ژنتیک کلستریدیا

دکتر رضا پیله‌چیان لنگرودی
عضو هیأت علمی مؤسسه تحقیقاتی رازی

چکیده

طی سالهای اخیر پیشرفتهای زیادی در ژنتیک Clostridium perfringens صورت گرفته است. یک سری پلاسمیدهای الحاقی را در آن خصوصیت یابی نموده و نقشه ژنتیکی‌شان را ترسیم کرده‌اند. تعدادی از ژنهای مقاوم به آنتی بیوتیک‌ها در این باکتری مشخص و ترادف یابی شده‌اند، عناصر ژنتیکی قابل انتقال (transposable genetic elements) باکتری Cl. perfringens مشخص شده‌اند. نوعی پلاسمید کدکننده باکتریوسین آن به طور دقیق بررسی و کاملاً ترادف یابی شده و نقشه ژنتیکی Cl. perfringens باز سازی شده است. به علاوه electroporation در مورد ترانسفورماسیون سلولهای Cl. perfringens با استفاده از DNA پلاسمیدی گزارش شده وامروزه در بسیاری از آزمایشگاه‌ها به طور متداول استفاده می‌شود. تعدادی شاتل پلاسمید Cl. perfringens/ E. coli ساخته شده‌اند.

ترادف‌های ژنی توکسین‌های اپسیلون، آلفا، بتا، تتا و همچنین ترادف‌های ژنی برخی از پلاسمیدهای این باکتری مانند pIP 404 مشخص شده‌اند.

برخی از ژنهای آن مانند کلرآمفنیکل استیل ترانسفراز، ژن سیالیداز، ژن شاخص مقاومت به Tetracycline، ژن باکتریوسین (در پلاسمید pIP404) bcn ، ژن ترشح و ایمنی باکتریوسین (در پلاسمید pIP404 uviAB)، ژن ریکامبیناز (در پلاسمید pIP404 res) و ژن هیستیدین دکربوکسیلاز (در پلاسمید pVP-4) کلون شده‌اند. ترادف‌های پروموتوری پلاسمیدهای (pIP 404) Cl. perfringens و همچنین بخشی از ترادفهای ژنهای mRNA این باکتری که مکمل جایگاه اتصالی با زیر واحد کوچک ریبوزومی هستند (ترادفهای SD=(shine-dalgarno مشخص شده‌اند.

۱- مقدمه

تکنولوژی DNA نوترکیب (DNA recombination) انقلابی بزرگ در بیولوژی محسوب می‌گردد، این تکنولوژی را معمولاً مهندسی ژنتیک (genetic engineering) می‌نامند. وقوع همزمان سه پیشرفت علمی بزرگ در این میان نقش اساسی دارند که عبارتنداز:

الف- توان وارد نمودن DNA بیگانه به داخل باکتری *E. coli* (Transformation) و متعاقباً انتخاب باکتریهای تغییر شکل یافته.

ب - توان استخراج و خالص سازی DNA پلاسمید به مقدار زیاد.

ج - کشف، استخراج و خالص سازی Restriction Enzymes (RE_s).

با ادغام این سه فرآیند می‌توان مهندسی ژنتیک را به شکل زیر خلاصه نمود:

قطعاتی از DNA توسط RE_s بریده شده و بدینوسیله پایانه‌های چسبنده (stickyends) انتخابی به دست می‌آید، سپس قطعات DNA دارای ترادفهای پایانه‌ای مکمل مجدداً به یکدیگر پیوند داده شده و اتصالات جفت بازهای آلی تشکیل می‌گردد و اسکلت (backbone) شکسته شده فسفات را می‌توان مجدداً توسط آنزیمهای لیگاز (DNA Lygase) به یکدیگر اتصال داد. مهمترین مسئله در این میان این است که کلیه قطعات DNA که توسط RE_s مشابهی بریده می‌شوند، دارای پایانه‌های مکملی خواهند بود که قادرند با یکدیگر جفت شوند. آنچه که در این میان مشهود است این است که فرآیند DNA نوترکیب توسط انسان ابداع نشده، بلکه کشف گردیده و موجود زنده با این توانایی‌ها خلق شده است، توانایی‌هایی نظیر ترانسفورماسیون کونژوگاسیون، ترانس دوکسیون و غیره.

در این مقاله، هدف بررسی اطلاعات موجود در مورد ژنتیک کلستریدیومها به طور اعم و ژنتیک *Cl. perfringens* به طور اخص و همچنین چگونگی کاربرد فرآیندهای مهندسی ژنتیک در این باکتری است.

۱-۱- ترانسفورماسیون

این فرآیند در بسیاری از گونه‌های باکتریایی که می‌توانند به طور طبیعی DNA بیگانه را جذب نمایند توصیف شده است. فقط گروه کوچکی از باکتریها چنین توانی را دارند که آنها را Competent می‌گویند. در *E. coli* سلولهای به طور طبیعی به وجود نمی‌آیند ولی می‌توان این باکتریها را در محلول سرد $CaCl_2$ در معرض DNA بیگانه قرارداد و پس از یک شوک حرارتی آنها را به حال خود گذاشت، به این ترتیب DNA بیگانه وارد باکتری می‌گردد ولی مکانیسم ورود آن ناشناخته است. از این طریق 10^7 باکتری تغییر شکل یافته به ازاء هر میکروگرم DNA به کار رفته به دست می‌آید که برای منظور مهندسی ژنتیک کافی است.

۲-۱- پلاسمید

پلاسمیدها قطعاتی از DNA هستند که در باکتریها و برخی از یوکاریوتهای پست مشاهده می‌شوند ولی برای رشد و نمو ارگانیسم ضروری نیستند. چون پلاسمیدها مستقل از کروموزم همانندسازی می‌کنند آنها را عناصر ژنتیکی خارج کروموزمی می‌گویند. اکثر پلاسمیدها مولکول DNA حلقوی هستند ولی انواع خطی آن نیز مشاهده شده است. در مخمر یک پلاسمید خطی دو رشته‌ای RNA وجود دارد که توکسین کشنده‌ای را کد می‌کند که می‌تواند مخمرهای فاقد این پلاسمید را بکشد.

اولین پلاسمید به دست آمده، از *E.Coli* استخراج گردید و به دلیل توان شرکت در کونژوگاسیون و تبادل مواد ژنتیکی، فاکتور F(Fertility=F) نام گرفت. وزن مولکولی این پلاسمید kb ۹۶ است. این پلاسمید قابل انتقال (transmissible) بوده و فرآیند الحاق را آغاز نموده و خود بدین ترتیب وارد باکتری دیگر می‌گردد. فاکتورهای R نوع دیگری از پلاسمیدها هستند که مقاومت آنتی‌بیوتیکی (R=Resistance) را ایجاد نموده و قابل انتقال هستند.

پلاسمید Tol در پزودوموناس باعث می‌شود که میزبان قادر باشد از تولوئن به عنوان منبع کربن استفاده کند. پلاسمیدهای دیگری در باکتریهای ریشه گیاهان تیره لگومینه وجود دارند که باعث تثبیت نیتروژن می‌گردند. برخی از پلاسمیدهای ریزوبیوم اندازه شان بزرگ (kb ۳۰۰) بوده و به تعداد یک یا دو نسخه در هر سلول وجود دارند، لذا تخلیص این پلاسمیدها به سختی صورت گرفته و از یک کشت یک دسیمتر مکعبی باکتریایی در حدود چند میکروگرم DNA به دست می‌آید ولی بسیاری از پلاسمیدها کوچکتر از kb ۱۰ بوده و اغلب غیرقابل انتقال هستند و ۲۰ تا ۴۰ نسخه از آنها در هر سلول وجود دارد، لذا به آسانی تخلیص می‌شوند. یکی از اولین انواع این پلاسمیدها Col E1 می‌باشد که از *E. coli* جدا شده است. این پلاسمیدپروتئین ColicinE1 را تولید می‌کند که سویه‌هایی از *E. coli* را که فاقد این پلاسمید هستند، می‌کشد وفقط سویه‌هایی که این پلاسمید را داشته باشند در مقابله با این پروتئین زنده می‌مانند.

۳-۱- آنزیمهای محدود کننده

آنزیمهای محدود کننده (Restriction Enzymes=RE_s) هنگامی شناخته شدند که مشخص گردید باکتریها قادرند DNA بیگانه را تجزیه نمایند ولی DNA خودشان مصون باقی بماند. دلیل این مصونیت این است که DNA خودی در مناطقی که جایگاه عمل آنزیمهای فوق‌الذکر است متیله شده لیکن DNA بیگانه فاقد این متیلاسیون می‌باشد. این آنزیمها مناطقی به نام Palindrome را روی DNA تشخیص داده و اسکلت قند فسفات را به این منطقه می‌برند. هر گونه باکتریایی آنزیم خاص خود را دارد که ترادف مشخصی را طلب می‌کند و برخی از باکتریها بیش از یک RE دارند. (در پالیندروم که آن را dyad symmetry نیز می‌گویند یک ترادف بازی روی زنجیره 5-3 به طور معکوس روی ترادف دیگر نیز در جهت

5-3 قرار گرفته است. در این جا در هر رشتهٔ DNA مابین دو نوکلئوتید از ترادف مذکور یک یون فسفات بریده شده و لذا یک پایانه چسبنده "Cohesive end" به وجود می‌آید).

امروزه صدها RE_s شناخته شده و مورد استفاده قرار می‌گیرند که برخی پایانه چسبنده و برخی غیر چسبنده (blunt end) ایجاد می‌کنند. برخی ترادف ۶ بازی و گروهی دیگر ترادفهای ۴ بازی را تشخیص می‌دهند. در یک ترادف DNA فرضی، در هر 4^4 باز (۲۵۶ باز) یک ترادف ۴ بازی فرضی و در هر 6^6 باز (۱۳۹۶ باز) یک ترادف ۶ بازی فرضی وجود دارد، لذا RE_s که ترادفهای ۴ بازی را تشخیص می‌دهند برشهای بیشتر و قطعات بریده و محدود شده کوتاهتری را ایجاد می‌کنند. RE_s ارگانیسمهای مختلف که ترادفهای بازی مشابه یکدیگر را تشخیص می‌دهند، Isoschizomer خوانده می‌شوند.

۲- مشخصات عمومی

جنس کلستریدیوم

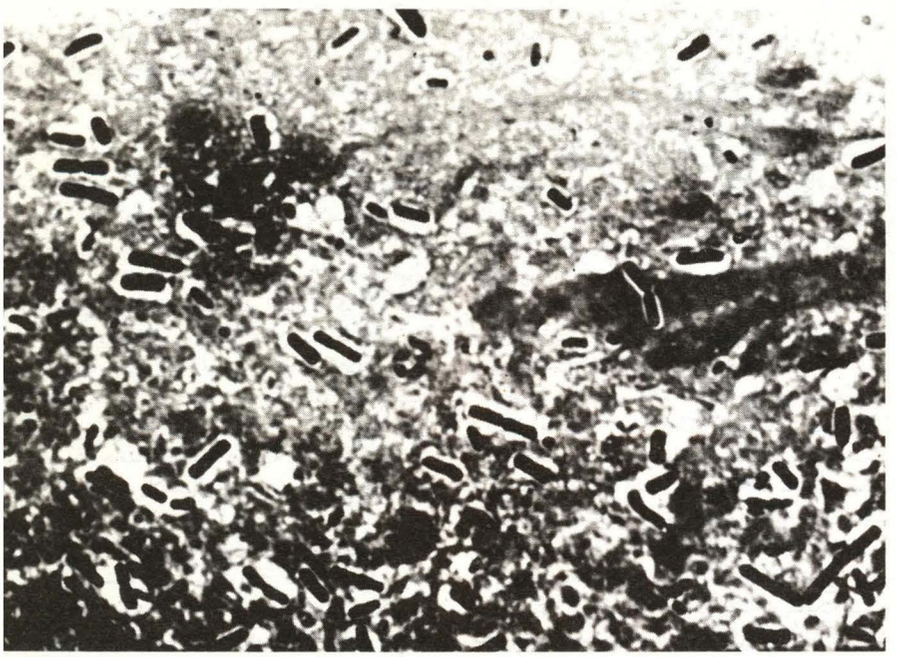
جنس کلستریدیوم شامل گروهی از باکتریهای گرم مثبت بی‌هوازی می‌باشد که در غیاب اکسیژن رشد نموده و اسپورهای مقاوم به حرارت (Heat-resistant spores) ایجاد می‌کنند. بسیاری از آنها برای انسان و دام بیماری‌زا بوده و بیماریهایی نظیر کزاز و بوتولیسم را که در اثر توکسینهای خارج سلولی ایجاد می‌شوند، به وجود می‌آورند. توان اسپورزایی غالباً در اپیدمیولوژی این گونه مسمومیتها اهمیت بسزایی دارد.

Cl. perfringens در روده و معده انسان و حیوانات به طور شایع وجود دارد و باعث بیماریهایی مانند گانگرن گازی، مسمومیت غذایی، آنتروکولیت نکروزان، همچنین باعث دیسانتری در بره، انتروتوکسمی گوسفند و بره، استراک و بیماری قلوه نرمی می‌گردد. *CL. perfringens* معمولاً به پنج تیپ A, B, C, D و E تقسیم می‌شوند. بیماریهایی که توسط این کلستریدیا ایجاد می‌گردند معمولاً در اثر آنزیمها و یا اگزوتوکسین‌های آن به وجود می‌آیند. البته به استثناء مسمومیت غذایی که توسط انتروتوکسین اختصاصی سلول اسپور شده ایجاد می‌گردد.

Cl. perfringens با بسیاری از کلستریدیومهای دیگر از جنبه‌های زیر متفاوت است. این باسیل بی حرکت بوده و فقط در محیط های کشت اختصاصی، اسپور تشکیل میدهد. ارگانیسمی تخمیرکننده بوده و در محیط حاوی کربوهیدرات رشد می‌کند و در چنین محیط هایی مقادیر زیادی H_2 و Co_2 ایجاد می‌کند که به ابقاء شرایط بی هوازی کمک می‌نماید. از آنجایی که Cl. perfringens بسیار سریع‌الرشد بوده و در حضور مقدار کمی اکسیژن قادر به ادامه حیات است، لذا کار کردن با آن در آزمایشگاه ساده بوده و به عنوان مدلی جهت مطالعه ژنتیک کلستریدیایی به کار می‌رود (شکل ۱).

بخش دوم - ابزارهای مورد استفاده در ژنتیک کلستریدیومها

شکل ۱- *Clostridium perfringens* جدا شده از یک نمونهٔ بیماری تصویر در بخش تهیه و تحقیق واکسن‌های بی‌هوازی مؤسسه تحقیقاتی رازی گرفته شده است.



۱- استفاده از موتانتها

یکی از ابزارهای مهم تجزیه و تحلیلهای ژنتیکی، ایزوله کردن سویه‌های موتانت است و از آنجایی که مکانیسمهای تبادل ژنتیکی در *Cl. perfringens* تا سالهای اخیر ناشناخته بود لذامطالعات اولیه در این مورد با استفاده از موتانت‌ها صورت می‌پذیرفت. موتانتهای حاوی نقص در اعمال گونا گونی مانند بیوسنتز اسیدهای آمینه، ویتامینها، پیریمیدینها، پورینها و مسیرهای متابولیکی تخمیرکننده و اسپورزایی در این باکتری یافت و خصوصیت یابی شده‌اند. مؤثرترین موتانت‌ها آنهایی هستند که طی مکانیسم جهش زایی مستقیم (Direct mutagenesis) عمل می‌کنند. از این قبیل عوامل موتاژن می‌توان به (Ethylmethan sulfonate) و همچنین (N-methyl-N -nitro-N-nitrosguanidin) اشاره کرد. عوامل جهش زای غیر مستقیم مانند اشعه UV در این میان بی‌اثرند.

مطالعه سویه‌های موتانت می‌تواند اطلاعات با ارزشی را در مورد عمل و تنظیم ژنی در اختیارمان قرار دهد. لیکن تجزیه و تحلیلهای ژنتیکی بیشتر نیازمند این است که بتوانیم جهشها را از یک سویه به سویه دیگر منتقل نمائیم. چنین امکاناتی تا چند سال پیش در مورد کلستریدیومها وجود نداشت لیکن امروزه روشهای انتقال کونژوگال پلاسمیدها و ترانسپوزونها و ترانسفورماسیون طی ترانسفکشن فاژ / پلاسمید انجام می‌پذیرد.

۲- باکتریوفاژهای *Cl. perfringens*

Cl. perfringens نیز مانند اکثر گونه‌های باکتریایی مستعد آلودگی با باکتریوفاژها می‌باشد ولی این فاژها نقش چندانی در درک ژنتیک این باکتری نداشته‌اند. چهار فاژ متعادل (Temprate phage) از دو رده مختلف در سویه‌های *Cl. perfringens* تیپ C شناخته شده‌اند و کوششهای ناموفقی در جهت ترانس‌دوکسیون ژن مقاومت به اریترومایسین در آنها صورت گرفته است.

همچنین یک فاژ متعادل دیگر به نام S9 را در *Cl. perfringens* تیپ A نژاد Le chien استفاده نموده‌اند. این نژاد که پذیرنده S9 است امروزه سویه 13 نامیده

می‌شود و احتمالاً فاقد سیستم محدود کننده است. اگر چه این سویه قابلیت لیزوژنیزه شدن را دارد لیکن هنوز هیچ کوششی در جهت ترانس دوکسیون مشتقات سویه 13 به منظور بازسازی و نوسازی یک سویه جدید در *Cl. perfringens* صورت نگرفته است.

۳- ترانسفورماسیون کلستریدیومها

پیشرفت تکنولوژی ترانسفورماسیون اهمیت بسزایی در تجزیه و تحلیل ژنتیکی کلستریدیومها داشته است. جهت تجزیه و تحلیل ژنتیکی این باکتریها، سالها از فرم Wall-less آنها استفاده می‌گردید لیکن با توسعه و تکمیل روش Electroporation امروزه می‌توان با کتریهای حاوی دیواره سلولی کامل را مورد ترانسفورماسیون قرار داد.

۳-۱- نوسازی پروتوپلاست - اتوپلاست

استفاده از پروتوپلاست جهت تجزیه و تحلیل ژنتیکی با کتریهای گرم مثبت در اواخر دهه ۱۹۷۰ بر روی انواع گونه‌های باسیلوس و استرپتومایسسها آغاز شد. اهمیت مسئله در مشاهده سلولهای L-form است. سلولهای L-form سلولهائی هستند که دیواره آنها در یک محیط کشت اسمتیک ثابت و پایدار حاوی سوکروز از بین رفته است. اگر این عمل به طور طبیعی صورت گیرد اتولیز نامیده شده و اتوپلاست تشکیل می‌شود ولی اگر به طور مصنوعی و با افزودن لیزوزیم صورت پذیرد پروتوپلاست به وجود می‌آید. سلولهای L-form می‌توانند در حضور پلی‌اتیلن گلیکول، DNA خارجی را جذب نماید. این تکنیک در مورد باکتریهایی به کار می‌رود که بتوانند پس از ترانسفورماسیون مجدداً دیواره سلولی را تشکیل دهند این عمل را می‌توان با کشت بر روی محیط های ایزوتونیک جامد انجام داد. در دهه ۱۹۸۰ با استفاده از این روشها پروتوپلاستهای کلستریایی به وجود آمدند.

۳-۲- ترانسفورماسیون *Cl. perfringens*

دو فرم از سلولهای بدون دیوارهٔ *Cl. perfringens* به نام L-from و اتوپلاست، ترانسفورم شده‌اند. L-form در اثر رشد در محیط کشت مایع حاوی مهار کننده رشد دیواره سلولی مانند Penicillin یا D- Cycluserine به وجود می‌آید. اتوپلاست در نتیجه فعالیت اتولیتیک در محیط کشت یا بافر حاوی پایدار کننده اسموتیک ایجاد می‌شود. هر دو فرم سلول در سال ۱۹۸۴ توسط Heefner و همکارانش با استفاده از pJU 124، یک پلاسمید کونژوگال *Cl. perfringens* که کد کننده مقاومت به Tetracycline (Tc^R) است تغییرشکل یافته‌اند. در حضور ۳۰٪ پلی‌اتیلن گلیکول (PEG 8000) فرکانس ترانسفور منتهای (Tc^R) در حدود ۱۰ µg DNA بوده است. در سال ۱۹۸۸ گروهی دیگر از محققین با استفاده از سلولهای L-form سویه دیگری از *Cl. perfringens* نتیجه مشابهی به دست آوردند. بدین طریق تعدادی شاتل و حامل *E. coli* و *Cl. perfringens* ساخته شده و به داخل *Cl. perfringens* وارد شده‌اند. سلول L-form ایجاد شده از این مسیر نمی‌تواند به حالت باسیلی شکل (واجد دیواره سلولی) بازگشت نماید، لذا بازگشت اتوپلاست تغییرشکل یافته به باکتری دارای دیواره سلولی با روش کامبرزوم (Cumbersome) دو مرحله‌ای صورت گرفت. طی این روش ابتدا واریانتهای L-form با DNA پلاسمید *E. coli* تغییرشکل داده می‌شوند، سپس DNA پلاسمید سلولی ترانسفورم شده استخراج شده و متعاقباً توسط این ONA نهایی تغییرشکل می‌گردد و نهایتاً اتوپلاست به شکل باسیل رویش می‌نماید. با توجه به این که این نوع ترانسفورماسیون پیچیدگیهای زیادی داشت لذا از روش الکترو پوریش برای ترانسفورماسیون *Cl. perfringens* استفاده گردید.

۳-۳- الکتروپوریشن

بخش اعظم پیشرفت در روشهای ترانسفورماسیون *Cl. perfringens* با استفاده از الکترو پوریش صورت پذیرفته است. این روش مستلزم به کارگیری یک میدان الکتریکی ولتاژ بالا بر روی سلولهای وجتاتیو با کتری برای یک مدت فرمان کوتاه است این میدآن الکتریکی منافذی را روی غشاء سلولی با کتری ایجاد کرده و ورود غیرفعال DNA را از خلال منافذ غشاء باعث می‌گردد. الکتروپوریشن تأثیری بر توانایی زنده ماندن سلول ندارد.

اولین تجربیات بر روی *Cl. perfringens* نوع A 3624 و با استفاده از پلاسمید انتروکوکال (entro coccal) به نام pAMB1 و شاتل پلاسمید pHR106 صورت پذیرفت. از این طریق تعداد کمی ترانسفورنت به دست آمد (۱/۵×10^2 µg DNA تا ۱/۲×10^3)

امروزه مشخص شده است که بهترین سویه برای ترانسفورماسیون از طریق الکتروپوریشن، سویه L-B است که فاقد سیستم تعدیل و محدودیت‌سازی است. اثر فازهای مختلف رشد، میزان DNA، نیروی میدان الکتریکی، زمان و دانسیته سلولی بر روی کیفیت ترانسفورماسیون سویهٔ L-B، توسط پلاسمید pHR106 به خوبی مطالعه شده‌اند و نتایج نشان می‌دهد که اگر سلولها از ابتدای فاز لگاریتمیک گرفته شده باشند و نیروی میدان الکتریکی نیز حدا کثر باشد فرکانس ترانسفورمنتها ۳×10^5 µg DNA خواهد بود.

تجارب اولیه برای ترانسفورم کردن سویه 13 توسط الکتروپوریشن ناموفق بود، لذا سلولها را ابتدا در معرض لیزوزیم قرار داده و سپس الکتروپوریشن صورت گرفت، لیکن نتیجه تغییر نکرد، ولی قراردادن سلولها در معرض لیزو استافین (Lysostaphin)، پپتیدازی که پل های پنتا گلیسین را در دیواره سلولی *Staphlococcus aureus* می‌شکند، باعث شد تعداد زیادی ترانسفورمنت به وجود آید.

۴- کونژوگاسیون

در سال ۱۹۷۷ انتقال اطلاعات ژنتیکی مابین سویه *Cl. perfringens* توسط مکانیسم کونژوگاسیون توسط Brefort و همکارانش مطرح گردید، ذیلاً به جزئیات این روش می‌پردازیم.

۴-۱- پلاسمیدهای کونژوگاتیو ذاتی

از میان پلاسمیدهای کونژوگاتیو ذاتی یافت شده در *Cl. perfringens* بیشترین توجه به خانواده بزرگ پلاسمیدهای Tc^R بوده است. چهار نمونه از پلاسمیدهای این خانواده مورد مطالعه قرار گرفته‌اند و جزئیات آنها بررسی شده است. لیکن جزئیات چگونگی انتقال این پلاسمیدها در میان سویه‌ها *Cl. perfringens* هنوز مشخص نیست این پلاسمیدها عبارتند از:

pJIR25 (52kb, Tc^R, Cm^R), pIP401 (53, Tc^R Cm^R)

pCW 3 47 kb, Tc^R) , pJI^R 27 (50 kb, Tc^R, Cm^R)

۴-۲- ترانسپوزونهای کونژوکاتیو

ترانسپوزونها رده جالبی از عناصر ژنتیکی هستند که در باکتریها وجود دارند و در داخل کروموزوم باکتری هستند. این عناصر در *(Cl. difficale, Cl. invecume)* یافت شده‌اند. ولی مورد مطالعه دقیق قرار نگرفته‌اند. از مهمترین ترانسپوزونها می‌توان Tn916 (16, 4kb.Tc^R) و(MLSR, Tc^R, Tn 1545 (25kb,Km^R, را در استرپتوکوک نام برد. این عناصر برای الحاق در کروموزوم به منطقه غنی از AT نیاز دارند و از آنجایی که می‌دانیم DNA کلستریدیومها حاوی GC کمی است لذا Tn 619 و Tn 1545 ابزارهای ژنتیکی بسیار مفیدی در بررسی ژنتیک کلستریدیومها هستند. در *Cl. perfringens* نیز دو ترانسپوزون Tn4451 و Tn4452 یافت شده‌اند که 6.2 kb Cm^R هستند و مطالعات زیادی روی آنها صورت گرفته و ترادفهای نوکلئوتیدی Tn 4451 مشخص شده است. این ترانسپوزونها نیز برای ورود به کروموزوم میزبان به مناطق غنی از AT نیاز دارند.

ترانسپوزون Tn 916 به *Cl. tetani* منتقل شده و مشاهده گردیده است که قادر است در جایگاه‌های متعددی وارد کروموزوم این باکتری شود.

۴-۳- انتقال کونژوگاتیو پلاسمیدهای غیر کونژوگاتیو

پلاسمیدهای کونژوگاتیو توان وارد کردن مواد ژنتیکی اضافی را به داخل کلستریدیومها دارند. این واقعیت در سال ۱۹۷۷ در پی به دست آمدن شواهدی روشن گردید که نشان می‌دادند پلاسمید (pIP 401) اگر همراه با پلاسمید دیگری به نام (63kbEm, pIP402 (63kbEm^R ClR^R) در یک *Cl. perfringens* دهنده وجود داشته باشد می‌توان آن را به همراه با خود به حرکت درآورد، همچنین دیده شده است که پلاسمید pAMB 1 می‌تواند پلاسمیدهای غیر کونژوگاتیو ارگانیسم‌های متنوعی را انتقال دهد، لیکن هنوز جزئیات چگونگی این انتقالها مشخص نشده است.

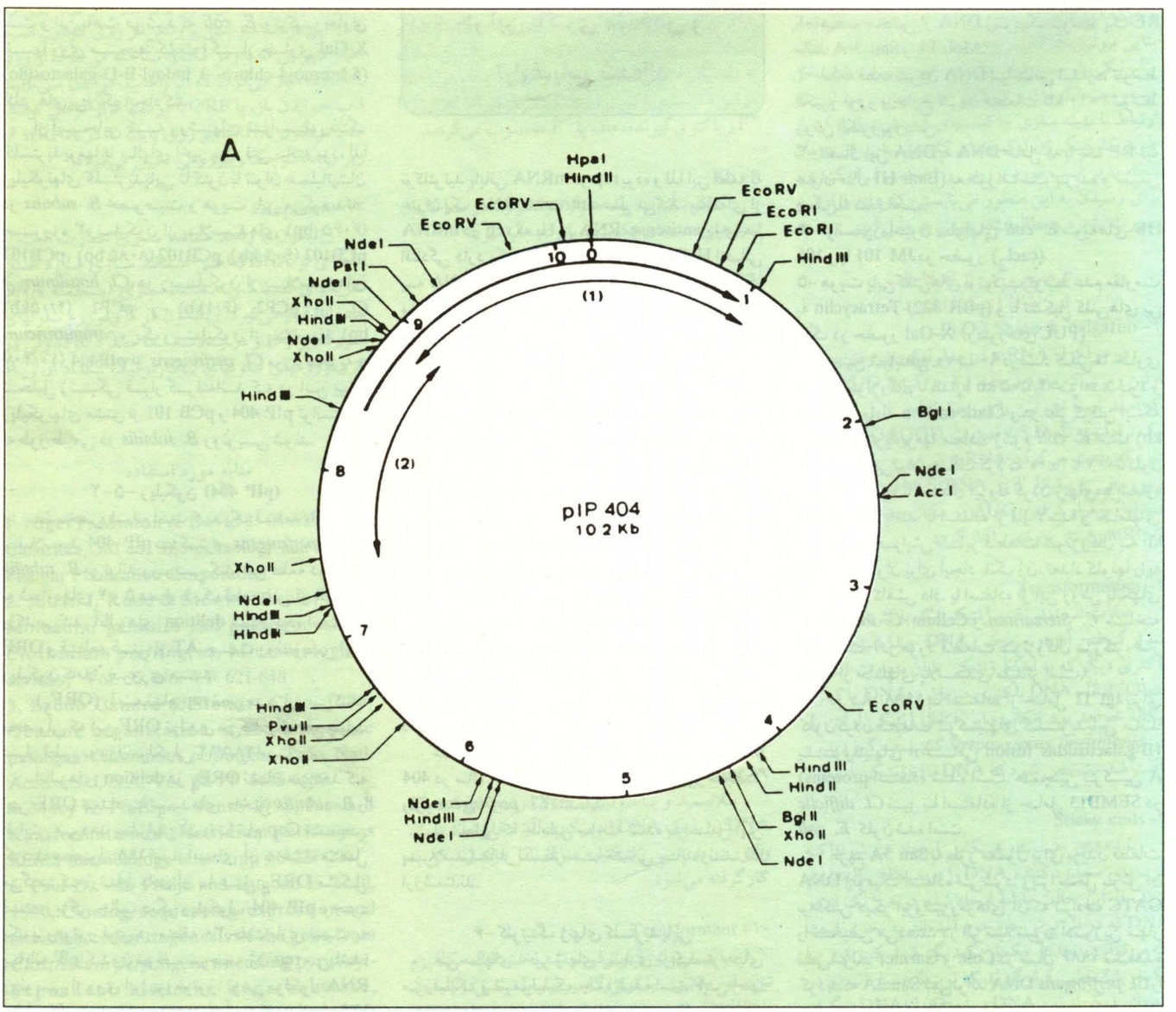
۵- پلاسمیدهای کلستریدیایی

۱-۵- پلاسمیدهای ذاتی

پلاسمیدهای زیادی در جنس کلستریدیوم وجود دارد که عمل برخی از آنها مشخص شده است و گروهی نیز از نظر پزشکی دارای اهمیت هستند. به عنوان مثال، ژنهای کد کننده توکسین کزاز و نوروتوکسین بوتولینوم تیپ G از عناصر خارج کروموزومی هستند.

از *Cl. perfringens* نیز تعدادی پلاسمید جدا شده است که محصولشان باکتریوسین (Bacteriocin) و مقاومت آنتی‌بیوتیکی است. پلاسمید pIP 404 در *Cl. perfringens* شناخته شده‌ترین پلاسمید کلستریدیایی است که بسیاری از خصوصیات آن مورد مطالعه قرار گرفته است، این پلاسمید باکتریوسین BCN 5را کد می‌کند و ترادف نوکلئوتیدی آن کاملاً شناخته شده است. تعداد ده (open reading frames) ORF_s در آن شناخته شده است که ۷۷٪ محصولات آن را معرفی می‌کند اعمالی که برای برخی از آنها پیشنهاد شده است عبارتند از ORF کدکننده پروتئین BCN 5 به وزن مولکولی ۹۶/۵۰۰، دو ORF به نامهای uvi (AB که در تشرح باکتریوسین نقش دارند و (res) ORFکه یک resolvase) راکد می‌کند. (شکل ۲).

شکل شماره ۲- نقشهٔ ترسیم شدهٔ پلاسمید pIP404 موقعیت و جهت رونویسی آن باکتریوسین (bcn) به وسیلهٔ یک فلش منفرد نشان داده شده است، فلش‌های دو جهته نشان دهندهٔ پراب‌های هیبریداسیون ۱ و ۲ هستند که موقعیت mRnA را طی تجزیه و تحلیلهای dot-blot نشان می‌دهد. سایر قطعات محدود شدهٔ توسط آنزیم‌های محدودکننده بر اساس کیلوباز می‌باشد.



چون کلستریدیومهای ساکارولیتیک مهم از نظر بیوتکنولوژی، فاقد پلاسمیدهای کد کننده مارکرهای ژنتیکی قابل انتخاب هستند، لذا حاملهایی برای استفاده در این ارگانیسمها در شرایط in vitro ساخته شده است که مهمترین مسئله در آنها خصوصیات فیزیکی یک پلاسمید قابل رونویسی در کلستریدیوم است. پلاسمیدهایی مانند pMTL 20/21E, pMTL20/21C که به ترتیب ژنهای باکتریهای گرم مثبت را برای کد کردن Cm^R و Em^R حمل می‌کنند، مثالهایی در این مورد هستند. این پلاسمیدها به طور طبیعی در *B. subtilis* بیان می‌شوند ولی با وارد کردن قطعاتی محدود از پلاسمیدهای دیگر (ریلیکون) در *E. coli* نیز بیان می‌شوند. این پلاسمیدها دارای منطقه Lac Z هستند که کلونینگ سایت آنها در این منطقه است و این باعث می‌شود که *E. coli* نوترکیب حاوی آنها روی محیط کشت آگار حاوی X-Gal (5-bromo-4 chloro- 3 indoyl-B-D-galactoside) کلنی‌های بی‌رنگ ایجاد کند.

از آنجایی که روشهای ترانسفورمینگ کلستریدیومها تا سالهای اخیر پیشرفتی نیافته بود، لذا ریلیکونهای کلستریدیایی تاکنون با توان عملیاتیشان در *B. subtilis* خصوصیت و هویت یابی می‌گردیدند. امروزه ۳ ریلیکون از پلاسمیدهای (۶۰۶۵ bp) pCB101، (۸۰۸۵ bp) pCB102، (۶۰۴ kb) pCB103 از *Cl. botulinum*، دو ریلیکون از پلاسمیدهای (۴/۰۵kb) pCP1 و (۶/۱kb) pCP2 از *Cl. paraputriricum* و یک ریلیکون از پلاسمید (۱۰/۲۰۷ bp) pIP404 از *Cl. perfringens* مورد تجزیه و تحلیل ژنتیکی قرار گرفته‌اند که در این میان ریلیکونهای مشتق از pCB 101 و pIP 404 توانسته‌اند به طور طبیعی در *B. subtilis* رونویسی شوند.

۲-۵- ریلیکون (pIP 404)

مشخص شده است که یک قطعه ۲/۸kb از پلاسمید pIP 404 باکتری *Cl. perfringens* در *B. subtilis* می‌تواند رونویسی کند. این قطعه دو ORF به شماره‌های ۴ و ۵ همراه با یک قطعه غنی از dA+dt را کد می‌کند. آنالیزهای delition نشان داده است که ORF و قطعه غنی از AT جهت رونویسی این ریلیکون کاملاً ضروری هستند.

(ORF_5) را به نام rep نیز معرفی می‌کنند، محصولی که این ORF تولیدی می‌کند یک پلی پپتید بسیار قطبی به وزن مولکولی ۴۸/۷۱۲ است.

آنالیزهای delition در ORF_4 نشان می‌دهد که این ORF تعداد پلاسمیدهای داخل *B. subtilis* را افزایش می‌دهد بنابراین آن را با نام Cop مشخص کردند. محصول ۱۹۸ اسید آمینه‌ای آن به غشاء متصل می‌گردد که ارتباط دادن آن با عمل ORF_4 مشکل است. ویژگی جالب دیگر ریلیکول، pIP 404 وجود یک پروموتور قوی در منطقه ۳۰ جفت بازی نسبت به پایانه '3 و کدون توقف ترجمه ژن rep می‌باشد، رونویسی از روی این پروموتور، نوعی مولکول RNA ۱۵۰ نوکلئوتیدی را به وجود می‌آورد که مکمل ۱۲۵ نوکلئوتید پایانی mRNA در rep بوده و لذا این قطعه به عنوان یک antisense RNA عمل می‌کند. منطقه‌ای از mRNA در rep که با این antisense RNA روی هم افتادگی دارد یک پروتئین Helix turn Helix اتصالی به DNA را کد می‌کند. بنابراین این مولکول یک مولکول تنظیمی است. مولکولهای antisense RNA معمولاً مکمل پایانه ۵ ژنی که تنظیم آن را به عهده دارند می‌باشند.

طی سالهای اخیر پیشرفتهای زیادی در ژنتیک *CL. perfringens* صورت پذیرفته که طی آن نقشه ژنتیکی آن ترسیم شده است و تعدادی از ژنهای مقاوم به آنتی‌بیوتیک‌ها در این باکتری مشخص و ترادف‌یابی شده‌اند

۳-۵- شاتل و حاملهای قابل استفاده در *Cl. perfringens*

در سال ۱۹۸۴ اولین شاتل حامل برای استفاده در *E. coli* و *Cl. perfringens* در اثر ترکیب پلاسمیدهای ذاتی و کوچک با پلاسمید pBR 322 و وارد کردن ژن Tc^R از فاکتور R کونژوگال p CW 3، به آن ساخته شد. بسیاری از پلاسمیدهایی که به این شکل ساخته شدند، ژن Tc^R را در هر دو میزبان رونویسی و بیان نمودند، امروزه انواعی از این پلاسمیدها نظیر pHR106 که کلونینگ سایتهای متعددی در داخل آنها جاسازی شده‌اند و به جای Tc^R کلستریایی، حاوی ژن Cm^R از پلاسمید pJIR 62 باکتری *Cl. perfringens* هستند، در دسترس می‌باشد.

شاتل حاملین pTG 36 و pT667 نیز براساس pIP 404 در سال ۱۹۸۸ ساخته شده‌اند ولی هنوز مجدداً وارد *Cl. perfringens* نشده‌اند.

از آنجایی که حاملین ساخته شده براساس این پلاسمیدها از نظر ساختمانی پایدارند، لذا ارزشمندند.

۶- کلونینگ ژنهای کلستریدیایی

طی سالهای اخیر ژنهای بسیاری از کلستریدیای مزوفیلیک و ترموفیلیک جدا شده است. این ژنها پروتئین های زیادی نظیر شاخصهای مقاومت آنتی بیوتیکی (antibiotic resistoince determinants)، اکسید و ردوکتازها، آنزیمهای سولونتوژنز (Solventogenesis)، توکسینها، نیتروژناز و آنزیمهای سلولیتیک را کد می‌کنند. *E. coli* علی‌رغم عدم ارتباط فیلوژنتیک، میزبانی بسیار عالی برای کلونینگ ژنهای لستریدیایی محسوب می‌گردد، نه تنها به این دلیل که فرآیندهای کلونینگ آن به خوبی جا افتاده است، بلکه به این دلیل که در هر دو نوع محیط های هوازی و بی هوازی به خوبی رشد می‌کند. به طور کلی ژنهای کلستریدیایی در *E. coli* پایدار بوده و در سطح کافی جهت آشکار سازی و اسکرین بیان می‌شوند.

۷- پروتکل کلونینگ

استراتژی عمومی کلونینگ به قرار زیر است:

۱- هضم بخشی از DNA ژنومیک توسط یک RE مانند Sau 3 A و یا Mob I.

۲- قطعه قطعه کردن DNA براساس اندازه، توسط الکترو فورز و خارج کردن قطعات kb ۱۰-۴ توسط روش الکتروپوریشن.

۳- اتصال این DNA به DNA حامل که با یک RE (به عنوان مثال Bam HI) به طور مناسب بریده و سپس فسفریله شده است.

۴- ترانسفورماسیون سلولهای *E. coli* سویه‌های HB 101 و یا JM 101 در حضور ($cacl_2$).

۵- هویت یابی کلنی‌های نوترکیب توسط عدم مقاومت به Tetracyclin (pBR 322) و با تشکیل کلنی‌های بی رنگ در حضور X-Gal (وکتورهای PUC)

چنین شرایطی ۷۰ تا ۹۰ درصد کلنی‌ها حاوی قطعات کونژوگال با اندازه kb ۵-۴/۵ خواهند بود و براساس معادله Clark-carbon و در نظر گرفتن اینکه ژنوم کلستریدیومها معادل ژنوم *E. coli* است (kb ۴۵۰۰)، لذا می‌توان حساب کرد که ۳۰۰۰ تا ۵۰۰۰ کلون مورد نیاز است تا احتمال ایزوله کردن ژنهای با اندازه متوسط ۹۹٪ باشد. با استفاده از فاژ لامبدا و حاملهای Cosmid و افزایش سایر قطعات کونژوگال به kb ۴۰-۲۰ می‌توان برای ایجاد بانک ژن، تعداد کلونها را به ۱۰۰۰ عدد کاهش داد. با استفاده از این روش بانکهای ژن *C. thermo* Cellum و *C. Sterearium* ساخته شده است. (در مورد قطعات کونژوگال بزرگتر، فاژ لامبدا از حاملهای پلاسمیدی مفیدتر است).

در سال ۱۹۸۸ با استفاده از حامل λgt 11 برای کلون کردن قطعات توکسینهای کلستریدیایی مانند پروتئینهای ادغامی (B-galactosidas fusion proteins) استفاده شده است. همچنین توکسین A *Cl. difficile* نیز با استفاده از حامل SEMB13 در *E. coli* کلون شده است.

آنزیم Sau 3A به طور معمول برای بریدن قطعات DNA ژنومیک استفاده می‌شود. زیرا محل برش آن برعکس دیگر ایزوشیزومرهای آن که ترادف GATC را تشخیص می‌دهند، در اثر متیلاسیون آدنوزین مهار نمی‌شوند. Garnier و Cole در سال ۱۹۸۶ مشاهده کردند که Sau 3A نمی‌تواند DNA *Cl. perfringens* را ببرد و علت آن احتمالاً این است که سیتوزین در محل

برش این آنزیم توسط سیستم محدودسازی و تعدیل، متیله می‌شود. لذا مشخص شده است که DNA در *Cl. perfringens* توسط آنزیم MobI که فقط ترادف GATC را می‌برد، قابل هضم است، آن هم در صورتی که آدنوزین در این ترادف متیله نباشد.

نتیجه

تجزیه و تحلیل ژنتیکی کلستریدیومها در مرحله بسیار جالبی است، تا کنون دو فرآیند انتقال ژنی به وجود آمده و تکمیل شده است که در جنس کلستریدیوم کاربرد وسیعی دارد. این دو فرآیند عبارتند از Electroporation، Conjugal plasmid Mobilization. در حال حاضر با استفاده از این ابزارها و دیگر ابزارهای ژنتیکی راه باز است تا مسائل زیر بنایی بیولوژیک کلستریدیومها مانند تنظیم جریانات متابولیکی در مسیرهای مختلف تخمیری و یا اساس مسمومیت اکسیژن و تشکیل اندوسپور و مسائل در ارتباط با بهینه سازی واکسنهای کلستریدیایی که از طریق کلونینگ ژن توکسینهای کلستریدیایی در میزبان انجام پذیر است مورد بررسی و تفحص قرار گیرد و برای رسیدن به این منظور می‌بایستی کارهای فراوانی صورت پذیرد و مطالعات وسیعی به عمل آید.

توضیح برخی از اصلاحات فنی مقالهٔ ژنتیک کلستریدیا

۱- Shine & dalgarno (S.D.)

در مولکول mRNA در سلولهای پروکاریوتیک اولین رمزی که مورد ترجمه قرار می‌گیرد، AUG است که اسید آمینهٔ متیونین را رمز می‌نماید. قبل از AUG یک ترادف به نام S.D به صورت AGGAGGU وجود دارد که باعث می‌گردد mRNA در زیر واحد کوچک ریبوزومی به پایانهٔ '3 در ۱۶ SrRNA متصل شده و متعاقباً با قرار گرفتن AUG در مکان صحیح، ترجمهٔ mRNA و سنتز پروتئین آغاز گردد.

۲- Transformation

عبارت است از تغییر ژنتیکی یک باکتری، متعاقب قرار گرفتن آن در معرض DNA جدا شده از یک باکتری دیگر که به لحاظ ژنتیکی با آن متفاوت است و متعاقباً ادغام DNA باکتری میزبان و DNA باکتری بیگانه خواهد بود. مکانیزم این انتقال ژنتیکی اولین بار در *Streptococcus pneumonia* کشف گردیده و باعث شد مشخص شود که DNA مادهٔ ژنتیکی است.

۳- Sticky ends

پایانه‌های چسبنده هنگامی ایجاد می‌شوند که آنزیمهای محدودکننده DNA را در منطقهٔ پالیندروم ببرند، در این حالت پایانهٔ ایجاد شده در هر یک از دو DNA که در اثر برش به وجود آمده‌اند به نحوی است که می‌توانند مجدداً مکمل یکدیگر قرار گیرند و یا مکمل پایانه‌هایی قرار گیرند که توسط همین آنزیم در نقطه‌ای دیگر از این DNA و یا مولکول DNA دیگری به وجود آمده‌اند.

۴- Back bone

در ساختمان اسیدهای هسته‌ای DNA و RNA نوکلئوتیدها از طریق قندهای پنج کربنی خود با یکدیگر پیوند فسفودی استر به وجود می‌آورند به این ترتیب که گروه فسفات مستقر بر کربن '5 قند ریبوز یادزاکسی ریبوز با گروه OH مستقر بر کربن '3 قند پنج کربنی نوکلئوتید دیگر باند می‌شود. تکرار بسیار زیاد این پیوند در طول اسید هسته‌ای به پیوند پلی‌استر معروف بوده و به این ترتیب back bone به وجود آید.

۵- Conjugation

الحاق، یک روش نوترکیب شدن DNA در باکتریها است که طی آن یک باکتری دهنده (donor) و یک باکتری پذیرنده (recipient) توسط یک پل الحاق به یکدیگر متصل شده و تبادل ژنتیکی انجام می‌دهند. در این مکانیسم باکتری دهندهٔ مادهٔ ژنتیکی، باکتری نر یا F^+ و باکتری گیرنده، ماده یا F^- محسوب می‌گردند.

۶- Kb

کیلو باز، به یک هزار نوکلئوتید در ساختمان اسیدهای هسته‌ای یک کیلو باز گفته می‌شود.

۷- DNA5' → 3' و 5' strandg →

اسید هسته‌ای DNA یک مولکول دو رشته‌ای مارپیچ است که دو رشتهٔ آن آنتی پارالل هستند و لذا چون هر رشته دارای یک پایانهٔ حاوی OH در کربن '3 قند پنج کربنی دزاکسی ریبوز و پایانهٔ دیگری حاوی گروه فسفات در کربن کد قند ذراکسی ریبوز است لذا می‌توان رشته‌ها را به شکل '5 → '3 و یا '3 → '5 نشان داد.

۸- Transduction

DNA ویروسهای باکتریوفاژ قادرند طی روند تکثیرشان DNA باکتری میزبان را با DNA خود ادغام کنند. ویروسی که به این روش ایجاد می‌شود، اگر سلول باکتری دیگری را آلوده نماید، DNA میزبان اول را به میزبان دوم منتقل نموده و میزبان دوم را نوترکیب می‌کند. این روش ترانس‌دوکسیون نامیده می‌شود و ویروسهای ترانس دیوس کننده را جزء ویروسهای سرطانزا نیز طبقه بندی می‌کنند.

۹- Vector

پلاسمید و یا مولکول DNA ویروسی که یک cDNA و یا یک DNA ژنومیک در آن ادغام شده است. وکتور در مهندسی ژنتیک به عنوان ناقل مواد ژنتیکی به کار گرفته می‌شود.

۱۰- Transformant

باکتریهای نوترکیب شدهٔ متعاقب مکانیزم ترانسفورماسیون یا کونژوگاسیون و یا ترانس‌دوکسیون می‌باشند.

۱۱- Transposons (Tn)

ترانسپوزونها عناصر ژنتیکی قابل انتقال در ژنوم باکتریها هستند که می‌توانند به مناطق مختلف ژنوم باکتری انتقال یابند. یک ترانسپوزون از نظر سایز ممکن است تا ۱۰kb نیز بالغ گردد. ترانسپوزون دارای یک منطقهٔ ژنتیکی مرکزی به نام Core است که می‌تواند اعمال مختلفی مانند مقاومت آنتی‌بیوتیک را کد کند. در انتهای ترانسپوزون یک ترادف به نام Insertion sequence وجود دارد که به سایز kb ۱ بوده و می‌تواند ترانسپوزون را نقل مکان دهد.

۱۲- Open reading frames (ORFs)

مولکول mRNA طی بیوسنتز پروتئین بر روی ریبوزومها، مورد عمل آنزیمهای بیوسنتز پروتئین قرار و در این فرآیند بیوسنتز پروتئین از روی کودون اسید آمینهٔ متیونین که با رمز AUG شناخته می‌شود، از روی mRNA آغاز می‌گردد که آن را قاب خواندن می‌نامیم. قاب خواندن باز، یا ORF با درست قرار گرفتن ترادف S.D مولکول mRNA بر روی پایانهٔ '3 در ۱۶ srRNA زیر واحد کوچک ریبوزومی تعیین می‌گردد.

۱۳- Replicon

رپلیکون یا واحد همانند سازی عبارت است از قطعه‌ای از DNA که طی همانند سازی مورد عمل آنزیمهای کمپلکس همانند سازی (منجمله DNA پلیمراز) قرار می‌گیرد. رپلیکون در کروموزوم سلولهای پروکاریوتیک و در پلاسمیدها منفرد بوده ولی در کروموزومهای سلولهای یوکاریوتیک تعداد آن زیاد است.

منابع مورد استفاده

1. Nigel P. Minton & David J. Clark, 1989, Clostridia, 3rd ed,. Biotechnology handbooks, Plenum Publication Corporation.
2. Julian I. Rood & Stewart T.cole, 1991, Molecular genetics and pathogenesis of *Clostridium perfringens*, Microbiological reviews, Vol. 55, No. 4 P 621-648
3. Bruno Canard & Stewart Cole, 1989, Genome organization of the anaerobic pathogen *Clostridium perfringens*, Proc. Natl. Acad. sci. U.S.A, Vol. 86 PP 6676-6680
4. Mary K. Phillips - Jones 1990, Plasmid transformation of clostridium perfringens FEMS microbiology letters. pp 66 221-226
5. Paul D. Van Poelje and Esmond E. Snell, 1990, Cloning, sequencing, expression and site-directed mutagenesis of the gene from *Clostridium perfringens* encoding pyruvoyl-dependent histidine decarboxylase, Biochemistry, 29, 132-139.