فصلنامه (علمی)

زیست شناسی تکوینی

سال پانزدهم، شماره ۲، بهار ۱۴۰۲ ص. ۳۳-۲۳

مقاله پژوهشی

ارزیابی مولکولی بیان ژن انتروتوکسین *sea* در *Staphylococcus aureus* تیمار شده با عصاره‌های گیاهی کهن‌دار و زنجبیل

شیده معصومی[۱]، هادی حبیب‌الهی[۲]، محمد رضا صفری مطلق[۳*]

[۱] گروه زیست شناسی، واحد رشت، دانشگاه آزاد اسلامی، رشت، ایران.

[۲] گروه زیست شناسی، واحد رشت، دانشگاه آزاد اسلامی، رشت، ایران.

[۳] گروه گیاه‌پزشکی، واحد رشت، دانشگاه آزاد اسلامی، رشت، ایران.

[*] (نویسنده مسئول مکاتبات): ssafarimotlagh@yahoo.com; safarimotlagh@iaurasht.ac.ir

تاریخ دریافت: خرداد ۱۴۰۱ تاریخ پذیرش: دی ۱۴۰۱

https://dorl.net/dor/20.1001.1.2008692.1402.15.2.2.2 DOI:10.30495/JDB.2023.1960528.1309

چکیده

در این پژوهش، تاثیر ضدمیکروبی عصاره‌های دو گیاه کهن‌دار و زنجبیل علیه *Staphylococcus aureus* و نیز اثر آنها بر بیان ژن انتروتوکسین *sea* مورد بررسی قرار گرفت. از دو سویه استاندارد و پاتوژن از *S. aureus* دارای ژن انتروتوکسین *sea* و عصاره‌های کهن‌دار و زنجبیل به‌صورت قرص‌های آماده با غلظت مشخص استفاده شد. آزمون ضدمیکروبی عصاره‌ها به‌صورت آغشته‌سازی دیسک انجام شد و سپس حداقل غلظت مهارکنندگی و کشندگی این دو عصاره بر اساس آزمون‌های MIC و MBC ارزیابی شد و از غلظت SubMIC این عصاره‌ها به‌منظور بررسی اثر تیمار عصاره‌ها بر بیان ژن انتروتوکسین *sea* استفاده گردید. سپس استخراج RNA و سنتز cDNA و در نهایت Real time PCR انجام و نتایج حاصل از آن تفسیر شد. نتایج حاصل از انتشار از دیسک و MIC نشان داد که عصاره زنجبیل دارای اثر ضدمیکروبی است. تفسیر نتایج Real time PCR نیز نشان داد که عصاره زنجبیل بیان ژن انتروتوکسین *sea* در سویه استاندارد ATCC 25923 را به صفر رساند و آن را کاملا مهار کرد. این عصاره بیان ژن موردنظر در سویه پاتوژن را نیز بسیار کاهش داد و بیان این ژن نسبت به نمونه بدون تیمار به ۴ درصد رسید. اما عصاره کهن‌دار باعث افزایش چشمگیر بیان ژن *sea* شد. این عصاره بیان ژن موردنظر در سویه استاندارد و پاتوژن را به‌ترتیب حدود ۵۵ و ۹ برابر افزایش داد. با توجه به نتایج این پژوهش، زنجبیل می‌تواند کاندیدای خوبی برای مقابله با عفونت‌های ناشی از *S. aureus* باشد.

کلیدواژه‌ها: *Staphylococcus aureus*، *Ginkgo biloba*، *Zingiber officinale*، ژن *sea*.

مقدمه

یکی از عوامل اصلی مرگ و میر و شدیدترین عوارض در بیماران دچار سوختگی، عفونت بیمارستانی می‌باشد [۱]. یکی از این باکتری‌های مهاجم، *Staphylococcus aureus* است. این باکتری در انسان و دام موجب ایجاد عفونت‌ها و بیماری‌های مختلفی مانند سوختگی‌ها، گل مژه، آبسه موضعی، اندوکاردیت و استئومیلت می‌شود [۲ و ۳]. با افزایش روزافزون مقاومت به انواع آنتی‌بیوتیک‌ها، علی‌رغم به‌کارگیری آنتی‌بیوتیک‌های قوی، بهبود شرایط بهداشت عمومی و کنترل عفونت‌های بیمارستانی، هنوز هم *S. aureus* به‌عنوان یک پاتوژن مهم در انسان محسوب می‌شود [۴]. به‌علت پیدایش سویه‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک در باکتری *S. aureus* روز به روز تعداد آنتی-بیوتیک‌های موجود

برای درمان این عفونت‌ها کاهش می‌یابد، به طوری که برخی از سویه‌ها حتی نسبت به تعداد زیادی از ترکیبات ضدمیکروبی، اعم از آنتی‌بیوتیک‌ها و ضدعفونی‌کننده‌ها، مقاومت نشان داده‌اند [۵ و ۶]. *S. aureus* به علت دارا بودن عوامل متعدد از جمله توکسین‌ها و فاکتورهای خارج سلولی، توانایی بیماری‌زایی بالایی داشته و مسوول ایجاد طیف وسیعی از بیماری‌ها ازجمله عفونت و مسمومیت غذایی می‌باشد [۷]. انتروتوکسین‌های *S. aureus* بر اساس خصوصیات بیولوژیکی و سرولوژیکی به ۱۸ سروتیپ طبقه‌بندی شده‌اند. از نظر مقاومت به شرایط فیزیکی و شیمیایی تقریبا تمام سروتیپ‌های انتروتوکسین در مقابل حرارت و عوامل آنزیمی از جمله تریپسین موجود در دستگاه گوارش مقاوم هستند [۸]. *S. aureus* توکسین‌های پروتئینی خارج‌سلولی با وزن مولکولی مختلف مانند لکوسیدین، همولیزین و انتروتوکسین تولید می‌کند که در بین آنها انتروتوکسین از اهمیت بالاتری برخوردار بوده و مصرف غذای آلوده به این توکسین باعث ایجاد مسمومیت غذایی می‌شود [۹]. انتروتوکسین‌ها پروتئین‌های محلول در آبی هستند که توسط سلول باکتری ترشح می‌شوند و به‌عنوان عامل استفراغ در مسمومیت‌های غذایی و گاستروآنتریت‌ها مطرح می‌باشند. انتروتوکسین‌ها از جمله سوپرآنتی‌ژن‌های مهم باکتریایی محسوب می‌شوند که تکثیر سلول‌های T را تحریک می‌کنند [۱۰]. چندین نوع انتروتوکسین استافیلوکوکوسی و ژن‌های مرتبط با آنها از جمله *sej*، *sei*، *seh* ، *seg*،*see*،*sec* و *sea* گزارش شده‌اند که از لحاظ ساختار و فعالیت‌های فیزیولوژیکی مشابه هم بوده ولی خصوصیت آنتی‌ژنی آن‌ها با یکدیگر متفاوت است که انتروتوکسین‌های A و B بیشترین نقش را در بیماری‌زایی ایفا می‌کنند [۹]. روش‌های مختلفی از جمله روش‌های فنوتیپی و ژنوتیپی برای تشخیص انتروکسین‌زایی باکتری‌ها و شناسایی *S. aureus* وجود دارد. روش‌های فنوتیپی مثل آگلوتیناسیون، اخترلونی وSRID و روش‌های ژنوتیپی از قبیل PCR و real time PCR و استفاده از پروب برای تشخیص ژن‌های مسئول تولید انتروتوکسین در سویه‌های *S. aureus* به‌کار می‌روند [۱۱]. روش‌های متداول استفاده شده برای شناسایی و جستجوی ژن‌های انتروتوکسین شامل الایزا، لاتکس آگلوتیناسیون، ایمونودیفیوژن، لاتکس ایمونواسی، رادیو ایمونواسی و غیره می‌باشند که در این روش‌ها باید شرایط لازم برای آنتی‌ژن موردنظر فراهم گردد. ولی در تکنیک PCR و PCR مرکب، نیازی به آنتی‌ژن نبوده و حتی در صورت نبودن توکسین یا میزان کم توکسین، ژن‌ها قابل ردیابی هستند [۱۲]. تنها برخی از سویه‌های *S. aureus* توانایی تولید انتروتوکسین و ایجاد مسمومیت غذایی را دارند که با استفاده از روش‌های تکثیر DNA می‌توان حضور سویه‌های *S. aureus* انتروتوکسوژنیک را بر اساس توالی اختصاصی ژن شناسایی نمود. انتروتوکسین‌های استافیلوکوکوسی فاکتور اصلی ایجاد مسمومیت غذایی می‌باشند که از تیپ‌های مختلفی تشکیل شده‌اند که مهم‌ترین آنها انتروتوکسین‌های تیپ A (SEA) و B (SEB) هستند [۱۱].

گیاهان از اهمیت فوق‌العاده‌ای در درمان بیماری‌ها برخوردار هستند طوری‌که محققان، داروهای قرن ۲۱ را در گیاهان جستجو می‌کنند و معتقدند که حلال مشکلات پزشکی در آینده، گیاهان می‌باشند. افزایش نیاز به دارو، سازگاری گیاهان دارویی با بدن و تاکید سازمان بهداشت جهانی بر جایگزینی داروهای شیمیایی به وسیله داروهای طبیعی، موجب شده است تا تجویز و مصرف گیاهان دارویی افزایش یابد. همچنین عوارض جانبی، هزینه بر و زمان بر بودن کشف و تولید داروهای شیمیایی، مصرف گیاهان دارویی را در صنایع بهداشتی و دارویی افزایش داده است [۱۳].

زنجبیل با نام علمی *Zingiber officinale* از گیاهان خانواده Zingiberaceae است. این گیاه بومی آسیا بوده و هم اکنون در آفریقا، هندوستان و سایر نواحی گرمسیری پرورش داده می‌شود. زنجبیل در درمان بسیاری از بیماری‌ها مانند روماتیسم، فشار خون بالا، یبوست، آسم، دیابت و ... نقش دارد. همچنین محرک اشتها، ضد اسپاسم، ضد التهاب، ادرارآور، خلط‌آور، ضددرد، آرامش‌بخش، ضدمیکروبی، شل کننده عروق، محرک موضعی، مسهل، ملین و تقویت‌کننده قوای جنسی نیز می‌باشد و فعالیت ضدمیکروبی این عصاره و عمل علیه باکتری‌هایی مثل سودوموناس و باسیلوس ثابت شده است [۱۴].

کهن‌دار با نام علمی *Ginkgo biloba* از قدیمی‌ترین درختان جهان است که تاریخچه آن به دو میلیون سال پیش برمی‌گردد و نقش مهمی در درمان بسیاری از بیماری‌ها از جمله افزایش مقاومت و تحمل به کاهش اکسیژن، خصوصا در بافت مغز، مهار پیشرفت ادم مغزی ناشی از سموم یا بعد از تروما و

تسریع در بهبود آن و... دارد [۱۵]. نقش پیشگیری‌کننده‌ی این گیاه دارویی را می‌توان به اجزای فعال آن یعنی فلانوئید گلوکوزیدها و ترپنوئیدها نسبت داد [۱۶ و ۱۷]. مشخص گردید که اثرات ضدباکتریایی گیاهان دارویی به‌دلیل ایجاد تورم، تغییرشکل قسمتی از دیواره باکتری، ایجاد سوراخ در دیواره مذکور و در نتیجه ممانعت از رشد این باکتری‌ها می‌باشد [۱۸]. همچنین فعالیت‌های ضد باکتریایی عصاره‌های گیاهی روی باکتری‌های مختلف به‌ویژه انواع گرم مثبت از جمله *S. aureus* به اثبات رسیده که این اسانس‌ها با دارابودن ترکیباتی مثل کارواکرول، تیمول، پریل آلدهید، سینام آلدهید و اسید سینامیک خاصیت ضدباکتریایی نشان می‌دهند [۱۹].

در مطالعه‌ای مشخص گردید که مصرف زنجبیل سبب کاهش قند خون، تری‌گلیسرید، بهبود حساسیت به انسولین و بهبود الگوی چربی‌های خون به‌ویژه در افراد مبتلا به دیابت نوع ۲ (type 2 diabetic patients) شد [۲۰]. در بررسی خاصیت ضدباکتریایی عصاره خام، آبی و الکلی پیاز و زنجبیل در برابر *S. aureus*، *Pseudomonas aeruginosa*، *Escherichia coli* و *Candida albicans* (چهار میکروارگانیسم عامل عفونت‌های دستگاه ادراری) نتایج نشان داد که عصاره الکلی زنجبیل نسبت به بقیه عصاره‌ها به‌طور موثرتری از رشد ارگانیسم‌های مورد آزمایش ممانعت می‌کند. *P. aeruginosa*، نسبت به سایر ارگانیسم‌ها، حساسیت بیشتری به عصاره‌های پیاز و زنجبیل نشان داد. عصاره زنجبیل اثر بازدارنده مشخصی را نسبت به عصاره پیاز روی ارگانیسم‌های مورد آزمایش ایجاد کرد [۲۱].

در مطالعه‌ای با هدف ارزیابی اثر کشندگی اسانس گیاهان **Zingiber officinale**، Aloysia citrodora و Artemisia dracunculus بر میزان بقای سویه‌های استاندارد باکتری‌های گرم مثبت و منفی، بیشترین اثر اسانس زنجبیل روی باکتری‌های *S. aureus*، Salmonella typhimurium و *Staphylococcus epidermidis* مشاهده شد [۲۲]. در مطالعه‌ای کارآیی عصاره برگ گیاه کهن‌دار در اختلال حافظه و آسیب نورونی هیپوکمپ ناشی از دیابت بررسی و مشخص شد که عصاره برگ جینکو اختلال حافظه ناشی از دیابت را بهبود و همچنین کاهش شمارش سلولی ناشی از دیابت را به‌صورت معناداری جبران کرد [۱۶]. در بررسی تاثیر عصاره برگ گیاه کهن‌دار روی وزوز گوش، مشخص گردید که این عصاره روی اختلالات حافظه موثر است، خون‌رسانی عروق مغزی را بهبود می‌بخشد و روی سلول‌های عصبی، آثار محافظت‌کننده دارد. یافته‌ها نشان داد که در ۵۳/۳% از بیمارانی که این عصاره را دریافت کرده بودند بهترشدنِ وزوز گوش اتفاق افتاد [۲۳].

در این پژوهش، تاثیر ضدمیکروبی عصاره‌های گیاهی کهن‌دار و زنجبیل علیه باکتری *S. aureus* و نیز اثر آن‌ها بر بیان ژن انتروتوکسین *sea* مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

تهیه عصاره‌های گیاهی

کپسول ۴۰ میلی‌گرمی گیاه کهن‌دار با نام جینکوگل (Ginkogol capsule) و کپسول ۲۵۰ میلی‌گرمی عصاره خشک ریشه گیاه زنجبیل با نام زینتوما (Zintoma capsule) از شرکت داروسازی گل دارو تهیه گردید. سپس از هر یک از آن‌ها، محلول‌های استوک ۱۰۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر و ۱۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر تهیه گردید.

برای تهیه استوک شماره ۱ زنجبیل، چهار عدد قرص زینتوما در یک ظرف استریل خرد شد و به‌صورت پودر درآمد. سپس این پودر در داخل لوله فالکون ریخته شد و ۱۰ میلی‌لیتر آب مقطر استریل به آن اضافه گردید. در مرحله بعد، محلول با دستگاه ورتکس شد تا کاملا حل شود. برای تهیه استوک شماره یک کهن‌دار نیز ۲۵ عدد قرص جینکوگل در یک ظرف استریل خرد و پودر گردید. این پودر داخل لوله فالکون ریخته شد و ۱۰ میلی‌گرم آب مقطر استریل به آن اضافه گردید. حجم نهایی استوک شماره یک ۱۰۰۰ میکروگرم بود.

زنجبیل:

$$\frac{250\text{mg} \times 4(\text{Zintoma})}{10\text{ml}(H2O)} = \frac{1000\text{mg}}{10\text{ml}} = \frac{100\text{mg}}{\text{ml}}(\text{stock1})$$

کهن‌دار:

$$\frac{40\text{mg} \times 25(\text{Ginkogol})}{10\text{ml}(\text{H2O})} = \frac{1000\text{mg}}{10\text{ml}} = \frac{100\text{mg}}{\text{ml}}(\text{stock1})$$

برای تهیه استوک شماره ۲، ۱ میلی‌لیتر از استوک شماره ۱ برداشته شد و داخل لوله فالکون ریخته شد. سپس ۹ میلی‌لیتر آب مقطر استریل به آن اضافه شد تا حجم آن به ۱۰ میلی‌گرم برسد.

$$1\text{ml(stock1)} + 9\text{ml H2O} = \frac{10\text{mg}}{\text{ml}} = \frac{10000\mu\text{g}}{\text{ml}}\text{(stock2)}$$

کشت و جداسازی باکتری *S. aureus*

کشت باکتری *S. aureus* از دو سویه استاندارد (ATCC 25923) و سویه نمونه‌گیری شده از پاتوژن به صورت کشت چمنی روی محیط کشت مولر هینتون آگار روی پلیت انجام گرفت. پلیت‌های حاوی باکتری در انکوباتور به‌مدت ۲۴ ساعت نگهداری و سپس در محیط مولر هینتون براث کشت داده شدند. ۲۴ ساعت پس از کشت، کدورتی معادل محیط نیم مک فارلند آماده گردید.

آزمون حداقل غلظت مهاری Minimum Inhibitory Concentration (MIC)

آزمون میکروبیMIC از عصاره‌های گیاهی با استفاده از محیط مولر هینتون براث انجام شد. برای تهیه مولر هینتون براث، ۲/۱ گرم از پودر براث به ۱ لیتر آب مقطر انتقال یافت و بعد از حل شدن کامل با هیتر مغناطیسی به مقدار ۲ میلی‌لیتر در هر یک از ۳۰ لوله آزمایش ریخته و اتوکلاو شد. سپس در لوله شماره ۱، به میزان ۲ میلی‌لیتر از عصاره ۱۰ میلی‌گرم در میلی لیتر (۱۰۰۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) گیاه مورد نظر (زنجبیل یا کهن‌دار) ریخته شد که در این حالت غلظت ۵۰۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر برای لوله شماره یک ایجاد گردید. ۲ میلی لیتر از لوله شماره ۱ به لوله شماره ۲، ۲ میلی‌لیتر از لوله شماره ۲ به لوله شماره ۳ و به ترتیب تا لوله شماره ۸ انتقال یافت و عملیات رقیق‌سازی سریالی انجام شد. لوله‌های شماره ۹ و ۱۰ نیز به ترتیب به‌عنوان کنترل مثبت و منفی در نظر گرفته شدند. به غیر از لوله کنترل منفی به بقیه لوله‌ها ۲۰۰ میکرولیتر از محیط براث حاوی باکتری با کدورت معادل نیم مک فارلند اضافه گردید و در نهایت این لوله‌ها در انکوباتور به مدت ۲۴ ساعت نگهداری شدند. از ۳۰ لوله آزمایش، ۱۰ لوله برای عصاره گیاه زنجبیل، ۱۰ لوله برای عصاره گیاه کهن‌دار و در نهایت ۱۰ لوله برای ترکیبی از عصاره‌های هر دو گیاه در نظر گرفته شد. این مراحل برای هر سویه باکتری *S. aureus* در نظر گرفته شد.

آزمون حداقل غلظت کشندگی Minimum Bactericidal Concentration (MBC)

بعد از ۲۴ ساعت از آزمون MIC، آزمون MBC انجام شد. در این آزمایش از نمونه‌های لوله‌های شماره ۱ تا ۸ استفاده گردید. این نمونه‌ها در هشت پلیت جداگانه حاوی محیط کشت مولر هینتون آگار به‌صورت چمنی و یک‌دست کشت داده شدند و بعد از آن به‌مدت ۲۴ ساعت پلیت‌ها از لحاظ رشد باکتری مورد بررسی قرار گرفتند.

آزمون اثر ضدمیکروبی عصاره‌های گیاهی

برای این‌منظور از دیسک‌های بلانک استفاده گردید. هر دیسک بلانک در عصاره گیاهی ۱۰۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر زنجبیل و کهن‌دار به‌طور جداگانه آغشته شد و در محیط کشت مولر هینتون آگار حاوی باکتری، دیسک‌گذاری انجام گردید. علاوه بر این از ترکیب عصاره‌های زنجبیل و کهن‌دار نیز برای آغشته‌سازی و دیسک‌گذاری استفاده گردید. سپس پلیت‌ها به‌مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند و قطر هاله عدم رشد اندازه‌گیری شد.

استخراج DNA

برای استخراج DNA از دو سویه مورد مطالعه رشدیافته در محیط مولر هینتون براث استفاده گردید. مراحل کار با استفاده از کیت استخراج DNA باکتری‌های گرم مثبت شرکت پیشگامان و طبق دستورالعمل این کیت انجام گرفت.

بررسی وجود ژن *sea* در سویه‌های مورد مطالعه

برای این منظور با استفاده از آغازگرهای اختصاصی از روش PCR استفاده گردید. توالی‌های جفت آغازگر موردنظر در جدول ۱ آمده است [۲۴].

واکنش PCR ژن *sea* با استفاده از مواد واکنش‌گر و برنامه دمایی که به‌ترتیب در جداول ۲ و ۳ آمده است، صورت گرفت.

ارزیابی محصول PCR

برای این منظور، الکتروفورز انجام شد. با استفاده از بافر TBE و پودر آگارز، ژل آگارز ۱٪ تهیه گردید و ۵ میکرولیتر از محصول PCR با پاورلود مخلوط و به درون چاهک‌ها تزریق شد. در یک چاهک نیز DNA Ladder 100 bp تزریق شد. پس از الکتروفورز در ولتاژ 150 ولت، با قرار دادن ژل روی دستگاه ***UV Transilluminato***r، باندهای محصول PCR رؤیت و ارزیابی گردید.

استخراج RNA

بر اساس نتایج حاصل از MIC و MBC، حداکثر غلظت عصاره‌های زنجبیل و کهن‌دار که باعث مهار و کشتن سویه‌های باکتریایی نمی‌شدند برای تیمار دو سویه موردنظر در محیط براث باکتریایی معادل نیم‌مک فارلند استفاده گردید و پس از انکوباسیون در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، استخراج RNA با استفاده از ترایزول شرکت ROJETechnologies، طبق دستورالعمل کیت و با رعایت شرایط استریل و در دمای پایین صورت گرفت.

سنتز cDNA

با استفاده از RNAهای استخراج شده و با استفاده از کیت سنتز شرکت Parstous biotechnology و طبق پروتکل این کیت، سنتز cDNA انجام شد.

واکنش Real time PCR

برای این منظور ۱۰ میکرولیتر SYBR Green Premix به هر میکروتیوب اضافه گردید. سپس ۱ میکرولیتر از آغازگر مستقیم و معکوس، ۲ میکرولیتر از محلول cDNA و نیز ۴ میکرولیتر ROX Reference Dyeبه میکروتیوب‌ها افزوده شد. برای رسیدن به حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر، ۶ میکرولیتر آب فاقد نوکلئاز اضافه و مخلوط گردید و ۱۸ میکرولیتر از این مخلوط به میکروتیوب‌های استریپ اضافه شد. به منظور نرمال‌سازی، ژن *16SrRNA* به عنوان ژن مرجع مورد استفاده قرار گرفت. برای تجزیه و تحلیل نتایج ریل تایم PCR از روش $2^{-\Delta\Delta CT}$ استفاده شد. در جدول ۴ توالی آغازگرهای مربوط به ژن ***sea*** و ژن مرجع *16 S rRNA* نشان داده شده است [۲۴].

جدول ۱- توالی‌های آغازگرهای مورد مطالعه برای ژن *sea* در *S. aureus*

نام آغازگر	توالی
sea-F	TTGGAAACGGTTAAAACGAA
sea-R	GAACCTTCCCATCAAAAACA

جدول ۲- مواد واکنش‌گر مورد استفاده در PCR ژن *sea* در *S. aureus*

واکنش‌گر	حجم (میکرولیتر)
آب مقطر	15.5
بافر PCR(10X)	2.5
$MgCl_2$ (10mM)	1.5
dNTPs (10mM)	1
آغازگر مستقیم (10p.mol)	0.5
آغازگر معکوس (10p.mol)	0.5
الگو DNA	3
Taq polymerase (100U/µl)	0.5
حجم کل	25

جدول ۳- شرایط بهینه دمایی PCR ژن *sea* در *S. aureus*

	دما	زمان	برنامه
	۹۴°C	۵ دقیقه	واسرشت اولیه
	۹۴°C	۴۵ ثانیه	واسرشت
۳۵ سیکل	۵۹°C	۶۰ ثانیه	دمای اتصال آغازگر
	۷۲°C	۴۵ ثانیه	گسترش آغازگر
	۷۲°C	۵ دقیقه	گسترش نهایی

نتایج

نتایج حاصل از روش آغشته سازی دیسک

این روش برای سویه‌های استاندارد و پاتوژن با غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر عصاره‌های کهن‌دار و زنجبیل انجام گردید (شکل ۱ الف و ب). قطر هاله عدم رشد در جدول ۵ نشان داده شده است.

نتایج آزمون MIC تحت تیمار با عصاره‌های زنجبیل و کهن‌دار

در این آزمایش دو سویه استاندارد و پاتوژن باکتری با غلظت‌های مختلف عصاره‌های گیاهی یعنی ۵۰۰۰µg/ml، ۲۵۰۰µg/ml، ۱۲۵۰µg/ml، ۶۲۵µg/ml، ۳۱۲/۵µg/ml، ۱۵۶/۲۵µg/ml، ۷۸/۱µg/ml و ۳۹/۶µg/ml تحت تیمار قرار گرفتند. MIC عصاره زنجبیل و کهن‌دار و همچنین ترکیب عصاره‌ها برای سویه‌های پاتوژن و استاندارد ۵۰۰۰µg/ml و ۲۵۰۰µg/ml بود. علاوه بر آن در لوله شماره ۹ (کنترل منفی) به علت فقدان باکتری رشدی مشاهده نگردید (شکل ۲).

نتایج حاصل از آزمون MBC تحت تیمار با عصاره‌های زنجبیل و کهن‌دار

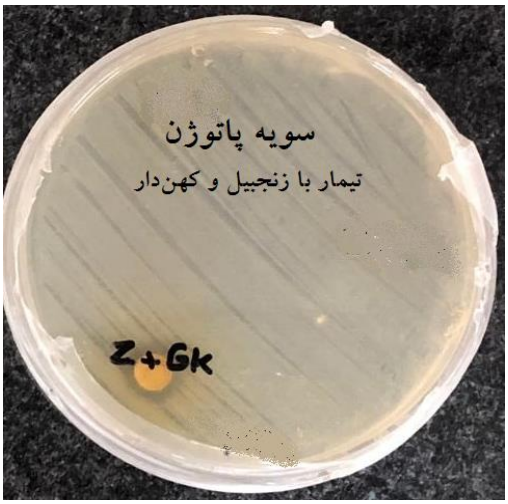
در تمامی این پلیت‌ها رشد سویه‌ها مشاهده شد و بر این اساس غلظت‌های به‌کار رفته در این آزمون اثر کشندگی روی سویه‌های مورد نظر نداشتند (شکل ۳).

جدول ۴- توالی آغازگرهای مربوط به ژن‌های *sea* و *16S rRNA* در *S. aureus*

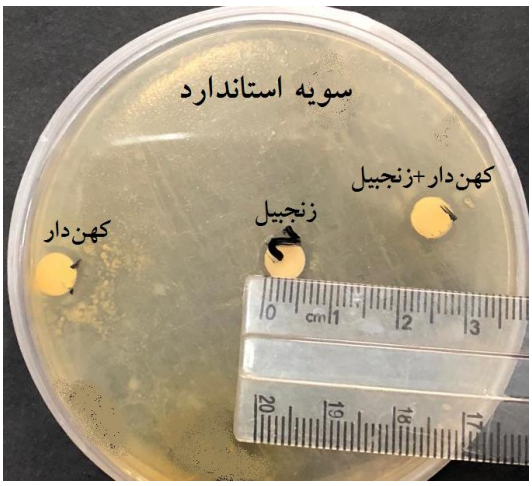
منبع	توالی	آغازگر
Atshan et al., 2013	TTGGAAACGGTTAAAACGAA	*sea*-F
	GAACCTTCCCATCAAAAACA	*sea*-R
Atshan et al., 2013	GGGACCCGCACAAGCGGTGG	*16S rRNA-F*
	GGGTTGCGCTCGTTGCGGGA	*16S rRNA-R*

جدول ۵- قطر هاله عدم رشد سویه‌های مورد مطالعه باکتری *S. AUREUS* تحت تیمار به روش دیسک‌گذاری

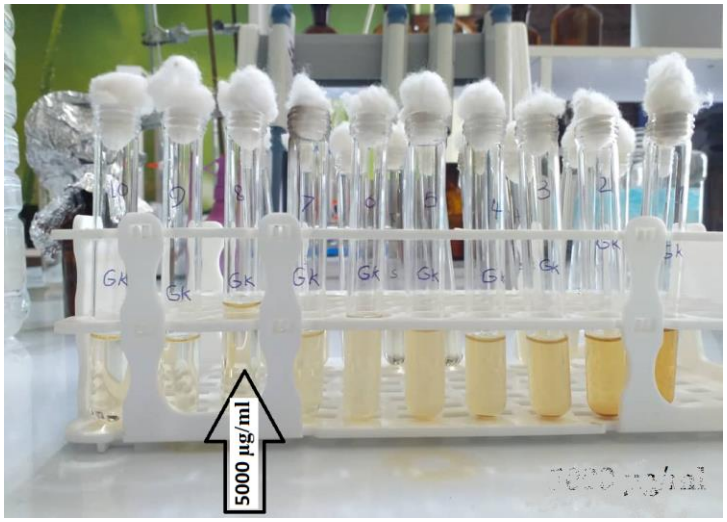
نوع سویه	تیمار با زنجبیل (غلظت ۱۰۰mg/ml)	تیمار با کهن‌دار (غلظت ۱۰۰mg/ml)	تیمار به نسبت مساوی با زنجبیل و کهن‌دار (غلظت ۱۰۰mg/ml)
پاتوژن	۹ mm	۱۲ mm	۱۰ mm
استاندارد	۰	۰	۰



شکل ۱ (الف): هاله عدم رشد سویه پاتوژن *S. aureus* در شرایط تیمار با زنجبیل و کهن‌دار

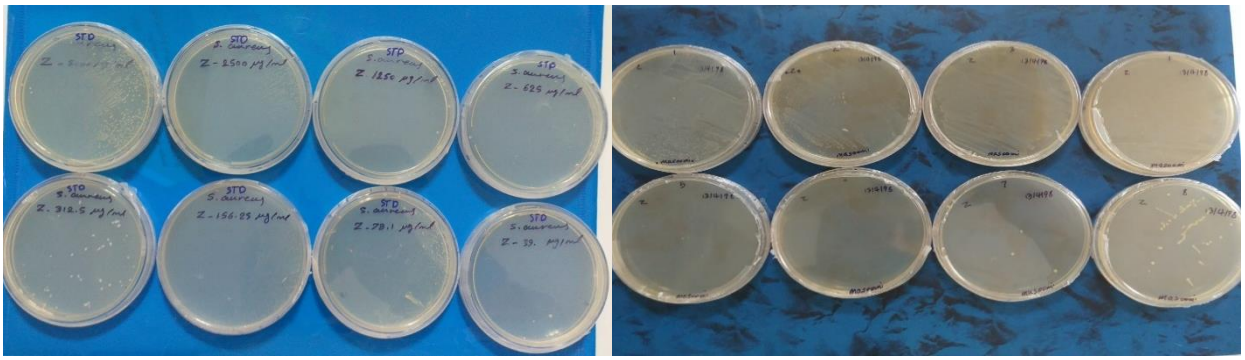


شکل ۱ (ب): هاله عدم رشد سویه استاندارد *S. aureus* در شرایط تیمار با زنجبیل و کهن‌دار



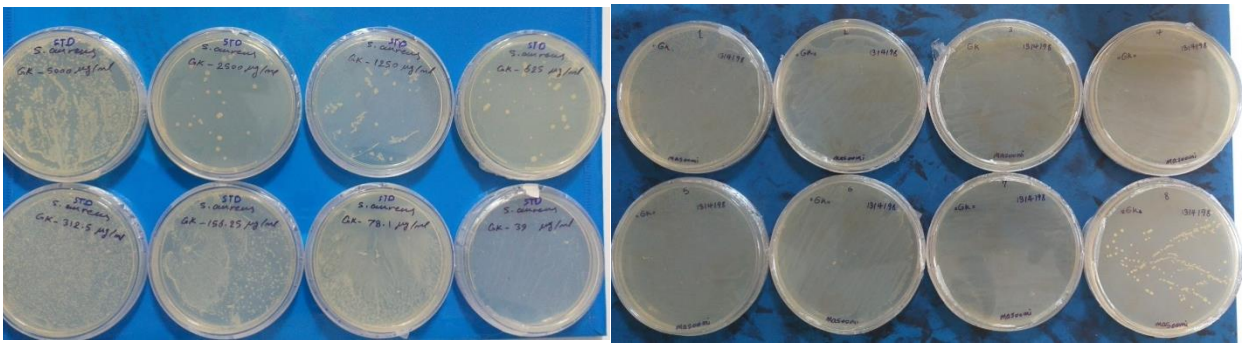
شکل۲- MIC مربوط به تیمار باکتری *S. aureus* با عصاره‌های زنجبیل و کهن‌دار

(غلظت‌های ۵۰۰۰µg/ml، ۲۵۰۰µg/ml، ۱۲۵۰µg/ml، ۶۲۵µg/ml، ۳۱۲/۵µg/ml، ۱۵۶/۲۵µg/ml، ۷۸/۱µg/ml، ۳۹/۶µg/ml)



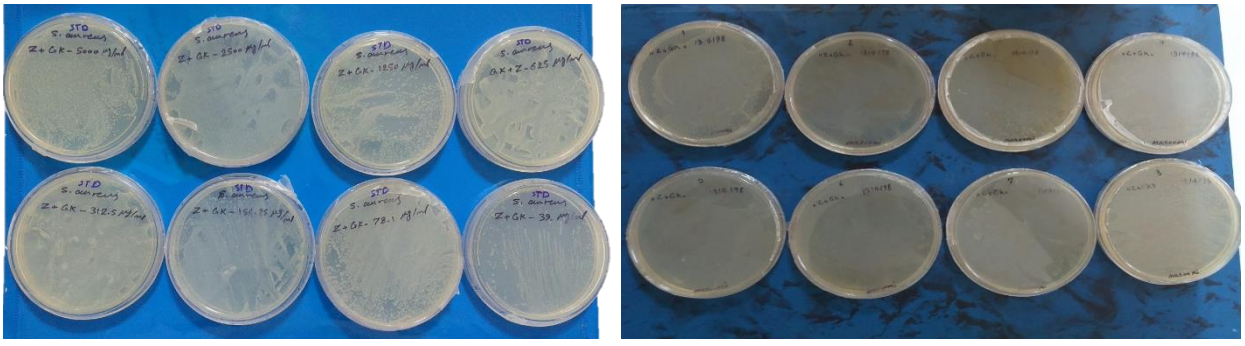
الف) تیمار سویه پاتوژن با عصاره زنجبیل

د) تیمار سویه استاندارد با عصاره زنجبیل



ب) تیمار سویه پاتوژن با عصاره کهن‌دار

ه) تیمار سویه استاندارد با عصاره کهن‌دار



ج) تیمار سویه پاتوژن با عصاره‌های ترکیبی

و) تیمار سویه استاندارد با عصاره‌های ترکیبی

شکل ۳- MBC مربوط به تیمار سویه‌های پاتوژن و استاندارد باکتری *S. aureus* با عصاره‌های زنجبیل و کهن‌دار به صورت جداگانه و ترکیبی

نتایج حاصل از Real time PCR

RNA سویه‌های تیمار شده با زنجبیل، کهن‌دار و ترکیب این دوعصاره و همچنین سویه کنترل (بدون تیمار) در شرایط استریل و برودتی و بر اساس دستورالعمل کیت استخراج ROJETechnologies استخراج شد و پس از ارزیابی کیفیت RNA استخراج شده از طریق الکتروفورز، سنتز cDNA انجام گردید و سپس با استفاده از آغازگرهای اختصاصی *sea* و به کارگیری ژن مرجع 16s rRNA تکنیک Real time PCR صورت گرفت.

بررسی بیان ژن *sea* تحت تأثیر عصاره‌های گیاهی در سویه استاندارد

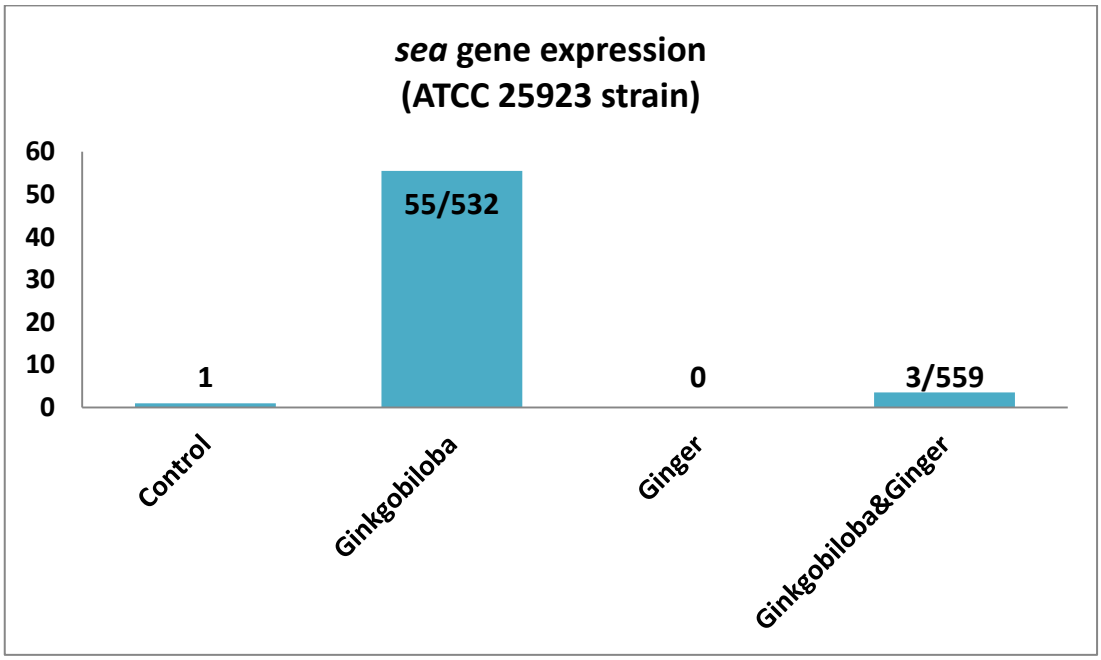
تجزیه و تحلیل نتایج Real time PCR در سویه استاندارد *S. aureus* تیمارشده با غلظت‌های مشخص عصاره‌های گیاهی کهن‌دار و زنجبیل نشان داد که میزان بیان ژن *sea* تحت تأثیر عصاره کهن‌دار حدود ۵۵ درصد افزایش یافت. اما عصاره زنجبیل بیان این ژن را کاملا مهار کرد. استفاده توام این دو عصاره نیز بیان این ژن را تا ۳/۵ درصد افزایش داد (شکل ۴).

بررسی بیان ژن *sea* تحت تأثیر عصاره‌های گیاهی در سویه پاتوژن

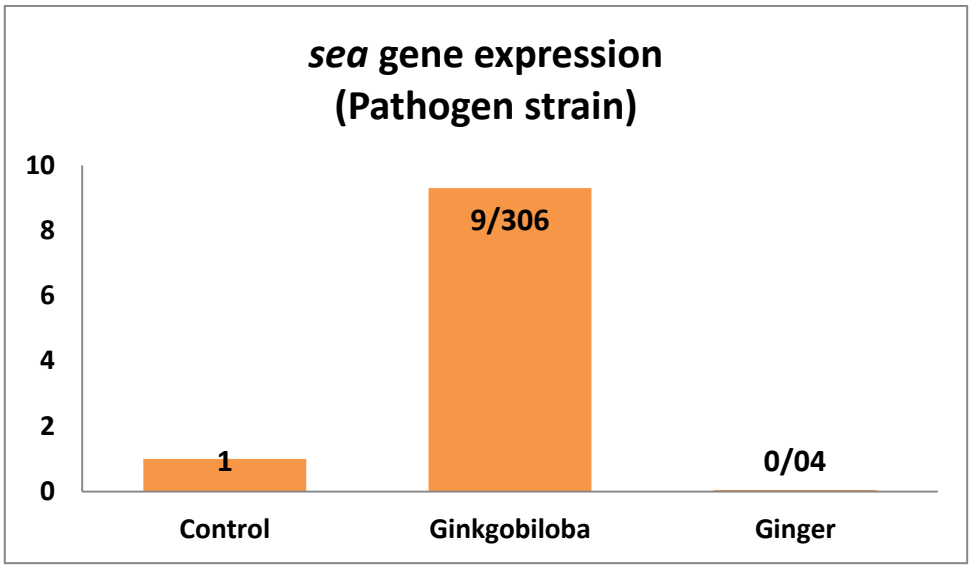
آنالیز نتایج Real time PCR در سویه پاتوژن *S. aureus* تیمارشده با غلظت‌های مشخص عصاره‌های گیاهی کهن‌دار و زنجبیل نیز نشان داد که میزان بیان ژن *sea* تحت تأثیر عصاره کهن‌دار حدود ۹ درصد افزایش می‌یابد ولی عصاره زنجبیل بیان این ژن را بسیار کاهش داد به طوری‌که بیان این ژن نسبت به نمونه بدون تیمار فقط به ۴ درصد رسید (شکل ۵).

بحث

پاتوژن‌های بیمارستانی همواره مشکلات زیادی را برای بیماران بستری و نیز پرسنل بیمارستان‌ها ایجاد می‌کنند. این باکتری‌های به‌طور پیوسته دستخوش تغییرات ژنتیکی و فنوتیپی می‌شوند و بدین ترتیب نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های رایج مقاومت کسب می‌کنند. باکتری *S. aureus* با ترشح سموم مختلف از جمله انتروتوکسین، شرایط تهاجم به میزبان را فراهم می‌کند. در میان این سموم، انتروتوکسین‌های A و B بیشترین نقش را در بیماری‌زایی دارند. با توجه به ظهور *S. aureus* های مقاوم به آنتی‌بیوتیک‌های مختلف، تحقیق در مورد یافتن داروهای مؤثر، ارزشمند به‌نظر می‌رسد. با توجه به این که آنتی‌بیوتیک‌ها اغلب دارای عوارض جانبی متعدد هستند، دست‌یابی به داروهای گیاهی مؤثر با عوارض جانبی کم بسیار حائز اهمیت است. از



شکل ۴- میزان بیان ژن *sea* تحت تیمار عصاره‌های کهن‌دار و زنجبیل در سویه استاندارد *S. aureus*



شکل ۵- میزان بیان ژن *sea* تحت تیمار عصاره‌های کهن‌دار و زنجبیل در سویه پاتوژن *S. aureus*

گذشته‌های بسیار دور انسان به خواص دارویی بسیاری از گیاهان پی برده و بر اساس تحقیقات صورت گرفته، خواص ضدمیکروبی بسیاری از گیاهان به اثبات رسیده است و در این میان، زنجبیل و کهن‌دار از اهمیت زیادی برخوردار هستند. تحقیقاتی در زمینه تأثیر ضد باکتریایی عصاره‌های گیاهی مذکور روی انواع باکتری‌های گرم مثبت و منفی وجود دارد [۲۲] اما این تحقیقات در حد مطالعات فنوتیپی و مشاهدات میکروبی و آزمون‌های بیوشیمیایی بوده است. در این پژوهش اثر ضدمیکروبی عصاره‌های گیاهی زنجبیل و کهن‌دار و تأثیر آن‌ها روی بیان ژن انتروتوکسین *sea* در سویه‌های استاندارد و پاتوژن باکتری *S. aureus* مورد بررسی قرار گرفت.

طبائی و همکاران [۲۵] نشان دادند که بیشترین میزان مقاومت *S. aureus* مقاوم به متی‌سیلین به‌ترتیب در آنتی‌بیوتیک‌های پنی‌سیلین، اریترومایسین، کلیندامایسین، متی‌سیلین، جنتامایسین، سولفومتوکسازوم و سیپروفلوکساسین است. این موضوع، زنگ خطری است که نشان می‌دهد در آینده‌ای نه چندان دور، سویه‌های بسیار مقاوم باکتری‌ها ظاهر خواهند شد.

مومنی و زمانی‌زاد [۲۱] در بررسی خاصیت ضدباکتریایی عصاره‌های پیاز و زنجبیل در برابر *S aureus*، *Pseudomonas aeruginosa*، *Escherichia coli* و *Candida albicans* نشان دادند که عصاره الکلی زنجبیل بیشتر از سایر عصاره‌ها از رشد ارگانیسم‌های مورد آزمایش ممانعت می‌کند. *P. aeruginosa*، نسبت به سایر ارگانیسم‌ها، حساسیت بیشتری به عصاره پیاز و زنجبیل نشان داد. عصاره‌های زنجبیل اثر بازدارنده مشخصی نسبت به عصاره پیاز روی ارگانیسم‌های مورد آزمایش نشان داد که این یافته با نتایج تحقیق حاضر در انطباق بود. تاج‌بخش و سلیمانی [۲۲] به این نتیجه رسیدند که بیشترین اثر اسانس زنجبیل با غلظت ۰/۱۲۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر روی باکتری‌های *S. aureus* و Salmonella typhimurium و *Staphylococcus epidermidis* بود که با نتایج تحقیق حاضر مطابقت داشت.

در پژوهش حاضر تأثیر عصاره‌های زنجبیل و کهن‌دار روی دو سویه استاندارد و پاتوژن *S. aureus* مورد مطالعه قرار گرفت. بر اساس نتایج آزمون انتشار از دیسک، اثر ضدمیکروبی عصاره زنجبیل در مورد سویه استاندارد و پاتوژن به‌خوبی مشهود بود و هاله عدم رشد ۱۵ و ۹ میلی‌متر به‌ترتیب در مورد سویه‌های استاندارد و پاتوژن مشاهده گردید ولی عصاره کهن‌دار روی سویه استاندارد اثر ضدمیکروبی نشان نداد.

بر اساس این پژوهش، MIC (حداقل غلظت بازدارندگی) عصاره زنجبیل و کهن‌دار و همچنین ترکیب عصاره‌ها برای سویه‌های پاتوژن و استاندارد ۵۰۰۰µg/ml و ۲۵۰۰µg/ml تعیین گردید. هدف اصلی از انجام آزمون MIC، یافتن Sub MIC بود که بر اساس آن، بیشترین غلظت عصاره‌ها که باعث مرگ باکتری نشود به کار گرفته شود.

بر اساس جستجوهای انجام شده، تاکنون تحقیقی در مورد تأثیر عصاره‌های گیاهی زنجبیل و کهن‌دار بر بیان ژن *sea* صورت نگرفته است. در تحقیق حاضر و بر اساس آنالیز نتایج حاصل از Real time PCR، بیان ژن انتروتوکسین *sea* در *S. aureus* بسیار متأثر از عصاره زنجبیل و همچنین عصاره کهن‌دار بود و این دو عصاره گیاهی تأثیر کاملا متفاوت روی بیان این ژن داشتند. این موضوع هم در مورد سویه استاندارد و هم در مورد سویه پاتوژن مشاهده گردید.

عصاره کهن‌دار، بیان ژن *sea* در سویه استاندارد را تا ۵۵ برابر و در سویه پاتوژن را تا بیش از ۹ برابر افزایش داد. بنابراین شاید بتوان گفت که عصاره این گیاه نه تنها خاصیت ضدمیکروبی ندارد بلکه با افزایش بیان ژن انتروتوکسین ممکن است در افزایش شدت بیماری‌زایی *S. aureus* ایفای نقش کند. اما تأثیر عصاره زنجبیل کاملا متفاوت و متضاد با کهن‌دار بود. بر اساس تحقیق حاضر، زنجبیل توانست بیان ژن انتروتوکسین *sea* در سویه استاندارد را به صفر و در سویه پاتوژن را نزدیک به صفر کاهش دهد. به عبارت دیگر عصاره زنجبیل اثر مهاری کامل روی ژن انتروتوکسین *sea* داشت.

نتیجه گیری

بر اساس نتایج حاصل از این پژوهش چنین استنباط می‌شود که عصاره زنجبیل دارای خواص ضدمیکروبی است. این عصاره گیاهی طبیعی روی بیان ژن انتروتوکسین *sea S. aureus* تأثیر مهاری کامل می‌تواند داشته باشد. این موضوع در مورد سویه استاندارد ATCC25923 و همچنین سویه پاتوژن *S. aureus* مشاهده گردید. بنابراین می‌توان زنجبیل را به‌عنوان یک کاندیدای مناسب برای مقابله با تهاجم این باکتری در نظر گرفت. اما کهن‌دار علی‌رغم فوائد بسیار زیاد و مختلف در زمینه‌های مختلف درمانی، عامل خوبی در مقابله با عفونت‌های *S. aureus* به نظر نمی‌رسد و حتی ممکن است منجر به تشدید این نوع عفونت‌ها گردد. به‌منظور تأیید و تکمیل نتایج حاصل از این پژوهش، پیشنهاد می‌شود که میزان بیان ژن انتروتوکسین *sea* در تعداد بیشتری از نمونه‌های *S. aureus* تحت تیمار عصاره‌های گیاهی زنجبیل و کهن‌دار مورد مطالعه قرار گیرند. عصاره‌های گیاهی مختلف دیگری نیز روی بیان ژن *sea* باکتری فوق مورد ارزیابی قرار گیرند و تأثیر عصاره‌های زنجبیل و کهن‌دار بر بیان انواع دیگر ژن‌های انتروتوکسین نظیر *seb*، *sec* و ... نیز مطالعه گردند.

References

[1] Gadyari F, Sattari M, Boroumand MA, Yaghoubi R, Sepehri Seresht S, Purgholi L. Detection of *Staphylococcus aureus* Entrotoxins A to D in clinical strains isolated from burned patients of Tehran Motahari Hospital. Iran J Med Microbiol, 2011; 5 (1 and 2): 20-27.

[2] Hornef MW, Wick MJ, Rhen M, Normark S. Bacterial strategies for overcoming host innate and adaptive immune responses. Nat Immunol. 3(11):1033-40. doi: 10.1038/ni1102-1033.

[3] Choobkar, N., Akhonzadeh Basti, A., Soltani, M., Sari, A.A., Malekshahi, A., Nemati, Gh., Partovi, R. 2010. Study on the growth of *Staphylococcus aureus* in processed fillets of silver carp with salt and nisin. J Vet Res, 2002; 65(3): 193 - 198.

[4] Krause KM, Renelli M, Difuntorum S, Wu TX, Dababov DV, Benton BM. *In vitro* activity of telavancin against resistant gram-positive bacteria. Antimicrob Agents Chemother, 2008; 52(7): 2647-2652.

[5] Roberts S, O'Shea K, Morris D, Robb A, Morrison D. A real-time PCR assay to detect the Panton Valentine Leukocidin toxin in staphylococci: screening *Staphylococcus schleiferi* subspecies *coagulans* strains from companion animals. *Vet Microbiol*, 2005; 107(1-2):139-44.

[6] Zia M, Beheshti S, Khalkhali H, Saffari S. Detection of antibiotic resistance in different strains of *Staphylococcus aureus* using disc diffusion agar. Razi J Med Sci, 2013; 20 (111): 70-78.

[7] Hosseini Jazani N, Sharifi Y, Farzaneh H, Zartoshti M. Determination of the efficacy of phosphomycin on clinical isolates of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Stud Med Sci, 2014; 25 (10):874-880.

[8] Lawrynowicz-Paciorek M., Kochman M., Piekarska K0., Grochowska A, Windyga B. The distribution of enterotoxin and enterotoxin-like genes in *Staphylococcus aureus* strains isolated from nasal carriers and food samples. Int J Food Microbiol, 2007; 117 (3): 319-323.

[9] Ertas N, Gonulalan Z, Yildirim Y, Kum E. Detection of Staphylococcus aureus enterotoxins in sheep cheese and dairy desserts by multiplex PCR technique. Int. J Food Microbiol, 2010; 142:74–77.

[10] Asgarpour D, Zeighami H. The role of *Staphylococcus aureus* enterotoxins in staphylococcal food poisoning. J Lab Diag, 2015; 28: 63-73.
[11] Imani-Fooladi A, Riazipour M, Sattari M. Molecular and serological detection of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* from traditionally dairy products. J Shahrekord Univ Med Sci, 2010; 11(4): 19-26.
[12] Valizadeh E, Amini K. Identification of *Staphylococcus aureus* enterotoxin genes using multiplex PCR. *J Babol Univ Med Sci*, 2016; *18 (12): 26-32.*
[13] Virk JK, Gupta V, Kumar S, Singh R, Bansal P. Ashtawarga plants - Suffering a triple standardization syndrome. J Tradit Complement Med, 2017; 7 (4): 392-399.
[14] Dadfar F, Hosseini SE, Bahaoddini A. A review of phytochemical, pharmacological and physiological properties of ginger. J Clin Excell, 2014; 3 (1): 72-86.
[15] Khafaga AF, Bayad AE. *Ginkgo biloba* extract attenuates hematological disorders oxidative stress and nephrotoxicity induced by single or repeated injection cycles of cisplatin in rats: physiological and pathological studies. Asian J Anim Sci, 2016; 10 (4-5): 235-246.
[16] Alimoradian A, Ghasemi S, Zahiri M, Saeedi AH, Miladi H, Sadegh M. Investigation of the effect of *Ginkgo biloba* leaf extract on spatial memory impairment and hippocampal neuronal loss caused by diabetes induced by streptozotocin in rats. J Kurdistan Univ Med Sci, 2018; 23(2): 114-124.
[17] Atashak S. Effect of *Ginkgo biloba* L. on total antioxidant capacity and malondialdehyde after aerobic exercise in inactive women. Iran J MedAromat Plants, 2018; 34 (3): 401-411.
[18] Mahmoud BSM, Yamazaki K, Miyashita K, Shin I, Suzuki T. A new technology for fish preservation by combined treatment with electrolyzed NaCl solutions and essential oil compounds. Food Chem, 2006; 99(4): 656-662.
[19] Burt S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods: a review. Int J Food Microbiol, 2004; 94(3):223-253.
[20] Arablou T, Aryaeian N, Valizadeh M, Sharifi F. The effect of ginger consumption on glycemic status, lipid profile and some inflammatory markers in patients with type 2 diabetes mellitus. Int J Food Sci Nut, 2014; 65(4): DOI:10.3109/09637486.2014.880671.
[21] Momeni L, Zamanzad B. The antibacterial properties of *Allium cepa* (onion) and *Zingiber officinale* (ginger) extracts on *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, and *Candida albicans* isolated from vaginal specimens. *J Shahrekord Univ Med Sci*, 2010; 11 (4): 81-87.
[22] Tajbakhsh M, Soleimani N. Evaluation of the bactericidal effects of *Zingiber officinale*, *Aloysia citrodora* and *Artemisia dracunculus* on the survival of standard gram-positive and gram-negative bacterial strains. Jorjani Biomed J, 2018; 6(1): 22-32.
[23] Yarmohammadi ME, Naseri M, Nabavi SM, Zanganeh A, Zayeri F. The effect of Ginkgo T.D. consumption in reducing mental tinnitus. Daneshvar Med J, 2006; 14 (67): 67-71.
[24] Atshan SS, Nor Shamsudin M, Sekawi Z, Than LTL, Awang Hamat R, Karunanidhi A, Alreshidi MA, Ghaznavi-Rad E, Ghasemzadeh-Moghaddam H, Chong Seng JS, Jeevajothi Nathan J, Chong PP. Prevalence of adhesion and regulation of biofilm-related genes in different clones of *Staphylococcus aureus.* J Biomed Biotechnol, 2012; DOI: 10.1155/2012/976972.
[25] Tabaei S, Kouhi Noghondar M, Mohammadzadeh M, Ataei L, Jamehdar SA. Pattern of antibiotic resistance in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) strains isolated from clinical specimens: Imam Reza hospital in Mashhad. Med J Mashhad Univ Med Sci, 2016; 59 (2): 64-70.

Molecular evaluation of *sea* enterotoxin gene expression in *Staphylococcus aures* treated with *Ginkgo biloba* and *Zingiber officinale* plant extracts

Masoumi Sh.[1], Habibollahi H.[2], Safari Motlagh M. R.*[3]

[1] Department of Biology, Rasht Branch, Islamic Azad University, Rasht, Iran.
[2] Department of Biology, Rasht Branch, Islamic Azad University, Rasht, Iran.
[3] Department of Plant Protection, Rasht Branch, Islamic Azad University, Rasht, Iran.

* (Corresponding author): ssafarimotlagh@yahoo.com; safarimotlagh@iaurasht.ac.ir

DOI:10.30495/JDB.2023.1960528.1309 https://dorl.net/dor/20.1001.1.2008692.1402.15.2.2.2

Received: June 2022 Accepted: December.2022

Abstract

In this study, the antimicrobial effect of extracts of *Ginkgo biloba* and *Zingiber officinale* plants against *Staphylococcus aureus* and their effect on the expression of *sea* enterotoxin gene were investigated. Two standard and pathogenic strains of *S. aureus* with enterotoxin *sea* gene and *G. biloba* and *Z. officinale* extracts were used as ready-made tablets with a specified concentration. Antimicrobial test of the extracts was performed by disk impregnation and then the minimum inhibitory and bacteriocidal concentrations of these extracts were evaluated by MIC and MBC tests and SubMIC concentration of these extracts was used to evaluate the effect of extract treatment on the expression of *sea* enterotoxin gene. Then RNA extraction and cDNA synthesis and finally Real time PCR were performed and the results were interpreted. The results of disk diffusion and MIC showed that *Z. officinale* extract has antimicrobial effect. Interpretation of Real time PCR results also showed that *Z. officinale* extract reduced and completely inhibited the expression of *sea* enterotoxin gene in standard strain ATCC 25923. This extract also significantly reduced the expression of the target gene in the pathogenic strain, and its expression was reduced to 4% compared to the untreated sample. On the contrary, *G. biloba* extract significantly increased *sea* gene expression. This extract increased the expression of the target gene in the standard strain and the pathogen by approximately 55 and 9 fold, respectively. According to the results of this study, ginger can be a good candidate to fight *S. aureus* infections.

Keywords: *Staphylococcus aureus*, *Ginkgo biloba*, *Z. officinale*, *sea* gene.