Archive of SID

کلونینگ قطعات کروموزومی برش خورده ناکامل باسیلوس سرئوس در باکتریوفاژ لامبدا، ساخت مخزن ژنی λ ZAP

*دکتر جواد بهروان و ** دکتر ای مویر

*دانشکده داروسازی و مرکز تحقیقات علوم دارویی پژوهشکده بوعلی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد

**دپارتمان بیولوژی و بیوتکنولوژی، دانشگاه شفیلد، انگلستان

خلاصه

یك مخزن ژنی λ ZAP از DNA کروموزومی باسیلوس سرئوس UM20.1 ۵۶۹ تهیه شد و برای یافتن کلون مناسب مورد غربالگری قرار گرفت. DNA کروموزومی از ارگانیسم یادشده فوق استخراج و با آنزیم برش دهنده *Sau*3A به صورت ناکامل برش زده شد. قطعات DNA دارای اندازه بین ۹-۴ کیلو جفت باز، از ژل آگارز بریده و خالص سازی شدند. سپس DNA خالص شده در بازوهای فاژ لامبدا که با آنزیم *Bam*HI برش خورده بودند کلون شد. محصول واکنش به صورت فاژهای فعال بسته بندی گردید. به منظور تعیین غلظت فاژهای فعال و تعیین نسبتی از آنها که حاوی DNA کلون شده بودند، عصاره بسته بندی شده تیتر شد و میزان فاژهای مزبور $۲/۸ \times ۱۰^{۵}$ pfu.μg^{-1} نسبت به وزن حامل مورد استفاده تعیین گردید. جداسازی پلاسمید pBK-CMV بصورت درون سلولی از حامل کلون جداشده انجام و منجر به جداسازی دو پلاسمید pJB1 و pJB2 گردید. دو پلاسمید مذکور جهت تعیین توالی DNA مورداستفاده قرار گرفتند.

کلمات کلیدی: مخزن ژنی λ ZAP ، باسیلوس سرئوس، کلونینگ

مقدمه

علیرغم پیشرفت قابل توجه در جهش زایی با واسطه ترانسپوزون Tn*917*-LTV1، جداسازی و دستیابی به DNA مجاور با انتهای دور از *lacZ* ترانسپوزون ممکن نیست (۲). بنابراین ساخت مخزن ژنی یك بخش مسلم و جدانشدنی از یك روش مدرن جهش زایی با ترانسپوزون می باشد تا محقق را قادر سازد که به تمام توالی ژن غیرفعال شده دسترسی داشته باشد (۵،۳). باکتریوفاژ لامبدا سالهاست که به عنوان یك حامل کلونینگ مورداستفاده قرار می گیرد و دانش وسیعی که از مطالعات ژنتیك و تداخل فاژ با *E. coli* (میزبان این فاژ) به دست آمده است منجر به ساخت حامل های DNA بر پایه فاژ لامبدا شده است (۴). حامل های لامبدا مزایای زیادی ازجمله ظرفیت کلونینگ بالا، بسته بندی بسیار کارآمد DNA و مراحل آلوده سازی راحت تر را دارند.

اگر تعداد کل فاژهای نوترکیب موردنیاز جهت داشتن یك کپی از تمام ژنوم یا کپی از تمام mRNA را درنظر بگیریم، مزیت ظرفیت بالای پذیرش کلون (۲۰ تا ۲۵ کیلوباز) بیشتر آشکار می شود. به عنوان مثال یك مخزن ژنی برای اینکه ژنوم یك پستاندار را عرضه کند نیاز به حدود ۸×۱۰^{۵} حامل نوترکیب دارد تا با احتمال ۹۹درصد یك توالی موردنظر داشته باشد (۴). مراحل اصلی در ساخت، غربالگری و جداسازی کلون از یك حامل لامبدا حاوی DNA ژنومیك یا cDNA به شرح زیر است:

۱- تهیه نمونه و DNA حامل ۲- اتصال DNA ژنومیك با cDNA با حامل لامبدا ۳- واکنش بسته بندی ۴- تیترکردن مخزن ژنی ۵- تکثیر مخزن ژن ۶- غربالگری برای یافتن کلون

www.SID.ir

Archive of SID

نوترکیب موردنظر ۷- تهیه عصاره حاصل از تجزیه فاژی ۸- جداسازی DNA لامبدای نوترکیب.

در این مقاله استفاده از حامل لامبدا برای کلون کردن DNA ژنومیك که بطور ناکامل برش خورده، از باکتری باسیلوس سرئوس UM20-1 ۵۶۹ گزارش می شود (۱). همچنین تهیه و غربالگری مخزن ژنی در این مقاله ارائه می شود.

مواد و روشها

تمام محلولهای مورد استفاده در این مطالعه برای کار میکروبیولوژیك و دستکاری برون سلولی DNA، اتوکلاو شدند. شرایط اتوکلاو کردن ۲۰ دقیقه در ۱۲۱ درجه سانتی گراد (۱۵ پوند بر اینچ مربع) بود.

مواد شیمیایی و آنزیمها همگی دارای درجه آنالیتیك بودند و از شرکت های Fisions, Sigma یا BDH خریداری شدند. X-gal (۵- برومو -۴- کلرو-۳ ایندولیل - β-D- گالاکتوپیرانوزید از شرکتNorthumberia Biologicals در دی متیل فرمامید به میزان ۲۰ میلی گرم در میلی لیتر در آب مقطر حل و با استفاده از فیلتر استریل و در ۲۰ - درجه سانتی گراد نگهداری شد.

تهیه مخزن ژنی λ ZAP از DNA کروموزومی

DNA کروموزومی باسیلوس سرئوس به طور ناکامل با *Sau*3A برش داده شد (۳). DNA هضم شده در ژل آگارز (w/v) ۰/۷٪ جداسازی و یك قطعه از ژل که مربوط به اندازه های ۹-۴ کیلو باز بود، بریده شد. قطعات DNA مربوطه با استفاده از کیت GENECLEAN II شرکت Quiagen خالص سازی شد. واکنش اتصال قطعات با افزودن یك میکروگرم از قطعات کروموزومی مذکور و یك میکروگرم از بازوهای ZAP، ۰/۵میکرولیتر بافر اتصال ۱۰x، ۰/۵ میکرولیتر ۱۰ میلی مولار ATP (pH=۷/۵) ، ۲ واحد لیگاز T_4 DNA، تهیه و حجم کل به ۵ میکرولیتر رسید. مخلوط واکنش اتصال در ۱۵ درجه سانتی گراد به مدت ۱۲ ساعت نگهداری شد و سپس این مخلوط با عصاره بسته بندی فاژ لامبدای شرکت استراتا ژن بنام Gigapack II بسته بندی شد.

آماده سازی باکتریهای میزبان فاژ، *E. coli*

باکتریهای میزبان با تلقیح یك کلونی مجزا از *E. coli XL1*-Blue MRF′ حاوی ۰/۲٪ مالتوز و ۱۰ میلی مولار $MgSO_4$ تهیه شدند. پس از گرمخانه گذاری شبانه در ۳۰ درجه سانتی گراد و با شدت تکان خوردن ۲۵۰ دور در دقیقه، مقداری از محیط کشت به نسبت ۱:۱۰۰ در ۵۰ میلی لیتر از LB رقیق شد. کشت حاصله به مدت ۲تا۳ ساعت تا هنگامی که دانسیته نوری درطول موج ۶۰۰ نانومتر، ۰/۵ بشود در ۳۷ درجه سانتی گراد، نگهداری شد.

تیتراسیون مخزن ژنی λ ZAP

به منظور تعیین غلظت فاژهای آلوده کننده و نسبتی از آنها که حاوی قطعات کلون شده بودند، عصاره بسته بندی شده مورد آزمایش قرار گرفت. یك میکرولیتر از مخلوط بسته بندی شده با ۲۰۰ میکرولیتر باکتریهای میزبان XLI-Blue MRF′ به مدت ۱۵ دقیقه در ۳۷ درجه سانتی گراد گرمخانه گذاری شد. مخلوط مذکور به ۳ میلی لیتر آگار رویی LB حاوی ۱۵ میکرولیتر IPTG (۰/۵ مولار) و ۵۰ میکرولیتر از X-gal (۲۵۰ میلی گرم بر میلی لیتر دی متیل فورمامید) اضافه شد و شبانه در ۳۷ درجه سانتی گراد نگهداری گردید. ذرات فاژ حاوی قطعه کلون شده به صورت پلاك های سفید و فاژهای غیرنوترکیب به صورت پلاکهای آبی رنگ مشاهده شدند.

نشانه گذاری کاوشگرهای DNA با دی گوکسی ژنین

قطعات DNA مربوط به پلاسمیدهای حاوی ژن موردنظر توسط روش پرایمر تصادفی و با استفاده از کیت نشانه گذاری و شناسایی DNA با دی گوکسی ژنین (DIG) نشانه گذاری شدند. DNA الگو (حدودا ۳ میکروگرم در ۵ میکرولیتر) با حرارت و در یك حمام آب جوش به مدت ۱۰ دقیقه دناتوره شد و بلافاصله با مخلوط اتانل و یخ به مدت ۳۰ ثانیه سرد گردید. به DNA دناتوره شده، ۲ میکرولیتر از مخلوط های هگزانوکلئوتیدی با غلظت ده برابر و مخلوط نشانه گذاری dNTP با غلظت ده برابر اضافه شد.حجم واکنش با آب مقطر تا ۱۹ میکرولیتر رسانیده شد و سپس یك میکرولیتر از جزء Klenow مربوط به آنزیم پلی مراز I *E. coli* اضافه شد.

www.SID.ir

Archive of SID

مخلوط واکنش شبانه و در ۳۷ درجه سانتیگراد انکوبه شد و سپس واکنش با افزودن ۲ میکرولیتر از EDTA، ۲۰۰ میلی مولار با pH= ۸ خاتمه یافت. DNA نشانه گذاری شده با افزودن ۰/۱۰ حجم از کلرید لیتیوم ۴ مولار و ۲/۵ حجم از اتانل سرد شده با یخ، رسوب داده شد و بعد از مخلوط کردن کامل لوله مربوطه در ۷۰- درجه سانتی گراد به مدت ۳۰ دقیقه نگهداری شد و DNA با سانتریفوژ (۱۳۰۰۰ g) به مدت ۱۵ دقیقه در ۴ درجه سانتی گراد) ته نشین گردید. اتانل از لوله خارج و رسوب ته نشین شده با اتانل ۷۰٪ (۲۰- درجه سانتی گراد) شسته شد. رسوب ته نشین شده در یك دسیکاتور وصل به خلاء خشك و در ۵۰ میکرولیتر از بافر TE سوسپانسیون شد. DNA نشانه گذاری شده یا بلافاصله مورداستفاده قرار گرفت یا در ۲۰- درجه سانتی گراد نگهداری شد.

مقدار DNA نشانه گذاری شده در مقایسه با DNA نشانه گذاری شده کنترل که دارای غلظت مشخص بود به شرح زیر تعیین گردید. DNA نشاندار کنترل و کاوشگر تهیه شده رقیق، و یك میکرولیتر از رقت های مختلف از ۲۰: ۱ تا ۲۰۰۰۰۰۰: ۱ برروی غشاءهای نایلون بار مثبت Hybond (شرکت Amersham) قرار گرفتند. سپس DNA برروی غشاء با روش تثبیت قلیایی ثابت شد و آشکارسازی DNA نشاندار شده با DIG انجام گرفت (به روش ایمونولوژیك با استفاده از آنتی بادی آنتی دیگوکسی ژنین متصل به آنزیم آلکالن فسفاتاز شدت رنگ نقاط به دست آمده، رقت های کنترل و کاوشگر با یکدیگر مقایسه شدند و غلظت کاوشگر به طور تخمینی محاسبه گردید. قبل از استفاده کاوشگر با گذاشتن لوله آن در آب جوش به مدت ده دقیقه دناتوره شد و بلافاصله لوله برروی یخ منتقل گردید).

تثبیت DNA برروی غشاء

غشاءهای نایلونی دارای بار مثبت Hybond از موسسه Amersham مورد استفاده قرار گرفتند. DNA برروی غشاء مذکور توسط ایجاد ارتباط متقاطع ازطریق اشعه ماوراءبنفش (۷۰۰ میلی ژول به مدت ۱۵ ثانیه) تثبیت شد.

بلاتینگ پلاک

سلولهای نشانگر و فاژها در آگارز رویی (۳ میلی لیتر برای هر پلیت) مخلوط شدند. آگارز رویی با افزودن ۰/۷ گرم آگارز به ۱۰۰ میلی لیتر محیط کشت LB و اتوکلاوکردن آن به دست آمد. قبل از استفاده یك میلی لیتر $MgSO_4$ (یك مولار) و یك میلی لیتر مالتوز استریل (۲۰ w/v٪) اضافه شد. پلیت ها به مدت ۸ ساعت در ۳۷ درجه سانتی گراد انکوبه شدند تا هنگامی که پلاك ها قابل رویت شدند (حدودا با قطر یك میلی متر). به طور تقریبی در هر پلیت ۱۰۰۰۰ پلاك مورد بررسی قرار گرفت. پلیت ها به مدت یك ساعت در ۴ درجه سانتی گراد سرد شده و سپس دایره های بریده شده از غشاء نایلونی دارای بار مثبت Hybond به مدت ۳۰ تا ۶۰ ثانیه برروی آنها قرار گرفت.

جهت قرارگرفتن غشاء برروی پلیت علامت گذاری شد و سپس غشاء مذکور در شرایطی که پلاك ها بروی غشاء قرار داشتند به مدت ۱۰ دقیقه برروی کاغذهای صافی خشك شد و سپس در شرایطی که پلاك ها به سمت بالای آن بودند به مدت ۵ دقیقه بروی کاغذ صافی اشباع شده با محلول دناتوره کننده (۰/۵ مولار NaOH و ۱/۵ مولار NaCl) گذاشته شد. پس غشاء مذکور برای مدت ۵ دقیقه دیگر برروی یك کاغذ صافی دیگر که با محلول خنثی کننده (تریس هیدروکلراید یك مولار با pH =۷/۵ و NaCl، ۱/۵ مولار) اشباع بود و سپس به مدت ۱۵ دقیقه برروی یك کاغذ صافی دیگر اشباع شده با محلول SSC ×۲ قرار گرفت. DNA در مرحله بعد با ایجاد ارتباطات متقاطع توسط پرتو ماوراء بنفش غشاء تثبیت گردید.

پیش دو رگه سازی و دو رگه سازی

غشاءهایی که قرار بود با DNA نشاندار شده با DIG مورد کاوش قرار گیرند به مدت یك ساعت در ۶۸ درجه سانتی گراد در محلول پیش از دورگه سازی (۲۰ میلی لیتر به ازای هر ۱۰۰ سانتی متر مربع از غشاء) قرار گرفتند. محلول

www.SID.ir

Archive of SID

پیش از دو رگه سازی شامل SSC × ۵، (W/V) ۱٪ عامل بلوك كننده ۰/۱٪ ان لوریل سارکوزین و ۰/۰۲٪ SDS بود. غشاء مذکور سپس با کاوشگر نشاندار شده به صورت شبانه در ۶۸ درجه سانتی گراد انکوبه شد. غلظت کاوشگر مورداستفاده ۵ تا ۲۵ نانوگرم بر میلی لیتر درطی مراحل پیش دورگه سازی بود. کاوشگر متصل نشده به غشاء با محلول SSC ×۲ حاوی ۰/۱٪ SDS به مدت ۵ دقیقه و در درجه حرارت دوبار شستشو شد. سپس غشاء با محلول ۰/۱٪ SSC حاوی (W/V) ۰/۱٪ SDS به مدت ۱۵ دقیقه در ۶۸ درجه سانتی گراد شسته شد.

آشکارسازی DNA نشاندار شده با DIG

غشاءهای دورگه سازی شده و شستشو داده شده با بافر شماره ۱ (مالئیك اسید ۱۰۰ میلی مولار، NaCl، ۱۵۰ میلی مولار، pH= ۷/۵) به مدت یك دقیقه به تعادل رسید و به مدت ۳۰ دقیقه با حرکت دادن آرام در بافر شماره ۲ (بافر ۱ + ۱٪ عامل بلوك كننده) بلوك شد. غشاء مذکور سپس به بافر شماره ۲ حاوی رقت ۱:۵۰۰۰ محلول ذخیره آنتی بادی آنتی DIG مارکدار شده با آلکالن فسفاتاز منتقل شد. پس از ۳۰ دقیقه انکوباسیون با حرکت آهسته، غشاء با بافر یك شسته شد و سپس دوبار (هر بار ۱۵ دقیقه) با بافر یك حاوی ۰/۳٪ توین ۲۰ شسته شد. سپس غشاء مذکور به مدت دو دقیقه با بافر ۳ حاوی ۴۵ میکرولیتر نیتروتترازولیوم بلو (۷۵ میلی گرم بر میلی لیتر در دی متیل فورمامید ۷۰٪) و ۳۵ میکرولیتر ایکس فسفات (۵۰ میلی گرم در میلی لیتر در DMF) مجاور شد و در مکان تاریك نگهداری گردید. پس از ایجاد رنگ غشاء با TE×۱شسته شدو سپس در محیط خشك وتاریك نگهداری شد.

جداسازی پلاسمید pBK-CMV از وکتور شناسایی شده λ ZAP به صورت درون سلولی

یك حفره شامل پلاك موردنظر از پلیت آگاردار جدا شد و در یك لوله میکروفیوژ حاوی ۵۰۰ میکرولیتر بافر SM و ۲۰ میکرولیتر کلرفرم قرار گرفت. پس از ورتکس کردن برای آزادسازی فاژها، لوله در ۴ درجه سانتی گراد به صورت شبانه نگهداری شد. سپس ۲۰۰ میکرولیتر از سلولهای میزبان با ۲۰۰ میکرولیتر از فاژهای موجود در SM و یك میکرولیتر از فاژ کمك دهنده Ex Assist (10^5 واحد تشکیل دهنده پلاك) مخلوط شد. پس از گرمخانه گذاری در ۳۷ درجه سانتی گراد و به مدت ۱۵ دقیقه، ۳ میلی لیتر LB به آن اضافه شد و کشت مذکور به مدت ۲ ساعت در ۳۷ درجه سانتی گراد نگهداری گردید. این کشت سپس در ۷۰ درجه سانتی گراد و به مدت ۱۵ دقیقه حرارت داده شد و سپس اجزاء سلولی توسط سانتریفوژg۵۰۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه در درجه حرارت اطاق) جداسازی شدند. مایع رویی که حاوی فاژمید بسته بندی شده بود به یك لوله استریل منتقل شد. ۱۰۰ میکرولیتر فاژمید جداشده با استفاده از ۲۰۰ میکرولیتر سلولهای میزبان *E. coli* XLOLR که مانند *E.coli* XLl-Blue MRF′ تهیه شده بودند اضافه شد و مخلوط در ۳۷ درجه سانتی گراد به مدت ۱۵ دقیقه نگهداری گردید. محیط کشت LB به میزان ۳۰۰ میکرولیتر به لوله افزوده شد و لوله به مدت ۴۵ دقیقه در ۳۷ درجه سانتی گراد نگهداری شد. رقت هایی از مخلوط تهیه شده برروی پلیت های LB حاوی ۵۰ میکروگرم بر میلی لیتر کانامیسین ریخته شد و به صورت شبانه در ۳۷ درجه سانتی گراد انکوبه شدند. کولونی های مقاوم به کانامایسین بعدا [illegible] سازی شده و پلاسمید حاصله استخراج و تعیین [illegible] شد.

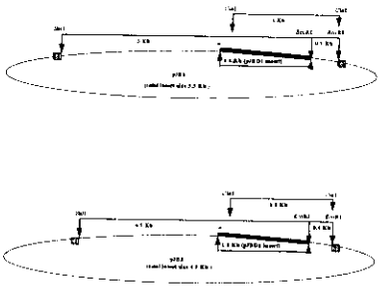
نتایج و بحث

بازیافت قطعه کامل موردنظر از مخزن ژنی λZAP

DNA کروموزومی مجاور ناحیه ورود ترانسپوزون در بخش دور از ژن *lacZ* با روش سریع کلونینگ (۲) قابل بازیابی نیست لذا یك مخزن ژنی از DNA کروموزومی باسیلوس سرئوس تهیه شد و با استفاده از یك کاوشگر به دست آمده از DNA موجود در پلاسمید pJBDI مورد غربالگری قرار گرفت.

www.SID.ir

Archive of SID



تصویر ۱: نقشه برداری برشی از ناحیه کلون شده در پلاسمید pJB2 – pJB1 . پلاسمیدها با آنزیم های مختلف محدودگر هضم شدند و قطعات مربوطه برروی ژل آگارز ۰/۷٪ جداسازی شدند. اندازه های نشان داده شده تخمینی هستند و محل های برش *Dra*I نشان داده نشده است. دو بلوک نشان داده شده مربوط به ناحیه چندگانه کلونیگ (MCS) است که در اطراف ناحیه ورود DNA کلون شده قرار دارد.
محل ترانسپوزون Tn*917*-LTV1 درموتانت AM1334 (۱).

مخزن ژنی λZAP از باسیلوس سرئوس UM20.1 ۵۶۹ تهیه گردید. ابتدا DNA کروموزومی استخراج شد و با آنزیم *Sau*3A به صورت ناکامل برش داده شد. قطعات بین ۴ تا ۹ کیلو جفت باز از DNA که مورد هضم ناکامل قرار گرفته بود از ژل جداسازی، خالص سازی (به میزان یك میکروگرم) و بعد در بازوهای حامل λZAP (یك میکروگرم) کلون شد و محصول واکنش در ۵۰۰ میکرولیتر حجم کل بسته بندی شد. سپس مخزن ژنی ساخته شده برروی *E.coli* XL1-Blue MRF′ تیتر شد. از آنجا که DNA باسیلوس سرئوس ژن *lacZα* حامل را غیرفعال نموده بود (۱)، پلاکهای نوترکیب برروی پلیت های حاوی IPTG/X-gal روشن بودند درحالی که پلاکهای غیرنوترکیب آبی بودند. بازیابی فاژهای نوترکیب به میزان $۲/۸\times۱۰^{۵}$ واحد تشکیل دهنده پلاك به ازای هر میکروگرم از حامل بود درحالی که تیتر فاژهای غیرنوترکیب ۵×۱۰^{۴} واحد تشکیل دهنده پلاك به ازای هر میکروگرم از حامل بود. حدود ۱۰/۰۰۰ پلاك فاژی (حدود ۸۵۰۰ پلاك حاوی قطعات کلون شده) به ازای هر پلیت ۸۵ میلی متری بر روی فیلترهای نیتروسلولزی مورد بررسی قرار گرفتند. یك قطعه دو کیلو بازی *Sal*I / *Eco*RI از پلاسمید pJBD1 که با دیگوکسی ژنین نشاندار شده بود جهت نشان دار کردن فیلتر مورد استفاده قرار گرفت.

حدود ۵۰/۰۰۰ پلاك غربال شدند و بیش از ۸۷ پلاك کاوشگر دورگه سازی (متصل) شدند. جهت تخلیص پلاکهای مثبت یك مرحله ثانوی غربالگری انجام شد. پلاکها از پلیت اولی کنده شدند و به داخل یك میلی لیتر بافر SM حاوی ۲ میکرولیتر کلرفرم به مدت یك شب در ۴ درجه سانتی گراد قرار گرفتند. به منظور جداسازی سوسپانسیون فاژها در مرحله بعدی سانتریفوژ شد و سپس رقیق سازی و فاژها پلیت گیری شدند تا پلاکهای مجزا و کاملا جدا ایجاد نمودند. در این مرحله پلاکها برروی فیلتر نیتروسلولز قرار گرفتند و با کاوشگر مورد غربالگری قرار گرفتند. درمورد دوکلون پلاکهای مثبت به مرحله سوم غربالگری نیز برده شدند. دراین مرحله حدودا ۳۰ پلاك در هر پلیت ۸۵ میلی متری غربالگری شدند که تمام آنها با کاوشگر دورگه شدند.

جداسازی پلاسمیدهای pJB1 و pHB2

دو فاژ مختلف خالص شده p4 و p6 که با کاوشگر دورگه شدند جهت جداسازی درون سلولی پلاسمیدهای pBK-CMV بکار گرفته شدند. سیستم Exassist / XLOLR جهت جداسازی موثر فاژمید های pBK-CMV از حامل های λZAPمورد استفاده قرار گرفت. سلولهای *E.coli* XLOLR حاوی پلاسمید جداسازی شده برروی آگار حاوی ۵۰ میکروگرم بر میلی لیتر کانامایسین جدا شدند. حداقل ۵۰۰ کولونی مقاوم به کانامایسین از هر کدام سوسپانسیونهای فاژی خالص شده به دست آمد. DNA پلاسمیدی با استفاده از روش تخریب قلیایی از کلونیهای مربوطه جدا شدند.

آنالیز پلاسمیدهای pJB1 و pJB2 توسط نقشه برداری برشی

نقشه برداری برشی اثبات کرد که پلاسمیدهایی که از یك فاژ جدا شده بودند همگی یکسان بودند. بنابراین فقط دو پلاسمید pJB1 و pJB2 جدا شده از فاژهای p^4 و p^6 مورد مطالعه بیشتر قرار گرفتند. این پلاسمیدها از حامل پلاسمیدی استراتاژن pBK-CMV که حاوی قطعات DNA باسیلوس سرئوس کلون شده در ناحیه *Bam*H1 از محل چندگانه کلونینگ حامل بود تشکیل شده بود.

www.SID.ir

Archive of SID

پلاسمیدهای مذکور با سه آنزیم *Cla*I, *Eco*RI, *Sal*I هضم شدند. این آنزیمها در داخل ناحیه چندگانه کلونینگ طرفین DNA داخل شده برش ایجاد می کرد. شباهت هایی بین DNA کروموزومی کلون شده در هر دو فاژ مید وجود داشت. هر دو حاوی قطعه داخلی *Eco*RI-*Cla*I به میزان ۱/۵ کیلوباز بودند یعنی به همان اندازه ای که در پلاسمید pJBD1 (۱) وجود داشت. قطعه وارد شده در پلاسمید pJB1 (۵/۵ کیلوباز) کمی از قطعه وارد شده در پلاسمید pJB2 (۴/۹ کیلوباز) بزرگتر بود. برای آزمایش اینکه این پلاسمید ها دارای همان ناحیه کروموزومی هستند، پلاسمیدهای مذکور و pJBD1 با آنزیم *Dra*I برش داده شدند، الگوی برش از اندازه های مورد نظر (۰/۵ و ۰/۸ کیلوباز)، که از توالی pJBD1 مورد انتظار بود به دست آمد.

بنابراین در منطقه های بازیابی شده که از ناحیه کلون شده در مخزن ژنی لامبدا تهیه شد هر دو حاوی یک منطقه از pJBD1 بودند (۱). البته یکی از پلاسمیدها قدری از پلاسمید دیگر بزرگتر بود. ناحیه کلون شده درحدود ۰/۵ کیلوباز دریک جهت و ۳/۷ کیلوباز درجهت دیگر کشیده شده بود. این ناحیه مربوط به ۳/۷ کیلوباز از توالی مربوط به انتهای دور از *lacZ* محل ورود ترانسپوزون می باشد. بعدا آزمایشات کلون کردن نیز اثبات نمود که نتیجه گیری فوق صحیح است (۲).

Reference

1. Behravan J., Chirakkal H., Masson A., Moir A., 2000, Mutations in the *gerP* locus of *Bacillus subtilis* and *Bacillus cereus* affect access of germinants to their targets in spores, J. Bacteriology, 182: 1987-1994.
2. Camili A., Portony D.A. and Youngman P. 1990, Insertional mutagenesis of *Listeria monocytogenes* with a novel Tn*917* derivative that allows direct cloning of DNA flanking transposon insertions. J. Bacteriology 172: 3738-3744.
3. Clements M.O. and Moir A., 1998, Role of the *gerI* operon of *Bacillus cereus* 569 in the response of spores to germinants, J. Bacteriology, 180:6729-6735.
4. Sambrook J., Fritsch E. F. & Maniatis T., 1989, In molecular cloning (a laboratory manual). 2nd Ed.m Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor. New York.
5. Thackray P., Behravan J., Southworth T.W. & Moir A., 2001, GerN, an antiporter homologue important in germination of Bacilus cereus endospores, J. Bacteriology, 183: 476-482.

www.SID.ir