Archive of SID

فصلنامه

دانش میکروب شناسی

سال دوم، شماره ۶، بهار ۱۳۸۹

بررسی کارآیی سه بافر لیزکننده مختلف جهت تخلیص DNA باکتری لپتوسپیرا

سهیلا مرادی بیدهندی[۱]، رها عاشورزاده[۲] و پژواک خاکی*[۱]

۱ . بخش میکروبیولوژی، موسسه تحقیقاتی واکسن و سرم سازی رازی، کرج، حصارک ۲ . گروه میکروبیولوژی دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال،

* نویسنده مسئول: پژواک خاکی، آزمایشگاه رفرانس لپتوسپیرا، بخش میکروبشناسی، موسسه تحقیقاتی واکسن و سرم سازی رازی، کرج، حصارک

khakipejvak@yahoo.com

چکیده

لپتوسپیروز بیماری مشترک بین انسان و حیوان می باشد که در مناطق گرمسیری و نیمه گرمسیری شایع است و توسط سروارهای بیماریزای لپتوسپیرا ایجاد می شود. با توجه به اینکه کشت و رشد این باکتری وقت گیر است روش های ملکولی از جمله PCR روش مناسبی برای تشخیص سریع این بیماری می باشد. هدف از این تحقیق به دست آوردن بهترین بافر لیزکننده جهت تخلیص DNA باکتری لپتوسپیرا است. بدین منظور از باکتری لپتوسپیرا بر روی محیط کشت اختصاصی EMJH کشت داده شد و رسوب حاصل جمع آوری گردید. سپس از ۳ بافر لیزکننده Lep2,Lep1 و Lep3 بطور جداگانه استفاده شد و سپس مراحل تخلیص با استفاده از فنل- کلروفرم- ایزوآمیل الکل انجام شد. نتایج به دست آمده با استفاده از نانودراپ و الکتروفورز ژل آگارز نشان داد که بهترین کیفیت DNA جهت انجام آزمایش PCR مربوط به بافر لیزکننده Lep1 بوده است. همچنین نتایجPCR با DNA های تخلیص شده حاکی از بهتر بودن بافر لیزکننده Lep1 است.

واژگان کلیدی: لپتوسپیرا، لپتوسپیروز، بافر لیزکننده ، استخراج DNA

مقدمه

باکتری لپتوسپیرا عامل بیماری لپتوسپیروز است. آلودگی انسان از طریق تماس با آب و خاک حاوی ادرار، خون جوندگان عفونی و یا سایر حیوانات صورت می گیرد. این بیماری با انتشار جغرافیایی وسیع در سطح دنیا نه تنها در کشورهای جهان سوم مسئله مهمی است ،بلکه در کشورهای پیشرفته نیز این بیماری مورد توجه است. سازمان بهداشت جهانی (WHO) این بیماری را دومین بیماری قابل انتقال از دام به انسان گزارش کرده است . لپتوسپیرا دارای میزبان های متعددی است که از آن جمله میتوان جوندگان وحشی و حیوانات اهلی مانند گاو، اسب، گوسفند، بز، سگ و انسان را نام برد. این بیماری در مناطقی که دارای زمینهای قلیایی با آبهای سطحی فراوان هستند بیشتر بروز می کند و همچنین در مناطقی که دارای آب وهوای گرم و مرطوب هستند بیشتر شایع است. جوندگان وحشی در انتقال و انتشار این بیماری نقش مهمی دارند(۱). با توجه به زئونوز بودن این باکتری و به دلیل این که درمان فقط در روز های اول بیماری موثر است، و از آنجاییکه جداسازی این باکتری از نمونه های بالینی احتیاج به زمان زیادی دارد بنابراین تشخیص درست و سریع لپتوسپیروز حائز اهمیت می باشد. به دلیل رشد کند باکتری و نبود آنتی بادی های اختصاصی در هفته اول بیماری، تست های سرولوژیک روش مناسبی برای تشخیص زودرس بیماری نمی باشند(۱). همین امر موجب گردیده تا روش های دیگری مانند Polymerase Chain Reaction, PCR به دلیل حساسیت و دقت بالای آن کاندید مناسبی برای این منظور محسوب گردد. لذا جهت انجام PCR ابتدا باید DNA باکتری تخلیص

www.SID.ir

Archive of SID

گردد. برای این منظور باید از بافر لیزکننده استفاده نمود.تاکنون جهت تخلیصDNA این باکتری از بافرهای لیزکننده با مواد مختلف و مقادیر متفاوت استفاده شده است که هرکدام نتایجی را در برداشته است. (۲، ۳،۴،۵)

در تحقیق حاضر از ۳ بافر لیزکننده با ترکیبات مختلف استفاده گردید و هدف از انجام این تحقیق بدست آوردن بافر لیزکننده مناسب و استفاده از آن در تخلیصDNA باکتری لپتوسپیرا بوده است.

مواد و روش ها

باکتری

در این تحقیق از سروار پاتوژن *Leptospira interrogans serovar hardjo* موجود در بانک میکروبی آزمایشگاه ملی لپتوسپیرای بخش میکروبشناسی موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی استفاده شد.

کشت

از باکتری‌های فوق بر روی محیط کشت اختصاصی EMJH (دیفکو-آمریکا) حاوی سرم خرگوش و مکمل‌های غذائی کشت داده شد . محیط های کشت داده شده در دمای ۲۸ درجه سانتیگراد قرار داده شدند و بعد از ۷-۱۰ روز جهت مشاهده رشد و تراکم باکتری با میکروسکوپ دارک فیلد مورد بررسی قرار گرفتند (۶).

بافر لیزکننده

در این تحقیق ۳ بافر مختلف لیزکننده جدید به نام هایLep1 ، Lep2 و Lep3 ساخته شد که ترکیبات آنها در جدول شماره ۱ آورده شده است.

جدول ۱. ترکیبات مختلف بافر لیز کننده مورد استفاده در تخلیص DNA لپتوسپیرا

بافر لیزکننده	ترکیبات
Lep1	EDTA(50mM), Tris(50mM), SDS(10%), NaCl(10000µM)
Lep2	EDTA(0/5M), Tris(1M), , SDS(10%), Glucose(50mM)
Lep3	EDTA(20mM), Tris(10mM), SDS(10%), NaOH(10N)

تخلیص DNA

جهت استخراج و تخلیص DNA محیط کشت حاوی لپتوسپیرا در دور ۱۳۰۰۰ دوردر دقیقه، بمدت ۲۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتیگراد سانتریفوژ شده و سپس رسوب حاصل یکبار با PBS شستشو داده شد. به رسوب شسته شده مقدار ۵۰۰ میکرولیتر از بافر لیزکننده های Lep1، Lep2 و Lep3 بطور جداگانه اضافه گردید و نمونه ها به مدت ۱۰ دقیقه در حرارت ۸۵ درجه سانتیگراد قرار داده شدند. سپس بقیه مراحل بصورت یکسان بر روی آنها انجام گردید بطوریکه بعد از رسیدن دمای آنها به دمای محیط، مقدار ۱۰ میکرولیتر پروتئیناز K(۱۰میلی گرم در میلی لیتر) و ۵ میکرولیتر RNase (۱۰ میلی گرم در میلی لیتر) به آنها اضافه شد و به مدت یک ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه سانتیگراد قرار داده شدند. پس از این مرحله بمقدار هم حجم آنها فنل-کلروفرم- ایزوآمیل الکل(۱:۲۴:۲۵) اضافه و بمدت ۱۵ دقیقه در یخ گذاشته شدند و در دور۱۳۰۰۰ بمدت ۲۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتیگراد عمل سانتریفوژ انجام شد. سپس فاز رویی را جدا کرده و به آنها کلروفرم خالص اضافه گردید و در دور ۱۳۰۰۰بمدت ۲۰ دقیقه سانتریفوژ گردیدند و سپس فاز رویی آنها جدا شد. در این مرحله یک میلی لیتر ایزوپروپانول به آنها اضافه و وجود رشته های DNA مشاهده شدند. سپس نمونه ها در دور ۱۳۰۰۰بمدت ۱۰ دقیقه و در دمای ۴ درجه سانتیگراد سانتریفوژ و بعد از آن اتانول ٪۷۰ به نمونه ها اضافه و بعد از حل کردن رسوب مجددا مورد سانتریفوژ واقع شدند. در نهایت DNA رسوب یافته در ۳۰میکرولیتر بافر TE (pH معادل ۸) حل گردید (۷).

بررسی کمیت و کیفیت DNA تخلیص شده

جهت بررسی کیفیت DNA استخراج شده توسط بافرهای لیز کننده فوق مقدار جذب محلول DNA در طول موج های ۲۶۰و ۲۸۰ نانومتر توسط اسپکتروفتومتر نانودراپ اندازه گیری و نسبت جذب ۲۸۰/۲۶۰ محاسبه شد. میزان این نسبت باید۱/۸ باشد. همچنین الکتروفورز با ژل ٪۱ و رنگ آمیزی اتیدیوم بروماید نیز انجام شد. کمیت DNA استخراج شده توسط بافرهای لیز کننده فوق با استفاده از جذب نوری در طول موج ۲۶۰ نانومتر انجام شد. میزان جذب ۱ در این طول موج تقریبا معادل ۵۰ میکروگرم در میلی لیتر از DNA دو رشته ای می باشد (۷).

www.SID.ir

Archive of SID

PCR

جهت بررسی DNA های استخراج شده توسط بافرهای لیزکننده فوق با استفاده از پرایمر طراحی شده اختصاصی ژن 16SrRNA برای لپتوسپیراهای پاتوژن با توالی:

LP F: 5-ACC ATg CAg CAC CTg TgA Ag-3و
LP R: 5-TgC AAg TCA AgC ggA gTA gC-3، PCR با مواد و مقادیر: آب مقطر۲ بار تقطیر ۷/۱۴میکرولیتر، بافر ۱۰X ۵/۲میکرولیتر، $MgCl_2$ ۸/۰ میکرولیتر، dNTP ۵/۰ میکرولیتر، پرایمرF ۱ میکرولیتر، پرایمرR ۱ میکرولیتر، آنزیم Taq ۵/۰ میکرولیتر و DNA الگو ۴ میکرولیتر انجام گردید و محصول PCR با الکتروفورز آگارز (۱٪) و رنگ آمیزی اتیدیوم بروماید مورد بررسی قرار گرفت.

نتایج و بحث

تخلیص DNA:

نتایج بدست آمده از نانودراپ DNA تخلیص شده با بافرهای لیز کننده نشان داد که مقدار DNA بدست آمده با بافر لیزکننده Lep1 دارای بیشترین مقـدار بوده است. مقدار DNA بدســت آمده با بافر Lep1 ۲۹۶۵ نانوگرم در میکرولیتـر و مـیزان نسبت جذب ۲۸۰/۲۶۰ آن ۸۹/۱ بود. در حالیکه مقدار DNA بدست آمده با بافرهای Lep2 و Lep3 به ترتیب ۲۰۱۲ و ۱۲۵۴ نانوگرم در میکرولیتر بود. و همچنین میزان نسبت جذب ۲۸۰/۲۶۰ آن بافر ها به ترتیب ۱۹/۲ و ۶۵/۱ بدست آمد (جدول۲). در الکتروفورز DNA تخلیص شده با بافر Lep1 باند با وضوح بیشتری نسبت به ۲ بافر دیگر بدست آمد (شکل ۱).

شکل ۱. نتایج الکتروفورز ژل آگارز از DNA های استخراج شده با ۳ بافر لیزکننده Lep1،Lep2و Lep3

جدول۲. نتایج حاصل از ۳ بافر لیزکننده Lep2,Lep1 و Lep3

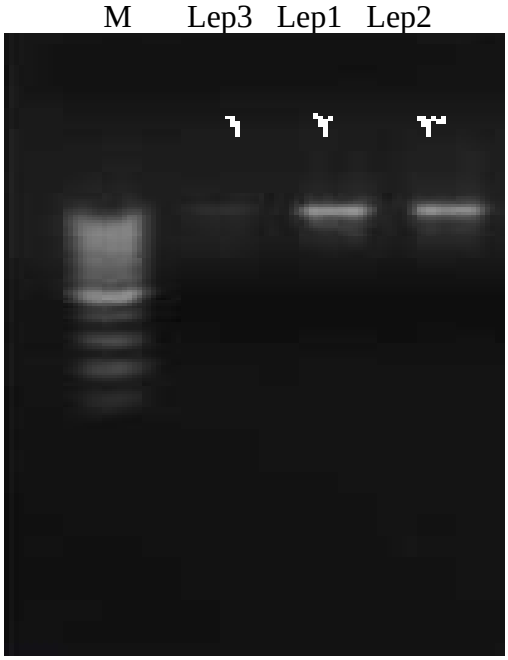
نام بافر	مقدارDNA استخراج شده (نانوگرم در میکرولیتر)	مقدار جذب در طول موج ۲۶۰nm	مقدار جذب در طول موج ۲۸۰nm	نسبت جذب ۲۸۰/۲۶۰
Lep 1	۲۹۶۵	۲۹۹/۶۷	۶۸۳/۳۵	۸۹/۱
Lep 2	۲۰۱۲	۱۰۸/۲۹	۲۹۴/۱۳	۱۹/۲
Lep 3	۱۲۵۴	۲۱۷/۱۱	۴۷۸/۷	۵/۱

www.SID.ir

Archive of SID

PCR

با توجه به اینکه بالاترین مقدار DNA بدست آمده با استفاده از بافر Lep1 نسبت به ۲ بافر دیگر بدست آمد، PCR نیز جهت تایید نتیجه نهایی انجام شد. نتایج ژل الکتروفورز حاصل از PCR سه DNA تخلیص شده با بافرهای لیزکننده Lep2,Lep1 و Lep3 در شکل شماره ۲ نشان داده شده است. همانطور که در ژل مشاهده می شود اگرچه محصول PCR در DNA تخلیص شده با هر ۲ بافر لیزکننده دارای باند است ،اما باند مربوط به بافرLep1 از دو بافر دیگر مشخص تر می باشد.



شکل ۲. نتایج PCR با ۳ بافر لیزکننده Lep2,Lep1 وLep3

M = مارکر DNA (100 bp)، ۱= بافر لیزکننده Lep3، ۲= بافر لیزکننده Lep1 ، ۳= بافر لیزکننده Lep2

لپتوسپیروز بیماری عفونی است که به دلیل زئونوز بودن خطری جدی برای بهداشت عمومی محسوب می شود. با توجه به این که تشخیص سریع و صحیح لپتوسپیرا در نمونه های بالینی از نظر سلامت جامعه و جلوگیری از عوارض گسترده آن حائز اهمیت است، بنابراین روش های تشخیصی سریع مانند PCR می تواند مورد استفاده قرار گیرد که در این روش تخلیص صحیح DNA و با کیفیت بالا در نمونه های بالینی می تواند کمک شایانی به امر تشخیص نماید. در تحقیق حاضر مقدار DNA تخلیص شده با استفاده از ۳ بافر لیزکننده نشان داد که بافر لیزکنندهLep1 (جدول ۱۱) نسبت به دو بافر دیگر از نظر مقدار نتایج بهتری را نشان داد.

Vaneys و همکاران در سال ۱۹۸۷، جهت تخلیص DNA لپتوسپیرا انتروگانس سروار هارجو، از بافر لیزکننده حاوی (۵۰ mM)Tris-HCl، (۱۰ mM) EDTAو (۵۰ mM)NaCl استفاده نمودند. سپس جهت لیز نهایی از ۵%SDS و پروتئیناز K (۲۰µg/ml) استفاده کردند و نتایج خوبی بدست آمد(۵). در تحقیق حاضر از بافر با ترکیب زیر (۱۰٪) SDS EDTA(50mM), Tris(50mM), و (۱۰۰۰۰µM) NaCl استفاده گردید که در مقادیر NaCl,SDS و EDTA با یکدیگر تفاوت داشتند. همچنین پروتئیناز K مورد استفاده ۱۰ میکروگرم در میلی لیتر بود. در تحقیقات صورت گرفته توسط Gravekamp و همکاران در سال ۱۹۹۳ بر روی لپتوسپیرا از بافر لیزکننده حاوی GuSCN، (۰/۱ M) Tris-HCl، (۰/۲ M)EDTA و Triton X-100 استفاده شد. آنها در PCR نتایج خوبی را بدست آوردند (۸). در بافر فوق GuSCN و Triton X-100 استفاده شده است که با بافر مورد استفاده در این تحقیق متفاوت است. همچنین در بافر لیزکننده آنها SDS بکار نرفته است که با بافر لیزکننده در تحقیق حاضر متفاوت می باشد.

Genelhu و همکاران در سال ۱۹۹۸ جهت استخراج DNA لپتوسپیراهای موجود در آب با استفاده از فنل - کلروفرم - ایزوآمیل الکل از بافر لیز کننده حاوی (۵۰ mM)Tris، (۵۰ mM) EDTA ، (۱۰۰ mM) NaCl و (۱%) SDS استفاده نمودند. آنها همچنین از آنزیم پروتئیناز گیاهی E۳۸۷۰ به جای آنزیم پروتئیناز K استفاده کردند (۹). در تحقیق حاضر مقادیر بکار رفته در تهیه بافر لیز کننده با مقادیر بافر آنها تفاوت داشت.

Verma و همکاران در سال ۲۰۰۵ در تحقیقاتشان بر روی لپتوسپیرا از بافر لیزکننده حاوی (۵۰ mM) Tris-HCl، (۱۰۰ mM) NaCl و (۰/۲٪)SDS و (۲ mM)EDTA استفاده کردند (۱۰) و نتایج خوبی را بدست آوردند که اگرچه مواد بکار رفته شده در تهیه بافر

www.SID.ir

Archive of SID

لیزکننده تحقیق آنها با تحقیق حاضر یکی بود ولی از نظر مقدار با یکدیگر تفاوت داشت.

Sugathan و همکاران در سال ۲۰۰۵ با کار بـر روی لپتوسـپیرا از دو گـروه بـافر لیزکننـده (Tris-HCl (۱۰ mM، KCl (۱۰mM) و EDTA(۲ mM) (۱۰ mM) $MgCl_2$ و دیگـری (Tris-HCl(۱۰ mM، (۱۰ KCl، EDTA (۲ mM)، $MgCl_2$(۱۰ mM) و NaCl (۰/۴ mM) جهت تحقیقاتشان استفاده نمودند که نتایج خوبی را بدست آوردند(۴) . آنها در ترکیب بافرشـان از کلرور پتاسیم و کلرور منیزیم نیز استفاده کردند کـه در بافر بکار رفته در این تحقیق وجود نداشت.

Murgia و همکاران در سال ۲۰۰۶جهت انجام تحقیقاتشان لپتوسپیرا را توسط بافر لیزکننده حاوی Tris-EDTA (۵۰ mM) و NaCl (۱ M) لیز نمودند. نتایج بدست آمده در استفاده از این بافر خوب بود(۳). تفاوت این بافر با بافر استفاده شده در این تحقیق در مواد مورد استفاده و میزان آنها بود بطوریکه در این بافر SDS وجود نداشت و Tris-EDTA بکار رفته بود.

Atzingen و همکاران در سال ۲۰۰۷ باکتری لپتوسپیرا را توسط بافر لیزکننده حاوی (Tris-HCl (۲۰ mM، NaCl (۵۰۰ mM) و تریتون X-۱۰۰ لیز نمودند(۲). آنها از تریتون X-۱۰۰ استفاده کرده و بافرشان فاقد SDS بود.

Fenner و همکاران در سال ۲۰۱۰جهت آنالیز ترادف ۱۶SrDNA از سروارهای لپتوسپیرای پاتوژن از بافر لیز کننده حاوی (Tris-HCl(۱۰۰ mM، (۱۰۰ mM) EDTA، NaCl(۵۰ mM) و (۱۰٪) SDS استفاده نمودند(۱۱). بافر لیزکننده آنها در مقادیر دو ماده EDTA و Tris-HCl با بافر بکار رفته در این تحقیق تفاوت داشت

Zakeri و همکاران در سال ۲۰۱۰ به منظور شناسایی لپتوسپیرای L. wolffii که در انسان، دام و سگ ایجاد بیماری می‌کند، سلول باکتری را توسط بافر لیزکننده حاوی (Tris-HCl (۱۰ mM و (۰/۱ mM) EDTA لیز نمودند(۱۲). این بافر علاوه بر اینکه در مقادیر مواد مورد استفاده شده تفاوت داشت بلکه دو ماده SDS و NaCl نیز در بافرشان بکار نبرده بودند.

بر اساس نتایج به دست آمده در این تحقیق از ۳ بافر لیزکننده مورد بررسی بافر لیزکننده Lep1 دارای نتیجه بهتری از نظر مقدار بدست آمده در استخراج و تخلیص DNA لپتوسپیرا نسبت به ۲ بافر لیزکننده دیگر بود. اگرچه نتایج PCR حاکی از عملکرد خوب هر ۳ بافر لیزکننده مورد استفاده بوده است اما کمیت وکیفیت DNA بدست آمده از بافر لیزکننده Lep1 در لیز کامل سلولی از ۲ بافر لیزکننده دیگر بهتر بوده است و این نتایج حاکی از آن است که می توان از این بافر در تخلیص DNA باکتری لپتوسپیرا جهت انجام تشخیص آن با استفاده از PCR استفاده نمود.

منابع

1. Levett P, (2001). Leptospirosis. *Clinical Microbiology Reviews*, **14**: 296-326.
2. Atzingen.M, Barbosa.A, De Brito.T, Vasconcellos.S, Morais.Z, MC Lima.D, AE Abreu.P, Nascimento.A,2007. Lsa21, a novel leptospiral protein binding adhesive matrix molecules and present during human infection. *BMC Microbiol*, **8**:70.Murgia.R, Riquelme.N, Baranton.G, Cinco.M, (2006). Oligonucleotides specific for pathogenic and saprophytic leptospira occurring in water. *FEMS Microbiology Letters*, **148**: 27-34.
3. Sugathan.S, Varghese.T, (2004). Multiplex PCR on Leptospiral Isolates from Kolenchery, Kerala, India. *Indian Journal of Medical Microbiology*, **23**: 114-116.
4. Vaneys.G, Graveka.C, Gerritsen.M, Quint.W, Cornelissen.M, Tee Schegget.M, Terpstra.W, (1989). Detection of Leptospires in Urine by Polymerase Chain Reaction. *Journal of Clinical Microbiology*, **27**: 2258-2262.
5. Faine. S. (1999). Leptospira and leptospirosis. 2nd ed. Melbourne: Medisci,. 272p.
6. Sambrook. J, Fritsch. E.F, Maniatis. T, (1989). Molecular cloning: a laboratory manual. New York, Cold Spring Harbor Press, 957p.

www.SID.ir

Archive of SID

7. Gravekamp. C, Van de Kemp.H, Franzen.M, Carrington. D, Schoone. G, Van Eys.G, Everard.C, Hartskeerl. R, Terpstra.W, (1993). Detection of seven species of pathogenic leptospires by PCR using two sets of primers. *J Gen Microbiol*, **139**:1691-700.
8. Genelhu.M, Zanini.M, Veloso.I, Carneiro.A, Lopes.M, Salas.C, (1998). Use of a cysteine proteinase from Carica candamarcensis as a protective agent during DNA extraction. *Braz J Med Biol Res*, **31**: 1129-1132.
9. Verma.A, Artiushin.S, Matsunaga.J, Haake.D, John F. Timoney.J, (2005). LruA and LruB, Novel Lipoproteins of Pathogenic Leptospira interrogans Associated with Equine Recurrent Uveitis. *Infection and Immunity*, November, **73**: 7259-7266.
10. Fenner.J, Anjum.M, Randall.L, Pritchard.G, Wua.G, Errington.J, Dalley.C, Woodward.M, (2010). Analysis of 16S rDNA sequences from pathogenic Leptospira serovars. *Research in Veterinary Science*. **89**: 48–57.
11. Zakeri.S, Khorami.N,. Ganji.F, Sepahian.N, Malmasi.A, Gouya.M, D. Djadid.N, (2010). Leptospira wolffii, a potential new pathogenic Leptospira species detected in human, sheep and dog. *Infection, Genetics and Evolution*, **10**: 273–277.

www.SID.ir