رضا بهلولی خیاوی، کارشناس ارشد میکروب‌شناسی پزشکی،
دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی ودرمانی اردبیل

استخراج DNA پلاسمیدی از سودوموناس ائروجینوزا

سودوموناس ائروجینوزا یکی از شایع‌ترین باکتری‌های گرم منفی است که در عفونت‌های بیمارستانی یافت شده و مقاومت آنتی‌بیوتیکی زیادی را نشان می‌دهد. ویژگی های فنوتیپی این باکتری، همانند الگوهای بیوشیمیایی، باکتریوفاژ تایپینگ، وجود آنتی‌ژن‌های سطحی سلول و الگوهای حساسیت به عوامل ضدمیکروبی براساس تغییرات در فاز رشد و موتاسیون خودبخودی، گرایش به دگرگونی دارند، بنابراین استفاده از این ویژگی ها برای شناسایی منبع عفونت و شیوع آن برای بررسی عفونت‌های ایجادشده توسط گونه‌های هتروژن باکتری مفید نخواهد بود. از این رو استفاده از روش های مولکولی همانند آنالیز الگوی پلاسمیدی در مطالعات اپیدمیولوژیک ضروری است.

در آنالیز الگوی پلاسمیدی سویه‌های باکتری، تعداد و اندازه پلاسمیدها اساس تشخیص سویه است و سویه‌های برخواسته از یک کلون دارای شمار همسانی از پلاسمیدها بوده و اندازه آن‌ها نیز مشابه خواهد بود.

مواد و روش‌ها

روش‌های متنوعی برای استخراج و خالص‌سازی DNA پلاسمیدی باکتری‌ها وجود دارد؛ در اینجا از روش لیز قلیایی تغییریافته استفاده شده است. دگرگونی در روش بالا، شامل استفاده از مخلوط CTAB (cetyltrimethylammonium bromide) و NaCL پس از لیز کردن باکتری و پیش از گرفتن رسوب DNA پلاسمیدی است، که به جداسازی کربوهیدرات‌های سلولی می انجامد.

مزایای روش لیز قلیایی تغییریافته

- ✔ انجام آن سریع و آسان است.
- ✔ به اولتراسانتریفوژ نیاز ندارد.
- ✔ به طور نسبی ارزان است.
- ✔ مقدار DNA بدست‌آمده خیلی زیاد است.
- ✔ DNA بدست‌آمده در این روش سوبسترای مناسبی برای هضم با آنزیم‌های محدودالاثر است

مواد و محلول‌های لازم

◀ محیط کشت LB(Luria Bertaini) حاوی آمپی‌سیلین

۱۰گرم باکتوتریپتون، ۵ گرم عصاره مخمر و ۵گرم NaCL در یک لیتر آب مقطر حل شده و با استفاده از NaOH۲ نرمال PH محیط در۷/۳ تنظیم و سپس اتوکلاو می‌شود. بعد از استریل کردن، حرارت محیط به کمتر از ۵۰درجه رسیده و آمپی‌سیلین به مقدار ۱میلی‌لیتر از محلول ذخیره‌شده ۵۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر، اضافه شده تا غلظت آن در محیط به ۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر برسد.

◀ محلول شماره یک (بافر لیزکننده)

حاوی گلوکز ۵۰میلی‌مول و 10Mm EDTA (PH=8) و 25Mm Tris-HCl است که به حجم ۱۰۰ میلی‌لیتر تهیه شده و تا زمان استفاده در یخچال در ٤ درجه سانتی‌گراد نگهداری می‌شود.

◀ محلول شماره۲ (محلول دناتوره کننده): حاوی۰.۲N NaOH و SDS ٪۳ است که هر روز موقع استفاده به‌صورت تازه تهیه می‌شود.

◀ محلول شماره ۳ (محلول استات پتاسیم)

حاوی ۱۲۰ میلی‌لیتر استات پتاسیم ۵مولاروو۲۳ میلی‌لیتر اسید استیک گلاسیال و ۵۷میلی‌لیتر آب مقطر است که تا زمان استفاده در یخچال در ٤درجه سانتی‌گراد نگهداری شده و قبل از استفاده به ظرف محتوی یخ منتقل شده و بعد مورداستفاده قرار می‌گیرد.

◀ محلول شماره ٤ (محلول ۱ درصد CTAB حاوی ۰/۷ مولار نمک طعام): ۱ گرم از پودر CTAB و ۰/٤۱ گرم نمک طعام را در ۱۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر حل کرده و محلول در حرارت آزمایشگاه نگهداری می‌شود.

◀ بافر TE

حاوی ۱۰Mm Tris-Hcl و ۱Mm EDTA است که بعد از تهیه اتوکلاو شده و تا زمان استفاده در یخچال در ٤ درجه سانتی‌گراد نگهداری می‌شود.

◀ RNase A با غلظت ۱۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر در یخچال در ٤ درجه سانتی‌گراد نگهداری می‌شود.

مراحل استخراج و خالص‌سازی DNA پلاسمیدی

◀ یک کلنی خالص از سودوموناس ائروجینوزا را به ۵میلی‌لیتر محیط کشت LB حاوی آنتی‌بیوتیک تلقیح کرده و به مدت ۲۰ ساعت در ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه می‌کنیم.

◀ ۱/۵ میلی‌لیتر از کشت باکتریایی را به میکروتیوب منتقل کرده و به مدت ٤ دقیقه در دور ٤۰۰۰ سانتریفوژ می‌کنیم.

◀ بعد از خالی کردن مایع رویی میکروتیوب، به‌طور معکوس به مدت ٤ دقیقه بر روی دستمال کاغذی برای خشک شدن رسوب باکتریایی قرار داده می‌شود.

◀ ۰/۲ میلی‌لیتر از محلول شماره ۱ که به مدت ۱ دقیقه در فریزر ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شده بود در وضعیت فوق‌العاده سرد بر روی رسوب سلولی ریخته می‌شود و سپس سلول‌های باکتریایی با استفاده از سمپلر در محلول به شکل سوسپانسیون درمی‌آیند و سوسپانسیون سلول به مدت ۵ دقیقه در حرارت آزمایشگاه انکوبه می‌شود.

◀ ۰/٤ میلی‌لیتر شماره ۲ تازه تهیه‌شده اضافه شده و سر لوله بسته می‌شود و ٦ بار به‌آرامی سروته شده و به مدت ۵ دقیقه در آب یخ انکوبه می‌گردد.

◀ ۰/۳ میلی‌لیتر از محلول شماره ۳ که به مدت ۲۰ دقیقه در فریزر در ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شده بود در وضعیت فوق‌العاده سرد اضافه گشته و ٦ بار به‌آرامی سروته شده و به مدت ۵ دقیقه در آب یخ انکوبه‌می‌شود.

◀ لوله به مدت ۵ دقیقه در دور ۱۲۰۰۰ در ٤ درجه سانتی‌گراد سانتریفوژ شده و پس از سانتریفوژ کردن ۷۵۰ میکرولیتر از مایع رویی به میکروتیوب جدید اضافه می‌گردد.

◀ بر روی ۷۵۰ میکرولیتر از مایع رویی ۱/۵ میکرولیتر از RNase A با غلظت ۱۰میلی‌گرم بر میلی‌لیتر افزوده شده و به مدت ۲۰ دقیقه در ۳۷ درجه انکوبه می‌گردد.

◀ ۸۰ میکرولیتر از محلول ۱ درصدCTABحاوی ۰/۷ مولار نمک طعام را اضافه کرده و به مدت ۱۰ دقیقه در ٦۵ درجه سانتی‌گراد انکوبه می‌شود.

◀ بعد از اتمام انکوباسیون و خنک کردن میکروتیوب‌ها در حرارت آزمایشگاه، ۷۵۰میکرولیتر از محلول فنل متعادل شده/کلروفرم/ایزوآمیل الکل (۱/۲٤/۲۵) اضافه شده و به مدت ۱دقیقه ورتکس شده سپس به مدت ٤ دقیقه در دور ۱۲۰۰۰ در ٤ درجه سانتی‌گراد سانتریفوژ می‌گردد.

◀ مایع رویی به میکروتیوب جدید منتقل شده و بر روی آن ۷۵۰ میکرولیتر اتانل ۹٦ درجه که به مدت ۱۰دقیقه در فریزر ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شده بود در وضعیت فوق‌العاده سرد اضافه می‌شود و ٦ بار به‌آرامی سروته شده و بعد به مدت ۲ ساعت در ۲۰- درجه سانتی‌گراد انکوبه می‌شود.

◀ سپس لوله به مدت ۱۵ دقیقه با دور ۱۲۰۰۰ در ٤درجه سانتریفوژ می‌شود. مایع رویی دور ریخته شده و رسوب سفیدرنگ در ته لوله باقی می‌ماند. میکروتیوب به به‌طور معکوس بر روی دستمال کاغذی برای خشک شدن رسوب قرار داده می‌شود.

◀ ۱ میلی‌لیتر اتانل ۷۰٪ که به مدت ۱۰ دقیقه در ٤ درجه نگهداری شده بود در وضعیت فوق‌العاده سرد اضافه شده و سر لوله بسته شده و با چند بار سروته کردن مخلوط می شود.

◀ سپس لوله به مدت ۱ دقیقه با دور۱۲۰۰۰در ٤ درجه سانتریفوژ می‌شود. مایع رویی دور ریخته شده و میکروتیوب به به‌طور معکوس بر روی دستمال کاغذی برای خشک شدن رسوب قرار داده می‌شود.

◀ به مدت ۵ تا ۱۰ دقیقه سر میکروتیوب به شکل باز در محیط آزمایشگاه قرار داده می‌شود تا اتانل تبخیر شود و سپس ۵۰ میکرولیتر از بافر TE بر روی رسوب اضافه شده و رسوب در آن حل گشته و در مواقع موردنیاز برای جمع شدن TE در ته لوله از سانتریفوژ استفاده‌می‌شود.

الکتروفورز DNA پلاسمیدی در روی ژل آگارز

◀ سینی ژل شسته شده و خشک شده و دو انتهای آن با چسب اتوکلاو بسته می‌شود.

◀ شانه ژل در سینی قرار داده شده به طوریکه شانه حدود ۱میلی‌لیتر بالاتر از سطح سینی قرار گیرد و سپس ژل بر روی میز به‌صورت تراز قرار داده می‌شود.

◀ به‌منظور تهیه آگارز ۰/۷درصد، ۱٤۰میلی‌گرم پودر آگارز در ارلن مایر ریخته شده و بر روی آن ۲۰میلی‌لیتر بافر الکتروفورز ۰.۵ TBE اضافه می‌شود و در ارلن مایر با درپوش شیشه‌ای پوشانده شده و سپس در میکروویو به مدت ۲۰ ثانیه قرار داده می‌شود تا آگارز حل شود.

◀ محلول آگارز تا ٦۰ درجه سانتی‌گراد خنک شده و سپس در سینی ژل ریخته می‌شود، طوری که هیچ حبابی مخصوصاً زیر شانه‌ها نباشد و ضخامت ژل حدود ٤ میلی‌لیتر باشد.

◀ بعد از اینکه ژل کاملاً بسته شد، به‌دقت قالب‌های کناری ژل و شانه برداشته شده و سینی به همراه ژل در تانک الکتروفورز قرار داده می‌شود طوری که چاهک‌های نمونه نزدیک قطب منفی قرار می‌گیرند.

◀ تانک الکتروفورز با ٤۵۰ میلی‌لیتر بافر الکتروفورز 0.5TBE پر

می‌شود. مقدار بافر به‌اندازه‌ای باید باشد که سطح ژل به عمق حداقل ۱ میلی‌متر پوشانده شود.

◀ مقدار ۵میکرولیتر از محلول DNA پلاسمیدی با ۱میکرولیتر از بافر لودکننده ژل (Gel loading buffer) حاوی ۰/۲۵درصد برومونفول بلو و ۰/۲۵درصد گزیلن سیانول و ۳۰ درصد گلیسرول در آب مخلوط شده و در چاهک موجود در ژل قرار داده می‌شود.

◀ سرپوش تانک الکتروفورز گذاشته شده و توسط سیم‌های ارتباطی به Power supply متصل شده و جریان الکتریکی برقرار می شود، به طوریکه ولتاژ مورداستفاده ۸۰ ولت بوده و الکتروفورز تا مدت ۱/۵ ساعت ادامه خواهد یافت.

◀ بعد از پایان کار جریان الکتریکی قطع شده و ژل برداشته شده و به مدت ۳۰ دقیقه در داخل آب مقطر حاوی ۰/۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر اتیدیم بروماید جهت رنگ‌آمیزی قرار داده می‌شود.

◀ پس از رنگ‌آمیزی با استفاده از نور اولتراویوله حاصل از ترانس لومیناتور با طول‌موج ۳۰۰ نانومتر موردبررسی قرار گرفته و از سایز مارکر لامبدا DNA برای بررسی اندازه قطعات استفاده می‌شود.

◀ پس از اتمام کار و تهیه عکس از ژل برای تخریب اتیدیم بروماید که سرطان‌زا است، ژل به مدت ۵ دقیقه در داخل محلول پرمنگنات پتاسیم قرار داده شده و سپس دور ریخته می‌شود.

◀ جهت شناسایی باندهایی که در مرحله اول به صورت‌های Supercoil, Open circular, Linear بودند از روش الکتروفورز دوبعدی استفاده می‌شود؛ بدین ترتیب که پس از الکتروفورز در مرحله اول و رنگ‌آمیزی با اتیدیم بروماید، ژل با آب دیونیزه شسته شده و از آن عکس تهیه می‌شود، سپس قسمتی از ژل که حاوی قطعات جداشده موردنظر بود بریده شده و به مدت ۵ دقیقه از فاصله ۳۰ سانتی‌متری تحت‌تأثیر نور اولتراویوله با طول‌موج ۲۵٤ نانومتر قرار داده می‌شود. در مرحله بعد قطعه ژل بریده‌شده در داخل ژل جدید قرارگرفته و در بعد دوم الکتروفورزمی‌شود. بعد از الکتروفورز، ژل دوباره با اتیدیم بروماید رنگ‌آمیزی شده و از آن عکس تهیه می‌شود.

مکانیسم عمل استخراج پلاسمید

در این روش برای اینکه بتوانیم مقدار زیادی از DNA را به دست آوریم، بایستی باکتری را در محیط کشت حاوی آنتی‌بیوتیک کشت دهیم و نیز باید یک سوم لوله از محیط مایع پر شود، تا مقدار کافی از اکسیژن در محیط وجود داشته باشد. همچنین محیط‌های کشت به مدت ۲٤ساعت در ۳۷درجه سانتی‌گراد انکوبه می‌شوند تا اندازه ی بایسته از سلول باکتریایی برای استخراج DNA پلاسمیدی وجود داشته باشد. برای آماده‌سازی باکتری‌ها برای لیز شدن، باکتری‌ها در بافر حاوی Tris- Hcl، گلوکز و EDTA حل می‌شوند. Tris یا هیدروکسی متیل آمینومتان، pk اپتیمم را برای نگهداری DNA دارد و PH را به طور ثابت حفظ می‌کند. EDTA با عوامل شلاته کننده نظیر Mg^{2+} که برای عمل آنزیم DNases موردنیاز هستند ترکیب شده و این عوامل را غیرفعال می‌کند. گلوکز برای بالابردن فشار اسمزی بیرون سلول است. در این روش برای لیزکردن باکتری‌ها از محلول SDS و NaOH استفاده می‌شود. SDS یک دترجنت است که چربی‌های غشاء سلولی را حل می‌کند و سود عامل قلیایی است که دو رشته DNA را از هم جدا می‌کند. اضافه کردن استات پتاسیم PH محلول را به خنثی نزدیک می‌کند و در این مرحله DNA دوباره دورشته‌ای می‌شود. تکه های DNA کروموزومی به گونه ی تصادفی با هم جفت می‌شوند، و بیشتر به حالت دناتوره باقی می‌مانند، و همراه با پروتئین‌های سلولی در داخل کمپلکس‌های بزرگ گیر افتاده و با دودسیل‌سولفات پوشیده شده، و با سانتریفیوژگردیدن ، رسوب می‌کنند. ولی DNAهای پلاسمیدی به علت داشتن اندازه کوچک و ساختار سوپرکویل به شکل متصل به هم باقی می‌مانند و دوباره به گونه ی دورشته‌ای درمی‌آیند و ساختار اولیه را به دست می‌آورند و پس از سانتریفوژ کردن در مرحله رویی باقی می‌مانند.

منابع:

1. De Freitas AL, Barth AL. Antibiotic resistance and molecular typing of Pseudomonas aeruginosa. focus on imipenem. Braz J Infect Dis:6(1): 2002.

2. Foxman B, Rilery L: Molecular Epidemiology: Focus on infections. Am J Epidemiol, 153:1135-1141,2001.

3. Sentchilo VS, Perebitok AN, Zehinder AJB, Vadermee JR: Molecular diversity of plasmid bearing genes that encode toluene andxylene metabolism in Pseudomonasaeruginosa strains isolated from different contaminated sites in Belarus. Applied and Environmental Microbiology, 66:2842-2852, 2000.

4. Nahaie MR, Goodfloow M, Harwood CR: A rapid screening procedure for Staphylococcal plasmids. J Microbial Meth, 2:73-81, 1984.

5. Hinterman G, Fisher HM, Crameri R, Hutter R: Simple procedure for distinguishing ccc, oc and L forms of plasmid DNA by agarose gel electrophoresis. Plasmids, 5:371-373, 1981.

6. Sambrook J, Russel DW: Molecular Cloning. A laboratory manual, volume 1, third ed.CSHL press, New York, 1.1-134& 5.1-5.17, 2001.

7. Satisvan: Pasmid DNA isolation. Molecular Biology Protocols. N.d. Availabl from yahoo.com. (http://www.esb.utexas.edu, Accessed July 2003.

8. Birmboim HC: A rapid alkaline extraction method for the isolation of plsmid DNA. Methods Enzymol, 100:243-255, 1983.