View metadata, citation and similar papers at core.ac.uk
brought to you by CORE
provided by Journals of University of Babylon

Journal of University of Babylon for Pure and Applied Sciences, Vol. (28), No. (3): 2020
Online ISSN: 2312-8135, Print ISSN: 1992-0652

# Evaluation of Different Methods of Curing Bacterial Plasmids

**Dalal. M.R.Al-Shuailiyah**[1] **Zahraa M. AL-Taee**[2] **Raflaa S.H. Hussian**[3]

**Hawraa Mohammed Ridha**[4] **Rasha Nayyef Ali**[5]

1. Department of Biology, College of Sciences, University of Babylon. sci.dalal.showali@uobabylon.edu.iq
2. Department of Biology, College of Sciences, University of Babylon . Sci.zahraa.mohammed@uobabylo.edu.iq
3. Department of Biology, College of Sciences, University of Babylon sci.raflaa.sabek@uobabylon.edu.iq
4. Department of Biology, College of Sciences, University of Babylon sci.hawraa.mohammed@uobabylon.edu.iq
5. Department of Biology, College of Sciences, University of Babylon Daydream8112@yahoo.com

Article Information
*Submission date:* 7/ 9/ 2020
*Acceptance date:* 8/11/ 2020
*Publication date:* 31/ 12/ 2020

## Abstract

Plasmids play an important role in the spread of antibiotic resistance among bacterial strains that pose a threat to global health. Traditional methods of curing plasmid rely on the development of bacterial strains under inappropriate conditions, such as high temperature or the addition of intruding agents that interfere with the structure of DNA synthesis during the replication of plasmids. Other methods rely on the phenomenon of plasmid compatibility based on the principle of competition between identical plasmids but require accurate knowledge of the mechanism of multiplying the target plasmid, in addition to the subsequent treatment of the interfering plasmid. With the advent of Crispras9, which simulates natural bacterial defense against plasmid and latex infiltrators, this technique has been used as an accurate tool for targeting places specializing in plasmid DNA. In this review, we will address the most important methods of removing and deleting plasmids from bacterial cells.

**Key words**: Plasmid, Type of plasmid, Mechanism the replication of plasmid, curing plasmid, CRISPRcas9.

© Journal of University of Babylon for Pure and Applied Sciences (JUBPAS) by University of Babylon is licensed under a Creative Commons Attribution 4. 0 International License, 2020.
https://www.journalofbabylon.com/index.php/JUBPAS, info@journalofbabylon.com, jub@itnet.uobabylon.edu.iq
+9647823331373 (Viber and Telegram)

Journal of University of Babylon for Pure and Applied Sciences, Vol. (28), No. (3): 2020
Online ISSN: 2312-8135, Print ISSN: 1992-0652

# تقييم الطرق المختلفة لحذف البلازميدات البكتيرية

**دلال محمد رضا محسن**

*قسم علوم الحياة – كليه العلوم – جامعه بابل*

**زهراء محمد عبدعلي الطائي**

*قسم علوم الحياة – كليه العلوم – جامعه بابل*

**رفلاء سابق حسين**

*قسم علوم الحياة – كليه العلوم – جامعه بابل*

**حوراء محمد رضا**

*قسم علوم الحياة – كليه العلوم – جامعه بابل*

**رشا نايف علي**

*قسم علوم الحياة – كليه العلوم – جامعه بابل*

## الخلاصة

تلعب البلازميدات دورا مهما في انتشار صفة مقاومة المضادات الحيوية بين السلالات البكترية والتي تشكل تهديدا على الصحة العالمية. لذا اقتضت الضرورة ايجاد طرق ناجعة و كفيلة للحد من انتقال البلازميدات. تعتمد الطرق التقليدية لازالة البلازميد على تنمية السلالات البكترية في ظل ظروف غير ملائمة ، مثل ارتفاع درجة الحرارة أو إضافة عوامل أقحام تتداخل مع بنية تركيب الدنا اثناء تكرار البلازميد. هنالك أساليب أخرى تعتمد على ظاهرة عدم توافق البلازميد القائمة على مبدأ التنافس بين البلازميدات المتطابقة ولكنها تتطلب معرفة دقيقة بآلية تضاعف البلازميد المستهدف ، بالإضافة إلى المعالجة اللاحقة للبلازميد المسبب للتداخل . مع ظهور تقنية كريسبركاس9 التي هي محاكاة الدفاع البكتيري الطبيعي ضد المتسللين من البلازميد والعاثي، تم استثمار هذه التقنية لتكون اداه دقيقة لاستهداف اماكن متخصصة في الحمض النووي البلازميدي. في هذه المراجعة سنتناول اهم طرق الازالة والحذف للبلازميدات من الخلايا البكتيرية.

**الكلمات الدالة:** البلازميد ، انواع البلازميد، آلية تضاعف البلازميد،حذف البلازميد، تقنية كريسبركاس9.

## المقدمة

تسمى الجزيئات الحلقية الإضافية التي تتضاعف بشكل مستقل عن المادة الوراثية للبكتيريا بالبلازميدات، وهي "مركبات مهمة لنقل المعلومات الوراثية بين البكتيريا .إن تبادل البلازميدات ينقل الصفات المرضية والبيئية إلى البكتيريا المضيفة، مما يعزز تطورها السريع والتكيف مع البيئات المختلفة على مدى العقود الستة الماضية، تم تحديد عدد كبير من البلازميدات وعزلها من الاحياء المجهرية المختلفة و مع ثورة تكنولوجيا التسلسل تم تحديد أكثر من 4600 تسلسل كامل من البلازميدات الموجودة في البكتيريا والبكتريا القديمة والخلايا حقيقية النواة [1]. بعض البلازميدات لها دور مهم في توليد عوامل الضراوة مثل البروتينات المسؤولة عن قتل البكتيريا، ولها أيضًا دور حيوي في نقل جينات المقاومة للمضادات الحيوية كما تحتوي البلازميدات على جينات تعزز بقاء الكائن الحي، إما عن طريق قتل الكائنات الحية الأخرى أو عن طريق الدفاع عن الخلية المضيفة عن طريق إنتاج السموم .نظرًا لأن البلازميدات صغيرة جدًا، فإنها لا تحتوي عادةً إلا على عدد قليل من الجينات ذات الوظيفة المحددة

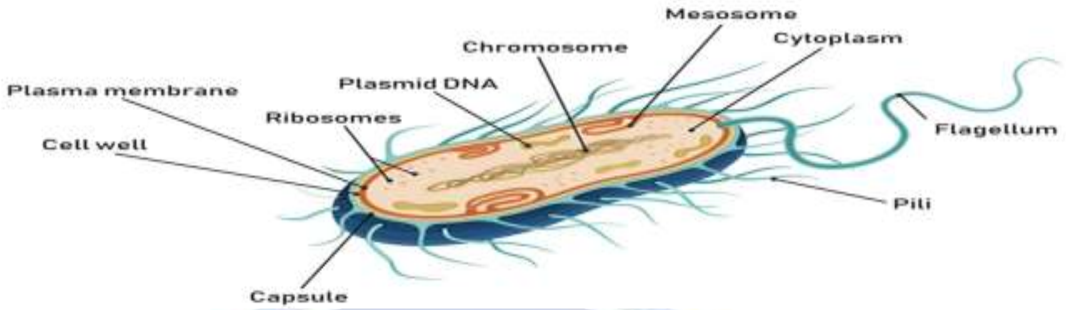
© Journal of University of Babylon for Pure and Applied Sciences (JUBPAS) by University of Babylon is licensed under a Creative Commons Attribution 4. 0 International License, 2020.
https://www.journalofbabylon.com/index.php/JUBPAS, info@journalofbabylon.com, jub@itnet.uobabylon.edu.iq
+9647823331373 (Viber and Telegram)

[2]. تعتبر البلازميدات نواقل تستخدم في تجارب الكلونة لنقل المادة الوراثية الغريبة من خلية الى اخرى وحيث تستطيع هذه الجينات التعبير والتضاعف في الخلايا الجديدة البلازميدات مفيدة في كلونه أجزاء قصيرة من الحمض النووي. أيضا، وتستخدم البلازميدات لاستنساخ البروتينات، مثل البروتين الذي يشفر للانسولين، بكميات كبيرة [3]. ان الامراض المتوارثة نتيجة لطفره وراثيه تجعل الخلايا غير قادره على تصنيع بروتين معين ويمكن علاج هذه الطفرات باستخدام البلازميدات في العلاج الجيني اذ تستخدم لنقل الجينات السليمة الى داخل الخلايا المتضررة [4]. تشكل بلازميدات المقاومة للمضادات الحيوية وبلازميدات الضراوة تهديدا حقيقيا لذا دعت الضرورة الى استخدام طرق مختلفة لازالة البلازميدات منها استخدام مواد كيمائية بتراكيز معينة مثل برتقالي أكريدين (AO) وبروميد إيثيديوم (EB) وكبريتات دوديسيل الصوديوم(SDS) . بالاضافة الى ذلك، الاستفادة من العوامل الفيزيائية عن طريق ايجاد ظروف غير ملائمة لنمو السلالة البكتيرية منها تعريض السلالات البكتيرية الحاملة لصفة المقاومة او الضراوة الى درجات حرارة مرتفعة و كذلك يتم حذف البلازميد عن طريق ايجاد صفة عدم توافق بين البلازميدات في السلالة البكتيرية[4]. تم اكتشاف نظام كريسبر لاول مره من قبل علماء يابانيين من جامعة اوساكا عام 1987 في بكتريا *E.coli* و تم تعريفة على انه نظام دفاعي مكتسب تستخدمة البكتريا عند تعرضها لهجمات فيروسية و الحمض النووى البلازميدي الاجنبي , تعتبر تسلسلات كريسبر او التكرارات العنقودية المتناظرة القصيرة منتظمة التباعد(CRISPR) عبارة عن تسلسلات دنا متواجدة في بدائية النوى كالبكتريا و البكتريا القديمة تضم بقايا الحمض النووي للفيروسات التي سبق ان هاجمت البكتريا و يحتفظ بها كفواصل حتى يستخدمها في الكشف عن الدنا الخاص بتلك الفيروسات في هجماتها اللاحقة ومن ثم يتم تدميرها بمساعدة بروتين كاس9(Cas 9) الذي يعمل كانزيم قاطع يستخدم تسلسلات كريسبر في التعرف على توالي معينة من الدنا الفيروسات المهاجمة للبكتريا و من ثم قصها[5]. طبقا للدراسات الحديثة يمكن الاستفادة من هذا النظام البكتيري الطبيعي (CRISPR) لاستهداف جينوم البكتيريا المسببة للأمراض على وجه التحديد [6] ، استنادًا إلى الانتقائية عالية لهذا النظام تم استخدامه في ازالة البلازميد البكتيري للحد من انتشار البلازميدات المقاومة للأدوية المتعددة بين السلالات البكترية[7].

## تعريف البلازميد

البلازميد عبارة عن قطعة دائرية صغيرة من الحمض النووي توجد و تتضاعف بشكل مستقل عن الحمض النووي الكروموسومي في الخلايا البكتيرية [8]. يلعب البلازميد دورًا حاسمًا في تطور الكائنات بدائية النواه عن طريق نقل الحمض النووي بين الأنواع البكتيرية المختلفة [9]. توجد البلازميدات بشكل أساسي في البكتيريا ، ولكن يمكن العثور عليها أيضًا في كائنات حية اخرى مثل البكتريا القديمة Archaea وبعض الكائنات متعددة الخلايا[10][11]. تختلف البلازميدات عن بعضها البعض من حيث الوزن الجزيئي فمنها الصغير و منها الكبير، وبالتالي تختلف في حملها للجينات فمنها لايحتوي على اي جين بينما هناك انواع تحتوي على عدة جينات[8]. يوضح شكل (1) تركيب البكتريا.

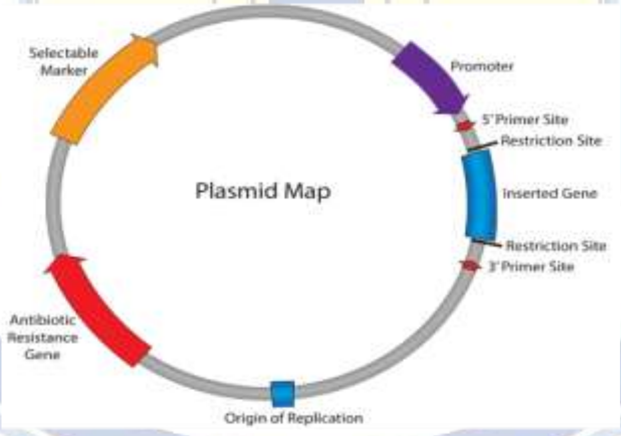
© Journal of University of Babylon for Pure and Applied Sciences (JUBPAS) by University of Babylon is licensed under a Creative Commons Attribution 4. 0 International License, 2020.
https://www.journalofbabylon.com/index.php/JUBPAS, info@journalofbabylon.com, jub@itnet.uobabylon.edu.iq
+9647823331373 (Viber and Telegram)




**الشكل (1) تركيب البكتريا**

للبلازميدات العديد من الوظائف المختلفة منها الحفاظ على بقاء و ديمومة الخلية المضيفة لها عن طريق إنتاج السموم، تسهل عملية التكاثر في البكتيريا، منح البكتريا صفة المقاومة المتعددة للمضادات الحيوية المختلفة وكذلك تساهم البلازميدات في عملية الايض الخلوي عن طريق تحويل السكريات المعقدة الى سكريات بسيطة[12].

يتالف البلازميد كما هو موضح في الشكل(2) من مجموعة من المناطق ابرزها : منطقة اصل التضاعف (ori) المسؤولة عن تضاعف البلازميد أثناء نمو وتضاعف البكتريا و منطقه المشغل (Promoter region) الذي ينظم عملية استنساخ البلازميد و منطقة ارتباط البادئ (Primer binding site) و جين مسؤول عن ايجاد صفة المقاومة للمضادات الحيوية و منطقة الجينات الحاشرة (inserted genes) التي تمثل تسلسل معين من الدنا يتم ادخاله للبلازميد لغرض دراسته و منطقة التقييد (Restriction site) التي تضم تسلسل معين من الدنا قادرة على قص و لصق مكونات البلازميد[3] .




شكل (2) تركيب البلازميد[3]

## انواع البلازميدات

يمكن تصنيف البلازميدات اعتمادا على ظاهرة التوافقية بين البلازميدات (Compatibility)( اي قدرة بقاء و تضاعف اكثر من بلازميد في الخلية البكتيرية) الى مجموعة من البلازميدات المتشابة في منطقة اصل التضاعف(Ori) لاتستطيع البقاء في الخلية المضيفة لمدة طويلة ويطلق عليها مجاميع غير متوافقة(Incompatibility groups) اما المجموعة الثانية فانها تضم بلازميدات مختلفة في منطقة اصل التضاعف (Ori) ولذا فان لها القدرة على البقاء في الخلية المضيفة بشكل ثابت و

© Journal of University of Babylon for Pure and Applied Sciences (JUBPAS) by University of Babylon is licensed under a Creative Commons Attribution 4. 0 International License, 2020.
https://www.journalofbabylon.com/index.php/JUBPAS, info@journalofbabylon.com, jub@itnet.uobabylon.edu.iq
+9647823331373 (Viber and Telegram)

Journal of University of Babylon for Pure and Applied Sciences, Vol. (28), No. (3): 2020
Online ISSN: 2312-8135, Print ISSN: 1992-0652

تعرف بالمجاميع المتوافقة (Compatibility groups)[12]. يمكن أن تتعايش البلازميدات المختلفة في البكتيريا إذا كانت متوافقة مع بعضها البعض فقط اما البلازميد غير المتوافق فانه يحذف من الخلية البكتيرية مع مرور الزمن[13]. هنالك نوع من البلازميدات لها دور فعال في عملية تبادل المادة الوراثية من خلية بكتيرية إلى أخرى بواسطة عملية الاقتران ، فعلى ضوء هذه الوظيفة تقسم البلازميدات الى قسمين: بلازميدات اقترانية (conjugative plasmid) تحتوي على جينات تسمى جينات النقل مسؤولة عن بداية حدوث عملية الاقتران، و بلازميدات غير اقترانية (non– conjugative plasmid) ليس لها القدرة على الانتقال من خلية الى اخرى و انما تكون عملية نقلها مرافقة لانتقال البلازميدات الاقترانية[13] .

يمكن تصنيف البلازميدات الى خمسة انواع رئيسة اعتمادا على الوظائف التي تقوم بها: بلازميدات الخصوبة ( Fertility plasmids) والمعروفة أيضًا باسم بلازميدات F ،تحتوي على جينات نقل (transfer genes) تسمح بانتقال الجينات من البكتيريا الواهبة إلى البكتريا المستلمة من خلال عملية الاقتران[14]. تحتوي بلازميدات المقاومة (Resistance plasmids) على جينات تساعد الخلية البكتيرية على مواجهة السموم أو المضادات الحيوية، يمكن لبعض البلازميدات المقاومة أن تنتقل عن طريق الاقتران عند حدوث ذلك تكون السلالة البكتيرية مقاومة للسموم و للمضادات الحيوية[15]. تعمل بلازميدات الضراوة (virulence plasmids) على منح الخلايا البكتيرية صفة الامراضية ، حيث توجد سلالات معينة من بكتريا الـ *E. coli* تمتلك بلازميدات ضراوة يمكن أن تسبب الإسهال الشديد والقيء[15] . البلازميدات المحللة (Degradative Plasmids) هي بلازميدات اقترانية تساعد البكتيريا المضيفة على هضم المركبات المعقدة مثل الكافور والزيلين والتولوين وحمض الساليسيليك نتيجة لامتلاكها جينات الإنزيمات الخاصة بتحليل المركبات المعقدة[15]. تحتوي بلازميدات الكولسين (Col plasmids) على جينات مسؤولة عن تصنيع بروتينات البكتريوسينات (المعروفة أيضًا باسم الكوليسينات)والتي تعمل على قتل السلالات البكتريا المختلفة و الدفاع عن البكتريا المضيفة، تم العثور على هذا النوع من البلازميدات في العديد من أنواع البكتيريا بما في ذلك *E. coli* [16].

**آليات تضاعف البلازميد plasmid replication mechanisms**

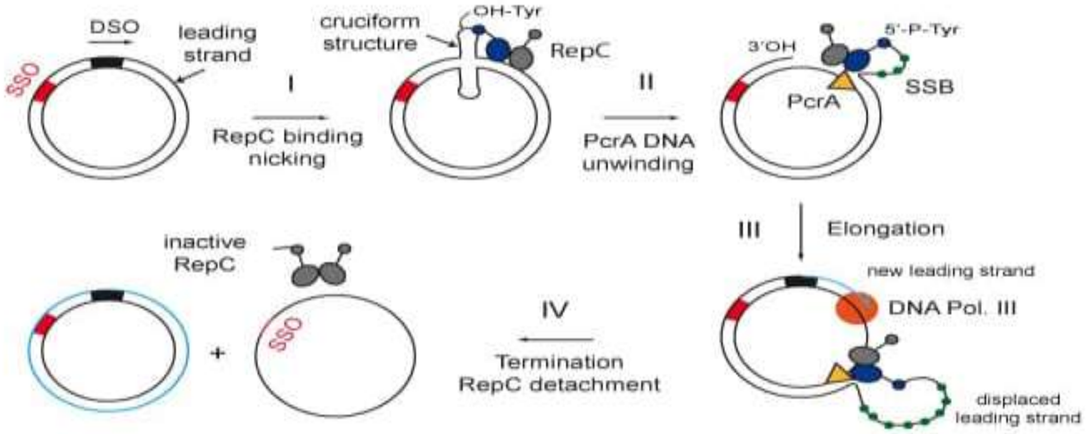
يمكن أن يكون فهم آليات تضاعف البلازميد مفيدًا لتطوير استراتيجيات ضد انتشار بلازميدات مقاومة المضادات الحيوية المتعددة بين السلالات البكتيرية اذ تلعب البلازميدات دورًا حاسمًا في تطور الكائنات بدائية النواه عن طريق نقل الحمض النووي بين الأنواع البكتيرية على الرغم من أن البلازميدات تتكاثر بشكل مستقل ، إلا أنها تتعايش بثبات داخل المضيف وتحافظ على عدد نسخها عن طريق تضاعف الحمض النووي الخاص بها قبل كل انقسام للخلايا [8] .يعتمد عدد نسخ البلازميد على نوع البلازميد والكائن المضيف وعوامل النمو و هناك ثلاثة أنواع من طرق تضاعف البلازميدات وهي اليه الدائرة المتدحرجة (rolling circle replication mechanism)، ونوع Col E1 type replication و الـ Intron– contaning replication [17].

**1–آلية الدائرة المتدحرجة Rolling circle replication mechanism**

تتضاعف العديد من البلازميدات البكتيرية بواسطة آلية الدائرة المتدحرجة بصوره غير متناظره وهذا يتطلب التعرف على التسلسل المحدد لبدء اصل التضاعف (Ori) ، و احداث شق في أحد خيوط DNA القالب ، وتفكيك الازدواج الحمض النووي قبل منطقة بدأ اصل التضاعف(Ori) ، تبدأ آلية الدائرة المتدحرجة (RCR) بواسطة بروتينات بدء التضاعف (بروتينات Rep المشفرة بواسطة البلازميد , تحتوي الـ Ori للبلازميد على مواقع خاصة لارتباط بروتينات Rep ،إن بروتينات الـ Rep قادرة على شق وربط الحمض النووي من خلال آلية الـ Topoisomerase I كماهو موضح في الشكل(3) [18] .

© Journal of University of Babylon for Pure and Applied Sciences (JUBPAS) by University of Babylon is licensed under a Creative Commons Attribution 4. 0 International License, 2020.
https://www.journalofbabylon.com/index.php/JUBPAS, info@journalofbabylon.com, jub@itnet.uobabylon.edu.iq
+9647823331373 (Viber and Telegram)

Journal of University of Babylon for Pure and Applied Sciences, Vol. (28), No. (3): 2020
Online ISSN: 2312-8135, Print ISSN: 1992-0652




شكل(3) آلية الدائرة المتدحرجة [18]

**في الخطوة الاولى** يرتبط بروتين RepC بتسلسل معين من الحمض النووي الموجود ضمن منطقة ori للحلزون المزدوج للبلازميد(dso) وينشأ نتوء يكون ضمن منطقه تحتوي على تسلسلات معكوسة تعطي شكل صليبي.

**الخطوة الثانية**: ترتبط بروتينات RepC بالشريط القائد Leading strand بالجهة 5'–end بواسطه phosphotyrosine linkage يتم تحميل انزيم PcrA helicase على الشريط المفرد للحمض النووي(ssDNA) و ارتباط كل من انزيم DNA polymerase III و بروتينات الـ single– strand DNA binding protein (SSB) في منطقة القطع لتنظيم عملية استطالة الشريط القائد.

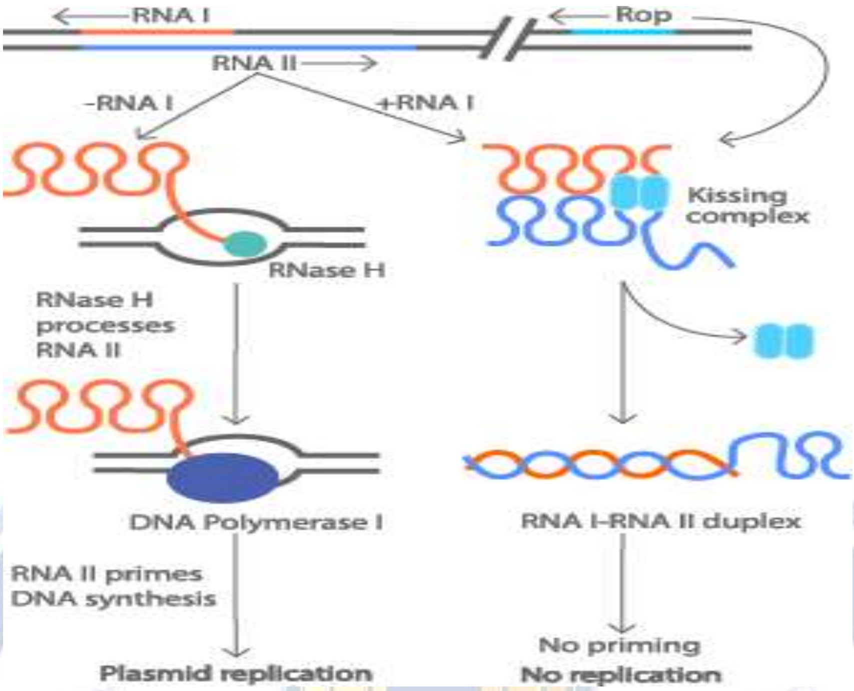
**الخطوة الثالثة**: يستمر تضاعف شريط القائد عن طريق استطالة النهاية الحرة 3'–end لشريط الدنا القائد حتي يتم استنساخ كامل لشريط الدنا الابوي و انفصاله. الخطوة الرابعة: عند منطقه الانهاء تنفصل بروتينات الـ RepC عن شريط الـDNA المفرد المتكون[18].

## 2–آلية تضاعف بلازميد Col1E1

يعد تضاعف Col E1 آلية تنظيم سلبية تمكن البلازميد من التحكم في أعداد النسخ الخاصة به عن طريق إشراك RNAمن النوع الأول ، والنوع الثاني من RNA ، وبروتين Rom ، والبلازميد نفسه. يبدأ تضاعف Col E1 عن طريق تفاعلات RNA–RNA ولا يعتمد على بروتينات بدء التضاعف المشفر بواسطة البلازميد لتنظيم عدد نسخه. ان نسخ الـ RNA النوع الثاني الذي يوجد اعلى منطقه بدء تضاعف بلازميد الـ Col E1 ب 555 قاعدة نايتروجينية , يعلن عن بدء تضاعف البلازميد . يحدث التضاعف عند تكون هنالك تشابه بين المنطقة الغنية بالقاعدة النتروجينية Gمن الـ RNA II و المنطقة الغنية بالقاعدة C في الشريط القالب لـ DNA مكونا اشكالا حلقيه ، يتعرف انزيم الـ RNase على الـ DNA/RNA الهجين ويعمل على فصل الـ RNA الهجين عند النهاية 3'–end ، بادئ الـ RNA يمكنه الان الارتباط بالنهاية الحرة 3'– end الناتجة من ازاله الـ RNA الهجين, بعدها يبدأ عمل انزيم الـ DNA polymerase من اكمال تضاعف البلازميد, كما في الشكل (4) [17].

© Journal of University of Babylon for Pure and Applied Sciences (JUBPAS) by University of Babylon is licensed under a Creative Commons Attribution 4. 0 International License, 2020.
https://www.journalofbabylon.com/index.php/JUBPAS, info@journalofbabylon.com, jub@itnet.uobabylon.edu.iq
+9647823331373 (Viber and Telegram)

Journal of University of Babylon for Pure and Applied Sciences, Vol. (28), No. (3): 2020
Online ISSN: 2312-8135, Print ISSN: 1992-0652



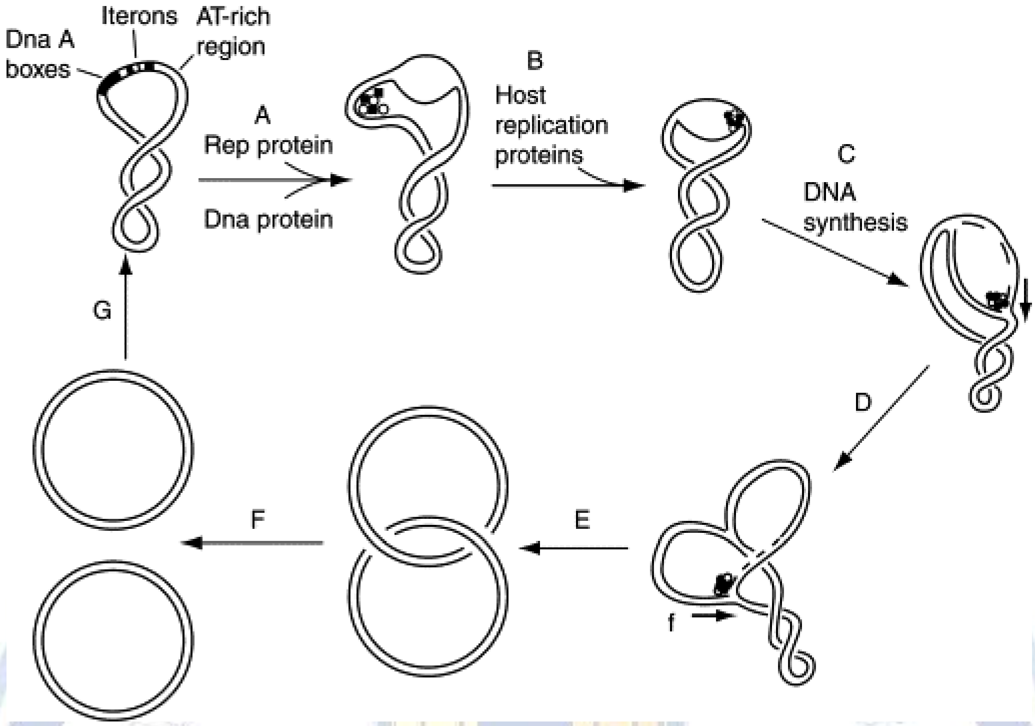

شكل (4) آلية تضاعف بلازميد Col E1 [30]

### 3-آلية تضاعف ريبلكون الايترون **Iteron-containing replicons**

يتكون ريبلكون الايترون من جين مسؤول عن تشفير بروتين Rep المسؤول عن تضاعف البلازميد ، مجموعة من تسلسلات التكرار المباشر تسمى ايترون (iteron) التي تكون بالقرب من منطقة غنية بالقواعد النتروجنية الادنين والثايمين (AT)وصناديق Dna . ان جين الايترون يشفر لبروتين مسؤول عن بدء عملية تضاعف الكروموسوم البكتيري. ان طول المنطقة الغنية بـ AT، عدد الايترون و صناديق DnaA تختلف من ريبلكون الى اخر. تبدأ آلية تضاعف ريبلكون الايترون عند ارتباط بروتينات Rep والـ Intron بنفس اتجاه حلزون الـ DNA ومن ثم ارتباطهما مع بروتينات صناديق Dna A في الريبلكون، تعمل مجموعة Rep-DnaA-DNA على تعزيز فك شريطي الـDNA في المنطقة الغنية بـ AT مما يسهل وصول العوامل المساعدة على التضاعف وتصنيع نسخة البلازميد الجديدة كما في الشكل ادناه [17].

© Journal of University of Babylon for Pure and Applied Sciences (JUBPAS) by University of Babylon is licensed under a Creative Commons Attribution 4. 0 International License, 2020.
https://www.journalofbabylon.com/index.php/JUBPAS, info@journalofbabylon.com, jub@itnet.uobabylon.edu.iq
+9647823331373 (Viber and Telegram)

Journal of University of Babylon for Pure and Applied Sciences, Vol. (28), No. (3): 2020
Online ISSN: 2312-8135, Print ISSN: 1992-0652




**شكل (5) آلية تضاعف ريبلكون الايترون[19]**

## حذف البلازميدات البكترية Plasmid curing in bacteria

من المعروف أن البلازميدات البكتيرية تحتوي على جينات مسؤولة عن مقاومة المضادات الحيوية والمعادن ،المسارات التقويضية مثل استخدام اللاكتوز وتحليل الهيدروكربونات والتصنيع الحيوي لبعض المضادات الحيوية. ان حذف البلازميدات في السلالات البكتيرية هي إحدى الطرق للقضاء على البلازميد البكتيري والتقليل من انتقال صفة مقاومة المضادات الحيوية المتعددة[20] تم تطوير العديد من الطرق التي تشمل العوامل الكيميائية والفيزيائية لازلة البلازميدات ، تبدأ آلية ازاله البلازميد عن طريق تثبيط تضاعفه حيث تقوم عوامل الاقحام intercalating agents بتكسير الشكل الحلزوني الفائق للحمض النووي البلازميدي لتشكيل بعد ذلك جزيئه DNA مفتوحه [21] . تعتبر المقاومة بشكل عام على أنها "كروموسومية" عندما لا تتأثر بآليات حذف البلازميد و"بلازميديه" عندما تتأثر بها. ان تثبيط البلازميدات الحاملة لجينات المقاومة للمضادات الحيوية وازالتها يحد من زياده انتشار صفة المقاومة للمضادات الحيوية في النظام البيئي. ان كفاءة العوامل المستخدمة في ازالة البلازميدات تختلف بصوره كبيره وهذا الاختلاف يعود الى نوع الكائن الحي, كفاءة وفعاليه عامل الحذف[22] .

تم بنجاح استخدام صبغات الاقحام Intercalating dyes مثل( acriflavine, acridine orange, ethidium bromide and quinacrine ) في ازالة البلازميدات البكتيرية [23] إن طريقه عمل هذه الصبغات تكون من خلال تثبيط عملية تضاعف البلازميد. تعمل جزيئه الإيثيديوم برومايد ذات الصيغة الكيميائية C21H20N3Br و المشابه للقواعد النتروجينية في هيكلها الكيميائي لذا على التداخل بسهولة بين شريطي الـ DNA محدثا خللا في تركيب الشريط الحلزوني المزدوج للبلازميد لذا يستخدم الإيثيديوم برومايد على نطاق واسع لازلة و حذف البلازميدات في مجموعة واسعة من السلالات البكتيرية[4]. يعتبر كل من الكوميرميسين والنوفوبيوسين من مثبطات انزيم DNA gyrase في الخلايا السليمة لبكتريا ال

© Journal of University of Babylon for Pure and Applied Sciences (JUBPAS) by University of Babylon is licensed under a Creative Commons Attribution 4. 0 International License, 2020.
https://www.journalofbabylon.com/index.php/JUBPAS, info@journalofbabylon.com, jub@itnet.uobabylon.edu.iq
+9647823331373 (Viber and Telegram)

Journal of University of Babylon for Pure and Applied Sciences, Vol. (28), No. (3): 2020
Online ISSN: 2312-8135, Print ISSN: 1992-0652

*E. coli*. حيث يعمل هذا الانزيم ازاله الالتفاف السالب لشريط ال DNAالبلازميدي فائق اللف [24]. اشار العالم Novick الى ان التراكيز القليلة من الكوميرمايسين ادت الى ازالة penicillinase plasmid في بكتريا*S. aureus* . ان آليه عمل هذه المضادات تكون من خلال تراكم الاشكال الوسطيه للبلازميد المتضاعف وبالتالي تعاني هذه الجزيئات من التحلل والازاله [25] . يثبط انزيم ريفامبيسين RNA polymerase في كل من بكتريا *E. coli* و بكتريا الـ *S. aureus* و, يعتبر ميتوميسين ج ( Mitomycin C) مسؤول عن تثبيط الـ Hydoquinone حيث يقوم بمهاجمة الروابط الالكيليه بين شريطي الحمض النووي [18]. اكتشف Rheinwaid وزملائه تأثير ميتوميسين C في *Pseudomonas putida* في القضاء على الجينات البلازميدية المشفرة لأكسدة الكافور[25].يستخدم المنظف الانيوني كبريتات دوديسيل الصوديوم (SDS) كعامل حذف كيميائي لازالة البلازميدات[4] . بين الباحثون أن استخدام SDS في ازالة البلازميد أكثر فعالية من تأثير ارتفاع درجات الحرارة او اضافة الاثيديوم برومايد في الوسط الزرعي [15] . عادة ما يستخدم العامل الفيزيائي مثل درجة حرارة النمو المرتفعة في حذف البلازميد المتواجد في بكتريا *Vibrio* .ان البكتريا التي تنمو في درجة حرارة 37 مئوية عند حضانتها بدرجات حرارية عالية تصل الى 42 درجه مئوية فأنها تفقد البلازميدات غير اساسية لبقائها [16] . أظهرت دراسة أخرى أن درجة حرارة النمو المرتفعة قد استخدمت بنجاح لعلاج سلالات إيجابية من البنسليناز للمكورات العنقودية الذهبية المقاومة للتتراسيكلين و يمكن استخدام تقييد الثايمين (Thymine limitation) لازلة البلازميدات المعتمدة على الثايمين اذكر كارو وآخرون ان هذه التقنيه استخدمت لحذف بلازميدات الكولسين المتواجدة في بكتريا الـ *E. coli*. يمكن حذف 80 % من بلازميدات بكتريا الـ *S.aureus* اثناء تشكيل وتجديد البروتوبلاست، حيث ان ازالة البلازميد تحدث خلال طور البروتوبلاست قبل تجديد الجدار الخلوي. تعد هذه الطريقة مناسبة في حذف البلازميد من البكتيريا الموجبه لصبغه غرام اذ يتم تحويلها بسهولة إلى خلايا بروتوبلاست عن طريق تعريضها لا نزيم lysosome [15]. إن استخدام إستراتيجيات حذف البلازميد التقليدية في بعض السلالات البكتيرية مثل صبغة أكريدين ، الإيثيديوم برومايد، نوفوبيوسين ، كبريتات دوديسيل الصوديوم (SDS) ، ودرجة حرارة العاليه أو الأشعة فوق البنفسجية (UV) لا تفيد في إزالة البلازميدات من البكتيريا في بعض السلالات البكتيرية، كما انها قد تؤدي إلى تلف الحمض النووي الكروموسومي وتكون البلازميدات غيرمستهدفة في عملية ازالة البلازميد كما ان التحري عن السلالات التي فقدت البلازميد يستغرق وقتًا طويلاً[4]. تشيرظاهرة عدم توافق البلازميدي إلى حقيقة أن اثنين من البلازميدات التي تنتمي إلى نفس مجموعة عدم التوافق البلازميدي ولا يمكن بقائها لمدة طويلة بشكل ثابت في نفس الخلية البنويه[26]. بينت الدراسات ان حذف البلازميد بطريقه عدم التوافق يشير الى حقيقة ان بلازميدين متشابهين في منطقة اصل التضاعف (Ori) يكونان غير قادرين على التواجد بطريقة مستقرة داخل الخلية نفسها. حيث يتم إدخال بلازميد غير متوافق في الكائن الحي الذي يتم معاملته ويتم الحفاظ على انتقاء للبلازميد الجديد أثناء نمو الكائن الحي. ثم يتم معاملة الخلايا التي فقدت البلازميد الأول (المقيم) من البلازميد الذي تم إدخاله عن طريق اختيار الظروف التي تؤدي إلى فقدانه[15] .

© Journal of University of Babylon for Pure and Applied Sciences (JUBPAS) by University of Babylon is licensed under a Creative Commons Attribution 4. 0 International License, 2020.
https://www.journalofbabylon.com/index.php/JUBPAS, info@journalofbabylon.com, jub@itnet.uobabylon.edu.iq
+9647823331373 (Viber and Telegram)

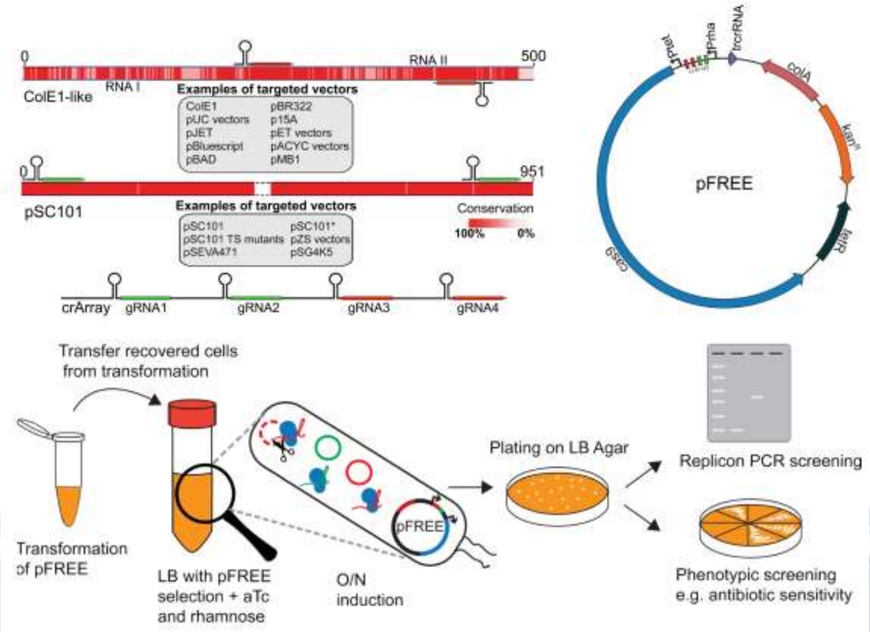
**استخدام تقنية كريسبر في حذف البلازميدات Using the CRISPR/Cas9 system to eliminate plasmids**

تعتبر الأمراض المعدية تهديدا عالميا يسهم في زيادة معدلات الاعتلال والوفاة سنويا، مع استمرار احتمال حدوث جوائح مزعزعة للاستقرار ، لذا فان دركنا لمسببات الامراضية للبكتيريا والفيروسات والفطريات والطفيليات، إلى جانب التشخيص السريع والعلاج من العدوى يساهم في الحد من انتشار الامراض جميع أنحاء العالم. يتم الآن تطبيق تكنولوجيا كريسبر بشكل روتيني لتحرير الجينات بكفاءة واستثمارها في مجالات طبية واسعة وبالاخص في مجال الامراض المعدية[4]. ان مفهومنا لبنية ووظيفة التكرارات العنقودية المتناوبة منتظمة التباعد (CRISPR) وما يرافقه من بروتينات كريسبر المرتبطة ببروتين كاس9 (Cas9) أدى إلى التوسع السريع في البحوث والتطبيقات السريرية، تم تحديد مكان كريسبر لأول مرة في عام 1987 ، عندما تم اكتشاف مقاطع وراثية تحتوي على 5 تكرارات متجانسة ل(29) نيوكليوتيد مفصولة ب(32) فواصل نوكليوتيدية في الإشريكية القولونية [27]. علم بعد سنوات أن تسلسلات الفواصل النوكليوتيدية مشتقة من عناصر جينية متنقلة بما في ذلك العاثيات و البلازميدات و الجينات القافزة , التي تشكل البنية الأساسية للمناعة التكيفية في البكتيريا والعتائق[28]. تم توظيف CRISPR–Cas9 من قبل العديد من المحققين لتشخيص الأمراض المعدية في 2016، تمكن مولر وزملائه بالاستفاده من تقنية كريسبر–كاس9 في تحديد جينات مقاومة المضادات الحيوية في البلازميدات البكتيرية، حيث قامو بتركيب معقد شريط الرنا الدليل–بروتين كاس9 (gRNA–Cas9) مع تسلسلات محددة من حمض النووى للبلازميدات التي تحتوي على جينات المقاومة وبعد ارتباط شريط الرنا الدليل مع تسلسلات الدنا المكملة له، يتم قص التسلسلات المحددة بفعل بروتين كاس9. ولغرض التحري عن قطع الدنا الحاصلة، تم ربط صبغة الفلورسنت (YOYO–1) وناتروبوسين بشكل مستقل مع الحمض النووي على أساس المناطق الغنية AT و بشكل انتقائي، مما أدى إلى توليد انبعاثات فريدة من نوعها لكل جزء من الحمض النووي. بالاستفادة من هذا الاختبار ،كان الباحثون قادرين على التمييز بين البلازميدات المختلفة التي تنتج مقاومة للمضادات الحيوية ذات الطيف الواسع، بما في ذلك سيفوتاكسيم–ام–15 ، سيفوتاكسيم–ام–14 والكربابنيم[29].

في تطبيق آخر، قام لورستين و زملائه بتصميم نظام ازالة بلازميد شامل اطلق عليه (PFREE)، حيث تم بناء هذا البلازميد عن طريق تضخيم العمود الفقري لبلازميد (Pmazsk) ؛ متضمنا لتسلسلات كريسبركاس9 و تسلسلات هدف تعود لأربع انواع مختلفة لبلازميد (ColE1) والغرض منه التخلص من بلازميدات مختلفة خلال خطوة واحدة كما موضح في الشكل ادناه [24].

© Journal of University of Babylon for Pure and Applied Sciences (JUBPAS) by University of Babylon is licensed under a Creative Commons Attribution 4. 0 International License, 2020.
https://www.journalofbabylon.com/index.php/JUBPAS, info@journalofbabylon.com, jub@itnet.uobabylon.edu.iq
+9647823331373 (Viber and Telegram)

Journal of University of Babylon for Pure and Applied Sciences, Vol. (28), No. (3): 2020
Online ISSN: 2312-8135, Print ISSN: 1992-0652




شكل (6) آلية عمل نظام ازالة البلازميد الشامل(PFREE)[24]

حيث قام الباحثون بتهيئة سلاله بكتيرية (*E.coli*) تحتوي على ثلاثة بلازميدات متوافقة ونقلها الى وسط تحول يحتوي بلازميدات (PFREE) و تم حضن المزيج لفترات زمنية مختلفة، ثم أخذ عينات من مزيج التحول و زراعتها على وسط التحول (LB agar) لمدة ليلة واحدة . حيث وجدو ان 80% من الخلايا المختبرة خالية من البلازميد تماما في حين ان 10% من الخلايا المختبرة تحتوي على واحد او اكثر من البلازميدات و كذلك وجدو ان جميع الخلايا المختبرة لاتحتوي على بلازميدات(pFREE) [24].

**Conflict of Interests.**

**There are non-conflicts of interest .**

## References

[1] M. Shintani, Z. K. Sanchez, and K. Kimbara, "Genomics of microbial plasmids: Classification and identification based on replication and transfer systems and host taxonomy," *Front. Microbiol.*, vol. 6, no. MAR, pp. 1–17, 2015, doi: 10.3389/fmicb.2015.00242.

[2] C. M. Thomas and K. M. Nielsen, "Mechanisms of, and barriers to, horizontal gene transfer between bacteria," *Nat. Rev. Microbiol.*, vol. 3, no. 9, pp. 711–721, 2005, doi: 10.1038/nrmicro1234.

[3] M. Bierman, R. Logan, K. O. Brien, E. T. Seno, and B. E. Schoner, "Plasmid cloning vectors for the conjugal transfer of DNA from Escherichia coli to Streptomyces spp .," vol. 116, pp. 43–49, 1992.

[4] V. Letchumanan, K. G. Chan, and L. H. Lee, "An insight of traditional plasmid curing in Vibrio species," *Front. Microbiol.*, vol. 6, no. JUL, 2015, doi: 10.3389/fmicb.2015.00735.

© Journal of University of Babylon for Pure and Applied Sciences (JUBPAS) by University of Babylon is licensed under a Creative Commons Attribution 4. 0 International License, 2020.
https://www.journalofbabylon.com/index.php/JUBPAS, info@journalofbabylon.com, jub@itnet.uobabylon.edu.iq
+9647823331373 (Viber and Telegram)

[5] D. M. Thurtle-Schmidt and T. W. Lo, "Molecular biology at the cutting edge: A review on CRISPR/CAS9 gene editing for undergraduates," *Biochem. Mol. Biol. Educ.*, vol. 46, no. 2, pp. 195–205, 2018, doi: 10.1002/bmb.21108.

[6] J. E. Garneau *et al.*, "The CRISPR/cas bacterial immune system cleaves bacteriophage and plasmid DNA," *Nature*, vol. 468, no. 7320, pp. 67–71, 2010, doi: 10.1038/nature09523.

[7] R. B. Vercoe *et al.*, "Cytotoxic Chromosomal Targeting by CRISPR/Cas Systems Can Reshape Bacterial Genomes and Expel or Remodel Pathogenicity Islands," *PLoS Genet.*, vol. 9, no. 4, 2013, doi: 10.1371/journal.pgen.1003454.

[8] M. Shintani, Z. K. Sanchez, and K. Kimbara, "Genomics of microbial plasmids : classification and identification based on replication and transfer systems and host taxonomy," vol. 6, no. March, pp. 1–16, 2015, doi: 10.3389/fmicb.2015.00242.

[9] A. Carattoli, "International Journal of Medical Microbiology Plasmids in Gram negatives : Molecular typing of resistance plasmids," *Int. J. Med. Microbiol.*, vol. 301, no. 8, pp. 654–658, 2011, doi: 10.1016/j.ijmm.2011.09.003.

[10] A. J. F. Griffiths, "Natural plasmids of filamentous fungi," *Microbiol. Rev.*, vol. 59, no. 4, pp. 673–685, 1995, doi: 10.1128/mmbr.59.4.673-685.1995.

[11] H. Al Doghaither and M. Gull, "Plasmids as Genetic Tools and Their Applications in Ecology and Evolution," *Plasmid*, pp. 1–16, 2019, doi: 10.5772/intechopen.85705.

[12] M. . Clark, DP, Pazdernik, NJ y McGehee, *Plasmids*. 2019.

[13] E. E. Udo, "A new incompatibility group plasmid . in Staphylococcus aureus," vol. 78, pp. 33–36, 1991.

[14] T. H. E. Fertility, F. Of, and E. Coli, "THE CONJUGATION SYSTEM OF F , ESCHERICHIA COLI," pp. 593–624, 1986.

[15] M. Shintani, Y. Takahashi, H. Yamane, and H. Nojiri, "The behavior and significance of degradative plasmids belonging to inc groups in pseudomonas within natural environments and microcosms," *Microbes Environ.*, vol. 25, no. 4, pp. 253–265, 2010, doi: 10.1264/jsme2.ME10155.

[16] H. Banu and K. P. Prasad, "Role of Plasmids in Microbiology," *J. Aquac. Res. Dev.*, vol. 08, no. 01, pp. 1–8, 2017, doi: 10.4172/2155-9546.1000466.

[17] N. Tabassum Khan, "Mechanisms of Plasmid Replication," *J. Proteomics Bioinform.*, vol. 10, no. 9, pp. 212–213, 2017, doi: 10.4172/jpb.1000444.

[18] C. L. Pastrana, C. Carrasco, P. Akhtar, S. H. Leuba, S. A. Khan, and F. Moreno-Herrero, "Force and twist dependence of RepC nicking activity on torsionally-constrained DNA molecules," *Nucleic Acids Res.*, vol. 44, no. 18, pp. 8885–8896, 2016, doi: 10.1093/nar/gkw689.

[19] J. M. Kaguni, *DNA Replication: Initiation in Bacteria*, 2nd ed. Elsevier Inc., 2013.

© Journal of University of Babylon for Pure and Applied Sciences (JUBPAS) by University of Babylon is licensed under a Creative Commons Attribution 4. 0 International License, 2020.
https://www.journalofbabylon.com/index.php/JUBPAS, info@journalofbabylon.com, jub@itnet.uobabylon.edu.iq
+9647823331373 (Viber and Telegram)

[20] C. Ghosh, P. Sarkar, R. Issa, and J. Haldar, "Alternatives to conventional antibiotics in the era of antimicrobial resistance," *Trends Microbiol.*, vol. 27, no. 4, pp. 323–338, 2019.

[21] M. M. C. Buckner, M. L. Ciusa, and L. J. V. Piddock, "Strategies to combat antimicrobial resistance: Anti-plasmid and plasmid curing," *FEMS Microbiol. Rev.*, vol. 42, no. 6, pp. 781–804, 2018, doi: 10.1093/femsre/fuy031.

[22] J. T. Trevors, "Plasmid curing in bacteria," *FEMS Microbiol. Lett.*, vol. 32, no. 3–4, pp. 149–157, 1986, doi: 10.1016/0378-1097(86)90286-7.

[23] L. Caro, G. Churchward, and M. Chandler, "5 Study of Plasmid Replication in vivo," *Methods Microbiol.*, vol. 17, no. C, pp. 97–122, 1984, doi: 10.1016/S0580-9517(09)70053-4.

[24] I. Lauritsen, A. Porse, M. O. A. Sommer, and M. H. H. Nørholm, "A versatile one-step CRISPR-Cas9 based approach to plasmid-curing," *Microb. Cell Fact.*, vol. 16, no. 1, pp. 1–10, 2017, doi: 10.1186/s12934-017-0748-z.

[25] J. G. Rheinwald and I. C. Gunsalus, "A Transmissible Plasmid Controlling Camphor Oxidation in Pseudomonas putida," vol. 70, no. 3, pp. 885–889, 1973.

[26] D. Wang *et al.*, "Curing both virulent mega-plasmids from bacillus anthracis wild-type strain A16 simultaneously using plasmid incompatibility," *J. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 25, no. 10, pp. 1614–1620, 2015, doi: 10.4014/jmb.1503.03083.

[27] Y. Ishino, H. Shinagawa, K. Makino, M. Amemura, and A. Nakata, "Nucleotide Sequence of the iap Gene, Responsible for Alkaline Phosphatase Isozyme Conversion in Escherichia coli , and Identification of the Gene Product," pp. 5429–5433, 1987.

[28] Y. Ishino, "crossm History of CRISPR-Cas from Encounter with a Mysterious," pp. 1–17, 2018.

[29] V. Müller *et al.*, "Direct identification of antibiotic resistance genes on single plasmid molecules using CRISPR / Cas9 in combination with optical DNA mapping," *Nat. Publ. Gr.*, no. December, pp. 1–11, 2016, doi: 10.1038/srep37938.

[30]http://parts.igem.org/Part:BBa_K2259065.

© Journal of University of Babylon for Pure and Applied Sciences (JUBPAS) by University of Babylon is licensed under a Creative Commons Attribution 4. 0 International License, 2020.
https://www.journalofbabylon.com/index.php/JUBPAS, info@journalofbabylon.com, jub@itnet.uobabylon.edu.iq
+9647823331373 (Viber and Telegram)