## الإنزيمات المقيدة أو القاطعة Restriction enzymes

**مقدمة:**

هي إنزيمات متخصصة غالباً في تقطيع الدنا من مواقع معينة تختلف اعتماداً على نوع الإنزيم. وتتعرف إنزيمات القطع على تسلسل معين من أزواج القواعد Base pairs في الحامض النووي وتقوم بعمل قطع فيه عند تلك النقطة التي تُسمى موقع القطع Restriction site وتوجد هذه الإنزيمات غالباً في البكتيريا كما يوجد بعضها في الطحالب الخضراء . ومهمتها هي حماية البكتيريا من الإصابة بالفيروسات وذلك عن طريق إحداث قطع بالحامض النووي المكوّن للفيروس ، بينما تتم حماية الحامض النووي الخاص بالبكتيريا نفسها عن طريق إضافة مجموعة الميثيل Methylation.

وتم اكتشاف هذه الإنزيمات عام ١٩٦٢م في بعض أنواع بكتيريا القولون Eschericia coli من السلالات K , E التي تصاب بالعاثيات أو البكتيريوفاج (الفيروسات التي تتطفل على البكتيريا) حيث تعمل هذه الإنزيمات على إعطاء البكتيريا مناعة تعمل على منع أو عرقلة نمو وتكاثر العاثيات وذلك عن طريق إتلاف المادة الوراثية لها أو تقييد فعاليتها . لذلك أطلق على هذه الإنزيمات بالإنزيمات المقيدة أو المحددة أو القاطعة . وآلية المناعة في البكتيريا تعتمد على إنزيمات القطع . ويصل عدد الإنزيمات المكتشفة حتى الآن إلى أكثر من ٤٠٠ إنزيم قادر على تمييز أكثر من ١٥٥ موقع تقييد أو قطع على الحامض النووي DNA ويتم تسميتها تبعاً للكائن الحي التي عُزلت منه.

**أنواع الإنزيمات المقيدة أو القاطعة:**

قسمت هذه الإنزيمات اعتماداً على قدرتها على القطع المتخصص واحتياجاتها الكيميائية للقيام بوظائفها إلى ثلاثة أنواع هي:

**أولاً : الإنزيمات المقيدة – الطراز الأول** Type I Restriction enzymes:

وتشمل الإنزيمات الأولية المستخلصة من بكتيريا القولون السلالة K و E المصابة بالعاثي لامبدا وتعمل هذه الإنزيمات على القطع العشوائي للحامض النووي DNA.

ولوحظ بأن هذه الإنزيمات ترتبط في مواقع القطع ثم تبدأ بهدم السلاسل المزدوجة في اتجاه واحد لمسافة تتراوح بين ١٠٠٠– ٥٠٠٠ نيوكليوتيد ثم تبدأ بعدها بهدم سلسلة مفردة لمسافة أخرى وتتوقف بعدها عن العمل.

تحتاج هذه الإنزيمات لعوامل مساعدة مثل أيونات المغنيسيوم وأدينوسين ثلاثي الفوسفات ATP وأدينوسيل ميثونين S-adenosyl methionine.

**ثانياً : الإنزيمات المقيدة – الطراز الثاني** Type II Restriction enzymes :

تُعتبر هذه المجموعة من الإنزيمات من أهم مجاميع إنزيمات القطع لاستخدامها على نطاق واسع في الهندسة الوراثية . وتمتاز هذه الإنزيمات بقدرتها على قطع الحامض النووي DNA عند مواقع معينة Restriction sites فقط بحيث تعطي عدداً ثابتاً من القطع لكل نوع من الأحياء.

وتستهدف هذه الإنزيمات ترددات (تتابعات) Sequences معينة بحيث أنها تتعرف على هذه التتابعات وتقوم بالقطع قبل أو بعد هذا التتابع مباشرة.

فمثلاً يمكن للإنزيم القاطع Eco R1 أن يتعرف على التردد 5G↓AATTC3 ويقوم بالقطع بين الجوانين والأدنين من النهاية الخامسة. وهكذا فإن الإنزيم يقوم بقطع سلاسل الدنا في جميع المواقع التي تحتوي على هذا التتابع. ويختلف عدد تتابعات مواقع القطع التي تتعرف عليها الإنزيمات من إنزيم إلى آخر ولكنها في الغالب تتراوح بين أربعة إلى ستة تتابعات (ترددات) (شكل ١).

ونظراً للأعداد الكبيرة التي اكتشفت من هذه الإنزيمات فإنه تم اقتراح نظام تسمية وضعه العالمان سميث وناثان Smith and Nathan عام ١٩٧٣م وعلى النحو التالي:

أ- يرمز لجنس الكائن الذي اكتشف فيه الإنزيم بالحرف الأول من اسم الإنزيم ويرمز لنوع الكائن بالحرفين الثاني والثالث من اسم النوع . فمثلاً الإنزيم المسمى Eco مأخوذ من البكتيريا E. coli فالحرف الأول من اسم الإنزيم مأخوذ من اسم جنس البكتيريا Eschericia والحرفان الثاني والثالث مأخوذان من اسم نوع البكتيريا coli.

وكذلك الحال بالنسبة للإنزيم Hin المأخوذ من اسم البكتيريا Haemophilus influenzae والإنزيم Hpa مأخوذ من اسم البكتيريا Haemophilus parainfluenza وكذلك الحال بالنسبة لبقية الإنزيمات.

ب- في حالة احتواء البكتيريا على بلازميد أو عاث فإنه يجب إضافة اسم البلازميد أو العاثي إلى اسم الإنزيم . فمثلاً في حالة الإنزيم Eco المشتق من اسم البكتيريا E. coli فإذا كانت البكتيريا تحتوي على البلازميد R1 فإن اسم الإنزيم يصبح Eco R1.

ج- في حالة وجود أكثر من إنزيم لنفس النوع من البكتيريا فإنه تُستخدم الأرقام الرومانية بعد نهاية الاسم كما هي الحال في الإنزيم Eco RI و Eco RII و Hind I و Hind II و Hind III.

**ثالثاً : الإنزيمات المقيدة – الطراز الثالث** Type III Restriction enzymes:

وهي إنزيمات وسط في صفاتها بين الطراز الأول والطراز الثاني ، وتقوم هذه الإنزيمات بالقطع في مواقع محددة وتحتاج إلى أيونات المغنيسيوم وجزيئات ATP .

| الإنزيم | التتابع المتعرف عليه وموقع القطع | الاسم العلمي للبكتيريا المعزولة منها |
|---|---|---|
| Bam HI | G↓GATCC<br>CCTAG↑C | Bacillus amyloliquef aciens H. |
| Bg1 II | A↓GATCT<br>TCTAG↑A | Bacillus globigi |
| Eco RI | G↓AATTC<br>CTTAA↑G | Eschericia coli RY13 |

| | | |
|---|---|---|
| Eschericia coli R245 | CCTGG<br>GGACC | Eco RII |
| Haemophilus influenzae Rd | A AGCTT<br>TTCGA A | Hind III |
| Haemophilus haemolyticus | GCG C<br>C GCG | Hha I |
| Haemophilus parainfluenza | GTT AAC<br>CAA TTG | Hpa I |
| Microcoleus strain | CC TNAGG<br>GGANT CC<br>N = أي من النيوكليوتيدات الأربعة | Mst II |
| Providencia stuartil 164 | CTGCA G<br>G ACGTC | Pst I |
| Thermus aquaticus YT1 | T CGA<br>AGC T | Taq I |
| Serratia marcescens | CCC GGG<br>GGG CCC | Sma I |
| Staphylococcus aureus 3A | GATC<br>CTAG | Sau 3A |
| Nocardia otitidis | GC GGCCGC<br>CGCCGG CG | Not I |

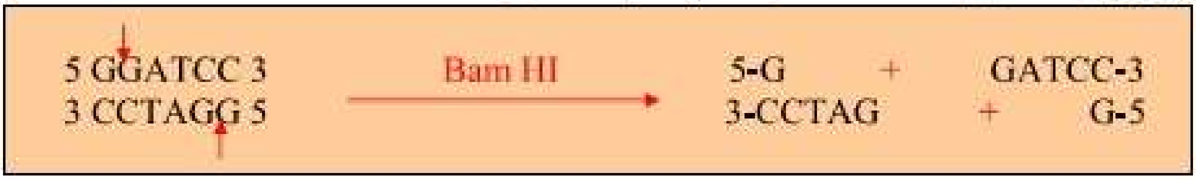
شكل ١ : بعض الإنزيمات المقيدة ومواقع التقييد والقطع الخاصة بها .

**مواقع عمل إنزيمات القطع :**

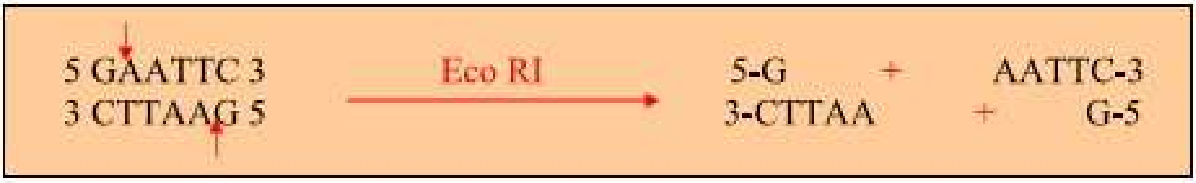
إن إنزيمات القطع (الطراز الثاني) كما ذكرت سابقاً تمتلك مواقع معينة على الحامض النـــووي DNA تتخصص في قطعها ولكن تختلف هذه الإنزيمات في بعض الأمور فيما يخص طبيعـــة موقع القطع ومكان القطع ونواتجه . **ومن أهم هذه الاختلافات ما يلي :**

١- من ملاحظة نواتج قطع بعض هذه الإنزيمات فإنه يتبين بأن بعضها يؤدي إلى إنتاج قطـــع ذات نهايات لزجة Sticky ends بينما تُنتج إنزيمات أخرى قطعاً ذات نهايات عمياء أو غيـــر لزجة Blunt ends.

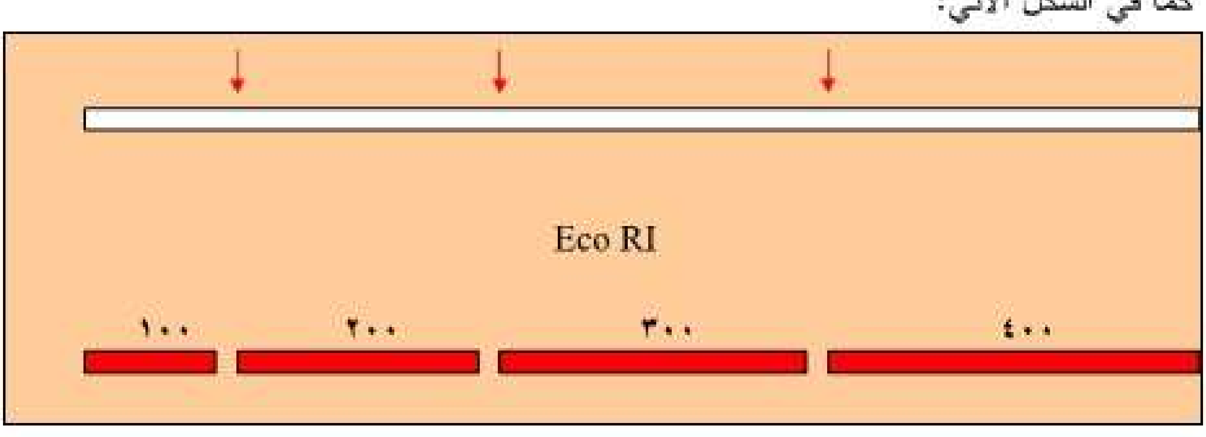
فمثلاً يقوم الإنزيم Bam HI بتمييز موقع التتابع أو التردد التالي 5-GGATCC-3 وقطعه بين الجوانين عند النهاية الخامسة منتجاً القطع التالية 5-G و G-ATCC3.

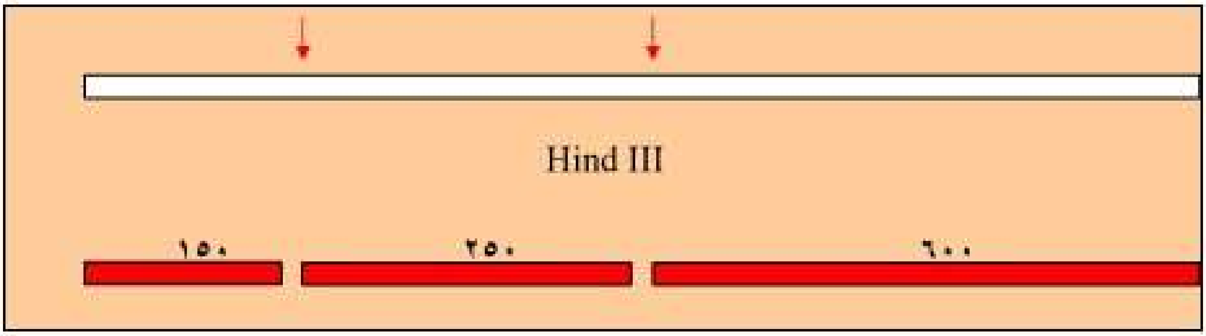



كما أن الانزيم Eco RI يقوم بتمييز موقع التردد (التتابع) 3 GAATTC 5 ويقوم بالقطع بين الجوانين والأدنين عند النهاية الخامسة منتجاً القطع التالية 5-G و 3-AATTC.




إنزيم Eco RI له المقدرة على قطع الدنا إلى قطع مختلفة الطول تحتوي علـــى ١٠٠ و ٢٠٠ و ٣٠٠ و ٤٠٠ نيوكليوتيدة . بينما إنزيم Hind III المعزول من بكتيريا هيمـــوفليس أنفلـــونزا فإنه يقوم بقطع الدنا إلى قطع مختلفة في الطول تحتوي على ١٥٠ و ٢٥٠ و ٦٠٠ نيوكليوتيدة كما في الشكل الآتي:






أما الإنزيم Pst I فإنه يقوم بتمييز التردد 5 CTGCAG 3 ويقطع بين الجوانين والأدنين عند النهاية الثالثة منتجاً القطع التالية 5-CTGCA و G-3 .

5 CTGCAG 3 —Pst I→ 5-CTGCA + G-3
3 GACGTC 5 → 3-G + ACGTC-5

ويلاحظ من القطع الناتجة عن عمل هذه الإنزيمات بأن نهايات القطع الناتجة تكون مكملة أو متممة Complementary مما يسمح لها بالالتصاق مرة أخرى لذلك تُسمى هذه القطع بالقطع ذات النهايات اللزجة Sticky ends . ويعود إنتاج هذه النهايات إلى موقع القطع على سلسلتي مزدوج الحامض النووي حيث يكون غير متناظر . أما في الإنزيمات Hpa I و Hae III و Sma I فإن مواقع القطع هذه تكون متناظرة تماماً كما يلاحظ فيما يلي :

5 GGCC 3 —Hae III→ 5-GG + CC-3
3 CCGG 5 → 3-CC + GG-5

5 GTTAAC 3 —Hpa I→ 5-GTT + AAC-3
3 CAATTG 5 → 3-CAA + TTG-5

لذلك فإنه لا وجود للتكامل في نهايات القطع الناتجة وتُدعى مثل هذه القطع بالقطع ذات النهايات العمياء Blunt ends لعدم قدرتها على الالتحام مرة أخرى إلاّ إذا أجريت لها بعض التحويرات لجعلها لزجة وتتم هذه التحويرات بواسطة إنزيمات تحوير الدنا DNA Modifying enzymes .

٢- من ملاحظة القطع الناتجة من عمل الإنزيمات Bam HI و Eco RI والقطع الناتجة عن الإنزيم Pst I فإنه يلاحظ بأن النتوءات الخاصة بالنهايات اللزجة مختلفة الاتجاه ، فمثلاً نتوءات القطع الناتجة عن الإنزيمات Bam HI و Eco RI ممتدة من النهاية الثالثة بينما تكون ممتدة من النهاية الخامسة في القطع الناتجة من الإنزيم Pst I .

٣- إن تتابعات (ترددات) مواقع القطع (التقييد) تختلف في عدد نيوكليوتيداتها فبعض الإنزيمات تستطيع تمييز مواقع تقييد رباعية التردد وتقطع قبلها أو بعدها أو بينها كما هو الحال في الإنزيمات التالية :

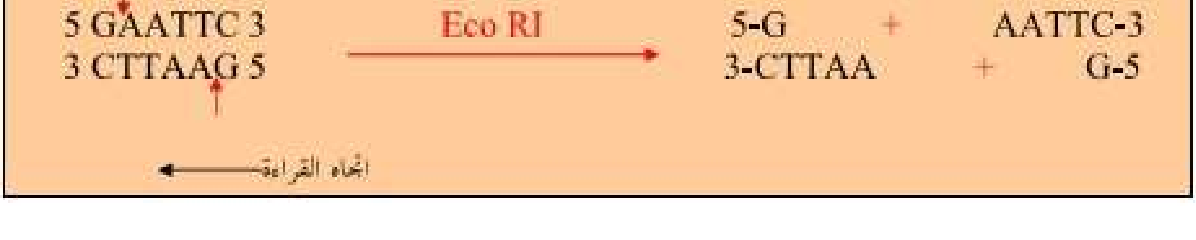
Mba I 5-↓GATC-3 , Sau 3A 5-↓GATC 3 , Hae III 5-GG↓CC-3

والبعض الأخر من الإنزيمات يستطيع تمييز مواقع تقييد خماسية التردد مثل الإنزيم Ava II الذي يميز الموقع 5-G↓GTCC-3 والإنزيم Eco RII الذي يميز الموقع 5-↓CCAGG-3 وغيرها من الإنزيمات .

وتكون معظم الإنزيمات الأخرى ذات مواقع تقييد سداسية التردد وتشذ عن ذلك مجموعة من الإنزيمات مثل الإنزيم Hga I الذي يميز الموقع 5-GACGA-3 ويقوم بالقطع بعده بخمسة نيوكليوتيدات في السلسلة الأولى وعشرة نيوكليوتيدات في السلسلة الثانية .

وكذلك الإنزيم Bbv I الذي يقوم بالقطع بعد ثمانية نيوكليوتيدات من موقع التقييد (القطع) 5-GCAGC(N)8 في السلسلة الأولى وبعد أثني عشر نيوكليوتيد في السلسلة الثانية 3-CGTCG(N)12 . هذا إضافة إلى إنزيمات أخرى .

٤- إن معظم ترددات مواقع تقييد الإنزيمات هي ترددات بالندرومية Palindromes حيث يمكن قراءة تردد موقع القطع بنفس الاتجاه في كلتا سلسلتي الحامض النووي . فمثلاً يمكن قراءة التردد 5-GAATTC-3 لموقع تقييد الانزيم Eco RI بنفس الاتجاه في سلسلتي الحامض النووي كما يلي :



إلاّ أن مواقع تقييد ( قطع ) البعض الآخر من هذه الإنزيمات تكون ترددات (تتابعات) غير بالندرومية حيث تختلف مواقع قطع هذه الإنزيمات في سلسلتي الحامض النووي . فمثلاً يقطع الإنزيم Bin I بعد أربعة نيوكليوتيدات من التتابع 5-GGATC(N)4-3 في السلسلة الأولى وبعد خمسة نيوكليوتيدات من التتابع 5-CCTAG(N)5-3 في السلسلة الثانية .

٥- الاختلاف في قطع الحامض النووي الناتجة عن القطع بالإنزيمات . إن معظم الإنزيمات القاطعة ذات مواقع قطع ثابتة لذلك فإن الحامض النووي الناتج عن فعل هذه الإنزيمات تكون ذات نهايات معروفة وثابتة ، فمثلاً القطع الناتجة من عمل الإنزيم Eco RI تنتهي دائماً بالتتابعات التالية G-5 و AATTC-3 وكذلك الحال في معظم الإنزيمات. إلاّ أنه في إنزيمات أخرى مثل إنزيم Dde I و Hinf I و Asu I فإن نهايات القطع الناتجة عن نشاطها تكون مختلفة ذلك لأن هذه الإنزيمات تستطيع تمييز أكثر من موقع تقييد أو قطع مختلف . فمثلاً الإنزيم Dde I يستطيع تمييز التتابعات التالية كمواقع قطع له وهي 5-CTAAG-3 و 5-CTTAG-3 و 5-CTCAG-3 و 5-CTGAG-3 ومن ملاحظة مواقع قطع هذا الإنزيم المؤشرة بالأسهم فإن القطع الناتجة عن نشاطه ستكون بأربع نهايات مختلفة هي :

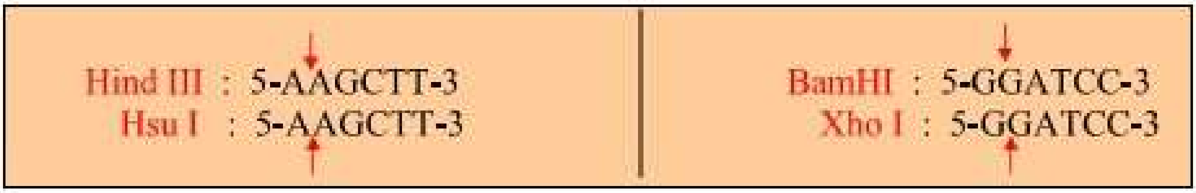
| | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| 5-C | | 5-C | | 5-C | | 5-C |
| 3-GATTC | و | 3-GAGTC | و | 3-GACTC | و | 3-GAATC |

ويلاحظ أن الاختلاف هنا هو دائماً في النيوكليوتيد الوسطي من النهاية الثالثة ( انظر الشكل السابق ) .

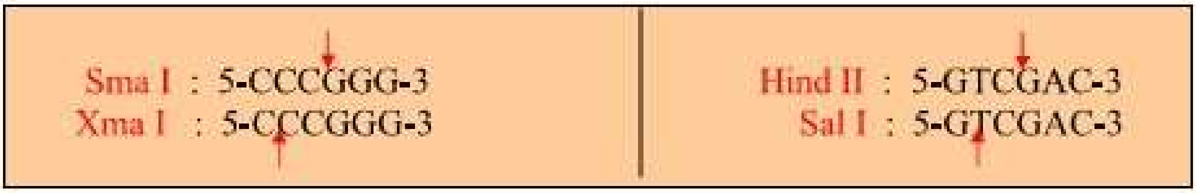
كما أن الإنزيم Hinf I يستطيع تمييز موقع القطع التالي 5-GANTC-3 (حيث إن N يمكن أن تكون A أو T أو C أو G) والإنزيم Asu I الذي يستطيع تمييز موقع القطع التالي 5-GGNCC-3 .

كما أنه يمكن الحصول على قطع حامض نووي DNA بنهايات مختلفة عديدة كما هو الحال مع القطع الناتجة عن الإنزيم Bgl I الذي يستطيع موقع القطع التالي 5-GCCNNNNNNNC-3 والإنزيم Xmn I الذي يستطيع تمييز موقع القطع التالي 5-GAANNNNTTC-3 وغيرها من الإنزيمات الأخرى .

٦- بعض الإنزيمات لها مواقع تقييد مشتركة وقد تقطع هذه المواقع بنفس المكـــان أو أمـــاكن مختلفة بنفس الموقع وتُدعى مثل هذه الإنزيمات بالإنزيمات المتناظرة Isoschizomers وقـــد تكون متناظرة تماماً Perfect Isoschizomers عندما يكون مكان قطعها متشابهاً كمـــا هـــو الحال مع الإنزيمات Hind III و Hsu I والإنزيمات Bam HI و Xho .




كما أن بعض الإنزيمات المتناظرة تكون غير تامـــة التنـــاظر Imperfect Isoschizomers حيث أن لها مواقع تقييد متشابهة وأماكن قطع مختلفـــة مثـــل الإنزيمـــات Sma I و Xma I والإنزيمات Hind II و Sal I .




٧- يمكن لعدد من الإنزيمات القاطعة أن تعمل في تردد مشترك لموقع تقييد معين حيث إن لكل منها موقع تقييد داخل التردد المشترك . فمـــثلاً الإنزيمـــات Bam HI و Mbo I و Sau 3A تعمل على التردد 5-GGATCC-3 حيث يتمكن الإنزيمان Mbo I و Sau 3A مـــن العمـــل على التردد الرباعي GATC الذي يقع ضمن التردد السداسي الذي يمثل موقع تقييـــد الإنـــزيم Bam HI .

وكذلك الإنزيمات Hind III و Alu I حيث يقطع الإنزيم الأول في التردد الربـــاعي AGCT الذي يقع ضمن التردد السداسي AAAGCTT الذي يمثل موقع تقييد الإنزيم الثاني .