استخدام قواعد البيانات لتحديد مواضع القطع ورسم خارطة التقييد للجين المشفر لأنزيم اللايبيز من بكتريا *Bacillus stearothermophilus*

Using of Data Base to Determine the Restriction Sites and Drawing Restriction Map for Lipase Gene from *Bacillus stearothermophilus*

حميد مجيد جاسم
كلية العلوم / جامعة النهرين

Hameed M. Jasim
College of Science/Al-Nahrain Univsity.

المسخلص

استخدمت قواعد البيانات الخاصة بأنزيمات التقييد (Rebase) والبروتينات ذات العلاقة في تصميم برنامج تنفيذي بلغة Quick basic لتحديد مواضع القطع ورسم خارطة التقييد لجين اللايبيز من بكتريا *Bacillus stearothermophilus* . وقد تم التمكن باستخدام هذا البرنامج الذي يعد ذو فائدة كبيرة في التنبؤ بأنماط التقطيع لجزيئات الدنا الأرتباطية من تحديد مواضع القطع الخاصة بستة عشر إنزيم من بين 46 نوع من إنزيمات التقييد المختلفة التي شملتها الدراسة . وقد أظهرت النتائج إن كل من إنزيمات التقييد *Sma*I و *Xho*I و *Sal*I و *Dde*I و *Cla*I و *Eag*I و *Bsp*HI و *Acc*I و *Eco*RV و *Hae*II و *Ban*I و *Bcl*I و *Cfr*I و *Sst*I و *Ksp*I و *Nae*I تمتلك تسلسلات تعرفيه ومواضع قطع في مناطق مختلفة من تعاقب الجين . وقد تم تحديد تلك المواضع بدقة وحساب حجوم القطع الناتجة في حالة المعاملة بهذه الأنزيمات . كما تم التمكن من رسم خارطة التقييد لجين اللايبيز التي تبين المواضع الحساسة لإنزيمات التقييد وتحديد المنطقة المشفرة للإنزيم والبالغ حجمها 1254 زوج قاعدي ضمن التعاقب النكليوتيدي الكامل للجين البالغ حجمه 1725 زوج قاعدي .

Abstract

Specific data base was used for restriction enzymes (rebase) and related proteins, to design executive program in quick basic language to determine the restriction sites and drawing restriction map for the complete sequence of lipase gene from *Bacillus stearothermophilus*. This program which was of a great benefit in prediction of the restriction patterns for the analysis of recombinant DNA molecules was used to determine the restriction sites for 16 enzyme among 46 type of different restriction enzymes having recognition sequences included in lipase gene which they are *Sma*I, *Xho*I, *Sal*I, *Dde*I, *Cla*I, *Eag*I, *Bsp*HI, *Acc*I, *Eco*RV, *Hae*II, *Ban*I, *Bcl*I, *Cfr*I , *Sst*I, *Ksp*I and *NaeI*. Results showed that it could be determine accurately the restriction sites and fragments sizes resulted in case of the treatment of lipase gene with these restriction endonucleases. It was also enabled to draw restriction map specific for these enzymes and determine coding region for lipase gene sized of 1254 bp included in the complete sequence for the cDNA of the gene sized of 1725 bp.

المقدمة

يعرف النوع الثاني من إنزيمات التقييد بأنها تلك المجموعة من الإنزيمات التي تتميز بقابليتها على التعرف على تسلسلات خاصة ضمن جزيئات الحوامض النووية (DNA) مزدوجة الخيط وتقطع بنمط معين ضمن أو قرب ذلك التعاقب [1] . وقد عزلت أعداد كبيرة ومتنوعة من هذه الإنزيمات بلغت 3698 أنزيم تقييد منها 262 أنزيم مشخصة بدقة ، وقد دونت عنها المعلومات بالكامل ضمن قواعد البيانات الخاصة بإنزيمات التقييد (Rebase) التي تضم المعلومات الكاملة عن هذه الإنزيمات من حيث التسلسل التعرفي ، موضع القطع ، الأنزيمات متناظرة القطع ، التوفر التجاري ، الحساسية للمثيلة ، بيانات التسلسل ، التراكيب البلورية والحرارة المثلى لعمل الإنزيم .

كما تتضمن أيضاً أنزيمات الدنا الناقلة للمثيل (DNA methyl transferases) ، أنزيمات الثلم (Nicking enzymes) وتخصص الوحدات الفرعية لهذه الأنزيمات [2 ،3] . أن القابلية الدقيقة لهذه الأنزيمات على كسر جزيئات DNA سمحت بنشر وتضاعف جزيئات الـ DNA المختلفة كالبلازميدات ، العاثيات والفايروسات الحيوانية فضلاً عن وضع الخرائط الفيزيائية لمثل هذه الجزيئات [4] . وقد استخدمت بعض الجزيئات الصغيرة الحجم لتحديد التسلسل التعرفي ومواضع القطع الخاصة بهذه الأنزيمات وذلك بعد تطور التقنيات السريعة لتحديد التعاقب والتي قادت إلى تحديد التعاقب النكليوتيدي الكامل للبلازميد pBR322 [5] والفايروسات SV40 [6] وØ X174 [7] ، حيث تم التمكن من استنباط التسلسل ألتعرفي ومواضع القطع لأنزيمات التقييد المكتشفة حديثاً من خلال معاملة هذه الجزيئات الصغيرة بأنزيم التقييد المراد تشخيصه بالتعرف على نمط التقطيع وحجوم القطع الناتجة بمساعدة الحاسوب [8] .

إن تصميم برنامج تنفيذي بمساعدة الحاسوب لتعيين التسلسل ألتعرفي ومواضع القطع لأنزيمات التقييد ضمن جزيئات الـ DNA المختلفة وتحديد حجوم القطع الناتجة من المعاملة بهذه الإنزيمات يعد ذو فائدة كبيرة لتشخيص الطفرات الوراثية التي تتعرض لها الجينات كطفرات الغرس ، الحذف أو الاستبدال لزوج قاعدي واحد أو أكثر مما يساهم في تحديد درجة التقارب الوراثي بين الكائنات الحية [9] ، كما أن مثل هذه البرامج تساعد في استنباط أنماط التقييد لجزيئات الـ DNA المنغرسة عندما يكون تسلسل نكليوتيداتها معروفا دون الحاجة إلى استئصالها وتنقيتها [10] ، فضلا عن مساهمته الكبيرة في دراسة أنماط التقييد ورسم الخرائط الفيزيائية (خرائط التقييد) المستقيمة والحلقية [9] ، إذ إن هذه المعلومات تعد أساسا لنجاح تجارب الاستنسال الجزيئي للعديد من الجينات وبشكل خاص تلك التي تشفر لنواتج حيوية مهمة للإنسان كالبروتينات المناعية والإنزيمات العلاجية كإنزيم اللاييز(3.1.1.3) الذي يحفز تفاعل التحلل المائي للكليسريدات الثلاثية , وللإنزيم تطبيقات صناعية مختلفة في إنتاج الأحماض الدهنية الحرة وبناء الببتيدات والاسترات المفيدة [11] . وعلى هذا الأساس فقد كان الهدف من هذا البحث هو استخدام قواعد البيانات الخاصة بالنوع الثاني من إنزيمات التقييد لتصميم برنامج تنفيذي للتنبؤ بمواضع القطع وتحديد حجوم القطع الناتجة من معاملة التعاقب النكليوتيدي الكامل للدنا المشفر لإنزيم اللاييز المشتق من بكتريا*Bacillus stearothermophilus* بعدد من إنزيمات التقييد فضلا عن رسم الخارطة الفيزيائية للجين وتحديد منطقة القراءة المفتوح(ORF) المشفرة للإنزيم ضمن التعاقب النكليوتيدي الكامل للجين .

طرائق العمل

استخدمت المعلومات الحيوية Bioinformatics لكتابة برنامج بلغة Quick basic وقد تم تكييف البرنامج ليتوافق مع التحليلات السريعة بلغة Visual basic ، شكل (1) يوضح المخطط الانسيابي للبرنامج . حيث يلاحظ من هذا الشكل بأنه قد تم تقسيم العملية التنفيذية للبرنامج إلى ثلاثة مراحل هي :

1. المدخلات (Input)

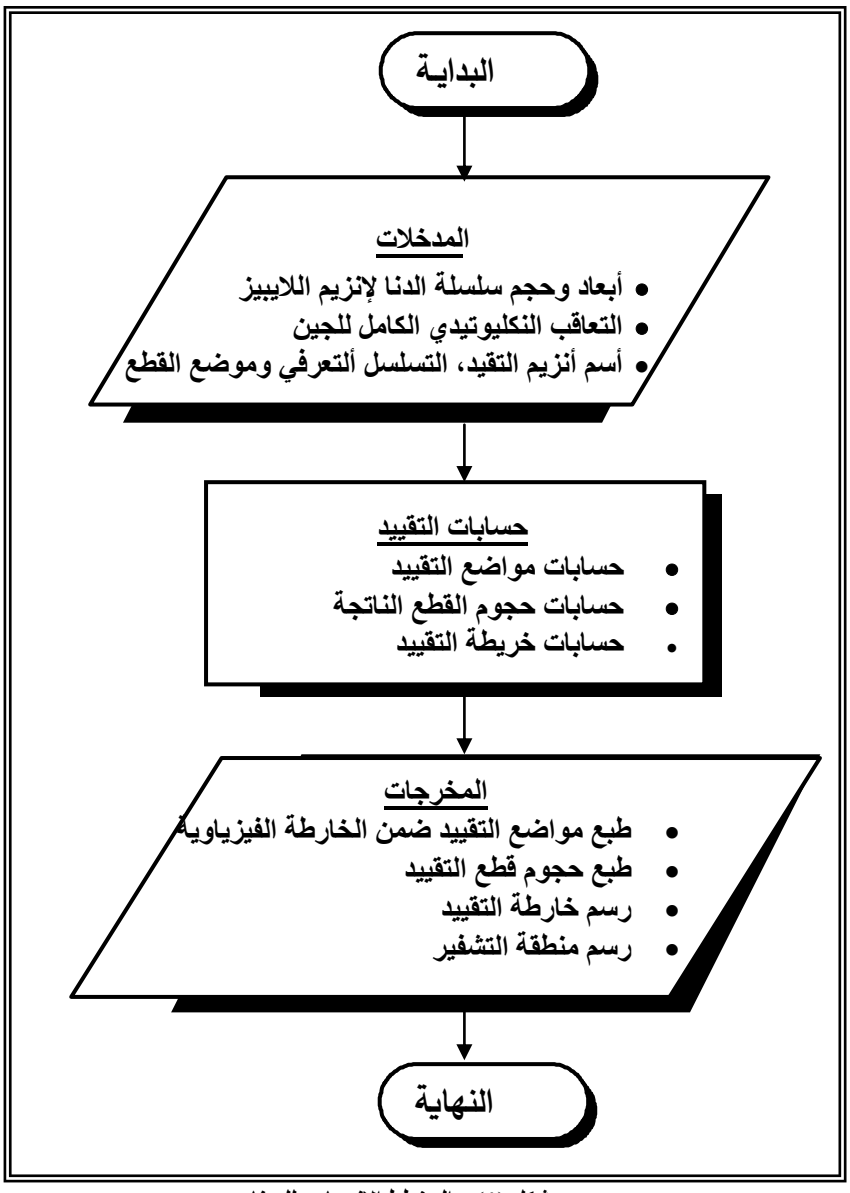
أجري في هذه المرحلة إدخال التعاقب النكليوتيدي الكامل لإنزيم اللاييز المشتق من بكتريا *Bacillus stearothermophilus* والمستنبط من قبل [12] والمبين في شكل (2) ، إذ يبلغ حجم الجين 1725 زوج قاعدي يشفر لبروتين (أنزيم) مفرز خارجيا مؤلف من 417 حامض أميني ، على شكل سلسلة ببتيدية متعددة متكونة من تعاقب الإشارة (29 حامض أميني) والبروتين الفعال المؤلف من 388 حامضا أمينيا يحفز التحلل المائي للكليسريدات الثلاثية طويلة السلسلة ، هذا ويمكن استبدال التعاقب النكليوتيدي لهذا الجين بالتسلسل النكليوتيدي الكامل لأي جزيئه DNA أخرى سواء كانت بلازميدية ، كوزميدية أو كروموسومية مهما كان حجمها . كما تم إدخال المعلومات الخاصة بعدد من إنزيمات التقييد وعددها 46 نوع من أكثر إنزيمات التقييد شيوعا واستخداما في مختبرات البيولوجي الجزيئي ، وقد شملت هذه المعلومات التسلسل ألتعرفي وموضع القطع الخاص بكل إنزيم ضمن هذه التسلسلات .

2. حسابات التقييد (Restriction calculations)

بعد إدخال المعلومات الخاصة بأنزيمات التقييد التي تمتلك تسلسلات تعرفية ضمن التعاقب النكليوتيدي الكلي البالغ 1725 زوج قاعدي للدنا المشفرة لإنزيم اللاييز والبيانات المحورة فقد تم إجراء حسابات التقييد لعدد القطع الناتجة من المعاملة بكل أنزيم وتحديد مواضع القطع ضمن التسلسل النكليوتيدي الكامل للجين و حجوم القطع الناتجة .

3. **المخرجات (Output)**

يمكن تقسيم هذه المرحلة إلى نتائج مطبوعة ونتائج مرسومة . حيث تم طباعة مواضع الهدف الخاصة بكل أنزيم لتتبع بالمجموعة الكاملة لحجوم قطع التقييد الناتجة فضلاً عن تحديد منطقة الدنا المشفرة للإنزيم . وقد طبعت هذه النتائج بشكل تعاقبي على طول التسلسل النكليوتيدي الكامل للجين ورسمت خارطة التقييد مؤشراً عليها مواقع القطع برفقة مقياس مدرج لحجم الجين بمقدار 345 زوج قاعدي لكل تدريجه يوضح مواضع القطع ومنطقة التشفير ضمن الحجم الكلي للجين ، وأخيراً فقد صمم البرنامج ضمن هذه المرحلة ليتسنى حساب حجوم قطع التقييد الناتجة من المعاملة بكل نوع من أنزيمات التقييد .



شكل (1) : المخطط الانسيابي للبرنامج

```
  1 tgatggaacgctgccatgccagagtgcagccaccttccattgtcggcggg
 51 aaacgaaatgcgccggcacaaacatgcgcttttctctttctctcacagaa
101 aaacccgacaattgccgggattgaatcagtcggttgatatatatagaata
151 tttaggtaattatgaacaaaaagattccgtttatgtgaggggaggagaag
201 gataggatgatgaaaggctgccgggtgatggttgtgttgctcggattatg
251 gtttgtgttcggcctatcggtcccgggagggcggacggaagcggcatctc
301 cacgcgccaatgatgcacccatcgtgcttctccatgggtttaccggatgg
351 gggcgagaggaaatgcttggattcaagtattggggcggcgtacgcggcga
401 tatcgaacaatggctgaacgacaacggatatcgaacgtatacgctggcgg
451 tcggaccgctctcgagcaactgggaccgggcgtgtgaagcgtacgcccag
```

```
 501 cttgtcggcggaacggtcgattatggcgcggcccatgcggcgaacgacgg
 551 ccatgcgcggtttggccgcacgtatccggggttgctgccggaattgaaaa
 601 gaggaggccgcgtccatatcatcgcccacagccaaggagggcagacggcc
 651 cgtatgcttgtctcgctcctggagaacggaagccaagaagagcgggagta
 701 cgccaaggagcacaacgtgtcgttgtcgccgttgtttgaaggcggacatc
 751 gttttgtgttgagcgtgacgaccatcgccactcctcatgacgggacgacg
 801 cttgtcaacatggttgatttcaccgatcgctttttttgacttgcaaaaagc
 851 ggtgctggaagcggcggctgtcgccagcaacgcgccgtacacaagcgaaa
 901 tatacgattttaagctcgaccaatgggggctgcgccgcgagccaggcgaa
 951 tcgttcgaccattattttgaacggctcaagcgctcccctgtctggacatc
1001 gaccgataccgcccgctacgatttatccgttcccggggctgagacgttga
1051 atcgatgggtgaaagccagcccgaatacgtattatttgagcttttctacc
1101 gaacggacgtatcgaggagctctgacaggcaactattatcccgaacttgg
1151 aatgaacgcattcagcgcgattgtctgcgccccgtttctcggctcgtacc
1201 gcaatgcggcgcttggcattgacagccattggcttgggaacgacggcatt
1251 gtcaataccatttcgatgaacggtccgaagcgtggatcaaacgatcgaat
1301 cgtgccgtatgacgggacgttgaaaaaaggagtttggaatgatatgggga
1351 cgtacaaggtcgaccatttggaagtcatcggcgttgacccgaatccgtca
1401 tttaatattcgcgccttttatttgcggcttgccgagcaactggcgagttt
1451 gcggccttaaaacgagtattttgcgaaaaagccatctcgatcggatggct
1501 ctttttttgaggagcaagctcttgagttgtatgacggccgcggatgtcc
1551 gatggtataataagggcaaagcaagcggatgggggaatggacgtgaagcc
1601 gcctgagcgaaaaggaacggtatacgtatcaagattatgtcaagtgggac
1651 ggacggtgggagctgatcaacggcgtaccttacaacatggcaccggcccc
1701 ttcatttgtctaccagtcgatcgtc
```

شكل (2) : التعاقب النكليوتيدي الكامل لجين اللاييز المشتق من بكتريا *Bacillus stearothermophilus* . Kim وجماعته (12).

النتائج والمناقشة :

إن استخدام المعلومات الحيوية Bioinformatics التي تهتم بتطبيقات تقانة إدارة وتحليل قواعد البيانات البيولوجية لجمع وخزن وتحليل ودمج تلك المعلومات والبيانات من خلال برامج حاسوبية يعد أمرا مهما في استكشاف جزيئات الحياة المختلفة كالحوامض النووية والبروتينات بشكل خاص , وعلى هذا الأساس فقد تم بناء قواعد البيانات الخاصة بكل من هذه الجزيئات مثل قواعد البيانات الخاصة بأنزيمات التقييد Restriction enzymes database التي رُصد لها موقعاً علـى الشبكـــة الدولية للمعلومات http://rebase.neb.com/rebase.html لتسهيل تداول جميع المعلومات الخاصة بهذه الأنزيمات [2] ، ونظراً لأهمية تحليل تعاقبات الـ DNA للبحث عن إمكانية وجود مواضع حساسة لإنزيمات التقييد [13] ، فقد تم التوجه إلى تصميم برنامج تنفيذي للتنبؤ النظري بمواضع القطع ومن ثم رسم خارطة التقييد لأي قطعة DNA مهما بلغ حجمها سواء كانت بلازميدية ، كوزميدية أو كروموسومية فضلاً عن محتواها من الجينات التركيبية والتنظيمية وذلك بعد تحديد التعاقب النكيلوتيدي الكامل لهذه الجينات أو لهذه الجزيئات , وقد صمم البرنامج ليتسنى تنفيذه باستخدام أبسط أجهزة الحاسوب المختبرية . تم إدخال التعاقب النكليوتيدي الكامل للجين المشفر لإنزيم اللاييز المشتق من بكتريا *Bacillus stearothermophilus* , ويلاحظ من شكل (2) إن هذا الجين مؤلف من 1725 زوج قاعدي ويتكون من أربعة مناطق متميزة هي منطقة الحفاز(Promoter) بطول207 زوج قاعدي في بداية التعاقب النكليوتيدي للجين والتي تحتوي على منطقتي 35 – (TTGATA) و 10 – (GGTAAT) اللتان تمثلان منطقتي ارتباط إنزيم الاستنساخ RNA polymerase , ثم التعاقب الذي يمثل منطقة ارتباط الرايبوسوم (RBS) قبل الشفرة البادئة لعملية الاستنساخ ATG , ثم منطقة التشفيرORF المؤلفة من 1254 زوج قاعدي تشفر لسلسلة ببتيدية متعددة مكونة من 417 حامضا أمينيا منها 29 حامض أميني تمثل تعاقب الإشارة Signal sequence القائدة للإنزيم وتعاقب الإنزيم الناضج المؤلف من 388 حامض أميني . كما يلاحظ أيضا أن منطقة التشفير تبدأ بالشفرة البادئة ATG (start codon) التي تشفر للحامض الأميني الميثايونين والتي تقع على بعد 207 زوج قاعدي من بداية تعاقب الجين وتنتهي بالشفرة الناهية للاستنساخ TAA stop codon ، وأخيرا منطقة الفاصل Terminator التي يبلغ طولها 264 زوج قاعدي وتقع في نهاية الجين . وقد أجريت عملية إدخال التعاقب النكليوتيدي الكامل للدنا المكملة للجين بوساطة الحاسوب ضمن مدخلات البرنامج الذي صمم بحيث يحتوي على المعلومات الكاملة عن 46 نوع من النوع الثاني من إنزيمات التقييد

المختلفة التي تتعرف على تسلسلات نكليوتيدية رباعية ، خماسية , وسداسية ومواضع القطع الخاصة بكل منها ضمن هذه التسلسلات ، هذا ويمكن زيادة حجم البرنامج ليعطي المعلومات الكاملة عن مواضع القطع وحجوم قطع التقييد الناتجة عن المعاملة بأكثر من 150 نوع من إنزيمات التقييد المعروفة والمشخصة بدقة في الوقت الحاضر .

وتشير النتائج التنفيذية المبينة في جدول (1) إلى إن هناك 16 إنزيم من إنزيمات التقييد المختلفة تمتلك تسلسلات تعرفيه ومواضع قطع ضمن التعاقب النكليوتيدي الكامل لجين اللاييبز , في حين أن هناك 30 إنزيم آخر من إنزيمات التقييد الأخرى التي لا تمتلك لمثل هذه التسلسلات ضمن تعاقب الجين وكما هو مبين في جدول (2) . ويلاحظ أيضا من خلال النتائج .

جدول(1) : إنزيمات التقييد التي تمتلك تسلسلات تعرفية ومواضع قطع ضمن التعاقب النكليوتيدي الكامل لجين اللاييبز المشتق من بكتريا *Bacillus stearothermophilus* .

أنزيم التقييد	*التسلسل التعرفي*	موضع القطع	نوع النهاية
***Sma*I**	**CCCGGG**	**G ↓ C**	**مستوية**
***Xho*I**	**CTCGAG**	**T ↓ C**	**لاصقة**
***Sal*I**	**GTCGAC**	**G↓T**	**لاصقة**
***Dde*I**	**CTNAG**	**T↓C**	**لاصقة**
***Cla*I**	**ATCGAT**	**T↓C**	**لاصقة**
***Eag*I**	**CGGCCG**	**C↓GG**	**لاصقة**
***Bsp*HI**	**TCATGA**	**C↓T**	**لاصقة**
***Acc*I**	**GTMKAC**	**M ↓ T**	**لاصقة**
***Eco*RV**	**GATATC**	**T↓A**	**مستوية**
***Hae*II**	**RGCGCY**	**Y↓C**	**لاصقة**
***Ban*I**	**GGYRCC**	**G↓G**	**لاصقة**
***Bcl*I**	**TGATCA**	**G ↓ T**	**لاصقة**
***Cfr*I**	**YGGCCR**	**Y ↓ G**	**لاصقة**
***Sst*I**	**GAGCTC**	**C↓T**	**لاصقة**
***Ksp*I**	**CCGCGG**	**GG ↓ C**	**لاصقة**
***Nae*I**	**GCCGGC**	**G ↓ C**	**لاصقة**

حيث أن : N = أي قاعدة؛ M = A أو C ؛ K = G أو T؛ R = A أو G؛ Y = C أو T

جدول (2) : إنزيمات التقييد التي لا تمتلك تسلسلات تعرفيه ومواضع قطع ضمن التعاقب النكليوتيدي الكامل لجين اللاييبز

أنزيم التقييد	التسلسل التعرفي	موضع القطع
***Hind*III**	**AAGCTT**	**A↓A**
***Eco*RI**	**GAATTC**	**A↓G**
***Aha*III**	**TTTAAA**	**T↓A**
***Apa*I**	**GGGCCC**	**CC↓C**
***BamH*I**	**GGATCC**	**G↓G**
***Bgl*II**	**AGATCT**	**G ↓ A**
***Hpa*I**	**GTTAAC**	**T↓A**

A↓C	**ACGCGT**	***Mlu*I**
C↓C	**GGTACC**	***Kpn*I**
T↓C	**GACGTC**	***Aat*II**
TG↓C	**GCATGC**	***Sph*I**
T↓C	**TCTAGA**	***XbaI***
T↓C	**CGATCG**	***Pvu*I**
GG↓C	**GGCGCC**	***Nar*I**
GC↓G	**CCGCGG**	***SacI*I**
G↓A	**CTGCAG**	***Pst*I**
GC↓G	**TGCGCA**	***Fsp*I**
CA↓T	**CATATG**	***Nde*I**
T↓C	**CTTAAG**	***Afl*II**
T↓A	**AGTACT**	***ScaI***
A↓C	**ACTAGT**	***SpeI***
T↓A	**AATAAT**	***Ssp*I**
G↓C	**AGGCCT**	***Stu*I**
C↓C	**CCTAGG**	***Avr*II**
C↓G	**TGCGCA**	***FspI***
G↓C	**TCGCGA**	***Nru*I**
T ↓CA	**ATGCAT**	***Nsi*I**
C↓R	**GRCGYC**	***Acy*I**
G↓G	**GGNCC**	***Asu*I**
G↓C	**CAGCTG**	***Pov*II**

حيث أن : R = A أو G ؛ Y = C أو T ؛ N= أي قاعدة

المبينة في جدول (1) أن القطع بإنزيمات التقييد *Sma*I و *Eco*RV التي تتعرف على تسلسلات نكليوتيدية سداسية يعطي قطع DNA ذات نهايات مستوية في حين إن المعاملة بأنزيمات التقييد الأخرى تعطي قطع DNA ذات نهايات لاصقة . وتعد هذه النتائج مهمة في تجارب الاستنسال الجزيئي عند الحاجة لأستنسال الجين في أحد نواقل التعبير الملائمة من خلال توفر المعلومات الكاملة عن إنزيم التقييد الملائم لقطع الجين أو استئصاله ونوع النهايات الناتجة في كل حالة ليتسنى اختيار ناقل التعبير الملائم للاستنسال وطريقة الربط المناسبة [14] .

وتشير النتائج المبينة في جدول (3) إلى اختلاف تردد التسلسلات التعرفية الخاصة بإنزيمات التقييد التي تمتلك لموضع قطع ضمن التعاقب النكليوتيدي الكامل لجين اللايبيز ، إذ يتردد هذا التسلسل 1 – 2 مرة وفي مواقع مختلفة مما يؤدي إلى إعطاء قطع تقييد ذات حجوم مختلفة ، فعند المعاملة بإنزيم التقييد *Sma*I الذي يمتلك موضعي قطع في مواقع مختلفة ضمن تعاقب الجين ينتج عنه ظهور ثلاثة قطع تقييد تبلغ أحجامها (273، 760 ، 692) زوج قاعدي على التوالي ، في حين يلاحظ ظهور قطعتي تقييد يبلغ حجميهما (462 ،1263) زوج قاعدي على التوالي عند المعاملة بأنزيم التقييد *Xho*I الذي يمتلك موضع قطع واحد ضمن هذا التعاقب وهكذا بالنسبة لبقية إنزيمات التقييد الأخرى المبينة في جدول (3) .

جدول(3) : مواضع القطع و حجوم القطع الناتجة من معاملة التعاقب النكليوتيدي الكامل لجين اللاييز بأنزيمات التقييد التي تمتلك لتسلسلات تعرفية ضمن تعاقب الجين

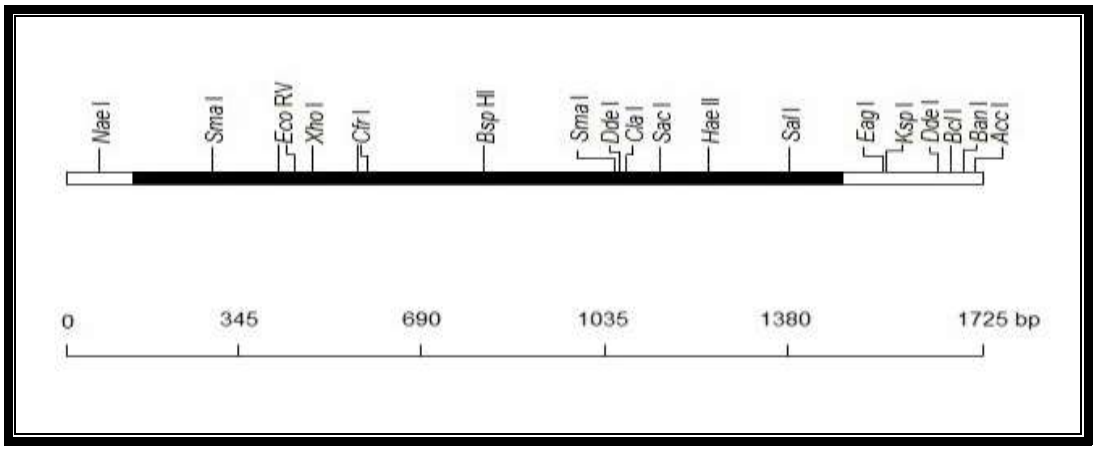
أنزيم التقييد	عدد مرات القطع	مواضع القطع		حجوم القطع الناتجة (كيلو زوج)		
		الموضع الأول	الموضع الثاني	القطعة الأولى	القطعة الثانية	القطعة الثالثة
***Sma*I**	2	273	1033	273	760	692
***Xho*I**	1	462	-	462	1263	-
***Sal*I**	1	1360	-	1360	365	-
***Dde*I**	2	1040	1640	1040	564	121
***Cla*I**	1	1052	-	1052	673	-
***Eag*I**	1	1537	-	1537	188	-
***Bsp*HI**	1	786	-	786	939	-
***Acc*I**	1	1709	-	1709	16	-
***Sac*I**	1	1118	-	1118	607	-
***Eco*RV**	2	400	428	400	28	1297
***Hae*II**	1	1209	-	1209	516	-
***Ban*I**	1	1690	-	1690	35	-
***Bcl*I**	1	1665	-	1665	60	-
***Cfr*I**	2	549	564	549	15	1161
***Sst*I**	1	1118	-	1118	607	-
***Ksp*I**	1	1540	-	1540	185	-
***Nae*I**	1	63	-	63	1662	-

ومن النتائج الأخرى التي تم التوصل إليها في هذه الدراسة هو إمكانية استخدام احد إنزيمي التقييد *Sau*3A و *Mbo*I في بناء مكتبة الجينات الخاصة بالدنا الكروموسومي لبكتريا *Bacillus stearothermophilus* وذلك نظرا لتردد التسلسل التعرفي لهذين الإنزيمين (AGCT) 6 مرات ضمن التعاقب النكليوتيدي الكامل لجين اللاييز بالمقارنة مع تردد التسلسل التعرفي لبقية إنزيمات التقييد الأخرى المبينة في جدول (3) . لذا يعد هذان الإنزيمان ملائمان جدا في هذه العملية التي تتطلب إجراء الهضم الجزئي للدنا الكلي للجين باستخدام إنزيم تقييد يتعرف على تسلسل نيكليوتيدي رباعي يقطع في مواقع مختلفة ليعطي قطع DNA ذات نهايات مستوية يمكن غرسها في موضع إنزيم التقييد *Bam*HI لناقل الاستنسال المستخدم بصورة مباشرة دون الحاجة إلى ربطها بوسائل الربط المختلفة وخاصة بالنسبة لنواقل الاستنسال المشتقة من دنا العاثي لامدة وكما هو موصوف من قبل [15] .

لذا فمن خلال هذه النتائج يمكن التنبؤ بعدد قطع التقييد الناتجة من المعاملة بأي من هذه الإنزيمات وحجم كل قطعة مهما كانت صغيرة وبالتالي التغلب على المشاكل الناجمة عن صعوبة تحديد عدد قطع التقييد الصغيرة الحجم الناتجة من هضم جزيئات الـ DNA بأنزيم التقييد الملائم ، ثم الترحيل الكهربائي للقطع الناتجة على هلام الأكاروز وذلك نظرا لصعوبة التحسس بهذه القطع الصغيرة من ناحية (وبشكل خاص تلك التي لا يزيد حجمها عن 100 زوج قاعدي) ، ولإمكانية فقدان هذه القطع بسهولة أثناء التحضير من الناحية الأخرى ، فضلا عن إمكانية ظهور القطع الصغيرة المتقاربة في الحجم على شكل حزمة واحدة بعد الترحيل الكهربائي على هلام الأكاروز المصبغ بصبغة بروميد الأيثديوم وكما هو موصوف من قبل [16] . ومن خلال هذه النتائج أيضا يمكن القول أنه من الممكن استخدام البرنامج الحالي لدراسة درجة التقارب الوراثي بين الأنواع المختلفة من الكائنات الحية وخاصة الحقيقية النواة من خلال تعيين درجة تماثل أطوال قطع التقييد RFLP الناجمة عن معاملة الجينات المتناظرة لهذه الكائنات بعدد من أنزيمات التقييد الملائمة ، وتعد هذه المسألة مهمة جدا لدى الباحثين في الوقت الحاضر لتعيين مدى نجاح عمليات الأستنسال الجزيئي ونقل الجينات بين الأنواع المتقاربة من الكائنات الحية [17] ، إذ ينشأ التباين في أطوال قطع التقييد عن الطفرات النقطية التي تؤدي إلى حذف أو إضافة موضع تقييد وخاصة بين السلالات البكتيرية العائدة لنفس النوع [18] .

وبعد تحديد عدد ونوع إنزيمات التقييد التي تمتلك لتسلسلات تعرفيه ومواضع قطع ضمن التعاقب النيكليوتيدي الكامل لجين اللاييز فقد تم التمكن من رسم خارطة التقييد الخاصة بهذا الجين التي تظهر هذه المواضع على طول الجين وكما هو موضح في شكل (3) . حيث يلاحظ من خلال هذا الشكل أن جين اللاييز يمتلك موضع

حساس فريد لأنزيم التقييد *Nae*I الذي يقع على مسافة 144 زوج قاعدي قبل منطقة التشفير التي تبدأ بالشفرة البادئة ATG وتعد هذه النتيجة مهمة جدا عند الحاجة لاستنسال الجين وذلك بالمحافظة على التعاقب النكليوتيدي الكامل للمنطقة المشفرة لإنزيم اللاييز بعد المعاملة بأنزيم *Nae*I وأي من تلك الإنزيمات التي تقطع في منطقة الفاصل(*Eag*I أو *Ksp*I أو *Bcl*I أو *Ban*I أو *Acc*I) ثم أستنسال الجين في احد نواقل التعبير الملائمة بحيث يغرس تحت سيطرة أحد الحفازات القوية ليتسنى استنساخه بكفاءة عالية في مضيفه الجديد . ومن بين النتائج الأخرى التي يمكن ملاحظتها من خلال النتائج المبينة في شكل (3) أن هناك عدد كبير من أنزيمات التقييد الأخرى التي تمتلك تسلسلات تعرفيه ومواضع قطع ضمن تعاقب الجين والمبينة في الجدولين (1 ، 3) لا يمكن استخدامها لأستنسال الجين نظرا لكونها تقطع مرة واحدة على الأقل ضمن التعاقب النكليوتيدي لمنطقة التشفير ، فمثلا أنزيم *Sma*I يمتلك موضعي قطع ضمن هذه لمنطقة، وإنزيم *Xho*I يمتلك موضع قطع واحد ضمن نفس المنطقة ، وفي هذه الحالة لا يمكن الحصول على التعاقب النكليوتيدي الكامل لمنطقة التشفير دون حدوث أي قطع ضمني فيها،وهذا يعني عدم إمكانية استخدام أي من هذه الإنزيمات لاستئصال الجين عند الحاجة لأستنساله .



شكل (3) : خارطة التقييد للتعاقب النكليوتيدي الكامل لجين اللاييز. المنطقة الغامقة تمثل منطقة التشفير والمنطقتان الطرفية المفتوحة تمثلان المناطق غير المشفرة للأنزيم

من خلال ما تقدم من النتائج يتضح لنا مدى أهمية البرنامج الحالي كأداة تحليلية لدى باحثي البايولوجي الجزيئي في توفير المعلومات الكاملة عن مواضع القطع وأطوال قطع التقييد الناتجة من معاملة جزيئات الـ DNA المختلفة بأي من إنزيمات التقييد التي تمتلك تسلسلات تعرفيه ضمن التعاقب النكليوتيدي الكامل لهذه الجزيئات ، فضلا عن مساهمته في تحديد درجة التقارب الوراثي بين الأنواع المختلفة من الكائنات الحية واستكشاف الطفرات الوراثية الناجمة عن حذف ، غرس أو استبدال زوج قاعدي واحد أو أكثر ضمن التتابع النكليوتيدي الكامل للجين من جهة ورسم خرائط التقييد من جهة أخرى .

References

1. Roberts, R.J. and Halford, S.E. (1993). Type II Restriction Endonucleases *In:* Nucleases, 2nd Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
2. Roberts, R.J. ; Vincze, T ; Posfai, J ;and Macelis, D . (2005). REBASE – restriction enzymes and DNA metyltransferation. Nucleic Acids Research, Vol. 33, Database issue D230-D232.
3. Roberts, R.J. ; Vincze, T ; Posfai, J ;and Macelis, D . (2007). REBASE – restriction enzymes and genes for DNA restriction and modification. Nucleic Acids Research, Vol. 35, Database issue D269-D270.
4. Brown,N.L and Smith,M. (1980). *In*: Methods in Enzymology, Vol.65, Academic press, New York, pp. 391 – 404.
5. Sutcliff, J.G. (1979). Cold Spring Harbour Symp. Quant. Biol. Vol. 43 , pp. 70 – 90.

6. Reddy, V.B.; Thimmappagy,B.; Dhar, R. ; Subramanian, K.N. ; Zain, B.S.; Pan, J; Ghosh, P.K.; Celma, M.L. and Weissman, S.M. (1978). Science, Vol.2, pp.494 – 502.
7. Sanger, F.;Coulson,A.R.; Friedmann,T.; Air,G.M.; Barrel,B.G.;Brown,N.L.; Fiddes, J.C.; Hutcison,C.A.;Slocombe,P.M.and Smith,M.(1978). J.Mol. Biol.Vol.125,pp .225–246.
8. Roberts,R.J. and Macelis, D. (1999). NAR Data Base Issue. Nucleic acid Res. Vol. 27, pp. 312 – 313.
9. Fuchs,D.; Rosenvold, E.; Honigman,A. and Szybalski, W.(1980). Gene, Vol. 19, pp. 225 – 246.
10. Lilly, D.M.J. (1982). A simple computer program for calculating, modifying and drawing restriction maps. Nucleic Acids Research, Vol. 10, No.1, pp. 19 – 26.
11. Dordick,J.S.(1989).Enz. Technol. Microb.11, 194-211.
12. Kim,H.K., Park,S.Y., Lee,J.K. and Oh,T.K. (1998).Gene cloning and characterization f thermostable lipase from *Bacillus stearothermophilus* L1. J. Biosci. Biotechnol. Biochem. 62 (1), 66-71.
13. Vineze,T.; Posfae,J. and Roberts, R.J.(2003).NEBcutter: a program to cleave DNA with restriction enzymes. Nucleic Acids Research, Vol.31, 3688-3691.
14. Maniatis , T.; Fritsch , E.F. and Sambrook , J.(1982) . Molecular Cloning. A laboratory manual, Cold Spring laboratory.
15. Glover, D.M.(1984) . Gene Cloning: The Mechanics of DNA Manipulation. Chapman and Hall, London, New York.
16. Tolstoshev , C.M. and Blackesley , R.W.(1982) . RSITE: a Computer Program to Predict the Recognition Sequence of a Restriction Enzyme. Nucleic Acids Research, Vol.10, No. 1, pp 1 – 18.
17. Lewin , B.(1990) . Genes II, 3rd edition, John Wiley and Sons, New York, U.S.A.
18. Dale, W.J. and Park S. F. (2004). Molecular Genetics of Bacteria, 4rd. Edition, John Wiley and Sons Ltd. West Sussex, England.