ارائه‌ی یک روش سریع برای استخراج DNA از کالوس گیاه دارویی مشک‌بو

مهدی شفیعی علویجه (۱)، منصور امیدی (۲)، آتنا اولادزاد (۱)، علیرضا اطمینان (۱)، فرهاد حریری (۱)
۱- پژوهشکده گیاهان داروئی جهاد دانشگاهی، ۲- استاد دانشگاه تهران

استخراج DNA ژنومی با کیفیت و کمیت بالا یکی از مهم‌ترین نیازهای موجود در ژنومیکس به‌شمار می‌آید. امکان استخراج DNA از برخی بافت‌های گیاه وجود دارد و همیشه استخراج DNA از برگ‌های تازه انجام می‌شود. به علت حضور ترکیبات پلی-ساکارید، آلکالوئید، تانن و فنولی در برگ‌های گیاهان دارویی، استخراج DNA به سهولت انجام نمی‌گیرد، بنابراین یافتن روشی مناسب برای کاهش این ترکیبات مفید به نظر می‌آید. دراین تحقیق، DNA ژنومی از کالوس و بافت‌های غیرتخصصی گیاه مشک‌بو که پایین‌ترین سطح این مواد را دارد استخراج شده است. همچنین کمیت و کیفیت DNA استخراج شده به وسیله الکتروفورز ژل آگارز مشخص می‌گردد. نتایج نشان می‌دهد که DNA ژنومی استخراج شده نسبتا خالص و مطلوب است و استخراج DNA از کالوس در این روش پیشنهاد می گردد.

مقدمه

در دو دهه‌ی اخیر بیوتکنولوژی کشاورزی چشم‌اندازهای امیدوارکننده‌ای را ارائه نموده است، در این بین، مباحث مولکولی از اهمیت روزافزونی در مطالعات مختلف علوم زیستی برخوردار بوده و شاید بتوان گفت استخراج اسیدهای‌نوکلئیک اولین گام در انجام این مطالعات باشد. در اختیار داشتن دستورالعمل‌های کارآمد به‌منظور نمونه‌گیری و دست‌ورزی در انجام کارهای مولکولی در آزمایشگاه بسیار مهم است. در بسیاری موارد استخراج مواد ژنتیکی با محدودیت‌هایی همراه می‌باشد که تغییر در شرایط استخراج توانسته است در بهبود کمیت و کیفیت DNA استخراج شده موثر باشد. با توجه به بررسی‌های انجام شده در زمینه مصارف داروئی این گیاه بومی ایران، که به‌طور مختصر اشاره خواهد شد، می‌توان این‌گونه استنتاج نمود که این گیاه می‌تواند به عنوان یک مقوله ارزشمند جهت مطالعات و پژوهش‌های دارویی و بیوتکنولوژی موردتوجه قرار گیرد (۳و۲).

گیاه دارویی مشک‌بو یا مشگک با نام علمی (*Ducrosia anethifolia*) گیاهی علفی و چندساله از خانواده چتریان (Apiaceae) می‌باشد. این گیاه به رنگ سبز، دارای ارتفاع حدود ۳۰ – ۱۰ سانتی‌متر و بدون کرک می‌باشد. ساقه‌ی گیاه به‌صورت متعدد، از قاعده دارای انشعابات دوشاخه‌ای می‌باشد. این انشعابات به‌صورت شاخه‌های کم و بیش منشعب و به حالت ایستاده یا خیزان می-باشد. بخش‌های پایینی گیاه دارای دو برگ بلند به طول ۱۶– ۱۰ سانتی‌متر بوده و پهنک آن‌ها دارای بریدگی سه‌تایی است. گل‌ها به رنگ‌های سفید، زرد تا کمی قرمز دیده می‌شود که به صورت گل‌آذین چترمرکب می‌باشند (۸و۶). این گیاه بومی ایران و قسمت-هایی از افغانستان می‌باشد. در ایران این گیاه در استان‌های کرمان، خراسان، یزد، سمنان، هرمزگان، سیستان و بلوچستان، اصفهان، لرستان، بوشهر و تهران رویش دارد (٤).

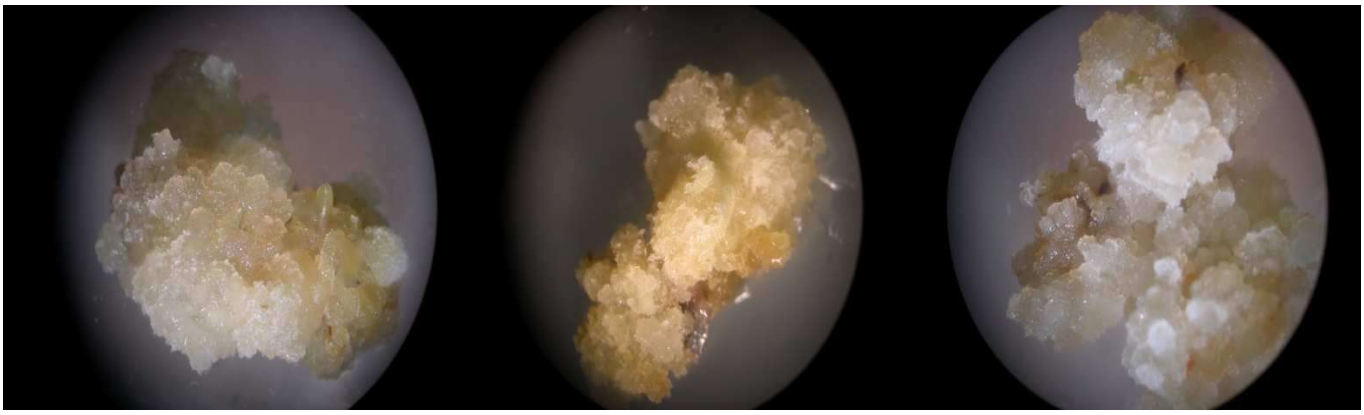
در تحقیقات انجام شده، گونه‌های این جنس دارای اثرات ضد میکروبی، شل‌کننده‌ی عضلانی و تسکین‌دهنده می‌باشند و در تولید داروهای ضد افسردگی نیز مورد استفاده قرار می‌گیرند و در طب سنتی از این گیاه برای رفع کمردرد و سردرد استفاده می‌شود (۵و۱). از مواد تشکیل‌دهنده اسانس این گیاه می‌توان دکانال نرمال (n-decanal، ضد قارچی)، دودکانال (dodecanal، ضد باکتری)، آلفا – پینن (α-pinenen، دافع حشرات در حشره‌کش‌ها، درمان سوختگی و بریدگی پوست)، بتا – میرسن (myrcene–

β، معطرکننده چای) و لینالوئول (linalool، ایجاد کف در شوینده‌های بهداشتی) را نام برد (۱۰،۱۲). بررسی‌های انجام گرفته درباره گیاه مشک‌بو (*Ducrosia anethifolia*) نشان می‌دهد که علیرغم آن‌که گیاه مشک‌بو (*Ducrosia anethifolia*) بومی کشورمان بوده است، اما در ایران، جز در رابطه با شناخت ترکیبات و اثرات اسانس این گیاه و در یک مورد نیز کشت بافت این گیاه، هیچ‌گونه مطالعات دیگری صورت نگرفته است (۱۱و۷و۹).

مواد و روش‌ها

تولید کالوس

ابتدا بذورگیاه مشک‌بو از رویشگاه‌های طبیعی جمع‌آوری و در محیط‌کشت موراشی و اسکوگ (MS، 1962) با گلوکز در مقدار ۳-۲ ٪ و آگار به مقدار ۸ g/L، تنظیم‌کننده‌های رشد اکسین و سیتوکنین در غلظت‌های ۲ و ۱ mg/L محیط‌کشت، درفضای کاملاً تاریک و دمای ۲۶-۲۴ درجه سانتی‌گراد به منظور تولید کالوس، کشت گردید



استخراج DNA

کالوس‌های تولیدشده را درهاون (اتوکلاو شده و قرارگرفته در فریزر۲۰-) به کمک نیتروژن مایع کاملا آسیاب کرده و به تیوب های۱/۵ ml انتقال می‌دهیم. به هریک از تیوب‌ها ۹۰۰ میکرولیتر محلول SDS 4% (۰/٤ گرم SDS در ۱۰ سی‌سی محلول تریس، EDTA، NaCl) اضافه کرده و به مدت ٤٥ دقیقه در بن‌ماری ٦٥ درجه سانتی‌گراد قرار می‌دهیم، لازم به ذکر است که بایستی عمل اینورت‌کردن به‌صورت متناوب صورت پذیرد. به هریک از تیوب‌ها ۳۰۰ میکرولیتر استات پتاسیم اضافه شده و به مدت ۲۵ دقیقه در ظرف محتوی یخ قرار می‌دهیم. تیوب‌ها را در دمای ۳ درجه سانتی‌گراد، به مدت ۱۵ دقیقه و در ۱۲۰۰۰rpm سانتریفوژ می-کنیم.۷۵۰ میکرولیتر از مایع فوقانی را کشیده، به تیوب جدید انتقال داده و ۷۵۰ میکرولیتر ایزوپروپانول به آن اضافه می‌کنیم و ۵ دقیقه در دمای آزمایشگاه قرار می‌دهیم. مجددا تیوب‌ها را در دمای ۳ درجه سانتی‌گراد، به مدت ۱۵ دقیقه و در ۱۲۰۰۰ rpmسانتریفوژ می‌کنیم. مایع فوقانی را دور ریخته وتیوب‌ها را به مدت ۱ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گرادقرار می‌دهیم. به هریک از تیوب‌ها ۱۰۰ میکرولیتر آب دیونیزه اتوکلاو شده اضافه نموده، تیپ می‌زنیم تا pellet تشکیل شده در انتهای تیوب کاملا حل شود و درنهایت نمونه‌ها را در یخچال ٤ درجه سانتی‌گراد نگهداری می‌کنیم.

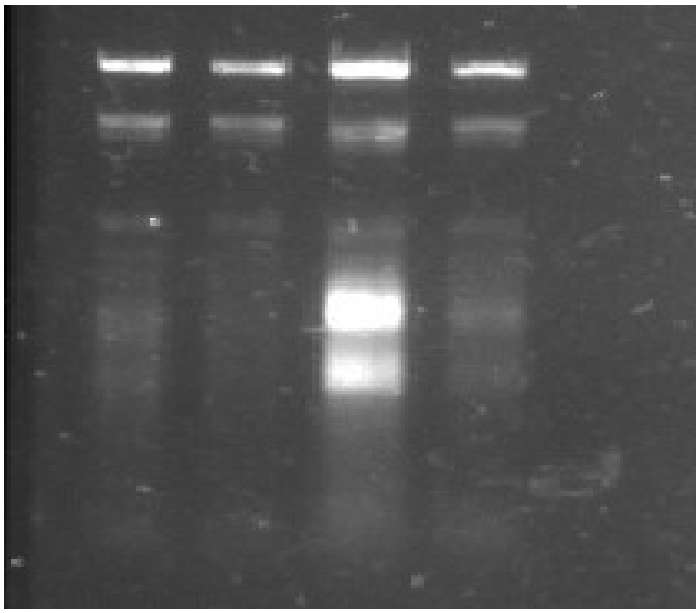
الکتروفورز ژل آگارز

۲/۵میکرولیتر از نمونه های DNAی آماده شده رابا ۲/۵ میکرولیتر ماده رنگی مخلوط کرده و محتوی ۵ میکرولیتر را در چاهک-های ژل آگارز ۰/۱٪ قرار می‌دهیم. ژل آگارز به مدت ۳۵ دقیقه با ولتاژ ثابت ۹۱ ولت الکتروفورز گردید و پس از رنگ‌آمیزی با اتیدیوم‌بروماید (به مدت ۳۰ دقیقه)، DNA در زیر نور UV در دستگاه Geldoc مشاهده و عکس‌برداری از آن انجام شد.

نتیجه‌گیری و بحث

با توجه به این که استخراج DNA از گیاهان دارویی به دلیل دارا بودن سطوحی از ترکیبات فنولی آلکالوئیدی، تانینی، روغنی و غیره مشکل و نیازمند شکلی از خالص‌سازی می‌باشد، استفاده از بافت‌های تمایزنیافته مانند کالوس می‌تواند بدون نیاز به

تخلیص، DNAی استخراجی را برطرف ساخته و با سرعت بیشتر و صرف هزینه‌ی کمتری امکان استخراج DNA را مهیا سازد. همان‌طور که تصویر ژل الکتروفورز نشان می‌دهد بدون به‌کار بردن RNAse و انجام پروسه‌ی تخلیص توسط فنول و کلروفرم ایزوآمیل الکل، DNAی حاصله دارای کیفیت نسبتا مناسبی می‌باشد. نکته‌ی قابل توجه انجام برخی تغییرات در پروسه‌ی استخراج از نظر دما، زمان و مقادیر مواد موردنیاز می‌باشد که می‌تواند روشی مناسب در استخراج DNA ودیگر تحقیقات مولکولی به‌شمار آید.



الکتروفورز ژل آگارز DNA نمونه‌های کالوس گیاه مشک‌بو

منابع

۱- اشتری، ر و م، سلوکی. اثر هورمون‌ها و ریزنمونه بر روی کشت بافت گیاه مشگک، پایان‌نامه کارشناسی‌ارشد اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زابل، ۱۳۸۷.

۲- اعلایی، م ونادری، ر و خلیقی، ا و وزوایی، ع و سلامی، ع. بررسی اجزای موثر در کمیت و کیفیت DNAی ژنومی استخراج شده از گونه‌های سیکلامن موجود درایران، پژوهش و سازندگی در زراعت و باغبانی، ۱۳۸۵.

۳- آینه‌چی، ی. مفردات پزشکی و گیاهان دارویی ایران، انتشارات دانشگاه تهران، ۱۳۷۰.

٤- سفیدکن، ف. بررسی ترکیب‌های تشکیل دهنده اسانس مشک‌بو، تحقیقات گیاهان دارویی و معطر:٦٤-۵۵.

۵- صفری، ج و ا، صفایی و ج، حقی. استخراج وتعیین مهم‌ترین ترکیبات عصاره گیاه*Ducrosia anethifolia (DC.) Boiss*، دانشکده شیمی، دانشگاه کرمان.

٦- فراهی پاریزی، غ و ف، مجاب و ع، روستاییان. بررسی مواد متشکله موجود در اسانس گیاه *Ducrosia anethifolia (DC.) Boiss*. پایان‌نامه عمومی دکترای داروسازی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی شهیدبهشتی، ۱۳۷٦.

۷- مصطفوی، ا و د، افضلی.ترکیبات شیمیایی عصاره گیاه *Ducrosia anethifolia (DC.) Boiss*، دانشکده داروسازی، دانشگاه شهید باهنر کرمان.

۸- مظفریان، و .گیاهان خانواده چتریان در ایران، انتشارات موسسه تحقیقات جنگلی و مراتع، نشریه ۳۵.

9- Al – Meshal, I.A.(1986).Isolation and characterization of a Bioactive Voliate oil from *Ducrosia ismaelis Asch*. Res commun chem. pathol pharmacol ;54 (1): 129-132.(Abstract).
10- Harraz, M. ; Fathala, M.(1996).Linear Furanocoumarins from *Ducrosia ismaelis*; 10 (1),7-70.
11- Janssen, A . M. ; Scheffer, J. J. ; Baerheim Svendsen A. ; Aynechi Y.(1984).The Essential oil of *Ducrosia anethifolia (DC.) Boiss*. chemicall composition and Antimicrobial Activity. Fharm Weekbl Sci;6(4):157-160.(Abstract).
12-Remold, H. ; wallner P.(1989).Ger. offen 1987. DE 3,734,657

A Rapid method for DNA extraction of callus in *Ducrosia anethifolia* as a medicinal plant

Mehdi shafei alavije[1], Mansor omidi, Atena oladzad, Alireza etminan, Farhad Hariri

Abstract
Genomic DNA extraction with a high quantity and quality is one of the most important requirements in genomics. It is possible to extract DNA from some tissues,usually DNA were extracted from fresh leaves. because of presence of polysaccharids, alkaloids, tanens, phenolic compounds in medicinal plant leaves, extraction of DNA is not simple in such plants so it is profitable to find some methods to reduce these compounds. In this research genomic DNA were extracted of callus as a dedifferentiated tissue of *Ducrosia anethifolia* that has low levels of these compounds by applying a modified method. The quality and quantity of DNA extracted by this method were determined by the aid of agarose gel electrophoresis. The results showed that extracted genomic DNA were approximately pure and fine. So it can be suggested to extract DNA from callus by the aid of this modified method.
Keywords: DNA extraction, callus, *Ducrosia anethifolia*, electrophoresis