

مقایسه کیفی و کمی نتایج مربوط به چند روش استخراج DNA از ژنوم مایکوباکتریوم‌های بیماری‌زا و ساپروفیت

علی نصیری^۱، یونس انزابی^{۲*}، محمدرضا مشایخی^۳

۱- دانش‌آموخته کارشناسی ارشد زیست‌شناسی - ژنتیک، دانشکده علوم پایه، واحد تبریز، دانشگاه آزاد اسلامی، تبریز، ایران.

۲- استادیار گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، واحد تبریز، دانشگاه آزاد اسلامی، تبریز، ایران.

۳- استادیار گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، واحد تبریز، دانشگاه آزاد اسلامی، تبریز، ایران.

*نویسنده مسئول مکاتبات: anzabi@iaut.ac.ir

(دریافت مقاله: ۹۶/۴/۳۰ پذیرش نهایی: ۹۷/۲/۹)

چکیده

با توجه به اینکه نخستین مرحله جهت انجام آزمایش‌های مولکولی مانند واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراس (Polymerase Chain Reaction; PCR) داشتن DNA کافی و با کیفیت می‌باشد، هدف از انجام این مطالعه مقایسه پنج روش مختلف استخراج DNA ژنومی مایکوباکتریوم‌ها به منظور معرفی بهترین روش بود. بدین منظور از پرگنه‌های خالص مایکوباکتریوم *اوپوم پاراتوبرکلوزیس* به‌عنوان مایکوباکتریوم بیماری‌زا و نیز سویه‌ای از یک مایکوباکتریوم ساپروفیت به نام *مایکوباکتریوم فلی* استفاده شد. کمیت و کیفیت DNA های به‌دست آمده توسط هر یک از روش‌ها، به ترتیب بر اساس غلظت DNA استخراجی (نانوگرم در میکرولیتر) در طول موج ۲۶۰ نانومتر و نیز بر مبنای نسبت OD در طول موج‌های ۲۶۰/۲۸۰ با استفاده از دستگاه نانودراپ محاسبه و مورد ارزیابی قرار گرفت. استخراج DNA از ژنوم مایکوباکتریوم‌ها با استفاده از روش CTAB (Cetyltrimethylammonium bromide) بیشترین میزان و روش مبتنی بر جوشانیدن کمترین میزان DNA را حاصل کرد. همچنین مقایسه میزان خلوص DNA استخراج شده در این روش‌ها نیز نشان داد که استخراج DNA با استفاده از روش CTAB بیشترین میزان و روش مبتنی بر جوشانیدن بازهم کمترین میزان خلوص را داشته است. همچنین بین دو نوع باکتری از نظر کیفیت DNA های استخراج شده در هیچ یک از روش‌های استفاده شده برای استخراج DNA اختلاف معنی‌داری وجود نداشت. با توجه به نتایج مطالعه حاضر به نظر می‌رسد که استفاده از روش CTAB یکی از مناسب‌ترین روش‌ها جهت استخراج DNA ژنومی از مایکوباکتریوم‌ها جهت تشخیص مولکولی آنها در نمونه‌های مختلف می‌باشد. کلیدواژه‌ها: استخراج DNA، ژنوم، مایکوباکتریوم، بیماری‌زا، ساپروفیت.

مقدمه

بیماری‌ها اکثراً میکروارگانیسم‌هایی با رشد کند و حساس به شرایط محیط کشت هستند، لذا این مسئله کشت و تکثیر آزمایشگاهی آنها را با مشکل مواجه ساخته است، به طوری که اغلب سویه‌های مایکوباکتریوم *اوویوم پاراتوبرکلوزیس* که نیازمند به مایکوباکتین J (سیدروفور متصل به آهن) هستند حتی در حضور این ماده به عنوان عامل رشد مهم خود نیز به کندی رشد می‌کنند. از طرف دیگر طولانی شدن مدت زمان گرم‌خانه‌گذاری جهت مشاهده پرگنه این باکتری‌ها (حدود ۱۶-۸ هفته)، غالباً باعث افزایش احتمال آلودگی ثانویه آزمایشگاهی و نیز حتی خشک شدن و ناکارآمد شدن محیط کشت قبل از حصول نتیجه لازم می‌شود که معمولاً در ثبت نتایج واقعی تأثیر می‌گذارد. علاوه بر این، مایکوباکتریوم‌ها غالباً تشکیل اشکال سلولی با دیواره ناقص یا اسفروپلاستی را می‌دهند که همین خاصیت امکان کشت آن‌ها را هم دوچندان مشکل می‌کند. از طرف دیگر نمونه‌های منجمد شده در مقایسه با نمونه‌های تازه، از حساسیت کمتری در عمل کشت برخوردارند. همچنین مطالعات مختلف نشان داده است که در عفونت‌های تحت‌بالینی، باکتری مذکور در مونسیت‌های خونی و ماکروفاژهای بافتی جایگزین شده و بعدها ممکن است از آن‌ها بیرون بریزد که در این موارد مخصوصاً آزمایش واکنش زنجیره‌ای پلی‌مرز (Polymerase Chain Reaction; PCR) با کارایی بالایی حضور این باکتری را بسیار بهتر در مقایسه با کشت می‌تواند شناسایی کند (Bono *et al.*, 1995; Bauerfeind *et al.*, 1996; Barrington *et al.*, 2003; Sivakumar *et al.*, 2004). لذا به نظر می‌رسد که کشت میکروبی نمی‌تواند آلودگی واقعی نمونه‌ها را به

مایکوباکتریوم‌ها جنسی از باکتری‌ها هستند که دارای گونه‌های مختلفی بوده و در سرتاسر جهان پراکنده‌اند. از میان گونه‌های پاتوژن متعددی که شناخته شده‌اند مایکوباکتریوم *لپره‌آ* و مایکوباکتریوم *لپره‌موریوم* انگل‌های داخل سلولی اجباری هستند (تا به حال در محیط آزمایشگاه کشت داده نشده‌اند) در حالی که گونه‌های *اویوم*، *بوویس*، *فورچیتوم*، *کانزاسی* و *توبرکلوزیس* انگل‌های داخل سلولی اختیاری می‌باشند. همچنین، بسیاری از گونه‌های جنس مایکوباکتریوم از جمله *فلئی ساپروفیت* هستند (Anzabi *et al.*, 2006; Anzabi *et al.*, 2009; Khakpoor *et al.*, 2011).

بر اساس آنالیز ژن‌های اسید ریبونوکلئیک ریبوزومی (rRNA) به طور کلی گونه‌های جنس مایکوباکتریوم به دو دسته تقسیم می‌شود که دسته اول شامل مایکوباکتریوم‌های سریع‌الرشد می‌باشد که غالباً مایکوباکتریوم‌هایی غیربیماری‌زا و محیطی هستند و دسته دوم هم شامل مایکوباکتریوم‌های کندرشد می‌باشد که مایکوباکتریوم‌هایی بیماری‌زا هستند. نشان داده شده است که در مایکوباکتریوم‌های کندرشد میزان rRNA از انواع سریع‌الرشد به مراتب کمتر است (Fang *et al.*, 2002; Elphinstone *et al.*, 2003; Aghazade *et al.*, 2004).

عقیده بر این است که بهترین روش جداسازی مایکوباکتریوم‌ها از نمونه‌های بالینی ارسالی به آزمایشگاه، استفاده از کشت اختصاصی به عنوان روش استاندارد طلایی می‌باشد (Anzabi *et al.*, 2009)، ولی در عین حال به کارگیری روش فوق دارای مشکلاتی نیز می‌باشد. در واقع نظر بر این‌که مایکوباکتریوم‌های

استاندارد DNA باکتری‌های مذکور در نمونه‌ها، می‌توان حساسیت آزمایشات مبتنی بر واکنش PCR جهت تشخیص این باکتری‌ها را ارتقا داده و پاسخ‌های مثبت واقعی بیشتری را در نمونه‌های بالینی تشخیص داد (Cousins *et al.*, 1999; Nebbia *et al.*, 2006; Wells *et al.*, 2006).

با توجه به مطالب ذکر شده و نظر بر این‌که PCR از جمله روش‌های تشخیصی آزمایشگاهی است که به علت دارا بودن ویژگی و حساسیت بالا و نیز سرعت عمل و سهولت انجام، امروزه جایگاه ویژه‌ای در میان انواع تحقیقات و تشخیص‌های مولکولی پیدا کرده است و نیز با توجه به اینکه قدم اول در مطالعات مبتنی بر بیولوژی مولکولی نظیر PCR، مرحله pre-PCR یعنی استخراج DNA می‌باشد، لذا مطالعه حاضر با هدف بالا بردن کیفیت، خلوص و کمیت DNA استخراجی از مایکوباکتریوم‌ها و ارائه روشی اختصاصی در این زمینه و نیز بهبود میزان حساسیت روش‌های تشخیصی مولکولی مخصوصاً PCR، انجام گرفت که به این منظور از مقایسه چند روش استخراج DNA ژنومی از مایکوباکتریوم اوویوم تحت‌گونه پاراتوبرکلوزیس به‌عنوان مایکوباکتریومی پاتوژن و کندرشد و سویه‌ای استاندارد از مایکوباکتریوم فئوسی به‌عنوان مایکوباکتریومی ساپروفیت و با رشد نسبتاً سریع استفاده گردید.

مواد و روش‌ها

مطالعه حاضر نوعی تحقیق تجربی است که در آن از پرگنه‌های خالص یکی از سویه‌های استاندارد

مایکوباکتریوم‌ها مشخص کند. بنابراین امروزه ردیابی DNA اختصاصی گونه‌ها، به‌عنوان یک روش سریع برای تشخیص مایکوباکتریوم‌ها در نمونه‌های بالینی ارسالی به آزمایشگاه‌های میکروبی‌شناسی کاربرد خوبی دارد (Anzabi *et al.*, 2009; Khakpoor *et al.*, 2011). گزارش‌های متعدد نشان می‌دهد پیشرفت‌های اخیر که در روش‌های مولکولی به‌دست آمده، راه را برای شناسایی و جداسازی هر چه بهتر این باکتری‌ها هموار کرده است (Cousins *et al.*, 1999; Fang *et al.*, 2002; Aghazade *et al.*, 2004; Anzabi and Hanifian, 2012).

در مطالعات مولکولی میکروبیولوژیکی، اولین مرحله استخراج DNA از ژنوم باکتری‌ها می‌باشد. اما وجود مقدار زیادی از لپیدهای کمپلکس مخصوصاً اسید مایکولیک در دیواره مایکوباکتریوم‌ها تا حدود زیادی باعث مقاومت در برابر عملکرد ترکیبات موجود در کیت‌های استخراج DNA می‌شود، به‌طوری‌که در برخی از پژوهش‌ها نشان داده شده که باکتری مایکوباکتریوم اوویوم پاراتوبرکلوزیس که دارای دیواره‌ای غنی از چربی (که گاهی تا ۶۰ درصد وزن خشک این باکتری را تشکیل می‌دهد)، پلی‌ساکارید و پروتئین می‌باشد، در برابر عملکرد ترکیبات موجود در کیت‌های استخراج DNA مقاومت کرده و لذا به‌هنگام استخراج DNA از باکتری مذکور غالباً DNA خالص و یک‌دست به‌دست نمی‌آید (Bono *et al.*, 1995; Bauerfeind *et al.*, 1996; Chan *et al.*, 2005; Butcher *et al.*, 1996).

لذا با اینکه آزمایش PCR دارای حساسیت بالایی برای تشخیص مایکوباکتریوم‌ها می‌باشد، ولی عقیده بر این است که با ابداع روش‌های بهتر استخراج و تخلیص

- استخراج DNA مایکوباکتریوم های مورد آزمایش بوسیله روش جوشانیدن: ابتدا برای غیرفعال کردن باکتری های مورد نظر، میکروتیوب های حاوی سوسپانسیون میکروبی تهیه شده از باکتری های مذکور را به مدت بیست دقیقه در دمای ۸۰ درجه سلسیوس قرار داده و سپس مراحل استخراج انجام گرفت. در مرحله اول با استفاده از عمل سانتریفیوژ در شتاب ۴۰۰۰ دور به مدت ۵ دقیقه رسوب سلول های باکتریائی از مقدار ۲۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون میکروبی استاندارد تهیه شده، جدا گردید. در ادامه پس از حل کردن رسوب ها در ۱۰۰ مایکرولیتر از بافر TE (Tris)، محلول های مذکور در بن ماری ۹۵ درجه سلسیوس به مدت ۱۵ دقیقه گرم خانه گذاری شد. سپس محلول های مذکور در شتاب ۱۲۰۰۰ دور به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ گردید. در نهایت هم مایع رویی که حاوی DNA های استخراج شده بود، به یک میکروتیوب جدید جهت نگه داری و استفاده در آزمایشات مولکولی انتقال داده شد و در دمای یخچال موقتاً نگه داری گردید (Queipo-Ortuño; *et al.*, 2008).

- استخراج DNA مایکوباکتریوم های مورد آزمایش بر اساس روش CTAB (Cetyltrimethylammonium bromide): ابتدا با استفاده از مقدار ۲۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون استاندارد تهیه شده و به کمک بافر لیزکننده و عمل سانتریفیوژ در شتاب ۱۶۰۰ دور به مدت ۱۵ دقیقه، رسوب سلول های باکتریائی از سوسپانسیون میکروبی مذکور جدا شد. سپس، سلول های رسوب شده به میکروتیوب های ۱/۵ میلی لیتری اپندورف منتقل شد. در ادامه ۶۰۰ میکرولیتر از بافر CTAB که قبلاً در

مایکوباکتریوم اوویوم پاراتوبرکلوزیس (DSM: 44133) و نیز یکی از سویه های استاندارد مایکوباکتریوم فئسی (ATTC: 11758) که از طریق کشت اختصاصی روی محیط هرولد حاوی زرده تخم مرغ حاصل شده بودند، جهت استخراج DNA استفاده گردید. بدین منظور ابتدا از هر یک از باکتری های مذکور سوسپانسیون میکروبی استاندارد بر اساس کدورت لوله شماره ۰/۵ مک فارلند تهیه و سپس بر مبنای روش های توصیف شده در زیر از هر کدام جداگانه و در ۵ تکرار مشابه عمل استخراج DNA انجام گرفت. لازم به ذکر است که در مورد تمام روش های استفاده شده به منظور کنترل صحت فرآیند استخراج، مقدار ۴ میکرولیتر از DNA Extraction Control (Primer Design LTD, UK) هم به هر لوله مربوط به استخراج DNA باکتری های فوق جداگانه اضافه شد (Klanicova *et al.*, 2012). همچنین با توجه به اینکه میزان خلوص DNA یک عامل بسیار مهم در کیفیت کارهای آزمایشگاه ژنتیک مولکولی است و در این ارتباط استفاده از عمل الکتروفورز با ژل آگارز معیار مهمی برای محاسبه کیفیت DNA و عدم شکستگی آن می باشد. لذا پس از مشخص شدن بهترین روش استخراج بر مبنای آنالیز آماری داده های به دست آمده، با انتخاب تعدادی از DNA های به دست آمده از روش مذکور (به عنوان روشی که در آن غلظت DNA های استخراج شده مناسب بوده و در عین حال بیشترین خلوص را نیز در این مورد حاصل کرده) به صورت تصادفی، آزمایش PCR ساده انجام و سپس باندهای به دست آمده بر روی ژل آگارز بررسی شدند.

درجه سلسیوس قرار گرفت. در این مرحله کلاف DNA قابل رؤیت بود. در ادامه میکروتیوب‌ها از فریزر خارج شده و ۱۵ دقیقه در دمای ۲- درجه سلسیوس، با شتاب ۱۰۰۰۰ دور سانتریفیوژ شدند تا کلاف DNA رسوب کند. سپس مایع رویی میکروتیوب‌ها خالی شده و به هر یک از آنها مقدار ۷۰ میکرولیتر اتانول ۷۰ درجه اضافه گردید تا رسوب حاصله شسته شود. در ادامه، بعد از پنج دقیقه سانتریفیوژ با شتاب ۱۰۰۰۰ دور در دمای ۴ درجه سلسیوس، مایع رویی خالی گردید. این مرحله مجدداً تکرار شد و بعد از آن میکروتیوب‌ها به صورت وارونه روی دستمال کاغذی قرار گرفتند تا خشک شوند. در نهایت و پس از خشک شدن کامل، به هر میکروتیوب مقدار ۵۰ میکرولیتر آب دوبار تقطیر دیونیزه استریل افزوده شده و حدود ۱۲ ساعت در دمای یخچال نگهداری شدند تا رسوب DNA به آرامی حل شود (Anzabi et al., 2006; Anzabi et al., 2009).

- استخراج DNA مایکوباکتریوم‌های مورد آزمایش با استفاده از کیت استخراج باکتری‌های گرم منفی: در این روش استخراج DNA باکتری‌ها با استفاده از کیت شرکت سیناژن (Cinna Pure-DNA Kit, PR881613, Cat No. و بر اساس دستورالعمل مربوطه به شرح زیر انجام گرفت:

۱- با استفاده از عمل سانتریفیوژ در شتاب ۵۰۰۰ دور به مدت ۵ دقیقه رسوب سلول‌های باکتریائی از مقدار ۲۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون میکروبی استاندارد تهیه شده، جدا گردید.

داخل بن‌ماری و در دمای ۶۰ درجه سلسیوس قرار داده شده بود، به داخل میکروتیوب‌ها اضافه گردید و چند دقیقه با دست تکان داده شد. سپس، بن‌ماری در دمای ۶۲ درجه سلسیوس تنظیم گردیده و نمونه‌ها بر روی یونولیت قرار داده شد (جهت شناورماندن در بن‌ماری و جلوگیری از باز شدن در میکروتیوب‌ها) و به مدت ۳۰ دقیقه داخل بن‌ماری قرار گرفت. لازم به ذکر است که هر ۵ الی ۶ دقیقه یکبار میکروتیوب‌های داخل بن‌ماری را تکان داده می‌شد تا بافر به‌طور کامل به کل نمونه برسد. همچنین در اواسط گرم‌خانه‌گذاری هم ۱ تا ۲ میکرولیتر از محلول ۲ درصد ترکیب ۲-مرکاپتواتانل به هر کدام از نمونه‌ها اضافه شد. در ادامه به هر تیوب ۵۰۰ میکرولیتر از مخلوط کلروفورم/ایزوامیل‌الکل (۱:۲:۴) افزوده شد، سپس میکروتیوب‌ها به مدت ۲۰ دقیقه روی شیکر قرار گرفتند. در نهایت هم به مدت ۱۵ دقیقه، در دمای ۴ درجه سلسیوس، با شتاب ۱۳۰۰۰ دور سانتریفیوژ شدند. در ادامه مایع فوقانی هر میکروتیوب با دقت زیاد، برداشته شده و به میکروتیوب‌های استریل جدید انتقال یافت. سپس مرحله افزودن مخلوط (۱:۲:۴) کلروفورم/ایزوامیل‌الکل مجدداً تکرار شد. منتها این بار به همان میزان که از فاز بالایی برداشته شده بود، به همان مقدار هم از مخلوط کلروفورم/ایزوامیل‌الکل به میکروتیوب‌ها اضافه شده و باز هم به مدت ۱۵ دقیقه، در دمای ۴ درجه سلسیوس، با شتاب ۱۳۰۰۰ دور سانتریفیوژ شد. در ادامه مقدار ۶/۰ حجم از محلول ایزوپروپانول سرد به نمونه‌ها اضافه شد، سپس محتویات داخل میکروتیوب‌ها به آرامی تکان داده شده و به مدت ۱۰ تا ۲۰ دقیقه در فریزر ۲۰-

۱۶- در نهایت مایع رویی که حاوی DNA های استخراج شده بود، به یک میکروتیوب جدید انتقال داده شد و در دمای یخچال موقتاً نگه‌داری گردید.

- استخراج DNA مایکوباکتریوم‌های مورد آزمایش با استفاده از کیت استخراج باکتری‌های گرم مثبت: در این روش هم استخراج DNA باکتری‌ها با استفاده از کیت شرکت سیناژن (Cinna Pure- DNA PR881614 Kit, Cat No.) و بر اساس دستورالعمل مربوطه به شرح زیر انجام گرفت:

۱- ابتدا با استفاده از عمل سانتریفیوژ در شتاب ۵۰۰۰ دور به مدت ۵ دقیقه رسوب سلول‌های باکتریایی از مقدار ۲۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون میکروبی استاندارد تهیه شده، جدا گردید.

۲- حل کردن رسوب باکتریایی به‌دست آمده با استفاده از ۲۰۰ میکرولیتر لیز بافر آنزیمی موجود در کیت.

۳- گرم‌خانه‌گذاری محلول باکتریایی تهیه‌شده در بن-ماری ۳۷ درجه سلسیوس به مدت ۳۰ دقیقه.

۴- اضافه‌کردن ۲۰۰ میکرولیتر از بافر LB (Lysis buffer) و نیز ۱۰ میکرولیتر از محلول حاوی آنزیم پروتئیناز K و در ادامه گرم‌خانه‌گذاری در بن-ماری ۵۶ درجه سلسیوس به مدت ۳۰ دقیقه.

۵- اضافه‌کردن ۱۰۰ میکرولیتر ایزوپروپانول به محلول باکتریایی و ورتکس کردن به مدت ۱۵ ثانیه.

۶- قراردادن ستون داخل تیوب ۲ میلی‌لیتری و ریختن تمام محلول داخل ستون.

۷- سانتریفیوژ محلول مذکور در شتاب ۱۱۰۰۰ دور به مدت ۱ دقیقه.

۸- حذف مایع عبوری از فیلتر.

۲- حل کردن رسوب باکتری‌ها با ۱۰۰ میکرولیتر بافر لیز اولیه و ۲۰ میکرولیتر آنزیم ریوتیناز.

۳- قراردادن محلول مرحله دوم در بن ماری ۵۵ درجه سلسیوس به مدت ۱ الی ۳ ساعت.

۴- اضافه کردن ۴۰۰ میکرولیتر بافر لیزکننده به محلول مذکور و انجام عمل ورتکس به مدت ۲۰ ثانیه.

۵- اضافه‌کردن ۳۰۰ میکرولیتر از محلول رسوب PR (Precipitation solution) و انجام ورتکس به مدت ۵ ثانیه.

۶- قراردادن ستون داخل تیوب ۲ میلی‌لیتری و ریختن تمام محلول داخل ستون.

۷- انجام عمل سانتریفیوژ در شتاب ۱۳۰۰۰ دور به مدت ۱ دقیقه.

۸- حذف مایع عبوری از فیلتر.

۹- در ادامه ریختن مقدار ۴۰۰ میکرولیتر از بافر WI (Wash buffer I) داخل ستون و انجام سانتریفیوژ با شتاب ۱۳۰۰۰ دور طی مدت ۱ دقیقه.

۱۰- حذف مایع عبوری از فیلتر.

۱۱- در ادامه ریختن مقدار ۴۰۰ میکرولیتر از بافر WII (Wash buffer II) داخل ستون و انجام سانتریفیوژ با شتاب ۱۳۰۰۰ دور طی مدت ۱ دقیقه.

۱۲- حذف مایع عبوری از فیلتر.

۱۳- انجام عمل سانتریفیوژ مجدد با شتاب ۱۳۰۰۰ دور به مدت ۱ دقیقه.

۱۴- انتقال ستون به میکروتیوب جدید و اضافه‌کردن ۵۰ میکرولیتر از بافر EB (Elution buffer) و قراردادن آن در بن‌ماری ۶۵ درجه سلسیوس به مدت ۳-۵ دقیقه.

۱۵- سانتریفیوژ در شتاب ۱۳۰۰۰ دور به مدت ۱ دقیقه.

۲- در ادامه ۶۰۰ میکرولیتر کلروفرم به مخلوط مذکور اضافه شده و چند بار تکان داده شد.

۳- به مدت ۲ دقیقه عمل سانتریفیوژ در شتاب ۱۰۰۰۰ دور.

۴- انتقال فاز رویی به میکروتیوب جدید و اضافه کردن ۷۲۰ میکرولیتر آب مقطر دوبار تقطیر دیونیزه استریل به اضافه ۸۰ میکرولیتر از بافر 10X (Elution buffer) کیت به نمونه مذکور.

۵- انجام سانتریفیوژ با شتاب ۱۰۰۰۰ دور در مورد نمونه به دست در مرحله قبل به مدت ۲ دقیقه.

۶- حذف مایع رویی و حل کردن رسوب حاوی DNA استخراجی در ۱۰۰ میکرولیتر از محلول NaCl.

۷- اضافه کردن ۳۰۰ میکرولیتر اتانول خالص سرد شده در دمای ۲۰- درجه سلسیوس به مدت ۱۰ دقیقه.

۸- انجام عمل سانتریفیوژ در شتاب ۱۰۰۰۰ دور بر روی نمونه مرحله قبل به مدت ۳ دقیقه.

۹- حذف مایع روئی و شستشو یک بار دیگر با اتانول ۷۰ درجه.

۱۰- حل کردن DNAهای استخراجی در ۱۰۰ میکرولیتر آب مقطر دوبار تقطیر دیونیزه استریل و انتقال آن به یک میکروتیوب جدید جهت استفاده در آزمایش PCR و نگهداری موقتی آن در دمای یخچال.

- نحوه قرائت و ارزیابی نتایج کار: در نهایت جهت ارزیابی غلظت DNAهای استخراج شده توسط هر یک از روش‌های مذکور (بر حسب نانوگرم در میکرولیتر) در طول موج ۲۶۰ نانومتر و جهت ارزیابی خلوص DNAهای مذکور با توجه به نسبت OD (چگالی نوری) در طول موج‌های ۲۶۰/۲۸۰ از دستگاه نانودراپ

۹- اضافه کردن ۶۰۰ میکرولیتر از بافر WI (Wash buffer I) به داخل ستون و سانتریفیوژ کردن آن در شتاب ۱۱۰۰۰ دور به مدت ۱ دقیقه.

۱۰- حذف مایع عبوری از فیلتر.

۱۱- اضافه کردن ۵۰۰ میکرولیتر از بافر WII (Wash buffer II) به داخل ستون و سانتریفیوژ کردن آن در شتاب ۱۱۰۰۰ دور به مدت ۱ دقیقه.

۱۲- حذف مایع عبوری از فیلتر.

۱۳- انتقال ستون به میکروتیوب جدید و اضافه کردن ۷۵ میکرولیتر از بافر EB (Elution buffer) به آن.

۱۴- در نهایت محلول مذکور در شتاب ۱۱۰۰۰ دور به مدت ۱ دقیقه سانتریفیوژ گردیده و مایع رویی که حاوی DNAهای استخراج شده بود، به یک میکروتیوب جدید جهت استفاده در آزمایش PCR انتقال داده شد و در دمای یخچال موقتاً نگهداری گردید.

- استخراج DNA مایکوباکتریوم‌های مورد آزمایش بر اساس کیت Thermo: بدین منظور از کیت استخراج DNA ساخت شرکت ترمو (DNA Purification DNPTM KIT- K0512; Lot: 00243919) و دستورالعمل مربوطه که توسط شرکت سازنده کیت توصیه شده بود، به شرح زیر استفاده گردید:

۱- ابتدا حدود ۲۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون میکروبی استاندارد تهیه شده هر یک از باکتری‌های مورد نظر، با ۴۰۰ میکرولیتر از بافر لیزکننده کیت مخلوط گردیده و در بن ماری ۶۵ درجه سلسیوس به مدت ۵ دقیقه گرم-خانه گذاری شد.

شد. بالاخره در سیکل آخر هم برای توسعه نهائی محصول آزمایش PCR، از همان دما در مدت ۷ دقیقه استفاده گردید. برنامه مذکور هم با استفاده از مقدار ۱ میکرولیتر از هر یک از پرایمرهای FP-25 و RP-26 (با غلظت ۰/۵ میکرومولار) و DNA استخراجی الگو به میزان ۶ میکرولیتر (۱۰۰ نانوگرم) و آنزیم TaqDNA polymerase (۵ واحد در میکرولیتر) به میزان ۰/۴ میکرولیتر که به همراه دیگر اجزای آزمایش یعنی مخلوط بازهای آلی سه فسفات (۱۰ میکرومولار) به مقدار ۰/۵ میکرولیتر و کلرید منیزیم (۵۰ میکرومولار) به مقدار ۱/۵ میکرولیتر و با اضافه کردن ۵ میکرولیتر از بافر 10X PCR و نیز ۳۴/۶ میکرولیتر آب مقطر دیونیزه استریل، که همگی از شرکت طوبی نگین تهران تهیه شده بود، با حجم نهائی ۵۰ میکرولیتر در میکروتیوب-های استریل ریخته شده و در میکروپلیت مخصوص دستگاه ترمال سایکلر شرکت اپندروف (Eppendorf-Germany) قرار داده شد. مطابق برنامه مذکور نیز در طی روند PCR قطعه‌ای به اندازه ۲۲۹ جفت‌باز تکثیر داده شد که در عمل الکتروفورز با مقدار ۷/۵ میکرولیتر از محصول PCR و در آگاروز ۱/۲ درصد باند آن مشخص گردید. در نهایت هم برای تصویربرداری از ژل‌های الکتروفورز شده نتایج PCR که نشان‌دهنده محصولات به دست آمده در مطالعه حاضر می‌باشد از دستگاه Box™ gel documentation (شرکت سینژن کمبریج، انگلستان) استفاده شد (Anzabi et al., 2006; Anzabi et al., 2009; Khakpoor et al., 2011; Anzabi et al., 2012).

- تحلیل آماری داده‌ها: جهت مقایسه کمیت و کیفیت DNAهای استخراج شده توسط روش‌های مختلف،

(Nanodrop 1000; Scientific, USA-Thermo) موجود در مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی دانشگاه آزاد اسلامی تبریز استفاده گردید. هم‌چنین جهت اثبات صحت عمل استخراج DNA مخصوصاً کیفیت آن‌ها از آزمایش simple-PCR و با بهره‌گیری از یک جفت پرایمر طراحی و سفارش داده شده به شرکت Shanghai Generary Biotech مربوط به سکانس IS900 که جایگاه ژنتیکی اختصاصی در باکتری مایکوباکتریوم اوویوم تحت گونه پاراتوبرکلوزیس می‌باشد به شرح زیر استفاده گردید (Marsh et al., 1999; Anzabi et al., 2006):

Forward Primer (F-IS900-562): 5'-CCGCTAATTGAGAGATGCGATTGG-3'

Rivers Primer (R-IS900-562): 5'-AATCAACTCCAGCAGCGCGCCTCG-3'

لازم به ذکر است که از DNAهای استخراج شده مربوط به یک سویه استاندارد از باکتری مذکور (DSM: 44133) به عنوان کنترل مثبت و از آب مقطر دوبار تقطیر دیونیزه استریل به عنوان کنترل منفی و همچنین از DNAهای استخراج شده از باکتری مایکوباکتریوم فلئی هم به عنوان نمونه منفی جهت تأیید اختصاصی بودن پرایمرهای مذکور در آزمایش PCR مورد نظر استفاده گردید. برنامه PCR مورد استفاده هم به این صورت انجام شد که در سیکل اول عمل دناتوراسیون به مدت ۴ دقیقه در دمای ۹۴ درجه سلسیوس در مورد نمونه‌ها اعمال گردید. همچنین در سیکل‌های اصلی هم که ۳۵ بار تکرار شدند، جهت انجام عمل مذکور از همان دما ولی به مدت ۳۰ ثانیه و برای اتصال از دمای ۷۰ درجه سلسیوس طی همان مدت زمان و برای عمل توسعه هم از دمای ۷۲ درجه سلسیوس به مدت ۴۰ ثانیه استفاده

یافته‌ها

نتایج مربوط به کیفیت و کمیت DNAهای استخراج‌شده از میکوباکتریوم‌های مورد آزمایش توسط روش‌های مختلف در جداول ۱ و ۲ نشان داده شده است:

به‌طور جداگانه از آزمون آماری دانکن بر مبنای میانگین داده‌های داده‌های بدست آمده مربوط به ۵ بار تکرار عمل استخراج DNA در سطح اطمینان ۹۵ درصد با استفاده از نسخه ۲۲ نرم‌افزار SPSS و برای مقایسه نتایج حاصله در دو گروه باکتری از آنالیز آماری تی (t-student) استفاده گردید.

جدول ۱- مقایسه روش‌های استخراج DNA با استفاده از آزمون آماری دانکن بر اساس خلوص DNAهای استخراج‌شده

| روش استفاده‌شده برای استخراج DNA | تعداد دفعات استخراج DNA از باکتری ^(۱) M.a.p | تعداد دفعات استخراج DNA از باکتری ^(۲) M.ph | میانگین نتیجه بر اساس غلظت DNAهای استخراج‌شده (ng/ul) ^(۳) |
|----------------------------------|--|---|--|
| CTAB | ۵ | ۵ | ۱۱۵۳/۵۵۰±۰/۰۴ ^a |
| کیت باکتری‌های گرم مثبت | ۵ | ۵ | ۱۰۸/۴۲۰±۰/۰۳ ^{bc} |
| کیت شرکت ترمو | ۵ | ۵ | ۳۴/۳۹۰±۰/۰۲ ^c |
| کیت باکتری‌های گرم منفی | ۵ | ۵ | ۳۲/۴۵۰±۰/۰۲ ^c |
| جوشانیدن | ۵ | ۵ | ۲/۴۶۰±۰/۰۱ ^c |

1) *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* 2) *Mycobacterium phlei* 3) mean±SD; Alpha= 0.05

جدول ۲- مقایسه میانگین روش‌های استخراج DNA با استفاده از تحلیل آماری بر اساس غلظت DNAهای استخراج‌شده

| روش استفاده‌شده برای استخراج DNA | تعداد دفعات استخراج DNA از باکتری ^(۱) M.a.p | تعداد دفعات استخراج DNA از باکتری ^(۲) M.ph | میانگین نتیجه بر اساس خلوص DNAهای استخراج‌شده (A260/A280) ^(۳) |
|----------------------------------|--|---|--|
| CTAB | ۵ | ۵ | ۱۱۵۳/۵۵۰±۰/۰۴ ^a |
| کیت باکتری‌های گرم منفی | ۵ | ۵ | ۱۰۸/۴۲۰±۰/۰۳ ^{bc} |
| کیت شرکت ترمو | ۵ | ۵ | ۳۴/۳۹۰±۰/۰۲ ^c |
| کیت باکتری‌های گرم مثبت | ۵ | ۵ | ۳۲/۴۵۰±۰/۰۲ ^c |
| جوشانیدن | ۵ | ۵ | ۲/۴۶۰±۰/۰۱ ^c |

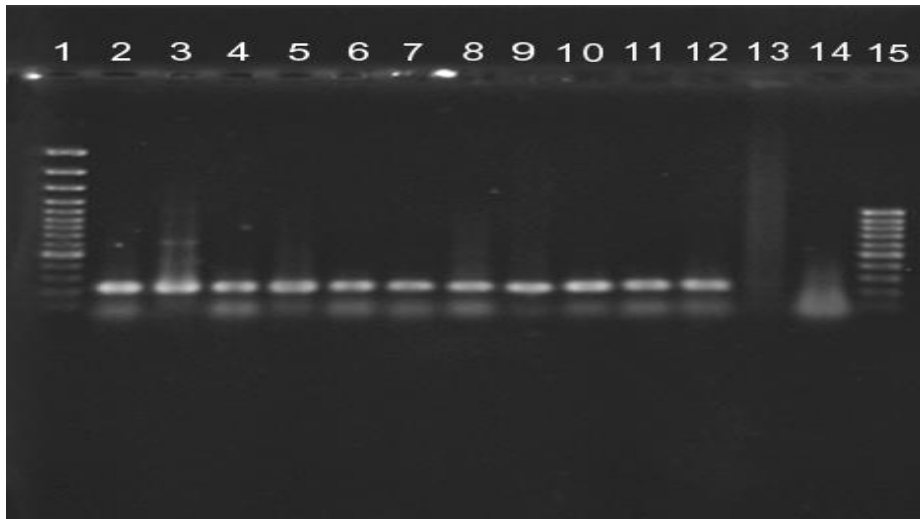
1) *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* 2) *Mycobacterium phlei* 3) Mean±SD; Alpha= 0.05

مختلف استفاده‌شده، استخراج DNA با استفاده از روش CTAB بیشترین میزان و روش مبتنی بر

بر اساس جدول ۱ و مقایسه میزان خلوص DNAهای استخراج‌شده توسط روش‌های

از مایکوباکتریوم‌های مورد آزمایش نیز در شکل ۱ نشان داده شده است. در این تصویر در چاهک‌های ردیف ۱ و ۱۵ سایز مارکر ۱۰۰ جفت‌بازی شرکت فرمتاز، در ردیف‌های ۱۲-۲ محصول PCR با استفاده از DNAهای استخراج‌شده از مایکوباکتریوم / اوویوم تحت-گونه پاراتوبرکلوزیس به‌عنوان جواب مثبت با اندازه ۲۲۹ جفت‌باز، در ردیف ۱۳ محصول PCR با استفاده از آب مقطر دوبار تقطیر استریل به‌عنوان کنترل منفی و در ردیف ۱۴ محصول PCR با استفاده از DNA استخراج شده از مایکوباکتریوم فلئی به‌عنوان جواب منفی مشاهده می‌شود.

جوشانیدن کمترین میزان خلوص DNA را داشت (بر مبنای کیفیت DNA استخراجی بر حسب A260/A280). همچنین با توجه به جدول شماره ۲، روش استخراج DNA ژنومی مایکوباکتریوم‌ها با استفاده از ۴ روش، از جمله روش CTAB بیشترین میزان و روش مبتنی بر جوشانیدن کمترین میزان DNA استخراج‌شده را حاصل کرد (بر مبنای غلظت DNA استخراجی بر حسب ng/μl). البته تحلیل آماری داده‌ها اختلاف معنی‌داری را بین کمیت و کیفیت DNAهای استخراج شده از مایکوباکتریوم / اوویوم پاراتوبرکلوزیس و مایکوباکتریوم فلئی نشان نداد. نتایج الکتروفورز ژل استفاده‌شده در مورد محصولات PCR انجام‌گرفته با استفاده از DNAهای استخراج‌شده



شکل ۱- نتایج ژل الکتروفورز شده در مورد محصولات PCR انجام‌گرفته با استفاده از DNAهای استخراج‌شده از مایکوباکتریوم‌های مورد آزمایش.

ژنومی مایکوباکتریوم‌های مورد نظر آزموده شد که یافته‌های حاصل، تفاوت معنی‌داری در کیفیت DNAهای استخراج‌شده توسط روش‌های مذکور به غیر

بحث و نتیجه‌گیری

در این مطالعه روش‌های مختلفی با ترکیبات متفاوت و طی مراحل مختلف برای استخراج DNA

2002; Fang *et al.*, 2002; Tripathi *et al.*, 2005; (Sharma *et al.*, 2007

در مطالعات متعدد استفاده از آزمایش PCR در مقایسه با سایر روش‌ها تعداد جواب‌های مثبت بیشتری را نشان داده و نیز حساسیت بالا و ویژگی مناسب این تکنیک در تشخیص بیماری‌ها توصیف شده است (Cousins *et al.*, 1999). در سال‌های اخیر برخی پژوهش‌های انجام گرفته در کشور ما هم غالباً مویید این موضوع بوده است (Anzabi *et al.*, 2006; Anzabi *et al.*, 2009; Khakpoor *et al.*, 2011). همچنین عقیده بر این است که مقدار زیادی از تفاوت‌های مشاهده‌شده بین نتایج حاصله از PCR و کشت میکروبی، مربوط به حساس‌تر بودن روش PCR می‌باشد. تحقیقات نشان داده است حداقل حد ردیابی روش کشت بعد از آلوده-زدایی با محلول ۰/۷۵ درصد HPC (Hexadecylpyridinium chloride) تقریباً ۱۰CFU/۵۰ml در نمونه شیر می‌باشد، در حالی که حداقل حد ردیابی PCR در این شرایط بسیار پایین‌تر از این مقدار می‌باشد به طوری که، این میزان در حدود ۱CFU/۵۰ml در نمونه شیر تخمین زده شده است (Anzabi *et al.*, 2006). همچنین در یک مطالعه تجربی در مورد کشت شیر برای جداسازی مایکوباکتریوم /اوویوم تحت‌گونه پاراتوبرکلوزیس در محیط هرولد حاوی مایکوباکتین و زرده تخم‌مرغ مشخص شده است جواب مثبت زمانی آشکار می‌شود که حداقل ۱۰CFU/۵۰ml از این باکتری در نمونه شیر موجود باشد در حالی که، برای ایجاد جواب مثبت از همین نمونه شیر از طریق PCR وجود حدود ۱۰CFU/۵۰ml از باکتری در نمونه کافی گزارش شده است (Millar *et al.*, 2002; Fang *et al.*, 2002; Tripathi *et al.*, 2005; (Sharma *et al.*, 2007

از روش CTAB را نشان نداد. البته تحلیل داده‌های به-دست آمده در بررسی حاضر برای تعیین اختلافات آماری بر اساس نوع باکتری هم نشان داد که بین دو نوع باکتری از نظر کیفیت DNAهای استخراج‌شده در هیچ-یک از روش‌های استفاده‌شده برای استخراج DNA اختلاف معنی‌داری وجود ندارد، اما از نظر میزان غلظت DNAهای استخراج‌شده در روش‌هایی مثل جوشانیدن اختلاف معنی‌داری با یکدیگر دارند. بنابراین، با توجه به نتایج مطالعه حاضر به نظر می‌رسد که استخراج DNA با استفاده از روش CTAB به دلیل اینکه در عین استخراج غلظت مناسبی از DNA مایکوباکتریوم‌های مورد آزمایش، در عین حال بالاترین خلوص را نیز در مورد آن‌ها حاصل می‌کند، از جمله مناسب‌ترین روش‌ها جهت استخراج DNA ژنومی، هم از مایکوباکتریوم‌های بیماری‌زا و هم از مایکوباکتریوم‌های ساپروفیت می-باشد.

با توجه به مشکلات مرتبط با روش کشت و جداسازی مایکوباکتریوم‌ها از نمونه‌های بالینی و نیز عدم دقت کافی روش‌های سرولوژیکی در این خصوص، امروزه استفاده از روش‌های مولکولی برای تشخیص این باکتری‌ها طرفداران زیادی پیدا کرده است، به طوری که با پیشرفت روش‌های تشخیص مولکولی از جمله تکنیک PCR اهمیت و ارزش استفاده از آن در تشخیص بیماری‌ها روز به روز بیشتر شده است. عقیده بر این است که استفاده از آزمایش PCR در مقایسه با کشت اختصاصی و روش‌های سرولوژیکی، این اجازه را می‌دهد که میکروارگانیسم‌های کندرشد بهتر و بیشتر شناسایی شوند (Dell'isola, 1994; Chiodini *et al.*, 1996; Collins *et al.*, 1998; Corti and Stephan,

می‌گیرد. در عین حال، آنزیم‌های دیگری مانند آنزیم DNAase، در همین شرایط دناتوره می‌شوند و ترکیبات متصل‌کننده یونی مانند اتیلن دی‌آمین تترا استیک اسید (EDTA)، برای جلوگیری از تجزیه DNA به آنزیم نوکلئاز متصل می‌شوند.

۳. با توجه به اینکه در DNAهای حاصله به دنبال عمل هضم مرحله ۲، معمولاً ناخالصی‌هایی از جنس پروتئینی وجود دارد، لذا در این مرحله جهت رسوب دادن پروتئین‌های مذکور از فنل و کلروفرم و یا محلول نمک اشباع ۶ مولار استفاده می‌شود.

۴. آخرین مرحله هم رسوب دادن DNAهای استخراج شده است که معمولاً این عمل با استفاده از اتانول مطلق سرد شده انجام می‌گیرد.

نکته قابل توجه این‌که بسیاری از مواد و فرایندهایی که بر پایه اصول بالا طراحی شده و استفاده می‌شوند زمان-بر (نیازمند حداقل ۲ روز زمان)، دارای سمیت (مانند فنل و کلروفرم) و نیز هزینه‌بر (مانند آنزیم پروتئیناز K) می‌باشند. بنابراین، استفاده از روشی که سریع، بی‌خطر و مقرون به صرفه بوده و در عین حال کمیت و کیفیت DNAهای به دست آمده توسط آن نیز مطلوب باشد، مورد نیاز می‌باشد. بدین منظور در مطالعه حاضر برای به دست آوردن DNA خالص از ماده CTAB (N-cetyl-N,N,N-trimethyl ammonium bromide) در شرایط یونی بالا استفاده شد. CTAB یک دترجنت کاتیونی می‌باشد که در شرایط یونی مختلف اعمال گوناگونی انجام می‌دهد به طوری که، ترکیب مذکور در شرایط یونی پائین (low ionic strength) باعث رسوب اسیدهای نوکلئیک می‌شود ولی پروتئین‌ها و

al., 1996; Corti and Stephan, 2002; Lazaro *et al.*, 2005; Nebbia *et al.*, 2006; Rodriguez-Eltholth *et al.*, 2009; Fathi *et al.*, 2011; Anzabi *et al.*, 2012; Klanicova *et al.*, 2012).

البته علی‌رغم این‌که از PCR امروزه به عنوان یک روش مدرن و سریع تشخیصی استفاده می‌شود، ولی اطلاعات درباره حساسیت و ویژگی آن در مطالعات مختلف، متفاوت گزارش شده است (Fathi *et al.*, 2011; Anzabi and Hanifian, 2012; Klanicova *et al.*, 2012). در این ارتباط گزارش‌ها نشان می‌دهد که PCR می‌تواند یک روش شناسایی با حساسیت بالا باشد ولی به شرطی که DNAهای مناسبی از ژنوم باکتری مورد نظر به دست آورده شود که برای نیل به این نکته مهم، باید DNA را از سلول باکتری‌ها به شکل مناسب و قابل استفاده استخراج کرد. گزارشات مختلف نشان می‌دهد که اصول کلی استخراج DNA از ژنوم باکتری‌ها در اکثر روش‌های متداول استفاده شده، شامل - چهار مرحله به شرح زیر می‌باشد (Bono *et al.*, 1995; Bauerfeind *et al.*, 1996; Butcher *et al.*, 1996; Barrington *et al.*, 2003; Chan *et al.*, 2005):

۱. شکستن سلول باکتری برای از بین بردن دیواره آن که معمولاً با استفاده از شوک اسمزی و یا ترکیبات اختصاصی مانند تریتون (Triton) و تریس (Tris) انجام می‌گیرد.

۲. هضم پروتئین‌ها که معمولاً با استفاده از دترجنت‌های یونی، مانند سدیم دودسیل سولفات (SDS) انجام می‌شود که سبب تخریب غشاء سلولی و پروتئین‌های متصل به DNA می‌گردد. معمولاً در این مرحله از آنزیم پروتئیناز K که نقش پروتئین‌زدایی دارد استفاده می‌شود، اما بایستی توجه کرد که فعالیت بهینه آنزیم مذکور در دمای ۵۵ تا ۶۵ درجه سلسیوس و در حضور SDS انجام

نمک و هم‌چنین با تکرار کردن مرحله شست‌وشو با الکل ۷۰ درجه، آلودگی پروتئینی در نمونه‌ها کمتر شده و خلوص DNAهای استخراج‌شده افزایش می‌یابد. اهمیت این موضوع زمانی بیشتر مشخص می‌شود که مطالعات مختلف هم‌نشان داده‌اند که چربی‌ها، پروتئین‌ها و غلظت‌های بالای کلسیم، مهارکننده‌های بالقوه آزمایش PCR می‌باشند (Butcher *et al.*, 1996; Elphinstone *et al.*, 2003; Chan *et al.*, 2005).

میزان خلوص DNA یک عامل بسیار مهم در کیفیت کارهای آزمایشگاه ژنتیک مولکولی است و در این ارتباط استفاده از عمل الکتروفورز با ژل آگارز معیار مهمی برای محاسبه کیفیت DNA و عدم شکستگی آن می‌باشد. همان‌گونه که قبلاً نیز ذکر گردید، پس از مشخص شدن بهترین روش استخراج DNA، به‌صورت تصادفی با انتخاب تعدادی از DNAهای به دست آمده در روش CTAB (به‌عنوان روشی که در آن غلظت DNAهای استخراج شده مناسب بود در عین حال بیشترین خلوص را نیز در این مورد حاصل کرده بود)، آزمایش PCR انجام گرفت، سپس باندهای به دست آمده بر روی ژل آگارز ۱ درصد پس از بارگذاری، بررسی شدند. همان‌طور که نتایج نشان داد وجود قطعات تکثیرشده در آزمایش PCR، دلیل بر فقدان ممانعت کننده برای آنزیم TaqDNA polymerase بوده و فقدان شکستگی و اسمیر در نمونه‌های استخراج شده با استفاده از روش CTAB، دلالت بر کیفیت مناسب DNAهای حاصله در این روش استخراج DNA دارد. همچنین اطلاعات به دست آمده از دستگاه ناندراپ، نشان می‌دهد که میزان خلوص DNAهای

پلی‌ساکاریدها در محلول باقی می‌مانند و برعکس در شرایط یونی بالا (high ionic strength)، پروتئین‌ها و پلی‌ساکاریدها کمپلکسی تشکیل می‌دهند که باعث می‌شود اسیدهای نوکلئیک در محیط عمل (معمولاً لوله آزمایش) باقی بمانند (Anzabi *et al.*, 2006; Anzabi *et al.*, 2009). در این بررسی مشاهده گردید که با بکار بردن CTAB در این شرایط، کمپلکس CTAB با پروتئین‌ها و پلی‌ساکاریدها تشکیل شده و در نهایت این کمپلکس با اثر دادن مخلوط ایزوآمیل‌الکل-کلروفرم جدا گردید و اسیدهای نوکلئیک با افزودن ایزوپروپانول بر روی مایع رویی، به دست آمدند که موید آن است که DNA به دست آمده توسط این روش خالص و یکدست می‌باشد. از طرف دیگر با تکیه بر مطالعات قبلی، به منظور بهینه‌سازی عمل استخراج DNA از مایکوباکتریوم‌ها، در روش CTAB استفاده شده در بررسی حاضر، برای جلوگیری از تکه تکه شدن DNAهای استخراجی، نمونه‌ها حداکثر تا ۶ ساعت پس از ذوب‌شدن و پس از اضافه کردن بافر لیزکننده، سانتریفیوژ شده و برای رسوب بافر لیزکننده از سانتریفیوژ با ۱۶۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۵ دقیقه استفاده شد، هرچند برخی گزارش‌ها در تحقیقات مشابه نشان داده‌اند که شتاب سانتریفیوژ از ۴۰۰ دور در دقیقه تا ۳۰۰۰ دور در دقیقه تأثیر معنی‌داری بر میزان DNAهای استخراجی ندارد (Dell'isola, 1994; Cousins *et al.*, 1999; Corti and Stephan, 2002; Chan *et al.*, 2005). همچنین در مطالعه حاضر مشخص شد که با افزایش طول زمان عمل سانتریفیوژ از ۱۰ دقیقه به ۱۵ دقیقه و افزایش دما از ۴- درجه سلسیوس به ۲- درجه سلسیوس، پس از اضافه کردن

مخصوصاً در آزمایشگاه‌هایی که محدودیت منابع مالی و زمانی دارند روش مناسبی به نظر می‌رسد، هر چند احتمالاً با پیشنهاد بر استفاده از روش‌های جدیدتر دیگر با استفاده از مواد و ترکیبات مناسب‌تر در این خصوص، بتوان کیفیت و کمیت DNAهای استخراج شده از انواع سویه‌های میکوباکتریوم‌ها را به مراتب بیشتر افزایش داد.

سپاسگزاری

با توجه به اینکه مقاله حاضر برگرفته از نتایج پایان‌نامه کارشناسی ارشد رشته زیست‌شناسی گرایش ژنتیک آقای علی نصیری می‌باشد، لذا بدین وسیله از پرسنل، کارشناسان و مسئولین محترم معاونت‌های پژوهش و فن‌آوری و اداری و مالی دانشگاه آزاد اسلامی واحد تبریز به جهت حمایت‌های مادی و معنوی تقدیر و تشکر می‌گردد.

تعارض منافع

نویسندگان اعلام می‌دارند که هیچ‌گونه تضاد منافی ندارند.

استخراج شده در روش مذکور نیز رضایت بخش بوده است. در عین حال به نظر می‌رسد تفاوت‌هایی که بین نتایج حاصله از مطالعه حاضر در مقایسه با نتایج مطالعات مشابه دیگر وجود دارد، احتمالاً ناشی از وجود تفاوت بین روش‌های مختلف استفاده‌شده، تفاوت در عملکرد کیت‌های تجاری و کیت‌های دست‌ساز آزمایشگاهی می‌باشد (Dell'isola *et al.*, 1994; Englund *et al.*, 1999; Whittington *et al.*, 1999; Wren and Dorrell, 2002; Barrington *et al.*, 2003; Englund, 2003; Rodreguez-Lazaro *et al.*, 2005; Singh *et al.*, 2007).

موضوع قابل تأمل نهایی اینکه، با کاهش قابل توجه در میزان مصرف مواد آزمایشگاهی و همچنین حذف زمان هضم آنزیمی، سرعت استخراج DNA در روش CTAB مورد استفاده مطالعه حاضر نیز افزایش یافت. به علاوه، این روش به مواد شیمیایی خطرناک و تجهیزات گران قیمت نیاز نداشته و در عین حال می‌توان مهارکننده‌های PCR را نیز در آن از بین برد. لذا به طور کلی می‌توان نتیجه‌گیری کرد که این روش ضمن ساده و سریع بودن، ایمن و نیز نسبتاً ارزان بوده و DNAهای استخراج‌شده توسط آن کیفیت و کمیت مطلوبی دارند و بدین ترتیب در تجزیه و تحلیل ژنوتیپی

منابع

- Aghazade, R., Zali, M.R., Bahrami, A., Amin, K., Ghahghaie, F., and Firouzi, F. (2004). Inflammatory bowel disease in IRAN: A review of 448 cases. *Archives of Iranian Medicine*, 7(3): 210-216.

- Anzabi, Y, Tabatabayi, A.H. and Asgharzade, M. (2006). A Survey on the infection status of *Mycobacterium avium paratuberculosis* in dairy cattles using PCR & culture of Tabriz region. *Journal of Comprative Pathobiology*, 2(4): 297-310. [In Persian]
- Anzabi, Y., Farashi Bonab, S. and Moggaddam, Gh.A. (2009). Efficiency of direct microbial diagnosis, IS900 PCR and microbial culture for detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in the feces of apparently healthy cattle. *Veterinary Journal of Islamic Azad University-Tabriz Branch*, 2(4): 309-317. [In Persian]
- Anzabi, Y. and Hanifian, S. (2012). Detection of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in pasteurized milk by IS900 PCR and culture method. *African Journal Microbiology Research*, 6(7):1453-1456.
- Barrington, GM., Gay, J.M. and Eriks, I.S., (2003). Temporal Patterns of diagnostic results in serial samples from Cattle with advanced *paratuberculosis* infections. *Journal of Veterinary Diagnosis*, 15(2):195-200.
- Bauerfeind, R., Benazzi, S., Weiss, R., Schliesser, T., Willems, H. and Baljer, G. (1996). Molecular Characterization of *Mycobacterium paratuberculosis* Isolates from Sheep, Goats and Cattle by Hybridization with a DNA probe to Insertion Element IS900. *Journal of Clinical Microbiology*, 34(7):1617-1621.
- Bono, T., Jemmi, T. and Bernasconi, C. (1995). Genotypic characterization of *Mycobacterium avium* strains recovered from animals and their comparison to human strains. *Applied and Environmental Microbiology*, 61(1): 371-373.
- Butcher, P.D., Hutchinson, N.A., Doran, T.J. and Dale, J.W. (1996). The application of molecular techniques to the diagnosis and epidemiology of mycobacterial disease. *Journal of Applied Bacteriology*, 81(25): 53-71.
- Chan, K.C., Yeung, S.W., Lui, W.B., Rainer, T.H. and Lo, Y.M. (2005). Effects of preanalytical factors on the molecular size of cell-free DNA in blood. *Clinical Chemistry*, 51(4): 781-784.
- Chiodini, R.J. and Rossiter, C.A. (1996). *Paratuberculosis: A potential zoonosis?* *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*, 12(2): 457-467.
- Fang, Y., Wu, W.H., Pepper, J.L., Larsen, J.L., Marras, S.A., Nelson, E.A., et al. (2002). Comparison of Real-Time, Quantitative PCR with Molecular Beacons to Nested PCR and Culture Methods for Detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in Bovine Fecal Samples. *Journal of Clinical Microbiology*, 40(1):287-291.
- Collins, D.M., Hilbink, F. and West, D.M. (1998). Investigation of *Mycobacterium paratuberculosis* in sheep by faecal culture, DNA characterization and the Polymerase Chain Reaction. *Veterinary Record*, 133(24): 566-600.
- Corti, S. and Stephan, R. (2002). Detection of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* specific IS900 insertion sequences in bulk-tank milk samples obtained from different regions throughout Switzerland. *BMC Microbiology*, 2(15): 1-14.
- Cousins, D.V., Whittington, R., Marsh, I., Masters, A., Evans, R.J. and Kluver, P. (1999). *Mycobacteria* distinct from *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* isolated from the faeces of ruminants possess IS900-like sequences detectable IS900 polymerase chain reaction: implications for diagnosis. *Molecular and Cellular Probes*, 13(6): 431-442.
- Dell'isola, B., Poyart, C., Goulet, O., Mougenot, J.F., Sadoun-Journo, E., Brousse, N., et al. (1994). Detection of *Mycobacterium paratuberculosis* by polymerase chain reaction in children with Crohn's disease. *Journal of Infectious Disease*, 169(2): 449-451.
- Eltholth, M.M., Marsh, V.R., Van Winden, S. and Guitian, F.J. (2009). Contamination of food products with *Mycobacterium avium paratuberculosis*: a systematic review. *Journal of Applied and Environmental Microbiology*, 107: 1061-1071.

- Elphinstone, M.S, Hinten, G.N, Anderson, M.J. and Nock, C.J. (2003). An inexpensive and high-throughput procedure to extract and purify total genomic DNA for population studies. *Molecular Ecology Notes*, 3(2): 317-320.
- Englund, S., Ballagi-Pordány, A. and Bölske, G. (1999). Single PCR and nested PCR with a mimic molecule for detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *Diagnostic microbiology and infectious disease*, 33(3): 163-171.
- Englund, S. (2003). IS900/ERIC-PCR as a tool to distinguish *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* from closely related mycobacteria. *Veterinary Microbiology*, 96(3): 277-287.
- Fathi, R., Sarkarati, F., Eslami, M., Rezavand, B. and Nourizadeh, A. (2011). Detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in cow milk using culture and PCR methods. *Archives of Razi Institute*, 66(2): 95-100.
- Khakpoor, M., Fardin, M., Ahmadi, H. and Nehzati, A. (2011). The infection status of *Mycobacterium avium paratuberculosis* in traditional dairy cattle farms in Mogham region. *Food Hygion Scientific-Research Journal*, 1(4): 45-52. [In Persian]
- Klanicova, B., Slana, I., Roubal, P., Pavlik, I. and Kralik, P. (2012). *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* survival during fermentation of soured milk products detected by culture and quantitative real time PCR methods. *International Journal of Food Microbiology*, 157(2): 150-155.
- Marsh, I., Whittington, R. and Cousins, D. (1999). PCR-restriction endonuclease analysis for identification and strain typing of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* and *Mycobacterium avium* subsp. *avium* based on polymorphisms in IS1311. *Molecular and Cellular Probes*, 13(2): 115-126.
- Millar, D., Ford, J., Sanderson, J., Withey, S., Tizard, M., Doran, T., et al. (1996). IS900 PCR to detect *Mycobacterium paratuberculosis* in retail supplies of whole pasteurized cows, milk in England and Wales. *Applied and Enviromental Microbiology*, 62(9): 3446-3452.
- Nebbia, P., Robino, P., Zoppi, S. and De Meneghi, D. (2006). Detection and excretion pattern of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in milk of asymptomatic sheep and goats by Nested-PCR. *Small Ruminant Research*, 66(1-3): 116-120.
- Queipo-Ortuño, M.I., Colmenero, J.D.D., Macias, M., Bravo, M.J. and Morata, P. (2008). Preparation of Bacterial DNA Template by Boiling and Effect of Immunoglobulin G as an Inhibitor in Real-Time PCR for Serum Samples from Patients with Brucellosis. *Clinical Vaccine Immunology*, 15(2): 293-296.
- Rodriguez-Lazaro, D., DAgostino, M., Herrewegh, A., Pla, M., Cook, N., and Ikonomopoulos, J. (2005). Real-time PCR-based methods for detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in water and milk. *International Journal of Food Microbiology*, 101(1): 93-104.
- Sharma, G., Singh, S.V., Sevilla, I., Singh, A.V., Whittington, R.J., Just, R.A., et al. (2007). Evaluation of indigenous milk ELISA with culture and m-PCR for the diagnosis of Bovine Johnes (BJD) in lactating Indian dairy cattle. *Research Veterinary Science*, 84(1): 30-37.
- Singh, S.V., Singh, A.V., Singh, R., Sandhu, K.S., Singh, P.K. and Sohal, J.S. (2007). Evaluation of highly sensitive indigenous milk ELISA kit with fecal culture, milk culture and fecal PCR for the diagnosis of bovine Johnes's disease (BJD) in India. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Disease*, 30(3):175-186.
- Sivakumar, P., Tripathi, B.N. and Nem, S. (2004). Detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in intestinal and lymph node tissues of water buffaloes (*Bubalus bubalis*) by PCR and bacterial culture. *Veterinary Microbiology*, 108(3-4):263-270.
- Tripathi, B.N., Periasamy, S., Paliwal, O.P. and Singh, N. (2005). Comparison of IS900 tissue PCR, bacterial culture, Johnin and serological test for diagnosis of naturally occurring *paratuberculosis* in goats. *Veterinary Microbiology*, 116(1-3): 129-137.

-
- Wells, S.J., Collins, M.T., Faaberg, K.S., Wees, C., Tavornpanich, S. and Petrini, K.R. (2006). Evaluation of a rapid fecal PCR test for detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in dairy cattle. *Clinical and Vaccine Immunology*, 13(10):1125-1130.
 - Whittington, R.J., Reddacliff, L., Marsh, I. and Saunders, V. (1999). Detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in formalin-fixed paraffin-embedded intestinal tissue by IS900 polymerase chain reaction. *Australian Veterinary Journal*, 77(6): 392-397.
 - Wren, B. and Dorrell, N. (2002). *Functional Microbial Genomics*. Volume 33, London: England, Academic Press, pp: 3-49.

Comparing qualitative and quantitative results of some DNA extraction methods from genome of pathogenic and saprophytic mycobacteria

Nasiri, A.¹, Anzabi, Y.^{2*}, Mashayekhi, M.R.³

1- Graduate of Biology-Genetic Master Science, Faculty of Basic Sciences, Tabriz Branch, Islamic Azad University, Tabriz, Iran.

2- Assistant Professor, Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, Tabriz Branch, Islamic Azad University, Tabriz, Iran.

3- Assistant Professor, Department of Biology, Faculty of Basic Sciences, Tabriz Branch, Islamic Azad University, Tabriz, Iran.

* Corresponding author's email: anzabi@iaut.ac.ir

(Received: 2017/7/21 Accepted: 2018/4/29)

Abstract

Given that the first step in performing molecular techniques such as PCR (Polymerase Chain Reaction) is having enough high quality DNA, the aim of this study was to compare five different extraction methods of genomic DNA of mycobacteria in order to introduce the best method. For this purpose, pure colonies of *Mycobacterium avium* paratuberculosis were used as pathogenic mycobacterium and also a saprophytic strain called *Mycobacterium phlei*. The quality and quantity of the obtained DNA by each method was calculated, measured and evaluated respectively; based on extracted DNA concentrations (nanograms per microliter) at a wavelength of 260 nm and also optical density (OD) ratio based on the 260/280 wavelength by using the Nanodrop technique. The highest and lowest amounts of mycobacterial genome DNA was extracted using the CTAB (Cetyltrimethylammonium bromide) and boiling methods respectively. Comparison of the purity of extracted DNA also indicated that the highest purity was obtained using the CTAB method and the lowest using the boiling method. Also no significant differences were observed regarding the quality of extracted DNA from pathogenic and saprophytic mycobacteria among the evaluated extraction methods. Thus, according to the results of this study it appears that using the CTAB method is the most suitable way to extract genomic DNA for molecular detection of mycobacteria in different samples.

Conflict of interest: None declared.

Keywords: DNA extraction, Genome, Mycobacterium, Pathogen, Saprophyte.