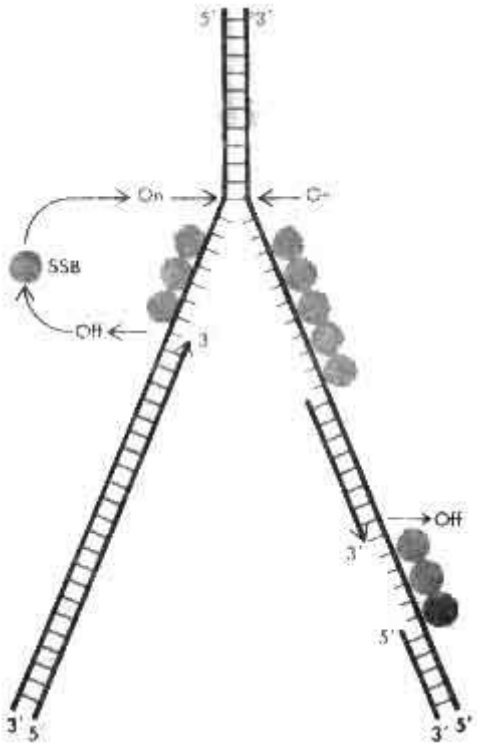
نواحی تک‌رشته‌ای شده DNA به وسیله پروتئین‌هایی که به آنها متصل می‌شوند پایدار می‌گردند

نواحی تک رشته‌ای که در اثر فعالیت پروتئین‌های هلیکاز بوجود می‌آیند ممکن است دوباره به یکدیگر متصل شوند، بنابراین نواحی تک‌رشته‌ای فوق به وسیله پروتئین‌هایی که تنها به DNA تک‌رشته‌ای وصل می‌گردند (پروتئین‌های فوق به نام SSB نامیده می‌شوند) پوشانده می‌شوند. برعکس هلیکازها، پروتئین‌های SSB برای اتصال به DNA نیاز به ATP ندارند و هیچ‌گونه نقش آنزیمی نیز نشان نمی‌دهند. پروتئین SSB اصلی کلی‌باسیل از ۱۷۷ اسید آمینه ساخته شده است که به صورت تترامر فعال است. این پروتئین حدود ۳۲ باز را در DNA تک‌رشته‌ای می‌پوشاند. در اثر اتصال یک تترامر SSB به قسمتی از DNA، قرار گرفتن تترامر دیگر SSB در مجاورت آن تسهیل می‌گردد. به این پدیده اتصال متعاون گفته می‌شود (شکل 1). ناحیه تک‌رشته‌ای که به وسیله پروتئین‌های SSB پوشیده می‌شود، بدون انعطاف و گسترده است و خمیدگی در آن وجود ندارد و آرایش فوق برای رشته الگو که از روی آن رشته مکمل ساخته می‌شود ضروری است. در صورت عدم وجود چنین آرایشی ممکن است نواحی تک‌رشته‌ای بر روی یکدیگر بیفتند و خمیدگی و یا پیچ ایجاد گردد. در این صورت با بوجود آمدن حلقه‌های سنجاق‌سری، عمل همانندسازی متوقف می‌شود.



شکل(۱) شمای فرضی نحوه عمل پروتئین‌های SSB در چنگال همانندسازی. این پروتئین‌ها به نواحی تک‌رشته‌ای متصل و باعث تسریع همانندسازی می‌شوند و همان‌گونه که در شکل نشان داده شده است پس از جدا شدن از DNA دوباره مورد استفاده قرار می‌گیرند.

شروع سنتز قطعات اوکازاکی به وسیله RNA پرایمر: آنزیم پریماز و پریموزوم‌ها

با مطالعه دقیق آنزیم‌های پلیمراز معلوم شد که این آنزیم‌ها تنها می‌توانند نوکلئوتیدها را به انتهای یک رشته پلی‌نوکلئوتیدی اضافه کنند و قادر نیستند که بدون مقدمه شروع به سنتز DNA نمایند. بنابراین باید آنزیم پلیمراز دیگری وجود داشته باشد که براحتی بتواند زنجیره پلی نوکلئوتیدی را از اول و بدون مقدمه بسازد. البته باید توجه داشت که آنزیم‌های آغازکننده فقط نقش فرعی دارند ولی تقریباً بیوسنتز همه مولکول‌های DNA به وسیله قطعات کوچکی از RNA که به نام پرایمر خوانده می‌شوند، شروع می‌گردد. بنابراین بیوسنتز DNA به وسیله آنزیم‌های DNA پلیمراز شروع نمی‌شود

بلکه این عمل به وسیله آنزیم‌هایی که از روی الگوی DNA، RNA می‌سازند انجام می‌گیرد. قطعات RNA ای که بدین ترتیب بوجود می‌آیند، نقش شروع‌کننده را ایفا می‌کنند. به هر حال آنزیم‌های RNA پلیمراز سلول که برای سنتز RNA از روی DNA بکار می‌روند تنها مقدار ناچیزی از این پرایمرها را تولید می‌کنند. RNAهای پرایمر قطعات اوکازاکی به وسیله RNA پلی‌مرازهایی که به پریماز معروف هستند ساخته می‌شوند. آنزیم‌های پریماز توالی خاصی از نواحی تک‌رشته‌ای DNA را تشخیص می‌دهند. آنزیم پریماز کلی‌باسیل از یک زنجیره پلی‌پپتیدی به وزن مولکولی ۶۰ کیلو دالتون ساخته شده است و در حدود ۵۰ الی ۱۰۰ نسخه از آن در سلول وجود دارد. آنزیم فوق به تنهایی فاقد فعالیت محسوس است. تنها زمانی که به شش یا هفت آنزیم پریماز دیگر متصل شود و مجموعه‌ای به نام پریموزوم را بوجود می‌آورد که دارای فعالیت آنزیمی می‌باشد.

این مجموعه آنزیمی در جهت $5' \rightarrow 3'$ رشته پیرو حرکت می‌کند و پرایمرهای قطعات اوکازاکی را بوجود می‌آورد. اعمال مختلف پریموزوم تا کنون مشخص نشده است ولی اجزاء فوق باید در ارتباط با یکدیگر عمل کنند، تا آنزیم بتواند بر روی زنجیره تک‌رشته‌ای DNA حرکت کرده، خود را جایگزین پروتئین‌های SSB بنماید و بدین ترتیب با شناسایی ردیف خاصی از زنجیره تک‌رشته‌ای پرایمر را سنتز نماید.

جهت حرکت پریموزوم‌ها روی رشته الگو عکس جهت حرکتی است که در هنگام هیدرولیز RNA پرایمر باید داشته باشند (آنها در جهت $5' \rightarrow 3'$ حرکت می‌کنند در حالی که هیدرولیز RNA در جهت $3' \rightarrow 5'$ نجام می‌شود). این ممکن است دلیلی باشد بر اینکه پرایمرها معمولاً از سه الی پنج نوکلئوتید تشکیل شده‌اند (جدول).

RNAهای پرایمر مربوط به همانندسازی غیرممتد DNA

ژنوم	طول زنجیره RNA که به قطعات DNA وصل می‌شوند	محصول اولیه
فاژ $T7$	۱-۵	$pppApCpC/A(PN)_{1-2}$ * (غنی از $N:A,C$)
فاژ $T4$	۱-۵	$pppApC\ (PN)_3$
کلی‌باسیل	۱-۳	نامعلوم
فاژ $\varphi X\ 174$	۱-۵ **	***
ستاره دریایی	۱ تا حدود ۸	$(p)ppA\ /G\ (PN)_7$
پولیوما و $SV40$	در حدود ۱۰	$pppA\ /\ G\ (Pn)\sim 9$
سلول‌های حیوانی	در حدود ۹	

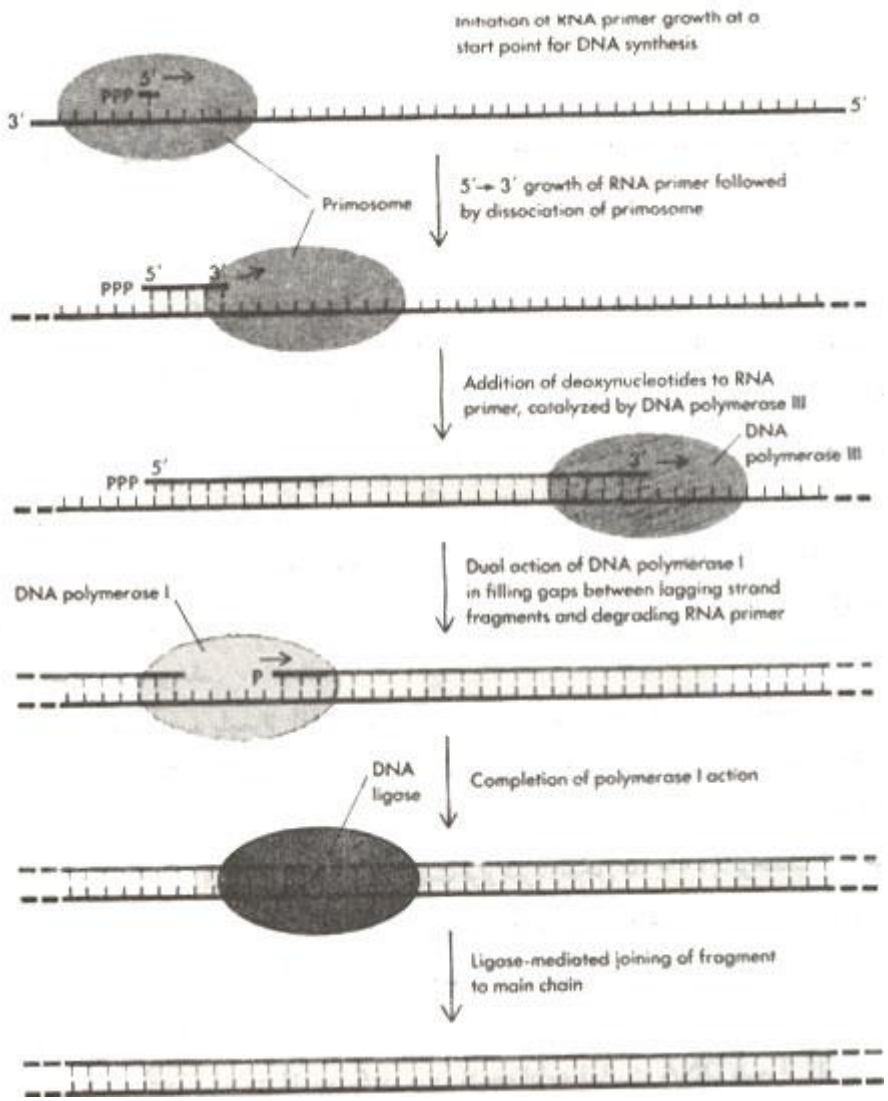
* ردیف مکمل الگوی مربوط به پرایمر، $pCpTpGp\ G/Tp$ - $3'$ است، G/T نشانگر آن می‌باشد که در این محل G و یا T می‌تواند حضور داشته باشد.

** از پرایمرهایی که در تبدیل $SS \rightarrow RF$ در لوله آزمایش به رشته مکمل وصل می‌شوند، ۳۹ درصد یک نوکلئوتیدی، ۱۸ درصد دو نوکلئوتیدی و ۸۳ درصد بین ۱ الی ۵ نوکلئوتیدی می‌باشند. نتایج مشابه در سلول : ۴۸ درصد یک نوکلئوتیدی، ۲۳ درصد دو نوکلئوتیدی و ۹۲ درصد ۱ الی ۵ نوکلئوتیدی هستند.

*** انتهای قطعات در ۸۰ درصد پرایمرها در لوله آزمایش باز A است.

در یک موجود (مثل ویروس) توالی پرایمرها بسیار شبیه یکدیگراست و این نشان‌دهنده آن می‌باشد که آنزیم‌های پریماز قطعاتی از RNA را می‌سازند که ردیف مکمل آنها در رشته‌ی الگوی پیرو تکرار می‌شود.

حذف پرایمرها بعداً به وسیله آنزیم دیگری صورت می‌گیرد. یکی از این آنزیم‌ها DNA پلیمراز I است که پس از برداشتن قسمتهای RNA، فضای خالی بین دو قطعه اوکازاکی را پر می‌کند. (شکل2).



استفاده از پرایمر RNA در شروع بیوسنتز رشته پیرو.

آنزیم DNA پلیمراز I به این ترتیب عمل می‌نماید که با اتصال به انتهای $3' - OH$ قطعه اوکازاکی قبلی یک نوکلئوتید اضافه می‌کند و همزمان از انتهای '5 قطعه اوکازاکی جدیدتر (مجاور) یک نوکلئوتید را بر می‌دارد. برداشت ریبونوکلئوتیدها به وسیله جایگاه خاصی از آنزیم صورت می‌گیرد که متمایز از جایگاه اگزونوکلئازی $5' \to 3'$ است (ر.ک. به شکل 2). فعالیت اگزونوکلئازی $3' \to 5'$، ریبونوکلئوتیدها و دزاکسی ریبونوکلئوتیدها را از زنجیره جدا می‌کند و بنابراین عملکرد آن فقط محدود

به پرایمرهای RNA نمی‌شود. همان‌طور که در مطالب بعد مطالعه خواهیم کـرد، آنـزیم DNA پلیمـراز I می‌تواند قطعاتی از DNA که به وسیله مواد رادیواکتیو تخریب شده‌اند را نیز از مولکول DNA بردارد.

علت استفاده از قطعات RNA برای بیوسنتز DNA احتمالاً به این منظور است کـه از اشـتباهات خطرناک و کشنده در سنتز DNA جلوگیری شود. قرار گرفتن نوکلئوتیدهای اولیه در مقابل DNA الگـو ذاتاً از صحت کمتری در مقایسه با نوکلئوتیدهایی که بعدها به قسمتهای طویل شـده اضـافه مـی‌شـود برخوردار می‌باشد و بنابراین بهتر است که قطعات اولیه از جنس RNA ساخته شده و بعـدها از زنجیـره جدا شوند. در این صورت بیوسنتز DNA صحت بالایی خواهد یافت.