بررسی کمی و کیفی DNA بلدرچین، استخراج شده با روش نمکی تغییر یافته و توالی‌یابی ژنومی آن

Quantity and Quality Checking of Quail DNA Extracted by Modified Salting out Method and Genomic Sequencing

احمد احمدی[۱*]، حسن مهربانی یگانه[۲]، سید رضا میرایی آشتیانی[۲]، اردشیر نجاتی جوارمی[۲]، عباس پاکدل[۲] و کریستین بندیکسن[۳]

چکیده

استخراج DNA به‌صورت خالص، پایدار و با کمیت و کیفیت مناسب، گام مهمی در اجرای پژوهش‌های بیولوژیکی می‌باشد. در این پژوهش، DNA مربوط به نمونه خون ۶۰۰ بلدرچین ژاپنی با روش نمکی تغییر یافته با پودر رختشویی و بدون استفاده از آنزیم پروتئیناز K استخراج شد. نمونه‌های DNA به‌دست آمده در مراحل آماده‌سازی کتابخانه ژنومی، با نانودراپ، فلئورومتر، بیوآنالیزر، الکتروفورز، PCR، هضم با آنزیم‌های آندونوکلئاز، اتصال برچسب و آدابتور و در نهایت با توالی‌یابی کل ژنوم کنترل کمی و کیفی گردید. متوسط مقدار DNA استخراج شده با متوسط میزان نسبت جذب نور در ۲۶۰ به ۲۸۰ نانومتر برای هر نمونه به‌ترتیب ۱۳۸ میکروگرم و ۱/۸۷ بود. فرآیندهای تکثیر، هضم، اتصال برچسب و آدابتور و توالی‌یابی ژنومی همه نمونه‌های DNA مورد استفاده با موفقیت کامل همراه بود. بر اساس نتایج مشخص شد که نمونه‌های مذکور از کمیت، کیفیت، قابلیت و پایداری لازم و حداقل آلودگی برخوردار بودند. این روش استخراج DNA به سادگی، سریع، ایمن و با حداقل هزینه انجام پذیرفت.

واژه‌های کلیدی: ارزیابی DNA، پودر رختشویی، توالی‌یابی چندگانه

۱. استادیار گروه علوم دامی دانشکده کشاورزی دانشگاه بوعلی سینا، همدان

۲. به ترتیب استادیار، استاد و دانشیاران گروه علوم دامی پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران

۳. استاد گروه ژنتیک و بیوتکنولوژی، دانشکده علوم و کشاورزی، دانشگاه آرهوس، دانمارک

*: نویسنده مستول Email: Ahmadi@basu.ac.ir

این مقاله بخشی از پایان‌نامه دکتری نویسنده اول در دانشگاه تهران می‌باشد.

مقدمه

استخراج DNA ژنومی خالص، پایدار و با کمیت و کیفیت مناسب اولین و مهم‌ترین گام در تحقیقات بیولوژیکی و ژنتیکی به‌ویژه در تکنولوژی توالی‌یابی ژنومی و تعیین ژنوتیپ افراد می‌باشد (Pietro *et al*. 2011). در این راستا تا به‌حال روش‌ها و کیت‌های متنوعی برای استخراج DNA از بافت‌های مختلف بدن جانداران ابداع و به‌طور دستی یا اتوماتیک استفاده شده‌اند که این روش‌ها در مقدار محصول، میزان آلودگی و زمان استخراج تنوع زیادی دارند و هر کدام از روش‌ها علی‌رغم داشتن مزایایی، دارای بعضی از معایب مانند استفاده از مواد خطرناک فنل- کلروفرم، پیچیدگی روش، محصول با کیفیت و کمیت پایین، آلودگی بالا، زمان استخراج طولانی و هزینه بالا و هم‌چنین با کارایی و قابلیت PCR کم‌تر از ۱۰۰٪ می‌باشند (Kalia *et al*. 1999; Palemora-Avalos *et al*. 2008; Viltrop *et al*. 2010). در روش فنل - کلروفرم که به‌عنوان شاهد مرجع در مقایسه روش‌ها در بعضی مقالات به کار رفته است، علاوه بر استفاده از مواد خطرناک، زمان طولانی و هزینه بالا، همه نمونه‌های حاصل کارایی لازم را برای PCR ندارد (Psifidi *et al*. 2010). در سال‌های اخیر تعدادی از پژوهش‌گران روش‌هایی را در رابطه با حذف معایب ذکر شده گزارش نموده‌اند (Bailes *et al*. 2007 and Saremi *et al*. 2008)، هم‌چنین استخراج DNA با کیت‌های تجاری به‌طور معمول سریع و با آلودگی کم‌تری نسبت به روش‌های سنتی انجام می‌شود لیکن محصول تولیدی محدود با واریانس و هزینه بالا است (Santos *et al*. 2010).

روش استخراج نمکی DNA از خون، بافت‌های سیتولوژیکی و حتی از نمونه‌های خاک در جهت کاهش پیچیدگی آزمایش و حذف فنل- کلروفرم و تا حدودی کاهش زمان لازم توسعه یافته است ولی در این روش، علاوه بر نیاز به آنزیم پروتئیناز K، درصدی از نمونه‌های DNA استخراج شده، برای PCR قابل استفاده نبوده است (Miller *et al*. 1988 and Riveroa *et al*. 2006). *نصیری* و همکاران (۲۰۰۵) استخراج DNA از خون انسان را به‌روش نمکی تغییر یافته با استفاده از پودرهای رختشویی مختلف با کمیت و کیفیت بالاتر گزارش نموده‌اند.

هدف از این پژوهش، استفاده گسترده از روش نمکی تغییر یافته با حداقل هزینه ممکن، برای استخراج DNA با کیفیت و کمیت بالا از نمونه‌های خون بلدرچین نژاد ژاپنی بود.

مواد و روش‌ها

نمونه‌ها و استخراج DNA

تعداد ۶۰۰ نمونه خون بلدرچین ژاپنی (دو لاین و فرزندان دو نسل F_1 و F_2 حاصل از تلاقی بین آن‌ها) مربوط به گله تحقیقاتی گروه علوم دامی در مزرعه آموزشی و پژوهشی پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران واقع در کرج استفاده گردید. بخش عمده‌ای از نمونه خون-های مذکور از طرح دیگری که توسط رضوان‌نژاد و همکاران در خال اجرا می‌باشد؛ اخذ شده و در زمان استفاده در این تحقیق بیش از نه ماه در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد ذخیره شده بودند.

استخراج DNA از نمونه خون‌ها با روش نمکی تغییر یافته و با استفاده از پودر رختشویی با اندکی تغییرات به شرح زیر انجام شد (نصیری و همکاران، ۲۰۰۵):

مقدار ۱۰۰ میکرولیتر خون حاوی EDTA (ضد انعقاد خون) در میکروتیوب یک و نیم سی‌سی (نمونه‌های کهنه در میکروتیوب دو سی‌سی) قرار داده شد و ۱۲۰۰ میکرولیتر بافر لیز کننده A (با ترکیب ساکارز ۰/۳ مولار، تریس اسیدکلریدریک با غلظت ۰/۰۱ مولار و اسیدیته ۷/۵، کلرید منیزیم با غلظت پنج میلی‌مولار و یک درصد تریتون ۱۰۰X) به آن اضافه و به‌خوبی مخلوط شد. سپس با دستگاه میکروسانتریفیوژ به‌مدت پنج دقیقه با سرعت ۲۵۰۰ دور سانتریفیوژ شد و بعد قسمت محلول آن حذف شد و بر روی پلت سفید متمایل به‌صورتی باقیمانده در میکروتیوب دوباره بافر A اضافه و مراحل فوق تکرار گردید. بعد بر روی پلت باقی‌مانده سفید مقدار ۵۰۰ میکرولیتر محلول تریس اسید کلریدریک ۱۰ میلی‌مولار با اسیدیته هشت اضافه شد و با دستگاه ورتکس به شدت مخلوط شد تا پلت در محلول به‌طور یکنواخت پخش شد. پس از سانتریفیوژ با سرعت ۳۰۰۰ دور به‌مدت چهار دقیقه محلول آن حذف و روی پلت باقی‌مانده دوباره مقدار ۳۳۰ میکرولیتر محلول تریس اسید کلریدریک و هم‌چنین مقدار ۳۳۰ میکرولیتر محلول پودر رختشویی تجاری تاژ (حاوی آنزیم‌های آمیلاز، پروتئاز، سلولاز و لیپاز) با غلظت ۳۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر اضافه گردید و به‌مدت ۹۰ ثانیه با ورتکس به شدت مخلوط شد و سپس مقدار ۲۵۰ میکرولیتر محلول کلرید سدیم شش مولار اضافه و دوباره به مدت ۲۰ ثانیه با ورتکس مخلوط شد. بعد از آن به مدت ۱۰ دقیقه با سرعت ۱۴۰۰۰ دور نمونه‌ها سانتریفیوژ شدند و بخش لایه بالایی محلول که حاوی DNA بود به میکروتیوب جدید منتقل و با اضافه کردن ۷۵۰ میکرولیتر الکل اتانل ۹۹

درصد سرد (۲۰- درجه سیلیسیوس) و با سانتریفیوژ کردن DNA رسوب داده شد. پس از حذف الکل ۹۹ درصد، پلت DNA دو بار با الکل اتانل ۷۰ درصد شستشو و پس از حذف کامل الکل، مقدار ۱۰۰ میکرولیتر محلول TE به پلت DNA اضافه شد. برای حل شدن کامل DNA پس از غوطه‌ور کردن پلت در محلول TE، نمونه‌ها در دمای اتاق یک یا دو روز رها شدند و سپس به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۶۵°C قرار گرفتند.

بررسی کمی وکیفی نمونه‌های DNA

در حال حاضر روش‌های متعددی برای بررسی کمیت و کیفیت DNA استخراج شده در آزمایشگاه‌های مختلف منطبق بر نیاز و امکانات موجود استفاده می‌شود. در این پژوهش برای بررسی DNA در مراحل مختلف آزمایش، دستگاه‌های نانودراپ، الکتروفورز، PCR، فلئورومتر، بیوآنالیزر و هضم به‌وسیله آنزیم‌های آندونوکلئاز محدودکننده به‌کار گرفته شد.

نانودراپ: پس از استخراج DNA برای بررسی اولیه کمیت و میزان آلودگی آن به RNA و پروتئین از دستگاه نانودراپ ND-1000 استفاده شد. با تزریق دو میکرولیتر محلول DNA در صفحه چشمی مخصوص، اسپکتروفتومتری نمونه با اشعه UV انجام شد که دستگاه میزان جذب نور را در فاصله ۲۲۰ تا ۳۵۰ نانومتر برای DNA به‌صورت نمودار و نسبت جذب نور در طول موج ۲۶۰ به ۲۸۰ و ۲۶۰ به ۲۳۰ (نشان دهنده میزان خلوص و آلودگی DNA) و در نهایت غلظت DNA را ng/µl گزارش کرد.

الکتروفورز روی ژل: برای بررسی کیفیت نمونه‌های DNA از طریق کنترل میزان خردشدگی و آلودگی به RNA، مقدار سه میکرولیتر نمونه DNA رقیق شده به نسبت یک به ۱۴ با محلول TE را با سه میکرولیتر بافر رنگی مخلوط کرده و در چاهک‌هایی با عرض ۵ میلی‌متر در ژل آگارز ۱٪ با یک نمونه شاهد DNA نشانگر با اندازه 1Kb بارگذاری شد و به مدت یک ساعت با ۱۲۰ ولت الکتروفورز شد. در موقع تهیه ژل مقدار ۴۵ میکرولیتر اتیدیم بروماید در ۳۰۰ سی‌سی ژل اضافه شده بود، بنابراین بلافاصله پس از الکتروفورز با دستگاه UVP از ژل عکس برداری شد.

تکثیر با PCR: جهت تعیین قابلیت تکثیر DNA استخراج شده و عدم حضور ممانعت کننده، از نشانگر ریزماهواره ADL0237 (GUQ0005) با آغازگرهای ۲۰ نوکلئوتیدی زیر برای تکثیر قطعه ۱۳۰ باز در دستگاه PCR استفاده شد (www.ncbi.nlm.nih.gov):

F: 5'-GCTTGTGCCTAAGAATGAAC-3'
R: 5'-TGTATGGAGTCTCAGCAAAT-3'

محلول واکنش PCR با ترکیب ۲/۵ میکرولیتر بافر ۱۰X حاوی $MgCl_2$، ۰/۵ میکرولیتر dNTP، یک میکرولیتر از هر آغازگر، ۲/. میکرولیتر آنزیم Taq پلیمراز، ۱۸/۸ میکرولیتر آب و یک میکرولیتر DNA الگو در مجموع محلول با حجم ۲۵ میکرولیتر آماده شد و برنامه واکنش PCR مورد استفاده آن در تکثیر ۱۰۰ نمونه DNA انتخاب شده تصادفی به صورت واسرشت سازی اولیه در دمای ۹۵ درجه سیلیسیوس در پنج دقیقه سپس ۳۵ دور که در هر دور مرحله واسرشت سازی ۳۰ ثانیه در دمای ۹۵ درجه سیلیسیوس، مرحله اتصال ۴۵ ثانیه در دمای ۵۶ درجه سیلیسیوس و مرحله تکثیر ۶۰ ثانیه در دمای ۷۲ درجه سیلیسیوس و پس از آن بسط نهایی چهار دقیقه در دمای ۷۲ درجه سیلیسیوس بود و محصول به‌دست آمده از تکثیر نمونه‌ها، بر روی ژل اکریل آمید ۸٪ الکتروفورز شد و پس از رنگ آمیزی با نیترات نقره، از باندهای مشاهده شده روی ژل عکس‌برداری شد.

هضم DNA: با توجه به این‌که نمونه‌ها برای توالی‌یابی ژنومی آماده می‌شدند، برای خرد کردن DNA و انتخاب بخشی از ژنوم یکسان در تمام نمونه‌ها، از آنزیم‌های آندونوکلئاز محدودکننده استفاده شد. بنابراین برای بررسی امکان و چگونگی هضم و انتخاب آنزیم، تعدادی نمونه DNA به‌صورت تصادفی انتخاب شد. مقدار پنج میکروگرم DNA با آنزیم‌های آندونوکلئاز محدودکننده مختلف به شرح جدول یک با شرایط اختصاصی هر آنزیم و با حجم نهایی ۲۰۰ میکرولیتر محلول در دمای ۳۷ °C به مدت ۱۶ ساعت هضم شدند (www.neb.com).

حجم محلول نمونه‌های هضم شده بدون خالص سازی با کمک دستگاه Freeze dryer به ۲۵ تا ۳۰ میکرولیتر تقلیل داده شد و در ژل آگارز ۲٪ حاوی اتیدیم بروماید الکتروفورز شدند و با دستگاه UVP از آن‌ها تصویربرداری شد.

آماده سازی نمونه‌ها برای توالی یابی ژنومی

به‌منظور توالی‌یابی چندگانه[1] DNA با تکنولوژی نسل جدید توالی‌یابی[2]، نمونه‌ها با آنزیم PstI هضم شدند (قطعات حاصل با طول چند باز تا چند کیلو باز با دو انتهای متقارن و چهار باز تک رشته‌ای آویزان بودند).

1. Multiplex Sequencing
2. Next Generation Sequencing Technology

جدول ۱: مشخصات و اجزای واکنش آنزیم‌های آندونوکلئاز استفاده شده برای هضم DNA ژنوم بلدرچین در آزمایش Insilico و *In vitro* (۱۶ ساعت)

Table 1: Characteristics and reaction components of endonuclease enzymes that used to *in vitro* (16 hours) and insilico digestion tests on genomic DNA of quail

Enzyme name	Recognition and cut site (bp)	Methylation Sensitivity	NEB Buffer	Number of Fragments*	Reaction components of digestion (µl)				Reaction Temprature (°C)
					DNA + water	NEB Buffer 10X	BSA	Enzyme	
AluI	AG^CT TC^GA	No	4	2514794	50 + 120	20	-	10	37
Sau3AI	^GATC CTAG^	Yes	1		50 + 100	20	20	10	37
MseI	T^TAA AAT^T	No	4	2230831	50 + 100	20	20	10	37
BamHI	G^GATCC CCTAG^G	No	3	54211	50 + 100	20	20	10	37
EcoRV	GAT^ATC CTA^TAG	Yes	3	62405	50 + 120	20	-	10	37
HindIII	A^AGCTT TTCGA^A	No	2	166550	50 + 120	20	-	10	37
BbsI	GAAGACN$_2$^ CTTCTGN$_5$^	No	2	209281	50 + 120	20	-	10	37
BseRI	GAGGAGN$_9$^ CTCCTCN$_7$^	No	4	314936	50 + 120	20	-	10	37
PstI	CTGCA^G G^ACGTC	No	3	375365	50 + 100	20	20	10	37
NotI	GC^GGCCGC CGCCGG^CG	Yes	3	252	50 + 108	20	20	2	37

*The numbers of fragments produced in Insilico digestion test of 393Mb of quail genome by Restrict software.

محصول هضم شده پس از نمک‌زدایی روی ژل آگارز ۲٪ الکتروفورز شد. بخشی از ژل حاوی قطعات DNA به‌طول ۳۰۰ تا ۵۰۰ جفت باز برش داده شد و DNA از روی ژل برش یافته با کیت QIAquik^{R} Gel Extraction Kit شرکت کیاژن دوباره استخراج شد (Anonymous, 2008). قطعات DNA هر نمونه با اتصال یک جفت الیگونوکلئوتید (به طول شش جفت باز به‌علاوه چهار نوکلئوتید مکمل انتهای آزاد قطعات DNA) به کمک آنزیم‌های T4 DNA Ligase و T4 Polynucleotide Kinase برچسب‌دار شدند (هر ۱۲ نمونه با ۱۲ جفت الیگونوکلئوتید مختلف). بعد از این مرحله هر ۱۲ نمونه با برچسب‌های مختلف با مقادیر برابر مخلوط شد. سپس براساس پروتکل روش سولکسا[1] کتابخانه ژنومی ۱۹ نمونه مخلوط (۱۲× ۱۹ برابر ۲۲۸ نمونه) طی مراحل مختلف آماده شد که پس از اتصال آدابتور[2] مقدار ۲۵ پیکوگرم DNA از هر ۱۹ نمونه در سه فلوسل[3] شیشه‌ای مخصوص کلاستر[4] شد (هر فلوسل هشت کانال دارد که برای هفت نمونه آزمایشی و یک نمونه شاهد استفاده می‌شود). در نهایت نمونه‌ها با دستگاه Illumina HiSeq^{TM}2000 در طی ۹ روز (هر فلوسل) به‌صورت دو طرفه (هر قطعه ۱۰۱ × ۲ نوکلئوتیدی) توالی‌یابی شد (www.illumina.com).

بیوآنالیزر: برای کنترل درستی طول قطعات DNA استخراج شده از ژل برش یافته، کنترل اتصال موفق آدابتورها (بر اساس طول قطعات به‌علاوه طول آدابتورهای اتصال یافته) که نشان دهنده کیفیت و کمیت انجام تمام مراحل قبلی است و دیگر مراحل آماده سازی برای توالی یابی، از دستگاه بیوآنالیزر Agilent 2100 با کیت مخصوص Agilent DNA 1000 Assay استفاده شد (http://www.corelabs.cgrb.oregonstate.edu/sites/default/files/Qubit%2protocol.pdf).

فلئورومتر: با دستگاه Invitrogen Qubit ^{TM} Fluorometer و با کیت Quanti-iT ^{TM} dsDNA HS Assay (0.2 – 100 ng/ul) مقدار DNA هر نمونه در مراحل مختلف آماده سازی کتابخانه ژنومی تعیین گردید.

نتایج و بحث

زمان لازم برای استخراج DNA از نمونه خون‌های تازه در حدود ۹۰ دقیقه به ازای ۲۴ نمونه بود ولی در نمونه‌های کهنه بیشتر بود. خلاصه آماری نتیجه بررسی کمی و کیفی DNA استخراج شده با دستگاه نانودراپ در جدول دو ارائه شده است. همان‌طور که ملاحظه می‌شود مقدار DNA استخراج شده بالا بود، که حتی در بعضی نمونه‌ها بیش از ۳۰۰ میکروگرم برآورد شد و حداقل DNA استخراج شده مربوط به نمونه خون-های لخته شده کهنه بود که مقدار آن‌ها نیز از ۱۵/۹۸ میکروگرم به بالا بود ولی حداقل مقدار DNAی به‌دست آمده از نمونه خون‌های تازه بیش از ۱۰۰ میکروگرم بود. میزان نسبت جذب نور در ۲۶۰ به ۲۸۰ نانومتر در اکثر نمونه‌ها در فاصله ۱/۸ تا ۲ قرار داشت (اگر این شاخص کمتر از ۱/۸ و بیشتر از دو باشد به-ترتیب نشان‌دهنده آلودگی به پروتئین و RNA می‌باشد). متوسط نسبت میزان جذب نور در ۲۶۰ به ۲۸۰ نانومتر در نمونه‌های DNA استخراج شده از خون را *پیه‌رو* و همکاران (Pietro *et al.* 2011) به روش‌های فنل–کلروفرم، نمکی با پروتئیناز K و کیت سیلکاژن را به‌ترتیب ۰/۳۲۱ ± ۱/۶۸، ۰/۴۶ ± ۱/۲۶ و ۰/۳۷ ± ۱/۹۸، صارمی و همکاران (2008) با روش RGDE را ۰/۱۳ ± ۱/۹۱، *ویل تروپ* و همکاران (Viltrop *et al.* 2010) با روش‌های فنل–کلروفرم و کیت‌های تجاری PAXgen، Fermentas، QIAgen،Oragen و Saligen را به‌ترتیب در دامنه ۱/۶۲ تا ۱/۹۲، ۱/۵۴ تا ۱/۹۶، ۱/۷ تا ۱/۹، ۱/۵۴ تا ۱/۹۶، ۱/۲۸ تا ۱/۹۲ و ۱/۵۸ تا ۲/۳۳، *سانتوز* و همکاران (Santos *et al.* 2010) با کیت Invitrogen را ۲/۰۷، در حالی‌که نصیری و همکاران (۲۰۰۵) با روش نمکی به کمک پودر رختشویی ۰/۱۱ ± ۱/۷۷ را گزارش نموده‌اند. بنابراین مجموع اطلاعات حاصل از نانودراپ در ارزیابی اولیه مشخص می‌کرد که DNA استخراج شده در این پژوهش با مقدار بالا و حداقل آلودگی به پروتئین و RNA می‌باشد.

با الکتروفورز نمونه‌ها روی ژل آگارز، نتایج دقیق‌تر و مشابه نانودراپ مشاهده شد. با وجودی که ۰/۲ میکرولیتر از مجموع ۱۰۰ میکرولیتر DNA بر روی ژل بارگذاری شده بود ولی نتایج الگوی الکتروفورز همه نمونه‌ها بر روی ژل آگارز به همراه DNA استاندارد (تصویر الکتروفورز تعدادی از نمونه‌ها، ۱۰ ماه پس از استخراج در شکل ۲) نشان می داد در اکثر نمونه‌ها باند DNA مشاهده شده غلیظ (در مقایسه با باند شاهد)، واضح و با حداقل کشیدگی بود که مبین این است که نمونه‌ها از کمیت و کیفیت مناسب برخوردار بوده است.

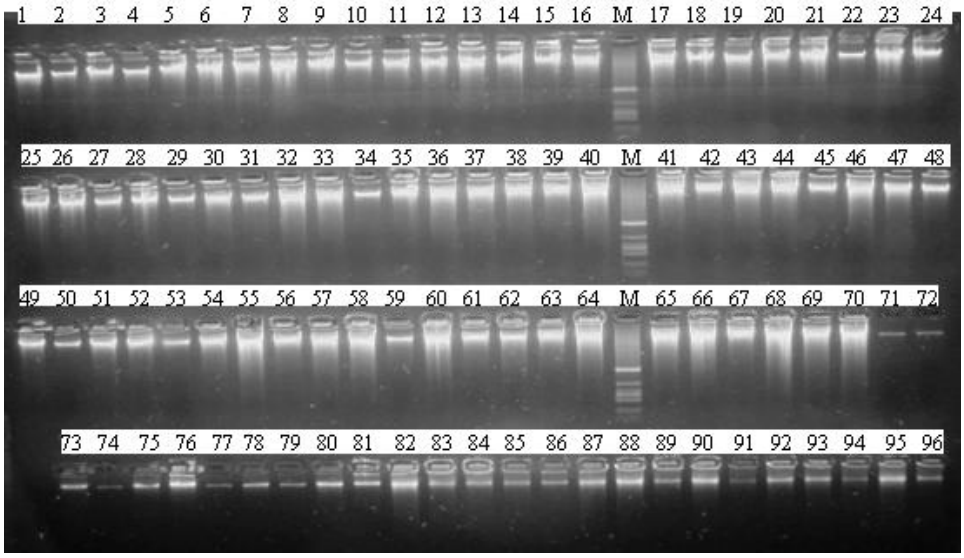
واکنش PCR با آغازگرهای نشانگر ریزماهواره-ایADL0237 در همه نمونه‌های مورد نظر انجام شده بود و باندهای مشخص و واضح با طول قطعات حدود ۱۳۰ جفت باز بدون باند اضافه بر روی ژل اکریل آمید مشاهده شد (شکل دو).

1. Solexa
2. Adaptor
3. Flowcell
4. Cluster

جدول ۲: خلاصه نتایج بررسی نمونه‌های DNA توسط دستگاه‌های نانودراپ و فلئورومتر

Table 2. The results of DNA measurements by Nanodrop and Fluorometer equipments.

260/280 absorption ratio			Concentrate (ng / µl)			Volume (µl)	Number of samples	Devices - Measurement process
Avrage	Max	Min	Avrage	Max	Min			
1.87	2.01	1.77	1379.99	3723.7	159.8	100	600	Nanodrop-after extraction of blood
			4.67	10.26	2.06	30	240	Fluorometer-after extraction of gel

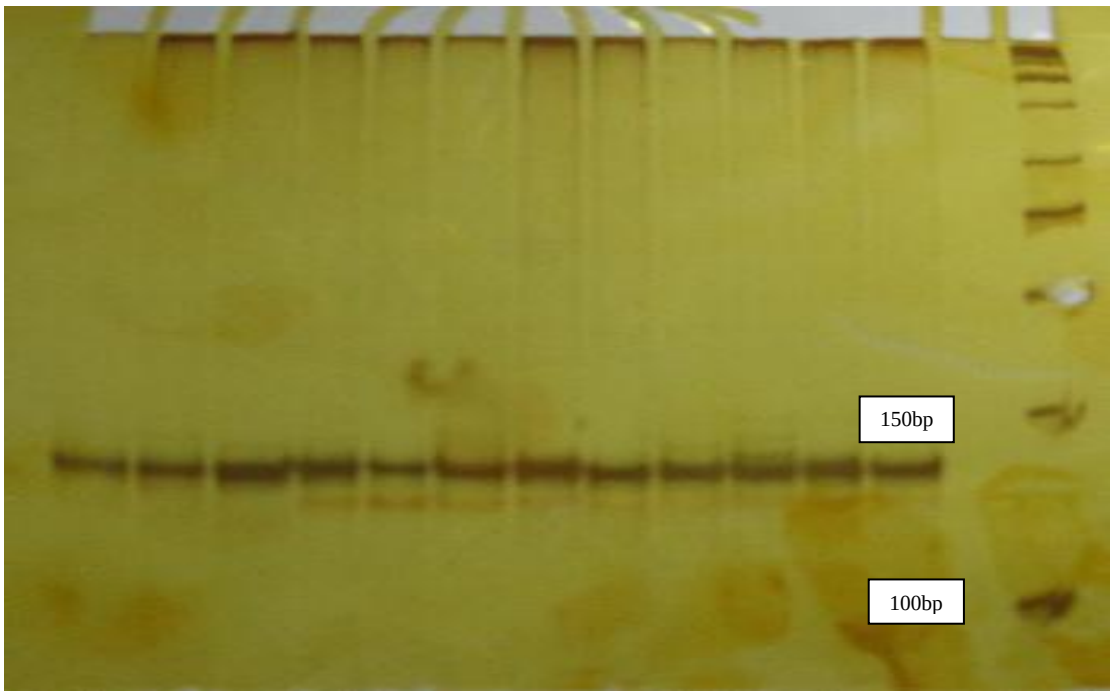


شکل ۱: تصویر الکتروفورز ۹۶ نمونه DNA بلدرچین، استخراج شده به روش نمکی با کمک پودر رختشویی و سه نمونه DNA اندازه یک کیلو بازی روی ژل یک درصد آگارز.

Figure 1: The electrophoresis image of 96 quail DNA samples extracted by salting out method using washing powder on 1% agarose gel and 3 samples of DNA ladder (1kb).

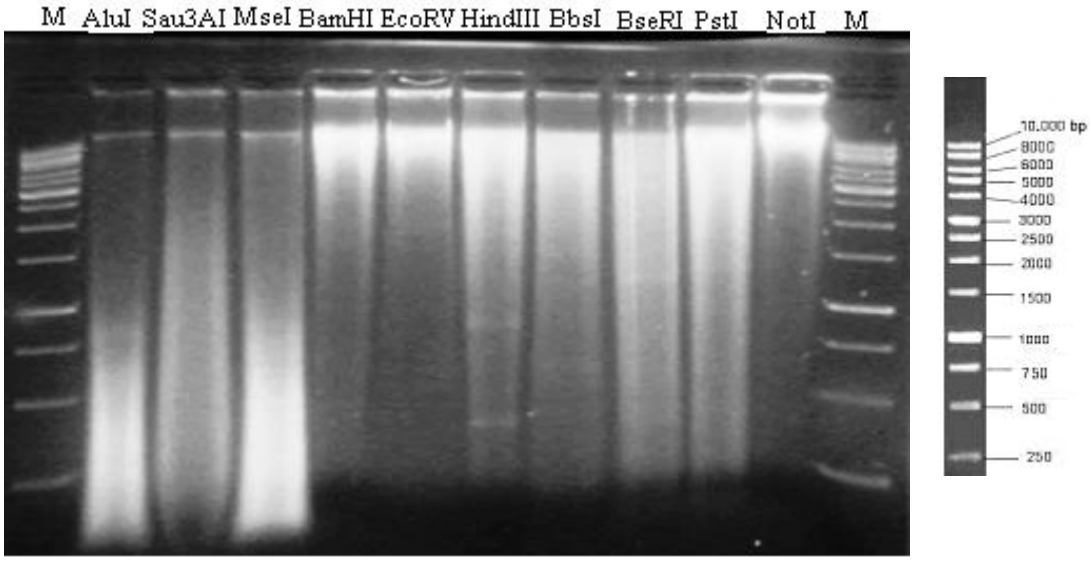
هم‌چنین چندین مرحله PCR قطعات خرد شده DNA ژنومی همه نمونه‌های استفاده شده در مراحل آماده سازی جهت توالی‌یابی ژنومی به درستی انجام شده بود (برای نمونه شکل چهار– د؛ مرحله پس از اتصال آدابتور، با آغازگرهای خاص آدابتور؛ PCR به تعداد ۱۲ سیکل). در حالی‌که *ری‌ورو* و همکاران (Riveroa *et al*. 2006) در بررسی استخراج DNA با روش‌های فنل–کلروفرم، استات آمونیوم و یک کیت تجاری اعلام کردند که برخی نمونه‌های به دست آمده در هر سه روش قابلیت PCR نداشته‌اند. هم‌چنین قابلیت PCR نمونه‌های DNA استخراج شده توسط *سانتوز* و همکاران (2010) با کیت Invitrogen را ۵۵/۸٪ و با روش فنل–کلروفرم را ۹۴/۱٪، *ویل تروپ* و همکاران (2010) با روش‌های فنل–کلروفرم را ۱۰۰٪ ولی با پنج کیت تجاری را ۵۳ تا ۹۶٪ و دآنجلو و همکاران (D'angelo *et al*. 2007) با روش نمکی پروتئیناز K را ۷۵٪ گزارش نموده‌اند.

شکل سه، نمونه‌ای از الکتروفورز پنج میکروگرم DNA هضم شده از یک نمونه با آنزیم‌های آندونوکلئاز محدودکننده مختلف را به تصویر کشیده است. DNA هضم شده با آنزیم NotI با محل تشخیص هشت نوکلئوتید با کمترین تعداد برش و آنزیم‌های BseRI، PstI، BbsI، HindIII، BamHI و EcoRV با محل تشخیص شش نوکلئوتید و تعداد برش متنوع به ترتیب از زیاد به کم و آنزیم‌های MseI، Sau3AI و AluIبا محل تشخیص چهار نوکلئوتید بیشترین تعداد برش را نشان دادند. بعضی از آنزیم‌ها در بین هم گروهی هایشان DNA را با تعداد قابل توجه کمتری برش زده‌اند که به‌علت حساسیت آن‌ها به برخی واکنش‌های بیوشیمیایی (نظیر متیلاسیون CpG) به هنگام اتصال و برش بوده است (www.neb.com).



شکل ۲: تصویر الکتروفورز تعدادی از نمونه‌های PCR شده DNA بلدرچین با نشانگر ریزماهواره ADL0237 روی ژل ۸ درصد اکریل آمید.

Figure 2. The electrophoresis image of some amplified quail DNA samples using ADL0237 microsatellite marker on 8% acryl amide gel.



شکل ۳: تصویر الکتروفورز نمونه DNA (۵ میکروگرم) هضم شده با آنزیم‌های آندونوکلئاز محدودکننده مختلف (NotI، PstI، BseRI، BbsI، HindIII، EcoRV، BamHI، MseI، Sau3AI و AluI) در ژل ۲% آگارز.

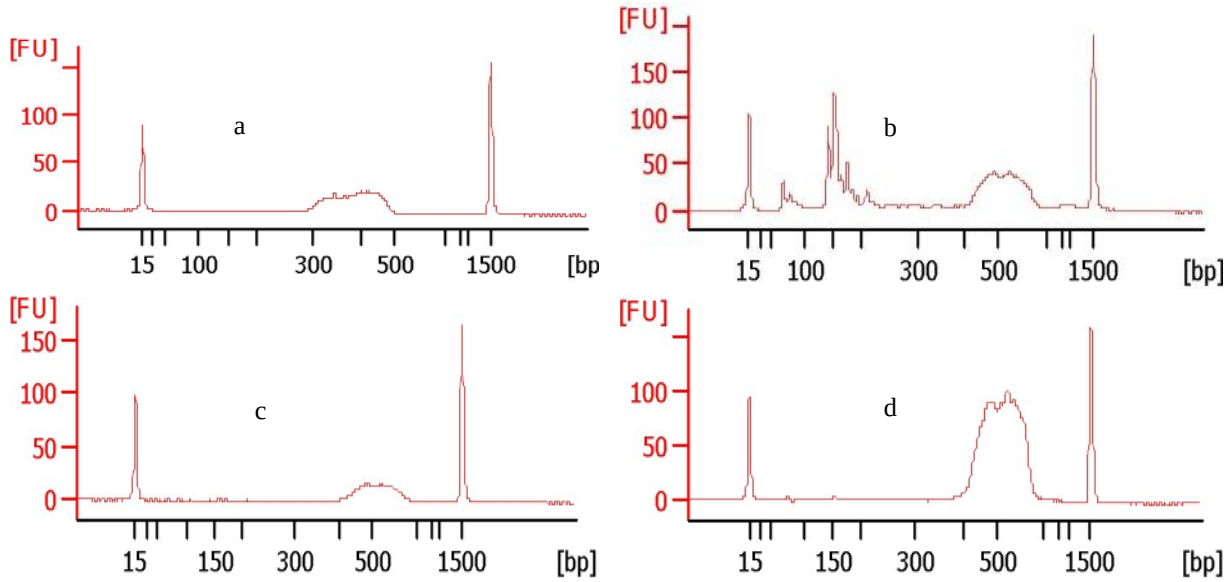
Figure 3: The electrophoresis image of digested quail DNA samples (5µg) using different restriction enzymes on 2% agarose gel.

خلاصه اندازه گیری با دستگاه فلئورومتر مقدار DNA استخراج شده از روی ژل برش یافته برای انتخاب قطعات به طول ۳۰۰ تا ۵۰۰ جفت باز نیز در جدول دو ارائه شده است. در این نمونه‌ها مقدار DNA هضم شده اولیه ۱۶ میکروگرم بود و مقدار DNA با قطعات ۳۰۰ تا ۵۰۰ جفت باز انتخاب شده پس از استخراج در دامنه ۶۱/۸ تا ۳۰۷/۸ نانوگرم بود.

در شکل چهار، نمودارهای مختلف، نتایج بررسی کمی و کیفی نمونه‌های DNA با قطعات ۳۰۰ تا ۵۰۰ جفت باز را بوسیله دستگاه بیوآنالیزر در مراحل مختلف آماده سازی کتابخانه DNA برای توالی‌یابی را نشان می‌دهند. نمودارهای الف پس از مرحله استخراج از ژل (انتخاب قطعات ۳۰۰ تا ۵۰۰ جفت بازی)، ب پس از اتصال بارکد و آدابتور به دو سمت قطعات (به طول ۴۷۲ تا ۶۷۲ = ۸۰ + ۶ + ۳۰۰ تا ۵۰۰ + ۶ + ۸۰ جفت باز)، ج پس از مرحله حذف کردن آدابتورهای اتصال نیافته (پس از الکتروفورز روی ژل، انتخاب و برش منطقه مورد نیاز و استخراج دوباره از ژل) و نمودار د پس از غنی سازی با PCR (قطعات ۴۷۲ تا ۶۷۲ جفت باز) را نشان می دهد. بنابراین نمودارها نشان می دهند که مراحل مذکور با موفقیت انجام شده است.

نتایج حاصل از توالی‌یابی به‌صورت عکس بود که ابتدا به توالی‌های نوکلئوتیدی تبدیل شد و پس از عبور از فیلترهای کنترل کیفیت، توالی‌های هر ۱۲ نمونه بر اساس برچسب جدا شدند. پس از حذف توالی‌های غیر قابل تفکیک، تعداد جفت توالی‌های خوانده شده (۹۵ × ۲ نوکلئوتیدی پس از حذف توالی برچسب) در فلوسل‌های اول، دوم و سوم بدون در نظر گرفتن نمونه شاهد به‌ترتیب ۵۳۵، ۷۵۸ و ۳۱۰ میلیون جفت قطعه، که به‌طور متوسط به ازای هر نمونه مخلوط (در یک کانال) به‌ترتیب تعداد ۱۲/۴۱ ± ۷۶/۴۷، ۱۴/۲۷ ± ۱۰۸/۲۷ و ۲۰/۰۵ ± ۶۱/۹۸ میلیون جفت قطعه حاصل شد. همه نمونه‌های DNA پس از دست‌کاری‌های مکرر و مختلف طی ۱۶ ماه، در نهایت با تهیه کتابخانه ژنومی با موفقیت توالی‌یابی شده بودند، که این نشان دهنده پایداری و حفظ حساسیت این نمونه‌های DNA در طولانی مدت برای آزمایش‌های مولکولی می‌باشد.

در این روش، هزینه لازم جهت استخراج هر نمونه DNA کمتر از ۱۵۰ تومان بود (جهت تهیه بافرها، الکل و میکروتیوب). در حالی‌که در روش‌های دیگر علاوه بر هزینه-های مذکور فقط هزینه تهیه پروتئیناز K یا کیت تجاری در ایران به ازای هر نمونه بالاتر از ۵۰۰ تومان بود. محققین مختلف نیز در مورد هزینه‌های استخراج DNA در اکثر روش‌ها و کیت‌های تجاری استفاده شده بین یک تا ۲۳ دلار یا یورو به ازای هر نمونه گزارش نموده اند (Nawrot *et al.* 2010; Santos *et al.* 2010; Viltrop *et al.* 2010).



شکل ۴: نتایج بررسی نمونه‌های DNA بوسیله دستگاه بیوآنالیزر (محور افقی طول قطعات DNA و محور عمودی تراکم آنها را نشان می‌دهد). a – پس از مرحله استخراج از ژل (انتخاب قطعات ۳۰۰ تا ۵۰۰ جفت بازی)، b – پس از اتصال برچسب و آدابتور، c – پس از مرحله حذف کردن آدابتورهای اتصال نیافته و d – پس از غنی سازی با PCR. در همه نمودارها امواج کناری در محدوده ۱۵ و ۱۵۰۰ جفت باز DNA شاخص را نشان می دهند.

Figure 4: The result of Bioanalyzer assay of DNA samples (Vertical and horizontal axes show the DNA fragments concentrate and length, respectively): a. After extraction from the gel (300-500 bp DNA pieces selection), b. After barcode and adapter ligation, c. After deletion of free adapters and d. After enrichment by PCR. The 15 and 1500 signs are DNA size marker.

نتیجه گیری

گسترش کلان تحقیقات و کاربردهای دانش بیوتکنولوژی و ژنتیک مولکولی باعث شده تا محققین نه تنها به‌دنبال تهیه DNAهای مورد استفاده، طی مراحل مختلف کنترل کمی و کیفی، تکثیر، هضم، تهیه کتابخانه و در نهایت توالی یابی ژنومی موفق، نشان دادند که DNAی استخراج شده با مقدار بالا و با حداقل آلودگی و ممانعت کننده‌ها، به‌طور کامل از پتانسیل لازم جهت انجام آزمایش‌های بیولوژیکی برخوردار بود و چون در این روش استخراج DNA از خون به سادگی و با حداقل هزینه ممکن انجام می شود، به‌نظر می‌رسد استفاده گسترده و حتی اتوماتیک از این روش در استخراج DNA از خون برای تحقیقات و کاربردهای بیولوژیکی قابل توصیه باشد.

سپاس‌گزاری

این گزارش مربوط به بخشی از پروژه‌ای است که با حمایت گروه علوم دامی پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران و گروه ژنتیک و بیوتکنولوژی دانشگاه آرهوس دانمارک در حال انجام است. بنابراین تلاش همه آنانی که ما را در این تحقیق یاری نموده‌اند، به‌ویژه دکتر الهام رضوان‌نژاد به‌خاطر نمونه خون‌هایی که در اختیار ما قرار دادند و مهندس امیر سبحانی، Mette Jeppesen، Hanne Jorgensen و Mahesha Kumari Perera به‌خاطر کمک‌های بیدریغ آن‌ها در آزمایشگاه‌های ژنتیک دو گروه مذکور شایسته نهایت سپاس‌گزاری است.

Quantity and Quality Checking of Quail DNA Extracted by Modified Salting out Method and Genomic Sequencing

Ahmadi[1]*, A., Mehrabani-Yeganeh[2], H., Miraei-Ashtiani[3], S. R., Nejati-Javaremi[4], A., Pakdel[5], A. and Bendixen[6], C.

Abstract

Pure, sensitive and high quantity and quality extracted DNA is very important in biological research. In this research, the whole blood samples of 600 quails (*Quturnix japonica*) were used to extract genomic DNA by modified salting out method (with washing powder and without Proteinase K enzyme). Quantity and quality of extracted DNA samples were assayed by Nanodrop, Fluorometer, Bioanalyzer, electrophoresis on gel, digestion with endonuclease enzymes, PCR, barcode and adapter ligation in library making processing and genome sequencing at the end. The averages of extracted DNA per sample and 260/280 OD ratio were 138µg and 1.87 respectively. All of the used DNA samples were successful in amplification, digestion, barcode and adapter ligation and genomic sequencing processes. The results showed that DNA samples were high quantity and quality, sensitive, stable and minimum contamination. In conclusion, DNA extraction by using this method is fast, safe, low cost and simply practical in any lab.

Keywords: DNA Assay, Washing Powder and Multiplex Sequencing

References

Anonymous. 2008. Minelute[R] handbook. Qiagen Company, http://www.qiagen. com/literature/

Bailes, S. M., Devers, J. J., Kirby, J. D. and Rhoads, D. D. 2007. An inexpensive, simple protocol for DNA isolation from blood for high-throughput genotyping by polymerase chain reaction or restriction endonuclease digestion. Poultry Science, 86: 102–106.

D'angelo, F., Santillo, A., Sevi, A. and Albenzio, M. 2007. Technical note: a simple salting out method for DNA extraction from milk somatic cells: investigation into the goat CSN1S1 gene. Journal of Dairy Science, 90: 3550-3552.

http://www.corelabs.cgrb.oregonstate.edu/sites/default/files/Qubit%2protocol.pdf

http://www.genomics.agilent.com/files/Manual/G2938-0014_KitDNA1000 Assay-ebook.pdf

Kalia, A., Rattan, A. and Chopra, P. 1999. A method for extraction of high-quality and high-quantity genomic DNA generally applicable to pathogenic bacteria. Analytical Biochemistry, 275: 1–5.

Miller, S. A., Dykes, D. D. and Polesky, H. F. 1988. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. Nucleic Acids Research, 16: 1215.

Nasiri, H., Forouzandeh, M., Rasaee, M. J. and Rahbarizadeh, F. 2005. Modified salting-out method: High-yield, high-quality genomic DNA extraction from whole blood using laundry detergent. J. Clinical Laboratory Analysis, 19: 229–232.

Nawrot, U., Wlodarczyk, K., Wrobel, M., Wasik, A. and Dobosz, T. 2010. Comparison of the utility of five commercial kits for extraction of DNA from *Aspergillus fumigatus* spores. Acta Biochimca Polonica, 57(4):567-571

Palomera-Avalos, V., Castro-Félix, P. and Villalobos-Arámbula, A. R. 2008. High yield and high quality DNA from vegetative and sexual tissues of Mexican white pine (Pinus ayacahuite). African Journal of Biotechnology, 7 (1): 51-54.

Pietro, F. D., Ortenzi, F., Tilio, M., Concetti, F. and Napolioni, V. 2011. Genomic DNA extraction from whole blood stored from 15 to 30 years at -20 ^{o}C by rapid phenolechloroform protocol: A useful tool for genetic epidemiology studies. Molecular and Cellular Probes, 25: 45-48.

1. Graduated of Animal Science Department, Tehran University, Karaj, Iran. And Assistant Professor of Animal Science Department, Bu-Ali Sina University, Hamedan, Iran.

2. Assistant Professor, Department of Animal Science, Tehran University, Karaj, Iran.

3. Professor, Department of Animal Science, Tehran University, Karaj, Iran.

4. Associated Professor, Department of Animal Science, Tehran University, Karaj, Iran.

5. Associated Professor, Department of Animal Science, Tehran University, Karaj, Iran.

6. Professor, Department of Genetics and Biotechnology, Faculty of Agricultural Science, Aarhus University, Tjele, Denmark.

*: Corresponding Author Email: Ahmadi@basu.ac.ir

Psifidi, A., Dovas, C. I. and Banos, G. 2010. A comparison of six methods for genomic DNA extraction suitable for PCR-based genotyping applications using ovine milk samples. Molecular and Cellular Probes, 24: 93-98.

Riveroa, E. R. C., Nevesb, A. C., Silva-Valenzuelac, M. G., Sousac, S. O. M. and Nunes, F. D. 2006. Simple salting out method for DNA extraction from formalin-fixed, paraffin-embedded tissues. Pathology Research and Practice, 202: 523–529.

Santos, E. M., Paula, J. F. R., Motta, P .M. C., Heinemann, M. B., Leite, R. C., Haddad, J. P. A., Del Puerto, H. L. and Reis, J. K. P. 2010. Comparison of three methods of DNA extraction from peripheral blood mononuclear cells and lung fragments of equines. Genetics and Molecular Research, 9 (3): 1591-1598.

Saremi, M. A., Saremi, M. and Tavallaei, M. 2008. Rapid genomic DNA extraction (RGDE). Genetics Supplement 1: 63–65.

Viltrop, T., Krjutškov, K., Palta, P. and Metspalu, A. 2010. Comparison of DNA extraction methods for multiplex polymerase chain reaction. Analytical Biochemistry, 398: 260–262.