Quarterly of the Horizon of Medical Sciences
Volume 21, Special Issue, 2015
Pages: 7-11
Type: Original Research

Polyethylene Glycol 200; a Rapid and Inexpensive Method for DNA Extraction from Gram Positive and Gram Negative Bacteria

Mardaneh J.[1] *PhD*, Mohammadzadeh A.* *PhD*, Masomian Z.[2] *BSc*

*Microbiology Department, Medicine School, Gonabad University of Medical Sciences, Gonabad, Iran
[1]Microbiology Department, Medicine School, Gonabad University of Medical Sciences, Gonabad, Iran
[2]Student Research Committee, Gonabad University of Medical Sciences, Gonabad, Iran

Abstract

Aims: In general, DNA extraction from the gram-positive bacteria is too hard and expensive. The aim of this study was to utilize Polyethylene Glycol 200 in order to extract DNA from Lactobacillus acidophilus gram-positive bacteria and Pseudomonas aeruginosa gram-negative bacteria, as well as PCR conducting on them to search Lacto and ExoA genes, respectively.

Materials & Methods: Standard strains of Lactobacillus acidophilus gram-positive bacteria and Pseudomonas aeruginosa gram-negative bacteria were cultured on MRS and Mueller-Hinton agar, respectively. Then, the bacteria colony was dissolved in TE buffer and DNA was extracted using PEG 200. PCR reactions were done on the specific Lacto and ExoA genes of each organism.

Findings: PCR was done on the selected genes for each organism; and bp231 Lacto genes were detected for the standard strain of Lactobacillus acidophilus and the strain of Lactobacillus acidophilus separated from the dairy. In addition, bp396 ExoA genes were detected for the standard strain of Pseudomonas aeruginosa and the clinical strains of Pseudomonas aeruginosa on agarose gel.

Conclusion: Since DNA extraction from gram-positive bacteria is too hard due their very strong walls, PEG 200 might be a very proper, affordable, quick, and available method to extract DNA from the gram-positive bacteria. In addition, DNA of gram-negative bacteria and fungi can simply be extracted through the method.

Keywords: Polyethylene Glycol 200; DNA Extraction; Gram-Positive Bacteria; Gram-Negative Bacteria;

*Corresponding Author
Tel: +985157225027
Fax: +985157223814
Address: Gonabad University of Medical Sciences, Near Asian Road, Gonabad, Iran. Postal Code: 9691793718
alm13604@gmail.com
Received: December 24, 2015 Accepted: April 19, 2016 ePublished: June 7, 2016

پلی‌اتیلن گلیکول ۲۰۰؛ روشی سریع و ارزان برای استخراج DNA از باکتری‌های گرم‌مثبت و گرم‌منفی

جلال مردانه PhD
گروه میکروب‌شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی گناباد، گناباد، ایران
علیرضا محمدزاده* PhD
گروه میکروب‌شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی گناباد، گناباد، ایران
زهره معصومیان BSc
کمیته تحقیقات دانشجویی، دانشگاه علوم پزشکی گناباد، گناباد، ایران

چکیده

اهداف: به‌طور کلی استخراج DNA از باکتری‌های گرم‌مثبت بسیار مشکل و پرهزینه است. هدف از این مطالعه استفاده از پلی‌اتیلن گلیکول ۲۰۰ به منظور استخراج DNA از باکتری گرم‌مثبت *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* و باکتری گرم‌منفی *سودوموناس آئروژینوزا* و انجام PCR روی آنها به منظور جست‌وجو به ترتیب برای ژن‌های *Lacto* و *ExoA* بود.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه سویه استاندارد باکتری گرم‌مثبت *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* و باکتری گرم‌منفی *سودوموناس آئروژینوزا* به ترتیب بر روی محیط کشت MRS آگار و مولرهینتون آگار کشت داده شدند. سپس کلونی باکتری در بافر TE حل شد و با استفاده از PEG 200 استخراج DNA انجام شد. واکنش PCR بر روی ژن‌های *Lacto* (اختصاصی *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس*) و *ExoA* (سودوموناس آئروژینوزا) اختصاصی هر ارگانیسم انجام شد.

یافته‌ها: PCR روی ژن‌های انتخاب‌شده برای هر اُرگانیسم انجام و وجود ژن‌های *Lacto* با اندازه bp۲۳۱ برای سویه استاندارد *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* و سویه *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* جداشده از لبنیات و *ExoA* با اندازه bp۳۹۶ برای سویه استاندارد *سودوموناس آئروژینوزا* و سویه‌های بالینی *سودوموناس آئروژینوزا* روی ژل آگارز مشاهده شد.

نتیجه‌گیری: از آنجایی که استخراج DNA از باکتری‌های گرم‌مثبت به دلیل داشتن دیواره بسیار محکم مشکل است، استفاده از PEG 200 می‌تواند روش بسیار مناسب، مقرون به‌صرفه و بسیار سریع و در دسترس برای استخراج DNA از باکتری‌های گرم‌مثبت باشد. علاوه بر این، با استفاده از این روش می‌توان به آسانی DNA باکتری‌های گرم‌منفی و قارچ‌ها را نیز استخراج نمود.

کلیدواژه‌ها: پلی‌اتیلن گلیکول ۲۰۰، استخراج DNA، باکتری‌های گرم‌مثبت، باکتری‌های گرم‌منفی

تاریخ دریافت: ۱۳۹۴/۱۱/۰۴
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۵/۰۱/۳۱
*نویسنده مسئول: alm13604@gmail.com

مقدمه

مرحله ابتدایی بسیاری از مطالعات مولکولی استخراج DNA و خالص‌سازی است. اگر چه بسیاری از پروتکل‌های استخراج و کیت‌های تجاری که هم اکنون در دسترس هستند، از تفاوت‌ها و آلودگی‌های پایدار در DNA استخراج‌شده رنج می‌برند. این آلودگی‌ها به ویژه مواد آلی ممکن است تکثیر PCR را مهار کند. برخی از متداول‌ترین روش‌های خالص‌سازی شامل جداسازی مواد آلی از طریق آگار الکتروفورز، پلی‌ونیل‌بیرولیدون (PVPP) و اتصال DNA مبتنی بر سیلیکا، خالص‌سازی DNA که به منظور دورریختن بافر استخراج و آلودگی‌ها انجام می‌شود نیز یک مرحله اساسی که تکنیک آماده‌سازی را تحت تاثیر قرار می‌دهند. متداول‌ترین نتیجه رسوب با ایزوپروپانول به دست آمده است اما اتانول و پلی‌اتیلن گلیکول نیز استفاده می‌شود [۱]. اخیراً *لامنوتن* و همکاران گزارش کرده‌اند که استفاده از ۱۰٪ پلی‌اتیلن گلیکول ۸۰۰۰ به جای ایزوپروپاول، منجر به کاهش چهاربرابری در مواد آلی موجود بدون کاهش در محصولات DNA می‌شود. گزارش‌های دیگر در خصوص اثر رسوب توسط PEG روی محصول DNA و مواد آلی متناقض است. این فرضیه وجود دارد که این تفاوت‌ها می‌تواند در نتیجه تفاوت در پروتکل‌های رسوب باشد (یعنی غلظت PEG) که به وسیله محققان مختلف استفاده شده است [۳-۱].

گسترش روش‌های بیولوژی ملکولی یعنی روش بر پایه PCR شامل استخراج DNA و واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز (PCR) منجر به پدیدآمدن تکنیک‌های جدید شده است که محدود به قابل کشت‌بودن میکروأرگانیسم‌ها نمی‌شود. بنابراین استخراج DNA طبیعی یک روش مفید و جایگزین برای مطالعه اجتماعات میکروبی مختلف در آزمایشگاه‌های میکروب‌شناسی بالینی و غیربالینی است. تعداد زیادی از روش‌ها برای استخراج DNA ژنومی منتشر شده است. اغلب این روش‌ها پر زحمت هستند. تغییر در کارآیی محصول لیزشده و خلوص DNA می‌تواند اساس تکنیک آنالتیکال از قبیل محصول PCR و آنالیز کمی را تحت تاثیر قرار دهد. بنابراین به یک روش مناسب و انتخابی با کارآیی استخراج بالا نیاز است که طراحی گشته و به صورت روتین استفاده شود. روش‌های اساسی استخراج DNA از سلول‌ها و بافت‌ها شامل لیزکردن نمونه و جداسازی اسیدنوکلئیک از آلودگی‌ها می‌باشد. از آنجایی که DNA بیشتر یا کمتر یونیورسال برای همه گونه‌ها است، آلودگی‌ها و میزان نسبی آنها به طور قابل توجهی تفاوت خواهد نمود [۲].

امروزه آزمایشات ژنتیک و شناسایی بیماری‌های عفونی نقش مهمی را در زمینه میکروبیولوژی بازی می‌کنند. این یک روش تشخیصی بر پایه بیولوژی ملکولی برای شناسایی و آنالیزنمودن توالی باز اسیدنوکلئیک (DNA یا RNA) است که برای اهداف میکروأرگانیسم اختصاصی است و طیف کاربردهای این روش گسترده بوده و می‌تواند به دو دسته تقسیم‌بندی شود. یکی استفاده

از روش‌های شناسایی میکروارگانیسم‌ها به طور مستقیم در نمونه‌های مورد آزمایش بدون انجام کشت است که منجر به افزایش سرعت انجام تست می‌شود. تایید حساسیت شناسایی و شناسایی میکروارگانیسم‌هایی که ممکن است مشکل یا حتی کشت آنها خطرناک باشد. گزارش‌هایی در خصوص شناسایی DNA باکتریایی در انواع مختلفی از نمونه‌های بالینی از قبیل خون، پلاسما، مایع مغزی نخاعی و دیگر نمونه‌ها با استفاده از این روش است [۵، ۶].

کاربرد دیگر آن استفاده از آنها در آنالیز اپیدمیولوژیک به منظور کلاس‌بندی باکتری‌هایی که قبلاً جداسازی شده و کشت داده شده، شناسایی و تایید گونه‌های آنها و عوامل ایجادکننده است. در بررسی ژنتیکی پاتوژن‌های باکتریایی، استخراج اسیدهای نوکلئیک از باکتری‌های جداشده در نمونه‌ها اولین قدم است. با استفاده از اسیدنوکلئیک تهیه‌شده از نمونه‌ها، ژن‌های هدف به وسیله PCR و پرایمرهای مختلف تکثیر داده شده و به وسیله تکنیک‌های مختلف شناسایی می‌شوند. مشکل این دستاوردهای بیولوژی ملکولی دست‌یابی به استخراج اسیدهای نوکلئیک از باکتری‌های گرم‌مثبت است. برای استخراج اسیدهای نوکلئیک از باکتری‌ها، سلول‌های باکتریایی پاره شده و اجازه داده می‌شود که DNA موجود در سیتوپلاسم آزاد شود. باکتری‌های گرم‌مثبت دارای یک دیواره سلولی ضخیم متشکل از لایه‌های متعدد پپتیدوگلیکان است که به آسانی تخریب نمی‌شوند که این عمل به کمک آنزیم‌های تخریب‌کننده پپتیدوگلیکان انجام می‌شود که بسیار هم گران‌قیمت بوده و برای باکتری‌های مختلف متفاوت است. از سوی دیگر نوع باکتری‌های موجود در نمونه‌ها نامشخص است از این رو روش‌های استخراج اسیدنوکلئیک که ساده‌تر، سریع‌تر، قابل استفاده برای انواع باکتری‌ها و کم‌هزینه‌تر باشند، بسیار کاربردی خواهند بود [۷-۵].

هدف از این مطالعه استفاده از پلی‌اتیلن گلیکول ۲۰۰ (PEG 200) به منظور استخراج DNA از باکتری گرم‌مثبت *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* و باکتری گرم‌منفی *سودوموناس آئروژینوزا* و انجام PCR روی آنها به منظور جست‌وجو به ترتیب برای ژن‌های *Lacto* و *ExoA* بود.

مواد و روش‌ها

تهیه پلی‌اتیلن گلیکول ۲۰۰: ابتدا ۶گرم پلی‌اتیلن گلیکول ۲۰۰ را وزن نموده سپس به آن ۹۳میکرولیتر NaOH یا KOH ۲مولار و همچنین ۳۹لاندا آب دیونیزه (DW) اضافه شد. pH نهایی این محلول ۱۳/۱۵ تنظیم شد.

کشت باکتری‌های گرم‌مثبت و گرم‌منفی روی محیط کشت: ابتدا سویه استاندارد باکتری گرم‌منفی *سودوموناس آئروژینوزا* (ATCC 27853) روی محیط کشت مولرهینتون آگار و باکتری گرم‌مثبت *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* (ATCC 314) روی محیط انتخابی لاکتوباسیلوس MRS آگار کشت داده و پلیت‌ها در دمای ۳۵°C تا ۳۷ به‌مدت ۱۶ تا ۱۸ساعت انکوبه شدند. سپس از هر یک از این اُرگانیسم‌ها یک لوپ از کلونی باکتری در ۵۰میکرولیتر بافر TE (تریس ۱۰mM؛ EDTA ۱mM؛ pH=۷/۸) حل و ۵۰۰میکرولیتر از PEG به میکروتیوب اضافه شد. پیپتینگ به آرامی انجام شد و میکروتیوب‌ها در دمای ۹۴°C به‌مدت ۱۵دقیقه قرار داده شده، سپس وورتکس شدند و در یخچال به منظور انجام PCR نگهداری شدند.

PCR: قبل از انجام PCR، نمونه DNA استخراج‌شده به وسیله دستگاه اسپکتروفتومتر و نیز بردن روی ژل آگارز و انجام الکتروفورز و سپس مشاهده باند زیر نور UV، مورد ارزیابی قرار گرفت. از پرایمرهای [۸، ۹] موجود در جدول برای انجام PCR استفاده شد (جدول ۱).

جدول ۱) پرایمرهای مورد استفاده برای شناسایی ژن *ExoA* در *سودوموناس آئروژینوزا* و ژن *Lacto* در *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس*

ژن هدف	توالی پرایمر	طول (باز)	اندازه آمپلیکون (جفت باز)
ExoA	For: 5′-GACAACGCCCTCAGCATCACCAGC-3′	۲۴	۳۹۶
	Rev: 5′-CGCTGGCCCATTCGCTCCAGCGCT-3′	۲۴	
Lacto	For: 5′-TGGAAACAGRTGCTAATACCG-3′	۲۱	۲۳۱
	Rev: 5′-GTCCATTGTGGAAGATTCCC-3′	۲۰	

واکنش PCR جهت شناسایی ژن *Lacto* در سویه استاندارد *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* (ATCC 314) و سویه *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* جداشده از لبنیات (۱۲ ایزوله) و ژن *ExoA* در سویه استاندارد *سودوموناس آئروژینوزا* (ATCC 27853) و سویه‌های بالینی *سودوموناس آئروژینوزا* (۵ ایزوله) انجام شد (جدول ۲).

جدول ۲) مراحل مختلف واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) برای شناسایی ژن‌های *ExoA* و *Lacto* (۳۵ چرخه)

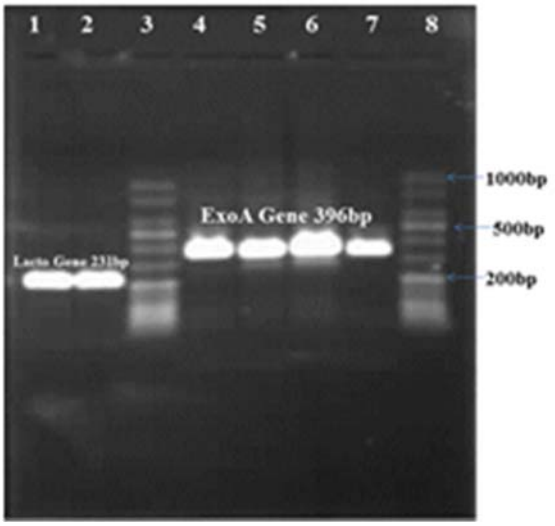
مرحله	دما (سانتی‌گراد)	زمان
پیش‌واسرشت	۹۴	۵دقیقه
واسرشت	۹۴	۳۰ثانیه
آنیلینگ	۶۸ (*P. aeruginosa*)؛ ۵۵ (*L. acidophilus*)	۳۰ثانیه
طویل‌سازی	۷۲	۲دقیقه
پساطویل‌سازی	۷۲	۵دقیقه

محصول PCR با استفاده از آگارز ۱٪ روی دستگاه الکتروفورز حاوی بافر TBE 0.5X الکتروفورز شد و با استفاده از دستگاه

ترانسلومیناتور به منظور جستجو باند bp۳۹۶ و bp۲۳۱ به ترتیب برای ژن‌های *ExoA* در باکتری *سودوموناس آئروژینوزا* و *Lacto* در باکتری *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* مورد آنالیز قرار گرفت.

یافته‌ها

DNA با استفاده از PEG استخراج و روی ژل آگارز ۰/۵٪ الکتروفورز شد. PCR روی ژن‌های انتخاب‌شده برای هر اُرگانیسم انجام و وجود ژن‌های *Lacto* با اندازه bp۲۳۱ برای سویه استاندارد *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* و سویه *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* جداشده از لبنیات و *ExoA* با اندازه bp۳۹۶ برای سویه استاندارد *سودوموناس آئروژینوزا* و سویه‌های بالینی *سودوموناس آئروژینوزا* روی ژل آگارز مشاهده شد (شکل ۱).



شکل ۱) ستون ۱: ژن *Lacto* (bp۲۳۱) سویه استاندارد *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* (ATCC 314)؛ ستون ۲: ژن *Lacto* (bp۲۳۱) سویه *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* جداشده از لبنیات؛ ستون ۳: مارکر bp۵۰؛ ستون ۴: ژن *ExoA* (bp۳۹۶) سویه استاندارد *سودوموناس آئروژینوزا* (ATCC 27853)؛ ستون ۵ تا ۷: ژن *ExoA* (bp۳۹۶) سویه‌های بالینی *سودوموناس آئروژینوزا*؛ ستون ۸: مارکر bp۵۰.

بحث

پس از روش صحیح نمونه‌گیری و نگهداری آن، انتخاب روش استخراج DNA روی نتایج روش‌های ملکولی از جمله PCR تاثیرگذار خواهد بود. به طور ویژه اولین قدم در استخراج DNA باکتریایی تخریب یا لیز غشا، بسته به تاکسونومی آن و ضخامت و یکپارچگی دیواره سلولی آن متفاوت خواهد بود [۱۰].

مشکل‌ترین قدم در به دست‌آوردن DNA از کشت‌های باکتریایی تخریب سلول‌های باکتریایی است. دیواره سلولی در باکتری‌های گرم‌مثبت از جنس پپتیدوگلیکان بوده و به صورت چندین لایه محکم اطراف باکتری را احاطه کرده است. دیواره سلولی باکتری‌های گرم‌مثبت دارای طیف وسیعی از ملکول‌ها هستند که اگزواسکلت محکم را برای محافظت علیه لیز مکانیکی و اسمزی فراهم می‌کند. در دهه گذشته مشخص شده که برخی از مکانیسم‌های منحصربه‌فرد در باکتری‌های گرم‌مثبت وجود دارد که به آنها اجازه می‌دهد پروتئین‌ها را روی سطوح خود ثابت کرده یا به وسیله اتصال کووالانی یا غیرکووالانی پروتئین به پپتیدوگلیکان یا پلیمرهای دیواره‌ای ثانویه از قبیل اسیدهای تایکوئیک این ملکول‌ها در دیواره سلول باکتری گرم‌مثبت در برابر لیزشدن توسط مواد شیمیایی مقاومت می‌کنند و این یکی از دلایل اصلی عدم به دست‌آوردن DNA مناسب برای انجام PCR است [۱۱].

لور و همکاران از PEG به عنوان ترکیبی برای رسوب‌دادن و استخراج DNA استفاده نموده‌اند و آن را به عنوان روشی مناسب و ارزان‌قیمت پیشنهاد می‌کنند [۱۲]. در بررسی‌های انجام‌شده توسط *دویی* و همکاران از پلی‌اتیلن گلیکول برای استخراج DNA استفاده کرده و عنوان نموده‌اند که مانع از رسوب اسیدهای هیومیک به همراه DNA می‌شود، در صورتی که در استخراج DNA توسط اتانول یا ایزوپروپانول اسیدهای هیومیک نیز همراه با ژنوم رسوب نموده‌اند و به عنوان مهارکننده در روند انجام PCR محسوب می‌شوند [۱۳، ۱۴].

در آزمایشگاه‌های بالینی، مواد غذایی و محیطی DNA با کیفیت بالا برای شناسایی میکروارگانیسم‌ها در نمونه‌ها لازم است. برای رسیدن به این هدف، چندین روش توسط محققان مورد مختلف مورد استفاده قرار گرفته‌اند. این روش‌ها به دو گروه اصلی شامل استفاده از روش‌های استخراج دستی و روش‌های استخراج به کمک کیت‌های تجاری تقسیم می‌شوند. کیت‌ها اگرچه ممکن است DNA با کیفیت بالاتر فراهم کنند اما در مقایسه به روش‌های دستی گران‌قیمت‌تر هستند. در مقابل روش‌های دستی زمان‌بر بوده و باید تمام بافرها و مواد مورد نیاز به صورت دستی تهیه شوند. در نتیجه انتخاب روشی که بتواند محصول DNA قابل قبول به ما دهد و نتایج مطلوبی در روش ملکولی حاصل شود، حائز اهمیت است. از سوی دیگر در بسیاری از هزینه‌ها صرفه‌جویی شده و همیشه در دسترس خواهد بود.

در مطالعه حاضر با استفاده از روش PEG به محصولات DNA مطلوب و کافی برای انجام PCR دست یافتیم. از نظر هزینه PEG بسیار مقرون به‌صرفه بوده و با صرف هزینه اندکی می‌توان از تعداد بسیار زیادی از باکتری‌ها DNA استخراج نمود. از سوی دیگر این روش بسیار سریع انجام شده و به طور کلی به همراه آماده‌سازی نمونه‌ها حدود ۲۰دقیقه زمان نیاز است. باکتری‌های گرم‌مثبت به ویژه باسیلوس‌ها و استرپتوکوکوس‌ها دارای دیواره سلولی بسیار ضخیم بوده و تخریب این دیواره بسیار مشکل و نیاز به زمان بسیار طولانی و گاهی یک‌شبانه‌روز انکوباسیون در مجاورت آنزیم‌ها و

صرف هزینه‌های بسیار برای خرید آنزیم‌ها و ترکیبات لیزکننده دیگر است اما به کمک روش PEG این مشکلات رفع خواهند شد. علاوه بر این، از روش PEG 200 می‌توان برای استخراج DNA از دیگر اُرگانیسم‌های دارای دیواره سخت و محکم نظیر قارچ‌ها استفاده نمود زیرا آنها به دلیل داشتن دیواره کتینی بسیار محکم، به‌راحتی تخریب نمی‌شود.

نتیجه‌گیری

از آنجایی که استخراج DNA از باکتری‌های گرم‌مثبت به دلیل داشتن دیواره بسیار محکم مشکل است، استفاده از PEG 200 می‌تواند روش بسیار مناسب، مقرون به‌صرفه و بسیار سریع و در دسترس برای استخراج DNA از باکتری‌های گرم‌مثبت باشد. علاوه بر این، با استفاده از این روش می‌توان به آسانی DNA باکتری‌های گرم‌منفی و قارچ‌ها را نیز استخراج نمود.

تشکر و قدردانی: نویسندگان از همکاری صمیمانه همکاران در آزمایشگاه میکروب‌شناسی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی گناباد تشکر و قدردانی می‌کنند.

تاییدیه اخلاقی: نویسندگان مقاله کلیه اصول اخلاقی مربوط به تحقیقات را رعایت نموده و مجوزهای لازم را از مراجع مربوطه اخذ نمودند.

تعارض منافع: هیچگونه تعارض منافعی گزارش نشده است.

منابع مالی: مطالعه حاضر با حمایت مالی دانشگاه علوم پزشکی گناباد انجام شد.

منابع

1- Arbeli Z, Fuentes CL. Improved purification and PCR amplification of DNA from environmental samples. FEMS Microbiol Lett. 2007;272(2):269-75.

2- Luna MG, Dell AA, Danovaro R. DNA extraction procedure: a critical issue for bacterial diversity assessment in marine sediments. Environ Microbiol. 2006;l8:308-20.

3- Lemarchand K, Berthiaumea F, Maynarda C, Harelb J, Paymentc P, Bayardelled P, et al. Optimization of microbial DNA extraction and purification from raw wastewater samples for downstream pathogen detection by microarrays. J Microbiol Method. 2005;63:115-26.

4- Shahriar M, Haque Md R, Kabir SH, Dewan I, Bhuyian MH. Effect of proteinase-K on genomic DNA extraction from gram-positive strains. S J Pharm Sci. 2011;4(1):53-7.

5- Sergeant MJ, Constantinidou C, Cogan T, Penn CW, Pallen MJ. High-throughput sequencing of 16S rRNA gene amplicons: effects of extraction procedure, primer length and annealing temperature. PLoS One. 2012;7(5):e38094.

6- Mozioğlu E, Akgöz M, Tamerler C, Kocagöz ZT. A simple guanidinium isothiocyanate method for bacterial genomic DNA isolation. Turk J Biol. 2014;38:125-9.

7- Elizaquível P, Aznar R. Comparison of four commercial DNA extraction kits for PCR detection of Listeria monocytogenes, Salmonella, Escherichia coli O157:H7, and Staphylococcus aureus in fresh, minimally processed vegetables. J Food Protect. 2008;l71:2110-4.

8- Scaccabarozzi L, Leoni L, Ballarini A, Barberio A, Locatelli C, Casula A, et al. Pseudomonas aeruginosa in dairy goats: Genotypic and phenotypic comparison of intramammary and environmental isolates. PLoS One. 2015;10(11):e0142973.

9- Byun R, Nadkarni MA, Chhour KL, Martin FE, Jacques NA, Hunter N. Quantitative analysis of diverse Lactobacillus species present in advanced dental caries. J Clin Microbiol. 2004;42(7):3128-36.

10- Wesolowska-Andersen A, Bahl MI, Carvalho V, Kristiansen K, Sicheritz-Pontén T, Gupta R, et al. Choice of bacterial DNA extraction method from fecal material influences community structure as evaluated by metagenomic analysis. Microbiome. 2014 ;2:19.

11- Chapaval L, Moon DH, Gomes JE, Duarte FR, Tsai SM. An alternative method for Staphylococcus aureusDNA isolation. Arq Bras Med Vet Zootec. 2008;60(2):299-306.

12- Lever MA, Torti A, Eickenbusch P, Michaud AB, Šantl-Temkiv T, Jørgensen BB. A modular method for the extraction of DNA and RNA, and the separation of DNA pools from diverse environmental sample types. Front Microbiol. 2015;6:476.

13- Devi SG, Fathima AA, Radha S, Arunraj R, Curtis WR, Ramya M. A rapid and economical method for efficient DNA extraction from diverse soils suitable for metagenomic applications. PLoS One. 2015;10(7):e0132441.

14- La Montagne MG, Michel FC, Holden PA, Reddy CA. Evaluation of extraction and purification methods for obtaining PCR-amplifiable DNA from compost for microbial community analysis. J Microbiol Meth. 2002;49:255-64.