



University of Isfahan
Biological Science and Technology
Department of Cell and Molecular Biology
Cellular and Molecular Laboratory
Farzaneh Forouharfar

عنوان

استخراج DNA از بافت

گیاهی

اهداف

- ۱ آشنایی با ساختار و اهمیت DNA
- ۲ بررسی اصول استخراج DNA از گیاهان
- ۳ شناسایی چالش‌های موجود در استخراج DNA از گیاهان
- ۴ استخراج و خالص‌سازی DNA از گیاهان

مقدمه

(دئوکسی ریبونوکلیک اسید) ماده ژنتیکی تمامی موجودات زنده است که اطلاعات لازم برای رشد، تکامل و انجام فعالیت‌های حیاتی را در خود ذخیره می‌کند. استخراج DNA اولین گام برای بسیاری از مطالعات زیست‌شناسی مولکولی و بیوتکنولوژی است. بدون استخراج DNA با کیفیت بالا، انجام آزمایش‌های ژنتیکی دقیق امکان‌پذیر نخواهد بود.

مقدمه

(دئوکسی ریبونوکلیک اسید) ماده ژنتیکی تمامی موجودات زنده است که اطلاعات لازم برای رشد، تکامل و انجام فعالیت‌های حیاتی را در خود ذخیره می‌کند. استخراج DNA اولین گام برای بسیاری از مطالعات زیست‌شناسی مولکولی و بیوتکنولوژی است. بدون استخراج DNA با کیفیت بالا، انجام آزمایش‌های ژنتیکی دقیق امکان‌پذیر نخواهد بود.

اهمیت استخراج DNA از گیاهان

گیاهان یکی از متنوع‌ترین گروه‌های زیستی روی زمین هستند و مطالعه DNA آنها برای اهداف مختلفی ضروری است، از جمله:

۱. بهبود محصولات کشاورزی

بررسی ژن‌های مرتبط با مقاومت به خشکی، بیماری‌ها و آفات
اصلاح نژاد گیاهان برای افزایش بازدهی و کیفیت محصولات

2. شناسایی و طبقه‌بندی گیاهان

استفاده از بارکدینگ DNA برای شناسایی گونه‌های گیاهی

بررسی تنوع ژنتیکی و روابط تکاملی بین گونه‌ها

شناسایی ژن‌های موثر در تولید متابولیت‌های مفید برای درمان بیماری‌ها

3. زیست‌فناوری و مهندسی ژنتیک

انتقال ژن‌های مفید به گیاهان برای تولید گونه‌های اصلاح‌شده ژنتیکی

مطالعه ژن‌های مرتبط با تولید متابولیت‌های ثانویه مانند داروهای گیاهی

4. تحقیقات پزشکی و داروسازی

مطالعه مسیرهای تولید ترکیبات دارویی در گیاهان

شناسایی ژن‌های موثر در تولید متابولیت‌های مفید برای درمان بیماری‌ها

5. حفاظت از گونه‌های در معرض خطر

بررسی تنوع ژنتیکی گونه‌های نادر و حفاظت از آنها از طریق بانک‌های ژنی

کمک به برنامه‌های اصلاحی برای احیای گیاهان در معرض انقراض

چالش‌های استخراج DNA از گیاهان

برخلاف سلول‌های حیوانی، سلول‌های گیاهی دارای دیواره سلولی سخت، پلی‌ساکاریدها، پلی‌فنول‌ها و متابولیت‌های ثانویه هستند که استخراج DNA را دشوار می‌کنند. این ترکیبات می‌توانند باعث تخریب DNA یا کاهش کیفیت آن شوند. بنابراین، انتخاب روش مناسب برای استخراج DNA از گیاهان مختلف اهمیت زیادی دارد.

در این آموزش، مراحل دقیق استخراج DNA از گیاهان را بررسی می‌کنیم تا بتوانید DNA خالص و باکیفیت را برای آزمایش‌های ژنتیکی خود استخراج کنید. روش ارائه‌شده برای طیف گسترده‌ای از گیاهان قابل استفاده است و می‌تواند بر اساس نیازهای تحقیقاتی بهینه‌سازی شود.

وسائل مواد و تجهیزات مورد نیاز



وسایل، مواد و تجهیزات مورد نیاز

۱. هاون و دسته هاون و یا هموژنایزر - برای خرد کردن نمونه گیاهی
۲. نیتروژن مایع (اختیاری) - برای خرد کردن بهتر و جلوگیری از دناتوره شدن DNA
۳. لوله‌های سانتریفیوژ (۱,۵ و ۵ میلی‌لیتر)
۴. پیپت و سمپلر - برای برداشت دقیق مایعات
۵. بن‌ماری (۶۵-۶۰ درجه سانتی‌گراد) - برای گرمادهی در مرحله استخراج
۶. سانتریفیوژ (با سرعت حداقل 10,000 دور در دقیقه) - برای جداسازی فازها
۷. اسپکتروفتومتر یا نانودراپ - برای اندازه‌گیری غلظت و خلوص DNA
۸. ژل الکتروفورز - برای بررسی کیفیت DNA

مواد شیمیایی مورد نیاز

۱. بافر CTAB یا SDS – برای شکستن غشاهای سلولی
۲. فنل-کلروفرم-ایزوآمیل الکل (25:24:1) – برای حذف پروتئین ها و ناخالصی ها
۳. ایزوپروپانول (100%) – برای رسوب دادن DNA
۴. اتانول 70% – برای شستشوی DNA
۵. بافر TE یا آب مقطر استریل – برای حل کردن و نگهداری DNA

توجه

بافر CTAB (Cetyltrimethylammonium Bromide) در استخراج DNA گیاهی یک دترجنت کاتیونی است که به طور گسترده برای جداسازی DNA ژنومی از نمونه های گیاهی استفاده می شود. این بافر مخصوصاً برای گیاهانی که دارای مقدار زیادی پلی ساکارید و پلی فنول هستند مناسب است.

نقش و عملکرد بافر CTAB در استخراج DNA گیاهی

۱. لیز کردن سلول $\rightarrow$ CTAB غشای سلولی و هسته را تجزیه کرده و DNA را آزاد می‌کند.
۲. رسوبدهی پلی‌ساکاریدها $\rightarrow$ CTAB به پلی‌ساکاریدها متصل شده و آن‌ها را در حضور نمک‌های بالا (مانند NaCl) رسوب می‌دهد، در حالی که DNA در محلول باقی می‌ماند.
۳. جلوگیری از اکسیداسیون پلی‌فنول‌ها $\rightarrow$ ترکیباتی مانند β -mercaptoethanol که در بافر CTAB گنجانده می‌شوند، از اکسیداسیون پلی‌فنول‌ها جلوگیری می‌کنند تا مانع از اتصال آن‌ها به DNA شوند.
۴. حفظ پایداری DNA EDTA موجود در بافر از فعالیت DNase ها جلوگیری کرده و DNA را از تخریب حفظ می‌کند.

ترکیب رایج بافر CTAB

→ CTAB (2%) دترجنت برای لیز سلولی و رسوب پلی ساکاریدها

→ NaCl (1.4 M) کمک به حل شدن DNA و رسوب پلی ساکاریدها

→ Tris-HCl (pH 8.0, 100 mM) حفظ pH و جلوگیری از دناتوره شدن DNA

→ EDTA (20 mM) مهار کننده آنزیم های DNase

→ β -mercaptoethanol (0.2% - 1%) جلوگیری

از اکسیداسیون ترکیبات فنلی

روش کار



Sample Preparation



Lysis



DNA Binding



Wash



DNA Elution



مرحله اول: آماده‌سازی نمونه گیاهی

۱. برگ تازه و تمیز از گیاه موردنظر جمع‌آوری کنید.

۲. نمونه را با هاون و نیتروژن مایع خرد کنید تا پودر کاملاً یکنواختی حاصل شود

دلیل استفاده از نیتروژن مایع چیست؟

نیتروژن مایع باعث شکستن دیواره سلولی و جلوگیری از دناتوره شدن DNA می‌شود.

۳. اگر نیتروژن مایع در دسترس نیست، می‌توان نمونه را به‌خوبی خرد کرد اما ممکن است بازده DNA کاهش یابد.

مرحله دوم: لیز سلولی و آزادسازی DNA

۴. حدود 500 میکرولیتر بافر CTAB یا SDS به پودر گیاهی اضافه کنید.

CTAB مناسب گیاهانی با میزان بالای پلی ساکارید است.

SDS برای شکستن غشاهای سلولی و هسته استفاده می شود.

۵. محلول را به خوبی مخلوط کنید تا سوسپانسیونی یکنواخت تشکیل شود.

۶. نمونه را در بین ماری ۶۵-۶۰ درجه سانتی گراد به مدت ۲۰-۳۰ دقیقه قرار دهید و هر ۵ دقیقه یکبار مخلوط کنید.

این مرحله باعث شکسته شدن غشای سلولی و آزاد شدن DNA می شود.

۷. پس از گرمادهی، اجازه دهید نمونه در دمای اتاق خنک شود.

مرحله سوم : جداسازی DNA از سایر اجزا

۸. افزودن فنل-کلروفرم-ایزوآمیل الکل:

به هر لوله ۵۰۰ میکرولیتر از مخلوط فنل-کلروفرم-ایزوآمیل الکل (۱:۲۴:۲۵) اضافه کنید.

لوله را به آرامی وارونه کنید تا لایه‌های محلول به خوبی مخلوط شوند.

۹. نمونه‌ها را در سانتریفیوژ با سرعت 10,000 دور در دقیقه به مدت 10 دقیقه قرار دهید.

۱۰. پس از سانتریفیوژ، دو فاز تشکیل می‌شود:

فاز بالایی (آبی‌رنگ) که حاوی DNA است.

فاز پایینی (آلی) که حاوی پروتئین‌ها و ناخالصی‌هاست.

۱۱. فاز بالایی را با دقت به یک لوله جدید انتقال دهید.

مرحله چهارم : رسوب‌دهی و خالص‌سازی DNA

۱۲. به فاز آبی، ۰.۶ حجم ایزوپروپانول سرد اضافه کنید و به آرامی مخلوط کنید.

13. نمونه را ۳۰ دقیقه در فریزر (۲۰- درجه سانتی‌گراد) قرار دهید تا DNA رسوب کند.

14. پس از انکوباسیون، نمونه را در سانتریفیوژ 10,000 دور در دقیقه به مدت 10 دقیقه قرار دهید.

۱۵. DNA به شکل یک رسوب سفید یا شفاف در ته لوله ظاهر می‌شود.

۱۶. محلول رویی را به آرامی خارج کنید و ۵۰۰ میکرولیتر اتانول ۷۰٪ به رسوب اضافه کنید.

۱۷. لوله را به آرامی بچرخانید تا شستشو انجام شود و دوباره سانتریفیوژ کنید.

۱۸. پس از سانتریفیوژ، اتانول را دور ریخته و رسوب DNA را در دمای اتاق خشک کنید.

مرحله 5: حل کردن و ذخیره DNA

۱۹. رسوب خشک شده را در ۵۰-۱۰۰ میکرولیتر بافر TE یا آب مقطر استریل حل کنید.
۲۰. DNA را در دمای ۴ درجه سانتیگراد برای استفاده کوتاه مدت یا -۲۰ درجه سانتیگراد برای نگهداری طولانی مدت ذخیره کنید.

مرحله ششم. بررسی کیفیت و کمیت DNA

سنجش کمیت با اسپکتروفتومتر

میزان جذب نمونه را در دستگاه نانودراپ یا اسپکتروفتومتر اندازه‌گیری کنید.
نسبت جذب 260/280 نانومتر باید بین 1.8 تا 2.0 باشد تا DNA خالص تلقی شود.

بررسی کیفیت با ژل الکتروفورز

1% ژل آگارز تهیه کنید و DNA را روی ژل بارگذاری کنید.
با رنگ‌آمیزی اتیدیوم بروماید (یا SYBR Safe)، باندهای DNA را مشاهده کنید.
باند شفاف و بدون smear نشان‌دهنده کیفیت بالای DNA است.

نتیجه‌گیری و کاربردها

DNA استخراج‌شده در مطالعات PCR، کلونینگ، تعیین توالی و ژنتیک گیاهی کاربرد دارد.

کیفیت و کمیت DNA بسته به نوع گیاه و روش استخراج متفاوت است. روش CTAB برای گیاهان دارای ترکیبات ثانویه بالا بهتر عمل می‌کند.

Grind plant tissue under liquid nitrogen to a fine powder



FAPG1 Buffer & RNase A
RT, 2 mins



65°C, 10~20 mins



Add FAPG2 Buffer,
on ice, 5 mins

Centrifuge ↪



Filtration
(Filter Column)



Add FAPG3 Buffer
(ethanol added)

Centrifuge ↪



Binding
(FAPG Column)

Centrifuge ↪



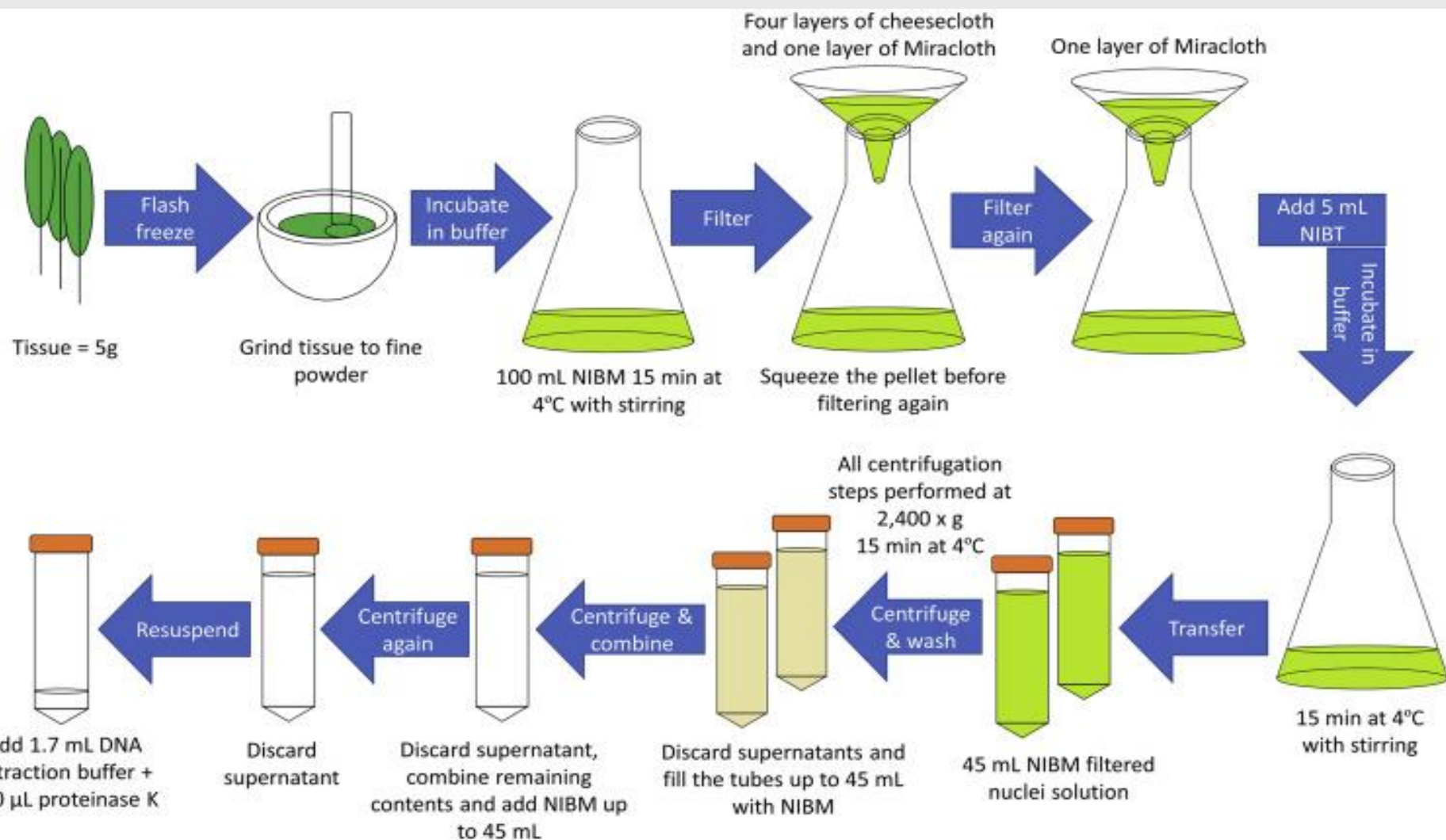
Wash (W1 Buffer)
(Wash Buffer) x 2

Centrifuge ↪

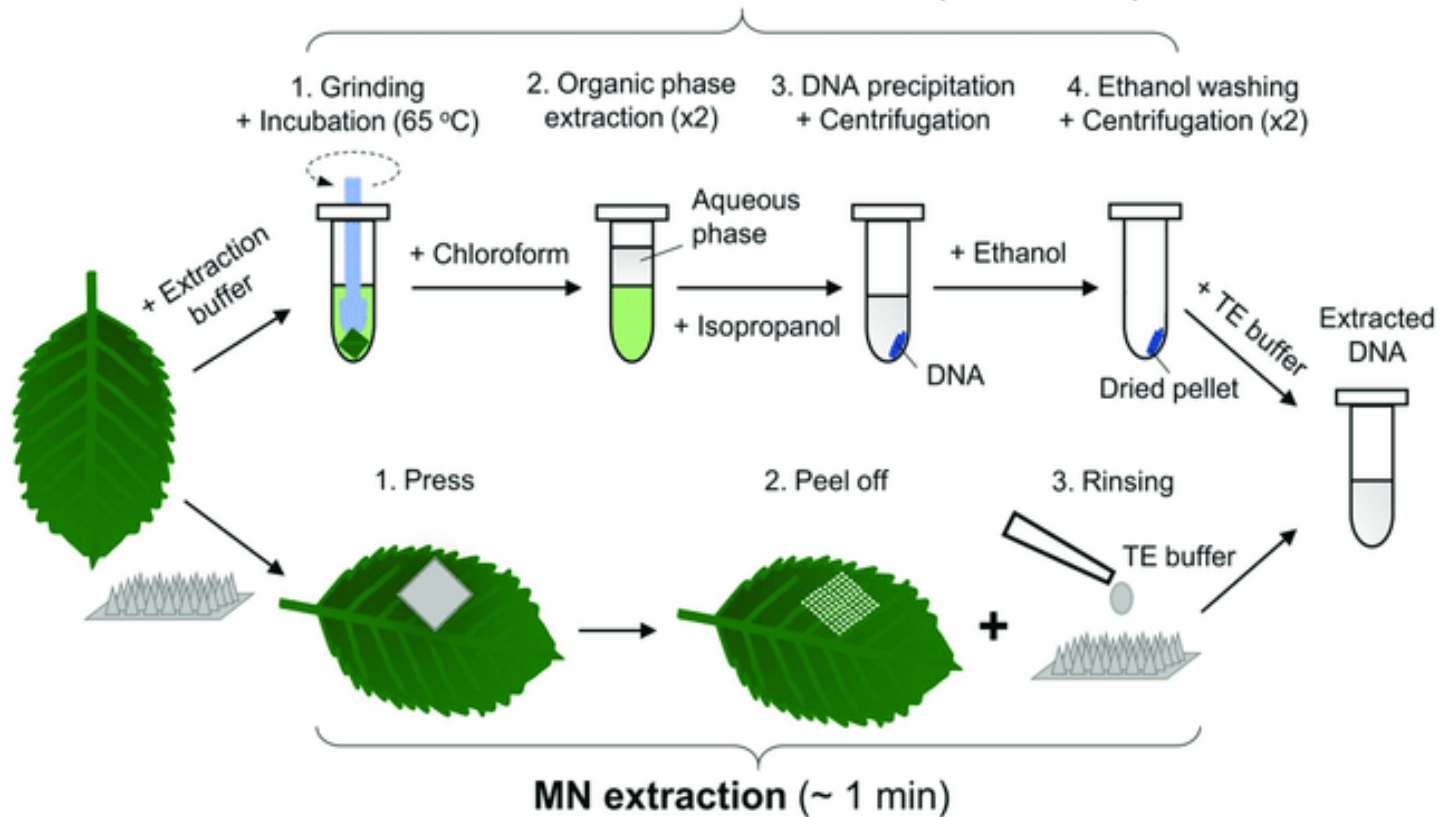


Elution Buffer/ddH₂O

خلاصه مراحل استخراج DNA ژنومی از بافت گیاهی



Conventional CTAB extraction (~3-4 hours)



تحلیل نتایج استخراج DNA از گیاه

بررسی کیفیت و کمیت DNA استخراج شده

بعد از انجام مراحل استخراج، مهمترین بخش تحلیل نتایج مربوط به کیفیت و کمیت DNA استخراج شده است. دو ابزار اصلی برای ارزیابی کیفیت DNA عبارتند از: اسپکتروفتومتر و ژل الکتروفورز.

سنجش کیفیت DNA با استفاده از اسپکتروفتومتر

یکی از ساده‌ترین و سریع‌ترین روش‌ها برای ارزیابی خلوص و کیفیت DNA استفاده از اسپکتروفتومتر است. این دستگاه با اندازه‌گیری جذب نور در طول موج‌های مختلف می‌تواند اطلاعات مفیدی در خصوص خلوص DNA ارائه دهد.

نسبت جذب 260/280 نانومتر

DNA خالص معمولاً دارای نسبت جذب در 260/280 نانومتر بین 1.8 و 2.0 است.

اگر نسبت این دو طول موج کمتر از 1.8 باشد، نشان‌دهنده وجود پروتئین‌ها یا آلاینده‌های دیگر مانند فنل یا کلروفرم است که به فرآیند استخراج نفوذ کرده‌اند.

نسبت بالاتر از 2.0 ممکن است نشان‌دهنده وجود RNA در نمونه باشد.

نتیجه مطلوب: نسبت 260/280 در محدوده 1.8-2.0، نشان‌دهنده DNA خالص و مناسب برای استفاده در آزمایش‌های بعدی است.

نسبت جذب 260/230 نانومتر

نسبت جذب در 260/230 نانومتر برای DNA خالص باید حداقل 2.0 باشد.

نسبت پایین‌تر از 2.0 می‌تواند به وجود آلاینده‌های ارگانیک مانند فنل یا سایر ترکیبات شیمیایی اشاره داشته باشد.

نتیجه مطلوب: نسبت 260/230 بالاتر از 2.0 نشان‌دهنده نبود آلاینده‌های مضر در نمونه است.

بررسی یکپارچگی DNA با استفاده از ژل الکتروفورز

برای ارزیابی بیشتر کیفیت DNA، از روش ژل الکتروفورز استفاده می‌شود که کمک می‌کند تا یکپارچگی DNA بررسی شود.

نتایج ممکن در ژل الکتروفورز

DNA با کیفیت خوب: پس از بارگذاری نمونه DNA در ژل، یک باند روشن و واضح در محل بارگذاری ظاهر می‌شود. این باند باید به‌طور شفاف و بدون هیچ‌گونه خرده‌های DNA (Smearing) باشد.

DNA با کیفیت پایین: اگر نمونه دچار آلودگی یا تخریب شده باشد، باندهای DNA ممکن است به صورت محو ظاهر شوند. این امر به‌ویژه زمانی اتفاق می‌افتد که DNA در طی مراحل استخراج دچار آسیب شده باشد یا آلاینده‌های شیمیایی (مانند فنل) وارد نمونه شده باشند.

وجود RNA :

اگر به طور خاص RNA در نمونه باقی مانده باشد، ممکن است باندهای اضافی در ژل ظاهر شوند که باید به دقت بررسی شوند. برای جلوگیری از این مشکل، در مرحله استخراج باید از آنزیم RNase استفاده کرد.

تحلیل کمیت DNA استخراج شده

پس از ارزیابی کیفیت، مرحله بعدی ارزیابی کمیت DNA استخراج شده است.

استفاده از اسپکتروفتومتر یا نانودراپ

پس از بررسی کیفیت، باید میزان غلظت DNA اندازه گیری شود.

معمولاً غلظت مناسب DNA برای استفاده در PCR یا سایر آزمایش ها باید بین 50 تا 200 نانوگرم در میلی لیتر باشد.

در صورت نیاز به مقدار بیشتر یا کمتر، می توان DNA را رقیق یا متمرکز کرد.

نتیجه مطلوب: اگر غلظت DNA بالای 50 نانوگرم در میلی لیتر باشد، آن وقت می توان از آن در آزمایش های بعدی مانند PCR استفاده کرد.

نتایج نهایی و اقدامات اصلاحی

- پس از تحلیل نتایج، در صورتی که نمونه استخراج شده دارای مشکلاتی از جمله پایین بودن کیفیت یا کمیت باشد، ممکن است لازم باشد که برخی از مراحل اصلاحی انجام شود:
- اگر نسبت 260/280 پایین باشد، می‌توان از تکنیک‌های تصفیه بیشتر مانند استفاده از فنل-کلروفرم اضافی یا شستشوی بیشتر با اتانول %۷۰ استفاده کرد.
- اگر نمونه تخریب شده باشد و باندهای محو در ژل مشاهده شوند، باید روش استخراج را تغییر داد و از مواد شیمیایی تازه و بهینه استفاده کرد.
- اگر DNA کمتر از 50 نانوگرم در میلی‌لیتر باشد، ممکن است نیاز به کشت گیاهان بیشتر یا استفاده از مقدار بیشتری ماده گیاهی در فرایند استخراج باشد.

کاربردهای DNA استخراج شده

بعد از استخراج DNA و اطمینان از کیفیت و کمیت آن، می‌توان از آن در آزمایش‌های ژنتیکی مختلف استفاده کرد. برخی از این کاربردها عبارتند از:

۱. PCR (واکنش زنجیره‌ای پلیمراز) برای تکثیر ژن‌ها و تحلیل‌های ژنتیکی.

۲. تعیین توالی DNA برای شناسایی و آنالیز توالی‌های ژنتیکی خاص.

۳. مهندسی ژنتیک برای ایجاد گیاهان اصلاح شده ژنتیکی.

۴. بررسی تنوع ژنتیکی گیاهان مختلف و شناسایی و طبقه‌بندی گونه‌ها.