مقـاله مـروری

همسانه‌سازی ژنوم‌های کامل و قطعات بزرگ DNA

بهرام حمیدی*، فیروز ابراهیمی، مصیب رستمیان

گروه و مرکز تحقیقات زیست شناسی، دانشگاه امام حسین (ع)، تهران، ایران

چکیده/همسانه سازی قطعات بزرگ DNA در خیلی از موارد برای مطالعه دقیق تر قطعات کلون شده ضروری است از این رو تلاش‌های زیادی برای همسانه سازی قطعات بزرگ DNA یی و حتی ژنوم‌های کامل صورت گرفته است . مطالعات صورت گرفته نشان می‌دهد که با بهره گیری از روش‌های معمول ژنتیکی می‌توان این قطعات بزرگ و حتی ژنومهای کامل اندامکی ، باکتریایی و ویروسی را همسانه سازی نمود .این کار می‌تواند از طریق همسانه سازی قطعات ژنومی همپوشان که در نهایت از طریق نوترکیبی، ژنوم کامل را ایجاد می‌نمایند و یا همسانه سازی پیوسته ژنوم کامل صورت گیرد. قطعات ژنومی ممکن است از طریق فرآیندی موسوم به inch worm elongation و از طریق جایگاههای نشست موسوم به LPA و یا به طور مستقیم از طریق نوترکیبی وارد حامل شده و به میزبان انتقال می‌یابند. ژنوم کامل نیز به کمک حامل‌های ویژه طراحی شده وارد ژنوم میزبان گردد.کارهای انجام شده نشان می‌دهد با بهره گیری از حامل‌های اختصاصی مناسب و فرآیندهای معمول ژنتیکی نظیر نوترکیبی و یا تبدیل ژنی که در ارگانیسم‌های زنده صورت می‌گیرد و همچنین توانایی ترانسپوزون‌ها و عناصر دخولی در این زمینه ، می‌توان به این مهم اقدام نمود.

واژگان کلیدی: همسانه سازی مولکولی؛ ژنوم؛ نوترکیبی ژنتیک.

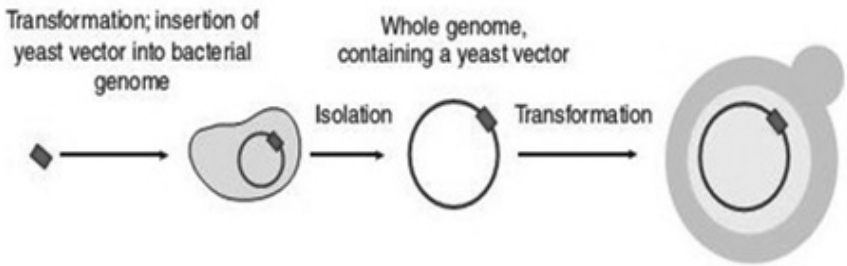
مقدمه

فناوری همسانه سازی[1] DNA یک تکنیک معمول و جا افتاده در زیست شناسی مدرن است که معمولا انتقال چندین ژن را شامل می‌شود. اخیرا هیجان برای همسانه سازی قطعات بزرگ DNA و حتی همسانه سازی کل ژنوم افزایش یافته است. به عنوان مثال ژنوم چندین اندامک سلولی تا به حال همسانه سازی شده است. ژنوم ۱۶ Kb میتوکندری موش در باکتری‌های *اشرشیاکلی*[2] *(۲و۱)*، *باسیلوس سوبتیلیس*[3] *(۳و۱)* و همچنین در مخمر[4] (٤) همسانه‌سازی شده است. همچنین ژنوم ۱۳۵ Kb کلروپلاست برنج در *باسیلوس سوبتیلیس* همسانه سازی شده است (۱). ژنوم‌های ویروسی نیز در باکتری *E.coli* همسانه سازی شده است که ازآن میان می‌توان به *هرپس ویروس*[5] (۵)، *باکولو ویروس*[6] (۸-٦)، *کورونا ویروس*[7](۹) و *پوکس‌ویروس*[8] (۱۰) اشاره نمود. ژنوم ۳٦ Kb *آدنوویروس* انسانی تیپ ۲[9](۱۱) و همچنین قطعات ۱۷۸ Kb ژنوم *سیتو مگالوویروس*[10] انسانی در مخمر همسانه‌سازی شده است (۱۲). در مورد باکتری‌ها نیزتقریبا۱۰٪ از ژنوم ۱/۸ Kb *هموفیلوس آنفولانزا*[11] در باکتری *E.coli* همسانه سازی شده است(۱۳). ژنوم ۳/۵ Mb باکتری *synechocytis* نیز به صورت چهارقطعه غیر ممتد وارد ژنوم *باسیلوس سوبتیلیس* شده است(١٤). به علاوه ژنوم

1. DNA cloning
2. Escherichia coli
3. Bacillus subtilis
4. yeast
5. herpes virus
6. Baculovirus
7. Coronavirus
8. poxvirus
9. human adenovirus type 2
10. Cytomegalovirus
11. Haemophilus influenzae

* بهرام حمیدی، کارشناس ارشد
تهران، نوبنیاد، بزرگراه شهید بابایی، دانشگاه امام حسین (ع)، گروه و مرکز تحقیقات زیست شناسی پست الکترونیک: hamidibahram@gmail.com
تاریخ دریافت: ۹۱/۰۷/۱۵. تاریخ پذیرش: ۹۱/۰۸/۲۸

Archive of SID
www.SID.ir



شکل۱: همسانه سازی کامل ژنوم مایکوپلاسما در مخمر "." ژنوم باکتری (دایره آبی) باید حاوی توالی مخمری باشد این توالی‌ها در حامل که به رنگ قرمز نشان داده شده قرار داده شده اند.

Mb ٦/، *Mycopplasma genitalium* در مخمر همسانه سازی شده است (١٦و١٥). همچنین این کار برای ژنوم Mb ١/١ و طبیعی M.mycoids زیر گونه Capari صورت گرفته است(١٧). موارد ذکر شده نشان می‌دهد که همسانه کردن کامل ژنوم ارگانیسم‌های مختلف به منظور دستکاری‌های ژنتیکی می‌تواند با استفاده از این روش‌های معمول ژنتیکی در مخمر صورت گیرد. انتقال ژنوم کامل که اخیرا و با کارهای ذکر شده صورت گرفته است این امکان را فراهم نموده است، تا بتوان ژنوم‌های تغییر یافته ای را ایجاد نموده و آن‌ها را دوباره به ارگانیسم‌های اصلی بازگرداند. همسانه سازی کامل ژنوم، مطالعه ارگانیسم‌هایی که کشت آنها به آسانی صورت نمی گیرد را امکان پذیر می‌سازد. علاوه بر این امر به ساخت و تکثیر ژنوم‌های صناعی کمک می‌نماید.

استراتژی‌های به کار رفته به منظور همسانه سازی ژنوم‌های کامل

با توجه به کارهای انجام شده به طور کلی برای همسانه سازی ژنوم‌های کامل ارگانیسم‌ها و اندامک‌های مختلف سلولی نظیر میتوکندری وکلروپلاست از دو روش کلی استفاده می‌شود. در یک روش ژنوم به قطعات کوچک تر تقسیم می‌شود. سپس این قطعات به طور جداگانه در میزبان مناسب و با استفاده از حامل‌های اختصاصی همسانه سازی شده و تکثیر می‌شوند. این روش مشابه ساخت کتابخانه‌های ژنومی با استفاده از کروموزوم‌های مصنوعی باکتر یایی و مخمری است. در روش دوم با استفاده از تکنیک‌های معمول ژنتیکی، ژنوم به صورت کامل و یک پارچه در میزبان مورد نظر وارد شده و تکثیر می‌یابد. بدین منظور نیز بر حسب مورد، از استرا تژی‌های مختلف استفاده می‌شود. اما به طور کلی در این مورد نیز به دو طریق عمل می‌شود. این کار ممکن است از طریق وارد کردن حامل‌های اختصاصی و ویژه‌ای طراحی شده به ژنوم مورد نظر و انتقال محصول نوترکیب ایجاد شده به میز بان و یا ترانس فورماسیون همزمان [12] میزبان به وسیله حامل و ژنوم صورت گیرد.

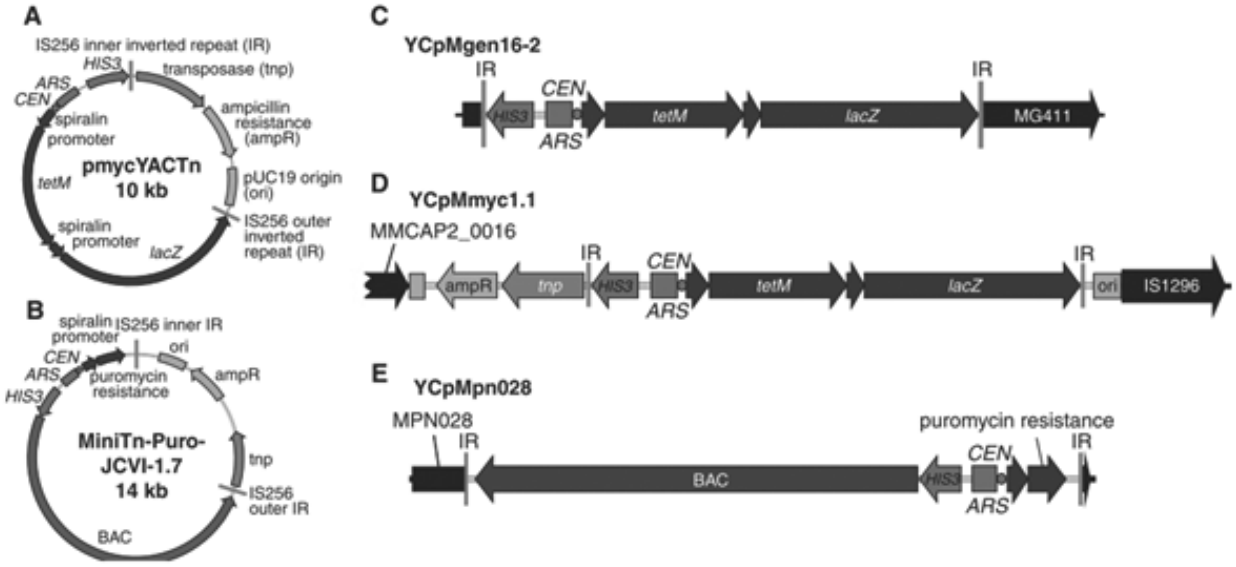
اتصال حامل به ژنوم و انتقال مجموعه نوترکیب حاصله به میزبان

بدین منظور، ورود حامل در ژنوم، باید در نقطه ای صورت گیرد که عملکرد ژنوم دچار اختلال نشود. این روش در مواردی که هدف از انتقال ژنوم به دست آوردن یک ژنوم فعال و زنده باشد حائز اهمیت است. مزیت دیگر استفاده از این روش عدم نیاز به آگاهی از توالی ژنوم مورد نظر می‌باشد. اگر از این روش برای همسانه سازی ژنوم کامل یک باکتری استفاده می‌شود، باید توجه نمود که باکتری مورد نظر قابل ترانسفورمه شدن با حامل باشد(١٨). هرچند که به نظر نمی رسد این امر مانع جدی تلقی شود چراکه می‌توان این کار را در محیط in vitro و برای ژنوم جداسازی شده انجام داد(١٩).

موفقیت دراستفاده از این روش منوط به طراحی حامل‌های[13] مناسب می‌باشد. حامل طراحی شده باید بتواند خود را به ژنوم متصل نموده، همچنین تکثیر ژنوم در میزبان و انتخاب کلون‌های نوترکیب را تضمین نماید. به عبارت دیگر این حامل‌ها باید دارای عناصری باشند که اتصال حامل به ژنوم را تسهیل نموده و همچنین سبب تکثیر ژنوم هدف در میزبان گردند. از طرف دیگر باید یک سیستم مناسب را برای انتخاب کلون‌های نوترکیب فراهم نمایند. به منظور ورود حامل در ژنوم ممکن است از توالی‌های همولوگ با ژنوم در محل ورود استفاده شود که امکان ورود حامل در ژنوم از طریق نوترکیبی همولوگوس را فراهم می‌نماید(٢٠) و یا ممکن است از توانایی ترانسپوزون‌ها[14] و توالی‌های

12. cotransformation
13. vector
14. transposons

Archive of SID
www.SID.ir



شکل۲: حامل‌های مخمری که در ژنوم‌های M.genitalium، M.mycoids، M.pneumoniae نشان داده شده‌اند. "A" وB دو حامل شاتلی مورد استفاده قرار گرفته اند(C-E). محل ورود حامل در هر کدام از ژنوم‌ها را نشان می‌دهد. نشانگرهای مایکو پلاسمایی به رنگ آبی، توالی‌های مربوط به حامل با رنگ قرمز و اسکلت پلاسمیدی نیز به رنگ نارنجی نشان داده شده است، توالی BAC با رنگ قهوه ای و عناصر ترانسپوزونی با رنگ سبز نشان داده شده است. توالی مایکوپلاسمایی نیز با رنگ سیاه نشان داده شده است.

دخولی[15] در ورود به ژنوم، برای اتصال حامل به ژنوم استفاده شود (۱۹و۱۸). نقطه ورود حامل در ژنوم به نحوی انتخاب می شود که در عملکرد ژنوم اختلال ایجاد ننماید(۱۸).

برای تکثیر ژنوم همسانه سازی شده نیز ممکن است از نقاط شروع تکثیر باکتریایی نظیر ori گاما (۱۹) و یا توالی های خود مختار همانندسازی[16] ARS برحسب میزبان به کار رفته، استفاده شود (۱۸). به منظور انتخاب کلون‌های نوترکیب نیز به طور معمول از ژن‌های ایجاد کننده مقاومت آنتی بیو تیکی استفاده می‌شود (۲۰و۱۹و۱۸). حامل طراحی شده با خصوصیات ذکر شده، از طریق نوترکیبی همولوگوس به کمک توالی‌های همولوگ پیش بینی شده در حامل(۲۰) و یا ترانسپوزون‌ها و عناصر دخولی وارد ژنوم می‌شود (۱۹و۱۸). به عنوان مثال می‌توان به حامل‌های *miniTn-puro-JCVI-1.7* ، *pmycYACTn* که در همسانه سازی ژنوم‌های *M.pneumoniae*، *M.mycoids*، M.genitalium ، و حامل ویژه ای که برای همسانه سازی ژنوم میتوکندری موش در *E.coli* به کار رفته شده است اشاره نمود(۱۸).

حامل pmycYACTn متشکل از: تعداد زیادی از ori ی حاصل از پلاسمید PUC19، ژن مقاومت به آمپی سیلین[17]، ترانسپوزاز[18] IS256 و توالی‌های تکراری معکوس برای انتقال به ژنوم Mycoplasma، ژن‌های *tet* و *lacz* برای انتخاب و غربال گری و ARS وCEN[19] یا همان توالی سانترومری برای تکثیر ژنوم و نشانگر ویژه مخمری، HIS3 می‌باشد. حامل miniTn-puro-JCVI-1.7 مشابه حامل pmycYACTn می‌باشد، با این تفاوت که فاقد ژن lacz بوده و به جای آن دارای ژن مقاومت به پوروماسین[20] می‌باشد. این حامل همچنین شامل کروموزوم مصنوعی باکتریایی[21] می‌باشد. هنگامی که حامل‌های miniTn-puro-JCVI-1.7 و pmycYACTn از طریق الکتروپورشن[22] و یا به کمک تیمار با مواد شیمیایی وارد Mycoplasma می‌شوند، همانطور که انتظار می‌رود به کمک عناصر دخولی وارد ژنوم باکتر یابی می‌شوند. این دخول همراه با از دست دادن ترانسپوزاز می‌باشد، که از جا به جائی توالی‌های دخولی پس از ورود آن به ژنوم جلوگیری می‌نماید. بررسی‌های انجام شده با استفاده از توالی یابی مستقیم و به کمک پرایمرهای طراحی شده برای توالی‌های ویژه حامل، وارد شدن

15. insertion sequence element
16. autonomously replicating sequence
17. Ampicillin
18. transposase
19. Centrosome
20. Puromycin
21. bacterial artificial chromosome (BAC)
22. Electroporation

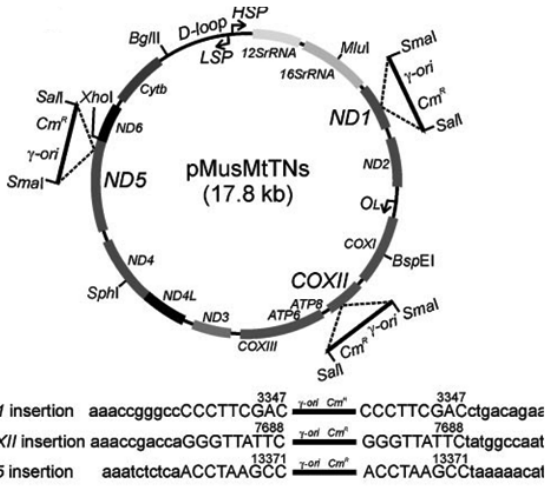
Archive of SID

www.SID.ir

حامـــل در توالی ژنوم را تایید می‌نماید. ورود حامل همراه با مضاعف شدن چندین جفت باز از حامل و حذف چندین جفت باز از توالی ژنوم باکتری در مقایسه با ژنوم دست نخورده است. ژنوم باکتریایی همراه با حامل، از هر سه باکتری جدا شده و به همراه اسفروبلاست‌های [۲۳] مخمری سوش , ۴N-VL۶ سویه ی مخمری توسعه یافته ای که میزان بالایی از ترانسفورماســیون را نشان می‌دهد، انکوبه می‌شوند. به این ترتیب ژنوم نوترکیب وارد میزبان مخمری می‌گردد. بررسی‌های انجام شده با multi plex- PCR برای شاخص‌های انتخابی که در ژنوم باکتریایی حضور دارند و همچنین تعیین اندازه قطعات حاصل از ژنوم کلون شــده و نیز استفاده از ساترن بلات [۲۴] همسانه سازی ژنوم کامل باکتریایی در مخمر را تائید می‌نماید(۱۸).

به منظور همسانه سازی ژنوم میتوکندری موش در باکتری *E.coli* نیز از یک حامل ترانسپوزونی که شامل ori گامای حاصل از پلاسمید R۶K، ژن مقاومت به کلرا مفنیکل[۲۵] *cmr* و جایگاه تشخیصی ترانسپوزون Tn۵ و توالی‌های موزائیکی انتهای آن ME می‌باشد، استفاده شده است. حامل ذکر شده از طریق PCR و با استفاده ازپلاسمید p2cym به عنوان الگو و پرایمرهایMEsalcm2 و MEsmalori آماده می‌شــود. این پرایمرها دارای توالی bp۱۹ جایگاه تشخیصی ترانسپونرون Tn5 و جایگاههای اختصاصی برای SalI و smaI در انتهای' ۵ و توالی اختصاصی پلاســمید در انتهای ' ۳ می‌باشد. (شکل ۳)

حامل ترانسپوزونی سنتز شده به همراه DNA ی میتوکندریای خالص شــده از سلول‌ها ی کبدی موش و ترانسپونرانر Tn5 فعال، مخلوط می‌شوند. نتیجه این امر وارد شدن حامل ترانسپونرونی به DNA ی میتوکندریایی است. بررسی انجام شده از طریق توالی یابی مستقیم با استفاده از پرایمرهای اختصاصی برای حامل سنتز شده نشان دهنده ورود آن در ژن‌های *ND1,coxII* و *ND5* به ژنوم میتوکندری است، این امر همراه با مضاعف شدن ۹bp در محل ورود به ژنوم می‌باشد. محصول به دست آمده از طریق الکتروپورشن وارد باکتری‌های *E.coli* ,که دارای یک کپی از ژن R6Kpir می‌باشند می‌گردد. این ژن پروتئین π لازم برای آغاز تکثیر از جایگاه گاما ori را فراهم می‌آورد. استفاده از توالی یابی مستقیم و ساخت نقشه محدود کننده همسانه سازی mtDNA در باکتری E.coliرا نشان می‌دهد. نکته جالب توجه آن که باز یابی mtDNA ی کلون شــده در باکــتری E.coli و انتقال مجدد آن به میتوکندری فاقد DNA، ســبب ان سر گیری رونوشت برداری از ژنوم مهندسی شده می‌گردد که این امر نشان دهنده فعال بودن ژنوم کلون شده است(۱۹).



شکل۳: همسانه سازی mt DNA موش با واکنش ترانسپوزونی در محیط in vitro و محل ورود ترانسپوزون‌ها "."یک ترانسپوزون سنتز شده به طول ۱,۵ kb که شامل ori گامای حاصل از پلاسمید R6K می‌باشد سنتز می‌شود. *Cmr* و دو توالــی فعال موزاییکی انتهایی در مجاورت محل برش آنزیم‌های *SalI* و *smaI* قرار گرفته اند. ترانسپوزون‌ها به ترتیب در ژن‌های *ND1,coxII*و *ND5* وارد ژ نوم می‌شوند. در محل ورود ترانسپوزون‌ها تکرار bp9 از توالی هدف ایجاد می‌گردد.

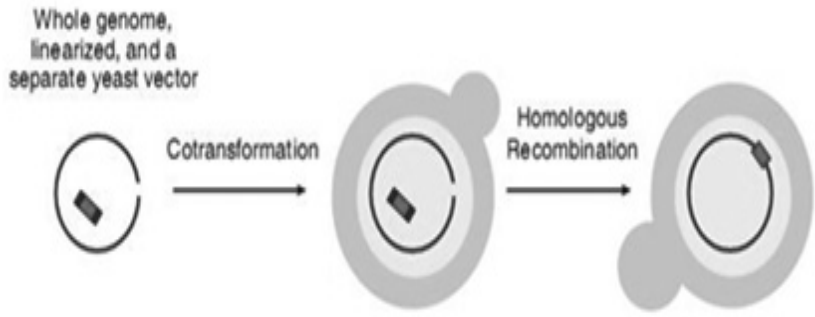
انتقال همزمان ژنوم و حامل به میزبان

استراتژی دیگری که برای همسانه سازی پیوسته ی ژنوم کامل مورد استفاده قرار گرفته است، انتقال همزمان ژنوم موش به همراه حامل به میزبان می‌باشد. در این مورد حامل استفاده شده یک حامل خطی اســت که ناحیه انتهای آن با محل ورود حامل به ژنوم مشابه بوده و با آن همولو ژی[۲۶] دارد. به همین دلیل ورود حامل به ژنوم از طریق نوترکیبی همولوگوس[۲۷] صورت می‌گیرد (۱۸). بررسی انجام شده نشان می‌دهد اگر ژنوم در نزدیکی نقطه ورود حامل دارای یک شکســت دو رشــته ای باشد کارایی انتقال به میزان فراوانی افزایش می‌یابد (۱۸).

این روش نیازمند انتقال حامل، به ارگانیسمی که همسانه سازی ژنوم آن مد نظر است، نمی باشد. از طرف دیگر به کشت ارگانیسم نیز وابسته نیست. این امر یک مزیت محسوب می‌شود، چراکه می‌توان از این روش در مورد ارگانیسم‌هایی که کشت آن‌ها با مشکل مواجه بوده

23. spheroplas
24. Southern blot
25. Chloramphenicol
26. Homology
27. Homologous recombination

Archive of SID
www.SID.ir



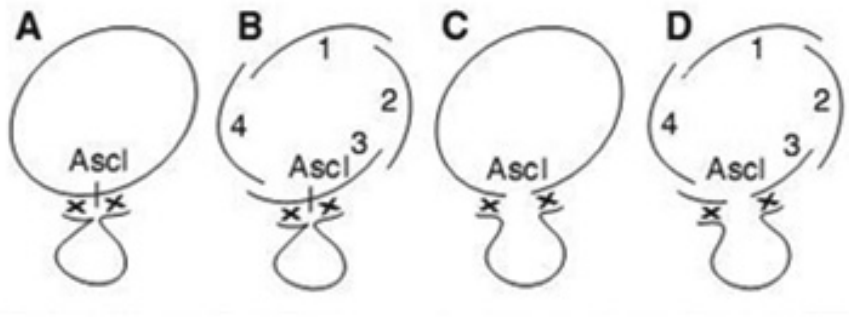
شکل۴: ترانس فورماسیون هم زمان ژنوم و حامل در میزبان"." در این مورد حامل و ژنوم باید حاوی توالی‌های هم پوشان باشند. با داشتن این توالی‌های هم پوشان، سلول مخمری میزبان می‌تواند آنها را از طریق نوترکیبی همولوگوس ادغام نماید.

شکل۵ : تقسیم شدن ژنوم به قطعات هم پوشان، حامل مورد استفاده نیز به عنوان یک قطعه مجزا، به علت داشتن همولوژی در دو انتهای خود با ژنوم، می‌تواند وارد ژنوم گردد. قطعات از طریق نوترکیبی همولوگوس، ژنوم کامل به همراه حامل را ایجاد می‌نماید.

و یا امکانپذیر نیست استفاده نمود. با این حال این روش قابلیت بقا ژنوم را تضمین نمی نماید، علاوه بر این ممکن است پیدا کردن جایگاه برش آنزیم محدود کننده برای ورود حامل مشکل باشد. از طرف دیگر ورود حامل در ژنوم مستلزم آگاهی از توالی ژنوم می‌باشد(۱۸).

برای انجام این کار ژنوم ارگانیسم مورد نظر جدا شده و خالص سازی می‌شود. سپس به کمک آنزیم محدود کننده در نقطه ورود حامل، شکست دو رشته ای در ژنوم ایجاد می‌شود. حامل مورد نظر به گونه ای طراحی می‌شود که در جایگاه ورود با ژنوم همولوگ باشد. به عنوان مثال ژنوم *M.genitalium* دارای سه جایگاه برش برای آنزیم *AscI* می‌باشد. بررسی انجام شده نشان می‌دهد که برش در جایگاهی که در انتهای '۳ ژن tRNA قرار دارد، سبب ایجاد اختلال در عملکرد ژنوم نمی شود لذا این نقطه برای برش انتخاب می‌شود. با استفاده از حاملی به نام PARS- VNبه عنوان الگوی PCR و یک جفت از پرایمرهایی که، هر کدام شامل هومولوگ ۶۰ bp به جایگاه دخول حامل در ژنوم می‌باشد حامل ویژه آماده می‌گردد. انکوباسیون اسفرو بلاست‌های مخمری سوش VL6-4N همراه با حامل و ژنوم M.genitalium دارای شکست دو رشته ای، سبب انتقال حامل و ژنوم باکتریایی به مخمر، ورود حامل به ژنوم باکتریایی از طریق نوترکیبی همو لوگوس در نقطه شکست دو رشته ای در ژنوم *M.genitalium* و متعاقب آن تکثیر ژنوم کلون شده در مخمر می‌گردد. در این مورد نیز بررسی انجام شده با PCR برای شاخص‌های موجود در ژنوم *M.genitalium* همسانه سازی آن در مخمر را نشان می‌دهد(۱۸).

www.SID.ir



شکل۶: دخول هدفدار یک حامل مخمری با استفاده از نوترکیبی همولوگوس"."
A : ورود یک حامل خطی مخمری بدون وجود شکست دو رشته ای در نقطه ورود، در ژنوم دست نخورده
B : قطعات ژنومی هم پوشان و حاملی که دارای همولوژی داخلی به یکی از قطعات می‌باشد.
C : ژنوم در محل ورود حامل خطی، شکسته شده است.
D : قطعات هم پوشان ژنومی و حامل

نکته مهم نقش وجود شکست دو رشته ای در نقطه ورود حامل، در افزایش تعداد کلون‌های نوترکیب می‌باشد، چرا که به وضوح نشان داده می‌شود که وجود یک جایگاه شکست دو رشته ای، نزدیک جایگاه نوترکیبی همو لوگوس، کارایی این امر را تا بیست برابر افزایش می‌دهد (۱۸).

همسانه سازی ژنوم از طریق شکست ژنوم

از روش‌های متنوع و پیچیده‌ای بر حسب مورد برای همسانه سازی ژنوم کامل بدین طریق استفاده می‌شود. ساده ترین و در عین حال جدیدترین روشی که بدین منظور استفاده می‌شود ساخت ژنوم کامل از طریق همسانه سازی قطعات هم پوشان حاصل از شکست ژنوم می‌باشد. از این روش می‌توان، برای تجمع قطعات DNA ی سنتزی یا طبیعی استفاده نمود (۱۸). در این حالت حامل می‌تواند به صورت یک قطعه مجزا و یا بخشی از یک قطعه بزرگتر باشد.

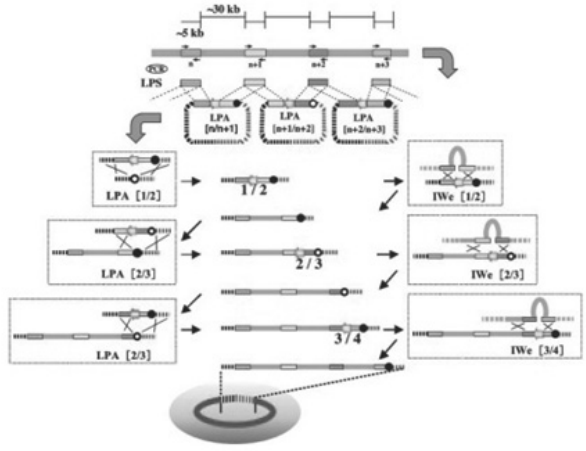
این کار بر روی ژنوم *M.genitalium* صورت گرفته است به این ترتیب که ابتدا ژنوم باکتری به چهار قطعه تقسیم شده و درکروموزوم مصنوعی باکتریایی کلون می‌شود. قطعات ژنومی با استفاده از هضم آنزیمی از حامل‌های کرموزومی جدا شده و ایجاد چهار قطعه هم پوشان را می‌نماید. این قطعات به همراه حامل PTABAC3 وارد مخمر می‌شوند. سه قطعه از این قطعات ژنومی دارای شکست دو رشته ای می‌باشند که از طریق هضم با آنزیم‌های محدود کننده ایجاد شده است. همان طور که بیان شد این امر احتمال ورود حامل به ژنوم را به طور چشمگیری افزایش می‌دهد. بررسی‌های متعاقب بعدی با استفاده از PCR برای شاخص‌های ژنومی که در هر یک از قطعات چهار گانه قرار دارند، همچنین استفاده از ساترن بلات، تمامیت و کامل بودن ژنوم کلون شده را نشان می‌دهد. به طور جالب توجه در این مورد نیز هنگامی که شکست‌های دو رشته ای در قطعات همپوشان ایجاد نمی شوند تعداد کلون‌های نوترکیب کاهش قابل ملا حظه ای را نشان می‌دهد.(شکل ۶)

روش دیگری که برای همسانه سازی ژنوم کامل به صورت قطعات مجزا مورد استفاده قرار گرفته است مبتنی بر استفاده از فرآیندی موسوم به inchworm elongation یا IWE می‌باشد (۲۰). در این روش از گیره‌های DNA یی که اصطلاحا توالی جایگاه‌های نشست[۲۸] (LPS) نامیده می‌شود و قبل از همسانه سازی، در محل ورود DNA، در حامل قرار گرفته است استفاده می‌شود.(شکل ۷)

حامل استفاده شده در این روش ژنوم B. subtilis ۱۶۸ است چرا که تحقیقات صورت گرفته نشان می‌دهد ژنوم B. subtilis- 168 حامل مناسب برای همسانه سازی قطعات بزرگ ژنوم است (۲۱). این حامل اصطلاحا BGMنامیده می شود. حامل مذکور دارای

28. landing pad

Archive of SID
www.SID.ir



شکل۷: مراحل IWe برای همسانه سازی بزرگ "." یک سری از LPSها با استفاده از PCR آماده شده و به صورت پشت سرهم در پلاسمیدهای مشتق از pBR۳۲۲ قرار می‌گیرند تا یک مجموعه از پلاسمیدهای LPA را ایجاد نمایند.
پلاسمید LPA[۲/۱] از طریق نوترکیبی هومولوگوس که با علامت x نشان داده شده است به توالی GpBR تحویل داده می‌شود. IWe[۲/۱] برداشته شدن توالی Synechocystis به وسیله سلول‌های B.subtilis صلاحیت دار نوترکیب در LPA و همگرایی داخلی پیوسته توالی که با رنگ سبز نشان داده شده است را نشان می‌دهد. LPA[۳/۲] به صورت هدایت شده به IWe بعدی تحویل داده می‌شود. تکرار LPA[n/n +۱]و IWe[n/n + ۱] سبب شکل گیری DNA ژنومی کامل و پیوسته Synechocystis در GpBR می‌گردد.

شکل۸ : حامل۱۶۸ B.subtilis و ویژ گی‌های آن"."

توالی مشتق از پلاسمید pBR322 می‌باشد که اصطلاحا GpBR[۲۹] نامیده می‌شود. در طول همسانه سازی توالی GpBR به دو قطعه مجزای ۲/۳ kb و ۲/۷ kb تقسیم می‌شود که در دو انتهای توالی ورودی قرار می‌گیرند. توالی دیگری که در این حامل وجود دارد ژن مقاومت به نئو مایسین[۳۰] است که در بین ژن‌های yvep وyvfc قرارمی گیرد. همانند سازی ژنوم ۳/mb۵باکتری فتوسنتزی Synechocystis به صورت چهار قطعه مجزای ۹۰۸ kb، ۸۷۷ kb، ۸۹۰ kb، ۹۳۱ kb با روش ذکرشده و حامل BGMصورت گرفته است (۲۰).(شکل ۸)

برای همسانه سازی ابتدا یک سری از LPSها با استفاده از PCR آماده شده و به صورت پشت سرهم در پلاسمیدهای مشتق ازpBR۳۲۲ قرار می‌گیرند. به این آرایش LPSها اصطلاحا آرایه LPS یا LPA گفته می‌شود. به این ترتیب یک سری از پلاسمیدهای LPA آماده می‌شوند. پلاسمیدهای LPA از طریق نوترکیبی هومولوگوس دو رشته ای وارد توالی GpBR در حامل BGM می‌گردند. به این ترتیب جایگاههای نشست LPS در محل ورود DNA ی خارجی در حامل فراهم می‌شود. (شکل ۹)

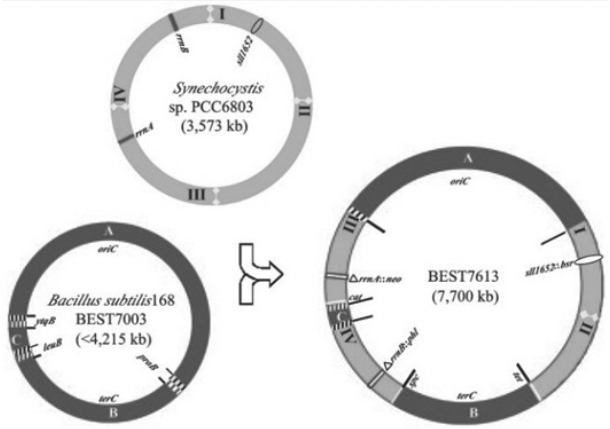
ژنوم Synechocystis به صورت چهار قطعه مجزا طبق فرآیند Iwe و از طریق نوترکیبی هومو لوگوس و به کمک جایگاههای نشست LPS فراهم شده در حامل وارد توالی GpBR حامل می‌شود. به این ترتیب ژنوم ۳/۵۷۳ kb باکتری Synechocystis وارد حامل ۴/۲۱۵ kb در باکتری B. subtilis ۱۶۸ می‌گردد و به همراه ژنوم باکتری تکثیر می‌یابد (۲۰).

29. genomic pBR
30. Neomycin

www.SID.ir

نتیجه گیری

با توجه به موارد ذکر شده، می‌توان گفت که با استفاده از تکنیک‌های معمول آزمایشگاهی موجود می‌توان به همسانه سازی ژنوم‌های کامل و قطعات بزرگ DNA یی اقدام نمود. همسانه سازی این ژنوم‌ها و قطعات بزرگ امکان مطالعه دقیق تر آنها را فراهم می‌آورد. به علاوه این کار یک ابزار مناسب برای مطالعه میکرو ارگانیسم‌هایی است که کشت آنها امکانپذیر بوده و یا به سختی صورت می‌گیرد، ارگانیسم‌هایی نظیر پاتوژن‌ها و نیز میکروارگانیسم‌های جدا شده از محیط، که به سختی کشت می‌شوند و یا کشت آنها مخاطره آمیز است. علاوه بر این در طول مطالعات صورت گرفته علاوه بر قطعات DNA یی و یا ژنوم‌هایی که انتظار همسانه سازی آنها می‌رود مولکول‌های بزرگ Mb ۲ نیز یافت شده است. تصور می‌رود این مولکول‌ها، مولکول‌های کانکاتامری می‌باشند که به طور ناخواسته ایجاد شده اند. این امر نشان می‌دهد که امکان همسانه سازی مولکول‌های حلقوی بزرگتر از ژنوم‌های باکتریایی که تا کنون مورد تحقیق قرار گرفته است، وجود دارد. از آنجا که بسیاری از ژنوم‌های باکتریایی و آرکئو باکتریایی اندازه کوچکتر از Mb ۲ را دارند. می‌توان به راحتی ژنوم این میکرو ارگانیسم‌ها را همسانه سازی نمود و مورد



شکل۹: ساختار ژنوم *Synechocystis* همسانه سازی شده در ژنوم *B.subtilis168* ژنوم *Synechocystis PCC6803* (دایره سبز رنگ)، *B. subtilis 168* (دایره قهوه‌ای رنگ) و سوش *BEST7613* (قهوه ای و سبز) نشان داده شده است. *B. subtilis 168* پلاسمید طبیعی نمی باشد. نواحی A، B، C از ژنوم *B. subtilis 168* و نواحی [I]-[IV] از *Synechocystis*می باشد.

بررسی قرار داد. به علاوه این فناوری امکان تولید ژنوم‌های مهندسی شده با خصوصیات دلخواه را فراهم می‌آورد.

منابع/ References

1. Itaya M, Fujita K, Kuroki A, et al. Bottom-up genome assembly using the Bacillus subtilis genome vector. Nat. Methods 2008; 5: 41–43.
2. Yoon Y.G, and Koob M.D. Efficient cloning and engineering of entire mitochondrial genomes in Escherichia coli and transfer into transcriptionally active mitochondria. Nucleic Acids Res 2003;31:1407–1415.
3. Yonemura I, Nakada K, Sato A, et al. Direct cloning of full-length mouse mitochondrial DNA using a Bacillus subtilis genome vector. Gene 2007;391:171–177.
4. Wheeler V.C, Aitken M, and Coutelle C. Modification of the mouse mitochondrial genome by insertion of an exogenous gene. Gene 1997;198: 203–209.
5. Adler H, Messerle M, and Koszinowski U.H. Cloning of herpesviral genomes as bacterial artificial chromosomes Rev. Med. Virol 2003;13:111–121.
6. Hilton S, Kemp E, Keane G, and Winstanley D. A bacmid approach to the genetic manipulation of granuloviruses. J. Virol. Methods 2008;152: 56–62.
7. Luckow V.A, Lee S.C, Barry G.F, et al. Efficient generation of infectious recombinant baculoviruses by site-specific transposon-mediated insertion of foreign genes into a baculovirus genome propagated in Escherichia coli. J. Virol 1993;67: 4566–4579.
8. Wang H, Deng F, Pijlman G.P, Chen X, et al. Cloning of biologically active genomes from a Helicoverpa armigera single-nucleocapsid nucleopolyhedrovirus isolate by using a bacterial artificial chromosome. Virus. Res 2003;97: 57–63.
9. Almazan F, Galan C, and Enjuanes L. Engineering infectious cDNAs of coronavirus as bacterial artificial chromosomes. Methods Mol. Biol , 2008;454:275–291.

Archive of SID

www.SID.ir

10. Domi A, and Moss B. Cloning the vaccinia virus genome as a bacterial artificial chromosome in Escherichia coli and recovery of infectious virus in mammalian cells. Proc. Natl Acad. Sci. USA, 2002;99:12415–12420.
11. Ketner G, Spencer F, Tugendreich S, et al. Efficient manipulation of the human adenovirus genome as an infectious yeast artificial chromosome clone. Proc. Natl Acad. Sci. USA 1994;91: 6186–6190.
12. Garcia-Ramirez J.J, Ruchti F, Huang H, et al. Dominance of virus over host factors in cross-species activation of human cytomegalovirus early gene expression. J. Virol , 2001;75: 26–35.
13. Smailus D.E, Warren R.L, and Holt R.A. Constructing large DNA segments by iterative clone recombination Syst. Synth. Biol 2007;1:139–144.
14. Itaya M, Tsuge K, Koizumi M, et al. Combining two genomes in one cell: stable cloning of the Synechocystis PCC6803 genome in the Bacillus subtilis 168 genome. Proc. Natl Acad. Sci. USA 2005;102:15971–15976.
15. Gibson D.G, Benders G.A, Andrews-Pfannkoch C, et al. Complete chemical synthesis, assembly, and cloning of a Mycoplasma genitalium genome. Science 2008;319:1215–1220.
16. Gibson D.G, Benders G.A, Axelrod K.C, et al. One-step assembly in yeast of 25 overlapping DNA fragments to form a complete synthetic Mycoplasma genitalium genome. Proc. Natl Acad. Sci. USA 2008;105: 20404–20409.
17. Lartigue C, Vashee S, Algire M.A, et al. Creating bacterial strains from genomes that have been cloned and engineered in yeast. Science 2009;325:1693–1696.
18. Gwynedd A.B, Vladimir N.N, Evgeniya A.D, et al. Cloning whole bacterial genomes in yeast. Nucleic Acids Research 2010; 38: 8. 2558–2569
19. Young G.Y, Michael D. K. Efficient cloning and engineering of entire mitochondrial genomes in Escherichia coli and transfer into transcriptionally active mitochondria. Nucleic Acids Research 2003; 31: 5 1407±1415.
20. Mitsuhiro I, Kenji T, Maki K, et al . Combining two genomes in one cell: Stable cloning of the Synechocystis PCC6803 genome in the Bacillus subtilis 168 genome. PNAS _ November 1 2005 ; 102: 44 _ 15971–15976
21. Itaya, M. Toward a bacterial genome technology: Integration of the Escherichia coliprophage lambda genome into the Bacillus subtilis 168 chromosome. Mol. Gen. Genet, 1995; 248:9-16.

Archive of SID

www.SID.ir