بهینه‌سازی روش استخراج DNA در بادام (*Amygdalus spp.*)

سعید کدخدایی[1] *و سیدرضا طبائی عقدائی*[2]

چکیده

مقاله حاضر به ارائه روشی ساده جهت استخراج DNA ژنومی از گیاهان دارای متابولیتهای ثانویه زیاد می‌پردازد. در این روش برگهای جوان و برگهای نسبتاً مسن از گونه‌های مختلف بادام وحشی و نیز ارقام اهلی، به‌عنوان مواد گیاهی، مورد بررسی قرار گرفتند. در این روش از SDS (به جای CTAB که عمدتاً برای استخراج DNA گیاهان حاوی پلی‌ساکارید زیاد بکارمی‌رود و نیز سارکوسیل که دارای هزینه نسبتاً بالایی می‌باشند)، نمک NaCl با غلظت نسبتاً زیاد جهت حذف پلی‌ساکاریدها، PVP به‌منظور حذف مواد پلی‌فنلی، RNase برای از بین بردن RNA و دو تا سه مرتبه استخراج به‌وسیله کلروفرم: ایزوآمیل الکل، استفاده گردید. میانگین عملکرد DNA بدست‌آمده از این روش به صورت ۵۰µg/g بافت برگی ۷۰µg/g بافت برگی جوان و ۳۰µg/g بافت برگی نسبتاً مسن) بود. DNA استخراج شده بدین روش از تقریباً ۱۰۰ mg برگ گیاه، با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر و نیز ژل آگارز آزمایش (ارزیابی) گردید و کیفیت و کمیت مناسب و قابل قبولی را نشان داد. تمامی این DNA ها به‌طور کاملاً موفقیت‌آمیزی در واکنشهای PCR (به میزان ۰/۵ ng/µl محلول واکنش) قابل تکثیر بودند. بنابراین به‌دلیل سادگی، کمیت و کیفیت مناسب DNA بدست‌آمده و هزینه نسبتاً کمتر، استفاده از این روش برای سایر گیاهان خانواده Rosaceae و احتمالاً خانواده‌های دیگری که استخراج DNA آنها با مشکل همراه است، مفید خواهدبود.

کلمات کلیدی: استخراج DNA، بادام وحشی، پلی‌ساکاریدها، پلی‌فنلها.

---

۱ - دانشجوی کارشناسی ارشد دانشگاه تبریز

۲ - عضو هیات علمی مؤسسه تحقیقات جنگلها و مراتع، تهران، صندوق پستی ۱۱۶- ۱۳۱۸۵

مقدمه

امروزه مباحث ملکولی از اهمیت روزافزونی در مطالعات زیستی برخوردار بوده و استخراج اسیدهای نوکلئیک (DNA و RNA) پایه و اساس این مطالعات می‌باشند. از طرفی بسیاری از موارد استخراج مواد ژنتیکی با محدودیتهایی همراه می‌باشد که تغییر مواد و pH بافر استخراج بهبود کمیت و کیفیت اسیدهای نوکلئیک (Clark، ۱۹۹۷، Tabaei-Aghdaei، ۱۹۹۷ و طبایی‌عقدائی، ۱۳۷۹) را امکان‌پذیر می‌سازد. استخراج DNA از گیاهانی که دارای متابولیتهای ثانویه زیاد نظیر پلی‌فنلها، پلی‌ساکاریدها و تانن‌ها می‌باشند از گذشته با مشکلاتی همراه بوده است. هر چند امروزه این مشکل با ابداع روشهایی مانند استفاده از گرادیان چگالی CsCl و سانتریفوژ با دور بسیار بالا [1] تا حد زیادی برطرف گردیده است، اما در بعضی از کشورها به‌دلیل محدودیتهای موجود لزوم بکارگیری روشهایی که حتی‌الامکان نیاز به مواد شیمیایی پرهزینه و تجهیزات پیشرفته آزمایشگاهی نداشته و با هزینه‌های کمتری بتوان DNA قابل قبولی را از لحاظ کمی و کیفی بدست آورد، کاملاً احساس می‌گردد. وجود متابولیتهای ثانویه در محلول DNA استخراج شده باعث جلوگیری از فعالیتهای آنزیمی نظیر Taq پلیمراز در واکنش زنجیره‌ای پلیمراز [2] (PCR) و آنزیمهای محدود کننده [3] می‌گردد. پلی‌ساکاریدها در محلول DNA استخراج شده به‌صورت بافتی لزج و ژل مانند تظاهر نموده و نمونه‌برداری دقیق از محلول DNA را با مشکل مواجه می‌سازند. نشانه حضور پلی‌فنلها در محلول DNA استخراج شده نیز وجود رنگ قهوه‌ای مایل به زرد در پلت [4] نهایی DNA می‌باشد. گاهی اوقات به دلایل مختلف نمونه‌های برگی جوان موجود نمی‌باشد که در این صورت خالص‌سازی DNA بیشتر با مشکل مواجه

---

1 - CsCl Density Gradient Ultra-centrifugation

2- Polymerase Chain Rection

3 Restriction enzymes

4 - Pellet: توده رسوب یافته در ته تیوب و یا بر روی دیواره آن

خواهدبود. DNA حاصل از مواد گیاهی پس از مرحله شکوفه‌دهی به‌سختی استخراج شده و در صورت نگهداری مدت پایدار نمی‌باشد که می‌تواند با افزایش میزان پلی‌فنلها، تاننها و پلی‌ساکاریدها در برگها در دوران بلوغ گیاه، در ارتباط باشد.

در این بررسی ابتدا روشهای مختلف موجود مورد آزمایش قرار گرفت، اما هیچ‌کدام از آنها نتایج رضایت‌بخشی را در برنداشت.

از این‌رو با بهینه‌سازی و اصلاح این روشها و با توجه به محدودیتهای موجود، روشی کم هزینه و با عملکرد کمی و کیفی مناسب برای استخراج DNA ژنومی از گونه‌های مختلف بادام *(Amygdalus spp.)* به‌منظور استفاده در واکنشهای زنجیره‌ای پلیمراز و به ویژه RAPDs[1] (Weir و همکاران، ۱۹۹۶) ایجاد گردید.

مواد و روشها

گونه‌های مختلف بادام وحشی از جمله گونه‌های *A. Amygdalus lycioides,* *A scoparia haussknechtii* و نیز چندین رقم بادام اهلی (*A. communis*) (بیش از ۱۰ گیاه برای هر گونه) برای استخراج DNA مورد استفاده قرار گرفت. در این روش بهینه‌سازی شده که تلفیقی از چندین روش استخراج DNA می‌باشد، از NaCl با غلظت بالا در بافر و نیز به‌طور جداگانه، به‌منظور حذف پلی‌ساکاریدها (Fang و همکاران، ۱۹۹۲)، PVP [2] جهت حذف پلی‌فنلها (Clark،۱۹۹۷)، RNase و چندین مرتبه تکرار استخراج به وسیله کلروفوم: ایزوآمیل الکل (با نسبت حجمی ۱:۲٤) استفاده گردید.

برگها، پس از جمع‌آوری با ازت مایع منجمد شده و تا زمان استفاده در دمای ۷۰- درجه سانتیگراد نگهداری شدند. ۱۰۰mg بافت برگ با استفاده از هاون و در حضور ازت مایع به صورت پودر نرم در آمد. قبل از ذوب شدن پودر مذکور مقدار ٦۰۰µl

---

1 - Random Amplified Polymorphic DNAs.
2 - polyvinyl pyrilidone

بافر استخراج حاوی NaCl۱/٤M، Tris-HCl۱۰۰Mm، pH=۹/۵، EDTA[1] ۲۰mM، pH =۸، SDS[2] ۱٪، ۰/۳۰٪، PVP[3] ۱٪ از پیش گرم شده PVP کمی به سختی در بافر حل می‌شود، لذا قبل از استفاده، در بافر و در حمام آب گرم و در دمای ۶۰°C به‌طور کامل حل شد) و ۲- مرکاپتواتانول[4] (۲- مرکاپتواتاتل بلافاصله پیش از استفاده بافر استخراج به آن اضافه شد) به آن اضافه شد (برای هر بار استخراج، بافر به صورت تازه و به میزان لازم تهیه گردید)، و به صورت مخلوط یکنواختی درآمد. مخلوط هموژنیزه شده به تیوب ۱/۵ ml انتقال یافت و در حمام آب گرم ۶۰°C به مدت ۳۰ دقیقه (هر ده دقیقه یک بار نمونه‌ها به آرامی و کمی واژگون[5] می‌گردید) نگهداری شد. پس از آن نمونه‌ها از حمام آب گرم خارج و در دمای اتاق (٤ تا ۵ دقیقه) به‌منظور خنک‌کردن آنها، قرار داده شدند. سپس با اضافه کردن۶۰۰ میکرولیتر (هم حجم) کلروفرم: ایزوآمیل الکل (۱:۲٤) بهم زدن[6] نمونه‌ها تا حد به وجود آمدن یک امولسیون همکن انجام شد. امولسیون حاصل به مدت ٦ دقیقه با شدت ۱۳۰۰۰ دور در دقیقه، در دمای اتاق و با حالت ملایم[7] (افزایش و کاهش آهسته میزان دور سانتریفوژ) سانتریفوژ شد. پس از آن با استفاده از تیپ دهانه گشاد[8] (با یک تیغ استریل نوک تیپها به اندازهٔ لازم و به‌منظور کاهش میزان شکستگی رشته‌های DNA، برش داده شد) ۵۰۰ میکرولیتر محلول رویی (سعی شد تنها محلول رویی برداشته شده و تداخلی با فاز بینابینی و یا زیرین صورت نگیرد) به یک تیوب جدید انتقال یافته و مقدار ۵۰۰µl (هم حجم)

---

1 - Ethylene Diamin Acetic acid

2 - Sodiun dodecyl sulfate

3 - Polyvinyl pyrrolidone

4 - 2-Mercaptoethanol

5 - Invert

6- vortex

7 - Soft

8 - tip

کلروفرم: ایزوآمیل الکل (۱:۲٤) به آن اضافه شد و پس از آن مجدداً به مدت ٦ دقیقه با شدت ۱۳۰۰۰ دور در دقیقه، در دمای اتاق و با حالت ملایم سانتریفوژ شد (از این مرحله به بعد به‌منظور کاهش شکستگی DNA، بهم زدن و واژگون نمودن تیوب حاوی نمونه‌ها، با شدت کمتری انجام شد). پس از آن ۳۵۰µl محلول رویی به یک تیوب جدید با استفاده از تیپ دهانه گشاد انتقال یافت و با اضافه کردن ۱۵۰ میکرولیتر محلول NaCl ۵M به آن، عمل واژگون نمودن نمونه‌ها تا ایجاد یک محلول شفاف، به آرامی انجام شد. در مواقعی که فاز رویی حاصل در این مرحله هنوز کدر بود، به‌منظور شفاف نمودن آن، مراحل انجام گرفته قبلی از افزایش ٦۰۰ میکرولیتر (هم حجم) کلروفرم: ایزوآمیل الکل (۱:۲٤) به بعد تکرار گردید. پس از آن دو حجم (۱۰۰۰µl) اتاتل مطلق سرد (-۲۰°C) به آن اضافه و تا پدیدار شدن کلاف DNA واژگون نمودن تیوب به آرامی انجام گرفت. نمونه‌ها به مدت ۲۰ دقیقه با شدت ۱٤۰۰۰ دور در دقیقه، در دمای ٤°C و با حالت ملایم سانتریفوژ شدند و پس از خالی شدن فاز رویی، شستن پلت حاصل با اتاتل ۸۰ درصد (-۲۰°C) (اضافه‌کردن µl ۱۰۰۰ اتاتل ۸۰ درصد و کمی اینورت) انجام شد. سپس ۵ دقیقه در ۱٤۰۰۰ دور در دقیقه در دمای ٤°C و با حالت ملایم سانتریفوژ شده و اتاتل رویی دور ریخته شد و پلت حاصل با وارونه گذاشتن تیوبها برروی کاغذ خشک‌کن استریل و یا قرار دادن آنها در شرایط خلاء برای مدتی کوتاه، خشک گردید. پس از آن با اضافه‌کردن ۳۵۰ میکرولیتر آب دوبار تقطیر اتوکلاو شده و ۳/۵µl محلول ۱۰mg در میلی‌لیتر RNase A، به‌منظور حل‌شدن پلت در آب، کمی واژگون گردیده و پس از یک سانتریفوژ کوتاه مدت (جهت پایین رفتن قطرات آب روی دیواره داخلی تیوب)، نمونه‌ها در دمای ۳۷°C به مدت ۳۰ دقیقه قرار داده شدند. در مواردی پلت به‌طور کامل نشده بود که این حالت پس از استخراج مجدد با کلروفرم : ایزوآمیل الکل بهبود یافت. پس از آن به‌منظور خنک‌شدن، نمونه‌ها در دمای اتاق (٤ تا ۵ دقیقه) قرار گرفتند، و پس از اضافه شدن ۳۵۰ میکرولیتر کلروفرم: ایزوآمیل الکل (۱:۲٤)، و کمی

واژگون شدن، نمونه‌ها به مدت ٦ دقیقه با شدت ۱۳۰۰۰ دور در دقیقه، در دمای اتاق و با حالت ملایم سانتریفوژ شدند. پس از این مرحله ۳۰۰ میکرولیتر از فاز رویی با تیپ دهانه گشاد به یک تیوب جدید انتقال یافت، و ۲۰µl استات سدیم ۵M و ۱۸۰µl H2O، اضافه‌شده و بعد به خوبی و به آرامی واژگون نموده و سپس با اضافه‌کردن µl ۱۰۰۰ اتانل مطلق (-۲۰°C)، مجدداً کمی به آرامی واژگون نموده (تا ظهور کلاف DNA) و ۲۰ دقیقه در ۱٤۰۰۰ دور در دقیقه و در دمای ٤°C با حالت ملایم سانتریفوژ شدند. در پایان این مرحله توده DNA به صورت شفاف قابل مشاهده بود. پس از آن با دور ریختن فاز رویی و شستن پلت حاصل با اتانل ۸۰ درصد مجدداً در ۱٤۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۵ دقیقه در دمای ٤°C و با حالت ملایم سانتریفوژ شدند. سپس فاز رویی حاصل دور ریخته شد و با وارونه گذاشتن تیوب‌ها روی کاغذ خشک‌کن استریل و یا استفاده از شرایط خلاء (در این مرحله، پلت نبایستی زیاد از حد خشک گردد، در صورت خشک شدن بیش از حد پلت، حل شدن مجدد آن در آب دوبار تقطیر اتوکلاو شده به سختی انجام خواهد شد) پلت خشک گردید. در نهایت مقدار ۱۰۰-۳۰۰µl آب دوبار تقطیر اتوکلاو شده یا بافر TE (Tris-HCl ۱۰Mm و EDTA ۱mM، pH ۸/٤) به پلت خشک شده اضافه شد، و با کمی ضربه‌زدن ملایم به تیوب محلول زلالی از DNA بدست آمد و ترجیحاً به مدت یک شب در دمای ٤°C قبل از استفاده نگهداری شدند.

بررسیهای کمی و کیفیDNA استخراج شده با استفاده از دو روش اسپکتروفتومتری و ژل آگارز صورت گرفت. در روش اول با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر (CECIL2000 جذب نوری محلولهای رقیق شده DNA به صورت ۱:۱۰۰ (۱۰µl محلول استوک DNA + ۹۹۰ میکرولیتر آب دوبار تقطیر اتوکلاو شده) در طول موجهای ۲٦۰، ۲۸۰ و ۳۲۰ ثانویه اندازه‌گیری و نسبت جذب نوری محلولهای DNA در طول موج ۲٦۰ nm به ۲۸۰ nm ($r = A_{۲٦۰}/A_{۲۸۰}$ که شاخص میزان خلوص DNA می‌باشد) بدست آمد. همچنین غلظت DNA با استفاده از فرمول زیر:

$$\text{غلظت DNA } (\mu g/ml) = (A_{260}-A_{320}) \times \frac{50\ (\mu l/ml)}{1\ (\text{واحد جذب})} \times 100\ (\text{میزان رقت})$$

محاسبه گردید. روش دیگر تعیین کمیت و کیفیت DNA که در این بررسی آزمایش شد، استفاده از ژل آگارز (۰/۸-۰/۶٪) رنگ‌آمیزی شده با اتیدمیوم بروماید و تهیه عکس از آن پس از تابش نور UV می‌باشد (شکل شماره ۱). مقایسهٔ شدت باند DNAهای مورد نظر با DNAهای هم‌اندازه و دارای غلظت مشخص[1] بر روی یک ژل، بیانگر وضعیت DNA استخراج شده خواهد بود.

به‌منظور بررسی قابلیت تکثیر DNAهای استخراج شده، واکنشهای PCR با استفاده از آغازگرهای تصادفی صورت گرفت. واکنشهای PCR با حجم ۲۵µl، شامل بافر واکنش PCR به صورت × ۱، MgCl2 ۱/۵ mM، dNTPs ۰/۲ mM، ۰/۴µM آغازگر، ۱ واحد آنزیم Taq پلیمراز و ۵۰-۱۰ نانوگرم DNA و با استفاده از دستگاه ترموسایکلر اپندورف[2] انجام گرفت. واکنش در یک چرخه دمایی (۹۴°C به مدت ٤ دقیقه، ۳٦°C به مدت ۱ دقیقه و ۷۲°C به مدت ۱/۵ دقیقه) و بلافاصله پس از آن طی ٤۰ دور در چرخه دمایی شامل دماهای ۹٤°C به مدت ۱ دقیقه، ۳٦°C به مدت ۱ دقیقه و ۷۲°C به مدت ۱/۵ دقیقه صورت گرفت، و نهایتاً دمای ۷۲°C به مدت ۵ دقیقه به‌منظور تکمیل مرحله بسط[3] بکار گرفته شد. ارزیابی فرآورده‌های واکنش زنجیره‌ای پلیمراز با جداسازی آنها از طریق الکتروفورز (روی ژل آگارز ۱/۵٪ و در محیط بافری TBE × ۰/۵)، و عکس‌برداری از ژل پس از رنگ‌آمیزی با محلول اتیدیوم بروماید و در زیر نور ماوراء بنفش[4]، بعمل آمد.

1 - DNA Mulecular Weigth Markers
2 - Eppendorf
3 - Extension
4- Ultra violet

نتایج و بحث

غلظت DNA استخراج شده از گیاهان بادام، با استفاده از روش اسپکتوفتومتری و ژل آگارز به‌طور متوسط به میزان ۵۰ μg/g بافت برگی (۷۰ μg/g بافت جوان و ۳۰ μg/g بافت نسبتاً مسن) محاسبه گردید. نسبت جذب نوری $r = A_{۲۶۰}/A_{۲۸۰}$ در روش اسپکتوفتومتری به‌طور متوسط به میزان ۱/۸۵ بدست آمد. همچنین کیفیت نمونه‌های مختلف DNA بادام با انجام الکتروفورز روی ژل آگارز و پس از رنگ‌آمیزی با محلول اتیدیوم بروماید ۰/۵ μg/ml و تابش نور UV، مورد ارزیابی قرار گرفت (شکل شماره ۱).

واکنش زنجیره‌ای پلیمراز نیز به‌طور موفقیت‌آمیز و تکرارپذیری با میزان حتی ۱۰ نانوگرم DNA (در حجم ۲۵ μl واکنش) صورت گرفت (شکل شماره ۲). افزایش میزان DNA تا ۱۰۰ نانوگرم در محلول واکنش باعث ایجاد زمینه[1] در باندها، تشدید باندها و در نتیجه عدم تشخیص دقیق آنها گردید.

هر چند متابولیتهای ثانویه ممکن است به‌طور کامل از DNA جدا نگردند، اما با این وجود، نمونه‌های DNA حاصل به اندازهٔ کافی خالص بود تا امکان تکثیر تکرارپذیر و قابل قبول آن در واکنش زنجیره‌های پلیمراز (با استفاده از آغازگرهای تصادفی) فراهم گردد. علاوه بر این کمیت DNA بدست آمده به میزانی است که می‌توان تا ۱۰۰۰ واکنش PCR را با آن انجام داد.

در این روش از PVP (یک پلیمر با وزن ملکولی بالا، قابل حل در آب و از لحاظ شیمیایی خنثی) به جای PVPP[2] (یک پلیمر نامحلول) استفاده گردید. PVP کمپلکسی را از طریق پیوندهای هیدروژنی با مواد پلی‌فنلی بوجود آورده و امکان جداسازی آنها را از DNA فراهم می‌نماید. استفاده ازPVPP در مقایسه با PVP باعث کاهش میزان

1- Backgroumd

2- Polyvinyl polypyrrolidone

DNA بدست آمده خواهد شد، اما در عوض PVP به‌منظور بهبود پایداری آنزیمها به واسطه حذف ناخالصیهای فنلی، مفید خواهد بود (Clark، ۱۹۹۷، Porebsky و همکاران، ۱۹۹۷، Weir و همکاران، ۱۹۹۶).

از جمله دیگر متابولیتهای ثانویه که در استخراج DNA بسیار مشکل‌زا می‌باشند. پلی‌ساکاریدها هستند. در این روش از SDS (به جای CTAB[1] که عمدتاً برای استخراج DNA گیاهان حاوی پلی‌ساکارید زیاد بکار می‌رود و نیز سارکوسیل که دارای هزینه نسبتاً بالایی می‌باشند)، با استفاده از غلظتهای بالای NaCl (هم در بافر و هم به صورت تیمار جداگانه) کیفیت DNA حاصل تا حد بسیار قابل توجهی بهبود یافت. بدین‌ترتیب پلی‌ساکاریدها بیشتر از اینکه با DNA رسوب پیدا کنند، همراه با اتانل در محلول باقی می‌مانند. تیمار NaCl را می‌توان با غلظت ۲/۵M-۱ انجام داد (Fang و همکاران، ۱۹۹۲). انتخاب بافت برگی مناسب برای استخراج DNA بسیار مناسب می‌باشد. برگهایی که به سرعت در حال باز شدن می‌باشند (یک تا دو گره از نوک شاخساره[2]) بهترین مواد گیاهی برای استخراج DNA می‌باشند. اگرچه در مورد برگهای کاملاً باز شده و مسن‌تر، عملکرد DNA از لحاظ کمی و کیفی کاهش خواهد یافت، با استفاده از پروتوکل حاضر می‌توان تا حد قابل قبولی DNA برگهای مسن‌تر را نیز استخراج نمود، که در این رابطه تعداد دفعات استخراج به وسیله کلروفرم: ایزوآمیل الکل افزایش می‌یابد. همچنین استفاده از فنل به صورت محلول فنل: کلروفرم : ایزوآمیل الکل (با نسبت حجمی ۲۵ :۱:۲٤) پیش از استخراج به وسیله کلروفرم: ایزوآمیل الکل و کاربرد پروتئیناز K می‌تواند کمک مؤثری برای حذف آلودگیها و ناخالصیها از DNA باشد، اگرچه مستلزم صرف هزینه و وقت بیشتر و مصرف مواد شیمیایی می‌باشد. بنابراین تا حد امکان باید از برگهای جوان برای استخراج DNA

1- Cetyl trimetyl amonium bromide

2- Shoot tip

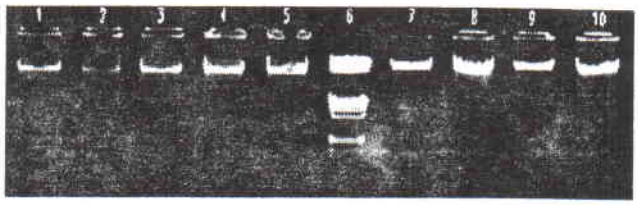
استفاده نمود. زمان مناسب برای جمع‌آوری برگها در خلال دوره طویل شدن شاخساره فعال پس از شکفتن جوانه[1] می باشد.

اقدام دیگر برای کاهش مواد پلی‌ساکاریدی در محلول DNA، نگهداری برگها در تاریکی و دمای پایین می‌باشد[2]، زیرا در این شرایط نمونه‌های برگی مقداری از ذخایر پلی‌ساکاریدی خود را به مصرف می‌رسانند. اگرچه وجود RNA تاثیری در واکنشهای تکثیر[3] و نیز هضم[4] با اندونوکلئازها [5]ندارد (Wang و همکاران، ۱۹۹٦)، ولیکن در صورت لزوم و به‌منظور خالص سازی بیشترDNA، با انجام یک تیمار ۳۰ دقیقه‌ای RNase، RNAهای زیاد موجود در نمونه‌های DNA به ریبونوکلئوزیدهای بسیار کوچکی شکسته شدند، به‌طوری که به وسیله الکتروفور ژل آگارز قابل تشخیص نبودند. احتمال رقابت ریبونوکلئوزیدهای کم باقی‌مانده با مقادیر زیاد آغازگر موجود در واکنشهای RAPD نیز بسیار بعید به نظر می‌رسد (Porebsky و همکاران، ۱۹۹۷).

روش ارائه شده در این مقاله برای استخراج DNA از گیاهان دارای متابولیتهای ثانویه زیاد، در مقایسه با روشهای دیگر استخراج DNA نظیر روشهای ارائه شده توسط Doyle و Doyle (۱۹۸۷)، Dellaporta وهمکاران (۱۹۸۳)، نسبتاً سریعتر، بسیار ساده و همچنین کم هزینه‌تر می‌باشد، به‌طوری که بدون استفاده از مواد و تجهیزات پرهزینه آزمایشگاهی (نظیر CsCl، سانتریفوژهای با دور زیاد، پروتئیناز K) و مواد شیمیایی خطرناک (مانند فنل که حتی بوی آن آزاردهنده است) می‌توان DNA با کیفیت و کمیت قابل قبولی را بدست آورد (شکلهای شماره ۱و ۲). بنابراین با توجه به نتایج بدست آمده این روش را می‌توان به‌طور کارآمد و مؤثری برای استخراج DNA از بافت برگی گیاهان بادام و احتمالاً سایر گیاهانی که از لحاظ استخراج DNA مشکل دارند، مورد استفاده قرار داد.

---

1 - Bud break
2 - De-starching
3 - Amplification
4 - Digestion
5 - Endonucleases

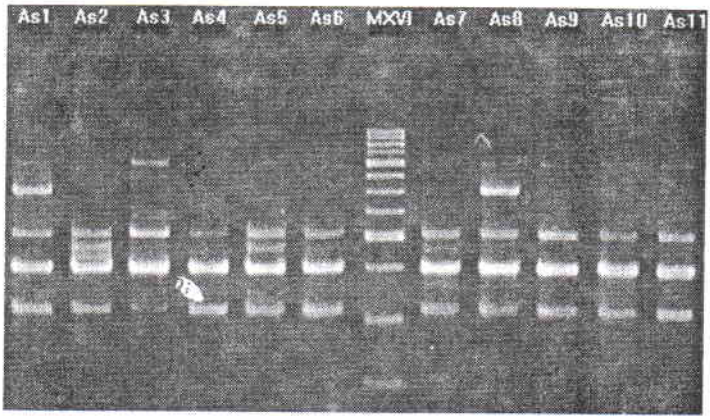


شکل شماره ۱- نمونه‌ای از الگوی DNA های استخراج شده از گیاهان بادام با استفاده از روش ارائه شده در متن.

۱ الی ۵: Amygdalus haussknechtii؛

۶: M III (Molecular weiht marker. Roche).

۷ الی ۱۰: Amygdalus scoparia؛



شکل شماره ۲- الگوی نواربندی فرآورده‌های تکثیری (PCR amplimers) نمونه‌های DNA استخراج شده از گیاهان *Amygdalus scoparia* با استفاده از آغازگر P17 (5`-CTGCTGGGAC-3`).

Mxvi: علامت اختصاری مارکر شماره ۱۶

(Molecular weight marker, Roche)

منابع

طبائـی‌عقدائـی، سیدرضـا، ۱۳۷۹، بررسی بیان ژن در واکنش به تنشهای محیطی در سه گونه گراس مرتعی، پژوهش و سازندگی شماره ٤٠: ٤٧-٤٤.

Clarck M. S., 1997. Plant molecular biology–A laboratory manual. Springer. Pp. 3-15.

Dellaporta S. L., J. Wood and J. B. Hicks, 1983. Plant DNA minipreparation: Version II. Plant Mol. Bio. Rep., 1: 19-21.

Doyle J. J. and J. L. Doyle. 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. Phytochem. Bull., 19: 11-15.

Fang G., S. Hammar and R. Rebecca, 1992. A quick and inexpensive method for removing polysaccharides from plant genomic DNA. Bio Techniques, 13: 52-56. 50.

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

Tabaei-Aghdaei. S. R., 1997. Studies of stress responses in Gramineae (Poaceae) Using biotechnological methods. PhD thesis, Newcastle University, UK.

Wang, X. D., Z. P. Wang and Y. P. Zou,. 1996. An improved procedure for the isolation of nuclear DNA from leaves of wild grapevine dried with Silica gel. Plant Mol. Bio. Rep., 14: 369-373.

Weir B. J., R. G. St. Pierre and R. N. Chibbar, 1996. Isolation of DNA for RAPD analysis from leaves of saskatoon (*Amelanchier alnifolia* Nutt.) and other horticultural crops. Can. J. Plant Sci., 79: 819-824.

Optimizing DNA extraction procedure in case of *Amygdalus* spp.

***Kadkhodaie*[1], *S. and S.R. Tabaie-Aghdaie*[2]**

Abstract

A simple method was developed to extract sufficient amount of genomic DNA, from plant species containing high amount of secondary metabolites. Leaves of different *Amygdalus* species including *A. scoparia*, *A. haussknechtii*, *A. lyciodes*, *A. elaegnifolia* and *A. commonis* were used for DNA extraction. SDS (instead of CTAB or Sarkosile), NaCl (to remove polysaccharides), PVP (to remove polyphenolic compounds) were used in extracting buffer. Sodium chloride was used again for more polysaccharide removal and RNase to remove RNA. Also, extraction was repeated several times, using chloform: isoamyl-alchohol to abtain more purified DNA. Average yield of DNA, extracted with this procedure was 50 µg per 1 g leaf tissue (70µg/g and 30µg/g in young and old leaf tissues, respectively). Extracted DNAs showed successful reproducibility through PCR amplification. This method which is relativerly inexpensive, could be efficiently applied for other species of rosaceae or different plant families from which DNA extraction is cumbersome.

Key words: DNA extraction, *Amygdalus* spp., Polysaccharides, Polyphenoles.

1 – Postgraduate student, Tabriz University

2 – Research Institute of Fortests and Rangelands, P.O.Box 13185-116, Tehran