ISSN: 2476-6917; Modares Journal of Biotechnology. 2019;10(1):103-107

Cloning of *Tpel* Gene of *Clostridium perfringens* in *E. coli*

ARTICLE INFO

Article Type
Original Research

Authors
Mamandi H.[1] *MSc*,
Golestani Eimani B.*[1] *PhD*,
Pilehchian Langroudi R.[2] *PhD*

How to cite this article
Mamandi H, Golestani Eimani B, Pilehchian Langroudi R. Cloning of *Tpel* Gene of *Clostridium perfringens* in *E. coli*. Modares Journal of Biotechnology. 2019;10(1):103-107.

ABSTRACT

Clostridium perfrinjens is an anaerobics, Gram-positive, rod-shaped and heat resistant bacterium of genus clostridium. *C. perfringens* is a spore-forming bacterium and widely occurring pathogen. The organism is grouped into 5 types (A, B, C, D, and E) on the basis of the production of 4 major toxins alpha, beta, epsilon, and iota toxins. Tpel *Clostridium perfringens* (*C. perfringens*) toxin have identified with A, B, and C types by cytotoxin activity in recent years. In this study *C. perfringens* type B had been used. Tpel caused to intestinal disease especially intestinal infections in human and necrotic enteritis in birds. In this study, perfect genomic DNA extracted by phenol-chloroform and Polymerase Chain Reaction (PCR) method used to isolation *Tpel* gene by a couple exclusive primer of perfect bacterium genomic DNA. PCR product after joining to pTZ57RL/T vector by TA cloning method in *E. coli* strain TOP10 susceptible became cloned and then colony PCR method used to screening transforming bacterium colonies with recombinant plasmid. Presence of fragment close to 2469bp on 1% agarose gel indicated that Tpel gene in *E. coli* strain TOP10 have be cloned.

Keywords *C. perfringens*; Tpel Toxin; TA Cloning; pTZ57RL/T Vector

Archive of SID

[1]Biology Department, Basic Sciences Faculty, Urmia Branch, Islamic Azad University, Urmia, Iran
[2]Razi Vaccine & Serum Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Alborz, Karaj, Iran

Correspondence
Address: Ayatollah Rafsanjani Complex, Urmia Branch, Islamic Azad University, 2 Kilometer of Airport Road, Urmia, Iran
Phone: +98 (44) 32917733
Fax: +98 (44) 32722738
golestani_bahram@yahoo.com

Article History
Received: August 15, 2017
Accepted: February 06, 2018
ePublished: March 16, 2019

CITATION LINKS

[1] Expression of Clostridium perfringens epsilon-beta fusion toxin gene in E. coli and its immunologic studies in mouse [2] Sherris medical microbiology: An introduction to infectious diseases [3] Oxford textbook of medicine [4] Medical microbiology. Bahador A, translator [5] Chemical synthesis and expression of the human calcitonin gene [6] Large clostridial cytotoxins: Cellular biology of Rho/Ras-glucosylating toxins [7] Characterization of Clostridium perfringens TpeL toxin gene carriage, production, cytotoxic contributions, and trypsin sensitivity [8] Clostridium perfringens tpeL is expressed during sporulation [9] Genetic analysis of toxin determinants of *Clostridium Perfringens* [10] Fusion of Clostridium perfringens type D and B epsilon and beta toxin genes and it's cloning in E. coli [11] Colony-PCR Is a Rapid Method for DNA Amplification of Hyphomycetes [12] Glycoprotein based phylogenetic analysis of rabies virus isolates [13] Novel non-templated nucleotide addition reactions catalyzed by procaryotic and eucaryotic DNA polymerases [14] A simple and efficient method for direct cloning of PCR products using ddT-tailed vectors [15] General method for direct cloning of DNA fragments generated by the polymerase chain reaction [16] A Simple Method to Construct T-Vectors Using XcmI Cassettes Amplified by Nonspecific PCR [17] One-Step Preparation of a TA-cloning Vector from a Specially Designed Parent Plasmid Containing a Dual lacZ Gene System

Copyright© 2019, TMU Press. This open-access article is published under the terms of the Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International License which permits Share (copy and redistribute the material in any medium or format) and Adapt (remix, transform, and build upon the material) under the Attribution-NonCommercial terms.

www.SID.ir

کلونینگ ژن *Tpel* *کلستریدیوم پرفرینجنز* در باکتری *اشریشیاکلی*

هیمن ماماندی MSc
گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، واحد ارومیه، دانشگاه آزاد اسلامی، ارومیه، ایران
بهرام گلستانی‌ایمانی* PhD
گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، واحد ارومیه، دانشگاه آزاد اسلامی، ارومیه، ایران
رضا پیله‌چیان‌لنگرودی PhD
موسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران

چکیده
توکسین Tpel *کلستریدیوم پرفرینجنز* با فعالیت سیتوتوکسیتی در تیپ‌های A، B و C در سال‌های اخیر شناسایی شده است. باکتری *کلستریدیوم پرفرینجنز* حداقل ۱۵ نوع توکسین مختلف تولید می‌کند که در بیماری‌زایی آن نقش دارند. براساس تولید چهار توکسین مهم و اصلی آلفا، بتا، اپسیلون و یوتا در پنج گروه A، B، C، D و E قرار داده شده است. در این تحقیق از *کلستریدیوم پرفرینجنز* تیپ B استفاده شد. توکسین Tpel موجب ایجاد بیماری‌های روده‌ای به‌ویژه عفونت‌های روده‌ای در انسان و بیماری آنتریت‌نکروتیک طیور می‌شود. در این مطالعه DNA ژنومی کامل به روش فنل- کلروفرم استخراج و از روش واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) برای جداسازی ژن *Tpel* به‌وسیله یک جفت پرایمر اختصاصی از DNA ژنومی کامل باکتری استفاده شد. محصول PCR پس از اتصال به وکتور pTZ57RL/T به روش TA-کلونینگ در باکتری *اشریشیا کلی* (*E. coli*) سویه TOP10 مستعد کلون شد و سپس روش PCR کلونی برای غربالگری کلونی‌های باکتری ترانسفورم‌شده با پلاسمید نوترکیب به کار رفت. وجود قطعه مورد نظر روی ژل آگارز ۱٪ نشان داد که ژن *Tpel* در *اشریشیا کلی* سویه TOP10 کلون شده است.
کلیدواژه‌ها: *کلستریدیوم پرفرینجنز*، توکسین Tpel، TA-کلونینگ، وکتور pTZ57RL/T

تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۰۵/۲۴
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۱۱/۱۷
*نویسنده مسئول: golestani_bahram@yahoo.com

مقدمه

گونه *پرفرینجنز* یک باکتری گرم مثبت، میله‌ای‌شکل، تشکیل‌دهنده اسپور و بی‌حرکت از جنس کلستریدیوم است[1]. این باکتری‌ها به‌طور فراوان در خاک و روده تمام حیوانات خونگرم وجود داشته و سومین عامل ایجاد مسمومیت غذایی در بریتانیا و ایالات متحده هستند[2].

عفونت‌های ایجادشده به‌واسطه *کلستریدیوم پرفرینجنز* عوارضی مانند نکروز بافت، باکتریمی (حضور باکتری در خون)، التهاب کیسه صفرا، آماس ریوی و گانگرن گازی را نشان می‌دهد[3]. حدت بیماری‌زایی این باکتری به‌خاطر تولید حداقل ۱۵ نوع توکسین است. باکتری *کلستریدیوم پرفرینجنز* براساس توانایی تولید چهار نوع توکسین اصلی به نام‌های آلفا، بتا، اپسیلون و یوتا به ۵ تیپ A، B، C، D و E طبقه‌بندی می‌شوند[4]. حداقل چهار گونه بیماری‌زای کلستریدیا، خانواده توکسین‌های بزرگ کلستریدیایی (LCTs) را تولید می‌کنند و بسیاری از LCTs فاکتورهای ویرولانس انسان و حیوان محسوب می‌شوند. توکسین‌های A (TcdA) و B (TcdB) *کلستریدیوم دیفیسیل*، توکسین هموراژیک TcsH و توکسین کشنده TcsL *کلستریدیوم سوردلی* و نیز آلفاتوکسین (TcnA) *کلستریدیوم نووآی*، از این خانواده هستند. به‌تازگی مشخص شده است که Tpel *کلستریدیوم پرفرینجنز* از این گروه است اما مطالعات کمی در مورد آن صورت گرفته است. این توکسین در تیپ‌های A، B و C دیده شده است ولی تیپ D فاقد آن است[5, 6]. پروتئین Tpel با وزن مولکولی حدود ۲۰۵کیلودالتون بزرگ‌ترین توکسین در میان هفده توکسین *کلستریدیوم پرفرینجنز* است، اما یک واریته آن با فعالیتی کمتر و با وزن مولکولی حدود ۱۵کیلودالتون سبک‌تر نیز یافت شده است. این توکسین در انتهای فاز لگاریتمی و ابتدای فاز ثابت به میزان حداکثر تولید و در محیط کشت رها می‌شود[7] که از این نظر با سایر LCTs کلستریدیایی که در انتهای فاز ثابت به محیط کشت رها می‌شوند متفاوت است. برخی از مطالعات نشان داده‌اند که این توکسین هنگام اسپوروژنز نیز تولید می‌شود. در هر صورت مکانیزم اثر این توکسین تاکنون مشخص نشده است[8]. این توکسین با ایجاد بیماری‌های روده‌ای در انسان و حیوانات و نیز بیماری آنتریت‌نکروتیک طیور از جمله توکسین‌های بیماری‌زا است که می‌بایست از طریق کلونینگ و بیان ژن *Tpel* اقدام به تولید واکسنی برای این توکسین نمود. مطالعه حاضر قسمتی از طرح کلونینگ ژن *Tpel* *کلستریدیوم پرفرینجنز* تیپ B با استفاده از روش TA-کلونینگ در باکتری *اشریشیا کلی* است که برای تهیه این ژن به‌صورت خالص به‌منظور تولید پروتئین نوترکیب آن صورت گرفته است.

مواد و روش‌ها

در مطالعه تجربی حاضر *کلستریدیوم پرفرینجنز* تیپ B (CN-1795) از موسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی تهیه شد و پس از حل‌کردن باکتری لیوفیلیزه درون محیط کشت نوترینت‌براث، به لوله حاوی عصاره جگر انتقال و به شیوه بی‌هوازی در انکوباتور ۳۷°C کشت داده شد. روز بعد دوباره کشت داده و پس از ۵ساعت از کشت تازه برای تخلیص DNA استفاده شد. استخراج DNA کل ژنومی به روش فنل کلروفرم صورت پذیرفت. در این مطالعه برای حصول نتیجه بهتر رقت‌های ۰/۱ و ۰/۰۱ از DNA استخراجی تهیه شد تا در واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) از رقت مناسب‌تر استفاده شود. اسپکتوفتومتری و الکتروفورز ژل آگاروز ۱% برای ارزیابی کمی و کیفی DNA استخراج‌شده استفاده شد. ژن *Tpel* به‌وسیله PCR با استفاده از پرایمرهای اختصاصی طراحی‌شده توسط نرم‌افزار Gene Runner 6.5.50 تکثیر یافت که مشخصات آنها در جدول ۱ ذکر شده است.

جدول ۱) مشخصات پرایمرهای ژن *Tpel*

پرایمر ژن *Tpel*	توالی	دمای ذوب (°C)	طول قطعه (جفت‌باز)
رفت	5' AAT CAT ATG GAT TAT AAA GCG CAA 3'	۵۵/۱۱	۲۴۸۴
برگشت	5' GGT CTC GAG ATC TCT ATA TCC TAT 3'	۵۵/۷۴	

واکنش PCR در حجم ۲۵میکرولیتر شامل ۰/۵میکرولیتر از هر کدام از پرایمرها، ۰/۵میکرولیتر DNA نمونه، ۱۲/۵میکرولیتر مسترمیکس و ۱۱میکرولیتر آب مقطر استریل و برنامه دمایی به شرح زیر بود:
دناتوراسیون اولیه در ۹۵°C به‌مدت ۵دقیقه و ۳۰ چرخه شامل دناتوراسیون در ۹۵°C به‌مدت ۱:۱۰دقیقه، ۵۶°C به‌مدت یک‌دقیقه و ۷۲°C به‌مدت ۲:۱۰دقیقه بوده و در پایان گسترش نهایی در ۷۲°C به‌مدت ۱۰دقیقه انجام شد. محصولات PCR روی ژل آگارز ۱% در

Archive of SID
www.SID.ir

ولتاژ ۸۰ و به‌مدت ۳۰دقیقه الکتروفورز شد.

کلونینگ ژن *Tpel* در وکتور pTZ57R/T: وکتور pTZ57R/T با اندازه ۲۸۸۷جفت‌باز و دارای ژن مقاومت به آمپی‌سیلین و سایت‌های محدودکننده برای آنزیم‌های مختلف برشی به کار رفت. در اینجا ابتدا برای ایجاد وکتورهای نوترکیب از روش TA-کلونینگ استفاده شد. با توجه به اینکه آنزیم DNAتک‌پلیمراز یک نوکلئوتید آدنین را به دو انتهای '۳ محصولات PCR اضافه می‌کند و از جهتی این پلاسمید به شکل خطی و در دو انتهای '۳ خود حاوی ddT است، بنابراین این خصوصیات موجب شده تا برای TA-کلونینگ مناسب باشد.

در الحاق طبق پیشنهاد کیت (فرمنتاز؛ ایالات متحده)، یک‌میکرولیتر آنزیم DNA لیگاز T4 در حضور ۶میکرولیتر بافر اتصال 5x، ۴میکرولیتر محصول PCR، ۱۶میکرولیتر آب بدون نوکلئاز و ۳میکرولیتر وکتور pTZ57R/T درون یک میکروتیوب مخلوط و به‌مدت یک شبانه‌روز در دمای ۴°C انکوبه شد. پس از آماده‌سازی سلول‌های مستعد *E. coli/TOP10* ترانسفورماسیون توسط شوک حرارتی (طبق کیت ترانسفورماسیون فرمنتاز Pub. No. MAN0012725) صورت پذیرفت.

از محیط کشت باکتریای ترانسفورم‌شده بلافاصله روی پلیت‌های محیط کشت LB آگار آمپی‌سیلین‌دار و بدون آمپی‌سیلین پاساژ داده و در دمای ۳۷°C انکوبه شد. برای حصول اطمینان و تایید وجود ژن کلون‌شونده (*Tpel*) در کلنی‌های مشاهده‌شده در محیط کشت LB آگار حاوی آمپی‌سیلین، تک کلنی‌های موجود در محیط مذکور را مجدداً به پلیت‌های حاوی محیط آمپی‌سیلین‌دار که به چهار قسمت تقسیم‌شده بود پاساژ داده و بعد از انکوبه‌شدن در ۳۷°C به‌مدت ۵ساعت از کلنی‌های موجود برای انجام PCR کلونی (Colony PCR) استفاده شد.

PCR کلونی با همان برنامه دمایی ذکرشده و پرایمرهای استفاده‌شده در PCR اولیه صورت پذیرفت ولی در اجزای واکنش از هر یک از پرایمرها یک‌میکرولیتر، ۱۲/۵میکرولیتر مسترمیکس، ۱۰/۵میکرولیتر آب مقطر استریل و به‌جای نمونه DNA از تک کلنی استفاده شد. برای بررسی محصول PCR کلونی الکتروفورز انجام شد.

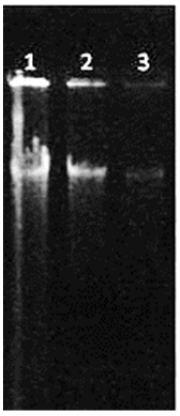
یافته‌ها

استخراج DNA ژنومیک: استخراج DNA به روش فنل- کلروفرم یکی از راه‌های معمول استخراج DNA است که DNA استخراج‌شده با این روش کیفیت و کمیت (نداشتن اسمیر زیاد) مناسبی دارد که شکل ژل الکتروفورز نشانگر استخراج DNA سالم بود (شکل ۱). لازم به ذکر است که درجه خلوص DNA تقریباً ۱/۸ بود.

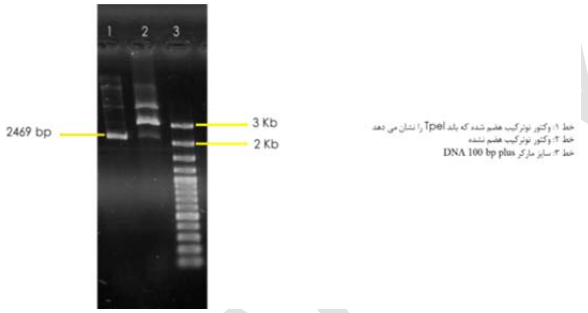
نتیجه اتصال ژن کلون‌شونده *Tpel* به وکتور pTZ57R/T: پس از لایگیشن، ژن *Tpel* *کلستریدیوم پرفرینجنز* تیپ B به‌اندازه ۲۴۶۹جفت‌باز تکثیرشده با PCR به وکتور pTZ57R/T (که دارای ۲۸۸۶جفت باز است) متصل و وکتور نوترکیب تشکیل شد که در شکل ۲ باند مربوط به این وکتور روی ژل آگارز ۱% مشاهده می‌شود.

ترانسفورماسیون و غربالگری کلنی‌های حاوی وکتور نوترکیب: وکتور pTZ57R/T به‌دلیل داشتن ژن مقاومت به آمپی‌سیلین در صورت ورود به درون *E. coli* آن را در محیط حاوی آمپی‌سیلین قادر به رشد می‌نماید بنابراین برای بررسی نتیجه ترانسفورماسیون لازم بود در محیط LB آگار آمپی‌سیلین‌دار و بدون آمپی‌سیلین کشت داده شود که پس از ۵ الی ۶ساعت انکوبه‌کردن، روی محیط LB حاوی آمپی‌سیلین کلنی‌های موردنظر تشکیل شد که در شکل ۳ و ٤ قابل مشاهده است.

PCR کلونی: نتایج بررسی PCR کلونی انجام‌شده با کلنی‌های نوترکیب *E. coli/TOP10/pTZ57R/T* رشد کرده روی محیط LB حاوی آمپی‌سیلین به‌وسیله ژل الکتروفورز در شکل ۵ نشان داده شده است که معمولاً در روش PCR کلونی به قطعه‌ای از ژن نه طول کل ژنوم دست پیدا می‌کنیم چون از پرایمرهایی استفاده شد که قسمتی از ژن *Tpel* را به ما می‌دهد. وجود باند نزدیک با اندازه نزدیک به باند ژن *Tpel* موفقیت عملیات کلونینگ ژن *Tpel* را در *E. coli* سویه Top10 تایید نمود.



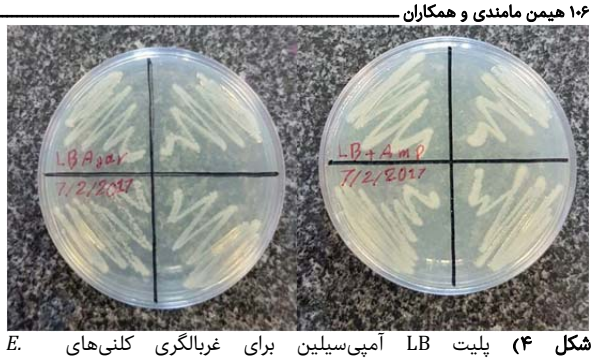
شکل ۱) DNA ژنومیک *کلستریدیوم پرفرینجنز* تیپ B؛ ۱: DNA ژنومیک *کلستریدیوم پرفرینجنز*



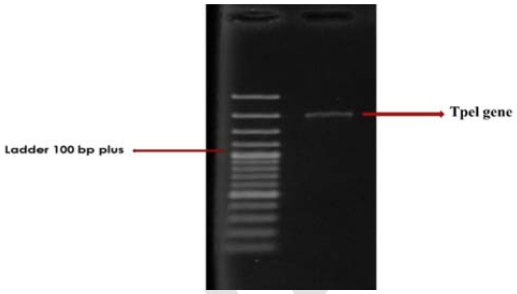
شکل ۲) وکتور نوترکیب

شکل ۳) پلیت LB آمپی‌سیلین‌دار حاوی تک‌کلنی‌های ترانسفورم‌شده با وکتور نوترکیب

www.SID.ir



شکل ۴) پلیت LB آمپی‌سیلین برای غربالگری کلنی‌های *E. coli/TOP10/pTZ57R/T*



شکل ۵) ژن کلون‌شده *Tpel* در باکتری *E. coli/TOP10*

بحث

کلستریدیوم جنس بزرگی از باکتری‌های گرم منفی است که تعدادی از انواع آن پاتوژن‌های خطرناکی برای انسان و دام به شمار می‌آیند. امروزه مشخص شده است که واکسیناسیون بهترین راه مبارزه و کنترل این عوامل بیماری‌زا است. واکسن‌های کشته‌شده کلستریدیایی به‌طور رایج در کشور تولید و مصرف می‌شوند. با توجه به این که واکسن‌های نوترکیب در فیلد واکسن‌سازی از اهمیت زیادی برخوردار هستند، بنابراین تحقیقات کلونینگ و بیان ژن‌های توکسین‌های کلستریدیایی اهمیت زیادی دارد. هدف از انجام این تحقیق کلونینگ ژن *Tpel* *کلستریدیوم پرفرینجنز* در باکتری *E. coli* بود. مهندسی ژنتیک یا تکنولوژی DNA نوترکیب به مجموعه روش‌هایی گفته می‌شود که به‌منظور جداسازی، خالص‌سازی، واردکردن و بیان یک ژن خاص در یک میزبان به کار می‌روند و نهایتاً منجر به بروز یک صفت خاص یا تولید محصول مورد نظر در جاندار میزبان می‌شوند. اولین کلونینگ موفق یک ژن از کروموزوم *کلستریدیوم پرفرینجنز* توسط *فیرویدر* و همکاران در سال ۱۹۸۷ گزارش شد. از آن زمان به بعد بیش از ۳۰ ژن در این زمینه کلونینگ و شناسایی شده است[9].

با توجه به خصوصیات ساختاری و مولکولی و نیز گیرنده‌های توکسین Tpel می‌توان نسبت به تولید واکسن و راه چاره‌ای برای درمان آن از طریق کلونینگ و بیان این ژن اقدام کرد که در این مطالعه کلونینگ ژن *Tpel* مورد بررسی قرار گرفت.

در این مطالعه برای انجام عمل تخلیص از باکتری تازه کشت داده‌شده استفاده شد. *پیله‌چیان* و همکاران در مطالعه‌ای که روی کلستریدیوم‌ها انجام داده‌اند از روش فنل- کلروفرم برای تخلیص DNA باکتری استفاده کرده‌اند[10] که در مقایسه با روش‌های دیگر تخلیص DNA که سایر محققین به کار برده‌اند ساده‌تر و در عین حال کارآمد است.

در تحقیق حاضر علاوه بر PCR برای جداسازی ژن موردنظر از روش PCR کلونی استفاده نمودیم که در این تکنیک از خود کلنی رشد کرده در محیط کشت بدون نیاز به استخراج DNA استفاده شد. از مزایای روش PCR کلونی می‌توان به جلوگیری از ریسک آلودگی در حین استخراج DNA، صرفه‌جویی در زمان، استفاده از لوازم و مواد ساده بدون نیاز به پروسه‌های مختلف برای استخراج DNA و نیاز به حداقل مواد کشت اشاره کرد. روش PCR کلونی یک روش سریع و یک برنامه کاربردی منظم برای توسعه PCR کشت‌های سلولی باکتریای، لاین‌های سلولی و کشت‌های مخمر است[11]. در یوکاریوت‌ها هم برای روش PCR کلونی از پرایمر T7 استفاده شد. در مطالعه *تومار* و همکاران در بررسی ژن بیماری هاری، بعد از PCR ژن مورد نظر توسط پرایمرهای خاص ژن، درون پلاسمید pTZ57RL/T درج و غربالگری توسط روش PCR کلونی با استفاده از پرایمر T7 و پرایمر رفت ژن خاص، تایید شد[12].

در این تحقیق به‌منظور بهینه‌سازی، از روش PCR کلونی با پرایمرهای طراحی‌شده برای PCR در مرحله تکثیر ژن استفاده شد. در مطالعه حاضر وکتور pTZ57R/T به‌عنوان ناقل به کار رفت. با استفاده از این وکتور برای غربالگری نوترکیب‌ها می‌توان از روش PCR کلونی به‌جای تکنیک سفید آبی استفاده کرد. این وکتور به صورت خطی و دارای ژن مقاومت به آمپی‌سیلین است که بعد از انجام ترانسفورماسیون فقط باکتری‌هایی که به‌وسیله وکتور پلاسمید نوترکیب ترانسفورم شده باشند در محیط حاوی آمپی‌سیلین رشد می‌کنند. در اینجا ابتدا برای ایجاد وکتورهای نوترکیب از روش TA- کلونینگ استفاده کردیم بدین‌صورت که آنزیم DNA تک‌پلیمراز که در تکثیر DNA طی مراحل PCR استفاده شد یک نوکلئوتید آدنین را به انتهای '۳ محصولات خود اضافه می‌کند. پس همه محصولات تولیدشده توسط این آنزیم دارای یک نوکلئوتید اضافی آدنین در انتهای '۳ خواهند بود، بنابراین برای بهره‌بردن از این ویژگی آنزیم، چنین پلاسمیدهایی طراحی شده‌اند که به شکل خطی بوده و در انتهای '۳ خود دارای یک باز تیمین هستند که می‌تواند با باز آدنین پیوند هیدروژنی برقرار کرده و لیگاسیون با راندمان بیشتری انجام می‌شود.

برای اولین بار *جیمز ام.کلارک* در سال ۱۹۸۸ مشاهده کرد که توانایی کاتالیز افزودن نوکلوتیدهای غیرالگو به پایانه '۳ انتهای صاف DNA دورشته‌ای یک ویژگی عمومی DNAپلیمراز است از این لحاظ که تعدادی از آنزیم‌های مختلف این پدیده را نشان می‌دهند[13] این آنزیم‌ها شامل DNAپلیمرازهایی از چندین یوکاریوت، پروکاریوت، یوباکترها و رتروویروس‌های وابسته به مرغان بود. همه این آنزیم‌ها یک اولویتی را برای استفاده از dATP برای افزودن انتهای صاف انجام دادند. این ویژگی در هر دو گونه یوکاریوت و پروکاریوت مشترک است. توانایی افزودن نوکلوتید غیرالگو یک ویژگی جالب و غیرمنتظره را از DNA پلیمراز نشان داد. چندین پلاسمید TA برای کلونینگ در *E. coli* در دسترس است. پلاسمید TA هم توسط محدودیت انتهای صاف هضم یک پلاسمید به‌دنبال افزودن دنباله‌های تیمیدین با استفاده از DNAپلیمراز تک[14] و هم با استفاده از آنزیم‌های محدودکننده که دنباله‌های '۳ تکی ایجاد می‌کنند، می‌توان مورداستفاده قرار گیرد. در ۱۹۹۱ برای اولین‌بار یک روش عمومی برای کلونینگ مستقیم قطعات DNA تولیدشده، توسط توسعه آنزیمی براساس قابلیت هضم وکتور کلونینگ با آنزیم اندونوکلئاز محدودگر برای به‌ثمررساندن یک واحد مولکول خطی با دنباله دئوکسی‌تیمیدین جفت‌نشده '۳ در هر دو انتها توصیف شد. این قبیل وکتورها قادر به لیگاسیون موثر با محصولاتی هستند که توسط توسعه آنزیمی با دنباله دئوکسی‌آدنوزین غیرجفت‌شونده بخش '۳ DNA تک‌پلیمراز

Archive of SID
www.SID.ir

در هر دو انتها فراهم می‌آیند که *دیوید کووالیک* و همکاران از آنزیم محدودکننده XcmI برای ایجاد دنباله‌های تکی بهره بردند و توانستند ژن مورد نظر را درون پلاسمید pGEM5fZ که با آنزیم هضمی NcoI بریده شده بود، قرار دهند[15].

استفاده از آنزیم‌های محدودکننده برای آماده‌سازی پلاسمید TA معمولاً یک محتوی شامل آنزیم‌های محدودکننده را نشان داد[16]. *جون* و همکاران کشف کردند که استفاده از آنزیم‌های محدودگر انعطاف‌پذیری محصول PCR را از نظر یکپارچگی محدود می‌کند و به تغییر و اصلاح پلاسمید نیاز است[17].

برای بررسی اختصاصی وکتورهای نوترکیب و اینکه احتمال باقی‌ماندن وکتور خطی که حاوی ژن مقاومت به آمپی‌سیلین است در محیط کشت است ما از روش PCR کلونی برای تشخیص وکتور نوترکیب استفاده کردیم.

در انتها وجود قطعه نزدیک به ۲۴۶۹جفت‌بازی روی ژل آگارز نشان داد که ژن *Tpel* در *اشریشیاکولی* سویه TOP 10 با موفقیت کلون شده و باکتری *E. coli* سویه TOP 10 میزبان مناسبی برای غربالگری ژن توکسین *Tpel* بود.

این تحقیق هیچ‌گونه محدودیتی را شامل نمی‌شود.

جنس کلستریدیوم از انتشار گسترده‌ای برخوردار است و بیماری‌های گسترده و خطرناکی ایجاد می‌کند. بیماری‌زایی این باکتری در رابطه با توکسین‌هایی است که تولید می‌کند؛ بنابراین تحقیقات بیشتر روی توکسین های دیگر این باکتری ضروری بوده و کلونینگ و بیان توکسین‌های دیگر این‌گونه باکتریایی پیشنهاد می‌شود. برای تهیه واکسن‌های کلستریدیایی، توکسین باکتری باید تبدیل به توکسوئید شود تا ضمن اینکه سیستم ایمنی موجود زنده را تحریک می‌کند اثرات مضر یا کشنده روی موجود زنده نداشته باشد. مراحل تبدیل توکسین به توکسوئید نیازمند صرف هزینه و زمان است. برای تولید واکسن به روش نوترکیب می‌توان علاوه بر این که توکسین را به روش کلون و بیان در یک میزبان کم‌ضرر یا بی‌ضرر تولید کرد، با ایجاد جهش‌های هدفمند در ژن کدکننده توکسین و کلونینگ و بیان ژن جهش‌یافته در میزبان بیانی، میزبان به‌جای توکسین، توکسوئید تولید کرده و هزینه‌های پایین‌دستی تولید واکسن کاهش یابد.

نتیجه‌گیری

وجود قطعه نزدیک به ۲٤٦۹جفت‌بازی روی ژل آگارز نشان داد که ژن *Tpel* در *اشریشیا کولی* سویه TOP 10 با موفقیت کلون شده و باکتری *E. coli* سویه TOP 10 میزبان مناسبی برای غربالگری ژن توکسین Tpel بود.

تشکر و قدردانی: از استاد گرامی جناب آقای دکتر *گلستانی* که بدون راهنمایی‌های ایشان تامین این پایان‌نامه بسیار مشکل می‌نمود و به‌ویژه از جناب آقای دکتر *پیله‌چیان* به‌دلیل یاری‌ها و راهنمایی‌های بی‌چشم‌داشت ایشان که بسیاری از سختی‌ها را برایم آسان‌تر نمودند نهایت تشکر را دارم.

تاییدیه‌اخلاقی: به‌دلیل اینکه در پژوهش حاضر روی نمونه انسانی و حیوانی عملی صورت نگرفت، تاییدیه‌اخلاقی لازم نبود.

تعارض منافع: هیچ‌گونه تعارض منافعی وجود ندارد.

سهم نویسندگان: هیمن مامندی (نویسنده اول)، نگارنده مقدمه/پژوهشگر اصلی (۳٤%)؛ بهرام گلستانی ایمانی (نویسنده دوم)، روش‌شناس (۳۳%)؛ رضا پیله‌چیان لنگرودی (نویسنده سوم)، نگارنده بحث (۳۳%)

منابع مالی: منابع مالی این تحقیق توسط آقای هیمن *مامندی* تامین شده است.

منابع

1- Pilehchian Langroudi R, Shamsara M, Aghaiypour K. Expression of Clostridium perfringens epsilon-beta fusion toxin gene in E. coli and its immunologic studies in mouse. Vaccine. 2013;31(32):3295-9.

2- Ryan KJ, George Ray C, Sherris JC. Sherris medical microbiology: An introduction to infectious diseases. Ryan KJ, George Ray C, editors. 4th Edition. New York: McGraw-Hill; 2004.

3- Warrell DA, Cox TM, Firth JD. Oxford textbook of medicine. 4th Edition. Oxford: Oxford University Press; 2010.

4- Murray PR, Rosenthal KS, Pfaller MA. Medical microbiology. Bahador A, translator. Tehran: Khosravi; 2013. pp. 334-49. [Persian]

5- Popoff MR, Bouvet P. Clostridial toxins. Future Microbiol. 2009;4(8):1021-64.

6- Schirmer J, Aktories K. Large clostridial cytotoxins: Cellular biology of Rho/Ras-glucosylating toxins. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects. 2004;1673(1-2):66-74.

7- Chen J, Mc Clane BA. Characterization of Clostridium perfringens TpeL toxin gene carriage, production, cytotoxic contributions, and trypsin sensitivity. Infect Immun. 2015;83(6):2369-81.

8- Paredes-Sabja D, Sarker N, Sarker MR. Clostridium perfringens tpeL is expressed during sporulation. Microb Pathog. 2011;51(5):384-8.

9- Fairweather NF, Pickard DJ, Morrissey PM, Lyness VA, Dougan G. Genetic analysis of toxin determinants of *Clostridium Perfringens*. In: Borriello SP, Hardie JM, Drasar BS, Duerden BI, Hudson MJ, Lysons RJ, editors. Recent Advances in Anaerobic Bacteriology, new perspectives in clinical microbiology. 12th Volume. Dordrecht: Springer; 1987. pp. 38-147.

10- Pilehchian Langroudi R, Aghaei Pour K, Shamsara M, Jabbari AR, Habibi GR, Goudarzi H, et al. Fusion of Clostridium perfringens type D and B epsilon and beta toxin genes and it's cloning in E. coli. Arch Razi Inst. 2011;66(1):1-10.

11- Walch, G, Knapp M, Rainer G, Peintner U. Colony-PCR Is a Rapid Method for DNA Amplification of Hyphomycetes. J. Fungi. 2016;2(2):12.

12- Tomar NR, Kumar R, Kumar A. Glycoprotein based phylogenetic analysis of rabies virus isolates. Int J Curr Microbiol App Sci. 2017;6(7):1727-34.

13- Clarke JM. Novel non-templated nucleotide addition reactions catalyzed by procaryotic and eucaryotic DNA polymerases. Nucleic Acids Res. 1988;16(20):9677-86.

14- Holton TA, Graham mw. A simple and efficient method for direct cloning of PCR products using ddT-tailed vectors. Nucleic Acids Res. 1990;19(5):1156.

15- Kovalic D, Kwak JH, Weisblum B. General method for direct cloning of DNA fragments generated by the polymerase chain reaction. Nucleic Acids Res. 1991;19(16):4560.

16- Chulman J, Sangmee AJ. A Simple Method to Construct T-Vectors Using XcmI Cassettes Amplified by Nonspecific PCR. Plasmid. 2001;45(1):37-40.

17- Jun SY, Yoon SJ, Kang SH. One-Step Preparation of a TA-cloning Vector from a Specially Designed Parent Plasmid Containing a Dual lacZ Gene System. Mol Biotechnol. 2010;45(1):9-14.

Archive of SID
www.SID.ir