مختبر ١١

هضم الـ DNA بواسطة إنزيمات التقييد

Digestion of DNA with Restriction Endonucleases

عملية هضم الـ DNA بواسطة إنزيمات التقييد هي أول خطوة في عملية تطويع الجين (gene manipulation) وتُعتبر هذه الإنزيمات هي جزء من نظام خاص يُطلق عليه جهاز التقييد والتحوير والذي بواسطته تستطيع الخلايا حماية نفسها من الغزو بواسطة الـ DNA الغريب وخصوصاً DNA العاثي البكتيري (bacteriophge- DNA). تستطيع إنزيمات التقييد قطع خيطي حلزون الـ DNA عن طريق كسر الأواصر الفوسفاتية ثنائية الإستر ولكن هذا القطع لايكون عشوائياً وإنما تتعرف هذه الإنزيمات على تتابعات معينة من النيوكليوتيدات في جزيئة الـ DNA فتقطع عندها أو بالقرب منها، وهذه التتابعات أما أن تكون رباعية (tetramer) أي تتكون من ٤- قواعد نتروجينية، أو خماسية (pentamer) أي تتكون من ٥- قواعد نتروجينية، أو سداسية (hexamer) أي تتكون من ٦- قواعد نتروجينية. تتردد هذه التتابعات بصورة عشوائية ضمن جزيئة الـ DNA سواء كانت DNA الغريبة أو التابعة لنفس الكائن الذي ينتج إنزيمات التقييد ومن هنا تبرز أهمية أجهزة التقييد والتحوير إذ يعمل إنزيم التحوير على حماية جزيئة DNA للكائن الذي ينتج إنزيم التقييد وذلك عن طريق إضافة مجاميع مثيل إلى قواعد معينة في هذه التتابعات مما يجعلها مقاومة لإنزيمات التقييد.

يوجد نظام تسمية موحد لجميع إنزيمات التقييد (restriction endonucleases) وينطبق هذا النظام على إنزيمات التحوير أيضاً Methylases. تعتمد التسمية على جنس ونوع الكائن الذي عُزل منه هذا الإنزيم، إذ يُؤخذ الحرف الأول من إسم الجنس ويُكتب بحرف كبير ثم يتبعه الحرف الأول والثاني من إسم النوع ويُكتبان بحرفين صغيرين فعلى سبيل المثال يُكتب إنزيم التقييد المعزول من بكتريا *Escherichia coli* بـ *Eco* ويُكتب الإسم الذي يتكون من ثلاثة أحرف بصورة مائلة ثم يُضاف حرف آخر يمثل إسم السلالة التي عُزل منها الإنزيم (في بعض الأحيان يكون الحرف المضاف إلى الإسم الثلاثي الأحرف يمثل حرف البلازميد المشفر لهذا الإنزيم) كما هو الحال في *Eco*R يمثل الإنزيم المنتج من *E. coli* الحاوية على البلازميد R الذي يشفر لهذا الإنزيم، تحتوي بعض سلالات البكتريا على أكثر من جهاز تقييد وتحوير واحد ففي هذه الحالة تُعطى أرقاماً رومانية

تُلحق بإسم الإنزيم تمييزاً للإنزيمات المنتجة من هذه الأجهزة فمثلا يمثل الإسم *Eco*RI أول إنزيم تقييد ينتج من بكتريا *E. coli* الحاملة للبلازميد.

وهنا بعض الأمثلة لأسماء إنزيمات التقييد:

- *Hin*dIII الإنزيم الثالث المنتج من السلالة d لبكتريا *Haemophilus influenza*.
- *Sma*I الإنزيم الأول لبكتريا *Serratia marcesens*.
- *Bam*HI الإنزيم الأول المنتج من السلالة H لبكتريا *Bacillus amyloliquifaciens*.
- *Kpn*I الإنزيم الأول المنتج من بكتريا *Klebsiella pneumonia*.

يُعتبر نظام التسمية الذي مر ذكره آنفاً هو واحد لكل من إنزيمات التقييد وإنزيمات التحوير لذا فقد أُعطيت أحرف صغيرة تسبق إسم الإنزيم للتمييز بين النوعين وهذه الأحرف هي أما "r" أو "m" فمثلاً يمثل m. *Eco*RI إنزيم المثيلة بينما يمثل r. *Eco*RI إنزيم التقييد، وفي كثير من الأحيان قد لاتُستعمل هذه الأحرف إذا لم يتم إستعمال إنزيمات التقييد والتحوير معاً في نفس العمل.

تعتمد تقنية الـ DNA الهجينة (recombinant DNA technology) على العديد من الإنزيمات التي لها القدرة على قطع حلزون الـ DNA تاركة شريط مفرد ذو نهايات متهاوية (مترنحة). تستطيع النهايات المقطوعة في خيط الـ DNA من الإلتصاق مرة أخرى فيما بينها عن طريق تكوين الأواصر الهيدروجينية ناتجة قطع مكملة بعضها البعض، وقد يحدث أن ترتبط قطعتي الـ DNA المقطوعة والناتجة من مصدرين مختلفين ناتجة بنفس إنزيم التقييد نتيجة لتماثل مواقع القطع مؤدية إلى تكوين نهايات لاصقة لها القدرة على إعادة الإرتباط فيما بينها إعتماداً على تتابع النيوكليوتيدات في تلك النهايات.

يمكن القول بأن سلسلتي حلزون الـ DNA متعاكسة بالتماثل (anti- parallel) وعلى هذا الأساس فان سلسلتي الحلزون ستكونان متخالفتين بالقطبية أي أنهما تتجهان بإتجاهين متعاكسين أحدهما يكون بالإتجاه '5 '3 بينما تكون الأخرى بالإتجاه '3 ⟵ '5 مؤدية هذه الظاهرة إلى تكوين تركيب متناسق يُطلق عليه Rotational أو Dyad symmetry أي بإستطاعة كل شريط أن يكون نفس تركيب الشريط الآخر عند دورانه ١٨٠° حول المحور .

نستنتج مماتقدم أن المواقع الحساسة لعمل الإنزيمات لاتقع حصراً على أحد الشريطين وإنما يشمل وجودها سلسلتي الحلزون معاً، فمثلاً نلاحظ أن الموقع الحساس لعمل الإنزيم *Eco*RI هو:

5'.....GAA TTC.....3'

3'.....CTT AAG.....5'

فمتى ماتعرف إنزيم *Eco*RI على هذا التتابع السداسي يستطيع أن يقطع عنده سواء في الشريط الأول أو الثاني، لذا يُطلق مصطلح Palindrome على هذا النوع من التنظيم ويعني مصطلح Palindrome أدبياً، القراءة المتشابهة (الواحدة) من كلا الإتجاهين (أمامي وعكسي) كما هو الحال في العبارة:

Madam, Im Adam

يجب الإشارة هنا إلى أن الموقع الحساس لإنزيمات التقييد لايمكن إعتباره Palindrome بالمعنى الحقيقي وذلك بسبب وقوع التتابع المشابه بالتسلسل والمخالف بالإتجاه واقع على الشريط الآخر وليس على نفس الشريط.

إن آلية القطع التي يحدثها إنزيم التقييد هي تكسير الآصرة الفوسفاتية ثنائية الإستر نتيجة تحللها عند إضافة جزيئة ماء خلال التفاعل مؤدي إلى إحداث قطع في خيطي الـ DNA نتيجة الإنشطار الذي يحدث بين نيوكليوتيدين متجاورين مما يؤدي إلى تكوين نهايتين حرة أحدهما 5'- phosphate والأخرى 3'-hydroxyl من جهة أخرى يمكن أن تعود هذه النيوكليوتيدات المنشطرة إلى الإتحاد مرة أخرى نتيجة لتكوين الأواصر الفوسفاتية ثنائية الإستر بفصل جزيئة ماء من التفاعل، وتعتبر إنزيمات DNA polymerase و RNA polymerase و DNA ligase هي الإنزيمات المسؤولة عن هذا الغرض.

تحدث عملية القطع في نفس النقطة على كل من الشريطين بسبب تماثل الشريطين بالتتابع والتركيب (إلا أنهما يكونان مختلفين بالإتجاه). بعد عملية القطع يتكون شريط مفرد ذو نهاية حرة متدلية (ناتئة) ويمكن إعتبار القطع الذي يحدثه *Eco*RI مثال على ذلك.

يقطع *Eco*RI التتابع السداسي منتجاً قطع DNA ذات نهايات ناتئة في الطرف '5 بينما هناك إنزيمات أخرى تقطع عند المواقع الحساسة لها منتجة قطع DNA ناتئة في الطرف '3 أو منتجة نهايات مستوية. وفيما يلي ثلاثة أمثلة توضح مواقع القطع:

*Hin*dIII (left)

5'…….A OH P AGCTT…….3'

3'…….TTCGA P HO A…….5'

*Kpn*I (right)
5'…….GGTAC OH P C…….3'
3'…….C P HO CATGG…….5'

*Sma*I (center)
5'…….CCC OH P GGG…….3'
3'…….GGG P OH CCC…….5'

من خلال الشكل الموضح أعلاه نلاحظ أن قطع الـ DNA الناتجة بواسطة الإنزيمين *Hin*dIII و *Kpn*I تنتج نهايات ناتئة وبما أن هذه النهايات الناتئة تكون متكاملة في القواعد النتروجينية فإنها يمكن أن ترتبط مع بعضها مرة أخرى عن طريق تكوين الأواصر الهيدروجينية مع بعضها وتعتبر هذه النهايات هي نهايات لاصقة، بينما نلاحظ القطع الذي يحدثه *Sma*I ذا نهايات مستوية إلا إنه يمكن أن يُعاد إرتباطه مرة أخرى. تكون هذه القطع الناتجة معرضة إلى عمليات تحوير ومعاملة أخرى بواسطة إنزيمات معينة لكي تتم باقي خطوات عملية الكلونة.

يحدث في بعض الأحيان أن تتداخل المواقع الحساسة لإنزيمات تقييد مختلفة مع بعضها البعض، فعلى سبيل المثال نلاحظ التتابع GATC والواقع ضمن التتابع السداسي لإنزيم التقييد *Bam*HI والمتمثل بـ G GATCC (إذ يشير السهم إلى موقع القطع) يوجد أيضا ضمن تتابع الموقع الحساس لإنزيم التقييد *Bgl*II والمتمثل بـ A GATCT وكذلك ضمن الموقع الحساس لإنزيم التقييد *Sauz*A والمتمثل بـ GATC ففي هذه الحالة يمكن أن ترتبط قطع الـ DNA المقطوعة بالإنزيم *Bam*HI مع قطع DNA أخرى مقطوعة بالإنزيم *Bgl*II نتيجة لتشابه القواعد النتروجينية في المواقع المنشطرة ففي هذه الحالة يمكن أن يطلق على مثل هذه الإنزيمات بالإنزيمات المتوافقة أو المنسجمة Compatible، بينما تكون القواعد النتروجينية الأخرى الواقعة خارج الموقع الحساس مختلفة فتكون النتيجة تكوين تتابع هجين لايمكن أن يقطع بـ *Bam*HI ولا بـ *Bgl*II. تكون التتابعات الجديدة المتكونة حاوية على التتابع الرباعي GATC وهو الموقع الحساس للإنزيم *Sauz*A بغض النظر عن التتابعات الأخرى الخارجية ففي هذه الحالة يمكن أن تقطع هذه التتابعات الجديدة بواسطة الإنزيم *Sauz*A وبنفس الحالة يمكن أن يُعاد إرتباط قطع الـ DNA المقطوعة بواسطة الإنزيم *Sauz*A مع قطع الـ DNA المقطوعة بواسطة الإنزيم *Bam*HI أو *Bgl*II نتيجة لإشتراكهما في أربعة قواعد نتروجينية ضمن الموقع الحساس لعمل الإنزيم. إن احتمالية تواجد التتابع الرباعي للإنزيم *Sauz*A في قطعة الـ DNA تكون

أكبر من إحتمالية تواجد التتابع السداسي للإنزيم *Bam*HI لذا فان مثل هذا الإنزيم *Sauz*A (أي الذي يميز التتابع الرباعي) يمكن أن يقطع بتردد أكبر من *Bam*HI (أي السداسي التتابع) ضمن قطعة الـ DNA.

لإنزيمات التقييد ظروف مثلى يمكن أن تعمل عندها وتختلف هذه الظروف من إنزيم لآخر ويمكن التعرف على متطلبات عمل كل إنزيم من خلال ورقة المعلومات المرافقة للإنزيم المزودة من قبل الشركة المصنعة. من أهم متطلبات عمل الإنزيم هي القوة الأيونية (أي تركيز الأملاح) والمحلول المنظم للتفاعل (buffer) ودرجة الحرارة، وتعتبر درجة الحرارة من أكثر العوامل خطورة وتأثيراً على سير التفاعل أما بالنسبة للقوة الأيونية فيكون تأثيرها أقل لإحتمالية وجود مدى واسع من الإنزيمات تتطلب تركيز ملحي عالي أو متوسط أو منخفض.

تجهز الشركات المصنعة الإنزيمات بتراكيز عالية إلا إنه 1µl لمعظم الإنزيمات كافية لقطع 10 µl من DNA. توجد تراكيز الإنزيمات على ورقة المعلومات المرافقة للإنزيمات والتي توضح فيها وحدات الإنزيم للحجم القياسي (أما ml أو µl). إن الوحدة هي كمية الإنزيم الضرورية للهضم التام لكمية قياسية للنوع القياسي من الـ DNA (وعادة يكون أما Bacteriophage أو Plasmid Pbr322) في وقت قياسي.

تُحفظ عادة الإنزيمات بدرجة حرارة -20°C في 50% من الكليسرول، فعندما تحفظ بهذه الطريقة يمكن الحفاظ على ثباتية عملها لأطول فترة ممكنة. هناك بعض الأمور التي تعرض ثباتية عمل الإنزيمات إلى الخطورة منها; تعريضها إلى الحرارة والتبريد بإستمرار، لذا يجب أن تُحفظ بثلاجات تبريد خاصة (لاتُحفظ الثلاجات الطبيعية المتوفرة الرخيصة الثمن)، كذلك يجب الأخذ بنظر الإعتبار عند إخراج الإنزيمات من ثلاجات الحفظ لغرض العمل أن تُحفظ في الثلج طول فترة العمل لحين إرجاعها إلى مكان الحفظ (لحين الإنتهاء من العمل).

هناك أمر آخر لايقل خطورة عن عملية حفظ الإنزيم بالطريقة الصحيحة وهو تلوث الإنزيم بإنزيمات خارجية (exonuclease) نتيجة ملامسته باليد ففي هذه الحالة لايُدمر الإنزيم فقط وإنما يُدمر العمل بكامله فقد يكون من الصعب تحطيم الـ DNA وبذلك لايحدث القطع المطلوب. لتجنب حدوث مثل هذه الحالة يجب مراعاة مايلي:

١- إرتداء القفازات (الكفوف) عند ملامسة الإنزيمات.

٢- إستعمال موصلة الماصة (tip) جديدة عند التعامل مع الإنزيمات، واذا أردنا أخذ حجم معين من الإنزيم مرة أخرى فيجب تغيير Tip.

٣- يجب إنجاز العمل بأقصى سرعة ممكنة، وذلك لأن تعرض الإنزيم إلى درجات حرارة مرتفعة لفترات طويلة يؤدي إلى تلف الإنزيم.

الطريقة العامة للهضم بواسطة إنزيمات التقييد

General Protocol for Performing Restriction Digestions

١- يكون الحجم الكلي لخليط التفاعل 20 µl إذ يكون هذا الحجم هو المرغوب في الترحيل الكهربائي. يعتمد حجم الـ DNA المضاف عادة على مصدر الـ DNA فنلاحظ أن البلازميد المُنقى بإستعمال CsCl2 يُضاف 3-5 µl منه، بينما الـ DNA المُنقى من عزلات بلازميدية عشوائية يؤخذ منه 10 µl.

٢- أضف 2 µl من 10X restriction buffer .

٣- أضف 0.2 µl من Acetylated BSA, 10 µg/ µl

٤- أضف Sterile distilled water لجعل الحجم 7.3 µl.

٥- أضف 0.5 µl من إنزيم التقييد، أضرب على الأنبوب عدة ضربات لضمان إمتزاج خليط التفاعل.

٦- إعمل طرد مركزي للأنابيب وذلك لتركيز جميع محتويات خليط التفاعل في قاعدة الأنبوب.

٧- توضع الأنابيب في الحمام المائي بدرجة حرارة 37°C لمدة 30-60 دقيقة .

٨- في نهاية عملية الهضم، يتم عمل واحدة من الخطوات القادمة إعتماداً على الغرض التي عُملت لاجله عملية الهضم وهي:

أ- إذا كان الغرض تحليل النتيجة بواسطة الهلام أضف 5 µl من صبغة الترحيل Tracking dye إلى العينة وتوضع العينة في الحفرة الموجودة في هلام الأگاروز.

ب- إذا كان الغرض هو ربط الـ DNA المقطوعة مع قطعة DNA أخرى فيجب تثبيط عمل إنزيمات التقييد لكي يجنب عملية إعادة القطع مرة أخرى وتتم ذلك أما بالحرارة أو الإستخلاص بالفينول ثم الترسيب بالإيثانول.

جـ- اذا كان الغرض تنقية الـ DNA لأي غرض آخر يجب أن يُستخلص بالفينول ثم الترسيب بالإيثانول.