

Changes in *ahpF* and *tviA* genes expression in *Salmonella enterica* PTCC 1230 upon osmotic and oxidative stress using Real-Time PCR

Mohammad Faezi Ghasemi *

Associate Professor, Head Department of Cell and Molecular Biology, Faculty of Basic Sciences-Lahijan Branch-Lahijan/Iran, faezi_m@yahoo.com

Hossein Zahmatkesh Zakariaei

MSc of Microbiology, Lahijan Branch- Islamic Azad University, Lahijan, Iran, hza_medimmune@yahoo.com

Abstract

Introduction: *Salmonella* is a member of the *Enterobacteriaceae* family causing infectious disease in human and animals. The diseases caused by this bacterium are typhoid, bacteremia, enterocolitis, salmonellosis which are a health problem worldwide. The aim of this study was to evaluate the changes in expression of *ahpF* and *tviA* genes in *Salmonella enterica* PTCC 1230 exposed to osmotic and oxidative stresses.

Materials and methods: For osmotic stress, *S. enterica* PTCC 1230 was subjected to 6, 8, 10, 12, and 14% (W/V) NaCl concentrations and for the oxidative stress, H₂O₂ at concentrations of 1200, 2400, 4800, 6000 and 7200 ppm were used. Change in expression of *ahpF* and *tviA* genes were quantified using Real-time PCR method.

Results: Based on the obtained results, NaCl at concentrations of 14% and 10% and H₂O₂ at concentrations of 7200 (ppm) and 6000 (ppm) had maximum effects on the bacterial growth, respectively. In concentration of 7200 ppm, the expression of *ahpF* gene increased about 1.8 and 2.5-fold more than H₂O₂ at 6000 ppm concentration and reference gene (16S rRNA). Also, in 14% (W/V) sodium chloride concentration the expression of *tviA* gene increased about 1.3 and 1.5 fold more than 10% and the reference gene (16S rRNA), respectively.

Discussion and conclusion: In this study, changes in expression level of *ahpF* and *tviA* genes upon oxidation and osmotic stresses were studied in *Salmonella enterica* PTCC 1230. The overall results of this study showed that the expression level of both *ahpF* and *tviA* genes were increased in stress condition and we recommend the study of the other genes incorporate in responses to environmental stresses.

Key words: Osmotic stress, Oxidative stress, *tviA* gene, *ahpF* gene, *Salmonella enterica* PTCC 1230, Real-Time PCR

* Corresponding author

Received: November 22, 2017 / **Accepted:** May 06, 2018

فصلنامه علمی- پژوهشی زیست‌شناسی میکروارگانیسم‌ها
سال هفتم، شماره ۲۷، پاییز ۱۳۹۷، صفحه ۲۳-۱۳
تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۰۹/۰۱ - تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۰۲/۱۶

تغییر در بیان ژن‌های *ahpF* و *tviA* در *Salmonella enterica* PTCC 1230 ناشی از تنش‌های اسمزی و اکسیداتیو با روش Real-Time PCR

محمد فائزی قاسمی* : گروه زیست‌شناسی سلولی مولکولی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی واحد لاهیجان، ایران، faezi_m@yahoo.com
حسین زحمتکش زکریایی: گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی واحد لاهیجان، ایران، hza_medimmune@yahoo.com

چکیده

مقدمه: سالمونلا یکی از اعضای خانواده انتروباکتریاسه است که باعث ایجاد بیماری‌های عفونی در انسان و حیوانات می‌شود. این باکتری بیماری‌هایی نظیر تب روده‌ای (تیفوئید)، باکتری، انتروکولیت و سالمونلوز ایجاد می‌کند که امروزه معضل بهداشتی در جهان محسوب می‌شوند. هدف بررسی و مطالعه حاضر، ارزیابی تغییرات ناشی از تنش‌های اسمزی و اکسیداتیو بر بیان ژن‌های *ahpF* و *tviA* در سالمونلا انتریکا PTCC 1230 است.

مواد و روش‌ها: برای اعمال تنش اسمزی، باکتری در معرض غلظت‌های ۶، ۸، ۱۰، ۱۲ و ۱۴ درصد وزنی/حجمی سدیم کلراید قرار گرفت و برای اعمال تنش اکسیداتیو از غلظت‌های ۱۲۰۰، ۲۴۰۰، ۴۸۰۰، ۶۰۰۰ و ۷۲۰۰ پی‌پی‌ام آب‌اکسیژنه استفاده شد. میزان کمی تغییر بیان ژن‌های *ahpF* و *tviA* با Real-Time PCR اندازه‌گیری شد.

نتایج: غلظت‌های ۱۴ و ۱۰ درصد سدیم کلراید و غلظت‌های ۷۲۰۰ و ۶۰۰۰ پی‌پی‌ام آب‌اکسیژنه بیشترین اثر را روی رشد سالمونلا انتریکا PTCC 1230 داشتند. میزان بیان ژن *ahpF* در غلظت ۷۲۰۰ پی‌پی‌ام آب‌اکسیژنه نسبت به شرایط ۶۰۰۰ پی‌پی‌ام و ژن مرجع (*16S rRNA*) به ترتیب ۱/۸ و ۲/۵ برابر افزایش یافت. همچنین بیان ژن *tviA* در غلظت ۱۴ درصد سدیم کلراید نسبت به غلظت ۱۰ درصد و ژن مرجع (*16S rRNA*) به ترتیب ۱/۳ و ۱/۵ برابر افزایش یافت.

بحث و نتیجه‌گیری: در پژوهش حاضر، میزان تغییر بیان ژن‌های *ahpF* و *tviA* در شرایط تنش‌های اسمزی و اکسیداتیو در باکتری سالمونلا انتریکا PTCC 1230 با روش Real-Time PCR بررسی شد. با توجه به نتایج، مشخص شد بیان ژن‌های *ahpF* و *tviA* در شرایط تنش افزایش می‌یابد و بررسی پاسخ سایر ژن‌ها به تنش‌های محیطی پیشنهاد می‌شود.

واژه‌های کلیدی: تنش اسمزی، تنش اکسیداتیو، ژن *tviA*، ژن *ahpF*، سالمونلا انتریکا PTCC 1230، Real-time PCR

* نویسنده مسئول مکاتبات

مقدمه

سالمونلا باکتری میله‌ای شکل، گرم منفی، بی‌هوازی اختیاری به طول ۲ تا ۵ میکرون و عرض ۰/۵ تا ۱/۵ میکرون، متحرک و دارای تازک‌های پری‌تریش^۱ است (۱). جنس سالمونلا به دو گونه تقسیم می‌شود: سالمونلا انتریکا^۲ و سالمونلا بونگوری^۳. سالمونلا انتریکا شامل شش زیرگونه است که عبارتند از: زیرگونه انتریکا^۴ (زیرگونه I)، زیرگونه سالامائی^۵ (زیرگونه II)، زیرگونه آریزونی^۶ (زیرگونه IIIa)، زیرگونه دیاریزونی^۷ (زیرگونه IIIb)، زیرگونه هوتنی^۸ (زیرگونه IV) و زیرگونه ایندیکا^۹ (زیرگونه VI) که بر اساس ویژگی‌های بیوشیمیایی و نتایج هیبریداسیون DNA-DNA شناسایی شده‌اند (۲). پاسخ به تنش در باکتری‌ها دارای اهمیت ویژه‌ای است؛ زیرا زیستگاه آنها در معرض تغییرات مداوم درجه حرارت، فشار اسمزی و دردسترس بودن مواد مغذی قرار دارد؛ برای نمونه، مقدار فعالیت آبی موجود در یک ماده شاخصی برای رشد باکتری در نظر گرفته می‌شود و این فعالیت آبی در محدوده صفر (بدون آب دردسترس) تا یک (آب خالص) تعیین می‌شود. فعالیت آبی کم به‌طور طبیعی برای حفظ مواد غذایی از فساد و رشد عوامل بیماری‌زا استفاده می‌شود؛ در نتیجه، باکتری‌ها سیستم‌های تکامل یافته‌ای ایجاد کرده‌اند که به آنها اجازه می‌دهد با تغییرات فعالیت آبی محیط‌زیست سازگار شوند. یون‌های پتاسیم^{۱۱} و گلوتامات^{۱۱} (حلال‌های یونی^{۱۱}) و گلايسين^{۱۳}، بتائين^{۱۴}، ترهالوز^{۱۵} و پرولين^{۱۶} (حلال‌های غیر یونی^{۱۷}) مهم‌ترین حلال‌های سازگار با سلول‌های باکتری هستند. اعضای خانواده انتروباکتریاسه^{۱۸} گلوتامات و ترهالوز را سنتز می‌کنند و

پتاسیم، گلايسين، بتائين و پرولين را از محیط خارج دریافت می‌کنند. تجمع پتاسیم هنگام تنش اسمزی طی پاسخ‌های اولیه اتفاق می‌افتد و سپس با افزایش سنتز گلوتامات همراه می‌شود تا حالت خنثی و پایداری الکترون را در سیتوپلاسم حفظ کند و انباشته شدن سایر حلال‌های سازگار مانند گلايسين، بتائين، پرولين و ترهالوز در پی آن رخ می‌دهد. به نظر می‌رسد دمای محیط بر سازوکارهای^{۱۹} تجمع حلال‌ها تأثیر می‌گذارد؛ زیرا گزارش شده است تجمع ترهالوز در دمای بیشتر (۴۵ درجه سانتی‌گراد) در سالمونلا تیفی‌موریوم^{۲۰} افزایش می‌یابد (۳). تداخل در تعادل بین تولید زیست‌محیطی گونه‌های اکسیژن فعال^{۲۱} (ROS) از جمله هیدروکسیل (OH) و پراکسید هیدروژن (H₂O₂) و توانایی سیستم‌های زیستی در شناسایی و رفع آنها تنش اکسیداتیو گفته می‌شود. رادیکال‌های بسیار واکنش‌پذیر اکسیژن باعث آسیب اکسیداتیو ماکرومولکول‌ها، پروتئین‌ها، چربی‌ها و DNA می‌شوند که به ازدست‌رفتن عملکرد، افزایش میزان جهش‌زایی و درنهایت مرگ سلول منجر می‌شود. موجودات زنده دارای سازوکارهای مختلفی در برابر تنش اکسیداتیو هستند که از مهم‌ترین آنها آنزیم‌های کاتالاز^{۲۲} و سوپراکسید دیسموتاز^{۲۳}، پروتئین‌های کوچکی مانند تیوردوکسین^{۲۴} و گلو تاردوکسین^{۲۵} و نیز مولکول‌هایی شبیه گلو تانین^{۲۶} هستند. دو تنظیم‌کننده عمده رونویسی (OxyR و SoxRS) پاسخ ژنتیکی باکتری‌ها در برابر تنش اکسیداتیو را کنترل می‌کنند (۴).

ژن‌های *ahp* کدکننده دو پروتئین هستند که در مجموع، آنزیم آلکیل‌هیدروپراکسیدردوکتاز^{۲۷} را می‌سازند. حذف ژن *ahp* در باکتری‌های *اشریشیا کلی*

تهاجم *سالمونلا تیفی* موریوم به عوامل تهاجمی مختلف شامل ترشح پروتئین‌های تهاجمی، فلاژله، حرکت و آنتی‌ژن کپسولی Vi بستگی دارد. جایگاه‌های کروموزومی *viaA* و *viaB* بیان آنتی‌ژن کپسولی Vi را کنترل می‌کنند. ژن‌های موجود در جایگاه *viaB* در *سالمونلاها* شامل ژن‌های *tviB*، *tviA*، *tviC*، *tviD*، *tviE*، *vexA*، *vexB*، *vexC*، *vexD* هستند (۹) که *tviB*، *tviC*، *tviD*، *tviE* ژن‌های ساختاری برای آنتی‌ژن محسوب می‌شوند. تجزیه و تحلیل توالی پروتئین نشان می‌دهد ژن *tviB* یک دهیدروژناز^{۳۱}، ژن *tviC* یک اپیمراز^{۳۲}، ژن *tviD* آنزیم سیتوکروم *p450*^{۳۳} و ژن *tviE* یک گلیکوزیل ترانسفراز^{۳۴} را کد می‌کنند. ژن‌های *tviB* و *tviC* یک پلیمر خطی متشکل از ان-استیل گالاکتوز آمینارونات^{۳۵} را کد می‌کنند (۱۰). ژن‌های *vexA*، *vexB* و *vexC* پروتئین‌هایی را کد می‌کنند که در انتقال آنتی‌ژن به سطح سلول باکتری دخالت دارند و محکم شدن آنتی‌ژن به سطح سلول باکتری به پروتئین *vexE* وابسته است. ژن *tviA* نقش تنظیمی برای بیان آنتی‌ژن Vi دارد و اختلال ژن *tviA* در کروموزوم *سالمونلا* به شدت موجب کاهش بیان آنتی‌ژن Vi می‌شود. مشخص شده است بیان ژن *tviA* در پاسخ به شرایط اسمزی بالاتفاق می‌افتد (۹). از آنجا که اطلاعات چندانی در زمینه میزان کمی بیان ژن‌های اصلی مسئول پاسخ به تنش‌های اکسیداتیو و اسمزی در *سالمونلاها* وجود ندارد، هدف مطالعه حاضر ارزیابی تغییرات کمی ناشی از تنش‌های اسمزی و اکسیداتیو بر بیان ژن‌های *tviA* و *ahpF* در *سالمونلا* /تتريکا PTCC 1230 است.

و *سالمونلا تیفی* موریوم موجب افزایش حساسیت در برابر پراکسید هیدروژن و کشته شدن آنها می‌شود (۵). آنزیم آلکیل هیدروپراکسیدردوکتاز و ژن کدکننده آن (*ahp*) در باکترئیدس فراژیلیس^{۲۸} شناسایی شده است. دو قسمت *ahp* شامل *ahpC* و *ahpF* روی یک اپرون قرار دارند و جهش‌یافته‌هایی از این باکتری که ژن‌های *ahpCF* را ندارند نسبت به نژادهای جهش‌نیافته دارای حساسیت بیشتری به شرایط رشد، جهش‌زا و پراکسیدها هستند (۶). همچنین ژن *ahpC* پروتئین *ahpC* را در باکتری *باسیلوس سوبتیلیس*^{۲۹} کد می‌کند که پروتئین تنش عمومی در پاسخ به حرارت، نمک و ورود باکتری به فاز رشد ثابت است (۷). جایگاه *ahp* در باکتری *سالمونلا تیفی* موریوم حاوی دو ژن *ahpC* و *ahpF* است که به ترتیب دو پروتئین C22 و F52a را کد می‌کنند. پروتئین C22 دارای ۱۸۳ آمینواسید با وزن مولکولی ۲۰/۶۹۹ دالتون است. پروتئین F52a از ۵۲۱ آمینواسید طویل تشکیل شده و دارای وزن مولکولی ۵۵/۹۵۹ دالتون است. توالی آمینواسید پروتئین F52a شباهت زیادی به مولکول تیوردو کسین ردوکتاز دارد (۸). ژن *OxyR* تنظیم‌کننده ژن‌های دارای فعالیت آنتی‌اکسیدانی مانند *katG* (کدکننده کاتالاز)، *gor* (کدکننده گلوکاتایون ردوکتاز) و *ahpC-ahpF* (کدکننده آلکیل هیدروپراکسیدردوکتاز) است که در برابر شوک اکسیداتیو بیان می‌شوند. ژن *ahpF* در باکتری *سالمونلا تیفی* موریوم در برابر شوک گرمایی به شکل وابسته به *OxyR* القا می‌شود اما ژن *ahpF* کلون‌شده در باکتری *اشریشیا کلی*^{۳۰} نمی‌تواند در این باکتری یا هنگام ورود به *سالمونلا* بیان شود (۵).

مواد و روش‌ها

ویال لیوفیلیزه سالمونلا انتریکا PTCC 1230 از مرکز کلکسیون باکتری‌های صنعتی عفونی سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران تهیه شد. ویال لیوفیلیزه باکتری در محیط آگار خون‌دار^{۳۶} در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت کشت داده شد و سپس به محیط آگار مغذی منتقل و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرماگذاری شد.

رسم منحنی رشد: برای رسم منحنی رشد سالمونلا انتریکا PTCC 1230، ابتدا سوسپانسیون باکتریایی با کدورت معادل نیم مک‌فارلند از کشت آگار مغذی تهیه شد و ۳۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون تهیه‌شده به ارلن ۱۰۰ میلی‌لیتری حاوی ۷۵ میلی‌لیتر محیط آبگوشت مغذی^{۳۷} تلقیح شد؛ سپس ارلن حاوی باکتری به مدت ۲۰ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد روی دستگاه شیکر انکوباتور با چرخش ۱۵۰ دور در دقیقه قرار گرفت. جذب نوری^{۳۸} نمونه در فواصل یک‌ساعته با دستگاه اسپکتروفوتومتر در طول موج ۶۰۰ نانومتر خوانده و منحنی رشد باکتری رسم شد.

آماده‌سازی سالمونلا انتریکا PTCC 1230 برای بررسی تنش: ۳۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون میکروبی با کدورت نیم مک‌فارلند در دو ارلن ۱۰۰ میلی‌لیتری حاوی ۷۵ میلی‌لیتر آبگوشت مغذی تلقیح شد و گرماگذاری در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۹ ساعت تا رسیدن رشد باکتری به میانه فاز نمایی ادامه یافت؛ سپس ۶ میلی‌لیتر از هر ارلن به داخل ۶ میکروتیوب ریخته شد (در مجموع ۱۲ میکروتیوب که هر یک حاوی ۱ میلی‌لیتر محیط یادشده بودند). برای دستیابی به جمعیت همگن باکتریایی، میکروتیوب‌ها به مدت نیم ساعت در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد با چرخش ۸۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ

وسلول‌های باقیمانده با محلول نمک فسفات بافری^{۳۹} (PBS) شستشو شدند.

اعمال تنش اسمزی: برای القای تنش اسمزی با غلظت‌های ۶، ۸، ۱۰، ۱۲ و ۱۴ درصد (وزنی/حجمی) نمک سدیم کلراید، در ۶ لوله آزمایش ۵ میلی‌لیتر محیط آبگوشت مغذی ریخته شد و سپس به ۵ لوله به ترتیب ۰/۳، ۰/۴، ۰/۵، ۰/۶ و ۰/۷ گرم نمک اضافه شد و یک لوله بدون اضافه کردن نمک محیط شاهد در نظر گرفته شد.

سلول‌های باکتری حاصل از مرحله پیش به میزان حجمی یکسان (معادل ۱۰۰ میکرولیتر) با غلظت‌های مختلف سدیم کلراید صفر، ۶، ۸، ۱۰، ۱۲ و ۱۴ درصد مجاور و به مدت دو ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد روی دستگاه شیکر انکوباتور با چرخش ۱۵۰ دور در دقیقه قرار گرفتند. برای به دست آوردن سلول‌ها، سانتریفیوژ در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد با چرخش ۸۰۰۰ دور در دقیقه به مدت نیم ساعت انجام و رسوب باکتری با محلول نمک فسفات بافری (PBS) شستشو شد. ۱۰۰ میکرولیتر بقایای سلولی باقیمانده از سانتریفیوژ در ارلن‌های حاوی ۷۵ میلی‌لیتر آبگوشت مغذی تلقیح و گرماگذاری به مدت ۱۸ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انجام شد. جذب نوری نمونه‌ها در فواصل یک‌ساعته با دستگاه اسپکتروفوتومتر در طول موج ۶۰۰ نانومتر خوانده شد (۱۱).

اعمال تنش اکسیداتیو: آب اکسیژنه با غلظت‌های صفر (شاهد)، ۱۲۰۰، ۲۴۰۰، ۴۸۰۰، ۶۰۰۰ و ۷۲۰۰ پی‌پی‌ام برای القای تنش اکسیداتیو استفاده شد. سلول‌های باکتریایی حاصل از مرحله قبل به میزان حجمی یکسان (معادل ۱۰۰ میکرولیتر) در مجاورت غلظت‌های مختلف آب اکسیژنه به مدت ۲ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد روی دستگاه شیکر انکوباتور با چرخش ۱۵۰ دور در دقیقه قرار گرفتند. پس از ۲ ساعت، سانتریفیوژ در

۶۰۰ نانومتر خوانده شد (۱۱).

انتخاب قطعه های ژنی و تهیه آغازگر های مناسب:

در مطالعه حاضر، ژن های *tviA* و *ahpF* ژن هدف و ژن *16S rRNA* ژن مرجع انتخاب شدند. طراحی آغازگرهای الیگنوکلئوتیدی برای این سه ژن یادشده بر اساس توالی موجود در پایگاه داده های NCBI^{۴۱} انجام شد (۱۱).

دمای ۴ درجه سانتی گراد و چرخش ۸۰۰۰ دور در دقیقه به مدت نیم ساعت انجام و رسوب باکتری با محلول نمک فسفات بافری (PBS) شستشو شد. ۱۰۰ میکرولیتر بقایای سلولی حاصل از سانتریفیوژ در ارلن های حاوی ۷۵ میلی لیتر مایع مغذی تلقیح و گرماگذاری در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد انجام شد. جذب نوری نمونه ها در فواصل یک ساعته با دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج

جدول ۱- توالی آغازگرهای طراحی شده برای ژن های هدف و مرجع

نام ژن	نوع الیگو	ترتیب توالی	دمای ذوب (درجه سانتی گراد)	درصد GC	طول آغازگر (جفت باز)
<i>tviA</i>	جلویی	5'-TCCTGAAGCTCTCCATACC-3'	۵۵/۳	۵۰	۲۰
<i>tviA</i>	برگشتی	5'-TTCGATGCGGCAACAT-3'	۵۳/۱	۵۰	۱۶
<i>ahpF</i>	جلویی	5'-AGCTCAGGGCTTACCTTG-3'	۵۵/۲	۵۵/۶	۱۸
<i>ahpF</i>	برگشتی	5'-GGAAAGACGGCTTGC-3'	۵۰/۹	۶۰	۱۵
<i>16S rRNA</i>	جلویی	5'-ATCCAACCGCAGGTTC-3'	۵۳	۵۶	۱۶
<i>16S rRNA</i>	برگشتی	5'-TGCCACGGTGAATACG-3'	۵۰	۵۶	۱۶

بیپت ادغام شد؛ نمونه ها به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد حرارت داده شدند؛ ۳۵۰ میکرولیتر RB Buffer به هر نمونه اضافه شد؛ پس از انجام سانتریفیوژ، ۴۰۰ میکرولیتر از فاز رویی به میکروتیوب انتقال یافت و اتانول ۷۰ درصد با حجم مساوی به آن اضافه شد و به کمک همزن با یکدیگر ادغام شدند؛ برای هر نمونه یک عدد RB Mini Column در لوله های Collection tube گرفت و پس از آن، ۷۵۰ میکرولیتر محلول حاصل از مراحل قبل به ستون RB انتقال یافت و به مدت ۱/۵ دقیقه با چرخش ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی گراد سانتریفیوژ شد؛ پس از دورریختن مایع رویی، ۵۰۰ میکرولیتر Wash Buffer ۱ اضافه و سانتریفیوژ انجام شد؛ پس از دورریختن مایع رویی، ۷۵۰ میکرولیتر Wash Buffer ۲ اضافه شد و پس از سانتریفیوژ و دورریختن مایع

آماده سازی آغازگرها (رقیق سازی): رقیق سازی آغازگرهای لیوفلیزه *tviA-F*، *tviA-R*، *ahpF-F* و *ahpF-R* برای رسیدن استوک اصلی به غلظت ۱۰۰ پیکومولار بر میکرولیتر یا ۱۰۰ میکرومولار به ترتیب با افزودن ۱۱۲/۵، ۱۳۱/۶، ۱۲۰/۶ و ۱۳۵/۶ میکرولیتر آب بدون نوکلئاز^{۴۲} انجام شد. سپس استوک کاری به غلظت ۱۰ میکرومولار با افزودن ۴۵ میکرولیتر آب بدون نوکلئاز به ۵ میکرولیتر از استوک اصلی هر آغازگر تهیه شد.

استخراج RNA: استخراج RNA با استفاده از کیت (Favorgen Biotec Corp., Taiwan) و به روش سمبورک (۱۲) طبق مراحل زیر انجام شد: ابتدا نمونه ها به مدت ۲ دقیقه با چرخش ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شدند؛ پس از دورریختن مایع رویی، ۱۰۰ میکرولیتر محلول واکنش لیزوزیم به هر نمونه اضافه و به خوبی با

واکنش Real-Time PCR: واکنش Real-Time PCR در دستگاه مدل EcoTM Real-Time (شرکت ایلومینا^{۴۴}، آمریکا) انجام شد. برای واکنش تکثیری درون هر چاهک از پلیت ۴۸ خانه‌ای، مخلوطی به حجم ۲۰ میکرولیتر متشکل از ۱۰ میکرولیتر آب بدون نوکلئاز، ۶ میکرولیتر مخلوط واکنشی سایبرگرین^{۴۵}، ۲ میکرولیتر DNA الگو و ۱ میکرولیتر آغازگرهای اختصاصی هر ژن تهیه شد. برنامه زمانی و دمایی واکنش در سه مرحله انجام شد: مرحله اول در یک چرخه به منظور فعال‌سازی آنزیم تک‌پلیمرز شروع داغ^{۴۶} و واسرشت‌سازی اولیه^{۴۷} DNA الگو در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳ دقیقه؛ مرحله دوم به شکل متناوب طی ۴۰ چرخه واسرشت‌سازی در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ ثانیه و اتصال^{۴۸} و گسترش^{۴۹} در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۰ ثانیه؛ مرحله سوم اعمال چرخه با دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ ثانیه، ۶۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه و ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ ثانیه به منظور رسم منحنی.

نتایج

شکل ۱ منحنی رشد سالمونلا انتریکا را در محیط مایع مغذی نشان می‌دهد. باتوجه به شکل، زمان فاز نمایی رشد از ساعت ۲ شروع و تا ساعت ۱۴ ادامه می‌یابد؛ بنابراین امکان بررسی آثار تنش‌های اسمزی و اکسیداتیو در این محدوده زمانی وجود دارد.

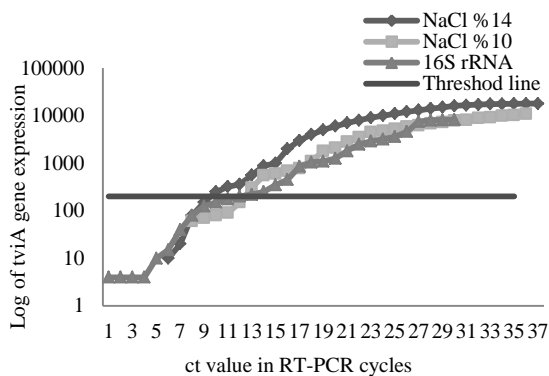
شکل ۳ بیان ژن *ahpF* را در حضور تنش اکسیداتیو نشان می‌دهد. میزان Ct بیان این ژن در شرایط تنش اکسیداتیو ۷۲۰۰ پی‌پی‌ام برابر عدد ۹ است که نسبت به Ct بیان این ژن در معرض غلظت ۶۰۰۰ پی‌پی‌ام و Ct بیان ژن مرجع به ترتیب ۱/۸ و ۲/۵ برابر بیشتر است.

روی، ستون RB برای خشک‌شدن کامل در Collection tube جدید قرار گرفت و به مدت ۳/۵ دقیقه با چرخش ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ شد؛ ستون RB درون Elution tube قرار گرفت و ۵۰ میکرولیتر آب بدون نوکلئاز در مرکز ستون RB افزوده شد؛ پس از گذشت یک دقیقه، سانتریفیوژ به مدت ۱/۵ دقیقه با چرخش ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد انجام و RNA در دمای منفی ۷۰ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد.

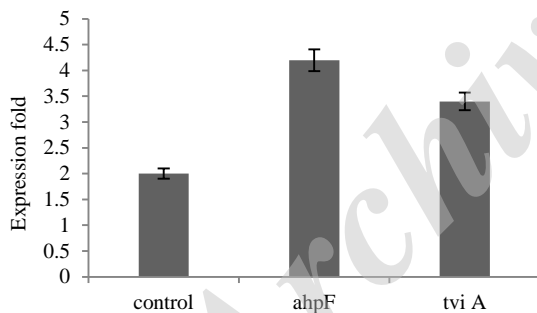
سنتز cDNA: به این منظور از کیت (یکتا تجهیز آزما، ایران) طبق دستور عمل شرکت سازنده استفاده شد. ابتدا رقیق‌سازی آغازگرهای لیوفیلیزه Oligo (dt) و Random Hexamer به ترتیب با افزودن ۶۰/۹۶ و ۱۸۴/۴۸ میکرولیتر آب تیمار شده با دی‌اتیل‌پیروکربنات^{۴۳} انجام شد. مخلوط RNA-primer با حجم کل ۱۳/۴ میکرولیتر شامل ۹/۴ میکرولیتر آب تیمار شده با دی‌اتیل‌پیروکربنات، ۲ میکرولیتر RNA، ۱ میکرولیتر Oligo (dt) و ۱ میکرولیتر Random Hexamer آماده و به مدت ۵ دقیقه در دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد در ترموسایکلر گرماگذاری شد. مخلوط سنتز cDNA با حجم کل ۶/۵ میکرولیتر شامل ۴ میکرولیتر first-strand buffer، ۱ میکرولیتر dNTPs، ۱ میکرولیتر M-MLV و ۰/۵ میکرولیتر RNasin آماده و به مخلوط RNA-primer اضافه شد؛ سپس به مدت ۱ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد برای Random Hexamer و ۳۰ دقیقه در دمای ۴۲ درجه سانتی‌گراد برای Oligo (dt) در بنماری گرماگذاری شد. برای پایان‌دادن به واکنش، نمونه به مدت ۵ دقیقه در دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد در ترموسایکلر گرماگذاری و در دمای منفی ۲۰ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد.

که نسبت به شرایط تنش ۱۰ درصد و ژن مرجع به ترتیب ۱/۳ و ۱/۵ برابر بیشتر است.

شکل ۵ مقایسه بیان ژن های *ahpF* و *tviA* نسبت به ژن مرجع *16S rRNA* را نشان می دهد. این مقایسه حاصل تقسیم مقدار عددی Ct ژن هدف بر Ct ژن مرجع است.



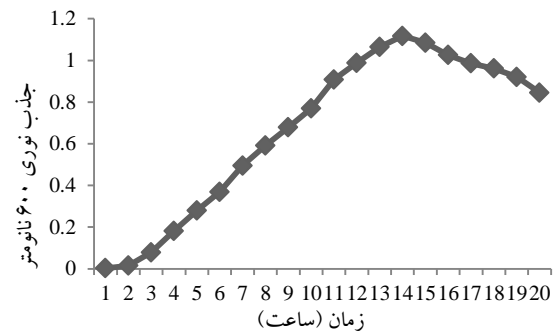
شکل ۴- بیان ژن *tviA* در حضور تنش اسمزی



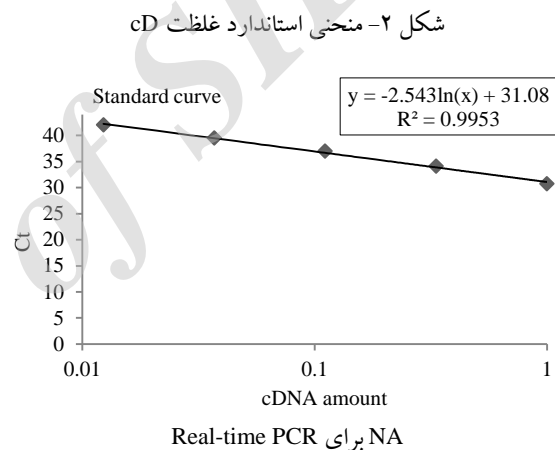
شکل ۵- مقایسه بیان ژن های *ahpF* و *tviA* نسبت به ژن مرجع *16SrRNA* انحراف معیار $\pm SD$ با $P \text{ value}=0.009$ است.

بحث و نتیجه گیری

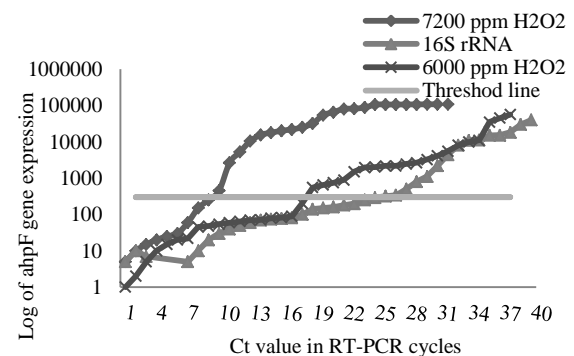
در پژوهش حاضر، میزان تغییر بیان ژن های *tviA* و *ahpF* در باکتری *سالمونلا* / *انتريکا* PTCC 1230 ناشی از تنش های اسمزی و اکسیداتیو با روش Real-Time PCR بررسی شد. باتوجه به شکل ۱ فاز نمایی رشد از ساعت ۲ آغاز شد و تا ساعت ۱۴ ادامه یافت؛ ساعت ۹



شکل ۱- منحنی رشد *سالمونلا* / *انتريکا* PTCC 1230 در محیط کشت مایع مغذی



شکل ۲- منحنی استاندارد غلظت cD



شکل ۳- بیان ژن *ahpF* در حضور تنش اکسیداتیو

شکل ۴ بیان ژن *tviA* را در حضور تنش اسمزی نشان می دهد. باتوجه به شکل، میزان Ct بیان این ژن در شرایط تنش ۱۴ درصد سدیم کلراید برابر عدد ۱۰ است

هکر^{۵۲} و همکاران در سال ۱۹۹۶ پاسخ‌های تنش اکسیداتیو را در *باسیلوس سوبتیلیس* بررسی کردند. نتایج بیان ۳ تا ۴ برابری mRNA ژن آلکیل‌هیدروپراکسید را پس از تنش گرما، نمک یا گرسنگی گلوکز و بیان ۲۰ برابری آن را در شرایط تنش اکسیداتیو نشان داد (۷).

میاموتو^{۵۳} و همکاران در سال ۲۰۰۵ *سالمونلا انتریتیدیس*^{۵۴} آسیب‌دیده با تنش گرمایی را مطالعه کردند. نتایج آنها نشان دادند بیان ۱۹ ژن مرتبط با گرما *dhf1B, gapA, ftsJ, fkpA, dnaJ, degP, clpX, clpB, mopB, mopA, don, dhtrA, htpG, hslV, hslU, hslJ, rpoE, anreB, ppiD* و ۱۲ ژن مرتبط با تنش اکسیداتیو *mutM, katG, dinF, grxA, fur, fldB, ahpF, ahpC, trxC, soxR, recA* و *zwf* در سلول‌های بهبودیافته افزایش می‌یابد (۱۳).

فونگسیسای^{۵۵} و همکاران در سال ۲۰۰۷ بیان ژن *htrB* را بررسی کردند که در *سالمونلا تیفی مورویوم* و کمپلوباکتر ژرونی^{۵۶} در شرایط سخت بیان می‌شود. نتایج آنها نشان دادند این ژن نقش اساسی در پاسخ به شرایط نامساعد بر عهده دارد و حذف آن در نتیجه جهش برای باکتری کشنده است (۱۴).

ازاکی^{۵۷} و همکاران در سال ۲۰۰۷ بیان ژن در *سالمونلا انتریکا* سرووار تیفی را طی تنش اسمزی بالا بررسی کردند. نتایج آنها نشان دادند پس از تنش اسمزی میزان بیان ۱۰ ژن مرتبط با آنتی‌ژن بیماری‌زایی (*tviA, tviB, tviC, tviD, tviE, vexA, vexB, vexC, vexD, vexE*) به‌وضوح کاهش می‌یابد و میزان بیان این ژن‌ها در شرایط اسمزی پایین ۳ تا ۱۰ برابر بیشتر از شرایط اسمزی بالا است. نتایج یادشده نشان دادند تمام ژن‌های بیماری‌زا بلافاصله پس از تغییر اسمزی تغییر می‌کنند (۱۵). زینمین^{۵۸} و همکاران در سال ۲۰۱۰ بیان ژن *tviA* در *سالمونلا انتریکا* سرووار تیفی را در شرایط تنش

منحنی رشد، نیمه‌فاز نمایی برای بررسی اثر شرایط تنش انتخاب شد. برای بررسی میزان بیان ژن‌ها بر اساس میزان cDNA ساخته‌شده از روی mRNA در Real-time PCR از منحنی استاندارد (شکل ۲) استفاده شد. میزان ct برای بیان ژن *ahpF* در غلظت ۷۲۰۰ پی‌پی‌ام آب‌اکسیژنه برابر عدد ۹ و برای غلظت ۶۰۰۰ پی‌پی‌ام آب‌اکسیژنه و ژن مرجع به ترتیب ۱۷ و ۲۵ بود. از آنجا که هرچه میزان عددی ct کمتر باشد میزان بیان بیشتر است، بیشترین میزان بیان ژن *ahpF* در غلظت ۷۲۰۰ پی‌پی‌ام آب‌اکسیژنه مشاهده می‌شود (شکل ۳).

در *سالمونلا انتریکا* PTCC 1230 بیان ژن *tviA* که در اصل نقش تنظیمی برای بیان آنتی‌ژن Vi کپسولی دارد در شرایط افزایش تنش اسمزی افزایش می‌یابد و اختلال در بیان این ژن موجب حساسیت در برابر فشار اسمزی می‌شود. بر اساس نتایج پژوهش حاضر، بیان ژن *tviA* پس از اعمال تنش اسمزی افزایش یافت. میزان عددی ct به‌دست آمده در شرایط ۱۴ و ۱۰ درصد سدیم کلراید به ترتیب ۱۰ و ۱۳ است که این میزان بیان نسبت به ژن مرجع به ترتیب ۱/۵ و ۱/۳ برابر بیشتر است (شکل ۴). شکل ۵ مقایسه بیان ژن‌های *ahpF* و *tviA* نسبت به ژن مرجع *16S rRNA* را در باکتری *سالمونلا انتریکا* PTCC 1230 نشان می‌دهد. این مقایسه بر اساس تقسیم ct به‌دست آمده برای ژن هدف بر ct ژن مرجع طی انجام واکنش انجام شد که با نتایج منحنی‌های بیان Real-time PCR بر خط آستانه مطابقت دارد. اسپنسر^{۵۹} و کوگوما^{۵۱} در سال ۱۹۹۱ پاسخ تنش اکسیداتیو در *سالمونلا تیفی مورویوم* را بررسی کردند. نتایج بررسی آنها نشان دادند بیان ژن‌های *katG* و *ahpF* در این باکتری در شرایط تنش اکسیداتیو افزایش می‌یابد و بسیاری از راه‌های متابولیسمی - نه همه آنها - در نتیجه تنش اکسیداتیو تغییر می‌کنند (۵).

References

- (1) Andino A., Hanning I. *Salmonella enterica*: survival, colonization, and virulence differences among serovars. *The Scientific World Journal* 2015; 1-17.
- (2) Dieckmann R., Helmuth R., Erhard M., Malorny B. Rapid classification and identification of *Salmonellae* at the species and subspecies levels by whole-cell matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *Applied and Environmental Microbiology* 2008; 74(24): 7767-7778.
- (3) Capozzi V., Fiocco D., Amodio ML., Gallone A., Spano G. Bacterial stressors in minimally processed food. *International Journal of Molecular Sciences* 2009; 10: 3076-3105.
- (4) Kashmiri ZN., Mankar SA. Free radicals and oxidative stress in bacteria. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences* 2014; 3(9): 34-40.
- (5) Spencer F., Kogoma T. Oxidative stress responses in *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. *Microbiological Reviews* 1991; 55(4): 561-585.
- (6) Rocha E., Smith J. Role of the alkyl hydroperoxide reductase (*ahpCF*) gene in oxidative stress defense of the obligate anaerobe *Bacteroides fragilis*. *Journal of Bacteriology* 1999; 181(18): 5701-5710.
- (7) Antelmann H., Engelmann S., Schmid R., Hecker M. General and oxidative stress responses in *Bacillus subtilis*: cloning, expression, and mutation of the alkyl hydroperoxide reductase operon. *Journal of Bacteriology* 1996; 178(22): 6571-6578.
- (8) Tartaglia L., Storz S., Brodsky M., Lai A., Ames M. Alkyl hydroperoxide reductase from *Salmonella typhimurium*. *The Journal of Biological Chemistry* 1990; 265(18): 10535-10540.

اسمزی بالا بررسی کردند. نتایج آنها نشان دادند بیان این ژن در شرایط افزایش تنش اسمزی سرکوب می‌شود (۱۶).

در پژوهش حاضر بیان ژن *tviA* در حضور غلظت‌های زیاد نمک افزایش یافت و باتوجه به اینکه مدت تیمار سویه باکتری با غلظت‌های مختلف نمک ۲ ساعت بود به نظر می‌رسد این زمان موجب افزایش میزان بیان ژن *tviA* در باکتری سالمونلا انتریکا PTCC 1230 شود.

کاسترزینسکا^{۵۹} و همکاران در سال ۲۰۱۵ تأثیر تنش اکسیداتیو بر بیان ژن تولیدکننده شیکاتوکسین را در سویه‌های اشریشیا کلی O157:H7 (STEC) و non-O157 بررسی کردند. بر اساس نتایج آنها بیان این ژن در بسیاری از سویه‌ها کاهش یافت، *stx1* و *stx2* به‌طور درخور توجهی در اشریشیا کلی O157:H7 (STEC) بیان شدند و سایر سویه‌ها افزایش ناچیزی در بیان *stx1* نشان دادند (۱۷).

سیرسات^{۶۰} و همکاران در سال ۲۰۱۵ بیان ژن مرتبط با شوک حرارتی را در سالمونلا تیفی‌موریوم در شرایط تنش حرارتی ۴۸ درجه سانتی‌گراد بررسی کردند؛ نتایج آنها نشان دادند بیان ژن‌های *rpoS*، *rpoH* و *rpoE* افزایش می‌یابد (۱۸). باتوجه به نتایج پژوهش حاضر بیان دو ژن *ahpF* و *tviA* در شرایط تنش‌های اکسیداتیو و اسمزی افزایش می‌یابد و بررسی در زمینه ژن‌های دیگر در پاسخ به تنش‌های محیطی پیشنهاد می‌شود.

سپاسگزاری

از حمایت‌های حوزه معاونت پژوهش و فناوری دانشگاه آزاد اسلامی واحد لاهیجان و سرکار خانم دکتر محدثه محسن‌پور برای یاری‌های ارزنده‌شان طی پژوهش حاضر سپاسگزاری می‌شود.

- (9) Virlogeux I., Waxin H., Ecobichon C., Popoff M. Role of the *viaB* locus in synthesis, transport and expression of *Salmonella typhi* Vi antigen. *Microbiology* 1995; 141: 3039-3047.
- (10) Zhang H., Zhou Y., Bao H., Liu W. Vi antigen biosynthesis in *Salmonella typhi*: characterization of UDP-N-acetylglucosamine C-6 dehydrogenase (TviB) and UDP-N-acetylglucosaminuronic acid C-4 epimerase (TviC). *Biochemistry* 2006; 45(26): 8163-8173.
- (11) Ghasemi MF., Moslem MN., Mirpour M. Effect of environmental stresses on growth pattern, biofilm formation and biochemical characteristics of *Mycobacterium marinum* CCUG20998. *Zahedan Journal of Research in Medical Sciences* 2016; 18(9): e2664.
- (12) Sambrook J., Russell D. *Molecular cloning: a laboratory manual*. 3rd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory; 2011.
- (13) Kobayashi H., Miyamoto T., Hashimoto Y., Kiriki M., Motomatsu A., Honjoh K., et al. Identification of factors involved in recovery of heat-injured *Salmonella Enteritidis*. *Journal of Food Protection* 2005; 68(5): 932-941.
- (14) Phongsisay V., Perera V., Fry B. Expression of the *htrB* gene is essential for responsiveness of *Salmonella typhimurium* and *Campylobacter jejuni* to harsh environments. *Microbiology* 2007; 153: 254-62.
- (15) Huang X., Xu H., Sun X., Ohkusu K., Kawamura T., Ezaki T. Genome-wide scan of the gene expression kinetics of *Salmonella enterica* Serovar Typhi during hyperosmotic stress. *International Journal of Molecular Sciences* 2007; 8: 116-135.
- (16) Xinmin X., Anping L., Hong D., Xiumei S., Haifang Z., Shungao X., et al. Expression of *tviA* is transiently repressed by Hfq in *Salmonella enterica* serovar Typhi at hyperosmotic stress. *Microbial Pathogenesis* 2010; 49: 54-57.
- (17) Mei G., Tang J., Carey C., Bach S., Kostrzynska M. The effect of oxidative stress on gene expression of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) O157:H7 and non-O157 serotypes. *International Journal of Food Microbiology* 2015; 215: 7-15.
- (18) Sirsat S., Baker C., Park S., Muthaiyan A., Dowd S., Ricke S. Transcriptomic response of *Salmonella Typhimurium* heat shock gene expression under thermal stress at 48 °C. *Journal of Food Research* 2015; 4(5): 51-56.

¹- Peritrichous flagella

²- *Salmonella enterica*

³- *Salmonella bongori*

⁴- *enterica*

⁵- *salamae*

⁶- *arizonae*

⁷- *diarizonae*

⁸- *houtenae*

⁹- *indica*

¹⁰- Potassium ions (K⁺)

¹¹- glutamate

¹²- Ionic solutes

¹³- Glycine

¹⁴- Betaine

¹⁵- Trehalose

¹⁶- Proline

¹⁷- Non ionic solutes

¹⁸- *Enterobacteriaceae* family

¹⁹- Mechanism

²⁰- *Salmonella typhimurium*

²¹- Reactive oxygen species

²²- Catalase

²³- Superoxide dismutase

²⁴- Thioredoxin

²⁵- Glutaredoxin

²⁶- Glutathione

²⁷- Alkyl hydroperoxide reductase

²⁸- *Bacteroides fragilis*

²⁹- *Bacillus subtilis*

³⁰- *Escherichia coli*

³¹- Dehydrogenase

³²- Epimerase

³³- Cytochrome P450

³⁴- Glycosyltransferases

³⁵- N-Acetylgalactosamineuronate

³⁶- Blood agar

³⁷- Nutrient Broth

³⁸- Optical Density

³⁹- phosphate buffered saline solution

⁴⁰- Primer

- 41- National Center for Biotechnology Information
- 42- Water, nuclease-free
- 43- DEPC Water
- 44- Illumina
- 45- SYBER Green Mastermix
- 46- Hot start Taq polymerase
- 47- Initial Denaturation
- 48- Anneal
- 49- Extend
- 50- Spencer
- 51- Kogoma
- 52- Hecker
- 53- Miyamoto
- 54- *Salmonella enteritidis*
- 55- Phongsisay
- 56- *Campylobacter jejuni*
- 57- Ezaki
- 58- Xinmin
- 59- Kostrzynska
- 60- Sirsat

Archive of SID