تازه‌های بیوتکنولوژی سلولی – ملکولی

دوره پنجم، شماره هفدهم، زمستان ۱۳۹۳

NCMBJ
Research Article
مقاله تحقیقی

معرفی یک روش جهت استخراج DNA از اکتینومایست‌های هوازی

شادی حبیب نیا[۱]، معصومه رسولی نسب[۱]، پروین حیدریه[۲]، مهدی فتاحی بافقی[۳]، سید سعید اشراقی[۴]*

۱. کارشناسی ارشد میکروب‌شناسی پزشکی، گروه پاتوبیولوژی، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی تهران

۲. استاد یار میکروب‌شناسی گروه میکروب‌شناسی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی البرز

۳. دانشگاه علوم پزشکی تهران–دانشکده بهداشت–گروه پاتوبیولوژی- بخش باکتری‌شناسی- دانشجوی دکتری باکتری‌شناسی

۴. دانشیار میکروب‌شناسی، گروه پاتوبیولوژی، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی تهران

چکیده

سابقه و هدف: استخراج DNA از اکتینومیست‌های هوازی به دلیل پیچیدگی ساختمان دیواره سلولی آنها با روش‌های روتین برای استخراج DNA متفاوت است. در این مطالعه از روش جوشاندن به همراه محلول STET buffer برای استخراج DNA از این باکتری‌ها استفاده گردید.

مواد و روش‌ها: با استفاده از محلول STET buffer، ژنوم میکروارگانیسم‌ها استخراج گردید. کیفیت و کمیت DNA استخراج شده، با استفاده از اسپکتروفوتومتر و الکتروفورز بر روی ژل آگارز مورد ارزیابی قرار گرفت.

یافته‌ها: نتایج به‌دست‌آمده از OD و الکتروفورز بر روی ژل آگارز، نشان‌دهنده کیفیت مناسب DNA استخراج شده جهت انجام کارهای مولکولی بود.

نتیجه‌گیری: ارزانی، آسانی، سریع بودن و داشتن DNA ژنومی خوب از مزیت‌های این روش می‌باشد.

کلمات کلیدی: اکتینومایست، استخراج DNA، STET buffer

مقدمه

اکتینومیست‌های هوازی گروهی از ارگانیسم‌های گرم مثبت، شاخه‌ای بوده که از نظر مورفولوژی مشابه قارچ‌ها می‌باشند. آنها بخشی از فلور میکروبی در بیشتر بسترهای طبیعی هستند که بواسطه آنزیم‌های تجزیه کننده خاص مواد آلی در اکوسیستم‌های خاکی حضور دارد. این باکتری‌ها بر اساس آنالیز دیواره سلولی از نظر حضور دی آمینوپایملیک اسید[1] و قندهای مشخص گروه‌بندی می‌شوند (۱۴،۵). علاوه بر این، حضور و طول زنجیره اسیدهای مایکولیک برای طبقه‌بندی این خانواده مفید است. این باکتری‌ها می‌توانند باعث ایجاد عفونت‌های خطرناک و کشنده‌ای در افراد سالم و نقص سیستم ایمنی می‌شود که از آن جمله می‌توان به عفونت‌های تنفسی، مغزی، منتشره، جلدی و زیر جلدی اشاره کرد. جداسازی و شناسایی اکتینومیست‌های هوازی مانند: نوکاردیا[2]، گوردونه[3]،

*نویسنده مسئول: دکتر سید سعید اشراقی

پست الکترونیکی: eshraghs@tums.ac.ir

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۲/۰۴/۱۲

تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۹۲/۰۹/۱۶

[1] Di-Aminopimelic

[2] *Nocardia*

[3] *Gordonia*

www.SID.ir

رودوکوکوس[۴]، استرپتومایسس[۵]، تسوکامورلا[۶]، و اکتینومادورا[۷] در آزمایشگاه‌ها دارای اهمیت است (۱۰،۴). از دلایل مهم شناسایی این عفونت‌ها می‌توان به شیوع بالای آنها در جهان در اثر افزایش مصرف داروهای کورتیکواستروئید و بیماری‌های نقص سیستم ایمنی اشاره نمود. در تشخیص عفونت‌های ناشی از این جنس ها، علاوه بر روش‌های فنوتیپی از روش‌های مولکولی نیز برای تشخیص جنس و گونه اکتینومایست‌ها استفاده می‌گردد (۶،۳). امروزه در تشخیص سریع و دقیق، استفاده از روش‌های مولکولی حائز اهمیت می‌باشد که مستلزم استخراج DNA از باکتری است. استخراج DNA در همه آزمایشگاه‌های مولکولی و میکروبی خصوصا آزمایشگاه‌هایی که بر روی اکتینومایست‌ها مطالعه می‌کنند، به دلیل دارا بودن دیواره سلولی پیچیده، از اهمیت بسیار بالایی برخوردار است. استخراج DNA از این باکتری‌ها نسبت به سایر باکتری‌ها به خصوص گرم منفی‌ها که با روش‌های روتین معمول انجام می‌گیرد، متفاوت می‌باشد. تا کنون روش‌های مختلفی برای استخراج DNA معرفی شده است که اغلب این روش‌ها پر هزینه و وقت‌گیر هستند (۹،۲). بنابراین نیاز به یک تکنیک سریع و ساده جهت جداسازی ژنوم این میکروارگانیسم‌ها ضروری به نظر می‌رسد لذا در این مطالعه برای استخراج DNA ، از محلول STET buffer استفاده گردیده است.

روش کار

۱۰۰ ایزوله اکتینومایست هوازی که از نمونه‌های خاک توسط روش‌های Paraffin Bait و کشت در محیط هیومیک اسید ویتامین B آگار[۸] بدست آمده بود، مورد بررسی قرار گرفت (۱۳،۱۲،۸). برای استخراج ژنوم بعد از کشت خالص باکتری بر روی محیط نوترینت آگار، یک لوپ از کلنی را در محیط Tryptic Soy Broth تلقیح نموده و در دمای ۳۷ درجه سانتی-گراد به مدت ۸-۷ روز انکوبه گردید. بعد از طی دوره انکوباسیون، محیط مایع حاوی باکتری در دور rpm ۱۰۰۰۰ به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ شد. بعد از دور ریختن محلول رویی، ۲۰۰ ماکرولیتر آب دیونیزه استریل به رسوب حاصل اضافه و در دور ۱۰۰۰۰ به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ گردید. در ادامه مجدداً مایع رویی را دور ریخته و مقدار ۲۰۰ ماکرولیتر از محلول STET buffer (روش تهیه آن در جدول شماره ۱ آمده است) را به آن اضافه کرده و ورتکس نموده تا یک سوسپانسیون کاملا یکنواخت حاصل گردد. در ادامه نمونه به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد جوشانده شد. سوسپانیون حاصل را به مدت ۱۰ دقیقه در دور ۱۰۰۰۰ سانتریفیوژ کرده و محلول رویی به میکروتیوب دیگر منتقل و ۳ برابر حجم آن، اتانل سرد ۹۶ درجه اضافه گردید و در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد به مدت ۶۰ دقیقه قرار داده شد. در ادامه آن را به مدت ۱۰ دقیقه در دور ۱۰۰۰۰ سانتریفیوژ نموده و محلول رویی را دور ریخته و تا خشک شدن الکل، در دمای آزمایشگاه قرار داده شد. در ادامه ۵۰ میکرولیتر آب دیونیزه استریل به هر میکروتیوب اضافه گردید. سپس جهت مشاهده کمیت DNA استخراج شده، مقدار ۵ میکرولیتر از آن، در ژل آگارز ۱ درصد الکتروفورز شد و در محلول اتیدیوم بروماید رنگ‌آمیزی گردید. برای تأیید کیفیت DNA استخراج شده، ۵ میکرولیتراز نمونه را با ۴۹۵ میکرولیتر آب مقطر مخلوط کرده و OD (Optimal density) آن با دستگاه اسپکتروفوتومتر در طول موج ۲۶۰ و۲۸۰ نانومترطبق فرمول زیر مورد بررسی قرار گرفت. طول موج اول OD ناشی از پروتئین و طول موج دوم OD ناشی از DNA را نشان می‌دهد. OD ناشی از پروتئین نشان از وجود ناخالصی در DNA می‌باشد. و هر چقدر میزان OD۲۶۰/OD۲۸۰ به ۱/۸ نزدیک‌تر باشد نشان از خلوص بیشتر DNA است (۲).

$$OD=\frac{260}{280}=1.8\sim 2$$

سپس DNA استخراج شده تا انجام بررسی‌های مولکولی در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد ذخیره گردید.

جدول ۱- طرز تهیه محلول STET buffer

مواد لازم	مقدار
Triton X100 (%5 (v/v))	5 cc
Tris- Hcl (10mM)	1.57 g
EDTA (1 Mm)	0.036 g
NaCl (0.1 M)	0.58g
DW	100ml
STET buffer pH=8	

بحث

با توجه به هزینه‌بر و وقت‌گیر بودن روش‌های آنزیماتیک (مانند لیزوزیم و پروتئیناز K) به منظور استخراج DNA، معرفی یک روش ساده، ارزان، سریع و حساس ضروری به نظر می‌رسد. گزارشات منتشر شده در منابع معتبر علمی، استخراج DNA از

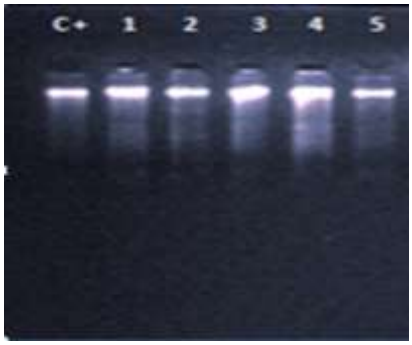
[4] *Rhodococcus*
[5] *Streptomyces*
[6] *Tsukamurella*
[7] *Actinomadura*
[8] Humic Acid-Vitamin B Agar

Archive of SID
www.SID.ir

باکتری‌هایی مانند کلستریدیوم پرفرنجنس، لیستریا منوسیتوژنز و لاکتو باسیلوس با استفاده از محلول STET buffer گزارش گردیده است (۱۱،۷،۱). همچنین در مطالعه انجام شده توسط فتاحی بافقی و همکاران، DNA استخراج شده از جنس نوکاردیا توسط این روش برای آزمون‌های مولکولی (تکثیر قطعه ژن های 16S rRNA و *hsp65*) از کیفیت بالایی برخوردار بود (۲). در مطالعه‌ای دیگر Andrew و همکاران با روش جوشاندن و TE buffer (مشابه STET buffer)، برای استخراج DNA اکتینومایست‌ها جهت انجام PCR- RFLP استفاده گردید (۶). در مطالعه کنونی برای سایر باکتری‌های خانواده اکتینومایست‌ها از جمله استرپتومایسس، رودوکوکوس و گوردونه کیفیت و کمیت DNA استخراج شده بر روی ژل آگارز مناسب به نظر می‌رسد که همچنین روش مورد بررسی ساده، ارزان و سریع برای استخراج DNA می‌باشد.

نتیجه‌گیری

در تصویر ۱، باندهای DNA های استخراج شده، روی ژل آگارز ۱ درصد مشخص شده است. ژنوم‌های استخراج شده دارای OD بین ۱/۸ تا ۲ بودند که کیفیت مناسب را تأئید نمودند.



تصویر ۱- استخراج DNA ایزوله‌های اکتینومایست شماره ۱ تا ۵کنترل مثبت (C^+): نوکاردیا آستروئیدس

سپاسگزاری

نویسندگان مایلند مراتب قدردانی خود را از آزمایشگاه اکتینومایست گروه میکروب‌شناسی پزشکی دانشکده بهداشت دانشگاه علوم پزشکی تهران به جهت حمایت‌های تکنیکی ابراز دارند.

منابع

1. Amagliani G, Omiccioli E, Campo A, Bruce IJ, Brandi G, Magnani M. Development of a magnetic capture hybridization-PCR assay for Listeria monocytogenes direct detection in milk samples. J Appl Microbiol ،2006; 100(2): 375-83.
2. Bafghi MF, Eshraghi SS, Heidarieh P, Habibnia S, Nasab MR. DNA extraction from nocardia species for special genes analysis using PCR. N Am J Med Sci, 2014; 6(5): 231-33.
3. Bafghi MF, Heidarieh P, Habibnia S, Rasouli-Nasab M, Kalantar Neyestanaki D, Afshar D, Eshraghi SS. Phenotypic and molecular properties of the Nocardia Species. Avecinna J Clin Microb Infect, 2014; 1(1): e19215.
4. Berd D. Laboratory identification of clinically important aerobic actinomycetes. Appl Microbiol, 1973; 25(4): 665-681.
5. Brown-Elliott BA, Brown JM, Conville PS, Wallace RJ, Jr. Clinical and laboratory features of the Nocardia spp. based on current molecular taxonomy. Clin Microbiol Rev, 2006; 19(2): 259-82.
6. Cook AE, Meyers PR. Rapid identification of filamentous actinomycetes to the genus level using genus-specific 16S rRNA gene restriction fragment patterns. Int J Syst Evol Microbiol, 2003; 53(6): 1907-15.
7. Gevers D, Huys G, Swings J.Applicability of rep-PCR fingerprinting for identification of Lactobacillus species. FEMS Microbiol Lett, 2001; 205(1): 31-6.
8. Habibnia S, Rasouli-Nasab M, Heidarieh P, Bafghi MF, Pourmand M, Eshraghi S. accepted. Phenotypic characterization of Nocardia spp. isolated from Iran soil microflora. International Journal of Environmental Health Engineering.
9. Laurent FJ, Provost F, Boiron P. Rapid identification of clinically relevant Nocardia species to genus level by 16S rRNA gene PCR. J Clin Microbiol, 1999; 37(1): 99-102.
10. Lesens O, Hansmann Y, Riegel P, Heller R, Benaissa-Djellouli M, Martinot M, Petit H, Christmann D. Bacteremia and endocarditis caused by a Gordonia species in a patient with a central venous catheter. Emerg Infect Dis, 2000, 6(4): 382-385.
11. Paredes-Sabja D, Sarker MR. Effect of the cortex-lytic enzyme SleC from non-food-borne Clostridium perfringens on the germination properties of SleC-lacking spores of a food poisoning isolate. Can J Microbiol, 2010; 56(11): 952-8.

Archive of SID

www.SID.ir

12. Rasouli-nasab M, Habibnia S, Heidarieh P, Fatahi-Bafghi M, Pourmand MR, Eshraghi SS. Identification of Nocardia Species Isolated from Soil Samples of the City of Tehran, Iran, Using Phenotypic Tests. Journal of Isfahan Medical School, 2014; 3(265): 2081-2088. (Full text in Persian)

13. Rasouli nasab M, Habibnia S, Heidarieh P, Pourmand M, Fatahi M, Eshraghi S. Comparison of Paraffin Bait, Humic Acid Vitamin B Agar and Paraffin Agar Methods to Isolate Nocardia from Soil. Medical Laboratory Journal, 2014; 7(5): 29-36.(Full text in Persian)
14. Waksman SA, Henrici AT. The Nomenclature and Classification of the Actinomycetes. J Bacteriol, 1943; 46(4): 337-341.

Archive of SID

www.SID.ir