استخراج DNA از نمونه‌های خشک شده گیاه و قارچ با روشی سریع، ایمن و بدون استفاده از نیتروژن مایع

سیده‌زهرا فاطمی‌فرد[۱] و اسد معصومی‌اصل[۲*]

۱- کارشناسی‌ارشد، گروه اصلاح نباتات، دانشگاه یاسوج، یاسوج، ایران، s.zfatemifard@yahoo.com

۲*- دانشیار، گروه اصلاح نباتات، دانشگاه یاسوج، یاسوج، ایران، Masoumiasl@yu.ac.ir

*نویسنده مسئول: اسد معصومی‌اصل

تاریخ دریافت: تیر ۱۳۹۸ تاریخ پذیرش: آذر ۱۳۹۸

DNA Extraction from dried specimens of plant and fungi in a fast, secure and non-use liquid nitrogen method

Seyedeh Zahra FatemiFard [1] and Asad Masoumiasl*[2]

1- M.Sc, Department of Plant Breeding, Yasouj University, Yasouj, Iran, s.zfatemifard@yahoo.com

2*- Associte Professor, Department of Plant Breeding, Yasouj University, Yasouj, Iran, Masoumiasl@yu.ac.ir

*Corresponding author: Asad Masoumiasl

Received: July 2019 Accepted: December 2019

چکیده

استفاده از تکنیک‌های مختلف مولکولی جهت اصلاح گیاهان و قارچ‌ها نیازمند استخراج DNA با کیفیت بالا است. در اغلب روش‌های جداسازی DNAی گیاهی و قارچی، تکنیک‌های معمولی که مورد استفاده قرار می‌گیرند شامل استفاده از CTAB، آنزیم‌ها (مثل پروتئیناز K)، حلال‌های آلی سمی (مثل فنل)، نیتروژن مایع، SDS و یا استفاده از کیت‌های استخراج DNA می‌باشد که هر کدام مزایا و معایب خاص خود را دارند. در اغلب روش‌های استخراج DNA لازم است جهت تهیه پودر مواد گیاهی یا قارچی از نیتروژن مایع استفاده شود. توصیه بر این است که از نیتروژن مایع در فضاهای بسته استفاده نشود زیرا تبخیر آن باعث افزایش درصد نیتروژن هوا و در نتیجه کاهش اکسیژن خواهد شد که می‌تواند موجب سردرد، بیهوشی و یا حتی مرگ گردد. تماس با نیتروژن مایع موجب سوختگی شدیدی نیز می‌شود که می‌تواند موجب از کار افتادن اعضاء و یا حتی مرگ شود. از طرف دیگر نمونه قارچ و یا گیاه باید در جعبه یخ به آزمایشگاه منتقل گردد که اینکار نیازمند تجهیزات انتقال نمونه و یخچال فریزر با دمای ۴۰- درجه سانتی‌گراد می‌باشد. در این تحقیق، پس از جمع‌آوری نمونه‌های برگ گندم و قارچ *Rhizoctonia solani*، ابتدا آنها را در پاکت‌های کاغذی سر باز، در دمای ۲۵ تا ۳۰ درجه سانتی‌گراد درون آون قرار داده و خشک کردیم. سپس دو نوع بافر استخراج تهیه و استخراج ماده وراثتی طبق دستورالعمل ارائه شده انجام شد و کمیت و کیفیت آن به ترتیب با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتری و با استفاده از آغازگرهای ISSR و واکنش زنجیره‌ای پلیمراز بررسی گردید. روش ارائه شده در این پژوهش یک روش سریع، ایمن، اقتصادی و ساده می‌باشد. این دستورالعمل برای جداسازی DNA از برگ گیاهان گونه غلات و گونه‌های قارچی مشابه ریزوکتونیا بسیار کاربردی می‌باشد. نتایج بدست آمده حاکی از کیفیت و کمیت بالای DNAی استخراج شده و تکثیر بسیار خوب آن بود.

کلمات کلیدی: استخراج DNA، الکتروفورز، برگ خشک شده، نیتروژن مایع

Abstract

The use of various molecular techniques to improve plants and fungi requires high quality DNA extraction. In most plant and fungal DNA isolation methods, common techniques that are used include the use of CTAB, enzymes (such as proteinase K), toxic solvents (such as phenol), liquid nitrogen, SDS, or the use of DNA extraction kits each have their own advantages and disadvantages. In most DNA extraction procedures, it is necessary to use liquid nitrogen to make powdered plant or fungi material. It is recommended that no liquid nitrogen be used in closed spaces because its evaporation causes an increase in nitrogen levels in the air, resulting in a decrease in oxygen that can cause headaches, anesthesia or even death. Contact with liquid nitrogen causes severe burns, which can lead to death of organs or even death. On the other hand, the sample of the fungus or plant should be transferred to the laboratory in an ice box, which requires a sample transfer equipment and refrigerator at -40 ° C. In this research, after collecting leave of wheat and *Rhizoctonia solani* samples, we first put them in unopened paper bags at a temperature of 25 to 30 ° C in the oven and dried. Two type extraction buffers were prepared and extraction of heredity materials from the samples was done according to the instructions provided and its quantity and quality was evaluated using spectrophotometric apparatus and using ISSR primers by polymerase chain reaction, respectively. The method presented in this study is a fast, secure, economic and simple approach. This instruction is very useful for isolating DNA from leaves of species of cereals and fungal species similar to rhizoctonia. The results showed that the quality and quantity of extracted DNA was high and its multiplication was very well.

Keywords: Electrophoresis, Dried leaf and liquid nitrogen, DNA extraction.

مقدمه و کلیات

از آنجایی‌که در اکثر فنون آزمایشگاهی از واکنش زنجیره ای پلیمراز (PCR) برای تکثیر DNA استفاده می‌شود و با توجه به حساسیت زیاد این سیستم به وجود یک DNA با کیفیت و کمیت مناسب، نیازمندی به تهیه روش بهینه استخراج DNA احساس می شود (Newton and Graham, 2002; Tan and Yiap, 2009). انتخاب هر دستورالعملی برای استخراج ماده وراثتی تا حد زیادی به نوع نمونه بستگی دارد. همچنین درک عملکرد هر ماده در روش کار، این امکان را فراهم خواهد نمود که در صورت نبود یک ماده، از ماده دیگری با عملکرد مشابه استفاده کرد. آلاینده‌هایی مانند تانن‌ها، پلی‌ساکاریدها و رنگدانه‌ها می‌توانند مقدار DNA را به وسیله آنزیم اندونوکلئاز محدود کنند (Nio *et al*., 2008). روش استخراج DNA بایستی ضمن حذف دیواره‌های سلولی و غشای هسته و رفع آنزیم‌های تخریب‌کننده DNA، امکان تهیه DNA با کیفیت و نسبتاً خالص با حجم مناسب را داشته باشد (آرمینیان و همکاران، ۱۳۸۹). معمولا کیفیت DNA با عواملی از قبیل عدم آلودگی ناشی از RNA، لیپید و پروتئین و سایر ساختارهایی که برای آنزیم‌های برشی و پلیمرازها مزاحمت ایجاد می‌کنند، سنجیده می‌شود. به علت بزرگ بودن اندازه مولکول DNA، روش‌های استخراجی باید حداقل تنش مکانیکی را در طی مراحل استخراج ایجاد نمایند. شوینده‌های یونیزه مانند SDS باعث شکستن کروموزوم می‌شوند ولی شوینده غیریونیزه مانند تریتون X100 فقط تجزیه سلول را انجام می‌دهد. نقش این شوینده‌ها هضم سلول و کمک به از بین بردن پروتئین‌های متصل به DNA می‌باشد. تریتون X100، غشاء سلولی را در خود حل می‌کند و در نتیجه سانتریفیوژ، یک محلول تجزیه شده شفاف باقی می‌ماند (مهدوی و همکاران، ۱۳۹٤). اگر NaOH به عصاره سلولی اضافه گردد، پیوندهای هیدروژنی مولکول DNAی پیچ نخورده را می‌شکند. اگر در این وضعیت، اسید افزوده شود، این رشته‌های دناتوره شده DNA به صورت توده‌ای مجتمع در می‌آید که با سانتریفیوژ قابل جداسازی است (مهدوی و همکاران، ۱۳۹٤). تغییر در pH و ترکیب بافر استخراج نیز می‌تواند در بهبود کیفیت و کمیت DNA استخراج شده تا حدودی موثر باشد (Lodi *et al*., 1994). برای تخریب دیواره یا غشاء سلولی، روش‌های فیزیکی و شیمیایی مختلفی بکار می‌رود. در روش‌های شیمیایی از آنزیم‌ها و موادی که باعث تخریب دیواره و غشاء می‌شوند، استفاده می‌شود. برای مثال EDTA یک عامل شلات کننده است که با حذف یون‌های فلزی مانند Ca^{2+} و Mg^{2+} که در استحکام دیواره نقش دارند، دیواره را سست می‌کند. این ماده شیمیایی یون‌های منیزیم را که برای حفظ ساختمان کلی پوشش سلولی لازم است، جذب می‌کند. به علاوه با حذف یون‌های فلزی که در آنزیم‌های تجزیه کننده اسیدهای نوکلئیک دخیل هستند، مانع تجزیه این مواد می‌شود. وجود EDTA به میزان حداقل ۲ میلی مولار در بافر استخراج باعث می‌شود که کوآنزیم‌های DNase با EDTA شلات شود و از تجزیه تصادفی DNA جلوگیری نماید. پس از جداکردن فاز آبی، می‌توان با اضافه کردن الکل‌هایی نظیر اتانول یا ایزوپروپانول در حضور کاتیون Na^{+} یا آمونیوم، اسیدهای نوکلئیک را رسوب داد. برای خالص سازی اسیدهای نوکلئیک از CTAB و محلول نمک نیز استفاده می‌کنند. DNA ای که متیله باشد یا DNA ای که پروتئین‌های همراه آن طی

عملیات استخراج به خوبی حذف نشده باشد به خوبی هضم و تکثیر نخواهد شد. بنابراین برای حذف پروتئین و لیپید، از موادی مانند کلروفرم استفاده می‌کنند (نقوی و همکاران، ۱۳۹۲). اتانول مطلق به طور موثری اسیدهای نوکلئیک پلیمریزه را رسوب می‌دهد (مهدوی و همکاران، ۱۳۹٤). حذف نکردن کامل اتانول مورد استفاده در خلال استخراج DNA نیز موجب کاهش کیفیت DNA می‌شود (نقوی و همکاران، ۱۳۹۲). در اکثر روش‌های استخراج DNA از بافت‌های گیاهی و قارچی، از نیتروژن مایع استفاده می‌شود. معمولا توصیه بر این است که از نیتروژن مایع در فضاهای بسته استفاده نشود زیرا تبخیر حتی چند لیتر از آن باعث افزایش درصد نیتروژن هوا و در نتیجه کاهش اکسیژن خواهد شد که این امر می‌تواند موجب سردرد، بیهوشی و یا حتی مرگ گردد. تماس با نیتروژن مایع باعث سوختگی شدیدی نیز می‌شود که می‌تواند موجب از کار افتادن اعضاء و یا حتی مرگ شود. به نقل از (Dentinger *et al*., 2010) روش‌های استخراج DNA فعلی از قارچ‌ها به دلیل اینکه بر روی دستورالعمل‌هایی تکیه می‌کنند که برای سایر ارگانیسم‌ها طراحی شده اند، غیر قابل اعتمادند و یا در صورتیکه تاریخچه زیادی برای استفاده داشته باشند، وقت‌گیر هستند و یا از مواد سمی در آن استفاده می‌گردد. در روش استخراج گزارش شده توسط آرمینیان و همکاران (۱۳۸۹) از SDS، نیتروژن مایع و RNAse استفاده شده است. در روش Nio *et al*., (2008) نیز از SDS، نیتروژن مایع، فنانترولین و استات پتاسیم استفاده شده که نیازمند تهیه مواد و هزینه زیادتری می‌باشد. گزارش اسفندانی بزچلویی (۱۳۹۵) تنها گزارشی است که در آن جهت استخراج DNA از نیتروژن مایع استفاده نشده است. در اکثر گزارشات موجود، مشخص شده که استفاده از بافت-های جوان نسبت به بافت‌های پیرگیاه نتایج استخراج DNA بهتر است (Wang *et al*., 1993; Khanuja *et al*., 1999; Choudhary *et al*., 2008; Moreira and Oliveria, 2011)، با اینحال همیشه بافت تازه و جوان در دسترس نیست. بنابراین، نیازمند روش بهینه ای هستیم که بتوان از نمونه های خشک شده نیز برای استخراج DNA بهره گرفت. قارچ‌ها دومین و بزرگترین گروه یوکاریوتی در زمین و دارای نقش مهمی در زندگی انسان می‌باشند و به طور سنتی یکی از روش‌های شناسایی آنها استفاده از ویژگی‌های مورفولوژیکی و تقسیمات میتوزی و میوزی بوسیله میکروسکوپ می باشد، اما گاهی با این روش امکان شناسایی وجود ندارد، بنابراین، بارکدگذاری DNA آن لازم می‌باشد. از آنجائیکه دسترسی به قارچ خشک شده در طبیعت خیلی راحت‌تر است، لذا اگر بتوان روش بهینه‌ای برای استخراج ماده وراثتی از نمونه خشک قارچی بدست آورد در جهت بارکدگذاری DNA آنها بسیار مفید خواهد بود. ویژگی روش اسفندانی بزچلویی (۱۳۹۵) استفاده از برگ خشک شده گیاهی بود که نیازمند نگهداری در دمای ٤۰- درجه سانتیگراد تا زمان استخراج نبود، اما به علت پائین بودن کیفیت DNA استخراجی، زمان طولانی و حجم کم DNA بدست آمده برای نمونه گیاهی و قارچی، هدف این تحقیق بدست آوردن روشی بهینه از نظر زمانی و اقتصادی و استخراج DNA با کیفیت‌تر و با حجم بیشتر برای نمونه های خشک غلات و قارچ با ایجاد تغییراتی بود که در سرعت سانتریفیوژها، میزان مواد شیمیایی، زمان‌ها و دماهای مورد استفاده در مراحل مختلف فرآیند استخراج ایجاد شد.

فرآیند پژوهش

پس از جمع آوری نمونه های برگ گندم و قارچ *Rhizoctonia solani*، ابتدا آنها را در پاکت‌های کاغذی سر باز، در دمای ۳۰-۲۵ درجه سانتی‌گراد درون آون قرار داده و خشک کردیم. سپس بافرهای استخراج ۱ و ۲ طبق جداول ۱ تهیه شدند.

ماده	غلظت نهایی در بافر استخراج ۱	غلظت نهایی در بافر استخراج ۲
$EDTA\text{-}Na_2$	۵۰ میلی مولار	۲۰ میلی مولار
Tris-HCl	۱۲۰ میلی مولار	۱۰۰ میلی مولار
NaCl	۱ مولار	۱/۵ مولار
Sucrose	۰/۵ مولار	-
Triton-X100	۲ درصد	-
B-mercaptoethanol	۲ درصد	۱ درصد
PVP	۰/۱ میلی‌لیتر در هر ۱۰ میلی‌لیتر	-
CTAB	-	۲ درصد

پس از تهیه بافرهای استخراج، استخراج DNA طبق مراحل زیر انجام شد:

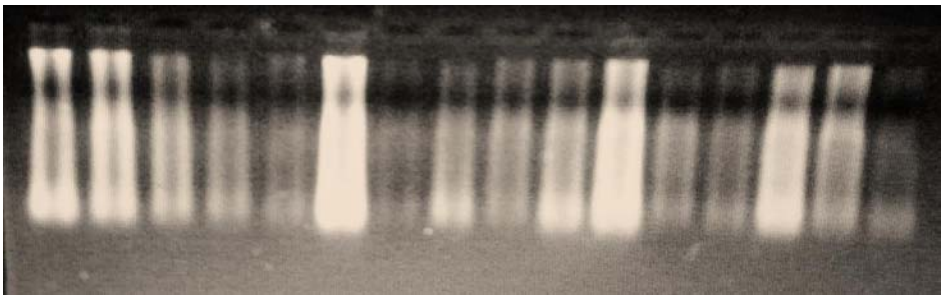
- ۰/۰۳-۰/۰۵ گرم از برگ خشک شده گیاه گندم را می‌سائیم و درون میکروتیوپ ۲ میلی‌لیتر می‌ریزیم.
- ۵۰۰ میکرولیتر از بافر استخراج یک، که قبلا به مدت یک ساعت در دمای ٦٠ درجه سانتیگراد قرار داده شده بود را درون آن ریخته و به مدت ٥-٦ ثانیه ورتکس گردید.
- ۱۰ دقیقه بر روی شیکر قرار داده شد (دور ۳۰۰ مناسب بود).
- ٦٠ میکرولیتر ۲- مرکاپتواتانول را درون میکروتیوپ ریخته و به مدت ٦-٥ ثانیه ورتکس گردید.
- میکروتیوپ‌ها را به صورت افقی به مدت ٤٠ دقیقه درون حمام بن‌ماری ٦٠ درجه سانتی‌گراد قرار داده و هر ۱۰ دقیقه ویال‌ها چرخانده شد.
- ویال‌ها به مدت ١٦ دقیقه و با دور ۱۲۰۰۰ سانتریفیوژ شدند.
- از بافر استخراج دو، به میزان ۱۵۰۰ میکرولیتر درون ویال‌ها ریخته شد.
- ویال‌ها را به مدت ۳۰ دقیقه درون حمام بن ماری ٦٠ درجه سانتی‌گراد به صورت افقی قرار داده و هر ۱۰ دقیقه ویال‌ها به آرامی با دست شیک شدند.
- ویال‌ها به مدت ۱۷ دقیقه در دور ۱۲۰۰۰ سانتریفیوژ شدند.
- فاز رویی را برداشته و دو برابر حجم هر ویال مخلوط کلروفرم: ایزوآمیل الکل (٢٤: ١) به آن اضافه کردیم.
- ویال‌ها به مدت ۱۰ دقیقه بر روی شیکر قرار داده شد (با سرعت ۲۵۰- ۲۰۰ دور در دقیقه).
- به مدت ١٦ دقیقه با دور ۱۲۰۰۰ سانتریفیوژ شدند.
- مراحل ۱۲- ۱۰ را به منظور خالص شدن بهتر DNA تکرار گردید (با این تفاوت که این بار ٤٠٠- ۳۵۰ میکرولیتر از فاز رویی برداشته شد).
- فاز بالایی را با سمپلر برداشته و ۲/۵ برابر آن، ایزوپروپانول سرد به آن افزوده شد.
- ویال‌ها ٦٠ دقیقه الی ٢٤ ساعت درون فریزر ٤٠- درجه سانتی‌گراد قرار داده شد (۳-۲ ساعت زمان بهینه است).
- بعد از ١٦ دقیقه سانتریفیوژ با دور ۱۲۰۰۰، مایع رویی ویال خالی گردید (در این مرحله رسوب دیده می‌شود). در صورت نمایان نشدن رسوب، با سمپلر به آرامی مایع رویی را خالی کرده و در حدود ۲۰۰- ۱۰۰ میکرولیتر از مایع را در انتهای میکروتیوپ باقی گذاشته شد.
- ۵۰۰ میکرولیتر الکل ۷۰٪ در ویال ریخته و با دور ۸۰۰۰، به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ گردید.
- مرحله ۱۷ را به منظور شستشوی بهتر DNA می‌توان تکرار کرد.
- در این مرحله رسوب دیده خواهد شد. مایع رویی را خالی کردیم تا الکل کاملا خشک گردد.
- ٦٠-٧٠ میکرولیتر بافر TE به رسوب افزوده شد.

– ویال‌ها به مدت ۳۰ دقیقه بطور عمودی درون حمام بن ماری با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد.
– ویال‌ها به مدت ٢٤ ساعت درون یخچال ٤ درجه سانتی‌گراد قرار داده و پس از آن به یخچال فریزر ٤٠– درجه سانتیگراد به منظور نگهداری طولانی مدت منتقل گردیدند.

جهت ارزیابی کمی و کیفی DNA بدست آمده از دستگاه اسپکتروفتومتر (مدل شیمادزو، ژاپن) و نیز واکنش زنجیره ای پلیمراز با استفاده از آغازگرهای نشانگر ISSR استفاده شد.

نتایج و بحث

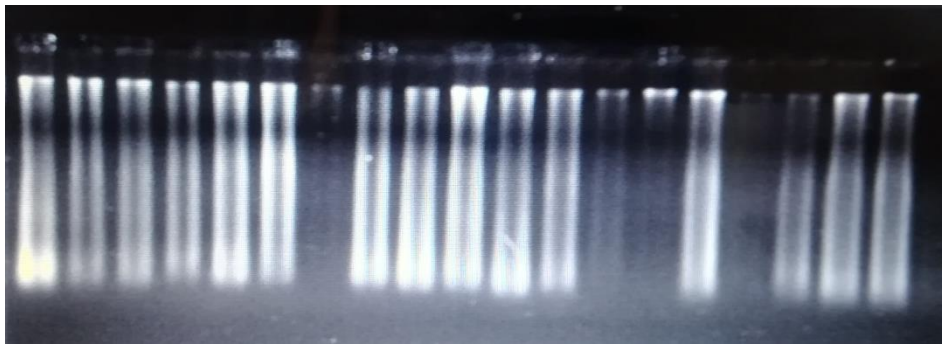
ارزیابی کیفیت DNA: استخراج DNA طبق روش اسفندانی بزچلوئی انجام گردید ولی همانطور که در شکل ۱ مشاهده می‌گردد، تصویر حاصل از الکتروفورز ژل آگارز DNA ارقام گندم دارای اسمیر و آلودگی پروتئینی می‌باشد. همچنین زمان استخراج طولانی و غلظت DNA استخراج شده کم بود.



شکل ۱- الکتروفورز نمونه‌های DNA استخراج شده از ارقام گیاه گندم به روش اسفندانی بزچلویی

Figure 1- Electrophoresis of DNA samples extracted from wheat cultivars using Esfandani Bozcheloei

تغییر در زمان و دور سانتریفیوژ (مرحله ٦ از ١٥ دقیقه به ١٦ دقیقه، مرحله ٩ از ١٥ به ١٧ دقیقه، مرحله ١٢ از ١٥ به ١٦ دقیقه، مرحله ١٦ از ١٥ به ١٦ دقیقه و در نهایت در مرحله ١٧ از ١٥ دقیقه به ١٠ دقیقه و دور آن از ١٢٠٠ به ٨٠٠٠–١٠٠٠٠ افزایش یافت) و همچنین حذف مراحل ٢٣–١٦ روش اسفندانی بزچلوئی انجام گردید و در نهایت نمونه DNA بدست آمد پس اززز این تغییرات برای تعیین کیفیت روی ژل آگارز بارگذاری شد (شکل ۲). با ایجاد این تغییرات آلودگی پروتئینی و میزان اسمیر به میزان زیادی کاهش یافت و به دلیل حذف مراحل ١٦–٢٣ روش اسفندانی بزچلوئی، غلظت DNA استخراجی نیز بیشتر گردید.



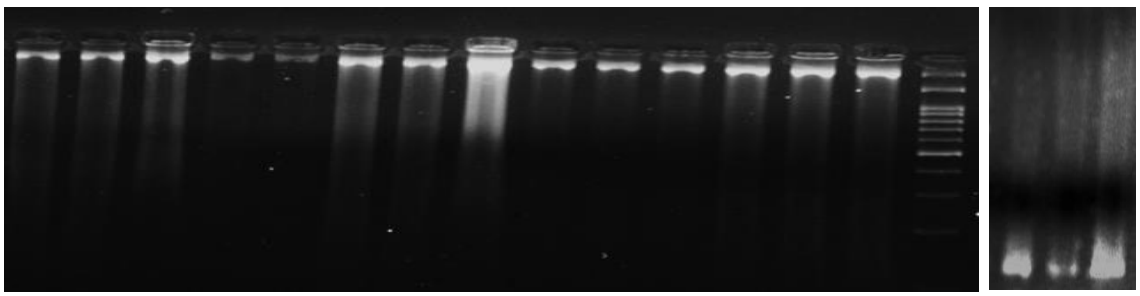
شکل ۲- الکتروفورز نمونه‌های DNA استخراج شده از ارقام گندم پس از اعمال تغییرات

Figure 2- Electrophoresis of DNA samples extracted from wheat cultivars after applying the changes

سپس برای حذف کامل اسمیر و آلودگی پروتئینی سایر تغییرات به شرح زیر انجام گردید:

- تنظیم مناسب‌ترین مقدار زمان ورتکس و شیک (ورتکس مراحل ۲ و ٤، پنج ثانیه، بهترین دور شیک در مرحله ۳ دور ۳۰۰ و در مرحله ۱۱ با سرعت ۲۵۰-۲۰۰ دور در دقیقه بودند).
- علاوه بر تغییرات زمانی، افزایش دور سانتریفیوژها نیز انجام گردید. به این صورت که در مرحله ١٦ افزایش سرعت دور را از ۱۰۰۰۰ به ۱۲۰۰۰ و در مرحله ١٦ از ۱۲۰۰ به ۱۲۰۰۰ اعمال گردید.
- در مرحله ۱۳ بهترین حجم قابل برداشت برای گیاه گندم ٤۰۰-۳۵۰ میکرولیتر در نظر گرفته شد.
- در مرحله ١٤ حجم ایزوپروپانول سرد از ۲ برابر به ۲/۵ برابر افزایش یافت. همچنین در مرحله ۱۵ از فریزر ٤۰- درجه سانتیگراد استفاده گردید و بهترین زمان نگهداری در فریزر ۳-۲ ساعت بود. به دلیل اینکه با کاهش زمان، نمونه DNA استخراج شده حجم کمی خواهد داشت و با افزایش بیشتر زمان، با وجود افزایش حجم DNA، شاهد افزایش آلودگی پروتئینی نیز خواهیم بود.
- مرحله ۱۷ به منظور شستشوی بهتر DNA تکرار گردید. همچنین در این مرحله می‌توان از الکل ۹٦ درصد نیز استفاده کرد.

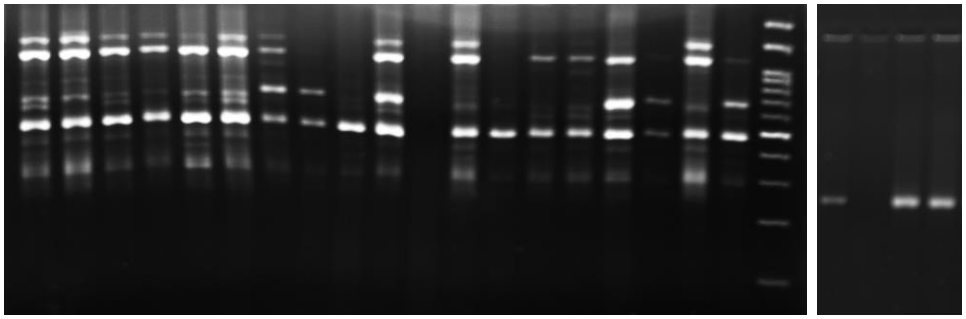
مطالعات ژنتیک مولکولی مانند انگشت نگاری DNA، توالی‌یابی و ... نیاز به DNA با کیفیت بالا دارند (Lutz *et al*., 2011). از نظر فیزیکی و خصوصیات ظاهری نمونه استخراج شده سفید، بدون تغییر رنگ و قابل مشاهده و با حجم زیاد بود. نمونه-های DNA استخراج شده، بر روی ژل آگارز ۱ درصد بارگذاری و نتیجه حاصل با دستگاه ژل‌داک عکس‌برداری شد (شکل ۳). همچنین جهت تعیین کیفیت نمونه‌ها، میزان جذب نوری آنها در طول موج‌های ۲۸۰ و ۲٦۰ نانومتر قرائت گردید. در پژوهش حاضر نسبت جذب نوری فوق بین ۱/۸ تا ۱/۹ بود که نشان دهنده کیفیت بالا و عدم آلودگی DNA استخراج شده بود. کیفیت DNA استخراج شده از اهمیت بالایی برخوردار بوده و DNAی با کیفیت ضعیف اعتبار داده‌های نشانگرها را تحت تأثیر قرار داده و تکرارپذیری آنها را کاهش می‌دهد. شکستگی DNAی الگو مانع تکثیر برخی از قطعه‌های بزرگ شده و بر تکرارپذیری باندها نیز تأثیر می‌گذارد. این شکستگی‌ها با ژل آگارز قابل بررسی بوده و در ژل، به صورت لکه یا اسمیر و یا به صورت قطعه‌هایی با وزن مولکولی کم مشاهده می‌شود (آرمینیان و همکاران، ۱۳۸۹).



شکل۳- ژل حاصل از بارگذاری DNA استخراج شده روی ژل آگارز ۱ درصد، شکل سمت راست مربوط به نمونه‌های قارچ و شکل سمت چپ مربوط به نمونه های برگی گندم می باشد.

Figure 3 - The gel of extracted DNA loading on 1% agarose gel, the right figure for the fungus samples and the left figure is related to the leaf samples of wheat.

واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR): ترکیبات پلی فنل موجود در DNA استخراج شده می‌تواند به عنوان یک مهارکننده قوی در PCR عمل کند (Singh *et al.*, 2002). سازوکار این مهارکنندگی به طور کامل مشخص نشده اما در موارد زیادی مطرح شده که پلی فنل‌ها می‌توانند مستقیما به DNA بچسبند و از انجام PCR جلوگیری کنند (Jobes et al., 1995). دراین پژوهش، PCR با ۱۲ آغازگر نشانگر مولکولیISSR انجام و محصول واکنش بر روی ژل ۲ درصد بارگذاری گردید (شکل ٤). PCR روشی سریع و ساده‌تر از همسانه‌سازی ژن‌ها می‌باشد و این توانایی را دارد که از یک ژن، میلیون‌ها نسخه تولید نماید. غلظت کمتر یا بالاتر DNA از یک حد خاص در PCR اشکال ایجاد می‌نماید. PCR وسیله ای برای تکثیر انتخابی یک ناحیه مورد نظر از یک مولکول DNA است (مهدوی و همکاران، ۱۳۹٤). کشف واکنش زنجیره‌ای پلیمراز فرصت مناسبی را برای بررسی تنوع و تفاوت موجودات مختلف در سطح DNA امکان پذیر کرده است.



شکل ٤- ژل حاصل از بارگذاری محصول PCR با آغازگر F6، شکل سمت راست مربوط به قارچ و شکل سمت چپ مربوط به گیاه گندم می‌باشد.

Figure 4: The gel produced by loading the PCR product of F6 primer, the right figure for the fungus and the left figure for the wheat plant.

غلظت NaCl مورد استفاده در بافر استخراج گیاهان بین ۰/٦-۰/۷ متفاوت می‌باشد. استفاده از کلرید سدیم بالای ۰/۰۵ مولار همراه با CTAB سبب حذف بهتر ترکیبات پلی ساکاریدی هنگام استخراج DNA در نمونه ها می‌گردد (Moreira and Oliveira, 2011; Patrson *et al.*, 1993)، بنابراین یکی از دلایل کیفیت خوب نمونه استخراج شده در این پژوهش را می‌توان غلظت بالای NaCl دانست. حائری زاده و همکاران (۱۳۹۵) بیان کردند که اشباع کردن فنل دشوار بوده و برای برخی افراد حساسیت‌زا می‌باشد و بنابراین امروزه تولید کنندگان تجاری سعی در حذف این ماده دارند. همچنین Schneiderbauer et al., (1991) بیان کردند که ترکیبات فنولی می‌توانند به طور برگشت ناپذیر به اسیدهای نوکلئیک متصل شده و همزمان با آن رسوب نمایند. به نقل از اسفندانی بزچلویی (۱۳۹۵)، روش گزارش شده آنها روش تغییر یافته ای از روش استخراج Saghai-Maroof *et al.*, (1984) می‌باشد که در آن فنل، نیتروژن مایع و همچنین پروتئیناز k و RNAse استفاده نشده و می-تواند از نظر مالی مقرون به صرفه باشد، نیز به گفته این پژوهشگر، با افزودن یون‌های Na^+، NH4+ و یا CTAB می‌توان پلی ساکاریدها را رسوب داد. بنابراین، ما در این پژوهش از $EDTA\text{-}Na_2$ استفاده کردیم. همچنین با تغییرات زمانی و دمائی و مقدار موادی که در دستورالعمل اسفندانی بزچلویی (۱۳۹۵) ایجاد کردیم، از نظر زمانی هم به روش بهینه ای دست یافتیم.

نتیجه‌گیری کلی

روش ارائه شده در پژوهش حاضر بر برخی از مشکلات استخراج DNA همچون استفاده از ازت مایع، فنل، SDS و زمان استخراج طولانی فائق آمده و به دلیل اینکه این دستورالعمل در ابتدا برای گیاهانی که دارای متابولیت ثانویه هستند، پیشنهاد شده بود ولی ما آن را برای سایر گیاهان و حتی قارچ هایی که حاوی این ترکیبات می‌باشند، پیشنهاد می‌کنیم. از مزایای این روش، سریع (به دلیل کوتاه کردن زمان استخراج)، ایمن (به دلیل حذف مواد سمی مانند فنل، SDS، نیتروژن مایع) و کم هزینه بودن (به دلیل عدم نیاز به فریزر و نگهداری نمونه تازه گیاهی، استفاده از مواد شیمیایی ارزان قیمت و کمتر) آن می‌باشد. همچنین حجم DNA استخراج شده زیاد می‌باشد. نیز این روش به گونه ای است که حتی می‌توان در مرحله ۱۰ دو نمونه از مایع قبلی را برداشت و سایر مراحل را انجام داد که به این وسیله با یک بار استخراج، دو نمونه DNA استخراج شده از هر نمونه با کیفیت و حجم زیاد بدست می‌آید.

منابع

۱) اسفندانی‌بزچلوئی، س. ۱۳۹۵. روشی نوین برای استخراج DNA ژنومی از گیاهانی که دارای متابولیت‌های ثانویه و پلی‌ساکاریدها بدون استفاده از نیتروژن مایع و فنول برای اولین بار در ایران. سومین کنفرانس بین‌المللی یافته‌های نوین علوم و بیوتکنولوژی قم، ایران.

۲) آرمینیان، ع. ۱۳۸۹. یک روش سریع و دقیق برای استخراج DNA ژنومی غلات. یازدهمین کنگره زراعت و اصلاح نباتات. دانشگاه شهید بهشتی، تهران.

۳) حائری زاده، ف.، ا. معصومی اصل، پ. آزادی، ح. رجبی معماری و ن. ابوفاضلی. ۱۳۹۵. بهینه سازی روش استخراج RNA از بافت پوست شاخه درختان خانواده مخروطیان. فصلنامه علمی-پژوهشی تحقیقات ژنتیک و اصلاح گیاهان مرتعی و جنگلی ایران. ۲٤(۱): ۱۰۲-۱۱۳.

٤) مهدوی م.، ا. موسوی و م. صادقی زاده. ۱۳۹٤. زیست شناسی سلولی و مولکولی و مهندسی ژنتیک. انتشارات خانه زیست شناسی ایران، تهران. ۳۸٤ ص.

۵) نقوی، م. ر. ب. قره‌یاضی و ق. حسینی‌سالکده. ۱۳۹۲. نشانگرهای مولکولی. انتشارات دانشگاه تهران. چاپ چهارم. ۳٤۰ ص.

6) Choudhary, K., Mathur, N., Choudhary, O.P., Pillai, U. 2008. Protocol for Isolation of Genomic DNA from dry and fresh leaves of Vigna species suitable for RAPD and restriction digestion. Advances in Biological Research. 2 (5-6): 83-89.

7) Dentinger Bryn, T.M., Margatitescu, S., Moncalvo, J.M. 2010. Rapid and reliable high-throughput methods of DNA extraction for use in barcoding and molecular systematics of mushrooms. Molecular Ecology Resources. 10(1111):628-633.

8) Jobes, D.V., Hurley, D.L., Thien, L.B. 1995. Plant DNA isolation: a method to efficiently remove polyphenolics, polysaccharides and RNA. Taxon. 44: 379–386.

9) Khanuja, S.P.S., Shasany, A.K., Darokar, M.P., Kumar, S. 1999. Rapid isolation of DNA from dry and fresh samples of plants producing large amounts of secondary metabolites and essential oils. Plant Molecular Biology Reporters. 17: 1–7.

10) Lodi, M.A., Ye, G.N., Weeden, N.F., Reisch, B.I. 1994. A simple and efficient method DNA extraction from grapevine cultivars and vitis species. Plant Molecular Biology Reporters. 12: 6-13.

11) Lutz K, Wang W, Zdepski A, Michael TP. 2011. Isolation and analysis of high quality nuclear DNA with reduced organellar DNA for plant genome sequencing and resequencing. BMC Biotechnology. 11:54.

12) Moreira, P.A., Oliveira, D.A. 2011. Leaf age affects the quality of DNA extracted from *Dimorphandra mollis* (Fabaceae), a tropical tree species from the Cerra do region of Brazil. Genetic Molecular Research. 10 (1): 353-358.

13) Newton, K., Graham, W. 2002. Polymerase Chain Reaction (PCR): Introduction Techniques. Translated by: Shahriari, Imamjomeh. Imam Reza University Publication. P. 223.

14) Nio, Ch., Kebede, H., Auld, D.L., Woodward, J.E., Burow, G., Wright, R.J. 2008. A safe inexpensive method to isolate high quality plant and fungal DNA in an open laboratory environment. African Journal of Biotechnology. 7: 2818-2822.

15) Paterson, A.H., Brubaker, C.L., Wendel, J.F. 1993. A rapid method for extraction of cotton (*Gossypium* spp.) genomic DNA suitable for RFLP or PCR analysis. Plant Molecular Biology Reporter. 11 (2): 122–127.

16) Saghai-Maroof, M.A., Soliman, K.M., Jorgensen, R.A., Allard, R.W. 1984. Ribosomal DNAsepacer-length polymorphism in barley: mendelian inheritance, chromosomal location, and population dynamics. PNAS. 81: 8014–8019.

17) Schneiderbauer, A., Sanderman, H.Jr., Ernst, D. 1991. Isolation of functional RNA from plant tissues rich in phenolic compounds. Annual Biochemistry. 197:91-95.

18) Singh, R.P., Nie, X., Singh, M., Coffin, R., Duplessis, P. 2002. Sodium sulphate inhibition of potato and cherry polyphenolics in nucleic acid extraction for virus detection by RT-PCR. Journal of Virological Methods. 99: 123–131.

19) Tan, S.C., Yiap, B.C. 2009. DNA, RNA, and protein extraction: the past and the present. Journal of Biomedicine and Biotechnology. 1-10.

20) Wang, H., Qi, M., Cutler, A.J. 1993. A simple method of preparing plant samples for PCR. Nucleic Acids Research. 21: 5651-5655.