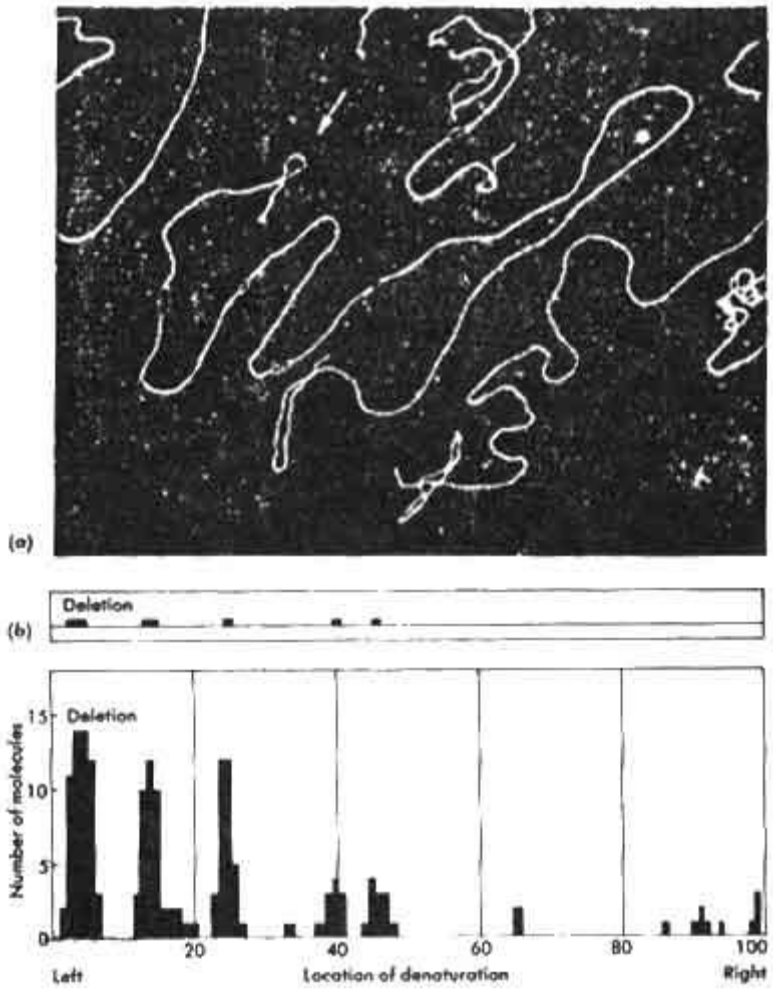
نقش دناتوره شدن جزیی DNA

قرار دادن مولکول DNA در شرایطی که باعث دناتوره شدن آن شود (مثل دمای بالا، PH پایین و یا ترکیبات شکننده پیوندهای هیدروژنی) ترجیحاً باعث باز شدن قسمتهای غنی از AT می‌گردد و نواحی غنی از GC نسبتاًدست نخورده باقی می‌مانند. چنانچه مولکول‌های فوق در مجاورت فرمالدئید قرار گیرند، قسمتهای تک رشته‌ای به صورت پایدار باقی می‌مانند.

بدین ترتیب که فرمالدئید با ترکیب‌شدن با گروههای آمین آزاد با آدنین باعث پایداری قسمتهای تک‌رشته‌ای می‌شود (به عبارت دیگر مانع از تشکیل جفتهای AT می‌گردد). این نواحی در زیر میکروسکوپ الکترونی به صورت حبابهای تک‌رشته‌ای در نقاط مشخصی دیده می‌شوند و مکان آنها در یک DNA معین همواره ثابت است (شکل).

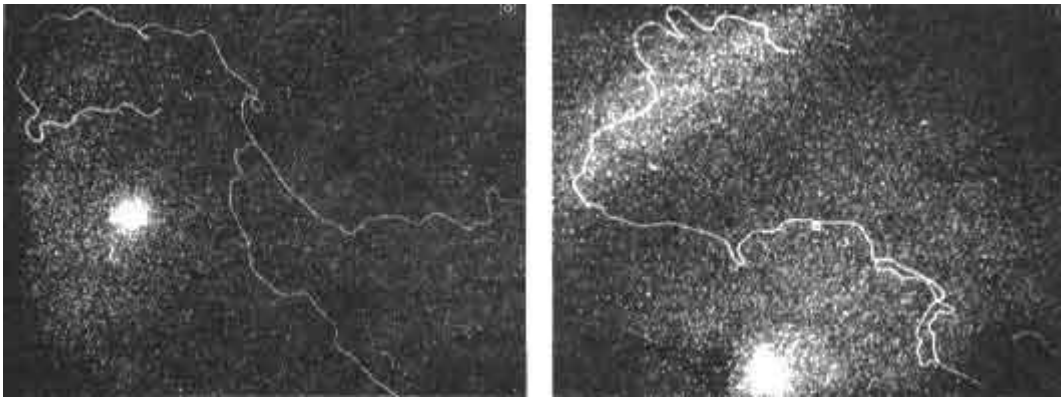


نقشه دناتوره. *(a)* تصویر الکترون میکروسکوپی از مولکول *DNA* فاژ *T7* که قسمتی از آن دناتوره شده است *(b)*. نقشه قسمتهای دناتوره شده همان مولکول *DNA*. *(c)* یک هیستوگرام که نقاط تک‌رشته‌ای مولکول‌های دناتوره شده را مشخص می‌کند پیکان در تصویر *(a)* یک حباب تک‌رشته‌ای را نشان می‌دهد. حباب فوق در *DNA* فاژ *T7* معمولی وجود ندارد بلکه تنها در مولکول‌های هترودوپلکس وجود دارد. جفت شدن زنجیره‌های مکمل *DNA* تیپ وحشی *T7* و تیپ جهش‌یافته‌ای که قسمتی از ناحیه انتهایی چپ آن حذف شده است. به کمک چنین آزمایشهایی نشان داده شده است که نواحی غنی از *AT* (که دناتوره شده‌اند) در نیمه چپ کروموزوم باکتریوفاژ فوق قرار دارند.

این نقشه‌های دناتوره براحتی یک انتهای مولکول *DNA* خطی را از انتهای دیگر آن متمایز می‌سازد و همچنین دقیقاً مناطق شروع همانندسازی *DNA* را نشان می‌دهد.

مشاهده همانندسازی یک مولکول DNA خطی

براحتی می‌توان یک مولکول DNA در حال همانندسازی را به وسیله میکروسکوپ الکترونی مشاهده نمود. زمانی که همانندسازی DNA خطی T_7 مطالعه می‌شد انتظار می‌رفت که محل شروع همانندسازی در هر دو انتهای مولکول فوق باشند، چرا که تصور می‌شد جدا شدن زنجیره‌ها از قسمت انتهای مولکول آسانتر از قسمت میانی آن باشد. اما عملاً مشاهده شده که مبدا همانندسازی تقریباً در منطقه‌ای که حدود هفده درصد سمت چپ مولکول واقع شده است قرار دارد(شکل).



همانندسازی T_7 DNA. *(a)* تصویر میکروسکوپ الکترونی که در آن حباب تک‌رشته‌ای در قسمت هفده درصد انتهای سمت چپ مولکول ایجاد شده است *(b)*. در مراحل پیشرفته همانندسازی مولکول DNA به شکل Y در می‌آید. این شکل در اثر ختم همانندسازی در قسمت سمت چپ بوجود می‌آید.

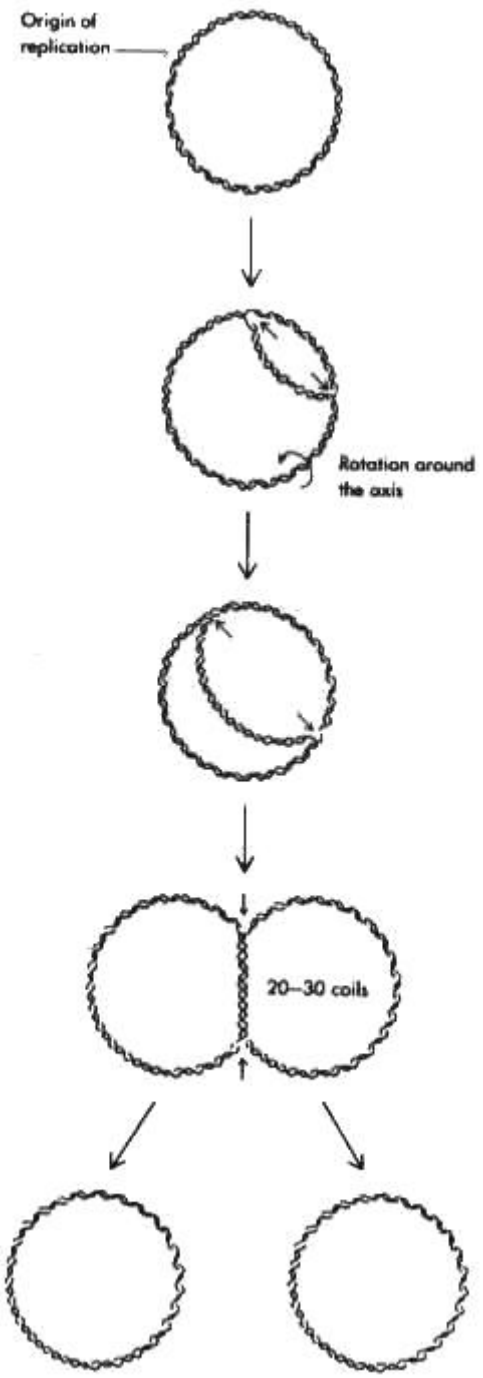
با شروع همانندسازی، این عمل در دو جهت نقطه شروع پیش می‌رود. بنابراین ابتدا ساختمانی حباب مانند یا شبیه چشم بوجود می‌آید و هنگامی که همانندسازی یک طرف مولکول DNA تا انتها انجام شد، DNA به صورت Y در می‌آید. ملاحظه این ساختمان نظریه‌های قبلی در مورد اینکه همانندسازی مستلزم جدا شدن دو زنجیره می‌باشد و تنها پس از آن است که هر یک می‌توانند به عنوان الگو قرار می‌گیرند را کاملاً رد کرد. بدین ترتیب معلوم شد که هنگام همانندسازی تنها قسمت کوچکی

از مولکول به صورت تک‌رشته‌ای است. بنابراین با باز شـــدن تـــدریجی دو رشـــته DNA مـــادر بتـــدریج رشته‌های مکمل دختر بوجود می‌آیند.

ایجاد شکل θ هنگام همانندسازی مولکول DNA حلقوی

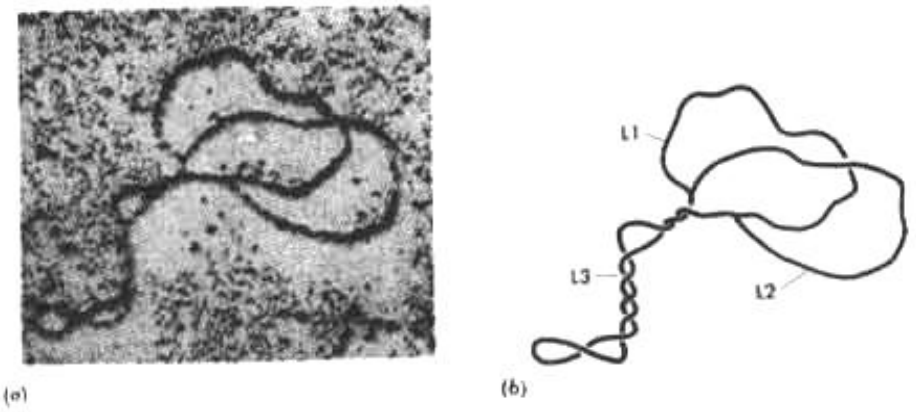
برای همانندسازی مولکول‌های حلقوی DNA لازم نیست که آنها به طور موقت به صـــورت خطـــی درآیند. تصاویر میکروسکوپ الکترونی که از بسیاری از کروموزوم‌های حلقوی در هنگام همانندسازی به دست آمده است، نشان می‌دهد که مولکول‌های فوق در طول همانندســـازی بـــه صـــورت حلقـــوی بـــاقی می‌مانند و ساختمانی شبیه به (θ)نشان می‌دهند.

ساختمان فوق به دلیل تشکیل حباب همانندسازی در نقطه شروع است (شکل). برای مثال مبداء همانندسازی DNA حلقوی لامبدا در ژن O قرار دارد و همانندسازی از این نقطـــه در دو جهـــت (جهـــت حرکت عقربه های ساعت وعکس آن) پیش می‌رود.



شکل : شکل ساده‌ای از نحوه همانندسازی *DNA* حلقوی. همانندسازی در دو جهت مخالف انجام می‌گیرد و در زیر میکروسکوپ الکترونی تنها قسمت کوچکی از ناحیه در حال همانندسازی به صورت شکل فوق قابل رویت است. علت این امر این است که زنجیره‌های مادر به صورت ابرمارپیچ هستند و تنها در هر لحظه *قسمت کوچکی* باز می‌شود و همانندسازی در آن صورت می‌گیرد.

از همان ابتدا چگونگی باز شدن زنجیره‌های DNA حلقوی در هنگام همانندسازی مورد سئوال بود. مادامی که DNA به صورت حلقوی باشد، حتی باز شدن تاب قسمت کوچکی از آن سبب ایجاد ابرمارپیچ مثبت در دو جهت ناحیه باز شده می‌شود. بنابراین لازمه همانندسازی نیمه حفاظتی در مولکول‌های حلقوی، قطع موقتی یک یا دو زنجیره است تا بدین ترتیب فشار حاصل از تشکیل ابرمارپیچ مثبت بر طرف گردد. زمان و چگونگی قطع مولکول حلقوی در مطالب بعد مورد بررسی قرار می‌گیرد.آنزیمی به نام توپوایزومراز با قطع و اتصال مجدد زنجیره‌های DNAحلقوی می‌تواند DNA در حال استراحت را به صورت ابرمارپیچ و یا برعکس در آورد، برای مثال آنزیم توپوایزومراز I یک زنجیره را به طور موقت قطع می‌کند و رشته قطع شده به دور ابرمارپیچ مادر تاب می‌خورد. بنظر می‌رسد که DNA حلقوی درطول همانندسازی عمدتاً به صورت دست‌نخورده باقی می‌ماند و قسمت همانندسازی نشده ساختمان θ، به طور متناوب ساختمان ابر مارپیچ مثبت و یا منفی را نشان می‌دهد. (شکل)



مولکول پیچ‌خورده DNA حلقوی $SV40$. (a) تصویر میکروسکوپ الکترونی مولکول در مرحله اولیه همانندسازی (b). طرح ساده‌ای از همان تصویر. قسمتهای $L1$, $L2$ همانند سازی شده‌اند در حالی که $L3$ قسمتی است که هنوز همانندسازی نشده و آرایش ابرمارپیچ را حفظ کرده است. توجه کنید که در طول همانندسازی، مولکول حالت حلقوی بودن خویش را حفظ می‌کند.

ابرمارپیچ‌های منفی به وسیله توپوایزومراز II (جیراز) و پس از طویل شدن زنجیره DNA بوجود می‌آیند و ابرمارپیچ‌های مثبت نیز چنانچه در هنگام همانندسازی برشی بوجود نیاید، ایجاد می‌شوند. به هر حال میزان تشکیل ابرمارپیچ‌های مثبت محدود است و اگر از حد معینی فراتر رود باعث توقف رشد حباب همانندسازی می‌گردد. حبابهای متوقف شده را می‌توان با حضور و فعالیت آنزیم توپوایزومراز I به حرکت درآورد. به این ترتیب ابرمارپیچ‌های مثبت ایجاد شده در قسمت‌های همانندسازی شده در اثر قطع و چرخش زنجیره‌ها از بین می‌روند. ضمناً آنزیم توپوایزومراز II نیز می‌تواند به دلیل از بین بردن ابرمارپیچ‌های مثبت سبب به حرکت در آمدن حباب همانندسازی گردد.