

DNA Ligase Enzymes

أنزيمات الربط في جزيئة الدنا

بعد اكتشاف أنزيمات القطع للدنا ظهرت مشكلة ربط جزيئات الدنا مع بعضها لتشكيل دنا مركب أو هجين ولم تدم هذه المشكلة طويلاً حيث تم حلها عن طريق اكتشاف أنزيمات تسمى أنزيمات ربط الدنا **DNA Ligase Enzymes** وذلك في عدة مخابر كان مصدرها الأحياء الدقيقة .

❖ **آلية عمل هذه الأنزيمات :** تشكيل روابط فوسفاتية ثنائية الأستر بين سلسلتي الدنا المقطوعة يتم عمل هذا

الأنزيم بتوفر ثلاثة عناصر أساسية :

(١) زمرة الهيدروكسيل **OH** على النهاية 3 للدنا المقطوع .

(٢) زمرة فوسفاتية ثنائية **P** على النهاية 5 للدنا المقطوع .

(٣) مصدر الطاقة الذي يكفل تأمين الطاقة اللازمة لربط الزمرتين **OH** مع **P** ، ولدينا حالتين :

أ- إذا كان العمل المخبري يتم على الخلايا عديمة النواة تؤمن تلك الطاقة من مركب NAD^+ .

ب- إذا كان العمل المخبري يتم على خلايا حيوانية وملتزمة الجراثيم (الفيروسات) تؤمن تلك الطاقة من مركب **ATP**

ملاحظة

ATP سكر خماسي مرتبط مع الأدينين وثلاث جزيئات فوسفور .

❖ **مهمة أنزيمات الربط :** تنحصر مهمة أنزيمات الربط في مهمتين رئيسيتين ، حيث أنه أثناء عملية التضاعف

يحدث انقطاع السلاسل بالعمود الفقري للدنا فتقوم أنزيمات الربط بـ :

١. ترميم هذا الانقطاع في السلسلة أو في السلسلتين .

٢. وأيضاً يقوم بربط سلسلتي الدنا المقطوع المتضاعف وإنتاج سلسلة جديدة موصولة مع بعضها البعض .

وبعد عملية الربط نحصل على ما يسمى الدنا الهجين .

❖ مراحل وخطوات عملية الربط :

- ١- يتم التفاعل بين أنزيم الربط Ligase مع مركب الطاقة ATP وتشكيل معقد يسمى أنيسيلات الأنزيم AMP ^{تعريف} حيث يرتبط AMP مع الزمرة NH_2 للحمض الأميني في الموقع الفعال للأنزيم ويترافق ذلك مع تشكيل رابطة فوسفوأميدية.
- ٢- ينشط الـ AMP ارتباط المجموعة الفوسفاتية على النهاية 5 .
- ٣- تتحقق من خلال تقدم OH على النهاية 3 لترتبط مع ذرة الفوسفات الفعالة بواسطة AMP وبالتالي تشكيل رابطة فوسفاتية ثنائية الأستر مع تحرير AMP .
- يتم تفعيل سلسلة التفاعلات الأنزيمية من خلال حلقة البيروفوسفات الذي تم تحريره أثناء تشكيل معقد AMP وبالتالي يمكن القول أنه يصرف رابطتين عاليتين الطاقة لتشكيل رابطة فوسفاتية ثنائية الأستر في العمود الفقري للدنا عند استخدام معقد AMP كمصدر للطاقة . ^{صح وخطأ}

❖ أنواع أنزيمات الربط : هناك نوعين من أنزيمات الربط حسب المصدر هما : ^{مهمات}

A. أنزيمات الربط المعزول من عديمات النواة ، مثل : **E.coli** وما يتميز به هذا الأنزيم :

١. يستطيع هذا الأنزيم ربط الدنا المقطوع ذو النهايات اللزجة والممتدة لكنه غير قادر على ربط الدنا المقطوع ذو النهايات الحادة .
٢. الطاقة اللازمة لهذا الأنزيم تأتي من مركب NAD^+ .
٣. الحرارة المثلى اللازمة لعمل أنزيمات الربط هي 37 C لكن وجد أن الروابط المتشكلة في هذه الحرارة غير ثابتة (مترهلة) وبالتالي تم إثبات أن الحرارة العملية لعمل هذه الأنزيم $(4-20\text{ C})$.

B. أنزيم الربط المعزول من الفاج (الفيروس) T_4 (آكل الجراثيم) ، وما يتميز به هذا الأنزيم :

- لا يستطيع الأنزيم السابق ربط دنا مقطوع بنهايات حادة إلا بشرط واحد وحالة خاصة هي إذا كانت قطع الدنا بكثافة عالية فيقوم بعملية ربط لكن بكفاءة ومردود أقل .

- في عام ١٩٨١ تم التغلب على هذه المشكلة بعزل أنزيم ربط **E.coli** ولكن المخلوطة بدنا فيروس **T₄** حيث يمكن لهذا الأنزيم ربط الدنا المقطوع بنهايات مقطوعة ولكن بكفاءة أقل من كفاءة ربط النهايات للزجة والممتدة .

❏ ما هي الأنزيمات النووية الأخرى المستخدمة في أبحاث الدنا ؟ سؤال مهم

على العموم لتحضير الجزيئة المؤشبة من دنا يتم أولاً تقطيع الدنا بأنزيم محدد للناقل ونقوم بتقطيع دنا المصدر (المعطي للمورثة المرغوبة) ويمكن تقطيعه بنفس أنزيم القطع ثم نقوم بربط الدنا المقطوع من المصدرين لتشكيل دنا مؤشَب (هجين) ، وتعتبر عملية التقطيع والربط أساس تقانة استنساخ الجينات وهما المثالين عن التقانات الممكن إجراؤها .

- في العقود الأخيرة تم تطوير عدد من التقانات الأخرى فأصبح بالإمكان تعديل جزيئات الدنا ، بمعنى :

١. تقصير جزيئات الدنا أو تطويلها أو نسخها لجزيئات جديدة أو نسخها لـ RNA .
٢. يمكن معالجة (تغيير) جزيئات الدنا من خلال إضافة أو حذف مجموعات أو زمر كيميائية معينة ويتم ذلك من خلال استخدام أنزيمات ذات نقاوة عالية ، وقد تطورت في العقود الأخيرة صناعة حقيقية بهذا المجال كالتقطع والربط والتعديل .

- أما الأنزيمات الأخرى المستخدمة في تقانة الدنا المؤشَب يمكن تصنيفها بأربعة أصناف أو صفوف يعتمد كل صف على نوع التفاعل الذي يتوسطه ، فنجد :

- الصف الأول : أنزيمات النوكلياز Nuclease : هي أنزيمات مسؤولة عن تقطيع وتقصير وتحلل الأحماض النووية بشكل عام (وقد تعمل على الـ RNA أيضاً) .
- الصف الثاني : أنزيمات البلمرة DNA Polymerase : وهي المسؤولة عن عملية تضاعف الحمض النووي DNA .
- الصف الثالث : أنزيمات التعديل Modifying Enzymes : وهي أنزيمات تلغي أو تضيف زمر كيميائية معينة لبنية الدنا .
- الصف الرابع : المماكة الموضعية ^٣ : لها وظيفة خاصة وهي مسؤولة عن حل العقد المتشكلة أثناء عملية تضاعف الدنا .