University of Isfahan

Faculty of Biological Science and Technology

Department of Cell and Molecular Biology and Microbiology

Farzaneh Forouharfar

# استخراج DNA ژنومی از بافت گیاهی
# (Genomic DNA Extraction from Plant Tissue)

# اهداف آزمایش:

- ✓ هموژنه نمودن بافت گیاهی
- ✓ استخراج DNA ژنومی

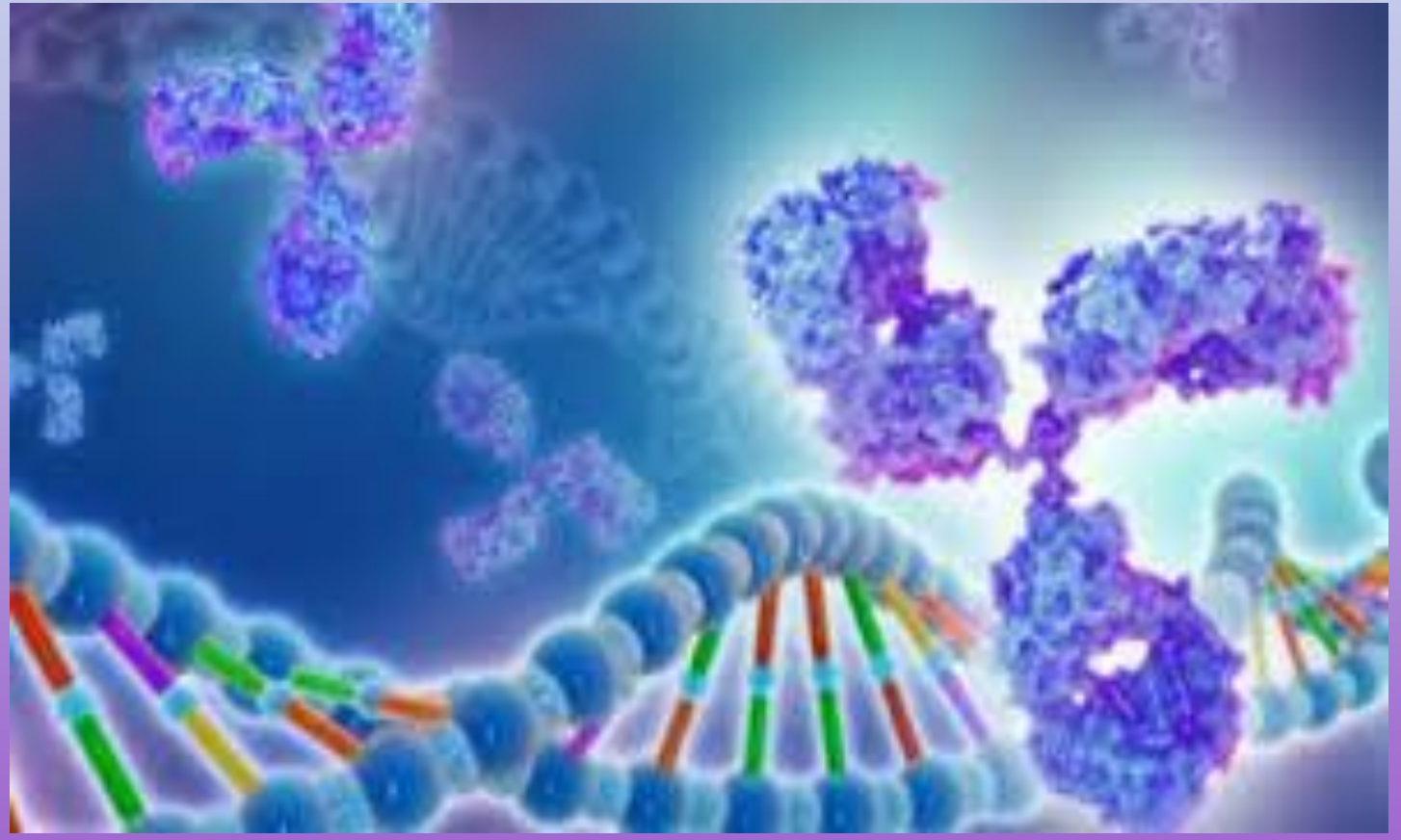
# مقدمه

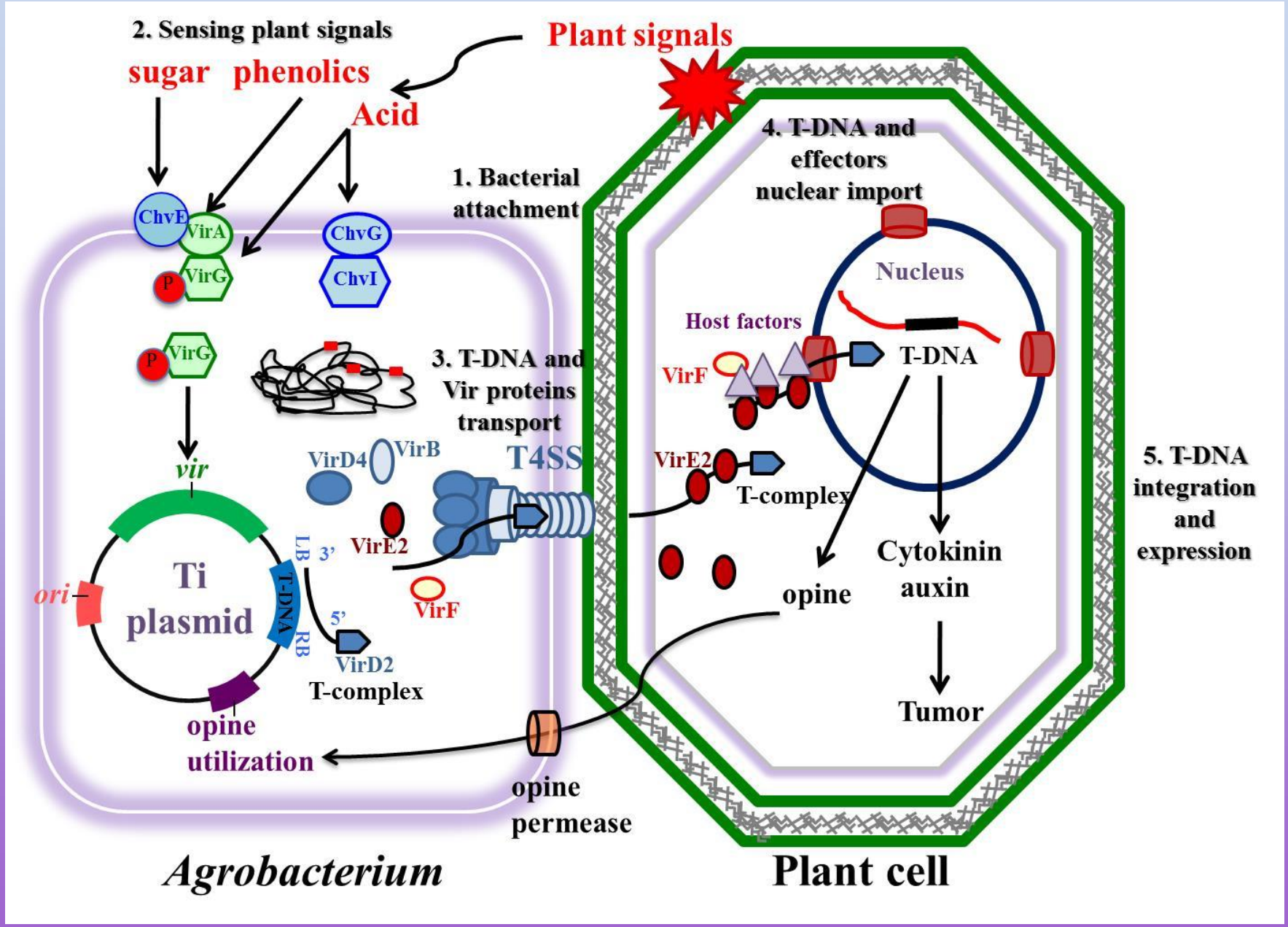
علاوه بر تولید محصولات ارزشمند به وسیله میکروب‌ها، از مهندسی ژنتیک می‌توان به منظور ایجاد گیاهان و جانوران تغییر یافته نیز استفاده کرد که به این موجودات Transgenic گفته می‌شود. تغییرات ژنی این موجودات، مواردی چون تولید محصولات بیشتر، تغییر کیفیت محصولات و تولید پروتئین‌های خاصی که بوسیله باکتری‌ها نمی‌توان آنها را تولید کرد، را در برمی گیرد. این کار بطور کلی از طریق وارد کردن ژن‌های نوترکیب در دوران جنینی به جانوران و در کشت بافت به گیاهان انجام می شود.

در این راستا گیاهان نه تنها اهمیت بسزایی در کشاورزی دارند، بلکه بعضی از گیاهان زینتی و دارویی ارزش اقتصادی بسیاری دارند. امروزه از کدئین، کیتین و دیگوکسین گیاهان داروهایی جهت کاهش درد، ضد مالاریا و ضد التهاب قلب و .... تهیه می شود. بعلاوه در مطالعاتی در زمینه تولید گیاهان برتر مانند گیاهان مقاوم به علف کش‌ها، مقاوم در برابر حشرات و خشکی، مقاوم در برابر ویروس ها از جمله بیماری موزائیک تنباکو، مقاوم نسبت به بیماری‌های قارچی. تولید اسید آمینه‌های مختلف، و تحمل به نمک در گیاه تنباکو، سیب زمینی و گوجه فرنگی صورت گرفته است و روش‌هایی برای کشت سریع گیاهان و انتقال DNA خارجی به گیاهان ابداع شده است.

دانشمندان تمایل دارند به همان گونه که ژنی را وارد مخمر یا وارد باکتری می‌کنند، بتوانند ژنی را به سلول گیاهی وارد کنند. این موضوع طی دو مرحله اساسی شکل خواهد گرفت: اول بدست آوردن ژنهای خاص، دوم: انتقال آن به ژنوم گیاه. یکی از راه‌های ایجاد نوترکیبی در گیاه استفاده از باکتری آگروباکتریوم میباشد. این باکتری حاوی پلاسمیدی به نام پلاسمید Ti می‌باشد که ایجاد تومور در بعضی از گیاهان می‌کند. شکل ۱-۷ انتقال T-DNA باکتری به گیاه را نشان می دهد.

پلاسمید Ti در باکتری آگروباکتریوم باقی می‌ماند چون فقط قسمتی از آن بنام T-DNA وارد گیاه می شود. این DNA باعث ساخته شدن اسید آمینه‌های غیر ضروری مانند اوپینها (Opines) می‌شود و نهایتاً منجر به تولید اکسین و فیتوهورمون می‌شوند که باعث رشد سلول می‌شود. اوپین‌ها هرگز در گیاهان وجود ندارند و این ماده منبع ازت برای رشد اگروباکتریوم میباشد (پلاسمید Ti مولکول‌های DNA حلقوی با وزن مولکولی ۱۰۰ × ۱/۲ می‌باشند).






شکل ۱-۷: انتقال T-DNA باکتری به گیاه

- یکی دیگر از راههای وارد کردن ژن نوترکیب به درون سلولهای گیاهی استفاده از ویروس‌هایی است که خاصیت بیماري‌زايي آن را از بین برده باشیم. برای مثال، ویروس «زمینی دو» DNA تک زنجیره‌ای دارد که در حالت همانندسازی به صورت دو زنجیره تبدیل می‌شود. از این ویروس برای انتقال ژنوم به گیاه استفاده می شود.

- راه دیگر انتقال DNA به گیاه از طریق شوک الکتریکی است. با توجه به اینکه آگروباکتریوم، فقط سلول‌های دو لپه‌ای را آلوده می‌کند، برای سلول‌هایی مانند گندم، برنج و ذرت از طریق شوک الکتریکی برای انتقالDNA به درون سلول استفاده می‌شود. برای استفاده از الکتروپوریشن به سلول گیاه احتیاج به پروتوپلاست است ولی تولید گیاه کامل از پروتوپلاست تک لپه‌ای مشکل است و اگر DNA مستقیم به درون سلول تزریق شود بهتر است. بنابراین می توان از طریق تزریق توسط تفنگ آبی DNA مورد نظر را وارد سلول‌های حاوی دیواره نمود.

مطالعات جهت تنظیم بیان ژن در گیاهان و بهینه کردن محصولات کشاورزی در ابعاد مختلف ادامه دارد. در این جلسه با دستورالعمل سریع استخراج DNA از یک بافت گیاهی آشنا خواهید شد.

## مواد و محلول‌های مورد نیاز:

بافر استخراج ۲۰ میلی لیتر کامل:

| | |
|---|---|
| Tris-HCl 1M, pH = 8 | 10 ml |
| NaCl 5M | 2.5 ml |
| EDTA 0.5 M | 2.5 ml |
| $H_2O$ استریل | 5 ml |

---

SDS 20%

استات پتاسیم (3M, pH = 5.2)

ایزوپروپیل

بافر TE

استات سدیم (3M, pH = 5.2)

اتانول خالص (مرك) (سرد ۲۰ °C- )

الكل ٪۷۵

کلرید پتاسیم (KCl) 5M

آب مقطر استریل و یخ

## وسائل مورد نیاز:

- لوله‌های اپندرف ۱.۵ میلی لیتری استریل
- میله شیشه‌ای ظریف استریل
- بن ماری ۶۵° C
- دستگاه میکروسانتریفوژ
- فریزر ۲۰ °C-

## روش کار:

۱- ۰/۵ گرم از بافت گیاهی را با 1ml بافر استخراج DNA، در یک اپندرف مخلوط کرده و با میله شیشه‌ای کاملا بسائید. با این روش بافت را هموژنه می‌کنید.

۲- ۱۵۰ میکرولیتر محلول SDS ۲۰٪ به مخلوط اضافه کنید.

۳- بعد از مخلوط کردن و تکان دادن لوله اپندرف به مدت ۱۰ دقیقه در بن ماری ۶۵° C انکوبه کنید.

٤- $\frac{۱}{۳}$ حجم محلول استات پتاسیم (3M, pH = 5.2) اضافه کنید (۴۰۰ میکرولیتر)

۵- به خوبی نمونه را مخلوط کنید و به مدت ۱۰ دقیقه در یخ انکوبه نمائید.

۶- نمونه را در دور ۱۰۰۰۰rpm به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ کنید.

۷- محلول رویی را به ایندرف تمیز و استریل منتقل نموده و هم حجم آن ایزوپروپانول اضافه کنید.

۸- نمونه را به آرامی مخلوط کرده و به مدت ۱۰ دقیقه در فریزر ۲۰C°- انکوبه کنید.

۹- به مدت ۱۵ دقیقه لوله ها را در دور ۱۰۰۰۰rpm سانتریفوژ کنید.

۱۰- محلول روئی را دور ریخته و 1µL بافر TE (۰/۱) به آن اضافه کنید.

*در صورت نیاز به خالص سازی نمونه، مراحل ۱۷-۱۱ را انجام دهید.

۱۱- ۱۰۰ µL محلول استات سدیم (5M, pH = 5.2) اضافه کرده، مخلوط کنید.

۱۲- ۲ حجم اتانول خالص سرد (۲۰ °C-) اضافه کنید و ۵ دقیقه در دمای آزمایشگاه انکوبه نمائید.

۱۳ - ۱۰ دقیقه در دور ۱٤۰۰۰ rpm سانتریفوژ نمائید.

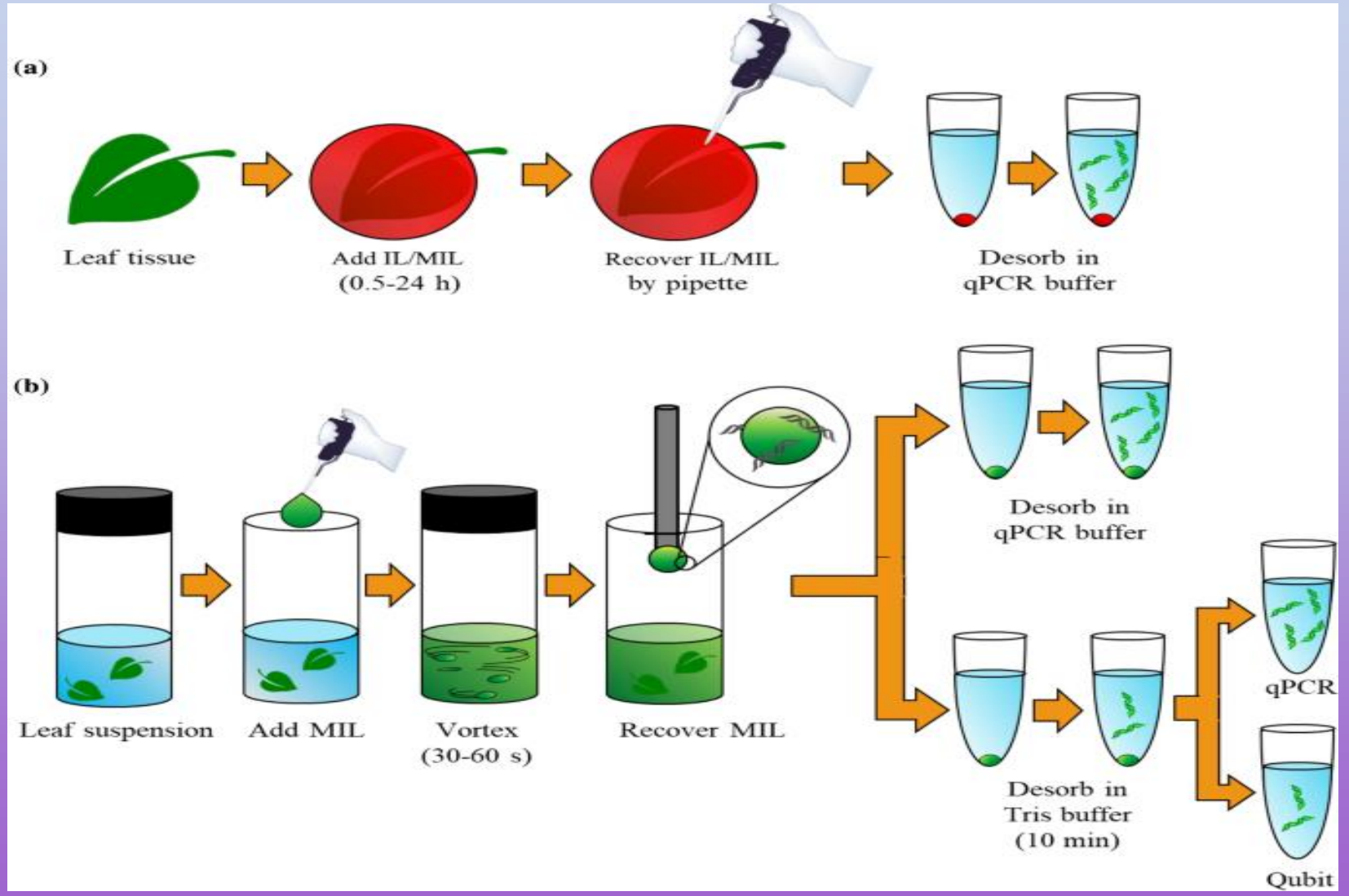
۱٤- محلول روئی را دور ریخته و رسوب را در ۵۰۰ µL الکل ۷۵٪ شستشو دهید.

۱۵- ۳ دقیقه در دور ۱٤۰۰۰ rpm سانتریفوژ کنید.

۱۶- الکل را دور ریخته و اجازه دهید لوله‌ها در معرض هوا یک تا دو دقیقه خشک شوند.

۱۷- به رسوب حاوی DNA، ۵۰ میکرولیتر TE اضافه کنید.

۱۸- پس از حل شدن کامل DNA در بافر، آنرا در ژل آگاروز آنالیز کنید.


(a)
Leaf tissue
Add IL/MIL
(0.5-24 h)
Recover IL/MIL
by pipette
Desorb in
qPCR buffer
(b)
Leaf suspension
Add MIL
Vortex
(30-60 s)
Recover MIL
Desorb in
qPCR buffer
Desorb in
Tris buffer
(10 min)
qPCR
Qubit

## سؤالات:

۱- در چه مرحله‌ای DNA ژنومی گیاهی رسوب داده می شود؟

۲- به نظر شما چه تغیراتی در این روشها می توان داد به نحوی که در کیفیت و کمیت میزان DNA استخراج شده، تغییری حاصل نشود؟

۳- استخراج DNA ژنومی از بافت جانوری را با بافت گیاهی مقایسه نمایید.