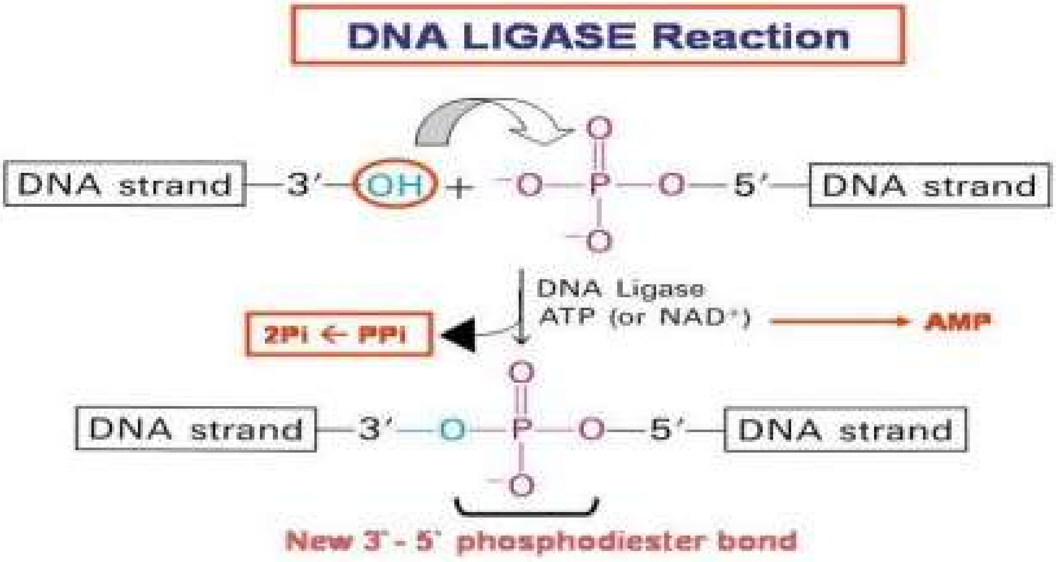
ربط قطع الدنا DNA Ligation

ان عملية ربط تلك القطع من الخطوات الاساسية والمهمة التي تجري طبيعيا في الخلايا الحية او خلال تجارب الهندسة الوراثية، وذلك بألاعتماد على قدرة الانزيمات اللاحمة (الانزيمات الرابطة DNA ligases) الموجودة ضمن الانزيمات المشاركة في عملية التضاعف replication واصلاح الاخطاء.

حيث تتمتع هذه الانزيمات بالقدرة على بناء الاصرة الفوسفاتية ثنائية الايستر phosphodiester bond بين مجموعة الهدروكسيل ($3^{-}OH$) لاحدى النيوكليوتيدات ومجموعة الفوسفات ($5^{-}P$) للنيوكليوتيد المتجاور (الشكل1)، وقد استثمرت هذه القدرة في تجارب الهندسة الوراثية بعد عزل هذا الانزيم من عدة كائنات حقيقية وبدائية النواة وكذلك الفيروسات وجميعها تشترك بقابليتها على اصلاح الكسور الموجودة في الخيوط المفردة لكلا النوعين من النهايات اللاصقة او المستوية.



الشكل1: بناء الاصرة الفوسفاتية ثنائية الايستر

تركزت الدراسات حول الانزيمين المعزولين من بكتريا *E.coli* ومن العاثي T4 ، وملخص خصائصهما ان الوزن الجزيئي للاول يبلغ 74000 دالتون اما الثاني فقد بلغ 60000 دالتون كما ان حاجة الاول للعوامل المساعدة تركزت بوجود العامل NAD^{+} اما الثاني فيحتاج للعامل ATP، اما آلية عملهما

فانهما يتشابهان حيث ينشطر العامل المساعد ليكون معقدا من الانزيم و AMP الذي يرتبط بالثلمة (الكسر) الحاملة للمجموعتين (3ˉOH) و (5ˉP) ليقوم باعادة تكوين الاصرة ومحررا AMP من العملية.

الا ان الافضلية تتجه نحو الانزيم المعزول من العاثي T4 لقابليته على ربط قطع الدنا ذات النهايات المستوية واللاصقة على حد سواء بينما انزيم بكتريا *E.coli* فانه يعمل اساسا على ربط النهايات اللاصقة، عزل الانزيم من العاثي T4 اصلا من خلايا *E.coli* مصابة بالعاثي T4، ولاجل تسريع وتسهيل عملية الحصول عليه تم كلونة الجين المسؤل عن انتاجه في احد نواقل العاثي لامدا الذي ادخل فيما بعد الى بكتريا E.coli على شكل عاثي اولي prophage، وبهذا اصبح ممكنا الحصول على كميات كبيرة من هذا الانزيم وبسهولة من بكترياE.coli الحاوية على العاثي الهجين لامدا، ويتوفر الان تجاريا وباسعار مناسبة ويستعمل بشكل واسع في تجارب لبهندسة الوراثية.

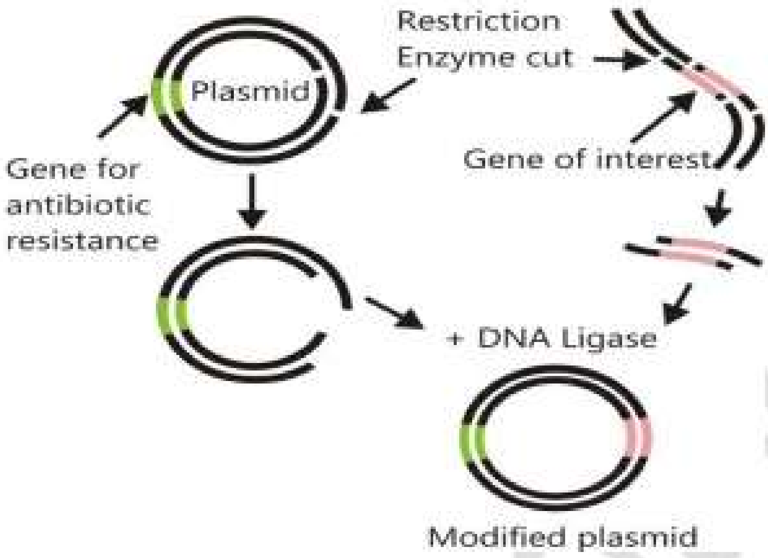
1-ربط قطع الدنا ذات النهايات اللاصقة: Sticky Ends Ligation

عند الشروع في اي تجربة من تجارب الكلونة، يجب اولا اختيار انزيم التقييد المناسب لقطع ناقل الكلونة وجزيئة الدنا الغريبة المرغوب كلونتها، ويفضل عادة ان يكون الانزيم المستعمل من النوع الذي ينتج قطع دنا ذات نهايات لاصقة متكاملة لسهولة ربط مثل هذه القطع بواسطة انزيم DNA ligase.

تتحد النهايات اللاصقة اولا عن طريق ارتباط قواعدها النيتروجينية المتكاملة بواسطة الاواصر الهيدروجينية، الا ان هذا الاتحاد لا يكون قوياً بالدرجة الكافية لحمل قطعتي الدنا معاً بصورة ثابتة ولكنه يسهل عمل انزيم لايجيز الدنا الذي يضاف فيما بعد لاصلاح الكسرين الباقيين في العمود الفقري للخيطين، اللذان يبعدان عن بعضهما ببضعة ازواج قاعدية، وذلك عن طريق تكوين الاواصر الفوسفاتية ثنائية الايستر. يؤدي عمل انزيم DNA ligase الى تكوين جزيئة دنا هجينة مستقرة يمكن ادخالها فيما بعد الى خلية المضيف الملائم باتباع احدى الطرق الملائمة مثل التحول transformation .

ومن الجدير بالذكر ان مناطق ارتباط النهايات اللاصقة المتكاملة ستكون حساسة لنفس الانزيم الذي انتجها او الامر، وبهذا سيكون من السهوله استخلاص قطعة الدنا الغريبة المكلونه وذلك بمعاملة الجزيئة الهجينة بنفس الانزيم.

DO NOT COPY



الشكل 2 : ربط قطعة الدنا الغريبة الى ناقل كلونة مناسب.

ان هدف الكلونة هو ربط قطعة الدنا الغريبة (المرغوبة) الى ناقل كلونة مناسب، في انبوبة الاختبار، ليتسنى فيما بعد ادخال الجزيئات الهجينة الناتجة الى الخلايا المضيفة (الشكل 2). ولكن يجب على الباحث وضع في حساباته ان تكوين الجزيئات الهجينة ليس الاحتمال الوحيد الناتج من عملية الربط بواسطة DNA ligase، وانما هناك احتمالات اخرى يمكن حدوثها في خليط التفاعل فقد ترتبط نهايتا ناقل الكلونة مع بعضها مما يؤدي الى تدوير الناقل على نفسه circularization بدون الارتباط بقطعة الدنا الغريبة، كما يمكن ارتباط جزيئتين من ناقل الكلونة مع بعضها لتكوين ناقل ثنائية(دايمر dimer) لاتحتوي على قطعة دنا غريبة.

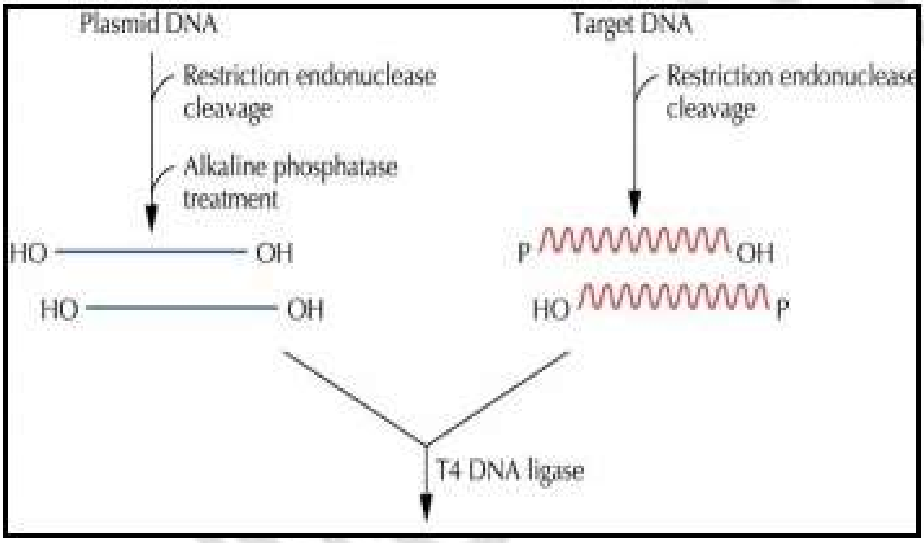
تؤدي مثل هذه الارتباطات بدون شك الى اختزال كفاءة عملية الكلونة ، وذلك لان كثير من الخلايا المتحولة ستحتوي على نواقل الكلونة فقط بدون قطعة الدنا الغريبة. لذا يتوجب تهيئة كافة الظروف الملائمة التي من شأنها زيادة احتمالية الحصول على افضل النتائج من خلال الحصول على جزيئات هجينة والتقليل من الارتباطات الاخرى.

ان احد العوامل المهمة التي تساعد على زيادة تكوين الجزيئات الهجينة هي اجراء التفاعل بوجود تركيز عالي من قطع الدنا. وقد اوضحت الدراسات ان نسبة تركيز جزيئات الناقل الى تركيز الدنا الغريبة في

DO NOT COPY

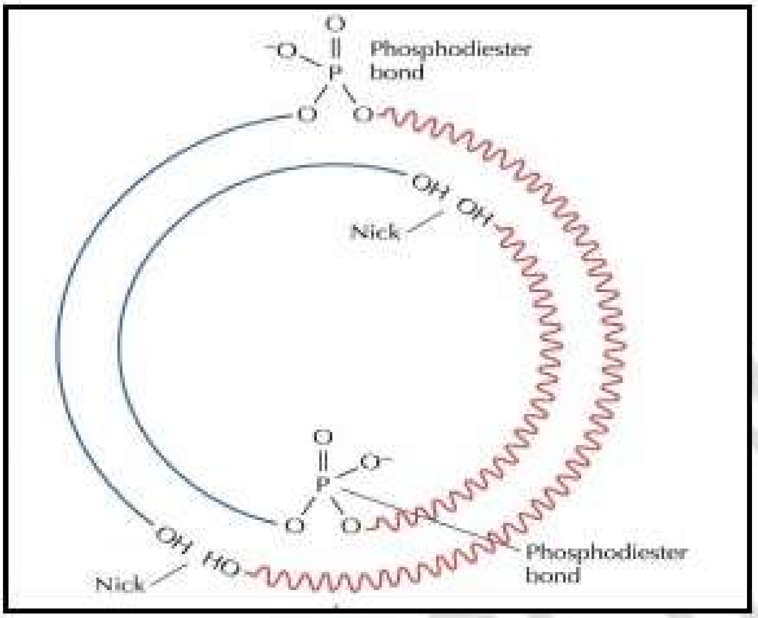
خليط التفاعل لها دور مهم في زيادة كفاءة عملية الربط والحصول على جزيئات هجينة، ولهذا تتم تفاعلات الربط في الغالب بخلط جزيئات الناقل والدنا بنسبة ثلاثة الى واحد.

طريقة اخرى تستخدم لزيادة كفاءة الكلونة هي معاملة نواقل الكلونة (وقبل خلطها مع الدنا الغريبة) بانزيم الفوسفاتيز القاعدي alkaline phosphatase المعزول من البكتريا او العجول الذي يعمل على ازالة مجاميع الفوسفات من الطرف 5 للنهايات اللاصقة مما يمنع تدور النواقل او ارتباطها مع بعضها (الشكل 3).



الشكل 3: معاملة نواقل الكلونة بانزيم الفوسفاتيز القاعدي

ان الطريقة الوحيدة لتدوير النواقل المعاملة بهذا الانزيم هي ربطها مع قطعة دنا غريبة غير معاملة بالانزيم، التي ستوفر مجموعة فوسفات طرفية في كل من منطقتي الارتباط، في هذه الحالة سيعمل انزيم DNA ligase على اصلاح الكسرين الحاويين على مجموعة فوسفات، في حين يبقى كسر واحد في كل من منطقتي الارتباط (Nick) بدون تصليح (الشكل 4). الا ان بقاء هذين الكسرين لايؤثر كثيرا على استقرار الجزيئة الهجينة بحيث يمكن ادخالها الى خلايا المضيف التي تعمل على اصلاحها فيما بعد بواسطة اجهزة الاصلاح التي تحتويها هذه الخلايا.



الشكل 4: بقاء كسر واحد في كل من منطقتي الارتباط (Nick) بدون تصليح.

هناك عوامل اخرى تؤثر على كفاءة تفاعلات الربط مثل درجة حرارة التفاعل، على الرغم من ان درجة الحرارة المثلى لفعالية انزيم DNA ligase هي 37 م°، الا ان تفاعلات ربط قطع الدنا ذات النهايات اللاصقة لا تجري في مثل هذه الدرجة لان الاواصر الهيدروجينية التي تربط القواعد المتكاملة للنهايات اللاصقة لا تكون مستقرة في مثل هذه الدرجة العالية، لذا تجرى هذه التفاعلات بدرجة حرارة تضمن التوزان بين فعالية الانزيم واستقرار الاواصر الهيدروجينية، وغالبا ما تتراوح درجة الحرارة المستعملة بين 10م°- 15 م°.

بالنظر لسهولة وكفاءة عملية ربط قطع الدنا ذات النهايات اللاصقة فانها تستخدم بشكل واسع في تجارب الكلونة، الا ان ذلك لا يعني عدم استعمال قطع الدنا ذات النهايات المستوية في مثل هذه التجارب وخاصة في حالة عدم توفر انزيم تقييد الملائم الذي ينتج نهايات لاصقة.

لاجل ربط قطع الدنا ذات النهايات المستوية لابد من استعمال انزيم لايجيز الدنا T4 القادر على ربط هذه النهايات، ولكن نظرا لطبيعة النهايات المستوية فان عملية ربطها اقل كفاءة واكثر بطأ من عملية

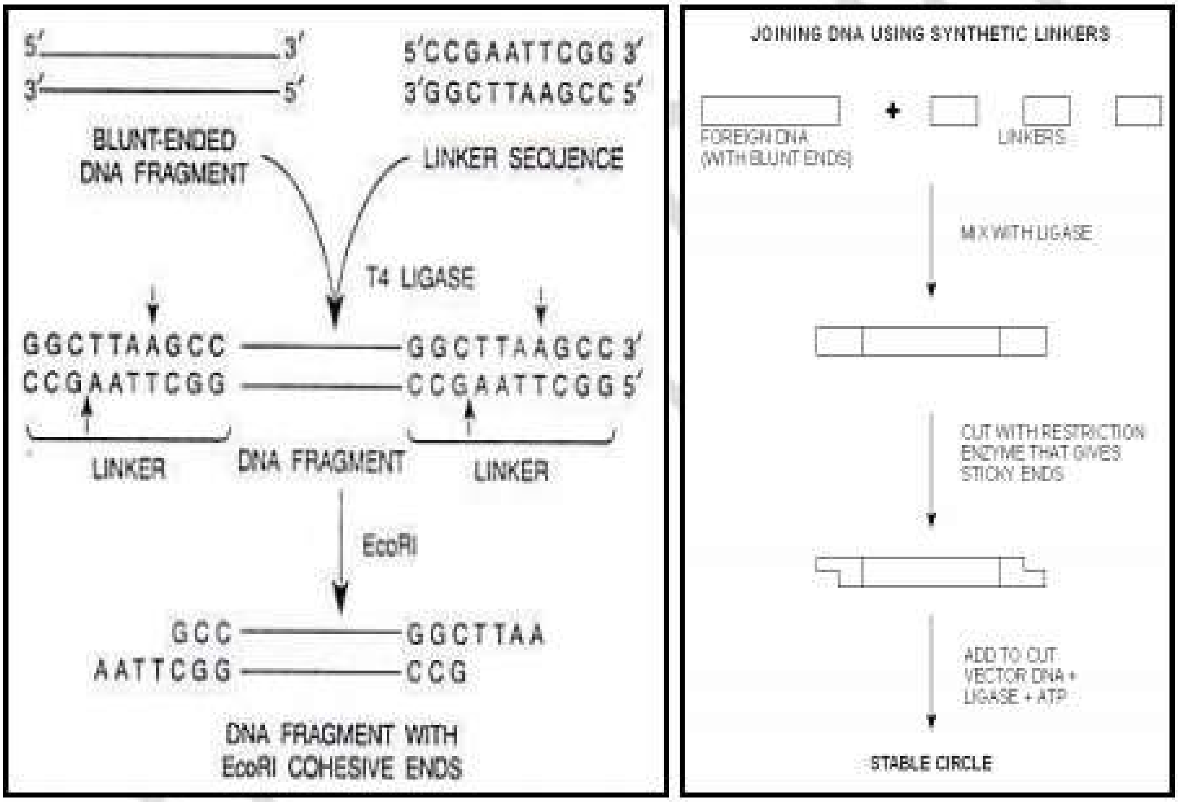
ربط قطع الدنا ذات النهايات اللاصقة، فقد وجد ان عملية ربط قطع الدنا ذات النهايات اللاصقة اسرع بحوالي مئة مرة من عملية ربط قطع الدنا ذات النهايات المستوية ويعود السبب في ذلك الى عدم قدرة النهايات المستوية على الاتحاد الاولي مع بعضها (كما في حالة النهايات اللاصقة) لتسهيل عمل لايجيز الدنا. فلكي يقوم لايجيز الدنا بربط النهايات المستوية لابد من التقاء هذه النهايات اولا بحيث تصبح متقابلة وقريبة من بعضها ليتسنى للانزيم ربطها معا. وبما احتمال التقاء النهايات المستوية بهذا الشكل في محلول التفاعل قليل جدا، وان حدث يكون لفترة زمنية قصيرة جدا، فان تركيز الدنا في خليط التفاعل يجب ان يكون اعلى من التركيز المستعمل في ربط النهايات اللاصقة وذلك لزيادة فرص التقاء النهايات المستوية مع بعضها. ويعتقد ان تفاعل ربط قطع الدنا ذات النهايات المستوية يحتاج، في الاقل، الى جزيئتين من انزيم لايجيز الدنا T4، واحدة تعمل على حمل النهايتين المستويتين في موضع متقابل، وتعمل الاخرى على تكوين الاواصر الفوسفاتية ثنائية الايستر بين النهايتين لاتمام عملية الربط. لذا فان تركيز لايجيز الدنا T4 المستعمل في مثل هذا التفاعل يكون اكثر بحدود 10−30 مرة من تركيز الانزيم المطلوب للحصول على نفس معدل الارتباط باستعمال النهايات اللاصقة. بما ان تفاعلات ربط قطع الدنا ذات النهايات المستوية لاتعتمد على اتحاد النهايات بواسطة الاواصر الهيدروجينية، فان درجة الحرارة لا تلعب نفس الدور المؤثر الذي تلعبه في تفاعلات ربط النهايات اللاصقة، وعموما تتروح درجة الحرارة المستعملة في تفاعلات ربط النهايات المستوية بين 25−20 م°.

ذكرنا ان احد الشروط الاساسية لربط النهايات اللاصقة هو ان تكون هذه النهايات منتجة بنفس انزيم التقييد. وبهذا سيكون ممكنا استخلاص الدنا المكلونة بسهولة عن طريق معاملة الجزيئة الهجينة بنفس انزيم التقييد المستعمل في قطع الدنا الغريبة وناقل الكلونة. اما في حالة ربط قطع الدنا ذات النهايات المستوية فان العملية ممكنة سواء كانت هذه النهايات منتجة بنفس الانزيم او بانزيمين مختلفين. وفي الحالة الثانية سيكون موضع الارتباط الناتج غير حساس لكلا الانزيمين مما يعني عدم امكانية استخلاص الدنا المكلونة من جزيئة الناقل وهذا يمثل مشكلة كبيرة في تجارب الكلونة، ولاجل تجاوز هذه المشكلة استنبطت وسائل يمكن من خلالها زيادة كفاءة كلونة قطع الدنا ذات النهايات المستوية ومن ثم استخلاصها بسهولة من ناقل الكلونة. اهم هذه الوسائل هي استخدام الجزيئات الرابطة Linker molecules، الوصيلات Adaptors و التذييل بالبوليمرات المتجانسة Homopolymer Tailing .

1-2:الجزيئات الرابطة Linker molecules:

الجزيئات الرابطة عبارة عن تتابعات قصيرة مكونة من 8-10 ازواج من النيوكليوتيدات مصنعة مختبريا بحيث تحتوي على موضع حساس لواحد او اكثر من انزيمات التقييد، تستخدم عادة في عمليات كلونة قطع الدنا ذات النهايات المستوية بطريقه تسمح باستخلاصها من الناقل اذا دعت الحاجة لذلك.

يوضح الشكل ادناه كلونة قطع دنا ذات نهايات مستوية باستخدام جزيئة رابطة من نوع EcoRI.



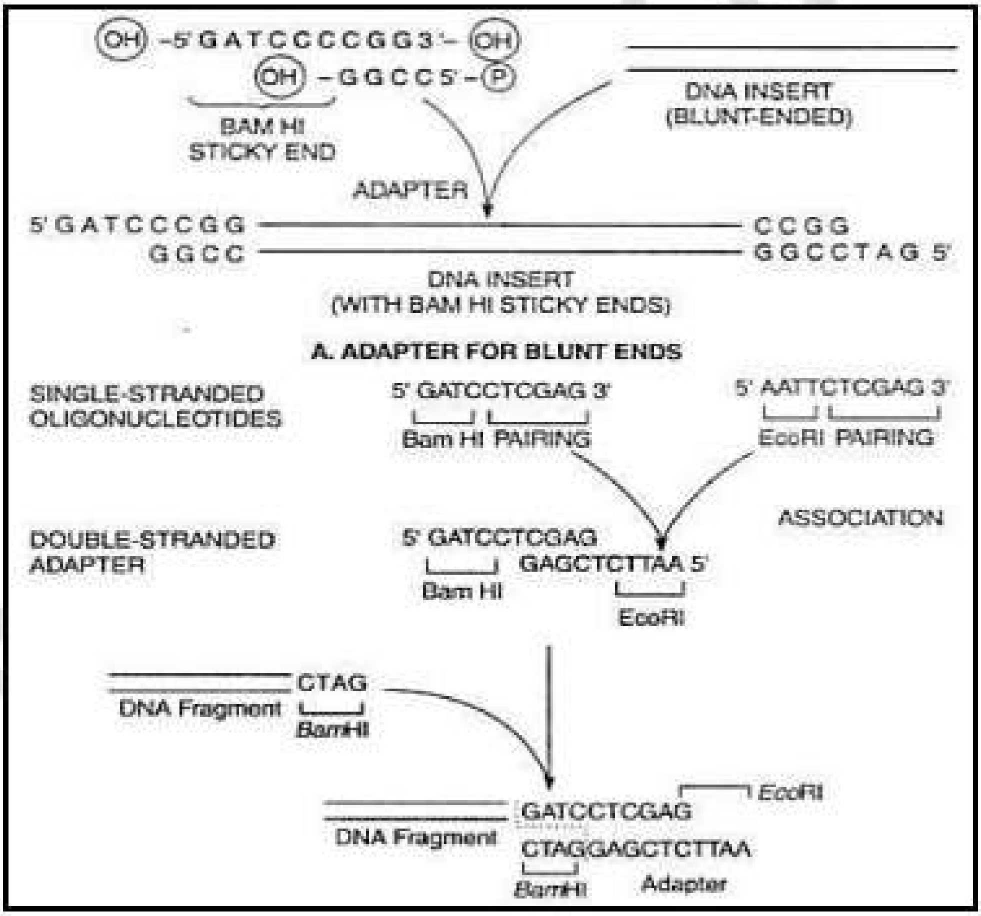
الشكل 5 : استخدام الجزيئات الرابطة Linkers في تجارب الكلونة.

اي انها تحتوي على موضع حساس لانزيم تلصق EcoRI ، اولا الجزيئات الرابطة الى طرفي قطع الدنا ذات النهايات المستوية بواسطة انزيم لايجيز الدنا T4 ، ثم تعامل القطع الناتجة بانزيم EcoRI الذي يقطع مواضعه الحساسة في الجزيئات الرابطة لانتاج قطع دنا ذات نهايات لاصقة من نوع EcoRI.

يمكن بعد ذلك كلونة هذه القطع وبسهولة عن طريق ارتباط نهاياتها اللاصقة مع النهايات اللاصقة لناقل الكلونة المقطوع بالانزيم EcoRI. ان مواضع الارتباط الناتجة ستكون في هذه الحالة حساسة للانزيم EcoRI مما يسمح بأستخلاص الدنا المكلونة عن طريق معاملة الجزيئة الهجينة بالانزيم EcoRI.

2-2: استخدام الوصيلات Adaptors:

على الرغم من استخدام الجزيئات الرابطة وبنجاح في الكلونة، الا ان استخدامها لا يكون ممكنا في حالة احتواء قطعة الدنا الغريبة على موضع حساس او اكثر لنفس الانزيم الذي يستعمل لقطع الجزيئات الرابطة، ففي هذه الحالة ستقطع جزيئة الدنا الغريبة الى قطعتين او اكثر مما يفقدها هويتها المميزه.



الشكل 6: كلونة قطع دنا ذات نهايات مستوية باستخدام الوصيلات من نوع BamHI.

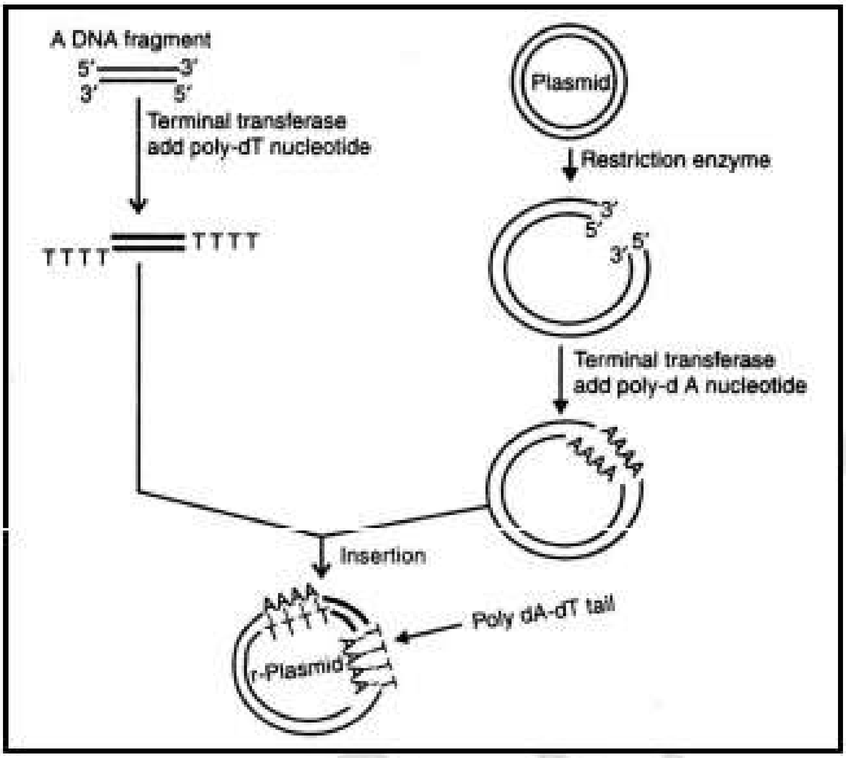
يمكن تجاوز هذه المشكلة باستخدام انزيم اخر لقطع الجزيئات الرابطة وفي حالة تعذر الحصول على الانزيم الملائم لذلك، وخاصة اذا كانت قطع الدنا الغريبة كبيرة الحجم ومحتوية على مواضع حساسة لعدد من الانزيمات، فعندئذ يمكن اللجوء الى حل اخر وهو تحوير الموضع الحساس داخل الدنا الغريبة ليصبح مقاوما لانزيم التقييد. وبما ان عمليات التحوير تتسم بالصعوبة والتعقيد يلجأ عادة الى حل جذري وعام لهذه المشكلة وهو استخدام الوصيلات Adaptors ، وهي عبارة عن قطع صغيرة مصنعة في المختبر تحتوي على نهاية لاصقة ومنزوعة الفوسفات في احد طرفيها والطرف الاخر ذات نهاية مستوية حاوية على مجموعة الفوسفات. يوضح (الشكل 6) كلونة قطع دنا ذات نهايات مستوية باستخدام الوصيلات من نوع BamHI.

تربط النهايات المستوية للوصيلات اولا الى قطع الدنا الغريبة باستعمال انزيم لايجيز T4 لانتاج قطع دنا ذات نهايات لاصقة من نوع BamHI، وبما ان هذه النهايات لا تحتوي على مجاميع الفوسفات لا يكون هناك اي احتمال لارتباطها مع بعضها في محلول التفاعل. وبعد اتمام ربط الوصيلات وقبل كلونة القطع الناتجة عن هذا الارتباط لابد من اضافة مجموعة فوسفات الى الطرف5 من النهايات اللاصقة لتصبح جاهزة للكلونة في موضع BamHI لناقل الكلونة وتكوين الجزيئة الهجينة.

2-3: استخدام التذييل بالبوليمرات المتجانسة Homopolymer tailing :

يقصد بها انها خيط دنا مفرد مكون من عدد من الوحدات البنائية(النيوكليوتيدات) المتماثلة، فاذا كان هذا الخيط مكوناً، على سبيل المثال، من عدد من النيوكليوتيدات من نوع الادينوسين منقوص الاوكسجين deoxyadenosine dA يطلق عليه اسم متعدد الادينوسين منقوص الاوكسجين polydeoxyadenosine او متعدد dA للاختصار .

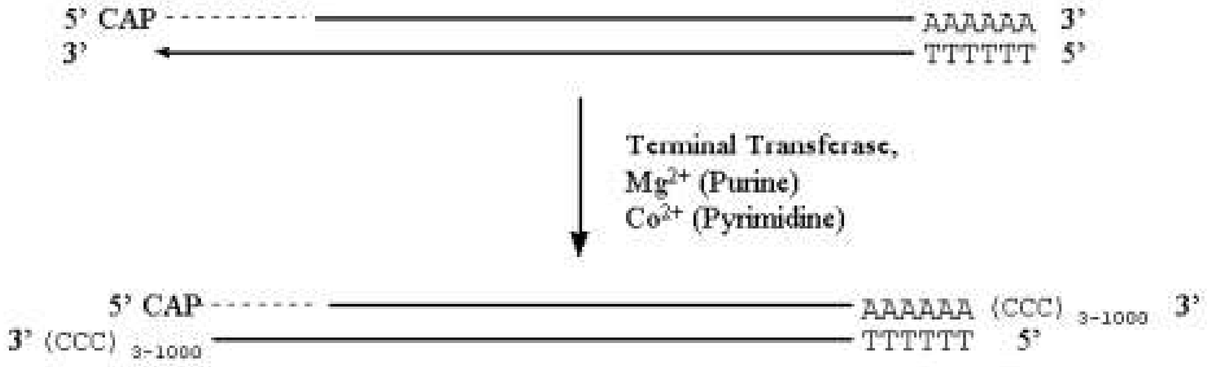
تتضمن عملية التذييل اضافة عدد من dA يتراوح بين 10-40 نيوكليوتيد الى طرفي 3-oH لاحد قطع الدنا، واضافة عدد من dT الى طرفي 3-oH للقطعة الثانية التي يراد ربطها الى القطعة الاولى مما يؤدي الى تكوين قطع دنا ذات نهايات لاصقة متكاملة يمكن ربطها معا لتكوين جزيئة هجين دائرية.



الشكل 7: التذييل اضافة عدد من dA الى طرفي 3−oH لاحد قطع الدنا، واضافة عدد من dT الى طرفي 3−oH للقطعة الثانية

يمكن ادخال الجزيئة الهجينة المتكونة الى المضيف الملائم الذي يعمل على ملئ الفراغات واصلاح الكسور الباقية في الجزيئة، بواسطة اجهزة الاصلاح الموجودة فيه لتكوين جزيئة هجينة كاملة ومستقرة.

ان الانزيم المسؤول عن تخليق الذيول هو انزيم Terminal deoxynucleotidyl – transferase (terminal transferase) الترانسفيريز الطرفي الذي يقوم باضافة النيوكليوتيدات وبصورة متعاقبة الى النهاية 3−oH منتجا ذيولا متكونة من عدد من النيوكليوتيدات المتماثلة.



الشكل 8: انزيم λ exonuclease يعمل على هضم خيوط الدنا من الطرف 5 منتجا ذات نهايات 3-oH مكشوفة

يشترط لعمل هذا الانزيم توفر نهاية 3-oH حرة ومكشوفة exposed ليتسنى له اضافة النيوكليوتيدات الى هذه النهاية. وبما ان معظم النهايات اللاصقة تكون ناتئة في الطرف 5-p فان مجموعة 3-oH تكون مغطاة مما يعيق عمل الانزيم، كما ان الطرف 3-oH للنهايات المستوية لا يكون مكشوفا بالدرجة الكافية لاستعماله من قبل انزيم الترانسفيريز الطرفي. لذا فان حلزونات الدنا غالبا ما تعامل بانزيم λ exonuclease الذي يعمل على هضم خيوط الدنا من الطرف 5 منتجا بذلك جزيئات دنا ذات نهايات 3-oH مكشوفة وملائمة لعمل انزيم الترانسيفريز الطرفي (الشكل 8).

من الجدير بالذكر ان قطع الدنا المنتجة بانزيم تقييد مثل PstI تكون ملائمة لعمل انزيم الترانسيفريز الطرفي بدون معاملتها بانزيم λ exonuclease لانها تحتوي على نهايات ناتئه في الطرف 3-oH.