ایده های نوین در بهینه سازی روشهای مختلف استخراج DNA گیاه گز (Tamarix)

زهره مؤدب و مریم شهرکی

زابل-خیابان هیرمند-کوچه الغدیر-بن بست رو به روی دبستان ۱۲ فروردین-پلاک ۱۳

Z.moadab@yahoo.com

دانشگاه آزاد اسلامی واحد زاهدان

چکیده :

جنس Tamarix از تیره Tamaricaceae دارای ۲۳ گونه است. گونه های مورد بررسی در این پژوهش سه گونه ۱) گونه گز بومی سیستان T . serotina ۲) گونه گز شاهی یا کور گز (یا کرگز) T. aphylla ۳) گونه گز T . ramosissima می باشند. از آنجا که استخراج DNA اساس وپایه هرنوع تکنیک مولکولی می باشد ، لذا بهینه سازی روشی مناسب برای استخراج DNA امری ضروری است.در این پژوهش ۴ روش استخراج DNA (دلاپورتا، ادوارد، Grades، CTAB) فقط برای گونه T.serotina مقایسه گردید وبهترین روش (CTAB) برای دوگونه دیگرنیز اجرا گردید. پس ازاستخراج DNA ، کمیت و کیفیت نمونه ها با استفاده از الکتروفورز ژل آگارز و دستگاه بیوفتومتر تعیین شد. سپس با نمونه های تنظیم غلظت شده DNA و پرایمرهای نیمه تصادفی، PCR صورت گرفت و پرایمر های مناسب برای این نمونه ها مشخص گردید. بهترین باندهای DNA و بیشترین غلظتهای DNA از روش CTAB حاصل گشتند و بهترین پرایمر مورد استفاده ET_{36} تشخیص داده شد. نتایج تفاوت معنی داری را بین غلظتهای DNA درهر۴ روش استخراج و میزان OD_{280} / OD_{260} درهر ۴روش (که فقط برای گونه T.serotina اجرا گردید) نشان می دهد و همچنین تفاوت غیر معنی داری را بین غلظتهای DNA استخراجی به روش CTAB ،در هر سه گونه و میزان OD_{280} / OD_{260} درهر سه گونه نشان می دهد.

واژگان کلیدی :

استخراج DNA ، الکتروفورز ، PCR ، طرح کامل تصادفی ، بیوفتومتر ، پرایمر نیمه تصادفی

مقدمه :

گَز یا گِز درختی است کهن سال، این درخت به علت رسیدن ریشه‌اش به آب سطحی زمین عمر طولانی دارد .از شاخه‌های این درخت ماده‌ای به خارج ترشح می‌شود که به گز انگبین موسوم است و دارای ساکارز، موسیلاژ و پراکسیداز است . و به علت شور بودن برگهای آن فقط شتر و شترسانان از آن استفاده می‌کنند . شیرینی ای که در نواحی اصفهان و بلداجی به نام گز ساخته می‌شود نیز نام خود را از شهد ترشح یافته از پسیل گز که اختصاصا برروی این درختچه جایگیر می‌شود گرفته‌است . ارزش گز انگبین در این است که یکی از معدود قندهای فروکتوز به تنهایی در طبیعت می‌باشد . [1] با توجه به خصوصیات مطلوب گسترده این گیاه ، جهت استفاده بهینه از این خصوصیات نیاز به بررسی تکنیک های مولکولی آن احساس می شود . از آنجائیکه در برنامه های اصلاحی ، استخراج DNA یکی از ارکان اساسی پژوهش است لذا در این پژوهش به مقایسه روشهای استخراج DNA توسط PCR پرداخته شده است . معرفی یک روش مناسب برای استخراج DNA در کوتاه کردن زمان پروژه اصلاحی مؤثر است .

مواد و روشها :

با مراجعه به محل رویش گیاهان نسبت به جمع آوری نمونه های کامل ، سالم و عاری از بیماری های گیاهی اقدام گردید . از مناطق جنوبی اطراف شهر شیراز گونه T.ramosissma و از اطراف شهر زابل T. serotina و T.aphylla تهیه شدند .

برای مقایسه روشهای استخراج DNA گیاه گز (Tamarix) ، چهار روش مختلف از روشهای استخراج DNA در گیاهان انتخاب گردید و هر کدام از روشها با سه تکرار انجام شدند . این چهار روش استخراج DNAعبارت بودند از : دلاپورتا ، ادوارد ، Grade ، CTAB . هر ۴ روش استخراج برای گونه T.serotina اجرا گردیدند . سپس توسط الکتروفورز ژل آگارز کیفیت نمونه ها بررسی گردید و بهترین روش از نظر داشتن بهترین باندهای DNA انتخاب گشت . طبق بررسی های انجام شده بهترین روش CTAB تشخیص داده شد . سپس این روش برای استخراج DNA دو گونه دیگر نیز بکار گرفته شد که در این دو گونه نیز DNA هایی با باند دهی خوب ، طی استخراج به روش CTAB حاصل گردیدند . در تمام استخراج ها تکرارهایی که کمترین شکستگی DNA و حداقل ناخالصی را نشان می دادند ، برای PCR انتخاب گردیدند . قبل از انجام PCR باید غلظت DNA تعیین شود تا غلظتی مناسب از DNA برای PCR بکار برده شود ، که این کار توسط دستگاه بیوفتومتر صورت پذیرفت . طی انجام چند PCR با بکار گیری چند نوع پرایمر مختلف ، که پرایمرهای نیمه تصادفی بودند ، بهترین پرایمرها با باند دهی خوب انتخاب شدند .

نتایج و بحث :

با مقایسه مشاهده ای روشهای استخراج DNA در این گیاه روش ادوارد به عنوان راحت ترین و ارزانترین روش و CTAB به عنوان طولانی ترین روش در نظر گرفته شدند و برای مقایسه مقدار DNA استخراجی از تجزیه واریانس در قالب طرح کاملاً تصادفی استفاده شد .

غلظت ها ی DNA در ۴ روش استخراج که هر کدام در سه تکرار انجام شدند ، میانگین گیری شده و با استفاده از اعداد بدست آمده ، جدول تجزیه واریانس تشکیل شد. پس از مقایسه F حاصله با F جدول در سطوح ۵٪ و ۱٪ اختلاف معنی داری بین غلظتهای DNA برای ۴ روش استخراج (که فقط برای گونه T.serotina اجرا گردیدند) مشاهده شد :

SOV	DF	SS	MS	F
تیمار	۳	۳۲۳۳۰/۹۱	۱۰۷۷۶/۹۷	۲۵/۷۸**
خطا	۸	۳۳۴۴/۰۰	۴۱۸/۰۰	
کل	۱۱	۳۵۶۷۴/۹۱		

جدول ۱. تجزیه واریانس غلظت های DNA برای هر ۴ روش استخراج (در گونه T.Serotina)

برای غلظتهای DNA که استخراج آن به روش CTAB صورت گرفت نیز میانگین گیری و جدول تجزیه واریانس دیگری تشکیل شد و اختلاف غیر معنی داری بین غلظتهای DNA برای هر ۳ گونه مشاهده شد :

SOV	DF	SS	MS	F
تیمار	۲	۴/۲۲	۲/۱۱	۰/۲۵ n.s
خطا	۶	۵۰	۸/۳۳	
کل	۸	۵۴/۲۲		

جدول۲. تجزیه واریانس غلظت های DNA هر سه گونه (طی استخراج به روش CTAB)

برای مقایسه میانگین غلظت های DNA برای۴ روش استخراج (که فقط برای گونه T.serotina اجرا گردیدند) از آزمون دانکن استفاده شد آزمون مقایسه میانگین نشان داد که روشهای Grade ، ادوارد و دلاپورتا اختلافی نداشتند اما این۳ روش با روش CTAB اختلاف دارند:

CTAB	GRADE	دلاپورتا	ادوارد
۱۷۷/۶۷	۷۴/۳۳	۶۱/۳۳	۴۵
a	b		

نمودار ۱- **مقایسه میانگین غلظت های DNA برای هر ۴ روش استخراج (در گونه T.Serotina) به روش دانکن**

برای مقایسه کیفیت DNA حاصل از ۴روش استخراج (در گونه T.serotina) از طرح کاملاً تصادفی استفاده شد و مقادیر OD 260 / OD 280 این ۴ روش با هم مقایسه شدند که اختلاف بسیار معنی داری مشاهده شد :

SOV	DF	SS	MS	F
تیمار	۳	۰/۸۲	۰/۲۷	۸/۸۳**
خطا	۸	۰/۲۴	۰/۰۳	
کل	۱۱	۱/۰۷		

جدول ۳. تجزیه واریانس نسبت های OD 260 / OD 280 برای هر ۴ روش استخراج DNA (در گونه T. Serotina)

برای مقایسه OD 260 / OD 280 در هر سه گونه نیز جدول تجزیه واریانسی تشکیل شد . اختلاف غیر معنی داری مشاهده شد .

SOV	DF	SS	MS	F
تیمار	۲	۰/۰۰۹	۰/۰۰۴	۱/۵۲ n.s
خطا	۶	۰/۱۹۰	۰/۰۰۳	
کل	۸	۰/۰۲۹		

جدول ۵- تجزیه واریانس نسبت های OD 260 / OD 280 در هر سه گونه (طی استخراج به روش CTAB)

برای مقایسه کیفیت DNA حاصله از چهار روش استخراج از آزمون دانکن استفاده شد ونتایج نشان داد کـه OD 260 / OD 280 مربـوط به روشهای CTAB و ادوارد ، ادوارد و Grade ، Grade و دلاپورتا مشابه بوده و اختلافی ندارند .

CTAB	ادوارد	GRADE	دلاپورتا
۱/۸۷	۱/۶۰	۱/۳۰	۱/۱۹
a			
	b		
		c	

نمودار ۲- مقایسه میانگین نسبت های OD 260 / OD 280 برای هر ۴ روش استخراج DNA (در گونه T.Serotina) به روش دانکن

نتیجه گیری کلی :

نتایج حاصل از آزمونها حاکی از آن بود که روش CTAB با بیشترین غلظت ، بیشترین کیفیت را نیز دارا است . علت بالا بودن غلظـت و کیفیت می تواند این مطلب باشد که ، نمونه ها در این روش نسبت به ۳ روش دیگر مدت زمان بیشتری را در بن مـاری نگهـداری شـدند در نتیجه گرما باعث لیز و تجزیه شدن سلولهای آنها گشته است . پس از انجام استخراج به روش CTAB برای هر سه گونه ، نتایج نشان داد که غلظت و کیفیت هر سه گونه در این روش استخراج اختلافی ندارند . با بررسی پرایمرهای استفاده شده طـی PCR ، نتـایج نشـان داد روش CTAB با بیشترین OD ، بیشترین پرایمر باند داده را دارد و بهترین باندهی در پرایمر ET_{36} مشاهده شد . با استفاده از ایـن پرایمـر در ۳ روش دیگر استخراج یا باندی مشاهده نشد یا باندهای مشاهده شده ضعیف بودند . پرایمر ET_{36} دارای بهترین باندها در هـر سـه گونـه نیـز

بوده و در سه گونه بهترین پرایمر از لحاظ باندهی شناخته شد . البته پرایمرهـای ET_{32}وET_{33} و ET_{15} نیـز در روش CTAB بانـددهی داشته اند

پیشنهادات :

۱ – بدلیل اینکه روش CTAB دارای بیشترین غلظت و کیفیت DNA می باشـد ، پیشـنهاد مـی شـود کـه از ایـن روش در آزمایشـات استفاده گردد .

۲ – اگر هدف دستیابی به DNA در کمترین زمان ممکن باشد ، روشهای Grade و ادوارد دارای این خصوصیت می باشند .

۳ – پرایمرهای نیمه تصادفی ET در این گیاه نتایج مطلوب تری را داشتند که پیشنهاد می شود از این پرایمرها در PCR استفاده گردد .

منابع :

ikipedia . org
and J. L. Doyle.1990.Isolation of plant DNA from fresh tissue. Focus. 12: 13-16

Sixth National Conference on new ideas in agriculture

1 and 2 March 2012 Islamic Azad University, Faculty of Agriculture

New ideas in optimization of DNA extraction methods for plant Gaz (Tamarix)

Zohreh moaddab and Maryam Shahraki

Z.moadab@yahoo.com

Islamic Azad University, Zahedan

Abstract:

Genus of Tamarix from Tamaricaceae families that have 23 species. Species examined in this study, three types 1) Gaz species native to Sistan T- serotina 2) Species The Imperial Gaz or cor gaz T. aphylla 3) Species The Imperial Gaz. Because of The extracted DNA is the molecular basis of any technique , Therefore optimization is essential method for DNA extraction. In this study, four methods to extract DNA (Dlapvrta, Edward, Grades, CTAB) were compared for the T.serotina and Best method (CTAB) was carried out for other species. After extracting DNA, the quantity and quality of the samples was determined using agarose gel electrophoresis and biophotometer. Then with samples the concentration was adjusted DNA and semi-random primers, PCR performed. Primers for these samples

was determined. Most of the best bands of DNA and DNA concentrations were obtained from the CTAB method and Best primer that used was ET36 diagnosed. Results are significant differences between the concentrations of each 4 method DNA extraction and the rate of OD 280 / OD 260 (which was performed only for species T.serotina) shows And also non-significant difference between concentrations of extracted DNA using CTAB, in all three species, and the OD 280 / OD 260 every three shows.

Keywords:

Extraction of DNA, Electrophoresis, PCR, Completely randomized design, Biophotometer , Semi-random primer