مقارنة بين طريقتين لاستخلاص الحامض النووي الـــ DNA من دم الاغنام

اسماعيل ابراهيم حسن و سعد توفيق رشيد
كلية الطب البيطري/جامعة تكريت

الكلمات الدالة :
مقارنة ، DNA ، اغنام

للمراسلة :
اسماعيل ابراهيم حسن
كلية الطب البيطري – جامعة تكريت

الاستلام:
2013-2-2
القبول :
2013-3-19

الخلاصة

يعد الحامض النووي الـــ DNA العنصر الاساسي المسؤول عن نقل المعلومات الوراثية والتفاعلات الكيمائية الحيوية فقد اولى الباحثون اهتماماً خاصاً بطرق عزله وتنقيته لاستخدامه في مجالات واسعة مثل الهندسة الوراثية والعلاجات الجينية وتحسين الانتاج الحيواني والنباتي لذا تناولت الدراسة معرفة افضل الطرق لاستخلاص الـــ DNA من دم الاغنام، حيث استخدمت طريقتين الاولى كانت عضوية باستخدام مادة بيروكلوريدات الصوديوم (Sodium perchlorate) كبديل للمذيبات العضويه الايثانول والكلوروفورم اما الثانية فهي اللاعضوية التي تستخدم الانزيم (proteinase k)، وتعتمد الطريقة المعدلة على الاستفادة من محاسن بيروكلوريدات الصوديوم التي تتميز برخص سعرها مقارنةً مع الانزيم (proteinase k) وكذلك بسهولة خزنها وحفضها ونقلها وسهولة استخدامها، اوضحت نتائج الدراسة ان الطريقة العضوية المعدلة كانت لها نتائج جيدة من حيث كميه و نقاوة الـــ DNA مقارنة مع الطريقة الاعضوية التي كانت نتائج نقاوتها اعلى .

Compression of two genomic DNA extraction methods from Sheep blood

Esmail I. H and Saad T. R.
College of veterinary medicine, university of tikrit, tikrit, Iraq

KeyWords:
DNA,genomic , sheep

Correspondence:
Esmail I. H
College of Veterinary Medicine-University of Tikrit-Iraq

Received:
2-2-2013

Accepted:
19-3-2013

Abstract

The DNA is the major factor that responsible of transporting genetic code and biochemical reactions because of that the researcher show specific interest about the methods of extraction and purification of it to be used in different techniques like genetic engineering and gene therapy as well as improving animals and plant production, our study was about evaluation of two DNA extraction methods from sheep blood to know the best one of them. The first method was the modified organic method by using Sodium Perchlorat instead of organic solvent (Ethanol, chloroform), The other method was the enzymatic method by using proteinase K, The modified method is depend on utilization of the sodium perchlorat advantage that come from its cheap price and low storage and shipping requirements, The result show that the modified method give a good DNA yield and need relatively short time while the enzymatic method give an excellent DNA yield.

المـــقـــدمـــة

يوجد الـــ DNA في معظم خلايا الجسم وهو شفرة المعلومات الوراثية المنقولة من الآباء الى الابناء وان لكل شخص DNA خاص به حتى في حالة التوائم فان DNA احدهما لا يطابق الآخر(2004, Briody).

لم يكن اكتشاف الـــــ DNA ناتجاً عن تجربة واحدة قام بها شخص معين بل هي سلسلة من الاحداث المكمل احدها للآخر فان وجود الجينات والقوانين التي تحكم انتقالها تم التطرق لها من قبل العالم مندل عام 1866 م حيث صاغ مندل قوانين ينص فيها على انتقال العامل الوراثي من جيل الى اخر. وفي عام 1869 اكتشف العالم Friedrich Miescher نوع جديد من الحوامض الضعيفة يوجد بشكل وافر في نوى خلايا الدم البيضاء، ولسنين عديدة بقي الـــحامض الضعيف مجهول الوظيفة ولم ينسب له اي دور في انتقال الصفات الوراثية (HARTL , JONES 2009,).

وفي عام 1953 قام كل من james Watson و Fracis crick بوصف تركيب الـــ DNA الذي فتح الآفاق امام الاكتشافات الوراثية الحالية (2003, Bansal) .

تعاضدت كل الاكتشافات السابقة مع غيرها من الاكتشافات الاخرى ليس فقط على اكتشاف وتحديد الامراض العضوية ومسبباتها بل وعلى انتاج علاجات فعالة ووافرة بأسعار زهيدة لتلك الامراض و امراض وراثية اخرى كما تمت الاستفادة

من الحامض النووي لإنتاج حيوانات ونباتات ذات كفاءة عالية بتعديل جيناتها لتصبح مقاومة لظروف بيئية معينة او لزيادة انتاجها او لاستخدامات اخرى مدنية كانت او عسكرية (Lewis ,2010)

على الرغم من استخدامات الـــ DNA في مجالات عديدة وبالأخص في تشخيص الامراض الوراثية الا ان هذه الاستخدامات ظلت محدودة كما ان تطور هذا الحقل يحدث بسرعة وان اغلب الاختبارات للحصول على الحامض النووي تتطلب وقت كبير لذا فان تزويد المختبرات بطرق استخلاص اسرع يعتبر امر ضروري (Adell و Ogbonna ,1990). كما ان استخدام DNA ذو نقاوة عالية يعتبر امر اساسي في الحصول على نتائج جيدة خاصةً في التجارب التي تتضمن استخدام تقنية تفاعل سلسلة انزيم البوليمريز (polymerase chain reaction) والذي تؤثر فيه بقايا الخلايا والبروتينات على سير التفاعل (Biase واخرون ,2002).

لذلك فان الـــحـــصـــول على تقنيات تكفل الكمية والنقاوة و التكامل العالي لعينة الـــ DNA من الانسجة والخلايا لهو امر مهم في تقنيات البيولوجي الجزيئي (Santos واخرون ,2010) ولهذا فأن الغاية من هذه الدراسة كان لمعرفة مدى نقاوة الـــ DNA الناتج عند استخلاصه بطريقتين مختلفتين .

المواد وطرق العمل:

جمع العينات:

استخدمت في الدراسة عينات دم الاغنام حيث تم جمع 14 عينة من اغنام مختلفة من حقول كلية الزراعة بجامعة تكريت، حفظت العينات من التجلط بواسطة استخدام عبوات مانعات التجلط سعة 5 مل والحاوية على مادة EDTA، نقلت العينات الى مجمدات المختبر بواسطة حاوية معدنية تحوي جريش الثلج وتم حفظ العينات بدرجة حرارة 4 م°.

طرق استخلاص الـــ DNA:

1. طريقة الاستخلاص العضوية:

تم استخلاص الـــ DNA حسب طريقة (Roulston و Barlett ,2004)، اذيبت عينات الدم المجمدة بتحريكها وتقليبها عدة مرات، وضع 2 مل من العينة في انبوبة زجاجية معقمة وقابلة للغلق المحكم ثم اضيف 6 مل من المحلول الحال لكريات الدم الحمر (0.01 M Tris-HCL,PH 7.4, 320sucrose, 5 mM $MgCl_2$,1%Triton X-100 5 mM) تم وضع الخليط في الثلاجة مدة 15 دقيقة مع المزج والدحرجة كل 5 دقائق، وضع بعدها المزيج بجهاز الطرد المركزي مدة 20 دقيقة بسرعة دوران 4000 دورة في الدقيقة، سكب الطافي وبقي الراسب (الحبيبات) تم التخلص من الرطوبة الزائدة بقلب الانبوبة على ورق جاف، ثم اضيف 3 مل اخرى من المحلول الحال لخلايا الدم الحمر مزج بشدة ثم وضع المزيج مرة اخرى بجهاز الطرد المركزي مدة 20 دقيقة بسرعة دوران 4000 دورة في الدقيقة، سكب الطافي وبقي الراسب تم التخلص من الرطوبة البـــاقيـــة بـــقـــلـــب الانـــبـــوبـــة عـــلـــى ورق جـــاف، أُضـــيـــف 5 مل من المحلول الحال للخلايا (SDS,PH 8.0 0.4M Tris-HCL ,150mM NaCL,0.06M EDTA,1%) ورج سريعاً لأعاده تعليق الخلايا ومُزج جيداً باستعمال الماصة، أُضيف 1مل من 5M $NaClO_4$ ومزجت بقلب الانبوبة عدة مرات، وضعت الانبوبة في حمام مائي مدة 60 دقيقة بدرجة حرارة 65 م° مع تقليب الانبوبة من وقت الى آخر، رفعت العينات وتركت مدة 5 دقائق لتبرد بدرجة حرارة الغرفة، اضيف 4 مل من 6M NaCl مزجت العينات وقلبت مدة دقيقتين، وضعت العينات بجهاز الطرد المركزي 20 دقيقة بسرعة 4000 دورة بالدقيقة، نُقِلَ الجزء العلوي الى انبوبة زجاجية معقمة باستعمال ماصة معقمة تم اعادة الطرد المركزي والنقل الى انبوبة معقمة لبعض العينات لكون العالق يحتوي على حطام غير مترسب، لتنقية الـــ DNA وترسيبه تم اضافة 0.5 مل من M7.5 خلات الامونيوم و 3 مل من الايثانول المطلق، تركت الانبوبة الزجاجية بدرجة 0 م° مدة 10 دقائق ومزجت بطريقة التقليب عدة مرات وبرفق حتى تكونت كتلة قطنية بيضاء، أُستعمِل خطاف زجاجي معقم للف الراسب بنهاية الخطاف، ثم غسل الراسب باستعمال 2 مل من 70% ايثانول مبرد مع قلب الانبوبة بحذر مرة واحدة، وضعت الانبوبة بجهاز الطرد المركزي مدة 10 دقائق بسرعة دوران 4000 دورة في الدقيقة، صب العالق وتركت الكتلة لتجف بالهواء وذلك بقلبها على ورق نشاف مع عدم خروج الـــ DNA الى الخارج، تم اذابة راسب الـــ DNA في حجم مناسب من المحلول المنظم (Tris) Ethylenediaminetetraacetic acid (100–500 µl)، نُقِلَ 1.5 من النموذج الى انبوبة ابندورف(Ependorf).

2. طريقة الاستخلاص الانزيمية:

تم استخلاص الـــ DNA باسخدام 2 مل من الدم حيث وضع في انبوبة زجاجية سعة 10 مل، اضيف اليها 6 مل من المحلول الحال لكريات الدم الحمر (155 mM كلوريد الامونيوم و 10 mM هيدروكربونات البوتاسيوم و 1 mM Na_2EDTA)، وضعت العينات على جهاز الهزاز لمدة 5 دقائق ثم وضعت العينات 15–30 دقيقة في درجة حرارة 0 م° (فريزر الثلاجة)، ادخلت الى جهاز طرد مركزي 4000 دورة لمدة 20 دقيقة حفظ الراسب وقليل من الرائق ثم تخلصنا من باقي الرائق، اضيف 4 مل من محلول حل كريات الدم الحمر (155 mM كلوريد الامونيوم و 10 mM هيدروكاربونات البوتاسيوم و 1 mM Na_2EDTA) لغرض الغسل والتخلص من بقايا الهيموكلوبين وضعت العينات 15–30 دقيقة في درجة حرارة 0 م° مرة اخرى وعمل لها طرد مركزي 4000 دورة لمدة 20 دقيقة، خلط

الراسب بواسطة جهاز الرج(vortex) لمدة 40 ثانية، لتكسير محتويات الخلية قمنا بإضافة 5 مل من محلول تحليل الخلايا (20 mM Tris-HCL و 4mM Na_2EDTA و 100 mM) NaCL بواسطة ماصة ثم اضيف اليها 500 µl من محلول SDS %10 ، خلطت بواسطة جهاز الرج لمدة 2 دقيقة الى أن اصبح لها رغوة كثيفة اضيف أليها 50 µl من محلول protienase K، وضعت الأنابيب في حمام مائي لمدة 90 دقيقة مع تحريكها بالتقليب بين الحين والآخر (كل 10 دقائق)، وضعت العينات في حوض حاوي على الثلج مدة 3 دقائق لكي تبرد وتصل الى درجة حرارة الغرفة، لترسيب المحتوى البروتيني اضيف 4 مل من محلول ترسيب البروتين وهو محلول كلوريد الصوديوم بتركيز 5,3 M خلطت بواسطة جهاز الرج لمدة دقيقة واحدة، عمل لها طرد مركزي 4000 دورة لمدة 20 دقيقة، سحب الرائق بواسطة الماصة (micropipette) ووضع في أنبوبة نظيفة جديدة ثم اضيف أليه حجم مماثل لحجم الرائق من محلول الآيزوبروبانول (Isopropanol) المبرد رجت العينة بشكل خفيف بواسطة اليد بحدود 50 مرة الى ان ظهرت خيوط الـــ DNA بشكل خيوط بيضاء سحبت خيوط الـــ DNA بواسطة قضيب زجاجي معقوف النهاية (hook) ووضعت في أنبوبة أبندورف أخرى حاوية على 2 مل من محلول الغسل (70%أيثانول) وتركت لمدة 10 دقائق بعدها عمل لها طرد مركزي 3000 دورة لمدة 5 دقائق (لترسيب الـــ DNA)أما في حالة كون الخيوط المتجمعة قليلة فتم عمل طرد مركزي لها 3000 دورة لمدة 3 دقائق، تخلصنا من الرائق بحذر شديد مع الحفاظ على الـــ DNA ترك الـــ DNA يجف وذلك بقلب الأنبوبة على مناديل ورقية لمـــدة 10 دقائق، أُضيف 2مل من محلول 70% حركت الأنبوبة باليد لغرض غسل الدنا وعمل لها طرد مركزي 3000 دورة لمدة 5 دقائق، تخلصنا من الرائق مع المحافظة على الـــ DNA نقلب الأنبوبة على مناديل ورق حتى تجف لمدة 10 دقائق، لتذويب الحمض النووي قمنا بإضافة 300 µl من محلول Tris Ethylenediaminetetraacetic acid ، وضعت الأنبوبة في حمام مائي بدرجة 30 م° لمدة ساعة ثم وضعت في الفريزر (–20 م°).

قياس نقاوة الحامض النووي:

تم تحضير النموذج بإضافة 1980 µl من الماء المقطر الى 20 µl من الحامض النووي، قيست نقاوة الحامض النووي بقسمة كمية الامتصاصية للنموذج عند طول موجي 260 nm على قيمة الامتصاصية عند طول موجي 280 nm تكون العينة نقية اذا كان الناتج 1.8(OD ; Optical density) .

الترحيل الكهربائي في هلام الاكاروز:

تم الـــترحيل الكـــهـــربائي فـــي هـــــلام الاكـــاروز (1gm / 100ml) الذي وضـــع فـــي محـــــلول مـــــنـــظـــم (89 mmol boric acid , 2 mmol of EDTA , 89 mmol Tris-borate , Ph 8.0)، وبمستوى افقي مزجت العينات مع محلول التحميل ورحلت كهربائياً على 50 فولط مدة ساعة واحدة، وضع الهلام في صبغة بروميد الاثيديوم (0.5 µg/ml) مدة نصف ساعة، وضع الهلام على جهاز الاشعة فوق البنفسجية U.V. ثم اخذت الصورة بواسطة كامرة رقمية.

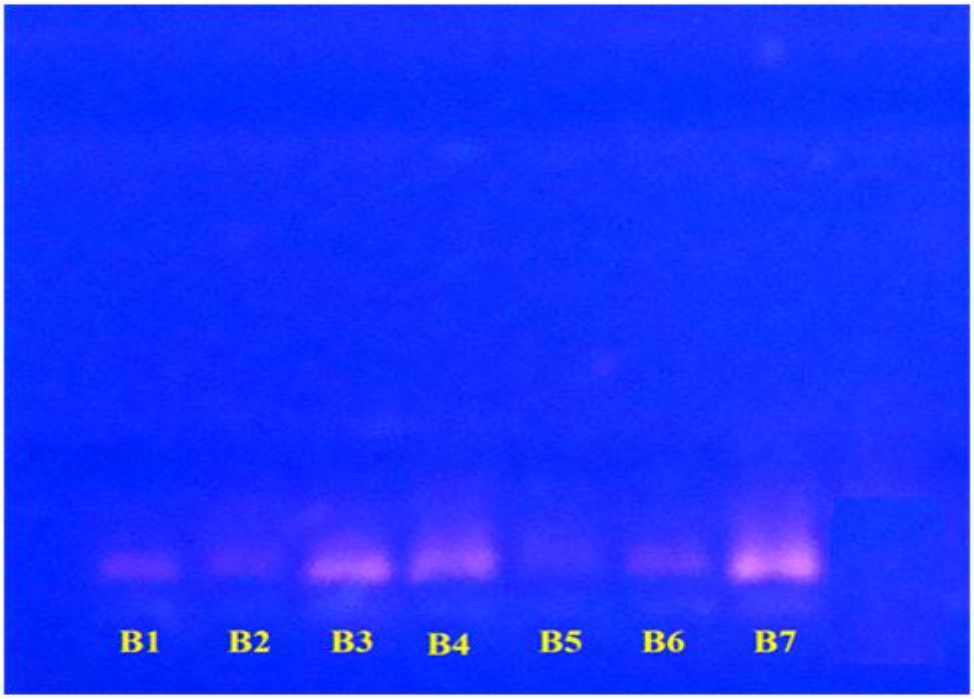
الـــنـتـــائـــج والمناقشة

بعد جمع 14 عينة دم من اغنام مختلفة لغرض استخلاص الـــ DNA منها بطريقتين هما الطريقة العضوية المعدلة والطريقة الانزيمية بينت النقاوة المقاسة بقسمة امتصاصية العينة بطول موجي 260/ 280 nm ان الطريقة العضوية المعدلة اعطت ناتج DNA ذو نقاوة جيده وبمعدل نقاوة 1.18 OD وكما مبين في الجدول 1 كما تم التأكد من وجود الـــ DNA ومدى جودة الـــ DNA بواسطة ترحيله كهربائياً على هلام الاكاروز 1% بعد صبغه ببروميد الاثيديوم وكما مبينة في الشكل 1 كما اظهرت الطريقة الانزيمية للاستخلاص باستخدام الانزيم بروتنيز K نتائج ممتازة من حيث نقاوة الـــ DNA فكان معدل النقاوة 1.76 OD (Optical density) وتم التأكد من وجود الـــ DNA وجودته وذلك بترحيل الـــ DNA كهربائياً على هلام الاكاروز 1% بعد صبغه ببروميد الاثيديوم فكانت النتائج ممتازة (الشكل 2).

جدول 1. يوضح امتصاصية العينات بطول موجي 260 و 280 nm و نقاوة العينات باستعمال الطريقة العضوية

رقم العينة	الامتصاصية عند طول موجي 260 nm	الامتصاصية عند طول موجي 280 nm	نسبة النقاوة
1	0.1629	0.1306	1.24
2	0.1156	0.0971	1.19
3	0.1097	0.0914	1.20
4	0.1839	0.1531	1.20
5	0.1255	0.1057	1.18
6	0.1040	0.0910	1.14
7	0.1043	0.0895	1.16
معدل النقاوة العام للعينات			1.18

شكل 1. يوضح قطع DNA على هلام الاكاروز باستخدام جهاز UV باستعمال الطريقة العضوية



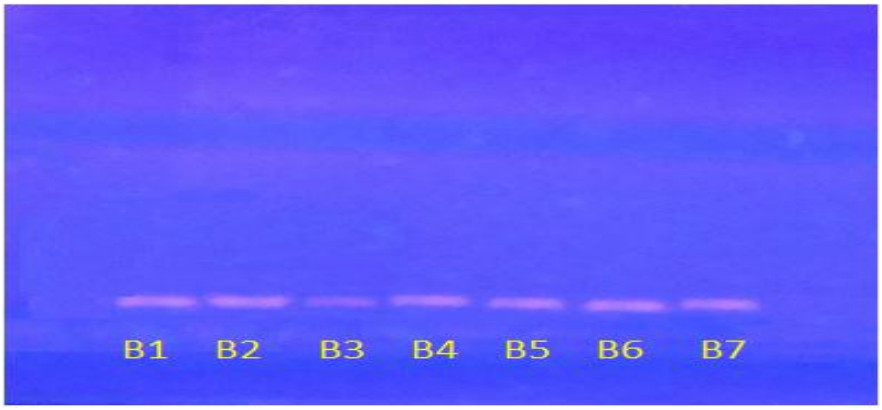
حيث ان B1 ، B2، ..... B7 تمثل الDNA لنماذج دم الاغنام

جدول 2. يوضح نسب نقاوة العينات

رقم العينة	درجة النقاوة للعينة (OD)*
1	1.74
2	1.81
3	1.60
4	1.72
5	1.83
6	1.81
7	1.84
المعدل	1.76

* **Optical density**

شكل 2 . يوضح قطع DNA على هلام الاكاروز باستخدام جهاز UV للطريقة الانزيمية



حيث ان B1 ، B2، ..... B7 تمثل الـــDNA لنماذج دم الاغنام

يتضح من النتائج ان الطريقة الانزيمية تعطي ناتج DNA عالي النقاوة وهذه النتيجة متفقة مع ما وجده Khosravinia واخرون (2007) و Parzer و Mannhalte (1991) بالمقارنة مع الطريقة العضوية المعدلة، ان الطريقة العضوية المعدلة تعتبر ارخص واسرع من الطريقة الانزيمية (Bahl و Pfenninger , 1996)، وتمتاز بعدم استخدامها الفينول والكلوروفورم السام (Nasiri و اخرون ,2005)، حيث أنه كما هو معروف هناك مضار صحية على العاملين في المختبر من استخدام الكلوروفورم (Wallace ,1987)، كما أن طريقة الاستخلاص به تعتبر بطيئة (Rudolph واخرون 1993)، كذلك فإنها تؤدي الى تثبيط عملية تضخيم الـــ DNA المستخلص (Jalava و Jalava ,2002)، وكذلك هو الحال في استخدام بعض انواع الكتات التجارية والتي وان اتصفت بالسرعة فأن بعضها غير ملائم في العملية التشخيصية بأستخدام تقنية الـــ PCR (Vandezee واخرون ,2002)، وعلى الرغم من ان استخدام عدة العمل الجاهزة (Kit) اكثر اماناً من استخدام الفينول (Fernondes واخرون, 2004) الا انها مكلفة وغير متوفرة في بعض الدول (Sharbatkhoriواخرون;2009)، فبالرغم من وجود عدة طرق لاستخلاص الـــ DNA الأن اغلب الطرق تعتبر غير مجدية (Miller واخرون,1988)، لذا فقد تم التركيز على توفير طرق استخلاص الـــ DNA بنقاوة و كمية عالية من دون استخدام مواد سامة مثل الكلوروفورم او مواد ذات كلفة عالية مثل Preteinase K وخلال فترة زمنية قليلة (Nurnherger واخرون,1997).

ان لوجود مادة EDTA في الطريقة الانزيمية الاثر المهم في عدم تحطيم الـــ DNA فهي توجد بتركيز اكبر من الطريقة العضوية المحورة، كما ان التركيز العالي لمادة SDS يؤدي الى تحلل كامل لانوية الخلايا البيضاء (Lahiriو Schnable, 1993).

ان لعملية ترسيب البروتين باستخدام خلات الامونيوم المستخدمة في الطريقة الانزيمية الاثر الواضح في زيادة ناتج الـــ DNA المستخلص وتقليل الوقت الاضافي الازم من استخدام المذيبات العضوية وذلك من خلال ترسيب البروتينا(Marisi و 2007,Peres)، كما ان زيادة تركيز مادة EDTA في فوق مستوى (11.49 mg/µl) في محلول الاستخلاص يؤدي الى زيادة امتصاصية الضوء عبر الطول الموجي 260 والذي يؤدي الى زيادة معدل النقاوة الناتج من قسمة الامتصاصية OD 280/260 والذي يُقبل خطأً كزيادة فعلية في نقاوة الـــ DNA المستخلص Sambrook; 1995 Glaselواخرون, 1989).

المصادر

Adell, K. and Ogbonna,G.(1990). Rapid Purification Of Human DNA from Whole Blood for Potential Application in Clinical Chemistry Laboratories. Clinical Chemistry 36:261

Bahl, A. and Pfenninger, m.(1996). Arapid merthod of DNA isolation using lundry defergent. Nucleic Acids Research 24: 1587_1588.

Bansal,M. (2003). DNA structure: Revisiting the Watson–Crick double helix. India Current Science 85: 1556.

Biase, F.H., Franco, M.M., Goulart, L.R. and Antunes (2002). Protocol for extraction of genomic DNA from swine solid tissues. Genetics and Molecular Biology 25: 313-315.

Briody,M. (2004). The effects of DNA evidence on homicide cases in Court. the Australian and New zealand Journal of Criminology . 37: 231–252

Fernondes, J.V., Meissner, R.V., Fernandes, T.A. and Rocha, L.R.M. (2004). Comparacao de tres protocolos de extracdo de DNA apartir de tecido fixado em formol e

include em parafina. J. Bras. patol. Med. lab. 40:141-146.

Glasel, J.A. (1995). Validity of nucleic acid purities monitored by 260 nm / 280 nm absorbance ratio. Biotechniques 18: 62-63.

Hartl, A.L. and Jones, E.W.(eds). (2009). Genetics Analysis of Gene and Gene. 7th (ed), Jones and Bartlett. Canada

Jalava, R.K. and Jalava, J. (2002). Optimal DNA isolation method for detection of bacteria in clinical speciments by broad-range PCR. J clin microbial. 40:4211-4217.

Khosravinia,H., Murthy,H.N., Parasad,D. and Pirany, N.(2007). Optimizing factors influencing DNA extraction from fresh whole avian blood. African Journal of Biotechnology 6:481-486.

Lahiri, D.K. and Schnabel, B. (1993). DNA isolation by a rapid method from human blood samples: effect of mach, EDTA, Storage time and temperature on DNA yield and quality. Biochemical genetic 31: 321-327.

Lewis,R. (ed). (2010). Human Genetics concepts and applications. ninth edition. McGraw-Hill.inc.

Marisi,A.I. and Peres,L.I. (2007). A Simple and Cost-Effective Protocol for DNA

Isolation from Buccal Epithelial Cells. Braz Dent J. 18: 148-152.

Miller,S.A., Dykes,D.D. and Poleskc,H.F.(1988). A simplesarling out procedure for extraeting DNA from human nucleated cells. Nucleic Acids Res. 16: 1215.

Nasiri, H., Forouzandeh,M., Rasaee,M.J. and Rahbarizadeh,F. (2005). Modified salting-out method: high-yield, high-quality genomic DNA extraction from whole blood using laundry detergent. J.Clin. Lab. Anal. 19:229-232

.Nurnherger,J.I. and Lahiri,D.K. (1997). A rapid non-enzllmatic method for the preparation of HMW DNA from blood for RFLP studies. Nuclic Acid Research 19:5444 .

Parzer,S. and Mannhalter,C. (1991). A rapid method for the isolation of genomic DNA from citrated whole blood. Biochem.J. 273: 229-231.

Roulston,J.E. and Barlett,J.M.(2004). Molecular Diagnosis of cancer,method and protocols.Human press Inc.

Rudolph,k.m., Parkinson,A.J. and Black,C.M.(1993). Evaluationof polymerase chain reaction for diagnosis of pneumococcal pneumonia. J. clin. microbial 32:2661-2666 .

Samboork , J., Fritsch, E.F. and Manutis, T. (1989). Molecular Cloning a laboratory manual. 2nd(ed). vol. 3. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY.

Santos, E.M., Paula, J.F.R., Motta, P.M.C., Heinemann, M.B. Leite, R.C. Haddad, J.P.A. Del Puerto, H.L. and Reis, J.K.P. (2010). Comparison of three methods of DNA extraction from peripheral blood mononuclear cells and lung fragments of equines. Genet Mol Res. 9:1591-1598 .

Sharbatkhori,M., Kia,E.B., Harandi,M.F., Jalalizand,N., Zahabiun,F. and Mirhendi,H.(2009). Comparison of Five Simple Methods for DNA Extraction from Echinococcus granulosus Protoscoleces for PCR Amplification of Ribosomal DNA, Iranian J. Parasitol 4:54-60.

Vandezee, A., Pecters, M. and dejong, C. (2002). Qiagen DNA extraction kits for sample preparation for legionella PCR are not suitable for diagnostic purposes. J. clin. microboil 40:1126.

Wallace, D.M. (1987). Large and small scale phenol ertuctions.in: Berger SL, Kimmel AR.ed.Guide to Molecular cloning Techniques. Academic press:pp 33-49.