

SID



ابزارهای پژوهش



سرویس ترجمه تخصصی



کارگاه‌های آموزشی



بلاگ مرکز اطلاعات علمی



سامانه ویراستاری STES



فیلم‌های آموزشی

سامانه ویراستاری (ویرایش متون فارسی، انگلیسی، عربی)

کارگاه‌ها و فیلم‌های آموزشی مرکز اطلاعات علمی



روش تحقیق کمی

روش تحقیق کمی



آموزش مهارت‌های کاربردی در تدوین و چاپ مقالات ISI

آموزش مهارت‌های کاربردی در تدوین و چاپ مقالات ISI



آموزش نرم افزار Word برای پژوهشگران

آموزش نرم افزار Word برای پژوهشگران

کلونینگ قطعات کروموزومی برش خورده ناکامل باسیلوس سرئوس

در باکتروفاژ لامبدا، ساخت مخزن ژنی ZAP λ

*دکتر جواد بهروان و **دکترای مویر

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

**دپارتمان بیولوژی و بیوتکنولوژی، دانشگاه شفیله، انگلستان

خلاصه

یک مخزن ژنی ZAP λ از DNA کروموزومی باسیلوس سرئوس UM20.1 ۵۶۹ تهیه شد و برای یافتن کلون مناسب مورد غربالگری قرار گرفت. DNA کروموزومی از آرگانسیم یادشده فوق استخراج و با آنزیم برش دهنده *Sau3A* 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 *BamHI* 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 $۲/۸ \times 10^5$ pfu.μg⁻¹ نسبت به وزن حامل مورد استفاده تعیین گردید. جداسازی پلاسمید pBK-CMV بصورت درون سلولی از حامل کلون جداسازی انجام و منجر به جداسازی دو پلاسمید pJB1 و pJB2 گردید. دو پلاسمید مذکور جهت تعیین توالی DNA مورد استفاده قرار گرفتند.

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

مقدمه

اگر تعداد کل فاژهای نو ترکیب مورد نیاز جهت داشتن یک کپی از تمام ژنوم یا کپی از تمام mRNA را در نظر بگیریم، مزیت ظرفیت بالای پذیرش کلون (۲۰ تا ۲۵ کیلوباز) بیشتر آشکار می شود. به عنوان مثال یک مخزن ژنی برای اینکه ژنوم یک پستاندار را عرضه کند نیاز به حدود ۸×10^5 حامل نو ترکیب دارد تا با احتمال ۹۹ درصد یک توالی مورد نظر داشته باشد (۴). مراحل اصلی در ساخت، غربالگری و جداسازی کلون از یک حامل لامبدا حاوی DNA ژنومیک یا cDNA به شرح زیر است:

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

علیرغم پیشرفت قابل توجه در جهش زایی با واسطه ترانسپوزون Tn917-LTV1، جداسازی و دستیابی به DNA مجاور با انتهای دور از *lacZ* ترانسپوزون ممکن نیست (۲). بنابراین ساخت مخزن ژنی یک بخش مسلم و جدانشدنی از یک روش مدرن جهش زایی با ترانسپوزون می باشد تا محقق را قادر سازد که به تمام توالی ژن غیرفعال شده دسترسی داشته باشد (۳، ۵). باکتروفاژ لامبدا سالهاست که به عنوان یک حامل کلونینگ مورد استفاده قرار می گیرد و دانش وسیعی که از مطالعات ژنتیک 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 از جمله ظرفیت کلونینگ بالا، بسته بندی بسیار کارآمد DNA و مراحل آلوده سازی راحت تر را دارند.

آماده سازی باکتریهای میزبان فاز، *E. coli*

باکتریهای میزبان با تلقیح یک کولونی 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 ۳ تا ۲ ساعت تا هنگامی که دانسیته نوری در طول موج ۶۰۰ نانومتر، ۰/۵ شود در ۳۷ درجه سانتی گراد، نگهداری شد.

تیتراسیون مخزن ژنی λ ZAP

به منظور تعیین غلظت فازهای آلوده کننده و نسبتی از آنها که حاوی قطعات کلون شده بودند، عصاره بسته بندی شده مورد آزمایش قرار گرفت. یک 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 فورامید) اضافه شد و شبانه در ۳۷ درجه سانتی گراد نگهداری گردید. ذرات فاز حاوی قطعه کلون شده به صورت پلاک های سفید و فازهای 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 (حدوداً ۳ میکروگرم در ۵ میکرولیتر) با حرارت و در یک 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 یک میکرولیتر از جزء Klenow مربوط به آنزیم پلی مرز *E. coli* I اضافه شد.

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

در این مقاله استفاده از حامل لامبدا برای کلون کردن DNA ژنومیک 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 میکروبیولوژیک 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 آنالیتیک بودند و از شرکت های Fisions, Sigma یا BDH خریداری شدند. X-gal (۵- برومو-۴- کلرو-۳- ایندولیل -D- β -Northumberia Biologicals از شرکت گلاکتوپیرانوزید از شرکت Northumberia 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 *Sau3A* برش داده شد (۳). DNA هضم شده در ژل آگارز (w/v) ۰/۷٪ جداسازی و یک قطعه از ژل که مربوط به اندازه های ۹-۴ کیلو باز بود، بریده شد. قطعات DNA مربوطه با استفاده از کیت GENE CLEAN II شرکت Quiagen خالص سازی شد. واکنش اتصال قطعات با افزودن یک میکروگرم از قطعات کروموزومی مذکور و یک میکروگرم از بازوهای ZAP ۰/۵ میکرولیتر بافر اتصال ۱۰x، ۰/۵ میکرولیتر ۱۰ میلی مولار ATP (pH=۷/۵)، ۲ واحد لیگاز DNA T_4 ، 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 فاز لامبدای شرکت استراتا ژن بنام Gigapack II بسته بندی شد.

مذکور توسط ایجاد ارتباط متقاطع از طریق 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 اتوکلاو کردن آن به دست آمد. قبل از استفاده یک میلی لیتر $MgSO_4$ (یک مولار) و یک 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 پلاک ها قابل رویت شدند (حدوداً با قطر یک میلی متر). به طور تقریبی در هر پلیت ۱۰۰۰۰ پلاک مورد بررسی قرار گرفت. پلیت ها به مدت یک 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 بر روی آنها قرار گرفت.

جهت قرار گرفتن غشاء بر روی پلیت علامت گذاری شد و سپس غشاء مذکور در شرایطی که پلاک ها بروی غشاء قرار داشتند به مدت ۱۰ دقیقه بر روی کاغذهای صافی خشک شد و سپس در شرایطی که پلاک 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 بر روی یک کاغذ صافی دیگر که با محلول خنثی کننده (تریس هیدروکلراید یک مولار با pH=۷/۵ و NaCl ۱/۵ مولار) اشباع بود و سپس به مدت ۱۵ دقیقه بر روی یک کاغذ صافی دیگر اشباع شده با محلول ۲× SSC 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 یک 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

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 یک دسیکاتور وصل به خلاء خشک و در ۵۰ میکرولیتر از بافر TE سوسپانسیون شد. DNA نشانه گذاری شده یا بلافاصله مورد استفاده 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 یک میکرولیتر از رقت های مختلف از ۱:۲۰ تا ۱:۲۰۰۰۰۰۰ بر روی غشاءهای نایلون بار مثبت Hybond (شرکت Amersham) قرار گرفتند. سپس DNA بر روی غشاء با روش تثبیت قلبایی ثابت شد و آشکارسازی DNA نشاندار شده با DIG انجام گرفت (به روش ایمونولوژیک با استفاده از آنتی بادی آنتی دیگوکسی ژنین متصل به آنزیم آلکالین 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 بر روی یخ منتقل گردید).

تثبیت DNA بر روی غشاء

غشاءهای نایلونی دارای بار مثبت Hybond از موسسه Amersham مورد استفاده قرار گرفتند. DNA بر روی غشاء

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 یک میکرولیتر از فاژ کمک دهنده Ex Assist (۱۰^۵ واحد تشکیل دهنده پلاک) 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 سانتریفوژ ۵۰۰۰g به مدت ۱۰ دقیقه در درجه حرارت اتاق جداسازی شدند. مایع رویی که حاوی فاژمید بسته بندی شده بود به یک لوله استریل منتقل شد. ۱۰۰ میکرولیتر فاژمید جداسازی شده با استفاده از ۲۰۰ میکرولیتر سلولهای میزبان *E. coli* XL0LR که مانند *E. coli* XLI-Blue MRF^r 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 بر روی 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 کانامیسین بعد از ۱۸ ساعت سازی شده و پلاسمید حاصله استخراج و تعیین جنس و میزبان شد.

فازمید و پلاسمید

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

پیش از دو رگه سازی شامل SSC $\times 5$ ، ۱ (W/V) عامل بلوک کننده 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 مورد استفاده ۵ تا ۲۵ نانوگرم بر میلی لیتر در طی مراحل پیش دورگه سازی بود. کاوشگر متصل نشده به غشاء با محلول $2 \times$ SSC حاوی ۱/۰٪ SDS به مدت ۵ دقیقه و در درجه حرارت دوبرار شستشو شد. سپس غشاء با محلول ۱/۰٪ SSC حاوی ۱ (W/V) 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 (مالیک اسید ۱۰۰ میلی مولار، NaCl، ۱۵۰ میلی مولار، pH=۷/۵) به مدت یک دقیقه به تعادل رسید و به مدت ۳۰ دقیقه با حرکت دادن آرام در بافر شماره ۲ (بافر ۱ + ۱٪ عامل بلوک کننده) بلوک شد. غشاء مذکور سپس به بافر شماره ۲ حاوی رقت ۱:۵۰۰۰ محلول ذخیره آنتی بادی آنتی DIG مارکدار شده با آلکان فسفاتاز منتقل شد. پس از ۳۰ دقیقه انکوباسیون با حرکت آهسته، غشاء با بافر یک شسته شد و سپس دوبرار (هر بار ۱۵ دقیقه) با بافر یک حاوی ۰/۳٪ توین ۲۰ شسته شد. سپس غشاء مذکور به مدت دو دقیقه با بافر ۳ حاوی ۴۵ میکرولیتر نیتروترتروزولیوم 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 تاریک نگهداری گردید. پس از ایجاد رنگ غشاء با $1 \times$ TE شسته شد و سپس در محیط خشک و تاریک نگهداری شد.

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

یک حفره شامل پلاک مورد نظر از پلیت آگاردار جدا شد و در یک لوله میکروفیوژ حاوی ۵۰۰ میکرولیتر بافر SM و ۲۰ میکرولیتر کلر فرم قرار گرفت. پس از ورتکس کردن برای

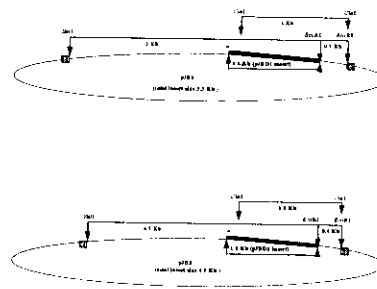
حدود ۵۰/۰۰۰ پلاک غریبال شدند و بیش از ۸۷ پلاک کاوشگر دورگه سازی (متصل) شدند. جهت تخلیص پلاکهای مثبت يك مرحله ثانوی غربالگری انجام شد. پلاکها از پلیت اولی کنده شدند و به داخل يك میلی لیتر بافر SM حاوی ۲ میکرولیتر کلرفرم به مدت يك شب در ۴ درجه سانتی گراد قرار گرفتند. به منظور جداسازی سوسپانسیون فاژها در مرحله بعدی سانتریفوژ شد و سپس رقیق سازی و فاژها پلیت گیری شدند تا پلاکهای مجزا و کاملاً جدا ایجاد نمودند. در این مرحله پلاکها بر روی فیلتر نیتروسولوز قرار گرفتند و با کاوشگر مورد غربالگری قرار گرفتند. درمورد دو کلون پلاکهای مثبت به مرحله سوم غربالگری نیز برده شدند. در این مرحله حدوداً ۳۰ پلاک 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 / XLORL جهت جداسازی موثر فایمیدهای pBK-CMV از حامل های λZAP مورد استفاده قرار گرفت. سلولهای *E. coli* XLORL حاوی پلاسمید جداسازی شده بر روی 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 يك فاژ جدا شده بودند همگی یکسان بودند. بنابراین فقط دو پلاسمید pJB1 و pJB2 جدا شده از فاژهای p⁴ و p⁶ مورد مطالعه بیشتر قرار گرفتند. این پلاسمیدها از حامل پلاسمیدی استراتاژن pBK-CMV که حاوی قطعات DNA باسیلوس سرئوس کلون شده در ناحیه BamHI از محل چندگانه کلونینگ حامل بود تشکیل شده بود.



تصویر ۱: نقشه برداری برشی از ناحیه کلون شده در پلاسمید pJB2 – pJB1. پلاسمیدها با آنزیم های مختلف محدودگر هضم شدند و قطعات مربوطه بر روی ژل آگارز ۰.۷٪ جداسازی شدند. اندازه های نشان داده شده تخمینی هستند و محل های برش DraI نشان داده نشده است. دو بلوک نشان داده شده مربوط به ناحیه چندگانه کلونیک (MCS) است که در اطراف ناحیه ورود DNA کلون شده قرار دارد. محل ترانسپوزون Tn917-LTV1 درموتانت AM1334 (۱).

مخزن ژنی λZAP از باسیلوس سرئوس UM20.1 ۵۶۹

تهیه گردید. ابتدا DNA کروموزومی استخراج شد و با آنزیم *Sau3A*، 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 يك میکروگرم) و بعد در بازوهای حامل λZAP (يك میکروگرم) کلون شد و محصول واکنش در ۵۰۰ میکرولیتر حجم کل بسته بندی شد. سپس مخزن ژنی ساخته شده بر روی *E. coli* XL1-Blue MRF' تیترا شد. از آنجا که DNA باسیلوس سرئوس ژن *lacZα* حامل را غیرفعال نموده بود (۱)، پلاکهای نوترکیب بر روی پلیت های حاوی IPTG/X-gal روشن بودند درحالی که پلاکهای غیرنوترکیب آبی بودند. بازبای فاژهای نوترکیب به میزان $2/8 \times 10^5$ واحد تشکیل دهنده پلاک به ازای هر میکروگرم از حامل بود درحالی که تیترا فاژهای غیرنوترکیب 5×10^4 واحد تشکیل دهنده پلاک به ازای هر میکروگرم از حامل بود. حدود ۱۰/۰۰۰ پلاک فاژی (حدود ۸۵۰۰ پلاک حاوی قطعات کلون شده) به ازای هر پلیت ۸۵ میلی متری بر روی فیلترهای نیتروسولوزی مورد بررسی قرار گرفتند. يك قطعه دو کیلو بازی *SalI* / *EcoRI* از پلاسمید pJB1 که با دیگوکسی ژنین نشاندار شده بود جهت نشان دار کردن فیلتر مورد استفاده قرار گرفت.

ناحیه مربوط به ۳/۷ کیلوباز از توالی مربوط به انتهای دور از *lacZ* محل ورود ترانسپوزون می باشد. بعداً 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 Tn917 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 *Bacillus cereus* endospores, J. Bacteriology, 183: 476-482.

پلاسمیدهای مذکور با سه آنزیم *Clai*, *EcoRI*, *Sall* 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 فاز مید وجود داشت. هر دو حاوی قطعه داخلی *EcoRI-Clai* 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 پلاسمیدها دارای همان ناحیه کروموزومی هستند، پلاسمیدهای مذکور و pJBD1 با آنزیم *DraI* 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 در حدود ۰/۵ کیلوباز در یک جهت و ۳/۷ کیلوباز در جهت دیگر کشیده شده بود. این

SID



ابزارهای پژوهش



سرویس ترجمه تخصصی



کارگاه‌های آموزشی



بلاگ مرکز اطلاعات علمی



سامانه ویراستاری STES



فیلم‌های آموزشی

سامانه ویراستاری (ویرایش متون فارسی، انگلیسی، عربی)

کارگاه‌ها و فیلم‌های آموزشی مرکز اطلاعات علمی



روش تحقیق کمی

روش تحقیق کمی



آموزش مهارت‌های کاربردی در تدوین و چاپ مقالات ISI

آموزش مهارت‌های کاربردی در تدوین و چاپ مقالات ISI



آموزش نرم افزار Word برای پژوهشگران

آموزش نرم افزار Word برای پژوهشگران