بسمه تعالی

فاژ لامبدا و کاربردهای آن در مهندسی ژنتیک

مولف :

حمید جامی الاحمدی

(چاپ و نشر ایران)

۱۳۹۹

فهرست مطالب :

پیشگفتار

فصل اول

فاژهای معتدل

فاژ لامبدا(λ Phage)

همانندسازی DNA لامبدا بفرم حلقه در حلقه یا θ

همانندسازیDNA لامبدا بفرم دایره چرخان (Rolling circle replication)

موارد ژنتیکی لازم برای همانندسازی DNA لامبدا

ژنوم لامبدا

چرخه های فاژ λ؛ لیتیک و لیزوژنی

مرحله عدم التزام (Uncommitment Stage)

- جذب و ورود

مرحله التزام (Commitment stage)

- مرحله رونویسی زود هنگام فوری

- مرحله رونویسی زودهنگام تاخیری

تصمیم بین لیزوژنی و لیتیک

مسیر لیتیک، مرحله دیررس

الف- همانندسازی DNA

ب- سیستم های نوترکیبی در سلولهای آلوده شده با فاژ λ

ج- رونویسی مرحله دیررس لیتیک

د- بسته بندی DNA و دورهم جمع شدن اجزاء باکتریوفاژ

آنزیم ترمیناز لامبدا

و- لیز شدن سلول باکتری

ه- سازمان یابی هوشمندانه ژنوم

مسیر لیزوژنی

الحاق و ورود DNA فاژ به کروموزوم میزبان

رونویسی از ژن‌های پروفاژ

گریز از لیزوژنی

چند نتیجه لیزوژنی

ترانس داکشن اختصاصی در فاژ لامبدا

ترانس داکشن اختصاصی

لیزوژنی دوتایی (Dilysogeny)

حالت های دیگر لیزوژنی

ایمنی به آلودگی مضاعف (Super Infection)

فاژهای لیزوژنیک و بیماری زایی باکتریایی

دیفتری(Diphtheria)

وبا(Cholera)

بوتولیسم و کزاز (Botulism and Tetanus)

جزایر پاتوژنیک (Pathogenic Islands) و فاژ λ

فصل دوم

کاربردهای فاژλ

بخش الف) استفاده از فاژ لامبدا بعنوان یک ناقل کلونینگ (cloning vector)

انواع وکتورهای لامبدا

۱-وکتورهای الحاقی (Insertional Vectors)

۲-وکتورهای جایگزینی(Replacement Vectors)

۳-وکتورهای بیان شونده(Expression Vectors)

۴-وکتورهای کازمیدی (Cosmid Vectors)

۵- فاژمیدها (Phasmid Vectors)

۶- شاتل وکتورها (Shuttle Vectors)

۷- وکتورهای "همه در یکی" (All-in-one Vectors)

کتابخانه ژنومی، جنبه ای از کاربرد وکتورهای λ

شمای کلی از ساخت کتابخانه

احتمال حضور قطعه موردنظر در وکتور

انتخاب وکتور

بسته بندی (packaging)

غربالگری (Screening)

کتابخانه‌های cDNA

وکتورهای توسعه یافته فاژ λ

- وکتورهای Charon

وکتورهای λgt_{10} و λgt_{11}

وکتورهای λZAP

چند وکتور دیگر λ

λDASH

λFIX

سری EMBL

بخش ب) دیگر کاربردهای فاژ λ

مخفف‌ها (Abbreviations)

منابع(Refrences) :

پیشگفتار:

فاژ λ یک فاژ معتدل دارای چرخه های لیزوژنیک و لیتیک می باشد. این فاژ دو فرم اصلی همانندسازی θ و دایره چرخان دارد. همانندسازی دایره چرخان فرم اصلی تامین کننده مواد ژنتیکی جهت بسته بندی در سرهای ۲۰وجهی فاژ می باشد. ژنهای فاژ λ بطور هوشمندانه ای، دسته بندی های خاص پیدا کرده اند بطوریکه هر دسته جایگاه و عمل خاصی دارد. سیستم کنترلی پیشرفته فاژ λ با دقت زیادی برروی وضعیت لیزوژنیک یا لیتیک بودن کنترل دارد بطوریکه سلول میزبان به هر حالت که ملزم شد، تمام مکانیسم های کنترلی در جهت ایجاد آن وضعیت و سپس تثبیت آن عمل می کنند. بطورکلی مراحل چرخه لیزوژنیک را می توان به چهار مرحله: ۱- مرحله زودهنگام فوری، ۲- مرحله

زودهنگام تاخیری، ۳- مرحله برپاسازی و ۴- مرحله برقرارسازی تقسیم بندی کرد و برای چرخه لیتیک نیز سه مرحله:

۱- مرحله زودهنگام فوری، ۲- مرحله زودهنگام تاخیری و ۳- مرحله دیررس لیتیک را می توان درنظر گرفت که دو مرحله اول بین دو مسیرمشترک است و پس از آن است که باکتریوفاژ تصمیم می گیرد که چه مسیری را انتخاب کند. از نتایج لیزوژنی می توان به "ایمنی به آلودگی مضاعف" و فرایند "تبدیل لیزوژنیک" که سلول میزبان در طی آن دارای برخی خصوصیات جدید می شود و همینطور "ترانس داکشن اختصاصی"اشاره کرد. لیزوژنی حالتهای دیگری از جمله لیزوژنی دوتایی یا وضعیت هایی که در سایر فاژهای معتدل مثل Mu و P_1 رخ می دهد را نیز شامل می شود. در پایان بخش اول به

برخی بیماری های باکتریایی که بواسطه فاژهای لیزوژنیک ایجاد شده اند و همینطور پدیده "جزایر پاتوژنیک" بعنوان نقشی که فاژهای باکتریایی می توانند در بیماریزایی ایفا کنند اشاره می شود.

فاژ λ کاربردهای مختلفی و بطور عمده در مهندسی ژنتیک دارد. فاژ λ تیپ وحشی بعلت مشکلات خاص از جمله وجود جایگاههای برش آنزیمی زیاد و نابجا درون ژنوم خود، برای استفاده در کارهای کلونینگ مناسب نیست، از این رو تلاشهایی در جهت بهبود این فاژ بعنوان یک وکتور صورت پذیرفت که آن را به وسیله ای مناسب و بعضا" ارجح تر نسبت به پلاسمیدها درکارهای کلونینگ تبدیل نمود. وکتورهای فاژ λ را می توان بطورکلی در گروههای زیر طبقه بندی کرد: ۱- وکتورهای الحاقی، ۲- وکتورهای جایگزینی و ۳- وکتورهای بیان شونده. در دسته بندی دیگری که

موارد قبلی را هم شامل می شود، وکتورهای فاژ λ به گروههای: وکتورهای کازمیدی، وکتورهای فاژمیدی، و وکتورهای ((همه در یکی)) تقسیم بندی شده اند.

از مهمترین کاربردهای وکتور λ در کلونینگ، در تهیه کتابخانه های ژنومی و cDNA می باشد. در کتابخانه های ژنومی، ژنوم موردنظر را هضم آنزیمی و سپس درون وکتورهای λ وارد می کنند و بعنوان منبعی از کلِیه قطعات ژنوم آن را نگهداری می کنند.در کتابخانه cDNA برای ژنومهای بزرگ که کار مشکل تر است بر اساس mRNA ، cDNA آن را ساخته و سپس با استفاده از وکتور λ کتابخانه آن را تهیه می کنند. در ادامه بطور مختصر به چند وکتور توسعه یافته و جدید فاژ λ پرداخته می شود و در پایان به برخی کاربردهای دیگر فاژλ(غیر از

کلونینگ) شامل: تعیین نقشه ژنتیکی، شناسایی کارسینوژنها، آلودگی زدایی از بیمارستانها و محیط و تکنیک نمایش فاژی به طور مختصر اشاره می شود.

فصل اول

مقدمه :

ویروسها میکروارگانیسم های RNA دار یا DNA داری هستند که از لحاظ برهمکنش زیستی، جزء پارازیت ها حساب می شوند. از لحاظ ساختاری ژنوم آنها درون کپسید قرار گرفته که کپسید، خود از پروتئین های پوششی(کپسیدی) تشکیل شده است. پروتئین های کپسیدی از لحاظ آرایش به فرم مارپیچی و یا به فرم ۲۰وجهی (Icosahydral) هستند. معمولا ویروسها از لحاظ رده بندی چون محدودیت میزبان دارند، بر اساس نوع میزبان به سه دسته: ویروسهای جانوری، ویروسهای گیاهی و باکتریوفاژها یا ویروسهای

باکتریایی طبقه بندی می شوند. البته علاوه بر این سه دسته کلی، شبه ویروسهای غیرطبیعی تر نیز وجود دارند که شامل : ویروسهای ناقص (defective viruses)، ویروسهای کاذب، پریونها و ویروئیدها هستند (۸، ۲۲، ۲۴).

از لحاظ تاریخی ویروسهای باکتریایی یا باکتریوفاژها توسط Twortو D'Herelle بطور مستقل و بعنوان عوامل فیلترشدنی وقابل انتقال توسط ماده حاصل از لیز باکتریایی کشف و شناخته شدند(سال ۱۹۱۵). فاژها آنقدر در بررسیهای آزمایشگاهی از لحاظ کاری و دستورزی راحت بودند که خیلی زود اطلاعات در مورد آنها گسترش یافت. براساس مشاهدات اولیه که فاژها توانایی تشکیل پلاک در کشت باکتریایی دارند اولین ایده ها برای استفاده از فاژها، برای مبارزه علیه باکتری های پاتوژنیک- هم برای استفاده های درمانی و هم

در آلودگی زایی از محیط مثلا" در خالص سازی منابع آب- شکل گرفت ولی در زمان خود این ایده ها رنگ واقعیت به خود نگرفت. با این حال، از ابتدای دهه ۱۹۲۰، فاژها بطور گسترده در تعیین تیپ سویه های باکتریایی که از لحاظ پزشکی مورد توجه بودند بکار رفتند. بعد از اوایل دهه ۱۹۴۰، اولین تلاشهای پایه ای و بیولوژی مولکولی توسط Max Delbruck وSalvador Luria صورت گرفت. بعدها با کارهای Benzer روی موتاسیون های کشنده شرطی در فاژهای λ و T_4 امکان بررسی فرایندهای پیشرفته و توسعه یافته فاژها فراهم شد (۲۲، ۴۳). بطور همزمان با کارهای مولکولی وحتی زودتر از آن (حدود دهه ۱۹۳۰) توسط Schlesingerو بعد در حدود دهه ۱۹۵۰ توسطHershey & Chase کارهای بیوشیمیایی

روی فاژها انجام شد و بعد از آن گسترش یافت (۲۲، ۲۳، ۴۶). Andre Lwoff در حدود دهه ۱۹۵۰ وضعیت لیزوژنیک در فاژها را در E.Coli مشخص کرد.

فاژهای قادر به تولید کمپلکس لیزوژنیک، فاژ معتدل نامیده شدند و فرم غیر آلوده کننده که در آن فرم اطلاعات ژنتیکی فاژ منتقل می شود، پروفاژ نامیده شد. از فاژهای معتدل، کلی فاژλ بیشتر مطالعه شده که تاحدی به این دلیل بوده که روی سویه E.Coli $K_{۱۲}$ رشد می کند که برای آن نقشه هم یوغی و ترانس داکشن از حدود دهه ۱۹۵۰ تهیه شده بود. دیری نگذشت که پی بردند که پروفاژ بطور خطی در یک جایگاه ویژه کروموزوم باکتری وارد می شود.از دهه ۱۹۵۰ به بعد به دلیل شناخت ژنوم فاژها و با توجه به قابلیت وارد شدن فاژ در سلولهایی خاص و بطور همزمان آلوده کردن همه سلولهای

موجود در محیط کشت، فاژها به دستواره ای مناسب برای بسیاری از آزمایش های زیست مولکولی از جمله مشخص کردن برش و اتصال DNA در طول نوترکیبی ژنتیکی و برای مشخص کردن ماهیت کد سه تایی، تبدیل شد(۲۵). از دهه ۱۹۶۰، فاژλ بطور ویژه بعنوان مدلی مناسب برای سیستم تنظیم ژنتیکی قرار گرفت که بسیاری از این کارها توسط Jacob & Monod صورت پذیرفت. اگرچه مطالعات اولیه روی "موتاسیونهای کشنده شرطی" در T_4 نسبت λ به گسترش بیشتری یافت ولی λ مزیت های خاص خود را داشت از جمله: * شروع برنامه سیکل لیتیک از دو پروموتر مستقیماً توسط رپرسور کنترل می شود که مکانیسم منحصر به فردی از سیستم تنظیم ژنتیکی را نشان می‌دهد و در درک مولکولی از اپرون‌ها کمک شایانی نمود. مولکول کلیدی

رپرسورλ در ۱۹۶۷ توسط Mark Ptashne جداسازی شد(۲۸). * مولکولهای DNA استخراج شده از ویریونها، شکل یکسانی دارند. * پروبهای خاص برای قسمت های مختلف ژنوم توسط فاژهای دارای ترانس داکشن اختصاصی و حذف ها یا جابجایی‌ها (که جایگاه‌های آنها از طریق نقشه هترودوپلکس می تواند تعیین شود) فراهم شد که می‌توان با آنها تاثیرات دستکاری های ژنتیکی را روی وقایع مولکولی به سادگی قابل تفسیر ساخت. * وجود قابلیت تغییر مسیر به سمت لیتیک یا لیزوژنی به جذابیت فاژ λ افزوده است (۲۷، ۲۹). از ۱۹۷۰ کار روی فاژ با زیست شناسی جدید تجلی یافته زیرا کلونینگ مصنوعی امکان کاربرد تکنیک هایی که در ابتدا در فاژها انجام می شد را برای سیستم های زیادی فراهم کرد (۲۲،۲۷) و بالاخره از زمانی که ژنوم λ توسط Fred Sanger و همکارانش

در ۱۹۸۲ تعیین شد که نقطه برجسته ای در بیولوژی مولکولی بود اطلاعات زمینه ای روی سیستم های فاژی گسترش یافت. علاوه بر اینها دستکاری آسان فاژها، امکان استفاده از آنها را در سطح بالایی فراهم کرد. ازجمله دیگر کاربردهایی که فاژها در زیست مولکولی داشته اند می توان به موارد زیر اشاره کرد:

★از فاژها برای مطالعه همانندسازی سلول استفاده شده، زیرا فاژها تقریبا بطور کامل برای همانندسازیDNA خود به پروتئین های سلول میزبان وابسته اند. ★همچنین از فاژها برای مشخص کردن نحوه سنتز گلیکوپروتئین‌ها و سایر مواد درون سلول - با وارد کردن ویروس و وادار کردن سلول به سنتز آن مواد- استفاده شده است. ★بعلاوه فاژها در تعیین نقش فاکتورهای سلولی خاص در سنتز پروتئین، به دلیل این که پروتئین های ویروسی در

سنتز پروتئین میزبان اختلال ایجاد می کنند استفاده شایانی داشته اند. ★استفاده از فاژها در کلونینگ و تعیین نقشه ژنتیکی و تهیه کتابخانه ژنومی و cDNA از کاربردهای مهم فاژها می باشد. ★می توان از فاژها برای کارهای کلینیکی و پزشکی مثلا باکتری زدایی از لباس های بیمارستانی (۱۳)، آب و سایر منابع استفاده کرد(۲۴، ۴۶، ۴۸).

۴ گروه از فاژهایی که در مطالعات ژنتیک زیاد استفاده می شوند در زیر آمده اند:

۱- گروه فاژهای T: که DNA دو رشته ای دارند و باعث لیز سلولی می شوند، شامل دو دسته T evens: bp $۲*۱۰^{۵}$ و T odds: bp $۲*۱۰^{۴}$(شکل ۰).

۲- فاژهای معتدل: نمونه بارز آنها فاژλ است که دارای DNA دو رشته ای است. فاژλ هر دو چرخه لیتیک و لیزوژنیک را می تواند داشته باشد. در مسیر

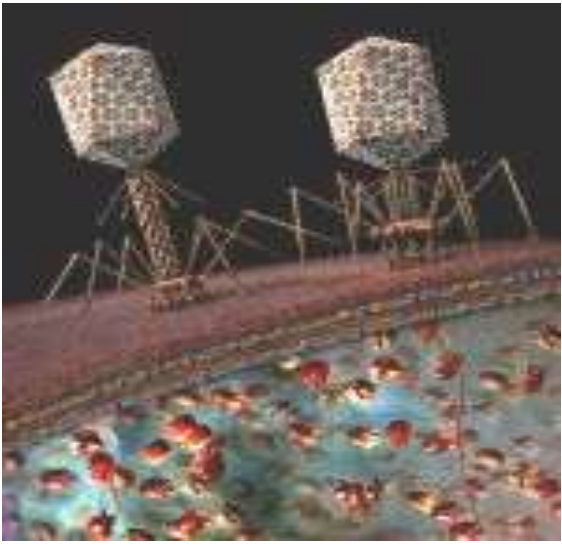
لیزوژنیک، DNA دو رشته ای حلقوی شده و آنزیم های ویژه ای مولکول حلقوی فاژ و میزبان را می شکنند و DNA فاژ درون DNA میزبان قرار می گیرد. مکانیسم های کنترلی دقیق ژنهای فاژ، جلوی چرخه لیتیک را می گیرند و DNA فاژ را مانند بخشی از DNA میزبان می سازند. در اثر القاء شدن های خاص، فاژ چرخه لیتیک را شروع می‌کند.

۳- فاژهای دارای DNA کوچک: فقط ۱۲-۱۰ پروتئین را کد می کنند(تقریبا ٪ ۱۰-۵ تعداد پروتئینی که توسط فاژهای T کد می شوند). مثالهای مهم آنها ØX-۱۷۴ و $M_{۱۳}$ (میله ای شکل) هستند. این دو اولین موجوداتی بودند که ژنومشان تعیین توالی شد. اینها بعلت سادگی، نیاز به پروتئین های سلولی میزبان برای تکثیر دارند و لذا عاملی برای

شناسایی پروتئین های سلولی دخیل در همانند سازی بودند.

۴- فاژهای RNA دار: منبع آماده ای از mRNA برای تخلیص هستند(۹، ۲۴، ۴۳، ۴۶).

در این سمینار، بعلت گستردگی مطلب به مطالعه چرخه لیتیک، لیزوژنی و کاربردهای فاژ λ پرداخته خواهد شد، هرچند هر کجا که لازم بوده به دیگر فاژها در آن مورد خاص نیز اشاره شده است.

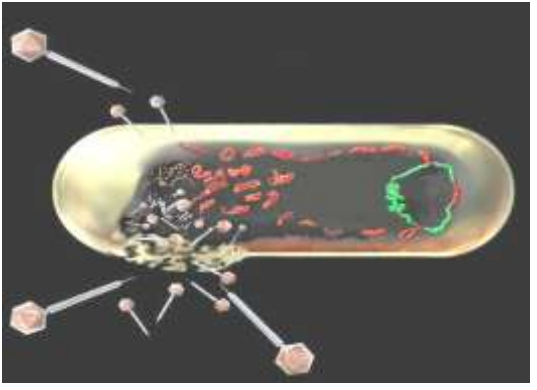


شکل۰ : فاژ T٤ در حال تزریق ژنوم خود به درون سلول میزبان(٥٤).

فاژهای معتدل:

فاژهای معتدل غالبا" ویروسهای دارای DNA دورشته ای بزرگی(kb ۲۰<) هستند. سه الگوی اساسی می توان براساس شیوه برقراری (پایداری) لیزوژنی در آنها مشاهده کرد. اولین مورد، در کلی فاژλ ، که DNA را در یک یا چند جایگاه ترجیحی وارد کروموزوم میزبان می کند، مشاهده می شود(شکل۱-۱). دومین مورد توسط فاژ MU-۱ نشان داده می شود که DNA خود را در هر جایی از کروموزوم میزبان- با استفاده از یک "ترانسپوزاز" کد شده توسط خود فاژ- وارد می کند. در مورد سوم که توسط فاژ P_1 نشان داده می شود، DNA پروفاژ وارد کروموزوم میزبان نمی شود اما در عوض بعنوان یک پلاسمید درون باکتری باقی می ماند.برخی فاژهای دیگر، مانند فاژ P_4 ماهواره ای هم

می توانند مانند پروفاژهای الحاق شده، درون کروموزوم سلول میزبان بمانند و هم می توانند مانند پلاسمیدها باشند. ((حالت الحاقی)) اگر ژنهای فاژی لازم برای همانندسازی فاژ بازداشته شوند، می تواند پایدار باشد، درصورتیکه در ((حالت پلاسمیدی)) برخی عملکردهای ویروسی بدون این که باعث کشتن سلول شوند، بیان می شوند(۲۲،۴،۲).

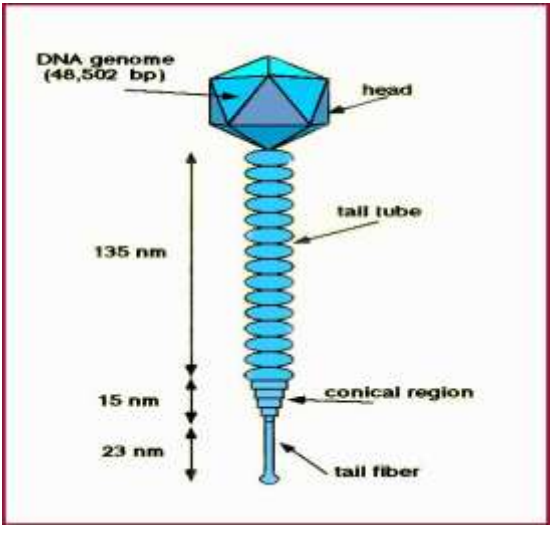


شکل۱-۱: رها شدن فاژهای λ پس از لیز کردن سلول E.coli(٥٤).

فاژ لامبدا(λ Phage):

ویریون λ ایزومتریک است که کپسومرهای آن یک کنفیگوراسیون T=۷(T: تعداد کپسومر بازای هر دور) دارند، بعلاوه یک دم انتهایی دراز که به یک رشته در انتها ختم می شود، دارد. DNA ویریون، یک مولکول خطی ۴۸۵۰۲bp است که انتهاهای N ۱۲ یک رشته ای در دو سر'۵خود دارد که مکمل هم بوده ومی توانند بهم بچسبند(انتهاهای چسبنده یا cohesive ends) (شکل ۲-۱). به محض ورود به میزبان باکتریایی، انتهاهای چسبنده با هم جفت می شوند و یک مولکول حلقوی ایجاد می کنند که دو شکاف در محل اتصال دو قطعه انتهایی چسبنده باقی می ماند. این شکاف ها بلافاصله توسط DNA لیگاز میزبان و ژیراز، بسته و ترمیم می شوند تا اینکه یک مولکول DNA حلقوی

بسته ایجاد کنند که بعنوان الگو برای رونویسی در مرحله ابتدایی آلوده کردن میزبان عمل می کند. این مولکول حلقوی DNA همچنین می تواند همانندسازی کند زیرا بعلت حلقوی بودن همیشه در سمت چپ آن، DNA وجود دارد که بعنوان یک پرایمر عمل می کند. در واقع در DNA های حلقوی به همین علت، مشکل مرحله شروع، شامل وجود $3'OH$ آزاد در یک توالی که از قبل موجود باشد(پرایمر)وهمچنین وجود محلی برای نشستن آنزیم برطرف شده و این DNA حلقوی تا چندین بار می تواند همانندسازی کند(۸، ۲۲).



شکل۲-۱: یک ویریون فاژ λ دارای یک سر ۲۰وجهی در برگیرنده ژنوم آن و اجزاء دمی می باشد(۵۷).

همانندسازی DNA لامبدا بفرم حلقه در حلقه یا θ:

(θ form or circle to circle replication)

هنگامی که مولکولهای حلقوی DNA لامبدا در سلول تشکیل شدند می توانند توسط یک مکانیسم همانندسازیθ همانندسازی کنند که مانند همانند سازی پلاسمیدهاست (شکل۳-۱). همانندسازی از جایگاه ori در ژن O شروع می شود و در هر دو جهت پیش می رود که با سنتز هر دو رشته رهبر (leading) و پیرو(lagging) در چنگال همانندسازی توام است. وقتی دوچنگال همانندسازی در طرف مقابل حلقه بهم برسند، دو مولکول دختری از هم جدا می شوند. (۴، ۳۹).

همانندسازی DNA لامبدا بفرم دایره چرخان:
(Rolling circle replication)

بعد از این که تعدادی مولکول DNA لامبدا توسط همانندسازی به فرمθ درون سلول تجمع یافتند، شرایط برای انجام همانندسازی بفرم دایره چرخان مهیا می شود. شروع همانندسازی دایره چرخان فاژλ که مشابه با همانندسازی فاژ M۱۳ است، با بریده شدن یک رشته از DNA حلقوی توام است که انتهای '۳ آزاد حاصله بعنوان یک پرایمر عمل می کند تا سنتز رشته جدید آغاز شود که باعث باز شدن و دور شدن رشته قدیمی می شود(شکل ۳-۱). DNA مکمل رشته قدیمی هم ساخته می شود که نهایتا"یک DNA دورشته ای جدید ایجاد می شود.ویژگی این همانند سازی در فاژ λ

این است که رشته قدیمی باز شده و مکمل آن ساخته می شود، بعد از یک دور زدن دایره چرخان و کامل شدن آن، برش نمی خورد بلکه دایره به چرخیدن خود ادامه می دهد و ایجاد تکرارهای پشت سر هم از مولکولهای DNA لامبدا می کند که بهم متصلند و به این مجموعه "کنکاتومر" می گویند.در مرحله آخر،کنکاتومرهای طویل شده در جایگاههای cos که اندازه فاصله هر دو جایگاه، همان اندازه یک ژنوم لامبدا است، بریده می شوندکه بعدا درون سرهای فاژ بسته بندی می شوند. فاژ لامبدا فقط DNA کنکاتومری را بسته بندی خواهدکرد و حداقل باید دو ژنوم λ از انتها بهم وصل باشند، زیرا سیستم بسته بندی در سر فاژ، فقط یک جایگاه cos را بر روی DNA کنکاتومریک می شناسد و DNA را بر می دارد تا زمانی که به

جایگاه بعدی برسد، که آن را می شکند تا بسته بندی تکمیل شود، به عبارت دیگر، جایگاه بعدی را در حالت اتصال به ژنوم بعدی می شناسد نه بصورت یک انتهای آزاد(۲۴، ۳۸، ۳۹).

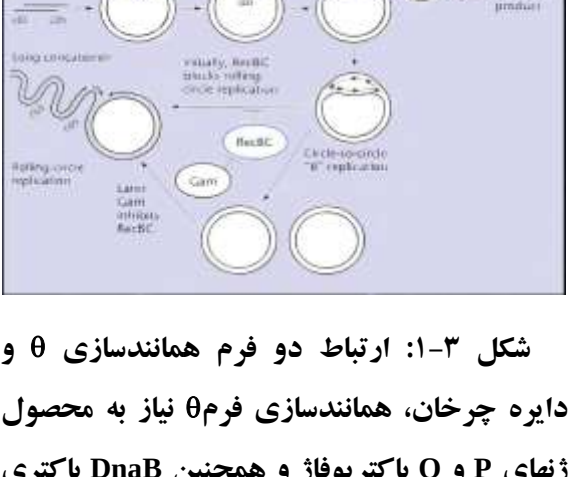
موارد ژنتیکی لازم برای همانندسازی DNA لامبدا:

برای همانندسازی DNA لامبدا تنها محصولات دو ژن λ ،یعنی O و P لازمند. هر دوی این پروتئینها برای شروع همانندسازی DNA در جایگاه ori لازمند. تصور می شود که پروتئین O، DNA را با اتصال به سکانس های تکراری در قسمت ori خم می کند – مشابه مکانیسمی که پروتئین DnaA همانندسازی کروموزوم را شروع می کند- و سپس پروتئین P به پروتئین O و اجزاء کمپلکس همانندسازی میزبان متصل می شود و آنها را برای

همانندسازی DNA لامبدا به خدمت می گیرد.سنتز پرایمر نیز باید در ناحیه ori برای شروع همانندسازی λ (در مکانیسم θ) انجام شود. معمولا" این سنتز از پروموتر P_R شروع می شود و احتمالا این RNA برای جداسازی دو رشته DNA در ناحیه ori و یا بعنوان یک پرایمر برای همانندسازی نقش دارد(۲۴).

یک پروتئین دیگر از λ ، که محصول ژن gam است برای تغییر وضعیت به حالت دایره چرخان همانندسازی لازم است. نوکلئاز V یا Rec BCD از E.Coli (آنزیمی که نوترکیبی را تسهیل می کند)، به نحوی تغییر وضعیت به همانندسازی دایره چرخان را باز می دارد، اما Gam ، نوکلئاز RecBCD را مهار می کند. بنابراین یک موتان gam لامبدا، به وضعیت همانندسازی θ محدود می شود و کنکاتومرها اگر بخواهند ایجاد شوند فقط می توانند

از DNA های λ حلقوی توسط نوترکیبی ایجاد شوند و همانطورکه قبلا" ذکر شد کنکاتومرها برای بسته بندی ضروری هستند(شکل ۳-۱). این موتان ها بعدا" به شناسایی سکانس های chi منجر شدند(۲۵، ۲۷، ۲۸).



شکل ۳-۱: ارتباط دو فرم همانندسازی θ و دایره چرخان، همانندسازی فرمθ نیاز به محصول ژنهای P و O باکتریوفاژ و همچنین DnaB باکتری

دارد. درنهایت این پروتئینها محصول اولیه برای فرم همانندسازی دایره چرخان را فراهم می کنند. مجموعه آنزیمی RecBC از تغییر وضعیت محصولات فرم θ به دایره چرخان جلوگیری می‌کند ولی محصول ژن gam فاژ λ این آنزیم باکتریایی را مهار می‌کند(۳۹).

ژنوم لامبدا:

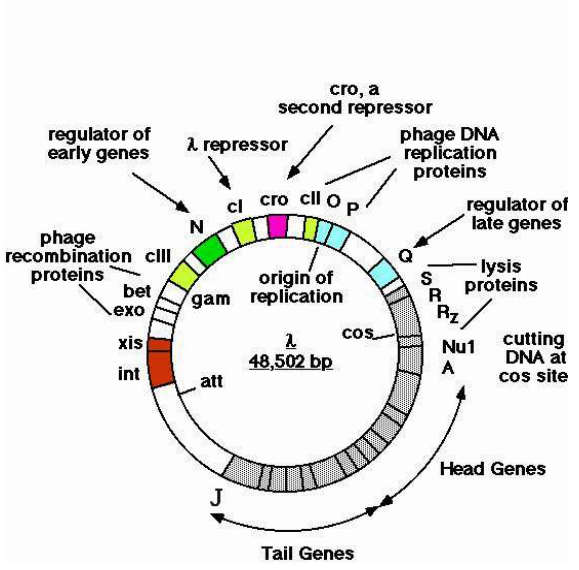
حداقل ۳۰ ژن در ژنوم λ وجود دارد (شکل ۴-۱) که درون دسته های وابسته از لحاظ عملکردی سازمان یافته اند:

♦ ناحیه دست چپ شامل ژنهای Nu۱ تا J که محصولاتش برای دسته بندی DNA ویروس درون سرهای باکتریوفاژی (Heads) و همچنین برای سرهم کردن (Assembling) ویریونهای آلوده

کننده، از سرهای پر شده از DNA و دم های از قبل ساخته شده لازمند(۲۲، ۳۲).

♦ ناحیه مرکزی از J تا gam ، برای عملکردهای درگیر در تنظیم ژن، برپایی و حفظ و ابقاء لیزوژنی و نوترکیبی ژنتیکی لازمند. بسیاری از ژنهای ناحیه مرکزی برای رشد لیتیک ضروری نیستند و در ساخت وکتور فاژ λ می توانند حذف شوند تا فضای خالی برای قطعه های DNA خارجی ایجاد شود(۲۲، ۳۲).

♦ ناحیه دست راست از gam تا Rz ، دارای ژنهای ضروری مورد استفاده در همانندسازی باکتریوفاژ λ و لیز باکتری آلوده شده می باشد(۲۲، ۳۲).



شکل٤-١: موقعیت ژنها روی ژنوم حلقوی λ(٥٧).

چرخه های فاژ λ ؛ لیتیک و لیزوژنی:

سیستم کنترلی پیشرفته فاژ λ یک نمونه خوب برای کنترل ژن در سیستم های پیشرفته می باشد. یک سلول آلوده شده یکی از دو راه را دارد، یا می تواند لیز شود و ویروسهای جدید را تولید کند و یا زنده بماند و بعنوان یک لیزوژن به چرخه زندگی خود ادامه دهد. هرگاه که سلول به یکی از این دو راه ملزم شد، چند مکانیسم در آنجا برای تثبیت آن تصمیم عمل می کنند(۱، ۲۳).

برای سهولت در درک مراحل مختلف، می توان چرخه لیزوژنیک را به چهار مرحله اصلی:

۱- مرحله زودهنگام فوری (Immediate early stage)،

۲- مرحله زود هنگام تاخیری (Delayed early stage)،

۳-مرحله برپاسازی و قرارگیری (Stablishment stage)

۴- مرحله برقرارسازی و تثبیت یا ابقاء (Maintenance stage) تفکیک کرد (شکل ۵-۱).

و برای چرخه لیتیک می توان بخش های:

۱- مرحله زودهنگام فوری (Immediate early stage)،

۲- مرحله زود هنگام تاخیری (Delayed early stage) و

۳- مرحله دیررس (Late stage) را در نظر گرفت که البته دو مرحله اول بین دو مسیر لیزوژنی و لیتیک مشترک است و در واقع هنوز سلول به سمت