الأنزيمات

لكي تجري التفاعلات لابد أولا من تفكيك الروابط الكيميائية بين المركبات المتفاعلة. ولكي يتم هذا الأمر لابد من تقديم طاقة تدعى بطاقة التنشيط Activation energy.

يمكن تنشيط المواد المتفاعلة وتحفيزها على التفاعل فيما بينها عن طريق رفع درجة حرارتها. إذ أنه مع ارتفاع درجة الحرارة تزداد فرص اصطدام الجزيئات المختلفة فيما بينها نتيجة زيادة طاقتها الحركية، كما تنخفض قوة الروابط الكيميائية بين الذرات ضمن الجزيئة الواحدة. إذاً يمكن اعتماد الحرارة كأحد مصادر طاقة التنشيط اللازمة لانجاز التفاعل الكيميائي. لكن التفاعلات الكيميائية تجري داخل الخلايا الحية في درجة حرارة معتدلة وهذه الدرجة تعد غير كافية لإنجاز هذه التفاعلات، ولا يمكن للخلايا أن تتحمل درجات حرارة مرتفعة لأجل إنجاز تفاعلاتها الحيوية. لذا لجأت الخلايا الحية إلى تطوير طريقة أخرى لإنجاز تفاعلاتها وهي باستخدام وسائط حيوية، يُشار إليها بالأنزيمات Enzymes.

لتفريق تسمية الأنزيمات عن غيرها من المركبات تم عالمياً اعتماد المقطع (ase-) في نهاية اسم الأنزيم، فمثلاً هناك أنزيمات تفكيك الدسم (ليباز Lipase) وأنزيمات حلمهة النشاء (أميلاز Amylase) وأنزيمات تفكيك الماء الأوكسجيني (كاتالاز Catalase) وأنزيمات أكسدة المركبات الفينولية (فينول أوكسيداز Phenol oxidase)، وغيرها الكثير.

تمثل الأنزيمات وسائط حيوية ذات طبيعة بروتينية تعمل على تسريع التفاعلات الكيميائية وإنجازها داخل الخلايا الحية في درجة حرارة معتدلة. يتمثل الدور الفعال للأنزيمات في إنجاز التفاعلات الحيوية عن طريق تخفيضها لمقدار طاقة التنشيط اللازمة لإنجاز التفاعل. إذاً لا يقدم الأنزيم طاقة تنشيط بل أنه يخفض من مقدار هذه الطاقة اللازمة لإنجاز التفاعل.

طبيعة الأنزيمات:

تمثل الأنزيمات مركبات بروتينية متفاوتة في الحجم من بروتينات صغيرة ذات وزن جزيئي بحدود 10 كيلو دالتون إلى مركبات معقدة قد يصل وزنها الجزيئي إلى حدود بضعة آلاف من الكيلو دالتون. تكون بعض الأنزيمات ذات طبيعة بروتينة صرفة مئة بالمئة، بينما لا يمكن لبعضها الآخر أن يعمل إلا إذا كان البروتين الأنزيمي مرتبطاً بنيوياً إلى عامل مساعد Cofactor. يمكن للعوامل المساعدة أن تكون مركبات عضوية تدعى المرافقات الأنزيمية Coenzymes، أو تكون عبارة عن عناصر معدنية.

1- المرافقات الأنزيمية Coenzymes : تمثل المرافقات الأنزيمية مركبات عضوية مشتقة من الفيتامينات، ويتم الحصول عليها مع الغذاء. لا تمتلك الخلايا الحيوانية المقدرة على تصنيع الفيتامينات، وبالتالي فمن البديهي القول أن نقص الفيتامينات في غذائها سيكون له أثر سلبي كبير في حياتها.

من أمثلة المرافقات الأنزيمية الحاوية على فيتامينات، المرافق الأنزيمي أ (Coenzyme A) الذي يحتوي حمض البانتوثينيك pantothenic acid ، و هو اسم فيتامين B5 المكون من اتحاد حمض البانتويك مع بيتا الانين و موجود في البقوليات و الخضروات و البيض و اللحوم الحمراء.

Coenzyme A له دور هام في تكوين و أكسدة الأحماض الدسمة و في أكسدة الالبيروفيت في دورة حمض الستريك.

والمرافق الأنزيمي فلافين أدينين ثنائي النكليوتيد (FAD) الذي يحتوي في تركيبه على فيتامين (الريبوفلافين Riboflavin) و يعرف باسم فيتامين B2. وهو ضروري لعملية التمثل الغذائي لكل من الكربوهيدرات و الأحماض الأمينية و الليبيدات، كما أنه يدعم وظيفة مضدات الأكسدة من أجل توفير الحماية للجسم.

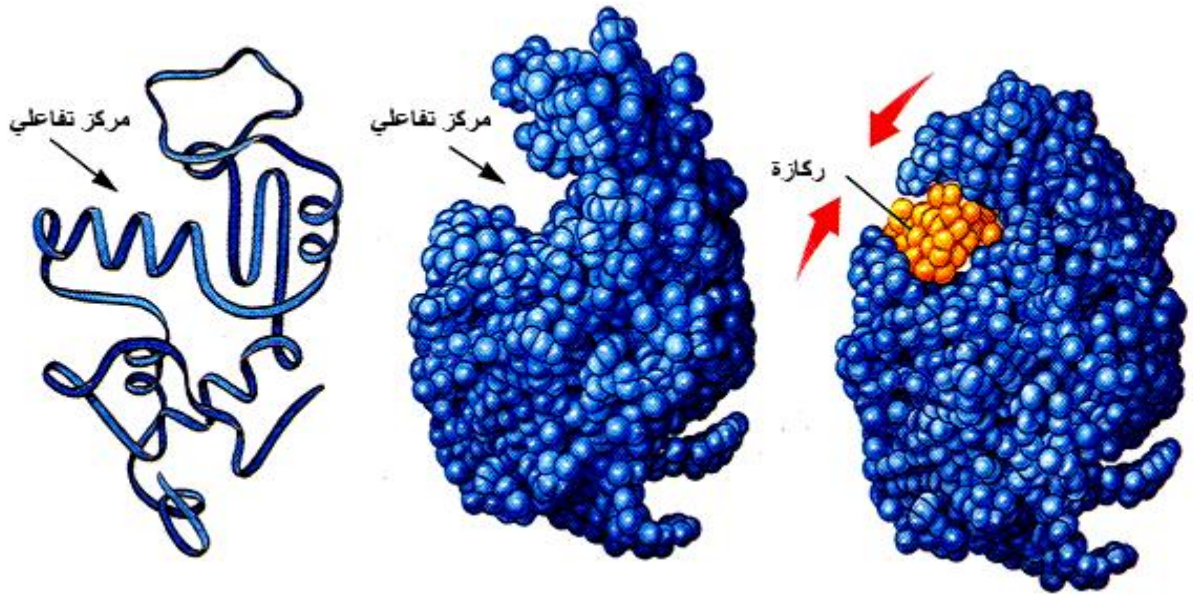
FAD هو عامل مرافق تأكسدي-اختزالي منخرط و مشارك في تفاعلات مهمة في عملية الأيض.

2- العناصر المعدنية Metallic ions : وهي يمكن أن تشكل مجموعة وظيفية ضرورية لعمل الأنزيم، ومنها الحديد الذي يدخل في تركيب أنزيمات السيتوكروم Cytochromes المساهمة في العملية التنفسية، والكالسيوم الذي يدخل في تركيب أنزيم التروبونين Troponin (أنزيم التقلصات العضلية).

آلية عمل الأنزيمات:

تحتوي الأنزيمات في بنيتها على مراكز تفاعلية Reaction centres، تتوضع على هيئة جيوب خاصة ضمن السلسلة البروتينية شديدة الالتفاف، وتأخذ هذه المراكز دوماً شكلاً فراغياً محدداً يتناسب تماماً مع الركازة التي يعمل عليها الأنزيم دون غيرها (الشكل 25)، لذا يمكن القول أن الأنزيم يتعامل مع ركائزه بطريقة شديدة التخصص.

ترتبط الركازة المحددة إلى الأنزيم في المركز التفاعلي بواسطة روابط كيميائية، ليتشكل معقد يدعى بمعقد (الأنزيم ـ ركازة). أثناء هذا الارتباط يقوم الأنزيم بخلخلة الروابط الكيميائية ضمن جزيء الركازة مؤدياً إلى إضعافها وتخفيض كمية طاقة التنشيط اللازمة لجريان التفاعل.



الشكل25: يبين موضع مركز التفعيل في الأنزيم وركازته

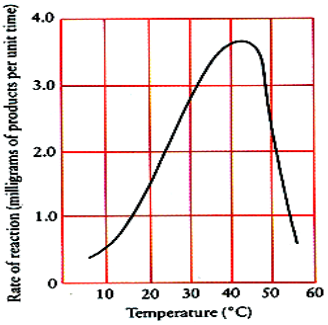
تنظيم الفعالية الأنزيمية:

تعمل معظم الأنزيمات بأقل من طاقتها القصوى، أي أن الفعل الأنزيمي يخضع لعوامل تحد من فعاليته، وأهمها تركيز مادة التفاعل، ومدى توفر العوامل المساعدة.

تقوم الخلايا بإنتاج بعض الأنزيمات بشكلها غير الفعال، وفقط حين تدعو الحاجة لعمل هذه الأنزيمات فإنه يجري تنشيطها، ومثال ذلك أنزيم الكيموتربسين Chymotrypsin الهضمي. يجري إنتاج هذا الأنزيم في خلايا البنكرياس على هيئة شكل غير نشط يدعى كيموتربسينوجين Chymotrypsinogen ، ولكن عند إفراز هذا الأنزيم في الأمعاء الدقيقة خارج خلايا البنكرياس فإنه يتحول إلى الشكل النشط، ويبدأ بممارسة نشاطه الهضمي.

توجد مجموعة من العوامل التي تحدد سرعة التفاعلات الأنزيمية وتتحكم فيها، وأهمها:

- الحرارة: تتضاعف سرعة التفاعلات الأنزيمية مع كل ارتفاع في درجة الحرارة بمعدل 10 درجات مئوية، حتى الوصول إلى حدود الدرجة 40 مئوية إذ تنخفض بعدها بشكل سريع. يمكن تفسير زيادة سرعة التفاعلات الأنزيمية ضمن المجال [0 ـــ 40 درجة مئوية] بأنه تزداد مع ارتفاع درجة الحرارة حركية الجزيئات المتفاعلة وتزداد فرص اصطدامها ببعضها، كما تقل متانة الروابط الكيميائية بين ذرات الجزيئة الواحدة مما يسهل دخولها في التفاعلات. ولكن عند ارتفاع الحرارة فوق 40 درجة مئوية تبدأ البنية الفراغية أي البنية الثالثية والثانوية لجزيء البروتين الأنزيمي بالتخرب، الأمر الذي يؤدي إلى تشوه بنية المراكز التفاعلية وبالتالي يصبح البروتين الأنزيمي غير فعال Denatured protein، ويتوقف التفاعل (الشكل26).



الشكل 26: يبين تأثير ارتفاع درجة الحرارة على سرعة التفاعلات الأنزيمية

- الـ (pH): يرتبط الشكل الفراغي للأنزيم إلى حد بعيد بقوى التجاذب والتنافر بين الأحماض الأمينية المشحونة سلباً والمشحونة إيجاباً المكونة للسلسلة البروتينية للأنزيم. عند تغير الـ pH للوسط فإن ذلك يقود إلى تغير في طبيعة هذه الشحنات، الأمر الذي يعني تبدلاً في البنية الفراغية للأنزيم وبالتالي خلل في فعاليته. تختلف درجة الرقم الهيدروجيني المثالي من حمض أميني لآخر، فالأنزيمات المعدية الهاضمة على سبيل المثال تعمل في درجة حموضة عالية (pH منخفض) تتسم بها العصارة المعدية. في حين تكون هذه الحموضة مخربة لفعالية معظم الأنزيمات الأخرى.

- المثبطات التنافسية: تقوم بعض المركبات بتثبيط فعالية بعض الأنزيمات عن طريق شغلها للمراكز التفاعلية لهذه الأنزيمات بشكل مؤقت، وهذا ما يُسمى بالتثبيط التنافسي Competitive inhibition لأن جزيئات مادة التفاعل (الركازة) وجزيئات المثبط تتنافسان من أجل الارتباط إلى المركز التفاعلي للأنزيم. يعد التثبيط التنافسي عكوساً، ويتعلق حدوثه بمدى توفر كل من جزيئات المثبط والركازة في الوسط.

تعتمد آلية تأثير بعض الأدوية في البكتيريا المسببة للأمراض في الخلايا الحيوانية على مبدأ التثبيط التنافسي، ومثال ذلك استخدام العقار سلفانيل أميد Sulfanilamide في القضاء على بعض أنواع البكتيريا.

لا تستطيع الخلايا الحيوانية تصنيع فيتامين حمض الفوليك Folic acid ، بينما الخلايا البكتيرية التي تصيب تلك الخلايا الحيوانية لها القدرة على تصنيع هذا الحمض عبر سلسلة تفاعلات استقلابية مروراً بحمض بارا أمينوبنزويك Para-aminobenzoic acid (PABA). يشبه العقار سلفانيل أميد في بنيته إلى حد بعيد حمض البارأمينوبنزويك، فعند توفر السلفانيل أميد في الوسط تقوم البكتيريا باستخدامه بهدف تصنيع حمض الفوليك الضروري لنموها، لكن السلفانيل أميد هو مستقلب شبيه وليس بحمض باراأمينوبنزويك الحقيقي، لذا يتوقف اصطناع حمض الفوليك لدى البكتيريا وتموت.

- **المثبطات اللاتنافسية:** لا يشبه جزيء المثبط في هذه الحالة جزيء مادة التفاعل (الركازة)، أي أن المثبط لن يرتبط إلى المركز التفاعلي للأنزيم بل سيرتبط إلى أي مكان آخر من البروتين الأنزيمي. من الأمثلة على هذا النمط من المثبطات نذكر عنصر الرصاص. يشكل الرصاص روابط تشاركية مع الزمر السلفهيدرية (SH) لكثير من أحماض السيستئين الداخلة في بنية كثير من البروتينات الأنزيمية. يؤدي الارتباط إلى الرصاص إلى شل الأنزيم وتخرب بنيته الفراغية، وحدوث ما يُسمى بالتسمم بالرصاص Lead poisoning .

يكون عادة التثبيط التنافسي عكوساً، لكن الانعكاسية لا تتحقق بزيادة تركيز الركيزة، ففي حالة التسمم بالرصاص يمكن تحقيق الانعكاسية وسحب الرصاص من بنية الأنزيم عن طريق المعالجة بمركبات حاوية جذور سلفهيدرية أخرى يمكن أن ترتبط إلى الرصاص بشكل أقوى مما يقوم به السيستئين.

- **المثبطات غير العكوسة:** يمكن لبعض المركبات أن تثبط الأنزيم بشكل غير قابل للانعكاس، إما عن طريق ارتباطها بشكل دائم إلى المراكز التفاعلية للأنزيمات، أو عن طريق تشويه البنية الفراغية للأنزيم بشكل يصبح معه غير قابل للترميم مرة أخرى. تشكل غازات الأعصاب التي تستخدم في الحروب بشكل واسع أحد الأمثلة عن المثبطات غير العكوسة. تعمل هذه الغازات على الحيلولة دون نقل السيالات العصبية بين الأعصاب المختلفة، الأمر الذي يقود إلى الشلل والموت.

الأنزيمات المؤثرة على جزيئات الـ DNA

تصنف الأنزيمات المؤثرة على جزيئات الـ DNA إلى أربعة صفوف أساسية و هي:

1- أنزيمات النوكلياز Nucleases: تقوم بالقطع و التقصير و أيضا تحلل جزيئات الأحماض النووية.
2- أنزيمات البلمرة (أنزيمات البوليميراز) Polymerase: و هي الأنزيمات التي تصنع نسخا من الحموض النووية.
3- أنزيمات التعديل Modifying Enzymes : هي الأنزيمات التي تلغي أو تضيف زمرا كيميائية.
4- الأنزيمات المماكبة الموضعية Topoisomerases: الأنزيمات التي تدخل أو تلغي التفافات من جزيئة الـ DNA الدائرية المغلقة.

أولا – أنزيمات النوكلياز:

آلية عمل تلك الأنزيمات تقوم بتحليل جزيئات الـDNA عن طريق كسر الروابط الفوسفاتية ثنائية الأستر الرابطة التي تربط النكليوتيدات مع بعضها البعض في سلسلة الـ DNA (النكليوتيد هو الوحدة البنائية الأساسية لجزيء الـ DNA).

تتكون أنزيمات النوكلياز من نوعين :

1. أنزيمات النوكلياز الخارجي التي تلغي أو تزيل النكليوتيدات واحدا بعد الآخر انطلاقا من نهاية جزيئة الـDNA.

مثال : أنزيم النوكلياز الخارجي Exonuclease III المستخرج من جرثومة الـ *Escherichia coli* على هضم سلسلة واحدة فقط من جزيئات الـ DNA مضاعفة السلسلة. و نحصل في نهاية عملية الهضم على سلسلة واحدة فقط من الـ DNA.

2. أنزيمات النوكلياز الداخلي التي تكسر الروابط الفوسفاتية ثنائية الاستر الموجودة داخل جزيئة الـ DNA.

مثال : أنزيم النوكلياز الداخلي DNAase I (deoxyribonuclease I) المعزول من بنكرياس الأبقار. يستطيع هذا الأنزيم قطع سلاسل مفردة من الـDNA و يستطيع كذلك قطع جزيئات DNA مضاعفة السلسلة.
و يعتبر هذا الأنزيم غير نوعي لأنه يهاجم الـ DNA في العديد من المواقع الداخلية بهضم الروابط الفوسفاتية ثنائية الاستر الداخلية. في المخبر عند استخدام أنزيم DNAase I لفترات حضن طويلة، يظهر في مزيج التفاعل مزيجا من النكليوتيدات الأحادية و سلاسل قصيرة جدا من متعددات النكليوتيدات.

ثانيا- أنزيمات البلمرة:

إن الكثير من أنزيمات البلمرة لها القدرة على تصنيع جزيئات DNA جديدة و تتصف في نفس الوقت باحتوائها على فعالية أنزيمية محللة مثل أنزيمات النوكلياز.
هناك أربع أنواع مختلفة من أنزيمات الـ DNA Polymerase المستخدمة بشكل روتيني في أبحاث الوراثة الجزيئية و الهندسة الوراثية و هي :

1- أنزيم الـ DNA Polymerase 1
2- قطعة Klenew
3- أنزيم النسخ العكسي
4- أنزيم Taq polymerase

❖ **أنزيم الـ DNA Polymerase 1 :**

تم التعرف ثلاثة أنماط مختلفة من أنزيم الـ DNA Polymerase مسؤولة عن تضاعف الـ DNA في الخلايا حقيقية النواة وهي I و II و III . يستخلص أنزيم الـ DNA Polymerase 1 من جرثومة الـE.coli .

من أهم تطبيقات هذا الأنزيم :

1- تحديد التسلسل النكليوتيدي للـ DNA

2- إنتاج مسابير موسومة إشعاعيا.

3- بناء نواقل استنساخ انطلاقا من حمض نووي مفرد السلسلة

4- اصطناع السلسلة الثانية من الـ cDNA.

ملاحظة : (cDNA و هو complementary DNA الذي يصنع اعتبارا من mRNA بواسطة أنزيم النسخ العكسي).

❖ **قطعة Klenew:**

يتألف أنزيم الـDNA Polymerase I من 928 حمض أميني، و يحتوي على فعاليتين أنزيميتين محللتين، واحدة في الاتجاه ´5 إلى ´3 و الثانية في الاتجاه ´3 إلى ´5. أوضح العالم Klenew أن السلسلة الببتيدية لهذا الأنزيم يمكن أن تشطر إلى قطعتين، واحدة كبيرة و الأخرى صغيرة، و ذلك عند استخدام أنزيم الـ Trypsin أو subtilisen. القطعة الصغيرة يبلغ طولها 323 حمض أميني ولها فعالية محللة خارجية تعمل في الاتجاه ´5 إلى ´3. بينما القطعة الكبيرة المسماة Klenew لها فعالية مبلمرة في الاتجاه ´5 إلى ´3 و فعالية محللة في الاتجاه´3 إلى ´5.

❖ **أنزيم النسخ العكسي Transcriptase Ensyme:**

تعتبر أنزيمات النسخ العكسي و أنزيمات التقطيع من أهم الأنزيمات التي طورت علوم البيولوجيا الجزيئية، الوراثة الجزيئية، و الهندسة الوراثية.

حيث يستخدم أنزيم النسخ العكسي قالبا من الـ RNA لتصنيع الـ DNA المتمم له ويسمى بـ cDNA و يستخدم بشكل خاص أثناء تشكيل مكتبات الـ cDNA في المخير، و يلاحظ في الفيروسات الحاوية على الـ RNA بدلا من الـ DNA كمادة وراثية، مثل فيروس الإيدز.

❖ **أنزيم Taq DNA polymerase:**

يستخدم هذا الأنزيم في تقنية تفاعل البوليمراز التسلسلي (PCR)، و هي تقنية تستخدم لتضخيم قطعة الـ DNA المراد دراستها ملايين المرات في جهاز مقاوم لدرجات الحرارة المختلفة.

يتم عزل هذا الأنزيم من جرثومة *Thermus aquaticus* التي تعيش في المياه الحارة. ويتميز هذا الأنزيم بأنه ثابت تجاه الحرارة وبالتالي سيكون مقاوما للتمسخ (فصل سلسلتي الـ DNA في الجهاز عند رفع درجة الحرارة إلى 94ºC).

ثالثا- أنزيمات التعديل أو التغيير :

هناك العديد من الأنزيمات التي تغير جزيئات الـ DNA من خلال إضافة أو إزالة زمرا كيميائية خاصة و من أهمها :

1- أنزيم الفوسفاتاز القلوي Alkaline phosphatase

يحفز هذا الأنزيم إزالة الزمرة الفوسفاتية الموجودة على النهاية ´5 لجزيئات الـ DNA مزدوج الخيط أو سلاسل الـ RNA. تستخلص أنزيمات الفوسفاتاز القلوي المستخدمة في أبحاث البيولوجيا الجزيئية و الهندسة الوراثية من الجراثيم أو الخلايا الظهارية المبطنة لأمعاء الحيوانات المجترة.

2- أنزيم الكيناز Polynucleotide kinase

يستخلص من الجراثيم *E.coli* المصابة بآكل الجراثيم T4. ولذلك يسمى T4 Polynucleotide kinase ويستخدم لنقل الفوسفات الموجودة في جزيئة الـ ATP وله استخدامات عديدة.

3- أنزيم النقل الطرفي Terminal transferase

يستخلص أنزيم النقل الطرفي من الغدة التيموسية للعجول، يحفز هذا الأنزيم إضافة نكليوتيدات ريبية منقوصة الأوكسجين على النهاية ´3OH الحرة لجزيئة الـ DNA.

رابعا- الأنزيمات المماكبة الوضعية Topoisomerases:

تستطيع الأنزيمات المماكبة الموضعية تغيير هيئة الـ DNA المغلق الدائري (على سبيل المثال جزيئات الـ DNA البلاسميدي) من خلال إضافة أو إزالة الالتفافات.

تقانات البيولوجيا الجزيئية

(1)

تقنية الـ Cloning

من أجل دراسة مورثة معينة يتوجب عزلها وتكثيرها بشكل منعزل عن باقي تسلسل الجينوم، ولتحقيق ذلك هناك تقنيتين رئيسيتين :

1- تقنية الـ Cloning 2- تقنية الـ PCR

أولا- تقنية الـ Cloning :

يتم في هذه التقنية قص القطعة المستهدفة المراد دراستها من الجينوم بمقصات جزيئية (أنزيمات اقتطاع) ومن ثم إدخالها على الخلية ضمن ناقل Vector يحوي نقطة بدء تضاعف (ori). ندخل الناقل المحمل بالقطعة الهدف إلى خلية مضيفة (خلية جرثومية) وتترك الخلية لتتكاثر، فنحصل على نسخ عديدة من القطعة المرغوبة من الـ DNA محمولة على الناقل.

نجمع الخلايا المتكاثرة ثم نحل الغشاء الخلوي ونخرج مكونات الخلية ونستخلص نسخ الناقل الذي يحمل تسلسل الـ DNA المراد دراسته وبذلك نكون قد حصلنا على المورثة المطلوبة بكميات كبيرة.

من أجل انجاز هذه التقنية يجب إجراء التقنيتين التاليتين:

1- الـ Recombinant DNA

2- الـ Transformation

1- **الـ Recombinant DNA:** ويعرف باسم الـ DNA المأشوب والذي يشير إلى الـ DNA المعدل المرتبط بقطع والذي تم تجميعه من مصادر مختلفة أو تصنيعه.

وللحصول عليه:

- ❖ يجب عزل قطعة الـ DNA المراد دراستها من جينومها ومن أجل تحقيق ذلك لابد من قصها من شريط الجينوم بواسطة المقصات الجزيئية (أنزيمات الاقتطاع).
- ❖ يجب استخدام ناقل Vector ينقل القطعة المطلوبة إلى الخلايا المتكاثرة.

أ- أنزيمات الاقتطاع: إن اكتشاف أنزيمات الاقتطاع Restriction Endonucleases (Res) هو الذي فتح الباب أمام تقدم علم البيولوجيا الجزيئية، إذ كنا عاجزين عن التعامل مع المورثات قبل اكتشافها.

اكتشف في عام 1970 أن البكتريا تملك أنزيمات الـ nucleases التي تقوم بالتعرف على المواقع الصغيرة للنكليوتيدات في الحلزون المضاف للـ DNA وتقطع هذه المواقع في كلا الذراعين في الحلزون المضاعف و دعيت باسم Restriction Endonucleases RES أو بشكل أبسط دعيت Restrictions.Enzymes

تنتج الخلايا الجرثومية هذه الأنزيمات من أجل التصدي لجينوم المعتدي والذي غالبا" ما يكون الفيروسات الملتهمة للجراثيم. وتحمي الجراثيم جينومها الخاص من خلال متيلة مواقع التعرف (متيلة: إضافة جذر المتيل (CH3) لأنزيمات الاقتطاع التي تنتجها السلالة.

عزلت الأنزيمات من عدد كبير من السلالات الجرثومية المختلفة، لذلك يدعى الأنزيم حسب السلالة الناتج عنها، فتشتق الأحرف المكونة لاسمه من جنس ونوع الجرثوم ومن السلالة المستخدمة.

بشكل عام هناك أكثر من 100 موقع نكليوتيدي تتعرف عليهم أنزيمات القطع، مختلف المواقع النكليوتيدية التي تعرف من قبل هذه الأنزيمات طولها يبلغ 4 إلى 8 نكليوتيد التي تتصف بتناظر داخلي خاص.

وتصنف أنزيمات الاقتطاع ضمن ثلاث عائلات رئيسية (ترقم I و II و III) وتشترك بصفات عامة مثل:

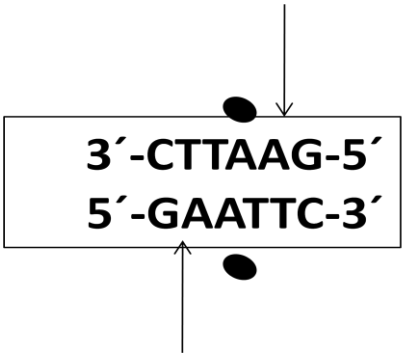
1- تتعرف على تسلسل معين من الـ DNA وترتبط بخيط الـ DNA عنده يدعى موقع التعرف (recognition site).

2- لديها موقع قطع تقوم عنده بقطع خيط الـ DNA.

تختلف طريقة القطع باختلاف العائلة. فأنزيمات العائلة الثانية REsII تتعرف وتقطع بنفس المكان دائما"، أما العائلتان الأولى والثالثة REsIII-REsI فيكون موقع التعرف مختلفا" عن موقع القطع كما ويكون موقع القطع فيها غير ثابت تماما" مما يجعل استخدامها غير موثوق به في تطبيقات البيولوجيا الجزيئية.

تتميز REsII بخاصية القطع المتناظر (تقوم بقطع الخيطين بشكل متناظر) يسمى هذا النوع من التناظر بالمعكوس ***palindrome***. (أي نحصل على نفس التسلسلات إذا حاولنا قراءتها بالاتجاه ´5 إلى ´3 من الخيط الأول وبالاتجاه ´3 إلى ´5 للخيط الثاني).

مثال : الموقع الخاص الذي يعرف من قبل أنزيم الـ ***Eco*R1** هو :

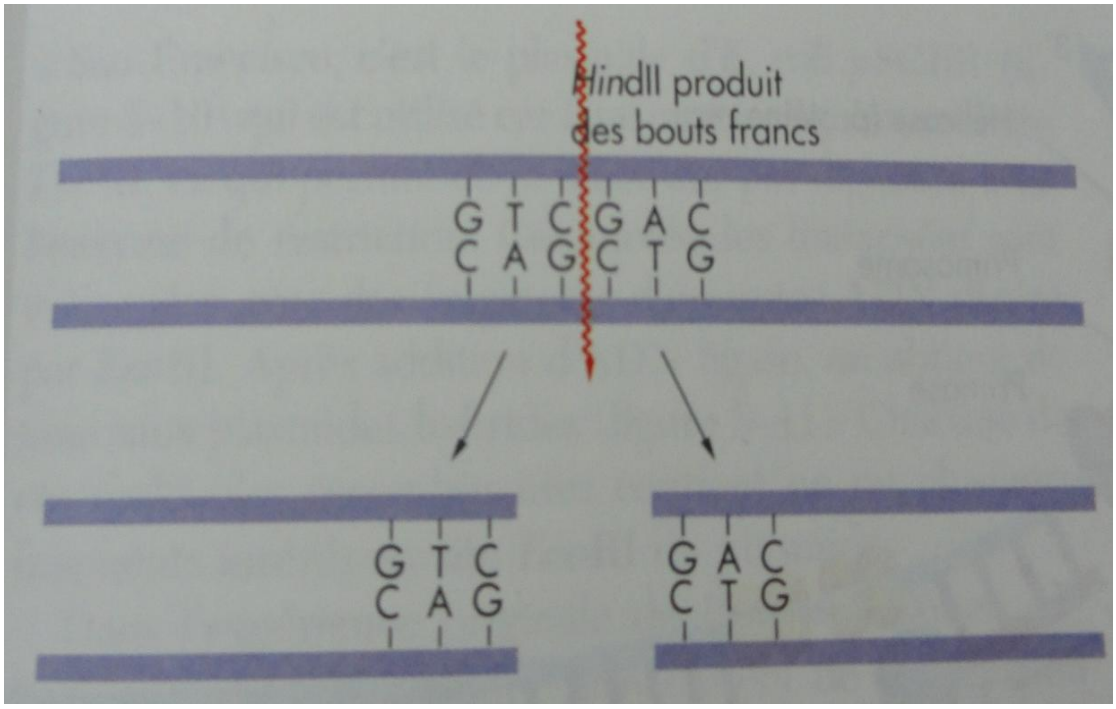


الشكل 27: الموقع الخاص الذي يعرف من قبل أنزيم الـ *Eco*R1

عندما يهاجم أنزيم الـ **EcoR1** هذا الـ***palindrome*** يحطم ذراعي القطعة في نفس المنطقة فالقطع يحصل حسب الأسهم المشار إليهما على القطعة ويكون بين A و G، النقط السوداء المعلمة فوق القطعة تشير إلى الأسس التي أجريت لها عملية متيلة من أجل حماية القطعة من الهجوم الأنزيمي لـ DNA المضيف.

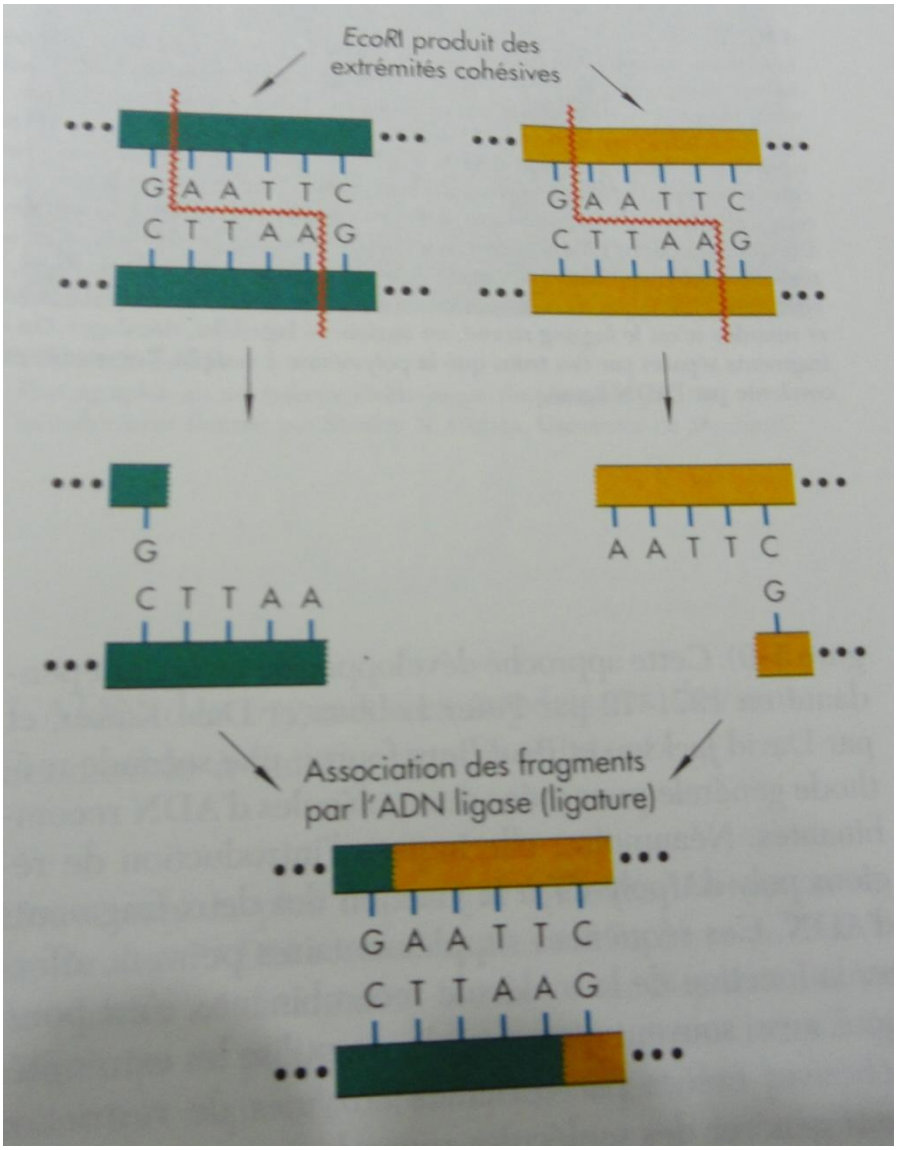
وبما أن العائلة REsII تتميز بخاصية القطع المتناظر هنا يكون لدينا احتمالين للقص:

1- يقوم الأنزيم بالقطع بشكل محوري (من المنتصف) مما يعطي نهايات كليلة Blunt ends.



الشكل 28: أنزيم القطع HindII يقطع الـDNA في المنتصف ويعطي نهايات كليلة لا تملك القدرة على إعادة الارتباط

2- أو أنه يقطع من الأطراف وينتج لدينا نهايات سائبة إما ´5 أو ´3 قادرة على الارتباط (التتام) مع النكليوتيدات المقابلة إذا ما سنحت لها الفرصة، لذا تدعى بالنهايات الالتصاقية Sticky ends.



الشكل 29: أنزيم *Eco*R1 القطع يقطع موقع التعرف بشكل متناظر وينشىء عنه نهايات سائبة و التي لها القدرة على إعادة ارتباطها مع أي نهاية أخرى منتجة من قبل نفس الأنزيم

تقوم أنزيمات الاقتطاع بعملها بغض النظر عن مصدر الجينوم ولذلك بإمكاننا أن نقطع شريطي DNA من مصدرين مختلفين بنفس الأنزيم ومن ثم وصلهما فينتج لدينا شريط DNA جديد.

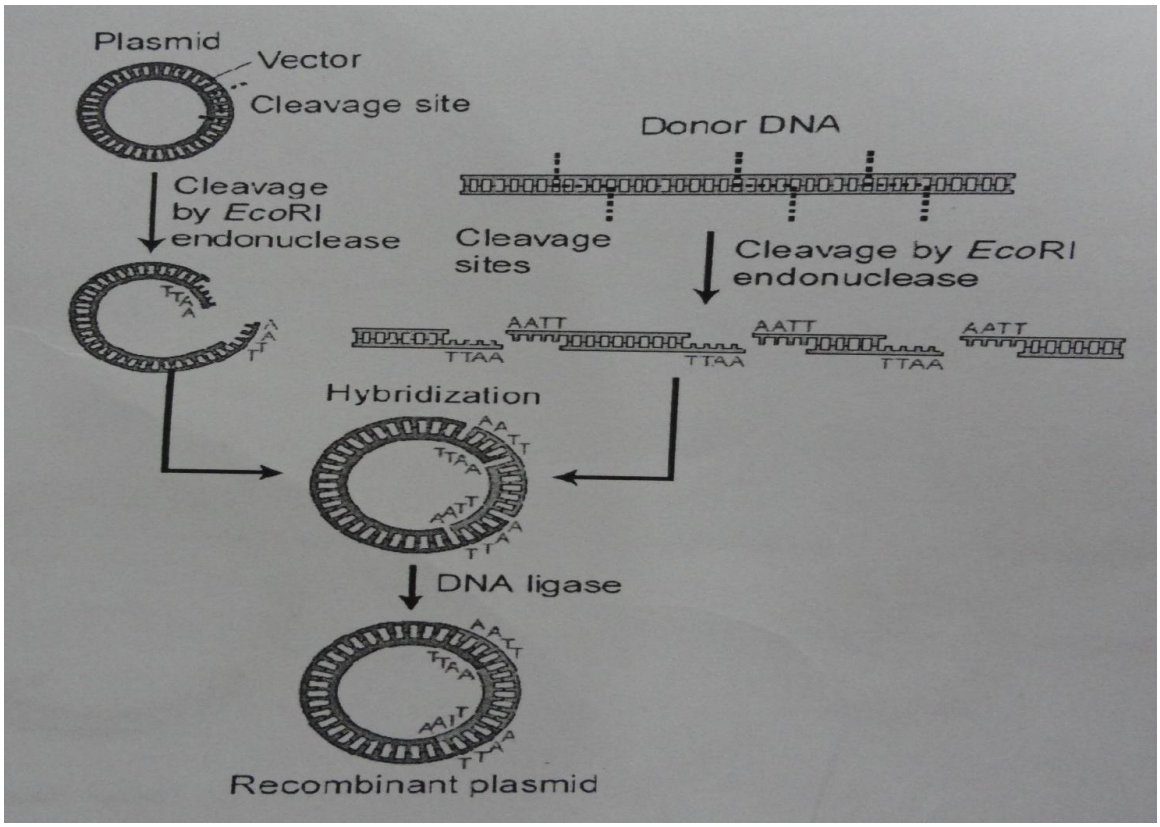
ب- الناقل Vector :

الذي يقوم ينقل القطعة المطلوبة إلى الخلايا البكتيرية المتكاثرة. ويجب أن يتمتع بالحفاظ على نفسه وقابليته للتضاعف في الخلية المضيفة من خلال امتلاكه نقطة بدء التضاعف ori .

تمتلك النواقل المشتقة من البلاسميدات هذه الصفات حيث تكون حلقية وتملك نقطة بدء التضاعف ori، و لا تستطيع أنزيمات exonuclease هضمها، أما أنزيمات الـ endonuclease تتمكن من أن تقتطعها.هذه الخاصية تفيد في إدخال قطع جديدة من الـ DNA التي تسمى inserts ويكون مصدرها من الـ DNA المعطي إلى الناقل.

من أجل إجراء عملية Cloning نقوم بقطع الـ DNA المعطي بأنزيم قطع معين فنحصل على تسلسلات مختلفة بالطول ولكنها متشابهة بالنهايات السائبة نقوم بقطع الناقل بالأنزيم ذاته، فينتج لدينا نهايات متشابهة ومتتامة مع بعضها فترتبط مع بعضها بروابط هيدروجينية ويقوم أنزيم الـ ligase بإنشاء روابط الفوسفو دي استر فنحصل على هجين من الناقل وقطعة الـDNA المعطي وهذا ما يدعى بالـ Recombinant DNA.

ولا تجري هذه العملية على خلية واحدة وناقل واحد وإنما تحتاج إلى عدد كبير من جزيئات الـ DNA المعطي وعدد كبير من جزيئات الناقل. ونتيجة لذلك نحصل بعد عملية التنسيل (Cloning) على عدد كبير من جزيئات الناقل الهجينة التي تحتوي الـ inserts.



الشكل 30: عملية قص الناقل و إعادة لحمه مع القطعة المرغوبة

هناك أنواع عديدة من النواقل المستخدمة في عمليات البيولوجيا الجزيئية سندرس منها البلاسميد الجرثومي.

تم تصنيف النواقل البلاسميدية إلى عائلتين: pBR, pUC

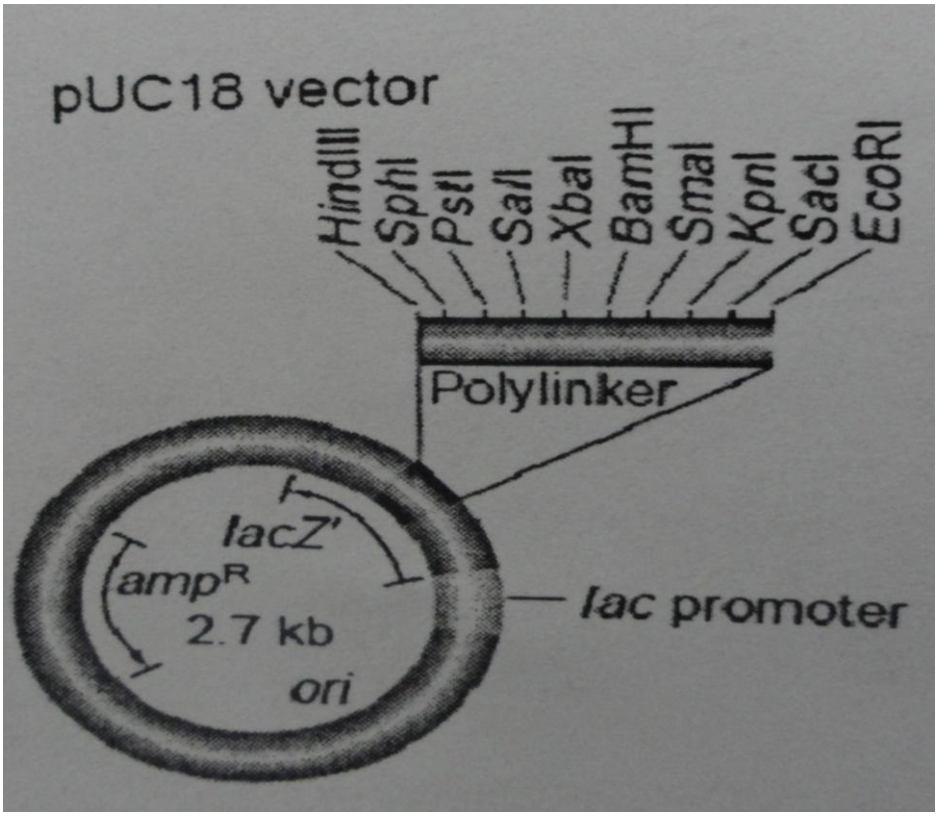
1- لكل منهما نقطة بدء التضاعف ori.

2- لكل منهما مواقع تعرف للعديد من أنزيمات الاقتطاع بحيث يكون لكل أنزيم اقتطاع موقع تعرف واحد فقط على طول البلاسميد.

3- المنطقة التي تحمل مواقع التعرف لأنزيمات الاقتطاع تدعى poly linker

أو Multiple Cloning Site (MCS)

4- توجد واصمات انتقائية (Selectable markers) كمؤشرات في عمليات التنسيل مثل مورثات المقاومة الصادات الحيوية ampR tetR. والواصمات عبارة عن مورثات من السهل اكتشاف نمطها الظاهري و يمكن أن نتتبعه بالعيان كإعطاء لون معين أو تنمو في وسط معين.....



الشكل 31: الناقل PUC18

بعد وصل القطعة المطلوبة insert بالناقل يتم دخول الجزيء الهجين إلى الخلية المضيفة بعملية تدعى الـ Transformation.

2- الـ Transformation:

عملية الـ Transformation تعتمد على دخول قطعة الـ DNA (insert) المحملة على الناقل داخل الخلية الجرثومية عبر غشائها الخلوي، لا تحدث بشكل طبيعي إلا نادرا أما في المخبر تستخدم مواد كيميائية أو عوامل فيزيائية لإجبار الخلايا الجرثومية على أخذ الـ DNA وتسمى الخلايا الجرثومية الجاهزة مخبريا لأخذه بهذه الطريقة (competent cells).

إن قطع الـinsert و قطع الناقل و محاولة وصلهما معا ومن ثم إجراء عليهما عملية الـ transformation فنكون أمام 3 احتمالات:

1- عدم دخول الناقل الهجين إلى الخلية المضيفة.

2- ارتباط الناقل مع نفسه و دخوله للخلية بدون أن يحمل قطعة الـ DNA المرغوبة (INSERT).

3- ارتباط الناقل بالـINSERT ويدخل إلى الخلية المضيفة.

للتأكد من نجاح عملية الـ transformation يختلف الأمر باختلاف الناقل، نأخذ مثال على ذلك :

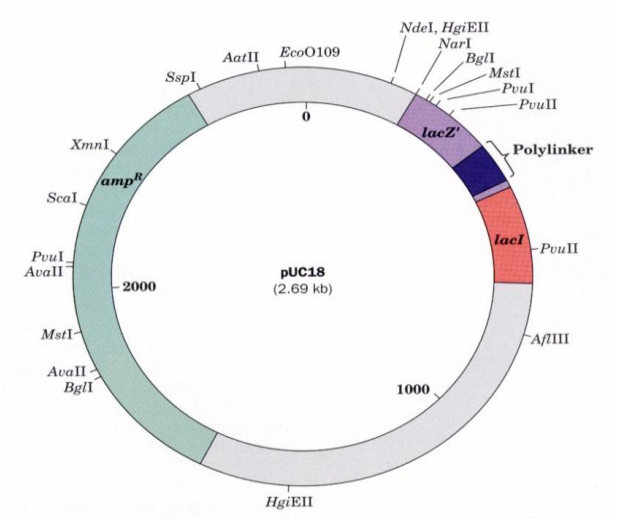
أحد أنماط البلاسميد pUC18 يملك ori و ampR و lacZ التي توجد بداخلها الـ Linker.

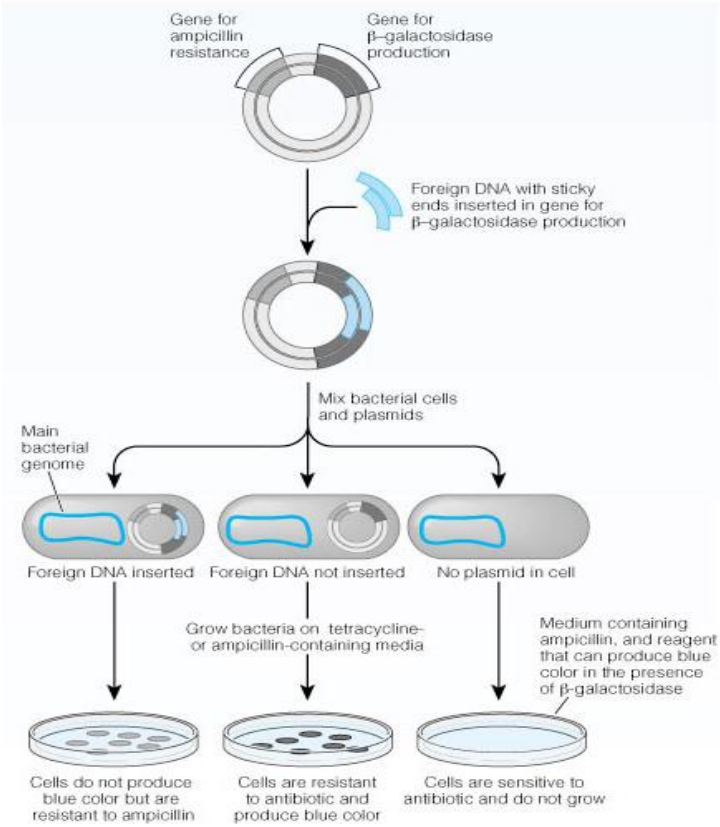
المورثتان ampR و lacZ تعتبر واصمات انتقائية تستخدم كل واحدة منهما لاستبعاد أحد الاحتمالات الثلاثة.

- تستخدم المورثة ampR لاستبعاد الاحتمال الأول : حيث تزرع الخلايا على وسط يحوي الأمبيسلين فتنمو الخلايا المقاومة للأمبيسلين فقط وهذا يشير إلى دخول الناقل إلى الخلية المضيفة.

- تستخدم المورثة **lacZ** لاستبعاد الاحتمال الثاني : تستعمل الخلية المضيفة سكر اللاكتوز لحياتها ومن أجل هذا تحتاج إلى العديد من الأنزيمات منها أنزيم B-galactosidase الذي يعمل على ركائز طبيعية ويمكنه أن يعمل على ركائز صنعية مثل x-gal فيعطي نتيجة تفاعله مع الركازة مركب يلون أزرق والمورثة المسؤولة عن إنتاج هذا الأنزيم هي مورثة lacZ .

عند اختبار الخلايا بالركازة الصنعية أي إضافة x-gal إلى الوسط وإنتاج اللون الأزرق يشير هذا إلى وجود المورثة lacZ وعدم نجاح عملية إدخال الـ insert، أما إذا لم ينتج اللون الأزرق والحصول على مستعمرات بيضاء يشير هذا إلى غياب المورثة lacZ لأن الـ insert توضعت ضمنها وخربتها.





الشكل 32: التحقق من عملية نجاح الـ Transformation