

بررسی سه روش استخراج دی.ان.ای (DNA) از *Pseudomonas aeruginosa* توسط اسپکتروفتومتر نانودراپ و ژل الکتروفورز

سمیه اعظمی^۱، عزت عسگرانی^۲
احیا عبدی عالی^۳

تاریخ دریافت: ۸۹/۱۱/۸

تاریخ تصویب: ۹۰/۱۰/۶

چکیده

استخراج دی.ان.ای اولین مرحله در مطالعه‌ی ساختار و عملکرد ژن است. در تحقیقات مهندسی ژنتیک و میکروبیولوژی، دستیابی به روش مؤثر جداسازی دی.ان.ای ضروری است. روش‌های زیادی برای استخراج دی.ان.ای از باکتری‌ها وجود دارد که بر حسب ساختار دیواره و غشای باکتری استفاده می‌شوند.

هدف این تحقیق، ارزیابی روش‌های مختلف استخراج دی.ان.ای از باکتری گرم منفی سودوموناس آئروجینوزا و انتخاب روش مؤثر بود.

در این پژوهش سه روش استخراج دی.ان.ای از باکتری گرم منفی سودوموناس آئروجینوزا به منظور تعیین میزان کمی و کیفی دی.ان.ای و مقایسه‌ی آن‌ها با یکدیگر بررسی شد. این روش‌ها شامل بافر لیز حاوی پروتئیناز *DNGTM- plus kit* و جوشاندن بود. در هر روش ده نمونه در قالب طرح کاملاً تصادفی، انتخاب و غلظت دی.ان.ای استخراج شده با استفاده از دستگاه نانودراپ و ژل الکتروفورز آگارز اندازه‌گیری شد.

۱. گروه زیست‌شناسی، دانشگاه الزهرا azami.somayeh@yahoo.com

۲. استادیار گروه زیست‌شناسی، دانشگاه الزهرا

۳. دانشیار گروه زیست‌شناسی، دانشگاه الزهرا

تجزیه‌ی واریانس تفاوت معنی‌داری بین این سه روش نشان داد. میانگین غلظت‌های دی. ان. ای با استفاده از آزمون دانکن نیز تفاوت معنی‌داری نشان داد. سرانجام روش جوشاندن، مناسب‌ترین روش با بالاترین بازده استخراج در نظر گرفته شد.

واژه های کلیدی: استخراج دی. ان. ای، اسپکتروفوتومتر نانودراپ، ژل الکتروفورز، تجزیه‌ی واریانس، آزمون دانکن.

مقدمه

در تحقیقات مولکولی بر اساس نوع ژن و وسیله‌ی انتقال، هم‌سازگی یکی از سه نوع دی. ان. ای ژنومی، دی. ان. ای پلاسمیدی و دی. ان. ای فاژی لازم است. جداسازی کامل دی. ان. ای ژنومی برای دستیابی به ژن‌هایی که باید کلون شود، انجام می‌شود. جداسازی دی. ان. ای پلاسمیدی مراحل اصلی تخلیص ژنوم را دارد؛ با این تفاوت که باید از ژنوم (کل دی. ان. ای سلول) جدا شود. نوع سوم، دی. ان. ای فاژی است که در هم‌سازگی یک حامل ژن است (براون، ۱۳۸۶). اولین مرحله برای خالص کردن دی. ان. ای باکتریایی، حذف دیواره‌ی سلولی است. در باکتری‌های گرم منفی علاوه بر دیواره، غشای خارجی که ترکیبات لیپو پلی ساکاریدی دارد، سلول را احاطه می‌کند. در مقایسه با سایر باکتری‌های گرم منفی جنس‌هایی از قبیل زانتوموناس، سودوموناس، آگروباکتریوم و ریزوبیوم مولد مقادیر زیادی پلی ساکارید هستند. این رایج‌ترین مشکل مؤثر در خلوص دی. ان. ای و بازدارنده‌ی فعالیت تعداد زیادی از آنزیم‌های مهم، مانند دی. ان. ای پلیمراس است (Ausubel & et al, 1987).

علم مهندسی ژنتیک یا به عبارتی، تولید دی. ان. ای نو ترکیب بر پایه‌ی تحقیقات روی میکروارگانیسم‌ها آغاز شده است. تکنولوژی دی. ان. ای نو ترکیب در مطالعه‌ی میکروارگانیسم‌ها کاربرد فراوان دارد. به علت تنوع زیستگاه‌های طبیعی و تنوع فراوان متابولیکی، خزانه‌ی ژنی بزرگی در باکتری‌ها وجود دارد. کلون کردن ژن و به دست آوردن سویه‌های جدید میکروبی را می‌توان برای شناخت فرایندهای اصلی میکروبی، مانند رابطه‌ی ساختار و عمل، رشد سلولی، تنظیم آنزیمی و اکولوژیکی میکروبی به کار برد. مهندسی ژنتیک به محقق امکان می‌دهد که میکروارگانیسم موضوع مطالعه را نشانه‌دار کند تا بتوان آن را در محیط شناسایی کرد؛ برای مثال ورود ژن β -گالاکتوزیداز به سودوموناس فلورسنت که یک میکروارگانیسم خاکری است. در این روش از پلیت‌های آگار معرف برای جست‌وجوی کلنی‌های آبی‌رنگ مولد آنزیم استفاده می‌شود. میکروارگانیسم که به طور طبیعی نمی‌تواند لاکتوز مصرف کند، لاکتوز را مصرف می‌کند و در محیط کشت شناسایی می‌شود (امتیازی، ۱۳۸۶).

ژل آگارز بارگذاری شد. روش جوشاندن بالاترین بازده را نشان داد (جناب و همکاران، ۲۰۱۰). استخراج دی. ان. ای اولین مرحله در مطالعه ساختار و عملکرد ژن است و دستیابی به روش مؤثر استخراج دی. ان. ای در تحقیقات مهندسی ژنتیک و میکروبیولوژی ضروری است. روش‌های مختلف زیادی برای استخراج دی. ان. ای از باکتری‌ها وجود دارد که بر حسب ساختار دیواره و غشای باکتری به کار گرفته می‌شود. در این پژوهش سه روش مختلف استخراج دی. ان. ای از باکتری گرم منفی سودوموناس آئروجینوزا برای تعیین میزان کمی و کیفی دی. ان. ای و مقایسه آن‌ها با یکدیگر بررسی شد. سودوموناس آئروجینوزا، پاتوژن انسانی فرصت طلب در بیماران نقص ایمنی، مانند مبتلایان به ایدز، فیروز سیستمیک و مصدومان سوختگی است. گام نخست در دست‌کاری‌های ژنتیکی باکتری، تعیین روش مؤثر و کارآمد برای استخراج دی. ان. ای است. ایجاد جهش در ژن‌های بیماری‌زا یا سیستم‌های تنظیمی آن‌ها می‌تواند سبب توقف یا کاهش بیماری‌زایی شود.

مواد و روش‌ها

به منظور مقایسه‌ی روش‌های استخراج دی. ان. ای در باکتری گرم منفی سودوموناس آئروجینوزا سه روش استخراج دی. ان. ای انتخاب شد. ده سوش مورد نظر پس از کشت روی محیط TSA (Trypticase soy agar) در دمای 37°C گرماگذاری شبانه شد. در هر سه روش ۲-۳ کلونی تک در سرم فیزیولوژی تلقیح

کارایی چهار روش استاندارد بافر لیز حاوی پروتیناز K، فنل/کلروفرم/ایزوامیل الکل، تیمار با امواج کوتاه و تیمار گرمایی روی باکتری بورخولد ریای جدا شده از کشت‌های خالص و فاضلاب با یکدیگر مقایسه شد. سرانجام روش بافر لیز به ساده‌ترین و ارزان‌ترین روش انتخاب شد (Merk & et al, 2001). دی. ان. ای به روش کلروفرم از باکتری‌های مولد پلی ساکارید جدا شد که نسبت جذب نوری ≥ 2 را در طول موج $260/280 \text{ nm}$ نشان داد. از مزایای این روش سادگی و سرعت آن بود (Chen & et al, 1993) برای جداسازی آر. ان. ای از باکتری‌های گرم منفی و گرم مثبت سه روش Hot phenol, Triton x-100-boiling Qiagen kit, به کار رفت. در روش جوشاندن، آر. ان. ای با کیفیت مناسب و طول کامل که عاری از آلوده‌کننده‌های 23S rRNA و 16S rRNA بود، به دست آمد (Sung & et al, 2003). سه روش استخراج، شامل فنل کلروفرم، سونیکاسیون و جوشاندن روی باکتری گرم منفی هلیکوباکتر پیلوری اعمال شد. مقایسه‌ی میزان OD به دست آمده از سه روش نشان داد که جوشاندن به عنوان روش مقرون به صرفه و سریع، نسبت به سایر روش‌ها مزیت دارد (فرشاد و همکاران، ۲۰۰۴). از روش جوشاندن به منظور جداسازی دی. ان. ای ژنومی سودوموناس آئروجینوزا استفاده شد (Chen & et al, 2009). روش‌های پروتیناز K، فنل-کلروفرم و جوشاندن، برای جداسازی دی. ان. ای از نمونه‌های داخل رحمی آلوده به کلامیدیا تراکوماتیس استفاده شد. محصول دی. ان. ای استخراج شده از هر روش روی

در دور ۱۲۰۰۰ برای ۵ دقیقه، ۱ ml اتانول ۷۵٪ افزوده و سانتریفیوژ تکرار شد. رسوب دی. ان. ای در ۶۵°C به مدت ۵ دقیقه، خشک و در ۵۰ μl آب مقطر استریل حل شد. مواد نامحلول در ۱۲۰۰۰ دور به مدت ۳۰ ثانیه سانتریفیوژ شد. دی. ان. ای خالص از سوپرناتانت به دست آمد.

۳. روش اصلاح شدهی جوشاندن (چن و همکاران، ۲۰۰۹): ۱۰۰ μl از هر سوسپانسیون در دمای ۱۰۰°C به مدت ۱۰ دقیقه گرماگذاری شد، سپس به ظرف یخ منتقل و پس از سرد شدن در دور ۱۱۰۰۰g، به مدت ۲ دقیقه سانتریفیوژ شدند. ۵۰ μl سوپرناتانت که حاوی دی. ان. ای تخلیص شده است، به میکروتیوب استریل منتقل شد و ۴ μl آنزیم RNase به آن افزوده شد و پس از نگاهداری در دمای اتاق به مدت ۳۰ دقیقه در ۲۰°C ذخیره شد.

تعیین کمیت و کیفیت دی. ان. ای

برای بررسی غلظت دی. ان. ای در نمونه‌های استخراج شده و تعیین مؤثرترین روش استخراج از روش‌های اسپکتروفوتومتر نانودراپ و ژل الکتروفورز استفاده شد. زمان اندازه‌گیری سریع در کمتر از ۵ ثانیه، قابلیت اندازه‌گیری مقادیر بسیار کم دی. ان. ای (۳-۰/۵ μl)، تعیین غلظت‌های بالاتر از ۳۰۰۰ ng/μl بدون نیاز به رقیق‌سازی نمونه از مزایای اسپکتروفوتومتر نانودراپ هستند. این آزمایش در طرحی کاملاً تصادفی انجام شد و از آزمون دانکن برای مقایسه‌ی میانگین داده‌ها استفاده شد.

شد تا سوسپانسیون باکتریایی به غلظت نهایی CFU 10^6 برسد.

روش‌های استخراج دی. ان. ای

۱. روش اصلاح‌شدهی بافر لیز حاوی پروتئیناز k: (ویلکاکس، ۲۰۰۹)، ۱ ml بافر لیز (ساکارز ۲۰٪، ۵۰ mM Tris، ۵۰ mM EDTA) به ۱۰۰ μl سوسپانسیون باکتریایی افزوده و به مدت ۱۵ دقیقه در یخ نگاه‌داشته شد، سپس ۹ μl (۲۵٪ SDS) به آن اضافه و به مدت ۶۰ دقیقه در دمای اتاق گرماگذاری شد. پس از افزودن ۱۰ μl پروتئیناز k (۱ mg/ml) و گرماگذاری به مدت ۶۰ دقیقه، ۰/۵ استات آمونیوم ۰/۵ M اضافه شد و پس از ۱۵ دقیقه در دور ۱۲۰۰۰ و دمای ۴۰°C به مدت ۱۲ دقیقه سانتریفیوژ شد. به دلیل میزان بالای موکوس، نمونه‌ها دو بار سانتریفیوژ شدند. دو برابر حجم، اتانول سرد برای تشکیل رسوب افزوده شد. پس از سانتریفیوژ در دور ۱۲۰۰۰ به مدت ۱۲ دقیقه، اتانول خارج شد و دی. ان. ای حاصل، به مدت یک شبانه‌روز در دمای ۳۷°C نگاهداری و سپس در ۵۰ μl آب مقطر استریل حل شد و RNase به نسبت ۱/۲۵ به محلول افزوده شد.

۲. روش DNG™-plus kit: استخراج دی. ان. ای در این روش طبق دستورالعمل انجام شد. محلول

DNG™ plus در انکوباتور شیکر در دمای ۳۷°C به مدت ۲۰ دقیقه حرارت داده شد. ۱۰۰ μl نمونه با ۴۰۰ μl محلول استخراج دی. ان. ای ورتکس شد. ۳۰۰ μl ایزوپروپانول افزوده شد و به مدت ۲۰-۱۵ ثانیه دوباره ورتکس انجام شد. پس از سانتریفیوژ

جدول شماره ۱. نتایج به دست آمده از استخراج به روش بافر لیز حاوی پروتیناز k

DNA/RNA	DNA/PROTEIN	غلظت DNA (ng/μl)	شماره ی نمونه	روش (۱) بافر لیز حاوی پروتیناز k
۱/۵	۱/۹	۱۱۰	۱	
۰/۷	۱/۸	۹۹	۲	
۰/۶۸	۱/۷۸	۱۰۷	۳	
۰/۹	۱/۸	۱۶۰	۴	
۰/۷	۱/۸	۱۳۷	۵	
۰/۵	۱/۶۵	۷۷	۶	
۰/۶۴	۱/۶۶	۱۰۰	۷	
۱/۳۷	۱/۳	۸۸	۸	
۰/۶	۱/۷۵	۱۶۸	۹	
۰/۴۶	۱/۷	۱۰۱	۱۰	

جدول شماره ۲. نتایج به دست آمده از استخراج به روش DNG™ plus-kit

DNA/RNA	DNA/PROTEIN	غلظت DNA (ng/μl)	شماره ی نمونه	روش (۲) DNG™-plus kit
۰/۴۳	۱/۶	۴۳/۷	۱	
۱/۵۷	۱/۴۸	۷۴	۲	
۱/۶۴	۱/۳	۳۷	۳	
۰/۶	۱/۶۳	۴۲	۴	
۰/۶۳	۱/۴۰	۴۴	۵	
۰/۱۲	۱/۶۶	۶۷	۶	
۰/۰۶	۱/۳۶	۴۷	۷	
۰/۱۹	۱/۷	۹۰	۸	
۰/۱۱	۱/۴۰	۳۵	۹	
۰/۰۳	۱/۳۳	۲۷	۱۰	

جدول شماره ۳. نتایج به دست آمده از استخراج به روش جوشاندن

DNA/RNA	DNA/PROTEIN	غلظت DNA (ng/μl)	شماره نمونه	روش (۳) جوشاندن
۱/۱۹	۱/۹۳	۵۱۷	۱	
۱/۱۸	۱/۹۰	۱۸۸	۲	
۱/۵۰	۱/۹۷	۱۷۰	۳	
۱/۲۰	۱/۹۴	۱۹۶	۴	
۱/۴۶	۱/۹۵	۲۵۳	۵	
۱/۳۳	۱/۹۷	۲۸۰	۶	
۱/۲۵	۱/۹۹	۱۷۷	۷	
۰/۹۳	۱/۹۰	۱۱۸	۸	
۱/۴۳	۱/۹۶	۳۹۰	۹	
۱/۲۲	۱/۹۷	۵۹۳	۱۰	

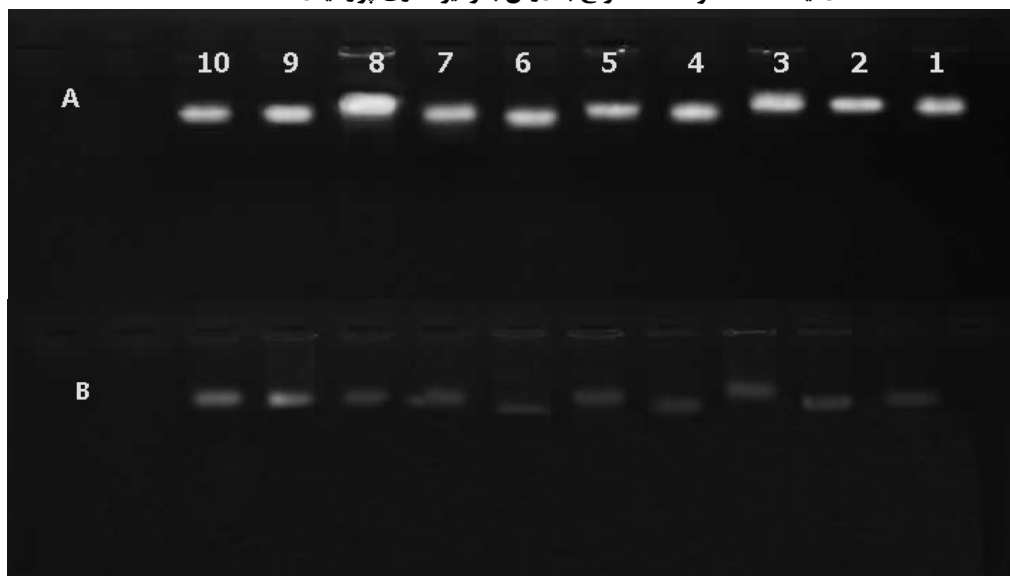
جدول شماره ۴. تجزیه ی واریانس غلظت های DNA

	مجموع مقادیر	درجه آزادی	میانگین مجذورات	دفعات مشاهده	
				شده	سطح معنی داری
بین اعضای گروه	۳۰۲۰۷۵/۳۰۶	۲	۱۵۱۰۳۷/۶۵۳	۱۶/۸۱ ۳	۰/۰۰۰۱
داخل گروه	۲۴۲۵۵۵/۹۰۱	۲۷	۸۹۸۳/۵۵۲		
مجموع	۵۴۴۶۳۱/۲۰۷	۲۹			

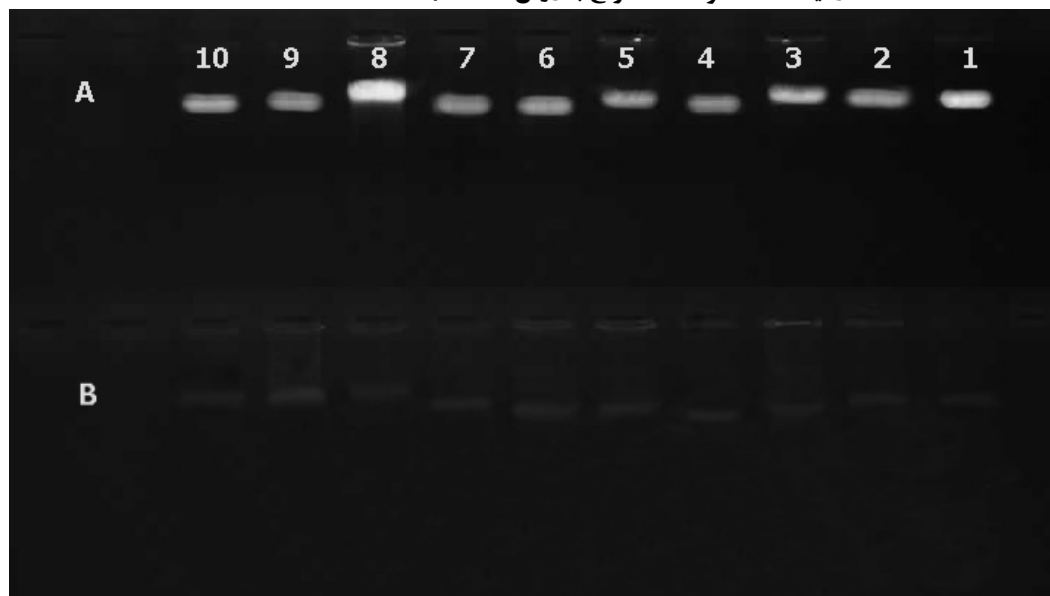
جدول شماره ۵. مقایسه ی میانگین ها با آزمون دانکن

روش	N	Subset for alpha = 0.05 DNA بر اساس (ng/μl) غلظت	
		۱	۲
روش ۱	۱۰	۱۱۴/۷۰۰۰	
روش ۲	۱۰	۵۰/۶۷۰۰	
روش ۳	۱۰		۲۸۸/۲۰۰۰

شکل شماره ۱. آنالیز محصولات دی. ان. ای استخراج شده. ردیف A: محصولات استخراج به روش جوشاندن
ردیف B: محصولات استخراج به روش بافر لیز حاوی پروتئیناز k



شکل شماره ۲. آنالیز محصولات دی. ان. ای استخراج شده. ردیف A: محصولات استخراج به روش جوشاندن
ردیف B: محصولات استخراج به روش DNGTM-plus kit



نتایج

غلظت‌ها و نسبت‌های به‌دست آمده از دستگاه نانودراپ: برای تعیین خلوص و غلظت دی. ان. ای به‌دست آمده از هر روش، از اسپکتروفوتومتر نانودراپ استفاده شد. نتایج حاصل در جدول‌های شماره‌ی ۳-۱ نشان داده شده است.

مقایسه‌ی روش‌های استخراج دی. ان. ای از راه بررسی آماری

برای مقایسه‌ی مقدار دی. ان. ای استخراج شده از تجزیه‌ی واریانس و نرم‌افزار SPSS استفاده شد. برای اندازه‌گیری غلظت دی. ان. ای ده نمونه به سه روش استخراج شد. پس از مقایسه‌ی F حاصله با F جدول در سطح ۵٪ اختلاف معنی‌داری بین غلظت‌های دی. ان. ای مشاهده شد. جدول شماره‌ی (۴) تجزیه‌ی واریانس غلظت‌های دی. ان. ای را نشان می‌دهد.

برای مقایسه‌ی میانگین غلظت‌های دی. ان. ای از آزمون دانکن در سطح ۵٪ استفاده شد. این آزمون رایج‌ترین آزمون تعیین حداقل دامنه‌ی معنی‌داری است. میانگین غلظت‌های دی. ان. ای هر روش به صورت ذیل بود: روش ۱، ۱۱۵؛ روش ۲، ۵۰/۷؛ روش ۳، ۲۸۸. در روش ۳ بالاترین غلظت دی. ان. ای به‌دست آمد. پس از آن روش ۱ غلظت پایین‌تری نشان داد و کمترین غلظت در روش ۲ دیده شد. اعداد دو زیرگروه ۱ و ۲ در جدول شماره‌ی (۵) معرف میانگین غلظت‌اند. در خروجی مربوط به زیرمجموعه‌های آزمون دانکن، میانگین‌هایی که با هم تفاوت ندارند، در یک زیرگروه قرار می‌گیرند.

به‌منظور نتیجه‌گیری درباره‌ی وضعیت برابری یا عدم برابری میانگین‌ها از ستون sig در جدول شماره‌ی (۴) استفاده می‌شود. اعداد مشاهده شده در ستون sig معرف P-value به‌دست آمده در آزمون‌اند. آزمون در سطح ۰/۰۵ موضوع بررسی است. در این جدول میزان $P\text{-value} < 0/05$ به‌دست می‌آید؛ بنابراین فرضیه‌ی تفاوت معنی‌دار میانگین غلظت دو زیرگروه، نسبت به هم تأیید می‌شود.

آنالیز محصولات دی. ان. ای استخراج شده از روش الکتروفورز ژل آگارز

با مقایسه‌ی باندهای تشکیل شده در الکتروفورز مشخص شد که به ترتیب، روش‌های ۱ و ۲ باندهای مشخص‌تری تشکیل داده‌اند. مقایسه‌ی این دو روش نیز نشان داد که روش ۱ (جوشاندن) بالاترین بازده استخراج دی. ان. ای را داشت که علت آن، ناپایداری پلی‌ساکارید و پروتئین‌های غشای سلول نسبت به گرما است. در روش ۳ (DNGTM-plus kit) کمترین میزان غلظت دی. ان. ای به‌دست آمد.

منابع

- امتیازی. گیتی (۱۳۸۶). میکروبیولوژی کاربردی و مهندسی ژنتیک، ویرایش دوم، انتشارات دانشگاه اصفهان.
- براون. ترای (۱۳۸۶). کلون‌سازی ژن‌ها و آنالیز دی. ان. ای، چاپ اول، انتشارات خانه‌ی زیست‌شناسی، تهران.

- Ausubel. F. M., Brent. R., Kingston, R. E., Moore, D. D. Seidman, J.G. Smith, J.A. Struhl K., (1987). Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing Associated and Wiley-Interscience, New York.
- Chen. W. P., Kuo T. T.; (1993). A simple and rapid method for the preparation of gram-negative bacterial genomic DNA, Nucleic acid research, 21-9.
- Chen. J., Su. Z., Liu Y., Wang SH., Dai X., Li Y., Peng S., Shao Q., Zhang H., Wen P., Yu J., Huang X., Xu H.; (2009). Identification and characterization of class 1 integrons among *Pseudomonas aeruginosa* isolates from patients in Zhenjiang, China, Int J of Infect Dis, 13:717-721.
- Farshad. SH, rasouli. M., Alborzi A.; (2004). Simultaneous detection of *Helicobacter* genus and *Helicobacter pylori* spesies using a multiplex PCR method, Iran. Biomed. J, 8(4): 205-209.
- Harding , N. E., Cleary J. M., Cabanas D. K., Rosen I.G., Kang K.S.; (1987). Genetic and physical analyses of a cluster of genes essential for xantan gum biosynthesis in *Xanthomonas campestris*, J. Bacteriol, 169: 2854-2861.
- Hentzer. M., Wu. H., Andersen J.B., Riedel K., Rasmussen T.B., Bage N, Kumar. N., Schembri m. a., Song. Z.; (2003). Attenuation of *Pseudomonas aeruginosa* virulence by quorum sensing inhibitors. EMBO J. 22: 3803-3815.
- Jenab A., Roghanian R., Golbang. N., Golbang P., Chamani L.; (2010). Comparison of three methods of DNA extraction in endocervical specimens for *Chlamydia trachomatis* infection by spectrophotometry, agarose gel and PCR., Arch. Immunol. Ther. Exp., 58: 227-234.
- Merk S., Neubauer H., Meyer H., Greiser-wilke I.; (2001). Comparison of different methods for the isolation of *Burkholderia cepacia* DNA from pure cultures and waste water, Int J Hyg Environ Health, 204: 127-131.
- Sung K., Khan S.A., Nawaz M.S. ,Khan A.A.; (2003). A simple and efficient TritonX-100 boiling and chloroform extraction method of RNA isolation from gram-positive and gram-negative bacteria, FEMS Microbiology Letters, 229: 97-101.
- Wilcox H.; (2009). DNA extraction-sucrose lysis method, Worden lab.