روش ترکیبی استخراج DNA از بافت کهنه میگو به هدف تکثیر نشانگر مولکولی

رعنا نیک پور* [1]، سید جواد حسینی [2]، دارا باقری [3]

1-گروه علوم سلولی و مولکولی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه خلیج فارس، بوشهر

2- گروه زیست شناسی دانشکده علوم پایه، گروه بیوتکنولوژی پژوهشکده خلیج فارس، دانشگاه خلیج فارس، بوشهر

3- دانشکده علوم و فنون دریایی، گروه شیلات، دانشگاه خلیج فارس، بوشهر

raana.nikpoor@gmail.com

چکیده

در بیش‌تر آزمایشگاه‌های معتبر دنیا آزمایش‌هایی برای جدا کردن DNA ژنومی باهدف تعیین توالی و شناسایی عملکرد ژن‌های آن انجام می‌شود . استخراج DNA ژنومی خالص، پایدار و باکیفیت و کمیت مناسب، اولین و مهم‌ترین گام در بسیاری از تحقیقات بیولوژیکی و ژنتیکی توالی یابی ژنومی، تعیین ژنوتیپ افراد و شناسایی موتاسیون ها است. پیشرفت در هر رشته علمی به در دسترس بودن تکنیک‌ها و روش‌های جدید و کارآمد در آن رشته بستگی دارد. در سال‌های گذشته روش‌های سلولی و مولکولی ارتقا پیدا کرده است. روش‌های مولکولی از قبیل تعیین توالی نقش مهمی در مطالعه ژنتیکی آبزیان دارند. یکی از این روش‌های سلولی و مولکولی تعیین توالی نشانگرها باهدف مطالعه روابط فیلوژنیک آبزیان است. هدف از این مطالعه بهینه سازی روش‌های استخراج DNA از بافت‌های کهنه میگو هست. باهدف تعیین کارایی این روش و اطمینان از کیفیت DNA استخراج شده بخشی ازتوالی ژن ND2 میگو ببری سبز با استفاده از پرایمرهای اختصاصی تکثیر شد. نتایج نشان داد که DNA حاصل از این روش کیفیت لازم جهت واکنش PCR را داراست. عدم استفاده از نیتروژن مایع و پروتئیناز k از مهم‌ترین مزایای این روش است. به نظر می‌رسد استفاده از تکنیک جوشاندن در این روش، ضمن تخریب سریع‌تر بافت، عوامل ممانعت کننده PCR را احتمالاً حذف می‌کند.

کلمات کلیدی: استخراج DNA، میگو، بافت کهنه، میگو

1-مقدمه:

پیشرفت در هر رشته علمی به در دسترس بودن تکنیک‌ها و روش‌های جدید و کارآمد در آن رشته بستگی دارد. در سال‌های گذشته روش‌های سلولی و مولکولی ارتقا پیدا کرده است، در بیشتر آزمایشگاه‌های معتبر دنیا آزمایش‌هایی برای جدا کردن DNAژنومی جهت پیدا کردن توالی و عملکرد آن انجام می‌شود (Pietro et al., 2011). روش‌های مولکولی مانند تعیین توالی نقش مهمی در مطالعه ژنتیکی آبزیان دارند. نقش ژنتیک و بیوتکنولوژی در پرورش میگوها با ظهور انواع نشانگرهای مولکولی پر رنگ‌تر شده است . لازمه تفکیک گونه‌ها و جمعیت‌ها از همدیگر، تنوع ژنتیکی و تعیین رابطه فیلوژنیک و تکاملی آبزیان (Vaseeharan et al., 2013, Kumar & Chachan, 2010)، کاربردهای مهم‌تری مانند حفاظت و مدیریت ذخایر و برنامه‌های اصلاحی ژنتیکی، استخراج DNA ژنومی و تعیین توالی آن است (Castello-Jarez et al., 2015). از معیارهای یک استخراج خوب کم هزینه، ساده، کوتاه و کارا بودن فرایند استخراج هستند و همچنین DNA کافی و باکیفیت مناسب جهت مطالعات مولکولی را در اختیار قرار دهد (طحان زاده و همکاران، 1394). در این مطالعه استخراج بر اساس روش CTAB ارائه شده توسط Doyle (1987) با تغییر و به شرح زیر انجام گرفت. لذا در این مقاله روش تغییریافته CTAB جهت استخراج DNA از بافت کهنه میگو ارائه شده و از تکثیر بخشی ازتوالی ژن ND2 میگو ببری سبز به‌عنوان یک نشانگر میتوکندریایی جهت ارزیابی کارایی آزمایش استفاده شد.

2- مواد و روش:

نمونه‌ها، بافرها و محلول‌ها: نمونه‌هایی که برای استخراج مورد استفاده قرار گرفتند شامل بافت میگوی تازه و بافت بدن میگوی که بیش از دو سال در الکل 96٪ (ساخت ایران) نگهداری شده بودند. محلول کلروفرم، ایزوپروپانول، اتانل 70%، NACL 5 مولار، 70%SDS و 2%CTAB برای استخراج مورد استفاده قرار گرفتند

استخراج DNA: بافر لیز کننده شامل Tris, EDTA, CTAB SDS, NACL است.

در این مطالعه استخراج بر اساس روش CTAB ارائه شده توسط Doyle(1987) با تغییر و به شرح زیر انجام گرفت. این روش ترکیبی از تکنیک جوشاندن و CTAB است.

برای شروع با استفاده از قیچی و اسکالپل چند گرم از بافت بدنی میگو جدا و ریش‌ریش گردید. بعد به مدت 20 تا 30 دقیقه در دمای 37 درجه در انکوباتور قرار داده شد. بافت خشک شده درون هاون چینی به‌خوبی پودر و حدود 70 میلی گرم از آن در ویال دو اضافه شد.

سپس به این ویال 900-1000 میکرولیتر آب تزریقی استریل شده اضافه شد و با سوزن ته گرد روزنه‌ای بر روی درب ویال ایجاد گردید. این ویال را روی یونولیت گذاشته و درون آبجوش (بن ماری) به مدت 15 دقیقه جوشانده شد. ویال را از آبجوش خارج کرده و حدود 630 میکرولیتر CTAB و 70 میکرولیتر SDS به آن اضافه کرده و به مدت 30 دقیقه در دمای 58 درجه با سرعت 300 rpm در ترمومیکسر قرار داده شد. بعد از آن 300 میکرولیتر کلروفرم به آن اضافه کرده و حدود 10 دقیقه با دور 12000 در سانتریفیوژ قرار داده شد. سپس ماده‌ی رویی و شفاف که 800 تا 700 میکرولیتر است، در ویال ریخته شد. بعد از آن به همین میزان به آن ایزوپروپانول اضافه کرده و به مدت 40 دقیقه در فریزر قرار گرفت. بعد از 40 دقیقه ویال را از فریزر خارج کرده و 20 دقیقه در سانتریفیوژ با دور 12 دقیقه گذاشته، حال ماده رویی محلول داخل ویال را دور ریخته و رسوب سفید رنگ را به مدت 5 دقیقه با اتانول 70٪ با سرعت 8000 rpm سانتریفیوژ کرده و در نهایت بعد از خارج کردن الکل به آن 50 تا 60 میکرو لیتر آب اضافه شد.

سنجش DNA استخراج شده:

به‌منظور سنجش کیفیت و کمیت DNA استخراج شده از دستگاه اسپکتوفتومتر مدل (Biothec photometer) و الکتروفورز روی ژل آگارز 1٪ استفاده گردید. غلظت و درجه خلوص DNA در طول موج 260 نانومتر و نسبت طول موج 260 نانومتر به 280 نانومتر با دستگاه اسپکتوفتومتر تخمین زده شد.

از PCR برای تعیین کیفیت DNA استخراج شده استفاده شد. Mastermix امپیلکون، خریداری شده از شرکت کالا زیست جهت انجام واکنش PCR مورد استفاده قرار گرفت.

آغازگرهای اختصاصی استفاده شده در این پژوهش ND2F (GAT AAG CTA AGY AAG CTC GTG G) و ND2R (CGT CAG ACT GCA ATT CTG AAG AT) هستند که توسط شرکت متابیون (آلمان سنتز شدند.

بهینه‌سازی بر اساس گرادیانت دمایی انجام شد. برای زوج آغازگرهای ND2F/ND2R گرادیانت دمایی 61-59 درجه سانتی‌گراد و پرایمرهای گرادیانت دمایی 58-56 درجه سانتی‌گراد اعمال شد. الگوی حرکتی DNA ژنومی استخراج شده و محصول حاصله از DNA،PCR استخراج شده از این روش در شکل 1 نشان داده شده است

3-نتایج و بحث:

مرحله استخراج DNA پایه ژنتیک مولکولی است به‌طوری که تکرارپذیری، امکان پذیری و قابل اطمینان بودن تحقیقات ژنتیک مولکولی به مرحله استخراج بستگی دارد(Pereira et al., 2011).

از معیارهای یک استخراج خوب کم هزینه، ساده، کوتاه و کارا بودن فرایند استخراج هستند و همچنین DNA کافی و باکیفیت مناسب جهت مطالعات مولکولی را در اختیار قرار دهد. در مجموع در این روش از خشک کردن بافت میگو در درجه حرارت 37 درجه و پودر کردن ان در هاون چینی به‌جای نیتروژن مایع استفاده شد.

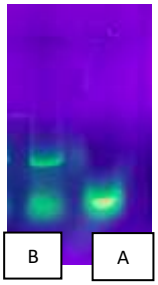
نتیجه تخمین کمیت و کیفیت DNA استخراج شده با این روش که با دستگاه اسپکتوفتومتر به دست آمد که در جدول 1 ارائه شده است. با توجه به داده‌های ارائه شده در جدول 1 علی رغم یکسان بودن شرایط در انجام آزمایش‌ها، تفاوت در OD نمونه‌ها نسبتاً زیاد است که احتمالاً مربوط به خطاهای شخصی و آزمایشگاهی هست.

الگوی حرکتی DNA روی ژل اگاروز نشان داد که در نمونه استخراج شده علاوه بر DNA، RNA وجود دارد چون از RNAase در این روش استفاده نشده است. با توجه به اینکه DNA ژنومیک حاصله از کیفیت بالایی برخوردار نیست اما با این وجود جهت انجام واکنش pcr مناسب است، در صورتی که با آزمایش‌هایی که قبلاً انجام شد واکنش PCR با DNA استخراج شده باکیفیت بهتر جواب نداد.کیفیت DNA الگوی حاصل از این روش با pcr بررسی شد و مشخص شد این DNA جهت pcr مناسب است و می‌توان از آن برای سایر آزمایش‌های مولکولی استفاده کرد (شکل 2).

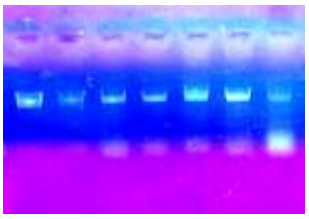
در این روش مدت زمان استخراج به سه ساعت کاهش یافته که یکی از مزایای مهم این روش است. همچنین این روش برای سایر سخت پوستان نیز می‌تواند مورد استفاده قرار گیرد. در این روش از آنزیم استفاده نمی‌شود، امکان تکثیر قطعات تا 1700bp وجود دارد، یک مرحله قبل از تیمار، نمونه جوشانده می‌شود و مدت زمان تیمار به سی دقیقه کاهش یافته است.

جدول 1: کمیت و کیفیت DNA استخراج شده در این روش

غلظت ngr/µ	A260/A280	A260
1167	2.200	1.167
1400	1.802	1.400
1554	1.900	1.554
1600	1.852	1.600
1161	2.087	1.161
1592	1.638	1.592



شکل 1: الگوی حرکتی DNA استخراج شده از این روش (A) و محصول حاصله از PCR آن (B)



شکل 2: الگوی حرکتی محصول‌های حاصل از DNA PCR های استخراج شده در این روش

4- منابع:

طحان زاده، ن.، حسینی، س. ج.، علیزاده، ر.، غلامی دشتی، ف.ف نظریان.، م. (1394). روش ساده و کارا برای جداسازی DNA ژنومیک از چینی‌جاهای کهنه میگو ببری سبزPenaeus semisulcatus مناسب برای PCR معکوس. فصلنامه علمی پژوهشی محیط زیست جانوری، سال هشتم، شماره 4.

Castello-Jarez, H., Campos-Montes, G.R., Caballero Zamora, A. and Montaldo, H. H., 2015. Genetic improvement of Pacific white shrimp [Penaeus (Litopenaeus) vannamei]: perspectives for genomic

selection. Front Genet. Vol. 9, pp: 64-69.

Chauhan, T. and Kumar, R., 2010. Molecular markers and their applications in fisheries and aquaculture. Advances in Bioscience and Biotechnology. Vol. 5010, No. 1, pp: 571-561.

Doyle, J., Doyle, A., Doyle, J.L., 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. Phytochrom Bulletin. Vol. 16, pp: 11-12.

Pietro, F., Ortenzi, F., Tilio, M ., Concetti, F., Napolioni V., 2011. Genomic DNA extraction from whole blood stored from 15- to 30-years at _20 _C by rapid phenolechloroform protocol: A useful tool for genetic epidemiology studies. Molecular and Cellular Probes,vol. 25, pp: 44-48.

Pereira, J.C., Chaves, R., Bastos, E., Leitao, A. and Guedes-Pinto, H., 2011. An efficient method for genomic DNA extraction from different mollusks species. Int. J. Mil. Sci. Vol. 15, pp: 7079-7062.

Vaseeharan, B., Rajakamaran, P., Jayaseelan, D. and Vincent, A.Y., 2013. Molecular markers and their application in genetic diversity of penaeid shrimp. Aquacult International. Vol. 51, pp: 516-521.