جداسازی متابولیت‌های ثانویه طی فرآیند استخراج DNA از گیاه آویشن و آنالیز آنها با روش GC-Mass

سید محمود ضابطی[۱]، احمد اسماعیلی[۱*]، حسن مداح عارفی[۲]، فرهاد نظریان فیروزآبادی[۱] و فرزانه مجیری[۱]

[۱] خرم آباد، دانشگاه لرستان، دانشکده کشاورزی، گروه زراعت و اصلاح نباتات

[۲] کرج، موسسه تحقیقات ثبت و گواهی بذر و نهال

تاریخ دریافت: ۹۱/۹/۲۵ تاریخ پذیرش: ۹۲/۳/۵

چکیده

استخراج DNA ژنومی با کیفیت و کمیت مطلوب از نیازهای بنیادی فنهای مولکولی زیستی مختلف است. در بعضی تحقیقات به دلایل مختلفی نمونه‌های گیاهی مورد مطالعه از طبیعت جمع‌آوری می‌شود که این گیاهان معمولاً خشبی بوده و استخراج DNA از بافت گیاهی این نمونه‌ها به علت وجود کربوهیدرات‌ها، ترکیبات پلی‌فنلی و پروتئینها با مشکلاتی روبرو است. به ویژه آنکه این ترکیبات به شکل کمپلکس با اسیدهای نوکلئیک ترکیب می‌شوند و جداسازی آنها را با مشکل مواجه می‌کند. در این تحقیق DNA ژنومی از برگ گیاه آویشن به گل رفته با چهار روش Doyle and Doyle، Dellaporta، Kang and Yang و Khanuja استخراج گردید. نتایج به‌دست آمده نشان داد که روش خانوجا با اندکی تغییرات از بقیه روشها بهتر بود. در این روش استخراج، رسوب چسبناک قهوه‌ای رنگی در محلول حاوی DNA به‌دست آمد که در روشهای دیگر دیده نشد. بر این اساس این رسوب توسط آنالیزهای GC-Mass، IR و طیف UV مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت و مشخص شد که این رسوب شامل تیمول، کارواکرول، نرولیدول و بورنئول بود. در طیف GC بیشترین میزان را ماده تیمول دارا بود (۶۵ درصد). از این رو روش خانوجا بهینه شده توانست متابولیت‌های ثانویه عمده آویشن را جداسازی کرده و می‌توان پیشنهاد نمود که این روش جهت استخراج DNA گیاهانی که به گل رفته‌اند مناسب‌تر از سایر روشها می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: آویشن، استخراج DNA، متابولیت‌های ثانویه، GC-Mass، IR

* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۶۶۱۴۲۰۰۱۹۱ ، پست الکترونیکی: ismaili.a@lu.ac.ir

مقدمه

داروهای شیمیایی با وجود کارآیی که دارند اما دارای اثرات نامطلوب فراوانی هم هستند، این موضوع باعث شده محققین به مواد طبیعی (که دارای اثرات نامطلوب کمتری هستند) بیشتر توجه نمایند. امروزه در اکثر کشورها از گیاهان دارویی در فرآیندهای درمانی استفاده‌های مختلفی می‌شود (۱۲).

آویشن یکی از گیاهان دارویی مهم در ایران است که در طب سنتی و مدرن کاربرد فراوان دارد (۲۰). جنس آویشن (*Thymus*)، یکی از جنسهای خانواده نعناعیان (Lamiaceae) است که در زیرخانواده Nepetoideae قرار دارد (۱۹). با توجه به اهمیت این گیاه در صنایع دارویی، محققان به دنبال آن می‌باشند که با استفاده از فن‌آوریهای زیستی علاوه بر مطالعات پایه (از قبیل شناسایی گونه‌ها و تاکسونومی)، به کاربردهای زیستی تولید داروها و مهندسی متابولیک آن بپردازند.

همانند بسیاری از فن‌آوریهای دیگر، زیست‌فناوری دارای مزایای زیادی می‌باشد و با توجه به نیاز فراوان به این رشته، هر روز شاهد ظهور فنون جدید آزمایشگاهی یا

بهبود فنون قبلی در مطالعات و پژوهشهای این رشته می توان بود. یکی از مهم ترین تکنیکهای پایه در علوم DNA نوترکیب و مهندسی ژنتیکی و سایر مطالعات ژنتیکی، استخراج DNA است و شاید بتوان گفت استخراج اسیدهای نوکلئیک اولین گام در انجام این‌گونه مطالعات است (۱). از آنجایی که در اکثر فنون آزمایشگاهی از تکنیک واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) برای آنالیز DNA استخراج شده استفاده می‌شود و با توجه به حساسیت زیاد این سیستم به یک الگو با کیفیت و کمیت مناسب (۷) نیاز به بهینه‌سازی روش استخراج احساس می‌شود. وجود ترکیبات بازدارنده در محلول DNA استخراج شده باعث جلوگیری از فعالیت آنزیمهای تک پلیمراز در واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) و همچنین مانع عمل آنزیمهای برشگر می‌شود (۹). روشهایی که نیاز به تجهیزات پیشرفته آزمایشگاهی نداشته باشد و با هزینه کمتری بتوان DNA قابل استفاده از لحاظ کمی و کیفی به‌دست آورد، بسیار مورد اهمیت است. با وجود اینکه ایده اصلی پشت استخراج DNA خیلی پیچیده نیست، دستورالعملهای مختلف استخراج DNA برای گونه‌های خاصی پیشنهاد شده است و دستورالعملهای منتشر شده لزوماً قابل استفاده برای همه گونه‌ها نیست (۲۱). مشکلی که عمدتاً در طی استخراج رخ می‌دهد این است که ترکیباتی از قبیل پلی-ساکاریدها و ترکیبات فنلی به شکل کمپلکس با اسیدهای نوکلئیک باند می‌شوند (۲۳)، که تغییر در pH و ترکیب بافر استخراج توانسته است در بهبود کمیت و کیفیت DNA استخراج شده تا حدودی موثر باشد (۱۸).

تحقیقات متعددی جهت بهینه‌سازی روش استخراج صورت گرفته است به‌طور مثال شلفرد و همکارانش (۲۰۰۲) دستورالعملهای استخراج را در سه گونه مختلف با بافتهای تازه و فریز شده مقایسه نمودند و دریافتند که بافتهای فریز شده دارای غلظت DNA بیشتری هستند (۲۲). امام جمعه و همکاران (۲۰۰۶)، چهار روش استخراج DNA ژنومی را در *Agaricus bisporus* با هم مقایسه کردند، این محققین هر چهار روش را مناسب دانستند و پیشنهاد دادند که هر پژوهشگر براساس امکانات آزمایشگاهی دردسترس، یکی از روشها را انتخاب نماید (۱۴). در تحقیقی دیگر جهت بهینه‌سازی استخراج DNA از گیاهان دارویی که در مناطق مختلف ترکیه رشد می‌کنند چهار روش مورد آزمون قرار گرفت و نتیجه گرفته شد هنگامی که از گیاهان بالغ استفاده می شود هیچ‌کدام از روشها نتیجه مطلوبی را به‌دست نمی‌دهد و این به علت وجود متابولیت‌های ثانویه در این نوع گیاهان می‌باشد (۲۵).

در اکثر منابعی که مورد بررسی قرار گرفت مشخص شد که استخراج از بافتهای جوان به مراتب نتایج بهتری را نسبت به وقتی که بافت پیر بوده ارائه می‌دهد (۱۰، ۱۷ و ۲۶)؛ اما در مواقعی محقق براساس نوع تحقیق و یا به اجبار باید از سطح طبیعت و یا مزرعه نمونه‌برداری کند که در این حالت اکثر گیاهان به گل رفته و متابولیت‌های ثانویه زیادی در گیاه تولید شده‌اند. این موضوع سبب می‌شود کیفیت مطلوبی در حین استخراج DNA مشاهده نشود. بنابراین در این تحقیق به بررسی و بهینه‌سازی روشی مناسب و مطلوب برای گیاه بالغ آویشن پرداخته شد تا بتوان به یک روش مناسب جهت استخراج DNA آن دست یافت و آن را به دیگر گیاهان بالغ هم تعمیم داد. در این مطالعه از چهار روش مختلف استخراج استفاده گردید. همچنین رسوبهای به‌دست آمده در روشهای مختلف جهت درک بهتر از ماهیت مواد موجود در آنها مورد آنالیز فیتوشیمیایی قرار گرفت.

مواد و روشها

مواد گیاهی: نمونه‌های مورد بررسی از مزرعه تحقیقاتی مؤسسه تحقیقات جنگلها و مراتع کشور جمع‌آوری شد. نمونه‌ها همه از گیاهان بالغ و به گل رفته انتخاب گردید. برگهای گیاهان پس از شستشو با آب مقطر توسط ازت مایع پودر و به آزمایشگاه تحقیقاتی دانشکده کشاورزی

دانشگاه لرستان منتقل و درون میکروتیوپ در دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد تا زمان استخراج نگهداری شد.

استخراج DNA: در این تحقیق، روشهای مختلف استخراج شامل، دویل و دویل (۱۳)، دلاپورتا (۱۱)، کانگ و یانگ (۱۵) و خانوجا (۱۷) با توجه به کمیت و کیفیت DNA مورد مقایسه قرار گرفتند. در ادامه یک روش دیگر که مشابه روش خانوجا ولی با کمی تغییرات بود هم مورد آزمون قرار گرفت. در روش خانوجای تغییریافته، تعداد دورهای سانتریفیوژ متفاوت از دستورالعمل اصلی انتخاب گردید (مرحله اول ۸۰۰۰ دور، مرحله دوم ۱۰۰۰۰ دور)؛ همچنین اولین رسوب DNA بهدست آمده، با الکل ۸۰ درصد همراه با سانتریفیوژ در ۱۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۳ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد شستشو داده شد و بعد از خشک کردن رسوب به جای بافر TE با نمک بالا، در آب مقطر دو بار استریل حل گردید. از آنجا که انجام مراحل بعدی پروتکل موجب تشکیل رسوب ژلاتینی DNA شد به‌گونه‌ای که پس از غلظت‌سنجی نمونه‌ها، مقدار DNA بهدست آمده کمتر و از کیفیت مطلوبی برخوردار نبود استخراج در این مرحله به پایان رسانده شد که این کار موجب کوتاه تر شدن مدت زمان استخراج گردید. با توجه به نقش NaCl در استخراج DNA خالص (۳ و ۲۶)، در این روش علاوه بر بافر استخراج که شامل NaCl غلیظ (۵ مولار) بود، در مرحله افزودن ایزوپروپانول هم مجدداً از NaCl غلیظ (۵ مولار) استفاده گردید.

بررسی کمیت و کفیت DNA استخراج شده: با استفاده از الکتروفورز DNA بر روی ژل آگارز ۰/۸ درصد و مقایسه تراکم نوارهای DNA هر نمونه با تراکم نوارهای نشانگر کیفیت باند DNA هر نمونه مشخص شد. برای هر نمونه ۸ میکرولیتر DNA استخراج شده با ۲ میکرولیتر بافر بارگذاری مخلوط شد و در چاهکهای ژل آگارز در شرایط بافری TAE تخلیه گردید و با اعمال ولتاژ ثابت ۹۰ ولت به مدت ۶۰ دقیقه الکتروفورز گردید

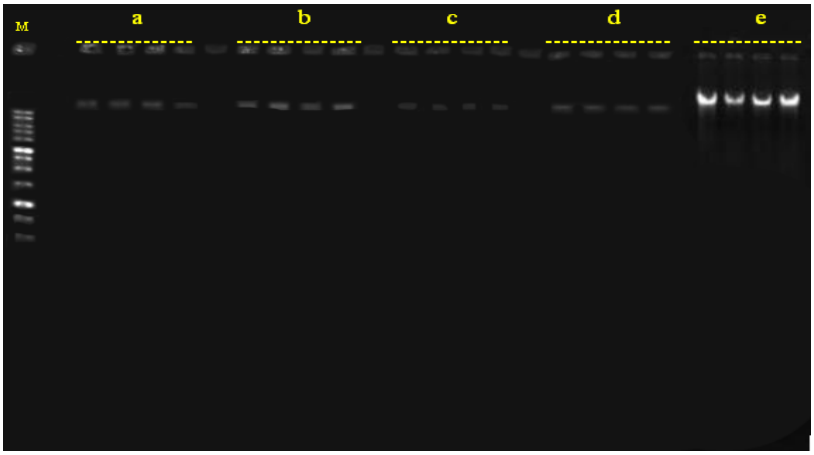
به منظور بررسی کمیت DNA استخراج شده از دستگاه بیوفتومتر استفاده گردید. در ابتدا جهت بالا بردن دقت دستگاه غلظت DNA نمونه‌ها کاهش داده شد. بدین منظور غلظت نمونه‌ها با نسبت ۵ به ۱۹۵ آب مقطر استریل تنظیم گردید و بعد از بلانک دستگاه با آب مقطر استریل، نسبت جذب ۲۶۰ به ۲۸۰ و غلظت DNA بر اساس نانوگرم در میکرولیتر قرائت گردید.

آنالیز فیتوشیمیایی: در روش خانوجای تغییریافته گیاهانی که بافت پودر شده آنها خشبی‌تر بودند، بلافاصله بعد از افزودن نمک در مرحله انکوبه کردن با ایزوپروپانول، در ویال حاوی محلول DNA، رسوب چسبناک قهوه‌ای رنگی تشکیل می‌شد که در سایر روشها مشاهده نگردید. بنابراین، این رسوب مورد بررسی قرار گرفت، تا ترکیبات موجود در آن شناسایی شوند.

به دلیل اینکه رسوبهای قهوه‌ای رنگ به دست آمده از لحاظ رنگ و نمونه مورد بررسی با هم متفاوت بودند، هر رسوب به‌طور جداگانه نگهداری گردید. در ابتدا ۱۰ رسوب مختلف از لحاظ رنگ به طور تصادفی انتخاب گردید. تست حلالیت برای آنها به وسیله ۱۰ حلال مختلف (متانول، اتانول، دی متیل فرم آمید، پروپانول، اتر، کلروفرم، اتیل استات، تترا هیدرو فوران، تولوئن و آب مقطر) انجام شد. با وجود اینکه تمام این حلالها تا حدودی توانستند رسوب را در خود حل کنند اما جهت بررسیهای بعدی از حلال آب مقطر استفاده شد که کار با آن ساده‌تر بود. بنابراین نمونه‌ها با آب مقطر به حجم ۲۵ میلی‌لیتر رسانده و طیف UV آنها با استفاده از دستگاه (SHIMADZU) UV-Visible گرفته شد. سپس برای تعیین کیفی و گروههای عاملی موجود در این رسوبها، طیف IR آنها با استفاده از دستگاه (SHIMADZU) IR به دست آمد. برای این منظور ابتدا ۰/۰۱ میلی‌گرم از رسوب همراه با ۰/۰۲ میلی‌گرم از ماده KBR در هاون به خوبی با هم مخلوط گردید، سپس توسط دستگاه پرس به صورت قرص درآورده و از قرص

حاصل طیف گرفته شد. در انتها برای تعیین نوع مواد و میزان مواد موجود در رسوب از نمونه‌ها طیف GC-Mass گرفته شد. برای این کار ابتدا ۰/۰۰۱ میلی‌گرم از رسوب را در متانول حل کرده و به میزان ۲ میکرولیتر از محلول توسط سرنگهای خاص به دستگاه تزریق گردید و طیف آن به دست آمد.

نتایج و بحث



شکل۱- DNA ژنومی استخراج شده از گیاه آویشن به کمک روشهای متفاوت (از چپ به راست): a) روش b Dellporta) روش CTAB c) روشKang and Yang d)روش خانوجا e) روش خانوجای تغییر یافته M) نشانگر اندازه 1kb.

مقدار OD بین ۲-۱/۸ بود که نشان‌دهنده آن است DNA استخراجی از کیفیت و خلوص بالایی برخوردار است (جدول ۱). NaCl به کار رفته در استخراج با تشکیل یون Na^+ و اتصال با فسفات موجود در ساختمان DNA سبب می‌شود که مولکولهای DNA به دور هم جمع شوند. همان‌طور که در جدول ۱ دیده می شود، روش خانوجای تغییر یافته، به دلیل استفاده از غلظت بالای NaCl نتایج چشمگیری از نظر کیفیت پس از غلظت‌سنجی DNA نشان داد که استفاده دو مرحله‌ای از نمک در تحقیقات دیگر هم نتیجه مطلوبی را ارائه داده است (۱۶). همچنین در تحقیقات دیگر کاربرد NaCl با غلظت بالا توانست کیفیت مطلوب‌تری از DNA را به دست آورد (۲۴).

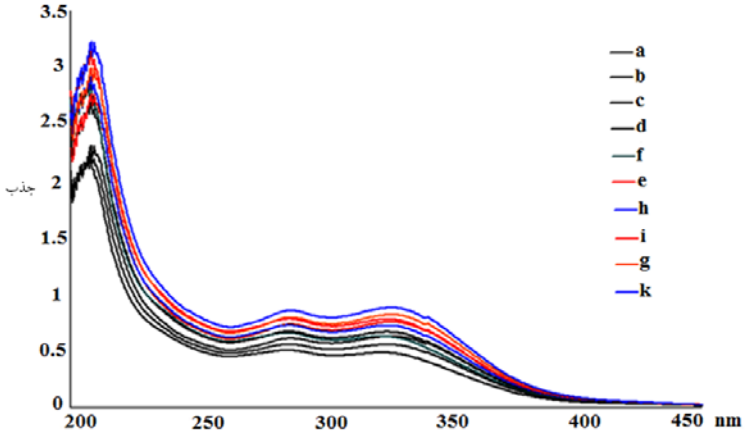
در روش Doyle and Doyle استفاده از استات آمونیوم باعث تشکیل رسوب ژلاتینی شد که پس از غلظت‌سنجی نمونه‌ها، مقدار DNA به‌دست آمده کمتر و میزان آلودگی بیشتر بود(۱۳). در روش دلاپورتا به علت عدم اتصال بهینه SDS بافر استخراج با پروتئینها در نتیجه نسبت OD ۲۶۰/۲۸۰ پس از غلظت‌سنجی بالا گزارش شد(۱۱). در روش Kang and Yang، حتی فنل هم نتوانست نتیجه قابل قبولی بدهد و مقدار DNA کمتر از روش خانوجای تغییریافته بود (۱۵).

از بین روشهای مورد آزمون روش خانوجا با اندکی تغییرات نتایج بهتری را نشان داد. کیفیت DNA استخراج شده در این روش از روش‌های دیگر بالاتر بود (شکل ۱). این روش بهینه شده به نوعی ترکیبی چند روش متداول می‌باشد. استفاده از روشهای ترکیبی می‌تواند نتایج بهتری را نسبت به روشهای متداول داشته باشد (۵).

جدول ۱- مقایسه کمی و کیفی پنج روش استخراج DNA مورد مطالعه در این تحقیق.

	انواع روشها				
	CTAB	Dellporta	Kang and Yang	Khanuja۵۰۰	modified Khanuja
غلظت(ng/µl)	۳۲۰	۱۸۰	۴۱۰	۱/۳	۸۰۰
$OD_{260/280}$	۱/۷	۲/۵	۱/۴		۱/۹

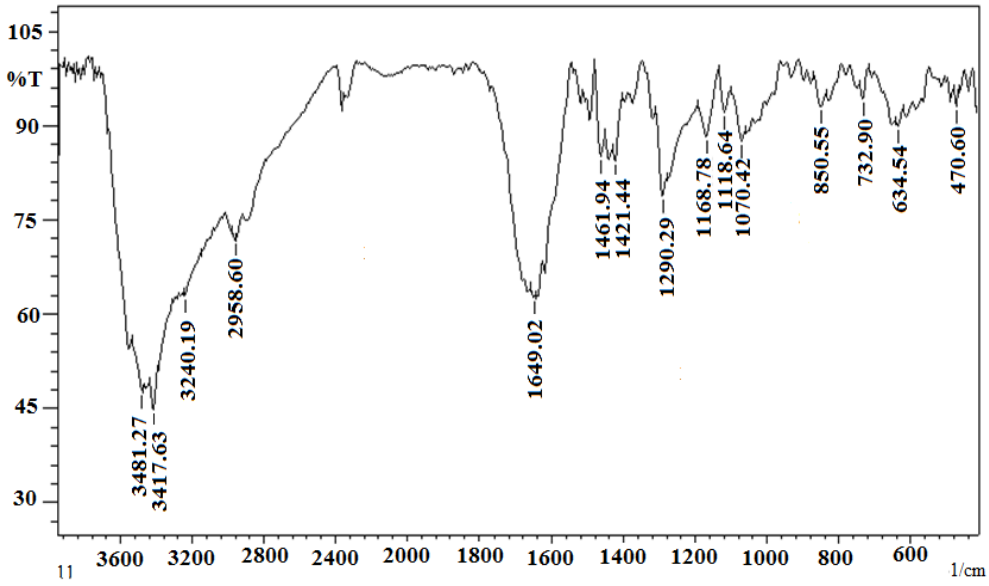
همان‌گونه که در شکل۲ دیده می‌شود، تمامی ۱۰ نمونه، الگوی منحنی یکسانی را نشان دادند؛ این امر مبین این موضوع است که تمام نمونه‌های مورد آزمون دارای ترکیبات مشابه می‌باشند و تنها غلظت آنها متفاوت است؛ دلیل متفاوت بودن رنگ رسوبها هم همین تفاوت در غلظت‌ها می‌باشد.



شکل۲- طیف UV از ۱۰ نمونه تصادفی. حروف a تا k نمایانگر نمونه‌ها می‌باشد.

با توجه به این موضوع، تمام رسوبهای حاصل با هم مخلوط شده و در آنالیزهای بعدی از مخلوط این رسوبها استفاده گردید. طیف IR تا حدودی نشان‌دهنده گروههای عاملی موجود در ماده ناشناخته می‌باشد. پیکهای ظاهر شده در ۱۴۰۰ تا ۱۵۵۰ مربوط به کربنهای (C-C) آروماتیک می‌باشد و پیک ۱۶۴۹ مربوط به گروه کربونیل EDTA می‌باشد که یکی از ترکیبات اولیه بافر استخراج است (شکل ۳). همچنین پیک ناحیه ۲۳۰۰ تا ۳۶۰۰ مربوط به OH فنل می‌باشد و پیک ناحیه ۲۹۰۰ مربوط به CHهای آروماتیک است. پیکهای ۳۰۰۰ تا ۳۲۰۰ مربوط به CHهای آلیفاتیک می‌باشد. پیک ظاهر شده در ۱۲۹۰ مربوط به CO یگانه است که ممکن است مربوط به فنل و یا EDTA باشد. با توجه به این اطلاعات، نمونه مجهول شامل بخش عظیمی از ترکیبات آروماتیکی و آلیفاتیکی می باشد.

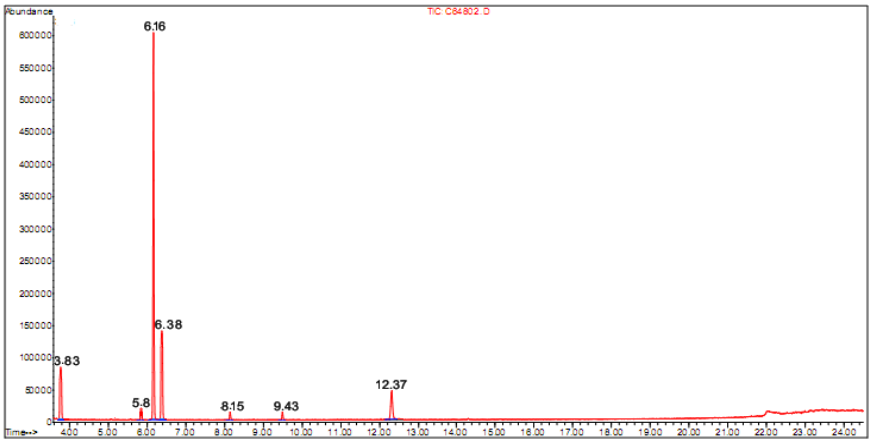
طیف GC مشخص کننده تعداد ترکیبات پایدار در نمونه مجهول می‌باشد، که هرچه میزان جذب یک پیک بیشتر باشد نشان‌دهنده آن است که، آن ترکیب در نمونه مجهول درصد بیشتری دارد. همچنین هرچه پیک در زمان بازداری طولانی‌تری ظاهر شود، نشان‌دهنده جرم مولکولی بیشتر آن ماده است. از روی طیف GC به دست آمده مشخص شد که پنج ماده پایدار در این رسوب وجود دارند و ترتیب ظهور آنها نیز در شکل ۴ نشان داده شده است.



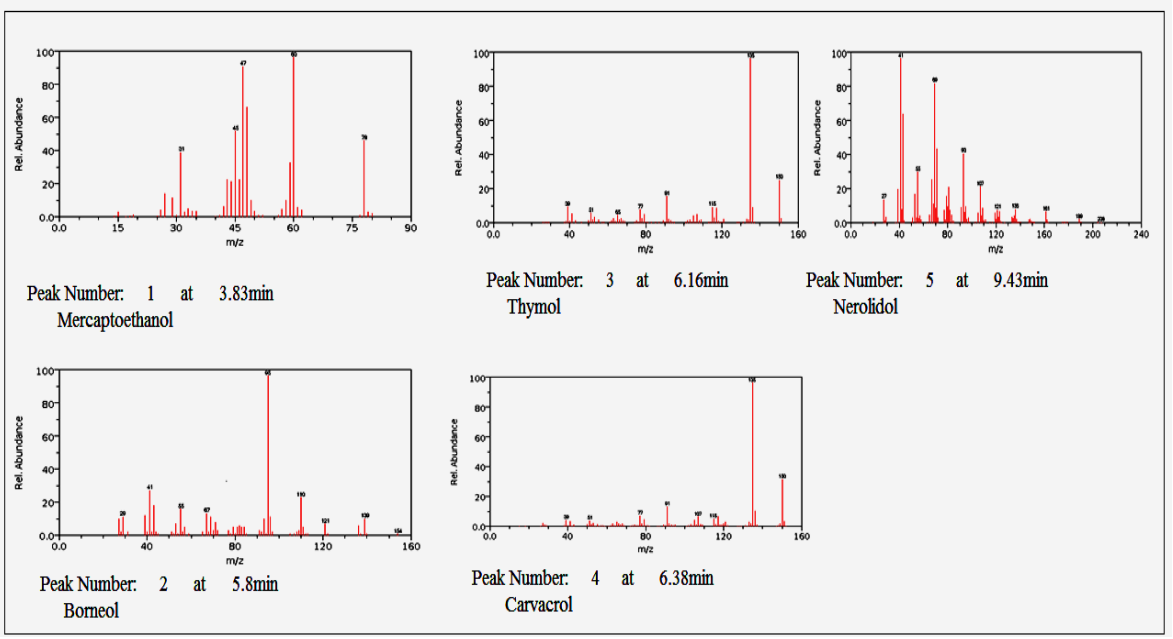
شکل۳- طیف IR، مربوط به رسوب حاصل از استخراج DNA

با توجه به طیف Mass مشخص شد که اولین طیف که در دقیقه ۳/۸۳ ظهور کرده متعلق به ماده مرکاپتواتانول است که از مواد اولیه بافر استخراج می‌باشد؛ دومین طیف در دقیقه ۵/۸ مربوط به ماده بورنئول بوده و در چرخه بیوسنتز بعد از تیمول و کارواکرول تولید می‌شود (۴)؛ سومین طیف در دقیقه ۶/۱۶ ماده تیمول است که یکی از متابولیت‌های ثانویه عمده آویشن بوده و تحقیقات نشان داده است که اثر آرام بخشی این گیاه تا حدود زیادی بستگی به وجود این متابولیت دارد (۲۷)؛ طیف چهارم متعلق به ماده کارواکرول است که در دقیقه ۶/۳۸ ظهور کرده این ماده خاصیت آنتی اکسیدانی دارد (۸) و آخرین طیف در دقیقه ۹/۴۳ ظهور کرد که مربوط به ماده نرولیدول بود (شکل۵).

همانطور که مشاهده می‌شود یکسری از مهمترین متابولیت-های ثانویه در آویشن که می‌توانند مواد مزاحم در استخراج DNA از گیاهان مسن باشند، توسط روش استخراج DNA خانوجا (با اندکی تغییرات) جداسازی شده‌اند؛ که این مواد در گیاهان بالغ و مسن به‌وفور یافت می‌شوند.



شکل۴- طیف GC، مربوط به رسوب حاصل از استخراج DNA



شکل۵- طیف Mass حاصل از آنالیز پیکهای مهم نمونه های GC به ترتیب زمان ظهور پیک

روشهایی که در این تحقیق مورد بررسی قرار گرفتند بارها در مطالعات قبلی نتایج رضایت‌بخشی را نشان دادند به طور مثال کاراکوسیس (۲۰۰۳) توانست با روش Kang and Yang، DNA خالص و مطلوبی را استخراج کند (۱۶)؛ همچنین اعلائی و همکاران (۱۳۸۵) با استفاده از روش CTAB توانستند DNA ای با کمیت و کیفیت مناسب از گیاه سیکلامن جداسازی نمایند (۱). باقرزاده و همکاران (۱۳۸۸) با استفاده از روش خانوجا موفق به استخراج DNA خالص از گیاه دارویی آویشن شدند(۲)؛ معصومی اصل وهمکاران (۱۳۸۸) توانستد با روش دلاپورتا جهت آنالیز PCR نمونه های با کیفیتی را استخراج کنند(۶).

جدول۲- مراحل دستورالعمل روش استخراج بهینه شده

مرحله۱	حدود ۲۰۰ تا ۲۵۰ میلی‌گرم از بافت گیاهی پودر شده در نیتروژن مایع به داخل میکروتیوپ۲ میلی‌لیتری انتقال داده شود.
مرحله۲	۸۰۰ میکرولیتر از بافر استخراج (Tris-Hcl ۱۰۰mM یک مولار؛ EDTA ۲۵mM نیم مولار؛ ۲/۵٪ CTAB (۲۰w/v٪)؛ ۱/۵M NaCl ۵ مولار؛ ۰/۲v/v٪ مرکاپتواتانول و ۱w/v٪ از PVP) اضافه کرده و میکروتیوپ‌ها را در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد بن‌ماری به مدت یک ساعت قرار می‌دهیم.
مرحله۳	هم حجم محلول فوق، کلروفرم-ایزوآمیل (۲۴:۱) اضافه کرده و به مدت ۱۵ دقیقه با سروته کردن میکروتیوب، مخلوط و سپس در دور ۸۰۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه در ۳۰-۲۵ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ گردد.
مرحله۴	مایع فوقانی را به میکروتیوب جدید منتقل کرده و به فاز رویی ۴۰۰ میکرولیتر NaCl ۵ مولار افزوده و سپس میزان ۰/۶ حجم محلول، ایزوپروپانل ۱۰۰٪ اضافه کرده و پس از سروته کردن به مدت یک ساعت در دمای محیط قرار داده شود.
مرحله۵	سانتریفیوژ در دور ۱۰۰۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه در ۳۰-۲۵ درجه سانتی‌گراد انجام گیرد. در این مرحله یک رسوب شیری رنگ در ته لوله تشکیل می‌گردد (مایع فوقانی حذف شود).
مرحله۶	رسوب حاصله با الکل سرد ۸۰٪ شستشو داده شود و سپس در مجاورت هوا تا حدودی خشک گردد.
مرحله۷	رسوب خشک شده در ۲۰۰ میکرولیتر آب مقطر دو بار تقطیر حل گردد و سپس در ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شود.

اما درخصوص گیاهان بالغ که دارای متابولیت‌های ثانویه زیادی هستند این روش‌ها چندان کارساز نیستند که این مطلب با نتایج به‌دست آمده توسط ورال (۲۰۰۹) که بر روی گیاهان دارویی بالغ صورت گرفته بود، مطابقت داشت (۲۵).

بنابراین روشی که در این مطالعه بهینه گردید (جدول۲)، می‌تواند به عنوان یک دستورالعمل پایه برای مطالعات مختلف بر روی گیاهان دارویی مسن که دارای متابولیت-های ثانویه زیادی (به ویژه با ترکیبات مشابه این گیاه) بوده، پیشنهاد گردد.

منابع

۱- اعلائی، م.، ر. نادری.، ا. خلیقی.، ع. وزوائی و س. ع. سلامی (۱۳۸۵). بررسی اجزای موثر در کمیت و کیفیت DNA ژنومی استخراج شده از گونه‌های سیکلامن موجود در ایران. مجله پژوهش و سازندگی در زراعت و باغبانی. شماره ۷۳: ۱۱-۱۶.

۲- باقرزاده، ف.، ف. ا. شهریاری و ح. مرعشی (۱۳۸۸). بررسی تنوع ژنتیکی بین گونه‌ای و درون گونه‌ای آویشن و تعیین روابط خویشاوندی با استفاده از ارزیابی مولکولی RAPD. ششمین همایش ملی بیوتکنولوژی جمهوری اسلامی ایران، تهران.

۳- باقری، ع (۱۳۷۶). مبانی کشت بافت‌های گیاهی. انتشارات دانشگاه فردوسی مشهد.

۴- جم‌زاد، ز (۱۳۸۸). آویشن و مرزه‌های ایران. انتشارات موسسه تحقیقات جنگل‌ها و مراتع کشور.

۵- لهراسبی نژاد، ا.، م. م. یعقوبی و ح. ناظم (۱۳۸۹). بهینه‌سازی استخراج و تکثیر DNA از بلوک‌های بافتی پارافینی با ارائه یک روش ترکیبی. مجله زیست‌شناسی ایران. ۲۳(۱): ۱۳۲-۱۴۰.

۶- معصومی اصل، ا.، م. جلالی جواران.، ف. مهبودی و ه. علیزاده (۱۳۸۸). همسانه‌سازی وانتقال ژن فعال‌کننده پلاسمینوژن بافتی (tPA) با منشاء انسانی به گیاه توتون. مجله زیست‌شناسی ایران. ۲۲(۳): ۵۱۶-۵۲۵.

۷- نیوتن، ک. و ا. گراهام (۱۳۸۱). واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز PCR مقدمه‌ای بر تکنیک‌های ملکولی. ترجمه: شهریاری، ف. و امام جمعه، ع. ۲۲۳ صفحه. انتشارات دانشگاه امام رضا (ع).

8- Aeschbach R, Loliger J, Scott, B C, Murcia A, Butler J, Halliwell B, Aruma O I (1994) Antioxidant actions of thymol, carvacrol, 6-gingerol, zingerone and hydroxytyrosol. Food Chemistry Toxicology 32:6-31.

9- Bushra C, Afshan Y, Tayyab H, Riazuddin S (1999) Mini-scale genomic DNA extraction from cotton. Plant Molecular Biology Reports 17: 1-7.

10- Choudhary K, Mathur N, Choudhary O P, Pillai U (2008) Protocol for Isolation of Genomic DNA from dry and fresh leaves of *Vigna* species suitable for RAPD and restriction digestion. Advances in Biological Research 2 (5-6): 83-89.

11- Dellaporta S L, Wood J, Ticks J B (1983) A plant molecular DNA minipreparation version 2. Plant Molecular Biology Reports 1: 19-21.

12- Dorman H J, Deans S G (2000) Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. Journal Application Microbiology 88: 308-316

13- Doyle J J, Doyle J L (1990) Isolation of plant DNA from fresh tissue. Focus 12:13–15.

14- Imamjomeh A, Soluki M, Taheri F, Nikfetrat A (2006) Comparison of DNA extraction methods in *Agaricus bisporus* by random and semi random PCR (RAPD and ISJ markers). Proceedings of the 2006 WSEAS Int. Conf. on Cellular and Molecular Biology, Biophysics and Bioengineering, Athens, Greece. pp. 63-68.

15- Kang T J, Yang M S (2004) Rapid and reliable extraction of genomic DNA from various wild-type and transgenic. Biotechnology 6750:4-20.

16- Karakousis A, Langridge P (2003) A High-throughput plant DNA extraction method for marker analysis. Plant Molecular Biology Reporters 21: 95a–95f.

17- Khanuja S P S, Shasany A K, Darokar M P, Kumar S (1999) Rapid isolation of DNA from dry and fresh samples of plants producing large amounts of secondary metabolites and essential oils. Plant Molecular Biology Reporters 17: 1–7.

18- Lodi M A, Ye G N, Weeden N F, Reisch B I (1994) A simple and efficient method DNA extraction from grapevine cultivars and vitis species. Plant Molecular Biology Reporters 12: 6-13.

19- Morales R (2002) The history, botany and taxonomy of the genus *Thymus*. In: Stahl-Biskup, E. Sazes, F.eds. *Thyme*. The genus *Thymus*.346 pages. Taylor & Francis.

20- Naghibi F, Mosaddegh M, Mohammadi Motamed S, Ghorbani A (2005) Labiatae Family in folk Medicine in Iran: from Ethnobotany to Pharmacology. Iranian Journal of Pharmaceutical Research 2: 63-79

21- Porebski S, Bailey L G, Baum B R (1997) Modification of a CTAB DNA extraction protocol for plants containing high polysaccharide and polyphenol components. Plant Molecular Biology Reporter 15:8-15.

22- Shelpherd M, Cross M, Stokoe R, Scott L, Jones M (2002) High-troughput DNA extraction from forest trees. Plant molecular biology reporter 20 (3): 425a-425j.

23- Varadarajan G S. Prakash C S (1991) A rapid and efficient method for the extraction of total DNA from the sweet potato and its related species. Plant Molecular Biology Reporter 9(1):6-12.

24- Vroh B I I, Hraventg L, Chandelier A, Mergeai G, Du Jardin P, (1996) Improved RAPD amplification of recalcitrant plant DNA by use of activated charcoal during DNA extraction. Plant Breeding 115:205-206.

25- Vural H C (2009) Genomic DNA isolation from aromatic and medicinal plants growing in Turkey. Scientific Research and Essay 4 (2): 059-064.

26- Wang H, Qi M, Cutler A J (1993) A simple method of preparing plant samples for PCR. Nucleic Acids Research 21: 5651-5655.

27- Wienkotler N, Begrow F, Kinzinger U, Schierstedt D, Verspohl E J (2007) The effects of thyme extracts on β2-receptors and mulocillary clearance. Planta medical 73(7): 629-635.

Separation of secondary metabolites in DNA extraction process of *Thymus* and analysis of them by GC mass

Zabeti S.M.[1], Ismaili A. [1], Madah-Arefi H.[2], Nazarian-Firouzabadi F.[1] and Mojiri F.[1]

[1] Agronomy and Plant Breeding Dept.,Faculty of Agriculture, Lorestan University, Khorramabad, I.R. of Iran

[2] Seed and Plant Certification and Registration Institute, Karaj, I.R. of Iran

Abstract

One of the basic needs of different techniques in molecule biology is the production of genomic DNA with desired quality and quantity. In some researches the plant samples are collected from nature and these plant tissues are usually adult and due to presence of carbohydrate, polyphenols complex and proteins in their components, we cannot extract DNA with high quality and quantity. In other hand, these complexes are bond with nucleic acids and separation of them from acid nucleic is difficult. In this study, genomic DAN extraction from the leaf of adult *Thymus* plant was carried out by Doyle and Doyle, Dellaporta, Kang and Yang and Khanuja methods. The results showed that Khanuja method with some modifications is better than others. In this extraction method, brown-sticky sediment was separated from DNA. Analysis by GC-Mass, IR and UV revealed that this sediment contain Thymol, Carvacrol, Nerolidol and Borneol. Thymol substance has the greatest amount in GC (%65). So, the improved Khanuja method can separate the main secondary metabolites of *Thymus* and this method could be advised for DNA extraction from adult and mature plant.

Key words: *Thymus*, DNA extraction, secondary metabolites, GC-Mass, IR