مقاله تحقیقی
مجله تحقیقات دامپزشکی، ۱۳۹۵، دوره ۷۱، شماره ۱، ۸۹-۸۳
Journal of Veterinary Research. 71,1:83-89, 2016
Original Article

به کارگیری ۳ روش متفاوت استخراج DNA برای آنالیز بقایای ژنومی DNA در روغن خام و تصفیه شده سویا

غزال نعمتی[۱] ابولفضل کامکار[۱] بریجیت اکرت[۲] افشین آخوند زاده بستی[۱] نگین نوری[۱] ایرج اشرافی[۳] پرویز شایان[۲،۴*]

۱) گروه بهداشت و کنترل مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، تهران- ایران
۲) موسسه Molecular Biological System Transfer (MBST)، تهران- ایران
۳) گروه میکروبیولوژی، دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، تهران- ایران
۴) گروه انگل شناسی، دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، تهران- ایران

(دریافت مقاله: ۲۲ آذر ماه ۱۳۹۴، پذیرش نهایی: ۷ بهمن ماه ۱۳۹۴)

چکیده

زمینه مطالعه: روغن سویا یکی از پرمصرف ترین روغن‌های گیاهی در جهان است. این روزها، استفاده از دانه‌های سویا اصلاح ژنتیکی شده برای تولید روغن سویا به طور مداوم در حال افزایش می‌باشد. روش مناسب برای تشخیص گیاهان اصلاح ژنتیکی شده در روغن و غذا با میزان بالا فرآوری، روشی است که بر پایه آنالیز بقایای ژنتیکی موجود در غذا باشد. کارایی و تکثیر موفق DNA استخراج شده، شدیداً به روش مورد استفاده برای استخراج DNA از روغن وابسته است. **هدف:** به کار بردن ۳ روش مختلف استخراج DNA برای بررسی بقایای ژنتیکی موجود در روغن به منظور دستیابی به DNA با خلوص بالا می‌باشد. **روش کار:** روش‌های استخراج بر اساس اتصال اختصاصی DNA به غشاهای سیلیکایی (ستون) و رزین طراحی شده اند. آنالیز DNA استخراج شده با روش PCR و با استفاده از جفت پرایمرطراحی شده از ژن ۱۸S rRNA و ۵/۸S rRNA و پرایمر اختصاصی مشتق شده از ژن لکتین گیاه سویا انجام شد. **نتایج:** در این مطالعه، با استفاده از روش ۱، DNA قابل تکثیراز نمونه‌های روغن سویا استخراج نشد. در روش ۲، روغن ابتدا با PBS مخلوط و سپس با استفاده از ایزوپروپانول رسوب داده شد، در این روش نیز تکثیر مشاهده نشد اما میزان OD۲۶۰ کاهش یافت. در روش ۱و ۲ DNA استخراج شده جهت تکثیر به میزان کافی خالص نبود. برای حذف مؤثرتر آلودگی، روش ۳ که ترکیبی از روش ۲ به همراه کلرفرم بود، استفاده گردید که DNA استخراج شده از تمامی نمونه‌ها با موفقیت تکثیر شدند. **نتیجه‌گیری نهایی:** اعتقاد ما بر این است اگر چه یکی از مشکلات استخراج DNA در ماده غذایی کمی میزان DNA موجود در روغن می‌باشد اما در واقع مهمترین نقش را در موفقیت تکثیر DNA استخراج شده از روغن، خلوص آن دارد. روش ۳ می‌تواند به عنوان روش مناسبی برای جدا سازی DNA خالص از روغن سویا مورد استفاده قرار گیرد.

واژه‌های کلیدی: روغن سویا خام، استخراج DNA، PCR، روغن سویا تصفیه شده

مقدمه

روغن‌هـای گیاهـی نقش مهمـی را در صنایع غذایی، دارویی و آرایشـی برعهده دارند. تفاوت در ارزش غذایی و قیمت روغن‌های گیاهی، پتانسیل تقلـب در این ماده را بالا برده اسـت. بنابراین در حیطه مدیریت سـلامت جامعه، تعیین اعتبار و قابلیت پیگیری این روغن‌ها از ارزش خاصی برخوردار می‌باشد. براساس تعاریف کمیسـیون اروپا قابلیت پیگیری ماده غذایی به توانایی ردیابی ماده غذایی، خوراک دام و مواد تشکیل دهنده آن در تمامی مراحل تولید، فرآوری و توزیع آن ماده، گفته می‌شود (http://ec.europa.eu/food/food/foodlaw/traceability/index_en. htm). با این رویکرد، تعیین روش‌های معتبر و اسـتانداردهای معیار از اهمیت بالایی بر خوردار است (۶).

روغن سـویا یکی از پر مصرف‌ترین روغن‌های‌گیاهی در جهان است که ۳۰٪ از مصرف جهانی روغن‌های گیاهی را به خود اختصاص داده است (۵،۱۱). این روزها، اسـتفاده از دانه‌های سـویا اصلاح ژنتیکی شـده برای تولید روغن سـویا به طور مداوم در حال افزایش است. روش مناسب برای تشخیص گیاهان اصلاح ژنتیکی شـده در روغن و غذا یی با میزان بالای فرآوری، روشی است که بر پایه آنالیز بقایای ژنتیکی موجود درآن ماده غذا باشـد. کارایی و تکثیر موفق DNA استخراج شـده، شدیداً به روش مورد استفاده برای اسـتخراج DNA از روغن وابسته است. روش‌های مختلفی برای استخراج DNA ازنمونه‌های روغن وجود دارد (۴). از جمله این روش‌ها CTAB می‌باشد. بر اساس مطالعات قبلی، در این روش از ۱ml-۱۰۰ نمونه اولیه روغن جهت استخراج DNA استفاده گردیده است (۲،۳،۷،۹،۱۰،۱۴). در برخی از مطالعات از کلرفرم و هگزان برای بهبود این روش بهره برده‌اند (۳،۷). در گزارش‌های پیشـین از معایب این روش، نا خالص بودن DNA اسـتخراج شـده، ذکر شـده اسـت (۱۱). در جهت کاهش این ناخالصی، روش‌هایی بر پایه اتصال اختصاصی DNA با غشای سیلیکایی موجود در سـتون یا رزین گسترش یافت. در مطالعات پیشین، برای استخراج DNA از نمونه‌های روغن کیت‌های گیاهی و غذایی Nucleospin (۳،۹)، کیت مدفوع QIAamp (۱،۵،۱۴)، کیت گیاهی DNeasy (۱۴) مورد اسـتفاده قرار گرفته اسـت. از مقدار ۱ml- ۲۰۰ نمونه اولیه روغن، جهت استخراج DNA توسط این کیت‌ها، استفاده گردیده است.

اینگونه به نظر می‌رسد که یکی از مشکلات اصلی در استخراج DNA

*) نویسنده مسئول: تلفن: ۰۲۱-۶۶۹۲۹۵۳۱ نمابر: ۰۲۱-۶۶۹۳۳۲۲۲ Email: pshayan@ut.ac.ir

از روغن میزان کم DNA و خلوص پایین DNA استخراج شده می‌باشد. معمولاً روغن‌ها قبل از اینکه به بازار عرضه شوند، جهت از بین بردن بو و رنگ‌های نامناسب، توسط پروسه‌های شیمیایی و مکانیکی تصفیه می‌شوند. پروسه‌های شیمیایی شامل صمغ گیری، خنثی سازی، شستشو، رنگ بری و بوگیری می‌باشد. تمامی مراحل استخراج روغن و تصفیه آن سبب خرد شدن DNA ژنومی می‌گردد (۸). از سوی دیگر نمونه‌های غذایی و روغن شامل ترکیباتی از قبیل پروتیئن و پلی ساکاریدها می‌باشند که این مواد می‌توانند سبب مهار واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) گردند (۱۳). بطور کلی DNA استخراج شده از نمونه‌های مختلف روغن می‌تواند با برخی از ممانعت کننده‌های PCR همراه باشد. در این مطالعه با هدف افزایش خلوص DNA استخراج شده، به بررسی روش‌های بهبود استخراج DNA از روغن سویا تصفیه شده و خام، پرداخته شده است.

مواد و روش کار

نمونه: در این مطالعه ۲ روغن خام و تصفیه شده سویا از کارخانه مارگارین (ایران – تهران) تهیه شد. تمامی نمونه‌ها توسط آزمایش GC تأیید شده بودند. دانه گیاه سویا به عنوان نمونه کنترل مثبت برای صحت عملکرد پرایمرها به کار گرفته شد.

استخراج DNA از دانه گیاه سویا: برای استخراج DNA از دانه سویا کیت استخراج DNA از گیاه MBST (ایران – تهران) مورد استفاده قرار گرفت. به این منظور، قسمت جوانه رویشی از دانه جداسازی و به خوبی به همراه ۳۰۰µl لایزیس بافردر تیوب‌های ۱/۵ml کوبیده و مخلوط گردید.

۲۰µl پروتیناز K به نمونه‌ها افزوده و در ۵۶°C به مدت ۲ ساعت گرم‌خانه‌گذاری شد. سپس مخلوط به مدت ۵ دقیقه با ۸۰۰۰ xg (اپندرف، ۵۸۱۰ دور، آلمان) سانتریفوژ گردید و مایع رویی به تیوب جدید انتقال داده شد. در مرحله بعد، ۵۴۰µl بایندینگ بافر به مخلوط افزوده و در ۷۰°C گرم‌خانه گذاری شد. مخلوط به مدت ۵ دقیقه با ۸۰۰۰xg سانتریفوژ گردید و مایع رویی به ستون A کیت انتقال داده شد. پس از سانتریفوژ به مدت ۱ دقیقه با ۸۰۰۰xg، ستون دور انداخته شد. به مخلوط باقی مانده در تیوب ۴۱۰µl اتانول خالص (Merck، آلمان) افزوده گردید. مخلوط به ستون B منتقل و در ادامه، پس از ۱ دقیقه سانتریفوژ ۸۰۰۰xg، ستون ۲ بار با بافر شستشو شسته شد. در پایان DNA ژنومی استخرج شده توسط ۴۰µl آب استریل و گرم‌خانه گذاری در ۷۰°C از ستون B جداسازی گردید.

استخراج DNA از روغن روش ۱: برای استخراج DNA از روغن کیت استخراج MBST، DNA (ایران) مورد استفاده قرار گرفت. اساس استخراج DNA در این کیت غشای سیلیکایی است که در ستون‌های این کیت قرار داده شده است. ۱ml از هر کدام از روغن‌ها به

تیوب ۱/۵ml افزوده و با ۳۰۰µl لایزیس بافر به خوبی مخلوط گشت. مخلوط یک ساعت در ۷۰°C گرم‌خانه گذاری و بعد از یک دقیقه ورتکس، به مدت ۵ دقیقه ۸۰۰۰xg (اپندرف، ۵۸۱۰ دور، آلمان) سانتریفوژ گردید. سپس محلول زیرین به همراه فاز میانی به تیوب استریل جدید انتقال داده شد. ۲۰µl پروتیناز K به نمونه‌ها افزوده و در ۵۶°C به مدت ۲۰ دقیقه گرم‌خانه گذاری شد. در مرحله بعدی، ۵۴۰µl بایندینگ بافر به مخلوط افزوده، به خوبی هم زده و به مدت ۱۰ دقیقه در ۷۰°C گرم‌خانه گذاری شد. سپس به مخلوط ۴۱۰µl اتانول خالص (Merck، آلمان) افزوده گردید. مخلوط به ستون MBST منتقل، پس از ۱ دقیقه سانتریفوژ ۸۰۰۰ xg، ستون ۲ بار با بافر شستشو شسته شد. در پایان DNA ژنومی استخرج شده توسط ۴۰µl آب استریل و گرم‌خانه گذاری در ۷۰°C از ستون جداسازی گردید.

استخراج DNA از روغن روش ۲: برای استخراج روغن به این روش ۵ از هر کدام از نمونه‌ها مورد استفاده قرار گرفت. ۵ml از نمونه روغن با ۵ml PBS (۸g NaCl، ۰/۲g KCl ، ۱/۴۴g Na۲HPO۴، ۰/۲۴g KH۲PO۴، pH ۸/۰، در ۱l آب مقطر، Merck، آلمان) و ۱ml توین ۸۰ (Merck، آلمان) در تیوب‌های ۱۵ml مخلوط و در ۷۰°C به مدت ۳ ساعت گرم‌خانه گذاری گردید. نمونه‌ها در حین گرم‌خانه گذاری بطور منظم ۴ بار به مدت یک دقیقه کاملاً مخلوط می‌شدند. پس از آن مخلوط به مدت یک دقیقه ورتکس به مدت ۲۰ دقیقه ۴۰۰۰ xg (اپندرف، ۵۸۱۰ دور، آلمان) سانتریفوژ گردید. پس از سانترفوژ ۳ فاز ایجاد گشت که لایه رویی آن (فاز روغن) جداسازی و دور ریخته شد. برای رسوب DNA، به دو لایه باقی مانده (لایه‌های میانی و زیرین)، ۰/۱ حجم محلول سدیم استات (۳M ، pH =۵/۵)، هم حجم محلول ایزو پروپانول (Merck، آلمان) و ۶۰µl رزین (MBST ، ایران) افزوده و به مدت ۲۰ دقیقه در ۲۰°C- سرد خانه گذاری شد. پس از ۲۰ دقیقه سانتریفوژ ۴۰۰۰ xg، محلول رویی دور ریخته و رسوب در ۳۰۰µl لایزیس بافرو ۵۴۰µl بایندینگ بافر (MBST، ایران) مجدد حل شد و به تیوپ ۱/۵ml استریل انتقال یافت. مخلوط به خوبی هم زده وبه مدت ۱۰ دقیقه در ۷۰°C گرم‌خانه گذاری شد. سپس به مخلوط ۴۱۰µl اتانول خالص (Merck، آلمان) و ۳۰µl رزین MBST افزوده گردید و به مدت ۱ ساعت در دمای اتاق قرار داده شد. سپس مخلوط ۵ دقیقه ۸۰۰۰ xg سانتریفوژ گردید و پس تخلیه محلول رویی، رزین ته نشین شده ۲ بار با بافر شستشو شسته شد. در پایان DNA ژنومی استخرج شده توسط ۴۰µl آب استریل و گرم‌خانه گذاری در ۷۰°C از رزین جداسازی گردید.

استخراج DNA از روغن روش۳: برای استخراج روغن به این روش ۵ml از هر کدام از نمونه‌ها مورد استفاده قرار گرفت. ۵ml از نمونه روغن با ۵ml PBS (۸g NaCl، ۰/۲g KCl ، ۱/۴۴g Na۲HPO۴، ۰/۲۴g KH۲PO۴، pH ۸/۰، در ۱l آب مقطر، Merck، آلمان)، ۱ml توین ۸۰ (Merck، آلمان) در تیوب‌های ۱۵ml مخلوط و در ۷۰°C به مدت ۳ ساعت گرم‌خانه گذاری گردید. نمونه‌ها در حین گرم‌خانه گذاری بطور منظم ۴ بار به مدت یک دقیقه کاملاً مخلوط می‌شدند. پس از آن مخلوط به مدت

یک دقیقه ورتکس به مدت ۲۰ دقیقه ۴۰۰۰xg (اپندرف، ۵۸۱۰ دور، آلمان) سانتریفوژ گردید. پس از سانترفوژ ۳ فاز ایجاد گشت که لایه‌رویی آن (فاز روغن) جداسازی و دور ریخته شد. دو لایه باقی مانده (لایه‌های میانی و زیرین) دو بار با ۵ml کلرفرم شسته و به مدت ۵ دقیقه ۴۰۰۰ xg سانتریفوژ گردید. لایه رویی ایجاد شده که حاوی محلول PBS بود جدا سازی و به تیوب جدید انتقال داده شد. برای رسوب DNA ، به دو لایه باقی مانده (لایه‌های میانی و زیرین)، ۰/۱ حجم محلول سدیم استات (۳ M، ۵/۵= pH)، هم حجم محلول ایزو پروپانول (Merck، آلمان) و ۶۰µl رزین (MBST، ایران) افزوده و به مدت ۲۰ دقیقه در ۲۰°C- سرد خانه گذاری شد. سپس به مدت ۲۰ دقیقه ۴۰۰۰ xg سانتریفوژ گردید محلول رویی دور ریخته و رسوب در ۳۰۰µl لایزیس بافر و ۵۴۰µl باندینگ بافر (MBST، ایران) مجدد حل شده و به تیوپ ۱/۵ml استریل انتقال یافت. مخلوط به خوبی هم زده و به مدت ۱۰ دقیقه در ۷۰°C گرمخانه گذاری شد. سپس به مخلوط ۴۱۰µl اتانول خالص (Merck، آلمان) و ۳۰µl رزین MBST افزوده گردید و به مدت ۱ ساعت در دما اتاق قرار داده شد. پس از سانتریفوژ مخلوط ۵ دقیقه ۸۰۰۰xg، محلول رویی تخلیه و رزین ته نشین شده ۲ بار با بافر شستشو شسته شدند. در پایان DNA ژنومی استخرج شده توسط ۴۰µl آب استریل و گرمخانه گذاری در ۷۰°C از رزین جداسازی گردید.

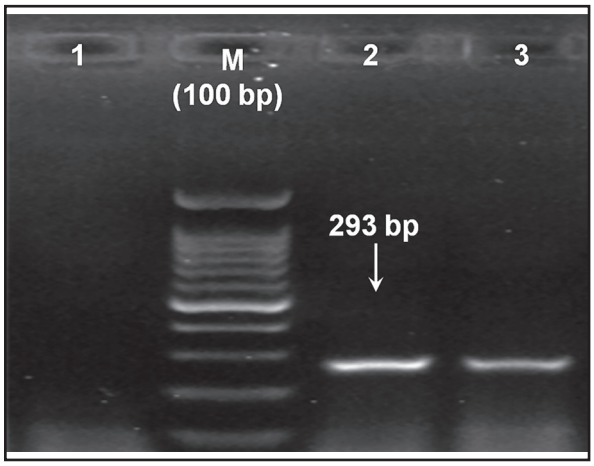
واکنش PCR: برای تکثیر PCR ۲/۱µl یا ۵ از نمونه‌های DNA استخراج شده به کار برده شد. این واکنش در حجم ۱۰۰µl انجام گرفت که شامل بافر ۱x PCR، ۲/۵ واحد آنزیم Taq پلی مراز (سیناژن، ایران)، ۲µl از پرایمرهای sense و antisense (۲۰ Mm، MWG، آلمان)، ۲۰۰ µM dCTP، dTTP، dATP و dGTP (Fermenta) و ۱/۵mM MgCl۲ بود. اتوماتیک ترموسایکلر (MWG، آلمان) با برنامه ۳۵-۳۸ سیکل، ۴۵ ثانیه ۵۶°C-۶۰ (مرحله ی اتصال)، ۴۵ ثانیه ۷۲°C (مرحله تکثیر)، ۴۵ ثانیه ۹۴ °C (مرحله واسرشت) و در پایان ۱۰ دقیقه ۷۲°C (مرحله تکثیر نهایی) به کار برده شد. پرایمرهای مورد استفاده، از توالی ژن ۱۸S rRNA و ۵/۸S rRNA (accession ۶۰۶۷۳۴ number: FJ، نوکلوتید ۲۷ - ۳۲۰) طراحی شد. توالی پرایمر sense ۵`TGCGGAAGGATCATTGTCG۳` و توالی پرایمر antisense ۵`ATTTCGCTACGTTCTTCATCGATGC ۳` بود. علاوه بر این پرایمرهای اختصاصی گیاه سویا متعلق به ژن لکتین (forward primer: ۵`GCCCTCTACTCCACCCCCATCC۳` و reverse primer: ۵`GCCCATCTGCAAGCCTTTTTGTG۳`) نیز مورد استفاده قرار گرفت (۱۱). محصول PCR توسط ژل ۱/۸٪ آگارز وبافر TBE ۰/۵x (۵/۴g Tris base، ۲/۷۵g اسید بوریک، ۲ml EDTA ۰/۵M، pH ۸/۰ در ۱l آب مقطر) آنالیز شد. برای رنگ آمیزی ژل، اتیدیوم برامید و cyber safe (سیناژن، ایران) مورد استفاده قرار گرفت.

نتایج

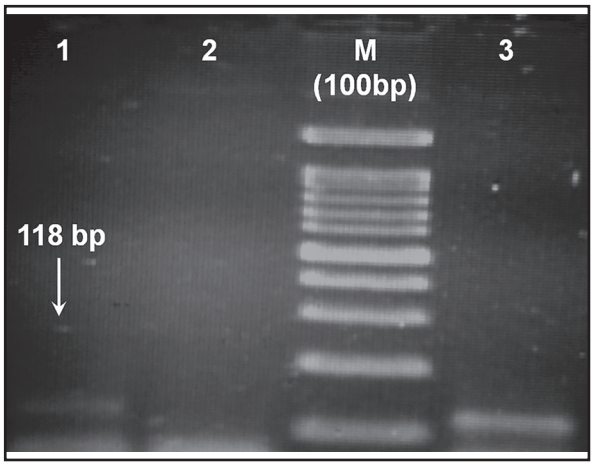
در این مطالعه، ۳ روش برای استخراج DNA از روغن‌های خام و تصفیه شده سویا مورد استفاده قرار گرفت. DNA استخراج شده از دانه سویا با پرایمر طراحی شده از توالی ژن ۱۸S rRNA و ۵/۸S rRNA با موفقیت تکثیر شد. روش اول، استخراج DNA با استفاده از کیت MBST براساس اتصال اختصاصی DNA با غشاهای سیلیکایی درون ستون‌ها بود. در این روش DNA قابل تکثیر از روغن‌های به کار برده شده، استخراج نشد. اینگونه به نظر می‌رسد، یکی از مهمترین مشکلات در استخراج DNA قابل تکثیر، از روغن‌های ذکر شده، میزان خلوص DNA می‌باشد. نتایج به دست آمده از سنجش میزان خلوص DNA توسط اسپکترفوتومتر نشان داد که میزان DNA در نمونه‌های تکثیر نشده ۱۴/۵±۱/۵µl/ng بود. جالب اینکه، آنالیز DNA بر روی ژل آگارز، هیچگونه DNA قابل تشخیصی را نشان نداد. این به این معناست که DNA استخراج شده از روغن‌های خام و تصفیه شده سویا با ترکیبی غیر از DNA مخلوط هستند که به عنوان ممانعت کننده DNA پلی مراز عمل می‌کند و درطول موج ۲۶۰nm دارای جذب نوری می‌باشد. برای کاهش فاکتور ممانعت کننده DNA پلی مراز روش ۲ به کار برده شد. در این روش ابتدا ۵ml روغن با ۵ml PBS مخلوط، در ادامه توسط ایزوپروپانول رسوب DNA انجام شد. در این روش نیز DNA استخراج شده با پرایمر طراحی شده از توالی ژن ۱۸S rRNA و ۵/۸S rRNA باند قابل مشاهده‌ای تشکیل نداد. میزان DNA اندازه گیری شده در نمونه‌های تکثیر نشده ۵/۲±۰/۸ µl/ng بود. برای حذف ممانعت کننده PCR از روغن‌های سویا، روغن‌ها در ابتدا با PBS مخلوط و پس از سانتریفوژ و جدا سازی لایه رویی که حاوی روغن بود، دو لایه باقی مانده زیرین دو بار با کلرفرم شسته شد (روش ۳)، در ادامه مرحله رسوب DNA با ایزو پروپانول در حضور رزین (MBST، ایران) انجام پذیرفت. نمونه‌های DNA استخراج شده از روغن‌های سویا خام و تصفیه شده با استفاده از پرایمر طراحی شده از توالی ژن ۱۸S rRNA و ۵/۸S rRNA با موفقیت تکثیر شدند، محصول PCR به دست آمده منتج به تشکیل باند در طول ۲۹۳bp (تصویر ۱) بر روی ژل آگارز گشت. علاوه بر این DNA استخراج شده توسط پرایمر اختصاصی طراحی شده از ژن لکتین با موفقیت تکثیر شد. محصول PCR باندی با طول ۱۱۸bp (تصویر ۲) تشکیل داد. نتایج حاصل از خوانش OD۲۶۰ در نمونه‌های استخراج شده توسط روش ۳، مقدار DNA موجود را غیر قابل تشخیص، نشان داد. تمامی نتایج با حداقل سه بار با روغن‌های مختلف سویا تکرار شد. نتایج ما نشان داد که مهمترین مشکل برای استخراج DNA از نمونه‌های روغن سویا خلوص DNA استخراج شده می‌باشد.

بحث

یکی از جنبه‌های مهم ارزیابی ماده غذایی یافتن روش‌های عملی



تصویر ۱. الکتروفورز ژل آگارز متعلق به محصول PCR حاصل از تکثیر DNA استخراج شده از روغن خام و تصفیه شده سویا با به کاربردن روش ۳ و با استفاده از جفت پرایمرطراحی شده از ژن ۱۸S rRNA و ۵/۸S rRNA (چاهک شماره ۱: کنترل منفی، چاهک شماره ۲: ۲ µl DNA استخراج شده از روغن سویا خام، چاهک شماره ۳: ۲ µl DNA استخراج شده از روغن سویا تصفیه شده).



تصویر ۲. الکتروفورز ژل آگارز متعلق به محصول PCR حاصل از تکثیر DNA استخراج شده از روغن خام سویا با به کاربردن روش ۳ و با استفاده از جفت پرایمر اختصاصی مشتق شده از ژن لکتین گیاه سویا (چاهک شماره ۱: ۲ µl DNA استخراج شده از روغن سویا خام،چاهک ۲: کنترل منفی، چاهک شماره ۳: ۲ µl DNA استخراج شده از دانه سویا).

مناسب جهت رد یابی منشأ اولیه ماده غذایی در تمامی مراحل تولید آن ماده، می‌باشد (۶). روغن سویا یکی از پر مصرف‌ترین روغن‌های گیاهی در جهان است. این روزها، استفاده از دانه‌های سویا اصلاح ژنتیکی شده برای تولید روغن سویا به طور مداوم در حال افزایش می‌باشد (۵،۱۱). روش مناسب برای تشخیص گیاهان اصلاح ژنتیکی شده در روغن و غذایی با میزان بالا فرآوری، روشی است که بر پایه آنالیز بقایای ژنتیکی موجود در غذا باشد. کارایی و تکثیر موفق DNA استخراج شده، شدیداً به روش مورد استفاده برای استخراج DNA از روغن وابسته است (۴).

در سال‌های اخیر تحقیقات بسیاری جهت دستیابی به رو ش مناسب استخراج DNA از روغن انجام گرفته است (۵،۷،۱۱،۱۲). Nicolic و همکاران درسال ۲۰۱۴ گزارش کردند که DNA استخراج شده از روغن سویا خام با استفاده از روش CTAB به مقدار کافی برای انجام واکنش PCR خالص نبود (۱۱). بیشترین روش توصیه شده توسط محققین، برای استخراج DNA از روغن، روش‌هایی است که برپایه اتصال اختصاصی DNA به غشای سیلیکایی طراحی شده باشد که با نتایج به دست آمده از این مطالعه نیز همخوانی دارد (۶،۱۱). برتری این روش در مقایسه با روش CTAB، میزان کمتر از دست دادن DNA در پروسه استخراج می‌باشد. Gimenez و همکاران در سال ۲۰۱۰ نشان دادند خلوص DNA استخراج شده توسط روش CTAB با به کاربردن هگزان و کلروفرم در مراحل استخراج افزایش می‌یابد (۷).

در این مطالعه، روش اول به کار برده شده با استفاده از کیت MBST و بر مبنای اتصال اختصاصی DNA با غشای سیلیکایی (ستون) بود که در آن DNA قابل تکثیر با استفاده از روش PCR به دست نیامد. در ادامه نتایج اسپکترفتومتری، نشان داد که غلظت DNAهای تکثیر نشده µl/ ۱۴/۵±۱/۵ng بود در حالیکه، آنالیز DNA بر روی ژل آگارز، هیچگونه DNA قابل تشخیصی را نشان نداد. اعتقاد ما بر این است که، میزان بالای جذب در OD۲۶۰ با DNA استخراج شده مرتبط نمی‌باشد و احتمالاً به حضور آلودگی در نمونه‌ها وابسته است. برای افزایش خلوص DNA استخراج شده روش ۲ به کار برده شد. با این روش علی رغم کاهش OD۲۶۰ اما واکنش PCR با موفقیت انجام نشد. اینگونه به نظر می‌رسد که آلودگی توسط این روش تا حدی کاهش یافته است. برای حذف بهتر ممانعت کننده، روش ۳ طراحی شد که در آن کلروفرم به عنوان حلال ملکول‌های آلی (به غیر ازDNA) مورد استفاده قرار گرفت. جالب اینکه، تمامی DNA استخراج شده از نمونه‌های روغن خام و تصفیه شده ی سویا با استفاده ازروش PCR و پرایمرطراحی شده از ژن ۱۸S rRNA و ۵/۸S rRNA و پرایمر اختصاصی مشتق شده از ژن لکتین تکثیر شدند و میزان جذب نوری تحت طول موج ۲۶۰nm در همه نمونه‌ها غیر قابل تشخیص بود. این نتایج نشان دهنده آن است که اگر چه یکی از مشکلات استخراج DNA در ماده غذایی کمی میزان DNA موجود در روغن می‌باشد اما در واقع مهمترین نقش را در موفقیت تکثیر DNA استخراج شده از روغن، خلوص آن دارد. نتایج ما، تحقیقات Costa و همکاران سال ۲۰۱۲، را مبنی بر میزان کم DNA در روغن‌های گیاهی تأیید می‌کند (۶). اما اعتقاد ما بر این است که میزان کم DNA در روغن علت عدم تکثیر DNA استخراج شده از روغن‌ها نمی باشد. نتایج ما همچنین با نتایج Nicolic و همکاران درسال ۲۰۱۴ و Costa و همکاران درسال ۲۰۱۰ مبنی بر اهمیت خلوص DNA استخراج شده از روغن برای تکثیرDNA با روش PCR مطابقت دارد (۵،۱۱).

نتایج ما، نشان داد DNA استخراج شده می‌تواند با پرایمر طراحی شده تکثیر گردد و باندی با طول ۲۹۳bp را تشکیل دهد. در پروسه تصفیه روغن مراحل شیمیایی و مکانیکی، فازبو گیری (۲۴۰°C)، اسیدی کردن با اسید

فسفزیک و خنثی سازی با سود منجر به خرد شدگی DNA می‌گردد (۴). بنابر این برخی از محققین توصیه می‌کنند که در تکثیر DNA استخراج شده از روغن‌های گیاهی، از پرایمرهایی که توالی کوچکتر از ۱۵۰bp را تکثیر می‌نماید، استفاده گردد (۵،۱۱). Costa و همکاران در سال ۲۰۱۰ گزارش کردند DNA استخراج شده از روغن سویا با پرایمربا طول ۱۰۳bp با موفقیت تکثیر شد و تکثیر DNA استخراج شده با پرایمرهایی با طول ۱۱۸bp و ۱۲۰ ناموفق بود (۵).

Nikolic و همکاران نیز توصیه می‌کنند در مواد غذایی فر آوری شده ناحیه‌ای از DNA با حداکثر طول ۱۵۰bp استفاده گردد (۱۱). با وجود اینکه ما در این مطالعه قادر به تکثیر موفق DNA و تولید محصول PCR با طول ۲۹۳bp بودیم اما با توصیه Nicolic و همکاران در سال ۲۰۱۴ و Costa و همکاران در سال ۲۰۱۰ مبنی بر تکثیر قطعات کوچکتر مورد تکثیر در DNA درردیابی غذاهای فر آوری شده، موافقیم چراکه ژن مورد استفاده در این مطالعه مولتی کپی ژن (۱۸S rRNA و ۵/۸S rRNA) بود در حالیکه احتمالاً در سایر مطالعات از ژن‌هایی با تعداد کپی کمتر استفاده شده است (۵،۱۱).

بطور کلی، بر اساس نتایج به دست آمده در این مطالعه، مشکل اصلی در استخراج DNA از روغن وجود ترکیبات ممانعت کننده PCR می‌باشد. همانگونه که نتایج نشان می‌دهد، بهترین روش برای استخراج DNA از روغن، روشی است که توانمندی حذف بهتر ممانعت کننده PCR را از DNA استخراج شده داشته باشد.

تشکر و قدرانی

نویسندگان این مقاله از جناب آقای دکتر فرزاد اسدی، آقای دکتر عباس برین و آقای دکتر علی خسروی که ما را در به انجام رساندن این پژوهش یاری نمودند، کمال تشکرو قدردانی را دارد.

References

1. Ayed, R.B., Grati-Kamoun, N., Moreau, F., Rebaï, A. (2009) Comparative study of microsatellite profiles of DNA from oil and leaves of two Tunisian olive cultivars. Eur Food Res Technol. 229: 757-762.
2. Busconi, M., Foroni, C., Corradi, M., Bongiorni, C., Cattapan, F., Fogher, C. (2003) DNA extraction from olive oil and its use in the identification of the production cultivar. Food Chem. 83: 127-134.
3. Consolandi, C., Palmieri, L., Severgnini, M., Maestri, E., Marmiroli, N., Agrimonti, C., Baldoni, L., Donini, P., De Bellis, G., Castiglioni, B. (2008) A procedure for olive oil traceability and authenticity: DNA extraction, multiplex PCR and LDR-universal array analysis. Eur Food Res Technol. 227: 1429-1438.
4. Costa, J., Mafra, I., Amaral, J.S., Oliveira, M. (2010a) Monitoring genetically modified soybean along the industrial soybean oil extraction and refining processes by polymerase chain reaction techniques. Food Res Int. 43: 301-306.
5. Costa, J., Mafra, I., Amaral, J.S., Oliveira, M.B.P. (2010b) Detection of genetically modified soybean DNA in refined vegetable oils. Eur Food Res Technol. 230: 915-923.
6. Costa, J., Mafra, I., Oliveira, M. (2012) Advances in vegetable oil authentication by DNA-based markers. Trends Food Sci Tech. 26: 43-55.
7. Giménez, M.J., Pistón, F., Martín, A., Atienza, S.G. (2010) Application of real-time PCR on the development of molecular markers and to evaluate critical aspects for olive oil authentication. Food Chem. 118: 482-487.
8. Gryson, N., Messens, K., Dewettinck, K. (2004) Influence of different oil-refining parameters and sampling size on the detection of genetically modified DNA in soybean oil. J Am Oil Chem Soc. 81: 231-234.
9. Martins-Lopes, P., Gomes, S., Santos, E., Guedes-Pinto, H. (2008) DNA markers for Portuguese olive oil fingerprinting. J Agric Food Chem. 56: 11786-11791.
10. Muzzalupo, I., Perri, E. (2002) Recovery and characterisation of DNA from virgin olive oil. Eur Food Res Technol. 214: 528-531.
11. Nikolić, Z., Vasiljević, I., Zdjelar, G., Đorđević, V., Ignjatov, M., Jovičić, D., Milošević, D. (2014) Detection of genetically modified soybean in crude soybean oil. Food Chem. 145: 1072-1075.
12. Pauli, U., Liniger, M., Zimmermann, A. (1998) Detection of DNA in soybean oil. Zeitschrift für Lebensmitteluntersuchung und-Forschung A. 207: 264-267.
13. Pinto, A.D., Forte, V., Guastadisegni, M.C., Martino, C., Schena, F.P., Tantillo, G. (2007) A comparison of DNA extraction methods for food

analysis. Food Control. 18: 76-80.
14. Testolin, R., Lain, O. (2005) DNA extraction from olive oil and PCR amplification of micro-satellite markers. J Food Sci. 70: C108-C112.

Analysis of residual genomic DNA in crude and refined soybean oil using three different DNA extraction methods

Nemati, Gh.[1], Kamkar, A.[1], Eckert, B.[2], Akhondzadeh Basti, A.[1], Noori, N.[1], Ashrafi, I.[3], Shayan, P.[2,4*]

[1]*Department of Food Hygiene, Faculty of Veterinary Medicine University of Tehran, Tehran- Iran*
[2]*Research Institute Molecular Biological System Transfer, Tehran- Iran*
[3]*Department of Microbiology, Faculty of Veterinary Medicine University of Tehran, Tehran- Iran*
[4]*Department of Parasitology, Faculty of Veterinary Medicine University of Tehran, Tehran- Iran*
(Received 13 December 2015, Accepted 27 January 2016)

Abstract:

BACKGROUND: Soybean oil is one of the highly consumed vegetable oil worldwide. Nowadays, usage of genetically modified (GM) soybean seeds for soybean oil production is constantly increasing. The recommended methods for GMO detection are based on analysis of residual DNA in vegetable oil and highly processed food. However, the successful amplification of isolated DNA depends on the efficiency of DNA extraction method. **OBJECTIVES:** The purpose of this study was to apply three different DNA extraction methods for analysis of residual genomic DNA in crude and refined soybean oil to obtain high pure of DNA suitable for DNA amplification. **METHODS:** Extraction methods were developed based on the specific binding of DNA molecules to the silica membrane (column) or resin. The isolated DNA was then analyzed by PCR technique using primer pairs, derived from 18S rRNA and 5.8S rRNA gene and soybean lectin gene. **RESULTS:** The results showed that amplifiable DNA could not be extracted from crude/refined soybean oil in method 1. In method 2, by pre-treating of oil with PBS and subsequent precipitation with Isopropanol, the amplification was not observed but OD260 was decreased. In method 1 and 2 the DNA was not pure enough to be amplifiable. To remove more effectively contaminant, method 2 was combined with chloroform extraction as method 3. The extracted DNA from all examined oil samples could be amplified. **CONCLUSIONS:** We believe that the purity of DNA in samples is decisive for amplification and not necessarily the low amount of DNA in samples. Method 3 can be determined as a suitable method for the isolation of the pure DNA.

Keyword: crude soybean oil, DNA extraction method, PCR, refined soybean oil

Figure Legends and Table Captions

Figure 1. Agarose gel electrophoresis of PCR products from the amplification of DNA extraction from refined and crude soybean oil extracted with method 3 using primer pair derived from 18S rRNA and 5.8S rRNA genes (lane1: negative control, lane 2: 2 µl of DNA extracted from crude soybean oil, lane 3: 2 µl of DNA extracted from refined soybean oil).

Figure 2. Agarose gel electrophoresis of PCR products from the amplification of DNA extraction from refined and crude soybean oil extracted with method 3 using primer pair derived from soybean lectin gene (lane 1: 2 µl of DNA extracted from crude soybean oil, lane1: negative control, lane 3: 2 µl of DNA extracted from soybean).

***Corresponding author's email: pshayan@ut.ac.ir, Tel: 021-66929531, Fax: 021-66933222**