تحقیقی

دارای رتبه علمی - پژوهشی از کمیسیون
نشریات علوم پزشکی کشور

استخراج سریع DNA ژنومی *استافیلوکوکوس اورئوس* توسط دترجنت های رخشویی و ارزیابی کارایی این DNA در انجام فرایندهای پائین دستی با استفاده از PCR

مهرداد موسی زاده مقدم
کارشناس ارشد ژنتیک ، مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی کاربردی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله(عج) ، تهران، ایران

حمید باباولیان
دانشجوی دکترای تخصصی بیوتکنولوژی پزشکی ، مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی کاربردی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله(عج) ، تهران، ایران

رضا میرنژاد
دکترای تخصصی باکتری شناسی پزشکی ، مرکز تحقیقات بیولوژی مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله(عج) ، تهران، ایران

فاطمه شاکری
کارشناس ارشد بیوتکنولوژی گیاهی، مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی کاربردی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله(عج) ،تهران، ایران

نویسنده مسئول: رضا میرنژاد
تلفن : 021-88039883
پست الکترونیک: rmirnejadreza@yahoo.com
آدرس : تهران،دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله(عج)، مرکز تحقیقات بیولوژی مولکولی

وصول مقاله: 90/9/5
اصلاح نهایی: 90/11/20
پذیرش مقاله:91/1/26

چکیده

زمینه و هدف *: جداسازی DNA ژنومی از سلول های باکتریایی از جمله فرایندهایی است که به طور معمول در اکثر آزمایشگاه های بیولوژیک انجام می گیرد و لذا برای آن روش های گوناگونی به صورت دستی و استفاده از کیت ارایه شده است، اما این روش ها ممکن است وقت گیر و هزینه بر باشند. در این مقاله جهت دستیابی به روشی سریع و کم هزینه استخراج DNA ژنومی باکتری استافیلوکوکوس اورئوس با استفاده از تعدادی از برند های دترجنت های رختشویی موجود در ایران مورد بررسی قرار گرفت.*

روش بررسی*: برندهای تاژ از نوع 5 آنزیم و برند سافتلن از نوع 3 آنزیم ، برندهای دریا و پاک فاقد آنزیم در غلظت های 5 ، 10، 20، 40، 80 میلی گرم در لیتر مورد استفاده قرار گرفتند. در ادامه جهت بررسی کارایی DNA استخراج شده در انجام فرایندهای پائین دستی، تست PCR اختصاصی برای ژن femA موجود در ژنوم باکتری استافیلوکوکوس اورئوس انجام گرفت.*

یافته‌ها*: بررسی DNA استخراج شده توسط غلظت های مختلف برندهای مورد آزمایش نشان داد که محصول بدست آمده با استفاده از غلظت 40mg/lit پودر برند تاژ و سافتلن، دارای مناسب ترین نتیجه از نظر دو شاخص غلظت (µg/ml) و خلوص (A260/A280) DNAمی باشد که قابل مقایسه با نمونه های بدست آمده از روش دستی و کیت است. این شاخص ها به ترتیب 387/5 و 1/88 (تاژ)، 254/1 و 2/80 (سافتلن)، 396/6 و 1/95(دستی) و 423/3 و 2/2 (کیت) بود. در ادامه نتایج PCR انجام گرفته با استفاده از این DNA ها نشان داد که استخراج ژنوم با استفاده از دترجنت های رخشویی هیچ تاثیری بر روی کارایی آن به منظور استفاده در فرایندهای پائین دستی ندارد.*

نتیجه گیری*: از یافته های این تحقیق می توان نتیجه گرفت که از غلظت های مناسب دترجنت های رخشویی می توان به منظور استخراج DNA ژنومی با راندمان مشابه روش های استخراج دستی و کیت استفاده نمود.*

واژه های کلیدی*: استخراج DNA، پودر رخشویی، ژنوم باکتریایی، واکنش زنجیره پلی مراز*

آدرس مقاله:
موسی زاده 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 بهار و تابستان ، 1391دوره ششم(شماره1) :42-35

Archive of SID
www.SID.ir

مقدمه

استخراج DNA ژنومی از سلول های باکتریایی با غلظت و درصد خلوص بالا، یکی از فرایندهای متداول در آزمایشگاه های مولکولی تحقیقاتی و بالینی می باشد که روش های متنوعی برای آن ارایه شده است. در همه این روش ها، اولین مرحله استخراج ژنوم باکتری لیز سلول با استفاده از ترکیبات شیمیائی یا روش های فیزیکی می باشد. به همین دلیل در اغلب روشهای رایج، برای لیز باکتریهای گرم منفی از ترکیبات شیمیائیTris HCl، NaCl،SDS،EDTA و برای لیز باکتریهای گرم مثبت از لیزوزیم به اضافه سوکروز به همراه پروتئیناز K جهت لیز پروتئین ها استفاده می شود(5-1). در کنار این روش های دستی، به منظور تسریع و آسان سازی این فرایندها شرکت های بیولوژیک متعددی نیز کیت های مختلفی را به بازار ارایه داده اند، اما در تمام این روش ها لزوم به کارگیری مواد اختصاصی تا حدودی باعث بالا رفتن هزینه های استفاده از آن می گردد. از طرفی باید توجه داشت فرایندهای آزمایشگاهی اکثرا روش های تجربی می باشند که براساس بهترین نتایج بدست آمده استانداردسازی شده اند، لذا این امکان وجود دارد که با استفاده از روش های جایگزین و ساده تر نتایجی را کسب نمود که مشابه و حتی بهتر از نتایج حاصل از روش های استاندارد موجود باشد و در عین حال دارای هزینه کمتری نیز باشند(7،6).

از جمله روش های جایگزینی که بر این اساس توسط برخی از محققین جهت استخراج DNA ژنومی مورد بررسی و استفاده قرار گرفته است به کارگیری درجنت های رختشویی می باشد(8،7). این درجنت ها بر اساس ماهیت شیمیایی و آنزیمی که دارند می توانند با تاثیرگذاری بر غشا و دیواره سلولی باکتری سبب آزادسازی محتوی ژنومی سلول گردند بدون آنکه بر روی ژنوم آن اثر تخریبی داشته باشند. مزیت استفاده از این شوینده ها آسان، سریع، کم هزینه و در دسترس بودن می باشد.

استفاده صنعتی از آنزیم ها در ترکیبات شوینده از اوایل دهه 1970 با استفاده از آنزیم پروتئاز شروع شد. در سال های بعد استفاده از آنزیم ها در این پودرها با به کارگیری آنزیمهایی مانند لیپاز، آمیلاز و سلولاز توسعه پیدا کرد.

پروتئاز پر استفاده ترین نوع آنزیم ها می باشد که بر اساس منابع تهیه (حیوانی،گیاهی،میکروبی) و نوع فعالیت کاتالیستی آنها (endopeptidase, exopeptidase) به گروههای مختلف تقسیم بندی می شوند. این آنزیم با فعالیت خود به هیدرولیز باندهای زنجیره پپتیدی سرعت می بخشد. با توجه به اینکه در دیواره سلولی باکتریها پروتئین های فراوانی وجود دارد لذا این آنزیم می تواند در لیز دیواره سلولی باکتریها نقش مهمی داشته باشد.

آمیلاز از دیگر آنزیم های مورد استفاده در پودر ها می باشد که با گسستن و هیدرولیز پیوندهای یک و چهار آلفا موجود در ترکیبات نشاسته آن ها را به دو جز محلول دکسترین ها (dextrins) و اولیگوساکاریدها (oligosaccharides) تبدیل می کند و با کاهش ویسکوزیته ترکیب اولیه باعث افزایش حلالیت آن می شود. انواع مختلف آنزیم آمیلاز در گستره وسیعی ازPH (11-6) و درجه حرارت (100°C – 25) می توانند مورد استفاده قرار گیرند. این آنزیم در شکستن پلی ساکاریدهای دیواره سلولی و لیز باکتری ها به خصوص باکتری های گرم منفی نقش مهمی دارد.

آنزیم سلولاز موجود در شوینده ها نیز باعث شکسته شدن پیوند بتا یک و چهار گلیکوزیدی در ساختارهای سلولزی می گردد. لیپازها، ترکیبات چربی و مشتقات آن ها مانند تری گلیسرید را به اجزا آبدوست تر مانند منو و دی گلیسرید، اسید چرب آزاد و گلیسرول تجزیه می کنند. این آنزیم به همراه آمیلاز در شکستن پلی ساکاریدهای دیواره سلولی و لیز باکتری ها به خصوص باکتری های گرم منفی نقش مهمی دارد.

لازم به توضیح است که عملکرد این آنزیم ها تحت تاثیر عواملی همچون pH شوینده، قدرت یونی، دما، زمان، دیگر اجزا و ترکیبات تشکیل دهنده شوینده و عملیات مکانیکی می باشد. همچنین کارآیی و پایداری آنزیم شدیدا تحت تاثیر بعضی از سورفکتانت ها و سیستم های لکه بری موجود در شوینده قرار دارد (9).

Archive of SID

www.SID.ir

لذا نکته قابل توجه در استفاده از این پودرها وجود برندهای گوناگون با ترکیبات شیمیایی و آنزیمی متفاوت است که هر یک براساس میزان و محتوای شیمیایی و آنزیمی (5، 3 و بدون آنزیم) ممکن است نتایج متفاوتی از خود نشان دهند و گاهی ترکیبات موجود در این پودرها مانع کسب نتایج مناسب در روش های مولکولی بعدی مانند PCR گردند(8،10).

مطالعات قبلی که اغلب برای استخراج ژنوم از سلول های یوکاریوتی (مانند سلولهای خونی انسان، بز و غیره) انجام شده است نشان می دهد که می توان از پودرهای رختشوئی جهت استخراج DNA از سلولهای خونی با خلوص و کیفیت بالا استفاده نمود(10-5). در مورد استخراج ژنوم باکتریها با استفاده از پودرهای رختشوئی مطالعاتی انجام نشده و اغلب برای استخراج ژنوم از روش های مختلف مانند روش معمول فنل– کلروفرم، جوشاندن و با استفاده از کیت های تجاری انجام می شود که هرکدام از این روش ها دارای معایب و مزایائی می باشند. در این مطالعه که برای اولین بار انجام شد، از برندهای مختلف پودرهای رختشوئی که در کشور ایران رایج می باشد برای استخراج یک عامل اصلی عفونت های بیمارستانی در دنیا بنام استافیلوکوکوس اورئوس استفاده گردید(11).

به منظور بررسی و مقایسه کارایی برندهای مختلف پودر رختشویی موجود در ایران تعدادی از مطرح ترین آن ها شامل برندهای تاژ، سافتلن، دریا و پاک انتخاب گردیدند و جهت استخراج DNA ژنومی باکتری گرم مثبت *استافیلوکوکوس اورئوس*به عنوان یک عامل مهم ایجادکننده عفونت بیمارستانی در دنیا مورد استفاده قرار گرفتند(11-13). در ادامه جهت تایید نتایج و همچنین کارآزمایی فرایندهای که در آن ها از DNA ژنومی به عنوان الگو استفاده می شود از تست PCR استفاده گردید.

روش بررسی

پودر های رختشوئی مورد استفاده

از برندهای تاژ از نوع 5 آنزیم (حاوی آنزیم های آمیلاز، پروتئاز، لیپاز، سلولاز و ماناز) و برند سافتلن از نوع 3 آنزیم ، برندهای دریا و پاک فاقد آنزیم استفاده گردید.

نمونه های باکتریائی

در این مطالعه سوش استاندارد *استافیلوکوکوس اورئوس*(PTCC 1113) و 30 باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس*ایزوله شده از نمونه های مختلف بالینی که در آزمایشگاه با روش های کشت و بیوشیمیائی تائید شده بودند، مورد بررسی قرار گرفتند.

استخراج DNA ژنومی با استفاده از پودر رختشویی

ابتدا جهت بررسی کارایی برندهای مورد اشاره، غلظت هایی از پودر آن ها در آب استریل به میزان 5، 10، 20، 40، 80 میلی گرم در لیتر تهیه گردید(14). به منظور استخراج DNA ژنومی با استفاده از این پودرها، 1میلی لیتر از محیط کشت شبانه حاوی باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس*را به یک میکروتیوب منتقل نموده و پس از اضافه نمودن 700 میکرولیتر از غلظت مورد نظر پودر، محلول فوق به مدت 1 دقیقه ورتکس شد. پس از سانتریفوژ نمودن این محلول با دور 11000 به مدت 3 دقیقه، محلول رویی که حاوی محتویات درون سلولی بود به یک میکروتیوب جدید منتقل گردید.

در ادامه جهت حذف پروتئین ها به هم حجم محلول جدا شده استات سدیم 3 مولار اضافه نموده و به مدت 1 دقیقه میکروتیوب به صورت دستی تکان داده شد تا پروتئین های موجود رسوب نمایند. به منظور حذف کامل پروتئین ها محلول به مدت 20 دقیقه با دور 14000 سانتریفوژ و محلول رویی که فاقد پروتئین های سلولی بود به یک میکروتیوب جدید انتقال یافت.

جهت رسوب محتوی DNA ژنومی موجود در این محلول، به 2/5 برابر حجم آن اتانول خالص اضافه و پس از 1 دقیقه ورتکس دستی، محلول 3 دقیقه با دور 14000 سانتریفوژ گردید. پس از حذف محلول رویی به رسوب حاصل 700 میکرولیتر اتانول 70 درصد اضافه و مجددا سانتریفوژ به مدت 10 دقیقه با دور 14000 دور تکرار گردید. در مرحله بعد به رسوب به دست آمده 100 میکرولیتر آب مقطر استریل اضافه و به مدت 1 ساعت در دمای 37 درجه سانتیگراد قرار داده شد تا رسوب که در واقع DNA استخراج

Archive of SID

www.SID.ir

شده می باشد در آب حل گردد. لازم به ذکر است که برای حذف RNA نیز می توان از آنزیم RNase استفاده نمود.

استخراج DNA ژنومی با استفاده از روش دستی و کیت به عنوان نمونه های کنترل

استخراج DNA ژنومی باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* به روش دستی طبق پروتکل استاندارد صورت گرفت(15)، این پروتکل برای باکتری های گرم مثبت مورد استفاده قرار می گیرد. جهت استخراج DNA ژنومی با استفاده از کیت نیز از محصول شرکت BIONEER (ساخته کشور آلمان) استفاده گردید و نتایج این دو روش با نتیجه استخراج ژنوم با پودر رختشوئی مقایسه گردید.

بررسی فرایند استخراج

به منظور تعیین غلظت و خلوص DNA استخراج شده، میزان DNA و نسبت میزان جذب A260/A280 نمونه های استخراج شده توسط دستگاه نانودراپ اندازه گیری و تعیین گردید. هم چنین جهت ارزیابی یکپارچگی و سلامت DNAی استخراجی نمونه ها بر روی ژل آگارز 0/8% مورد بررسی قرار گرفتند. در آزمایشات معیار بهترین عملکرد بر اساس بررسی همزمان دو شاخص غلظت DNA استخراج شده (بر حسب میزان ماکروگرم DNA در یک میلی لیتر) و فاکتور خلوص DNA (طبق شاخص جذب A260/A280) در نظر گرفته شد. هرچه نسبت میزان جذب نمونه حاوی DNA از 1/8 بیشتر باشد نمونه استخراج شده دارای مقدارکمتری پروتئین همراه بوده و لذا از خلوص بیشتری برخوردار می باشد.

تایید فرایند استخراج با فرایندی که بر مبنای DNA ژنومیک می باشد

واکنش PCR برای تعیین وجود مواد بازدارنده و مداخله کننده در طی انجام واکنش انجام گردید. بدین منظور تکثیر ناحیه ای داخلی از ژن femA استافیلوکوکوس اورئوس در نظر گرفته شد. این ژن فاکتور ضروری مقاومت به متی سیلین نامیده می شود که در تمامی ایزوله های باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس*وجود دارد(13). در جدول 1 پرایمرهای مورد استفاده در طی واکنش PCR نشان داده شده است.

واکنش PCR در حجم نهائی 30µL در نظر گرفته شد. هر نمونه شامل: 15µl از 2X Master mix (ساخته کمپانی Ampliqon III کشور دانمارک) حاوی 1.5mM MgCl2 ، 1 µgr DNA الگو، 20pmol از هر پرایمر R و F و آب مقطر دوبار تقطیر استریل تا حجم 30 µl بود.

فرایند PCR در دستگاه ترموسایکلر اپندورف شامل 5 دقیقه 95 درجه سلسیوس ، به دنبال آن 30 سیکل 30 ثانیه در 94 درجه سلسیوس ، 30 ثانیه در 58 درجه سلسیوس مرحله Annealing و 30 ثانیه در 72 درجه سلسیوس و در نهایت 5 دقیقه در 72 درجه سلسیوس انجام گرفت.

برای بررسی محصولات PCR از الکتروفورز در ژل آگاروز 1/5% و رنگ آمیزی DNA با رنگ اتیدیوم برماید استفاده شد. ژلها با استفاده از دستگاه Gel Documentation مورد بررسی قرار گرفتند.

جدول 1: توالی پرایمرهای مورداستفاده در این مطالعه

Nucleotide sequence (5`to 3`)	Product length
AACTGTTGGCCACTATGAGT CCAGCATTACCTGTAATCTCG	306 bp

آنالیز آماری

داده ها با استفاده از آمار توصیفی (میانگین ± انحراف معیار) بیان گردیدند و روش مطلوب براساس مقایسه فاکتورهای خلوص (A260/280) بدست آمده با 3 بار تکرار تعیین شد.

یافته ها

بررسی فرایند استخراج با استفاده از تعیین میزان A260/A280

پس از انجام فرایند استخراج DNA ژنومی باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس*با استفاده از غلظت های مختلف برندهای پودر رختشویی، خلوص و غلظت DNA استخراج شده با استفاده از دستگاه نانودراپ مورد ارزیابی قرار گرفت که نتایج آن در جدول 2 نشان داده شده است.

Archive of SID

www.SID.ir

جدول2 : نتایج حاصل از عملکرد رقت های مختلف برندهای مورد آزمایش بر اساس فاکتور خلوص و غلظت DNA استخراجی

نام برند	رقت (mg/lit)	فاکتور خلوص (A260/280)	غلظت (ng/ml)
تاژ	5	1/12 ± 0/016*	458/3
	10	1/74 ± 0/016	237/4
	20	1/92 ± 0/016	256/1
	40	1/88 ± 0/016	387/5
	80	1/1 ± 0/016	4/57
سافتلن	5	0/9 ± 0/017	228/7
	10	1/37 ± 0/017	294/2
	20	1/86 ± 0/017	187/7
	40	2/08 ± 0/017	254/1
	80	0/87 ± 0/017	20/2
دریا	5	1/1 ± 0/015	178/5
	10	1/31 ± 0/015	182/7
	20	1/75 ± 0/015	240/1
	40	2/15 ± 0/015	221/4
	80	0/55 ± 0/015	10/6
پاک	5	1/02 ± 0/015	279/2
	10	1/21 ± 0/015	2/2
	20	1/94 ± 0/015	145/6
	40	2/9 ± 0/015	179/8
	80	0/43 ± 0/015	32/2
استخراج به روش دستی		1/95 ± 0/016	396/6
استخراج با استفاده از کیت		2/2 ± 0/016	423/3

* نشان دهنده انحراف معیار است که برای فاکتور خلوص 0/01 می باشد

Archive of SID

www.SID.ir

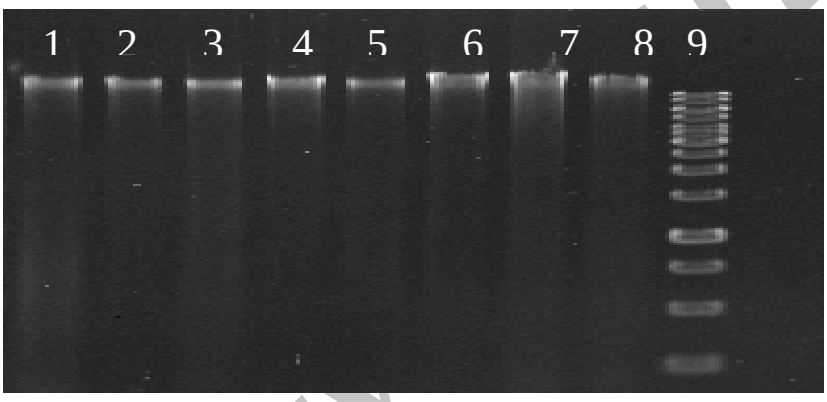
نتایج بدست آمده نشان داد که به ترتیب غلظت های 10، 20، 40 میلی گرم در لیتر پودر برند تاژ و غلظت های 40 میلی گرم در لیتر پودر برندهای سافتلن، دریا و پاک با توجه به فاکتور خلوص و غلظت DNA دارای بهترین عملکرد در جداسازی و تخلیص DNA می باشند.

بررسی فرایند استخراج DNA با تکنیک ژل الکترفورزیس

در شکل 1 بهترین نتایج تایید یکپارچگی و سلامت DNA با غلظت مختلف برندهای متفاوت پودرهای رختشوئی با انجام تکنیک ژل الکترفورزیس روی ژل آگارز 0/8% ارائه شده است. با توجه این نتایج مشخص شده که DNA ژنومی تخلیص شده با استفاده از غلظت 40mg/lit پودر برند تاژ و سافتلن، بهترین یکپارچگی و سلامت را دارا می باشند و هیچ گونه اسمیری نشان نمی دهند و از این DNA ژنومی جهت انجام تست های PCR به عنوان الگو استفاده گردید.

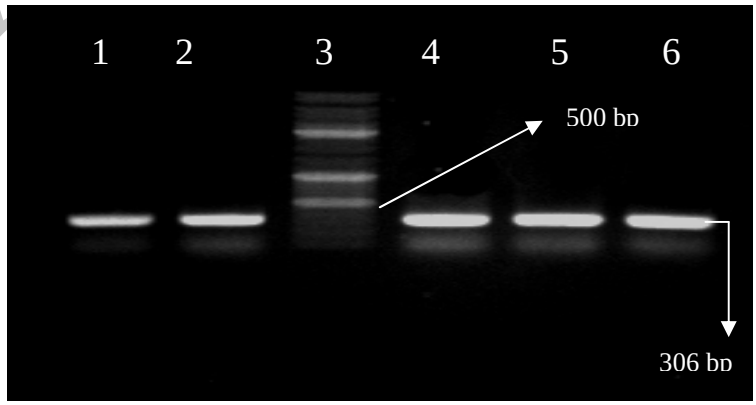
آزمایش PCR

همان طورکه در شکل 2 مشاهده می گردد نتایج حاصل از PCR استخراج شده DNA با غلظت 40mg/lit پودر رخشویی تاژ و سافتلن نشان می دهد که تکثیر ژن femA از DNA ژنومی به خوبی انجام گرفته و ترکیبات و مواد مورد استفاده در طی استخراج در این غلظت پودر رختشوئی ممانعتی جهت واکنش PCR ایجاد نمی کنند و هیچ گونه اسمیری مشاهده نمی گردد.



شکل1: بررسی **DNA** ژنومی استافیلوکوکوس اورئوس استخراج شده توسط دترجنت رختشویی در ژل آگارز 0/8 درصد.

ردیف 1. غلظت 10 mg/lit تاژ، ردیف 2. غلظت 20 mg/lit تاژ، ردیف 3. غلظت 40 mg/lit تاژ، ردیف 4. DNA ژنومی تخلیص شده به صورت دستی، ردیف 5. DNA ژنومی تخلیص شده با استفاده از کیت، ردیف 6. غلظت 40 mg/lit پاک، 7. غلظت 40 mg/lit دریا ، ردیف 8. غلظت 40 mg/lit سافتلن، ردیف 9. مارکر (100bp DNA ladder, SM#333).



شکل2: بررسی نتایج **PCR** ژن **femA** در ژل آگارز 1/5 درصد

Archive of SID
www.SID.ir

ردیف 1. محصول PCR از DNA ژنومی تخلیص شده به روش دستی، ردیف 2. محصول PCR از DNA ژنومی تخلیص شده با استفاده از کیت، ردیف 4. محصول PCR از DNA ژنومی بدست آمده با غلظت 40 mg/lit سافتلن، ردیف 5 و 6 . محصول PCR از DNA ژنومی بدست آمده با غلظت 40mg/lit تاژ و ردیف 3 .مارکر (100bp DNA ladder, SM#333).

بحث

همانند مطالعه ناصری و همکارانش و کومار و همکارانش، نتایج این مطالعه نشان داد که غلظت های مختلف دترجنت های مورد استفاده دراستخراج DNA ژنومی مفید می باشند، اما میزان خلوص این DNA با توجه به میزان غلظت و نوع برندها متفاوت است که بایستی در زمان استخراج ژنوم به آن توجه داشت (16،14).

برخلاف مطالعه ناصری و همکارانش که گزارش داده اند برندهای مختلف پودرهای رختشوئی در خلوص و یکپارچگی DNA در طی فرایند استخراج نقشی ندارند و تفاوت معنی داری بین نتایج بدست آمده از برندهای مختلف مشاهده نمی گردد(14)، نتایج این مطالعه نشان داد که به طور میانگین، خالص ترین DNA در غلظت های 10، 20، 40 میلی گرم در لیتر پودر برند تاژ بدست می آید، و در غلظت 40 mg/lit تمامی برندهای مورد بررسی بهترین نتیجه را با توجه به فاکتور خلوص و غلظت DNA نشان می دهند. البته در مورد برند تاژ غلظت های 10 و 20 میلی گرم در لیتر این برند در مقایسه با همین غلظت ها در برندهای دیگر کارایی بهتری نشان داد. علت این اختلاف در دو مطالعه، تفاوت در روش کار و نوع سلول های مورد استفاده در طی استخراج ژنوم می باشد.

همچنین برخلاف مطالعه چنگ و همکارش که گزارش نمودند استفاده از فنل برای لیز باکتری ها بجای ترکیبات لیز شیمیائی و کلروفرم برای حذف مواد اضافی یک روش مناسب برای استخراج ژنوم از باکتری ها می باشد (1)، نتایج این مطالعه نشان داد که استفاده از پودرهای رختشوئی برای استخراج ژنوم از باکتری ها بدون استفاده از فنل و کلروفرم روشی مناسبت تر و ارزان تر می باشد، چراکه اشباع نمودن فنل خود هم دشوار بوده و بیشتر افراد به آن حساسیت نشان می دهند و اغلب تولید کنندگان کیت های تجاری سعی در حذف این ماده دارند و نیز پودرهای رختشوئی بوفور در دسترس می باشند (5،1).

این مطالعه نشان داد که DNA ژنومی استخراج شده توسط غلظت 40mg/lit برند تاژ دارای بهترین کیفیت است که حتی قابل مقایسه با DNA استخراج شده توسط کیت (شکل 1 ردیف 5) و روش دستی (شکل 1ردیف 4) می باشد، هرچند که باندهای مربوط به غلظت ها و برندهای دیگر نیز قابل توجه است. همانند سایر مطالعات نتایج این مطالعه نشان داد که خلوص و غلظت DNA ژنومی استخراج شده توسط برندهای مختلف، ممکن است متغیر باشد، که احتمالا به دلیل نوع و نسبت متفاوت مواد پایه تشکیل دهنده این پودرها و نوع آنزیم موجود در آن ها می باشد (17،16،13،1).

نتایج حاصل از PCR که با استفاده از DNA ژنومی استخراج شده توسط غلظت 40mg/lit برند تاژ (شکل 2 ردیف 5 و 6) و سافتلن (شکل 2 ردیف 4) به عنوان نمونه انجام گرفت نشان داد که این فرایند با استفاده از DNA ژنومی استخراج شده توسط دترجنت های رختشویی به خوبی انجام پذیر می باشند و استفاده از این شیوه بر فرایندهای پایین دستی که در آن ها از این DNA به عنوان الگو استفاده می شود فاقد تاثیر است.

دترجنت هایی مورد استفاده در این تحقیق از نوع سنتزی می باشند که از ترکیبات متنوعی تشکیل یافته اند، از مهمترین آن ها می توان به مواد اکتیو آنیونیک (آلکیل سولفات ها ROSO3Na) به عنوان ماده اصلی، سدیم تری پلی فسفات جهت حذف نمودن یون های موجود درآب و تنظیم کننده بافر محلول، کربوکسی متیل سلولز به عنوان یک جداکننده ارگانیک جهت تعلیق چربی اشاره نمود. به علت وجود شرایط اسمزی بالا در محیط حاوی دترجنت قرارگرفتن سلول در این محیط باعث لیز آن می گردد، در ادامه نیز وجود آنزیم ها و ترکیبات ارگانیک جداکننده منجر به شکست و واسرشتی پروتئین های سلول شده که با اضافه نمودن محلول نمکی غلیظ می توان این پروتئین ها را از محلول حاوی DNA جدا نمود. وجود الکیل سولفات ها نیز با توجه به بار مثبتی که دارند ممکن است در جدا نمودن

Archive of SID

www.SID.ir

ملکولی مثل DNA که دارای بار منفی است موثر باشد(2،18). در این مطالعه همانند مطالعه ناصری و همکارانش مشخص شد که می توان با استفاده از تک تک مواد تشکیل دهنده پودرهای رختشوئی، ژنوم را استخراج نمود، ولی استفاده از این ترکیبات شیمیائی به طور جداگانه، مقرون به صرفه نمی باشد(14).

نتیجه گیری

با توجه به نتایج بدست آمده در این پژوهش و مقایسه با روش های مورد استفاده مرسوم می توان نتیجه گرفت که استخراج ژنومیک با استفاده از پودرهای رختشوئی دارای مزایائی از جمله:1 – تعداد مراحل استخراج DNA کمتر بوده، لذا در مدت زمان کمتری می توان ژنوم را استخراج کرد.2 – ارزان قیمت بودن این روش چرا که در این روش استفاده از فنل، کلروفروم، RNase،SDS ، lysozyme و proteinase K ضروری نمی باشد. 3- محصول DNA استخراج شده در این روش در مقایسه با روش های دیگر مانند فنل و کلروفروم دارای خلوص و کیفیت بالاتری می باشد. 4- با توجه به اینکه در این روش از فنل و کلروفرم استفاده نمی گردد، لذا این روش یک روش ایمن برای کاربر می باشد. در هر صورت با توجه به موارد فوق می توان از این روش به عنوان جایگزین سریع و کم هزینه روش های استاندارد استخراج DNA در آزمایشگاههای بیولوژی مولکولی استفاده نمود.

تشکر و قدردانی

این مطالعه در مراکز تحقیقاتی بیولوژی مولکولی و بیوتکنولوژی کاربردی دانشگاه علوم پزشکی بقیه ا... اجرا شد، لذا نویسندگان مقاله از همکاریهای کارکنان آن مراکز کمال تشکر را دارند.

References

1- Cheng HR, Jiang 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.

3- Hebron HR, Yang Y, Hang J. *Purification of Genomic DNA with Minimal Contamination of Proteins*. J Biomol Tech. 2009 ; 20(5): 278-81.

4- Syn CK, Swarup S. *A scalable protocol for the isolation of large-sized genomic DNA within an hour from several bacteria*. Anal Biochem. 2000; 278(1): 86–90.

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(2): 245–50.

6- Garcia-Sepulveda CA, Carrillo-Acuna E, Guerra-Palomares SE, Barriga-Moreno M. *Maxiprep genomic DNA extractions for molecular epidemiology studies and biorepositories*. Mol Biol Rep.2010; 37(4):1883–90.

7- 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.

8- Bahl A, Pfenninger M. *A rapid method of DNA isolation using laundry detergent*. Nucleic Acids Res. 1996; 24(8):1587–8.

9-Olsen HS, Falholt P. *The role of enzymes in modern detergency*. J Surfactants Deterg. 1998; 44(1):555-567.

10-Neumann B, Pospiech A, Schairrer HU. *Rapid isolation of genomic DNA from Gram-negative bacteria.* Trends Genet. 1992; 8(10): 332–3.

11-Cataldo MA, Taglietti F, Petrosillo N. *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus: a community health threat*. Postgrad Med. 2010;122(6) :16-23.

12--Dulon M, Haamann F, Peters C, Schablon A, Nienhaus A. *MRSA prevalence in european healthcare settings: a review*. BMC Infect Dis. 2011 ;11:138.

13-Mathews AA, Thomas M, Appalaraju B, Jayalakshmi J. *Evaluation and comparison of tests to detect methicillin resistant S. aureus*. Indian J Pathol Microbiol. 2010;53(1):79-82.

14-Nasiri H, Forouzandeh M, 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(6): 229–32.

15-www.protocole-online.org, Microbiology Category, Bacteria, DNA Extraction from Gram-positive Bacteria (NWFSC)

16-Kumar OS, Sharma MK, Singh D. *DNA isolation from goat blood using different brands of household detergents and its downstream application*. Indian J Exp Biol. 2006; 44(10):852-4.

17-Pusch C. *A simple and fast procedure for high quality DNA isolation from gels using laundry detergent and inverted columns*. Electrophoresis. 1997; 18(7): 1103–4.

18-Bajpai D, Tyagi VK. *Laundry detergents: an overview*. J Oleo Sci. 2007; 56(7):327-40.

Archive of SID

www.SID.ir