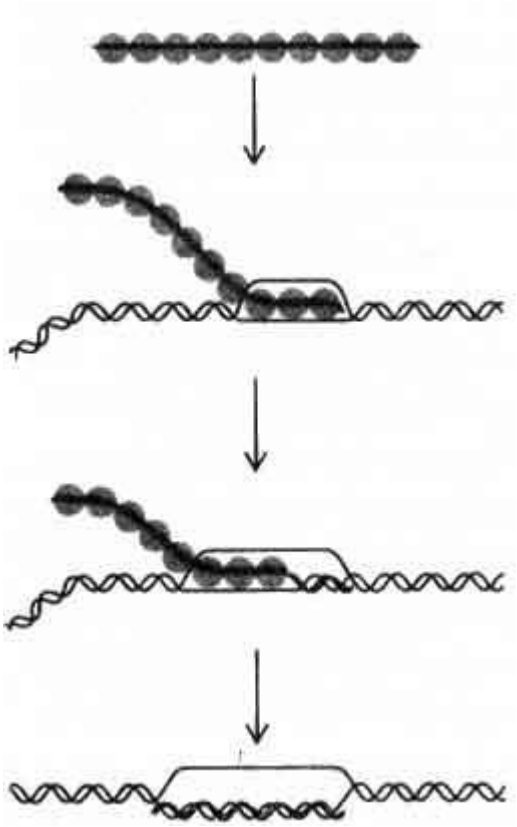
پروتئین $RecA$ سبب جور شدن یک DNA تک‌رشته‌ای با توالی مکمل آن در کروموزوم هدف می‌شود

با توجه به خواص فیزیکی DNA هیچ دلیلی وجود ندارد که به سادگی دو مولکول DNA صرفاً به دلیل وجود بریدگی یا شکاف در یکی از آنها بتوانند با یکدیگر تبادل قطعه نمایند. در واقع کارهای انجام شده نشان می‌دهند که فاژ، باکتری و مخمر برای انجام مراحل بیوشیمیایی نوترکیبی دارای آنزیم‌هایی هستند و این واقعیت بدون شک در مورد سایر جانداران نیز صادق است. بهترین اطلاعات ما در مورد مکانیسم نوترکیبی حاصل از مطالعه پروتئین $RecA$ می‌باشد. این پروتئین محصول ژن $recA$ کلی‌باسیل است و می‌تواند سبب انجام مرحله اصلی نوترکیبی شود. به عبارت دیگر سبب جفت شدن بازهای دو مولکول DNA مختلف به یکدیگر و تشکیل یک مولکول DNA دو رگه می‌گردد.

خواص آنزیمی پروتئین $RecA$ نشان‌دهنده اهمیت وجود بریدگی یا شکاف DNA در انجام عمل نوترکیبی است. چنانچه دو مولکول DNA دو رشته‌ای همولوگ سالم با پروتئین $RecA$ مخلوط شوند، هیچ واکنشی بین آن‌ها رخ نمی‌دهد ولی اگر یک قطعه DNA تک‌رشته‌ای در محیط وجود داشته باشد، سبب جفت شدن آن با توالی مکمل در مولکول DNA دو رشته‌ای همولوگ و در عین حال سبب جابجا شدن رشته دیگر DNA دو رشته‌ای فوق می‌شود (شکلهای 1,2) نحوه عمل پروتئین $RecA$ بدین صورت است که ابتدا با نسبت ثابت (یک پلی‌پپتید به ازای ۵ نوکلئوتید) به DNA تک‌رشته‌ای متصل می‌شود و بدین ترتیب میله‌ای (فیلامانی) از جنس پروتئین – DNA بوجود می‌آید. اگر ATP در محیط وجود داشته باشد، پروتئین $RecA$ موجود در فیلامان فوق می‌تواند سبب باز شدن تاب DNA دو رشته‌ای شود

و به طریقی سعی می‌کند تا رشته DNA متصل به خود را با نواحی باز شده جفت نماید. این کـار آنقـدر ادامه می‌یابد تا توالی مکمل آن در DNA دو رشته‌ای یافت گردد. به محض آنکه قطعه کـوچکی از DNA فوق توانست بخوبی با یکی از رشته‌های DNA دو زنجیره‌ای جفت شود، انرژی ATP سبب تکمیل عمـل جفت شدن می‌گردد و بتدریج حرکت از جهت $5' \rightarrow 3'$ انجام میشود (ابتدا انتهای $5'$ تک‌رشـته‌ای بـه $RecA$ وصل می‌شود و سپس جفت شدن به سمت انتهای $3'$ پیش می‌رود) با تشکیل تدریجی DNA دو رگه جدید پروتئین $RecA$ جابجا می‌شود، به طوری که DNA دو رگه فاقد پروتئین $RecA$ خواهد بود. در قسمتهای بعدی توضیح داده می‌شود که چگونه چنین عملی می‌تواند سبب تشکیل پلی بین دو مولکول مارپیچ مضاعف DNA گردد (به شرط آنکه یکی از آنها دارای ناحیـه تـک‌رشـته‌ای کـوچکی باشـد = شکاف). باید تذکر داد که بریدگی نیز مانند شکاف اگر در DNA وجود داشته باشد، میتواند سبب شروع نوترکیبی شود. علت این امر آن است که بریدگیها یا مکانی جهت عمل نوکلئازها پدید می‌آورند که باعث تخریب قسمتی از رشته‌های مارپیچ مضاعف DNA می‌شوند (شکاف بوجود مـی‌آورنـد) یـا مکـان ورود آنزیم‌های بازکننده تاب می‌باشند. آنزیم‌های اخیر با بازکردن قسمتی از تـاب DNA دو رشـته‌ای سـبب می‌شود یکی از رشته‌ها در معرض واکنش با پروتئین $RecA$ قرار گیرد. (شکل 1).



پروتئین *RecA* ابتدا به *DNA* تک‌رشته‌ای متصل می‌شود.

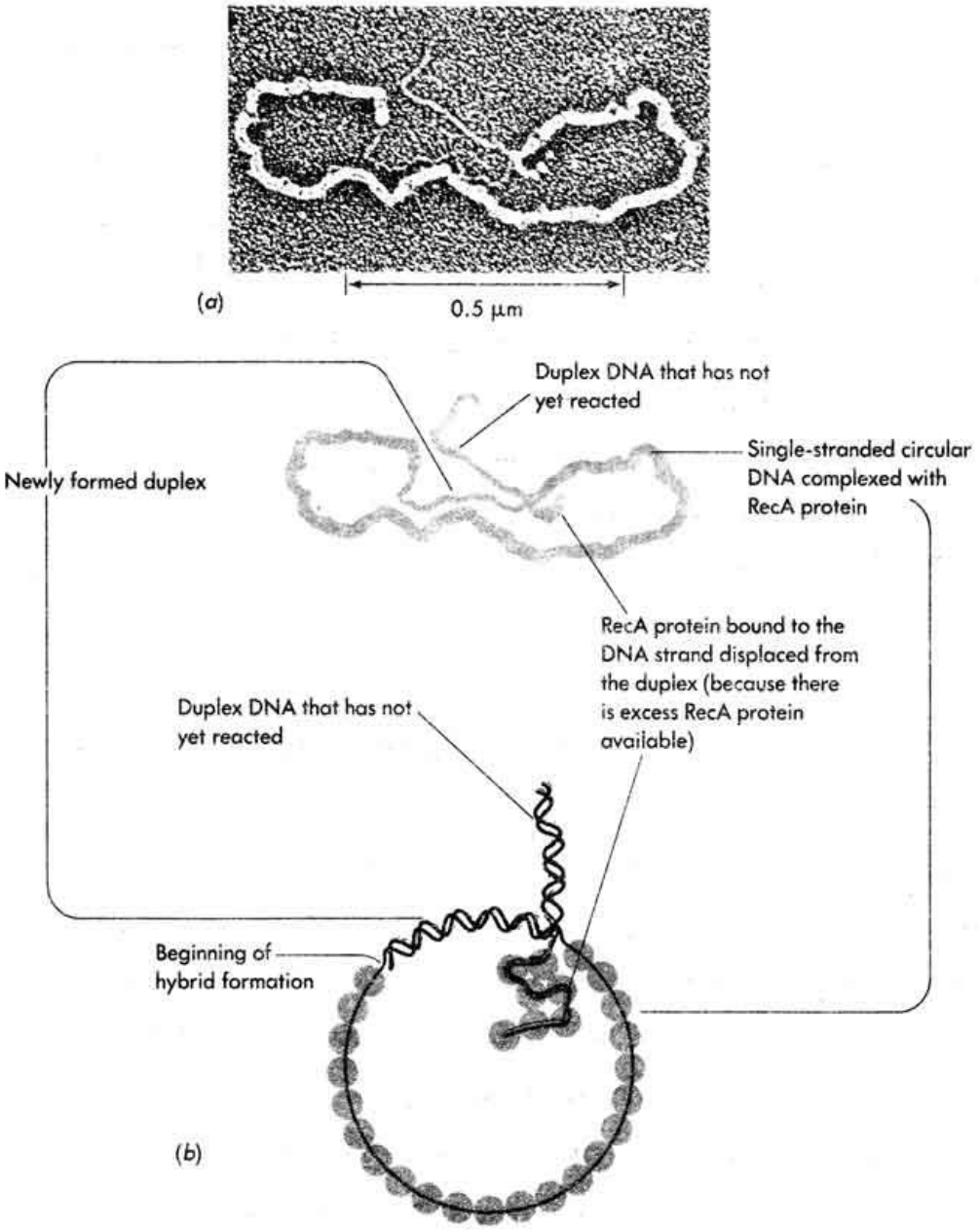
مناطق مختلفی از مارپیچ مضاعف *DNA* بـه وسـیله پـروتئین *RecA* که متصل به قطعه تک رشته‌ای است باز می‌شوند.

به محض اینکه در قسمتی از مارپیچ مضاعف بـه تـوالی همولـوگ برخورد شود جفت شدن بازهای *DNA* تـک رشـته‌ای بـا یکـی از رشته‌های فوق شروع و به کمک پروتئین *RecA* مولکـول دو رگـه طویل‌تر می‌شود.

دو رگه حاصل در چنین مواردی به نام حلقه *D* خوانده می‌شود.

فعالیت پروتئین *RecA* در لوله آزمایش *(in vitro)* به صورت طرحی ساده نمایش داده شده است.

(شکل ۲)



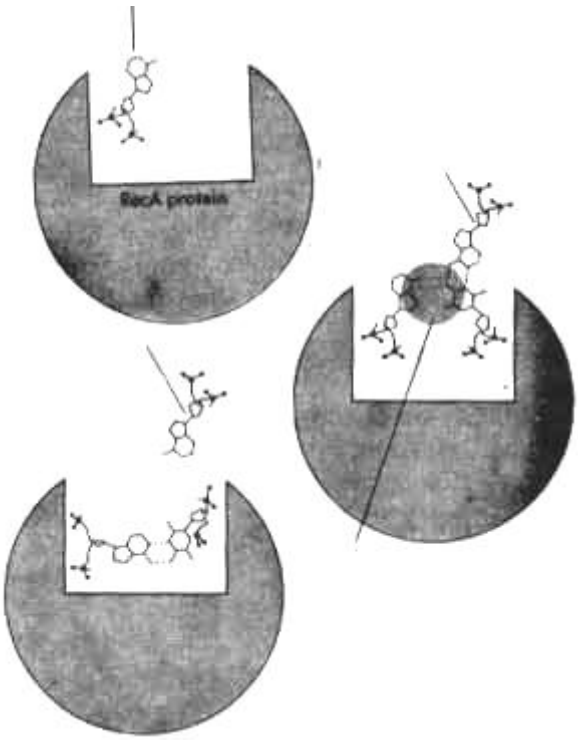
عکس الکترون میکروسکوپی پروتئین $RecA$ که سبب تعویض رشته‌های DNA در لوله آزمایش می‌شود. در این مورد مولکول‌های DNAای که بکار گرفته شده‌اند عبارتند از : یک DNA تک‌رشته‌ای حلقوی و یک قطعه DNA مارپیچ مضاعف خطی که با قسمتی از DNA تک‌رشته‌ای حلقوی همولوگ است. طی این واکنش یکی از رشته‌های قطعه مارپیچ مضاعف با قطعه همتراز خود در DNA حلقوی جابجا می‌شود. محصولات این واکنش یک قطعه DNA تک رشته‌ای خطی (که احتمالاً به اضافی پروتئین $RecA$ موجود در محیط آزمایش متصل شده است) و یک قطعه DNA حلقوی (که عمدتاً تک‌رشته‌ای می‌باشد و تنها در قسمتی از آن یک ناحیه مارپیچ مضاعف وجود دارد) می‌باشند. تهیه نمونه میکروسکوپی میتوند سبب گسیختن بخشی از این ساختمان (مثلاً مجموعه فرضی که پروتئین $RecA$ و سه رشته DNA که در شکل 3 نشان داده شده است) بشود. در زیر عکس الکترون میکروسکوپی طرحی از چگونگی جابجایی قطعات DNA رسم شده است.

فاژهایی چون $T7$ و λ (لامبدا) نیز آنزیم‌های ساده‌تری را بـرای انجـام نـوترکیبی مـی‌سـازند: آنزیم‌های نوکلئاز برای در معرض قرار دادن DNA تک‌رشته‌ای (با حذف قسمتی از یکـی از رشـته‌هـای DNA دو رشته‌ای) مورد استفاده قرار می‌گیرند و پروتئین‌هایی که به DNA متصل مـی‌گردنـد (عملـی مشابه $RecA$) سبب باز شدن مارپیچ مضاعف و تسهیل جفت شدن دو رشته DNA (DNA دو رگـه) از طریق برخورد تصادفی می‌شوند. شاید چنین ابزاری در مورد فاژها بخوبی بتواند سـبب ایجـاد دو رگـه گردد چون غلظت توالی فاژ در سلول‌های آلوده بسیار زیاد است و بنابراین شانس نسبتاً زیـادی وجـود دارد که نواحی تک‌رشته‌ای مکمل وجود داشته باشند ولی در مورد جانداران عالی‌تر بدلیل فراوانی بسیار کمتر یک توالی معین، انتظار می‌رود که آنزیم‌های تخصصی‌تری چون پروتئین $RecA$ باید وجود داشـته باشند تا بتوانند نواحی همولوگ را پیدا نمایند. در واقع شواهدی وجود دارند که نشان مـی‌دهنـد قـارچ اوستیلاگو دارای چنین آنزیمی است.

امکان تشکیل مارپیچ‌های سه رشته‌ای و چهار رشته‌ای DNA در عمل نوترکیبی

ابتدا بنظر می‌رسید که واکنش جفت شدن اختصاصی که به کمک پروتئین $RecA$ صورت می‌گیرد و در آن یک DNA تک‌رشته‌ای با توالی مکمل خود در قطعه‌ای از مارپیچ مضاعف جفت می‌شود، تنها در صورتی میتواند صورت گیرد که تاب مارپیچ مضاعف باز شده باشد (در نتیجه امکان جفـت شـدن بازهـا وجود داشته باشد) ولی نظریه دیگر آن است که DNA تک‌رشته‌ای به صـورت خاصـی بـه دور مـارپیچ مضاعف تاب می‌خورد. به کمک مدل‌سازی میتوان نشان داد که بین دو مارپیچ مـضاعف نیـز تماسـهای

اختصاصی جفت شدن بازها میتواند صورت گیرد و در این صورت مارپیچ‌های فوق از طریق گروههای شیمیایی که در شیارهای دو مارپیچ مضاعف وجود دارند ساختمان چهار رشته‌ای متداخلی را تشکیل می‌دهند. یک رشته *DNA* واحد نیز که به پروتئین *RecA* متصل شده است میتواند چنین طرحی را نشان دهد. بدین ترتیب که رشته فوق با یکی از شیارهای مارپیچ مضاعف *DNA* هدف، تماسهای اختصاصی برقرار می‌کند بنابراین توالی مکمل از خارج (بدون آنکه باز شدن مارپیچ مضاعف صورت گرفته باشد) تشخیص داده می‌شود (شکل۳).



رشته‌ها بنحوی کنار هم قرار می‌گیرند که یک مارپیچ مضاعف دو رگه بوجود آید و رشته دیگر *DNA* دو رشته‌ای اولیه جدا شود.

مقطع هر دو رشته مارپیچ مضاعف *DNA* و رشته *DNA* تک‌رشته‌ای همولوگ آن مقطع یک *DNA* تک رشته‌ای که به پروتئین *RecA* متصل است.

مدل جفت شدن فرضی مارپیچ مضاعف و *DNA* تک‌رشته‌ای از خارج. در این مرحله یک مارپیچ سه رشته‌ای موقت ایجاد می‌شود.

چگونگی ارتباط یک مارپیچ سه رشته‌ای و پروتئین *RecA* هنگام پدیده تعویض رشته در مولکول‌های *DNA*

چنین مارپیچ‌های سه رشته‌ای نشان می‌دهند که ابتدا توالی بازها تشخیص داده می‌شوند و سپس تاب مارپیچ در مکان بخصوصی باز می‌گردد و بازهای *DNA* تک‌رشته‌ای مهاجم با رشته مکمل آن (یکی از رشته‌های مارپیچ مضاعف اولیه) جفت می‌شوند. بدیهی است که این نوع جفت شدن (ایجاد مارپیچ

سه‌رشته‌ای) سبب تسریع عمل جستجوی قطعه همولوگ می‌شود چون در چنین حالتی لازم نیست کــه ابتدا تابهای هر قطعه‌ای که از نظر داشتن توالی مکمل مورد آزمایش قرار می‌گیرد باز گردد.