ارزیابی روش مناسب استخراج DNA کپک *Aspergillus niger* از رب گوجه فرنگی

رضا کاراژیان[۱]، محمد باقر حبیبی نجفی[۲*]، مسعود یاورمنش[۳]، محمدرضا عدالتیان[۳]، حمیدرضا پوریان فر[۴]

۱- دانشجوی دکترا. مهندسی کشاورزی- علوم و صنایع غذایی. گرایش میکروبیولوژی مواد غذایی. دانشگاه فردوسی مشهد
۲- استاد صنایع غذایی. دانشگاه فردوسی مشهد. دانشکده کشاورزی گروه علوم و صنایع غذایی
۳- استادیار صنایع غذایی. دانشگاه فردوسی مشهد. دانشکده کشاورزی گروه علوم و صنایع غذایی
٤- استادیار بیوتکنولوژی. جهاددانشگاهی مشهد. گروه پژوهشی زیست فناوری قارچ های صنعتی جهاددانشگاهی مشهد

(تاریخ دریافت: ۹۳/۹/۱۰ تاریخ پذیرش: ۹۳/۱۲/۱۰)

چکیده

در این تحقیق روش های استخراج DNA آسپرژیلوس نایجر از رب گوجه فرنگی بهینه سازی شده و با همدیگر مقایسه شده اند. به این منظور از روش های کلاسیک استخراج بهینه سازی شده و روش های مبتنی بر کیت تجاری استفاده شد. اسپور کپک آسپرژیلوس نایجر در غلظت های مختلف (10^{1}، 10^{3}، 10^{5} CFU/gr) به رب گوجه فرنگی اضافه شد و پس از رشد و ایجاد میسیلوم کپک استخراج DNA با پنج روش انجام شد.تفاوت روش های به کار گرفته شده بر اساس استفاده از نیتروژن مایع، اولتراسوند و محلول های لیز کننده دیواره سلولی بود. این روش ها از نقطه نظر کمیت و کیفیت DNA استخراج شده با استفاده از روش اسپکتروفتومتری با دستگاه نانودراپ مورد بررسی قرار گرفتند. همچنین با استفاده از الکتروفورز ژل DNA استخراج شده از لحاظ عدم مشاهده هاله و نبود آلودگی پروتئینی و جهت بررسی وجود ممانعت کننده های PCR در نمونه های DNA استخراج شده عملیات PCR با استفاده از پرایمرهای پیشرونده و پس رونده طراحی شده انجام شد. نتایج نانودراپ و الکتروفورز ژل DNA و نتایج PCR در ۵ روش موید این مطلب است که روش ۱ مناسب ترین روش برای استخراج DNA این کپک از رب گوجه فرنگی می باشد.

کلید واژگان: استخراج DNA، آسپرژیلوس نایجر، رب گوجه فرنگی

* مسئول مکاتبات: habibi@um.ac.ir

Archive of SID
www.SID.ir

۱- مقدمه

گوجه فرنگی سرشار از ویتامین C و لیکوپن است. این محصول امروزه به طور خام یا فراوری شده در رب گوجه فرنگی و انواع سس استفاده می‌شود و بخش مهمی از رژیم غذایی مردم بسیاری از کشورها را تشکیل می‌دهد. طبق آمار در سال ۲۰۰۸ حدود ۱۳۰ میلیون تن گوجه فرنگی در دنیا تولید شد و مصرف سرانه گوجه فرنگی در ایران ٤۹ کیلوگرم بود [۱].

کپک ها گروهی از میکروارگانیسم ها هستند که قادرند به خوبی بر روی گوجه فرنگی و فرآورده های آن رشد کنند و با تولید توکسین سلامت مصرف کننده را به خطر اندازند. فلور کپکی گوجه فرنگی شامل جنس های متعددی از کپک ها می باشد. اغلب گونه های کپکی همراه با ماده خام در اثر فرآیندهای اعمال شده طی فرآوری رب از بین می روند اما بعضی از کپک هایی که دارای آسکوسپورهای مقاوم به حرارت هستند می توانند در فراورده های حاصل از میوه ها و سبزیها ایجاد فساد کنند که از جمله مهم ترین آن ها جنس آسپرژیلوس می باشد [۱].

جنس آسپرژیلوس از کپک های میکروسکوپی دارای دیواره است که به عنوان یکی از کپک های مهم آلوده کننده مواد غذایی می باشد و به دلیل قدرت بالای رشد در مواد غذایی و نیز قدرت تولید توکسین های میکروبی (قارچی) به خصوص آفلاتوکسین ها در مواد غذایی از اهمیت فراوانی برخوردار است [۲].

در روش استاندارد ایران و دنیا تعیین آلودگی کپکی این محصول به روش هوارد انجام می شود این روش بر پایه روش شناسایی مستقیم میسیلیوم کپک است و به دلیل مشاهده چشمی کپک ها و ریسه آنها در زیر لام احتمال خطای آزمون کننده وجود دارد، دقت کمی دارد و دارای انحراف معیار ۱۵ درصد و بیشتر است [۳]. علاوه بر این به مهارت شخص آزمون کننده نیز بستگی دارد. به دلیل خطاهای متعددی طی تشخیص کپک، نتایج آزمون یک نمونه در آزمایشگاه های مختلف متفاوت می باشد و نتایج حاصله قابلیت تکرار پذیری ندارند [٤]. بنابراین تعیین یک روش استاندارد مبتنی بر روش های جدید مولکولی جهت تعیین دقیق میزان آلودگی کپکی این محصول لازم به نظر می رسد.

استخراج DNA از کپک های موجود در رب گوجه فرنگی و فرآورده های آن اولین گام در تبیین یک روش مولکولی جهت شناسایی و اندازه گیری میزان این کپک ها در فرآورده ها می باشد. که می تواند به عنوان روش کارآمد و مناسب جایگزین روش های استاندارد اندازه گیری کیفی و کمی حال حاضر بشود. روش های مولکولی تفاوت های DNA را در میان انواع متفاوت میکرومیست قابل تشخیص می کند. آزمون PCR یک روش معمول است که اغلب به این منظور مورد استفاده قرار می گیرد. اساس و پایه روش PCR وجود یک قالب DNA می باشد که ماده ژنتیکی میکروارگانیسم است. مشکل بسیار مهم یافتن روشی است که از دو جنبه سرعت و حساسیت با مقدار کم DNA از تعداد سلول های محدود بتواند عمل استخراج DNA را انجام بدهد [۲].

به دلیل وجود دیواره سلولی سخت کپک ها در مقایسه با باکتری ها شکستن و لیز کردن دیواره سلولی جهت خارج کردن محتویات داخل سلولی سخت تر بوده و زمان بر می باشد و بایستی از روش ها و مواد شیمیایی مناسب استفاده کرد. مشکل ترین مرحله در استخراج DNA از *آسپرژیلوس نایجر* تخریب دیواره سلول بدون آسیب رساندن به DNA ژنومی می باشد [۲]. همچنین این روش ها نیاز به مهارت بالایی دارند و DNA استخراج شده توسط این روش ها برای تکنیک های مولکولی که در حال حاضر استفاده می شوند مناسب نیست [۵]. همچنین استخراج DNA از یک ماده غذایی مانند رب گوجه فرنگی به دلیل داشتن مقادیر متنابهی رنگدانه از قبیل لیکوپن و بتاکاروتن و همچنین ترکیبات فنلی دیگر از قبیل فلاونول ها و همچنین وجود ترکیبات قندی از قبیل گلوکز و ساکارز و اسیدهای آمینه به دلیل ایجاد ممانعت در عمل استخراج DNA با مشکلات متعددی مواجه است. وجود ترکیبات فنلی در محلول DNA استخراج شده باعث جلوگیری از فعالیت های آنزیم های DNA پلیمراز مانند تک پلیمراز در واکنش زنجیره ای پلیمراز (PCR) و همچنین جلوگیری از کار آنزیم های برش گر می شود. وجود مواد آنتی اکسیدان و فلاونوئیدها باعث اکسیداسیون شدید DNA می شوند همچنین وجود پلی ساکاریدها و پروتئین بالا در DNA استخراج شده باعث می شود که کیفیت DNA برای مراحل بعدی مطالعات مولکولی کاهش پیدا کند [٦].

بیشتر روش ها از تکنیک های مکانیکی یا فیزیکی- مکانیکی برای تخریب دیواره سلولی استفاده می کنند به عنوان مثال

Archive of SID

www.SID.ir

استفاده از گلوله های شیشه ای، کوبیدن و ساییدن در نیتروژن مایع، آسیاب کردن، انجماد و خروج از انجماد متوالی، استفاده از امواج فراصوت به صورت ترکیبی با بافرهای لیزکننده حاوی سدیم دودسیل سولفات (SDS) و استفاده از اشعه ماکروویو می باشد. آنزیم ها نیز می توانند برای هضم دیواره سلولی استفاده شوند. روش های تخریب دیواره سلولی اغلب به صورت ترکیبی است. هضم پروتئین ها اساساً توسط پروتئیناز K صورت می گیرد و برای حذف RNA نیز از RNase استفاده می شود. استخراج با استفاده از حلال (بر پایه فنل- کلروفرم) به همراه ترسیب توسط ایزوپروپانل نیز اغلب مورد استفاده قرار می گیرد. برای شست و شوی DNA اتانل و ایزوپروپانل نیز می توانند مورد استفاده قرار گیرند. این روش ها زمان بر هستند و به مهارت بالایی نیاز دارند. در سال های اخیر کیت های تجاری به طور مکرر مورد استفاده قرار گرفته اند. دیواره سلولی کپک ها به طور فوق العاده ای محکم هستند و به همین دلیل لیز کردن دیواره سلولی به وسیله روش های استخراج تجاری مشکل است و قبل از عمل پاک کردن و خالص سازی، مراحل مقدماتی برای لیز کردن دیواره سلول لازم است [۲,۵].

هدف از این تحقیق مقایسه روش های جداسازی DNA *آسپرژیلوس نایجر* از رب گوجه فرنگی با توجه ویژه به مقدار و کیفیت به استحصال شده است. کمیت و کیفیت DNA استحصال شده توسط اسپکتروفتومتری با نانودراپ تعیین شده، سپس به وسیله PCR تکثیر می شود و محصول واکنش PCR با استفاده از الکتروفورز ژل جهت تعیین عدم وجود مهار کننده های PCR مورد بررسی قرار می گیرد.

۲- مواد و روش ها

۲-۱- تهیه سوش کپک خالص

جنس کپک *آسپرژیلوس نایجر* (PTCC 5010) از سازمان پژوهش های علمی و صنعتی ایران، مرکز کلکسیون باکتری ها و قارچ ها به صورت خالص و لیوفیلیزه تهیه شد.

۲-۲- آماده سازی رب گوجه فرنگی

جهت انجام این تحقیق احتیاج به رب گوجه فرنگی پاستوریزه بدون مواد افزودنی، نگهدارنده رنگ های خوراکی، نمک و غیره است تا از رشد غیر طبیعی کپک ها و یا بازدارندگی رشد آن ها جلوگیری شود. بدین منظور پس از تهیه گوجه فرنگی سالم، بدون کپک، آفت زدگی و لهیدگی استفاده شد و رب گوجه فرنگی با بریکس ۲٤ تا ۲٦ مشابه رب های تجاری موجود در بازار تهیه شد. محصول بدست آمده در ظروف شیشه ای درب دار قابل اتوکلاو استریل شده پر کرده و بعد از درب بندی پاستوریزه شدند.

۲-۳- فعال سازی کپک و تهیه نمونه ها

برای فعال سازی کپک های موردنظر از محیط کشت مالت اکستراکت براث[1] استفاده شد. فعال سازی آمپول لیوفیلیزه شده کپک تحت شرایط کاملاً استریل و سترون شده طبق دستورالعمل سازنده انجام گردید. از سوسپانسیون محیط کشت و کپک تلقیح شده در لوله بعد از گذشت چند ساعت اینکوباسیون در دمای ۲۵ درجه سانتی گراد در پلیت های محیط PDA[2] به صورت خطی کشت داده شد. پلیت ها در دمای ۲۵ درجه سانتی گراد به مدت ۵ تا ۷ روز اینکوبه شدند تا کلنی های کپک ظاهر شده رشد کرده و میسیلیوم تولید کند [۷].

۲-٤- تلقیح کپک به رب گوجه فرنگی

بدین منظور با آنس استریل از اسپور کپک رشد کرده روی سطح محیط کشت برداشته و به وسیله محلول رینگر رقیق می کنیم. توسط لام هموسایتومتر تعداد اسپورهای کپک سوسپانسیون شده در داخل رینگر محاسبه می شود (10^8 تا 10^9 عدد اسپور در هر میلی لیتر). سپس رقت های مختلف اسپور (10^1، 10^3 و 10^5) تهیه شده و به رب اضافه می شود. و به مدت ۷۲ ساعت در ۲۵ درجه سانتی گراد اینکوبه می شوند تا اسپورها فرصت ایجاد فرم میسیلیومی را پیدا کنند و بتوان از نمونه های رب آلوده شده حاصله استخراج DNA را انجام داد.

1. Malt Extract Broth
2. Potato Dextrose Agar

Archive of SID

www.SID.ir

۲-۵- روشهای استخراج DNA از میسلیوم کپکی

در این تحقیق از پنج روش مختلف برای استخراج DNA از میسلیوم کپک های مورد نظر استفاده شد. چهار روش با استفاده از روش های استخراج دستی با استفاده از محلول های مختلف لیز کننده دیواره سلولی مطابق با روش سنیس [۵]، ساییدن در نیتروژن مایع و استفاده از امواج فراصوت (قرار دادن تیوب های آزمایش در حمام اولتراسوند به مدت ۳۰ دقیقه با فرکانس ٤٥ کیلوهرتز و توان ۱۰۰٪) مطابق روش موتکوا و همکاران در سال ۲۰۱۱ [۲] و نیز حلال ها جهت خالص سازی می باشند و یک روش استخراج توسط کیت استخراج DNA انجام شد که بر پایه جذب- شستشو[3] می باشد که از کیت DENA zist Genomic DNA isolation kit IV(25)s-1030(IV) از شرکت دنا زیست تهیه شد.

پس از انجام عمل استخراج، DNA حاصله به مدت یک شب در دمای ۱۸- درجه سانتی گراد نگهداری شدند و سپس کمیت و کیفیت DNA استخراج شده توسط روش اسپکتروفتومتری و جذب محلول DNA استخراجی در طول موج ۲٦۰، ۲۸۰ و ۳۲۰ نانومتر و همچنین نسبت جذب ۲٦۰/۲۸۰ نانومتر، الکتروفورز بر روی ژل آگارز و واکنش زنجیره ای پلیمراز (PCR) با استفاده از پرایمرهای پیش رونده و پس رونده (جدول ۱) مورد بررسی قرار گرفت. شرایط واکنش PCR مطابق جدول ۲ انجام گرفت.

به دلیل طولانی بودن روش های مختلف استخراج DNA تنها به توضیح مناسب ترین روش اشاره می کنیم: لازم به توضیح می باشد که در روش ۱ (السامرایی و اشمیت ۲۰۰۰) [۸] از نیتروژن مایع به همراه بافر استخراج (CTAB ۲ درصد -Tris-HCl ۱۰۰ میلی مول (pH=۸) -EDTA ۲۰ میلی مول -NaCl ۱/٤ مول -PVP ۳ درصد -ß-Mercaptoethanol ۰/۲درصد) جهت لیز کردن دیواره سلولی استفاده شد. در روش دوم (موتکووا و ویتراسووا ۲۰۱۱) [۲] از امواج فراصوت به صورت ترکیبی در مرحله لیز کردن دیواره سلول استفاده شد و در روش سوم (پرابها ۲۰۱۳) [۹] در ترکیب محلول لیز کننده از SDS و Na_2So_3 به جای CTAB و ß-Mercaptoethanol استفاده گردیدو در روش چهارم (بزیدنهوت ۲۰۰٦) [۱۰] از NaCl ۲/٥ مولار -PVP ۳ درصد -ß-Mercaptoethanol ۱/٥ درصد استفاده شد. در روش ٥ نیز از کیت استخراج DNA -DNAs IV) 1030) ساخت شرکت دنا زیست استفاده شد.

نمونه های رب آلوده شده با کپک ابتدا به وسیله کوبیدن در هاون استریل توسط ازت مایع به صورت پودر در می آیند. ٥۰ تا ۷۰ میلی گرم از پودر به میکروتیوپ منتقل شده و ٦۰۰ میکرولیتر بافر استخراج گرم شده (شرح در بالا) به آن اضافه می شود. سپس در ٦۲ درجه سانتی گراد به مدت ۳۰ دقیقه حرارت داده می شود. سپس۱ میکرولیتر پروتئیناز k به مخلوط اضافه شده و در ۳۷ درجه سانتی گراد به مدت ۳۰ دقیقه اینکوبه می شود.

٦۰۰ میکرولیتر کلروفرم – ایزوآمیل الکل به نسبت ۲٤ به ۱ اضافه شده و به مدت ۱۰ دقیقه با اینورت کردن تیوپ مخلوط می شوند. مخلوط حاصل به مدت ۱۰ دقیقه با سانتریفوژ با دور rpm ۱۳۰۰۰ در ٤ درجه سانتی گراد سانتریفوژ می شود.

فاز رویی (حدود ۳۰۰ میکرولیتر) را برداشته و به تیوب جدید منتقل می شود. ۲ میکرولیتر RNase اضافه کرده و در ۳۷ درجه به مدت ۳۰ دقیقه اینکوبه می شود. حجم مساوی کلروفرم – ایزوآمیل الکل اضافه شده و ٥ دقیقه اینورت می شود سپس مخلوط حاصل به مدت ۱۰ دقیقه با سانتریفوژ با دور rpm ۱۳۰۰۰ در ٤ درجه سانتی گراد سانتریفوژ می شود. فاز رویی (حدود ۲٥۰ میکرولیتر) را برداشته و به تیوب جدید منتقل می شود سپس دو سوم حجم ایزوپروپانول سرد به آن اضافه شده و در فریزر به مدت ۱٥ دقیقه اینکوبه می شود سپس به مدت ۱۰ دقیقه با سانتریفوژ با دور rpm ۱۳۰۰۰ در ٤ درجه سانتی گراد سانتریفوژ می شود. سوپرناتانت دور ریخته شده و ٥۰۰ میکرولیتر اتانول ۷۰ درصد اضافه می کنیم و ۲۰ بار اینورت کرده و به انتهای تیوب ضربه وارد کرده تا حل شود سپس به مدت ۱۰ دقیقه با سانتریفوژ با دور rpm ۱۳۰۰۰ در ٤ درجه سانتی گراد سانتریفوژ می شود. اتانل دور ریخته شده و پلت حاصله در انتهای تیوپ در دمای اتاق خشک می شود. به پلت خشک شده ٥۰ میکرولیتر آب دیونیزه اضافه کرده و به مدت یک شب در ٤ درجه سانتی گراد نگهداری می کنیم.

3. Absorption-Elution

Archive of SID

www.SID.ir

جدول ۱ پرایمرهای پیش رونده و پس رونده جنس آسپرژیلوس مورد استفاده در واکنش زنجیره ای پلیمراز

پرایمر پیش رونده	5’<TGTTTCTATTATGACCCGTTCGG>3’
پرایمر پس رونده	5’<CCCCGTGTTGAGTCAAATTAAGC>3’

جدول ۲ برنامه واکنش زنجیره ای پلیمراز

مرحله	دما (درجه سانتی گراد)	زمان (دقیقه)	تعداد سیکل
شروع	۹٤	۱۰	۱
واسرشت	۹٤	۰/۵	٤۰
اتصال	۵۲-۵۵	۰/۵	٤۰
طویل شدن	۷۲	۲	٤۰
طویل شدن نهایی	۷۲	۵	۱

۲-٦- آنالیز آماری

داده های حاصل از نانودراپ نمونه های DNA استخراج شده تکرار و جهت بررسی اختلاف معنی دار بین روش های مختلف با استفاده از نرم افزار mstatc و مقایسه میانگین داده ها با استفاده از آزمون چند دامنه ای دانکن با سطح معنی داری ۰/۰۵٪ انجام شد. رسم نمودارها با نرم افزار 2007 اکسل انجام شد.

جهت مقایسه میانگین نتایج با استفاده آزمون فاکتوریل با سه

جدول ۳ نتایج حاصل از عملکرد روش های مختلف استخراج بر اساس فاکتور خلوص (۲٦۰/۲۸۰) و غلظت DNA استخراج شده

روش	مقدار اسپور کپک	فاکتور خلوص (۲٦۰/۲۸۰)	مقدار DNA
روش ۱	$۱۰^{۱}$	۱/۹٤۰	٤۲
	$۱۰^{۳}$	۱/۷۰۷	۱٤٦/۱
	$۱۰^{۵}$	۱/۷٦۵	۳۳٤/۱
روش ۲	$۱۰^{۱}$	۱/۸۲۳	۵٦/۵
	$۱۰^{۳}$	۱/٤۸۳	٦۵/۸
	$۱۰^{۵}$	۱/۷٦۰	۱٤۸/۵
روش ۳	$۱۰^{۱}$	۱/۷۹٦	۱۳۰/۷
	$۱۰^{۳}$	۲/۰٦۵	۷۰۰/۰
	$۱۰^{۵}$	۱/۹٤٦	۹٤٦/۵
روش ٤	$۱۰^{۱}$	۱/۷۸٤	٤۳۸/۳
	$۱۰^{۳}$	۱/۹۷٦	۱٦۱۷
	$۱۰^{۵}$	۲/۱۰۹	۲٦۳۹
روش ۵	$۱۰^{۱}$	۱/٤۳۲	۱۲/۰۵
	$۱۰^{۳}$	۱/۷۹۰	۱٤/۲۵
	$۱۰^{۵}$	۱/۵٤۰	۱۹/۵۵

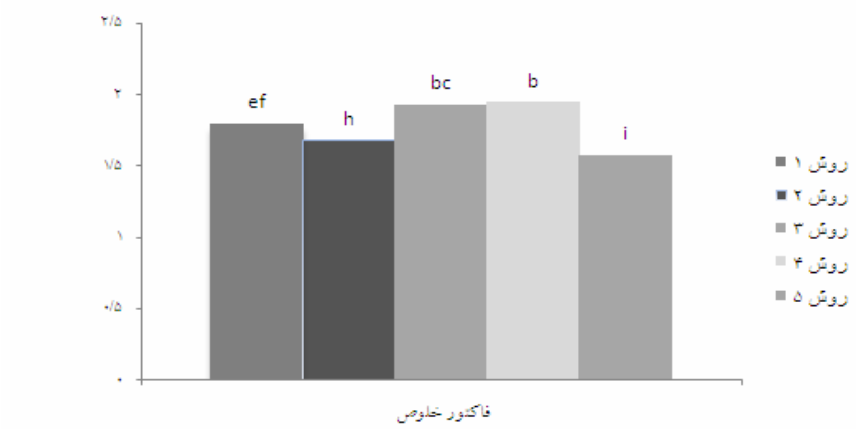
Archive of SID

www.SID.ir

۳- نتایج

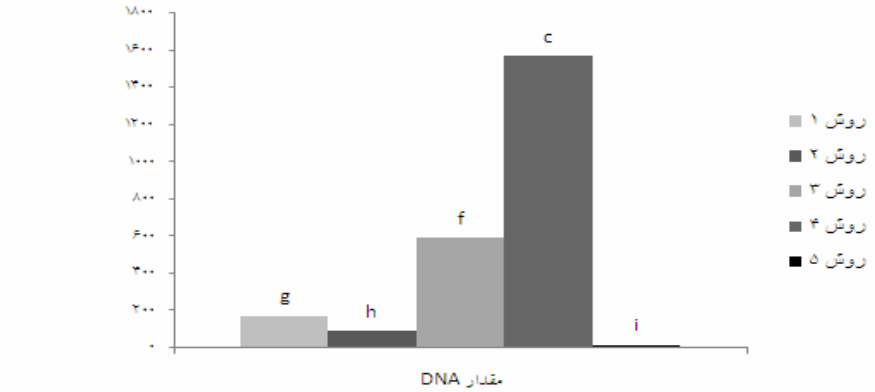
همان طور که از جدول ۱ ملاحظه می شود روش چهارم مقدار DNA بیشتری را در مقایسه با روش های دیگر استحصال نموده است اما در روش های دوم و چهارم مقادیر نسبت جذب ۲۶۰/۲۸۰ نانومتر عدد بالاتر از ۲ را نشان می دهد که بیان گر کیفیت پایین DNA استخراجی می باشد و احتمال آلودگی به RNA در این نمونه ها زیاد است، اگر این نسبت کمتر از عدد ۱/۸ باشد نشان دهنده آلودگی DNA با پروتئین و ترکیبات فنلی است که به دلیل وجود ترکیبات فنلی بالا در رب گوجه فرنگی این احتمال وجود دارد که این روش های استخراج جهت حذف این ترکیبات مناسب نبوده اند [٦ و ١١].

همان طور که در شکل ۱ نشان داده شده است روش های ۱ و ۲ از نقطه نظر خلوص DNA استخراج شده در میانگین قابل قبولی (۲-۱/۸) می باشند روش های ۳ و ٤ از این لحاظ با همدیگر اختلاف معنی داری ندارند و در روش استخراج با کیت خلوص DNA بدست آمده در حد قابل پذیرش نیست.



شکل ۱ نتایج حاصل از عملکرد روش های مختلف استخراج بر اساس فاکتور خلوص (۲۶۰/۲۸۰) DNA استخراج شده
(ردیف های با حداقل یک حرف غیر مشترک در سطح آماری ۵ درصد تفاوت معنی داری با یکدیگر ندارند)

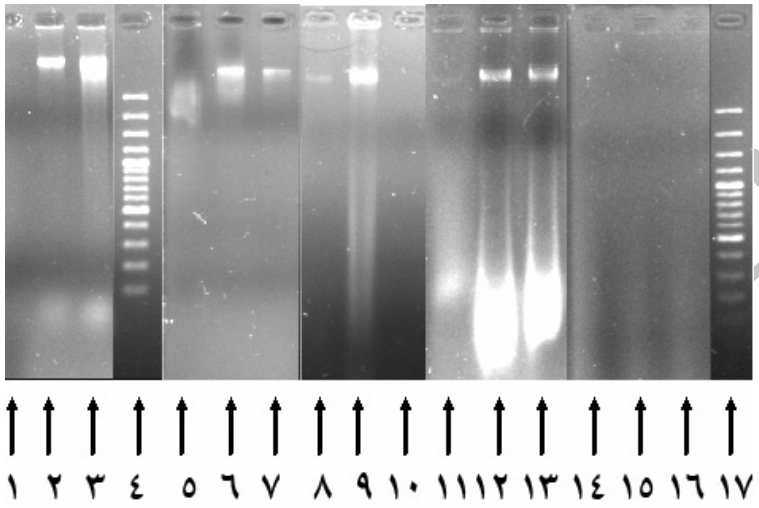
همان طور که در شکل ۲ پیدا است روش چهارم بیشترین مقدار DNA کپک را از نمونه های رب استخراج نموده است و تفاوت معنی داری با سایر روش های به کار گرفته شده دارد. سایر روش ها نیز با همدیگر از نقطه نظر میزان استخراج DNA تفاوت معنی داری دارند این در حالی است که روش استخراج با کیت کمترین بازدهی در استحصال DNA را داشته است



شکل ۲ نتایج حاصل از عملکرد روش های مختلف استخراج بر اساس مقدار DNA استخراج شده
(ردیف های با حداقل یک حرف غیر مشترک در سطح آماری ۵ درصد تفاوت معنی داری با یکدیگر ندارند)

www.SID.ir

نتایج الکتروفورز DNA استخراج شده نشان می دهد که روش ۱ و ۲ باندهای قابل مشاهده، بدون هاله و شکستگی دارند در حالی که در روش چهارم هاله و شکستگی به میزان زیاد دیده می شود و در روش ۵ باند دیده نمی شود همچنین در روش ۳ در مقادیر 10^1 و 10^5 باند مناسبی ایجاد نشده است. الکتروفورز ژل هر نمونه که یکپارچه و سالم باشد و هیچگونه هاله و شکستگی نداشته باشد دارای بهترین استخراج DNA می باشد [٦]. بنابراین می توان نتیجه گرفت که روش های ۱ و ۲ کیفیت DNA مناسبی دارند.



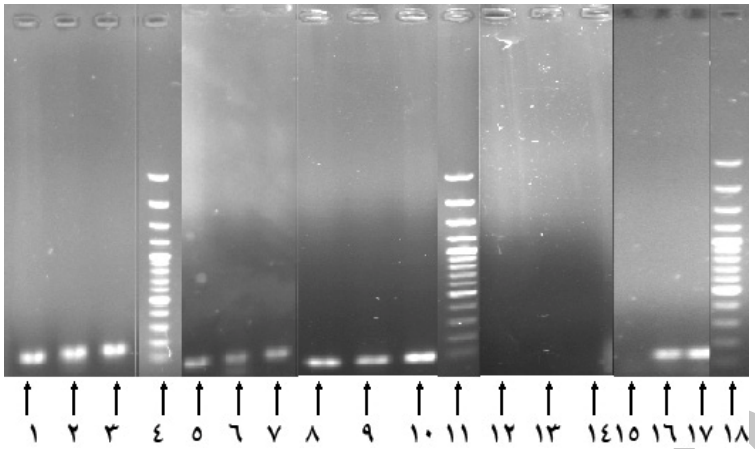
شکل ۳ نتایج الکتروفورز بر روی DNA استخراج شده به روش های مختلف به ترتیب عبارتند از:

روش ۱	۳- Aspegillus 10^5	۲- Aspegillus 10^3	۱- Aspegillus 10^1
روش ۲	۷- Aspegillus 10^5	٦- Aspegillus 10^3	٥- Aspegillus 10^1
روش ۳	۱۰- Aspegillus 10^5	۹- Aspegillus 10^3	۸- Aspegillus 10^1
روش ٤	۱۳- Aspegillus 10^5	۱۲- Aspegillus 10^3	۱۱- Aspegillus 10^1
روش ٥	١٦- Aspegillus 10^5	١٥- Aspegillus 10^3	١٤- Aspegillus 10^1

شماره های ٤ و ۱۷ ladder هستند.

واکنش PCR برای تعیین وجود مواد بازدارنده و مداخله کننده در طی واکنش انجام گردید. در تأیید فرآیند استخراج توسط PCR نشان می دهد که در طی استخراج توسط این روش ها به جز روش ٤ ممانعتی جهت واکنش PCR ایجاد نکرده اند و وجود قطعات تکثیر شده در PCR دلیل بر فقدان ممانعت کننده برای آنزیم تک پلیمراز است [٦ و ۱۱] . روش های ۱، ۲ و ۳ باندهای مناسبی ایجاد کرده اند ولی برای روش ٤ باند ایجاد نشده است که می تواند به دلیل ممانعت کننده های PCR در محیط باشد. می توان نتیجه گرفت که در روش ٤ مواد و واکنش گرهای مورد استفاده در استخراج DNA از واکنش PCR ممانعت کرده اند و این روش جهت استخراج DNA مناسب نیست.

Archive of SID
www.SID.ir



شکل ٤ نتایج الکتروفورز PCR Product بر روی ژل به روش های مختلف به ترتیب عبارتند از:

توضیح شکل ٤

روش ١	١- Aspegillus 10^1	٢- Aspegillus 10^3	٣- Aspegillus 10^5
روش ٢	٥- Aspegillus 10^1	٦- Aspegillus 10^3	٧- Aspegillus 10^5
روش ٣	٨- Aspegillus 10^1	٩- Aspegillus 10^3	١٠- Aspegillus 10^5
روش ٤	١٢- Aspegillus 10^1	١٣- Aspegillus 10^3	١٤- Aspegillus 10^5
روش ٥	١٥- Aspegillus 10^1	١٦- Aspegillus 10^3	١٧- Aspegillus 10^5

شماره های ٤، ١١ و ١٨ ladder هستند.

٤- بحث

نتایج حاصل از مقایسه روش های مختلف استخراجDNA از کپک آسپرژیلوس نایجر نشان می دهند که از نقطه نظر مقدار، خلوص، شکستگی DNA و وجود ممانعت کننده های مختلف PCR در محلول استخراج تفاوت های معنی داری مشاهده می شود به طوری که استفاده از کیت های تجاری از لحاظ کارایی در مقدار استخراج و خلوص DNA بدست آمده بسیار ضعیف می باشد و شاید این به دلیل وجود دیواره سلولی سخت کپک ها می باشد که اجازه شکافتن و لیز کردن دیواره را توسط محلول های کیت نمی دهد.

الکتروفورز با ژل آگارز معیار مهمی برای محاسبه غلظت DNA و عدم شکستگی در آن می باشد. چربی، پروتئین و غلظت های بالای کلیسم مهارکننده های بالقوه برای عملیات PCR هستند. فقدان شکستگی و اسمیر در نمونه های استخراج شده نشان دهنده خلوص بالای DNA می باشد. اگر نسبت مقدار جذب محلول DNA در٢٦٠/٢٨٠=OD در محدوده ٢-١/٨ باشد نشاندهنده این است که جذب عمدتاً به علت اسید نوکلئیک است و خلوص DNA استخراج شده مطلوب است. اعداد کمتر از ١/٨ نشان دهنده آلودگی با پروتئین یا ترکیبات فنلی است. و اعداد بالاتر از ٢ نشان دهنده آلودگی با RNA است. وجود قطعات تکثیر شده در PCR دلیل بر فقدان ممانعت کننده برای آنزیم تک پلیمراز است [٦]. بنابراین در روش ٤ ممانعت کننده PCR وجود داشته که در مطالعات مولکولی بعدی ایجاد مشکل خواهد کرد.

از آن جایی که استخراج DNA زمان بر و پر هزینه بوده و نیاز به استفاده از مواد شیمیایی گران قیمت و سمی دارد بنابراین بهینه کردن روش استخراج جهت کاهش زمان و هزینه ها و افزایش راندمان و خلوص DNA بدست آمده ضروری است [١١]. روش ١ استخراج DNA از نقطه نظر کمیت و کیفیت DNA، نداشتن هاله و عدم شکستگی DNA الکتروفورز شده و همچنین نداشتن ممانعت کننده های PCR مناسب می باشد. روش ١

Archive of SID

www.SID.ir

برای استخراج DNA این کپک از مواد غذایی پیشنهاد می شود. نتایج این تحقیق نشان میدهد که استفاده از نیتروژن مایع و ساییدن سلول ها و شوک حرارتی باعث ایجاد راندمان بهتری در استحصال DNA می باشد و استفاده از موادی چون SDS، Na_2So_3، PVP و ß-Mercaptoethanol– باعث ایجاد شکستگی در DNA و نیز خلوص پایین می شود.

پرابها و همکاران (۲۰۱۳) روشی ساده برای استخراج DNA ژنومی از کپک ها پیشنهاد کرد [۹]. روش پیشنهادی در این تحقیق استفاده از روش CTAB برای استخراج DNA بود در این تحقیق سوشهای ساپرولگنیا و کپک آسپرژیلوس فلاووس و پنی سیلیوم مورد مطالعه قرار گرفتند. نتایج نشان داد که آسیاب کردن نمونه ها با نیتروژن مایع باعث استحصال بیشتر DNA خواهد شد و روش بکار گرفته شده باعث ایجاد باندهای مناسب در الکتروفورز نمونه ها و نیز باندهای مطلوب در PCR نمونه ها شده است.

جین و همکاران (۲۰۰٤) در تحقیقی روشی را برای استخراج DNA سوش های کپک های آسپرژیلوس فومیگاتوس و سایر سوش های این جنس پیشنهاد کردند [۷]. از آنزیم پروتئیناز K و محلول های لیز کننده استفاده کردند. نتایج الکتروفورز ژل DNA و همچنین PCR آن ها نشان داد که این روش استخراج مناسب می باشد.

لیزا و همکاران (۲۰۰٦) روش های متعددی را برای استخراج DNA از آسپرژیلوس فومیگاتوس با همدیگر مقایسه کردند [۱۱]. استخراجDNA در این تحقیق با استفاده از کیت تجاری Qiagen انجام گرفت اما جهت کارایی بهتر فرایند استخراج و افزایش سهولت در شکستن دیواره سلولی از مراحل تکمیلی از قبیل انجماد– ذوب کردن، انجماد– پختن، هضم آنزیمی، استفاده از گلوله های شیشه ای، هضم آنزیمی و گلوله های شیشه ای و استفاده از بافرهای لیز کننده و گلوله های شیشه ای استفاده کردند. هر چند این روش ها در عمل در آزمایشگاه ها به صورت روتین انجام نمی شوند. نتایج نشان داد که استفاده از گلوله های شیشه ای و گلوله های شیشه ای به همراه محلول های لیز کننده دیواره سلولی بیشترین مقدار DNA را از این کپک استخراج کردند و این دو روش سریع ترین، راحت ترین و دارای قابلیت تکرار زیادتر در مقایسه با روش های دیگر است.

موتکووا و همکاران (۲۰۱۱) روش استخراج DNA کلاسیک را با روش مبتنی بر کیت تجاری برای کپک های جنس آسپرژیلوس مقایسه کرده و آن را بهینه کردند [۲]. در روش کلاسیک علاوه بر استفاده از بافر های لیز کننده و محلول های خالص کننده DNA از نیتروژن مایع و امواج فراصوت نیز در فرایند استخراج استفاده شد. نتایج بیانگر این نکته بود که روش استخراج کلاسیک از نقطه نظر مقدار و کیفیت DNA استخراج شده در مقایسه با روش بهینه شده با امواج فراصوت و نیتروژن مایع اختلاف معنی داری داشته و روش بهینه شده با نیتروژن مایع کارایی بهتری را از خود نشان داده است. همچنین روش های مبتنی بر کیت در مقایسه با روش های کلاسیک به کار گرفته شده کارایی ضعیف تری را از خود نشان داده اند.

السامرایی و همکاران (۲۰۰۰) روشی ساده را برای استخراج DNA ژنومی را از کپک ها معرفی کردند [۸]. کپک های مورد مطالعه از جنس های آسپرژیلوس، فوزاریوم، پنی سیلیوم و رایزوپوس بودند. روش مذکور استفاده از نیتروژن مایع و بافرهای لیز کننده سلولی، رسوب پروتئین ها و جداسازی پلی ساکاریدها با استفاده از NaCl و فنل – کلروفرم و در نهایت خالص سازی DNA با اتانل انجام گرفت. نتایج نشان داد که این روش می تواند به طور موثری وزن مولکولی DNA استحصالی و همچنین قابلیت هضم را توسط آنزیم های برش گر را افزایش دهد.

رونگ گائو و همکاران (۲۰۰۵) دو روش سریع و موثر را در استخراج DNA ژنومی از کپک ها معرفی کردند [۱۲]. این دو روش بر پایه محلول های DNAzol و روش Cenis بودند [۱۳,۵]. این تحقیق کپک های جنس های آسپرژیلوس، فوزاریوم، پنی سیلیوم و رایزوپوس را نیز شامل می شدند. نتایج نشان دادند که روش Cenis بازدهی DNA بالاتری را نسبت به روش DNAzol دارد و میزان خلوص DNA در این روش نیز بالاتر است.

پاسونه و همکاران (۲۰۱۰) کپک جنس آسپرژیلوس را از بادام زمینی انبار شده جداسازی کرده و اثر شرایط انبارداری را بر روی تولید آفلاتوکسین بررسی کردند [۱٤]. استخراج DNA در این تحقیق به روش کلاسیک و با استفاده از بافر استخراج و گلوله های شیشه ای انجام گرفت. برای حذف ترکیبات پلی ساکاریدی و پروتئینی از فنل: کلروفرم: ایزوآمیل الکل به نسبت ۱:۲٤:۲۵ و

Archive of SID

www.SID.ir

محلول ۵ مولار NaCl استفاده شد و خالص سازی DNA توسط اتانل ۷۰ درصد انجام گرفت.

سانتیه و همکاران (۲۰۰۹) با استفاده از تکنیک Multiplex Real Time PCR کپک های توکسین زای آسپرژیلوس پنی سیلیوم و فوزاریوم را شناسایی و اندازه گیری کردند [۱۵]. جهت استخراج DNA از روش کلاسیک و با استفاده از محلول های استخراج حاوی SDS، Tris، NaCl و EDTA استفاده کردند و در مراحل بعدی جهت حذف ترکیبات کربوهیدرات و پروتئینی از کلروفرم: ایزوآمیل الکل به نسبت ۲٤ به ۱ استفاده کردند. کمیت و کیفیت DNA بدست آمده کپک ها با این روش برای انجام مراحل بعدی این تحقیق مناسب بود.

۵- منابع

[1] Elahami Rad, A H. Shahidi. F. Evaluation of Physicochemical and Microbial Changes of Bulk Tomato Paste in Cold Storage. Journal of Science and Technology of Agriculture and Natural Resources 2004; 8 (1): 171-188

[2] Motkova P and vytrasova J. Compariosn of methods for isolating Fungal DNA. Czech J. food Sci 2011; 29: 76-85

[3] Noterman S and Heuvelman J.C. Immunological detection of moulds in food by using the enzyme- linked immunosorbent assay (ELISA) preparation of antigens. International journal of food microbiology 1985; 2: 247-258

[4] Alastair R, Naresh p, James G. Immunofluorescence detection of mould – an aid to the Howard mould counting technique. Food microbiology 1988; 5: 33-42

[5] Cenis J.L. Rapid extraction of fungal DNA for PCR amplification. Nucleic Acids Research 1992; 20: 2380.

[6] Sadeghi M, Mohammadi H, Moradi Shahrbabak M, Moradi Shahrbabak H.. Comparison of the efficiency of the buffer/detergent extraction and standard salting-out methods for DNA extraction from blood and semen samples. Genetics in the 3rd Millennium 2011; 8 (4) :2155-2161

[7] jin J, lee Y, wickes BL. simple chemical extraction method for DNA isolation from *aspergillus fumigatus* and other aspergillus species. Journal of clinical microbiology 2004; 42 (9): 4293-4296.

[8]- Al-Samarrai TH, Schmid J. A simple method for extraction of fungal genomic DNA. Letters in Applied Microbiology 2000; 30: 53–56

[9]- Prabha TR, Revathi K, Vinod MS, Shanthakumar SP, Bernard.P. A simple method for total genomic DNA extraction from water moulds. Current Science 2013; 104. 3 (10)

[10] Bezuidenhout, C.C., Prinsloo, M., Van der walt, A.M. 2006. Multiplex PCR –Based Detection of Potential Fumonisin-producing Fusarium in Traditional African Vegetables. Environmental Toxicology. 21: 360-366.

[11] Griffith LJ, Ayim M, Doffman S, wilks M, Miller MR, Agrawal SG. Comparison of DNA extraction methods for *Aspergillus fumigatus* using real-time PCR. Journal of Medical microbiology 2006; SS. 1187-1191.

[12] Guo JR, Schnieder F, Abd-Elsalam KA, Verreet.JA. Rapid and efficient extraction of genomic DNA from different phytopathogenic fungi using DNAzol reagent. Biotechnology Letters 2005; 27: 3–6

[13] Chomezynski P, Mackey K, Drews R, Wilfinger W. DNAzol: a reagent for the rapid isolation of genomic DNA. Bio Techniques 1997; 22: 550–553.

[14] Alejandra Passone M, Cristina Rosso L, Ciancio A, Etcheverry M. Detection and quantification of *Aspergillus* section *Flavi* spp. in stored peanuts by real-time PCR of *nor*-1 gene, and effects of storage conditions on aflatoxin production. International Journal of Food Microbiology 2010; 138 (3): 276–281

[15] Suanthie Y, Maribeth A, Woloshuk CP. Multiplex real-time PCR for detection and quantification of mycotoxigenic Aspergillus, Penicillium and Fusarium. Journal of Stored Products Research 2009; 45: 139–145

Archive of SID

www.SID.ir

Evaluation suitable method for DNA extraction *Aspergillus niger* from tomato paste

Karazhian, R. [1], Habibi Najafi, M. B. [2*], Yavarmanesh, M. [3], Edalatian, M. R. [4], Pourianfar, H. R. [5]

1. Phd student of food microbiology Ferdowsi University of Mashhad Faculty of Agriculture Department of Food Science & Technology
2. professor. Ferdowsi University of Mashhad Faculty of Agriculture Department of Food Science & Technology
3. Assistant professor Ferdowsi university of Mashhad, Faculty of agriculture, Department of food science & technology
4. Assistant Professor. Food Science and technology Department, Agriculture Faculty,Ferdowsi University of Mashhad(FUM),
5. Assistant Professor. Iranian Academic Centre for Education, Culture and Research (ACECR)-Mashhad Branch

(Received: 93/9/10 Accepted: 93/12/10)

In this research different methods of DNA extraction from *Aspergillus niger* in tomato paste have been optimized and compared with each other. For this purpose classical optimization techniques and commercial Kit base methods were used. Mold spores of *Aspergillus niger* at different levels (10^1, 10^3 and 10^5 CFU/g) were added to the tomato paste. After mycelium growth DNA extraction was perfomed by five methods. Different methods employed by use the Liquid nitrogen, ultrasonic and lysis solution in the cell wall. These methods in terms of quality and quantity of DNA extracted were studied using spectrophotometer with NanoDrop. The absence of smear, protein contamination and no presecnce of PCR inhibitors determined with PCR that performed forward and reverse primers. Result of gel electrophoresis and PCR assay showed that Method 1 is the most appropriate method for DNA extraction is the mold of tomato paste.

Keywords: DNA extraction, *Aspergillus niger*, tomato paste

Archive of SID

* Corosponding Auther E-Mail Address:habibi@um.ac.ir

www.SID.ir