

بهینه‌سازی تکثیر ژن *apa* در مایکوباکتریوم آویوم تحت گونه پاراتوبرکلوزیس با استفاده از دی متیل سولفوکسید

مصطفی روستا^۱، زهرا همتی^{۲*}، عبدالله درخشنده^۳، امین نعمت‌الهی^۴

۱. دانشجوی دکترای تخصصی باکتری شناسی، گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهرکرد، شهرکرد-ایران.

۲. گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهرکرد، شهرکرد-ایران.

۳. گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شیراز، شیراز-ایران.

۴. گروه بهداشت و کنترل کیفیت مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهرکرد، شهرکرد-ایران.

پذیرش: ۱۲ آبان‌ماه ۱۴۰۳

دریافت: ۲۸ شهریور ۱۴۰۳

چکیده

مایکوباکتریوم آویوم تحت گونه پاراتوبرکلوزیس (MAP) یک باکتری بسیار کندرشدی است که به‌عنوان عامل بیماری یون مطرح می‌باشد. این بیماری خسارت‌های اقتصادی فراوانی به صنعت دامپروری به‌خصوص گاوداری‌های شیری در سراسر دنیا وارد می‌کند. باتوجه‌به علائم بالینی و آسیب‌شناسی مشابه در بیماری یون و کرون، احتمال می‌رود این باکتری در بروز و پیشرفت بیماری کرون نقش داشته باشد، از این‌رو امکان انتقال MAP از طریق شیر موجب ایجاد نگرانی‌های زیادی شده است؛ لذا تشخیص صحیح این باکتری با حساسیت و ویژگی بالا نظیر روش‌های بر پایه مولکولی از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است. بررسی توالی ژن *apa* در پایگاه داده‌ای NCBI نشان می‌دهد که دارای درصد بالایی از بازهای سیتوزین و گوانین یا GC می‌باشد. این امر منجر به اختلال در تکثیر این ژن در طی سیکل PCR می‌گردد. تکثیر قطعات غنی از GC به علت شکل‌گیری ساختارهای ثانویه مانند ساختارهای سنجاق‌سری یا حلقوی در رشته‌ی الگو، همواره با مشکلات زیادی همراه بوده است. مطالعه حاضر باهدف بررسی امکان تکثیر بخشی از ژن *apa* با بهینه‌سازی غلظت دی متیل سولفوکسید (DMSO) به اجرا درآمد. بررسی بیوانفورماتیک از نظر وضعیت GC و ساختارهای ثانویه احتمالی، توسط CpG Plot و Mfold انجام گردید. در نهایت طبق طراحی PCR غلظت ۳ میکرولیتر DMSO بدون حضور باندهای غیر اختصاصی و با دمای اتصال ۵۵ درجه سانتی‌گراد ژن *apa* تکثیر گردید. نتایج این مطالعه نشان داد، تکثیر ژن *apa* در شرایط عدم حضور DMSO امکان‌پذیر نبود و اضافه‌کردن این ماده سبب بهبود تکثیر این ژن گردید.

واژه‌های کلیدی: مایکوباکتریوم آویوم تحت گونه پاراتوبرکلوزیس، بیماری یون، *apa* PCR، دی متیل سولفوکسید.

مقدمه

می‌ماند و در برابر کلرزنی و پاستوریزاسیون پایدار می‌باشد (۱۸، ۲۰). در مطالعات گذشته ثابت شده است که باکتری MAP می‌تواند ۱۸-۶ ماه در آب و شرایط سخت زنده بماند و بنابراین ممکن است مخازن آب آلوده منابع مهمی در انتشار آلودگی MAP در مزارع باشند (۱۷). علاوه بر این باکتری MAP در پنیر، گوشت، منابع آب و ذرات معلق در هوا نیز یافت شده است (۲۰).

کنترل و پیشگیری بیماری یون، به دلیل ماهیت مزمن، دوره‌ی کمون طولانی چالش برانگیز است (۱۵). به

بیماری یون یک آنتریت مزمن، کشنده و پیشرونده‌ای است که در نشخوارکنندگان اهلی و وحشی مثل گاو، گوسفند، بز و آهو دیده شده و بوسیله مایکوباکتریوم آویوم تحت‌گونه پاراتوبرکلوزیس (*Mycobacterium avium* subsp. *Paratuberculosis*) ایجاد می‌گردد که به اختصار MAP نامیده می‌شود. این باکتری به کندی و سختی رشد نموده و اسید فست است و به دلیل مقاومت دیواره سلولی در شرایط سخت برای مدت طولانی زنده



توسعه یافته است. روش مولکولی PCR تکنیکی است که نیاز به کشت باکتری را از بین می‌برد (۹). روش PCR می‌تواند برخی از اشکالات روش کشت مدفوع را با تقویت DNA از مواد بالینی مانند مدفوع، شیر یا بافت تنها در چند ساعت برطرف کند (۲۶، ۳۶).

مایکوباکتریوم‌های بیماری‌زا اغلب با القا پروتئین‌های مختلفی، از سیستم ایمنی میزبان فرار می‌کنند به این صورت می‌توانند در داخل سلول‌های ماکروفاژ زنده بمانند. بنابراین توجه زیادی به شناسایی ژن‌هایی که برای ورود و بقاء این باکتری‌ها در سلول‌های میزبان مهم هستند، می‌شود (۲، ۲۸). از آنجایی که پروتئین‌های سطحی MAP نقش مهمی را در شروع عفونت با سلول‌های ایمنی میزبان بازی می‌کنند، در این مطالعه آنتی‌ژن مهم سطحی این باکتری، یعنی آنتی‌ژن غنی از آلانین و پرولین (*apa*) انتخاب شد. پروتئین *Apa* توسط ژن *MAP1569* در سویه MAP K-10 کد می‌شود (۲۹، ۳۷). آنتی‌ژن‌های ترشح شده توسط MAP می‌توانند از طریق مدفوع دفع و به‌عنوان یک نشانگر بالقوه زیستی-مدفوعی مطرح باشند. ژنوم بیشتر گونه‌های خانواده مایکوباکتریوم حاوی درصد بسیار بالایی از بازهای گوانین یا سیتوزین یا GC (۶۶٪) است که اغلب منجر به ایجاد ساختارهای ثانویه پایدار می‌شود که مانع از پیشرفت DNA پلی‌مرز در طول تکثیر می‌گردد (۴، ۳۴). محتوای بالای GC مشکلاتی را در طراحی پرایمر مانند عدم تطابق، دمای بالای اتصال، پرایمر دایمر و ایجاد ساختارهای ثانویه را باعث می‌شود. این ساختارهای اضافی عملکرد آنزیم‌های DNA پلی‌مرز را محدود کرده و منجر به محصولات ضعیف و باندهای غیر اختصاصی می‌گردد (۵، ۳۱). روش‌های متعددی مثل استفاده از هیدروکسید سدیم، بتائین، فرمامید (Formamide) و دی‌متیل سولفوکساید (Dimethyl sulfoxide: DMSO) برای غلبه بر این مشکلات پیشنهاد شده است (۵، ۱۹). DMSO یک ترکیب آلی گوگردی با فرمول

دلیل احتمال ارتباط نقش باکتری MAP در ایجاد بیماری کرون در انسان، افزایش فشار برای کنترل بیماری یون در سراسر جهان وجود دارد (۳). انتقال این بیماری از راه مدفوعی - دهانی (Fecal - oral) می‌باشد و بسیاری از حیوانات قبل از شش ماهگی به باکتری آلوده می‌شوند. حیوانات آلوده به یون از روزهای اول شروع به انتشار باکتری MAP در مدفوع و در مراحل بعدی در شیر می‌کنند، بنابراین راه اصلی انتقال بیماری خوردن آب و غذای آلوده به مدفوع دام آلوده و همچنین مصرف شیر دام آلوده است (۲۴). با توجه به مقاومت دمایی بالای باکتری MAP، احتمالاً این باکتری می‌تواند در شیر پس از پاستوریزاسیون زنده بماند (۱۳). بیشترین استعداد در ابتلا به بیماری در گوساله‌های زیر یک ماه دیده می‌شود و با افزایش سن میزان این حساسیت کاهش می‌یابد، از این رو شناسایی و حذف حیوانات عامل عفونی قبل از اینکه منبع آلودگی در مزرعه باشند، معیار اصلی کنترل بیماری در سطح گله است (۱۲). با این وجود انتقال داخل رحمی نیز گزارش شده است (۱۰). بیماری یون در لیست بیماری‌های سازمان جهانی بهداشت (WHO) در گروه B قرار گرفته و محدودیت‌های تجاری ایجاد می‌نماید (۷).

با توجه به اینکه باکتری MAP، یک باکتری کند رشد است، روش‌های سنتی تشخیص، زمان‌بر و با حساسیت پایین هستند. با این حال، کشت مدفوع به‌عنوان روش استاندارد طلایی برای تشخیص حیوانات با آلودگی به باکتری MAP مطرح می‌باشد (۱۱، ۳۳). از معایب کشت مدفوع زمان‌بر بودن رشد باکتری بین ۱۴ تا ۱۶ هفته می‌باشد که می‌تواند منجر به ادامه گردش عامل بیماری‌زا در گله شود (۲۲، ۳۰). محدودیت‌های روش‌های تشخیصی مستقیم و دوره کمون طولانی مورد نیاز برای جداسازی کشت می‌تواند منجر به تاخیر در شناسایی و مدیریت حیوانات آلوده به باکتری MAP گردد (۸). به همین دلیل، جهت تشخیص سریع‌تر حیوانات آلوده به بیماری یون، روش‌های تشخیصی سرولوژیکی و مولکولی متعددی

کننده *MAP1569* با ارزیابی BLASTp در وب سایت NCBI GenBank به صورت آنلاین با شماره دسترسی NC_002944.2:1723216-1724322 و اندازه ۱۱۰۷ جفت باز از بانک ژن استخراج گردید. توالی‌های نوکلئوتیدی و پروتئینی ژن مذکور به کمک نرم افزار CLC.main.viewer ویرایش ۲۰ شرکت QIAGEN آلمان آنالیز گردید. به منظور بررسی دقیق‌تر وضعیت GC توالی ژن *apa* در برنامه‌ی تحت وب CpG Plot به فرمت FASTA وارد شد و نتایج مربوط به درصد GC در قسمت‌های مختلف توالی و احتمال وجود جزایر CpG در توالی به صورت نمودار ترسیم گردید. همچنین به کمک برنامه‌ی تحت Mfold مقاوم ترین ساختار و تعداد احتمالی شکل‌گیری ساختار ثانویه مورد بررسی قرار گرفت. طراحی آغازگرهای مربوط نیز به کمک نرم افزار Vector NTI انجام و در نهایت توسط شرکت ژن فن آوران سنتز شدند. توالی آغازگرها و سایر اطلاعات آن‌ها در جدول ۱ آمده است.

شیمیایی $SO_2(CH_3)$ است و همچنین یک حلال معروف قطبی است که مولکول‌های قطبی و غیرقطبی را حل می‌کند و با آب و تعدادی از حلال‌های آلی دیگر قابل اختلاط است. این ترکیب در تشکیل پیوندهای هیدروژنی تداخل ایجاد کرده و مانع از اتصال بین رشته‌ای و درون رشته‌ای می‌گردد (۶). بر اساس همین ویژگی‌ها در این مطالعه ترکیب DMSO انتخاب شد و هدف این مطالعه بهینه‌سازی مراحل تکثیر ژن *apa* (آنتی ژن غنی از آلانین-پرولین) با درصد بالای GC کد شده توسط ژن *MAP1569* در باکتری *مایکوباکتریوم آویوم* تحت گونه *پاراتوبرکلوزیس* سویه K-10 با استفاده از غلظت‌های مختلف DMSO با استفاده از روش PCR بود.

مواد و روش کار

مطالعه حاضر در آزمایشگاه میکروبی شناسی دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهرکرد انجام گردید. مواد مورد استفاده در تحقیق از شرکت‌های معتبر سیگما، سیناکلون، یکتاتجهیز تهیه و استفاده گردید. توالی کامل ژن کد

جدول ۱- پرایمرهای مورد استفاده برای تکثیر ژن *map1569*

اندازه (bp)	توالی پرایمر (۵'-۳')	پرایمر	
۶۹۳	5'- GAATTCATGGATCAGGTGGAAGCGAC-3'	Forward	MAP1569
	5'- CTCGAGGGTGCTGTCCTGGTTGATG-3'	Reverse	

برای تعیین نتایج در حضور و عدم حضور DMSO مطابق جدول ۲ طراحی شد. DMSO به مخلوط PCR در غلظت‌های ۰/۵، ۱، ۲، ۳ و ۴ میکرولیتر برای افزایش تکثیر محصول PCR اضافه شد. در ادامه با افزودن آب مقطر استریل حجم هر نمونه PCR حاوی غلظت‌های مختلف DMSO به ۲۵ میکرولیتر رسانده شد. شرایط دمایی و زمانی واکنش PCR مطابق جدول ۳ در دستگاه ترمال سایکلر اجرا شد. برای بررسی محصولات تکثیر یافته PCR از الکتروفورز ژل آگارز یک درصد در بافر TAE IX به کمک دستگاه ترانس لامیناتور استفاده گردید.

برای بهینه‌سازی تکثیر ژن *apa* از غلظت‌های مختلف تقویت‌کننده DMSO و DNA خالص شده باکتری MAP اهدا شده توسط سازمان CIRG هندوستان به‌عنوان کنترل مثبت استفاده گردید. به طور خلاصه، مسترمیکس PCR در حجم کلی ۲۱ میکرولیتر حاوی، ۵/۴ میکرولیتر بافر X10 حاوی $MgCl_2$ (Geneaid)، تایوان، ۲/۵ میکرولیتر dNTPs، ۰/۶ میکرولیتر از هر پرایمر (۰/۱ μmol) و ۰/۶ میکرولیتر آنزیم TaqDNA پلیمرز، ۴ میکرولیتر DNA باکتری MAP و ۷/۳ میکرولیتر آب مقطر استریل تهیه گردید. واکنش PCR



نتایج مربوط به درصد GC در قسمت‌های مختلف توالی و احتمال وجود جزایر CpG در توالی‌ها به صورت نمودار شکل یک ترسیم شد (emboss_cpplot-).
 I20240909-063210-0965-55305382-p1m
 برنامه CpG Plot احتمال وجود جزیره CpG را در توالی ۶۷۵ جفت باز را نشان داد (شکل ۱). نتایج برنامه Mfold ثابت کرد که امکان تشکیل ۲۴ ساختار ثانویه برای ژن *apa* وجود دارد و مقاوم‌ترین آن‌ها دارای انرژی ۲۷۱/۵۳- کیلوکالری بر مول می‌باشد. این ساختارها با فعالیت آنزیم پلی‌مراز و علاوه بر این در ارتباط پرایمرها با رشته الگو تحت شرایط واکنش PCR تداخل ایجاد می‌کند (شکل ۲).

محصولات PCR روی ژل آگارز ۱٪ حاوی Safe Stain در بافر TAE 1X قرار داده شد. با توجه به نتایج شکل ۳، مشخص شد که بهترین عملکرد تکثیر ژن مربوط به غلظت ۳ میکرولیتر DMSO بدون حضور باندهای غیراختصاصی دیگر است.

جدول ۲- بهینه‌سازی تکثیر ژن *apa* با استفاده از DMSO.

نمونه						
۶	۵	۴	۳	۲	۱	
۲۱	۲۱	۲۱	۲۱	۲۱	۲۱	مستر میکس (μl)
-	۴	۳	۲	۱	۰/۵	DMSO (μl)
-	۰	۱	۲	۳	۳/۵	آب مقطر (μl)

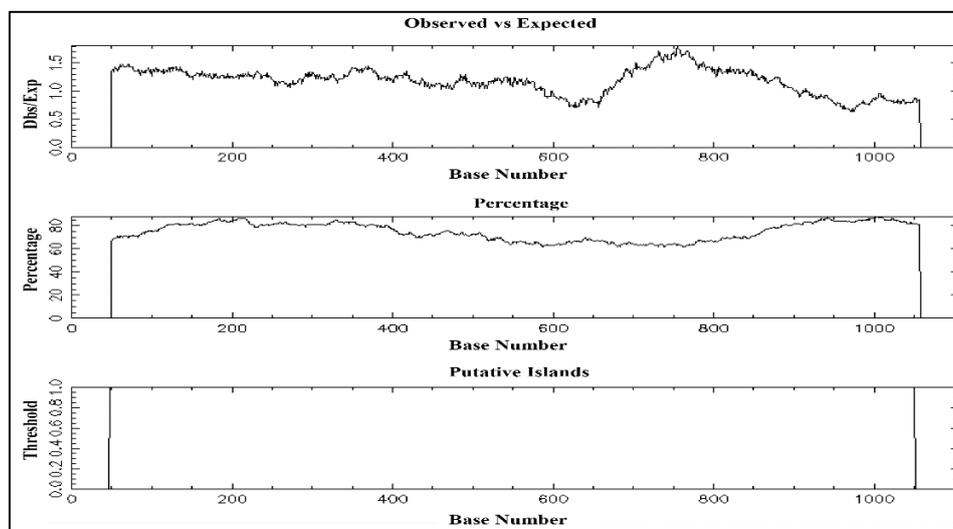
نمونه‌های ۱-۵ غلظت‌های مختلف DMSO و نمونه ۶ کنترل منفی بدون DMSO می‌باشند.

جدول ۳- چرخه حرارتی و زمانی مورد استفاده برای PCR

مرحله	دما (°C)	زمان	تعداد سیکل‌ها
واسرشت‌سازی اولیه	۹۵	۵ دقیقه	۱
واسرشت‌سازی اتصال پرایمرها	۹۵	۳۰ ثانیه	۳۷
	۵۵	۳۰ ثانیه	
تکثیر	۷۲	۱ دقیقه	
تکثیر نهایی	۷۲	۷ دقیقه	۱

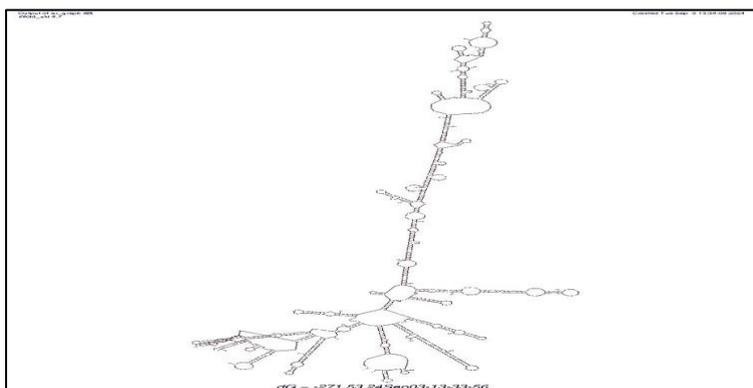
نتایج

برای بررسی دقیق‌تر وضعیت GC، توالی ۶۷۵ جفت باز ژن *apa* در نرم افزار وب CpG Plot (EMBOSS6.6.0.0) با فرمت FASTA وارد شد.

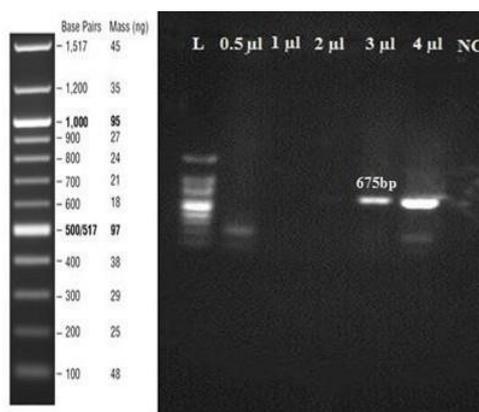


شکل ۱- نتیجه برنامه CpG Plot برای قطعه‌ی ۶۷۵ جفت باز با پیش فرض‌های ارزیابی، حداقل مشاهده/مورد انتظار ۰/۶، حداقل درصد G+C ۵۰ درصد، حداقل طول جزیره CpG ۲۰۰ جفت باز

Evaluation defaults: Observed/Expected ratio > 0/60, Percent C + Percent G > 50/00, Length > 200.



شکل ۲- نتایج Mfold. پایدارترین ساختار ثانویه‌ی ممکن برای قطعه‌ی ۶۷۵ جفت باز با انرژی ۲۷۱/۵۳ - کیلو کالری بر مول. با پیش فرض‌های ارزیابی، سدیم یک مولار و میزان منیزیم صفر در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد پیش‌گویی و محاسبه گردید.
Evaluation defaults: [Na+] = 1/0 M, [Mg⁺⁺] = 0/0 M at 37°C



شکل ۳- اثرات DMSO بر تقویت محصولات PCR چاهک L مارکر DNA 100bp (#N3231SVIAL)، چاهک ۱: غلظت ۰/۵ میکرولیتر DMSO، چاهک ۲: غلظت ۱ میکرولیتر DMSO، چاهک ۳: غلظت ۲ میکرولیتر DMSO، چاهک ۴: غلظت ۳ میکرولیتر DMSO، چاهک ۵: غلظت ۴ میکرولیتر DMSO، چاهک NC: کنترل منفی بدون DNA باکتری MAP و حاوی DMSO

بحث

مثل حیوانات مبتلا (۳-۴ زایمان)، حذف زود هنگام و افزایش مرگ و میر، زیان اقتصادی عمده‌ای را به سیستم تولید دام به ویژه صنایع دام شیری وارد می‌کند (۱، ۲۵). PCR یک روش قدرتمند و بسیار قوی جهت تشخیص با حساسیت و ویژگی بالاست و معمولاً به بهینه‌سازی کمی نیاز دارد. با این حال، مواردی وجود دارد که در آنها تکثیر ناحیه DNA خاص توسط PCR دشوار است. تقویت اهداف غنی از محتوای GC یا اهدافی که می‌توانند ساختار ثانویه را تشکیل دهند، اغلب منجر به بازده کمی یا بدون محصول مورد انتظار می‌شود. علاوه بر این، تقویت ممکن است منجر به محصولات نامطلوبی شود که از مناطقی غیر از ناحیه DNA هدف مشتق شده‌اند که با نوارهای متعدد

امروزه برنامه‌های کنترلی در مورد بسیاری از بیماری‌های عفونی دام صورت می‌پذیرند. گام اول چنین برنامه‌هایی، اغلب تشخیص عفونت در جمعیت دامی یک منطقه است که با استفاده از روش‌ها و آزمون‌های مختلفی انجام می‌شود. در این میان، بیماری یون یکی از بیماری‌های عفونی مهم نشخوارکنندگان به ویژه گاو است که به واسطه‌ی عوارضی همچون دهیدراتاسیون، کاهش تولید شیر، لاغری مفرط و ضعف، خسارت‌های اقتصادی چشم‌گیری را بر گاوداری‌های صنعتی وارد می‌کند. بیماری یون به دلیل کاهش بهره‌وری کمیت و کیفیت شیر، گوشت، پوست، اسهال و کاهش وزن، کاهش تولید



بستگی دارد و زمان آنیلینگ بهینه برای ژن‌های غنی از GC در محدوده ۳-۶ ثانیه است. به طوری که ژن‌های فاقد GC این حساسیت وجود ندارد (۲۳).

در مطالعه حاضر با مشاهده نتایج نمودار CpG برای توالی ژن *apa* و همچنین نرخ بالای $CG > 60\%$ مطابق شکل ۱ و همچنین با مشاهده نتایج Mfold، امکان تشکیل ۲۴ ساختار ثانویه برای ژن *apa* وجود دارد. که مقاوم‌ترین آن دارای $271/53$ کیلوکالری بر مول است (شکل ۲). این ساختارها در صورت شکل‌گیری در شرایط واکنش PCR دخالت می‌کنند. تکثیر نواحی غنی از GC اغلب منجر به بازده و ویژگی کم محصولات PCR می‌شود (۳۸). برای رفع این محدودیت‌ها از افزودن ترکیبات تقویت‌کننده PCR استفاده می‌کنند. قالب‌های غنی از GC به دلیل دمای ذوب بیش از حدشان به سختی واسرشت می‌شوند. در نهایت با تشکیل پرایمر دایمر باعث تشکیل بیشتر ساختارهای ثانویه می‌گردند (۲۱، ۲۷). بنابراین برای بهبود تکثیر افزودن تقویت‌کننده‌هایی مانند بتائین، DMSO و فرمامید می‌تواند محل‌های ذوب مارپیچ‌های DNA دو رشته‌ای را تنظیم کند و امکان جداسازی آسان رشته‌ها را فراهم کند (۵، ۲۱). DMSO از تشکیل پیوند هیدروژنی تداخل ایجاد می‌کند و مانع از اتصال بین رشته‌ای و درون رشته‌ای می‌شود (۵). در مطالعه حاضر با افزودن غلظت‌های مختلف محلول DMSO، شرایط بهینه برای تکثیر ژن *apa* با استفاده از تکنیک PCR ایجاد شد در نهایت با غلظت ۳ و ۴ میکرولیتر از محلول DMSO موفق به تکثیر ژن *apa* انجامید. هر چند که میزان ۳ میکرولیتر به علت عدم وجود باندهای غیراختصاصی دیگر در ناحیه تقریباً ۲۰۰-۳۰۰ جفت باز مناسب‌تر می‌باشد نتایج این مطالعه نشان داد، تکثیر ژن *apa* در شرایط عدم حضور DMSO امکان‌پذیر نبود و اضافه کردن این ماده سبب بهبود تکثیر این ژن گردید.

روی ژل آگارز نشان داده می‌شود. بهینه‌سازی غلظت منیزیم، PH بافر، زمان‌ها و دماهای واسرشت و دمای اتصال و تعداد چرخه در برخی موارد مفید است، اما نه همه موارد. علیرغم تلاش‌های بهینه‌سازی، اغلب اگر افزودنی مناسب در ترکیب گنجانده شود، می‌توانند موثر باشد از انواع افزودنی‌ها و عوامل تقویت‌کننده می‌توان به DMSO، N، N، N- تری متیل گلیسین (بتائین)، فرمامید، گلیسرول، شوینده‌های غیر یونی، سرم آلبومین گاوی، پلی‌اتیلن گلیکول و کلرید تترا متیل آمونیوم اشاره کرد. این افزودنی‌ها اثرات مفیدی بر روی برخی از محصولات PCR دارند با این حال، نمی‌توان پیش‌بینی کرد که کدام عوامل ممکن است برای یک هدف خاص مفید باشند. با این وجود، DMSO و بتائین بسیار ارزان، به راحتی قابل دستیابی و سازگاری بالایی با سایر عوامل بیولوژیکی هستند که آنها را برای هر گونه آزمایش سنتز ژن ایده آل می‌کند (۱۶). ترکیب DMSO یک مولکول آلی است که در PCR برای تقویت واکنش‌ها با کاهش دمای ذوب از اتصال مجدد DNA واسرشت شده جلوگیری کرده و باعث افزایش ویژگی و بازدهی محصولات PCR می‌گردد (۱۹، ۳۵). این ترکیب به ویژه برای تقویت الگوهای با محتوای بازهای سیتوزین و گوانین بالا یا GC بالا مفید است. الگوهایی با نواحی غنی از GC ساختارهای ثانویه‌ای مانند Stem-Loop را ایجاد می‌کنند که منجر به پخش آنزیم پلی‌مراز در طول واکنش PCR می‌شود (۳۵). DMSO به‌عنوان یک افزودنی PCR برای واسرشت کردن قالب‌هایی با محتوای بالای GC توصیه می‌شود. همچنین این می‌تواند به کاهش ساختار ثانویه کمک کرده و باعث تقویت محصولات PCR گردد (۱۴، ۳۲).

در یک مطالعه Mamedov و همکاران در سال ۲۰۰۸ با تجزیه و تحلیل نظری با تاکید تجربی بر ژن‌های غنی از GC در انسان ثابت کرده اند که تکثیر ژن‌های غنی از GC به زمان اتصال یا آنیلینگ در واکنش PCR

7. Chapter, O; 2.1. 11 Paratuberculosis . Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals Paris: OIE. 2014.
8. Chiodini, RJ; Collins, MT. and Basse, EO; Proceedings of the Fourth International Colloquium on Paratuberculosis, July 17-July 21, 1994: A Meeting of the International Association for Paratuberculosis, St. John's College, Cambridge, UK. 4th International Colloquium on Paratuberculosis, Cambridge, England (United Kingdom), 1994-1995: International Association for Paratuberculosis.
9. Collins, D; Stephens, D. and De Lisle, G; Comparison of polymerase chain reaction tests and faecal culture for detecting *Mycobacterium paratuberculosis* in bovine faeces. Veterinary microbiology; 1993; 36(3-4): 289-99.
10. Collins, MT; Gardner, IA; Garry, FB; Roussel, AJ. and Wells, SJ; Consensus recommendations on diagnostic testing for the detection of paratuberculosis in cattle in the United States. Journal of the American Veterinary Medical Association; 2006; 229(12): 1912-9.
11. Collins, MT; Wells, SJ; Petrini, KR; Collins, JE; Schultz, RD. and Whitlock, RH; Evaluation of five antibody detection tests for diagnosis of bovine paratuberculosis. Clinical and Vaccine Immunology; 2005; 12(6): 685-92.
12. Conde, C; Thézé, J; Cochard T; Rossignol, M-N; Fourichon, C. and Delafosse, A; Genetic features of *Mycobacterium avium* subsp.

منابع

1. Agrawal, G; Borody, TJ. and Aitken, JM; Mapping Crohn's Disease Pathogenesis with *Mycobacterium paratuberculosis*: A Hijacking by a Stealth Pathogen. Digestive Diseases and Sciences; 2024: 1-15.
2. Ahmad, F; Rani, A; Alam, A; Zarin, S. and Pandey, S; Singh H; Macrophage: a cell with many faces and functions in tuberculosis. Frontiers in immunology; 2022; 13: 747799.
3. Aitken, JM; Aitken, JE. and Agrawal, G; *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* and Crohn's disease—diagnostic microbiological investigations can inform new therapeutic approaches. Antibiotics. 2024; 13(2): 158.
4. Alam, MS; Guan, P; Zhu, Y; Zeng, S; Fang, X. and Wang S; Comparative genome analysis reveals high-level drug resistance markers in a clinical isolate of *Mycobacterium fortuitum* subsp. *fortuitum* MF GZ001. Frontiers in Cellular and Infection Microbiology; 2023; 12: 1056007.
5. Assa, I N. and Lin, M; PCR procedures to amplify GC-rich DNA sequences of *Mycobacterium bovis*. Journal of Microbiological Methods; 2021; 181: 106121.
6. Baskaran, N; Kandpal, RP; Bhargava, AK; Glynn, MW; Bale, A. and Weissman, SM; Uniform amplification of a mixture of deoxyribonucleic acids with varying GC content. Genome research. 1996; 6(7): 633-8.



- subset candidates for diagnostics with special reference to *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* infection. *Veterinary Quarterly*; 2019; 39(1): 65-75.
19. Jensen, MA; Fukushima, M. and Davis, RW; DMSO and betaine greatly improve amplification of GC-rich constructs in de novo synthesis. *PloS one*; 2010; 5(6): e11024.
 20. Kandeepan, G. and Tahseen, A; Modified atmosphere packaging (map) of meat and meat products: A review. *Journal of Packaging Technology and Research*; 2022; 6(3): 137-48.
 21. Karunanathie, H; Kee, PS; Ng, SF; Kennedy, MA. and Chua, EW; PCR enhancers: Types, mechanisms, and applications in long-range PCR. *Biochimie*; 2022; 197: 130-43.
 22. Lambrecht, RS; Carriere, JF; Collins, MT; A model for analyzing growth kinetics of a slowly growing *Mycobacterium* sp. *Applied and environmental microbiology*; 1988; 54(4): 910-6.
 23. Mamedov, T; Pienaar, E; Whitney, SE; TerMaat, JR; Carvill, G. and Goliath, R; A fundamental study of the PCR amplification of GC-rich DNA templates. *Computational biology and chemistry*; 2008; 32(6): 452-7.
 24. Manual, O; Office International des Epizooties Manual of Standards for Diagnostic Tests and Vaccines. Rabies, 5th ed Office International des Epizooties, Paris. 2004.
 25. Morrison, R. and Rose DC; Factors that influence dairy farmers' decision *paratuberculosis* strains circulating in the west of France deciphered by whole-genome sequencing. *Microbiology Spectrum*; 2022; 10(6): e03392-22.
 13. Espeschit, I; Bastos, D; Fonseca Junior, A; Cardoso, S; Ferrari, M. and Moreira, M; *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* and Crohn's disease: characterization of the interaction with different aspects of the disease. *Brazilian Journal of Microbiology*; 2023; 54(2): 1239-49.
 14. Farrell, EM. and Alexandre, G; Bovine serum albumin further enhances the effects of organic solvents on increased yield of polymerase chain reaction of GC-rich templates. *BMC research notes*; 2012; 5:1-8.
 15. Feller, M; Huwiler, K; Stephan, R; Altpeter E; Shang A. and Furrer H; *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* and Crohn's disease: a systematic review and meta-analysis. *The Lancet infectious diseases*; 2007; 7(9): 607-13.
 16. Frackman, S; Kobs, G; Simpson, D. and Storts, D; Betaine and DMSO: enhancing agents for PCR. *Promega notes*; 1998; 65(27-29): 27-9.
 17. Harris, NB. and Barletta, RG; *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in veterinary medicine. *Clinical microbiology reviews*; 2001; 14(3): 489-512.
 18. Hemati, Z; Derakhshandeh, A; Haghkhah, M; Chaubey, KK; Gupta, S. and Singh M; Mammalian cell entry operons; novel and major



- Amplification of GC-rich genes by following a combination strategy of primer design, enhancers and modified PCR cycle conditions. *Molecular and cellular probes*; 2007; 21(4): 303-7.
32. Sharma, SK; Shafeeque, CM; Jag Mohan, JM; Azeez, PA. and Singh, RP; PCR amplification protocol for GC rich protamine gene from chicken testis cDNA. 2014.
33. Sumiyah Rasool, SR; Deepti Narang, DN; Mudit Chandra, MC. and Sharma, N; Faecal culture and IS 900 PCR assay for the detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in bovine faecal samples. 2017.
34. Treangen, TJ. and Salzberg, SL; Repetitive DNA and next-generation sequencing: computational challenges and solutions. *Nature Reviews Genetics*; 2012; 13(1): 36-46.
35. Viswanathan, V. and Krmarik, K; Cianciotto NP. Template secondary structure promotes polymerase jumping during PCR amplification. *Biotechniques*; 1999; 27(3): 508-11.
36. Wichert, A; Einax, E; Hahn, N; Klassen, A. and Donat, K; Detection of *Mycobacterium avium* subspecies *Paratuberculosis* in pooled fecal samples by fecal culture and real-time PCR in relation to bacterial density. *Animals*; 2021; 11(6): 1605.
37. Wu. C-w; Schramm. TM; Zhou. S; Schwartz. DC. and Talaat. AM; Optical mapping of the *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* genome. *BMC genomics*; 2009; 10:1-10.
- to implement Johne's Disease control practices: A systematic review. *Preventive Veterinary Medicine*; 2023: 106053.
26. Park, H-T; Ha, S; Park, H-E; Shim, S; Hur, TY. and Yoo, HS; Comparative analysis of serological tests and fecal detection in the diagnosis of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* infection. *Korean Journal of Veterinary Research*; 2020; 60(3): 117-22.
27. Quail, MA; Corton, C; Uphill, J; Keane, J. and Gu, Y; Identifying the best PCR enzyme for library amplification in NGS. *Microbial Genomics*; 2024; 10(4): 001228.
28. Rahlwes, KC; Dias, BR; Campos, PC; Alvarez-Arguedas, S. and Shiloh, MU; Pathogenicity and virulence of *Mycobacterium tuberculosis*. *Virulence*; 2023; 14(1): 2150449.
29. Rathnaiah, G; Lamont, EA; Harris, NB; Fenton, RJ; Zinniel, DK. and Liu, X; Generation and screening of a comprehensive *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* transposon mutant bank. *Frontiers in cellular and infection microbiology*; 2014; 4: 144.
30. Rathnaiah, G, Zinniel, DK, Bannantine, JP, Stabel, JR, Gröhn, YT. and Collins, MT; Pathogenesis, molecular genetics, and genomics of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*, the etiologic agent of Johne's disease. *Frontiers in veterinary science*; 2017; 4: 187.
31. Sahdev, S; Saini, S; Tiwari, P; Saxena, S. and Saini, KS;



38. Yang, Z; Yang, J; Yue, L; Shen, B; Wang, J. and Miao Y; Enhancement Effects and Mechanism Studies of Two Bismuth-Based Materials Assisted by DMSO and Glycerol in GC-Rich PCR. *Molecules*; 2023; 28(11): 4515.





Optimization of *apa* gene replication in *Mycobacterium avium* subsp *paratuberculosis* the usage of dimethyl sulfoxide (DMSO)

Mustafa Roosta¹; Zahra Hemati^{2*}; Abdollah Derakhshandeh³;
Amin Nematollahi⁴

1. PhD Candidate of Bacteriology, Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, Shahrekord University, Shahrekord- Iran.
2. Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, Shahrekord University, Shahrekord- Iran.
3. Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, Shiraz University, Shiraz- Iran.
4. Department of Food Hygiene and Quality Control, Faculty of Veterinary Medicine, Shahrekord University, Shahrekord- Iran.

Received: 18 September 2024

Accepted: 2 November 2024

Summary

Mycobacterium avium subsp. *paratuberculosis* is a remarkably slow-growing bacterium identified as the causative agent of Johne's disease. This disease causes economic losses especially in dairy cattle breeding, all over the world. Considering the similar clinical and pathological symptoms of Crohn's disease and Johne's disease, it is probable that this bacterium plays a role in the occurrence and progression of Crohn's disease. Hence the potential transmission of MAP through milk has raised significant concerns. Examination of the *apa* gene sequence in the NCBI database indicates a substantial prevalence of cytosine and guanine nucleotides, signifying elevated GC content. This leads to the disruption of gene amplification throughout the PCR cycle. The abundance of GC-rich regions has caused various problems due to the formation of secondary structures, such as needle-like or ring-shaped topologies in DNA pattern. The aim of this study was the feasibility of enhancing a portion of the *apa* gene through the modification of dimethyl sulfoxide (DMSO) concentration. A bioinformatics analysis utilizing CpG Plot and Mfold was performed to evaluate the GC content and probable secondary structures of the targeted region of the *apa* gene. According to the PCR design, the *apa* gene was amplified using 3µl of DMSO at an annealing temperature of 55 °C, without any unspecific bands. The results of this study demonstrated that *apa* gene amplification was unachievable without DMSO, and the application of this substance facilitated the gene's amplification.

Keywords: *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*, Johne's disease, *apa*, PCR, DMSO.

* Corresponding Author: z.hemati@sku.ac.ir

