مقایسه کارایی سه روش استخراج DNA از باله و فلس اردک ماهی (*Esox lucius*)

مقاله‌پژوهشی

مونا تبرک[1]، محمدرضا کلباسی مسجد شاهی[1]*، محمد صادق علوی یگانه[2]

۱. گروه شیلات، دانشکده علوم دریایی، دانشگاه تربیت مدرس

۲. گروه شیلات، زیست شناسی دریا، دانشکده علوم دریایی، دانشگاه تربیت مدرس

چکیده/ استخراج DNA ژنومی با کمیت و کیفیت مطلوب ازنیازهای اساسی ژنتیک مولکولی است. لذا امروزه برای استخراج DNA از روش‌های بافت‌های مختلف موجودات استفاده می‌شود. از منظر حفاظت گونه‌ها، روش های غیر مخرب و غیر کشنده، نمونه برداری در الویت می باشند. این مطالعه با هدف معرفی روش بهینه استخراج DNA از دو بافت باله و فلس اردک ماهی از طریق مقایسه سه روش فنل - کلروفرم، روش نمک فوق اشباع واستات آمونیوم صورت پذیرفت. برای انجام این مقایسه از ۹۰ نمونه باله و فلس اردک ماهی جمع آوری شده از استانهای گیلان و مازندران استفاده شد. پس از تخلیص DNA از دو بافت مذکور پارامتر های کمی و کیفی به ترتیب با استفاده از دستگاه نانودراپ و ژل آگارز ۱٪ و همچنین قابلیت تکثیر DNA توسط نشانگر ریزماهواره و با استفاده از آغازگر ELU۱۹ مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج نشان داد بالاترین کارایی در مواردی که غلظت DNA واجد اهمیت می‌باشد به ترتیب ازروش فنل – کلروفرم و بافت باله حاصل می شود و در مواردی که غلظت اهمیت کمتری دارد روش نمک اشباع و بافت باله یا فلس نتایج بهتری در بر خواهند داشت. همچنین با توجه به نتایج PCR-SSCP اندازه باندهای حاصله ۱۵۰bp بود و کیفیت باند ها در بافت باله با استفاده از روش فنل - کلروفرم و نمک اشباع نسبت به فلس با سه روش به کاربرده دیگر بهتر بود. در مجموع روش نمک اشباع به‌واسطه عدم استفاده از مواد سمی و با توجه به هزینه کمتر در استخراج DNA از اردک ماهی توصیه می گردد.

واژگان کلیدی: : اردک ماهی؛ روش‌های استخراج DNA؛ فنل کلروفرم

مقدمه

استخراج DNA اولین و مهم ترین نیاز در اجرای تحلیل های ژنتیکی، مانند تشخیص جهش و پی بردن به توالی و عملکرد بخش های مختلف ژنوم می باشد (۱). موفقیت های ناشی از استخراج بهینه DNA به خلوص و غلظت بالای DNA استخراج شده وابسته است. از سوی دیگر در سالهای اخیر، ژنتیک مولکولی یک ابزار قدرتمند در برنامه های مختلف اصلاح آبزیان بوده است(۲) . بیشترین مزیت این ابزار حاصل روش های بهینه استخراج DNA با حذف مهارکننده های واکنش زنجیرهای پلیمراز (PCR) است (۲). اصول کلی استخراج DNA شامل چهار مرحله است(۳):

۱-شکستن سلول برای از بین بردن دیواره هسته که با استفاده از شوک اسمزی و شوینده‌های یونی ،مانند تریس ،صورت می گیرد.

۲-هضم پروتئین‌های با استفادها از تیمار آنزیمی (پروتئیناز K) نقش پروتئین زدایی دارد. فعالیت بهینه این آنزیم در دمای ۵۵ تا ۶۵ درجه سانتی گراد است.

* **محمدرضا کلباسی مسجد شاهی، PhD**

استاد ژنتیك و بیوتکنولوژی آبزیان پرورشی دانشگاه تربیت مدرس

پست الکترونیک: kalbassi_m@modares.ac.ir

تاریخ دریافت: ۹۲/۳/۲۷ • تاریخ پذیرش:۹۲/۵/۲۲

Archive of SID

www.SID.ir

۳-رسوب پروتئین ها در DNA حاصل از هضم ناخالصی هایی وجود دارد. جهت رسوب پروتئین ها از فنل و کلروفرم و یا محلول نمک اشباع (۶مولار) و یا سایر مواد مانند استفاده می شود.

۴-رسوب دادن DNA که معمولا با استفاده از اتانول مطلق سرد انجام می شود.

معمولا کیفیت DNA استخراج شده با عدم وجود آلودگی حاصل از وجود RNA، پروتئین، لپید و سایر ساختارهایی که برای آنزیم تک پلیمراز در واکنش زنجیره های پلیمراز (PCR) و آنزیم های برشی محدودیت و ممانعت ایجاد می کنند، سنجیده می شود. امروزه با توجه به بحث های حفاظت محیط زیستی و حفظ گونه های در معرض خطر و بومی کشورمان، بهتر است در مطالعات ژنتیکی برای تخلیص DNA از روش های غیر مخرب و بدون کشتن و آسیب زدن به موجودات استفاده شود. بنابراین، روش های متعددی برای استخراج DNA بدون آسیب زدن به موجودات گزارش شده است که بیشتر بر روی مهرداران خشکی می باشد که از خون آنها استفاده شده است که برای نمونه گیری از خون ماهی مشکلات زیادی وجود دارد از جمله به سایز ماهی و سرعت نمونه گیری بالا و به کارگیری نیروی متخصص بیشتر می توان اشاره کرد.

از روش های بسیار رایج برای استخراج DNA از بافت کبد و بافت عضله ماهی می باشد که کشنده است اما می توان به مطالعاتی که در ضمینه استخراج DNA از بافت عضله و یا خون ماهی اشاره کرد که بدون کشتن موفق به نمونه-گیری شده اند (۴,۵). از روش های غیرکشنده برای نمونه گیری از ماهی می توان به نمونه گیری از فلس و باله ماهیان اشاره کرد (۶,۷). تاکنون مطالعات بسیار زیادی در خصوص استخراج DNA از ماهیان مختلف در کشور انجام شده است اما در رابطه با اردک ماهی در خصوص مطالعات مولکولی و به طبع استخراج DNA از این گونه گزارشی مشاهده نشده است. (۸)

در مطالعات خارج از کشور بر روی این گونه بیشتر از روش Chelex® (۹) و نیز از کیت های مختلف استخراج DNA (Wizard Genomic DNA purification Kit) استفاده می شود (۱۰). بسیاری از روش های که برای استخراج DNA استفاده می شود، زمان بر و یا سمی و هزینه بر می باشند بنابراین هدف از انجام این تحقیق بررسی روش های مختلف استخراج DNA بر روی دو بافت غیر کشنده اردک ماهی و انتخاب بهترین و بی خطر ترین روش برای استخراج DNA از باله و فلس اردک ماهی می باشد.

مواد و روش ها

نمونه ها و استخراج DNA

این مطالعه از نوع توصیفی تحلیلی است و بر روی بیش از ۹۰ نمونه از باله و فلس اردک ماهی انجام شده است. نمونه ها از استان های مازندران (تالاب لپوی زاغمرز، آب بندان ایزدشهر، رودخانه های تجن ساری و دریاچه ولشت) و گیلان (تالاب انزلی و تالاب امیر کلایه) جمع آوری و در الکل ۹۶٪ تا زمان انجام مطالعات درفریزر ۲۰- نگهداری شد.

استخراج DNA با روش فنل کلروفرم

۱۵۰ میلی گرم از بافت باله و یا فلس نگه داری شده در الکل ۹۶٪ را در یک تیوپ ۱/۵ میلی لیتری قطعه قطعه و ۶۰۰ میکرولیتر STE و ۳۰ میکرولیتر SDS ۲٪ و ۱۰ میکرولیتر پروتئیناز k به نمونه اضافه شد و سپس ۱۲ ساعت در دمای ۵۶ درجه در انکوباتور شیکردار نگه داری گردید و بعد از آن با محلول فنل- کلروفرم - ایزوآمیل الکل به نسبت (۲۵-۲۴-۱) شست و شو داده شد. پس از آن به مدت ۱۰ دقیقه با دور ۱۳۰۰۰ rpm سانتریفیوژ گردید و بعد از آن محلول فوقانی برداشت و با کلروفرم شسته شد و پس از آن مجدد به مدت ۱۰ دقیقه با دور ۱۳۰۰۰ rpm سانتریفیوژ شد. بعد از برداشت محلول فوقانی، الکل مطلق سرد و استات سدیم ۰/۱ مولار به آن اضافه شد و کلاف DNA قابل رویت شد و سپس به مدت ۳۰ دقیقه با دور ۱۲۰۰۰ rpm در دمای ۴- سانتریفیوژ صورت پذیرفت و با الکل ۷۰٪ نیز شست و شو و سپس با استفاده از سانتریفیوژ با دور ۸۰۰۰ rpm به مدت ۱۰ دقیقه الکل تخلیه شد و به نمونه DNA خود به میزان ۱۰۰ میکرولیتر آب مقطر تزریقی اضافه گردید (۱۱).

روش نمک اشباع

همانند روش فوق الذکر نمونه ها تا مرحله نگهداری در انکوباتور شیکردار به مدت ۱۲ساعت تیمار شد و در ادامه به آن ۵۰۰ میکرولیتر Nacl، ۵ مولار اضافه گردید و همانند روش فنل -

Archive of SID
www.SID.ir

کلروفرم، افزودن الکل، شست و شو، جمع آوری و نگهداری DNA در آب مقطر تزریقی صورت پذیرفت(۱۲). از این روش استخراج به طور گسترده در تحقیقات و حتی در آزمایشگاه‌های پزشکی نیز استفاده می‌شود (۱۳).

روش آمونیوم استات

این روش نیز جزو روش‌های نمکی برای استخراج DNA دسته‌بندی می‌شود و همانند روش های فوق الذکر نمونه ها تا مرحله نگهداری در انکوباتور شیکردار به مدت ۱۲ ساعت تیمار شد و در ادامه ۶۰۰ میکرولیتر استات آمونیوم ۷/۵مولار به نمونه ها اضافه شد و همانند روش فنل-کلروفرم، افزودن الکل، شست و شو، جمع آوری و نگهداری DNA در آب مقطر تزریقی صورت پذیرفت.

بررسی کمی و کیفی نمونه های DNA

در حال حاضر روش های متعددی برای بررسی کمیت و کیفیت DNA استخراج شده در آزمایشگاه‌های مختلف منطبق بر نیاز و امکانات موجود استفاده می شود. در این پژوهش برای بررسی DNA در مراحل مختلف آزمایش، دستگاه های نانودراپ، الکتروفورز، PCR به کار گرفته شد.

نانودراپ: پس از استخراج DNA از هر دو بافت و از هر سه روش برای بررسی اولیه کمیت، میزان آلودگی آن به RNA و پروتئین از دستگاه نانودراپ مدل استفاده شد. با تزریق ۲ میکرولیتر محلول DNA در صفحه چشمی مخصوص، اسپکتروفتومتری نمونه با اشعه UV انجام شد که دستگاه میزان جذب نور را در فاصله ۲۲۰ تا ۳۵۰ نانومتر برای DNA به صورت نمودار و نسبت جذب نور در طول موج ۲۶۰ به ۲۸۰ و ۲۳۰ (نشان دهنده میزان خلوص و آلودگی DNA) و در نهایت غلظت DNA را به ng/µl گزارش کرد.

برای بررسی کیفیت نمونه های DNA از طریق کنترل میزان شکسته شدن DNA و آلودگی به RNA، مقدار ۳ میکرولیتر نمونه DNA رقیق شده با آب مقطر تزریقی با ۳ میکرولیتر بافر رنگی و سنگین کننده مخلوط کرده و در چاهک هایی با عرض ۵ میلی متر در ژل آگارز ۱٪ تزریق گردید. الکتروفورز به مدت یک ساعت با ولتاژ ۷۰ انجام شد. در موقع تهیه ژل مقدار ۴۵ میکرولیتر اتیدیم بروماید در ۳۰۰ سی سی ژل اضافه گردید، بنابراین بلافاصله پس از اتمام الکتروفورز کیفیت ژل از طریق عکسبرداری توسط ژل داکیومنتیشن (IN GENIUS) مورد ارزیابی قرار گرفت.

جهت تعیین قابلیت تکثیر DNA استخراج شده و عدم حضور ممانعت کننده، از آغازگر مربوط به نشانگر ریزماهواره ELU19 که از جمله آغازگرهای اختصاصی برای با توالی زیر برای PCR استفاده شد (۱۴).

F: CATCATGAACATTCAGACGC

R: GAGATGCTAATTCATCCACTG

محلول واکنش PCR شامل غلظت master mix red x۱، ۰/۱ میکرو مولار آغازگر، ۱میکرو مولارDNA استخراج شده بود که با افزودن ۹ میکرولیتر آب مقطر تزریقی حجم نمونه به ۲۵ میکرولیتر رسانیده شد. برنامه PCR مورد استفاده جهت تکثیر DNA با نشانگر میکروستلایت در جدول شماره یک خلاصه گردیده است محصولات PCR با استفاده از ژل آگارز ۲٪ و رنگ آمیزی اتیدیوم بروماید مورد ارزیابی قرار گرفت. مقایسه میانگین نتایج حاصل از کمیت و کیفیت DNA استخراج شده از طریق آنالیز واریانس مورد ارزیابی قرار گرفت. خصوصیات نمونه ها و درجه خلوص نمونه های DNA در جدول شماره ۲ آمده است. در شکل شماره یک نمونه های استخراج شده DNA بر روی ژل آگارز ۱٪ مشاهده می شود و نیز نمونه های حاصل از PCR را بر روی ژل آگارز ۲٪ در تصویر شماره ۲ مشاهده می گردد. و نیز تحقیقات گذشته (۱۵,۱۶) روشهای مختلف نگهداری بافت و استخراج DNA از سایر ماهیان رامورد بررسی قرار داده اند به نتایج مشابه دست یافته اند.

نتایج

با توجه به نتایج حاصل از این تحقیق و نیز مطالعات انجام شده در سایر تحقیقات روش فنل کلروفرم و بافت باله نسبت به سایر روش ها و فلس ماهی کمیت و کیفیت DNA بهتری را حاصل می کند نتایج حاصل از آنالیز واریانس نشان داد که بین روش های استخراجی DNA تفاوت آماری معنی داری در غلظت و خلوص وجود نداشت (P ،0/05). از نظر مدیریت محیط زیست دفع و بازیافت مواد سمی و خطرناکی که در این روش به کار رده می‌شود، کاربرد آن بی خطر نیست اما روش نمک اشباع از نظر کمیت و کیفیت متوسط است و از

Archive of SID

www.SID.ir

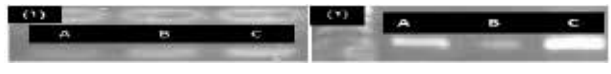
لحاظ مواد به کار رفته در این روش امنیت بالای دارد و نیز از نظر هزینه و زمان انجام مراحل استخراج نیز بهینه تر از روش فنل کلروفرم می باشد. به طور کلی روش نمک اشباع روشی ایمن، ارزان، ساده و سریع می باشد و DNA استخراج شده کیفیت مطلوبی دارد و در نتیجه در تجزیه و تحلیل ژنوتیپی، در آزمایشگاه های که محدودیت منابع مالی و زمانی دارند، روش مناسبی به نظر میرسد. اگر چه روش-های ذکر شده در این تحقیق نتایج خوبی را نشان می دهند اما در تمامی موارد صدق نمی کند و تغییر بعضی از محلولها، PH و زمان سانتریفوژ لازم می باشد. زمان نگهداری نمونه، فیکساتیو مورد استفاده، گونه ماهی، نوع بافت عوامل بسیار موثر در انتخاب روش استخراج تاثیر گذار می باشند.

جدول شماره۱: برنامه PCR مورد استفاده جهت تکثیر DNA با نشانگر میکروستلایت (تعداد چرخه PCR ۳۰ مرتبه است).

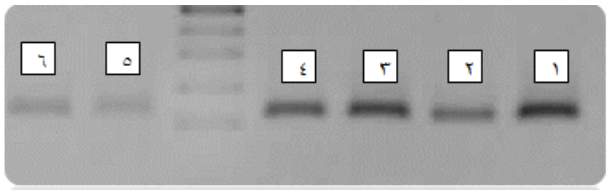
مدت زمان	دما(درجه سانتی گراد)	مرحله
۳ دقیقه	۹۴	مرحله آغازی
۳۰ ثانیه	۹۴	واسرشته سازی
۴۰ثانیه	۶۰	اتصال آغازگر
۳۰ ثانیه	۷۲	توسعه تکثیر
۲۰دقیقه	۷۲	مرحله نهایی

جدول :۲ میانگین خلوص و کمیت DNA استخراج شده با روش های مختلف

روش‌های استخراج DNA مورد مطالعه	تعداد	باله		فلس	
		DNA (ng/µl)	DNA(OD)	DNA (ng/µl)	DNA (OD)
فنل – کلروفرم	۳۰	120±30	1/850±0/05	62±20	1/79±0/073
نمک فوق اشباع	۳۰	40± 93	1/85±0.08	58±20	1/81±0/05
استات آمونیوم	۳۰	15 ± 70	1/75±0/086	40±25	1/65±0/08



شکل شماره ۱: تصویر شماره ۱ مربوط به استخراج DNA از فلس اردک ماهی می¬باشد A۱ روش استات آمونیوم و B۱ روش نمک اشباع و C۱ روش فنل کلروفرم است. تصویر شماره ۲ مربوط به DNA استخراج شده از بافت باله می باشد A۲ روش نمک اشباع B۲ روش استات آمونیوم C۲ روش فنل کلروفرم است.



شکل شماره ۲: الکتروفورز محصول PCR بر روی ژل آگارز ۲٪، باند شماره یک حاصل از روش نمک اشباع از باله اردک ماهی، باند شماره دو از فلس ماهی است. باند شماره ۳ و ٤ حاصل روش فنل-کلروفرم به ترتیب از باله و موکوس می باشد. باند شماره ٥ و ٦ حاصل از روش استات آمونیوم به ترتیب از فلس و باله می باشد.

بحث

مطالعات ژنتیک جمعیت به طور چشم گیری به صورت پذیرفتن، واکنش زنجیره ای پلی مراز (PCR) وابسته است و ماده اولیه برای انجام این نوع از مطالعات، DNA استخراج شده با کیفیت مطلوب می باشد. از آنجا که برای انجام واکنش زنجیره پلی مراز به میزان اندکی DNA با کیفیت بالا مورد نیاز می باشد(۱) لذا مقادیر حاصل از روش های مختلف استخراج در این مطالعه مطلوب می باشند.

لذا مقدار DNA استخراج شده با سه روش مذکور برای صد ها مورد PCR جهت تحلیل ژنوتیپی (مانند تجزیه و تحلیل میکروستلایت ویا غیره) کافی است. الکتروفورز با ژل آگارز معیار مهمی برای محاسبه غلظت DNA و عدم شکستگی آن و نیز کنترل آلودگی های ناشی از وجود چربی ، پروتئین ها و غلظت های بالای کلسیم که مهار کننده های بالقوه PCR هستند می باشد(۱۶). همان طور که در شکل شماره یک دیده می شود فقدان شکستگی و اسمیرشدگی در نمونه های استخراج شده مشخص است. میزان خلوص DNA یک عامل بسیار مهم در کارهای آزمایشگاه ژنتیک مولکولی است. با توجه به میانگین طول موج های جذبی به دست آمده از نانودراپ میزان خلوص DNA حاصله از این روش ها رضایت بخش است. اگر نسبت مقدار جذب محلول DNA در طول موج ۲۶۰نانومتر به مقدار جذب در طول موج ۲۸۰ نانو متر در محدوده ۱,۸-۲ باشد، نشان دهنده این است که جذب عمدتا به علت اسید نوکلئیک است و کیفیت و خلوص DNA مطلوب است. اعداد کمتر از ۱,۸ آلودگی پروتئین یا فنلی را نشان می دهد و اعداد بالاتر از۲ نشان دهنده آلودگی RNA هستند (۱۸و۱۷). دادهای حاصل از نانودراپ نشان می دهد که سه روش استخراج به کاربرده شده کارایی مطلوبی از لحاظ کیفیت DNA استخراج شده را فراهم می کنند. از نظر غلظت DNA حاصل شده از روش فنل

Archive of SID

www.SID.ir

- کلروفرم برای صدها واکنش PCR برای مطالعات ژنتیکی با استفاده از نشانگر میکروستلات کفایت می کند.، با توجه به نوع مطالعه میتوان از روش‌های مختلفی برای استخراج DNA استفاده کرد در این پژوهش غلظت متوسط DNA برای انجام PCR برای مطالعه با روش ریزماهواره نیاز می‌باشد که با روش نمک اشباع نیز نتیجه مطلوب حاصل می‌شود و نیز استفاده از این روش از لحاظ صرفه جویی در هزینه‌ها و نیز امنیت بیشتر محیط زیستی توصیه می‌شود.

منابع/ References

1. Nasiri H, Forouzandeh M, Rasaee M.J, Rahbarizadeh F. Modified Salting-Out Method: High-Yield, High-Quality Genomic DNA Extraction from Whole Blood Using Laundry Detergent. J of Clin Lab Anal 2005; 19: 229–232.
2. D ´ Angelo F, Santillo A, Sevi A, Albenzio M. Technical note: A simple salting-out method for extraction from milk somatic cells: Investigation into the goat CS1S1 gene. J Dairy Sci 2007; 90:3550-3552.
3. 3- Poljak M, Barlic J, Seme K, Avsic-Zupanc T, Zore A. Isolation of DNA from archival Papanicolaou stained cytological smears using a simple salting-out procedure. J Clin Pathol: Mol Pathol 1995; 48: 55-56.
4. Hilsdorf A, Caneppele D, Krieger J. Muscle biopsy technique for electrophoresis analysis of fish from the genus Brycon. Genet. Mol. Biol 1999; 22: 547– 550.
5. Cummings A, Thorgaard G. Extraction of DNA from fish blood and sperm. Biotechniques 1994; 17:426 -428.
6. Yue GH, Orban L. Rapid isolation of DNA from fresh and preserved fish scales for polymerase chain reaction. Mar Biotechnol 2001; 3:199–204.
7. Yang L, Yang ST, Wei XH, Gui JF. Genetic diversity among different clones of the gynogenetic silver crucian carp, Carassius auratus gibelio, revealed by transferrin and isozyme markers. Biochem Genet 2001; 39:213–225
8. Estoup A, Rousset F, Michalakis, Y, Cornuet, J, Adrimanga M, Guyomard R. Comparative analysis of microsatellite and allozyme markers: a case study investigating microgeographic differentiation in brown trout (Salmo trutta). Mol. Ecol 1998; 7: 339–353.
9. Lucentini L, Caporali S, Palomba A, Lancioni H, Panara F. A comparison of conservative DNA extraction methods from fins and scales of freshwater fish: a useful tool for conservation genetics. Conser. Genet 2006; 592-613.
10. Sambrook J, Fritsch F, Mantiatis T. Molecular cloning Laboratory manual, 1989,Vol 3 , Cold spring harbor, New York
11. Paabo S, poinar H, scrrc D,et al. Genetic analyses from ancient DNA, Annu Rev Genet 2004; 38:645-679.
12. Miller L, Kapuscinski A. Microsatellite DNA markers reveal new levels of genetic variation in northern pike. Trans. Am. Fish. Soc 1996; 125:971–977.
13. Kury F D, Schneeberger C, Sliutz G,et al. Determination of HER- 2/neu amplification and expression in tumor tissue and cultured cells using a simple, phenol-free method for nucleic acid isolation. Oncogene 1990; 5:1403–1408.
14. Lucentini L, Palomba A, Lancioni H, Natali M., Panara F. A nondestructive, rapid, reliable and inexpensive method to sample, store and extract high-quality DNA from fish body mucus and buccal cells. Mol. Ecol 2006; 6:257–260.
15. Rousseau F, Réhel R, Rouillard P, DeGranpré P, Khandjian E. High throughput and economical mutation detection and RFLP analysis using a minimethod for DNA preparation from whole blood and acrylamide gel electrophoresis. Hum Mutat 1994; 4:51–54.
16. Glasel J. Validity of nucleic acid purities monitored by 260nm /280nm absorbance ratio.Biotech 1995, 18: 62-63.
17. Eeles R, Stamps C. Polymerase Chain Reaction (PCR). The Technique and its Applications1994; R.G. Landes Company, USA.
18. Pourkazemi M. Molecular and biochemical genetic analysis of sturgeon Stocks from Caspian Sea . Ph.D thesis, school of Biology, university of Wales, Swansea 1996; 260-270.

Archive of SID

www.SID.ir

ABSTRACT

Efficiency Comparison of Three Different DNA Extraction Methods from the Fin and Scale Samples of the Pike (*Esox lucius*)

Mona Tabarrok, Mohammad Reza Kalbassi*, Mohammad Sadegh Alavi Yeganeh

Genomic DNA extraction with high quantity and quality is one of the basic necessities of molecular genetic studies. Therefore, nowadays, various methods for extracting DNA from different organisms and tissues are used. Non destructive and non-lethal sampling methods are preferred for conservation reasons. This study introduces an optimal method for extracting DNA from two non-lethal sample tissues of the pike through comparing three methods of phenol - chloroform, saturated NaCl, and ammonium acetate. Ninety samples of the pike fins and scales were collected from Gilan and Mazandaran. Nanodrop and electrophoresis on 1 % agarose gel were used for evaluating the quality and quantity of extracted DNA samples. Also amplification ability of the DNA was assessed with microsatellite markers using the ELU19 primer. Based on the results, the best efficiency, if the DNA concentration was important, was achieved by the phenol - chloroform method and the fin tissue. The saturated salt method from the fin or scale tissues showed higher efficiency if the DNA concentration was less important. According to the results of PCR-SSCP, amplified bands were 150bp. DNA samples of the fin tissue using phenol – chloroform and saturated salt methods showed sharper bands in comparison with the scale tissues in all three methods. So, the saturated salt method seems to be a suitable method for DNA extraction from pike tissues because it uses less toxic materials and is inexpensive.

Key words: *Esox lucius*; DNA Extraction Method; Phenol-chloroform.

* **mohammad reza kalbassi, PhD**
professor, Department of Fisheries, College of Natural Resources and Marine Sciences, Tarbiat Modares University
Email: kalbassi_m@modares.ac.ir
Submission Date:17. Jun. 2013 • Acceptance Date: 13. Aug. 2013

Archive of SID

www.SID.ir