نشریه حفاظت گیاهان (علوم و صنایع کشاورزی)
جلد ۲۷، شماره ۳، پاییز ۱۳۹۲، ص. ۴۰۶-۴۰۲

Journal of Plant Protection
Vol. 27, No. 3, Fall 2013, P. 402-406

مقاله کوتاه پژوهشی

مقایسه کمیت و کیفیت روشهای مختلف استخراج دی‌ان‌ای از زنبورهای پارازیتوئید جنس *Lysiphlebus* به روش اسپکتروفتومتری

سمیه رحیمی کلده[۱*]- رضا حسینی[۲]- جلیل حاجی زاده[۳]

تاریخ دریافت:۱۳۹۰/۳/۳۰
تاریخ پذیرش:۱۳۹۲/۴/۱۵

چکیده

استخراج دی‌ان‌ای ژنومی با کمیت و کیفیت مناسب اولین مرحله در شناسایی مولکولی حشراتی است که شناسایی مورفولوژیک آن‌ها مشکل و تحت تأثیر یک مرحله خاص از زندگی، اندازه و جنس قرار دارد. انتخاب یک پروتکل مناسب به منظور تهیه دی‌ان‌ای خالص از این حشرات اهمیت بسزایی در این امر دارد. در تحقیق حاضر پنج روش رایج استخراج دی‌ان‌ای در آزمایشگاه‌های حشره‌شناسی شامل CTAB، Phenol- chloroform، EST، Lysis buffer و Chelex، از لحاظ کمیت و کیفیت دی‌ان‌ای استخراج شده با هم مقایسه شده‌اند. غلظت دی‌ان‌ای استخراج شده با استفاده از اسپکتروفتومتری اندازه‌گیری شد. نتایج تجزیه واریانس تفاوت معنی‌داری را بین روش‌های مورد بررسی نشان داد. در نهایت روش چلکس با توجه به سادگی، در دسترس بودن و کم خطر بودن به عنوان روشی مناسب با عملکرد بالاو مقرون صرفه برای استخراج دی‌ان‌ای زنبورهای پارازیتوئید جنس *Lysiphlebus* پیشنهاد شد.

واژه‌های کلیدی: اسپکتروفتومتری، دی‌ان‌ای، چلکس، *Lysiphlebus*

مقدمه

اساس کنترل بیولوژیک، شناسایی دقیق دشمنان طبیعی است، فقدان روش‌های مناسب برای شناسایی می‌تواند منجر به شکست برنامه‌های کنترل بیولوژیک گردد. اکثر پارازیتوئیدها دارای جثه‌ای کوچک بوده و اغلب گونه‌های نزدیک به هم، دارای تعداد بسیار جزیی صفات مورفولوژیک متمایز کننده به منظور شناسایی دقیق هستند. زنبورهای پارازیتوئید جنس *Lysiphlebus* spp (Hym.: Braconidae) پارازیتوئید انفرادی- داخلی شته‌ها هستند. این جنس دارای تعداد کمی گونه است، با وجود کم بودن گونه‌های این جنس، یکی از گروه‌های بسیار مشکل و ناشناخته از لحاظ بیولوژیک و سیستماتیک به شمار می‌آید (۷). پرساد و همکاران (۵) جهت سهولت شناسایی و ردیابی زنبور پارازیتوئید *L. testaceipes* از آغازگرهای اختصاصی و جهت استخراج دی‌ان‌ای زنبورهای پارازیتوئید از روش چلکس استفاده کردند. سندروک و همکاران (۷) نیز از روش چلکس به منظور استخراج دی‌ان‌ای زنبور پارازیتوئید *L. fabarum* استفاده کردند.

در مباحث مولکولی، استخراج مواد ژنتیکی با محدودیت‌هایی همراه است که تغییر در ترکیب و pH بافر استخراج توانسته است در بهبود کمیت و کیفیت DNA و RNA به دست آمده مؤثر باشد. کیفیت دی‌ان‌ای یک نمونه به سن، نحوه نگه‌داری، ذخیره‌سازی و روش استخراج آن بستگی دارد. بنابراین اولین مرحله در استخراج دی‌ان‌ای استفاده از یک روش سریع، مقرون به صرفه از لحاظ اقتصادی و زمانی، با کمیت و کیفیت مورد قبول است. هدف از این پژوهش، مقایسه پنج روش مختلف استخراج دی‌ان‌ای به منظور ارائه یک روش سریع و آسان برای استخراج دی‌ان‌ای حشرات با جثه کوچک، خلوص بالا و عدم آلودگی به پروتئین و ترکیبات آلی است.

مواد و روش‌ها

استخراج دی‌ان‌ای به روش CTAB: پنج عدد زنبور پارازیتوئید *L. fabarum* در داخل تیوب حاوی ۶۰۰ میکرولیتر بافر استخراج قرار داده شده و با استفاده از پستل پلاستیکی خرد شد. نمونه به مدت ۶۰-۴۰ دقیقه در داخل حمام آب گرم در دمای ۶۵ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. پس از سانتریفیوژ، مایع رویی به تیوب جدید منتقل و به آن ۵۵۰ میکرولیتر کلروفرم اضافه گردید. پس از

۱، ۲ و ۳- به ترتیب دانشجوی کارشناسی ارشد، استادیار و دانشیار گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه گیلان
(*- نویسنده مسئول: Email: s.rahimik@yahoo.com)

سانتریفیوژ مجدد، مایع رویی به تیوب جدید منتقل و ۷۵۰ میکرولیتر ایزوپروپانول سرد به آن اضافه گردید. سپس به مدت ۳۰ دقیقه تا یک شب در فریزر ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. پس از گذشت زمان لازم نمونه سانتریفیوژ گردید. مایع رویی فاقد دی‌ان‌ای دور ریخته شده و دی‌ان‌ای ته‌نشین شده با استفاده از اتانول ۷۰٪ سرد سانتریفیوژ گردید. در پایان ۵۰ میکرولیتر بافر TE به نمونه اضافه گردید (۲).

استخراج دی‌ان‌ای به روش فنل-کلروفرم: پنج عدد زنبور پارازیتوئید *L. fabarum* در داخل تیوب حاوی ۴۰۰ میکرولیتر بافر استخراج قرار داده شده و با استفاده از پستل پلاستیکی خرد شد. مقدار ۵ میکرولیتر پروتئیناز K به غلظت ۲۰ میکروگرم بر میکرولیتر به نمونه اضافه شده و به مدت ۱۵ دقیقه در حمام آب گرم در دمای ۵۶ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. سپس مقدار ۰/۵ میکرولیتر RNase-A به غلظت ۱۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر به نمونه اضافه شده و به مدت ۱۵ دقیقه در داخل حمام آب گرم در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. پس از سانتریفیوژ، مایع رویی به تیوب جدید منتقل و به آن ۲۰۰ میکرولیتر فنل-کلروفرم به نسبت مساوی اضافه شده و مجدداً سانتریفیوژ گردید. مایع رویی به تیوب جدید منتقل و یک حجم ایزوپروپانول سرد و ۰/۲ حجم سدیم کلراید ۵ مولار اضافه و به مدت ۱۵ دقیقه در فریزر ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. نمونه سانتریفیوژ گردیده و مایع رویی دور ریخته شد. دی‌ان‌ای ته‌نشین شده با اتانول ۷۰٪ سرد شسته شده و در پایان ۵۰ میکرولیتر بافر TE به نمونه اضافه گردید (۷).

استخراج دی‌ان‌ای به روش EST: پنج عدد زنبور پارازیتوئید *L. fabarum* در داخل تیوب حاوی ۵۰۰ میکرولیتر بافر استخراج قرار داده شده و با استفاده از پستل پلاستیکی خرد شد. نمونه به مدت ۱۲ دقیقه در داخل حمام آب گرم در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. پس از سانتریفیوژ، مایع رویی به تیوب جدید منتقل و ۷۰۰ میکرولیتر ایزوپروپانول سرد بعلاوه ۲۰۰ میکرولیتر کلرید سدیم ۵ مولار به نمونه اضافه و سپس سانتریفیوژ گردید. پس از انتقال فاز رویی به تیوب جدید، ۵۰ میکرولیتر اتانول سرد ۷۰٪ به تیوب اضافه و سانتریفیوژ گردید. اتانول دور ریخته شده و درپایان ۵۰ میکرولیتر بافر TE به نمونه اضافه گردید (۳).

استخراج دی‌ان‌ای به روشLysis buffer: پنج عدد زنبور پارازیتوئید *L. fabarum* در داخل تیوب حاوی ۴۰۰ میکرولیتر بافر استخراج قرار داده شده و با استفاده از پستل پلاستیکی خرد شد. نمونه به مدت ۳۰ دقیقه در داخل حمام آب گرم در دمای ۵۶ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد، سپس ۶۰ میکرولیتر استات پتاسیم به نمونه اضافه گردید و به مدت ۳۰ دقیقه روی یخ قرار داده شد و در نهایت سانتریفیوژ گردید. در این مرحله فاز رویی به تیوب جدید منتقل شده و ۵۰۰ میکرولیتر ایزوپروپانول سرد به نمونه اضافه و سپس سانتریفیوژ گردید. پس از حذف فاز رویی، ۱۰۰ میکرولیتر استات آمونیوم ۰/۵ مولار و ۴۰۰ میکرولیتر اتانول ۷۰٪ اضافه و سپس سانتریفیوژ شد. فاز رویی حذف و در پایان ۵۰ میکرولیتر بافر TE به نمونه اضافه گردید (۴).

استخراج دی‌ان‌ای به روش Chelex: پنج عدد زنبور پارازیتوئید *L. fabarum* در داخل تیوب حاوی ۱۰۰ میکرولیتر Chelex-100 %5 قرار داده شده و با استفاده از پستل پلاستیکی خرد شد. نمونه به مدت ۲ ساعت در داخل هات پلیت در دمای ۶۵ درجه سانتیگراد قرار داده شد. سپس به مدت ۸ دقیقه در دمای ۱۰۰ درجه سانتیگراد قرار داده شده و پس از آن ۱۵-۱۰ ثانیه ورتکس گردید. مجدداً به مدت ۸ دقیقه در دمای ۱۰۰ درجه سانتیگراد قرار داده شد و سپس ۱۵-۱۰ ثانیه ورتکس و سانتریفیوژ گردید. فاز رویی حاوی دی‌ان‌ای به تیوب جدید منتقل شد (۸).

برای تعیین کمیت و کیفیت دی‌ان‌ای استخراج شده به روش‌های ذکر شده در بالا و مقایسه این روش‌ها، از دستگاه (ND-1000 Spectrophotometer nanodrop, USA) در مؤسسه تحقیقات مرکبات کشور استفاده شد. غلظت دی‌ان‌ای هر نمونه برحسب نانوگرم دی‌ان‌ای بر میلی‌لیتر نمونه به دست آمد. این بررسی در قالب طرح کاملاً تصادفی و با ۱۱ تکرار انجام شد و از آزمون LSD برای مقایسه میانگین داده‌ها استفاده شد.

نتایج

نتایج حاصل از اسپکتروفتومتری در جدول ۱ نشان داده شده است. نتایج تجزیه واریانس میزان غلظت DNA به دست آمده نشان داد بین روش‌های مورد بررسی به لحاظ آماری در سطح احتمال یک درصد اختلاف معنی‌داری وجود دارد (جدول ۲).

بر اساس این نتایج روش Chelex با میانگین۸۵/۴ نانو گرم بر میلی‌لیتر دارای بیشترین غلظت دی‌ان‌ای استخراجی بوده و با سایر روش‌ها اختلاف معنی‌داری نشان داد. روش‌های CTAB و Lysis بافر با دارا بودن کمترین میزان غلظت DNA در یک گروه آماری قرار گرفتند.

بحث

در تعیین یک روش استخراج دی‌ان‌ای بهینه عواملی از قبیل، هزینه و مدت زمان لازم به منظور استخراج دی‌ان‌ای هر نمونه، حجم نمونه استخراجی، مواد، ترکیبات اضافی و دستگاه‌های مورد نیاز باید مد نظر قرار گیرند (۱).

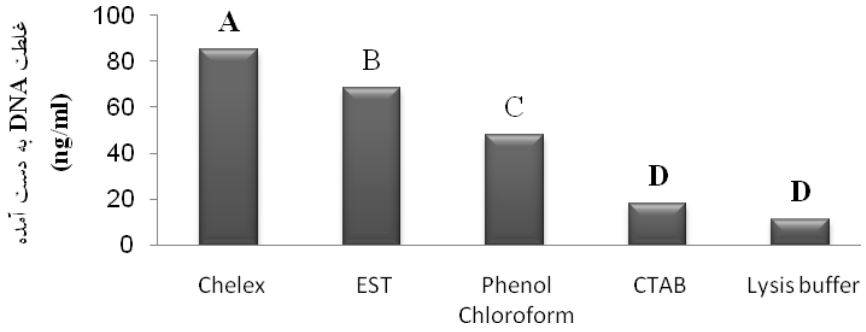
جدول ۱- غلظت‌ها و نسبت‌های به دست آمده توسط اسپکتروفتومتری

روش‌ها	تکرار	غلظت DNA (ng/ml)	نسبت DNA/Protein	نسبت DNA/RNA
EST	۱	۴۱/۴۰	۲/۲۳	۰/۱۰
	۲	۳۱/۰۰	۳/۰۸	۰/۱۲
	۳	۹۸/۵۰	۲/۲۴	۰/۲۹
	۴	۴۲/۶۰	۲/۵۱	۰/۱۳
	۵	۶۰/۶۰	۲/۴۱	۰/۱۹
	۶	۷۰/۷۰	۲/۵۳	۰/۲۱
	۷	۴۰/۹۰	۲/۷۶	۰/۱۲
	۸	۱۲۰/۹۰	۲/۳۲	۰/۳۳
	۹	۸۶/۳۰	۲/۴۳	۰/۲۶
	۱۰	۹۳/۳۰	۲/۴۳	۰/۲۵
	۱۱	۶۸/۶۲	۲/۵۸	۰/۱۸
Phenol-chloroform	۱	۶۱/۴۰	۱/۵۸	۰/۱۵
	۲	۴۰/۹۰	۱/۸۱	۰/۱۲
	۳	۲۱/۱۰	۱/۸۳	۰/۰۷
	۴	۱۸/۶۰	۲/۳۷	۰/۰۶
	۵	۹۱/۵۰	۱/۵۴	۰/۲۶
	۶	۴۲/۸۰	۱/۶۶	۰/۱۲
	۷	۵۸/۸۰	۱/۵۸	۰/۱۷
	۸	۴۰/۳۰	۱/۷۸	۰/۱۱
	۹	۴۱/۳۰	۱/۶۶	۰/۱۱
	۱۰	۶۳/۶۰	۱/۵۴	۰/۱۷
	۱۱	۴۸/۰۳	۱/۹۲	۰/۱۱
Lysis buffer	۱	۶/۱۰	۱/۸۴	۰/۲۴
	۲	۲۴/۷۰	۲/۳۸	-۲/۶۲
	۳	۱/۵۰	۲/۲۰	-۰/۱۳
	۴	۱۹/۵۰	۲/۲۷	-۱/۴۸
	۵	۱۰/۰۸	۲/۷۶	-۵/۱۲
	۶	۱۳/۸۰	۲/۷۴	-۰/۸۴
	۷	۸/۱۰	۳/۰۴	-۱/۲۹
	۸	۱۴/۲۰	۲/۳۵	-۰/۹۰
	۹	۵/۷۰	۳/۸۸	-۰/۲۰
	۱۰	۸/۰۰	۳/۷۷	-۰/۴۳
	۱۱	۱۱/۱۷	۲/۸۴	۰/۲۱[۱]
CTAB	۱	۲۱/۰۰	۱/۳۰	-۰/۲۵
	۲	۱۷/۰۰	۳/۶۱	-۰/۲۸
	۳	۴/۰۰	۲/۷۲	-۰/۴۷
	۴	۱۷/۰۰	۲/۶۴	-۰/۴۳
	۵	۳۰/۰۰	۱۰/۳۹	-۰/۱۷
	۶	۱۰/۵۰	۰/۴۵	۰/۰۳
	۷	۴۲/۲۰	۲/۰۱	-۰/۰۵
	۸	۱۷/۸۰	۱۲/۰۱	-۰/۱۱
	۹	۷/۰۰	۳/۸۹	-۰/۶۳
	۱۰	۱۴/۰۰	۲/۲۹	۰/۱۱
	۱۱	۱۸/۰۵	۲/۱۵	-۰/۲۸
Chelex	۱	۷۹/۵۰	۰/۷۹	۱/۵۰
	۲	۸۹/۸۰	۱/۴۲	۳/۴۹
	۳	۷۱/۳۰	۱/۷۸	-۲/۵۹
	۴	۱۰۲/۹۰	۱/۶۲	۱/۰۵
	۵	۹۵/۰۰	۱/۰۰	۱/۳۶
	۶	۱۰۰/۸۰	۱/۰۳	۱/۹۴
	۷	۸۵/۴۰	۱/۳۰	۲/۵۲
	۸	۹۹/۲۰	۷/۴۷	-۱/۰۷
	۹	۹۲/۶۰	۱/۰۸	۲/۰۰
	۱۰	۸۶/۳۰	۲/۱۹	-۱/۲۰
	۱۱	۳۶/۶۰	۱/۵۸	۱/۱۲

جدول ۲- تجزیه واریانس غلظت دی‌ان‌ای

منابع تغییرات	درجه آزادی (df)	میانگین مربعات (MS)
تیمار (روش استخراج)	۴	۱/۸۶ **
خطا	۵۰	۰/۰۵
C. V.		۱۵/۷۶

**- در سطح ۱ درصد معنی‌دار



شکل ۱- نمودار مقایسه میانگین غلظت دی‌ان‌ای به دست آمده در روشهای مختلف استخراج دی‌ان‌ای

نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد که کمیت و کیفیت دی‌ان‌ای حاصل از روش چلکس مطلوب‌تر از دیگر روش‌ها است، به طوریکه اختلاف معنی‌داری با دیگر روش‌های استخراجی نشان داد. این روش بدون نیاز به حلال‌های آلی، تیوب‌های متعدد و نیز به دلیل عدم دارا بودن ترکیبات شیمیایی روشی بسیار ایمن است. روش EST بعد از روش چلکس، دارای بیشترین غلظت دی‌ان‌ای بوده که در مدت زمان کمتر از یک ساعت کامل می‌گردد. روش CTAB به همراه روش Lysis buffer در یک گروه آماری قرار گرفت، هر دو روش از غلظت کمی برخوردار بوده و با توجه به تعداد زیاد مراحل، صرف مدت زمان زیاد و آلودگی شدید به ترکیبات آلی، روش چندان مناسبی به منظور استخراج دی‌ان‌ای نمی‌باشند، اگر چه روش CTAB هم اکنون در بسیاری از آزمایشگاه‌های مولکولی خصوصاً در رابطه با استخراج از بافت‌های گیاهی مورد استفاده قرار می‌گیرد. تعداد مراحل زیاد در روش‌های CTAB، فنل- کلروفرم و Lysis بافر احتمال آلودگی نمونه‌ها را بالا می‌برد. از طرف دیگر استفاده از آنزیم‌ها و ترکیباتی از قبیل فنل-کلروفرم هزینه این روش‌ها را به طور معنی‌داری افزایش می‌دهد. با در نظر گرفتن تمامی موارد یاد شده و میزان غلظت DNA به دست آمده از روش‌های مورد بررسی، در نهایت روش چلکس به عنوان روشی ساده، ایمن و کارآمد برای استخراج دی‌ان‌ای ژنومی زنبورهای *Lysiphlebus* پیشنهاد می‌شود.

منابع

1- Fredricks D.N., Smith C. and Meier A. 2005.Comparison of Six DNA Extraction Methods for Recovery of Fungal DNA as Assessed by Quantitative PCR, Journal of clinical microbiology, 43: 5122-5128.

2- Juen A. and Traugott M. 2005. Detecting predation and scavenging by DNA gut-content analysis: a case study using a soil insect predator-prey system, Oecologia, 142: 344- 352.

3- Koekemoer L.L., Kamau L., Hunt R.H. and Coetzee M. 2002. A cocktail polymerase chain reaction assay to identify members of the *Anopheles funestus* (Diptera: Culicidae) group, The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, 6: 804-811.

4- Longmire J.L., Maltbie M. and Baker R.J. 1997. Use of "Lysis buffer" in DNA isolation and its implication for museum collections. Occasional Papers, The Museum of Texas Tech University, 163: 1-3.

5- Persad A.B., Jeyaprakash A. and Hoy M. 2004. High-fidelity PCR assay discriminates between immature *Lipolexis oregmae* and *Lysiphlebus testaceipes* (Hymenoptera: Aphidiidae) within their aphid hosts, Florida Entomologist, 87: 18-27.

6- Sambrook J., Fritsch E.F. and Maniatis T. 1989."Molecular Cloning: A Laboratory Manual," 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.

7- Sandrock C., Frauenfelder N., Burg S.V. and Vorburger C. 2007. Microsatellite DNA markers for the aphid parasitoid *Lysiphlebus fabarum* and their applicability to related species, Molecular Ecology Notes, 7: 1080-1083.
8- Walsh P.S., Metzger D.A. and Higuchi R. 1991. Chelex 100 as a medium for simple extraction of DNA for PCR-based typing from forensic material, Biotechniques, 10: 506-513.