(مقالهٔ پژوهشی)

مقایسهٔ کمی و کیفی روش‌های CTAB و SDS برای تخلیص DNA از گیاه دارویی ماریتیغال (*Silybum marianum* L.)

سید امیر حسینی[1*]، مسعود شمس‌بخش[2]، خلیل عالمی سعید[3]، زهره هدایت‌منش[4]، احمد حیدری[5]

۱-دانشجوی دکترای تخصصی نانوبیوتکنولوژی.
۲-دانشیار گروه بیماری های گیاهی.
۳-استادیار گروه بیوتکنولوژی.
۴-دانش‌آموختهٔ کارشناسی ژنتیک.
۵-دانشجوی دکترای تخصصی رشتهٔ اصلاح نباتات- ژنتیک مولکولی.

۱-گروه نانو بیوتکنولوژی، دانشگاه جامع امام حسین (ع).
۲-دانشیار گروه بیماری های گیاهی، دانشگاه تربیت مدرس تهران.
۳-استادیار گروه بیوتکنولوژی دانشگاه رامین خوزستان.
۴-دانش‌آموختهٔ کارشناسی ژنتیک دانشکدهٔ بهزیستی و توانبخشی خوزستان.
۵- دانشجوی دکترای تخصصی رشتهٔ اصلاح نباتات- ژنتیک مولکولی دانشگاه زنجان.

*نویسندهٔ مسؤول:
سید امیر حسینی؛ دانشجوی دکترای تخصصی رشتهٔ نانوبیوتکنولوژی، دانشگاه جامع امام حسین (ع).
تلفن: ۰۰۹۸۹۳۸۵۸۵۵۶۰۰
Email:
s.a.hoseini360@gmail.com

چکیده

زمینه و هدف: معمولاً کیفیت DNA با عوامل مختلفی از جمله: عدم آلودگی ناشی از RNA، پروتئین، لیپید و سایر ساختارهایی که برای آنزیم تک پلیمراز (Taq Polymerase) در واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) و آنزیم-های برشی مزاحم، سنجیده می‌شود. وجود ترکیبات فنلی و ترکیبات ثانویهٔ دیگر، استخراج DNA از بافت برگ گیاه دارویی ماریتیغال (*Silybum marianum* L.) را جهت استفاده در مطالعات ژنتیکی و بیوتکنولوژی مشکل ساخته است.

روش بررسی: در این مطالعه دو روش استخراج DNA جهت استخراج از بافت برگ ۱۱ تودهٔ ماریتیغال مورد مقایسه قرار گرفت. روش نخست بر اساس روش SDS انجام شد و در روش دوم از دستورالعمل CTAB با انجام تغییراتی استفاده گردید. کمیت DNA استخراج شده با تعیین میزان جذب هر یک از نمونه‌ها در طول موج‌های۲۶۰ و ۲۸۰ نانومتر به‌وسیلهٔ دستگاه اسپکتروفتومتر مشخص گردید. در این پژوهش کیفیت DNA از نظر وجود شکستگی و مقدار RNA استخراج شده به‌وسیلهٔ الکتروفورز با ژل آگارز ارزیابی شد.

یافته‌ها: در میان روش‌های به‌کار گرفته شده جهت استخراج DNA از بافت برگ جمعیت‌های ماریتیغال، روش CTAB از نظر کمیت و کیفیت DNA استخراج شده کارآیی پایینی داشت، در حالی‌که روش SDS کارآیی مناسبی از نظر کمیت، کیفیت و خلوص DNA استخراج شده نشان داد.

نتیجه‌گیری: از آنجایی‌که نسبت A۲۶۰/A۲۸۰ بیش از ۲ نشان‌دهنده وجود RNA و تخریب زیاد DNA و نسبت کمتر از ۱/۸ نشان‌دهندهٔ وجود آلودگی پروتئینی در DNA است، باید گفت که در مطالعات ژنتیکی و کارهای مهندسی ژنتیک روشی برای تخلیص DNA مناسب‌تر است که DNA با کیفیت و کمیت بالاتری تولید کند. بسیاری از مطالعات انجام گرفته نشان می‌دهد که در گیاهان دارویی و گیاهانی که حاوی مواد پلی‌فنلی و پلی‌ساکارید بالایی هستند به‌کارگیری روش تخلیص CTAB و روش‌هایی که از نظر تکنیکی نزدیک به این روش هستند کارایی مناسب‌تری نشان می‌دهند. CTAB به عنوان یک ماده شوینده می‌تواند با DNA تشکیل کمپلکس دهد و آن را از کربوهیدرات‌ها و پروتئین‌ها جدا نماید. پلی‌ساکاریدهای باقیمانده نیز به-وسیلهٔ NaCl غلیظ حذف می‌گردند.

کلید واژگان: استخراج DNA، روش CTAB، روش SDS، گیاه دارویی ماریتیغال (*Silybum marianum* L.)، PCR.

دریافت مقاله: ۱۳۹۴/۱۱/۱۲ **دریافت مقالهٔ اصلاح‌شده: ۱۳۹۵/۳/۸** **اعلام قبولی: ۱۳۹۵/۴/۶**

مقدمه

در سال‌های اخیر با پیشرفت رشتهٔ ژنتیک، در اکثر آزمایشگاه‌های معتبر دنیا آزمایش‌هایی برای جدا کردن بخش ویژه‌ای از DNAی ژنوم ارگانیسم جهت پی بردن به توالی و عملکرد آن، انجام می‌شود (۳).

استخراج DNA یکی از مراحل مهم در روش‌های اندازه‌گیری مولکولی بوده و نقش مهمی در سیستم‌های مبتنی بر ژل ایفا می‌کند (۶). روش‌های مختلفی جهت استخراج و خالص‌سازی DNA ارائه شده است و هر کدام از این روش‌ها بسته به بافت و ترکیبات مورد استفاده با یکدیگر تفاوت دارند.

نخستین گام در بررسی‌های مولکولی (مطالعات ژنتیکی، بیوتکنولوژی و غیره) استخراج اسیدهای نوکلئیک با کیفیت مطلوب می‌باشد. با توجه به حجم آزمایش‌ها، میزان زیاد نمونه‌های مورد بررسی و محدودیت‌های استخراج DNA از قبیل ترکیب و pH بافر استخراج و همچنین ترکیبات متابولیک موجود در نمونه‌ها باعث شده که علی‌رغم دستورالعمل‌های کارآمد استخراج DNA، محققان زمان زیادی را در آزمایشگاه‌های زیستی صرف بهینه‌سازی روش‌های استخراج DNA نمایند (۱۱).

مشکلاتی که در جداسازی و خالص‌سازی DNA با وزن مولکولی بالا از گونه‌های دارویی و معطر با آن‌ها مواجه می‌شویم را در دو گروه می‌توان دسته‌بندی کرد: ۱) کاهش میزان DNA به علت وجود آنزیم‌های اندونوکلئاز، و نیز تخلیص‌شدن همزمان پلی‌ساکاریدهای با ویسکوزیتهٔ بالا در هنگام جداسازی، و ۲) وجود ممانعت‌کننده‌های مرکب از قبیل پلی‌فنول‌ها و متابولیت‌های ثانویه دیگر که به‌طور مستقیم یا غیر مستقیم در واکنش‌های آنزیمی ایجاد مزاحمت می‌کنند (۱۸). استخراج DNA از برخی گیاهان که علاوه بر ترکیبات پلی‌ساکاریدی زیاد، حاوی متابولیت‌های ثانویه فراوان مانند پلی‌فنل‌ها تانن‌ها هستند از گذشته با مشکلاتی همراه بوده است (۵). پلی‌فنول‌ها که اکسید کننده‌های بسیار قوی هستند، مقدار DNA استخراج شده و خلوص آن را کاهش می‌دهند (۱۲ و ۱۵) و پلی‌ساکاریدها که در DNA استخراج شده، به واسطهٔ ویسکوزیتهٔ بالایی که دارند، ترکیب چسبنده‌ای را به‌وجود می‌آورند و DNA را به شکلی در می‌آورند که قابلیت کشیده شدن با سمپلر را نداشته باشد (۹).

برای حذف پلی‌ساکاریدها می‌توان از غلظت بالای نمک و برای حذف پلی‌فنول‌ها از PVP (Poly Vinyl Pyrrolidone) استفاده کرد (۱۵).

تفاوت شیمیایی بین گونه‌های گیاهی ممکن است استخراج DNA مناسب را با یک پروتکل مشترک غیر ممکن سازد، و بنابراین حتی گونه‌های با ارتباط خیلی نزدیک به هم، برای استخراج DNA به پروتکل متفاوتی نیاز خواهند داشت (۱۷).

اعلائی و همکاران (۱) در مطالعه‌ای که بر گونه‌های سیکلامن ایرانی (*Cyclamen persicum*) انجام دادند به این نتیجه رسیدند که در بین چهار روش مختلف تخلیص DNA، روش Murry & Thompson که در آن از مواد بتامرکاپتواتانول و PVP و CTAB استفاده شده است بیشترین و با کیفیت‌ترین DNA استحصال شده است. زمانی و همکاران (۲) شش روش مختلف؛ ورابی و همکاران، دلاپورتا و همکاران، زیگن هاگن و همکاران، دویل و دویل، لودهی و همکاران و موری و تامپسون را برای استحصال DNA از برگ جوان و بالغ انار به‌کار گرفتند. نتایج این تحقیق نشان می‌دهد که بهترین کیفیت DNA تخلیص شده از برگ‌های جوان متعلق به روش موری و تامپسون (روش بسیار شبیه به روش CTAB) می‌باشد با آنکه از نظر کمیت روش بسیار خوبی ارزیابی نگردید. همچنین نتایج این پژوهش نشان داد که روش ورابی و همکاران هم در برگ‌های بالغ و هم در برگ‌های جوان DNA بیشتری را فراهم می‌کند.

اصول کلی استخراج DNA شامل چهار مرحله است (۱۴):

۱. شکستن سلول برای از بین بردن غشای سلولی و دیوارهٔ هسته با استفاده از شوک اسمزی و دترجنت‌ها مانند تریتون (Triton) و یا با استفاده از تریس (Tris) و EDTA صورت می‌گیرد (البته تریس برای ثابت نگه داشتن pH استفاده می‌شود).

۲. هضم پروتئین‌ها با استفاده از دترجنت‌های یونی، مانند سدیم دودسیل سولفات (SDS)، که سبب تخریب پروتئین‌های سلولی و پروتئین‌های متصل شونده به DNA می‌شود.

۳. ترسیب پروتئین‌ها، که جهت رسوب آن‌ها از فنل و کلروفرم استفاده می‌شود.

۴. ترسیب DNA، که معمولاً با استفاده از اتانول مطلق سرد انجام می‌شود.

امروز با پیشرفت روز افزون ژنتیک و بیوتکنولوژی بهبود فنون قبلی در مطالعات و پژهش‌های این رشته‌ها بیش از پیش اهمیت پیدا کرده است. تخلیص و استحصال DNA با کیفیت یکی از اولین ملزومات همسانه‌سازی و ایجاد کتابخانهٔ ژنومی به شمار می‌رود. با توجه به اهمیت گیاه مارتیغال در مطالعات دارویی و متابولیت‌های فارماکولوژیک، محققان در صدد هستند با استفاده از تکنولوژی‌های جدید علاوه بر مطالعات پایه‌ای در این گیاه به اعمال فنون و تکنیک‌های جدید نیز بپردازند. در این پژوهش سعی شده یک روش کارا از نظر کمی و کیفی جهت خالص‌سازی DNA از برگ گیاه دارویی ماریتیغال با در نظر گرفتن محدودیت‌های موجود ارائه شود.

روش بررسی

در این مطالعه از ۱۱ تودهٔ گیاه دارویی ماریتیغال که مربوط به مناطق مختلف داخل و خارج از کشور، شامل: اصفهان (A)، شوشتر (B)، مجارستان (C)، عرب اسد (D)، نجف‌آباد (E)، مبارکه (F)، اهواز (G)، ملاثانی (H)، بابل (I)، ساری (J) و آمل (K) بوده است و از شرکت پاکان بذر اصفهان، مؤسسهٔ جنگل‌ها و مراتع تهران، پژوهشکدهٔ گیاهان دارویی جهاد دانشگاهی تهران و مزارع استان خوزستان تهیه شده‌اند، استفاده شد.

استخراج DNA: جهت استخراج DNA، بذر تهیه شده از توده‌های مختلف، به‌طور جداگانه در گل‌خانه کشت شدند. و پس از رشد گیاهچه‌ها تا مرحلهٔ ۵-۳ برگی، از درون هر توده تعداد ۶-۵ بوته به طور تصادفی انتخاب و جهت استخراج DNA به محل آزمایشگاه منتقل شدند. عملیات استخراج پس از شست‌وشوی نمونه‌ها با آب مقطر برای هر نمونه با دو روش CTAB و SDS انجام گرفت.

الف) استخراج DNA با روش CTAB اصلاح شده (۱۵ و ۱۶):

۱. توزین ۰/۲ گرم نمونه برگی تازه (بدون رگ‌برگ و دم‌برگ)،

۲. خرد کردن نمونهٔ منجمد شده با ازت مایع در هاون چینی که از قبل اتوکلاو و سرد شده بود،

۳. انتقال پودر نمونه‌ها به میکروتیوب‌های دو میلی‌لیتری و اضافه کردن ۶۰۰ میکرولیتر از بافر استخراج (جدول۱) به آن‌ها،

۴. اضافه کردن ۲-۱ میکرولیتر بتامرکاپتواتانول به هر لوله و قرار دادن نمونه‌ها به مدت ۶۰ دقیقه در دمای ۶۵ درجهٔ سانتی‌گراد (حمام آب) که در این مدت نمونه‌ها هر ۵ دقیقه سر و ته شدند،

۵. خارج کردن میکروتیوب‌ها از حمام آب و خنک کردن آنها در دمای اتاق،

۶. اضافه کردن معادل حجم آن (۷۰۰ میکرو لیتر) کلروفرم- ایزوآمیل الکل (به نسبت ۲۴ به ۱) و مخلوط کردن آرام آن و سانتریفیوژ به مدت ۱۰ دقیقه در ۱۰۰۰۰rpm و دمای ۴ درجهٔ سانتی‌گراد، (بسته به درجهٔ شفافیت مایع رویی ممکن است این عمل چندین مرتبه تکرار شود)،

۷. انتقال مایع رویی به میکروتیوب‌های جدید و اضافه کردن به اندازهٔ دو برابر حجم به آنها اتانول ۹۵ درصد سرد (۲۰- درجه) و به آرامی سر و ته کردن آنها تا زمانی که کلاف DNA ظاهر شود، قرار دادن لوله‌ها به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق تا DNA به صورت غیر محلول درآید،

۸. سانتریفیوژ نمونه‌ها به مدت ۵ دقیقه در ۱۰۰۰۰rpm و دور ریختن فاز محلول آن‌ها، پلت حاصل با اتانول ٪۷۰ سه بار شست‌وشو گردید،

۹. خشک کردن تودهٔ سفید DNA رسوب کرده در ته لوله‌ها به مدت ۱۵ دقیقه در هوای آزاد، سپس اضافه کردن ۲۰۰-۱۰۰ میکرولیتر TE به آن و نگهداری در دمای ۴ درجهٔ سانتی‌گراد در یخچال،

ب) استخراج DNA با روش SDS (۱۳):

۱. ابتدا ۰/۲ گرم برگ (بدون رگ‌برگ و دم‌برگ) را به‌وسیلهٔ ازت مایع و با هاون چینی سرد پودر کرده و به میکروتیوب ۱/۵ میکرولیتری منتقل می‌کنیم.

۲. به میزان ۵۰۰-۴۰۰ سی‌سی از بافر استخراج (100 mM Tris-HCl, 20 mM EDTA, 1.4 M NaCl, 2% SDS) به آن اضافه می‌نماییم.

۳. پس از آن ٪۱ β-Mercapto Ethanol به میزان ۲-۱ میکرولیتر به نمونه‌ها اضافه می‌کنیم.

۴. در ادامه نمونه‌ها را در حمام آب به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۶۵ درجهٔ سانتی‌گراد قرار می‌دهیم و هر ۵ دقیقه به آرامی سر و ته می‌کنیم.

۵. بعد از بیرون آوردن نمونه‌ها از حمام آب، در دمای اتاق به مدت ۱۰-۵ دقیقه خنک می‌کنیم.

۶. به میزان ۳۰۰ میکرولیتر استات پتاسیم ۵ M فوق‌العاده سرد به نمونه‌ها اضافه می‌کنیم.

۷. حدود ۶۰۰-۵۰۰ میکرولیتر کلروفورم-ایزوآمیل الکل (۲۴:۱) سرد به نمونه‌ها اضافه می‌کنیم و به آرامی تکان می‌دهیم.

۸. به مدت ۱۵ دقیقه نمونه‌ها با ۵۰۰۰ rpm سانتریفیوژ می‌کنیم.

۹. فاز مایع بالایی را با سمپلر کشیده و به میکروتیوب‌های جدید منتقل می‌کنیم.

۱۰. بسته به درجهٔ شفافیت مایع بالایی، مرحلهٔ ۵ تا ۷ را تکرار می‌کنیم.

۱۱. حدود ۳۰۰ میکرولیتر استات آمونیوم ۰/۰۱ M همراه با ۶۰۰ میکرولیتر ایزوپروپانول سرد به نمونه‌ها اضافه می‌کنیم.

۱۲. مجدداً مرحلهٔ ۶ تکرار می‌شود.

۱۳. رسوب ته میکروتیوب‌ها را با الکل ۷۵-۷۰ درصد شست‌وشو می‌دهیم.

۱۴. رسوب را به مدت ۱۵ دقیقه در هوای اتاق خشک می‌کنیم و بعد بسته به میزان غلظت DNA ۲۰۰-۱۰۰ میکرولیتر به آن آب مقطر یا TE اضافه می‌کنیم.

پس از استخراج، کمیت و کیفیت DNA تخلیص شده از نمونه‌های مختلف و روش‌های مختلف تخلیص، با استفاده از اسپکتروفتومتر در طول موج‌های ۲۶۰ و ۲۸۰ نانومتر اندازه‌گیری و از نسبت A۲۶۰/A۲۸۰ به عنوان شاخص کیفیت و از فرمول زیر (۱۰) برای اندازه‌گیری غلظت (کمیت) DNA ی مورد بررسی، استفاده شد:

غلظت DNA (ng/µl) = A۲۸۰ × ۵۰ × ضریب رقت

همچنین برای اطمینان از نتایج حاصله، کمیت و کیفیت DNA استخراجی روی ژل آگارز ٪۱ بررسی شد (شکل ۱). در نهایت با استفاده از DNA های استخراج شده و یک جفت آغازگر عمومی، واکنش PCR انجام شد، و نتیجهٔ آن روی ژل اکریل‌آمید تفکیک شد تا بهینه بودن کمیت و کیفیت DNA استخراجی برای واکنش PCR بررسی شود.

یافته‌ها

تجزیهٔ واریانس کمیت نمونه‌های تخلیص شده مشخص کرد که روش تخلیص، توده‌ها و اثر متقابل آنها بسیار معنادار می‌باشد و همچنین نشان داد که روش تخلیص، توده‌ها و اثر متقابل آنها بر کیفیت DNA تخلیص‌شده تأثیر داشتند (جدول ۲). پس از مقایسهٔ

میانگین‌ها برای کمیت به روش LSD مشاهده شد که تودهٔ ۱ با توده‌های ۳، ۶، ۷و ۸ از نظر غلظت تفاوت معناداری داشت. و توده‌های ۳، ۷ و ۸ با توده‌های ۵ و ۹ تفاوت داشتند (جدول ۳). همچنین مقایسهٔ میانگین‌ها با روش مذکور برای کیفیت (جدول ۴) نشان داد که تودهٔ ۱ با توده‌های ۴، ۵، ۹ و ۱۰، تودهٔ ۵ با توده‌های ۲، ۳، ۷ و۸ ، تودهٔ ۸ با توده‌های ۴، ۶، ۱۰ و ۱۱ و تودهٔ ۹ با توده‌های ۲، ۳، ۶، ۷، ۸ و ۱۱ تفاوت معناداری داشتند.

با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر میزان جذب محلول‌های رقیق‌شده DNA در طول موج‌های ۲۶۰ نانومتر (طول‌موج جذب اسیدهای نوکلئیک) و ۲۸۰ نانومتر (طول‌موج جذب پروتئین) اندازه‌گیری و نسبت جذب نوری محلول‌های در طول‌موج ۲۶۰ به ۲۸۰ نانومتر به دست آمد.

جدول ۱: بافر استخراج CTAB

۱۰۰ cc	غلظت استوک	مادهٔ شیمیایی	اتوکلاو
۵ cc	۲ M	Tris-Hcl pH=8.0	بله
۴ cc	۰/۵ M	EDTA	بله
۴۰ cc	۵ M	NaCl	بله
۳ g	۲٪ w/v	CTAB	خیر
۱۰۰ µl	۰/۲٪ w/v	β-mercaptoethanol	خیر
۲/۵ g	۳٪ w/v	PVP	خیر

در نهایت حجم بافر را با آب مقطر دوبار تقطیر استریل به ۱۰۰ سی‌سی می‌رسانیم.

جدول ۲: تجزیهٔ واریانس برای تعیین کمیت و کیفیت DNA (بر اساس غلظت)

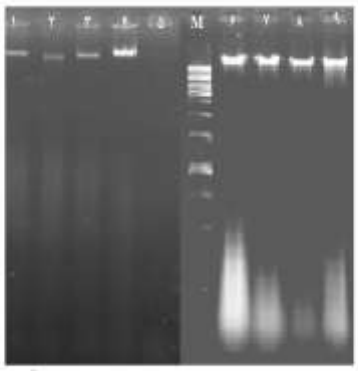
منابع	کمیت		کیفیت	
	درجهٔ آزادی	میانگین مربعات	درجهٔ آزادی	میانگین مربعات
روش	۱	۲۳۹۹۸۰۳/۸۴**	۱	۱/۱۰۴**
توده	۱۰	۴۹۴۲۹۹/۵*	۱۰	۰/۰۴۳**
روش × توده	۱۰	۵۷۰۴۵۱/۹۷*	۱۰	۰/۰۳۷**
خطا	۱۰۴	۲۴۸۴۶۹/۳۲۷	۱۰۵	۰/۰۱۴
کل	۱۲۵		۱۲۶	
CV	۰/۰۱۰۴٪		۷/۷۱۸۵٪	

جدول ۳: مقایسهٔ میانگین‌ها به روش LSD برای کمیت

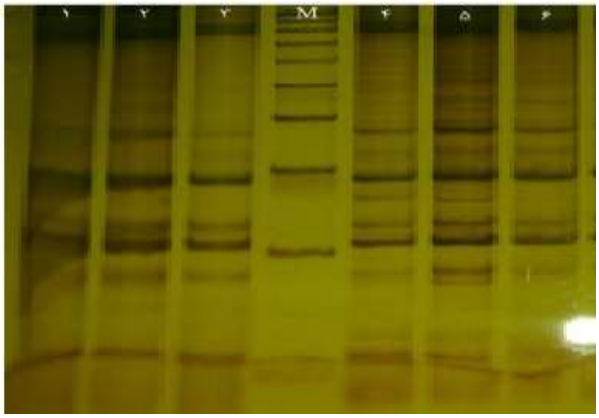
تفاوت میانگین بین دو توده	توده‌ها	تفاوت میانگین بین دو توده	توده‌ها	تفاوت میانگین بین دو توده	توده‌ها	تفاوت میانگین بین دو توده	توده‌ها
-۰/۰۳۲۶۵۰	۷،۸	-۰/۱۱۵۱۶۴	۴،۸	-۰/۰۶۸۱۷۰	۲،۸	۰/۰۵۵۱۷۵	۱،۲
۰/۱۶۴۶۱۱*	۷،۹	۰/۰۸۲۰۹۲	۴،۹	۰/۱۲۹۰۸۳*	۲،۹	۰/۰۴۱۵۴۲	۱،۳
۰/۰۸۷۹۵۵	۷،۱۰	۰/۰۰۵۴۳۶	۴،۱۰	۰/۰۵۲۴۲۷	۲،۱۰	۰/۱۰۲۱۶۷*	۱،۴
۰/۰۶۷۰۰۰	۷،۱۱	-۰/۰۱۵۵۲۰	۴،۱۱	۰/۰۳۱۴۷۳	۲،۱۱	۰/۱۵۴۷۱۷*	۱،۵
۰/۱۹۷۲۵۶*	۸،۹	-۰/۰۶۸۰۰۰	۵،۶	۰/۰۶۰۶۲۵	۳،۴	۰/۰۸۶۷۲۰	۱،۶
-۰/۱۲۰۶۰۰*	۸،۱۰	۰/۱۳۵۰۶۹*	۵،۷	۰/۱۱۳۱۷۵*	۳،۵	۰/۰۱۹۶۴۸	۱،۷
۰/۰۹۹۶۴۵*	۸،۱۱	-۰/۱۶۷۷۱۴*	۵،۸	۰/۰۴۵۱۷۹	۳،۶	۰/۰۱۳۰۰۰	۱،۸
-۰/۰۷۶۶۶۰	۹،۱۰	۰/۰۲۹۵۴۲	۵،۹	-۰/۰۲۱۸۹۰	۳،۷	۰/۱۸۴۲۵۸*	۱،۹
-۰/۰۹۷۶۱۱*	۹،۱۱	-۰/۰۴۷۱۱۰	۵،۱۰	-۰/۰۵۴۵۴۰	۳،۸	۰/۱۰۷۶۰۲*	۱،۱۰
-۰/۰۲۰۹۶۰	۱۰،۱۱	-۰/۰۶۸۰۷۰	۵،۱۱	۰/۱۴۲۷۱۷*	۳،۹	۰/۰۸۶۶۴۸	۱،۱۱
–	–	-۰/۰۶۷۰۷۰	۶،۷	۰/۰۶۶۰۶۱	۳،۱۰	-۰/۰۱۳۶۳۰	۲،۳
–	–	-۰/۰۹۹۷۱۸*	۶،۸	۰/۰۴۵۱۰۶	۳،۱۱	۰/۰۴۶۹۹۲	۲،۴
–	–	۰/۰۹۷۵۳۸*	۶،۹	۰/۰۵۲۵۵۰	۴،۵	۰/۰۹۹۵۴۲*	۲،۵
–	–	۰/۰۲۰۸۸۲	۶،۱۰	-۰/۰۱۵۴۵۰	۴،۶	۰/۰۳۱۵۴۵	۲،۶
–	–	-۰/۰۰۰۰۷۳*	۶،۱۱	-۰/۰۸۲۵۲۰	۴،۷	-۰/۰۳۵۵۳۰	۲،۷

جدول۴: مقایسهٔ میانگین‌ها به روش LSD برای کیفیت

تفاوت میانگین بین دو توده	توده‌ها	تفاوت میانگین بین دو توده	توده‌ها	تفاوت میانگین بین دو توده	توده‌ها	تفاوت میانگین بین دو توده	توده‌ها
۲۹۸/۶۳۱۴	۶،۹	-۱۹۴/۰۷۱	۴،۶	-۳۵۸/۰۸	۲،۷	-۲۶۸/۴۷۱۹	۱،۲
۹۶/۹۹۴۱	۶،۱۰	-۳۹۳/۶۷۶	۴،۷	-۳۷۰/۵۲۸	۲،۸	-۵۴۱/۳۱۶۳*	۱،۳
-۱۷۹/۵۵۵	۶،۱۱	-۴۰۶/۱۲۴	۴،۸	۱۴۰/۱۵۶۳	۲،۹	-۲۳۲/۸۷۵۹	۱،۴
-۱۲/۴۴۸	۷،۸	۱۰۴/۵۶۰۳	۴،۹	-۶۱/۴۸۱۱	۲،۹	-۷۸/۴۵۹۴	۱،۵
۴۹۸/۲۳۶۱*	۷،۹	-۹۷/۰۷۷	۴،۱۰	-۲۱/۰۷۹۸	۲،۱۱	-۴۲۶/۹۴۷۱*	۱،۶
۲۹۶/۵۹۸۷	۷،۱۰	-۱۴/۵۱۱۶	۴،۱۱	۳۰۸/۴۴۰۳	۳،۴	-۶۲۶/۵۵۱۷*	۱،۷
۳۷۹/۱۵۹۷	۷،۱۱	۳۴۸/۴۸۸	۵،۶	۴۶۲/۸۵۶۹*	۳،۵	-۶۳۸/۹۹۹۷	۱،۸
۵۱۰/۶۸۴۱*	۸،۹	-۵۴۸/۰۹۲۴	۵،۷	۱۱۴/۳۶۹۲	۳،۶	-۱۲۸/۳۱۵۶	۱،۹
۳۰۹/۰۴۶۷	۸،۱۰	-۵۶۰/۵۴۰۳*	۵،۸	-۸۵/۲۳۵۵	۳،۷	-۳۲۹/۹۵۳	۱،۱۰
۳۹۱/۶۰۷۶	۸،۱۱	۴۹/۸۵۶۲	۵،۹	-۹۷/۶۸۳۴	۳،۸	-۲۴۷/۳۹۲۱	۱،۱۱
-۲۰۱/۶۳۷	۹،۱۰	-۲۵۱/۴۹۴	۵،۱۰	۴۱۳/۰۰۰۶*	۳،۹	-۲۷۲/۸۴۴۴	۲،۳
-۱۱۹/۰۷۶	۹،۱۱	-۱۶۸/۹۳۳	۵،۱۱	-۲۱۱/۳۶۳۳	۳،۱۰	۳۵/۵۹۹	۲،۴
۸۲/۵۶۰۹	۱۰،۱۱	-۱۹۹/۶۰۵	۶،۷	۲۹۳/۹۲۴۲	۳،۱۱	-۱۹۰/۰۱۲۵	۲،۵
-	-	-۲۱۲/۰۵۳	۶،۸	۱۵۴/۴۱۶۶	۴/۵	-۱۵۸/۴۷۵۲	۶،۲



شکل ۱: تفکیک باندهای حاصل از DNA استخراجی (چاهک‌های ۵-۱ با روش CTAB و چاهک‌های ۹-۶ با روش SDS) روی ژل آگارز ۱٪. M: خط کش مولکولی (۱Kb)



شکل ۲: تفکیک باندهای حاصل از واکنش زنجیره‌ای پلیمراز با استفاده از DNA تخلیص شده (چاهک‌های ۳-۱ از روش CTABو چاهک‌های ۶-۴ از روش SDS) روی ژل اکریل آمید ۸٪ برده شد. M: خط کش مولکولی (۵۰bp)

بحث

از آنجایی که نسبت A۲۶۰/A۲۸۰ بیش از ۲ نشان‌دهندهٔ وجود RNA و تخریب زیاد DNA و نسبت کمتر از ۱/۸ نشان‌دهندهٔ وجود آلودگی پروتئینی در DNA است، باید گفت که در مطالعات ژنتیکی و کارهای مهندسی ژنتیک روشی برای تخلیص DNA مناسب‌تر است که DNA با کیفیت و کمیت بالاتری تولید کند. پوربسکی و همکاران (۱۵) روش CTAB را برای استخراج DNA از گیاهانی که دارای سطوح بالایی از ترکیبات پلی‌فنلی و پلی‌ساکاریدی هستند، معرفی کردند. همچنین سومان و همکاران (۱۷) روش CTAB را برای جداسازی سریع و ارزان قیمت DNA از نمونه‌های تازه و خشک گیاهان تولید کنندهٔ مقادیر بالای ترکیبات ثانویه معرفی کردند.

شکرپور و همکاران (۱۶) روش CTAB را برای استخراج DNA از گیاه دارویی ماریتیغال به عنوان روشی مناسب معرفی کردند. در این تحقیق طبق داده‌های حاصل از مقایسهٔ دو روش استخراج SDS و CTAB برای گیاه دارویی ماریتیغال (شکل ۲)، روش CTAB به عنوان روشی مناسب‌تر و کاراتر معرفی می‌گردد. با مقایسهٔ ضخامت باندهای به‌دست آمده با باندهای استاندارد، غلظت نمونه‌ها برآورد گردید. مشاهدات ژل به‌دست آمده از بارگذاری حجم‌های مساوی از DNA تخلیص‌شده نتایج اسپکتروفتومتر را تأیید می‌کند. مشاهده گردید که

DNA استحصال شده به روش CTAB تغییر یافته بیشترین ضخامت نوار را نشان داد (شکل ۲). اعلائی و همکاران (۱) بیان داشتند که کمیت و کیفیت DNA تخلیص شده به روش استخراج و نوع برگ از لحاظ سن فیزیولوژیک برگ بستگی دارد.

نتایج تحقیقات مختلف بر روی انواع گیاهان نشان می‌دهد که روش موری و تامپسون از کارایی بالایی برخوردار است (۱). روش موری و تامپسون شبیه به روش CTAB تغییر یافته است که در آن مادهٔ PVP با تشکیل پیوندهای هیدروژنی با فنل‌ها می‌تواند باعث جداسازی آنها از DNA گردد (۴). CTAB به عنوان یک مادهٔ شوینده می‌تواند با DNA تشکیل کمپلکس دهد و آن را از کربوهیدرات‌ها و پروتئین‌ها جدا نماید. پلی-ساکاریدهای باقیمانده نیز به‌وسیلهٔ NaCl غلیظ حذف می‌گردند (۸). بتا مرکاپتواتانول نیز به عنوان یک آنتی-اکسیدان عمل می‌نماید و از اکسید شدن فنل‌ها جلوگیری می‌کند (۷ و ۱۵). عوامل یاد شده باعث می‌گردد که کمیت و مخصوصاً کیفیت DNA تخلیص شده مناسب-تر باشد.

منابع

1-Aelayie, M, Naderi, R, Khalighi, A, Vazvayie, A, Salami, SG 2008, Study on effective components on the quantity and quality of genomic DNA extracted from Iran cyclamen, Pajouhesh Va Sazandgi journal, Vol.73, No.3, Pp.11-16.

2-Zamani, T, Sarkhosh, A, Fatahi Moghadam, MR, Ebadi, A 2007, Comparison of six genomic DNA extraction methods from Pomegranate (Punica granatum L.), Olom va Fonoon Baghebani Iran, Vol.6, No.2, Pp.99-110.

3-Shakibayie, MR 2005, Biotechnology and recombinant DNA, Moasesye Kerman Taksir, Kerman.

4-Kadkhodayie, S 2005, Simple and low-cost method for the isolation of nucleic acids from plants containing high polysaccharides and polyphenols: optimization of DNA extraction method in Almond, Third biotechnology congress of Iran, Pp.417-419.

5-Ahmad, R, Ferguson, L, Southwick, S 2003, Identification of pistachio (Pistacia vera L.) nuts with microsatellite markers. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, Vol.128, Pp.898-903.

6-Ahmadikhah, A 2009, A rapid mini-prep DNA extraction method in rice (*Oryza sativa* L.), *African Journal of Biotechnology*, Vol.8, No.2, Pp.323-327.

7-Bushra, C, Afshan, Y, Tayyab, H, Riazuddin, S 1999, Mini-scale genomic DNA extraction from cotton. *Plant Mol. Bio. Rep.*, Vol.17, Pp.1-7.

8-Cheng, YJ, Guo, WW, Yi, HL, Pang, XM, Deng, X 2003, An efficient protocol for genomic DNA extraction from Citrus species. *Plant Mol. Bio. Rep.*, Vol.21, Pp.177-177.

9-Fang, G, Hammar, S, Grumet, R 1992, A quick and inexpensive method for removing poly saccharides from plant genomic DNA, *Biotechniques*, Vol.13, No.1, Pp.52-54.

10-Green, RL, Roinestad, IC, Boland, C, Hennessy, LK 2005, Developmental validation of the quantifiler real-time PCR kits for the quantification of human nuclear DNA samples, *J. Forensic Sci.*, Vol.50, No.4, Pp.1-17.

11-Lodhi, MA, Ye, GN, Weeden, NF, Reisch, BI 1998, A simple and efficient method DNA extraction from grapevine cultivars and vitis species, *Plant Mol. Bio.Rep.*,Vol.12, No.1, Pp.6-13.

12-Loomis, MD 1974, Overcoming problems of phenolics and quinones in the isolation of plant enzymes and organelles. *Methods Enzymol*, Vol.31, Pp.528-544.

13-McCouch, SR 2002, A Brief Introduction to Rice DNA Technology, (http://www.ricelab.plbr.cornell.edu).

14-Poljak, M, Barlic, J, Seme, K, Avsic-Zupanc, T, Zore, A 1995, Isolation of DNA from archival Papanicolaou stained cytological smears using a simple salting-out procedure, J. Clin. Pathol., Vol.48, No.1, Pp.55-56.

15-Porebski, S, Bailey, LG, Baum, BR 1997, Modification of a CTAB DNA extraction protocol for plants containing high polysaccharide and polyphenol components. *Plant Mol. Biol. Reptr.*, Vol.15, NO.1, Pp.8-15.

16-Shokrpour, M, Mohammadi, SA, Moghaddam, M, Ziai, SA, Javanshir, A 2008, Variation in flavonolignan concentration of milk thistle (Silybum marianum) fruits grown in Iran, journal of herb, species & medicinal plants, Vol.13, No.4, Pp.55-69.

17-Suman, PS, Khanuja, Ajit, K, Shasany, MP, Darokar, S, 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. Reptr.*, Vol.17, No.1, Pp.1-7.

18-Weishing, K, Nybom, H, Wolff, K, Meyer, W 1995, DNA isolation and purification. In: DNA fingerprinting in plants and fungi, Pp.44-59. CRC Press, Boca Raton, Florida.

Quantitative and Qualitative Comparison of CTAB and SDS Method for DNA Extraction from the Herb Milk Thistle (*Silybum marianum* L.)

Seyed Amir Hoseini[1*], Masoud Shams Bakhsh[2], Khalil Alami Saeed[3], Zohre Hedayat Manesh[4], Ahmad Heidari[5]

1-Ph.D. of Nanobiotechnology, 2-Associated Professor Plant Pathology.
3-Associated Professor Biotechnology.
4-Bs of Genetic.
5-Ph.D. oF Plant Breedin.

1-Department of Nanobiotechnology, Emam Hossein University, Tehran, Iran.
2-Department of Plant Pathology, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran.
3-Department of Biotechnology, Ramin University of Khuzestan, Molasani, Iran.
4-Department of Genetic, Faculity of Welfare and Rehabilitation, Khuzestan.
5-Department of Plant Breedin at Zanjan University, Znjan, Iran.

**Corresponding author:*
Seyed Amir Hoseini; Department of Nanobiotechnology, Emam Hossein University, Tehran, Iran.
Tel:+989385855600
Email: s.a.hoseini360@gmail.com

Abstract

Background and Objective: Quality of DNA is usually determined by multiple factors such as pollution especially caused by RNA, protein, lipid and other structures that inhibit Taq polymerase enzyme in polymerase chain reaction (PCR) and inhibit the cutting enzymes. The existence of phenolic compounds and other secondary metabolites has many effects on the quantity and quality of the purified DNA. At this investigation, in terms of quality and quantity with an efficient method for purification of DNA from *S. marianum* L. plant leaves, taking into account existing limitations to be provided.

Subjects and Methods: In this study quantitative and qualitative comparison between two DNA extraction methods namely sodium dodecyl sulfate (SDS) and a modified cetyl trimethylammonium bromide (CTAB), were undertaken. The quantity of extracted DNA was determined by measurement of the absorption rate in wavelengths of 260 and 280 nm and their ratios by spectrophotometer. For investigate DNA quality the existence of RNA fracture was evaluated by agarose gel.

Results: In terms of quantity and quality, for DNA extraction from *S. marianum* Populations, CTAB method had low performance While, SDS method showed appropriate performance in terms of quantity, quality and purity of extracted DNA.

Conclusion: ANOVA of samples revealed that the purification method, races and their interaction is very significant and showed that the purification of the races and their interaction had an impact on the quality of purified DNA. The 280A/260A ratio that is more than 2 indicates the presence of RNA and DNA degradation. Also if this ratio is less than 1.8 Indicating the presence of protein contamination in DNA. In genetic engineering researches and genetic studies, the suitable methods for DNA purifying are those that get higher quantity and quality of net DNA. Many studies carried out on medicinal plants and plants which contain high level of polyphenol and polysaccharide compounds showed that CTAB method and other methods that are technically same to CTAB have better efficiency. CTAB as a detergent can form complex with the DNA and can separate it from carbohydrates and proteins. The remaining polysaccharides are removed by concentrated NaCl.

Keywords: DNA extraction, DNA quantity and quality, CTAB method, SDS method, Medicinal plant, *Silybum marianum*, PCR.

►*Please cite this paper as:*
Hoseini SA, Shams Bakhsh M, Alami Saeed Kh, Hedayat Manesh Z, Heidari A. Quantitative and Qualitative Comparison of CTAB and SDS Method for DNA Extraction from the Herb Milk Thistle (Silybum marianum L.). Jundishapur Sci Med J 2016;15(3):293-301.

Received: Feb 1, 2016 **Revised: May 28, 2016** **Accepted: June 26, 2016**