الفصل الثالث
الأنزيمات المستعملة في الهندسة الوراثية

ا

الأنزيمات المستعملة في الهندسة الوراثية

تتطلب تقانة الهندسة الوراثية توفر العديد من الأنزيمات الضرورية لاستخدامها، للحصول على قطع من الـ DNA وعزلها، وإجراء التحويرات اللازمة بهدف دمجها مع الحمض النووي للمضيف، وكذلك بهدف إزالة الأجزاء غير الضرورية. ولهذا تعد هذه الأنزيمات من الأدوات الهامة والضرورية في الهندسة الوراثية ويعد التعرف عليها وعلى آلية عملها أمراً ضرورياً وأولياً، من أجل انطلاقة تقانة الهندسة الوراثية مع الأخذ بالحسبان أن مصدر هذه الأنزيمات هو الكائنات الحية المختلفة، **وقد قسمت هذه الأنزيمات إلى:**

- أنزيمات هدم الأحماض النووية Nucleases
- أنزيمات اللحام Ligases
- أنزيمات البلمرة Polymerases
- أنزيمات التحوير Modifying enzymes
- أنزيمات فك الحلزنة Topoisomirases

أنزيمات هدم الأحماض النووية Nucleases

تستهدف هذه الأنزيمات بالقطع وهدم الروابط الفوسفاتية ثنائية الأستر التي تربط النيكلوتيدات ببعضها، والتي تعطي البنية الأولية للأحماض النووية في الـ DNA و الـ RNA، تعمل هذه الأنزيمات بشكل معاكس لأنزيمات البلمرة التي تعمل على تشكيل الروابط الفوسفاتية ثنائية الأستر بين النيكلوتيدات،

ويمكننا من حيث المبدأ تقسيم هذه الأنزيمات إلى:

- أنزيمات القطع الداخلي Endonucleases وهي التي تمارس القطع داخل السلسلة، مؤدية إلى تقطيع الجزيء إلى قطع أصغر.
- أنزيمات القطع الخارجي Exonucleases وهي التي تهاجم سلاسل الـ DNAوالـ RNA من أطرافها مؤدية إلى تحرير نيكلوتيدات أحادية أو ثنائية أو ثلاثية وأحيانا أكثر من ذلك.

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

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

يوجد نمطان من هذه الأنزيمات وذلك بحسب نوعية الركيزة Substrate:

- الأول، يقطع الرابطة الفوسفورية ثنائية الاستر لـDNA، تعرف هذه الأنزيمات بـ**DNase**.
- الثاني، يقطع الرابطة الفوسفورية ثنائية الاستر لـRNA، تعرف هذه الأنزيمات بـ**RNase**.

أنزيمات القطع الخارجي DNA ase : EXONUCLEASES

تقوم هذه الأنزيمات كما أسلفنا بتحطيم الروابط الفوسفاتية ثنائية الأستر في الـ DNA، وقد تم عزل وتمييز ثلاثة أنماط منها في العصية القولونية E. colie (I-II-III) من النمط خارجي الهدم.

يقوم الأنزيم الأول بتحطيم الروابط الاستيرية للسلاسل المفردة للـ DNA والـ RNA مما يؤدي إلى تحرير وحدات ثلاثية النيكلوتيد من النهاية ′3 أما النمط الثاني فهو يقوم بمهاجمة السلاسل المزدوجة من حمض الـ DNA في النهاية ′3

وقد وجدت أنماط أخرى من أنزيمات القطع الخارجي القادرة على قطع وحدات لايتجاوزطولها أربعة نيكلوتيدات تقطع من النهاية 5

أما الأنزيم DNAase المستخلص من الطحال والتيموس لبعض الحيوانات، فيقوم بإنتاج قطع يبلغ طولها مالا يزيد عن ٦ نيكلوتيدات ويعمل أيضاً في النهاية ′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.

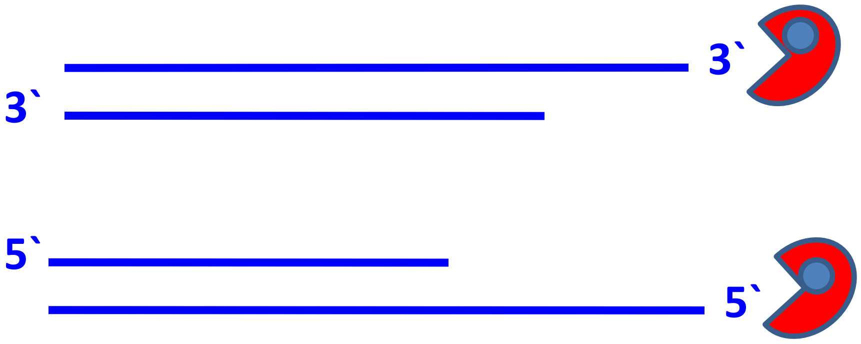
•النكلياز التي تهاجم DNA ثنائي الشريط من نهاياته الفوسفاتية مثال lambda exonuclease.

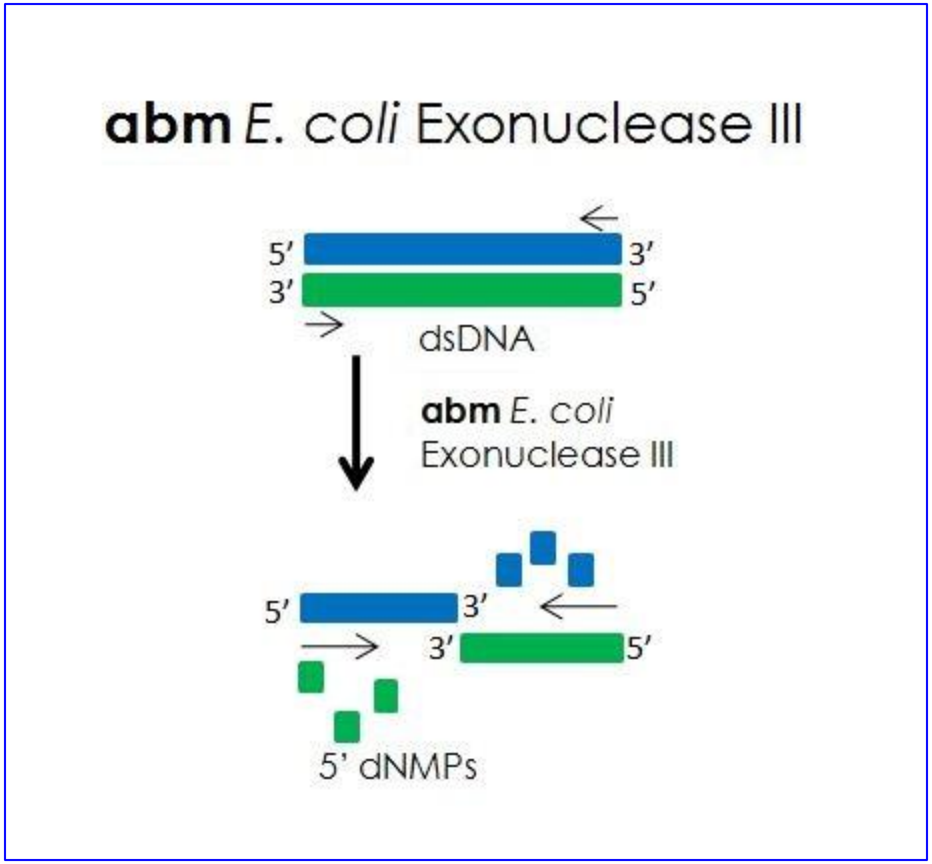
•النكلياز التي تهاجم DNA ثنائي الشريط من نهاية `3 مثال أكزونكلياز III.

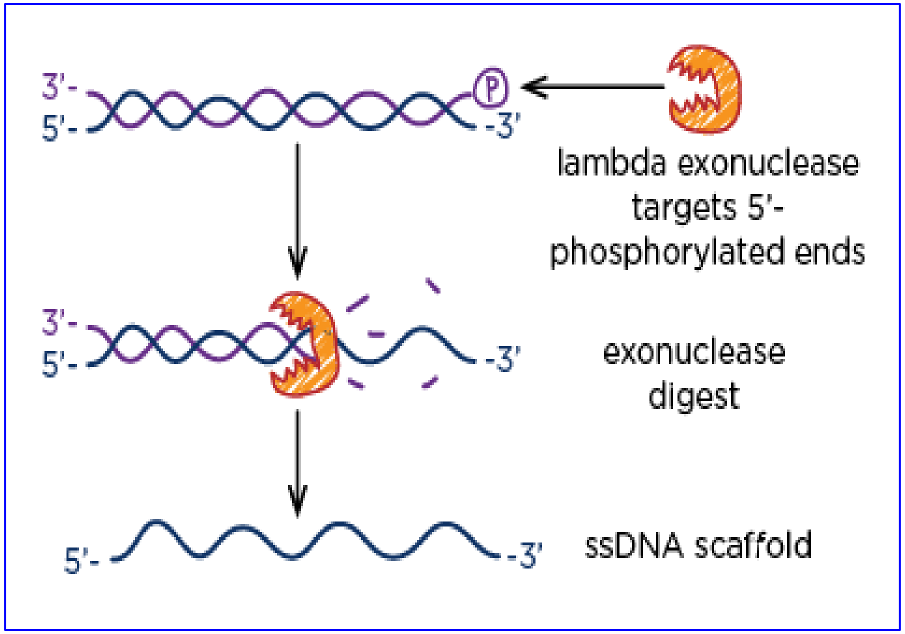
•النكلياز التي تهاجم النهايات الناتئة للشريطة الثنائية ولها نوعين:

النكلياز الخارجية `3

النكلياز الخارجية `5




abm E. coli Exonuclease III
5′
3′
3′
5′
dsDNA
abm E. coli
Exonuclease III
5′
3′
3′
5′
5′ dNMPs


3′-
5′-
P
-3′
lambda exonuclease targets 5′-phosphorylated ends
3′-
5′-
-3′
exonuclease digest
5′-
-3′
ssDNA scaffold

.

.

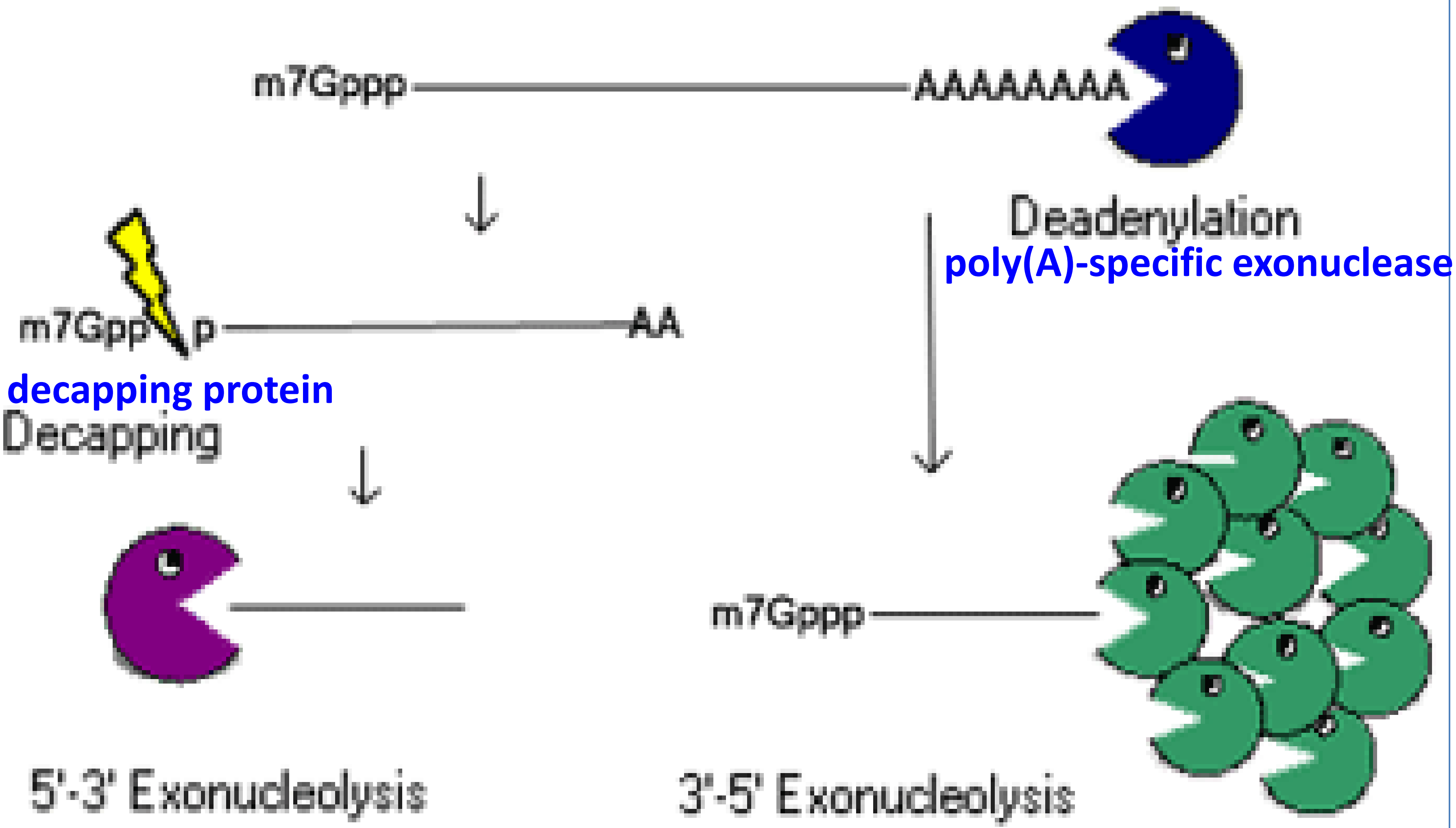
- تضم مجموعة، النكلياز الهاضمة للـRNA من أطرافه الانماط:

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

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

تزال القبعة عادة بوساطة بروتين مزيل للقبعة decapping protein، بينما يزال الذيل بوساطة أنزيم من نمط نكلياز خارجية خاص بالذيل poly(A)-specific exonuclease.

النكلياز الخارجية الهاضمة لـ RNA



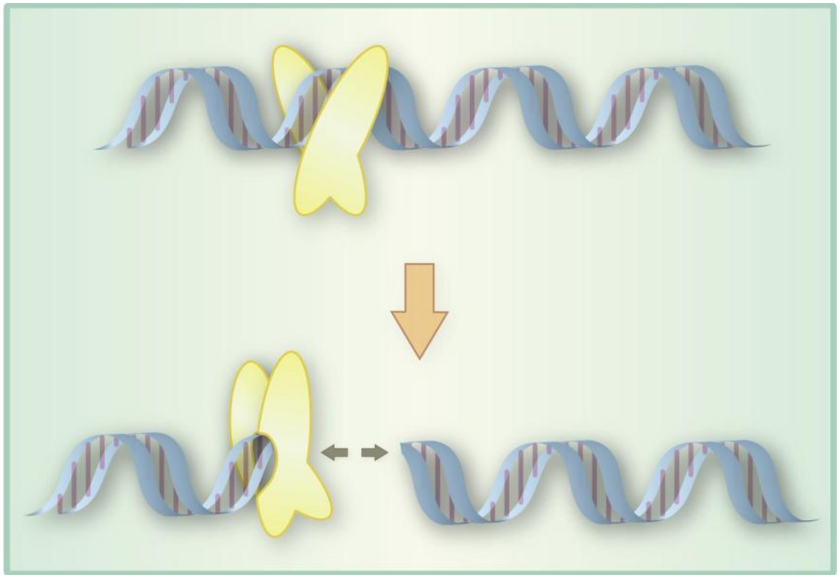
يكون تحطيم RNA بالاتجاه `5→`3

يكون تحطيم RNA بالاتجاه `3→`5

أنزيمات القطع الداخلي ENDONUCLEASES

وهي أنزيمات كبيرة الأهمية بالنسبة إلى تقانة الهندسة الوراثية، ومن أهم أنماطه مايُطلق عليها أيضاً أنزيمات التقيد أو أنزيمات التحديد.

هي أنزيمات النكلياز التي تهاجم الحموض النووية فتقطع الروابط ضمن سلاسلها وينتج عن عملها شدف 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.

أنزيمات القطع الداخلية Endonucleases			
الأنزيم Enzyme	الفعالية Activities	الركيزة Substrate	الناتج Product
S1 نكلياز	نكلياز داخلية خاصة بالجزيئات مفردة الشريط.	DNA أو RNA أحادي الشريط.	نكليوتيدات أحادية حرة.
RNAse H	نكلياز داخلية غير نوعية.	هجين DNA/RNA.	عديدات نكليوتيدات.
RNAse III	نكلياز داخلية غير نوعية.	RNA ثنائي الشريط.	عديدات نكليوتيدات من ١٥ وحدة على الأكثر.

Restriction Enzymes أنزيمات التقييد

Restriction endonucleases

أنزيمات نكلياز داخلية توجد في كثير من السلالات البكتيرية بشكلٍ طبيعي إذ تستخدمها الجراثيم للدفاع عن نفسها من أي DNA غريب يمكن أن يدخل إليها من الوسط المحيط فتقوم هذه الأنزيمات بتقطيعه والتخلص منه.تلعب دور مناعي عند الجرثيم وهو من العوامل التي النوعيه فروس جرثوم .

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

يتألف بموقع التقييد غالباً من أربعة أو ستة أو ثمانة نكليوتيدات.

يوجد ثلاث مجموعات (صفوف) من الأندونكلياز المقيدة restriction endonucleases أو أنزيمات التقييد او التحديد

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 التقييد، على الشريطتين

تقطع ضمن موقع التقييد، على الشريطتين

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

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

Enzyme	Recognition Sequence*
*Alu*I	A G ↓ C T
*Bam*HI	G ↓ G A T C C
*Bgl*II	A ↓ G A T C T
*Cla*I	A T ↓ C G A T
*Eco*RI	G ↓ A A T T C
*Hae*III	G G ↓ C C
*Hind*II	G T Py ↓ Pu A C
*Hind*III	A ↓ A G C T T
*Hpa*II	C ↓ C G G
*Kpn*I	G G T A C ↓ C
*Mbo*I	↓ G A T C
*Pst*I	C T G C A ↓ G
*Pvu*I	C G A T ↓ C G
*Sal*I	G ↓ T C G A C
*Sma*I	C C C ↓ G G G
*Xma*I	C ↓ C C G G G
*Not*I	G C ↓ G G C C G C

*Only one DNA strand, written 5′ → 3′ left to right is presented, but restriction endonucleases actually cut double-stranded DNA as illustrated in the text for *Eco*RI. The cutting site for each enzyme is represented by an arrow.

أنزيمات الصف الثاني class II restriction endonucleases تقطع ضمن التسلسل.

5′ G A A T T C 3′
3′ C T T A A G 5′

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

تمتاز أنزيمات التقييد بالنوعية العالية لتسلسل موقع التقييد.

تغير نكليوتيد واحد في موقع التقييد يلغي كل الفعالية الأنزيمية للأنزيم

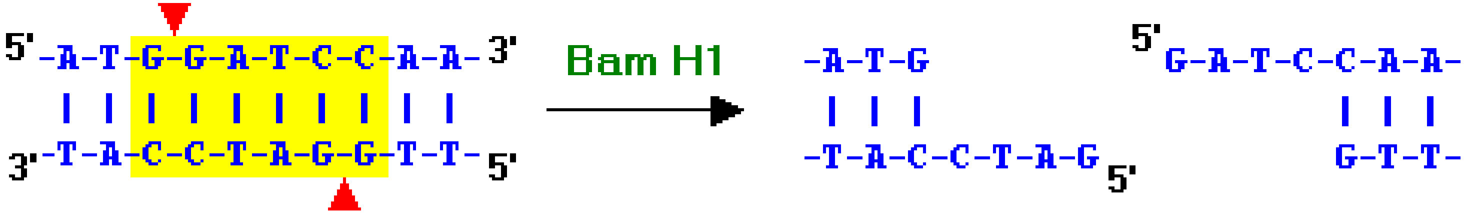
ينتج عادة عن عمل هذه الأنزيمات شدف من DNA تختلف نهاياتها باختلاف نوع الأنزيم:

- **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.

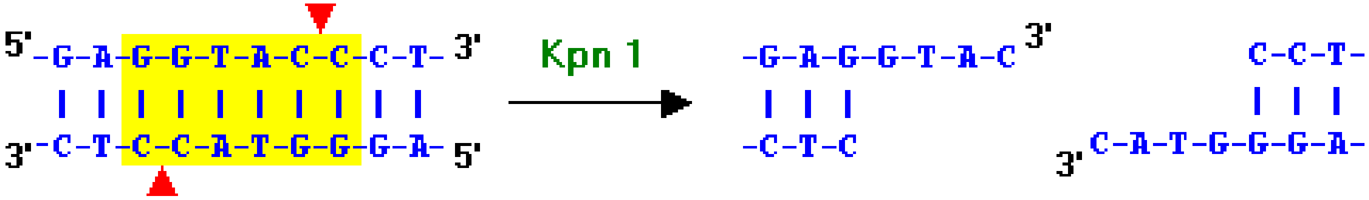
- **نهايات حرة مستوية Sharps** عندما يقطع الأنزيم في وسط موقع التقييد، تعرف هذه النهايات بالعمياء Blunts إذ ينخفض مردود تفاعل الربط عند استخدام شدف نهاياتها عمياء.

Patterns of DNA Cutting by Restriction Enzymes

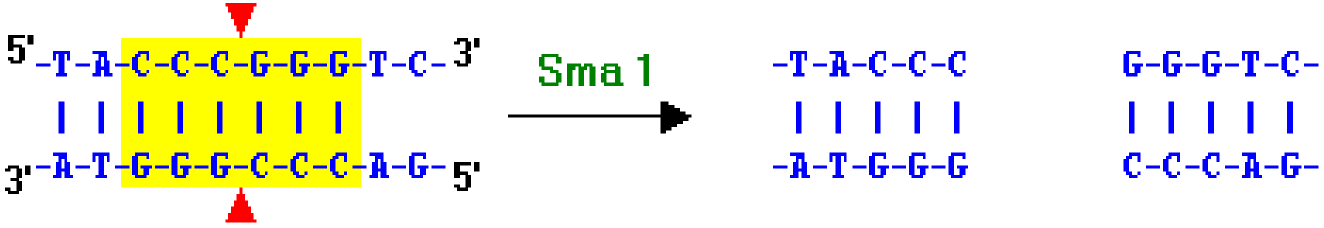
- **5' overhangs:** The enzyme cuts asymmetrically within the recognition site such that a short single-stranded segment extends from the 5' ends. BamHI cuts in this manner.



- **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.



جـ - خرائط مواقع أنزيمات التحديد لجزيئات الـ DNA:

أثبتت الدراسات أن احتمال تكرار موقع تحديد ما على علاقة مع عدد النيكلوتيدات المؤلفة للموقع، فكلما كان عدد النيكلوتيدات أكبر كان احتمال تكراره أقل، وهذا يتوافق مع قوانين الاحتمال.

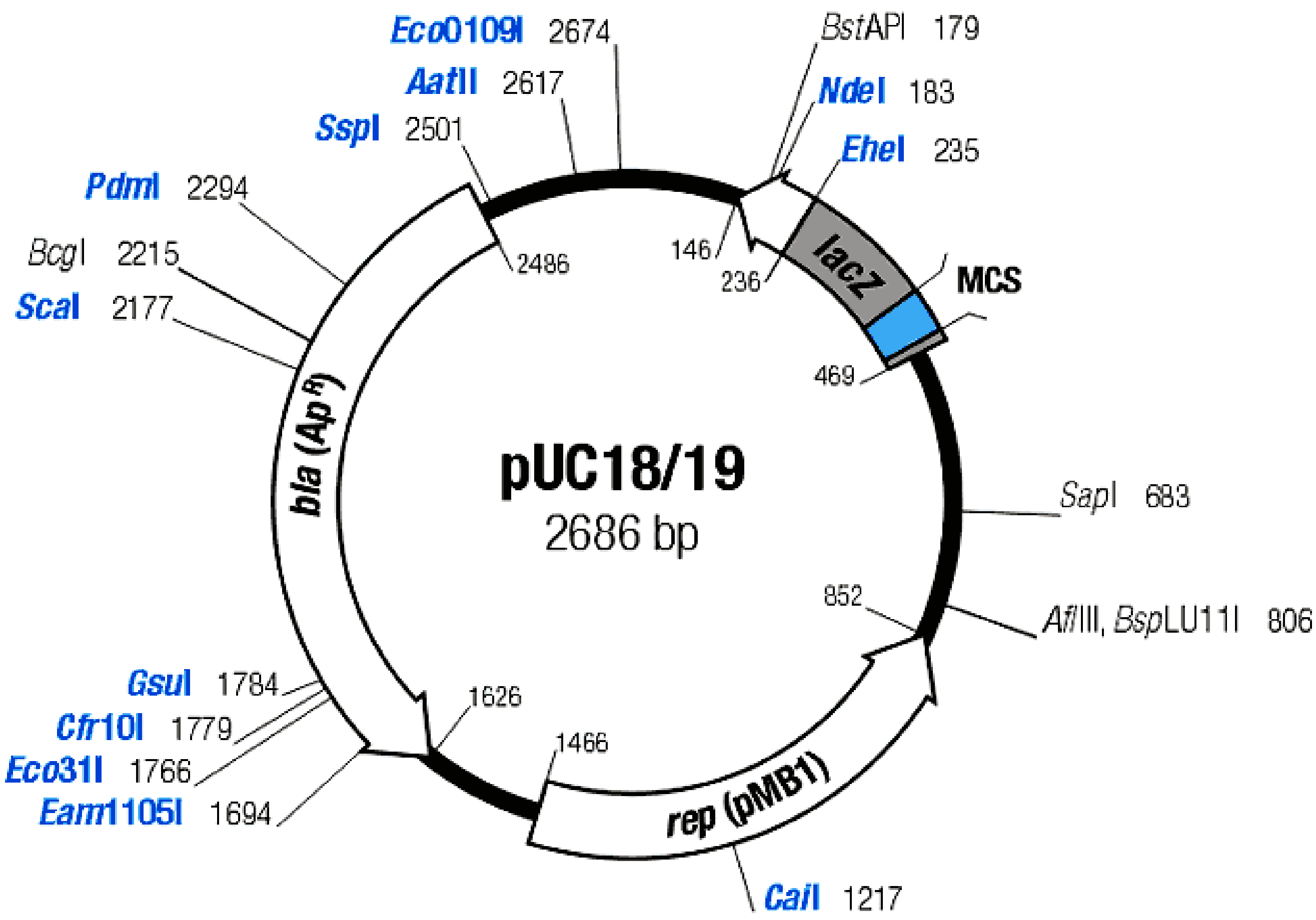
تعد الخرائط التي تحدد مواقع عمل أنزيمات التحديد لجزيء الـ DNA من الأمور الهامة، حيث يؤدي كل أنزيم تحديد إلى إعطاء عدد محدد ومعروف من قطع الـ DNA لكل نوع، ويمكن لعدد هذه القطع أن يتغير في حال حصول طفرة في أحد المواقع الخاصة بأنزيم معين. يمكن لهذه الطفرة أن تؤدي إلى اختفاء أحد هذه المواقع، وقد تؤدي إلى ظهور موقع جديد، وتسهل معرفة مواقع عمل أنزيمات التحديد في التعرف على مواقع الجينات، وكذلك في اختيار الأنزيمات المناسبة لعملية العزل للجينات وهندستها.

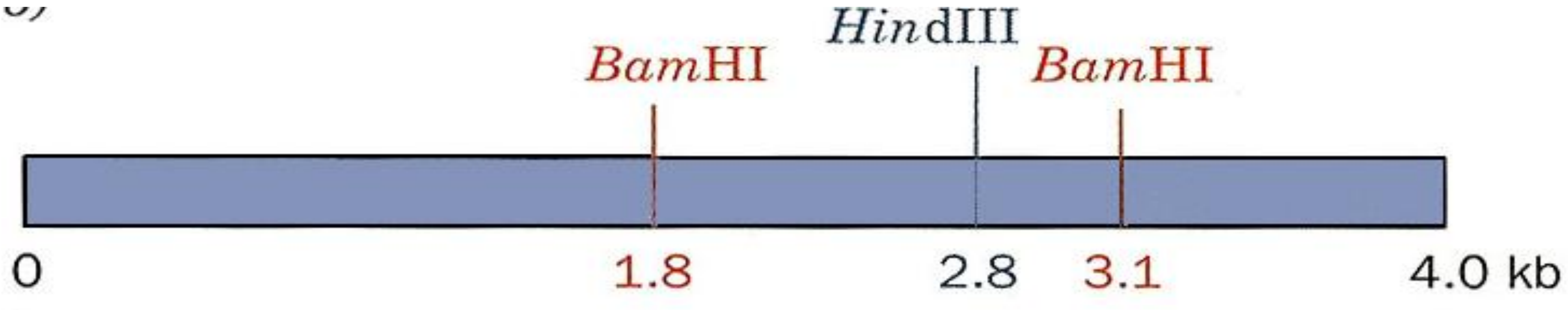
ويمثل الرحلان الكهربائي Electrophoreses على الهلام طريقة مناسبة لتحديد الأوزان الجزيئية والأحجام للجزيئات الناتجة من عملية معاملة الـ DNA بأنزيمات القطع التحديدية، وكذلك وسيلة لعزل وتنقية هذه القطع.

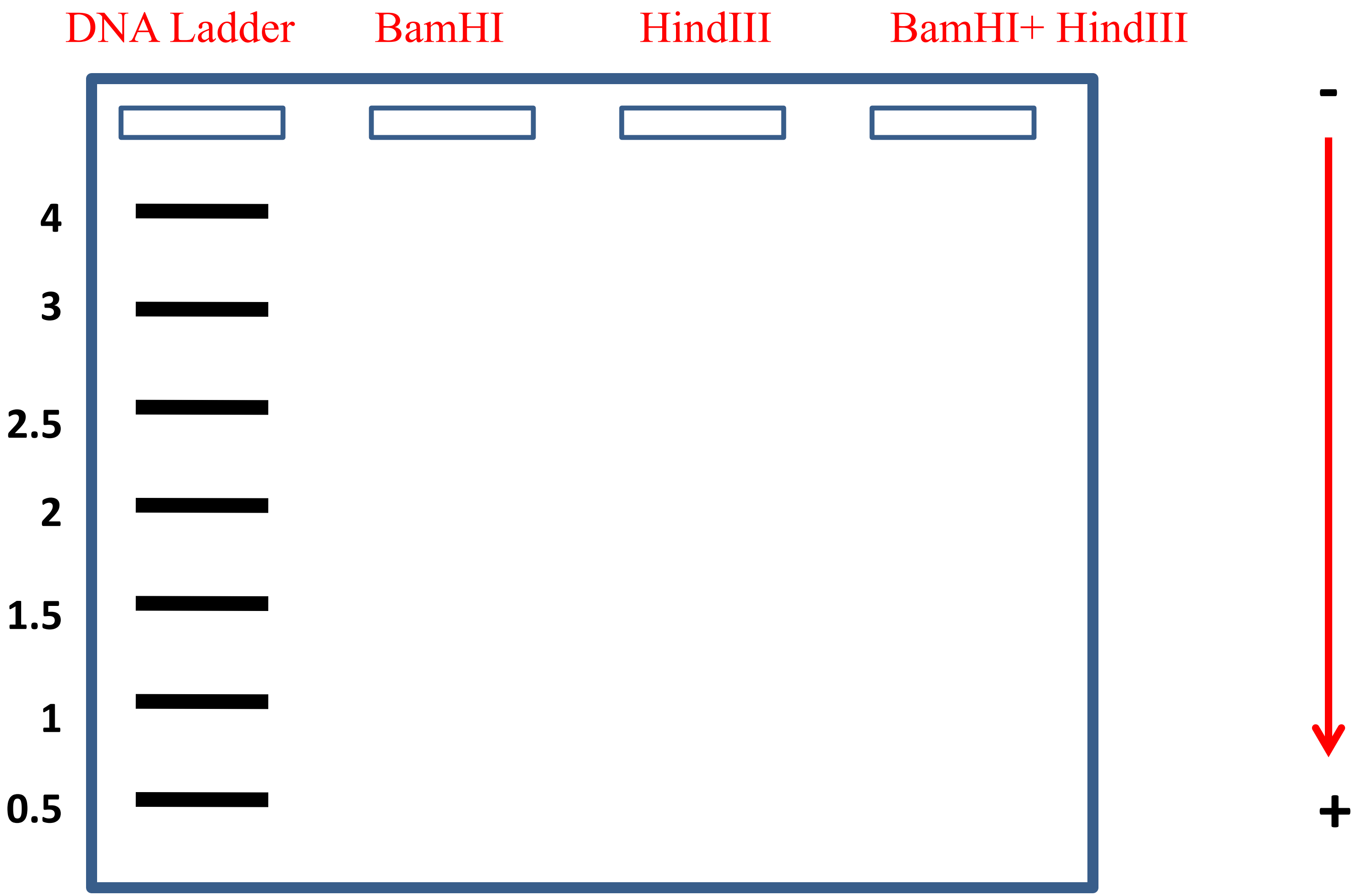
ويتطلب وضع مثل هذه الخريطة إجراء سلسلة من التفاعلات الأنزيمية المنفردة، ومعرفة حجم قطع الـ DNA الناتجة منها باستعمال الرحلان الكهربائي ومقارنتها مع نماذج معروفة الحجم.

ويتم بعد إجراء التفاعلات الأنزيمية المزدوجة، والتي يشترك فيها أنزيمان في كل مرة، والذي يتم في أنبوب واحد، مقارنة نتائج التفاعلات المزدوجة مع نتائج التفاعلات المنفردة، مما يمكننا أن نضع الخريطة الأنزيمية لمواقع التحديد لهذين الأنزيمين، وبتطوير هذه التجارب يمكننا أن نضع الخريطة الكاملة لكل أنزيمات التحديد شائعة الاستعمال.

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




BamHI
HindIII
BamHI
0
1.8
2.8
3.1
4.0 kb


DNA Ladder
BamHI
HindIII
BamHI+ HindIII
4
3
2.5
2
1.5
1
0.5
-
+

Restriction fragment length polymorphism (RFLP **Analysis**)
التعدد الشكلي لأطوال شدف التقييد (تحليل RFLP)

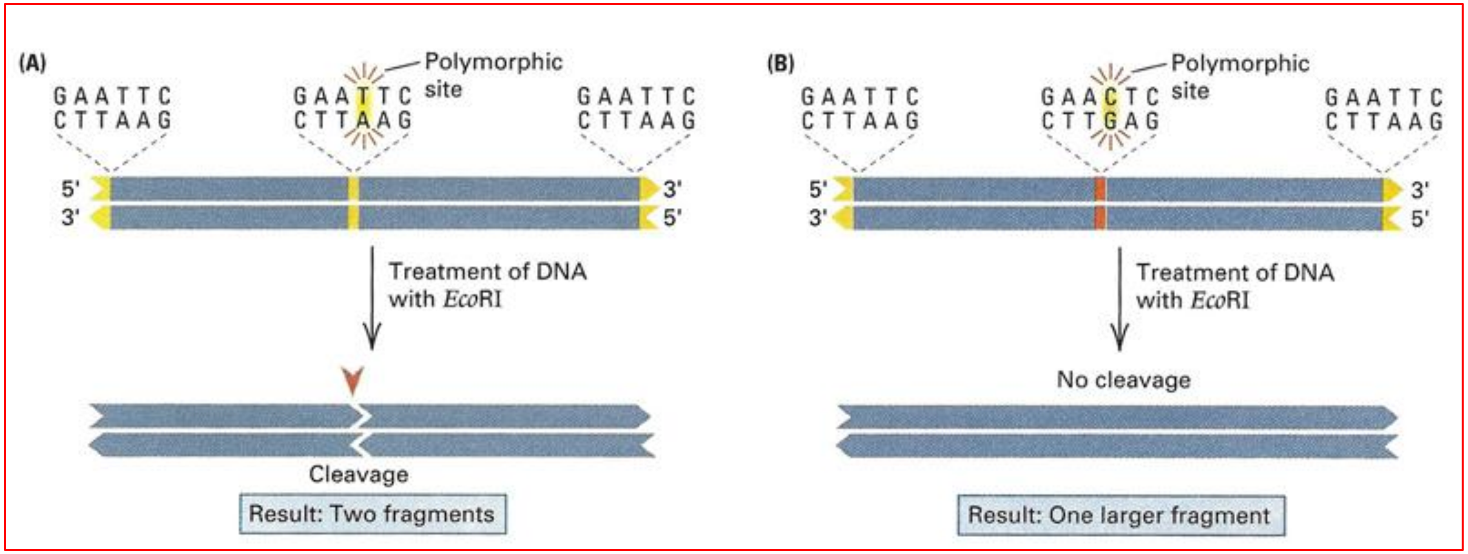
• Some genetic polymorphisms can be identified by the presence or absence of a specific restriction endonuclease recognition site: For example:

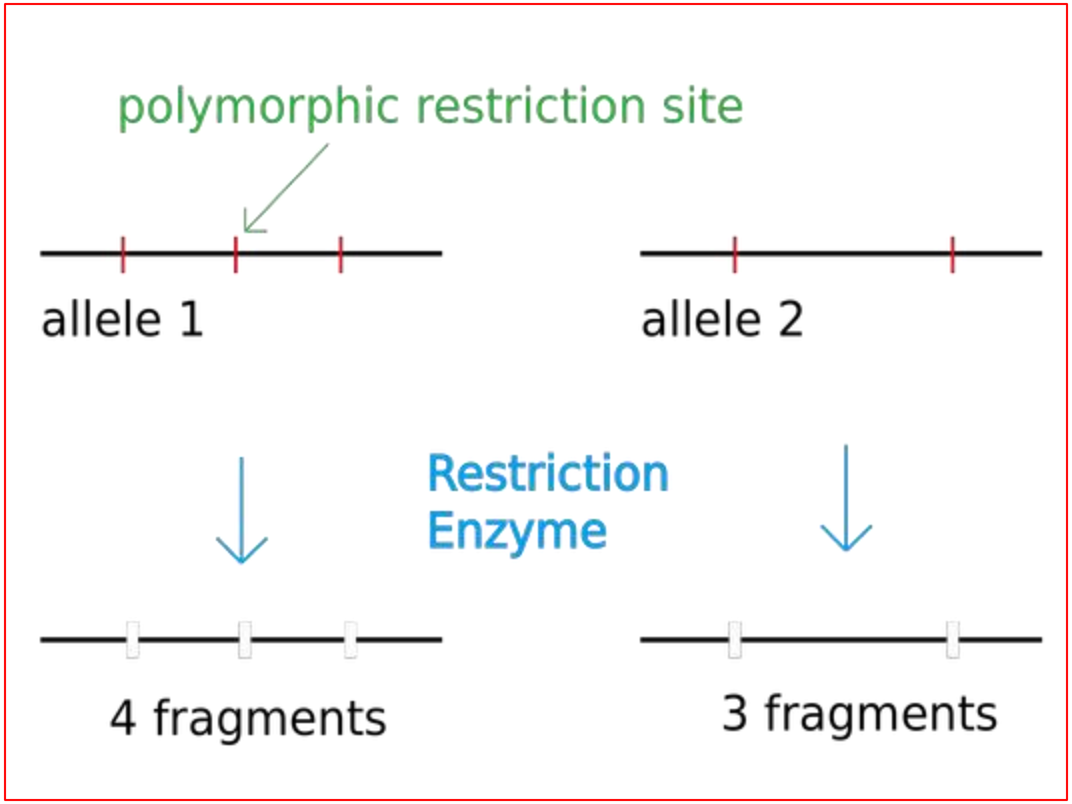
يمكن كشف بعض أنماط التعدد الشكلي الجيني (التبدلات في النكليوتيدات = الطفرات النقطية) عن طريق تحديد وجود أو غياب مواقع تقييد.

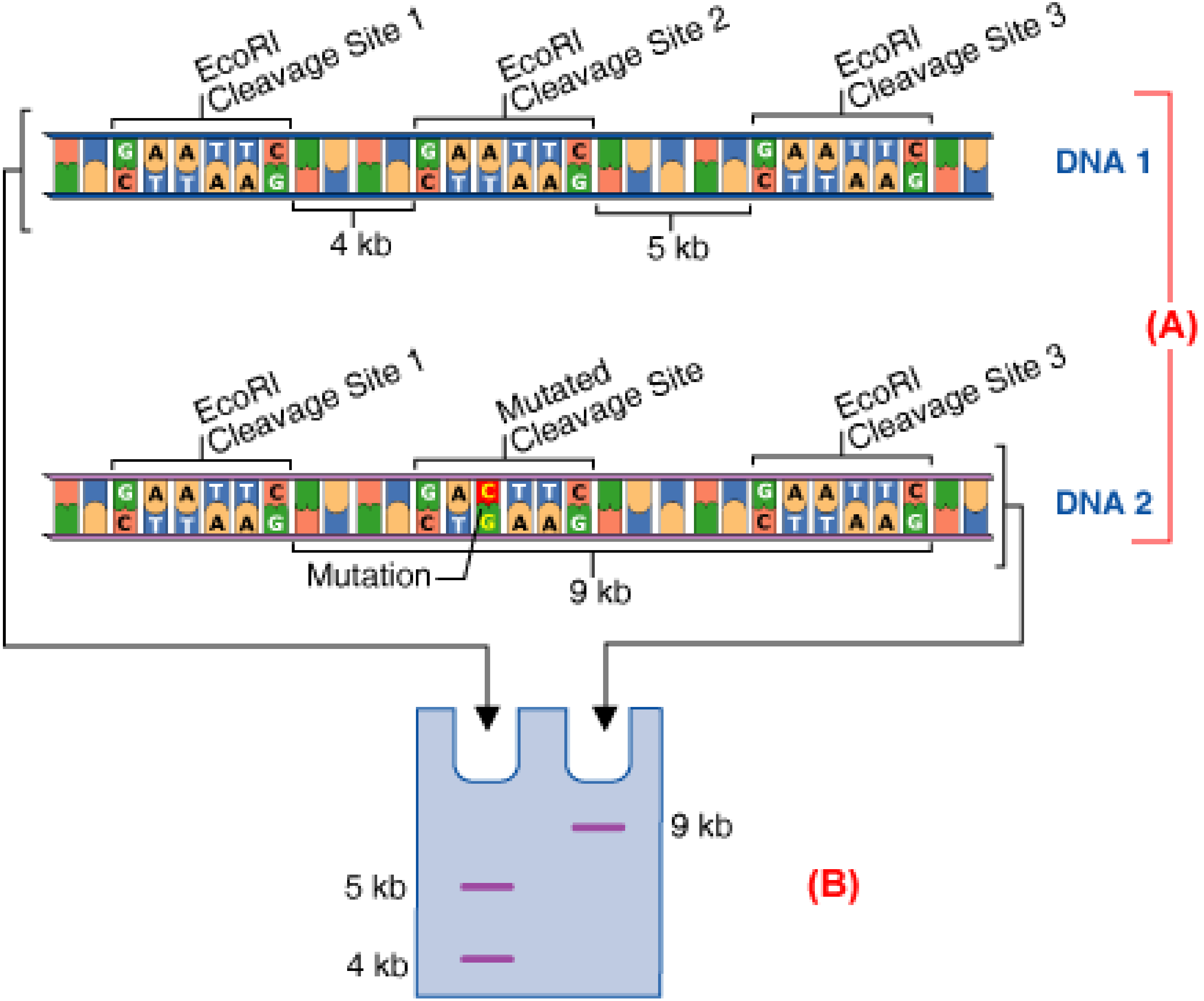
GAATTC versus GATTTC مثلاً التغير:

• 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.


(A)
GAATTC
CTTAAG
GAATTC
CTTAAG
Polymorphic site
GAATTC
CTTAAG
5'
3'
3'
5'
Treatment of DNA with EcoRI
Cleavage
Result: Two fragments
(B)
GAATTC
CTTAAG
GAACTC
CTTGAG
Polymorphic site
GAATTC
CTTAAG
5'
3'
3'
5'
Treatment of DNA with EcoRI
No cleavage
Result: One larger fragment


polymorphic restriction site
allele 1
allele 2
Restriction Enzyme
4 fragments
3 fragments



EcoRI Cleavage Site 1
EcoRI Cleavage Site 2
EcoRI Cleavage Site 3
DNA 1
4 kb
5 kb
(A)
EcoRI Cleavage Site 1
Mutated Cleavage Site
EcoRI Cleavage Site 3
DNA 2
Mutation
9 kb
9 kb
5 kb
4 kb
(B)

أنزيمات فك الحلزنة Topoisomirase:

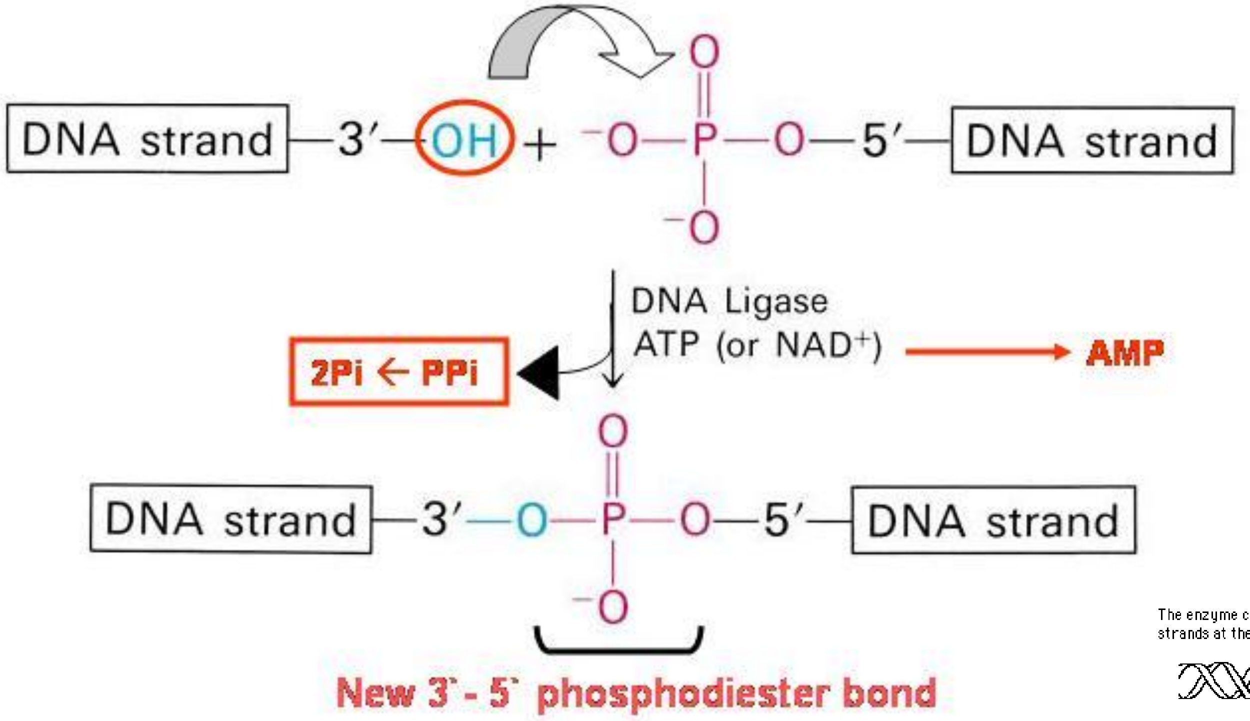
تعمل هذه الأنزيمات على فك الالتفاف في الجزيء المضاعف للـ DNA، وعملية فك الحلزنة أو الالتفاف ضرورية من أجل إنجاز عملية التضاعف والنسخ، وقد تم الكشف عن نوعين من هذه الأنزيمات I وII، تقوم هذه الأنزيمات بفك الحلزنة عن طريق كسر الروابط سكر فوسفات، وبالتالي التحرك بعكس اتجاه الانفتال وعند الانتهاء من هذا الأمر يقوم أنزيم آخر يدعى الجيراز Gyrase بلحام نهايات الشريط مرة أخرى، وتتم عمليات اللحام في المواقع نفسها التي تم فيها الكسر.

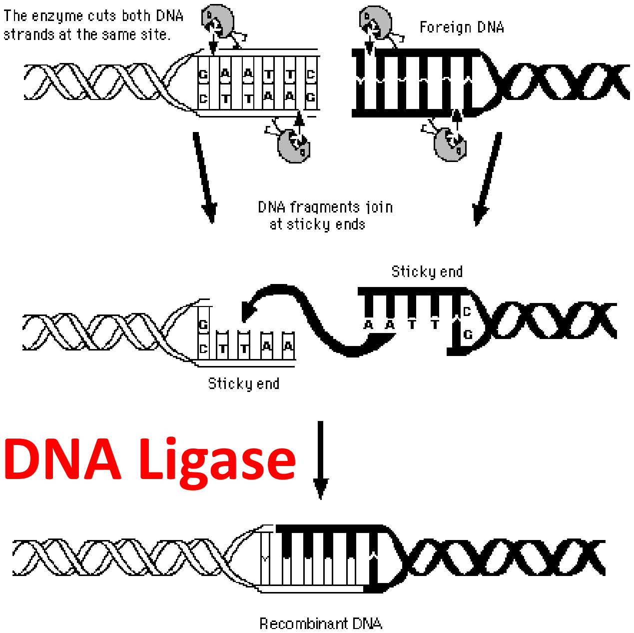
٢. أنزيمات الربط

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 الادينوزين ثلاثي الفوسفات ATP.

DNA LIGASE Reaction





الأنزيمات الرابطة للحموض النووية DNA و RNA

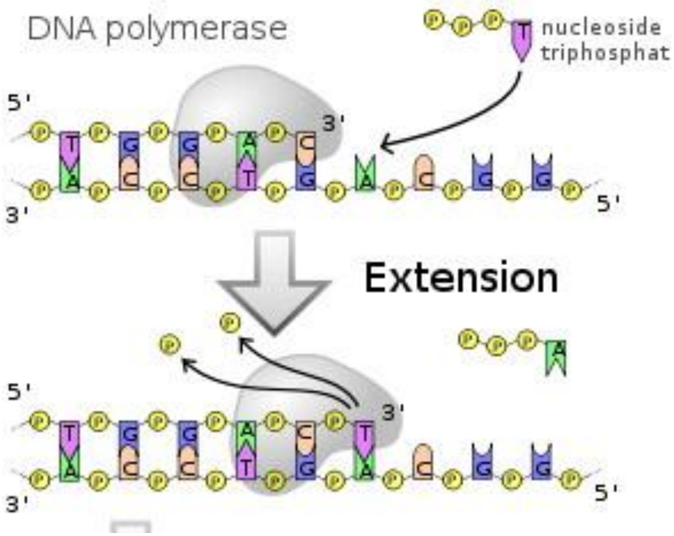
الأنزيم Enzyme	الفعالية Activities	الركيزة Substrate	الناتج Product
ليغاز RNA T4	ربط جزيئات من RNA	RNA أحادي الشريط.	جزيئات مرتبطة من RNA
ليغاز DNA T4	تشكيل روابط فوسفورية ثنائية الاستر	- DNA مضاعف الشريط مع تكسرات على أحد الشريطتن. -شدف من DNA مع أطراف لزجة. - شدف من DNA مع أطراف عمياء.	-DNA مضاعف الشريط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

٣. أنزيمات البناء (البلمرة) polymerases

DNA polymerase

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 وبادئة Primer.
- تضاعف DNA.
- مثال: DNA بوليميراز III.

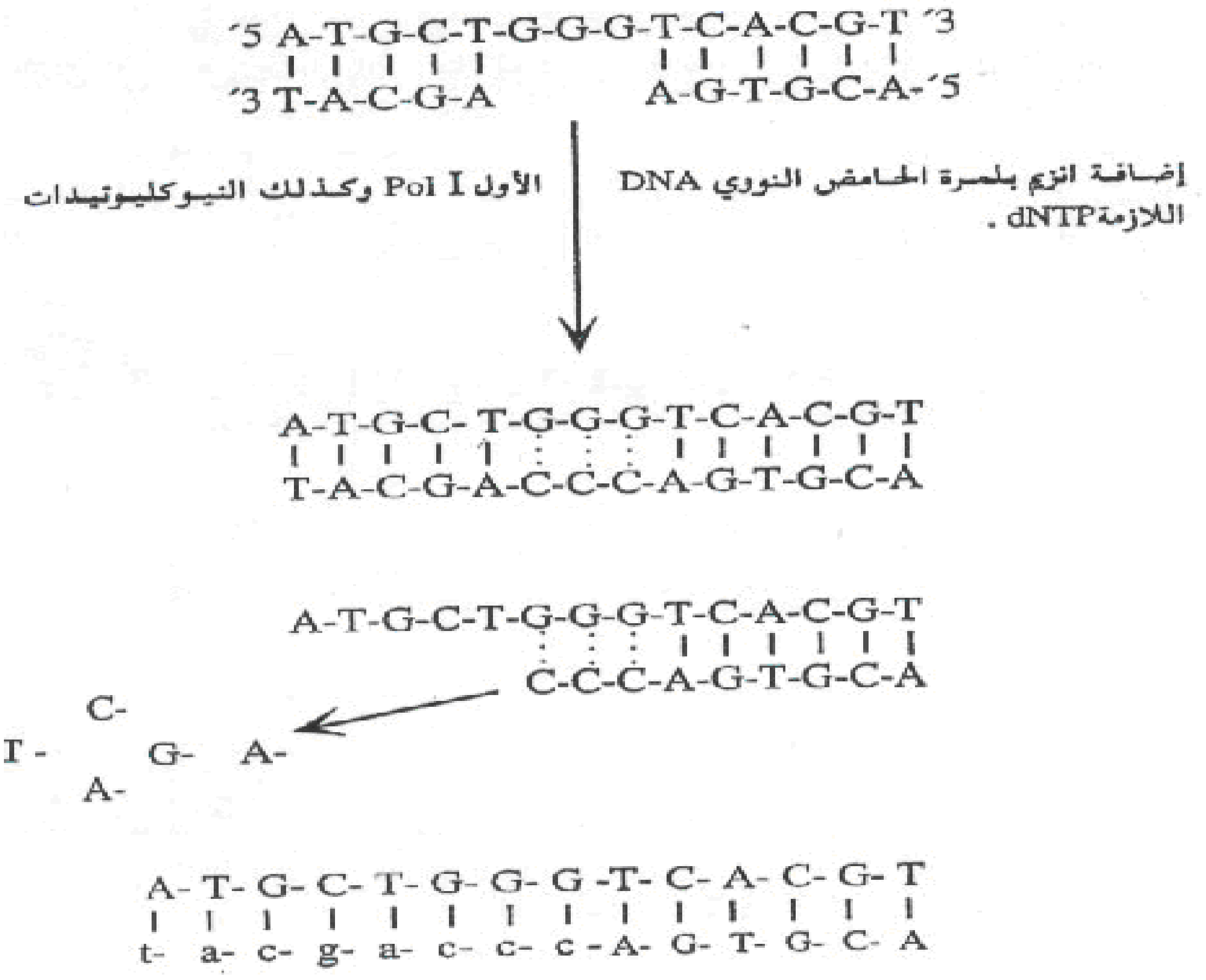


تم عزل وتحديد ثلاثة أنماط من الأنزيم DNA polymerase في حقيقيات النوى وطليعياتها، وتم بالمقابل تحديد ثلاثة أنماط من الأنزيم RNA polymerase في حقيقيات النوى ونمط واحد في طليعيات النوى.

ومن أهم أنزيمات البلمرة المستخدمة في الهندسة الوراثية هو النمط DNA polymerse I، والذي يدعى أيضاً بأنزيم كورنبرغ Korinberg وقد تم عزله من E.colie وهو يعمل على ترميم الفراغات الموجودة في إحدى سلسلتي الجزيء المزدوج ويعمل بدءاً من الجهة $3'$

مستخدماً السلسلة المقابلة كقالب، يعمل هذا الأنزيم بالهدم في الوقت نفسه للسلسلة من الجانب الآخر، وبالتالي استكمال بناء السلسلة الجديدة.

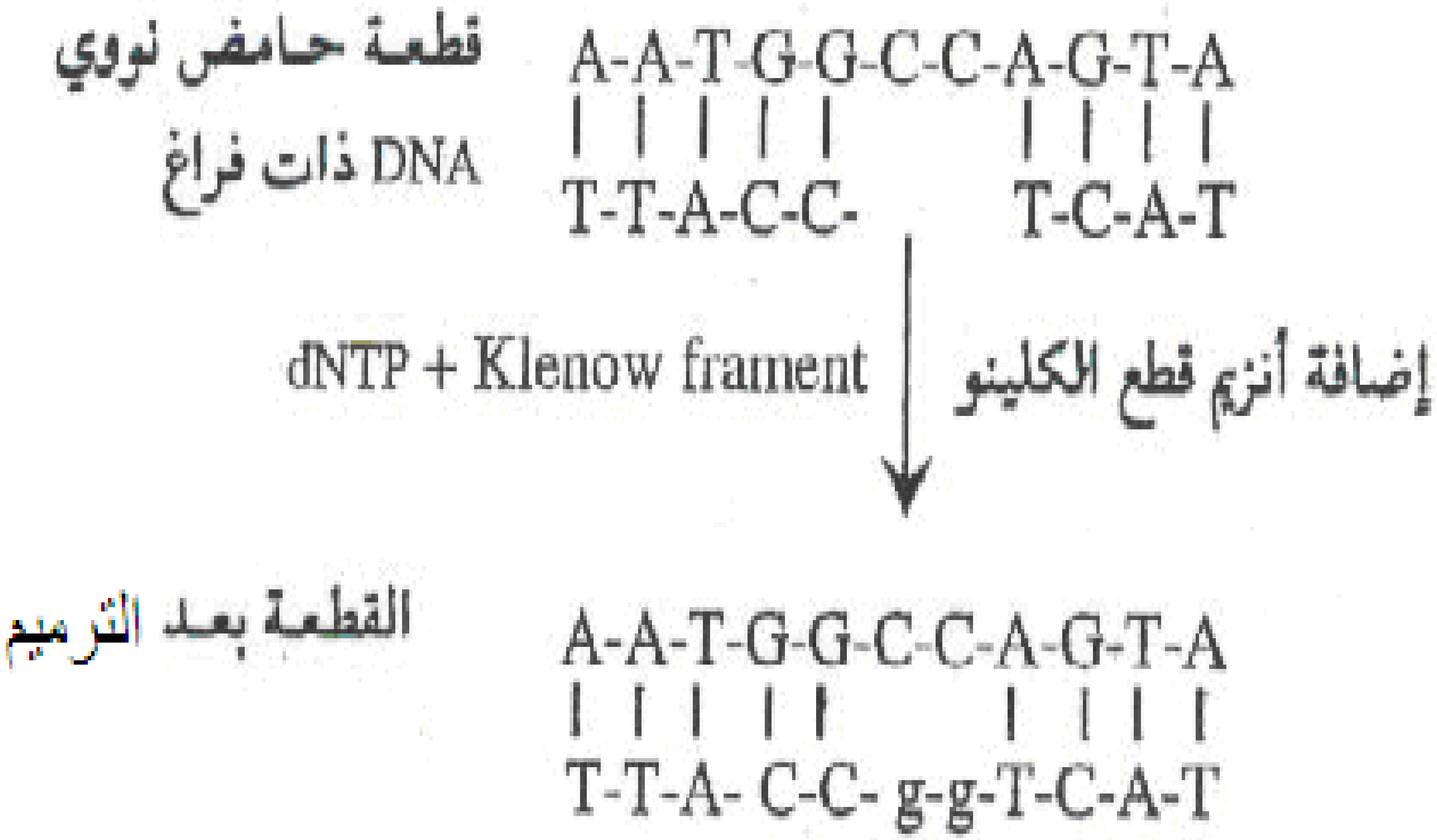
يستخدم هذا الأنزيم مخبرياً لبناء سلسلة DNA باستعمال سلسلة أخرى كقالب، ولكن بوجود بادئة قصيرة primer ذات نهاية هيدروكسيلية، إضافة إلى شوارد المغنيزيوم الثنائية والنيكلوتيدات المستعملة في البناء d(NTP).



نشاط البناء و الهدم لدى أنزيم بلمرة الحامض النووي DNA Polymerase I، ويلاحظ بأن الأنزيم استخدم سلسلة كقالب، و استخدم قطعة قصيرة من السلسلة المقابلة كبادئة من أجل البناء بدءاً من النهاية الثالثة بينما ابتدأ نشاط الهدم من النهاية الخامسة.

يعود نشاط البناء والهدم لهذا الأنزيم إلى أنه يتألف من ثلاث وحدات: الأولى هي المسؤولية عن البناء، والتي تدعى بقطعة كلينو Klenow fragment وتستخدم بكثرة لبناء سلاسل الـ DNA. أما الوحدة الثانية فهي خاصة بعملية الهدم، في حين أن وظيفة الوحدة الثالثة هو تنظيم هذه الأنشطة وتسيير عملية الهدم والبناء بالاتجاه $5' \rightarrow 3'$

يقوم أنزيم كورنبرغ أيضاً بدور هام لإصلاح وترميم المواقع التي يحصل عندها نقص في جزيء الـ DNA، من خلال وحدة البناء klehow fragment كما يوضح الشكل.



آلية ترميم قطع الحامض النووي DNAباستخدام نشاط البناء لأنزيم بلمرة الحامض النووي DNA POL I

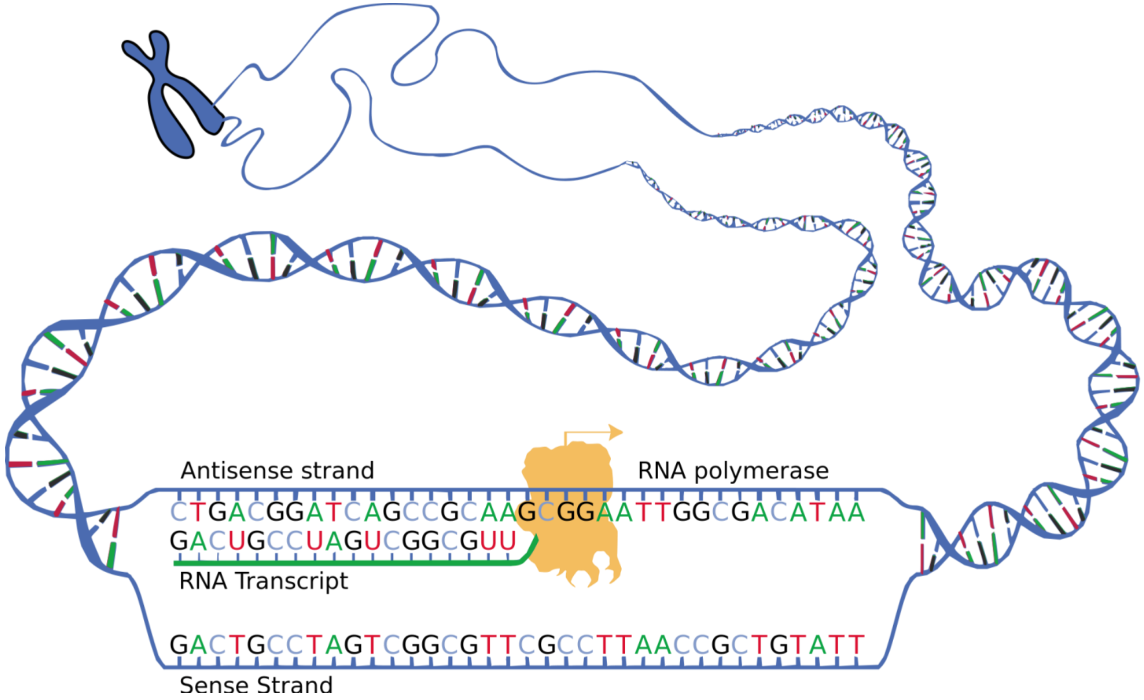
RNA polymerase: DNA dependent

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.

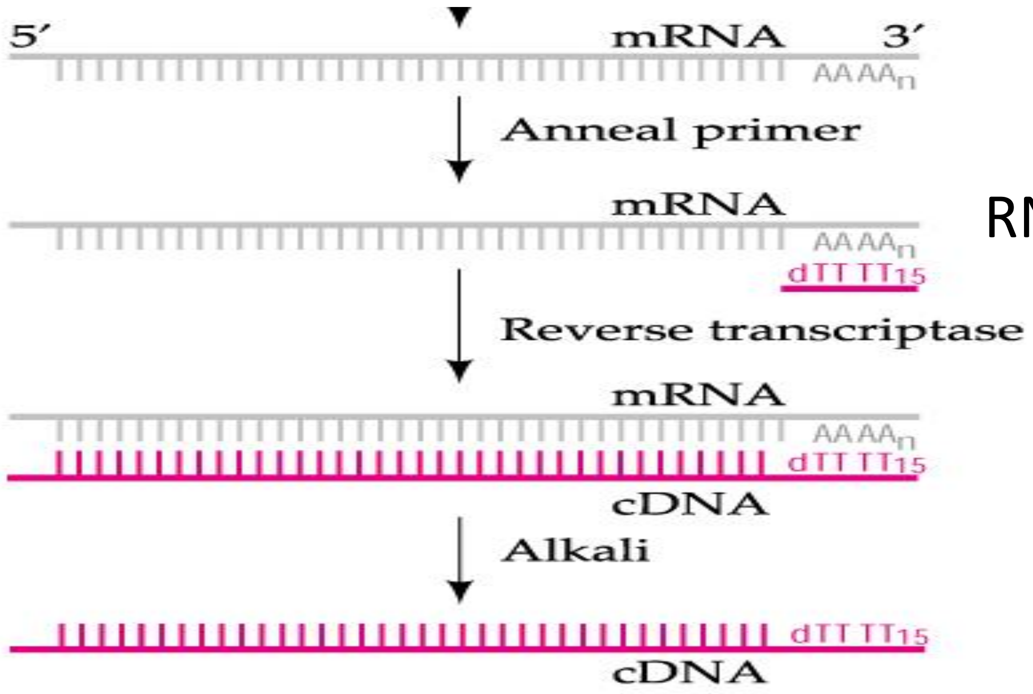
•مثال: RNA بوليميراز I و II و III.



Reverse transcriptase: RNA dependent
أنزيم النسخ العكسي، منوط بـRNA

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 بآلية تعرف بالنسخ العكسي، الأنزيم بحاجة إلى بادئة.



هو أنزيم DNA بوليميراز، منوط بـRNA

٤. أنزيمات التعديل

- الفوسفاتيز القلوي Alkaline phosphates: الفوسفات من النهاية 5 يستطيع هذا الأنزيم، والذي تم عزله من E . collie حذف مجموعة للـ DNA، يعمل هذا الحذف على تقليل احتمال اللصق عند هذه النهاية بعد إجراء القطع بواسطة أنزيمات القطع.

- أنزيم الكيناز متعدد النيكليوتيد Polynucleotide kinase: يستطيع هذا الأنزيم إضافة مجموعة فوسفات إلى النهاية $5'$ من الـ DNA، أي إن هذا الأنزيم يقوم بوظيفة معاكسة لأنزيم الفوسفاتيز القلوي، مما يسهل عملية لحم نيكلوتيدات جديدة على هذه النهاية.

- أنزيم الترانسفيراز الطرفي Terminal deoxynucleotidal transferase: وهو يقوم بإضافة نيكلوتيد أو أكثر إلى النهاية $3'$ لقطع الـ DNA

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.