اسم المحاضرة : ربط جزيئات الدنا

رقم المحاضرة : العاشرة

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.

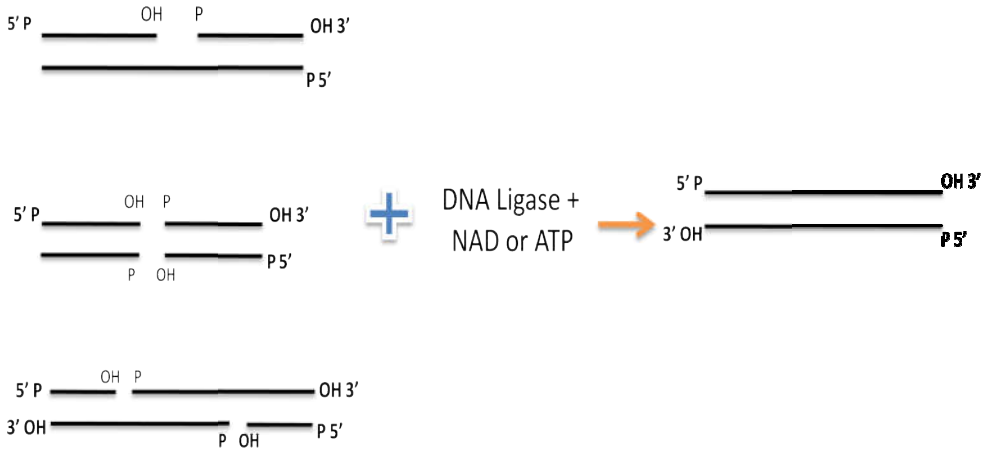
ربط جزيئات الدنا DNA Ligation

تعتمد فعالية ربط قطع الدنا على فعالية إنزيم DNA Ligase الذي يتصف بقابليته على لحم الكسور في العمود الفقري لجزيئه الدنا عن طريق إعادة تكوين الآصرة ثنائية الايستر بين مجموعة الهيدروكسيل (3- OH) لأحد النيوكليوتيدات ومجموعة الفوسفات (5- P) للنيوكليوتيدة المجاورة، ليعيد جزيئات الدنا المقطوعة الى حالتها الطبيعية.

إن قابلية هذا الإنزيم على إصلاح الكسور الموجودة في خيوط الدنا جعلت له دورا مهما في عمليات تخليق الخيوط الجديدة أثناء تكرار الدنا وفي إصلاح الجزيئات المعطوبة وكذلك في إعادة الارتباط Recombination . كما إن له أهمية كبيرة جدا في تقنيات الهندسة الوراثية لقابليته على ربط قطع الدنا ذات النهايات اللاصقة او المستوية.

تم عزل الإنزيم من عدة كائنات حقيقية وبدائية النواة وكذلك من الفايروسات وقد وجد ان جميع الإنزيمات لها القابلية على إصلاح الكسور الموجودة في خيوط الدنا. تركزت الدراسات بصورة خاصة حول الإنزيمين المعزولين من بكتريا الـ *E coli* (٧٥٠٠٠ دالتون) ومن العاثي T4 (٦٠٠٠٠ دالتون)، حيث يعمل هذين الإنزيمين بنفس الطريقة في إصلاح الكسور. يتميز انزيم T4 DNA Ligase بقابليته على ربط قطع الدنا ذات النهايات اللاصقة إضافة إلى النهايات المستوية ويستخدم بصورة أوسع في تجارب الكلونة ويفضل على الإنزيم المعزول من الـ *E coli* الذي يعمل أساسا على ربط النهايات اللاصقة. ويختلف الإنزيمان كذلك في حاجتهما الى العوامل المساعدة، اذ يحتاج الانزيم المنتج من قبل *E coli* الى +NAD كعامل مساعد بينما يحتاج الانزيم الذي ينتجه العاثي T4 الى ATP لاتمام عمله. اذ ينشطر العامل المساعد في كلا الحالتين ليكون معقدا من الانزيم و AMP الذي يرتبط بالثلمة (الكسر) الحاملة للمجموعتين 5-P و 3-OH ليقوم باعادة تكوين الاصرة الفوسفاتية ثنائية الايستر.

للحصول على انزيم T4 DNA Ligase بصورة واسعة فقد تم كلونة الجين المسؤول عن انتاجه في احد نواقل كلونة العاثي لامدا λ phage الذي تم ادخاله فيما بعد الى بكتريا E coli وبهذا اصبح ممكنا الحصول عليه بكميات كبيرة.



ربط قطع الـ DNA ذات النهايات اللاصقة

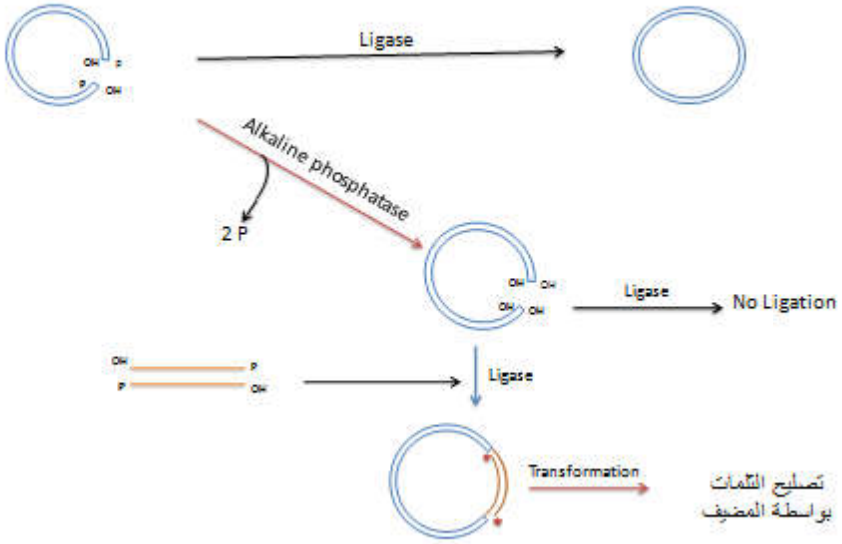
في تجارب الكلونة يفضل عادة ان يكون الإنزيم المستعمل من النوع الذي ينتج نهايات لاصقة متكاملة لسهولة ربط مثل هذا النوع من القطع بواسطة إنزيم DNA Ligase ، اذ تتحد اولا النهايات اللاصقة عن طريق ارتباط القواعد النيتروجينية المتكاملة بواسطة الأواصر الهيدروجينية الا ان هذا الاتحاد لا يكون قويا بالدرجة الكافية لحمل قطعتي الدنا معا بصورة ثابتة ولكنه يسهل عمل انزيم DNA Ligase الذي يعمل على إصلاح الكسرين الباقيين في العمود الفقري للخيطيين عن طريق تكوين الآصرة الفوسفاتية ثنائية الايستر مما يؤدي الى تكوين جزيئه دنا مستقرة يمكن إدخالها فيما بعد الى خلية المضيف. ان مناطق ارتباط النهايات اللاصقة المتكاملة ستكون حساسة لنفس الإنزيم الذي أنتجها أول مرة وبهذا سيكون من السهولة استخلاص قطعة الدنا الغريبة المكلونة مرة اخرى وذلك بمعاملتها بنفس الانزيم القاطع.

ان هدف عملية الكلونة هو ربط قطعة الدنا الغريبة الى ناقل الكلونة المناسب في انبوبة الاختبار ليتم ادخال جزيئة الدنا الهجينة الى الخلايا المضيفة. الا ان عملية خلط قطع الدنا الغريبة مع نواقل الكلونة (المعاملة كليهما بانزيمات التقييد) لتكوين جزيئات الدنا الهجينة ليس الاحتمال الوحيد الناتج لعملية الربط بواسطة الانزيمات اللاصقة، انما هناك احتمالات اخرى يمكن ان تحدث في انبوبة الاختبار فقد ترتبط نهايات ناقل الكلونة مع بعضها لتكوين جزيئة ناقل ثنائية Dimer لاتحتوي على قطعة الدنا الغريبة، او ترتبط نهايات ناقل الكلونة مع بعضهما في عملية اعادة ارتباط للناقل Re-ligation بدون الارتباط بقطعة الدنا الغريبة. تؤدي مثل هذه الارتباطات الى اختزال كفاءة عملية الكلونة لان الخلايا المتحولة سوف تكون غير حاوية على قطعة الدنا الغريبة، لذا وجب تهيئة كل الظروف الملائمة التي من شأنها زيادة احتمالية الحصول على جزيئات دنا هجينة، احد هذه العوامل هي اجراء التفاعل بوجود تركيز عالي من قطع الدنا الغريبة نسبة الى جزيئات الناقل (تكون النسبة ٣ : ١) لخفض نسبة التقاء او تصادم جزيئات الناقل مع بعضها وزيادة كفاءة عملية الكلونة.

من الطرق الاخرى المستخدمة لزيادة كفاءة عملية الكلونة هي معاملة نواقل الكلونة المقطوعة وقبل خلطها بالدنا الغريبة بانزيم الفوسفاتيز القاعدي Alkaline phosphatase المعزول من البكتريا او العجول الذي يعمل على ازالة مجاميع الفوسفات من الطرف '5 للنهاية اللاصقة مما يمنع تدوير النواقل او ارتباطها مع بعضها، وبهذا ستكون الطريقة الوحيدة لتدوير الناقل هي بربطها مع جزئية دنا غريبة وهنا سيعمل الانزيم اللاصق على اصلاح وربط الكسرين الحاويين على مجموعة فوسفات ويبقى كسرين في منطقة الارتباط بدون ربط وهذا لايؤثر كثيرا على عملية ادخال جزئية الدنا الهجينة الى داخل المضيف ويتم اصلاح هذين الكسرين داخل خلايا المضيف بواسطة اجهزة الاصلاح.

تكون درجات الحرارة المنخفضة هي المثلى لعمل انزيم DNA Ligase كذلك تكون الحرارة المنخفضة هي مثالية لتكوين الاواصر الهيدروجينية بين القواعد النيتروجينية للنهايات اللاصقة. وتكون درجة الحرارة المثلى هي ١٦°م .

- **ربط قطع الدنا ذات النهايات اللاصقة**



ربط قطع الـ DNA ذات النهايات المستوية

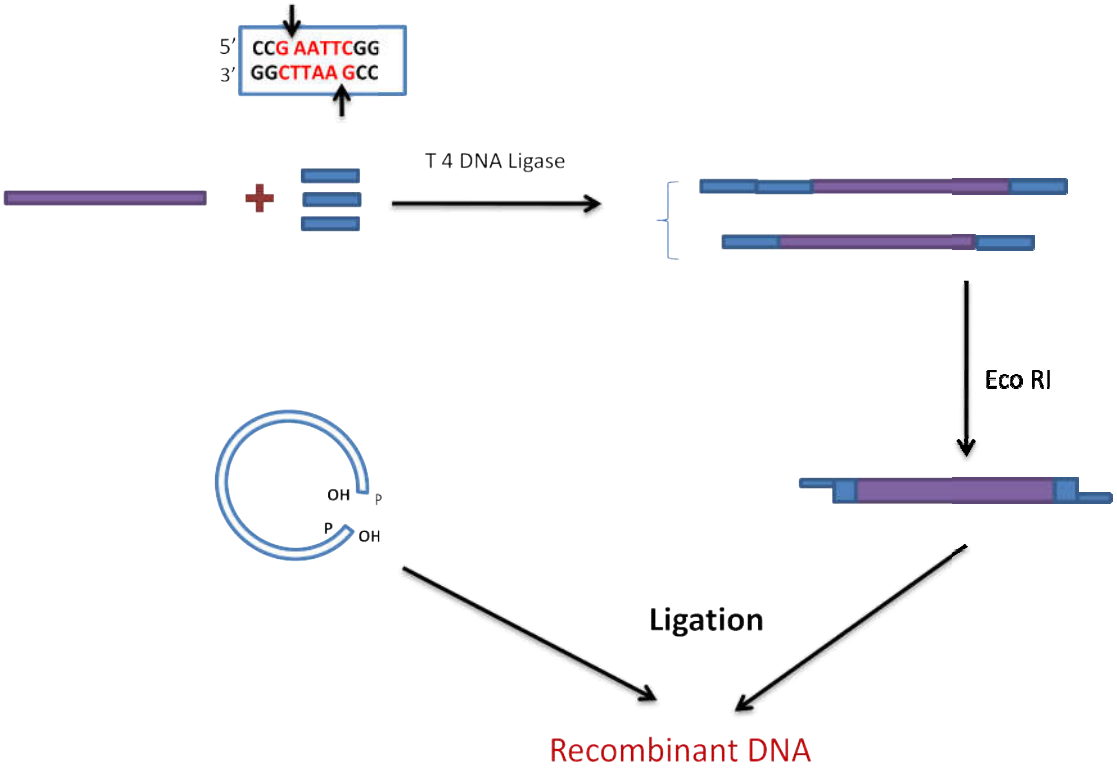
على الرغم من سهولة وكفاءة عملية ربط قطع الدنا ذات النهايات اللاصقة في عمليات الكلونة الا ان ذلك لا يعني عدم استخدام قطع الدنا ذات النهايات المستوية وخاصة في حالة عدم إمكانية استخدام انزيمات قاطعة تعطي نهايات لاصقة. لآجل ربط قطع الدنا ذات النهايات المستوية يتم استخدم إنزيم T4 DNA Ligase القادر على ربط هذه النهايات. ولكن عملية ربط النهايات المستوية تكون اقل كفاءة واكثر بطئاً من عملية ربط قطع الدنا ذات النهايات اللاصقة ، اذ تكون عملية ربط قطع الدنا ذات النهايات اللاصقة اسرع بـ ١٠٠ مرة من ربط قطع الدنا ذات النهايات المستوية، ويعود السبب الى عدم قدرة النهايات المستوية على الاتحاد مع بعضها كما في النهايات اللاصقة لتسهيل عمل الانزيم اللاصق، فلكي يقوم الانزيم اللاصق بعمله يجب ان تكون قطع الدنا قريبة جدا من بعضها البعض كي يتسنى للانزيم القيام بعمله وبما ان احتمالية التقاء قطع الدنا بهذا الشكل تكون قلية في مثل هذه الظروف وان حدث فانه يكون لفترة زمنية قصيرة جدا ، فأن تركيز الدنا في خليط التفاعل يجب ان يكون اعلى من ذلك المستخدم في ربط القطع ذات النهايات اللاصقة وذلك لزيادة فرص التقاء النهايات المستوية مع بعضها العض.

يحتاج التفاعل اللازم لربط قطع الدنا ذات النهايات المستوية على الاقل الى جزيئيتين من انزيم T4 DNA Ligase واحدة تعمل على حمل النهايتين المستويتين في موضع متقابل وتعمل الاخرى على تكوين الاصرة الفوسفاتية ثنائية الايستر لاتمام عملية الربط ، لذا فان تركيز الانزيم المطلوب في هذا التفاعل يكون اكثر بحدود ١٠ – ٣٠ مرة من تركيز الانزيم المستخدم للحصول على نفس معدل الارتباط في قطع الدنا ذات النهايات اللاصقة. في هذا النوع من التفاعل فان درجة الحرارة لا تلعب نفس الدور الي تلعبه في عملية ربط القطع ذات النهايات اللاصقة، عموما تتراوح درجة الحرارة المستعملة في ربط النهايات المستوية بين ٢٠ - ٢٥° م .

في عملية ربط قطع الدنا ذات النهايات اللاصقة، تكون النهايات منتجة بنفس انزيم التقييد وبهذا سيكون ممكنا اعادة قطعها واستخلاصها مرة اخرى بنفس الإنزيم المستخدم في عملية القطع، اما في حالة ربط النهايات المستوية فأن عملية الربط ممكنة سواء سواء أكانت هذه النهايات منتجة بنفس إنزيم التقييد او بأنزيمين مختلفين، وفي الحالة الثانية سيكون موضع الارتباط الناتج غير حساس لكلا الإنزيمين القاطعين مما يعني عدم إمكانية استخلاص الدنا المكلونة من جزيئة الناقل وهذا يمثل مشكلة في تجارب الكلونة. ولأجل تجاوز هذه المشكلة استنبطت وسائل يمكن خلالها زيادة كفاءة عملية الكلونة ومن اهم هذه الوسائل هي استخدام الجزيئات الرابطة **Linker molecules** او الوصيلات **Adaptors** .

١- استخدام الجزيئات الرابطة

الجزيئات الرابطة عبارة عن تتابعات قصيرة مكونة من ثمانية الى عشر أزواج من النيوكليوتيدات مصنعة مختبريا حاوية على واحد او اكثر من المواضع الحساسة لإنزيمات التقييد. تستخدم هذه الجزيئات في عمليات كلونة القطع ذات النهايات المستوية تسمح بإعادة استخلاصها مرة أخرى اذا دعت الحاجة الى ذلك.



٢- استخدام الوصيلات

الوصيلات عبارة عن قطعة صغيرة من تتابعات الدنا مصنعة مختبريا حاوية على نهاية لاصقة منزوعة الفوسفات في احد طرفيها ونهاية مستوية حاوية على مجموعة فوسفات في طرفها الثاني . يتم استخدم الوصيلات في حالة احتواء قطعة الدنا المراد كلونتها على موضع حساس لواحد او اكثر من الانزيمات القاطعة التي تستخدم لقطع الجزيئات الرابطة. ففي هذه الحالة سيتم قطع جزيئة الدنا الغريبة الى قطعتين او اكثر إضافة الى قطع الجزيئة الرابطة. لذا يتم اللجوء الى استخدام الوصيلات، وبما ان النهايات اللاصقة للوصيلات لا تحتوي على مجاميع فوسفات لذا فلن يكون هناك اي احتمال لارتباطها مع بعضها في محلول التفاعل. بعد اتمام ربط الوصيلات وقبل كلونة القطع الناتجة عن هذا الارتباط تتم إضافة مجاميع الفوسفات الى الطرف 5' من النهايات اللاصقة لتصبح جاهزة للكلونة.