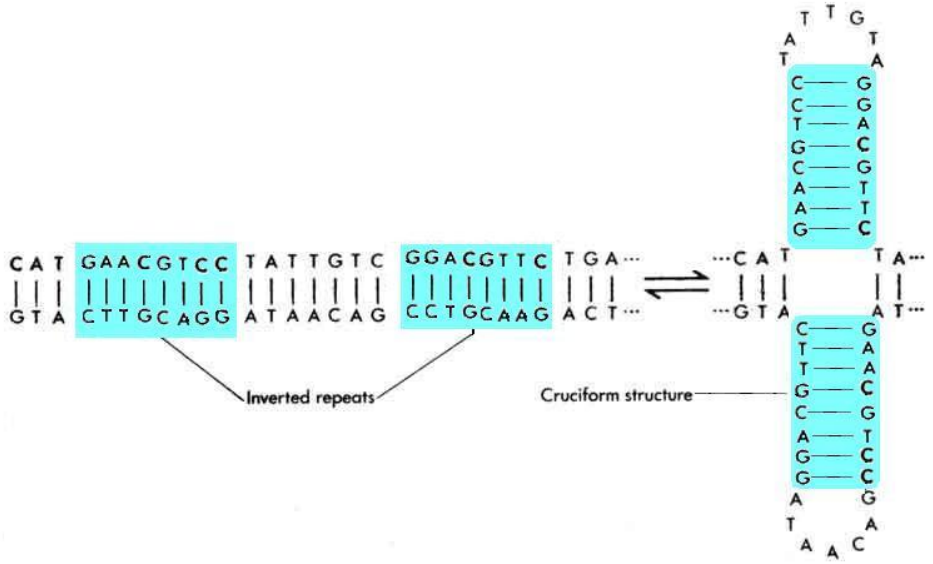
اتصال قطعات DNA و تشکیل DNAهای نوترکیب

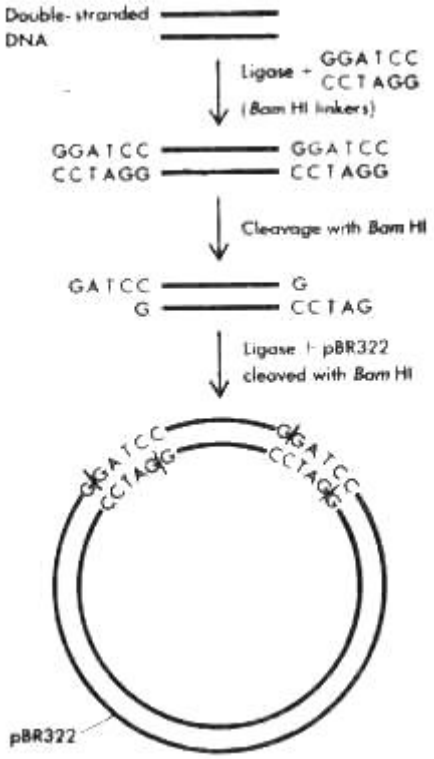
قطعات DNA حاصل از عمل آنزیم‌های محدود کننده به علت داشتن انتهای چسبنده (قسمتی که به صورت تک‌رشته‌ای است و با قطعه دیگر ساختمان مکمل تولید می‌کند) به طور موقت به یکدیگر متصل می‌شوند. با افزودن آنزیم لیگاز (وصل کننده) پیوند فسفو دی‌استر بین دو رشته بوجود می‌آید و دو قطعه محکم به یکدیگر متصل می‌شوند (شکل).



قسمتهایی از DNA که دارای توالیهای مکمل باشند (مانند آنچه در بالا نشان داده شده است) با تشکیل پیوندهای هیدروژنی بین توالیهای تکراری معکوس خود می توانند حلقه های صلیبی شکل ایجاد نمایند.

آنزیم لیگاز در حضور ATP و یا NAD^+ عمل می‌کند و با کسب انرژی لازم باعث ایجاد پیوند فسفو دی‌استر در اسکلت DNA می‌شود. این آنزیم در همانندسازی DNA و باز ترکیبی DNA در داخل سلول نقش اساسی دارد. ابتدا تصور می‌شد که آنزیم لیگاز فقط قطعاتی را به هم متصل می‌کند که دارای

انتهاهای مکمل باشند، اما قطعات *DNA*ای که انتهای آنها فاقد قسمتهای تک رشته‌ای هستند نیز اگر به میزان زیاد وجود داشته باشند توسط آنزیم لیگاز به هم وصل می‌شوند. با این حال احتمال اتصال قطعات فاقد قسمتهای تک‌رشته‌ای بسیار کم است و اغلب قسمتهای تک‌رشته‌ای مکمل به انتهای قطعات اضافه می‌شوند که این عمل تشکیل پیوندهای هیدروژنی بین بازهای مکمل بین انتهاها را افزایش داده و عمل آنزیم لیگاز را آسانتر می‌کند (شکل).



از اولیگونوکلئوتیدهای دو رشته‌ای که به متصل کننده *Bam HI* معروفند برای ایجاد قطعات *DNA* لبه‌دار استفاده می‌شود (منظور از لبه‌دار قطعات *DNA*ای است که انتهای کوتاه تک‌رشته‌ای دارند). ابتدا قطعات کوتاه متصل کننده به دو انتها *DNA* متصل می‌شوند و سپس آنزیم *Bam HI* اضافه می‌گردد تا انتهاهای لبه‌دار تولید شوند. اتصال دو انتهای *DNA* از طریق انتهاهای لبه‌دار انجام می‌شود.

از آنجا که انتهاهای مکمل همواره به طور خودبخود با ایجاد پیوندهای هیدروژنی ساختمان مکمل می‌سازند، برای عمل آنزیم لیگاز لازم نیست که دو قطعه DNA قبلاً به هم وصل شده باشند. با استفاده از آنزیم‌های محدودکننده‌ای که انتهای چسبنده می‌سازند (مانند $ECoRI$) و آنزیم لیگاز روشهای نوترکیبی DNA در آزمایشگاه با سهولت بیشتری انجام می‌شوند و بدین ترتیب میتوان قطعات مختلف DNA که از منابع مختلف استخراج شده‌اند را به یکدیگر متصل کرد. با ابداع روشهای تکثیر DNA (آمپلی فیکاسیون = کلونینگ)، روشهای نوترکیبی DNA اهمیت خود را در میان دانشمندان به اثبات رسانده است.

روش کلونینگ DNA به این ترتیب است که قطعات DNA مورد نظر را وارد واحدهای کروموزومی که مستقل از کروموزوم سلول میزبان همانندسازی می‌کنند، می‌نمایند. این واحدها که به پیکان (وکتور) معروف هستند اغلب فاژ، پلاسمید و یا اسیدهای نوکلئیک ویروسی هستند. در اثر ورود وکتورهای فوق به سلول میزبان مناسب، بدون توجه به همانندسازی کروموزوم میزبان، همانندسازی آنها بطور مستقل انجام می‌گیرد. به وکتورهایی که در روش کلونینگ بکار گرفته می‌شوند پیکانهای کلونینگ گفته می‌شود. با استفاده از پیکانهای کلونینگ قطعات مورد نظر در سلولهای میزبان تکثیر می‌یابند.

آرشیو قطعات DNA تکثیریافته

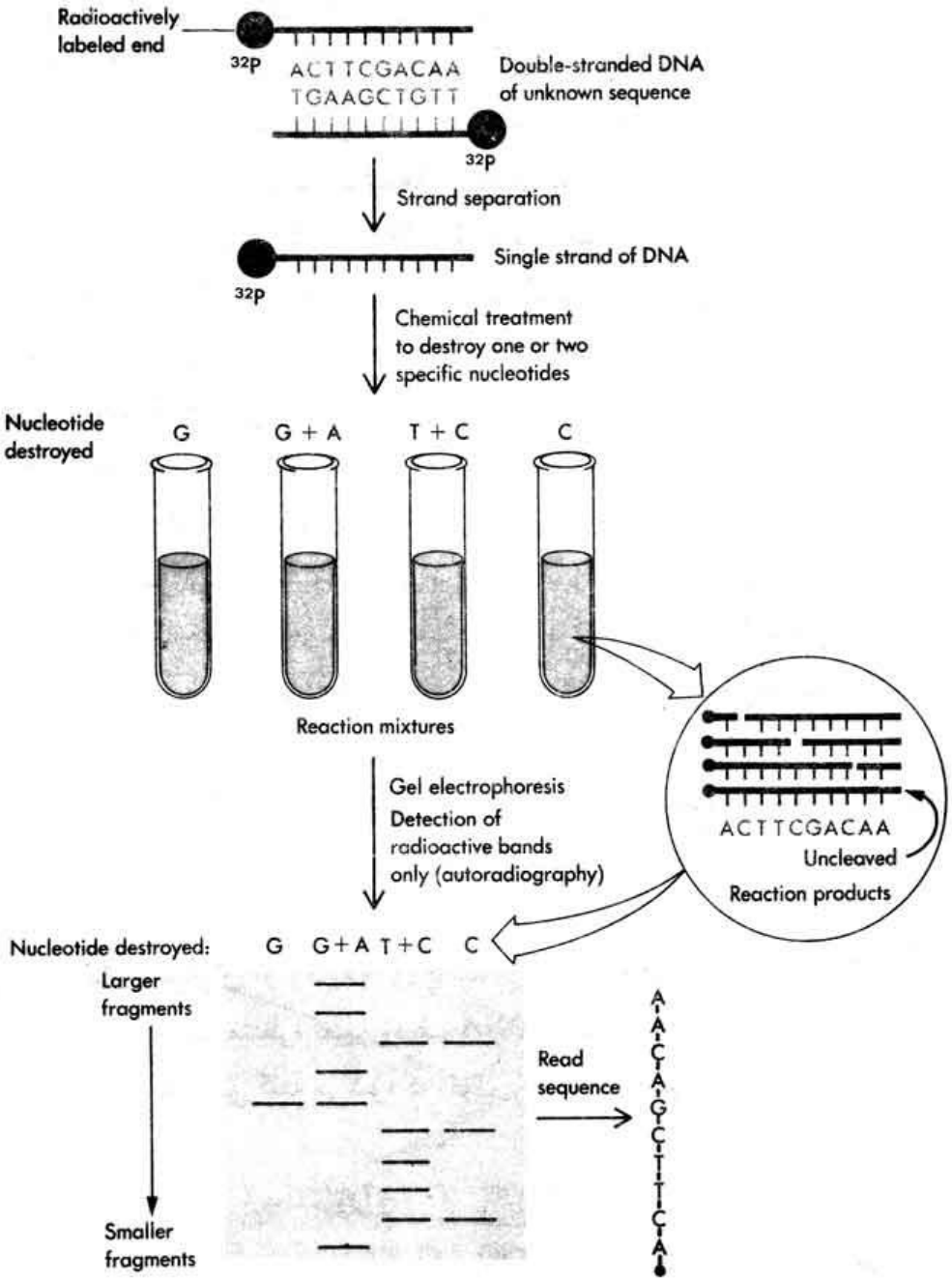
با استفاده از روش الکتروفورز بر روی ژل آگاروز می‌توان قطعات DNA حاصل از عمل آنزیم‌های محدودکننده بر روی DNA پلاسمید، ویروس و یا باکتری را از یکدیگر جدا کرد. اما تفکیک قطعات DNA سلولهایی که کروموزوم بسیار طویلی دارند خیلی دشوار است. حتی با بکارگیری آنزیم‌های محدودکننده‌ای که توالی جایگاه تشخیص بسیار نادری دارند کروموزوم‌های سلول‌های یوکاریوت‌ها به قطعات بسیار زیادی تقسیم می‌شوند که تفکیک آنها به وسیله الکتروفورز بسیار دشوار است و بدین ترتیب در ژل آگاروز به جای نوارهای نازک مجزا، نوارهای بسیار ضخیم و منتشری ایجاد می‌شود. برای مثال، آنزیم محدودکننده $EcoRI$، ژنوم انسان را که حاوی 8×10^9 جفت باز است به دو میلیون قطعه DNA تبدیل می‌کند که جداسازی این قطعات در ژل آگاروز بخوبی انجام نمی‌شود.

امروزه مطالعه قطعات DNA سلولی با ابداع روشهای نوترکیبی DNA انجام می‌شود. قطعاتی که از لحاظ اندازه با یکدیگر مشابه هستند، با قرار گرفتن در پیکانهای کلونینگ از یکدیگر جدا می‌شوند. به عنوان مثال کلیه قطعات محدودکننده تولید شده از ژنومی به بزرگی ژنوم مگس سرکه را می‌توان در چهل‌هزار پلاسمید مختلف کلی‌باسیل جا داد. تکثیر هر یک از این پلاسمیدها و یا پیکانها (که مجموعاً به آرشیو ژنی معروفند) امکان مطالعه دقیق هر یک از قطعات محدودکننده را بآسانی فراهم می‌سازد. در حال حاضر تهیه آرشیو ژنی DNA سلولها بسیار ساده است و به طور روزمره انجام می‌شود. گاه مطالعه و شناسایی خصوصیات یکی از اعضاء آرشیو ژنی مورد نظر است در این صورت با بکارگیری روشهای

آزمایشگاهی ملایم می‌توان به این هدف نایل شد. باز هم باید تاکید کرد که توسعه مطالعات و تحقیقات بیولوژی مولکولی مدیون ایجاد آرشیوهای ژنی بوده است.

توالی مولکول‌های بسیار طویل DNA را می‌توان بسرعت تعیین کرد

با کشف آنزیم‌های محدودکننده و بکارگیری روشهای نوترکیبی DNA دو روش برای تعیین ردیف بازهای آلی (T,C,G,A) یک رشته DNA ابداع گردیده است. در روش اول با استفاده از مواد شیمیایی خاصی که با بازهای آلی واکنش اختصاصی نشان می‌دهند (مثل دی‌متیل سولفات، رشته‌های DNA در نقاط خاصی قطع می‌شوند به طوری که اختلاف قطعات مختلف تنها در مورد یک نوکلئوتید باشد بدین ترتیب می‌توان ردیف بازهای رشته‌های DNA را شناسائی کرد.(شکل).

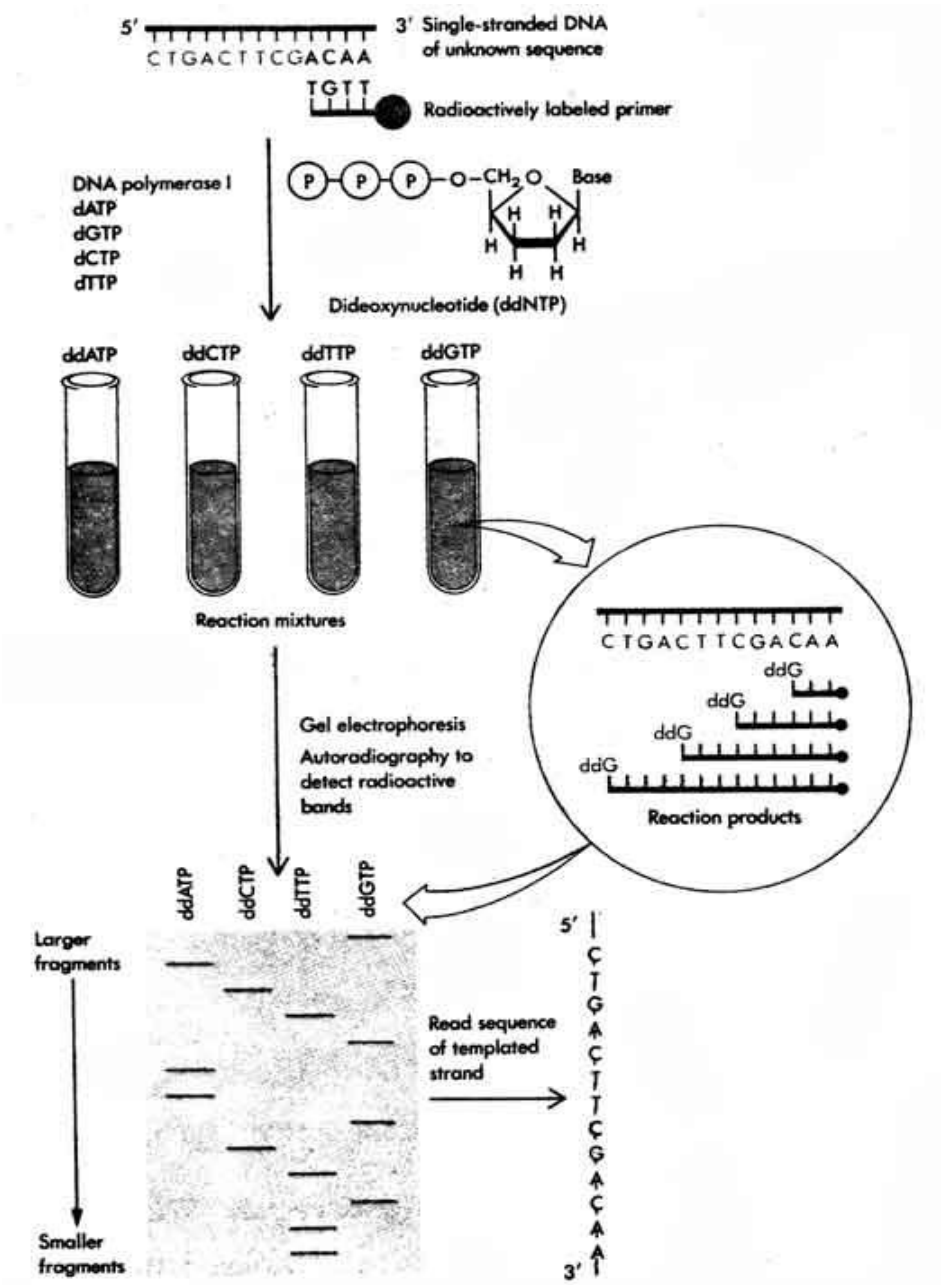


تعیین ردیف DNA به روش ماکسام – ژیلبرت. در این روش مواد شیمیایی خاصی بکار رفته است که نوکلئوتیدها را در مکانهای خاصی تخریب می‌کنند و مولکول‌های DNA در این نقاط قطع می‌شوند. ابتدا مولکول DNA در یک انتها (که معمولاً انتهای '5 است) نشان‌دار می‌گردد و دو زنجیره مکمل از یکدیگر جدا می‌شوند و تنها یک رشته جهت تعیین ردیف مورد استفاده قرار می‌گیرد. سپس در چهار لوله آزمایش زنجیره DNA فوق با چهار ترکیب شیمیایی که زنجیره را در یک و یا دو نقطه قطع می‌کنند مخلوط می‌شوند. واکنش‌ها طوری انجام می‌گردند که در هر زنجیره DNA فقط یک واکنش شیمیایی انجام شود. بنابراین برای مثال در روش بالا با تخریب نوکلئوتید C یک سری قطعات DNA نشان‌دار با اندازه‌های مختلف بوجود می‌آید. با جداکردن قطعات DNA بر روی ژل و نمایان کردن نوارها برروی فیلم پرتونگاری ردیف بازها در زنجیره مشخص می‌شود.

قطعاتی که در یک نوکلئوتید با یکدیگر اختلاف داشته باشند به کمک الکتروفورز از یکدیگر جدا می‌شوند و بدین وسیله می‌توان هم در روش شیمیایی و هم در روش آنزیمی ردیف قطعات را شناسایی کرد. در هر صفحه ژل پلی‌اکریل آمید ۳۰۰ قطعه DNA مختلف که اختلافشان در یک نوکلئوتید است از یکدیگر جدا می‌شوند. این روش برای اولین بار برای تعیین ردیف ژن تنظیم‌کننده اپرون لاکتوز باکتری مورد استفاده قرار گرفت و سپس تنها در طی یک سال ردیف کامل پلاسمید $pBR322$ (که حاوی ۴۳۶۲ جفت باز است) توسط یک دانشمند تعیین شد.

روش دیگری برای تعیین ردیف DNA وجود دارد که در این روش با بکارگیری آنزیم DNA پلیمراز I قطعات DNA در اندازه‌های مختلف ساخته می‌شوند و با جداکردن آنها از یکدیگر بر روی ژل الکتروفورز، ردیف نوکلئوتیدها مانند روش اول مشخص می‌گردد. در این روش یک رشته DNA، که قرار است تعیین ردیف شود به عنوان الگو قرار می‌گیرد و رشته مکمل آن توسط آنزیم با استفاده از چهار نوع باز آلی به صورت دزاکسی نوکلئوتید و $3', 2'$ دی‌دزاکسی نوکلئوتیدهای آدنین، گوانین، سیتوزین و تیمین‌دار (به عنوان خاتمه‌دهنده زنجیره) ساخته می‌شود. آنالوگ‌های دی‌دزاکسی نوکلئوتیدها در مقادیر کم‌مصرف می‌شوند و محل قرار گرفتن آنها در زنجیره سبب ختم سنتز رشته DNA می‌گردد و در نتیجه رشته‌های DNA در اندازه‌های مختلف ساخته می‌شوند (بسته به محل قرار گرفتن آنالوگ‌های دی‌دزاکسی). در چهار لوله آزمایش چهار آنالوگ مختلف قرار داده می‌شود و بعد از ساخته شدن قطعات DNA، رشته‌ها در ژل الکتروفورز از یکدیگر جدا می‌گردند. در هر یک از واکنشهای آنزیم پلیمراز ممکن است با استفاده از آنالوگ‌دی دزاکسی سبب ختم بیوسنتز رشته مکمل در حال ساخته شدن شود و DNA هایی که بدین ترتیب ساخته شده‌اند تنها در یک نوکلئوتید با یکدیگر اختلاف دارند (اختلاف

طول). سپس قطعات حاصل از چهار سری واکنش بر روی یـک ژل (در چاهکهـای متفـاوت) قـرار داده می‌شوند و نوارهای مختلف ظاهر شده بررسی می‌گردند (شکل).



تعیین ردیف DNA به روش سنگر. یک آنالوگ دی‌دزاکسی نوکلئوتید به انتهای در حال طویل شدن زنجیره اضافه شده و طویل شدن زنجیره متوقف می‌شود. طویل نشدن زنجیره به خاطر این است که آنالوگهای دی‌دزاکسی نوکلئوتید قادر به تشکیل پیوند فسفودی‌استر با نوکلئوتید بعدی نیستند. چهارسری واکنش با چهار آنالوگ دی‌دزاکسی در چهار لوله انجام می‌شود و محصول هر سری واکنش قطعات DNA ای است که به طورناقص طویل شده‌اند با جداسازی قطعات DNA فوق بر روی ژل، ردیف DNA اولیه همانند روش ماکسام ژیلبرت از روی ژل خوانده می‌شود.

با این روش توالی کروموزوم فاژ T_4 (به طول ۵۵۷۷ جفت باز) و فاژ لامبدا (به طول ۴۸۵۱۳ جفت باز) شناسایی شده است.

با تهیه بیشتر آنالوگ‌های دی‌دزاکسی نوکلئوتیدها و سهولت انجام این روش انتظار می‌رود که در دهه آینده ترجیحاً این روش به جای روش شیمیای مورد استفاده قرار گیرد.