

ارزیابی روش های مختلف استخراج DNA از ماهیان قزل آلائی رنگین کمان طلایی پرورشی (Golden Rainbow Trout: *Oncorhynchus mykiss*) به منظور مطالعه مولکولی

بهاره اکبرنژاد^۱، سیامک یوسفی سیاه کلرودی^{۲*}، شهره زارع کاریزی^۱

۱- گروه ژنتیک، دانشکده علوم زیستی، واحد ورامین- پیشوا، دانشگاه آزاد اسلامی، ایران، صندوق پستی: ۳۳۸۱۷-۷۴۸۹

۲- گروه زیست شناسی، دانشکده علوم زیستی، واحد ورامین- پیشوا، دانشگاه آزاد اسلامی، ایران، صندوق پستی: ۳۳۸۱۷-۷۴۸۹

تاریخ پذیرش: ۲۶ اسفند ۱۳۹۶

تاریخ دریافت: ۱۰ آذر ۱۳۹۶

چکیده

استخراج DNA یک گام معمول در بسیاری از مطالعات بیولوژیکی است و روش های مختلفی جهت جداسازی مولکول DNA از مواد بیولوژیکی ابداع شده است. بسیاری از این روش ها دارای سه هدف: ۱- لیز سلول و خروج اسیدنوکلئیک از مایع درون سلولی، ۲- از بین بردن مولکول های آلی و معدنی غیر از اسیدنوکلئیک در مایع درون سلولی و ۳- به حداقل رساندن تخریب اسیدنوکلئیک ها در طی مراحل خالص سازی می باشند. ماهی قزل آلائی رنگین کمان از جمله گونه های اهلی شده آزاد ماهیان بوده و امروزه مهم ترین گونه ماهی سرد آبی در کشور است. جهت انجام این پژوهش ۴ روش استخراج: ۱- کیت استخراج شرکت Gena All، ۲- Trizol Reagent، ۳- روش سنتی حرارت و آنزیم پروتئیناز K و ۴- فنل کلروفرم مورد بررسی قرار گرفت و مشخص شد که بهترین روش استخراج از لحاظ کیفیت و کمیت DNA استخراج شده توسط دستگاه نانودراپ و ژل آگاروز ۱ درصد و همچنین از لحاظ کارآمد بودن PCR مربوط به روش کیت استخراج DNA شرکت Gene All کشور کره جنوبی است.

کلمات کلیدی: قزل آلائی رنگین کمان طلایی پرورشی، استخراج DNA، کیت استخراج شرکت Gene All، PCR.

* عهده دار مکاتبات (✉) siamak.yousefi1@gmail.com

مقدمه

استخراج DNA یک گام معمول در بسیاری از مطالعات بیولوژیکی از جمله شناسایی مولکولی، استنتاج فیلوژنتیک، ژنتیک و ژنوم است. علاوه بر این استخراج DNA اغلب در معاینات پزشکی، تشخیص بالینی و تحقیقات پزشکی قانونی استفاده می شود؛ بنابراین روش های مختلفی جهت جداسازی مولکول DNA از مواد بیولوژیکی ابداع شده است (Milligan, 1998) و انواع مختلفی از کیت استخراج DNA به صورت تجاری در دسترس است (Chen, et al., 2010). بسیاری از این روش ها دارای سه هدف: ۱- لیز سلول و خروج اسید نوکلئیک از مایع درون سلولی، ۲- از بین بردن مولکول های آلی و معدنی غیر از اسید نوکلئیک در مایع درون سلولی و ۳- به حداقل رساندن تخریب اسید نوکلئیک ها در طی مراحل خالص سازی می باشند (Tsai and Olson, 1991; MacGregor, et al., 1997; Hurt, et al., 2001). روش های مختلف استخراج تأثیرات متفاوتی روی DNA استخراج شده دارند (Waldschmidt, 1997; Chen, et al., 2008). در یک تکنیک ایده آل استخراج بایستی عملکرد DNA بهینه سازی شود، تخریب DNA به حداقل رسد و از لحاظ زمان، نیروی کار و منابع کارآمد باشد (Chen, et al., 2010).

ماهی قزل آلا رنگین کمان از جمله گونه های اهلی شده آزاد ماهیان بوده که اگرچه در ایران گونه ای غیربومی محسوب می شود، اما به سبب مزایای بی شماری که از خود در سامانه های پرورشی نشان داده است، امروزه مهم ترین گونه ماهی سرد آبی در کشور است (درافشان، ۱۳۸۵). این گونه در سراسر جهان پراکنده شده و ۷۵ نژاد متمایز، تولید کرده است

(Kincaid, et al., 1977). در ایران در دوره های مختلف تخم چشم زده این ماهیان از چندین کشور مانند دانمارک، فرانسه، نروژ، ایتالیا و انگلیس وارد کشور شده و به صورت غیراصولی با یکدیگر اختلاط پیدا کرده و پرورش یافته اند که خود سبب ایجاد آسیب های جدی به ذخیره ژنی قزل آلاهای پرورشی در ایران شده است. هم چنین به علت تلاقی بیش از حد نژادهای مولدین موجود، کاهش رشد و تلفات زیاد در بچه ماهیان قزل آلا به وجود آمده است. بسیاری از بچه ماهیان موجود نیز ناهنجاری های شکلی را نشان می دهند (عبدالحی، ۱۳۸۳). در این صورت توان تولید ماهیان کاهش و بهای تمام شده محصول افزایش خواهد یافت؛ بنابراین، شاید بتوان از وقوع غیر عمدی هم خونی و رانش ژنتیکی که ناشی از کوچک بودن جمعیت ماهیان موجود در مراکز تکثیر است به عنوان یکی از عوامل اصلی کاهش توان تولید و افزایش هزینه تولید نام برد (Aulstad and Kittlesen, 1971).

به طور کلی برای به حداکثر رساندن پتانسیل بیولوژیکی ماهیان، یکی از اهداف مدیریت کارگاه های تکثیر، به کارگیری اصول اساسی ژنتیک و اصلاح نژاد است. بنابراین تنوع ژنتیکی برای بقای طولانی مدت یک گونه ضروری است (Bataillon, et al., 1996). مدیریت تنوع ژنتیکی در موجودات، نیازمند ارزیابی ساختار ژنتیکی و تفکیک ذخایر گونه مورد نظر است (Pujolar, et al., 2009). از تحقیقات انجام گرفته در زمینه مقایسه روش های مختلف استخراج DNA در آزیان می توان به تبرک و همکاران (۱۳۹۵) که به مقایسه کارایی سه روش استخراج DNA از باله و فلس اردک ماهی (*Esox Lucius*) پرداختند، طحان زاد و همکاران (۱۳۹۵) که به بررسی روش ساده و کارا برای

سانتی‌گراد خارج گردیدند و در دمای اتاق قرار داده شدند تا از حالت فریز در آیند. از هر نمونه باله دمی بچه ماهیان ۲۰ میلی‌گرم با ترازوی دیجیتالی با دقت ۰/۱ میلی‌گرم وزن گردید و در میکروتیوپ ۱/۵ میلی‌لیتر قرار داده شد.

مراحل استخراج DNA با کیت استخراج DNA شرکت Gene All کشور کره جنوبی به شرح زیر است:

- CL Buffer به میزان ۲۰۰ میکرولیتر به نمونه‌ها اضافه گردید و به کمک دستگاه هموژنایزر هموژن شدند.

- آنزیم پروتئیناز K به میزان ۲۰ میکرولیتر به نمونه‌ها اضافه گردید، به مدت ۲۰ ثانیه ورتکس شدند، جهت لیز شدن به مدت ۱ ساعت در دمای ۵۶ درجه سانتی‌گراد ترموبلاک انکوبه گردیدند و اسپین شدند.

- BL Buffer به میزان ۲۰۰ میکرولیتر به تیوپ‌ها اضافه گردید، به مدت ۲۰ ثانیه ورتکس شدند، به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد انکوبه گردیدند و اسپین شدند.

- اتانول مطلق به میزان ۲۰۰ میکرولیتر به تیوپ‌ها اضافه گردید، ورتکس و اسپین گردیدند و به ستون‌های فیلتر دار انتقال داده شدند.

- با دور ۶۰۰۰ xg (۸۰۰۰ rpm) به مدت ۱ دقیقه سانتریفیوژ گردیدند و مواد عبور کرده از فیلتر spin column ها دور انداخته شدند.

- ۶۰۰ میکرولیتر BW Buffer اضافه گردید، با دور ۶۰۰۰ xg (۸۰۰۰ rpm) به مدت ۱ دقیقه سانتریفیوژ گردیدند و مواد عبور کرده از فیلتر spin column ها دور انداخته شدند.

جداسازی DNA ژنومیک از بافت‌های کهنه میگو ببری سبز (*Penaeus semisulcatus*) مناسب برای PCR معکوس پرداختند و رجبی و همکاران (۱۳۹۵) که به مقایسه روش‌های متفاوت استخراج DNA از بافت‌های مختلف حلزون مخروطی دریایی (*Conus coronatus*) پرداختند می‌توان اشاره نمود. لذا اولین قدم در انجام این گونه مطالعات مولکولی به دست آوردن DNA ژنومی با کیفیت و کمیت مناسب است؛ بنابراین این پژوهش به منظور تعیین بهترین روش استخراج DNA از نمونه ماهیان قزل‌آلای رنگین‌کمان طلایی پرورشی صورت گرفته است.

مواد و روش‌ها

به منظور انجام این پژوهش در سال ۱۳۹۵ تعداد ۱۰۰ قطعه بچه ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان طلایی پرورشی از مجتمع پرورش ماهی ارجمند واقع در ۵ کیلومتری شهرستان فیروزکوه در استان تهران تهیه شد و در فلاکس یخ قرار داده شدند و به آزمایشگاه بیولوژی و مولکولی دانشگاه علوم پزشکی بقیه‌الله انتقال داده شدند و تا ادامه روند پژوهش در فریزر ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. جهت انجام استخراج از باله دمی بچه ماهیان ۴ روش مختلف استخراج DNA: ۱- روش استخراج با کیت استخراج DNA شرکت Gene All کشور کره جنوبی (اکبرنژاد، ۱۳۹۵)، ۲- روش (Hongbao, et al., Trizol Reagent (2008)، ۳- روش سنتی حرارت و آنزیم پروتئیناز K (Innis, et al., 1990) و ۴- روش فنل کلروفرم (Sambrook, et al., 1989)، مورد بررسی قرار گرفت. قبل از شروع مراحل استخراج، بچه ماهیان قزل‌آلای رنگین‌کمان طلایی پرورشی از فریزر ۲۰- درجه

- ۷۰۰ میکرولیتر TW Buffer اضافه گردید، با دور ۶۰۰۰ xg (۸۰۰۰ rpm) به مدت ۱ دقیقه سانتریفیوژ گردیدند و مواد عبور کرده از فیلتر spin column ها دور انداخته شدند.

- با دور ۱۳۰۰۰ xg به مدت ۱ دقیقه سانتریفیوژ گردیدند تا TW Buffer باقی‌مانده حذف گردد.

- ۵۰ میکرولیتر از AE Buffer که برای مدتی در دمای اتاق قرار داده شده بود به مرکز ستون‌ها منتقل گردید و بعد از ۱ دقیقه انکوبه شدن در دمای اتاق با دور ۱۳۰۰۰ xg به مدت ۱ دقیقه سانتریفیوژ گردیدند. مایع حاصله از سانتریفیوژ که حاوی DNA استخراجی بود جهت نگه‌داری به دمای ۴ درجه سانتی گراد انتقال داده شدند (اکبرنژاد، ۱۳۹۵).

مراحل استخراج DNA با روش Trizol Reagent به شرح زیر است:

- ۲۰۰ میکرولیتر Trizol به میکروتیوپ ۱/۵ میلی‌لیتری حاوی نمونه باله دمی بچه ماهیان اضافه گردید به‌طوری که کل بافت را بپوشاند.

- ۱۰ میکرولیتر آنزیم پروتئیناز K اضافه گردید و به مدت ۱ دقیقه به‌خوبی ورتکس شدند.

- به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد انکوبه شدند.

- ۱۰۰ میکرولیتر بافر لیز سلول اضافه گردید و به مدت ۲ دقیقه ورتکس شدند.

- به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۵۶ درجه سانتی گراد انکوبه شدند.

- ۱۰۰ میکرولیتر کلروفرم اضافه گردید و میکروتیوپ‌ها به شدت تکان داده شدند تا دو فاز نمایان گردد.

- به مدت ۱۵ دقیقه در دمای اتاق انکوبه شدند.

- به مدت ۱۵ دقیقه با دور ۱۲۰۰۰ xg در دمای ۴ درجه سانتی گراد سانتریفیوژ شدند. سه فاز ایجاد گردید. فاز مایع رویی RNA، فاز وسط فاز جامد و فاز مایع پایینی DNA است.

- فاز مایع پایینی که حاوی DNA است، جدا گردید و هم‌حجم آن ایزوپروپانول اضافه گردید.

- به مدت ۱ ساعت در دمای ۴ درجه سانتی گراد انکوبه شدند.

- به مدت ۱۰ دقیقه با دور ۱۲۰۰۰ xg در دمای ۴ درجه سانتی گراد سانتریفیوژ شدند. مایع رویی حذف گردید و رسوب حاوی DNA است.

- به رسوب حاوی DNA، ۵۰۰ میکرولیتر اتانول ۷۵ درصد اضافه گردید و سپس ورتکس شدند.

- به مدت ۵ دقیقه با دور ۱۰۰۰۰ xg در دمای ۴ درجه سانتی گراد سانتریفیوژ شدند. مایع رویی حذف و به رسوب که همان DNA است، مقدار ۵۰ میکرولیتر آب دو بار تقطیر اضافه گردید.

- به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد انکوبه گردیدند تا رسوب DNA در آب دو بار تقطیر حل گردد و در نهایت به یخچال با دمای ۴ درجه سانتی گراد انتقال یافتند (Hongbao, et al., 2008).

مراحل استخراج DNA با روش سنتی حرارت و آنزیم پروتئیناز K به شرح زیر است:

- ۲۰۰ میکرولیتر بافر لیز سلول به میکروتیوپ‌های ۱/۵ حاوی نمونه باله دمی بچه ماهیان اضافه گردید، به‌طوری که کل بافت را بپوشاند.

- جهت حذف پروتئین‌ها مقدار ۱۰ میکرولیتر آنزیم پروتئیناز K اضافه گردید و ۱ دقیقه ورتکس شدند.

- به مدت ۴ ساعت در دمای ۵۵ درجه سانتی گراد انکوبه شدند.

- به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه گردیدند تا رسوب DNA در آب دو بار تقطیر حل گردد و در نهایت به یخچال با دمای ۴ درجه سانتی‌گراد انتقال یافتند (Sambrook, et al., 1989).

جهت بررسی کیفیت و کمیت DNA های استخراج شده در هر ۴ روش مذکور از روش متداول الکتروفورز ژل آگاروز ۱ درصد (Moore, et al., 1991) و دستگاه نانودراپ استفاده شد. سپس جهت تکثیر ژن Tyrosine در ماهیان قزل‌آلای رنگین کمان طلایی پرورشی به طول ۴۲۳ جفت باز از آغاز گره‌های اختصاصی Tyr1.2f و Tyr1.2r (Lori et al., 1999) با توالی‌های:

Tyr1.2r 5' CCTCCCTACTCTGACATCGT3'
Tyr1.2f 5' CAGCTCAGACTATGTCATC3'

استفاده گردید. به منظور انجام واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) ژن Tyrosine در حجم ۲۰ میکرولیتر از ۱۰ میکرولیتر مسترمیکس، ۱ میکرولیتر DNA استخراجی، ۱ میکرولیتر پرایمر مستقیم، ۱ میکرولیتر پرایمر معکوس و ۷ میکرولیتر آب دو بار تقطیر تحت شرایط سکیل دمایی دستگاه ترموسایکلر ذیل صورت پذیرفت: واسرشته‌سازی کلی به مدت ۵ دقیقه در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد، واسرشته‌سازی به مدت ۴۰ ثانیه در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد، اتصال پرایمرها به مدت ۴۰ ثانیه در دمای ۵۸/۶ درجه سانتی‌گراد، بسط اولیه پرایمر به مدت ۴۰ ثانیه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد و سرانجام بسط نهایی پرایمر به مدت ۷ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد برای ۳۰ سیکل در مراحل ۲ تا ۴ تنظیم گردید. نهایتاً محصولات PCR روی ژل آگاروز ۱ درصد حاوی رنگ سیف‌استین الکتروفورز شدند.

نتایج

- به منظور خنثی کردن فعالیت آنزیم پروتئیناز K به مدت ۵ دقیقه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد انکوبه گردیدند.

- به مدت ۱۰ دقیقه با دور ۱۰۰۰۰ xg سانتریفیوژ شدند. مایع رویی حاوی DNA را جدا کرده و به میکروتیوپ ۱/۵ میلی‌لیتری جدیدی انتقال داده و در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد یخچال نگهداری شدند (Innis, et al., 1990).

مراحل استخراج DNA با روش فنل کلروفرم به شرح زیر است:

- ۲۵۰ میکرولیتر STE به میکروتیوپ‌های ۱/۵ میکرولیتری حاوی نمونه باله دمی بچه ماهیان اضافه گردید.

- به کمک دستگاه هموژنایزر نمونه‌ها به خوبی هموژن گردیدند.

- ۱۰ میکرولیتر آنزیم پروتئیناز K اضافه گردید.

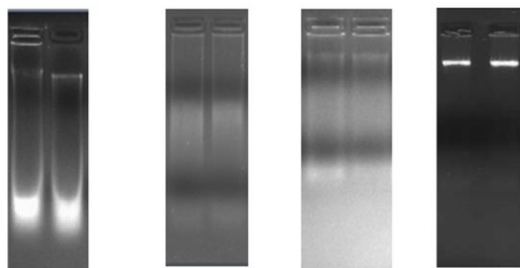
- به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند.

- به مدت ۱۰ دقیقه با دور ۱۰۰۰۰ xg سانتریفیوژ شدند. مایع رویی که حاوی DNA است جدا شده و هم‌حجم آن فنل کلروفرم اضافه گردید.

- به مدت ۱۰ دقیقه با دور ۱۰۰۰۰ xg سانتریفیوژ شدند. مایع رویی که حاوی DNA است جدا شده و هم‌حجم آن ایزوپروپانول اضافه گردید.

- به مدت ۱ تا ۲ ساعت در فریزر -20 درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند.

- به مدت ۲۰ دقیقه با دور ۱۵۰۰۰ xg سانتریفیوژ شدند. مایع رویی حذف و به رسوب که همان DNA است، مقدار ۵۰ میکرولیتر آب دو بار تقطیر اضافه گردید.



شکل ۱: نتایج کیفیت و کمیت استخراج DNA با استفاده از ۴ روش استخراج DNA ۱- کیت استخراج DNA شرکت Gene All ۲- روش Trizol reagent ۳- روش سنتی حرارت و آنزیم پروتئیناز K ۴- فنل کلروفرم روی ژل آگاروز ۱ درصد

شکل ۱: نتایج کیفیت و کمیت استخراج DNA با استفاده از ۴ روش استخراج DNA ۱- کیت استخراج DNA شرکت Gene All ۲- روش Trizol reagent ۳- روش سنتی حرارت و آنزیم پروتئیناز K ۴- فنل کلروفرم روی ژل آگاروز ۱ درصد

نتایج کیفیت و کمیت استخراج شده روی ژل آگاروز ۱ درصد نشان داد که بهترین کیفیت و کمیت DNA استخراج شده از لحاظ عدم آلودگی و شارپ بودن باندهای ایجاد شده مربوط به روش کیت استخراج شرکت Gene All است و در سایر روش‌ها عدم شارپ بودن باندها و وجود اسمیر که نشان‌دهنده آلودگی است دیده شد (شکل ۱).

نتایج حاصل از تکثیر ژن تیروزیناز با استفاده از تکنیک PCR در شکل‌های ۲ تا ۵ آورده شده است.

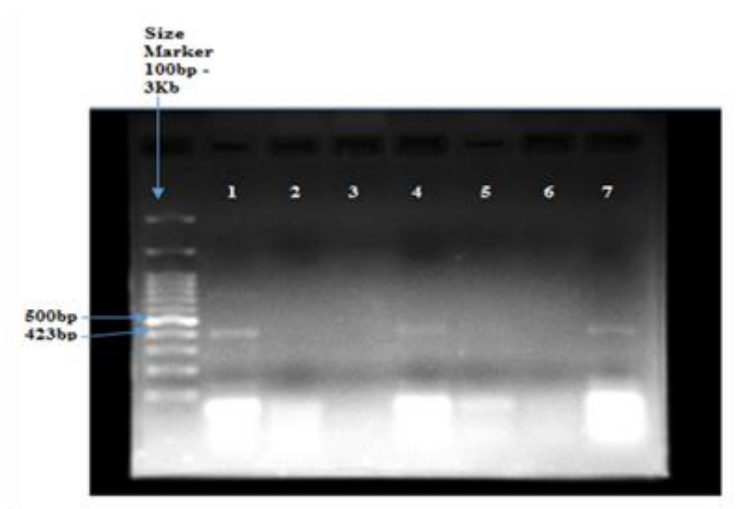
در این مطالعه ۴ روش استخراج DNA روی ۱۰۰ نمونه از باله دمی ماهیان قزل‌آلای رنگین‌کمان طلایی مقایسه شدند. نتایج کیفیت و کمیت نانودراپ استخراج DNA با روش‌های مختلف در جدول شماره ۱ آورده شده است.

جدول ۱: مقایسه ۴ روش استخراج DNA از باله دمی ماهیان قزل‌آلای رنگین‌کمان

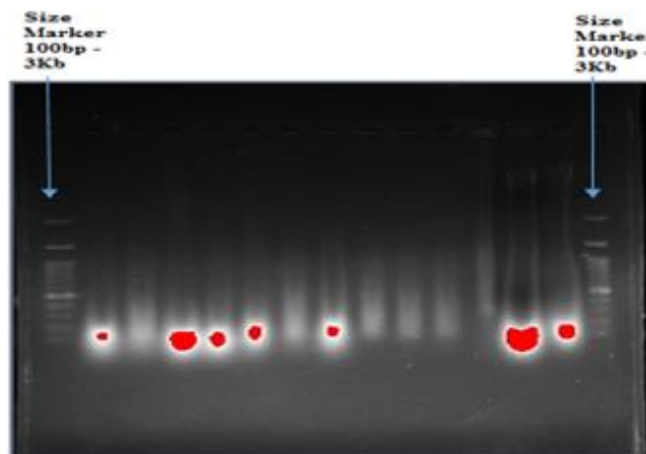
روش منفی	میانگین غلظت	نسبت جذب نوری	زمان
کیت استخراج DNA شرکت Gene All	۱۲۰/۳	۱/۸۲	<۳h
روش استخراج Trizol Reagent	۶۰/۸	۱/۲۰	<۳h
K روش سنتی حرارت و آنزیم پروتئیناز	۷۱/۱	۰/۹۴	>4h
الکل ایزوآمیل فنل کلروفرم	۹۱/۵	۱/۴۸	>4h

در جدول ۱ بیشترین و کمترین غلظت به ترتیب مربوط به روش‌های کیت استخراج DNA شرکت Gene All و روش Trizol Reagent بود و همچنین بیشترین و کمترین نسبت جذب نوری (OD) مربوط به روش‌های کیت استخراج DNA شرکت Gene All و روش سنتی حرارت و آنزیم پروتئیناز K بود.

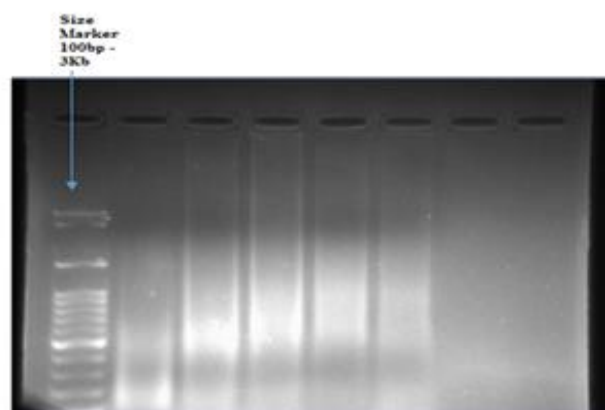
نتایج کیفیت و کمیت استخراج DNA روی ژل آگاروز ۱ درصد به ترتیب در شکل ۱ آورده شده است.



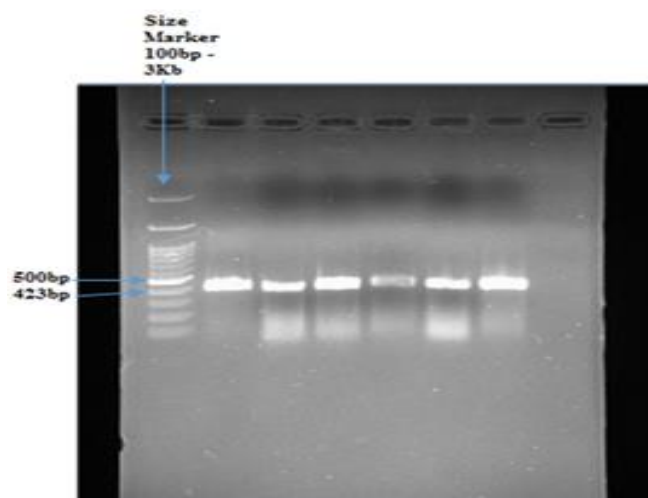
شکل ۲: نتیجه واکنش PCR روی ژن Tyrosinase در روش فنل کلروفرم باند 423bp در چاهک‌های شماره ۱، ۴ و ۷ مشاهده شد.



شکل ۳: نتیجه واکنش PCR روی ژن Tyrosinase در روش سنتی حرارت و آنزیم پروتئیناز K



شکل ۴: نتیجه واکنش PCR روی ژن Tyrosinase در روش استخراج Trizol



شکل ۵: نتیجه واکنش PCR روی ژن Tyrosinase در روش کیت استخراج DNA شرکت Gene All

نتایج به دست آمده از تکثیر ژن تیروزیناز مشخص نمود که باند 423bp تنها در روش کیت استخراج DNA شرکت Gene All با موفقیت کامل تکثیر شده است (شکل ۵) و این در حالی است که در روش فنل کلروفرم (شکل ۲) چند باند بیشتر تشکیل نگردید و در دو روش دیگر سستی حرارت و آنزیم پروتئیناز K و Trizol reagent با وجود غلظت و خلوص تا حدودی قابل قبول هیچ بانندی مشاهده نگردید (شکل ۳ و ۴). از مزیت دیگر استخراج به روش کیت استخراج شرکت Gene All می توان به زمان پاسخ دهی کم تر نسبت به سایر روش های ذکر شده در جدول ۱ اشاره نمود.

بحث

پژوهش انجام شده باهدف مقایسه ۴ روش استخراج DNA از ماهی قزل آلا رنگین کمان طلایی پرورشی (Golden Rainbow Trout: *Oncorhynchus mykiss*) به منظور مشخص نمودن بهترین روش استخراج DNA جهت مطالعه مولکولی در ماهیان قزل آلا رنگین کمان طلایی پرورشی مورد بررسی قرار

گرفت. طی انجام این پژوهش ۳ متغیر غلظت، طیف جذب نوری و زمان مورد ارزیابی قرار گرفت و مشخص شد که بهترین روش استخراج مربوط به روش کیت استخراج DNA شرکت Gene All کشور کره جنوبی است. باندهای ایجاد شده توسط این روش شارپ بوده و از کیفیت مناسبی برخوردار هستند و می تواند در تحقیقات مولکولی نظیر بررسی تنوع ژنتیکی، بررسی چندشکلی ژنتیکی و ... در ماهیان قزل آلا رنگین کمان مورد استفاده قرار گیرد تا بتوانیم توسط تکنیک هایی نظیر PCR-RFLP، PCR و ... ژنوم این گونه از ماهیان را مورد تمایز قرار دهیم. در بررسی کیفیت و کمیت DNA های استخراج شده در هر ۴ روش توسط دستگاه نانودراپ به نظر می آمد که هر ۴ روش از غلظت و طیف جذب نوری قابل قبولی برخوردار هستند، اما در واکنش زنجیره ای پلیمرز (PCR) به جز روش کیت استخراج شرکت Gene All و تا حدودی روش فنل کلروفرم که چند باند کم رنگ مشاهده گردید ما بقیه روش ها موفق نبودند که می تواند به علت وجود آلودگی ناشی از RNA، پروتئین، لیپید و

سایر ساختارهایی باشد که مانع از عملکرد صحیح آنزیم ها محدودگر و مهارکننده ها در طی واکنش زنجیره ای پلیمرز (PCR) می شود (Berthomieu and Meyer, 1991; Jeanpierre, 1987). مطالعه حاضر با پژوهش کیالاشکی و همکاران (۱۳۹۱) که به ارزیابی ۵ روش استخراجی DNA کیست ژياردیالامبلیا پرداخته است، هم خوانی دارد. کیالاشکی و همکاران مشخص نمودند که در روش جوشاندن همانند روش سنتی حرارت و آنزیم پروتئیناز k استفاده شده در پژوهش حاضر هیچ باندی در طی فرآیند تکثیر توسط تکنیک PCR ایجاد نشده است و در روش فنل کلروفرم همانند روش فنل کلروفرم پژوهش حاضر چند باند در کل نمونه های مورد بررسی بیشتر نمایان نشده است و بهترین روش استخراج را روش کیت (FGK Accuprep) اعلام کردند. همچنین پژوهش حاضر با پژوهش رحیمی کلد و همکاران (۱۳۹۲) که به بررسی تفاوت کیفیت و کمیت DNA استخراج شده از زنبورهای پارازیتوئید توسط ۵ روش استخراج پرداخته بودند که طی آن روش استخراج Chelex را بهترین روش اعلام کردند و روش های دیگر از جمله فنل کلروفرم را به دلیل تعداد مراحل زیاد، افزایش آلودگی و هزینه زیاد مطلوب اعلام نداشتند با نتیجه پژوهش حاضر که روش فنل کلروفرم را ناکارآمد اعلام داشتیم هم خوانی دارد. در مطالعه دیگر محامی اسکویی و همکاران (۱۳۹۰) به مقایسه روش های مختلف استخراج DNA به منظور مطالعه مولکولی انگل فاسیولا پرداختند و مشخص نمودند که بهترین کیفیت و بازده PCR مربوط به دو روش Chelex و کیت استخراج است و علت ناکارآمد بودن سایر روش های استخراج از جمله روش فنل کلروفرم را همانند تحقیق حاضر وجود آلودگی ناشی

RNA، پروتئین، لیپید و سایر ساختارهایی که مانع از عملکرد صحیح آنزیم ها محدودگر و مهارکننده ها در طی واکنش زنجیره ای پلیمرز (PCR) می شود اعلام داشتند. تبرک و همکاران (۱۳۹۵) به مقایسه کارایی سه روش استخراج DNA از اردک ماهی پرداختند و برخلاف تحقیق حاضر هر سه روش استخراج از جمله روش فنل کلروفرم را کارآمد اعلام داشتند. همچنین پژوهش حاضر با مطالعه داودی و همکاران (۱۳۸۸) که به مقایسه روش های استخراج DNA از بافت پارافینه با دو روش کیت تجاری و روش سنتی حرارت و آنزیم پروتئیناز K پرداخته بودند هم خوانی نداشت. آن ها بهترین روش استخراج DNA را برخلاف تحقیق حاضر روش سنتی حرارت و آنزیم پروتئیناز K اعلام کردند. در تحقیق حاضر چهار روش مختلف استخراج DNA شامل ۱- کیت استخراج شرکت Gena، ۲- Trizol Reagent، ۳- روش سنتی حرارت و آنزیم پروتئیناز K و ۴- فنل کلروفرم مورد بررسی قرار گرفت و مشخص شد که بهترین روش استخراج از لحاظ کیفیت و کمیت DNA استخراج شده توسط دستگاه نانودراپ و ژل آگاروز ۱ درصد و همچنین از لحاظ کارآمد بودن PCR مربوط به روش کیت استخراج DNA شرکت Gene All کشور کره جنوبی است.

سپاسگزاری

در اینجا بر خود لازم می دانیم از زحمات کلیه کسانی که ما را در انجام این تحقیق یاری نمودند سپاسگزاری نماییم.

منابع

۱. اکبرنژاد، ب.، ۱۳۹۵. بررسی چندشکلی ژن تیروزیناز در ماهیان قزل آلاي رنگین کمان. پایان نامه کارشناسی ارشد. رشته زیست شناسی گرایش ژنتیک. دانشکده تحصیلات تکمیلی. دانشگاه آزاد اسلامی واحد ورامین - پیشوا. ۷۸ صفحه.
۲. تبرک، م.، کلباسی مسجد شاهی، م. ر.، علوی یگانه، م. ص.، ۱۳۹۵. مقایسه کارایی سه روش استخراج DNA از باله و فلس اردک ماهی (*Esox Lucius*) ژنتیک در هزاره سوم، شماره ۳، سال یازدهم، صفحات ۳۲۰۵-۳۲۰۰.
۳. داودی، ه.، هاشمی، س. ر.، اوهنگ فونگ، س.، قربانی، م.، ۱۳۸۸. مقایسه روش های استخراج DNA از بافت های پارافینه با استفاده از روش سنتی حرارت و روش تجاری استفاده از کیت. مجله علوم آزمایشگاهی، دوره سوم، شماره ۲، صفحات ۲۹-۳۳.
۴. درافشان، س.، ۱۳۸۵. دستکاری های کروموزومی ماهی آزاد دریای خزر (*Salmo trutta caspius*) و قزل آلاي رنگین کمان (*Oncorhynchus mykiss*) جهت پرورش نسل F1. رساله دکتری تخصصی. دانشکده منابع طبیعی و علوم دریایی. دانشگاه تربیت مدرس. ۱۴۴ صفحه.
۵. رجبی، ح.، ذوالقرنین، ح.، رونق، م. ت.، سواری، الف.، شریف رنجبر، م.، ۱۳۹۵. مقایسه روش های متفاوت استخراج DNA از بافت های مختلف حلزون مخروطی دریایی (*Conus coronatus*). مجله زیست شناسی جانوری تجربی، سال ۴، شماره ۴، صفحات ۱۹-۲۵.
۶. رحیمی کلد، س.، حسینی، ر.، حاجی زاده، ج.، ۱۳۹۲. مقایسه کمیت و کیفیت روش های مختلف استخراج DNA از زنبورهای پارازیتوئید جنس (*Lysiphlebus*) به روش اسپکتروفتومتری. نشریه حفاظت گیاهان، جلد ۲۷، شماره ۳، صفحات ۴۰۶-۴۰۲.
۷. طحان زاده، ن.، حسینی، س.، ج.، علیزاده، ر.، غلامی دشتی، ف.، نظریان، م.، ۱۳۹۵. روش ساده و کارا برای جداسازی DNA ژنومیک از بافت های کهنه میگو ببری سبز (*Penaeus semisulcatus*) مناسب برای PCR معکوس. فصلنامه محیط زیست جانوری، دوره هشتم، شماره ۴، صفحات ۲۳۶-۲۲۷.
۸. عبدالحی، ح.، سید قمی، م.، پورکاظمی، م.، رضوانی، س.، نادری منش، ح.، ۱۳۸۳. مطالعه جامع ژنتیک مولکولی و اصلاح نژاد ماهیان سردآبی ایران. موسسه تحقیقات شیلات ایران. ۴۴ صفحه.
۹. کیلاشکی، الف.، شریف، م.، فخار، م.، دریایی، الف.، پقه، ع.، ۱۳۹۱. ارزیابی روش های مختلف استخراج DNA از کیست ژیا ردیا لامبلیا. مجله دانشگاه علوم پزشکی مازندران، دوره بیست و دوم، شماره ۹۸، صفحات ۷۴-۶۷.
۱۰. محامی اسکویی، م.، دلیمی اصل، ع.، فروزنده مقدم، م.، رکنی، م. ب.، ۱۳۹۰. مقایسه روش های مختلف استخراج DNA به منظور مطالعه مولکولی انگل های فاسیولا. نشریه دامپزشکی، شماره ۹۲، صفحات ۳۵-۳۱.
11. Aulstad, D., Kittlesen, A., 1971. Abnormal body curvatures of rainbow trout (*Salmo gairdneri*) inbred fry. J. Fish. Res. Board Can, Vol. 28, pp: 1918-1920.

21. Lori, A. Passmore., Barbara Kaesmann-Kellner Bernhard, H. F. Weber., 1999. Novel and recurrent mutations in the tyrosinase gene and the P gene in the German albino population. Hum Genet, Vol. 105, pp. 200-210.
22. MacGregor, B. J., Moser, D. P., Alm, E. W., Nealson, K. H., Stahl, D. A., 1997. Crenarchaeota in Lake Michigan sediment. Appl, Environ, Microbiol, Vol. 63, pp. 1178-1181.
23. Milligan, B. G., 1998. Total DNA isolation. In: Hoelzel AR, editor. Molecular Genetic Analysis of Population: A Practical Approach, 2nd Edition. Oxford, New York, Tokyo: Oxford University Press, pp. 29-64.
24. Moore, G., Cheung, W., Schwarzacher, T., Flavell, R., 1991. BIS-I, a major component of the cereal genome and atool for studying genomic organisation. Genomics, Vol. 10, pp. 469-476.
25. Pujolar, J. M., Deleo, G. A., Ciccotti, E., Zane, L., 2009. Genetic composition of Atlantic and Mediterranean recruits of European eel *Anguilla anguilla* based on EST-linked microsatellite loci. Journal of Fish Biology, Vol. 74, pp. 2034-2046.
26. Sambrook, J., Fritsch, E. F., Maniatis, T., 1989. Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd Edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, pp. 1626.
27. Tsai, Y. L., Olson, B. H., 1991. Rapid method for direct extraction of DNA from soil and sediments. Appl, Environ, Microbiol, Vol. 57, pp. 1070-1074.
28. Waldschmidt, A. M., 1997. Extraction of genomic DNA from (*Melipona quadrifasciata*) Hymenoptera: Apidae, Meliponinae. Braz J Genet, Vol. 20, pp. 421-423.
12. Bataillon, T. M., David, J. L., Schoen, D.J., 1996. Neutral genetic markers and conservation: Simulated germplasm collections. Genetics, Vol. 144, pp: 409-417.
13. Berthomieu, P., Meyer, C., 1991. Direct amplification of plant genomic DNA from leaf and root pieces using PCR. Plant Mol Biol, Vol. 17, pp. 555-557.
14. Chen, M., Zhu, Y., Tao, J., Luo, Y., 2008. Methodological comparison of DNA extraction from (*Holcocerrus hippophaecolus*) Lepidoptera: Cossidae for AFLP analysis. For Study China, Vol. 10, pp. 189-192.
15. Chen, H., Rangasamy, M., Tan, S. Y., Wang, H., Siegfried, B. D., 2010. Evaluation of five methods for total DNA extraction from western corn rootworm beetles. PLoS one, Vol. 5, No. 8, pp. e11963.
16. Hongbao, M. a., Young, J., Shen, C., 2008. RNA, DNA and protein isolation using TRIzol reagent. Nature and Science, Vol. 6, No. 3, pp. 66-75.
17. Hurt, R. A., Qiu, X., Wu, L., Roh, Y., Palumbo, A. V., Tiedje, J. M., et al. 2001. Simultaneous recovery of RNA and DNA from soils and sediments. Appl, Environ, Microbiol, Vol. 67, pp. 4495-4503.
18. Innis, M. A., Gelfand, D. H., Sninsky, J. J., 1990. White TJ. PCR Protocol; A Guide to Methods and Applications. 1st. Academic Press, Inc. New York, pp. 482.
19. Jeanpierre, M., 1987. A rapid method for the purification of DNA from blood. Nucleic Acid, Research, Vol. 15, No. 22, pp. 9611.
20. Kincaid, H.L., Bridges, W.R., Vonlimbach, B., 1977. Three generations of selection for growth rate in fall spawning rainbow trout. Transactions of the American Fisheries Society, Vol. 106, pp: 421-428.