نشریه دامپزشکی
(پژوهش و سازندگی)
شماره ۹۲، پاییز ۱۳۹۰

مقایسه روش های مختلف استخراج DNA به منظور مطالعه مولکولی انگل های فاسیولا

• **محمود محامی اسکویی**
دانشجوی دکترای تخصصی گروه انگل شناسی پزشکی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران
• **عبدالحسین دلیمی اصل** (نویسنده مسئول)
استاد گروه انگل شناسی پزشکی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران
• **مهدی فروزنده مقدم**
دانشیار گروه بیوتکنولوژی پزشکی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران
• **محمد باقر رکنی**
دانشیار گروه انگل شناسی و قارچ شناسی پزشکی، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی تهران
تاریخ‌دریافت: آذر ماه ۱۳۸۹ تاریخ‌پذیرش: تیر ماه ۱۳۹۰
تلفن تماس نویسنده مسئول: ۰۲۱-۸۲۸۸۳۸۳۸
Email: dalimi_a@modares.ac.ir

چکیده

فاسیولوزیس یکی از مهم ترین بیماری های انگلی مشترک بین انسان و دام می باشد که به لحاظ مشکلات بهداشتی و خسارات اقتصادی فراوان، در مناطق مختلف دنیا مورد توجه قرار دارد. با توجه به شیوع فاسیولوزیس، انجام مطالعات مختلف از جمله مطالعات مولکولی بر روی انگل های فاسیولا دارای اهمیت فراوانی است. هدف از این تحقیق دستیابی به روش مناسب استخراج DNA از انگل های فاسیولا به منظور انجام مطالعات مولکولی می باشد. پس از جمع آوری انگل های فاسیولا، پنج روش مختلف استخراج DNA شامل فنل کلروفرم، Ish-Horowicz، CTAB، Chelex و کیت مورد استفاده قرار گرفتند. به منظور ارزیابی روش های مذکور، کیفیت و کمیّت DNA حاصل از هر روش با توجه به OD، غلظت DNA و بازدهی PCR مورد بررسی قرار گرفتند. طبق نتایج حاصله در این مطالعه بیشترین غلظت DNA با استفاده از روش Ish-Horowicz، بهترین کیفیت DNA و بازدهی PCR با استفاده از کیت به دست آمد. روش های CTAB، Chelex و فنل کلروفرم در مقایسه با روش Ish-Horowicz کمترین غلظت DNA و نسبت به کیت کمترین کیفیت DNA و بازدهی PCR را داشتند. در اثر استفاده از روش Ish-Horowicz به لحاظ کمیت DNA بیشتری از انگل های فاسیولا در مقایسه با سایر روش ها حاصل می شود اما وقت گیر بودن روش، آلودگی و کیفیت پایین DNA و در نتیجه بازدهی پایین PCR می تواند از معایب این روش باشد. علی رغم اینکه مقدار DNA حاصله در اثر استفاده از کیت نسبت به روش Ish-Horowicz کمتر می باشد اما کیفیت بالای DNA، آلودگی پایین، سریع تر بودن و بازدهی مناسب تر PCR در استفاده از کیت نسبت به سایر روش ها از مزایای استفاده از کیت می باشد.

کلمات کلیدی: استخراج DNA، انگل های فاسیولا، مطالعه مولکولی.

Veterinary Journal (Pajouhesh & Sazandegi) 92 pp: 30-35

Comparison of different DNA extraction methods for molecular study of Fasciola parasites

By: AM Mahami-Oskouei, Department of Medical Parasitology, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran. A Dalimi (Corresponding Author; Tel:+982182883838) M Forouzandeh-Moghadam, Department of Medical Biotechnology, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran.MB. Rokni, Department of Medical Parasitology and Mycology, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran.

Fasciolosis is an important parasitic disease common among humans and livestock. It is considered as a health problem and causes great economic losses in several regions of the world. Considering the prevalence of fascioliasis, study on molecular aspect of the parasite is so much important. The present study was carried out to achieve a suitable method of DNA extraction from Fasciola for further molecular study.After collection of Fasciola, five different DNA extraction methods, including phenol chloroform, Chelex, CTAB, Ish-Horowicz and kit were evaluated. In this evaluation, the quality and quantity of DNA obtained from each method considering OD, DNA concentration and PCR efficiency were investigated. The results indicated that, the highest concentration of DNA, and efficiency of PCR were obtained by using Ish-Horowicz, and the kit respectively. Chelex, CTAB and phenol chloroform methods in comparison with Ish-Horowicz had lower concentration of DNA and the lower PCR efficiency.The method of Ish-Horowicz showed higher DNA quantity in comparison with other methods. But in term of time consuming, DNA contamination and quality and efficiency of PCR is not so favorite method.

Key words: DNA extraction, Fasciola, Molecular study.

مقدمه

فاسیولوزیس یکی از مهم ترین بیماری های انگلی مشترک بین انسان و دام می باشد که به لحاظ مشکلات بهداشتی و خسارات اقتصادی فراوان در مناطق مختلف دنیا مورد توجه قرار دارد (۳، ۱۲). آلودگی دام ها به فاسیولا در برخی نقاط ایران بسیار شدید است. بر اساس مطالعات انجام شده در ایران، در استان گیلان، شیوع فاسیولوزیس در حیوانات ۲۱/۵ درصد و در استان مازندران ۱۲ درصد بوده است(۵). در آزمایش ۴۴۵ نمونه مدفوع جمع آوری شده از گاوهای بومی منطقه گیلان در ۳۲ درصد آنها تخم فاسیولا یافت شده است که حداکثر آلودگی (۵۵/۲ درصد) مربوط به ناحیه تالش بوده است(۷). در یک مطالعه در کشتارگاه های استان مازندران به طور میانگین ۱/۹۸ درصد گوسفندان و ۶/۷۲ درصد گاوها به فاسیولا آلودگی داشتند(۱۶). انسان به طور تصادفی به فاسیولا مبتلا می شود. در حدود ۲/۴ میلیون مورد فاسیولوزیس انسانی و ۱۸۰ میلیون انسان در معرض خطر ابتلاء به فاسیولوزیس در جهان وجود دارند که اهمیت فاسیولوزیس انسانی را می رساند(۱۳). در شمال ایران دو اپیدمی بزرگ فاسیولوزیس انسانی با ابتلاء حدود ۱۰۰۰۰ نفر در هر مورد به وقوع پیوسته است (۱، ۱۹). با توجه به اهمیت بهداشتی و اقتصادی فاسیولوزیس در ایران انجام مطالعات مختلف از جمله مطالعات مولکولی به خصوص در جهت شناسایی و ژنوتایپینگ انگل های فاسیولا ضروری به نظر می رسد. روش های مبتنی بر ژنوم انگل ها نقش مهمی در تشخیص، اپیدمیولوژی، ساخت واکسن، آنالیز ساختارهای ژنتیکی و ژنوتایپینگ دارد. واکنش زنجیره ای پلیمراز (PCR) روش حساس و مناسبی در جهت تکثیر ژن های مورد نظر به منظور رسیدن به اهداف فوق می تواند باشد. برای انجام هر واکنش مبتنی بر DNA در قدم اول یک روش استخراج DNA مناسب مورد نیاز می باشد تا نتایج قابل قبولی در PCR حاصل گردد(۱۷). هدف از این مطالعه دست یابی به روش مناسب استخراج DNA از انگل های فاسیولا به منظور انجام مطالعات مولکولی می باشد.

جمع آوری نمونه

در این بررسی، پس از هماهنگی با ادارهٔ دامپزشکی شهرستان های رباط کریم و شهریار جهت مراجعه به کشتارگاه، تعداد ۳۰ ترماتد فاسیولا از کبدهای آلوده گاوی و گوسفندی جمع آوری گردیده و پس از جداسازی و شستشوی انگل ها در آزمایشگاه جهت انجام مطالعات مولکولی در فریزر ۷۰ درجه سانتی گراد نگهداری شدند.

استخراج DNA:

در این مطالعه پنج روش مختلف فنل کلروفرم، CTAB، Chelex، Ish-Horowicz و کیت جهت استخراج DNA از انگل های فاسیولا مورد استفاده قرار گرفتند.

روش فنل کلروفرم: بر روی بافت های له شده انگل فاسیولا ۸۰۰ میکرولیتر بافر لیز و ۴۰ میکرولیتر پرتئیناز K اضافه نموده و پس از مخلوط نمودن در بن ماری ۵۶ درجه سانتی گراد به مدت ۳ ساعت انکوبه می شوند. سپس یک میلی لیتر مخلوط فنل کلروفرم (۵۰۰ میکرولیتر فنل + ۵۰۰ میکرولیتر کلروفرم) اضافه شده و پس از مخلوط نمودن به مدت ۵ دقیقه با دور rpm ۵۰۰۰ سانتریفوژ می شوند. پس از سانتریفوژ، فاز رویی را برداشته و معادل حجم آن کلروفرم اضافه نموده و دوباره به مدت ۵ دقیقه با دور rpm ۵۰۰۰ سانتریفوژ انجام می گیرد. سپس مایع رویی را برداشته و دو برابر حجم آن الکل مطلق سرد و ۰/۱ حجم آن استات سدیم ۳ مولار اضافه نموده و به مدت نیم ساعت در

فریزر ۷۰ درجه سانتی گراد می مانند و پس از آن به مدت نیم ساعت با دور rpm ۱۲۰۰۰ سانتریفوژ شده و فاز رویی دور ریخته می شود. بر روی رسوب حاصله ۱۰۰ میکرولیتر اتانول ۷۰ درصد سرد اضافه شده و به مدت ۵ دقیقه با دور rpm ۱۳۰۰۰ سانتریفوژ انجام می گیرد و پس از خشک شدن کامل نمونه ها ۳۰-۲۵ میکرولیتر آب مقطر اضافه نموده و در فریزر ۲۰ درجه سانتی گراد نگه داری می شوند.

روش Chelex: ابتدا بر روی بافت له شده انگل فاسیولا ۵۰۰ میکرولیتر از محلول Chelex ۵ درصد به اضافه ۲۰ میکرولیتر پروتئیناز K به غلظت mg/ml ۱۰ اضافه می گردد. سپس بر روی شیکر در ۵۶ درجه سانتی گراد به مدت یک شبانه روز انکوباسیون انجام می پذیرد. پس از انکوباسیون، مخلوط گردیده و در ۹۵ درجه سانتی گراد به مدت ۱۵-۱۰ دقیقه قرار گرفته و سپس به مدت ۵ دقیقه با دور rpm ۵۰۰۰ سانتریفوژ می شوند. ۴۰۰-۲۰۰ میکرولیتر از محلول فوق را برداشته و بر روی آن یک میکرولیتر اتانول مطلق سرد و ۵۰ میکرولیتر استات سدیم ۳ مولار اضافه شده و در فریزر ۷۰ درجه سانتی گراد به مدت ۱۵ دقیقه قرار داده می شوند. پس از سانتریفوژ به مدت ۵ دقیقه با دور rpm ۱۴۰۰۰ و خارج نمودن اتانول، ۵۰۰ میکرولیتر اتانول ۷۰ درصد اضافه گردیده و به مدت ۱ دقیقه با دور rpm ۱۲۰۰۰ ساتریفوژ و محلول رویی دور ریخته می شود. سپس رسوب حاصله خشک گردیده و ۱۰۰-۵۰ میکرولیتر بافر (TE) Tris Hcl, EDTA یا آب مقطر اضافه و در فریزر ۷۰ درجه سانتی گراد نگهداری می شود.

روش CTAB: بر روی بافت له شده انگل فاسیولا ۱۵۰ میکرولیتر از بافر PH=۸ (TE ۱۰ mM) و ۶۰ میکرولیتر از SDS ۱۰ درصد و ۱۰-۵ میکرولیتر پروتئیناز K(۲۰mg/ml) اضافه و پس از ورتکس نمودن در ۶۵-۵۵ درجه سانتی گراد به صورت Overnight انکوبه می شود. سپس ۱۰۰ میکرولیتر ۵M NaCl اضافه و مخلوط نموده و در مرحله بعد از محلول CTAB/NaCl گرم شده در ۶۵ درجه سانتی گراد به میکروتیوب اضافه و مخلوط کرده و به مدت ۱۰ دقیقه در ۶۵ درجه سانتی گراد انکوبه می شود. پس از انکوباسیون، ۷۰۰ میکرولیتر از کلروفرم-ایزوآمیل الکل(۲۴:۱) اضافه کرده و پس از ۲۰ ثانیه ورتکس به مدت ۸ دقیقه در rpm ۱۱۰۰۰ سانتریفوژ می نماییم. سپس مایع رویی را به میکروتیوب دیگری منتقل و ۰/۶ حجم (حدود ۴۲۰ میکرولیتر) ایزوپروپانول یا الکل مطلق اضافه و به آرامی مخلوط می شود و ۳۰ دقیقه در ۲۰ درجه سانتی گراد قرار داده و بعد به مدت ۱۵ دقیقه در rpm ۱۲۰۰۰ سانتریفوژ می نماییم. بعد از این مرحله مایع رویی را دور ریخته و ۱ml اتانول ۷۰ درصد سرد اضافه و به آرامی مخلوط شده و ۵ دقیقه در rpm ۱۲۰۰۰ سانتریفوژ می گردد. سپس مایع رویی را خالی کرده و به منظور تبخیر اتانول، میکروتیوب حاوی Pellet به مدت ۱۵ دقیقه در حرارت اتاق قرار گرفته و در نهایت رسوب حاصله در حدود ۱۰۰ میکرولیتر آب مقطر استریل دیونیزه حل می شود.

روش Ish-Horowicz: در این روش پس از له شدن کامل انگل فاسیولا، مقدار ۱۰۰ میکرولیتر از محلول Grinding Mix [Grinding buffer(NaCl, EDTA, Tris-HCl), Spermine/ Spermidine, Sucrose ۱۰درصد] به اضافه ۱۰ میکرولیتر از محلول SDS Mix [SDS buffer(EDTA, Tris-HCl), SDS ۱۰درصد، Sucrose ۱۰درصد، Diethylpyrocarbonate] را داخل میکروتیوب اضافه و ورتکس می نماییم. سپس میکروتیوب به مدت ۴۵-۳۰ دقیقه در بن ماری ۶۵ درجه سانتی گراد قرار گرفته و پس از رسیدن دمای نمونه به دمای آزمایشگاه، مقدار ۳۰ میکرولیتر از محلول استات پتاسیم ۸ مولار به میکروتیوپ اضافه می شود. پس از ورتکس نمونه، میکروتیوب به مدت ۱۲۰-۴۵ دقیقه داخل یخ خرد شده قرار گرفته و سپس با دور rpm ۱۳۰۰۰ به مدت ۳ دقیقه سانتریفوژ می شود. محلول رویی جدا و به میکروتیوب جدید منتقل گردیده و ۳۰۰ میکرولیتر اتانول ۹۶ درصد سرد اضافه شده و نمونه به صورت Overnight در ۲۰ درجه سانتی گراد نگهداری می شود. سپس میکروتیوب با دور rpm ۱۳۰۰۰ به مدت ۳۰ دقیقه سانتریفوژ و محلول رویی دور ریخته می شود. مقدار ۵۰۰ میکرولیتر اتانول ۷۵ درصد را به رسوب اضافه و به مدت ۵ دقیقه با دور rpm ۱۳۰۰۰ سانتریفوژ می نماییم. الکل رویی موجود در میکروتیوب را دور ریخته و این مرحله ۳ بار تکرار می گردد. سپس درب میکروتیوب را باز نموده و به مدت ۳۰-۲۰ دقیقه به منظور تبخیر کامل الکل موجود در داخل میکروتیوب در دمای آزمایشگاه قرار می گیرد. پس از تبخیر کامل الکل، مقدار ۲۵-۱۵ میکرولیتر بافر TE به میکروتیوب اضافه شده و در ۲۰ درجه سانتی گراد نگهداری می گردد.

روش کیت (*Bioneer AccuPrep*®): در این روش پس از اینکه بافت انگل فاسیولا به طور کامل له شد، مقدار ۲۰۰ میکرولیتر از محلول Tissue Lysis buffer به همراه ۲۰ میکرولیتر پروتئیناز K به میکروتیوب حاوی نمونه اضافه نموده و به مدت یک ساعت در بن ماری ۶۰ درجه سانتی گراد انکوبه می شود. پس از Spin، مقدار ۲۰۰ میکرولیتر از محلول Binding buffer به میکروتیوب اضافه و بلافاصله ورتکس شده و در بن ماری ۶۰ درجه سانتی گراد به مدت ۱۰ دقیقه قرار می گیرد. سپس ۱۰۰ میکرولیتر ایزوپروپانول به نمونه اضافه شده و به وسیلهٔ سمپلر به آرامی مخلوط می گردد. تمامی محتویات میکروتیوب را به تیوب مخصوص حاوی Binding column منتقل نموده و به مدت یک دقیقه با دور rpm ۸۰۰۰ سانتریفوژ می نماییم. Binding column به میکروتیوب ۲ml جدید منتقل شده و ۵۰۰ میکرولیتر Washing buffer ۱ اضافه و با دور rpm ۸۰۰۰ به مدت ۱ دقیقه سانتریفوژ می شود. پس از خالی نمودن محلول شستشو، ۵۰۰ میکرولیتر Washing buffer ۲ اضافه و به مدت ۱ دقیقه با دور rpm ۸۰۰۰ سانتریفوژ می نماییم. سپس به منظور خارج نمودن اتانول موجود در محلول شستشو یکبار نیز میکروتیوب با دور rpm ۱۲۰۰۰ به مدت یک دقیقه سانتریفوژ می گردد. Binding column به میکروتیوب ۱/۵ ml منتقل و ۲۰۰ میکرولیتر از محلول Elution buffer اضافه می شود. در نهایت به مدت ۱ دقیقه میکروتیوب با دور rpm ۱۲۰۰۰ سانتریفوژ شده و پس از جداسازی DNA، Binding column حاصل در ۲۰ درجه سانتی گراد نگهداری می شود. در این مطالعه به علت اینکه با روش کیت نتایج مناسبی جهت استخراج DNA از انگل های فاسیولا حاصل نشد، بنابراین تغییراتی در روش کیت از جمله افزایش زمان انکوباسیون اول از یک ساعت به حداقل ۴ ساعت و افزایش مقدار پروتئیناز K از ۲۰ میکرولیتر به ۴۰ میکرولیتر ایجاد گردید (روش بهینه سازی شده کیت) که با لحاظ این تغییرات نتایج مناسب و قابل قبولی با استفاده از کیت

برای استخراج DNA از انگل های فاسیولا به دست آمد.

PCR: واکنش زنجیره ای پلیمراز (PCR) برای تکثیر ناحیه ITS۱, ۵,۸S rDNA, ITS۲ با استفاده از پرایمرهای BD۱ (forward; ۵ درصد-۳-GTCGTAACAAGGTTTCCGTAدرصد) و BD۲ (reverse; ۵ درصد--TATGCTTAAATTCAGCGGGTدرصد) انجام گرفت (۱۰). برای واکنش PCR، یک میکرولیتر از DNA استخراج شده، یک واحد آنزیم Taq DNA Polymerase، ۳۰ mM KCl، ۱۰ mM Tris-HCl(PH=۹)، Mμ۲۵۰ dNTP و ۱/۵ mM $MgCl_2$ و یک میکرولیتر از هر یک از پرایمرهای Forward و Reverse با غلظت ۱۰ Pmol به میکروتیوب استریل افزوده شده و با آب مقطر دو بار تقطیر حجم نهایی به ۲۰ میکرولیتر رسانده می شود. پس از بهینه سازی شرایط مطلوب برای PCR بهترین شرایط به شرح ذیل به دست آمد: Initial Denaturation با دمای ۹۵ درجه سانتی گراد به مدت ۵ دقیقه، ۳۰ سیکل بعدی به صورت Denaturation با دمای ۹۵ درجه سانتی گراد به مدت ۳۰ ثانیه، Annealing با دمای ۶۱/۵ درجه سانتی گراد به مدت ۳۰ ثانیه، Extension با دمای ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۳۰ ثانیه و Final Extension با دمای ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۷ دقیقه. برای مشاهده نتیجه PCR، ۵ میکرولیتر از محصول PCR با ۲ میکرولیتر Loading dye مخلوط گردیده و در چاهک های ژل یک درصد در کنار مارکر ۱۰۰ bp به همراه کنترل مثبت (محصول PCR نمونه تعیین توالی شده فاسیولا) و کنترل منفی (حاوی تمام مواد لازم برای تکثیر ژن مورد نظر به جز DNA) قرار داده می شود. برای رنگ آمیزی ژل از Ethydium bromide استفاده گردید. قطعات تکثیر شده (۱۰۰۰ bp)،کنترل مثبت، کنترل منفی و مارکر ۱۰۰ bpبا ولتاژ ۸۰ به مدت ۴۵ دقیقه الکتروفورز شده و سپس با دستگاه UVITEC عکسبرداری از ژل انجام گرفت (شکل ۱).

نتایج

استخراج DNA از نمونه های فاسیولا با استفاده از پنج روش مذکور انجام گرفت. به منظور ارزیابی روش های مذکور، کیفیت و کمیت DNA حاصل از هر روش با توجه به OD، غلظت DNA، و بازدهی PCR مورد بررسی قرار گرفتند (جدول ۱).

در این مطالعه بیشترین OD و غلظت DNA با استفاده از روش Ish-Horowicz، بهترین کیفیت و بازدهی PCR با استفاده از کیت به دست آمد. روش های CTAB، Chelex و فنل کلروفرم در مقایسه با روش Ish-Horowicz کمترین غلظت DNA و نسبت به کیت کمترین کیفیت DNA و بازدهی PCR را داشتند. برای ارزیابی بازدهی PCR، ناحیه ITS, ITS۱,۵/۸S rDNA ۲ به طول ۱۰۰۰ bp مورد تقویت قرار گرفت. DNA استخراج شده به روش های CTAB، Chelex و فنل کلروفرم باندهای ضعیف تری نسبت به روش های Ish-Horowicz و کیت در شرایط مساوی PCR ایجاد کردند. استفاده از روش تغییر یافته کیت در مقایسه با سایر روش ها کیفیت بالا و بدون آلودگی از DNA را حاصل نموده و نتیجه مناسب تری را نسبت به سایر روش ها در PCR از خود نشان داد (شکل ۱). روش Ish-Horowicz در مقایسه با سایر روش ها، DNA بیشتری را به لحاظ کمیت حاصل نمود اما دارای آلودگی و اسمیر بوده که به نظر می رسد این روش در حذف آلودگی های پروتئینی و غیره توانایی بالایی را نداشت به طوری که استفاده از DNA حاصل از این روش در PCR نیز کیفیت بالایی را حاصل نکرد.

بحث

معمولاً کیفیت DNA با عواملی از قبیل عدم آلودگی ناشی از RNA، پروتئین، لیپید و سایر ساختارهایی که مانع عملکرد صحیح آنزیم های برشی و پلیمرازها و از جمله مهارکننده های PCR هستند سنجیده می شوند. از طرفی روش های استخراج DNA باید حداقل استرس مکانیکی در طی استخراج ایجاد نمایند(۲، ۸). در این مطالعه پنج روش مختلف فنل کلروفرم، Chelex، CTAB، Ish-Horowicz و کیت جهت استخراج DNA از انگل های فاسیولا مورد ارزیابی و مقایسه قرار گرفتند. شاید بتوان گفت که در استخراج DNA از انگل های فاسیولا دو مشکل عمده وجود دارد یکی بافت سخت و محکم انگل که نیازمند یک روش مناسب برای هضم بافت می باشد و دیگری حذف آلودگی هایی که به نحوی مهارکننده PCR می توانند باشند.

روش Ish-Horowicz روش مناسبی برای استخراج DNA از بافت های سخت و محکم به خصوص حشرات معرفی شده است و بخاطر همین در استخراج DNA از حشرات کاربرد زیادی دارد (۱۴، ۱۵). در این مطالعه در اثر استفاده از روش Ish-Horowicz به لحاظ کمیت، DNA بیشتری از انگل های فاسیولا در مقایسه با سایر روش ها حاصل شد اما وقت گیر بودن این روش، آلودگی بالا و کیفیت پایین DNA حاصله و در نتیجه بازدهی پایین PCR می توانند از معایب این روش باشند. هرچند که روش های فنل کلروفرم، CTAB و Chelex در مطالعات مختلف به عنوان روش های مناسبی برای استخراج DNA از میکروارگانیسم ها و سلول های مختلف معرفی شده اند (۶، ۹، ۱۱).

اما بر اساس مطالعهٔ حاضر، این روش ها در استخراج DNA از انگل های فاسیولا به خصوص در مقایسه با روش های Ish-Horowicz و کیت (بهینه سازی شده) چندان موفق نبودند. امروزه در بسیاری از مطالعات مولکولی، کیت های مختلف استخراج DNA مورد استفاده قرار می گیرند. سهولت کار با کیت، حصول نتایج مناسب، کیفیت بالای DNA، آلودگی بسیار پایین و بازدهی مناسب PCR از مزایای استفاده از کیت های استخراج DNA می باشند (۴، ۱۸، ۲۰). بر اساس مطالعه حاضر در ابتدا با استفاده از کیت نتایج مناسبی حاصل نگردید اما با تغییر برخی پارامترها از جمله افزایش مدت انکوباسیون و افزایش مقدار پروتئیناز K و بهینه سازی کیت نتایج قابل توجه و مناسبی برای استخراج DNA از انگل های فاسیولا با استفاده از کیت به دست آمد. علی رغم گران تر بودن کیت نسبت به سایر روش های مذکور در استخراج DNA از انگل های فاسیولا و کمتر بودن مقدار DNA حاصل در اثر استفاده از کیت نسبت به روش Ish-Horowicz اما کیفیت بالای DNA، آلودگی پایین سریع تر بودن و بازدهی مناسب تر PCR در اثر استفاده از کیت نسبت به سایر روش ها از مزایای استفاده از کیت جهت استخراج DNA از انگل های فاسیولا می باشد.

تشکر و قدردانی

این تحقیق به عنوان بخشی از رساله دکترای تخصصی انگل شناسی پزشکی مصوب دانشـــکدهٔ علوم پزشکی دانشگاه تربیت مدرس با حمایت مالی دانشـــگاه مذکور انجام شده اســـت. از کلیه همکاران محترم معاونت پژوهشی دانشکده تشکر و قدردانی می نماییم.

منابع مورد استفاده

1- Asmar, M, Milani A, Amirkhani A, Yadegarynia D. (1991) Seroepidemiological investigation of fascioliasis in Iran. *Med. J. of IR of Iran*, (1-2): 23-7.

2- Berthomieu P and Meyer C. (1991) Direct amplification of plant genomic DNA from leaf and root pieces using PCR. *Plant Mol Biol*, 17: 555–7.

3- Boray J.C. (1982) *Fascioliasis*. In: Handbook series in Zoonoses. Section C. Parasitic Zoonoses. Volume III (G.V. Hillyer and C.E. Hopla Edit.) CRC Press, Boca Raton-Florida; 71-88.

4- Edvinsson B, Jalal S, Nord CE, Pedersen BS, Evengard B; (2004) ECSMID Study Group on Toxoplasmosis. DNA extraction and PCR assays for detection of *Toxoplasma gondii*. *APMIS*; 112(6):342-8.

5- Farag H.F. (1998) Human fascioliasis in some countries of the Eastern Mediterranean Region. *East Mediterr Health* J; 4(1):156-60.

6- Guyot K, Follet-Dumoulin A, Lelièvre E, Sarfati C, Rabodonirina M, Nevez G, Cailliez JC, Camus D, Dei-Cas E. (2001) Molecular characterization of Cryptosporidium isolates obtained from humans in France. *J Clin Microbiol;* 39(10):3472-80.

7- Hosseini H, Jolokhani M, Bahonar A, Eslami A. (2010) Cattle fascioliasis in Gilan province, Iran. Int J of Vet Res.; 4(1).

8- Jeanpierre, M. (1987) A rapid method for the purification of DNA from blood. *Nucleic Acid. Research*; 15(22): 9611.

9- Kelly, J. M. (1993) *Isolation of DNA and RNA from Leishmania.* In: Hyde, J. E. (ed.), Protocols in Molecular Parasitology;Vol. 21. Humana Press, Totoa, NJ. PP: 123-31.

10- Luton K, Walker D, Blair D. (1992) Comparisons of ribosomal internal transcribed spacers from two congeneric species of flukes (Platyhelminthes: Trematoda: Digenea). *Mol Biochem Parasitol;* 56:323–7.

11- Mahittikorn A, Wickert H, Sukthana Y. (2005) Comparison of five DNA extraction methods and optimization of a b1 gene nested PCR (nPCR) for detection of *Toxoplasma gondii* tissue cyst in mouse brain. *Southeast Asian J Trop Med Public Health*; 36(6):1377-82.

12- Mas-Coma S, Bargues MD, Valero MA. (2005) Fasciolosis and other plant-borne trematode zoonoses. *Int J Parasitol;* 35:1255-78.

13- Mas-Coma S, Bargues M.D. (1999) *Human fascioliasis*. In: Dalton J(editor), fascioliasis. Dublin city, CAB International; P:411-33.

14- Rassi Y, Sofizadeh A, Abai MR, Oshaghi MA, Rafizadeh S, Mohebail M, Mohtarami F, Salahi R. (2008) Molecular Detection of *Leishmania major* in the Vectors and Reservoir Hosts of Cutaneous Leishmaniasis in Kalaleh District, Golestan Province, Iran. *Iranian J Arthropod-Borne Dis*; 2(2): 21-7

15- Ready PD, Lainson R, Shaw JJ, Souza AA. (1991) DNA probes for distinguishing *Psychodopygus wellcomei* from Psychodopygus complexus (Diptera: Psychodi-dae). *Mem Inst Oswaldo Cruz*; 86: 41-9.

16- Salahi-Moghaddam A. (2004) *Study of Human Fascioliasis and its intermediate host in Mazandaran Province.* Ph.D. Thesis, School of Public Health, Tehran, Tehran University of Medical Sciences, [In Persian].

17- Sharbatkhori M, KiaEB, Fasihi Harandi M, Jalalizand N, Zahabiun F, Mirhendi H. (2009) Comparison of five simple methods for DNA extraction from *Echinococcus granulosus* protoscoleces for PCR-Amplification of ribosomal DNA. *Iranian J Parasitol;* 4(2):54-60.

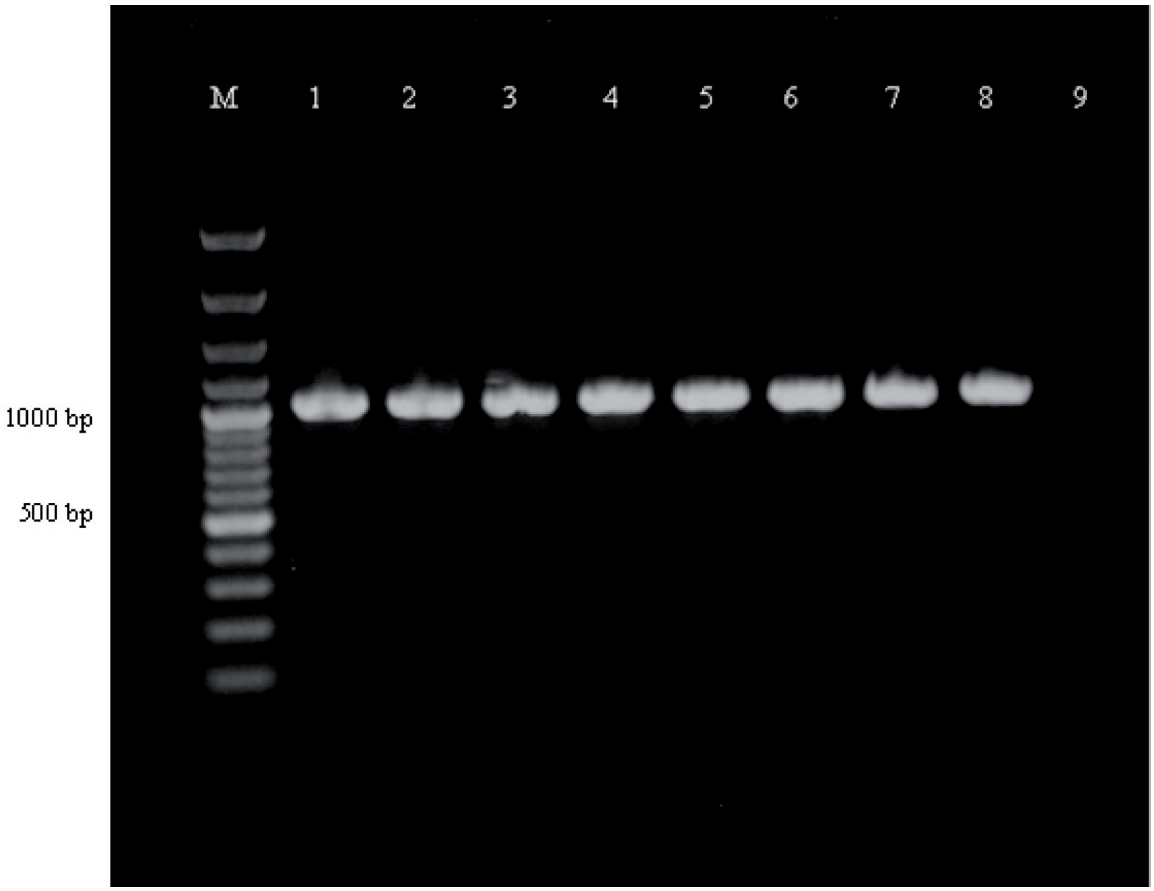
18- Smith K, Diggle MA, Clarke SC. (2003) Comparison of commercial DNA extraction kits for extraction of bacterial genomic DNA from whole-blood samples. *J Clin Microbiol*; 41(6):2440-3.

19- World Health Organization. (1995) *Control of Food-borne Trematode Infections.* Technical Report Series No.849; Geneva: WHO.

20- Yera H, Filisetti D, Bastien P, Ancelle T, Thulliez P, Delhaes L. (2009) Multicenter comparative evaluation of five commercial methods for toxoplasma DNA extraction from amniotic fluid. *J Clin Microbiol;* 47(12):3881-6.

جدول۱- میانگین کمیت و کیفیت DNA استخراج شده از انگل های فاسیولا با استفاده از روش های مختلف

روش استخراج DNA	غلظت (µg/ml)	نسبت ۲۶۰/۲۸۰
Ish-Horowicz	۴۳۵	۱/۴۸
DNA Extraction Kit	۲۱۷/۹	۱/۸۲
Phenol-chloroform	۲۳۸	۱/۵۴
Chelex	۱۱۵/۶	۱/۴۲
CTAB	۴۴/۲	۱/۱۸



شکل ۱- الکتروفورز محصول PCR با استفاده از DNA استخراج شده نمونه های مختلف فاسیولا با روش بهینه سازی شده کیت. (۷-۱) قطعات تکثیر شده (۱۰۰۰ bp) ناحیه ITS۱,۵,۸S rDNA,ITS۲ با استفاده از پرایمرهای BD۱ و BD۲، (۸) کنترل مثبت، (۹)کنترل منفی، (M)مارکر ۱۰۰ bps.