SID

فیلم های آموزشی

سامانه ویراستاری STES

بلاگ مرکز اطلاعات علمی

کارگاه های آموزشی

سرویس ترجمه تخصصی

سرویس های ویژه

کارگاه های آموزشی مرکز اطلاعات علمی جهاد دانشگاهی

کارگاه آنلاین آشنایی با پایگاه های اطلاعات علمی بین المللی و ترفند های جستجو

کارگاه آنلاین
پرپوزال نویسی و پایان نامه نویسی

کارگاه آنلاین
بررسی مقابله ای متون (مقدماتی)

Archive of SID

اولین کنگره بین المللی
و سیزدهمین کنگره ملی علوم زراعت و اصلاح نباتات
و سومین همایش علوم وتکنولوژی بذر
1st International and
13th Iranian Crop Science Congress
3rd Iranian Seed science and Technology Conference

روش STE به عنوان روشی مناسب در تهیه DNA ژنومی از گیاه آزولا (*Azolla Filiculoides*) جهت مطالعات ژنتیکی

محبوبه پیشداد[1]، قربانعلی نعمت‌زاده[2]، نورالدین حسین‌پورآزاد*[3]، خدیجه فتحعلی‌پور[1]

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد بیوتکنولوژی، پژوهشکده ژنتیک و زیست فناوری کشاورزی طبرستان، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری

۲- استاد ژنتیک، پژوهشکده ژنتیک و زیست فناوری کشاورزی طبرستان، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری

۳- نویسنده مسئول: دانشجوی دکتری مهندسی ژنتیک، پژوهشکده ژنتیک و زیست فناوری کشاورزی طبرستان، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری

آدرس مکاتبه: ساری- کیلومتر۹ جاده دریا- دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری- پژوهشکده ژنتیک و زیست فناوری کشاورزی طبرستان. تلفکس:۰۱۵۱۳۸۲۲۷۴۴ ایمیل:pishdad.mahbobe@yahoo.com

چکیده

در این تحقیق جهت دستیابی به مواد ژنتیکی با کیفیت مطلوب برای مطالعات ژنتیکی در گیاه آزولا، از سه روش استخراج DNA ژنومی (دلاپورتا و همکاران، CTAB و STE) در قالب طرح بلوکهای کامل تصادفی و در سه تکرار مختلف استفاده گردید. کیفیت سنجی ماده ژنومی استخراج گردیده با استفاده از روش الکتروفورز با ژل آگارز، اسپکتروفتومتری و روش واکنش زنجیره‌ای پلیمرار (PCR) انجام پذیرفت. نتایج حاصله از آزمون مقایسات میانگین بر پایه روش دانکن در سطح احتمال ۰/۰۵ با نرم‌افزار آماری R معنی دار بودن روش استخراج STE را تایید نمود. DNA استخراج شده از روشهای مورد مقایسه با استفاده از پرایمرهای نیمه تصادفی ISSR و همچنین نتایج توالی‌یابی حاصل از تکثیر ناحیه ژنی ITS تایید کننده کیفیت و غلظت مناسب DNA استخراج شده با روش مورد مطالعه STE نسبت به سایر روشها بود. غلظت DNA ژنومی حاصله از مقدار و حجم مشخص از بافت مورد استفاده به ترتیب برای روش دلاپورتا و همکاران، STE و CTAB دارای بالاترین میزان بود. بدین ترتیب با توجه به نتایج حاصله در این پروژه روش STE بهینه شده به عنوان روش مناسب جهت دستیابی به DNA ژنومی با کیفیت و کمیت مطلوب برای انجام مطالعات ژنتیکی در گیاه آزولا معرفی می‌گردد.

کلمات کلیدی: آزولا، استخراج DNA، روش STE

مقدمه

آزولا نوعی سرخس آبزی از خانواده Salviniaceae می‌باشد. ساقه‌های آن به صورت ریزوم‌های منشعب شناور است، برگ‌های آن کوچک و به صورت متناوب بر روی هم قرار دارند. ریشه آن به صورت معلق در آب به طول ۲ تا ۵ سانتیمتر می‌باشد. خاستگاه اولیه این گیاه آمریکای شمالی است. این گیاه برای اولین بار در سال ۱۸۷۳ میلادی شناسایی شد و تاکنون هفت گونه از این گیاه در جهان به ثبت رسیده است. مشخص گردیده آزولا در هم‌زیستی با جلبک سبز، آبی آنابنا[1] قابلیت جذب نیتروژن هوا را به دست می‌آورد (۵). در مباحث مولکولی استخراج محتوای ژنتیکی با محدودیت‌هایی همراه است که تغییر در ترکیب و pH بافر استخراج توانسته است در بهبود کمیت و کیفیت DNA و RNA به دست آمده موثر باشد. کیفیت DNA یک نمونه به سن، نحوه ذخیره‌سازی و روش استخراج آن بستگی دارد (۲). متابولیتهای ثانویه و پلی‌ساکاریدها در پروسه جداسازی و تکثیر ژن و هم چنین تجزیه و تحلیل ژنوم به وسیله آنزیمهای محدود کننده تداخل ایجاد می‌کنند. حذف این آلاینده‌ها نیاز به پروتکلی پیچیده و وقت‌گیر دارد (۲). امکان استفاده از یک

[1] Anabaena

August 24-26,2014
Seed and Plant Improvment Institute Karaj, Iran
۲۴-۲۶ شهریورماه ۱۳۹۳
موسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر، کرج، ایران

www.SID.ir

Archive of SID

پروتکل استخراج DNA برای گونه‌های مختلف گیاهی وجود ندارد. به عنوان مثال گونه‌های مشابه گیاهی نیز به پروتکل‌های مختلف استخراج DNA نیاز دارند. لذا برای هر یک از گونه‌های گیاهی یک پروتکل کارآمد استخراج DNA جهت بهینه‌سازی شرایط PCR مورد نیاز است (۹). در این تحقیق سه روش تغییر یافته دلاپورتا و همکاران (Dellaporta et al., 1983)، CTAB و STE به منظور انتخاب بهترین روش استخراج DNA از گیاه آزولا مورد بررسی و ارزیابی قرار گرفتند.

مواد و روشها

سه روش استخراج DNA ژنومی روی نمونه‌های برگی سرخس آبی آزولا در قالب طرح کاملا تصادفی در سه تکرار مورد بررسی قرار گرفتند. نمونه‌های گیاهی از مزرعه پژوهشی پژوهشکده ژنتیک دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی ساری تهیه گردید. سه روش استخراج DNA که جهت این گیاه بهینه شدند، روش دلاپورتا و همکاران (Dellaporta et al., 1983)، CTAB[2] (Doyle & Doyle, 1987) و STE[3] می‌باشد.

الف: روش دلاپورتا و همکاران

در روش دلاپورتا بافر استخراج بصورت Tris-Hcl 150mM, EDTA50 mM, NaCl 250mM, SDS 10% (PH8) تهیه و سپس اتوکلاو شد. مقدار 500 µl بافر استخراج به علاوه بتامرکاپتواتانول ۱٪ و مقداری pvp[4] ۰/۴ ٪ به تیوبهای حاوی بافت برگی که توسط ازت مایع در هاون استریل خرد شده بود اضافه شد. بعد از این مرحله نمونه‌ها به مدت ۴۵ دقیقه در حمام آب گرم با دمای ۶۵°C قرار گرفتند. سپس ۲۰۰µl استات‌پتاسیم (KAC) ۵M به هر نمونه اضافه و به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۲۰- °C قرار گرفتند. از بین بردن پروتئینهای سلولی و هیستونهای متصل به DNA و ته‌نشین کردن آنها با استات‌پتاسیم صورت می گیرد. پس از این مرحله ۵۰۰µl کلروفرم‌ایزوآمیل‌الکل (ایزوآمیل ۱ : ۲۴ کلروفرم) اضافه و به مدت ۱۰ دقیقه با دور ۱۳۴۰۰rpm سانتریفیوژ شد. در این مرحله سه فاز آبی[5]، فاز میانی[6] و فاز آلی[7] در تیوب‌ها قابل مشاهده است. فاز آبی حاوی مولکولهای محلول در آب به انضمام اسیدهای‌نوکلئیک می‌باشد. پروتئین و لیپیدها در فاز آلی قرار گرفته و مواد زائد گیاهی غیر قابل حل نیز در فاز میانی خواهند بود. بنابراین فاز رویی که حاوی DNA می‌باشد، به تیوب جدید منتقل می‌شود. بعد از اضافه نمودن ایزوپروپانول سرد کلاف DNA قابل مشاهده است. نمونه‌ها به مدت ۲۰ دقیقه در ۲۰- درجه سانتیگراد قرار داده شدند سپس با دور ۹۰۰۰ rpm و به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ شدند. مرحله بعد شستشوی DNA با الکل ۷۰٪ و سانتریفیوژ به مدت ۱۰ دقیقه ۵۰۰۰rpm می‌باشد. سپس پلت خشک گردیده و پس از اضافه نمودن ۵۰ µl بافر TE[8] در دمای ۴°C نگهداری شدند.

ب: روش CTAB

در روش CTAB بافر استخراج شامل Tris – Hcl 100mM ، EDTA 50mM، NaCl 2.5 M و CTAB ۲٪ با (PH 8) استفاده گردید. پس از خرد شدن نمونه در ازت مایع و انتقال به تیوبها، ۹۰۰µl بافر استخراج و pvp ۰/۴ ٪ به مقدار اندک به هر تیوب اضافه و به مدت ۶۰ دقیقه در حمام آبگرم با دمای ۶۵°C قرار گرفتند و هر ۱۵ دقیقه محتویات به هم زده می‌شوند. سپس نمونه‌ها به مدت ۱۵ دقیقه با دور ۱۳۴۰۰ rpm سانتریفیوژ شد. به هر تیوب ۶۰۰µl ایزوپروپانول سرد اضافه و ۳۰ دقیقه در دمای ۲۰- قرار گرفتند. سپس به مدت ۱۲ دقیقه با ۹۰۰۰ rpm سانتریفیوژ نموده و مایع درون تیوب خارج شده ۱۵۰µl بافر شستشو

---

[2] Hexa decyltrimethyl ammoniumbromid
[3] (Sucrose, Tris, EDTA)
[4] Polyvinylpyrrolidone
[5] Aqueous phase
[6] Inter phase
[7] Organic phase
[8]

August 24-26,2014
Seed and Plant Improvment Institute Karaj, Iran
۴-۶ شهریورماه ۱۳۹۳
موسسه تحقیقات اصلاح وتهیه نهال و بذر، کرج، ایران
www.SID.ir

Archive of SID

(اتانول 75% + استات پتاسیم یک مولار) به هر تیوب اضافه و با دور ۹۰۰۰ rpm به مدت ۳ دقیقه سانتریفیوژ گردید. در انتها پلت در ۶۰ میکرولیتر بافر TE حل شده و در دمای ^{o}C ۴ نگهداری شد.

ج: روش STE

بافر STE شامل (۱ M) Sucrose، (۸ =pH ,100 mM) Tris-HCL، (EDTA 20 mM, pH=8) می‌باشد. ۵۰۰ میلی‌گرم باف برگی را به قطعات کوچکی تبدیل کرده و در داخل هاون چینی قرار می‌گیرند. ۵ میلی‌لیتر بافر STE به هاون اضافه نموده بلافاصله ۳۰۰ میکرو لیتر (۲۰٪) SDS به آن اضافه می‌گردد، محتویات هاون با کوبش، بخوبی هموژنیزه می‌گردد، مراحل بعدی شامل انتقال ۵۰۰ میکرولیتر از محتویات هموژنیزه شده به تیوب‌های ۱/۵ میلی‌لیتری، اضافه نمودن ۲۰۰ میکرولیتر کلریدلیتیم و ۰/۲درصد بتامرکاپتواتانل به هریک از تیوب‌ها، (استفاده از کلریدلیتیم بیش از مقدار توصیه شده باعث عدم تکثیر DNA در فرآیند PCR می گردد)، اضافه کردن ۱/۵٪ pvp به هر یک از تیوب‌ها و قرار دادن تیوب‌ها در حمام آب گرم ۶۰ درجه به مدت ۴۵ دقیقه می‌باشد. اضافه کردن کلروفرم – ایزوآمیل‌الکل به مقدار هم حجم محتویات به تیوب، سانتریفیوژ نمودن نمونه‌ها در ۱۳۴۰۰ rpm در دمای آزمایشگاه به مدت ۱۵ دقیقه، برداشت فاز رویی و انتقال به تیوب‌های جدید، اضافه نمودن دو سوم حجم محلول ایزوپروپانل ۲۰- درجه سانتی‌گراد به هر یک از تیوب‌ها از مراحل بعدی استخراج می‌باشد. که پس از اجرای این مرحله کلافهای DNA بخوبی در وسط محلول قابل مشاهده خواهند بود. سپس می توان کلاف DNA را با استفاده از پیپت پاستور برداشته و پس از شستشوی DNA با الکل ۷۰ درصد پیپت‌ها بصورت عمودی قرار گرفته تا DNA خشک گردد، DNA بدست آمده در ۱۰۰ میکرولیتر بافر TE حل شده و در دمای مناسب نگهداری می‌شود (4).

د: تعیین کیفیت و کمیت DNA استخراج شده

جهت تعیین کیفیت و کمیت DNA تهیه شده با روشهای مورد مطالعه از الکتروفورز DNA بر روی ژل آگارز ۰,۷٪ (شکل۱)، اسپکتروفتومتری (جدول۱) و روش PCR با پرایمر نیمه تصادفی ISSR (شکل ۳) و تکثیر ناحیه ژنی ITS (شکل ۴) استفاده گردید.

نتایج و بحث

در روشهای معمول استخراج DNA از بافتهای مختلف از مواد مختلفی استفاده می‌گردد که برخی از این مواد علاوه بر داشتن هزینه بالا، به دلیل مضرات گوناگون که برای سلامتی دارند بکارگیری آنها بایستی با احتیاط کامل انجام پذیرد.

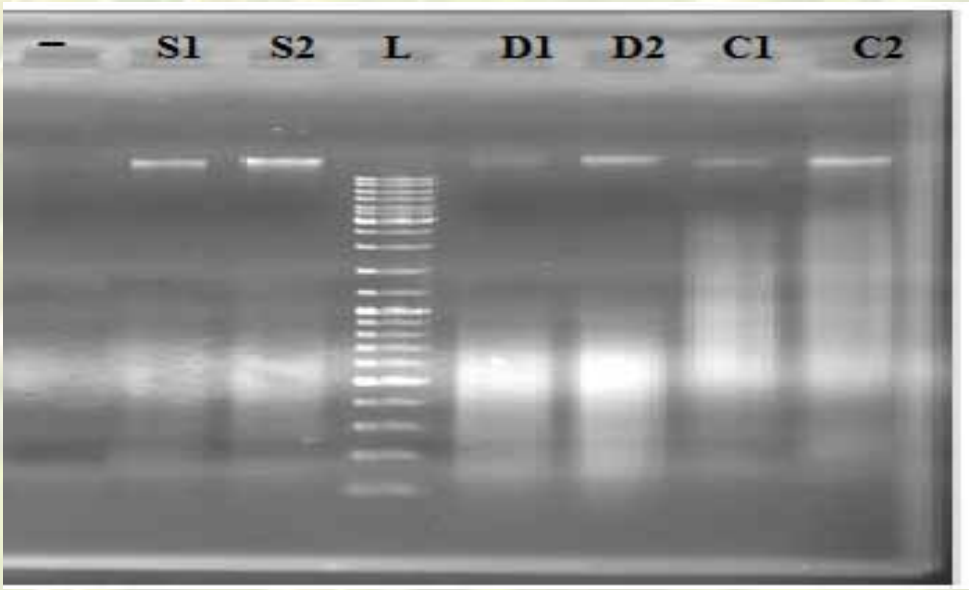
PVP با تشکیل پیوند هیدروژنی با ترکیبات پلی‌فنلی باند شده و منجر به حذف ناخالصی‌های ناشی از متابولیت‌های ثانویه می‌گردد. بتامرکاپتواتانول هم به عنوان یک آنتی‌اکسیدان (احیاءکننده) است که محافظت از گروههای تیول آنزیمها را در مقابل اکسیداسیون بر عهده دارد همچنین مانع چسبیدن پلی‌فنولها به مولکول DNA می‌شود و با تغییر PH بافر استخراج از اکسید شدن پلی‌فنولها جلوگیری می‌کند (3). اما به دلیل مضرات احتمالی که این ماده ممکن است برای سلامتی انسان داشته باشد می‌توان با تغییرات مختلف در سطوح مورد استفاده از ماده PVP، از بکارگیری این ماده در محتویات محلول استخراجی اجتناب نمود. در تحقیقی که به منظور بررسی اثر بتامرکاپتواتانول انجام پذیرفت ثابت شد اضافه کردن این ماده به بافر استخراج DNA هیچ افزایش قابل توجهی در عملکرد و یا پیشگیری از آلودگی DNA ندارد لذا می‌توان آن را حذف کرده و از خطرات جدی که برای سلامتی دارد پیشگیری نمود (8).

روش STE به عنوان یک روش ساده، سریع و ارزان برای استخراج DNA ژنومی در گل گاوزبان ایرانی بهینه گردید که می‌توان این روش را در طیف وسیعی از گیاهان دارویی نیز به کار گرفت. در این روش طی آزمایشات مختلف و بدون نیاز به ازت مایع جهت شکستن دیواره سلولی بافتها از بافر استخراج STE حاوی PVP استفاده گردید که ضمن داشتن مقاومت بالا در برابر افزایش دما، باعث حذف متابولیتهای ثانویه به خصوص پلی‌فنل‌ها از محتویات سلولی بافت گیاهان می‌گردد. در استفاده از این بافر به دلیل قدرت

www.SID.ir

Archive of SID

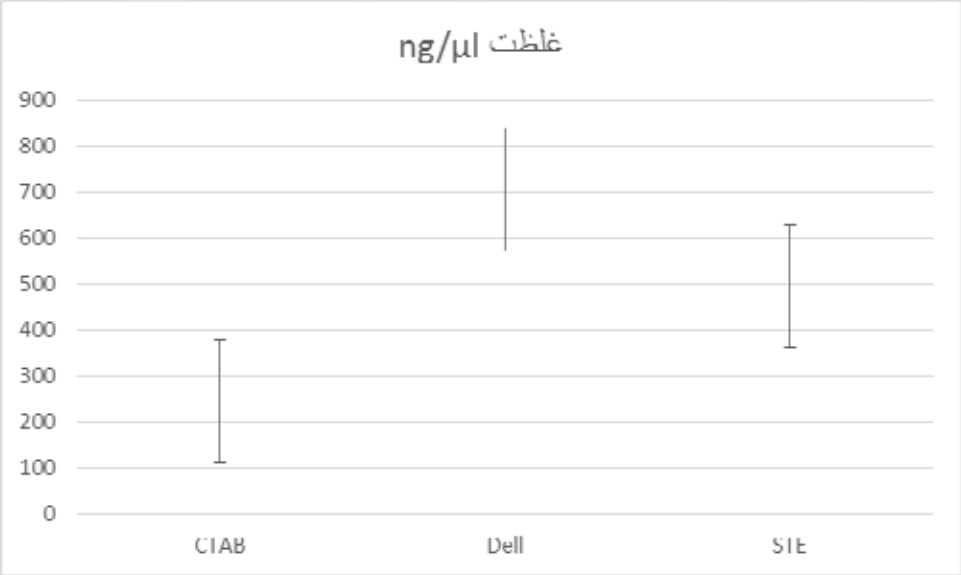
بالای حذف محتویات سلولی بدون صدمه رساندن به مواد ژنتیکی، شستشوی عصاره سلولی با محلول ترکیبی کلروفرم- ایزوآمیل‌الکل به راحتی و در طی زمان کوتاه یک مرحله قابل انجام می‌باشد با توجه به هزینه پایین این روش و صرفه‌جویی در زمان، این روش را به روش سریع و ارزان نسبت به دیگر روش‌های معمول تبدیل می‌نماید (4). با توجه به نتایج حاصله اسمیر ناشی از وجود RNA و یا شکستگی‌های مربوط به مواد ژنتیکی در ارزیابی با روش الکتروفورز در روش STE به دلیل بکارگیری محلول نمکی کلریدلیتیم (LiCl) نسبت به دیگر روشها مقدار کمتری را نشان می‌داد. کلریدلیتیم اولین بار توسط Pirtlla et al (2001) به جای RNase استفاده گردید. عنصر لیتیم باند بسیار اختصاصی با RNAهای دارای بیش از ۲۰۰ جفت باز ترکیب RNA-Li داده و به دلیل غیر محلول بودن، این ترکیب به راحتی رسوب یافته و از آلودگی DNA ژنومی استخراجی کاسته می‌شود. علاوه بر این بکارگیری LiCl به حذف DNAهای برش یافته، پروتئین‌های پسماند و پلی‌ساکاریدها کمک مؤثری می‌نماید (1). در استفاده از DNAهای استخراج شده به عنوان الگو جهت تکثیر با پرایمر نیمه تصادفی ISSR الگوی باندی حاصله از DNA استخراج شده با روش STE نسبت به دیگر روشها بیشترین ناحیه تکثیر و بالاترین وضوح باندی را نشان می‌داد که در نتیجه کیفیت بالای مواد ژنتیکی استخراج شده با این روش بود. وجود آلودگی‌های مختلف از جمله پروتئینها و پلی‌ساکاریدها در محتویات ژنوم مورد استفاده به دلیل عدم اتصال کامل DNA پلیمراز و آغازگرهای مورد استفاده در نواحی مورد تکثیر باعث ممانعت از تکثیر مواد ژنتیکی می‌گردد. عدم وجود اسمیر نشان دهنده خلوص بالای DNA استخراجی است. شکستگی DNA در طول استخراج به طور مستقیم و غیر مستقیم می‌تواند در فعالیت آنزیمی و مطالعات مولکولی مختلف مانند PCR، RFLP، RAPD و غیره تداخل ایجاد کند (7).



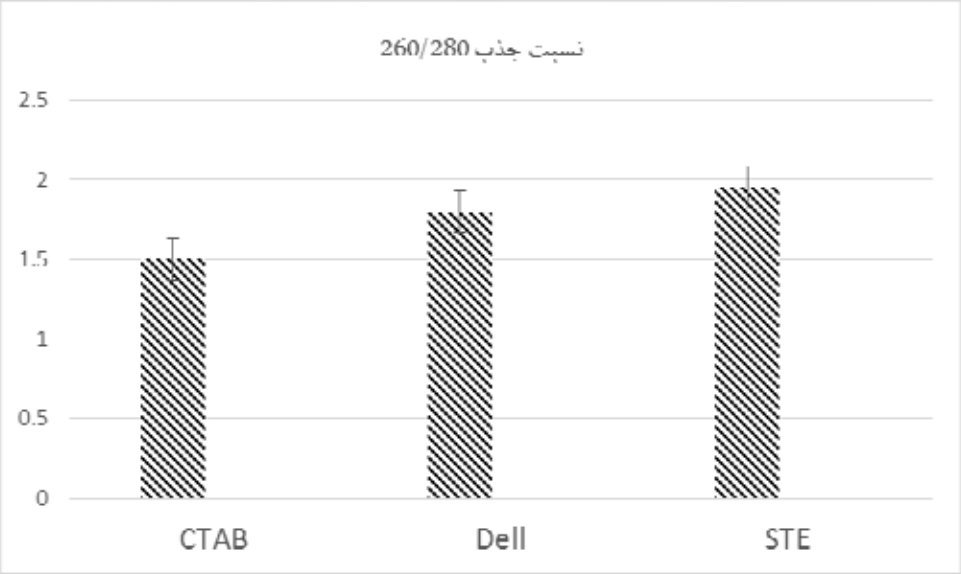
شکل ۱: الکتروفورز DNA استخراج شده با ژل آگارز ۰٫۷٪ به ترتیب (C: CTAB، D: Dellaporta، S: STE و L: 1 kb Plus DNA Ladder)

www.SID.ir

Archive of SID



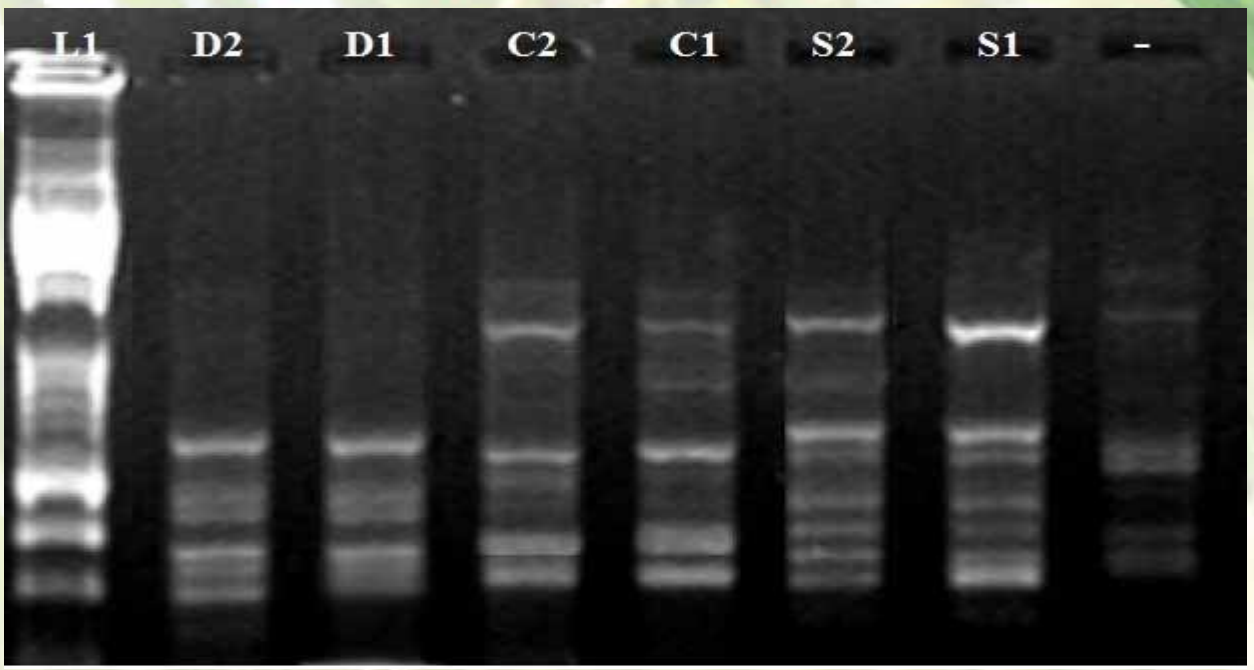
شکل ۳: تجزیه آماری نتایج بدست آمده با اسپکتروفتومتر جهت کمیت‌سنجی



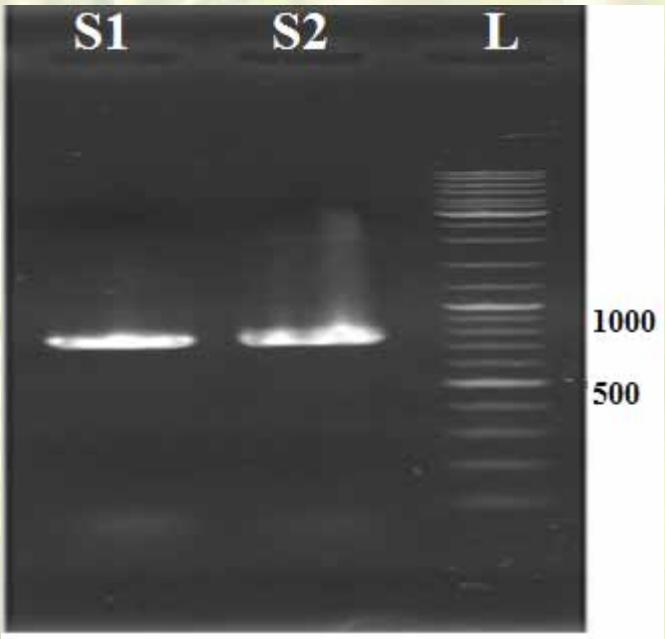
سنجی‌شکل۴: تجزیه آماری نتایج بدست آمده با اسپکتروفتومتر جهت کیفیت

www.SID.ir

Archive of SID



شکل۲: تکثیر ناحیه ISSR با توالی پرایمری نیمه تصادفی (GAGAGAGAGAGAGAGAA) از DNA ژنومی استخراج شده



شکل۳: تکثیر ناحیه ژنی ITS به طول ۷۵۰bp با توالی پرایمری (F: AGA GTT TGA CTM TGG CTC AG و GACTAC TGG GGT R: ATC TAA TCC CWT T) با استفاده از DNA ژنومی استخراج شده با روش STE

تشکر و قدردانی

کلیه هزینه‌های مادی و معنوی این پروژه از طرف پژوهشکده ژنتیک و زیست فناوری کشاورزی طبرستان تامین گردید. بدین وسیله از ریاست محترم و کارکنان پژوهشکده نهایت سپاسگزاری را داریم.

www.SID.ir

Archive of SID

References

1. **Ahmad,S. M., Ganaie, M. M., Qazi, P. H., Verma, V., Basir, S. F and Qazi. G.N. 2004.** Rapid isolation protocol for angiospermic plants.Bulg. j . Physiol, 30 (1-2), 25-33 .

2. **Amani, J., kazemi, R., Abbasi, A.R., & Salmanian, A.H. (2012).** A simple and rapid leaf genomic DNA extraction method for polymerase chain reaction analysis. *IRANIAN JOURNAL of BIOTECHNOLOGY.* ***1:9***

3. **Brose, T., Joshi, P., & Chaphalkar, S. (2011).** Biochemical Role of Ascorbic acid during the Extraction of Nucleic Acids in Polyphenol Rich Medicinal Plant Tissues. *Plant Molecular Biology & Biotechnology. 2: (2) 1-7*

4. **Hosseinpour Azad, N and Nematzade, G. A. 2013.** Introducing a new method of genomic DNA extraction in dicotyledonous plant. Scholarly Journal Of Agriculture Science. Vol. 2(6), pp. 242-248.

5. **Hussner, A., 2012**. Alien aquatic plant species in European countries. *Weed Research* DOI: 10.1111/j.1365-3180.20.12.00926.x.

6. **Sadeghi, R., Zarkami, R., Sabetraftar, K., & Van Damme, p. (2013).** A review of some ecological factors affecting the growth of *Azolla spp. Caspian Journal of Environmental Sciences.* Vol. 11 No.1 pp**.** 65-76**.**

7. **Sahu, S. K., Thangaraj, M & Kathiresan, K. (2012).** DNA Extraction Protocol for Plants with High Levels of SecondaryMetabolites and Polysaccharides without Using Liquid Nitrogen and Phenol. International Scholarly Research Network. pp. 164-169.

8. **Tung Nguyen, C. T., Son, R., Raha, A. R., Lai, O. M. and Clemente Michael, W. V. L. (2009).** Comparison of DNA extraction efficiencies using various methods for the detection of genetically modified organisms (GMOs). *International Food Research Journal 16: 21-30*

9. **Xin, Z., & Chen, J. (2012).** A high throughput DNA extraction method withhigh yield and quality. *Plant Methods.* 8:26.

STE method as a suitable method for genomic DNA preparation from Azolla plant (Azolla Filiculoides) for genetic studies

M. Pishdad [1], GH. NematZadeh [2], N. Husseinpourazad* [3], Kh. fathalipour [1]

1 - MSc Student of Biotechnology, Genetics& agricultural bitechnology institute of tabarestan, Sari University of Agriculture, Sari, Iran

2 - Professor of Genetics, genetics& agricultural bitechnology institute of tabarestan, Sari University of Agriculture, Sari, Iran

3 - Correspondence: PhD student of Genetics Engineering, Genetics& agricultural bitechnology institute of tabarestan, Sari University of Agriculture, Sari, Iran

Fax: ۰۱۵۱۳۸۲۲۷۴۴ E-mail: pishdad.mahbobe@yahoo.com

Abstract

In order to obtain the genomic materials from azolla with high quality and appropriate to genomics investigations, three DNA extraction methods (CTAB, STE and Dellaporta et al.,) in RCBD design with three replications were conducted. the assessment of genomic DNA were performed by PCR, spectrophotometery and agarose gel electrophoresis. analysis of mean comparison with Duncan test at 0.05 value by R software, indicated significantly different of STE method. DNA amplification with ISSR semi random primers and sequencing of ITS gene region, confirmed the quality and quantity of genomic DNA were extracted via STE in comparison to the other methods. the genomic DNA concentrations ranked in high to low level of Dellaporta et, al., STE and CTAB respectively. finaly with regard to results, the optimized STE can be introduced as a suitable method to get a high quantity and quality of genomic DNA for genetic studies in azolla.

Key words: Azolla, DNA extraction, STE method

www.SID.ir

SID

فیلم های آموزشی

سامانه ویراستاری STES

بلاگ مرکز اطلاعات علمی

کارگاه های آموزشی

سرویس ترجمه تخصصی

سرویس های ویژه

کارگاه های آموزشی مرکز اطلاعات علمی جهاد دانشگاهی

کارگاه آنلاین آشنایی با پایگاه های اطلاعات علمی بین المللی و ترفند های جستجو

کارگاه آنلاین
پرپوزال نویسی و پایان نامه نویسی

کارگاه آنلاین
بررسی مقابله ای متون (مقدماتی)