Archive of SID

ISSN: 2476-6917; Modares Journal of Biotechnology. 2019;10(4):519-525

Comparison of the Efficiency of Iron-Magnetic Nanoparticles with CTAB and Rapid Detection Methods for DNA Extraction of Rose petal (Rosa hybrida L. cv. Vendetta)

ARTICLE INFO

Article Type
Original Research

Authors
Khatami F.[1] *PhD,*
Najafi F.*[1] *PhD,*
Yari F.[2] *PhD,*
Khavari-Nejad R.A.[1] *PhD*

How to cite this article
Khatami F, Najafi F, Yari F, Khavari-Nejad R. Comparison of the Efficiency of Iron-Magnetic Nanoparticles with CTAB and Rapid Detection Methods for DNA Extraction of Rose petal (Rosa hybrida L. cv. Vendetta). Modares Journal of Biotechnology. 2019;10(4):519-525.

[1]Plant Sciences Department, Biological Sciences Faculty, Kharazmi University, Tehran, Iran
[2]Agriculture Institute, Iranian Research Organization for Science and Technology (IROST), Tehran, Iran

Correspondence
Address: Plant Sciences Department, Biological Sciences Faculty, Kharazmi University, Tehran, Iran. Postal Code: 1571914911
Phone: +98 (21) 88329220
Fax: +98 (21) 88329220
najafi_f@khu.ac.ir

Article History
Received: April 10, 2018
Accepted: March 18, 2019
ePublished: December 21, 2019

ABSTRACT

The high quality and quantity of extracted DNA are necessary for a variety of molecular biology studies. Low yields and poor quality of genomic DNA extracted from petal due to high levels of secondary metabolites. Carotenoids, anthocyanins, phenolic acids, and flavonoids are the most effective secondary metabolites in petals, which are considered as contaminating compounds and could lead to interfering with DNA during extraction and purification. Considering that the basis of the most molecular research in genetic engineering and genomics is high-quality of DNA, therefore, it seems that finding an efficient method for reducing adverse effects of these contaminating compounds for the extraction is essential. In this regard, iron-magnetic nanoparticles have been used to improve the extraction of high yields and quality of DNA from rose petals in the present work. In the following, to compare the efficiency of DNA extraction, modified Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide (CTAB) and rapid detection methods were used. The results showed that petal's extracted DNA quantification and qualification by iron-magnetic nanoparticles procedure was much more reliable than two other methods. In addition, this method could extract the optimal amount of DNA with the lowest amounts of samples within few minutes. Due to high qualification and quantification of DNA purification by iron-magnetic nanoparticles, the present procedure could be recommended as an efficient protocol for rose petal DNA extraction.

Keywords DNA; Extraction; Petal

CITATION LINKS

[1] Optimization of DNA extraction for ISSR studies in Tectona grandis L.f.-an important forest tree species [2] Comparison of three genomic DNA extraction methods to obtain high DNA quality from maize [3] A rapid efficient method for DNA isolation from plants with high levels of secondary metabolites [4] DNA extraction protocol for plants with high levels of secondary metabolites and polysaccharides without using liquid nitrogen and phenol [5] Validation of a simple and rapid method for isolating genomic DNA from medicinal and aromatic plants for subsequent polymerase chain reaction [6] Plant genomic DNA isolation: An art or a science [7] DNA, RNA, and protein extraction: The past and the present [8] A modified mini-prep method for economical and rapid extraction of genomic DNA in plants [9] Isolation and analysis of high quality nuclear DNA with reduced organellar DNA for plant genome sequencing and resequencing [10] A simple protocol for isolating genomic DNA from chestnut rose (Rosa roxburghii Tratt) for RFLP and PCR analyses [11] An efficient protocol for genomic DNA extraction from Citrus species [12] Application of PCR-based methods for rapid detection of corn ingredients in processed foods [13] A modified CTAB method for DNA extraction from soybean and meat products [14] A simple and rapid leaf genomic DNA extraction method for polymerase chain reaction analysis [15] Magnetic nano fluids for isolation of genomic DNA and total RNA from various prokaryote and eukaryote cells [16] An improved method for isolation of total DNA from the leaves of Fragaria spp [17] Metabolite production and antibacterial activities of callus cultures from rosa damascena mill [18] Comparison and improvement of different methods of RNA isolation from strawberry (Fragria× ananassa) [19] Identification of superior reference genes for data normalisation of expression studies via quantitative PCR in hybrid roses (Rosa hybrida) [20] Surface modification of magnetic silica microspheres and its application to the isolation of plant genomic nucleic acids [21] Magnetic nanoparticles: From design and synthesis to real world applications [22] Magnetic particles for the separation and purification of nucleic acids

Copyright© 2019, TMU Press. This open-access article is published under the terms of the Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International License which permits Share (copy and redistribute the material in any medium or format) and Adapt (remix, transform, and build upon the material) under the Attribution-NonCommercial terms.

www.SID.ir

Archive of SID

مقایسه کارآیی نانوذرات مغناطیسی آهن با روش‌های CTAB و تشخیص سریع برای استخراج DNA از گلبرگ گل سرخ رقم "Vendetta"

فائزه خاتمی PhD
گروه علوم گیاهی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه خوارزمی، تهران، ایران
فرزانه نجفی* PhD
گروه علوم گیاهی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه خوارزمی، تهران، ایران
فتانه یاری PhD
پژوهشکده کشاورزی، سازمان پژوهش‌های علمی وصنعتی ایران، تهران، ایران
رمضانعلی خاوری‌نژاد PhD
گروه علوم گیاهی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه خوارزمی، تهران، ایران

چکیده
استخراج DNA با کیفیت و کمیت عالی برای بسیاری از مطالعات بیولوژی مولکولی ضروری است. DNA استخراج‌شده از بافت گلبرگ به خاطر محتوای فراوان متابولیت‌های ثانویه از کمیت و کیفیت مطلوبی برخوردار نیست. کاروتنوئیدها، آنتوسیانین‌ها، فنولیک‌اسیدها و فلاونوئیدها، موثرترین متابولیت‌های ثانویه موجود در گلبرگ به‌عنوان آلودگی در نظر گرفته می‌شوند و در فرآیند استخراج و تخلیص DNA اختلال ایجاد می‌نمایند. با توجه به این که مبنای بسیاری از تحقیقات مولکولی در مهندسی ژنتیک و ژنومیکس، وجود DNA با کیفیت بالا است، بنابراین یافتن روشی کارآمد برای کاهش اثرات منفی این ترکیبات در فرآیند استخراج ضروری به نظر می‌رسد. در همین راستا نانوذرات مغناطیسی آهن برای بهبود استخراج DNA با کمیت و کیفیت عالی از بافت گلبرگ گل سرخ در این پژوهش استفاده شده است. در ادامه به‌منظور مقایسه کارآیی استخراج DNA، از روش‌های ستیل‌تری‌متیل‌اتیل‌آمونیوم‌بروماید (CTAB) بهینه شده و روش تشخیص سریع استفاده شد. نتایج نشان داد که کمیت و کیفیت DNA استخراج‌شده از گلبرگ با استفاده از روش نانوذرات مغناطیسی آهن در مقایسه با دو روش دیگر قابل اعتمادتر بود. علاوه براین، این روش قادر به استخراج مقدار مطلوب DNA، با کمترین میزان نمونه در طی چند دقیقه است. با توجه به کیفیت وکمیت DNA استخراج‌شده با نانوذرات مغناطیسی آهن، این روش به‌عنوان یک پروتکل کارآمد برای استخراج DNA از گلبرگ گل سرخ توصیه می‌شود.

کلیدواژه‌ها: DNA، استخراج، گلبرگ

تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۱/۲۱
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۱۲/۲۷
*نویسنده مسئول: najafi_f@khu.ac.ir

مقدمه

شرط موفقیت در هر رشته علمی منوط به در دسترس‌بودن تکنیک‌ها و روش‌های جدید و کارآمد در آن رشته است. به لحاظ اهمیت روزافزون مباحث مولکولی در جهان امروز، استخراج DNA ژنومی خالص، پایدار و با کمیت و کیفیت مناسب، اولین و مهم‌ترین گام در بسیاری از تحقیقات بیولوژیکی و ژنتیکی به‌ویژه توالی‌یابی ژنومی، تعیین ژنوتیپ و شناسایی موتاسیون‌ها است[1]. بنابراین در سال‌های اخیر با پیشرفت روش‌های مولکولی، در اکثر آزمایشگاه‌های معتبر علوم زیستی دنیا تحقیقاتی برای خالص‌سازی DNA ژنومی به‌منظور بالابردن کمیت و کیفیت آن انجام شده است. اگرچه تنوع ژنتیکی و تفاوت‌های ناشی از آن، مانع از کارآیی کاملاً موفق یک شیوه بوده و همچنان بهینه‌سازی روش‌ها با توجه به نوع و بافت گونه گیاهی ضروری به نظر می‌رسد. به‌ویژه عواملی از قبیل آلودگی ناشی از پلی‌ساکاریدها و متابولیت‌های ثانویه از جمله کاروتنوئیدها، آنتوسیانین‌ها، پلی‌فنول‌ها و فلاونوئیدها سبب کاهش کمیت و کیفیت DNA ژنومی استخراجی و پایین‌آمدن کارآیی تحقیقات انجام‌شده بر مبنای آن شده و هنگام استخراج DNA بر اثر اتصال قوی بین اسیدهای نوکلئیک با متابولیت‌های ثانویه و پلی‌ساکاریدها، ادامه روند فرآیند استخراج با اختلال مواجه می‌شود[2-5]. همچنین گزارش شده است ترکیبات پلی‌فنولی اکسیدشده به‌صورت کووالانسی با DNA پیوند داده، سبب تغییر رنگ آن به قهوه‌ای شده و مدت‌زمان نگه‌داری نمونه را به‌شدت کاهش می‌دهد[6]. مشاهده شده است که حضور این ترکیبات در نمونه DNA سبب ممانعت از فعالیت آنزیم تک‌پلیمراز و آنزیم‌های برشی شده و نیز به هنگام تخلیص و استخراج DNA همراه با آن رسوب کرده و سبب ویسکوزیته بالای محلول می‌شوند[7-9].

روش‌های متعددی برای استخراج DNA از گیاهان دارای مقادیر بالای پلی‌ساکارید و متابولیت‌های ثانویه گزارش شده است که اگرچه DNA حاصله از کمیت و کیفیت مناسبی برخوردار است ولی در عین حال روش‌هایی هزینه‌بر و زمان‌بر هستند و کارآیی این روش‌ها در گیاهان و بافت‌های مشابه به بررسی تکمیلی نیاز دارد[2, 4, 6, 10]. گل سرخ (*Rosa hybrida* L.) نیز از دسته گیاهان مذکور بوده و حاوی مقدار زیادی پلی‌ساکارید، پلی‌فنول و دیگر متابولیت‌های ثانویه است که دستیابی به اسیدهای نوکلئیک با خلوص بالا به‌ویژه از بافت گلبرگ را بسیار محدود کرده است[10]. بنابراین هدف از این پژوهش معرفی روشی مناسب، آسان، کم‌هزینه باکیفیت مطلوب و پایداری بالا به‌منظور استخراج DNA از نمونه‌های گلبرگ گل سرخ بوده است. بدین‌منظور، روش‌های استخراج DNA با استفاده از هم‌رسوبی با نانوذرات مغناطیسی آهن، CTAB [11-13] و روش تشخیص سریع[14] مورد ارزیابی قرار گرفتند.

مواد و روش‌ها

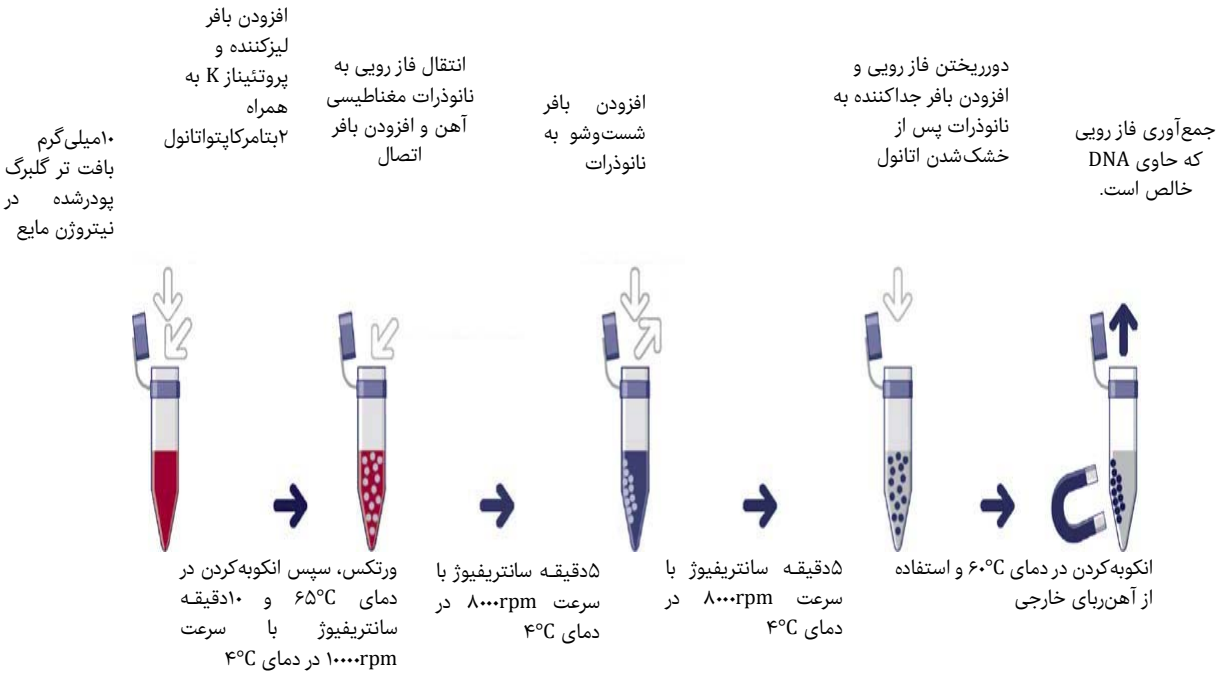
مواد گیاهی: گل‌ها از پایه‌های یکساله گل‌های سرخ شاخه‌بریده رقم "Vendetta" از گلخانه پژوهشی سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران با دمای ۲۵±۲°C و رطوبت نسبی ۵±۷۰% با دوره نوری ۱۶ساعت روشنایی تهیه شدند.

خالص‌سازی DNA ژنومی با کاربرد نانوذرات مغناطیسی آهن از بافت گلبرگ: طبق دستورالعمل کیت GABIT با شماره ثبت اختراع ۸۹۴۵۷، DNA ژنومی استخراج شد[15]. ۱۰میلی‌گرم از بافت تر گلبرگ در هاون به کمک نیتروژن مایع کاملاً آسیاب شده و به تیوب‌های استریل انتقال داده شد. سپس مطابق با پروتکل بافر لیزکننده (گوانیدین‌تیوسیانات، تریس‌هیدروکلراید، اتیلن‌دی‌آمین‌تترا استیک‌اسید، تریتون X-100، سدیم‌کلراید،

www.SID.ir

Archive of SID

پتاسیم‌استات، ان‌لوریل سارکوزیل، سدیم‌سیترات، سدیم‌استات، پلی‌وینیل‌پیرولیدون، گلوکز، دی‌اتیل‌پیروکربنات، میزان Ph برابر با ۳/۵) اضافه شد. به دنبال آن پروتئیناز K (۲میلی‌گرم بر میلی‌لیتر)، همراه با ۲- بتامرکاپتواتانول به مخلوط اضافه و ورتکس شد. در ادامه نمونه‌ها در دمای ۶۵°C انکوبه و سپس به‌مدت ۱۰دقیقه با سرعت ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه در دمای ۴°C سانتریفیوژ (Centric CF108GR) شدند. پس از اتمام سانتریفیوژ محلول رویی به نانوذرات مغناطیسی آهن منتقل شد. منظور از نانوذرات مغناطیسی، نانوذرات آهن (Fe_3O_4) در حضور اسیداولئیک و تووین ۲۰ است. در ادامه نانوذرات مغناطیسی آهن به‌آرامی مخلوط شده تا به‌طور کامل در محلول معلق شوند. در این مرحله بافر اتصال (پلی‌اتیلن‌گلیکول، سدیم‌کلراید، دی‌اتیل‌پیروکربنات) اضافه و به‌شدت مخلوط شد تا به‌طور کامل نانوذرات مغناطیسی آهن در محلول پخش شوند. سپس به‌مدت ۵دقیقه با سرعت ۸۰۰۰ دور در دقیقه در دمای ۴°C سانتریفیوژ صورت گرفت و فاز رویی دور ریخته شد. در ادامه بافر شست‌وشو (گوانیدین‌هیدروکلراید، تریس‌هیدروکلراید، اتیلن‌دی‌آمین تترا استیک‌اسید، اتانول مطلق، دی‌اتیل پیروکربنات، با میزان pH برابر با ۵/۶) به نانوذرات مغناطیسی آهن اضافه و خوب مخلوط شد. پس از سانتریفیوژ مجدد به‌مدت ۵دقیقه با سرعت ۸۰۰۰ دور در دقیقه در دمای ۴°C، فاز رویی دور ریخته شد و ویال حاوی نانوذرات مغناطیسی آهن به حالت برعکس به‌مدت ۱۰دقیقه قرار داده شد تا اتانول آن خشک شود. در این مرحله بافر جداکننده (تریس‌هیدروکلراید، اتیلین‌دی‌آمین تترا استیک‌اسید، دی‌اتیل پیروکربنات، با میزان pH برابر با ۸/۹) به نانوذرات مغناطیسی آهن اضافه شد، به‌طوری که نانوذرات در آن به‌طور کامل معلق شده و سپس تیوب در دمای ۶۰°C انکوبه شد و با استفاده از یک آهن‌ربای خارجی، نانوذرات مغناطیسی آهن بی‌حرکت شد و فاز رویی که حاوی DNA بود، جمع‌آوری، سپس به تیوب‌های استریل جدید منتقل و در دمای ۲۰°C- نگهداری شد (شکل ۱).



شکل ۱) مسیر شماتیک استخراج و تخلیص DNA با کاربرد نانوذرات مغناطیسی آهن

استخراج DNA با استفاده از روش تشخیص سریع: ۴۰میلی‌گرم بافت تر گلبرگ در دمای اتاق با سمبه استریل‌شده درون تیوب‌های استریل له شد و سپس ۵۰۰میکرولیتر بافر استخراجی (سدیم‌دودسیل‌سولفات ۰/۵%، EDTA ۲۵میلی‌مولار، سدیم‌کلرید ۲۵۰میلی‌مولار، ۲۰۰میلی‌مولار تریس- HCl با میزان pH برابر با ۷/۵) به آنها افزوده شد[14]. در ادامه تیوب‌ها حاوی نمونه و بافر در دمای ۶۰°C به‌مدت ۳۰دقیقه انکوبه شدند. سپس هم‌حجم آن کلروفرم- ایزوآمیل‌الکل (۲۴:۱) به عصاره افزوده شد. به دنبال آن نمونه‌ها به‌مدت ۵دقیقه با سرعت ۱۵۰۰۰ دور در دقیقه در دمای ۴°C سانتریفیوژ و فاز رویی به میکروتیوب جدید منتقل شد. در ادامه هم‌حجم آن ایزوپروپانول افزوده و مخلوط شد. سپس نمونه‌ها برای مدت ۳۰دقیقه در دمای ۲۰°C- انکوبه شدند. مجدداً سانتریفیوژ به‌مدت ۵دقیقه با سرعت ۱۵۰۰۰ دور در دقیقه در دمای ۴°C صورت پذیرفت و رسوب ایجادشده در ۱۰۰میکرولیتر بافر TE حل شد. در ادامه نمونه‌ها به‌مدت ۵دقیقه روی یخ نگه‌داری شدند و در این مرحله مجدداً سانتریفیوژ به‌مدت ۲دقیقه با سرعت ۱۵۰۰۰ دور در دقیقه در دمای ۴°C انجام و محلول رویی را که حاوی DNA است در دمای ۲۰°C- نگه‌داری شد.

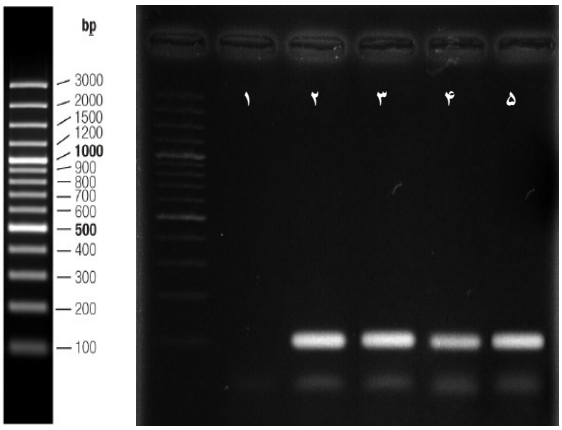
www.SID.ir

Archive of SID

استخراج DNA با استفاده از روش CTAB: در این روش برای استخراج از ۱۰۰میلی‌گرم بافت تر گلبرگ از شیوه بهینه‌شده ستیل‌تری‌متیل اتیل‌آمونیوم‌بروماید (CTAB) استفاده شد[11-13]. به‌طور خلاصه بافت گیاهی مذکور در هاون به کمک نیتروژن مایع کاملاً آسیاب شده و به تیوب‌های استریل انتقال داده شد. سپس ۷۰۰میکرولیتر بافر CTAB به نمونه‌ها افزوده و در ادامه استخراج به کمک ۲۰میکرولیتر بتامرکاپتواتانول انجام و نمونه‌ها در دمای ۵۵°C برای مدت ۶۰دقیقه انکوبه شدند و در این مدت هر ۵دقیقه یکبار سر و ته می‌شدند. سپس خروج تیوب‌ها از حمام آب گرم و خنک‌کردن آنها در دمای اتاق صورت گرفت. در ادامه استخراج به کمک ۷۰۰میکرولیتر کلروفرم- ایزوآمیل‌الکل (۲۴:۱) تکمیل شد. سپس سانتریفیوژ به‌مدت ۱۵دقیقه با سرعت ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه در دمای ۴°C صورت پذیرفت (امکان تکرار سانتریفیوژ، وابسته به درجه شفافیت فاز رویی است). سپس ۷۰۰میکرولیتر ایزوپروپانول سرد به فاز رویی افزوده و تیوب‌ها به‌مدت ۲ساعت در یخچال ۴°C نگه‌داری شدند. سپس سانتریفیوژ به‌مدت ۱۵دقیقه با سرعت ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه در دمای ۴°C صورت گرفت. نهایتاً فاز رویی دور ریخته شد و سپس تیوب‌ها دو مرتبه با اتانول ۷۰% شسته شدند. سپس به‌منظور حذف کامل اتانول، تیوب‌های حاوی DNA به حالت برعکس به‌مدت ۱۰دقیقه در دمای اتاق قرار گرفتند تا کاملاً خشک شوند و رسوب ایجادشده در ۱۰۰میکرولیتر بافر TE حل و در انتها DNA حاصله در ۲۰°C- نگهداری شد.

بررسی کیفیت و کمیت DNA: برای بررسی کیفیت DNAهای استخراج‌شده، از ژل آگارز ۱% و عکس‌برداری در دستگاه ژل‌داک و به‌منظور تعیین کمیت آن از اسپکتروفتومتر Eppendorf BioPhotometer ®D30 با اندازه‌گیری میزان جذب نوری ۲۶۰ به ۲۸۰ و ۲۶۰ به ۲۳۰نانومتر استفاده و غلظت براساس نانوگرم در میکرولیتر خوانده شد. در ادامه با استفاده از نرم‌افزار AlleleID به‌منظور طراحی آغازگرهای مناسب رفت (CCACCTACACCAATCTCAATC) و برگشت (CTGAATGTGGATGTGACTGAG) ۲۱نوکلئوتیدی از بانک ژن NCBI (http://www.ncbi.nlm.nih.gov) برای تکثیر ژن خانه‌دار آلفاتوبولین (۹۸جفت‌باز) با لوکوس شناسایی AF394915 واکنش زنجیره‌ای پلیمراز انجام شد (شکل ۲). واکنش زنجیره‌ای پلیمراز شامل مرحله واسرشت‌سازی اولیه در ۹۴°C به‌مدت ۲دقیقه، ۳۵ سیکل شامل واسرشت‌سازی، ۹۴°C به‌مدت ۳۰ثانیه، اتصال پرایمر، ۵۹°C به‌مدت ۳۰ثانیه و بسط پرایمر، ۷۲°C به‌مدت ۳۰ثانیه و مرحله بسط نهایی ۷۲°C به‌مدت ۵دقیقه بود.

تجزیه‌های آماری: داده‌های حاصل توسط نرم‌افزار SAS 9.1 براساس واریانس یک‌طرفه مورد تجزیه قرار گرفتند و همچنین مقایسه میانگین با استفاده از آزمون چنددامنه‌ای دانکن انجام شد. قابل ذکر است کلیه آزمایش‌ها در سه تکرار انجام و نتایج با استفاده از نرم‌افزار اکسل ۲۰۱۶ رسم شد.



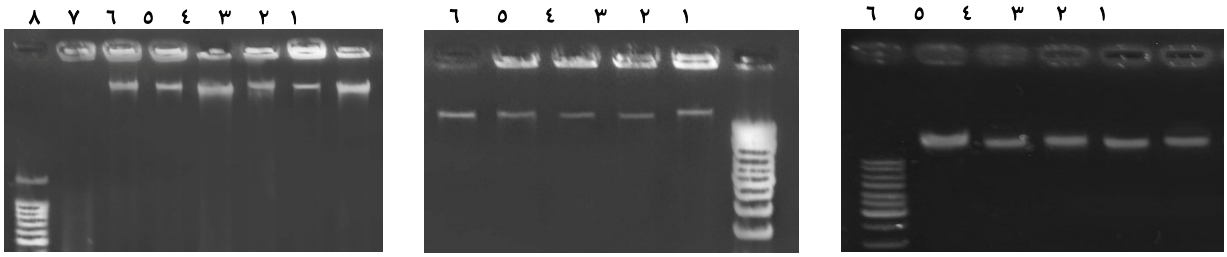
شکل ۲) الکتروفورز ژل آگارز محصول آزمون PCR، DNA ژنومی استخراج‌شده از گل سرخ رقم "Vendetta" با استفاده از روش نانوذرات مغناطیسی آهن با پرایمرهای ژن کنترل داخلی روی ژل آگارز ۱%؛ چاهک ۱: کنترل منفی (آب)- چاهک‌های ۲-۵: آلفاتوبولین، ۹۸جفت‌باز

نتایج و بحث

سنجش کمی و کیفی DNA حاصل از نمونه‌های گلبرگ گل سرخ براساس سه روش به‌کاربرده‌شده توسط اسپکتروفتومتر و الکتروفورز ژل آگارز ۱% آنالیز و نتایج به‌ترتیب در نمودار ۱ و ۳ ذکر شده‌اند. در سنجش کیفی DNAهای استخراجی سه روش مذکور نمونه‌های DNA حاصل از روش هم‌رسوبی با نانوذرات مغناطیسی آهن باندهای واضح و بدون اسمیری را نشان دادند، در حالی که باندهای نمونه‌های حاصل از دو روش دیگر از وضوح خوب و مطلوبی برخودار نبودند (شکل ۳). اگرچه تصویر ژل آگارز به‌تنهایی برای نتیجه‌گیری صحیح گویا نیست. با این حال، وضوح وکیفیت باندهای استخراج DNA در روش تشخیص سریع در مقایسه با روش CTAB بهتر بود. در ادامه برای حصول نتیجه قابل اعتمادتر از سنجش کمی داده‌ها از روش اسپکتروفتومتری استفاده شد. سنجش کمی DNAهای استخراج‌شده توسط اسپکتروفتومتر نشان دادند که بیشترین میزان DNA به‌دست‌آمده از گلبرگ گل سرخ توسط روش نانوذرات مغناطیسی آهن است که با میزان DNA به‌دست‌آمده توسط دو روش دیگر اختلاف معنی‌داری را نشان داد (جدول ۱ و نمودار ۱- الف). همچنین نسبت‌های جذب نوری ۲۶۰ به ۲۳۰ در روش هم‌رسوبی با نانوذرات (۱/۹۹)، با روش تشخیص سریع (۱/۳۸) و همینطور روش CTAB (۰/۹۸) و جذب نوری ۲۶۰ به ۲۸۰ در روش هم‌رسوبی با نانوذرات (۱/۹۸)، با روش تشخیص سریع (۱/۳۳) و همینطور روش CTAB (۰/۹۶) اختلاف معنی‌داری ($p\leq$۰/۰۱) را نشان دادند (جدول ۱ و نمودار ۱- ب و ج). شایان ذکر است که اعداد گزارش‌شده بیانگر آن است که روش هم‌رسوبی با نانوذرات مغناطیسی آهن تا حد قابل توجهی توانسته است میزان آلودگی‌ها را به هنگام استخراج کاهش دهد و درنهایت کیفیت DNA استخراجی بسیار مطلوب است.

www.SID.ir

Archive of SID



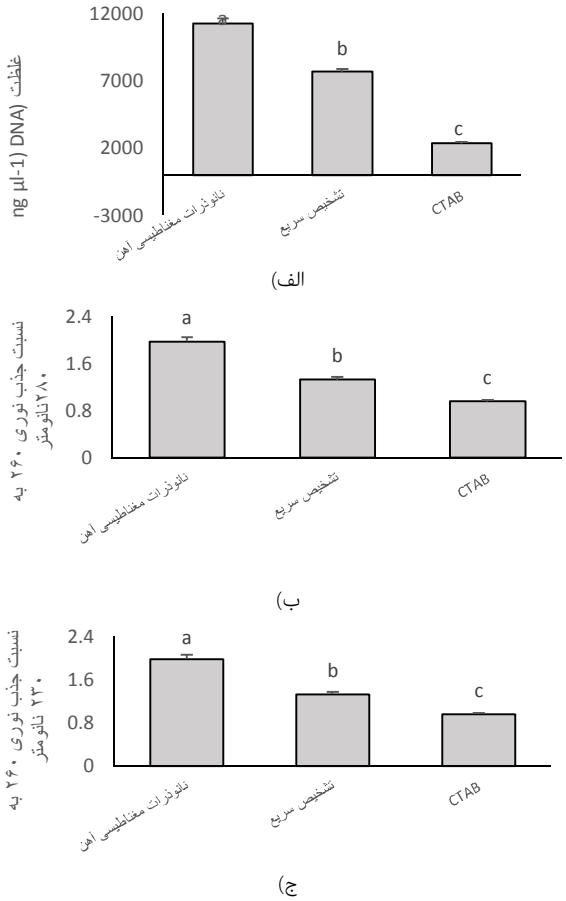
الف) ب) ج)

شکل ۳) الکتروفورز ژل آگارز DNA گلبرگ گل سرخ با روش‌های مختلف الف) نانوذرات مغناطیسی آهن، ب) CTAB و ج) تشخیص سریع

جدول ۱) تجزیه واریانس اثر نوع روش استخراج بر میزان غلظت DNA و نسبت جذب ۲۶۰ به ۲۳۰ و ۲۶۰ به ۲۸۰نانومتر در گلبرگ گل سرخ رقم "Vendetta"

منابع تغییر	درجه آزادی	میانگین مربعات			
		غلظت DNA	نسبت جذب ۲۶۰ به ۲۳۰	نسبت جذب ۲۶۰ به ۲۸۰
نوع روش استخراج	۲	۱۰۰۵۳۱۴۰۶/۶*	۰/۰۱۶۹**	۰/۷۶۸**
خطا	۱۲	۱۲۱۷۵۷۱۱/۵	۰/۰۱۴۹	۰/۰۰۰۷
ضریب تغییرات	-	۱۴/۲۰	۷/۴۸	۲/۰۰۵

**نشان‌دهنده معنی‌داربودن اختلاف در سطح احتمال ۱٪ است.



نمودار ۱) مقایسه کمیت DNA استخراج‌شده از گلبرگ گل سرخ رقم "Vendetta"، الف) براساس غلظت (نانوگرم بر میکرولیتر)، ب) نسبت جذب نوری ۲۶۰ به ۲۸۰نانومتر و ج) نسبت جذب نوری ۲۶۰ به ۲۳۰نانومتر با استفاده از سه روش استخراجی؛ داده‌ها نماینده سه تکرار مستقل هستند. حروف متفاوت نشان‌دهنده معنی‌داربودن تفاوت در سطح $p\leq$۰/۰۱ است.

تخلیص و استخراج DNA ژنومی از نمونه‌های بیولوژیکی با کمیت و کیفیت مطلوب یک مرحله اساسی در بسیاری از زمینه‌های تحقیقاتی در علوم زیستی است[2]. در پژوهش حاضر نیز استخراج DNA مطلوب و با کیفیت از گلبرگ‌های گل سرخ به‌منظور انجام دست‌ورزی‌های ژنتیکی و تایید مولکولی در پژوهش‌های آتی از اهمیت ویژه‌ای برخوردار بود. استخراج DNA و سپس انجام واکنش‌های متعاقب آن، به‌منظور آنالیزهای مولکولی از بافت گلبرگ گل سرخ به‌علت داشتن متابولیت‌های ثانویه (کاروتنوئیدها، آنتوسیانین‌ها، پلی‌فنول‌ها و فلاونوئیدها) و پلی‌ساکاریدهای فراوان معمولاً مشکل است[16-18]. بنابراین روشی برای استخراج DNA با کیفیت و کمیت بالا از بافت گلبرگ مورد نیاز است که میزان اتلاف زمان، هزینه و انرژی را در استخراج DNA به حداقل برساند. همچنین بررسی کیفیت بیان ژن به کمک واکنش زنجیره‌ای پلیمراز، از شناخته‌شده‌ترین تکنیک تا به امروز است و ژن خانه‌دار آلفاتوبولین، از بهترین گزینه‌ها به‌منظور مطالعات مولکولی در گل سرخ بوده است[19]. بدین‌ترتیب بهینه‌سازی مطالعات پایه در این پژوهش بر مبنای این ژن انجام شد. در این مطالعه علاوه بر مقایسه دو روش متداول استخراج DNA، CTAB [11-13] و روش تشخیص سریع[14]، روش هم‌رسوبی با نانوذرات مغناطیسی آهن به‌منظور استخراج DNA با کیفیت و کمیت بالا از گلبرگ‌های گل سرخ معرفی شده است. همانطور که نتایج نشان دادند DNA استخراجی توسط روش پیشنهادی این مقاله که بر پایه روش هم‌رسوبی با نانوذرات مغناطیسی آهن است، کیفیت و کمیت مطلوب‌تری دارد. اگرچه در روش مرسوم CTAB، گسیختن سلول‌ها و حذف آلودگی‌های پروتئینی و لیپیدی توسط CTAB در محلول صورت می‌گیرد و نیز در غلظت بالای نمک، به پلی‌ساکاریدها متصل و آنها را از محلول جدا می‌کند؛ اما دارای مشکلاتی همچون به‌کارگیری ترکیبات شیمیایی سمی (مثل فنول، کلروفرم و ایزوآمیل‌الکل)، سخت و زمان‌بربودن فرآیند استخراج است[20]. مزیت روش تشخیص سریع[14] به روش مرسوم CTAB، قابلیت استفاده از مواد گیاهی اندک (۴۰میلی‌گرم) به‌منظور کاهش مواد بازدارنده همچون کاروتنوئیدها، آنتوسیانین‌ها، پلی‌فنول‌ها، فلاونوئیدها و پلی‌ساکاریدها است که سبب حذف بهتر این ترکیبات به هنگام استخراج DNA از نمونه‌ها می‌شود. همچنین این روش توانایی

www.SID.ir

Archive of SID

استخراج DNA از تعداد زیادی نمونه در مدت زمان بسیار کوتاه را بدون استفاده از نیتروژن مایع دارد. در سال‌های اخیر روش‌های استخراج DNA براساس فاز جامد (روش هم‌رسوبی با نانوذرات مغناطیسی آهن) جایگزین روش‌های استخراج براساس فاز مایع (روش CTAB و روش تشخیص سریع) شده‌اند[20, 21].

از مزایای روش استخراج براساس هم‌رسوبی با نانوذرات مغناطیسی آهن در مقایسه با دو روش به‌کاررفته، می‌توان به عدم استفاده از ترکیبات شیمیایی سمی، قابلیت استفاده از مواد گیاهی بسیار اندک (۱۰میلی‌گرم)، اندازه یکنواخت نانوذرات و ظرفیت بالای اتصال مستقیم نانوذرات به DNA به‌دلیل پوشش خاص و بار مغناطیسی مثبت، کاهش میزان شکستگی رشته‌های DNA و در نتیجه حذف سایر مواد بازدارنده، همچنین پاسخ مغناطیسی بسیار سریع نانوذرات به آهن‌ربا به‌دلیل اندازه بسیار کوچک آن و افزایش کارآیی کمی و کیفی استخراج DNA اشاره نمود[19]. همچنین، پوشش پلیمری به‌کاررفته روی نانوذرات مغناطیس، موجب حفظ هسته و خواص مغناطیسی آن و عمل‌گراکردن نانوذرات می‌شود. مدت‌زمان کوتاه استخراج و هزینه اندک خالص‌سازی از دیگر مزیت‌های این روش نسبت به دو روش دیگر مورد استفاده است[20-22].

در استخراج و تخلیص DNA به روش هم‌رسوبی با نانوذرات مغناطیسی آهن از ذرات نانو با پوشش خاص به‌عنوان سطح جامد برای جداسازی و جذب DNA از سایر مواد در محیط استفاده می‌شود. به این صورت که در ابتدا دیواره و غشای سلول با به‌کاربردن بافرهای مناسب شکسته می‌شوند. سپس ذرات نانو به محیط اضافه شده و با اضافه‌کردن بافر اتصال شرایط محیطی برای اتصال DNA به سطح ذرات نانو فراهم می‌شود. درنهایت شست‌وشوی DNA متصل به ذرات به کمک بافر شست‌وشو انجام می‌شود. پس از خشک‌شدن رسوب ذرات نانو، بافر جداکننده اضافه می‌شود. شرایط موجود در این بافر موجب می‌شود که DNA از ذرات نانو جدا شده و با حذف ذرات نانو از محیط توسط آهن‌ربا، DNA به‌صورت روشناور خالص در دسترس قرار گیرد[15]. مزیت عمده نانوذرات آهن قابلیت استفاده مجدد آنها پس از چندین بار تکرار (حدوداً ۸-۹ مرتبه) و دارابودن همان درصد تخلیص اولیه است، به‌گونه‌ای که با یک شست‌وشوی ساده همان کارآیی اولیه را برای خالص‌سازی پیدا می‌کنند[15]. بنابراین روش هم‌رسوبی با نانوذرات مغناطیسی آهن علاوه بر توانایی استخراج DNA با خلوص بالا، با حفظ تمامیت و کمترین شکستگی، در مدت‌زمان کوتاه با هزینه اندک و نیز مقدار بسیار کم نانورزین مورد نیاز، عدم نیاز به فعال‌نمودن آن و به حالت سوسپانسیون درآوردن نانورزین به‌منظور جذب اسیدهای نوکلئیک، همچنین سازگار با محیط زیست به‌دلیل عدم به‌کارگیری ترکیبات سمی به‌منظور استفاده ایمن و بسیار کارا در آزمایشگاه‌های تحقیقاتی توصیه می‌شود[15].

در انتها قابل ذکر است که اهمیت این روش بیشتر بومی بودن آن است و این مهم گامی بزرگ در مسیر قطع وابستگی‌ها است. ساخت نانوذرات مغناطیسی آهن در شرایط تحریم، نشان‌دهنده تلاش محققان ایرانی در راستای تولید مواد مورد نیاز کشور و تلاش در مسیر پیشرفت و اعتلای کشور مقدس جمهوری اسلامی ایران است. از محدودیت‌های مطالعه حاضر می‌توان به ساخت نانوذرات مغناطیسی آهن در شرایط تحریم اشاره نمود. پیشنهاد می‌شود که روش هم‌رسوبی با نانوذرات مغناطیسی آهن به‌منظور استخراج DNA با خلوص بالا در سایر حوزه‌ها همچون مهندسی ژنتیک، پزشکی، پزشکی قانونی، تشخیص هویت، تشخیص بیماری‌های نادر، صنایع غذایی، دارویی و کشاورزی در سطح کشور مورد استفاده قرار گیرد.

نتیجه‌گیری

بنابراین روش هم‌رسوبی با نانوذرات مغناطیسی آهن علاوه بر توانایی استخراج DNA با خلوص بالا، با حفظ تمامیت و کمترین شکستگی، در مدت زمان کوتاه با هزینه اندک و نیز مقدار بسیار کم نانورزین مورد نیاز، عدم نیاز به فعال‌نمودن آن و به حالت سوسپانسیون درآوردن نانورزین به‌منظور جذب اسیدهای نوکلئیک، همچنین سازگار با محیط زیست به دلیل عدم به‌کارگیری ترکیبات سمی به‌منظور استفاده ایمن و بسیار کارا در ازمایشگاه‌های تحقیقاتی توصیه می‌شود[15]. در انتها قابل ذکر است که اهمیت این روش بیشتر بومی‌بودن آن است و این مهم گامی بزرگ در مسیر قطع وابستگی‌ها است. ساخت نانوذرات مغناطیسی آهن در شرایط تحریم، نشان‌دهنده تلاش محققان ایرانی در راستای تولید مواد مورد نیاز کشور و تلاش در مسیر پیشرفت و اعتلای کشور مقدس جمهوری اسلامی ایران است.

تشکر و قدردانی: بدین‌وسیله از دانشگاه خوارزمی و سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران برای حمایت از پژوهش حاضر قدردانی و تشکر می‌شود. همچنین از راهنمایی‌ها و کمک کارشناسان پژوهشکده ژنتیک و زیست‌فناوری کشاورزی طبرستان، دانشگاه کشاورزی و منابع طبیعی ساری کمال تشکر را داریم.

تاییدیه‌اخلاقی: مقاله حاضر توسط همه نویسندگان تایید شده و در نشریه دیگری به زبان فارسی، انگلیسی یا زبان دیگری چاپ نشده یا به‌طور همزمان برای نشریه دیگری ارسال نشده است.

تعارض منافع: نویسندگان اعلام می‌دارند هیچگونه تعارض منافعی وجود ندارد.

سهم نویسندگان: فائزه خاتمی (نویسنده اول)، پژوهشگر اصلی (۲۵%)؛ فرزانه نجفی (نویسنده دوم)، نگارنده مقدمه/روش‌شناس (۲۵%)؛ فتانه یاری (نویسنده سوم)، تحلیلگر آماری (۲۵%)؛ رمضانعلی خاوری نژاد (نویسنده چهارم)، نگارنده بحث (۲۵%)

منابع مالی: پژوهش حاضر با حمایت‌های مالی دانشگاه خوارزمی و سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران انجام شد.

منابع

1- Narayanan C, Dubey S, Wali SA, Shukla N, Kumar R, Mandal AK, et al. Optimization of DNA extraction for ISSR

www.SID.ir

Archive of SID

methods for rapid detection of corn ingredients in processed foods. Int J Nutr Food Sci. 2014;3(3):199-202.
13- Stefanova P, Taseva M, Georgieva T, Gotcheva V, Angelov A. A modified CTAB method for DNA extraction from soybean and meat products. Biotechnol Biotechnol Equip. 2013;27(3):3803-10.
14- Amani J, Kazemi R, Abbasi AR, Salmanian AH. A simple and rapid leaf genomic DNA extraction method for polymerase chain reaction analysis. Iran J Biotechnol. 2011;9(1):69-71.
15- Ghahari S, Ghahari S, Nematzadeh GA. Magnetic nano fluids for isolation of genomic DNA and total RNA from various prokaryote and eukaryote cells. J Chromatogr B. 2018;(1102-1103):125-34.
16- Cai BH, Zhang JY, Gao ZH, Qu SC, Tong ZG, Mi L, et al. An improved method for isolation of total DNA from the leaves of Fragaria spp. Jiangsu J Agric Sci. 2008;24(6);875-7.
17- Olgunsoy P, Ulusoy S, Akçay UÇ. Metabolite production and antibacterial activities of callus cultures from rosa damascena mill. petals. Marmara Pharm J. 2017;21(3):590-7.
18- Yu D, Tang H, Zhang Y, Du Z, Yu H, Chen Q. Comparison and improvement of different methods of RNA isolation from strawberry (Fragria× ananassa). J Agric Sci. 2012;4(7):51-6.
19- Klie M, Debener T. Identification of superior reference genes for data normalisation of expression studies via quantitative PCR in hybrid roses (Rosa hybrida). BMC Res Notes. 2011;4(1):518.
20- Zhang ZC, Yuan C, Wan QH. Surface modification of magnetic silica microspheres and its application to the isolation of plant genomic nucleic acids. Chin J Anal Chem. 2007;35(1):31-6.
21- Kudr J, Haddad Y, Richtera L, Heger Z, Cernak M, Adam V, et al. Magnetic nanoparticles: From design and synthesis to real world applications. Nanomaterials. 2017;7(9):243.
22- Berensmeier S. Magnetic particles for the separation and purification of nucleic acids. Appl Microbial Biotechnol. 2006;73(3):495-504.
studies in Tectona grandis L.f.-an important forest tree species. Afr J Biotechnol. 2006;5(13):1220-3.
2- Abdel-Latif A, Osman G. Comparison of three genomic DNA extraction methods to obtain high DNA quality from maize. Plant Methods. 2017;13:1.
3- Dehestani A, Kazemi Tabar SK. A rapid efficient method for DNA isolation from plants with high levels of secondary metabolites. Asian J Plant Sci. 2007;6(6):977-81.
4- Sahu SK, Thangaraj M, Kathiresan K. DNA extraction protocol for plants with high levels of secondary metabolites and polysaccharides without using liquid nitrogen and phenol. ISRN Mol Biol. 2012;2012:205049.
5- Kumar V, Prasad A, Roy Ch, Chattopadhyay T. Validation of a simple and rapid method for isolating genomic DNA from medicinal and aromatic plants for subsequent polymerase chain reaction. Int J Curr Microbiol App Sci. 2018;7(8):2562-6.
6- Varma A, Padh H, Shrivastava N. Plant genomic DNA isolation: An art or a science. Biotechnol J. 2007;2(3):386-92.
7- Tan SC, Yiap BC. DNA, RNA, and protein extraction: The past and the present. J Biomed Biotechnol. 2009;2009:574398.
8- Khan IA, Awan FS, Ahmad A, Khan AA. A modified mini-prep method for economical and rapid extraction of genomic DNA in plants. Plant Mol Biol Rep. 2004;22(1):89.
9- Lutz KA, Wang W, Zdepski A, Michael TP. Isolation and analysis of high quality nuclear DNA with reduced organellar DNA for plant genome sequencing and resequencing. BMC Biotechnol. 2011;11:54.
10- Xu Q, Wen X, Deng X. A simple protocol for isolating genomic DNA from chestnut rose (Rosa roxburghii Tratt) for RFLP and PCR analyses. Plant Mol Biol Rep. 2004;22(3):301-2.
11- Cheng YJ, Guo WW, Yi HL, Pang XM, Deng X. An efficient protocol for genomic DNA extraction from Citrus species. Plant Mol Biol Rep. 2003;21(2):177-8.
12- Gabriadze I, Kutateladze T, Vishnepolsky B, Karseladze M, Datukishvili N. Application of PCR-based

www.SID.ir