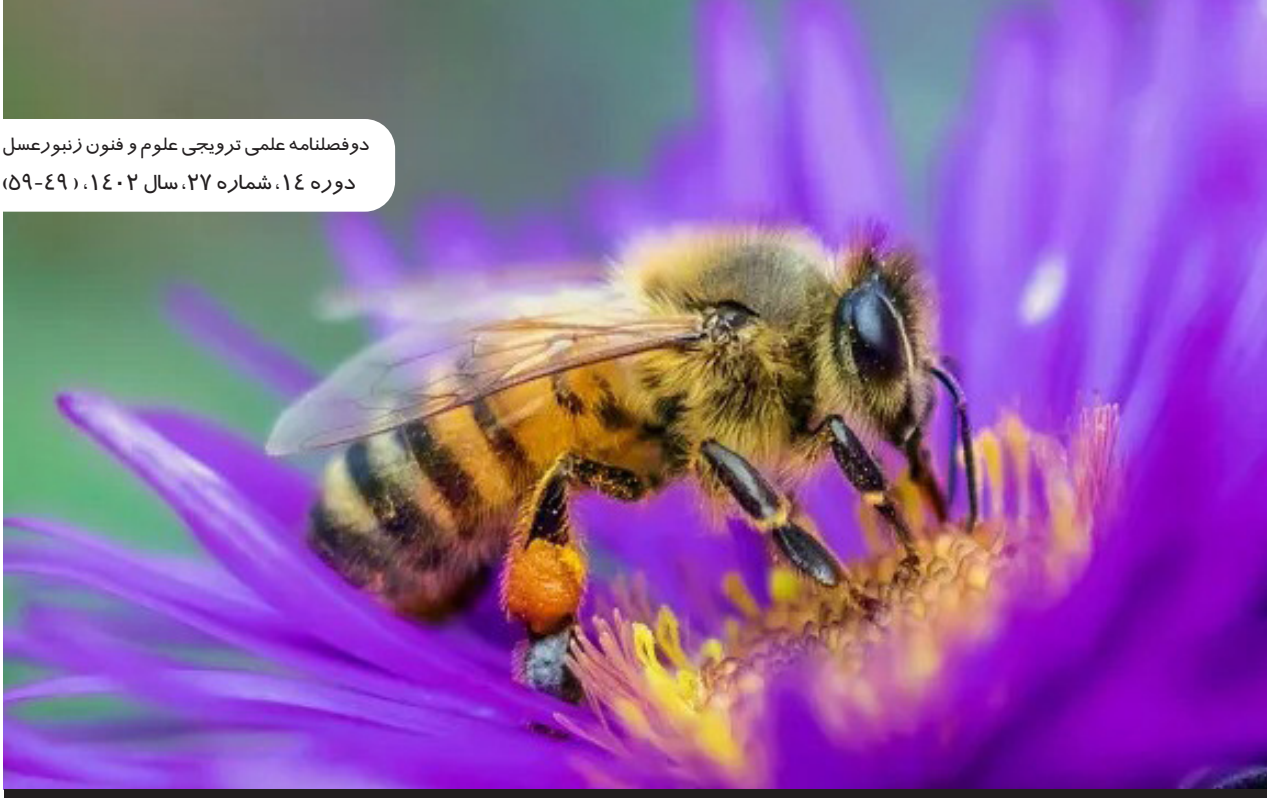
دوفصلنامه علمی ترویجی علوم و فنون زنبورعسل
دوره ۱٤، شماره ۲۷، سال ۱٤۰۲، (٤۹-۵۹)



# پروتکل بهینه شده استخراج DNA برای زنبورعسل ایرانی

**عطاالله رحیمی[1*]، شبنم پری چهره[2]، ناصر تاج آبادی[2]**

۱- بخش تحقیقات علوم دامی، مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی کردستان، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، سنندج، ایران
۲- بخش تحقیقات زنبورعسل، موسسه تحقیقات علوم دامی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران

**تاریخ دریافت:** ۱۴۰۲/۹/۸ **تاریخ پذیرش:** ۱۴۰۲/۱۰/۱۱
**شناسه دیجیتال** (DOI): 10.22034/HBSJ.2024.364258.1152
**رایانامه:** Ata.rahimi@areeo.ac.ir

**چکیده:**

برخلاف بسیاری از موجودات، حشرات منجمله زنبورعسل دارای کوتیکول سخت و سفت بوده و همین موضوع استخراج DNA از آنها را با مشکل مواجه کرده است. برای استخراج DNA از زنبورعسل (*Apis mellifera*) و سایر گونه‌های جنس *Apis* اکثراً از دستورالعمل‌های عمومی که بیشتر برای استخراج DNA از بافت‌های گیاهی و خون طراحی و بهینه شده، استفاده می‌شود. DNA استخراج شده زنبورعسل با استفاده از دستورالعمل‌های بهینه شده برای بافت‌های گیاهی و خون اکثراً دارای کیفیت خیلی پایینی بوده و آلودگی پروتئینی و RNA بالایی دارد که مشکلات زیادی را حین تکثیر در واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز و مراحل بعدی آنالیزها درست می‌کند. از آنجاییکه نقطه شروع و اساس کار تمام تحقیقات ژنتیک مولکولی و مهندسی ژنتیک، جدا سازی DNA با کیفیت عالی است و از طرف دیگر، با توجه به نتایج متفاوت دستورالعمل‌های استفاده شده جهت استخراج DNA زنبورعسل در آزمایشگاه‌های خارج و داخل کشور و اهمیت و ضرورت تحقیقات مولکولی روی زنبورعسل ایرانی، در ادامه مطلب نحوی نمونه‌برداری، تعداد نمونه زنبورعسل مورد نیاز، شرایط نگهداری نمونه‌ها، مراحل دستورالعمل بهینه شده استخراج DNA از زنبورعسل ایرانی و روش تعیین کیفیت و کیمت آن ارائه خواهد شد.

**کلمات کلیدی:** زنبورعسل، استخراج DNA، پروتکل بهینه شده، ژنتیک مولکولی

## مقدمه

زنبورعسل (*Apis mellifera* Linnaeus, 1758) یکی از مهمترین حشرات گرده‌افشان دنیاست که اهمیت زیادی در بخش کشاورزی، پزشکی و تامین امنیت غذایی دارد (Rahimi *et al*., 2023). تاکنون ۹ گونه زنبورعسل از جنس *Apis* در دنیا شناخته شده است که دو گونه از آنها، زنبورعسل معمولی (*A. mellifera*) و زنبورعسل کوچک (*Apis florea* Fabricius, 1787)، در ایران وجود دارند. همچنین، تاکنون ۳۳ زیرگونه و تعداد زیادی اکوتیپ از زنبورعسل معمولی براساس خصوصیات رفتاری، مورفولوژیکی و مولکولی در جهان شناخته شده است (Rahimi *et al*., 2022) که یکی از این زیرگونه‌ها تحت عنوان زنبورعسل ایرانی (*Apis mellifera meda* Shorikov 1929) در ایران وجود دارد (Ruttner *et al*., 1985).

امروزه محققان مختلفی در سرتاسر دنیا با رشته‌های تخصصی متفاوت به سمت تحقیقات روی زنبورعسل به علت اهمیت زیاد آن گرایش پیدا کردند به ویژه در دهه‌های اخیر از لحاظ تحقیقات ژنتیک مولکولی و مهندسی ژنتیک بسیار مورد توجه قرار گرفته است. نقطه شروع و اساس کار تمام تحقیقات ژنتیک مولکولی و مهندسی ژنتیک، جدا سازی DNA با کیفیت عالی و سپس آنالیز آن است (Evans *et al*., 2013; Rahimi *et al*., 2014). پیشرفت در هر رشته علمی به دسترس بودن تکنیک‌ها و روش‌های جدید و پیشرفته آن رشته بستگی دارد (Holloway *et al*., 2013). در سال‌های اخیر با پیشرفت رشته ژنتیک، در اکثر آزماشگاه‌های معتبر دنیا آزمایش‌هایی برای جداکردن بخش‌های ویژه‌ای از DNA ارگانیسم‌ها جهت پی بردن به خصوصیات ژنتیکی آن انجام شده است (Kek *et al*., 2018). مباحث مولکولی از اهمیت روزافزونی در علوم زیستی برخودار است و استخراج اسیدهای نوکلئیک اولین و مهمترین نیاز در بررسی و تحلیل‌های ژنتیکی و مولکولی می‌باشد (Berthomieu and Meyer, 2018). همچنین، مهندسی ژنتیک براساس اطلاعات ژنتیکی پایه گذاری شده که به صورت ژن‌های روی DNA کدگذاری شده‌اند. بنابراین، لزوم دستیابی به ساختمان DNA در مباحث مهندسی ژنتیک و ژنتیک مولکولی موجب شده است چندین روش آزمایشگاهی برای استخراج DNA موجودات به وجود آید (Watson, 2004; Chen *et al*., 2010).

برخلاف بسیاری از موجودات، حشرات منجمله زنبورعسل دارای کوتیکول سخت و سفت بوده و همین موضوع استخراج DNA از آنها را با مشکل مواجه کرده است (Rahimi *et al*., 2018). اکثراً، برای استخراج DNA از زنبورعسل (*Apis mellifera*) و سایر گونه‌های جنس *Apis* از دستورالعمل‌های عمومی که بیشتر برای استخراج DNA از بافت‌های گیاهی و خون طراحی و بهینه شده، استفاده می‌شود. در این شرایط، DNA استخراج شده اکثراً دارای کیفیت خیلی پایینی بوده و آلودگی پروتئینی و RNA بالایی دارد که مشکلات زیادی را حین تکثیر در واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز و مراحل بعدی آنالیزها ایجاد می‌کند. بنابراین، با توجه به نتایج متفاوت دستورالعمل‌های استفاده شده جهت استخراج DNA از زنبورعسل در آزمایشگاه‌های خارج و داخل کشور و همچنین اهمیت و ضرورت تحقیقات مولکولی روی زنبورعسل ایرانی در دهه اخیر، در ادامه مطلب نحوی نمونه‌برداری، تعداد نمونه زنبورعسل مورد نیاز، شرایط نگهداری نمونه‌ها، مراحل دستورالعمل بهینه شده استخراج DNA از زنبورعسل ایرانی و روش تعیین کیفیت و کیمت آن شرح داده خواهد شد.

## تعداد و نحوی جمع آوری نمونه‌های زنبورعسل از کلنی‌ها

از آنجایی که هر کلنی زنبورعسل دارای یک ملکه است و این ملکه در پرواز جفتگیری به طور متوسط با ۱۵-۱۲ زنبور نر جفت گیری می‌کند، بنابراین از لحاظ ژنتیکی افراد داخل یک کلنی متفاوت و تک تک آنها قابلیت و ارزش بررسی را دارند ولی این موضوع از لحاظ هزینه‌ها و زمان مقرون به صرفه نیست و لازم است از هر کلنی تعداد نمونه‌ای خاص با توجه به محدودیت زمان و هزینه‌ها، از مکان خاصی در داخل کندو برداشته شود. متناسب با نوع هدف مورد بررسی در مطالعات ژنتیکی زنبورعسل ایرانی، لازم است از ۱ تا ۵۰ نمونه‌ی زنبور از هر کلنی از محل پرورش نوزادان برداشته شود. لازم به ذکر است، بهتر است که نمونه‌های انتخاب شده از هر کلنی از روی قاب‌های حاوی تخم و لارو که دارای بیشترین تعداد زنبور پرستار هستند، انتخاب و به عنوان نماینده آن کلنی برای انجام مطالعات مورد استفاده قرار داد. توصیه می‌شود در فصل غارت، نمونه‌برداری از کلنی‌ها انجام نگردد یا در صورت ضرورت، نمونه‌ها با دقت بالایی از قاب‌های محل پرورش نوزادان برداشته شوند. هنگام برداشتن نمونه‌های زنبور از کندوها، بهتر است آنها را با اتر بیهوش کرد زیرا بیهوش کردن با اتر باعث می‌شود که خرطوم زنبورها تا حدودی بیرون آمده و صاف و کشیده باشد که این امر، در بیرون آوردن خرطوم و اندازه گیری طول آن را در بررسی‌های مورفولوژیک راحت‌تر

می‌کند. لازم به ذکر است تمام اطلاعات ضروری مثل شماره کندو، شماره زنبورستان، اسم شهرستان و استان، مشخصات شخص جمع‌آوری کننده و سال جمع‌آوری روی ظرف حاوی نمونه‌ها درج شود. همچنین، لازم است در هنگام نمونه‌برداری اطلاعات جغرافیایی محل نمونه‌برداری نیز ثبت گردد (شکل ۱).

**شکل ۱: شیشه حاوی محلول پامپل و نمونه‌های زنبورعسل برای بررسی‌های مورفولوژیکی (رحیمی، ۱۳۹۵)**

## شرایط نگهداری نمونه‌های زنبورعسل

**نگهداری نمونه‌ها برای اندازه گیری صفات مورفولوژیک-ژئومتریک:**

در مطالعات مورفولوژیک و بخصوص اندازه‌گیری صفات مورفولوژیک- ژئومتریک به‌خاطر عدم تغییر رنگ و شکل اعضای مختلف بدن زنبور، بهتر است نمونه‌های جمع آوری شده از هر کلنی در داخل ظرف حاوی محلول پامپل تا زمان بررسی نگهداری شود (شکل ۱) که این محلول به شرح ذیل تهیه می‌شود:

**دستورالعمل تهیه محلول پامپل**

**نگهداری نمونه ها برای مطالعات مولکولی:**

برای مطالعات مولکولی با هدف آنالیز DNA، بهتر است نمونه‌ها را داخل ظروف درب بسته حاوی اتانول مطلق یا اتانول ۹۶ درصد بالا و در یخچال (برای دوره کوتاه مدت) یا در فریز ۲۰- درجه سانتی‌گراد (برای دوره طولانی مدت) تا زمان استخراج DNA نگهداری کرد (شکل ۲).

**شکل ۲: شیشه حاوی اتانول مطلق و نمونه‌های زنبورعسل برای بررسی‌های مولکولی (رحیمی، ۱۳۹۵)**

## نحوی آماده سازی نمونه‌ها برای استخراج DNA

با توجه به اینکه نمونه‌های زنبورعسل از محل زنبورستان تا زمان استخراج DNA در داخل اتانول نگهداری می‌شوند، لازم است قبل از استفاده از آنها برای عمل استخراج DNA، مدتی روی یک تکه پارچه سفید رنگ تمیز قرار گیرند تا اتانول از روی بدن آنها تبخیر شده و سپس برای انجام مراحل استخراج مورد استفاده قرار بگیرند (شکل۳). از آنجاییکه افراد داخل یک کلنی از لحاظ ژنتیکی متفاوت هستند، لازم است DNA زنبورها به صورت انفرادی از تک تک نمونه‌ها استخراج گردد. نوع هدف و تکنیک استفاده شده برای آنالیز DNA مشخص می‌کند که کل بدن یا قسمتی از بدن نمونه زنبور برای استخراج DNA مورد استفاده قرار گیرد. از آنجاییکه زنبورعسل یک حشره گرده‌افشان است و روی پای سوم سبدگرده، روی پا اول شاخک پاک‌کن و همچنین دارای موهای منشعب است، احتمال دارد روی بدن یا درون این اندام‌ها گرده یا بره‌موم یا دورن سیستم گوارشی آنها گرده و شهدگیاهان موجود باشد. بنابراین، بهتر است استخراج DNA از اندام‌هایی مثل سر و پیوست‌های آن، ماهیچه‌های قفسه سینه، بال‌ها و پاهای دوم صورت گیرد. براساس نتایج تحقیقات انجام شده حتی هنگام استفاده از نشانگرها و آغازگرهای اختصاصی پیشنهاد نمی‌گردد که از قسمت شکم زنبور جهت استخراج DNA استفاده شود زیرا آلودگی‌ها را چند برابر می‌کند (Rahimi *et al*., 2023).

**شکل ۳: مراحل تبخیر اتانول و جداکردن قطعات بدن نمونه‌ی زنبورعسل قبل از عمل استخراج DNA (رحیمی، ۱۳۹۵)**

## اصول و مراحل استخراج DNA از زنبورعسل

از زمان اولین استخراج DNA روی موجودات مختلف تاکنون پروتکل‌ها و روش‌های مختلفی معرفی شده است و به تدریج اصلاحاتی در هریک از آنها صورت گرفته است که منجر به ساده شدن فرایند و افزایش بازده استخراج DNA گردیده است. بدین ترتیب در ادامه مطلب، شمایی کلی از مراحل استخراج اسیدهای نوکلیئک ارائه می‌شود:

**شکستن سلول:**

از آنجایی که DNA در داخل سلول قرار دارد، جهت جداسازی آن باید سلول را شکست. برای این کار در مورد هر موجود، بافت و سلول باید روش خاصی را به‌کار برد. با توجه به اینکه زنبورعسل دارای کوتیکول و بافت‌های کتینی سخت و سفت است از شوینده‌های یونی به ویژه SDS (سدیم دودسیل سولفات) برای شکستن سلول استفاده می‌شود. لازم به ذکر است که به دلیل شکنندگی رشته‌های DNA، شکستن سلول‌ها باید در داخل بافر انجام گیرد. این بافر شامل Tris-HCL (Tris: هیدروکسی اتیل آمینواتیل هیدروکلراید)، EDTA (اتیلن دی آمین ترا استیک اسید) و SDS می‌باشد. SDS دوتا خاصیت عمده دارد: یکی باعث حل شدن چربی‌ها می‌شود و دیگر اینکه با اتصال به DNA باعث پایداری آن می‌گردد. همچنین، EDTA نیز باعث حل شدن غشای خارجی دیواره سلول‌ها می‌شود.

**رسوب پروتئین‌ها:**

همزمان با شکسته شدن سلول، محتویات آن که شامل DNA، RNA، پروتئین، قند، چربی و غیره است، آزاد می شود. در این مرحله برای خالص سازی DNA باید پروتئین‌ها رسوب یابند. برای این کار می‌توان از فنل، کلروفورم و یا محلول غلیظ نمک‌های مختلف استفاده کرد که این مواد باعث تغییر شکل پروتئین‌ها (Denaturation) و در نتیجه رسوب آنها می‌شوند.

**رسوب دادن DNA:**

برای رسوب DNA از الکل مطلق استفاده می‌شود. الکل سرد به سوسپانسیون حاصل از شکستن سلول اضافه می‌شود و سپس سوسپانسیون حاوی الکل سرد در فریزر قرار می‌گیرد. در این مرحله در حدفاصل آب و الکل، DNA و RNA رسوب می‌کند.

**جدا کردن DNA و RNA از یکدیگر:**

در این مرحله با توجه به هدفی که مدنظر است (آنالیز DNA یا RNA) DNA و RNA را باید از یکدیگر جدا کرد. با توجه به اینکه هدف ما، بررسی DNA است با استفاده از آنزیم RNase، می‌توان RNA ها را تجزیه کرد.

## مراحل پروتکل بهینه شده استخراج DNA

با توجه به اینکه نمونه‌های زنبور از محل زنبورستان تا زمان استخراج DNA در داخل اتانول نگهداری می‌شوند، ضروریست قبل از شروع مراحل استخراج برای مدت چند دقیقه‌ای روی پارچه‌ای سفید رنگ تمیز قرار گیرند تا الکل از روی بدن آنها تبخیر شده و سپس برای استخراج DNA که مراحل آن به شرح ذیل می‌باشد، مورد استفاده قرار گیرند.

۱- ابتدا یک زنبورکارگر را از داخل ظرف حاوی اتانول مطلق خارج کرده و برای مدت چند لحظه روی یک پارچه سفید رنگ تمیز قرار داده تا اتانول آن کاملاً جذب پارچه شده و تبخیر شود (شکل ۳).

۲- سر و قفسه‌سینه هر زنبورکارگر به همراه پیوست‌های آنها (هنگام کار کردن با نشانگر و آغازگرهای اختصاصی) (شکل ۳) یا سر و پیوست‌های آن، ماهیچه‌های قفسه سینه، پاهای دوم و بالها (در صورت استفاده از نشانگر یا آغازگرهای عمومی یا نیمه اختصاصی) هر نمونه زنبور را با پنس استریل جدا کرده و آن را در داخل هاون چینی استریل قرارداده (شکل ۴ a) و با استفاده از دسته هاون و در حضور ازت مایع نمونه را به‌خوبی سائیده به طوری که کاملاً پودر شود. سپس، با یک قاشقک کوچک مواد پودر شده را جمع آوری کرده و در داخل یک میکروتیوب ml ۲ استریل بریزید (شکل ۴ b).

**شکل ۴: مراحل خرد و پودر کردن و برداشتن نمونه‌ی زنبور و اضافه کردن بافر استخراج DNA به آن (رحیمی، ۱۳۹۵)**

۳- حدود ۴۰۰ الی ۵۰۰ میکرولیتر از بافر استخراج به میکروتیوب حاوی نمونه پودر شده اضافه گردد (دمای بافر استخراج باید حدود ۶۰ – ۵۰ درجه سانتی‌گراد باشد) (شکل ۴ c). سپس، پنج میکرولیتر پروتئیناز K و ده میکرولیتر ماده ۲- مرکاپتو اتانول را به میکروتیوب حاوی نمونه اضافه کرده و به آرامی ترکیب را ورتکس کنید تا کاملاً مخلوط شود.

۴- میکروتیوب حاوی نمونه را به مدت یک الی ۱/۵ ساعت درون ترموبلاک یا بن‌ماری با دمای ۶۵ درجه سانتی‌گراد گذاشته و در طول این زمان هر نیم‌ساعت یک بار به آرامی میکروتیوب را سر و ته کرده تا محلول داخل میکروتیوب کاملاً مخلوط شود.

۵- بعد از سپری شدن این زمان، میکروتیوب را از درون دستگاه بن‌ماری یا ترموبلاک خارج کرده و ۳۰۰ میکرولیتر استات پتاسیم (پنج مولار) به آن اضافه گردد. چند بار میکروتیوب را سر و ته کرده تا محتویات آن کاملاً مخلوط شود. سپس، به مدت ۱۵ دقیقه میکروتیوب را روی یخ خشک درون فریزر ۲۰- درجه سانتی‌گراد قرار داده شود.

۶- بعد از انجام مرحله پنج، به میکروتیوب ۴۰۰ الی ۵۰۰ میکرولیتر محلول کلروفورم ایزو آمیل الکل (۱:۲۴) اضافه کرده و سپس میکروتیوب را هفت الی هشت بار به آرامی سر و ته کنید تا یک سوسپانسیون یک دست تشکیل شود.

۷- سپس، میکروتیوب را به مدت ده دقیقه با دور ۱۱۰۰۰ سانتریفیوژ کنید. در این مرحله بیشتر ناخالصی‌ها رسوب کرده و داخل میکروتیوب دو فاز جدا تشکیل خواهد شد که فاز بالایی آن حاوی محلول DNA است.

۸- محلول فاز بالایی را به آرامی برداشته و با رعایت احتیاط کامل جهت مخلوط نشدن مجدد محلول DNA با ناخالصی‌های رسوب کرده در فاز زیرین، به تدریج محلول فاز بالایی به میکروتیوب ۱/۵ ml استریل منتقل شود. در صورتی که مایع جدا شده از شفافیت کافی برخودار باشد، مرحله بعدی استخراج را انجام دهید و در غیر این صورت مراحل شش، هفت و هشت مجدداً تکرار شود تا محلولی کاملاً شفاف بدست آید.

۹- هم حجم مایع زلال بالایی، ایزوپروپانول سرد (یا دو برابر حجم مایع زلال رویی که در مرحله هشت به میکروتیوب جدید منتقل شده اتانول سرد مطلق) اضافه‌کنید و سپس به آرامی میکروتیوب را حدود هشت الی نه بار سر و ته کرده تا کلاف DNA تشکیل شود وکم کم رسوب کند.

۱۰- پس از مخلوط کردن محلول زلال حاوی DNA با

ایزوپروپانول سرد با نسبت ذکر شده، این محلول را به مدت ۱/۵ الی دو ساعت روی یخ خشک در داخل فریزر با دمای ۲۰ –درجه سانتی‌گراد گذاشته و بعد از سپری شدن این زمان، میکروتیوب حاوی محلول DNA و ایزوپروپانول با سرعت ۱۱۰۰۰ دور به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ کنید.

۱۱- مایع رویی را به آرامی دور ریخته و به رسوب تشکیل شده ۳۰۰ میکرولیتر الکل ۷۰ ٪ اضافه کنید و با دور ۸۰۰۰ به مدت پنج دقیقه میکروتیوب مورد نظر سانتریفیوژ گردد (زمانیکه رسوب حاصله تیره بود این مرحله ۲ بار تکرار گردد) و سپس میکروتیوب حاوی پلیت رسوب کرده DNA را در مجاورت هوا قرار دهید تا الکل آن به طور کامل حذف گردد.

۱۲- سپس، ۷۰ الی ۸۰ میکرولیتر بافر TE یا آب‌مقطر دوبار استریل به کلاف رسوب کرده DNA در ته میکروتیوب به آرامی اضافه کنید و میکروتیوب را در دمای یخچال به مدت ۱۲ ساعت قرار دهید تا کلاف رسوب کرده DNA به آرامی در بافر TE یا آب‌مقطر دوبار استریل حل شود.

۱۳- بعد از حل شدن کلاف DNA در بافر TE یا آب‌مقطر دوبار استریل، استوک اصلی DNA برای استفاده طولانی مدت در فریزر ۲۰– یا ۸۰– درجه سانتی‌گراد نگهداری کنید.

### طرز تهیه ۱۰۰ سی‌سی بافر استخراج DNA

| | | |
|---|---|---|
| EDTA (PH=8) | ۵۰ میلی‌مولار | ۱/۴۶۱ گرم |
| Tris-HCL | ۱۰۰ میلی-مولار | ۱/۵۷۶ گرم |
| NaCl | ۵۰۰ میلی-مولار | ۲/۹۲۲ گرم |
| SDS | ۲/۵ درصد | ۲/۵ گرم |

### طرز تهیه TE (۱۰۰ سی‌سی)

| | | |
|---|---|---|
| Tris-Base | ۱۰ میلی‌مولار | ۰/۰۱۲۱ گرم |
| EDTA (PH=8) | ۱ میلی‌مولار | ۰/۰۰۳۷۲ گرم |

### طرز تهیه بافر TBE (10X) (۱۰۰۰ سی‌سی)

| | | |
|---|---|---|
| Tris- Base | ۱ مولار | ۱۲۱/۱ گرم |
| Boric acid | ۱ مولار | ۶۱/۸ گرم |
| EDTA | ۱ مولار | ۷/۴ گرم |

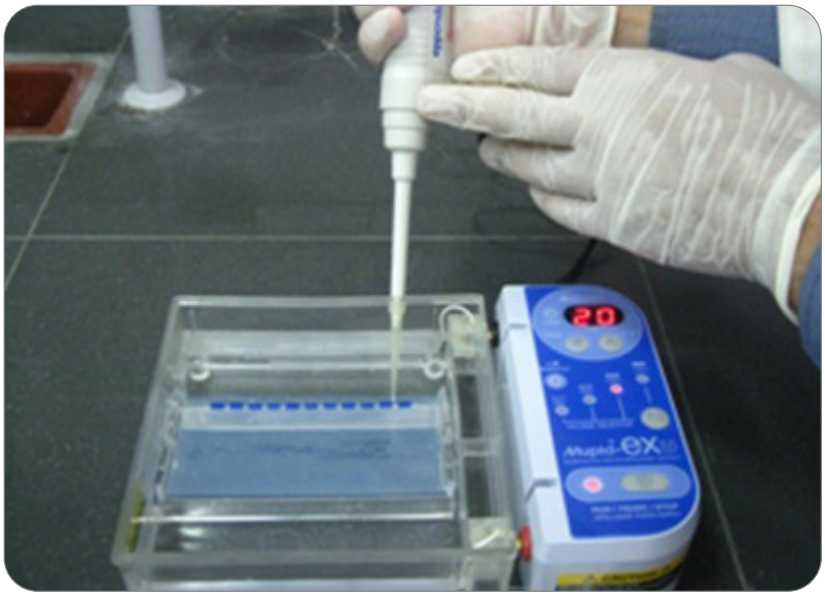
### تعیین کمیت و کیفیت DNA استخراج شده

با توجه به اینکه اکثریت تکنیک‌های مولکولی استفاده شده جهت آنالیز DNA نیاز به غلظت مشخصی از DNA برای انجام واکنش رنجیره‌ای پلی‌مراز دارند، بنابراین لازم است که قبل از شروع واکنش‌ها کیفیت، کمیت و خلوص DNA استخراج شده، مشخص گردد.

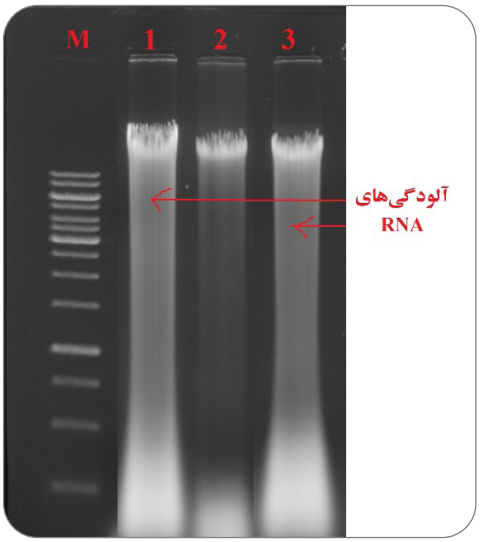
### تعیین کیفیت نمونه‌های DNA استخراج شده با استفاده از دستورالعمل بهینه شده بالا

برای بررسی شکستگی، آلودگی‌های RNA و پروتئینی نمونه‌های DNA استخراج شده، بایستی از ژل آگارز (۰/۹ درصد در بافر (TBE(1X) استفاده شود. برای این کار، چهار میکرولیتر از استوک اصلی DNA استخراج شده را با دو میکرولیتر بافر بارگذاری مخلوط و در درون یک چاهک روی ژل آگارز ۰/۹ درصد بارگذاری کنید. همچنین، از یک سایز مارکر (DNA با وزن مولکولی ۱۵۰۰bp) به عنوان کنترل جهت تخمین غلظت DNA استفاده شود. الکتروفورز ژل به مدت یک ساعت با ولتاژ ۷۰ ولت ران گردد (عکس ۵). بعد از سپری شدن این زمان و اتمام الکتروفورز، ژل آگارز را با اتیدیوم بروماید (۰/۵ میکروگرم بر میکرولیتر) رنگ‌آمیزی کرده و توسط دستگاه تصویربرداری (Gel documentation) از ژل آگارز رنگ آمیزی شده عکس‌برداری و سپس آنرا مشاهده کنید. کیفیت نمونه‌های DNA را می‌توان از طریق مقایسه موقعیت و شدت باند حاصل از DNA های بارگذاری شده با الگوی نواربندی حاصل از سایز مارکر مورد استفاده، تعیین نمایید. در مورد کیفیت DNA، نوار اسمیر معیاری برای تعیین کیفیت DNA است و وجود آن نشان دهنده‌ی کیفیت نامطلوب DNA و وجود هاله در انتهای محصول الکتروفورز نشان دهنده‌ی وجود آلودگی به‌ویژه آلودگی RNA است (شکل ۶) و در صورتی که باند حاصل بر روی ژل آگارز کاملاً تیز[1]، منفرد و بدون هیچ پس زمینه‌ای باشد (شکل ۷)، نشان دهنده‌ی مرغوبیت، عدم شکستگی، آسیب دیدگی و عدم آلودگی DNA استخراج شده‌است. با توجه به تقریبی و نسبی بودن این روش و همچنین نیاز به تجربه بالا برای تعیین غلظت DNA، لازم است از داده‌های حاصل از روش طیف جذبی (اسپکتروفتومتری) نیز برای تعیین کمیت DNA استخراج شده استفاده گردد (رحیمی، ۱۳۹۵).

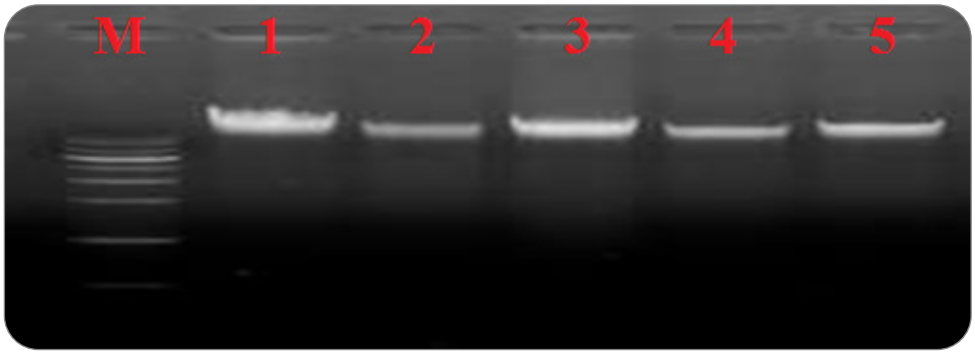
1- Sharp



**شکل۵: بارگیری DNA استخراج شده زنبورعسل روی ژل آگارز برای تعیین کیفیت آن (رحیمی، ۱۳۹۵)**




**شکل ۶: کیفیت DNA استخراج شده با آلودگی بالایRNA (چاهک M: سایز مارکر، چاهک‌های ۱ و ۳ نمونه‌های DNA با آلودگی زیاد RNA)**




**(رحیمی، ۱۳۹۵)**

**شکل ۷: کیفیت نمونه‌های DNA استخراج شده زنبورعسل ایرانی روی ژل آگارز ۰/۹ درصد با دستورالعمل بهینه شده مطالعه حاضر (چاهک M:**

**سایز مارکر، چاهک‌های ۱ تا ۵ نمونه‌های DNA زنبورعسل با پروتکل بهینه شده برای زنبورعسل ایرانی) (رحیمی، ۱۳۹۵)**

## تعیین کمیت نمونه‌های DNA استخراج شده با استفاده از دستورالعمل بهینه شده بالا

جهت تعیین غلظت نمونه‌های DNA استخراج شده از روش طیف جذبی(اسپکتروفتومتری (Cary Scan ۱۰۰)) استفاده می‌گردد. جذب نوری DNA و پروتئین در طول موج‌های ۲۶۰ و ۲۸۰ نانومتر انجام می‌گیرد. ظرفیت کووت[2] مورد استفاده معمولا در بیشتر دستگاه‌های اسپکتروفتومتر ۱۰۰۰ میکرولیتر است. قبل از اندازه‌گیری غلظت نمونه‌های DNA، باید دستگاه کالیبره شود. برای کالیبره نمودن دستگاه از ۱۰۰۰ میکرولیتر آب‌مقطر دو بار استریل استفاده می‌شود. این عمل به این طریق انجام می‌گردد که ابتدا کووت را سه بار با آب‌مقطر شستشو داده، سپس ۱۰۰۰ میکرولیتر آب‌مقطر دو بار استریل به آن اضافه و درون دستگاه قرار دهید. زمانی که دستگاه با فشردن کلید کالیبره کردن در طول موج‌های A۲۶۰ و A۲۸۰، عدد صفر را نشان داد، نشانگر کالیبره شدن دستگاه می‌باشد. پس از کالیبره شدن دستگاه، برای ارزیابی کمیت هر نمونه، ۹۹۵ میکرولیتر آب‌مقطر دوبار استریل را به همراه پنج میکرولیتر از محلول استوک اصلی DNA استخراج شده درون کووت ریخته و کووت را درون دستگاه اسپکتروفتومتر قرار دهید تا دستگاه میزان جذب نور آن را در طول موج‌های مورد نظر (OD) و نیز غلظت محلول DNA بر حسب میکروگرم بر میکرولیتر را قرائت کند. در صورتی که نسبت قرائت شده (OD۲۸۰/OD۲۶۰) در محدوده ۲-۱/۸ بود، نشان دهنده‌ی کیفیت مناسب DNA جهت واکنش زنجیره‌ای پلی-مراز است. نسبت‌های کمتر از ۱/۸ نشانه حضور پروتئین و سایر ناخالصی‌ها در DNA استخراج شده می‌باشد، در این حالت توصیه می‌شود DNA مجدداً توسط کلروفورم رسوب داده شود. نسبت‌های بالاتر از دو نشان دهنده‌ی وجود RNA است، در این وضعیت بهتر است در صورت مشاهده چنین نسبت‌هایی (بالاتر از دو)، استخراج DNA آن نمونه دوباره انجام گیرد. وجود ناخالصی‌ها موجب اختلال در واکنش رنجیره‌های پلی مراز، واکنش‌های هضم آنزیمی و اشکال در عمل برش DNA توسط آنزیم‌های برش دهنده می‌شود. پس از انتخاب نمونه‌های DNA استخراج شده که نسبت جذبی آنها در محدوده ۲-۱/۸ باشد، لازم است از اعداد مربوط به طول موج ۲۶۰ نانومتر جهت محاسبه غلظت DNA رقیق شده طبق فرمول زیر استفاده گردد (رحیمی، ۱۳۹۵).:

غلظت DNA = OD۲۶۰ × ضریب رقت × ۵۰

(غلظت DNA به نانوگرم در میکرولیتر)

عدد ۵۰ به این دلیل نوشته می‌شود که اگر جذب OD۲۶۰ نانوگرم برابر با یک باشد یعنی تقریباً معادل ۵۰ نانوگرم در میکرولیتر DNA دو رشته‌ای است. ضریب رقت هم در این فرمول طبق نسبت ۱۰۰۰: ۵۰ (آب مقطر: محلول استوک DNA) ۲۵۰ می‌باشد. برای رقیق‌سازی و یکسان نمودن غلظت نمونه‌های DNA استخراج شده و تهیه استوک‌های آماده مصرف با غلظت تعیین شده از فرمول زیر استفاده کنید:

$$N_2V_2=N_1V_1$$

در این فرمول:

$N_1$= غلظت DNA در استوک اصلی

$V_1$= حجمی از DNA که از استوک پایه بایستی برداشته شود.

$N_2$= میزان غلظت DNA مورد نظر در استوک آماده مصرف

$V_2$= حجم کل استوکی که بایستی تهیه شود.

پس از مشخص شدن کمیت و کیفیت DNA استخراج شده، لازم است غلظت DNA مورد استفاده را تعیین و با استفاده از آب‌مقطر دوبار استریل رقیق کنید. سپس، استوک‌های DNA رقیق شده و استوک‌های اصلی (پایه) را جهت استفاده طولانی مدت و انجام آزمایشات بعدی به ترتیب در فریزر ۲۰- و ۸۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری کنید.

ارزیابی کمیت و کیفیت DNA نمونه‌های زنبورعسل استخراج شده با دستورالعمل بالا، نشان داد که نمونه‌های DNA استخراج شده از کمیت و کیفیت بالایی برخوردار بودند (شکل ۷). غلظت DNA استخراج شده از ۹۱۷ تا ۲۶۲۹ ng/µl متغییر بود. نسبت جذب در طول موج ۲۶۰ به ۲۸۰ به‌طور متوسط بین ۱/۸ تا ۲/۰۱ و نسبت جذب در طول موج ۲۶۰ به ۲۳۰ به طور متوسط بین ۱/۹ تا ۲/۴ بود. حصول DNA مناسب و ایده‌آل، بیانگر کارآمدی دستورالعمل بهینه شده فوق الذکر است (رحیمی، ۱۳۹۵).

2- Cuvette

## منبع ها:

رحیمی، ع. ۱۳۹۵. بررسی تنوع‌ژنتیکی و روابط فیلوژنتیکی جمعیت‌های زنبورعسل زیرگونه ایرانی (*Apis mellifera meda*) با استفاده از نشانگرهای ریخت‌شناسی و مولکولی. پایان نامه دکتری، دانشگاه رازی، کرمانشاه، ایران.

Berthomieu, P. & Meyer, C. 2018. Direct amplification of plant genomic DNA from leaf and root pieces using PCR. *Plant Molecular Biology*. 17 (3): 555-557

Chen, H., Rangasamy, M., Tan, SY., Wang, H. & Siegfried, B.D. 2010. Evaluation of five methods for total DNA extraction from western corn rootworm beetles. *PLoS ONE*. 5: e11963.

Evans, J.D., Schwarz, R.S., Chen, Y.P., Budge, G., Cornman, R.S., De la Rua, P., Miranda, JR., Foret, S., Foster, L. & Gauthier, L. 2013. Standard methods for molecular research in *Apis mellifera. Journal of Apicultural Research*. 52(4): 1-53.

Holloway, B.A., Tarver, M.R. & Rinderer, T.E. 2013. An economical and effective high-throughput DNA extraction protocol for molecular marker analysis in honeybees. *Entomologia Experimentalis et Applicata*. 148: 196–200.

Kek, S.P., Chin, N.L., Tin, S.W., Yusof, Y. & Chua, LS. 2018. Comparison of DNA extraction methods for entomological origin identification of honey using simple additive weighting method. *International Journal of Food Science and Technology*. 14: 1-10.

Rahimi, A., Mirmoayedi, A., Kahriz, D., Zarei, L. & Jamali, J. (2023). Genetic characterization of Iranian honeybees, *Apis mellifera meda* Skorikow, 1829, based on microsatellite DNA polymorphism. *Biochemical genetics*. 61 (2): 1-25.

Rahimi, A., Mirmoayedi, A., Kahriz, D., Zarei, L. & Jamali, J. (2022). Molecular genetic diversity and population structure of Iranian honey bee (*Apis mellifera meda*) populations: Implications for breeding and conservation. *Journal of Plant diseases and protection*. 129 (4): 1-12.

Rahimi, A., Mirmoayedi, A., Kahrizi, D., Zaraei, L. & Jamali, S. 2018. Genetic Variation in Iranian Honeybees, *Apis mellifera meda* Skorikow, 1829, (Hymenoptera: Apidae) Inferred from RFLP Analysis of two mtDNA Regions (COI and 16S rDNA). *Sociobiology*.65(3): 482-490.

Rahimi, A., Mirmoayedi, A., Kahrizi, D., Abdolshahi, R., Kazemi, E. & Yari, K. 2014. Microsatellite genetic diversity of *Apis mellifera meda skorikov. Molecular Biology Reports*. 41: 7755- 7761.

Ruttner, F., Pourasghar, D. & Kauhausen. D. 1985. Die Honigbienen des Iran. *I. Apis florea Fabricius. Apidologie*. 16: 119-12

Watson, J. 2004. Transcription and structure Gen. (Samadi, A., and Pasalar, P.) University of Tehran publication. Tehran. P. 436.

# An optimized DNA extraction protocol for Iranian honey bee



**A. Rahimi[1]*, S. paricheherch[2], N. tajabadi[2]**

1- Animal Science Research Department, Kurdistan Agricultural and Natural Resources Research and Education Center, Agricultural Research Education and Extension Organization (AREEO), Sanandaj, Iran

2- Honey Bee Research Department, Animal Science Research of Iran, Agricultural Research Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran

**DOI:** 10.22034/HBSJ.2024.364258.1152

**Abstract**

Unlike many organisms, insects, especially honey bees, have hard cuticles, which makes it difficult to extract DNA from them. The optimized general protocols for extracting DNA from plant tissues and blood are mostly used for extracting DNA from honey bees (Apis mellifera) and other species of the Apis genus. In these conditions, the extracted DNA is mostly of very low quality and has high protein and RNA contamination, which causes many problems during amplification in the polymerase chain reaction and subsequent stages of analysis. Considering the importance of DNA quality, the different results of the protocols used to extract DNA from honey bees in different laboratories, and the necessity of molecular research on Iranian honey bees, we will present the sampling method, the number of honey bee samples required, the storage conditions of the samples, steps of the optimized protocol for extracting DNA from Iranian honey bees, and the methods for the quantity and quality of the extracted DNA in this article.

**Key words:** Honey bee, DNA extraction, Optimized protocol, Molecular genetics

**Corresponding Author:** A. Rahimi
**Email:** ata.rahimi@areeo.ac.ir