**مجله ایمنی زیستی**

**دوره ۱۶، شماره ۴، زمستان ۱۴۰۲**

**ISSN 2716-9804 الکترونیکی، ISSN 2717-0632 چاپی**

# بررسی تنوع سیستم‌های CRISPR-Cas در باکتری *کلستریدیوم بوتولینوم* با استفاده از رویکرد کاوش ژنی

نوع مقاله: پژوهشی

**نعیمه شیخ الاسلامی[۱]، حمید میرزائی[۱و۲]، جلیل خندقی[۲و۳]، یوسف نامی[۴]، افشین جوادی[۱و۲*]**

۱- گروه بهداشت مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی، واحد علوم پزشکی تبریز، دانشگاه آزاد اسلامی، تبریز، ایران.

۲- گروه بیوتکنولوژی مواد غذایی، مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی، واحد تبریز، دانشگاه آزاد اسلامی، تبریز، ایران.

۳- گروه علوم و صنایع غذایی، واحد سراب، دانشگاه آزاد اسلامی، سراب، ایران.

۴- گروه بیوتکنولوژی مواد غذایی، واحد شمال غرب و غرب پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی (AREEO)، تبریز، ایران.

hmirzaei@iaut.ac.ir

تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۰۲/۲۲، تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۰۵/۰۱

صفحه ۳۴-۱۷

## چکیده

سیستم تکرارهای کوتاه پالیندرومیک خوشه‌ای منظم و پروتئین مرتبط با آن یا CRISPR-Cas اهداف ژنتیکی ارزشمندی برای تجزیه و تحلیل فیلوژنی باکتری‌ها در مطالعات همه‌گیری شناسی محسوب می‌شوند. در این مطالعه داده‌های ژنومی ۸۰۰ توالی سویه‌های *کلستریدیوم بوتولینوم* از پایگاه داده مرکز ملی اطلاعات بیوتکنولوژی (NCBI) جمع‌آوری و حضور و تنوع سیستم‌های CRISPR-Cas کامل و توالی‌های فاصله‌انداز و تکرارهای آن در ژنوم‌های ثبت شده برای این باکتری‌ها با روش *In-silico* ارزیابی شد. همچنین ساختارهای ثانویه توالی‌های تکراری بر اساس الگوریتم حداقل انرژی آزاد (MFE) پیش‌بینی شد. بر اساس نتایج، از مجموع ۵۲۶ ژنوم با آرایه CRISPR-Cas کامل، تعداد ۳۰۶ سویه (۵۸ درصد) دارای ژن‌های *Cas* بودند. زیرگروه‌های I-B، I-D، II-C، III-D و III-B در این آرایه‌ها شناسائی شد. یافته‌ها همچنین نشان داد که Cas 6 پروتئین اصلی تولید شده توسط مجموعه ژن‌های بیان‌کننده در سیستم‌های CRISPR-Cas مورد مطالعه است و پروتئین‌های متنوع Cas توسط ماژول‌های سازگاری و تداخل در این آرایه‌ها تولید می‌شوند. طول متوسط توالی‌های فاصله‌انداز و تکرار در آرایه‌های CRISPR به ترتیب ۳۵-۳۰ و ۳۶-۳۰ جفت باز بود. به‌علاوه، پیش‌بینی ساختارهای ثانویه‌ی توالی‌های تکراری نشان داد که زیرگروه II-C، با ساقه‌های بلندتر نسبت به سایر زیرگروه‌ها، تمایل به تشکیل ساختارهای ثانویه RNA پایدارتری دارد.

**واژه‌های کلیدی:** توالی تکرار، توالی فاصله‌انداز، کاوش ژن، *کلستریدیوم بوتولینوم*، CRISPR-Cas.

[ Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2026-11-12 ]

## مقدمه

*کلستریدیوم بوتولینوم* (*Clostridium botulinum*) باکتری گرم مثبت و بی‌هوازی اجباری تولیدکننده آندوسپور است که به‌عنوان باکتری بیماری‌زا و عامل فساد غذایی شناخته می‌شود. سویه‌های این باکتری هتروژن بوده و از نظر سرولوژیکی هفت نوع از باکتری *C. botulinum* (A-G) شناخته شده‌است. سروتیپ‌های A، B، E و F باعث ایجاد بوتولیسم انسان و حیوان بوده درحالی که انواع C وD باعث بوتولیسم حیوانی می‌شوند (Lindström et al. 2010). سموم عصبی بوتولینوم قوی‌ترین سموم زیستی شناخته شده تا به امروز هستند که توسط *C. botulinum* و برخی دیگر از گونه‌های *کلستریدیوم* تولید می‌شوند. سم بوتولین باعث ایجاد عوارض متعددی مانند افتادگی پلک، فلجی، تهوع و استفراغ، گرفتگی شکم و اختلال در بلع یا تکلم می‌شود (Rossetto et al. 2014).

موارد اپیدمی متعدد بوتولیسم ناشی از مصرف سوسیس‌ها یا غذاهای کنسروی سبب اتخاذ اقدامات کنترلی خاصی به‌ویژه برای تولید غذاهای کنسروی شده‌است. با اینحال، به‌ویژه در مورد غذاهای آماده سرد، بوتولیسم همچنان یک چالش محسوب می‌شود، زیرا این میکروب می‌تواند در یخچال رشد کند (Hashempour-Baltork et al. 2019). یکی از نکات مهم در مورد این باکتری بیماری‌زا این است که ژن‌های تولید توکسین در کلستریدیوم‌ها بر روی کروموزوم، پلاسمیدها یا فاژها شناسایی شده‌اند و این ژن‌ها می‌توانند از طریق پلاسمیدها (Smith et al. 2015) و همچنین باکتریوفاژها (Skarin et al. 2011) به روش انتقال افقی ژن (horizontal gene transfer) بین سویه‌های مختلف *C. botulinum* و همچنین برخی از گونه‌های غیر بوتولینوم جابجا شوند (Hill et al. 2015). بنابراین، دانش بیشتر در مورد سویه‌های *C. botulinum* به درک بهتر مکانیسم سم‌زایی و یافتن راهکارهای بازدارنده کمک می‌کند.

ارزیابی تنوع ژنتیکی سویه‌های دخیل در اپیدمی برای درک توزیع فیلوژنتیکی عوامل ایجادکننده، نظارت بر شیوع بیماری‌ها و اتخاذ تدابیر مدیریتی ضروری است. ردیابی و طبقه‌بندی جدایه‌های بالینی به طور معمول با روش‌هایی مانند ژل الکتروفورز میدان پالسی (pulse-field gel electrophoresis) و تعیین توالی چند لوکوس (multilocus sequence typing) انجام می‌شود (Kuijper et al. 2009) و همچنین روش استاندارد برای تفکیک نوع سویه‌ها نیز توالی‌یابی کل ژنوم جدایه‌ها است (Andersen et al. 2016)، اما این رویکردها هنوز برای اکثر آزمایشگاه‌ها غیرقابل دسترس هستند. در این میان، سیستم تکرارهای کوتاه پالیندرومیک خوشه‌ای منظم و پروتئین



[ Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2026-11-12 ]

مرتبط با آن یا CRISPR-Cas ( Clustered regularly interspersed short palindromic repeats-CRISPR associated protein) اهداف ژنتیکی ارزشمندی در مطالعات اپیدمیولوژیک برای تجزیه و تحلیل فیلوژنی باکتری‌ها (از جمله بیماری‌زاهای انسانی) با دقت بالا محسوب می‌شوند (Shariat and Dudley, 2014).

سیستم‌های CRISPR-Cas در اصل یکی از سیستم‌های ایمنی میکروبی است که در دفاع باکتری در برابر انواع عناصر ژنتیکی متحرک مانند فاژها و پلاسمیدها نقش دارد. این راهکارها با برش عناصر ژنتیکی مهاجم خارجی از ایجاد عفونت جلوگیری می‌کنند. آرایه‌های CRISPR نشان‌دهنده حافظه ایمنی عفونت‌های قبلی است که درون فاصله‌اندازهای جداگانه رمزگذاری شده‌اند و با تکرارهای حفظ‌شده از هم جدا می‌شوند (Panahi et al. 2023). به‌عبارت بهتر پروتئین‌های Cas اسید نوکلئیک خارجی را که وارد سلول پروکاریوتی شده است، شناسایی کرده و آن را به یک توالی جدید پردازش می‌کنند که به‌صورت یک رونوشت آر.ان.اِ از ناحیه CRISPR موسوم به crRNA نگهداری می‌شود. این فرآیند به سلول باکتری اجازه می‌دهد تا در صورت مواجهۀ مجدد، اسید نوکلئیک خارجی را هدف قرار دهند. همچنین پروتئین‌های Cas به‌عنوان نوکلئاز و هلیکاز عمل کرده و توانایی باز کردن و برش دادن دی.ان.اِ را دارند (Karvelis et al. 2013). به‌علاوه، تنوع و پراکندگی این جایگاه‌ها که از آرایه‌های فاصله‌انداز و تکرارشونده تشکیل شده‌اند می‌تواند نشان‌دهنده مواجهه یک سویه میکروبی با عناصر ژنتیکی مهاجم بوده و در شکل‌گیری روابط خویشاوندی بین سویه‌های دارای اجداد مشترک و بنابراین نمایش مسیرهای تکاملی در طول زمان مورد استفاده قرار گیرد (Shariat and Dudley, 2014). بنابراین، ماهیت متفاوت آرایه‌های CRISPR آن‌ها را برای کاربردهای تعیین تیپ، به‌ویژه در گونه‌هایی با سیستم‌های فعال CRISPR-Cas ارزشمند می‌کند. همچنین پژوهشگران این سیستم را به‌عنوان ابزاری برای ویرایش ژن توسعه داده‌اند ( Jiang et al. 2013). ابزارهای بیوانفورماتیکی روش‌هایی برای توسعه دانش در حوزه‌های مختلف، بدون نیاز به آزمایشات وقت‌گیر و گران‌قیمت آزمایشگاهی هستند (Lino et al. 2018) به‌طوری‌که در گذشته مطالعات متعددی در مورد سیستم‌های CRISPR بر اساس این رویکرد در باکتری‌های گوناگون انجام شده است ( Nami et al. 2021; Pursey et al. 2022; Yadav and Singh, 2022).

این مطالعه با هدف بررسی حضور و ویژگی‌های سیستم‌های CRISPR-Cas در سویه‌های مختلف *C. botulinum* با روش *In-silico* طراحی شده است. اطلاعاتی که در مورد سیستم‌های CRISPR-



[ Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2026-11-12 ]

Cas به دست خواهد آمد، می‌تواند در درک بهتر زمینه‌های تکاملی این باکتری بیماری‌زا و بررسی اهداف فاژی و یا پلاسمیدی باکتری و مکانیسم‌های دفاعی ذاتی آن در برابر عناصر متحرک ژنتیکی در مطالعات آینده مورد استفاده قرار گیرد.

## مواد و روش‌ها

### جمع‌آوری داده‌های ژنومی

به‌منظور جمع‌آوری داده‌های سویه‌های مختلف *C. botulinum* در این پژوهش، لیست ۸۰۰ توالی ژنومی و ژنوم‌های سرهم‌بندی شده با متاژنوم یا MAGs (Metagenome-assembled genomes) برای این باکتری استفاده شد. توالی‌های ژنوم کامل به همراه اطلاعات مرتبط و همچنین MAG برای *کلستریدیوم بوتولینوم* (در قالب FASTA) از پایگاه داده مرکز ملی اطلاعات بیوتکنولوژی (NCBI) جمع‌آوری و استخراج شد.

### شناسایی سیستم‌های CRISPR-Cas در ژنوم باکتری‌ها

در قدم اول، تشخیص تکرارهای جزئی در انتهای آرایه‌های CRISPR در ژنوم باکتری‌ها با استفاده از Meta CRT انجام شد (Moller and Liang, 2017). یک آرایهٔ CRISPR طولانی ممکن است به دلیل تکرار با جهش‌های بیش از حد یا فاصله‌اندازهای طولانی، به چندین مورد تقسیم شود که برای جلوگیری از این حالت، کریسپرهایی که توالی‌های تکراری مشابه‌ای را در یک مکان به اشتراک می‌گذارند و نزدیک به یکدیگر هستند (۱۰۰۰۰ جفت باز)، به‌عنوان یک CRISPR واحد در نظر گرفته شدند. در قدم بعدی، تکرارهای حفاظت شده برای هر آرایهٔ CRISPR تعیین و با استفاده از CD-HIT-EST بر اساس دستورالعمل و گزینه‌های استاندارد خوشه‌بندی شد (Li and Godzik, 2006). سپس از hmmscan برای جستجوی پروتئین‌های Cas مرتبط با سیستم‌های شناسایی شده با بهره‌گیری از داده پایگاه pfam استفاده شد و بر این اساس پروتئین‌های Cas در یکی از دسته‌های پروتئینی universal، Cas1، Cas5، Cas7، Cas8، Cas9، Cas10، csf1 و cpf1 طبقه‌بندی شدند (Panahi et al. 2023).

### تعیین نوع و زیرشاخه CRISPR-Cas

جایگاه CRISPR همراه با ژن‌های *Cas* مرتبط با آن به‌عنوان یک جایگاه CRISPR-Cas تعریف می‌شوند. برای پیش‌بینی نوع سیستم CRISPR از پایگاه داده‌ی CRISPR-Cas$^{++}$ (https://crisprcas.i2bc.paris-saclay.fr/)استفاده شد (Nami et al. 2023). جایگاه‌های CRISPR، تکرارهای مستقیم و فاصله‌اندازها در سویه‌های باکتریایی *C. botulinum*، در این داده پایگاه تعیین



[ Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2026-11-12 ]

شدند. در مرحله بعد، ۱۰۰۰۰ جفت باز در بالادست و پایین دست CRISPRهای به دست آمده انتخاب و به وب سرور CRISPR-Cas Finder ( https://crisprcas.i2bc.paris-saclay.fr/ CRISPRCasFinder/Index) منتقل شد تا ژن‌های *Cas* مرتبط را شناسایی کند ( Panahi et al. 2023). در این مرحله، نوع سیستم‌های دفاعی در یکی از کلاس‌های I، II، III، IV و V تعیین گروه و طبقه‌بندی خواهند شد.

به‌علاوه، برای اعتبارسنجی بیشتر و نیز به‌منظور شناسایی نوع و زیرشاخه آرایه‌های CRISPR شناسایی‌شده، از پایگاه داده CRISPRone ( https://omics.informatics.indiana.edu/ CRISPRone/) استفاده شد و فقط مکان‌های تأیید شده برای تنوع سیستم CRISPR مورد ارزیابی قرار گرفت (Zhang and Ye, 2017). پایگاه داده CRISPRone ابزاری برای پیش‌بینی مکان‌های CRISPR و تصویرسازی آرایهٔ CRISPR است و اطلاعاتی مانند مشخصات آرایه، مکان و جهت tracrRNA، طول ناحیه ضد تکرار (anti-repeat) و عدم تطابق (mismatch) را ارائه می‌دهد.

### پیش‌بینی ساختار ثانویه توالی‌های تکراری

برای مطالعه‌ی ساختارهای ثانویه‌ی توالی‌های تکراری بر اساس توالی‌های حفاظت شده در هر نوع از آرایه‌های CRISPR، نوکلئوتیدهای T با U جایگزین شده و سپس ساختار ثانویه RNA بر اساس الگوریتم حداقل انرژی آزاد ( minimum free energy) در پایگاه RNAfold ( http://rna.tbi.univie.ac.at/cgi-bin/RNAWeb Suite/RNAfold.cgi) پیش‌بینی شد ( Hofacker. 2003). لازم به ذکر است در این نرم‌افزار پیش‌فرض تعیین شده در نرم‌افزار ارائه بهترین تاخوردگی‌است.

## نتایج و بحث

### سیستم‌های CRISPR-Cas شناسایی شده

در این مطالعه، از مجموع ۵۲۶ ژنوم با آرایهٔ CRISPR-Cas کامل متعلق به سویه‌های *C. botulinum* که از پایگاه داده NCBI جمع‌آوری شد، بر اساس جستجوی سیستم‌های CRISPR تأیید شده ۳۰۶ جدایه دارای ژن‌های *Cas* بودند که ۵۸ درصد از سویه‌های مورد بررسی را شامل می‌شود. تا به امروز، تنها یک مطالعه در رابطه با نقش و ارزیابی سیستم‌های CRISPR در باکتری *C. botulinum* منتشر شده است ( Negahdaripour et al. 2017). در مطالعه مذکور که بر روی تعداد ۱۰۰ سویه *C. botulinum* انجام شده بود ۸۰ درصد سویه‌های مورد بررسی دارای سیستم‌های CRISPR تأیید شده بودند.

برای تعیین نوع و زیرگروه آرایه‌های کامل CRISPR-Cas سویه‌های *C. botulinum*



[ Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2026-11-12 ]

شناسایی‌شده در پژوهش حاضر از الگوریتم Blast پروتئین استفاده شد. در جدول۱، جایگاه‌های CRISPR شناسایی شده کامل که حاوی ژن *Cas* بودند نشان داده شده است. همانطوری‌که مشاهده می‌شود زیرگروه‌های I-B، I-D، II-C، III-D و III-B در این آرایه‌ها وجود دارد (جدول۱).

**جدول ۱**- آرایه‌های CRISPR-Cas شناسایی شده در سویه‌های *C. botulinum*

| ردیف | سویه | نوع | جهت قرارگیری | ردیف | سویه | نوع | جهت قرارگیری | ردیف | سویه | نوع | جهت قرارگیری |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| ۱ | Okra | I/III | -/+ | ۱۰۳ | Su1935 | I-B | - | ۲۰۵ | IZSVe-TV_1899_2_14 | I-D | + |
| ۲ | BF | I-B | + | ۱۰۴ | Su1918 | I-B | + | ۲۰۶ | IZSVe-TV_1671_2_11 | I-D | - |
| ۳ | Eklund | I-B | + | ۱۰۵ | AM526 | I-B | - | ۲۰۷ | IZSVe-TV_7863_07 | I-D | + |
| ۴ | Loch Maree | I-B | + | ۱۰۶ | Su0850 | I-B | + | ۲۰۸ | IZSVe-TV_6025_15 | I-D | + |
| ۵ | BoNT E Beluga | I-B | + | ۱۰۷ | Man111 | I-B | + | ۲۰۹ | IZSVe-TV_3522_4_13 | I-D | + |
| ۶ | 1873 | I-B | + | ۱۰۸ | BrQuSJ | I-B | + | ۲۱۰ | IZSVe-TV_2667_2_14 | I-D | + |
| ۷ | V891 | I-B | + | ۱۰۹ | Su0110 | I-B | - | ۲۱۱ | IZSVe-TV_2454_7_14 | I-D | + |
| ۸ | BkT028387 | I-B | - | ۱۱۰ | CDC59947 | I-B/III-B | +/+ | ۲۱۲ | IZSVe-TV_3524_3_13 | I-D | + |
| ۹ | BKT015925 | I-B | + | ۱۱۱ | CDC48611 | I-B/III-B | +/+ | ۲۱۳ | IZSVe-TV_1585_18_11 | I-D | + |
| ۱۰ | CB11.1-1 | I-B | + | ۱۱۲ | CCUG7969 | I-B/III-B | +/+ | ۲۱۴ | IZSVe-TV_5262_1_14 | I-D | + |
| ۱۱ | Af84 | I-B | + | ۱۱۳ | 62-A-KM138-1 | I-B/III-B | -/- | ۲۱۵ | IZSVe-TV_2454_6_14 | I-D | + |
| ۱۲ | CDC54085 | I-B | + | ۱۱۴ | Cam11A-KM36-1 | I-B/III-B | +/+ | ۲۱۶ | IZSVe-TV_3522_5_13 | I-D | - |
| ۱۳ | CDC54075 | I-B | - | ۱۱۵ | JP6-A-KM22-1 | I-B/III-B | +/+ | ۲۱۷ | CCUG7971 | II-C | + |
| ۱۴ | 16868 | I-B | + | ۱۱۶ | 78A-KM34-1 | I-B/III-B | +/+ | ۲۱۸ | 1277_DC | II-C | + |
| ۱۵ | BKT75002 | I-B | + | ۱۱۷ | DFPST0043 | I-B | + | ۲۱۹ | F1425 | III-D | - |
| ۱۶ | BKT2873 | I-B | -/+ | ۱۱۸ | KM28 | I-B | + | ۲۲۰ | B305 | III-D | + |
| ۱۷ | BKT12695 | I-B/III | -/- | ۱۱۹ | KM78-1-VHE | I-B | - | ۲۲۱ | B609 | III-D | - |
| ۱۸ | Sp77 | I-B | - | ۱۲۰ | DFPST009 | I-B/III-B | +/+ | ۲۲۲ | B515 | III-D | - |
| ۱۹ | B2 433 | I-B | + | ۱۲۱ | KM125-1-BelugaE | I-B | + | ۲۲۳ | Su1036 | III-D | - |
| ۲۰ | A2B387 | I-B/III-B | -/- | ۱۲۲ | DFPST008 | I-B/III-B | +/+ | ۲۲۴ | ATCC3502 | III-B | - |
| ۲۱ | B2 331 | I-B | - | ۱۲۳ | DFPST010 | I-B | + | ۲۲۵ | Hall | III-B | - |

[ Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2026-11-12 ]

| ردیف | سویه | نوع | جهت قرارگیری | ردیف | سویه | نوع | جهت قرارگیری | ردیف | سویه | نوع | جهت قرارگیری |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| ۲۲ | A2B792 | I-B | + | ۱۲۴ | 69-A-KM145-1 | I-B/III-B | +/+ | ۲۲۶ | langeland | III-B | − |
| ۲۳ | KAPB-3 | I-B | + | ۱۲۵ | SCPM-O-B-7189 | I-B | + | ۲۲۷ | ATCC19397 | III-B | − |
| ۲۴ | DC5 | I-B/III-B/I-D | −/+/+ | ۱۲۶ | SCPM-O-B-8707 | I-B | − | ۲۲۸ | 657 | III-B | − |
| ۲۵ | 111 | I-B/III | −/− | ۱۲۷ | IZSVe-TV_9877_1_12 | I-B | −/+ | ۲۲۹ | 230613 | III-B | − |
| ۲۶ | Prevot_594 | I-B | − | ۱۲۸ | IZSVe-TV_6537_1_13 | I-B | + | ۲۳۰ | H04402065 | III-B | − |
| ۲۷ | CDC_1436 | I-B/III-B | −/+ | ۱۲۹ | IZSVe-TV_6433_3_13 | I-B | + | ۲۳۱ | CFSAN002369 | III-B | − |
| ۲۸ | B2 450 | I-B | + | ۱۳۰ | IZSVe-TV_10018_12 | I-B | + | ۲۳۲ | CFSAN002367 | III-B | − |
| ۲۹ | CDC68016 | I-B | − | ۱۳۱ | IZSVe-TV_7573_3_12 | I-B/III-B/I-D | +/+/− | ۲۳۳ | CFSAN002368 | III-B | − |
| ۳۰ | CDC41370 | I-B/III-B | −/+ | ۱۳۲ | IZSVe-TV_7573_4_12 | I-B/I-D/III-B | −/+/− | ۲۳۴ | Osaka05 | III-B | − |
| ۳۱ | 48212-CD | I-B | − | ۱۳۳ | IZSVe-TV_900_3_11 | I-B | − | ۲۳۵ | CDC54088 | III-B | + |
| ۳۲ | 38028-CD | I-B | + | ۱۳۴ | IZSVe-TV_9877_3_12 | I-B | − | ۲۳۶ | B2_267 | III-B | − |
| ۳۳ | 12LNR13-CD | I-B | + | ۱۳۵ | IZSVe-TV_6433_2_13 | I-B | + | ۲۳۷ | B2 275 | III-B | − |
| ۳۴ | 49511-CD | I-B | − | ۱۳۶ | IZSVe-TV_6433_4_13 | I-B | + | ۲۳۸ | CDC-297 | III-B | + |
| ۳۵ | 51714-DC | I-B/I-D/III-B | +/+/+ | ۱۳۷ | IZSVe-TV_6186_1_16 | I-B | − | ۲۳۹ | Prevot25NCASE | III-B | − |
| ۳۶ | 47295-DC | I-B/I-D/III-B | −/−/+ | ۱۳۸ | IZSVe-TV_7608_3_14 | I-B | − | ۲۴۰ | CDC41370NT | III-B | − |
| ۳۷ | 71840-CD | I-B | + | ۱۳۹ | IZSVe-TV_6606L_3_14 | I-B | − | ۲۴۱ | Walls8G | III-B | + |
| ۳۸ | 58272-CD | I-B | + | ۱۴۰ | IZSVe-TV_6188_5_16 | I-B | − | ۲۴۲ | ATCC17862 | III-B | + |
| ۳۹ | ATCC 25763 | I-B/III-B | +/+ | ۱۴۱ | IZSVe-TV_5694_2_13 | I-B | − | ۲۴۳ | AM1295 | III-B | + |
| ۴۰ | ATCC 17786 | I-B | − | ۱۴۲ | IZSVe-TV_10380_20_14 | I-B/III-B | −/− | ۲۴۴ | SU 1575 NT | III-B | − |
| ۴۱ | SU 1064 | I-B | + | ۱۴۳ | IZSVe-TV_8103_09 | I-B | − | ۲۴۵ | Prevot 697B | III-B | − |
| ۴۲ | 211 | I-B/III-B | −/+ | ۱۴۴ | IZSVe-TV_2659_2_10 | I-B | − | ۲۴۶ | SU 0729 | III-B | − |
| ۴۳ | SU 0994 | I-B | + | ۱۴۵ | IZSVe-TV_6433_6_13 | I-B | − | ۲۴۷ | McCLung 844 | III-B | + |
| ۴۴ | SU 1891 | I-B | − | ۱۴۶ | IZSVe-TV_2659_1_10 | I-B | − | ۲۴۸ | ATCC 449 | III-B | + |
| ۴۵ | SU 1274 | I-B | − | ۱۴۷ | IZSVe-TV_4045_5_13 | I-B/III-B | +/− | ۲۴۹ | Walls 8G | III-B | + |
| ۴۶ | SU 1054 | I-B | − | ۱۴۸ | IZSVe-TV_10380_18_14 | I-B/III-B | −/− | ۲۵۰ | VPI 7124 | III-B | − |
| ۴۷ | SU 1072 | I-B | − | ۱۴۹ | IZSVe-TV_10380_17_14 | I-B/III-B | −/− | ۲۵۱ | KFMeyer 33 | III-B | + |

[ Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2026-11-12 ]

| ردیف | سویه | نوع | جهت قرارگیری | ردیف | سویه | نوع | جهت قرارگیری | ردیف | سویه | نوع | جهت قرارگیری |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| ۴۸ | Prevot Dewping | I-B/III-B | –/– | ۱۵۰ | IZSVe-TV_5313_4_14 | I-B | – | ۲۵۲ | CDC_69096 | III-B | – |
| ۴۹ | SU 1304 | I-B | + | ۱۵۱ | IZSVe-TV_6315_2_15 | I-B | + | ۲۵۳ | GiorgioA-KM21-1 | III-B | – |
| ۵۰ | SU 1917 | I-B | + | ۱۵۲ | IZSVe-TV_7574_5_12 | I-B/III-B | +/– | ۲۵۴ | KM123 | III-B | + |
| ۵۱ | SU 1937 | I-B | – | ۱۵۳ | IZSVe-TV_1585_19_11 | I-B/III-B | +/– | ۲۵۵ | CCUG7968 | III-B | + |
| ۵۲ | KF Meyer 126 | I-B/III-B | –/– | ۱۵۴ | IZSVe-TV_6660_7_15 | I-B | – | ۲۵۶ | CDC21601 | III-B | – |
| ۵۳ | Hall 80 | I-B/III-B | +/+ | ۱۵۵ | IZSVe-TV_66061_3_14 | I-B | – | ۲۵۷ | B742 | III-B | – |
| ۵۴ | An436 | I-B/III-B | –/– | ۱۵۶ | IZSVe-TV_5792_11 | I-B | – | ۲۵۸ | CFSAN034200 | III-B | + |
| ۵۵ | Prevot 910 | I-B/III-B | +/+ | ۱۵۷ | IZSVe-TV_5313_3_14 | I-B | + | ۲۵۹ | CDC69043 | III-B | – |
| ۵۶ | CDC KA-95B | I-B | + | ۱۵۸ | IZSVe-TV_3650_3_13 | I-B | – | ۲۶۰ | CDC69057 | III-B | + |
| ۵۷ | CDC_69094 | I-B | – | ۱۵۹ | IZSVe-TV_3650_1_13 | I-B | – | ۲۶۱ | CDC_67086 | III-B | + |
| ۵۸ | AM282 | I-B | – | ۱۶۰ | IZSVe-TV_7494_7_14 | I-B | – | ۲۶۲ | CDC68158 | III-B | + |
| ۵۹ | F634 | I-B | + | ۱۶۱ | IZSVe-TV_6503_1_13 | I-B | – | ۲۶۳ | NCTC13319 | III-B | + |
| ۶۰ | 1276_DC | I-B/I-D/II-C | –/+/+ | ۱۶۲ | IZSVe-TV_5262_6_14 | I-B/III-B | +/– | ۲۶۴ | DFPST011 | III-B | + |
| ۶۱ | 1274_DC | I-B/I-D/II-C | –/–/+ | ۱۶۳ | IZSVe-TV_3859_5_11 | I-B/III-B | +/– | ۲۶۵ | X58540 | III-B | – |
| ۶۲ | BS-A-KM7-1 | I-B/III-B | +/+ | ۱۶۴ | IZSVe-TV_1899_2_14 | I-B/III-B | +/– | ۲۶۶ | H20 | III-B | + |
| ۶۳ | DFPST 010 | I-B | + | ۱۶۵ | IZSVe-TV_1671_2_11 | I-B/III-B | +/– | ۲۶۷ | P85 | III-B | + |
| ۶۴ | CCUG 7969 | I-B/III-B | +/+ | ۱۶۶ | IZSVe-TV_7863_07 | I-B/III-B | +/– | ۲۶۸ | H11 | III-B | – |
| ۶۵ | BrDura | I-B | – | ۱۶۷ | IZSVe-TV_6025_15 | I-B/III-B | +/– | ۲۶۹ | 20150006193-DFPST | III-B | – |
| ۶۶ | A634 | I-B | + | ۱۶۸ | IZSVe-TV_3522_4_13 | I-B/III-B | +/– | ۲۷۰ | KM87-1-86F | III-B | – |
| ۶۷ | AM1051 | I-B | + | ۱۶۹ | IZSVe-TV_2667_2_14 | I-B/III-B | +/– | ۲۷۱ | KM84 | III-B | – |
| ۶۸ | Food_20 | I-B/III-B | –/– | ۱۷۰ | IZSVe-TV_4863_4_13 | I-B | + | ۲۷۲ | DFPST0028 | III-B | – |
| ۶۹ | RF5 | I-B/III-B | +/+ | ۱۷۱ | IZSVe-TV_9659_15 | I-B | – | ۲۷۳ | GS1342-KM11-1 | III-B | + |
| ۷۰ | MAP5 | I-B/III-B | +/+ | ۱۷۲ | IZSVe-TV_5792_2_15 | I-B | + | ۲۷۳ | 20150006195-DFPST | III-B | + |
| ۷۱ | CFSAN064329 | I-B/III-B | –/– | ۱۷۳ | IZSVe-TV_2454_7_14 | I-B/III-B | –/– | ۲۷۵ | DFPST0033 | III-B | – |
| ۷۲ | ATCC17841 | I-B/III-B | +/+ | ۱۷۴ | IZSVe-TV_6289_14 | I-B | – | ۲۷۶ | Cam2A-KM19-1 | III-B | + |

[ Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2026-11-12 ]

| ردیف | سویه | نوع | جهت قرارگیری | ردیف | سویه | نوع | جهت قرارگیری | ردیف | سویه | نوع | جهت قرارگیری |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| ۷۳ | CDC69 068 | I-B/III-B | +/+ | ۱۷۵ | IZSVe-TV_6422_2_14 | I-B | – | ۲۷۷ | GiorgioA-KM21-1 | III-B | – |
| ۷۴ | CDC37 496 | I-B/III-B | –/+ | ۱۷۶ | IZSVe-TV_5850_15 | I-B | + | ۲۷۸ | CJ5-1 | III-B | – |
| ۷۵ | BAC-04-07755 | I-B/III-B | +/+ | ۱۷۷ | IZSVe-TV_3524_3_13 | I-B/III-B | +/– | ۲۷۹ | 2015006187-DFPST | III-B | + |
| ۷۶ | AM922 | I-B | + | ۱۷۸ | IZSVe-TV_4863_2_13 | I-B | – | ۲۸۰ | DFPST0032 | III-B | – |
| ۷۷ | ZBS3_16-257-02 | I-B/III-B | +/+ | ۱۷۹ | IZSVe-TV_1585_18_11 | I-B/III-B | +/– | ۲۸۱ | Cam3A-KM20-1 | III-B | + |
| ۷۸ | ZBS3_16-240-01 | I-B/III-B | +/+ | ۱۸۰ | IZSVe-TV_5262_1_14 | I-B/III-B | –/+ | ۲۸۲ | KM52-1-383B | III-B | + |
| ۷۹ | ZBS3_16-257-05 | I-B/III-B | +/+ | ۱۸۱ | IZSVe-TV_5792_1_15 | I-B | + | ۲۸۳ | 97A-KM35-1 | III-B | + |
| ۸۰ | ZBS3_16-257-04 | I-B/III-B | +/+ | ۱۸۲ | IZSVe-TV_2454_6_14 | I-B/III-B | –/+ | ۲۸۴ | Cbot23-KM43-1 | III-B | + |
| ۸۱ | ATCC25763 | I-B/III-B | –/– | ۱۸۳ | IZSVe-TV_4879_20_10 | I-B | – | ۲۸۵ | 73A-KM33-1 | III-B | + |
| ۸۲ | 2015006229-DFPST | I-B | + | ۱۸۴ | IZSVe-TV_3522_5_13 | I-B/III-B | +/–– | ۲۸۶ | DFPST0024 | III-B | + |
| ۸۳ | DFPST0041 | I-B/IIIB | –/– | ۱۸۵ | IZSVe-TV_10380_13_14 | I-B/III-B | –/– | ۲۸۷ | DFPST0025 | III-B | – |
| ۸۴ | KM25 | I-B | – | ۱۸۶ | FE9504ACG | I-B | – | ۲۸۸ | DFPST0027 | III-B | – |
| ۸۵ | DFPST012 | I-B/III-B | –/+ | ۱۸۷ | OKra_BUMBAC_00010 | I-B/III-B | –/+ | ۲۸۹ | KM123 | III-B | + |
| ۸۶ | DFPST007 | I-B/III-B | +/+ | ۱۸۸ | Beluga_EUMBAC_00009 | I-B | – | ۲۹۰ | KM88-1-PC-F | III-B | – |
| ۸۷ | DFPST002 | I-B/III-B/III-B | +/–/+ | ۱۸۹ | 69_AUMBAC_00004 | I-B/III-B | +/+ | ۲۹۱ | DFPST0029 | III-B | – |
| ۸۸ | DFPST0006 | I-B/III-B | +/– | ۱۹۰ | 62_AUMBAC_00003 | I-B/III-B | –/– | ۲۹۲ | DFPST0031 | III-B | + |
| ۸۹ | DFPST005 | I-B | + | ۱۹۱ | CDC61126 | I-B | + | ۲۹۳ | 2015006204-DFPST | III-B | + |
| ۹۰ | DFPST0017 | I-B | + | ۱۹۲ | 3213087 | I-B | + | ۲۹۴ | DFPST0026 | III-B | – |
| ۹۱ | DFPST011 | I-B | + | ۱۹۳ | 3213029 | I-B | + | ۲۹۵ | KM90-1-8G-F | III-B | – |
| ۹۲ | SBPRU-0556 | I-B | – | ۱۹۴ | 3213041 | I-B | + | ۲۹۶ | KM53 | III-B | – |
| ۹۳ | 3859 11 | I-B/III-B | +/+ | ۱۹۵ | FE9508BPD | I-B | + | ۲۹۷ | KM57-1-TJ980B | III-B | + |
| ۹۴ | E-1331 | I-B | – | ۱۹۶ | FE9508BRB | I-B/III-B | –/+ | ۲۹۸ | CC1-A-KM44-1 | III-B | – |
| ۹۵ | P559 | I-B | – | ۱۹۷ | PA9508B | I-B/III-B | –/+ | ۲۹۹ | CC4A-KM61-1 | III-B | + |
| ۹۶ | P81 | I-B | + | ۱۹۸ | LNC5-DC | I-D/II-C | –/– | ۳۰۰ | ST7B | III-B | + |
| ۹۷ | H4 | I-B | + | ۱۹۹ | Stockholm | I-D/III-B | +/+ | ۳۰۱ | 90_AUMBAC_00005 | III-B | + |



[ Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2026-11-12 ]

| ردیف | سویه | نوع | جهت قرارگیری | ردیف | سویه | نوع | جهت قرارگیری | ردیف | سویه | نوع | جهت قرارگیری |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| ۹۸ | H41 | I-B | + | ۲۰۰ | IZSVe-TV_4045_5_13 | I-D | + | ۳۰۲ | 56_AUMBAC_00002 | III-B | + |
| ۹۹ | H49 | I-B | - | ۲۰۱ | IZSVe-TV_7574_5_12 | I-D | + | ۳۰۳ | TMW2.991 | III-B | - |
| ۱۰۰ | H61 | I-B | - | ۲۰۲ | IZSVe-TV_1585_19_11 | I-D | - | ۳۰۴ | FE9508BPD | III-B | + |
| ۱۰۱ | P551 | I-B | - | ۲۰۳ | IZSVe-TV_5262_6_14 | I-D | + | ۳۰۵ | DFPST005 | III-B | - |
| ۱۰۲ | H34 | I-B | - | ۲۰۴ | IZSVe-TV_3859_5_11 | I-D | + | ۳۰۶ | DFPST0017 | III-B | - |

در بین جدایه‌ها ۱۲۰ مورد (۳۹/۲۱ درصد) در زیرگروه I-B، پنج مورد (۱/۶۳ درصد) در زیرگروه II-C، ۱۷ مورد (۵/۵۶ درصد) در زیرگروه I-D، پنج مورد (۱/۶۳ درصد) در زیرگروه III-D و ۸۳ مورد (۲۷/۱۲ درصد) در زیرگروه III-B قرار گرفتند. همان‌طوری‌که در جدول ۱ دیده می‌شود نزدیک به یک پنجم از سویه‌های *C. botulinum* بررسی شده به‌صورت هم‌زمان دو یا چند نوع آرایهٔ CRISPR-Cas در ژنوم خود داشتند. سه نوع سیستم CRISPR باکتریایی شناسایی شده تا کنون، عبارتند از الف) سیستم کریسپر نوع I که برای برش از پروتئین‌های متعدد مانند ریبونوکلئوپروتئین‌های Cas1، Cas6 و Cas5 استفاده می‌کند و در حال حاضر به هفت زیر شاخه (I-A، I-B، I-C، I-D، I-E، I-F و I-U) تقسیم‌بندی شده است. ب) سیستم کریسپر نوعII نیز برای فعالیت به پروتئین‌های کمتری از جمله Cas9 نیاز داشته و به سه زیرشاخه (II-A، II-B و II-C) تقسیم شده است. ج) سیستم کریسپر نوع III که برای فعالیت به پروتئین‌های زیادی از جمله Cas2 و Cas6 نیاز داشته و به دو زیرشاخه (III-A و III-B) تقسیم شده است. در مطالعه‌ی قبلی انجام شده بر روی *C. botulinum* تنها زیرگروه‌های I-B و III-B در ۱۰۰ سویهٔ این باکتری شناسایی شد (Negahdaripour et al. 2017).

شایع‌ترین زیرگروه آرایه‌های CRISPR-Cas در سویه‌های *C. botulinum* در پژوهش حاضر نیز همین دو زیر گروه هستند.

**تنوع ساختار پروتئینی در سیستم‌های CRISPR-Cas**

بر اساس بررسی‌های صورت گرفته، پروتئین‌های ساختاری و عملکردی تشکیل‌دهندهٔ سیستم‌های CRISPR-Cas از نظر ترکیب پروتئینی، ترتیب قرارگیری پروتئین‌ها و نیز جهت قرارگیری برای ایجاد یک واحد عملکردی CRISPR-Cas با هم متفاوت بودند. ژن *Cas* نوع مکان CRISPR/Cas را در هر آرایه تعیین می‌کند

[ Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2026-11-12 ]

و شناسایی یک پروتئین Cas زمانی مطمئن است که حداقل دارای سه ژن *Cas* سازگار باشد (به جز نوع V) زیرا برای نوع V تنها یک ژن منفرد cpf1 گزارش شده است (Makarova et al. 2011).

ارزیابی ما نشان داد (شکل۱) که مجموعه ژن‌های بیان‌کننده پروتئین‌های Cas ( expression module) در آرایه‌های CRISPR-Cas متعلق به پروتئین Cas 6 است که تقریباً در تمام سیستم‌های پیش‌بینی‌شده وجود دارد و اهمیت عملکردی Cas6 را در مدولاسیون ایمنی سویه‌های *C. botulinum* برجسته می‌کند. Cas 6 جزء اصلی ماژول بیان در آرایه‌های CRISPR-Cas باکتریایی است (Makarova et al. 2020). ژن‌های بیان‌کننده، رونویسی، پردازش، و بارگذاری موثر crRNAها بر روی پروتئین‌های Cas را تضمین کرده و سیستم CRISPR-Cas را قادر می‌سازد تا به‌طور موثر عناصر ژنتیکی خارجی را شناسایی کرده و در برابر آن‌ها دفاع کند ( Munawar and Ahmad, 2021).

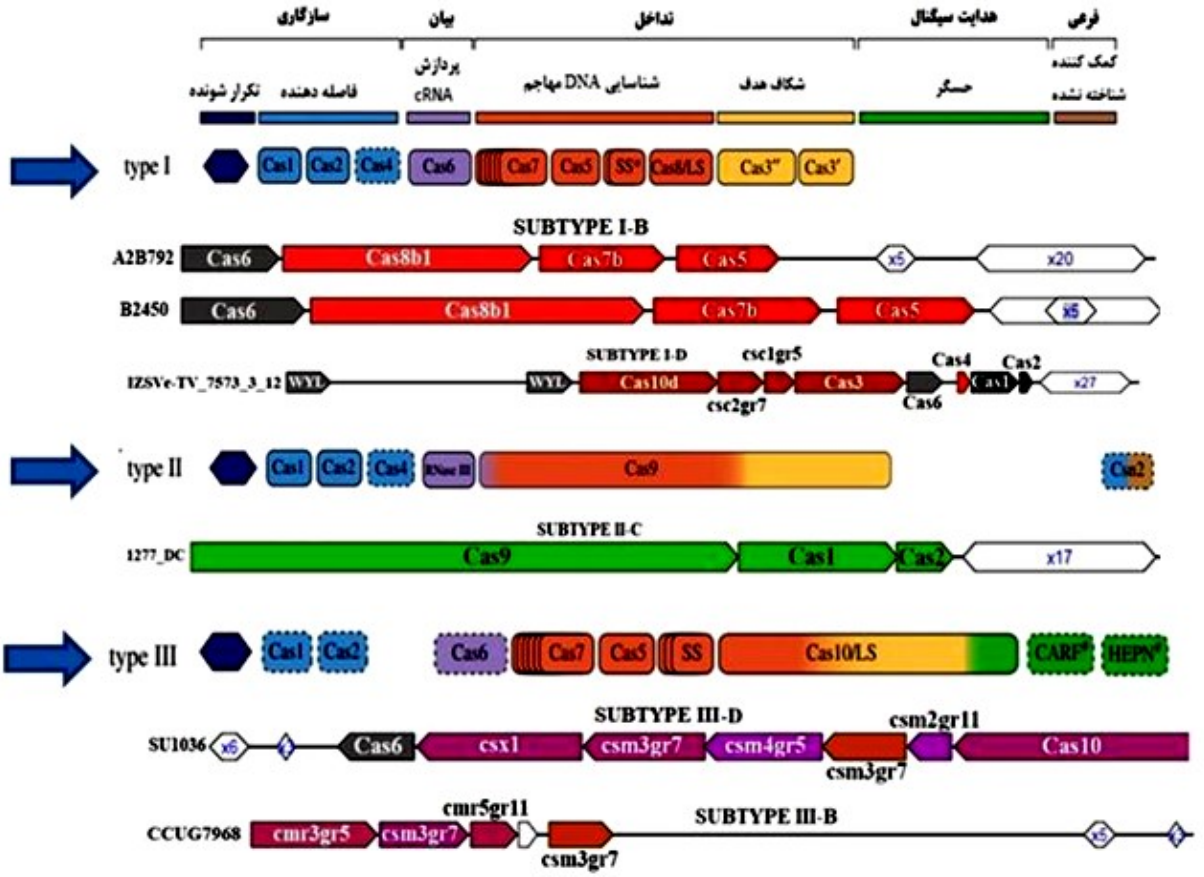
یافته‌ها همچنین نشان دادند که مجموعه ژن‌های سازگاری (adaptation module) در سیستم‌های کریسپر زیرگروه‌های I-D و I-B سویه‌های *C. botulinum* شامل ژن‌های تولید پروتئین Cas1، Cas2 و Cas4 است، درحالی‌که در زیرگروه II-C این پروتئین‌ها شامل Cas1 و Cas2 است. همچنین، هیچ ماژول سازگاری در زیرگروه‌های III-D و III-B مشاهده نشد (شکل۱). مجموعه ژن‌های سازگاری در آرایه‌های CRISPR-Cas به باکتری‌ها اجازه می‌دهد تا با متصل شدن به قطعات دی.ان.ای خارجی، نسبت به عناصر ژنتیکی خاصی مصونیت پیدا کنند ( Faure et al. 2019). به‌علاوه، تجزیه و تحلیل ژنومی سویه‌های *C. botulinum* انواع متنوعی از ماژول‌های تداخل (interference module) را شناسایی کرد. این ژن‌ها در زیرگروه I-B، پروتئین‌های Cas3، Cas5، Cas7 و Cas8 را تولید می‌کردند که Cas5 در همه سویه‌ها وجود داشت. آرایه‌های سویه‌های نوع I-D فقط Cas3 را در ماژول تداخل در خود جای دادند و در زیرگروه II-D، همه‌ی سویه‌ها Cas9 را به‌عنوان جزء اصلی ماژول تداخل نشان دادند. همچنین، در زیرگروه‌های III-D و III-B، به‌جز سویه‌های A2B387 و CCUG7968، همه باکتری‌ها حاوی Cas10 به‌عنوان جزء اصلی ماژول تداخل برای این زیرگروه بودند (شکل۱). مشخص شده است که ماژول تداخل به شناسایی و برش قطعات ژنومی هدف کمک می‌کنند (Zhang et al. 2020).

ماژول تداخل آرایه‌های CRISPR-Cas کلاس I غالبا از ژن‌های سازنده پروتئین‌های Cas3، Cas5، Cas7، Cas8 و Cas3HD تشکیل شده است (Bhatia & Yadav, 2023) و ژن‌های ماژول تداخل در آرایه‌های کلاس II نیز معمولا شامل



[ Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2026-11-12 ]

ژن‌های ایجادکننده پروتئین Cas9 است (Makarova et al. 2020). همچنین، پروتئین‌های Cas5، Cas7 و Cas10 هم اغلب محصول ژن‌های ماژول تداخل در آرایه‌های CRISPR- Cas کلاس III باکتری‌ها هستند (Tamulaitis et al. 2017).




**شکل ۱**- شماتیک آرایهٔ CRISPR-Cas کامل متعلق به زیرگروه‌های I-B، I-D، II-C، III-D و III-B شناسایی شده در باکتری *C. botulinum*

### توالی‌های فاصله‌انداز و تکرارها

بررسی توالی‌های فاصله‌انداز و تکرارها در سیستم‌های کامل CRISPR-Cas در سویه‌های *C. botulinum* انجام و خلاصه‌ی پنج ویژگی عددی شامل کمترین مقدار (lower whisker)، یک چهارم اول (first quartile)، میانه (median)، یک چهارم سوم (third quartile) و بیشترین مقدار (upper whisker) برای این توالی‌ها نشان داده شد (جداول ۲، ۳ و ۴). گزارش شده است که طول فاصله‌اندازها و تکرارها در سیستم‌های CRISPR-Cas نقش مهمی در تعیین ویژگی، پایداری، کارایی و پویایی تکاملی پاسخ ایمنی

[ Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2026-11-12 ]

ایجاد شده توسط این سیستم‌ها ایفا می‌کنند (Nussenzweig and Marraffini, 2020). همانطوری‌که در جدول۲ نشان داده شده است، در زیرگروه‌های I-B، I-D، III-D، و III-B طول متوسط فاصله‌اندازها ۳۵ جفت باز بود، درحالی که در آرایهٔ نوع II-C طول ۳۰ جفت باز مشاهده شد. همچنین مشخص شد بالاترین تعداد توالی‌های فاصله‌انداز سیستم‌های CRISPR، در زیرگروه II-C (با میانگین۱۷ فاصله‌انداز) وجود دارد (جدول۳). فاصله‌اندازهای طولانی‌تر به دلیل توانایی بیشتر در هدف قرار دادن عناصر ژنتیکی، ایمنی بیشتری را ایجاد می‌کنند (Heler et al. 2017). از سوی دیگر، فاصله‌اندازهای کوتاه‌تر ممکن است با هدف‌گیری کمتر اختصاصی، خطر برش ناخواسته دی.ان.ای میزبان را افزایش دهند (Doench et al. 2014).

مقایسه میانگین طول توالی‌های تکرار در میان پنج زیرگروه سیستم‌های CRISPR-Cas در سویه‌های *C. botulinum* شناسایی شده نشان داد که زیرگروه‌های I-D و II-C دارای میانگین طول تکرار ۳۶ جفت باز بودند، در حالی که زیرگروه‌های I-B، III-D و III-B میانگین طول تکرار ۳۰ جفت باز را نشان دادند (جدول۴). ثابت شده است که توالی‌های تکرارهای طولانی‌تر، ادغام فاصله‌اندازهای جدید در آرایهٔ CRISPR را تسهیل کرده و بنابراین منجر به کارایی بالاتر در اکتساب ایمنی جدید باکتری میزبان در برابر عناصر ژنتیکی مهاجم می‌شود (Heler et al. 2017).

علاوه‌بر این، توالی‌های طولانی به پایداری ساختاری آرایهٔ CRISPR کمک می‌کند. این ثبات برای حفظ یکپارچگی آرایه در طول زمان و در نسل‌های متعدد سلول‌های باکتری میزبان مهم است (Levy et al. 2015).

**جدول ۲**- تنوع طول فاصله‌اندازها در جایگاه‌های CRISPR شناسایی شده در سویه‌های *C. botulinum*

| نوع سیستم CRISPR | بیشترین مقدار | یک چهارم سوم | میانه | یک چهارم اول | کمترین مقدار |
|---|---|---|---|---|---|
| I-B | ۳۱ | ۳۰ | ۳۰ | ۲۹ | ۲۸ |
| I-D | ۳۶ | ۳۶ | ۳۶ | ۳۶ | ۳۶ |
| II-C | ۳۶ | ۳۶ | ۳۶ | ۳۶ | ۳۶ |
| III-D | ۳۱ | ۳۰ | ۳۰ | ۲۹ | ۲۸ |
| III-B | ۳۴ | ۳۲ | ۳۰ | ۳۰ | ۲۸ |

[ Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2026-11-12 ]

**جدول ۳**- تنوع تعداد فاصله‌اندازها در جایگاه‌های CRISPR شناسایی شده در سویه‌های *C. botulinum*

| نوع سیستم CRISPR | بیشترین مقدار | یک چهارم سوم | میانه | یک چهارم اول | کمترین مقدار |
|---|---|---|---|---|---|
| I-B | ۳۴ | ۱۹ | ۱۱ | ۷ | ۱ |
| I-D | ۱۲ | ۱۱ | ۱۱ | ۶ | ۳ |
| II-C | ۱۷ | ۱۷ | ۱۷ | ۱۷ | ۱۷ |
| III-D | ۶ | ۶ | ۳/۵ | ۳ | ۳ |
| III-B | ۱۱ | ۷ | ۶ | ۴ | ۳ |

**جدول ۴**- تنوع طول تکرارهای حفاظت شده در جایگاه‌های CRISPR شناسایی شده در *C. botulinum*

| نوع سیستم CRISPR | بیشترین مقدار | یک چهارم سوم | میانه | یک چهارم اول | کمترین مقدار |
|---|---|---|---|---|---|
| I-B | ۳۷ | ۳۶ | ۳۵ | ۳۵ | ۳۴ |
| I-D | ۳۶ | ۳۶ | ۳۵ | ۳۵ | ۳۵ |
| II-C | ۳۰ | ۳۰ | ۳۰ | ۳۰ | ۳۰ |
| III-D | ۳۵ | ۳۵ | ۳۵ | ۳۵ | ۳۵ |
| III-B | ۳۷ | ۳۵ | ۳۵ | ۳۱ | ۲۶ |

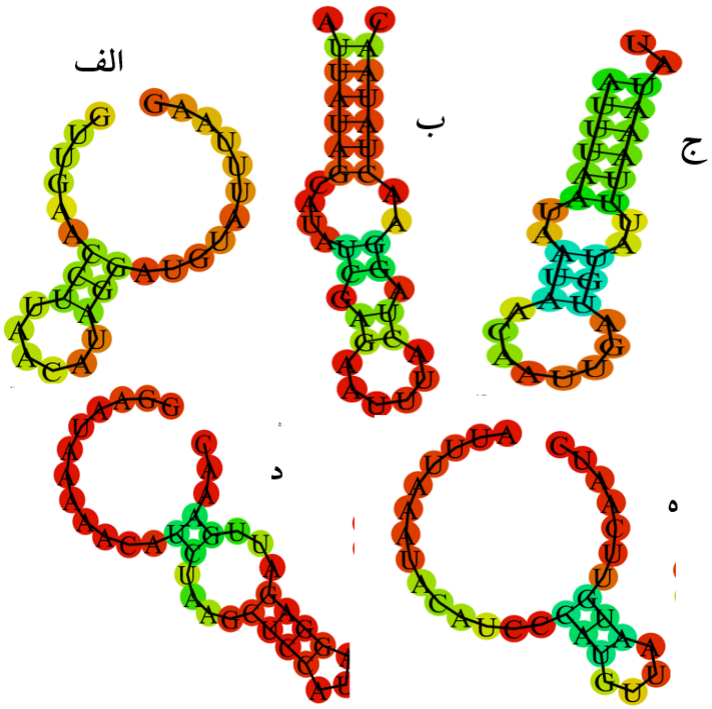
**پیش‌بینی ساختار ثانویه تکرارهای مستقیم**

در شکل۲ ساختار مربوط به هر زیر گروه آرایهٔ CRISPR/Cas باکتری‌های *C. botulinum* نشان داده شده است و همانطوری‌که مشاهده می‌شود، ساختارهای ثانویه آر.ان.ای متنوع بوده و همگی ساقه‌هایی را در وسط تشکیل می‌دهند. بر اساس پارامترهای پیش‌فرض سیستم، در هر ساختار رنگ‌های قرمز و سبز به ترتیب نشان‌دهنده‌ی نقاط با احتمال بالا و پایین کانفورماسیون هستند. توالی‌های تکرار مستقیم در جایگاه‌های CRISPR مرتبط با ژن‌های *Cas* زیرگروه‌های I-D و I-B، به ترتیب طول ساقه‌های ۵ و ۶ جفت باز با حداقل انرژی آزاد ۰/۲۰- و ۴/۷۳- کیلوکالری بر مول را نشان دادند، درحالی‌که در زیرگروه II-C، طول ساقه ۷ جفت باز با حداقل انرژی آزاد ۰/۱۰- کیلوکالری بر مول مشاهده شد. این پیش‌بینی نشان می‌دهد که زیرگروه II-C، با ساقه‌های بلندتر در مقایسه با زیرگروه‌های I-D و I-B، تمایل به تشکیل ساختارهای ثانویه آر.ان.ای پایدارتری دارد. کوتاه‌ترین ساقه‌های ساختار ثانویه تکرارهای مستقیم با ۴ جفت باز (با حداقل انرژی آزاد ۲/۰۰- کیلوکالری بر مول) نیز در زیرگروه III-B از آرایه‌های CRISPR/Cas سویه‌های *C. botulinum* مطالعه شده وجود داشت (شکل۲).

تجزیه ساختار ثانویه تکرارهای مستقیم، اطلاعاتی در مورد سیستم CRISPR/Cas به‌دست

[ Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2026-11-12 ]

می‌دهد به‌طوری که ساختار مناسب که منجر به آزاد شدن crRNAهای منحصر به فرد می‌شود، برای شناسایی و از بین بردن اهداف ژنومی توسط پروتئین‌های Cas میزبان، بسیار مهم است (O'Connell. 2019). پیوندهایی که بین جفت بازهای CG و AU در ساختار سه بعدی مولکول آر.ان.اِ وجود دارد باعث پایداری آن شده و این مفهوم به‌عنوان مدل پایین‌ترین سطح انرژی نامیده می‌شود چرا که برای باز کردن آن باید مقداری انرژی (به‌صورت گرما) به‌کار برد. بنابراین هر ساختار ثانویه آر.ان.اِ پایدار، همیشه یک ارزش انرژی منفی بر حسب کیلوکالری بر مول دارد (Ghaffarian and Panahi, 2023). اثبات شده است ساختارهایی با محتوای GC بیشتر و ساقه (stem) بلندتر پایدارتر از ساختارهایی با محتوای GC کمتر و طول کوتاه‌تر هستندو همچنین اثبات شده است ساختارهای ثانویه با محتوای بازهای گوانین و سیتوزین بیشتر و ساقه بلندتر، پایدارتر از ساختارهایی با محتوای GC کمتر و طول کوتاه‌تر هستند (Yang et al. 2020).




**شکل ۲**- ساختارهای ثانویه توالی‌های تکرار در آرایه‌های CRISPR باکتری *C. botulinum*. الف) آرایهٔ نوع III-B متعلق به سویهٔ CDC_1436 با انرژی ۲/۰۰- کیلوکالری بر مول، ب) آرایهٔ نوع II-C متعلق به سویهٔ DC_۱۲۷۷ با انرژی ۱/۰۰- کیلوکالری بر مول، ج) آرایهٔ نوع I-B متعلق به سویهٔ DFPST010 با انرژی ۰/۲۰- کیلوکالری بر مول، د) آرایهٔ نوع I-D متعلق به سویهٔ IZSVe-TV_7573_4_12 با انرژی ۴/۷۳- کیلوکالری بر مول و ه) آرایهٔ نوع III-D متعلق به سویهٔ B515 با انرژی ۰/۱۰- کیلوکالری بر مول.

[ Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2026-11-12 ]

در مجموع، مطالعه حاضر تنوع قابل‌توجه‌ای از سیستم‌های CRISPR-Cas را در سویه‌های *C. botulinum* نشان داد که شامل پنج زیرگروه مجزا است. این تنوع نقش طبیعی این سیستم ها را به‌عنوان دفاع ایمنی فعال در برابر فاژها و دی.ان.اِ خارجی برجسته می‌کند. بین گونه‌های مورد مطالعه در تعداد و توالی فاصله‌اندازها و توالی‌های تکرارهای حفاظت شده، همچنین ساختار ثانویه تکرارهای مستقیم تنوع بالایی مشاهده شد. این پژوهش بینشی عمیق از تنوع و عملکرد سیستم CRISPR/Cas در باکتری *C. botulinum* ارائه می‌کند و اطلاعات پایه‌ای با ارزشی را برای مطالعات پیش رو فراهم می‌کند، به‌طوریکه تنوع و ویژگی سیستم‌های CRISPR-Cas، می‌تواند درک ما از ژنتیک میکروبی و توسعه ابزارهای مهندسی ژنتیکی و راهکارهای کنترل زیستی علیه این باکتری را افزایش دهد.

## فهرست منابع

## References


**Andersen JM, Shoup M, Robinson C, Britton R, Olsen KE, Barrangou R. 2016.** CRISPR diversity and microevolution in *Clostridium difficile*. Genome biology and evolution 8(9): 2841-2855.

**Bhatia S, Yadav SK. 2023.** CRISPR-Cas for genome editing: Classification, mechanism, designing and applications. International Journal of Biological Macromolecules. 124054.

**Doench JG, Hartenian E, Graham DB, Tothova Z, Hegde M, Smith I, Sullender M, Ebert BL, Xavier RJ, Root DE. 2014**. Rational design of highly active sgRNAs for CRISPR-Cas9–mediated gene inactivation. Nature biotechnology. 32(12): 1262-1267.

**Faure G, Makarova KS, Koonin EV. 2019.** CRISPR–Cas: complex functional networks and multiple roles beyond adaptive immunity. Journal of molecular biology. 431(1): 3-20.

**Ghaffarian S, Panahi B. 2023.** Investigating the diversity of phage and plasmid targets of the CRISPR/Cas systems in the Leuconostoc genus using the insilico approach. Journal of Biosafety. 16(1). (In Farsi with English abstract)

**Hashempour-Baltork F, Hosseini H, Shojaee-Aliabadi S, Torbati M, Alizadeh AM, Alizadeh M. 2019.** Drug resistance and the prevention strategies in food borne bacteria: An update review. Advanced pharmaceutical bulletin. 9(3): 335.

**Heler R, Wright AV, Vucelja M, Bikard D, Doudna JA, Marraffini LA. 2017.** Mutations in Cas9 enhance the rate of acquisition of viral spacer sequences during the CRISPR-Cas immune response. Molecular cell. 65(1): 168-175.

**Hill KK, Xie G, Foley BT, Smith TJ. 2015.** Genetic diversity within the botulinum neurotoxin-producing bacteria and their neurotoxins. Toxicon. 107: 2-8.

**Hofacker IL. 2003.** Vienna RNA secondary structure server. Nucleic acids research. 31(13): 3429-3431.

**Jiang W, Bikard D, Cox D, Zhang F, Marraffini LA. 2013.** RNA-guided editing of bacterial genomes using CRISPR-Cas systems. Nature biotechnology. 31(3): 233-239.


[ Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2026-11-12 ]

**Karvelis T, Gasiunas G, Miksys A, Barrangou R, Horvath P, Siksnys V. 2013.** crRNA and tracrRNA guide Cas9-mediated DNA interference in *Streptococcus thermophilus*. RNA biology. 10(5): 841-851.

**Kuijper EJ, van den Berg RJ, Brazier JS. 2009.** Comparison of molecular typing methods applied to *Clostridium difficile*. Molecular Epidemiology of Microorganisms: Methods and Protocols. 159-171.

**Levy A, Goren MG, Yosef I, Auster O, Manor M, Amitai G, Edgar R, Qimron U, Sorek R. 2015.** CRISPR adaptation biases explain preference for acquisition of foreign DNA. Nature. 520(7548): 505-510.

**Li W, Godzik A. 2006.** Cd-hit: a fast program for clustering and comparing large sets of protein or nucleotide sequences. Bioinformatics. 22(13): 1658-1659.

**Lindström M, Myllykoski J, Sivelä S, Korkeala H. 2010.** *Clostridium botulinum* in cattle and dairy products. Critical reviews in food science and nutrition. 50(4): 281-304.

**Lino CA, Harper JC, Carney JP, Timlin JA. 2018.** Delivering CRISPR: a review of the challenges and approaches. Drug delivery. 25(1): 1234-1257.

**Makarova KS, Wolf YI, Iranzo J, Shmakov SA, Alkhnbashi OS, Brouns SJ, Charpentier E, Cheng D, Haft DH, Horvath P. 2020.** Evolutionary classification of CRISPR–Cas systems: a burst of class 2 and derived variants. Nature Reviews Microbiology. 18(2): 67-83.

**Makarova KS, Aravind L, Wolf YI, Koonin EV. (2011).** Unification of Cas protein families and a simple scenario for the origin and evolution of CRISPR-Cas systems. Biology direct. 6: 1-27.

**Moller AG, Liang C. 2017.** MetaCRAST: reference-guided extraction of CRISPR spacers from unassembled metagenomes. PeerJ. 5: e3788.

**Munawar N, Ahmad A. 2021.** CRISPR/Cas system: an introduction. CRISPR Crops: The Future of Food Security. 1-35.

**Nami Y, Imeni N, Panahi B. 2021.** Application of machine learning in bacteriophage research. BMC microbiology. 21(1): 1-8.

**Nami Y, Rostampour M, Panahi B. 2023.** CRISPR-Cas systems and diversity of targeting phages in *Lactobacillus johnsonii* strains; insights from genome mining approach. Infection, Genetics and Evolution. 114: 105500.

**Negahdaripour M, Nezafat N, Hajighahramani N, Rahmatabadi SS, Ghasemi Y. 2017.** Investigating CRISPR-Cas systems in *Clostridium botulinum* via bioinformatics tools. Infection, Genetics and Evolution. 54: 355-373.

**Nussenzweig PM, Marraffini LA. 2020.** Molecular mechanisms of CRISPR-Cas immunity in bacteria. Annual review of genetics. 54: 93-120.

**O'Connell MR. 2019.** Molecular mechanisms of RNA targeting by Cas13-containing type VI CRISPR–Cas systems. Journal of molecular biology. 431(1): 66-87.

**Panahi B, Dehganzad B, Nami Y. 2023.** CRISPR-Cas systems feature and targeting phages diversity in *Lacticaseibacillus rhamnosus* strains. Frontiers in microbiology. 14: 1281307.

**Pursey E, Dimitriu T, Paganelli FL, Westra ER, van Houte S. 2022.** CRISPR-Cas is associated with fewer antibiotic resistance genes in bacterial pathogens. Philosophical Transactions of the Royal Society B. 377(1842): 20200464.

**Rossetto O, Pirazzini M, Montecucco C. 2014.** Botulinum neurotoxins: genetic, structural and mechanistic insights. Nature Reviews Microbiology. 12(8): 535-549.

**ShariatN., Dudley EG. 2014.** CRISPRs: molecular signatures used for pathogen subtyping. Applied and environmental microbiology. 80(2): 430-439.

**Skarin H, Håfström T, Westerberg J, Segerman B. 2011.** *Clostridium botulinum* group III: a group with dual identity shaped by plasmids, phages and mobile elements. BMC genomics. 12(1): 1-13.

[ Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2026-11-12 ]

**Smith TJ Hill KK, Raphael BH. 2015.** Historical and current perspectives on *Clostridium botulinum* diversity. Research in Microbiology. 166(4): 290-302.

**Tamulaitis G, Venclovas Č, Siksnys V. 2017.** Type III CRISPR-Cas immunity: major differences brushed aside. Trends in microbiology. 25(1): 49-61.

**Yadav G, Singh R. 2022.** In silico analysis reveals the co-existence of CRISPR-Cas type I-F1 and type I-F2 systems and its association with restricted phage invasion in *Acinetobacter baumannii*. Frontiers in microbiology. 3079.

**Yang L, Li W, Ujiroghene OJ, Yang Y, Lu J, Zhang S, Pang X, Lv J. 2020.** Occurrence and diversity of CRISPR loci in *Lactobacillus casei* group. Frontiers in microbiology. 11: 624.

**Zhang H, Li Z, Xiao R, Chang L. 2020.** Mechanisms for target recognition and cleavage by the Cas12i RNA-guided endonuclease. Nature structural & molecular biology. 27(11): 1069-1076**.**

**Zhang Q, Ye Y. 2017.** Not all predicted CRISPR–Cas systems are equal: isolated cas genes and classes of CRISPR like elements. BMC bioinformatics. 18: 1-12.

# Investigation of CRISPR-Cas Systems Diversity in *Clostridium botulinum* via Genome Mining Approach

**Naiymeh Sheikholeslami [1], Hamid Mirzaei [1,2], Jalili Khandaghi [2,3], Yousef Nami [4], Afshin Javadi [1,2]**

1- Department of Food Hygiene, Faculty of Veterinary Medicine, Tabriz Medical Sciences, Islamic Azad University, Tabriz, Iran.

2- Department of food Biotechnology, Biotechnology Research Center, Tabriz Branch, Islamic Azad University, Tabriz, Iran.

3- Department of Food Science and Technology, Sarab Branch, Islamic Azad University, Sarab, Iran.

4- Department of Food Biotechnology, Branch for Northwest & West region, Agricultural Biotechnology Research, Institute of Iran, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Tabriz, Iran.

hmirzaei@iaut.ac.ir

**Abstract**

Clustered regularly interspaced short palindromic repeats and its associated protein or CRISPR-Cas systems are valuable genetic targets for bacterial phylogeny analysis in epidemiological studies. In this study, the genomic data of 800 sequences of *Clostridium botulinum* strains from the National Center for Biotechnology Information (NCBI) database was collected and the occurrence and variety of the complete CRISPR-Cas systems and its spacer and repeat sequences evaluated in the genomes recorded for these bacteria with the *in-silico* method. Also, the secondary structures of repeat sequences were predicted based on the minimum free energy (MFE) algorithm. According to the results, from the 526 genomes with complete CRISPR-Cas array, 306 strains (58%) had *Cas* genes. Subtypes I-B, I-D, II-C, III-D, and III-B were identified in these arrays. The findings also revealed that Cas 6 is the main protein produced by expression module genes in the studied CRISPR-Cas systems, and diverse Cas proteins are produced by the adaptation and interference modules in these arrays. The average length of spacer and repeat sequences in CRISPR arrays was 30-35 and 30-36 bp, respectively. Moreover, the prediction of secondary structures of repeat sequences showed that subtype II-C, with longer stems than other subtypes, tends to form more stable RNA secondary structures.

**Keywords:** *Clostridium botulinum*, CRISPR-Cas, Genome Mining, Repeat Sequence, Spacer Sequence.

[ Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2026-11-12 ]