An Optimized DNA Extraction Method from Low Amount of Tissue in Land Arthropods: A Case Study in Terrestrial Isopods

Elnaz Zangani[1], Sara Kafimolla[1], Abbas Bahari[2], Vahab Jafarian[1], Gasem Mohammady Kashany[1,*]

1- Department of Biology, Zanjan University, Zanjan, Iran
2- Research Institute of Modern Biological Techniques, University of Zanjan, Iran

Received: 11 December 2021 Accepted: 9 March 2022

Key words

DNA extraction
PCR
terrestrial isopods
Protracheoniscus

Abstract

In recent years DNA extraction from various organisms is of strategic importance in downstream research such as molecular analysis, phylogeny, and more recently new generation sequencing. This process will be even more important in organisms for which there is very limited genomic information. In the present work, genomic DNA was extracted from almost 0.002 gram tissue of terrestrial isopods of *Protracheoniscus* species collected from different parts of Iran, based on phenol-chloroform procedure. The quality of extracted DNA was evaluated by electrophoresis and nanodrop methods. Polymerase chain reaction for mitochondrial gene COI and its subsequent successful sequencing were regarded as another confirmation of DNA extraction from the given amount of these creatures tissue. The results of the present study can be used in phylogenetic studies or other genomic analyzes in rare species with very low tissue content due to the abundance of organisms with limited low genomic information.

* Email: kashani_gm@znu.ac.ir

بهینه سازی روش استخراج DNA از مقادیر کم بافت در بندپایان خشکی زی: مطالعه موردی در جورپایان خشکی زی

الناز زنگانی[۱]، سارا کافی مولا[۱]، عباس بهاری[۲]، وهب جعفریان[۱]، قاسم محمدی کاشانی[۱*]

[۱]گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه زنجان، زنجان، ایران

[۲]پژوهشکده فناوری های نوین زیستی، دانشگاه زنجان، زنجان، ایران

دریافت: ۲۰ آذر ۱۴۰۰ پذیرش: ۱۸ اسفند ۱۴۰۰

واژه‌های کلیدی

استخراج DNA
PCR
جورپایان خشکی زی
Protracheoniscus

چکیده

در سال های اخیراستخراج DNA از موجودات مختلف اهمیت راهبردی در مطالعات تحلیل های مولکولی، تبازایی و اخیرا توالی یابی نسل جدید (NGS) دارد. این فرآیند در موجوداتی که اطلاعات ژنومی بسیار محدودی برای آنها وجود دارد از اهمیت بیشتری برخوردار است. در مطالعه حاضر، DNA ژنومی از گونه های جورپایان خشکی زی جنس *Protracheoniscus* که از مناطق مختلف ایران جمع آوری شده است، از حدود ۰/۰۰۲ گرم بافت غالبا کیتینی بر پایه روش فنل-کلروفرم استخراج شد. کیفیت استخراج با روش های الکتروفورز و نانودراپ بررسی شد. واکنش زنجیره ای پلیمراز برای ژن میتوکندریایی COI و متعاقبا توالی یابی موفق آن تایید دیگری در استخراج از این میزان کم بافت این جانداران بود. نتایج تحقیق حاضر می تواند با توجه به فراوان بودن جانداران با اطلاعات ژنومی محدود به صورت کاملا کاربردی در مطالعات تبازایی یا سایر آنالیزهای ژنومی در گونه‌های نادر با میزان بافت بسیار کم به کار گرفته شود.

* پست الکترونیکی: kashani_gm@znu.ac.ir

مقدمه

پایه تقریبا تمام تحقیقات بیوتکنولوژی و مطالعه ساختار عملکرد ژنی، دستکاری و تجزیه و تحلیل DNA است که پیش نیاز آن، استخراج DNA از موجودات مورد نظر و خالص سازی آن است (Moradi و همکاران 2014 ، Yari و همکاران 2017). تکنیک هایی که برای استخراج DNA استفاده می شوند و منابع DNA مورد استفاده بسیار متنوع هستند و بسته به منبع نمونه، اندازه و قدمت آن متفاوت هستند (صمدی کفیل و همکاران ۱۳۹۳، Ribeiro و Lovato، ۲۰۰۷). واضح است که هر کدام از روش های استخراج DNA باید مطابق با نمونه مورد نظر انتخاب شود به نحوی که بتوان با استفاده از آن به طور مؤثری DNA را از نمونه جداسازی نمود. مسئله مهم دیگر اندازه نمونه است. گاهی مقدار بافت در دسترس آنقدر کم است که لزوم روش های کارآمد برای استخراج DNA ضرورت می یابد. همچنین امروزه انجام مطالعات مولکولی بدون لزوم کشتن موجودات زنده به ویژه در مورد تاکسون هایی که در معرض خطر یا انقراض قرار دارند در حال گسترش است (Oliveiraو همکاران 2007). گاهی نیز ممکن است نمونه برداری مجدد از نواحی مختلف جغرافیایی که نمونه کمی از آن در دسترس است بسیار مشکل و یا حتی غیرممکن باشد. در مواردی نیز ارزش نمونه های در دسترس آن قدر بالاست (برای مثال نمونه های تایپ) که حداقل آسیب به آن ها ضرورت بالایی دارد. بنابراین، نیاز به پروتکلی آزموده و کارامد برای انجام مطالعات بر پایه DNA از مقادیر کم بافت محسوس است.

بندپایان بزرگترین گروه جانوری را تشکیل می دهند (حدود ۸۵ درصد کل گونه های جانوری) که اکثرا دارای اندازه های کوچک هستند و بدنشان از خارج بوسیله کوتیکول پوشیده شده است (Brusca و همکاران 2016). جورپایان خشکی زی نیز از جمله سخت پوستانی هستند که عموما دارای اندازه های کوچک (بین ۵ تا ۳۰ میلیمتر) هستند (Paoletti & Hassall 1999). اعضای این تاکسون دارای هفت زوج پای حرکتی کم و بیش هم اندازه می باشند که هر یک از شش بند تشکیل شده است (Schmidt 2008). پاها نیز همانند سایر بخش های بدن از خارج بوسیله کوتیکول پوشیده شده است، اما در بخش داخلی، عضلات نیروی لازم برای حرکت را فراهم می آورند. در خرخاکی ها، به طور معمول فقط پای حرکتی هفتم در جنس نر از نظر تشخیصی دارای اهمیت است و سایر پاها فاقد اهمیت تشخیصی هستند (Leistikow 2001، Schmidt 2002، Kashani 2018)؛ به همین دلیل می توانند منبع بالقوه ای برای به دست آوردن DNA باشند. کیتین از فراوان ترین بیوپلیمرها بعد از سلولز است. این پلی ساکارید طبیعی به طور برجسته در اسکلت خارجی بندپایان و دیوار سلولی قارچ ها یافت می شود. کیتین (برخلاف اکثر پلی ساکاریدها) در طبیعت به صورت بازی موجود است و وجود همین خصوصیت منحصر به فرد آن را قادر می سازد تا به صورت شیمیایی با چربی ها، کلسترول، پروتئین ها، DNA، RNA و یون های فلزی پیوند تشکیل دهد. کیتین به دلیل خاصیت چربی دوستی بالا در آب و بسیاری از حلال های آبی نامحلول است. بنابراین جداکردن و حذف کیتین از بافت های حاوی مقادیر بالای این ماده در مراحل استخراج DNA از اهمیت بالایی برخوردار است.

هدف مطالعه حاضر، معرفی و پیشنهاد روشی کارآمد برای استخراج DNA در جانوران دارای اسکلت خارجی کیتینی با اندازه کوچک (مقدار بافت ۰/۰۰۲> گرم)، با تاکید بر حفظ کلیت بدن (برای مواردی که ممکن است نمونه ها به راحتی در دسترس نباشند) می باشد که به طور موردی روی جورپایان خشکی زی صورت گرفته است.

مواد و روش ها

در این مطالعه، یک پروتکل سه روزه برای استخراج DNA مورد استفاده قرار گرفت. نمونه های مورد استفاده شامل پای حرکتی از جورپایان خشکی زی از جنس *Protracheoniscus* بود (شکل ۱). این نمونه ها از کلکسیون شخصی نویسنده آخر در دانشگاه زنجان تهیه شد.

شکل ۱. جورپای خشکی زی *Protracheoniscus* sp.

روز اول، تعداد ۲ یا ۳ پا را از نمونه جدا کرده و توسط اسکالپل تا حدامکان به آرامی خرد می نمائیم و سپس با دقت تمامی تکه های خرد شده را وارد ویال حاوی ۶۰۰ میکرولیتر بافرلیز می نمائیم. سپس به ویال حدود ۱۰-۱۵ میکرولیتر پروتئین کیناز (P.K) اضافه می کنیم. ویال را با دست چندبار تکان داده و سپس به مدت ۱ شب (Over night) با رعایت شرایط دمای ۵۵ درجه سانتیگراد و دور ۳۰۰-۳۵۰ rpm در دستگاه ترمومیکسر قرار می دهیم. در تهیه بافرلیز، تریس ۰/۵ مولار، EDTA ۰/۱ مولار و SDS ۲ درصد استفاده شد. روز دوم، ابتدا ویال را به مدت نیم ساعت در فریزر قرار می دهیم. سپس درون ویال سرد ۳۰۰ میکرولیتر استات آلومینیوم یا استات پتاسیم اضافه می کنیم. ویال ها را به مدت ۱۵ دقیقه در دور ۱۲۰۰۰ rpm سانتریفیوژ می کنیم. با احتیاط فاز رویی را در ویال های جدید خالی کرده و ویال های حاوی رسوب را دور می اندازیم. مجدا به مدت مدت ۶ دقیقه در دور ۸۰۰۰ rpm سانتریفیوژ می کنیم (این مرحله برای اطمینان است و می تواند برای نمونه های قدیمی حذف شود). فاز رویی را با احتیاط در ویال جدید ریخته و ویال حاوی رسوب را دور می اندازیم. به ویال ۶۰۰ میکرولیتر ایزوپروپانول سرد اضافه کرده (جهت شستشو و آبگیری بافت ها) و ویال ها را با دست تکان می دهیم و برای یک شب در فریزر قرار می دهیم.

روز سوم، نمونه را از فریزر خارج کرده و در سانتریفیوژ تحت شرایط دور ۱۲۰۰۰rpm به مدت ۲۰ دقیقه قرار می دهیم. سپس فاز رویی را دور می ریزیم و ۱۰۰۰ میکرولیتر الکل ۷۰ درصد را به حالت سرد به ویال اضافه می نمائیم. ویال را به مدت ۱۵ دقیقه در دور ۱۲۰۰۰ rpm سانتریفیوژ می کنیم. فاز رویی را از فاز زیرین با احتیاط جدا می کنیم و به فاز زیرین مجددا ۱۰۰۰ میکرولیتر الکل سرد ۷۰ درصد را برای شستشو و اطمینان بیشتر اضافه می نمائیم. ویال را به مدت ۸ دقیقه در دور ۶۰۰۰ rpm سانتریفیوژ می کنیم. در نهایت الکل روی رسوب را خالی کرده و در زیر هود ویال را با در باز روی دستمال یا کاغذ خشک کن قرار می دهیم تا خشک شود (این مرحله کمتر از دو ساعت نباشد تا الکل نمونه ها به طور کامل خشک شود). سپس با توجه به میزان DNA بین ۲۰ تا ۳۰ میکرولیتر تریس ۱۰ میلی مولار اضافه می کنیم. بادست به ویال ضربه می زنم تا DNA و تریس میکس شوند. ویال را به مدت یک ساعت در یخچال قرار داده و سپس می توان روی ژل لود کرد.

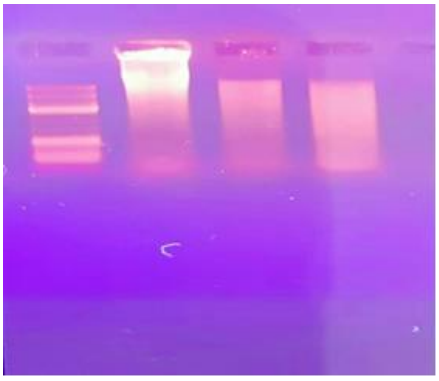
در این مطالعه، برای اطمینان از استخراج DNA و کیفیت آن، محصول استخراج روی ژل لود شد (شکل ۲). همچنین غلظت DNA با دستگاه نانودراپ بررسی شد (شکل ۳). همچنین از محصول DNA استخراج شده، ژن میتوکندریایی COI از طریق واکنش زنجیری پلیمراز (PCR) تکثیر شد. برای این منظور، ۱۲/۵ میکرولیتر از مسترمیکس، ۱۰/۵ میکرولیتر آب مقطر، ۰/۵ میکرولیتر آغازگر پیشرو و ۰/۵ میکرولیتر پرایمر معکوس و ۱ میکرولیتر از محصول DNA استخراج شده (حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر) استفاده شد. توالی آغازگرها از Flomer et al. (1994) اقتباس شد (جدول ۱).

فرایند PCR طی یک برنامه سه مرحله ای (جدول ۲) انجام شد. پس از انجام PCR، دو میکرولیتر از محصول آماده شده

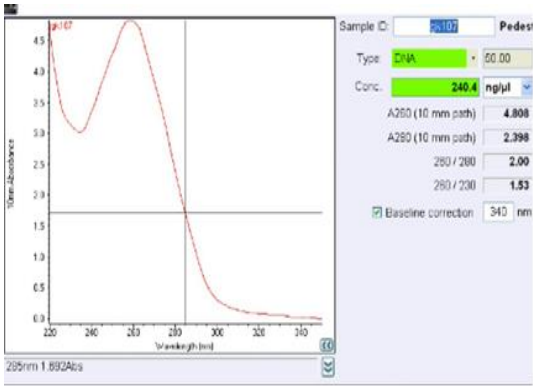
برای بررسی و تعیین اندازه، روی ژل آگارز ۱ درصد ران ارسال شد.
شد (شکل ۴). پس از تایید، محصول PCR برای توالی یابی

جدول ۱. توالی آغازگرها از Flomer و همکاران (۱۹۹۴)

Primer LCO-1490	5’ GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG3’
Primer HCO-2198	5’TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAACA3’



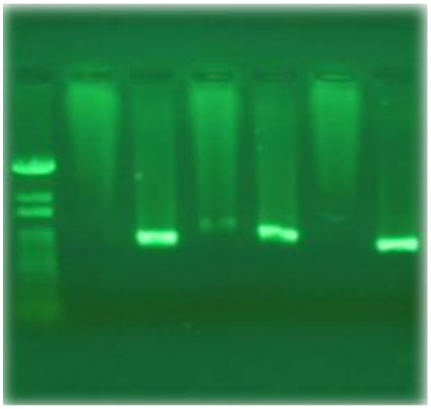
شکل ۲. باندهای حاصل از استخراج DNA روی ژل آگارز. لدر در سمت چپ برای تعیین اندازه محصول استخراج.



شکل ۳. نمودار حاصل از اسپکتروفتومتری محصول PCR ژن COI در جورپای خشکی زی مورد مطالعه.

جدول ۲: مراحل فرایند PCR برای تکثیر ژن COI در مطالعه حاضر

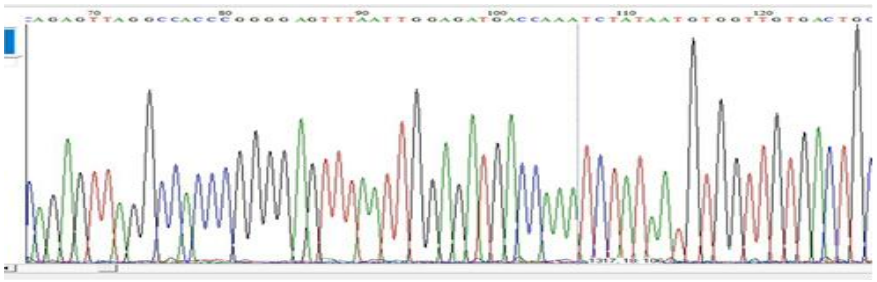
مرحله	تعداد چرخه (سیکل)	دما (°C)	زمان
مرحله۱	۱	۹۵	۳ دقیقه
		۹۵	۳۰ثانیه
مرحله۲	۳۴	۴۶	۴۰ ثانیه
		۷۲	۵۰ ثانیه
مرحله ۳	۱	۷۲	۱۰ دقیقه



شکل ۴. باندهای حاصل از PCR ژن COI روی ژل آگارز. لدر در سمت چپ برای تعیین اندازه محصول PCR.

نتایج و بحث

معمولا کیفیت DNA با عواملی از قبیل عدم آلودگی ناشی از RNA، پروتئین، لیپید و سایر ساختارهایی که مانع عملکرد صحیح آنزیم های برشی و پلیمرازها هستند و از جمله مهار کننده های PCR می باشند، سنجیده می شود. از طرفی روش های استخراج DNA باید به گونه ای باشند که کمترین استرس مکانیکی را در طی استخراج ایجاد نمایند. کیفیت و کمیت DNA استخراج شده با روش های مختلفی از جمله روش اسپکتروفتومتری در دستگاه نانودراپ، الکتروفورز روی ژل آگارز و روش واکنش زنجیری پلیمراز مورد بررسی قرار می گیرد. در این مطالعه، استخراج موفق DNA با بررسی روی ژل آگارز تایید شد (شکل ۲). به منظور بررسی دقیق تر، روش اسپکتروفتومتری در دستگاه نانودراپ نیز استفاده شد. در این روش، اگر میزان جذبDNA در طول موج ۲۶۰ نانومتر به مقدار جذب در طول موج ۲۸۰ نانومتر در محدوده ۱/۸ تا ۲ باشد نشان دهنده این است که بیشتر جذب توسط اسیدهای نوکلئیک صورت گرفته و کیفیت DNA به دست آمده مطلوب و از خلوص لازم و غلظت بالایی نیز برخودار می باشد (شکل ۳). همچنین نتایج به دست آمده از واکنش زنجیری پلیمراز نشان داد که DNA استخراج شده با این روش از کیفیت لازم برای PCR نیز برخوردار است که روشنی و وضوح باند تشکیل شده تأیید کننده این موضوع بودند (شکل ۴). بعلاوه، نتیجه توالی یابی محصول PCR حاصل از ژن COI نیز نشان داد که فرایند PCR به تولید محصولی با کیفیت بالا منجر شده است به طوری که ژن مورد نظر با طول حدود ۶۵۰ جفت باز که مورد نظر بود به خوبی توالی یابی شده است (شکل ۵).



شکل ۵. بخشی از توالی یابی محصول PCR ژن COI در جورپای خشکی زی مورد مطالعه.

حساسیت (sensitivity) و کارایی روش مورد استفاده در این مطالعه با استخراج موفق DNA از تعداد حداقل ۵۰ نمونه مورد تایید قرار گرفت. LOD (limit of detection) در این روش حدود ۰/۰۰۲ گرم تعیین شد که معادل یک پا در نمونه های درشت تر و ۲ تا ۴ پا در نمونه های کوچک تر می باشد. استفاده از این مقدار بافت می تواند تضمین کننده عدم آسیب به نمونه های با اندازه کوچک یا نمونه هایی که در استفاده از آنها محدودیت وجود دارد (از جمله نمونه های تایپ) باشد. اختصاصیت (specificity) این روش استخراج نیز بسیار بالا می باشد به طوری که در ۵۰ نمونه مورد مطالعه، کم و بیش در تمام نمونه ها به خوبی نتیجه داد.

نتیجه گیری

استخراج DNA در مطالعات مولکولی بر پایه DNA گام اول برای انجام پژوهش می باشد. استفاده از روش های مولکولی در مطالعات بیوسیستماتیک و تبارزایی جانوران و سایر گروه های موجودات زنده از افزایش چشمگیری در سال های گذشته برخوردار بوده است. بدلیل حساسیت های موجود در حفاظت از تنوع زیستی، محدودیت های صید، اندازه کوچک نمونه ها و همچنین محدودیت های موجود بر سر راه نمونه برداری، استفاده از مقادیر بافتی کم جهت استخراج DNA بسیار ضروری است. در این مطالعه، استخراج DNA از پاهای جورپایان خشکی زی با وزن کمینه ۰/۰۰۲ گرم با موفقیت انجام شد که می تواند به طور مشابه برای طیف وسیعی از بندپایان کوچک و سایر جانوران کوچک با پوشش خارجی مورد استفاده قرار گیرد.

منابع

صمدی کفیل ح، اصغرزاده م، زینال زاده ا، حسینی سرتشنیزی ب. ۱۳۹۳. بهینه سازی روش استخراج DNA از استخوان برای به دست آوردن ماده ژنتیکی از استخوان و دندان های باستانی. مجله علمی پزشکی قانونی ۲۰ (۲)، ۷-۱۲.

Brusca RC, Moore W, Shuster SM. 2016. Invertebrates. Sinauer Associates, Inc., USA.

Flomer O, Black M, Hoeh W, Lutz R, Vrijenhoek R. 1994. DNA primers for amplification of cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. Molecular Marine Biology and Biotechnology 3, 294–299.

Leistikow A. 2001. Phylogeny and biogeography of South American Crinocheta, traditionally place in the family "Philosciidae" (Crustacea: Isopoda: Oniscidea). Organisms, Diversity & Evolution 1, 239–240.

Kashani G.M. 2019. Revision of the terrestrial isopods of the subgenus *Hemilepistus* (*Desertellio*) Verhoeff, 1930 (Isopoda: Oniscidea). Zootaxa 4555 (4), 531–547.

Moradi MT. Yari K, Khodarahmi R. 2014. A novel, efficient, fast and inexpensive DNA extraction protocol from whole blood applicable for studying drug-DNA interaction. Journal of Reports in Pharmaceutical Sciences 3(1), 80–84.

Oliveira CG, Martinez RA, Gaiotto FA. 2007. DNA extraction from bristles and quills of *Chaetomys subspinosus* (Rodentia: Erethizontidae) using a novel protocol. Genetic and Molecular Research 6(3), 657–666.

Paoletti M, Hassall M. 1999. Woodlice (Isopoda: Oniscidea): their potential for assessing sustainability and use as bioindicators. Agriculture, Ecosystems and Environment 74, 157–165.

Ribeiro RA, Lovato MB. 2007. Comparative analysis of different DNA extraction protocols in fresh and herbarium specimens of the genus *Dalbergia*, Genetics and Molecular Reserch 6 (1), 173–187.

Schmidt C. 2002. Contribution to the phylogenetic system of the Crinocheta (Crustacea, Isopoda). Part 1 (Olibrinidae to Scyphaidae s. str.). Mitteilungen aus dem Museum für Naturkunde in Berlin (Zoologische Reihe), 78: 275–352.

Schmidt C. 2008. Phylogeny of the terrestrial Isopoda (Oniscidea): a review. Arthropod Systematics and Phylogeny 66 (2), 191–226.

Yari P, Valiee T, Bashiri H, Kahrizi D, Yari K. 2017. An Efficient and Optimized Protocol for DNA Extraction from Animal Tissues. Biological, Environmental and Agricultural Sciences 2, 41–44.