جمهوری اسلامی ایران

وزارت جهاد کشاورزی

سازمان تحقیقات آموزش و ترویج کشاورزی

موسسه علوم شیلاتی کشور

پژوهشکده اکولوژی خلیج فارس و دریای عمان

عنوان دستور العمل	**دستور العمل فنی استخراج ماده ژنتیکی کل (Total DNA) در جانوران آبزی**	
شماره دستورالعمل		تاریخ شروع اجرا
شماره بازنگری		تاریخ اعتبار

عنوان

دستور العمل فنی استخراج ماده ژنتیکی کل (Total DNA) در جانوران آبزی

شماره بازنگری	تاریخ بازنگری	شرح مختصر تغییرات	صفحات موردبازنگری

عنوان	تهیه کنندگان	تایید کننده	تصویب کننده
سمت: رییس بخش بیوتکنولوژی	سعید تمدنی جهرمی		

جمهوری اسلامی ایران

وزارت جهاد کشاورزی

سازمان تحقیقات آموزش و ترویج کشاورزی

موسسه علوم شیلاتی کشور

پژوهشکده اکولوژی خلیج فارس و دریای عمان

عنوان دستور العمل	**دستور العمل فنی استخراج ماده ژنتیکی کل (Total DNA) در جانوران آبزی**	
شماره دستورالعمل		تاریخ شروع اجرا
شماره بازنگری		تاریخ اعتبار

فهرست مندرجات

عناوین

۱، هدف : ارایه روش در زمینه استخراج ماده ژنتیکی کل (Total DNA) در جانوران آبزی میباشد.

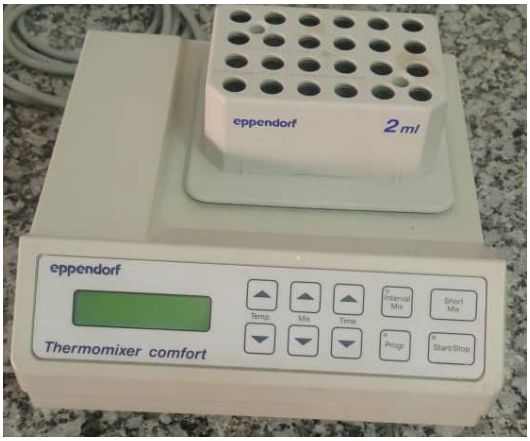
۲، دامنه کاربرد: مطالعات ژنتیکی در گونه های مختلف آبزیان ، تشخیص بیماری های ویروسی

۳، مسئولیت : استخراج DNA و تعیین کمیت و کیفیت آن توسط کارشناس مربوطه صورت می‌گیرد.

۴، تعاریف

- DNA : ماده ژنتیکی انتقال دهنده صفات و تمایز ژنتیکی در گونه های مختلف
- ترمو میکسر:

دستگاهی است که دما و لرزش مناسب را در جهت نفوذ پروتییناز K و تخریب بافت چربی و پروتیینی را فراهم کرده و به آزاد سازی DNA از سلول کمک میکند.



عنوان	تهیه کنندگان	تایید کننده	تصویب کننده
سمت: رییس بخش بیوتکنولوژی	سعید تمدنی جهرمی		

جمهوری اسلامی ایران

وزارت جهاد کشاورزی

سازمان تحقیقات آموزش و ترویج کشاورزی

موسسه علوم شیلاتی کشور

پژوهشکده اکولوژی خلیج فارس و دریای عمان

عنوان دستور العمل	**دستور العمل فنی استخراج ماده ژنتیکی کل (Total DNA) در جانوران آبزی**	
شماره دستورالعمل		تاریخ شروع اجرا
شماره بازنگری		تاریخ اعتبار

- دستگاه **میکرو سانتریفیوژ**

میکرو سانتریفیوژ یکی از تجهیزات متداول آزمایشگاهی است که برای چرخاندن نمونه های اندک مایع در سرعت های بالا استفاده می شود. سانتریفیوژ نمونه های اندک برای بسیاری از کاربرد های زیست شناسی مهم است نظیر به شکل جدا سازی اسید های نوکلئیک یا پروتئین ها از یک محلول ، ریز فیلتراسیون نمونه های آبی اندک یا به آسانی برای گرد هم آوری آخرین قطرات با ارزش مایع به داخل کف لوله ی آزمایشگاه. اکثر اوقات ، **میکرو سانتریفیوژ** ها سانتریفیوژ های کوچک رو میزی فشرده ای هستند که در مدل های غیر یخچالی شده یا یخچالی شده وجود دارند. حداکثر تعداد تیوب های ۱/۵ با ۲ میلی لیتری حاوی نمونه که بتوان در یک گردش نگه داشت در میکروسانتریفوژ ها بین ۱۲ تا ۲۴ تیوب میباشد.

عنوان	تهیه کنندگان	تایید کننده	تصویب کننده
سمت: رییس بخش بیوتکنولوژی	سعید تمدنی جهرمی		

جمهوری اسلامی ایران

وزارت جهاد کشاورزی

سازمان تحقیقات آموزش و ترویج کشاورزی

موسسه علوم شیلاتی کشور

پژوهشکده اکولوژی خلیج فارس و دریای عمان

عنوان دستور العمل	**دستور العمل فنی استخراج ماده ژنتیکی کل (Total DNA) در جانوران آبزی**	
شماره دستورالعمل		تاریخ شروع اجرا
شماره بازنگری		تاریخ اعتبار

- اسپکتروفتومتر (Bio photometer) یا دستگاه طیف‌سنج نوری

اسپکتروفتومتر مرئی– ماوراءبنفش یا Spectrophotometer UV/Vis از تجهیزات آنالیتیکال آزمایشگاهی است که از برهم‌کنش بین نور و ماده جهت آنالیز مواد استفاده می‌کند. مهم‌ترین کاربرد دستگاه طیف‌سنج اسپکتروفتومتر در مقدار سنجی مواد و ترکیبات مولکولی با استفاده از خاصیت جذب مولکولی نور توسط ماده آنالیز می‌باشد. دستگاه اسپکتروفتومتر مرئی با استفاده از لامپ تنگستن و اسپکتروفتومتر ماوراءبنفش یا UV با بکار بردن لامپ دوتریم امکان اندازه‌گیری غلظت آنالیز را فراهم می‌آورد. میزان جذب هر ماده شیمیایی در طول‌موج‌های مختلف انرژی الکترومغناطیس متفاوت می‌باشد. با توجه به این امر، هر ماده شیمیایی در طول‌موج خاصی از انرژی الکترومغناطیس حداکثر جذب و حداقل عبور را خواهد داشت که این فرآیند در جهت تعیین خاصیت آن ماده شیمیایی استفاده می‌شود. همچنین غلظت هر ماده شیمیایی نیز در میزان جذب طول‌موج خاصی از امواج الکترومغناطیس تأثیر دارد. بطوریکه با افزایش غلظت ماده، میزان جذب در طول‌موج مشخص افزایش و با کاهش غلظت، میزان جذب کاهش و مقدار نور عبوری افزایش می‌یابد که به نام قانون بیر*شناخته می‌شود .غلظت نمونه های DNA استخراج شده با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر اندازه‌گیری میشود تا مقادیری که در مرحله PCR بایستی استفاده شود معین شود. این عمل با استفاده از رابطه میزان جذب نوری (OD) نمونه ها در طول موج ۲۶۰ نانومتر انجام میگیرد. خلوص DNA استخراجی با استفاده از نسبت جذبی OD260/OD 280 تعیین میشود. (Sambrook, 1989).

عنوان	تهیه کنندگان	تایید کننده	تصویب کننده
سمت: رییس بخش بیوتکنولوژی	سعید تمدنی جهرمی		

جمهوری اسلامی ایران

وزارت جهاد کشاورزی

سازمان تحقیقات آموزش و ترویج کشاورزی

موسسه علوم شیلاتی کشور

پژوهشکده اکولوژی خلیج فارس و دریای عمان

عنوان دستور العمل	**دستور العمل فنی استخراج ماده ژنتیکی کل (Total DNA) در جانوران آبزی**	
شماره دستورالعمل		تاریخ شروع اجرا
شماره بازنگری		تاریخ اعتبار

دستگاه بیوفتومتر جهت اندازه گیری مقدار DNA استخراج شده

* قانون بیر : با افزایش غلظت ماده، میزان جذب در طول‌موج مشخص افزایش و با کاهش غلظت، میزان جذب کاهش و مقدار نور عبوری افزایش می‌یابد که به نام قانون بیر شناخته می‌شود.

- کوت

کووت ها محفظه‌های شفافی هستند که محلول مورد آزمایش در آن ریخته شده و در جایگاه خاص خود که در مسیر نور تک‌رنگ تعبیه‌شده است قرار می‌گیرد .کوت‌ها با توجه به نوع مصرف، جنس،

عنوان	تهیه کنندگان	تایید کننده	تصویب کننده
سمت: رییس بخش بیوتکنولوژی	سعید تمدنی جهرمی		

شکل و حجم متفاوتی دارند. برای محلول‌های اسیدی و قلیایی از کووت‌های مخصوص شیشه‌ای از جنس کوارتز استفاده می‌شود.

۵، روش کار

الف: روش استخراج Total DNA با استفاده از فنل – کلروفورم (Taggart et al.,1990)

- در این روش ابتدا mg ۵۰ از بافت عضلانی فیکس شده در اتانول خالص را در داخل تیوپهای ۱/۵ میلی لیتری بصورت قرارداده وخرد میشود .

- سپس بر روی آن مقدار۵۰۰ میکرولیتر از محلول STE (Salt,Triss,EDTA) ریخته میشود.بدینصورت قطعات خرد شده بصورت سوسپانسیون در می‌آیند.

- در مرحله بعدی مقدار ۶ میکرولیتر پروتئنیاز K (10 mg/ml) و ۲۰ میکرولیتر SDS ۲۰٪ (سدیم دودسیل سولفات) به تیوبها اضافه کرده و تیوپها در ترمومیکسر ۵۰ درجه سانتی گراد به مدت ۵-۶ ساعت قرار داده میشوند.

- .بعد از مرحله هضم سلولی مقدار ۴۲۵ ماکرولیتر فنل (PH= 8) ۴۲۵ ماکرولیتر کلروفرم – ایزو آمیل الکل (۲۴ :۱) اضافه نموده و به مدت ۱ دقیقه با استفاده از شیکلر هم زده شدند. سپس نمونه ها به مدت ۵ دقیقه در ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ میشوند.

- بعد از سانتریفوژ دو فاز در داخل تیوبها تشکیل میگردد که فاز آبی یا محلول رویی را برداشته و فاز آلی را دور ریخته میشوند.

- فاز آبی را به تیوپهای جدید انتقال و مرحله اول دوباره تکرارمیشود. عمل مخلوط کردن توسط شیکر و سانتریفوژ مجدداً تکرار میگردد.

عنوان دستور العمل	**دستور العمل فنی استخراج ماده ژنتیکی کل (Total DNA) در جانوران آبزی**	
شماره دستورالعمل		تاریخ شروع اجرا
شماره بازنگری		تاریخ اعتبار

- فاز رویی را به تیوبهای جدید منتقل و به مقدار هم حجم آن کلروفورم - ایزوآمیل الکل (۲۴:۱) اضافه کرده و عمل هم زدن و سانتریفوژ کردن انجام میگیرد.
- در نهایت دو برابر حجم محلول بالایی جدا شده، اتانول خالص و ۵۰ ماکرولیتر نمک ۴ مولار اضافه میگردد و بعد از چندین بار به هم زدن به مدت یک شبانه روز در فریزر ۲۰- قرار داده میشود.
- روز بعد نمونه ها در دور ۱۲۰۰۰ دور به مدت ۱۵ دقیقه سانتریوفوژ گردیده و فاز رویی دور ریخته و پلاک DNA در ته تیوب قابل مشاهده است.
- در مرحله بعد این پلاک را با الکل ۷۰ درصد شستشو و سپس در هوای آزاد قرار داده تا خشک شود بعد از این مرحله بر روی رسوب به مقدار ۵۰ میکرولیتر از بافر TE و یا آب مقطر اضافه میگردد و در ۲۰ - درجه سانتی گراد نگهداری میشود.

ب: روش استخراج Total DNA بدون استفاده از فنل (Cattaneo 1997) :

در این روش که سریعتر از روش قبلی می باشد

- ابتدا mg ۵۰ از بافت عضلانی فیکس شده در اتانول خالص را در داخل تیوبهای ۱/۵ لیتری بصورت خرد شده قرار میشود.
- سپس بر روی آن مقدار ۵۰۰ میکرو لیتر از محلول STE اضافه کرده همچنین به میزان ۶ میکرولیتر پروتئیناز k (۱۰mg/ml) و ۲۰ میکرو لیتر SDS ۲۰٪ اضافه کرده و تیوبها را در ترمیکسر ۵۰ درجه سانتی گراد قرار داده میشود.

عنوان	تهیه کنندگان	تایید کننده	تصویب کننده
سمت: رییس بخش بیوتکنولوژی	سعید تمدنی جهرمی		

عنوان دستور العمل	**دستور العمل فنی استخراج ماده ژنتیکی کل (Total DNA) در جانوران آبزی**		
شماره دستورالعمل		تاریخ شروع اجرا	
شماره بازنگری		تاریخ اعتبار	

- پس از هضم سلولها به میزان ۱۰۰ میکرولیتر از محلول آمونیوم استات ۷/۵ مولار بر روی محلول داخل تیوب اضافه کرده و پس از هم زدن، نمونه ها را به مدت ۵ دقیقه با دور ۱۳۲۰۰ دور در ثانیه سانتریفوژ کرده و محلول رویی را به تیوپهای جدید انتقال داده به میزان ۵۰۰ میکرولیتر ایزوپروپانول اضافه کرده و عمل هم زدن و سانتریفوژ مـجدداً تـکـرار می شود.
- در نهایت محلول رویی دور ریخته شده و رسوبات جدار لوله و ته لوله با الـکل °۷۰ درجه شستشو داده شده و پس از آبگیری توسط کاغذ صافی جهت خشک شدن در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی گراد قرار داده می شود
- در نهایت بر روی رسوب به میزان ۵۰ میکرولیتر از بافر TE اضافه گردیده و برای استفاده در ۴ درجه سانتی یا ۲۰- گراد نگهداری میشوند.

الکتروفورز DNA استخراج شده :

الکتروفورز تکنیکی است که از طریق آن ذرات باردار در یک میدان الکتریکی از یکدیگر جدا می‌شوند. مولکولهای نظیر آمینو اسیدها و پروتئین به دلیل داشتن گروههای قابل یونیزاسیون می‌توانند در محیطهای بافری مختلف از نقطه نظر ایزوالکتریک آنها دارای بار الکتریکی مثبت یا منفی باشند.

بنابراین چنانچه این مولکولها تحت تاثیر میدان الکتریکی مناسب قرار گیرند می‌توانند به طرف الکترودها مهاجرت کنند. مولکولهایی که دارای بار یکسان ولی جرم مولکولی متفاوت هستند بدلیل تفاوت در نسبت جرم مولکولی به بار الکتریکی در میدان مناسب دارای سرعتهای مختلفی می‌باشند که این موضوع موجب جداسازی آنها میشود. به چنین فرایندی الکتروفورز می گویند.

عنوان	تهیه کنندگان	تایید کننده	تصویب کننده
سمت: رییس بخش بیوتکنولوژی	سعید تمدنی جهرمی		

جمهوری اسلامی ایران

وزارت جهاد کشاورزی

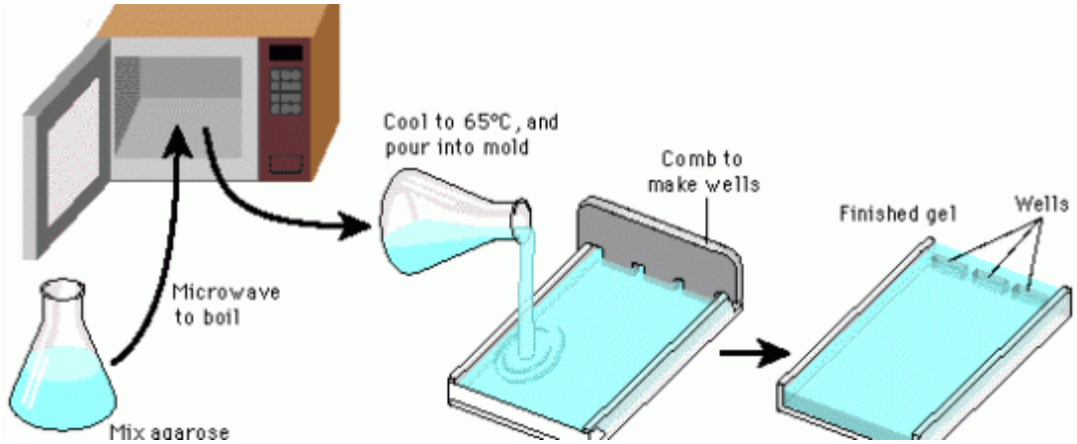
سازمان تحقیقات آموزش و ترویج کشاورزی

موسسه علوم شیلاتی کشور

پژوهشکده اکولوژی خلیج فارس و دریای عمان

عنوان دستور العمل	**دستور العمل فنی استخراج ماده ژنتیکی کل (Total DNA) در جانوران آبزی**	
شماره دستورالعمل		تاریخ شروع اجرا
شماره بازنگری		تاریخ اعتبار

DNA استخراج شده از نمونه ها برای ارزیابی کمی یا کیفی با استفاده از ژل آگارز الکتروفورز میشوند. برای این کار ابتدا قالب حاوی ژل آگاروز را در تانک مخصوص که با بافر TBE به مقدار لازم پر شده است قرار داده میشود



- در حدود ۴-۳ میکرولیتراز محصول استخراج شده را با ۲ میکرولیتر LB(بافر سنگین کننده) به همراه ۷-۶ میکرولیتر آب مقطر استریل شده مخلوط و ترکیب بدست آمده در چاهک های ایجاد شده در داخل ژل

عنوان	تهیه کنندگان	تایید کننده	تصویب کننده
سمت: رییس بخش بیوتکنولوژی	سعید تمدنی جهرمی		

جمهوری اسلامی ایران

وزارت جهاد کشاورزی

سازمان تحقیقات آموزش و ترویج کشاورزی

موسسه علوم شیلاتی کشور

پژوهشکده اکولوژی خلیج فارس و دریای عمان

عنوان دستور العمل	**دستور العمل فنی استخراج ماده ژنتیکی کل (Total DNA) در جانوران آبزی**		
شماره دستورالعمل		تاریخ شروع اجرا	
شماره بازنگری		تاریخ اعتبار	

آگارزکه قبلا توسط شانه مخصوص ایجاد شده است ریخته میشود و تانک را به دستگاه پاور ساپلای متصل میکنیم.الکتروفورز با جریان ۷۵ میلی آمپر (دستگاه EPS) به مدت ۴۵ دقیقه انجام میشود .

روش تهیه ژل آگارز :

- جهت آماده کردن ژل آگارز با علم مشخص بودن حجم ظرفی که ژل در آن ریخته می شود و محلول TAE تهیه و با آب مقطر به نسبت ۱ به ۹ رقیق کرده و سپس بسته به غلظت ژل آگارز مورد نظر پودر آگارز بر روی محلول ریخته میشود (۱ گرم در ۱۰۰ سی سی)

- این ترکیب روی شعله تا وقتیکه رنگ آن شفاف شود هم زده می شود. بعد از کاهش درجه حرارت محلول به میزان ۱ میکرولیتر رنگ Safe Stain به محلول اضافه کرده و بعد از هم زدن ، محلول نسبتاً سرد شده داخل ظرف الکتروفورز حاوی شانه ریخته میشود.

- ظرف ژل را در مکانی که دارای تراز یکنواخت باشد قرار داده تا محلول ژل قوام یافته و سفت شود.. عمدتاً بعد از ۱۵ دقیقه ژل سفت شده و شانه را از داخل ژل خارج و ژل در داخل دستگاه الکتروفورز قرار داده میشود.

- بعد از قرار دادن ژل در داخل دستگاه الکتروفورز و اتمام کار الکتروفورز آنگاه ژل را از دستگاه خارج کرده و جهت بررسی کیفیت DNA زیر اشعه UV (با استفاده از سیستم مستند ساز ژل) قرار داده تا با استفاده از خاصیت فلورسنت ایجاد شده باند DNA مورد ارزیابی قرار میگیرد.

عنوان	تهیه کنندگان	تایید کننده	تصویب کننده
سمت: رییس بخش بیوتکنولوژی	سعید تمدنی جهرمی		

جمهوری اسلامی ایران

وزارت جهاد کشاورزی

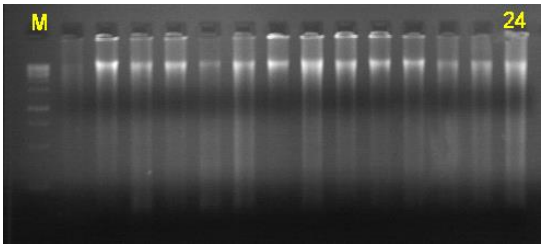
سازمان تحقیقات آموزش و ترویج کشاورزی

موسسه علوم شیلاتی کشور

پژوهشکده اکولوژی خلیج فارس و دریای عمان

عنوان دستور العمل	**دستور العمل فنی استخراج ماده ژنتیکی کل (Total DNA) در جانوران آبزی**		
شماره دستورالعمل		تاریخ شروع اجرا	
شماره بازنگری		تاریخ اعتبار	

دستگاه مستند سار ژل (ducumentation



Gel)

نمونه ای از DNA استخراج شده (بدون شکستگی و یا الودگی با RNA)

عنوان	تهیه کنندگان	تایید کننده	تصویب کننده
سمت: رییس بخش بیوتکنولوژی	سعید تمدنی جهرمی		

جمهوری اسلامی ایران

وزارت جهاد کشاورزی

سازمان تحقیقات آموزش و ترویج کشاورزی

موسسه علوم شیلاتی کشور

پژوهشکده اکولوژی خلیج فارس و دریای عمان

عنوان دستور العمل	**دستور العمل فنی استخراج ماده ژنتیکی کل (Total DNA) در جانوران آبزی**	
شماره دستورالعمل		تاریخ شروع اجرا
شماره بازنگری		تاریخ اعتبار

بررسی کمی DNA استخراجی

غلظت نمونه های DNA استخراج شده با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر اندازه‌گیری میشود تا مقادیری که در مرحله PCR بایستی استفاده شود معین شود. این عمل با استفاده از رابطه میزان جذب نوری (OD) نمونه ها در طول موج ۲۶۰ نانومتر انجام میگیرد. همچنین خلوص DNA استخراجی نیز با دستگاه اسپکتروفتومتر و با استفاده از نسبت جذبی OD260/OD 280 تعیین میشود. (Sambrook, 1989).

- جهت تعیین مقادیر DNA یا RNA از طریق استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر بایستی جذب نوری نمونه در طول موجهای ۲۶۰ و ۲۸۰ نانومتر قرائت شود. جذب نوری نمونه در طول موج ۲۶۰ نانومتر نشاندهنده غلظت اسید نوکلئیک نمونه میباشد بصورتیکه اگر جذب نوری نمونه‌ای از DNA در طول موج ۲۶۰ نانومتر برابر با یک شود نشاندهنده وجود تقریباً ۵۰ µg/ml از DNA دو رشته ای در محلول و ۴۰ µg/ml از DNA تک رشته ای و ۲۰µg/ml از الیگو نوکلئوتید تک رشته‌ای می باشد. همچنین نسبت بین جذب در طول موج ۲۶۰ نانومتر به جذب در طول موج ۲۸۰ نانومتر (OD260/OD280) برای سنجش خلوص اسیدهای نوکلئیک بکار می‌رود بطوریکه این نسبت در مورد DNA خالص برابر ۱/۸ و در مورد RNA برابر ۲ می باشد.

چنانچه نمونه‌ای حاوی پروتئین یا فنل باشد این نسبت برای DNA و RNA پایین تر از مقادیر گفته شده خواهد بود و تشخیص دقیق میزان اسیدهای نوکلئیک ممکن نخواهد بود.

عنوان	تهیه کنندگان	تایید کننده	تصویب کننده
سمت: رییس بخش بیوتکنولوژی	سعید تمدنی جهرمی		