# البلازميدات البكتيرية Plasmids

يمثل البلازميد قطعة مادة وراثية من الدنا غير الكروموسومية قادرة على التكرار الذاتي في الخلية وهي موجودة في معظم الأنواع البكتيرية. غالبية البلازميدات جزيئات حلقية و ثنائية الشريط تعزل بهيئة جزيئات فائقة اللف Supercoiled. و هناك أشكال أخرى لوحظت.مثل الجزيئات الخطية مزدوجة الشريط. و البلازميدات لا تكون مقتصرة على البكتريا حيث تم عزلها من الخمائر و البروتوزوا والنباتات.

TABLE 14-2 FEATURES OF SELECTED PLASMIDS OF *E. coli*

| Plasmid | Size (Kb) | Copy Number | Conjugative | Other Phenotype |
|---|---|---|---|---|
| ColE1 | 6.6 | 10–20 | No | Colicin production and immunity |
| F | 95 | 1–2 | Yes | *E. coli* sex fact |
| R100 | 89 | 1–2 | Yes | Antibiotic-resistance genes |
| P1 | 90 | 1–2 | No | Plasmid form is prophage; produces viral particles |
| R6K | 40 | 10–20 | Yes | Antibiotic-resistance genes |

في الإنسان هناك أنواع من الفيروسات (منها فيروس Human papilloma virus و Epstein Barr virus) يمكن أن تتواجد بصورة بلازميدات في نواة الخلية. وبهذه الصورة يتم تكرار الفيروسات بصورة متوازية مع الكروموسومات في النواة. لقد درست الحياة الجزيئية للبلازميدات بشكل مكثف في البكتريا ويلخص الجدول 14-2بعض الخصائص لأساسية في العديد من البلازميدات التي درست بشكل جيد في البكتريا *E. coli*.

تمتلك بعض البلازميدات البكترية القابلية على نقل نفسها من خلية إلى أخرى، و بذلك تنتشر في المجتمع البكتيري. وبعض الميزات الخاصة لقسم من البلازميدات تمكنها حتى من إحداث الترابط بين أنواع البكترية مختلفة..هذه القدرات على النقل أساسية في الدور الذي تلعبه البلازميدات في التطور الوراثي. وتمثل الجينات المحمولة من قبل البلازميد مستودع متنقل للمعلومات الوراثية التي تمنح الخلية البكترية المعيلة قابلية النمو في بيئات ضارة،.ومثال على احدها ذات العلاقة المباشرة بالإنسان هي مقاومة البكتريا للمضادات الحياتية التي غالباً ما تمنح للخلية البكترية من المورثات البلازميدية. هناك بلازميدات معينة

قادرة على الانتقال الكفء إلى خلايا الحساسة الأخرى. مؤدية إلى سرعة التحول الأفقي الكامل المجتمع البكتيري إلى مقاومة العقار. و من الشائع في بعض البلازميدات إنها تمنح المقاومة لعدة مضادات حياتية.

تتوزع البلازميدات البكتيرية على مدى وسع من الحجم، من التي تحتوي مورث واحد أو اثنين(عدة ألاف من أزواج القواعدKb) إلى تلك التي تحمل عدة مئات من المورثات (أكثر من 500 Kb) ولان بعض البلازميدات كبيرة الحجم (وقادرة على نقل جينات عديدة) يكون بإمكانها أن تغير بشكل كبير القدرات الأيضية للخلايا المعيلة لها. وفي غياب الضغط الانتخابي، يكون لا حاجه لامتلاك بلازميد لعدم وجود حاجه وراثية له. في هذه الظروف يمكن أن يمثل امتلاك البلازميد عبئ وراثي على للخلية ومن المحتمل أن يفقد من مجتمع الخلايا البكتيرية. إن المهمة التطورية للبلازميد هي إكثار نفسه وضمان الانتقال المستقر في المجتمع البكتيري .لذلك فعلى الرغم من كونها ليس سوى جزيئات دنا عارية غير قادرة على البقاء خارج الخلية، طورت البلازميدات البكتيرية آليات دقيقة لضمان بقائها.

خاصية مهمة للبلازميدات البكتيرية هي تواجدها بعدد مميز لكل خلية بكتيرية. تواجهه جميع البلازميدات مشكلة عامة تتمثل في حاجتها إلى **تنسيق تكرارها مع تكرار كروموسوم العائل** وذلك حتى لا يتم تخفيف عددها مع انقسام الخلية. البكتريا قادرة على التكاثر بسرعة مختلفة. حيث إنها قد تنقسم مرة واحدة كل ساعة في قولون اللبائن أو تنقسم مرة كل 20دقيقة في الوسط الأغنائي في دورق المزرعة. وبالتالي يجب أن يكون البلازميد قادر على تحسس سرعة انقسام العائل وتعديل السرعة التي يتكرر بها بناءاً على ذلك. كما يجب أن ينظم تكرار البلازميد بحيث لا يضعف تكرار كروموسوم العائل وحياة الخلية نفسها.

ولان البلازميدات هي جزيئات دنا متوارثة بصورة مستقرة، لذا كانت مناسبة لاستخدامها موديل بحثي من قبل الباحثين لدراسة الآلية الجزيئية التي تنظم وتسيطر على تكرار الدنا. وبسبب حجمها الصغير وعدم ضرورتها الوراثية فأنه من السهل تحويرها بتقنيات تكنولوجيا ترتيب الدنا. وقد لعبت البلازميدات دوراً أساسيا في تطور واستخدام تكنولوجيا الدنا المرتبة.

## المورثات ذات المنشاء البلازميدي :

تلعب البلازميدات البكتيرية دوراً مهماً في الأمراض البشرية. هذا توضع بصورة مثيرة في الستينات (1960s) من القرن الماضي باكتشاف سلالات بكتيرية اكتسبت بشكل متزامن المقاومة لأربعة مضادات حياتية مستخدمة بشكل مكثف في المستشفيات اليابانية. حيث انتقلت صفة المقاومة المتعددة للعقاقير إلى سلالات حساسة وكانت مسئولة عن وبائية الدزنتري البكتيري Bacterial dysentery. وكانت البكتريا المقاومة للمضادات الحياتية تحمل بلازميد كبير، يسمى عامل المقاومة R factor (من كلمة مقاومة Resistance) الذي يحتوي مورثات تشفر البروتينات التي تحطم أو تثبط المضادات الحياتية. كما اكتشف أنواع أخرى من بلازميدات R تجعل البكتريا مقاومة للمعادن الثقيلة الموجودة في البيئة، مثل الزئبق والرصاص. وجود هذه البلازميدات في البكتريا سمح بنموها في البيئات شديدة التلوث.

قدرة البكتريا على مقاومة تأثير المضاد الحياتي آو معادلة المواد السامة في البيئة تعتمد عادة على عدد قليل من الإنزيمات الأساسية أو المفتاحية التي تنتج بكميات كبيرة. وتعمل هذه الأنزيمات بمهاجمة المواد الضارة. تشفير هذه الإنزيمات الأساسية من البلازميدات (التي تعمل بصورة كروموسوم صغير) تجعل البكتريا مهيأة بشكل جيد لإنتاج كميات كبيرة من الأنزيم المطلوب بسرعة لان البلازميد غالباً من يكون موجود بعدة نسخ (جدول14-2) بوجود عدة نسخ من المورث ذو العلاقة، سوف تولد عملية الاستنساخ بسرعة كمية كافية من الأنزيم لمواجهة المضاد الضاد الحياتي أو الخطر الكيميائي الذي يواجه البكتريا.

تعد بكتريا *E. coli* مستوطن طبيعي من أمعاء الإنسان. بلازميدات معينة تزود هذه البكتريا بالقدرة على النمو في بيئات مختلفة، وبذلك تحولها من بكتريا مستوطنة عديمة الضرر إلى بكتريا مرضية. منها بلازميد يشفر بروتينات تعدل سطح الخلية البكترية متيحاً التصاق البكتريا إلى بطانة الأمعاء الدقيقة. وهناك

**TABLE 14-3 PLASMID-ENCODED PROTEINS**

| Protein | Function |
|---|---|
| Colicin | Secreted protein, kills bacteria lacking plasmid that encodes colicin-immunity protein. |
| Enterotoxin | Secreted protein, alters ion balance of eukaryotic cells. Responsible for water loss from cells. |

مورث ثاني موجود على البلازميد يشفر لبروتين إفرازي يسمى الذيفان الداخلي Enterotoxin الذي يدمر الخلايا المعوية ويكون مسئولا بصورة مباشرة عن أعراض الدزنتري (جدول 14-3).

بلازميدات أخرى تسمى بلازميدات الكولسينات Col plasmids تمنح الخلية الحاوية لها بفائدة نمو تنافسية انتخابية لأن البلازميد تشفر بروتينات إفرازية مضادة للبكتريا تسمى الكولسين Colicin تقتل الخلايا غير الحاوية على بلازميد. وتظهر الخلية المعيلة للبلازميد مناعة لتأثير الكولسين بواسطة بروتين خاص يشفر له أيضا من قبل البلازميد. وتتغاير الآلية التي يقتل من خلال الكولسين الخلايا الغير حاملة للبلازميد،(تولد أنواع معينة، مثل الكولسين E1، ثقب في غشاء الخلية الحساسة، أنواع أخرى ،مثل الكولسين E3، يدخل الخلية ويقوم بشكل متخصص يشطر الدنا الرايبوسومي موقفاً تخليف البروتين).

يمكن أن تقدم البلازميدات الفائدة للخلية المعيلة بوسائل أخرى مثل حملها لمورثات تقيد الدنا و تحويره، تشفر هذه المورثات بروتينات ارتباط متخصص بالدنا عند تتابعات معينة، لها القدرة على تميز

وتكسير الدنا الغريبة على الخلية (التقيد:Restriction) بينما تقوم بتعديل تركيب دنا العائل بحيث لا يتم تكسيرها (تحوير Modification). لقد تم وصف عدة مئات من أنظمة التقيد (Restriction) والتحوير (Modification) في البكتريا، وضيفتها الطبيعية هي حماية الخلية المعيلة من الإصابة بالفيروسات غير المرغوب بها. وفي حالات معينة يتم تحوير الدنا الفيروسي كيميائيا وذلك لأضعاف قابليته على التكرار، وفي حالات أخرى يتم تحطيم دنا العاثيات المهاجمة عند تكرارها مما يؤدي إلى إيقاف دورة تكرار العاثي. إن عملية تكسر دنا العاثي تتم بواسطة إنزيمات خاصة لتكسير الدنا تسمى نيوكليز (Nuclease). هذه الأنزيمات تميز تتابعات نكلوتيدية خاصة وتقطع الدنا عندها، هذه الأنظمة هي مصدر إنزيمات التقيد، والتي هي وسيلة أساسية في تكنولوجيا ترتيب الدنا. العديد من الأنظمة التقيد والتحوير تكون ذات منشأ بلازميدي بينما تكون أنظمة أخرى محمولة على كروموسوم العائل

## انتقال البلازميدات

لقد كان هناك تخمين بان فيروسات البكتريا قد تطورت من البلازميدات. بافتراض إن قطعة صغيرة من كروموسوم الخلية البكترية قد انفصلت بهيئة بلازميد بدائي، والذي تطور في النهاية إلى عاثي متكامل.

قابلية نقل المورثات من خلية بكترية إلى أخرى، الخاصية التي يمتاز بها كل من البلازميدات و الفيروسات ساهمت بدون شك في تطور الأنواع البكترية. ومن وجهة النظر التطورية هذه، ربما لا توجد وظيفة تجعلها أكثر أهمية من الوظيفة التي تساعد على نقل البلازميد من خلية إلى أخرى والتي تتوسط في عملية انتقال الجينات خلال المجتمع البكتيري. تسمى عملية انتقال البلازميد بـ الاقتران البكتيري (Conjugation) ويشرح الشكل 14-6عملية الاقتران.

حيث تحمل البلازميدات الاقترانية مجموعة كبيرة من مورثات النقل المسئولة عن تراكيب خلوية متخصصة و إنزيمات مطلوبة في النقل الفيزيائي للمكون الوراثي للبلازميد من الخلية الواهبة إلى المستقبلة. ويقال لمثل هذا البلازميد بأنة ذاتي الانتقال(Self transmissible). الشكل النمطي (النمط الممثل) للبلازميدات لاقترانية في بكتريا *E. coli* هو البلازميد F ويسمى عامل الجنس (sex Factor)، بلازميد حلقي بحدود 95Kb يتواجد في كل خلية 1-2 نسخة (شكل14-7) وتسمى الخلية الحاملة للبلازميد $F^+$ بالذكر male وتكون قادرة على التزاوج مع الخلايا التي تفتقد للبلازميد $F^-$ (Females).

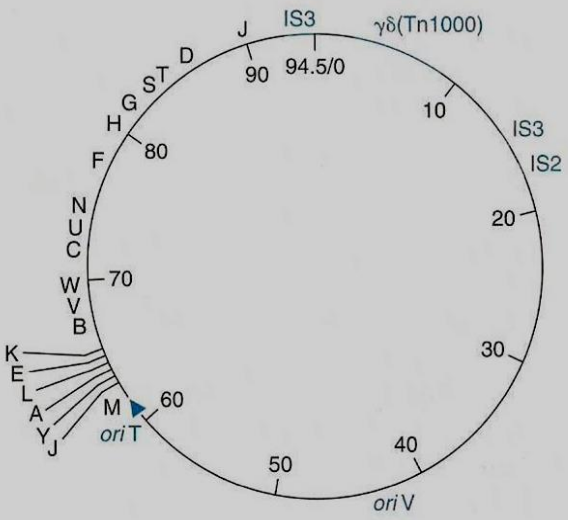


**Figure 14-7** A map of the sex plasmid F. Points are given in kilobases. The single capital letters refer to the midpoints of the locations of the corresponding *tra* genes. The insertion sequences, γδ (Tn1000), IS2, and IS3, are shown in blue. The blue arrow (*ori*T) shows the location of the origin for transfer replication, as well as the direction of transfer. *ori*V shows the location of the origin for vegetative (nontransfer) replication.

الاقتران عملية معقدة تتضمن نواتج تجمع معقد كبير من المورثات موجود في البلازميد يطلق علية *tra* operon (مأخوذة من transfer) يتألف من أكثر من 20 مورث (شكل14-7، كما نعلم إن الأوبرون تجمع من الجينات يعبر عنها بشكل متناسق من خلال جزيئة رنا رسول mRNA كبيرة متعدد السسترون). عند مزج الخلايا المذكرة مع الخلايا المؤنثة، تتكون ثنائية التزاوج،التي ترتبط إلى بعضها بواسطة تركيب خاص يسمى جسر الاقتران. تشفر مورثات معينة في بلازميد F بروتينات خاصة بتراكيب متخصصة على سطح الخلايا المذكرة تسمى الشعيرة Pilus. ويحتمل إن الـ F pilus (التي تتكون أساسا من امتداد مجوف من سطح الخلية البكتيرية) ترتبط مع مستقبلات خاصة على سطح الغشاء الخارجي للخلية المؤنثة لتكوين جسر الاقتران. ويعد اتصال خلية إلى خلية، يثلم احد شريطي دنا (قطع شريط مفرد) بلازميدF فائق اللف عند تتابع خاص يسمى منشأ النقل (*Ori* T).وهذا ينجز بواسطة إنزيم قطع داخلي خاص يشفر له من قبل البلازميد F. وترتبط بروتينات أخرى (تشفر بواسطة اوبرون *tra*) بعدها إلى النهاية المكشوفة 5- وتقود شريط الدنا إلى الخلية المؤنثة، وعند دخول الشريط يبدأ تكرار الدنا في كلا الخليتين الواهبة والمستقبلة لتحويل الشريط المفرد إلى دنا مزدوج الشريط، ويتم تحويل البلازميد الجديد إلى الشكل الحلقي ثم تحول حلقة الدنا إلى شكل فائق اللف بواسطة إنزيم DNA gyrase.والعملية موضحة بمخطط في الشكل 14-8. إن نتيجة الاقتران هي التكرار شبة المحافظ للبلازميدF في كلا الخليتين وتحويل الخلية التي كانت مؤنثة إلى خلية مذكرة تكون بعدها قادرة على نقل البلازميد F إلى خلية مؤنثة أخرى .(هكذا يمكن تخيل بلازميد على أنة عامل معدي قادر على الانتشار خلال مجتمع الخلايا المؤنثة).

القدرة على التوسط في عملية الاقتران ليست محصورة على بلازميد F. تحمل بلازميدات أخرى (خصوصاً بلازميد R) أيضا المعلومات الوراثية المطلوبة في عملية الاقتران. وعندما تنتقل هذه البلازميدات، تصبح الخلية مؤنثة المستقبلة مقاومة للمضادات الحياتية التي تتمكن من تثبيطها بواسطة نواتج مورثات محدده من بلازميد R. وكما في نقل بلازميدF ،تصبح الخلية الأنثى المستقبلة خلية ذكرية واهبة

قادرة بعدها على تحويل البلازميد. بلازميدات أخرى مثل Col E1 لا تكون قادرة على الانتقال الذاتي بنفسها. إلا إنها طورت القابلية على الاستفادة من النقل الوراثي المجاني المقدم نتيجة تواجدها المترافق مع بلازميد اقتراني، عندما ينتقل البلازميد الاقتراني، تستطيع البلازميدات الصغيرة مثل *Col*E1 أيضا من الانتقال إلى الخلية المستقبلة. ويقال إنها قابلة للتحريك Imobilizable.

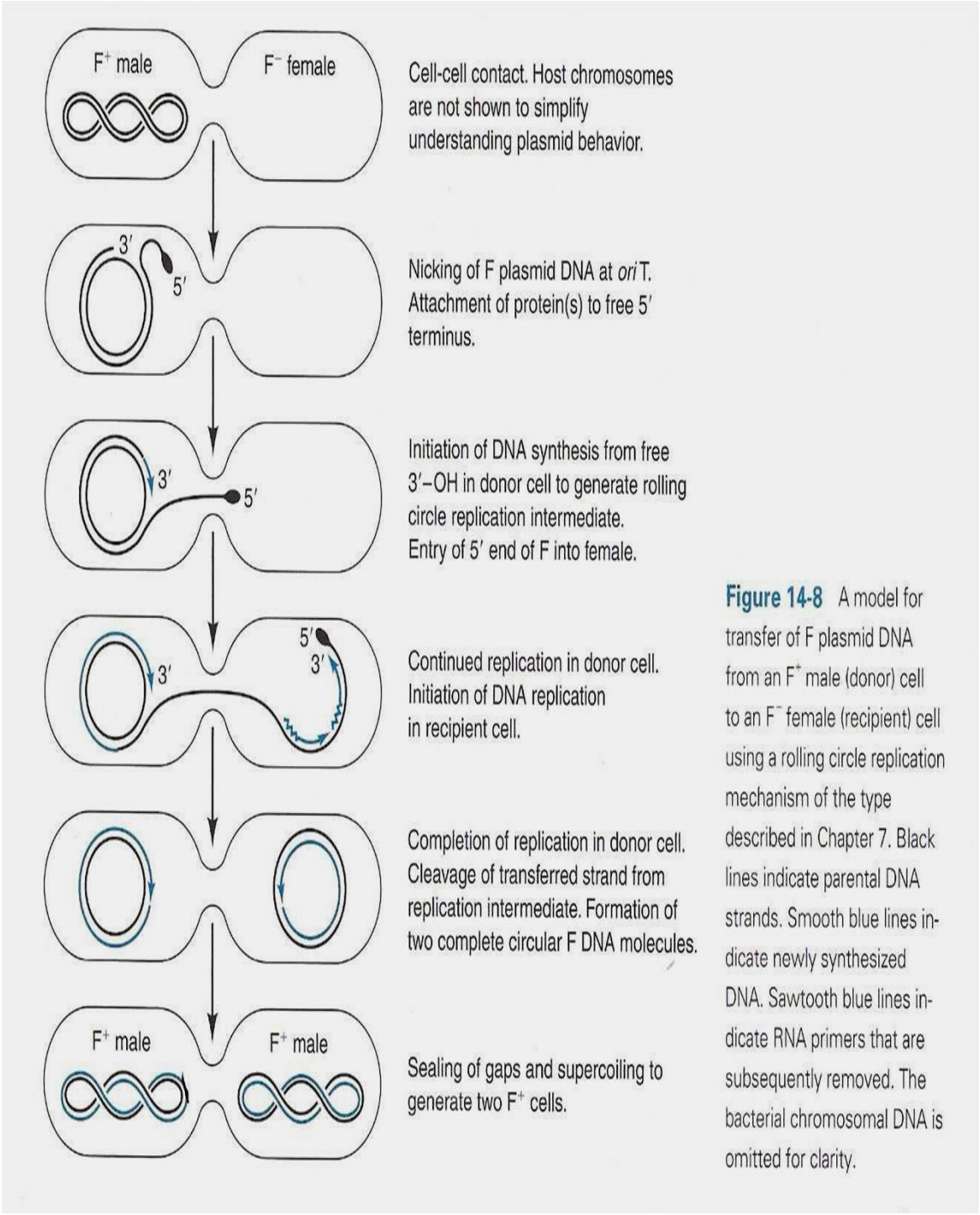


**Figure 14-8** A model for transfer of F plasmid DNA from an F+ male (donor) cell to an F− female (recipient) cell using a rolling circle replication mechanism of the type described in Chapter 7. Black lines indicate parental DNA strands. Smooth blue lines indicate newly synthesized DNA. Sawtooth blue lines indicate RNA primers that are subsequently removed. The bacterial chromosomal DNA is omitted for clarity.

**البلازميد F قادر على نقل المورثات الكروموسومية بأعادة لارتباط مع المكون الوراثي للمعيل:**

عملية الاقتران التي شرحت تتصف ورثياً بتحويل الخلية المستقبلة إلى خلية واهبة. إلا إن الاقتران الذي اكتشف في البداية نتيجة البحث الناجح عن عملية وراثية تم فيها نقل مورثات كروموسومية من خلية إلى أخرى. وهذا بتطلب تفسير قدرة بلازميد F على نقل مورثات أخرى غير المورثات التي يحملها. هذه القدرة أصبحت مفهومة في ضوء معرفة إن بلازميد F يمكن أن يتواجد بأشكال أخرى في خلايا معينة (إضافة إلى التواجد بشكل مستقل بهيئة بلازميد منفصل) حيث وجد إن بلازميد F قادر على الدخول في عملية إعادة الترتيب الوراثي (Recombination) مع كروموسوم الخلية العائل. ولان كل الجريئتين حلقية الشكل تؤدي حدوث عملية إعادة ترتيب واحدة إلى اندماج البلازميد في داخل الكروموسوم. إن تحويل بلازميدF الحر إلى بلازميدF مدغم integrated F هي حدث نادر يقع بحدود حالة واحدة في كل $10^5$ خلية وتسمى هذه الخلايا النادرة بخلايا التكرار العالي لإعادة الترتيب (Hfr) مختصر ( High frequency of recombination). ويستطيع بلازميد F من الاندماج في الكروموسوم عند عدة مواقع مختلفة وهكذا يمكن أن تنشا سلالات بكترية متنوعة يحتوي كل منها بلازميدF مدمج في بقعة مختلفة على جينوم العائل. وان الأساس الجزيئي لدخول بلازميدF إلى الكروموسوم عند موقع محددة يتم من خلال تتابعات الغرس IS التي شرحت سابقاً. مورثات البلازميدF المسئولة عن ذكورة الخلية يعبر عنها في خلايا Hfr. وهكذا فان الخلية Hfr تستطيع التزاوج ونقل الدنا (شكل 14-9) .

وعند ثلم دنا بلازميدFالمندمج مع دنا سلالة الـ Hfr بواسطة إنزيمات القطع الداخلية لنقل شريط دنا البلازميد إلى داخل الخلية المستقبلة، فأن دنا من كروموسوم العائل يمكن أن ينقل أيضا وذلك لأرتباطة مع دنا بلازميدF. نقل الدنا العائل إلى الخلية المستقلة يمكن أن يكون له عواقب وراثية عميقة. خلال العملية ينقل الدنا من الخلية الواهبة بمعدل يقارب من 50 Kb/دقيقة. لذا يتطلب نقل كامل الكروموسوم البكتيري بحدود 100 دقيقة. إلا انه في معظم الحالات لا تكون ثنائيات التزاوج مستقرة لفترة كافية لنقل كامل الكروموسوم، حيث تنفصل الخلايا عن بعضها تاركتاً الخلية المستقبلة بنسخة جزئية من البلازميدF وقطعة من جينوم الخلية المانحة. لذلك وعلى الأغلب ينقل فقط جزء من المورثات الكروموسومية.

ولأن منشأ النقل يقع داخل المكون الوراثي للبلازميد F (يدخل أولا جزء واحد من البلازميد F الى الخلية المستقبلة، لكن بقية بلازميد F سوف تكون الأخيرة الدخول).لذلك فان نسخة كاملة من بلازميدF لا تتواجد في الخلية المستقبلة ما لم ينتقل كامل الكروموسوم. وبالنتيجة تكون المستقبلات لمعظم عمليات نقل Hfr غير قادرة ان تصبح واهبة. وكما في عمليات نقل البلازميد F الذاتية. يصاحب نقل الشريط المفرد التكرار في كلا الخليتين.

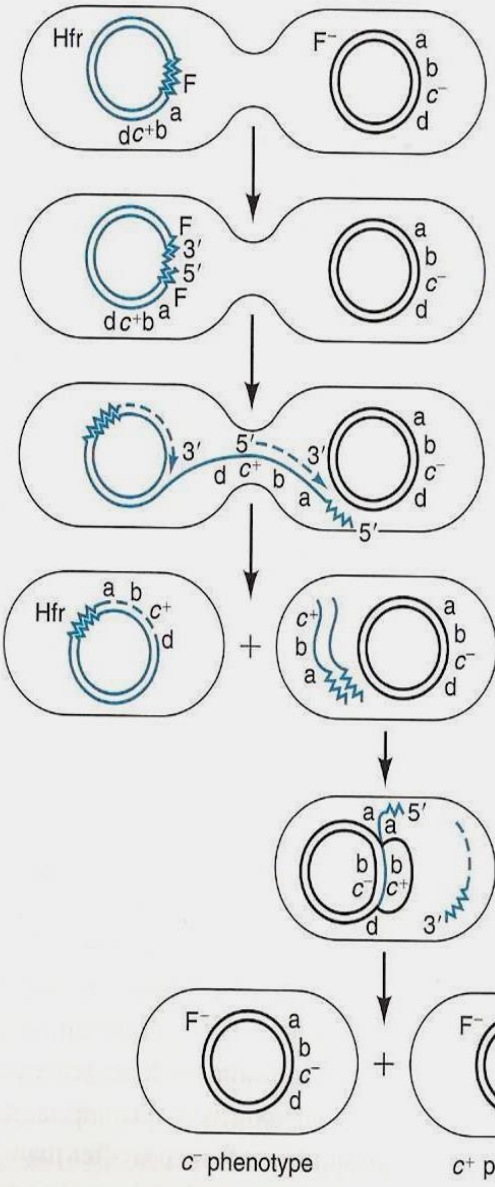


**Figure 14-9** A diagram showing conjugation between an Hfr male (donor) bacterium and an F⁻ female bacterium. The solid blue and black circles represent the chromosomal DNA of the Hfr and F⁻ cells, respectively. Dashed blue lines indicate DNA synthesis. Sawtooth lines represent the integrated F plasmid. Lower case italic letters represent genes on the chromosome. The F⁻ cell carries a mutation in the *c* gene ($c^-$), while the Hfr strain has a wild-type copy of this gene. Following Hfr transfer and replication, a population of F⁻ cells has been converted to a $c^+$ phenotype. These genes and the F plasmid DNA are not drawn to scale relative to the chromosomal circles. Supercoiling is omitted for simplicity.

نظرا لآلية الحماية الموجود، تمتلك قطعة الدنا الكروموسومية المنقولة من خلية Hfr الواهبة فرصة قليلة للبقاء والتكاثر. إلا انه وبسبب التماثل في التتابعات مع جينات في كروموسوم الخلية المستقبلة تستطيع أن تدخل في عملية إعادة الارتباط التي يتوسطها نظام إعادة الترتيب للتبعات المتماثلة في بكتريا *E. coli* Homologous recombination. يمكن ألكشف حدوث إعادة الترتيب من خلال الاختيار والغربلة المناسبة. مثلاً في التزاوج بين خلايا سلالة *Hfr leu*$^+$ معينة وخلية مستقبلة مؤنثة *F*$^-$ *leu*$^-$ يمكن الكشف

عن وجود خلايا *F⁻ Leu⁺*. يودي حدوث إعادة الترتيب في هذه الخلايا إلى استبدال مورث الليوسين *Leu⁻* مع مورث الليوسين *Leu⁺* الداخل للخلية.

## انتقال Hfr يمكن ان يستخدم للبحث عن مواقع المورثات

تحليل العديد من سلالاتHfr كشف عن خاصية مهمة متعلقة بعملية النقل. تنقل سلالات Hfr المختلفة بشكل متكرر مورثات بكتيرية مختلفة بتكرار عالي. مثلاً السلالة الافتراضية لـHfr1ربما تنقل الجينات ABC بتكرار عالي و المورثات XYZ بتكرار منخفض بينما سلالة أخرى Hfr2 ربما تنتقل المورثات XYZ بتكرار عالي والمورثاتABC بتكرار منخفض هذا السلوك متعلق بمواقع غرس مختلفة للبلازميدF في كروموسوم الخلية Hfr الواهبة. تلك المورثات البكتيرية التي تقع على جانب واحد من منشأ النقل *ori T* تكون أول المورثات البكتيرية التي تدخل الخلية المستقبلة، وسوف تنتقل بتكرار عالي عن تلك المورثات التي تقع ابعد عن منشأ النقل *ori T*.

ولان المورثات تنقل بترتيب خطي إلى الخلية المستقبلة في نقل الـ Hfr فان وقت نقل موروث معين يعكس موقعه النسبي على الكروموسوم البكتيري قياسا إلى منشأ النقل وهكذا فأن سلالات Hfr وسيله مهمة لتحديد خريطة الكروموسوم البكتيري (الترتيب الخطي للمورثات على الكروموسوم). وبتحديد الوقت اللازم لانتقال مورث معين نسبة إلى نقل المورثات الأخرى يمكن تحديد الموقع النسبي للمورثات على الكروموسوم.

### أندغام بلازميد F إلى مواقع خاصة

ما الذي يحدد موقع أندغام بلازميد F ؟

يحمل بلازميد F عدة تتابعات خاصة من الدنا التي تتواجد أيضا بعدة نسخ في الكروموسوم البكتيري، تسمى تتابعات الفرس(IS). إن خصائص لانتقال لمعظم سلالات Hfr يمكن أن تفهم على إنها نتيجة لحدوث عملية إعادة الارتباط Recombination بين تتابعات الغرس IS على بلازميدF و التتابعات المناظرة لها على الكروموسوم.

كما لاحظنا إن بلازميدF يمكن بأخذ شكلين في داخل الخلية، أما بشكل بلازميد حر في الخلية أو يندغم في الكروموسوم ليشكل سلالة Hfr. وقد لوحظ شكل ثالث من بلازميد F في الخلية، يسمى هذا الشكل F′ (F prime) والذي ينتج عن خروج غير دقيق للبلازميد F من الكروموسوم ورجوعه إلى حالة البلازميد الحر. إن عملية الاستئصال(خروج البلازميد من موقعه) يمكن أن يرفع معه مورثات بكتيرية مجاورة للبلازميد F أيضا على الشكل البلازميدي. إن عملية الاستئصال نفسها (Excision أي خروج البلازميد) نتيجة عملية إعادة الترتيب بين تتابعات ضمن بلازميد F وتتابعات خارجه. عدة أنواع مختلفة من بلازميدF′ تم وصفها، بعضها تحمل كتلة كبيرة من الكروموسوم البكتيري.و البلازميدF′ (شبيه بلازميدF)يحتفظ بالقدرة على نقل نفسه إلى خلية مستقبلة مؤنثة في حالة عدم فقدانه لأي من مورثات الضرورية للنقل(*tra* operon).

إن نقل بلازميد F′ يسبب إدخال كفؤ للمورثات الكروموسومية المصاحب له إلى الخلية المستقبلة. لذلك فان النتائج الوراثية مختلفة عن نتائج نقل Hfr. بعد نقل F′ ، يحافظ على المورثات البكتيرية المصاحبة له بشكل مستقر وذلك لقدرة بلازميدF′ على التكرار في حالة امتلاكه منشأ تكرار فعال. وهكذا فان الخلية المستقبلة لـ F′ تحمل نسختين من مورثات معينة.واحدة موجودة على الكروموسوم البكتيري و الأخرى على بلازميدF′ ،وتوصف وراثياً على إنها ثنائية المكون الوراثي جزئياً (Merodiploid) على خلاف الجينوم البكتيري الذي يكون في حالة مفردة haploid. ولان بلازميد F′ يكون اصغر من الكروموسوم البكتيري، لذا يحدث انتقاله الكامل قبل انفصال ثنائيات التزاوج تلقائيا، ونتيجة ذلك فان الخلية المستقبلة المؤنثة سوف تتحول إلى F′ مذكرة. وعادة تسمى بلازميدات F′ بأسماء الجينات الكروموسومية التي تحملها مثلاً F′*lac* ويحمل مورثات اللاكتوز.

## تكرار االدنا البلازميدي

ذكرنا خاصية أساسية للبلازميدات البكتيرية تواجدها بعدد خاص لكل نوع في الخلية. ويعبر عن عدد البلازميدات بنسبة عدد جزيئات البلازميد إلى عدد نسخ الكروموسوم في الخلية الواحدة. البلازميدات الطبيعية تتواجد بمدى واسع لعدد النسخ. هناك بلازميدات معينة مثل بلازميد F أو العاثي الأولي Prophage في البكتريا *E. coli* (*E.coli* cirus P1) تتواجد بعدد نسخ 1-2، بينما تلك التي تعود العائلة Col E1 تتواجد بعدد نسخ 20-40.

و تعتمد البلازميدات عادة على آلية التكرار الخلوية في تكرارها مثلاً Col E1 لا يحمل أي معلومات وراثية محددة لإنزيمات لها علاقة بالتكرار (إنها تعتمد كلياً على مكونات العائل). البلازميدات الأخرى تشفر لإنزيمات معينه تشترك في خطوات محددة من التكرار. ولا توجد حالة واحدة يستقل فيها البلازميد تماماً عن إنزيمات تكرار العائل. تحتوي بكتريا *E. coli* ثلاث إنزيمات بلمرة مختلفة لتحفيز عملية تكرار الدنا وهي DNA *polymerase I,II,III*. معظم بلازميدات بكتريا *E. coli* والكروموسوم البكتيري نفسه يستخدمان DNA *pol III* باعتباره إنزيم البلمرة الأساسي.(استثناء مهم لهذه الحالة هي عائلة البلازميدات Col E1 التي يلعب فيها DNA *pol I* دوراً أساسيا في التكرار).

### عدد نسخ البلازميدات

يتم تنظيم عدد النسخ بالسيطرة على تكرار ابتداء Initiation تخليق الدنا Controlling of the frequency. إن ابتداء التكرار في البلازميد يحدث عند منشأ تكرار *ori*. حيث تبدءا شوكة التكرار في *ori* بالتحرك أما باتجاه واحد أو باتجاهين Unidirectionally or bidirectionally حول البلازميد الحلقي. معظم شوكات التكرار في البلازميد ثنائية الاتجاه، إلا إن البلازميد Col E1 يستخدم شوكة تكرار أحادية الاتجاه.

***ما هي خصائص التتابعات في *ori* لتمكنها من العمل لابتداء التكرار ؟**

***وكيف تتم عملية السيطرة على عدد مرات ابتداء التكرار للحفاظ على عدد النسخ الخاص!.**

العديد من تتابعات منشأ ابتداء التكرار *ori* في البلازميدات منظمة بصورة مشابهة لمنشأ التكرار في الكروموسوم *ori* C البكتيري. والخاصية الأساسية لمنشأ التكرار بصورة عامة هي انفتاح الحلزون

المزدوج للدنا في هذه المنطقة، مما يسمح بالوصول إلى القواعد من قبل إنزيمات بلمرة الدنا وبقية إنزيمات آلية التكرار.

**ان عملية فتح الحلزون في الموقع الخاص تتم بعدة خطوات .**

**الخطوة الأولى هي : تميز منطقة *ori* بواسطة بروتينات متخصصة للارتباط بالدنا**. بالنسبة لمنشأ التكرار في بكتريا العائل *ori* C، البروتين الأساسي المشارك في ابتداء التكرار يشفر له من قبل المورث *dna* A (شرح في محاضرة التكرار). العديد من البلازميدات تشفر البروتين المناظر، والذي يكون مطلوباً بصورة خاصة للتكرار،يسمى (Rep protein) وهو يلعب دوراً أساسيا في ابتداء تكرار البلازميد. فإذا فقد مورث *rep* أو تعرض للطفرة فلا يمكن حدوث تكرار البلازميد من منشأ التكرار في البلازميد. و أكثر من ذلك، إن عدد نسخ البلازميد مرتبطة مع مستوى بروتين Rep داخل الخلية. إن وظيفية بروتين الـ Rep هي لتميز تتابع قصير من الدنا في منشأ التكرار *ori* للبلازميد

وفي موقع *ori* ترتبط البروتينات الأخرى المشفرة من العائل مع بروتين Rep ليتم تجميع الإلية الإنزيمية الخاصة للتكرار التي تسمى الريبلسوم Replisome، وحال ارتباط الريبلسوم إلى موقع *ori* يقوم بفتح الحلزون، الذي يتبع بتكوين بادئ الرنا RNA Primer وتكرار الشريط القائد والمتلكئ. إن ارتباط الـ Replisome.المتخصص يعتمد بالأساس على ارتباط بروتين Rep إلى الدنا في موقع *ori*.

إن البلازميدات طورت آلية دقيقة جداً لتنظيم إنتاج هذا البروتين المهم. تتحسس هذه الآلية لتركيز الدنا البلازميدي في الخلية وتنظيم إنتاج بروتين Rep بناءاً على ذلك. وعند إدخال البلازميد إلى الخلية يحدث ابتداء تكرار سريع للبلازميد لتكوين عدد نسخ البلازميد المستقرة،وهذا يتطلب مستوى تعبير عالي نسبياً للمورث البلازميدي *rep*.

بعد تكوين البلازميد، يجب السيطرة على مستوى بروتين Rep لمنع استمرار تكرار البلازميد الذي يمكن أن يكون مميت للخلية. يسيطر على كمية بروتين Rep الفعال عند مستوى الترجمة بدلا من التنظيم عند مستوى ما بعد الترجمة. مثلاً إن مستوى تعبير مورثات *rep* في بعض البلازميدات مثل مورث *rep* A في بلازميد عامل المقاومة R نوع R1 ينظم عند كلا المستويين الترجمة وما بعد الترجمة بواسطة نواتج مورثات منفصلة يشفر لها للبلازميد التي تقوم بكبت استنساخ مورث *rep*.