بسم الله الرحمن الرحیم

استخراج DNA از گوجه فرنگی برای برگ‌های بالغ با روش CTAB بهینه شده

|علی محسنی|روش های نوین آزمایشگاهی در به‌نژادی|دکتر شریفی|

مواد مورد نیاز:

بافر استخراج

اذت مایع

مرکاپتو اتانول

ایزوپروپانول الکل

کلروفرم ایزامین الکل

الکل اتانول ۹۶ درصد

آب مقطر

وسایل ازمایشگاهی مورد نیاز:

تانک ازت

سانتیرفیوژ

میکروفیوژ یا اسپین

ورتکس

هود شیمیایی

هاون چینی آزمایشگاهی

ترازو آزمایشگاهی دو صفر

میکروتیوپ

سمپلر

۱. نمونه برداری

دستورکار حاضر نوعی استخراج به روش CTAB است که برای نمونه‌های برگی بالغ یا نمونه های برگی که که دارای متابولیت های ثانویه بالایی مثل آنتوسیانین و غیره دارند، بهینه‌سازی شده است تا امکان استخراج DNA با کیفیت بالا وجود داشته باشد. در صورت استفاده از روش معمولی CTAB باید از برگ های و اولیه و جوان گیاهچه استفاده شود که از متابولیت های ثانویه کمتری برخوردار هستند. روش بهینه شده بسیار زمان بر است زیرا سه مرحله کلروفورم ایزوامیل دارد و برای دور زدن این روش باید حتما نمونه برگی گیاهچه ای باشد تا از روش معمول استفاده شود. روش بهینه تنها برگ بالغ یا خشبی تعلق دارد و برای نمونه های حساس که نمونه های برگی کمتری می‌توان از آن ها گرفت پیشنهاد می شود. . نمونه برداری باید با دستکش و قیچی یا تیغ ترجیحا استریل انجام شود. پس از نمونه برداری هر یک از نمونه‌ها باید در فویل های آلومینیومی پیچیده شده تا امکان نشت نمونه وجود نداشته باشد و همچنین در ظرف ازت مایع یا ظرف یخ گذاشته شوند، با سرعت به آزمایشگاه انتقال داده شوند.

۲. سایش نمونه‌ها

در زمانی که تمام سلول‌های گیاهی به هم متصل هستد، بافر استخراج امکان سایش دیوارهای گیاهی ندارند مگر آنکه سایش مکانیکی انجام شده باشد. برای سایش مکانیکی هریک از نمونه‌ها را در هاون‌های چینی در داخل ازت مایع سایش داده می‌شوند تا به یک پودر سبز کمرنگ تبدیل شوند. این کار سلول های گیاهی را از هم جدا می‌کند و به بافر استخراج اجازه می‌دهد که به راحتی دیواره‌های سلولی را لیز کند. با کمک تیوپ‌های حجم ۲ ml از نمونه‌های سایش یافته به اندازه دو گرم (معادل سه چهارم تیوپ) از هر نمونه برداشته می‌شود.

۳ بافر استخراج

مواد لازم	مقدار مورد نیا	جرم ملکولی
PVP.	۲ –> ۲ گرم در ۱۰۰ cc اب	
CTAB	۲ –> ۲ گرم در ۱۰۰ cc اب	
NaCl	۲۰ میلی مولار –> ۸.۱۸۸ گرم در ۱۰۰۰ cc آب	۵۸.۴۴
EDTA	۲۰ میلی مولار –> ۰.۷۴۴ گرم در ۱۰۰۰cc آب	۳۷۲.۲۴

Tris Base	۱۰۰ میلی مولار –> ۱.۲۱ گرم در ۱۰۰۰cc آب	۱۲۱.۴

ساخت بافر استخراج

ابتدا برای ساخت ۱۰۰ میلی لیتر بافر مقدار ۹۵ میلی لیتر آب مقطر اندازه گرفته و داخل ظرف می‌ریزیم. سه ترکیب NaCl، EDTA وTris Base به علت نمکی بودن به راحتی در آب حل می‌شوند. می توان آن‌های را به راحتی با هم در آب حل کرد. این سه مواد را اندازه گرفته و به ارامی به داخل آب مقطر اضافه می‌کنیم. CTAB و PVP به علت آنکه در آب به راحتی حل نمی‌شوند باید به آرامی بعد از ترکیبات قبلی اضافه شوند. سپس در بن‌ماری دمای ۶۵ درجه قرار داده شوند. تا به در این دما حل دو مواد ذکر شده صورت بگیرد. در برخی منابع برای حل شدن CTAB و PVP از همان ابتدا از بن‌ماری کمک می‌گیرند ولی در حالت عادی حل شدن این دو ممکن بیشتر ۲۴ تا ۴۸ ساعت در دمای محیط بدون نیاز به بن‌ماری طول بکشد. پس از حل شدن کامل بافر باید ph محلول اندازه گیری شود به مقدار به ۸ برسد. سپس محلول به حجم مورد نظر می‌رسانیم. بافر استخراج تا زمانی که مواد داخل آن رسوب نکند قابل استفاده است.

مراحل استخراج

- از بین بردن دیواره سلولی و لیز کردن
- جداسازی و ته نشین کردن DNA
- شستشو پلت DNA

از بین بردن دیواره سلولی و لیز کردن

وظیفه اصلی بافر استخراج لیز کردن دیواره های سلولی است تا امکان جدا سازیه DNA از دیگر محتویات وجود داشته باشد. به هر نمونه سایش شده مقدار ۱۰۰ میکارولیتر بافر و، ۱۲ میکرولیتر مرکاپتواتالول اضافه می‌شود.بافر استخراج باید در دمای ۶۵ درجه سانتیگراد استفاده شود. این دما توسط بمناری و صورت تدریجی صورت می‌گیرد. با یک ورتکس کوتاه تمام محتویات تیوپ را مخلوط می‌کنیم. به علت سمی بودن مرکاپتواتالول باید در زیر هود اضافه شود.

نمونه ها باید به مدت نیم ساعت در بنماری ۶۵ درجه قرار گرینند و به ازای هر ۱۰ دقیقه، یک بار برعکس شوند تا دوباره هم بخورند. درطی این مرحله بافر استخراج دیواره های سلولی لیز کرده است. اما هنوز امکان جدا سازایه DNA از دیگر محتوایات سلولی مثل پروتئین وجود ندارند. جدا سازیه دیواره های شکسته شده و یگر محتویات سلولی توسط یک مرحله سانتیفیوژ دور ۱۰.۰۰۰ به مدت ۱۴ انجام می شود تا در تیوپ ها دو فاز سبز رنگ و شفاش رنگ مایل زرد ایجاد شود بخش رویی بر داشته می‌شود و به یک تیوپ جدید انتقال داده می یابند.

جداسازی و ته نشین کردن DNA

فاز شفاف زرد رنگ شامل تمام پروتئین های RNA و DNA سلولی است. برای رسوب پروتئین های گیاهی به محلول استخراج ۷۰۰ ماکرولیتر کلوفرم ایزوالکل اضافه می شود. کلوفرم ایزوالکل به علت خاصیت غیر قطبیه در محلول استخراج حل نمی شود و دو فاز مایع ایجاد می کند. برای و مخلوط کردن دو فاز تشکیل شده نیاز به یک ورتکس شدید چند دقیقه ای است.

تیوپ های در سانتیفیوژ در دور ۱۰.۰۰۰ به مدت ۱۴ دقیق به حرکت در می‌آیند تا دیواره ها وپروتئین ها و دیگر اجزای سلولی در سه فاز مجزا جدا شوند. تیوپ ها باید به آرامی از دستگاه خارج شوند. و فاز بالایی جدا آن ها که شامل DNA وRNA است با کمک سمپلر با دقت جدا شود و تیوپ ها دیگر انتقال داده شوند. سپس به اندازه حجم آن ها به هر یک از نمون ها کلروفرم ایزوامین الکل ۱:۲۴ اضافه می شود. و دوباره در سانتیفوژ به دور ۱۰.۰۰۰ به مدت ۱۴دقیق به چرخ در می آیند. این مرحله نیاز است که دوباره تکرار شود تا نمونه های خاصل گردند و احتمال وجود الودگی پروتئین کاهش یابد.

شستشو پلت DNA

زمانی که محلول استخراج اماده برای رسوب DNA باشد. به محلول باقی مانده با همان مقدار ایزوپروپانول الکل سرد اضافه می شود. ایزوپروپانوال با آب پیوند هیدروژنی برقرار می کند و با عث رسوب DNA می شود. محلول را به آرامی با حرکت دست مخلول می شوند و برای۲۰ دقیقه در دما ۲۰- درجه سانتی گراد نگه می شوند تا DNA موجود در محلول بر روی دیواری تیوپ رسوب کند.

پس از مرحله ایزوپروپانول الکل ساتیفیوژ دور ۱۰.۰۰۰ به مدت ۲۰ دقیقه اجرا می شود. DNA به شکل یک نقطه سفید رنگ درانتهای میکروتیوپ متصل به دیواره میکروتیوپ ظاهر می شود و به آن پلت گفته می شود. تخلیه تمام محتویات میکروتیوپ به غیر از پلت به باید دقت باید انجام شود. و در مرحله بعد برای شتوشی پلت از الودگی های احتمالی ۳۰۰ ماکرولیتر الکلی ۹۶ درصد به تیوپ اضافه می شود و به مدت ۵ دقیق در دور ۱۰.۰۰۰ ساتیفیوژ به حرکت در آید. سپس میکروتیوپ ها در هوای آزاد رها می شوند تا الکل مرحله قبل خشک شود و در آخرین مرحله ۳ تا ۵ میکرولیتر آب‌مقطر دوباره تقدیر شده به آن اضافه می‌کنیم تا DNA استخراج شده محافظت کنیم.

این نمونه را می توان برای مدت ۴۸ در یخچال ۴- برای مدت یک هفته در یخچال ۸۰- نگهداری کرد. و برای استفاده از آن ابتدا باید باید با کمک دستگاه نانو دراپ یا اسپکتو فتومتر از کیفت استخراج اطمینان حاصل کرد. یک نمونه خوب عدد ۱.۸ تا ۲.۲ را نتیجه آزمایش نانو دراپ نشاند می دهد. همچنین این آزمایش ها غلضت نمونه استخراج شده را نشان هم می دهند.