بررسی دو روش فنل-کلروفرم و استفاده از نانوذرات مغناطیسی جهت استخراج DNA ژنومی باکتری استافیلوکوکوس اورئوس

حدیثه رستمی[۱]، فرزانه فیروزه[۲و۳*]، محمد زیبایی[۳و۴]، ایمان سلحشوری فر[۵]، علی سبحانی نسب[۶]، وجیهه سادات نیک بین[۷]

[۱] کارشناسی ارشد، گروه تخصصی زیست شناسی، دانشکده علوم پایه دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات تهران، ایران

[۲] دانشیار، گروه میکروب شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی البرز، کرج، ایران

[۳] مرکز تحقیقات گیاه درمانی و طب مکمل مبتنی بر شواهد، دانشگاه علوم پزشکی البرز، کرج، ایران

[۴] استاد، گروه انگل شناسی و قارچ شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی البرز، کرج، ایران

[۵] استادیار، گروه ژنتیک، دانشکده علوم پایه دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات تهران، ایران

[۶] استادیار، مرکز تحقیقات فیزیولوژی، پژوهشکده علوم پایه، دانشگاه علوم پزشکی کاشان، کاشان، ایران

[۷] دکتری تخصصی، بخش باکتری شناسی، انستیتو پاستور ایران، تهران، ایران

نویسنده مسئول:

دانشیار گروه میکروب شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی البرز، کرج، ایران

۰۲۶۳۲۵۶۳۳۱۸
Email: firoozeh823@gmail.com

تاریخ دریافت مقاله: ۱۴۰۱/۱/۱۷؛ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۵/۲۹

چکیده

زمینه و هدف: جدا کردن DNA ژنومی از سلول‌های باکتریایی از جمله فرایندهایی است که به طور معمول در اکثر آزمایشگاه‌های بیولوژیک انجام می‌گیرد، لذا برای آن روش‌های گوناگونی ارائه شده است. در این مطالعه از دو روش فنل و کلروفرم، و استفاده از نانوذرات مغناطیسی در جهت استخراج DNA ژنومی باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* استفاده شده است.

مواد و روش ها: در مطالعه حاضر از باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* سویه استاندارد به شماره ATCC 25923 استفاده گردید. جهت استخراج DNA ژنومی از دو روش فنل-کلروفرم و استخراج به وسیله نانوذرات مغناطیسی استفاده شد. جهت بررسی کیفیت و غلظت DNA استخراج شده با دو روش فوق از دستگاه نانودراپ و روش الکتروفورز روی ژل آگارز استفاده گردید.

یافته‌ها: بررسی غلظت DNA استخراج شده در هر دو روش، توسط نانودراپ انجام شد که غلظت DNA استخراج شده در روش فنل-کلروفرم و استفاده از نانوذرات مغناطیسی Fe_3O_4/SiO_2 به ترتیب ۵۵۰/٤ و ۱۳۱/٦ میکروگرم بر میلی لیتر به دست آمد.

بحث و نتیجه گیری: از یافته‌های این تحقیق می‌توان نتیجه گرفت که با توجه به دیواره ضخیم باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس*، استخراج DNA ژنومی به وسیله نانوذرات مغناطیسی SiO_2/Fe_3O_4 دارای غلظت و خلوصی قابل قبول برای انجام پروسه های مولکولی مانند PCR است و می‌تواند به عنوان جایگزین سایر روش های استخراج استفاده شود.

کلمات کلیدی: استافیلوکوکوس اورئوس، استخراج DNA، نانوذرات مغناطیسی، فنل-کلروفرم، ژنوم باکتری

مقدمه

باکتری های پاتوژن باعث مرگ و میر و عوارض قابل توجه در انسان می‌گردند. *استافیلوکوکوس اورئوس* یکی از مهم‌ترین پاتوژن‌هایی است که هر ساله صدها هزار نفر از مردم به عفونت با این باکتری مبتلا می‌شوند[۱]. در ۵۰ سال گذشته این باکتری تغییرات ژنتیکی زیادی را متحمل شده است. از آنجایی که این باکتری دارای ژنوم انعطاف پذیر می‌باشد، سویه های بیماری‌زا و مقاوم به داروی آن گسترش یافته است[۲]. در سال‌های اخیر نقش مهم *استافیلوکوک اورئوس* در ایجاد عفونت های بیمارستانی و نیز جامعه منجر به افزایش تحقیقات بر روی این باکتری شده است[۲]. استخراج و خالص سازی DNA گام مهمی در برنامه‌های مختلف پزشکی مثل درمان ژنتیکی و تشخیص بالینی محسوب می‌شود[۳]. امروزه آنالیز DNA نقش مهمی در زیست شناسی مولکولی دارد. دستیابی به یک سیستم مناسب استخراج DNA جهت کسب نتایج موفقیت‌آمیز در بررسی های مولکولی حائز اهمیت بسیاری است[٤]. استخراج DNA ژنومی از سلول‌های باکتریایی با غلظت و درصد خلوص بالا، یکی از فرایندهای مورد توجه محققان در آزمایشگاه های مولکولی، تحقیقاتی و بالینی می‌باشد[۵و۶]. چندین عامل کلیدی در انتخاب روش مناسب جهت استخراج DNA را باید در نظر داشت که از آن جمله می‌توان به سریع بودن و مقرون به صرفه بودن آنها اشاره کرد[۷]. از جمله روش‌هایی که توسط برخی از محققان جهت استخراج DNA ژنومی مورد بررسی و استفاده قرار گرفته، روش فنل-کلروفرم می‌باشد که این روش با توجه به قدرت فنل جهت لیز باکتری‌ها، و هم‌چنین کلروفرم جهت حذف مواد اضافه، در سال‌های گذشته بسیار مورد توجه بوده است[۵]. امروزه به دلیل سمیت و عوارض خطرناک ناشی از فنل روش فوق محدود تر شده است. استخراج و خالص سازی نوکلئیک اسید یک مرحله اساسی برای بسیاری از تکنیک‌های مولکولی است[۸]. از این رو استفاده از روش جایگزین موثر و قابل اعتماد جهت جدایی و خالص سازی نوکلئیک اسید از مخلوط پیچیده بسیار حائز اهمیت است [۹و۱۰].

در سال های اخیر استفاده از نانو ذرات مغناطیسی جهت استخراج DNA به دلیل سهولت کار، سادگی، بی خطری و ارزان بودن مورد توجه قرار گرفته است[۱۱]. ترکیب شدن نانوذرات با DNA به شکل Magneto Plexes در خاصیت مغناطیسی ژن‌ها، جداسازی DNA، آنالیزهای زیستی موثرتر هستند[۱۴-۱۲]. یکی از استفاده‌های نانو ذرات مغناطیسی، استفاده از آن‌ها به عنوان یک حامل برای تجمع مواد فعال بیولوژیکی از جمله آنزیم، آنتی بادی و DNA است.

این تحقیق به منظور بررسی اثر نانوذرات مغناطیسی SiO_2/Fe_3O بر استخراج DNA ژنومی باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* و مقایسه آن با روش معمول فنل-کلروفرم انجام گرفته است.

مواد و روش‌ها

بررسی حاضر، یک ارزیابی آزمایشگاهی و برون‌تنی (Invitro) بوده که از بهمن ۱۳۹۷ لغایت مرداد ۱۳۹۸ در آزمایشگاه مرکز تحقیقات مولکولی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی البرز و دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات تهران انجام و با شناسه اخلاق IR.IAU.SRB.REC.1398.211 مورد تایید قرار گرفت. در این پژوهش که به منظور استخراج DNA ژنومی باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* انجام شد، سویه استاندارد ATCC 25923 از بانک نمونه‌های میکروبی انستیتو پاستور ایران خریداری شد. هم‌چنین نانوذرات مغناطیسی نیز از بخش نانو تکنولوژی دانشگاه کاشان تهیه گردیدند.

لیزوزیم و پروتئیناز K و محیط های کشت LB آگار و TSB مرک آلمان و از شرکت ژن فن آوران تهیه شدند اما سایر مواد آنالیتیکال بوده و از منابع تجاری تهیه گردیدند.

استخراج DNA ژنومی با استفاده از فنل-کلروفرم

به طور خلاصه یک نمونه باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* سویه استاندارد ATCC 25923 روی محیط کشت LB آگار به مدت ٢٤ ساعت در انکوباتور با دمای ۳۷ درجه کشت داده شد. سپس کلنی‌های رشد کرده به محیط کشت TSB انتقال داده شدند و ٢٤ ساعت در انکوباتور شیکردار با دمای ۳۷ درجه رشد کردند. پس از این زمان ۳۰۰۰ میکرولیتر از محیط کشت TSB (Merck, Germany) که باکتری روی آن رشد کرده بود با دور ۵۰۰۰ به مدت ۲ دقیقه سانتریفیوژ شد. روی رسوب حاصل از سانتریفیوژ، ۵۰۰ ماکرولیتر بافر سوسپانسیون شامل: (۲۰۰۰ ماکرولیتر EDTA, 0.5 M و ۵۰۰۰ ماکرولیتر 1 M Tris-HCl,) اضافه شد. پس از مخلوط کردن به محتوی لوله ۷۰ ماکرولیتر SDS 10%، ۲۸ ماکرولیتر NaOH 0.5 M، ۷ ماکرولیتر لیزوزیم، و ۱۰۰ ماکرولیتر آب دوبار تقطیر اضافه شد. پس از مخلوط

کردن، لوله در بن‌ماری ۳۷ درجه سانتی گراد انکوبه گردید. پس از گذشت ۱ ساعت ۵ ماکرولیتر پروتئیناز K روی آن اضافه گردید و مجدداً در بن ماری ۵۵ درجه سانتی گراد به مدت ۱ ساعت انکوبه شد. از ترکیب فنل-کلروفرم: ایزوآمیل الکل با نسبت ۲۵:۲٤:۱، مقدار ٦۰۰ ماکرولیتر به لوله اضافه گردید. در ادامه در دور ۱۰۰۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شد. مرحله فوق مجدداً تکرار و در دور ۱۰۰۰۰ برای ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ گردید. به محلول رویی ٦۰۰ ماکرولیتر کلروفرم اضافه گردید و در دور ۱۰۰۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شد. به محلول رویی ۱۰۰۰ ماکرولیتر اتانول مطلق سرد اضافه گردید و کلاف DNA در این مرحله مشاهده شد، که به مدت ۱ ساعت در ۲۰- درجه سانتیگراد قرار داده شد و سپس به مدت ۱۰ دقیقه در دور ۱۳۰۰۰ سانتریفیوژ شد. سپس روی رسوب حاصله ۲۰۰ ماکرولیتر اتانول ۷۰ درصد اضافه و در دور ۱۳۰۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ گردید، مایع رویی دور ریخته شد و زمان داده شد تا لوله خشک شود. سپس روی رسوب حاصل ۵۰ ماکرولیتر بافر TE اضافه گردید و ۱ ساعت داخل شیکر قرار گرفت. پس از ٤۵ دقیقه در دمای اتاق قرار داده شد و پس از این زمان در ۲۰- نگهداری گردید [۱۵].

استخراج DNA ژنومی با استفاده از نانوذرات مغناطیسی

یک نمونه باکتری استافیلوکوکوس اورئوس سویه استاندارد ATCC 25923 روی محیط کشت LB آگار، به مدت ۲٤ ساعت در انکوباتور با دمای ۳۷ درجه کشت داده شد. سپس کلنی های رشد کرده به محیط کشت TSB انتقال داده شدند و ۲٤ ساعت در انکوباتور شیکردار با دمای ۳۷ درجه سانتی گراد رشد کردند. پس از این زمان ۳۰۰۰ ماکرولیتر از محیط کشت TSB که باکتری روی آن رشد کرده بود با دور ۱۰۰۰۰ به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ شد. روی رسوب حاصل، ۵۰۰ ماکرولیتر بافر سوسپانسیون که شامل ۲۰۰۰ ماکرولیتر EDTA, 0.5 M و ۵۰۰۰ ماکرولیتر Tris-HCl, 1 M بود اضافه گردید. و پس از مخلوط کردن به آن ۷۰ ماکرولیتر SDS 10% و ۲۸ ماکرولیتر NaOH 0.5 M و ۷ ماکرولیتر لیزوزیم و ۱۰۰ ماکرولیتر آب دوبار تقطیر اضافه شد و در بن ماری ۳۷ درجه به مدت ۱ ساعت انکوبه سپس۱۰ ماکرولیتر پروتئیناز K به آن اضافه گردید، مجدداً در بن ماری ۵۵ درجه به مدت ۱ ساعت انکوبه و در دور ۱۰۰۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه و دمای ٤ درجه سانتریفیوژ شد. به مایع رویی ۲۰۰ ماکرولیتر بافر بایندینگ که شامل ۱/۲۵ ماکرولیتر NaCl 1M، پلی‌اتیلن‌گلیکول ٦۰ درصد و آب می‌باشد، اضافه گردید. در مرحله بعد ۰/۸میلی‌گرم نانوذرات مغناطیسیFe3O4/ SiO2 اضافه و ۳۰ دقیقه در دمای اتاق انکوبه شد. با استفاده ازمگنتیک راک دانه‌های ایجاد شده جدا شدند. سپس ۲۰۰ ماکرولیتر از اتانول سرد ۷۰ درصد به آن اضافه گردید و به مدت ۱۰ دقیقه در دور ۱۰۰۰۰ سانتریفیوژ شد. در این مرحله مایع رویی دور ریخته، پس از خشک شدن در دمای اتاق به آن ۵۰ ماکرولیتر بافر TE با pH: 8 اضافه گردید و ۱۰ دقیقه در انکوباتور شیکردار با دمای ۵۵ درجه سانتیگراد قرار گرفت و در دور ۵۰۰۰ به مدت ۱ دقیقه سانتریفیوژ شد. سپس با استفاده از مگنتیک راک مایع رویی حاوی DNA جدا و در دمای ۲۰- نگهداری شد.

بررسی غلظت DNA استخراج شده با استفاده از نانودرآپ

برای تعیین غلظت DNA استخراج شده از دستگاه نانودرآپ مدل BoecoN-1C استفاده شد.

الکتروفورز روی ژل آگارز

برای بررسی بیشتر DNA ژنومی استخراج شده از الکتروفورز در ژل آگارز ۱/۵ درصد استفاده شد. بدین منظور مقدار ۰/۵ گرم آگارز در ۳۵ میلی‌لیتر بافر TBE 1X حل شد و پس از آماده شدن ژل الکتروفورز، ۲ ماکرولیتر از Loading dye (تهیه شده از شرکت ژن فن آوران) با ٤ ماکرولیتر از DNA استخراج شده ترکیب شد و بر روی چاهک های موجود در ژل وارد گردید.

یافته‌ها

در روش فنل-کلروفرم مقدار DNA استخراج شده سویه استاندارد ATCC25923 به‌وسیله نانودرآپ به میزان ٥٥۰/٤ µg/ml به دست آمد. نتایج آن در جدول ۱ آورده شده است. در روش استخراج با استفاده از نانوذرات مغناطیسی غلظت DNA استخراجی باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* سویه استاندارد ATCC25923 دارای غلظت ۱۳۱/٦ µg/ml بود. اطلاعات مربوط به این نمونه در جدول ۲ آورده شده است. تصویر باندهای DNA پس از الکتروفورز در ژل آگارز ۱/۵ درصد در شکل ۱ آمده است.

بحث

در مطالعات موجود از روش‌های گوناگون نظیر روش فنل-کلروفرم، روش استفاده از کیت های تجاری، روش جوشاندن و سایر روش‌ها در جهت استخراج DNA ژنومی باکتری‌ها استفاده شده است. اما در این مطالعه که برای اولین بار در ایران انجام گرفته است از نانو ذرات مغناطیسی برای استخراج DNA ژنومی باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* استفاده شده است.

در مطالعه ای که در سال ۲۰۱۲ توسط Chen و همکاران انجام و در آن از نانو ذرات مغناطیسی با هسته Fe_3O_4 و پوسته SiO_2 برای دسترسی سریع به DNA ژنومی باکتری استافیلوکوکوس اورئوس استفاده شد، محققان توانستند در مدت زمان کم DNA ژنومی باکتری استافیلوکوکوس اورئوس را به وسیله نانو ذرات مغناطیسی جدا کنند، در مطالعه حاضر نیز از نانو ذرات مغناطیسی SiO_2/Fe_3O_4 برای جدا کردن DNA ژنومی باکتری استافیلوکوکوس اورئوس استفاده شده است[۱۶].

Rahnama و همکاران نیز در سال ۲۰۱۶ اقدام به استخراج DNA پلاسمید PBI121 به وسیله نانو ذرات مغناطیسی دولایه SiO_2/Fe_3O_4 و سه لایه $SiO_2/TiO_2/Fe_3O_4$ کردند و در نتایج خود بیان داشتند که خلوص و مقدار DNA استخراج شده به وسیله نانو ذرات دو لایه SiO_2/Fe_3O_4 بیش از $SiO_2/TiO_2/Fe_3O_4$ بوده است[۱۷].

در یک تحقیق توسط Wecke و همکاران که در سال ۱۹۸۲ به تاثیر آنزیم لیزوزیم بر روی باکتری استافیلوکوکوس اورئوس پرداختند، بیان کردند که لیزوزیم قادر به حمله به دیواره سلولی استافیلوکوکوس اورئوس در شرایط اسیدی بوده و این حمله بر روی دیواره سلولی به صورت نامتقارن شروع شده و در نتیجه یک شکاف بین دیواره سلولی و غشاء سیتوپلاسمی به وجود آمده و بخش های بزرگ دیواره سلولی جدا و در محیط معلق می‌شود[۱۸]. در پژوهش حاضر نیز از آنزیم لیزوزیم به منظور تخریب دیواره سلولی باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* استفاده شد و لیزوزیم توانست دیواره سلولی باکتری را تخریب کند و DNA آن را در دسترس قرار دهد. در مطالعات دیگر، از نانو ذرات متفاوت استفاده شده است که تاثیر نانو ذرات را در عوامل مختلف دخیل در پژوهش مورد بررسی قرار داده اند از جمله این مطالعات می‌توان به مطالعه Chakraborti و همکاران در سال ۲۰۱۰ و نیز Xu و همکاران در سال ۲۰۱۰ اشاره کرد که به ترتیب بر روی تاثیر نانو ذره ZnO و نانو ذره TiO_2 بر آنزیم لیزوزیم پرداخته اند. محققان در نتایج خود بیان کردند که این نانو ذرات در عملکرد آنزیم لیزوزیم تاثیر مهاری دارند[۱۹و۲۰]. در مقایسه با این تحقیق نتایج مطالعات Koc و همکاران در سال ۲۰۱۵ درباره رفتار جذب لیزوزیم بر روی نانو کامپوزیت‌های Fe_3O_4 نشان دهنده‌ی تاثیر مساعد Fe_3O_4 بر عملکرد آنزیم لیزوزیم بود[۲۱]. مطابق با یافته Koc و همکاران ، مطالعه حاضر نیز تایید کننده تاثیر مساعد نانو ذرات Fe_3O_4/SiO_2 بر عملکرد آنزیم لیزوزیم می‌باشد.

در این تحقیق همانند مطالعه Mardaneh و همکاران که در سال ۲۰۱۵ انجام شده است، مشخص شد که استفاده از پلی‌اتیلن‌گلیکول در استخراج DNA از باکتری های گرم مثبت روشی مناسب است[۲۲]. در مطالعه‌ای که Cheng و همکاران درسال ۲۰۰۶ انجام دادند، از فنل-کلروفرم برای استخراج DNA باکتری و مخمر استفاده کرده و بیان نمودند که استفاده از فنل جهت لیز باکتری‌ها و کلروفرم برای حذف مواد اضافی یک روش مناسب برای استخراج ژنوم از باکتری‌ها و مخمرها است[۵]. مطالعات بیشتر در این زمینه مانند بررسی Mirnezhad و همکاران که در سال ۲۰۱۲ برای استخراج DNA ژنومی باکتری استافیلوکوکوس اورئوس از روش‌های فنل-کلروفرم، کیت تجاری و استفاده از پودرهای رختشویی استفاده کرده بودند، نشان دادند که اشباع نمودن فنل دشوار بوده و همچنین بیشتر افراد به آن حساسیت نشان می‌دهند به طوریکه اغلب تولیدکنندگان کیت‌های تجاری سعی در حذف این ماده دارند[۲۳].

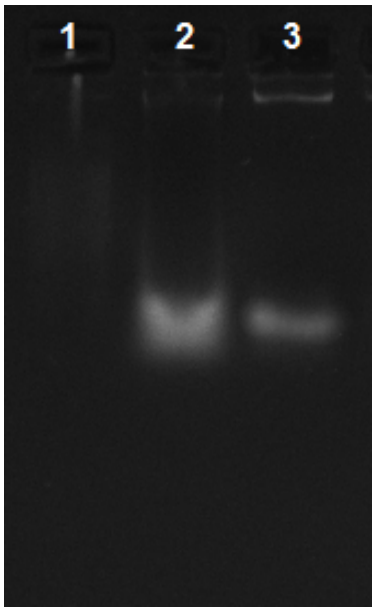
با توجه به نتایج به دست آمده در این پژوهش و مقایسه با روش‌های مورد استفاده مرسوم می‌توان نتیجه گرفت که استخراج DNA ژنومیک با استفاده از نانو ذرات مغناطیسی SiO_2/Fe_3O_4 دارای چندین مزایا می‌باشد که از آن جمله می‌توان به موارد زیر اشاره کرد: ۱) تعداد مراحل استخراج DNA کمتر بوده، لذا در زمان کمتری می‌توان ژنوم را استخراج کرد، ۲) با توجه به اینکه در این روش از فنل-کلروفرم استفاده نمی‌شود، لذا این روش یک روش ایمن برای کاربر می‌باشد، و اینکه ۳) غلظت DNA به دست آمده در این روش برای انجام پروسه‌های مولکولی مانند PCR و سایر روش‌ها مناسب می‌باشد.

جدول ۱: نتایج استخراج DNA از طریق روش فنل -کلروفرم

باکتری	غلظت DNA (µg/ml)	A260	A280	260/280
سویه استاندارد باکتری استافیلوکوک اورئوس (ATCC25923)	۵۵۰/٤	۱۱/۰	۵/۹	۱/۸

جدول ۲: نتایج استخراج DNA با استفاده از نانو ذرات مغناطیسی SiO_2 / Fe_3O_4

باکتری	غلظت DNA (µg/ml)	A260	A280	260/280
سویه استاندارد باکتری استافیلوکوک اورئوس (ATCC25923)	۱۳۱/٦	۲/۷	۱/۵	۱/۸



شکل ۱: نتایج مشاهده باند های DNA استخراج شده پس از الکتروفورز بر روی ژل آگارز ۱/۵ درصد. ستون ۱: کنترل منفی (آب مقطر دیونیزه استریل)؛ ستون ۲: باند مربوط به استخراج با روش فنل–کلروفرم؛ ستون ۳: باند مربوط به استخراج با استفاده از نانو ذرات مغناطیسی.

نتیجه گیری

با توجه به موارد فوق می‌توان نتیجه گیری کرد که روش استخراج DNA ژنومی با استفاده از نانو ذرات، می‌تواند به عنوان روشی سریع و بی‌خطر برای استخراج DNA در آزمایشگاه‌های بیولوژی مولکولی مورد استفاده قرار گیرد.

سپاسگزاری

این مقاله منتج از پایان نامه با عنوان" استخراج DNA ژنومی باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* با استفاده از نانوپارتیکل های مغناطیسی SiO_2 /Fe_3O_4 " در مقطع کارشناسی ارشد رشته زیست فناوری میکروبی، دانشکده علوم پایه دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات تهران با شناسه اخلاق IR.IAU.SRB.REC.1398.211 می‌باشد.

References

1. Gao X , Yao X, Zhang Z, Jia L. Rapid and sensitive detection of *Staphylococcus aureus* assisted by polydopamine modified magnetic nanoparticles. Talanta 2018;186:147-153.
2. Holden M, Feil E, Lindsay J, et al. Complete genomes of two clinical *Staphylococcus aureus* strains: evidence for the rapid evolution of virulence and drug resistance. Proceedings of the National Academy of Sciences 2004;101(26):9786-9791.
3. Sosa-Acosta JR, Silva JA, Ferna′ndez-Izquierdo L, et al. Iron oxide nanoparticles (IONPs) with potential applications in plasmid DNA isolation. Coll Surf A 2018;545(2018):167-178.
4. Niemirowicz K, Markiewicz KH, Wilczewska AZ, et al. Magnetic nanoparticles as new diagnostic tools in medicine. Adv Med Sci 2012;57(2):196-207.
5. Cheng HR, Jiang N. Extremely rapid extraction of DNA from bacteria and yeasts. Biotechnol Lett 2006;28(1):55-59.
6. Park D. Genomic DNA isolation from different biological materials. Methods Mol Biol 2007; 353:3-13.
7. Tafvizi F,Osareh A. Comparison of DNA extraction methods from fixed tissue in formalin. J Comp pathobiol Iran 2015;12(3):1677-1682.
8. Intorasoot S, Srirung R, Intorasoot A, et al. Application of gelatin-coated magnetic particles for isolation of genomic DNA from bacterial cells. Anal Biochem 2009; 386(2):291-292.
9. Berensmeier S. Magnetic particles for the separation and purification of nucleic acids. Appl Microbiol Biotechnol 2006;73(3):495-504.
10. Saiyed ZM, Ramchand CN, Telang SD. Isolation of genomic DNA using magnetic nanoparticles as a solid-phase support. J Phys Condens Matter 2008;20(20):204153.
11. Ketaki K, Dipak V, Deshmukh M. Isolation of genomic DNA from *Escherichia coli* K12 Strain by using iron oxide nanoparticles. J Pharm Biol Sci 2015;10(3):49-52.
12. McBain SC, Yiu HHP, EI Haj A, et al. Polyethyleneimine functionalized iron oxide nanoparticles as agents for DNA delivery and transfection. J Mater Chem 2007;17(24):2561-2565.
13. Chen XW, Mao QX, Liu JW, et al. Isolation/separation of plasmid DNA using hemoglobin modified magnetic nanocomposites as solid-phase adsorbent. Talanta 2012;100:107-112.
14. Maye MM, Nykypanchuk D, Van Der Lelie D, et al. A simple method for kinetic control of DNA-induced nanoparticle assembly. J Am Chem Soc 2006;128(43):14020-14021.
15. Oliveira CF, Paim TG, Reiter KC, et al. Evaluation of four different DNA extraction methods in coagulase-negative staphylococci clinical isolates. Rev Inst Med Trop Sao Paulo 2014;56(1):29-33.
16. Chen L, Zhang J. Bioconjugated magnetic nanoparticles for rapid capture of gram-positive bacteria. J Biosens Bioelectron 2012;S11:1-5.
17. Rahnama H, Sattarzadeh A, Kazemi F, et al. Comparative study of three magnetic nano-particles (FeSO4, FeSO4/SiO2, FeSO4/SiO2/TiO2) in plasmid DNA extraction. Anal Biochem 2016;513:68-76.
18. Wecke J, Lahav M, Ginsburg I, et al. Cell wall degradation of *Staphylococcus aureus* by lysozyme. Arch Microbiol 1982;131(2):116-123.
19. Chakraborti S, Chatterjee T, Joshi P, et al. Langmuir 2010;26(5):3506-3513.
20. Xu Z, Liu XW, Ma YS, et al. Interaction of nano-TiO 2 with lysozyme: insights into the enzyme toxicity of nanosized particles. Environ Sci Pollut Res Int 2010;17(3):798-806.
21. Koc K, Alveroglu E. Adsorption and desorption studies of lysozyme by Fe3O4–polymer nanocomposite via fluorescence spectroscopy. J Mol Struct 2015;1089(2015):66-72.
22. Mardaneh J, Mohammadzadeh AR, Masomian Z. Polyethylene Glycol 200; a rapid and inexpensive method for DNA extraction from gram positive and gram negative bacteria. Q Horizon Med Sci 2015;21:7-11.
23. Mirnejad R, Babavalian H, Moosazadeh Moghadam M, et al. Rapid DNA extraction of bacterial genome using laundry detergents and assessment of the efficiency of DNA in downstream process using polymerase chain reaction. Afr J Biothecnol 2012;11(1):173-178.

AUMJ Alborz University of Medical Sciences Journal

Alborz University of Medical Sciences Journal, January 2023, Vol. 12, No. 1: 42-48 *Original Article*

Hadiseh Rostami [1], Farzaneh Firoozeh [2,3*], Mohammad Zibaei [3,4], Iman Salahshoorifar [5], Ali Sobhani-Nasab [6], Vajihe Sadat Nilkbin [7]

[1] MSc, Department of Biology, Faculty of Basic Sciences, Islamic Azad University, Science and Research Branch, Tehran, Iran

[2] Associate Professor, Department of Microbiology, School of Medicine, Alborz University of Medical Sciences, Karaj, Iran

[3] Research Center for Herbal Medicine and Complementary Medicine, Alborz University of Medical Sciences, Karaj, Iran

[4] Professor, Department of Parasitology and Mycology, School of Medicine, Alborz University of Medical Sciences, Karaj, Iran

[5] Assistant Professor, Department of Genetic, Faculty of Basic Sciences, Islamic Azad University, Science and Research Branch, Tehran, Iran

[6] Assistant Professor, Physiology Research Center, Basic Sciences Research Institute, Kashan University of Medical Sciences, Kashan, Iran

[7] PhD, Department of Bacteriology, Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran

***Corresponding Author:**

Associate Professor, Department of Microbiology, School of Medicine, Alborz University of Medical Sciences, Karaj, Iran.

Tel: 02632563318

E-mail: firoozeh823@gmail.com

Survey of Two Methods Including Phenol-Chloroform and Application of Magnetic Nanoparticles for Genomic DNA Extraction of Staphylococcus *aureus*

Received: 6 Apr 2022 ; Accepted: 20 Aug 2022

Abstract

Background and Aim: Isolation of genomic DNA from bacterial cells is one of the processes typically performed in most biological laboratories and there are different methods to do it. In this study, two methods including phenol-chloroform, and magnetic nanoparticles, were used to extract genomic DNA of *Staphylococcus aureus*.

Materials and Methods: In the present study, the standard strain of *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 was used for extraction of genomic DNA by phenol-chloroform and magnetic nanoparticles methods. Nanodrop and electrophoresis on agarose gel were used to evaluate the quality and concentration of extracted DNA.

Results: The concentration of extracted DNA by phenol-chloroform and magnetic nanoparticle) SiO2/Fe3O4) methods were obtained 550.4 and 131.6 µg/ml respectively.

Conclusion: From the findings of this study it can be concluded that due to the thick wall of *Staphylococcus aureus*, genomic DNA extraction by magnetic nanoparticles (Fe3O4/SiO2) have acceptable concentration and purity for molecular processes such as PCR, and can be used as an alternative to other extraction methods.

Keywords: Staphylococcus aureus, DNA extraction, Magnetic nanoparticles, Phenol-chloroform, Bacterial genome