Archive of SID

Physical and Chemical Properties of DNA Ligases

Sara Abdolahi[1, 2], Maryam Borhani Haghighi[2, 3], Hadi Aligholi[4*]

[1]Department of Pathobiology, School of Veterinary Medicine, Shiraz University, Shiraz, Iran
[2]Shefa Neuroscience Research Center, Khatam Alanbia Hospital, Tehran, Iran
[3]Department of Anatomy, School of Medicine, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran
[4]Department of Neuroscience, School of Advanced Medical Sciences and Technologies, Shiraz University of Medical Sciences, Shiraz, Iran

Article Info:
Received: **4 Dec 2016** ***Accepted*****: 19 Feb 2017**

Downloaded from shefayekhatam.ir at 14:40 +0430 on Tuesday July 4th 2017

ABSTRACT

Introduction: DNA ligases as a particular type of enzyme which catalyze and facilitate the formation of a phosphodiester bond in duplex DNA are central enzymes in molecular biology. DNA ligase forms a bond between the end of a donor nucleotide and the end of an acceptor nucleotide. Reaction of DNA ligases is necessary for all organisms and serves as the fundamental step of DNA replication and repair. DNA ligase can play an important role in repairing single strand disruptions and fasten nicks in double-stranded DNA. It also connects Okazaki fragments during the replication of DNA. *T4* DNA ligase, E. coli DNA ligase, and thermostable DNA ligases are examples of DNA ligase enzyme family. These enzymes differ in their co-factor requirements, substrate specificity, and thermal stability. ***Conclusion:*** DNA ligase has the widespread use in laboratories of molecular biology for recombinant DNA experiments. Despite the existence and operation of the DNA ligases in all organisms, they show a vast variety of amino acid sequences, molecular sizes, and attributes.

Key words:

1. DNA Ligases
2. Zinc Fingers
3. Biology

Corresponding Author: Hadi Aligholi
E-mail: *hadialigholi@yahoo.com*

www.SID.ir

Archive of SID

ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی DNA لیگازها

سارا عبدالهی[۱،۲]، مریم برهانی حقیقی[۲،۳]، هادی علیقلی[۴*]

[۱]گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شیراز، شیراز، ایران
[۲]مرکز تحقیقات علوم اعصاب شفا، بیمارستان خاتم‌الانبیاء، تهران، ایران
[۳]گروه آناتومی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران
[۴]گروه علوم اعصاب، دانشکده علوم و فناوری‌های نوین پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شیراز، شیراز، ایران

اطلاعات مقاله:

تاریخ دریافت: ۱۴ آذر ۱۳۹۵

تاریخ پذیرش: ۱ اسفند ۱۳۹۵

چـــــکیده

مقدمه: DNA لیگازها به‌عنوان نوع خاصی از آنزیم‌ها که تشکیل پیوند فسفودی استر در DNA دو رشته‌ای را تسریع و تسهیل می‌کنند، آنزیم‌های اصلی در زیست شناسی مولکولی هستند. DNA لیگاز بین انتهای یک نوکلئوتید دهنده و انتهای یک نوکلئوتید پذیرنده یک پیوند تشکیل می‌دهد. واکنش DNA لیگاز برای تمام موجودات زنده لازم است و به‌عنوان گام اساسی ترمیم و تکثیر DNA عمل می‌کند. DNA لیگاز می‌تواند نقش مهمی در ترمیم اختلالات DNA تک رشته و اتصال شکاف‌ها در DNA دو رشته بازی کند. همچنین قطعات اکازاکی در طی همانندسازی DNA را به یکدیگر متصل می‌کند. DNA لیگاز *T4*، DNA لیگاز *E. coli* و DNA لیگاز مقاوم به حرارت نمونه‌هایی از آنزیم‌های خانواۀ DNA لیگاز هستند. این آنزیم‌ها در کوفاکتور مورد نیاز خود، سوبسترای اختصاصی و پایداری حرارتی متفاوت هستند. ***نتیجه‌گیری:*** DNA لیگازها دارای استفادۀ گسترده در آزمایشگاه‌های زیست شناسی مولکولی برای آزمایش‌های DNA نوترکیب می‌باشند. با وجود حضور و عملکرد DNA لیگازها در تمام موجودات، آن‌ها تنوع گسترده‌ای از توالی‌های اسیدآمینه، اندازه‌های مولکولی و خصوصیات را نشان می‌دهند.

کلید واژه‌ها:

۱. DNA لیگازها
۲. دمین زینک فینگر
۳. زیست شناسی

* **نویسنده مسئول:** هادی علیقلی

آدرس الکترونیکی: *hadialigholi@yahoo.com*

Downloaded from shefayekhatam.ir at 14:40 +0430 on Tuesday July 4th 2017

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from shefayekhatam.ir at 14:40 +0430 on Tuesday July 4th 2017

مقدمه

نامگذاری و طبقه‌بندی آنزیم‌های خانوادهٔ لیگاز

مطابق با فهرست کمیتهٔ نامگذاری اتحادیهٔ بین‌المللی بیوشیمی و بیولوژی مولکولی[1]، آنزیم‌ها به شش کلاس اصلی تقسیم می‌شوند که هر کدام بر اساس نوع واکنشی که کاتالیز می‌کنند دارای زیر کلاس‌های مختلف می‌باشند (جدول ۱).

در این طبقه‌بندی آنزیم‌ها توسط چهار عدد و همچنین یک نام سیستماتیک که مشخص کنندهٔ نوع واکنش کاتالیز کننده می‌باشد، نامگذاری می‌شوند (۱). این عدد چهار رقمی عدد کمیسیون آنزیمی[2] می‌باشد. عدد اول مشخص کنندهٔ نام کلاس آنزیم، عدد دوم مربوط به زیرکلاس آنزیم و عدد سوم و چهارم اختصاصی آنزیم می‌باشد. به طور مثال عدد کمیسیون آنزیمی برای لیگاز DNA EC 6. 5. 1. 1 می‌باشد که عدد اول کلاس آنزیم (لیگاز)، عدد دوم زیر کلاس آنزیم (تشکیل باند فسفریک استر) و عدد سوم و چهارم اختصاصی آنزیم می‌باشند (۱). در جدول‌های ۲، ۳، ۴، ۵ و ۶ طبقه‌بندی زیر کلاس‌های مختلف خانوادهٔ لیگاز و زیر کلاس‌های لیگازها بر اساس نوع واکنش مشخص شده است (۱).

جدول ۱- طبقه‌بندی بین‌المللی آنزیم‌ها (۱).

عدد	کلاس	واکنش کاتالیزی
۱	اکسیدوردکتازها	انتقال الکترون‌ها (یون‌های هیدرید یا اتم‌های H)
۲	ترانسفرازها	واکنش‌های انتقال گروه
۳	هیدرولازها	واکنش‌های هیدرولیز (انتقال گروه‌های عامل به آب)
۴	لیازها	افزودن گروه‌ها به پیوندهای دوگانه یا ایجاد پیوندهای دوگانه با برداشت گروه‌ها
۵	ایزومرازها	انتقال گروه‌ها در داخل مولکول‌ها جهت ایجاد اشکال ایزومری
۶	لیگازها	تشکیل پیوند در طی واکنش‌های کندانسیون همراه با تجزیهٔ ATP

جدول ۲- زیر کلاس‌های خانوادهٔ لیگازها (۱).

شماره	نام
EC 6-1	تشکیل پیوند اکسیژن -کربن
EC 6-2	تشکیل پیوند کربن -سولفور
EC 6-3	تشکیل پیوند کربن -نیتروژن
EC 6-4	تشکیل پیوند کربن -کربن
EC 6-5	تشکیل پیوند فسفوریک استر
EC 6-6	تشکیل پیوند نیتروژن -فلز

جدول ۳- زیر کلاس‌های لیگازها بر اساس نوع واکنش (۱).

شماره	نوع واکنش
EC 6-1	تشکیل پیوند کربن -اکسیژن
EC 6-1-1	تشکیل آمینواسیل tRNA و ترکیبات وابسته
EC 6-2	تشکیل پیوند کربن -سولفور
EC 6-2-1	اسید -تیول لیگاز
EC 6.3	تشکیل پیوند کربن -نیتروژن
EC 6.3.1	اسید -آمین لیگاز (Amide Synthases)
EC 6.3.2	اسید -آمینواسید لیگاز (Peptide SynthaseS)
EC 6.3.3	سیکلو لیگاز
EC 6.3.4	کربن -نیتروژن لیگازهای دیگر
EC 6.3.5	لیگازهای کربن -نیتروژن با گلوتامین
EC 6.4	تشکیل پیوند کربن -کربن
EC 6.5	تشکیل پیوند فسفو دی استر
EC 6.6	تشکیل پیوند نیتروژن -فلز
EC 6.6.1	تشکیل کمپلکس کوئوردیناسیون

جدول ۴- زیرکلاس‌های EC 6.1 لیگازها (۱).

Number	Name
EC 6.1.1.1	tyrosine—tRNA ligase
EC 6.1.1.2	tryptophan—tRNA ligase
EC 6.1.1.3	threonine—tRNA ligase
EC 6.1.1.4	leucine—tRNA ligase
EC 6.1.1.5	isoleucine—tRNA ligase
EC 6.1.1.6	lysine—tRNA ligase
EC 6.1.1.7	alanine—tRNA ligase
EC 6.1.1.8	deleted
EC 6.1.1.9	valine—tRNA ligase
EC 6.1.1.10	methionine—tRNA ligase
EC 6.1.1.11	serine—tRNA ligase
EC 6.1.1.12	aspartate—tRNA ligase
EC 6.1.1.13	D-alanine—poly(phosphoribitol) ligase
EC 6.1.1.14	glycine—tRNA ligase
EC 6.1.1.15	proline—tRNA ligase
EC 6.1.1.16	cysteine—tRNA ligase
EC 6.1.1.17	glutamate—tRNA ligase
EC 6.1.1.18	glutamine—tRNA ligase
EC 6.1.1.19	arginine—tRNA ligase
EC 6.1.1.20	phenylalanine—tRNA ligase
EC 6.1.1.21	histidine—tRNA ligase
EC 6.1.1.22	asparagine—tRNA ligase
EC 6.1.1.23	aspartate—tRNAAsn ligase
EC 6.1.1.24	glutamate—tRNAGln ligase
EC 6.1.1.25	lysine—tRNAPyl ligase
EC 6.1.1.26	pyrrolysine—$tRNA^{Pyl}$ ligase

[1] Nomenclature committee of the international union of biochemistry and molecular biology
[2] Enzyme commission number

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from shefayekhatam.ir at 14:40 +0430 on Tuesday July 4th 2017

جدول ۵- زیرکلاس‌های EC 6.2 لیگازها (۱).

Number	Name
EC 6.2.1.1	acetate—CoA ligase
EC 6.2.1.2	butyrate—CoA ligase
EC 6.2.1.3	long-chain-fatty-acid—CoA ligase
EC 6.2.1.4	succinate—CoA ligase (GDP-forming)
EC 6.2.1.5	succinate—CoA ligase (ADP-forming)
EC 6.2.1.6	glutarate—CoA ligase
EC 6.2.1.7	cholate—CoA ligase
EC 6.2.1.8	oxalate—CoA ligase
EC 6.2.1.9	malate—CoA ligase
EC 6.2.1.10	acid—CoA ligase (GDP-forming)
EC 6.2.1.11	biotin—CoA ligase
EC 6.2.1.12	4-coumarate—CoA ligase
EC 6.2.1.13	acetate—CoA ligase (ADP-forming)
EC 6.2.1.14	6-carboxyhexanoate—CoA ligase
EC 6.2.1.15	arachidonate—CoA ligase
EC 6.2.1.16	acetoacetate—CoA ligase
EC 6.2.1.17	propionate—CoA ligase
EC 6.2.1.18	citrate—CoA ligase
EC 6.2.1.19	long-chain-fatty-acid—luciferin-component ligase
EC 6.2.1.20	long-chain-fatty-acid—[acyl-carrier-protein] ligase
EC 6.2.1.21	covered by EC 6.2.1.30
EC 6.2.1.22	[citrate (pro-3S)-lyase] ligase
EC 6.2.1.23	dicarboxylate—CoA ligase
EC 6.2.1.24	phytanate—CoA ligase
EC 6.2.1.25	benzoate—CoA ligase
EC 6.2.1.26	o-succinylbenzoate—CoA ligase
EC 6.2.1.27	4-hydroxybenzoate—CoA ligase
EC 6.2.1.28	3α,7α-dihydroxy-5β-cholestanate—CoA ligase
EC 6.2.1.29	deleted now EC 6.2.1.7
EC 6.2.1.30	phenylacetate—CoA ligase
EC 6.2.1.31	2-furoate—CoA ligase
EC 6.2.1.32	anthranilate—CoA ligase
EC 6.2.1.33	4-chlorobenzoate—CoA ligase
EC 6.2.1.34	trans-feruloyl-CoA synthase
EC 6.2.1.35	ACP-SH:acetate ligase

جدول ۶- زیرکلاس‌های EC 6.3 لیگازها (۱).

Number	Name
EC 6.3.1.1	Aspartate-ammonia ligase
EC 6.3.1.2	Glutamate-ammonia ligase
EC 6.3.1.3	now EC 6.3.4.13
EC 6.3.1.4	Aspartate-ammonia ligase (ADP-forming)
EC 6.3.1.5	NAD+ synthase
EC 6.3.1.6	Glutamate-ethylamine ligase
EC 6.3.1.7	methyleneglutamate-ammonia ligase-4
EC 6.3.1.8	glutathionylspermidine synthase
EC 6.3.1.9	trypanothione synthase
EC 6.3.1.10	adenosylcobinamide-phosphate synthase
EC 6.3.1.11	Glutamate-putrescine ligase
EC 6.3.1.12	D-aspartate ligase
EC 6.3.1.13	L-cysteine:1D-*myo*-inositol 2-amino-2-deoxy-α-D-glucopyranoside ligase

جدول ۷- زیرکلاس های EC 6-4 لیگازها (۱).

Number	Name
EC 6.4.1.1	pyruvate carboxylase
EC 6.4.1.2	acetyl-CoA carboxylase
EC 6.4.1.3	propionyl-CoA carboxylase
EC 6.4.1.4	methylcrotonoyl-CoA carboxylase
EC 6.4.1.5	geranoyl-CoA carboxylase
EC 6.4.1.6	acetone carboxylase
EC 6.4.1.7	2-oxoglutarate carboxylase

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from shefayekhatam.ir at 14:40 +0430 on Tuesday July 4th 2017

جدول ۸- زیرکلاس های EC 6-5 لیگازها (۱).

Number	Name
EC 6.5.1.1	DNA ligase (ATP)
EC 6.5.1.2	DNA ligase (NAD^+)
EC 6.5.1.3	RNA ligase (ATP)
EC 6.5.1.4	RNA-3'-phosphate cyclase

جدول ۹- زیرکلاس‌های EC 6-6 لیگازها (۱).

Number	Name
EC 6.6.1.1	magnesium chelatase
EC 6.6.1.2	cobaltochelatase

لیگازها خانواده‌ای از آنزیم‌ها می‌باشند که اتصال دو مولکول بزرگ را به وسیلهٔ تشکیل یک پیوند شیمیایی جدید کاتالیز می‌کنند که معمولاً همراه با هیدرولیز گروه شیمیایی کوچکی است که متصل به یکی از مولکول‌های بزرگ است. به طور معمول لیگازها واکنش زیر را کاتالیز می‌کنند (Ab + C → A–C + b، Ab + cD → A–D + b + c). لیگازها همچنین سینتتاز نیز نامیده می‌شوند زیرا برای ترکیب مولکول‌های جدید به کار می‌روند (۲).

DNA لیگازها یک نوع خاص از لیگازها (EC 6. 5. 1. 1) می‌باشند که می‌توانند دو رشتهٔ DNA را که هر دو رشته دچار بریدگی شده‌اند را به هم متصل نمایند. DNA لیگاز یک آنزیم سلولی حیاتی است که برای تعدادی از فرایندهای مهم از جمله رونویسی DNA، ترمیم DNA آسیب دیده، نوترکیبی DNA، بازآرایی ژن ایمونوگلوبولین، ویرایش RNA[3] و اتصال قطعات اکازاکی مورد نیاز می‌باشد. DNA لیگاز یک آنزیم ضروری برای همهٔ سلول‌ها است به طوری که شکاف‌های موجود در چهارچوب فسفات -قند DNA را به هم می‌چسباند (۴-۲). DNA لیگازها اتصال دهندهٔ قطعات اکازاکی اصلاح شده در طول رونویسی نیز بوده و سنتز DNA در طی فرایند ترمیم DNA را برای مدت کوتاهی کامل می‌کنند. DNA لیگاز دو رشتهٔ DNA را به صورت کووالانسی به هم متصل می‌کند (۴). DNA لیگازها همچنین به طور گسترده به‌عنوان ابزاری در دستکاری DNA و کلونینگ DNA در آزمایشات in vitro مورد استفاده قرار می‌گیرند. این آنزیم‌ها می‌توانند به دو کلاس تقسیم شوند، یک دستهٔ آنزیم‌هایی که به کوفاکتور NAD^+ نیاز دارند و دستهٔ دیگر آنزیم‌هایی هستند که به کوفاکتور ATP نیاز دارند. DNA لیگازهای یوکاریوت‌ها، ویروس‌ها و آرکئی باکترها از کوفاکتور ATP استفاده می‌کنند و تنها در یوباکترها NAD^+ به‌عنوان کوفاکتور DNA لیگاز استفاده می‌شود (۲، ۵)

اتصال پایانه‌های DNA توسط DNA لیگاز

اتصال قطعات اکازاکی به آنزیمی احتیاج دارد که انتهای دو زنجیرهٔ DNA را به هم متصل کند، وجود مولکول‌های DNA حلقوی نیز دلیلی بر وجود این آنزیم است. در سال ۱۹۶۷ محققین چندین آزمایشگاه به طور همزمان، موفق به کشف DNA لیگاز شدند. این آنزیم ایجاد پیوند فسفو دی استر بین گروه هیدروکسیل ′۳ در انتهای یک زنجیره و گروه فسفات ′۵ در انتهای زنجیرهٔ دیگر را تسریع می‌کند. برای انجام این واکنش که از لحاظ ترمودینامیکی انرژی خواه می‌باشد یک منبع انرژی مورد نیاز است. در یوکاریوت‌ها و آرکئی باکتری‌ها ATP و در باکتری‌ها NAD^+ منبع انرژی می‌باشند (۵).

سایز لیگازهای وابسته به ATP در محدودهٔ بین ۳۰ kDa تا ۱۰۰ kDa < قرار دارد، اما لیگازهای وابسته به NAD^+ شباهت بسیار زیادی به یکدیگر دارند و از پروتئین‌های مونومریک ۸۰-۷۰ kDa تشکیل شده‌اند (۶). توالی‌های مشابهی بین دو کلاس DNA لیگازها مشاهده می‌شد تا اینکه اخیراً روی توالی موتیف KxDG متمرکز شده‌اند، این موتیف (I) حفاظت شده یکی از شش توالی co-linear موتیف‌های (I-VI) مشخص شده در جایگاه فعال آنزیم‌های زیر خانوادهٔ نوکلئوتیدیل ترانسفرازها از جمله DNA لیگازهای وابسته به ATP، RNA لیگازها، tRNA لیگازها و همچنین آنزیم‌های کلاهک گذار mRNA یوکاریوتی می‌باشد (۷، ۸). روش‌هایی که برای شناسایی توالی‌های تکراری جدید به کار گرفته شده است، نشان می‌دهد که ۵ موتیف از این ۶ موتیف در لیگازهای وابسته به NAD^+ نیز وجود دارد (۹، ۱۰). شواهدی وجود دارد که نشان می‌دهد تعدادی از ویروس‌ها حاوی ژنی هستند که DNA لیگاز خود را کد می‌کنند. این آنزیم‌ها به دو گروه ظاهر می‌شوند؛ یک گروه آنزیم‌هایی هستند که برای فعالیت به NAD^+ نیاز دارند و گروه دیگر به ATP نیاز دارند. این تفاوت در سوبسترای اختصاصی و ضرورت لیگاز وابسته به NAD^+ برای بقاء باکتری‌ها ضروری می‌باشد. در همهٔ آنزیم‌های یوکاریوتی منبع انرژی ATP می‌باشد. این آنزیم‌ها تنوع گسترده‌ای از حجم مولکولی را نشان می‌دهند، آنزیم نوع ۱ انسانی ۱۰۳ KDa و آنزیم‌های باکتریوفاژ *T7* ۴۱ kDa وزن مولکولی دارند. DNA لیگاز باکتریوفاژ T7 یکی از کوچکترین DNA لیگازهای شناخته شده است (۶).

DNA لیگازها نمی‌توانند دو مولکول DNA تک رشته‌ای را به هم متصل کرده یا DNA تک رشته‌ای را حلقوی کنند. در واقع لیگازها بریدگی‌های مولکول‌های DNA دو رشته‌ای را پر می‌کنند. این آنزیم در *E. coli* معمولاً یک پل فسفو دی استر را تنها زمانی به وجود می‌آورد که حداقل چندین باز از DNA تک رشته‌ای در انتهای قطعهٔ

[3] RNA editing

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from shefayekhatam.ir at 14:40 +0430 on Tuesday July 4th 2017

دو رشـته‌ای DNA وجـود داشـته باشـد و در نزدیکـی بازهـای تـک رشـته‌ای قطعـهٔ دیگـر DNA قـرار بگیـرد تـا تشـکیل جفـت بـاز را میسـر سـازد. لیـگاز رمـز شـده بـه وسـیلهٔ باکتریوفـاژ *T4* می‌توانـد دو قطعـهٔ دو رشـته‌ای مارپیچـی را کـه دارای انتهـای کـور هسـتند را بـه هـم متصـل کنـد کـه ایـن توانایـی در فنـاوری DNA نوترکیـب بـه کار گرفتـه شـده اسـت. لیگازهـا نقـش اساسـی در گسـترش زیسـت مولکولـی و بیوتکنولـوژی ایفـاء می‌کننـد (۲، ۳، ۶).

واکنش DNA لیگاز

DNA لیگازهـا اتصـال یـک رشـتهٔ DNA بـا گـروه هیدروکسـیل ۳′ آزاد را بـه رشـتهٔ دیگـر بـا گـروه فسـفات ۵′ آزاد کاتالیـز می‌کننـد. در یوکاریوت‌هـا و آرکـی باکترهـا، ATP بـه PPi و AMP تجزیـه می‌شـود تـا ایـن واکنـش پیـش رود. در باکتری‌هـا، NAD^+ بـه AMP و نیکوتیـن آمیـد مونونوکلئوتیـد (NMN)[4] تجزیـه می‌شـود (۶).

مکانیسم واکنش لیگازها

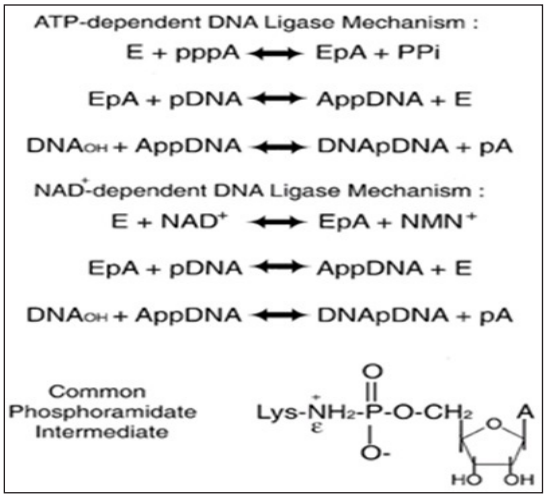
واکنش لیگازها در سه مرحله رخ می‌دهد (تصویر ۱).

مرحلـهٔ ۱- ناحیـهٔ فعـال زنجیـرهٔ جانبـی لیزیـن بـه ATP یـا NAD^+ حملـه می‌کنـد (بانـد N-P)، واکنـش حـد واسـط AMP لیـگاز تشـکیل مـی شـود و PPi یـا NMN آزاد می‌شـود.

مرحلـهٔ ۲- گـروه AMP از لیـگاز بـه گـروه فسـفات ۵′ متصـل می‌شـود و واکنـش حـد واسـط AMP -نوکلئیـک اسـید (AMP-NA) تشـکیل می‌شـود.

مرحلـهٔ ۳- گـروه هیدروکسـیل انتهـای ۳′ بـه گـروه فسـفات انتهـای ۵′ حملـه می‌کنـد و AMP آزاد می‌شـود.

در لیگازهـای یوکاریوتـی کمپلکـس AMP -آنزیـم پـس از واکنـش آنزیـم و ATP بـا آزاد شـدن پیروفسـفات‌های آزاد شـده تشـکیل می‌شـود. آدنیلاسـیون لیگازهـای باکتریایـی نیـز در واکنش‌هـای غیـر معمولـی کـه بـا تقسـیم NAD^+ و آزاد شـدن نیکوتیـن آمیـد مونونوکلئوتیـد شـروع می‌شـود صـورت می‌گیـرد (۶، ۱۰).



تصویر ۱- مکانیسم واکنش DNA لیگاز (۶).

تشکیل AMP لیگاز

DNA لیگازهـا حـاوی یـک دمیـن OB-fold[5] بـا ۵ رشـتهٔ β-barrel می‌باشـند کـه از امتـداد یافتـن C-ترمینـال دمیـن NTase[6] بـه وجـود آمده‌انـد. در سـاده‌ترین DNA لیگازهـا از جملـه DNA لیـگاز باکتریوفـاژ *T7* و ویـروس *Chlorella* دو دمیـن NTase و OB قـادر بـه انجـام همـهٔ مراحـل DNA لیـگاز هسـتند (۳، ۱۱، ۱۲).

DNA لیگازهـای وابسـته بـه ATP از همـکاری باقی‌مانده‌هـای حفاظـت شـده بـر روی دمیـن OB در تشـکیل حـد واسـط AMP لیـگاز اسـتفاده می‌کننـد. در مقایسـه بـا DNA لیگازهـای وابسـته بـه ATP، DNA لیگازهـای وابسـته بـه NAD^+ نمی‌تواننـد از همـکاری دمیـن OB در تشـکیل حـد واسـط AMP لیـگاز اسـتفاده کننـد. DNA لیگازهـای وابسـته بـه NAD^+ از مکانیسـم‌های مختلفـی اسـتفاده می‌کننـد کـه در آن‌هـا باقی‌مانده‌هـای مـورد نیـاز از امتـداد یافتـن N-ترمینـال دمیـن NTase بـه وجـود می‌آینـد، کـه دمیـن Ia نامیـده می‌شـود (۱۴، ۱۳، ۶). بنابرایـن هـردو دسـتهٔ DNA لیگازهـای وابسـته بـه ATP و NAD^+ از دمین‌هـای معینـی بـرای تشـکیل AMP لیـگاز اسـتفاده می‌کننـد امـا هرکـدام از ایـن دو دسـته لیگازهـا از دمین‌هـا و مکانیسـم‌های کامـلاً متفاوتـی اسـتفاده می‌کننـد. بعـد از تشـکیل حـد واسـط AMP لیـگاز، چرخـش پیوسـتهٔ دمین‌هـای Ia و OB از ناحیـهٔ فعـال NTase اجـازهٔ حملـه بـه DNA وارد شـده را می‌دهنـد. اخیـراً سـاختمان‌های کریسـتالی جدیـدی کـه از DNA لیگازهـای وابسـته بـه ATP و NAD^+ بـه دسـت آمـده اسـت نشـان می‌دهـد کـه دمیـن OB می‌توانـد یـک موقعیـت فعـال ثانویـه نیـز در طـی مرحلـهٔ وابسـته بـه ATP ایجـاد نمایـد (۶). در مقایسـه بـا DNA لیگازهـا، RNA لیگازهـا نمی‌تواننـد از دمین‌هـای معینـی در تشـکیل AMP لیـگاز اسـتفاده کننـد، بـرای مثـال RNA لیـگاز ۱ و ۲ باکتریوفـاژ *T4* در تشـکیل حـد واسـط AMP لیـگاز فقـط از دمیـن NTase اسـتفاده می‌کننـد (۶).

شناسایی شکاف به وسیلهٔ DNA لیگاز

شـکاف DNA بـه طـور معمـول دارای فسـفات ۵′ و هیدروکسـیل ۳′ در ضلع‌هـای مقابـل هـم در ناحیـهٔ شکسـته شـده در چهـار چـوب DNA اسـت. Shuman و همکارانـش نشـان دادنـد کـه گـروه فسـفات ۵′ بـرای شناسـایی شـکاف توسـط لیگازهـای وابسـته بـه ATP کامـلاً ضـروری اسـت امـا گـروه هیدروکسـیل ۳′ ضـروری نیسـت. در هنـگام تشـکیل کمپلکـس شـکاف، اگـر شـکاف فاقـد گـروه فسـفات ۵′ باشـد، کمپلکـس شـکاف دچـار کاهـش قابـل توجهـی می‌شـود. لیگازهـا همچنیـن تفـاوت بیـن شـکاف و فاصلـه را تشـخیص می‌دهنـد. فاصله‌هـای بیشـتر از 1 nt < در ناحیـهٔ شـکاف را از بیـن می‌برنـد (تصویـر ۲)-(۶، ۱۵).

[4] Nicotinamide mononucleotide
[5] Oligonucleotide/oligosaccharide-binding
[6] Nucleotidyl transferase domain

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from shefayekhatam.ir at 14:40 +0430 on Tuesday July 4th 2017

مکانیسم شناسایی شکاف و عملکرد DNA لیگاز

۱- اتصال NAD^+ یا ATP در فرورفتگی نوکلئوتید که به دنبال بسته شدن دمین ۲ صورت می‌گیرد.

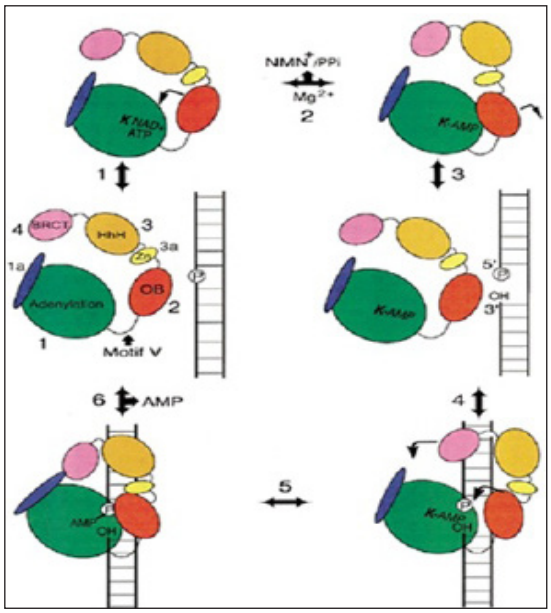
۲- با وارد شدن Mg و رها شدن NMN^+ یا PPi، در واکنش ترانس آدنیلاسیون، AMP به جایگاه فعال لیزین منتقل می‌شود.

۳- باز شدن دمین ۲ و آماده شدن آنزیم برای بستن شکاف.

۴- اتصال آنزیم آدنیله شده به شکاف DNA و بسته شدن دمین ۲ در ناحیهٔ شکاف (در لیگازهای بزرگ از جمله لیگاز *Tfi*[7]، علاوه بر این دمین‌ها ممکن است پیچ و تاپ‌هایی نیز در اطراف DNA وجود داشته باشد).

۵- انتقال AMP به ناحیهٔ فسفات ′۵ شکاف.

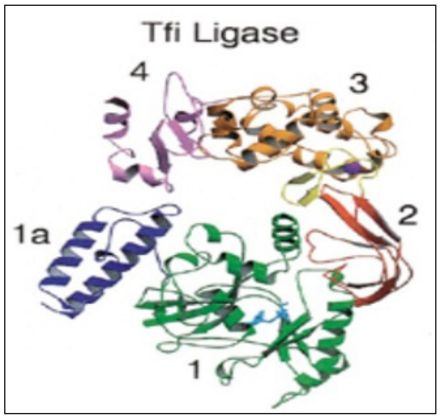
۶- گروه هیدروکسیل انتهای ′۳ به گروه فسفات انتهای ′۵ شکاف حمله می‌کند و یک باند فسفودی استر تشکیل می‌شود و شکاف همراه با آزادشدن AMP بسته می‌شود.



تصویر ۲- مکانیسم شناسایی شکاف به وسیلهٔ DNA لیگاز (۶).

ساختمان DNA لیگاز وابسته به NAD^+ در باکتری‌ها

ساختمان DNA لیگاز باکتری *Thermus filiformis* شامل یک بخش هسته مانند (nucleotide-binding-OB-fold) است که به دمین‌های zinc finger و دمین BRCA1 C -ترمینال متصل شده است (تصویر ۳). دو ساختمان کریستالی مشابه با ساختمان DNA لیگاز وابسته به NAD^+ در باکتری *Enterococcus faecalis* شناسایی شده است که تغییر قابل توجهی در ساختمان آن‌ها که در کمپلکس با سوبسترا (NAD^+) یا محصول (NMN) مرحلهٔ اول آدنیلاسیون هستند، وجود دارد. به طور قابل توجهی کمپلکس (NMN) کریستاله شده می‌تواند به کمپلکس NAD^+ تبدیل شود (۱۶).



تصویر ۳- DNA -لیگاز وابسته به NAD^+ در Thermus filiformis (۶).

DNA لیگاز وابسته به NAD^+ در *E. coli*

DNA لیگاز وابسته به NAD^+ در باکتری‌ها دارای ساختارهای چند دمینی هستند که دمین‌های OB و NTase هستهٔ این آنزیم‌ها را تشکیل می‌دهند ولی با این وجود ساختارهای کاملاً متفاوتی نسبت به DNA لیگاز وابسته به ATP در یوکاریوت‌ها دارند. در این دسته از آنزیم‌ها دمین N -ترمینالی Ia تشکیل AMP لیگاز را تحریک می‌کند، این آنزیم‌ها حاوی سه دمین C -ترمینالی هستند که از گسترش دمین OB به وجود آمده‌اند و شامل دمین‌های Zn، HhH[8] و BRCT هستند. آنالیزهای بیوشیمیایی که روی لیگاز *Drosera* filiformis انجام شده است نشان می‌دهد که دمین BRCT در آزمایشات in vitro برای واکنش لیگاز ضروری نیست، از طرفی عملکرد این دمین در آزمایشات in vivo نیز آشکار نشده است. دمین HhH در LigA *E. coli*[9] از امتداد یافتن دمین‌های OB و Zn به وجود آمده است و به دمین NTase متصل شده است، این دمین یک گیرهٔ[10] پروتئینی ایجاد می‌کند که DNA را در بر می‌گیرد. دمین Zn نیز سبب تشکیل یک پل بین دمین‌های OB و HhH در LigA می‌شود. دمین HhH در LigA، همچنین دمین DBD[11] در LIG1[12] با وجود اینکه فولدهای پروتئینی کاملاً متفاوتی دارند اما دارای نقش عملکردی مشابهی هستند (۱۸، ۱۷، ۳).

DNA لیگاز وابسته به ATP در ویروس *Chorella*

DNA لیگاز ویروس *Chlorella* دارای دو دمین ساختاری NTase و OB می‌باشد. ساختمان کریستالی حد واسط AMP لیگاز در این ویروس در ناحیهٔ شکاف DNA با

[7] Thermus filiformis
[8] Helix-hairpin-helix
[9] Ligase A
[10] Clamp
[11] DNA-binding domain
[12] LIG1 DNA ligase 1 (human)

www.SID.ir

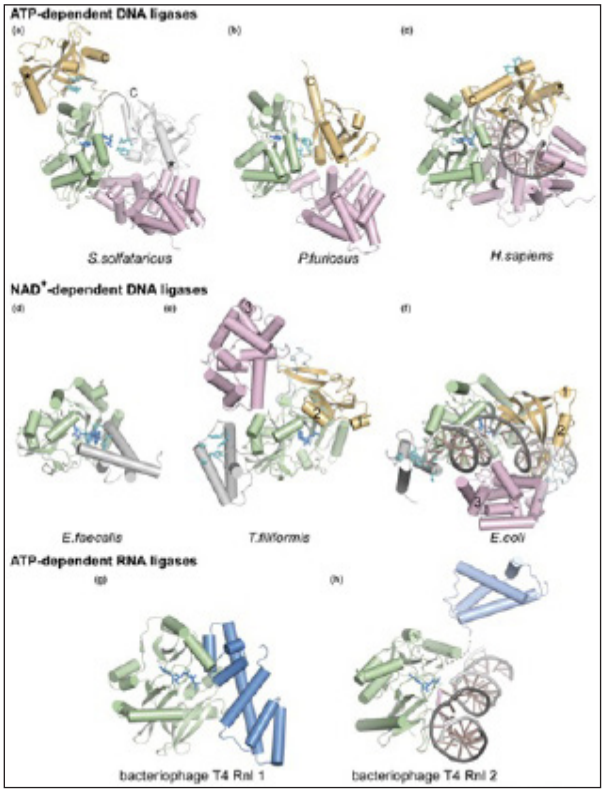
Archive of SID

Downloaded from shefayekhatam.ir at 14:40 +0430 on Tuesday July 4th 2017

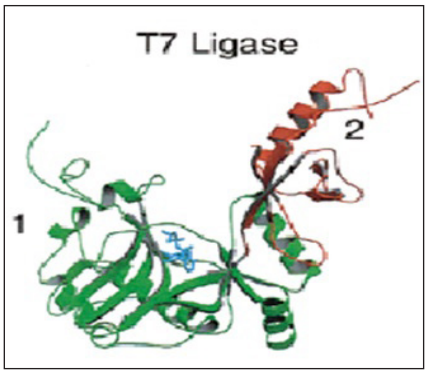
پایانه‌هـای فسـفات ′۵ و هیدروکسـیل ′۳ نشـان داده شـده است. در حالتـی کـه لیـگاز *Chlorella* بـا DNA کمپلکس تشـکیل می‌دهـد، گـروه AMP و باقی‌مانده‌هایـی از دمیـن NTase در محـل فسـفات انتهـای ′۵ سوبسـترا قـرار دارنـد. ایـن بـر هم‌کنش‌هـا یـک اسـاس فیزیکـی بـرای تعییـن مولکول‌هایـی اسـت کـه بـه صـورت طبیعـی توانایـی شناسـایی شـکاف در لیـگاز *Chlorella* را دارنـد، ایـن مولکول‌هـا شـامل حـد واسـط AMP لیـگاز و گـروه فسـفات انتهـای ′۵ هسـتند (۱۹، ۳). دمین‌هـای NTase و OB لیـگاز *Chlorella* در حالتـی مشـابه بـا LIG1 و LigA سوبسـترای DNA را در بـر می‌گیرنـد و موقعیـت دمین‌هـای NTase و OB را در یـک حالـت پایـدار در طـول مرحلـۀ ۲ و ۳ واکنـش تعییـن می‌کننـد. دمیـن OB در لیـگاز *Chlorella* حـاوی ۳۰ باقی‌مانـده در سـطح لـوپ می‌باشـد کـه تعییـن کننـدۀ محـل بسـت[۱۳] اسـت. در انتهـای محـل بسـت دمیـن NTase قـرار دارد (۱۳، ۳). در تصویـر ۴ سـاختمان کریسـتالی و کونفورماسـیون فعـال DAN و RNA لیگازهـا مشـاهده می‌شـود. در ایـن تصویـر (a): سـاختمان کریسـتالی DNA لیـگاز *s. solfatricus* دمین‌هـای DBD (بنفـش)، NTase (سـبز) و OB (زرد) در حالـت بـاز، باعـث رسـیدن بـه کونفورمایسـیون می‌شـوند. (b): سـاختمان کریسـتالی DNA لیـگاز *P. furiosis* نشـان داده شـده اسـت کـه کونفورماسـیون OB فـوراً بـه دنبـال تشـکیل ligase-AMP تشـکیل می‌شـود. در ایـن سـاختار اتصـال AMP (آبـی) بـا جایـگاه فعـال لیزیـن بـه صـورت کـووالان نیسـت. (c): سـاختمان کریسـتالی LIG1 انسـانی متصـل شـده بـه حـد واسـط AMP-DNA. تغییـر وضعیـت دمیـن OB بیـن سـه حالـت (a)،(b) و (c) وابسـته بـه موقعیـت دو هلیکـس دومیـن OB اسـت کـه بـا c و * مشـخص شـده‌اند. (d): سـاختمان کریسـتالی دمیـن Ia (خاکسـتری) و دمیـن NTase (سـبز) DNA لیـگاز *E. facealis*. (e): سـاختمان کریسـتالی حـد واسـط ligase-AMP، DNA لیـگاز *T. filiformis* در کونفورماسـیون بـاز، بـا جایـگاه فعـال آزاد NTase متصـل شـده بـه DNA. (f) سـاختمان کریسـتالی LigA در *E.coli* بـا حـد واسـط AMP-DNA. تغییـر در ترتیـب دمین‌هـا در بیـن دو حالـت (e) و (f) وابسـته بـه موقعیـت دو هلیکـس در دمیـن OB (۱ و ۲) و یـک هلیکـس در دمیـن HhH (۳) اسـت. (g): سـاختمان کریسـتالی RNA لیـگاز ۱ باکتریوفـاژ *T4*، AMPcPP (آنالـوگ ATP: آبـی) متصـل شـده بـه جایـگاه فعـال. تنهـا دمیـن c -ترمینـال بـه رنـگ آبـی تیـره. (h): سـاختمان کریسـتالی RNA لیـگاز ۲ باکتریوفـاژ *T4* متصـل شـده بـه هیبریـد RNA/DNA..

ساختمان لیگاز باکتریوفاژ *T7*

سـاختمان لیـگاز باکتریوفـاژ *T7* نشـان می‌دهـد کـه ایـن آنزیـم حـاوی دو دمیـن اسـت (تصویـر ۵)، دمیـن ۱؛ دمیـن بـزرگ N- ترمینـال (سـبز) و دمیـن ۲؛ دمیـن کوچـک C - ترمینـال (قرمـز). دمیـن ۱ (باقی‌مانده‌هـای ۲۴۰-۱) شـامل سـه β-sheet غیـر مـوازی اسـت کـه توسـط ۶ α-helix احاطـه شـده‌اند. دمیـن ۱ همچنیـن دارای ناحیـۀ اتصالـی بـرای ATP اسـت کـه در زیـر فرورفتگـی یکـی از β-sheet هـا قـرار گرفتـه اسـت (تصویـر ۵)-(۶).



تصویر ۴- ساختمان کریستالی و کونفورماسیون فعال DAN و RNA لیگازها (۳).



تصویر ۵- DNA لیگاز وابسته به ATP در باکتریوفاژ *T7* (۶).

Doherty و Wigley نشـان دادنـد کـه دمیـن ۱ بـه طـور ذاتـی فعالیـت آدنیلاسـیون دارد، بنابرایـن ایـن دمیـن را دمیـن آدنیلاسـیون می‌نامنـد. همچنیـن در آنزیم‌هـای کلاهـک گـذار PBCV-1[۱۴] و دمین‌هـای N- ترمینـال لیگازهـای *Bst*[۱۵] و *Tfi* و در تعـداد دیگـری از آنزیم‌هـای کـه بـه ATP و GTP متصـل می‌شـوند نیـز دمیـن ۱ مشـاهده می‌شـود. دمیـن ۱ لیگازهـای وابسـته بـه NAD^+ همچنیـن دارای زیـر دمیـن ۱a (آبـی) اسـت کـه بیشـتر در α-helix اسـت. ایـن سـاختار در لیـگاز *T7* مشـاهده نمی‌شـود (۲۱، ۲۰، ۶).

[13] Latch
[14] Paramecium bursaria *chlorella* virus 1
[15] Bacillus stearothermophilus

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from shefayekhatam.ir at 14:40 +0430 on Tuesday July 4th 2017

تعدادی از باقی‌مانده‌هایی که در فرورفتگی ناحیهٔ اتصالی دمین آدنیلاسیون لیگازهای *T7*، *Bst* و *Tfi* قرار دارند، متعلق به ۵ موتیف (موتیف‌های I-V) از ۶ توالی حفاظت شده در نوکلئوتیدیل ترانسفرازها هستند. این موتیف‌ها حاوی باقی‌مانده‌های شناخته شده‌ای هستند که برای کاتالیز ضروری می‌باشند. بررسی موقعیت این موتیف‌ها در داخل ساختمان DNA لیگازها نشان داد که این موتیف‌ها به‌صورت خوشه در اطراف ناحیهٔ اتصالی ATP قرار می‌گیرند. تعدادی از باقی‌مانده‌ها در داخل این موتیف‌ها بر هم‌کنش‌های خاصی با ATP ایجاد می‌کنند (۲۲، ۶).

لیگاز ۱ انسان (LIG1) , DNA لیگاز وابسته به ATP

ساختمان کریستاله شدهٔ LIG1 اولین ساختمان لیگازهای پلی نوکلئوتیدی شناخته شده است که یک بینش جدیدی از عملکرد دمین‌های OB و NTase را ارائه می‌دهد. واحدهای کاتالیتیکی LIG1 انسان (باقی‌مانده‌های ۹۱۹-۲۳۳) در کمپلکس با حد واسط AMP-DNA هستند. در LIG1 که با DNA کمپلکس شده است، دمین‌های NTase و OB به پروتئین سطحی که نزدیک به شکاف DNA است و در شیار کوچک قرار دارد متصل شده است. دمین NTase به سمت ′۳ شکاف DNA متصل شده است و بین چهارچوب فسفو دی استر رشتهٔ شکسته شده و رشتهٔ DNA سالم ارتباط برقرار می‌کند، از طرفی باقی‌مانده‌های حفاظت شده در شیار کوچک نزدیک به شکاف DNA قرار می‌گیرند. این باقی‌مانده‌ها در موقعیت OH انتهای ′۳ سوبسترا در داخل جایگاه فعال قرار می‌گیرند. دمین NTase در موقعیت ′۵ شکاف قرار می‌گیرد و اصولاً به گروه AMP متصل شده است. دمین OB در LIG1 نیز با قرار گرفتن در انتهای ′۵ شکاف، به بسته شدن شیار کوچک منجر می‌شود و یک ارتباط وسیعی را بین چهارچوب فسفو دی استر رشتهٔ سالم و رشتهٔ شکسته شده DNA ایجاد می‌کند (۳). DNA لیگازهای وابسته به ATP در یوکاریوت‌ها، ساختمان چند دمینی دارند که علاوه بر هستهٔ کاتالیکی که حاوی دمین‌های NTase و OB است، یک α- هلیکس N- ترمینالی نیز دارند که از امتداد یافتن DBD به وجود آمده است. DBD در LIG1 انسان سبب تحریک دمین‌های NTase و OB جهت افزایش فعالیت کاتالیکی این دمین‌ها می‌شود (۲۳، ۳).

تغییر ساختار نوکلئوتیدیل ترانسفرازها

با وجود شباهت ساختمان هستهٔ DNA لیگازهای وابسته به NAD^+ و ATP و آنزیم‌های کلاهک گذار، این آنزیم‌ها طی واکنش دچار تغییر ساختار می‌شوند. DNA لیگازهای وابسته به ATP و آنزیم‌هایی که mRNA وابسته به GTP را کلاهک گذاری می‌کنند فاقد دمین ۱a ناحیهٔ اتصالی NMN هستند، در عوض مراحل ۱ و ۲ با چرخش دمین OB نسبت به دمین اتصالی نوکلئوتید، با هم جفت می‌شوند. این ساختار گذرا به خوبی با استفاده از ساختمان کریستالی آنزیم‌های کلاهک گذاری mRNA در ویروس *Chlorella* نشان داده شده است. دو مولکول از آنزیم‌های کلاهک گذار در ساختار متفاوت کریستاله شده‌اندکه به دو حالت فعال و غیر فعال دیده می‌شوند، در ساختار غیر فعال موتیف VI خارج از جایگاه فعال قرار دارد اما در ساختار فعال، دمین OB به موتیف VI اجازه می‌دهد که در جایگاه فعال قرار گیرد. موتیف VI که در نوکلئوتیدیل ترانسفرازها به صورت حفاظت شده است باعث هماهنگ کردن α و β فسفاتاز کوفاکتور GTP برای حملهٔ نوکلئوفیلی به وسیلهٔ جایگاه فعال لیزین و تشکیل حد واسط GMP -لیزین می‌شود. از طرفی باقی‌مانده‌های موتیف VI برای مرحلهٔ ۱ واکنش آنزیم‌های کلاهک گذار و لیگاز وابسته به ATP در ویروس *Chlorella* مورد نیاز می‌باشند (۲۴، ۲).

DNA لیگازهای چند دمینی

در ساختمان کریستالی به دست آمده از DNA لیگاز ۱ انسان علاوه بر اینکه دمین اتصالی DNA (DBD) جدیدی شناسایی شد، نشان داده شد که این آنزیم سوبستراهای DNA را نیز احاطه می‌کند. توالی آمینواسیدی ناحیهٔ DBD در DNA لیگازهای وابسته به ATP در یوکاریوت‌ها حفاظت شده است و این ناحیه برای فعالیت آنزیمی لیگازهای چند دمینی مورد نیاز است (۲۷-۲۵، ۲). شباهت ساختمانی بین DBD، DNA لیگاز ۱ انسان و دمین HhH لیگاز باکتریایی و همچنین ناحیهٔ فعال دمین HhH نشان می‌دهد که لیگازهای وابسته به NAD^+ می‌توانند سوبستراهای DNA را احاطه کنند (۱۸، ۲).

دمین OB-fold

در همهٔ DNA لیگازها دمین ۱ آدنیلاسیون به دمین ۲ حفاظت شده متصل شده است. دمین OB-fold علاوه بر اینکه در ساختمان DNA لیگاز *T7* و *Tfi* وجود دارد در ساختمان تعدادی از پروتئین‌ها که به DNA تک رشته‌ای و دو رشته‌ای و RNA متصل می‌شوند نیز وجود دارد. این دمین در انواع مختلف پروتئین‌ها نیز مشاهده شده است، از جمله در پروتئین‌های ریبوزومی باکتریایی S1 و S7، زیر واحدهای پروتئین رونویسی A، فاکتورهای آغازی رونویسی، پروتئین SSB، فاکتور IF1 ترجمه، پروتئین‌های CspA و CspB، انتهای تلومر پروتئین‌های اتصالی، پروتئین نوترکیب RuvA DNA و چندین tRNA سنتتاز مشاهده شده است (۳۱-۲۸، ۶). تعدادی از این دمین‌ها به لیگاندهای خود در سطح β-barrel متصل می‌شوند (۳۱). مطالعات بیوشیمیایی نشان می‌دهد که دمین OB لیگاز *T7* به DNA دو رشته‌ای متصل می‌شود و باعث افزایش فعالیت آدنیلاسیون در دمین

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from shefayekhatam.ir at 14:40 +0430 on Tuesday July 4th 2017

۱ می‌شـود. در سـاختمان لیـگاز *T7* دمیـن OB در فاصلـهٔ نسـبتاً دوری از دمیـن ۱ قـرار دارد، بنابرایـن دمیـن ۲ OB بـرای تحریـک فعالیـت آدنیلاسـیون دمیـن ۱ بایـد متحمـل تغییـرات سـاختاری عمیقـی شـود. دو سـاختمان کریسـتالی بـه دسـت آمـده از آنزیم‌هـای کلاهـک گـذار mRNA، شـواهد قطعـی بـرای ایـن قبیـل تغییـرات سـاختاری هسـتند کـه در طـول واکنـش گوانیلاسـیون در آنزیم‌هـای کلاهـک گـذار رخ می‌دهـد. ایـن واکنـش معـادل واکنـش آدنیلاسـیونی اسـت کـه توسـط DNA لیگازهـا کاتالیـز می‌شـود. در طـی ایـن تغییـرات سـاختاری کـه در آنزیم‌هـای کلاهـک گـذار PBCV-1 رخ می‌دهـد، باقی‌مانده‌هـای حفاظـت شـده‌ای در موتیف‌هـای V و VI مشـاهده می‌شـود کـه در محـل دمیـن OB قـرار دارنـد. موتیـف VI رشـتهٔ انتهایـی دمیـن ۲ را احاطـه کـرده اسـت. دو باقی‌مانـدهٔ (R295, R298) از موتیف‌هـای مشـابه در آنزیم‌هـای کلاهـک گـذار بـه دم تـری فسـفات GTP متصـل شـده‌اند کـه ایـن اتصـال بـرای حملـهٔ مسـتقیم بـه جایـگاه فعـال لیزیـن بـه کار مـی‌رود.

موتیف zinc finger

چهـار باقی‌مانـدهٔ حفاظـت شـدهٔ سیسـتئین (Cys406, Cys409, Cys422, Cys 427) در ناحیـهٔ C -ترمینـال لیگازهـای وابسـته بـه NAD^+ مشـاهده شـده اسـت کـه بـر اتصـالات zinc و برهم‌کنـش آن‌هـا بـا DNA دلالـت می‌کنـد. بـا اسـتفاده از اسپکتروسـکوپی[16] اتصـالات zinc در لیـگاز *Tfi* تأییـد شـده اسـت. در سـاختمان لیـگاز *Tfi*، zinc بـا اسـتفاده از چهـار باقی‌مانـدهٔ حفاظـت شـده سیسـتئین بـه صـورت لیگانـد چهـار وجهـی در آمـده اسـت. موتیـف zinc finger، زیـر دمینـی (۳a) از دمیـن ۳ لیـگاز *Tfi* اسـت. ایـن احتمـال وجـود دارد کـه همـهٔ لیگازهای وابسـته بـه NAD^+ دارای zinc finger هـای مشـابه باشـند. Zinc finger هـا و موتیف‌هـای وابسـته بـه آن‌هـا در شناسـایی DNA نقـش دارنـد و اغلـب توالی‌هـای خـاص DNA را شناسـایی می‌کننـد (۳۲).

موتیف HhH

Doherty و همکارانـش نشـان دادنـد کـه چهـار کپـی حفاظت شـده از موتیـف HhH در C -ترمینـال لیگازهـای وابسـته بـه NAD^+ حضـور دارد. ایـن موتیـف حـاوی دو هلیکـس بـا طـول حفاظـت شـده اسـت کـه توسـط β-turn نـوع ۲ متصـل می‌شـود. موتیف‌هـای HhH در تعـداد زیـادی از آنزیم‌هایـی کـه در ترمیـم DNA شـرکت می‌کننـد حضـور دارنـد، از جملـه در آنزیم‌هـای اندونوکلئـوس III، A1kA، MutY، DNA پلـی مـراز β و RuvA مشـاهده می‌شـود. اخیـراً تعییـن سـاختار لیگازهـای *Tfi* کـه لیگازهـای وابسـته بـه NAD^+ هسـتند وجـود چهـار موتیـف HhH را در ایـن سـاختارها تأییـد می‌کنـد (۳۵-۳۳).

دمین BRCT

اخیـراً یـک موتیـف نهایـی در هـر دو نـوع DNA لیـگاز (هـم وابسـته بـه ATP و هـم وابسـته بـه NAD^+) شناسـایی شـده اسـت کـه جزئـی از زیـر خانـوادهٔ دمیـن BRCT اسـت. دمین‌هـای BRCT در لیگازهـای وابسـته بـه NAD^+ و لیـگاز III و IV یوکاریوتـی حضـور دارنـد. دمیـن BRCT اولیـن بـار در سـاختمان لیـگاز *Tfi* شناسـایی شـده اسـت و بـه نظـر می‌رسـد کـه بخشـی از پروتئین‌هـای چنـد دمینـی باشـد. دمیـن BRCT لیـگاز *Tfi* حـاوی چهـار β-sheet مـوازی اسـت کـه توسـط سـه α-helix احاطـه شـده اسـت. ایـن دمیـن مشـابه دمیـن BRCT در C -ترمینـال پروتئیـن XRCC1 [17] اسـت. XRCC1 یـک پروتئیـن چنـد دمینـی اسـت کـه در ترمیـم شکسـت‌های تـک رشـتهٔ DNA نقـش دارد. دمیـن BRCT پروتئیـن XRCC1 بـا دمین‌هـای BRCT در C-ترمینـال DNA لیـگاز III پسـتانداران کمپلکـس تشـکیل می‌دهـد. لیگازهایـی کـه در ترمیـم DNA نقـش دارنـد از جملـه لیـگاز IV، بـا پروتئیـن XRCC4 کـه از جملـه پروتئین‌هـای اسـت کـه در فراینـد ترمیـم DNA نقـش دارد، بـر هم‌کنـش دارد کـه ایـن بـر هم‌کنـش از طریـق تکرارهـای مکـرر موتیـف BRCT صـورت می‌گیـرد. ایـن بـر هم‌کنش‌هـا بـه صـورت سـاختمانی ظاهـر می‌شـوند و احتمـالاً کمپلکس‌هـای DNA لیـگاز نواحـی از DNA آسـیب دیـده را بـه وسـیلهٔ بـر هم‌کنـش پروتئیـن -پروتئیـن بـه کار می‌گیرنـد. همچنیـن ممکـن اسـت دمین‌هـای BRCT باعـث انتقـال سـیگنال‌های پیـدا شـده در DNA آسـیب دیـده بـه دیگـر اجـزاء مکانیسـم‌های ترمیـم DNA شـود کـه از طریـق بـر هم‌کنش‌هـای پروتئیـن -پروتئیـن خاصـی صـورت می‌گیـرد. سـاختمان کریسـتالی لیـگاز *Tfi* نشـان می‌دهـد کـه دمیـن BRCT در کونفورماسـیون بـاز بسـیار متحـرک می‌باشـد در حالـی کـه ایـن تحـرک در کونفورماسـیون بسـته وجـود نـدارد (۳۷، ۳۶، ۶).

در لیـگاز *Bst*، موقعیـت زیـر دمیـن ۱a وابسـته بـه زیردمیـن ۱b در N -ترمینـال اسـت. زیردمیـن ۱a لیـگاز *Bst* بـا زاویهٔ ۹۰ درجـه اطـراف Pro68 می‌چرخـد کـه ایـن حالـت در لیـگاز *Tfi* هـم دیـده شـده اسـت. Lee و همکارانـش نشـان دادنـد کـه زیـر دمیـن ۱a در لیـگاز *Tfi* موقعیتـی مشـابه بـه لیـگاز *Bst* اتخـاذ می‌کنـد و سـپس بـا دمیـن BRCT بـر هم‌کنـش می‌دهـد. همچنیـن ممکـن اسـت دمیـن BRCT در حالتـی کـه بـا helix B در دمیـن ۱a در تمـاس اسـت سـا ختـار مارپیـچ شـکلی را تشـکیل می‌دهـد (۳۷).

مکانیسـم کاتالیتیکـی حفاظـت شـده بـرای DNA لیگازهـا و نوکلئوتیدیـل ترانسـفراز

DNA لیگازهـا مشـابه آنزیم‌هـای خانـوادهٔ نوکلئوتیدیـل ترانسـفرازها از حـد واسـطهای کـووالان AMP -آنزیـم تشـکیل شـده‌اند کـه در آن‌هـا AMP از طریـق لیزیـن بـه آنزیـم متصـل می‌شـود. ایـن لیزیـن قسـمتی از موتیـف ۱ حفاظـت شـده اسـت کـه در آنزیم‌هـای کلاهـک گـذار، RNA لیگازهـا و tRNA لیگازهـا نیـز پیـدا شـده اسـت.

[16] Spectroscopy
[17] X-ray repair cross-complementing protein 1

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from shefayekhatam.ir at 14:40 +0430 on Tuesday July 4th 2017

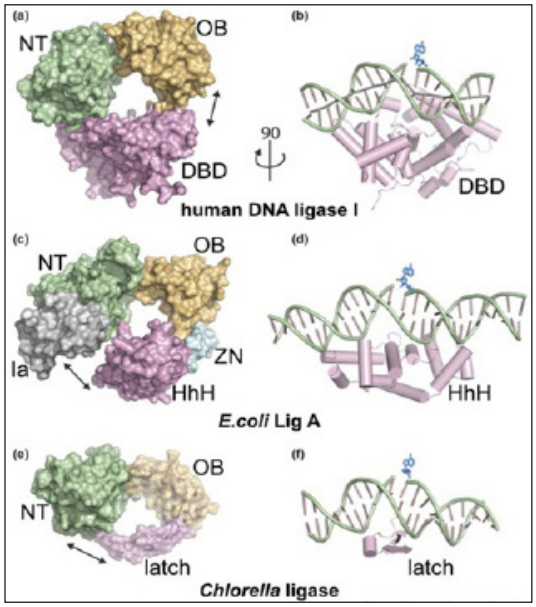
Shuman و Schwer پیشنهاد کردند که این آنزیم‌ها بخش معمول مکانیسم نوکلئوتیدیل ترانسفرازها هستند و احتمالاً ساختمان‌های مشابهی نیز دارند (۶). این مسئله از طریق آنالیزهای بیوشیمیایی آنزیم‌های موتاسیون یافته نیز تأیید شده است و اخیراً با استفاده از ساختمان DNA لیگاز *T7* و آنزیم‌های کلاهک گذار RNA ویروس *Chlorella* و همینطور دمین ۱ در N -ترمینال لیگاز *Bst* و لیگاز *Tfi* نیز این مسئله تأیید شده است. بررسی موقعیت توالی‌های حفاظت شدهٔ موتیف در ساختمان DNA لیگاز و آنزیم‌های کلاهک گذار نشان داد که این آنزیم‌ها به صورت خوشه اطراف نواحی اتصالی NTP قرار گرفته‌اند، از طرفی فرم جانبی شیار بین دمین I و II را نیز تشکیل می‌دهند. ساختمان کریستالی لیگازهای *Tfi* و *T7* نقش حفاظت شده‌ای را برای تعدادی از این باقی‌مانده‌ها در این موتیف‌ها نشان داده‌اند. بررسی توالی‌های حفاظت شده بین DNA لیگازها و آنزیم‌های کلاهک گذار و جفت شدن این آزمایشات با ساختمان‌های کریستالی اطلاعاتی راجع به چگونگی دست یافتن به نوکلئوتیدهای اختصاصی را نشان می‌دهد (۳۹). دو بر هم‌کنش مهم بین گروه 6-amino حلقهٔ آدنین و لیگازها وجود دارد؛ یکی از طریق زنجیرهٔ اصلی کربونیل I133/H115 و دیگری از طریق زنجیرهٔ جانبی E32/E114 صورت می‌گیرد. باقی‌ماندهٔ آخر معمولاً Glu است ولی گاهی اوقات در لیگازهای وابسته به ATP، Asp یا Gln نیز می‌تواند حضور داشته باشد. اما در مقایسه با این‌ها این باقی‌مانده‌ها در آنزیم‌های کلاهک گذار متنوع هستند اما هیچ گاه Glu، Asp و Gln نیستند (۶، ۳۸).

Ho و Shuman پیشنهاد کردند که همهٔ نوکلئوتیدیل ترانسفرازها از یک جد مشترک منشأ گرفته‌اند، و احتمالاً آنزیم‌های متصل کنندهٔ RNA های قدیمی هستند. بیشتر مطالعاتی که بر روی RNA لیگازها صورت گرفته است به RNA لیگاز ۱ در باکتریوفاژ(*T4* Rnl1) متمرکز شده است، که یک خانوادهٔ کوچکی از RNA لیگازها است که در برخی یوکاریوت‌ها و ویروس‌های یوکاریوت تقسیمات نزدیک به هم دارد. اگرچه Rnl1 نمونهٔ ضعیفی برای نوکلئوتیدیل ترانسفرازهای اجدادی است اما بخش کوچکی از توالی‌های آن با DNA لیگازها و آنزیم‌های کلاهک گذار RNA همولوژی دارد و تنها موتیف‌های I، IV، V نوکلئوتیدیل ترانسفرازها محفوظ مانده است. اخیراً نیز RNA لیگاز ۲ (Rnl2)، لیگاز دیگری است که از باکتریوفاژ *T4* به دست آمده است. بر خلاف Rnl1، Rnl2 توالی‌های مشابهی با DNA لیگاز و آنزیم‌های کلاهک گذار RNA دارد که شامل موتیف‌های حفاظت شدهٔ I، III، IIIa، IV، V نوکلئوتیدیل ترانسفرازها است (۶، ۳۹).

نوکلئوتیدیل ترانسفرازها مکانیسم‌های پایه‌ای مشابهی دارند که در مورد RNA لیگاز وقتی شروع می‌شود که مولکول ATP به وسیلهٔ گروه نوکلئوفیل لیزین متصل می‌شود و آدنیلاسیون آنزیم و رها شدن پیروفسفات اتفاق می‌افتد. آنزیم بارگذاری شده سپس نیمی از AMP را به انتهای فسفات ۵′ منتقل می‌کند و پس از آن پیوند فسفو آن هیدرید تشکیل می‌شود (۶، ۳۹).

گیره‌های پروتئینی لیگاز

گیره‌های پروتئینی در طی چندین مکانیسم به وسیلهٔ DNA لیگازها شکل می‌گیرند و با استفاده از دمین‌های مختلف و اجسام ساختمانی که از امتداد یافتن نواحی مختلف NTase و OB به وجود آمده‌اند، DNA را احاطه می‌کنند. در لیگاز *Chlorella*، در حالتی که بست شده است، برآمدگی‌های دمین OB با سوبسترای DNA بر هم‌کنش دارد و دمین OB به دمین NTase متصل شده است. دمین HhH باکتری‌ها از امتداد یافتن C -ترمینال دمین‌های NTase و OB به وجود آمده است، در حالی که DBD یوکاریوت‌ها از امتداد یافتن N -ترمینال دمین‌های NTase و OB به وجود آمده است (۴۱، ۴۰، ۱۸، ۳). در تصویر ۶ گیره‌های پروتئینی DNA لیگازهای مختلف نشان داده شده است. در این تصویر DNA (a) لیگاز ۱ انسان، (c) *E. coli* LigA، (e) لیگاز *Chlorella*. پیکان دو سر نشان دهندهٔ نقطه انفصال در گیره‌های لیگاز است. (b) سوبستراهای DNA را در مجاورت DBD لیگاز ۱ انسان نشان می‌دهد. (d) دمین HhH لیگاز A در *E. coli* و (f) قفل شدن لیگاز *Chlorella*.



تصویر ۶- گیره‌های پروتئین DNA لیگاز (۳).

واکنش زنجیره‌ای لیگاز (LCR)

واکنش زنجیره‌ای لیگاز (LCR)[18]، یکی از روش‌های گسترش DNA است. در این روش از دو جفت اولیگو نوکلئوتید استفاده می‌شود، که یکی مکمل با رشتهٔ الگو بالا و دیگری مکمل با رشتهٔ الگو پائین است،

[18] Ligase chain reaction

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from shefayekhatam.ir at 14:40 +0430 on Tuesday July 4th 2017

سـپس گـروه فسـفات ′۵ یـک رشـته بـا گـروه ′۳ رشـتهٔ مجـاور بـا هـم جفـت می‌شـوند. LCR هـم در آنزیم‌هـای DNA پلـی مـراز و هـم DNA لیـگاز جهـت پیـش بـردن واکنـش اسـتفاده می‌شـود. LCR هماننـد PCR بـه یـک سـیکل دمایـی جهـت پیـش رفتـن واکنـش نیـاز دارد. LCR روشـی اسـت جهـت سـنجش و شناسـایی موتاسـیون‌های تـک بـازی، بـا اسـتفاده از روش LCR می‌تـوان تعـداد زیـادی از موتاسـیون‌های انسـانی را شناسـایی کـرد کـه از جملـهٔ ایـن موتاسـیون‌ها بیمـاری سـایکل سـل اسـت کـه در اثـر موتاسـیون در یـک بـاز از ژن β-globin بـه وجـود می‌آیـد (۴۲، ۴۳).

کاربرد DNA لیگاز در زیست مولکولی

DNA لیـگاز ابـزار مناسـبی در زیسـت مولکولـی بـرای تولیـد DNA هـای نوترکیـب اسـت، بـرای مثـال DNA لیگازهـا همـراه بـا آنزیم‌هـای محـدود کننـده بـرای انتقـال یـک قطعـهٔ DNA (اغلـب ژن) بـه درون پلاسـمید بـه کار می‌رونـد. DNA لیـگاز در فرایندهـای مهـم از جملـه رونویسـی DNA، ترمیـم DNA آسـیب دیـده، نوترکیبـی DNA، بازآرایـی ژن ایمونوگلوبولیـن، RNA editing و اتصـال قطعـات اکازاکـی مـورد نیـاز اسـت (۴۴).

نتیجه‌گیری

DNA لیگازهـا یـک کاندیـد ایـده‌آل بـرای مطالعـات سـاختاری همـهٔ حـد واسـطها در مسـیر اتصـال پایـدار هسـتند. در ایـن مقالـه تصاویـری از سـاختمان DNA لیگازهای وابسـته بـه ATP و NAD^+ و آنزیم‌هـای وابسـته بـه آن‌هـا در کنفورماسـیون‌های کاتالیکـی مختلـف نشـان داده شـده اسـت کـه بیانگـر نقـش ایـن خانـواده از آنزیم‌هـا در مکانیسـم‌های کاتالیـزوری حفاظـت شـده اسـت. بـا وجـود داشـتن توالی‌هـای آمینواسـیدی متفـاوت، بـه نظـر می‌رسـد کـه DNA لیگازهـای وابسـته بـه ATP و NAD^+ هـر دو یـک هسـتهٔ سـاختمانی مشـترکی دارنـد کـه مسـئول شناسـایی شـکاف هسـتند. سـاختمان کریسـتالی نقـش کاتالیـزوری توالی‌هـای حفاظـت شـده را روشـن و تأییـد می‌کنـد. آنزیم‌هـای ویروسـی از جملـه *T7* و *Chlorella* برخـی از خـواص کاتالیتیکـی لیگازهـای باکتریایـی و یوکاریوتـی را دارا می‌باشـند. لیگازهـای بزرگ‌تـر دومین‌هـای اضافـی دارنـد کـه بـه احتمـال زیـاد بـه منظـور افزایـش خـواص معینـی از ایـن آنزیم‌هـا از جملـه اتصـال DNA، شناسـایی شـکاف و هـدف قـرار دادن آنزیـم، همانندسـازی و نوترکیبـی در ناحیـهٔ آسـیب دیـده DNA می‌باشـد. امـا ایـن دومین‌هـای اضافـی بـه نظـر نمی‌رسـد کـه مسـتقیماً در کاتالیـز نقـش داشـته باشـند.

منابع

1. International union of biochemistry and molecular biology. www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/.

2. Alan ET, Sangeetha V, John MP, Tom E. DNA ligases: structure, mechanism, and function. Chem Rev. 2006; 106(2): 687-99.

3. John MP. DNA and RNA ligases: structural variations and shared mechanisms. Curr Opin Struc Biol. 2008; 18(1): 96-105.

4. Lehman IR. DNA ligase: structure, mechanism, and function. Science. 1974; 186(4166): 790-7.

5. Shuman S, Lima CD. The polynucleotide ligase and RNA capping enzyme superfamily of covalent nucleotidyltransferase. Curr Opin Struct Biol. 2004; 14(6): 747-64.

6. Aidan JD, Se WS. Structural and mechanistic conservation in DNA ligases. Nucleic Acids Res. 2000; 28(21): 4051-8.

7. Shaun H, Mohinder S, Michael JG. Cloning and expression in E.coli of a synthetic gene for the bacteriocidal protein caltrin/seminalplasmin. Protein Enz. 1987; 5(1): 425-31.

8. Jayakrishnan N, Kiong CH, Christopher DL, Stewart Sh. RNA substrate specificity and structure-guided mutational analysis of bacteriophage t4 rna ligase 2. Gene. 2004; 142: 129-34.

9. Aravind L, Koonin EV. Gleaning non-trivial structural, functional and evolutionary information about proteins by iterative database searches. J Mol Biol. 1999; 287(5): 1023-40.

10. Montecucco A, Fontana M, Focher F, Lestingi M, Spadari S, Ciarrocchi G. Specific inhibition of human DNA ligase adenylation by a distamycin derivative possessing antitumor activity. Nucleic Acids Res. 1991; 19(5): 1067-72.

11. Akey D, Martins A, Aniukwu J, Glickman MS, Shuman S, Berger JM. Crystal structure and nonhomologous end-joining function of the ligase component of Mycobacterium DNA ligase D. J Biol Chem. 2006; 281(19): 13412-23.

12. Pascal JM, Tsodikov OV, Hura GL, Song W, Cotner EA, Classen S, et al. A flexible interface between DNA ligase and PCNA supports conformational switching and efficient ligation of DNA. Mol Cell. 2006; 24(2): 279-91.

13. Odell M, Sriskanda V, Shuman S, Nikolov DB. Crystal structure of eukaryotic DNA ligase-adenylate illuminates the mechanism of nick sensing and strand

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from shefayekhatam.ir at 14:40 +0430 on Tuesday July 4th 2017

joining. Moll cell. 2000; 6(5): 1183-93.

14. Sriskanda V, Shuman S. Mutational analysis of Chlorella virus DNA ligase: catalytic roles of domain I and motif VI. Nucleic Acids Res. 1998; 26(20): 4618-25.

15. Sriskanda V, Shuman S. Specificity and fidelity of strand joining by Chlorella virus DNA ligase. Nucleic Acids Res. 1998; 26(15): 3536-41.

16. Gajiwala KS, Pinko C. Structural rearrangement accompanying NAD+ synthesis within a bacterial DNA ligase crystal. Structure. 2004; 12(8): 1449-59.

17. Tomkinson AE, Tappe NJ, Friedberg EC. DNA ligase I from Saccharomyces cerevisiae: physical and biochemical characterization of the CDC9 gene product. Biochemistry. 1992; 31(47): 11762-71.

18. Jeon HJ, Shin HJ, Choi JJ, Hoe HS, Kim HK, Suh SW, et al. Mutational analyses of the thermostable NAD+-dependent DNA ligase from Thermus filiformis. FEMS Microbiol Lett. 2004; 237(1): 111-8.

19. Sriskanda V, Shuman S. Chlorella virus DNA ligase: nick recognition and mutational analysis. Nucleic Acids Res. 1998; 26(2): 525-53.

20. Hakansson K, Doherty AJ, Shuman S, Wigley DB. X-ray crystallography reveals a large conformational change during guanyl transfer by mRNA capping enzymes. Cell. 1997; 89(4): 545-53.

21. Singleton MR, Håkansson K, Timson DJ, Wigley DB. Structure of the adenylation domain of an NAD-dependent DNA ligase. Structure. 1999; 7(1): 35-42.

22. Shuman S, Schwer B. RNA capping enzyme and DNA ligase: a superfamily of covalent nucleotidyl transferases. Mol Microbiol. 1995; 17(3): 405-10.

23. Pascal JM, O'Brien PJ, Tomkinson AE, Ellenberger T. Human DNA ligase I completely encircles and partially unwinds nicked DNA. Nature. 2004; 432(7016): 473-8.

24. Hakansson K, Doherty AJ, Shuman S, Wigley DB. X-ray crystallography reveals a large conformational change during guanyl transfer by mRNA capping enzymes. Cell. 1997; 89(4): 545-53.

25. Tomkinson AE, Tappe NJ, Friedberg EC. DNA ligase I from saccharomyces cerevisiae: physical and biochemical characterization of the CDC9 gene product. Biochemistry. 1992; 31(47): 11762-171.

26. Sriskanda V, Schwer B, Ho CK, Shuman S. Mutational analysis of Escherichia coli DNA ligase identifies amino acids required for nick-ligation in vitro and for in vivo complementation of the growth of yeast cells deleted for CDC9 and LIG4. Nucleic Acids Res. 1999; 27(20): 3953-63.

27. Grawunder U, Zimmer D, Leiber MR. DNA ligase IV binds to XRCC4 via a motif located between rather than within its BRCT domains. Curr Biol. 1998; 8(15): 873-6.

28. Bycroft M, Hubbard JP, Proctor M, Freund MV, Murzin AG. The solution structure of the S1 RNA binding domain: a member of an ancient nucleic acid-binding fold. Cell. 1997; 88: 235-42.

29. Horvath MP, Schweiker VL, Bevilacqua JM, Ruggles JA, Schultz SC. Crystal structure of the oxytricha nova telomere end binding protein complexed with single strand DNA. Cell. 1998; 95(7): 963-74.

30. Schindler T, Perl D, Graumann P, Sieber V, Marahiel MA, Schmid FX. Surface-exposed phenylalanines in the RNP1/RNP2 motif stabilize the cold-shock protein CspB from Bacillus subtilis. Proteins. 1998; 30(4): 401-6.

31. Murzin AG. OB (oligonucleotide oligosaccharide binding)-fold-common structural and functional solution for nonhomologous sequences. EMBO J. 1993; 12(3): 861-7.

32. Klug A, Schwabe JW. Protein motifs 5. Zinc fingers. FASEB J. 1995; 9(8): 597-604.

33. Rafferty JB, Sedelnikova SE, Hargreaves D, Artymiuk PJ, Baker PJ, Sharples GJ, et al. Crystal structure of DNA recombination protein RuvA and a model for its binding to the holliday junction. Science. 1996; 274: 415-21.

34. Roe SM, Barlow T, Brown T, Oram M, Keeley A, Tsaneva IR, et al. Crystal structure of an octameric RuvA-holliday junction complex. Mol Cell. 1998; 2(3): 361-72.

35. Doherty AJ, Serpell LC, Ponting CP. The helix-hairpin-helix DNA-binding motif: a structural basis for non-sequence-specific recognition of DNA. Nucleic Acids Res. 1996; 24(13): 2488-97.

36. Bork P, Hofmann K, Bucher P, Neuwald AF, Altschul SF, Koonin EV. A superfamily of conserved domains in DNA damage-responsive cell cycle checkpoint proteins. FASEB J.1997; 11(1): 68-76.

37. Callebaut I, Mornon JP. From BRCA1 to RAP1: a widespread BRCT module closely associated with DNA repair. FEBS let. 1997; 400(1): 25-30.

38. Steitz TA, Smerdon SJ, Jäger J, Joyce CM. A unified

www.SID.ir

Archive of SID

polymerase mechanism for nonhomologous DNA and RNA polymerases. Science. 1994; 266(5193): 2022-5.

39. Kletzin A. Molecular characterisation of a DNA ligase gene of the extremely thermophilic archaeon desulfurolobus ambivalens showes close phylogenetic relationship to eukaryotic ligases. Nucl. Acids Res. 1992; 20(20): 5389-96.

40. Nair PA, Nan dJ, Smith P, Odell M, Lima CD, Shuman S. Structural basis for nick recognition by a minimal pluripotent DNA ligase. Nat Struct Mol Biol. 2007; 14(8): 770-8.

41. Nandakuma RJ, Nair PA, Shuman S. Last stop on the road to repair: structure of E. coli DNA ligase bound to nicked DNA- adenylate. Mol Cell. 2007; 26(2): 257-71.

42. Wiedmann M, Wilson WJ, Czajka J, Luo J, Barany F, Batt CA. Ligase chain reaction (LCR) overview and applications. PCR Methods Appl. 1994; 3(4): 51-64.

43. Xiangxian M, Xiaohai Y, Kemin W, Qiuping G, Yongjun T, Qiuhua M, et al. Direct fluorescence detection of point mutations in human genomic DNA using microbead-based ligase chain reaction. Talanta. 2010; 80(5): 1725-9.

44. Rittié L, Perbal B. Enzymes used in molecular biology: a useful guide. J Cell Commun Signal. 2008; 2(1-2): 25-45.

Downloaded from shefayekhatam.ir at 14:40 +0430 on Tuesday July 4th 2017

www.SID.ir