روشی ساده و مؤثر برای استخراج DNA ژنومی از گیاه و قارچ جهت آزمون‌های مبتنی برPCR

Simple and effective method for genomic DNA extraction from plant and fungus for PCR-based analyses

پیمان نوروزی[۱]

برای استخراج DNA ژنومی از منابع گیاهی و قارچی روش‌های بسیاری وجود دارد که در آزمایشگاه‌های مختلف بسته به میزان کمیت و کیفیت DNA موردنیاز از آن‌ها استفاده می‌گردد. با این حال، اصول کلی مراحل استخراج DNA در اغلب روش‌ها یکسان است (Edward et al. 1991; Murry and Thompson 1980; Rogers and Bendich 1988; Saghai- Maroof et al. 1984). با توجه به انجام طرح‌های تحقیقاتی مبتنی بر نشانگرهای مولکولی در آزمایشگاه بیوتکنولوژی مؤسسه تحقیقات چغندرقند، نیاز به روشی ساده، کم هزینه و درعین حال کارآمد برای استخراج DNA ژنومی گیاه و یا قارچ که پیش نیاز آزمون‌های مولکولی مبتنی بر PCR می‌باشد حس می‌گردید. بنابراین سعی گردید با مقایسه چندین روش استخراج DNA در منابع مختلف (Cartner and Milton 1993; Edward et al. 1991; Huang and San 2000; and Thomas 1980; Rogers and Bendich 1988; Saghai- Maroof et al. 1984) به روشی ساده و تکرارپذیر دست یافت که مورد استفاده برای منابع گیاهی و قارچی باشد. در نهایت، روش یا دستورالعمل زیر به کار گرفته شد و DNA استخراج شده از نمونه‌های مختلف دو منبع گیاهی و قارچی پس از تعیین کمیت و کیفیت، مورد آزمون PCR اختصاصی و RAPD قرار گرفتند. الگوی نوارهای حاصل از تکثیر DNA نشان داد که روش به کار رفته در استخراج DNA برای هر دو منبع گیاهی و قارچی مؤثر بوده است (شکل ۱). زمان لازم برای این روش استخراج کم‌تر از سه ساعت بوده و در مقایسه با اکثر روش‌های معمول در آزمایشگاه‌های زیست شناسی مولکولی با هزینه کم‌تری قابل انجام است.

دستورالعمل استخراج DNA ژنومی از گیاه و قارچ

ابتدا محلول های بافر استخراج طبق جدول یک تهیه گردد.

جدول۱- تهیه ۱۰۰ میلی لیتر بافر استخراج DNA

Table 1 Preparing of 100 ml DNA extraction buffer

محلول های ذخیره Stock solutions	حجم برداشتی (میلی‌لیتر) Required volume(milt)	غلظت نهایی Final concentration
SDS 5%	20	1%
NaCl, 2.5M	20	500 mM
Tris HCl, 1M, pH=8	10	100 mM
EDTA, 0.5 M, pH=8	10	50 mM
ddH2O	39	----
2-Mercaptoethanol (add Freshly)	1	1%

۱ - عضو هیئت علمی مؤسسه تحقیقات چغندرقند، Email: norouzi@sbsi.ir

سپس استخراج DNA طبق مراحل زیر صورت پذیرد:

۱ – آسیاب نمودن ۱۰۰–۵۰ میلی‌گرم بافت برگ یا میسلیوم قارچ (منجمد شده در ازت مایع) در میکروتیوب ۱/۵ میلی‌لیتری با وسیله ساینده.

۲ – افزودن ۳۰۰ میکرولیتر بافر استخراج، سپس ورتکس مخلوط.

۳ – نگه‌داری میکروتیوب‌ها در حمام آب گرم$60^{o}C$ به مدت ۳۰ دقیقه با اینورت (سر و ته کردن) متناوب.

۴ – انتقال نمونه‌ها بر روی یخ و نگه‌داری به مدت ۵ دقیقه.

۵ – افزودن ۸۰۰ میکرولیتر کلروفرم: ایزوآمیل الکل (نسبت حجمی۲۴ به یک) و اینورت نمونه‌ها به مدت حداقل پنج دقیقه.

۶ – سانتریفوژ نمونه‌ها در rpm ۹۰۰۰ دور در دقیقه در دمای آزمایشگاه به مدت ۱۰ دقیقه.

۷ – انتقال فاز روئی به میکروتیوب جدید. تکرار مراحل ۷–۵.

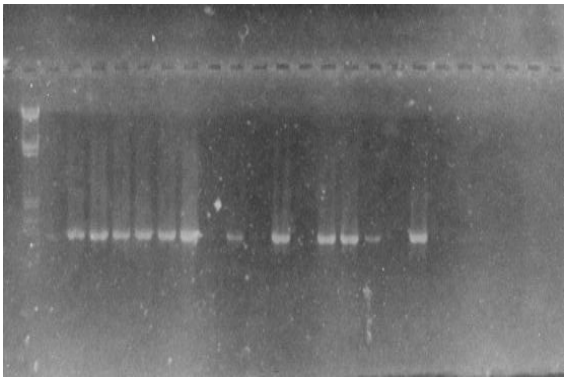
۸ – افزودن دوسوم حجم ایزوپروپانل سرد، چند بار اینورت نمونه‌ها، سپس قراردادن آن‌ها در فریزر $-20^{o}C$ به مدت ۶۰–۳۰ دقیقه.

۹ – سانتریفوژ درrpm ۸۰۰۰ در دمای آزمایشگاه به مدت ۱۰ دقیقه و سپس حذف محلول روی رسوب.

۱۰– شستشوی رسوب با الکل ۷۰ درصد برای دو مرتبه.

۱۱– افزودن ۱۰۰–۵۰ میکرو لیتر بافر TE (Tris ده میلی‌مولار+ EDTA یک میلی‌مولار) حاوی RNase (۲۰–۱۰ میکروگرم بر میلی لیتر) بسته به حجم رسوب و نگه داری بر روی ترمومیکسر(Termomixer) $37^{o}C$ به مدت یک ساعت.

۱۲– نگه‌داری نمونه ها در یخچال $4^{o}C$ تا زمان استفاده.



شکل ۱– نمونه‌ای از نتایج آزمون PCR که DNA الگوی به کار رفته در واکنش، با روش مذکور در این گزارش استخراج شده است

Fig. 1 A result of PCR analysis in which template DNA into reaction has been extracted by the above method

References

منابع مورد استفاده

Cartner MJ, Milton ID (1993) An inexpensive and simple method for DNA purifications on silica particles. Nucleic Acids Research. 21: 1044.

Edwards K, Johnstone C, Thompson CA (1991) Simple and rapid method for the preparation of plant genomic DNA for PCR analysis. Nucleic Acids Research. 19: 1349.

Huang J, Ge X, Sun M (2000) Modified CTAB protocol using a silica matrix for isolation of plant genomic DNA. BioTechniques. 28: 432-434.

Murry MG, Thompson WF (1980) Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. Nucleic Acids Research. 8: 4321-4325.

Rogers SO, Bendich AJ (1988) Extraction of DNA from plant tissues. Plant Molecular Biology Manual. A6: 1-10. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht- Planted in Belgium.

Saghai-Maroof MA, Soliman KM, Jorgensen RA, Allard RW (1984) Ribosomal DNA spacer-length polymorphism in barley: Mendelian inheritance, chromosomal, location and population dynamics. Proc Nat Acad Sci USA 81: 8014-8018.