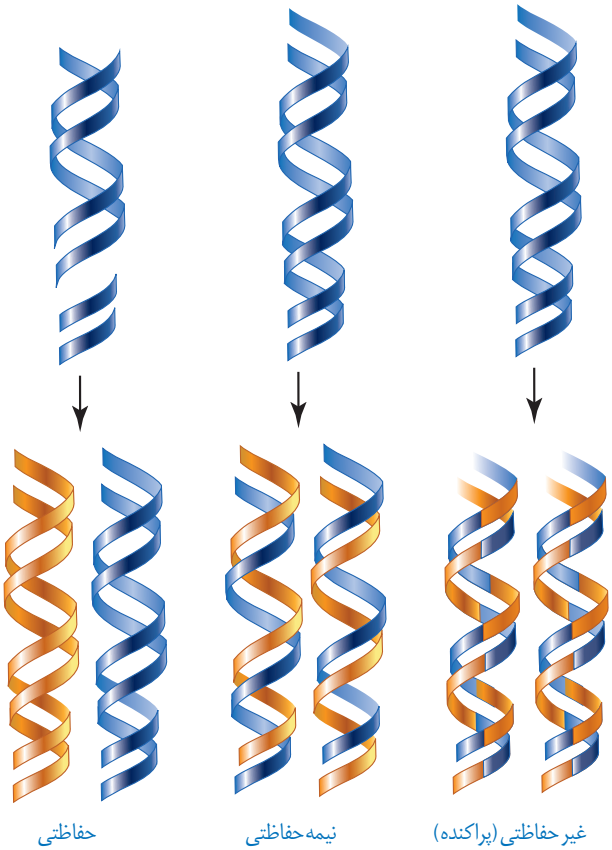
گفتار ۲ همانندسازی دِنا

با توجه به اینکه دِنا به عنوان ماده وراثتی، حاوی اطلاعات یاخته است، این پرسش مطرح می‌شود که هنگام تقسیم یاخته، این اطلاعات، چگونه بدون کم وکاست به دو یاخته حاصل از تقسیم می‌رسند؟

این کار با همانندسازی دِنا انجام می‌شود. به ساخته شدن مولکول دِنای جدید از روی دِنای قدیمی **همانندسازی**[۱] می‌گویند.

با توجه به مدل واتسون و کریک و وجود رابطهٔ مکملی بین بازها تا حد زیادی همانندسازی دِنا قابل توضیح است؛ گرچه طرح‌های مختلفی برای همانندسازی دِنا پیشنهاد شده بود (شکل ۹).



شکل ۹ــ طرح‌های مختلف برای همانندسازی

۱ــ همانندسازی حفاظتی: در این طرح هر دو رشتهٔ دِنای قبلی (اولیه) به‌صورت دست نخورده باقی مانده، وارد یکی از یاخته‌های حاصل از تقسیم می‌شوند، دو رشته دِنای جدید هم وارد یاختهٔ دیگر می‌شوند. چون دِنای اولیه به‌صورت دست نخورده در یکی از یاخته‌ها حفظ شده است به آن همانندسازی حفاظتی می‌گویند.

۲ــ همانندسازی نیمه حفاظتی: در این طرح در هر یاخته یکی از دو رشته دِنا مربوط به دِنای اولیه است و رشتهٔ دیگر با نوکلئوتیدهای جدید ساخته شده است. چون در هر یاختهٔ حاصل، فقط یکی از دو رشته دِنای قبلی وجود دارد، به آن نیمه‌حفاظتی می‌گویند.

۳ــ همانندسازی غیر حفاظتی (پراکنده): در این طرح هر کدام از دِناهای حاصل، قطعاتی از رشته‌های قبلی و رشته‌های جدید را به‌صورت پراکنده در خود دارند.

کدام طرح مورد تأیید قرار گرفته است؟

مزلسون[۲] و استال[۳] با به‌کارگیری روش علمی پاسخ این پرسش را به‌دست آوردند. آنها فرضیه‌های متعدد ارائه شده را در نظر گرفتند و با توجه به امکانات، آزمایشی را طراحی کردند تا بتوانند به پاسخ قانع‌کننده‌ای برسند. برای شروع کار، آنها باید بتوانند رشته‌های دِنای نوساز را از رشته‌های قدیمی تشخیص دهند. آنها با این هدف دِنا را با استفاده از نوکلئوتیدهایی که ایزوتوپ سنگین نیتروژن (^{15}N) دارند، نشانه‌گذاری کردند.

۱ــ Replication
۲ــ Meselson
۳ــ Stahl

دِناهایی که با N^{15} ساخته می‌شوند نسبت به دِنای معمولی که در نوکلئوتیدهای خود N^{14} دارد چگالی بیشتری دارند. بنابراین، به‌وسیلهٔ گریزانهٔ با سرعت بسیار بالا[1] می‌توان آنها را از هم جدا کرد.

آنها ابتدا باکتری‌ها را در محیط دارای N^{15} کشت دادند. N^{15} در ساختار بازهای آلی نیتروژن‌دار که در ساخت دِنای باکتری شرکت می‌کنند، وارد شدند. پس از چندین مرحله رشد و تکثیر در این محیط، باکتری‌هایی تولید شدند که دِنای سنگین‌تری نسبت به باکتری‌های اولیه داشتند.

سپس این باکتری‌ها را به محیط کشت دارای N^{14} منتقل کردند. با توجه به اینکه تقسیم باکتری‌ها حدود ۲۰ دقیقه طول می‌کشد در فواصل ۲۰ دقیقه‌ای باکتری‌ها را از محیط کشت جدا و بررسی کردند.

برای سنجش چگالی دِناها در هر فاصلهٔ زمانی، دِنای باکتری‌را استخراج و در شیبی از محلول سزیم کلرید با غلظت‌های متفاوت و در سرعتی بسیار بالا گریز دادند؛ در نتیجه مواد بر اساس چگالی در بخش‌های متفاوتی از محلول در لوله قرار گرفتند. مراحل آزمایش مزلسون و استال و نتایج آن را در شکل ۱۰ می‌بینید.

همان‌طور که مشاهده می‌کنید نتایج این آزمایش نشان داد که همانندسازی دِنا، نیمه حفاظتی است.

شکل ۱۰ــ آزمایش‌های مزلسون و استال و نتایج به‌دست آمده:

الف) دِنای باکتری‌های اولیه پس از گریز دادن، یک نوار در انتهای لوله تشکیل دادند چون هر دو رشته دِنای آنها N^{15} و چگالی سنگینی داشت.

ب) دِنای باکتری‌های حاصل از دور اول همانندسازی در محیط کشت حاوی N^{14} (بعد از ۲۰ دقیقه) پس از گریز دادن، نواری در میانه لوله تشکیل دادند. پس دِنای آنها چگالی متوسط داشت.

پ) دِنای باکتری‌های حاصل از دور دوم همانندسازی (بعد از ۴۰ دقیقه) پس از گریز دادن دو نوار، یکی در میانه و دیگری در بالای لوله تشکیل دادند. پس نیمی از آنها چگالی متوسط و نیمی چگالی سبک داشتند. چرا؟

1- باکتری دارای N^{15} نسبت به باکتری N^{14} سنگین تر است

2- باکتری دارای N^{14} ابتدا در محیط N^{15} قرار داده می شود

3- پس ازچندین مرحله رشد وتکثیر باکتری های تولید شده دنای سنگین تری نسبت به باکتری های اولیه دارند

4- سپس باکتری دارای N^{15} به محیط N^{14} منتقل می شود

5 - در زمان های صفر- 20 و 40 دقیقه باکتری را استخراج و در شیبی از محلول سزیم کلرید قرار می دهند وبا سرعت بالا گریز می دهند

محلول سزیم کلرید برای ایجاد شیب غلظت است

۱ــ Ultracentrifuge

با مشخص شدن اینکه همانندسازی به‌صورت نیمه‌حفاظتی انجام می‌شود، سؤال دیگری مطرح شد: دو رشته دِنا چگونه از یکدیگر باز می‌شوند؟ آیا هر دو رشته کاملاً از یکدیگر جدا می‌شوند و سپس همانندسازی انجام می‌شود یا جدا شدن دو رشته تدریجی و همراه با آن همانندسازی انجام می‌شود؟

تحقیقات نشان داده است در محلی که قرار است همانندسازی انجام شود دو رشته از هم باز می‌شوند. بقیه قسمت‌ها بسته هستند و به تدریج باز می‌شوند.

عوامل و مراحل همانندسازی

در همانندسازی عوامل متعددی مؤثرند که مهم‌ترین آنها به شرح زیر است:

اهمیت مولکول دنا برای همانند سازی

1ـ مولکول دِنا به عنوان الگو

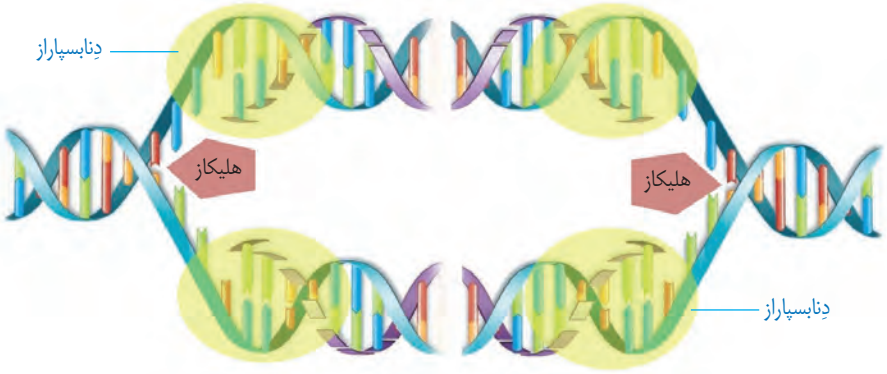
2ـ واحدهای سازندهٔ دِنا که بتوانند در کنار هم نسخه مکمل الگو را بسازند. این واحدها نوکلئوتیدهای آزاد داخل یاخته و سه فسفاته هستند که در لحظهٔ اتصال به رشته پلی‌نوکلئوتید در حال ساخت، دو فسفات خود را از دست می‌دهند.

اهمیت نوکلئوتید ها در همانند سازی

3ـ آنزیم‌های لازم برای همانندسازی که ضمن بازکردن دو رشته نوکلئوتیدها را به‌صورت مکمل روبه‌روی هم قرار می‌دهد و با پیوند فسفودی‌استر به هم وصل می‌کند.

وظیفه آنزیم های موثر در همانند سازی

مراحل همانندسازی: قبل از همانندسازی دِنا باید پیچ‌وتاب فامینه، باز و پروتئین‌های همراه آن یعنی هیستون‌ها از آن جدا شوند تا همانندسازی بتواند انجام شود. این کارها با کمک آنزیم‌هایی انجام می‌شود. سپس آنزیم **هلیکاز**[1] مارپیچ دنا و دو رشته آن را از هم باز می‌کند (شکل ۱۱).



شکل ۱۱ـ همانندسازی دِنا

به نظر شما برای باز شدن دورشته دِنا آنزیم هلیکاز چه پیوندهایی را از هم باز می‌کند؟ **پیوند هیدرژنی**

انواع دیگری از آنزیم‌ها با همدیگر فعالیت می‌کنند تا یک رشته دِنا در مقابل رشته الگو ساخته شود. یکی از مهم‌ترین آنها که نوکلئوتیدهای مکمل را با نوکلئوتیدهای رشته الگو جفت می‌کند **دِنابسپاراز**[2] (DNA پلی‌مِراز) است. با توجه به اینکه در محل همانندسازی، همانندسازی در دو جهت انجام می‌شود؛ به آن **همانندسازی دو جهتی** نیز می‌گویند.

۱ـ Helicase
۲ـ DNA Polymerase

بیشتر بدانید

گریزانهٔ هم‌چگال

برای جداکردن ذره هایی با چگالی متفاوت و تعیین چگالی آنها از روشی به نام گریزانهٔ هم‌چگال استفاده می‌شود. در این روش محلولی از نمک یک فلز سنگین مثل سزیم کلرید را در لوله آزمایش قرار می‌دهند. غلظت این ماده و چگالی آن به طور یکنواخت از پایین به بالای لوله کم می‌شود و به اصطلاح شیب پیوسته‌ای از غلظت‌های مختلف نمک در آن وجود دارد.

با ورود مولکول های مد نظر در این محلول و حرکت آنها حین سانتریفیوژ، براساس چگالی خود در نقطه ای متوقف می شوند. چون ذره ها با چگالی یکسان در یک منطقه تجمع می‌یابند، نوارهایی را تشکیل می دهند که به آسانی قابل تشخیص اند. با مشخص شدن چگالی محلول درهرنقطه ازلوله، می توان چگالی ذره های مورد آزمایش را معلوم کرد.

دوراهی همانندسازی: در شکل ۱۱ می‌بینید در محلی که دو رشتهٔ دِنا از هم جدا می‌شوند، دو ساختار Y مانند به‌وجود می‌آید که به هریک از آنها دوراهی همانندسازی می‌گویند. در فاصلهٔ بین این دو ساختار، پیوندهای هیدروژنی بین دو رشته از هم گسیخته و دو رشته از یکدیگر باز شده‌اند. همچنین پیوندهای فسفودی‌استر جدیدی در حال تشکیل هستند. دِنابسپاراز نوکلئوتیدها را به انتهای رشته در حال تشکیل اضافه می‌کند. اضافه شدن یک نوکلئوتید به نوع بازی بستگی دارد که در نوکلئوتید رشته الگو قرار دارد. هر نوکلئوتید باید با نوکلئوتید روی رشته الگو مکمل باشد. هنگام اضافه شدن هر نوکلئوتید سه‌فسفاته به انتهای رشته پلی‌نوکلئوتید دو تا از فسفات‌های آن از مولکول جدا می‌شوند و نوکلئوتید به‌صورت تک‌فسفاته به رشته متصل می‌شود (شکل ۱۲).

فعالیت پلیمرازی انزیم

همانند سازی به سمت دوراهی همانند سازی انجام می شود

شکل ۱۲ ــ همانندسازی دِنا

نوکلئوتید های :تیمین- آدنین - سیتوزین و گوانین در فرایند همانند سازی شرکت می کنند

نوکلئوتید یوراسیل در محیط وجود دارد اما در همانند سازی شرکت ندارد. یوراسیل در فرایندی به نام رونویسی شرکت دارد

فعالیت‌های آنزیم دِنابسپاراز

فعالیت نوکلئازی آنزیم

همانندسازی دِنا با دقت زیادی انجام می‌شود؛ این دقت تاحدود زیادی مربوط به رابطهٔ مکملی بین نوکلئوتیدها است. اگرچه آنزیم دِنابسپاراز، نوکلئوتیدها را براساس رابطهٔ مکملی مقابل هم قرار می‌دهد ولی گاهی در این مورد اشتباهی هم صورت می‌گیرد؛ بنابراین آنزیم دِنابسپاراز پس از برقراری هر پیوند فسفودی‌استر، برمی‌گردد و رابطهٔ مکملی نوکلئوتید را بررسی می‌کند که رابطهٔ آن درست است یا اشتباه؟ اگر اشتباه باشد آن را برداشته و نوکلئوتید درست را به‌جای آن قرار می‌دهد. برای حذف نوکلئوتید نادرست باید بتواند پیوند فسفودی‌استر را بشکند و نوکلئوتید نادرست را از دِنا جدا کند. توانایی بریدن دِنا را فعالیت **نوکلئازی** گویند که در آن پیوند فسفودی استر می‌شکند. بنابراین آنزیم دِنابسپاراز، هم فعالیت **بسپارازی** (پلیمرازی) دارد که در آن پیوند فسفودی استر را تشکیل می‌دهد و هم فعالیت نوکلئازی که در آن پیوند فسفودی استر را برای رفع اشتباه می‌شکند. فعالیت نوکلئازی دنابسپاراز را که باعث رفع اشتباه‌ها در همانندسازی می‌شود، **ویرایش** می‌گویند.

همانند سازی در پروکاریوت‌ها و یوکاریوت‌ها

در پروکاریوت‌ها که شامل همهٔ باکتری‌ها می‌شوند، مولکول‌های وراثتی در غشا محصور نشده

1- در یوکاریوت ها:DNA خطی در هسته و DNA حلقوی در سیتوپلاسم (میتوکندری و کلروپلاست)قرار دارد

2- در پروکاریوت ها DNA حلقوی در سیتوپلاسم هست

3- یوکاریوت داری چندین جایگاه آغاز همانند سازی هستند

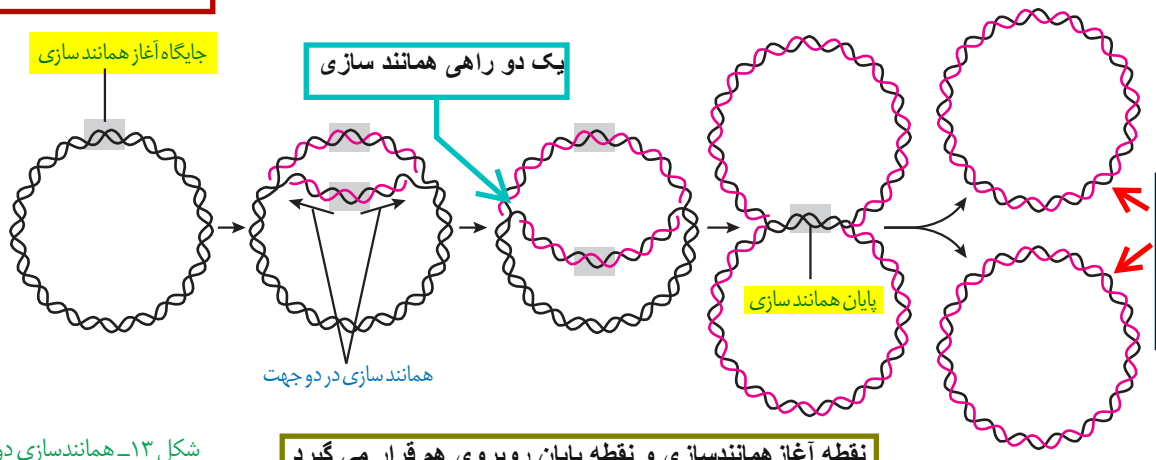
4- اغلب پروکاریوت ها فقط یک جایگاه آغاز همانندسای دارند(برخی پروکاریوت بیش از یک جایگاه آغاز همانند سازی دارند)

5- پروکاریوت ها علاوه بر DNA اصلی ، دارای پلازمید نیز هستند.

6- پلازمید در فناوری های نوین زیستی به انسان ها کمک می کند

و فام‌تن اصلی دارای یک مولکول دِنای حلقوی است که در سیتوپلاسم قرار دارد و به غشای یاخته متصل است. پروکاریوت‌ها علاوه بر دِنای اصلی ممکن است مولکول‌هایی از دِنایی دیگر به نام **دیسَک (پلازمید)** داشته باشند. اطلاعات این مولکول ها می‌تواند ویژگی های دیگری را به باکتری بدهد مانند افزایش مقاومت باکتری در برابر **پادزیست(آنتی بیوتیک)ها**.

اغلب پروکاریوت‌ها فقط یک جایگاه آغاز همانندسازی در دِنای خود دارند. در این جایگاه دو رشته دِنا از هم باز می‌شوند. همانند یوکاریوت‌ها، همانندسازی دوجهتی در باکتری‌ها نیز وجود دارد؛ یعنی از یک نقطه همانندسازی شروع و در دو جهت ادامه می‌یابد تا به همدیگر رسیده و همانندسازی پایان یابد (شکل ۱۳).



شکل ۱۳ــ همانندسازی دوجهتی دِنا در پروکاریوت‌ها با یک نقطهٔ آغاز

در یوکاریوت‌ها که بقیه موجودات زنده یعنی آغازیان، قارچ‌ها، گیاهان و جانوران را شامل می‌شوند دِنا در هر فام‌تن به‌صورت خطی است و مجموعه‌ای از پروتئین‌ها که مهم‌ترین آنها هیستون‌ها هستند همراه آن قرار دارند. بیشتر دِنا درون هسته قرار دارد که به آن **دِنای هسته‌ای** می‌گویند. در یوکاریوت‌ها علاوه بر هسته در سیتوپلاسم نیز مقداری دِنا وجود دارد که به آن **دِنای سیتوپلاسمی** می‌گویند. این نوع از دِنا که حالت حلقوی دارد در راکیزه (میتوکندری) و دیسه (پلاست) دیده می‌شود.

1-همانند سازی در یوکاریوت ها ، پیچیده تر از پروکاریوت ها است

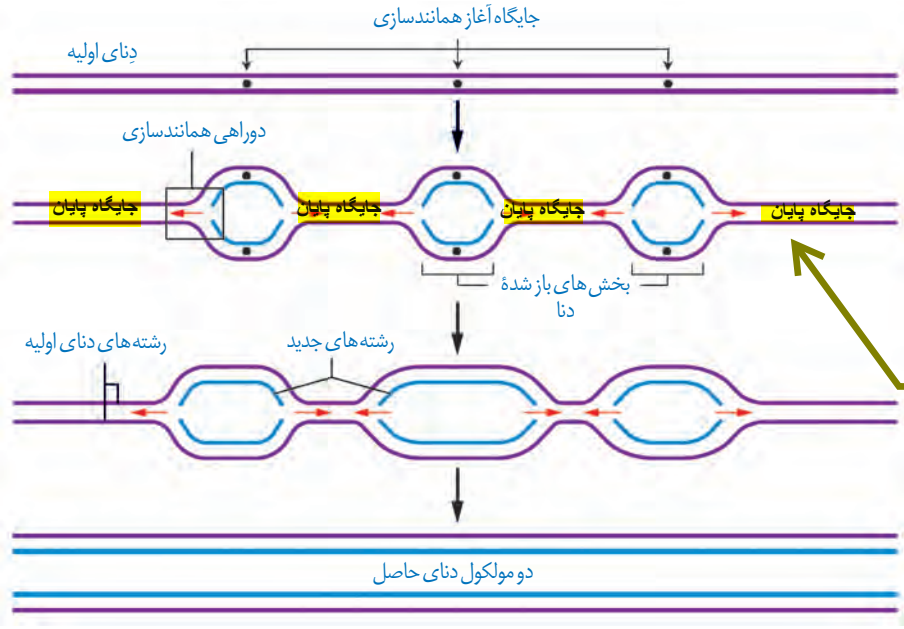
2- دریوکاریوت ها مقدار DNA بیشتر است و تعداد کروموزوم ها هم بیشتر است

3-تعداد جایگاه های آغاز همانندسازی در یوکاریوت ها بیشتر است ، در غیر اینصورت مدت زمان زیادی برای همانند سازی لازم بود

4- تعداد جایگاه آغاز همانند سازی در وکاریوت با توجه به مراحل رشد و نمو قابل تنظیم است

چرا همانندسازی در یوکاریوت‌ها بسیار پیچیده‌تر از پروکاریوت‌ها است؟علت این مسئله وجود مقدار زیاد دِنا و قرار داشتن در چندین فام‌تن است که هر کدام از آنها چندین برابر دِنای باکتری هستند. بنابراین اگر فقط یک جایگاه آغاز همانندسازی در هر فام‌تن داشته باشند مدت زمان زیادی برای همانندسازی لازم است. به همین علت در یوکاریوت‌ها، آغاز همانندسازی در چندین نقطه در هر فام‌تن انجام می‌شود (شکل ۱۴).

تعداد جایگاه‌های آغاز همانندسازی در یوکاریوت‌ها حتی می‌تواند بسته به مراحل رشد و نمو تنظیم شود؛ مثلاً در دوران جنینی در مراحل مورولا و بلاستولا (مرحله تشکیل بلاستوسیست) سرعت تقسیم زیاد و تعداد جایگاه‌های آغاز همانندسازی هم زیاد است ولی پس از تشکیل اندام‌ها، سرعت تقسیم و تعداد جایگاه‌های آغاز کم می‌شوند.



شکل ۱۴ ــ همانندسازی در یوکاریوت ها

در این شکل :

سه جایگاه آغاز

چهار جایگاه پایان

شش آنزیم هلیکاز

دوازده آنزیم DNA پلی مراز وجود دارد

به ازاء هر جایگاه آغاز دو هلیکاز و چهار آنزیم DNA پلی مراز لازم است

هنگام همانند سازی دریک DNA خطی، سرعت ، شروع و پایان همانند سازی در نقاط مختلف رشته DNA متفاوت است

برای انجام همانند سازی عوامل مختلفی وجود دارد .بعضی از عوامل سرعت همانند سازی را زیاد و برخی کم می کنند.

دراین شکل : مرحله آغاز یکی است ، اما در مرحله ادامه سرعت همانند متفاوت می شود .علت ممکن است بخاطر نوع نوکلئوتید ها باشد . مثلاسرعت همانند سازی در مناطقی که تعداد آدنین و تیمین بیشتری دارند نسبت به مناطقی که گوانین و سیتوزین بیشتری دارند ، زیاد تر است . زیرا پیوند هیدرژنی بین گوانین و سیتوزین بیشتر و سرعت باز شدن دو رشته DNA کمتر است

عامل دیگرممکن است : فشردگی DNA توسط هیستون ها باشد. هر چه فشردگی بیشتر ، سرعت باز شدن رشته کمتر است