

به کارگیری 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 آخوندزاده بستی^۱، نگین نوری^۱، ایرج اشرفی^۳، پرویز شایان^{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 پر مصرف ترین روغن های گیاهی در جهان است. این روزها، استفاده از دانه های سویا اصلاح ژنتیکی شده برای تولید روغن سویا به طور مداوم در حال افزایش می باشد. 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 روش مختلف استخراج DNA برای بررسی بقایای ژنتیکی موجود در روغن به منظور دستیابی به DNA با خلوص بالا می باشد. روش کار: روش های استخراج بر اساس اتصال اختصاصی DNA به غشای سیلیکایی (ستون) و رزین طراحی شده اند. آنالیز DNA استخراج شده با روش PCR و با استفاده از جفت پرایمر طراحی شده از ژن ۱۸S rRNA و ۵S rRNA و پرایمر اختصاصی مشتق شده از ژن لکتین گیاه سویا انجام شد. نتایج: در این مطالعه، با استفاده از روش ۱، DNA قابل تکثیر از نمونه های 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 OD_{۲۶۰} کاهش یافت. در روش ۱ و 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 نمونه ها با موفقیت تکثیر شدند. نتیجه گیری نهایی: اعتقاد ما بر این است اگر چه یکی از مشکلات استخراج DNA در ماده غذایی کمی میزان DNA موجود در روغن می باشد اما در واقع مهم ترین نقش را در موفقیت تکثیر DNA استخراج شده از روغن، خلوص آن دارد. روش ۳ می تواند به عنوان روش مناسبی برای جدا سازی DNA خالص از روغن سویا مورد استفاده قرار گیرد.

واژه های کلیدی: روغن سویا خام، استخراج DNA، PCR، روغن سویا تصفیه شده

مقدمه

فرآوری، روشی است که بر پایه آنالیز بقایای ژنتیکی موجود در آن ماده غذا باشد. کارایی و تکثیر موفق DNA استخراج شده، شدیداً به روش مورد استفاده برای استخراج DNA از روغن وابسته است. روش های مختلفی برای استخراج DNA از نمونه های روغن وجود دارد (۴). از جمله این روش ها CTAB می باشد. بر اساس مطالعات قبلی، در این روش از ۱-۱۰۰ ml نمونه اولیه روغن جهت استخراج DNA استفاده گردیده است (۱۴، ۱۰، ۷، ۳، ۲). در برخی از مطالعات از کلرفرم و هگزان برای بهبود این روش بهره برده اند (۳، ۷). در گزارش های پیشین از معایب این روش، ناخالص بودن DNA استخراج شده، ذکر شده است (۱۱). در جهت کاهش این ناخالصی، روش هایی بر پایه اتصال اختصاصی DNA با غشای سیلیکایی موجود در ستون یا رزین گسترش یافت. در مطالعات پیشین، برای استخراج DNA از نمونه های روغن کیت های گیاهی و غذایی Nucleospin (۳، ۹)، کیت مدفوع QIAamp (۱۴، ۵، ۱)، کیت گیاهی DNeasy (۱۴) مورد استفاده قرار گرفته است. از مقدار ۱-۲۰۰ ml نمونه اولیه روغن، جهت استخراج DNA توسط این کیت ها، استفاده گردیده است.

اینگونه به نظر می رسد که یکی از مشکلات اصلی در استخراج DNA

روغن های گیاهی نقش مهمی را در صنایع غذایی، دارویی و آرایشی برعهده دارند. تفاوت در ارزش غذایی و قیمت روغن های گیاهی، پتانسیل تقلب در این ماده را بالا برده است. بنابراین در حیطه مدیریت سلامت جامعه، تعیین اعتبار و قابلیت پیگیری این روغن ها از ارزش خاصی برخوردار می باشد. براساس تعاریف کمیسیون 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 می شود (http://ec.europa.eu/food/food/foodlaw/traceability/index_en.htm). با این رویکرد، تعیین روش های معتبر و استانداردهای معیار از اهمیت بالایی بر خوردار است (۶).

روغن سویا یکی از پر مصرف ترین روغن های گیاهی در جهان است که ۳۰٪ از مصرف جهانی روغن های گیاهی را به خود اختصاص داده است (۵، ۱۱). این روزها، استفاده از دانه های سویا اصلاح ژنتیکی شده برای تولید روغن سویا به طور مداوم در حال افزایش است. روش مناسب برای تشخیص گیاهان اصلاح ژنتیکی شده در روغن و غذا با میزان بالای



مدت ۵ دقیقه $800 \times g$ (اپندرف، ۵۸۱۰ دور، آلمان) سانتریفوژ گردید. سپس محلول زیرین به همراه فاز میانی به تیوب استریل جدید انتقال داده شد. $200 \mu\text{l}$ پروتیناز K به نمونه‌ها افزوده و در 56°C به مدت ۲۰ دقیقه گرم‌خانه گذاری شد. در مرحله بعدی، $540 \mu\text{l}$ باندینگ بافر به مخلوط افزوده، به خوبی هم زده و به مدت ۱۰ دقیقه در 70°C گرم‌خانه گذاری شد. سپس به مخلوط $410 \mu\text{l}$ اتانول خالص (Merck، آلمان) افزوده گردید. مخلوط به ستون MBST منتقل، پس از ۱ دقیقه سانتریفوژ $800 \times g$ ، ستون ۲ بار با بافر شستشو شسته شد. در پایان DNA ژنومی استخراج شده توسط $400 \mu\text{l}$ آب استریل و گرم‌خانه گذاری در 70°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. 5 ml از نمونه روغن با 5 ml PBS (1 g NaCl ، 0.2 g KCl ، $0.4 \text{ g Na}_2\text{HPO}_4$ ، $0.2 \text{ g KH}_2\text{PO}_4$ ، pH ۸٫۰، در ۱۱ آب مقطر، Merck، آلمان) و 1 ml توپین 80 (Merck، آلمان) در تیوب‌های 15 ml مخلوط و در 70°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 $800 \times g$ (اپندرف، ۵۸۱۰ دور، آلمان) سانتریفوژ گردید. پس از سانتریفوژ 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)، 0.1 حجم محلول سدیم استات (3 M ، pH=۵٫۵)، هم حجم محلول ایزوپروپانول (Merck، آلمان) و $600 \mu\text{l}$ رزین (MBST، ایران) افزوده و به مدت ۲۰ دقیقه در 20°C سرد خانه گذاری شد. پس از ۲۰ دقیقه سانتریفوژ $800 \times g$ ، محلول رویی دور ریخته و رسوب در $300 \mu\text{l}$ لایزین بافر $540 \mu\text{l}$ باندینگ بافر (MBST، ایران) مجدد حل شد و به تیوب 5 ml استریل انتقال یافت. مخلوط به خوبی هم زده و به مدت ۱۰ دقیقه در 70°C گرم‌خانه گذاری شد. سپس به مخلوط $410 \mu\text{l}$ اتانول خالص (Merck، آلمان) و $300 \mu\text{l}$ رزین MBST افزوده گردید و به مدت ۱ ساعت در دمای اتاق قرار داده شد. سپس مخلوط ۵ دقیقه $800 \times g$ سانتریفوژ گردید و پس تخلیه محلول رویی، رزین ته نشین شده ۲ بار با بافر شستشو شسته شد. در پایان DNA ژنومی استخراج شده توسط $400 \mu\text{l}$ آب استریل و گرم‌خانه گذاری در 70°C از رزین جداسازی گردید.

استخراج DNA از روغن روش ۳: برای استخراج روغن به این روش 5 ml از هر کدام از نمونه‌ها مورد استفاده قرار گرفت. 5 ml از نمونه روغن با 5 ml PBS (1 g NaCl ، 0.2 g KCl ، $0.4 \text{ g Na}_2\text{HPO}_4$ ، $0.2 \text{ g KH}_2\text{PO}_4$ ، pH ۸٫۰، در ۱۱ آب مقطر، Merck، آلمان) و 1 ml توپین 80 (Merck، آلمان) در تیوب‌های 15 ml مخلوط و در 70°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

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 پروتئین و پلی ساکاریدها می‌باشند که این مواد می‌توانند سبب مهار واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (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 $300 \mu\text{l}$ لایزین بافر در تیوب‌های 1.5 ml کوبیده و مخلوط گردید. $200 \mu\text{l}$ پروتیناز K به نمونه‌ها افزوده و در 56°C به مدت ۲ ساعت گرم‌خانه‌گذاری شد. سپس مخلوط به مدت ۵ دقیقه با $800 \times g$ (اپندرف، ۵۸۱۰ دور، آلمان) سانتریفوژ گردید و مایع رویی به تیوب جدید انتقال داده شد. در مرحله بعد، $540 \mu\text{l}$ باندینگ بافر به مخلوط افزوده و در 70°C گرم‌خانه گذاری شد. مخلوط به مدت ۵ دقیقه با $800 \times g$ سانتریفوژ گردید و مایع رویی به ستون A کیت انتقال داده شد. پس از سانتریفوژ به مدت ۱ دقیقه با $800 \times g$ ، ستون دور انداخته شد. به مخلوط باقی مانده در تیوب $410 \mu\text{l}$ اتانول خالص (Merck، آلمان) افزوده گردید. مخلوط به ستون B منتقل و در ادامه، پس از ۱ دقیقه سانتریفوژ $800 \times g$ ، ستون ۲ بار با بافر شستشو شسته شد. در پایان DNA ژنومی استخراج شده توسط $400 \mu\text{l}$ آب استریل و گرم‌خانه گذاری در 70°C از ستون B جداسازی گردید.

استخراج DNA از روغن روش ۱: برای استخراج DNA از روغن کیت استخراج DNA، MBST (ایران) مورد استفاده قرار گرفت. اساس استخراج DNA در این کیت غشای سیلیکایی است که در ستون‌های این کیت قرار داده شده است. 1 ml از هر کدام از روغن‌ها به تیوب 1.5 ml افزوده و با $300 \mu\text{l}$ لایزین بافر به خوبی مخلوط گشت. مخلوط یک ساعت در 70°C گرم‌خانه گذاری و بعد از یک دقیقه ورتکس، به



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 ۵S 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 اسپکتروفوتومتر نشان داد که میزان DNA در نمونه‌های تکثیر نشده $1/5 \pm 1/4/5 \mu\text{l}/\text{ng}$ 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 مرز عمل می‌کند و در طول موج 260 nm دارای جذب نوری می‌باشد. برای کاهش فاکتور ممانعت کننده DNA پلی مرز روش ۲ به کار برده شد. در این روش ابتدا 5 ml روغن با 5 ml 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 ۵S rRNA باند قابل مشاهده‌ای تشکیل نداد. میزان DNA اندازه گیری شده در نمونه‌های تکثیر نشده $1/8 \pm 5/2 \mu\text{l}/\text{ng}$ 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 ۵S rRNA با موفقیت تکثیر شدند، محصول PCR به دست آمده منتج به تشکیل باند در طول 293 bp (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 118 bp (تصویر ۲) تشکیل داد. نتایج حاصل از خوانش OD_{260} 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

یک دقیقه ورتکس به مدت 20×4000 (اپندرف، 5810 دور، آلمان) سانتریفوژ گردید. پس از سانتریفوژ ۳ فاز ایجاد گشت که لایه رویی آن (فاز روغن) جداسازی و دور ریخته شد. دو لایه باقی مانده (لایه‌های میانی و زیرین) دو بار با 5 ml کلرفرم شسته و به مدت 5×4000 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)، $1/1$ حجم محلول سدیم استات (3 M ، $5/5 = \text{pH}$)، هم حجم محلول ایزو پروپانول (Merck، آلمان) و $60 \mu\text{l}$ رزین (MBST، ایران) افزوده و به مدت 20 دقیقه در 20°C سرد خانه گذاری شد. سپس به مدت 20×4000 سانتریفوژ گردید محلول رویی دور ریخته و رسوب در $30 \mu\text{l}$ لایزبس بافر و $540 \mu\text{l}$ باندینگ بافر (MBST، ایران) مجدد حل شده و به تیوب $1/5 \text{ ml}$ استریل انتقال یافت. مخلوط به خوبی هم زده و به مدت 10 دقیقه در 70°C گرم‌خانه گذاری شد. سپس به مخلوط $410 \mu\text{l}$ اتانول خالص (Merck، آلمان) و $30 \mu\text{l}$ رزین MBST افزوده گردید و به مدت 1 ساعت در دما اتاق قرار داده شد. پس از سانتریفوژ مخلوط 5 دقیقه $8000 \times$ ، محلول رویی تخلیه و رزین ته نشین شده 2 بار با بافر شستشو شسته شدند. در پایان DNA ژنومی استخراج شده توسط $40 \mu\text{l}$ آب استریل و گرم‌خانه گذاری در 70°C از رزین جداسازی گردید.

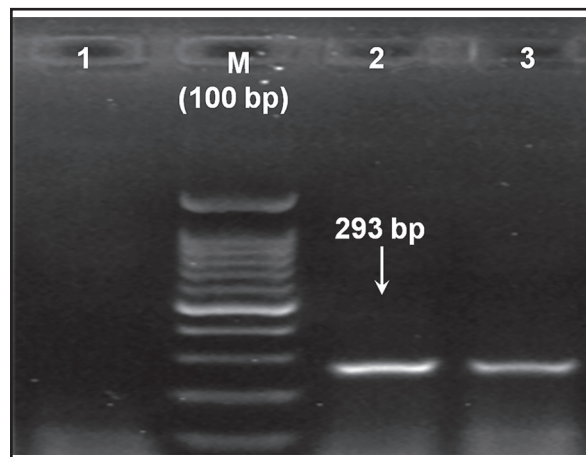
واکنش PCR: برای تکثیر PCR $1/1$ یا $2/5$ از نمونه‌های DNA استخراج شده به کار برده شد. این واکنش در حجم $100 \mu\text{l}$ انجام گرفت که شامل بافر PCR $1 \times$ ، $2/5$ واحد آنزیم Taq پلی مرز (سیناژن، ایران)، $2 \mu\text{l}$ از پرایمرهای sense و antisense (20 Mm ، MWG، آلمان)، $200 \mu\text{M}$ dATP، dGTP، dCTP و dTTP (Fermenta)، $1/5 \text{ mM}$ MgCl_2 بود. اتوماتیک ترموسایکلر (MWG، آلمان) با برنامه $35-38$ سیکل، 45 ثانیه $56-60^\circ\text{C}$ (مرحله ی اتصال)، 45 ثانیه 72°C (مرحله تکثیر)، 45 ثانیه 94°C (مرحله واسرشت) و در پایان 10 دقیقه 72°C (مرحله تکثیر نهایی) به کار برده شد. پرایمرهای مورد استفاده، از توالی ژن ۱۸S rRNA و ۵S rRNA (accession: 6734 number: FJ sense، $5'$ TGGCGAAGGATCATTTGTCG $3'$ و توالی پرایمر antisense $5'$ ATTTTCGCTACGTTCTTCATCGATGC $3'$ بود. علاوه بر این پرایمرهای اختصاصی گیاه سویا متعلق به ژن لکتین (forward primer: $5'$ GCCCATCTGCAAGCCTTTTTGTG $3'$) نیز مورد استفاده قرار گرفت (۱۱). محصول PCR توسط ژل $1/8$ آگارز و بافر TBE ($0.5 \times$) (Tris base 5.4 g ، $2/75 \text{ g}$ اسید بوریک، 2 ml EDTA 0.5 M ، 0.1 M pH در 1 l آب مقطر) آنالیز شد. برای رنگ آمیزی ژل، اتیدیوم برامید و cyber safe (سیناژن، ایران) مورد استفاده قرار گرفت.



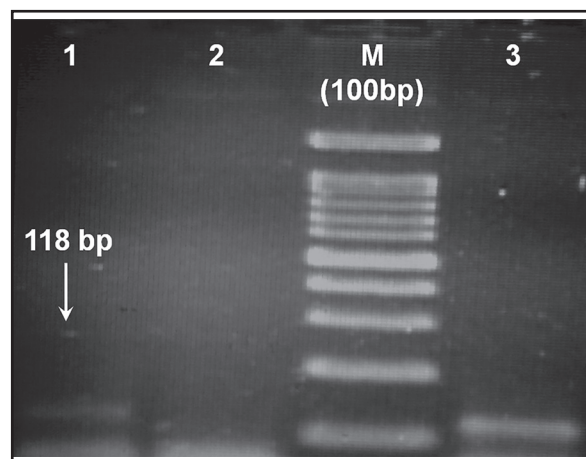
سویا خام با استفاده از روش CTAB به مقدار کافی برای انجام واکنش PCR خالص نبود (۱۱). بیشترین روش توصیه شده توسط محققین، برای استخراج DNA از روغن، روش‌هایی است که برپایه اتصال اختصاصی DNA به غشای سیلیکایی طراحی شده باشد که با نتایج به دست آمده از این مطالعه نیز همخوانی دارد (۶، ۱۱). برتری این روش در مقایسه 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 کار بردن 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 اسپکتروفتومتری، نشان داد که غلظت DNAهای تکثیر نشده $14/5 \pm 1/5$ ng/μl 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 OD₂₆₀ 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 علی‌رغم کاهش OD₂₆₀ 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 از DNA) مورد استفاده قرار گرفت. جالب اینکه، تمامی DNA استخراج شده از نمونه‌های روغن خام و تصفیه شده‌ی سویا با استفاده از روش PCR و پرایمر طراحی شده از ژن ۱۸S rRNA و ۵S 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 نمی‌باشد. نتایج ما همچنین با نتایج Nicolic و همکاران در سال ۲۰۱۴ و Costa و همکاران در سال ۲۰۱۰ مبنی بر اهمیت خلوص DNA استخراج شده از روغن برای تکثیر DNA 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، فازبوگیری (۲۴۰°C)، اسیدی کردن با اسید



تصویر ۱. الکتروفورز ژل آگارز متعلق به محصول PCR حاصل از تکثیر DNA استخراج شده از روغن خام و تصفیه شده سویا با به کار بردن روش ۳ و با استفاده از جفت پرایمر طراحی شده از ژن ۱۸S rRNA و ۵S rRNA (چاهک شماره ۱: کنترل منفی، چاهک شماره ۲: DNA استخراج شده از روغن سویا خام، چاهک شماره ۳: 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 کار بردن روش ۳ و با استفاده از جفت پرایمر اختصاصی مشتق شده از ژن لکتین گیاه سویا (چاهک شماره ۱: DNA استخراج شده از روغن سویا خام، چاهک شماره ۲: کنترل منفی، چاهک شماره ۳: DNA استخراج شده از دانه سویا).

مناسب جهت ردیابی 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 روش مناسب استخراج DNA از روغن انجام گرفته است (۵، ۷، ۱۱، ۱۲). Nicolic و همکاران در سال ۲۰۱۴ گزارش کردند که DNA استخراج شده از روغن



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., Bongiorno, 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

فسفوزیک و خنثی سازی با سود منجر به خرد شدگی DNA می گردد (۴).
 بنابر این برخی از محققین توصیه می کنند که در تکثیر DNA استخراج شده از روغن های گیاهی، از پرایمرهایی که توالی کوچکتر از ۱۵۰bp را تکثیر می نماید، استفاده گردد (۵،۱۱). Costa و همکاران در سال ۲۰۱۰ گزارش کردند DNA استخراج شده از روغن سویا با پرایمر با 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 می کنند در مواد غذایی فرآوری شده ناحیه ای 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 Nikolic و همکاران در سال ۲۰۱۴ Costa و همکاران در سال ۲۰۱۰ مبنی بر تکثیر قطعات کوچکتر مورد تکثیر در DNA در ردیابی غذاهای فرآوری 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 ژن هایی 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 می باشد. همانگونه که نتایج نشان می دهد، 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 تشکر و قدرانی را دارد.

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*}

¹Department of Food Hygiene, Faculty of Veterinary Medicine University of Tehran, Tehran- Iran

²Research Institute Molecular Biological System Transfer, Tehran- Iran

³Department of Microbiology, Faculty of Veterinary Medicine University of Tehran, Tehran- Iran

⁴Department 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

J. Vet. Res. 71, 1, 2016