

مقایسه چهار روش استخراج DNA از باکتری‌های گرم منفی و گرم مثبت

بابک شهبازی^۱، هنار نارنجی^۱

۱- کارشناس ارشد میکروپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی کردستان

ایمیل: hanar.narenji89@gmail.com - شماره موبایل: ۰۹۱۴۳۸۰۰۳۵۷

چکیده

زمینه و هدف: استخراج DNA، اولین مرحله در اجرای تحقیقات مهندسی ژنتیک می‌باشد و بدست آوردن پروتکل مناسب برای تهیه یک DNA خالص، اهمیت بسزایی در تحقیقات مهندسی ژنتیک دارد؛ به همین دلیل برای آن روش‌های گوناگونی ارائه شده است. در تحقیق حاضر، چهار روش مختلف استخراج DNA از باکتری‌های گرم منفی و گرم مثبت از لحاظ کارایی هر کدام از روش‌ها و مقایسه آن‌ها با یکدیگر، مورد بررسی و آزمون قرار گرفته است. هدف این مقاله، دستیابی به روشی سریع‌تر و کم‌هزینه‌تر استخراج DNA ژنومی برای باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی است.

روش بررسی: در این مطالعه، از باکتری‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* و *ویبریوکلرا* سوسپانسیون‌های باکتری، معادل کدورت نیم مک فالند تهیه شد. سپس به چهار روش: کیت تجاری، جوشاندن، فنل-کلروفرم و روش دترجنت رختشویی، DNA استخراج و هر کدام از روش‌ها در قالب طرح کامل تصادفی سه بار تکرار شد. غلظت‌های نمونه‌های استخراج شده با استفاده از دستگاه نانودراپ و ژل الکتروفورز اندازه‌گیری شد. در ادامه، جهت بررسی کارایی DNA استخراج شده در انجام فرایند‌های پایین دستی، تست‌های REP PCR، PCR و ERIC PCR اختصاصی برای باکتری‌های نام‌برده انجام شد.

یافته‌ها: بررسی غلظت DNA های استخراج شده، نشان دهنده تفاوت چشمگیر میان باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی بود؛ همچنین تجزیه واریانس، تفاوت معنی‌داری بین این چهار روش نشان داد. انجام فرایند‌های پایین دستی نشان داد: همه روش‌های نام‌برده به غیر از روش دترجنت رختشویی، برای انجام PCR در غلظت‌های معین مناسب می‌باشند؛ در روش REP PCR، DNA های استخراج شده به روش‌های جوشاندن، فنل-کلروفرم و کیت تجاری نتایج مورد انتظار را نشان دادند. روش ERIC PCR با DNA های استخراج شده در روش کیت تجاری باندهای مورد نظر را نشان داد ولی در سایر روش‌ها هیچ باندهای مشاهده نشد.

بحث و نتیجه‌گیری: از یافته‌های این تحقیق می‌توان نتیجه گرفت، با وجود حساسیت بیشتر پروتکل کیت تجاری سیناژن در مقایسه با سه روش دیگر، در مقابل، با توجه به زمان و هزینه کمتر و راندمان تقریباً مشابه دو روش فنول کلروفرم و جوشاندن خصوصاً روش جوشاندن، می‌توان از این روش برای استخراج DNA در باکتری‌های گرم منفی و مثبت استفاده کرد.

واژه‌های کلیدی: استخراج DNA باکتری، PCR، ERIC PCR، REP PCR

مقدمه

استخراج DNA ژنومی از سلول‌های باکتریایی با غلظت و % خلوص بالا، یکی از فرایندهای مورد توجه در علم ژنتیک و محققان در آزمایشگاه‌های مولکولی-تحقیقاتی و بالینی می‌باشد^(۱،۲). درک ویژگی‌های شیمیایی و فیزیکی رشته‌های DNA (اندازه، شکل و ساختمان)، توانسته است کمک شایانی به انتخاب روش‌های مختلف جدا سازی آن‌ها کند^(۳). مراحل تهیه کل DNA از یک محیط کشت باکتریایی را می‌توان به چهار مرحله تقسیم کرد: ۱- برداشت باکتری‌هایی که در یک محیط رشد کردند ۲- متلاشی کردن سلول‌ها برای رها سازی محتویاتشان ۳- حذف محتویات عصاره سلولی از مخلوط حاوی DNA ۴- تغلیظ DNA^(۴).

اصلی‌ترین و مهم‌ترین مرحله استخراج DNA باکتری، لیز سلول با استفاده از ترکیبات شیمیایی یا روش‌های فیزیکی می‌باشد؛ به همین دلیل در بیشتر روش‌های رایج، برای لیز باکتری‌های گرم منفی، از ترکیبات شیمیایی Tris HCL، NACL، SDS و EDTA و برای لیز باکتری‌های گرم مثبت، از لیزوزیم و سوکروز به همراه پروتئیناز K، برای لیز پروتئین‌ها استفاده می‌شود^(۵). در کنار این روش‌های دستی، به منظور تسریع و آسان سازی این فرایندها، شرکت‌های بیولوژیک متعددی نیز کیت‌های مختلفی را به بازار ارائه دادند؛ البته وجود مواد اختصاصی، باعث بالا رفتن قیمت آن‌ها شد^(۶).

از جمله روش‌های جایگزینی که بر این اساس توسط برخی از محققان جهت استخراج ژنومی مورد بررسی و استفاده قرار گرفته است، روش فنل-کلروفرم می‌باشد که این روش با توجه به قدرت فنل برای لیز باکتری‌ها، به جای ترکیبات لیز شیمیایی و همچنین

کلروفرم برای حذف موارد اضافه در سال‌های گذشته مورد توجه قرار گرفته است^(۱).

از دیگر روش‌های جایگزین می‌توان به استفاده از دترجنت‌های رختشویی اشاره کرد^(۷). این دترجنت‌ها بر اساس ماهیت شیمیایی و آنزیمی که دارند، می‌توانند با تأثیر گذاری بر غشا و دیواره سلولی باکتری، سبب آزاد شدن محتوی ژنومی سلول شوند. از جمله آنزیم‌های مورد استفاده در این دترجنت‌ها می‌توان به پروتئاز، آمیلاز، لیپاز و سلولاز اشاره کرد. پروتئاز-استفاده‌ترین نوع آنزیم می‌باشد. این آنزیم با فعالیت خود به هیدرولیز باندهای زنجیره پپتیدی سرعت می‌بخشد. با توجه به اینکه در دیواره سلولی باکتری پروتئین‌های فراوانی وجود دارد، این آنزیم می‌تواند در لیز دیواره سلولی باکتری‌ها نقش مهمی داشته باشد.

آمیلاز از دیگر آنزیم‌های مورد استفاده در دترجنت‌های رختشویی است؛ این آنزیم در شکستن پلی‌ساکاریدهای دیواره سلولی و لیز باکتری، به-خصوص باکتری گرم منفی نقش مهمی دارد. آنزیم سلولاز موجود در شوینده‌ها، باعث شکستن پیوند بتا یک و چهار گلیکوزیدی در ساختار سلولزی می‌شود. لیپازها نیز همراه با آمیلاز، در شکستن پلی ساکارید دیواره سلولی و لیز باکتری‌ها نقش دارد^(۸).

در حال حاضر روش‌های کیت‌های تجاری، فنل-کلروفرم و جوشاندن از روش‌های رایج می‌باشند درحالی‌که استفاده از دترجنت رختشویی کمتر مورد استفاده قرار گرفته است.

برای بررسی و مقایسه‌ی کارایی چهار روش کیت‌های تجاری، فنل-کلروفرم، دترجنت رختشویی و جوشاندن، از باکتری‌های *استافیلوکوک اورئوس* و *ویبریو کلرا* استفاده شد. در ادامه جهت تایید نتایج

کردیم و ابتدا به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد قرار دادیم؛ سپس ۴ درجه‌سانتی‌گراد برای مدت ۵ دقیقه سرد کردیم. در مرحله بعد به هر میکروتیوب ۱۰۰ میکرولیتر فنل -کلر فرم اضافه و ورتکس کردیم؛ به مدت ۲۰ دقیقه در دور ۱۲۰۰۰ سانتریفوژ کردیم. فاز آبی را به یک میکروتیوب جدید منتقل و هم حجم آن را کلروفرم -ایزو آمیل الکل اضافه، پس از ورتکس به مدت ۵ دقیقه در دور ۱۲۰۰۰ سانتریفوژ کردیم. مجدداً فاز بالایی را به یک میکروتیوب جدید منتقل و $\frac{1}{10}$ حجم آن سدیم استات ۳ مولار (موجود بر روی یخ) و سه حجم اتانول ۹۶٪ اضافه و مخلوط یاد شده را به مدت ۳۰ دقیقه بر روی یخ نگه داری کردیم. پس از سانتریفوژ به مدت ۱۵ دقیقه در دور ۱۲۰۰۰، به ته‌نشین ۵۰۰ میکرولیتر اتانول ۷۰٪ اضافه کرده و آن را ۵ مرتبه وارونه کردیم. میکروتیوب را به مدت ۵ دقیقه در دور ۱۲۰۰۰ سانتریفوژ، سپس دکانته کردیم و ته‌نشین آن را در خلأ به مدت ۳۰ دقیقه قرار دادیم (یا ۵ دقیقه در دمای ۶۵ درجه خشک کردیم). مقدار ۳۰ میکرولیتر آب دو بار تقطیر و اتوکلاو شده را به نمونه اضافه و در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری کردیم^(۱).

استخراج DNA باکتری‌های گرم منفی بر اساس کیت شرکت سیناژن

برای استخراج DNA با استفاده از کیت تجاری، بر اساس پروتکل شرکت سیناژن موجود در داخل کیت استخراج انجام گرفت.

استخراج به روش جوشاندن

برای استخراج DNA به روش جوشاندن در اولین مرحله، ۴۰۰ میکرو لیتر آب مقطر داخل میکروتیوب ریختیم؛ یک لوپ از کلنی‌های تک

وهمچنین کارآزمایی فرایندهایی که در آن‌ها از DNA ژنومی به عنوان الگو استفاده می‌شود، از تست‌های PCR, REP PCR و ERIC PCR استفاده شد.

روش بررسی

در این مطالعه از سوش های *استافیلوکوکوس اورئوس* و *ویبریو کلرا* ایزوله شده از نمونه های مختلف بالینی که به روش کشت و بیوشیمیایی تایید شده بودند، مورد بررسی قرار گرفتند.

استخراج DNA ژنومی با استفاده از پودر رختشویی تاژ

ابتدا جهت بررسی کارایی نام تجاری مورد اشاره، غلظت‌هایی از پودر تاژ ۵ آنزیم، در آب استریل به میزان ۴۰ میلی گرم در لیتر تهیه شد. به منظور استخراج DNA ژنومی با استفاده از این پودر به ترتیب ۱ میلی لیتر از محیط کشت شبانه حاوی باکتری‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* و *ویبریو کلرا* را به ۲ میکروتیوب منتقل، سپس به هر دو میکروتیوب ۷۰۰ میکرو لیتر از غلظت پودر مورد نظر اضافه و محلول فوق را به مدت یک دقیقه ورتکس کردیم. پس از سانتریفوژ کردن این محلول با دور ۱۱۰۰۰ به مدت سه دقیقه، محلول‌های رویی که حاوی محتویات درون سلولی بود به چهار میکروتیوب جدید منتقل و طبق پروتکل میر نژاد و همکاران انجام شد^(۹).

استخراج DNA ژنومی با استفاده از روش فنل-کلروفرم

برای استخراج DNA در این روش از محلول DXPTM سیناژن که حاوی پروتئیناز K و سدیم دو دسیل سولفات می‌باشد، به روش زیر استفاده شد. در یک میکروتیوب چند کلنی باکتری را به ۸ میکرولیتر محلول DXPTM اضافه سپس کاملاً آن را ورتکس

موجود در محیط کشت برداشت و یک سوسپانسیون نسبتاً غلیظ از باکتری تهیه کردیم، سپس ورتکس کردیم تا سوسپانسیون یکنواخت شود. در ادامه در دور ۸۰۰۰ به مدت ۵ دقیقه در دمای ۲۰ درجه سانتیوفوژ کردیم؛ ۱۰۰ میکرو لیتر NaOH ۵۰ میلی مولار داخل میکروتیوب ریخته و ورتکس انجام شد؛ به دنبال آن میکروتیوب‌ها را ۳۰ دقیقه در بن‌ماری ۱۰۰ درجه قرار می‌دهیم، سپس خارج می‌کنیم تا دمای آن پایین بیاید. ۵۰ میکرو لیتر TIRIS ۲۰ میلی مولار ریختیم و ورتکس کردیم. در مرحله آخر، در دور ۱۲۰۰۰ در دمای ۴ درجه سانتیوفوژ و محلول رویی حاوی DNA استخراجی را به داخل میکروتیوب جدید منتقل کردیم.

بررسی فرایند استخراج

به منظور تعیین غلظت و خلوص DNA استخراج شده، میزان DNA و نسبت میزان جذب A260/A 280 نمونه‌های استخراج شده توسط دستگاه نانودراپ اندازه گیری و تعیین شد. هم چنین جهت ارزیابی یکپارچگی و سلامت DNA استخراجی نمونه‌ها بر روی ژل آگار ۰/۸٪ مورد بررسی قرار گرفتند. در آزمایشات

معیار، بهترین عملکرد بر اساس بررسی همزمان دو شاخص غلظت DNA استخراج شده (بر حسب میزان میکروگرم DNA در یک میلی لیتر) و فاکتور خلوص DNA (طبق شاخص جذب A260/A 280) در نظر گرفته شد. هرچه نسبت میزان جذب نمونه حاوی DNA از ۱/۸ بیشتر باشد نمونه استخراج شده دارای مقدار کمتری پروتئین همراه بوده و در نتیجه از خلوص بیشتری برخوردار می‌باشد.^(۹)

بررسی روش‌های PCR, REP PCR و BOX PCR

واکنش‌های فوق برای تعیین وجود مواد بازدارنده و مداخله کننده طی انجام واکنش انجام شد. واکنش PCR در باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس*، بر روی ژن *mec A* در حجم نهایی ۲۵ میکرو لیتر انجام شد. به هر نمونه شامل ۱۱ میکرو لیتر Master mix (ساخت شرکت سیناژن) و ۱۰ میکرو لیتر آب مقطر استریل، از هر پرایمر F و R نیز یک لاند اضافه شد (در جدول ۱ پرایمر های مورد استفاده نشان داده شده است). در انتها هم دو میکرو لیتر از DNA الگو اضافه شد. فرایند PCR در دستگاه ترموسایکلر مطابق جدول ۲ انجام شد.

جدول ۱: پرایمرهای استفاده شده در این مطالعه برای ژن *mecA*

منبع	Sequence (size)	ژن هدف	پرایمر
This study	AAA CTA CGG TAA CAT TGA TCG CAA C-3'-5'	<i>mecA</i> geneF	1
This study	CTT GTA CCC AAT TTT GAT CCA TTT G-3'-5'	<i>mecA</i> geneR	2

جدول ۲: فرایند PCR در دستگاه ترموسایکلر برای ژن *mecA*

Primary denaturation	95 °C	5 min	1 cycle
Denaturation	95 °C	45 s	35 cycles
Annealing	57.5 °C	45 s	
Extension	72 °C	1 min	
Final Extension	72 °C	10 min	1 cycle

واکنش PCR در باکتری ویبریو کلرا، بر روی ژن *ctxA* در حجم نهایی ۲۵ میکرو لیتر انجام گرفت. به هر نمونه شامل ۱۲ میکرو لیتر Master mix (ساخت شرکت سیناژن) و ۹ میکرو لیتر آب مقطر استریل، از هر پرایمر F و R نیز یک لاند اضافه شد (در جدول ۳ پرایمرهای مورد اس مطابق جدول ۴ انجام شد).

جدول ۳: پرایمرهای استفاده شده در این مطالعه برای ژن *ctxA*

منبع	Sequence (size)	ژن هدف	پرایمر
This study	5'TTGTTAGGCACGATGATGGA-3'	<i>ctxA</i> geneF	1
This study	5'CAAGCACCCCAAAATGAACT-3'	<i>ctxA</i> geneR	2

جدول ۴: فرایند PCR در دستگاه ترموسایکلر برای ژن *ctxA*

Primary denaturation	94 °C	5 min	1 cycle
Denaturation	94 °C	45 s	35 cycles
Annealing	60 °C	45 s	
Extension	72 °C	1 min	
Final Extension	72 °C	10 min	1 cycle

(5'AAGTAAGTGACTGGGGTGAGCC-3')
استفاده شد.

یافته‌ها

پس از انجام فرایند استخراج DNA ژنومی با روش‌های مختلف خلوص و غلظت DNA استخراج

در روش‌های REP و ERIC، سیکل دمایی و میزان مواد همانند ژن *ctxA* در ویبریو کلرا انجام شد. در واکنش PCR REP از پرایمر با توالی: R: (5'IIICGICATCIGGC-3') , pr -F:(5'ICGICTTATCIGGCCTA-3') استفاده شد. در واکنش ERIC PCR نیز از توالی‌های: pr-R: (5'-ATGTAAGCTCCTGGGGATTAC-3') pr -F:

شده، با استفاده از دستگاه نانو دراپ مورد ارزیابی قرار گرفت که نتایج در جدول ۵ مشخص شده است.

جدول ۵: نتایج فاکتور خلوص و غلظت DNA استخراجی

نام روش	فاکتور خلوص	غلظت (ng/ml)
کیت تجاری	۲/۱	۴۳۰
فنل-کلروفرم	۱/۹۵	۴۰۱
جوشاندن	۱/۹۴	۳۸۰
پودر رختشویی	۱/۱	۲۵۰

نتایج نشان داد که در روش کیت تجاری نسبت به سه روش نام برده، با توجه به فاکتور خلوص و غلظت DNA، دارای بهترین عملکرد در جداسازی و تخلیص DNA می باشد و سپس به ترتیب روش های فنل-کلروفرم، جوشاندن و پودر رختشویی تاژ دارای بهترین عملکرد می باشد.

نتایج روش های پایین دستی

DNA های استخراج شده در همه روش ها به غیر از روش پودر رختشویی، دارای عملکرد مناسب در روش PCR، هم در باکتری / استافیلوکوکوس او رئوس و هم در ویبریوکلرا، بودند که روش جوشاندن با توجه به صرف وقت و هزینه کمتر روش مناسب تری برای انجام PCR می باشد.

در روش REP PCR، DNA استخراج شده در روش کیت تجاری در هردو باکتری گرم مثبت و گرم منفی دارای کیفیت مناسب و تعداد باندهای بیشتر در مقایسه با سه روش دیگر می باشد؛ هم چنین روش های فنل-کلروفرم و روش جوشاندن در باکتری گرم منفی دارای تعداد باند قابل قبولی بودند؛ ولی در باکتری گرم مثبت تعداد و کیفیت باندها بسیار کمتر از حد انتظار بود. در روش ERIC PCR، تنها DNA های استخراج

شده از روش کیت تجاری هیچ ممانعتی برای انجام PCR نشان نداد ولی در سایر DNA های استخراج شده هیچ بانندی مشاهده نشد.

بحث و نتیجه گیری

مانند مطالعه کیخاصابر و همکارانش، نتایج این مطالعه نشان داد که روش جوشاندن با توجه به عملکرد مناسب در روش PCR و حتی REP PCR، باید با توجه به صرف زمان و هزینه پایین و بدست آوردن DNA ای با غلظت و خلوص مناسب مورد توجه قرار گیرد^(۱۰). برخلاف مطالعه رضا میر نژاد و ناصری که گزارش کردند روش دترجنت های رختشویی DNA ای با خلوص و غلظت بالا فراهم می کند و هیچ اختلالی در فرایند های پایین دستی ایجاد نمی کند^(۱۱،۹). نتایج این مطالعه نشان داد: به طور میانگین DNA های استخراج شده به روش دترجنت رختشویی، علاوه بر اینکه دارای خلوص پایین در روش های پایین دستی بود، نتایج مورد انتظار هم حاصل نشد که می تواند به دلیل نوع و نسبت متفاوت مواد پایه تشکیل دهنده این پودرها و نوع آنزیم های موجود در آن ها باشد^(۱۲).

همچنین همانند مطالعه چنگ و همکارانش که روش فنل-کلروفرم را روش مناسبی ارزیابی کردند^(۱)، نتایج این مطالعه هم مناسب بودن این روش را نشان داد؛ اما با توجه به اینکه اشباع کردن فنل خود هم دشوار است و بیشتر افراد به آن حساسیت نشان می دهند و با توجه به نتایج یکسانی که روش جوشاندن و روش فنل-کلروفرم دارا می باشند، بنابراین پیشنهاد می شود از روش جوشاندن که کم خطر است، استفاده شود.

نتایج این مطالعه نشان داد، کیت های تجاری که با دقت و مطالعه بسیار تهیه می شوند، دارای بهترین

۱/۹۵، جوشاندن ۱/۹۴ و دترجنت رختشویی ۱/۱ می‌باشد. قابل توجه است که روش کیت تجاری در همه‌ی فعالیت‌های پایین دستی هیچ مشکلی ایجاد نمی‌کند.

عملکرد از لحاظ فرایند استخراج و همچنین بر مبنای DNA ژنومیک می‌باشند و با فاکتور خلوص ۲/۱، دارای بهترین خلوص و غلظت در میان روش‌های مورد آزمایش این تحقیق هستند. بعد از روش کیت تجاری، به ترتیب: روش‌های فنل-کلروفرم با فاکتور خلوص

References

1. Cheng H.R. J.N. Extremely rapid extraction of DNA from bacteria and yeasts. *Biotechnol Lett*, 2006;28(1):55-9.
2. Park D. Genomic DNA isolation from different biological materials. *Methods Mol Biol*, 2007;353:3-13.
۳. عقدایی ع، جعفر م، بیوتکنولوژی گیاهی، موسسه تحقیقات و جنگل‌ها، ۱۳۸۰.
4. Bahador.A., H. Etemadi, B. Kazemi, R. Ghorbanzadeh. Extraction method for detection of mycobacterium tuberculosis by PCR. *J Med Sci*. 2004; 4: 252-6.
5. Lee YK. Kim HW, Liu CL, Lee HK. A simple method for DNA extraction from marine bacteria that produce extracellular materials. *J Microbiol Methods*. 2003; 52:245-50.
6. Drabek J, Petrek M. A sugar laundry detergent and salt method for extraction of deoxyribonucleic acid from blood. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub*, 2002;146:37-9.
7. Cataldo MA, Taglietti F, Petrosillo N. Methicillinresistant staphylococcus aureus. a community health threat. *Postgrad Med*. 2010;122: 16-23.
8. Olsen HS The role of enzymes in modern detergency. *J Surfactants Deterg*. 1998; 44:555-67.
9. مقدم م، بابولیان ح، میرنژاد ر، شاکری ف. استخراج سریع DNA ژنومی /ستافیلوکوکوس/ اورئوس توسط دترجنت های رختشویی و ارزیابی کارایی این DNA در انجام فرایندهای پائین دستی با استفاده از PCR. *مجله علوم آزمایشگاهی*، شماره ۱، دوره ششم، ۱۳۹۱، صفحات ۳۵-۴۲.
۱۰. کیخا صابر م، مهدی نژاد ن، تهامی س. مقایسه چهار روش استخراج دی ان ای از باکتری های گرم منفی، همایش منطقه ای غذا و بیوتکنولوژی، ۱۳۸۸.
11. Nasiri H, Rasaee MJ, Rahbarizadeh F. Modified salting-out method: high-yield, high-quality genomic DNA extraction from whole blood using laundry detergent. *J Clin Lab Anal*. 2005; 19: 229-32.
12. Pusch C. A simple and fast procedure for high quality DNA isolation from gels using laundry detergent and inverted columns. *Electrophoresis*. 1997; 18: 1103-4.

Comparison of four methods of DNA extraction from gram-negative and gram-positive bacteria

Babak Shahbazi¹, Hanar Narenji^{1*}

1- Microbiology Department, Kurdistan University of Medical Sciences, Sanandaj, Iran

Corresponding author: hanar.narenji89@gmail.com; Mobil: 09143800357

Abstract

Background and Aim: DNA extraction is the first step in the genetic engineering research and obtains a suitable protocol for the preparation of a purified DNA which is essential. In this context, many manual and kit methods were provided. The aim of this study is to achieve a faster and low cost method for DNA extraction of Gram-positive bacteria and gram-negative bacteria. We compared four DNA extraction methods, Kit extraction, phenol chloroform, using detergent laundry brand tag and boiling.

Materials and Methods: In this study, bacterial suspensions of *Staphylococcus aureus* and *Vibrio cholerae* were produced similar to McFarland 0.5 turbidity. Bacterial DNA was extracted using four different methods and three times for each. Using spectrophotometer and gel electrophoresis were measured concentrations and quality of DNA extraction product accordingly. In order to evaluate the efficiency of DNA extraction method, PCR, ERIC PCR and REP-PCR were performed on some of housekeeping genes downstream regions.

Results: The concentration of the extracted DNA and results of PCR, ERIC-PCR and REP-PCR were different between gram-positive and gram-negative bacteria significantly ($P < 0.05$). ERIC PCR and REP-PCR efficiency of the boiling and chloroform extraction methods was disrupted only in ERIC PCR. No deficiency was observed in Sinagen kit method.

Conclusions: The findings of this study show that despite the availability and lower cost of manual methods, these methods can be substitute for kit method.

Key words: PCR, REP-PCR, ERIC PCR, Bacterial DNA extraction