الانزيمات اللازمة في الهندسة الوراثية

تتطلب الهندسة الوراثّية تقطّيع الحامض النووي DNA وعزل القطع الناتجة لاختّيار المناسب منها. كما قد تتطلب هذه العملّيات تحوير هذه القطع لجعلها مناسبة او معاملة هذه القطع لإضافة او ازالة مجامّيع كّيمّيائّية معّينة او لحامها مع ناقل مناسب او قطع إضافّية لزّيادة كفاءة الهندسة. تتم جمّيع هذه العملّيات عن طرّيق عمل مجموعة كبّيرة من الانزّيمات التّي يّطلق علّيها **انزيمات الهندسة الوراثية**. إذ ان الهندسة الوراثّية فّي حقّيقة الامر بدأت مع بزوغ واكتشاف هذه الانزّ يمات ونظراً لاختلاف وظائف هذه الانزيّمات فقد قسمت تبعاً لذلك الى **خمس** مجامّيع رئّيسة هيً :

١ - انزّيمات هدم الاحماض النووّية Nucleases

٢ - انزّيمات اللحام Ligases

٣ - انزّيمات البلمرة Polymerases

٤ - انزّيمات التحوّير Modifying enzymes

- انزّيمات إزالة الانطباق Topoisomerases

أنزيمات هضم الاحماض النووية Nucleases

تمثل انزّيمات قطع الـ DNA احد اهم الادوات التي تمكن من سهولة التعامل مع الحامض النووي، وهّي توجد فيً خلاّيا البكترّيا كجزء من آلّية وقائّية تسمى نظام القطع والتحوّير حّيث تقوم بالتحلل المائّي لأي DNA دخّيل يظهر فّي الخلّية ومن ناحّية اخرى تقوم بتحوّير DNA الخلّية عن طرّيق امثلته Methylation بإضافة مجموعة مّيثاّيل لبعض القواعد فّي مناطق نشاط الانزّيم لمنعه من قطع DNA الموجود في الخلّية. تعمل هذه الانزّيمات على استهداف رابطة الفسفور ثنائّي الاستر Phosphodiester bonds التّي تربط النّيوكلّيوتّيدات بعضها ببعض طولياً والتّي تمثل العمود الفقري لسلاسل الاحماض النووية، تقسم انزيمات الى نوعين اساس ين هما:

١ - انزيمات القطع الداخلية endonuclease :

وهّي الانزيمات التّي تقوم بالقطع خلال وتعتمد قطعة الـ DNA التّي ينتجها الانزيم على موضع القطع ويحدد طرف القطع للإنزيم نوع نهايات الجزء المقطوع ويترتب على ذلك ثلاث انواع محتملة لأنواع الاجزاء المنتجة وهّي قطع مصمتة اوعمياء Blunt لا توجد بها قواعد فردية حرة وقطع لها نهايات '3 بارزة وقطع لها نهايات '5 كما فً الشكل (4-1) إذ ينتج الانزيم *HaeIII* نهاية مصمتة فّي حين ينتج الانزيم *PstI* والانزيم *EcoRI* قطع بارزة cohesive لزجة يمكن لها ان تتزاوج مع قواعد متواليات اتحادية ناتجة عن نفس الانزيم وبالتالّي يمكن انتاج rDNA كما هو مبين فً الشكل (4-2)،

شكل 4 .1 : أنواع النهايات الناشئة عن تأثير إنزيمات مختلفة مدرجة فـي (a) مـع متواليـة التحديد وأماكن القطع موضحة في (b) و (c) على التـوالي. (d) نمـاذج ممثلـة النهايـات الناشئة.

ويظهر الجدول التالّي اهم انزيمات القطع الداخلية المستخدمة فًي تطبيقات الهندسة الوراثية.

جدول رقم (1–4)
متواليات التمييز
ومواقع قطع لبعض الإنزيمات

الإنزيم	موقع القطع	متوالية التمييز	النهايات
BamH1	G↓GATCC CCTAG↑G	5` – GGATCC – 3`	5`
EcoRI	G↓AATTC CTTAA↑G	5` – GAATTC –3`	5`
HaeII	GG↓CC CC↑GG	5` – GGCC –3`	مصمتة
HpaI	GTT↓AAC CAA↑TTG	5` – GTTAAC –3`	مصمتة
PstI	CTGCA↓G GA↑CGTC	5` – CTGCAG –3`	3`
Sau3A	↓GATC CTAG↑	5` – GATC –3`	5`
SmaI	CCC↓GGG GGG↑CCC	5` – CCCGGG –3`	مصمتة
SstI	GAGCT↓C C↑TCGAG	5` – GAGCTC –3`	3`
XmaI	C↓CCGGG GGGCC↑C	5` – CCCGGG –3`	5`

ملاحظة: متولية التمييز موضحة على هيئة جدائل أحادية، أما مواقع تمييـز الإنزيمـات القاطعة مبينة في الاتجاه `3 ← `5 على هيئة جدائل ثنائية لتبين أنواع النهايات وتشير `5 و `3 إلى مواقع ذرات الكربون الطرفية الخامسة والثالثة على التوالي.

٢ . انزيمات القطع الخارجية exonuclease :

وهًي الانزيمات التًي تقطع الـ DNA من الاطراف, إذ تستهدف هذه الانزيمات نفس الاواصر التًي تستهدفها انزيمات القطع الداخلية الا انها تختلف عنها فًي الموقع الطرفًي لعملها مؤدية الى انتاج وحدات مفردة على الاغلب من النيوكليوتيدات.

انزيمات اللحام Ligases:

تعمل هذه الانزيمات على اعادة روابط الفوسفور ثنائي الاستر بين النيوكليوتيدات. وهي بهذه الوظيفة تكون على عكس وظيفة الانزيم القاطعة . إذ تعمل على لحام مناطق مجاميع الهيدروكسيد في النهاية الثالثة 3- OH في النيوكليوتيدات مع مجاميع الفوسفات في النهاية الخامسة 5-P للنيوكليوتيدات المجاورة لها وتكوين روابط الفوسفور ثنائية الاستر وذلك اثناء تضاعف الحامض النووي DNA او استصلاحه او تركيبة. ولا تعمل انزيمات اللحام على توليد الروابط الهيدروجينية التي تربط القواعد النتروجينية، ولكن تساعد الاواصر الهيدروجينية بين قواعد النيوكليوتيدات المتكاملة على توفير فرصة اكبر للالتقاء

الصحيح في حالة وجود النهايات اللزجة، إذ لا تعمل الا بعد التقاء النهايات الصحيحة وهو ما تحدده الصدفة، لذلك يستخدم تركيز عالي من الحامض النووي مختبرياً فيً عملية اللحام لزيادة هذه الفرصة، فضلا عن تركيز انزيم اللحام ونوع النهايات والظروف الفيزيائية الصحيحة اللازمة لمثل هذه التفاعلات والتي تعمل مجتمعة في سرعة حصول العملية.

3 - انزيمات البلمرة Polymerases:

تعمل انزيمات على تصنيع سلاسل جديدة من الحامض النووي المتمم لقالب من الحامض النووي DNA او RNA. وتعمل معظم انزيمات البلمرة مستخدمة قالب مزدوج بحيث ان هناك منطقة تعمل كبادئة يبدأ منها تصنيع السلسلة الجديدة.

هناك عدة طرز من انزيمات البلمرة ومع ذلك فان هناك اربعة انزيمات تستخدم حالياً فيً مجال الهندسة الوراثية وهي :

أ - DNA Polymerase I او ما يدعى بأنزيم كورنبرج ، يعمل هذا الانزيم المعزول من بكتريا القولون على تمّيز المناطق الصغّيرة المفردة الشرّيط في الاشرطة المزدوجة للحامض النووي DNA والناتجة عن فقدان نُوكليوتّيدات قلّيلة ، إذ يعمل هذا الانزيم على البدء في بناء هذا الفراغ اعتباراً من النهاّية الثالثة مستخدماً الشرّيط الاخر كقالب له، ونظراً لوجود نشاط هدم في هذا الانزيم إضافة لنشاط البناء فأنه يقوم بهدم شرّيط الحامض النووي من الجانب الاخر واستكمال بناء الشرّيط الجدّيد. اما مختبرياً فان هذا الانزيم يعمل على شرّيط مفرد للحامض كقالب بوجود بادئة قصيرة ذات نهاية هيدروكسيلية اضافة الى النيوكليوتيدات وايونات المغنيسيوم لتصنيع شريط ثانيً مكمل للقالب لاحظ الشكل التالي.

(الشكل 3-10): نشاط البناء والهدم في أنزيم بلمرة الحامض النووي DNA PolymeraseI ويلاحظ بان الأنزيم استخدم الشريط الكامل كقالب واستخدام قطعة الشريط القصير كبادئة لأجل البناء اعتباراً من النهاية الثالثة. بينما ابتدأ نشاط الهدم من النهاية الخامسة

ب - انزيم قطع كلينو Klenow fragment وهو وحدة البناء المسؤولة عن نشاط البناء فًي انزيم البلمرة رقم I السابق الذكر، إذ تم فصلة وتنقيتة بشكل مستقل ، ويستخدم على نطاق واسع فًي بناء اشرطة الحامض النووي DNA .

ت - انزيم الاستنساخ العكسيً Reverse transcriptase عزل هذا الانزٌيم من الرواشح المرتدة ، يختلف عن انزٌيم البلمرة فًي انه يستخدم قالباً مؤلفاً من شرٌيط حامض نووي RNA لبناء نسخة متممة له من شرٌيط DNA .

ث - انزيم بلمرة الحامض النووي RNA المعزول من بكتريا القولون ويمكن استخدامه فيً تصنيع نسخ mRNA لمورث او مورثات معين لأجل معرفة البروتين المشفر له.

٤ - انزيمات التحوير Modifying enzymes تتطلب بعض طرق الهندسة الوراثية تحويراً للحامض النووي وذلك عن طريق اضافة او حذف بعض المجاميع الكيميائية بواسطة هذا النوع من الانزيمات وخصوصاً في ما تعلق بالحوامض النووية ذات النهايات العمياء وتحويلها الى نهايات لزجة، إذ تبقى فًي جميع الاحوال عملية لحام النهايات اللزجة اسهل من النهايات العمياء. ومن اهم هذه الانزيمات هو انزيم الفوسفاتٌيز القاعدي Alkaline phosphatase الذي يعمل على ازالة مجموعة الفوسفات الموجودة فًي النهاٌية الخامسة لقطع الحامض النووي يستعمل هذا الانزيم لمنع ارتباط جزيئات الدي ان اي بشكل غير

مرغوب. وانزّيم كاٌينز متعدد النّيوكلُيوتّيد Polynucleotide kinase الذي يعمل عملاً معاكسً للانزّيم السابق باضافة مجموعة فوسفات. وانزّيم الترانسفٌيرّيز النهائّي terminal deoxy transferase الذي يقوم بإضافة نيوكليوتّيد اواكثر الى النهاٌية الهٌيدروكسيلٌية الثالثة لقطع الحامض النووي.

٥ - انزّيمات إزالة الانطباق Topoisomerases وهّي الانزّيمات التّي تعمل ازالة البرم من انواع الحامض النووي DNA شدّيدة الانطباق، لتسهّيل عمل انزّيمات البلمرة، ومن اشهر هذه الانزّيات انزّيم التوبوٌايزمٌيريزTopoisomerase II .

- قص وقطع الحمض النووي Cleavage of DNA

كما هو معروف فإن البروتينات توجد داخل الخلية على شكل قطع منفصلة عن بعضها البعض وهذا بالطبع يسهل عملية فصلها بطرق تقنية مناسبة٠ ولكن الجينات موجودة على الكروموسومات على شكل حبات متصلة ببعضها البعض وليست على شكل قطع منفصلة٠ وهذا التسلسل والترابط في الجينات جعل عملية فصل وعزل وإستخلاص جين محدد عن بقية الجينات مهمة صعبة إن لم تكن مستحيلة حتى قبل عام ١٩٧٠، ولكن إكتشاف الإنزيمات القاطعة **Restriction Nucleases** ساعد في عملية إستخلاص الجينات وقطع**DNA** ونسخها٠

Restriction Nucleases الإنزيمات القاطعة :-

لا شك أن لكل كائن حي طرق دفاعية مختلفة تحميه من غارات الأعداء وهجوم المعتدين، فالبكتيريا هي إحدى هذه الكائنات والتى لها أعداء آثيرة ومن أهم أعدائها الفيروسات المختلفة٠ ولقد قامت بعض من البكتيريا بإنتاج إنزيمات مهمتها تدمير الفيروسات٠ وتقوم هذه المقصات أو أدوات القطع بقص الحمض النووي للفيروس وبذلك يشل عمله ويبطل مفعولة٠

ويمكن وضع هذة القطع المحددة على لوح الچيل وفصلها إلى وحدات أصغر٠

- **قطع** DNA **على لوح من الچل بالترحيل الكهربي**

Gel Electrophoresis الترحيل **الكهربائي تقنية تستخدم لعزل المواد حسب معدل حركتها تحت تأثير المجال الكهربائي.** إستعمل العلماء تقنية فصل البروتينات عن بعضها البعض عن طريق تحركها على الچل(هجرة كهربائية) وإنفصالها عن بعضها البعض حسب الوزن الجزيئى لها فى صورة حزم **bands or**

fragments وكذلك حسب الشحنة الكهربية الموجودة على الحزم ، وذلك عن طريق تعريضها إلى تياركهربائي وهي على لوح من المادة الهلامية المعروفة بالجل٠ ولقد إستعمل العلماء نفس الفكرة في فصل قطع **DNA** عن بعضها البعض. يستعمل الجل المكون من مادة الاكاروز- وهي مادة مأخوذة من نباتات بحرية-،حيث يتم عمل شريحة الاكاروز عن طريق اذابة المادة في محلول منظم وتسخينه حتى يصبح المحلول صافيا تماما ومن ثم صب الاكاروز في إناء خاص حتى يبرد مما ينتج عنه مادة جيلاتينية مرنة يتم استخدامهافي عملية الفصل، وإثناء عملية الفصل توضع الشريحة الجيلاتينية داخل وعاء يحوي محلول منظم

القطب السالب

القطب الموجب

(الوزن الجزيئى صغير)

ومن المعروف أن للحمض النووي شحنة سالبة ولذلك فعند وضع بعض من **DNA** في طرف من أطراف قالب الجيل ثم تعرض لسريان تياركهربائي بحيث يكون القطب السالب عند الطرف الذي وضعنا فيه **DNA** والقطب الموجب عن الطرف الأخير من القالب فإن **DNA** ينتقل تلقائيا بإتجاه الطرف الموجب٠ وتتوقف حركة قطع أو حزم **DNA** على حسب أحجامها على طول اللوح٠ فالقطع أو الحزم الصغيرة تتحرك بشكل أكبر من القطع الكبيرة٠ وبذلك يمكن فصل هذه القطع عن بعضها البعض٠ ويمكن تحديد الحجم الفعلي لكل قطعة أو حزمة عن طريق إضافة قطع معروفة الحجم من**DNA** والتي تكون بمثابة مقياس يرجع إليه لإستنتاج أحجام القطع٠ وعلى أية حال هناك نوعان أساسيان من ألواح الجل، الأول ي سمى بجل الأجروز**Agarose gel** والثاني بجل البولي أكريلاميد **Polyacrylamide gel**٠

وتجدر الإشارة أن القطع المفصولة بالبولي أكريلاميد والأجروز لا تكون واضحة للعيان ولذلك يجب تعرض لوح الچل للصبغ بمادة بروميد الإثيديوم **Ethidium bromide** والتي تلمع عند تعريضها للأشعة فوق البنفسجية٠ وهناك طريقه أكثر دقه لمشاهدة القطع على لوح الچيل وهذه الطريقة تعتمد على إضافة مادة مشعة نووية إلى **DNA** قبل أن يوضع على لوح الچل ولكن هذه الطريقة تحتاج إلى إحتياطيات معينه لكي لا تضر من يستخدمها٠