

كلية الصيدلة

Faculty of Pharmacy

السنة الثالثة

مقرر الهندسة الوراثية (الجينية)

المحاضرة السادسة

2019-2020

د. شادي سكرية

أهم الأدوات الجزيئية للهندسة الجينية

Enzymes الأنزيمات

Cutting and joining
قطع ووصل DNA

١. أنزيمات القطع

٢. أنزيمات الربط

٣. أنزيمات البناء (البلمرة)

٤. أنزيمات التعديل

١. أنزيمات القطع

تقوم هذه الأنزيمات بقطع الرابطة الفوسفورية ثنائية الأستر بين النكليوتيدات المشكلة لهيكل الحموض النووية.

تعرف هذه الأنزيمات بالفوسفوديستيراز Phosphodiesterases أو **النكلياز Nucleases**.

يوجد نمطان من هذه الأنزيمات وذلك بحسب نوعية الركيزة
:Substrate

- الأول، يقطع الرابطة الفوسفورية ثنائية الأستر لـDNA، تعرف هذه الأنزيمات بـ**DNase**.

- الثاني، يقطع الرابطة الفوسفورية ثنائية الأستر لـRNA، تعرف هذه الأنزيمات بـ**RNase**.

تقسيم أنزيمات النكلياز إلى مجموعتين بحسب طريقة عملها:

المجموعة الأولى: تهاجم الحموض النووية من أطرافها فتعرف **بالنكلياز الخارجية Exonucleases**.

النكلياز الخارجية تقطع الأحماض النووية من نهاياتها نكليوتيد فنكليوتيد.

•تضم هذه المجموعة، النكلياز الهاضمة للـRNA من أطرافه وهي:

-النكلياز الخارجية 3' التي تهاجم RNA بعد إزالة ذيل عديد الأدينيل

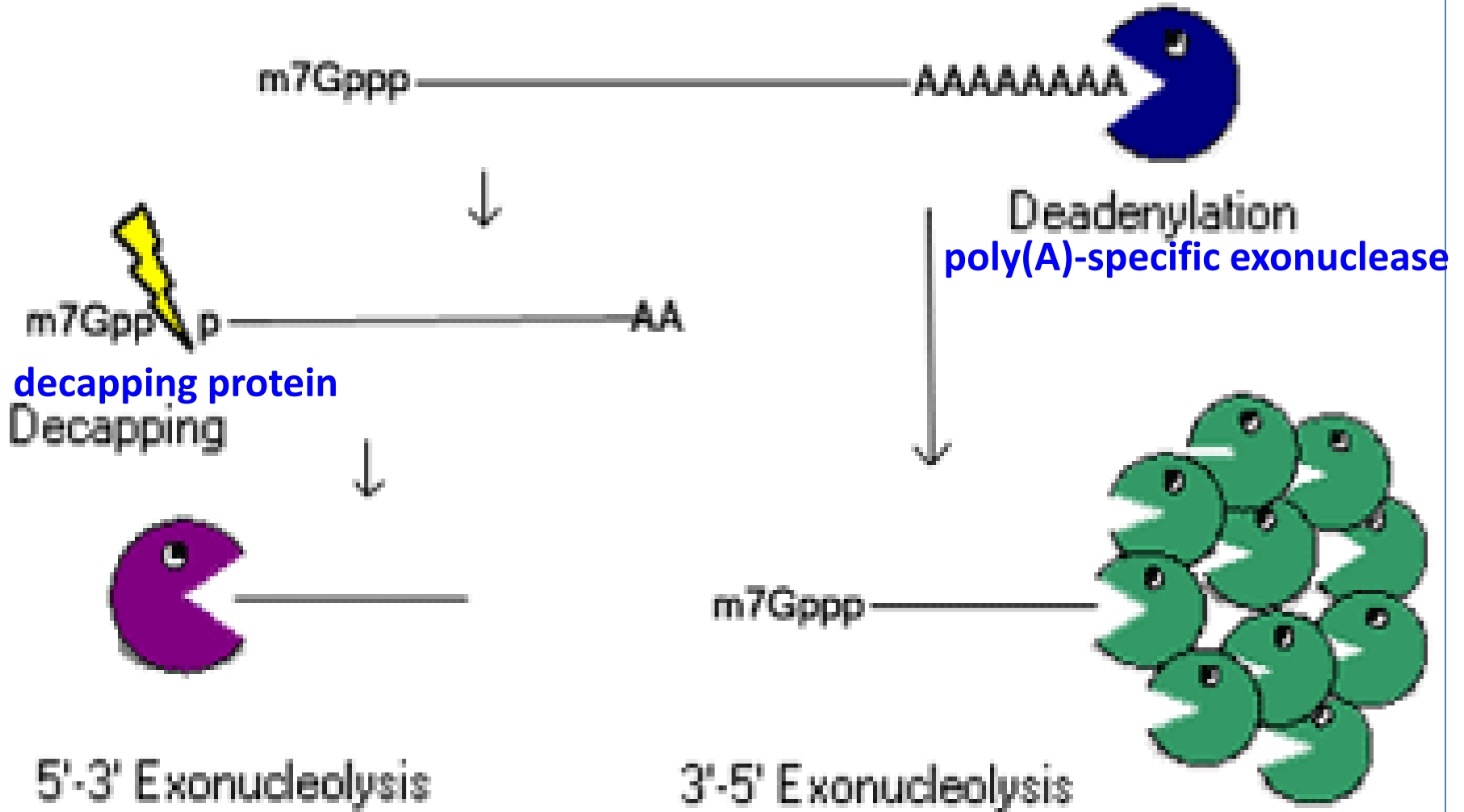
-النكلياز الخارجية 5' التي تهاجم RNA بعد إزالة القبعة.

تزال القبعة عادة بواسطة بروتين مزيل للقبعة decapping

protein، بينما يزال الذيل بواسطة أنزيم من نمط نكلياز خارجية

خاص بالذيل poly(A)-specific exonuclease.

النكليات الخارجية الهاضمة لـ RNA



يكون تحطيم RNA بالاتجاه $5' \rightarrow 3'$

يكون تحطيم RNA بالاتجاه $3' \rightarrow 5'$

• **تضم** هذه المجموعة، النكلياز الهاضمة للـ DNA من أطرافه وهي:

• مجموعة من أنزيمات النكلياز غير النوعية التي تهاجم DNA الخطي

أحادي وثنائي الشريط مثال **النكلياز BAL31**.

• النكلياز التي تهاجم DNA ثنائي الشريط من نهاياته الفوسفاتية مثال

lambda exonuclease.

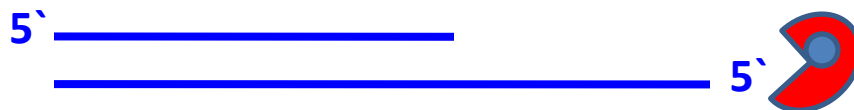
• النكلياز التي تهاجم DNA ثنائي الشريط من نهاية 3' مثال

أكزونكلياز III.

• النكلياز التي تهاجم النهايات الناتئة للشريطة الثنائية ولها نوعين:

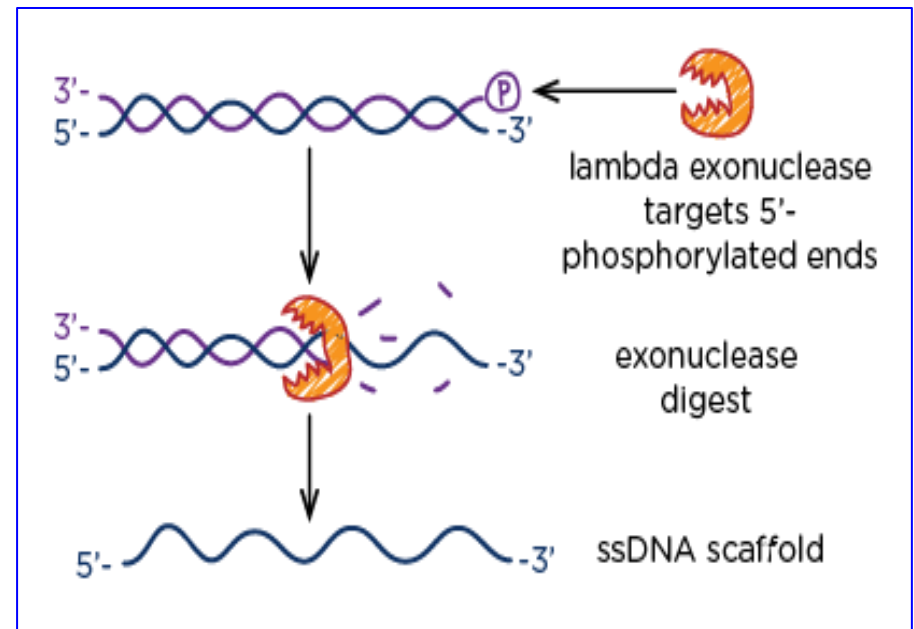
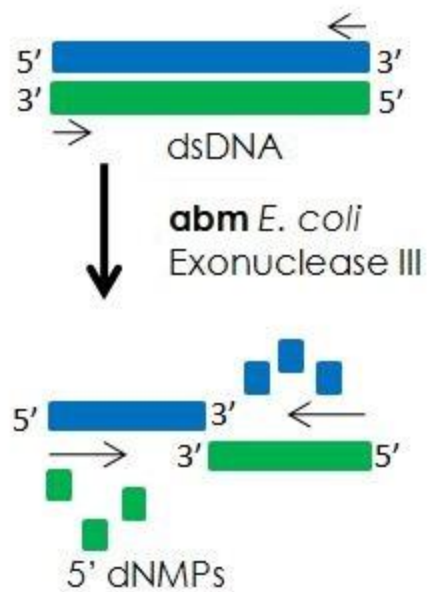


النكلياز الخارجية 3'

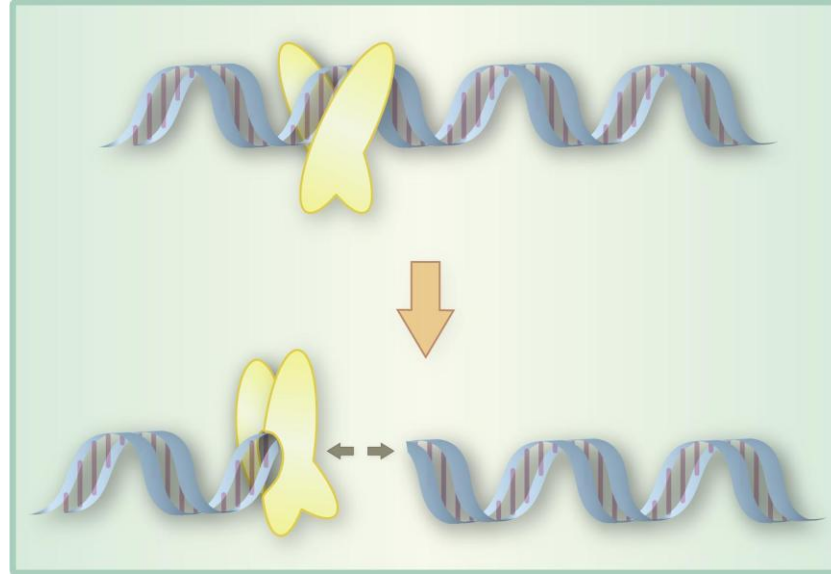


النكلياز الخارجية 5'

abm *E. coli* Exonuclease III



المجموعة الثانية: تضم أنزيمات النكلياز التي تهاجم الحموض النووية فتقطع الروابط ضمن سلاسلها وينتج عن عملها شذف قصيرة من عديدات النكليوتيدات تعرف هذه الأنزيمات **بالنكلياز الداخلية**



.Endonucleases

تتصف هذه المجموعة باحتوائها على أنزيمات **غير نوعية** تقطع DNA بشكل عشوائي في أي مكان وتعطي قليلات نكليوتيد، وأنزيمات **نوعية** تقطع DNA ضمن تسلسلات محددة، تعرف هذه الأنزيمات **بأنزيمات التقييد** لأنها لا تقطع بشكل عشوائي فهي مقيدة بتسلسل معين للقطع.

Endonucleases أنزيمات القطع الداخلية

النتاج Product	الركيزة Substrate	الفعالية Activities	الأنزيم Enzyme
نكليوتيدات أحادية حررة.	DNA أو RNA أحادي الشريط.	نكلياز داخلية خاصة بالجزئيات مفردة الشريط.	S1 نكلياز
عديدات نكليوتيدات.	هجين DNA/RNA.	نكلياز داخلية غير نوعية.	RNase H
عديدات نكليوتيدات من ١٥ وحدة على الأكثر.	RNA ثنائي الشريط.	نكلياز داخلية غير نوعية.	RNase III

أنزيمات التقيد Restriction Enzymes

Restriction endonucleases

أنزيمات نكلياز داخلية توجد في كثير من السلالات البكتيرية بشكل طبيعي إذ تستخدمها الجراثيم للدفاع عن نفسها من أي DNA غريب يمكن أن يدخل إليها من الوسط المحيط فتقوم هذه الأنزيمات بتقطيعه والتخلص منه.

تتصف أنزيمات التقيد بالتنوع العالية وذلك بفضل قدرتها في التعرف على تسلسل معين من DNA يعرف بموقع التقيد restriction site والقطع إما ضمنه أو بعده، وذلك بحسب الأنزيم.

يتألف بموقع التقيد غالباً من أربعة أو ستة أو ثمانية نكليوتيدات.

يوجد ثلاث مجموعات (صفوف) من الأندونكلياز المقيدة restriction endonucleases أو أنزيمات التقيد

Major classes of restriction endonucleases.

Class	Abundance	Recognition site
Type I	Less common than type II	Cut both strands at a nonspecific location > 1000 bp away from recognition site
Type II	Most common	Cut both strands at a specific, usually palindromic, recognition site (4–8 bp)
Type III	Rare	Cleavage of one strand only, 24–26 bp downstream of the 3' recognition site

تقطع بعد ألف نكليوتيد من موقع التقيد، على الشريطين

تقطع ضمن موقع التقيد، على الشريطين

تقطع بعد ٢٤-٢٦ شفع من الأسس من موقع التقيد وعلى شريط واحد فقط

اسم الأنزيم	المصدر	موقع التقويد
AluI	<i>Arthrobacter luteus</i>	AG↓CT TC↑GA
BamHI	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> H	G↓GATC C C CTAG↑G
EcoRI	<i>Escherichia coli</i> R factor	G↓AATT C C TTAA↑G
HaeIII	<i>Hemophilus aegyptus</i>	GG↓CC CC↑GG
HindIII	<i>Hemophilus influenzae</i> Rd	A↓AGCT T T TCGA↑A
NotI	<i>Norcadia otitidis-caviarum</i>	GC↓GGCC GC CG CCGG↑CG
PstI	<i>Providencia stuartii</i>	C TGCA↓G G↑ACGT C

تُعطى هذه الأنزيمات أسماءً مركبة من حروف وأرقام، يشير عادة الحرف الكبير الأول إلى اسم **جنس** البكتيريا المحضر ابتداءً منه الأنزيم ويتبع بحرفين صغيرين يدلان على **النوع** ثم حرف كبير آخر لدلالة على اسم **السلالة** بينما يدل الرقم الذي غالباً ما يكتب بالأرقام الرومانية إلى تسلسل **عزل الأنزيم**.

أنزيمات الصف الثاني class II restriction endonucleases تقطع ضمن التسلسل.



موقع التقييد: تسلسل بالاندرومي **palindrome**
يقراً على الشريطتين بنفس الاتجاه، بنفس الترتيب

تمتاز أنزيمات التقييد بالنعوية العالية لتسلسل موقع التقييد.

تغير نكليوتيد واحد في موقع التقييد يلغي كل الفعالية الأنزيمية للأنزيم

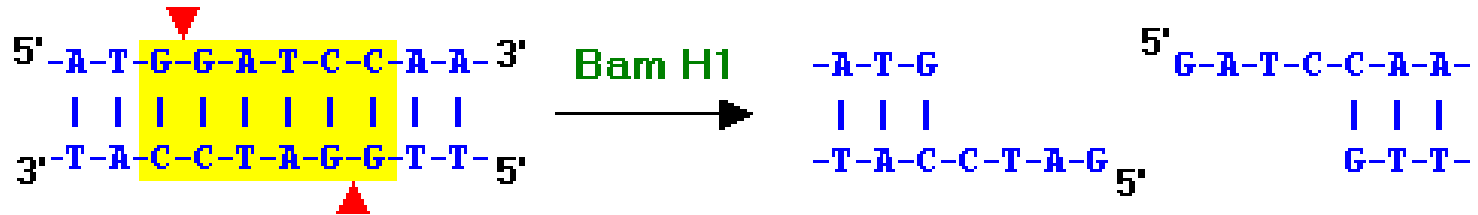
ينتج عادة عن عمل هذه الأنزيمات شدف من DNA تختلف نهاياتها باختلاف نوع الأنزيم:

- **نهايات حرة ناتئة Overhangs** إما 5` أو 3` وذلك عندما يقوم الأنزيم بالقطع على **أحد أطراف موقع التقييد**، تعرف هذه **النهايات باللزجة Sticky** وذلك لسهولة استخدامها في تفاعلات الربط حيث تتطابق فيزيائياً النهايات الناتئة للشدف المربوطة مما يسهل تفاعل الربط.

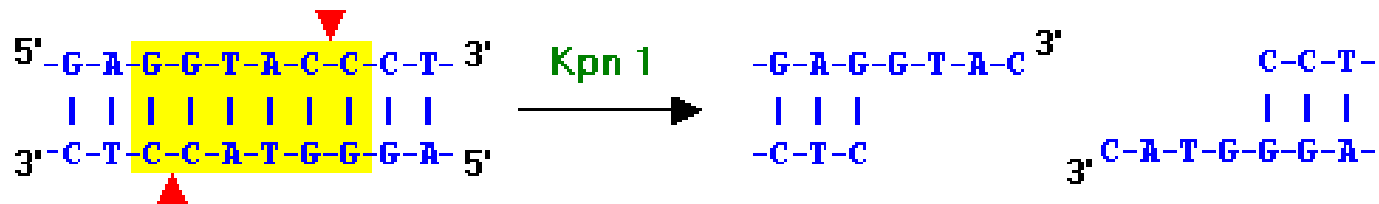
- **نهايات حرة مستوية (حادة) Sharps** عندما يقطع الأنزيم في **وسط موقع التقييد**، تعرف هذه **النهايات بالعمياء Blunts** إذ ينخفض مردود تفاعل الربط عند استخدام شدف نهاياتها عمياء.

Patterns of DNA Cutting by Restriction Enzymes

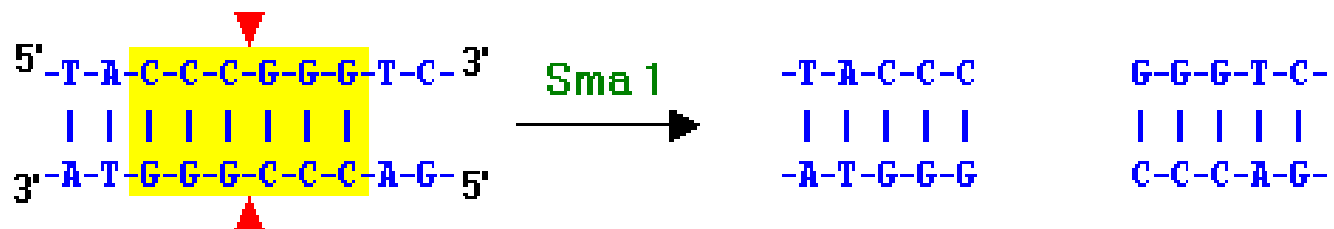
- **5' overhangs:** The enzyme cuts asymmetrically within the recognition site such that a short single-stranded segment extends from the 5' ends. **BamHI** cuts in this manner.



- **3' overhangs:** Again, we see asymmetrical cutting within the recognition site, but the result is a single-stranded overhang from the two 3' ends. **KpnI** cuts in this manner.

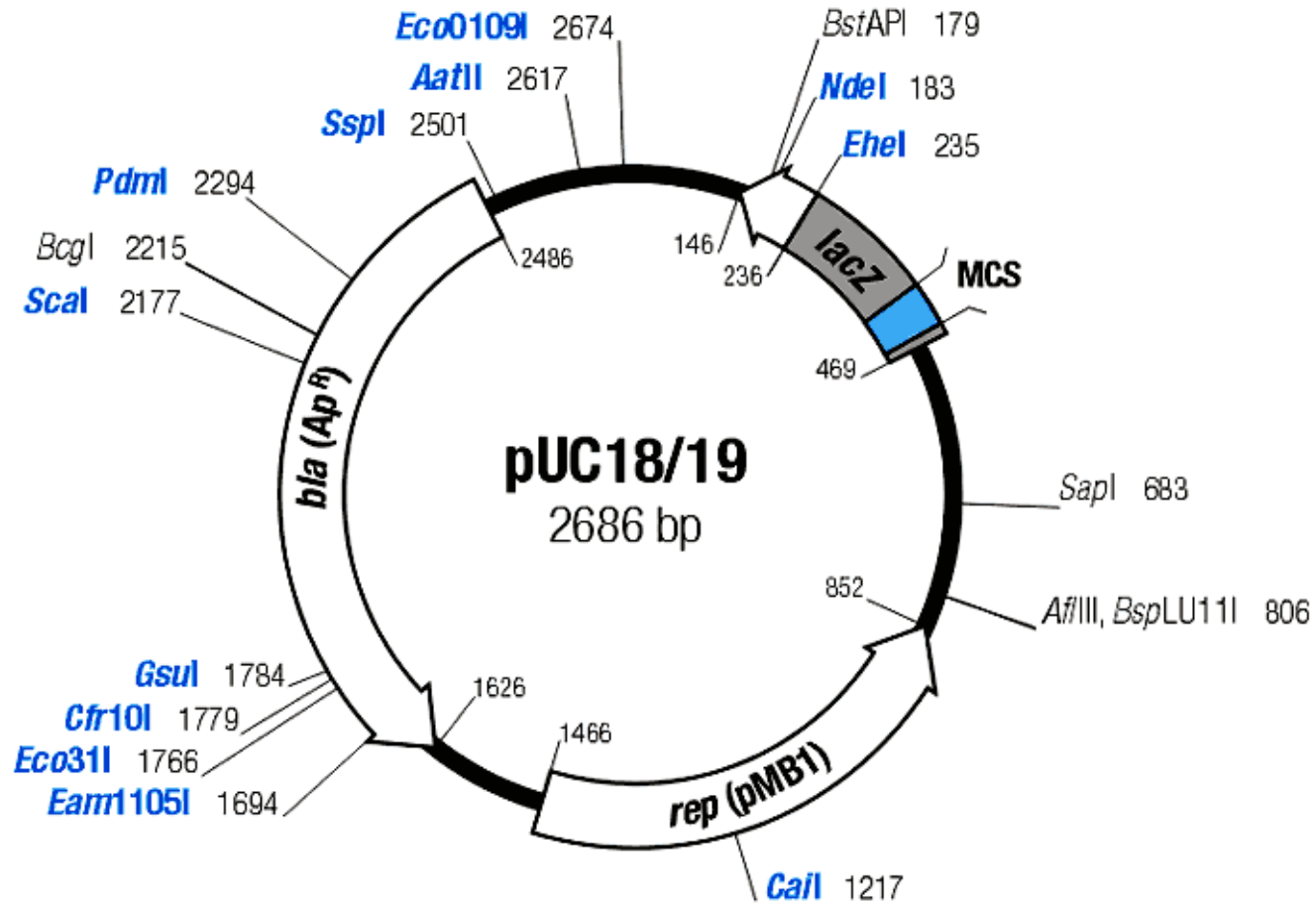


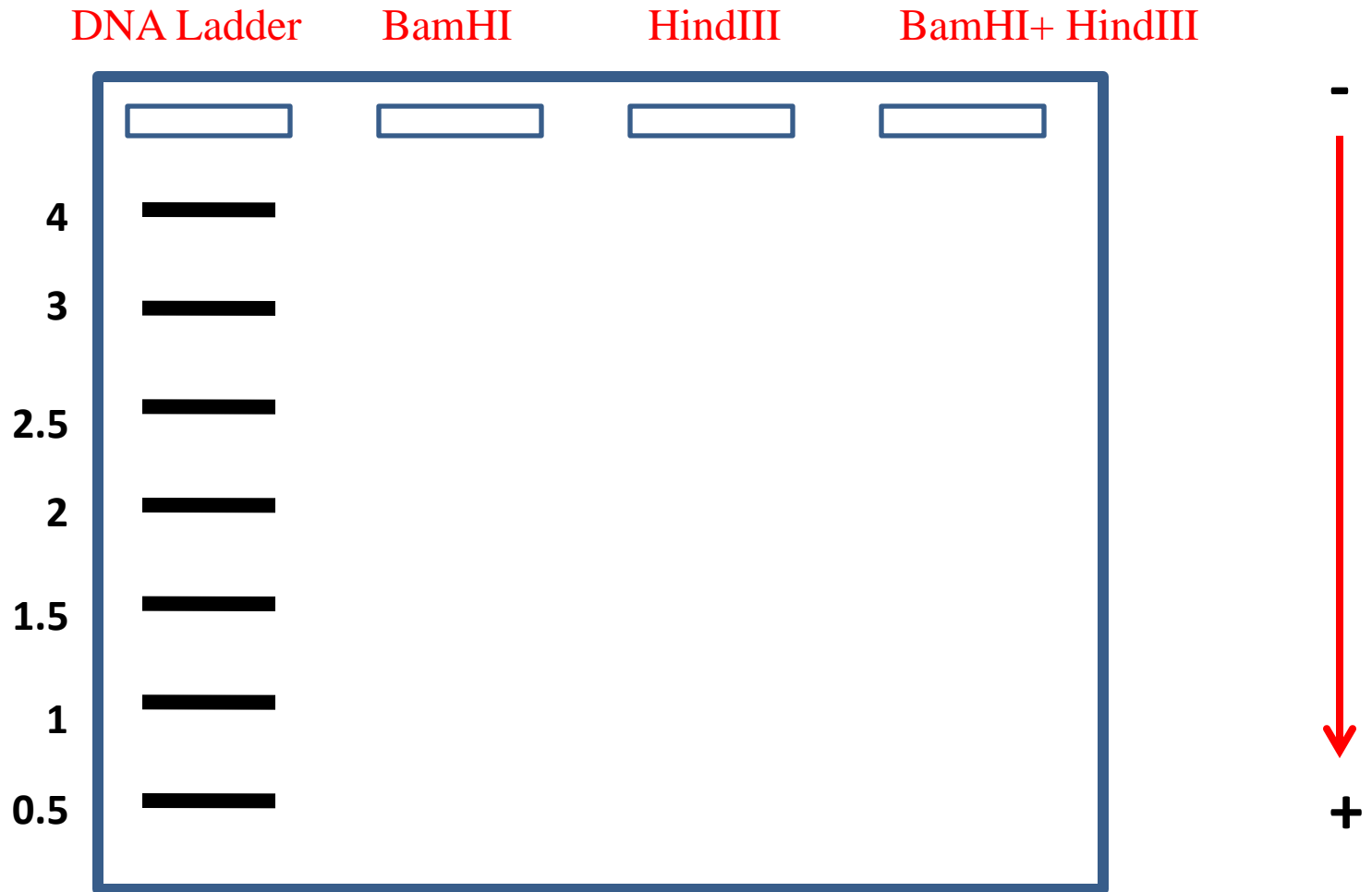
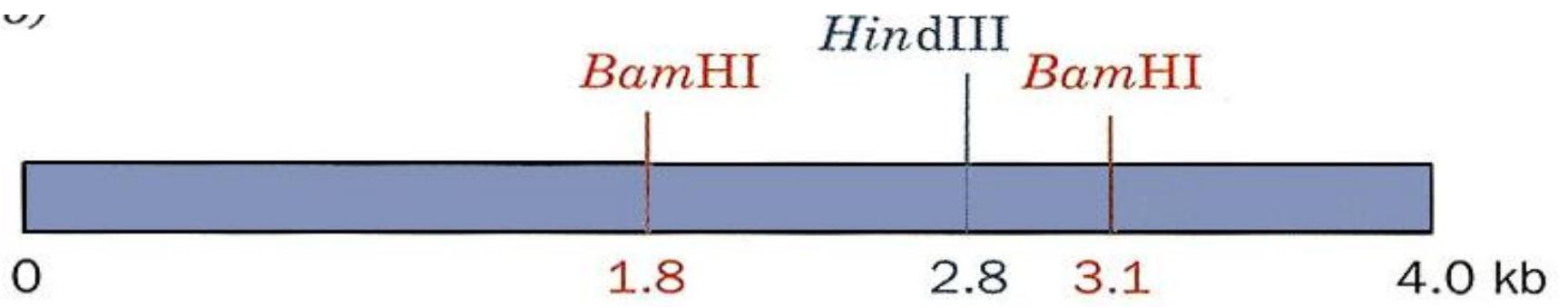
- **Blunts:** Enzymes that cut at precisely opposite sites in the two strands of DNA generate blunt ends without overhangs. **SmaI** is an example of an enzyme that generates blunt ends.



Restriction mapping

خارطة التقييد: ترتيب مواقع التقييد على تسلسل معين من DNA
الحلقي أو الخطي





Restriction fragment length polymorphism (RFLP Analysis)

التعدد الشكلي لأطوال شدف التقييد (تحليل RFLP)

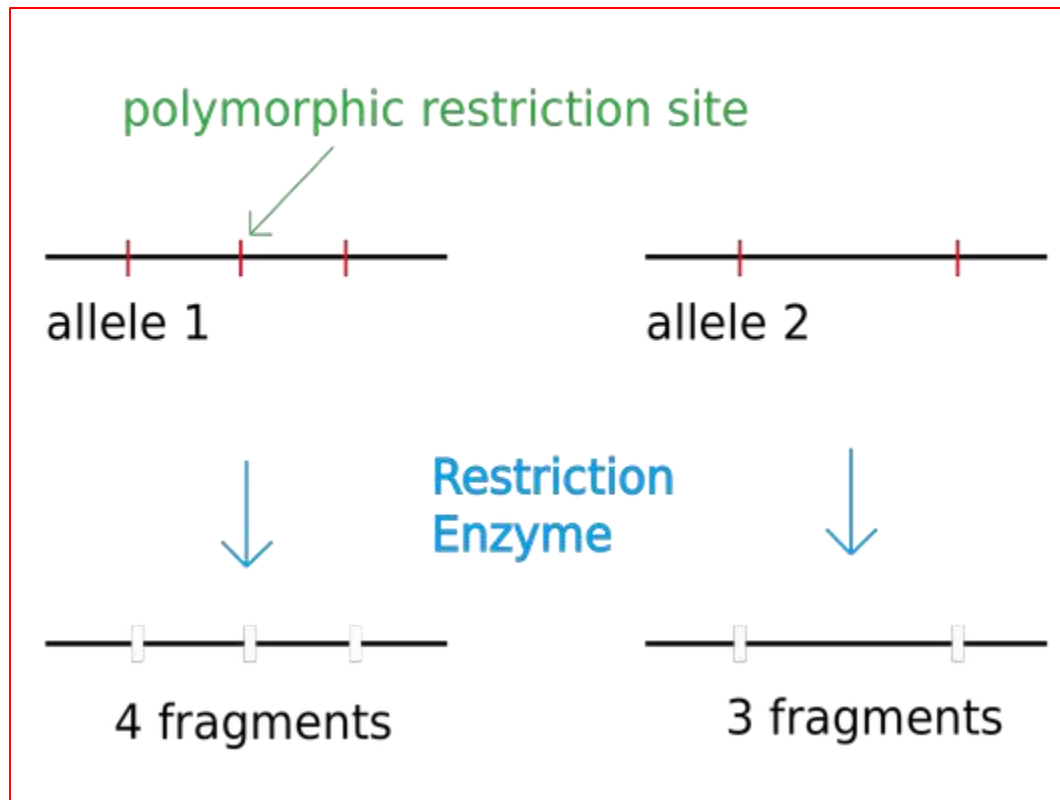
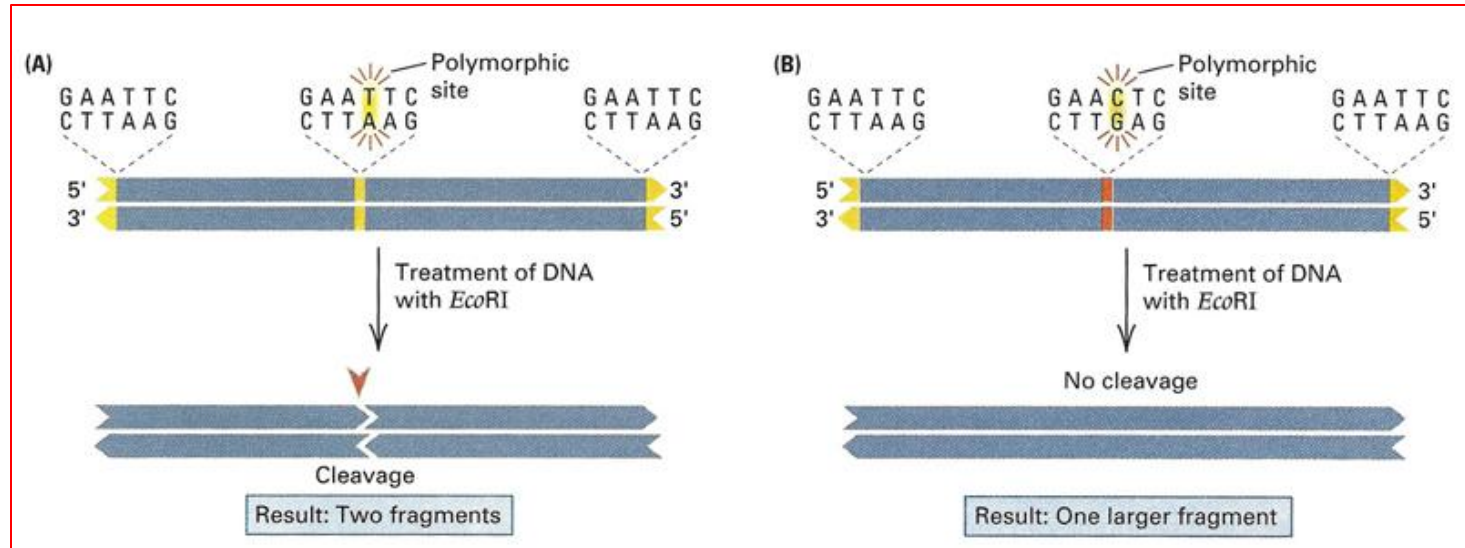
- Some genetic polymorphisms can be identified by the presence or absence of a specific restriction endonuclease recognition site: For example:

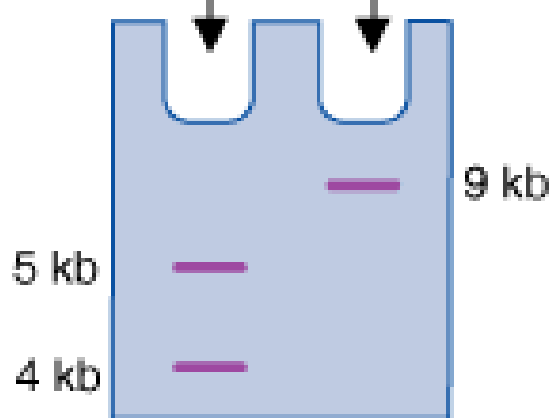
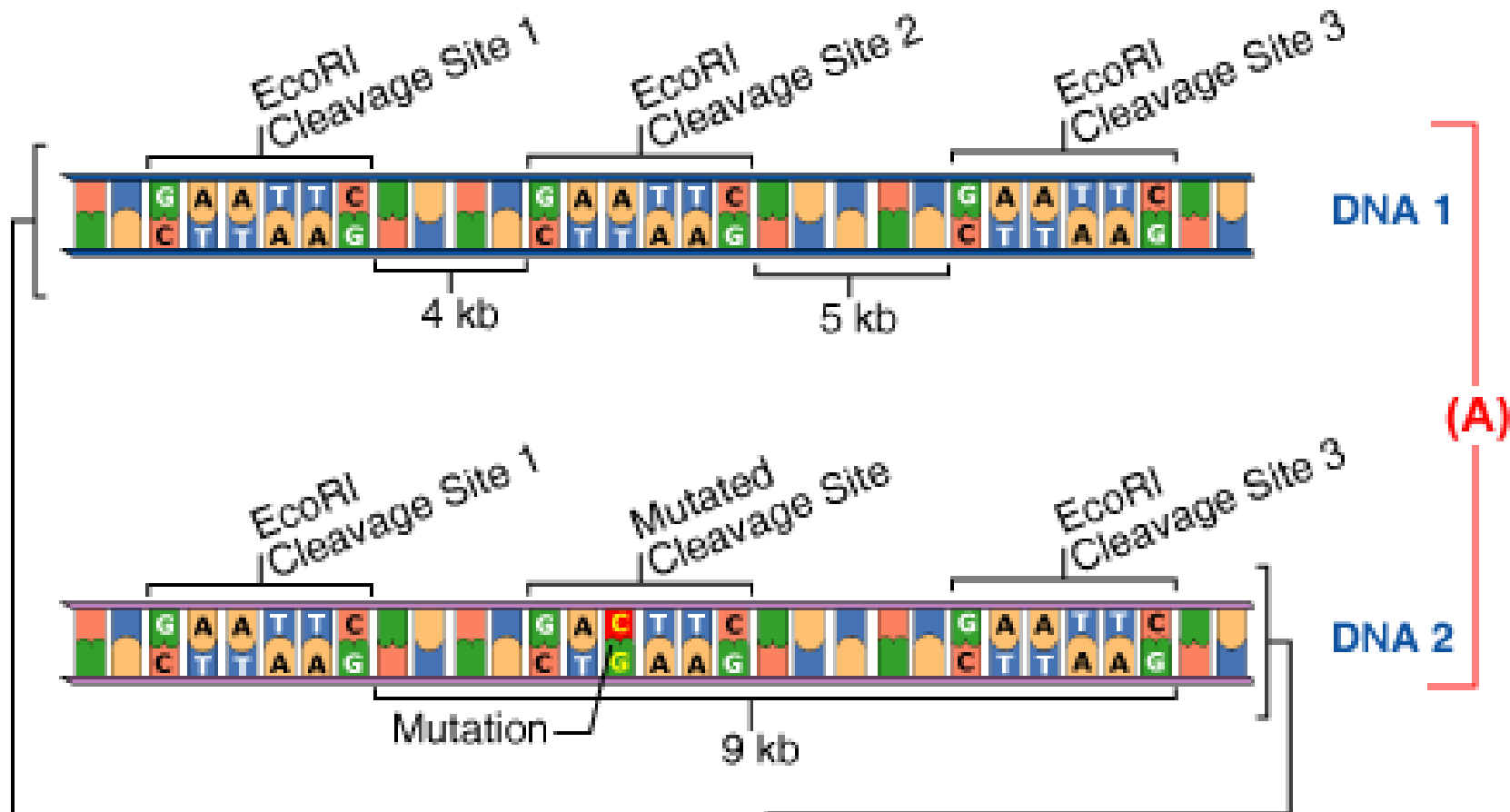
يمكن كشف بعض أنماط التعدد الشكلي الجيني (التبدلات في النكليوتيدات الطرفية النقطية) عن طريق تحديد وجود أو غياب مواقع تقييد.

GAATTC versus GATTC: مثلاً التغير:

- RFLP analysis is the detection of the change in the length of the restriction fragments as a result of these mutations.

تحليل RFLP: كشف التغيرات في أطوال شدف التقييد كنتيجة لتغيرات النكليوتيدية أي كنتيجة للطفرات النقطية.



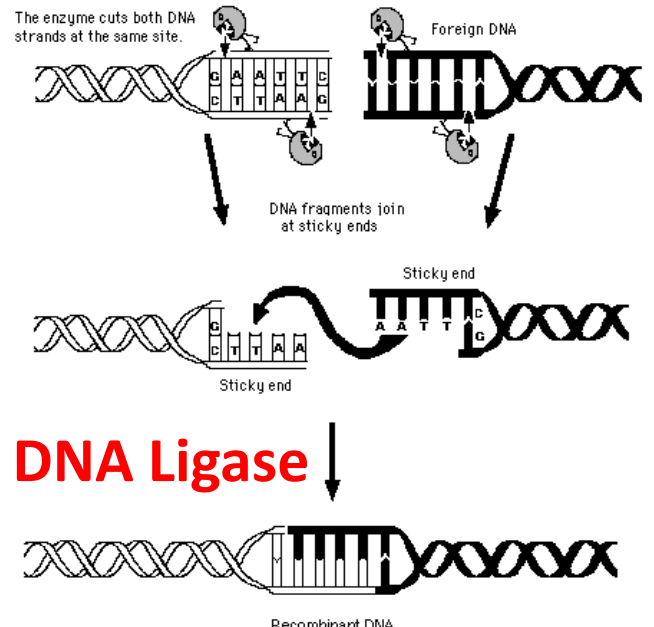
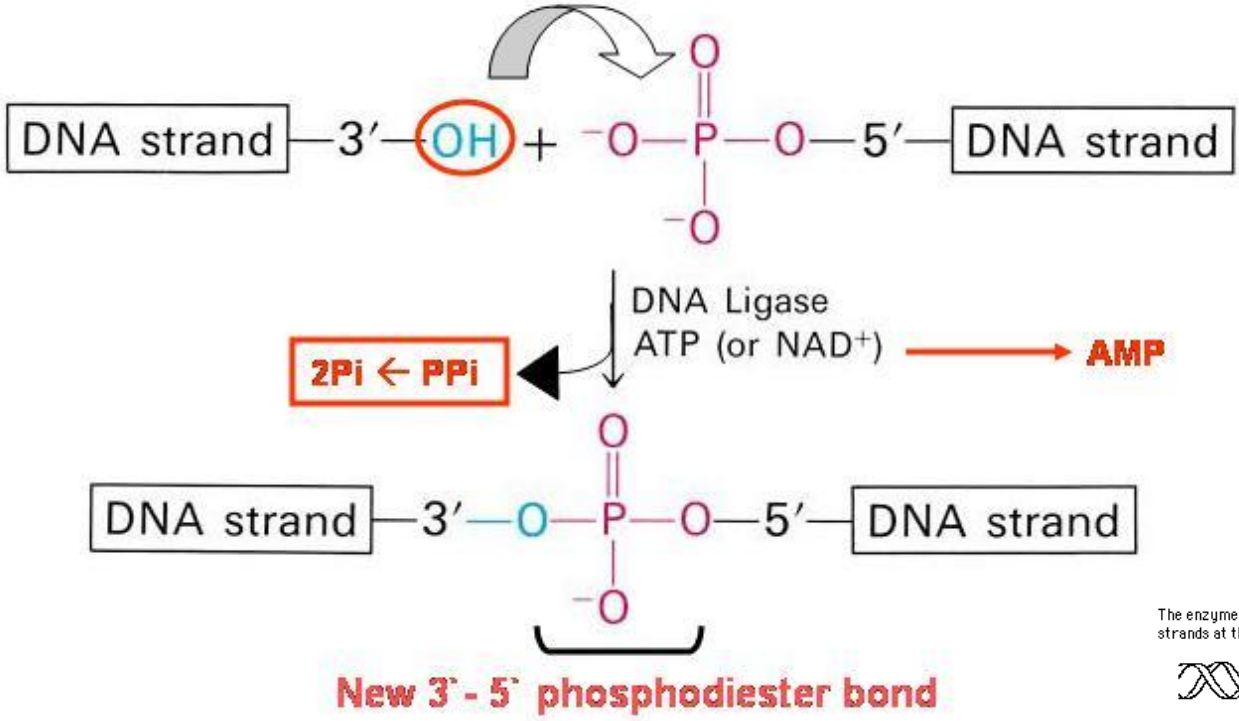


٢. أنزيمات الربط

تقوم هذه الأنزيمات بإعادة تشكيل الرابطة الفوسفورية ثنائية الاستير بين نكليوتيدين على جزيئة أو جزيئتين مختلفتين من DNA يسمى عندها الأنزيم DNA ليغاز **DNA Ligase** أو من RNA يسمى عندها الأنزيم RNA ليغاز **RNA Ligase**.

تحتاج أنماط أنزيمات الليغاز جميعها إلى مصدر طاقة كي تتمكن من إعادة تشكيل الرابطة التكافؤية بين النهايات الحرة لأطراف السلاسل البولينكلوتيدية (بين زمرة الفوسفات للسلسلة الأولى وزمرة الهيدروكسل الحرة للسلسلة الثانية). ويتم في أغلب الأحيان الحصول على هذه الطاقة من جزيئات الأدينوزين ثلاثي الفوسفات ATP.

DNA LIGASE Reaction



الأنزيمات الرابطة للحموض النووية DNA و RNA

النتاج Product	الركيزة Substrate	الفعالية Activities	الأنزيم Enzyme
جزيئات مرتبطة من RNA	RNA أحادي الشريط.	ربط جزيئات من RNA	RNA T4 ليغاز
DNA- مضاعف الشريط سليم.	DNA - مضاعف الشريط مع تكسرات على أحد الشريطتن.	تشكيل روابط فوسفورية ثنائية الاستر	DNA T4 ليغاز
- ربط شدف من DNA بروابط تكافؤية.	- شدف من DNA مع أطراف لزجة. - شدف من DNA مع أطراف عمياء.		

٣. أنزيمات البناء (البلمرة)

polymerases

DNA polymerase: DNA dependent

المنوطة بـ DNA

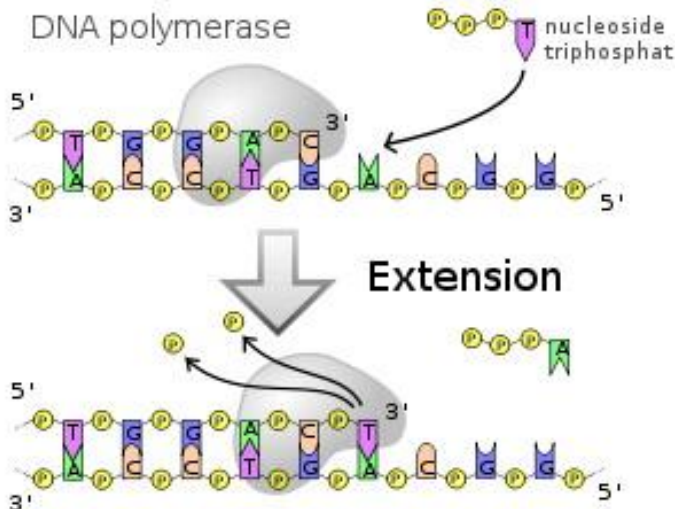
The main function of DNA polymerase is to make DNA from nucleotides.

• الوظيفة الرئيسية: اصطناع DNA بدءاً من نكليوتيدات حرة بوجود قالب

• Template من DNA أحادي الشريطة وبإدئة Primer.

• تضاعف DNA.

• مثال: DNA بوليميراز III.

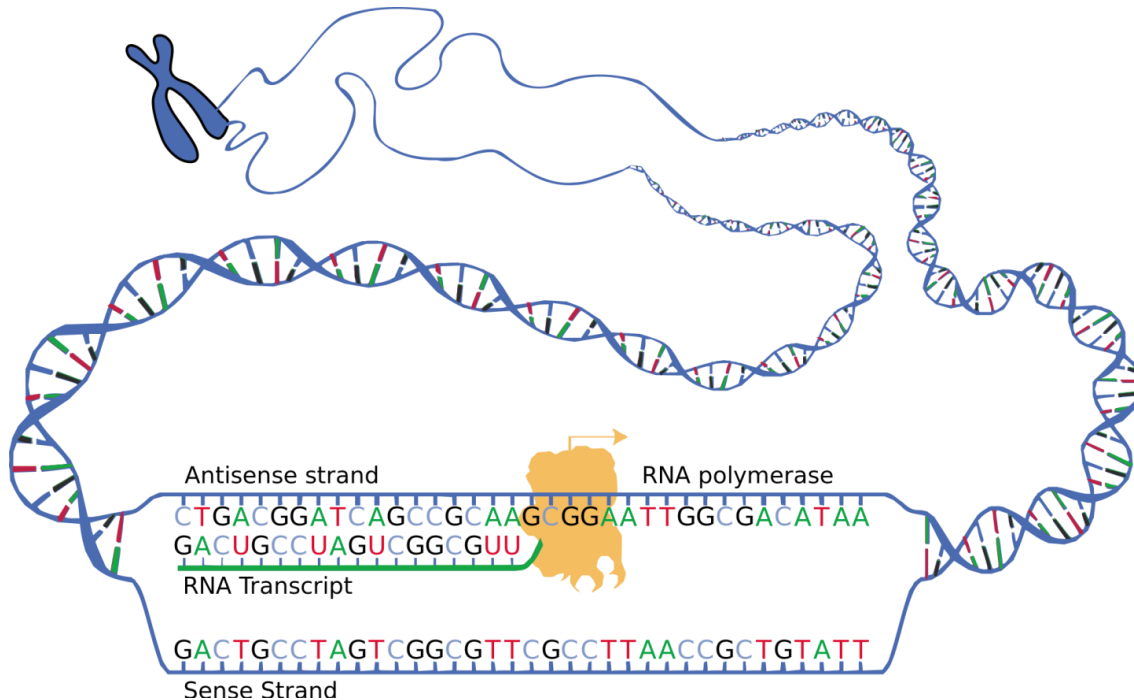


RNA polymerase: DNA dependent

المنوطة بـ DNA

is an enzyme that produces primary transcript RNA

- الوظيفة الرئيسية: اصطناع RNA بدءاً من نكليوتيدات حرة وبوجود قالب من DNA أحادي الشريطة بدون الحاجة لبادئة.
- الانتساخ.
- مثال: RNA بوليميراز I و II و III.

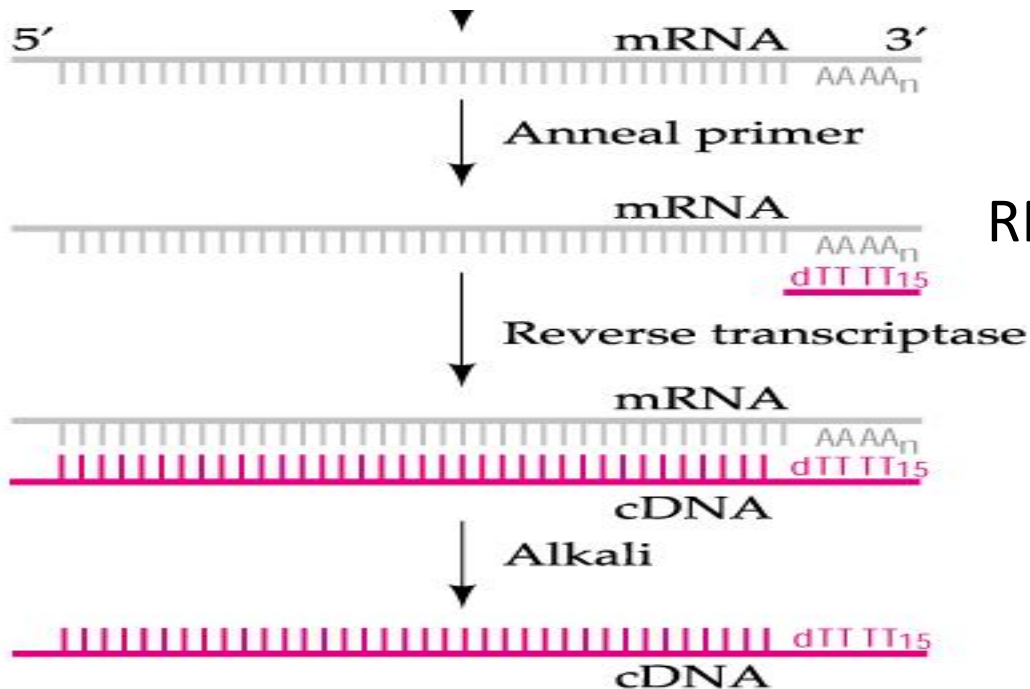


Reverse transcriptase: RNA dependent

أنزيم النسخ العكسي، منوط بـ RNA

is an enzyme used to generate **complementary DNA** (cDNA) from an RNA template, a process termed reverse transcription.

أنزيم فيروسي تستعمله الفيروسات القهقرية لاصطناع DNA متمم cDNA ابتداءً من قالب من RNA بألية تعرف بالنسخ العكسي، الأنزيم بحاجة إلى بادئة.



هو أنزيم DNA بوليميراز، منوط بـ RNA

أنزيمات البناء أو البلمرة

النتج Product	الركيزة Substrate	الفعالية Activities	الأنزيم Enzyme
DNA ثنائي السلسلة بنهايات عمياء.	DNA - ثنائي الشريط ناتئ النهاية على أحد الشرائط مع زمرة OH حرة في النهاية 3'.	3' ← 5' اكزونكلياز 3' ← 5' بوليميراز 5' ← 3' اكزونكلياز	DNA بوليميراز I
DNA- ثنائي الشريط بنهايات عمياء. DNA- أحادي الشريط.	النهايات الداخلية والخارجية الحاوية على زمر OH حرة لجزيئات DNA أحادي وثنائي الشريط.	3' ← 5' بوليميراز 5' ← 3' اكزونكلياز	DNA T4 بوليميراز
DNA- ثنائي الشريط بنهايات عمياء.	-شريط مفرد من DNA مع بادئة.	3' ← 5' بوليميراز 5' ← 3' اكزونكلياز	الشدفة Klenow
جزئ هجين DNA/RNA	جزئ أحادي الشريط من RNA	تصنيع DNA المتمم أو ما يعرف بـ cDNA	أنزيم النسخ العكسي

٤. أنزيمات التعديل

من أهم امثلتها:

الكيناز: أنزيمات تضيف زمرة الفوسفات إلى نهايات الأحماض النووية وذلك ابتداءً من جزيء يقدم هذه الزمرة (مثلًا ATP).

مثال: T4 بولينكليوتيد كيناز.

الفوسفاتاز: أنزيمات تنزع زمر الفوسفات من الأحماض النووية من النهايات 5' حيث توجد محولة النهاية إلى OH.

مثال: بيروفوسفاتاز.

كل الأنزيمات السابقة عزلت ونقيت من مصادرها الطبيعية في سبعينيات القرن الماضي ومن ثم أنتجت بتقانات DNA المؤشب، مما سمح بالحصول على كميات هائلة منها وتسويقها من قبل شركات تقانة حيوية عالمية مما جعل الهندسة الجينية في متناول الجميع.