Archive of SID

استخراج و خالص سازی آنزیم برشگر خاص و محدودکننده Xho1 ازباکتری های بومی ایران

پرویز ادبی فیروزجائی،[۱] دکتر حشمت ا...رحیمیان[۲] و دکتر محمد رضا نوری دلوئی*[۳]

۱- گروه ژنتیک، دانشکده علوم پایه، دانشگاه تربیت مدرس

۲- گروه گیاه پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه مازندران

۳- گروه ژنتیک پزشکی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران

چکیده

اندونوکلئازخاص و محدود کننده Xho1که از جدایه های *Xanthomonas vasicola pv.holcicola* تولید می شود ترتیب نوکلئوتیدی 5´-CTCGAG-3´ راشناسائی نموده وبرش می دهد ونیز انتهای تک رشته چسبان تولید می کند. به منظور بررسی وجود وخالص سازی این آنزیم از جدایه های باکتری زانتوموناس جدا شده از علف قیاق در استان کرمان اقدام گرد ید(رحیمیان ۱۳۷۳). با عصاره گیری درحضوراسترپتومایسین سولفات و انجام کروماتو گرافی بر روی ستونها ی فسفو سلو لز (whatmanp-11) وDEAEی بخش‌های سلولز نمونه‌های حاوی آنزیم بر روی مولکول هایDNAی متفاوت از جمله فاژ لامبدا ، پلا زمید PTEM وDNA ی کروموزومی کلی باسیل وباکتری میزبان اثرداده شد .مقایسه ی نوار های الکترو فورزی قطعا ت DNAی حاصل از اثر این آنزیم و آنزیم استاندارد Xho1 تولیدی شرکت سیگما ،خلوص کافی وا ختصاصی بودن محل های برش آنزیم به دست آمده را تأیید نمود.

واژه های کلیدی :استخراج ، خالص سازی ، آنزیم برشگر خاص و محدود کننده .

* noori daloii@ut.ac.ir

www.SID.ir

Archive of SID

مقدمه

آنزیمهای نوکلئازی برشگر و محدود کننده ازآنزیمهای هیدرولیز کننده اسیدهای نوکلئیک هستند. این آنزیم ها اولین باردرسال ۱۹۵۰ طی بررسی اثر باکتریوفاژها بر روی باکتریها شناخته شدند. به این صورت که باکتریوفاژهایی که یک سوش از باکتری را آلوده می کردند قادر به تکثیر در جدایه های دیگر همان باکتری نبودند ،این پدیده را « پدیده محدود کننده میزبان » (Restriction endonuclease) وآنزیمهای دخیل در آن را آنزیم محدود-کننده (host restriction modification) نامید ند. بعد ها ثابت شد که این آنزیمها باکتریوفاژها را در نقاط خاصی برش می دهند ، نقاطی که به وسیله این آنزیم ها شناسائی می شوند معمولا مرکب از٤تا ٦ جفت باز می باشند. یکی از مهمترین خصوصیات این توالی های ٤تا٦ نوکلئوتیدی این است که به صورت توالی معکوس می باشند. این توالی قرینه ها اصطلاحاً پالیند روم (palindromic sequence) نامیده می‌شود. طول مکان شناسایی آنزیم های محدود کننده متفاوت است. بطور مثال آنزیمهای محدود کننده EcoR1 ،Sac1، SSt1 هرکدام توالی ٦نوکلئوتیدی را شناسایی می کنند در حالیکه Not1 توالی ۸ نوکلئوتیدی را شناسایی می کند ومحل شناسایی Sau3A ٤نوکلئوتیدی است .آنزیمهای با محل شناسایی یکسان ایزو شیزومر نامیده می‌شوند. محل شناسایی آنزیمهای محدودکننده می تواند شناخته شده ویا ناشناخته باشد. به طور نمونه آنزیم BamH1 که توالی‌های GGATCC را شناسایی نموده و هیچ توالی دیگری غیر از آن را نمی شناسد از نمونه‌های شناخته شده می‌باشد. در صورتیکه Hinf1 یک توالی پنج نوکلئوتیدی که با GA شروع وبه TC ختم می شود و هر باز قرار گرفته در بین این دو را شناسایی می‌کند. بنابراین محل شناسایی مبهم ونامشخص دارد .Xho11 توالی های GGATCC، AGATCT AGATCC ،GAGATCT راشناسایی وبرش می‌دهد در این صورت محل شناسایی یک آنزیم می تواند محل اثر آنزیم دیگر باشد. به طور مثال یک محل شناسایی Xho11 می تواند محل شناسایی BamH1بوده وبا Sau3A برش داده شود. آنزیم های محدود کننده پیوند بین قند وفسفات موجود در رشته DNA را برش می دهند به طوری که در انتهای ´5 گروه فسفات ودر انتهای ´3 گروه دیگر هیدروکسیل، در هر دورشته بریده شده، به جا می‌گذارد.آنزیمهای محدود کننده که بیشترین کاربرد را در زیست شناسی مولکولی دارند در محل شناسایی، برش ایجاد نموده و یکی از سه نوع انتهای مختلف را ایجاد می کنند

۱-انتهای ´5 آویزان :آنزیم با برش نامتقارن در داخل محل شناسایی را یک قطعه کوتاه تک رشته درنا حیه ´5 ایجاد می کنند .

۲-انتهای ´3 آویزان :ایجاد برش نامتقارن در داخل محل شناسایی منجر به ایجاد انتهای تک رشته ای آزاد در انتهای ´3 می شود مانند Kpn1 که بدین صورت برش می دهد .

۳-انتهای هموار یا صاف : آنزیم هایی که محل های مقابل هم را دقیقا در دو رشته برش می دهند و انتهای تک رشته‌ای به جا می گذارند .تعداد کمتری از این آنزیم ها چنین برشی را ایجاد می کنند.

انتهای آزاد ´3 یا ´5 ایجاد شده توسط آنزیم ها در اثر برش نامتقارن را انتهای چسبنده می گویند زیرا آنها براحتی با جفت شدن بازها بهم متصل می شوند . اکثر این آنزیم ها ی محدود کننده به عنوان سیستم های دفاعی باکتریها می باشند . یعنی اینکه اگر DNAی خارجی مانند ویروس ها وقتی که وارد باکتری ها شوند توسط این آنزیم غیر فعال می شوند اما بدلیل وجود آنزیم متیل ترانسفراز همراه که توالی هد ف برای آنزیم محدودکننده رادر DNA میزبان متیله می کند و از

www.SID

Archive of SID

بریده‌شدن آن جلو گیری می کند .این برهمکنش آنزیم محدودکننده وآنزیم متیلاز رابه عنوان سیستم تغییر واصلاح محدود Restriction modification system می نامند .تاسال ۱۹۹۶ تعداد کل آنزیم های محد ودکننده ۲۷۲۳ عدد گزارش گردیده است که از بین آنها ۱۸ تا ازنوع 1 ،چهار عدد از نوع III و۲۷۰۱عد د از نوع II هستند(۹) .از آن سال به بعد نیز تعداد آنها مرتباً رو به افزایش است(Brown,2001).

بر اساس چگونگی وجود سیستم متیلا سیون ونحوه عمل آنزیم های محدود کننده ، این آنزیم ها را به سه گروه تقسیم می کنند :

آنزیم نوع اول : اگر در محل شنا سایی آن هیچیک از دو رشته DNA متیله نباشد این آنزیم DNA را به عنوان DNA ی خارجی شناسایی نموده وآنرا برش می‌دهد این آنزیم علی رغم شناسایی محل های خاص در DNA بطور تصادفی آن را برش می دهد ، بنا براین جزء ابزارهای کلون ســـــازی مولکولی شناخته نمی‌شوند (۵) .

آنزیم های نوع دوم که مو لکول DNA را در محل خاص شناسایی و برش می دهند توسط در سال ۱۹۷۰شناسایی شد ند ،این آنزیم ها خاصیت متیلا سیون ندارند و توالی های خاص را شناسایی می کنند ، اگر این توالی ها متیله نشده باشند آنها را برش داده وانتهای صاف یا چسبنده بوجود می آورند. این نوع آنزیمها نقش اصلی رادر پژوهش‌های زیست مو لکولی به عهده دارند .

آنزیمهای نوع سوم که ردیف های خاصی را شناسایی می کنند و مولکول DNA را حدود ۲۵تا ۲۷ جفت باز دور تر از محل شنا سایی در طرف 3´ برش می دهند (۸).

از سیستم نام گذاری خاصی برای این آنزیم ها استفاده می‌شود، برای این منظور از علا مت اختصاری سه حرفی که حرف اول از نام جنس ، حرف دوم وسوم از نام گونه باکتری تولید کننده آنزیم انتخاب می شود و اسم سویه در صورت وجود بعد از علامت اختصاری قرار می گیرد ،وآنزیم های متفاوت استخراج شده از باکتری بوسیله اعداد رومی که نشانگر ترتیب شناسایی یا استخراج آنهاست مشخص می شود، بطور مثال FnuDI FnuDII، FnuDIII، که سه نوع آنزیم استخراج شد. ازجدایه D باکتری *Fusobactrium nucleatum* هستند (۸،۱۲،۱۳).

باتوجه به گسترش روز افزون کاربرد روش ها وفنون مهندسی ژنتیک در زمینه‌های مختلف صنعت، داروسازی، بیوتکنولوژی وبمنظور انجام کارهای دقیق ژنتیکی مانند کلون سازی ،تعیین ردیف نوکلئوتیدی DNA ،تعین نقشه کروموزومی، آنزیم‌های برشگر خاص ومحدود کننده یکی از ابزارهای اصلی مورد نیاز در این زمینه هستند که عموما از باکتریها به دست می آیند. به نظر می‌رسد در ایران حد اقل دو پاتووار زانتوموناس *Xanthomonas vasicola pv.hlcicola* و *X.oryzae pv.oryzae* وجود دارد که تولید کننده این آنزیم ها باشند وجود دارند (۱).

خالص سازی آنزیم xhoI از باکتری ذکر شده واستفاده از آن در هضم DNA های پلاسمیدی وکروموزومی هد ف اصلی این پژوهش بوده است.

مواد روشها

۱-خالص کردن وکشت باکتری

باکتـــــــری‌های جداشده از قـــیاق بر روی محیط (NAS)حاوی سوکروز ۱۰ گرم نوترینت براث ۸ گرم ، آگار ۱۵ گرم درلیتر کشت داده شد. سپس کلنی ها ی منفرد تشکیل شده پس از ۳روز رشد دردمای ۲۸ درجه سانتی گراد، روی محیط کشت YNA (حاوی ۱۰ گرم عصاره مخمر،۸ گرم نوترینت براث ، ۱۵ گرم آگار در یک لیتر آب مقطر)کشت داده شد تا مقداری باکتری خالص

www.SID.ir

ویک دست حاصل گردید.باکتریها در بافر حاوی Tris-Hcl ۰/۰۱مولار PH=7.4 ، ۲ - مرکاپتو اتانل ۰/۰۱ مولاربه شکل سوسپانسیون درآمد و مدت ۱۵ دقیقه در ۲۰۰۰×g در دمای ۱۰ درجه سانتی گرادسانتریفوژ گردید، و رسوب باکتری چندین بار در همین بافر سوسپانسیون شد تا لعاب آن شسته و حذف گردد.

۲- عصاره گیری

عصاره گیری وخالص سازی آنزیم ها براساس روش گینگراز(۸) باتغییراتی به شرح زیر انجام شد:

برای تخریب سلول وعصا ره گیری حدود ۵ گرم سلول شسته شده باکتری همر اه ۵ گرم پودر شیشه درهاون استریل سرد ریخته وکوبیده شد. بمنظور جلوگیری فعا لیت پروتئازها این عمل در دمای ٤ درجه سانتیگراد انجام شد . پس از تخریب سلول وتشکیل خمیر لزج سفید رنگ مقدار ۲۰ میلی لیتر بافر عصاره (۰/۰۱مولار Tris-HcL،۰/۰۱مولار ۲ - مرکاپتو اتانل ٤/ PH= ۷)حاوی ۲۵میکرو گرم در لیترفنیل متیل سولفونیل فلوراید(PMSF)به آن اضافه تا سوسپانسیون همگن حاصل شد پس از ته نشین شدن پودر شیشه ،مایع روئی به لوله منتقل وبه مدت ۹۰دقیقه در ۱۰۰۰۰×g در دمای ٤ درجه سانتیگراد سانتریفوژگردید تا اجزای سلول وسلولهای تخریب نشده رسوب داده شوند .مایع روئی به آرامی به یک بشر ۳۰ میلی لیتری منتقل وبه مقدار یک پنجم حجم استرپتو مایسین سولفات ۱۰٪تازه تهیه شده به این محلول اضافه گردید تا غلظت نهائی آن به ۲٪ برسد. سپس به مدت ۳۰ دقیقه با یک همزن مغناطیسی بهم زده شد تا اسید های نوکلئیک به صورت نامحلول درآیند . سوسپانسیون حاصل به مدت نیم ساعت باسرعت۷۰۰۰×gسانتریفوژ گردیده ومایع روئی به بشر ۵۰ میلی لیتر منتقل گردید. هم حجم محلول بافرPC(۰/۰۱ مولاربافر فسفات پتاسیم PH=٤/۷ ،۰/۰۱مولار مرکاپتواتانل،۰/۰۰۰۱مولارEDTANa2و۱۰٪گلیسرول) سرد به آن اضافه گردید. ومحلول به دست آمده به کیسه دیالیز منتقل شد ودر ۵۰۰ میلی لیتر بافر PC به مدت ۱۲ ساعت در داخل یخچال دیالیز گردید.

۲-۱-کروماتو گرافی فسفو سلولز :

عصاره دیالیز شده روی ستون فسفو سلولز به ابعاد ۱۵-۱۰ سانتیمتر که از قبل با PC بافر متعادل شده بود ریخته شد وستون با۵۰ میلی لیتر گرادیان خطی از صفر تا یک مولار کلرید پتاسیم در بافر PCشسته شده وبخشهای ۲میلی لیتری جمع آوری گردید.آنزیم XhoI شسته شده در حدود ۰/٤۳تا ۰/۵۰مولار کلرید پتاسیم ذخیره گردید .بخشهای حاوی فعالیت آنزیم در بافر PC دیالیز شد و در مقابل گلیسرول تغلیظ گردید.

۲-۲ - کروماتو گرافی در ستون DEAE سلو لز

به منظور خالص سازی بیشتر آنزیم بخش های حاوی آنزیم فعال پس از عمل دیالیز از ستون DEAE سلولز به ابعاد ۱/۲ ۹ سانتیمتر عبور داده شد . ستون ابتدا با سه حجم بافر PC شسته شد و با ۳۰ میلی لیتر گرادیان صفر تا ۰/٦مولار کلرید پتاسیم در PC شستشو گرد ید .آنزیم XhoI فعال در گرادیان ۰/۱٦تا ۰/۳۰ مولار کلرید پتاسیم از ستون جدا گردید. بخشهای ۲ میلی لیتری جمع آوری شد و نمونه‌هایی که بیشترین فعالیت آنزیمی XhoI را داشت در مقابل بافر PC دیالیز ودر گلیسرول تغلیظ گردید.جهت نگهداری آنزیم مقداری محلول پایدار کننده اضافه گردید. غلظت نهایی محلول پایدار کننده برای نگهداری آنزیم بشرح زیر است :

۲۰میلی مولار Tris—HCL ،PH=۷/۵

۱۰۰میلی مولار Nacp

۰/۱میلی مولار EDTA

۱۰ میلی مولار ۲-مرکاپتواتنل

۰/۱درصد تریتون X-۱۰۰

۵۰ گلیسرول

۳- سنجش آنزیم

بهترین ومناسبترین روش سنجش آنزیم بعد از کروماتوگرافی ،الکترو فورز قطعات DNAهای هضم شده توسط آن در ژل آگارز (سودن وهمکاران۱۹۷٤) یا پلی آکریلامید (۲) است.

۳-۱- استخراج DNAی کروموزمی

جهت سنجش آنزیم DNAی کروموزومی باکتری میزبان لازم است که با دو روش کلروفرم –ایزوآمیل الکل -CTAB (۱۲) وفنل کلروفرم تهیه گرد ید که روش اخیر به اختصار توضیح داده می شود:

باکتری کشت شده بر روی محیط NA، در بافر TE سوسپانسیون گرد ید و غلظت آن در OD =۰/۸ تنظیم شد. سپس سدیم دو د سیل سولفات با غلظت نهائی یک درصد اضافه وبملایمت هم زده ودر ۳۷درجه سانتی گراد قرار داه شد . پس ازشفاف شدن سوسپانسیون ،به میزان هم حجم آن فنل اشباع از آب افزوده و به مدت یک ساعت به آرامی تکان داده شد.امولسیون ،حاصله ۲۰ دقیقه در g ٦۰۰۰ سانتریفژ گرد ید، مایع روئی به لوله دیگری منتقل ونیم حجم فنل اشباع از آب به آن اضافه گردید و چند دقیقه تکان داده شد. امولسیون۱۵ دقیقه در g ٦۰۰۰سانتریفوژ گردید. محلول روئی به لوله دیگری منتقل گردید وحدود نیم حجم کلروفرم به محلول اضافه شد و به آرامی مخلوط گردید، و به مدت ۱۵ دقیقه در g ٦۰۰۰سانتریفوژ وسپس ٦/ ۰حجم آن ایزو پروپانول افزوده شد.DNA با چرخاندن میله شیشه ای جدا شد وبه لوله استریل پلا ستیکی منتقل گردید .

۳-۲-استخراج پلاسمید

پلاسمیـــد ها DNAی حلقوی خارج کروموزومـــــی هستند که به عنوان سوبسترای برای سنجش آنزیم بدست آمده لازم است و در مهندسی ژنتیک جهت انتقال ژنها ابزاری بسیار مهم هستند. از روشهای متعددی مانند روش تعدیل شده برین‌بویم ودالی (۳،٤) ومینگیو(۱۰) و کورپر و نستر(٦) جهت استخراج پلاسمید استفاده شد.

۳-۳-تهیه نمونه برای الکتروفورز

مقدار ۲۰ میکرولیتراز هر بخش را جداگانه در داخل لوله ها ی میکرو فیوژ استریل ۰/۵میلی لیتر ی ریخته و ۲۰ میکرولیتر محلول DNA ی پلاسمیدی PTEM و ۱۰میکرو لیتر محلول واکنش ده برابر غلظت تهیه شده و ۵۰میکرولیتر آب مقطر استریل به آن اضافه شده وبه مد ت ۳تا ۵ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد قرار داده شد ، سپس٤۰میکرولیتر محلو ل سنگین کننده به آن اضافه گردید و به مد ت ۱۰ دقیقه در فریزر قر ا ر داده شد . پس از آن به مد ت ۱۰ دقیقه در حما م آب گرم ٦۵ درجه سانتیگراد قرار داده شد تا انتها ی بریده شده دوباره بهم متصل نشوند .سپس نمونه ها با دقت به مقدار ۲۰ میکرولیتر به چاهکهای ژل اکریلامید ۳۰٪ وآگارز ۰/۸ درصد جداگانه انتقا ل داده شد .پس از الکترو فورز ، با اتید یوم بروماید رنگ آمیزی و در زیر پرتو ماوراء بنفش، نوار های DNA در ژل معلوم و عکس برداری شد .

نتایج

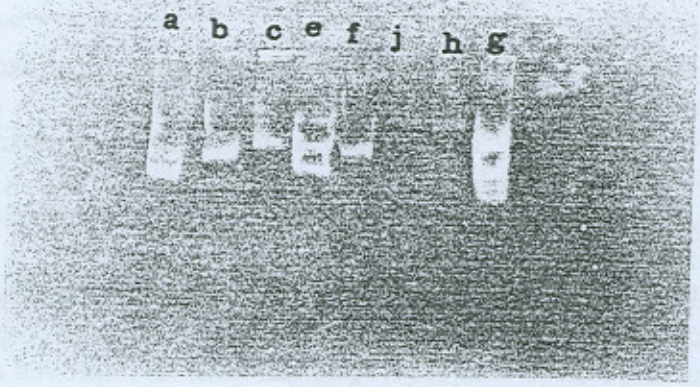
بررسی وجود آنزیم توسط الکترو فورز نمودن قطعات DNA ی هضم شده اثر آنزیم XhoIروی DNA ی کروموزومی باکتری مولد آنزیم به عنوان DNA ی خودی ونیز DNAی باکتری E.coli As2261 وپلاسمید TEM به عنوان DNA ی بیگا نه مورد ارزیابی قرار گرفت. آنزیم استخراج شده بر روی DNAی مولد آنزیم برشی ایجاد نکرد و تنها یک نوار

www.SID.ir

Archive of SID

قطور در ژل تشکیل شد اما بر روی DNAی کلی باسیل اثر نموده وآن راکاملا به صورت قطعات خطی در آورد که در ژل به صورت نوار پیوسته مشاهده شد.

اما در بعضی از جاها به صورت نوار ضخیم تر مشاهده شده وبر روی پلاسمید PTEM که جایگاه برشی برای آنزیم دارد اثر نموده و دو نوار در ژل تشکیل داده است. اثر این آنزیم بر روی پلازمید PUC18 و DNA ی لامبدا آزمایش شده که بر روی PUC18 به علت عدم وجود محل برش اثر نکرده اما DNAی لامبدا را برش داد (نتایج اثر آنزیمها روی دو مورد اخیر نشان داده نشد).



بررسی اثر بخش های بد ست آمده از ستون فسفو سلولز بر روی پلاسمید PTEM :
پلاسمید PTEM بدون اثر آنزیم(a) ،و با اثر دادن بخش ۱۶ (b) ،۱۷ (c) ،۲۱ (e) ،۲۳ (f) ،۲۵ (g) ،۲۴ (h) ،۱۴ (j)

بحث

با توجه به اینکه مولکول DNA ی پلاسمید p^{TEM} یک مکان برش برای آنزیم xho1 (۷) دارد ونیز یک برش درتوالی نوکلئوتیدی 5-CTCGAG-3 ایجاد می کند که با نتایج، استخراج آنزیم xho1 از باکتری *x.v.pv.holcicola* و *x.papavericola* توسط (R.j.Roberts1978!)بدست آمده یکسان می‌باشد . ضمناً اثر آ نزیم XhoI استخراج شده از سویه قیاق ۳ بر روی مولکول DNAی پلاسمیدی PTEM و PUC18 و لامبدا و DNA ی کرومو زومی کلی باسیل و قیاق ۳ و مقایسه با اثر آنزیم استاندارد XhoI نتایج یکسانی به دست آمد .DNAی پلاسمید PTEM یک محل برش برای آنزیم مذ کور دارد که در اثر تیمار با آنزیم به صورت خطی در آمده ومولکول DNA ی PUC18 محل شناسایی برای برش آنزیم نداشته و طبیعتا تحت تاثیر آنزیم قرار نگرفته است. نتایج حاصل از اثر آنزیم XhoI استاندارد واستخراج شده بر روی DNA ی کلی باسیل نقوش الکترو فورزی یکسانی به دست داد که دلیل بر ردیف شناسایی یکسان برای هر دو آنزیم می باشد اما اثر بخش های حاوی آنزیم XhoI استخراج شده واستاندارد بر روی DNAی قیاق ۳ به عنوان DNAی خودی و وجود تغییر وتبدیلاتی در محل برش قادر به شکستن نبوده ودر نتیجه یک نوار تشکیل شد

www.SI

Archive of SID

فهرست منابع

۱- رحیمیان ، حشمت ا... (۱۳۷۳)،بیماری نوار ی باکتریایی ذرت خوشه ای در استان کرمان ،مجله بیماریهای گیاهی جلد ۳۰ ص ۱

2-Ausuble,F.M.,Brent,R.,kingston,R.E..,Moor,D.D.,Sydeman,J.G..smith,.J.A., Stuhl.1987.current protole in molecular biology Green publishing Associate Wiley inter science Newyork

3-Brinboim,H.C.1983.A rapid lkalin extraction method for the isolation of plasmid DNA ,Mthod.Enzimol.**100**:243-255

4- Brinboim, H.C.,and Doly,J.1979.Arapid alkalin extratrain procedure for screening recombinant plasmid DNA. NuCl . Acid Res.7:1513-1523

5 - Brown, T.A.2001, Gene Cloning and DNA andlysis,An introdaction, chapter 4, pp 61-68,Blackwell Publishing.

6-Currier ,T.C.,and Nester ,E.W.1976.Isolation of covalently closed circular DNA of high molecular weiht from bactrial strain Anal .Biochem.**76**:431-441

7-Endow,S.A.,AND roberts,R.J,1979.Tow restriction –like enzyme from xanthomonas malvacearum.J.Mol.Biol,**112**:6521-

8-Gingerase,T.R.,Mayer,p.A.,Olson,j.A andRoberts,R.J.,1978 A new specific endonuclease present in xantomonasholcicola j.mol.biol.**118**,113

9-Maclelland ,M.and Nelson ,M.,1988.The effect of sit-specific DNA methylation on restriction endo nuclease and DNA modification methyl transferases .Gene .**74**.291-304

10- Mingyue HE., Mustak.A. kaderbhai,1991.Technical note: an improved and rapid procedure for isolting RNA –Free E coli plasmid DNA : gene analysis technique application. **8**:107-110.

11-Roberts,R.J., andMaclis,D.1996 Rebase restrictionenzymes and Metylases Nucleic Acid Recarch,.**24(1):**223-235.

12-se chang kwon,1988,purification and characterization of xho11 Endonuclease from xanthomonas holcicola,Korean biochem j.**21(2):** pp134-140

13- Smith ,HO,.Nathans,D, 1973,nomenclature for bacterail host modification restriction systems and their anzymes ,J.Mol.Biol. **81**:419.

14-Smith,H.o,wilcox,k.w.1970,restriction enzyme from Hemophilus influenzae ,purification and general properties.J.Mol.Bio.**51**:379-392.

15-Torson.J.1991.Isolation and purification chromosomal DNA from bactrial strains .current protocole in Molecular Biology Green publishing Associates/wiley interscience Newyork.

www.SID.ir