مولکولهای DNA خطی طویل در طول خود شامل مناطق حلقوی ابر مارپیچ هستند.

وجود انتهاهای آزاد در مولکول های DNA حلقوی ممکن است این تصور را بوجود آورد که آنها را نمی توانند واجد نواحی ابر مارپیچ باشند ولی با بررسی کروموزوم های یوکاریوتی که با دقت و احتیاط جدا شده اند نشان داده شده است که کروماتین آنها از تعدد زیادی نواحی حلقوی متوالی (اشکال سنجاق سری) که به یک داربست پروتئینی متصل هستند تشکیل شده است. داربست فوق عمدتاً از دو نوع پروتئین که به DNA متصل می شوند، ساخته شده است. از آنجا که DNA موجود در هر یک از این نواحی حلقوی به طور مستقل به صورت ابر مارپیچ درآمده اند و هر ناحیه تحت فشار موضعی خاص است تصور می شود که اتصالات فوق به طریقی مانع از سرایت چرخش یک ناحیه به نواحی مجاور گردند. با بررسی کروموزوم های بزاقی مگس سرکه و حلقه های کروموزوم های برسی شکل سمندر، معلوم شده است که هر یک از حلقه های فوق در واقع واحد عمل کننده کروماتین را تشکیل می دهند و در اثر رونویسی یک یا دو مولکول RNA بسیار طویل را بوجود می آورند. مسئله چگونگی نگهداری حلقه های ابر مارپیچ (به طور مستقل) توسط پروتئین های داربستی تا همین اواخر ناشناخته بود، ولی اخیراً معلوم شده است که جزء اصلی داربست را توپوایزومراز II تشکیل می دهد.

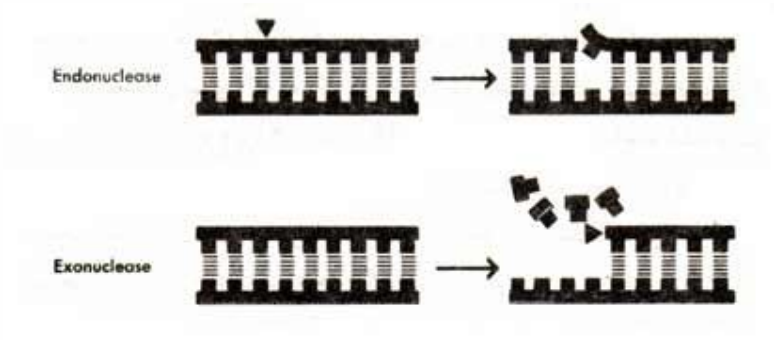
بزودی معلوم شد که نه تنها کروموزوم های خطی طویل جانداران عالی بلکه DNA کروموزوم حلقوی کلی باسیل نیز دارای مناطق حلقوی ابرمارپیچ می باشد. ضمناً DNA کلی باسیل بنحوی به 50 ناحیه حلقوی ابرمارپیچ (که طول هر کدام 20 میکرون است) تقسیم می شود که میزان ابرمارپیچ شدن آنها به طور مستقل کنترل می شود. تا کنون هیچ داربست پروتئینی در کروموزوم های باکتری ها کشف نشده است. در واقع

شبکه رشد – شبکه ملی مدارس ایران
Olympiad.roshd.ir

بهترین راه شناسایی آنها جستجوی فعالیت توپوایزومراز II درسلول هایی است که با احتیاط و ملایمت شکسته شده اند.

تولید قطعات اختصاصی با آنزیم های محدود کننده

آنزیم هایی که سبب قطع پیوندهای فسفو دی استر اسیدهای نوکلئیک می شوند به نام نوکلئاز خوانده می شوند. آن دسته از نوکلئازها که پیوندهای فسفو دی استر واقع در قسمتهای داخلی مولکول را قطع می کنند آندونوکلئاز و گروهی که پیوندهای فسفو دی استر انتهایی را قطع می نمایند اگزونوکلئاز نامیده می شوند



نمایش چگونگی عمل آندونوکلئازها و اگزونوکلئازها

مدتها تصور می شد که آندونوکلئاز ها غیر اختصای عمل می کنند یعنی پیوند بین نوکلئوتیدها را صرف نرظر از توالی نوکلئوتیدی اطراف قطع می نمایند. به هر حال ظرف ده سال اخیر دسته خاصی از آندونوکلئازها در پروکاریوتها کشف شدند که تنها توالی نوکلئوتیدی خاصی را قطع می کنند. این آندونوکلئازها که به طور کلی آنزیم های محدود کننده خوانده می شوند معمولاً توالیهای خاصی را تشخیص می دهند. توالیهای فوق

شبکه رشد – شبکه ملی مدارس ایران
Olympiad.roshd.ir

حول یک محور مخصوص دارای تقارن دو تایی می باشند $\left(\frac{AAGCTT}{TTCGAA}\right)$. به دلیل آنکه چنین توالیهایی در هـر دو زنجیره یافت می شوند (البته جهت مخالف یکدیگر) آنزیم های فوق می توانند در دو زنجیره بریدگی ایجاد کنند .

Enzyme	Recognition Site (Axis; Cut bond)		Enzyme	Recognition Site (Axis of symmetry; Cut bond)	
Eco RI	5'-GAA CTT	TTC AAG	*Hin* dII	5'-GTPy CAPu	PuAC PyTG
Hin dIII	AAG TTC	CTT GAA	*Hpa* I	GTT CAA	AAC TTG
Hpa II	CC GG	GG CC	*Hae* III	GG CC	CC GG
Acy I	GPuC CPyG	GPyC CPuG	*Afl* III	ACPu TGPy	PyGT PuCA
Aha II	GPuG CPyG	GPyC CPuG	*Ase* I	CPyC GPuG	GPuG CPyC
Cfr I	PyGG PuCC	CCPu GGPy	*Gdi* II	PyGG PuCC	CCG GGC
Hae II	PuGC PyCG	GCPy CGPu	*Hgi* CI	GGPy CCPu	PuCC PyGG
Hgi JII	GPuG CPyC	CPyC GPuG	*Nsp* CI	PuCA PyGT	TGPy ACPu
Alu I	AG TC	CT GA	*Asu* II	TTC AAG	GAA CTT
Cla I	ATC TAG	GAT CTA	*Bse* PI	GCG CGC	CGC GCG

نقاط تشخیص آنزیم های محدود کننده مختلف پیکانها محل قطع پیوند فسفو دی استر را نشان می دهند. پورین $= Pu$ و پیریمیدین $= Py$ در کلیه قطعات فوق انتهای $5'$ زنجیره بالایی در سمت چپ قرار دارد

شبکه رشد – شبکه ملی مدارس ایران
Olympiad.roshd.ir

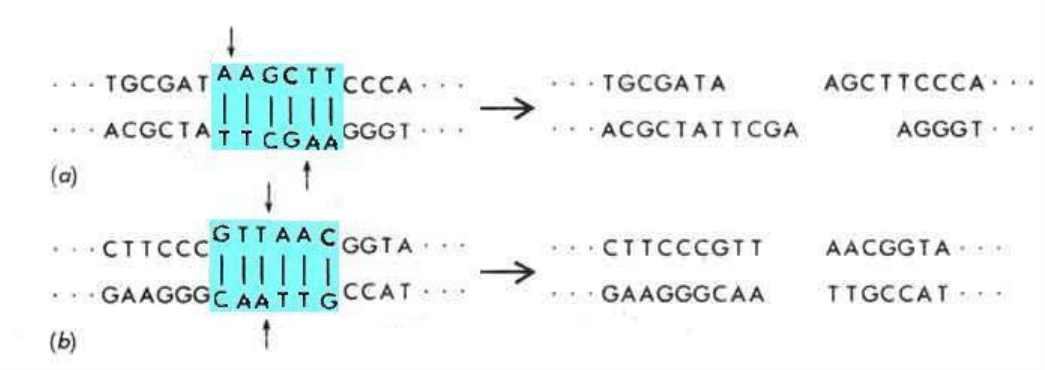
ضمناً با توجه به آنکه آنزیم های محدود کننده غالباً به صورت دیمر به دو زنجیره مکمل DNA در جایگاههای تشخیص متصلم ی شوند به طور همزمان برش انجام می شود.

کشف آنزیم های محدود کننده با شناخت خاصیت آنها در قطع مولکول های DNA بیگانه و عدم تاثیر آنها بر DNA خودی شروع شد. به عبارت دیگر هر آنزیم محدود کننده می تواند DNA سلولی که در آن سنتز شده است را از سایر DNA ها تمیز دهد. به نظر می رسد عمل اصلی (و شاید تنها عمل) این آنزیم ها، تخریب قطعات DNA بیگانه قبل از قرار گرفتن آن در کروموزوم میزبان باشد. کشف این آنزیم ها کاملاً غیر مترقبه بود، زیرا تصور نمی شد که اولاً ورود مولکول های DNA بیگانه به سلول پدیده عادی باشد و ضمناً آنچنان خطرناک باشد که سلول های میزبان مجبور شده باشند حربه ای بر علیه آنها اتخاذ نمایند تا از عواقب ژنتیکی ورود آنها در امان بمانند.

تا کنون از بیش از 300 نوع سلول پروکاریوت مختلف، بیش از 100 نوع آنزیم محدود کننده با خواص آندونوکلئازی اختصاصی استخراج شده است. در حالی که اکثر سلول های پروکاریوتی دارای آنزیم های محدود کننده هستند سلول های یوکاریوتی فاقد آنها می باشند و هنوز دلیل این اختلاف شناخته نشده است. اکثر آنزیم های محدود کننده گروههای 4 تا 6 نوکلئوتیدی اختصاصی و پاره ای دسته های هشت نوکلئوتیدی را تشخیص می دهند. توالیهای متقران (توالیهای یکسان – معکوس) دو زنجیره همواره به طور ممتد نیستند (به عبارت دیگر محور تقارن، نقطه ای نیست) بلکه گاه یک یا چند جفت باز بین آنها قرار می گیرد. در هر صورت محل قطع در همان توالیهای متقارن (جایگاه تشخیص) می باشد. در اثر عمل بعضی آنزیم های محدود کنننده قطعات DNA ای بوجود می آید که دارای انتهاهای صاف می باشند و حال آنکه محل قطع در اکثر آنزیم های محدود کننده خارج از مرکز قرار دارد و همین امر سبب ایجاد قطعات DNA ای می شود که در انتهای خود

شبکه رشد – شبکه ملی مدارس ایران
Olympiad.roshd.ir

دارای نواحی تک رشته ای کوتاهی هستند (شکل).



چگونگی عمل آنزیم های محدود کننده *(a)* محل قطع اکثر آنزیم های محدود کننده خارج از مرکز تقارن جایگاه تشخیص است. نتیجه این امر ایجاد قطعات تک رشته ای کوتاه می باشد. در اینجا توالی وجود دارد که واجد جایگاه تشخیص آنزیم *Hind III* است. این آنزیم در محل پیکانها *DNA* راقطع می نماید. *(b)* پاره ای از آنزیم های محدود کننده مانند *Hpa I* که در اینجا نشان داده شده است، *DNA* را درست در محل تقارن قطع می کنند و در نتیجه قطعات *DNA* حال دارای انتهای صاف می باشند. جایگاه تشخیص در مورد خاکستری شده اند.

ممکن است دو آنزیم مختلف یک جایگاه تشخیص واحد را شناسایی کنند ولی محل قطع آنها یکسان نیست. در حال حاضر ثابت شده است که میزان C,G در جایگاههای تشخیص بیشتر است با این حال اخیراً یک آنزیم محدود کننده $(Aha\ \ III)$ یافت شده است که جایگاه تشخیص آن فاقد بازهای G,C بوده و صرفاً از بازهای $T,A(TTTAAA)$ تشکیل یافته است. هنوز معلوم نیست که فراوانی بیشتر C,G در جایگاههای تشخیص آیا به دلیل محکم بودن پیوند آنها است یا دلیل دیگری دارد.

احتمال وجود تصادفی یک جایگاه تشخیص اختصاصی چهارتایی بسیار بیشتر از جایگاههای شش تایی است، به طوری که جایگاههای چهارتایی امکان دارد به ازاء هر چند صد جفت باز آلی یکبار وجود داشته باشند

شبکه رشد – شبکه ملی مدارس ایران
Olympiad.roshd.ir

در حالی که این احتمال برای جایگاههای شش تایی به یک در چند جفت باز آلی می رسد. بنابراین هر چه تعداد نوکلئوتیدهای جایگاه تشخیص بیشتر باشد، تعداد قطعات کمتر و طول آنها بیشتر می شود. برای مثال در مولکول $SV_{40}DNA$ تنها یک جایگاه تشخیص برای آنزیم محدود کننده $EcoRI$ وجود دارد در حالی که آنزیم $Hind\ III$ مولکول فوق را در پنج ناحیه قطع می کند (پنج جایگاه تشخیص برای آنزیم $Hind\ III$ در SV_{40} وجود دارد). ضمناً ممکن است جایگاه تشخیص یک آنزیم در یک DNA وجود نداشته باشد. برای مثال DNA فاژ $T7$ (که **39936** جفت باز دارد) هیچ جایگاه تشخیصی برای آنزیم $EcoRI$ ندارد.

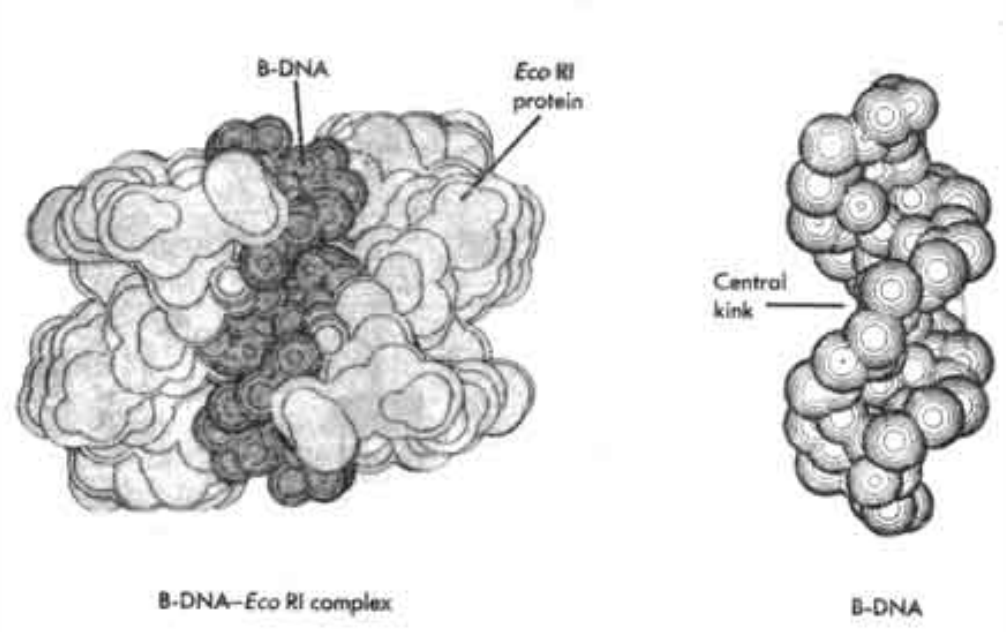
ایجاد خمیدگی در کمپلکس DNA و آنزیم $EcoRI$

اولین بار چگونگی اتصال یک آنزیم محدود کننده به DNA از طریق کریستالوگرافی اشعه ایکس مجموعه آنزیم $EcoRI$ و DNA قطعه ای با توالی $\frac{TCGCGAATTCGCG}{AGCGCTTAAGCGC}$ که دارای توالی تشخیص $GAATTC$ بود، معلوم شد. مجموعه آنزیم $EcoRI$ DNA در فقدان یون Mg^{2+} پایدار است ولی در حضور Mg^{2+} آنزیم سوبسترای خویش را هیدرولیز کرده از آن جدا می شوند.

دو رشته پلی پپتیدی آنزیم $EcoRI$ بخوبی به دور مارپیچ مضاعف تاب می خورند و با بازهای موجود در شیار بزرگتر اتصالات محکمی برقرار می سازند ولی هیچ اتصالی با شیار کوچکتر بوجود نمی آورند. شکل فضایی DNA در محلی که با آنزیم در تماس است با اشکال کلاسیک A, B مولکول DNA متفاوت است. به عبارت دیگر انحرافات فوق در سه خمیدگی شدید که سبب جدا شدن چهار قطعه (هر قطعه از سه نوکلئوتید تشکیل شده است) شده اند متمرکز شده است. به دلیل تقارن توالی DNA، خمیدگی اول و سوم همشکل می

شبکه رشد – شبکه ملی مدارس ایران
Olympiad.roshd.ir

باشند ولی با خمیدگی مرکزی تفاوت دارند. دو ناحیه همشکل انتهایی DNA ، شکل فضایی شبه A دارند ولی قسمت مرکزی (میانی) دارای آرایش $B-DNA$ می باشد. خمیدگیهای انتهایی مسئول شکل حد واسطی هستند که اشکال B, A را از یکدیگر جدا می سازد. خمیدگی مرکزی موجود در قطعه $B-DNA$ سبب باز شدن تاب مارپیچ مضاعف به اندازه 25 درجه می شود و یک خمیدگی 12 درجه ای DNA موجب وسیع شدن شیار بزرگتر می گردد، امکان دسترسی $EcoRI$ به آن را (شیار بزرگتر) فراهم می سازد. (شکل).



اتصال $B-DNA$ به آنزیم $EcoRI$ پیکان محکم خمیدگی مرکزی در ناحیه اتصال آنزیم $EcoRI$ به $B-DNA$ را نشان می دهد. خمیدگی مرکزی دو رشته DNA را 25 درجه باز می کند و خمیدگی بوجود می آید که باعث وسیعتر شدن شیار بزرگ می گردد.

این ساختمان کاملاً با ساختمان همین توالی در عدم حضور آنزیم فوق متفاوت می باشد، خصوصاً خمیدگی مرکزی احتمالاً در عدم حضور آنزیم $EcoRI$ تنها به مدت بسیار کوتاهی وجود دارد.

شبکه رشد – شبکه ملی مدارس ایران
Olympiad.roshd.ir

شبکه رشد – شبکه ملی مدارس ایران
Olympiad.roshd.ir