من الفلاتر ذاتها بـ mRNA خاص بالأوراق معلم إشعاعيًا. يتم التعرف على الـ cDNAs الخاصة بالأزهار كبقع لا تضئ إلاّ بمجسات الـ mRNA الخاص بالأزهار أما البقع الأخرى التى تتهجن – كذلك – بالـ mRNA الخاص بالأوراق فإنها تمثل جينات الـ house keeping. يفيد عزل الجينات بهذه الطريقة فى التعرف على تلك التى تتحكم فى بعض العمليات الحيوية الخاصة (عن Chahal & Gosal ٢٠٠٢).

الإنزيمات المستعملة فى مجال الـ Gene Cloning

منذ أن اكتشفت الإنزيمات القادرة على قطع شريط الدنا عند تتابعات معينة من النيكليوتيدات، واكتشاف إنزيمات الليجيز ligase القادرة على وصل قطع الدنا معًا .. أصبح من الممكن تحفيز تكوين أى توافيق جديدة من الجينات فى المختبر، وتزويدها بتتابعات دنا يمكنها تنظيم عملية التعبير عن تلك الجينات فى النباتات المحولة وراثيًا فى المرحلة المناسبة من النمو (temporal expression)، وفى الأنسجة التى يُراد التعبير فيها (spatial expression).

توفر إنزيمات القطع restriction enzymes وإنزيمات الوصل الخاصة بالدنا DNA ligase عمليات القطع والوصل لأجزاء الدنا، وهى التى تعد ضرورية لإنتاج جزيئات دنا جديدة recombinant DNA molecules. أما الإنزيمات الأخرى التى تستعمل فى مجال الهندسة الوراثية فإنها تعرف مجتمعة بإنزيمات تحوير الدنا DNA modifying enzymes، وهى تقوم بعمليات التحلل degradation، والتمثيل synthesis، والتحوير alteration للدنا.

تحلل إنزيمات النيوكلييز nucleases الأحماض النووية بكسر الروابط الـ phosphodiester التى تربط النيكليوتيدات معًا. وتعد إنزيمات القص من الأمثلة الجيدة للـ endonucleases التى تقطع الدنا فى مواقع داخل الخيوط. وتوجد مجموعة أخرى من الـ nucleases تقوم بتحليل الدنا من جزيئاته الطرفية، وهى التى تعرف باسم exonucleases (عن Nicholl ١٩٩٤).

إنزيمات القطع

يلزم عند تكوين جزئ دنا جديد recombinant DNA molecule قطع الحامض النووى الحلقى للناقل فى نقطة واحدة محددة، هى التى يمكن عندها إيلاج جزئ الدنا المراد زراعته . ويتعين أن يحدث القطع فى جزيئات الناقل فى نفس مكان القطع فيها جميعاً يتحقق ذلك بفضل إنزيمات القطع الداخلية restriction endonucleases التى تقوم بقطع الدنا فى مواقع محددة

ولقد عزل أول تلك الإنزيمات من *Haemophilus influenzae* فى عام ١٩٧٠، وتعرف حاليًا عديد من تلك الإنزيمات التى أمكن عزلها من أنواع بكتيرية كثيرة ومتباينة

تتميز معظم الأنواع البكتيرية بالقدرة على مقاومة الدنا الغريب عنها، فهى تحتوى على إنزيمات خاصة من الـ endonucleases (الإنزيمات القاطعة المحددة restriction enzymes) وتقوم البكتيريا بحماية دناها الخاص من التأثير القاتل المحتمل لإنزيماتها القاطعة المحددة بتحويره مسبقا – عادة – بواسطة DNA methylase مناسب، يؤدى إلى مثلمة methylation بعض القواعد الآزوتية للدنا عند تتابعات محدودة، فلا يمكن للإنزيمات التعرف عليها كمواقع للقطع

ونظرًا لأن الإنزيمات القاطعة المحدِّدة استخدمت تقليديًا لأجل تقطيع أوصال الدنا، فإنها أصبحت تُعرَّف – أساسا بالتتابعات التى تتعرف عليها لأجل قطع الدنا عندها ويمكن للغالبية العظمى من تلك الإنزيمات تمييز تتابعات يتراوح طولها بين ٤، و ٦ نيكليوتيدات، إلاّ أن البعض منها يمكنه التعرف على تتابعات تصل إلى ثمانى نيكليوتيدات يقوم الإنزيم بقطع الدنا فى كل موضع يتضمن تتابع أزواج القواعد الآزوتية التى يمكنه التعرف عليها فيه، ولذا فإنه كلما قل عدد النيكليوتيدات فى أى موقع تُعرَّف للإنزيم كلما زاد عدد مرات قطع الإنزيم للدنا (Webb & Wilson ١٩٩١)

تعرف ثلاثة طرز من الإنزيمات القاطعة restriction enzymes، هى I، و II، و III، وبعظم ما يستعمل منها حاليًا هو من الطراز II، وهو أبسطها من حيث طريقة فعله تعد هذه الإنزيمات من التى تعمل فى النواة nucleases ونظرًا لأنها تقطع خيط

الدنا فى موقع داخلى منه (مقارنة بتلك التى تبدأ القطع عند أحد الأطراف)؛ لذا .. فإنها تعرف باسم endonucleases؛ ومن هنا جاء اسمها الكامل type II restriction endonucleases، ولكنها غالبًا ما تسمى restriction enzymes للتبسيط، وهى فى جوهرها مقصات جزيئية.

تعطى الإنزيمات القاطعة أسماء متباينة، ويشكل اسم الكائن الذى اكتشف فيه الإنزيم لأول مرة الجزء الأول من اسم هذا الإنزيم، حيث يؤخذ من الكائن الحرف الأول من اسم جنسه، والحرفين الأولين من اسم نوعه. وبذا .. فإن إنزيمًا قاطعًا من سلالة من البكتيريا *Escherichia coli* يأخذ الرمز Eco، وآخر من البكتيريا *Bacillus amyloliquefaciens* يأخذ الرمز Bam ... وهكذا. ويمكن أن يدخل فى اسم الإنزيم مواصفات أخرى، مثل السلالة البكتيرية. ومن أكثر الإنزيمات استخدامًا من بين تلك المشار إليها أعلاه EcoRI، و BamHI.

وترجع أهمية الإنزيمات القاطعة إلى تخصصها؛ فكل إنزيم منها لا يمكنه التعرف إلاّ على تتابعات محددة من القواعد الآزوتية بالدنا. وأكثر التتابعات التى تميز بتلك الإنزيمات شيوعًا تتكون من أربعة أزواج من القواعد، أو خمسة، أو ستة أزواج طولاً. وعليه .. فمع العلم بأنه يوجد أربعة من القواعد فى الدنا، وبافتراض أن توزيعها عشوائى .. فإن المعدل المتوقع لأى تتابع يكون $٤^{ن}$، حيث ن هى طول التتابع المعنى. ويعنى ذلك أن موقعًا يحتوى على أربعة تتابعات محددة يمكن أن يقع مرة فى كل ٢٥٦ حالة لأربعة تتابعات، بينما يمكن أن يقع تتابع محدد لخمس قواعد مرة فى كل ١٠٢٤ حالة، ويقع التتابع المحدد لست قواعد مرة فى كل ٤٠٩٦ حالة. ونظرًا لأن القواعد الآزوتية لا تكون موزعة عشوائيًا - بطبيعة الحال - فإن النسب المختلفة لأطول التتابعات المختلفة تختلف - عمليًا - عن النسب المتوقعة لها، والتى تعد مجرد مؤشرات إلى احتمالات حدوثها. وبناء على ما أسلفنا بيانه .. فإن الإنزيم الذى يمكنه التعرف على تتابع معين لأربع نيكليوتيدات (والذى يسمى أحيانًا قاطع الأربع four-cutter) سوف ينتج أجزاء من الدنا أقصر من تلك التى ينتجها قاطع الست.

ويعطى جدول (١١-١) أمثلة لأكثر الإنزيمات القاطعة استعمالاً والتتابعات التى

يمكن لتلك الإنزيمات التعرف عليها، وأين يحدث القطع (عن Nicholl ١٩٩٤)، كما يعطى جدول (١١-٢) مزيدًا من التفاصيل عن تلك الإنزيمات وغيرها (عن Chawla ٢٠٠٠).

جدول (١١-١): مواقع القَطع التى تتعرف عليها إنزيمات القطع فى تتابعات الحامض النووى وأنواع نهايات سلاسل النيكليوتيدات التى تترتب على عملية القطع.

الإنزيم	التتابعات التى يتعرف عليها	مواقع القَطع	النهايات
BamHI	5′-GGATCC-3′	G↓GATCC CCTAG↑G	5′
EcoRI	5′-GAATTC-3′	G↓AATTC CTTAA↑G	5′
HaeIII	5′-GGCC-3′	GG↓CC CC↑GG	Blunt
HpaI	5′-GTTAAC-3′	GTT↓AAC CAA↑TTG	Blunt
PstI	5′-CTGCAG-3′	CTGCA↓G G↑ACGTC	3′
Sau3A	5′-GATC-3′	↓GATC CTAG↑	5′
SmaI	5′-CCCGGG-3′	CCC↓GGG GGG↑CCC	Blunt
SstI	5′-GAGCTC-3′	GAGCT↓C C↑TCGAG	3′
XmaI	5′-CCCGGG-3′	C↓CCGGG GGGCC↑C	5′

وتنتج إنزيمات مثل PstI، و EcoRI قِطَع دنا ذات أطراف "لزجة" sticky، نظرًا لأن التتابعات البارزة منها يمكنها التقارن مع القواعد ذات التتابعات المكملة لها والتى ينتجها الإنزيم ذاته. وبذا . فإنه يمكن بقطع عينتان من الدنا بإنزيم واحد ثم خلط قطع الدنا الناتجة معًا الحصول على دنا جديد انعزالى recombinant DNA، كما يظهر شكل (١١-٩). ويعد ذلك من أهم استعمالات إنزيمات القص.

جدول (١١-٢): بيان ببعض الإنزيمات القاطعة، وخصائصها، والكائنات التى تقوم بإنتاجها.

الإنزيم	الكائن المنتج له	التتابعات التى يتعرف عليها
Staggered cut (sticky ends)		
BamHI	*Bacillus amyloliquefaciens* H	G↓GATCC
BglII	*Bacillus globigi*	A↓GATCT
EcoRI	*Escherichia coli* R	G↓AATTC
HindIII	*Haemophilus infuenzae* Rd	A↓AGCTT
PstI	*Providencia stuartii*	CTGCA↓G
SalI	*Streptomyces albus* G	G↓TCGAC
TaqI	*Thermus aquaticus*	T↓CGA
PstI	*Providencia stuartii*	CTGCA↓G
Blunt ends		
AluI	*Arthrobacter luteus*	AG↓CT
HaeIII	*Haemophilus aegypticus*	GG↓CC
HpaI	*Haemophilus parainfuenzae*	GTT↓AAC
PvuII	*Proteus vulgaris*	CAG↓CTG
Sau3A	*Staplylococcus aureus* 3A	↓GATC
SmaI	*Serratia marcescens*	CCC↓GGG

شكل (١١-٩): تكوين دنا جديد recombinant DNA، وذلك بوصل قطع دنا من مصادر مختلفة بعضها ببعض عند أطرافها اللزجة sticky ends؛ وهى الأطراف التى تتكون بفعل عديد من إنزيمات القص restriction enzymes، ويحدث الالتحام بفعل إنزيم وصل الدنا DNA ligase.

تستعمل الإنزيمات القاطعة بطريقة بسيطة للغاية، حيث تضاف كمية مناسبة من الإنزيم إلى الدنا المعنى فى محلول منظم، مع تحضين التفاعل على ٣٧م. يتم التعبير عن النشاط الإنزيمى بالوحدات، تحدد كل وحدة منها بكمية الإنزيم التى يمكنها هضم (قص) ميكروجرام واحد من الدنا خلال ساعة واحدة على ٣٧م. وعلى الرغم من تتطلب معظم الدراسات إجراء هضم كامل للدنا المعنى، فإن هناك حالات تستخدم فيها توافيق مختلفة من تركيز الإنزيم مع وقت التحضين لتحقيق هضم جزئى فقط.

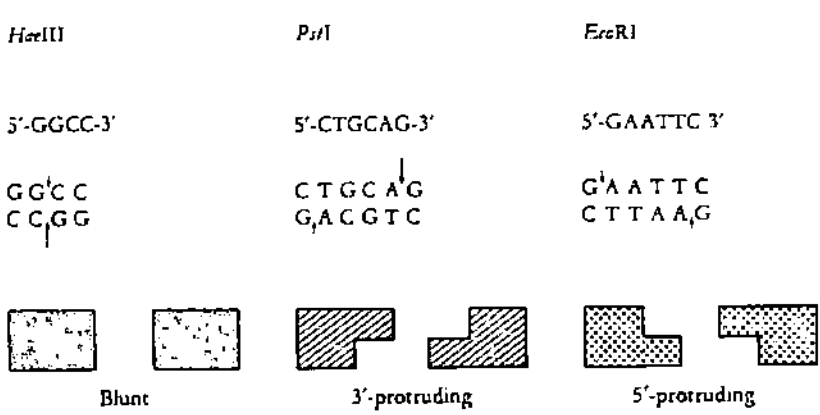
يتوقف نوع جزئ الدنا الذى ينتجه إنزيم معين على كل من التتابع الذى يتعرف عليه الإنزيم، وعلى موقع القطع داخل ذلك التتابع. وكما أسلفنا فإن طول قطعة الدنا يتوقف على معدل حدوث التتابع الذى يمكن للإنزيم التعرف عليه على امتداد الدنا ويحدد مكان القطع الفعلى للإنزيم نوع النهايات الممكنة لقطع الدنا المقطوعة. ولذلك أهمية كبيرة بالنسبة لعمليات التداول التالية للدنا

ويمكن أن تنتج ثلاثة طرز من النهايات لقطع الدنا، هى (شكل ١١-١٠).

١ – قطع دنا ذات نهايات مسطحة blunt ends

٢ – قطع دنا تبرز منها الـ 3'ends.

٣ – قطع دنا تبرز منها الـ 5'ends (عن Nicholl ١٩٩٤).



شكل (١١-١٠): أنواع النهايات التى تحدث بفعل أنواع مختلفة من إنزيمات القص تُميز الإنزيمات فى الشكل بكل من: (أ) التتابعات التى يمكنها التعرف عليها، و (ب، جـ) مواقع القص، و (د) نوعيات النهايات التى تتكون نتيجة لذلك.

وتجدر الإشارة إلى أن معظم المواقع تحتوى على محورين متناظرين، وتكون القواعد الآزوتية فى الموقع محددة بصورة فريدة، إلا أن ذلك لا يصدق فى كل الحالات. تقوم الإنزيمات القاطعة التى تتعرف على المواقع المتناظرة بقطع بصورة متناظرة فى الموقع ذاته وفيما يجاوره، بينما تقوم الإنزيمات القاطعة التى تتعرف على المواقع غير المتناظرة assymetrical sites بقطع الدنا فى مكان يبعد بمسافة عن الموقع ذاته.

وكما أسلفنا فإن لطبيعة القطع أهمية كبيرة؛ نظرًا لأن النهايات المترتبة على عملية القطع تحدد مدى مناسبة قِطَع الدنا الناتجة للإجراءات التى تلى عملية القطع. إن جميع الإنزيمات القاطعة تقطع الدنا الذى تعمل عليه، لتنتج نهاية 5′phosphate، و 3′hydroxy على كل خيط عند كل قطع. ويمكن لتلك الكسور أن تنتظم لتعطى إما 5′phosphate overhangs (شكل ١١-١١أ)، وإما 3′hydroxyl overhangs (شكل ١١-١١ب)، وإما قد تعطى الكسور نهايات blunt (شكل ١١-١١جـ).

```
أ   ...GAATTC...   EcoRI    ...G3'        5'AATTC...
    ...CTTAAG...  ------>   ...CTTAA           G...

ب   ...CTGCAG...   PstI     ...CTGCA3'        5'G...
    ...GACGTC...  ------>   ...G           ACGTC...

جـ  ...CCCGGG...   SmaI     ...CCC3'        5'GGG...
    ...GGGCCC...  ------>   ...GGG            CCC...
```

شكل (١١-١١): ثلاثة نهايات يمكن أن تتكون نتيجة لقطع الدنا بالإنزيمات القاصة، هى: (أ) 5′-overhangs، (ب) 3′-overhangs، و (جـ) النهايات المتساوية blunt ends.

يؤدى هضم الدنا بتلك الإنزيمات إلى إنتاج أجزاء متباينة الطول، حسب توزيع مواقع القطع فى الدنا. ويمكن فصل تلك الأجزاء بالـ gel electrophoresis (Webb & Wilson ١٩٩١).

تحتوى معظم قطع الدنا على مواقع التعرف لمختلف إنزيمات القص، ويكون – غالبًا – من المفيد التعرف على المواقع النسبية لبعضها البعض. وتعرف التقنية التى تستعمل للحصول على هذه المعلومات باسم restriction mapping. ويتضمن ذلك قطع جزء من

الدنا بعدد من إنزيمات القص المختارة إما منفردة، وإما فى توافيق مختلفة. يلى ذلك تمرير القطع الناتجة فى agarose gel لأجل فصل الأحجام وتحديدها. ويمكن من نتائج ذلك الاختبار تحديد المواقع النسبية لأماكن القطع.

نفترض – مثلاً – أننا نرغب فى رسم خريطة أماكن القطع لإنزيمات القطع BamHI، و EcoRI، و PstI، وأن الدنا المعنى يبلغ طوله ١٥ kb. يتم إجراء عدة عمليات هضم، ثم تمرر قطع الدنا الناتجة فى جل الأجاروز وتحدد أحجامها (جدول ١١–٣). ونظرًا لأن كل عملية قطع إنزيمى ينتج عنها قطعتان من الدنا، فإنه يمكننا الاستنتاج بأن الدنا يوجد به مكان قطع واحد لكل إنزيم ويمكن الهضم المزدوج (باستعمال إنزيمين) من رسم خريطة جزيئية، ويؤكد الهضم الثلاثى (باستعمال ثلاثة إنزيمات) تلك الخرائط (شكل ١١–١٢) (عن Nicholl ١٩٩٤)

جدول (١١–٣): هضم قطعة دنا طولها **15 kb** باستعمال ثلاثة إنزيمات قاطعة[أ]

BamHI	EcoRI	PstI	BamHI + EcoRI	BamHI + PstI	EcoRI + PstI	BamHI + EcoRI + PstI
14	12	8	11	8	7	6
1	3	7	3	6	5	5
			1	1	3	3
						1

أ – القيم التى تظهر بالجدول هى بالـ kb لقطع الدنا التى تتكون نتيجة لهضم القطعة الـ 15kb باستعمال إنزيمات BamHI، و EcoRI، و PstI وتظهر نتائج عمليات الهضم الفردى والمزدوج والثلاثى كما هو مبين بالجدول.

الإنزيمات النووية nucleases الأخرى

بخلاف إنزيمات القطع فإنه تعرف أربعة أنواع من الـ nucleases التى غالبًا ما تستعمل فى مجال الهندسة الوراثية، وهى:

Bal 31 (exonuclease)
exonuclease III (exonucleas)
deoxyribonuclease I or Dnase I (endonuclease)
S_1-nuclease (endonuclease)

النباتات الوحيدة الفلقة التى تستعصى إصابتها بالبكتيريا يمكن - تحت ظروف خاصة - تحويلها وراثيًا بالأجروباكتيريم (عن Jahne وآخرين ١٩٩٥).

وكما سبق أن أوضحنا .. فقد ثبت إمكان نقل الـ T-DNA من الأجروباكتيريم إلى الخلايا النباتية لعديد من وحيدات الفلقة الهامة، مثل الذرة، والأرز، والقمح. ولقد وجد فى الذرة أن النبات ينتج مركب أيض ثانوى ذات فعل بكتيرى مثبط يمنع حث الـ vir genes، إلا أن هذا المركب ليس ثابتًا، حيث أدت فترة من الزراعة فى مزارع الأنسجة قبل التلقيح بالبكتيريا، أو إطالة فترة مزرعة الأنسجة مع البكتيريا إلى التغلب على هذا التأثير المثبط.

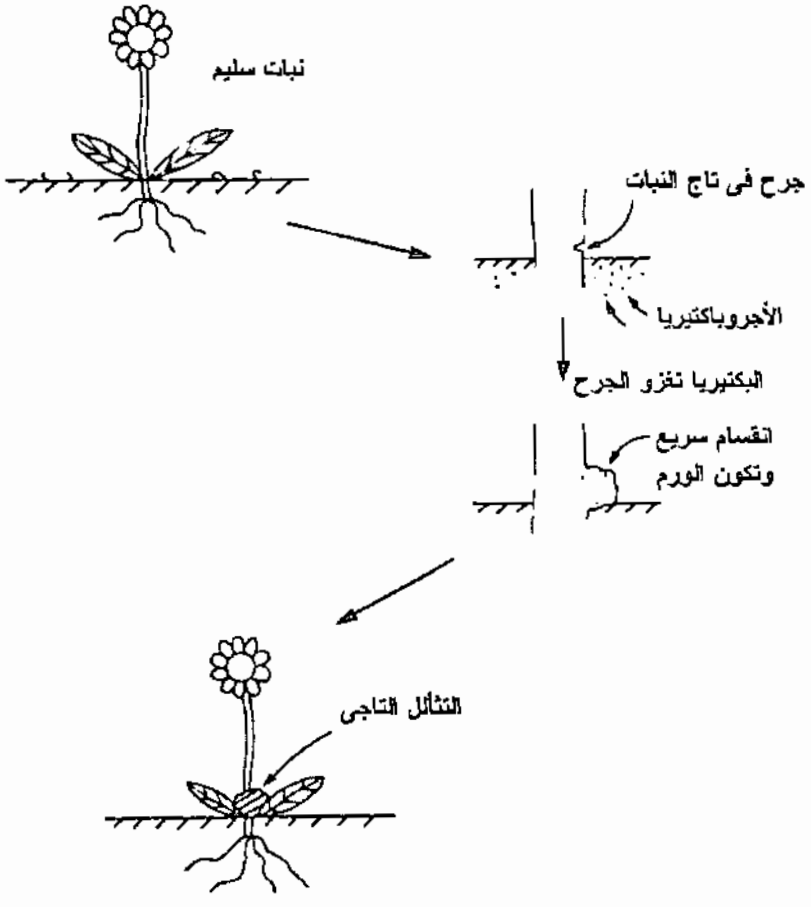
هذا وتنتج سلالات الأجروباكتيريم المختلفة آليلات خاصة من الـ vir A gene، يمكن لبعضها أن يشفر لبروتين vir A غير حساس للمركب الأيضى الثانوى الذى تطلقه النباتات الأحادية الفلقة. ولذا . فإنه من الضرورى فى عمليات التحول الوراثى للنباتات الأحادية الفلقة استعمال سلالة أجروباكتيريم تحتوى على جين vir A متوافق معها (عن Block ١٩٩٣).

كذلك أمكن زيادة كفاءة التحويلات الوراثية المعتمدة على بكتيريا الأجروباكتيريم، والتغلب على مشكلة عدم قدرة البكتيريا على إصابة عوائل معينة باللجوء إلى الترددات الصوتية العالية sonication. وفى هذه الطريقة يُعَرَّض النسيج النباتى المستهدف لفترات قصيرة من الموجات الصوتية الفائقة ultrasound فى وجود الأجروباكتيرم. ولقد أمكن بهذه الطريقة الحصول على تحويلات وراثية ثابتة فى فول الصويا. وأوضح التحليل الهستولوجى أن المعاملة أحدثت فى النسيج النباتى تشققات دقيقة ومتجانسة وقنوات، وهى التى ربما تكون قد ساعدت فى تسهيل الإصابة بالبكتيريا (عن Simmond & Smartt ١٩٩٩)

باثولوجى الإصابة بالأجروباكتيريم

عندما تحدث الجروح فى منطقة تاج النبات - أو فى أى مكان آخر منه - فإنه يمكن أن تحدث العدوى بالبكتيريا *A. tumefaciens* بسهولة، حيث تبدأ الخلايا النباتية فى

مكان الإصابة فى الانقسام والتضخم لتكون ورمًا tumor، أو ما يعرف بالتثأل التاجى (شكل ١٢-٢)، ثم تبدأ فى تمثيل مشتق من الأرجنين يطلق عليه اسم أوبين opine، يكون - عادة - إما نوبالين nopaline، وإما أوكتابين octapine، الأمر الذى يتوقف على سلالة الأجروباكتيريم المستعملة فى العدوى تستخدم هذه الأوبينات كمصادر للطاقة بواسطة البكتيريا وجدير بالذكر أن سلالات بكتيريا الأجروباكتيريم التى تستحث تمثيل النوبالين يمكنها النمو على النوبالين وليس الأوكتابين، والعكس بالعكس. وبينما توجه البكتيريا أيض النبات لإنتاج الأوبينات التى تستفيد منها كمصدر للطاقة، فإن تلك المركبات ليست لها فائدة للنبات (عن Gardner وآخرين ١٩٩١).



شكل (١٢-٢): كيفية ظهور أعراض التثأل التاجى crown gall

وعند وصف إنزيم polymerase يستعمل مصطلح DNA-dependent، أو RNA-dependent للدلالة على نوع الحامض النووى الذى يستعمله الإنزيم كقالب له. وبذا .. فإن DNA-dependent DNA polymerase ينسخ الدنا ليكون دنا جديد، والـ RNA-dependent RNA polymerase ينسخ الرنا ليكون رنا جديد. وتقوم تلك الإنزيمات بتمثيل الأحماض العضوية بوصل نيكليوتيدات معًا تكون قواعدها متممة لخيط الحامض النووى القالب.

أما الإنزيم reverse transcriptase فإنه يعد RNA-dependent DNA polymerase، وهو يقوم بإنتاج خيط دنا من قالب من الرنا. ويستعمل هذا الإنزيم أساسًا فى نسخ جزيئات RNA عند تحضير الـ cDNA (وهو الـ complementary DNA، أو الـ copy DNA، عن Nicholl ١٩٩٤).

الإنزيمات التى تحور نهايات جزيئات الدنا

تعمل مجموعة من الإنزيمات على نهايات جزيئات الدنا، ومن أمثلتها ما يلى:

Alkaline phosphatase

Polynucleotide kinase

Terminal transferase

ومن خلال وظائف تلك الإنزيمات، فإنه يستفاد منها فى أوجه شتّى.

وكما يستدل من الإسم، فإن إنزيمات الـ phosphatase، والـ kinase تقوم بوظيفة إزالة أو إضافة مجموعات الفوسفات. فمثلاً يقوم الإنزيم البكتيرى alkaline phosphatase بإزالة مجموعات الفوسفات من الأطراف الـ 5′ للدنا، تاركًا مجموعة الـ 5′-OH، ويستعمل الإنزيم فى منع الربط ligation غير المرغوب فيه لجزيئات الدنا، وهو الذى قد يتسبب فى مشكلة فى بعض إجراءات عزل الجينات.

أما الإنزيم terminal transferase فإنه يضيف - بصورة متكررة - نيكليوتيدات لأى نهاية 3′ متوفرة، وهو يستعمل أساسًا فى إضافة ذيل من الـ homopolymer لجزيئات الدنا قبل إنشاء التركيب الجديد له (عن Nicholl ١٩٩٤).

إنزيمات وصل الدنا

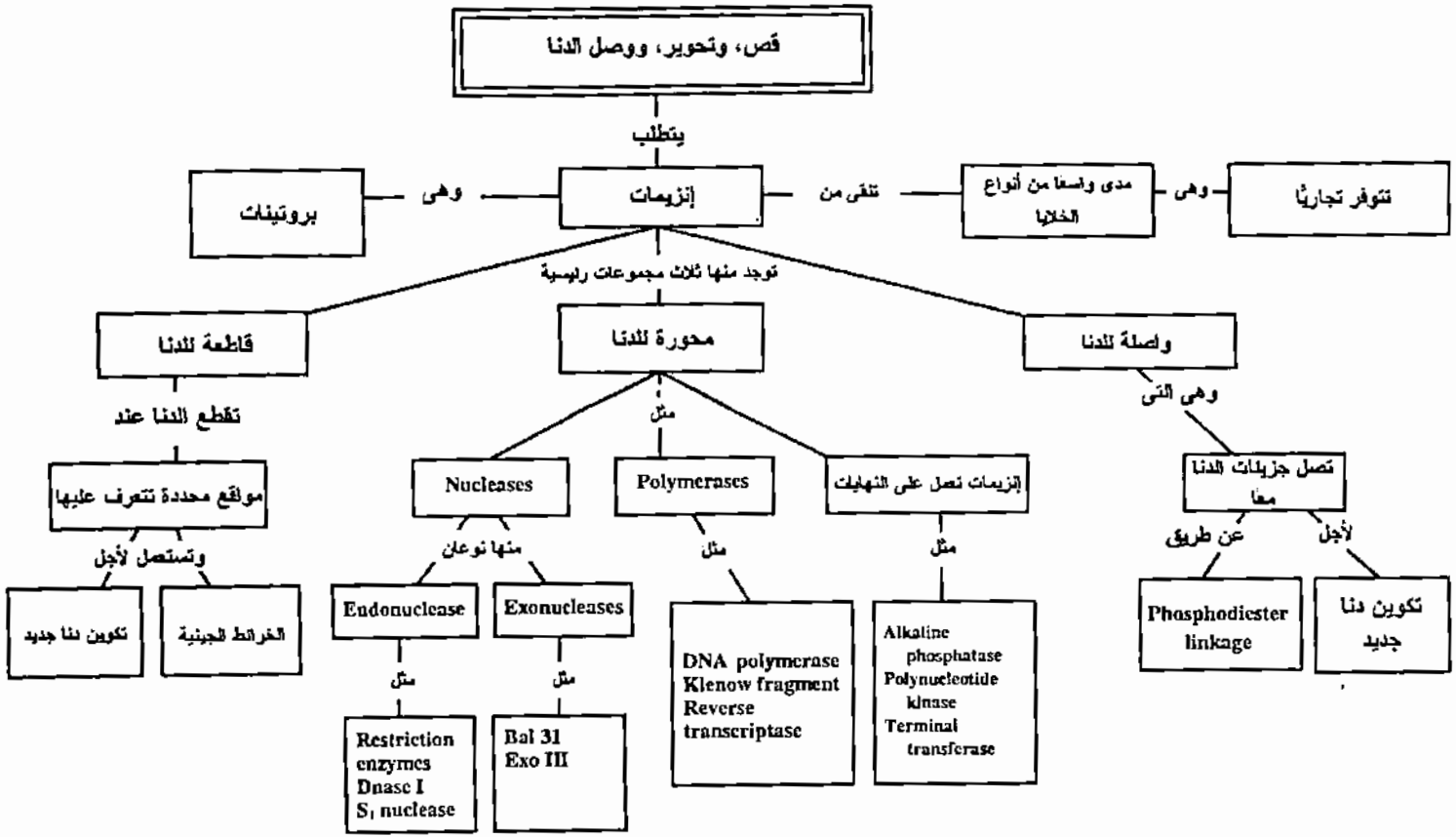
إن الإنزيمات التى تستعمل فى وصل جزيئات الدنا تعرف باسم DNA ligases وعندما يقطع كلاً من دنا الناقل vector DNA والدنا الغريب foreign DNA بالإنزيم القاطع restriction enzyme ذاته، فإن النهايتين المتطابقتين جزئيًا لكل من دنا الناقل والدنا الغريب تكونا متوافقتين ومكملتين لبعضهما البعض وعند خلط أجزاء الدنا وجزيئات الناقل معًا فإنهما يكونا أزواج متكاملة من القواعد بين التتابعات الطرفية المتطابقة جزئيًا لخيط الدنا المفرد. تعمل إنزيمات الـ ligases على الدنا ذات مجموعات الفوسفات الطرفية من النوع 5′، وتكون الرابطة الـ phosphodiester بين تتابعات كل من دنا الناقل والدنا الغريب لربطهما معًا. وتلك هى الخطوة الأخيرة فى تركيب جزئ دنا جديد recombinant DNA molecule. وتعرف تلك العملية باسم ligation (عن Chawla ٢٠٠٠)

تعد إنزيمات ربط الدنا DNA ligase من الإنزيمات الخلوية الهامة؛ إذ إنها تعمل على إصلاح الروابط الـ phosphodiester التى قد تحدث عشوائيًا، أو كنتيجة لانقسامات الدنا أو انعزالاته وتستعمل هذه الإنزيمات فى مجال الهندسة الوراثية فى لحام حالات عدم الاستمرارية فى سلاسل الـ sugar-phosphate التى تنشأ عند تكون الدنا الجديد، وذلك بربط جزيئات دنا من مصادر مختلفة، وهى بذلك تعد بمثابة صمغ جزيئى يستعمل فى لصق قطع من الدنا مع بعضها البعض وتعد هذه الوظيفة أساسية لنجاح عديد من الخطوات.

وأكثر إنزيمات الربط استعمالاً الإنزيم T4 DNA ligase. الذى يُحصل عليه من البكتيريا *E coli* المصابة بالبكتيريوفاج (الفاج البكتيرى) T4

وجدير بالذكر أن جميع عمليات قص الدنا ولصقه تتم فى أنابيب الاختبار، إلا أنه ما أن يُحصل على الدنا الجديد recombinant DNA، فإنه يتعين إكثاره حتى يتوفر لدينا قدر كافٍ منه لعمليات التداول التالية وتجرى عملية الإكثار هذه فى كائن حىّ

هذا ويلخص شكل (١١-١٤) الأنواع المختلفة من الإنزيمات المستعملة فى مجال التعامل مع الدنا ووظائفها (عن Nicholl ١٩٩٤)



شكل (١١-١٤): الإنزيمات المستعملة فى مجال التعامل مع الدنا ووظائفها.