IranJPP
Iranian Journal of
Physiology and Pharmacology

مجله فیزیولوژی و فارماکولوژی ایران

سال ۱۴۰۰، دوره ۵، پیاپی ۱۵، صفحه ۲۳۸-۲۳۳

گزارش فنی

معرفی یک روش بهینه تخلیص DNA ژنومی *توکسوپلاسما گوندی* از مغز موش صحرایی جهت افزایش کارایی تشخیص عفونت توکسوپلاسما

ستایش یاسمی‌خیابانی[۱]، سمیرا چوپانی[۲]، جلال بابایی[۱*]، مجید گل‌کار[۱]، ، محمد سیاح[۲*]

۱. گروه انگل‌شناسی، انستیتو پاستور ایران، تهران، ایران
۲. گروه فیزیولوژی و فارماکولوژی، انستیتو پاستور ایران، تهران، ایران

دریافت: ۹ آذر ۱۴۰۰ پذیرش: ۱۵ دی ۱۴۰۰

چکیده

زمینه و هدف: استخراج DNA ژنومی *توکسوپلاسما گوندی* از مغز موش صحرایی به‌دلیل میزان ناچیز آلودگی و چربی زیاد مغز چالش برانگیز است. واکنش کمی زنجیره‌ای پلیمراز در زمان واقعی (RT-qPCR) علیرغم تشخیص مقادیر ناچیز ژن هنوز با نتایج منفی-کاذب همراه است. ما با تغییر روش استخراج DNA از بافت مغز موش توانستیم تعداد موارد منفی-کاذب آلودگی به *توکسوپلاسما گوندی* را کاهش دهیم.

روش‌ها: از مغز یازده موش (نر ویستار) آلوده به سوش تهران انگل توکسوپلاسما (در هفته هشتم آلودگی) و سه موش غیرآلوده استفاده شد. جهت تخلیص DNA بجای ۲۰ میلی‌گرم مغز (روش معمولی) کل مغز استفاده شد. میزان آنزیم پروتئیناز کا دو برابر و مدت انکوباسیون شش‌برابر روش معمول شد. سپس میزان DNA نمونه‌ها با روش RT-qPCR اندازه‌گیری شد.

یافته‌ها و نتیجه‌گیری: با روش رایج از یازده موش آلوده فقط سه موش مثبت شدند در حالی‌که با بهینه‌سازی تخلیص DNA، نه موش مثبت تشخیص داده شدند.

واژه‌های کلیدی: تخلیص DNA، واکنش کمی زنجیره‌ای پلیمراز، REP-529

مقدمه

واکنش زنجیره‌ای پلیمراز[۱] در زمان واقعی[۲] یکی از روش‌های پرکاربرد در آزمایشگاه‌های بالینی و تشخیصی است که امکان اندازه‌گیری کمی تعداد کپی‌های DNA را فراهم کرده است. پیشرفت در این فناوری امکان شناسایی بیماری‌ها را نیز به شکل قابل اعتمادتری، فراهم کرده است. ابداع روش RT-PCR باعث افزایش حساسیت، کاهش زمان بررسی و افزایش موفقیت شناسایی عوامل بیماری‌زا شده است. PCR زمان واقعی کمی[۳]، یک تکنیک مبتنی بر PCR است که تکثیر توالی DNA هدف را با کمی‌سازی غلظت DNA هدف در واکنش همراه می‌کند.

عوامل متعددی در واکنش PCR دخیل هستند که هر یک به نوبه خود بر حساسیت و اختصاصی بودن واکنش تاثیر گذاشته و بهینه‌سازی آن‌ها موجب صرفه‌جویی در زمان و هزینه می‌گردد. ازجمله مواردی که به قابل‌اعتمادبودن روش‌های تشخیصی مبتنی بر PCR کمک می‌کند، خلوص DNA الگوی هدف و وجود تعداد کافی از آن‌ها است [۱].

توکسوپلاسما گوندی[۴] انگل درون‌سلولی اجباری است که شکل تاکی‌زوایت[۵] آن بعد از ورود به میزبان وارد بافت‌های

[1] Polymerase chain reaction (PCR)
[2] Real-time PCR (RT-PCR)
[3] Quantitative real-time PCR (RT-qPCR)
[4] *Toxoplasma gondii*
[5] Tachyzoite

* نویسندگان مسئول مکاتبات: jalalbabaie@gmail.com (ORCID ID: 0000-0002-4989-5998)
sayyahm2@yahoo.com (ORCID ID: 0000-0003-0603-2444)

[Downloaded from ijpp.phypha.ir on 2025-05-17]

مختلف از جمله مغز می‌شود (فاز حاد). سپس به‌واسطه تاثیر سیستم ایمنی میزبان به شکل برادی‌زوایت[6] درآمده و تشکیل کیست بافتی (فاز مزمن) می‌دهد [۲]. موش‌های صحرایی[7] به کشندگی انگل مقاوم هستند و ازاین‌رو مدل مناسبی برای مطالعه توکسوپلاسموز انسانی می‌باشند [۳]. یکی از چالش‌های اساسی تشخیص توکسوپلاسموز در موش صحرایی انگشت‌شمار بودن تعداد کیست‌ها در مغز است. به‌دلیل این که بررسی میکروسکوپی کل بافت مغز برای یافتن کیست تقریبا ناممکن است باید از تکنیک‌های جایگزین استفاده شود. ازطرف‌دیگر، استفاده از روش سرولوژی و بررسی سرم نیز صرفا سابقه ابتلا به عفونت را نشان می‌دهد و ضرورتا نشان دهنده وجود انگل در بدن میزبان نیست [۴]. در مواردی که سنجش‌های سرولوژیکی قابل اعتماد نیستند یا زمانی که تشخیص بالینی مورد تردید است، می‌توان از تکنیک‌های مبتنی بر PCR سود جست [۵]. تشخیص DNA توکسوپلاسما با استفاده از PCR مشکلاتی را که در هنگام استفاده از سنجش‌های مبتنی بر سرولوژی یا مبتنی بر کشت با آن مواجه می‌شویم به حداقل می‌رساند. PCR برای نشان‌دادن حضور توکسوپلاسما در نمونه‌های بالینی مختلف از جمله مغز، خون، مایع آمنیوتیک و غیره استفاده می‌شود [۶] ولی استخراج مولکول DNA هدف از بافت‌هایی که حاوی مقادیر خیلی کمی از پاتوژن هستند یک چالش عمده در روش‌های تشخیص مولکولی بر اساس PCR محسوب می‌شود. همچنین در بافت‌های دارای مقادیر زیادی چربی، لیپیدها با روند تخریب بافت و یا با تأثیر بر شیمی بافرهای جداسازی DNA در روند کار اختلال ایجاد می‌کنند [۷].

ازآنجایی‌که برای تخلیص DNA از بافت‌های جانوری، طبق دستورالعمل رایج، از ۲۰ میلی‌گرم بافت استفاده می‌شود. تحت‌این‌شرایط، فراهم آوردن تعداد کافی الگوی DNA هدف مشکل بوده و عمدتا با نتایج منفی کاذب همراه است. در این مطالعه، با تمرکز بر بهینه‌سازی روش استخراج DNA و با واردکردن کل بافت مغز در فرآیند تخلیص، این معضل به شکل قابل قبولی رفع شده است.

[6] Bradyzoite
[7] Rat

مواد و روش‌ها

حیوانات مورد استفاده

موش‌های صحرایی نر ویستار (تعداد ۱۴ سر با سن ۵ تا ۶ هفته و وزن ۹۰ تا ۱۰۰ گرم تولید شده در انستیتو پاستور ایران) در گروه‌های چهارتایی در قفس‌های استاندارد از جنس پلی‌پروپیلن در اتاقی با دمای کنترل شده (۲ ± ۲۳ درجه سانتیگراد) در بازه ۱۲ ساعته چرخه نور/تاریکی (۶ صبح تا ۶ عصر) نگهداری شدند. موش‌ها با غذای استاندارد و دسترسی آزاد به آب آشامیدنی تغذیه شدند. حیوانات به‌طور تصادفی به دو گروه تقسیم شدند. کلیه آزمایشات بر اساس دستورالعمل کمیته اخلاق کار با حیوانات آزمایشگاهی انستیتو پاستور ایران (کد مجوز ۹۳-۰۲۰۱-۱۳۰۸۵، ۱۲ دی ماه ۱۳۹۳) و دستورالعمل اتحادیه اروپا مورخ ۲۴ نوامبر ۱۹۸۶ (EEC/۶۰۹/۸۶) انجام شد.

القای توکسوپلاسموز در موش صحرایی

در این مطالعه، از سویه نوع II توکسوپلاسما معروف به سویه تهران [۸] استفاده شد. کیست‌ها از بانک انگل بخش انگل‌شناسی انستیتو پاستور ایران تهیه شدند. کیست‌ها به روش گرادیان پرکول[8] از مغز موش‌های سوری نژاد NMRI با عفونت یک‌ماهه (مزمن) توکسوپلاسما جمع‌آوری شده بودند. جهت ایجاد آلودگی، ۵۰۰ کیست معلق در ۰/۲ میلی‌لیتر بافر فسفات به داخل صفاق یازده موش، تزریق شد [۹]. به سه موش دیگر به جای کیست، بافر فسفات تزریق شد. هشت هفته بعد از عفونت موش‌ها قربانی شده و مغز خارج گردید. مغز موش‌های صحرایی بلافاصله در نیتروژن مایع فریز شد و در دمای ۸۰- درجه سانتیگراد نگهداری شد.

استخراج و تخلیص DNA از مغز

برای استخراج DNA از کیت کیاژن (آلمان) استفاده شد. طبق روش رایج (دستورالعمل کیت) ۲۰ میلی‌گرم از مغز برداشته شد. ۱۸۰ میکرولیتر بافر مخصوص اضافه و هموژن شد. سپس ۲۰ میکرولیتر پروتئیناز K به هموژنا اضافه شد. باقی مراحل مطابق دستورالعمل کیت انجام شد. در روش بهینه‌شده به کل باقی مانده مغز (حدود ۲ گرم)

[8] Percoll gradients

[Downloaded from ijpp.phypha.ir on 2025-05-17]

۲ میلی‌لیتر بافر فسفات اضافه شد. در ۳ مرحله با سر سرنگ‌های شماره ۱۹، ۲۲ و بعد ۲۷ نمونه به‌خوبی هموژن گردید. ۱۰۰ میکرولیتر از هموژنا (معادل ۵۰ میلی‌گرم از مغز) وارد فرایند تخلیص شد. هموژنا برای ۵ دقیقه با سرعت ۳۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ شد. به رسوب حاصل، ۳۵۰ میکرولیتر بافر مخصوص و ۴۰ میکرولیتر پروتئیناز K اضافه شد. پس از ورتکس، نمونه‌ها در ۵۶ درجه سانتیگراد انکوبه شدند تا دیواره کیست‌های توکسوپلاسما تخریب گردد. مدت انکوباسیون در روش کیت ۱۰ دقیقه و در روش بهینه‌شده ۳ ساعت بود. بقیه مراحل مطابق دستوالعمل کیت انجام گرفت. در انتها، در دو مرتبه جداگانه، هر بار ۱۰۰ میکرولیتر بافر شستشو به‌طور مستقیم روی غشا ستون ریخته شد و DNA ژنومی جمع‌آوری گردید. DNA ژنومی بدست آمده در دمای ۸۰- درجه سانتیگراد نگهداری شد.

انجام RT-qPCR برای تشخیص REP-۵۲۹

توالی ژنومی REP-۵۲۹ با دارا بودن ۳۰۰-۲۰۰ تکرار جزو توالی‌های تکراری ژنوم توکسوپلاسما می‌باشد. بنابراین هدف مناسبی برای تشخیص توکسوپلاسما است [۱۰]. مجموعه پرایمرها و پروب با استفاده از نرم افزار AlleleID نسخه ۷/۵ (RRID: SCR_014790) و باتوجه به توالی منتشر شده از توالی REP-۵۲۹ در NCBI (NCBI Nucleotide, RRID: LN714508) طراحی شد. روش RT-qPCR جهت تشخیص تعداد کپی REP-۵۲۹ در مغز موش، مطابق روش قبلی [۱۱] انجام شد. به‌طور خلاصه، محصول PCR قطعه REP-۵۲۹ در پلاسمید pTZ57R/T کلون شد. تعداد پلاسمیدهای موجود در هر میکرولیتر از محلول محاسبه شد [۱۲]. از پلاسمید pTZ57R-REP529 برای تهیه رقت‌های ۱۰ برابری استاندارد ($۱۰^۱$، $۱۰^۲$، $۱۰^۳$ و $۱۰^۴$ پلاسمید/میکرولیتر) در تکرارهای سه تایی برای رسم منحنی استاندارد استفاده شد. برای بدست آوردن Ctها و تعداد کپی توالی ژنومی REP-۵۲۹ در مغز از منحنی استاندارد استفاده شد. کنترل منفی و مثبت در هر آزمون گنجانده شد. کنترل منفی واکنش PCR بدون DNA الگو بود. برای کنترل مثبت از DNA ژنومی خالص شده از کیست‌های بافتی استفاده شد.

آنالیز آماری

برای تحلیل آماری از نرم‌افزار GraphPad Prism نسخه ۸ استفاده شد. تفاوت فراوانی موارد مثبت و منفی در گروه‌ها با آزمون کای اسکوئر[9] آنالیز شد. اگر داده‌ها توزیع نرمال داشتند با تست تی غیر زوج و دو دامنه آنالیز شدند. درغیراین‌صورت داده‌ها با آزمون غیرپارامتریک (Mann-Whitney U) آنالیز گردیدند.

یافته‌ها

آنالیز کمی داده‌ها برای تخمین تعداد کپی‌های توالی هدف به روش سنجش مطلق و به کمک تکنیک RT-qPCR انجام گرفت. منحنی استاندارد با استفاده از رسم کردن مقادیر Ctهای به‌دست‌آمده در مقابل لگاریتم طبیعی غلظت‌ها (تعداد نسخه‌های پلاسمید pTZ57R-REP529 در هر میکرولیتر) به‌دست آمد (نمودار ۱). خط آستانه به‌منظور برآورد Ctهای هر یک از نمونه‌ها، با استفاده از نمونه استانداردهای تهیه شده و تنظیم نرم‌افزار Rotor Gene Q (ورژن ۲/۳/۵) رسم شد. معادله استخراج شده از نمودار منحنی استاندارد برای محاسبه تعداد دقیق REP-۵۲۹ استفاده شد.

مطابق با جدول ۱، با استفاده از روش رایج تخلیص تنها سه مورد از نمونه‌ها (۲۷/۳ ٪) مثبت شدند در حالی که به کمک روش بهینه‌شده از ۱۱ نمونه ۹ مورد (۸۱/۸ ٪) مثبت تشخیص داده شد که از نظر آماری معنی‌دار ($p < ۰/۰۵$) بود. بنابراین خطای حاصل برای گزارش منفی کاذب، از ۷۲/۷٪ به ۱۸/۲٪ کاهش یافت. تعداد کپی‌های REP-۵۲۹ با استفاده از بهینه‌سازی تخلیص حدود ۷۴۶ برابر بیشتر از روش رایج بود (نمودار ۲).

بحث و نتیجه‌گیری

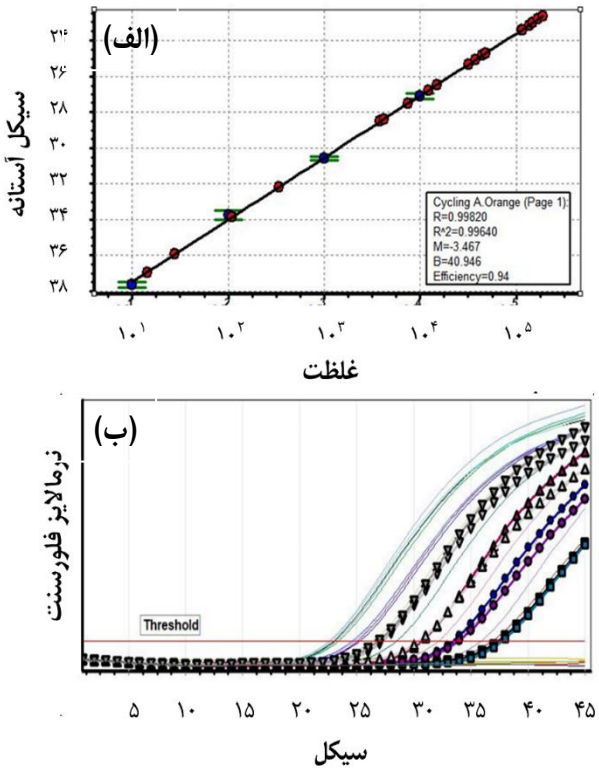
نتایج این تحقیق نشان داد که با رعایت برخی نکات کلیدی در تخلیص DNA ژنومی از نمونه‌های بافتی حاوی مقادیر خیلی کم توالی هدف، می‌توان کارایی روش RT-qPCR در تشخیص توکسوپلاسما را به‌طور معنی‌داری افزایش داد.

در روش‌های رایج تخلیص DNA ژنومی ۲۰ میلی‌گرم از

[9] Chi-square

[Downloaded from ijpp.phypha.ir on 2025-05-17]

مغز (یک صدم کل مغز) برداشت می‌شود. مقداری از DNA ژنومی طی فرآیند خالص‌سازی تلف شده و در نهایت در ۱۰۰ تا ۲۰۰ میکرولیتر از بافر نهایی جمع‌آوری می‌شود. درانتها به‌طور متوسط ۵ تا ۱۰ میکروگرم DNA استخراج شده و ۵ تا ۱۰ نانوگرم از آن در واکنش PCR استفاده می‌شود. طی فرآیندهای یادشده مقادیر DNA هدف بیشتر از ۱۰۰ هزار برابر رقیق می‌شود به شرط آن که در آن ۲۰ میلی‌گرم بافت برداشت‌شده، انگل وجود داشته باشد. پس احتمال تشخیص بسیار کم می‌شود. در روش ما ابتدا کل مغز هموژن شد. هر کیست با اندازه متوسط توکسوپلاسما به‌طور متوسط حاوی بیشتر از ۲۵۰ برادی‌زوایت است [۱۳]. بنابراین وقتی کل مغز هموژن می‌شود احتمال اینکه هر سهم ۵۰ میکروگرمی از نمونه بافت مغز دارای برادی‌زوایت باشد بسیار محتمل است.



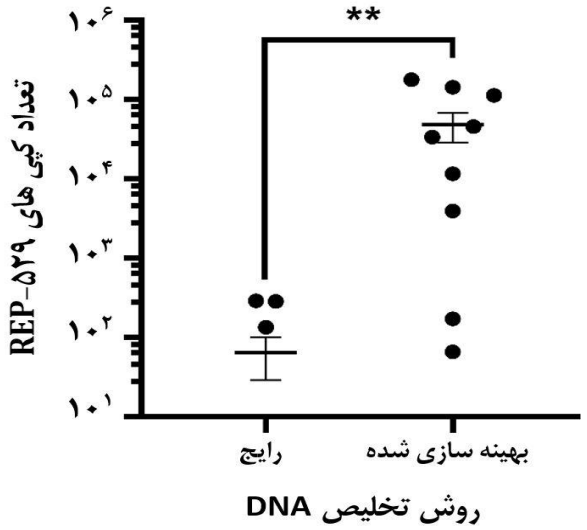
نمودار ۱- منحنی استاندارد و تکثیر RT-qPCR. (الف) منحنی استاندارد برای رقت‌های مختلف: 10^1، 10^2، 10^3 و 10^4 پلاسمید، به‌منظور تخمین تعداد توالی REP-۵۲۹ هدف. (ب) منحنی تکثیر استاندارد و نمونه‌ها شیب خط (M) برابر با ۳/۴۷ و مقدار R^2 برابر با ۰/۹۹ بدست آمد که نشان‌دهنده کارایی بالای واکنش انجام شده می‌باشد. با R^2 برابر با ۰/۹۹ همه آزمون‌ها حداقل تا ۵ لوگ خطی بودند. در هیچ یک از نمونه‌های کنترل منفی (فاقد DNA الگو) و نمونه‌های غیرآلوده تکثیر دیده نشد.

جدول ۱- فراوانی موارد منفی کاذب در دو روش تخلیص DNA

روش	تعداد نمونه آلوده (مغز)	تعداد آلودگی مثبت (مغز)	تعداد آلودگی منفی (مغز)
معمول	۱۱	۳	۸
بهینه شده	۱۱	۹	۲

برخلاف تاکی‌زوئیت‌ها، کیست‌ها و برادی‌زوئیت های داخل آن به آنزیم‌های پروتئولیتیک مقاوم هستند [۱۴]. بنابراین افزایش زمان هضم آنزیمی بافت هدف حائز اهمیت است. از این رو، در روش بهینه شده در این مطالعه ۵۰ میکروگرم از بافت مغز با بافر کیت به همراه پروتئیناز k به مدت ۳ ساعت در ۵۶ درجه سانتیگراد لیز شد تا شانس آزادشدن توالی ژنومی توکسوپلاسما افزایش پیدا کند. با تغییرات جزئی یاد شده، قدرت تشخیص تکنیک RT-qPCR بکار برده شد در این مطالعه بیش از ۳۰۰٪ (۸۱٫۸٪ در مقابل ۲۷٫۳٪) نسبت به روش رایج افزایش پیدا کرد.

با بهینه‌سازی روش تخلیص DNA، می‌توان بدون افزایش هزینه و با اعمال تغییرات جزئی در روش کار کیت‌های تجاری، ضمن تهیه DNA ژنومی با کیفیت بالا، کارایی روش‌های مولکولی تشخیص توکسوپلاسما را افزایش داد.



نمودار ۲- مقایسه تعداد کپی ژن هدف با استفاده از دو روش تخلیص. میزان REP-۵۲۹ با تکنیک RT-qPCR اندازه‌گیری شد. میانگین ± خطای استاندارد میانگین داده‌ها نشان داده شده است. **: $p < ۰/۰۱$.

[Downloaded from ijpp.phypha.ir on 2025-05-17]

ملاحظات مالی

برای اجرای پژوهش حاضر حمایت مالی دریافت نشده است.

تعارض در منافع

نویسندگان این مقاله تعارض در منافع ندارند.

نقش نویسندگان

س.ی.خ: انجام مطالعه، جمع‌آوری داده‌ها و نگارش مقاله؛ ج.ب: طراحی مطالعه، نظارت بر اجرای پژوهش و آنالیز داده ها؛ س.چ: انجام بخشی از مطالعه؛ م.گ: نظارت بر حسن اجرای کار؛ م.س: مشاوره و راهنمایی اجرای پژوهش.

فهرست منابع

[1] Lampel KA, Orlandi PA, Kornegay L, Improved template preparation for PCR-based assays for detection of food-borne bacterial pathogens. ***Appl Environ Microbiol*** 66 (2000) 4539-4542.

[2] Dubey JP, Lindsay DS, Speer CA, Structures of Toxoplasma gondii tachyzoites, bradyzoites, and sporozoites and biology and development of tissue cysts. ***Clin Microbiol Rev*** 11 (1998) 267-299.

[3] Dubey JP, Shen SK, Rat model of congenital toxoplasmosis. ***Infect Immun*** 59 (1991) 3301-3302.

[4] Dubey JP, Toxoplasmosis of animals and humans. Boca Raton: CRC Press, 2010: 313 -314.

[5] Bastien P, Molecular diagnosis of toxoplasmosis. ***Trans R Soc Trop Med Hyg*** 96 Suppl 1 (2002) S205-S215.

[6] Bin Dajem SM, Almushait MA, Detection of Toxoplasma gondii DNA by PCR in blood samples collected from pregnant Saudi women from the Aseer region, Saudi Arabia. ***Ann Saudi Med*** 32 (2012) 507-512.

[7] Ojo-Okunola A, Claassen-Weitz S, Mwaikono KS, Gardner-Lubbe S, Zar HJ, Nicol MP, du Toit E, The Influence of DNA extraction and lipid removal on human milk bacterial profiles. ***Methods Protoc*** 3 (2020) 39.

[8] Ghorbani M, Samii AH, Toxoplasmic lymphadenitis in Iran. ***J Trop Med Hyg*** 76 (1973) 158-160.

[9] Babaie J, Sayyah M, Choopani S, Asgari T, Golkar M, Gharagozli K, Toxoplasmosis accelerates acquisition of epilepsy in rats undergoing chemical kindling. ***Epilepsy Res*** 135 (2017) 137-142.

[10] Edvinsson B, Lappalainen M, Evengard B, Toxoplasmosis ESGf, Real-time PCR targeting a 529-bp repeat element for diagnosis of toxoplasmosis. ***Clin Microbiol Infect*** 12 (2006) 131-136.

[11] Babaie J, Sayyah M, Fard-Esfahani P, Golkar M, Gharagozli K, Contribution of dopamine neurotransmission in proconvulsant effect of Toxoplasma gondii infection in male mice. ***J Neurosci Res*** 95 (2017) 1894-1905.

[12] Staroscik A, *Copy number calculator for realtime PCR* [cited 14, Feb 2016]. Available from http://scienceprimer.com/copy-number-calculator-for-realtime-pcr.

[13] Watts E, Zhao Y, Dhara A, Eller B, Patwardhan A, Sinai AP, Novel approaches reveal that Toxoplasma gondii bradyzoites within tissue cysts are dynamic and replicating entities in vivo. ***MBio*** 6 (2015) e01155-01115.

[14] Jacobs L, Remington JS, Melton ML, The resistance of the encysted form of Toxoplasma gondii. ***J Parasitol*** 46 (1960) 11-21.

[Downloaded from ijpp.phypha.ir on 2025-05-17]

Technical report

Introducing an optimized method for purifying *Toxoplasma gondii* genomic DNA from rat brain to increase diagnosis efficiency of Toxoplasma infection

Setayesh Yasami-Khiabani[1], Samira Choopani[2], Jalal Babaie[1*], Majid Golkar[1], Mohammad Sayyah[2*]

1. Department of Parasitology, Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran
2. Department of Physiology and Pharmacology, Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran

Received: 30 December 2021 Accepted: 5 January 2022

Abstract

Background and Aim: Extraction of *Toxoplasma gondii* genomic DNA from rat brain is challenging due to low level of contamination and high fat content. Quantitative real-time polymerase chain reaction (RT-qPCR) is associated with false negative results despite detecting small amounts of the gene. By changing method of DNA extraction, we could decrease number of false negative results.

Methods: Brains of eleven male Wistar rats infected with Tehran strain of Toxoplasma parasite (with 8 weeks of parasite infection) and three uninfected rats were isolated. The whole brain was used to purify DNA instead of 20 mg brain in the conventional method. Amount of protein kinase was doubled and the incubation period increased to 6 times. Then DNA of the samples was measured by RT-qPCR.

Results and Conclusion: Only three of the eleven infected rats were infection positive by the conventional method, while nine mice were positive by the optimizing method.

Keywords: DNA extraction, RT-qPCR, REP-529

Please cite this article as follows:

Yasami-Khiabani S, Choopani S, Babaie J, Golkar M, Sayyah M, Introducing an optimized method for purifying *Toxoplasma gondii* genomic DNA from rat brain to increase diagnosis efficiency of Toxoplasma infection. ***Iran J Physiol Pharmacol*** 5 (2022) 233-238.

*Corresponding authors: jalalbabaie@gmail.com (ORCID ID: 0000-0002-4989-5998)
sayyahm2@yahoo.com (ORCID ID: 0000-0003-0603-2444)

[Downloaded from ijpp.phypha.ir on 2025-05-17]