

بررسی مقایسه‌ای اسید نوکلئیک استخراج شده از باکتری *اشریشیا کلای* با دو روش استخراج با فنل-کلروفرم و تکنیک استفاده از نانو ذرات مغناطیسی

آلا امیری^۱، فرزانه فیروزه^{۲*}، محمد زیبایی^۳، ایمان سلحشوری^۴

^۱ کارشناسی ارشد زیست فناوری میکروبی، 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 گیاه‌درمانی و طب مکمل مبتنی بر شواهد، دانشگاه علوم پزشکی البرز، کرج، ایران

^۴ استاد، گروه انگل‌شناسی و قارچ‌شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی البرز، کرج، ایران
^۵ گروه ژنتیک دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم تحقیقات، تهران، ایران

چکیده

تاریخ دریافت مقاله: ۹۸/۶/۱۹؛ تاریخ پذیرش: ۹۸/۹/۱۸

مقدمه: از موضوعات مهم پژوهش‌ها در زمینه‌های مولکولی و مهندسی ژنتیک، استفاده از روش‌های بهینه در استخراج محتوای ژنومی میکروارگانیسم‌ها و سلول‌ها است که با استفاده از آن بتوان با صرف کمترین زمان و هزینه، به بیشترین مقدار و مناسب‌ترین خلوص دست‌یافت. روش‌های متعددی در راستای استخراج DNA باکتری‌ها وجود دارد که از روش‌های نوین جداسازی اسید نوکلئیک می‌توان به استفاده از نانو ذرات مغناطیسی اشاره نمود. هدف از این مطالعه، مقایسه دو روش استخراج DNA از باکتری *اشریشیا کلای* با دو تکنیک فنل - کلروفرم و استفاده از نانو ذرات مغناطیسی است.

روش بررسی: در این مطالعه از باکتری *اشریشیا کلای* سویه ATCC25922 جهت مقایسه دو روش استخراج DNA ژنومی استفاده گردید. جهت استخراج DNA ژنومی از روش فنل-کلروفرم و نیز تکنیک استفاده از نانو ذرات مغناطیسی با بکارگیری نانوذره دولایه SiO₂/Fe₃O₄ استفاده گردید. هر دو محصول به‌دست‌آمده جهت سنجش جذب نوری با دستگاه نانودرآپ قرائت و سپس از طریق روش الکتروفورز روی ژل آگارز بررسی گردیدند.

نتایج: در بررسی میزان جذب نوری با استفاده از دستگاه نانودرآپ میزان غلظت DNA استخراج‌شده با روش فنل - کلروفرم ۷۶۱/۴ میکروگرم بر میلی‌لیتر و با استفاده از تکنیک استخراج با نانو ذرات مغناطیسی ۵۳۱ میکروگرم بر میلی‌لیتر به دست آمد.

نتیجه‌گیری: با توجه به نتایج به‌دست‌آمده و با مقایسه جذب‌های نوری دو محصول و نیز ارزیابی مقایسه‌ای با گروه‌های کنترل در استخراج به روش نانو ذرات مغناطیسی و نیز با مقایسه فاکتورهای مختلفی نظیر میزان زمان موردنیاز، هزینه‌ها، کاربری آسان می‌توان نتیجه گرفت که به دلیل زمانبر و خطرآفرین بودن روش فنل - کلروفرم، روش استفاده از نانو ذرات مغناطیسی یک روش مناسب برای استخراج محتوی ژنومی است.

کلمات کلیدی: استخراج DNA، فنل - کلروفرم، نانو ذرات، *اشریشیا کلای*

نویسنده مسئول:

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

۰۲۶-۳۲۵۶۳۳۱۸

E-mail: firoozeh823@gmail.com

مقدمه

استخراج اسید نوکلئیک یکی از ابتدایی‌ترین و ضروری‌ترین گام‌های مطالعات مولکولی است که کاربردهای فراوانی در تشخیص بیماری‌ها و ارگانسیم‌ها، طبقه‌بندی ارگانسیم‌ها، ویرایش ژنتیکی و حتی درمان دارد.^۱ از زمان کشف DNA تاکنون، روش‌های مختلفی برای استحصال محتوای ژنومی ارگانسیم‌ها ابداع و استفاده‌شده و به‌مرور زمان دچار تغییراتی در راستای بهینه‌سازی در زمان استخراج، کیفیت و مقدار DNA استخراجی و نیز کاهش آلودگی این روش‌ها گردیده است.^۲ کیفیت خلوص DNA و عدم آلودگی به پروتئین‌ها و پلی ساکاریدها بسیار بااهمیت است، به دلیل آنکه آلودگی به مواد مذکور، به‌عنوان مهارکننده در آزمایش واکنش زنجیره پلی مرز (PCR) (Polymerase chain reaction) ایفای نقش نموده و مانع از عملکرد درست آنزیم‌های دخیل در PCR می‌شوند.^۳ برخی از روش‌های استخراج DNA باکتریایی بر پایه استفاده از محلول‌های مختلف (نظیر فنل-کلروفرم)، استفاده از حرارت، استفاده از سانتریفیوژ و نیز استفاده از کیت‌های استخراج مبتنی بر دستورالعمل شرکت سازنده کیت است.^۴ برخی از روش‌های یادشده، نیازمند مدت‌زمان قابل توجهی برای استخراج می‌باشند و در برخی دیگر از آن‌ها، استفاده از مواد و محلول‌های سمی می‌تواند پروسه استخراج DNA را برای سلامتی افراد، خطرناک جلوه دهد.^۵ از محبوب‌ترین و رایج‌ترین روش‌های استخراج می‌توان استفاده از روش دستی فنل-کلروفرم و کیت‌های آماده را نام برد.

کیت‌های موجود باوجوداینکه از نظر زمانی و وجود مواد سمی بهینه‌سازی شده و در هر دو مورد کاهش را داشته‌اند؛ اما محدودیت‌هایی نیز داشته و اکثر آن‌ها گران‌قیمت بوده و پروژه‌های تحقیقاتی و تشخیصی را بسیار هزینه‌بر می‌نمایند.

روش فنل-کلروفرم نیز باوجود کم‌هزینه‌تر بودن و بازده قابل قبول در کیفیت و خلوص DNA استخراج‌شده، معایبی چون سمی و سرطان‌زا بودن آن دارد و نیز نیاز به مدت‌زمان طولانی برای استخراج، نیاز به تکنسین مجرب و بالا بودن احتمال آلودگی به دلیل دستی بودن این روش را می‌توان از سایر معایب آن برشمرد.^۶ مواد دیگری برای استخراج DNA بر پایه فاز جامد وجود دارند که از آن‌ها می‌توان به سیلیکا، نانوتیوب‌های کربنی و نانو ذرات

مغناطیسی و سایر روش‌ها اشاره کرد.^۷ در این میان استفاده از مواد ذرات مغناطیسی در مقیاس نانو، به جهت مزایای قابل‌تأمل آن‌ها در امر استحصال DNA از باکتری‌ها، توجهات بسیاری را در دهه اخیر به خود جلب نموده است.^{۸،۹} ازجمله مزیت‌های این روش نسبت به روش‌های مرسوم می‌توان به کاربری آسان، مقرون‌به‌صرفه بودن، نیاز به مدت‌زمانی کمتر، محدود نمودن استفاده از مواد شیمیایی و پایین بودن احتمال آسیب و آلودگی DNA را برشمرد که می‌تواند به‌منظور استخراج کارآمدتر، توسط محققین به خدمت گرفته شود.^{۱۰}

در مطالعه حاضر به مقایسه دو روش استفاده از فنل-کلروفرم و نانو ذرات مغناطیسی برای استخراج DNA پرداخته و جنبه‌های مثبت و منفی هر یک بررسی گردیده است.

مواد و روش‌ها

در این مطالعه از باکتری *اشریشیا کلای* سویه استاندارد ۲۵۹۲۲ ATCC خریداری‌شده از انستیتو پاستور ایران جهت استخراج DNA استفاده گردید.

روش کار استخراج DNA ژنومی باکتری *اشریشیا کلای* با استفاده از فنل - کلروفرم

جهت استخراج DNA با استفاده از روش فنل-کلروفرم، ابتدا از کشت ۱۶ ساعته باکتری *اشریشیا کلای* سویه استاندارد ۲۵۹۲۲ ATCC در محیط (Merck, Germany) (TSB (Tryptic soy broth)، ۲ میلی‌لیتر برداشته و به مدت ۱۰ دقیقه در دور ۱۰۰۰۰ سانتریفیوژ گردید. مایع رویی دور ریخته شده و به رسوب آن ۶۰۰ میکرولیتر از بافر لیز (۱ مولار NaCl، ۱۰ مولار Tris-HCl، ۰/۵ مولار EDTA) اضافه گردید. ۳ میکرولیتر آنزیم پروتیناز K (Qiagen, Germany) و سپس ۱۳ میکرولیتر از محلول SDS (سدیم دو دسیل سولفات) ۲۵٪ اضافه گردید. به مدت‌زمان ۱ ساعت در دمای ۵۵ درجه در بن ماری انکوبه گردید. پس از آنکوباسیون ۶۰۰ میکرولیتر از مخلوط فنل-کلروفرم و ایزو آمیل الکل با نسبت ۲۵:۲۴:۱ به آن اضافه شد و ۱۰ دقیقه با دور ۱۰۰۰۰ سانتریفیوژ گردید. فاز رویی جداشده و بر روی رسوب آن ۱۰۰۰ میکرولیتر اتانول مطلق ریخته شد. پس از

افزودن ۲۰۰ ماکرولیتر الکل ۷۰٪ و سانتریفیوژ به مدت ۱۰ دقیقه با دور ۱۰۰۰۰ مایع رویی دور ریخته شده و رسوب در دمای اتاق خشک گردید. برای شست و شوی نهایی از ۵۰ ماکرولیتر بافر TE استفاده و جذب نوری یا OD (Optical Density) نمونه استخراجی از باکتری /شریشیا کلای سویه استاندارد ATCC ۲۵۹۲۲ به منظور سنجش میزان و کیفیت اسید نوکلئیک استحصال شده با دستگاه نانودرآپ (Boeco N_1C, Germany) قرائت شد. همچنین DNA محصول پس از الکتروفورز روی ژل آگاروز (شرکت ژن فناوران) ۱/۵ درصد مورد بررسی قرار گرفت.^{۱۲}

افزودن ۲۰۰ ماکرولیتر الکل ۷۰٪ و سانتریفیوژ به مدت ۱۰ دقیقه با دور ۱۰۰۰۰ مایع رویی دور ریخته شده و رسوب در دمای اتاق خشک گردید. برای شست و شوی نهایی از ۵۰ ماکرولیتر بافر TE استفاده و جذب نوری یا OD (Optical Density) نمونه استخراجی از باکتری /شریشیا کلای سویه استاندارد ATCC ۲۵۹۲۲ به منظور سنجش میزان و کیفیت اسید نوکلئیک استحصال شده با دستگاه نانودرآپ (Boeco N_1C, Germany) قرائت شد. همچنین DNA محصول پس از الکتروفورز روی ژل آگاروز (شرکت ژن فناوران) ۱/۵ درصد مورد بررسی قرار گرفت.^{۱۲}

استخراج DNA ژنومی از باکتری /شریشیا کلای با استفاده از نانوپار تیکل های مغناطیسی

جهت استخراج DNA با استفاده از نانو ذرات مغناطیسی ابتدا از کشت ۱۶ ساعته باکتری /شریشیا کلای سویه استاندارد ATCC ۲۵۹۲۲ در محیط TSB (Merck, Germany) ۳ میلی لیتر برداشته شده و به مدت زمان ۵ دقیقه با دور ۱۰۰۰۰ سانتریفیوژ گردید. به رسوب باقیمانده ۶۰۰ ماکرولیتر بافر لیز (۱ مولار NaCl، ۱ مولار Tris-HCl، ۰/۵ مولار EDTA) اضافه گردید. پس از آن ۳ ماکرولیتر پروتئیناز K و ۱۳ ماکرولیتر SDS ۲۵٪ به آن اضافه شده و به مدت ۱ ساعت در دمای ۵۵ درجه انکوبه گردید. سپس در دور ۱۰۰۰۰ و به مدت زمان ۱۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتریفیوژ شد. به مایع رویی ۲۰۰ ماکرولیتر بافر بایندینگ (۱/۲۵ میلی مولار NaCl و پودر پلی اتیلن گلیکول ۸۰٪ و آب) اضافه گردید. به ازای هر میلی لیتر از بافر بایندینگ ۰/۲ میلی گرم نانوذره دولایه SiO₂/Fe₃O₄

یافته ها

یافته های به دست آمده از قرائت جذب نوری اسید نوکلئیک استخراج شده به هر دو روش به تفکیک نشان داد که میزان غلظت DNA به دست آمده با روش فنل-کلورفرم ۱/۴ μg/ml بوده و غلظت DNA استخراج شده با روش نانو ذرات مغناطیسی ۱/۷ μg/ml است (جدول ۱).

نتایج بررسی DNA حاصل از دو روش استخراج پس از الکتروفورز روی ژل آگاروز ۱/۵ درصد در شکل ۱ آمده است.

جدول ۱: غلظت و کیفیت DNA استخراج شده با دو روش فنل-کلورفرم و استخراج با استفاده از نانو ذرات مغناطیسی در باکتری /شریشیا

کلای سویه استاندارد ATCC ۲۵۹۲۲

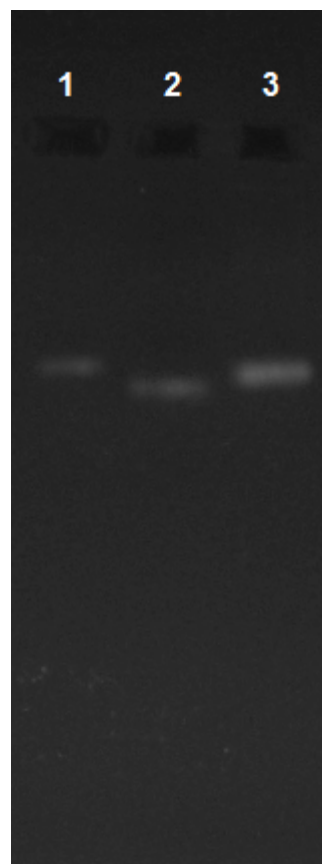
260/280	جذب در (280 nm)	جذب (260 nm)	غلظت DNA (μg/ml)	روش استخراج DNA
۱/۸	۸	۱۵	۷۶۱/۴	فنل-کلورفرم
۱/۷	۷	۱۲	۵۳۱	نانو ذرات مغناطیسی

پذیرفت نیز، با صرف زمان و هزینه اندکی نسبت به دیگر روش‌های مرسوم، استخراج DNA از باکتری‌های *اشریشیا کلای* و *استافیلوکوکوس اورئوس* با روش استفاده از ذرات مغناطیسی به‌آسانی انجام و با بهبود ذرات مذکور، با استفاده از پوشش ژلاتینی کمیت و کیفیت محصول به‌دست‌آمده افزایش یافت.^{۱۶}

مطالعه Min و همکاران نشان داد که با استفاده از نانو ذرات مغناطیسی که با ماده دی مرکاپتو سوکسینیک اسید پوشانیده شده‌اند، می‌توان مولکول‌های DNA را به میزان قابل قبول و کارآمدی از نمونه‌های خام بیولوژیکی استخراج نمود. در پژوهش مذکور نیز به‌مانند مطالعه حاضر، تأکید بر ساده و سریع بودن استفاده از نانو ذرات نانو مغناطیسی داشته، همچنین پوشش دار نمودن ذرات نانو مغناطیسی با برخی مواد مانند سوکسینیک اسید را عامل افزایش میل به اتصال و افزایش بهره‌وری در استخراج متذکر می‌شود.^{۱۷}

در سال ۲۰۱۱، Shan و همکاران طی مطالعه‌ای به استخراج DNA از نمونه‌های ادرار انسانی پرداختند که طی آن، از نانو ذرات مغناطیسی کربوکسیله شده برای این منظور استفاده نمودند. همچنین از ماده EDTA و تنظیم اسیدیته (pH) برای افزایش کارایی استخراج استفاده گردید. در این مطالعه بر سازگاری زیستی، حساسیت، سریع و آسان بودن روش استفاده از نانو ذرات مغناطیسی تأکید شد که در تأیید پژوهش حاضر است.^{۱۱}

نتایج بررسی الکتروفورز بر روی ژل آگارز نشان‌دهنده خلوص مناسب DNA در هر دو روش استخراج است اگرچه این میزان در روش فنل-کلروفرم بالاتر است. همچنین غلظت DNA به‌دست‌آمده با روش فنل-کلروفرم بالاتر از روش استفاده از نانو ذرات مغناطیسی بود، اگرچه غلظت DNA حاصل از نانو ذرات مغناطیسی نیز مناسب بوده و نسبت به بسیاری از روش‌های استخراج DNA مانند کیت‌های تجاری مناسب و قابل قبول است. در مطالعه انجام‌شده توسط شهبازی و همکاران میزان غلظت و خلوص DNA استخراج‌شده از باکتری‌ها با استفاده از ۴ روش کیت تجاری، فنل-کلروفرم، جوشاندن و پودر رختشویی مورد مقایسه قرار گرفت و بالاترین غلظت استخراجی DNA به ترتیب مربوط به روش‌های کیت تجاری و فنل-کلروفرم بودند، که در مقایسه با مطالعه حاضر غلظت و خلوص پایین‌تری داشتند.^{۱۸}



شکل ۱: تصویر ژل الکتروفورز، ستون‌های شماره ۱ و ۲ نمونه DNAهای استخراج‌شده توسط ذرات مغناطیسی Fe_3O_4/SiO_2 و نمونه شماره ۳، DNA استخراج‌شده با روش فنل-کلروفرم

بحث

در مطالعه حاضر، استخراج DNA از باکتری *اشریشیا کلای* با دو تکنیک فنل-کلروفرم و استفاده از نانوذرات مغناطیسی مورد مقایسه قرار گرفته است. در ایده آل‌ترین شرایط پروتکل جداسازی DNA بایستی در زمان کوتاه، به‌سادگی و با استفاده از مواد ایمن منجر به دستیابی به DNA کارآمد به غلظت کافی و کیفیت مناسب جهت کاربرد در مطالعات و آنالیزهای مولکولی باشد.^{۱۴} پژوهش حاضر به‌مانند مطالعه Ketaki و همکاران، نشان داد که با استفاده از نانوذرات مغناطیسی می‌توان در زمان کوتاه‌تری نسبت به بقیه روش‌های رایجی نظیر استخراج DNA با روش فنل-کلروفرم، به DNA-مطلوبی از نظر کمیت و خلوص دست‌یافت.^{۱۵}

در مطالعه Intorasoot و همکاران که در سال ۲۰۰۹ صورت

مطلوب استخراج کرد. همچنین می‌توان با دستکاری و بهینه‌سازی نانوذره‌های مختلف مغناطیسی در راستای افزایش کارایی این ذرات در استخراج DNA باکتری‌ها و دیگر ارگانسیم‌ها، گام برداشت.

نتیجه‌گیری

روش استخراج DNA ژنومی با نانو ذرات مغناطیسی SiO₂/Fe₃O₄ در مقایسه با روش‌های مرسوم، روشی سریع و آسان است و این امکان را فراهم می‌آورد تا محصول DNA باکیفیتی

References

- Vesty A, Biswas k, Taylor M, et al. Evaluating the impact of DNA extraction method on the representation of human oral bacterial and fungal communities. *PloS One*. 2017; 12(1):e0169877.
- Shahbazi B, Narenji H. Comparison of four methods of DNA extraction from gram-negative and gram-positive bacteria. *Zanko J Med Sci*. 2014;15(45):9-16.
- Abdel-Latif A, Osman G. Comparison of three genomic DNA extraction methods to obtain high DNA quality from maize. *Plant Methods*. 2017;13(1):1-9.
- Wilson K. Preparation of genomic DNA from bacteria. *Curr Protoc Mol Biol*. 2001;56(1):2-4.
- Mayta H, Romero Y, Pando A, et al. Improved DNA extraction technique from clot for the diagnosis of Chagas disease. *PLoS Negl Trop Dis*. 2019;13(1): e0007024.
- Sambrook J, Russell DW. Purification of nucleic acids by extraction with phenol: chloroform. *C S H Protoc*. 2006;2006(1). pii: pdb.prot4455.
- Rohland N, Hofreiter M. Comparison and optimization of ancient DNA extraction. *Biotechniques*. 2007;42(3):343-52.
- Danthanarayana AN, Manatunga DC, De Silva RM, et al. Magnetofection and isolation of DNA using polyethyleneimine functionalized magnetic iron oxide nanoparticles. *R Soc Open Sci*. 2018 12;5(12):181369.
- Wierucka M, Biziuk M. Application of magnetic nanoparticles for magnetic solid-phase extraction in preparing biological, environmental and food samples. *TrAC Trend Anal Chem*. 2014 1;59:50-8
- Shahabadi N, Jamshidbeigi M, Falsafi M. Functionalization of Fe₃O₄@ SiO₂ magnetic nanoparticles with nicotinamide and in vitro DNA interaction. *J Mol Liq*. 2016;224:227-33.
- Shan Z, Zhou Z, Chen H, et al. PCR-ready human DNA extraction from urine samples using magnetic nanoparticles. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*. 2019;1128:121777.
- Wright MH, Adelskov J, Greene AC. Bacterial DNA extraction using individual enzymes and phenol/chloroform separation. *J Microbiol Biol Educ*. 2017;18(2). pii: 18.2.48.
- Rahnama H, Sattarzadeh A, Kazemi F, et al. Dataset of plasmid DNA extraction using different magnetic nanoparticles (MNPs). *Data Brief*. 2016;9: 807-11.
- Pipan B, Zupančič M, Blatnik E. Comparison of six genomic DNA extraction methods for molecular downstream applications of apple tree (*Malus X domestica*). *Cogent Food Agric*. 2018; 4: 1540094.
- Ketaki K, Dipak V, Deshmukh M. Isolation of genomic DNA from *Escherichia coli* K12 Strain by using iron oxide nanoparticles. *J Pharma Bio Sci*. 2015;10(3):49-52.
- 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):291-2.
- Min JH, Woo MK, Yoon HY, et al. Isolation of DNA using magnetic nanoparticles coated with dimercaptosuccinic acid. *Anal Biochem*. 2014;447:114-8.
- Shahbazi B, Narenji H. Comparison of four methods of DNA extraction from gram-negative and gram-positive bacteria. *Zanko J Med Sci*. 2014; 15 (45) :9-16.

Ala Amiri¹, Farzaneh Firoozeh^{2,3}, Mohammad Zibaei^{3,4}, Iman Salahshoorifar⁵

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

² 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 Department of Parasitology and Mycology, School of Medicine, Alborz University of Medical Sciences, Karaj, Iran

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

Comparative Study of Extracted Nucleic Acid from *Escherichia coli* by Two Methods Phenol-chloroform and Extraction Using Magnetic Nanoparticle

Received: 10 Sept. 2019 ; Accepted: 9 Dec. 2019

Abstract

Background: The most important researches in molecular and genetic engineering fields are the finding of optimal methods for extraction of the genomic content of microorganisms and cells using them, can achieve the most amount and purity with the least time and cost. There are several methods for the extraction of bacterial DNA and the use of magnetic nanoparticles is one of the novel methods of nucleic acid isolation. The aim of this study is to compare DNA extracted from *Escherichia coli* using two techniques including phenol-chloroform and magnetic nanoparticles.

Methods: In this study, *Escherichia coli* strain ATCC25922 was used to compare the two extraction methods. For genomic DNA extraction the phenol-chloroform methods as well as the technique of using bilayer SiO₂/Fe₃O₄ magnetic nanoparticles were used. Both products were analyzed by nanodrop and following agarose gel electrophoresis.

Results: The results of optical density (OD) evaluation with nanodrop spectrophotometer showed that the concentration of extracted DNA with conventional phenol-chloroform method and magnetic nanoparticle extraction technique were 761.4 µg/ml and 531 µg/ml respectively.

Conclusion: According to the obtained results by comparing the optical absorption of the two products and comparative evaluation with control groups in magnetic nanoparticle extraction method, also by comparing different factors such as the amount of time required, costs, ease of use, it can be concluded that due to the time-consuming and dangerous nature of the phenol-chloroform method, the using magnetic nanoparticles is an appropriated method for extracting the genomic content.

Keywords: DNA extraction, Phenol-chloroform, Nanoparticles, *Escherichia coli*

*Corresponding Author:
Department of Microbiology,
Faculty of Medicine, Alborz
University of Medical
Sciences, Karaj, Iran

Tel: 026-32563318
E-mail: firoozeh823@gmail.com