



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

عنوان

مراحل، اصول و کاربردهای
استخراج DNA از پروکاریوت‌ها

اهداف

- ۱ آشنایی با ساختار سلولی پروکاریوت‌ها و اهمیت DNA آن‌ها
- ۲ بررسی روش‌های استخراج DNA از پروکاریوت‌ها
- ۳ بررسی چالش‌ها و ملاحظات در استخراج DNA از پروکاریوت‌ها
- ۴ تحلیل نتایج و بررسی کیفیت و کمیت DNA استخراج‌شده

مقدمه

DNA در سلول‌های پروکاریوتی به صورت یک حلقه واحد و بدون غشای هسته‌ای موجود است. این **DNA** در منطقه‌ای به نام نوکلئوتید **Nucleoid** قرار دارد و برخلاف سلول‌های یوکاریوتی، فاقد کروموزوم‌های خطی است. پروکاریوت‌ها معمولاً یک یا چند پلاسمید نیز دارند که **DNA** را حمل می‌کنند و نقش مهمی در انتقال ژن‌های مقاومت به آنتی‌بیوتیک دارند.

چرا استخراج **DNA** از پروکاریوت‌ها مهم است؟

- ۱ مطالعه ژنوم پروکاریوت‌ها برای تعیین ویژگی‌های ژنتیکی و مقاومتی آن‌ها
- ۲ استفاده از **DNA** در تکنیک‌های مهندسی ژنتیک، مانند کلونینگ، تولید پروتئین‌ها و اصلاح ژنتیکی
- ۳ شناسایی و تعیین نوع باکتری‌ها از طریق **PCR** و سایر آزمایش‌های مولکولی
- ۴ بررسی تغییرات ژنتیکی در جمعیت‌های پروکاریوتی

وسائل مواد و تجهیزات مورد نیاز



وسایل، مواد و تجهیزات مورد نیاز

۱. سانتریفیوژ - برای جدا کردن اجزای مختلف سلولی
۲. پیپت و سمپلر - برای برداشت مایعات
۳. بن ماری - برای گرمادهی نمونه‌ها
۴. لوله‌های سانتریفیوژ - برای جداسازی اجزای سلولی
۵. میکروسکوپ - برای بررسی وضعیت سلول‌ها
۶. فریزدرایر (اختیاری) برای خشک کردن نمونه‌ها

مواد شیمیایی مورد نیاز

۱. بافر PBS (فسفات بافر سالین) – برای شستشوی سلول‌ها
۲. بافر (Lysis سودا، SDS یا NaOH) – برای انهدام دیواره سلولی
۳. فنل-کلروفرم – برای حذف پروتئین‌ها
۴. ایزوپروپانول (100%) – برای رسوب DNA
۵. اتانول 70% – برای شستشوی DNA
۶. (اختیاری) RNase – برای حذف RNA

روش کار



مرحله اول: آماده‌سازی سلول‌های پروکاریوتی

۱. یک کشت باکتریایی تازه از محیط کشت انتخابی خود تهیه کنید.

۲. از یک لوله سانتریفیوژ 1.5 میلی‌لیتری یا 15 میلی‌لیتری استفاده کنید.

۳. یک حجم معین از کشت باکتریایی (معمولاً 1-2 میلی‌لیتر) را در لوله سانتریفیوژ بریزید.

۴. لوله را سانتریفیوژ کنید با سرعت ۸,۰۰۰-۶,۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۵-۱۰ دقیقه.

۵. پس از سانتریفیوژ، پلت باکتری‌ها (رسوب سلولی) را از فاز مایع جدا کنید.

مرحله دوم: لیز سلولی و آزادسازی DNA

۶. سلول‌های باکتریایی را با بافر لیز (برای سلول‌های با دیواره سخت مانند باکتری‌های گرم منفی) که معمولاً شامل SDS یا NaOH است، مخلوط کنید. این محلول باعث حل شدن دیواره سلولی و آزادسازی DNA می‌شود.

۷. به نمونه RNase اضافه کنید تا RNA باقی‌مانده از بین برود (در صورت نیاز).

۸. محلول را در بن‌ماری ۴۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ دقیقه انکوبه کنید.

این مرحله باعث آزاد شدن DNA از باکتری‌ها می‌شود.

مرحله سوم : جداسازی DNA از سایر اجزا

۹. پس از انکوباسیون، به نمونه مقدار فنل-کلروفرم (۱:۲۴:۲۵) اضافه کنید.

۱۰. لوله‌ها را به آرامی مخلوط کنید و سپس در سانتریفیوژ ۸,۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه قرار دهید.

دو فاز تشکیل می‌شود: فاز آبی (که حاوی DNA است) و فاز آلی (که حاوی پروتئین‌ها و مواد دیگر است).

11. فاز آبی را با دقت به یک لوله جدید منتقل کنید.

مرحله چهارم : رسوب‌دهی و خالص‌سازی DNA

۱۲. به فاز آبی، ایزوپروپانول سرد (0.6 حجم ایزوپروپانول به حجم فاز آبی) اضافه کنید.

۱۳. محلول را به آرامی مخلوط کنید و در فریزر (۲۰- درجه سانتی‌گراد) به مدت ۳۰ دقیقه قرار دهید.

۱۴. پس از انکوباسیون، لوله را سانتریفیوژ کنید (۸,۰۰۰-۶,۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه) تا DNA رسوب کند.

۱۵. رسوب DNA را با دقت از محلول جدا کنید.

مرحله پنجم : شستشوی DNA

۱۶. رسوب DNA را با اتانول ۷۰٪ شستشو دهید.

۱۷. دوباره سانتریفیوژ کنید تا شستشوی کامل انجام شود و اتانول اضافی از بین برود.

۱۸. رسوب DNA را خشک کرده و در بافر TE یا آب مقطر استریل حل کنید.

مرحله ششم . بررسی کیفیت و کمیت DNA

۶.۱. بررسی کیفیت DNA با استفاده از اسپکتروفتومتر

پس از استخراج DNA، از اسپکتروفتومتر برای اندازه‌گیری نسبت 260/280 نانومتر استفاده کنید.

برای DNA خالص، نسبت 260/280 باید بین 1.8 تا 2.0 باشد.

برای بررسی وجود RNA در نمونه، از نسبت 260/230 نانومتر استفاده کنید که باید حداقل 2.0 باشد.

۶.۲. بررسی یکپارچگی DNA با استفاده از ژل الکتروفورز

یک درصد ژل آگارز (۱٪) تهیه کرده و از DNA برای بارگذاری استفاده کنید.

نمونه‌های DNA را روی ژل بارگذاری کرده و پس از رنگ‌آمیزی با اتیدیوم بروماید یا سایر رنگ‌ها، الکتروفورز کنید.

DNA با کیفیت خوب باید یک باند روشن و واضح در ژل نشان دهد.

تحلیل نتایج

DNA تحلیل کیفیت

اگر نسبت 260/280 کمتر از 1.8 باشد: ممکن است DNA آلودگی پروتئینی یا شیمیایی داشته باشد. در این صورت، می‌توان از فنل-کلروفرم اضافی یا شستشوی بیشتر با اتانول ۷۰٪ استفاده کرد.

اگر نسبت 260/230 کمتر از 2.0 باشد: احتمال وجود آلاینده‌های ارگانیک مانند فنل است که باید با شستشوی بیشتر با اتانول یا استفاده از روش‌های تصفیه دیگر رفع شود.

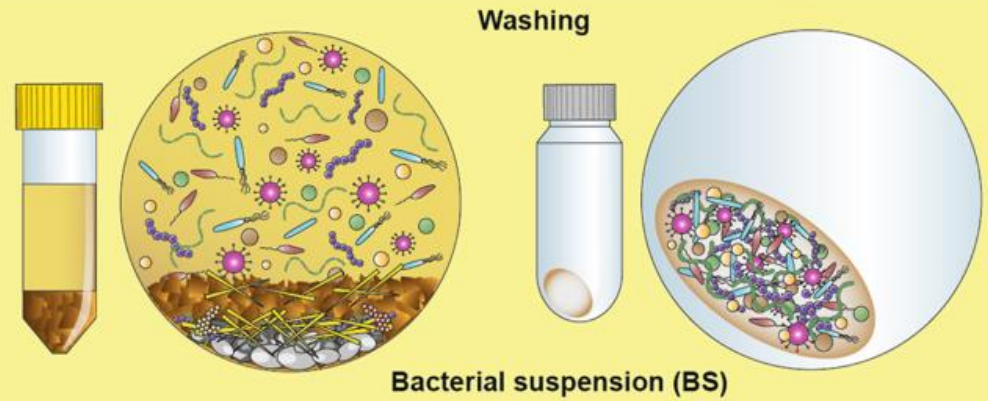
اگر باندهای ژل الکتروفورز محو باشند: نشان‌دهنده تخریب DNA است که ممکن است ناشی از استفاده از مواد شیمیایی نادرست یا دمای بالای انکوبه باشد.

تحلیل کمیت DNA

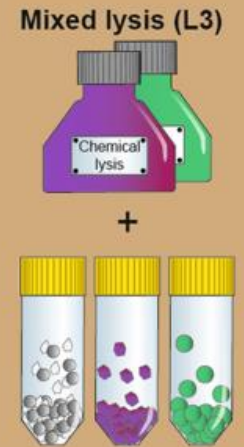
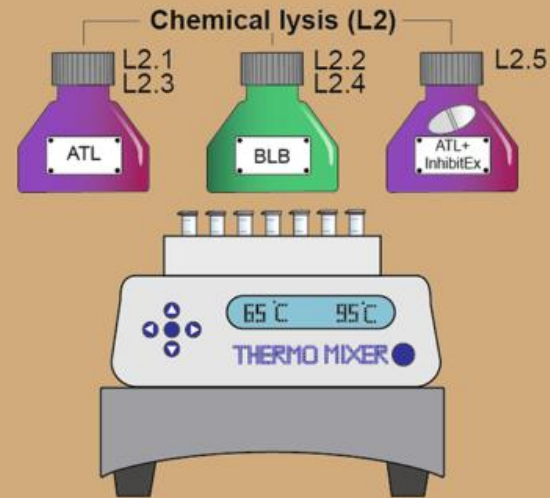
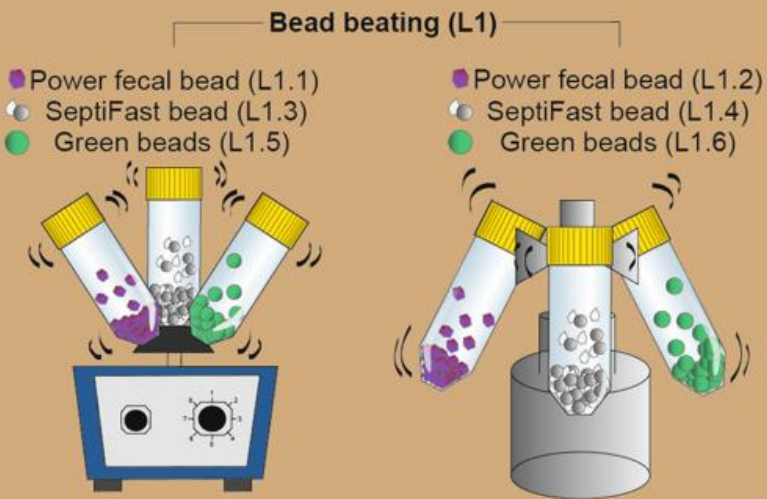
غلظت مناسب DNA برای PCR و سایر آزمایش‌ها باید بین 50 تا 200 نانوگرم در میلی‌لیتر باشد.

اگر غلظت پایین باشد، ممکن است نیاز به استخراج مجدد یا افزایش حجم نمونه‌ها باشد.

Homogenization (H)

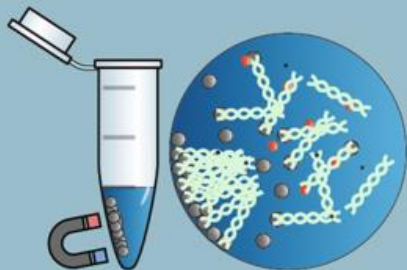


Lysis (L)

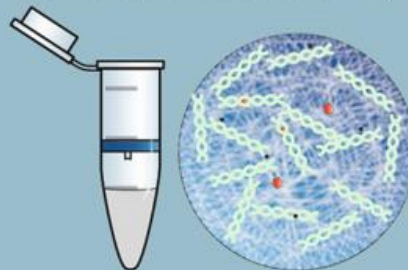


DNA purification (P)

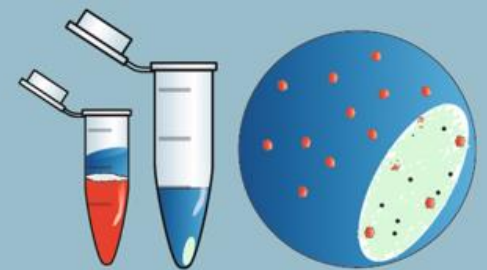
Robotic magnetic bead based (P4)
 Roche MagNA Pure 24 Pathogen 200 (P4.1)
 Roche MagNA Pure 24 Pathogen 1000 (P4.2)

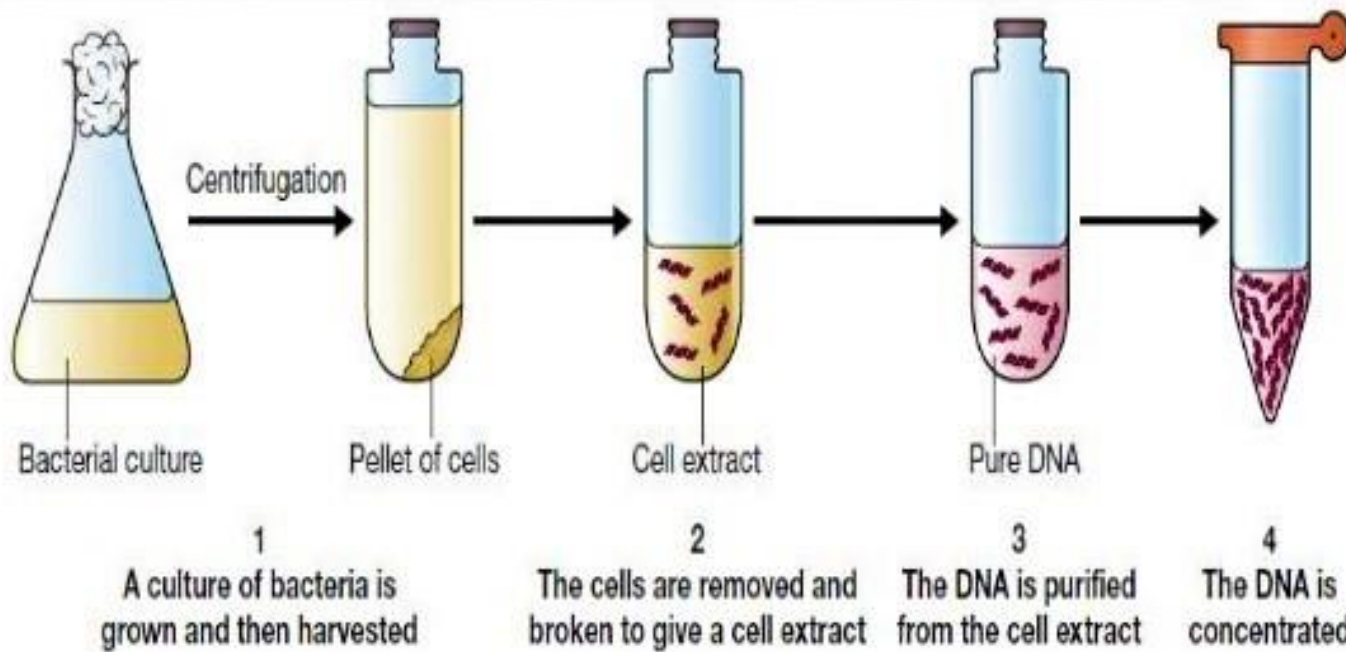


Commercial silica column based (P5)
 QIAamp DNA Stool Mini Kit (P5.1)
 QIAamp Power Fecal DNA Kit (P5.2)
 DNeasy PowerSoil Kit (P5.3)



Conventional precipitation based (P6)





Sample
Preparation



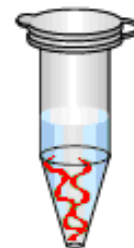
Cell Lysis



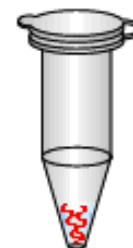
Protein
Removal



DNA
Precipitation

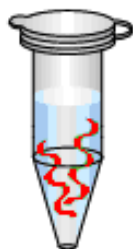


DNA
Rehydration



DNA Purification

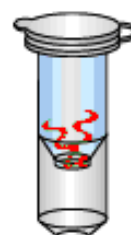
Sample
Preparation



DNA Binding



Wash



DNA Elution

