جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

مجله دنیای میکروب‌ها
سال پنجم، شماره سوم و چهارم (پیاپی ۱۳)، زمستان ۱۳۹۱
صفحات ۸۴-۷۷

Original Article

همسانه سازی زنجیره سنگین ژن نوروتوکسین باکتری *کلاستریدیوم بوتولینیوم* در باکتری *اشریشیا کلی*

عباس دوستی[*1]
[1]استادیار، دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد، مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی

چکیده

سابقه و هدف: بوتولیسم یک بیماری ناشی از فعالیت نوروتوکسین‌های بوتولینوم می‌باشد که توسط باکتری *کلاستریدیوم بوتولینوم* تولید شده و در انتقال محرک‌های عصبی و عضلانی ایجاد اختلال می‌نماید. نوروتوکسین‌های این باکتری از سمی‌ترین مواد شناخته شده هستند به طوری که با جلوگیری از آزاد شدن استیل کولین در پایانه‌های عصبی، موجب فلج کردن عضلات می‌شوند. این پژوهش با هدف همسانه سازی زنجیره سنگین ژن نوروتوکسین باکتری *کلاستریدیوم بوتولینیوم* به عنوان کاندیدای واکسن ژنی در باکتری *اشریشیا کلی* انجام گرفت.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه، توالی کامل زنجیره سنگین ژن نوروتوکسین باکتری *کلاستریدیوم بوتولینیوم* با استفاده از پرایمرهای اختصاصی و روش PCR تکثیر گردید. قطعه DNA مربوط به زنجیره سنگین ژن نوروتوکسین به روش T/A Cloning در حامل PCR 8/GW/TOPO کلون و ساختار حاصل به باکتری *اشریشیا کلی* ترانسفورم گردید.

یافته‌ها: با استفاده از روش PCR همسانه سازی قطعه ۲۵۳۰ جفت بازی مربوط به زنجیره سنگین نوروتوکسین تایید گردید. نتایج مرحله بعد نیز نشان دهنده همسانه سازی موفقیت آمیز زنجیره سنگین ژن نوروتوکسین باکتری *کلاستریدیوم بوتولینیوم* در باکتری *اشریشیا کلی* بود. تایید نهایی سازواره تهیه شده با استفاده از آنزیم‌های *Hind*III و *Bam*HI انجام شد.

نتیجه گیری: با توجه به نتایج به دست آمده در این مطالعه به نظر می‌رسد که سازه ژنی تولید شده در این پژوهش می‌تواند به عنوان واکسن ژنی علیه نوروتوکسین بوتولینیوم در تحقیقات آینده مورد استفاده قرار گیرد.

واژگان کلیدی: بوتولیسم، نوروتوکسین، کلون سازی، زنجیره سنگین.

دریافت مقاله: اسفند ۱۳۹۰ پذیرش برای چاپ: فروردین ۱۳۹۱

مقدمه

بوتولیسم یک اختلال حاد عصبی و فلج کننده است که دستگاه عصبی مرکزی و دستگاه عضلانی را تحت تأثیر قرار می‌دهد. این بیماری در اثر سم حاصل از باکتری *کلاستریدیوم بوتولینیوم* (*Clostridium Botulinum*) به وجود می‌آید. *کلاستریدیوم بوتولینیوم* یک باکتری گرم مثبت میله‌ای شکل، فاقد کپسول، اسپوردار و بی‌هوازی اجباری است که اغلب متحرک و دارای تاژک پیرامونی می‌باشد (۱). اولین مورد گزارش بوتولیسم غذایی مربوط به مصرف یک نوع سوسیس خانگی درسال ۱۷۹۳ بوده است. عامل بیماری اولین بار در سال ۱۸۹۶ از سوسیس آلوده جداسازی گردید. از آن‌جایی که سوسیس در زبان لاتین به معنای بوتولوس است، این بیماری را بوتولیسم و باکتری مولد آنرا *باسیلوس بوتولینوس* (*Bacillus botulinus*) نامیدند. نام *کلاستریدیوم بوتولینیوم* در سال ۱۹۲۳ برای این باکتری اختصاص یافت. در سال ۱۹۴۳ عامل بوتولیسم زخم و در سال ۱۹۷۶ عامل بوتولیسم نوزادان

*) آدرس برای مکاتبه: شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد، مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی
تلفن: ۰۳۸۱۳۳۶۱۰۰۱، پست الکترونیک: abbasdoosti@yahoo.com

جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

شناسایی گردید (۲). این باکتری به دلیل تولید نوروتوکسین‌های مختلف سبب خسارت‌های فراوان به صنایع غذایی و مسمومیت‌های شدید غذایی در سراسر جهان شده است. بیماری بوتولیسم در سه نوع بوتولیسم کلاسیک یا غذایی (Food Botulism)، بوتولیسم نوزادان (Infant Botulism) و بوتولیسم زخم (Wound Botulism) وجود دارد (۳). یکی از خطرناک‌ترین مسمومیت‌های غذایی، مسمومیت بوتولیسم است که در اثر مصرف مواد غذایی آلوده به ویژه انواع کنسروهای گوشتی و گیاهی به ظاهر سالم، فرآورده‌های غذایی تخمیر شده و به ندرت فرآورده‌های لبنی رخ می‌دهد. این بیماری به عنوان یکی از مشکلات مهم بهداشتی در برخی از کشورهای جهان به ویژه ایران به شمار می‌آید (۴). سم بوتولیسم از رها شدن استیل کولین از انتهای اعصاب حرکتی محیطی جلوگیری می‌نماید. به طوری که این پدیده موجب ایجاد اختلالات عصبی به صورت فلج و شل شدن عضلات (به ویژه عضلات تنفسی یا عضله قلب) و در نهایت مرگ می‌گردد (۵).

در ایران مسمومیت غذایی بوتولیسم یکی از مشکلات بهداشتی است که کم‌تر مورد توجه قرار گرفته است. در سال ۱۳۴۴ در شهرستان رشت اولین همه‌گیری بوتولیسم در ایران به وقوع پیوست که طی آن ۲۸ نفر دچار مسمومیت گردیدند (۴). همچنین در سال‌های ۱۳۵۱ تا ۱۳۵۴ در مجموع ۳۸۹ مورد بوتولیسم در شمال کشور ثبت و گزارش گردیده است (۶). در مطالعه‌ای که توسط وحدانی (Vahdani) و همکاران در سال ۱۳۸۱ بر روی نمونه‌های سرم خون و مدفوع ۱۱۵ بیمار بستری شده به دلیل مسمومیت بوتولیسم در مراکز بهداشتی و درمانی تهران انجام گرفت، در ۷۳ مورد باکتری *کلاستریدیوم بوتولینیوم* جداسازی گردید. بررسی‌های بیشتر نشان داد که مصرف کنسرو ماهی، ماهی دودی شده و تخم ماهی شور علت اصلی بروز مسمومیت بوده است (۷). علاوه بر کنسروها و فرآورده‌های دریایی، مواردی از وقوع بوتولیسم در اثر مصرف فرآورده‌های لبنی در ایران گزارش گردیده است. به طوری که پورشفیع (Porshafie) و همکاران در سال ۱۳۷۵، پنیر محلی را عامل آلودگی افراد مبتلا اعلام نمودند. در این مطالعه در سرم خون ۱۰ تن از بیماران و پنیر مصرف شده، وجود توکسین *کلاستریدیوم بوتولینیوم* تأیید گردید (۸). گزارشات متعددی از وقوع بوتولیسم در حیوانات وجود دارد. به عنوان نمونه بنا بر گزارش شارپ (Sharpe) و همکاران، در اثر مسمومیت بوتولیسم در یک گله شیری در ایرلند تعداد ۳۶ رأس از گاوهای شیری تلف گردیدند (۹).

نوروتوکسین‌های *کلاستریدیوم بوتولینوم* دارای زنجیره پپتیدی با وزن مولکولی ۱۵۰ کیلو دالتون می‌باشند. این سموم متشکل از یک زنجیره سبک (Light Chain LC) با وزن مولکولی ۵۰ کیلو دالتون، یک زنجیره سنگین (Heavy Chain HC) با وزن مولکولی ۱۰۰ کیلو دالتون و یک بخش غیرسمی با وزن مولکولی ۵۰۰ کیلو دالتون می‌باشند. نقش بخش غیرسمی، حفاظت از سم در برابر اسید معده و آنزیم‌های پروتئولیتیک می‌باشد. زنجیره سنگین مانند یک منفذ عمل کرده به طوری که زنجیره سبک از آن عبور و به سیستم اعصاب نفوذ می‌نماید. همچنین بخش سنگین نوروتوکسین این باکتری یکی از آنتی‌ژن‌های مهم آن در تحریک سیستم ایمنی می‌باشد (۵ و ۱۰).

بر اساس تفاوت‌های آنتی‌ژنیک، توکسین بوتولیسم به تیپ‌های A تا G تقسیم بندی می‌شود. از این میان تیپ‌های A، B، E و F در انسان و C و D تقریباً به صورت انحصاری در حیوانات موجب ایجاد بیماری می‌گردند. اما تاکنون گزارشی مبنی بر ایجاد بیماری توسط تیپ G مشاهده نشده است (۱۱ و ۱۲). اهمیت سویه‌های مولد تیپ E در مقایسه با سایر سویه‌ها، توانایی رشد و توکسین‌زایی در دماهای پایین است و همچنین اسپور باکتری قادر به جوانه زدن (به ویژه در فرآورده‌های تهیه شده به صورت سنتی) می‌باشد. (۱۲ و ۱۳). بوتولیسم در حیواناتی مانند گاو، گوسفند و اسب بیشتر به وسیله تیپ‌های C و D و به ندرت تیپ B گزارش شده است. همچنین وقوع بوتولیسم در طیور نیز گزارش شده است و تیپ C به عنوان شایع‌ترین عامل ابتلا در پرندگان شناخته شده است (۱۶-۱۴). استفاده از واکسن‌های ژنی روشی جدید جهت ایجاد ایمنی موثر علیه بیماری‌ها می‌باشد. استفاده از این تکنیک در زمینه

جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

ایمونولوژی و بیولوژی مولکولی در حال گسترش است، چرا که واکسن‌های ژنی قادر به القای پاسخ‌های ایمنی سلولی، هومورال و یا هر دو می‌باشند. امروزه از پلاسمیدهای حامل قطعات ژن خارجی به عنوان ایمونوژن استفاده می‌گردد. در مدل‌های حیوانی مشاهده شده که واکسیناسیون به وسیله DNA سبب ایجاد ایمنی علیه بسیاری از عوامل عفونی شده است (۱۷). واکسن‌های ژنی در مقایسه با سایر واکسن‌ها دارای مزایایی چون: تولید ساده‌تر، خالص‌تر بودن محصول، ذخیره سازی و نگهداری آسان می‌باشند (۱۸). در همین راستا، این پژوهش با هدف همسانه سازی ژن زنجیره سنگین نوروتوکسین باکتری *کلاستریدیوم بوتولینیوم* به عنوان کاندیدای واکسن ژنی در باکتری *اشریشیا کلی* انجام گرفت.

مواد و روش‌ها

الف) استخراج DNA ژنومی: DNA ژنومی از باکتری *کلاستریدیوم بوتولینیوم* تیپ A استخراج گردید. برای این منظور از کیت استخراج DNA، شرکت سیناژن ایران (DNP™ KIT) استفاده شد. کیفیت DNA تخلیص شده، پس از الکتروفورز بر روی ژل آگاروز ۱٪ مورد بررسی قرار گرفت.

ب) *واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز*: به منظور تکثیر توالی کامل زنجیره سنگین ژن نوروتوکسین باکتری *کلاستریدیوم بوتولینیوم* از پرایمرهای Hc-F: 5'-CCAAGCTTATCAAAGTTAATAATTGGGACTTG-3' و Hc-R: 5'-CCGGATCCTTACAGTGGCCTTTCTCCC-3' استفاده گردید (۱۷).

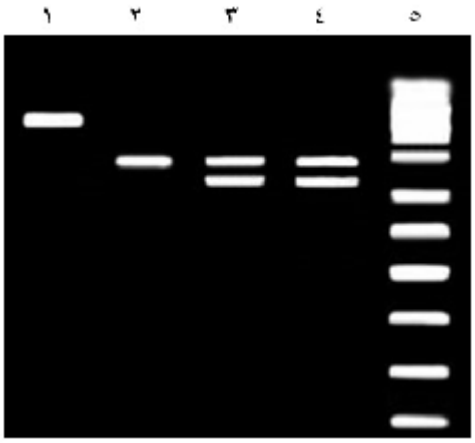
در این مطالعه به منظور سهولت کلون‌سازی، در انتهای '۵ هر یک از پرایمرهای Hc-F و Hc-R ، به ترتیب جایگاه برش آنزیم‌های *Hind*III و *Bam*HI قرار داده شد (نواحی که زیر آنها خط کشیده شده است). واکنش PCR با حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر شامل ۲/۵ میکرولیتر DNA الگو، ۰/۲ میکرومول از هر پرایمر، ۲۰۰ میکرومول dNTP Mix، ۱/۵ میکرومول $MgCl_2$، ۲/۵ میکرولیتر بافر PCR (10X) و ۱ واحد آنزیم DNA پلی‌مراز *pfu* انجام گردید. سپس به منظور جلوگیری از آلودگی و تبخیر، ۲ تا ۳ قطره روغن معدنی استریل به مخلوط واکنش اضافه گردید. واکنش PCR در دستگاه ترموسایکلر (Mastercycler Gradient, Eppendorf) ساخت کشور آلمان با شرایط دمایی ۵ دقیقه واسرشت شدن ابتدایی در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد و در ادامه ۳۲ چرخه شامل واسرشت شدن در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه، اتصال در دمای ۶۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه، طویل شدن در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه و در نهایت طویل شدن نهایی در دمای ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۵ دقیقه انجام شد.

ج) *استخراج DNA از ژل*: محصولات PCR به ژل آگاروز ۱ درصد واجد اتیدیوم برماید منتقل و الکتروفورز گردیدند. قطعه DNA مربوط به ژن زنجیره سنگین نوروتوکسین به کمک تیغ اسکالپل از ژل جداسازی و با استفاده از کیت استخراج DNA از ژل (BIONEER) ساخت کشور کره مطابق با دستورالعمل کیت، تخلیص شد. برای اطمینان از صحت قطعه ژن تخلیص شده و کیفیت آن، ۳ میکرولیتر از آن بر روی ژل آگاروز ۱/۵ درصد و در کنار مارکر الکتروفورز مورد بررسی قرار گرفت.

د) *انجام T/A Cloning*: برای این منظور محصول PCR تخلیص شده از ژل، با استفاده از کیت شرکت Invitrogen (TOPO TA Cloning Kit) ساخت کشور آمریکا کلون گردید. در ابتدا محصول الحاق شده (Ligation) در باکتری *اشریشیا کلی* سویه TOP-10 F ترانسفورم و باکتری‌های یاد شده در محیط آگاردار Luria-Bertani محتوی اسپکتینومایسین (۱۰۰ میکروگرم در هر میلی‌لیتر) کشت داده شدند. از کلنی‌های حاصل با استفاده از کیت شرکت Qiagen ساخت کشور آمریکا تخلیص پلاسمید انجام شد و سپس تایید اولیه صحت کلونینگ به روش PCR صورت گرفت. تایید نهایی سازواره (کانستراکت) حاصل به روش هضم آنزیمی انجام شد.

یافته‌ها

در این مطالعه، استخراج DNA ژنومی از باکتری



شکل ۱: هضم پلاسمیدهای آمیخته PCR 8/GW/TOPO vector با *Hind*III و *Bam*HI، ۱) سازه TOPO-Hc بریده نشده، ۲) وکتور TOPO فاقد قطعه کلون شده، ۳ و ۴) سازه TOPO-Hc بریده شده با آنزیم *Eco*RI، ستون ۵) مارکر ۱ کیلو بازی.

کلاستریدیوم بوتولینیوم با موفقیت انجام شد. نتایج الکتروفورز DNA تخلیص شده بر روی ژل آگاروز، نشان دهنده کیفیت مناسب آن جهت انجام آزمایشات مولکولی بود. واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز با استفاده از پرایمرهای اختصاصی بخش Hc ژن نوروتوکسین موجب تکثیر قطعه‌ای به طول ۲۵۳۰ جفت باز گردید (شکل ۱). کلون سازی محصول PCR به روش T/A در وکتور TOPO، به منظور ایجاد همسانه‌ای از زنجیره سنگین ژن نوروتوکسین، موجب تولید سازه TOPO-Hc گردید. تست‌های تاییدی به کار رفته در مورد صحت همسانه سازی ژن Hc شامل PCR و هضم آنزیمی بود که واکنش PCR نشان داد درصد زیادی از کلون‌های حاصل، واجد سازه TOPO-Hc می‌باشند. همچنین هضم آنزیمی دوگانه با آنزیم‌های *Hind*III و *Bam*HI بر روی پلاسمیدهای تخلیص شده، حضور قطعه ۲۵۳۰ جفت بازی مربوط به ژن Hc در وکتور TOPO را نشان داد (شکل ۱).

بحث

با توجه به خطرات ناشی از *کلاستریدیوم بوتولینیوم* برای انسان و دام، یافتن راهی موثر در پیشگیری از بیماری بوتولیسم ضروری می‌باشد. امروزه برخی از کشورها، واکسن توکسوئیدی را مورد استفاده قرار داده‌اند که به صورت چندگانه علیه سروتیپ‌های A تا E عمل می‌نماید. این واکسن با غیرفعال نمودن مایع فوقانی محصول کشت باکتری به وسیله فرمالدئید حاصل می‌گردد (۱۹). از مشکلات این واکسن می‌توان به قیمت گران، لزوم استفاده از چندین سروتیپ مختلف (که در بسیاری از آن‌ها میزان تولید سم بسیار ناچیز است) و نیاز به چندین مرحله تجویز یادآور (booster) برای محافظت در برابر این پنج نوع سروتیپ، اشاره نمود. از طرفی اندازه بزرگ ساختار پروتئینی آن و ناخالصی‌های همراه توکسوئید، واکنش‌های ناخواسته عمومی و موضعی را در بدن به دنبال خواهد داشت (۲۰)

امروزه نسل جدید واکسن‌های بوتولیسم نیز پیشنهاد شده است که شامل استفاده از بخش سنگین ژن نوروتوکسین *کلاستریدیوم بوتولینوم* به عنوان آنتی‌ژن می‌باشد. اخیراً واکسن‌های ژنی که شامل بخش رمز گذار زنجیره سنگین نوروتوکسین بوتولینیوم است، در مورد سروتیپ‌های مختلف این باکتری در حال بررسی می‌باشد (۲۱).

در آغاز دهه ۱۹۹۰ نشان داده شد که تزریق DNA رمز گذار آنتی‌ژن‌ها موجب بروز پاسخ ایمنی از نوع هومورال و سلولی می‌شود (۱۷ و ۱۸). از آن زمان به بعد، گزارشات متعددی از اثر بخشی واکسن‌های ژنی علیه عوامل عفونی (ویروسی، باکتریایی یا انگلی) و بیماری‌های اکتسابی مانند انواع سرطان‌ها، اعلام گردیده است (۲۲). واکسن‌های ژنی متعددی علیه بوتولیسم مورد بررسی قرار گرفته است. شیو (Shyu) و همکاران در سال ۲۰۰۰، از بخش C نوروتوکسین *کلاستریدیوم بوتولینیوم* به عنوان واکسن ژنی علیه این عامل عفونی بهره گرفتند. نتایج مطالعه این محققین حاکی از ایجاد ایمنی حفاظتی موثر علیه بوتولیسم در موش‌های واکسینه شده بود (۲۳). کلایتون (Clayton) و همکاران در سال ۲۰۰۰ اقدام به واکسیناسیون موش‌ها با DNA رمزگذار قطعه بزرگی از ژن نوروتوکسین تیپ A نمودند (۱۷). بنت (Bennett) و همکاران در سال ۲۰۰۳ نوعی DNA واکسن علیه نوروتوکسین تیپ F بوتولیسم به کار بردند. این محققان ایمنی حفاظتی نسبتاً بالایی را در برابر بوتولیسم به دست آوردند (۲۰). جاتول (Jathoul) و همکاران

در سال ۲۰۰۴ به تحقیق در مورد اثر بخشی انواع پروموترها جهت بیان بخش HC سم بوتولیسم تایپ F در انواع واکسن‌های ژنی پرداختند. نتایج نشان داد، بخش HC توان بالایی در ایجاد ایمنی حفاظتی علیه بوتولیسم دارد (۲۱). هالی (Holly) و همکاران در سال ۲۰۰۱ بخش HC نوروتوکسین *کلاستریدیوم بوتولینیوم* تیپ F را کلون سازی نمودند. موش‌های واکسینه شده با این واکسن نوترکیب نسبت به *کلاستریدیوم بوتولینیوم* مقاومت نشان دادند (۲۴). یو (Yu) و همکاران در سال ۲۰۰۸ بخش HC نوروتوکسین *کلاستریدیوم بوتولینیوم* تیپ F را با پرایمرهای اختصاصی واجد جایگاه‌های برش *Eco*RI و *Xho*I تکثیر نمودند. طول قطعه حاصل ۱۲۶۳ جفت باز بوده و در وکتور pMD18-T کلون گردید. یافته‌های پژوهش این محققین نشان داد که FHC نوترکیب پس از بیان در *اشریشیا کلی* ایمنی حفاظتی موثر در موش‌ها ایجاد نمود و این واکسن زیرواحدهای نوترکیب FHC ممکن است در انسان مفید باشد (۲۵). وودوارد (Woodward) و همکاران در سال ۲۰۰۳ بخش HC نوروتوکسین *کلاستریدیوم بوتولینیوم* تیپ‌های C و D را کلون سازی نمودند و به عنوان کاندیدای واکسن ژنی علیه این باکتری در موش به کار بردند (۲۶). در تحقیق حاضر، زنجیره سنگین نوروتوکسین *کلاستریدیوم بوتولینیوم* تیپ A، به منظور ایجاد سازواره واکسن ژنی مورد استفاده قرار گرفت که از نظر تیپ باکتری انتخاب شده با کار کلایتون و همکاران مشابهت و با سایر محققین اشاره شده در بالا تفاوت دارد. همچنین به طور کلی نوع وکتور مورد استفاده جهت کلون سازی ژن مورد نظر با کارهای صورت گرفته توسط سایر محققین در زمینه کلون سازی بخش HC نوروتوکسین *کلاستریدیوم بوتولینیوم*، متفاوت است.

نتیجه گیری

نتایج به دست آمده در مطالعه حاضر کلون سازی موفقیت آمیز ژن رمز گذار بخش HC سم بوتولیسم در باکتری *اشریشیا کلی* را نشان داد. بنابراین به نظر می‌رسد ساختار تولید شده در این پژوهش می‌تواند به عنوان کاندیدای واکسن ژنی علیه نوروتوکسین *بوتولینیوم* در مطالعات آینده مورد استفاده قرار گیرد.

تشکر و قدردانی

نویسنده این مقاله مراتب تشکر و سپاس خود را از حوزه معاونت پژوهشی و همکاران مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد به دلیل حمایت های علمی و و مالی اعلام می‌دارد.

References

1. Dhaked RK, Singh MK, Singh P, Gupta P. Botulinum toxin: Bioweapon and magic drug. Indian J Med Res. 2010; 132: 489-503.
2. Adams MR, Moss MD. Food Microbiology. Cambridge, 2nd ed, R.S.C 2002; 200-212.
3. Shapiro RL, Hatheway C, Swerdlow DL. Botulism in the United States: a clinical and epidemiologic review. Ann Intern Med.1998; 129: 221-228.
4. Tavakoli HR, Zeynali M, Mehrabi Tavana A. Scrutiny of food-borne botulism intoxication in Iran during 2003-2007 with the food hygiene view point. Hakim Res J. 2009; 11(4): 38-46. [In Persian]
5. Rusnak JM, Smith LA. Botulinum neurotoxin vaccines past history and recent developments. Hum Vaccin. 2009; 5(12): 794-805.

6. Vahdani P. Botulism and food poisoning. Nazhat publication. 2001; 111-117.

7. Vahdani P. The epidemiological survey on patients who were hospitalized in Logman Hakim Hospital with dignosis Botulism during 1997- 1998. The sixth congress in infectious diseases and tropical medicine. Shiraz University.

8. Porshafie A, Saadati M, Salimian J. Foodborne botulism due to consumption of local product cheese. Nabz J. 1996; 7: 44-47. [In Persian]

9. Sharpe AE, Brady CP, Byrne W, Moriarty J, O'Neill P, McLaughlin JG. Major outbreak of suspected botulism in a dairy herd in the Republic of Ireland. Vet Rec. 2008; 162(13): 409-412.

10. Jain S, Ponmariappan S, Kumar O. Development of immunodetection system for botulinum neurotoxin type B using synthetic gene based recombinant protein. Indian J Med Res. 2011; 134: 33-39.

11. Baldwin MR, Tepp WH, Przedpelski A, Pier CL, Bradshaw M, Johnson EA, Barbieri JT. Subunit vaccine against the seven serotypes of botulism. Infect. Immun. 2008; 76: 1314-1318.

12. Zichel R, Mimran A, Keren A, Barnea A, Steinberger-Levy I, Marcus D, Turgeman A, Reuveny S. Efficacy of a potential trivalent vaccine based on Hc fragments of botulinum toxins A, B, and E Produced in a cell-free expression system. Clin Vaccine Immunol. 2010; 17 (5): 784-792.

13. Macdonald TE, Helma CH, Shou Y, Valdez YE, Ticknor LO Foley BT, Davis SW, Hannett GE, Kelly-Cirino CD, Barash JR, Arnon SS, Lindström M, Korkeala H, Smith LA, Smith TJ, Hill KK. Analysis of *Clostridium botulinum* serotype E strains by using multilocus sequence typing, amplified fragment length polymorphism, variable-number tandem-repeat analysis, and botulinum neurotoxin gene sequencing. Appl Environ Microbiol. 2011; 77: 8625-8634.

14. Critchley EMR. A comparison of human and animal botulism. J R Soc Med. 1991; 84(5): 295-298.

15. Mereb G, Rosetti F, Castelli E, Ganuza R, Ottavioni, Cavallero D, Calderon A. Description of a botulism type C outbreak among waterbirds in the province of La Pamp, Argentina. Anaerobe. 1999; 5: 191-193.

16. Schoenbaum MA, Hall SM, Glock RD, Grant K, Jenny AL, Schiefer TJ, Sciglibaglio P, Whitlock RH. An outbreak of type C botulism in 12 horses and a mule. J Am Vet Med Assoc. 2000; 217(3): 365-368.

17. Srivastava IK, Liu MA. Gene vaccines. Ann Intern Med. 2003; 138: 550-559.

18. Yu Y, Zhang S, Sun Z, Wang S, Yu W. Enhanced immune responses using plasmid DNA replicon vaccine encoding the Hc domain of *Clostridium botulinum* neurotoxin serotype A. Vaccine. 2007; 25: 8843-8850.

19. Zhou Y, Foss S, Lindo P, Sarkar H, Singh BR. Hemagglutinin 33 of type A botulinum neurotoxin complex binds with synaptotagmin II. FEBS J. 2005; 272 (11): 2717-2726.

20. Bennett AM, Perkins SD, Holley JL. DNA vaccination protects against Botulinum neurotoxin type F. Vaccine. 2003; 21: 3110-3117.

21. Jathoul AP, Holley JL, Garmory HS. Efficacy of DNA vaccines expressing the type F botulinum toxin Hc fragment using different promoters. Vaccine. 2004; 22: 3942-3946.

22. Liu MA. DNA vaccines: a review. J Int Med. 2003; 253: 402-410.

23. Shyu RH, Shaio MF, Tang SS, Shyu HF, Lee CF, Tsai MH, Smith JE, Huang HH, Wey JJ, Huang JL, Chang HH. DNA vaccination using the fragment C of botulinum neurotoxin type A provided protective immunity in mice. J Biomed Sci. 2000; 7: 51-57.

24. Holley JL, Elmore M, Mauchline M, Minton N, Titball RW. Cloning, expression, and evaluation sub-unit vaccine against clostridium type F toxin. Vaccin. 2001; 19: 288-297.

25. Yu YZ, Li N, Wang RL, Zhu HQ, Wang S, Yu WY, Sun ZW. Evaluation of a recombinant Hc of Clostridium botulinum neurotoxin serotype F as an effective subunit vaccine. Clin Vaccine Immunol. 2008; 15(12):1819-1823.

26. Woodward LA, Arimitsu H, Hirst R, Oguma K. Expression of Hc subunits from *C. botulinum* type C and D and their evaluation as candidate vaccine antigens in mice. Infect Immun. 2003;71: 2941-2944.

Journal of Microbial World
Volume 5, No. 3 & 4, January 2013

Original Article

Cloning of the gene encoding neurotoxin heavy chain of *Clostridium botulinum* in *E. coli*

Abbas Doosti[1]

[1]Assistant Professor, Biotechnology Research Center, Islamic Azad University, Shahrekord Branch, Shahrekord, Iran.

Abstract

Background and Objectives: Botulism is a food poisoning problem in which the transmission of neuromuscular stimuli is disrupted due to the activity of botulinum neurotoxins (BoNT) produced by *Clostridium botulinum*. The botulinum neurotoxins are the most known toxic substances that cause flaccid paralysis due to preventing the release of the neurotransmitter acetylcholine at neuromuscular junctions. The aim of this study was cloning the heavy chain (HC) domain of *Clostridium botulinum* neurotoxin gene in *E. coli* as a gene vaccine candidate.

Materials and Methods: In this study, the heavy chain of neurotoxin of *Clostridium botulinum* was fully amplified based on PCR and the specific primers. DNA fragment of heavy chain of neurotoxin gene was cloned by T/A cloning technique in PCR 8/GW/TOPO vector and the clone was transformed into *E. coli*.

Results: Cloning of 2530 bp of neurotoxin was confirmed by PCR. The results of next step showed that the heavy chain of *Clostridium botulinum* neurotoxin was successfully cloned in *E. coli* . Final confirmation of construct was done by *Bam*HI and *Hind*III restriction enzymes.

Conclusion: According to the results, the amplified gene can be used as a target for gene vaccines against botulism in the future.

Keywords: Botulism, Neurotoxin, Cloning, Heavy chain.

Correspondance to: Abbas Doosti
Tel: +983813361001
E-mail: abbasdoosti@yahoo.com
Journal of Microbial World 2013, 5(3&4): 77-84.