سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی
مؤسسه تحقیقات علوم باغبانی
پژوهشکده چای

دستورالعمل فنی استخراج DNA از گیاه چای

نگارندگان:

کلثوم چراغی و شاهین جهانگیرزاده‌خیاوی

1398

وزارت جهاد کشاورزی
سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی
موسسه تحقیقات علوم باغبانی
پژوهشکده چای

دستورالعمل فنی استخراج DNA از گیاه چای

نگارندگان:
کلثوم چراغی و شاهین جهانگیرزاده‌خیاوی
محقق و عضو هیات علمی موسسه تحقیقات علوم باغبانی - پژوهشکده چای

1398

دستورالعمل فنی استخراج DNA از گیاه چای

نگارندگان: کلثوم چراغی و شاهین جهانگیرزاده‌خیاوی

ناشر: موسسه تحقیقات علوم باغبانی، پژوهشکده چای

شمارگان:

تاریخ انتشار: آذر ماه 1398

مسؤلیت صحت مطالب با نویسندگان است.

این نشریه با شماره 56600 مورخه 1398/09/17 در مرکز فناوری اطلاعات و اطلاع‌رسانی کشاورزی به ثبت رسیده است.

نشانی: لاهیجان، خیابان شیخ زاهد گیلانی، پژوهشکده چای

تلفن: 3-01342424001 ؛ دورنگار: 01342425575 ؛ کد پستی: 4415975555

http://chay.areeo.ac.ir/

فهرست مطالب

عنوان **صفحه**

چکیده 1

مقدمه 2

اسیدهای نوکلئیک 2

استخراج DNA 3

روش‌های استخراج DNA 4

1- روش سنتی 4

1-1- آماده‌سازی نمونه 4

1-2- از بین بردن دیواره سلولی یا لیز کردن سلول‌ها 5

1-3- رسوب‌دهی یا جد اکردن مواد غیر از DNA 5

1-4- شستشو و خالص‌سازی DNA از ناخالصی‌ها 6

1-5- محلول کردن مجدد رسوب DNA 6

2- روش تجاری 6

مزایا و معایب دو روش سنتی و تجاری 6

نقش مواد مختلف در استخراج DNA 7

1- متلاشی کردن سلول یا از بین بردن دیواره سلولی 7

1-1- ازت مایع 7

1-2 شوینده‌های صابونی 7

2- رسوب‌دهی یا جدا کردن مواد غیر از DNA 9

2-1 - فنل 9

2-2- کلروفرم/ایزوآمیل 10
2-3- استات آمونیوم یا استات سدیم 10
3- تغلیظ DNA دراتانول یا ایزوپروپانول سرد 10
4- شستشو، خشک کردن و محلول کردن مجدد 11
استخراج DNA در گیاه چای 12
مواد گیاهی 12
محلول‌ها و مواد شیمیایی مورد نیاز 13
روش استخراج DNA از برگ چای به روش دلاپورتا 16
استخراج DNA ژنومی به روش موری و تامسون 19
استخراج DNA به روش ورابی یا CTAB 20
استخراج DNA ژنومی به روش دویل دویل 20
تعیین کمیت و کیفیت سنجی نمونه‌های DNAی استخراج شده 21
1- اندازه‌گیری کمیت DNA 22
2- اندازه‌گیری کیفیت DNA 23
نتیجه‌گیری 24
منابع 25

چکیده

استخراج DNA ژنومی با کمیت و کیفیت مناسب در آزمایشگاه‌های ژنومیکس ضروری می‌باشد. استخراج DNA از بافت‌های گیاهان چوبی افزون بر وجود کربوهیدرات‌ها با مشکل مواد پلی‌فنلی نیز روبرو است که بر کیفیت DNA اثر منفی می‌گذارد؛ بنابراین، روش‌های استخراج که این مواد را بتواند به حداقل برسانند، بسیار مطلوب هستند. در این دستورالعمل، برای استخراج DNA از گیاه چای روش‌های متفاوت استخراج DNA توضیح داده شده و در نهایت مناسبترین روش برای این امر معرفی شده است. به این ترتیب بعد از استخراج با چندین روش و انجام آزمون PCR، روش دلاپورتا و همکاران (1983) با کمی تغییر، به علت آلودگی و شکستگی کمتر به عنوان یک روش مناسب، برای استخراج DNA از برگ‌های بالغ و لطیف چای تشخیص داده شده و به عنوان روش استخراج DNA خالص در این دستورالعمل معرفی می‌شود.

مقدمه

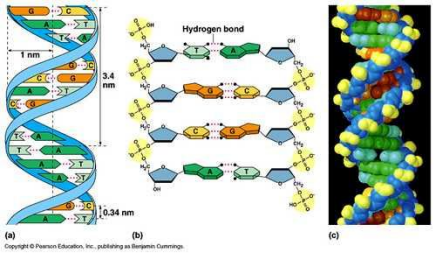
امروزه مباحث مولکولی از اهمیت روزافزونی در بررسی‌های علوم زیستی برخوردار بوده و برای این کار، اولین گام استخراج اسیدهای نوکلئیک (DNA یا RNA) می‌باشد. میزان خلوص و کیفیت مورد نیاز DNA استخراج شده بسته به نوع کاربرد متفاوت است. به عنوان مثال برای کتابخانه ژنومی، DNA با وزن مولکولی بالا و خیلی خالص مورد نیاز است. در بسیاری از موارد، استخراج مواد ژنتیکی با محدودیت‌هایی همراه است که تغییر در ترکیب و pH بافر استخراج توانسته است در بهبود کمیت و کیفیت DNA و RNA استخراج شده مؤثر باشد. استخراج DNAی ژنومی از گیاهان چوبی که علاوه بر ترکیبات پلی‌ساکاریدی زیاد حاوی متابولیت‌های ثانویه مانند پلی‌فنل‌ها و تانن‌ها می‌باشند، همیشه یک چالش برای دانشمندان بوده؛ در حالی‌که این مشکل در گیاهان علفی کمتر مشاهده می‌شود. اگرچه این مشکلات به وسیله روش‌های خاصی (سانتریفیوژ دور بالا و شیب غلظت کلرید سزیم) تا حدودی بر طرف شده؛ اما گاهی به دلیل عدم دسترسی به این امکانات، استفاده از روش‌های ساده‌تر و کم‌هزینه‌تر ضروری به نظر می‌رسد. وجود ترکیب‌های فنلی در محلول DNA استخراج شده، باعث جلوگیری از فعالیت آنزیم‌های DNA پلیمراز مانند Taq پلیمراز در واکنش زنجیره‌ای پلیمراز[1] و هم‌چنین جلوگیری از کار آنزیم‌های برش‌گر می‌شود. به همین منظور، آزمایش‌هایی توسط پژوهش‌گران مختلف روی گیاهان متفاوت صورت گرفته است (Lodhi *et al.*, 1998).

اسیدهای نوکلئیک

اسیدهای نوکلئیک (اسیدهای هسته‌ای) بزرگترین مولکول‌های زیستی هستند که به عنوان ماده ژنتیکی با ارزش، جایگاه خاصی در علم زیست‌فناوری (بیوتکنولوژی) دارند. بررسی ساختار شیمیایی اسیدهای نوکلئیک در قرن 18 میلادی با کشف اسیدهای نوکلئیک توسط میشر[2] آغاز شد و تقریباً 75 سال طول کشید تا نقش زیستی این ترکیبات روشن گردد. اسیدهای نوکلئیک نه تنها در هسته سلول‌های گیاهی و جانوری وجود دارد، بلکه بخشی از ساختار ویروس‌ها و سلول‌های پروکاریوت را نیز تشکیل می‌دهد. دو نوع اسید نوکلئیک به نام داکسی‌ریبونوکلئیک اسید[3] و اکسی‌ریبونوکلئیک اسید[4] وجود دارد که از به هم پیوستن واحدهای ساختاری به نام نوکلئوتید در یک ردیف منظم به‌وجود آمده‌اند. نوکلئوتیدها از سه ترکیب اصلی بازهای نیتروژن‌دار، قندهای پنج‌کربنه و اسید فسفریک تشکیل شده‌اند. آوری و همکاران در سال 1944 اظهار داشتند که DNA به عنوان ماده ژنتیکی انتقال صفات را از نسلی به نسل دیگر به عهده دارد. با آنکه وجود RNA به عنوان بخشی از ساختار ویروس‌ها شناخته شده بود، فعالیت اختصاصی آن در سنتز پروتئین در یاخته‌های عالی از سال‌های 1957

[1] Polymerase Chain Reaction
[2] Miescher
[3] DNA
[4] RNA

به بعد آغاز شد. آن‌چه اسیدهای نوکئیک را از سایر مولکول‌های زیستی متمایز می‌کند، نقش اساسی DNA به عنوان ماده ژنتیکی است و از این رو مطالعه آنها افق جدیدی را در علم بیوشیمی و زیست‌شناسی باز کرد. ساختمان سه بعدی DNA توسط واتسون و کریک در سال 1953 کشف شد (شکل 1). این کشف ساده باعث شد تا دانشمندان بتوانند سیستم‌های مختلف ژنتیکی را بررسی کنند. مدل پیشنهادی آنان چنین بود که DNA یک مارپیچ دو رشته‌ای است که رشته‌های آن به دور یک محور مرکزی، معمولاً به صورت راست‌گرد پیچ می‌خورند. طبق مدل واتسون و کریک، ستون‌های قند - فسفات همانند نرده‌های پلکان به دو قسمت خارجی بازهای آلی پیچیده و به این ترتیب در معرض محیط آبکی داخل سلول هستند و بازهای آلی که خاصیت آب‌گریزی دارند، در داخل مارپیچ قرار می‌گیرند. هنگام تشکیل مارپیچ رشته‌ها به صورت موازی متقابل قرار می‌گیرند (ربانی، 1386).



شکل 1- ساختمان DNA

استخراج DNA

جداسازی DNA به فرایند خالص‌سازی DNA از نمونه‌های مورد مطالعه به وسیله ترکیبی از روش‌های فیزیکی و شیمیایی اطلاق می‌شود. اولین جداسازی DNA در سال 1869 توسط فریدریچ میشر[5] انجام گرفت، که تلاش کرد سلول‌ها را از گره‌های لنفاوی استخراج کند. او توانست نشان دهد که پروتئین‌ها ماده اصلی تشکیل‌دهنده سیتوپلاسم سلول می‌باشند. فردریچ میشر به منظور جدا کردن DNA از پروتئین موجود در عصاره‌های سلولی، پروتکلی جدید طراحی کرد و توانست DNA را جدا کند. پس از میشر تلاش‌های دیگری نیز به این منظور صورت گرفت و باعث پیشرفت‌های فراوان در زمینه جداسازی شد. اولین پروسه‌ی آزمایشگاهی مشخص برای استخراج DNA بر پایه استراتژی‌های سانتریفیوژ بر اساس چگالی توسعه یافتند. بعد از آن روش‌های بیشتری جهت استخراج DNA به‌کار گرفته شد و امروزه این امر، فرآیندی معمول در آنالیزهای زیست‌شناسی سلولی و مولکولی بوده و برای بسیاری از مطالعات مربوط مورد نیاز است.

به سبب اینکه ماکرومولکول‌های زیستی مانند DNA و پروتئین‌ها باردار هستند، می‌توان با قرار دادن آنها در یک میدان الکتریکی، آن‌ها را بر اساس خواص فیزیکی مانند شکل فضایی، وزن مولکولی و بار الکتریکی،

[5] Friedrich Miescher

تفکیک کرد. برای این منظور، از روشی به نام الکتروفورز استفاده می‌شود. روش‌های مختلف الکتروفورزی برای تفکیک و مطالعه بیومولکول‌ها اعم از اسیدهای نوکلئیک یا پروتئین‌ها ابداع شده است. الکتروفورز[6] از دو کلمه Electro و Phoresis به معنی حرکت و انتقال ذره تشکیل شده است و در کل به معنی حرکت ذرات در یک مایع تحت میدان الکتریکی است (ابراهیمی و همکاران، 1393).

روش‌های استخراج DNA

قدم اول در اکثر پروژه‌های ژنتیک مولکولی و مهندسی ژنتیک، جداسازی و خالص‌سازی اسیدهای نوکلئیک با به‌کارگیری روش‌های مناسب است. روش‌های متفاوتی برای استخراج DNA وجود دارد، انتخاب روش به نوع DNA جداشونده و کاربرد آن بستگی دارد. هدف نهایی این روش‌ها در اصل، جداکردن اسیدهای نوکلئیک از پروتئین‌ها است که به خاطر ویژگی شیمیایی متفاوت آنها به آسانی انجام می‌شود؛ خصوصاً میزان بالای فسفات در اسیدهای نوکلئیک باعث شده است تا نسبت به پروتئین‌ها آب‌دوست محسوب شوند. جداسازی انواع اسید نوکلئیک از هم به خاطر خصوصیات مشابهی که دارند، دشوارتر است. بیشتر روش‌های جداسازی اسیدهای نوکلئیک شامل مرحله‌ی لیز سلولی (از بین بردن دیواره سلول)، تیمارهای آنزیمی، قابلیت حل متفاوت (مثلاً تقطیر فنل یا جذب به یک نگه‌دارنده جامد) و رسوب‌کردن می‌باشد (ابراهیمی و همکاران، 1393). به طور کلی، استخراج DNA با دو روش سنتی و تجاری انجام می‌شود.

1- روش سنتی

در طول زمان روش‌های متعددی برای به‌دست آوردن DNA با کمیت و کیفیت طراحی شده است. روش‌های سنتی استخراج DNA در سال‌های 1950 توسعه یافته‌اند که در آن‌ها از ترکیبات آلی حلال برای جداسازی پروتئین‌ها از DNA استفاده می‌شد. این روش‌ها نیاز به آماده‌سازی محلول‌ها دارند. به طور کلی، روش‌های سنتی شامل پنج مرحله اصلی می‌باشند که در زیر به آن‌ها اشاره می‌شود (Stulnig *et al*., 1994).

1-1- آماده سازی نمونه

جمع‌آوری نمونه‌ها و مدیریت مناسب آن‌ها یکی از مهم‌ترین موارد استخراج DNA مناسب می‌باشد. نمونه‌برداری مناسب و به‌کارگیری صحیح نمونه‌ها به ما امکان جداسازی DNA مناسب و بدون آلودگی را می‌دهد. هر بافتی تهیه و نگه‌داری مخصوص به خود دارد که مستلزم رعایت آن برای استخراج مناسب می‌باشد.

[6] Electrophoresis

نکاتی که برای تهیه نمونه‌های گیاهی باید رعایت شود:

- نمونه‌برداری از باغ و انتقال نمونه: در صورت تهیه نمونه از اندام‌های هوایی، توصیه می‌شود از بافت‌های جوان انتخاب شود؛ زیرا سلول‌های بیشتری را به ازای هر گرم بافت نسبت به بافت‌های مسن دارا هستند و نسبت به نمونه‌های مسن ترکیبات پلی‌ساکاریدی و پلی‌فنلی (که معمولاً در استخراج DNA مشکل ایجاد می‌کند) کمتری دارند. نمونه‌های جمع‌آوری شده بلافاصله باید در نیتروژن مایع قرار بگیرند تا از تشکیل کریستال‌ها که متابولیت‌های ثانویه را ایجاد می‌کنند و همچنین از فعالیت آنزیم DNA آز جلوگیری شود. اگر نمونه‌ها از گلخانه یا کشت‌های گلخانه‌ای گرفته شوند، نیاز به انتقال نمونه‌ها به داخل نیتروژن مایع نیست و باید از ظرف یخ جهت انتقال به آزمایشگاه برای استخراج DNA استفاده شود و لازم به ذکر است که زمان جدا کردن نمونه از پایه مادری نباید طولانی باشد.

- نگه‌داری نمونه قبل از استخراج DNA: به منظور جلوگیری از کاهش کیفیت نمونه‌ها، آن‌ها را در فریزر80- درجه سلسیوس نگه‌داری می‌کنند تا در فرصت مناسب استخراج DNA از آن‌ها انجام شود. توصیه می‌شود به منظور جلوگیری از انتقال چندباره نمونه‌های مشابه به فریزر 80- درجه، نمونه‌ها در چند پاکت کوچک نگه‌داری شوند؛ تا در هنگام نیاز یکی از پاکت‌ها بیرون آورده شود و ترجیحاً دوباره به فریزر منتقل نشود. هم‌چنین نمونه‌ها را می‌توان در شرایط خلا در دمای 15 تا 25 درجه سلسیوس نگه‌داری کرد.

1-2- از بین بردن دیواره سلولی یا لیز کردن سلول‌ها

در گیاهان، هسته توسط غشای هسته حفاظت شده که آن نیز توسط غشا و دیواره سلولی محاط شده است. بنابراین، برای جداسازی DNA از سلول نیاز به موادی است که دیواره و غشای سلولی را تخریب کند. در این مرحله برای ساییدن نمونه‌ها از ازت مایع و هم‌چنین از شوینده‌های صابونی هم‌چون اس دی اس[7] (سدیم دو دسیل سولفات)، سی‌تب، ای دی تی ای، پی وی پی و ... استفاده می‌شود. در روش‌های سنتی و تجاری لیزکردن سلول‌ها مشابه می‌باشد. ساده‌ترین روش برای پودر کردن نمونه‌های گیاهی کوچک با بافت نرم استفاده از هاون می‌باشد. برای پودر کردن بافت‌های فیبردار خرد کردن با نیتروژن مایع توصیه می‌شود (Murray *et al.*, 1980 و Sambrook *et al.*, 1989).

1-3- رسوب دهی یا جد اکردن مواد غیر از DNA

این قسمت شامل سه مرحله است: در مرحله اول، از فنل و کلروفرم برای جداسازی پروتئین استفاده می‌شود؛ در مرحله دوم، از نمک‌ها (مانند کلرید سدیم) استفاده می‌شود که برای جدا کردن باندهای هیدروژنی بین آب و گروه فسفات DNA کاربرد دارد و مرحله سوم شامل استفاده از ایزو پروپانول برای جداسازی DNA از سایر ناخالصی‌ها است (Stulnig *et al.*, 1994).

[7] Sodium Dodecyl Sulphate (SDS)

1-4- شستشو و خالص سازی DNA از ناخالصی‌ها

این قسمت شامل شستشوی DNA با اتانول و سپس خشک کردن آن می‌باشد.

1-5- محلول کردن مجدد رسوب DNA

پس از خشک شدن کامل باید DNA استخراج شده را مجدداً به صورت محلول درآورد. برای این کار از آب مقطر دوبار تقطیر یا محلول تی ای[8] استفاده می‌شود.

2- روش تجاری

پس از سال‌های 1990، کیت‌های تجاری استخراج DNA وارد بازار شده است که این کیت‌ها قابلیت جداسازی DNA بسیاری از نمونه‌ها را داراست و نمونه‌های DNA معمولاً بر خلاف روش‌های سنتی عاری از ترکیبات بازدارنده می‌باشد. در این روش از کیت‌های تجاری شامل غشاهای سیلیکونی استفاده می‌شود که در بسیاری از آن‌ها ترکیبات لیزکننده وجود دارد که قبل از انتقال مواد لیزکننده از طریق ستون، اتانول به بافرها اضافه می‌شود. ترکیبات لیپیدی و پروتئین‌ها از غشا عبور کرده و از طریق محلول‌های شستشو حذف می‌شوند. جهت جداسازی DNA با استفاده از کیت، غشا با محلول‌های شستشو آب‌گیری می‌شود و پس از چند مرحله سانتریفیوز و حذف اتانول از طریق تبخیر، آب یا بافرهای مناسب در وسط غشا قرار گرفته و DNA در لوله‌های زیر غشا جمع‌آوری می‌شود. اصول کلی استخراج در اکثر کیت‌ها مشابه بوده؛ اما بر اساس نوع نمونه‌ها (گیاهی، حیوانی یا انسانی) متفاوت است که ممکن است بعضی از مراحل در آن‌ها به‌صورت اختصاصی طراحی شده باشد. علاوه بر استفاده از کیت‌ها، در روش‌های جدید از دستگاه‌های خودکار (ربات‌ها) استفاده می‌شود که کمترین دخالت کاربرها را داشته و موجب کاهش زمان استخراج و استخراج تعداد زیادی از نمونه‌ها می‌شود (Tang *et al*., 2005 و Dundass *et al*., 2008).

مزایا و معایب دو روش سنتی و تجاری

استخراج DNA به روش سنتی دارای هزینه کمتر ولی زمان‌بر بوده و گاهی با آلودگی همراه است. در حالی که استخراج به روش تجاری با سرعت بیشتر و آلودگی کمتر بوده ولی پر هزینه می‌باشد (*www.publicaciones.inecc.gob*).

[8] Tris-EDTA

نقش مواد مختلف در استخراج DNA

1 - متلاشی کردن سلول یا از بین بردن دیواره سلولی

1 - 1 - ازت مایع

سبب تخریب دیواره سلولی و بیرون ریختن محتویات هسته بخصوص DNA داخل سیتوپلاسم سلول می‌شود، و هم‌چنین بعلت پایین بودن دما (منفی 196 درجه سلسیوس) مانع فعالیت آنزیم تخریب کننده DNA یعنی DNA آز می‌شود (Doyle & Doyle, 1990).

نکته: برگ به علت دارا بودن سلول‌های بزرگ و مناسب بهترین اندام برای استخراج DNA گیاهی می‌باشد. برگ‌های جوان نیز نسبت به سایر قسمت‌های گیاه دارای مواد پلی‌ساکاریدی و مواد ثانویه کمتری هستند، به همین علت در بیشتر موارد برای استخراج DNA از برگ‌های جوان استفاده می‌شود (Doyle & Doyle, 1990).

بعد از مرحله پودر کردن به نمونه‌های مورد نظر بافر استخراج اضافه می‌شود. بافر استخراج ها معمولا شامل: شوینده‌ها،کلرید سدیم، تریس، EDTA و مرکاپتو اتانول می‌باشند.

1 - 2 شوینده‌های صابونی

الف) SDS یک شوینده است که در استخراج DNA استفاده می‌شود. این ماده سبب جداسازی یون‌های مثبت از پروتئین موجود در غشای سلولی شده و در اثر آن پروتئین، ساختار خودش را از دست داده و تخریب می‌شود که به موجب آن، غشای سلول هم آسیب دیده و سبب شکستن سلول می‌شود (Bushra *et al.*, 1999).

ب) CTAB[9]: به عنوان یک ماده شوینده است که با مولکول DNA کمپلکس تشکیل داده و آن را از موادی همچون کربوهیدرات‌ها و پروتئین که سبب کاهش کیفیت DNA می‌شود، جدا می‌کند.

پ) ان-لاریول سارکوسین سدیم[10]: یک سورفکتانت آنیونی (با بار منفی) است که یکی دیگر از شوینده‌های صابونی است که از آن در استخراج DNA استفاده می‌شود و با جذب یون‌های مثبت پروتئین‌ها، سبب تخریب آن و متلاشی شدن غشای سلولی می‌شود (Bushra *et al.*, 1999).

ج) EDTA11: یک عامل کلاته هست که سبب جذب یون‌های فلزی داخل سلول به‌خصوص یون منیزیوم می‌شود. منیزیوم یکی از عناصر موجود در داخل سلول است که نقش کوفاکتور را در فعالیت آنزیم DNA آز

---

[9] Cetyltrimethylammonium bromide
[10] N-Lauroylsarcosine sodium
[11] Ethylene Diamine Tetraacetic Acid (EDTA)

دارد و سبب تخریب ساختمان DNA در سلول می‌شود. در واقع اتصال EDTA با منیزیوم سبب غیرفعال شدن آنزیم DNA آز می‌شود (Brown, 2001).

د) PVP: در بعضی از روش‌های استخراج از PVP نیز استفاده می‌شود. در طی مراحل خالص‌سازی DNA، PVP با استفاده از پیوندهای هیدرژنی سبب جذب پلی‌فنل‌ها شده و با ایجاد کمپلکس با فنل‌ها، سبب جداسازی آن‌ها از DNA می‌شود. پلی‌ساکاریدها و تانن‌ها به عنوان مشکل اصلی در گیاهان مطرح می‌باشند؛ زیرا جداسازی آن‌ها از DNA مشکل است. پلی فنل‌ها اگر از سلول جدا نشوند، ممکن است مانع انجام فعالیت PCR شوند (کدخدایی، 1382 و موری و تامسون، 1980).

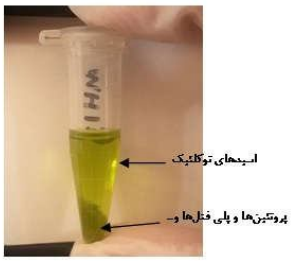
ه) نمک کلرید سدیم: همان‌طور که می‌دانیم پلی‌ساکاریدهای باقی مانده در طی مراحل استخراج از جمله موادی هستند که سبب کاهش کیفیت DNA می‌شوند. از کلرید سدیم با غلظت یک تا دو و نیم مولار جهت رسوب و حذف این مواد استفاده می‌شود. هم‌چنین کلرید سدیم باعث هضم و تجزیه دیواره سلولی می‌شود و بارهای الکتریکی موجود در داخل سلول مانند بارهای DNA و RNA را خنثی نموده و سبب نزدیکی بهتر آن‌ها به هم شده و منجر به رسوب‌دهی بهتر خواهد شد (Ziegenhagen, 1998).

و) تریس[12]: تریس یا هیدروکسی متیل آمینومتان، عموماً در بافر استخراج وجود دارد و باعث حفظ pH در محلول استخراج و هضم دیواره سلولی می‌شود. اساساً یک اثر متقابل با لیپوپلی‌ساکاریدهای موجود در غشای بیرونی سلول دارد که با حل کردن آن‌ها، سبب نفوذپذیری غشای سلول می‌شود. قابل ذکر است که اثر تریس با حضور EDTA تشدید می‌شود (Bushra *et al.*, 1999).

نکته 1: حضور بعضی از شوینده‌های مذکور و تریس در بافر استخراج ضروری است. عموماً بعد از افزودن بافر استخراج محلول را حرارت می‌دهند (60 تا 65 درجه سانتی‌گراد) که این حرارت دادن به شکستن سلول‌ها کمک کرده و سبب غیرفعال شدن آنزیم‌های DNA آز نیز می‌شود. البته باید دقت شود حرارت دادن بیش از 15 دقیقه طول نکشد؛ زیرا حرارت دادن زیاد سبب تجزیه خود DNA نیز خواهد شد. به همین علت در روش‌هایی که از حرارت استفاده می‌شود، باید حداکثر 15 دقیقه عصاره را در حمام آب گرم قرار داد و سپس بلافاصله جهت جلوگیری از انهدام DNA عصاره را در حمام آب سرد به مدت پنج تا 15 دقیقه قرار داد.

نکته 2: استفاده از شوینده‌های صابونی سبب می‌شود که پروتئین‌ها، پلی‌ساکاریدها و پلی‌فنل‌ها از سلول جدا شده و پس از سانتریفیوژ در فاز پایینی محلول قرار گرفته و در ته میکروتیوب‌ها (شکل 2) رسوب کنند. اسیدهای نوکلئیک در فاز رویی قرار می‌گیرد که در مراحل بعدی ناخالصی‌های بیشتری از آن گرفته خواهد شد.

[12] Hydroxymethyl aminomethane (TRIS)



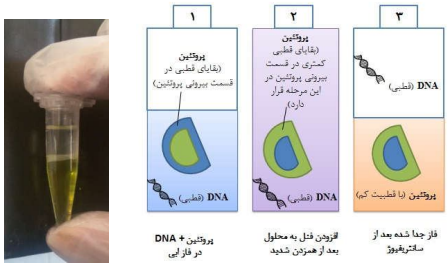
شکل 2- تشکیل دو فاز مختلف بعد از استفاده از شوینده‌ها

ز) بتا مرکاپتو اتانول[13]: بتا مرکاپتواتانول به عنوان یک آنتی‌اکسیدان قوی عمل کرده و از اکسید شدن مواد پلی‌فنلی جلوگیری می‌کند (Porebski *et al.*, 1997).

2 - رسوب‌دهی یا جدا کردن مواد غیر از DNA

2 - 1- فنل

فنل در طی مراحل استخراج، معمولاً برای جداسازی پروتئین از DNA استفاده می‌شود و پروتئین را از سلول‌هایی که در طی مراحل استخراج در حال فساد و نابودی هستند جدا می‌کند. بعد از افزودن فنل به محلول حاوی DNA بعد از انجام عمل سانتریفیوژ دو فاز ایجاد می‌شود، چون فنل در آب غیرمحلول می‌باشد. از آنجایی‌که فنل نسبت به آب تراکم و چگالی بالاتری دارد؛ بنابراین، بعد از سانتریفیوژ در فاز پایینی میکروتیوب قرار گرفته و فاز آبی که حاوی DNA می‌باشد در فاز رویی قرار می‌گیرد. در حین انجام عمل سانتریفیوژ، پروتئین در فاز آبی ساختار خود را از دست داده و با اتصال با فنل در فاز پایینی ته‌نشین می‌شود (شکل 3) (Sambrook *et al.*, 1989).

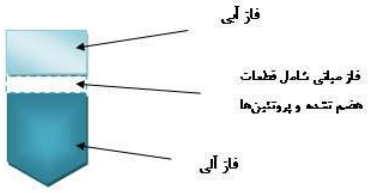


شکل3- افزودن فنل به عصاره در طی مراحل استخراج

[13] β-Mercaptoethanol

2 - 2 - کلروفرم/ایزوآمیل

محلول کلروفرم /ایزوآمیل برای جداسازی پروتئین از DNA استفاده می‌شود. کلروفرم سبب تخریب ساختمان پروتئین شده و هم‌چنین باعث می‌شود بعد از عمل سانتریفیوژ دو فاز آلی و آبی در میکروتیوب‌ها تشکیل شود (شکل 4)، که فاز آلی حاوی قطعات غشا و پروتئین‌ها و سایر اندامک‌ها است که در قسمت زیرین قرار گرفته و راحت جداسازی می‌شوند؛ در حالی‌که اسیدهای نوکلئیک در فاز آبی قرار می‌گیرند. در حد فاصل این دوفاز نیز یک لایه که در واقع قطعات هضم نشده و پروتئین‌ها می‌باشند، عموماً قرار دارد (Doyl & Doyle, 1990).



شکل 4- جداسازی سه فاز مختلف بعد از افزودن کلروفرم

پس از جدا شدن دو فاز از یک دیگر فقط فاز آبی که حاوی DNA و RNA می‌باشد مورد نیاز است؛ بنابراین آن را برداشته و فاز آلی را دور می‌ریزیم.

2 - 3 - استات آمونیوم یا استات سدیم

پروتئین‌های هیستون و سلولی که به DNA متصل هستند می‌توانند توسط پروتئاز یا افزودن استات آمونیوم یا استات سدیم ته‌نشین شده و از DNA جدا شوند. همچنین می‌توان پروتئین‌های مذکور را با افزودن ترکیب فنل-کلروفرم از DNA جدا کرد (Matsudaira, 2005).

نکته: هیستون‌ها[14] پروتئین‌های موجود در هسته‌ی سلول‌های یوکاریوت هستند؛ رشته‌های DNA به دور پروتئین‌های هیستون پیچ می‌خورد و نوکلئوزوم را تشکیل می‌دهد. هیستون‌ها، هم‌چنین در تشکیل کروموزوم نقش دارند. هیستون‌ها از جمله پروتئین‌های ساختاری به شمار می‌روند (Matsudaira, 2005).

3 - تغلیظ DNA دراتانول یا ایزوپروپانول سرد

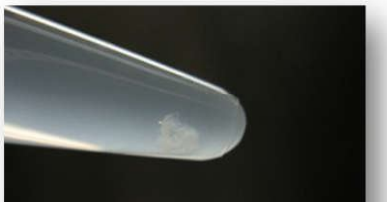
چون الکل‌ها باعث آب‌گیری از DNA می‌شوند و آن را به صورت رسوب در می‌آورند؛ برای جدا نمودن DNA از فاز آبی به آن الکل اضافه می‌شود. برای غلیظ‌کردن و خالص‌سازی DNA از ایزو پروپانول استفاده می‌شود. نکته‌ای که باید توجه شود این است که اگر الکل خیلی غلیظ باشد، DNA به‌شدت آب خود را از

[14] Histone

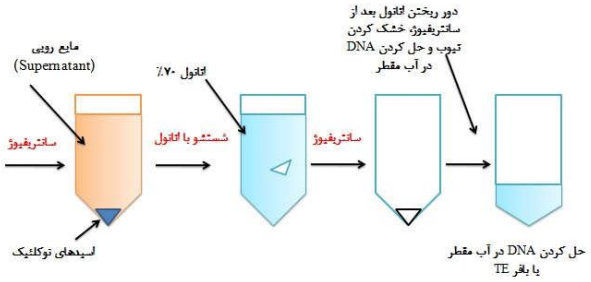
دست می‌دهد و در نهایت از بین می‌رود. الکل باید سرد استفاده شود، زیرا افزودن الکل باعث تولید حرارت می‌شود که این حرارت ممکن است به DNA آسیب رساند؛ بنابراین الکل‌ها را باید به‌صورت سرد (دمای منفی 20 درجه سلیسیوس) استفاده کنیم تا سرمای آن‌ها اثر گرمای ایجاد شده را خنثی نماید. هنگامی که ایزو پروپانول در تیوب حاوی مواد حاصل از استخراج افزوده می‌شود، بعد از عملیات سانتریفیوژ، DNA رسوب کرده و به‌صورت لایه نازکی در انتهای میکروتیوب‌ها قرار می‌گیرد. هر چیزی جز DNA در ایزوپروپانول حل می‌شود و در فاز آبی یا رویی قرار می‌گیرد و بعد از دور ریختن فاز رویی، آن چیزی که در ته میکروتیوب‌ها می‌ماند DNA می‌باشد (Matsudaira, 2005).

4 - شستشو، خشک کردن و محلول کردن مجدد

برای شستشوی رشته‌های DNA از الکل اتانول استفاده می‌شود. چون در این مرحله دیگر فاز آبی وجود ندارد، برای کاهش قدرت آب‌گیری الکل معمولاً آن را با غلظت کمتر (معمولاً 70 درصد) استفاده می‌کنند. اگر الکل خیلی غلیظ باشد، DNA از بین می‌رود. الکل باید سرد باشد چون آبگیری درمحیط سرد صورت می‌گیرد. از آنجایی‌که DNA در الکل محلول نیست به محض افزودن الکل به محلول، DNA آزاد شده و بلافاصله در سطح محلول جمع می‌شوند و همچنین DNA های موجود در عمق محلول نیز با جمع شدن در الکل به سمت بیرون از محلول رانده شده و قابل رویت می‌شوند .بعد از عملیات سانتریفیوژ و دور ریختن الکل بطور کامل رشته‌های DNA به‌صورت هاله‌ای سفید رنگ در انتهای میکروتیوب‌ها قابل مشاهده است (شکل 5). بعد از دور ریختن الکل میکروتیوب‌ها بصورت وارونه روی دستمالی تمیز قرار می‌گیرند تا بطور کامل خشک شوند. پس از خشک شدن کامل باید DNA استخراج شده را مجددا به صورت محلول در آورد. برای این کار از آب مقطر دو بار تقطیر یا محلول تی ای (تریس ای‌دی‌تی‌آ) استفاده می‌شود. پس از افزودن ماده حل کننده تیوبها به مدت 12 ساعت به حال خود با درب بسته در دمای چهار درجه سلسیوس قرار داده می شوند تا کاملاً DNA استخراج شده در بافر یا آب افزوده حل شود. برای نگه‌داری طولانی مدت می‌توان، نمونه‌های DNA را در دمای منفی 20 درجه سلسیوس نگه‌داری نمود و در زمان نیاز آن ها را ذوب و مقدار DNA مورد نظر را برداشت کرد. مراحل کامل کار در (شکل 6) نشان داده شده است.



شکل5 – هاله‌ای سفید رنگ در انتهای میکرو تیوب‌ها بعد از دور ریختن اتانول



شکل 6- مرحله شستشو اسیدهای نوکلئیک و حل کردن DNA در آب مقطر

نکته: اسیدیته آب جهت رقیق‌سازی DNA بسیار مهم می‌باشد که مقدار مناسب pH آب، برای حل شدن کامل DNA و جلوگیری از هیدرولیز اسیدها، باید هفت باشد.

نکته: هنگامی که DNA به صورت محلول است از پیپت کردن اضافی و سانتریفیوژ در دور بالا خودداری شود؛ زیرا سبب شکستن مولکول DNA می‌شود.

نکته: یکی دیگر از حالت‌هایی که می‌توان از تخریب DNA جلوگیری کرد، نگه‌داری DNA در درجه حرارت 55 درجه سلسیوس به مدت یک تا دو ساعت با حرکت آرام روی شیکر می‌باشد.

نکته: برای نگه‌داری طولانی مدت DNA جهت جلوگیری از فعالیت DNA آز، توصیه می‌شود به‌جای آب از بافر تی‌ای استفاده شود.

استخراج DNA در گیاه چای

مواد گیاهی

جهت استخراج DNA از گیاه چای، ابتدا نمونه‌های برگی (بدون هر گونه علائم ظاهری ناشی از بیماری) (شکل 7) را از سرشاخه‌های جوان درختچه چای (شکل 8) تهیه کرده و به‌وسیله یخ خشک در سریع‌ترین زمان ممکن به آزمایشگاه منتقل نموده و جهت جلوگیری از فعالیت اندونوکلئاز تا زمان استخراج DNA بایستی در فریزر 80- درجه سانتی‌گراد نگهداری شوند. در مرحله بعد DNA ژنومی از این برگ‌ها جهت بررسی مولکولی استخراج می‌شود. مراحل استخراج DNAی ژنومی از نمونه‌های برگی جمع آوری شده بر اساس چهار

دستورالعمل معرفی شده دلاپورتا و همکاران (1983)، موری و تامسون (1998)، ورابی و همکاران (1996) و دویل و دویل (1990) استخراج گردید.

بعد از این‌که DNA استخراج شده از لحاظ کمی و کیفی سنجش شد در نهایت روش دلاپورتا و همکاران[15] (1983) با اندکی تغییر بهترین روش شناخته شد.

شکل 7- سرشاخه‌های جوان چای

شکل 8- درختچه چای

محلول‌ها و مواد شیمیایی مورد نیاز:

1. ازت مایع
2. تیوپ‌های اپندورف دو میلی‌لیتری و1/5 میلی‌لیتری
3. بافر استخراج مطابق جدول (1)
4. حمام آب گرم با دمای 65°C
5. استات سدیم 5 مولار
6. مخلوط کلروفورم-ایزوآمیل الکل 24: 1
7. سانتریفیوژ یخچال‌دار
8. ایزوپروپانول سرد (-20°C)
9. بافر TE

[15] Dellaporta

10. فریزر -20°C

11. اتانل 75 درصد

این محلول از اتانل مطلق تهیه شده و برای شستشوی DNA استفاده می‌شود. این محلول باعث از بین بردن نمک باقی‌مانده از مراحل مختلف استخراج شده و برای ضدعفونی به‌کار می‌رود.

12. محلول تریس هیدروکلراید[16] دو مولار (Tris-HCl pH=8)

برای تهیه یک لیتر محلول استوک تریس، مقدار 242/28 گرم از تریس هیدرو کلراید را در 800 میلی‌لیتر آب مقطر حل کرده و با اسیدکلریدریک یک نرمال، pH آن روی هشت (8) تنظیم شده؛ سپس حجم محلول را به 1000 میلی‌لیتر رسانده، و بعد از اتوکلاو در یخچال (4°C) نگه‌داری می‌شود.

13. EDTA[17] نیم مولار (pH=8)

برای تهیه یک لیتر محلول نیم مولار EDTA مقدار 186/12 گرم اتیلن دی آمین ترا استیک اسید (EDTA) را در 800 میلی‌لیتر آب مقطر به کمک هم‌زن مغناطیسی حل کرده و با افزودن هیدروکسید سدیم، pH آن روی هشت (8) تنظیم شده، سپس حجم محلول را به یک لیتر رسانده و بعد از اتوکلاو در یخچال نگه‌داری می‌شود. EDTA با باند کردن Zn++ آنزیم DNAase را غیر فعال می‌کند.

14. کلرید سدیم 5 مولار

برای تهیه یک لیتر کلرید سدیم پنج (5) مولار مقدار 292/2 گرم NaCl را در 800 میلی‌لیتر آب مقطر حل کرده، حجم محلول را به یک لیتر رسانده و بعد از اتوکلاو جهت تهیه بافر استخراج مورد استفاده قرار می‌گیرد.

15. بافر TE

این بافر به‌عنوان نگه‌دارنده و حلال، از مخلوط دو محلول زیر به‌دست می‌آید. برای تهیه 100 میلی‌لیتر بافر مقدار 500 میکرولیتر Tris –HCl pH=8 دو مولار و 200 میکرولیتر EDTA 0.5M pH=8 را به 90 میلی لیتر آب مقطر دوبار تقطیر اضافه کرده و سپس حجم را با آب مقطر دوبار تقطیر به 100 میلی‌لیتر رسانده، اتوکلاو کرده و در دمای اتاق نگه‌داری شود (چراغی، 1396).

---

[16] Trishydroxy Methyl Amino Ethan

[17] Ethylenediaminetetraacetic Acid

جدول 1- بافر استخراج DNA به روش دلاپورتا

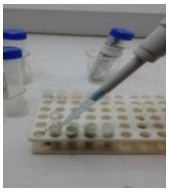
مواد به‌کار رفته	غلظت استوک	غلظت نهایی	میزان لازم برای 100 میلی‌لیتر	قابلیت اتوکلاو
Tris-HCl pH 8.0	2M	100mM	5ml	دارد
Sodium EDTA	0.5M	20mM	4 ml	دارد
NaCl	5M	1.4M	28 ml	دارد
CTAB	---	---	2gr	ندارد
ß-mercaptoethanol			2 ml	ندارد

در نهایت حجم بافر با آب مقطر دوبار تقطیر استریل به 100 میلی‌لیتر می‌رسد.

توجه: بتا مرکاپتواتانول بعد از اتوکلاو کردن و درست قبل از مصرف به بافر اضافه می‌شود.

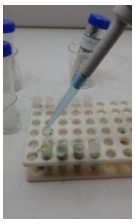
روش استخراج DNA از برگ چای به روش دلاپورتا

1- برگ‌های جوان تهیه شده از گیاه چای را در هاون چینی داخل نیتروژن مایع به‌طور کامل پودر کرده و حدود 0/5 گرم از این پودر به تیوپ‌های اپندورف دو میلی‌لیتری که توسط نیتروژن مایع خنک شده، منتقل شود (دلیل خنک کردن تیوپ‌ها، جلوگیری از آب انداختن پودر برگ در زمان انتقال به تیوپ‌ها است).



2- یک میلی‌لیتر بافر استخراج با دمای 65°C به تیوپ‌های حاوی نمونه‌ها اضافه شوند (بافر استخراج قبل از اضافه کردن به نمونه‌ها به‌خوبی تکان داده شود). تیوپ‌ها چند بار سروته شده تا توده تشکیل نشود.

3- تیوپ‌ها در حمام بخار با دمای 65°C به مدت 15 دقیقه قرار داده شوند (لازم به ذکر است که تیوپ‌ها به فواصل متناوب سروته شود تا توده تشکیل نشده و نمونه‌ها به‌طور یکنواخت با بافر تماس داشته باشند).



4- 200 میکرو لیتر استات سدیم 5 مولار سرد ($4^{\circ}C$) به هر لوله اضافه و لوله‌ها را چند بار سروته شوند.

5- تیوپ‌ها در دمای صفر درجه به مدت 10 دقیقه قرار داده شوند.

6- به هر تیوپ یک میلی‌لیتر مخلوط کلروفرم-ایزوآمیل الکل 24: 1 (در زیر هود) اضافه کرده و چند بار سروته شوند.

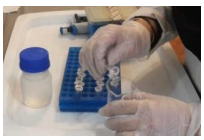
7- تیوپ‌ها در دمای $4^{\circ}C$ در 12000g به مدت 15 دقیقه سانتریفیوژ شوند.

8- فاز بالایی حاصل با دقت جدا شده به داخل تیوپ‌های 1/5 میلی‌لیتری جدید انتقال داده شوند.

9- هم حجم فاز رویی برداشته شده، به تیوپ‌ها ایزوپروپانول سرد ($-20^{\circ C}$) اضافه کرده و تیوپ‌ها چند بار سروته شوند (در این زمان رشته‌های DNA قابل مشاهده هستند).

10- سانتریفیوژ تیوپ‌ها به مدت 5 دقیقه در 12000 g.

11- فاز رویی دور ریخته شود (در این مرحله رسوب DNA به ته تیوپ چسبیده است) و رسوب با اتانل 75 درصد شستشو داده شود (می‌توان یک میلی‌لیتر اتانل در تیوپ‌ها ریخته و به مدت دو دقیقه در 12000g سانتریفیوژ کرد).



12- اتانل به آرامی خارج شود (در این مرحله باید دقت شود چون ممکن است نمونه همراه اتانل دور ریخته شوند).

13- تیوپ‌ها در دمای محیط خشک شوند.

14- به هر تیوپ مقدار 200 میکرولیتر آب مقطر دو بار تقطیر استریل سرد ($4^{\circ C}$) یا بافر TE اضافه کرده و نمونه‌ها در یخچال $4^{\circ C}$ به مدت یک شب گذاشته تا رسوب DNA حل شود.

لازم به یادآوری است که در صورتی که نیاز باشد نمونه استخراج شده به مدت طولانی‌تری نگه‌داری شود باید تیوپ‌های حاوی DNA در فریزر 80°C- نگه‌داری شوند (چراغی، 1396).

استخراج DNA ژنومی به روش موری و تامسون[18]

1- توزین 0/5 گرم نمونه برگ

2- پودر کردن نمونه برگی در حضور ازت مایع در هاون چینی اتوکلاو شده و از قبل در فریزر سرد شده

3- اضافه کردن مقدار پنج میلی‌لیتر از بافر استخراج به هر نمونه و انتقال سریع نمونه‌ها به لوله‌های سانتریفیوژ 15 میلی‌لیتری (فالکون)

4- قرار دادن نمونه در حمام آب گرم 65 درجه سلیسیوس به مدت 30 دقیقه؛ در حین این مدت لوله‌ها چند بار تکان داده شوند.

5- اضافه کردن سه میلی‌لیتر از مخلوط کلروفرم ایزو آمیل الکل 24 به 1 به هر لوله و چندین بار سر و ته کردن آن‌ها و به مدت 15 دقیقه سانتریفیوژ در 1000 دور در دقیقه انجام شود.

6- انتقال روشناور به لوله سانتریفوژ 15 میلی‌متری جدید با استفاده از سمپلر

7- اضافه کردن ایزوپروپانول خالص سرد به مقدار 0/6 حجم محلول (حجم روشناور که برداشته شده است که معمولاً دو میلی‌لیتر است) و سر و ته کردن به آرامی و سپس قرار دادن نمونه‌ها به مدت پنج دقیقه در شرایط آزمایشگاه. در این مرحله توده ژله‌ای بی‌رنگ DNA قابل مشاهده است.

8- سانتریفیوژ لوله ها در 10000 دور به مدت 15 دقیقه تا DNA در کف لوله‌ها رسوب کند.

9- خالی کردن مایع بالایی به آرامی طوری که توده رسوب DNA در لوله باقی بماند.

10-شستشوی رسوب محتوی DNA دو بار با اتانول 75 درصد با توجه به عدم خروج رسوب از لوله هنگام خالی کردن اتانول؛ قرار دادن لوله‌ها به مدت 30 دقیقه در معرض جریان هوا به صورت وارونه روی دستمال کاغذی تا رسوب حاصله خشک شود.

11-اضافه کردن 500 میکرولیتر آب مقطر دو بار تقطیر استریل به لوله‌ها و قرار دادن نمونه به مدت یک شب در یخچال در دمای چهار درجه سلیسیوس تا توده DNA در داخل آب مقطر حل شود.

[18] Murry&Thompson

استخراج DNA به روش ورابی یا CTAB

1- توزین یک گرم نمونه برگی

2- خرد کردن نمونه در حضور ازت مایع در هاون چینی از قبل اتوکلاو شده و سرد

3- انتقال نمونه‌ها به لوله فالکون 15 میلی‌لیتری و اضافه کردن 7/5 میلی‌لیتر از بافر استخراج به آن‌ها

4-اضافه‌کردن 25 میلی‌گرم کربن فعال به‌ازای هر گرم برگ و مخلوط کردن به آرامی

5- اضافه‌کردن 500 میکرولیتر بتا مرکاپ تواتانول به هر لوله و قرار دادن نمونه‌ها به مدت 60 دقیقه در دمای 65 درجه که در این مدت نمونه‌ها چندین مرتبه تکان داده می‌شوند.

6- فالکون‌ها از حمام آب گرم خارج و اجازه داده می‌شود تا در دمای اتاق خنک شود.

7- معادل حجم آن کلروفرم- ایزوآمیل الکل (به نسبت 24 به 1) اضافه شده، به آرامی مخلوط و نمونه‌ها به مدت 10 دقیقه در دمای محیط قرار داده شوند. سانتریفیوژ به مدت 25 دقیقه در 6000 دور در دقیقه و دمای چهار درجه سلیسیوس انجام شود.

8- انتقال روشناور به لوله جدید و به اندازه 7/0 از حجم آن ایزوپروپانول سرد اضافه شده و به آرامی مخلوط شود. قرار دادن نمونه‌ها به مدت 30 دقیقه در دمای اتاق تا رسوب DNA به صورت غیر محلول در آید.

9- سانتریفیوژ به مدت پنج دقیقه در 5000 دور در دقیقه، فاز محلول دور ریخته شده و سپس 10 میلی‌لیتر اتانول 70 درصد به آن اضافه و بعد از 10 دقیقه اتانول دور ریخته شود.

10- به توده سفید DNA که در ته لوله رسوب کرده، اجازه داده شود که در هوای اتاق خشک شود و سپس 500 میکرولیتر TE به آن اضافه شده و در دمای چهار درجه سلیسیوس در یخچال نگه‌داری شود.

استخراج DNA ژنومی به روش دویل دویل

1- توزین نیم گرم نمونه برگی

2- خرد کردن نمونه برگی داخل هاون چینی از قبل اتوکلاو شده به کمک نیتروژن مایع

3- به نمونه‌ها بلافاصله پنج میلی‌لیتر بافر استخراج اضافه کرده

4- ریختن محتوی هاون در لوله‌های 15 میلی‌لیتری فالکون و قرار دادن در دمای 65 درجه به مدت 30 دقیقه که در حین این مدت نمونه‌ها چندین مرتبه تکان داده می‌شود.

5-کاهش دادن دما به چهار درجه سلیسیوس و اضافه کردن پنج میلی‌لیترکلروفرم : ایزوآمیل الکل به نسبت 24 به 1 و چند بار سر و ته کردن لوله‌ها و سانتریفیوژ در 10000 دور در دقیقه به مدت 15 دقیقه انجام شود.

6- برداشت روشناور با تیپ بریده و انتقال به لوله جدید.

7- اضافه کردن یک میلی‌لیتر از بافر 5XCTAB (0/5CTAB درصد و NaCl 0/7 مولار) به هر لوله و سر و ته کردن لوله‌ها.

8- اضافه کردن پنج میلی‌لیتر محلول کلروفرم : ایزوآمیل و سانتریفیوژ به مدت 15 دقیقه در 10000 دور.

9- برداشت روشناور با تیپ بریده وانتقال به لوله جدید و اضافه کردن 3/5 میلی‌لیتر ایزوپروپانول سرد و سر و ته کردن لوله‌ها و سپس قرار دادن در محیط آزمایشگاه به مدت دو ساعت.

10- سانتریفیوژ به مدت 15 دقیقه در 500 دور و دمای چهار درجه سلیسیوس برای رسوب دادن DNA.

11- خالی کردن ایزوپروپانول (توجه شود که رسوب خارج نگردد) و سپس اضافه کردن پنج میلی‌لیتر بافر شستشو (76 درصد اتانول و 10 میلی‌مولار استات آمونیوم) سرد، سر و ته کردن و سپس قرار دادن در محیط آزمایشگاه به مدت 30 دقیقه.

12- سانتریفیوژ در 3200 دور به مدت 10 دقیقه در دمای چهار درجه سلیسیوس.

13- خالی کردن بافر شستشو(توجه شود به همان صورت که محلول خالی می‌شود، بدون برگرداندن لوله اپندروف آن را به صورت وارونه روی دستمال کاغذی قرار دهید تا رسوب خشک شود).

14- خشک کردن رسوب با جریان هوای ملایم (لوله‌ها به صورت وارونه روی دستمال کاغذی زیر هود).

15- بعد از حدود 30 دقیقه (خشک شدن کامل) به میزان 500 میکرولیتر به هر لوله بافر TE اضافه کرده و به مدت یک شب برای حل شدن DNA در یخچال در دمای چهار درجه سلیسیوس قرار گیرد.

تعیین کمیت و کیفیت سنجی نمونه‌های DNAی استخراج شده

بعد از اتمام مراحل استخراج، باید DNA مورد نظر از لحاظ کمی و کیفی مورد بررسی قرار بگیرد. بنابراین، برای غلظت‌سنجی یا کمیت DNA از دستگاه اسپکتروفتومتر نانو دراپ (شکل 9) و تعیین کیفیت DNA به‌دست آمده از الکتروفورز ژل آگارز 0/8٪ با بافر(1X) TBE استفاده شد (شکل 10).

.

شکل 9- اسپکتروفتومتر (نانودراپ)

شکل 10- ژل الکتروفورز

1- اندازه‌گیری کمیت DNA

به منظور ارزیابی کمیت و کیفیت DNA و آگاهی از میزان غلظت و خلوص آن می‌توان از روش اسپکتروفتومتری استفاده کرد. این روش یک روش کمی بوده و می‌توان غلظت DNA را با استفاده از جذب نوری در طول موج 260 نانومتر محاسبه کرد. در این روش ساده و دقیق، میزان جذب اشعه UV توسط بازهای DNA اندازه گرفته می‌شود. مولکول‌های DNA به علت حضور بازهای آروماتیک آدنین، تیمین، سیتوزین و گوانین؛ دارای جذب نوری زیاد در محدوده ماوراء بنفش می‌باشند. بنابراین، اندازه‌گیری جذب نوری محلول‌های DNA شاخص خوبی برای درجه خلوص آن می‌باشد.

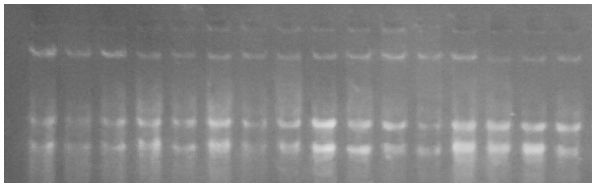
حداکثر جذب مولکول DNA در طول موج 260 نانومتر است. از طرفی معمولاً محلول‌های DNA مقداری آلودگی پروتئینی دارند که حداکثر جذب محلول‌های پروتئینی نیز به علت حضور اسیدهای آروماتیک مانند تریپتوفان فنیل، تیروزین و آلانین در طول موج 280 نانومتر می‌باشد. بنابراین، نسبت جذب در طول موج‌های 260/280 را، مشخص می‌کنند. جذب نوری معیار مناسبی برای تعیین نسبت DNA به پروتئین در یک نمونه و به عبارتی درجه خلوص خواهد بود. به همین علت، برای تعیین غلظت DNA محلول، باید جذب آن را در طول موج‌های 260 و 280 نانومتر مشخص نمود. وجود نسبت‌های جذب در طول موج 260 به 280 نانومتر در محدوده 2-1/7 بیان‌گر جذب حداکثری نور توسط اسیدهای نوکلئیک بوده و نشان از کیفیت بالای DNA دارد؛ هرچه این نسبت به 1/8 نزدیک‌تر باشد، یعنی DNA به‌دست آمده خالصتر است. پایینتر از نسبت 1/8 نشانه آلودگی به پروتئین‌هاست.

2 - اندازه‌گیری کیفیت DNA

برای اندازه‌گیری کیفیت DNA از دستگاه الکتروفورز استفاده می‌شود. الکتروفورز به حرکات ذرات در یک مایع تحت میدان الکتریکی گویند. الکتروفورز، یک روشی آزمایشگاهی است که برای جداسازی ماکرومولکول‌هایی هم‌چون DNA، RNA و پروتئین استفاده می‌شود. این جداسازی بر اساس اندازه و بار الکتریکی ذرات صورت می‌گیرد. مولکول‌های اسید نوکلئیک با قرار گرفتن در میدان الکتریکی با توجه به منفی بودن بار الکتریکی آن‌ها در یک محیط هادی هم‌چون آگاروز یا سایر محیط‌ها حرکت می‌کند. مولکول‌هایی با اندازه کوچک و وزن سبکتر سریعتر از مولکول‌های بزرگ و سنگینتر حرکت می‌کنند؛ زیرا به‌راحتی و با سرعت بیشتری از منافذ ژل عبور می‌کنند. الکتروفورز برحسب نوع ژل به کار گرفته شده به دو نوع الکتروفورز ژل آگارز (الکتروفورز افقی) و الکتروفورز ژل پلی‌اکریل‌آمید (الکتروفورز عمودی) تقسیم می‌شود. برای مولکول‌هایی که وزن مولکولی کمی دارند، بیشتر ژل پلی‌آکریل آمید استفاده می‌شود که قدرت تفکیک بالایی دارند. برای تفکیک اسیدهای نوکلئیک اغلب از ژل آگارز استفاده می‌شود.

در اینجا از الکتروفورز ژل آگارز استفاده می‌شود. به این صورت که مقدار 5µl از نمونه DNA با 3µl بافر بارگذاری و 5µl آب مقطر و 2µl محلول Dye مخلوط شد و حجم 10µl از مخلوط حاصل در ژل آگارز بارگذاری شد. ژل به مدت نیم ساعت در ولتاژ 100 الکتروفورز شد.

برای مشاهده باندهای تشکیل شده از دستگاه ژل‌داک استفاده شد که در زیر نور UV عکس‌برداری جهت مستندسازی اطلاعات صورت گرفت (شکل 11).



شکل 11- تعدادی از نمونه‌های DNA که خوب استخراج‌شده

برای بررسی واکنش PCR از دو آغازگر ISSR با توالی‌های (GA)8T و (AG)8YA استفاده شد. هر مخلوط واکنش PCR شامل 40ng الگوی DNA، 1/5µl از آغازگر با غلظت 10µM و 8µl کیت PCR با غلظت 2X بود که در نهایت با اضافه کردن آب مقطر استریل حجم مخلوط واکنش به 16µl رسید.

هضم و برش DNA استخراج شده توسط آنزیم محدودگر EcoRI بر اساس دستورالعمل کارخانه تولیدکننده صورت گرفت. برش به شرح 5µl از DNA استخراج شده، 2µl بافر هضم (10X)، 20 واحد آنزیم

برشی در حجم نهایی 31µl، صورت گرفت. مخلوط واکنش برش در دمای 37°c به مدت 10h قرار گرفت (جدول 2).

جدول 2- دستورالعمل تکثیر DNA در آزمایش ISSR

مراحل انجام واکنش	دما (°C)	زمان (دقیقه)	تعداد چرخه
واسرشته شدن ابتدایی	94	4	1
واسرشته شدن چرخه اصلی	94	1	36
اتصال آغازگر	54	1	
بسط چرخه اصلی	72	2	
بسط نهایی	72	7	1
نگهداری پایانی	4	5	

نتیجه‌گیری

در تمام روش‌ها DNAی به‌دست آمده روی ژل آگارز الکتروفورز گردید و با مقایسه ضخامت باندهای به دست آمده با باندهای DNAی استاندارد، غلظت آنها تخمین زده شد. شکستگی قطعات DNA در طی مراحل استخراج که به‌صورت دنباله در روی ژل دیده می‌شود؛ به عنوان معیاری برای کیفیت پایینتر DNA تلقی می‌گردد. مشاهده ژل به‌دست آمده از بارگذاری حجم‌های مساوی از DNA استخراجی از برگ‌ها، نتایج تقریباً مشابهی با بررسی اسپکتروفتومتری نشان داد و آن را تایید نمود. به علت آنکه برخی نمونه‌ها دارای غلظت بسیار بالای DNAی استخراجی بودند، برای راحتی حرکت DNAی استخراجی در ژل آگارز، تمام نمونه‌ها با یک غلظت یکسان رقیق سازی گردیدند و به این طریق امکان مقایسه با نتایج اسپکتروفتومتری فراهم گردید. بر اساس مقایسه چهار روش استخراج با یکدیگر مشابه روش اسپکتروفتومتری روش استخراج دلاپورتا و همکاران (1983) دارای بالاترین غلظت و کیفیت بود.

منابع

ابراهیمی، م.ع.، توحیدفر، م. و احمدی نیک، ا. (1393). اصول و مبانی مهندسی ژنتیک. دانشگاه پیام نور، 270 ص.

چراغی، ک. (1396). بررسی تنوع و روابط ژنتیکی برخی ژنوتیپ‌های انتخابی چای با استفاده از نشانگرهای مورفولوژی و ISSR. پایان نامه کارشناسی‌ارشد بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشگاه پیام نور واحد کرج، 82 ص.

ربانی چادگانی، ع. (1386). مبانی بیوشیمی. انتشارات دانشگاه تهران، 276 ص.

علنی، ب.، مطلبی، م.، زمانی، م. ر.، ضرغامی، ن.، رهبانی نوبر، م.، جبارزاده تبریزی، س. و مشایخی، م. ر. (1383). استفاده از روش RAPD جهت بررسی پلی‌مورفیسم DNA در سویه‌های جدا شده قارچ فوزاریوم اگزیسپوروم. مجله پزشکی دانشگاه علوم پزشکی تبریز، دوره 38، شماره 63: 70-65.

فارسی، م.، ذوالعلی، ج. و شهریاری، ف. ا. (1394). اصول بیوتکنولوژی گیاهی. دانشگاه فردوسی مشهد، 554 ص.

کدخدایی، س. (1382). روش ساده و کم‌هزینه جهت جداسازی اسیدهای نوکلئیک از گیاهان حاوی مواد پلی‌ساکاریدی و پلی‌فنلی زیاد: بهینه‌سازی روش استخراج DNA در بادام. مجموعه مقالات سومین کنگره بیوتکنولوژی ایران، صفحات 417 تا 419.

-Boeck & Larcier. (1999). La structure moléculaire des gènes et des chromosomes (Chapter, 10), 514p.

- Brown, T. A. (2001). Gene cloning and DNA analysis: An introduction. Blackwell Scientific Publication, Oxford.

-Bushra, C., Y. Afshan, H., Tayyab and S. Riazuddin. (1999). Mini-scale genomic DNA extraction from cotton. *Plant Molecular Biology Reporter*, **17**: 1-7.

-Dellaporta, S. L., Wood, J. & Hicks, J. B. (1983). A plant DNA minipreparation: version II. *Plant Molecular Biology Reporter*, **1(4)**: 19-21.

-Doyle, J. J. and J. L. Doyle. (1990). Isolation of plant DNA from fresh tissues. *Focus*, **12**: 11-15.

-Dundass N., N. K. Leos, M. Mitui, P. Revell and B. B. Rogers.(2008). Comparison of automated nucleic acid extraction methods with manual extraction. *Journal of Molecular Diagnostics*, **10**: 311-316.

-Lodhi, M. A., G. N. Ye., N. F. Weeden and B. I. Reisch. (1998). A simple and efficient method of DNA extraction from grapevine cultivars and Vitis species. *Plant Molecular Biology Reporter*, **12**: 6-13.

-Matsudaira, B. (2005). Biologie moléculaire de la cellule by Lodish, Maison d'édition De.

-Murry, M. and W. F. Thompson. (1980). Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucleic Acid Research*, **8**: 4321-4325.

-Porebski, S., L. Grant Bailey and B. R. Boum. (1997). Modification of a CTAB DNA extraction protocol for plants containing high polysaccharide and polyphenol components. *Plant Molecular Biology Reporter*, **15 (1)**: 8- 15.

-Sambrook J., E. F. Fritsch and T. Maniatis. (1989). Molecular cloning: A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.

-Stulnig T. M. and A. Amberger. (1994). Exposing contaminating phenol in nucleic acid preparations. *BioTechniques*, **16**: 402-404.

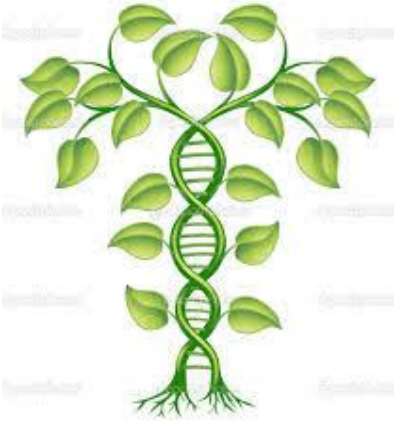
-Tang, Y. W., S. E. Sefers, H. Li, D. J. Kohn and G. W. Procop. (2005). Comparative evaluationof three commercial systems for nucleic acid extraction from urine specimens. *Journal of Clinical Microbiology*, **43**: 4830-4833.

-Velazquez, L. P. A., Martinez, M. C. A. and Romero, A. C. Extraccion and Purificacion de DNA, In: *www.publicaciones.inecc.gob.mx/ libros/710/extraccion.pdf.*

-Vroh Bi, I., L. Hraventg, A. Chandelier, G. Mergeai and P. Du Jardin. (1996). Improved RAPD amplification of recalcitrant plant DNA by use of activated charcoal during DNA extraction. *Plant Breeding*, **115**: 205-206.

-Ziegenhagen, B. (1998). Comparative analyziz of different DNA extraction protocols: A fast universal maxi-preparation of high quality plant DNA for genetic evalution and phylogenetic studies. *Plant Molecular Biology Reporter*, **16**: 69-86.

در اختیار داشتن دستورالعمل کارآمد، آسان و کم هزینه برای استخراج DNA در گیاه چای به منظور نمونه‌گیری و دست‌ورزی در انجام کارهای مولکولی در آزمایشگاه؛ بسیار مهم و ضروری است.



Ministry of Jihad–e-Agriculture

Agricultural Research, Education & Extension Organization

Horticultural Sciences Research Institute

Tea Research Center

Instructions of DNA Extraction in Tea Plant

BY:

Kolsoom Cheraghi

Shahin Jahangizadeh Khiavi

2019

پژوهشکده چای
گیلان: لاهیجان
خیابان شیخ زاهد گیلانی
تلفن: ۴۲۴۲۶۸۰۸ - ۰۱۳
دورنگار: ۴۲۴۲۵۵۷۵- ۰۱۳
www. chay.areeo.ac.