservative
- 2) Conservative
- 3) Dispersive

الطرق المحتملة لتضاعف الـ DNA

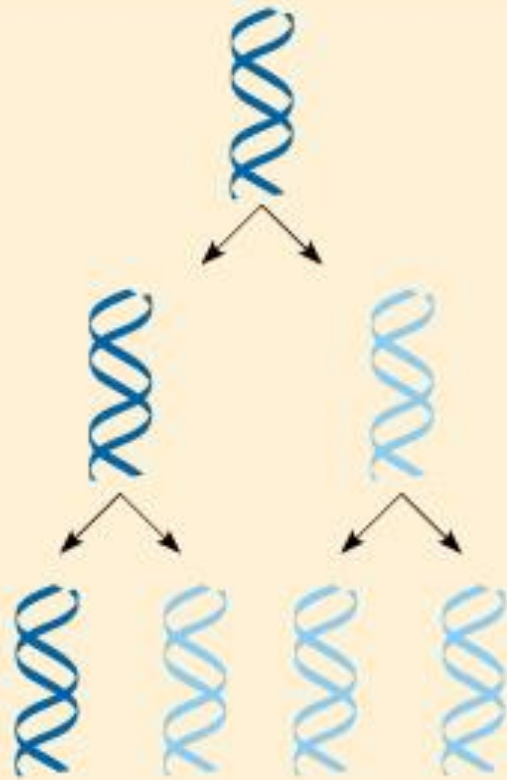
- (1) تضاعف DNA شبه المتحفظ Semiconservative Replication of DNA :
وفقًا لهذا النموذج ، فإن تضاعف الحمض النووي سيخلق جزيئين. سيكون كل واحد منهم عبارة عن مجمع من خيط قديم (أبوي وابنة).
- (2) تضاعف DNA المحافظ Conservative Replication of DNA :
وفقًا لهذا النموذج ، فإن عملية التضاعف للحمض النووي ستخلق حلزونًا مزدوجًا جديدًا للحمض النووي مكونًا من خيطين ابنتين بينما تظل السلاسل الأبوية معًا.
- (3) تضاعف DNA المشتت Dispersive Replication of DNA :
وفقًا لهذا النموذج ، فإن عملية التضاعف ستنشئ سلسلتين مزدوجتين من الحمض النووي ، كل منهما تحتوي على أجزاء من كل من الجزيئات الأم والابنة.

Three Models of DNA Replication

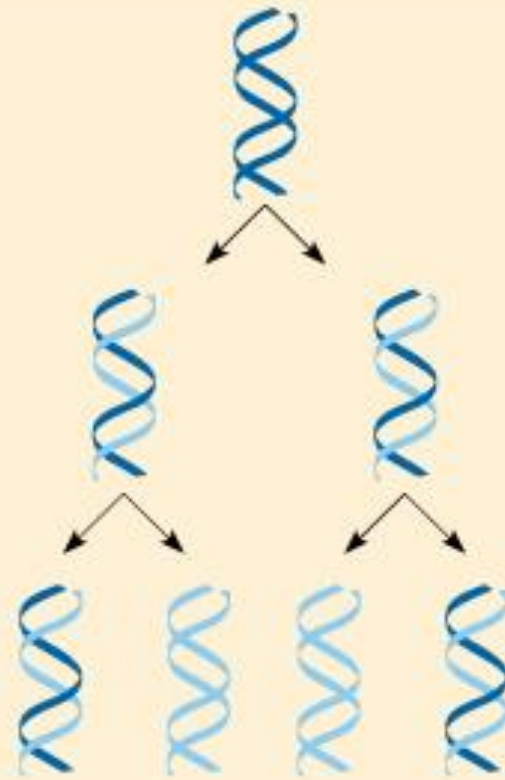
**PARENT
CELL**

**FIRST
REPLICATION**

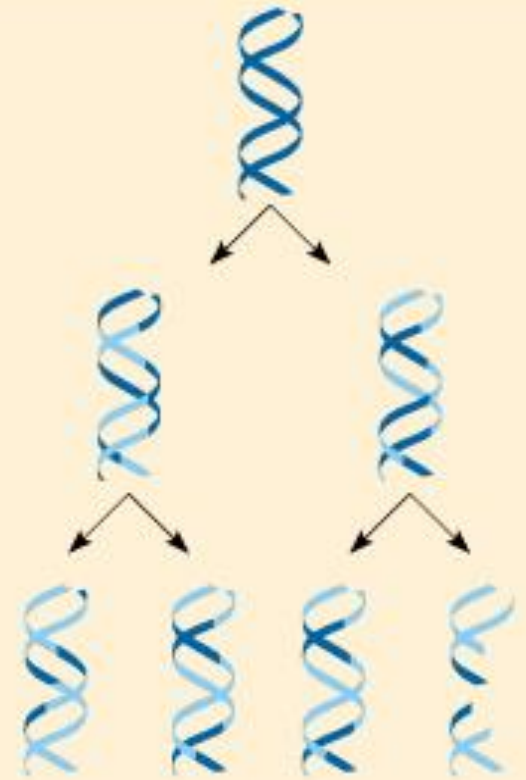
**SECOND
REPLICATION**



(a) Conservative model: The parental double helix remains intact and a second, all-new copy is made.



(b) Semiconservative model: The two strands of the parental molecule separate, and each functions as a template for synthesis of a new complementary strand.



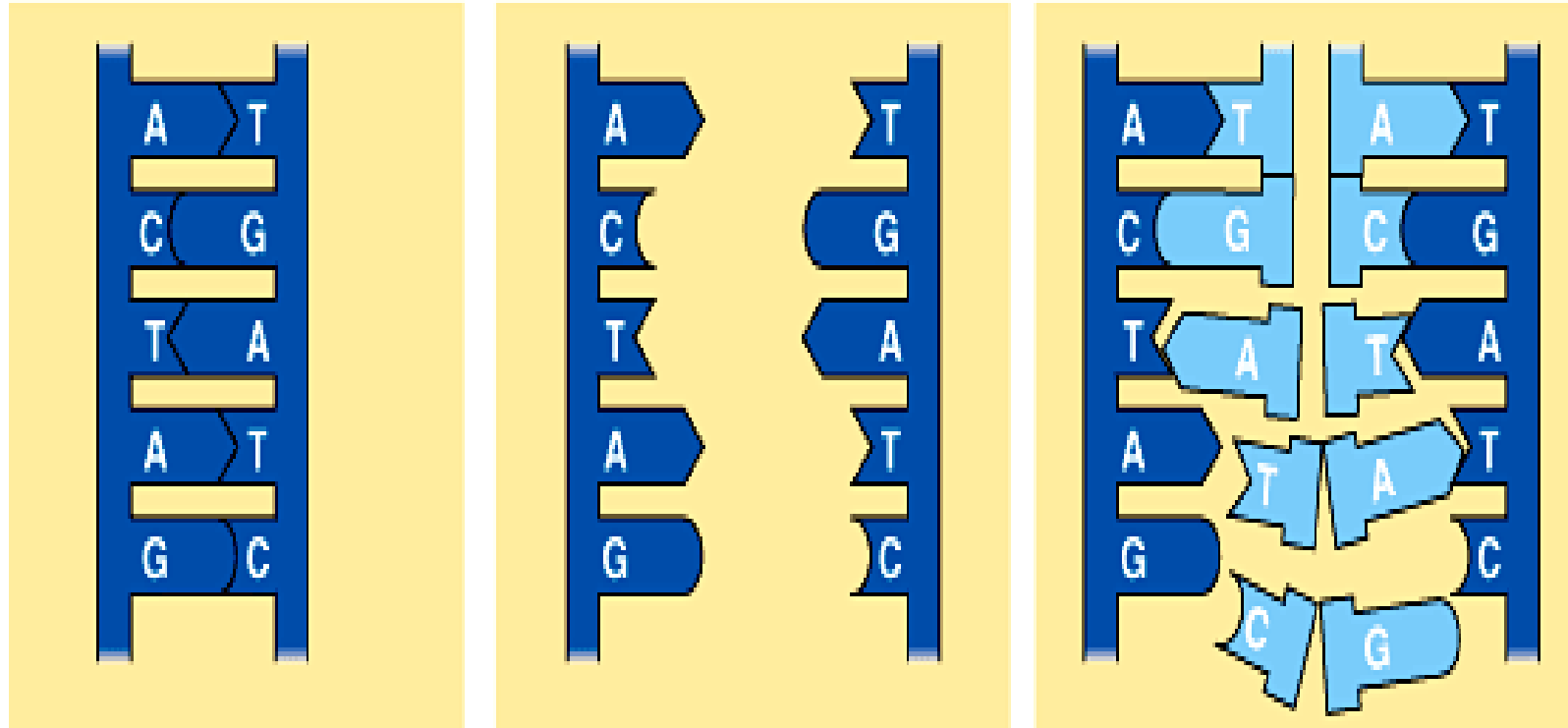
(c) Dispersive model: Each strand of both daughter molecules contains a mixture of old and newly synthesized parts.

الطريقة الشبه محافظة لتضاعف المادة الوراثية

Semiconservative Replication of DNA

- وفيها يمكن لكل خيط أبوى فى هذه الحالة أن يدير عملية تكوين خليط مكمل جديد على أساس شروط نظام تزاوج القواعد النتروجينية السابق ذكره. وبالتالي فكل خيط أبوى يعمل كقالب لخيط جديد . فمثلا الجوانين G فى الخيط الأبوى يعمل كقالب لوضع السيتوزين C وأيضا الثيمين T فى الخيط الأبوى يعمل كقالب لوضع الأدنين A وسميت هذه الطريقة فى تضاعف DNA بالطريقة الشبه محافظة للتضاعف نظرا لأن الحلزون الأبوى المزدوج يحافظ عليه جزئيا أثناء تضاعف الحامض النووى DNA وآلية التضاعف شبه المحافظة Semiconservative Replication Mechanism هذه قد تم اقتراحها بواسطة العالمان واتسن وكريك . وهى طريقة بسيطة وتوضح كيفية مضاعفة الحامض النووى DNA. كما فى الشكل التالى

DNA Replication



Each parental strand now serves كقالب that determines the order of the bases along a new complementary strand.

كل سلسلة أبوية تخدم كقالب والتي يحدد ترتيب القواعد في السلسلة الجديدة المكمل

الطريقة المحافظة لتضاعف المادة الوراثية Conservative Replication of DNA

- آلية هذه الطريقة هو بقاء الحلزونات الأبوية المزدوجة كما هي بدون أن تنفصل السلسلتين عن بعضهما أى بدون تكسر الروابط الهيدروجينية الموجودة بين القواعد الآزوتية ومن هنا جاءت التسمية أنها محافظ عليها تماما . وفى هذه الطريقة فإن الحلزون المزدوج يقوم بتكوين حلزون مزدوج جديد مكون من خيطين مخلقين.
- (لاحظ أن الحلزون الابوى المزدوج استخدام كقالب لتكوين هذان الخيطان) .

الطريقة التشتتية لتكرار المادة الوراثية Dispersive Replication of DNA

- يتم فيها تداخل أجزاء من الخيوط الأبوية والخيوط الجديدة من خلال عمليات تكسير وتخليق والتحام هذه الأجزاء, ويجدر الإشارة أن هذا التداخل بين أجزاء الخيوط بطريقة عشوائية . الشكل يوضح التداخل العشوائي (تكسير - تخليق - إعادة التحام) أثناء الطريقة التشتتية لتضاعف الحامض النووي الديزوكس ريبوزى . DNA

التحقق من الطريقة الفعلية للتضاعف

- ولقد أجريت بعض التجارب الهامة للتحقق من أى من هذه الطرق يحدث فعلا فى

حالة تضاعف الحمض النووى DNA

- ومنها تجربة ميسلسون واستال The Meselson & Stahl Experiment

The Meselson & Stahl Experiment

تجربة ميسلسون وستال

- تم إجراء هذه التجربة بواسطة العالمان ميسليون وستال عام 1958 وكان الغرض منها هو التعرف على أى من طرق التضاعف السابقة هو الذى يحدث فى الخلايا. وأثبتت هذه التجربة أن تضاعف الـ DNA فى بكتيريا *E. coli* وقد يكون فى معظم الكائنات يحدث بالطريقة شبه المحافظة.

التنمية على بيئة تحتوي نيتروجين N15

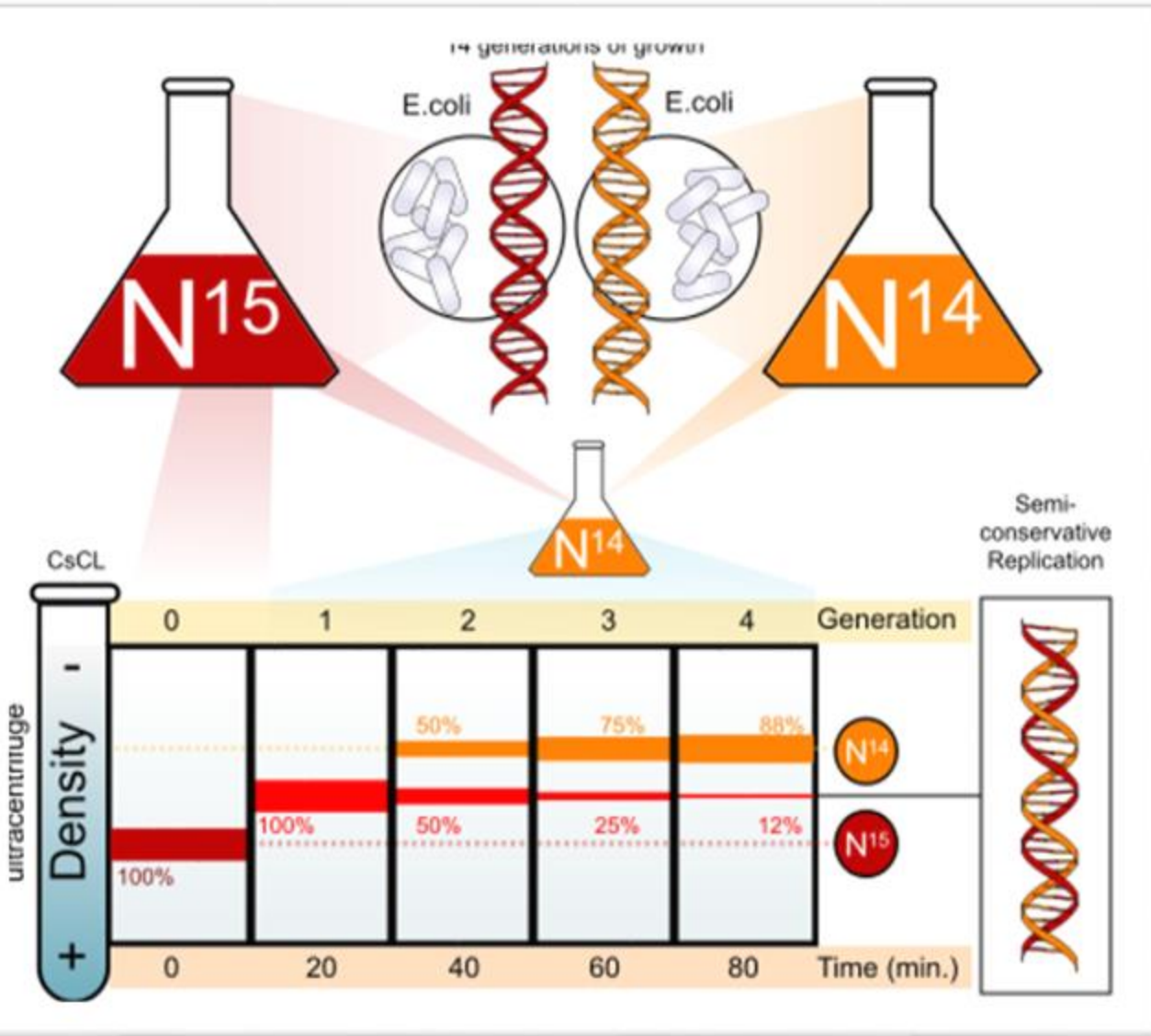
- ثم أخذ بكتيريا E. coli وتنميتها على بيئة تحتوي على مصدر نيتروجين N15 بدلا من N14 والمعروف أن N15 هو النظير الثقيل لـ N14 ولكنه غير مشع. وقواعد البيورين Purines والبريميدين Pyrimidines التي تدخل في تركيب الـ DNA تحتوي على النيتروجين. ولذلك فإن DNA الخلايا التي نمت على بيئة تحوى على مصدر نيتروجين N15 يكون ذو درجة كثافة أعلى من DNA الخلايا التي تنمى على بيئة مصدر النيتروجين فيها هو N14 العادى. ويمكن فصل جزيئات الـ DNA مختلفة الكثافة عن طريق عملية الطرد المركزى مع التوازن المتدرج فى الكثافة (الذي يطلق عليها تجارب تغيير الكثافة) (شكل 2-3).

تابع

- وقد أخذ هذان العالمان خلايا بكتيرية سبق تنميتها على بيئة تحتوى على النظير الثقيل N^{15} لعدة أجيال (لذا فهي تحتوى على DNA ثقيل) ثم غسلت هذه الخلايا لإزالة آثار البيئة المحتوية على N^{15} ونميت بعد ذلك على بيئة مصدر النيتروجين فيها N^{14} العادى. وبعد نمو هذه الخلايا على البيئة الجديدة لفترات زمنية مختلفة ثم استخلص الـ DNA وحلل باستخدام منحني اتزان الكثافة في محلول كلوريد السيزيوم.

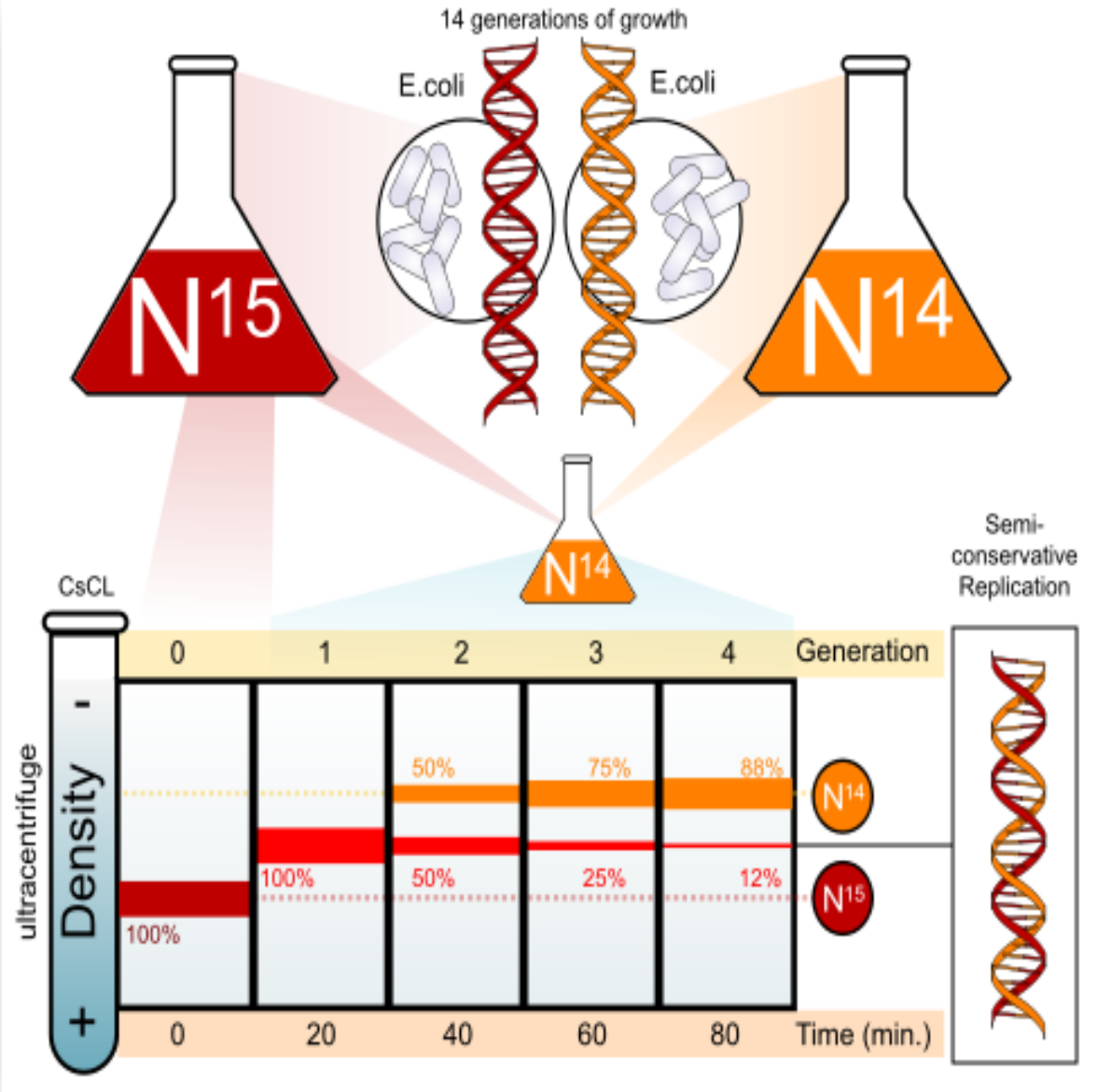
- وجد بعد جيل واحد من النمو فى البيئة الجديدة أن كثافة الـ DNA الناتج كانت متوسطة (تحتوى على DNA ثقيل و DNA خفيف بنسبة 1:1). وبعد الجيل الثانى كان جزء من الـ DNA كثافته متوسطة (DNA ثقيل مع DNA خفيف) وجزء كبير به DNA خفيف كثافته أقل.
- (شكل 2-3)

كلوريد السيزيوم (CsCl).



وتكون كثافة الـ DNA مماثلة تقريبا لكثافة المحاليل المركزة للأملح الثقيلة مثل كلوريد السيزيوم (CsCl). فعند خلط الـ DNA مع ملح كلوريد السيزيوم بتركيز معين وعمل طرد مركزي على 30.000-50.000 لفة/دقيقة لمدة 48-72 ساعة فإنه يتكون اتزان متدرج الكثافة Equilibrium density gradient فإذا ما تواجد الـ DNA في هذا التدرج فإنه سوف يتحرك إلى الموقع الذي تكون فيه كثافة المحلول الملحي مساوية لكثافة هذا الـ DNA

الخلاصة

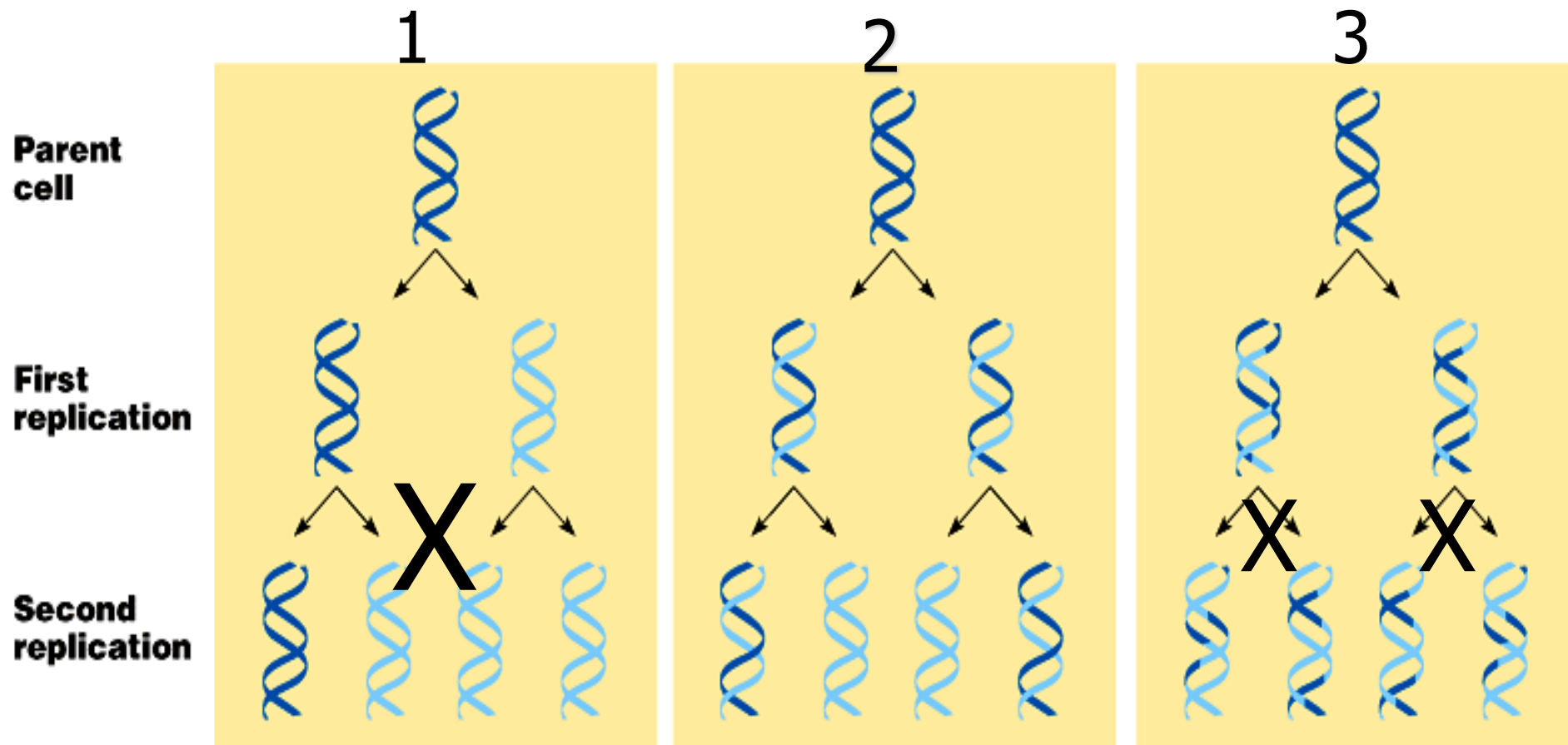


- وقد تطابقت نتائج هذه التجربة تماما مع نظرية تضاعف الـ DNA بالطريقة شبه المحافظة Semiconservative واستبعدت احتمالات حدوث التضاعف بالطريقة المحافظة أو التشتتية.

- فجميع الـ DNA المعزول من الخلايا التي نمت لمدة جيل واحد في بيئة تحتوي على N¹⁴ يكون ذو كثافة وسطية ما بين كثافة الـ DNA الثقيل والخفيف. وهذه الكثافة عادة يطلق عليها **الكثافة الهجينية** وبعد جيلين من النمو في البيئة المحتوية على N¹⁴ فإن نصف كمية الـ DNA تظهر كثافة هجينية بينما يظهر النصف الآخر كثافة خفيفة.

كيف يتضاعف DNA ؟ How does DNA replicate?

الفروض: 1 و 3 ثبت خطأها



Conservativ المحافظ

Semi-Conservative الشبه م

Dispersive التشتتي

In vitro DNA Synthesis

إبتناء DNA معمليا

التخليق الصناعي للـ DNA خارج الخلية: In vitro DNA Synthesis

- أول من قام بتخليق الـ DNA صناعيا هو العالم آرثر كورنبرج A. Kornberg الحاصل على جائزة نوبل عام 1959 عن هذا العمل العظيم.
- وقد قام كورنبرج بعزل إنزيم البلمرة للـ (DNA Polymerase) من خلايا بكتيريا القولون E. Coli ويطلق البعض على هذا الإنزيم اسم إنزيم كورنبرج Kornberg enzyme هذا الإنزيم له المقدرة على تجميع أو بلمرة (Polymerization) نيكلوتيدات ثلاثية الفوسفات /-5 Nucleotide Triphosphate لتكوين خيوط عديدة النيكلوتيدات Polynucleotides

وقد قام كورنبرج بتوفير المكونات الأساسية والظروف المناسبة لتخليق الـ DNA

- وهى:
- 1- نيكلوتيدات الـ أوكس ريبوز للقواعد الأربعة (dATP, dCTP, dGTP, dTTP.)
- 2 - إنزيم بلمرة الـ DNA ويسمى DNA Polymerase I.
- 3 - بعض جزيئات الـ DNA الطبيعية التى تعمل كقالب لتخليق الـ DNA الجديد ويطلق على هذه الجزيئات الطبيعية Primary DNA ويمكن الحصول عليه عن طريق عمل تحليل denaturation للـ DNA يتم ذلك على حرارة 5100م لمدة 10 دقائق).
- 4 - مصدر للطاقة وهو ATP.
- 5 - بعض أيونات المغنيسيوم (عنصر ثنائى التكافؤ) التى تعمل كمنشط للإنزيمات.
- 6- التحضين على درجة حرارة 55-560م لمدة 2-3 ساعة لعمل البلمرة. Polymerization.

• وتحت هذه الظروف تمكن كورنبرج من الحصول على جزيئات DNA لها نفس الخواص الكيميائية والفيزيائية للـ DNA الطبيعى.

الإختلافات بين الـ DNA المخلق صناعيا والـ DNA الطبيعي

- ولكن هناك اختلافات بسيطة بين الـ DNA المخلق صناعيا والـ DNA الطبيعي وهى:
 - أ- الـ DNA المخلق صناعيا يحتوى على أكثر من نقطة لبداية التضاعف Origin of Replication.
 - ب- DNA المخلق صناعيا قد يحتوى على أجزاء متفرعة لا يمكن تغييرها بالتسخين أى ليس من السهل عمل تحلل Denaturation لها.
 - ج- أحيانا لا يتحد الـ DNA المخلق صناعيا بأغشية الخلايا كما يحدث مع الـ DNA المخلق داخل الخلية *in vivo*

DNA: Franklin, Crick & Watson
1953



Dr. Abdel-Hamid Ali •



THANK YOU