Downloaded from tjpm.mazums.ac.ir at 5:07 +0330 on Sunday September 24th 2017

Tabari Journal of Preventive Medicine

31 Volume 2, Issue 1, Spring 2016

Original Article

Bacterial DNA Extraction Using Silica Gel: A New Method with High Quality and Simplicity

Samane Saeedi[1], Ali Nazemi[2*], Mustafa Jafarpour[2]

1. MSc Student, Department of Biology, Islamic Azad University of Tonekabon Branch, Tonekabon, Iran
2. Assistant Professor, Department of Biology, Islamic Azad University of Tonekabon Branch, Tonekabon, Iran

Corresponding Author: Ali Nazemi, Department of Biology, Islamic Azad University, Tonekabon Branch, Tonekabon, Iran

Email: alinazemy@yahoo.com

Received: 3 December 2015
Revised: 24 February 2016
Accepted: 30 April 2016

ABSTRACT

Background & Objectives: Today, major progress has been made in molecular experiments. The first step towards improving these experiments is the accurate extraction of nucleic acid. In this study, a protocol for DNA extraction was proposed in accordance with silica gel method. DNA purification, developed based on the silica-gel-membrane technology, is a simple method, which involves three stages of binding, rinsing, and recycling. Nucleic acids, unlike polysaccharides and proteins, are absorbed by silica gel in the presence of chaotropic agents and are removed through rinsing. Following the stage of rinsing, purified nucleic acids are extracted from silica gel through rinsing with buffer or distilled water. Accordingly, the aim of the present study was to introduce a simple, high-quality DNA extraction method.
Materials and Methods: In this study, eight bacterial samples, including three Gram-positive and five Gram-negative bacteria, were evaluated. DNA extraction of all specimens was performed, using dissolved silica gel. Optical density was measured by a spectrophotometer. Moreover, the quality of the samples was assessed through Agarose gel electrophoresis. The mean absorbance at 260/280 nm was estimated at 1.92. Also, electrophoresis of PCR products was performed on 1.5% Agarose gel.
Results: The mean DNA absorbance at 260/280 nm in Gram-negative and Gram-positive DNAs, extracted from whole blood cells, was 1 and 1.25, respectively. Based on the findings, Agarose gel electrophoresis of PCR products was shown to have good quality.
Conclusion: According to the results of the present study, the proposed method showed higher efficacy for Gram-negative bacteria, compared to Gram-positive bacteria. Overall, gel silica method is recognized as a simple, cost-effective, and high-quality method. However, this method has several shortcomings, which can be resolved through increasing the assay time, improving the rinsing frequency, and altering the time of enzyme efficacy.

Keywords: Bacterial DNA extraction, Silica gel

▶ **Citation**: Saeedi S, Nazemi A, Jafarpour M. Bacterial DNA Extraction Using Silica Gel: A New Method with High Quality and Simplicity. Tabari J Prev Med. Spring 2016; 2(1):31-37.

Downloaded from tjpm.mazums.ac.ir at 5:07 +0330 on Sunday September 24th 2017

مقاله پژوهشی

بهینه‌سازی استخراج DNA ژنومی باکتریایی به روش سیلیکاژل

سمانه سعیدی[۱]، علی ناظمی[۲*]، مصطفی جعفرپور[۲]

چکیده

سابقه و هدف: در عصر حاضر، آزمایشات مولکولی گسترش بسیاری پیدا نموده است. اولین گام در موفقیت این آزمایشات استخراج صحیح اسید نوکلئیک می‌باشد. در این مطالعه، دستور کاری برای استخراج DNA براساس سلیکا ارائه گردیده است. خالص‌سازی DNA براساس تکنولوژی غشاء سیلیکاژل یک روش ساده و شامل سه مرحله اتصال، شستشو و بازیابی می‌باشد. اسیدهای نوکلئیک برخلاف پلی‌ساکاریدها و پروتئین‌ها، در حضور نمک‌های کائوتروپیک (Ciportoahc) جذب سلیکا می‌شوند و با شستشو حذف می‌گردند. پس از مرحله شستشو، اسیدهای نوکلئیک خالص‌سازی شده، به‌وسیله شستشو با بافر یا آب مقطر از سیلیکا جدا و بازیابی می‌گردند؛ بنابراین هدف از این مطالعه معرفی یک روش استخراج DNA با کیفیت بالا و ساده است.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه ۸ نمونه باکتری شامل ۳ باکتری گرم مثبت و ۵ باکتری گرم منفی مورد بررسی قرار گرفت. استخراج DNA تمام نمونه‌ها براساس سلیکا محلول انجام گردید. مقدار چگالی نوری (DO) آن‌ها با استفاده دستگاه بایوفتومتر سنجیده شده و برای تعیین کیفیت هر نمونه پس از استخراج، نمونه‌ها بر روی ژل آگارز برده شدند. جذب نوری در mn ۲۸۰/۲۶۰ به‌طور میانگین ۱/۲۹ بوده و الکتروفورز از محصولات PCR بر روی ژل آگارز ۱/۵ درصد انجام گردید.

یافته‌ها: متوسط جذب DNA در mn ۲۶۰/۲۸۰ از DNA باکتری های گرم منفی و باکتری‌های گرم مثبت استخراج شده از سلول های خونی، به ترتیب ۱ و ۱/۲۵ بود. براساس نتایج به دست آمده الکتروفورز ژل آگارز از محصولات PCR بهره وری بالایی داشت.

نتیجه‌گیری: نتایج مطالعه حاضر نشان داد که این روش کاری برای باکتری‌های گرم منفی در مقایسه با باکتری‌های گرم مثبت بهره‌وری بیشتری دارد و روش ژل سیلیکا محلول یک روش ساده، ارزان و با کیفیت مناسب می‌باشد. با این حال این روش معایبی دارد که با تغییر در روش کار مانند: افزایش زمان، دفعات شستشو و تغییر در زمان اثردهی آنزیم‌ها و ... می‌توان کیفیت آن را افزایش داد.

واژه‌های کلیدی: سلیکا ژل، استخراج DNA باکتریایی

۱. دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه زیست‌شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تنکابن، تنکابن، ایران
۲. استادیار، گروه زیست‌شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تنکابن، تنکابن، ایران

نویسنده مسئول: علی ناظمی، گروه زیست‌شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تنکابن، تنکابن، ایران

پست الکترونیک:
alinazemy@yahoo.com

دریافت: ۱۳۹۴/۹/۱۲
اصلاحیه: ۱۳۹۴/۱۲/۵
ویراستاری: ۱۳۹۴/۱۲/۱۱

◄ **استناد:** سعیدی، سمانه؛ ناظمی، علی؛ جعفرپور، مصطفی. بهینه‌سازی استخراج DNA ژنومی باکتریایی به روش سیلیکاژل. مجله طب پیشگیری طبری، بهار ۱۳۹۵؛۲(۱):۳۷-۳۱.

Downloaded from tjpm.mazums.ac.ir at 5:07 +0330 on Sunday September 24th 2017

مقدمه

امروزه آزمایشات مولکولی گسترش بسیاری پیدا نموده است. اولین گام در موفقیت این آزمایش‌ها استخراج صحیح اسید نوکلئیک می‌باشد. استخراج ژنوم از موجودات زنده اولین مرحله‌ی آزمایشات مولکولی در تحقیقات ژنتیکی مانند: هضم آنزیمی، طبقه‌بندی، تشخیص بیماری‌ها و عوامل عفونی بوجود آورنده آن‌ها است (۱،۲). انتخاب شیوه مناسب و مطمئن، عدم حضور عوامل شیمیایی و فیزیکی که سبب تخریب ماکرومولکول‌های DNA می‌گردد و به‌دست آوردن محصول اسید نوکلئیک با کیفیت و کمیت بالا و با قابلیت نگهداری برای مدت طولانی ضروری می‌باشد(۵-۳). روش‌های فراوانی برای استخراج ژنوم توسط محققین ابداع شده که همواره در جهت بهبود کیفیت محصول، مقرون به صرفه بودن و صرفه‌جویی در زمان بوده است. به‌طور معمول استخراج ژنوم شامل سه مرحله کلی: لیز دیواره یا غشای سلول، حذف ناخالصی‌های پروتئینی و کربوهیدراتی و بازیابی DNA خالص می‌باشد.

یکی از معمول‌ترین روش‌ها برای خالص‌سازی DNA کروموزومی، پلاسمیدی و سلولی، جذب DNA به سیلیس تحت تأثیر نمک کائوتروپیک است که امروزه اساس اکثر کیت‌های استخراج اسید نوکلئیک می‌باشد.

اساس عملکرد استخراج بر پایه سلیکا ژل به‌علت میل بالای DNA با بار منفی برای اتصال به سلیکا با بار یونی مثبت در حضور نمک‌های کائوتروپیک (Chaotropic) می‌باشد. در استخراج به روش سلیکا از بافر حاوی نمک‌های کائوتروپیک مانند: گوانیدین تیوسیانات، گوانیدین هیدروکلراید و ... (۱۱-۶) با غلظت بالا استفاده می‌گردد که باعث شکست پیوندهای هیدروژنی، کوالانسی و بی آب شدن DNA و اتصال آن به سلیکا در شرایط یونی بالا ($pH \geq ۷$) می‌شود. سپس می‌توان مولکول DNA را توسط بافر شستشو که حاوی نمک با غلظت بالا و اتانول است، شستشو داده و در نهایت DNA خالص‌شده تحت شرایط یونی پایین ($pH \leq ۷$) توسط آب مقطر یا بافر شسته و از سلیکا جدا می‌گردد. در این مطالعه سعی شده است روشی آسان و کم‌هزینه با کیفیت بالا و مناسب جهت استخراج DNA ارائه گردد (۲،۹،۱۰،۱۲). به‌طور کلی دو شیوه استخراج DNA بر پایه‌ی سیلیکا وجود دارد: اولین روش استفاده از فاز جامد یا غشای سیلیکا می‌باشد که امروزه بسیار مرسوم بوده و اکثر کیت‌های تجاری براساس آن ساخته شده است (۱۳). روش دوم استفاده از پودر سیلیکا یا همان روش محلول می‌باشد که هر کدام معایب و مزایایی دارند. از معایب روش محلول، آلودگی پروتئینی و نیازمندی به آماده‌سازی سیلیکا را می‌نوان نام برد که در این مرحله به خاطر تأثیر پودر سیلیکا بر سیستم تنفسی باید مسائل ایمنی رعایت شود. استفاده از فاز جامد آسان، سریع، بدون مواد سمی و ارزان است و DNA خالص‌سازی شده کیفیت بالایی دارد.

مواد و روش ها

استخراج DNA باکتریایی

در این مطالعه جهت استخراج DNA باکتریایی از باکتری‌های گرم مثبت شامل: *E.coli, Bacillus cereus, Bacillus subtilis, Staphylococcus aureus, Proteus, Serratia, Salmonella, Klebsilla* استفاده شد. بعد از آماده‌سازی سلیکا (۳) جهت استخراج، ۳۰۰ µl DNA از کشت ۲۴ ساعته حاوی باکتری را به یک میکروتیوب منتقل نموده و پس از اضافه نمودن ۱۰ µl آنزیم لیزوزیم (به باکتری‌های گرم منفی) به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد قرار گرفت. سپس ۲۰۰ µl Binding buffer (۶ M گوانیدین هیدروکلراید، ۱۰ mM اوره، ۱۰ mM Tris-HCl، pH ۴/۴، ۲۰ درصد تریتون X-۱۰۰) افزوده شد (نقش لیز دیواره و اتصال اسید نوکلئیک به سیلیکا را دارد) و پس از اضافه نمودن ۱۰ µl پروتئیناز، به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۷۰ درجه سانتیگراد قرار گرفت. بعد از سپری شدن زمان انکوباسیون، ۱۰۰ µl ایزوپروپانول سرد به مجموعه اضافه گردید. سپس ۲۰۰ µl از سوپانسیون سلیکا (آماده شده) پس از ورتکس شدید به مجموعه افزوده شد و به مدت دو دقیقه ورتکس گردید. پس از سانتریفوژ نمودن با دور ۱۰۰۰۰ rpm به مدت دو دقیقه، محلول رویی دور ریخته شد و به رسوب حاصله بافر مهارکننده

Downloaded from tjpm.mazums.ac.ir at 5:07 +0330 on Sunday September 24th 2017

جدول ۱: پرایمرهای به‌کار رفته جهت انجام واکنش PCR

پرایمر	توالی نوکلئوتیدی(۳'→۵')	منبع
27F Forward	5'AGAGTTTGATCMTGGCTCAG3'	(14)
1492 R Reverse	5'TACGGYTACCTTGTTACGACTT3'	(14)

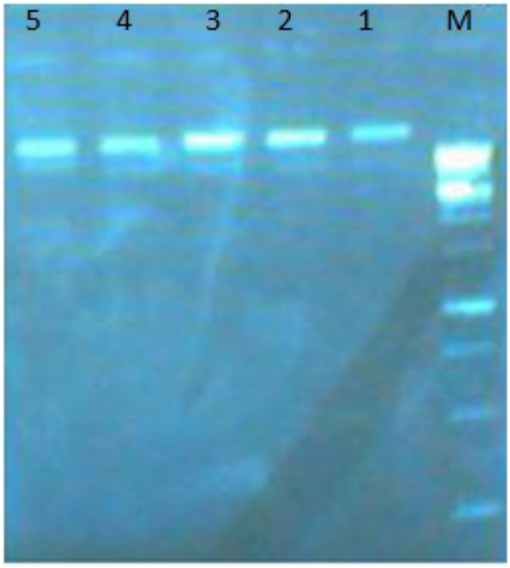
(۵ M گوانیدین هیدروکلراید، ۶/۶ mM Tris-HCL, pH: ۱۰، ۳۰ mL اتانول مطلق) اضافه و برای یک دقیقه ورتکس انجام شد. سپس به مدت یک دقیقه با دور ۱۰۰۰۰ rpm سانتریفوژ گردید. رسوبات سلیکای به‌دست آمده دوبار (هر بار با µl ۵۰۰ محلول شستشو یک دقیقه ورتکس، به مدت یک دقیقه سانتریفیوژ) شستشو داده شد. در ادامه میکروتیوپ‌ها به مدت دو دقیقه با دور ۱۴۰۰۰ rpm به‌منظور حذف باقی‌مانده بافر شستشو، سانتریفوژ و محلول باقی‌مانده به کمک سمپلر خارج شد و رسوب سلیکا در دمای ۶۵-۶۰ درجه سانتیگراد خشک گردید. پس از اضافه نمودن µl ۱۰۰ بافر TE به رسوب حاصله، به مدت ۵ دقیقه در دمای اتاق قرار گرفت و برای یک دقیقه ورتکس گردید و در نهایت به مدت یک دقیقه در ۱۰۰۰۰ rpm سانتریفوژ شد و فاز آبی که حاوی DNA بوده توسط سمپلر به میکروتیوپ جدید انتقال یافت و جهت استفاده در مراحل بعدی در دمای ۷۰- درجه سانتیگراد ذخیره گردید.

بررسی فرآیند استخراج

به‌منظور بررسی درجه خلوص DNA استخراج‌شده، جذب نوری براساس نسبت nm ۲۶۰/۲۸۰ و جذب نوری nm ۲۶۰/۲۳۰ مورد بررسی قرار گرفت. همچنین جهت ارزیابی کیفیت DNA استخراجی از نمونه‌ها، بر روی ژل آگارز ۰/۸ درصد الکتروفورز انجام شد.

تأیید کیفیت DNA استخراج‌شده باکتری‌های گرم منفی از طریق واکنش زنجیره پلیمراز

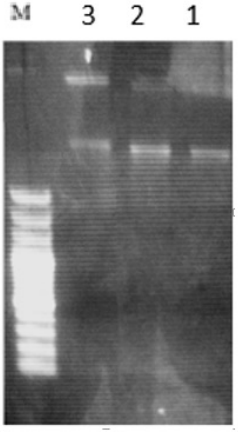
تأیید کیفیت DNA استخراج‌شده از طریق واکنش زنجیره پلیمراز (PCR) تحت شرایط زیر برای ژن ۱۶S انجام گردید. مخلوط واکنش PCR برای انجام یک واکنش با حجم µl ۲۵ به این شرح می‌باشد: با استفاده از سمپلر، µl ۱۲ مسترمیکس (فرمنتاز-۵X) در میکروتیوب ml ۰/۲ ریخته شد. سپس µl ۱ پرایمر رفت و µl ۱ پرایمر برگشت به هر میکروتیوب اضافه گردید (جدول ۱). سپس µl ۵ DNA استخراجی به محتویات میکروتیوب و در نهایت µl ۶ آب مقطر استریل اضافه گشت. فرآیند پلیمریزاسیون در دستگاه ترمال سایکلر (بیو رد، آلمان) شامل تقلیب اولیه به مدت پنج دقیقه در دمای ۹۵ درجه سانتیگراد تنظیم گردید. سپس ۴۵ سیکل به‌صورت ۴۵ ثانیه در دمای ۹۵ درجه سانتیگراد، ۴۰ ثانیه در دمای ۵۶ درجه سانتیگراد و یک دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتیگراد اجرا شد. در پایان عمل طویل‌سازی نهایی در ۷۲ درجه سانتیگراد به مدت ۱۰ دقیقه تنظیم گشت. همچنین بررسی محصولات PCR به کمک الکتروفورز بر روی ژل آگارز ۰/۸ درصد انجام شد.



شکل ۱: بررسی DNA استخراج‌شده در باکتری‌های گرم منفی بر روی ژل آگارز

چاهک ۱: Proteus، چاهک ۲: E.coli، چاهک ۳: Serrati، چاهک ۴: salmonella، چاهک ۵: Klebsiella، چاهک M: DNA سایز مارکر ۱۰۰

Downloaded from tjpm.mazums.ac.ir at 5:07 +0330 on Sunday September 24th 2017



شکل ۲: بررسی DNA استخراج‌شده باکتری‌های گرم مثبت بر روی ژل آگارز

چاهک ۱: Bacillus cereus، چاهک ۲: Bacillus subtilis، چاهک ۳:Staphylococcus aureus ، چاهک M: DNA سایز مارکر ۱۰۰

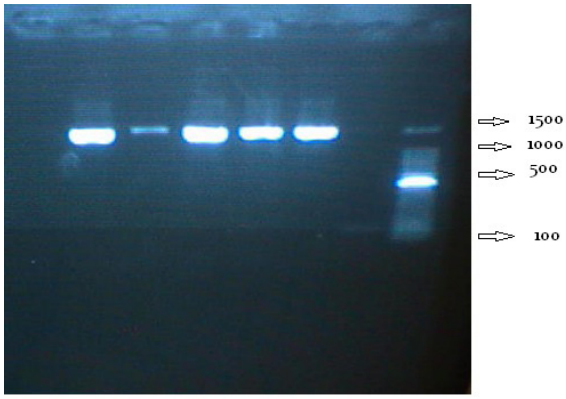
نتایج

بررسی فرآیند استخراج

نتایج به‌دست آمده از ارزیابی جذب نوری پس از انجام فرآیند استخراج در جدول ۲ نشان داده شده است که میانگین جذب در ۲۶۰/۲۸۰ و ۲۶۰/۲۳۰ به‌ترتیب ۱/۲۲، ۰/۸ به‌دست آمد.

بررسی کیفیت و سلامت DNA استخراج‌شده

در شکل ۱ (باکتری‌های گرم منفی) و شکل ۲ (باکتری‌های گرم مثبت)، بررسی کیفی DNA استخراج‌شده با استفاده از تکنیک الکتروفورز بر روی ژل ۰/۸ درصد نشان داده شده است. همان‌طور که مشاهده می‌گردد، DNA استخراج‌شده در باکتری‌های گرم منفی نسبت به باکتری‌های گرم مثبت کیفیت بهتری دارد.



شکل ۳: بررسی نتایج PCR ژن ۱۶S DNA بر روی ژل آگارز ۱/۵ درصد

M۱۵۰۰Bp/ L ۵ ۴ ۳ ۲ ۱

چاهک M: DNA سایز مارکر ۱۰۰، چاهک ؟؟کنترل منفی، چاهک ۱: Proteus، چاهک ۲: E.coli، چاهک ۳: Klebsiella، چاهک ۴: Serrati، چاهک ۵: salmonella

PCR

در نهایت برای تأیید کیفیت DNA استخراج‌شده باکتری‌های گرم منفی، واکنش زنجیره پلیمراز (PCR)

جدول ۲: بررسی کیفی DNA به‌وسیله UV در جذب نوری ۲۶۰/۲۸۰ و ۲۳۰/۲۶۰

نمونه	جذب نوری ۲۳۰/۲۶۰	جذب نوری ۲۶۰/۲۸۰
Serratia	99/0	89/1
E.coli	98/0	73/1
Klebsiella	88/0	80/1
proteus	97/0	98/1
Salmonella	96/0	77/1
Staphylococcus aureus	87/0	73/1
Bacillus cereus	82/0	85/1
B.subtilis	86/0	96/1
Total	33/7	00/2
Median	91/0	92/1

Downloaded from tjpm.mazums.ac.ir at 5:07 +0330 on Sunday September 24th 2017

انجام شد. باید توجه داشت که قابلیت PCR برای DNA استخراج‌شده بسیار مهم است که نشان می‌دهد اسید نوکلئیک به‌دست آمده برای انجام دیگر تکنیک‌های و آزمایشات مولکولی مناسب می‌باشد. نتایج حاصله در شکل ۳ نشان داده شده است.

بحث

نتایج به‌دست آمده نشان داد، دستورالعمل فوق جهت استخراج DNA از باکتری سه مرحله اساسی دارد. مرحله اول لیز سلول می‌باشد؛ از آنجا که دیواره باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی با هم متفاوت است این امر در نتایج مرحله اول (لیز سلول) تأثیرگذار است. لیز باکتری‌های گرم مثبت به‌علت پپتیدوگلیکان ضخیم‌تر، مشکل‌تر است و انجام صحیح این مرحله تأثیر بسزایی بر روی استخراج DNA می‌گذارد و این مسأله باعث تفاوت در کیفیت باندهای ایجاد شده بر روی ژل آگارز گشته؛ بنابراین باندهای قوی‌تری در بررسی DNA استخراجی از باکتری‌های گرم منفی مشاهده شد. همچنین در بررسی جذب نوری (OD) با استفاده از بایوفتومتر، میانگین حاصل از جذب نوری nm ۲۶۰/۲۸۰ برابر ۱/۸ مشاهده شد که نشان‌دهنده آلودگی پروتئینی است. با افزایش زمان شستشو و تکرار استخراج، این رقم به ۱/۴۵ افزایش یافت که حاکی از بالا رفتن کیفیت و کم شدن آلودگی پروتئینی و آماده‌سازی DNA برای انجام فرآیندهای پایین دستی می‌باشد. هرچند این مرحله زمان استخراج را طولانی‌تر کرد و این از معایب این روش می‌باشد. با وجود آسان بودن استخراج براساس ستون سیلیکا، به‌علت گران بودن کیت‌های تجاری، هنوز روش‌های دستی استخراج جایگاه خود را حفظ نموده‌اند و در این بین روش استخراج بر پایه فنل–کلروفورم روش طلایی نام گرفته است (۱۱,۱۵). Cheng و همکاران (۱۶) روش فنل کلروفورم را روشی مناسب ارزیابی نمودند. اما شهبازی (۱۷) در سال ۱۳۹۳ در کردستان در مطالعه خود تحت عنوان مقایسه چهار روش استخراج DNA (شامل کیت تجاری (تهیه شده از شرکت سیناژن)، جوشاندن، فنل–کلرفورم و روش دترجنت رختشویی) از باکتری‌های گرم منفی و مثبت اعلام نمود؛ اگرچه حساسیت دستورالعمل کیت تجاری سیناژن در مقایسه با سه روش دیگر بالاتر است؛ اما با توجه به زمان و هزینه کمتر و بازده تقریباً مشابه دو روش فنل کلروفرم و جوشاندن (به‌ویژه جوشاندن)، می‌توان از این روش برای استخراج DNA در باکتری‌های گرم منفی و مثبت استفاده کرد؛ اما برخلاف مطالعه میرنژاد و همکارن (۱۸) در سال ۱۳۹۱ در تهران که از دترجنت‌های رختشویی جهت استخراج DNA ژنومیک در یک باکتری گرم مثبت (استافیلوکوکوس اورئوس) استفاده کردند، این روش دارای خلوص پایین‌تری برای کارهای پایین دستی داشت که علت آن می‌تواند نوع و نسبت متفاوت مواد پایه تشکیل‌دهنده این پودرها و نوع آنزیم‌های موجود در آن‌ها باشد. استخراج بر مبنای سلیکاژل نیز مانند روش‌های دیگر دارای محاسن و معایبی است. از جمله محاسن این روش خلوص و غلظت بالای DNA استخراج‌شده و استفاده برای طیف گسترده‌ای از نمونه‌ها و از معایب آن سمی بودن و اثر مهارکنندگی فنل در واکنش PCR را می‌توان نام برد. همچنین اتانول که در مرحله نهایی، DNA را رسوب می‌دهد، یک ممانعت‌کننده PCR است و اگر مرحله خشک کردن DNA از اتانول به‌طور کامل انجام نشود، در انجام PCR مشکل ایجاد می‌شود.

نتیجه‌گیری

در این تحقیق نشان داده شد که می‌توان از روش سیلیکای محلول برای استخراج DNA باکتری‌های گرم مثبت و منفی استفاده کرد؛ به‌طوری که DNA استخراجی دارای کیفیت مناسب برای انجام PCR دارا می‌باشد.

حمایت مالی

این مطالعه حمایت مالی نداشته است.

ملاحظات اخلاقی

کلیه اقدامات جهت رعایت اخلاق در تهیه و استفاده از

Downloaded from tjpm.mazums.ac.ir at 5:07 +0330 on Sunday September 24th 2017

اطلاعات مقالات دیگر جهت بکارگیری در این مقاله توسط نویسندگان انجام گردید. این مقاله کد اخلاقی ندارد.

تعارض منافع

در بین نویسندگان این مقاله هیچ‌گونه تضاد و تعارضی وجود ندارد.

تشکر و قدردانی

این مطالعه در گروه زیست‌شناسی دانشگاه آزاد اسلامی واحد تنکابن اجرا شد؛ بنابراین نویسندگان مقاله از همکاری‌های کارکنان آن واحد دانشگاهی کمال تشکر را دارند.

References

1. Ausubel FM. Current protocols in molecular biology. New York: John Wiley & Sons; 2007.
2. Salazar O, Asenjo JA. Enzymatic lysis of microbial cells. Biotechnol Lett 2007; 29(7):985-94.
3. Elphinstone MS, Hinten GN, Anderson MJ, Nock CJ. An inexpensive and high-throughput procedure to extract and purify total genomic DNA for population studies. Mol Ecol Notes 2003; 3(2):317-20.
4. Wolk D, Mitchell S, Patel R. Principles of molecular microbiology testing methods. Infect Dis Clin North Am 2001; 15(4):1157-204.
5. Eble JN, Cheng L, Zhang DY. Molecular genetics pathology. Totowa: Humana; 2008. P. 65-131.
6. Esser KH, Marx WH, Lisowsky T. MaxXbond: first regeneration system for DNA binding silica matrices. London: Nature Methods Application Notes; 2006.
7. Farnoosh GR, Hassanpour K, Taheri R, Ghamgosha M, Sani MM, Mellat M. Comparison of three different DNA extraction methods from positive smears prepared from lesions of patients with cutaneous leishmaniasis. Eur J Expe Biol 2013; 3(6):212-4.
8. Jeanpierre M. A rapid method for the purification of DNA from blood. Nucleic Acids Res 1987; 15(22):9611.
9. Köchl S, Niederstätter H, Parson W. DNA extraction and quantitation of forensic samples using the phenol-chloroform method and real-time PCR. Methods Mol Biol 2005; 297:13-30.
10. Martínez G, Shaw EM, Carrillo M, Zanuy S. Protein salting-out method applied to genomic DNA isolation from fish whole blood. Biotechniques 1998; 24(2):238-9.
11. Melzak KA, Sherwood CS, Turner RF, Haynes CA. Driving forces for DNA adsorption to silica in perchlorate solutions. J Colloid Interf Sci 1996; 181(2):635-44.
12. Mammina C, Bonura C, Verde MS, Fasciana T, Palma DM. A fatal bloodstream infection by Staphylococcus pettenkoferi in an intensive care unit patient. Case Rep Crit Care 2011; 2011:612732.
13. Tan SC, Yiap BC. DNA, RNA, and protein extraction: the past and the present. J Biomed Biotechnol 2009; 2009:574398.
14. Vogelstein B, Gillespie D. Preparative and analytical purification of DNA from agarose. Proc Nat Acad Sci U S A 1979; 76(2):615-9.
15. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. Molecular cloning: New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 1989.