التقانات الأحيائية Biotechnology

المحاضرة السادسة- تضاعف الحامض النووي المنقوص الأوكسجين
DNA Replication

د. لبيد السعد - جامعة البصرة - كلية الزراعة - قسم وقاية النبات

مصطلحات مهمة

- تضاعف الـDNA (DNA Replication): وهي عملية حيوية يتم خلالها انتاج نسختين متماثلتين من الـDNA بالاعتماد على نسخة أصلية واحدة. وهذه العملية تحدث في جميع الكائنات الحية وهي اسا الوراثة البايولوجية.
- منطقة التضاعف Origin of Replication: وهو عبارة عن تتابع محدد في الجينوم تبدأ منه عملية تضاعف الجينوم وهذا يشمل تضاعف الكائنات الحية البدائية والحقيقية النواة وكذلك الفايروسات ذات الشريط المزدوج سواء كان DNA أو RNA.
- معقد بدء التضاعف Pre-Replication complex (Pre-RC): وهو عبارة عن معقد بروتيني (يتكون من سلسلتسن ببتيديتين مرتبطتين أو أكثر) يتشكل عند منطقة التضاعف خلال الخطوة الأولى من العملية ووجوده مهم جدا لبدء عملية التضاعف.
- بروتينات منع الارتباط Single Strand Binding proteins (SSB): ترتبط هذه البروتينات بشريطي الـDNA بعد فك ارتباطهما بواسطة الهليكيز وتمنع اعادة التصاقهما للتمكن من اكمال استنساخهما.

مصطلحات مهمة

- الهلكيز Helicase: وهو نوع من الإنزيمات الحيوية والمهمة للكائنات الحية وظيفته الأساسية فك ارتباط شريطي الـDNA وهذا الإنزيم عبارة عن بروتين يتحرك باتجاه ثابت على طول شريط الـDNA ويعمل على كسر الأواصر الهدروجينية لفك ارتباطاشريطين باستخدام الطاقة المتحررة من تحلل ATP.
- التوبيزوميريز Topisomerase: يعمل هذا الإنزيم على فك الأتواء (البرم) الناتج عن عملية فك ارتباط الشريطين حيث يرتبط هذا الإنزيم بالشريطين ويعمل على قطع أحدهما أو كلاهما مؤقتا لإزالة الالتواء ثم يعيد ربطهما من جديد. ومن انواعه DNA gyrase.
- البرايميز Primase: وهو عبارة عن إنزيم يعمل على اضافة نقطة بداية بشكل برايمر RNA primer ليتمكن انزيم البوليمريز من عمل نسخة من شريط الـDNA.
- البوليميريز DNA Polymerase: وهو الأنزيم المسؤول عن اضافة نيوكليوتيدات جديدة لكل شريط من أشرطة الـDNA من النهاية 5′ باتجاه 3′ بالنسبة للـ DNA polymerase III لعمل نسختين متطابقتين من كل شريط أما DNA Polymerase I ملأ الفراغات بعد إزالة الـ RNA primer الموجود في السلسة العكسية Lagging strand.

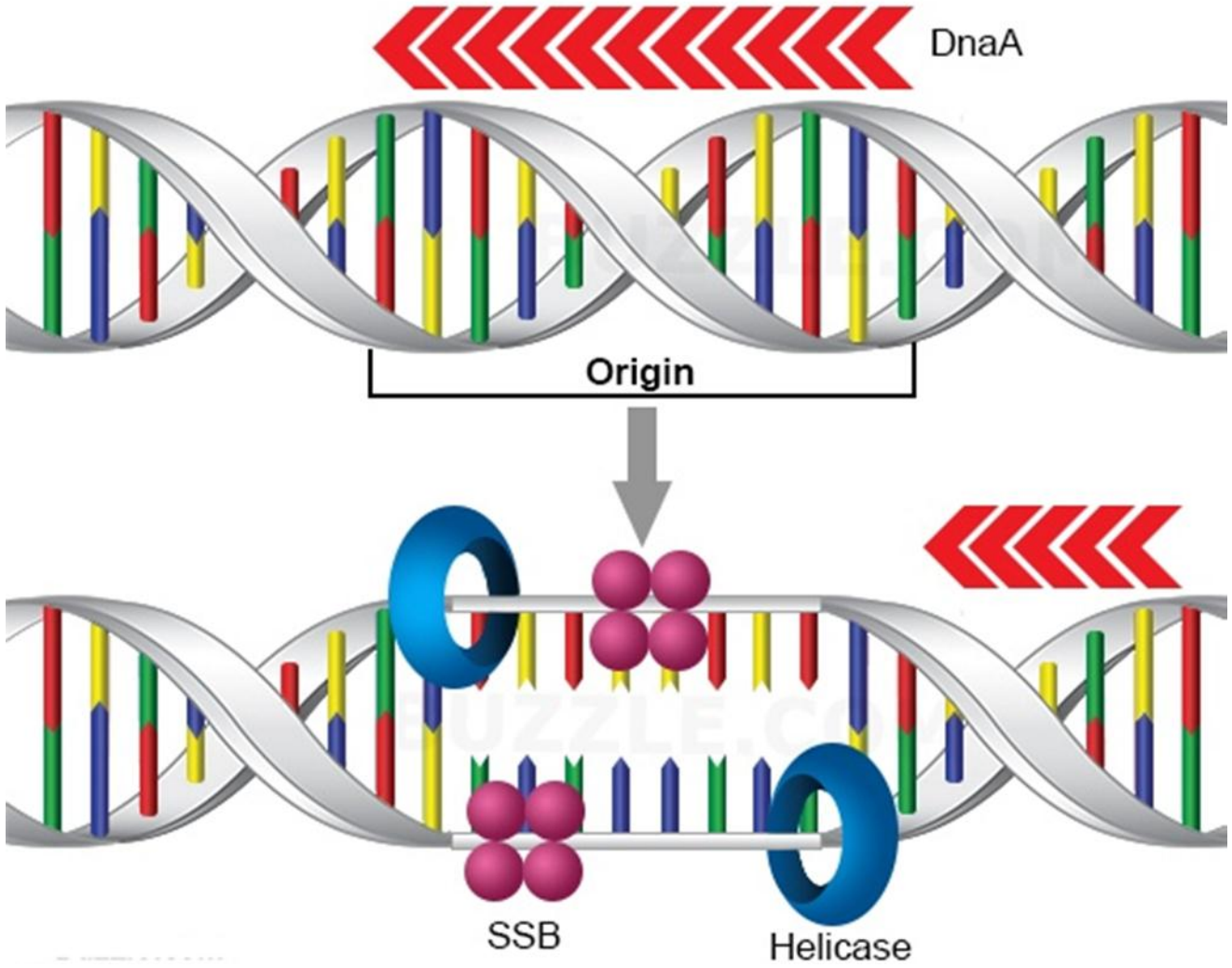
مصطلحات مهمة

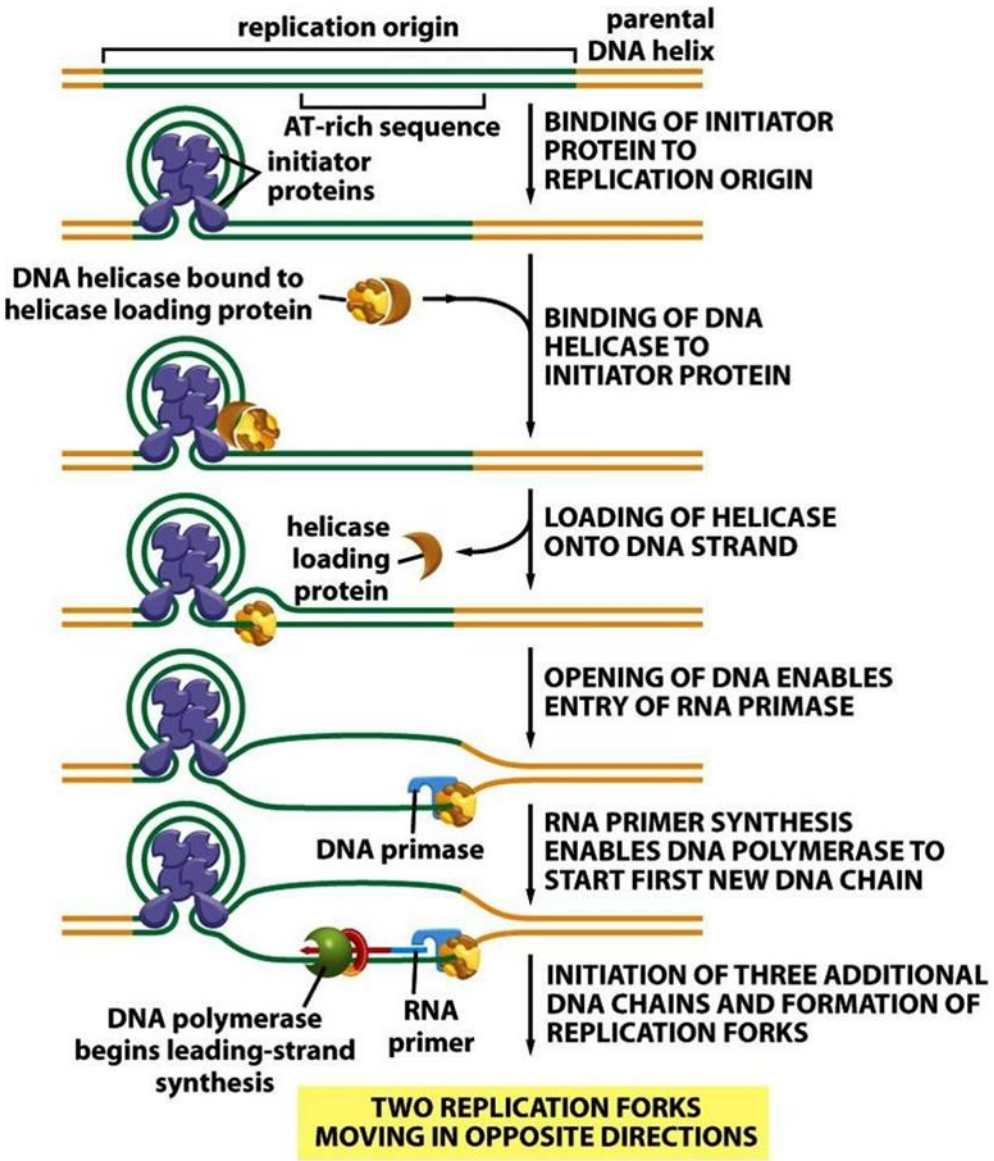
- قطع اوكازاكي Okazaki fragments: وهي عبارة قطع صغيرة من شريط الـDNA الحديث التكوين على السلسلة العكسية يتراوح طولها من ١٠٠٠-٢٠٠٠ قاعدة نتروجينية في الكائنات البدائية النواة ومن ١٠٠-٢٠٠ قاعدة نتروجينية في الكائنات الحقيقية النواة وتكون هذه القطع مفصولة ببرايمر (RNA primer) طوله حوالي ١٢٠ قاعدة وتبقى مفصولة لحين ازالة البرايمر وسد الفراغات بواسطة DNA polymerase I ومن ثم توصيلها بواسطة الليكيز.
- الليكيز DNA Ligase: وهو عبارة عن إنزيم يعمل على ربط قطع شريط الـDNA في السلسلة العكسية Lagging strand والمعروفة بقطع اوكازاكي Okazaki fragments.
- التيلوميريز Telomerase: عبارة عن أنزيم يعمل على اطالة منطقة التيلومير Telomere (وهي منطقة نهاية الكروموسوم) بالنسبة للشريط العكسي عن طريق اضافة تتابعات متكررة ليتسنى اكمال استنساخه.
- شوكة التضاعف Replication fork: وهي المنطقة التي يحدث فيها تضاعف شريطي الـDNA فعليا حيث يفتح الشريطين ليكونان شكل يشبه شوكة الطعام Fork او حرف Y ويسمى احد الشريطين بالشريط القائد أو الأمامي Leading strand ويسمى الثاني بالشريط المتخلف أو العكسي Lagging strand.

خطوات تضاعف الـ DNA

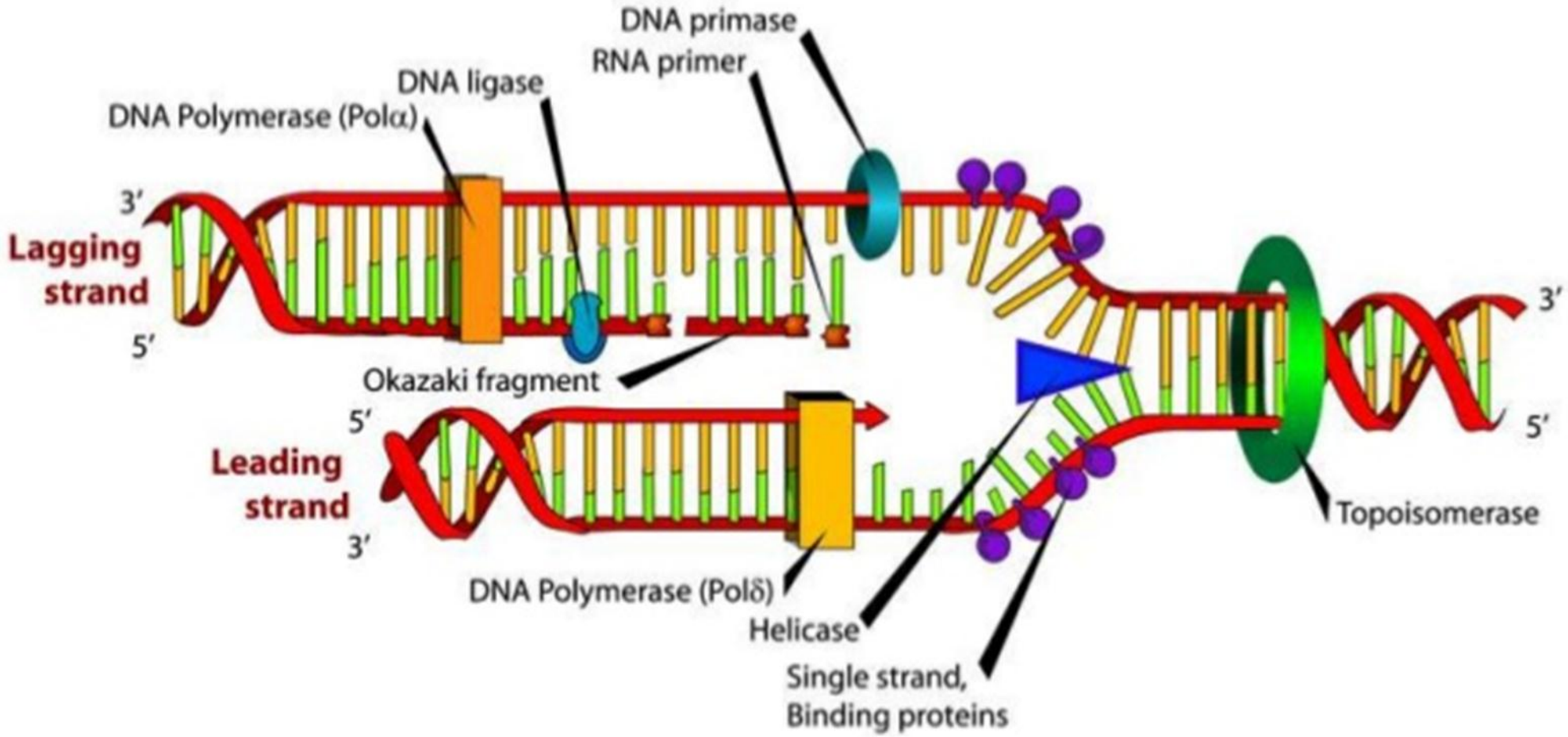
- أنشاء بداية التضاعف Initiation: وتتم هذه الخطوة من خلال استهداف منطقة بداية التضاعف Origin of Replication من قبل بروتينات خاصة لتكون معقد بروتيني يسمى بمعقد التضاعف الإبتدائي Pre-replication complex.
- فتح الشريطين Denaturation: وتتم من خلال كسر الأواصر الهيدروجينية بواسطة إنزيم الهليكيز والذي يدعم بارتباط بروتينات منع الالتصاق لتثبيت انفصال الشريطين اثناء عملية الاستنساخ وتكوين شوكة التضاعف Replication fork حيث يكون شكل الشريطين المنفصلين يشبه الحرف Y او شوكة الأكل.
- بعد انفصال الشريطين يكون أحدهما باتجاه شوكة التضاعف ويسمى بالشريط القائد Leading strand (5′ to 3′) أما الثاني يكون (5′ to 3′) ولكن عكس اتجاه الشوكة ويسمى بالشريط المتخلف أو العكسي Lagging strand ونظرا لهذا التموضع فأن الشريطين سيتضاعفان بشكل مختلف.

خطوات تضاعف الـ DNA





خطوات تضاعف الـ DNA



خطوات تضاعف الـ DNA

السلسلة القائدة (الأمامية) Leading strand

- يلتصق بها برايمر واحد RNA primer بواسطة انزيم البرايميز في نهاية الشريط ويعمل كنقطة بداية للتضاعف.
- يلتصق انزيم البوليمريز Polymerase III عند موقع البرايمر الابتدائي مرة واحدة ويمشي على طول السلسلة مضيفا نيوكليوتيدات حاوية على الأدنين A مقابل كل ثيامين T وكوانين G مقابل كل سايتوسين C وبالعكس.
- يسمى هذا النوع من التضاعف بالتضاعف المستمر Continuous replication.

السلسلة المتخلفة (العكسية) Lagging strand

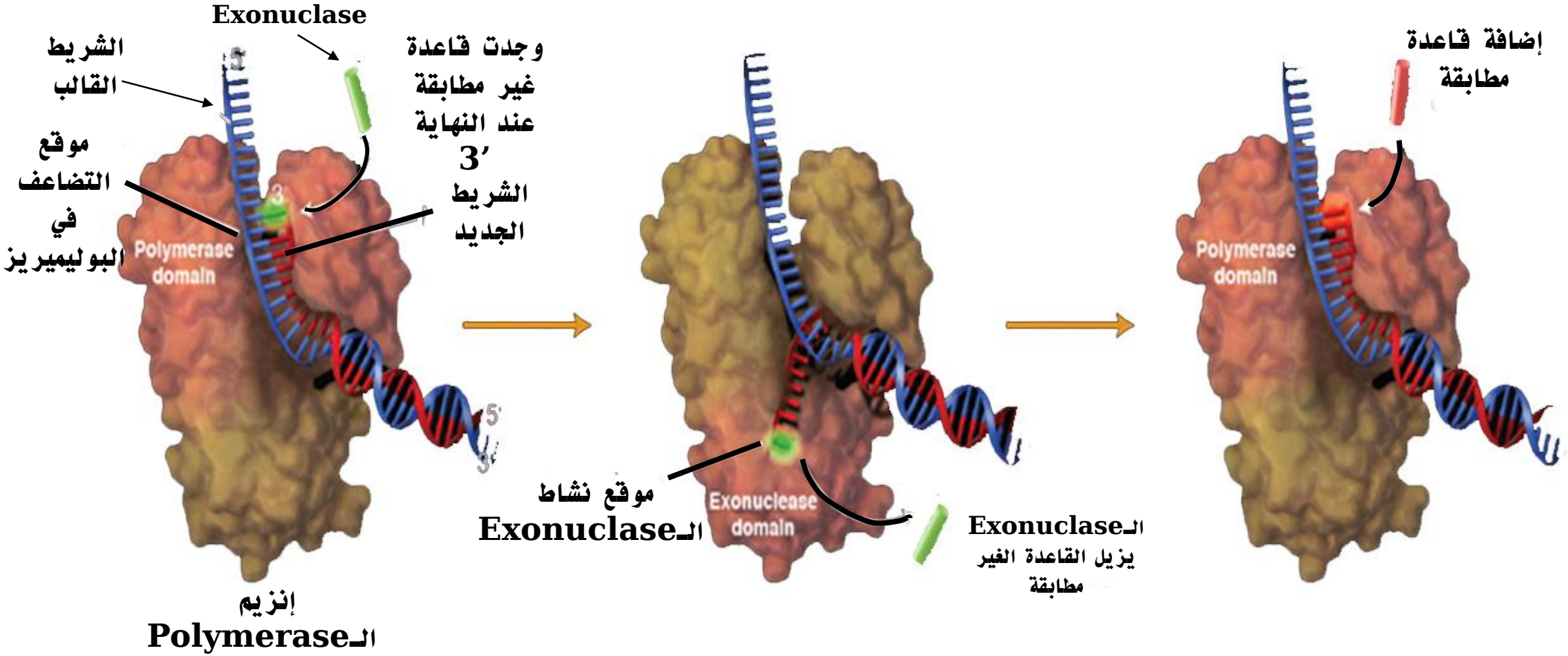
- يلتصق بها عدة برايمرات RNA primers بواسطة انزيم البرايميز قي مواقع متعددة على طولها لحين انتهاء عملية للتضاعف.
- يلتصق انزيم البوليمريز Polymerase III مرات عديدة عند كل موقع برايمر ويقوم باضافة A مقابل كل T و G مقابل كل C وبالعكس مشكلا سلسلة متقطعة تسمى كل قطعة منها Okazaki fragment.
- يسمى هذا النوع من التضاعف بالتضاعف المتقطع لأن قطع اوكازاكي تحتاج إلى ربط فيما بعد.

خطوات تضاعف الـ DNA

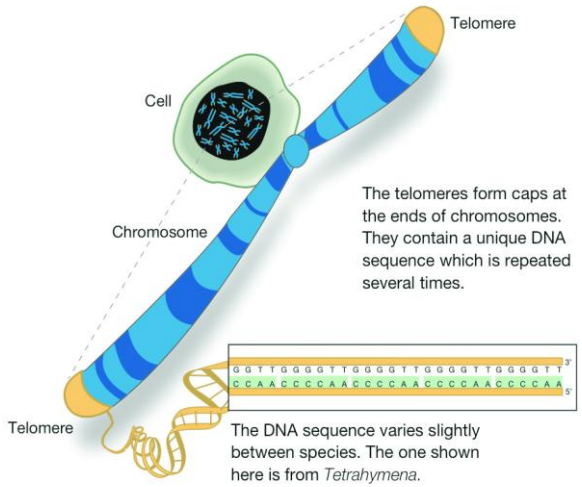
- بعد الانتهاء من اجراء التضاعف بحيث تتطابق كل قاعدة مع متممتها يأتي دور انزيم الإندونيوكليز Endonuclease والذ يمشي على طول السلاسل لأزالة البرايمرات ثم يقوم انزيم البوليميريز Polymerase I بمليء الفراغات بما يلائمها من نيوكليوتيدات.
- بعد ذلك يتم تدقيق التضاعف Proofreading بواسطة انزيم الإكزونيوكليز Exonuclease للتأكد من عدم وجود اخطاء في تتابعات الشريطين (عدم تطابق).
- في هذه الخطوة يقوم انزيم اللاكيز Lagase بسد الفجوات بين قطع اوكازاكي عن طريق اضافة نيوكليوتيدات تحتوي على القواعد النتروجينية الملائمة.
- في النهاية يتكون لدينا جينومين كل واحد منهما يحتوي على شريطين احدهما قديم (من الشريط الأصلي او القالب) والآخر جديد.
- بعد انتهاء التضاعف فإن الشريطين يلتويان اوتوماتيكيا ليكونان Double helix.

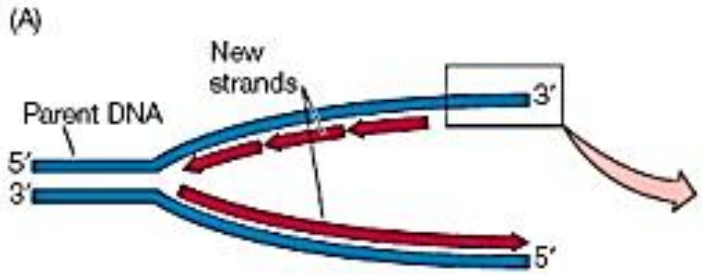
تدقيق قراءة الـ DNA

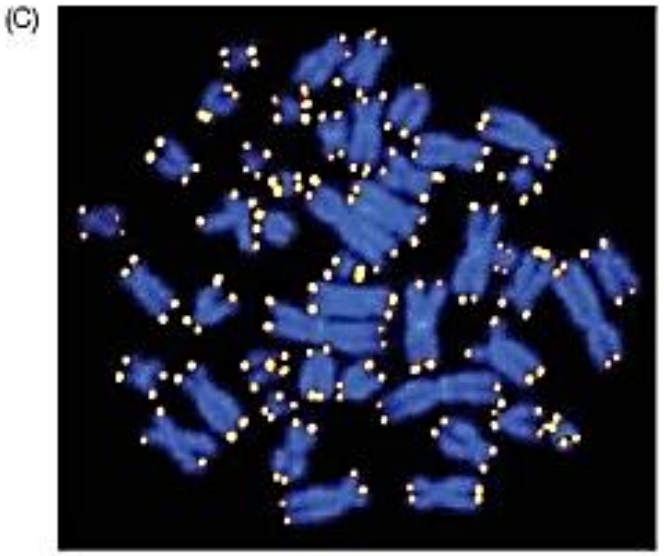
حالة عدم تطابق اثناء تضاعف الـDNA	تصحيح القراءة بواسطة انزيم Exonuclase	إكمال استنساخ الـDNA بعد استبدال القاعدة الخاطئة

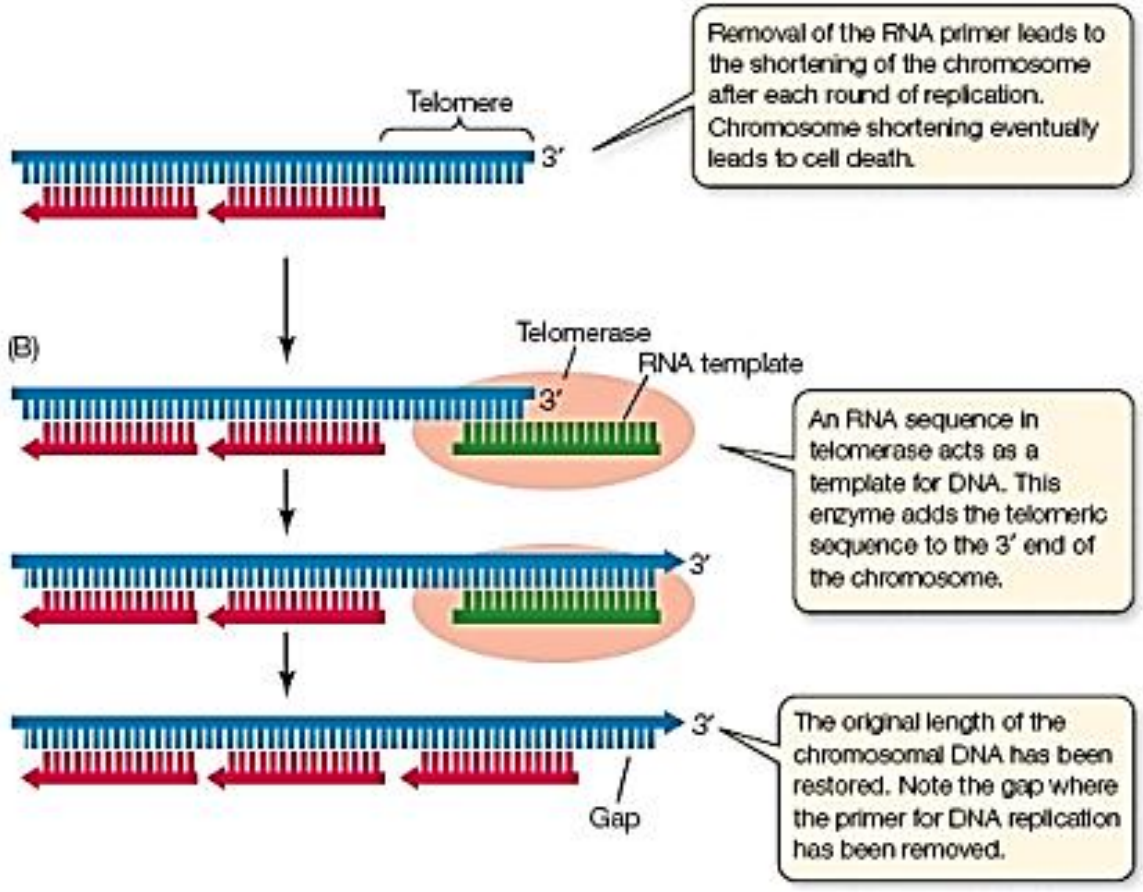


خطوات تضاعف الـ DNA : وظيفة التيلوميريز









خطوات تضاعف الـ DNA : وظيفة التوبسيميريز

Activity of Topoisomease II