Archive of SID

نشریه دامپزشکی
در
پژوهش و سازندگی شماره ۱۱۳ زمستان ۱۳۹۵

بررسی فیوژن ژن اپسیلون– آلفا کلستریدیوم پرفرینجنز تیپ D و کلستریدیوم سپتیکوم به روش In silico

• **مرضیه کمالی روستا،**
دانشگاه خوارزمی، دانشکده علوم
• **رضا پیله چیان لنگرودی (نویسنده مسئول)**
آزمایشگاه تحقیقات تخصصی کلستریدیا، موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران

تاریخ دریافت: اسفند ۹۴ تاریخ پذیرش: خرداد ۹۵
Email: r.pilehchian@rvsri.ir

چکیده

تکنولوژی DNA نوترکیب یک تکنیک مولکولی in vitro جهت جداسازی و دستکاری قطعات DNA می‌باشد. با استفاده از تکنیک ساخت مولکول‌های کایمریک DNA نوترکیب، سپس واردکردن این مولکول نوترکیب به سلول‌های زنده، همانندسازی و تکثیر آنها در سلول امکان‌پذیر شد. امروزه تکنولوژی فیوژن پروتئین یک استراتژی برای دسترسی سریع، ارزان و پربازده بیان پروتئین‌هاست. توالی نوکلئوتیدی ژن اپسیلون *کلستریدیوم پرفرینجنز* تیپ D (*etx*D) و ژن آلفای *کلستریدیوم سپتیکوم* (*csa*) از GenBank به دست آمد.سپس جهت تولید فیوژن پروتئین کایمریک، فیوژن ژن اپسیلون- آلفا طراحی گردید. ساختارهای دوم و سوم و ویژگی‌های فیوژن پروتئین حاصل به وسیله نرم افزارهای آنلاین تعیین شد. نتایج نشان داد ساختار فیوژن ژن طراحی شده برای بیان فیوژن پروتئین کایمریک مناسب است.

کلمات کلیدی: *کلستریدیوم پرفرینجنز*،*کلستریدیوم سپتیکوم*، توکسین اپسیلون، توکسین آلفا، فیوژن ژن

www.SID.ir

Archive of SID

● Veterinary Journal (Pajouhesh & Sazandegi) No 113 pp: 128-135

In silico fusion of epsilon and alpha toxin genes of *Clostridium perfringens* type D and *Clostridium-septicum*

By: Kamalirousta M., Faculty of science, Kharazmi University; Reza Pilehchian langroudi, (Corresponding Author) Razi Vaccine and Serum Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization, (AREEO), Alborz, Karaj, Iran

Email: r.pilehchian@rvsri.ir

Received: March 2015 Accepted: June 2015

Recombinant DNA technology is an in vitro molecular techniques to isolate and manipulate DNA fragments. Using this technique, construction chimeric molecules, called recombinant DNA molecules, then insert the recombinant molecules to living cells, replication and proliferation of the cells was possible. The fusion protein technology is the strategy to achieve rapid, cheap and efficient expression of proteins. *Clostridium perfringens* type D epsilon gene nucleotide sequence (*etx*D) and *Clostridium septicum* alpha gene (*csa*) were retrieved from GenBank. Then, to produce chimeric fusion protein, epsilon-alpha fusion gene was designed. Secondary and tertiary structures and characteristics of the fusion protein was determined by online software.The results showed that the designed fusion gene construction is suitable to expression of chimeric fusion protein.

Key words: Clostridium, epsilon gene, alpha gene, fusion gene, In silico

مقدمه

باکتری گرم مثبت، میله‌ای، بی هوازی و اسپوردار*کلستریدیوم پرفرینجنز*، یک باکتری مقاوم به گرما از جنس کلستریدیوم‌هاست. این باکتری اغلب در خاک یافت می‌شود و جزء فلورطبیعی دستگاه گوارش انسان و پستانداران می‌باشد (۲۰). سلول باکتری در شرایط نامساعد محیطی، اندوسپورهایی را تشکیل می‌دهد که بقای آن را در شرایط ناگوار مثل: خشکی، گرما و کمبود مواد غذایی تضمین می‌کند. اسپورها در محیط وجود داشته و اغلب، مواد غذایی خام را آلوده می‌کنند.*کلستریدیوم پرفرینجنز* بیش از ۱۷ نوع توکسین متفاوت تولید می‌کند. از این میان چهار نوع اصلی آن، آلفا، بتا، اپسیلون و یوتا برای طبقه‌بندی پرفرینجنز به پنج تیپ A-E استفاده می‌شود (۱۷). هر تیپ این باکتری، ترکیب متفاوتی از ژن‌های توکسین را حمل می‌کند. آلفاتوکسین در تمام تیپ‌های پرفرینجنز تولید می‌شود ولی در تیپ A بیش از دیگر گونه‌ها تولید می گردد. در واقع همه سویه‌های *کلستریدیوم پرفرینجنز*، ژن کدکننده پروتئین CPA را دارند. این ژن (*cpa*) روی DNA کروموزومی و نزدیک مبدا همانندسازی قرار دارد و یکی از حفاظت شده‌ترین نواحی درون کروموزوم باکتری است. آلفا توکسین *کلستریدیوم پرفرینجنز* عامل ایجاد گازگانگرن می‌باشد. بتاتوکسین در تیپ B و C و توکسین اپسیلون در تیپ B و D *کلستریدیوم پرفرینجنز* و توکسین یوتا فقط درتیپ E مشاهده شده است (۱۶).

اپسیلون یکی از توکسین‌های قوی *کلستریدیوم پرفرینجنز* تیپ D و بعد از نوروتوکسین‌های بوتولینوم و تتانوس، سومین توکسین قوی کلستریدیایی است (۱۸). توکسین اپسیلون ۳۷ کیلو دالتون وزن مولکولی داشته و به صورت یک پروتوتوکسین غیرفعال ترشح می‌شود و به وسیله تیمار با آنزیم پروتئولیتیک مانند تریپسین می‌تواند فعال گردد. توکسین اپسیلون عامل بیماری انتروتوکسمی درگوسفند و عامل necrotic enteritis در بره‌های خیلی جوان می‌باشد وگاها می‌تواند باعث شرایط مشابه در اسب‌های تازه متولد شده گردد (۴ و ۱۰). توکسین اپسیلون یکی از اعضای خانواده معروف Clostridium/Bacillusmosquitocidal toxin ETX/MTX2 است.

باکتری گرم مثبت، میله‌ای و اسپوردار *کلستریدیوم سپتیکوم* جزء فلور طبیعی انسان و دیگر جانوران است(۲۱).*کلستریدیوم سپتیکوم* از جمله باکتری‌های متحرک است و با استفاده از peritrichous flagellae از یک محیط به محیط دیگر جا به جا می‌شود (۱۵). این باکتری بی هوازی تخمیرکننده بوده و درهر جایگاه anoxic حاوی ترکیبات آلی یافت می‌شود (۷). *کلستریدیوم سپتیکوم* قادر به تولید چهار توکسین اصلی آلفا، بتا، گاما و دلتا می باشد (۱). از این میان آلفا توکسین عامل اصلی کشندگی در این باکتری و عامل بیماری گاز گانگرن است (۱۳). آلفا توکسین *کلستریدیوم سپتیکوم* از جمله توکسین‌هایی است که به صورت پروتوکسین غیرفعال تولید می‌شود و برای فعال شدن نیاز به هیدرولیز پروتئولیتیک دارد. پروتوکسین ترشح شده به پروتئین‌های غشایی GPI-anchored روی سلول‌های هدف متصل شده (۸) و به وسیله پروتئازهای سلول میزبان مانند فورین، با جداشدن یک توالی ۴۵ اسید آمینه ای از پایانه کربوکسی (پایانه C) فعال می شود (۳ و ۹). آلفا توکسین یکی از اعضای خانواده پروتئینی *Clostridium septicum* alpha toxin/aerolysin/ heamolysin/lecucidin toxin می‌باشد.

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۱. توکسین های اصلی تیپ های مختلف کلستریدیوم پرفرینجنز

تیپ	توکسین آلفا	توکسین بتا	توکسین اپسیلون	توکسین یوتا
A	+	–	–	–
B	–	+	+	–
C	–	+	–	–
D	–	–	+	–
E	–	–	–	+

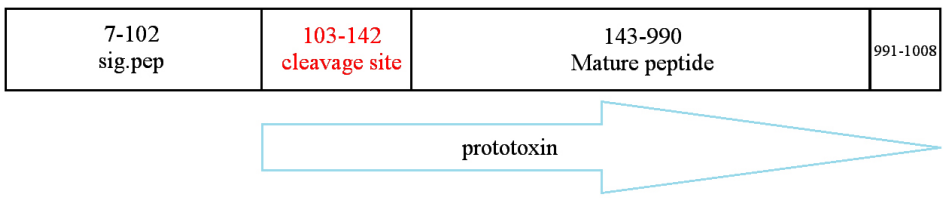
بررسی توالی‌های ثبت شده و ساختار فیوژن ژن و فیوژن پروتئین

به منظور طراحی فیوژن ژن اپسیلون- آلفا *کلستریدیوم پرفرینجنز* تیپ D و *کلستریدیوم سپتیکوم* از توالی‌های ثبت شده در GenBank استفاده شد. اولین داده مربوط به ژن *etx* بود. آنالیز توالی نوکلئوتیدی ژن اپسیلون ثبت شده باشماره ثبت HQ179546.1 نشان داد در این توالی ۱۰۰۸ جفت نوکلئوتیدی از باز شماره ۱۰۲-۷مربوط به توالی سیگنال پپتید است و مابقی توالی، پروتوتوکسین اپسیلون می‌باشد.درتوالی پروتوتوکسین باز ۱۴۲-۱۰۳ مربوط به قسمت کلیواژ است که در توکسین فعال حذف می شود.این قسمت در پایانهN و بلافاصله بعد از سیگنال پپتید قرار دارد. توکسین اپسیلون حاصل از این توالی، یک پروتئین ۳۳۴ اسید آمینه‌ای می‌باشد که یک قطعه ۳۲ اسید آمینه‌ای در پایانه N، سیگنال پپتید و قطعه اسید آمینه‌ای باقی مانده، پپتید بالغ غیرفعال یا پروتوتوکسین است و بعد از کلیواژ به توکسین فعال تبدیل می‌شود. شکل ۱ نمای شماتیک ژن اپسیلون و نمای شماتیک توکسین اپسیلون را نشان می‌دهد.

مراحل مشابه روی ژن آلفای توکسین *کلستریدیوم سپتیکوم* انجام شد. ژن آلفا توکسین ثبت شده در انک ژن با شماره JN793989 یک توالی ۱۳۳۲ نوکلئوتیدی می‌باشد. این توالی، مربوط به توکسین فعال آلفاست.

در واقع در این توالی ثبت شده قسمت مربوط به کلیواژ از پایانه C حذف شده است. این توالی، یک پروتئین ۴۴۳ اسید آمینه‌ای را کد می‌کند که ۳۱ اسید آمینه ابتدای آن مربوط به سیگنال پپتید است. این پروتئین تولید شده همان توکسین فعال آلفا می‌باشد. شکل ۲ نمای شماتیک ژن توکسین آلفا را نشان می‌دهد

توالی‌های نوکلئوتیدی برای طراحی فیوژن ژن کایمریک استفاده شد. این فیوژن ژن از اتصال ژن *etx* *کلستریدیوم پرفرینجنز* تیپ D و ژن *csa* *کلستریدیوم سپتیکوم* ساخته شد. ساختار یک فیوژن پروتئین شامل اتصال دو پروتئین یا حوضه پروتئین ها به وسیله یک لینکر پپتیدی است. انتخاب توالی لینکر برای ساختار فیوژن پروتئین بسیار مهم و حائز اهمیت است. بر اساس مطالعات انجام شده بهترین پپتید، توالی (A=۲-۵) n A(EAAAK) n می باشد، لینکرهای هلیکال به طور موثر می‌تواند حوضه‌های پروتئین‌ها را از هم جدا کنند و فاصله بین حوضه‌ها با تغییر طول موتیف EAAAK می‌تواند کنترل شود. بنابراین دو توالی نوکلئوتیدی توسط توالی AEAAAKEAAAKA که برای *E. coli* اپتیمایز شد به هم متصل شد. سپس جایگاه اثر آنزیم محدود کننده NdeI و توالی جانبی آن در انتهای ´۵ ژن etxو جایگاه اثر آنزیم محدودکننده *XhoI* و توالی جانبی آن در انتهای ´۳ ژن *csa* طراحی شد. طول فیوژن ژن طراحی شده ۲۲۶۵



شکل ۱ الف. نمای شماتیک ژن اپسیلون کلستریدیوم پرفرینجنز تیپ D

www.SID.ir

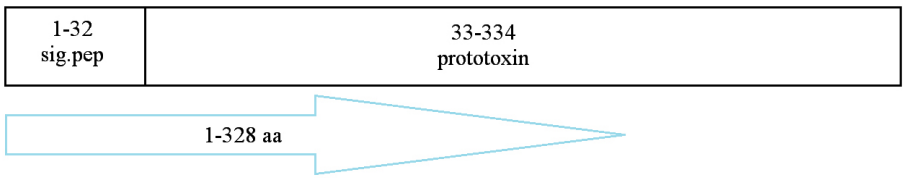
Archive of SID

جفت باز است.
از نوکلئوتیـــد۹۸۷-۱ مربوط به ژن اپســـیلون، جفـــت بازهای۱۰۲۴-۹۸۸ (۳۶bp) مربوط به توالی لینکر و جفت بازهای ۲۲۶۵-۱۰۲۴ مربوط به ژن آلفا می باشد (با در نظرگرفتن توالی آنزیم های محدودکننده). بنابراین ژن *etx* به همراه سیگنال پپتید و ناحیه مربوط به کلیواژ و ATG آغاز و ژن *csa* بدون ســـیگنال پپتید و ناحیه کلیـــواژ و بدونATGآغاز و کدون اختتام در توالی فیوژن ژن طراحی شده استفاده گردید.

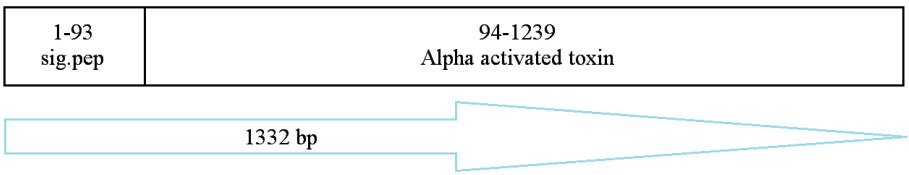
شـــکل‌های ۱ تا ۳ نمای شماتیک ژن‌های اپسیلون و آلفا و طراحی شده و فیوژن پروتئین کایمریک را نشان می دهد.

آنالیز آنلاین فیوژن پروتئین

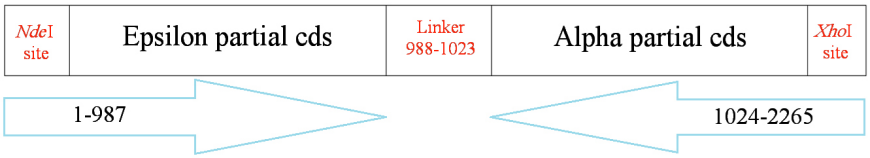
الگوها و پروفایل‌های فیوژن پروتئین کایمریک به وسیله نرم افزار آنلاین InterPro پیشگویی شد.



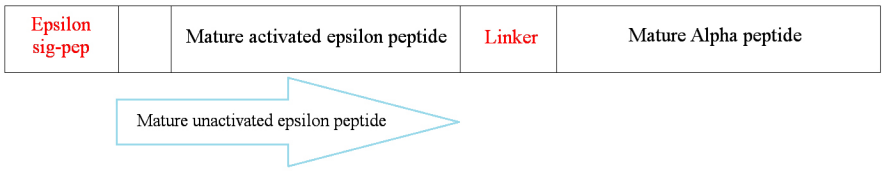
شکل ۱ ب. شماتیک توکسین اپسیلون *کلستریدیوم پرفرینجنز* تیپ D



شکل ۲. شماتیک ژن آلفای *کلستریدیوم سپتیکوم*



شکل ۳ الف. شماتیک فیوژن اپسیلون - ژن آلفای *کلستریدیوم سپتیکوم*



شکل۳ ب. شماتیک فیوژن پروتئین کایمریک حاصل از بیان فیوژن ژن اپسیلون- آلفای طراحی شده

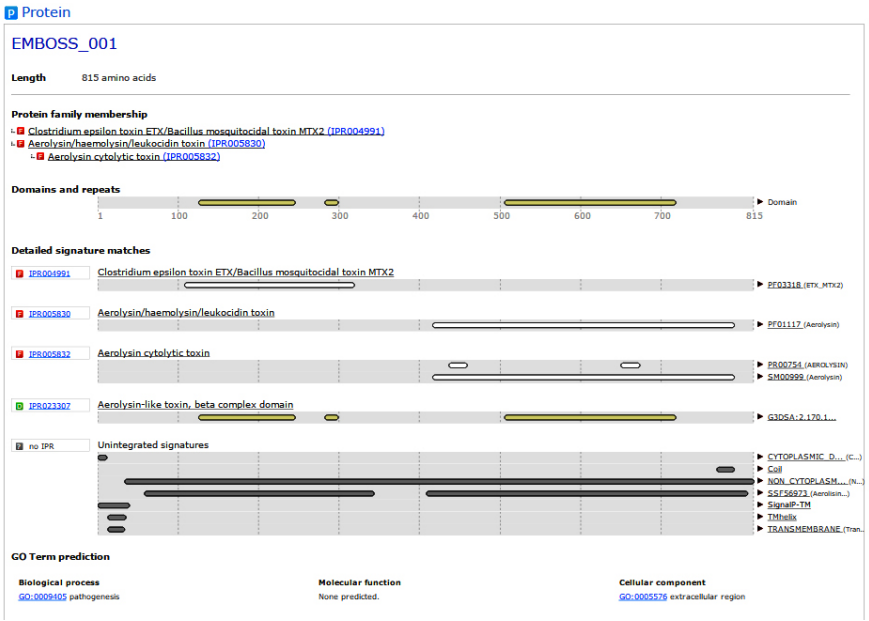
www.SID.ir

Archive of SID

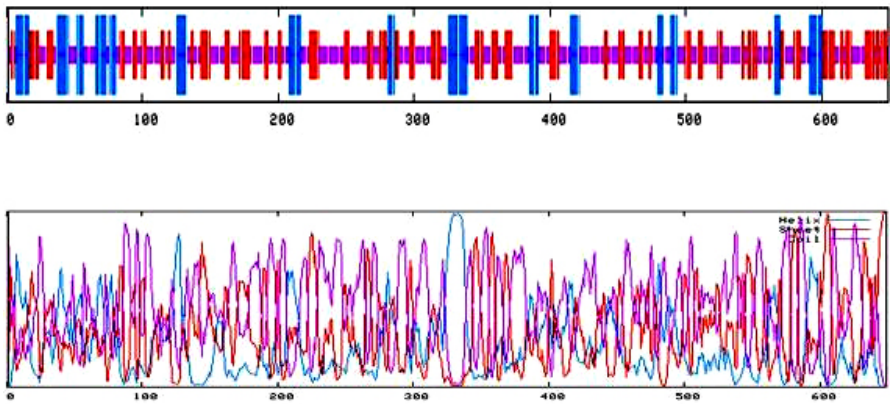
(http://www.ebi.ac.uk/Tools/InterProScan) بر اساس نتایج حاصل، مشخص شدکل ساختار، ترکیبی از توکسین اپسیلون(*Clostridium perfringens* epsilon toxin ETX/Bacillusmosquitocidal toxinMTX2) و توکسین آلفا (Clostridium septicum alpha toxin/aerolysin/heamolysin/lecucidin toxin) می باشد. شکل۴ اینترپرواسکن فیوژن پروتئین کایمریک را نشان می دهد.

ساختار دوم فیوژن پروتئین با استفاده از برنامه PROMOTIF پیشگویی شد.

(http://www.rubic.rdg.ac.uk/~gail/#software) برای این منظور از سه ست آنالیز: epsilontoxin peptide (۳۲۸aa) و alpha toxin peptide (۴۱۲aa) و fusion chimeric peptide (۷۵۲aa) اســـتفاده شد. نتایج نشان داد توالی ۷۵۲ اسید آمینه ای شامل پروتوتوکسین اپســـیلون، لینکرو پپتید بالغ آلفا می‌باشد. از نرم افزار GOR برای تعیین محل دقیق لینکر اســـتفاده شد (۶). نتایج نشان داد یک هلیکـــس پیک بین جایگاه ۳۴۰-۳۲۸ وجود دارد که مربوط به قطعه لینکر اســـت. شکل ۵ آنالیز ســـاختار دوم فیوژن پروتئین به وسیله GOR را نشان می‌دهد. نتایج تجزیه و تحلیل GOR نشـــان داد که یک قله مارپیچ در مکان ۳۴۰-۳۲۸ قرار گرفته است که مربوط به قطعه رابط می‌شود.



شکل۴. اینترپرواسکن فیوژن پروتئین کایمریک



شـــکل۵: تجزیه و تحلیل ساختمان دوم فیوژن پروتئین با نرم افزار GOR، قطعهٔ رابط بین اسید آمینه های ۳۲۹ تا ۳۴۰ قرار گرفته است.

www.SID.ir

Archive of SID

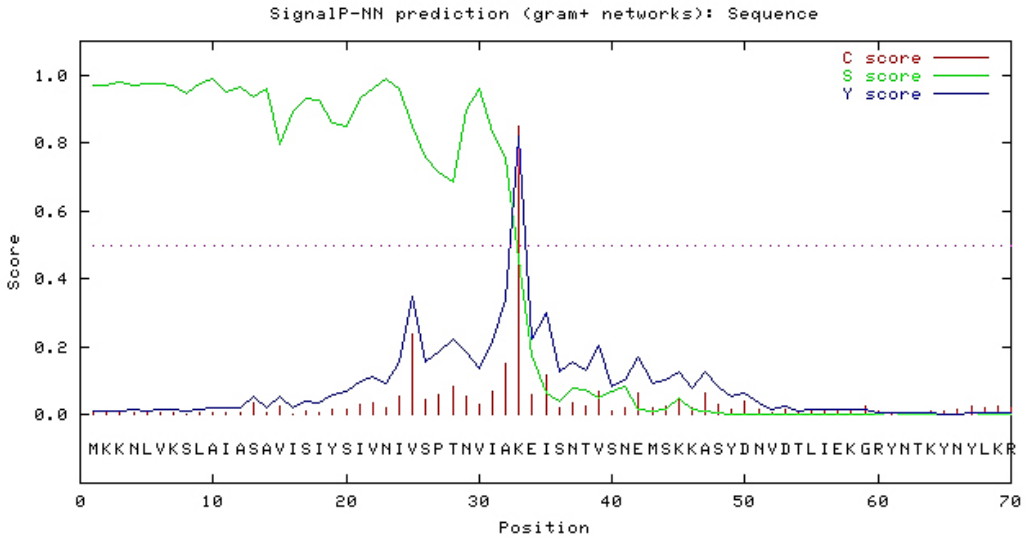
از نرم افزار signalP برای تعیین محل دقیق سیگنال پپتید استفاده گردید و مشخص شد بیشترین احتمال کلیواژ بین جایگاه اسیدآمینه ۳۳-۳۲، ناحیه مربوط به سیگنال پپتید ژن اپسیلون قرار دارد. کلیواژ سایت سیگنال پپتید در شکل۶ نشان داده شده است. بر اساس نتایج بدست آمده از نرم افزار آنلاین SignalP محتمل‌ترین جایگاه برش در فیوژن پروتئین در منطقه اسید آمینه ۳۳-۳۲ قرار دارد. نتایج حاصل از تجزیه و تحلیل با HM-MTOP نشان داد که پایانه آمین فیوژن پروتئیین در داخل قرار گرفته و یک مارپیچ در حد فاصل اسید آمینه‌های ۸ تا ۲۵ قرار دارد که یک مارپیچ غشائی است.

پیشگویی ساختار سوم فیوژن پروتئین

پیشگویی ساختار سوم فیوژن پروتئین با آپلود چندین مدل روی سرور I-TASSER انجام شد (۲۲). مدل‌های آپلود شده شامل complete epsilon (toxin (328aa) ,epsilon prototoxin peptide (296aa ۴۴۳aa),mature) activated epsilon toxin(282aa),complete alpha toxin alphatoxin (۴۱۲aa) بود. مدل آپلود شده فیوژن ژن کایمریک به این ترتیب: complete epsilon toxin+linker+alpha maturepeptide بود.توالی لینکر استفاده شده AEAAAKEAAAKA بود که برای E.coli،optimize می شود (۱۹).
GCGGAAGCGGCGGCGAAAGAAGCGGCGGCGAAAGCG.
نتایج پیشگویی ساختار سوم فیوژن پروتئین،که در شکل ۷ مشاهده می شود یک پروتئین شامل دو حوزه که با یک لینکرکوچک به هم متصل شده بود را نشان داد.

بحث

در مطالعه حاضر،روش های بیوانفورماتیک مورد استفاده برای فیوژن ژن etx و csa توضیح داده شد. بر طبق آخرین اطلاعات این اولین طراحی فیوژن ژن اپسیلون-آلفا جهت تولید فیوژن پروتئین نوترکیب است.این یافته ها نشان داد فیوژن پروتئین حاصل می تواند برای تولید واکسن جهت جلوگیری از مسمومیت ناشی از توکسین اپسیلون و آلفا استفاده شود.تولید مقادیر زیاد واکسن از سویه های پاتوژن نیاز به شرایط ایمنی شدید، استحصال پرهزینه توکسین و مراحل کنترل کیفیت دقیق دارد. بنابراین این روش برای تولید این توکسین ها در یک میزبان مطمئن و در یک شکل ایمونولوژیک سودمند خواهد بود. از آنجا که سطح بیان پروتئین نوترکیب معمولا در باکتری بالاست، سیستم های بیان باکتریایی برای این هدف مناسب ترین هستند مخصوصا زمانی که تغییرات پس از ترجمه نیاز نمی‌باشد (۵).
در مطالعه حاضر، توالی کامل ژن توکسین اپسیلون با سیگنال پپتید آن برای ترشح مناسب فیوژن پروتئین و توالی ژن آلفا توکسین، بدون سیگنال پپتید آن و توالی AEAAAKEAAAKA به عنوان لینکر نیاز است. بر طبق یافته های چندین بانک اطلاعاتی شامل PROSITE، PRINTS، Pfam-A،TIGRFAM، PROFILES و PRODOM کل ساختار فیوژن پروتئین شامل ترکیبی از توکسین اپسیلون کلستریدیوم از خانواده ETX/MTX2 و حوضه-alpha toxin/aerolysin/heamolysin/lecu *Clostridium septicum* cidin toxin می‌باشد.
در سال ۱۹۹۲، Hunter و همکارانش نشان دادند توالی اسید آمینه‌ای حاصل از ژن توکسین اپسیلون بین کدون آغاز در باز ۱۸۸ و کدون اختتام



شکل ۶. پیشگوئی جایگاه برش پپتید علامتی در فیوژن پروتئین با استفاده از نرم افزار آنلاین SignalP .

www.SID.ir

Archive of SID

در باز ۱۱۷۴ قرار دارد. بدین معنا که این قسمت مربوط به ۹۸۶ جفت باز بین کدون آغاز و پایان است. داده ها نشان داد از متیونین آغاز تا لایزین (باز۲۸۴) حدود ۳۲ اسید آمینه، سیگنال پپتید است که لایزین ممکن است اولین باز توکسین بالغ و غیرفعال باشد. در مطالعه دیگری که در توسط Imagawa انجام شد مشخص گردید ژن آلفا توکسین *کلستریدیوم* سپتیکوم ۲۲۹۳ جفت باز طول دارد و توالی توکسین آلفای حاصل بین باز ۵۶۰ و ۱۸۹۲ قرار دارد. از باز ۵۶۰ تا باز ۶۵۳ (۹۳ نوکلئوتید) مربوط به سیگنال پپتید است. این توالی، یک پروتئین ۴۴۳ اسید آمینه‌ای را کد می‌کند که ۳۱ اسید آمینه ابتدایی آن سیگنال پپتید می‌باشد. برای تایید این یافته ساختار دوم توکسین آلفا و اپسیلون و فیوژن پروتئین با نرم افزار آنلاین PROMOTIF پیشگویی شد (۱۲). نتایج نشان داد اسید امینه لایزین شماره ۳۳ اولین نوکلئوتید اپسیلون غیرفعال (پروتوتوکسین) است که با کلیواژ توسط تریپسین به توکسین فعال تبدیل می شود. بر طبق یافته های Habeeb و Bhown از لایزین (باز ۲۸۶) تا لایزین (باز۳۲۳) حدود ۱۳ اسید آمینه بعد از کلیواژ حذف می شود. بر مبنای نتایج مطالعه حاضر، ژن کایمریک طراحی شده برای اولین بار سنتز و به وکتور کلونینگ PGEM-B1 لایگیت، سپس به باکتری *E. coli*/TOP 10 ترانسفورم گردید. توالی فیوژن ژن کلون شده با شماره KU 726861 در بانک ژن ثبت شد. یافته‌ها تولید این پروتئین را در سلول میزبان تایید کرد که شامل سیگنال پپتید توکسین اپسیلون(۳۲ آمینواسید)،epsilon mature inactivatedpeptide (۲۹۶aa)، یک لینکر کوچک هیدروفوبیک (۱۲ آمینواسید) و alpha toxin maturepeptide (۴۱۲aa) می‌باشد. برای ورود ساختمان فیوژن ژن طراحی شده به وکتور بیانی pET ، قراردادن جایگاه اثر آنزیم *NdeI* در انتهای ´۳ ژن اپسیلون و *XhoI* در انتهای ´۵ ژن آلفا ضروری است. یافته های تحقیقات InterProScan به وسیله نتایج پیشگویی ساختار سوم فیوژن پروتئین با استفاده از برنامه نرم افزاری آنلاین I-TASSER تایید شد. نتایج، یک پروتئین شامل دو حوضه که با یک لینکر کوچک به هم متصل شده‌اند را نشان داد.نتایج پیشگویی ساختار دوم هم با نتایج پیشگویی ساختار سوم complete epsilon toxin، epsilon prototoxin،epsilon activated toxin، complete alpha toxin و alpha mature peptide تایید شد. نتایج نشان داد specificity هر دو ژن اپسیلون و آلفا در ساختار سوم فیوژن ژن وجود دارد. شکل۷، ساختار سوم قسمت ها و حوضه های فیوژن پروتئین کایمریک که با I-TASSER پیشگویی شده است را نشان می دهد.

بعد از بیان، این ساختارها می‌توانند باعث تجمع مناسب فیوژن پروتئین در فضای پری پلاسمیک *E. coli* شوند. به دلیل وجودسیگنال پپتید توکسین اپسیلون پروتئین کایمریک که به آن اجازه عبور از غشای سیتوپلاسمی را می دهد.بنابراین مطالعه In silico فولدینگ و ساختار یک پروتئین عملکردی، مهمترین و بهترین راه برای درک ساختار و عملکرد آن است. نتایج مطالعه حاضر به وضوح نشان داد فیوژن ژن اپسیلون- آلفا در یک میزبان مناسب می تواند تولید و بیان شود.

شکل ۷. نتایج پیشگویی ساختار سوم فیوژن پروتئین حاصل از بیان فیوژن ژن اپسیلون- آلفای طراحی شده، توکسیناپسیلون با یک لینکرکوچک به پروتئین آلفا توکسین متصل است.

www.SID.ir

Archive of SID

منابع مورد استفاده:

1- Ballard J, Bryant A, Stevens D and Tweten RK (1992). Purification and characterization of the lethal toxin (alpha-toxin) of ***Clostridium septicum***. *Infection and Immunity*. 60(3): 784-790.

2- Ballard,J., Crabtree,J.,Roe B.,A,Tweten.,1995,The primary structure of Clostridium septicum alpha- toxin exhibits similarity with that of *Aeromonashydrophyla aerolysin, Infect Immun*,63(1):340

3- Ballard, J., Sokolov, Y., Yuan, W.L., Kagan, B.L., Tweten, R.K., 1993. Activation and mechanism of *Clostridium septicum* alpha toxin. *Mol. Microbiol*. 10, 627-634.

4- Brown AS, Habeeb AFSA (1977). Structural studies on Epsilon toxin of *Clostridium perfringens* type D. Localisation of thesite of tryptic scission necessary for activation of epsilontoxin. *Biochem Biophysl Res Commu.* 73: 889-896.

5- Dertzbaugh MT (1998).Genetically engineered vaccines: an overview. *Plasmid* 39: 100-113.

6- Garnier JF, Gibrat B, Robson GOR (1996). Secondary structure prediction method version IV, Methods in Enzymology, RF Doolittle Ed. 266: 540-553.

7- Gabay EL, Rolfe RD and Finegold SM (1981). Susceptibility of *Clostridium septicum* to 23 antimicrobial agents. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 852-853.

8- Gordon, V.M., Nelson, K.L., Buckley, J.T., Stevens, V.L., Tweten, R.K., Elwood, P.C., Leppla, S.H., 1999. *Clostridium septicum* alpha-toxin uses glycosylphosphatidylinositol-anchored protein receptors. *J. Biol. Chem.* 274, 27274-27280.

9- Gordon, V.M., Benz, R., Fujii, K., Leppla, S.H., Tweten, R.K., 1997. *Clostridium septicum* alpha-toxin is proteolytically activated by furin. Infect. Immun. 65, 4130-4134.

10- Habeeb AFSA, Lee CL, Atassi MZ (1973). Conformational studies on modified proteins and peptides VII Conformation of epsilon prototoxin and epsilon toxin from *Clostridium perfringens*. Conformational changes associated with toxicity. *Biochemica et Biophysica Acta.* 322: 245-250.

11- Hunter SEC, Clarck IN, Kelly DC, Titball RW (1992). Cloning and Nucleotide Sequencing of the *Clostridium perfringens* Epsilon-Toxin Gene and Its Expression in *Escherichia coli*. I*nfect Immun.* 60: 102-110.

12- Hutchinson EG, Thornton JM (1996).”PROMOTIF- A program to identify structural motifs in proteins” *Protein Sci.* 5: 212-220.

13- Hickey MJ, Kwan RYQ, Awad MM, Kennedy CL, Young LF, Hall P, Cordner LM, Lyras D, Emmins JJ and Rood JI (2008). Molecular and cellular basis of microvascular perfusion deficits induced by *Clostridium perfringens* and *Clostridium septicum*. *PLoS Pathogens.* 4(4): 1-9.

14- Imagawa, T., Dohi, Y., Higashi, Y., 1994. Cloning, nucleotide sequence and expression of a hemolysin gene of *Clostridium septicum. FEMS Microbiol. Lett.* 117, 287-292.

15- Liechti ME, Schob O, Kacl GM and Caduff B (2003). *Clostridium septicum* aortitis in a patient with colon carcinoma. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 22: 632-634.

16- McClane BA (2001). *Clostridium perfringens.* Doyle MP, editor.Food microbiology: fundamentals and frontiers. Washington,DC: ASM Press. PP. 351-372.

17- McDonel JL (1986). Toxins of *Clostridium perfringens* types A, B,C, D, and E, Dorner F, Drew H, editors. Pharmacology of bacterial toxins. Oxford: Pergamon Press. PP. 447-5

18- Payne DW, Oysten P (1997). The *Clostridium perfringens* epsilon toxin. The Clostridia: Molecular biology and pathogenesis. Academic Press Limited: London. PP. 439-447.

19- Pilehchian Langroudi R, Aghaei Pour K, Shamsara M, Jabbari AR, Habibi GR, Goudarzi H, Ghorashi SA (2011). Fusion of *Clostridium perfringens* type D and B epsilon and beta toxin genes and it’s cloning in E. coli. *Archives of Razi Institute*. 66: 1-10.

20- Rood JI, Cole ST (1991). Molecular genetics and pathogenesis of *Clostridium perfringens*. *Microbio Rev.* 55: 621-648.

21- Smith-Slatas CL, Bourque M and Salazar JC (2006). Clostridiumsepticum infections in children: a case report and review of the literature. *Pediatrics*. 117(4): e796-e805.

22- Zhang Y (2008). I-TASSER server for protein 3D structure prediction. *BMC Bioinformatics*. 9: 1-8.

23- Zhang Y (2009). I-TASSER: Fully automated protein structure prediction in CASP8. *Proteins* S9: 100-113.

www.SID.ir