



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.

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 (*Fragaria × 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

¹Plant Sciences Department, Biological Sciences Faculty, Kharazmi University, Tehran, Iran

²Agriculture 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

مقایسه کارایی 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

فدانه یاری PhD

پژوهشکده کشاورزی، سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی 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 فرایند 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 فرایند 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 کارایی استخراج DNA، از روش‌های ستیل‌تری‌متیل‌اتیل‌آمونیم‌بروماید (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 و کمیت 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 دسترس بودن 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 بالا بردن کمیت و کیفیت آن انجام شده است. اگرچه تنوع ژنتیکی و تفاوت‌های ناشی از آن، مانع از کارایی 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 پایین آمدن کارایی تحقیقات انجام‌شده بر مبنای آن شده و هنگام استخراج DNA بر اثر اتصال قوی بین اسیدهای نوکلئیک با متابولیت‌های ثانویه و پلی‌ساکاریدها، ادامه روند فرایند 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 تک‌پلیمرز 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 کارایی 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 با کیفیت 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.

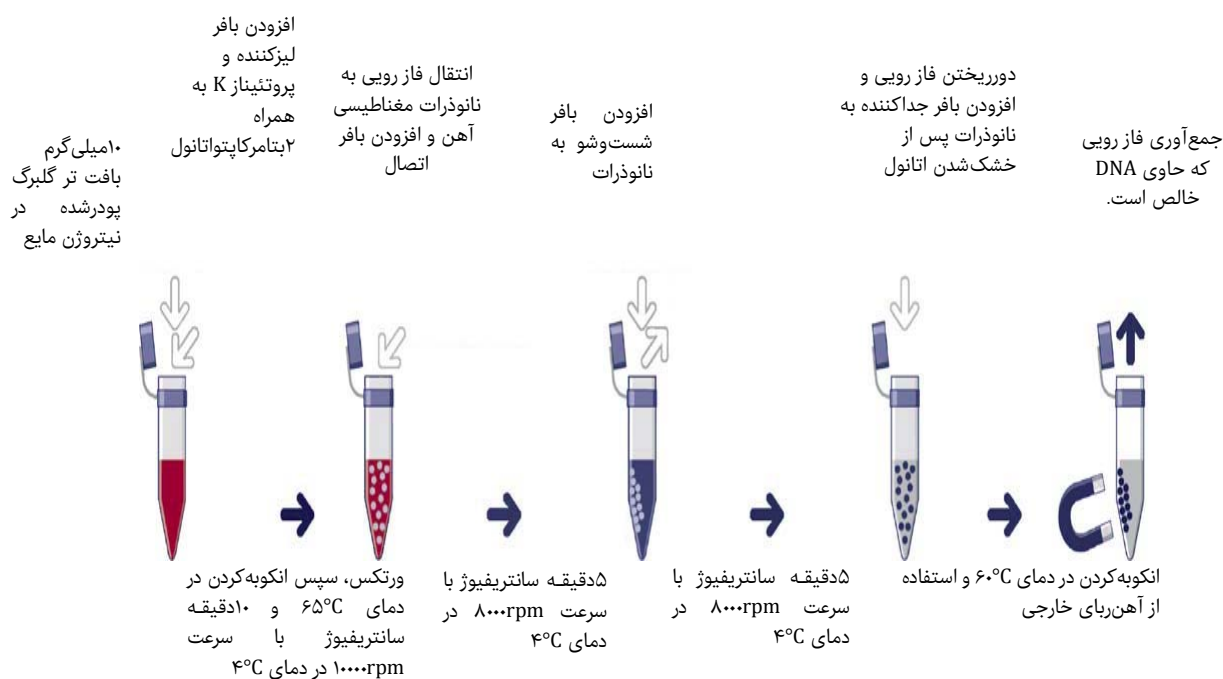
مواد و روش‌ها

مواد گیاهی: گل‌ها از پایه‌های یکساله گل‌های سرخ شاخه‌بریده رقم "Vendetta" از گلخانه پژوهشی سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران با دمای $25 \pm 2^\circ\text{C}$ و رطوبت نسبی $70 \pm 5\%$ با دوره نوری ۱۶ ساعت 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]. ۱۰ میلی‌گرم 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 (گوانیدین تیوسیانات، تریس‌هیدروکلراید، اتیلن‌دی‌آمین‌تترا استیک‌اسید، تریتون X-100، سدیم کلراید،

شد. در ادامه بافر شست و شو (گوانیدین هیدروکلراید، تریس هیدروکلراید، اتیلن دی آمین تترا استیک اسید، اتانول مطلق، دی اتیل پیروکربنات، با میزان pH برابر با ۵/۶) به نانوذرات مغناطیسی آهن اضافه و خوب مخلوط شد. پس از سانتریفیوژ مجدد به مدت ۵ دقیقه با سرعت ۸۰۰۰ دور در دقیقه در دمای ۴°C، فاز رویی دور ریخته شد و ویال حاوی نانوذرات مغناطیسی آهن به حالت برعکس به مدت ۱۰ دقیقه قرار داده شد تا اتانول آن خشک شود. در این مرحله بافر جداکننده (تریس هیدروکلراید، اتیلن دی آمین تترا استیک اسید، دی اتیل پیروکربنات، با میزان pH برابر با ۸/۹) به نانوذرات مغناطیسی آهن اضافه شد، به طوری که نانوذرات در آن به طور کامل معلق شده و سپس تیوب در دمای ۶۰°C انکوبه شد و با استفاده از یک آهن ربای خارجی، نانوذرات مغناطیسی آهن بی حرکت شد و فاز رویی که حاوی DNA بود، جمع آوری، سپس به تیوب های استریل جدید منتقل و در دمای ۲۰°C نگهداری شد (شکل ۱).

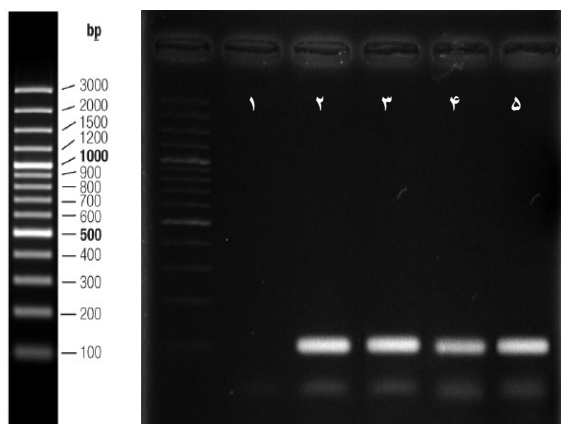
پتاسیم استات، ان لوریل سارکوزیل، سدیم سیترات، سدیم استات، پلی وینیل پیرولیدون، گلوکز، دی اتیل پیروکربنات، میزان Ph برابر با ۳/۵ اضافه شد. به دنبال آن پروتئیناز K (۲ میلی گرم بر میلی لیتر)، همراه با ۲- بتامرکاپتواتانول به مخلوط اضافه و ورتکس شد. در ادامه نمونه ها در دمای ۶۵°C انکوبه و سپس به مدت ۱۰ دقیقه 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 اسید اولئیک و تووین ۲۰ است. در ادامه نانوذرات مغناطیسی آهن به آرامی مخلوط شده تا به طور کامل در محلول معلق شوند. در این مرحله بافر اتصال (پلی اتیلن گلیکول، سدیم کلراید، دی اتیل پیروکربنات) اضافه و به شدت مخلوط شد تا به طور کامل نانوذرات مغناطیسی آهن در محلول پخش شوند. سپس به مدت ۵ دقیقه با سرعت ۸۰۰۰ دور در دقیقه در دمای ۴°C سانتریفیوژ صورت گرفت و فاز رویی دور ریخته



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

سانتریفیوژ و فاز رویی به میکروتیوب جدید منتقل شد. در ادامه هم حجم آن ایزوپروپانول افزوده و مخلوط شد. سپس نمونه ها برای مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۲۰°C انکوبه شدند. مجدداً سانتریفیوژ به مدت ۵ دقیقه با سرعت ۱۵۰۰۰ دور در دقیقه در دمای ۴°C صورت پذیرفت و رسوب ایجاد شده در ۱۰۰ میکرولیتر بافر TE حل شد. در ادامه نمونه ها به مدت ۵ دقیقه روی یخ نگهداری شدند و در این مرحله مجدداً سانتریفیوژ به مدت ۲ دقیقه 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.

استخراج DNA با استفاده از روش تشخیص سریع: ۴۰ میلی گرم بافت تر گلبرگ در دمای اتاق با سمبه استریل شده درون تیوب های استریل له شد و سپس ۵۰۰ میکرولیتر بافر استخراجی (سدیم دودسیل سولفات ۵٪، EDTA ۲۵ میلی مولار، سدیم کلرید ۲۵۰ میلی مولار، ۲۰۰ میلی مولار تریس-HCl با میزان pH برابر با ۷/۵) به آنها افزوده شد^[۱۴]. در ادامه تیوب ها حاوی نمونه و بافر در دمای ۶۰°C به مدت ۳۰ دقیقه انکوبه شدند. سپس هم حجم آن کلروفرم-ایزوآمیل الکل (۲۴:۱) به عصاره افزوده شد. به دنبال آن نمونه ها به مدت ۵ دقیقه با سرعت ۱۵۰۰۰ دور در دقیقه در دمای ۴°C



شکل ۲ الکتروفورز ژل آگارز محصول آزمون PCR، DNA ژنومی استخراج شده 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)- چاهک های ۲-۵: آلفاتوبولین، ۹۸ جفت باز

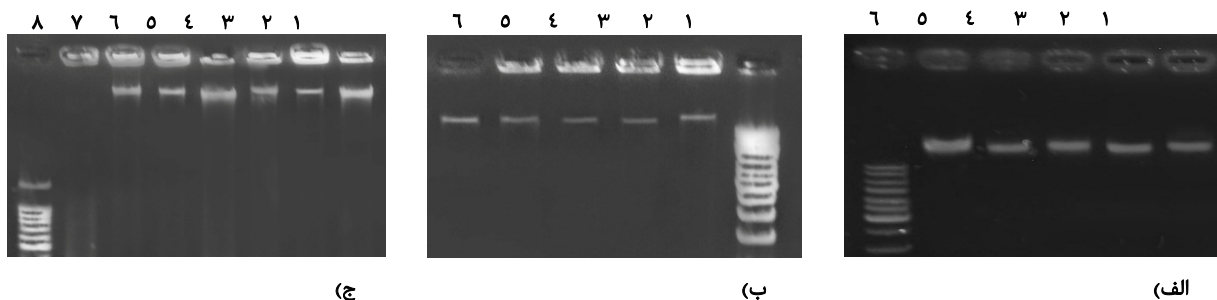
نتایج و بحث

سنجش کمی و کیفی DNA حاصل از نمونه های گلبرگ گل سرخ براساس سه روش به کار برده شده توسط اسپکتروفتومتر و الکتروفورز ژل آگارز ۱٪ آنالیز و نتایج به ترتیب در نمودار ۱ و ۳ ذکر شده اند. در سنجش کیفی DNA های استخراجی سه روش مذکور نمونه های DNA حاصل از روش هم رسوبی با نانوذرات مغناطیسی آهن باندهای واضح و بدون اسمیری را نشان دادند، در حالی که باندهای نمونه های حاصل از دو روش دیگر از وضوح خوب و مطلوبی برخوردار نبودند (شکل ۳). اگرچه تصویر ژل آگارز به تنهایی برای نتیجه گیری صحیح گویا نیست. با این حال، وضوح و کیفیت باندهای استخراج DNA در روش تشخیص سریع در مقایسه با روش CTAB بهتر بود. در ادامه برای حصول نتیجه قابل اعتمادتر از سنجش کمی داده ها از روش اسپکتروفتومتری استفاده شد. سنجش کمی DNA های استخراج شده توسط اسپکتروفتومتر نشان دادند که بیشترین میزان DNA به دست آمده از گلبرگ گل سرخ توسط روش نانوذرات مغناطیسی آهن است که با میزان DNA به دست آمده توسط دو روش دیگر اختلاف معنی داری را نشان داد (جدول ۱ و نمودار ۱-الف). همچنین نسبت های جذب نوری ۲۶۰ به ۲۳۰ در روش هم رسوبی با نانوذرات (۱/۹۹)، با روش تشخیص سریع (۱/۳۸) و همینطور روش CTAB (۰/۹۸) و جذب نوری ۲۶۰ به ۲۸۰ در روش هم رسوبی با نانوذرات (۱/۹۸)، با روش تشخیص سریع (۱/۳۳) و همینطور روش CTAB (۰/۹۶) اختلاف معنی داری ($p \leq 0.01$) را نشان دادند (جدول ۱ و نمودار ۱-ب و ج). شایان ذکر است که اعداد گزارش شده بیانگر آن است که روش هم رسوبی با نانوذرات مغناطیسی آهن تا حد قابل توجهی توانسته است میزان آلودگی ها را به هنگام استخراج کاهش دهد و در نهایت کیفیت DNA استخراجی بسیار مطلوب است.

استخراج DNA با استفاده از روش CTAB: در این روش برای استخراج از ۱۰۰ میلی گرم بافت تر گلبرگ از شیوه بهینه شده ستیل تری متیل اتیل آمونیوم بروماید (CTAB) استفاده شد [11-13]. به طور خلاصه بافت گیاهی مذکور در هاون به کمک نیتروژن مایع کاملاً آسیاب شده و به تیوب های استریل انتقال داده شد. سپس ۷۰۰ میکرولیتر بافر CTAB به نمونه ها افزوده و در ادامه استخراج به کمک ۲۰ میکرولیتر بتامرکاپتوانول انجام و نمونه ها در دمای 55°C برای مدت ۶۰ دقیقه انکوبه شدند و در این مدت هر ۵ دقیقه یکبار سر و ته می شدند. سپس خروج تیوب ها از حمام آب گرم و خنک کردن آنها در دمای اتاق صورت گرفت. در ادامه استخراج به کمک ۷۰۰ میکرولیتر کلروفرم- ایزوآمیل الکل (۲۴:۱) تکمیل شد. سپس سانتریفیوژ به مدت ۱۵ دقیقه با سرعت ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه در دمای 4°C صورت پذیرفت (امکان تکرار سانتریفیوژ، وابسته به درجه شفافیت فاز رویی است). سپس ۷۰۰ میکرولیتر ایزوپروپانول سرد به فاز رویی افزوده و تیوب ها به مدت ۲ ساعت در یخچال 4°C نگه داری شدند. سپس سانتریفیوژ به مدت ۱۵ دقیقه با سرعت ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه در دمای 4°C صورت گرفت. نهایتاً فاز رویی دور ریخته شد و سپس تیوب ها دو مرتبه با اتانول ۷۰٪ شسته شدند. سپس به منظور حذف کامل اتانول، تیوب های حاوی DNA به حالت برعکس به مدت ۱۰ دقیقه در دمای اتاق قرار گرفتند تا کاملاً خشک شوند و رسوب ایجاد شده در ۱۰۰ میکرولیتر بافر TE حل و در انتها DNA حاصله در 20°C - نگهداری شد.

بررسی کیفیت و کمیت DNA: برای بررسی کیفیت DNA های استخراج شده، از ژل آگارز ۱٪ و عکس برداری در دستگاه ژل داک و به منظور تعیین کمیت آن از اسپکتروفتومتر Eppendorf BioPhotometer @D30 با اندازه گیری میزان جذب نوری ۲۶۰ به ۲۸۰ و ۲۶۰ به ۲۳۰ نانومتر استفاده و غلظت براساس نانوگرم در میکرولیتر خوانده شد. در ادامه با استفاده از نرم افزار AlleleID به منظور طراحی آغازگرهای مناسب رفت (CCACCTACCAATCTCAATC) و برگشت (CTGAATGTGGATGTGACTGAG) نوکلئوتیدی از بانک ژن NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) برای تکثیر ژن خانه دار آلفاتوبولین (۹۸ جفت باز) با لوکوس شناسایی AF394915 واکنش زنجیره ای پلیمرز انجام شد (شکل ۲). واکنش زنجیره ای پلیمرز شامل مرحله واسرشت سازی اولیه در 94°C به مدت ۲ دقیقه، ۳۵ سیکل شامل واسرشت سازی، 94°C به مدت ۳۰ ثانیه، اتصال پرایمر، 59°C به مدت ۳۰ ثانیه و بسط پرایمر، 72°C به مدت ۳۰ ثانیه و مرحله بسط نهایی 72°C به مدت ۵ دقیقه بود.

تجزیه های آماری: داده های حاصل توسط نرم افزار SAS 9.1 براساس واریانس یک طرفه مورد تجزیه قرار گرفتند و همچنین مقایسه میانگین با استفاده از آزمون چنددامنه ای دانکن انجام شد. قابل ذکر است کلیه آزمایش ها در سه تکرار انجام و نتایج با استفاده از نرم افزار اکسل ۲۰۱۶ رسم شد.



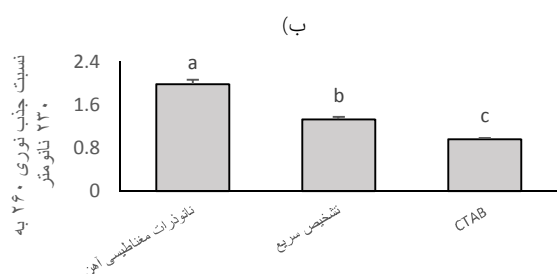
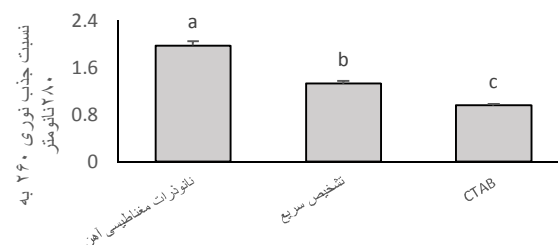
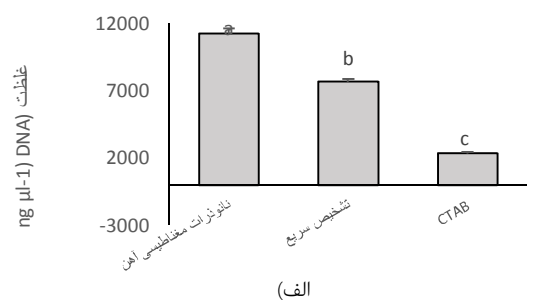
شکل ۳) الکتروفورز ژل آگارز DNA گلبرگ گل سرخ با روش‌های مختلف (الف) نانوذرات مغناطیسی آهن، (ب) CTAB و (ج) تشخیص سریع

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 پلیمرز، 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 زمان‌بر بودن فرآیند استخراج است [20]. مزیت روش تشخیص سریع [14] به روش مرسوم CTAB، قابلیت استفاده از مواد گیاهی اندک (۴۰ میلی‌گرم) 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

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

منابع تغییر	درجه آزادی	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 معنی‌دار بودن 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 ۲۸۰ نانومتر و (ج) نسبت جذب نوری ۲۶۰ به ۲۳۰ نانومتر با استفاده از سه روش استخراجی؛ داده‌ها نماینده سه تکرار مستقل هستند. حروف متفاوت نشان‌دهنده معنی‌دار بودن تفاوت در سطح $p \leq 0.05$ است.

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 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.

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.

تاییدیه اخلاقی: 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 منافی وجود ندارد.

سهم نویسندگان: فائزه خاتمی (نویسنده اول)، پژوهشگر اصلی (۲۵٪)؛ فرزانه نجفی (نویسنده دوم)، نگارنده مقدمه/روش‌شناس (۲۵٪)؛ فائزه 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

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 (۱۰ میلی‌گرم)، 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 آهن‌ریا به‌دلیل اندازه بسیار کوچک آن و افزایش کارایی 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 آهن‌ریا، DNA به‌صورت روشن‌آور 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 کارایی 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

- 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