الانزيمات القاطعة Restriction Enzymes :

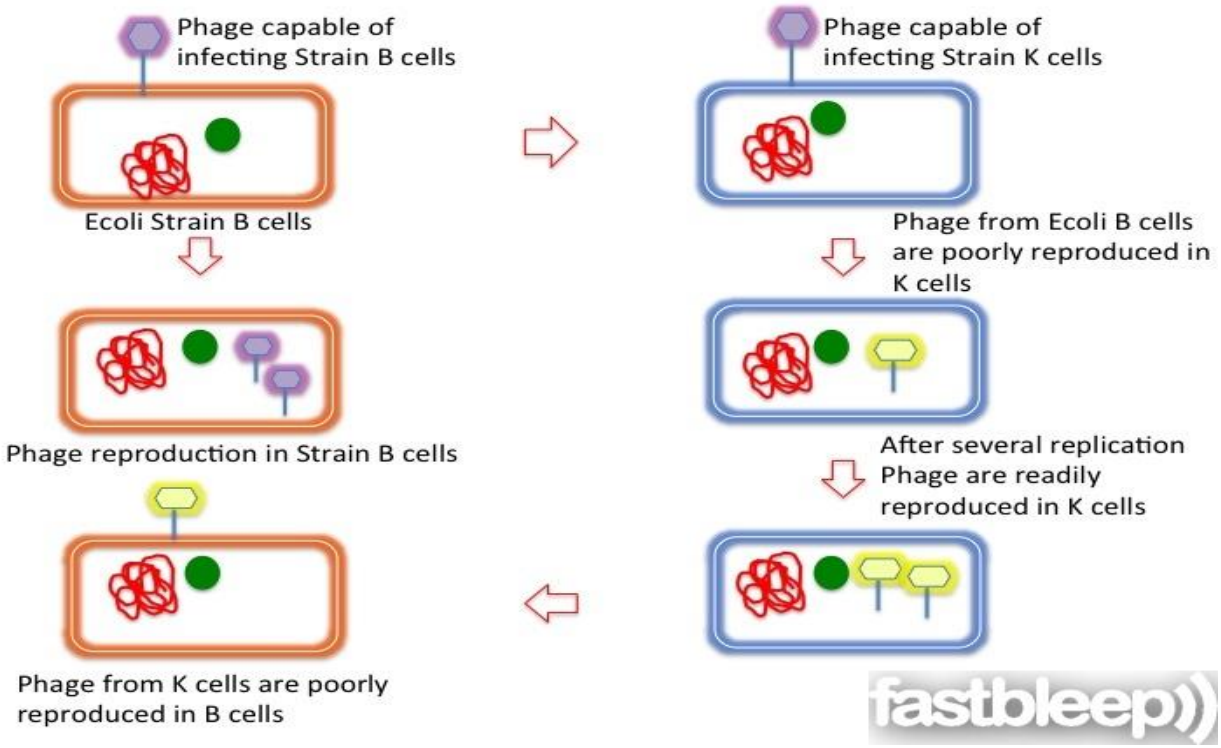
المصادر :

الشهيب ، محمد باقر واخرون ، مبادئ الوراثة الجزيئية (2013)وزارة التعليم العالي والبحث العلمي ، جامعة بابل ، كلية العلوم – العراق

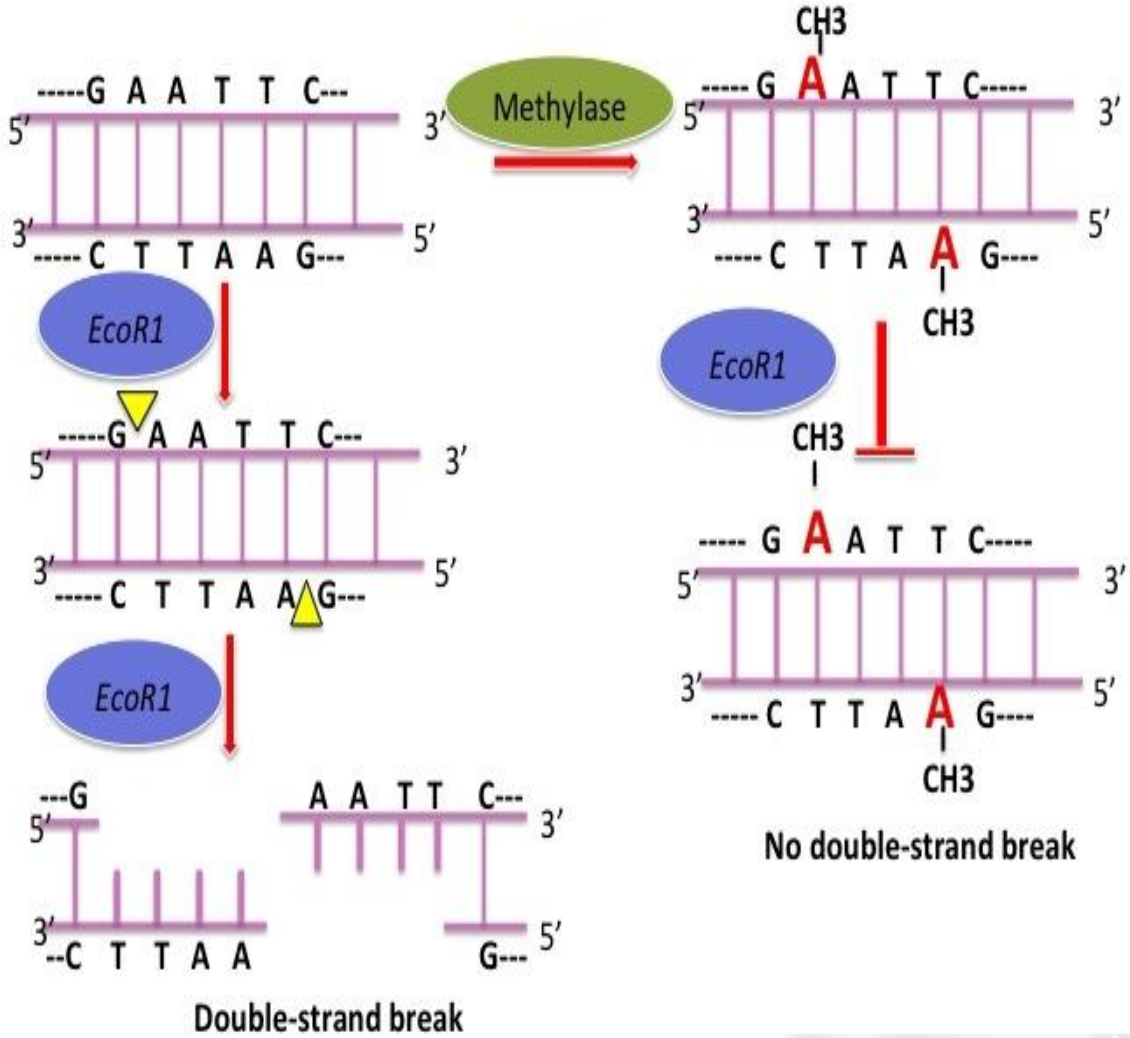
الجنابي ، عباس عبد الله ، البايلوجي الجزيئي (2013)وزارة التعليم العالي والبحث العلمي ، الجامعة التكنولوجية ، قسم العلوم التطبيقية - العراق

تعرف أيضا بالمقص الجزيئي (Molecular Scissors) وهي الانزيمات التي لها القابلية على قطع جزئية الدنا في موقع محدد من النيوكليوتيدات يسمى بموقع التميز Recognition site وقد يقطع عند نفس الموقع او بعيدا عنه ويعرف موقع القطع بـ Cleave or restriction site . وتوجد 3-5 انواع منها تختلف بالتركيب وموقع القطع ونوع القطع الذي تحدثه.

اكتشفت الانزيمات القاطعة في خمسينيات القرن المنصرم 1950 بواسطة Salvador and Giuseppe BertaniLuria من خلال دراستهم على عاثيات البكتيريا نوع لأمدا λ phage حيث لاحظوا ان هذا العاثي يصيب احد سلالات بكتريا الاشريشيا القولونية ويتكاثر بحرية في حين تقل نسبة الإصابة بها من نفس العاثي لسلالات اخرى من بكتريا الاشريشيا القولونية وفيما بعد فسر هذا على أساس ان قلة الإصابة ناتجة من ان الاشريشيا القولونية قليلة الإصابة تنتج أنزيمات قاطعه تقوم بقطع وتدمير المادة الوراثية للفيروس لكن ما السبب في عدم قطع وتدمير دنا الاشريشيا القولونية نفسها ؟



ان السبب في ان دنا البكتريا المنتجة للإنزيم القاطع لا يتأثر بهذا الأنزيم التي تنتجه هو لوجود نظام حماية لدنا البكتريا المنتجة وهو عبارة عن انزيم يقوم بإضافة مجموعة مثيل عند قاعدة الأدنين ويسمى هذا الإنزيم بـ DNA methyletransferease وعند دمج هذين النظامين ينتج نظام جديد متناسق سمي بنظام القطع والتحوير restriction-modification system وان الغرض الأساسي من هذا النظام هو لحماية المادة الوراثية للبكتريا التي يوجد فيها من المادة الوراثية الدخيلة والغريبة ومن الجدير بالذكر ان هذا النظام يوجد في كل من Eubacteria and Archea.



fastbleep

على الرغم من وجود هذا النظام إلا انه بعض العاثيات البكتيرية تكون مقاومة لفعل الكثير من الانزيمات القاطعة؟ ويعود السبب الى انه بعض العاثيات تحتوي على بعض الأنظمة المشابه لـ restriction-modification system ومثالها hydroxymethyltransferases or glucosylases والتي تمكنها من المقاومة.

انواع الانزيمات القاطعة :

ان أول انزيم قاطع تم اكتشافه كانت في عام 1970 من قبل Hamilton O. Smith, and Kent WilcoxThomas Kelly وهو انزيم *Hin*dII الذي تم عزله من بكتريا *Haemophilus influenzae* *وبصوره عامه تقسم الانزيمات القاطعة الى عدة انواع بالاعتماد على:*

1- عدد الوحدات الثانوية المكونة للإنزيم subunits
2- العوامل المساعدة cofactors
3- ميكانيكية عمل الإنزيم
4- موقع التمييز Recognition site
5- موقع القطع cleavage or restriction site
6- موقع اضافة المثيل
7- الوزن الجزيئي

Character	Type I	Type II	Type III
Nature of the enzyme	single multifunctional enzyme	Endonuclease and methylase	single multifunctional enzyme
Molecular weight	450kDa	20-30kDa	200kDa
Protein conformation	3 different subunits	2 proteins	2 different subunits
Cofactors	Ado-met, ATP, Mg2+	Mg2+	Ado-met, Mg2+, ATP
Cleavage site	1000bp from recognition site	Within recognition site	24-26bp to 3' recognition site
Site of methylation	Recognition site	Recognition site	Recognition site

Ado-met = **S-Adenosyl methionine**

تسمية الانزيمات القاطعة :

يتكون اسم الإنزيم القاطع من:

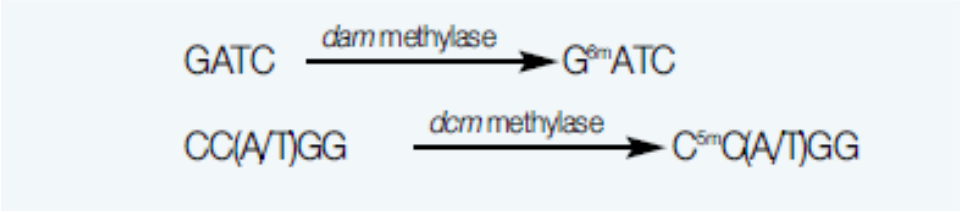
1- الحرف الأول للجنس البكتيري ويكتب بالحرف الكبير ومائل
2- الحرفين الأولين للنوع ويكتبان بالحرف الصغير ويكونان أيضا مائلين
3- الحرف الاول من اسم السلالة ويكتب بالحرف الكبير عادي (غير مائل)
4- رقم ويمثل ترتيب السلالة ضمن الاكتشاف

ويمثل الجدول التالي مثالا واضحا على التسمية:

Derivation of the *Eco*RI name		
Abbreviation	**Meaning**	**Description**
E	**Escherichia**	**genus**
co	**coli**	**species**
R	**RY13**	**strain**
I	**First identified**	**order of identification in the bacterium**

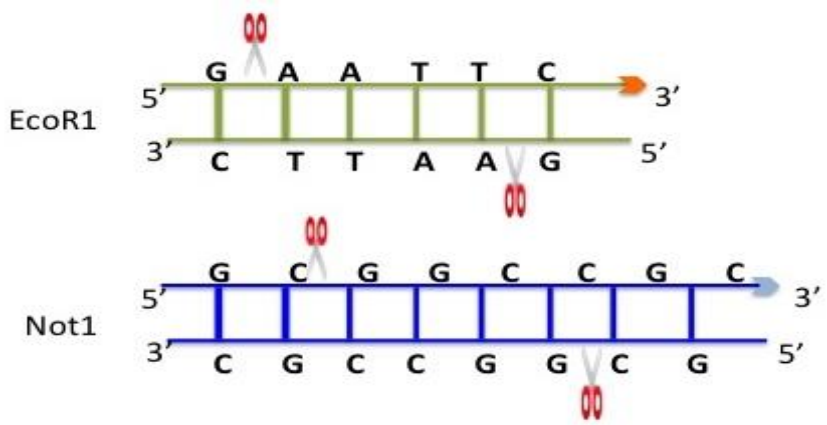
Example: EcoR1
Genus: Escherichia
Species: coli
Strain: R
Order discovered: 1

تتم عملية المثيلة بنقل مجموعة مثيل من S-Adenosyl methionine الى ذرة النتروجين السادسة ضمن الأدنين الموجود ضمن التسلسل GATC وتتم هذه العملية بواسطة انزيم المثيليز المشفر بواسطة الجين *Dam* اما المثيليز المشفر بواسطة الجين *Dcm* فانه يقوم بإضافة مجموعة المثيل الى ذرة الكاربون الخامسة ضمن السايتوسين الموجود ضمن التسلسل CCTGG

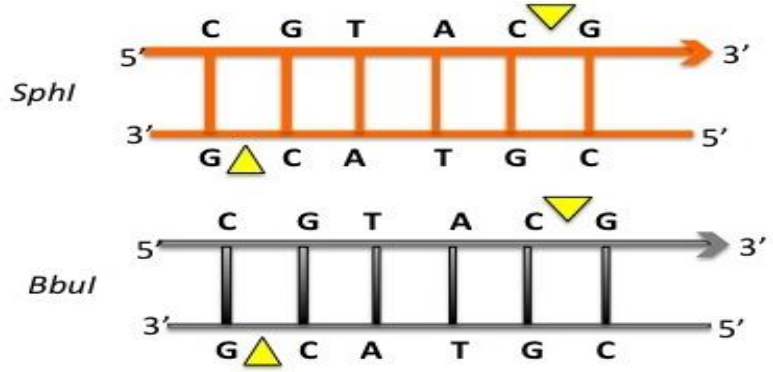


موقع التمييز Recognition site :

تختلف مواقع التمييز في عدد قواعدها وتسلسلاتها من انزيم لأخر فمثلا انزيم *Eco*RI يميز التسلسل ذو الست قواعد بينما *Not*I يميز موقع ذو ثمان قواعد وكما موضح ادناه :

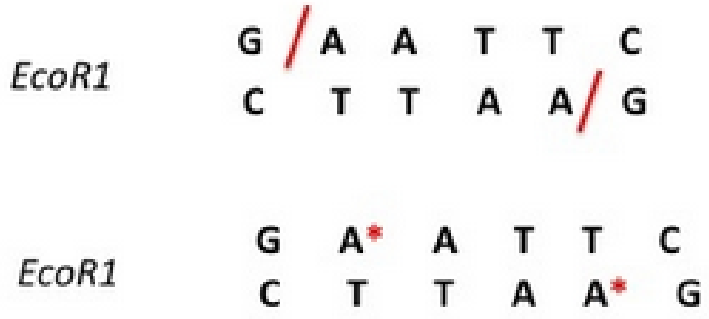


هنالك اكثر من انزيم لها نفس موقع التمييز وتسمى بـ isoschizomers ومثالها *Sph*I و *Bbu*I



هنالك انزيم يميز موقع يحتوي على موقع تميز لأنزيم اخر (موقع داخل موقع) ومثالها انزيم *Bam*HI الذي يحتوي في موقعه على موقع قطع لأنزيم *Sau*3AI

يتصف موقع التمييز بأنه ذو تسلسل متناوب Palindromic sequences ويقصد انها تقرا بنفس القراءة في كلا الاتجاهين



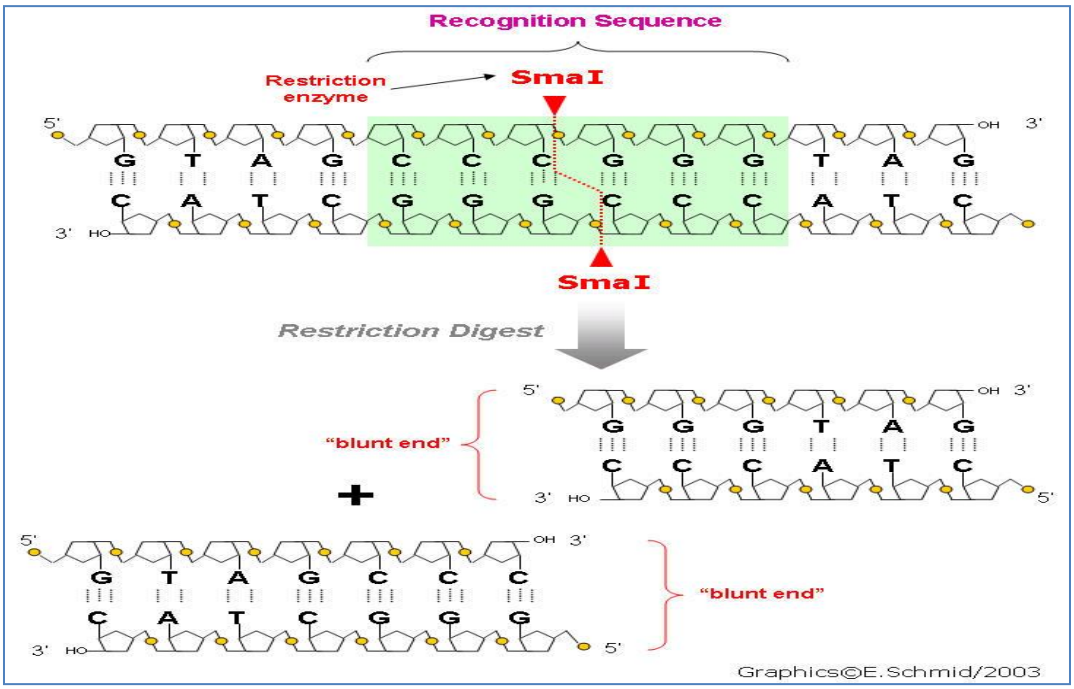
أنماط القطع Cleavage Pattern :

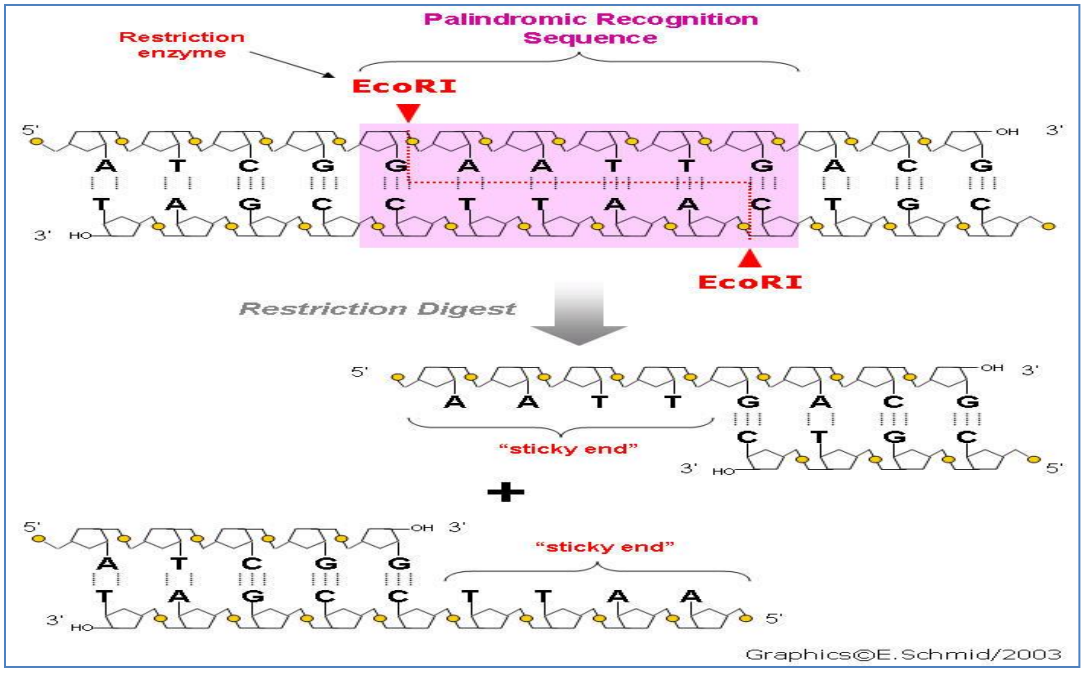
هنالك نمطين من انماط القطع هي :

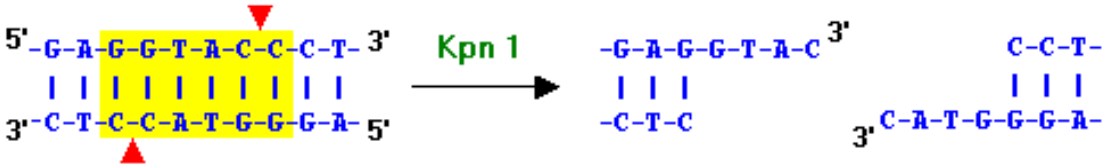
1- النهايات العمياء Blunt ends : تنتج من القطع عند نفس الموقع في كلا الشريطين كما في *Sma*I

2- النهايات اللاصقة Sticky ends : وتنتج عندما يقطع الإنزيم الشريطين بصوره غير متناظرة مخلفا بذلك قطعة قصيره معلقة عند الطرف '5 او عند الطرف '3 وبذلك يكون على نوعين:

- **5' overhangs كما في القطع الذي يحدثه الأنزيم *Eco*RI**
- **3' overhangs كما في القطع الذي يحدثه الأنزيم *Kpn*I**


Recognition Sequence
Restriction enzyme
SmaI
SmaI
Restriction Digest
"blunt end"
"blunt end"
Graphics©E.Schmid/2003


Palindromic Recognition Sequence
Restriction enzyme
EcoRI
EcoRI
Restriction Digest
"sticky end"
"sticky end"
Graphics©E.Schmid/2003


5'-G-A-G-G-T-A-C-C-C-T- 3'
3'-C-T-C-C-A-T-G-G-G-A- 5'
Kpn 1
-G-A-G-G-T-A-C 3'
-C-T-C
C-C-T-
C-A-T-G-G-G-A- 3'

س/ كيف يتعرف الإنزيم القاطع على المكان المفترض أن يحدث القطع فيه؟

كل إنزيم قاطع عبارة عن مقص خاص لقطع الدي إن أي في نقطة محددة و يتعرف الإنزيم القاطع على مكان القطع حسب تسلسل الدي إن أي للقطعة فكل إنزيم قاطع يقطع في تسلسل محدد فمثلا الإنزيم القاطع Eco RI يقطع عندما يجد GAATTC وهو من الانزيمات التي تقطع الـدنا بشكل متعرج

لبعض الإنزيمات القاطعةRecognition Sitesتسلسل مواقع القطع		
الإنزيم القاطع	المصدر	المقطع الذي تُميزه
Eco RI	*Escherichia coli*	**GAATTC**
*Hin*d III	*Haemophilus influenzae*	**AAGCTT**
*Taq*I	*Thermus aquaticus*	**TCGA**

ملاحظة / اذا لم يقطع الانزيم في احد الاماكن التي كان من المفترض ان يقصها ولم يتم القطع فنستنتج ان الشخص لديه طفرة فتظهر لديه قطع متفاوتة بالطول وتدعى هذه الطريقة بتفاوت القطع المحددة Restriction Fragment Length polymorphism.(RFLP)

بصمة الحامض النووي DNA Genetic Fingerprint

لم تُعرَف البصمة الوراثية للـ DNAحتى عام 1984 حينما نشر د. آليك جيفريز عالم الوراثة البريطاني بحثًا أوضح فيه أن المادة الوراثية قد تتكرر عدة مرات، وتعيد نفسها في تتابعات عشوائية غير مفهومة وهي تتابعات متكررة ولكن اعداد تكرارها هي التي تختلف من شخص لآخر او انها ترددات فريدة نادرة التكرار بين الافراد .وقد توصل أن هذه التتابعات مميّزة لكل فرد، ولا يمكن أن تتشابه بين اثنين إلا في حالات التوائم المتماثلة فقط بل إن احتمال تشابه بصمتين وراثيتين بين شخص وآخر هو واحد في الترليون، مما يجعل التشابه مستحيلاً وأطلق على هذه التتابعات اسم "البصمة الوراثية للإنسان " The DNA Fingerprint" وعرفت على أنها "وسيلة من وسائل التعرف على الشخص عن طريق مقارنة مقاطع من الـ DNA وتُسمَّى في بعض الأحيان الطبعة الوراثية "DNA typing". اثبتت البصمة الوراثية فاعلية كبيرة في المجال التطبيقي عند استخدامها في كثير من المجالات حيث يستخلص الحامض النووي DNA المستخدم في هذه الأدلة من عينات مختلفة مثل الدم وبصيلات الشعر والانسجة والعظام والمني وغيرها وتعتمد طرق مختلفة من أجل الاستخلاص حيث يتم لاحقا تحديد تتابع تكرار الانماط القصيرة لها Short Tandem Repeats (STR) .

التتابعات المتكررة في الحامض النووي DNA تصنف الى :

- **توابع الحامض النووي Satellite DNA**: تتكرر بعدد كبير (1000_100000) مرة ويبلغ طول الجزء المكرر من التوابع (100-300) زوج قاعدي.

- **توابع الحامض النووي الصغيرة Min Satellite DNA**: تكرارها اقل (70-40) مرة وطول الجزء المكرر (10-60) زوج قاعدي.

- **توابع الحامض النووي الميكروية Micro Satellite DNA**: عدد التكرار اقل (40 -5) والتكرار قصير جدا (2-6) زوج قاعدي .

من امثلة التتابعات الميكروية المتكررة في الحامض النووي هي :

- احادي النيوكليوتيد GTAAAAAAAAAAAAAAAGGAT

- ثنائي النيوكليوتيد GTCACACACACACACACAGGAT

- ثلاثي النيوكليوتيد GTCACCACCACCACCACCACGGAT

- رباعي النيوكليوتيد GTCAGACAGACAGACAGAGGAT

- خماسي النيوكليوتيدGTCAAGACAAGACAAGACAAGAGGAT

- سداسي النيوكليوتيدGTCCAAGACCAAGACCAAGACCAAGAGGAT