

أنزيمات التقييد (القطع) Restriction enzymes-cutting

لا شك في أن لكل كائن حي طرق دفاعية مختلفة تحميه من الكائنات الأخرى مثلاً تقوم بعض أنواع من البكتيريا بإنتاج إنزيمات مهمتها تدمير الفيروسات التي تهاجمها، و من هذه الإنزيمات، الإنزيمات القاطعة التي تقوم بقص الحمض النووي (الحمض الريبي النووي منقوص الأوكسجين) للفيروس و بذلك يُبطل عمله و يُبطل مفعوله. و بما أن الحمض الريبي النووي منقوص الأوكسجين مادة موجودة بشكل طبيعي في البكتيريا كما هو الحال في الفيروسات والكثير من الكائنات الحية فإن هذه الإنزيمات قد تشكل خطراً على البكتيريا نفسها في قصها للحمض الريبي النووي منقوص الأوكسجين الخاص بها. ولكن هذا لا يحدث و السر في ذلك هو قيام البكتيريا بتحويل أجزاء من الحمض الريبي النووي منقوص الأوكسجين الخاص بها عن طريق إضافة مجموعة الميثيل إلى بعض الأسس الأروتية من نوع الأدينين أو السيتوزين فلا يستطيع الأنزيم Methyl القاطع من قطع الحمض النووي الخاص بالبكتيريا.

تصنف إنزيمات القطع في ثلاثة أنواع وهي (I، II و III) و تكون معظم الإنزيمات المستخدمة من النوع الثاني II لأنها تقطع تسلسل نوعي من الحمض الريبي النووي منقوص الأوكسجين و تتعرف عليه من خلال قطعه لرابطة الفوسفات ثنائية الاستر. أما النوعان I و III فهما لا يتعرفان على تسلسل معين للقطع و إنما يعملان على إزالة النيكليوتيدات في نهاية RNA و الحمض الريبي النووي منقوص الأوكسجين.

يختص كل إنزيم بمعرفة تتابع محدد من النيكليوتيدات في الحمض الريبي النووي منقوص الأوكسجين و تكون معظم التتاليات أو التسلسلات المعروفة مكونة من أربعة أو خمسة أو ستة أزواج من القواعد طويلاً و يمكن أن تصل إلى ثمانية أزواج من القواعد. و هذا التسلسل المعين يعرف باسم موقع القطع Restriction site أو موقع التعرف (Recognition Site (Sequence).

على افتراض أن هذه الأسس موزعة عشوائياً فإنه يمكن حساب تواتر أي تتابع خاص ⁴

عندما تكون n طولاً للتتابع المحدد للإنزيم، و على هذا الأساس يمكن التنبؤ بالعثور على جزيء رباعي النيكليوتيد ضمن 256 زوجاً قاعدياً، و خماسي النيكليوتيد ضمن 1024 زوج قاعدي و سداسي النيكليوتيد ضمن 4096 زوجاً قاعدياً. و عليه فالإنزيم المحدد لتتابع رباعي النيكليوتيد سينتج القطع الأقصر من الحمض الريبي النووي منقوص الأوكسجين بالمقارنة مع الأنزيم المحدد لتتابع سداسي النيكليوتيد. وقد وضع في الجدول التالي بعض الأنزيمات المألوفة المستخدمة مع تتابعاتها المحددة و مواقع القطع. ساعد اكتشاف الإنزيمات القاطعة (Restriction Nucleases) في عملية استخلاص المورثات و قطع الحمض الريبي النووي منقوص الأوكسجين و نسخها.

جدول. أهم أنزيمات القطع المحددة وموقع عمل كل منها:

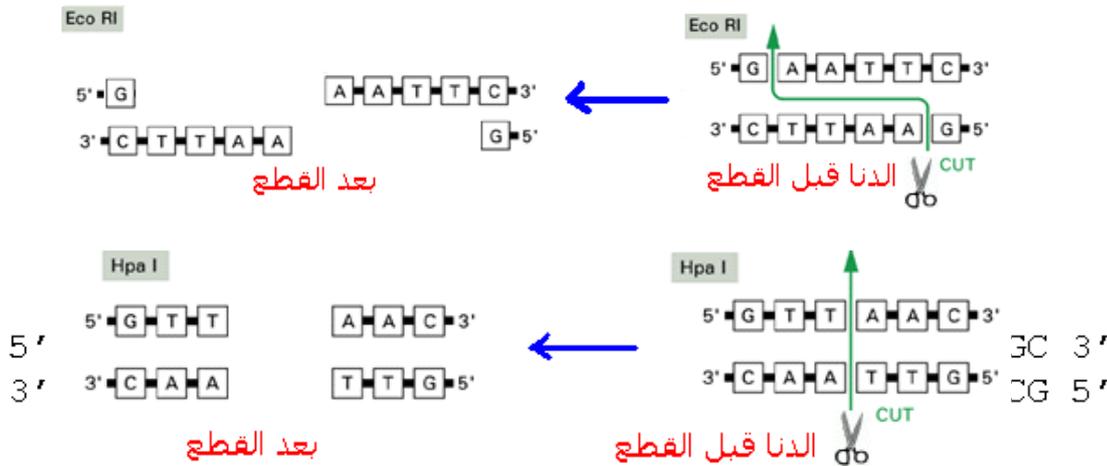
الكائن الحي المنتج للإنزيم	التتابع المستهدف Sequence	Target	الإنزيم
<i>Escherichia coli RY13</i>	TTC GAA AAG CTT		EcoRI
<i>Bacillus amylolique</i> <i>H faciens</i>	TCC GGA AGG CCT		BamHI
<i>Bacillus globigii</i>	TCT AGA AGA TCT		BgIII
<i>Haemophilus aegyptius</i>	GCpy PuGC CGpu pyCG		HaeII
<i>Haemophilus influenza R</i>	CTT AAG GAA TTC		HindIII

تسمية إنزيمات القطع:

تعتمد تسمية إنزيم القطع على الاسم اللاتيني للكائن الحي الذي يحوي الإنزيم، حيث يستخدم اسم الجنس للتعبير عن الجزء الأول من اسم الإنزيم و الحروف الأولى من اسم النوع تضاف إلى الاسم الأول مثلاً: الإنزيم Eco يوجد في البكتريا *Escherichia coli* حيث استخدم الحرف الأول من اسم الجنس **E** و الحرفيين الأوليين من اسم النوع **co** فأصبح الاسم **Eco**. يمكن أن يضاف إلى اسم الإنزيم بعض الحروف أو الأرقام التي تعبر عن اسم السلالة و رقمها مثلاً: **EcoRI** و هو إنزيم تم اكتشافه في السلالة R y13 من البكتريا *Escherichia coli*.

خصائص أنزيمات القطع:

- 1- غالباً ما يتم عزلها من أنواع البكتريا المختلفة أو فطر الخميرة.
- 2- تقطع الحمض النووي في نقطة محددة أو مكان وموقع قطع معين Recognition .Sit
- 3- تعمل كنظام مناعي مصغر للبكتريا يحميها من جزئيات الحمض الريبي النووي منقوص الأوكسجين الغريبة مثل الإصابة الفيروسية.
- 4- أنزيمات القطع إما أن تترك نهايات لاصقة أو بشكل متعرج cohesive or sticky في 5' و 3' مثل الإنزيم القاطع (RI) Eco الذي يقطع عندما يجد 6 من الأحماض النووية في هذا التسلسل (GAATTC) أو نهايات تامة أو حادة أو بشكل رأسي مستقيم blunt مثل الإنزيم القاطع (Hpa1) الذي يقطع عندما يجد 6 من الأحماض النووية في هذا التسلسل (GTTAAC) يوجد في بكتيريا الهيموفلس بارا انفلونزا (*Hemophilus parainfluenzae*) (شكل 1).



شكل 1 : آليات قطع الأنزيم.

تكون مناطق القطع غالباً متقابلة (ذات تسلسل متعاكس) palindromic sequences الحمض الريبي النووي منقوص الأوكسجين (الباليندروم أي توجد منطقة القطع بنفس التتابع على شريطي الحمض الريبي النووي منقوص الأوكسجين العلوي والسفلي عكس بعضهما أي باتجاهين متعاكسين).

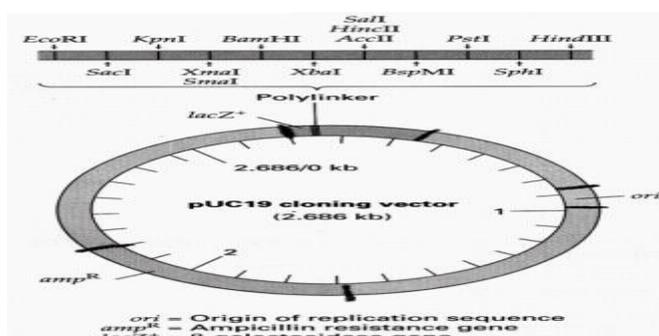
البلاسميدات

تم اكتشاف العديد من الأنواع البلاسميدية الطبيعية منذ عام 1973، في البكتيريا وفي بعض أنواع الخميرة (Yeast). البلاسميدات هي عبارة عن جزيئات الحمض الريبي النووي منقوص الأوكسجين شبيهة بالفيروسات الصغيرة ولكنها لا تحتوي على غلاف من البروتين. تتكون البلاسميدات من جزيئات من الحمض الريبي النووي منقوص الأوكسجين، مضاعفة السلسلة، حلقيية، و تكون نسبياً صغيرة بالمقارنة مع صبغي الخلية و غالباً موجودة في حالة صبغي إضافي Extrachomosomal.

تتميز البلاسميدات بقدرتها على التضاعف الذاتي و بمعزل عن بقية الصبغيات الموجودة في الخلية و ذلك لاحتوائها على وحدة التضاعف الذاتي (وهي تسلسل نوعي من الحمض الريبي النووي منقوص الأوكسجين مؤلف من 50-100 pb و موجودة ضمن البلاسميد).

بالإضافة إلى ذلك فهناك كثير من المورثات التي قد تكون على البلاسميد و هي مفيدة للعلماء في عملية نسخ المورثات، فمثلاً يوجد على البلاسميد مورثة خاصة تكافح المضادات الحيوية Antibiotics (كالأمبيسيلين و التتراسيكلين و البنسلين و الكاناميسين و الكلوروموفينيوكول). تساعد هذه المورثات الحامية من المضادات الحيوية في التعرف على البكتيريا التي تحتوي على البلاسميد الذي يحمل المورثة الذي نود استساخها و عزلها. كما تمتلك البلاسميدات أيضاً منطقة التنسيل المتعددة (أماكن وجود إنزيمات القطع) و يتم في هذه المنطقة إدخال الحمض الريبي النووي منقوص الأوكسجين الغريب (شكل 2). يوجد بلاسميدات تستطيع التكاثر داخل البكتيريا و الخميرة في آن واحد.

اعتماداً على نوع الحمض النووي نستطيع تمييز نوعين من البلاسميدات فهناك البلاسميدات ذات الحمض النووي الحمض الريبي النووي منقوص الأوكسجين و البلاسميدات ذات الحمض النووي RNA. و تميز أيضاً عن طريق وزنها الجزيئي فمنها الصغير (وزن جزيئي منخفض) 2-5 كيلوباز و منها الكبير (وزن جزيئي عالي). تستخدم هذه البلاسميدات في الهندسة الوراثية كحامل



للمورثات الغريبة.

شكل 2: بنية البلاسميد pUC19. حيث،

ori: منطقة التضاعف الذاتي.

amp^R: مورثة تكافح المضاد الحيوي.

lacZ: مورثة β _galactosidase و التي ترمز لنفس الإنزيم بيتا غالاكتوسيداز.

منطقة التنسيل المتعددة polylinker

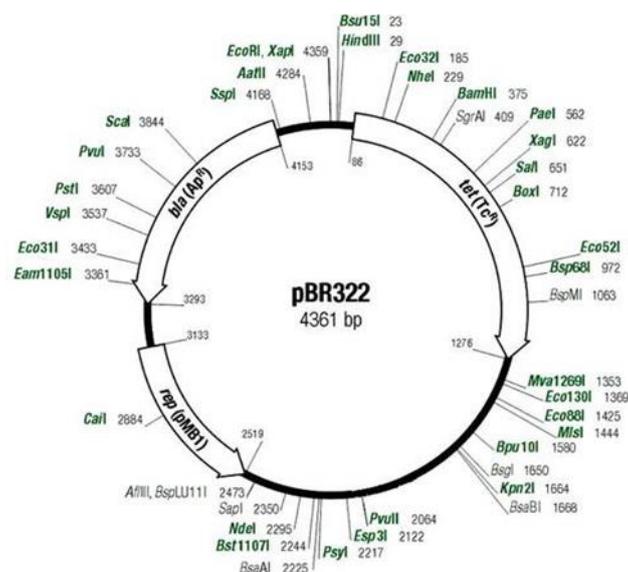
بلاسميدات التنسيل الأساسية:

تُحور البلاسميدات الموجودة طبيعياً بشكل واسع في الهندسة الوراثية لإنتاج النواقل التي تحمل الصفات المرغوبة. و من البلاسميدات شائعة الاستخدام البلاسميد pBR322 الذي طور من قبل الباحث Francisco Bolivar و زملائه. يتضمن

تركيب البلاسميد pBR322 سلسلة من المعاملات للوصول به لأن يمتلك سمات الناقل الجيد، مثل الوزن الجزيئي المنخفض، و مورثات مقاومة للمضادات الحيوية (الأمبيسلين و التتراسيكلين Tc^r , Ap^r)، بالإضافة إلى عدة مواقع أحادية القطع.

نواقل بلاسميدية مبتكرة أخرى

بالرغم من الاستخدام الواسع لبلاسميدات pBR322 (شكل 3) و pAT153 لغرض التطبيقات العديدة في التنسيل المورثي فإنه توجد نواقل بلاسميدية أخرى ملائمة. و منها سلسلة بلاسميدات العائلة البلاسميدية pUC التي لاقت انتشاراً واسعاً، و هي تحتوي على سمات خاصة لا توجد في النواقل الأبسط. حيث تمتلك هذه البلاسميدات منطقة تحتوي على عدة مواقع قطع مفردة لإنزيم الأندونوكلياز ضمن امتداد قصير للحمض الريبي النووي منقوص الأوكسجين. و تعرف هذه المنطقة بموقع التنسيل المتعدد أو polylinker site (MCS) و التي تكون مفيدة بسبب إمكانية الاختيار للموقع القابل لإدخال قطع الحمض الريبي النووي منقوص الأوكسجين.



شكل 3. بنية البلاسميد pBR322.

حيث أن:

rep: منطقة التضاعف الذاتي.

tetr-amp^R: مورثتان تقاومان المضاد الحيوي.

lacZ: مورثة β _galactosidase و التي ترمز لنفس الإنزيم بيتا غالاكتوزيداز.

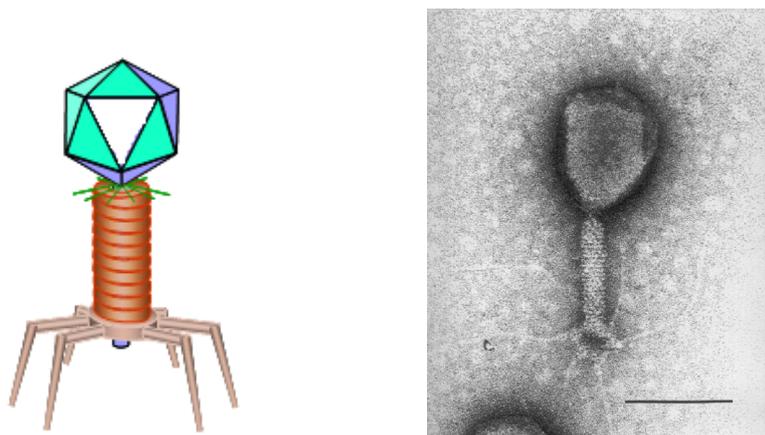
- مواقع أحادية لأنزيمات القطع (**Kpn21, Esp31** وغيرها).

تمتلك بلاسميدات pUC بالإضافة إلى منطقة التنسيل المتعدد منطقة أخرى تدعى مورثة β _galactosidase و التي ترمز لنفس الإنزيم بيتا غالاكتوزيداز β _galactosidase.

على الرغم من امتلاك النواقل البلاسميدية بالعديد من الخواص المفيدة، فهي تمتلك أيضاً عدد من السلبيات، و أحد أهم هذه السلبيات هو حجم قطعة الحمض الريبي النووي منقوص الأوكسجين التي يمكن إدخالها إلى البلاسميدات، و التي تكون بأقصى مدى 5 kb من الحمض الريبي النووي منقوص الأوكسجين DNA على الأكثر و التي تؤثر بشدة على فعالية التنسيل. في بعض التطبيقات فإنه من المهم زيادة حجم القطع التي يمكن تنسيلها و يحتاج مثل هذا النوع من العمل لنواقل لها القابلية لاستقبال قطع أكبر من الحمض الريبي النووي منقوص الأوكسجين و منها الفاج البكتيري لميدا Bacteriophage lambda و التي سنتعرض له في القسم التالي.

الفاجات:

بالرغم من أن النواقل التي بنيت على أساس الفاجات البكتيرية هي أكثر تخصصاً من النواقل البلاسميدية، إلا أنها متشابهة معها في الوظيفة من الناحية الجوهريّة، أي أنها تعمل كحاملة لقطع جزيئات الحمض الريبي النووي منقوص الأوكسجين و قد طور بشكل واسع نوعان من الفاجات البكتيرية (λ - M13) لأغراض التنسيل (شكل 4).



شكل 4. الفاج لميدا أو λ

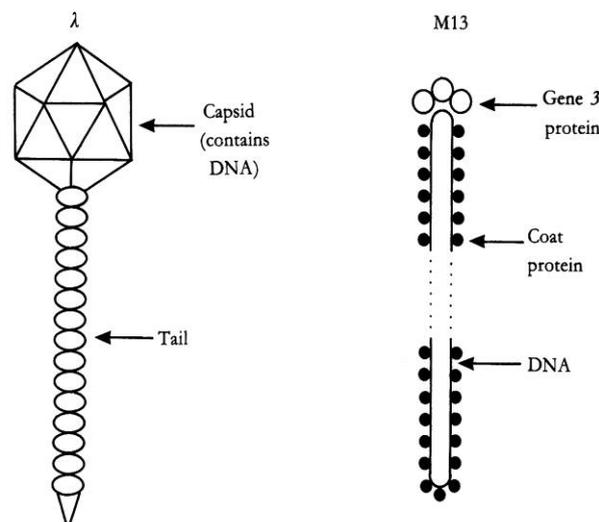
تعد الفاجات أفضل من البلاسميدات للأسباب الآتية:

- تستطيع الفاجات إصابة الخلايا بفعالية أكبر من البلاسميدات.
- معدل ظهور المستعمرات عادةً يكون أعلى.
- تعود فعالية الفاج δ لأنها تستخدم في بناء المكتبات الوراثية.

ما هي الفاجات البكتيرية

هي ببساطة فيروسات آكلات البكتيريا و تعتمد في توالدها (تضاعفها) على البكتيريا. وتصنف الفاجات تركيبياً ضمن ثلاث مجموعات رئيسية:

- عديمة الذنب: (غير مذنب) Tailless.
- المذنب (Head and tail): بحيث يوجد الرأس (الحاوي على الحمض الريبي النووي منقوص الأوكسجين الفيروسي) مع الذنب (يستخدم لإصابة الخلايا المضيفة *E. coli*).
- خيطية Filamentous .

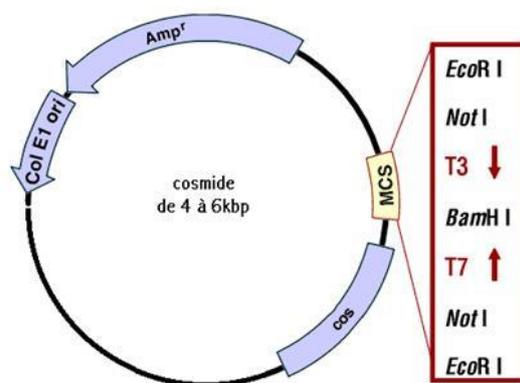


شكل 5. مقارنة بين الفاج لمدنا و M13

تتكون مادتها الوراثية من سلسلة مفردة أو مزدوجة من الحمض الريبي النووي منقوص الأوكسجين أو RNA و غالباً ما تكون مؤلفة من سلسلتين مزدوجتين من الحمض الريبي النووي منقوص الأوكسجين. تكون المادة الوراثية للفاجات المذنبة و غير المذنبة محاطة بغلاف بروتيني يدعى الكابسيد Capside و الذي يعرف في بعض الأحيان بمعطف الفاج Coat. تؤلف المادة الوراثية في الفاجات المزدوجة السلسلة في الحالات المثلى 50% من كتلة الفاج.

تتكون المادة الوراثية للفاج λ (و هو فيروس موجود في *E. coli*) من 48.5 kb طولاً لتؤلف ما يقرب من 46 مورثة. تختلف الفاجات البكتيرية الخيطية M13 عن الفاجات λ في التركيب و دورة الحياة. تتمثل المادة الوراثية للفاج M13 في كونها جزيئات من الحمض الريبي النووي منقوص الأوكسجين مفردة السلسلة حلقية الشكل و بطول 6407 bp و يستطيع الفاج إصابة الخلايا البكتيرية *E. coli* فقط.

لقد حوّرت هذه النواقل لكي تستطيع حمل أكبر كمية من الحمض الريبي النووي منقوص الأوكسجين فعلى سبيل المثال الكوسميد (Cosmids) (شكل 6) عبارة عن تهجين جزء من فاج ليمبدا (Phage) مع البلاسميد (Plasmid) و بذلك تكون ملائمة لتسهيل قطع الحمض الريبي النووي منقوص الأوكسجين لما يقرب 47 كيلوباز (kb) في الطول.



شكل 6 . بنية الكوسميد.

حيث أن:

ori: منطقة التضاعف الذاتي.

amp^R: مورثة تكافح المضاد الحيوي.

COS: مورثة β _galactosidase و التي ترمز لنفس الإنزيم بيتا غالاكتوزيداز.

MCS: منطقة إنزيمات القطع.

الباك الفيروسي المسمى بالصبغي p1 الصناعي (P1-derived artificial Chromosomes / PAC) عبارة عن تحوير للفاج (P1 Bacteriophage) وإضافته إلى البلازميد.

النواقل الصبغية الصناعية (Artificial Chromosomes):

نظراً للحاجة إلى نقل أحجام كبيرة من الحمض الريبي النووي منقوص الأوكسجين فقد قام العلماء بتحويل بعض الناقلات الطبيعية لكي تقوم بهذه المهمة. من هذه النواقل:

1- صبغي الخميرة الصناعي، YAC (Yeast Artificial Chromosomes/) (شكل 7).

يستطيع هذا الناقل نقل قطعة كبيرة من الحمض الريبي النووي منقوص الأوكسجين أكبر من 500 كيلوباز (500 kb) و هو عبارة عن قطعة من الحمض الريبي النووي منقوص الأوكسجين مترابطة و تحتوي على:

طرفي الصبغي (2 Telomeres)

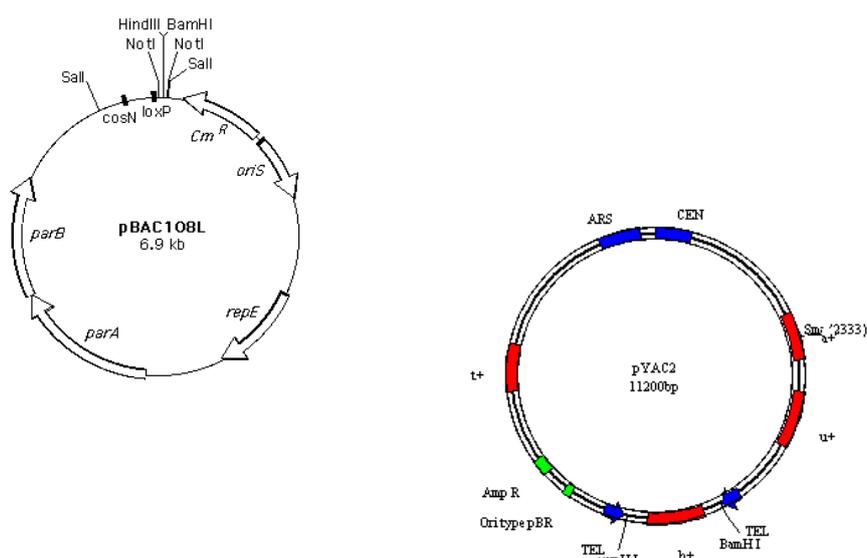
و الجزء المركزي للصبغي (Centromere)

و مركز للتضاعف الذاتي (Autonomous replicating sequence ARS).

و يمكن استخدامه من أجل تسهيل قطع كبيرة جداً من الحمض الريبي النووي منقوص الأوكسجين و لإنتاج مكتبة وراثية لكائن حي ما.

2- صبغي البكتيريا الصناعي، BAC (Bacterial Artificial Chromosomes) (شكل 7).

يستطيع هذا الناقل حمل حتى 150 كيلوباز (هو عبارة عن تحوير للبلازميد المعروف بعامل تكاثر بكتيريا *E. coli* Fertility plasmid-factor).



شكل 7. الصبغي البكتيري الصبغي و صبغي الخميرة الصناعي.

انتهت الجلسة