**[بهینه سازی بازﻳافت DNA از ارقام مختلف گندم ( .: چکیده :](http://www.ake.blogfa.com/post/3754/%D8%A8%D9%87%DB%8C%D9%86%D9%87-%D8%B3%D8%A7%D8%B2%DB%8C-%D8%A8%D8%A7%D8%B2%EF%BB%B3%D8%A7%D9%81%D8%AA-DNA-%D8%A7%D8%B2-%D8%A7%D8%B1%D9%82%D8%A7%D9%85-%D9%85%D8%AE%D8%AA%D9%84%D9%81-%DA%AF%D9%86%D8%AF%D9%85-%28-aestivumTriticum%29-%DA%86%DA%A9%DB%8C%D8%AF%D9%87-)**

**[بهینه سازی بازﻳافت DNA از ارقام مختلف گندم ( .aestivumTriticum):](file:///I%3A%5C%5Cmaghale%20jadid%5C%5Cpost-2222.aspx)**

چکیده :

بازیافت DNA با اهداف متفاوت ژنتیکی صورت می گیرد که یکی از این اهداف توالی یابی DNA می باشد. لذا ضرورت دارد که مراحل بازیافت DNA برای هر گونه گیاهی بهینه شود .

به منظور بهینه سازی شرایط باز یافت DNA از ارقام مختلف گندم ، تحقیقی در آزمایشگاه ژنتیک مولکولی دانشگاه زابل صورت گرفت .DNA این ارقام به روش دلاپورتا استخراج ، پس از تعیین غلظت نمونه ها برای تکثیر قطعات DNA الگو از پرایمرهای تصادفی و نیمه تصادفی استفاده شد . پس از الکتروفورز محصولات حاصل از PCR برروی ژل آگارز 1% ، باندهای تکثیری که از کیفیت و وضوح خوبی برخوردار بودند انتخاب و از روی ژل جدا شده و روشهای مختلف برای بازیافت DNA استفاده شد که مناسبترین روش بازیافت ، استفاده از PCR مجدد و ته نشین کردن DNA حاصله با اتانول بود . که در این روش باند جدا شده از ژل پس از سانتریفیوژ لحظه ای ،به مدت 15 دقیقه در دمای 70- قرار داده شد و سپس در دمای 65 درجه حمام آب گرم قرار داده شد تا باند ذوب شود پس از آن باند ذوب شده را در تریس حل کرده و از این محلول به عنوان ماده اصلی مجدداً برای PCR استفاده گردید . PCR با همان شرایط PCR اولیه صورت گرفت و محصولات PCR الکتروفورز گردیده و در صورت تشکیل باند،باند حاصله را با اتانول ته نشین کرده که این DNA ته نشین شده آماده توالی یابی میگردد .

**واژگان کلیدی :** گندم،بازیافت،ژل،آگارز

مقدمه:

گندم مهمترین غله ایران ودنیا است.(1)مبدأ اصلی گندم به عنوان مهمترین غله ایران وجهان در جنوب غربی آسیا بوده و10تا 15 هزار سال قبل از میلاد مسیح از این گیاه در تغذیه انسانها استفاده می شده است.(2)دامنه وسیع وسازگاری زیاد این گیاه وهمچنین مصارف متنوع این غله در تغذیه انسانها باعث گردیده که بعنوان مهمترین غله جهان بویژه در کشورهای در حال توسعه وجهان سوم مطرح گرددو حدود 20درصد منابع غذایی مردم جهان را تشکیل دهد.(3) در ایران سرانه مصرف گندم برای هر فرد 150 تا200 کیلو گرم می باشد.(7)با توجه به روند رو به افزایش جمعیت ، در کشورهای در حال توسعه وایران واهمیت اقتصادی وسیاسی تولید این گیاه باید نگاهی ویژه، به تولید واصلاح آن داشت. از طرف دیگر محدودیت ارقام سازگار به خشکی، شوری،سرماومقاوم به بیماریها وآفات وسازگار با شرایط موجود در مناطق مختلف یکی دیگر از عواملی است که تولید این غله را در کشورهای در حال توسعه وایران با بحران روبرو نموده است.(1)ورود مداوم ا رقام اصلاحی از خارج از کشورنیز به علت ایجاد وابستگی کشور به دیگر کشورها مقرون به صرفه نمی باشد.(2) لذانیاز به اصلاح این گیاه وبهره گیری از ارقام محلی ،بومی وخویشاوندان وحشی آنها با توجه به تنوع ژنتیکی بالا ودارا بودن صفاتی چون مقاومت به بیماریها ،آفات ،خشکی ،سرما وشوری بر هیچکس پوشیده نیست.

توالی یابی DNA یکی از کاربردهای واکنش زنجیره ای پلیمراز می باشد که بدین منظور بایستی محصولات حاصل از PCR را از ژل آگارز بازیافت نمود . (5)

برای هر گونه روش توالی یابی ، در اختیار داشتن مقدار نسبتاً زیادی از قطعه های یکسان DNA تک رشته ای ضروری است (6)

خلوص بالای نمونه های DNA برای توالی یابی ضروری است ، تا نتایج حاصل از توالی یابی از کیفیت خوبی برخوردار باشد ، روشهای مختلف مورد استفاده برای خالص سازی DNA بایستی بتواند از محصولات PCR ، نمونه های DNA خالص با غلظت مناسب بدست آورد.

برای توالی یابی قطعات DNA مربوط به فراورده های PCR روشهای متعددی وجود دارند که امکان تعیین سریع توالی مورد نظر را فراهم می آورند.

توالی یابی مستقیم فراورده های PCRاين امكان را فراهم مي آوردتا ویژگیهای توالیهای مورد نظر بدون نیاز به کلون کردن فرعی یا زیر کلونسازی سریعأ تعیین شوند.مزیت دیگر آن در اینست که اشتباهات ناشی از که در فراوده های تکثیری مشاهده می گردند،تشخیص داده نمی شوند.چرا که این اشتباهات باید به ندرت در موقعیتهای تصادفی در قطعه تکثیری بوقوع بپیوندند.

توالی یابی توده بزرگی از مولکولهای موجود در DNAتکثیر یافته امکان تشخیص اشتباهات PCRرا ازبین می برد،مگر اینکه PCRبر روي مقادیر بسیار کمی از DNAالگو انجام شود،در اینصورت این امکان وجود دارد که اشتباهی در اوایل تکثیر PCR رخ دهد و در نهایت بتوان آن را در فراورده های نهایی PCR تشخیص داد. بنابراین پس از توالی یابی مستقیم ،یک توالی عمومی ازمولکولهای DNA در مخلوط واکنش PCR حاصل می گردد.(5)

مواد وروشها:

این تحقیق درسال 1384 در آزمایشگاه ژنتیک مولکولی وابسته به مرکز زیست پژوهشی علوم سلولی ومولکولی (بیوسنتر) دانشگاه زابل صورت گرفت.

مواد گیاهی :

تعداد 12 رقم ولاین گندم از کلکسیون بذر ومرکز تحقیقات زابل تهیه شد که این ارقام شامل:

Pethneer-2123/Hirmand,V.8187/Arvand-7,Pethneer-2123/Bolani,Hirmand ,Kalak Afghan,Star,Kavir ,Vees/3/Bows/Vees/Kaf/4/Bolani,Alvand,Mahdavi ,Bolani,Hamoon.

بذور در داخل گلدانهایی کشت واز برگهای سبز برای استخراج DNA استفاده گردید.

استخراج DNA:

استخراج DNAازنمونه های گیاهی با روش دلاپورتا وهمکاران(Dellaporta et al 1993) انجام شد.(8)

برای تعیین کمیت وکیفیت DNA ازدو روش الکتروفورز برروی ژل آگارز وبیوفتومتر استفاده شد.

واکنش زنجیره ای پلیمراز:

در این تحقیق برای تکثیر قطعات DNA الگو از پرایمرهای تصادفی ونیمه تصادفی استفاده شد، واکنش زنجیره ای پلیمراز با حجم 25 میکرولیتر حاوی بافر PCR ،کلرور منیزیم ، پرایمر ، dntp ،آنزیم Taq و 30 نانوگرم از DNA ژنومی از هر نمونه انجام گردید .

برای واکنش زنجیره ای پلیمراز در دستگاه ترموسایکلر از دو نوع برنامه حرارتی استفاده گردید .

مرحله اول واسرشت سازی ،به مدت 50 ثانیه در دمای 94 درجه سانتیگراد .

مرحله دوم اتصال ،برای پرایمر های تصادفی به مدت 50 ثانیه در دمای 34 درجه سانتیگراد

و برای پرایمرهای نیمه تصادفی به مدت 50 ثانیه در دمای 50 درجه سانتیگراد .

مرحله سوم بسط ، به مدت 90 ثانیه در دمای 72 درجه سانتیگراد که این سه مرحله 40 سیکل تکرار گردید و درنهایت یک سیکل تکمیل کننده بسط به مدت 8 دقیقه در دمای 72 درجه سانتیگراد انجام شد .

جدا سازی قطعات تکثیری:

برای جدا سازی قطعات تکثیرشده از ژل آگارز 5/1 درصد ورنگ آمیزی با اتیدیوم بروماید استفاده شد.

بازیافت DNA:

پس از مشاهده باندهای تکثیر شده ،باند هایی که از وضوح و کیفیت خوبی برخوردار بودند انتخاب وازروی ژل جدا شد،سپس باند جدا شده را در تیوپ قرار داده وسانتریفیوژ لحظه ای انجام شد.سپس به مدت 15 دقیقه در دمای 70- قرارداده شد وبعد از عمل منجمد شدن ،در حمام 65درجه قرار گرفت تا باند ذوب گردد.پس از آن باند ذوب شده را در تریس 10میلی مولار حل کرده واز این محلول به عنوان ماده اصلی مجددأ برای PCR استفاده گردید.

قبل از انجام PCR مجدد، DNA بازیافت شده با دستگاه بیوفتومتر تعیین غلظت گردید وسپس با همان غلظتی که برای PCR اولیه انجام شده بود برای PCR دوم نیز در نظر گرفته شدو PCRمجدد صورت گرفت.پس از آن محصول PCRبر روی ژل آگارز 5/1 درصد الکتروفورز شد وبعد از رنگ آمیزی توسط اتیدیوم بروماید ومشاهده باندها عمل ته نشین نمودن DNAانجام گرفت .

ته نشین کردن DNA :

ابتدا حجم محصول PCRرا اندازه گرفته وسپس 1/0 حجم آن استات سدیم 3مولار(PH=5.2)ویک حجم ایزوپروپانول اضافه گردید.سپس به مدت 10دقیقه در14000دور سانتریفیوژ گردید.پلیت حاصله با اتانول 70%چندین بار شسته شدوبعد از خشک شدن پلیت در تریس 10میلی مولارحل گردید.(5)

این آخرین مرحله بازیافت می باشدوبعد از آن DNAآماده توالی یابی می باشد.

نتایج وبحث:

برای بازیافت DNAاز روشهای مختلفی استفاده شد که این روشها عبارتند از:

1-بازیافت نمونه های DNA با فنول

در این روش بعد از جدا کردن باند مورد نظر وذوب کردن باند ،یک حجم به آن فنول اشباع شده با TEاضافه ونمونه ها به مدت 30ثانیه ورتکس گردید سپس به مدت 5دقیقه در 13000دور سانتریفیوژ شدند تا فازها از هم جدا شوند سپس فاز بالایی به تیوپ جدید منتقل و به نسبت 1:1 فنول اشباع شده با TEوکلروفرم اضافه ومجددأ سانتریفیوژ گردید وسپس فاز بالایی به تیوپ جدید منتقل و یک حجم اتر به آن اضافه وورتکس لحظه ای انجام شد وسپس برای 3دقیقه در13000دور سانتریفیوژ شد.فاز بالایی به تیوپ جدید منتقل گردید ودوباره یک حجم اتر اضافه گردید وعمل سانتریفیوژ تکرار شد.سپس برای ته نشین کردن DNAاز اتانول استفاده شد.5/2 حجم اتانول 95% و1/0 حجم استات سدیم 12/0 مولار به تیوپ اضافه واینورت گردید .سپس در حمام آب یخ به مدت 10دقیقه قرار گرفت وبعد ازآن به مدت 15 دقیقه در دمای 4درجه سانتی گراد و12000دور سانتریفیوژ شد.فازرویی را جدا کرده وسپس اتانول 80%به ان اضافه ودر دمای اتاق برای 10-5 دقیقه قرار گرفت وسپس برای 5 دقیقه در 12000دور سانتریفیوژ گردید. فاز بالا یی دور ریخته شد وپلیت حاصله به مدت 10-5 دردمای اتاق قرار گرفت تا خشک شود.وبعد از آن در تریس 10میلی مولار حل گردید. (10)که در این روش هیچ گونه پلیتی حاصل نشد.

روش دوم :بازیافت DNAاز ژل آگارز (با نقطه ذوب پایین)روشی که آقای siraisi استفاده کرده اند.در این روش قطعه DNAاز ژل آگارز با نقطه ذوب پایین پس از رنگ آمیزی با اتیدیوم برماید ومشاهده باند جدا و به تیوپ منتقل شد وسپس دو حجم TEو3/0 حجم استات سدیم 3مولاربا 7 =PHبه ان اضافه گردید ودر حمام آب گرم 65درجه گذاشته شد تا زمانی که ژل ذوب گرددوبا TEمخلوط گردد.سپس یک حجم فنول اشباع شده باTEبه ان اضافه وبه مدت 30 ثانیه ورتکس گردید.وبعد از آن به مدت 5 دقیقه در دمای 4درجه سانتی گراد ودر13000دور سانتریفیوژ گردید.سپس فازرویی به تیوپ جدید منتقل وبعد با اتانول ته نشین گردید.(11)مراحل ته نشین کردن در قسمت قبل توضیح داده شده است.در این روش DNA بدست آمده از کمیت وکیفیت مناسبی برخوردار نبود.

روش سوم که توسط سلوکی وهمکاران انجام شد.(13)در این روش پس از جدا کردن باند مورد نظر ازژل وانتقال به تیوپ به مدت 2دقیقه در 8000دور سانتریفیوژ گردید وسپس 400میکرولیتر آب مقطربه آن اضافه ودر حمام آب گرم 65درجه سانتی گراد به مدت 10 دقیقه قرار گرفت وسپس 500میکرولیتر فنول به آن اضافه و30ثانیه ورتکس گردید.پس از آن به مدت 10 دقیقه در 8000دور سانتریفیوژ شد.فاز رویی را بر داشته وبه تیوپی که حاوی 250میکرولیتر فنول و250کلروفرم بود منتقل شد.نمونه ها به مدت 30 ثانیه ورتکس وسپس به مدت 5دقیقه در 8000دور سانتریفیوژ گردید.فاز رویی به میکرو تیوپ منتقل و500میکرولیتر کلروفرم به آن اضافه شد ومانند مرحله قبل ورتکس وسانتریفیوژ گردید.مجددأ فاز رویی به تیوپ جدید منتقل وبرای ته نشین کردن DNA از 1میکرو لیتر استات آمونیوم (5/7 مولار)و5/2 حجم اتانول استفاده شد وسپس در 20- درجه سانتی گراد برای 24ساعت قرار گرفت.ودر روز بعد نمونه ها به مدت 30دقیقه در 8000دور سانتریفیوژ گردید. پلیت حاصله پس از خشک شدن درتریس 10میلی مولار حل گردید.در این روش نیز DNAحاصله از کمیت وکیفیت مناسبی برخوردار نبود.

روش چهارم که استفاده از PCRمجدد بود درقسمت ماد وروشها توضیح داده شده است . این روش بهترین ومناسبترین روش برای بازیافت DNAبود زیرا که DNA حاصله

از کیفیت وکمیت مناسبی بر خوردار بودو همین روش به عنوان روش اصلی برای بازیافت انتخاب شد.

منابع:

1-آذرکیش ،ر؛ 1380.تجزیه وتحلیل چند متغیره ، جهت بررسی تنوع ژنتیکی واجزای عملکرد در گندم دوروم.پایان نامه کارشناسی ارشد اصلاح نباتات . دانشکده کشاورزی ، دانشگاه زابل.

2- ارزانی ،ا ؛ اصلاح گیاهان زراعی.(ترجمه).انتشارات دانشگاهی صنعتی اصفهان؛ 1380.

3- خلف باغی،م؛1383.تعیین فاصله ژنتیکی ارقام گندم بااستفاده از نشانگر های مولکولی،پایان نامه کارشناسی ارشد اصلاح نباتات .دانشکده کشاورزی، دانشگاه زابل.

4- رجب زاده، ن؛تکنولوژی نان ؛ انتشارات دانشگاه تهران؛1368.

5- شهریاری،ف؛امام جمعه،ع؛واکنش زنجیره ای پلیمراز،مقدمه ای بر تکنیکهای مولکولی ؛1381.

6- صبور ، م؛ علمی غروی ،ح ، 1381، **واکنش زنجیره ای پلیمراز ، مقدمه ای بر تکنیکهای مولکولی ؛** چاپ اول

7 - کریمی،ه ؛گندم؛ انتشارات دانشگاهی تهران ، 1368.

8- Dellaporta s.l.,wood.j.,and Hicks,j.b.1993.Aplant DNA mini preparation Version II.plant Mol .Biol Rep.1.19 .

9- www.m.biotech.co.kr

10-http://humgen.wustl.edu/hdk\_lab\_manual/rdm9.html

11-http://rothlab.ucdavis.edu/protocols/dna-electro elution.html

12-http://www.baseclear.com/labservices/purification/PCR Purification.

13- [http://www.elchrom.com/](file:///I%3A%5Cwww.elchrom.com%5Cdefault.htm) public/ index .php article .

14-Soloki ,M .1997 .genetictrans formation of grape somatic embryos . university of Nottingham