ارزیابی روش‌های مختلف استخراج DNA از ماهیان قزل‌آلای رنگین‌کمان طلایی پرورشی (Golden Rainbow Trout: *Oncorhynchus mykiss*) به‌منظور مطالعه مولکولی

بهاره اکبرنژاد [۱]، سیامک یوسفی‌سیاه‌کلرودی *[۲]، شهره زارع کاریزی [۱]

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

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

تاریخ دریافت: ۱۰ آذر ۱۳۹۶ تاریخ پذیرش: ۲۶ اسفند ۱۳۹۶

چکیده

استخراج DNA یک گام معمول در بسیاری از مطالعات بیولوژیکی است و روش‌های مختلفی جهت جداسازی مولکول DNA از مواد بیولوژیکی ابداع‌شده است. بسیاری از این روش‌ها دارای سه هدف: ۱- لیز سلول و خروج اسیدنوکلئیک از مایع درون‌سلولی، ۲- از بین بردن مولکول‌های آلی و معدنی غیر از اسیدنوکلئیک در مایع درون‌سلولی و ۳- به حداقل رساندن تخریب اسیدنوکلئیک‌ها در طی مراحل خالص‌سازی می‌باشند. ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان ازجمله گونه‌های اهلی‌شده آزادماهیان بوده و امروزه مهم‌ترین 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- فنل‌کلروفرم موردبررسی قرار گرفت و مشخص شد که بهترین روش استخراج ازلحاظ کیفیت و کمیت DNA استخراج‌شده توسط دستگاه نانودراپ و ژل آگاروز ۱ درصد و همچنین ازلحاظ کارآمد بودن PCR مربوط به روش کیت استخراج DNA شرکت Gene All کشور کره جنوبی است.

کلمات کلیدی: قزل‌آلای رنگین‌کمان طلایی پرورشی، استخراج DNA، کیت استخراج شرکت Gene All، PCR.

* عهده‌دار مکاتبات (✉)، siamak.yousefi1@gmail.com

[Downloaded from aqudev.lahijan.iau.ir on 2026-11-05]

[DOR: 20.1001.1.23223545.1397.12.2.10.6]

مقدمه

استخراج DNA یک گام معمول در بسیاری از مطالعات بیولوژیکی ازجمله شناسایی مولکولی، استنتاج فیلوژنتیک، ژنتیک و ژنوم است. علاوه بر این استخراج DNA اغلب در معاینات پزشکی، تشخیص بالینی و تحقیقات پزشکی قانونی استفاده می‌شود؛ بنابراین روش‌های مختلفی جهت جداسازی مولکول DNA از مواد بیولوژیکی ابداع‌شده است (Milligan, 1998) و انواع مختلفی از کیت استخراج DNA به‌صورت تجاری در دسترس است (Chen, *et al.*, 2010). بسیاری از این روش‌ها دارای سه هدف: ۱- لیز سلول و خروج اسیدنوکلئیک از مایع درون‌سلولی، ۲- از بین بردن مولکول‌های آلی و معدنی غیر از اسیدنوکلئیک در مایع درون‌سلولی و ۳- به حداقل رساندن تخریب اسیدنوکلئیک‌ها در طی مراحل خالص‌سازی می‌باشند (Tsai and Olson, 1991; MacGregor, *et al.*, 1997; Hurt, *et al.*, 2001). روش‌های مختلف استخراج تأثیرات متفاوتی روی DNA استخراج‌شده دارند (Waldschmidt, 1997; Chen, *et al.*, 2008). در یک تکنیک ایده آل استخراج بایستی عملکرد DNA بهینه‌سازی شود، تخریب DNA به حداقل رسد و ازلحاظ زمان، نیروی کار و منابع کارآمد باشد (Chen, *et al.*, 2010).

ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان ازجمله گونه‌های اهلی‌شده آزادماهیان بوده که اگرچه در ایران گونه‌ای غیربومی محسوب می‌شود، اما به سبب مزایای بی‌شماری که از خود در سامانه‌های پرورشی نشان داده است، امروزه مهم‌ترین گونه ماهی سرد آبی در کشور است (درافشان، ۱۳۸۵). این‌گونه در سراسر جهان پراکنده‌شده و ۷۵ نژاد متمایز، تولید کرده است (Kincaid, *e al.*,1977). در ایران در دوره‌های مختلف تخم چشم زده این ماهیان از چندین کشور مانند دانمارک، فرانسه، نروژ، ایتالیا و انگلیس وارد کشور شده و به‌صورت غیراصولی با یکدیگر اختلاط پیداکرده و پرورش‌یافته‌اند که خود سبب ایجاد آسیب-های جدی به ذخیره ژنی قزل‌آلاهای پرورشی در ایران شده است. هم‌چنین به علت تلاقی بیش‌ازحد نژادهای مولدین موجود، کاهش رشد و تلفات زیاد در بچه ماهیان قزل‌آلا به وجود آمده است. بسیاری از بچه ماهیان موجود نیز ناهنجاری‌های شکلی را نشان می‌دهند (عبدالحی، ۱۳۸۳). در این صورت توان تولید ماهیان کاهش و بهای تمام‌شده محصول افزایش خواهد یافت؛ بنابراین، شاید بتوان از وقوع غیرعمدی هم‌خونی و رانش ژنتیکی که ناشی از کوچک بودن جمعیت ماهیان موجود در مراکز تکثیر است به‌عنوان یکی از عوامل اصلی کاهش توان تولید و افزایش هزینه تولید نام برد (Aulstad and Kittlesen, 1971).

به‌طورکلی برای به حداکثر رساندن پتانسیل بیولوژیکی ماهیان، یکی از اهداف مدیریت کارگاه‌های تکثیر، به‌کارگیری اصول اساسی ژنتیک و اصلاح نژاد است. بنابراین تنوع ژنتیکی برای بقای طولانی‌مدت یک‌گونه ضروری است (Bataillon, *et al.*, 1996). مدیریت تنوع ژنتیکی در موجودات، نیازمند ارزیابی ساختار ژنتیکی و تفکیک ذخایر گونه موردنظر است (Pujolar, *et al.*, 2009). از تحقیقات انجام‌گرفته درزمینه مقایسه روش‌های مختلف استخراج DNA در آبزیان می‌توان به تبرک و همکاران (۱۳۹۵) که به مقایسه کارایی سه روش استخراج DNA از باله و فلس اردک‌ماهی (*Esox Lucius*) پرداختند، طحان زاد و همکاران (۱۳۹۵) که به بررسی روش ساده و کارا برای

[Downloaded from aqudev.lahijan.iau.ir on 2026-11-05]
[DOR: 20.1001.1.23223545.1397.12.2.10.6]

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 این‌گونه مطالعات مولکولی به دست آوردن DNA ژنومی باکیفیت و کمیت مناسب است؛ بنابراین این پژوهش به‌منظور تعیین بهترین روش استخراج DNA از نمونه ماهیان قزل‌آلای رنگین‌کمان طلایی پرورشی صورت گرفته است.

مواد و روش‌ها

به‌منظور 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 بقیةالله انتقال داده شدند و تا ادامه روند پژوهش در فریزر 20- 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 کره‌جنوبی (اکبرنژاد، ۱۳۹۵)، ۲- روش Trizol Reagent (Hongbao, *et al.*, 2008)، ۳- روش سنتی حرارت و آنزیم پروتئیناز K (Innis, *et al.*, 1990) و ۴- روش فنل‌کلروفرم (Sambrook, *et al.*, 1989)، موردبررسی قرار گرفت. قبل از شروع مراحل استخراج، بچه ماهیان قزل‌آلای رنگین‌کمان طلایی پرورشی از فریزر 20- درجه سانتی‌گراد خارج گردیدند و در دمای اتاق قرار داده شدند تا از حالت فریز درآیند. از هر نمونه باله دمی بچه ماهیان ۲۰ میلی‌گرم با ترازوی دیجیتال 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.

[Downloaded from aqudev.lahijan.iau.ir on 2026-11-05]
[DOR: 20.1001.1.23223545.1397.12.2.10.6]

- 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 داده‌شده 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 به‌طوری‌که 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 سانتی‌گراد انکوبه شدند.
- ۱۰۰ میکرولیتر بافر لیز سلول اضافه گردید و به مدت ۲ دقیقه ورتکس شدند.
- به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۵۶ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند.
- ۱۰۰ میکرولیتر کلروفرم اضافه گردید و میکروتیوپ‌ها به‌شدت تکان داده شدند تا دو فاز نمایان گردد.
- به مدت ۱۵ دقیقه در دمای اتفاق انکوبه شدند.
- به مدت ۱۵ دقیقه با دور ۱۲۰۰۰ xg در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد 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 سانتی‌گراد انکوبه شدند.
- به مدت ۱۰ دقیقه با دور ۱۲۰۰۰ xg در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد 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 سانتی‌گراد 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 سانتی‌گراد انکوبه گردیدند تا رسوب DNA در آب دو بار تقطیر حل گردد و درنهایت به یخچال با دمای ۴ درجه سانتی‌گراد 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، به‌طوری‌که 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 سانتی‌گراد انکوبه شدند.

[Downloaded from aqudev.lahijan.iau.ir on 2026-11-05]
[DOR: 20.1001.1.23223545.1397.12.2.10.6]

- به‌منظور خنثی کردن فعالیت آنزیم پروتئیناز K به مدت ۵ دقیقه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد انکوبه گردیدند.
- به مدت ۱۰ دقیقه با دور xg ۱۰۰۰۰ 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 به‌خوبی 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 xg ۱۰۰۰۰ سانتریفیوژ شدند.
- مایع رویی که حاوی DNA است جداشده و هم‌حجم آن فنل کلروفرم اضافه گردید.
- به مدت ۱۰ دقیقه با دور xg ۱۰۰۰۰ سانتریفیوژ شدند.
- مایع رویی که حاوی DNA است جداشده 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 xg ۱۵۰۰۰ 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 سانتی‌گراد انکوبه گردیدند تا رسوب DNA در آب دو بار تقطیر حل گردد و درنهایت به یخچال با دمای ۴ درجه سانتی‌گراد انتقال یافتند (Sambrook, *et al.*, 1989).

جهت بررسی کیفیت و کمیت DNA های استخراج‌شده 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 رنگین‌کمان طلایی پرورشی به طول ۴۲۳ جفت باز از آغازگرهای اختصاصی Tyr1.2r و Tyr1.2f (Lori *et al.*, 1999) با توالی‌های:

Tyr1.2r 5́ CCTCCCTACTCTGACATCGT3́
Tyr1.2f 5́ CAGCTCAGACTATGTCATC3

استفاده گردید. به‌منظور 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، واسرشته سازی 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

[Downloaded from aqudev.lahijan.iau.ir on 2026-11-05]
[DOR: 20.1001.1.23223545.1397.12.2.10.6]

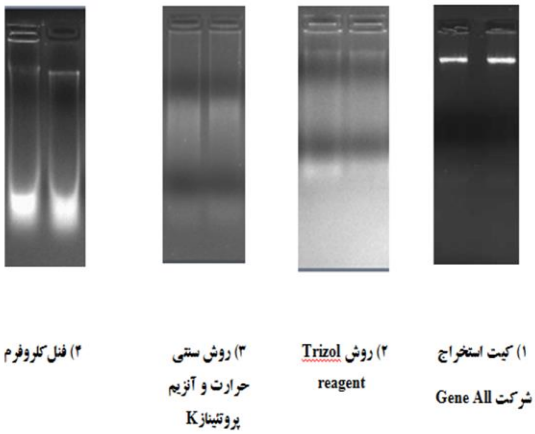
در این مطالعه ۴ روش استخراج DNA روی ۱۰۰ نمونه از باله دمی ماهیان قزل‌آلای رنگین‌کمان طلایی مقایسه شدند. نتایج کیفیت و کمیت نانودراپ استخراج DNA با روش‌های مختلف در جدول شماره ۱ آورده شده است.

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

روش متغیر	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
Kروش سنتی حرارت و آنزیم پروتئیناز	۷۱/۱	۰/۹۴	>4h
الکل ایزوامیل 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.

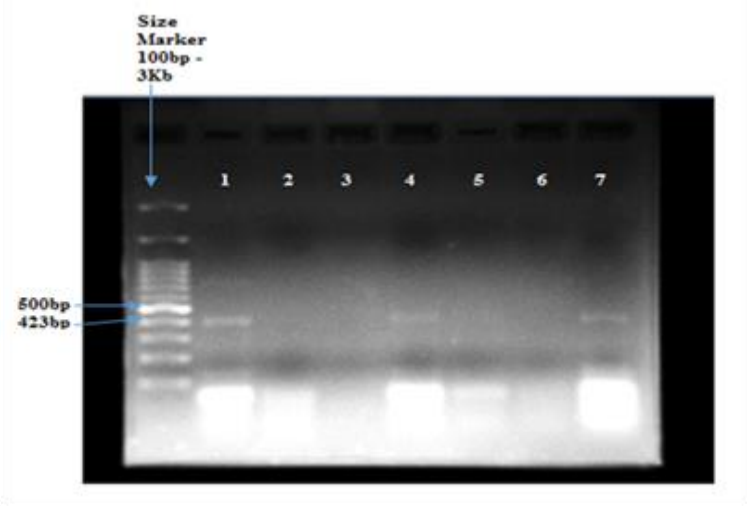


شکل ۱: نتایج کیفیت و کمیت استخراج DNA با استفاده از ۴ روش استخراج DNA ۱- کیت استخراج DNA شرکت Gene All ۲- روش Trizol reagent ۳- روش سنتی حرارت و آنزیم پروتئیناز K ۴- فنل کلروفرم روی ژل آگاروز ۱ درصد

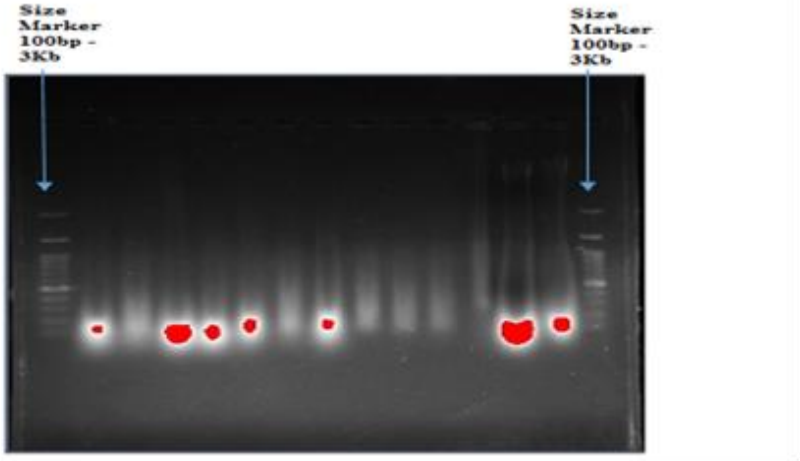
نتایج کیفیت و کمیت DNA استخراج‌شده روی ژل آگاروز ۱ درصد نشان داد که بهترین کیفیت و کمیت DNA استخراج‌شده ازلحاظ عدم آلودگی و شارپ بودن باندهای ایجادشده مربوط به روش کیت استخراج شرکت Gene All است و در سایر روش‌ها عدم شارپ بودن باندها و وجود اسمیر که نشان‌دهنده آلودگی است دیده شد (شکل ۱).

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

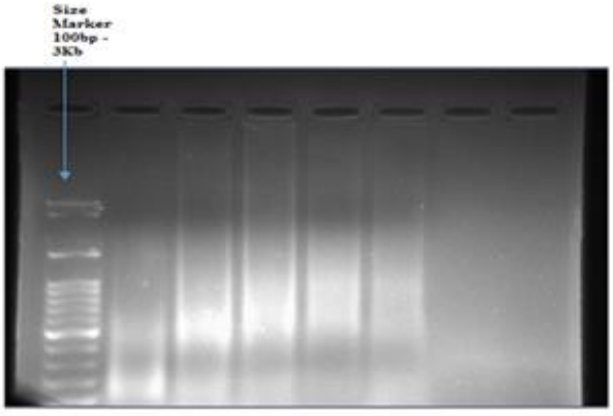
[Downloaded from aqudev.lahijan.iau.ir on 2026-11-05]
[DOR: 20.1001.1.23223545.1397.12.2.10.6]



شکل ۲: نتیجه واکنش PCRروی ژن Tyrosinase درروش فنل‌کلروفرم باند 423bp در چاهک‌های شماره ۱، ۴ و ۷ مشاهده شد.

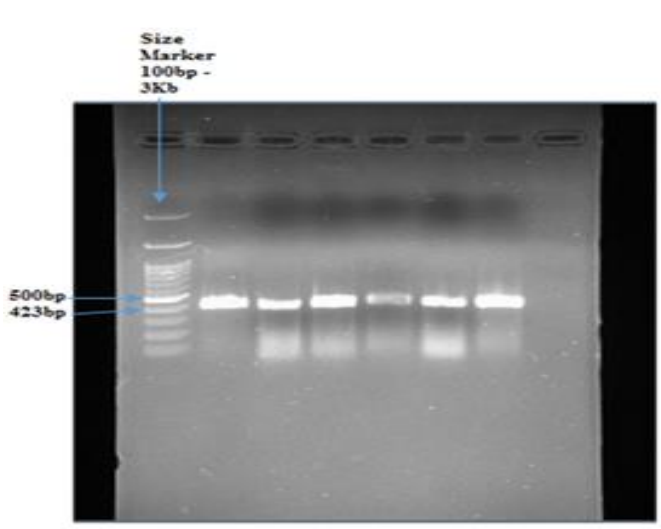


شکل ۳: نتیجه واکنش PCR روی ژن Tyrosinase درروش سنتی حرارت و آنزیم پروتئیناز K



شکل ۴: نتیجه واکنش PCR روی ژن Tyrosinase درروش استخراج Trizol

[Downloaded from aqudev.lahijan.iau.ir on 2026-11-05]
[DOR: 20.1001.1.23223545.1397.12.2.10.6]



شکل ۵: نتیجه واکنش PCRروی ژن Tyrosinase درروش کیت استخراجDNA شرکت Gene All

نتایج به‌دست‌آمده از تکثیر ژن تیروزیناز مشخص نمود که باند 423bp تنها درروش کیت استخراج DNA شرکت Gene All با موفقیت کامل تکثیرشده است (شکل ۵) و این در حالی است که درروش فنل کلروفرم (شکل ۲) چند باند بیشتر تشکیل نگردید و در دو روش دیگر سنتی حرارت و آنزیم پروتئیناز K و Trizol reagent باوجود غلظت و خلوص تا حدودی قابل‌قبول هیچ باندی مشاهده نگردید (شکل ۳ و ۴). از مزیت دیگر استخراج به روش کیت استخراج شرکت Gene All می‌توان به زمان پاسخ‌دهی کم‌تر نسبت به سایر روش‌های ذکرشده در جدول ۱ اشاره نمود.

بحث

پژوهش انجام‌شده باهدف مقایسه ۴ روش استخراج DNA از ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان طلایی پرورشی (Golden Rainbow Trout: *Oncorhynchus mykiss*) به‌منظور مشخص نمودن بهترین روش استخراج DNA جهت مطالعه مولکولی در ماهیان قزل‌آلای رنگین‌کمان طلایی پرورشی موردبررسی 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 ایجادشده توسط این روش شارپ بوده و از کیفیت مناسبی برخوردار هستند و می‌تواند در تحقیقات مولکولی نظیر بررسی تنوع ژنتیکی، بررسی چندشکلی ژنتیکی و ... در ماهیان قزل‌آلای رنگین‌کمان مورداستفاده قرار گیرد تا بتوانیم توسط تکنیک‌هایی نظیر PCR، PCR-RFLP و ... ژنوم این‌گونه از ماهیان را مورد تمایز قرار دهیم. در بررسی کیفیت و کمیت DNAهای استخراج‌شده در هر ۴ روش توسط دستگاه نانودراپ به نظر می‌آمد که هر ۴ روش از غلظت و طیف جذب نوری قابل قبولی برخوردار هستند، اما در واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) به‌جز روش کیت استخراج شرکت Gene All و تا حدودی روش فنل‌کلروفرم که چند باند کم‌رنگ مشاهده گردید ما بقیه روش‌ها موفق نبودند که می‌تواند به علت وجود آلودگی ناشی از RNA، پروتئین، لیپید و

[Downloaded from aqudev.lahijan.iau.ir on 2026-11-05]
[DOR: 20.1001.1.23223545.1397.12.2.10.6]

سایر ساختارهایی باشد که مانع از عملکرد صحیح آنزیم‌ها محدودگر و مهارکننده‌ها در طی واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) می‌شود (Berthomieu and Meyer, 1991; Jeanpierre, 1987). مطالعه حاضر با پژوهش کیالاشکی و همکاران (۱۳۹۱) که به ارزیابی ۵ روش استخراجی DNA کیست ژیاردیالامبلیا پرداخته است، هم‌خوانی دارد. کیالاشکی و همکاران مشخص نمودند که درروش جوشاندن همانند روش سنتی حرارت و آنزیم پروتئیناز k استفاده‌شده در پژوهش حاضر هیچ باندی در طی فرآیند تکثیر توسط تکنیک PCR ایجاد نشده است و درروش فنل کلروفرم همانند روش فنل کلروفرم پژوهش حاضر چند باند در کل نمونه‌های موردبررسی بیشتر نمایان نشده است و بهترین روش استخراج را روش کیت (FGK Accuprep) اعلام کردند. همچنین پژوهش حاضر با پژوهش رحیمی کلده و همکاران (۱۳۹۲) که به بررسی تفاوت کیفیت و کمیت DNA استخراج‌شده از زنبورهای پارازیتوئید توسط ۵ روش استخراج پرداخته بودند که طی آن روش استخراج Chelex را بهترین روش اعلام کردند و روش‌های دیگر ازجمله 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 هم‌خوانی دارد. در مطالعه دیگر محامی اسکویی و همکاران (۱۳۹۰) به مقایسه روش‌های مختلف استخراج DNA به‌منظور 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 روش‌های استخراج ازجمله روش فنل کلروفرم را همانند تحقیق حاضر وجود آلودگی ناشی RNA، پروتئین، لیپید و سایر ساختارهایی که مانع از عملکرد صحیح آنزیم‌ها محدودگر و مهارکننده‌ها در طی واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) می‌شود اعلام داشتند. تبرک و همکاران (۱۳۹۵) به مقایسه کارایی سه روش استخراج DNA از اردک‌ماهی پرداختند و برخلاف تحقیق حاضر هر سه روش استخراج ازجمله روش فنل کلروفرم را کارآمد اعلام داشتند. همچنین پژوهش حاضر بامطالعه داودی و همکاران (۱۳۸۸) که به مقایسه روش‌های استخراج DNA از بافت پارافینه با دو روش کیت تجاری و روش سنتی حرارت و آنزیم پروتئیناز K پرداخته بودند هم‌خوانی نداشت. آن‌ها 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 All، ۲- Trizol Reagent، ۳- روش سنتی حرارت و آنزیم پروتئیناز K و ۴- فنل کلروفرم موردبررسی قرار گرفت و مشخص شد که بهترین روش استخراج ازلحاظ کیفیت و کمیت DNA استخراج‌شده توسط دستگاه نانودراپ و ژل آگاروز ۱ درصد و همچنین ازلحاظ کارآمد بودن PCR مربوط به روش کیت استخراج DNA شرکت Gene All کشور کره جنوبی است.

سپاسگزاری

در اینجا بر خود لازم می‌دانیم از زحمات کلیه کسانی که مارا در انجام این تحقیق یاری نمودند سپاسگزاری نماییم.

[Downloaded from aqudev.lahijan.iau.ir on 2026-11-05]
[DOR: 20.1001.1.23223545.1397.12.2.10.6]

منابع

۱. اکبرنژاد، ب.، ۱۳۹۵. بررسی چندشکلی ژن تیروزیناز در ماهیان قزل‌آلای‌رنگین‌کمان. پایان‌نامه کارشناسی‌ارشد. 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 روش‌های استخراج DNA از بافت‌های پارافینه با استفاده از روش سنتی حرارت و روش تجاری استفاده از کیت. مجله علوم آزمایشگاهی، دوره سوم، شماره ۲، صفحات ۳۳-۲۹.

۴. درافشان، س.، ۱۳۸۵. دستکاری‌های کروموزومی ماهی آزاد دریای خزر(*Salmo trutta caspius*) و قزل آلای رنگین کمان (*Oncorhynchus mykiss*) جهت پرورش نسلF1. رساله دکتری تخصصی. دانشکده منابع طبیعی و علوم دریایی. دانشگاه تربیت مدرس . ۱۴۴ صفحه.

۵. رجبی، ح.، ذوالقرنین، ح.، رونق، م، ت.، سواری، الف.، شریف‌رنجبر، م.، ۱۳۹۵. مقایسه روش‌های متفاوت استخراج DNA از بافت‌های مختلف حلزون مخروطی دریایی (*Conus coronatus*). مجله زیست‌شناسی جانوری تجربی، سال ۴، شماره ۴، صفحات ۱۹-۲۵.

۶. رحیمی کلده، س.، حسینی، ر.، حاجی زاده، ج.، ۱۳۹۲. مقایسه کمیت و کیفیت روش‌های مختلف استخراج DNA از زنبورهای پارازیتوئید جنس (*Lysiphlebus*)به روش اسپکتروفتومتری. نشریه حفاظت گیاهان، جلد ۲۷، شماره ۳، صفحات ۴۰۶-۴۰۲.

۷. طحان‌زاده، ن.، حسینی، س، ج.، علیزاده، ر.، غلامی‌دشتی، ف.، نظریان، م.، ۱۳۹۵. روش ساده و کارا برای جداسازی DNA ژنومیک از بافت‌های 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.، 1383. مطالعه جامع ژنتیک مولکولی و اصلاح نژاد ماهیان سردآبی ایران. موسسه تحقیقات شیلات ایران. 44صفحه.

۹. کیالاشکی، الف.، شریف، م.، فخار، م.، دریایی، الف.، پقه، ع.، ۱۳۹۱. ارزیابی روش‌های مختلف استخراج DNA از کیست ژیاردیا 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.

[Downloaded from aqudev.lahijan.iau.ir on 2026-11-05]

[DOR: 20.1001.1.23223545.1397.12.2.10.6]

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.
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.

[Downloaded from aqudev.lahijan.iau.ir on 2026-11-05]
[DOR: 20.1001.1.23223545.1397.12.2.10.6]