

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.karamooz@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.

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 *alpha-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

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

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 با هنر 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

چکیده

اهداف: هدف از انجام این پژوهش، تکثیر و همسانه‌سازی شکل کامل و همچنین بخش ابتدایی ژن کشنده آلفاتوکسین (α -Toxin) باکتری کلاستریدیوم پرفرینجنس 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 کپازن 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 اندازه‌های مورد انتظار نشان داد. بعلاوه با استفاده از آزمایش هضم آنزیمی منفرد و دوگانه توسط آنزیم‌های برشگر *HindIII* و *XhoI* همسانه‌سازی 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 واکنش‌های نوترکیب ژنتیکی مهندسی شده می‌توان کنترل و مقابله با پاتوژن‌های مهمی همچون باکتری کلاستریدیوم پرفرینجنس را امکان‌پذیر ساخت.

کلمات کلیدی: آلفاتوکسین، کلاستریدیوم پرفرینجنس، همسانه‌سازی

مقدمه

گونه‌های باکتری کلاستریدیوم 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 (et al. 2003; Frank 2004; Evy et al. 2016; Navarro et al. 2018). کلاستریدیوم‌ها به پنج گروه کلاستریدیوم پرفرینجنس، کلاستریدیوم سپتیکوم، کلاستریدیوم نوای تیپ A، کلاستریدیوم همولیتیکوم، کلاستریدیوم سردلی تقسیم می‌شوند (Ahsani et al. 2010). این باکتری‌ها همچنین با پدیده میکرونگروز یا گازگانگرن مرتبط هستند. در جریان جنگ جهانی اول این میکروارگانیسم به عنوان عامل مهم قانقاریای گازی مرگ صدها هزار سرباز را سبب شد (Shimizu et al. 2002). باکتری کلاستریدیوم پرفرینجنس تعداد 15 نوع توکسین مختلف را تولید می‌کند (Yuan et al. 2012) آلفاتوکسین یا فسفولیباز C تولید شده توسط تیپ‌های نوع A و D یک عامل بیماری‌زای

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 هم گسیختگی 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 پرفرینجنس *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 حیواناتی 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 پرفرینجنس منجر به ایجاد ایمنی‌شده و حیوان را در مقابل آلوده شدن با باکتری بیماری‌زای کلستریدیوم پرفرینجنس مقاوم نموده، بطوریکه علائم بیماری Gas gangrene در موش‌ها مشاهده نشده است (Williamson 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 بر نقش بیماری‌زایی می‌تواند به عنوان ایمونوژن 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 دومین‌های 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 مسؤل بیماری‌زایی میکروب، به روش‌های مهندسی ژنتیک صورت می‌گیرد. روش دیگر به گونه‌ای هست که یک یا چند ژن رمز کننده پروتئین‌های ایمنی‌زا از مخزن ژنی میکروب بیماری‌زا را جدا کرده و به یک ویروس یا باکتری بی‌خطر یا ضعیف شده دیگری پیوند

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 واکسن‌ها 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. 2004; Stevens et al. 2007).

واکسن‌های نوترکیب نسبت به واکسن‌های نسل اول از مزایای بسیاری برخوردار 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 و در 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 و سپس انتقال پلاسمید نوترکیب به یک باکتری، مخمر و یا سلول مناسب حیوانی و یا گیاهی تهیه می‌گردند. 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 جمع‌آوری سلول‌ها، پروتئین نوترکیب از بین سلول‌ها یا محیط کشت، استخراج و تصفیه و پس از طی مراحل 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 سریع‌تر و مستقیم عفونت‌های باکتریایی را مستقیماً 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 ویژگی‌های موجود زنده شناخته شد. به این ترتیب تمایل برای شناخت هرچه بیشتر ژن‌ها به منظور توجیه پدیده‌های زیستی افزایش یافت؛ تا حدی که در چند دهه اخیر، تجهیزات مورد نیاز در تحقیقات مولکولی به طور گسترده‌ای افزایش یافته است و امروزه تحقیقات مولکولی جزو مطالعات رایج آزمایشگاه‌های زیستی است. اطلاعات به دست آمده از تحلیل داده‌های زیستی به وسیله علم بیوانفورماتیک، در به خط کردن توالی‌ها در بانک‌های اطلاعاتی برای یافتن شباهت‌ها و تفاوت‌های ژنی، پیش‌گویی ساختار و عملکرد محصولات ژن‌ها و یافتن ارتباط فیلوژنتیک میان ژن‌ها و توالی‌های پروتئینی کمک می‌کند (Hadizadeh et al. 2013; Hadizadeh et al. 2014). لذا، هدف از انجام

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

مواد و روش‌ها

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 درصد تعیین گردید. الیگونوکلئوتیدهای لازم برای تکثیر شکل کامل ژن آلفاتوکسین (α -Toxin) به اندازه 1110 جفت باز و بخش ابتدایی ژن فوق به اندازه حدود 750 جفت باز به صورت جلوبرنده و برگشت با استفاده از ردیف ژن آلفاتوکسین در آزمایشگاه طراحی و از شرکت سیناژن خریداری شدند. ردیفهای آنزیمهای برشگر *HindIII* و *XhoI* در ابتدای بخش 5' پرایمرها اضافه شدند تا اتصال قطعات ژنی در داخل پلاسمید مورد نظر به‌درستی انجام شود (جدول 1). واکنش PCR در حجم نهایی 50 میکرولیتر حاوی 5 میکرولیتر از بافر 10X، 1,5 میکرولیتر $MgCl_2$ (50 میلی مولار)، یک میکرولیتر از dNTPs (10 میلی مولار)، یک میکرولیتر از هر پرایمر (100 میکرومولار)، یک میکرولیتر از آنزیم Taq DNA polymerase، 2 میکرولیتر 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 سلول‌های شایسته (Competent Cell Preparation): ابتدا یک کلونی از سلولهای باکتری محیط

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 میلی‌لیتر با 7 میلی‌لیتر محیط کشت LB broth در دمای 37 درجه با 200 دور در دقیقه به مدت 5 ساعت نگهداری شدند. میزان جذب تراکم باکتریها با دستگاه اسپکتروفوتومتری 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 سانتیفریوژ 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 کاملاً 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 سانتیفریوژ و مایع بالایی دور ریخته شد. در مرحله آخر توده سلولی با محلول حاوی 85 درصد کلرید 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.

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.

طول قطعه تکثیر شده	پرایمرها primers	نام ژن Gene name
Amlicon size bps		
1110	(PF α 5'- <u>AAGCTTGGCATGAAAAGAAAGATTTGT</u> -3') (PR α 5'- <u>GAGCTCCGCCCTCAACTGCTAATTC</u> -3')	آلفاتوکسین <i>Alpha -Toxin</i>
750	(PFN5'- <u>AAGCTTATGGGCCAGTGCAAGTGT</u> - 3') (PRN5'- <u>GAGCTCCGTTACTTTGCTGCATAATC</u> -3')	بخش ابتدایی ژن آلفاتوکسین N domain of alpha-toxin

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 میلی لیتر باکتری 24 ساعت کشت داده شده به وسیله سانتریفیوژ جمع آوری شدند. شستشوی سلولها با یک میلی لیتر 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 میلی مولار، تریس 25 میلی مولار و EDTA با غلظت 10 میلی مولار و pH برابر با 8) با میکروپیپت کاملاً 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 2N NaOH، 200 میکرولیتر از محلول 10 SDS درصد و 2600 میکرولیتر آب) اضافه شد. مخلوط کردن نمونهها با 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 نمونهها به مدت 10 دقیقه با سرعت 10000 rpm سانتریفیوژ و محلول شفاف بالایی در لوله جدید جمع آوری شدند. در ادامه به نمونهها 400 میکرولیتر کلروفرم اضافه، با وارونه نمودن لولهها کاملاً مخلوط و عمل سانتریفیوژ به مدت 6 دقیقه با سرعت 10000 rpm انجام شد. بخش بالایی نمونهها با میکروپیپت با دقت در لوله جدید منتقل شدند. سپس با اضافه نمودن و مخلوط کردن

800 میکرولیتر ایزوپروپانول عمل سانتریفیوژ به مدت 15 دقیقه با سرعت 12000 rpm انجام شد. با دور ریختن الکل ایزوپروپانول، عمل آبگیری و حذف دیگر ناخالصی‌ها یک میلی‌لیتر الکل اتانول 70% سرد به نمونه‌ها اضافه شد. با سانتریفیوژ به مدت یک دقیقه و با سرعت 10000 rpm و حذف الکل، پلت سفید پلاسمید در دمای اتاق برای خشک شدن به مدت 10 دقیقه 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 پلاسمیدهای استخراجی با استفاده از ژل الکتروفورز تعیین شد.

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

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 آنزیمی برای 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. نمونه‌ها به مدت 3 ساعت در دمای 37 درجه برای برش آنزیمی و 5 دقیقه در دمای 65 درجه سانتیگراد برای غیر فعال کردن آنزیم‌های 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 استفاده از آنزیم *T4 DNA Ligase*:

اتصال DNA های برش‌خورده و تخلیص شده در یک محلول شامل یک میکرولیتر (5 واحد) از *T4 DNA Ligase*، 2 میکرولیتر از بافر لیگاز، 8 میکرولیتر محصول PCR، 3 میکرولیتر از پلاسمید *pET28a* و استفاده از آب تزریقی و رساندن مخلوط به حجم 20 میکرولیتر انجام شد. در پایان مخلوط حاصل به مدت 8 ساعت در دمای 16 درجه سانتیگراد و 10 دقیقه در دمای 65 درجه سانتیگراد به منظور غیرفعال کردن آنزیم لیگاز قرار داده شد.

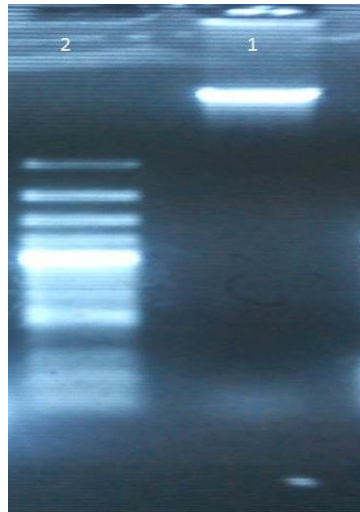
ترانسفورماسیون و غربال‌گری سلول‌های نوترکیب: 10 میکرولیتر از محلول پلاسمیدهای نوترکیب به لوله

حاوی 100 میکرولیتر سلول میزبان شایسته اضافه و به مدت 30 دقیقه در یخ قرار داده شدند. در ادامه نمونه‌ها در دمای 42 درجه سانتی‌گراد 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 مدت 2 ساعت در دمای 37 درجه سانتیگراد با چرخش 150 دور در دقیقه نگهداری شدند. پس از آن نمونه‌ها در سرعت 1000 rpm به مدت 2 دقیقه سانتریفیوژ 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 مجدداً کشت داده شدند. از

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

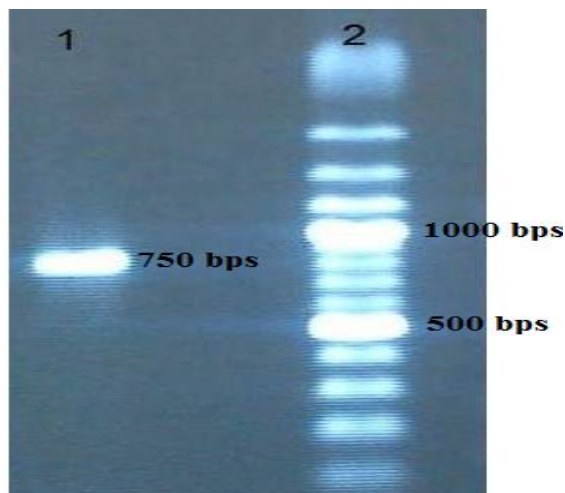
نتایج

استخراج DNA ژنومی از باکتری کلوستریدیوم پرفرینجنس: DNA ژنومی، با استفاده از کیت استخراج DNA (کیژن) 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 (شکل 1). 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 و 3).



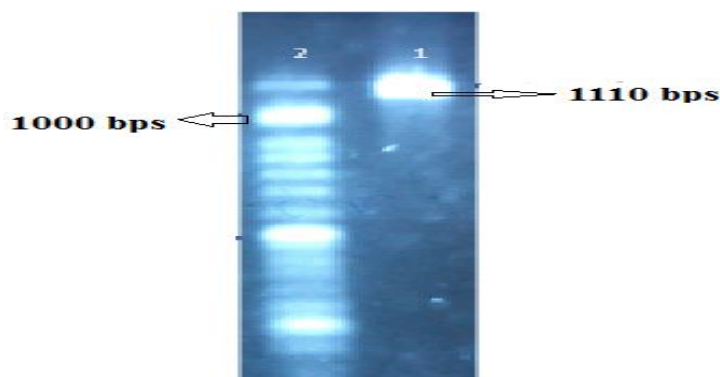
شکل 1. الکتروفورز محصول استخراج DNA ژنومی باکتری کلوستریدیوم پرفرینجنس روی ژل آگارز یک درصد. ستون 1. DNA استخراج شده، ستون 2. مارکر 100 جفت باز (VC 50bp plus DNA ladder).

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



شکل 2. الکتروفورز محصولات حاصل از واکنش PCR با استفاده از DNA ژنومی استخراجی از باکتری کلسترییدیوم پرفرینجنس را نشان می دهد. ستون 2. مارکر 100 جفت بازی (VC 100bp plus DNA ladder) می باشد، ستون 1. محصول PCR بخش ابتدایی ژن آلفا توکسین با اندازه 750 جفت باز.

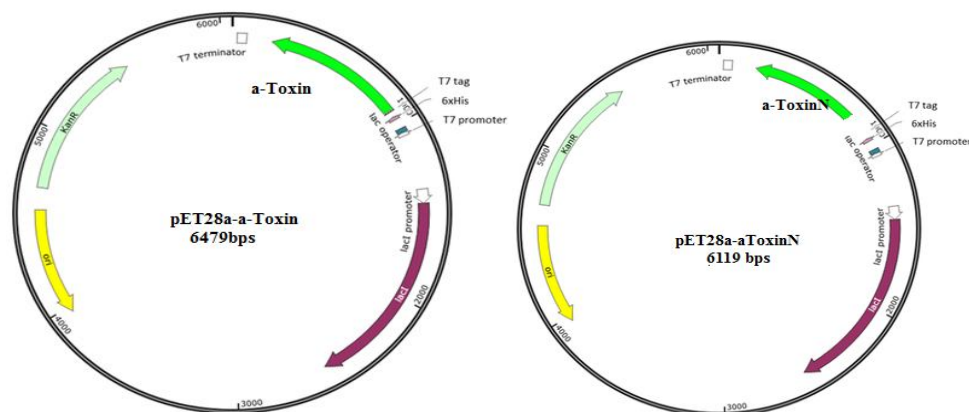
Figure 2. Results of PCR reactions using of *Clostridium perfringens* genomic template DNA. Lane 2. marker, VC 100bp plus DNA ladder. Line 1. N domain of alpha-toxin with 750 bps.



شکل 3. الکتروفورز محصولات حاصل از واکنش PCR با استفاده از DNA ژنومی استخراجی از باکتری کلسترییدیوم 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.

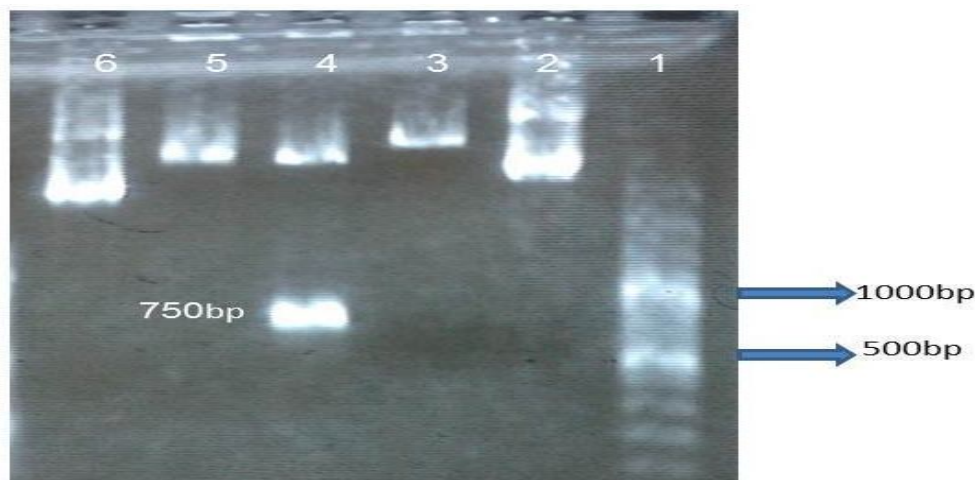
Figure 3. Results of PCR reactions using of *Clostridium perfringens* genomic template DNA. Lane 2. Marker, VC 50bp plus DNA ladder. Line 1. Full form of alpha-toxin with 1110 bps.

همساز ساختن شکل کامل و بخش ابتدایی ژن آلفا توکسین باکتری کلستریدیوم پرفرینجنس در باکتری *E. coli*: شکل 3 نقشه پلاسمیدهای نو ترکیب 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 نو ترکیب حاوی ساختمان کامل و بخش ابتدایی ژن آلفا توکسین باکتری کلستریدیوم پرفرینجنس را در باکتری میزبان نشان می‌دهد. برش دوگانه ناقل‌های نو ترکیب قطعات اضافی برابر با مقادیر مورد انتظار را علاوه بر اندازه پلاسمیدهای غیر نو ترکیب به طور واضح نشان می‌دهد. قطعات ژنی برش خورده و جدا شده برابر با اندازه‌های 1110 و 750 جفت باز بودند که کلون نمودن ژنهای آلفا توکسین را تایید می‌کند (شکل 5 و شکل 6).



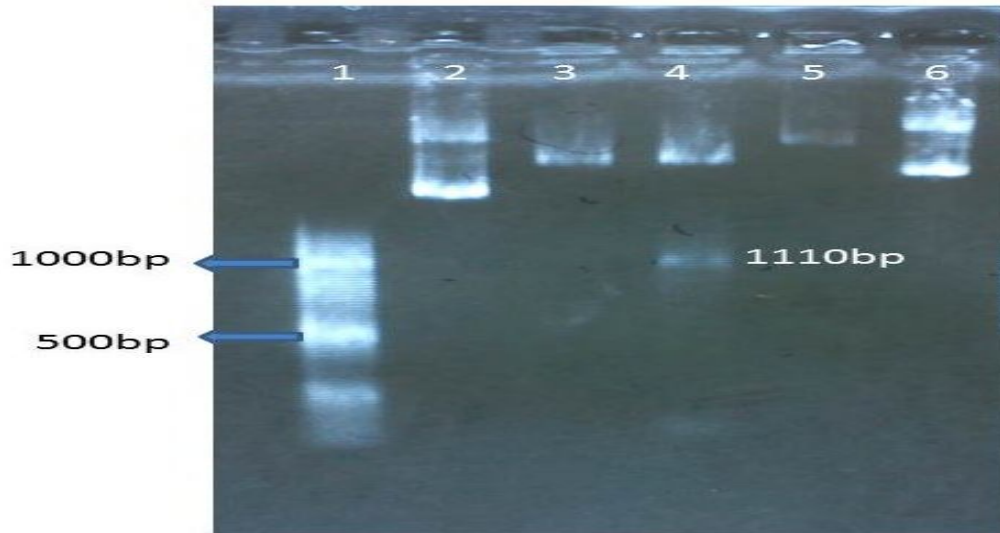
شکل 4. نقشه پلاسمیدهای نو ترکیب pET28a-aToxinN حاوی بخش ابتدایی یا N ژن آلفا توکسین (سمت راست) و پلاسمید نو ترکیب pET28a-a-Toxin حاوی شکل کامل ژن آلفا توکسین (سمت چپ). مکان کلون شدن قطعات ژنی فوق در ناحیه برش آنزیمهای چند گانه و بعد از پروموتور T7 می باشند که به رنگ سبز مشخص شده است.

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 length of alpha-toxin gene (Left). The site of cloned the genes of interest is in MCS after T7 promoter and detected green color.



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



شکل 6. برش آنزیمی پلاسمیدهای نو ترکیب pET28a-a-Toxin و غیر نو ترکیب pET28a. 1. مارکر 100 جفت بازی (VC 100bp plus DNA ladder)، 2. پلاسمیدهای غیر نو ترکیب غیر برشی pET28a. 3. پلاسمید غیر نو ترکیب تک برشی pET28a با آنزیم برشی *HindIII*. 4. پلاسمید نو ترکیب برش دوگانه pET28a-a-Toxin با آنزیمهای برشگر دوگانه *HindIII* و *XhoI* و مشاهده قطعه کلون شده، 5. پلاسمید نو ترکیب برش خورده pET28a-a-Toxin با آنزیم برشی *HindIII*. 6. پلاسمید نو ترکیب 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 کلسترییدیوم پرفرینجنس با فعالیتهای متعدد بیماری زایی فسفولیپازی، اسفنگولیپومینازی و بیولوژیکی منجر به سلسله واکنشهای زیادی در سلول شده و نهایتاً باعث تخریب سلول، کشندگی و تخریب پوستی می گردد. سم فوق مهمترین عامل درگیر در ایجاد بیماری قانقاریای گازدار است (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

کلیستریدیوم 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).

بهره گیری از روش های مهندسی ژنتیک سبب تولید داروها و واکسن های نوترکیب یا واکسن های نسل دوم گردیده است. واکسن هپاتیت که قبلاً با استفاده از پلاسمای خون بیماران مبتلا به هپاتیت تهیه می شد و خطر انتقال عوامل ویروسی چون هپاتیت C و ایدز و سایر عوامل عفونی ناشناخته را داشت جای خود را به واکسن های نوترکیب هپاتیت که امروزه به عنوان یک واکسن مطمئن با کاربرد گسترده داده است. 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 آنزیم های برشی از پلاسمید نوترکیب جدا، در پلاسمید p^{CDNA3} ساب کلون 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 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 توالی های 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 لاکتوکوکوس لاکتیس 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 توپ های نوترکیب در لاکتوکوکوس لاکتیس (قسمتی از یک آنتی ژن که توسط سیستم دفاعی تشخیص داده می شود) 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. ماهی های 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

محصول D1 و D4 ژن ایروولیرین تولید آنتی بادی IgM را در تیلاپیا نیز نشان داد. به طور نسبی تزریق داخل صفاقی D1 و D4 حدود 55-82 درصد بقا را در مقابل عفونت ایروموناس ایجاد کرد در حالی که مصرف خوراکی واکسن بقا را حدود 70-100 درصد ایجاد نمود. نواحی D1 و D4 پروتئین ایروولیزین 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 کلوستریدیوم 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 تزریق 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 مثلاً "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 تزریق شدند. تولید آنتی بادی های پروتئینهای تزریقی در پلاسمای خون حیوانات آزمایشی مشاهده شد (Marcos et al. 2016).

در یک بررسی قدیمی تر ژن کشنده 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 کلوستریدیوم پرفرینجنس با استفاده از دومین C ژن آلفاتوکسین که نوترکیب شده بود نیز بررسی شد. برای این منظور بخش انتهایی ژن آلفاتوکسین به گلوپاتینون-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 کلوستریدیوم 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 کلوستریدیوم پرفرینجنس را امکان‌پذیر ساخت. در نهایت اثبات کلونینگ و بیان بخش اول ژن آلفاتوکسین بیماری‌زا در موجود میزبان این امکان را می‌دهد که 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 می‌توان 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 کارایی بالا که حتی مصرف خوراکی نیز می‌توانند 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

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. اولاً "پرایمرهای طراحی شده برای تکثیر این ژن اختصاصی‌اند. ثانیاً" به عنوان یک مارکر جهت شناسایی و طبقه‌بندی این باکتری‌ها می‌توانند مورد استفاده واقع شوند. ثالثاً" با تولید پروتئین نوترکیب و تزریق آن به حیوانات امکان استفاده از این پروتئین سمی را به عنوان واکسن احتمالی می‌توان مورد بررسی قرار داد.

منابع

کریمی علی (1381) مقدمه ای برواکسنهای ژنی. تهران انتشارات دانشگاه امام حسین، شماره شابک 9644521293، 2001.
 ناصری فر راضی، غفاری فر فاطمه، دلیمی اصل عبدالحسین، شریفی زهره (1390) کلونینگ ژن GRA5 توکسوپلازما گوندای سوبه RH در پلاسمید یوکاریوت بیانی pCDNA3 و بیان آن در سلول. مجله علمی دانشگاه علوم پزشکی ایلام. 19(3)، 1-12.

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.

- 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.

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

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.