Short Communication

A Study of the Stability of *Escherichia coli* on DNA Banking Card (DBC) for Molecular Tests

Zahra Shahab Movahhed[1], Sirous Zeinali[2, 3], Mohammad Mehdi Aslani[4*]

1- M.Sc., Department of Microbiology, Faculty of Basic Sciences, Ghom Branch of Islamic Azad University, Ghom, Iran

2- Associated Professor, Medical Biotechnology Research Center, Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran

3- Associated Professor, Kowsar Human Genetics Research Center, Tehran, Iran

4- Professor, Department of Microbiology, Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran

**Corresponding Address: P.O.Code: 1316943551, Department of Microbiology, Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran*
Email: mmaslani @yahoo.com

Received: 08/Dec/2011, Accepted: 11/Feb/2012

Abstract

Objective: Traditional methods for storing microbial DNA samples use the low-temperatures of 4 °C, -20°C or -80 °C. The DBC Card is a new method of storing microbial DNA at room temperature. This study evaluates the stability and determine the best storing method of Bacterial DNA on the DBC card.

Methods: In this study, we used a pair of primers from the conserved domain of 16srRNA designed to identify *Escherichia coli*. Four different types of samples we prepared: i) bacterial suspension, ii) bacterial DNA extracted by the phenol – chloroform method, iii) bacterial lysate with lysis buffer and iv) bacterial DNA produced by the boiling method. All four samples were spotted on separate DBC cards and dried at room temperature. After periods of 3, 5 and 7 months, *Escherichia coli* samples were checked for DNA stability with two molecular techniques, conventional PCR with 1, 2 and 3 disks as a source of bacterial DNA (1 mm diameter) and Real-Time PCR.

Results: Data showed that DNA stability was maintained after 7 months on a DBC disk, even using only one disk as a DNA source. The bacterial suspension was the best method for long-term storage of *Escherichia coli* DNA on the DBC Card.

Conclusion: In traditional methods for storing sample, DNA quality reduces after freezing and thawing. However in the DBC method, DNA quality was maintained for a long duration. Advantages of the DBC method are easy sample handing, low cost, faster extraction, and reduced individual and environmental contamination.

Keywords: DNA Banking Card (DBC), Bacteria Suspension, Storing Method of Bacterial DNA, Real-Time PCR

Modares Journal of Medical Sciences: *Pathobiology*, Vol 14, No 4, Winter 2012, Pages: 99-107

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2025-01-16]

مقاله کوتاه

بررسی پایداری DNA اشریشیا کلی روی کارت نگهداری DNA برای انجام آزمایش‌های مولکولی

زهرا شهاب‌موحد[1]، سیروس زینلی[2،3]، محمدمهدی اصلانی[4*]

۱- کارشناس ارشد، گروه میکروب‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی واحد قم، ایران
۲- دانشیار، مرکز بیوتکنولوژی پزشکی، انستیتو پاستور ایران، تهران، ایران
۳- دانشیار، مرکز تحقیقات ژنتیک انسانی کوثر، تهران، ایران
۴- استاد، بخش میکروب‌شناسی، انستیتو پاستور ایران، تهران، ایران

آدرس نویسنده مسئول: ایران، تهران، کدپستی: ۱۳۱۶۹۴۳۵۵۱، انستیتو پاستور ایران، بخش میکروب‌شناسی
Email: mmaslani@yahoo.com

دریافت مقاله: ۹۰/۰۹/۱۸ پذیرش مقاله: ۹۰/۱۱/۲۳

چکیده

هدف: برای نگهداری DNA میکروارگانیسم‌ها از روش‌های سنتی نگهداری در دمای پایین ۲۰،٤- و ۸۰- درجه سانتی‌گراد استفاده می‌شود. کارت DBC یک روش نوین نگهداری DNA در دمای اتاق است. پژوهش حاضر به‌منظور بررسی پایداری DNA باکتری و تعیین بهترین روش نگهداری DNA روی کارت نگهداری DNA طراحی شد.

مواد و روش‌ها: از یک جفت آغازگر از قسمت حفاظت شده دومین 16 srRNA برای شناسایی اشریشیا کلی استفاده شد و چهار نوع مختلف نمونه باکتریایی شامل سوسپانسیون باکتری، DNA خالص باکتری به روش فنل- کلروفرم، باکتری لیز شده با بافر لیز کننده و DNA باکتری با روش جوشاندن تهیه و در روی کارت جداگانه ریخته و در دمای اتاق خشک شد. سپس در زمان‌های ۳، ۵ و ۷ ماه پایداری DNA باکتری اشریشیا کلی با دو روش مولکولی PCR مرسوم با تعداد ۱، ۲، ۳ دیسک (به قطر ۱ میلی‌متر) به‌عنوان منبعی از DNA باکتری و Real-Time PCR بررسی شد.

نتایج: DNA باکتری پس از هفت ماه روی یک دیسک از کارت نگهداری DNA پایداری خود را حفظ نمود و حتی یک پانچ از دیسک به‌عنوان منبع DNA کافی بود. اما نتایج بررسی حاضر نشان داد که سوسپانسیون باکتری بهترین روش نگهداری طولانی مدت DNA باکتری روی کارت نگهداری DNA است.

نتیجه‌گیری: در روش‌های سنتی نگهداری DNA، پس از منجمد و ذوب شدن DNA کیفیت آن کاهش می‌یابد اما در روش کارت نگهداری DNA کیفیت DNA برای زمان طولانی‌تر حفظ می‌شود و علاوه برآن این روش مزایایی مانند آسانی در کارکردن با نمونه، قیمت پایین، تخلیص سریع‌تر و در نهایت کاهش آلودگی فردی و محیطی را دارد.

کلیدواژگان: کارت نگهداری DNA، سوسپانسیون باکتری، روش‌های نگهداری DNA باکتری، Real-Time PCR

مجله علوم پزشکی مدرس: آسیب شناسی زیستی، دوره ۱۴، شماره ۴، زمستان ۱۳۹۰، صفحات: ۹۹-۱۰۷

مقدمه

دمای متداول برای ذخیره‌سازی DNA خالص ٤ درجه سانتی‌گراد است. برای ذخیره‌سازی در ۲۰- درجه سانتی‌گراد استفاده از فریزر بدون یخ مناسب‌تر است. برای ذخیره‌سازی طولانی مدت، دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد توصیه می‌شود. به‌طور کلی DNA تخلیص شده در دمای ٤ درجه سانتی‌گراد برای چندین هفته، در ۲۰- درجه سانتی‌گراد برای چندین ماه و در دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد برای چندین سال نگهداری

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2025-01-16]

می‌شود. در روش سنتی نگهداری DNA این احتمال وجود دارد که بر اثر منجمد و ذوب شدن DNA کیفیت آن پایین آمده و نیاز به تخلیص مجدد باشد. علاوه بر آن؛ در روش‌های نگهداری سنتی DNA نیاز به شرایط کنترل شده آزمایشگاهی است که این روش‌ها وقت‌گیر و دارای هزینه است و از طرفی کشت و تخلیص DNA باکتری‌های سخت رشد، غیر قابل کشت و باکتری‌های بی‌هوازی با مشکلاتی همراه است [۱].

با توجه به طولانی بودن تشخیص براساس کشت باکتریایی و نیز مشکلاتی که در زمینه کشت در ایجاد جهش‌های جدید وجود دارد و همچنین آلودگی‌هایی که در انجام آزمایش ایجاد شده، امروزه شناسایی میکروارگانیسم‌ها به‌طور سریع از تشخیص براساس شکل ظاهری کلونی به سمت روش‌هایی بر پایه تجزیه و تحلیل ژنومیک حرکت کرده است؛ بنابراین لازم است یک روش راحت و مطمئن برای نگهداری DNA باکتری ایجاد شود [۲].

فناوری کارت نگهداری DNA روش جدیدی است که به‌منظور آسان‌تر کردن نگهداری، حمل و نقل، بایگانی و خالص‌سازی اسید نوکلئیک برای نمونه‌های زیست‌شناختی به‌منظور تحقیق و تجزیه و تحلیل DNA طراحی شده است [۳]. کارت نگهداری DNA یک جایگزین مناسب برای نگهداری طولانی مدت DNA است که با تجهیزات کمتر، تعداد روش‌های کمترو ارزان‌تر قابل انجام است. نمونه‌های ذخیره شده با این روش برای تکثیر DNA انسانی، ویروسی و باکتریایی استفاده می‌شود [٤، ٥]. مهم‌ترین مزیت استفاده کارت نگهداری DNA در زمینه میکروبی این است که باکتری‌های بیماری‌زا به محض تماس با کارت غیرفعال می‌شوند؛ بنابراین این کارت محیطی امن و بی‌خطر را برای محققانی که در زمینه باکتری‌های خطرناک فعالیت می‌نمایند، فراهم می‌کند [٦، ٧].

کارت نگهداری DNA (DNA Banking Card: DBC) ابزاری برای نگهداری و بایگانی DNA است. سلول‌های زیست‌شناختی در تماس با کارت نگهداری DNA لیز می‌شود و تنها DNA در فیلتر کارت قرار می‌گیرد. مواد شیمیایی پوشانده روی کارت، DNA را از آسیب‌های شیمیایی و آنزیماتیک محافظت می‌کند [۸].

با توجه به مزیت‌های فوق، بررسی بهترین روش نگهداری باکتری روی این کارت‌ها از ضرورت انجام این تحقیق است که پایداری و کیفیت DNA را حفظ کرده و برای روش‌های مولکولی مثل PCR و Real-Time PCR کارا باشد. هدف این مطالعه ارزیابی یک روش نوین و کاربردی برای نگهداری DNA است تا با استفاده از آن کیفیت بالای DNA برای انجام روش‌های مولکولی حفظ شود.

مواد و روش‌ها

نحوه قرار دادن نمونه‌ها روی DBC

در این مطالعه از سویه استاندارد اشریشیا کلی ATCC 25922 استفاده شد و چهار نمونه شامل سوسپانسیون باکتری، DNA خالص شده از باکتری به روش فنل- کلروفرم، باکتری لیز شده با بافر لیز و DNA به‌دست آمده از باکتری بعد از جوشاندن به کار برده شد.

استخراج DNA باکتری به روش فنل- کلروفرم انجام شد. به‌طور خلاصه بعد از کشت باکتری در محیط کشت مایع BHI (Brain Heart Infusion)، به‌مدت ٢٤ ساعت در انکوباتور شیکردار (Shaker Incubator) قرار داده شد و پس از سانتریفوژ با دور ٤٠٠٠ دور در دقیقه به‌مدت ٢٠ دقیقه، به رسوب آن ٦٠٠ میکرولیتر بافر لیز کننده (EDTA ٠/٥ مولار، Tris-HCl ١ مولار، NaCl ١ مولار)، ٣ میکرولیتر آنزیم پروتئیناز K (٢٠ میلی‌گرم در میلی‌لیتر) (Qiagen) و ١٣ میکرولیتر SDS ١٠ درصد اضافه شد و سپس به‌مدت ٦٠ دقیقه در بن‌ماری ٦٠ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. به هر نمونه سه مرتبه فنل- کلروفرم اضافه شد و بعد از رسوب دادن DNA با استات سدیم و ٠/٥ میلی‌لیتر اتانل مطلق سرد، DNA با اتانل ٧٠ درصد شسته و بعد از خشک نمودن رسوب، در ٣٠ تا ٥٠ میکرولیتر بافر TE (Tris-EDTA) حل و در دمای ٢٠- درجه

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2025-01-16]

سانتی‌گراد ذخیره شد.

برای تهیه سوسپانسیون باکتری تعدادی از کلونی‌های باکتری در محیط کشت مایع BHI حل شده و سپس با دستگاه اسپکتوفتومتر در طول موج ۶۰۰ نانومتر، تعداد باکتری در سوسپانسیون مشخص شد [۷].

برای تهیه نمونه DNA از باکتری به روش جوشاندن، ابتدا مقداری از کلونی باکتری در آب استریل حل شد و سوسپانسیون به‌مدت ۳۰ دقیقه در بن‌ماری ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد و بعد از سانتریفوژ با دور ۹۰۰۰ دور در دقیقه به‌مدت ۱۰ دقیقه، محلول رویی به میکروتیوپ جدید منتقل شد.

برای تهیه باکتری لیز شده با بافر لیز ابتدا به رسوب حاصل از سانتریفوژ کشت مایع باکتری بافر لیز کننده، SDS ۱۰ درصد و آنزیم پروتئیناز K اضافه شد و در بن‌ماری ۶۰درجه سانتی‌گراد به‌مدت یک ساعت قرار داده شد.

نمونه‌های DNA در حجم ۵۰ میکرولیتر به جذب ۱۰۰۰ نانوگرم بر میکرولیتر تنظیم شد و ۵۰ میکرولیتر از نمونه‌ها در دایره‌ای به قطر ۲ سانتی‌متری روی دیسک DBC ریخته شد. بررسی تعیین مقدار DNA روی یک دیسک با قطر ۱ میلی‌متر نشان داد که حدود ۲/۵ نانوگرم بر میکرولیتر DNA روی یک دیسک قرار داشته است. نمونه‌ها به‌صورت همگن روی سطح دایره کارت DBC (شرکت زیست فناوری کوثر، تهران، ایران) ریخته شد و در دمای اتاق به‌مدت یک ساعت خشک و سپس کارت‌ها در کسیه پلاستیکی زیپ‌کیپ مربوط به کارت گذاشته شد و در جای مناسب و دور از رطوبت و نور نگهداری شد.

روند طراحی آغازگر برای واکنش PCR

دراین مطالعه ژن هدف گذاری شده برای تشخیص باکتری اشریشیا کلی از قسمت حفاظت شده ژن 16 srRNA است. برای طراحی آغازگر، ترادف‌های این ژن از سایت NCBI استخراج شد. ۲۷۷ توالی دریافتی با استفاده از نرم‌افزار (CLC Sequence viewer Version 6.4) ترازبندی شد. با توجه به بررسی نقاط حفاظت شده توالی باکتری، تشابه توالی‌های ژنی با هم مقایسه شد. پس از ترازبندی ترادف‌های اخذ شده برخی از نقاط حفاظت شده کاملاً با هم‌ترازنشدند، بنابراین یک جفت آغازگر با بازهای متغیر یا آغازگر دژنره (Degenerate) طراحی شد. برای اطمینان از اختصاصی بودن آغازگرها از سرویس‌های Primer BLAST و Nucleotide BLAST در سایت NCBI استفاده شد. بررسی خصوصیات ترمودینامیکی آغازگرها با استفاده از نرم‌افزار Oligo Analyzer (نسخه ۳/۱) صورت گرفت. توالی آغازگرهای طراحی شده این ژن و طول محصول PCR در جدول ۱ نشان داده شده است.

جدول ۱ آغازگر دژنره (R: A یا G، Y: A یا C، W: A یا T)

آغازگر	توالی	طول محصول PCR
توالی پیشرو	5′CAC ACT GGR ACTGAG ACA CGG 3′ (۲۱ جفت‌باز)	۱۰۵
توالی پیرو	5′ CCT TCW TCA YWC ACG CGG C 3′ (۱۹ جفت‌باز)	

انجام PCR

ابتدا با استفاده از میکروپانچ (Micro Punch) با قطر ۱ میلی‌متر به تعداد ۱، ۲ و ۳ دیسک برای هر ٤ نمونه موجود روی کارت تهیه شد و طبق دستورالعمل استخراج DNA از کارت DBC، دیسک‌ها شستشو شد و مستقیماً در داخل تیوپ PCR برای انجام واکنش قرار گرفت. از DNA تخلیص شده باکتری با روش فنل- کلروفرم در لوله آزمایش به‌عنوان کنترل مثبت استفاده شد.

برنامه PCR به این ترتیب بود: یک مرحله واسرشت اولیه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۱۰ دقیقه، سپس ۳۲ چرخه شامل واسرشت‌سازی در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۱ دقیقه، اتصال آغازگرها در دمای ۵۵ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۱ دقیقه، تکثیر قطعه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۱ دقیقه و در نهایت یک چرخه نهایی در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۱۰ دقیقه.

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2025-01-16]

اندازه قطعه حاصل از تکثیر۱۰۵ جفت باز بود. در هر واکنش که در حجم ۲۵ میکرولیترانجام شد، بافر PCR ۱۰X (شرکت کوثر، ایران)، ۱۰۰ میلی‌مولار منیزیوم کلراید (شرکت کوثر، ایران)، ۱۰میلی‌مولار dNTP (شرکت کوثر، ایران)، ۱۰ میلی‌مولار آغازگر (شرکت سیناژن، ایران) و ۱ واحد آنزیم *Taq* پلیمراز (شرکت GeneON، آلمان) استفاده شد.

محصول PCR پس از اتمام واکنش تکثیر برای بررسی کیفی الکتروفورز شد.

روند طراحی آغازگر برای واکنش Real-Time PCR

از قسمت حفاظت شده ژن 16srRNA به‌عنوان ژن هدف برای تشخیص باکتری اشریشیا کلی برای واکنش Real-Time PCR استفاده شد. برای طراحی آغازگر برای واکنش Real-Time PCR از ترادف‌های منطقه ژن حفاظت شده ژن 16srRNA استفاده شد. برای اطمینان از اختصاصی بودن آغازگرها سرویس‌های Primer BLAST و Nucleotide BLAST سایت NCBI و بررسی خصوصیات ترمودینامیکی آغازگرها با استفاده از نرم‌افزار Gene Runner (نسخه ۳/۰۵) به‌کار برده شد. توالی آغازگرهای طراحی شده این ژن و طول محصول PCR در جدول ۲ نشان داده شده است.

جدول ۲ توالی آغازگر Real-Time PCR

آغازگر	توالی	طول محصول PCR
توالی پیشرو	5′ AACTGAGACACGGTCCAGACTCC 3′ (۲۳ جفت‌باز)	۲۳۰
توالی پیرو	5′ GCTTGCACCCTCCGTATTACC 3′ (۲۱ جفت‌باز)	

واکنش Real-Time PCR و تعیین کمترین غلظت DNA روی کارت DBC

برای انجام واکنش Real-Time PCR ابتداً ٤ دیسک از هر چهار نمونه آماده شده از کارت‌های مربوط با استفاده از میکروپانچ جدا کرده و ۳۰۰ میکرولیتر از آب مقطر استریل به میکروتیوپ اضافه و به‌مدت ۱۵ دقیقه در دمای اتاق گذاشته شد و هر ۵ دقیقه یک‌بار ورتکس (Vortex) انجام شد و درنهایت محلول رویی که حاصل از شستشو اولیه دیسک‌ها است از محیط خارج شد سپس مجدداً۵۰ میکرولیتر آب مقطر استریل به میکروتیوپ اضافه و به‌مدت ۳۰ دقیقه در بن‌ماری ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد جوشانده شد و سپس دیسک‌ها خارج شد. این محلول حاوی ژنوم باکتری بود [۹].

برای واکنش Real-Time PCR از نمونه DNA تخلیص شده هر چهار نمونه به‌صورت تکرار سه‌تایی (Triplicate) به همراه یک واکنش بدون DNA الگو گذاشته شد و برای نمونه استاندارد از DNA تخلیص شده به روش فنل- کلروفرم به غلظت ۱۰ نانوگرم بر میکرولیتر در واکنش استفاده شد. واکنش Real-Time PCR با استفاده از دستگاه ABI 7500 (شرکت ABI، آمریکا) انجام شد. درون هر چاهک از پلیت دستگاه مخلوطی به حجم ۲۵ میکرولیتر از ۱۲/۵ میکرولیتر مخلوط اصلی سایبرگرین (YBER Green Master Mix Applied I Biosystems , UK)، ۲ میکرولیتر از هر یک از آغازگرهای اختصاصی، ۵ میکرولیتر از نمونه‌ها و ٤/۵ میکرولیتر آب مقطر تهیه شد. برنامه زمانی و دمایی واکنش انجام شده در دستگاه Real-Time PCR مدل ABI 7500 در سه مرحله عبارت بود از: مرحله اول شامل چرخه واسرشت‌سازی اولیه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۱۰ دقیقه، مرحله دوم ٤۵ چرخه واسرشت‌سازی در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۱۵ ثانیه، اتصال آغازگر در دمای ٦۰ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۱ دقیقه و در مرحله سوم به‌منظور رسم منحنی تفکیک، یک چرخه با دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۱۵ ثانیه، ٦۰ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۲۰ ثانیه و ۹۵ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۱۵ ثانیه.

به‌منظور بررسی کمترین غلظت DNA روی کارت DBC یک رقت متوالی از نمونه سوسپانسیون باکتری اشریشیا کلی روی کارت DBC و سپس رقت‌های متوالی (۱/۲، ۱/٤، ۱/۸ و ۱/۱٦) از نمونه اولیه DNA تخلیص شده تهیه و به‌صورت تکرار سه‌تایی گذاشته شد و روش آماده‌سازی DNA، نسبت

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2025-01-16]

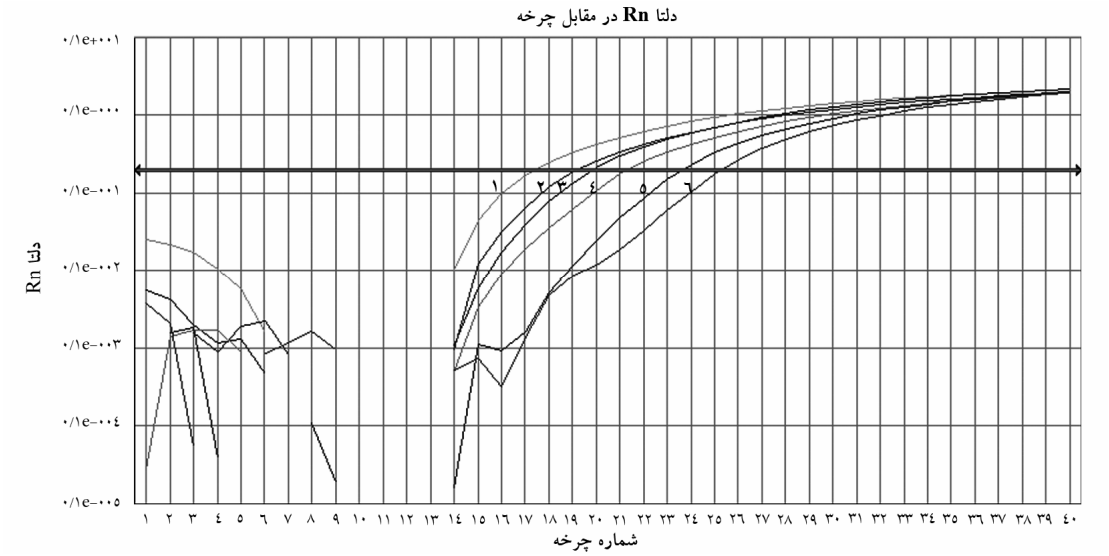
ترکیبات واکنش Real-Time PCR و برنامه دستگاه Real-Time PCR مطابق با روش ذکر شده قبلی انجام شد.

نتایج

بررسی واکنش PCR ژن 16srRNA

در این مطالعه در سه، پنج و هفت ماه پس از قرار دادن نمونه‌ها روی کارت، پایداری DNA با استفاده از واکنش PCR بررسی شد. نتایج نشان داد که پایداری DNA پس از گذشت هفت ماه حفظ شده و هر چهار نمونه DNA باکتری دارای DNA مناسب و با کیفیت برای انجام واکنش PCR است. در ضمن حتی DNA روی یک دیسک با قطر ۱ میلی‌متری دارای مقدار کافی و مناسب برای انجام واکنش PCR بود (شکل ۱).

شکل ۱ تکثیر ژن 16srRNA با استفاده از دیسک پس از هفت ماه قرار دادن باکتری روی کارت؛ ۱) DNA خالص باکتری به روش فنل- کلروفرم (۱ دیسک)، ۲) جوشانده شده باکتری (۱ دیسک)، ۳) سوسپانسیون باکتری (۱ دیسک)، ٤) لیز شده باکتری (۱ دیسک)، ٥) DNA خالص باکتری به روش فنل-کلروفرم (۲ دیسک)، ٦) جوشانده شده باکتری (۲ دیسک)، ۷) سوسپانسیون باکتری (۲ دیسک)، ۸) لیز شده باکتری (۲ دیسک)، ۹) DNA خالص باکتری به روش فنل- کلروفرم (۳ دیسک)، ۱۰) جوشانده شده باکتری (۳ دیسک)، ۱۱) سوسپانسیون باکتری (۳ دیسک)، ۱۲) لیز شده باکتری (۳ دیسک)، ۱۳) کنترل مثبت مقدار ۱ میکرولیتر از نمونه تخلیص باکتری به روش فنل- کلروفوم، ١٤) کنترل منفی (فاقد DNA)، M) نشانگر ۵۰ جفت‌بازی



نمودار ۱ نمودار Ct برای بررسی کارایی Real-Time PCR پس از هفت ماه قرار دادن باکتری روی کارت؛ ۱) نمونه استاندارد، ۲) سوسپانسیون باکتری، ۳) رقت ۱/۲ سوسپانسیون باکتری، ٤) رقت ۱/٤ سوسپانسیون باکتری، ٥) رقت ۱/۸ سوسپانسیون باکتری، ٦) رقت ۱/۱٦ سوسپانسیون باکتری

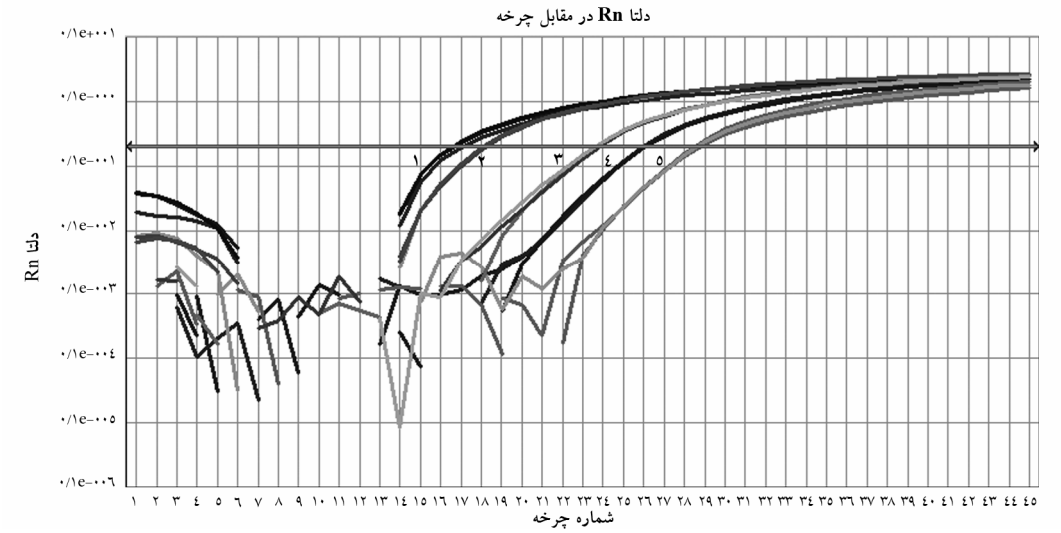
تعیین کمترین غلظت DNA روی کارت DBC با روش Real-time PCR

رقت‌های متوالی از DNA از کارت سوسپانسیون نشان داد که با رقیق شدن نمونه مقدار چرخه آستانه افزایش پیدا کرده و از طرفی مقدار DNA حاصل از رقت ۱/۱٦ دارای پایداری مناسب و کارا برای انجام Real-time PCR است (نمودار ۱).

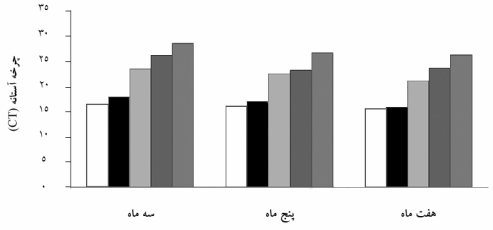
[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2025-01-16]

بررسی واکنش Real-Time PCR برای ژن 16srRNA

داده‌های اولیه حاصل از انجام Real-Time PCR با استفاده از روش مقایسه‌ای چرخه آستانه (Threshold Cycle: Ct) در هر ماه بررسی شد (نمودار ۲). چرخه آستانه به‌طور معکوس با مقادیر اولیه DNA ژنومی متناسب بود و چرخه آستانه کمتر از ۲۵ دارای مقادیر مناسب و کافی برای انجام واکنش است و هرچه مقادیر چرخه آستانه بالاتر باشد، نشانگر مقادیر کمتری از DNA در نمونه اولیه است [۱۰]. نتایج بررسی چرخه آستانه نشان داد که در هر سه مرحله زمانی، روش سوسپانسیون باکتری نسبت به حالت‌های دیگر دارای چرخه آستانه کمتر و تکثیر بالاتر است. از میان روش‌های مورد استفاده روش جوشاندن از هر چهار حالت دیگر کیفیت و مقدار DNA پایین‌تری داشت (نمودار ۳).



نمودار ۲ نمودار Real-Time PCR پس ازهفت ماه قراردادن باکتری روی کارت؛ ۱) نمونه استاندارد، ۲) سوسپانسیون باکتری، ۳) لیز شده باکتری، ٤) DNA خالص باکتری، ۵) جوشانده شده باکتری



نمودار ۳ مقایسه بین مقادیر چرخه آستانه (Ct) ماه‌های ۳، ۵ و۷ ماه پس از قرار دادن باکتری روی کارت

بحث

امروزه از روش‌های مولکولی برای تشخیص سریع و دقیق باکتری‌ها استفاده می‌شود. از میان روش‌های مورد استفاده دو روش PCR، Real-Time PCR بیشترین کاربرد را دارد. استفاده از روش Real-Time PCR بعد از تشخیص ویروس، بیشترین کاربرد را در تشخیص سریع و دقیق باکتری‌های بیماری‌زا دارد [۱۱]. برای انجام واکنش‌های مولکولی نیاز به DNA خالص و با کیفیت است.

روش تخلیص DNA باکتری به روش فنل- کلروفرم زمان‌بر بوده و برای تخلیص باکتری از زمان کشت تا آخرین مرحله تخلیص باکتری حداقل دو روز زمان لازم است. البته اگر روش به‌درستی انجام نشود ممکن است مواد آلی در DNA باقی مانده و بعدها به‌عنوان مهارکننده‌ای برای انجام روش‌های مولکولی باشد. در ضمن استفاده از مواد شیمیایی مثل فنل و کلروفرم با خطراتی برای فرد آزمایش کننده همراه

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2025-01-16]

است که تمامی این مراحل طولانی و با احتمال خطر بالاست و از نظر اقتصادی نیز به‌صرفه نیست. روش‌های مبتنی بر استفاده از کیت‌های تجاری نیز معمولاً پرهزینه و وقت‌گیر است. سایر روش‌های تخلیص نیز مشکلات مشابهی دارد. اما در روش ارایه شده که بر مبنای کارت‌های استاندارد طراحی شده است، تخلیص DNA به راحتی و در زمان بسیار کوتاه صورت می‌گیرد و برای تخلیص DNA نیز نیازی به استفاده از مواد شیمیایی خطرناک و شرایط آزمایشگاهی خاص نیست. علاوه بر آن چون باکتری روی کارت غیرفعال شده است پس امکان آلودگی شخصی و محیطی به حداقل می‌رسد.

کارت FTA (Flinders Technology Associates) توسط شرکت واتمن (Whatman) در سال ۲۰۰۲ با تحقیقی که راجندرام (Rajendram) و همکارانش در زمینه نگهداری باکتری روی کارت FTA انجام دادند، شناخته شد [۱۲]. لامپل (Lampel) و همکارانش در سال ۲۰۰۳ توانستند اسپور چندین سویه باسیلوس (*Bacillus*) را از روی کارت FTA با روش PCR جداکنند. آن‌ها ادعا داشتند که روش استفاده از کارت FTA در زمینه نمونه‌های غذایی، بالینی و محیطی مفید است [۱۳]. در سال ۲۰۰۶ راجندرام و همکارانش ۴۰۰ جنس و گونه مختلف باکتری روی کارت FTA نگهداری کردند و پس از یک سال ۱۰۰ جنس باکتریایی را با روش مولکولی بررسی کردند و اثبات کردند که کارت FTA، کارتی مناسب برای نگهداری DNA باکتری برای طولانی مدت است [۷]. در ضمن استفاده از این کارت‌ها بسیار ارزان‌تر از سایر روش‌های اشاره شده است.

در سال ۲۰۰۹ فتاح و همکارانش تحقیقی را در زمینه نگهداری و تشخیص لیشمانیا (*Leishmania*) انجام دادند که در این بررسی از کارت FTA برای مقایسه‌ای بین نمونه‌های تازه تخلیص شده لیشمانیا و نمونه‌های نگهداری شده در کارت FTA استفاده شد که نتیجه کیفیت بهتر PCR با نمونه DNA تخلیص شده از کارت بود [۱۴].

در این تحقیق از باکتری اشریشیا کلی که عامل طیف وسیعی از بیماری‌های عفونی و ادراری [۱۵] است، استفاده شد. این باکتری همچنین به‌عنوان یک ارگانیسم مدل در بیوتکنولوژی و تولید پروتین‌های نوترکیب کاربرد وسیعی دارد [۱۶]. هم اکنون سازمان‌ها و مراکز مختلفی در ایران در زمینه نگهداری باکتری فعالیت می‌کنند (مثلاً مرکز ملی ذخایر ژنتیکی و زیستی، مرکز ملی ذخایر ژنتیکی و زیستی ایران، مرکز پژوهشی کلکسیون میکروارگانیسم‌های دانشگاه تهران، کلکسیون میکروبی انستیتو پاستور) ولی هنوز مراکز مستقلی وجود ندارد که روی نگهداری DNA باکتری فعالیت کند. کارت DBC مشابه کارت FTA و دارای همان خصوصیات نگهداری DNA است که به‌صورت محصول داخلی عرضه شده است. با توجه به مزایایی که در بالا بیان شد، جای این کارت‌ها در آزمایشگاه‌ها و مراکز تحقیقاتی خالی است و مطالعه حاضر نشان داد که کارت DBC قابلیت نگهداری DNA باکتری اشریشیا کلی را برای مدت طولانی دارد؛ بنابراین توصیه می‌شود استفاده از DBC جایگزین روش‌های سنتی نگهداری DNA باکتری شود و در مراکز فعال در زمینه مطالعه، بررسی و آزمایش و نیز ذخیره باکتری‌ها، مورد استفاده قرار گیرد.

تشکر و قدردانی

بدین‌وسیله از مرکز تحقیقات میکروب‌شناسی انستیتو پاستور ایران و مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی انستیتو پاستور ایران و آزمایشگاه ژنتیک پزشکی دکتر زینلی بابت همکاری در این تحقیق تشکر می‌نماییم.

منابع

[1] Holland NT, Smith MT, Eskenazi B, Bastaki M. Biological sample collection and processing for molecular epidemiological studies. Mutat Res 2003; 543(3): 217-34.

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2025-01-16]

[2] Bosshard PP, Abels S, Zbinden R, Böttger EC, Altwegg M. Ribosomal DNA sequencing for identification of aerobic gram-positive rods in the clinical laboratory (an 18-month evaluation). J Clin Microbiol 2003; 41(9), 4134-40.

[3] Whatman Inc. FTA protocols: collect, transport, archive and access nucleic acids-all at room temperature; WB120047; Copyright Whatman Inc. 2002. Available at www.whatman.com.

[4] De Paoi P, Biobanking in microbiology: from sample collection to epidemiology, diagnosis and research, FEMS Microbiol Rev 2005; 29: 897-910

[5] Becker S, Franco JR, Simarro PP, Stich A, Abel PM, Steverding D. Real-time PCR for detection of *Trypanosoma brucei* in human blood samples. Diagn Microbiol Infect Dis 2004; 50(3): 193-9.

[6] Smith LM, Burgoyne LA. Collecting, archiving and processing DNA from wildlife samples using FTA databasing paper. BMC Ecol 2004; 4, 4.

[7] Rajendram D, Ayenza R, Holder FM, Moran B, Long T, Shah HN. Long-term storage and safe retrieval of DNA from microorganisms for molecular analysis using FTA matrix cards. J Microbial Methods 2006; 67(3): 582-92.

[8] Neimark H. Proposal for archival reference collections of chromosomal DNA from uncultivated bacterial species. Int J Syst Evol Microbial 2005; 55(Pt 4): 1407.

[9] Whitman Inc. Recommended Protocol: Whatman FTA® Elute. Long-term DNA storage at room temperature combined with easy elution for multiple applications from a single sample, WB120410, Available at www.whatman.com.

[10] Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. Methods 2001; 25(4): 402-8.

[11] Mackay IM. Real-time PCR in the microbiology laboratory. Clin Microbiol Infect 2004; 10(3): 190-212.

[12] Rajendram. Microbial Applications of FTA. Technology. Bacterial strains and clinical isolates stored on FTA. 2002 Poster IUMS International. Conference, Paris. (www.levanchimica.it/ assets/.../whatman-Brochure-Bio-SCEVCE.pdf)

[13] Lampel KA, Dyer D, Kornegay L, Orlandi PA. Detection of *Bacillus* spores using PCR and FTA filters. J Food Prot 2004; 67(5): 1036-8.

[14] Fata A, Khamesipour A, Mohajery M, Hosseininejad Z, Afzalaghaei M, Berenji F, Ganjbakhsh M, Akhavan AA, Eskandari E, Amin-Mohammadi A. Whatman paper (FTA cards) for storing and transferring *Leishmania* DNA for PCR examination. Iranian J Parasitol 2009; 4(4): 37-42.

[15] Todar K. "Pathogenic *E. coli*". Online Textbook of Bacteriology. University of Wisconsin-Madison Department of Bacteriology. Retrieved 2007-11-30. (http://textbookofbacteriology.net)

[16] Cornelis P. Expressing genes in different *Escherichia coli* compartments. Curr Opin Biotechnol 2000; 11(5): 450-4.

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2025-01-16]