فصل‌نامه‌ی داروهای گیاهی

journal homepage: www.journal.iaushk.ac.ir

بررسی و مقایسه روش های مختلف استخراج DNA در گیاهان دارویی و معطر

مهدی رحیم ملک[1*]

۱. استادیار گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه صنعتی اصفهان، اصفهان، ایران؛

[*]مسئول مکاتبات (Email: *mrahimmalek@cc.iut.ac.ir*)

شناسه‌ی مقاله

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۰/۰۵/۱۴

تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۹۰/۷/۲۰

نوع مقاله: مروری

موضوع: به زراعی – به نژادی

کلید واژگان:

- ✓ *استخراج DNA*
- ✓ *گیاهان دارویی*
- ✓ *اکسیداسیون DNA*
- ✓ *خلوص DNA*

چکیده

گیاهان دارویی به دلیل داشتن متابولیت های ثانویه از اهمیت زیادی در علوم پزشکی و داروسازی برخوردارند. اسانس ها، آنتی اکسیدان ها و فلاونوییدها ترکیبات اصلی بسیاری از گیاهان دارویی را تشکیل می دهند. این ترکیبات بالاخص آنتی اکسیدان ها می‌توانند باعث اکسیدشدن قسمت‌های مختلف گیاه و محتویات وراثتی (DNA)، در اثر وارد شدن زخم به گیاه گردند. امروزه با پیشرفت علم بیوتکنولوژی، نشانگرهای مولکولی مختلفی برای بررسی روابط فیلوژنتیکی، تهیه نقشه های ژنتیکی گیاهان و حذف نمونه های تکراری در بانک ژن ارایه شده است. اکثر این روش ها نیاز به استفاده از DNA با کیفیت و خلوص بالا دارند. روش‌های مختلفی برای استخراج DNA از گیاهان وجود دارد. در بیشتر این روش‌ها سه نکته اساسی مدنظر است که شامل کیفیت DNA، سرعت استخراج و میزان آن می باشد. گیاهان دارویی به علت داشتن ترکیبات فنولی فراوان و ناخالصی‌های زیاد نیازمند به کارگیری روش مناسبی برای استخراج DNA در جهت جلوگیری از اکسید شدن می‌باشد. در این تحقیق چهار روش استخراج DNA در چند گیاه دارویی که شامل آویشن دنایی (*Thymus daenensis*)، نعناع (*Mentha* spp.)، نعناع فلفلی(*Mentha pipertia*)، پونه (*Mentha longifolia*) و چند گونه بومادران (*Achillea*) مورد بررسی و مقایسه قرار گرفتند. این روش ها شامل موری و تامسون، روش تغییر یافته پریتیلا و هم‌کاران، روش تغییر یافته دلاپورتا و هم‌کاران و روش کوماتسودا و هم‌کاران با استفاده از همزن بود. نتایج نشان داد که مخلوطی از دو روش موری و تامسون و پریتیلا، با استفاده از بافر دو مرحله ای و استفاده همزمان از دو ترکیب ۲- مرکاپتواتانول و پلی ونیل پیرولیدین باعث کاهش شدید اکسیداسیون و مقادیر مناسب DNA می گردد. کمترین میزان DNA و بیشترین سرعت استخراج در روش کوماتسودا و هم-کاران به دست آمد. در بین گیاهان مورد مطالعه بیشترین و کمترین میزان اکسیداسیون DNA به ترتیب در گیاه بومادران و نعناع مشاهده شد.

۱. مقدمه

اکثر تحقیقات در گذشته در گیاهان دارویی به استخراج مواد موثره و ترکیبات ثانویه گیاهان معطوف شده است. این در حالی است که امروزه پژوهشگران در تلاشند تا بتوانند راه‌کارهای جدیدی برای اصلاح گیاهان دارویی ارایه دهند. پایه و اساس تحقیقات به نژادی گیاهان به وجود تنوع وسیع ژنتیکی استوار است و در واقع بدون دسترسی به چنین تنوع ژنی، به نژادگر شانس موفقیت چندانی برای ایجاد و ارائه ارقام اصلاح شده جدید نخواهد داشت. ارقام بومی گیاهان دارویی مختلف و خویشاوندان وحشی آن‌ها بخش اعظم نمونه های گیاهی ارزنده فلور هر کشور را تشکیل می دهند. این ارقام به دلیل سازشی که طی دوران بسیار طولانی با شرایط و تنش های محیطی خود پیدا کرده اند حاوی ژن های بسیار ارزنده مانند مقاومت به تنش هایی از قبیل خشکی، شوری، سرما، گرما و

نیز مقاومت در برابر حمله آفات و بیماری های مهم گردیده اند که معمولاً به عنوان منابع و مخازن ژنی ارزنده و دست افزار کار به نژادگران گیاهان مورد استفاده قرار می گیرند. امروزه خطرات مختلف از جمله خشک‌سالی، چرای بیش از حد دام ، برداشت بیش از حد از گیاهان دارویی ذخایر ژنتیکی این گیاهان را در خطر انقراض قرار داده است. از این رو محققین به دنبال استفاده از روش های نوین بیوتکنولوژی در جهت ارایه راه‌کارهای حفاظت ژنتیکی می باشند (Rahimmalek *et al*., 2009).

استخراج DNA با کیفیت و خلوص بالا در گیاهان دارویی لازمه مراحل بعدی در علم ژنومیکس[1] است. روش‌های مختلفی در گیاهان برای استخراج DNA ارایه شده است که هر کدام معایب و محاسن خاص خود را دارد. گیاهان دارویی به دلیل داشتن متابولیت‌های ثانویه چون اسانس ها، آنتی اکسیدان ها و فلاونوییدها در خطر اکسید شدن شدید DNA می باشند و برخی از آن ها به دلیل داشتن پلی ساکارید و پروتئین فراوان کیفیت لازم برای مراحل بعدی مطالعات مولکولی را ندارند (Pirttila *et al*., 2001). از این رو پژوهشگران گیاهان دارویی روش‌های متفاوتی را برای استخراج DNA ارایه دادند. میچیلز و هم‌کاران (Michiels *et al*., 2003) از روش تغییر یافته CTAB برای گیاهان خانواده کاسنی که حاوی لاتکس فراوان هستند مانند گل قاصد استفاده نمودند. این پژوهشگران استفاده از برگ پیر شده را مناسب‌تر دانستند. دل سرنه و هم‌کاران (Del Serrone *et al*., 2007) سه روش استخراج DNA از ریشه گیاه دارویی جین‌سینگ را مورد بررسی قرار دادند و بهترین روش و با کیفیت ترین میزان DNA را با استفاده از کیت به دست آوردند. ما و هم‌کاران (Ma *et al*., 1999) نیز توانستند از کمترین میزان برگ (۰/۰۰۱mg) غلظت و کیفیت بالای DNA را در گیاه جین‌سینگ به‌دست آوردند. شهزادی و هم‌کاران (Shahzadi *et al*., 2010) نیز روش های مختلف استخراج را در گل جعفری (*Tajets minuta*) که ارزش دارویی نیز دارد مورد بررسی قرار دادند و استخراج DNA از برگ تازه و بذر را مناسبتر گزارش نمودند. کومار و هم‌کاران (Kumar *et al*., 2010) نیز روش مناسبی را برای استخراج DNA از گیاه مارچوبه ارائه دادند. ورل (Vural, 2008) در مطالعه خود روش‌های مختلف استخراج DNA را در بسیاری از گیاهان دارویی ترکیه مورد مطالعه قرار داد. بوراگوهاین و کونوار (Buragohain & Konwar, 2008) در پژوهشی روش مناسبی برای کاهش اکسیداسیون در گیاه دارویی و سنتی هند با نام علمی *Meyna spinosa* گزارش نمودند. این محققین از پلی ونیل پیرولیدین (PVP) ۴٪ در بافر استخراج استفاده نمودند. پریتیلا و هم‌کاران (Pirttila *et al*., 2001) نیز از روش جدیدی جهت استخراج DNA در گیاهانی چون ترخون و بومادران استفاده نمودند. در این مطالعه نیز از مرکاپتواتانول و PVP به طور هم‌زمان برای رفع مشکل اکسیداسیون استفاده نمودند.

در این مقاله تلاش بر آن است که مروری بر روش‌های استخراج DNA در گیاهان دارویی ارایه شود و در ضمن روش استخراج DNA مناسب در برخی از گیاهان دارویی رایج مانند آویشن دنایی (*Thymus daenensis*)، نعناع (*Mentha* spp.)، نعناع فلفلی (*Mentha pipertia*)، پونه (*Mentha longifolia*) و چند گونه بومادران (*Achillea*) مقایسه و یک جمع بندی در رابطه با روش مناسب استخراج DNA در گیاهان دارویی ارایه گردد.

۲. متن مقاله

۲-۱. روش های استخراج DNA

روش های مختلفی برای استخراج DNA از گیاهان به وجود دارد. در بیشتر این روش ها دو نکته اساسی مدنظر است ۱- کیفیت DNA استخراج شده؛ ۲- سرعت استخراج؛ ۳- عدم اکسیداسیون DNA. گیاهان دارویی به علت داشتن ترکیبات فنولی فراوان نیازمند دقت کافی در طی مراحل استخراج DNA می باشد. از بین روش های مختلف، چهار روش مورد بررسی قرار گرفت که شامل روش موری وتامسون (Murry & Thompson, 1984)، روش پریتیلا و هم‌کاران (Pirttila *et al*., 2001)، روش تغییر یافته دلاپورتا و هم-کاران (Dellaporta *et al*., 1983) و روش سریع همزن (Blender) توسط کوماتسودا و هم‌کاران(Komatsuda *et al*., 1998) بود.

[1] - Genomics

الف) روش موری و تامسون

در این روش مقدار برگ جوان استفاده شده در حدود نیم گرم ، از ماده CTAB ۲٪-۵٪ در بافر استخراج تک مرحله ای استفاده می شود و مدت قرارگیری نمونه ها در حمام آب گرم ۳۰ دقیقه می باشد، دور سانتریفوژ در حدود rpm ۱۰۰۰۰-۱۴۰۰۰ و برای ممانعت از اکسیداسیون از ماده ۲- مرکاپتواتانول به صورت جدا از بافر یا به صورت مخلوط در بافر استخراج استفاده می شود.

ب) روش تغییر یافته دلاپورتا و هم کاران

در این روش ۰/۱ گرم برگ جوان استفاده می شود، از ماده سدیم دو دسیل یولفات (SDS) ۰/۵٪ در بافر استخراج تک مرحله-ای استفاده می شود و مدت قرارگیری نمونه ها در حمام آب گرم ۳۰ دقیقه می باشد، دور سانتریفوژ در حدود rpm ۱۰۰۰۰-۶۰۰۰ و برای ممانعت از اکسیداسیون از ماده ۲-مرکاپتواتانول به صورت جدا از بافر یا به صورت مخلوط در بافر استخراج استفاده می‌شود. در این روش بعد از مرحله بافر و قرار گیری نمونه ها در حمام گرم نیاز به استفاده از نمک استات سدیم می باشد تا رسوب ترکیبات پلی ساکاریدی و برخی از پروتئین ها تسهیل شود.

ج) روش تغییر یافته پریتیلا و هم کاران

در این روش در حدود ۰/۲ تا ۰/۵ گرم برگ جوان مناسب می-باشد. از ماده CTAB ۲ ٪ از دو بافر استخراج و به صورت دو مرحله ای استفاده می شود به نحوی که زمان دو مرحله در مجموع حدود ۳۰ دقیقه نمونه ها در حمام آب گرم قرار گیرند. در این روش برای حل نمودن مشکل اکسیداسیون از دو ماده ۲-مرکاپتواتانول و PVP به طور هم‌زمان در بافر اول استفاده می شود. دور سانتریفوژ شبیه روش موری و تامسون است. نکته جالب توجه در این روش استفاده از نمک کلرید لیتیم در مرحله بعد از اضافه شدن دو بافر می باشد.

د) روش کوماتسودا و هم کاران با استفاده از همزن(Blender)

نکته جالب توجه در این روش استفاده از مقادیر بسیار کم برگ بسیار جوان و عدم نیاز به استفاده از نیتروژن مایع می باشد. در این روش ۲۵-۲۰ میلی گرم برگ را در داخل لوله ۱/۵ میلی لیتر قرار داده شده و به جای نیتروژن مایع از همزن برای له کردن برگ های جوان استفاده می شود. از دو بافر استخراج و به صورت دو مرحله ای استفاده می شود به نحوی که بافر اول دارای همه ترکیبات مورد نیاز غیر از SDS می باشد که پس از له شدن کامل از SDS ۴۰٪ به عنوان بافر دوم استفاده می شود. زمان دو مرحله در مجموع حدود ۲۰ ثانیه می باشد و نمونه ها در حدود ۱۵ دقیقه در حمام آب گرم قرار می‌گیرند. دور سانتریفوژ ۱۲۰۰۰ به مدت ۳۰-۶۰ ثانیه است. در این روش برای حل نمودن مشکل اکسیداسیون از ماده ۲-مرکاپتواتانول به طور جدا در بافر دوم استفاده می‌شود.

۲-۲- انتخاب روش استخراج DNA در یک گیاه دارویی

انتخاب روش استخراج DNA در گیاهان دارویی منوط به مواردی چون نوع گیاه، متابولیت های ثانویه گیاه، تعداد نمونه، نشانگر مولکولی که قرار است در ادامه پروژه مورد استفاده قرار گیرد، بستگی دارد. در این مطالعه آویشن دنایی، نعناع معمولی، نعناع فلفلی، پونه و بومادران از لحاظ انتخاب روش مورد مقایسه قرار گرفتند. نتایج حاصل نشان داد که در گیاه بومادران مشکل اکسیدشدن DNA و پلی ساکارید بالا از همه نمونه های مورد مطالعه شدیدتر بود. بنابراین روشی انتخاب گردید که کمترین میزان اکسیداسیون و ناخالصی را ارایه دهد. در بین روش‌های مورد مطالعه روش پریتیلا و هم‌کاران (Pirttila *et al*., 2001) کمترین میزان اکسیداسیون را داشت و به دلیل استفاده از کلرید لیتیم برای رسوب پلی ساکاریدها و پروتئین ها بهتر بود. حسن روش پریتیلا و هم‌کاران استفاده از کلرید لیتیم به جای استات پتاسیم بود. به علت این‌که لیتیم در جدول تناوبی دارای عدد ۳ و پتاسیم دارای عدد ۱۹ می باشد تعداد لایه های یونی آن کمتر و انرژی جنبشی بیشتری در مقایسه با پتاسیم و قدرت رسوب دهی بسیار قوی تری دارد. بر اساس روش جدیدی که توسط ابورمان (Abu-Romman, 2011) ارایه شد در گیاهانی که دارای ترکیبات فنولی فراوان هستند استفاده از بافر CTAB حاوی PVP و زغال فعال[2] می تواند مشکل اکسیداسیون را تا حد بسیار زیادی حل

[2] Charcoal

کند. زغال فعال توانایی ترکیبات فنولی در گیاهان دارویی را دارد و این ایده برای اولین بار در روش استخراج DNA توسط این پژوهشگران در گیاه دارویی مریم گلی (*Salvia* spp.) ارایه شده است. آویشن دنایی، نعناع معمولی، نعناع فلفلی و پونه دارای اکسیداسیون کمتری در مقایسه بودند. در این گیاهان روش موری و تامسون بر سایر روش ها ارجحیت داشت ولی دو روش دیگر هم در آن‌ها قابل قبول بود. برای گیاه آویشن دنایی روش همزن خلوص و سرعت بالایی داشت و به علت ریز بودن برگ های آویشن و کم بودن نمونه در برخی مناطق روش قابل قبولی برای این گیاه بود. دلیل خلوص بالاتر در روش همزن زمان رسوب‌دهی کمتر در دورهای سانتریفوژ می باشد، لذا رسوب پروتئین و سایر ناخالصی‌ها در این روش کمتر می‌باشد. البته زمانی که میزان DNA بیشتر مورد نیاز باشد یا برگ‌ها مسن شده باشند و به راحتی با همزن له نگردند سایر روش ها بر روش کوماتسودا و هم‌کاران (Komatsuda *et al*., 1998) ارجحیت دارند. در روش دلاپورتا و کوماتسودا که از بافر SDS استفاده می شود؛ وجود SDS در بافر استخراج باعث واسرشته شدن پروتئـین ها می‌شـود و EDTA با یون‌های Mg^{2+} که کوفاکتور ضروری برای فعالیت نوکلئازها هستند کمپلکس تشکیل می‌دهد و از این طریق مانع فعالیت نوکلئازها می‌شود. البته روش استخراج می‌تواند مرتبط با نوع نشانگر مولکولی مورد استفاده باشد. نشانگرهای مولکولی که در آن‌ها از آنزیم های برشی استفاده می شود نیاز به خلوص و غلظت بالای DNA دارند که از جمله این نشانگرها می توان به RFLP و AFLP اشاره نمود در حالی که در نشانگرهای مبتنی بر واکنش زنجیره ای پلیمراز (PCR) خلوص کمتر DNA در مقایسه با نشانگرهای مبتنی بر آنزیم های برشی مشکل حادی ایجاد نمی کند. از جمله این نشانگرها می‌توان به ISSR، SSR، RAPD و SRAP اشاره نمود.

۳. نتیجه گیری

در مجموع می توان گفت که نکته اول در انتخاب روش استخراج در یک گیاه دارویی توجه به بحث اکسیداسیون است که پس از حل این مشکل بر اساس نشانگر مولکولی انتخابی یا روشی که قرار است در آینده استفاده شود غلظت و خلوص مدنظر قرار می گیرد و در پایان زمان استخراج برای تعداد نمونه بالا می تواند اهمیت داشته باشد.

۴. منابع

Abu-Romman, S. 2011. Comparison of methods for isolating high quality DNA from sage (*Salvia officinalis*). *Journal of Medicinal Plants Research*, 5(6): 938-941.

Buragohain, J. and Konwar, B.K. 2008. An efficient and reliable method of DNA Extraction from *Meyna spinosa* a traditional medicinal plant from North-East India. *Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology*, 17 (1): 103-105.

Dellaporta, S.L,Wood, J. and Hicks, J.B. 1983. "A plant DNA minipreparation: Version II. *Plant Molecular Biology Reporter*, 4: 19-21.

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. *Natural Product Research*, 21 (99): 1099-1103.

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

Kumar, M., Sarla, S., Yadav, O.P. and Chhokar, V. 2010. An efficient protocol for the extraction of high molecular weight DNA from asparagus (*Asparagus racemosus*). *Annals of Agri Bio Research*, 15 (2): 127-131.

Ma, X., Wang, X., Cai, M., Sun, S and Xiao, P. 1999. The extraction of DNA from milligram amounts of wild mountain ginseng tissues. *Zhongguo Zhongyao Zazhi*, 24 (4): 205-207.

Michiels, A, Ende, W. V., Tucker, M., Van Riet, L. and Laer, A.V. 2003. Extraction of high-quality genomic DNA from latex-containing plants. *Analytical Biochemistry*, 315: 85–89.

Murry, M. and Thompson, W. F. 1984. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucleic Acid Research*, 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 Molecular Biology Reporter*, 19: 273a-273f.

Rahimmalek, M., Bahreininejad, B., Khorami, M. and Sayed Tabatabaei, B.E .2009. Genetic diversity and geographical differentiation of *Thymus daenensis*, an endangerd medicinal plant, as revealed by Inter Simple Sequence Repeat (ISSR) markers. *Biochemical Genetics*, 47: 831–842.

Shahzadi, I., Ahmed, R., Hassan, A. and Shah, M.M. 2010. Optimization of DNA extraction from seeds and fresh leaf tissues of wild marigold (*Tagetes minuta*) for polymerase chain reaction analysis. *Genetics and Molecular Research*, 9 (1): 386-393.

Vural, H.C. 2008. Genomic DNA isolation from aromatic and medicinal plants growing in Turkey. *Scientific Research and Essays*, 4 (2): 59-64.