الجولة السادسة:

«اكتشاف إنزيمات التحديد والبتر restriction enzymes وانـزيم الليجيز Ligase:

اكتشفت إنزيمات التحديد والبتر Nucleases فى البكتيريا فى عام ١٩٦٨م.

وفى مراجع أخرى تذكر أنه فى عام ١٩٦٢م، اكتشف (Arber) وجود إنزيمات التكسير وحصل على جائزة نوبل عام ١٩٧٨م، وفى عام ١٩٦٧م اكتشف (Gellert) إنزيمات الـلصق Ligases، ولقد أوجدها المولى عز وجل فى خلايا البكتيريا ـ [أنواع منها] لتصبح وسائل دفاعية؛ تتمكن بواسطتها البكتيريا من الدفاع عن نفسها ضد بعض أنواع الفيروسات التى تهاجمها (من نوع لاقمات البكتيريا Phages or bacteriophages) وتسمى أيضاً «الفاجات». ولهذه الإنزيمات القدرة على أن تهزم وتمزق الفيروسات المهاجمة بتقطيع چيناتها (مادتها الوراثية).

وبالتالى تتلف هذه المادة الوراثية للفاجات فتحدّ من انتشارها.

وسرعان ما تبين أن إنزيم التحديد بخلاف المقصات الحقيقية، أداة تدقق فيما تقطعه ، فهى متخصصة وتعمل كمقص منمق، لا تقطع جديلة الدنا إلا بعد ما تبحث به جيداً وتلاقى فيها تتابعاً معيناً من الحروف (نقاط معينة من القواعد النيتروچينية)، يقطع عنده الإنزيم ـ ما بين قاعدتين محددتين له وبالتالى تحولها لقطع عديمة النفع فتتلف المادة الوراثية للفاجات ـ (كما ذكرنا منذ قليل) ـ فتحد من انتشار هذه الفاجات. ومن هذا المنطلق تم استغلال هذه الإنزيمات واستخلاصها من البكتيريا فكانت فتحاً للدخول لعالم الهندسة الوراثية.

ونحن نعرف الآن «٤٠٠» نوع مختلف من إنزيمات التحديد ـ من أنواع عديدة من البكتيريا ـ يتعرف كل منها على تتابع مختلف من حروف دنا وراثى ليقطع عندها وكأنه مقص لا يقطع الورق إلا عندما يجد كلمة «تحديد».

وهناك إنزيمات الليجيز Ligases:

وهى الأداة التى تصل وتَحيك (تلصق) الجمل السائبة (المقاطع) من «دنا» أينما

وقع عليها، وهذه الإنزيمات موجودة طبيعياً فى الخلايا، ووظيفتها إصلاح التكسير أو التقطيع الذى يحدث فى الدنا أثناء عملية التضاعف (DNA replication) حيث لها القدرة على ربط قطعتين معاً، وبالرغم من أن كل الخلايا الحية تحتوى على ligases إلا أن الإنزيم الذى يُستخدم فى الهندسة الوراثية مستخلص من بعض أنواع بكتيريا الأمعاء E.coli.

وإذا ما تجولنا فى عالم إنزيمات التحديد واللصق لبعض الوقت (على أن نستكملها فى جولات أخرى). نذكر:

١ـ بالنسبة لأنواعها: نذكر أولاً أنه تتم عملية التكسير من خلال تكسير الروابط الفوسفاتية ثنائية الإستر. والنوعان هما:

(أ) **Exonucleases**: وهى إنزيمات لها المقدرة على قطع أو تكسير نيوكليوتيدات من أطراف «الحامض النووى DNA».

(ب) **"Endonucleases"** وهى إنزيمات لها المقدرة على تكسير الروابط الفوسفاتية ثنائية الإستر داخل جزىء الـ DNA. وبعض إنزيمات Nucleases لها القدرة أيضاً على تكسير الـ RNA مثل إنزيم الـ RNAase والذى يتم معاملة الـ DNA المستخلص به وذلك لتنقية الـ DNA من الـ RNA. وتوجد أنواع عديدة من إنزيمات القطع وتختلف هذه الأنواع عن بعضها البعض حسب تتابع النيوكليوتيدات التى يحدث عندها القطع. ومنها إنزيمات Hpal، Ecori، Hind III

٢ـ بالنسبة لطول القطع:

وعادة طول القطع الذى يتعرف عليه إنزيم القطع ما بين ٤ و ٨ نوتيدات (حسب نوع الإنزيم)، وأطلق على هذه الإنزيمات اسم إنزيمات التحديد، يرجع ذلك فى الأصل لأنها تحدد مجال العوائل التى يمكن للفيروس أن يحيا بها، وهذه الإنزيمات يصفها الباحثون بأنها تعمل مثل مقراص أسلاك تحت ميكروسكوب، ولقد مكّن العمل على أنواع عديدة من البكتيريا غير الضارة مثل بكتيريا إيشيريشيا كولاى E.coli الباحثين من تعلم كيفية نقل أجزاء محددة من المادة الوراثية من كائن لآخر، وتنجح عملية نقل مادة وراثية من كائن لآخر بناءً على مبدأ أن للمادة الوراثية

للكائنات الحية جميعاً نفس البنية الكيماوية، وبالتالى يمكن استعمال إنزيمات التحديد للقطع ثم باستخدام إنزيمات الوصل أن نصل قِطع دنا مأخوذة من بكتيريا فى دنانيات أو حيوان بل وتولج قطعة من دنا بشرى فى المادة الوراثية لنبات أو لبكتيريا فيتكوَّن لدينا ذلك الدنا (المطعوم أو الهجين) Recombinant DNA فى المعمل، والذى نتج عن وصل قطع دنا من مصادر (كائنات حية) مختلفة.

أمثلة:

إنزيم "EcoR 1" البكتيريا المنتجة له هى إيشيريشيا كولاى E.Coli والتتابع على الجديلتين وموقع البتر: ٥ ـ ج. أ أ ث ث س والأطراف بعد البتر لزجة

س ث ث أ أ . ج ـ ٥

إنزيم "Hind III" والبكتيريا المنتجة له هى Haemopilus influenzae، التتابع على الجديلتين وموقع البتر: ة أ.أ ج س ث ث والأطراف بعد البتر لزجة

ث ث س ج أ. أ

التفسير:

(أ) ولتفسير الأمثلة السابقة نذكر المثال الأول حيث إنزيم "ECORi" وهذا الإنزيم مأخوذ من بكتيريا إيشير يشيا كولاى E.coli. ومن المعلوم مُسبقًا أن ترتيب النيوكليوتيدات على أحد شريطى DNA يكون من ٥ : ٣، فيكون ترتيب النيوكليوتيدات بالجديلة الثانية هو من ٣ ـ ٥ [راجع كتابنا الأول].

وهذا الإنزيم يتعرف على تتابع من ست نيوكليوتيدات (تتابع التعرف) هى:

٥ ـ ج أ أ ث ث س ـ ٣ ، ويقطع ما بين القاعدتين (ج ، أ)

٥ ـ ج. أ أ ث ث س ١ ـ الجديلة ١ (الاتجاه من ٥ ـ ٣).

س ث ث أ أ ج ـ ٥ ٢ ـ الجديلة ٢ (الاتجاه من ٣ ـ ٥).

ملحوظة: يُشار إلى مكان القطع بالنقطة، الإنزيم يتعرف على مكان القطع فى الجديلة ١ فيقطع عندها، ويتعرف على مكان القطع فى الجديلة ٢ فيقطع عندها.

ومن هنا يتبين أن إنزيمات التحديد طالما وجدت التتابعات التى تتعرف عليها بالمادة الوراثية فهى تعمل عندها دون تفرقة بين كائن حى وآخر، وكلما كان التتابع

الذى يتعرف عليه إنزيم التحديد طويلاً ـ بحيث يقل احتمال وجوده ـ كان هذا الإنزيم هو الأفضل بالنسبة للباحث لأنه ينتج عدداً محدوداً من الشظايا المبتورة يمكن فصلها وفحصها.

شكل الأطراف بعد البتر:

قد يكون مكان البتر بوسط التتابع فيترك مكان القطع بالجديلتين بأطراف جافة blunt ends (وتكون النهايات منتظمة) وقد يكون مكان القطع بالجديلتين بأطراف منحرفاً عن وسط التتابع ـ كما رأينا فى المثال السابق ـ ليترك مكان القطع بأطراف أو نهايات غير منتظمة وتسمى أيضًا [أطراف لزجة sticky end].

لماذا لا تهضم إنزيمات التحديد الدنا البكتيرى؟!!

هناك تفسيرات عديدة تفسر السبب وراء أن إنزيمات التحديد المستخرجة من البكتيريا لا تقطع الدنا الوراثى الخاص بهذه البكتيريا، ومن هذه التفسيرات نذكر ما يلى:

١ـ أن البكتيريا المنتجة لإنزيم التحديد تُرقم ما يحمل دناها من هذا التتابع بإضافة ذرة كربون لبضع قواعد منه، فتحفظ بذلك جهازها الوراثى .

ـ [سبحان الله تعالى] ـ تحفظه من البتر وهذا يذكرنا بما سبق ودرسناه بالمراحل التعليمية المختلفة عن كيف أنه لا تقوم إنزيمات الهضم بالجهاز الهضمى بهضم المعدة والاثنى عشر والأمعاء؟!! وكيف أن حمض HCL لا يتسبب فى العادة فى أى ضرر للمعدة رغم خواصه الحامضية المعروفة بقوة تركيزها!!

٢ـ والتفسير الثانى:

ويُعتبر مُكملاً .. ويذكر أن للبكتيريا إنزيمات للوقاية الذاتية تصلح بها دناها عندما يُكسَر أو يُساء نسخه (هى إنزيمات اللصق Ligase).