فصلنامه علمی – پژوهشی گیاه و زیست بوم
سال ۸، شماره ۳۱، تابستان ۱۳۹۱

معرفی روش سریع و ساده‌ی استخراج دی ان ای در گل گاو زبان ایرانی (*Echium amoenum* Fisch&Mey.)

نورالدین حسین پورآزاد[۱]، قربانعلی نعمت زاده[۲]*

چکیده

در کل برای تهیه‌ی بافر استخراج دی ان ای از مواد مختلفی استفاده می‌گردد. برخی از این مواد حساس به دما بوده و برخی نیز همانند فنول-کلرفرم از نظر سلامتی برای انسان خطرناک می‌باشند. علاوه بر این نیازمند استفاده از نیتروژن مایع و آنزیم آر ان آز (RNase) هستند. با استفاده از بافر STE، بسیاری از مواد یاد شده حذف می‌گردد. همچنین در روش‌های قبلی به دلیل نیاز داشتن به موادی همچون BSA که علاوه بر داشتن هزینه‌ی بالا و حساسیت به ازدیاد دما درحین عمل استخراج، نیازمند استفاده از دستگاه سانتریفیوژ با قابلیت سیستم خنک‌کننده را امری اجتناب‌ناپذیر می‌نماید که بسیاری از آزمایشگاه‌ها فاقد این امکانات هستند، از سوی دیگر روش‌های معمول نیازمند بکارگیری محلول‌ها در حجم بالا می‌باشند که روی هم رفته هزینه استخراج دی ان ای را افزایش می‌دهند به همین دلیل استفاده از روش‌های معمول برای استخراج DNA در گل گاو زبان ایرانی مقرون به صرفه نبود. در روش بهینه شده و پیشنهادی، طی آزمایشات مختلف از PVP به جای BSA استفاده گردید این ماده ضمن داشتن مقاومت بالا در برابر افزایش دما، باعث حذف متابولیت‌های ثانویه بخصوص پلی‌فنل‌ها از محتویات سلولی بافت گیاهان می‌گردد با بکارگیری این ماده زمان شستشوی عصاره‌ی سلولی با محلول ترکیبی کلروفرم- ایزوآمیل الکل به یک مرحله کاهش می‌یابد. مجموعه‌ی عوامل فوق باعث می‌شوند که این روش نسبت به روش‌های معمول استخراج DNA در مدت زمان کم‌تری قابل انجام باشد. همچنین با کاهش مواد مصرفی به میزان یک چهارم نسبت به روش‌های قبلی، روش STE به عنوان یک روش ساده، سریع و ارزان برای استخراج DNA ژنومی در گل گاو زبان ایرانی بهینه گردید که می‌توان این روش را در طیف وسیعی از گیاهان دارویی نیز بکار گرفت.

واژه‌های کلیدی: گل گاو زبان ایرانی، بافر STE، PVP ، BSA، استخراج DNA

۱- پژوهشکده ژنتیک و زیست فناوری کشاورزی طبرستان، گروه اصلاح نباتات، ساری، ایران
۲- پژوهشکده ژنتیک و زیست فناوری کشاورزی طبرستان، ساری، ایران
* مکاتبه‌کننده: (gmplant21@gmail.com)

تاریخ دریافت: بهار ۱۳۹۰ تاریخ پذیرش: بهار ۱۳۹۰

Archive of SID
www.SID.ir

مقدمه

روش‌های مختلفی برای استخراج DNA ژنومی در گونه‌های مختلف گیاهان پیشنهاد گردیده، برای مثال از روش Murry & Thompson (1980) برای استخراج DNA از گیاهانی نظیر برنج، گندم، توتون، سیب زمینی و گل رز و جهت استخراج DNA ازگیاهان زینتی و درختان میوه از روش Doyle & Doyle (1990) استفاده شده است. همچنین از روش Lodi *et al* (1994) برای استخراج DNA از مو، سیب، گل میمون استفاده شـده است.Casaikl *et al* (1998) روش استخراج دلاپورتا و همکاران وی را به عنوان روشی موثر برای استخراج DNA از نمونه‌های برگی ذرت، برنج و برخی از گل‌های زینتی معرفی کردند. به دلیل شرایط خاص، بافت‌های گیاهان دارویی که دارای سطوح مختلفی از متابولیت‌های ثانویه بخصوص پلی‌فنول‌ها می‌باشند، استخراج DNA ژنومی آن‌ها با کیفیت و کمیت مناسب جهت واکنش‌های زنجیره‌ای پلیمراز، با مشکلات عمده‌ای مواجه می‌باشند چه بسا بسیاری از دانشجویان و محققان به ناچار باید زمان زیادی صرف بهینه سازی روش استخراج دی ان ای بنمایند (Shrma *et al*., 2002). هر چند روش‌های متعددی جهت استخراج دی ان ای ژنومی از بافت‌های گیاهان مختلف دارویی صورت گرفته است اما تا به حال هیچ گزارشی مبنی بر بهینه سازی روش استخراج دی ان ای ژنومی از گیاه دارویی گل گاو زبان ایرانی گزارشی نگردیده است (حسین پورآزاد و همکاران، ۱۳۹۰). دسترسی به DNA ژنومی با کیفیت مناسب جهت انجام کارهای مرتبط با مهندسی ژنتیک از جمله نیازهای ضروری یک محقق می‌باشد جهت رسیدن به این اهداف پارامترهای زیادی از جمله مواد شیمیایی مورد استفاده، مدت زمان استخراج و همچنین هزینه‌ی انجام کار بسیار مهم هستند. با توجه به اهمیت بسیار ارزشمند گل گاو زبان ایرانی، استخراج DNA مطلوب از این گیاه به منظور بررسی تنوع ژنتیکی و مطالعات بیولوژی مولکولی امری ضروری می‌باشد. هدف از این تحقیق مقایسه‌ی تطبیقی روش‌های دلاپورتا و همکاران، CTAB و STE بهینه شده با یکدیگر و انتخاب بهترین گزینه برای استخراج دی ان ای ژنومی با کیفیت و کمیت مطلوب در گیاه گل گاو زبان ایرانی می‌باشد.

مواد و روش‌ها

الف- مواد گیاهی مورد نیاز

بافت برگی تازه و جوان تحت دمای ۴ درجه سانتی‌گراد به آزمایشگاه انتقال یافتند. آنگاه جهت پاک‌سازی مواد گیاهی از آلودگی‌های خارجی مواد گیاهی با آب مقطر شستشو گردیدند، تا تبخیر شدن آب از سطح برگ‌ها (در دمای اتاق) به حال خود رها گردیده و سپس برای استخراج دی ان ای مورد استفاده قرار گرفتند (حسین پورآزاد و همکاران، ۱۳۸۸).

ب- مواد شیمیایی و معرف‌های مورد نیاز

مراجعه به جدول (۱).

Archive of SID

www.SID.ir

جدول ۱- مواد مورد نیاز جهت استخراج دی ان ای ژنومی با استفاده از روش STE*[1] بهینه شده

ردیف	غلظت مورد استفاده	علایم اختصاری
۱	20Mm,PH8	$EDTA\text{-}Na_2$
۲	4M	Sucrose
۳	mM,PH۲ ۸	Tris-HCL
۴	٪۲۰	SDS
۵	8M	LICL
۶	%1/5	PVP[2]
۷	%0/2	B-mercaptoethanol
۸	24:01	Chloroform-isoamyl alcohol
۹	70%	ethanol
۱۰	به مقدار لازم	Isopropanol

* بافر STE شامل {(Sucrose (۴ M، (Tris-HCL (۲ mM, PH ۸ ،(EDTA 20Mm, PH8)} بوده که پس از آماده‌سازی بایستی اتوکلاو گردد.

ج- دستورالعمل استخراج DNA

۱- ۵۰۰ میلی‌گرم (۵.گرم) بافت برگی را به قطعات کوچکی تبدیل کرده و در داخل هاون چینی قرار گیرد.

۲- ۵ میلی‌لیتر بافر STE به هاون اضافه نموده بلافاصله ۳۰۰ میکرولیتر (۲۰٪) SDS به آن اضافه گردد.

۳- محتویات هاون با کوبش، به خوبی هموژنیزه می‌گردد (زمان هموژنیزه‌سازی بسیار مهم است).

۴- انتقال ۵۰۰ میکرولیتر از محتویات هموژنیزه شده به تیوب‌های ۱/۵ میلی‌لیتری.

۵- اضافه نمودن ۲۰۰ میکرولیتر کلرید لیتیم و ۰/۲ درصد بتا مرکاپتواتانل به هریک از تیوب‌ها، (استفاده از کلرید لیتیم بیش از مقدار توصیه شده باعث عدم تکثیر DNA در فرآیند PCR می‌گردد).

۶- اضافه نمودن (۱/۵٪) PVP به هر یک از تیوب‌ها (بدین صورت که قبل از گذاشتن تیوب‌ها در حمام آب گرم به هر یک از تیوب‌ها (به صورت پودر) اضافه گردد و به آرامی با محتویات تیوب مخلوط گردد).

توجه: در صورتیکه مواد گیاهی دارای میزان بالایی از مواد پلی‌فنولی باشد می‌توان از مقدار PVP بیش‌تری استفاده کرد (با رعایت تناسب در استفاده از سایر مواد).

۷- قرار دادن تیوب‌ها در حمام آب گرم (۶۰ درجه) به مدت ۴۵ دقیقه (هرچند دقیقه جهت یکنواختی در گرم شدن و مخلوط نمودن محتویات، تیوب‌ها به آرامی سر و ته می‌گردند).

۸- خارج نمودن تیوب‌ها از حمام آب گرم و قراردادن آن‌ها به مدت ۱۰ دقیقه در دمای آزمایشگاه.

1. Sucrose – Tris - EDTA
2. پلی وینیل پیرولیدین

Archive of SID
www.SID.ir

۹- اضافه نمودن کلروفرم- ایزوآمیل الکل به مقدار هم حجم محتویات به تیوب.

۱۰- سانتریفیوژ نمودن نمونه‌ها در ۱۳۴۰۰ rpm در دمای آزمایشگاه به مدت ۱۵ دقیقه.

۱۱- برداشت فاز رویی و انتقال به تیوب‌های جدید.

۱۲- در صورت عدم شفافیت محلول، با اضافه نمودن هم حجم آن کلروفرم- ایزوآمیل الکل و دوباره سانتریفیوژ نمودن نمونه‌ها در ۱۳۴۰۰ rpm به مدت ۱۰ دقیقه.

۱۳- برداشت فاز رویی و اضافه نمودن دو سوم حجم محلول ایزوپروپانل ۲۰- درجه سانتی‌گراد به هر یک از تیوب‌ها.

نکته: پس از اجرای مرحله سیزدهم کلاف‌های DNA به خوبی در وسط محلول قابل مشاهده خواهند بود سپس می‌توان به دو روش ذیل استخراج دی ان ای را ادامه داد.

ج – الف (روش اول):

۱-۱-۱۴: برداشت کلاف DNA با استفاده از پیپت پاستور و یا هر وسیله‌ی شیشه‌ای با قدرت کاپیلاریته بالا. (وسایل شیشه‌ای دارای بار مثبت بوده و DNA که دارای بار منفی است به راحتی به آن چسبیده و از سایر محتویات جدا می‌گردد).

۲-۱-۱۴: شستشوی DNA با استفاده از الکل ۷۰ درصد (احتیاط گردد تا کلاف DNA همراه اتانول از نوک پیپت حذف نگردد).

۳-۱-۱۴: پیپت‌ها به صورت عمودی قرار گرفته تا DNAبه‌طور کامل خشک گردد (بوی الکل ندهند).

۴-۱-۱۴: DNA بدست آمده را در ۱۰۰ میکرولیتر بافر *TE حل نمایید (پیش گرم نمودن TEدر انحلال DNA موثر است)،

توجه: (گاهی EDTA مورد استفاده در بافر TE به عنوان عامل بازدارنده در واکنش‌های آنزیمی بوده بدین جهت می‌توان بجای TE از آب آمپول تزریقی استفاده نمود) و

۵-۱-۱۴: نگهداری DNA در دمای ۴ درجه‌ی سانتی‌گراد تا زمان استفاده.

ج – ب (روش دوم):

۱-۲-۱۴: سانتریفیوژ نمونه‌ها در ۵۰۰۰ rpm به مدت ۱۰ دقیقه.

۲-۲-۱۴: خالی نمودن مایعات داخل تیوب‌ها (احتیاط، توده‌DNA از دست نرود).

۳-۲-۱۴: اضافه نمودن ۱۰۰ میکرولیتر الکل ۷۰٪ به هر یک از تیوب‌ها و سانتریفیوژ مجدد آن با rpm ۲۴۰۰ به مدت ۹۰ ثانیه.

۴-۲-۱۴: تکرار مرحله قبلی (۳-۲-۱۴).

۵-۲-۱۴: خشک نمودن DNA در دمای آزمایشگاه تا زمانی که بوی الکل ندهند.

۶-۲-۱۴: تکرار مرحله (۴-۱-۱۴) و

۷-۲-۱۴: تکرار مرحله (۵-۱-۱۴).

* بافر TE اتوکلاو شده با PH8 شامل (Tris ۱۰ میلی مولار + EDTA یک میلی مولار) می‌باشد.

د- تعیین کیفیت و کمیت DNA

پس از استخراج دی ان ای ژنومی با روش‌های مورد مقایسه، دی ان ای‌های بدست آمده در ۱۰۰ میکرولیتر آب مقطر دو بار تقطیر یافته حل گردیده و به مدت ۲۴ ساعت در دمای آزمایشگاه قرار گرفتند.

کیفیت و کمیت دی ان ای ژنومی استخراج شده، با استفاده از دو روش اسپکتروفتومتری و الکتروفورز روی ژل آگارز ۰/۸ درصد مورد بررسی قرار گرفت. البته برخی از نمونه‌ها که در مراحل اجرای PCR تکثیر خوبی نشان نمی‌دادند جهت اطمینان کامل از

Archive of SID
www.SID.ir

کیفیت مطلوب دی ان ای مورد استفاده، دی ان ای الگو با آنزیم برشی EcoR1 مورد هضم قرارمی‌گرفت (شکل ۳). برای کیفیت‌سنجی به روش اسپکتروفتومتری نمونه‌های دی ان ای پس از رقیق شدن در طول موج ۲۶۰ نانومتر (طول موج جذب اسیدهای نوکلئیک) اندازه‌گیری شده و با فرمول زیر:

ضریب رقت (۵۰) × عکس رقت × مقدار جذب در ۲۶۰نانومتر = غلظت

غلظت آن‌ها تعیین گردید. از آنجایی‌که هر واحد جذب در طول موج۲۶۰ نانومتر معادل ۵۰ میکروگرم در میکرولیتر دی ان ای دو رشته‌ای است اگر نسبت مقدار جذب محلول دی ان ای در طول موج ۲۶۰ نانومتر به مقدار جذب در طول موج۲۸۰ نانومتر در محدوده‌ی ۱/۹-۱/۷ باشد نشان‌دهنده‌ی این است که جذب به‌طور عمده توسط اسیدهای نوکلئیک صورت گرفته و کیفیت دی ان ای بدست آمده مطلوب بوده و از خلوص لازم برخوردار است (Monika *et al.*, 2006). همچنین با استفاده از الکتروفورز DNA روی ژل آگارز ۰/۸٪ دوباره کیفیت باند هر نمونه مشخص شد بدین ترتیب که برای هر نمونه ۴ میکرولیتر DNA استخراج شده با ۲ میکرولیتر بافر بارگذاری مخلوط گردیده و در چاهک‌های ژل آگارز ۰/۸٪در شرایط بافری TBE تخلیه گردید. ژل آگارز به مدت یک ساعت با ولتاژ ثابت ۸۵ الکتروفورز گردید. پس از رنگ‌آمیزی با اتیدیوم بروماید، DNA در زیر نور (UV) در دستگاه Geldoc شرکت UVP آمریکا، مشاهده و عکس-برداری شد. پس از تفسیر ژل، نمونه‌های مناسب از نظر کیفی و کمی جهت انجام PCR بعنوان دی ان ای الگو انتخاب گردیدند.

نتایج

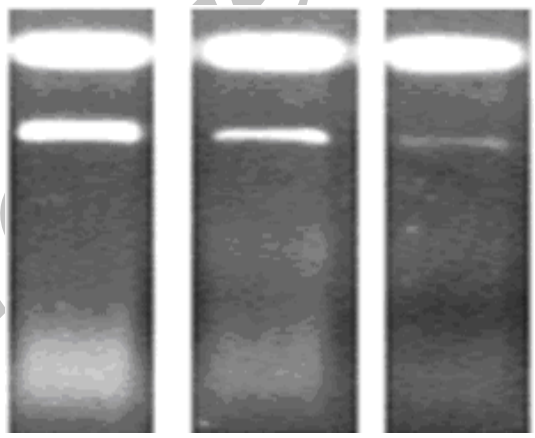
نتایج حاصل از اسپکتروفتومتری برای هر دو مورد از نمونه‌های برگی (جوان و بالغ) نشان از مقدار کم دی ان ای استخراجی از برگ‌های بالغ در هر سه روش مورد مقایسه بود (جدول ۲). نتایج بدست آمده نشان می‌دهند که سن فیزیولوژیکی مواد گیاهی و روش‌های استخراج دی ان ای، در کیفیت و کمیت دی ان ای تاثیرگذار هستند. در عین حال نتایج بدست آمده حاکی از آن هستند که استخراج دی ان ای ژنومی با روش STE بهینه شده برای برگ‌های جوان و بالغ از کمیت و کیفیت بهتری نسبت به سایر روش‌ها برخوردار می‌باشد. در مقدار ۰/۵ گرم ماده‌ی برگی بیش‌ترین مقدار دی ان ای به میزان تقریبی ۹۱۰ - ۷۸۰ نانوگرم در میکرولیتر (۱۶۹ گرم/میکروگرم) برای برگ‌های جوان و مقدار ۴۳۰ - ۳۰۰ نانوگرم (۷۳گرم/ میکروگرم) برای برگ‌های بالغ از روش STE بهینه شده بدست آمدند. در حالی‌که کم‌ترین آن مربوط به روش دلاپورتا بود. در روش CTAB با مقدار مساوی از بافت برگی، بیش‌ترین مقدار دی ان ای ژنومی بدست آمده از بافت برگی جوان با میانگین تقریبی ۳۰۰ نانوگرم و برای نمونه‌های برگی بالغ در مقدار ۲۰۰نانوگرم در هر میکرولیتر حاصل گردید. در بکارگیری روش دلاپورتا و همکاران کم‌ترین مقدار دی ان ای ژنومی (۱۵۰ نانوگرم برای بافت‌های برگی جوان و۵۰ نانوگرم در میکرولیتر برای بافت‌های بالغ برگی) نسبت به دیگر روش‌های مورد مطالعه حاصل شد (جدول ۲). نتایج حاصل از کمیت‌سنجی با اسپکتروفتومتری نشان از غالبیت نسبی روش STE بهینه شده در دستیابی به دی ان ای ژنومی با مقدار حداکثر بود که آزمون کمیت سنجی با ژل آگارز ۰/۸٪ نیز تاییدکننده‌ی این موارد می‌باشد (شکل ۱ و ۲). در بررسی کیفیت‌سنجی با اطلاعات

Archive of SID

www.SID.ir

بدست آمده از اسپکتروفتومتری میانگین جذب نوری در طول موج ۲۶۰ تا ۲۸۰ نانومتر نتایج حاکی از آن بودند که روش دلاپورتا و همکاران با محدوده‌ی جذبی ۱/۳ – ۰/۸۶ روش مناسبی برای استخراج دی ان ای ژنومی از گیاه مورد مطلعه نمی‌باشد که این موضوع در الکتروفورز نیز تایید گردید (شکل ۱ و ۲). نتایج مربوط به آزمایشات هضم آنزیمی با استفاده از آنزیم EcoR1 نشان داد که در روش STE بهینه شده DNA به طور مناسب برش‌خورده و DNA استخراجی با روش CTAB و دلاپورتا به ترتیب دارای رتبه‌های بعدی می‌باشند. برش آنزیمی مطلوب بیانگر خلوص بالاتر و کیفیت بهتر DNA حاصل از روش STE بهینه شده می‌باشد (شکل ۳). در واقع وجود ناخالصی در DNA استخراج شده موجب ممانعت از عمل آندونوکلئازهای محدودکننده از طریق اشغال کردن احتمالی سایت‌های برشی آن‌ها می‌گردد.

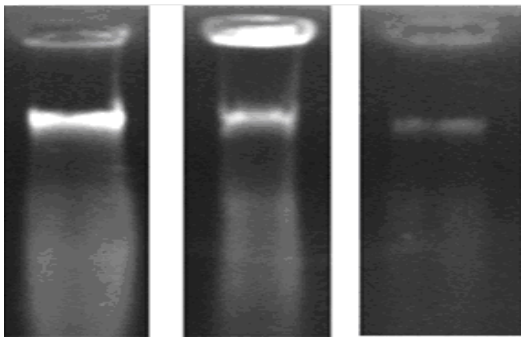
نتایج حاصل از واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) نشان دادند که DNA استخراجی با روش STE بهینه شده از کیفیت لازم برای PCR برخوردار است که وضوح و تعداد باندهای تکثیر شده در مقایسه با سایر روش‌های استخراج DNA ژنومی از این گیاه اثبات‌کننده‌ی این موضوع می‌باشد (شکل ۴).



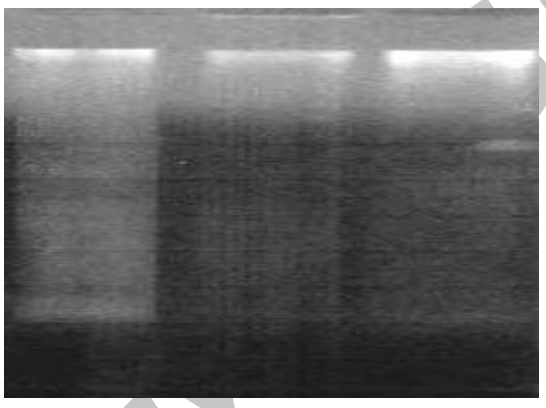
شکل ۱- کیفیت‌سنجی DNA استخراجی از برگ‌های جوان گیاه دارویی گل گاو زبان ایرانی بر اساس روش الکتروفورز با آگارز ۸۰ ٪. از چپ به راست: ۱- روش STE بهینه شده، ۲- روش CTAB و ۳- روش دلاپورتا و همکاران وی.

Archive of SID

www.SID.ir



شکل ۲- کیفیت‌سنجی DNA استخراجی از برگ‌های بالغ گیاه دارویی گل گاو زبان ایرانی بر اساس روش الکتروفورز با آگارز ۸. ٪. از چپ به راست: ۱- روش STE بهینه شده، ۲- روش CTAB و ۳- روش دلاپورتا و همکاران وی.



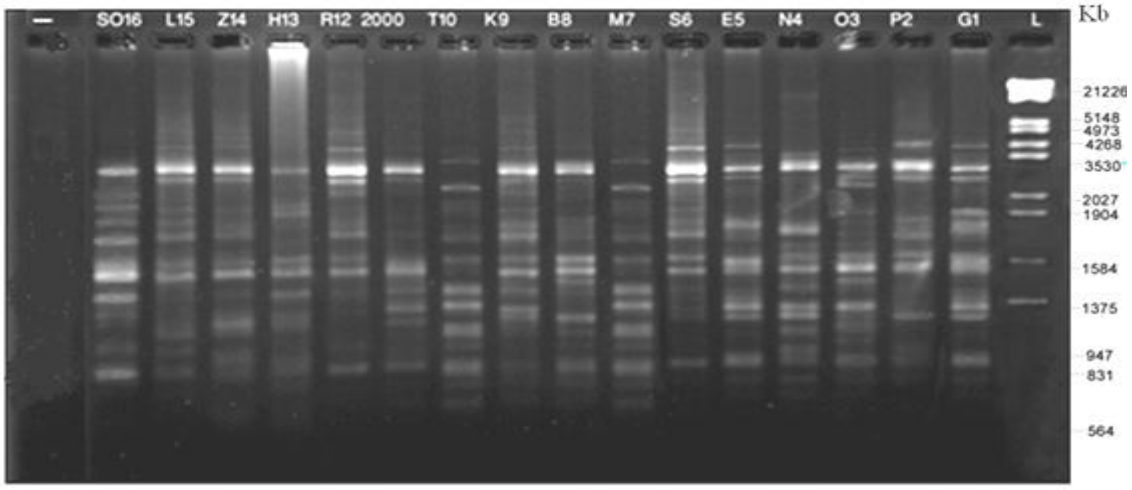
شکل ۳- آزمون هضم آنزیمی با استفاده از آنزیم برشی Ecor1 به ترتیب از چپ به راست: ۱- STE بهینه شده، ۲- CTAB و ۳- دلاپورتا و همکاران (مقدار DNA تزریق گردیده در هر یک از چاهک‌ها ٦ میکرولیتر می‌باشند).

جدول ۲- مقایسه کیفیت و کمی DNA ژنومی از برگ‌های جوان و بالغ، با استفاده از روش اسپکتروفتومتری

روش استخراجی	نمونه برگی		مقدار DNA	میانگین جذب (نانومتر)
	جوان	بالغ		
STE	❋		۷۸ -۹۱	۱/۸۵
STE		❋	۳۰ -۴۳	۱/۶
CTAB	❋		۳۴ -۴۱	۱/۵۸
CTAB		❋	۱۸ -۲۵	۱/۳۸
Dellaporta	❋		۱۲ -۱۹	۱/۴
Dellaporta		❋	۳ -۷	۰/۸۶

Archive of SID

www.SID.ir



شکل ٤ - واکنش زنجیره‌ای پلیمراز با استفاده از آغازگر OPA-10 با توالی 5-TCCGCTCTGG-3 با DNA ژنومی استخراجی به روش STE از برگ‌های جوان گاو زبان ایرانی جمع‌آوری شده از ١٦ منطقه کشور (حسین پورآزاد و همکاران، ۱۳۹۰).

جدول ۳- مقایسه مواد مصرفی روش‌های مختلف استخراج دی ان ای.

روش / مواد	STE بهینه شده	CTAB	دلاپورتا و همکاران
ساکارز	+	-	-
Tris-HCL	+	+	+
SDS	+	-	+
LICL	+	-	-
NACL	-	+	+
CH_3OOK	-	+	-
CH_3OONa	-	-	+
نیتروژن	-	+	+
CTAB	-	+	-
RNase	-	+	+
EDTA	+	+	+
PVP	+	+	-

Archive of SID
www.SID.ir

بحث و نتیجه‌گیری

به طور کلی برگ‌های جوان نسبت به سایر قسمت‌های گیاه دارای مواد پلی ساکاریدی و متابولیت‌های ثانویه کم‌تری هستند که این موضوع موجب گردیده در بیش‌تر موارد، جهت استخراج DNA از برگ‌های جوان استفاده گردد (De Masi *et al*., 2006). مواد شیمیایی استفاده شده برای هر سه روش مورد مطالعه در جدول ۳ آورده شده است همانگونه که در جدول مشاهده می‌گردد، در روش STE بهینه شده نیازی به نیتروژن مایع (جهت شکستن سلول‌ها و بافت‌های گیاهی) نمی‌باشد. درحالی‌که در سایر روش‌های متداول استخراج دی ان ای از جمله روش‌های CTAB و دلاپورتا نیاز به ازت مایع می‌باشد. در این روش بر خلاف سایر روش‌های یاد شده نیاز به ساکارز می‌باشد. استفاده از ساکارز در برخی از روش‌های استخراج دی ان ای نیز گزارش گردیده است. Kaufman *et al* (1999) برای اولین بار از ساکارز در محتویات بافر استخراج دی ان ای ژنومی از سلول‌های گیاهی استفاده نمودند. همچنین قابل ذکر است که EDTA با کلاته نمودن یون‌های منیزیم که به عنوان کوفاکتور جهت فعالیت آنزیم‌های نوکلئاز هستند از فعالیت آن‌ها جلوگیری به عمل می‌آورد. SDS به عنوان شوینده در محتویات بافرهای استخراج DNA مطرح بوده و به عنوان حذف‌کننده‌ی لیپیدهای غشایی (شکستن دیواره‌ی سلولی و دیواره‌ی هسته) مطرح بوده و همچنین به جدا شدن ترکیبات پروتیینی از DNA کمک می‌نماید (Ahmad *et al*., 2004). بتا مرکاپتو اتانول به عنوان آنتی اکسیدان عمل کرده و از اکسیده شدن مواد پلی فنولی جلوگیری می‌کند، اکسید شدن مواد پلی فنولی باعث قهوه‌ای شدن پلیت DNA استخراج شده می‌گردد (Monika *et al*., 2006). کلرید لیتیم اولین بار توسط Pirttla *et al* (2001) به جای RNase استفاده گردید. عنصر لیتیم باند بسیار اختصاصی با RNAهای دارای بیش از ۲۰۰ جفت باز ترکیب Li-RNA داده و به دلیل غیر محلول بودن، این ترکیب به راحتی رسوب یافته و از آلودگی DNA ژنومی استخراجی کاسته می‌شود. علاوه بر این بکارگیری LiCL به حذف DNAهای برش‌یافته (shared)، پروتیینهای پسماند و پلی ساکاریدها کمک موثری می‌نماید. در گونه‌های گیاهی که دارای حجم بالایی از مواد پلی فنولی هستند می‌توان با بکارگیری مقادیر مناسبی از PVP (پلی وینیل پیرولیدین) بر مشکل بازدارندگی این مواد در روند استخراج غلبه نمود (Ahmad *et al*., 2004). مجموعه عوامل فوق باعث گردیدند تا DNA ژنومی استخراج شده از برگ‌های گیاه دارویی گل گاو زبان ایرانی از کیفیت و کمیت مناسبی برخوردار باشند. در نهایت می‌توان گفت روش STE بهینه شده جهت استخراج DNA با کیفیت و کمیت مطلوب از نمونه‌های برگی جوان و بالغ گل گاو زبان ایرانی (*Echium amoenum*) بهترین، کم هزینه‌ترین و سریع‌ترین روش استخراج DNA در مقایسه با سایر روش‌های رایج محسوب می‌شود.

سپاس‌گزاری

بدین وسیله نویسندگان بر خود لازم می‌دانند از ریاست محترم پژوهشکده ژنتیک و زیست فناوری کشاورزی طبرستان که هزینه‌های این پروژه را تقبل نمودند تشکر نمایند.

Archive of SID
www.SID.ir

منابع

آزاد بخت،م. ۱۳۷۸. رده بندی گیاهان دارویی، تهران: موسسه فرهنگی انتشاراتی تیمورزاده، ۴۰۴ صفحه، ص۲۵۵-۲۵۳.

حسین پورآزاد،ن.، ق.ع.نعمت زاده، م.آزادبخت، س.ک.کاظمی تبار، و ا.شکری. ۱۳۹۰. بررسی تنوع ژنتیکی برخی از اکوتیپ‌های گل گاو زبان ایرانی (*Echium amoenum* Fisch& Mey.) نواحی شمال و شمال غرب ایران با استفاده از نشانگر مولکولی RAPD، دو فصلنامه علمی- پژوهشی تحقیقات ژنتیک و اصلاح گیاهان مرتعی و جنگلی ایران)، تهران، شماره۱ جلد ۱۹، صفحات ۱۳-۱.

حسین پورآزاد،ن.، ق.ع.نعمت زاده، ا.شکری و م.آزادبخت. ۱۳۸۸. مقایسه روش‌های مختلف استخراج DNA ژنومی از گیاه دارویی گل گاو زبان ایرانی، مجموعه مقالات ششمین همایش ملی بیوتکنولوژی ایران، تهران.

Ahmad,S. M., M. M.Ganaie, P.H.Qazi, V.Verma, S.F.Basir, and G.N.Qazi. 2004. Rapid isolation protocol for angiospermic plants.Bulg. j . Physiol, 30 (1-2), 25-33 .

Casaikl,U.M., M.Bastian, R.Brettschneider, S.Gauch, A.Meir, M.Schauret, F.Schols, C.Sperisen, B.Vomam and, B.Ziegemhagen. 1998. Comparative analiziz of diffrent DNA extraction protocols: A fast universal maxi preparation of high quality plant DNA for genimic evaluation and phylogenetic studies. Plant. Mol .Bio. rep 16:69-86.

Doyle,j.j., and j.L.Doyle. 1990. Isolation of plant DNA from fresh tissue.Focus. Vol.12: 11-15.

Kaufman,B., S.Richards, and D.A.Dierig. 1999. DNA isolation method for high polysacharide Lesquerella Species. Ind.Crop. Prod.,9 111-114.

Lodi, M.A., G.N. Ye, F.Weeden, and B.I.Reisch. 1994. A simple and efficient method DNA extraction from grapevine caltivares and vitis species.Plant Mol. Bio.Rep.Vol 12.pp.6-13.

Masi,L.D., C.Esposito, D.Castaldo, F.Siano, and B.Laratta. 2006. Assessment of agronomic, chemical and genetic variability in common basil (Ocimum basilicum L.). Eur. Food Res. Technol. 223:273-281.

Monika,S.J., K.Sawicki, C.Polok, and R.Holdynski. 2006. Comparison of three polygonatum species from Poland based on DNA markers. Ann. Bot. Fennici 43: 379-388.

Murry,M., and W.F.Thompson. 1980. Rapid isolation of molecular weight plant DNA. Nucleic Acid Research. 8:4321-4325.

Pirttla A.M., M.Hirsikorpi, T.Kamarainen, L.Jaakola, and A.Hohtola. 2001. DNA isolation method for medicinal and aromatic plants. Plant. Biol. Reptr., 19, 273a-f.

Shrma, A.,G.PrabhjotKaur, and S,Prabhjeet. .2002. DNA isolation from dry and fresh samples of polysaccharide-rich plants. Plant Molecular Biology Reporter, December 2002, vol. 20, no. 4, p. 415a-415f.

Archive of SID

www.SID.ir