مهندس مصطفی حق پناه
کارشناس مجتمع تحقیقات کاربردی و تولیدبذر
شرکت توسعه کشت دانه های روغنی

پروتکل استخراج DNA کلزا

روش‌های مختلفی برای استخراج DNA ژنومی از گیاهان وجود دارد و بسته به گیاه و میزان کمیت و کیفیت، DNA مورد نیاز متفاوت است. به طور معمول در گیاه کلزا از دو روش دلاپورتا و همکاران (۱) و روش CTAB (۲) استفاده می‌شود. در این مطلب سعی می‌شود روش بهینه شده CTAB در گیاه کلزا مورد بررسی قرار گیرد.

۱) حدود ۱-۳ گرم از نمونه برگی گیاه کلزا در یک هاون چینی به همراه نیتروژن مایع به خوبی پودر و ۰/۱ گرم از آن به ویال ۲ میلی‌لیتری منتقل شود. بافت گیاهی انتخاب شده باید جوان و شاداب باشد و بعد از نمونه برداری باید بلافاصله فریز شود. هرچقدر نمونه گرفته شده بیشتر در دمای محیط بماند احتمال استخراج DNA با کیفیت و کمیت مطلوب کمتر می‌شود. هنگام پودر کردن بافت باید توجه داشت که بافت پودر شده تیره رنگ نشود و بعد از پودر شدن بهتر است بلافاصله از بافر استخراج استفاده شود.

۲) ۷۰۰ میکرولیتر از بافر استخراج (CTAB) گرم شده(جدول ۱) در دمای ۶۵ درجه سانتی‌گراد در حمام بن ماری به همراه ۲۱ میکرولیتر مرکاپتواتانول (به ازای هر ۱۰۰ میکرو لیتر بافر ۳ میکرو لیترمرکاپتو) به هر ویال اضافه و به مدت ۱ دقیقه هر ویال را به آرامی تکان داده شود. نسبت حجم بافت استفاده شده به بافر بسیار مهم است و بهتر است بافر حدود ۷ تا ۱۰ برابر بافت پودر شده باشد.

۳) نمونه‌ها داخل حمام بن ماری با دمای ۶۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۵ دقیقه قرار گرفتند و هر ۱۵ دقیقه به آرامی تکان داده شود.

۴) به هر ویال استخراج حدود ۶۰۰ میکرولیتر محلول کلروفرم:ایزوآمیل الکل (۲۴:۱) اضافه و بعد از تکان داده ویال‌ها در دستگاه سانتریفوژ با سرعت ۱۳۴۰۰ دور در دقیقه (rpm) به مدت ۵ دقیقه قرار گیرد. و پس از تشکیل ۳ فاز آبی، میانی، آلی، فاز بالایی که فاز آبی می باشد را با استفاده از سمپلر به آرامی برداشته و به ویال‌های جدید منتقل شود.

۵) به منظور جلوگیری از رنگی شدن پلت DNA، مقدار ۱۰۰ میکرولیتر از محلول CTAB، ۱۰٪ (حل شده در NaCl ۰/۷ مولار) به هر ویال اضافه گردد و به آرامی تکان داده شود.

۶) مرحله ۴ در اینجا تکرار گردد.

۷) جهت رسوب DNA، هم حجم نمونه ایزو پروپانول سرد به هر ویال اضافه و جهت تشکیل کلاف DNA چندین بار به آرامی وارونه و به مدت ۵ دقیقه در فریزر ۸۰- درجه سانتی گراد یا ۲۰ دقیقه در فریزر ۲۰- درجه سانتی گراد یا ۴۰ دقیقه در یخچال ۴ درجه سانتی گراد قرار داده شود.

۸) برای تشکیل پلت DNA از فاز آبی، نمونه با سرعت rpm ۱۳۴۰۰ به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفوژ و سپس محلول رویی دور ریخته شود.

۹) جهت شستن نمک‌ها وسایر آلودگی‌ها، پلت DNA با اتانول ۷۰٪ دوبار شستشو گردد. باید توجه داشت هنگام شستن پلت به آن ضربه وارد نشود زیرا DNA به شدت شکننده است و در حین شستشو حتما پلت باید از دیواره ویال جدا شود.

۱۰) جهت حل کردن پلت DNA مقدار ۱۰۰ میکرولیتر محلول TE به هر ویال اضافه و به مدت ۲۴ ساعت در یخچال ۴ درجه قرار داده شود.

تعیین کمیت و کیفیت DNA

کیفیت و کمیت DNA ژنومی استخراج شده، با استفاده از دو روش اسپکتروفتومتری و الکتروفورز روی ژل آگارز۰/۷ درصد مورد بررسی قرار گیرد. برای کیفیت سنجی به روش اسپکتروفتومتری نمونه های DNA پس از رقیق شدن در طول موج ۲۶۰ نانومتر(طول موج جذب اسیدهای نوکلئیک) اندازه‌گیری شود و با فرمول:

ضریب رقت (۵۰) × عکس رقت × مقدار جذب در ۲۶۰ نانومتر = غلظت DNA(نانو گرم در میکرولیتر)

غلظت آنها تعیین گردد.

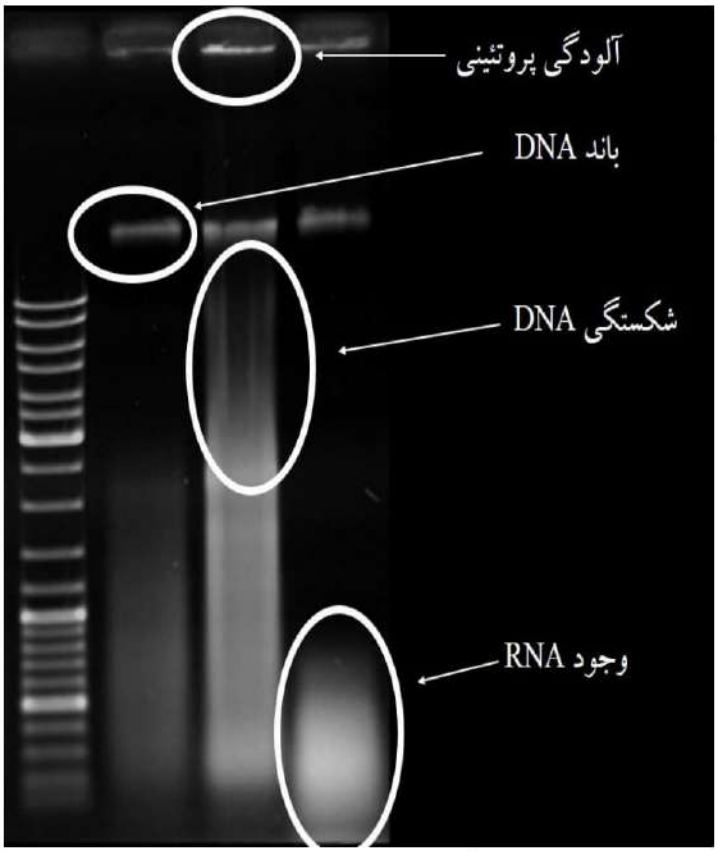
از آنجائیکه هر واحد جذب در طول موج ۲۶۰ نانومتر معادل ۵۰ میکروگرم در میکرولیتر DNA دو رشته‌ای است اگر نسبت مقدار جذب محلول DNA در طول موج ۲۶۰ نانومتر به مقدار جذب در طول موج ۲۸۰ نانو متر در محدوده بیش از ۱/۸ باشد نشان دهنده این است که جذب عمدتا توسط اسیدهای نوکلئیک صورت گرفته و کیفیت DNA حاصله مطلوب بوده و از خلوص لازم بر خوردار است.

با استفاده از الکتروفورز DNA روی ژل آگارز ۰/۷٪ کیفیت باند هر نمونه مشخص شود. برای هر نمونه ۴ میکرولیتر DNA استخراج شده با ۲ میکرولیتر بافر بار گذاری(Loading Dye) مخلوط گردد و در چاهک های ژل آگار در شرایط بافری TBE یا TAE تخلیه گردد. ژل آگارز به مدت یک ساعت با ولتاژ ثابت ۶۵ الکتروفورز گردد. ولتاژ بالاتر می تواند سبب کشیدگی DNA درون ژل شود. پس از رنگ آمیزی باید به نکات زیر توجه شود.

DNA ژنومی استخراج شده باید، تک باندی پر رنگ بوده و هرچه شدت باند بیشتر باشد کمیت DNA استخراجی بیشتر است. وجود موادی قابل مشاهده در چاهک‌ها به دلیل آلودگی پروتئینی است و می‌تواند در مراحل بعدی آزمایشات بازدارنده باشد. اگر این آلودگی بسیار زیاد بود توصیه می‌شود در مرحله ۳ از فنول، کلروفورم، ایزو آمیل الکل با نسبت (۱:۲۴:۲۵)استفاده شود. وجود کشیدگی (smear) در انتهای چاهک دلیل بر وجود RNA می‌باشد که اگر آزمایشات بعدی خیلی حساس نباشد می‌توان وجود آن را نادیده گرفت در هر صورت با استفاده از آنزیم RNase می‌توان آن را حذف کرد. لازم به ذکر است بعد از استفاده از RNase حتما باید مرحله تکرار شود.

جدول ۱. بافر استخراج DNA (۱۰۰ میلی لیتر)

pH	مقدار مورد نیاز	ماده مورد نظر
-	۲ گرم	CTAB
pH 8	۱۰ میلی لیتر	۱ مولار Tris
pH 8	۴۰ میلی لیتر	۰/۵ مولار EDTA
-	۲۸ میلی لیتر	۵ مولار NaCl



شکل ۱. کیفیت سنجی DNA استخراجی

منابع:

1. Dellaporta, S. L., Wood, J., & Hicks, J. B. (1983). A plant DNA minipreparation: version II. Plant molecular biology reporter, 1(4), 19-21.

2. Doyle J.J. and J.L. Doyle. 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. Phytochem. Bull 19:11–15.