Archive of

Agricultural Biotechnology Journal
p-ISSN 2228-6705
e-ISSN 2228-6500
Shahid Bahonar University of Kerman
Iranian Biotechnology Society

Amplification and Cloning of *alfa-Toxin* Gene from *Clostridium Perfringenes* Bacterium in *E. coli*

Mahin Rasani
MSc student, Department of Engineering Animal Sciences, Faculty of Agriculture, Shahid Bahonar University of Kerman, rasanimahin@gmail.com.

Hosseinali Sasan
* **Corresponding Author.** PhD, Department of Biology, Faculty of Sciences, Shahid Bahonar University of Kerman, hsasa@uk.ac.ir.

Samaneh Karamooz
MSc student, Department of Engineering Animal Sciences, Faculty of Agriculture, Shahid Bahonar University of Kerman, sa.karamoz@gmail.com.

Ali Esmailizadeh Koshkoiyeh
PhD, Department of Engineering Animal Sciences, Faculty of Agriculture, Shahid Bahonar University of Kerman, aliesmaili@uk.ac.ir.

Masoud Asadi Fouzi
PhD, Department of Engineering Animal Sciences, Faculty of Agriculture, Shahid Bahonar University of Kerman, masadi@uk.ac.ir.

Ahmad Ayatollahi Mehrgardi
PhD, Department of Engineering Animal Sciences, Faculty of Agriculture, Shahid Bahonar University of Kerman, mehrgardi@uk.ac.ir.

Abstract

Objective

The aim of this study was to amplify and cloning complete, as well as the primary part of the α-toxin gene from Clostridium perfringens with the size of 1100 and 750 bps, in *E. coli* using the expression vector pET28a.

www.SID.ir

Archive of SID

Materials and Methods

Genomic DNA was extracted using Kiagen kit. Forward and reverse primers were designed in the lab, as the *HindIII* and *XhoI* enzymes rows were added in the initial regions of the oligonucleotides according to the cloning region of the pET28a plasmid. The genes of interests were amplified by PCR and cloned in the pET28a vector using the heat-shock method. Extraction of plasmid DNA was done using alkaline lysis method.

Results

The results showed the PCR products, clear and unique bands for the complete, as well as the initial portion of the desired genetic components in accordance with the expected sizes. In addition, by using single and double enzyme digestion experiments with *HindIII* and *XhoI* enzymes, cloning of alpha toxin genes in host bacteria and production of recombinant bacteria was confirmed.

Conclusions

Due to the successful cloning of alpha toxin genes in expression host bacteria done by this work, it can be said that primers designed in this study are highly specific for the α-toxin gene amplification. These primers can be also used as markers for the identification and classification of Clostridium perfringens bacteria. Also, by development construction of genetically engineered recombinant vaccines, it is possible to control and cope with important pathogens such as Clostridium perfringens bacteria.

Keywords: alpha-toxin, clostridium perfringenes, cloning

Citation: Rasani M, Sasan H, Karamooz S, Esmailizadeh Koshkoiyeh AK, Asadi Fouzi M, Ayatollahi Mehrgardi A (2019) Amplification and Cloning of *alfa-Toxin* Gene from *Clostridium Perfringenes* Bacterium in *E. coli*. Agricultural Biotechnology Journal 11(4), 76-86.

Agricultural Biotechnology Journal 11(4), 76-86.

DOI: 10.22103/jab.2019.14129.1135

Received: October 30, 2019; Accepted: December 5, 2019

© Faculty of Agriculture and Technology Institute of Plant Production, Shahid Bahonar University of Kerman-Iranian Biotechnology Society

www.SID.ir

Archive of SID

تکثیر و همسانه‌سازی ژن آلفاتوکسین باکتری کلوستریدیوم پرفرینجنس در باکتری *E. coli*

مهین رسانی

دانشجوی کارشناسی ارشد، بخش مهندسی علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید با هنر کرمان، rasanimahin@gmail.com

حسینعلی ساسان

* نویسنده مسئول. بخش زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه شهید باهنر کرمان، 3. بخش علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید با هنر کرمان. hsasa@uk.ac.ir

سمانه کارآموز

دانشجوی کارشناسی ارشد، بخش مهندسی علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید با هنر کرمان، sa.karamoz@gmail.com

علی اسماعیل‌زاده کشکوئیه

بخش مهندسی علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید با هنر کرمان، aliesmaili@uk.ac.ir

مسعود اسدی فوزی

بخش مهندسی علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید با هنر کرمان، masadi@uk.ac.ir

احمد آیت‌اللهی مهرجردی

بخش مهندسی علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید با هنر کرمان، mehrgardi@uk.ac.ir

تاریخ دریافت: 1397/08/08، تاریخ پذیرش: 1398/09/14

www.SID.ir

Archive of SID

چکیده

اهداف: هدف از انجام این پژوهش، تکثیر و همسانه‌سازی شکل کامل و همچنین بخش ابتدایی ژن کشنده آلفاتوکسین (α-Toxin) باکتری کلستریدیوم پرفرِینجنس با اندازه‌های به ترتیب 1100 و 750 جفت باز با استفاده از ناقل بیانی pET28a در باکتری *E.coli* بود.

مواد و روش‌ها: استخراج DNA ژنومی با استفاده از کیت کیاژن صورت گرفت. آغازگرهای جلوبرنده و برگشت در آزمایشگاه طراحی و در ناحیه ابتدایی آغازگرها ردیف‌های آنزیم‌های برشگر *HindIII* و *XhoI* مطابق با ناحیه کلونینگ پلاسمید مورد نظر اضافه گردید. قطعات ژنی مورد نظر با روش PCR معمولی تکثیر و در ناقل pET28a با کمک روش شوک حرارتی کلون شدند. استخراج DNA پلاسمیدی با استفاده از روش لیز قلیایی صورت گرفت.

نتایج: نتایج ژل الکتروفورز محصولات PCR، تکثیر واضح و واحد شکل کامل و همچنین بخش ابتدایی قطعات ژنی مورد نظر را مطابق با اندازه های مورد انتظار نشان داد. بعلاوه با استفاده از آزمایش هضم آنزیمی منفرد و دوگانه توسط آنزیم های برشگر *HindIII* و *XhoI* همسانه سازی ژنهای آلفاتوکسین در باکتری میزبان و تولید باکتریهای نوترکیب تأیید شد.

نتیجه‌گیری: با توجه به موفقیت آمیز بودن دقیق کلونینگ ژنهای آلفاتوکسین در باکتری‌های بیانی میزبان، می‌توان گفت که پرایمرهای طراحی شده در این تحقیق برای تکثیر ژن آلفاتوکسین بسیار اختصاصی بوده و به عنوان مارکر شناسایی و طبقه بندی این باکتری‌ها می‌توانند استفاده واقع شوند. همچنین با ساخت احتمالی واکسن‌های نوترکیب ژنتیکی مهندسی‌شده می‌توان کنترل و مقابله با پاتوژن‌های مهمی همچون باکتری کلستریدیوم پرفرینجنس را امکان‌پذیر ساخت.

کلمات کلیدی: آلفاتوکسین، کلستریدیوم پرفرینجنس، همسانه‌سازی

مقدمه

گونه‌های باکتری کلستریدیوم به طور گسترده‌ای در محیط توزیع شده‌اند. این باکتری‌ها میله‌ای ، گرم مثبت، ناهمگن، غیرهوازی، تخمیرکننده و اسپورزا هستند (Ahsani et al. 2011). از میان بیش از 1500 گونه این باکتری‌ها حدود 20 گونه دارای زیستگاه روده انسان بوده و بیماری‌زا می‌باشند (Claudia 2018; Evy et al. 2016; Navarro et al. 2003; Frank 2004). کلستریدیوم‌ها به پنج گروه کلستریدیوم پرفرینجنس، کلستریدیوم سپتیکوم، کلستریدیوم نوای تیپ A، کلستریدیوم همولیتیکوم، کلستریدیوم سردلی تقسیم می شوند (Ahsani et al. 2010). این باکتری‌ها همچنین با پدیده میکرونکروز یا گازگانگرن مرتبط هستند. در جریان جنگ جهانی اول این میکروارگانیزم به عنوان عامل مهم قانقاریای گازی مرگ صدها هزار سرباز را سبب شد (Shimizu et al. 2002). باکتری کلستریدیوم پرفرینجنس تعداد 15 نوع توکسین مختلف را تولید می کند (Yuan et al. 2012) آلفاتوکسین یا فسفولیپاز C تولید شده توسط تیپ‌های نوع A و D یک عامل بیماری‌زای

www.SID.ir

Archive of SID

مهم با فعالیت‌های فسفولیپازی، اسفنگولیومینازی و بیولوژیکی از جمله ویژگی همولیزی و نکروزیس است که باعث همولیز، مرگ و نکروز سلولها می‌شود (Zandi et al. 2014; Shahdadnejad et al. 2016). این سم می‌تواند مواد فسفاتیدیل‌کولین و اسفنگومیلین را هیدرولیز نموده و با از هم‌گسیختگی کامل غشای سلولی، مرگ سلول آلوده شده و قانقاریای گازی را باعث شود (Siu-Tong et al. 2012; Oda et al. 2015; Oda et al. 2012; Oda et al. 2008; Radhika et al. 2016; Mohammadabadi 2017).

باکتری کلستریدیوم پرفرِینجنس *Clostridium perfringens* با استفاده از پروتئین سمی آلفا ایجاد بیماری‌هایی از جمله بیماری مهم فساد گازی Gas gangrene با علائم درد، تب و ورم را سبب شده و از این راه خسارات مهمی به بخش‌های دامی از جمله تلفات زیاد گوسفندان را به همراه داشته است (Mohammadabadi 2017). تزریق سم آلفا توکسین به حیوانات همچون خرگوش و گوسفند باعث ظهور علائم بیماری و آشکار شدن آثار تخریب بافتی می‌شود (Sakurai et al. 2004; Naqpal et al. 2015). از طرفی واکسیناسیون حیواناتی مثل موش با بخش‌هایی از پروتئین آلفا-توکسین باکتری کلستریدیوم پرفرِینجنس منجر به ایجاد ایمنی‌شده و حیوان را در مقابل آلوده شدن با باکتری بیماری‌زای کلستریدیوم پرفرِینجنس مقاوم نموده، بطوریکه علائم بیماری Gas gangrene در موش‌ها مشاهده نشده است (Wiliamson et al. 1993).

در مطالعه ایمن‌سازی جوجه‌های گوشتی با سم آلفاتوکسین نوترکیب در چالش با باکتری کلستریدیوم پرفرینجنس مشخص شد که پرندگان واکسینه شده با آلفاتوکسین نوترکیب به میزان 35,1 درصد در اثر بیماری آنتریت نکروتیک خسارت دیدند .این درحالی بود که میزان خسارت در پرندگان غیر واکسینه به طور میانگین 37,2 درصد تخمین زده شد. میزان غلظت آنتی بادی IgG در پرندگان واکسینه شده نسبت به پرندگان غیر واکسینه نیز پنج برابر بیشتر مشاهده شد. این نتایج نشان داد آلفاتوکسین علاوه برنقش بیماری‌زایی می‌تواند به عنوان ایمنوژن نیز مورد استفاده قرار گیرد (Sakurai et al. 2009). در یک بررسی تکثیر، بیان و ایمنی‌زایی ژن ترکیبی آلفا و بتا از باکتری کلستریدیوم پرفرینجنس مورد بررسی قرار گرفت. این قطعه ژن با استفاده از پلاسمید p^{zcpab} کلون شد. قطعه کلون شده ژن با بیان پایدار اتصال ژن ترکیبی آلفا و بتا کدگذاری شد. دو ژن داخل وکتور P^{BV221} بیان شدند. بیان پروتئین ترکیبی آلفا و بتا توسط تست الیزا، وسترن بلات و روش خنثی‌سازی مشخص شد. نتیجه بررسی نشان داد که پروتئین ترکیبی آلفا و بتا تولید شده می‌تواند در مقابل حمله سم آلفا و بتا مقاومت ایجاد کند. پیشنهاد شده است روش جایگزین برای استفاده از دومین های α-توکسین به عنوان واکسن، شکل طبیعی سم و یا مهندسی شده اشکال گوناگون از سم فوق با کاهش قدرت سمیت می‌تواند باشد (Schoepe et al. 2006; Jia-ning et al. 2006).

واکسن‌های نوترکیب که به روش مهندسی ژنتیک تهیه می‌شوند دو نوع هستند. در نوع اول که جهت تهیه واکسنهای زنده ضعیف شده بکار می‌رود، برای غیرحاد کردن یک عامل عفونی با حذف یا ایجاد جهش در بخشی از یک یا چند ژن مسئول بیماری‌زایی میکروب، به روش‌های مهندسی ژنتیک صورت می‌گیرد. روش دیگر به گونه‌ای هست که یک یا چند ژن رمز کننده پروتئین های ایمنی‌زا از مخزن ژنی میکروب بیماری‌زا را جدا کرده و به یک ویروس یا باکتری بی‌خطر یا ضعیف شده دیگری پیوند

www.SID.ir

Archive of SID

می زنند. این نوع واکسن‌های نوترکیب زنده مزایای بسیاری نسبت به واکسن‌های ضعیف‌شده متداول دارند. این نوع واکسنها فقط پروتئینهای خاصی از میکروبهای بیماری‌زا را تولید نموده و امکان بازگشت قدرت بیماری‌زایی یا وحشی‌شده میکروب وجود ندارد. البته هیچ واکسن انسانی با این روش تاکنون تهیه نشده و اغلب این واکسن ها در مراحل تحقیق و آزمایشات تکمیلی می باشند. با این حال واکسن‌های متعدد دامی از این روش تهیه شده و مورد استفاده قرار می گیرند (Karami 2001; Neeson et al. 2007; Stevens et al. 2004).

واکسن‌های نوترکیب نسبت به واکسن‌های نسل اول از مزایای بسیاری برخور دار هستند. مهمترین ویژگی آنها استفاده از پادگن ایمنی‌زا در تهیه واکسن بجای استفاده از کل پیکره میکروب است. واکسن‌های نوترکیب به دلیل اینکه از یک پروتئین ایمنی‌زا میکروب در تهیه آن استفاده می‌شوند، فاقد مشکلات واکسن‌های کشته و ضعیف شده هستند. پروتئین نوترکیب استخراج شده فاقد آلودگی ویروسی و عوامل ناشناخته دیگر هست که در هنگام تهیه واکسن‌های ویروس زنده کشت‌های سلولی انسانی و حیوانی می‌تواند وجود داشته باشد. در این موارد تحریک غیر ضروری سیستم ایمنی توسط سایر پروتئین‌های پیکره میکروبی صورت نمی‌گیرد ودر نتیجه واکسن‌ها بسیار بی‌خطر و ایمن هستند (Evy et al. 2016).

واکسن‌های نوترکیب با الحاق ژن رمز کننده پروتئین ایمنی‌زای میکروب عامل بیماری به یک حامل ژنتیکی موسوم به پلاسمید وسپس انتقال پلاسمید نوترکیب به یک باکتری، مخمر و یا سلول مناسب حیوانی و یا گیاهی تهیه می گردند. برای تولید انبوه واکسن نوترکیب، سلول حاوی پلاسمید نوترکیب در مخزن‌های بزرگ تخمیری (بیوراکتور) حاوی محیط کشت مخصوص تکثیر می‌شوند. در این مرحله ژن مربوط به پادگن ایمنی‌زا در داخل سلول باکتری، مخمر و یا سلول به روش‌های شیمیایی یا فیزیکی القاء شده و پروتئین مربوطه به مقادیر انبوه تولید می‌شود. با جمع آوری سلول‌ها، پروتئین نوترکیب از بین سلول‌ها یا محیط کشت، استخراج و تصفیه و پس از طی مراحلی به عنوان واکسن نوترکیب مورد استفاده قرار می‌گیرد (Karami 2001).

PCR از مدرن‌ترین تکنولوژی‌ها در تشخیص بیماری‌های عفونی در مقایسه با تکنیک‌های سنتی است و نشان داده شده که بسیار سریع‌تر و قابل اعتمادتر است و در طی چند ساعت نتایج قابل مشاهده هستند. PCR تشخیص سریع تر و مستقیم عفونت‌های باکتریایی را مستقیما از نمونه‌های کلینیکی فراهم می‌آورد (Ahsani et al. 2010). همچنین با پیشرفت علم ژنتیک، ژن به عامل اصلی در برنامه ریزی عملکرد سلول و به دنبال آن کنترل ویژگی های موجود زنده شناخته شد. به این ترتیب تمایل برای شناخت هرچه بیشتر ژ نها به منظور توجیه پدیده های زیستی افزایش یافت؛ تا حدی که در چند دهه اخیر، تجهیرات مورد نیاز در تحقیقات مولکولی به طور گسترد ه‌ای افزایش یافته است و امروزه تحقیقات مولکولی جزو مطالعات رایج آزمایشگاه های زیستی است. اطلاعات به دست آمده از تحلیل داده های زیستی به وسیله علم بیوانفورماتیک، در به خط کردن توالی ها در بانک‌های اطلاعاتی برای یافتن شباهت ها و تفاوت های ژنی، پیش گویی ساختار و عملکرد محصولات ژ نها و یافتن ارتباط فیلوژنتیک میان ژ نها و توال ی‌های پروتئینی کمک می کند (Hadizadeh et al. 2013; Hadizadeh et al. 2014). لذا، هدف از انجام

www.SID.ir

Archive of SID

این تحقیق، تکثیر شکل کامل و همچنین بخش ابتدایی ژن کشنده آلفاتوکسین (α-Toxin) باکتری کلستریدیوم پرفـرِینجنس و همسانه‌سازی قطعات ژنی فوق در میزبان *E. coli* بود.

مواد و روش ها

استخراج DNA باکتری، طراحی الیگونوکلئوتیدها و تکثیر قطعات ژنی (PCR): استخراج DNA ژنومی با استفاده از کیت کیاژن بر اساس دستور العمل استاندارد انجام شد. کیفیت DNA استخراج شده با استفاده از ژل آگارز یک درصـد تعیین گردید. الیگونوکلئوتیدهای لازم برای تکثیر شکل کامل ژن آلفاتوکسین (α-Toxin) بـه انـدازه 1110 جفـت بـاز و بخـش ابتدایی ژن فوق به اندازه حدود 750 جفت باز به صورت جلوبرنده و برگشت با اسـتفاده از ردیـف ژن آلفاتوکسـین در آزمایشـگاه طراحی و از شرکت سیناژن خریداری شدند. ردیفهای آنزیمهای برشگر *HindIII* و *XhoI* در ابتدای بخش '5 پرایمرهـا اضـافه شدند تا اتصال قطعات ژنی در داخل پلاسمید مورد نظر به‌درسـتی انجـام شـود (جـدول1). واکـنش PCR در حجـم نهـایی 50 میکرولیتر حاوی 5 میکرولیتر از بافر 10X، 1,5 میکرولیتر MgCl2 (50 میلی مـولار)، یـک میکرولیتـر از dNTPs (10 میلـی مولار)، یک میکرولیتر ازهر پرایمر (100 میکرومـولار)، یـک میکرولیتـر از آنـزیم Taq DNA polymerase، 2 میکرولیتـر از DNA الگو به میزان 50 نانو گرم و 37,5 میکرولیتر آب انجام شد. برنامه PCR شامل 5 دقیقه جهت دناتوراسیون اولیه و سپس 33 سیکل شامل یک دقیقه 95 درجه سانتیگراد، یک دقیقه 57 درجه سانتیگراد، یک دقیقه 72 درجه سانتیگراد و نهایتاً 5 دقیقه 72 درجه سانتیگراد با استفاده از دستگاه ترموسایکلر شرکت Bioneer کره جنوبی انجام شد.

تهیه سلول های شایسته (Competent Cell Preparation): ابتدا یک کلونی از سـلولهای بـاکتری محـیط کشت جامد بر روی پلت برداشته در 5 میلی‌لیتر محیط کشت Luria Bertani broth در دمای 37 درجه با 200 دور در دقیقه به مدت 24 ساعت کشت داده شد. 3 میلی‌لیتر از محیط کشت مایع باکتری در یک لوله 50 میلی لیتر با 7 میلی لیتر محیط کشـت LB broth در دمای 37 درجه با 200 دور در دقیقه به مدت 5 ساعت نگهداری شدند. میزان جذب تـراکم باکتریهـا بـا دسـتگاه اسپکتروفتومتری با طول موج 550 نانو متر در اندازه 0,4 مشخص شد. در ادامه کشت باکتریایی به مدت 5 دقیقه با سرعت rpm 3500 در دمای 4 درجه سانتریفیوژ و توده سلولی جمع‌آوری و مایع بالایی دور ریخته شد. سپس 10 میلی‌لیتر از کلرید کلسیم سرد 0,1 مولار روی رسوب سلولهای باکتری اضافه و با میکروپیپت آهسته کاملا" مخلوط و به مدت 30 دقیقه در داخل یخ قرار گرفت. نمونه‌ها به مدت 5 دقیقه با سرعت rpm 3500 با دمای 4 درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ و مایع بالایی دور ریخته شد. در مرحله آخر توده سلولی با محلول حاوی 85 درصدکلرید کلسیم 0,1 مولار و 15 درصد گلیسرول مخلوط و به میزان 100 میکرولیتر در هر لوله نیم میلی‌لیتر منتقل و در دمای منفی 80 درجه سانتیگراد نگهداری شدند. کیفیت سلولهای مستعد با کاشت در محیط کشت جامد و مشاهده رشد آنها مشخص گردید.

www.SID.ir

Archive of SID

جدول 1. پرایمرهای جلوبرنده و برگشت برای تکثیر قطعات ژنی کامل و بخش ابتدایی آلفاتوکسین. مکانهای خط ممتد به ترتیب ردیفهای برش آنزیمهای برشگر *HindIII* و *XhoI* می باشند.

Table 1. Forwards and reverse primers for full and N fragment of alpha-toxin genes. Underlines are *HindIII* and *XhoI* restriction sites.

نام ژن Gene name	پرایمرها primers	طول قطعه تکثیر شده Amlicon size bps
آلفاتوکسین *Alpha -Toxin*	(PFα5'-AAGCTTGGCATGAAAAGAAAGATTTGT-3') (PRα5'-GAGCTCCGCCCTCAACTGCTAATTC-3')	1110
بخش ابتدایی ژن آلفاتوکسین N domain of alpha-toxin	(PFN5′-AAGCTTATGGGCCAGTGCAAGTGT-3′) (PRN5′-GAGCTCCGTTACTTTGCTGCATAATC-3′)	750

استخراج پلاسمید از باکتری *E.colipET28a*: استخراج پلاسمید با استفاده از روش تخریب بازی رایج در آزمایشگاه صورت گرفت. سلول‌های باکتریایی با سرعت 10000 rpm به مدت 3 دقیقه از میزان 3 میلی‌لیتر باکتری 24 ساعت کشت داده شده به وسیله سانتریفیوژ جمع آوری شدند. شستشوی سلول ها با یک میلی‌لیتر آب استریل انجام و به مدت یک دقیقه با سرعت 1000 rpm سانتریفیوژ انجام گردید. مایع بالایی دور ریخته و سلولها به وسیله 200 میکرولیتر محلول لیز کننده شماره یک GTE (گلوکز 50 میلی‌مولار، تریس 25 میلی‌مولار و EDTA با غلظت 10 میلی‌مولار و pH برابر با 8) با میکروپیپت کاملا" مخلوط و در دمای اتاق به مدت 6 دقیقه نگهداری شدند. به نمونه‌ها 400 میکرولیتر محلول تازه تهیه شده شماره 2 (200 میکرولیتر از محلول NaoH 2N، 200 میکرولیتر از محلول SDS 10 درصد و 2600 میکرولیتر آب) اضافه شد. مخلوط کردن نمونه‌ها با به هم زدن ووارونه کردن و نگهداری نمونه‌ها در یخ به مدت 5 دقیقه ادامه یافت. در مرحله بعد 400 میکرولیتر محلول سرد شماره 3 (سدیم استات 3 مولار) اضافه و با مخلوط کردن نمونه‌ها در یخ به مدت 5 دقیقه دوباره نگهداری شدند. سپس نمونه-ها به مدت 10 دقیقه با سرعت 10000 rpm سانتریفیوژ و محلول شفاف بالایی در لوله جدید جمع‌آوری شدند. در ادامه به نمونه-ها 400 میکرولیتر کلروفرم اضافه، با وارونه نمودن لوله‌ها کاملا" مخلوط و عمل سانتریفیوژ به مدت 6 دقیقه با سرعت rpm 10000 انجام شد. بخش بالایی نمونه‌ها با میکروپیپت با دقت در لوله جدید منتقل شدند. سپس با اضافه نمودن و مخلوط کردن

www.SID.ir

Archive of SID

800 میکرولیتر ایزوپروپانول عمل سانتریفیوژ بـه مـدت 15 دقیقـه بـا سـرعت 12000 rpm انجـام شـد. بـا دور ریخـتن الکـل ایزوپروپانول، عمل آبگیری و حذف دیگر ناخالصی‌ها یک میلی‌لیتر الکل اتانول 70% سرد به نمونه‌ها اضافه شد. با سانتریفیوژ بـه مدت یک دقیقه و با سرعت 10000 rpm و حذف الکل، پلت سفید پلاسمید در دمای اتاق برای خشک شدن به مدت 10 دقیقـه نگهداری شد. در نهایت با اضافه نمودن 50 میکرولیتر آب استریل دو بار تقطیر شده پلاسمیدها حل شده و در دمای منفی 20 درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. کیفیت پلاسمید های استخراجی با استفاده از ژل الکتروفورز تعیین شد.

برش آنزیمی دوگانه پلاسمید *pET28a* و محصول PCR با استفاده از آنزیم های *HindIII* و *XhoI*:

مخلوط هضم آنزیمی برای برش پلاسمیدها شامل 5 میکرولیتر پلاسمید، 2 میکرولیتر بافر مشترک، یک میکرولیتر آنزیم *HindIII* و یک میکرولیتر آنزیم *XhoI* و 11 میکرولیتر آب با حجم نهایی 20 میکرولیتر تنظیم شد. همچنین مخلوط هضم آنزیمـی بـرای برش محصول PCR، شامل 9 میکرولیتر محصول PCR، 2 میکرولیتر بافر، یک میکرولیتر آنزیم *HindIII*، یک میکرولیتر آنزیم *XhoI* و 7 میکرولیتر آب با حجم نهایی 20 میکرولیتر تنظیم شد. نمونه ها به مدت 3 ساعت در دمای 37 درجه برای برش آنزیمی و 5 دقیقه در دمای 65 درجه سانتیگراد برای غیر فعال کردن آنزیم های برش‌گر قرار داده شدند. محصول برش در دمای منفی 20 درجه سانتیگراد نگهداری و کمیت و کیفیت برش قطعات با استفاده از ژل الکتروفورز یک درصد تعیین شد.

اتصال محصول PCR و پلاسمید pET28a برش‌داده شده با اسـتفاده از آنـزیم T4 DNA Ligase:

اتصال DNA های برش‌خورده و تخلیص شده در یـک محلـول شـامل یـک میکرولیتـر (5 واحـد) از T4 DNA Ligase، 2 میکرولیتر از بافر لیگاز، 8 میکرولیتر محصول PCR، 3 میکرولیتر از پلاسـمید pET28a و اسـتفاده از آب تزریقـی و رسـاندن مخلوط به حجم 20 میکرولیترانجام شد. در پایان مخلوط حاصل به مدت 8 ساعت در دمای 16 درجه سـانتیگراد و 10 دقیقـه در دمای 65 درجه سانتیگراد به منظور غیرفعال کردن آنزیم لیگاز قرار داده شد.

ترانسفورماسیون و غربال‌گری سلول‌های نوترکیب: 10میکرولیتر از محلول پلاسمیدهـای نوترکیـب بـه لولـه حاوی 100 میکرولیتر سلول میزبان شایسته اضافه و به مدت 30 دقیقه در یخ قرار داده شدند. در ادامه نمونه‌ها در دمای 42 درجه سانتی گراد به مدت 2 دقیقه برای ایجاد شوک حرارتی منتقل و بلافاصله دوباره به مدت 5 دقیقه در محیط یخ انتقال داده شدند. سپس محتویات لوله‌ها به لوله 1,5 میلی‌لیتر ریخته شد و پس از اضافه نمودن 900 میکرولیتر محیط کشت مایع LB به مـدت 2 ساعت در دمای 37 درجه سانتیگراد با چرخش 150 دور در دقیقه نگهداری شدند. پس از آن نمونه‌ها در سـرعت 1000 rpm بـه مدت 2 دقیقه سانتریفوژ شدند. 80 درصد مایع بالایی دور ریخته شد و به میزان 100 میکرولیتر بر روی هر پتری‌دیش LB Agar حاوی آنتی‌بیوتیک کانامایسین (پنجاه میکروگرم در هر میلی‌لیتر) کشت داده شدند. رشد کلنی‌ها پس از یک تا 2 روز مورد بررسی قرار گرفت. به منظور غربالگری و تعیین سلولهای نوترکیب از غیرنوترکیب کلنی‌های رشد داده شده مجددا" کشت داده شـدند. از

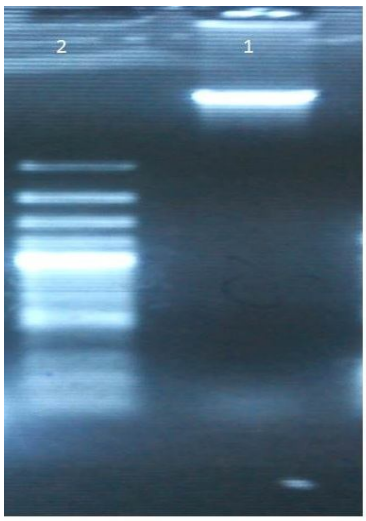
www.SID.ir

Archive of SID

هر کلنی به صورت مجزا پلاسمید استخراج و بوسیله روش برش آنزیمی و انتقال بر روی ژل آگارز سلولهای نوترکیب مشخص شدند. روش تایید همسانه‌سازی ژن با استفاده از PCR مجدد و الگو قرار دادن پلاسمیدهای نوترکیب نیز مورد بررسی قرار گرفت.

نتایج

استخراج DNA ژنومی از باکتری کلستریدیوم پرفینجنس: DNA ژنومی، با استفاده از کیت استخراج DNA (کیاژن) و بر اساس روش ذکر شده در کیت استخراج شد. برای تعیین کمیت و کیفیت DNA استخراج شده (میزان و خالص بودن) از ژل آگارز یک درصد و الکتروفورز افقی استفاده شد (شکل1). وجود تنها یک باند دلیلی بر کیفیت مطلوب DNA استخراج شده است. کیفیت DNA از روی واضح بودن باند ایجاد شده و همچنین نداشتن کشیدگی مشخص شد. تکثیر قطعات ژنی: واکنشهای PCR با استفاده از DNA ژنومی استخراج شده، آغازگرهای PR و PF (جلوبرنده و برگشت) و طبق برنامه PCR ذکر شده در بخش مواد و روش‌ها انجام شد. نتایج حاصل از PCR وجود دو نوار قوی با حدود 1100 و 750 جفت باز را روی ژل آگارز نشان داد که به ترتیب هم اندازه کل ژن آلفاتوکسین و بخش ابتدایی ژن مورد نظر بر اساس مقادیر مورد انتظار می باشند (شکل 2 و3).

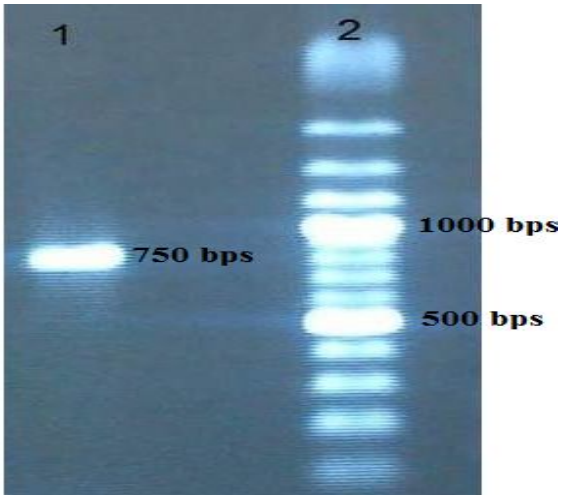


شکل 1. الکترفورزمحصول استخراج DNA ژنومی باکتری کلستریدیوم پرفرینجنس روی ژل آگارز یک درصد. ستون 1 . DNA استخراج شده، ستون 2. مارکر100جفت باز(VC 50bp plus DNA ladder).

Figure 1. Genomic DNA extraction from *Clostridium perfringenes*. Line 1. Extracted Genomic DNA, line 2. DNA ladder VC 50 bps plus.

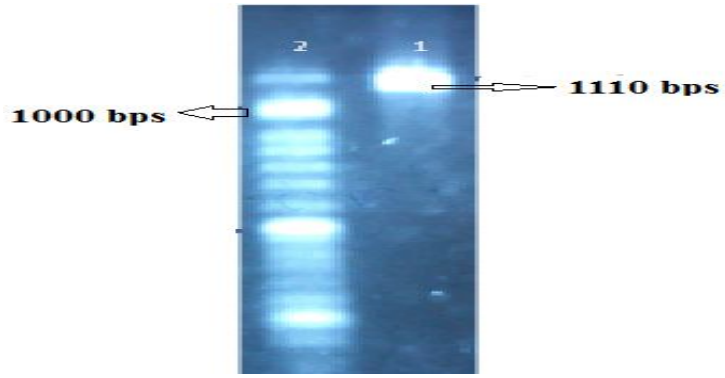
www.SID.ir

Archive of SID



شکل 2. الکتروفورز محصولات حاصل از واکنش PCR با استفاده از DNA ژنـومی اسـتخراجی از بـاکتری کلستریدیوم پرفرینجنس را نشان می دهد. سـتون 2. مـارکر 100جفـت بـازی (VC 100bp plus DNA ladder) می باشد، ستون 1. محصول PCR بخش ابتدایی ژن آلفا توکسین با اندازه 750 جفت باز.

Figure 2. Results of PCR reactions using of *Clostridium perfringenes* genomic template DNA. Lane 2. marker, VC 100bp plus DNA ladder. Line 1. N domain of alpha-toxin with 750 bps.



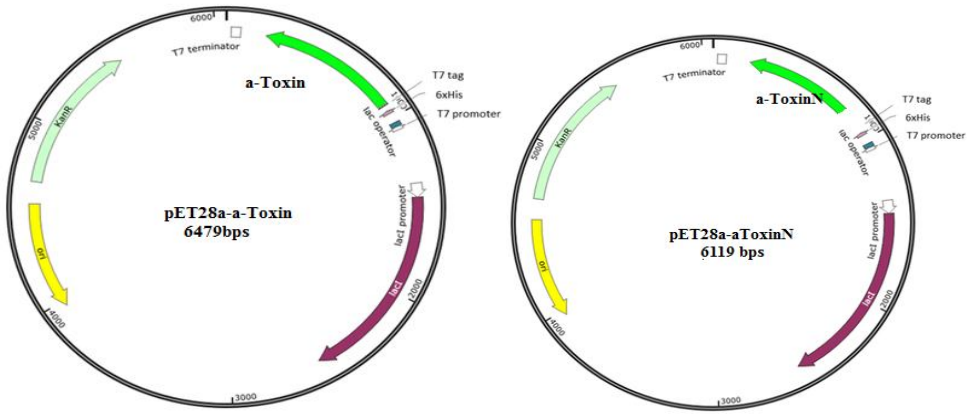
شکل 3. الکتروفورز محصولات حاصل از واکنش PCR با استفاده از DNA ژنـومی اسـتخراجی از بـاکتری کلستریدیوم پرفرینجنس را نشان می دهد. ستون 2. مارکر 50 جفت بازی(VC 50bp plus DNA ladder) می باشد، ستون 1. محصول PCR شکل کامل ژن آلفا توکسین با اندازه 1110 جفت باز.

Figure 3. Results of PCR reactions using of *Clostridium perfringenes* genomic template DNA. Lane 2. Marker, VC 50bp plus DNA ladder. Line 1. Full form of alpha-toxin with 1110 bps.

www.SID.ir

Archive of SID

همسانه سازی شکل کامل و بخش ابتدایی ژن آلفا توکسین باکتری باکتری کلستریدیوم پرفرینجنس در باکتری *E. coli*: شکل 3 نقشه پلاسمیدهای نوترکیب حاوی قطعات ژنی مورد نظر را نشان می‌دهد. قطعات فوق در مکان برش آنزیمهای چندگانه (MCS) پلاسمید pET28a و بعد از پروموتور T7 ناقل وارد شده اند. شکل 4 برش آنزیمی پلاسمیدهای نوترکیب حاوی ساختمان کامل و بخش ابتدایی ژن آلفاتوکسین باکتری باکتری کلستریدیوم پرفرینجنس را در باکتری میزبان نشان می دهد. برش دوگانه ناقلهای نوترکیب قطعات اضافی برابر با مقادیر مورد انتظار را علاوه بر اندازه پلاسمیدهای غیر نوترکیب به طور واضح نشان می دهد. قطعات ژنی برش خورده و جداشده برابر با اندازهای 1110 و 750 جفت باز بودند که کلون نمودن ژنهای آلفا توکسین را تایید می-کند (شکل 5 و شکل 6).

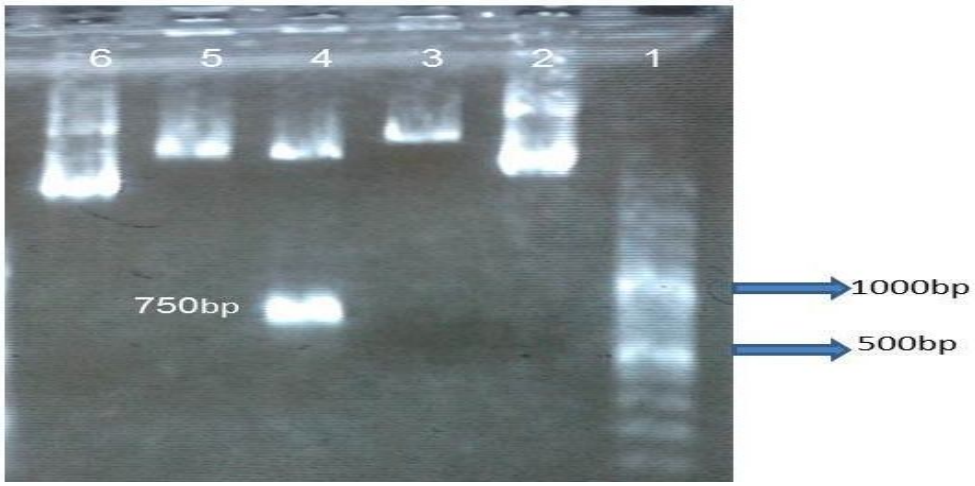


شکل 4. نقشه پلاسمیدهای نوترکیب pET28a-aToxinN حاوی بخش ابتدایی یا N ژن آلفاتوکسین (سمت راست) و پلاسمید نوترکیب pET28a-a-Toxin حاوی شکل کامل ژن آلفاتوکسین (سمت چپ). مکان کلون شدن قطعات ژنی فوق در ناحیه برش آنزیمهای چند گانه و بعد از پروموتر T7 می باشند که به رنگ سبز مشخص شده است.

Figure 4. The maps of recombinant pET28a-aToxinN plasmid harboring the N terminal of alpha-toxin (Right) and recombinant pET28a-a-Toxin plasmid harboring the full leangth of alpha-toxin gene (Left). The site of cloned the genes of interest is in MCS after T7 promoter and detected green color.

www.SID.ir

Archive of SID

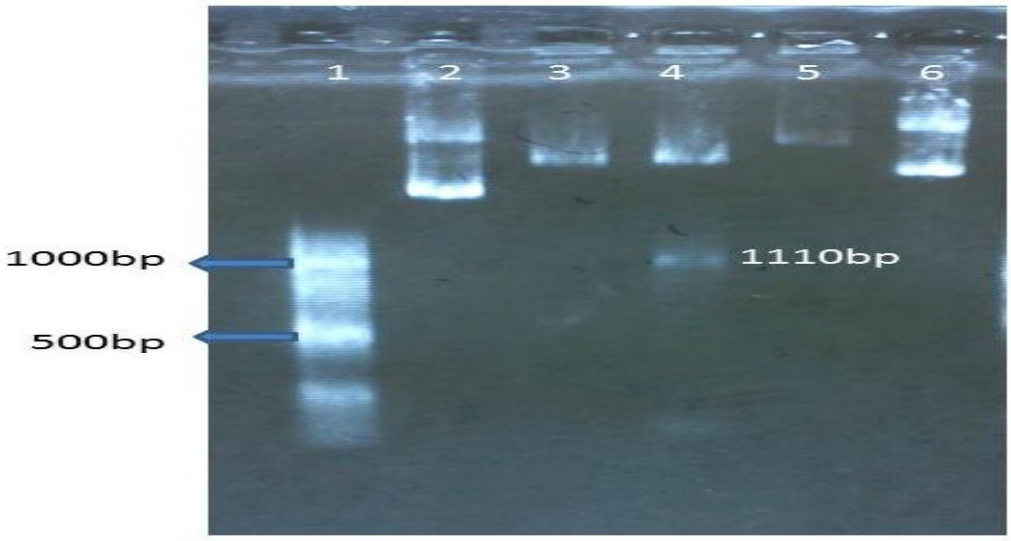


شکل5. برش آنزیمی پلاسمیدهای نوترکیب pET28a-aToxinN و غیر نوترکیب pET28a. 1. مارکر 100 جفت بازی (VC 100bp plus DNA ladder)، 2. پلاسمیدهای نوترکیب غیر برشی pET28a-aToxinN، 3. پلاسمید نوترکیب تک برشی pET28a-aToxinN با آنزیم برشی*HindIII*، 4. پلاسمید نوترکیب برش دوگانه pET28a-aToxinN با آنزیم‌های برشگر دوگانه *HindIII* و *XhoI* و مشاهده قطعه کلون شده، 5. پلاسمید غیرنوترکیب برش خورده pET28a با آنزیم برشی *HindIII*، 6. پلاسمید غیرنوترکیب غیر برشی pET28a .

Figure 5. RE digestion analysis of recombinant Plasmid pET28a-aToxinN containing *C. Perferingenes* alpha-toxin N domain gene and non-recombinant pET28a plasmid. 1. DNA Marker, VC 100bp plus DNA ladder. 2. Undigested recombinant pET28a-aToxinN Plasmid. 3. Single digestion of recombinant pET28a-aToxinN Plasmid with *Hind* III. 4. Double digestion of recombinant Plasmid pET28a-aToxinN with *XhoI and Hind* III showing the cloned segment. 5. Single digestion of non-recombinant plasmid, pET28a, with *Hind* III. 6. Undigested non-recombinant plasmid, pET28a.

www.SID.ir

Archive of SID



شکل 6. برش آنزیمی پلاسمیدهای نوترکیب pET28a-a-Toxin و غیر نوترکیب pET28a. 1. مارکر 100 جفت بازی (VC 100bp plus DNA ladder)، 2. پلاسمیدهای غیر نوترکیب غیر برشی pET28a. 3. پلاسمید غیر نوترکیب تک برشیpET28a با آنزیم برشی*HindIII*، 4. پلاسمید نوترکیب برش دوگانه pET28a-a-Toxin با آنزیم‌های برشگر دوگانه *HindIII* و *XhoI* و مشاهده قطعه کلون شده، 5. پلاسمید نوترکیب برش خورده pET28a-a-Toxin با آنزیم برشی *HindIII*، 6. پلاسمید نوترکیب غیر برشی pET28a-a-Toxin.

Figure 6. RE digestion analysis of recombinant Plasmid pET28a-a-Toxin containing *C. Perferingenes* alpha-toxin gene and non-recombinant pET28a plasmid. 1. DNA Marker, VC 100bp plus DNA ladder. 2. Undigested non-recombinant pET28a Plasmid. 3. Single digestion of non-recombinant pET28a Plasmid with *Hind* III. 4. Double digestion of recombinant Plasmid pET28a-a-Toxin with *XhoI and Hind* III showing the cloned segment. 5. Single digestion of recombinant plasmid, pET28a-a-Toxin, with *Hind* III. 6. Undigested recombinant plasmid, pET28a-a-Toxin.

بحث

پروتئین آلفا توکسین باکتری کلستریدیوم پرفرینجنس با فعالیتهای متعدد بیماری زایی فسفولیپازی، اسفنگولیومینازی و بیولوژیکی منجر به سلسله واکنشهای زیادی در سلول شده و نهایتا" باعث تخریب سلول، کشندگی و تخریب پوستی می گردد. سم فوق مهمترین عامل درگیر در ایجاد بیماری قانقاریای گازدار است (Jan 2004; Mohammadabadi 2017; Oda et al. 2015). در این مطالعه شکل کامل ژن آلفاتوکسین با اندازه 1110 و بخش ابتدایی ژن فوق با اندازه 750 جفت باز از باکتری

www.SID.ir

Archive of SID

کلستریدیوم پرفرینجنس به وسیله آغازگرهای طراحی شده و با استفاده از روش شوک حرارتی در پلاسمید بیانی pET28a و باکتری میزبان *E. coli* با موفقیت همسانه شدند. تولید سلولهای نوترکیب با استفاده از روش هضم آنزیمی منفرد و دوگانه به اثبات رسید.

اکثر روشهای درمان بیماریها در موجودات زنده حیوانی مشتمل بر استفاده از آنتی بیوتیک ها، داروهای شیمیایی و روشهای واکسیناسیون معمولی می باشد. مواد شیمیایی و آنتی بیوتیکها دارای عوارض جانبی همچون انباشت در بدن موجودات، ایجاد مقاومت دارویی و آلودگی محیط زیست را سبب می شوند. از طرفی عمده واکسنهای رایج از نوع نسل اول می باشند. واکسنهای ضعیف شده، کشته شده و غیر فعال شده هر کدام دارای معایب و محدودیتهایی هستند. پاسخ ایمنی ضعیف، برگشت حالت بیماری زایی و عدم روش مناسب برای استفاده در مراحل ابتدایی زندگی همچون دوره لاروی برخی حیوانات از جمله معایب واکسنهای قدیمی و رایج است. واکسنهای بر پایه DNA به خصوص باکتریهای زنده، مفید و سالم مهندسی شده نوترکیب ژنتیکی برای موجودات زنده (پروبیوتیک) گزینه مناسبی برای درمان و بویژه جلوگیری و کنترل بیماریهای عفونی و حتی غیر عفونی می توانند مورد استفاده قرار گیرند (Sasan 2007).

بهره‌گیری از روش‌های مهندسی ژنتیک سبب تولید داروها و واکسن‌های نوترکیب یا واکسن‌های نسل دوم گردیده‌است. واکسن هپاتیت که قبلاً با استفاده از پلاسمای خون بیماران مبتلا به هپاتیت تهیه می‌شد و خطر انتقال عوامل ویروسی چون هپاتیت C و ایدز و سایر عوامل عفونی ناشناخته را داشت جای خود را به واکسن‌های نوترکیب هپاتیت که امروزه به عنوان یک واکسن مطمئن با کاربرد گسترده داده‌است. در یک مطالعه ژن GRA5 را با استفاده از روش PCR تکثیر و در پلاسمید انتقالی p^{TZ57R} کلون و در باکتری اشرشیاکلی سوش TOP10 انتقال داده شد. ژن مورد نظر با استفاده از آنزیم‌های برشی از پلاسمید نوترکیب جدا، در پلاسمید $\mathbf{p^{CDNA3}}$ ساب‌کلون گردید. پلاسمید نوترکیب در سلول یوکاریوتی CHO منتقل و در پایان بیان پلاسمید نوترکیب مورد بررسی قرار گرفت. کلونینگ و ترانسفورم قطعه GRA5 در پلاسمید $\mathbf{p^{CDNA3}}$ با موفقیت انجام شده و با استفاده از روش وسترن بلات بیان پروتئین 13 کیلو دالتونی تایید گردید (Naserifar et al. 2010).

در مطالعه دیگری توالی‌های 750 و 250 جفت بازی مربوط به دومینهای D1 و D4 ژن ایرولیزین باکتری کشنده *Aeromonas hydrophila* با روش PCR تکثیر و به صورت جداگانه در پلاسمید p^{NZ8048} کلون و به داخل باکتری پروبیوتیک لاکتوکوکوس‌لاکتیس با روش الکتروپوریشن انتقال داده شدند. واکسنهای باکتریایی نوترکیب حاصل به صورت خوراکی و تزریقی وارد بدن ماهی تیلاپیا شدند. تولید آنتی بادی در نمونه های ماهی آزمایشی در مقایسه با گروه کنترل نشان داد که اپی توپ‌های نوترکیب در لاکتوکوکوس لاکتیس (قسمتی از یک آنتی ژن که توسط سیستم دفاعی تشخیص داده می‌شود) بیان شده و قادر به ایجاد پاسخ ایمنی در ماهی تیلاپیا هستند. جالب توجه اینکه دوزهای پایینی از Lac-D1ae و Lac- D4ae سطح بالایی از ایمنی را در طول دوره ایجاد کردند. ماهی‌های واکسینه شده با Lac-D1ae و Lac- D4ae نشان دادند که سطح بالایی از حفاظت را کسب کرده و کاهش میزان مرگ و میر نسبت به گروه کنترل مشاهده شد. لاکتوکوکوس لاکتیس نوترکیب

www.SID.ir

Archive of SID

محصول D1 و D4 ژن ایرولیرین تولید آنتی بادی IgM را در تیلاپیا نیز نشان داد. به طور نسبی تزریق داخل صفاقیD1 و D4 حدود 55-82 درصد بقا را در مقابل عفونت ایروموناس ایجاد کرد در حالی که مصرف خوراکی واکسن درصد بقا را حدود 70-100 درصد ایجاد نمود. نواحی D1 و D4 پروتئین ایرولیزین و به عنوان مناطق آنتی ژنی با موفقیت شناسایی شدند. که می‌تواند در تیلاپیا آنتی بادی تولید کند و در برابر چالش‌های ایروموناس هیدروفیلا محافظت ایجاد کنند (Anuradha et al. 2010).

همچنین آزمایش‌هایی در خصوص واکسیناسیون گاوها بر علیه باکتری کلستریدیوم پرفرینجنس انجام گرفته است. بخش غیر سمی آلفا توکسین یعنی ناحیه C پروتئین فوق در پلاسمید بیانی pBadtopota همسانه سازی و به منظور تحریک سیستم ایمنی به حیوانات ترزیق شد. با استفاده از آزمایش Elisa آنتی بادی پروتئین نوترکیب ناحیه C در پلاسمای خون حیوانات آزمایشی مشاهده گردید. آنها پیشنهاد کردند که تکامل واکسنهای بر پایه DNA مثلا" بخشهایی از پروتئین آلفا توکسین ممکن است به محافظت موجودات زنده در مقابل تهاجم باکتری های مهاجم کمک کند (Evy et al. 2016). به طور مشابه ناقلهای نوترکیب سه گانه پروتئینهای سمی آلفا، بتا و اپسیلون باکتری کلوستریدیوم پرفرینجنس را ایجاد و به منظور بروز ایمنی به حیوانات ترزیق شدند. تولید آنتی بادی های پروتئینهای ترزیقی در پلاسمای خون حیوانات آزمایشی مشاهده شد (Marcos et al. 2016).

در یک بررسی قدیمی‌تر ژن‌کشنده پروتئیناز باکتری ایروموناس هیدروفیلا در باکتری لاکتوکوکوس کلون و باکتری‌های نوترکیب به عنوان واکسن در ماهی تیلاپیا مورد آزمایش قرار گرفتند. نتایج واکسیناسیون کاهش 26 درصد میزان مرگ و میر در مقایسه با نمونه‌های غیرواکسینه شده را نشان داد (Sasan 2007; Sasan 2010). اثر ایمنی‌سازی موش در چالش با باکتری کلستریدیوم پرفرینجنس با استفاده ازدومین C ژن آلفاتوکسین که نوترکیب شده بود نیز بررسی شد. برای این منظور بخش انتهایی ژن آلفاتوکسین به گلوتاتیون–S-ترانسفراز متصل گردید. این فیوژن‌های ترکیبی به عنوان پروتئین نوترکیب بیان شدند. نتایج نشان داد تزریق پروتئین‌های نوترکیب (GST-C) به موش القای پاسخ ایمنی در موش درچالش با باکتری کلستریدیوم پرفرینجنس را نشان داد (Negahama 2013).

با توجه به موفقیت‌آمیز بودن کلونینگ ژن آلفا توکسین در باکتری‌های میزبان می‌توان گفت که اولاً پرایمرهای طراحی شده برای تکثیر این ژن اختصاصی‌اند، ثانیاً به عنوان یک مارکر جهت شناسایی و طبقه بندی این باکتری‌ها می‌توانند مورد استفاده واقع شوند، ثالثاً با ساخت واکسن‌های نوترکیب ژنتیکی مهندسی شده می‌توان راه کنترل و مقابله با پاتوژن‌های مهمی همچون باکتری کلستریدیوم پرفرینجنس را امکان‌پذیر ساخت. در نهایت اثبات کلونینگ و بیان بخش اول ژن آلفاتوکسین بیماری‌زا در موجود میزبان این امکان را می‌دهدکه بتوان بخش دیگر و حتی کل ژن فوق را کلون، بیان و امکان ایجاد ایمنی‌زا در حیوانات مورد بررسی قرار داد. چنانچه نتایج تولید پروتئین و آزمایشات واکسیناسیون همراه با موفقیت باشد، در گام بعدی می توان با ساخت باکتری‌های زنده مهندسی شده ژنتیکی از طریق کلونینگ و بیان ژن‌های بیماری‌زا در باکتری‌های مفید، بی‌خطر و پروبیوتیک لاکتوکوکوس لاکتیس واکسن‌های زنده با کارآیی بالا که حتی مصرف خوراکی نیزمی‌توانند داشته باشند، را طراحی و تولید نمود. نتایج چنین تحقیقاتی بطور قطع می‌تواند در کنترل بیماری‌های ناشی از میکروارگانیزم‌های پاتوژن مؤثر باشد. زیرا با پیشرفت

www.SID.ir

Archive of SID

روش‌های ژنتیک مولکولی و مهندسی ژنتیک امکان ساخت واکسن نوترکیب مهندسی شده برای مقابله و کنترل این باکتری بیماری‌زا امروزه امکان‌پذیر شده است.

نتیجه گیری: با توجه به تکثیر و کلونینگ ژن آلفاتوکسین در باکتری‌های میزبان که در این مطالعه انجام گرفت می‌توان گفت. اولا"پرایمرهای طراحی شده برای تکثیر این ژن اختصاصی‌اند. ثانیا"به عنوان یک مارکر جهت شناسایی و طبقه‌بندی این باکتری‌ها می‌توانند مورد استفاده واقع شوند. ثالثا"با تولید پروتئین نوترکیب و تزریق آن به حیوانات امکان استفاده ازاین پروتئین سمی را به عنوان واکسن احتمالی می‌توان مورد بررسی قرار داد.

منابع

کرمی علی (1381) مقدمه ای برواکسنهای ژنی.تهران انتشارات دانشگاه امام حسین، شماره شابک 9644521293، 2001.

ناصری فر راضس، غفاری فر فاطمه، دلیمی اصل عبدالحسین، شریفی زهره (1390) کلونینگ ژن GRA5 توکسوپلاسما گوندای سویه RH در پلاسمید یوکاریوت بیانی pcDNA3 و بیان آن در سلول. مجله علمی دانشگاه علوم پزشکی ایلام. 19(3)، 12-1.

References

Ahsani MR, Bafti MS, Esmailizadeh AK, Mohammadabadi MR (2011) Genotyping of isolates of Clostridium perfringens from vaccinated and unvaccinated sheep. Small Rumin Res 95, 65-69.

Ahsani MR, Mohammadabadi MR, Shamsaddini MB (2010) Clostridium perfringens isolate typing by multiplex PCR. J Venom Anim Toxin Includ Tropic Dis 16, 573-578.

Anuradha K, Foo HL, Mariana NS Loh TC et al. (2010) Live recombinant *Lactococcus lactis* vaccine expressing aerolysin genes D1 and D4 for protection against *Aeromonas hydrophila* in tilapia (*Oreochromis niloticus*). J Appl Microb 109, 1632–1642.

Claudia EAF, Viviane N, Edison LD, Mario JV (2003) Prevalence of *Clostridium spp.* and *Clostridium difficile* in Children with Acute Diarrhea in São Paulo City, Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro 98, 451-454.

Evy G, Stefanie V, Bonnie V, Bart P (2016) The C‑terminal domain of *Clostridium perfringens* alpha toxin as a vaccine candidate against bovine necrohemorrhagic enteritis. Vet Res 47, 52.

www.SID.ir

Archive of SID

Frank M (2004) Clostridial Diseases of Cattle and Sheep: Text of a paper presented at the annual meeting of the Association of Veterinary Surgeons Practising in Northern Ireland, Enniskillen.

Hadizadeh M, Mohammadabadi MR, Niazi A et al. (2013) Use of bioinformatics tools to study exon 2 of GDF9 gene in Tali and Beetal goats. Modern Genet J (MGJ) 8, 283-288.

Hadizadeh M, Niazi A, Mohammad Abadi M et al. (2014) Bioinformatics analysis of the BMP15 exon 2 in Tali and Beetal goats. Modern Genet J 9, 117-120.

Jia-Ning B, Yang Z, Bao-Hua Z (2006) Cloning of α-β fusion gene from *Clostridium perfringens* and its expression. WJG 12, 1229-1234.

Karami A (2001) Introduction to Genetic Vaccines. Imam Hossein Publications, ISSN: 9644521293.

Marcos R, Ferreira A, Gustavo MSGM, Carlos EPC et al. (2016) Recombinant Alpha, Beta, and Epsilon Toxins of Clostridium perfringens: Production Strategies and Applications as Veterinary Vaccines. Toxin 8, 340.

Mohammadabadi MR (2017) Role of *Clostridium perfringens* in pathogenicity of some domestic animals. J Adv Agric 7, 1-9.

Negahama M (2013) Vaccines against *Clostridium perfringens* alpha-toxin. Curr Pharm Biotechnol 14, 913-17.

Naserifar R, Ghaffarifar F, Dalimiasl A, Sharifi Z (2010) Cloning and Expression of GRA5 Gene from *toxoplasma gondii* RH in eukaryotic pcDNA3. Scientific J Medic Univ Ilam 19, 1-10.

Navarro MA, McClane BA, Uzal FA (2018) Mechanisms of Action and Cell Death Associated with *Clostridium perfringens* Toxins. Toxin 10, 212e

Neeson BN, Clark GC, Atkins HS, Lingard B et al. (2007) Analysis of protection afforded by a *Clostridium perfringens* alpha-toxoid against heterologous clostridial phospholipases C. Microb Pathog 43, 161–165.

Naqpal R, Oqata K, Tsuji H, Matsuda K et al. (2015) Sensitive quantification of *Clostridium perfringens* in human feces by quantitative real-time PCR targeting alpha-toxin and enterotoxin genes. BMC Micro 15, 219e.

Oda M, Kabura M, Takagishi T, Suzue A et al. (2012) *Clostridium perfringens* Alpha-toxin Recognizes the GM1a-TrkA Complex: J Biol Chem 287, 33070-9.

Oda M, Kihara A, Yoshioka H, Saito Y et al. (2008) Effect of Erythromycin on Biological Activities Induced by *Clostridium perfringens* α-Toxin. JPET 327, 934–940.

www.SID.ir

Archive of SID

Oda M, Yutaka T, Jun S, Masahiro N (2015) Membrane-Binding Mechanism of *Clostridium perfringens* Alpha-Toxin. Toxin 7, 5268–5275.

Radhika B, Kumar NV, Sreenivasulu D (2016) Detection of *Clostridium perfringens* alpha toxin gene in lambs by loop mediated isothermal amplification. Vet World 9, 60-64.

Sakurai J, Negahama M, Oda M (2004) *Clostridium perfringens* Alpha- Toxin: Characterization and Mode of Action. J Biochem 136, 569–574.

Sakurai J, Negahama M, Oda M, Tsuge H et al. (2009) *Clostridium perfringens* Iota-Toxin: Structure and Function: Toxin 1, 208-228.

Sasan H (2007) Cloning and expression of aerolysin and metalloprtease genes from a locally isolated aeromonas hydrophila in *Escherchia coli* and *lactococcus lactis* and the effects of the recombinant *lactococcus lactis* on tilapia, PhD Thesis, UPM pp:150-220.

Sasan H (2010) Cloning of EprA1 gene of *Aeromonas hydrophila* in *Lactococcus lactis*, IJB 8, 193-198.

Schoepe H, Neubauer A, Schlapp T, Weiler LH et al. (2006) Immunization with an alpha toxin variant 121A/91-R212H protects mice against *Clostridium perfringens* alphatoxin. Anaerobe 12, 44–8.

Shahdadnejad N, Mohammadabadi MR, Shamsadini M (2016) Typing of Clostridium Perfringens Isolated from Broiler Chickens Using Multiplex PCR. Genet Third millennium 14, 4368-4374.

Shimizu T, Ohtani K, Hirakawa H, Yamashita A et al. (2002) Complete genome sequence of *Clostridium perfringens*, an anaerobic flesheater. Proc Natoin Acad Sci 99, 996-1001.

Siu-Tong L and Ming KL (2012) A middle-aged lady with a pyogenic liver abscess caused by *Clostridium perfringens*. World J Hepatol 4, 252-255.

Stevens DL, Titball RW, Jepson M, Bayer CR et al. (2004) Immunization with C-domain of alpha-toxin prevents lethal infection, localises tissue injury and promotes host response to challenge with viable *Clostridium perfringens*. J Infect Dis 190, 767–773.

Williamson ED, Titball RW (1993) A genetically engineered vaccine against the alpha-toxin of *Clostridium perfringens* protects mice against experimental gas gangrene. Vaccine 11, 1253–8.

Zandi E, Mohammadabadi MR, Ezzatkhah M, Esmailizadeh AK (2014) Typing of Toxigenic Isolates of Clostridium Perfringens by Multiplex PCR in Ostrich. Iran J Appl Anim Sci 4, 509-514.

www.SID.ir

Archive of SID

Yuan T, Ming W, Bin L, Jianzhong C et al. (2012) Detection, cloning, and sequencing of the enterotoxin gene of *Clostridium perfringens* type C isolated from goat: Turk J Vet Anim 36, 153-158.

www.SID.ir