Archive of SID

مقایسه دو روش PCR مستقیم و PCR با استفاده از روش استخراج DNA در تعیین تیپ‌های مختلف *کلستریدیوم پرفرینجنس*

محمدرضا احسنی[۱] و مهرداد شمس‌الدینی‌بافتی[۲]

تاریخ دریافت: ۹۰/۱/۲۰ تاریخ پذیرش: ۹۱/۱/۱۵

خلاصه

واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) یک روش مناسب برای شناسایی عوامل بیماری‌زا محسوب می‌شود و جداسازی DNA اولین گام در این مسیر است. استخراج DNA یک مرحله وقت‌گیر در تحقیقات ژنتیک مولکولی به شمار می‌آید که در بعضی موارد از کل مراحل انجام PCR طولانی‌تر است. هدف از انجام این تحقیق، استفاده از PCR مستقیم (بدون استخراج DNA) جهت تعیین تیپ‌های مختلف باکتری *کلستریدیوم پرفرینجنس* می‌باشد. در این تحقیق PCR مستقیم و همچنین PCR با DNA استخراج شده بر روی چهار تیپ A، B، C و D باکتری *کلستریدیوم پرفرینجنس* انجام شد، که برای این هدف از چهار جفت پرایمر اختصاصی که مکمل بخش‌هایی از ژن‌های کد کننده توکسین‌های آلفا، بتا، اپسیلون و یوتای این باکتری بودند استفاده گردید. در هر دو روش PCR مستقیم و PCR با DNA استخراج شده، قطعات ۱۹۶، ۳۲۴ و ۶۵۵ جفت بازی سنتز گردید که به ترتیب مربوط به توکسین آلفا، بتا و اپسیلون می‌باشند. در نهایت براساس طول قطعات سنتز شده در PCR، تیپ‌های مختلف این باکتری تشخیص داده شدند. نتایج این تحقیق نشان می‌دهد که انجام PCR به طور مستقیم از کلونی بسیار ساده است و کیفیت باند ایجاد شده در PCR مستقیم و PCR با DNA استخراج شده با هم تفاوتی ندارند. بنابراین با توجه به اینکه استفاده از PCR مستقیم زمان، مراحل و هزینه PCR را کاهش می‌دهد و امکان آزمون تعداد زیادی نمونه را در زمان کوتاهتری فراهم می‌آورد، استفاده از این روش توصیه می‌گردد.

کلمات کلیدی: *کلستریدیوم پرفرینجنس*، استخراج DNA، PCR مستقیم

مقدمه

کلستریدیوم پرفرینجنس باکتری میله‌ای، گرم مثبت، اسپورزا، بی حرکت و بی هوازی است که باعث بیماری در انسان و دام می‌شود (۱۵، ۱۶، ۱۷ و ۱۸). چهار گروه اصلی توکسین *کلستریدیوم پرفرینجنس* شامل آلفا، بتا، اپسیلون و یوتا می‌باشد که اساس طبقه‌بندی این باکتری به صورت پنج تیپ مختلف A تا E است (۳۰). تیپ‌های مختلف این باکتری عامل بیماری‌های مختلفی است و حتی ممکن است یک سویه بیماری‌های متفاوتی را در میزبان‌های مختلف ایجاد. از طرفی شناسایی سریع عوامل بیماری‌زا اساس کنترل بیماری‌هاست و تعیین ژنوتیپ این عوامل جهت بررسی کامل و برنامه کنترلی مورد نیاز می‌باشد (۲۲). جهت تشخیص تیپ‌های مختلف باکتری *کلستریدیوم پرفرینجنس* روش‌های متفاوتی وجود دارد که اکثراً دشوار، زمان‌بر و پرهزینه هستند و از حساسیت و اختصاصیت پایینی نیز برخوردارند. در بعضی آزمایشگاه‌ها جهت تعیین و تشخیص توکسین باکتری، از آزمایش خنثی‌سازی توکسین در موش و خوکچه هندی استفاده می‌شود. روش جستجوی توکسین در محتویات روده به این صورت است که ابتدا نمونه را در مجاورت محلول کلروفرم قرار داده تا خاصیت پادگنی توکسین حفظ شود، سپس نمونه صاف شده را به حیوانات آزمایشگاهی تزریق می‌کنند. در خوکچه هندی به علت وجود توکسین نکروز دهنده بعد از ۴۸ ساعت در محل تزریق مناطق نکروز مشاهده می‌شود، در حالی که در موش به علت وجود

[۱] کارشناسی ارشد ژنتیک و اصلاح نژاد دام، دانشگاه شهید باهنر کرمان E-mail: Ahsani2001@gmail.com (نویسنده مسئول)

[۲] استادیار موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی شعبه جنوب شرق کشور، کرمان

www.SID.ir

Archive of SID

توکسین کشنده بعد از ۴ تا ۱۲ ساعت تلف می‌شود (۲ و ۲۷). این روش شناسایی بسیار مشکل، وقت‌گیر، پر هزینه و تک ظرفیتی است، از طرفی انجام آن روی حیوانات آزمایشگاهی از نظر اخلاقی غیر قابل قبول است (۱۲ و ۲۴). در روش شناسایی الایزا از پادتن‌های پلی‌کلونال برای تشخیص توکسین‌های *کلستریدیوم پرفرینجنس* استفاده می‌شود (۱۱). مشکل این روش، ایجاد واکنش متقاطع بین پادتن‌های تولید شده علیه توکسین‌ها می‌باشد که می‌تواند در شناسایی نوع توکسین اختلال ایجاد کند. همچنین الایزا قادر به شناسایی توکسین β_2 نیست و برای تشخیص و تعیین توکسین باید اسپورزایی را به وسیله روش‌های کشت خاص تحریک کرد. یکی از تکنولوژی‌های جدیدی که در تشخیص بیماری‌های عفونی استفاده کاربردی دارد، PCR است (۵). زیربنای تکنیک PCR، استخراج DNA است (۴ و ۱۳) که اغلب یک روش سریع، کم‌خطر و مقرون به صرفه جهت این امر مورد نیاز است. پروتکل‌های استاندارد استخراج DNA نیازمند انجام مراحل مختلف و متعددی است که برای تعداد زیادی نمونه کار دشواری است (۱۳). استخراج DNA فرآیندی وقت‌گیر و ضروری برای انجام PCR است و روش‌های مختلفی برای این امر وجود دارد که در تمام روش‌ها، اصول کار مشترک و شامل پنج مرحله شکستن سلول، رسوب دادن DNA و RNA، جدا کردن DNA و RNA، رسوب پروتئین‌ها و جدا کردن DNA از RNA می‌باشد (۱). شکستن سلول بر اساس نوع و ضخامت دیواره با روش‌های مختلفی انجام می‌شود (۲۰). برای رسوب دادن DNA و RNA از الکل استفاده می‌شود که الکل سرد به سوسپانسیون حاصل از شکستن سلول افزوده و اسیدهای نوکلئیک در حد فاصل آب و الکل، رسوب می‌کنند (۸). در گذشته برای جدا کردن DNA و RNA از میله شیشه‌ای استفاده می‌شد به این صورت که میله را به آرامی داخل لوله فرو برده و می‌چرخانند، رشته‌های DNA و RNA به دور میله شیشه‌ای می‌چسبند، سپس میله به آرامی خارج شده و در یک لوله دیگر محتوی بافر فرو برده می‌شود تا DNA و RNA در بافر حل شوند. اما بعدها از اتانل در رسوب اسیدهای نوکلئیک استفاده شد. رسوب پروتئین‌ها با استفاده از فنل، کلروفرم و یا محلول غلیظ نمک‌های مختلف قابل انجام است. پروتئین‌زدائی بیشتر از طریق پروتیئناز K صورت می‌گیرد (۲۶). آخرین مرحله جدا کردن DNA از RNA است که با استفاده از آنزیم RNase، RNAها تجزیه و DNA خالص می‌شود (۸).

اخیراً پروتکل‌هایی بدون استخراج DNA برای انجام PCR ارائه شده است. این روش‌ها اجازه می‌دهند که واکنش PCR مستقیماً از نمونه انجام شود. تحقیقاتی در استفاده از PCR مستقیم روی گونه‌های گیاهی (۲۵)، ویروس طاعون نشخوارکنندگان کوچک (۲۲)، نرووویروس‌ها (۲۳)، خون کامل (۶) و باکتری (۱۰ و ۱۹) انجام شده که همگی موفقیت‌آمیز بوده است. تاکنون روش‌های زیادی برای استخراج DNA باکتری ارائه و مقایسه شده است (۷، ۱۴ و ۲۱) اما تعداد معدودی گزارش از انجام PCR بدون استخراج DNA برای باکتری موجود می‌باشد (۱۰ و ۱۹). در ایران نیز تاکنون تحقیق مستندی در این مورد وجود ندارد.

مواد و روش کار

سویه‌ها و شرایط کشت: سویه‌های استاندارد تیپ A، B، C و D باکتری *کلستریدیوم پرفرینجنس* و *کلستریدیوم سپتیکوم* (کنترل منفی) روی محیط بلاد آگار حاوی ۵ درصد خون دفیبرینه گوسفند به صورت خطی کشت داده شد (سویه‌های استاندارد موسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی کرمان). پلیت‌های کشت داده شده درون جار بی‌هوازی قرار داده و به وسیله دستگاه انوکسیمت[1] (مدل Mart microbiology، ساخت کشور هلند) شرایط بی‌هوازی در آنها فراهم و به مدت ۲۴ ساعت درون انکوباتور با درجه حرارت ۳۷°C قرار داده شدند. از کلونی‌های رشد یافته برای استخراج DNA و PCR مستقیم استفاده گردید.

1- Anoxomat

www.SID.ir

Archive of SID

استخراج DNA و PCR

جهت استخراج DNA، چند کلونی خالص از باکتری رشد کرده روی محیط آگار کشت خون درون میکروتیوب حاوی یک میلی‌لیتر آب مقطر حل کرده و پس از مخلوط شدن، به مدت یک دقیقه در ۱۳۰۰۰ دور و در $4^{\circ}C$ سانتریفوژ شدند تا باکتری رسوب کند. مقدار ۳۵۰ میکرولیتر از بافر STET (100mM Tris HCl, 10mM EDTA, 100mM NaCl, 5% (v/v) Triton 100X) به میکروتیوب حاوی باکتری افزوده و بعد از آن ۲۵ میکرولیتر لیزوزوم (10mg/ml) به آن اضافه و ۳ ثانیه ورتکس[1] گردید. میکروتیوب‌ها به مدت ۴۰ ثانیه در بشر آب جوش قرار داده و سپس به مدت ۱۵ دقیقه در ۱۳۰۰۰ دور در دمای اتاق سانتریفوژ شدند. برای رسوب اسیدهای نوکلئیک مقدار ۴۰ میکرولیتر از استات سدیم ۳ مولار و ۴۲۰ میکرولیتر ایزوپروپانول به محلول اضافه و ورتکس گردید و ۵ دقیقه در دمای اتاق قرار داده شد. میکروتیوب‌ها با دور ۱۳۰۰۰ و دمای $4^{\circ}C$ به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ شدند و بعد از خارج کردن محلول رویی، رسوب با اتانول ۷۰٪ شسته و خشک شد. رسوب در ۵۰ میکرولیتر بافر TE حاوی 20mg/ml RNase حل شد (۲۶).

واکنش Multiplex PCR در میکروتیوب‌های ۰/۲ میلی‌لیتری، با حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر انجام شد. ترکیبات واکنش شامل ۲/۵ میکرولیتر بافر PCR (10X) (10mM Tris–HCl, pH= 9.0, 50mM KCl)، ۱ میکرولیتر $MgCl_2$ (50mM)، ۱/۲۵ میکرولیتر از هر جفت پرایمرها (10µM)، ۰/۵ میکرولیتر آنزیم تک پلیمراز (5U/µl)، ۰/۵ میکرولیتر مخلوط dNTP (10mM)، ۱۳ میکرولیتر آب عاری از نوکلئاز و ۲/۵ میکرولیتر DNA استخراج شده بود. در واکنش PCR مستقیم به جای DNA، یک کلونی کوچک باکتری به طور مستقیم به واکنش افزوده شد. آغازگرهای مورد استفاده در این تحقیق از مقاله Wasinski (۲۰۰۷) و مقاله Van Asten و همکاران (۲۰۰۹) استخراج و توسط شرکت سیناژن ساخته شد که توالی این آغازگرها در جدول ۱ آمده است.

جدول ۱: اطلاعات در مورد آغازگرها

نوع توکسین	ژن	توالی آغازگر ۳´ - ۵´	جایگاه روی ژن	طول قطعه (جفت باز)
آلفا	plc (cpa)	GCTAATGTTACTGCCGTTGA CCTCTGATACATCGTGTAAG	۶۶۳ – ۹۶۸	۳۲۴
بتا	cpb	GCGAATATGCTGAATCATCTA GCAGGAACATTAGTATATCTTC	۸۷۱ –۱۰۴۵	۱۹۶
اپسیلون	etx	GCGGTGATATCCATCTATTC CCACTTACTTGTCCTACTAAC	۲۶۷ – ۸۶۲	۶۵۵
یوتا	iap	ACTACTCTCAGACAAGACAG CTTTCCTTCTATTACTATACG	۱۷۳۹ – ۲۱۶۱	۴۴۶

جهت کاهش تبخیر، ۱۰ میکرولیتر روغن معدنی به میکروتیوب‌ها حاوی مخلوط PCR اضافه و در ترموسایکلر[2] (مدل Bio-Rad، ساخت آمریکا) با برنامه موجود در جدول ۲ قرار داده شد. جهت مشاهده نتایج، ۱۰ میکرولیتر از محصولات PCR با ۲ میکرولیتر از بافر بارگذاری 6X مخلوط کرده و با احتیاط به داخل چاهک ژل الکتروفورز (۱/۵ درصد) منتقل شد. همچنین ۴ میکرولیتر مارکر مولکولی استاندارد در چاهک اول ژل ریخته شد. ولتاژ روی ۸۰ ولت تنظیم گردید و به مدت ۲ ساعت الکتروفورز شد. پس از اتمام الکتروفورز، ژل به مدت ۲۰ دقیقه در محلول اتیدیوم بروماید (10µg/ml) قرار داده شد تا محصولات PCR تکثیر شده، رنگ شود. ژل روی صفحه ترانسلومیناتور UV قرار داده شد و عمل عکسبرداری از ژل انجام گردید. سپس طول قطعات تولید شده با استفاده از برنامه کامپیوتری Onedscan اندازه‌گیری شد.

1- Vortex
2- Thermocycler

www.SID.ir

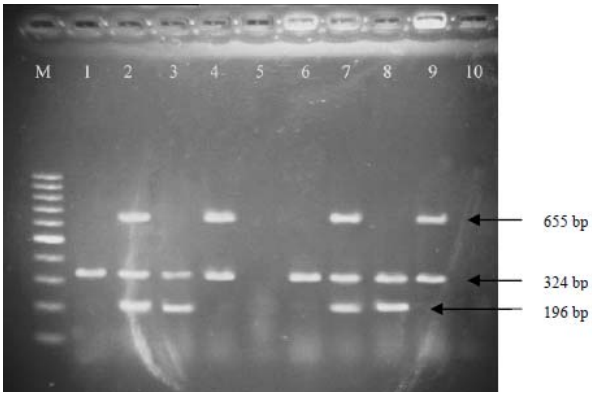
Archive of SID

جدول ۲: پروتکل دمایی PCR

مرحله	دما (سانتی‌گراد)	مدت زمان	تعداد سیکل
دناتوره شدن اولیه	۹۵	۵ دقیقه	۱
دناتوره شدن	۹۴	۳۰ ثانیه	۳۵
چسبیدن	۵۳	۴۵ ثانیه	
سنتز	۷۲	۹۰ ثانیه	
سنتز نهایی	۷۲	۵ دقیقه	۱

نتایج

در این تحقیق روش PCR مستقیم از کلونی باکتری و بدون استخراج DNA با موفقیت انجام گرفت و برای مقایسه نتایج از واکنش PCR با DNA استخراج شده به عنوان شاهد و کنترل مثبت استفاده شد. در هر دو روش PCR مستقیم و PCR با DNA استخراج شده، قطعات ۳۲۴، ۱۹۶ و ۶۵۵ جفت بازی که به ترتیب مربوط به ژن‌های کدکننده توکسین آلفا، بتا و اپسیلون بودند سنتز گردید (شکل ۱).



شکل ۱: تکثیر ژن کدکننده توکسین‌های آلفا، بتا و اپسیلون با PCR مستقیم و DNA حاصل از روش جوشاندن.
M: مارکر مولکولی استاندارد 100bp، چاهک‌های ۴-۱: PCR با DNA استخراج شده‌ی تیپ‌های A، B، C و D باکتری کلستریدیوم پرفرینجنس، چاهک ۵: PCR با DNA استخراج شده باکتری کلستریدیوم سپتیکوم به عنوان کنترل منفی، چاهک‌های ۹-۶: PCR مستقیم تیپ‌های A، B، C و D باکتری کلستریدیوم پرفرینجنس، چاهک ۱۰: PCR مستقیم کلستریدیوم سپتیکوم به عنوان کنترل منفی.

در نهایت تیپ‌های مختلف باکتری *کلستریدیوم پرفرینجنس* بر اساس طول قطعات سنتز شده و با توجه به جدول ۳ تشخیص داده شد.

جدول ۳: توکسین‌های اصلی** کلستریدیوم پرفرینجنس **و تیپ‌های آن (۲).

تیپ	توکسین			
	آلفا	بتا	اپسیلون	یوتا
A	+*	-	-	-
B	+	+*	+	-
C	+	+*	-	-
D	+	-	+*	-
E	+	-	-	+*
* توکسین اصلی در بروز بیماری				

بحث

به طور کلی برای تشخیص و طبقه‌بندی میکروارگانیسم‌ها یک روش سریع شناسایی ژنوم ضروری است (۷). آنالیز مولکولی نمونه‌های کلینیکی برای میکروارگانیسم‌ها نسبت به روش‌های سابق مزیت‌های زیادی دارد. با روش PCR دامنه وسیعی از ارگانیسم‌های مورد نظر را می‌توان شناسایی کرد. همچنین حساسیت و اختصاصیت این روش نسبت به روش‌های دیگر بیشتر است (۲۱). حساسیت بالای PCR نسبت به روش‌های سرولوژیکی و بیولوژیکی این امکان را فراهم می‌سازد تا عفونت را در اولین مراحل آن تشخیص داد. اگرچه PCR یک روش ساده، موثر و اقتصادی برای تکثیر، تشخیص و تعیین ژنوتیپ DNA است ولی به استخراج DNA که یک مرحله وقت‌گیر است نیاز دارد (۶). از نظر تئوری، واکنش PCR می‌تواند حتی با یک مولکول DNA انجام شود و قطعه مورد نظر را تکثیر کند (۱). اما برای دست یافتن به یک تکثیر رضایت بخش باید شرایط بهینه برای PCR فراهم شود، زیرا کیفیت و کمیت DNA الگو می‌تواند تکثیر قطعات را در واکنش PCR را به طور

www.SID.ir

Archive of SID

مستقیم تحت تأثیر قرار دهد. برای یک واکنش PCR ایده آل 10^4 تا 10^7 مولکول DNA الگو توصیه شده است (۴). اکثر روش‌های سابق استخراج DNAی باکتری چندین ساعت طول می‌کشد. همچنین اکثراً در اصول کار مشترکند، تنها تفاوت آنها در خلوص DNA به دست آمده است (۱) که مقدار DNA استخراج شده بر اساس روش مورد استفاده متفاوت است (۱۴). از لحاظ حساسیت و قابلیت تشخیص صحیح توالی مورد نظر در واکنش PCR، بین روش‌های مختلف استخراج DNA تفاوت معنی‌داری گزارش شده است (۹). بعضی روش‌ها مانند روش جوشاندن بسیار ساده و سریع است اما DNA به دست آمده از این روش خلوص پایینی دارد و به RNA، پروتئین، چربی و کربوهیدرات آلودگی دارد. این روش تنها از این نظر مهم می‌باشد که می‌تواند DNA را در دسترس قرار دهد. استخراج DNA با روش فنل-کلروفرم، دقیق و خلوص DNA نیز زیاد است، اما این روش بسیار طولانی است همچنین کار کردن با موادی مانند فنل بسیار خطرناک است و یک روش پرهزینه‌ای است (۱). همچنین در اغلب روش‌های استخراج DNA طی مراحل متعدد انتقال مواد، امکان آلودگی بالا می‌رود (۶ و ۲۲). بنابراین حذف مرحله استخراج DNA و استفاده از PCR مستقیم بسیار سودمند است (۶). پروتکل‌هایی که برای انجام PCR بدون استخراج DNA ارائه شده است روی گونه‌های گیاهی (۲۵)، ویروس (۲۲)، نروویروس‌ها (۲۳)، خون کامل (۶) و باکتری‌ها (۱۰ و ۱۹) قابلیت اجرا شدن را دارست.

تاکنون تحقیقات زیادی در تعیین ژنوتیپ باکتری *کلستریدیوم پرفرینجنس* انجام شده است (۵، ۱۲ و ۲۸) که در همه آنها واکنش PCR با استفاده از DNAی استخراج شده انجام گردیده ولی در این مطالعه واکنش PCR مستقیماً از کلونی باکتری و بدون استخراج DNA انجام گرفت. Layton و همکاران (۲۰۰۶) آزمایش Real-time PCR بدون استخراج DNA برای شناسایی همه گونه‌های باکتریوئیدها در مدفوع انسان، گاو و اسب طراحی کردند و گزارش دادند که این روش غلظت و کمیت مدفوع و منشا آن را در آب‌ها شناسایی می‌کند (۱۹). Fode-Vaughan و همکاران (۲۰۰۳) PCR مستقیم را یک روش مفید برای تشخیص *اشرشیاکلی* و دیگر عوامل بیماری‌زای محیطی و نمونه ارزیابی کردند (۱۰). گزارش شده که روش PCR مستقیم توان بالقوه‌ای برای آنالیز سریع تعداد زیادی نمونه گیاهی دارد. این روش می‌تواند بدون تجهیزات زیاد به راحتی به صورت اتومات در آمده و اجرایی شود (۲۵). همچنین این روش خطر آلودگی بین نمونه‌ها را محدود می‌کند (۲۲) و یک روش حساسی است. استفاده از روش PCR مستقیم، هزینه اجرای PCR را کمتر می‌کند و خطر آلودگی نمونه نیز کاهش می‌یابد (۶). Nishimura و همکاران (۲۰۰۹) گزارش کردند که RT-PCR مستقیم اختصاصیت و حساسیت کافی برای شناسایی نروویروس‌ها را دارد و مرحله استخراج و خالص‌سازی RNA می‌تواند حذف شود، همچنین گزارش کردند که استفاده از این روش برای شناسایی نروویروس‌ها در نمونه مدفوع آسان است و اطلاعات ارزشمندی در مورد انتشار ویروس می‌دهد، به علاوه این روش می‌تواند برای دیگر ویروس‌ها نیز کاربردی باشد (۲۳). در این تحقیق نشان داده شده است که نتایج PCR با استفاده از DNA استخراج شده و روش مستقیم، یکسان است و کیفیت باندهای ایجاد شده در هر دو روش تقریباً مشابه است (شکل ۱). توجیه روش PCR مستقیم این گونه است که حرارت دناتوره شدن اولیه به مدت ۵ دقیقه در دمای 95^oC و همچنین دناتوره شدن مکرر در 94^oC، برای لیز شدن و شکستن تعداد زیادی سلول کاملاً کفایت می‌کند و مقدار زیادی اسید نوکلئیک آزاد می‌شود که در واکنش به عنوان DNA الگو از آن استفاده می‌شود. در این مطالعه، PCR مستقیم به عنوان روشی آسان، سریع و کم هزینه در شناسایی ژنوتیپ‌های مختلف باکتری *کلستریدیوم پرفرینجنس* به کار رفت و با انجام PCR مستقیم از کلونی‌های باکتری نشان داده شد که استخراج DNA مرحله اساسی برای

www.SID.ir

Archive of SID

انجام PCR نیست که با یافته‌های حاصل از تحقیق Grevelding و همکاران (۱۹۹۶) نیز مطابقت دارد. از آنجایی که ژن‌های متفاوتی توکسین‌های مختلف این باکتری را کد می‌کنند، استفاده همزمان از چند پرایمر، در شناسایی توکسین‌های مختلف تداخلی ایجاد نمی‌کند و با استفاده از پرایمرهای مختلف که برای هر توکسین اختصاصی بود تیپ‌های مختلف این باکتری تشخیص داده شد. چنانکه در مقاله Van Asten و همکاران (۲۰۰۹) نیز PCR تک ژنی و Multiplex PCR، ۱۰۰٪ با هم مطابقت داشتند (۲۸). Baums و همکاران (۲۰۰۴) نیز از Multiplex PCR جهت تشخیص ژن کد کننده توکسین‌ها استفاده کردند و نشان دادند که Multiplex PCR یک ابزار مفید و مطمئن در تعیین ژنوتیپ *کلستریدیوم پرفرینجنس* است. همچنین گزارش دادند که PCR همه مشکلات روش‌های قبل در ژنوتیپ باکتری را به خوبی حل می‌کند و تنها در یک واکنش می‌تواند همه سویه‌ها را تشخیص دهد، حتی اگر باکتری تجزیه شده باشد (۵). اصول و روش کار این تحقیق با دیگر مطالعات (۵، ۱۶، ۲۸، ۲۹ و ۳۰) مطابقت زیادی دارد تنها تفاوت در این است که هدف روش حاضر حذف مرحله استخراج DNA است.

گزارش شده که روش PCR مستقیم برای ارگانیسم‌ها با دیواره سلولی طبیعی و همچنین دیواره سلولی از جنس کیتین و کوتیکول نیز کارایی دارد و انتظار می‌رود برای خیلی از سلول‌های یوکاریوتی نیز قابل اجرا باشد (۱۳). Bu و همکاران این روش را برای تعیین ژنوتیپ سریع بسیار امید بخش ارزیابی کردند (۶). زمانی که امکانات لازم جهت استخراج DNA در دسترس نباشد و یا اگر مقدار نمونه خیلی کم باشد استفاده از روش PCR مستقیم می‌تواند بسیاری از مشکلات را حل کند. بنابراین با توجه به اینکه استخراج DNA یک مرحله وقت‌گیر است و در صورت حذف این مرحله، تشخیص عوامل بیماری‌زا با سرعت بسیار بالاتری انجام می‌گیرد، می‌توان استفاده از PCR مستقیم را برای شناسایی میکروارگانیسم‌ها پیشنهاد کرد. این روش زحمت و هزینه PCR را کاهش داده و امکان آزمون تعداد زیادی نمونه را نیز فراهم می‌آورد. در زیر به بعضی از محاسن PCR مستقیم اشاره می‌شود که می‌تواند مشکلاتی که روش PCR معمولی با آن مواجه است را حل کند:

۱- اسید نوکلئیک برای کاربرد PCR معمولاً با روش فنل کلروفرم یا بعضاً یک روش جایگزین دیگری استخراج می‌شود که حداقل ۳ ساعت طول می‌کشد (۴) در حالی که با حذف این مرحله در PCR مستقیم کارهای مولکولی تسریع می‌شوند. ۲- مواد مورد استفاده در استخراج DNA ممکن است بازدارنده واکنش PCR باشند. برای مثال فنل اگر به طور کامل از محیط واکنش خارج نشود می‌تواند مانعی برای واکنش PCR باشد (۲۱). از مواد بازدارنده دیگر که در استخراج DNA به کار می‌رود می‌توان به SDS، پروتئیناز K و EDTA اشاره نمود (۳). ۳- استخراج DNA برای نمونه‌های باستانی یا DNAهایی که در اثر مرور زمان ضعیف شده‌اند یک مرحله خطرناک به حساب می‌آید که ممکن است به از بین رفتن DNA منجر شود (۴). ۴- در اغلب روش‌های استخراج DNA طی مراحل متعدد انتقال مواد، امکان آلودگی بالا می‌رود که در PCR مستقیم این مشکلات حل شده است (۶). ۵- زمانی که امکانات و مواد کمی در دسترس است و اگر مقدار نمونه خیلی کم باشد استفاده از این روش می‌تواند بسیاری از مشکلات را حل کند. ۶- هزینه پایین‌تر از دیگر برتری این روش است.

البته استفاده مستقیم از خون برای تکثیر قطعات DNA در واکنش PCR مشکل است زیرا بعضی مواد در خون ممکن است مانع لیز شدن سلول شوند و یا برای DNA پلیمراز مزاحمت ایجاد کنند به علاوه موادی مانند EDTA ممکن است مانع تکثیر DNA شوند (۶). اما PCR مستقیم برای میکروارگانیسم‌ها بسیار ساده‌تر از خون است زیرا میکروارگانیسم موجود در نمونه را می‌توان با یک کشت ساده خالص نمود و از کلونی‌های رشد کرده روی محیط جهت PCR استفاده نمود.

www.SID.ir

Archive of SID

تشکر و قدردانی

این تحقیق با امکانات و تجهیزات موسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی شعبه جنوب شرق کشور- کرمان انجام پذیرفته است لذا از همکاری‌های مسئولین محترم این موسسه تشکر و قدردانی می‌شود.

منابع

۱- امتیازی گیتی (۱۳۸۶). مبانی زیست مولکولی و مهندسی ژنتیک، ویرایش دوم، انتشارات مانی دانشگاه اصفهان، صفحات ۳۲۹-۲۶۹.

۲- حسنی‌طباطبایی عبدالمحمد و فیروزی رویا (۱۳۸۴). بیماری‌های باکتریایی دام، چاپ دوم، دانشگاه تهران، صفحات ۱۴۳-۱۱۴.

3- Aygan A. (2006). Nucleic Acid Extraction from Clinical Specimens for PCR Applications, Turkish Journal of Biology, 30: 107-120.

4- Bartlett J.M.S. and Stirling D. (2003). Methods in Molecular Biology, PCR Protocols. 2th ed., Humana press, 226; Pp 53-100.

5- Baums C.G., Schotte U., Amtsberg G. and Goethe R. (2004). Diagnostic multiplex PCR for toxin genotyping of *Clostridium perfringens* isolates. Veterinary Microbiology, 100: 11-16.

6- Bu Y., Huang H. and Zhou G. (2008). Direct polymerase chain reaction (PCR) from human whole blood and filter-paper-dried blood by using a PCR buffer with a higher pH. Analytical Biochemistry, 375: 370-372.

7- Cheng H.R. and Jiang N. (2006). Extremely rapid extraction of DNA from bacteria and yeasts. Biotechnology Letters, 28: 55-59.

8- Dale J.W. and Schantz Mv. (2002). Purification and separation of nucleic acids. From Genes to Genomes, Concepts and Applications of DNA Technology, Pp 31-39.

9- De Vries J.J.C., Claas E.C.J., Kroes A.C.M. and Vossen A.C.T.M. (2009). Evaluation of DNA extraction methods for dried blood spots in the diagnosis of congenital cytomegalovirus infection. Journal of Clinical Virology, 46(4): 37-42.

10- Fode-Vaughan K.A., Maki J.S., Benson J.A. and Collins M.L.P. (2003). Direct PCR detection of Escherichia coli O157:H7, Letters in Applied Microbiology, 37: 239-243.

11- Forbes B.A. and Sahm D.F. (2002). Baily & Scott'S Diagnostic Microbiology, 11th ed. Mosby, St. Louis, Mo, pp: 511-519.

12- Gokce H.I., Genc O., Sozmen M. and Gokce G. (2007). Determination of *Clostridium perfringens* Toxin-Types in Sheep with Suspected Enterotoxemia in Kars Province, Turkey. Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences, 31(5): 355-360.

13- Grevelding C.G., Kampkotter A., Hollmann M., Schafer U. and Kunz W. (1996). Direct PCR on fruitflies and blood flukes without prior DNA isolation. Nucleic Acids Research, 24 (20): 4100-01.

14- Guthrie J.N., Moriarty D.J.W. and Blackall L.L. (2000). DNA extraction from coral reef sediment bacteria for the polymerase chain reaction. Journal of Microbiological Methods, 43: 73-80.

15- Kalender H. and Ertas H.B. (2005). Isolation of *Clostridium perfringens* from Chickens and Detection of the Alpha Toxin Gene by Polymerase Chain Reaction (PCR). Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences, 29: 847-851.

16- Kalender H., Ertas H.B., Cetinkaya B., Muz A., Arslan N. and Kilic A. (2005). Typing of isolates of *Clostridium perfringens* from healthy and diseased sheep by multiplex PCR, Veterinary Medicine - Czech, 50(10): 439-442.

17- Kalender H., Kilic A. and Atil E. (2007). Enterotoxemia in a Cow due to *Clostridium perfringens* Type A, Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences, 31(1):83-84.

18- Komoriya T., Hashimoto A., Shinozaki A., Inoue M. and Kohno H. (2007). Study on Partial Purification of α-Toxin Produced from Obligate Anaerobe *Clostridium perfringens*, Report of the Research Institute of Industrial Technology, Nihon University, 88: 1-11.

19- Layton A., McKay L., Williams D., Garrett V. and Gentry R. (2006). Development of *Bacteroides* 16S rRNA Gene TaqMan-Based Real-Time PCR Assays for Estimation of Total, Human, and Bovine Fecal Pollution in Water. applied and environmental microbiology, 72(6): 4214-24.

20- Mahalanabis M., Al-Muayad H., Kulinski M.D., Altman D. and Klapperich C.M. (2009). Cell lysis and DNA extraction of gram-positive and gram-negative bacteria from whole blood in a disposable microfluidic chip. The Royal Society of Chemistry, 9: 2811-17.

www.SID.ir

Archive of SID

21- McOrist A.L., Jackson M. and Bird A.R. (2002). A comparison of five methods for extraction of bacterial DNA from human faecal samples. Journal of Microbiological Methods, 50: 131-139.

22- Michaud V., Gil P., Kwiatek O., Prome S., Dixon L., Romero L. and et al. (2007). Long-term storage at tropical temperature of dried-blood filter papers for detection and genotyping of RNA and DNA viruses by direct PCR. Journal of Virological Methods, 146: 257-265.

23- Nishimura N., Nakayamaa H., Yoshizumib S., Miyoshib M., Tonoikea H., Shirasakia Y. and et al. (2009). Detection of noroviruses in fecal specimens by direct RT-PCR without RNA purification. Journal of Virological Methods, Journal of Virological Methods, 163(2): 282-286.

24- Piatti R.M., Ikuno A.A. and Baldassi L. (2004). Detection of bovine *Clostridium perfringens* by polymerase chain reaction. Journal of Venomous Animals, 10(2): 154-160.

25- Rogers H.J. and Parkes H.C. (1999). Direct PCR amplification from leaf discs. Plant Science, 143: 183-186.

26- Sambrook J. and Russell D.W. (2002). Molecular cloning a laboratory manual, 3th ed, cold spring harbor laboratory press, pp: 18-96.

27- Timoney J.F., Gillespie J.H., Scott F.W. and Barlough J.E. (1988). Hagan and Bruner's microbiology and infectious diseases of domestic animals, 8th ed, Comstock Publishing Associates, Ithaca, N.Y. USA, pp: 214-40.

28- Van Asten A.J.A.M., van der Wiel C.W., Nikolaou G., Houwers D.J. and Grone A. (2009). A multiplex PCR for toxin typing of *Clostridium perfringens* isolates. Veterinary Microbiology, 136: 411-412.

29- Wasinski B. (2007). Contribution of *Clostridium perfringens* type A with β2 toxin gene in aetiology of porcine enteric diseases. Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy, 51: 509-513.

30- Yoo H.S., Lee S.U., Park K.Y. and Y.H Park. (1997). Molecular Typing and Epidemiological Survey of Prevalence of *Clostridium perfringens* Types by Multiplex PCR. Journal of Clinical Microbiology, 35: 228-232.

www.SID.ir