مجلة تكريت للعلوم الصرفة، 22 (3) 2017
ISSN: 1813 – 1662 (Print)
E-ISSN: 2415 – 1726 (On Line)

التحري عند المستوى الجزيئي عن الجينات المثبتة للنيتروجين *nif* genes في بكتريا *Klebsiella pneumoniea* باستعمال تقنية الـ Polymerase chain reaction (PCR)

فوز عبد السلام الصفار ، عبد الرزاق خضر ، نجوى ابراهيم البرهاوي
قسم علوم الحياة ، كلية التربية ، جامعة الموصل ، الموصل ، العراق

الملخص:

اجري هذا البحث لغرض الكشف عن جينات تثبيت النيتروجين الثلاثة *nifK* و *nifD* و *nifH* في 21 عزلة من بكتريا *K. pneumoniea* المرضية التي تم الحصول عليها من Prof. Jean-Marc في جامعة Leicester البريطانية باستخدام تقنية الـ PCR وباستعمال أربع بادئات متخصصة (P1، P2، P5، P6) ومقارنتها مع السلالة القياسية 342 *K. pneumoniea*. دلت نتائج التفاعل على وجود حزمتين لكل عزلة على حدا وبحجم جزيئي 0.5 Kbp مقارنة مع الدليل الحجمي 1 Kbp.

الكلمات المفتاحية: تثبيت النتروجين اللاتعايشي، الجينات المشفرة لتثبيت النيتروجين، الكلبسيلا المثبتة للنيتروجين

المقدمة

• **بكتريا الـ *K. pneumoniea***

بالرغم من أن النيتروجين الجوي لايكون متاحا من الناحية الأيضية بصورة مباشرة للمحاصيل الزراعية، نجد أن ذلك يكون متاحًا لبعض من الكائنات الحية الدقيقة والتي يطلق عليها (Diazotrophs) والتي تقسم بالاعتماد على طريقة تثبيتها للنيتروجين الى الكائنات التي تعيش بشكل حر في التربة وتثبت النيتروجين بطريقة لا تكافلية Free nitrogen-fixingbacteria living اي بمعزل عن النبات Nonsymbiotic وتشمل انواع من البكتريا مثل الـ *Klepsiella* الـ *Azotobacter* و الـ *Clostridium* و ايضا تشمل الطحالب الخضر المزرقة المعروفة بـ Cyanobacteria، والنوع الثاني هي تلك الانواع التي تدخل مع النبات بعلاقة تعايشية تكافلية Symbiotic واهم مثال عليها هو البكتريا العائدة للجنس *Rizobium* والـ *Bradyrhizobium* المكونة للعقد الجذرية على جذور النباتات البقولية (1).

الدراسات التي اجريت على بكتريا *K.pneumoniae* ركزت على كونها لها قابلية تثبيت النيتروجين اضافة لكونها منتجة لمادة 1,3propanediol المهمة اقتصاديا لاستخدامها في انتاج الـ polyurethanes والـ polyesters (2). يمكن العثور على الـ *Klepsiella* في مجموعة متنوعة من النباتات دون ان تسبب لها الامراض، وتمتلك البكتريا دوراً مهماً في تثبيت النيتروجين(3). واشار كل من الباحث (4) و(5) الى دور *K.pneumoniae* في عملية تثبيت النيتروجين، وتعتبر *K .pneumonia* و *K. oxytoca* من اهم انواع العائلة المعوية القادرة على تثبيت النيتروجين من الغلاف الجوي وتوفيره للنبات (6). حُدد المحتوى الجينومي لبكتريا كلبسيلا عام 2006 في مركز Genom Sequencing Center في سانت لويس جامعة واشنطن وعرف باسم *K.pneumonia* MGH 78578 ، تحوي هذه البكتريا على كروموسوم واحد حجمه Mbp 5.3 ، ويبلغ محتوى الـ DNA من الكوانين/سايتوسين نسبة 57%. وتمتلك الكلبسيلا خمسة انواع من البلازميدات pKPN3 و pKPN4 و pKPN5 و pKPN6 و pKPN7 ، طول كل بلازميد يصل الى 0.18 Mbp، 0.11 Mbp، 0.089 Mbp، 0.0043 Mbp، 0.0035 Mbp(7). اشارت العديد من الدراسات الى ان عدد الجينات المسؤولة عن تثبيت النيتروجين تبلغ 20 جين وتكون متجمعة بشكل عناقيد ثلاث من هذه الجينات تشفر لانزيم النيتروجينيز (Nitrogenase) وهي *nifK*، *nifD*، *nifH* يتكون هذا الانزيم من مركبين، الاول يحتوي على الموليبدنم والحديد Mo-Fe-protein ويسمى بانزيم الـ Dinitrogenase (المركب I) ومكون من اربع وحدات فرعية ($\alpha_2\beta_2$)؛ يُشفر الجين *nifD* للوحدة الفرعية من نوع الفا (α) اما الجين *nifK* يشفر للوحدة الفرعية من نوع β، وهذا البروتين هو المسؤول عن اختزال النيتروجين، المركب الثاني هو البروتين المحتوي على الحديد Fe-protein ويدعى بانزيم reductase Dinitrogenase (المركب II) ويُشفر من قبل الجين *nifH* (8)، والمركبين الاول والثاني المكونان لانزيم النيتروجينيز يكونان غير فعالين لوحدهما لكن جزيئة الانزيم الفعالة تتكون من اتحاد هذين الجزيئين مع بعضهما(9) وان اختزال النيتروجين بواسطة النيتروجينيز يحتاج الى تكوين مركب Mg-ATP Azoferredoxin والذي يتفاعل مع Molybdoferredoxin ليسمح بمرور الإلكترونات (10). وجاء الهدف من هذه الدراسة لتشخيص بكتريا *pneumonia Klebsiella* على المستوى الجزيئي و الكشف عن الجينات المشفرة لانزيم النيتروجينيز الـ *nifK*، *nifD*، *nifH* بتقنية الـ PCR باستخدام بادئات متخصصة متداخلة والتي تسمح بتضخيم الجينات المشفرة لانزيم النيتروجينيز

• **تفاعل البلمرة المتسلسل Polymerase Chain Reaction : (PCR)**

مع التطور في مجال التكنولوجيا الحيوية والذي يقوم على التعامل مع الحامض النووي الـ DNA بشكل اساسي، استدعى ذلك العلماء ليبحثوا عن طريقة تقوم على مضاعفة كمية الـ DNA بشكل كبير، ويمكن تعريف هذه التقانة بأنها القدرة على تضاعف نوعي لقطعة محددة من الـ DNA أنزيميا ملايين المرات خارج الجسم الحي (In vitro) بوجود البادئات وبزمن قصير وباستخدام جهاز المبلمر

ISSN: 1813 – 1662 (Print)
E-ISSN: 2415 – 1726 (On Line)

الحراري Thermocycler الذي يوفر درجات الحرارة الملائمة لكل مرحلة من مراحل التفاعل (11). ولكونها الطريقة الاسرع والأدق مقارنة بالاختبارات الكيميائية او حتى شريط الـ API 20E اعتمدت لتشخيص *K. oxytoca* عن *K.pneumoniae* (12).

• تفاعل البلمرة المتسلسل المتداخل التطفيري الـ Gene Splicing overlap extension PCR (SOEing)

تميزت هذه التقنية بأستغنائها عن الانزيمات القاطعة المستخدمة لتهجين الجينات لكونها لاتعتمد على مناطق التقييد وهى تمثل التقنية الاكثر دقة في اعادة توليف الجينات في مجال الهندسة الوراثية اضافة لذلك فان التتابعات النيوكليوتيدية لمنطقة التداخل Overlap rgion تحدد بوساطة البوادئ المتخصصة المصممة بشكل متداخل، جاعلا بالامكان انجاز عمليات التطفير واعادة التوليف بصورة متناسقة في هذه التقنية، اضافة لكونها بسيطة وسريعة وهى مختلفة تماما عن الطرائق التقليدية المستخدمة لتوليد قطع من الـ DNA الهجينة و المحورة، ويعتقد انها انطلاقة لبداية تقنية الـ DNA الهجين (13).

المواد وطرائق العمل

المواد

اجري هذا العمل في مختبرات جامعة Leicester البريطانية التابعة لقسم الاصابة والمناعة والالتهاب. على 21 عزلة بكتيرية من *K. pneumoniea* المرضية أضافة الى العزلة القياسية *Klebsiella pneumoniea* 342 اخذت من Prof. Jean-Marc في جامعة Leicester.

وسط المرق الخالي من النيتروجين Nitrogen-free broth: (NF)

حضر وسط المرق الخالي من النيتروجين من المكونات في جدول (1) ثم اكمل الحجم الى 1 لتر من الماء المقطر والمعقم ضبط الاس الهيدروجيني على 7 وعقم الوسط بالمؤصدة تحت ضغط 1 جو ودرجة حرارة 121°م لمدة 15 دقيقة ثم وزع الوسط على انابيب اختبار بسداد محكم سعة 30 سم^3 بواقع 15 سم^3 لكل انبوب واستخدم الوسط لتنمية البكتريا ومعرفة قدرتها على تثبيت النيتروجين (14).

جدول (1) مكونات وسط (NF):

المكونات	التركيز g/L
glucose	10
K_2HPO_4	0.52
KH_2PO_4	0.41
$MgSO_4.7H_2O$	0.16
NaCl	0.20
$CaSO_4.2H_2O$	0.20
$Na_2MoO_4.2H_2O$	0.002
$FeSO_4.7H_2O$	0.005
MgSO4.7H2O	0.1

عدة تفاعل تقنية البلمرة المتسلسل (PCR).

تم تفاعل البلمرة المتسلسل باستخدام عدة التفاعل PreMix المجهزة من شركة Bromega كما موضح في الجدول(2).

جدول (2) مكونات PCR PreMix

ت	المكونات	الحجم
1	Taq DNA polymerease	5 µl
2	DDH_2O	3 µl
3	Primer	1 µl
4	Templet DNA	1 µl

هلام الـ Agaros gel :

تم تحضيره باذابة 1غم من الاكاروز/ 100 سم^3 من بفر Tris-acetat with EDTA (TAE) ثم سخن لدرجة الغليان وبرد بعد ذلك ثم أضيف له 10 µl من صبغة الايثيديوم بروماید Ethidium Bromide.

صبغة التحميل Loading stain:

استخدم للكشف عن وجود الحزم عند الترحيل على هلام الاكاروز، جهز من قبل شركة England Biolab وعند الاستخدام خفف باخذ 1 سم^3 من صبغة بروموفينول الازرق مع 1 سم^3 من الماء الخالي من الايونات DDH_2O.

الدليل الحجمي الـ Ladder Markers:

استخدم Ladder من نوع 1Kbp المخفف باخذ 100 µl منه ويمزج مع 100 µl من الصبغة اضافة الى 400 µl من DDH_2O المجهز من قبل شركة England Biolab.

البادئات (Primers):

صممت بالاعتماد على العزلة القياسية342 *k. pneumoniea* والمجهزة من قبل شركة Eurofins الالمانية ويوضح جدول (3) البادئات المستخدمة في هذه الدراسة.

جدول (3) البادئات المستخدمة في تفاعل الـ PCR الخاص مع تسلسلاتها للتحقق من وجود الجينات المثبتة للنيتروجين

ت	البادئ	تسلسل القواعد النتروجينية (5'→3')
1	P1	5'GG CGTTATGACTGAGGATCA3'
2	P2	5' GAAGCAGCTCCAGCCTACACCCGGATTTGAGACCTATCTCGG3'
3	P5	5'GGACCATGGCTAATTCCCATGCTTTGTTTTCGCGGATCGG 3'
4	P6	5'ACTGAGCAAAATTCGCAGC 3'

ISSN: 1813 – 1662 (Print)
E-ISSN: 2415 – 1726 (On Line)

طرائق العمل

ظروف تنشيط وتنمية البكتريا قيد الدراسة:

بعد تنشيط العزلات البكتيرية قيد الدراسة على وسط المرق Luria-Bertani (15). اجريت عملية اعادة الزرع لـ 21 عزلة من بكتريا *K. pneumoniea* على وسط NF المذكور اعلاه بواقع مكررين لكل عزلة، بمزج حملة loop واحدة من الزرع البكتيري المنشط مع 100 µl من DDH_2O وزع في انبوبتي اختبار واضيف لكل منهما 10 سم^3 من الوسط الخالي من النيتروجين علقت الانبوبتان وحضنت بدرجة حرارة 30°م بشكل مائل Slants، وتم قياس كثافة النمو بعد 6 ايام بوساطة جهاز المطياف الضوئي عند الطول الموجي 600 nm.

استخدام تقنية Polymerase chain reaction (PCR) للكشف عن وجود جينات تثبيت النيتروجين:

بهدف التاكد من وجود جينات تثبيت النيتروجين اجري تفاعل البلمرة Polymerase chain reaction (PCR) تم التفاعل بتحضير الـ PreMix لاحظ جدول(2)، وبعد استخلاص الـ DNA وتنقيته حسب طريقة (16) وباستخدام البوادئ المتخصصة المجهزة من قبل شركة Eurofins الالمانية، التي صممت بشكل متداخل حسب تقنية الـ SOEing PCR ليتمكن البادئان P2/P1 من الكشف عن الـ *nifK* وجزء من الـ *nifD* اما الـ *nifH* وجزء من الـ *nifD* فيكشف عنه باستخدام البادئان P6/P5 كما موضح في جدول رقم (3). نقلت الانابيب الى جهاز المبلمر الحراري Thermocycler ضمن البرنامج المتبع للـ Checking بما اوصت به الشركة المصنعة للبوادئ. وللتحري عن مدى صلاحية الحامض النووي الـ DNA المستخلص من العزلات البكتيرية قيد الدراسة *K. pneumoniea* تم تحديد تركيز الحامض النووي ng/µ1 باستخدام جهاز المطياف الضوئي Nano Drop عند الطول الموجي 260 nm. تم قياس نقاوة الحامض النووي الجينومي من خلال قراءة الامتصاصية في نفس الجهاز عند الطولين الموجيين 260-280 nm (17).

جدول (4) خطوات برنامج تفاعل البلمرة الـ PCR

Steps	Temperature	Time	Number of Cycles
Initial Denaturation	49	10min	1
Denaturation	95	45 s	30
Annealing	55	45 s	
Extension	72	2 min	
Final Elongation	72	10min	1

الترحيل الكهربائي على هلام الاكاروز Agarose gel:

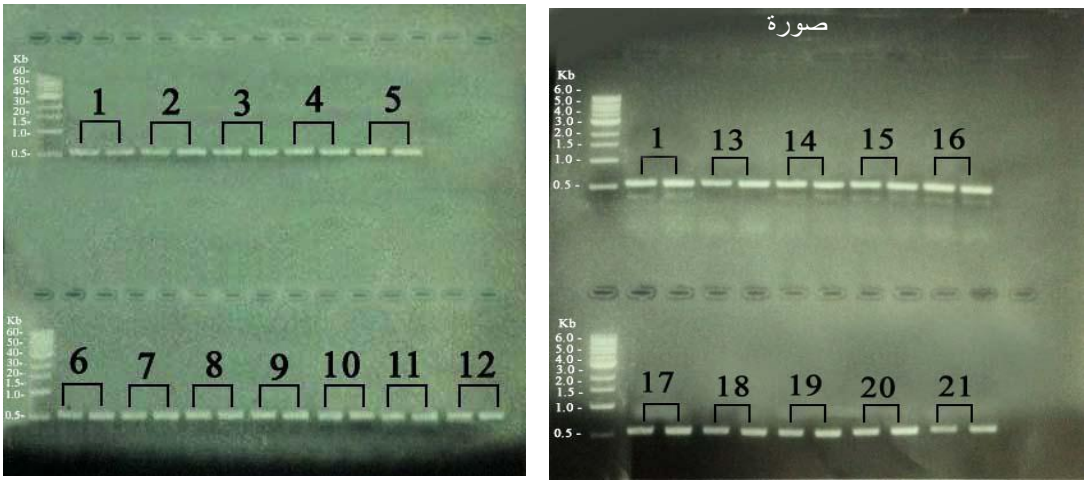
بعد تحضر هلام الاكاروز سكب ببطء في القالب المناسب لعدد العينات بعد تثبيت المشط comb الخاص بتكوين الحفر wells عند احد طرفي القالب مع ملاحظة تجنب حصول فقاعات و ترك هلام الاكاروز فترة ليتصلب، بعدها رفع المشط من القالب وتكونت حفر ذات ابعاد متساوية ووضعت العينات في هذه الحفر، استعملت لتمثل عينات كل عينة هي بمزج 5 µl من العينة مع 5 µl من دارئ التحميل حملت العينات في الحفر مع الانتباه لتخصيص حفرة يرحل فيها الدليل الحجمي الـ DNA Ladder من نوع 1Kbp على احد جانبي الهلام لمعرفة الاحجام الجزيئية لقطع الـ DNA اذ ان العلاقة بين المسافة المقطوعة من قبل العينات على هلام الاكاروز تتناسب عكسيا مع الحجم الجزيئي للـ DNA ومن خلال الدليل الحجمي يمكن معرفة الاحجام الجزيئية للعينات المُرحلة، ملئ حوض الترحيل بالمحلول TBE 1X، ثم ربط جهاز الترحيل الكهربائي بمجهز القوة الكهربائية بشكل صحيح بحيث يكون اتجاه الترحيل من القطب السالب الى القطب الموجب تحت فرق جهد 120 فولت ولمدة 45 دقيقة الى حد وصول العينات الى قبل نهاية الهلام، رفع الهلام بعدها ووضع على جهاز التألق الاشعاعي للاشعة فوق البنفسجية U.V transilluminator ثم صورت قطعة الهلام بكامرا رقمية موصولة بالحاسوب.

النتائج والمناقشة

اثبتت الابحاث الحديثة ان تشخيص الاحياء الدقيقة القائم على اساس الفروقات الفسيولوجية او الشكلية قد لايكون دقيقا فضلا عن كونه يتطلب جهدا ووقتا كبيرين لذا ظهرت حديثا تقنيات كثيرة تعتمد على استخدام الحامض النووي الـ DNA لعمل البصمة الوراثية ودراسة التنوع الوراثي للكائنات المجهرية المختلفة، تميزت هذه التقنيات بقدرات عالية على التمييز بين الكائنات الدقيقة حتى مستوى السلالات وسمحت بالكشف عن الجينات المشفرة لانواع مختلفة من الانزيمات. لاثبات وجود الجينات المشفرة لانزيم النيتروجينيز للعزلات البكتيرية قيد الدراسة اجري التشخيص الجزيئي باستعمال تقنية الـ PCR من خلال تصميم بادئات متخصصة متداخلة (وفق تقنية الـ SOEing) تسمح بالكشف عن الجينات المشفرة للانزيم.

بينت نتائج التحري عن الجينات المشفرة لانزيم النيتروجينيز بالاعتماد على بادئات متخصصة متداخلة كما مبين في الشكل (1) وبعد الترحيل على هلام الاكاروز وجود الجينات المشفرة لانزيم النيتروجينيز (*nifH, nifD, nifK*) اذ اعطت كل عزلة بكتيرية حزمتين بحجم 0.5 Kbp مقارنة مع الدليل الحجمي 1 Kbp وهذا يتطابق بدوره مع ما جاء من معلومات تخص تصميم البادئات انفة الذكر ضمن الموقع الاليكتروني للمركز العالمي للتقنات الاحيائية National Center for Bioinformation Information والتي تعطي دليل قاطع لايقبل الشك على امتلاك العزلات البكتيرية للجينات المشفرة لانزيم النيتروجينيز بدلالة ظهور حزمتين واضحتين متساويتي الحجم كل حزمة تشفر لجين وجزء من جين اخر من الجينات الثلاثة المشفرة لانزيم النيتروجينيز بناءا على البادئات المصممة المتداخلة التي استخدمت للكشف عنها. وهذه النتيجة تدعم قدرة العزلات المختلفة لقابلية تثبيتها للنيتروجين عند نموها في الوسط الخالي من النيتروجين بدلالة امتلاكها للجينات المشفرة للانزيم. واشار العديد من الباحثين في

استعمال بادئات متخصصة لكشف وتضخيم الجينات المشفرة لانزيم النيتروجينيز وجاءت النتيجة الحالية مقاربة لما توصل اليه (18) الى ان الجينيين *nifH* و *nifD* يعملان على تثبيت النيتروجين الجوي في حالة توفره كمصدر وحيد للنيتروجين ولا يعملان في حالة توفر مصدر اخر للنيتروجين مضاف للوسط الزرعي مثل الامونيا داعمة لدراستنا، وجاءت مطابقة لما ذكره (19) في اهمية الكشف عن الجينات المشفرة لانزيم النيتروجينيز (*nifH, nifD, nifK*) باستعمال تفاعل البلمرة المتسلسل وتحليل نواتج التضخيم لهذه الجينات بالاعتماد على بادئات متخصصة.



(1) (2)

شكل(1) نواتج تضخيم الحامض النووي للعزلات البكتيرية المختلفة على هلام الاكاروز التي كشفت عن الجينات المشفرة لانزيم الـ Nitrogenase (*nifH, nifD, nifK*).

المصادر

1) Berman-Frank, I.; Lundgren, P.; Falkowski, P. (2003). Nitrogen fixation and photosynthetic oxygen evolution in cyanobacteria Res Microbiol Apr;154 (3):157-646.

2) Petersen, J. C.; Gessner, K.; Fisher, C. J.; Mitchell, D.; Lowe, J.; and Lubitz, W. (2005). Mn2+-adenosine nucleotide complexes in the presence of the nitrogenase iron-protein: Detection of conformational rearrangements directly at the nucleotide binding site by EPR and 2D-ESEEM (two-dimensioml electron spin-echo envelope modulation spectroscopy).Biochem. J., 391: 527-539.

3) Douglas, F.(2008). Colifroms - Medical Microbiology Book. USA.

4) Fout, D.; Tyler, H.; Deboy, R.; Dougherty, S.; Ren, Q.; Badger, J. Durkin, A.; Hout, H.; Shirvastava, S.; Kothary, S.; Robert, J.; Donson, R.; Mohamoud, Y.; Khouri, H.; Roesh, L.; Kragfeld, K.; Struve, C.; Triplett, E.; and Methe, B. (2008). Complete Genome Sequence of the N_2. Fixing Broad Host Range EndophyteKlebsiella pneumonia 342 and Virulence Prediction Verified in Mice – Plos Genetics. 4 Issue 7: 1 – 18.

5) Prescott, L. (2002). Microbiology. 5th. Ed. The McGraw - Hill Companies, U.S.A.

6) Brisse, S., Grimont, F., and Grimont, P. A. D (2006). Prokaryotes. New York, NY: Springer New York. p. 159-196 .

7) McClelland, M., Florea, L., Sanderson, K., Clifton, S., Parkhill, J., Churcher, C., Dougan, G., Wilson, R., Miller, W.(2000). Comparison of the *Escherichia coli* K-12 genome with sampled genomes of a*Klebsiella pneumoniae* and three *Salmonella enterica* serovars, Typhimurium, Typhi and Paratyphi. Nucleic Acids Res... V:28(24). p. 4974–4986.

8) Jenkins, B. D.; Steward, G. F.; Short, S. M.; Ward, B. B.; and Zehr, J. P. (2004). Fingerprinting diazotroph communities in the Chesapeake Bay by using a DNA macroarray. Applied and Environmental Microbiology 70: 1767-1776.

9) Burris, R. H. (1991). Nitrogenases. Journal of Biological Chemistry 266: 9339-9342.

10) Mortenson, L. E.; Huang T. C.; and Zumft W.G. (1973). Structure of the molybdoferredoxin complexfrom Clostridium pasteurianum and Isolation ofits subunits. J. Bacteriology., 113(2):884-890.

11) Stefan, B. (2009). Methicillin - resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) and antibiotic resistance genes. Linköping University. ISSN: 0345-0082 .

12)Kovtunovych, G.; Lytvynenko, T.; Negrutska, V.; Lar, O.; Brisse, S.; and Kozyrovska, N.(2003). Identification of *Klebsiella oxytoca* using a specific PCR assay targeting the polygalacturonase *pehX* gene. Research in Microbiology. J ELSEVIER. 154.P. 587–592.

13) Horton, H.; Cai, Z.; Ho, N. S. and Pease, R. L. (1990). Gene Splicing by Overlap Extension: Tailor-Made Genes Using the Polymerase Chain Reaction. Reprinted from Bio Techniques 8(5):528-535.

characterization of extracellular B-glucosidase from *Bacillus sp*. Advan in Environ. Biol. ,3(3): 269-277.

18) Souillard, N., and Sibold, L. (1989). Primary structure, functional organization and expression of nitrogenase structural genes of the thermophilic archaebacterium Methanococcus thermolithotrophicus. Mol. Microbiol 3: 541-51.

19) Howard, J. B., Rees, D. C. (2006). "How many metals does it take to fix N2? A mechanistic overview of biological nitrogen fixation". Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 103 (46): 17088–17093.

14) Wilson, P.W., and Knight, S.C. (1952). Experiments in bacterial physiology. Burguess, Minneapolis, USA, p. 49.

15) Sambrook, J.; Fritgah, E.; and Maniatis, T. (1989). Molecular Cloning: A laboratory Manual. Cold spring Harbour laboratory, New York.

16) Neumann, B.; Pospiech, A.; and Schairrer, H.U. (1992) Rapid isolation of genomic DNA from Gram-negative bacteria. Trends Genet. 8: 332–333.

17) Samiallah, T. R.; Bakhah, A.; Rao, A. Q. and Naz, M. (2009). Isolation, purification and

Investigation at the molecular level for a nifgenes to bacteria *klebsiella pneumoniea* the use of polymerase chain reaction (PCR)

Fawz Abdul Salam K.AL-Saffar Abdul Razak K. Mahmood Najwa I. AL- Barhawi

Department of Biology , College of Education , University of Mosul , Mosul , Iraq.

Abstract

This research was aimed at detection on three nitrogen fixation genes *nifK* , *nifD* , *nifH* in 21 *K.* pneumonia pathogenic isolates which obtained from Prof. Jean-Marc in Leicester British university by using PCR technique and four specific primers P1, P2 , P5 , P6 and compare it with K. pneumoniae 342 standard strain. The results showed presence of two bands for each isolate with M.W 0.5 Kbp comparing with 1 Kbp of the marker.

key words: non-symbiotic fix nitrogen, *nif* genes , *Klebsiella pneumoniea* 342