بررسی مقایسه‌ای سه روش استخراج DNA ژنومی از نمونه‌های تازه و گیاکده‌ای برگ بومادران کوتاه دشتی

عذرا صبورا[۱*]، مریم امیری راد[۱]، عزت عسگرانی[۲] و طیبه رجبیان[۳]

دریافت: ۱۳۹۶/۰۷/۱۰/ اصلاح: ۱۳۹۷/۰۲/۲۵/ پذیرش: ۱۳۹۷/۰۳/۰۷/ انتشار: ۱۳۹۷/۱۲/۲۸

[۱] گروه علوم گیاهی، دانشکدهٔ علوم زیستی، دانشگاه الزهرا (س)، تهران، ایران
[۲] گروه بیوتکنولوژی، دانشکدهٔ علوم زیستی، دانشگاه الزهرا (س)، تهران، ایران
[۳] گروه زیست شناسی، دانشکدهٔ علوم پایه، دانشگاه شاهد، تهران، ایران
[*] مسئول مکاتبات: saboora@alzahra.ac.ir

چکیده. استخراج DNA از بافت‌های گیاهی اغلب مشکلاتی را فراهم می‌سازد. بطورمثال عدم حذف متابولیت‌های ثانویه نظیر ترکیبات فنلی گیاهان معطر و دارویی، باعث بروز خطا در نتایج کاربرد DNA استخراج شده طی آزمایشهای مولکولی می‌شود. بومادران (*Achillea wilhelmsii*)، گیاهی دارویی متعلق به تیره کاسنیان و انحصاری ایران است که اطلاعات کمی در رابطه با ژنوم آن وجود دارد. بدین جهت بهینه‌سازی روش‌های استخراج برای تهیه DNA با کمیت و کیفیت مناسب ضروری به نظر می‌رسد. در این مطالعه دو روش سنتی استخراج DNA ژنومی از برگ گیاه بومادران (با استفاده از بافت تازه و گیاکده‌ای) و یک روش دیگر با استفاده از کیت استخراج تجاری MAGNAN$_{TM}$ مورد مقایسه قرار گرفته است. نتایج نشان داد که استخراج DNA از برگ‌های تازه طبق دستورالعمل Khanuja و همکاران (1999) به دلیل افزایش مقدار DNA استخراج شده و کاهش آلودگی ترکیبات مزاحم مثل RNA، پلی‌ساکاریدها، پروتئین‌ها و متابولیت‌های ثانوی بهتر از دو روش دیگر بود. ارزیابی کیفیت DNA استخراج شده از نمونه‌های گیاکده‌ای نشان داد که علیرغم مقدار بالای DNA (۱۰-۵۰ برابر نسبت به دو روش دیگر)، کیفیت عصاره روی ژل آگارز بخاطر وجود کشیدگی و شکستگی مولکول DNA پایین بود. این امر می‌تواند استفاده از عصاره فوق را در آزمایشهای مولکولی با محدودیت روبرو سازد. کاربرد کیت استخراج MAGNAN$_{TM}$ گرچه از نظر کاهش زمان و هزینه استخراج و کاهش آلودگی به پروتئین و RNA مناسب بود، اما نیازمند اصلاح فرایند تخلیص برای گیاه بومادران جهت افزایش کمیت DNA حاصل است.

واژه‌های کلیدی: استخراج ژنومی، بومادران، پلی فنلها، نانوذرات مغناطیسی، نمونه خشک

Comparison study of three methods for genomic DNA extraction from fresh and herbarium leaf specimens of *Achillea wilhelmsii* C. Koch

Azra Saboora[1*], Maryam Amiri Rad[1], Ezat Asgarani[2] & Tayebeh Radjabian[3]

Received 02.10.2017/ Revised 15.05.2018/ Accepted 28.05.2018/ Published 19.03.2019

[1]Plant Science Department, Biological Science Faculty, Alzahra University, Tehran, Iran
[2]Biotechnology Department, Biological Science Faculty, Alzahra University, Tehran, Iran
[3]Biology Department, Basic Sciences Faculty, Shahed University, Tehran, Iran
[*]Correspondent author: saboora@alzahra.ac.ir

Abstract. DNA extraction from plant tissues is often problematic. For example, unsuccessful removal of secondary metabolites, such as phenolic compounds, during the extraction of the DNA of aromatic and medicinal plants results in errors in the results of molecular experiments. *Achillea wilhelmsii* is a medicinal plant which belongs to Asteraceae family and is native to Iran, there is little information about its genomic data. Therefore, the optimization of DNA extraction methods to obtain yield with higher quality and quantity is necessary. In this study, two traditional DNA extraction methods (using fresh and herbarium leaf samples) and a commercial DNA kit (MAGNAN$_{TM}$) in Yarrow were compared. Results showed that DNA extracted from fresh leaves of yarrow by the application of Khanuja *et al.* (1999) method was better than other methods mentioned in this research, because of increased amount of extracted DNA and reduced amount of harmful compounds such as RNA, polysaccharides, protein and secondary metabolites. The evaluation of the quality of extracted DNA from herbarium specimens showed that the quality of this extract was low on agarose gel because of the formation of smear and broken molecules, in spite of the high yielding DNA (10-50 fold ratio to the other methods). This can be considered to be a limitation of the extract in molecular experiments. The procedure of MAGNAN$_{TM}$ DNA kit proved to be appropriate for reducing the time and cost of extraction as well as its low contamination of protein and RNA. However, this process still needs some modifications for yarrow to increase the amount of extracted DNA.

Keyword. *Achillea wilhelmsii*, genomic DNA extraction, herbarium samples, magnetic nanoparticle, polyphenols

مقدمه

تعداد زیادی از گیاهان غنی از متابولیت‌های ثانویه هستند و امروزه در تولید دارو و فرایندهای درمانی به‌طور گسترده استفاده می‌شوند. بومادران کوتاه دشتی (*Achillea wilhelmsii*-K.Koch) گیاهی دارویی متعلق به تیرهٔ کاسنیان (Asteraceae) است. این گونه انحصاری ایران بوده و به‌طور گسترده در بخش‌های مختلف ایران به‌ویژه در مناطق مرکزی و غربی پراکنش دارد (Asgary *et al.*, 2000). ترکیبات شیمیایی موجود در بخش‌های هوایی گیاه مانند فلاونوئیدها، ترپنوئیدها، لیگنان‌ها، مشتقات آمینواسیدی، اسیدهای چرب و آلکامیدها در گل‌ها و برگ‌ها دارای خواص درمانی مختلف مانند خاصیت ضدمیکروبی، آنتی‌اکسیدانی، ضدسرطان، ضدالتهابی، حفاظت کننده دستگاه گوارش و غیره هستند (Lakshmi *et al.*, 2011). تولید تجاری متابولیت‌های ثانویه و ترکیبات دارویی مهم گیاهان، از طریق عصاره‌گیری گیاهان وحشی که حاوی مقدار درخورتوجهی از این ترکیبات مؤثره هستند صورت می‌گیرد یا سنتز آنها در کارخانجات شیمیایی انجام می‌شود. روش‌های بیوتکنولوژی مانند کشت بافت و سلول گیاهی، دست‌کاری‌های ژنتیکی، کشت ریشه‌های موئین و مهندسی متابولیت نیز می‌تواند در این راستا مورد توجه قرار گیرد. بنابراین شناخت ژنوم گیاهان دارویی بومی کشور، استخراج DNA، شناسایی ژن‌های کلیدی در مسیرهای متابولیسمی مهم و بررسی مکانیسم تنظیمی ژن‌ها در مطالعات زیستی و مباحث مولکولی به‌منظور افزایش تولید متابولیت‌های ثانویه از اهمیت ویژه‌ای برخوردار هستند (Zhoua & Wu, 2006).

بهینه‌سازی استخراج اسیدهای نوکلئیک اولین مرحله در انجام این مطالعات است (Alaey *et al.*, 2007). تا به حال روش‌های مختلفی برای استخراج DNA از گیاهان ارائه شده است. در انتخاب این روش‌ها، ابتدا کمیت و کیفیت مناسب DNA استخراج شده و سپس سرعت، سادگی و کاهش هزینه فرایند استخراج مهم است (Rahim Malek, 2011; Lickfeldt *et al.*, 2002). عدم کیفیت DNA استخراج شده ممکن است به‌دلیل تجزیه مولکول DNA به علت صدمات مکانیکی، عملکرد آنزیم‌های نوکلئازی و یا به دلیل اثر ترکیبات ناخواسته در فرایند استخراج DNA باشد. این ناخالصی‌ها شامل ترکیبات شیمیایی مورد استفاده در محلول بکار برده شده برای استخراج DNA یا کربوهیدرات‌ها، پروتئین‌ها و متابولیت‌های ثانویه گیاهی هستند (Sahare & Srinivasu, 2012). یکی از مشکلاتی که اغلب به دلیل وجود ناخالصی‌ها رخ می‌دهد آن است که ترکیباتی از قبیل پلی‌ساکاریدها و ترکیبات فنلی با اسیدهای نوکلئیک هم‌تافته تشکیل می‌دهند. پلی‌فنل‌ها می‌توانند باعث اکسیداسیون DNA شوند (Khanuja *et al.*, 1999; Varadarajan & Prakash, 1991). وجود چنین آلودگی‌هایی در محلول DNA می‌تواند در مراحل بعدی مانع فعالیت آنزیم‌های Taq-پلیمراز در واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) و آنزیم‌های برشگر شوند (Bushra *et al.*, 1999). بنابراین بررسی روشهای استخراج جهت بالا بردن کمیت و کیفیت DNA استخراج شده ضروری است.

در مطالعات Prittila و همکاران (2001) روش جدیدی جهت استخراج DNA از گیاهانی مانند بومادران ارائه شد که در آن از مرکاپتواتانول و پلی‌وینیل پیرولیدون (PVP) به‌طور هم‌زمان برای رفع مشکل اکسیداسیون استفاده می‌شد. در این راستا، Rahim Malek چهار روش استخراج DNA از گیاهان دارویی و معطر مختلف شامل چند گونه بومادران (*Achillea* L.) را تحت بررسی قرار داد (Rahim Malek, 2011). نتایج این تحقیق نشان داد که در میان گیاهان تحت بررسی گونه‌های بومادران بیشترین میزان ناخالصی پلی‌ساکاریدی و اکسیداسیون DNA را داشتند. آنها نیز کاهش میزان اکسیداسیون DNA اندازه‌گیری شده را طبق روش استخراج Pirttila و همکاران (۲۰۰۱) تائید کردند. Khanuja و همکاران دستورالعملی را برای استخراج سریع DNA از گیاهان دارویی و معطر مختلف با محتوای متابولیت‌های ثانویه و اسانس فراوان منتشر کردند (Khanuja *et al.*, 1999). این روش، در برخی منابع با اندکی تغییرات، به عنوان روشی مناسب برای اغلب گیاهان دارویی معرفی شده است (Sahare & Srinivasu, 2012; Viana *et al.*, 2015; Zabeti *et al.*, 2014). از طرفی امروزه استفاده از کیت‌های تجاری استخراج DNA، در کنار روش‌های آزمایشگاهی قدیمی، گسترش یافته است. در تعدادی از گزارش‌ها بیان شده است که استفاده از کیت استخراج در مقایسه با روش‌های دستی، DNA خالص‌تری را فراهم می‌کند (Del Serrone *et al.*, 2007; Sameer *et al.*, 2009). جداسازی مغناطیسی مولکول‌های زیستی با استفاده از نانوذرات مغناطیسی یکی از فناوری‌های جدید است که در سال‌های اخیر برای

استخراج انواع مولکول‌های زیستی مورد استفاده قرار گرفته است. گزارش شده است که نانوذرات به دلیل افزایش سطح تماس و جذب، توانایی بالایی در استخراج اسیدهای نوکلئیک نشان می‌دهند. طی استفاده از این کیتهای تجاری علاوه بر اینکه نیازی به استفاده از دستگاه‌های پیچیده نیست، زمان استخراج DNA نیز به طور قابل ملاحظه‌ای کاهش می‌یابد (Rahnama *et al.*, 2016). دومین عامل مؤثر در بررسی‌های مولکولی انتخاب بافت گیاهی مناسب است. معمولا برگ‌های تازه و جوان به عنوان منابع خوب استخراج DNA در نظر گرفته می‌شوند. اما در حال حاضر استفاده از گیاهان خشک و گیاکده‌ای نیز به‌طور قابل‌توجهی در مطالعات تبارزایشی و تکاملی افزایش یافته است (Cota-Sánchez *et al.*, 2006). توانایی استفاده از نمونه‌های گیاکده‌ای تا حد زیادی می‌تواند یافته‌های پژوهشی را ارتقا دهد. توانایی استفاده از نمونه‌های گیاکدهای و تغذیه از این مجموعه‌ها امکان ارتقا یافته‌های پژوهشی را افزایش داده است. امروزه به خاطر دسترسی آسان به این نمونه‌ها و استخراج DNA از آنها، شناسایی توالی‌های ویژه یا ژن‌های خاص در آرایه‌های مختلف تسهیل و کاربرد نتایج آن در مطالعات آرایه‌شناختی و مولکولی فراگیر شده است (Drábková, 2014; Gaudeul & Rouhan, 2013).

سرده بومادران در ایران دارای ۱۹ گونه است. از آنجا که در ایران تاکنون مطالعات مولکولی کمی روی آن به عنوان یک گیاه انحصاری صورت گرفته است، از اینرو جمع‌آوری داده‌های ژنتیکی برای بررسی‌های پیشرفته در رابطه با مسیرهای بیوسنتزی متابولیت‌های مهم آن ضروری به‌نظر می‌رسد. استخراج DNA مناسب از گیاه بومادران برای مطالعات مولکولی همانند بسیاری از گیاهان غنی از اسانس و ترکیبات شیمیایی پیچیده بسیار مشکل است. هدف از این مطالعه بهینه‌سازی استخراج DNA گیاه بومادران از بافت مناسب است و آزمایش‌های مربوطه روی گونه *Achillea wilhelmsii* انجام شده است. به این منظور سه روش استخراج تحت مقایسه قرار گرفت: دو روش استخراج DNA از برگ تازه و نمونه گیاکده‌ای با استفاده از دستورالعمل‌های سنتی و روش سوم استخراج DNA از برگ تازه به کمک کیت MAGNAN$_{TM}$ (شرکت گیلنانوژن، تهران، ایران) تا در نهایت با توجه به کیفیت و کمیت محصول بدست آمده بهترین روش استخراج DNA از بومادران کوتاه دشت معرفی شود.

مواد و روش‌ها

آماده سازی نمونه گیاهی

به‌منظور به‌دست‌آوردن برگ‌های تازه جهت استخراج DNA، بذرهای گیاه بومادران کوتاه دشتی از رویشگاه طبیعی در روستای وادقان (از توابع بخش نیاسر شهرستان کاشان، استان اصفهان، ارتفاع ۱۸۹۷ متر از سطح دریا، عرض جغرافیایی ۵۱/۵۱۸، طول جغرافیایی ۳۴/۹) در اردیبهشت ماه توسط طیبه رجبیان و ریحانه دانایی‌پور جمع‌آوری شدند و پس از سترون‌سازی با الکل ۷۰ درصد، هیپوکلریت سدیم تجاری ۲۰ درصد و شستشو با آب مقطر روی محیط کشت جامد و بدون هورمون MS (Murashige & Skoog, 1962) کشت داده شدند. پتری‌ها در اتاق کشت به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۲±۲۳ درجه سانتیگراد و در تاریکی قرار گرفتند، سپس به دوره نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی منتقل شدند. گیاهچه‌های دو ماهه برداشت و در فریزر ۷۰- درجه سانتیگراد تا زمان استفاده نگهداری شدند. همچنین برای نمونه گیاکده‌ای از نمونه‌های خشک‌شده همین گونه که در اردیبهشت ماه ۱۳۸۹ جمع‌آوری و نمونه شاهد آن در هرباریوم دانشگاه تهران به شماره TUH-43916 نگهداری می‌شود، استفاده شد.

استخراج DNA

سه روش استفاده شده برای استخراج DNA به شرح زیر است:

روش اول دستورالعمل اصلاح شده Khanuja و همکاران (1999): مقدار ۰/۵ گرم بافت تازه برگ در بوته چینی با کمک ازت مایع سائیده و در ۱ میلی‌لیتر بافر استخراج CTAB (۱۰۰ میلی‌مولار Tris-Cl (pH= 8)، ۲۵ میلی‌مولار EDTA، ۱/۵ مولار NaCl، ۲/۵ درصد CTAB، ۰/۲ درصد بتامرکاپتواتانول و ۱ درصد پلیوینیل‌پیرولیدون) حل شد. مخلوط حاصل در یک لوله فالکون به‌مدت ۲-۱ ساعت در دمای ۶۰ درجه سانتیگراد در حمام آبی انکوبه شد. سپس ۱میلی‌لیتر محلول کلروفرم: ایزوآمیل الکل (به نسبت حجمی۲۴:۱) به نمونه اضافه و به‌مدت ۱۵ دقیقه به‌طور افقی به آرامی زیر و رو شد. نمونه با سرعت ۸۰۰۰ rpm به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۲۵ درجه سانتیگراد سانتریفیوژ (Spectrafuge 24D, labnet-USA) شد. لایه رویی جدا و ۰/۵ میلی لیتر محلول ۵ مولار NaCl و محلول ایزوپروپانول به نسبت ۰/۵ حجم به ترتیب به آن اضافه و محلول حاصل به مدت ۱ ساعت در دمای اتاق

انکوبه شد. پس از ۱ ساعت کلاف نوکلئوتیدی سفید رنگ قابل مشاهده در محلول جدا و با اتانل ۸۰ درصد شستشو داده شد و در ۱۷۰ میکرولیتر بافر TE با نمک بالا حل شد. با افزودن حجم مساوی از محلول کلروفرم: ایزوآمیل الکل (۲۴:۱) به آن، لایه رویی (لایه آبی) جداسازی و دو حجم اتانل سرد به آن اضافه شد و با سرعت ۱۰۰۰۰ rpm به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۲۵ درجه سانتیگراد سانتریفیوژ شد. رسوب با اتانل ۸۰ درصد شست‌وشو و در دمای اتاق خشک شد. در نهایت رسوب حاصل در ۷۰ میکرولیتر آب دوبار تقطیرحل شد (Khanuja *et al*., 1999).

روش دوم استفاده از کیت MAGNANTM (بافت گیاهی): در این روش، DNA از بافت تازه بومادران براساس دستورالعمل و مواد آماده شده کیت مگنان (شرکت گیل نانو ژن زیست فناور، ایران) به کمک کاربرد نانوذرات مغناطیسی و بافر اتصال استخراج شد. ابتدا ۰/۵گرم بافت تازه برگ در ۵ میلی‌لیتر بافر لیز شماره ۱ به مدت ۳۰ ثانیه ورتکس شد سپس ۲۵۰ میکرولیتر بافر لیز شماره ۲ اضافه و نمونه‌ها ۱۵ دقیقه در دمای ۶۵ درجه سانتیگراد نگه‌داری شد. به مخلوط حاصل ۷۵۰ میکرولیتر بافر لیز شماره ۳ اضافه شد و پس از ورتکس مجدد نمونه‌ها روی یخ به مدت ۲۰ دقیقه نگه‌داری شدند. در ادامه ۱۰۰ میکرولیتر از محلول رویی برداشته و ۳۸ میکرولیتر از محلول نانوذره و ۱۰۰ میکرولیتر بافر اتصال موجود در کیت استخراج به آن افزوده شد. نمونه‌ها به مدت ۴ دقیقه در دمای اتاق انکوبه و جداسازی رسوب حاصل به کمک رَک مغناطیسی انجام شد. ضمن شستشوی رسوب در مراحل بعدی مطابق دستورالعمل کیت MAGNANTM، مولکول های DNA از رسوب نانوذرات جدا شدند و با آب مقطر به حجم ۱۲۵ میکرولیتر رسید.

روش سوم دستورالعمل Costa و Robert (2014): در این روش از نمونه گیاکده‌ای استفاده شد، ۵۰ میلی‌گرم بافت خشک برگ به آرامی ساییده شد، سپس ۶۰۰ میکرولیتر بافر 2X CTAB که در دمای ۶۰ درجه سانتیگراد در حمام آبی گرم شده بود به همراه ۵۰ میلی‌گرم پلی وینیل پیرولیدون به پودر گیاه اضافه و مخلوط شد. محلول حاصل به مدت ۱/۵ ساعت در دمای ۷۰ درجه سانتیگراد در حمام آبی انکوبه شد، در این فاصله هر ۳۰ دقیقه نمونه به آرامی در جهت افقی هم‌زده شد. سپس ۶۰۰ میکرولیتر محلول کلروفرم: ایزوآمیل الکل (۲۴:۱) به نمونه اضافه و سانتریفیوژ (۱۰۰۰۰ rpm، ۲۰ دقیقه) شد. فاز آبی رویی جدا و ۵۴۰ میکرولیتر محلول ایزوپروپانول سرد به آن اضافه شد. مخلوط حاصل به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۲۵ درجه سانتیگراد انکوبه و سپس با سرعت rpm ۱۰۰۰۰، به مدت ۴ دقیقه سانتریفیوژ شد. با حذف روشناور، رسوب با اتانل ۷۵ درصد شست‌وشو و مجدداً سانتریفیوژ شد. در این مرحله روشناور حذف شد و پس از خشک کردن رسوب در دمای اتاق آنرا در ۸۰ میکرولیتر بافر 1X TE کاملاً حل شد، سپس ۸ میکرولیتر آمونیوم استات (۷/۵میلی‌مولار) و ۱۸۰ میکرولیتر اتانل خالص به آن اضافه شد و طی یک دوره نگهداری محلول حاصل در دمای ۲۵ درجه سانتیگراد برای ۲۰ دقیقه، نمونه به مدت ۴ دقیقه با سرعت rpm ۱۰۰۰۰ سانتریفیوژ شد و لایه رویی حذف شد. رسوب به جای مانده با اتانل ۷۵ درصد شست‌وشو و سانتریفیوژ شد. در نهایت رسوب در دمای اتاق خشک و در ۱۰۰ میکرولیتر بافر 1X TE حل شده و در ۲۰- درجه سانتیگراد نگهداری شد.

بررسی کمی و کیفی DNA

مقدار و خلوص محلول‌های DNA استخراج شده توسط دستگاه اسپکتروفتومتر و با دستگاه نانودراپ (Thermo scientific, nanodrop 2000, USA) بررسی شد. کیفیت نمونه‌ها با اندازه-گیری نسبت A_{260}/A_{280} (غلظت DNA نسبت به پرتئین‌ها) و A_{260}/A_{230} (غلظت DNA نسبت به متابولیت‌های ثانویه و ترکیبات مزاحم در بافر استخراج) مشخص شد (Zamani *et al*., 2005). همچنین برای اطمینان از حذف ناخالصی‌هایی نظیر ریبونوکلئیک اسیدها و عدم شکستگی و کیفیت DNA حاصل، الکتروفورز هر یک از محلول‌های حاوی DNA روی ژل آگارز ۱ درصد با ولتاژ ۸۰ ولت به مدت ۶۰ دقیقه انجام شد.

نتایج و بحث

نتایج حاصل از اندازه‌گیری کمّی DNA توسط دستگاه نانودراپ در جدول ۱ نشان داده شده است. مقایسه سه روش استخراج استفاده شده در این پژوهش نشان داد که ظاهرا بیشترین محتوای DNA در محلول استخراج شده توسط روش سوم از نمونه گیاکده‌ای و کمترین محتوای DNA به کمک کاربرد کیت استخراج به‌دست آمده بود (جدول ۱).

با توجه به اینکه در این پژوهش محتوای آب بافت‌های مورد استفاده برای استخراج DNA یکسان نبود، به‌منظور جلوگیری از

بروز خطا، مقدار ماده اولیه برای نمونه گیاکده‌ای (روش سوم) که محتوای آب بسیار کمتری داشت یک دهم مقدار بافت تر استفاده شده برای دو روش دیگر در نظر گرفته شد و در نهایت مقدار DNA در یک میلی‌گرم ماده اولیه محاسبه شد. محلول DNA استخراج شده از نمونه گیاکده‌ای دارای ۵۸۷/۲ نانوگرم DNA به ازای هر میلی‌گرم ماده خشک (یا ۵۸/۷۲ نانوگرم DNA به ازای هر میلی‌گرم ماده تر) بود که در مقایسه با مقدار ۲۹/۶ نانوگرم DNA استخراج شده در روش اول (Khanuja *et al.*, 1999) و ۱۱/۲۲ نانوگرم در روش دوم (کیت MAGNANTM) به ازای هر میلی گرم ماده تر محتوای قابل ملاحظه‌ای را نشان می‌داد (مقدار DNA استخراج شده در روش سوم با در نظر گرفتن وزن تر اولیه به‌ترتیب حدود ۲ و ۵/۲ برابر بیشتر بود). این اختلاف منطقی است زیرا به‌نظر می‌رسد خشک بودن نمونه به نوعی باعث تغلیظ DNA شده باشد. به‌علاوه طی فرایند خشک شدن و در طول زمان نگهداری سایر اسیدهای نوکلئیک نمونه گیاکده‌ای نظیر مولکول‌های RNA نیز تخریب شده بودند که باعث خالص‌سازی بهتر DNA استخراج شده می‌شود.

برای بررسی و مقایسه کیفیت محلول‌های DNA استخراج شده در سه روش فوق از دو پارامتر اسپکتروفتومتری (نسبت A_{260}/A_{280} و A_{260}/A_{230}) و الکتروفورز نمونه‌ها روی ژل‌های آگارز استفاده شد. مقایسه نمونه‌ها بیانگر آن بود که میزان آلودگی پروتئینی سه محلول استخراج در حد مجازی قرار داشت. اگر نسبت جذب محلول حاوی DNA در طول موج ۲۶۰ به ۲۸۰ نانومتر در محدوده ۲-۱/۸ باشد، جذب به‌طور عمده ناشی از حضور اسیدهای نوکلئیک بوده و کیفیت و خلوص DNA مطلوب است درحالی‌که نسبت کمتر از ۱/۸ آلودگی با پروتئین و نسبت بالاتر از ۲ آلودگی با RNA را نشان می‌دهد (Desjardins & Conklin, 2010). طی استخراج DNA با استفاده از روش اول و دوم هیچگونه آلودگی پروتئین و RNA مشاهده نشد، در حالی که کاربرد روش استخراج اول (Khanuja *et al.*, 1999) میزان بسیار کمی آلودگی با RNA را در نمونه‌های استخراج شده نشان داد که قابل چشم پوشی است.

در نمونه‌های با خلوص بالا، مناسب‌ترین نسبت جذب محلول حاوی DNA در طول موج ۲۶۰ به ۲۳۰ نانومتر حدود ۲/۲- ۲ است. درصورتی‌که این میزان پایینتر باشد نشان دهنده بالا بودن میزان آلودگی به کربوهیدرات‌ها، ترکیبات فنلی، املاح و یا کم بودن غلظت DNA است (Desjardins & Conklin, 2010). نتایج ما نشان داد که محلول DNA حاصل از کاربرد کیت نسبت به دو روش استخراج دیگر از کیفیت پایین‌تری برخوردار بود که ممکن است ناشی از آلودگی نمونه به ترکیبات فوق یا حاصل کاهش محتوای DNA استخراج شده باشد. با توجه به نسبت A_{260}/A_{230}، استخراج DNA با روش اول (Khanuja *et al.*, 1999) فاقد آلودگی‌های ذکر شده بود (جدول ۱). هر چند نسبت A_{260}/A_{230} در محلول DNA استخراج شده از نمونه‌های خشک گیاکده‌ای تا حدی نزدیک به مقادیر استاندارد و نسبت به‌دست‌آمده در روش اول بود ولی کمی آلودگی به ترکیبات شیمیایی نظیر ترکیبات فنلی را نشان داد اما در مقایسه با روش استفاده از کیت این نتایج به‌طور چشمگیری بیشتر بود (نسبت A_{260}/A_{230} برابر۱/۶۶ در مقابل ۰/۲۱). نتایج حاصل از بررسی کیفیت DNA روی ژل آگارز ۱ درصد در شکل ۱ نشان داده شده است. بررسی نحوه جداسازی مولکول‌های DNA استخراج شده به کمک روش اول (Khanuja *et al.*, 1999) روی ژل‌های آگارز (زیر نور UV- 366) حضور تک باند واضح و بدون کشیدگی را آشکار ساخت (شکل 1-A) که در مقایسه با دو روش دیگر آلودگی و خردشدن کمتر مولکول را نمایان کرد. کشیدگی زیر باندهای DNA ناشی از شکستگی یا خرد شدن DNA هستند (Zamani *et al.*, 2005).

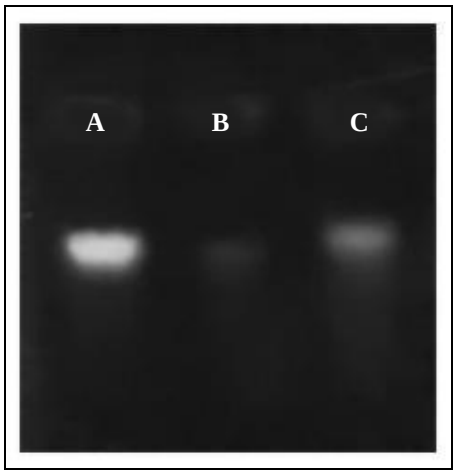
برعکس بارگیری نمونه حاصل از کیت استخراج MAGN-ANTM یک باند با وضوح کم را روی ژل‌های آگاروز ظاهر کرد (شکل 1-B) که با توجه به نسبت A_{260}/A_{230} پایین این نمونه می‌توان کاهش قابل ملاحظه مقدار DNA را در این محلول استخراج شده تایید کرد. بارگیری نمونه حاوی DNA استخراج شده از برگ خشک (نمونه گیاکده‌ای) کیفیت متوسطی را نشان داد که به نسبت روش دوم باندی با وضوح بیشتر اما همراه با کشیدگی آشکار می‌کرد.

در این پژوهش کمیت و کیفیت استخراج DNA ژنومی از برگ تازه، به کمک دو دستورالعمل آزمایشگاهی و کیت تجاری تحت مقایسه قرار گرفته است. نتایج نشان دادند که به ازای هر میلی‌گرم ماده اولیه، استخراج DNA با روش اصلاح‌شده Khanuja و همکاران (1999) به‌میزان بیشتری DNA استخراج می‌شود و محلول حاصل از لحاظ آلودگی با ترکیبات پروتئینی و فنلی خالص‌تر و با کیفیت بهتر بودند. کیفیت مطلوب این محلول DNA

جدول ۱- مقایسهٔ محتوای DNA برگ بومادران کوتاه دشتی در سه روش استخراج.

Table 1. Comparison of DNA content of leaves in *Achillea wilhelmsii* after three extraction methods.

روش استخراج	نوع بافت	غلظت DNA (ng/µl)	نسبت جذب 260/280 nm	نسبت جذب 260/230 nm
روش Khanuja et al., (1999)	برگ تازه	۲۲۱/۸	۲/۱۴	۲/۰۳
کیت MAGNAN TM	برگ تازه	۴۴/۹	۱/۸۴	۰/۲۱
روش Costa & Robert, (2014)	برگ گیاکده‌ای	۲۹۳/۶	۲/۰۲	۱/۶۶



شکل ۱- مقایسه کیفیت DNA های استخراج شده از برگ بومادران توسط سه روش مختلف. بارگیری نمونه‌ها روی ژل آگارز ۱ درصد با ولتاژ ۸۰ میلی ولت انجام شد: A) DNA استخراج شده با روش اول (Khanuja *et al.*, 1999) از بافت تازه؛ B) DNA استخراج شده با استفاده از کیت MAGNAN TM از بافت تازه؛ C) DNA استخراج شده با روش سوم (Costa & Robert, 2014) از نمونه گیاکده‌ای.

Fig. 1. The comparison of the quality of DNA extracted from *Achillea wilhelmsii* leaves by three different methods. The samples were loaded on 1% agarose gel and voltages of 80 mV .**A:** DNA extracted from the fresh tissue by the first method (Khanuja et al., 1999); **B:** DNA extracted from fresh tissue using MAGNAN TM kit; **C:** extracted DNA using the third method (Costa & Robert, 2014) from herbarium sample leaf.

با انجام واکنش زنجیره‌ای پلیمراز به اثبات رسید (داده‌های منتشر نشده). در تحقیقات Zabeti و همکاران (2014) نیز این روش به‌منزلهٔ روشی مناسب برای استخراج DNA از گیاه آویشن معرفی شد. طی استخراج DNA این گیاه رسوبی تشکیل شد که بررسی آن به وسلیه تحلیل‌های IR و GC mass مشخص کرد با این روش بخش عمده‌ای ازمتابولیت‌های ثانویه در محلول استخراج حذف شده بودند. از این رو پیشنهاد شد که این روش جهت استخراج DNA از گیاهانی که به گل رفته‌اند و اسانس‌ها و متابولیت‌های ثانویه متعدد دارند استفاده شود.

در تحقیقات Rahim Malek (2011) چهار روش استخراج (Komatsuda *et al.*, 1998; Dellaporta *et al.*, 1983; Pirttila *et al.*, 2001; Murry &Thompson, 1984) در گیاهان دارویی و معطر مختلف از جمله چند گونه بومادران (*Achillea*) تحت بررسی قرار گرفت. نتایج وی نشان داد که احتمالاً گونه‌های بومادران دارای مقادیر زیادی ترکیبات پلی‌ساکاریدی و پلی‌فنلی هستند که باعث اکسیداسیون و ناخالصی DNA استخراج شده می‌شود، کاربرد ترکیباتی نظیر شوینده CTAB، PVP، بتامرکاپتواتانول و نمک کلرید سدیم طی فرایند استخراج از عوامل مؤثر در افزایش کیفیت و کمیت DNA استخراج شده است (Zamani *et al.*, 2005). ماده شیمیایی CTAB مثل یک شوینده با مولکول DNA کمپلکس تشکیل داده و آن را از موادی چون کربوهیدارت‌ها و پروتئین‌ها جدا می‌کند (Cheng *et al*., 2003). PVP از طریق پیوندهای هیدروژنی با ترکیبات پلی‌فنلی کمپلکس ایجاد کرده و امکان جداسازی آنها از

DNA را فراهم می کند (Kadkhodaie, 2003). مرکاپتواتانول مثل یک آنتی‌اکسیدان عمل کرده و از اکسیدشدن ترکیبات پلی‌فنلی‌که ممکن است در جداسازی DNA اختلال ایجاد کنند، جلوگیری می‌کند (Bushra *et al.*, 1999، Porebski *et al.*, 1997).افزودن NaCl طی فرایند استخراج DNA باعث اتصال یون Na^+ به ساختار DNA شده به تشکیل کلاف مولکول‌های DNA کمک می‌کند (Zabeti *et al.*, 2014).

به‌نظر می‌رسد استخراج DNA برگ بومادران به روش Costa و Robert (2014)، که یکی از روش‌های تغییر یافته CTAB برای استخراج ماده ژنتیکی از گونه‌های کاسنیان است، احتمالا با خطای اندازه‌گیری غلظت DNA همراه بود و محتوای DNA محاسبه شده بیشتر از مقدار حقیقی DNA تخلیص شده است. هرچند نتایج طیف سنجی نشان داد که محتوای DNA حاصل از نمونه گیاکده‌ای نسبت به دو روش دیگر بالاتر بود، اما همان‌طور که در شکل 1-C نشان داده شده باند DNA مربوط به این عصاره روی ژل آگارز کمرنگ‌تر از روش اول و دارای کشیدگی بود که احتمالا ناشی از وجود ناخالصی-های کربوهیدراتی، ترکیبات فنلی و شکست و خرد شدن DNA است. طی فرایند خشک‌کردن، برخی متابولیت‌ها در بافت‌های گیاهی تغلیظ شده و ممکن است اثرات نامطلوبی بر کیفیت DNA حاصل از نمونه‌های گیاکدهای به‌جا بگذارند. از آنجایی که این ترکیبات می توانند در مراحل متعدد استخراج تداخل ایجاد کرده و طی فرایند زنجیره‌ای پلیمراز باعث مهار واکنش‌ها شوند (Costa & Robert, 2014)، می‌توان اظهار کرد که کیفیت DNA تخلیص‌شده در این روش کمتر از روش Khanuja و همکاران (1999) است. البته از این محلول DNA به عنوان الگو در واکنش‌های زنجیره‌ای پلیمراز برای تکثیر ژن استفاده شد که نتایج نسبتاً خوبی را نیز به همراه داشت (داده-های منتشر نشده). بنابراین این روش علیرغم مزایا و معایبی که دارد می‌تواند در بررسی‌های بیوسیستماتیکی جهت تحلیل نمونه‌های گیاکدهای قدیمی کاربرد داشته باشد.

در پژوهش ما گرچه DNA حاصل از کاربرد کیت مبتنی بر نانوذرات مغناطیسی آهن نیز به لحاظ جداسازی و حذف پروتئین‌ها و RNA دارای کیفیت مناسبی بود، اما محتوای DNA استخراج شده به ازای هر میلی گرم بافت تازه تقریبا نصف شده بود که ممکن است این امر برای آزمایش‌های پیشرفته مقرون به صرفه نباشد. البته می توان با تکرار مراحل استخراج روی باقیمانده عصاره اولیه و همچنین با تغییر حجم بافر نهایی که DNA را در خود حل می کند محتوای DNA را افزایش داد. به‌علاوه آلودگی محلول DNA به ترکیبات فنلی و مواد مزاحم اشکال دیگری است که از ارزش این روش نسبت به روش‌های قبلی می‌کاهد.

نتیجه‌گیری کلی

با توجه به یافته‌های حاصل از این پژوهش می‌توان نتیجه گرفت که بهترین روش استخراج DNA از برگ‌های بومادران، روش Khanuja و همکاران (1999) و استفاده از بافت تازه آن است. در این روش آلودگی به پروتئین و متابولیت‌های ثانوی و پلی-ساکاریدها به حداقل می‌رسد و با توجه به مراحل استخراج بخش زیادی از محتویات RNA بافت‌ها نیز تخریب شده و درصد تخلیص DNA نسبت به دو روش دیگر افزایش می‌یابد. روش سوم استخراج استفاده شده در این پژوهش می‌تواند در بررسی‌های تبارزایشی گونه‌های مختلف بومادران با استفاده از نمونه‌های گیاکده‌ای و قدیمی کاربرد داشته باشد. کاربرد کیت استخراج MAGNAN TM گرچه از نظر کاهش زمان و هزینه استخراج و کاهش آلودگی پروتئین و RNA در محلول نهایی استخراج به صرفه بود اما نیازمند اصلاحاتی برای بهینه‌سازی فرایند تخلیص به منظور افزایش کمیت DNA است.

سپاسگزاری

تمام آزمایش ها در آزمایشگاه فیزیولوژی گیاهی دانشگاه الزهرا انجام شده است. نویسندگان مراتب قدردانی خود را از مسئولان دانشکده علوم زیستی و معاونت محترم پژوهشی دانشگاه الزهرا که با پشتیبانی و تامین اعتبارات و بودجه ما را در انجام این تحقیق یاری نموده اند اعلام می دارند.

REFERENCES

Alaey, M., Nader, R., Khalighi, A., Vezvaeoi, A. and Salami, A.R. 2007. Study on effective components on the quantity and quality of genomic DNA extracted from Iran *cyclamen* species. – Pajouhesh & Sazandegi 73: 11-16.

Asgary, S., Naderi, G.H., Sarrafzadegan, N., Mohammadifard, N., Mostafavi, S. and Vakili, R. 2000. Anthypertensive and antihyperlipidemic effect of *Achillea wilhelmsii*. – Drugs Exp. Clin. Res. 26: 89-93.

Bushra, C., Afshan, Y., Tayyab, H. and Riazuddin, S. 1999. Mini-scale genomic DNA extraction from cotton. – Plant Mol. Biol. Rep. 17: 1-7.

Cheng, Y.J., Guo, W.W., Yi, H.L., Pang, X.M. and Deng, X. 2003. An efficient protocol for genomic DNA extraction from *Citrus* species. – Plant Mol. Biol. Rep. 21: 177-186.

Costa, C.M. and Roberts, R.P. 2014. Techniques for improving the quality and quantity of DNA extracted from herbarium specimens. – Phytoneuron 48: 1-8.

Cota-Sánchez, J.H., Remarchuk, K. and Ubayasena, K. 2006. Ready to use DNA extracted with a CTAB method adapted for herbarium specimens and mucilaginous plant tissue. – Plant Mol. Biol. Rep. 24: 161-167.

Del Serrone, P., Attorri, L. and Palazzino, G. 2007. Easy DNA extraction for rapid detection of *Panax ginseng* C.A. Meyer in commercial ginseng products. – Nat. Prod. Res. 21: 1099-1103.

Dellaporta, S.L., Wood, J. and Hicks, J.B. 1983. A plant DNA minipreparation: Version II. – Plant Mol. Biol. Rep. 4: 19-21.

Desjardins, P. and Conklin, D. 2010. Nano drop microvolume quantitation of nucleic acids. – J. Vis. Exp. 45: 1-4.

Drábková, L.Z. 2014. DNA extraction from herbarium specimens. – Methods Mol. Biol. 1115: 69-84.

Gaudeul M, and Rouhan G. 2013. A plea for modern botanical collections to include DNA-friendly material. – Trends Plant Sci. 18:184-5.

Kadkhodaie, A. 2003. A simple and low cost method for extraction of nucleic acids from plants containing polysaccharides and polyphenols: Optimizing the DNA extraction method in almonds. – Proceedings of the Third Iranian Congress of Biotechnology 417-419.

Khanuja, S.P.S., Shasany, A.K., Darokar, M.P. and Kumar, S. 1999. Rapid isolation of DNA from dry and fresh samples of plants producing large amounts of secondary metabolites and essential oils. – Plant Mol. Biol. Rep. 17: 1-7.

Komatsuda, T., Nakamura, I., Takaiwa, F. and Oka, S. 1998. Rapid, small scale DNA preparation from barley leaves. – Genome 41: 680-685.

Lakshmi, T., Geetha, R.V., Roy, A. and Kumar, S.A. 2011. Yarrow (*Achillea millefolium* LINN.) A herbal medicinal plant with broad therapeutic use – a review. – Int. J. Pharm. Sci. Rev. Res. 9: 136-141.

Lickfeldt, D.W., Hofmann, N.E., Jones, J.D., Hamblin, A.M. and Voigt, T.B. 2002. Comparing three DNA extraction procedures for cost, efficiency, and DNA yield. – Hort. Sci. 37: 822-825.

Murashige, T. and Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. – Physiol. Plant 15: 473-497

Murry, M. and Thompson, W.F. 1984. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. – Nucleic Acid Res. 8: 4321-4325.

Pirttila, A.M., Hirsikorpi, M., Kamarainen, T., Jaakola, L. and Hohtola, A. 2001. DNA isolation methods for medicinal and aromatic plants. – Plant Mol. Biol. Rep. 19: 273a-273f.

Porebski, S.L., Baily, G. and Baum, B.R. 1997. Modification of a CTAB DNA extraction protocol for plants containing high polysaccharide and polyphenol components. – Plant Mol. Biol. Rep. 15: 8-15.

Rahim Malek, M. 2011. Investigating and comparing different methods of DNA extraction in medicinal plants and aromatic plants. – Herbal Remedies 1: 1-5.

Rahnama, H., Sattarzadeh, A., Kazemi, F., Ahmadi, N., Sanjarian, F. and Zand, Z. 2016. Comparative study of three magnetic nano-particles ($FeSO_4$, $FeSO_4/SiO_2$, $FeSO_4/SiO_2/TiO_2$) in plasmid DNA extraction. – Anal. Biochem. 513: 68-76

Sahare, P. and Srinivasu, T. 2012. Method for the isolation of genomic DNA from medicinal plants producing large amount of secondary metabolites. – IJES 1: 37-39.

Sameer, S.A., Ul Rehman S., Banday, M.Z., Syeed, N., Pandit, A.A., Nanda, M.S. and Siddiqi, M.A. 2009. Comparison of the Different Methods of DNA Extraction from Snap-frozen Tumor Tissues: Our Experience. – IJBB 5: 43-50.

Varadarajan, G.S. and Prakash, C.S. 1991. A rapid and efficient method for the extraction of total DNA from the sweet potato and its related species. – Plant Mol. Biol. Rep. 9: 6-12.

Viana, J.P.G., Borges, A.N.C., Lopes, A.C.A., Gomes, R.L.F., Britto, F.B., Lima, P.S.C. and Valente, S.E.S. 2015. Comparison of eight methods of genomic DNA extraction from babassu. – Genet. Mol. Res. 14: 18003-18008.

Zabeti, S.M., Ismaili, A., Madah-Arefi, H., Nazarian-Firouzabadi, F. and Mojiri, F. 2014. Separation of secondary metabolites in DNA extraction process of Thymus and analysis of them by GC mass. – J. Mol. Cell. Res. (Iran J. Biol.) 27: 66-74.

Zamani, Z., Sarkhoush, A., Fatahi Moghadam, M.R. and Ebadi, A. 2005. Comparison of Six Genomic DNA extraction from pomegranate (*Punica granatum* L.). – Iran J. Hort. Sci. Technol. 6: 99-110.

Zhoua, L.G. and Wu, J.U. 2006. Development and application of medicinal plant tissue cultures for production of drugs and herbal medicinals in China. – Nat. Prod. Rep. 2: 789-810.

*****

How to cite this article:

Saboora, A., Amiri Rad, M., Asgarani, E. and Radjabian, T. 2019. Comparison study of three methods for genomic DNA extraction from fresh and herbarium leaf specimens of *Achillea wilhelmsii* C. Koch. – Nova Biol. Reperta 5: 458-465.

صبورا، ع.، امیری راد، م.، عسگرانی، ع. و رجبیان، ط. ۱۳۹۷. بررسی مقایسه‌ای سه روش استخراج DNA ژنومی از نمونه‌های تازه و گیاکده‌ای برگ بومادران کوتاه دشتی. – یافته‌های نوین در علوم زیستی ۵: ۴۶۵-۴۵۸.