در آزمایشگاه

سوده کمالی فرح‌آبادی
Kamali.s@arc-ordc.ir
کارشناس ارشد علوم باغبانی
مرکز تحقیقات کاربردی و تولید بذر، شرکت توسعه کشت دانه‌های روغنی

پروتکل استخراج DNA به روش CTAB تغییریافته جهت استخراج از بذر گیاه سویا

DNA extraction protocol using modified CTAB for extraction of soybean seeds

ابتدا وسایل و بافرهای موردنیاز جهت استخراج DNA آماده شده و در صورت لزوم در اتوکلاو استریل می‌شوند.

مواد و غلظت‌های مورد نیاز جهت تهیه بافر استخراج CTAB طبق جدول ذیل می‌باشد:

جدول تهیه بافر CTAB

اجزای بافر استخراج	غلظت در بافر استخراج	غلظت محلول پایه	مقدار برداشته‌شده برای تهیه ۱۰۰ میلی‌لیتر بافر
Tris	۱۰۰ میلی مولار	۱ مولار	۱۰ میلی‌لیتر
EDTA	۱۵۰ میلی مولار	۰/۵ مولار	۳۰ میلی‌لیتر
NaCl	۲۱۰۰ میلی مولار	۵ مولار	۴۲ میلی‌لیتر
CTAB	۲ درصد	–	۲ گرم
آب مقطر	–	–	۱۸ میلی‌لیتر

مراحل استخراج DNA براساس روش ذکر شده به شرح ذیل می‌باشد:

۱. قبل از شروع کار بافر استخراج CTAB (CetylTerimetilAmoniomBromide) را در دمای ۶۵ درجه سانتی‌گراد به مدت نیم ساعت در بن‌ماری قرار داده که هدف از انجام این کار حل شدن مجدد نمک‌ها و یکنواخت شدن محلول می‌باشد.

۲. مقدار کمی بذر سویا را در هاون چینی سرد ریخته و به همراه ازت مایع کاملاً پودر کرده و به میزان ۰/۲ گرم به تیوب ۲ منتقل می‌شود.

۳. مقدار ۸۰۰ میکرولیتر بافراستخراج (جدول) و ۲۴ میکرولیتر مرکاپتواتانول (β–Mercaptoethanol) (به‌ازای هر ۱۰۰ میکرولیتر بافر استخراج، ۳ میکرولیتر مرکاپتو) و ۱۰۰ میکرولیتر ۲۰٪ SDS به هرکدام از تیوب‌های حاوی نمونه اضافه شده و سپس وورتکس کرده تا بافر به تمام نمونه رسیده و لیز شدن اولیه انجام گیرد. مرکاپتواتانول یک آنتی‌اکسیدانت (احیاکننده) بوده که محافظت از گروه‌های تیول آنزیم‌ها در مقابل اکسیداسیون را بر عهده دارد و قبل از استفاده به بافر استخراج اضافه می‌شود. به علت سمی و بدبو بودن بهتر است اضافه کردن مرکاپتواتانول به نمونه زیر هود انجام گیرد. ترکیب بافر استخراج با نمونه منجر به تجزیه غشاء سلولی و همچنین مانع فعالیت نوکلئازها می‌شود.

۴. به مدت نیم ساعت نمونه‌ها در داخل بن‌ماری در دمای ۶۵ درجه سانتی‌گراد قرار داده شده و هر پنج دقیقه یک بار آن‌ها را اینورت کرده که هدف از انجام این کار بالا بردن کارایی بافر است.

۵. هم‌حجم نمونه (۸۰۰ میکرولیتر) محلول فنل: ایزوآمیل الکل: کلروفرم به هر نمونه اضافه کرده و چندین بار تیوب‌ها (ویال‌ها) به آرامی سر و ته می‌شوند. نسبت این محلول ۲۴:۱:۲۵ است یعنی در ۱۰۰ سی‌سی آن مقدار ۵۰ سی‌سی فنل، ۴۸ سی‌سی کلروفرم و ۲ سی‌سی ایزوآمیل الکل وجود دارد.

۶. نمونه‌ها به مدت ۱۰ دقیقه در دمای اتاق (۲۴ درجه) در دور ۱۳۰۰۰ سانتریفوژ شده. پس از عمل سانتریفوژ سه لایه در تیوب تشکیل می‌شود: فاز آبی (Aqueous Phase) ، فاز میانی (Inter Phase) و فاز آلی (Organic Phase). فاز آبی حاوی مولکول‌های محلول در آب به انضمام اسیدهای نوکلوئیک می‌باشد. پروتئین‌ها و لیپیدها در فاز آلی قرار گرفته و مواد زائد گیاهی غیرقابل حل نیز در فاز میانی، بین این دو لایه گیر می‌افتند و از هم جدا می‌شوند. از سه لایه تشکیل شده در تیوب‌ها محتویات لایه رویی را با سمپلر به آرامی و با دقت بالا بدون آنکه نوک تیوب با ناخالصی‌ها تماس داشته باشد به میزانی که مقدور باشد(حدود ۶۰۰-۵۰۰ میکرولیتر) برداشته و به تیوب جدیدی منتقل می‌شوند.

۷. برای دستیابی به DNA با خلوص بالا مجدد هم‌حجم نمونه کلروفورم به هر نمونه اضافه کرده و ۱۰ دقیقه در ۱۳۰۰۰ دور سانتریفیوژ گردیده، محتویات لایه رویی به میزان ۵۰۰-۴۰۰ میکرولیتر برداشته می‌شود.

۸. جهت رسوب DNA به اندازه دو سوم (۲/۳) حجم نمونه (۲۵۰ تا ۳۵۰ میکرولیتر) ایزوپروپانول سرد به آن اضافه شده، در این مرحله با چند بار تکان دادن تیوب، می‌توان کلاف DNA را مشاهده نمود و سپس به مدت نیم ساعت نمونه‌ها را در فریزر ۲۰- درجه سانتی‌گراد قرار داده و هر ۱۰ دقیقه یک بار آن‌ها را به آرامی سر و ته کرده، این مرحله را می‌توان تا ۱۶ ساعت در یخچال نگهداری نمود.

۹. برای رسوب و تشکیل پلت (Pellet) از فاز آبی، نمونه‌ها به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد در ۱۳۰۰۰ دور سانتریفوژ گردید، در پایان این مرحله DNA ژنومی در ته تیوب رسوب نمود.

۱۰. محتویات تیوب را خالی کرده و به هر نمونه ۵۰۰ میکرولیتر الکل اتانول ۸۰ درصد اضافه شده و به آرامی آن‌ها را سر و ته می‌کنند، جهت رسوب مجدد پلت تیوب‌ها به مدت پنج دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد و دور ۸۰۰۰ سانتریفیوژ می‌شوند، پس از آن محتویات تیوب را خارج نموده و آن‌ها را به مدت ۳۰ دقیقه بر روی کاغذ صافی یا دستمال کاغذی وارونه قرار داده تا الکل آن خارج شود.

۱۱. برای استفاده از DNA در مراحل بعدی ارزیابی ژنوتیپی و جهت حل شدن پلت DNA ، مقدار ۱۰۰-۵۰ میکرولیتر بافر TE (۱ مولار Tris، ۰/۵ مولار EDTA) و یا آب تزریقی به هر تیوب اضافه شده و به مدت ۲۴ الی ۴۸ ساعت در دمای اتاق نگهداری کرده، سپس به داخل فریزر با دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد منتقل خواهند شد.

منبع: سقایی معروف و همکاران، ۱۹۸٤. (با کمی تغییرات)