استخدام قواعد البيانات لتحديد مواضع القطع ورسم خارطة التقييد للجين المشفر لأنزيم Serine dehydratase المشتق من خلايا خميرة *Saccharomyces serevisiae*

ماجد حسين الجيلاوي، حميد مجيد جاسم الدليمي

قسم التقانة الإحيائية، كلية العلوم، جامعة النهرين

الخلاصة

استخدمت قواعد البيانات الخاصة بإنزيمات التقييد (REBASE) والبروتينات ذات العلاقة في تصميم برنامج تنفيذي بلغة Quick Basic لتحديد مواضع القطع ورسم خارطة التقييد للتسلسل النكليوتيدي الكامل للجين المشفر لإنزيم Serine dehydratase المشتق من خلايا خميرة *Saccharomyces serevisiae* . وقد تم التمكن باستخدام هذا البرنامج الذي يعد ذو فائدة كبيرة في التنبؤ بأنماط التقطيع لجزيئات الدنا الارتباطية من تحديد مواضع القطع لسبعة عشر إنزيم من بين 40 نوع من إنزيمات التقييد المختلفة التي تمتلك تسلسلات تعرفية ضمن التسلسل النكليوتيدي الكامل لجين Serine dehydratase البالغ حجمه 2797 زوج قاعدي هي إنزيمات *Hind*III ، *Eco*RI ، *Hpa*I ، *Sph*I ، *Aha*III ، *Sac*I ، *Xba*I ، *Hha*I ، *Xho*I ، *Fba*I ، *Pst*I ، *Avr*II ، *Cla*I ، *Nde*I ، *Nco*I ، *Spe*I و *Stu*I . كما تم التمكن باستخدام هذا البرنامج من رسم خارطة التقييد التي تبين مواضع القطع الخاصة بهذه الإنزيمات ضمن تعاقب الجين فضلاً عن تحديد منطقة القراءة المفتوحة ORF (Open reading frame) المشفرة لإنزيم Serine dehydratase البالغ حجمها 1041 زوج قاعدي ضمن التسلسل النكليوتيدي الكامل للجين .

المقدمة

يعرف النوع الثاني من إنزيمات التقييد بأنه [illegible] المجموعة من الإنزيمات التي تتميز بقابليتها على التعرف على تسلسلات نكليوتيدية خاصة ضمن جزيئات الدنا مزدوجة الخيط وتقطع بنمط معين ضمن أو قريباً من ذلك التسلسل (1). وقد عزلت أعداد كبيرة ومتنوعة من هذه الإنزيمات بلغت 3134 إنزيم تقييد منها 139 إنزيم مشخصة بدقة وقد دونت عنها المعلومات بالكامل ضمن قواعد البيانات الخاصة بإنزيمات التقييد من حيث المصادر المنشورة وغير المنشورة، التسلسل التعرفي، مواضع القطع، المتناظرات الإنزيمية، التوفر التجاري، الحساسية للمثيلة، بيانات التسلسل، التراكيب البلورية والحرارة المثلى لعمل الإنزيم. كما تتضمن أيضاً إنزيمات الدنا الناقلة للمثيل (DNA Methyl Transferases)، إنزيمات [illegible] (Nicking Enzymes) وتتضمن الوحدات الفرعية لهذه الإنزيمات (2). إن قابلية التفرقة لهذه الإنزيمات على كسر جزيئات DNA سمحت بـ [illegible] وتضاعف جزيئات الـDNA المختلفة كالبلازميدات، العاثيات والفايروسات الحيوانية فضلاً عن وضع الخرائط الفيزياوية لمثل هذه الجزيئات (3). وقد استخدمت بعض الجزيئات الصغيرة الحجم لتحديد التسلسل التعرفي ومواضع القطع الخاصة بهذه الإنزيمات وذلك بعد تطور التقنيات السريعة لتحديد التتابع والتي قادت إلى تحديد التتابع الكامل للبلازميد pBR322 (4) والفايروسات SV40 (5) و ΦX 174 (6)، حيث تم التمكن من استنباط التسلسل التعرفي ومواضع القطع لإنزيمات التقييد المكتشفة حديثاً من خلال معاملة هذه الجزيئات الصغيرة بإنزيم التقييد المراد تشخيصه بالتعرف على نمط التقطيع وحجوم القطع الناتجة بمساعدة الحاسوب (7).

إن تصميم برنامج تنفيذي بمساعدة الحاسوب لتحديد التسلسل التعرفي ومواضع القطع لإنزيمات التقييد فضلاً عن رسم خرائط التقييد المستقيمة والحلقية يعد ذو فائدة كبيرة لدراسة أنماط التقييد ونجاح تجارب الاستنسال الجيني فضلاً عن تشخيص الطفرات الوراثية التي يمكن أن تتعرض لها الجينات كطفرات التعويض، الاستبدال أو الحذف لزوج قاعدي واحد أو أكثر مما يساهم في تحديد درجة القرابة الوراثية بين الكائنات الحية (8). كما أن مثل هذا البرنامج يساعد في استنباط أنماط التقييد لجزيئات الدنا المنقولة عندما يكون تسلسل نكليوتيداتها معروفاً دون الحاجة إلى استنساخها وتنقيتها (9). فضلاً عن مساهمته الكبيرة في دراسة أنماط التقييد ورسم الخرائط الفيزياوية (الخرائط المستقيمة والحلقية) (8)، إذ أن هذه المعلومات تعد أساساً لنجاح تجارب الاستنسال الجزيئي للعديد من الجينات وبشكل خاص تلك التي تشفر لنواتج حيوية مهمة للإنسان كالبروتينات المناعية والإنزيمات الخلوية مثل إنزيم Serine dehydratase الذي يحفز تفاعل التميؤ (dehydration) وانتزاع مجموعة الأمين من الحامض الأميني سيرين بوجود المرافق الأنزيمي pyridoxal phosphate (10). وعلى هذا الأساس فإن 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 التسلسل النكليوتيدي الكامل للجين المشفر لإنزيم Serine dehydratase بعدد من

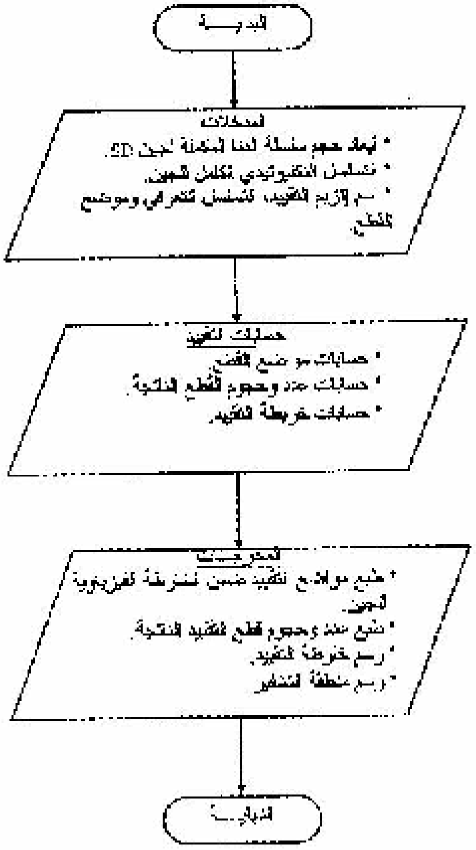
إنزيمات التقييد فضلاً عن رسم الخارطة الفيزيائية للجين وتحديد المنطقة المشفرة للإنزيم ضمن التسلسل النكليوتيدي الكامل للجين.

المواد وطرائق العمل

تم كتابة البرنامج الحالي بلغة Quick Basic وقد تم تكييف البرنامج ليتوافق مع التحليلات السريعة بلغة Visual basic، والشكل (1) يوضح المخطط الانسيابي للبرنامج، حيث يلاحظ من هذا الشكل أنه قد تم تقسيم العملية التنفيذية للبرنامج إلى ثلاث مراحل هي:

1. المدخلات (Input):

أجريت في هذه المرحلة إدخال التسلسل النكليوتيدي الكامل لجين (SD) Serine dehydratase المستنبط عن wolgeng (11)، والمبين في الشكل (2)، إذ يبلغ حجم الجين 2797 زوج قاعدي يشفر لإنزيم Serine dehydratase المؤلف من 338 حامض أميني، هذا ويمكن استبدال التسلسل النكليوتيدي الكامل للجين بالتسلسل النكليوتيدي لأي جزيئة DNA أخرى سواء كانت بلازميدية، كوزميدية أو كروموسومية مهما كان حجمها. كما تم إدخال المعلومات الخاصة بعدد من إنزيمات التقييد وعددها 10 نوع من أكثر أنواع إنزيمات التقييد شيوعاً واستخداماً في مختبرات البايولوجي الجزيئي، وقد شملت هذه المعلومات كل من التسلسل التعرفي ومواضع القطع الخاصة بكل إنزيم ضمن هذه التسلسلات التي تراوحت بين 4-6 زوج قاعدي.



شكل(1): المخطط الانسيابي للبرنامج.

2. حسابات التقييد (Restriction Calculations):

بعد إدخال المعلومات الخاصة بإنزيمات التقييد التي تمتلك تسلسلات تعرفية ضمن التتابع النكليوتيدي الكامل للجين (2797 زوج قاعدي) والبيانات المحفوظة فقد تم إجراء الحسابات لعدد القطع الناتجة من المعاملة بكل إنزيم وتحديد مواضع القطع ضمن التسلسل النكليوتيدي الكامل للجين وحجوم القطع الناتجة.

شكل(2): التسلسل النكليوتيدي الكامل لجين Serine dehydratase.

3. المخرجات (Output):

يمكن تقسيم هذه المرحلة إلى نتائج مطبوعة ونتائج مرسومة، حيث تم طباعة مواضع الهدف الخاصة بكل إنزيم تقييد بالمجموعة الكاملة لحجوم قطع التقييد الناتجة فضلاً عن تحديد منطقة الهدف المشفرة للإنزيم. وقد طبعت هذه النتائج بشكل تعاقبي على طول التسلسل النكليوتيدي للجين وقد رسمت خارطة التقييد موشراً عليها مواضع القطع برفقة مقياس مدرج لحجم الجين بمقدار 506 زوج قاعدي لكل شريحة يوضح مواضع القطع ومنطقة التشفير ضمن الحجم الكلي للجين، وأخيراً فقد صمم البرنامج ضمن هذه المرحلة لإعطاء حساب حجوم قطع التقييد الناتجة من المعاملة بكل نوع من إنزيمات التقييد المستخدمة.

النتائج والمناقشة

إن التطور المستمر والثورة الهائلة في علم الجينات دعت الباحثين في الآونة الأخيرة إلى تكثيف الجهود في شتى المجالات للولوج في آفاق وسبر أغوار هذا العلم الحديث وعلى هذا الأساس فقد تم عالمياً إنشاء قواعد البيانات الخاصة بإنزيمات التقييد (Restriction Enzyme Database) ووضعت لها موقع على الشبكة الدولية للمعلومات (http://rebase.neb.com) والبريد الإلكتروني ftp (ftp.neb.com) لتسهيل تداول جميع المعلومات الخاصة بهذه الإنزيمات (2). ونظراً للجهود الحثيثة التي تجري حالياً في مختلف المختبرات العالمية لوضع الخرائط الوراثية الخاصة بالجينوم البشري (Human Genome)، فقد تم التوجه إلى تصميم برنامج تنفيذي بلغة Quick basic ليتسنى تنفيذه باستخدام أبسط أجهزة الحاسوب الشخصية لتحديد مواضع القطع ورسم خارطة التقييد لأي جزيئة DNA مهما بلغ حجمها سواء كانت بلازميدية، كوزميدية أو كروموسومية فضلاً عن محتواها من الجينات التركيبية والتنظيمية وذلك بعد تحديد التتابع النكليوتيدي الكامل لهذه الجينات أو لهذه الجزيئات. وعلى هذا الأساس فقد تم إدخال التسلسل النكليوتيدي الكامل لجين Serine dehydratase المعزول من خلايا خميرة *Saccharomyces cerevisiae*، ويلاحظ من الشكل (2) أن هذا الجين مؤلف من 2972 زوج قاعدي مقسم إلى ثلاث مناطق متميزة هي منطقة المحفز (1254 زوج قاعدي) تقع في بداية التسلسل النكليوتيدي الكامل للجين، ثم منطقة التشفير (1014 زوج قاعدي) تبدأ بالشفرة البادئة ATG (Start codon) التي تشفر للحامض الأميني ميثايونين والتي تقع على مسافة 1254 زوج قاعدي من بداية الجين، ويلاحظ أن هذه المنطقة تحتوي على التسلسل النكليوتيدي الكامل للجين المشفر لإنزيم Serine dehydratase المتكون من 338 حامض أميني، وأخيراً منطقة الفاصل (Terminator) التي يبلغ طولها 529 زوج قاعدي تبدأ بالشفرة النهائية TAA (Stop codon).

وقد أجريت عملية إدخال التسلسل النكليوتيدي الكامل للجين بوساطة الحاسوب ضمن مدخلات البرنامج الذي صمم بحيث يحتوي على المعلومات الكاملة لـ40 نوع من إنزيمات التقييد المختلفة التي تتعرف على تسلسلات نكليوتيدية رباعية، خماسية وسداسية ومواضع القطع الخاصة بكل منها ضمن هذه التسلسلات، هذا ويمكن استخدام البرنامج أيضاً لبعض المعلومات الكاملة عن مواضع القطع وحجوم قطع التقييد الناتجة من المعاملة بأكثر من 150 إنزيم من النوع الثاني من إنزيمات التقييد المعروفة والمشخصة بدقة في الوقت الحاضر. وتشير النتائج التنفيذية للبرنامج المبينة في الجدول (1) إلى أن هناك 17 نوعاً من إنزيمات التقييد المختلفة تمتلك تسلسلات تعرفية ومواضع قطع ضمن التتابع الكلي لجين Serine dehydratase، في حين أن هناك 23 نوع من إنزيمات التقييد الأخرى لا تمتلك مثل هذه التسلسلات ضمن تتابع الجين وكما هو مبين في الجدول (2). ويلاحظ أيضاً من خلال النتائج المبينة في الجدول (1) أن القطع بإنزيمات التقييد *HpaI*، *AhaI* و *StuI* التي تتعرف على تسلسلات نكليوتيدية متناسبة يعطي قطع DNA ذات نهايات مستوية في حين أن المعاملة بإنزيمات التقييد الأخرى المبينة في نفس الجدول تعطي قطع DNA ذات نهايات لاصقة. وتعد هذه النتائج مهمة جداً في تجارب الاستنساخ الجزيئي عند الحاجة لاستنسال الجين ليقع تحت سيطرة أحد المحفزات القوية في ناقل التعبير الملائم 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 ربط المناسبة (12)، في حين تستبعد جميع إنزيمات التقييد الأخرى المدونة في الجدول (2) عند الحاجة لاستنسال الجين نظراً لعدم امتلاكها موضع قطع ضمن التسلسل النكليوتيدي الكامل للجين.

جدول (1) : إنزيمات التقييد التي تمتلك تسلسلات تعرفية ومواضع قطع ضمن التسلسل النكليوتيدي الكامل لجين Serine dehydratase.

إنزيم التقييد	التسلسل التعرفي	موضع القطع	نوع النهاية
*Hind*III	AAGCTT	A↓A	لاصقة
*Eco*RI	GAATTC	G↓A	لاصقة
*Hpa*I	GTTAAC	T↓A	مستوية
*Sph*I	GCATGC	TG↓C	لاصقة
*Aha*III	TTTAAA	T↓A	مستوية
*Sac*I	GAGCTC	T↓C	لاصقة
*Xba*I	TCTAGA	T↓C	لاصقة
*Hha*I	GCGC	CG↓C	لاصقة
*Xho*I	CTCGAG	C↓T	لاصقة
*Fba*I	TGATCA	T↓G	لاصقة
*Pst*I	CTGCAG	A↓G	لاصقة
*Avr*II	CCTAGG	C↓C	لاصقة
*Cla*I	ATCGAT	T↓C	لاصقة
*Nde*I	CATATG	CA↓T	لاصقة
*Nco*I	CCATGG	C↓C	لاصقة
*Spe*I	ACTAGT	A↓C	لاصقة
*Stu*I	AGGCCT	G↓C	مستوية

جدول (2) : إنزيمات التقييد التي لا تمتلك تسلسلات تعرفية ومواضع قطع ضمن التسلسل النكليوتيدي الكامل لجين Serine dehydratase.

إنزيم التقييد	التسلسل التعرفي	موضع القطع
*Bam*HI	GGATCC	G↓G
*Bgl*II	AGATCT	A↓G
*Sal*I	GTCGAC	G↓T
*Sma*I	CCCGGG	C↓G
*Eco*RV	GATATC	T↓A
*Nae*I	GCCGGC	G↓C
*Hae*II	RGCGCY	C↓Y
*Acc*I	GTMKAC	T↓M
*Bcn*I	CCSGG	S↓G
*Rsh*I	CGATCG	T↓C
*Dra*I	GGGCCC	CC↓C
Fsp I	TGCGCA	C↓G
*Eag*I	CGGCCG	C↓G
*Nar*I	GGCGCC	GG↓C
*Nsi*I	ATGCAT	CA↓T
*Sst*II	CCGCGG	GC↓G
*Hsu*I	AAGCTT	A↓A
*Bal*I	TGGCCA	G↓C
*Sca*I	AGTACT	T↓A
*Aat*II	GACGTC	T↓C
*Kpn*I	GGTACC	G↓C
*Mlu*I	ACGCGT	A↓C
*Pml*I	CACGTG	C↓C

حيث أن : R = A أو G ، Y = C أو T ، M = A أو T ، K = G أو T ، S = C أو G.

وتشير النتائج المبينة في الجدول (3) إلى اختلاف تردد التسلسلات العرفية الخاصة بإنزيمات التقييد التي تمتلك لمواضع قطع ضمن التسلسل النكليوتيدي الكامل لجين Serine dehydratase ، إذ يلاحظ أن تردد التسلسل التعرفي لهذه الإنزيمات يتراوح من 1 – 2 مرة في مواقع مختلفة حسب نوع الإنزيم، مما تؤدي عملية المعاملة بهذه الإنزيمات إلى إنتاج أنواع تقييد ذات حجوم مختلفة؛ فمثلاً عند المعاملة بإنزيم التقييد *Eco*RI الذي يقطع مرة واحدة ضمن تتابع الجين يؤدي إلى ظهور قطعتي تقييد يبلغ حجمهما 1119 و 1678 زوج قاعدي، في حين أن المعاملة بإنزيم التقييد *Hind*III الذي يقطع مرتين يؤدي إلى ظهور ثلاث قطع تقييد تبلغ حجومها 1436 ، 346 و 1015 زوج قاعدي على التوالي، وهكذا بالنسبة لبقية إنزيمات التقييد الأخرى المبينة في الجدول (3).

جدول (3): مواضع القطع و حجوم القطع الناتجة من معاملة التسلسل النكليوتيدي الكامل للدنا المكملة لجين Serine dehydratase بإنزيمات التقييد القاطعة للجين.

إنزيم التقييد	عدد مرات القطع	مواضع القطع			حجوم قطع التقييد الناتجة (زوج قاعدي)			
		موضع الأول	موضع الثاني	موضع الثالث	القطعة الأولى	القطعة الثانية	القطعة الثالثة	القطعة الرابعة
EcoRI	3	9	160	765	9	151	605	1259
HindIII	3	1753	1764	1777	1753	11	13	247
BamHI	1	1394	-	-	1394	630	-	-
HpaI	1	1418	-	-	1418	606	-	-
XhoI	1	1346	-	-	1346	678	-	-
HindI	1	149	-	-	149	1875	-	-
AflII	1	2	-	-	2	2022	-	-
SphI	1	1649	-	-	1649	375	-	-
SacI	1	906	-	-	906	1118	-	-
HincII	1	1418	-	-	1418	606	-	-
NspII	2	426	1346	-	426	920	678	-
AvaII	3	736	987	1434	736	251	447	590
NcoI	1	1091	-	-	1091	933	-	-
NsiI	1	1243	-	-	1243	781	-	-
StuI	2	1311	1570	-	1311	26	664	-

ومن النتائج الأخرى التي تم التوصل إليها في هذه الدراسة هو إمكانية استخدام إنزيم التقييد *AluI* في بناء مكتبة الجينات الخاصة بخلايا خميرة *Saccharomyces cerevisiae* وذلك نظراً لتردد التسلسل التعرفي لهذا الإنزيم (AG↓CT) 11 مرة ضمن التسلسل النكليوتيدي الكامل لجين Serine dehydratase بالمقارنة مع تردد التسلسل التعرفي لبقية إنزيمات التقييد الأخرى المبينة في الجدول (3). لذا يعد هذا الإنزيم ملائم جداً في هذه العملية التي تتطلب إجراء الهضم الجزئي للدنا الكروموسومي الكامل لخميرة *Saccharomyces cerevisiae* باستخدام إنزيم تقييد مناسب يتعرف على تسلسل نكليوتيدي رباعي ويقطع في مواضع مختلفة ليعطي قطع تقييد ذات نهايات مستوية يمكن غرسها مباشرة في موضع إنزيم التقييد *StuI* (AGG↓CCT) لناقل الاستنسال المستخدم دون الحاجة إلى ربطها بوسائل الربط الأخرى الأكثر صعوبة (كالطرائق استخدام الجزيئات الرابطة، الوصيلات أو باستخدام الذيل بالبوليمرات المتجانسة) وخاصة بالنسبة لنواقل الاستنسال المشتقة من دنا العاثي لامدا وكما هو موصوف من قبل Glover (13).

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 الDNA بإنزيم التقييد الملائم ثم الترحيل الكهربائي للقطع الناتجة على هلام الأكاروز وذلك نظراً لصعوبة التحسس بهذه القطع الصغيرة من ناحية (وبشكل خاص تلك التي لا يزيد حجمها عن 100 زوج قاعدي) ولإمكانية تداخل هذه القطع بسهولة أثناء الترحيل من الناحية الأخرى فضلاً عن إمكانية ظهور القطع الصغيرة المتقاربة في الحجم على شكل حزمة واحدة بعد الترحيل الكهربائي على هلام الأكاروز المصبغ بصبغة بروميد الأثيديوم وكما هو موصوف من قبل Tolstoshev و Blackesley (14).

ومن خلال هذه النتائج أيضاً يمكن القول أنه من الممكن استخدام البرنامج الحالي لدراسة درجة التقارب الوراثي بين الأنواع المختلفة من الكائنات الحية وبشكل خاص حقيقة النواة من خلال تعيين درجة تماثل قطع التقييد (RFLPs) الناجمة عن معاملة الجينات المتناظرة لهذه الكائنات بعدد من إنزيمات التقييد الملائمة، وتعد هذه المسألة مهمة جداً لدى الباحثين في الوقت الحاضر لتعيين مدى نجاح عمليات الاستنسال الجزيئي ونقل الجينات بين الأنواع المتقاربة من الكائنات الحية، إذ ينشأ التباين في أطوال قطع التقييد عن الطفرات النقطية التي تؤدي إلى حذف أو إضافة موضع تقييد مفرد وخاصة بين السلالات البكتيرية العائدة لنفس النوع (15).

ولغرض تحديد عدد ونوع إنزيمات التقييد التي تمتلك تسلسلات تعرفية ومواضع قطع ضمن التسلسل النكليوتيدي الكامل لجين Serine dehydratase ، فقد تم التمكن من رسم خارطة التقييد الخاصة بهذا الجين والتي تظهر مواضع القطع الخاصة بكل نوع من إنزيمات التقييد وكما هو مبين في الشكل (3)، حيث يلاحظ من هذا الشكل أن التسلسل النكليوتيدي لجين Serine dehydratase يمتلك مواضع حساسة فريدة لإنزيمات *XbaI* ، *AhaI* ، *XhoI* ، *EcoRI* ، *HpaI* ، *PstI* ، *NdeI* و *SacI* لكونها تقطع في مواضع محددة تقع خارج حدود منطقة إطار القراءة المفتوح (ORF) التي تشفر للأنزيم (Serine dehydratase) وبذلك يمكن استخدام أي من هذه الأنزيمات في كلونة الجين في داخل الكلونة الملائم دون حدوث أي ضرر في منطقة التشفير ، وتعد هذه النتائج مهمة جداً عند الحاجة لاستنسال الجين وذلك بالمحافظة على التسلسل النكليوتيدي الكامل لمنطقة إطار القراءة المفتوح التي تحمل المعلومات الوراثية الكاملة الخاصة بإنشاء إنزيم Serine dehydratase الذي يمكن استعماله في إحدى نواقل التعبير الملائمة بحيث يقع تحت سيطرة أحد المحفزات القوية لغرض استنساخه بكفاءة عالية في مضيفه الجديد، ومن بين النتائج الأخرى التي يمكن ملاحظتها من خلال النتائج المبينة في الشكل (3) هو عدم إمكانية استخدام إنزيمات التقييد الأخرى التي تمتلك مواضع قطع ضمن منطقة التشفير لغرض استنسال الجين نظراً لكونها تقطع مرة واحدة على الأقل ضمن التسلسل النكليوتيدي الكامل لمنطقة التشفير فمثلاً هناك موضع حساس مفرد لإنزيم التقييد ClaI فضلاً عن موضعين حساسة لإنزيم التقييد HindIII وهذا يعني عدم إمكانية استخدام هذه الإنزيمات لاستنسال الجين عند الحاجة لاستنساله.

شكل (3): خارطة التقييد لجين *SDHII* المشفر لأنزيم **serine dehydratase**

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 الـ DNA الناتجة من معاملة جزيئات الـ DNA المختلفة بأي من إنزيمات التقييد التي تمتلك تسلسلات تعرفية ضمن التتابع النكليوتيدي الكامل لهذه الجزيئات، فضلاً 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 ناحية ورسم الخرائط الفيزيائية لهذه الجزيئات الحيوية من الناحية الأخرى.

المصادر

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. and Macelis , D. (2000). REBASE — restriction enzymes and methylases. Nucleic Acids Research, Vol. 28, No.1:306 – 307.
3. Brown,N.L and Smith,M. (1980). *In* : Methods in Enzymology, Vol.65, Academic press, New York, pp. 391 – 404.
4. Sutcliff, J.G. (1979). Cold Spring Harbour Symp. Quant. Biol. Vol. 43 , pp. 70 – 90.
5. Reddy, V.B.; Thimmappaya,B.; Dhar, R. ; Subramanian, K.N. ; Zain, B.S.; Pan, J; Ghosh, P.K.; Colma, M.L. and Weissman, S.M. (1978). Science , Vol. 200, pp. 494 – 502.
6. Sanger, F.; Coulson,A.R.; Friedmann, T.; Air, G.M.; Barrel, B.G.; Brown, N.L.; Fiddes, J.C.; Hutchison, C.A.; Slocombe, P.M. and Smith, M. (1978). J.Mol. Bio., Vol. 125, pp. 225 – 246.
7. Roberts,R.J. and Macelis, D. (1999). NAR Data Base Issue. Nucleic acid Res. Vol. 27, pp. 312 – 313.
8. Fuchs,D.; Rosenvold, E.; Honigman,A. and Szybalski, W.(1980).
9. 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.
10. Wolfgang Seufert . (1990) .nucleotide sequence of the yeast SDHII gene encoding a serine dehydratase homology .
11. Turley, S. M.; Choe, S. M.; Ni, W. and Trelease, R. N. (1990). Nucleic acids research, Vol. 18, No. 12, pp. 3643.

12. Maniatis, T.; Fritsch, E. F. and Sambrook, J. (1982) Molecular Cloning. A laboratory manual. Cold Spring Laboratory.

13. Glover, D. M. (1984). Gene Cloning: The Mechanics of DNA Manipulation. Chapman and Hall, London. New York.

14. Tolstoshev, C. M. and Blackesley, R. W. (1982). RSITE: a computer program to predict the recognition sequence of a restriction enzyme. Nucleic Acisds Research, Vol. 10, No. 1, pp. 1-18.

15. Lewin, B. (2000). Genes II, 4th edition, John Wiley and Sons, New York, U.S.A.

Abstract

Database specific for restriction enzymes (REBASE) and related proteins was used to design executive program in quick basic language to determine restriction sites and drawing restriction map for the SDH1 gene coding for the complete sequence of serine dehydratase drived from *Saccharomyces serevisiae* , the program was useful in prediction of restriction patterns for the analysis of recombinant DNA molecules, it was enables to determine restriction sites for 17 enzyme among 40 different restriction enzymes having recognition sequences included in the SDH1 gene sized of 2797 bp which it was *Hin*dIII, *Eco*RI, *Hpa*I, *Sph*I, *Afu*III, *Sac*I, *Xba*I, *Hin*dI, *Xho*I, *Fba*I, *Pst*I, *Avr*II, *Cla*I, *Nde*I, *Nco*I, *Spe*I, and *Stu*I , in addition to predict fragment sizes resulted from the treatment SDH1 gene with these enzymes.

It was also enables to draw restriction map that showing restriction sites specific for these enzymes in the sequence of SDH1 gene in addition to determine open reading frame (ORF) coding for serine dehydratase sized of 1074 bp included in the complete sequence of the gene .