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 علوم‌پایه، واحد تبریز، دانشگاه آزاد اسلامی، تبریز، ایران.
۲- استادیار گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، واحد تبریز، دانشگاه آزاد اسلامی، تبریز، ایران.
۳- استادیار گروه زیست شناسی، دانشکده علوم‌پایه، 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 پلی‌مراز (Polymerase Chain Reaction; PCR) داشتن DNA کافی و با کیفیت می‌باشد، هدف از انجام این مطالعه مقایسه پنج روش مختلف استخراج DNA ژنومی مایکوباکتریوم‌ها به‌منظور معرفی بهترین روش بود. بدین منظور از پرگنه‌های خالص *مایکوباکتریوم اویوم پاراتوبرکلوزیس* به‌عنوان مایکوباکتریوم بیماری‌زا و نیز سویه‌ای از یک مایکوباکتریوم ساپروفیت به‌نام *مایکوباکتریوم فلئی* استفاده شد. کمیت و کیفیت DNA های به‌دست‌آمده توسط هر یک از روش‌ها، به‌ترتیب 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 استخراج‌شده 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 DNAهای استخراج‌شده در هیچ‌یک از روش‌های استفاده‌شده برای استخراج DNA اختلاف معنی‌داری وجود نداشت. با توجه به نتایج مطالعه حاضر به‌نظر 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

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 به‌حال در محیط آزمایشگاه کشت داده نشده‌اند) در حالی‌که 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) به‌طور 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 طلائی می‌باشد (Anzabi *et al*., 2009)، ولی در عین حال به‌کارگیری روش فوق دارای مشکلاتی نیز می‌باشد. در واقع نظر بر این‌که مایکوباکتریوم‌های بیماری‌زا 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، به‌طوری‌که 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 طولانی‌شدن 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 تاثیر می‌گذارد. علاوه بر این، مایکوباکتریوم‌ها غالباً تشکیل اشکال سلولی با دیواره ناقص یا اسفروبلاستی را می‌دهند که همین خاصیت امکان کشت آن‌ها را هم دوچندان مشکل می‌کند. از طرف دیگر نمونه‌های منجمدشده 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 مونوسیت‌های خونی و ماکروفاژهای بافتی جایگزین شده و بعدها ممکن است از آن‌ها بیرون بریزد که در این موارد مخصوصاً آزمایش واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز (Polymerase Chain Reaction; PCR) با کارائی 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 مشخص کند. بنابراین امروزه ردیابی DNA اختصاصی گونه‌ها، به‌عنوان یک روش سریع برای تشخیص مایکوباکتریوم‌ها در نمونه‌های بالینی ارسالی به آزمایشگاه‌های میکروب‌شناسی کاربرد خوبی دارد (Anzabi *et al*., 2009; Khakpoor *et al*., 2011). گزارش‌های متعدد نشان می‌دهد پیشرفت‌های اخیری 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 لیپیدهای 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 به هنگام استخراج DNA از باکتری مذکور غالباً DNA خالص و یک‌دست به‌دست نمی‌آید (Bono *et al*., 1995; Bauerfeind *et al*., 1996 ; Butcher *et al*., 1996 ; Chan *et al*., 2005). 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 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 ذکرشده و نظر بر این‌که PCR ازجمله 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 فلئی* به عنوان 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

مایکوباکتریوم اوویوم پاراتوبرکلوزیس (DSM: 44133) و نیز یکی از سویه‌های استاندارد *مایکوباکتریوم فلئی* (ATTC: 11758) که از طریق کشت اختصاصی روی محیط هرولد حاوی زرده تخم‌مرغ حاصل شده بودند، جهت استخراج DNA استفاده گردید. بدین منظور ابتدا از هر یک از باکتری‌های مذکور سوسپانسیون میکروبی استاندارد بر اساس کدورت لوله شماره ۰/۵ مک‌فارلند تهیه و سپس بر مبنای روش‌های توصیف‌شده در زیر از هر کدام جداگانه و در ۵ تکرار مشابه عمل استخراج DNA انجام گرفت. لازم به ذکر است که در مورد تمام روش‌های استفاده شده به منظور کنترل صحت فرآیند استخراج، مقدار ٤ میکرولیتر از DNA Extraction Control(Primer Design LTD, UK) هم به هر لوله مربوط به استخراج DNA باکتری‌های فوق جداگانه اضافه شد(Klanicova *et al*., 2012). همچنین با توجه به اینکه میزان خلوص DNA یک عامل بسیار مهم درکیفیت کارهای آزمایشگاه ژنتیک مولکولی است و در این ارتباط استفاده از عمل الکتروفورز با ژل آگارز معیار مهمی برای محاسبه کیفیتDNA و عدم شکستگی آن می‌باشد. لذا پس از مشخص شدن بهترین روش استخراج بر مبنای آنالیز آماری داده‌های به‌دست آمده، با انتخاب تعدادی از DNAهای به‌دست آمده از روش مذکور (به‌عنوان روشی که در آن غلظت DNAهای استخراج‌شده مناسب بوده و در عین‌حال 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.

- استخراج DNA مایکوباکتریوم های مورد آزمایش بوسیله روش جوشانیدن: ابتدا برای غیرفعال کردن باکتری‌های مورد نظر، میکروتیوب‌های حاوی سوسپانسیون میکروبی تهیه‌شده از باکتری‌های 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 ٤۰۰۰ دور به مدت ۵ دقیقه رسوب سلول‌های باکتریائی از مقدار ۲۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون میکروبی استاندارد تهیه شده، جدا گردید. در ادامه پس از حل کردن رسوب‌ها در ۱۰۰ مایکرولیتر از بافر TE (Tris)، محلول های مذکور در بن ماری ۹۵ درجه سلسیوس به‌مدت ۱۵ دقیقه گرم‌خانه‌گذاری شد. سپس محلول های مذکور در شتاب ۱۲۰۰۰ دور به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ گردید. در نهایت هم مایع رویی که حاوی DNAهای استخراج شده بود، به یک میکروتیوب جدید جهت نگه‌داری و استفاده در آزمایشات مولکولی انتقال داده شد و در دمای یخچال موقتاً نگه‌داری گردید (Queipo-Ortuño; *et al*., 2008).

- استخراج DNA مایکوباکتریوم‌های مورد آزمایش بر اساس روش CTAB (Cetyltrimethylammonium bromide): ابتدا با استفاده از مقدار ۲۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون استاندارد تهیه‌شده و به کمک بافر لیزکننده و عمل سانتریفیوژ در شتاب ۱٦۰۰ دور به مدت ۱۵ دقیقه، رسوب سلول‌های باکتریائی از سوسپانسیون میکروبی مذکور جدا شد. سپس، سلول‌های رسوب‌شده به میکروتیوب‌های ۱/۵ میلی‌لیتری اپندورف منتقل شد. در ادامه ٦۰۰ میکرولیتر از بافر CTAB که قبلاً در

داخل بن‌ماری و در دمای ٦٠ درجه سلسیوس قرار داده شده بود، به داخل میکروتیوب‌ها اضافه گردید و چند دقیقه با دست تکان داده شد. سپس، بن‌ماری در دمای ٦٢ درجه سلسیوس تنظیم گردیده و نمونه‌ها بر روی یونولیت قرار داده شد (جهت شناورماندن در بن‌ماری و جلوگیری از بازشدن در میکروتیوب‌ها) و به مدت ۳۰ دقیقه داخل بن‌ماری قرار گرفت. لازم به ذکر است که هر ٥ الی ٦ 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 ٥٠٠ میکرولیتر از مخلوط کلروفرم/ایزوآمیل الکل (١:٢٤) افزوده شد، سپس میکروتیوب‌ها به مدت ۲۰ دقیقه روی شیکر قرار گرفتند. در نهایت هم به مدت ۱۵ دقیقه، در دمای ٤ 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 (١:٢٤) کلروفرم/ایزوامیل الکل مجدداً تکرار شد. منتها این‌بار به همان میزان که از فاز بالایی برداشته شده بود، به همان مقدار هم از مخلوط کلروفرم/ایزوامیل الکل به میکروتیوب‌ها اضافه شده و بازهم به مدت ۱۵ دقیقه، در دمای ٤ درجه سلسیوس، با شتاب ۱۳۰۰۰ دور سانتریفیوژ شد. در ادامه مقدار ٠/٦ 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- 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 مقدار۷۰ میکرولیتر اتانول ۷۰ درجه اضافه گردید تا رسوب حاصله شسته شود. در ادامه، بعد از پنج دقیقه سانتریفیوژ با شتاب۱۰۰۰۰ دور در دمای ٤ 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 ٥٠ 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 شتاب٥٠٠٠ دور به مدت ٥ دقیقه رسوب سلول‌های باکتریائی از مقدار ۲۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون میکروبی استاندارد تهیه شده، جدا گردید.

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

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

٤- اضافه کردن ٤۰۰ 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.

٦- 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 ٤۰۰ میکرولیتر از بافر WI (Wash buffer I) داخل ستون و انجام سانتریفیوژ با شتاب۱۳۰۰۰ دور طی مدت ۱ دقیقه.

۱۰- حذف مایع عبوری از فیلتر.

۱۱- در ادامه ریختن مقدار ٤۰۰ میکرولیتر از بافر WII (Wash buffer II) داخل ستون و انجام سانتریفیوژ با شتاب۱۳۰۰۰ دور طی مدت ۱ دقیقه.

۱۲- حذف مایع عبوری از فیلتر.

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

١٤- انتقال ستون به میکروتیوب جدید و اضافه‌کردن ۵۰ ماکرولیتر از بافر EB (Elution buffer) و قراردادن آن در بن‌ماری ٦۵ درجه سلسیوس به مدت ۵-۳ دقیقه.

۱۵- سانتریفیوژ در شتاب۱۳۰۰۰ دور به مدت ۱ دقیقه.

١٦- در نهایت مایع رویی که حاوی DNAهای 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 به‌مدت ۳۰ دقیقه.

٤- اضافه‌کردن ۲۰۰ میکرولیتر از بافر LB (Lysis buffer) و نیز ۱۰ میکرولیتر از محلول حاوی آنزیم پروتئیناز K و در ادامه گرم‌خانه‌گذاری در بن‌ماری ٥٦ درجه سلسیوس به مدت ۳۰ دقیقه.

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

٦- 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.

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- اضافه‌کردن 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 ماکرولیتر از بافر EB (Elution buffer) به آن.

۱٤- 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 تهیه‌شده هر یک از باکتری‌های مورد نظر، با ٤۰۰ میکرولیتر از بافر لیزکننده کیت مخلوط گردیده و در بن ماری ٦٥ درجه سلسیوس به مدت ۵ دقیقه گرم-خانه‌گذاری شد.

۲- در ادامه ٦۰۰ میکرولیتر کلروفرم به مخلوط مذکور اضافه شده و چند بار تکان داده شد.

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

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

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

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

۷- اضافه کردن۳۰۰ میکرولیتر اتانول خالص سردشده 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 استخراج‌شده توسط هر یک از روش‌های مذکور (بر حسب نانوگرم در میکرولیتر) در طول موج ۲٦۰ نانومتر و جهت ارزیابی خلوص DNAهای مذکور با توجه به نسبت OD (چگالی‌نوری) در طول موج‌های ۲٦۰/۲۸۰ از دستگاه نانودراپ

(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 داده‌شده به شرکت Shanghai Generary Biotech مربوط به سکانس *IS900* که جایگاه ژنتیکی اختصاصی در باکتری *مایکوباکتریوم اوویوم* تحت‌گونه *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´-AATCAACTCCAGCAGCGCGGCCTCG-3´

لازم به ذکر است که از DNAهای استخراج‌شده مربوط به یک سویه استاندارد از باکتری مذکور (DSM: 44133) به‌عنوان کنترل مثبت و از آب مقطر دوبار تقطیر دیونیزه استریل به عنوان کنترل منفی و همچنین از DNA های استخراج‌شده از باکتری *مایکوباکتریوم فلئی* هم به‌عنوان نمونه منفی جهت تائید 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 ٤ دقیقه در دمای ٩٤ 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 ٤٠ ثانیه استفاده 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 ٦ میکرولیتر (۱۰۰ نانوگرم) و آنزیم TaqDNA polymerase (۵ واحد در میکرولیتر) به میزان ٠/٤ میکرولیتر که به همراه دیگر اجزای آزمایش یعنی مخلوط بازهای آلی سه‌فسفاته (۱۰ میکرو مولار) به مقدار ۰/۵ میکرولیتر و کلرید منیزیوم (۵۰ میکرو مولار) به مقدار ۱/۵ میکرولیتر و با اضافه کردن ۵ میکرولیتر از بافر 10X PCR و نیز ٣٤/٦ میکرولیتر آب مقطر دیونیزه استریل، که همگی از شرکت طوبی نگین تهران تهیه شده بود، با حجم نهائی ۵۰ میکرولیتر در میکروتیوب‌های 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 الکتروفورزشده نتایج PCR که نشان‌دهنده محصولات به‌دست 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 استخراج‌شده توسط روش‌های مختلف،

به‌طور جداگانه از آزمون آماری دانکن برمبنای 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.

یافته‌ها

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

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 M.a.p[1]	تعداد دفعات استخراج DNA از باکتری M.ph[2]	میانگین نتیجه بر اساس غلظت DNAهای استخراج‌شده (ng/µl)[3]
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

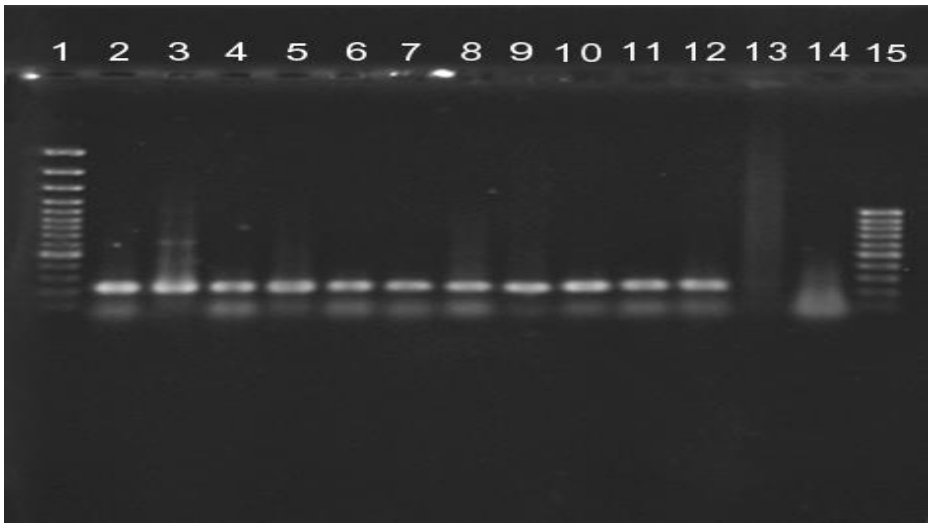
روش استفاده‌شده برای استخراج DNA	تعداد دفعات استخراج DNA از باکتری M.a.p[1]	تعداد دفعات استخراج DNA از باکتری M.ph[2]	میانگین نتیجه بر اساس خلوص DNAهای استخراج‌شده (A260/A280)[3]
CTAB	۵	۵	۱۱۵۳/۵۵۰±۰/۰۴[a]
کیت باکتری های گرم منفی	۵	۵	۱۰۸/۴۲۰±۰/۰۳[bc]
کیت شرکت ترمو	۵	۵	۳۴/۳۹۰±۰/۰۲[c]
کیت باکتری های گرم 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

بر اساس جدول ۱ و مقایسه میزان خلوص DNAهای استخراج‌شده توسط روش‌های مختلف استفاده‌شده، استخراج DNA با استفاده از روش CTAB بیشترین میزان و روش مبتنی بر

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 ٤ روش، ازجمله روش CTAB بیشترین میزان و روش مبتنی بر جوشانیدن کمترین میزان DNA استخراج‌شده را حاصل کرد (بر مبنای غلظت DNA استخراجی برحسب 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 از مایکوباکتریوم‌های مورد آزمایش نیز در شکل ۱ نشان داده شده است. در این تصویر در چاهک‌های ردیف ۱ و ۱۵ سایز مارکر۱۰۰جفت‌بازی شرکت فرمنتاز، در ردیف‌های ۱۲-۲ محصول PCR با استفاده از DNAهای استخراج‌شده از *مایکوباکتریوم اوویوم* تحت‌گونه پاراتوبرکلوزیس به‌عنوان جواب مثبت با اندازه ۲۲۹ جفت‌باز، در ردیف۱۳ محصول PCR با استفاده از آب مقطر دوبار تقطیر استریل به‌عنوان کنترل منفی و در ردیف ١٤ محصول PCR با استفاده از DNA استخراج شده از *مایکوباکتریوم فلئی* به‌عنوان جواب منفی مشاهده می‌شود.



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

بحث و نتیجه‌گیری

در این مطالعه روش‌های مختلفی با ترکیبات متفاوت و طی مراحل مختلف برای استخراج DNA ژنومی مایکوباکتریوم‌های مورد نظر آزموده شد که یافته‌های حاصل، تفاوت معنی‌داری در کیفیت DNAهای استخراج‌شده توسط روش‌های مذکور به غیر

از روش CTAB را نشان نداد. البته تحلیل داده‌های به‌دست 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 هیچ‌یک 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 به‌نظر می‌رسد که استخراج DNA با استفاده از روش CTAB به‌دلیل اینکه در عین استخراج غلظت مناسبی از DNA مایکوباکتریوم‌های مورد آزمایش، در عین حال بالاترین خلوص را نیز در مورد آن‌ها حاصل می‌کند، ازجمله مناسب‌ترین روش‌ها جهت استخراج DNA ژنومی، هم از مایکوباکتریوم‌های بیماری‌زا و هم از مایکوباکتریوم‌های ساپروفیت می‌باشد.

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، به‌طوری‌که 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, 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 موید 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 آلوده‌زدایی با محلول ۰/۷۵ درصد HPC (Hexadecylpyridinium chloride) تقریباً ۱۰CFU/۵۰ml در نمونه شیر می‌باشد، در حالی‌که حداقل حد ردیابی PCR در این شرایط بسیار پایین‌تر از این مقدار می‌باشد به‌طوری‌که، 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 ۱۰۰CFU/۵۰ml از این باکتری در نمونه شیر موجود باشد در حالی‌که، 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., 1996; Corti and Stephan, 2002; Lazaro *et al*., 2005; Nebbia *et al*., 2006; Rodreguez- 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 به‌شرطی که DNAهای مناسبی از ژنوم باکتری مورد نظر به‌دست 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 استفاده‌شده، 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 می شود 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 ٦۵ درجه سلسیوس و درحضور SDS انجام 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 به‌دنبال عمل هضم مرحله ۲، معمولاً ناخالصی‌هایی از جنس پروتئینی وجود دارد، لذا در این مرحله جهت رسوب‌دادن پروتئین‌های مذکور از فنل و کلروفرم و یا محلول نمک اشباع ٦ مولار استفاده می‌شود.

٤. آخرین مرحله هم رسوب‌دادن DNAهای استخراج شده است که معمولاً این عمل با استفاده از اتانول مطلق سردشده 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 به‌دست آمده توسط آن نیز مطلوب باشد، مورد نیاز می‌باشد. بدین منظور در مطالعه حاضر برای به‌دست 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 به‌طوری‌که، ترکیب مذکور در شرایط یونی پائین (low ionic strength) باعث رسوب اسیدهای نوکلئیک می‌شود ولی پروتئین‌ها و

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 ایزوآمیل الکل-کلروفرم جدا گردید و اسیدهای نوکلئیک با افزودن ایزوپروپانول بر روی مایع رویی، به‌دست آمدند که موید آن است که DNA به‌دست 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 ٦ ساعت پس از ذوب‌شدن و پس از اضافه کردن بافر لیزکننده، سانتریفیوژ شده و برای رسوب بافر لیزکننده از سانتریفیوژ با ١٦٠٠ دور در دقیقه به مدت ۱۵ دقیقه استفاده شد، هرچند برخی گزارش‌ها در تحقیقات مشابه نشان داده‌اند که شتاب سانتریفیوژ از ٤٠٠ 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 از٤ – درجه سلسیوس به ۲- درجه سلسیوس، پس از اضافه کردن 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 هم نشان 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)، آزمایشPCR انجام گرفت، سپس باندهای به‌دست 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 مناسبDNAهای حاصله در این روش استخراج DNA دارد. همچنین اطلاعات به دست آمده از دستگاه نانودراپ، نشان می‌دهد که میزان خلوص DNAهای

استخراج شده در روش مذکور نیز رضایت بخش بوده است. در عین حال به‌نظر می‌رسد تفاوت‌هائی 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. به‌علاوه، 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 به‌طور 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 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 مایکوباکتریوم‌ها 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 بدین‌وسیله 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 منافعی ندارند.

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 Hybrization with a DNA probe to Insertion Element IS900. Journal of Clinical Microbiology, 34(7):1617-1621.
- Bono, T., Jemmi, T. and Bernascconi, C. (1995). Genotupic characterization of Mycobacterium avium strains recovered from animals and their comparison to human strains. Applied and Enviromental Microbilogy, 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 paratuberclosis 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.
- Rodreguez-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 Johne'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.