زیست شناسی ملکولی *کلستریدیوم پرفرینجنز* با تاکید بر ژن های توکسین اپسیلون و توکسین بتا

پیله چیان لنگرودی، ر.

دریافت: ۱۳۹۱/۱۰/۰۹ پذیرش: ۱۳۹۱/۱۲/۰۸

خلاصه

کلستریدیوم پرفرینجنز از گروه باسیل های بی هوازی گرم مثبت هاگ زا است که در خاک، رسوبات و سیستم گوارشی انسان و حیوانات زیست می کند و تعداد زیادی توکسین تولید می کند که مسئول ویرولانس آن بوده و بر اساس بیشترین میزان تولید هر یک از توکسین ها به پنج تیپ A، B، C، D، E طبقه بندی می گردد. توکسین های این باکتری از جنس پروتئین بوده و اگزوتوکسین هستند. مطالعات اخیر مشخص کرده اند که هفده نوع اگزوتوکسین توسط *کلستریدیوم پرفرینجنز* ترشح می شود که چهار توکسین اصلی آن آلفا، بتا، اپسیلون، یوتا و برخی از توکسین های فرعی آن به نام های سیگما، تتا، کاپا، لامبدا، مو، نو، نورآمینیداز (سیالیداز) و انتروتوکسین شناخته می شوند. در سال ۱۹۹۳ نقشه *کروموزومی کلستریدیوم پرفرینجنز* به عنوان اولین نقشه کروموزومی کلستریدیائی حاوی جزئیات در باکتری های گرم مثبت ترسیم گردید. طی سال های اخیر مطالعات زیادی در سطح ملکولی و ساختار ژنتیکی و چگونگی کلونینگ و بیان ژن های کلستریدیائی، بویژه ژن های اپسیلون و بتا *کلستریدیوم پرفرینجنز* در ایران و جهان صورت گرفته است که در این مقاله به بیان این مطالعات پرداخته شده است.

واژه‌های کلیدی: *کلستریدیوم* ، ساختار ملکولی، ژن، توکسین، نوترکیبی

---

۱. موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی، بخش تحقیق و تولید واکسن های بی هوازی، کرج، ایران

*نویسنده مسؤول: **r.pilehchian@rvsri.ac.ir**

مقدمه

باکتری های بی هوازی به دو گروه تقسیم می شوند، باکتری های بی هوازی بدون هاگ که در تولید بعضی بیماری ها و عفونت های انسان و دام اهمیت دارند و باکتری های بی هوازی هاگ دار که مهمترین جنس آن کلستریدیوم ها(*Clostridium*) بوده و نقش مهمی در ایجاد بیماری های انسان و دام دارند. تاکنون بیش از ۱۱۸ گونه (species) کلستریدیوم شناسائی شده که حدود ۱۵ گونه آن برای انسان و دام بیماری زا می باشند. کلستریدیوم ها دارای انواع متعدد و برخی از آنها دارای تیپ های مختلفی بوده و بسیاری ازانواع و تیپ های آن برای انسان و دام بیماری زا هستند. این باکتری ها در خاک، آب و دستگاه گوارش انسان و دام زندگی می کنند و چنانچه شرایط زندگی و رشد آنها در بدن موجود زنده و حساس فراهم گردد بسرعت تکثیر یافته و با ترشح توکسین بیماری های خطرناک و کشنده ای ایجاد می نمایند. بیش از دو دهه است که مطالعات ملکولی و تحقیقات مهندسی ژنتیک و کلونینگ و بیان ژن های کلستریدیائی در حال انجام می باشد. در این مقاله ژنتیک ملکولی *کلستریدیوم پرفرینجنز* با تاکید بر توکسین اپسیلون *کلستریدیوم پرفرینجنز* تیپ D و توکسین بتا *کلستریدیوم پرفرینجنز* تیپ B مورد بررسی و تجزیه وتحلیل قرار گرفته است.

ساختارآنتی ژنیک کلستریدیوم ها

براساس تفاوت ترکیب بازهای نوکلئوتیدی DNA در گونه های مختلف جنس کلستریدیوم، به نظر می رسد که اعضا این جنس می بایست حداقل در دو جنس قرار داده شوند. درصد G+C و میزان حفاظت SrRNA ۲۳ در ۵۴ گونه کلستریدیوم، چهار گروه پیشنهاد شده است که در سه گروه محتوی G+C ژنوم کمتر از ۲۲ – ۳۲ درصد و در گروه چهارم بیشتر از ۴۱ – ۴۵ درصد است. گروه اول شامل ۴۷ سویه از ۳۳ گونه است که اغلب کلستریدیوم های بیماری زا را نیز شامل می شود و دارای G+C ۲۲ – ۲۹ درصد می باشد (Rood و همکاران ۱۹۹۸). در جنس کلستریدیوم سه گروه آنتی ژنی وجوددارد. گروه اول آنتی ژن های پلی ساکاریدی کپسول است که فقط به باکتری *کلستریدیوم پرفرینجنز* *Clostridium perfringens* (*C. perfringens*) محدود می باشد. گروه دوم آنتی ژن های فلاژل و دیواره سلولی است که در همه سویه ها دو آنتی ژن سوماتیک ۱ و۲ و پنج آنتی ژن تاژکی a, b, c, d, e وجود دارد. گروه سوم توکسین ها و آنتی ژن هایی با فعالیت زیست شناختی هستند. جنس کلستریدیوم پروتئین هایی با گسترهٔ وسیعی از فعالیت های متفاوت زیستی تولید می کند که بسیاری از آنها در ایجاد بیماری در انسان و دام دخالت دارند. در میان باکتری ها، کلستریدیوم بیشتر از هر جنس دیگری توکسین تولید می کند. در این جنس علاوه بر پروتئین های خارج سلولی که در بیماری زایی دخالت دارند بیش از ۲۰ توکسین نیزشناخته شده است. ژن های کروموزومی برخی از توکسین های کلستریدیائی، با فاژهای لیزوژن به کروموزوم وارد شده است ولی در مورد ژن های سایر توکسین ها، فاژ شناخته نشده است. برخی از ژن ها از جمله آنترو توکسین *کلستریدیوم پرفرینجنز* (جدا شده از بیماری انسانی)، خارج کروموزومی بوده و در پلاسمید قرار دارند و وجود این فاکتورهای بیماری زا بر روی عناصر ژنتیکی متحرک و خارج کروموزومی می تواند به عدم پایداری ژنتیکی باکتری منجر گردد (Topley و همکاران ۲۰۰۵). مقابله با بیماری های کلستریدیومی از طریق واکسیناسیون صورت می پذیرد. در سال۱۹۶۷ در ایران جدا سازی سویه های توکسیژنیک *کلستریدیوم پرفرینجنز* از خاک گزارش شده است (Ardehali و همکاران ۱۹۶۷، ۱۹۷۹، ۱۹۹۴)، همچنین بیش از ۶ دهه است که واکسن های کلستریدیائی در ایران به تولید و مصرف می رسند (Rafyi و Ardehali ۱۹۶۱؛ Moosawi و همکاران ۱۹۹۲؛ Ardehali و همکاران ۱۹۹۲؛ Ardehali و Derakhshan ۱۹۷۴). با توجه به پیشرفت های تکنولوژیک اخیر، هم اکنون تولید این واکسن ها در فرمانتور صورت می پذیرد (Pilehchian و همکاران ۲۰۱۲).

کلستریدیوم پرفرینجنز

کلستریدیوم پرفرینجنز از گروه باسیل های بی هوازی گرم مثبت هاگ زا و از راسته *Clostridiales* و خانواده *Clostridiaceae* و جنس *Clostridium* است که در خاک، رسوبات و سیستم گوارشی انسان و حیوانات زیست می کند و اولین بار در سال ۱۸۹۲ با نام *Bacillus aerogenes capsulatus* معرفی شد (Welch، ۱۸۹۲) و مسئول ایجاد طیف وسیعی از بیماری ها شامل مسمویت غذائی، گاز گانگرن و انتریت نکروزی، عفونت های معدی–روده ای با منشاء غیرخوراکی در انسان و انتروتوکسمی، قلوه نرمی و عفونت های سیستم گوارشی در دام بوده که می تواند به سرعت منجر به مرگ گردد (Rood و Cole ۱۹۹۱). این باکتری تعداد زیادی توکسین تولید می کند که مسئول ویرولانس آن بوده و بر اساس بیشترین میزان تولید هر یک از توکسین ها به پنج تیپ A، B، C، D، E طبقه بندی می گردد. باسیلی است غیر متحرک و دارای کپسول، گرم مثبت به طول ۲ – ۴ میکرون و عرض ۰/۵ – ۱/۵ میکرون، هاگ بیضی شکل که مرکزی و یا نزدیک به انتها بوده و در شرایط معمولی در پیکرهٔ باکتری مشاهده نمی گردد (Brooks و همکاران ۱۹۵۷).

توکسین های *کلستریدیوم پرفرینجنز*

توکسین های این باکتری از جنس پروتئین بوده و اگزوتوکسین می باشند.

هفده نوع اگزوتوکسین توسط *کلستریدیوم پرفرینجنز* ترشح می شود که چهار توکسین اصلی آلفا، بتا، اپسیلون، یوتا (جدول۱) و برخی از توکسین های فرعی آن به نام های سیگما، تتا، کاپا، لامبدا، مو، نو، نورآمینیداز (سیالیداز) و انتروتوکسین می باشند (Smith، ۱۹۷۹). اخیرا گزارشی مبنی بر اینکه این باکتری به طور بالقوه می تواند تا ۳۰ توکسین تولید کند منتشر شده است (Lebrun و همکاران ۲۰۱۰). تعیین تیپ جدایه ها بر حسب چهار توکسین اصلی و تعیین زیر تیپ ها با شناسائی توکسین های فرعی انجام می گردد. برخی توکسین های کلستریدیائی مانند توکسین بتا *کلستریدیوم پرفرینجنز* تیپ های B و C به هنگام ترشح فعال هستند. این توکسین ها عامل اصلی نکروز در روده دام و انسان بوده و از توکسین های کشنده این باکتری می باشند. برخی دیگر مانند توکسین اپسیلون تیپ D غیرفعال بوده و بصورت پروتوتوکسین ترشح می شوند و بوسیله آنزیم های پروتئولیتیک مانند ترپیسین سیستم گوارش فعال می گردند و خاصیت کشندگی و نکروتیک پیدا می کنند. در مورد توکسین اپسیلون تیپD پس از این برش LD_{50}=70 ng/kg شده و توکسیسیتی توکسین تا هزار برابر افزایش نشان می دهد (Rood و Cole ۱۹۹۱؛ Miyata و همکاران ۲۰۰۱). توکسین اپسیلون موجود در سوسپانسیون حاصل از کشت ۵ ساعته *کلستریدیوم پرفرینجنز* به روش اولترا فیلتراسیون و دیالیز با سولفات آمونیوم تغلیظ و به طور نسبی تخلیص شده و تاثیر مایع روئی حاصل از فیلتراسیون باکتری در مورد اندام زائی جنین های موش سفید کوچک آزمایشگاهی بررسی گردید و نتایج کاهش معنی دار قد و وزن را نشان داد (پیله چیان لنگرودی و همکاران ۱۳۷۵). باکتری *کلستریدیوم پرفرینجنز* انواع توکسین ها را در مراحل اولیه رشد (آغاز رشد تا میانهٔ فاز لگاریتمی) تولید می کند که این خود نشان دهنده نیاز باکتری به این توکسین ها است تا طی تجزیه و تخریب سلول میزبان، مواد غذائی لازم برای رشد خود را بدست آورد، لذا بیماری زائی و تامین نیازهای غذائی در عفونت های *کلستریدیوم پرفرینجنز* بشدت به یکدیگر وابسته اند و این ویژگی منحصر بفرد احتمالا می تواند باعث مهار رشد و ممانعت از عفونت به این باکتری گردد (Shimizu و همکاران ۲۰۰۲).

ژنتیک *کلستریدیوم پرفرینجنز*

تحقیقات سال های ۱۹۸۹و ۱۹۹۵ منجر به ترسیم نقشه کروموزومی *کلستریدیوم پرفرینجنز* سویه پاتوژن انسانی CPN50 به عنوان اولین نقشه کروموزومی کلستریدیائی حاوی جزئیات در باکتری های گرم مثبت گردید. این باسیل حاوی یک کروموزوم حلقوی ۳/۵۸ میلیون جفت بازی است که بیش از یکصد جایگاه برش آنزیم اندونوکلئاز محدودکننده و ۲۴ مکان ژنی روی آن مشخص گردیده است (Canard و Cole ۱۹۸۹; Katayama و همکاران ۱۹۹۵).

سال ها از فرم بدون دیواره *کلستریدیوم پرفرینجنز* برای ترانسفورم کردن آن استفاده می شد و دو شکل اتوپلاست و L–form آن کاربرد زیادی داشتند. مطالعات بعدی نشان دادند که نفوذ پذیر کردن غشاء سلولی به روش الکتریکی برای این باکتری قابل استفاده است و امروزه بیشتر از این روش استفاده می شود. اولین تجربیات روی تیپ A سویه ۳۶۲۴ و با استفاده از پلاسمید انتروکوکال pAMBI و شاتل پلاسمید pHR106 صورت گرفت ولی سویه های ترانسفورم شدهٔ کمی بدست آمد. سال های بعد از سویه L–B استفاده شد و امروزه سویه ۱۳ بیشترین کاربرد را در ترانسفورماسیون دارد (Scott و Rood ۱۹۸۹).

کلستریدیوم پرفرینجنز تیپ A سویه ۱۳ یک سویه انتروتوکسین منفی و یک جدایهٔ طبیعی از خاک است که بدلیل سهولت ترانسفورماسیون کاربرد زیادی بعنوان مدل آزمایشگاهی داشته و دارای ۳۰۳۱۴۳۰ جفت باز است و ۲۶۶ منطقه رمز کننده روی آن تشخیص داده شده است. این سویه میزان G+C کمی (در حدود۲۸/۶٪) دارد و تراکم زیاد G+C فقط در نواحی رمزکننده ژن هایrRNA دیده می شود. این کروموزوم ۱۰ ژن rRNA و ۹۶ ژن tRNA دارد و منشاء همانندسازی آن در بالادست ژن *dnaA* قرار دارد (Shimizu و همکاران ۲۰۰۲).

در سال های اخیر ژن های بسیاری از کلستریدیای مزوفیلیک و ترموفیلیک جدا شده اند. این ژن ها پروتئین های زیادی نظیر شاخص های آنتی بیوتیکی، اکسیدو ردوکتاز، آنزیم های سولونتوژنز، توکسین ها، نیتروژنازها و آنزیم های سلولیتیک را رمز می کنند. ژن های توکسین اپسیلون (Goswami و همکاران ۱۹۹۶). توکسین بتا (Nijland و همکاران ۲۰۰۷) و توکسین آلفا یا فسفو لیپاز Cکلون شده و برخی نیز بیان شده اند (Okabe و همکاران ۱۹۸۹). در ایران شناسایی سریع *کلستریدیوم پرفرینجنز* تیپ های ، A،B ،C D به روش Multiplex PCR نجام شده (سعادتی و همکاران ۱۳۸۳) و سویه های *توکسیژنیک کلستریدیوم پرفرینجنز* جدا شده از گوسفند، مورد مطالعه قرار گرفته و تایپینگ ملکولی آنها انجام شده است (Jabbari و همکاران ۲۰۱۱).

توکسین اپسیلون *کلستریدیوم پرفرینجنز* تیپ D

ساختمان ژن توکسین اپسیلون

کلستریدیوم پرفرینجنز تیپ D، عامل ایجاد آنتروتوکسمی گوسفندان بوده و توکسین اصلی آن اولین بار در سال ۱۹۳۱ توسط Wilsdon

توصیف گردید و اپسیلون نامیده شد (Batty و Glenny ۱۹۴۷، Orlans و همکاران ۱۹۶۰).

در سال ۱۹۹۲ ژن اپسیلون تیپ B (*etxB*, NTCC 8533) و تیپ D(*etxD*, NTCC 8346) توالی یابی شد. با استفاده از پرایمرهائی که از *etxB* بدست آمد، هر دو رشته ORF در *etxD* توالی یابی شده و تشابه های زیادی بین این دو توالی نشان داده شد. توکسین اپسیلون در تیپ های B و D با یکدیگر واکنش متقاطع داشته، وزن ملکولی مشابهی دارند و تقریباً مشابه اند، جدول۲ توالی های پروموتری دو ژن را نشان می دهد. در توالی‌های رمزکننده دو تفاوت بین این دو ژن دیده می‌شود که اولی در ۷۶۲+ است که یک جهش خاموش بوده و در *etxB* رمز CAG و در *etxD* رمز CGG است که هر دو سرین را رمز می‌کنند. دومین تفاوت در منطقه ۹۶۲+ مشاهده می‌شود که یک جهش جایگزینی بوده و TCT را که در *etxB* سرین را رمز می‌کند، به TAT که در *etxD* تیروزین را رمز می‌کند، تبدیل می‌سازد. ولی این جهش حفاظت شده نیست و مطالعات نشان می‌دهد که توکسین اپسیلون *کلستریدیوم پرفرینجنز* تیپ B و D با یکدیگر واکنش متقاطع داشته، وزن ملکولی مشابهی دارند و تقریباً مشابه هستند (Havard و همکاران ۱۹۹۲).

محصول ژن توکسین اپسیلون (ساختمان پروتوتوکسین و توکسین)

توکسین اپسیلون توسط تعداد زیادی از محققین مستقل از یکدیگر تخلیص شده است. این توکسین به صورت غیرفعال (پروتوتوکسین) سنتز شده و طی فعالیت پروتئولیتیک آنزیم‌هائی نظیر تریپسین و کیموتریپسین، شکسته شده و به توکسین فعال تبدیل می‌گردد. وزن ملکولی آن توسط محققین مختلف از۲۳/۲ تا ۴۰/۵ کیلودالتون گزارش شده است (Mcdonel و همکاران ۱۹۸۶). ساکورائی وزن مولکولی پروتوتوکسین را بر مبنای ترکیب اسیدهای آمینه آن ۳۵۶۰۰ دالتون و بر مبنایSDS PAGE ۳۷۶۰۰ دالتون تخمین زده است. پروتوتوکسین حاوی یک زنجیره پلی پپتیدی ۳۱۱اسید آمینه‌ای است و وجود یک ملکول تریپتوفان، یک ملکول هیستیدین، یک ملکول تیروزین، سه یا چهار ملکول آسپارتیک یا گلوتامیک اسید و هشت ملکول لیزین برای فعالیت های کشندگی آن ضروری شناخته شده است (Sakurai و Nagahama ۱۹۸۷، ۱۹۸۵، Sakurai و همکاران ۱۹۸۵). حبیب در سال ۱۹۶۳ وزن مولکولی توکسین اپسیلون را بر مبنای ترکیب اسیدهای آمینه در حدود ۴۰۰۰۰ دالتون تخمین زد (Habeeb و همکاران ۱۹۶۳). در سال ۱۹۸۸ وزن ملکولی توکسین اپسیلون ۳۷/۶ کیلودالتون گزارش شد (Boarer و همکاران ۱۹۸۸).

وزن مولکولی توکسین فعال که پس از بریده شدن پروتوتوکسین بوسیله تریپسین حاصل می‌شود در حدود ۳۱۶۰۰ دالتون است که بر مبنای آنالیز SDS-PAGE بدست آمده است. (Bhown و Habeeb (۱۹۷۷)، نشان دادند که تریپسین در ناحیه ما بین لیزین شماره ۱۴ و آلانین شماره ۱۵ پروتوتوکسین بریده شده و یک قطعه کوچک ۱۴ اسید آمینه‌ای از پایانه آمینی آن جدا می شود و آن را به توکسین فعال با وزن مولکولی ۳۱۶۰۰ دالتون تبدیل می‌سازد. براساس گزارش Habeeb و همکاران (۱۹۶۳)، ملکول پروتوتوکسین ۲ ملکول تریپتوفان دارد، لیکن Sakuraiو Nagahama (a،۱۹۸۵ وb)، ثابت کردند که در هر ملکول پروتوتوکسین فقط یک ملکول تریپتوفان وجود دارد که در فعالیت کشندگی توکسین اهمیت داشته و با از بین رفتن آن فعالیت توکسین کاهش می‌یابد و از آنجائیکه این ملکول تریپتوفان با تیمارهای مختلفی نظیر (NBS)[1] و (NCS)[2] از بین می‌رود، بنابراین بنظر می رسد که این تریپتوفان در سطح ملکول پروتئین قرار داشته باشد. با برش پروتوتوکسین و تبدیل آن به توکسین، تریپتوفان در ساختمان توکسین ابقاء می‌گردد. طبق مطالعات Sakurai و Nagahama (a،۱۹۸۵ وb)، توکسین حداقل حاوی ۴۴ گروه کربوکسیل است که حدود ۷ گروه آن در سطح قرار می‌گیرند. در ساختمان پروتوتوکسین ۴۴ آسپارتیک اسید و یا ۴۴ آسپارژین وجود دارد. طبق مطالعات Habeeb و همکاران (۱۹۷۳)، پروتوتوکسین حداقل ۲ گلوتامیک اسید و یک آسپاراژین خود را طی فرآیند فعال شدن با تریپسین از دست می‌دهد. همچنین با تغییر گروه‌های کربوکسیل اختصاصی (آسپارتیک اسید و گلوتامیک اسید) روی سطح توکسین بدون اینکه ضرورتی وجود داشته باشد که فرم فضائی توکسین را تشخیص دهیم می‌توان توکسین را غیرفعال نمود (Habeebو همکاران ۱۹۷۳). مطالعات Sakurai و Nagahama (۱۹۸۷)، نشان می دهد که پروتوتوکسین حاوی سه ملکول هیستیدین است و مطالعات Habeebو همکاران (۱۹۷۳)، نشان داد که طی فعال شدن توکسین هیچیک ازاین هیستیدین‌ها از بین نمی‌روند ولی فقط یکی از آنها در سطح قرار می گیرد که از نظر فعالیت کشندگی توکسین ضروری است، جدول۳ ویژگی های ساختمانی توکسین اپسیلون را نشان می دهد.

بیان ژن توکسین اپسیلون نوترکیب

در سال ۱۹۹۲ ژن رمزکننده توکسین اپسیلون *کلستریدیوم پرفرینجنز* تیپ D کلون شد و با استفاده از پلاسمید pUC18 در *E. coli* بیان گردید. پروتئین بیان شده در فضای پیش پلاسمائی *E. coli* تجمع یافت که این یافته ها پیشنهاد می کند که پروتئین بیان شده همراه با یک

1. Bromosuccinimide
2. N-chlorosuccinimide

سیگنال پپتید که عبور آن را از غشاء سیتوپلاسمی امکان پذیر ساخته، تولید شده است. آنچه که این پیشنهاد را تائید می کند این واقعیت است که ژن *etx* تیپ D توالیی را رمز می کند که از نظر ساختمانی شبیه سیگنال پپتید است و باکتری نیز توکسین اپسیلون را در شرائط طبیعی به محیط کشت ترشح می کند (Hunter و همکاران ۱۹۹۲). در سال ۱۹۹۶ مجددا توکسین اپسیلون در *E. coli* تحت کنترل پروموتر فاژ T5 و با فیوز کردن ۶ ملکول هیستیدین بعنوان His Tag در پایانه آمینی آن کلون شد و پروتئین بیان شده بصورت گنجیدگی در سیتوزول *E. coli* تجمع یافت. بررسی ایمنی زائی این پروتئین در خرگوش نشان دادکه آنتی بادی علیه این پروتئین نوترکیب می تواند توکسین اصلی و غیرنوترکیب را نیز تشخیص دهد (Goswami و همکاران ۱۹۹۶). در ایران ژن توکسین اپسیلون *کلستریدیوم پرفرینجنز* تیپ D کلونینگ و توالی یابی شده و با شمارهٔ دسترسی HQ۱۷۹۵۴۶ در بانک ژن ثبت گردید (Pilehchian و همکاران ۲۰۱۱).

پاتوژنز توکسین اپسیلون

پروتوتوکسین تحت تاثیر پروتئازهای سیستم گوارشی مانند تریپسین و کموتریپسین موجب القاء یک تغییر معنی دار در نقطه ایزوالکتریک توکسین از۸/۳ در پروتوتوکسین به ۵/۴ در توکسین می گردد (Minami و همکاران ۱۹۹۷). توکسین اپسیلون در حیوانات آزمایشگاهی باعث افزایش فشار خون، افزایش نفوذ پذیری رگ ها، ادم و تراکم در اندام های مختلف از جمله ریه و کلیه می گردد. نکروز کلیه در بره هائی که در اثر انتروتوکسمی تلف شده اند مشاهده شده است (Sakurai و Nagahama ۱۹۸۳، Sakurai و همکاران ۱۹۸۳). توکسین اپسیلون با عبور ازسد خونی مِغز در مغز تجمع یافته و طی واکنش مستقیم با هیپوکامپ باعث رهاسازی بیش از حد گلوتامات می شود, (Sakurai و Nagahama ۱۹۹۱، ۱۹۹۸، Miyamoto و همکاران ۱۹۹۸، ۲۰۰۰). همچنین می تواند باعث نفوذ پذیری رگ ها، ادم و پریوازکولاری گردد که آن نیز سبب آسیب و نارسائی سیستم های عصبی می شود. بنابراین مرحله پایانی انتروتوکسمی با علائم عصبی نظیر بیقراری، لرزش و اپیستوتونوس مشخص می گردد (Payne و همکاران ۱۹۹۷). توکسین اپسیلون فعال شده به میزان۱۰۰ نانوگرم در هر کیلوگرم وزن بدن برای موش کشنده است. درآزمایش روی سلول های MDCK نشان داده شده است که توکسین با ایجاد کمپلکس های بزرگ روی غشاء سلولی مستقر شده و وارد سیتوزول نمی گردد. این کمپلکس ها باعث نفوذ یون K^+ به خارج از سیتوزول شده و به این ترتیب عبور و مرور یون هائی تا ۱ کیلو دالتون را بطور غیر انتخابی از غشاء امکان پذیر می سازند (Petit و همکاران ۲۰۰۱). توکسین یک منفذ هپتامریک درون میکرودومین های غیر محلول در غشاءهای سلولی MDCK و سیناپتوزوم های رات ایجاد و به این ترتیب غشاء های سلولی را نفوذ پذیر می کند، چگونگی تشکیل هپتامر در تصویر ۱ دیده می شود (Miyata و همکاران ۲۰۰۲). بر اساس مطالعات Buxton (۱۹۷۸b)، توکسین اپسیلون باعث افزایش غلظت آدنوزین۳-۵ مونوفسفات حلقوی (cAMP) در پلاسمای موش می‌گردد. انتروتوکسین مقاوم به حرارت *E. coli* ، انترتوکسین *V. cholerae* و دلتا توکسین *S. aureus* نیز تولید cAMP را در شرائط آزمایشگاهی در سلول های اپیتیال- موکوزال خوکچه هندی افزایش می‌دهند. با این تفاوت که دلتا توکسین *S. aureus* سیتوتوکسیک نیز می‌باشد. اپسیلون انتروتوکسینی است که با اتصال به رسپتورهای اختصاصی سطح سلولی در سلول های معینی مانند رگ های خونی، غشاءآپیکال سلول های پوششی لوپ هنله و لوله های درهم پیچیده دور در کلیه و سلول های سینوزوئیدی کبد موش، از طریق مکانیسمی که توسط سیستم آدنیل سیکلاز- آدنوزین منو فسفات حلقوی میانجیگری می‌شود، صدمات وسیعی ایجاد می کند. همچنین، توکسین در اتصال با بسیاری از رگ های مغز، هسته‌های سفید مخچه، پایه های مخچه، پل دماغی و پرده های مغز و مخچه، برخی از رگ های خونی کبد، بسیاری از سیاهرگ های مرکزی لوبول‌ها و سینوزوئیدهای کبدی مشاهده می‌شود (Buxton ۱۹۷۸،c, b, a). تاثیر فیلترات کشت ۵ ساعته *کلستریدیوم پرفرینجنز* بر روی وزن بدن موش سفید کوچک آزمایشگاهی بررسی گردید و نتایج کاهش معنی دار وزن را نشان داد (Pilehchian و همکاران ۱۹۹۶).

توکسین بتا *کلستریدیوم پرفرینجنز* تیپ B

باکتری *کلستریدیوم پرفرینجنز* تعدادی توکسین انتریک تولید می کند که در دستگاه معدی- روده ای انسان و دام ترشح می شوند. توکسین های انتریک شامل انتروتوکسین، اپسیلون، بتا و بتا۲، دارای دو ویژگی اصلی مشترک هستند: ۱. پلی پپتید های منفرد دارای وزن ملکولی متوسط ۳۵-۲۵ کیلو دالتون هستند. ۲. عموما از طریق تشکیل منفذ های اولیگومریک در غشاء پلاسمائی سلول میزبان فعالیت می کنند (تصویر ۲). مکانیزم فعالیت توکسین بتا۲ که به تازگی شناخته شده است هنوز مشخص نشده است (Smedley و همکاران ۲۰۰۴). اخیرا در مطالعه ای در ایران جدایه های *کلستریدیوم پرفرینجنز* واجد ژن بتا۲ مشخص و گزارش شده است (Jabbari و همکاران ۲۰۱۲). مطالعات نشان داده است که آرژنین ۲۱۲ اهمیت زیادی در فعالیت زیست شناختی توکسین بتا دارد و جایگزین کردن آن با

گلوتامیک اسید فعالیت آن را نسبت به تیپ وحشی به میزان ۱۱/۵ برابر کاهش می دهد، در حالیکه جایگزین کردن آن با گلوتامین فعالیت آن را ۵/۵ برابر کاهش می دهد. جایگزین کردن تیروزین ۲۰۳ با فنیل آلانین ۲/۵ بار افزایش را در LD^{50} ایجاد کرد که بیانگر نقش این اسیدآمینه در ساختمان و فعالیت پروتئین توکسین است. جایگزین کردن هر یک از اسیدهای آمینه هیستیدین با لوسین هیچگونه تغییری در فعالیت زیست شناختی توکسین بتا ایجاد نمی کند. مشخص شده است که اگرچه غیر فعال شدن پروتئین توکسین اکسیده شده بدلیل تغییر سیستئن است، لیکن حضور یک سیستئین نقشی در فعالیت زیست شناختی توکسین بتا ندارد. در این مطالعه ژن این توکسین با استفاده از پروموتر سیگنال پپتید اصلی آن در *B. subtilis* بیان و به میزان کارآمد در محیط کشت ترشح گردید (Steinthorsdottir و همکاران ۱۹۹۸).

ویژگی های ملکولی توکسین بتا

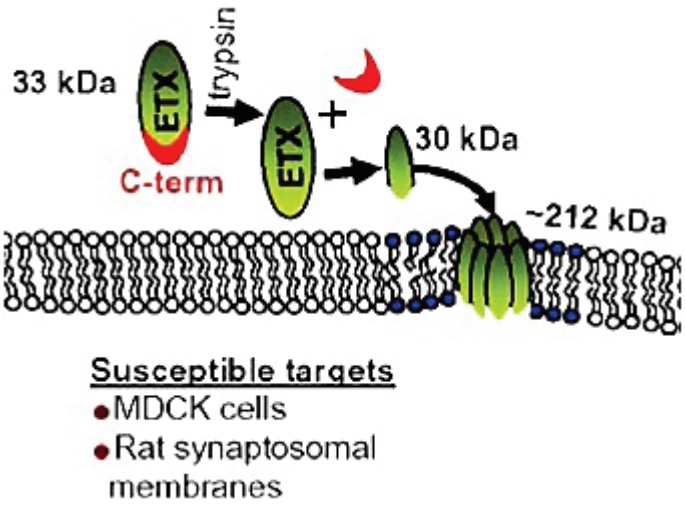
در سال ۱۹۹۳ توکسین بتا *کلستریدیوم پرفرینجنز* سویه NCTC 853 به لحاظ ژنتیکی مورد بررسی قرار گرفت و توالی نوکلئوتیدی ژن *cpb* تعیین و با آزمایش هیبریداسیون DNA مشخص گردید که این ژن فقط در تیپ های B و C وجود دارد. توالی اسید آمینه ای توکسین بتا با توکسین آلفا، توکسین گاما و لوکوسیدین *S. aureus* همسانی نشان می دهد. همچنین توکسین بتا تخلیص شده حالت منومریک و مولتی مریک را نشان می دهد. توکسین بتا نوترکیب بیان شده در *E. coli* عمدتا بصورت مولتی مریک است. در گزارش Duncan و همکاران (۱۹۷۸)، مطرح شده است که توکسین بتا *کلستریدیوم پرفرینجنز* بوسیله پلاسمید این باسیل رمز می شود، ولی گزارش Hunter و همکاران (۱۹۹۳)، نتوانسته است روشن کند که ژن این توکسین یک ژن پلاسمیدی است یا کروموزومی. مطالعات Sayeed و همکاران (۲۰۱۰)، Gurjar و همکاران (۲۰۱۰)، به ترتیب نشان می دهد که *cpbB* و *cpbC* روی پلاسمید هائی به وزن ۶۵ تا ۱۱۰ کیلو باز قرار دارند .

بیان توکسین بتا نوترکیب

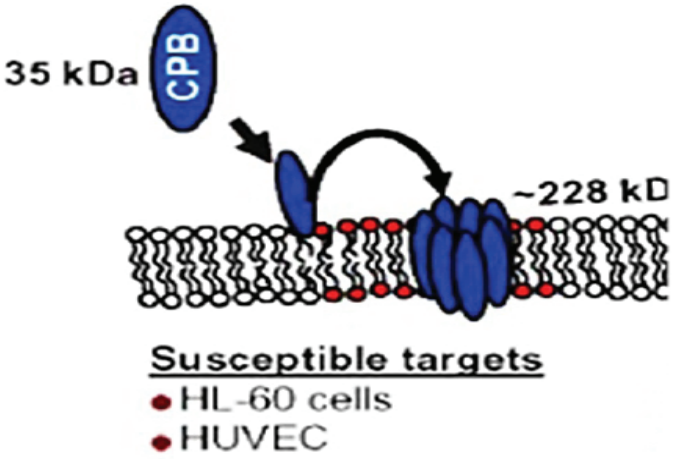
یک واریانت توکسین بتا توسط Segers و همکاران (۱۹۹۹)، گزارش شده است که در آن ۳ جهش نقطه ای وجود دارد و به این ترتیب توکسوئید بتا تولید شده است. این توکسوئید سمی نبوده ولی خاصیت ایمنی زایی خود را حفظ کرده بود. بر اساس این مطالعه و با استفاده از این واریانت، توکسوئید بتا در سال ۲۰۰۷ تولید و ترشح هترولوگ توکسوئید بتا *کلستریدیوم پرفرینجنز* در میزبان های گرم مثبت و نزدیک به آن انجام گردید. بدین منظور پروموتر قوی psF, *B. subtilis* در یک پلاسمید چند نسخه ای با دامنه میزبانی وسیع، کلون شد. در *B. subtilis* تولید درون سلولی بالائی تا حد 200 ug ml^{-1} کشت بدست آمد، ولی میزان ترشح آن به خارج از سلول کم بود. اما استفاده از همان پلاسمید بیانی در میزبان های هترولوگ دیگر مثل *L. lactis* و *S. pneumoniae* ترشح توکسوئید بتا را تا ۱۰ برابر افزایش داد (Nijland و همکاران ۲۰۰۷). در ایران ژن توکسین بتا *کلستریدیوم پرفرینجنز* تیپ های B و C کلونینگ و توالی یابی شده و به ترتیب با شمارهٔ دسترسی HQ179547 و HQ424445 در بانک ژن ثبت گردید (Pilehchian و همکاران ۲۰۱۱).

فیوژن توکسین نوترکیب کایمریک اپسیلون- بتا

طی سال های اخیر در یک مطالعهٔ بیو آنفورماتیک در شرائط *in silico* فیوژن ژن های توکسین اپسیلون و بتا *کلستریدیوم پرفرینجنز* تیپ های D و B مورد بررسی قرار گرفت و قابلیت تولید یک فیوژن پروتئین کایمریک با تمامی ویژگی های هر دو ژن در یک میزبان هترولوگ به خوبی نشان داده شد (Pilehchian و همکاران ۲۰۱۲). در شرائط *in vitro* ژن های توکسین اپسیلون و بتا *کلستریدیوم پرفرینجنز* تیپ های D و B با یکدیگر فیوز و فیوژن ژن پس از لیگاسیون در کلونینگ وکتور pJET1.2blunt در *E. coli* کلون شد، پلاسمید نوترکیب pJETεβ از درون باکتری نوترکیب *E.coli*/top10/pJETεβ تخلیص و فیوژن ژن توالی یابی و با شمارهٔ دسترسی JF833085در بانک ژن ثبت گردید (Pilehchian و همکاران ۲۰۱۲). در جدیدترین مطالعه ای که به تازگی و برای اولین بار در جهان انجام شده است پیله چیان وهمکاران بیان فیوژن ژن کایمریک اپسلون- بتا و تولید فیوژن پروتئین کایمریک اپسیلون- بتا را در باکتری نوترکیب *E. coli*/Rosetta/pET22εβ گزارش نموده و اثرات آسیب شناختی آنرا بر روی موش و همچنین اثرات ایمنولوژیک آن را بر روی خرگوش نشان داده اند. بر اساس این مطالعه، فیوژن پروتئین کایمریک اپسیلون- بتا مطابق استاندارد فارماکوپه اروپا ایمنی مناسبی را علیه توکسین های اپسیلون و بتا *کلستریدیوم پرفرینجنز* تیپ های D و B ایجاد کرده و کاندیدای مناسبی برای تولید واکسن نوترکیب فیوژن پروتئینی می باشد (Pilehchian و همکاران ۲۰۱۳).



تصویر ۱: مکانیسم عمل پروتئین منومر ETX با غشاء سلولی از طریق پیوند با فسفو لیپید های غشاء، که در آنجا طی واکنش با سایر منومرها، به هپتامر تبدیل می شود. برش پایانه C با تریپسین یا کموتریپسین برای فعال شدن توکسین و تولید هپتامر ضروری است (Smedley و همکاران ۲۰۰۴).



تصویر ۲: مکانیسم عمل پروتئین های منومریک CPB با غشاء سلولی از طریق پیوند با فسفو لیپید های غشاء، که در آنجا طی واکنش با سایر منومرها، به هپتامر تبدیل می شود (Smedley و همکاران ۲۰۰۴).

تیپ	توکسین			
	آلفا (کشنده)	بتا(کشنده)	اپسیلون(کشنده)	یوتا(کشنده)
	نکروتیک، لسیتیناز	نکروتیک	نکروتیک	نکروتیک
A	+	–	–	–
B	+	+	+	–
C	+	+	–	–
D	+	–	+	–
E	+	–	–	+

(Yoo و همکاران ۱۹۹۷)

جدول۱: ویژگی های توکسین های اصلی تیپ های مختلف در *کلستریدیوم پرفرینجنز*

ORF در *etxD* C.p. type D (۸۳۴۶ NTCC)	ORF در *etxB* C.p. type B (۸۵۳۳ NTCC)	
TATATT توالی ۱۰- است و در منطقه ۸۲ ـ تا ۸۷ ـ قرار دارد.	TATATT توالی ۱۰- است ولی در منطقه ۶۲ـ تا ۶۷ـ قرار دارد.	
TATATT توالی ۱۰- است ولی در منطقه ۶۲ـ تا ۶۷ـ قرار دارد.	TTGTAT توالی احتمالی ۳۵- است و ۱۷ توالی بالادست ۱۰- قرار دارد	توالی ۳۵- در *etxD* تقریباً شبیه همین توالی (TTGACA) در سایر باکتریهای گرم مثبت است
توالی شاین دلگارنو GCGTGG است که در منطقه ۵- تا ۱۰- قرار گرفته است	توالی شاین دلگارنو GCGTGG است که در منطقه ۵- تا ۱۰- قرار گرفته است	توالی شاین دلگارنو تشابه زیادی با توالیهای مربوطه در باکتریهای گرم مثبت نشان نمیدهد
توالی آغازگر ATG است که متیونین را رمز میکند و از منطقه ۱+ شروع میشود	توالی آغازگر ATG است که متیونین را رمز میکند و از منطقه ۱+ شروع میشود	

(Havard و همکاران ۱۹۹۲)

جدول۲: توالیهای پروموتر *etxD* و *etxB*

<table>
<tr><td colspan="2">به صورت غیر فعال یعنی پروتوتوکسین به وزن مولکولی ۳۷/۶ kD سنتز می شود</td></tr>
<tr><td colspan="2">پروتوکسین حاوی یک زنجیره پلی پپتیدی ۳۱۱ اسید آمینه ای است</td></tr>
<tr><td colspan="2">در ساختمان پروتوتوکسین ۴۴ آسپارتیک اسید و یا ۴۴ آسپاراژین وجود دارد</td></tr>
<tr><td colspan="2">تیریپسین و کیمو تریپسین در ناحیه مابین لیزین شماره ۱۴ و آنالین شماره ۱۵ پروتوتوکسین را بریده و یک قطعه ۱۴ اسید آمینه ای از ناحیه پایانه آمین ان جدا و آن را به توکسین فعال با وزن مولکولی در حدود ۳۱kD تبدیل می سازد</td></tr>
<tr><td colspan="2">حداقل ۴۴ گروه کربوکسیل دارد که حداقل ۷ گروه کربوکسیل آن در سطح توکسین قرار می گیرد</td></tr>
<tr><td colspan="2">پروتوتوکسین حداقل ۲ گلوتامیک اسید و یک آسپرازین خود را طی فعال شدن با تریپسین از دست می دهد</td></tr>
<tr><td colspan="2">سه مول هیستیدین به ازای هر مول پروتوتوکسین وجود دارد و طی فعال شدن پروتوتوکسین به توکسین به وسیله تریپسین هیچ یک ازاین هیستیدین ها از بین نمی رود و فقط یکی از سه مولکول هیستیدین در سطح توکسین قرار می گیرد که جهت فعالیت های کشندگی توکسین ضروری است</td></tr>
<tr><td rowspan="5">برای فعالیت های کشندگی توکسین ضروری شناخته شده است</td><td>یک مولکول تریپتوفان در سطح مولکول پروتئین</td></tr>
<tr><td>یک مولکول هیستیدین در سطح مولکول پروتئین</td></tr>
<tr><td>یک مولکول تیروزین</td></tr>
<tr><td>۳ یا ۴ مولکول اسپارتیک یا گلوتامیک</td></tr>
<tr><td>۸ مولکول لیزین</td></tr>
<tr><td colspan="2">بامدیفیکاسیون گروه های کربوکسیل اختصاصی (آسپارتیک اسید و گلوتامیک اسید) روی سطح توکسین بدون اینکه ضرورتی وجود داشته باشد که فرم فضایی توکسین تشخیص داده شود می توان توکسین غیر فعال نمود</td></tr>
</table>

(Habeeb و Bhown ۱۹۷۷، Habeeb و همکاران ۱۹۷۳، Sakurai و Nagahama ۱۹۸۷).

جدول۳. ویژگی های توکسین اپسیلون

Journal of Veterinary Laboratory Research 5 (2013) 5-19

Molecular biology of *Clostridium perfringens* focusing on epsilon and beta toxin genes

Pilehchian Langroudi, R.

Received: 29.12.2012 Accepted: 26.02.2013

Abstract

Clostridium perfringens is an anaerobic gram positive spore forming bacterium that lives in soil, sediments and human and animal digestive tracks. This bacterium produces many toxins that are responsible for its virulence and are used for its classification. Based on the toxin production amount, *C. perfringens* is divided into five types A, B, C, D and E. 17 protein exotoxin is produced by this bacterium which 4 of them are major (alpha, beta, epsilon and Utah), and others are minor toxins (sigma, theta, kappa, lambda, mu, nu, neuraminidase and enterotoxin). In 1993 *C. perfringens* chromosome was mapped for the first time. This map revealed details of the chromosome. In the recent years lot of studies in the field of Clostridium molecular biology and its DNA recombination has been done around the world and in Iran. This paper is a review of these studies.

Key words: *Clostridium*, molecular structure, gene, toxin, recombination

1. Department of anaerobic vaccine production, Razi vaccine and serum research institute, Karaj, Iran.

*Corresponding author: **r.pilehchian@rvsri.ac.ir**

منابع

پیله چیان لنگرودی، ر. ۱۳۷۵. تاثیرپروتوتوکسین اپسیلون *کلستریدیوم پرفرینجنز* تیپD بر روی وزن وقد جنین های موش سفید کوچک آزمایشگاهی. پژوهش وسازندگی، **(۳۳)** ، ۱۳۲ – ۱۳۴.

سعادتی،م. کمالی،م. صالحی،م .تولایی، م. اولاد،غ. پیله چیان لنگرودی،ر. موسوی شوشتری،م. ۱۳۸۸. شناسایی سریع *کلستریدیوم پرفرینجنز* تیپ های A، B،C ، D به روش Multiplex PCR. پژوهش و سازندگی، **(۸۳)**، ۶۳ – ۶۸.

Ardehali, M. 1967. Some observations on *Clostridium perfringens* strains isolated in Iran, Bulletin de la Office international desepizooties, **59(9-10)**,1207.

Ardehali, M., Darakhshan H. 1974. Production and standardization of *Clostridium perfringens* polyvalent vaccine in Iran; Developments in biological standardization, **32**, 31-34.

Ardehali, M., Darakhshan H. 1979. Isolation and typing of *Clostridium Oedemations* (*C. novyi*) from cases of Black disease of sheep in Iran, Comparative Immunology, Microbiology and infectious diseases, **2(1)**,107-111.

Ardehali, M., Moosawi M., Pilehchian lngroudi R. 1994. Isolation of toxigenic strains *of Clostridium perfringens* from the soil of farms in Iran. Archives of Razi institute, **44/45**, 95-100.

Ardehali, M., Moosawi M., Pilehchian R. 1992. Mass production of *Clostridium oedematiens* vaccine against Black disease of sheep. Archives of Razi institute, **42/43**, 91.

Batty, I., Glenny, A.T. 1947. Titration of *Clostridium welchii* epsilon toxin and antitoxin, The British Journal of experimental pathology, Vol. XXXVIII

Bhown, A.S., Habeeb AFSA. 1977. Structural studies on toxin of *Clostridium perfringens* type D. Localization of the site of tryptic scission necessary for activation of ε-toxin. Biochemical and Biophysical Research Communications, **73**, 889-896.

Boarer, C.D., Sojka, M.G., White, V.J., Roeder, P.L. 1988. The production and evaluation of monoclonal antibodies to *Clostridium perfringens* type D epsilon toxin. Journal of Biological Standardization, **16(3)**, 207-218.

Brooks, M.E., Sterne, M., Warrack, G.H. 1957. A reassessment of the criteria used for type differentiation of *Clostridium perfringens*. Journal of Pathology and Bacteriolgy, **74**, 185-195.

Buxton, D. 1978a. The use of an immunoperxidase technique to invwstigate by light and electron Microscopy the sites of binding of *Clostridium welchii* type D epsilon toxin in mice. Journal of Medical Microbiology, **11(3)**, 289 – 292.

Buxton, D. 1978b. Further studies on the mode of action of *Clostridium welchii* type-D epsilon toxin. Journal of Medical Microbiology, **11(3)**, 293–298.

Buxton, D. 1978c. IN Vitro effects of *Clostridium welchii* type D epsilon toxin on guine Pig، mouse، rabbit and sheep cells. Journal of Medical Microbiology, **11(3)**, 299-302.

Canard, B., Cole, ST. 1989. Genome organization of the anaerobic pathogen: *Clostridium perfringens*. Proceedings of the National Academy of Sciences, **86**, 6676-6680.

Duncan, C.L., Rokos, E.A., Christenson, C.M., Rood, J.I. 1978. Multiple plasmids in different toxigenic

types of *Clostridium perfringens*: possible control of beta-toxin production. In D. Schlessinger (ed.)، Microbiology. American Society for Microbiology، Washington، D.C. 246-248.

Goswami, P.P., Rupa, P., Prihar, N.S., Garg, L.C. 1996. Molecular Cloning of *Clostridium perfringens* Epsilon Toxin Gene and Its High Level Expression in *E. coli*. Biochemical and Biophysical Research Communications, **226**, 735–740.

Gurjar, A., Li, J., McClane, B.A. 2010. Characterization of Toxin Plasmids in *Clostridium perfringens* Type C Isolates. Infection and Immunity, **78(11)**, 4860–4869.

Habeeb, AFSA. 1963. Some studies on the chemical modification of epsilon toxin of *Clostridium perfringens* type D. Biochemica et Biophysica ACTA, **74**, 113-121.

Habeeb, AFSA., Lee, C.L., Atassi, M.Z. 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.

Havard, H.L., Hunter, S.E., Titbal,l R.W. 1992. Comparison of the nucleotide sequence and development of a PCR test for the epsilon toxin gene of *Clostridium perfringens* type B and type D. FEMS Microbiology Letters, **76(1-2)**, 77-81.

Hunter, SEC., Clarke, I.N., Kelly, D.C., Titball, R.W. 1992. Cloning and Nucleotide Sequencing of the *Clostridium perfringens* Epsilon Toxin Gene and Its Expression in *E. coli*. Infection and Immunity, **60(1)**,102-110.

Hunter, SEC., Brown, J.E., Oyston, PCF., Sakurai, J., Titball, R.W. 1993. Molecular genetic analysis of the beta toxin of *Clostridium perfringens* reveals sequence homology with the alpha-toxin, gamma-toxin and leukocidin of *Staphylococcus aureus*. Infection and Immunity, **61(9)**, 3958-3965.

Jabbari, A.R., Afshari-Far, S., Esmaelizad, M., Pilehchian-Langroudi, R., Moosawi-Shooshtari, M., Abdolmohammadi-Khiav, L. 2011. Molecular typing of toxigenic *Clostridium perfringens* isolated from sheep in Iran. Archives of Razi institute, **66(2)**, 81-86.

Jabbari, A.R., Tekyei, F., Esmaelizad, M., Pilehchian-Langroudi, R. 2012. Occurrence of Beta2 toxigenic *Clostridium perfringens* isolates with different toxin types in Iran. Archives of Razi institute, **67(2)**, 133-137.

Katayama, S.I., Dupuy, B., Garnier, T., Cole, S.T. 1995. Rapid Expansion of the Physical and Genetic Map of the Chromosome of *Clostridium perfringens* CPN50. Journal Of Bacteriology, **177(19)**, 5680–5685.

Lebrun, M., Mainil, J.G., Linden, A. 2010. Cattle enterotoxaemia and *Clostridium perfringens*: description, diagnosis and prophylaxis. The Veterinary Record, **167**, 13-22.

McDonel, J.L., Dorner, F., Drew, H. 1986. Toxins of *Clostridium perfringens* types A, B, C, D and E. Pharmacology of bacterial toxins. Oxford, Pergamon Press, 447–517.

Minami, J., Katayama, S., Matsushita, O., Matsushita, C., Okabe, A. 1997. [beta]2 (CD18) and [beta]1 (CD29) Lambda-toxin of *Clostridium perfringens* activates the precursor of epsilon-toxin by releasing its N- and C-terminal peptides. Microbiolgy and Immunologym, **41**, 527–535.

Miyata, S., Minami, J., Tamai, E., Matsushita, O., Shimamoto, S., Okabe, A. 2002. *Clostridium*

perfringens epsilon-Toxin Forms a Heptameric Pore within the Detergent-insoluble Microdomains of Madin-Darby Canine Kidney Cells and Rat Synaptosomes. The Journal of Biological Chemistry, **277(42)**, 39463–39468.

Miyamoto, O., Minami, J., Toyoshima, T., Nakamura, T., Masada, T., Nagao, S., Negi, T., Itano, T., Okabe, A. 1998. Neurotoxicity of *Clostridium perfringens* Epsilon-Toxin for the Rat Hippocampus via the Glutamatergic System. Infection and immunity, **66**, 2501–2508.

Miyamoto, O., Sumitami, K., Nakamura, T., Yamagani, S., Miyatal, S., Itano, T., Negi, T., Okabe, A. 2000. *Clostridium perfringens* epsilon toxin causes excessive release of glutamate in the mouse hippocampus. FEMS Microbiology Letter, **189**, 109–113.

Moosawi, M., Ardehali M. Pilehchian R. 1992, Immunisation of cattle with *Clostridium chauvoei* vaccine. Archives of Razi institute, 42/43, 91.

Nagahama, M., Sakurai, J. 1991. Distribution of labeled *Clostridium perfringens* epsilon toxin in mice. Toxicon, **29**, 211–217.

Nagahama, M., Sakurai, J. 1992. High-affinity binding of *Clostridium perfringens* epsilon-toxin to rat brain. Infection and immunity, **60**, 1237–1240.

Nagahama, M., Sakurai, J. 1993. Effect of drugs acting on the central nervous system on the lethality in mice of *C. perfringens* epsilon toxin, Toxicon, 3(4), 427-435.

Nijland, R., Lindner, C., Hartskamp, M., Hamoen, L.W., Kuipers, O.P. 2007. Heterologous production and secretion of *Clostridium perfringens* beta-toxoid in closely related Gram-positive hosts. Journal of Biotechnology, **127**, 361–372.

Okabe, A., Shimizu, T., Hayashi, H. 1989. Cloning and sequencing of a phospholipase C gene of *Clostridium perfringens*, Biochemical and Biophysical Research Communications. **160**, 33-39.

Orlans, EVAS، Richards, C.B., Jones, V.A. 1960. *Clostridium welchii* epsilon toxin and antitoxin. Immunology, **3**, 28-44.

Payne, D., Williamson, E.D., Titball, R.W. 1997. The *Clostridium perfringens* epsilon-toxin. Reviews in Medical Microbiology, **8**, 28-30.

Petit, L., Maier, E., Gibert, M., Popoff, M.R., Benz, R. 2001. *Clostridium perfringens* Epsilon Toxin Induces a Rapid Change of Cell Membrane ermeability to Ions and Forms Channels in Artificial Lipid Bilayers. The Journal of Biological Chemistry, **276(19)**, 15736–15740.

Pilehchian Langroudi, R., Ardehali, M., Farzan, A., Moosawi, M. 1996. The effect of *Clostridium perfringens* type D culture filtrate on the mouse body weight. Archives of Razi institute, **46/47**, 8l.

Pilehchian Langroudi, R., Aghaiypour, K.2, Shamsara, M., Ghorashi, SA. 2011. Synthetic construct of *Clostridium perfringens* epsilon-beta fusion protein gene. International Conference on Biotechnology and Environment Management, **18**,126-131.

Pilehchian Langroudi, R., Aghaei Pour, K., Shamsara, M., Jabbari, A.R., Habibi, G.R., Goudarzi, H., Ghorashi, S.A. 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)**, 1-10.

Pilehchian Langroudi, R., Aghaiypour, K.2, Shamsara, M., Ghorashi, SA. 2012. In silico fusion of epsilon

and beta toxin genes of *Clostridium perfringens* types D and B. Iranian Journal of biotechnology, **10(1)**, 55.

Pilehchian Langroudi, R., Jabbari, A.R., Moosawi Shoshtari, M. 2012. Large scale production of Black-leg vaccine by fermenter and enriched culture medium in Iran. Archives of Razi institute, **67(1)**, 43.

Pilehchian Langroudi, R., Shamsara, M, Aghaiypour, K. 2013. Expression of *Clostridium perfringens* epsilon-beta fusion toxin gene in *E. coli* and its immunologic studies in mouse. Vaccine, **31(32)**, 3295-3299.

Rafyi, A., Ardehali, M. 1961. Diseases of animals caused by *Clostridium welchii*. Bulletin de la Office international desepizooties, ‹T. **55**› 5-6.

Rood, J.I. 1998. Virulence genes of *Clostridium perfringens*. Annual Review of Microbiology, **52**, 333–360.

Rood, J.I, Cole, ST. 1991. Molecular genetics and pathogenesis of *Clostridium perfringens*. Microbiological Reviews, **55**, 621–648.

Sakurai, J., Nagahama, M., Fujii, Y. 1983. Effect of *Clostridium perfringens* epsilon toxin on the cardiovascular system of rats. Infection and Immunity, **42(3)**, 1183–1186.

Sakurai, J., Nagahama, M. 1985. Tryptophan content of *Clostridium perfringens* epsilon-toxin. Infection and Immunity, **47(1)**, 260-263.

Sakurai, J., Nagahama, M. 1985. Role of one tryptophan residue in the lethal activity of *Clostridium perfringens* epsilon toxin. Biochemical and Biophysical Research Communications, **128**, 760-766.

Sakurai, J., Nagahama, M. 1987. Histidine residues in *Clostridium perfringens* epsilon-toxin. FEMS Microbiology letters, **41**, 317-319.

Sakurai, J., Nagahama, M. 1987. The inactivation of *Clostridium perfringens* epsilon-toxin by treatment with tetranitromethane and N-acetylimidazole. Toxicon, **25**, 279-284.

Sakurai, J., Nagahama, M. 1987. Carboxyl groups in *Clostridium perfringens* epsilon-toxin. Microbial Pathogenesis, **3**, 469-474.

Sayeed, S., Li, J., McClane, B.A. 2010. Characterization of Virulence Plasmid Diversity among *Clostridium perfringens* Type B Isolates. Infection and Immunity, **78(1)**, 495–504.

Segers, R.P.A.M., Waterfield, N.R., Frandsen, P.L., Wells, J.M. 1999. *Clostridium perfringens* vaccine [EP0892054]. EUR. Ref Type: Patent.

Shimizu, T., Ohtani, K., Hirakawa, H., Ohshima, K., Yamashita, A., Shiba, T., Ogasawara, N., Hattori, M., Kuhara, S., Hayashi, H. 2002. Complete genome sequence of *Clostridium perfringens*, an anaerobic flesh-eater. Proceedings of the National Academy of Sciences, **99**, 996-1001.

Scott, PT, Rood, JI. 1989. Electroporation-mediated transformation of lysostaphin-treated *Clostridium perfringens*. Gene, **82(2)**, 327-333.

Smedley, JG. 3rd, Fisher, D.J., Sayeed, S., Chakrabarti, G., McClane, B.A. 2004. The enteric toxins of *Clostridium perfringens*. Reviews of Physiology Biochemistry and Pharmacology, **152**, 183-204.

Smith, L.D. 1979. Virulence factors of *Clostridium perfringens*. Reviews of Infectious diseases, **1**, 254-260.

Steinthorsdottir, V., Fridriksdottir, V. 1998. Eggert Gunnarsson, Oèlafur S. Andreèsson, Site-directed

mutagenesis of *Clostridium perfringens* beta-toxin: expression of wild-type and mutant toxins in Bacillus subtilis. FEMS Microbiology Letters, **158**, 17-23.

Topley, W.W.C., Wilson, G.S., Collier, L., Balows, A., Sussman, M. 2005. Topley & Wilson's microbiology & microbial infections. 10th edition London Hodder Arnold.

Welch, W.H., Nuttall, G.H.F. 1892. A gas producing bacillus (*Bacillus aerogenes capsulatus*, Nov, sepc.) capable of rapid development in the blood vessels after death. Bulletin of Johns Hopkins Hospital, **3**, 81–91.

Wilsdon, A.J. 1931. Observations on the classification of B. *welchii*. 2nd Report Direct Institute of Animal Pathology, University Cambridge, pp. 53-85.

Yoo, H.S., Lee, S.U., Park, K.Y., Park, Y.H. 1997. Molecular typing and epidemiological survey of prevalence of *Clostridium perfringens* types by multiplex PCR. Journal of Clinical Microbiology, **35**, 228–232.