استخراج و خالص‌سازی DNA پلاسمیدی از سودوموناس آئروجینوزا

رضا بهلولی خیاوی- کارشناس ارشد میکروب‌شناسی پزشکی

مقدمه

سودوموناس آئروجینوزا یکی از شایع‌ترین باکتری‌های گرم منفی است که در عفونت‌های بیمارستانی یافت شده و مقاومت آنتی‌بیوتیکی زیادی را نشان می‌دهد. خصوصیات فنوتیپی این باکتری نظیر الگوهای بیوشیمیایی، باکتریوفاژ تایپینگ، وجود آنتی‌ژن‌های سطحی سلول و الگوهای حساسیت به عوامل ضدمیکروبی براساس تغییرات در فاز رشد و موتاسیون خودبخودی، تمایل به تغییر دارند، بنابراین استفاده از این خصوصیات برای شناسایی منبع عفونت و شیوع آن برای بررسی عفونت‌های ایجادشده توسط گونه‌های هتروژن سودوموناس آئروجینوزا مفید نخواهد بود، لذا استفاده از متدهای مولکولی نظیر آنالیز الگوی پلاسمیدی در مطالعات اپیدمیولوژیک ضروری است. پلاسمیدها مولکول‌های DNA دورشته‌ای مستقل خارج کروموزومی هستند که وجود آن‌ها برای بقای سلول ضروری نیست اما ممکن است تنوع وسیعی از خصوصیات ژنتیکی را کد کنند که میزبان را برای رقابت بهتر با سایر میکروارگانیسم‌های اشغال‌کننده همان مکان اکولوژیک مستعد بکند. یکی از خصوصیاتی که پلاسمیدها را در میکروب‌شناسی با اهمیت خاص جلوه‌گر می‌سازد، توانایی آن‌ها در حمل و انتقال ژن‌های کدکننده مقاومت به ترکیبات ضدمیکروبی است. در آنالیز الگوی پلاسمیدی سویه‌های باکتری، تعداد و اندازه پلاسمیدها اساس تشخیص سویه می‌باشد و سویه‌های منشأ گرفته از یک کلون دارای تعداد مشابه 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 متد لیز قلیایی تغییریافته استفاده شده است. تغییر داده‌شده در روش فوق شامل استفاده از مخلوط CTAB (cetyltrimethylammonium bromide) و NaCL بعد از لیز کردن باکتری و قبل از گرفتن رسوب DNA پلاسمیدی است که موجبات جداسازی کربوهیدرات‌های سلولی را فراهم می‌سازد.

۱- مواد و محلول‌های لازم

۱-۱- محیط کشت LB (Luria Bertaini) حاوی آمپی‌سیلین: ۱۰ گرم باکتوتریپتون، ۵ گرم عصاره مخمر و ۵ گرم NaCL در یک لیتر آب مقطر حل شده و با استفاده از NaOH ۲ نرمال PH محیط در ۷/۳ تنظیم و سپس اتوکلاو می‌شود. بعد از استریل کردن، حرارت محیط به کمتر از ۵۰ درجه رسیده و آمپی‌سیلین به مقدار ۱ میلی‌لیتر از محلول ذخیره‌شده ۵۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر، اضافه شده تا غلظت آن در محیط به ۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر برسد و محیط‌های آماده‌شده تا زمان استفاده در یخچال در ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری می‌شوند.

۱-۲- محلول شماره یک (بافر لیزکننده): حاوی گلوکز ۵۰ میلی‌مول و 10Mm EDTA (PH=8) و 25Mm Tris-HCl است که به حجم ۱۰۰ میلی‌لیتر تهیه شده و تا زمان استفاده در یخچال در ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری می‌شود.

۱-۳- محلول شماره ۲ (محلول دناتوره کننده): حاوی 0.2 N NaOH و 3% SDS است که هر روز موقع استفاده به‌صورت تازه تهیه می‌شود.

۱-۴- محلول شماره ۳ (محلول استات پتاسیم): حاوی ۱۲۰ میلی‌لیتر استات پتاسیم ۵ مولار و ۲۳ میلی‌لیتر اسید استیک گلاسیال و ۵۷ میلی‌لیتر آب مقطر است که تا زمان استفاده در یخچال در ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شده و قبل از استفاده به ظرف محتوی یخ منتقل شده و بعد مورداستفاده قرار می‌گیرد.

۱-۵- محلول شماره ۴ (محلول ۱ درصد CTAB حاوی ۰/۷ مولار نمک طعام): ۱ گرم از پودر CTAB و ۰/۴۱ گرم نمک طعام را در ۱۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر حل کرده و محلول در حرارت آزمایشگاه نگهداری می‌شود.

۱-۶- بافر TE: حاوی 10Mm Tris-Hcl و 1Mm EDTA است که بعد از تهیه اتوکلاو شده و تا زمان استفاده در یخچال در ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری می‌شود.

۱-۷- RNase A با غلظت ۱۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر: در یخچال در ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری می‌شود.

۲- مراحل استخراج و خالص‌سازی DNA پلاسمیدی

۲-۱- یک کلنی منفرد از سودوموناس آئروجینوزا را به ۵ میلی‌لیتر محیط کشت LB حاوی آنتی‌بیوتیک تلقیح کرده و به مدت ۲ ساعت در ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه می‌کنیم.

۲-۲- ۱/۵ میلی‌لیتر از کشت باکتریایی را به میکروتیوب منتقل کرده و به مدت ۴ دقیقه در دور ۴۰۰۰ سانتریفوژ می‌کنیم.

۲-۳- بعد از خالی کردن مایع رویی میکروتیوب، به‌طور معکوس به مدت ۴ دقیقه بر روی دستمال کاغذی برای خشک شدن رسوب باکتریایی قرار داده می‌شود.

۲-۴- 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.

۲-۵- ۰/۴ میلی‌لیتر شماره ۲ تازه تهیه‌شده اضافه شده و سر لوله بسته می‌شود و ۶ بار به‌آرامی سروته شده و به مدت ۵ دقیقه در آب یخ انکوبه می‌گردد.

۲-۶- 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 ۶ بار به‌آرامی سروته شده و به مدت ۵ دقیقه در آب یخ انکوبه می‌شود.

۲-۷- لوله به مدت ۵ دقیقه در دور ۱۲۰۰۰ در ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفوژ شده و پس از سانتریفوژ کردن ۷۵۰ میکرولیتر از مایع رویی به میکروتیوب جدید اضافه می‌گردد.

۲-۸- برروی ۷۵۰ میکرولیتر از مایع رویی ۱/۵ میکرولیتر از RNase A با غلظت ۱۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر افزوده شده و به مدت ۲۰ دقیقه در ۳۷ درجه انکوبه می‌گردد.

۲-۹- ۸۰ میکرولیتر از محلول ۱ درصد CTAB حاوی ۰/۷ مولار نمک طعام را اضافه کرده و به مدت ۱۰ دقیقه در ۶۵ درجه سانتی‌گراد انکوبه می‌شود.

۲-۱۰- بعد از اتمام انکوباسیون و خنک کردن میکروتیوب‌ها در حرارت آزمایشگاه، ۷۵۰ میکرولیتر از محلول فنل متعادل شده/ کلروفرم/ ایزوآمیل الکل (۱/۲۴/۲۵) اضافه شده و به مدت ۱ دقیقه ورتکس شده سپس به مدت ۴ دقیقه در دور ۱۲۰۰۰ در ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفوژ می‌گردد.

۲-۱۱- مایع رویی به میکروتیوب جدید منتقل شده و بر روی آن ۷۵۰ میکرولیتر اتانل ۹۶ درجه که به مدت ۱۰ دقیقه در فریزر ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شده بود در وضعیت فوق‌العاده سرد اضافه می‌شود و ۶ بار به‌آرامی سروته شده و بعد به مدت ۲ ساعت در ۲۰- درجه سانتی‌گراد انکوبه می‌شود.

۲-۱۲- سپس لوله به مدت ۱۵ دقیقه با دور ۱۲۰۰۰ در ۴ درجه 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.

۲-۱۳- ۱ میلی‌لیتر اتانل ۷۰٪ که به مدت ۱۰ دقیقه در ۴ درجه نگهداری شده بود در وضعیت فوق‌العاده سرد اضافه شده و سر لوله بسته شده و با چند بار سروته کردن مخلوط می‌گردد.

۲-۱۴- سپس لوله به مدت ۱ دقیقه با دور ۱۲۰۰۰ در ۴ درجه سانتریفوژ می‌شود. مایع رویی دور ریخته شده و میکروتیوب به‌طور معکوس بر روی دستمال کاغذی برای خشک شدن رسوب قرار داده می‌شود.

۲-۱۵- 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 استفاده می‌شود.

۳- الکتروفورز DNA پلاسمیدی در روی ژل آگارز

۳-۱- سینی ژل شسته شده و خشک گردیده و دو انتهای آن با چسب اتوکلاو بسته می‌شود.

۳-۲- شانه ژل در سینی قرار داده شده بطوریکه شانه حدود ۱ میلی‌لیتر بالاتر از سطح سینی قرار گیرد و سپس ژل بر روی میز به‌صورت تراز قرار داده می‌شود.

۳-۳- به‌منظور تهیه آگارز ۰/۷ درصد، ۱۴۰ میلی‌گرم پودر آگارز در ارلن مایر ریخته شده و بر روی آن ۲۰ میلی‌لیتر بافر الکتروفورز TBE 0.5 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.

۳-۴- محلول آگارز تا ۶۰ درجه سانتی‌گراد خنک شده و سپس در سینی ژل ریخته می‌شود، طوری که هیچ حبابی مخصوصاً زیر شانه‌ها نباشد و ضخامت ژل حدود ۴ میلی‌لیتر باشد.

۳-۵- 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.

۳-۶- تانک الکتروفورز با ۴۵۰ میلی‌لیتر بافر الکتروفورز TBE 0.5 پر می‌شود. مقدار بافر به‌اندازه‌ای باید باشد که سطح ژل به عمق حداقل ۱ میلی‌متر پوشانده شود.

۳-۷- مقدار ۵ میکرولیتر از محلول DNA پلاسمیدی با ۱ میکرولیتر از بافر لودکننده ژل (Gel loading buffer) حاوی ۰/۲۵ درصد برومونفول بلو و ۰/۲۵ درصد گزیلن سیانول و ۳۰ درصد گلیسرول در آب مخلوط شده و در چاهک موجود در ژل قرار داده می‌شود.

۳-۸- سرپوش تانک الکتروفورز گذاشته شده و توسط سیم‌های ارتباطی به Power supply متصل گردیده و جریان الکتریکی برقرار می‌گردد، بطوریکه ولتاژ مورداستفاده ۸۰ ولت بوده و الکتروفورز تا مدت ۱/۵ ساعت ادامه خواهد یافت.

۳-۹- 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.

۳-۱۰- 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.

۳-۱۱- پس از اتمام کار و تهیه عکس از ژل برای تخریب اتیدیم بروماید که سرطان‌زا می‌باشد، ژل به مدت ۵ دقیقه در داخل محلول پرمنگنات پتاسیم قرار داده شده و سپس دور ریخته می‌شود.

۳-۱۲- 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 ۲۵۴ 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.

بحث

روش‌های متنوعی برای استخراج DNA پلاسمیدی از باکتری‌ها وجود دارد، در این پژوهش به این علت از روش لیز قلیایی تغییریافته استفاده شده است که دارای مزایای زیر می‌باشد:

۱- انجام آن سریع و آسان است.

۲- به اولتراسانتریفوژ نیاز ندارد.

۳- بطور نسبی ارزان است.

۴- مقدار DNA بدست‌آمده خیلی زیاد است.

۵- DNA بدست‌آمده در این روش سوبسترای مناسبی برای هضم با آنزیم‌های محدودالاثر است.

در این روش برای اینکه بتوانیم مقدار زیادی از DNA را بدست 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 ۲۴ ساعت در ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه می‌شوند تا مقدار کافی از سلول باکتریایی برای استخراج DNA پلاسمیدی وجود داشته باشد. برای آماده‌سازی باکتری‌ها به منظور 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 بطـور ثابـت حفـظ مـی‌کنـد. EDTA با عوامل شلاته کننده نظیر Mg^{2+} که برای عمل آنزیم DNases موردنیاز هستند ترکیب شده و ایـن عوامـل را غیرفعـال می‌کند. گلوکز برای بالابردن فشار اسمزی بیرون سلول است. در این روش بـرای لیزکـردن بـاکتری‌هـا از محلـول 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 ایـن مرحلـه DNA مجـدداً دورشـته‌ای می‌شود. قطعات DNA کروموزومی به صورت تصادفی با هم جفت می‌شوند و بیشتر به حالت دنـاتوره بـاقی مـی‌ماننـد و همـراه بـا پروتئین‌های سلولی در داخل کمپلکس‌های بزرگ گیر افتاده و با دودسـیل‌سـولفات پوشـیده شـده و از طریـق سـانتریفیوژ رسـوب می‌کنند ولی DNAهای پلاسمیدی به خاطر داشتن اندازه کوچک و ساختار سوپرکویل به صورت متصل به هـم بـاقی مـی‌ماننـد و مجدداً به صورت دورشته‌ای درمی‌آیند و ساختار اولیه را بدست می‌آورند و پس از سانتریفوژ کردن در مرحله رویی باقی می‌مانند.

برای به حداقل رساندن DNA کرموزومی در مراحل استخراج و خالص‌سازی DNA پلاسمیدی باید نکات زیر را رعایت کنیم:

۱- تهیه سوسپانسیون سلول باید با استفاده از سرسمپلر و به‌صورت خیلی آرام انجام گیرد.

۲- در مرحله لیز سلولی بعد از افزودن محلول لیزکننده، انکوباسیون در یخ به مدت ۵ دقیقه انجام می‌گیرد.

۳- محلول SDS باید در حرارت بالای ۲۰ درجه سانتی‌گراد نگهداری شود چون نگهداری در دمای پایین‌تر باعث کریستالیزه شـدن و عدم کارایی آن خواهد شد.

۴- بعد از اضافه کردن استات پتاسیم عمل مخلوط‌سازی باید خیلی سریع انجام گیرد.

۵- بعد از مرحله اثر دادن آنزیم RNase A، بایـد از محلـول ۱ درصـد CTAB حـاوی نمـک طعـام ۰/۷ مـولار بـرای حـذف پلـی ساکاریدها استفاده شود که در این صورت باعث رسوب DNA کروموزومی همراه باپلی ساکاریدها می‌شود.

References:

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.