مقایسه روش بهینه‌شده استخراج DNA از کپک‌های آسپرژیلوس، پنی سیلیوم و رایزوپوس در رب گوجه‌فرنگی

رضا کاراژیان[1*]، محمد باقر حبیبی نجفی[2]، مسعود یاورمنش[3]، محمدرضا عدالتیان دوم[3]، حمیدرضا پوریان فر[4]

١- استادیار صنایع غذایی.. گروه پژوهشی کیفیت و ایمنی مواد غذایی. پژوهشکده علوم و فناوری مواد غذایی جهاددانشگاهی مشهد

٢- استاد صنایع غذایی. دانشگاه فردوسی مشهد. دانشکده کشاورزی گروه علوم و صنایع غذایی

٣- استادیار صنایع غذایی. دانشگاه فردوسی مشهد. دانشکده کشاورزی گروه علوم و صنایع غذایی

٤- استادیار بیوتکنولوژی. جهاددانشگاهی مشهد. گروه پژوهشی زیست فناوری قارچ های صنعتی جهاددانشگاهی مشهد

(تاریخ دریافت: ٩٤/٥/٢٤ تاریخ پذیرش: ٩٤/١١/٢٦)

چکیده

در این تحقیق از روش بهینه‌سازی شده استخراج DNA برای استخراج DNA آسپرژیلوس نایجر، پنی‌سیلیوم کریزوژنوم و رایزوپوس اوریزا از رب گوجه‌فرنگی استفاده شد. روش مذکور مطابق با روش معرفی شده السامرایی بود که تغییراتی در غلظت محلول‌های بافر استخراج و بعضی مراحل آن داده شد تا روش بهینه‌سازی شود. اسپور کپک‌های مورد نظر در مقادیر مختلف (10^1، 10^3، 10^5 CFU/gr) به رب گوجه فرنگی اضافه شد و پس از رشد و ایجاد میسیلوم کپک استخراج DNA انجام شد. DNA های استخراج شده از نقطه نظر کمیت و کیفیت DNA استخراج شده با استفاده از روش اسپکتروفتومتری با دستگاه نانودراپ مورد بررسی قرار گرفتند. همچنین با استفاده از الکتروفورز ژل DNA استخراج شده از لحاظ عدم مشاهده هاله و نبود آلودگی پروتئینی مورد بررسی قرار گرفتند. جهت بررسی وجود ممانعت کننده های PCR در نمونه های DNA استخراج شده عملیات PCR با استفاده از پرایمرهای پیش‌رونده و پس‌رونده طراحی شده انجام شد. نتایج نانودراپ و الکتروفورز ژل DNA و نتایج PCR موید این مطلب است که این روش برای استخراج DNA این کپک ها از رب گوجه فرنگی مناسب می-باشد.

کلید واژگان: استخراج DNA، *آسپرژیلوس نایجر*، *پنی سیلیوم کریزوژنوم*، *رایزوپوس اوریزا*، رب گوجه فرنگی

* مسئول مکاتبات: reza_karazhyan2002@yahoo.com

۱- مقدمه

گوجه فرنگی سرشار از ویتامین C و لیکوپن است. این محصول امروزه به طور خام یا فراوری شده در رب گوجه فرنگی و انواع سس استفاده می‌شود و بخش مهمی از رژیم غذایی مردم بسیاری از کشورها را تشکیل می‌دهد. طبق آمار در سال ۲۰۰۸ حدود ۱۳۰ میلیون تن گوجه فرنگی در دنیا تولید شد و مصرف سرانه گوجه فرنگی در ایران ٤۹ کیلوگرم بود [۱].

کپک ها گروهی از میکروارگانیسم ها هستند که قادرند به خوبی بر روی گوجه فرنگی و فرآورده های آن رشد کنند و با تولید توکسین سلامت مصرف کننده را به خطر اندازند. فلور کپکی گوجه فرنگی شامل جنس های متعددی از کپک ها می‌باشد. اغلب گونه‌های کپکی همراه با ماده خام در اثر فرآیندهای اعمال شده طی فرآوری رب از بین می روند اما بعضی از کپک‌هایی که دارای آسکوسپورهای مقاوم به حرارت هستند می‌توانند در فراورده‌های حاصل از میوه‌ها و سبزی‌ها ایجاد فساد کنند که از جمله مهم ترین آن‌ها جنس آسپرژیلوس، پنی سیلیوم و رایزوپوس می‌باشند [۱].

این کپک‌ها به عنوان مهم‌ترین کپک‌های آلوده کننده مواد غذایی می‌باشد و به دلیل قدرت بالای رشد در مواد غذایی و نیز قدرت تولید توکسین‌های میکروبی (قارچی) به خصوص آفلاتوکسین‌ها در مواد غذایی از اهمیت فراوانی برخوردار هستند [۲].

در روش استاندارد ایران و دنیا تعیین آلودگی کپکی این محصول به روش هوارد انجام می شود این روش بر پایه روش شناسایی مستقیم میسیلیوم کپک است و به‌دلیل مشاهده چشمی کپک ها و ریسه آنها در زیر لام احتمال خطای آزمون کننده وجود دارد، دقت کمی دارد و دارای انحراف معیار ۱۵ درصد و بیشتر است [۳]. علاوه بر این به مهارت شخص آزمون کننده نیز بستگی دارد. به دلیل خطاهای متعددی طی تشخیص کپک، نتایج آزمون یک نمونه در آزمایشگاه های مختلف متفاوت می‌باشد و نتایج حاصله قابلیت تکرار پذیری ندارند [٤]. بنابراین تعیین یک روش استاندارد مبتنی بر روش‌های جدید مولکولی جهت تعیین دقیق میزان آلودگی کپکی این محصول لازم به نظر می‌رسد.

استخراج DNA از کپک‌های موجود در رب گوجه فرنگی و فرآورده‌های آن اولین گام در تبیین یک روش مولکولی جهت شناسایی و اندازه گیری میزان این کپک‌ها در فرآورده‌ها می‌باشد که می تواند به‌عنوان روش کارآمد و مناسب جایگزین روش‌های استاندارد اندازه گیری کیفی و کمی حال حاضر بشود.

روش‌های مولکولی تفاوت های DNA را در میان انواع متفاوت میکرومیست قابل تشخیص می‌کند. آزمون PCR یک روش معمول است که اغلب به این منظور مورد استفاده قرار می‌گیرد. اساس و پایه روش PCR وجود یک قالب DNA می‌باشد که ماده ژنتیکی میکروارگانیسم است. مشکل بسیار مهم یافتن روشی است که از دو جنبه سرعت و حساسیت با مقدار کم DNA از تعداد سلول های محدود بتواند عمل استخراج DNA را انجام بدهد [۲].

به دلیل وجود دیواره سلولی سخت کپک‌ها در مقایسه با باکتری‌ها شکستن و لیز کردن دیواره سلولی جهت خارج کردن محتویات داخل سلولی سخت‌تر بوده و زمان بر می‌باشد و بایستی از روش-ها و مواد شیمیایی مناسب استفاده کرد. مشکل‌ترین مرحله در استخراج DNA از کپک‌ها تخریب دیواره سلول بدون آسیب رساندن به DNA ژنومی می‌باشد [۲]. همچنین این روش‌ها نیاز به مهارت بالایی دارند و DNA استخراج شده توسط این روش-ها برای تکنیک های مولکولی که در حال حاضر استفاده می‌شوند مناسب نیست [۷]. همچنین استخراج DNA از یک ماده غذایی مانند رب گوجه فرنگی به دلیل داشتن مقادیر متنابهی رنگدانه از قبیل لیکوپن و بتاکاروتن و همچنین ترکیبات فنلی دیگر از قبیل فلاونول‌ها و همچنین وجود ترکیبات قندی از قبیل گلوکز و ساکارز و اسیدهای آمینه به دلیل ایجاد ممانعت در عمل استخراج DNA با مشکلات متعددی مواجه است. وجود ترکیبات فنلی در محلول DNA استخراج شده باعث جلوگیری از فعالیت های آنزیم‌های DNA پلیمراز مانند تک پلیمراز در واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) و همچنین جلوگیری از کار آنزیم‌های برش‌گر می‌شود. وجود مواد آنتی اکسیدان و فلاونوئیدها باعث اکسیداسیون شدید DNA می‌شوند همچنین وجود پلی‌ساکاریدها و پروتئین بالا در DNA استخراج شده باعث می‌شود که کیفیت DNA برای مراحل بعدی مطالعات مولکولی کاهش پیدا کند [۵].

بیشتر روش‌ها از تکنیک های مکانیکی یا فیزیکی- مکانیکی برای تخریب دیواره سلولی استفاده می‌کنند به عنوان مثال استفاده از

گلوله‌های شیشه‌ای، کوبیدن و ساییدن در نیتروژن مایع، آسیاب کردن، انجماد و خروج از انجماد متوالی، استفاده از امواج فراصوت به صورت ترکیبی با بافرهای لیزکننده حاوی سدیم دودسیل سولفات (SDS) و استفاده از اشعه ماکروویو می‌باشد. آنزیم‌ها نیز می‌توانند برای هضم دیواره سلولی استفاده شوند. روش‌های تخریب دیواره سلولی اغلب به صورت ترکیبی است. هضم پروتئین‌ها اساساً توسط پروتئیناز K صورت می‌گیرد و برای حذف RNA نیز از RNase استفاده می‌شود. استخراج با استفاده از حلال (بر پایه فنل- کلروفرم) به همراه ترسیب توسط ایزوپروپانول نیز اغلب مورد استفاده قرار می گیرد. برای شست و شوی DNA اتانول و ایزوپروپانول نیز می‌توانند مورد استفاده قرار گیرند. این روش‌ها زمان‌بر هستند و به مهارت بالایی نیاز دارند. در سال‌های اخیر کیت‌های تجاری به‌طور مکرر مورد استفاده قرار گرفته‌اند. دیواره سلولی کپک‌ها به طور فوق العاده‌ای محکم هستند و به‌همین دلیل لیز کردن دیواره سلولی به‌وسیله روش‌های استخراج تجاری مشکل است و قبل از عمل پاک کردن و خالص‌سازی، مراحل مقدماتی برای لیز کردن دیواره سلول لازم است [٢,٨].

هدف از این تحقیق مقایسه روش بهینه شده استخراج DNA برای استخراج DNA از سه کپک *آسپرژیلوس نایجر*، *پنی سیلیوم کریزوژنوم* و *رایزوپوس اوریزا* می‌باشد. کمیت و کیفیت DNA استحصال شده توسط اسپکتروفتومتری با نانودراپ تعیین شده، سپس به‌وسیله PCR تکثیر می‌شود و محصول واکنش PCR با استفاده از الکتروفورز ژل جهت تعیین عدم وجود مهار کننده‌های PCR مورد بررسی قرار می‌گیرد.

٢- مواد و روش‌ها

٢-١- تهیه سوش کپک خالص

جنس‌های کپک *آسپرژیلوس نایجر* (PTCC 5010)، *پنی سیلیوم کریزوژنوم* (PTCC 5034) و *رایزوپوس اوریزا* (PTCC 5176) از سازمان پژوهش های علمی و صنعتی ایران، مرکز کلکسیون باکتری‌ها و قارچ‌ها به صورت خالص و لیوفیلیزه تهیه شد.

٢-٢- آماده‌سازی رب گوجه فرنگی

جهت انجام این تحقیق احتیاج به رب گوجه فرنگی پاستوریزه بدون مواد افزودنی، نگهدارنده رنگ‌های خوراکی، نمک و غیره است تا از رشد غیر طبیعی کپک‌ها و یا بازدارندگی رشد آن‌ها جلوگیری شود. از گوجه فرنگی سالم، بدون کپک، آفت زدگی و لهیدگی استفاده شد و رب گوجه فرنگی با بریکس ٢٤ تا ٢٦ مشابه رب‌های تجاری موجود در بازار تهیه شد. محصول بدست آمده در ظروف شیشه‌ای درب دار قابل اتوکلاو استریل شده پر شده و بعد از درب بندی پاستوریزه شدند.

٢-٣- فعال سازی کپک و تهیه نمونه‌ها

برای فعال سازی کپک‌های مورد نظر از محیط کشت مالت اکستراکت براث[1] استفاده شد. فعال سازی آمپول لیوفیلیزه شده کپک تحت شرایط کاملاً استریل و سترون شده طبق دستورالعمل سازنده انجام گردید. از سوسپانسیون محیط کشت و کپک تلقیح شده در لوله بعد از گذشت چند ساعت گرمخانه‌گذاری در دمای ٢٥ درجه سانتی‌گراد در پلیت‌های محیط PDA[2] به صورت خطی کشت داده شد. پلیت‌ها در دمای ٢٥ درجه سانتی‌گراد به مدت ٥ تا ٧ روز گرمخانه‌گذاری شدند تا کلنی‌های کپک ظاهر شده رشد کرده و میسیلیوم تولید کند [٦].

٢-٤- تلقیح کپک به رب گوجه فرنگی

بدین منظور با آنس استریل از اسپور کپک رشد کرده روی سطح محیط کشت برداشته و توسط محلول رینگر رقیق شد. توسط لام هموسایتومتر تعداد اسپورهای کپک سوسپانسیون شده در داخل رینگر محاسبه شد (10^8 تا 10^9 عدد اسپور در هر میلی لیتر). سپس رقت‌های مختلف اسپور (10^1، 10^3 و 10^5) تهیه شده و به رب اضافه شد. نمونه‌ها به مدت ٧٢ ساعت در ٢٥ درجه سانتی-گراد گرمخانه‌گذاری شدند تا اسپورها فرصت ایجاد فرم میسیلیومی را پیدا کنند و بتوان از نمونه های رب آلوده شده حاصله استخراج DNA را انجام داد.

٢-٥- استخراج DNA از میسیلیوم کپکی

در این تحقیق از روش بهینه‌شده السامرایی (٢٠٠٠) استفاده شد [٧]. به طور خلاصه عمل استخراج به شرح ذیل می‌باشد:

1. Malt Extract Broth
2. Potato Dextrose Agar

نمونه‌های رب آلوده شده با کپک ابتدا به‌وسیله کوبیدن در هاون استریل توسط ازت مایع به صورت پودر شدند. ۵۰ تا ۷۰ میلی گرم از پودر به میکروتیوپ منتقل شده و ٦۰۰ میکرولیتر بافر استخراج گرم شده (CTAB ۲ درصد –Tris-HCl ۱۰۰ میلی-مول (pH=۸)– EDTA ۲۰ میلی مول –NaCl ۱/٤ مول – PVP ۳ درصد –ß-Mercaptoethanol ۰/۲درصد)) به آن اضافه شد. سپس در ٦۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ دقیقه حرارت داده شد. سپس۱ میکرولیتر پروتئیناز k به مخلوط اضافه شده و در ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ دقیقه گرمخانه‌گذاری گردید. ٦۰۰ میکرولیتر کلروفرم – ایزوآمیل الکل به نسبت ۲٤ به ۱ اضافه شده و به مدت ۱۰ دقیقه با چرخاندن تیوپ مخلوط شد. مخلوط حاصل به مدت ۱۰ دقیقه با سانتریفوژ با دور rpm ۱۳۰۰۰ در ٤ درجه سانتی‌گراد سانتریفوژ گردید. فاز رویی (حدود ۳۰۰ میکرولیتر) را برداشته و به تیوب جدید منتقل شد. ۲ میکرولیتر RNase اضافه کرده و در ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ دقیقه گرمخانه‌گذاری شد. حجم مساوی کلروفرم – ایزوآمیل الکل اضافه شده و ۵ دقیقه چرخانده شد سپس مخلوط حاصل به مدت ۱۰ دقیقه با سانتریفوژ با دور rpm ۱۳۰۰۰ در ٤ درجه سانتی‌گراد سانتریفوژ شد. فاز رویی (حدود ۲۵۰ میکرولیتر) را برداشته و به تیوب جدید منتقل شد.

سپس دو سوم حجم ایزوپروپانول سرد به آن اضافه شده و در فریزر به مدت ۱۵ دقیقه گرمخانه‌گذاری شد سپس به مدت ۱۰ دقیقه با سانتریفوژ با دور rpm ۱۳۰۰۰ در ٤ درجه سانتی‌گراد سانتریفوژ شد. سوپرناتانت دور ریخته شده و ۵۰۰ میکرولیتر اتانول ۷۰ درصد اضافه گردید و ۲۰ بار چرخانده و به انتهای تیوب ضربه وارد کرده تا حل شود سپس به مدت ۱۰ دقیقه با سانتریفوژ با دور rpm ۱۳۰۰۰ در ٤ درجه سانتی‌گراد سانتریفوژ شد. اتانول دور ریخته شده و پلت حاصله در انتهای تیوپ در دمای اتاق خشک شد. به پلت خشک شده ۵۰ میکرولیتر آب دیونیزه اضافه شد و به مدت یک شب در ٤ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. پس از انجام عمل استخراج، DNA حاصله به مدت یک شب در دمای ۱۸– درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند و سپس کمیت و کیفیت DNA استخراج شده توسط روش اسپکتروفتومتری و جذب محلول DNA استخراجی در طول موج ۲٦۰، ۲۸۰ و ۳۲۰ نانومتر و همچنین نسبت جذب ۲٦۰/۲۸۰ نانومتر، الکتروفورز بر روی ژل آگارز و واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) با استفاده از پرایمرهای پیش‌رونده و پس‌رونده (جدول ۱) مورد بررسی قرار گرفت. شرایط واکنش PCR مطابق جدول ۲ انجام گرفت.

Table 1 primers sequences used in PCR

Primer	Sequence (5′→3′)
Aspergillus niger (F)	TGTTTCTATTATGACCCGTTCGG
Aspergillus niger (R)	CCCCGTGTTGAGTCAAATTAAGC
Rhizopus oryzae (F)	CCTGCTTCAGTATCATCACAAACC
Rhizopus oryzae (R)	ATCACACACATTTTAGGTGCTCAC
Penicillium chrysogenum (F)	TCTAGGCCAGCGGTGACAAG
Penicillium chrysogenum (R)	GGACTGACCGAAGACGAAGTTG

Table 2 PCR amplification profile

Step	Temperature ºc	Time (min)	number
Initiation	94	10	1
Denaturation	94	0/5	40
Elongation	52-55	0/5	40
Extention	72	2	40
Final extention	72	5	1

٢-٦- آنالیز آماری

داده‌های حاصل از نانودراپ نمونه های DNA استخراج شده جهت مقایسه میانگین نتایج با استفاده آزمون فاکتوریل با سه تکرار و جهت بررسی اختلاف معنی‌دار بین روش های مختلف با استفاده از نرم افزار mstatc و مقایسه میانگین داده‌ها با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن با سطح معنی‌داری ٠/٠٥٪ انجام شد. رسم نمودارها با نرم افزار 2007 اکسل انجام شد.

٣- نتایج

در جدول ٣ مقدار DNA استخراج شده توسط روش السامرایی برای سه جنس کپک و در مقادیر مختلف اسپور تلقیح شده آورده شده است. نتایج نشان میدهند که مقدار DNA استخراج شده در این روش برای سه کپک اختلاف معنی داری (p≤ ٠/٠٥) وجود ندارد.

Table 3 The results of performance on the amount of DNA extraction technique

Spore amount	DNA aspergillus amount	DNA penicillium amount	DNA rhizopus amount
10^1	$42 \pm 654/2^{mno}$	$43 \pm 0/7^{mno}$	$157 \pm 1/563^{klm}$
10^3	$146/1 \pm 0/4^{klmn}$	$146/2 \pm 3/308^{klmn}$	$157/1 \pm 8/95^{klm}$
10^5	$334/1 \pm 466/23^{j}$	$732/3 \pm 5/896^{g}$	$130/5 \pm 4/491^{klmno}$

نتایج جدول ٤ نشان می دهد که فاکتور خلوص (OD=٢٦٠/٢٨٠) برای هر سه جنس کپک و در مقادیر مختلف اسپور تلقیح شده در دامنه قابل قبول (٢-١/٨) قرار دارد (p≤ ٠/٠٥).

Table 4 The results of the performance factor extraction technique based on purity (280/260) DNA extracted

Spore amount	DNA purity aspergillus	DNA purity penicillium	DNA purity rhizopus
10^1	$1/94 \pm 0/003^{defgh}$	$1/705 \pm 0/031^{n}$	$1/809 \pm 0/003^{ijklmn}$
10^3	$1/707 \pm 0/003^{n}$	$1/822 \pm 0/016^{hijklmn}$	$1/767 \pm 0/013^{klmn}$
10^5	$1/765 \pm 0/008^{klmn}$	$1/938 \pm 0/032^{defgh}$	$1/728 \pm 0/11^{hijklmn}$

نتایج الکتروفورز DNA استخراج شده نشان می دهد که برای تمامی جدایه‌های سه کپک در این روش استخراج باندهای قابل مشاهده، بدون هاله و شکستگی دارند. الکتروفورز ژل هر نمونه که یکپارچه و سالم باشد و هیچگونه هاله و شکستگی نداشته باشد دارای بهترین استخراج DNA می باشد [٥].

بنابراین می‌توان نتیجه گرفت که روش السامرایی برای استخراج DNA از سه کپک مورد نظر مناسب است.

واکنش PCR برای تعیین وجود مواد بازدارنده و مداخله کننده در طی واکنش انجام گردید.

در تأیید فرآیند استخراج توسط PCR نشان می‌دهد که در طی استخراج توسط این روش ممانعتی جهت واکنش PCR ایجاد نشده است و

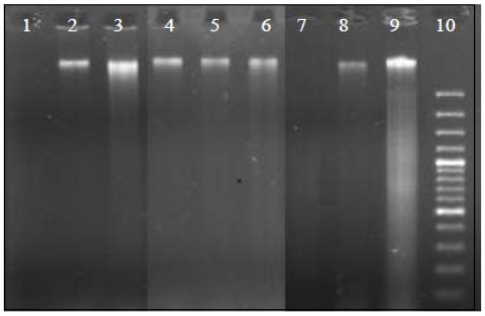

Fig 1 Gel electrophoresis of total DNA extracted
1- Aspergillus 10^1 2- Aspergillus10^3 3- Aspergillus10^5 4- Rhizopus 10^1 5- Rhizopus10^3 6- Rhizopus10^5 7- Penicillium 10^1 8- Penicillium 10^3 9- Penicillium 10^5 10- Ladder

وجود قطعات تکثیر شده در PCR دلیل بر فقدان ممانعت کننده برای آنزیم تک پلیمراز است [٥ و ٨] و می‌توان نتیجه گرفت که این روش جهت استخراج DNA مناسب است.

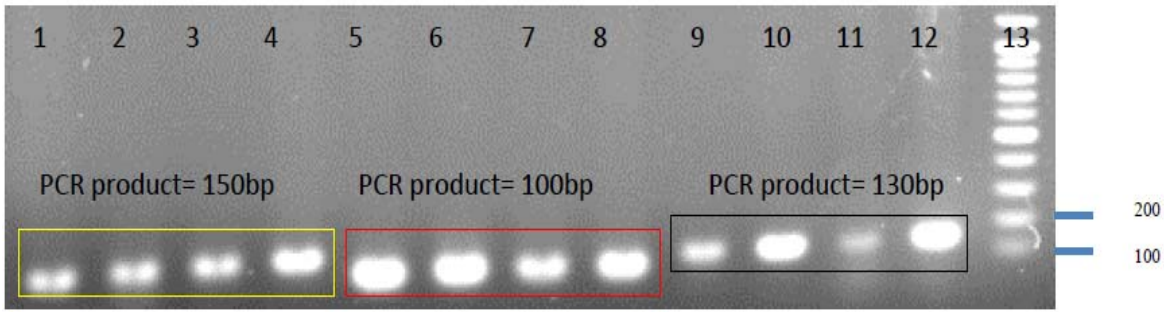

Fig 2 Gel electrophoresis of PCR product of DNA extracted

1- Aspergillus 2- Aspergillus 10^1 3- Aspergillus 10^3 4- Aspergillus10^5 5- Rhizopus 6- Rhizopus 10^1 7- Rhizopus 10^3
8- Rhizopus 10^5 9- penicillium 10- Penicillium10^1 11- Penicillium 10^3 12- Penicillium 10^5 13- ladder

٤- بحث

نتایج حاصل از استخراج DNA از سه کپک نشان می‌دهند که از نقطه نظر مقدار، خلوص، شکستگی DNA و وجود ممانعت کننده‌های مختلف PCR در محلول استخراج تفاوت‌های معنی-داری مشاهده نمی‌شود.

الکتروفورز با ژل آگارز معیار مهمی برای محاسبه غلظت DNA و عدم شکستگی در آن می‌باشد. چربی، پروتئین و غلظت‌های بالای کلیسم مهارکننده‌های بالقوه برای عملیات PCR هستند. فقدان شکستگی و هاله در نمونه های استخراج شده نشان‌دهنده خلوص بالای DNA می‌باشد. اگر نسبت مقدار جذب محلول DNA در OD=۲٦۰/۲۸۰ در محدوده ۲-۱/۸ باشد نشان‌دهنده این است که جذب عمدتاً به علت اسید نوکلئیک است و خلوص DNA استخراج شده مطلوب است. اعداد کمتر از ۱/۸ نشان دهنده آلودگی با پروتئین یا ترکیبات فنلی است. اعداد بالاتر از ۲ نشان‌دهنده آلودگی با RNA است. وجود قطعات تکثیر شده در PCR دلیل بر فقدان ممانعت کننده برای آنزیم تک‌پلیمراز است [٥]. بنابراین می‌توان نتیجه گرفت که روش السامرایی جهت استخراج DNA از سه کپک مورد آزمون مناسب می‌باشد.

از آن‌جایی که استخراج DNA زمان بر و پر هزینه بوده و نیاز به استفاده از مواد شیمیایی گران قیمت و سمی دارد بنابراین بهینه کردن روش استخراج جهت کاهش زمان و هزینه‌ها و افزایش راندمان و خلوص DNA بدست آمده ضروری است [٨]. روش السامرایی از نقطه نظر کمیت و کیفیت DNA، نداشتن هاله و عدم شکستگی DNA الکتروفورز شده و همچنین نداشتن ممانعت کننده‌های PCR مناسب می‌باشد و برای استخراج DNA کپک ها از مواد غذایی پیشنهاد می‌شود. نتایج این تحقیق نشان میدهد که استفاده از نیتروژن مایع و ساییدن سلول‌ها و شوک حرارتی باعث ایجاد راندمان بهتری در استحصال DNA می‌باشد و استفاده از موادی چون SDS، Na_2So_3، PVP و ß-Mercaptoethanol باعث ایجاد شکستگی در DNA و نیز خلوص پایین می‌شود.

پرابها و همکاران (۲۰۱۳) روشی ساده برای استخراج DNA ژنومی از کپک‌ها پیشنهاد کردند [۱۰]. روش پیشنهادی در این تحقیق استفاده از روش CTAB برای استخراج DNA بود در این تحقیق سوش‌های ساپرولگنیا و کپک *آسپرژیلوس فلاووس* و پنی‌سیلیوم مورد مطالعه قرار گرفتند. نتایج نشان داد که آسیاب کردن نمونه‌ها با نیتروژن مایع باعث استحصال بیشتر DNA خواهد شد و روش بکار گرفته شده باعث ایجاد باندهای مناسب در الکتروفورز نمونه‌ها و نیز باندهای مطلوب در PCR نمونه‌ها شده است.

جین و همکاران (٢٠٠٤) در تحقیقی روشی را برای استخراج DNA سوش‌های کپک‌های *آسپرژیلوس فومیگاتوس* و سایر سوش‌های این جنس پیشنهاد کردند [٦]. از آنزیم پروتئیناز K و محلول‌های لیز کننده استفاده کردند. نتایج الکتروفورز ژل DNA و همچنین PCR آن‌ها نشان داد که این روش استخراج مناسب می‌باشد.

گریفین و همکاران (٢٠٠٦) روش‌های متعددی را برای استخراج DNA از *آسپرژیلوس فومیگاتوس* با همدیگر مقایسه کردند [٨].

استخراج DNA در این تحقیق با استفاده از کیت تجاری Qiagen انجام گرفت اما جهت کارایی بهتر فرایند استخراج و افزایش سهولت در شکستن دیواره سلولی از مراحل تکمیلی از قبیل انجماد- ذوب کردن، انجماد- پختن، هضم آنزیمی، استفاده از گلوله‌های شیشه‌ای، هضم آنزیمی و گلوله‌های شیشه‌ای و استفاده از بافرهای لیز کننده و گلوله‌های شیشه ای استفاده کردند. هر چند این روش‌ها در عمل در آزمایشگاه‌ها به صورت روتین انجام نمی‌شوند. نتایج نشان داد که استفاده از گلوله های شیشه‌ای و گلوله‌های شیشه‌ای به همراه محلول‌های لیز کننده دیواره سلولی بیشترین مقدار DNA را از این کپک استخراج کردند و این دو روش سریع‌ترین، راحت‌ترین و دارای قابلیت تکرار زیادتر در مقایسه با روش‌های دیگر است.

موتکووا و همکاران (٢٠١١) روش استخراج DNA کلاسیک را با روش مبتنی بر کیت تجاری برای کپک های جنس آسپرژیلوس مقایسه کرده و آن را بهینه کردند [٢]. در روش کلاسیک علاوه بر استفاده از بافرهای لیز کننده و محلول‌های خالص کننده DNA از نیتروژن مایع و امواج فراصوت نیز در فرایند استخراج استفاده شد. نتایج بیانگر این نکته بود که روش استخراج کلاسیک از نقطه نظر مقدار و کیفیت DNA استخراج شده در مقایسه با روش بهینه شده با امواج فراصوت و نیتروژن مایع اختلاف معنی-داری داشته و روش بهینه شده با نیتروژن مایع کارایی بهتری را از خود نشان داده است. همچنین روش‌های مبتنی بر کیت در مقایسه با روش‌های کلاسیک به کار گرفته شده کارایی ضعیف-تری را از خود نشان داده‌اند.

السامرایی و همکاران (٢٠٠٠) روشی ساده را برای استخراج DNA ژنومی را از کپک ها معرفی کردند [٧]. کپک های مورد مطالعه از جنس‌های آسپرژیلوس، فوزاریوم، پنی سیلیوم و رایزوپوس بودند. روش مذکور استفاده از نیتروژن مایع و بافرهای لیز کننده سلولی، رسوب پروتئین‌ها و جداسازی پلی‌ساکاریدها با استفاده از NaCl و فنل - کلروفرم و در نهایت خالص سازی DNA با اتانول انجام گرفت. نتایج نشان داد که این روش می-تواند به طور موثری وزن مولکولی DNA استحصالی و همچنین قابلیت هضم را توسط آنزیم های برش‌گر را افزایش دهد.

رونگ گائو و همکاران (٢٠٠٥) دو روش سریع و موثر را در استخراج DNA ژنومی از کپک‌ها معرفی کردند [١١]. این دو روش بر پایه محلول‌های DNAzol و روش Cenis بودند [٧,١٢]. این تحقیق کپک‌های جنس های آسپرژیلوس، فوزاریوم، پنی سیلیوم و رایزوپوس را نیز شامل می شدند. نتایج نشان دادند که روش Cenis بازدهی DNA بالاتری را نسبت به روش DNAzol دارد و میزان خلوص DNA در این روش نیز بالاتر است.

پاسونه و همکاران (٢٠١٠) کپک جنس آسپرژیلوس را از بادام زمینی انبار شده جداسازی کرده و اثر شرایط انبارداری را بر روی تولید آفلاتوکسین بررسی کردند [١٣]. استخراج DNA در این تحقیق به روش کلاسیک و با استفاده از بافر استخراج و گلوله-های شیشه‌ای انجام گرفت. برای حذف ترکیبات پلی ساکاریدی و پروتئینی از فنل: کلروفرم: ایزوآمیل الکل به نسبت ١:٢٤:٢٥ و محلول ٥ مولار NaCl استفاده شد و خالص سازی DNA توسط اتانول ٧٠ درصد انجام گرفت. .

سانتیه و همکاران (٢٠٠٩) با استفاده از تکنیک Multiplex Real Time PCR کپک‌های توکسین‌زای آسپرژیلوس، پنی سیلیوم و فوزاریوم را شناسایی و اندازه گیری کردند [١٤]. جهت استخراج DNA از روش کلاسیک و با استفاده از محلول‌های استخراج حاوی SDS، Tris، NaCl و EDTA استفاده کردند و در مراحل بعدی جهت حذف ترکیبات کربوهیدرات و پروتئینی از کلروفرم: ایزوآمیل الکل به نسبت ٢٤ به ١ استفاده کردند. کمیت و کیفیت DNA بدست آمده کپک‌ها با این روش برای انجام مراحل بعدی این تحقیق مناسب بود.

٥- منابع

[1] Elahami Rad, A H. Shahidi. F. Evaluation of Physicochemical and Microbial Changes of Bulk Tomato Paste in Cold Storage. Journal of Science and Technology of Agriculture and Natural Resources 2004; 8 (1): 171-188

[2] Motkova P and vytrasova J. Compariosn of methods for isolating Fungal DNA. Czech J. food Sci 2011; 29: 76-85

[3] Noterman S and Heuvelman J.C. Immunological detection of moulds in food by using the enzyme- linked immunosorbent assay

(ELISA) preparation of antigens. International journal of food microbiology 1985; 2: 247-258

[4] Alastair R, Naresh p, James G. Immunofluorescence detection of mould – an aid to the Howard mould counting technique. Food microbiology 1988; 5: 33-42

[5] Sadeghi M, Mohammadi H, Moradi Shahrbabak M, Moradi Shahrbabak H.. Comparison of the efficiency of the buffer/detergent extraction and standard salting-out methods for DNA extraction from blood and semen samples. Genetics in the 3rd Millennium 2011; 8 (4) :2155-2161

[6] jin J, lee Y, wickes BL. simple chemical extraction method for DNA isolation from aspergillus fumigatus and other aspergillus species. Journal of clinical microbiology 2004; 42 (9): 4293-4296.

[7] Al-Samarrai TH, Schmid J. A simple method for extraction of fungal genomic DNA. Letters in Applied Microbiology 2000; 30: 53–56

[8] Cenis J.L. Rapid extraction of fungal DNA for PCR amplification. Nucleic Acids Research 1992; 20: 2380.

[9] Griffith LJ, Ayim M, Doffman S, wilks M, Miller MR, Agrawal SG. Comparison of DNA extraction methods for *Aspergillus fumigatus* using real-time PCR. Journal of Medical microbiology 2006; SS. 1187-1191.

[10] Prabha TR, Revathi K, Vinod MS, Shanthakumar SP, Bernard.P. A simple method for total genomic DNA extraction from water moulds. Current Science 2013; 104. 3 (10)

[11] Guo JR, Schnieder F, Abd-Elsalam KA, Verreet.JA. Rapid and efficient extraction of genomic DNA from different phytopathogenic fungi using DNAzol reagent. Biotechnology Letters 2005; 27: 3–6

[12] Chomezynski P, Mackey K, Drews R, Wilfinger W. DNAzol: a reagent for the rapid isolation of genomic DNA. Bio Techniques 1997; 22: 550–553.

[13] Alejandra Passone M, Cristina Rosso L, Ciancio A, Etcheverry M. Detection and quantification of *Aspergillus* section *Flavi* spp. in stored peanuts by real-time PCR of *nor*-1 gene, and effects of storage conditions on aflatoxin production. International Journal of Food Microbiology 2010; 138 (3): 276–281

[14] Suanthie Y, Maribeth A, Woloshuk CP. Multiplex real-time PCR for detection and quantification of mycotoxigenic Aspergillus, Penicillium and Fusarium. Journal of Stored Products Research 2009; 45: 139–145

Comparison of optimized DNA extraction from mold Aspergillus, Penicillium and Rhizopus of tomato paste

Karazhyan, R. [1*], Habibi-najafi, M. H. [2], Yavarmanesh, M.[3] , Edalatian dovom, M. R.[3] Pourianfar, H. R[4]

1. Phd. Member of scientific staff. Food quality and safety research department. Food science and technology research institute.
2. professor. Ferdowsi University of Mashhad Faculty of Agriculture Department of Food Science & Technology
3. Assistant professor Ferdowsi university of Mashhad, Faculty of agriculture, Department of food science & technology
4. Assistant Professor. Iranian Academic Centre for Education, Culture and Research (ACECR)-Mashhad Branch

(Received: 2015/08/15 Accepted: 2016/02/15)

In this study, the optimized method for DNA extraction from Aspergillus niger, Rhizopus oryzae and Penicillium chrysogenom in tomato paste were used. These methods are presented in accordance with the Al-Samarai That changes in the concentration of extraction buffer and some stages it were given to the optimization method. Mold spores of at different levels (10^1, 10^3 and 10^5 CFU/g) were added to the tomato paste. After mycelium growth DNA extraction was perfomed by this methods. This method in terms of quality and quantity of DNA extracted was studied using spectrophotometer with NanoDrop. The extracted DNA using gel electrophoresis for protein contamination and absence of smear were evaluated. In order to investigate The contamination and no presecnce of PCR inhibitors determined with PCR that performed forward and reverse primers. Results of gel electrophoresis and PCR assay showed that This method is suitable for DNA extraction is the mold of tomato paste.

Keywords: DNA extraction, *Aspergillus niger*, *Penicillium chrysogenom*, *Rhizopus oryzae*, Tomato paste

* Corresponding Author E-Mail Address: reza_karazhyan2002@yahoo.com