اسم المحاضرة : انزيمات التقييد

رقم المحاضرة : التاسعة

المصادر :

1- **Watson, J.D.; Baker, T.A,; Bell, S.P.; Gann, A. (2004). Molecular Biology of the Gene. 5th Ed. Pearson edution.**
2- **Clark, D. (2006). Molecular Biology Understanding the Genetic Revolution. Elsevier Inc.**
3- **Santos, D.M. (2011). Genetic Engineering, Recent Developments in application. Apple Academic press.**

٤-عماش، هدى صالح مهدي.(١٩٩٤). مبادئ علم الحياة الجزيئي. كلية العلوم . جامعة بغداد.

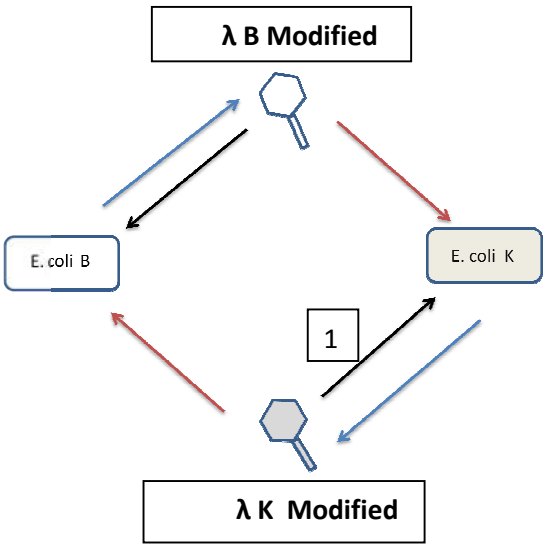
٥-البكري ، غالب حمزة.(١٩٩٠). مبادئ الهندسة الوراثية. جامعة البصرة.

إنزيمات التقييد Restriction Endonucleases

تُعرف إنزيمات التقييد بالإنزيمات القاطعة **Restriction enzyme** وهي إنزيمات موجودة بصورة طبيعية في البكتريا و تتعرف هذه الإنزيمات على تتابعات معينة من النيوكليوتيدات على شريط الدنا ومن ثم تعمل على قطع شريط الدنا خلال او قرب هذه التتابعات عن طريق كسر الآصرة ثنائية الايستر بين جزئية السكر الخماسي وبين مجموعة الفوسفات لتعطي نهاية 3-OH في طرف ونهاية 5- Phosohate من الطرف الأخر. وتعرف المنطقة التي يتم بها كسر الآصرة بالموضع الحساس للانزيم القاطع Restriction site . وعلى هذا الأساس أصبح من الممكن تقطيع المحتوى الجيني للكائن الحي Genome باستخدام هذه الإنزيمات لإنتاج قطع دنا صغيرة ومحددة مما ساعد كثيرا على تسهيل مهمة كلونة هذه الجينات وتحديد تتابع النيوكليوتيدات لها. وقد شكل اكتشاف واستخدام إنزيمات التقييد احد اهم العوامل التي ساهمت في تطوير حقل الهندسة الوراثية والوراثة الجزيئية.

تسمى الإنزيمات القاطعة كذلك بـالمقصات الجزيئية Molecular scissors او المشرط الجزيئي Molecular scalpels

كان العالم اربر وجماعته اول من لاحظ وجود إنزيمات التقييد في البكتريا في بداية الستينيات من القرن الماضي عندما كان يدرسون كفاءة العاثي لامدا (λ) في إصابة سلالات مختلفة من بكتريا *E. coli* . لاحظ الباحثون ان كفاءة العاثي لامدا المعزول من سلالة *E. coli* معينة في إصابة نفس السلالة تكون اكبر من كفاءتها في إصابة سلالة أخرى وقد اظهرت الدراسات اللاحقة ان سبب اختزال كفاءة العاثي في إصابة السلالة الاخرى يعود الى وجود أجهزة التقييد والتحوير .



اظهرت الدراسات ان عاثيات لامدا النامية على السلالة *E coli* B تكون اكثر كفاءة في اصابة نفس السلالة مقارنة بإصابتها للسلالة *E coli* K ، وهذا يعني ان العاثيات المعزولة من B قد قيدتها السلالة K وبهذا كانت كفاءة اصابتها وتحليلها لخلايا هذه السلالة واطئة جدا ، اي انها نجحت في إصابة اعداد قليلة جدا منها. ويعود سبب اختزال كفاءة العاثي لامدا المعزول من سلالة معينة في اصابة سلالة اخرى الى احتواء السلالة الثانية على إنزيمات تقييد تعمل على تقطيع دنا العاثي لمنعها من التكرار واحداث الإصابة . وعلى هذا الأساس فان دنا العاثيات المعزولة من الـ *E coli* B تقطع بواسطة انزيمات التقييد الموجودة في *E coli* K والعكس صحيح.

تحتوي البكتريا كذلك على نوع اخر من الانزيمات تدعى إنزيمات التحوير Modification enzymes التي تعمل على تحوير دنا البكتريا المنتجة للانزيمات القاطعة وذلك لحماية الدنا العائد لها من فعالية تلك الانزيمات ، ويتم التحوير بإضافة مجموعة مثيل ($-CH_3$) الى قواعد معينة من التتابعات الحساسة لانزيمات التقييد مما يجعل هذه التتابعات مقاومة لفعالية هذه الانزيمات. اي ان جهاز التقييد والتحوير يتكون من انزيمين يتعرفان على نفي التتابع من جزيئة الدنا ، احدهما يعمل على قطع الدنا في هذا التتابع في حين يعمل انزيم التحوير وهو من نوع المثيليز Methylase على اضافة مجاميع المثيل الى قواعد معينة في هذه التتابعات مما يجعلها مقاومة لانزيمات التقييد.

أوضحت الدراسات الوراثية الى وجود ثلاث جينات (*hsd M , hsd R, hsd S*) هي التي تكون مسئولة عن عن أجهزة التقييد والتحوير في بكتريا E coli . يعمل ناتج الجين *hsd M* على تحوير جزيئات الدنا باضافة مجاميع المثيل مما يجعلها مقاومة لانزيمات التقييد التي يشفر لها الجين *hsd R* . اما ناتج الجين *hsd S* فهو ضروري لعمل الانزيمين (التقييد والتحوير) .

نظر لأهمية إنزيمات التقييد في مجال الهندسة الوراثية فقد ازدادت جهود الباحثين في عزلها ودراسة خواصها ، فقد تم عزل العشرات من إنزيمات التقييد من مختلف الأحياء المجهرية .

تقسم انزيمات التقييد استنادا الى خصائصها الى ثلاث انواع رئيسية :-

- **إنزيمات التقييد من النوع الاول Type I Restriction Enzyme** : يشترط لعمل هذه الإنزيمات وجود عومل مساعدة مثل ايون المغنيسيوم Mg +2 و ATP ومادة S-adenosyl-methionine وتتسم طريقة قطع الحلزون بالتعرف على تتابع معين من حلزون الدنا ولكنها لا تقطع خلال هذا التتابع وانما تتحرك على طول جزيئة الدنا لمسافة تتراوح ١٠٠٠ – ٥٠٠٠ نيوكليوتيدة من موقع التتابع الحساس ومن ثم تقطع خيطا واحدا وبصورة عشوائية مكونة فجوة في ذلك الخيط طولها ٧٥ نيوكليوتيدة . اما قطع الخيط الثاني فيتطلب فعالية جزيئة ثانية من الإنزيم.

- **إنزيمات التقييد من النوع الثاني Type II Restriction Enzyme** : تتصف هذه الإنزيمات بقابليتها على التعرف على تتابع معين من النيوكليوتيدات في حلزون الدنا ثم تقطع الحلزون خلال او بالقرب من ذلك التتابع لإنتاج قطع محددة الاطوال من الدنا . يحتاج هذا النوع من الإنزيمات ايون المغنيسيوم فقط كعوامل مساعدة . يستخدم هذا النوع من الإنزيمات بصورة واسعة حاليا في مجال الهندسة الوراثية في تقطيع وانتاج القطع المطلوبة من الدنا.

- **إنزيمات التقييد من النوع الثالث Type III Restriction Enzyme** : تتميز هذه الإنزيمات بقابليتها على قطع الحلزون المزدوج في مواقع محددة ومعروفة وتتميز بحاجتها الى Mg +2 و ATP و S- adenosyl-methionine . وبهذا تكون صفات الانزيم وسطا بين صفات النوعين الاول والثاني .

تسمية انزيمات التقييد

بالنظر لاكتشاف العديد من انزيمات التقييد كان لا بد من ايجاد نظام تسمية موحد تسمى على اساسه كل الانزيمات المكتشفة. قدم سمث وناثانس عام ١٩٧٣ اقتراحا لتسمية الانزيمات القاطعة،حسب هذا النظام تكون اسماء انزيمات التقييد القاطعة مكونة من ٣ احرف تكتب بصورة مائلة او يوضع تحتها خط ، فمثلا يطلق على انزيم التقييد المعزول من بكتريا *Escherichia coli* بـ *Eco* حيث يمثل حرف E الحرف الاول من اسم الجنس بينما يمثل الحرف c و o الحرفين الاول والثاني لاسم النوع. وغالبا ما يتبع الاسم الثلاثي حرفا يمثل الضرب او السلالة المستعملة كمصدر للانزيم. او قد يكون هذا الحرف يمثل العاثي او البلازميد الحامل لجين التقييد او التحوير

التتابع الحساس	اسم الانزيم	الكائن المجهري
G AATTC	*Eco* RI	*Escherichia coli* RY13
A AGCTT	*Hin* d III	*Haemophilus influenzae* Rd
GGTAC C	*Kpn* I	*Klebsiella pneumoniae* OK
CCC GGG	*Sma* I	*Serratia marcescens*
G TCGAC	*Sal* I	*Streptomyces albus*
CGAT CG	*Xor* II	*Xanthomonas oryzae*
T CTAGA	*Xba* I	*Xanthomonas badrii*

مواضع عمل انزيمات التقييد

تتعرف انزيمات التقييد على مواضع معينة من تتابعات الدنا لتقطع خلال او قرب تلك المواضع ، تختلف هذه الانزيمات في تعرفها على المواضع الحساسة التي تكون رباعية او خماسية او سداسية او سباعية النيوكليوتيدات .

- مثال : انزيم Eco RI يتعرف على التتابع سداسي النيوكليوتيدات

5- G↓AATTC - 3
3- CTTAA↑G – 5

يقطع الانزيم التتابع الحساس في الموقع المؤشر بالاسهم منتجا قطع ذات نهايات ناتئة في الطرف 5- ، يمكن ان ترتبط القواعد النيتروجينية مع بعضها البعض مرة اخرى عن طريق الاواصر الهيدروجينية المتكونة بين القواعد النيتروجينية المتكاملة وعلى هذا الاساس يمكن ربط قطع الدنا المشتقة من الكائنات المختلفة اذا كانت حاوية على نهايات ناتئة حيث تتكامل القواعد النيتروجينية اولا مما يسهل عملية لحم ولصق الكسور المتبقية بواسطة انزيم DNA Ligase . وتسمى هذه النهاية بالنهاية اللاصقة Sticky ends .

عندما يحُور الموضع الحساس للانزيم Eco RI بأضافة مجموعة مثيل ($-CH_3$) الى قاعدة الادنين الداخلية (المؤشر بنجمة) في احد او كلا الخيطين، فأنه يصبح مقاوما للانزيم .

يوصف التتابع السداسي الحساس لانزيم *Eco* RI بأنه تتابع باليندرومي Palindromic sequence وذلك لانه يشبه الكلمة التي تعطي نفس القراءة عند قراءتها من الامام والخلف ، حيث ان خيطي هذا التتابع يقرأ بنفس الشكل من النهاية 5-

5- GAATTC - 3
3- CTTAAG – 5

علما انه توجد تتابعات اخرى توصف على انها باليندرومية مثل التتابع التالي

5- AGCCGA -3
3- TCGGCT -5

ان هذا التتابع غير متناظر المحاور وهو باليندرومي في خيط واحد فقط ، حيث يقرأ الخيط العلوي فقط بنفس الشكل من الطرفين 5- و 3-

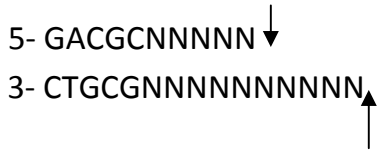
لاتقتصر الاختلافات بين الانزيمات على طبيعة الموضع الحساس فقط الذي تتعرف عليه وانما على طريقة قطعها للتتابعات الحساسة كذلك . حيث تقطع بعض الانزيمات شريطي الدنا لتنتج نهايات مستوية Blunt ends ، كما في الانزيم *Sma*I

5- CCC↓GGG -3
3- GGG↑CCC -5

كما ان هناك بعض الانزيمات تتعرف على تتابعات خماسية مثل انزيم *Eco* RII ، اما في الانزيم *Hga*I فانه يتعرف على تتابع خماسي غير متناظر المحاور

5- GACGC -3

لكنه لا يقطع عند هذا التتابع وانما يتحرك على جزيئة الدنا لمسافة خمسة نيوكليوتيدات على احد الخيطين وعشرة نيوكليوتيدات على الخيط الاخر ثم يقطع الحلزون



عند معاملة جزيئة دنا كبيرة بعدد من الانزيمات المختلفة، كل واحد على حدة ، يلاحظ ان عدد مرات القطع تختلف من انزيم الى اخر ، ويعود السبب الى اختلاف تردد Frequency المواضع الحساسة للانزيمات المختلفة في تلك الجزيئة. بصورة عامة يمكن تقدير تردد المواضع الحساسة لانزيمات التقييد في جزيئة الدنا باستخدام معادلة بسيطة بفتراض ان انتشار المواضع الحساسة يكون عشوائيا في الجزيئة. والمعادلة هي

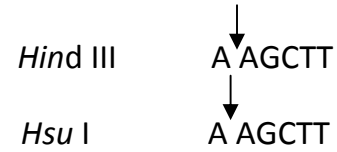
تردد الموضع الحساس = ١/٤ن

حيث تمثل ن عدد النيوكليوتيدات المكونة للموضع الحساس.

استنادا الى هذه المعادلة يمكن توقع تردد اي تتابع رباعي هو مرة كل ٤(٤) اي مرة كل ٢٥٦ زوج نيوكليوتيدي من جزئية الدنا في حين ان تردد اي تتابع سداسي هو مرة كل ٤(٦) اي مرة كل ٤٠٩٦ زوج نيوكليوتيدي. ان التردد الحقيقي للمواضع لحساسة لانزيمات التقييد لا يتطابق دائما مع التوقعات المبينة على اساس المعادلة اعلاه . كما اوضحت الدراسات ان انتشار المواضع الحساسة لانزيمات التقييد يميل الى التجمع عادة داخل او حول الجزيئات البنائية.

انزيمات التقييد المتناظرة

تتعرف انزيمات التقييد المختلفة عموما على تتابعات مختلفة في حلزون الدنا ، الا ان بعض الانزيمات المعزولة من مصادر مختلفة تشذ عن هذه القاعدة حيث تتعرف وتقطع نفس التتابعات . يطلق على مثل هذه الانزيمات بالانزيمات المتناظرة Isoschizomers ، التي قد تكون تامة التناظر Perfect isoschizomers مثل الانزيمين *Hin*d III و *Hsu* I اللذين يتعرفان على نفس التتابع ويقطعانه في نفس الموقع لانتاج قطع دنا متماثلة.



او قد تكون غير تامة التناظر Imperfect isoschizomers مثل الانزيمين *Sma* I و *Xma* I اللذين يتعرفان على نفس التتابع الا انهما يقطعانه في مواقع مختلفة مما يؤدي الى انتاج قطع دنا ذات نهايات غير متماثلة

Sma I CCC↓GGG

Xma I C↓CCGGG