

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 perfringens is an anaerobic, 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 been cloned.

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

¹Biology Department, Basic Sciences Faculty, Urmia Branch, Islamic Azad University, Urmia, Iran

²Razi 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 its 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

کلونینگ ژن *Tpel* کلاستریدیوم پرفرینجنز در باکتری *اشریشیا کلی*

هیمن مامندی MSc

گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، واحد ارومیه، دانشگاه آزاد اسلامی، ارومیه، ایران

بهرام گلستانی ایمانی* PhD

گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، واحد ارومیه، دانشگاه آزاد اسلامی، ارومیه، ایران

رضا پيله چيان لنگرودی PhD

موسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران

چکیده

توکسین *Tpel* کلاستریدیوم پرفرینجنز با فعالیت سیتوتوکسیتی در تیپ‌های A، B و C در سال‌های اخیر شناسایی شده است. باکتری کلاستریدیوم 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 کلاستریدیوم پرفرینجنز تیپ B استفاده شد. توکسین *Tpel* موجب ایجاد بیماری‌های روده‌ای به‌ویژه عفونت‌های روده‌ای در انسان و بیماری آنتریت نکروتیک طیور می‌شود. در این مطالعه DNA ژنومی کامل به روش فنل-کلروفرم استخراج و از روش واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (PCR) برای جداسازی ژن *Tpel* به‌وسیله یک جفت پرایمر اختصاصی از DNA ژنومی کامل باکتری استفاده شد. محصول PCR پس از اتصال به وکتور pTZ577RL/T-کلونینگ در باکتری *اشریشیا کلی* (*E. coli*) سویه TOP10 مستعد کلون شد و سپس روش PCR کلونی برای غربالگری کلونی‌های باکتری ترانسفورم شده 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: کلاستریدیوم پرفرینجنز، توکسین *Tpel*، TA-کلونینگ، وکتور pTZ577RL/T

تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۰۵/۲۴

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۱۱/۱۷

*نویسنده مسئول: golestani_bahram@yahoo.com

مقدمه

گونه پرفرینجنز یک باکتری گرم مثبت، میله‌ای شکل، تشکیل‌دهنده اسپور و بی‌حرکت از جنس کلاستریدیوم 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 کلاستریدیوم پرفرینجنز عوارضی مانند نکروز بافت، باکتری می (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 کلاستریدیوم 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 کلاستریدیا، خانواده توکسین‌های بزرگ کلاستریدایی (LCTs) را تولید می‌کنند و بسیاری از LCTs فاکتورهای ویروالانس انسان و حیوان محسوب می‌شوند. توکسین‌های A (TcdA) و B (TcdB) کلاستریدیوم دیفیسیل، توکسین همورازیک TcsH و توکسین کشنده TcsL کلاستریدیوم سورلی و نیز آلفاتوکسین (TcnA) کلاستریدیوم نووآی، از این خانواده هستند. به‌تازگی مشخص شده است که *Tpel* کلاستریدیوم

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 ۲۰۵ کیلودالتون بزرگ‌ترین توکسین در میان هفده توکسین کلاستریدیوم پرفرینجنز است، اما یک واریته آن با فعالیت کمتر و با وزن مولکولی حدود ۱۵ کیلودالتون 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 کلاستریدایی که در انتهای فاز ثابت به محیط کشت رها می‌شوند متفاوت است. برخی از مطالعات نشان داده‌اند که این توکسین هنگام اسپوروژن 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 آنتریت نکروتیک 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* کلاستریدیوم 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 کلاستریدیوم پرفرینجنز تیپ B (CN-1795) از موسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی تهیه شد و پس از حل‌کردن باکتری لیوفیلیزه درون محیط کشت نوترین‌براث، به لوله حاوی عصاره جگر انتقال و به شیوه بی‌هوازی در آنکوباتور ۳۷°C کشت داده شد. روز بعد دوباره کشت داده و پس از ۵ ساعت 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 پلیمرز (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*

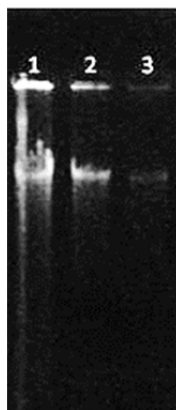
پرایمر ژن <i>Tpel</i>	توالی	دمای ذوب (°C)	طول قطعه (جفت‌باز)
رفت	5' AAT CAT ATG GAT TAT AAA GCG CAA 3'	۵۵/۱۱	۲۴۸۴
برگشت	5' GGT CTC GAG ATC TCT ATA TCC TAT 3'	۵۵/۷۴	

واکنش PCR در حجم ۲۵ میکرولیتر شامل ۰/۵ میکرولیتر از هر کدام از پرایمرها، ۰/۵ میکرولیتر DNA نمونه، ۱۲/۵ میکرولیتر مسترمیکس و ۱۱ میکرولیتر آب مقطر استریل و برنامه دمایی به شرح زیر بود:

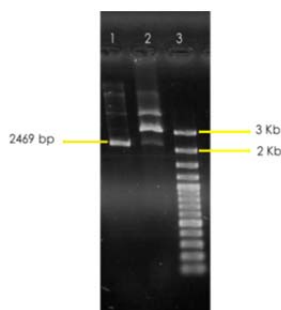
دنا‌توراسیون اولیه در ۹۵°C به مدت ۵ دقیقه و ۳۰ چرخه شامل دنا‌توراسیون در ۹۵°C به مدت ۱۰ دقیقه، ۵۶°C به مدت یک دقیقه و ۷۲°C به مدت ۲۰ دقیقه بوده و در پایان گسترش نهایی در ۷۲°C به مدت ۱۰ دقیقه انجام شد. محصولات PCR روی ژل آگارز ٪۱ در

در محیط LB آگار آمپی‌سیلین‌دار و بدون آمپی‌سیلین کشت داده شود که پس از ۵ الی ۶ ساعت انکوبه کردن، روی محیط LB حاوی آمپی‌سیلین کلنی‌های موردنظر تشکیل شد که در شکل ۳ و ۴ قابل مشاهده است.

PCR کلونی: نتایج بررسی PCR کلونی انجام شده با کلنی‌های نوترکیب *E. coli/Top10/pTZ57R/T* رشد کرده روی محیط LB حاوی آمپی‌سیلین به وسیله 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) ژنومیک کسترییدیوم پرفرینجنز تیپ B: ۱: DNA ژنومیک کسترییدیوم پرفرینجنز



شکل ۲) وکتور نوترکیب



شکل ۳) پلیت LB آمپی‌سیلین‌دار حاوی تک‌کلنی‌های ترانسفورم شده با وکتور نوترکیب

ولتاژ ۸۰ و به مدت ۳۰ دقیقه الکتروفورز شد.

کلونینگ ژن *Tpel* در وکتور pTZ57R/T: وکتور pTZ57R/T با اندازه ۲۸۸۷ جفت‌باز 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 DNA تک‌پلیمرز 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)، یک میکرولیتر آنزیم DNA لیگاز T4 در حضور ۶ میکرولیتر بافر اتصال ۵x، ۴ میکرولیتر محصول PCR، ۱۶ میکرولیتر آب بدون نوکلئاز و ۳ میکرولیتر وکتور pTZ57R/T درون یک میکروتیوب مخلوط و به مدت 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 ترانسفورم شده 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 مشاهده شده در محیط کشت LB آگار حاوی آمپی‌سیلین، تک کلنی‌های موجود در محیط مذکور را مجدداً به پلیت‌های حاوی محیط آمپی‌سیلین‌دار که به چهار قسمت تقسیم شده بود پاساژ داده و بعد از انکوبه شدن در ۳۷°C به مدت ۵ ساعت از کلنی‌های موجود برای انجام PCR کلونی (Colony PCR) استفاده شد.

PCR کلونی با همان برنامه دمایی ذکر شده و پرایمرهای استفاده شده در PCR اولیه صورت پذیرفت ولی در اجزای واکنش از هر یک از پرایمرها یک میکرولیتر، ۱۲/۵ میکرولیتر مسترمیکس، ۱۰/۵ میکرولیتر آب مقطر استریل و به جای 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 استخراج شده 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.

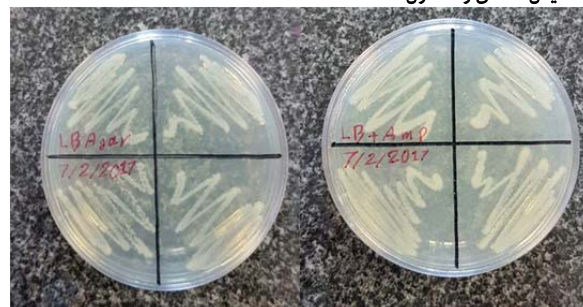
نتیجه اتصال ژن کلون‌شونده *Tpel* به وکتور pTZ57R/T: پس از لایگیشن، ژن *Tpel* کسترییدیوم پرفرینجنز تیپ B به اندازه ۲۴۶۹ جفت‌باز تکثیر شده با PCR به وکتور pTZ57R/T (که دارای ۲۸۸۶ جفت‌باز است) متصل و وکتور نوترکیب تشکیل شد که در شکل ۲ باند مربوط به این وکتور روی ژل آگارز ۱٪ مشاهده می‌شود.

ترانسفورماسیون و غربالگری کلنی‌های حاوی وکتور نوترکیب: وکتور pTZ57R/T به دلیل 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

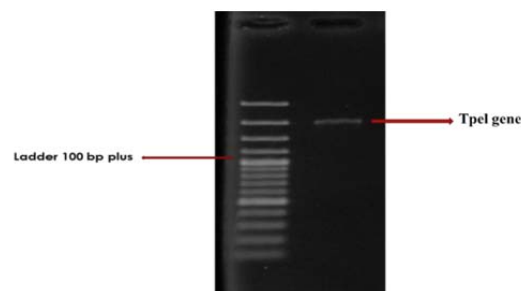
مزایای روش PCR کلونی می‌توان به جلوگیری از ریسک آلودگی در حین استخراج DNA، صرفه‌جویی در زمان، استفاده از لوازم و مواد ساده بدون نیاز به پروسه‌های مختلف برای استخراج DNA و نیاز به حداقل مواد کشت اشاره کرد. روش PCR کلونی یک روش سریع و یک برنامه کاربردی منظم برای توسعه PCR کشت‌های سلولی باکتریایی، لاین‌های 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 پلاسמיד 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 به منظور بهینه‌سازی، از روش PCR کلونی با پرایمرهای طراحی شده برای PCR در مرحله تکثیر ژن استفاده شد. در مطالعه حاضر وکتور pTZ57R/T به عنوان ناقل به کار رفت. با استفاده از این وکتور برای غربالگری نوترکیب‌ها می‌توان از روش PCR کلونی به جای 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 به وسیله وکتور پلاسמיד نوترکیب ترانسفورم شده باشند در محیط حاوی آمپی‌سیلین رشد می‌کنند. در اینجا ابتدا برای ایجاد وکتورهای نوترکیب از روش TA- کلونینگ استفاده کردیم بدین صورت که آنزیم DNA تک‌پلیماز که در تکثیر DNA طی مراحل PCR استفاده شد یک نوکلئوتید آدنین را به انتهای ۳' محصولات خود اضافه می‌کند. پس همه محصولات تولید شده 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 نوکلئوتیدهای غیرالگو به پایانه ۳' انتهای صاف DNA دورشته‌ای یک ویژگی عمومی DNA پلیماز است از این لحاظ که تعدادی از آنزیم‌های مختلف این پدیده را نشان می‌دهند [13]. این آنزیم‌ها شامل DNA پلیمازهایی از چندین یوکاریوت، پروکاریوت، یوآکترها و رتروویروس‌های وابسته به مرغان بود. همه این آنزیم‌ها یک اولیتی را برای استفاده از dATP برای افزودن انتهای صاف انجام دادند. این ویژگی در هر دو گونه یوکاریوت و پروکاریوت مشترک است. توانایی افزودن نوکلئوتید غیرالگو یک ویژگی جالب و غیرمنتظره را از DNA پلیماز نشان داد. چندین پلاسمید TA برای کلونینگ در *E. coli* در دسترس است. پلاسمید TA هم توسط محدودیت انتهای صاف هضم یک پلاسمید به دنبال افزودن دنباله‌های تیمیدین با استفاده از DNA پلیماز تک [14] و هم با استفاده از آنزیم‌های محدودکننده که دنباله‌های ۳' تکی ایجاد می‌کنند، می‌توان مورد استفاده قرار گیرد. در ۱۹۹۱ برای اولین بار یک روش عمومی برای کلونینگ مستقیم قطعات DNA تولید شده، توسط توسعه آنزیمی براساس قابلیت هضم وکتور کلونینگ با آنزیم اندونوکلاز محدودگر برای به‌ثمررساندن یک واحد مولکول خطی با دنباله دئوکسی‌تیمیدین جفت نشده 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 تک‌پلیماز



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



شکل ۵) ژن کلون شده *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 کشته شده کلستریدیایی به طور 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 به منظور جداسازی، خالص‌سازی، وارد کردن 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 داده شده استفاده شد. پیل‌چپان 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 مورد نظر 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

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 its 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.

در هر دو انتها فراهم می‌آیند که دیوید کوو/لیک 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]. چون و همکاران کشف کردند که استفاده از آنزیم‌های محدودکننده 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 ۲۴۶۹ جفت‌بازی 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 کلوستریدیوم 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 توکسین‌های دیگر این باکتری ضروری بوده و کلونینگ و بیان توکسین‌های دیگر این‌گونه باکتریایی پیشنهاد می‌شود. برای تهیه واکسن‌های کلوستریدیایی، 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 ۲۴۶۹ جفت‌بازی 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.

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 به دلیل یاری‌ها و راهنمایی‌های بی‌چشم‌داشت ایشان که بسیاری از سختی‌ها را برایم آسان‌تر نمودند نهایت تشکر را دارم.

تأییدیه اخلاقی: به دلیل اینکه در پژوهش حاضر روی نمونه انسانی و حیوانی عملی صورت نگرفت، تأییدیه اخلاقی لازم نبود.

تعارض منافع: هیچ‌گونه تعارض منافی وجود ندارد.

سهم نویسندگان: هیمن مامندی (نویسنده اول)، نگارنده مقدمه/پژوهشگر اصلی (۳۴٪)؛ بهرام گلستانی ایمانی (نویسنده دوم)، روش‌شناس (۳۳٪)؛ رضا پیله‌چیان لنگرودی (نویسنده سوم)، نگارنده بحث (۳۳٪)