مجله علوم پزشکی زانکو/ دانشگاه علوم پزشکی کردستان/ تابستان ۱۳۹۳/ ۱۶- ۹

مقایسه چهار روش استخراج DNA از باکتری‌های گرم منفی و گرم مثبت

بابک شهبازی[۱]، **هنار نارنجی**[۱]

۱- کارشناس ارشد میکروب‌شناسی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی کردستان

ایمیل:hanar.narenji89@gmail.com – شماره موبایل:۰۹۱۴۳۸۰۰۳۵۷

Downloaded from zanko.muk.ac.ir at 12:48 IRST on Monday January 16th 2017

چکیده

زمینه و هدف: استخراج DNA، اولین مرحله در اجرای تحقیقات مهندسی ژنتیک می‌باشد و بدست آوردن پروتکل مناسب برای تهیه یک DNA خالص، اهمیت بسزایی در تحقیقات مهندسی ژنتیک دارد؛ به همین دلیل برای آن روش‌های گوناگونی ارائه شده است. در تحقیق حاضر، چهار روش مختلف استخراج DNA از باکتری‌های گرم منفی و گرم مثبت از لحاظ کارایی هر کدام از روش‌ها و مقایسه آن‌ها با یکدیگر، مورد بررسی و آزمون قرار گرفته است. هدف این مقاله، دستیابی به روشی سریع‌تر و کم هزینه-تر استخراج DNAژنومی برای باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی است.

روش بررسی: در این مطالعه، از باکتری‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* و *ویبریوکلرا* سوسپانسیون‌های باکتری، معادل کدورت نیم مک فالند تهیه شد. سپس به چهار روش: کیت تجاری، جوشاندن، فنل-کلروفرم و روش دترجنت رختشویی، DNA استخراج و هرکدام از روش‌ها در قالب طرح کامل تصادفی سه بار تکرار شد. غلظت‌های نمونه های استخراج شده با استفاده از دستگاه نانودراپ و ژل الکتروفورز اندازه‌گیری شد. در ادامه، جهت بررسی کارایی DNA استخراج شده در انجام فرایند های پایین دستی، تست‌های PCR , REP PCR و ERIC PCRاختصاصی برای باکتری‌های نام‌برده انجام شد.

یافته‌ها: بررسی غلظت DNA های استخراج شده، نشان دهنده تفاوت چشمگیر میان باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی بود؛ همچنین تجزیه واریانس، تفاوت معنی‌داری بین این چهار روش نشان داد. انجام فرایندهای پایین دستی نشان داد: همه روش‌های نام‌برده به غیر از روش دترجنت رختشویی، برای انجام PCR در غلظت‌های معین مناسب می‌باشند؛ در روش REP PCR، DNA های استخراج شده به روش‌های جوشاندن، فنل-کلروفرم و کیت تجاری نتایج مورد انتظار را نشان دادند. روش ERIC PCR با DNA های استخراج شده در روش کیت تجاری باندهای مورد نظر را نشان داد ولی در سایر روش‌ها هیچ باندی مشاهده نشد.

بحث و نتیجه‌گیری: از یافته‌های این تحقیق می‌توان نتیجه گرفت، با وجود حساسیت بیشتر پروتکل کیت تجاری سیناژن در مقایسه با سه روش دیگر، در مقابل، با توجه به زمان و هزینه کمتر و راندمان تقریباً مشابه دو روش فنول کلروفرم و جوشاندن خصوصاً روش جوشاندن، می‌توان از این روش برای استخراج DNA در باکتری‌های گرم منفی و مثبت استفاده کرد.

واژه‌های کلیدی:استخراج DNA باکتری، PCR، ERIC PCR، REP PCR

Archive of SID

www.SID.ir

Downloaded from zanko.muk.ac.ir at 12:48 IRST on Monday January 16th 2017

مقدمه

استخراج DNA ژنومی از سلول‌های باکتریایی با غلظت و ٪ خلوص بالا، یکی از فرایند های مورد توجه در علم ژنتیک و محققان در آزمایشگاه‌های مولکولی- تحقیقاتی و بالینی می‌باشد[۲،۱]. درک ویژگی‌های شیمیایی و فیزیکی رشته های DNA (اندازه، شکل و ساختمان)، توانسته است کمک شایانی به انتخاب روش‌های مختلف جدا سازی آن‌ها کند[۳]. مراحل تهیه کل DNA از یک محیط کشت باکتریایی را می‌توان به چهار مرحله تقسیم کرد:۱- برداشت باکتری‌هایی که در یک محیط رشد کردند ۲- متلاشی کردن سلول‌ها برای رها سازی محتویاتشان ۳-حذف محتویات عصاره سلولی از مخلوط حاوی DNA ۴-تغلیظ DNA[۴].

اصلی‌ترین و مهم‌ترین مرحله استخراج DNA باکتری، لیز سلول با استفاده از ترکیبات شیمیایی یا روش‌های فیزیکی می‌باشد؛ به همین دلیل در بیشتر روش‌های رایج، برای لیز باکتری‌های گرم منفی، از ترکیبات شیمیایی Tris HCL، NACL، SDSو EDTA و برای لیز باکتری‌های گرم مثبت، از لیزوزیم و سوکروز به همراه پروتئیناز K، برای لیز پروتئین‌ها استفاده می‌شود[۵]. در کنار این روش‌های دستی، به منظور تسریع و آسان سازی این فرایندها، شرکت‌های بیولوژیک متعددی نیز کیت های مختلفی را به بازار ارائه دادند؛ البته وجود مواد اختصاصی، باعث بالا رفتن قیمت آن‌ها شد[۶].

از جمله روش‌های جایگزینی که بر این اساس توسط برخی از محققان جهت استخراج ژنومی مورد بررسی و استفاده قرار گرفته است، روش فنل-کلروفرم می‌باشد که این روش با توجه به قدرت فنل برای لیز باکتری‌ها، به جای ترکیبات لیز شیمیایی و همچنین کلروفرم برای حذف موارد اضافه در سال‌های گذشته مورد توجه قرار گرفته است[۱].

از دیگر روش‌های جایگزین می‌توان به استفاده از دترجنت های رختشویی اشاره کرد[۷].این دترجنت ها بر اساس ماهیت شیمیایی و آنزیمی که دارند، می‌توانند با تأثیر گذاری بر غشا و دیواره سلولی باکتری، سبب آزاد شدن محتوی ژنومی سلول شوند. از جمله آنزیم‌های مورد استفاده در این دترجنت ها می‌توان به پروتئاز، آمیلاز، لیپاز وسلولاز اشاره کرد. پروتئاز پر-استفاده‌ترین نوع آنزیم می‌باشد.این آنزیم با فعالیت خود به هیدرولیز باندهای زنجیره پپتیدی سرعت می‌بخشد. با توجه به اینکه در دیواره سلولی باکتری پروتئین‌های فراوانی وجود دارد ،این آنزیم می‌تواند در لیز دیواره سلولی باکتری‌ها نقش مهمی داشته باشد.

آمیلاز از دیگر آنزیم‌های مورد استفاده در دترجنت های رختشویی است؛ این آنزیم در شکستن پلی‌ساکاریدهای دیواره سلولی و لیز باکتری، به-خصوص باکتری گرم منفی نقش مهمی دارد.آنزیم سلولاز موجود در شوینده‌ها، باعث شکستن پیوند بتا یک و چهار گلیکوزیدی در ساختار سلولزی می‌شود. لیپازها نیز همراه با آمیلاز، در شکستن پلی ساکارید دیواره سلولی و لیز باکتری‌ها نقش دارد[۸].

در حال حاضر روش‌های کیت‌های تجاری، فنل-کلروفرم و جوشاندن از روش‌های رایج می‌باشند درحالیکه استفاده از دترجنت رختشویی کمتر مورد استفاده قرار گرفته است.

برای بررسی و مقایسه‌ی کارایی چهار روش کیت های تجاری، فنل-کلرفرم، دترجنت رختشویی و جوشاندن، از باکتری‌های *استافیلوکوک اورئوس* و *ویبریو کلرا* استفاده شد. در ادامه جهت تایید نتایج

Archive of SID

www.SID.ir

Downloaded from zanko.muk.ac.ir at 12:48 IRST on Monday January 16th 2017

وهمچنین کارآزمایی فرایندهایی که در آن‌ها از DNA ژنومی به عنوان الگو استفاده می‌شود، از تست‌های PCR,REP PCRو ERIC PCR استفاده شد.

روش بررسی

در این مطالعه از سوش های *استافیلوکوکوس اورئوس* و *ویبریو کلرا* ایزوله شده از نمونه های مختلف بالینی که به روش کشت و بیوشیمیایی تایید شده بودند، مورد بررسی قرار گرفتند.

استخراج DNA ژنومی با استفاده از پودر رختشویی تاژ

ابتدا جهت بررسی کارایی نام تجاری مورد اشاره، غلظت‌هایی از پودر تاژ ۵ آنزیم، در آب استریل به میزان ۴۰ میلی گرم در لیتر تهیه شد. به‌منظور استخراج DNAژنومی با استفاده از این پودربه ترتیب ۱ میلی لیتر از محیط کشت شبانه حاوی باکتری‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* و *ویبریو کلرا* را به ۲ میکروتیوب منتقل، سپس به هر دو میکروتیوب ۷۰۰ میکرو لیتر از غلظت پودر مورد نظر اضافه و محلول فوق را به مدت یک دقیقه ورتکس کردیم. پس از سانتریفیوژ کردن این محلول با دور ۱۱۰۰۰ به مدت سه دقیقه، محلول‌های رویی که حاوی محتویات درون سلولی بود به چهار میکروتیوب جدید منتقل و طبق پروتکل میر نژاد و همکاران انجام شد[۹].

استخراج DNAژنومی با استفاده از روش فنل-کلروفرم

برای استخراج DNAدر این روش از محلول DXPTM سیناژن که حاوی پروتئیناز Kو سدیم دو دسیل سولفات می‌باشد، به روش زیر استفاده شد. در یک میکروتیوب چند کلنی باکتری را به ۸میکرولیتر محلول DXPTM اضافه سپس کاملاً آن را ورتکس کردیم و ابتدا به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد قرار دادیم؛ سپس ۴درجه‌سانتی گراد برای مدت ۵ دقیقه سرد کردیم. در مرحله بعد به هر میکروتیوب ۱۰۰ میکرولیتر فنل -کلرفرم اضافه و ورتکس کردیم؛ به مدت ۲۰ دقیقه در دور ۱۲۰۰۰ سانتریفوژکردیم.فاز آبی را به یک میکروتیوب جدید منتقل وهم حجم آن را کلروفرم-ایزو امیل الکل اضافه، پس از ورتکس به مدت ۵ دقیقه در دور ۱۲۰۰۰ سانتریفوژ کردیم. مجدداً فاز بالایی را به یک میکروتیوب جدید منتقل و $\frac{1}{10}$ حجم آن سدیم‌استات ۳ مولار (موجود بر روی یخ) و سه حجم اتانول ۹۶% اضافه و مخلوط یاد شده را به مدت ۳۰ دقیقه بر روی یخ نگه داری کردیم. پس از سانتریفوژ به مدت ۱۵ دقیقه در دور ۱۲۰۰۰، به ته‌نشین ۵۰۰میکرولیتر اتانول ۷۰% اضافه کرده وآن را ۵ مرتبه وارونه کردیم. میکروتیوب را به مدت ۵ دقیقه در دور ۱۲۰۰۰ سانتریفوژ، سپس دکانته کردیم و ته‌نشین آن را در خلأ به مدت ۳۰ دقیقه قرار دادیم (یا ۵ دقیقه در دمای ۶۵ درجه خشک کردیم). مقدار ۳۰میکرولیتر آب دو بار تقطیر و اتوکلاو شده را به نمونه اضافه و در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری کردیم[۱].

استخراج DNA باکتری‌های گرم منفی بر اساس کیت شرکت سیناژن

برای استخراج DNA با استفاده از کیت تجاری، بر اساس پروتکل شرکت سیناژن موجود در داخل کیت استخراج انجام گرفت.

استخراج به روش جوشاندن

برای استخراج DNA به روش جوشاندن در اولین مرحله، ۴۰۰ میکرو لیتر آب مقطر داخل میکروتیوب ریختیم؛ یک لوپ از کلنی‌های تک

www.SID.ir

Downloaded from zanko.muk.ac.ir at 12:48 IRST on Monday January 16th 2017

موجود در محیط کشت برداشت و یک سوسپانسیون نسبتاً غلیظ از باکتری تهیه کردیم، سپس ورتکس کردیم تا سوسپانسیون یکنواخت شود. در ادامه در دور ۸۰۰۰ به مدت ۵ دقیقه در دمای ۲۰ درجه سانتریوفوژ کردیم؛ ۱۰۰ میکرو لیتر NAOH ۵۰ میلی مولار داخل میکروتیوب ریخته و ورتکس انجام شد؛ به‌دنبال آن میکروتیوب‌ها را ۳۰ دقیقه در بن‌ماری ۱۰۰ درجه قرار می‌دهیم، سپس خارج می‌کنیم تا دمای آن پایین بیاید. ۵۰ میکرو لیتر TIRIS ۲۰ میلی مولار ریختیم و ورتکس کردیم. در مرحله آخر، در دور ۱۲۰۰۰ در دمای ۴ درجه سانتریوفوژ و محلول رویی حاوی DNA استخراجی را به داخل میکروتیوب جدید منتقل کردیم.

بررسی فرایند استخراج

به منظور تعیین غلظت و خلوص DNAاستخراج شده، میزان DNAو نسبت میزان جذب A260/A 280 نمونه‌های استخراج شده توسط دستگاه نانودراپ اندازه گیری و تعیین شد .هم چنین جهت ارزیابی یکپارچگی و سلامت DNAاستخراجی نمونه‌ها بر روی ژل آگار۰/۸٪ مورد بررسی قرار گرفتند .در آزمایشات معیار، بهترین عملکرد بر اساس بررسی همزمان دو شاخص غلظت DNA استخراج شده (بر حسب میزان میکروگرم DNA در یک میلی لیتر) و فاکتور خلوص DNA(طبق شاخص جذب A260/A 280) در نظر گرفته شد. هرچه نسبت میزان جذب نمونه حاوی DNA از ۱/۸ بیشتر باشد نمونه استخراج شده دارای مقدار کمتری پروتئین همراه بوده و درنتیجه از خلوص بیشتری برخوردار می‌باشد[۹].

بررسی روش‌های PCR,REP PCR و BOX PCR

واکنش‌های فوق برای تعیین وجود مواد بازدارنده و مداخله کننده طی انجام واکنش انجام شد. واکنش PCR در باکتری *استافیلو کوکوس اورئوس*، بر روی ژن *mec A* در حجم نهایی ۲۵ میکرو لیتر انجام شد. به هر نمونه شامل ۱۱ میکرولیتر Master mix (ساخت شرکت سیناژن)و ۱۰ میکرولیتر آب مقطر استریل، از هر پرایمر F و R نیز یک لاندا اضافه شد (در جدول ۱ پرایمر های مورد استفاده نشان داده شده است). در انتها هم دو میکرولیتر ازDNA الگو اضافه شد. فرایند PCR در دستگاه ترموسایکلر مطابق جدول ۲ انجام شد.

جدول ۱: پرایمرهای استفاده شده در این مطالعه برای ژن*mecA*

پرایمر	ژن هدف	Sequence (size)	منبع
1	*mecA* geneF	AAA CTA CGG TAA CAT TGA TCG CAA C-3'-5'	This study
2	*mecA* geneR	CTT GTA CCC AAT TTT GAT CCA TTT G-3'-5'	This study

www.SID.ir

Downloaded from zanko.muk.ac.ir at 12:48 IRST on Monday January 16th 2017

جدول ۲: فرایند PCR در دستگاه ترموسایکلربرای ژن *mecA*

Primary denaturation	95 °c	5	min	1 cycle
Denaturation	95 °c	45	s	
Annealing	57.5°c	45	s	35 cycles
Extension	72 °c	1	min	
Final Extension	72 °c	10	min	1 cycle

واکنش PCR در باکتری *ویبریو کلرا*، بر روی ژن *ctx*A در حجم نهایی ۲۵ میکرو لیتر انجام گرفت. به هر نمونه شامل ۱۲ میکرو لیتر Master mix (ساخت شرکت سیناژن) و ۹ میکرو لیتر آب مقطر استریل، از هر پرایمر F و R نیز یک لاندا اضافه شد (در جدول ۳ پرایمر های مورد اس مطابق جدول ۴ انجام شد.

جدول ۳: پرایمرهای استفاده شده در این مطالعه برای ژن *ctxA*

.پرایمر	ژن هدف	Sequence (size)	منبع
1	*ctxA* geneF	5'TTGTTAGGCACGATGATGGA-3'	This study
2	*ctxA* geneR	5'CAAGCACCCCAAAATGAACT-3'	This study

جدول ٤: فرایند PCR در دستگاه ترموسایکلر برای ژن *ctxA*

Primary denaturation	94 °c	5	min	1 cycle
Denaturation	94 °c	45	s	
Annealing	60°c	45	s	35 cycles
Extension	72 °c	1	min	
Final Extension	72 °c	10	min	1 cycle

در روش‌های REPو ERIC،سیکل دمایی و میزان مواد همانند ژن ctxA در *ویبریوکلرا* انجام شد. در واکنش REP PCR از پرایمر با توالی: R: (5IIIICGICATCIGGC-3') , pr -F:(5'ICGICTTATCIGGCCTA-3')استفاده شد. در واکنش ERIC PCR نیز از توالی‌های:-5') pr-R: ATGTAAGCTCCTGGGGATTCAC-3') pr -F: (5'AAGTAAGTGACTGGGGTGAGCC-3') استفاده شد.

یافته‌ها

پس از انجام فرایند استخراج DNA ژنومی با روش‌های مختلف خلوص و غلظت DNA استخراج

Archive of SID

www.SID.ir

شده، با استفاده از دستگاه نانو دراپ مورد ارزیابی قرار گرفت که نتایج در جدول ۵ مشخص شده است.

جدول ۵: نتایج فاکتور خلوص و غلظت DNA استخراجی

نام روش	فاکتور خلوص	غلظت(ng/ml)
کیت تجاری	۲/۱	۴۳۰
فنل-کلروفرم	۱/۹۵	۴۰۱
جوشاندن	۱/۹۴	۳۸۰
پودر رختشویی	۱/۱	۲۵۰

نتایج نشان داد که در روش کیت تجاری نسبت به سه روش نام‌برده، با توجه به فاکتور خلوص و غلظت DNA، دارای بهترین عملکرد در جداسازی و تخلیص DNA می‌باشد و سپس به ترتیب روش‌های فنل-کلروفرم، جوشاندن و پودر رختشویی تاژ دارای بهترین عملکرد می‌باشد.

نتایج روش‌های پایین دستی

DNA های استخراج شده در همه روش‌ها به غیر از روش پودر رختشویی، دارای عملکرد مناسب در روش PCR، هم در باکتری *استافیلوکوکوس* او رئوس و هم در *ویبریوکلرا*، بودند که روش جوشاندن با توجه به صرف وقت و هزینه کمتر روش مناسب‌تری برای انجام PCR می‌باشد.

در روش REP PCR،DNA استخراج شده در روش کیت تجاری در هردو باکتری گرم مثبت و گرم منفی دارای کیفیت مناسب و تعداد باندهای بیشتر در مقایسه با سه روش دیگر می‌باشد؛ هم چنین روش‌های فنل-کلروفرم و روش جوشاندن در باکتری گرم منفی دارای تعداد باند قابل قبولی بودند؛ ولی در باکتری گرم مثبت تعداد و کیفیت باندها بسیار کمتر از حد انتظار بود. در روش ERIC PCR، تنها DNA های استخراج شده از روش کیت تجاری هیچ ممانعتی برای انجام PCR نشان نداد ولی در سایر DNA های استخراج شده هیچ باندی مشاهده نشد.

بحث و نتیجه گیری

مانند مطالعه کیخاصابر و همکارانش، نتایج این مطالعه نشان داد که روش جوشاندن با توجه به عملکرد مناسب در روش PCR و حتی REP PCR، باید با توجه به صرف زمان و هزینه پایین و بدست آوردن DNA ای با غلظت و خلوص مناسب مورد توجه قرار گیرد[۱۰]. برخلاف مطالعه رضا میر نژاد و ناصری که گزارش کردند روش دترجنت های رختشویی DNA ای با خلوص و غلظت بالا فراهم می‌کند و هیچ اختلالی در فرایند های پایین دستی ایجاد نمی‌کند[۹،۱۱]. نتایج این مطالعه نشان داد: به طور میانگین DNA های استخراج شده به روش دترجنت رختشویی، علاوه بر اینکه دارای خلوص پایین در روش‌های پایین دستی بود، نتایج مورد انتظار هم حاصل نشد که می‌تواند به دلیل نوع و نسبت متفاوت مواد پایه تشکیل دهنده این پودرها و نوع آنزیم‌های موجود در آن‌ها باشد[۱۲].

همچنین همانند مطالعه چنگ و همکارانش که روش فنل-کلروفرم را روش مناسبی ارزیابی کردند[۱]، نتایج این مطالعه هم مناسب بودن این روش را نشان داد؛ اما با توجه به اینکه اشباع کردن فنل خود هم دشوار است و بیشتر افراد به آن حساسیت نشان می‌دهند وبا توجه به نتایج یکسانی که روش جوشاندن و روش فنل-کلروفرم دارا می‌باشند، بنابراین پیشنهاد می‌شود از روش جوشاندن که کم‌خطر است، استفاده شود.

نتایج این مطالعه نشان داد، کیت های تجاری که با دقت و مطالعه بسیار تهیه می‌شوند، دارای بهترین

Downloaded from zanko.muk.ac.ir at 12:48 IRST on Monday January 16th 2017

Archive of SID

www.SID.ir

Downloaded from zanko.muk.ac.ir at 12:48 IRST on Monday January 16th 2017

عملکرد از لحاظ فرایند استخراج و همچنین بر مبنای DNA ژنومیک می‌باشند وبا فاکتور خلوص ۲/۱ ،دارای بهترین خلوص و غلظت در میان روش‌های مورد آزمایش این تحقیق هستند. بعد از روش کیت تجاری، به‌ترتیب: روش‌های فنل-کلروفرم با فاکتور خلوص ۱/۹۵، جوشاندن ۱/۹۴ و دترجنت رختشویی ۱/۱ می‌باشد. قابل توجه است که روش کیت تجاری در همه‌ی فعالیت‌های پایین دستی هیچ مشکلی ایجاد نمی‌کند.

References

1. Cheng H.R .J.N. Extremely rapid extraction of DNA from bacteria and yeasts. Biotechnol Lett, 2006;28(1):55-9.

2. Park D. Genomic DNA isolation from different biological materials. Methods Mol Biol,2007;353:3-13.

۳. عقدایی ع, جعفر م، بیوتکنولوژی گیاهی، موسسه تحقیقات وجنگل ها، ۱۳۸۰.

4. Bahador.A., H. Etemadi, B. Kazemi, R. Ghorbanzadeh. Extraction method for detection of mycobacterium tuberculosis by PCR. J Med Sci. 2004; 4: 252-6.

5. Lee YK. Kim HW, Liu CL, Lee HK. A simple method for DNA extraction from marine bacteria that produce extracellular materials. J Microbiol Methods. 2003; 52:245-50.

6. Drabek J, Petrek M. A sugar laundry detergent and salt method for extraction of deoxyribonucleic acid from blood. Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub, 2002;146:37–9.

7. Cataldo MA, Taglietti F, Petrosillo N. Methicillinresistant staphylococcus aureus. a community health threat. Postgrad Med. 2010;122: 16-23.

8. Olsen HS The role of enzymes in modern detergency. J Surfactants Deterg. 1998; 44:555-67.

9. مقدم م، باباولیان ح، میرنژاد ر، شاکری ف. استخراج سریع DNA ژنومی *استافیلوکوکوس اورئوس* توسط دترجنت های رخشویی و ارزیابی کارایی این DNA در انجام فرایندهای پائین دستی با استفاده از PCR. مجله علوم آزمایشگاهی، شماره ۱ ،دوره ششم،۱۳۹۱، صفحات ۳۵- ۴۲.

۱۰. کیخا صابر م، مهدی نژاد ن، تهامی س. مقایسه چهار روش استخراج دی ان ای از باکتری های گرم منفی، همایش منطقه ای غذا و بیوتکنولوژی، ۱۳۸۸.

11. Nasiri H, Rasaee MJ, Rahbarizadeh F. Modified salting-out method: high-yield, high-quality genomic DNA extraction from whole blood using laundry detergent. J Clin Lab Anal. 2005; 19: 229–32.

12. Pusch C. A simple and fast procedure for high quality DNA isolation from gels using laundry detergent and inverted columns. Electrophoresis. 1997; 18: 1103–4.

Archive of SID

www.SID.ir

Comparison of four methods of DNA extraction from gram-negative and gram-positive bacteria

Downloaded from zanko.muk.ac.ir at 12:48 IRST on Monday January 16th 2017

Babak Shahbazi[1], Hanar Narenji[1*]
1- Microbiology Department, Kurdistan University of Medical Sciences, Sanandaj, Iran
Corresponding author: hanar.narenji89@gmail.com; Mobil: 09143800357

Abstract

Background and Aim: DNA extraction is the first step in the genetic engineering research and obtains a suitable protocol for the preparation of a purified DNA which is essential. In this context, many manual and kit methods were provided. The aim of this study is to achieve a faster and low cost method for DNA extraction of Gram-positive bacteria and gram-negative bacteria. We compared four DNA extraction methods, Kit extraction, phenol chloroform, using detergent laundry brand tag and boiling.

Materials and Methods: In this study, bacterial suspensions of *Staphylococcus aureus and Vibrio cholerae* were produced similar to McFarland 0.5 turbidity. Bacterial DNA was extracted using four different methods and three times for each. Using spectrophotometer and gel electrophoresis were measured concentrations and quality of DNA extraction product accordingly. In order to evaluate the efficiency of DNA extraction method, PCR, ERIC PCR and REP-PCR were performed on some of housekeeping genes downstream regions.

Results: The concentration of the extracted DNA and results of PCR, ERIC-PCR and REP-PCR were different between gram-positive and gram-negative bacteria significantly ($P< 0.05$). ERIC PCR and REP-PCR efficiency of the boiling and chloroform extraction methods was disrupted only in ERIC PCR. No deficiency was observed in Sinagen kit method.

Conclusions: The findings of this study show that despite the availability and lower cost of manual methods, these methods can be substitute for kit method.

Key words: PCR, REP-PCR, ERIC PCR, Bacterial DNA extraction

Archive of SID

www.SID.ir