## الانزيمات القاطعة Restriction Enzymes :

و تدعى ايضا بالمقصات الجزيئية molecular scissors: اكتشفت عام ١٩٦٢ في بكتريا E.coli . هذه البكتريا لها نظام مناعي انزيمي يعمل على التعرف او تشخيص وتحطيم جزيئات الـDNA الغريبة الداخلة للخلية .تم التعرف على حوالي ٣٠٠٠ انزيم . تم عزل وتنقية العديد منها متوفرة حاليا بالاسواق .

التسمية :- تتم التسمية كل انزيم اعتمادا على اسم البكتريا التي اكتشف فيها .

مثال : EcoR1

Genus: Escherichia
Species: coli
Strain: R
Order discovered: 1

- لكل انزيم موقع قطع خاص به يسمى ( موقع القطع restriction site) يتعرف عليه ليقطعه. ويمتاز هذا الموقع بأنه مؤلف من ٤-٨ زوج قاعدي bp ذات تناظر palindromic يقرأ من اليمين الى اليسار . نفس ما يقرأ من اليسار الى اليمين مثل كلمة (باب ، دعد ، شيش ) .

- **5’-GGATCC-3’**

- **3’-CCTAGG-5**

- تقطع الانزيمات نوعين من الاواصرفي جزيئة الـDNA: الاواصر الهيدروجينية الرابطة بين الشريطين والاواصرالفوسفو داي استر التي تربط العمود الفقري لكل شريط.

- هنالك نوعان من الانزيمات القاطعة اعتمادا على طريقة القطع :

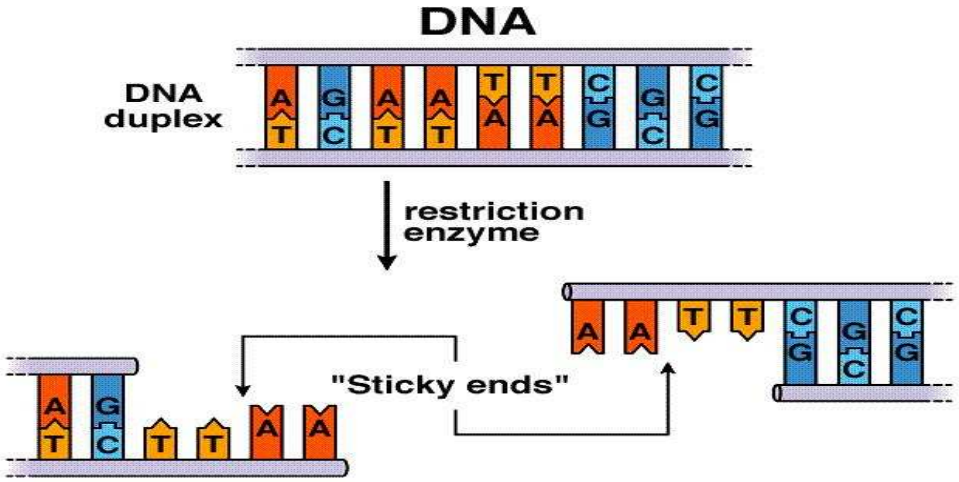
- الانزيمات ذات القطع المباشر حيث تقطع بطريقة مباشرة من متصف موقع القطع تاركة نهايات تسمى بالنهايات العمياء blunt ends ذات اشرطة مزدوجة ( لاحظ الجدول) .

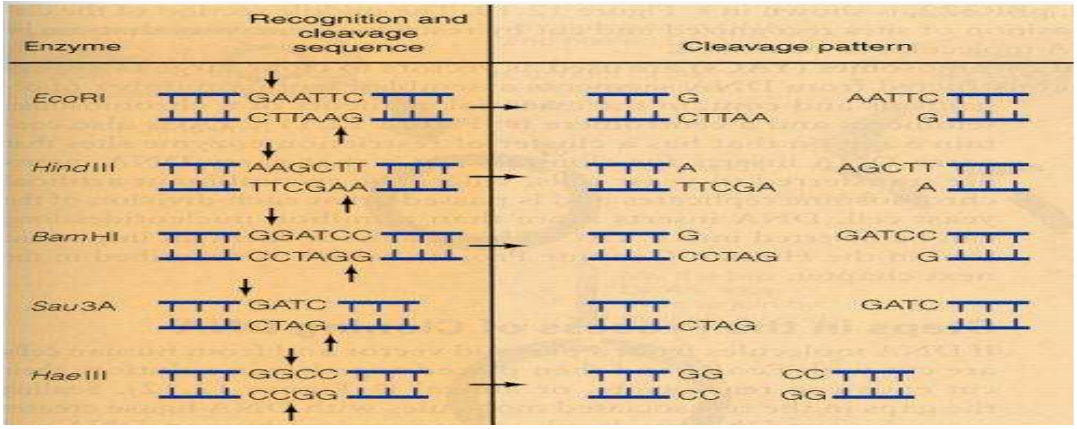
- PvuII 5'…CAGCTG…3'

- 3'…GTCGAC…5'

- الانزيمات ذات القطع المتعرج حيث تقطع بطريقة غيرمباشرة في موقع القطع تاركة نهايات ذات شريط مفرد تسمى بالنهايات اللزجة sticky ends وذلك لان لها القدرة على ارتباطها باي شريط DNAمن اي كائن اخر يمتلك القواعد المتممة لهذه النهايات ذات الشريط المفرد ( وهذا جوهر المبدأ الذي تمت الاستفادة فيه من هذه الانزيمات في الهندسة الوراثية .

Sylvia S Mader, Biology, 6th edition. © 1998 The McGraw-Hill Companies, Inc. All rights reserved.

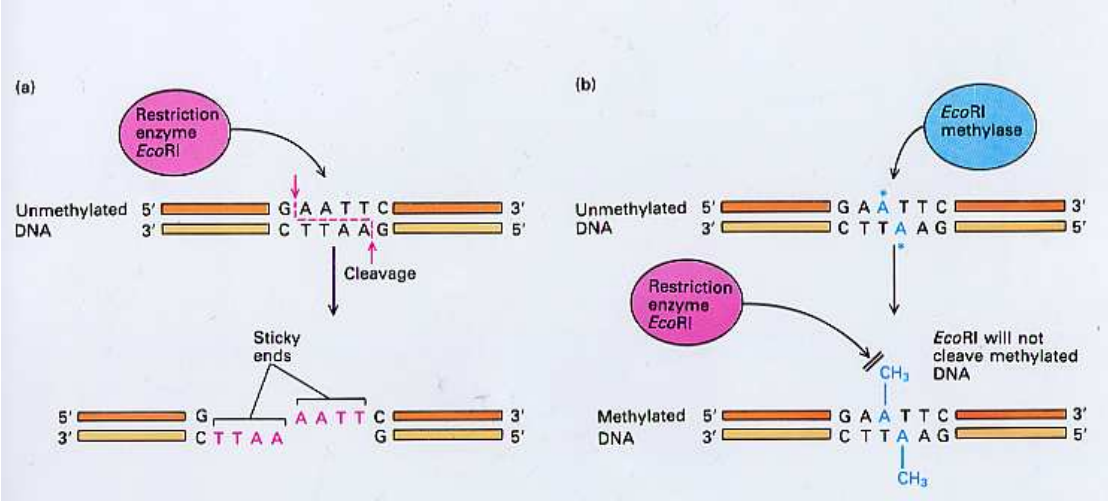


لماذا لا تقوم البكتريا بقطع الـ DNA الخاص بها بانزيماتها القاطعة ؟

- وذلك عن طريقة مثيلة ( اضافة جزيئة مثيل cH3 ) الى احدى قواعد الادنين في مواقع القطع المحدد للانزيم وهو بمثابة علامة للتنبيه لمنع القطع .

.



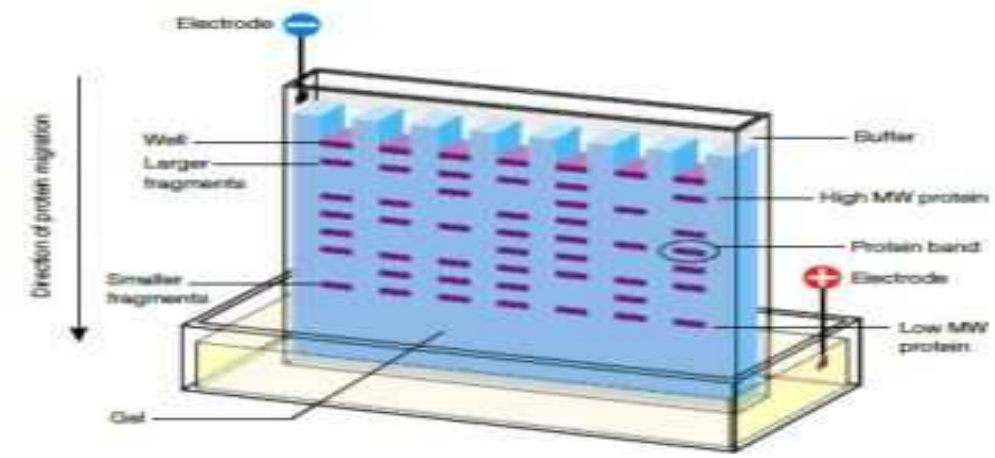

## استخدامات( او تطبيقات ) الانزيمات القاطعة

- التباين RFLP( Restriction Fragments Lengths Polymorphisms الوراثي لاطوال قطع DNAبالانزيمات القاطعة . يتباين الافراد عند قطع الDNA الخاص بكل واحد منهم الى اطوال مختلفة تباينا ملحوضا عند قطعها بنفس الانزيم القاطع اذ ينتج كل DNA قطع متباينة الاطوال تختلف من شخص لاخر وتستخدم في تحديد هوية الاشخاص في الطب العدلي وفي التحقيقات الجنائية وتشخيص الامراض وغيرها.

- تحديد تعاقب جزيئات DNA sequencing DNA.
- حفظ جزيئات ال DNA في بنك الجينات .
- اجراء عمليات الكلونة لقطع ال DNA والتحول في البكتريا.
- التحليل واسع المدى للجينات مثل رقائق الجينات .

## جهاز الترحيل الكهربائي Gel Electrophoresis :

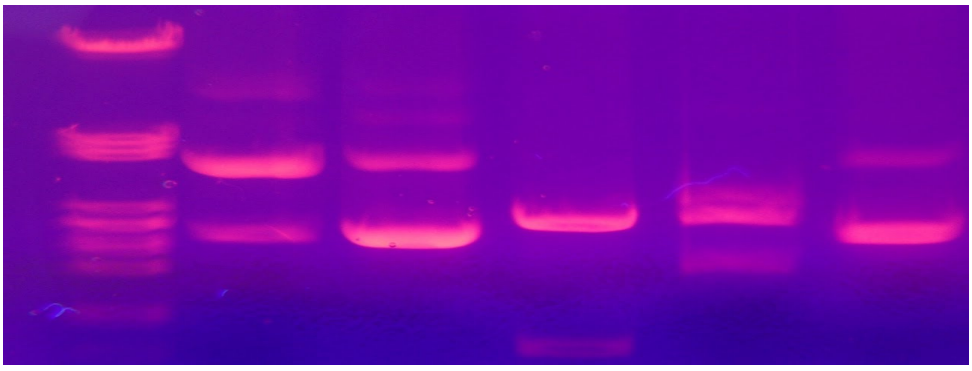
وهو جهاز(مكون من حوض ذوقطبين كهربائيين ومصدر للطاقة ومحلول منظم buffer ) يستعمل لفصل مجموعة من الجزيئات او المكونات ( مثلا خليط من البروتينات او من قطع الDNA ) اعتمادا على شحنتها charge وحجمها size موضوعة في هلام gel موضوع في مجال كهربائي. يتكون هذا الجهاز من قطبين سالب (كاثود) وموجب (انود ) ومحلول منظم ذو PH محدد ( لحماية المكونات من التلف ) . هنالك نوعان من هذا الجهاز : عمودي vertical و افقي horizontal.






يصنع هلام الاكاروز (يفصل هلام الاكاروز من ٥٠٠-٣٠٠٠٠ زوج قاعدي) بتركيز معين ويعمل فيه حفر pits توضع فيها العينات ( مثل الـDNA) ، يملأ الحوض بالمحلول المنظم يوصل القطبان بمصدر للطاقة على فولتية محددة .يمزج الـDNA مع صبغة البروموفينول الزرقاء لكي يمكن رؤيته اثناء حركته من الحفر ، توضع حفر - DNA بالقرب من القطب السالب ليتسنى للـDNA السالب بالحركة نحو القطب الموجب (الانود) .

بعد انتهاء الترحيل الكهربائي يصبغ الهلام بصبغة مشعة مثل بروميد الايثيديوم التي ترتبط بالـDNA و التي تتوهج عند تسليط الاشعة فوق البنفسجية UV فوقها.



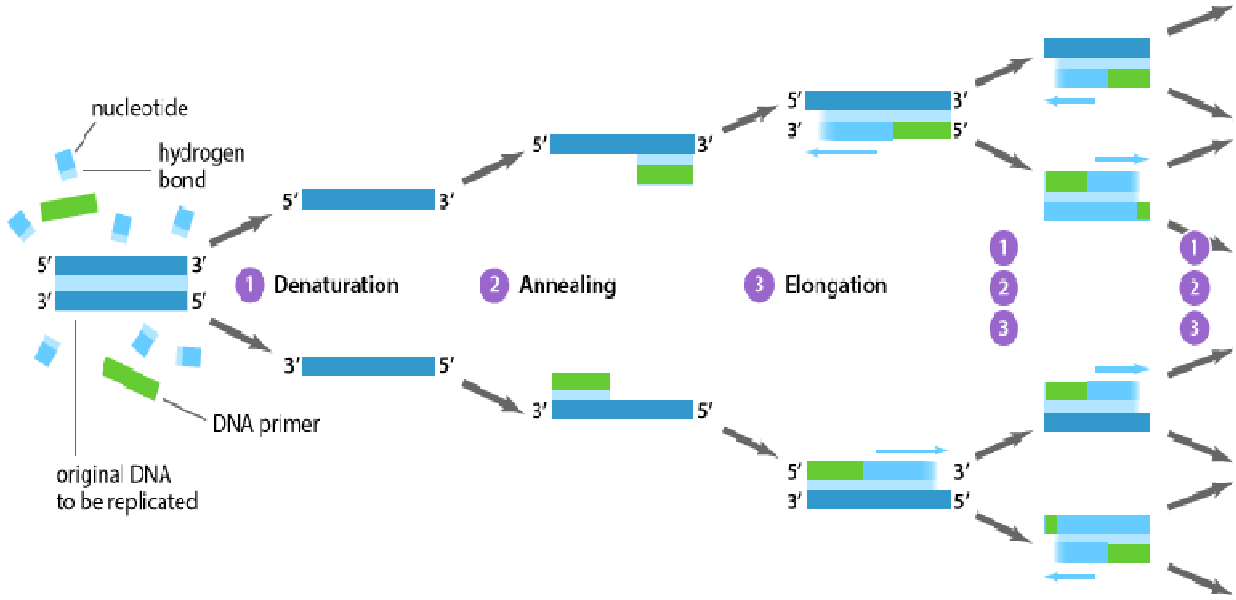
**تقنية الـ PCR :**

The PCR Cycle : Comprised of 3 steps:

1 - **Denaturation** of DNA at $95^0$C

2- Primer hybridization ( **annealing**) at 40-$50^0$C

3- DNA synthesis ( Primer **extension**) at $72^0$C

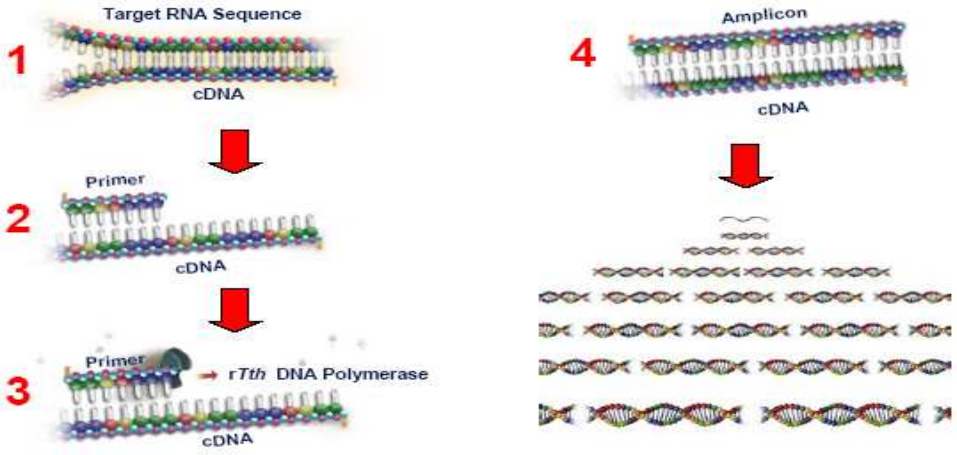



**من انواع الـ PCR :**

**RT – PCR(Reverse Transcriptase PCR)** يستخدم الـRNA كقالب اولي لصنع الـDNA ويوجه تسلسل القواعد في الـ RNA تسلسل قواعد الـ DNA بأستخدام انزيم التناسخ العكسي ويكون الناتج النهائي :

double strand complementary DNA( ds cDNA)

PCR Step 1 - Denaturation by Heat
PCR Step 2 - Annealing of Primer to cDNA
PCR Step 3 - rT*th* DNA Polymerase Catalyses Primer Extension
End of 1st PCR Cycle - Yields a Double-Stranded DNA Copy (Amplicon) of the Target Sequence




## تعاريف مهمة

Transcripteomics : وهو دراسة كل النواسخ transcripts التي يصنعها الكائن الحي في وقت محدد .

Proteomics : وهو دراسة كل مجموعة البروتينات التي يتم التعبير عنها في خلايا محددة اوكائن في وقت معين تحت ظروف محددة .