مجله علوم و فنون باغبانی ایران جلد ۲۴ شماره ۴ صفحه‌های ۵۰۳ تا ۵۲۴ (۱۴۰۲)
مقاله پژوهشی

بهینه‌سازی استخراج اسید نوکلئیک از سیکلامن ایرانی (*Cyclamen coum* Miller)

Optimization of Nucleic Acid Extraction from *Cyclamen coum* Miller

محمدصادق تمکین[۱]، مرضیه قنبری جهرمی*[۱]، امیر موسوی[۲]
۱- گروه علوم باغبانی و زراعی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران
۲- پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری، تهران، ایران
* نویسنده مسئول، پست الکترونیک : (ghanbari@srbiau.ac.ir)
تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۵/۳، تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۴/۱۷

چکیده

سیکلامن هم به عنوان گیاه زینتی و هم دارویی شناخته شده است. عصاره این گیاه، فعالیت زیستی قوی و محتوای پلی فنولی، تانن و پروتئین بالا دارد. به دلیل وجود این ترکیبات بازدارنده، استخراج اسیدهای نوکلئیک از گیاه دشوار است. بیشتر آزمون‌های زیستی با استخراج DNA و RNA آغاز می‌شود. بنابراین، انتخاب یک روش استخراج مناسب، قابل اعتماد و تکرارپذیر، اهمیت زیادی دارد. در این آزمایش، بهینه‌سازی استخراج اسیدهای نوکلئیک از گیاه سیکلامن ایرانی (*Cyclamen coum* Miller) و امکان بیان ژن‌های خانه‌دار مناسب در این گونه، ارزیابی شد. پس از جمع‌آوری نمونه‌های گیاهی از سه اندام برگ، گلبرگ و هیپوکوتیل، برای استخراج DNA روش‌های تغییریافته CTAB و SDS و برای استخراج RNA روش‌های Trizol تغییریافته، CTAB-LiCl و RNX-Plus، استفاده شد. کیفیت و کمیت DNA و RNA استخراج شده از راه الکتروفورز، اسپکتروفتومتری و PCR بررسی شد. برای تایید کیفیت DNA استخراج شده وجود قطعات ژن‌های *18S* ریبوزومی، اکتین (*ACT*)، توبولین (*TUB*) و فاکتور طویل‌سازی (*EF-1a*) به عنوان ژن خانه‌دار با کمک PCR بررسی شد. بر اساس نتایج به‌دست آمده، کمترین غلظت DNA در روش CTAB تغییریافته مشاهده شد. غلظت و کیفیت DNA نمونه‌های برگ، گلبرگ و هیپوکوتیل در روش SDS تغییریافته بهتر از روش CTAB بود. مقایسه سه روش Trizol تغییریافته، CTAB-LiCl و RNX-Plus در استخراج RNA، نشان داد که روش Trizol تغییریافته از لحاظ وضوح نوارها و غلظت RNA استخراج شده بهتر از دیگر روش‌ها بود. با استفاده از این پروتکل، نسبت جذب A260/280 نانومتر از ۲/۰۱ تا ۲/۱۰ متغیر بود که نشان دهنده کیفیت بالای RNA جدا شده بدون آلودگی فنولی یا پروتئینی است. علاوه بر این، نسبت A260/A230 نانومتر بین ۱/۹۹ و ۲/۱۵ بود که نشان می‌دهد RNA استخراج شده بدون پلی ساکارید است. ساخت cDNA از RNA استخراج شده از سه بافت سیکلامن ایرانی تنها در دو روش Trizol و RNX-Plus با موفقیت انجام شد. برای بررسی کیفیت نمونه‌های RNA، امکان بیان ژن‌های خانه‌دار با استفاده از RT-PCR ارزیابی شد. نتایج RT-PCR نشان داد که در بین ژن‌های خانه‌دار، *TUB* و *18S* در همه نمونه‌های برگ، گلبرگ و هیپوکوتیل سیکلامن ایرانی از وضوح باند بیشتر و کیفیت بالاتری برخوردار بودند.

واژه‌های کلیدی: استخراج RNA، Trizol، *Cyclamen coum*، استخراج DNA، ژن خانه‌دار.

مقدمه

دانش مولکولی دارای اهمیت روزافزونی در پژوهش‌های گوناگون علوم زیستی است و استخراج اسیدهای نوکلئیک، نخستین گام برای انجام این پژوهش‌ها می‌باشد. آگاهی از روش‌های استخراج کارآمد برای نمونه‌گیری و دستورزی در کارهای مولکولی در آزمایشگاه بسیار مهم است. سیکلامن ایرانی (*Cyclamen coum* Miller) گیاهی زینتی از تیره Primulaceae، از جمله گیاهانی است که بومی ایران می‌باشد (Alaey *et al*., 2005). به خاطر شرایط آب و هوایی مناسب، ایران دارای ژرم‌پلاسم غنی سیکلامن

[Downloaded from journal-irshs.ir on 2025-12-05]

و یکی از خاستگاه های مهم رویش سیکلامن می باشد، که این امر جمع‌آوری ژنوتیپ‌های گوناگون و ایجاد مجموعه‌هایی از این گیاه را ممکن می‌سازد. بنابراین ارزیابی و دسته‌بندی ژرم‌پلاسم از مراحل مهم نگهداری این گیاه است (Alaey *et al*., 2005). سیکلامن، یک گیاه زینتی گلخانه‌ای است که در زمستان به بازار عرضه می‌شود و چون گیاهان کمی در این فصل قادر به گلدهی هستند، بنابراین از دیدگاه اقتصادی ارزشمند است. رشد گیاه سیکلامن گسترده اما کند بوده و نیاز به یک دوره به نسبت طولانی برای گل‌دهی و ورود به مرحله زایشی دارد. این گیاه در همه مراحل رشد تا زمان گل‌دهی، نیاز به نگهداری ویژه دارد. اگر چه برخی از نمونه‌های این گیاه را به خاطر مقاومت در برابر سرما می‌توان در فضای باز کاشت؛ اما بیشتر این گیاهان به عنوان گیاهانی گلدانی پرورش می یابند. بهنژادگران انگلیسی ابتدا سعی بر پر رنگ‌تر و بزرگ‌تر کردن گلبرگ‌ها با جامی پهن‌تر کردند و در سال ۱۸۷۰ در انگلستان و آلمان گل‌هایی با دو برابر اندازه به وجود آمدند. هم اکنون در بازار انواع دوگان و چندگان این گیاه در دسترس است (Makari Khaje Dizj, 2016).

سیکلامن‌های وحشی دارای ویژگی‌هایی مانند مقاومت به یخبندان، تحمل به گرما، عطر گل، رنگ گل، شکل برگ، گلدهی در پاییز و زمستان و مقاومت به بیمارگر هستند که در سیکلامن‌های تجاری وجود ندارند، بنابراین از این گونه‌ها برای اصلاح و بهبود این ویژگی‌ها در سیکلامن تجاری استفاده می‌شود (Naderi, 2001). با توجه به اهمیت این گیاه در باغبانی و صنعت، بهبود ویژگی‌های آن از راه شناسایی ژنوم و پژوهش گوناگونی زیستی است. از آنجایی که کیفیت و کمیت استخراج RNA در موفقیت سنجش های مولکولی مانند RT-PCR و Northern blotting بسیار مهم است، بهینه‌سازی روش‌های گوناگون استخراج ریبونوکلئیک‌اسید (RNA) به صورت ساده و سریع از بافت‌های گوناگون گیاهی مانند گلبرگ، غده و برگ، ضروری به نظر می‌رسد. علت کیفیت و کمیت پایین محصول استخراج RNA از برخی بافت‌ها، تولید متابولیت‌های ثانویه مانند پلی‌فنول‌ها، لیگنین‌ها، کربوهیدرات‌ها و روغن‌های اتری در آن‌ها می‌باشد که در زمانی که بافت‌ها تخریب می‌شوند با اسیدهای نوکلئیک ترکیب می‌شوند (Dong and Dunstan, 1996). استخراج RNA از برخی بافت‌های گیاهی بسیار دشوار است. افزون بر این، حضور ریبونوکلئازها در بافت‌های گیاهی موجب تخریب سریع RNA می‌شود. با توجه به این که بافت‌های گوناگون گیاهی از لحاظ محتوای این گونه متابولیت‌های ثانویه و آنزیم‌های مداخله‌گر متفاوت هستند، بنابراین یک روش استخراج برای همه بافت‌ها کارایی ندارد (Ghawana *et al*., 2011).

بیشتر پژوهش‌ها نشان می‌دهد که بافت گیاهی نمونه‌های استخراج شده ممکن است محتوی DNA میکروارگانیسم‌ها مانند قارچ یا باکتری (D´Angelo *et al*., 2007) یا محتوی رسوب مواد شیمیایی از جمله پلی‌فنول‌ها، ترپنوئیدها، تانن و پلی‌ساکاریدها (Huang *et al*., 2012) باشند که می‌توانند به عنوان مهار کننده DNA پلی‌مراز طی تکثیر DNA گیاهی عمل کنند. اگر چه روش‌های بسیاری برای استخراج DNA از بافت‌های گیاهان گوناگون صورت گرفته است، اما پژوهش‌ها در زمینه استخراج در سیکلامن ناچیز بوده و گزارش های کمی در مورد استخراج DNA، از سیکلامن ارائه شده است (Alaey *et al*., 2005). در یک پژوهش، استخراج DNA ژنومی خالص از برگ‌های بالغ *C. persicum* Mill. و سایر گیاهان با پلی‌وینیل پلی‌آی پیرولیدون (PVPP) انجام شد (Kasajimaa *et al*., 2013). در این بررسی مجموعه‌ای از روش‌های استخراج، خالص‌سازی و اندازه‌گیری DNA به همراه آماده‌سازی نمونه‌ها برای به‌دست آوردن DNA خالص از برگ‌های بالغ سیکلامن و گونه‌های درختی ارائه شده است که کیفیت و مقدار DNA استخراج شده با هیچ روش دیگری قابل استخراج نمی‌باشد. در این آزمایش، یک بافر جدید استخراج DNA بنام buffer PVPP ساخته و نام‌گذاری شد که می‌تواند ۲۰ میلی‌گرم DNA را از ۱ گرم برگ‌های تازه و بالغ سیکلامن استخراج کند (Kasajimaa *et al*., 2013). پس ازاستخراج، خالص‌سازی DNA با موفقیت به وسیله Cesium chloride (CsCl) با التراسانتریفیوژ انجام شده و تجزیه و تحلیل کمی و کیفی DNA استخراج شده نه بر اساس تجزیه و تحلیل مبتنی بر جذب UV، بلکه با استفاده از الکتروفورز ژل انجام شد. به نظر می‌رسد که جذب UV کیفیت و کمیت DNA را بیش از اندازه نشان می‌دهد. پیش‌بینی می‌شود که کیفیت و مقدار عصاره‌های DNA در گزارش‌های پیشین کافی نبوده و بیش از مقدار واقعی گزارش شده است (Kasajimaa *et al*., 2013). DNA خالص در مقادیر بالا از برگ‌های بالغ گونه‌های مورد آزمایش (کاملیا، گل داودی، ارکیده، کاج، گل رز و چای) قابل بازیافت است که شامل استفاده از بافر PVPP و تصفیه با CsCl می‌باشد. استخراج با استفاده از بافر PVPP نیازی به تجهیزات ویژه ای ندارد و تصفیه CsCl نیاز به یک التراسانتریفیوژ دارد (Kasajimaa *et al*., 2013).

[Downloaded from journal-irshs.ir on 2025-12-05]

بررسی‌ها نشان می‌دهد استخراج RNA نسبت به DNA بسیار دشوارتر می‌باشد، زیرا مولکول RNA تک رشته‌ای بوده و حساسیت بالایی نسبت به گرما و فعالیت آنزیم RNase دارد که باعث تخریب آن می‌گردد (Gudenschwagera *et al*., 2012 و Liao *et al*., 2020). افزون بر این، بافت‌های گیاهی گوناگون از نظر مقدار و نوع ترکیب‌های پلی‌فنولی، پلی‌ساکاریدها، متابولیت‌های ثانویه و پروتئین‌ها با هم فرق دارند، بنابراین روش‌های گوناگونی بسته به نوع نژادگان گیاهی و یا اندام‌های گوناگون گیاهی برای استخراج RNA کل وجود دارد. این روش‌ها به طور معمول بر اساس CTAB، SDS، گوآنیدینیوم تیوسیانات، گوانیدین هیدروکلراید، فنل و کلروفرم، استوار می‌باشند. وجود ترکیب‌های پلی‌فنولی در گیاهان، مانع استخراج RNA با کیفیت بالا می‌گردد زیرا ترکیب‌های فنولی به آسانی به شکل کوئینون اکسید شده و به اسیدهای نوکلئیک متصل می‌گردند که در نتیجه آن، کیفیت و کمیت RNA به شدت کاهش می‌یابد و غیرقابل استفاده برای ساخت cDNA، RT–PCR و Real-time PCR می‌شود (Liao *et al*., 2020). روش فراگیر استخراج RNA در دنیا، کاربرد کیت می‌باشد، اما کیت به طور معمول گران قیمت است و برای هر گیاهی به صورت ویژه باید مورد بررسی قرار گیرد. اگر چه چندین روش برای استخراج RNA در گیاهان با ترکیب‌های پلی‌فنل و پلی‌ساکاریدِ بالا گزارش شده است، اما کیفیت و عملکرد RNA استخراج شده در آن‌ها خوب نمی‌باشد (Hu *et al*., 2012). استخراج RNA با کیفیت و کمیت بالا برای پژوهش‌های بعدی مانند بیان ژن، Northern blotting، خالص‌سازی mRNA، qRT-PCR، PCR، RT-PCR و ایجاد کتابخانه cDNA ضروری می‌باشد (Gasic *et al*., 2004).

محتوای بالای پلی‌ساکاریدها، تانن‌ها و پلی‌فنل‌ها می‌تواند استخراج و خالص‌سازی RNA را مهار کند و منجر به ضعف عملکرد در استخراج RNA گردد (Semagn *et al*., 2006; Rajakani *et al*., 2013). با توجه به اینکه بررسی‌های فیتوشیمیایی گیاه سیکلامن بیانگر بالا بودن میزان محتوای پلی فنولی در برگ (Turan *et al*., 2022)، گلبرگ (Kandylis, 2022) و غده (Mahomoodally *et al*., 2021)، تانن بالا در اندام هوایی (Jaradat *et al*., 2017; Turan *et al*., 2022)، فلاوونوئید بالا در برگ و گلبرگ (Jaradat *et al*., 2017 و Mahomoodally *et al*., 2021)، کارتنوئید بالا در گلبرگ و برگ (Cornea-Cipcigan *et al*., 2022) و پروتئین بالا (Alaey *et al*., 2005) در این گیاه است، بنابراین استخراج اسیدهای نوکلئیک در گیاه سیکلامن به خاطر وجود این ترکیبات بازدارنده نیاز به بهینه‌سازی دارد. با در نظر گرفتن اهمیت این گیاه ارزشمند بومی کشور و گوناگونی بالای آن، بهینه‌سازی استخراج اسیدهای نوکلئیک و بیان ژن‌های مرجع با هدف ارایه روشی کارآمد و قابل استفاده در پژوهش‌های مولکولی، سنجش های ژنتیکی و بیان ژن انجام شد.

مواد و روش‌ها

استخراج DNA از بخش‌های گوناگون سیکلامن

برای استخراج DNA ژنومی از نمونه‌های گلبرگ، برگ و هیپوکوتیل استفاده شد. نمونه‌ها، شامل بخش های گوناگون گیاه سیکلامن بود، که در اردیبهشت سال ۱۳۹۸ از جنگل‌های شمالی روستای لاجیم شهرستان سوادکوه، جمع‌آوری شدند. همه نمونه‌ها، پس از بسته‌بندی و کدگذاری درون یخدان کائوچویی دارای یخ به آزمایشگاه رازی دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات تهران، انتقال یافت و تا زمان انجام استخراج DNA ژنومی در فریزر ۸۰- درجه سلسیوس نگهداری گردید. استخراج DNA ژنومی با انجام تغییرهایی در دو روش CTAB (Porebski *et al*., 1997 و Dellaporta *et al*., 1983) و SDS (McCouch, 2002)، انجام گرفت (جدول ۱). پس از استخراج DNA در همه روش‌ها برای اطمینان از کیفیت DNA استخراج شده، الکتروفورز فرآورده استخراج شده روی ژل آگارز (شرکت سیناکلون) با غلظت یک درصد انجام شد. برای بررسی بیشتر کیفیت و کمیت DNA ، غلظت نمونه‌ها توسط دستگاه نانودراپ اندازه‌گیری شد.

استخراج DNA با روش SDS

۱) توزین ۵۰ میلی‌گرم از بافت گیاه، پودر کردن آن با نیتروژن مایع در هاون چینی سرد و انتقال پودر به یک لوله ۲ میلی لیتری انجام شد. ۲) یک میلی لیتر بافر استخراج SDS تغییر یافته (۱۰۰ میلی مولار Tris- Hcl+ ۵۰ میلی مولار EDTA+ ۱۰۰ میلی مولار NaCl) که از قبل گرم شده به همراه ۱۰۰ مایکرولیتر SDS 10% به لوله اضافه و به طور کامل ورتکس شد. ۳) نمونه‌ها به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۶۵ درجه سلسیوس در بن ماری انکوبه و هر ۲ الی ۳ دقیقه یکبار نمونه‌ها به آرامی سر و ته (Invert) شدند. ۴) ۳۰۰ مایکرولیتر پتاسیم استات ۵ مولار اضافه و نمونه‌ها کاملاً ورتکس و سپس به مدت ۲۰ دقیقه روی

[Downloaded from journal-irshs.ir on 2025-12-05]

یخ انکوبه شدند. ۵) نمونه‌ها به مدت ۲۵ دقیقه با دور ۱۳۰۰۰ در دمای ۴ درجه سلسیوس سانتریفیوژ گردید. فاز رویی با دقت جدا شده و به دو لوله ۱/۵ میلی‌لیتری جدید انتقال داده شد. ۶) ایزوپروپانل سرد (۲۰- درجه سلسیوس) به صورت هم حجم اضافه شده و پس از ۴ بار سر و ته کردن به مدت ۱-۰/۵ ساعت در دمای ۲۰- درجه سلسیوس انکوبه گردید. ۷) سپس به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۴ درجه با دور ۱۳۰۰۰ سانتریفیوژ شده و مایع رویی بیرون ریخته شد. ۸) رسوب سفید رنگ DNA با اتانول ۷۰٪ به میزان ۷۰۰ میکرولیتر به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۴ درجه با دور ۱۳۰۰۰ سانتریفیوژ کرده و شستشو داده شد. مایع رویی را دور ریخته و رسوب حاصله خشک شد. ۹) به میزان ۵۰ میکرولیتر بافر TE (۱۰ میلی مولار Tris، ۱ میلی مولار EDTA) به آن اضافه شد و DNA حل گردید. سپس به منظور حذف آلودگی RNA آنزیم RNAse A (Sigma Cat No. R6513) با غلظت ۱۰ میلی‌گرم در میلی لیتر استفاده و لوله‌ها در دمای ۳۷ درجه سلسیوس به مدت ۳۰ دقیقه انکوبه شد. ۱۰) نمونه‌های DNA بر روی ژل آگارز ۱ درصد بارگذاری شد.

استخراج DNA با روش SDS تغییریافته

این روش با ایجاد تغییراتی در روش SDS که در بند ۱-۱ توضیح داده شد آزمایش شد. تغییرات انجام شده شامل اضافه کردن دو مرحله جدید نسبت به روش عادی SDS بود. دو مرحله تکمیلی بعد از مرحله ۵ بدین ترتیب انجام شد؛ اضافه کردن ۵۰۰ میکرولیتر کلروفرم ایزوآمیل الکل (به نسبت ۲۴ به ۱) بعد از مرحله ۵ و سانتریفیوژ به مدت ۱۰ دقیقه ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه انجام شد. فاز مایع بالایی با سمپلر جدا و به لوله جدید منتقل شد. در مرحله بعد حجم ۲۰۰ میکرولیتر استات آمونیوم ۲ مولار به لوله‌ها اضافه و به آهستگی سر و ته و سپس به مدت ۲۰ دقیقه روی یخ انکوبه شدند. در نهایت نمونه‌ها به مدت ۱۵ دقیقه با دور ۱۳۰۰۰ در دمای ۴ درجه سلسیوس سانتریفیوژ گردید.

استخراج DNA با روش CTAB

۱) توزین ۵۰ میلی‌گرم از بافت گیاه، پودر کردن آن با ازت مایع در هاون چینی سرد و انتقال پودر به یک لوله ۲ میلی لیتری انجام شد. ۲) انتقال ۷۰۰ میکرولیتر بافر استخراج CTAB (۲ درصد CTAB، ۱/۴ مولار NaCl، ۱۰۰ میلی مولار Tris/HCl، ۲۰ میلی مولار EDTA، pH: 8.0) انجام شد.۳) لوله‌ها به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۶۵ درجه سلسیوس در بن ماری انکوبه و هر ۲ الی ۳ دقیقه یکبار نمونه‌ها به آرامی سر و ته شدند. ۴) خارج کردن لوله‌ها از حمام آب گرم و سپس اضافه کردن هم حجم آن معادل ۷۰۰ میکرولیتر کلروفرم ایزوآمیل الکل (به نسبت ۲۴ به ۱) به آن ۵) سانتریفیوژ کردن نمونه‌ها به مدت ۱۰ دقیقه ۱۳۰۰۰ دور در دقیقه. ۶) انتقال مایع رویی به لوله‌های جدید و اضافه کردن اتانول ۹۵ درصد سرد (۲۰- درجه سلسیوس) به اندازه دو برابر حجم به آن‌ها و سپس سر و ته کردن آن‌ها تا زمانی و سپس قرار دادن لوله‌ها در دمای اتاق تا DNA به صورت غیر محلول درآید. ۷) نمونه‌ها به مدت ۵ دقیقه در ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه و دور ریختن فاز محلول آن‌ها ۸) رسوب DNA حاصل از اتانول ۷۰ درصد سه بار شستشو گردید. ۹) خشک کردن رسوب DNA در ته لوله‌ها به مدت ۱۵ دقیقه در هوای آزاد سپس اضافه کردن بافر TE به آن‌ها ۱۰) اضافه کردن آنزیم RNAse A (Sigma Cat. No. R6513) با غلظت ۱۰ میلی‌گرم در میلی لیتر به لوله‌ها قرار دادن در دمای ۳۷ درجه سلسیوس به مدت ۳۰ دقیقه. ۱۱) نمونه‌های DNA بر روی ژل آگارز ۱ درصد بارگذاری شد.

استخراج DNA با روش CTAB تغییریافته

این روش با ایجاد تغییراتی در روش CTAB که در بند ۱-۳ توضیح داده شد، مورد آزمایش قرار گرفت. تغییرات انجام شده شامل اضافه کردن بافر PVP با غلظت ۳ درصد به بافر استخراج) و همچنین اضافه کردن ۲ میکرولیتر مرکاپتواتانول به هر نمونه قبل از مرحله ۳ و سپس قرار دادن لوله‌ها در حمام آب گرم ۶۵ درجه سلسیوس انجام شد.

استخراج RNA از بخش‌های گوناگون سیکلامن و ساخت cDNA

استخراج RNA از بافت‌های گوناگون سیکلامن ایرانی با استفاده از روش‌های RNX-PLUS، CTAB-LiCl و Trizol (Lin and Chen, 2008) با انجام تغییرهایی که در بخش‌های بعدی توضیح داده شده است، مورد استفاده قرار گرفت. پیش از آغاز استخراج RNA برای حذف RNase کلیه وسایل تیوب، هاون، فالکون و تیب‌ها دو مرتبه به مدت ۲۰ دقیقه در مای ۱۲۱ درجه سلسیوس و فشار ۱/۲ بار اتوکلاو شدند تا به طور کامل استریل شوند. همه محلول‌های مورد استفاده از جمله اتانول ۷۵ درصد

[Downloaded from journal-irshs.ir on 2025-12-05]

با آب تیمار شده با DEPC (به نسبت ۱ به ۱۰۰۰) تهیه شدند. پس از استخراج RNA در همه روش‌ها تیمار با DNase (Sinaclon Co. 1u/µl-MO5401) به منظور حذف آلودگی DNA انجام شد. در مرحله بعد با استفاده از پرایمر ژن‌های خانه‌دار PCR انجام شده است تا از حذف آلودگی ژنومی اطمینان حاصل شود. برای بررسی کیفیت RNA استخراج شده در همه روش‌ها، الکتروفورز فرآورده استخراج شده روی ژل آگارز (شرکت سیناکلون) با غلظت یک و نیم درصد، صورت گرفت. برای بررسی بیشتر کیفیت و کمیت RNA، غلظت نمونه‌ها توسط نانودراپ اندازه‌گیری شد. ساخت cDNA با استفاده از آنزیم نسخه‌برداری معکوس M-MuLV (Roche, Mannheim, Germany) و آغازگر oligo (dT)15 انجام شد.

استخراج RNA به روش CTAB-LiCl

این روش با ایجاد تغییراتی در روش Gasic و همکاران (2004) انجام شد. ۵۰ میلی‌گرم از هر نمونه با نیتروژن مایع در هاون چینی سرد پودر و در یک لوله ۱/۵ میلی لیتری استریل عاری از RNase ریخته شد. بافر CTAB (NaCl ۲ مولار، Tris-HCl ۱۰۰ میلی مولار (pH ۸)، EDTA ۲۵ میلی‌مولار (pH ۸)، CTAB ۲ درصد و PVP ۲ درصد) از قبل در حمام آب گرم به دمای ۶۵ درجه سلسیوس رسانده شد. یک میلی‌لیتر بافر CTAB به همراه آنزیم پروتئیناز K (۵۰ µg/ml) و مرکاپتواتانول ۰/۲ درصد به لوله‌ها اضافه شد. لوله‌ها به مدت ۱۵ دقیقه در حمام اب گرم ۶۵ درجه سلسیوس قرار گرفتند و سپس به مدت ۱۰ دقیقه در ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شدند. پس از انتقال فاز رویی به لوله جدید ۱/۵ میلی لیتری مقدار هم حجم LiCl ۴ مولار به هر لوله اضافه شد. نمونه‌ها به مدت ۴ ساعت در دمای ۴ درجه سلسیوس نگه داشته شدند. در مرحله بعد سانتریفیوژ در دمای ۴ درجه سلسیوس به مدت ۳۰ دقیقه ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه انجام شد و پس از آن مایع رویی دور ریخته شد و به رسوب ته لوله استات سدیم ۲ مولار و ایزوپروپانول به نسبت ۱ به ۴ اضافه و به مدت ۲ ساعت در فریزر ۸۰- درجه سلسیوس انکوبه شد. سپس سانتریفیوژ در دمای ۴ درجه سلسیوس به مدت ۲۰ دقیقه ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه انجام شد. محلول رویی را دورریخته که در این مرحله رسوب RNA شکل گرفت. ۱ میلی‌لیتر اتانول ۷۵ درصد ساخته شده با آب DEPC به هر ویال اضافه شد. لوله‌ها به میزان خیلی کم ورتکس شده تا رسوب از ته لوله جدا شود. لوله‌ها با دور ۱۲۰۰۰ با دمای ۴ درجه سلسیوس برای ۱۰ دقیقه سانتریفیوژگردید. فاز رویی دور ریخته شد و RNA به صورت رسوب در انتهای لوله‌ها باقی ماند. یک‌بار دیگر ۱ میلی‌لیتر اتانول اضافه و بقیه مراحل تا دور ریختن فاز رویی تکرار گشت. در مرحله بعد درب لوله‌هاباز گذاشته رسوب RNA خشک شود. سپس ۲۵ میکرولیتر از آب DEPC به لوله‌ها اضافه شد و به آرامی ضربه زده تا RNA در آب DEPC حل شد.

استخراج RNA به روش تغییر یافته Trizol

استخراج RNA در این روش با ایجاد تغییراتی در روش Li and Chen, (2008) انجام شد. یک میلی‌لیتر Trizol به ۵۰ میلی‌گرم از نمونه‌های پودر شده اضافه شد. ۲) ترکیب حاصله به مدت ۵ دقیقه در دمای اطاق با ورتکس سوسپانسیون شد. ۲۰۰ میکرولیتر کلروفرم به هر لوله اضافه شد. سوسپانسیون برای ۱۵ ثانیه ورتکس شد. لوله‌ها برای ۱۵ دقیقه در دمای اطاق قرار داده شد. جهت جدا کردن محلول رویی سانتریفیوژ با دور ۱۳۰۰۰ دور در دقیقه در دمای ۴ درجه سلسیوس به مدت ۱۵ دقیقه انجام شد. مایع رویی به لوله جدید منتقل شد. یک‌بار دیگر ۲۰۰ میکرولیتر کلروفرم به ویال‌ها افزوده و مراحل قبل تا استخراج فاز رویی یک بار دیگر انجام شد.۵۰۰ میکرولیتر از ایزوپروپانول به همراه ۲۵۰ میکرولیتر از استات آمونیوم ۲ مولار (تهیه شده با آب DEPC) به هر لوله اضافه شد. RNA در ایزوپروپانول غیرمحلول است، بنابراین در حضور این ترکیبات؛ قطعات RNA به صورت توده‌ای یا کلاف درآمده و در اثر سانتریفیوژ، تشکیل یک حالت گلوله‌ای در انتهای لوله داد. این عمل همچنین سبب حذف محلول نمک- الکل شد. ۱ میلی‌لیتر اتانول ۷۵ درصد ساخته شده با آب DEPC به هر لوله اضافه شد . اتانول سبب نمک‌زدایی اسیدهای نوکلئیک در محلول شده و به رسوب اسیدهای نوکلئیک در خارج از محلول کمک می‌کند. در واقع اتانول، ظرفیت یونی DNA را تغییر داده و مولکول‌های آب را از آن حذف می‌کند و به رسوب RNA کمک می‌کند. لوله‌ها به میزان خیلی کم ورتکس شده تا رسوب از ته لوله جدا شود. لوله‌ها با دور ۱۲۰۰۰ با دمای ۴ درجه سلسیوس برای ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ گردید. فاز رویی دور ریخته شد و RNA به صورت رسوب در انتهای لوله‌ها باقی ماند. یک‌بار دیگر ۱ میلی‌لیتر اتانول اضافه و بقیه مراحل تا دور ریختن فاز رویی تکرار گشت. در مرحله بعد درب لوله‌هاباز گذاشته رسوب RNA خشک شود. سپس ۲۵ میکرولیتر از آب DEPC به لوله‌ها اضافه شد و به آرامی ضربه زده تا RNA در آب DEPC حل شد.

استخراج RNA به روش RNX-plus

[Downloaded from journal-irshs.ir on 2025-12-05]

استخراج RNA از اندام‌های گوناگون سیکلامن با استفاده از کیت RNX-plus (Sinaclon Co.) و بر اساس روش کار شرکت سیناکلون انجام شد. ۵۰ میلی‌گرم از بافت پودر شده گیاهی در لوله‌های ۲میلی‌لیتری ریخته شد. ۱۰۰۰ میکرولیتر RNX سرد به بافت پودر شده اضافه شد. انجام ورتکس به مدت ۱۰ ثانیه و سپس ۵ دقیقه در دمای اتاق گذاشته شد.۲۰۰ میکرولیتر کلروفرم اضافه گردید. به مدت ۱۵ ثانیه لوله‌ها با دست سر و ته شد. ۵ دقیقه روی یخ گذاشته شد. نمونه‌ها در سانتریفوژ با ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه در دمای۴ درجه سلسیوس به مدت ۱۵ دقیقه گذاشته شد. فاز رویی را به دقت جدا و در یک لوله ۱/۵ میلی لیتری انتقال داده شد. ۱۰۰۰ میکرولیتر ایزوپروپانول سرد اضافه گشت. لوله‌ها به آرامی سر و ته و به مدت ۱۵ دقیقه روی یخ گذاشته شد. در سانتریفیوژ با ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه در دمای ۴ درجه سلسیوس برای ۱۵ دقیقه گذاشته شد. سپس مایع رویی دور ریخته شد. ۱۰۰ میکرولیتر اتانول ۷۵٪ به لوله‌ها اضافه و به آرامی با دست ورتکس انجام شد. نمونه‌ها در سانتریفیوژ با ۷۵۰۰ دور در دقیقه در ۴ درجه سلسیوس برای ۸ دقیقه گذاشته شد. سپس مایع داخل میکروتیوب را دور ریخته و روی دستمال استریل برگردانده شد تا به طور کامل خشک شوند. در نهایت ۲۵ میکرولیتر آب DEPC به رسوب RNA اضافه و در ۲۰- درجه سلسیوس مدت نگه‌داری شد.

تکثیر ژن‌های خانه‌دار در نمونه‌های DNA و بررسی امکان بیان آن‌ها در سطح RNA

در مرحله بعد برای ارزیابی کارایی نمونه‌های DNA در واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) و شناسایی ژن‌های خانه‌دار *18S*، اکتین (*ACT*)، بتاتوبولین (*TUB*) و *EF-1a* واکنش PCR با استفاده از آغازگرهای ویژه آن‌ها مورد بررسی قرار گرفت.

در مرحله بعد پس از استخراج RNA کل از بافت‌های گوناگون گیاه سیکلامن ایرانی، برای بررسی کارایی نمونه‌های RNA در واکنش RT-PCR و بیان ژن‌های خانه‌دار آزمون RT-PCR انجام شد. ساخت cDNA با استفاده از آنزیم نسخه‌برداری معکوس M-MuLV (Roche, Mannheim, Germany) و آغازگر Oligo(dT)15 صورت گرفت (جدول ۱). قبل از انجام واکنش یکسان سازی غلظت RNA در همه نمونه‌ها انجام شد. غلظت RNA مورد استفاده برای RT-PCR در همه نمونه‌ها ۱۰ میکروگرم در نظر گرفته شد. بعد از ساخت cDNA بیان ژن‌های خانه دار با استفاده از آغازگرهای اختصاصی ژن‌های ریبوزومی *18S*، اکتین (*ACT*)، بتاتوبولین (*TUB*) و *EF-1a* مورد بررسی قرار گرفت.

جدول ۱- ویژگی های آغازگرهای مورد استفاده در بررسی الگوی بیان ژن‌های خانه‌دار.

Table 1. The properties of primers used in reference genes expression evaluation.

نام ژن Gene name	توالی Sequence	نام آغازگر Primer name	طول قطعه تکثیر شده Fragment length
TUB	5´-GCTTTCAACACCTTCCTTCAG-3´ 5´-GGGGCGTAGGAGGAAAGC-3´	F -Tub R -Tub	۶۰۰ جفت باز 600 bp
ACT	5´-GACTCAAATTATGTTCGAGACATTCAAC-3´ 5´-TCGCATTTCATGATGGAGTTGTAG-3	F -Act R -Act	۵۰۱ جفت باز 501 bp
18S	5´-CGCGCAAATTACCCAATCCTGACA-3´ 5´-TCCCGAAGGCCAACGTAAATAGGA-3´	F -18S R -18S	۴۱۶ جفت باز 416 bp
EF-1a	5´-CGTGGATTCGTCGCATCTAAC-3´ 5´-CCGCCTGTCAATCTTGGTCAT-3´	F - EF R - EF	۱۸۳ جفت باز 183 bp

برنامه های زمانی و دمایی استفاده شده در واکنش زنجیره‌ای پلیمراز برای آغازگرهای ژن‌های خانه‌دار با توجه به اندازه نوارها و استفاده از منابع مرتبط در جدول (۲) تنظیم شد.

[Downloaded from journal-irshs.ir on 2025-12-05]

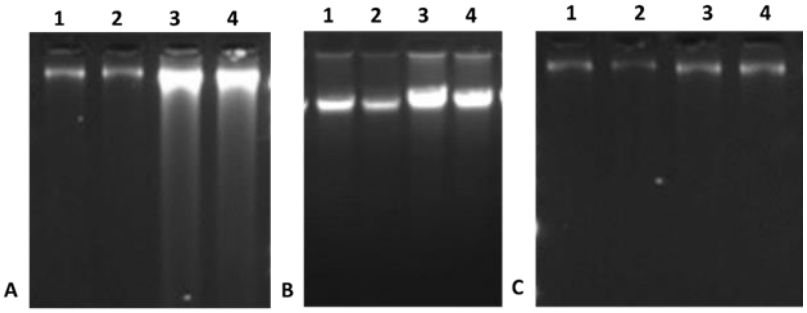
جدول ۲- برنامه های زمانی و دمایی استفاده شده در واکنش زنجیره‌ای پلیمراز برای آغازگرهای ژن‌های خانه‌دار.
Table 2. Time and temperature programs used in polymerase chain reaction for reference genes primers.

Primer	Initial denaturation	Denaturation	Annealing	Extension	Cycles	طویل شدن نهایی Final elongation
F -Tub R -Tub	5 min at 94 °C	45 sec at 94 °C	30 sec at 60 °C	30 sec at 72 °C	36	4 min at 72 °C
F -Act R -Act	5 min at 94 °C	1 sec at 94 °C	1 sec at 58 °C	1.45 sec at 72 °C	36	4 min at 72 °C
F -18S R-18S	5 min at 94 °C	30 sec at 94 °C	1 sec at 60 °C	1 sec at 72 °C	36	4 min at 72 °C
F-EF-1a R-EF-1a	5 min at 94 °C	45 sec at 94 °C	30 sec at 60 °C	30 sec at 72 °C	36	4 min at 72 °C

نتایج

نتایج DNA استخراج شده از سیکلامن به روش CTAB و SDS تغییر یافته

استخراج DNA از نمونه گلبرگ و برگ سیکلامن ایرانی با روش‌های تغییر یافته SDS و CTAB انجام شد. همان طور که در شکل ۱ نشان داده شده است، نوارهای DNA استخراج شده از نمونه گلبرگ و برگ سیکلامن ایرانی با روش SDS تغییریافته در مقایسه با دیگر روش‌ها، از کیفیت بهتری برخوردار بود. نوارهای DNA کل در هیپوکوتیل کم رنگ‌تر از بقیه اندام‌ها نشان داده شد. در حالیکه نوار DNA در نمونه‌های گلبرگ و برگ به ترتیب پررنگ‌تر بود.



شکل ۱- الگوی الکتروفورزی DNA ژنومی استخراج شده از اندام‌های گوناگون سیکلامن ایرانی روی ژل آگارز ۱٪. چاهک. A) DNA استخراج شده از گلبرگ با روش‌های مختلف (۱: SDS، ۲: CTAB، ۳: SDS تغییریافته، ۴: CTAB تغییریافته). B) DNA استخراج شده از برگ (۱: SDS، ۲: CTAB، ۳: SDS تغییریافته، ۴: CTAB تغییریافته) C) DNA استخراج شده از هیپوکوتیل با روش‌های مختلف (۱: SDS، ۲: CTAB، ۳: SDS تغییریافته، ۴: CTAB تغییریافته).

Fig. 1. Electrophoresis template of genomic DNA extracted from different organs of Iranian cyclamen on agarose (1%) gel. A) Extracted DNA from petal by different methods (1: SDS, 2: CTAB, 3: modified SDS, 4: modified CTAB). B) Extracted DNA from leaf by different method (1: SDS, 2: CTAB, 3: modified SDS, 4: modified CTAB) C) Extracted DNA from hypocotyl by different method (1: SDS, 2: CTAB, 3: modified SDS, 4: modified CTAB).

نتایج نانودراپ DNA استخراج شده از نمونه گلبرگ، هیپوکوتیل و برگ با روش‌های مورد آزمایش

نانودراپ DNA استخراج شده از نمونه برگ، گلبرگ و هیپوکوتیل گل سیکلامن با روش‌های تغییر یافته SDS و CTAB انجام شد. همان طور که در جدول شماره ۳ نشان داده شده است، در بین نمونه‌های برگ، هیپوکوتیل و گلبرگ سیکلامن ایرانی کمترین غلظت DNA (میانگین ۳۱۰ نانوگرم در میکرولیتر) مربوط به روش CTAB در نمونه هیپوکوتیل بود. استخراج DNA با استفاده از روش SDS تغییر یافته در همه نمونه‌ها نه تنها خلوص بالایی (نسبت A260/280 دامنه ۲ الی ۲/۱) داشت بلکه از عملکرد به نسبت بالایی (غلظت ۱۸۲۹ نانوگرم در هر میکرولیتر) نیز برخوردار بود و بیشترین میانگین غلظت DNA از این روش

[Downloaded from journal-irshs.ir on 2025-12-05]

به دست آمد. DNA استخراج شده در نمونه گلبرگ نسبت به سایر اندام‌ها، از غلظت و کیفیت بیشتری برخوردار بود. در هر دو روش CTAB تغییریافته و SDS تغییریافته، DNA با غلظت بالاتری نسبت به روش‌های عادی به دست آمد.

جدول ۳- نتایج جذب نوری به کمک نانودراپ در نمونه‌های DNA ژنومی استخراج شده به روش‌های گوناگون از برگ، گلبرگ و هیپوکوتیل سیکلامن ایرانی.

Table 3. Nanodrop results of extracted genomic DNA by different methods from leaf, petal and hypocotyl in Iranian cyclamen.

ردیف No.	نام روش Method name	DNA استخراج شده از انواع بافت‌ها Sample type	غلظت Concentration (ng/µl)	A260	A280	260/280	260/230
1	SDS	برگ leaf	501.5	22.12	12.26	1.81	1.55
2	Modified SDS	برگ leaf	1451.3	24.441	12.582	2.08	2.26
3	CTAB	برگ leaf	445.6	23.20	13.80	1.68	1.56
4	Modified CTAB	برگ leaf	1369.1	23.629	13.221	2.06	2.26
5	SDS	گلبرگ Petal	566.9	28.50	15.83	1.80	1.81
6	Modified SDS	گلبرگ Petal	1829.7	28.544	12.621	2.08	2.1
7	CTAB	گلبرگ Petal	410.8	27.10	16.42	1.65	1.71
8	Modified CTAB	گلبرگ Petal	1611.3	31.156	16.921	2.04	2.13
9	SDS	هیپوکوتیل hypocotyl	398.5	24.10	13.02	1.85	1.45
10	Modified SDS	هیپوکوتیل hypocotyl	697.9	22.90	10.90	2.1	2.23
11	CTAB	هیپوکوتیل hypocotyl	310.4	21.90	12.80	1.71	1.50
12	Modified CTAB	هیپوکوتیل hypocotyl	565.7	25.34	12.06	2.12	2.09

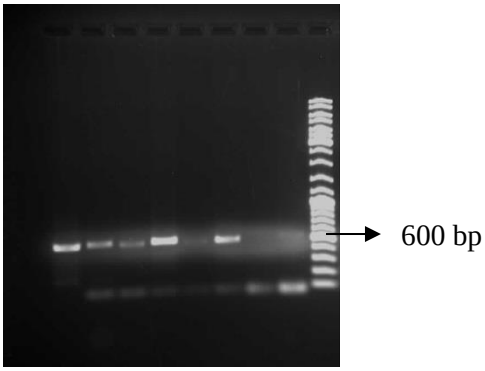
میزان آلودگی پروتئینی در هر دو روش SDS تغییریافته و CTAB تغییریافته، پایین‌تر از روش‌های عادی بود و مقدار 260/280 آن‌ها در دامنه قابل قبول ۱/۷ الی ۲/۱ قرار گرفت. بیشترین میزان آلودگی پروتئینی با نسبت A260/280 ۱/۶۵ در نمونه گلبرگ استخراج شده با روش معمولی CTAB به‌دست آمد.

نسبت 260/230 در نمونه‌های DNA برگ و هیپوکوتیل به دست آمده از روش‌های عادی SDS و CTAB پایین‌تر از ۱/۷ به دست آمد که این مقدار بیانگر وجود آلاینده‌هایی مانند نمک، پلی ساکاریدها و ترکیبات آلی است. DNA به دست آمده از نمونه گلبرگ در همه روش‌های تغییر یافته و عادی، دارای کیفیت بهتر و آلاینده‌های کمتری بود به طوری که نسبت 260/230 در همه نمونه‌ها بالاتر از ۱/۷ بود.

واکنش زنجیره‌ای پلیمراز DNA استخراج شده از سیکلامن برای ژن توبولین

نتایج واکنش زنجیره‌ای پلیمراز برای شناسایی ژن توبولین در نمونه‌های DNA استخراج شده از هیپوکوتیل، گلبرگ و برگ سیکلامن ایرانی مثبت بود. همان طور که در شکل ۲ دیده می شود، نوارهای ۶۰۰ جفت بازی حاصل از تکثیر مربوط به ژن توبولین DNA استخراج شده از نمونه‌های سیکلامن ایرانی با روش‌های تغییریافته CTAB و SDS می‌باشد.

[Downloaded from journal-irshs.ir on 2025-12-05]



شکل ۲- تکثیر بخشی از ژن خانه‌دار *TUB* در نمونه‌های DNA استخراج شده از اندام‌های گوناگون سیکلامن ایرانی. نمونه‌های الکتروفورز شده در چاهک‌های مختلف به ترتیب شامل؛ کنترل منفی (۱)، تکثیر بخشی از ژن خانه‌دار *TUB* در نمونه‌های استخراج شده از روش SDS تغییر یافته در نمونه گلبرگ (۲)، برگ (۳) و هیپوکوتیل (۴). تکثیر بخشی از ژن خانه‌دار *TUB* در نمونه‌های استخراج شده از روش CTAB تغییر یافته در نمونه گلبرگ (۵)، برگ (۶) و هیپوکوتیل (۷). تکثیر بخشی از ژن خانه‌دار *TUB* با روش SDS در نمونه گلبرگ (۸)، برگ (۹). نشانگر وزن مولکولی DNA (۱۰).

Fig. 2. Amplification of a segment of *TUB* housekeeping gene in DNA samples isolated from different organs of Iranian cyclamen on agarose (1%) gel. The samples electrophoresed in different wells include; Negative control (1), amplification of a part of the *TUB* housekeeping gene in the samples isolated from modified SDS method in petal (2), leaf (3) and hypocotyl (4) samples. Amplification of a segment of the *TUB* housekeeping gene in samples isolated from modified CTAB method in petal (5), leaf (6) and hypocotyl (7) samples. Amplification of a segment of *TUB* housekeeping gene by SDS method in petal sample (8), leaf (9). DNA molecular weight Marker (10).

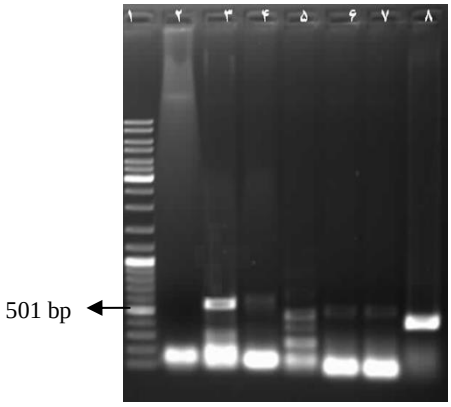
واکنش زنجیره‌ای پلیمراز DNA استخراج شده از نمونه‌های سیکلامن برای ژن اکتین

نتایج واکنش زنجیره‌ای پلیمراز برای ژن اکتین در نمونه‌های DNA استخراج شده از نمونه هیپوکوتیل، گلبرگ و برگ سیکلامن ایرانی مثبت بود و در نمونه مربوط به کنترل، هیچ قطعه‌ای دیده نشد. نوارهای ۵۰۱ جفت بازی حاصل از تکثیر مربوط به ژن اکتین DNA استخراج شده از نمونه سیکلامن ایرانی با روش استخراج شده CTAB و SDS تغییر یافته می‌باشد (شکل ۳).

واکنش زنجیره‌ای پلیمراز DNA استخراج شده از نمونه سیکلامن برای ژن *18S*

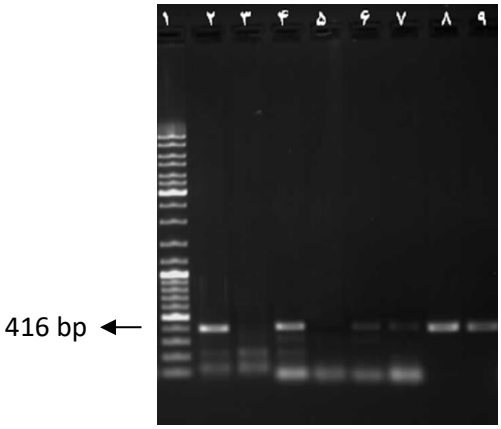
محصول PCR ژن *18S* در نمونه‌های DNA سیکلامن ایرانی در هر دو روش CTAB و SDS تغییر یافته تشکیل نوارهای ۴۱۶ جفت بازی در ژل الکتروفورز داد (شکل ۴). تکثیر مربوط به ژن *18S* در نمونه کنترل مثبت و همچنین در همه نمونه‌های استخراج شده تشخیص داده شد. کنترل منفی گروه شاهد هیچ گونه نواری نشان نداد که بیانگر عاری بودن نمونه از قطعه ژن *18S* است.

[Downloaded from journal-irshs.ir on 2025-12-05]



شکل ۳- تکثیر بخشی از ژن *ACT* در نمونه‌های DNA استخراج شده از اندام‌های گوناگون سیکلامن ایرانی. نمونه‌های الکتروفورز شده در چاهک‌های مختلف به ترتیب شامل؛ ۱) نشانگر وزن مولکولی (1Kb DNA Ladder, Fermentas)، ۲) کنترل منفی، تکثیر بخشی از ژن خانه‌دار *ACT* در نمونه‌های استخراج شده از روش SDS تغییریافته در نمونه گلبرگ (۳)، برگ (۴) و هیپوکوتیل (۵). تکثیر بخشی از ژن خانه‌دار *ACT* در نمونه‌های استخراج شده از روش CTAB تغییر یافته در نمونه گلبرگ (۶)، برگ (۷) و هیپوکوتیل (۸).

Fig. 3. Amplification of a segment of *ACT* gene in DNA samples isolated from different organs of Iranian cyclamen. The samples electrophoresed in different wells include; 1) molecular weight marker (1Kb DNA Ladder, Fermentas), 2) negative control, amplification of a segment of the *ACT* housekeeping gene in the samples separated by modified SDS method in petal (3), leaf (4) and hypocotyl (5) samples. Amplification of a segment of the *ACT* housekeeping gene in samples isolated from modified CTAB method in petal (6), leaf (7) and hypocotyl (8) samples.



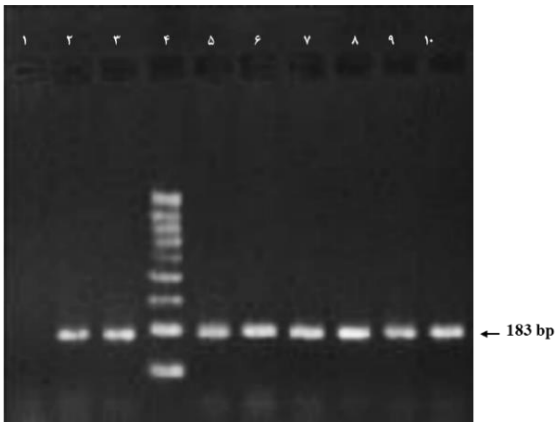
شکل ۴- تکثیر بخشی از ژن *18S* در نمونه‌های DNA استخراج شده از اندام‌های گوناگون سیکلامن ایرانی. نمونه‌های الکتروفورز شده در چاهک‌های مختلف به ترتیب شامل؛ ۱) نشانگر وزن مولکولی (1Kb DNA Ladder, Fermentas)، ۲) کنترل مثبت (DNA دارای ژن *18S*)، ۳) کنترل منفی، تکثیر بخشی از ژن خانه‌دار *18S* در نمونه‌های استخراج شده از روش SDS تغییر یافته در نمونه گلبرگ (۴)، برگ (۵) و هیپوکوتیل (۶). تکثیر بخشی از ژن خانه‌دار *18S* در نمونه‌های استخراج شده از روش CTAB تغییر یافته در نمونه گلبرگ (۷)، برگ (۸) و هیپوکوتیل (۹).

Fig. 4. Amplification of segment of *18S* gene in DNA samples isolated from different organs of Iranian cyclamen. The samples electrophoresed in different wells include; 1) molecular weight marker (1Kb DNA Ladder, Fermentas), 2) positive control (DNA with 18S gene), 3) negative control, amplification of a segment of the 18S housekeeping gene in the samples isolated from the modified SDS method in the petal sample (4), leaf (5) and hypocotyl (6). Amplification of a segment of the 18S housekeeping gene in samples isolated from modified CTAB method in petal (7), leaf (8) and hypocotyl (9) samples.

[Downloaded from journal-irshs.ir on 2025-12-05]

واکنش زنجیره‌ای پلیمراز DNA استخراج شده از نمونه‌های سیکلامن برای ژن *EF-1a*

نتایج واکنش زنجیره‌ای پلیمراز برای ژن *EF-1a* در DNA استخراج شده از نمونه هیپوکوتیل، گلبرگ و برگ سیکلامن ایرانی مثبت بود و در نمونه مربوط به کنترل هیچ قطعه‌ای دیده نشد. تولید نوارهای ۱۸۳ جفت بازی حاصل از تکثیر ژن *EF-1a* در DNA استخراج شده از اندام‌های سیکلامن ایرانی در هر دو روش استخراج CTAB و SDS تغییر یافته مشاهده شد (شکل ۵).



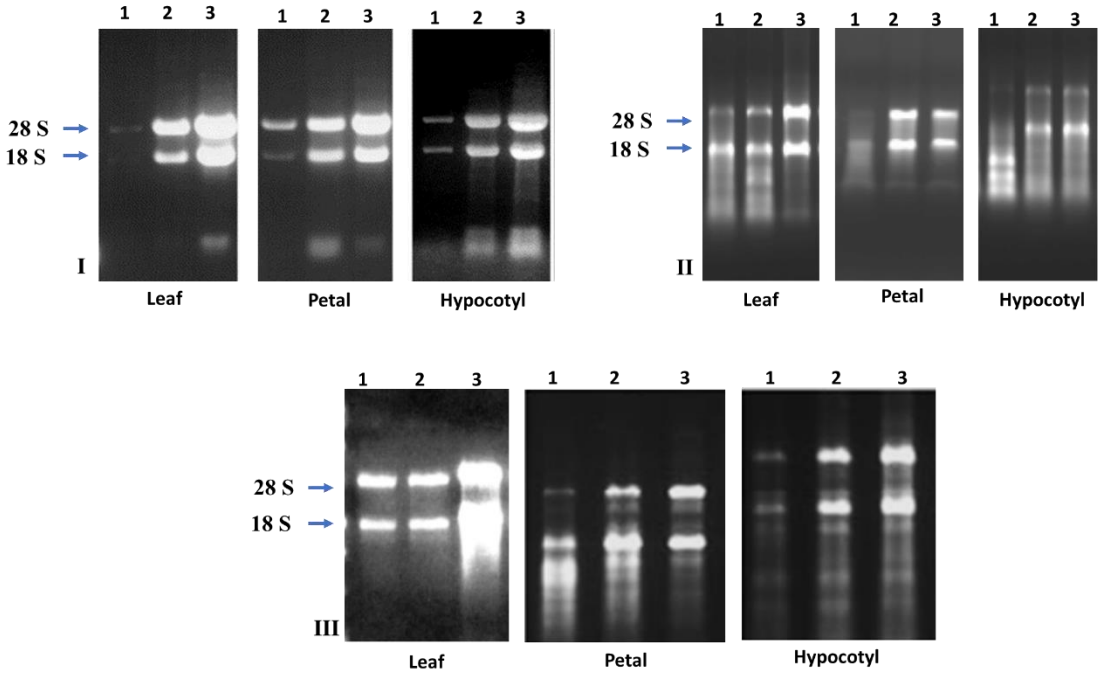
شکل ۵ -تکثیر بخشی از ژن *EF-1a* در نمونه‌های DNA استخراج شده از اندام‌های گوناگون سیکلامن ایرانی. نمونه‌های الکتروفورز شده در چاهک‌های مختلف به ترتیب شامل؛ ۱) کنترل منفی، ۲) کنترل مثبت (DNA دارای ژن *EF-1a*)، ۳) تکثیر بخشی از ژن خانه‌دار *EF-1a* با روش معمولی SDS در نمونه گلبرگ، ۴) نشانگر وزن مولکولی (100bp DNA Ladder)، تکثیر بخشی از ژن خانه‌دار *EF-1a* در نمونه‌های استخراج شده از روش SDS تغییر یافته در نمونه گلبرگ (۵)، برگ (۶) و هیپوکوتیل (۷). تکثیر بخشی از ژن خانه‌دار *EF-1a* در نمونه‌های استخراج شده از روش CTAB تغییر یافته در نمونه گلبرگ (۸)، برگ (۹) و هیپوکوتیل (۱۰).

Fig. 5. Amplification of a segment of *EF-1a* gene in DNA samples isolated from different organs of Iranian cyclamen. The samples electrophoresed in different wells include; 1) Negative control, 2) Positive control (DNA with EF-1a gene), 3) Amplification of a segment of the housekeeping gene *EF-1a* by standard SDS method in the petal sample, 4) Molecular weight marker (100bp DNA Ladder), Amplification a segment of the housekeeping gene *EF-1a* in the samples isolated by the modified SDS method in the petal (5), leaf (6) and hypocotyl (7) samples. Amplification of a segment of the housekeeping gene *EF-1a* in samples isolated from modified CTAB method in petal (8), leaf (9) and hypocotyl (10) samples.

کیفیت RNA استخراج شده از نمونه سیکلامن ایرانی

کیفیت سنجی RNA استخراج‌شده از گلبرگ سیکلامن ایرانی با سه روش Trizol تغییریافته، CTAB-LiCl و RNX-Plus انجام شد (شکل ۶). به تقریب هر سه روش توانایی استخراج RNA از بافت‌های سیکلامن ایرانی داشتند. اگرچه استخراج RNA با روش CTAB-LiCl کارایی خوبی نداشت. به طور کلی بهترین وضوح باند RNA مربوط به روش Trizol تغییریافته و کمترین وضوح مربوط به روش CTAB-LiCl بود.

[Downloaded from journal-irshs.ir on 2025-12-05]



شکل ۶- الگوی الکتروفورزی RNA کل استخراج شده (۱۸Sو ۲۸S) در سه تکرار I، II و III از اندام‌های گوناگون سیکلامن ایرانی بر روی ژل آگارز ۱/۵٪: I: ۱) RNA برگ استخراج شده به روش CTAB-LiCl، ۲) RNA برگ استخراج شده به روش RNX-plus، ۳) RNA برگ استخراج شده به روش Trizol تغییریافته. II: ۱) RNA گلبرگ استخراج شده به روش CTAB-LiCl، ۲) RNA گلبرگ استخراج شده به روش RNX-plus، ۳) RNA گلبرگ استخراج شده به روش Trizol تغییریافته. III: ۱) RNA هیپوکوتیل استخراج شده به روش CTAB-LiCl، ۲) RNA هیپوکوتیل استخراج شده به روش RNX-plus، ۳) RNA هیپوکوتیل استخراج شده به روش Trizol تغییریافته

Fig. 6. Electrophoresis template of RNA (18S and 28S) in three replicates I, II and III extracted from different organs of Iranian cyclamen on agarose (1.5%) gel. I: 1) Extracted RNA from leaf by CTAB-LiCl method, 2) Extracted RNA from leaf by RNX-plus method, 3) Extracted RNA from leaf by modified Trizol method. II: 1) Extracted RNA from petal by CTAB-LiCl method, 2) Extracted RNA from petal by RNX-plus method, 3) Extracted RNA from petal by modified Trizol method. III: 1) Extracted RNA from hypocotyl by CTAB-LiCl method, 2) Extracted RNA from hypocotyl by RNX-plus method, 3) Extracted RNA from hypocotyl by modified Trizol method.

نتایج نانودراپ RNA استخراج شده از نمونه گلبرگ، هیپوکوتیل و برگ گل سیکلامن

نتایج کمیت‌سنجی RNA کل استخراج شده از گیاه سیکلامن ایرانی با سه روش Trizol تغییر یافته، CTAB-LiCl و RNX-Plus در جدول ۴ ارائه شده است. کمترین غلظت RNA کل استخراج شده (۴۳/۹۷ نانوگرم در میکرولیتر)، مربوط به روش CTAB-LiCl از هیپوکوتیل بود. بیشترین غلظت (میانگین غلظت ۱۶۵۵ نانوگرم در میکرولیتر) و بهترین کیفیت RNA کل، از روش Trizol تغییر یافته و نمونه برگ سیکلامن ایرانی به دست آمد. به طور کلی، در روش Trizol مقدار RNA کل در همه اندام‌های سیکلامن ایرانی از غلظت به نسبت بیشتری در مقایسه با روش RNX-Plus برخوردار بود. استخراج RNA کل برگ با استفاده از روش Trizol نه تنها خلوص بالایی (نسبت A260/280 دامنه ۲الی۲/۱) داشت بلکه از عملکرد به نسبت بالایی نیز برخوردار بود.

[Downloaded from journal-irshs.ir on 2025-12-05]

جدول ۴- نتایج جذب نوری به کمک نانودراپ در نمونه‌های RNA کل استخراج به روش‌های گوناگون از برگ، گلبرگ و هیپوکوتیل سیکلامن.

Table 4. Nanodrop results of extracted genomic RNA by different methods from leaf, petal and hypocotyl in Iranian cyclamen.

ردیف No	نمونه استخراج شده Sample type	نام روش Method name	غلظت Concentration (ng/µl)	A260	A280	260/280	260/230
1	RNA گلبرگ Petal RNA	Trizol	1387.7	19.464	9.269	2.10	2.15
2		RNX	1191.3	28.528	13.793	2.11	2.22
3		CTAB-LiCl	101.2	21.544	10.881	1.98	2.02
4	RNA برگ Leaf RNA	Trizol	1655.7	26.262	13.066	2.01	2.11
5		RNX	1508.9	33.162	15.90	2.19	2.12
6		CTAB-LiCl	53.9	28.91	15.14	1.91	2.03
7	RNA هیپوکوتیل Hypocotyl RNA	Trizol	1245.6	14.237	6.812	2.09	1.99
8		RNX	1069.1	19.487	9.269	1.99	1.98
9		CTAB-LiCl	43.97	18.197	8.234	2.21	1.99

نتایج ساخت cDNA

ساخت cDNA از RNA استخراج شده از برگ، گلبرگ و هیپوکوتیل سیکلامن ایرانی با دو روش Trizol و RNX-Plus با موفقیت انجام شد (جدول ۵). از آنجایی که مقدار و کیفیت RNA استخراج شده از روش CTAB-LiCl مناسب و کافی نبود در این مرحله از آزمایش استفاده نشد. به طور کلی، ساخت cDNA در هر دو روش Trizol و RNX-Plus خوب بود اما روش Trizol تغییریافته از عملکرد بهتری برخوردار بود.

جدول ۵- نتایج جذب نور به کمک نانودراپ در نمونه‌های cDNA ساخته شده از RNA استخراج شده به روش‌های گوناگون از برگ، گلبرگ و هیپوکوتیل گل سیکلامن

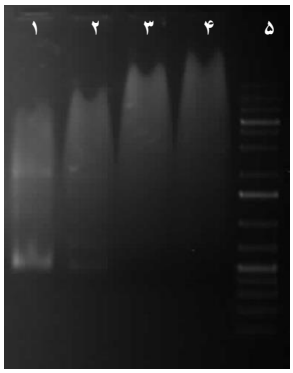
Table 5. Nanodrop results of cDNA made from extracted RNA by different methods from leaf, petal and hypocotyl in Iranian cyclamen.

ردیف No.	نمونه استخراج شده Sample type	نام روش Method name	غلظت Concentration (ng/µl)	A260	A280	260/280	260/230
1	RNA گلبرگ Petal RNA	RNX	972.2	13.256	6.275	1.54	1.64
2		Trizol	1187.1	12.615	6.973	2.1	2.19
3	RNA برگ Leaf RNA	RNX	1031.8	34.931	21.202	2.11	2.15
4		Trizol	1246.6	18.395	8.705	2.11	2.22

[Downloaded from journal-irshs.ir on 2025-12-05]

5	RNA هیپوکوتیل	Trizol	919.7	10.009	4.777	1.81	1.85
6	Hypocotyl RNA	RNX	853.4	11.592	5.735	1.65	1.86

بر اساس یافته های پژوهش، مقدار cDNA به دست آمده به ترتیب در روش‌های Trizol تغییر یافته با مقدار ۱۲۴۶/۶ و ۱۱۸۷/۱ نانوگرم بر میکرولیتر در برگ و گلبرگ و روش RNX-Plus با مقدار ۱۰۳۱/۸ نانوگرم بر میکرولیتر در نمونه برگ، دارای بیشترین غلظت cDNA بودند. بر اساس نتایج ساخت cDNA از RNA کل، نسبت‌های جذب نوری به دست آمده در طول موج‌های A260/280 (۱/۸۹ تا۲/۱۱) و A260/230 (۱/۹۵ تا۲/۲) نانومتر به ترتیب نشان دهنده پائین بودن آلودگی پروتئینی و آلودگی پلی‌فنولی و پلی‌ساکاریدی می‌باشند. نوارهای مربوط به cDNA حاصل از RNA استخراج شده از سیکلامن ایرانی با دو روش Trizol و RNX-Plus به صورت اسمیر در ژل الکتروفورز قابل مشاهده است (شکل ۷). ساخت cDNA در هر دو روش به خوبی انجام شد اما روش Trizol تغییر یافته از نظر نوار و همچنین نتایج به‌دست آمده از نانودراپ از کیفیت بهتری برخوردار بود.



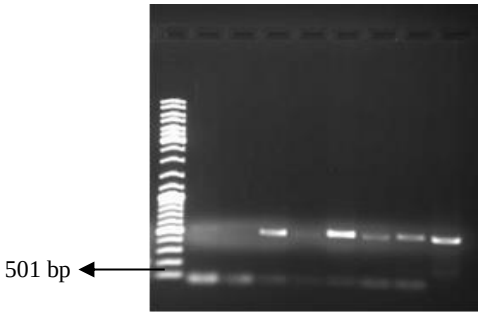
شکل ۷- الگوی الکتروفورزی محصول cDNA ساخت شده از اندام‌های گوناگون سیکلامن ایرانی بر روی ژل آگارز ۱/۵٪. چاهک شماره ۱ و ۲) ساخت cDNA از RNA استخراج شده از برگ به روش Trizol تغییریافته، ۳ و ۴) ساخت cDNA از RNA استخراج شده از برگ به روش RNX-Plus، ۵) نشانگر وزن ملکولی (1Kb DNA Ladder Mix, Fermantas).

Fig. 7. Electrophoresis template of cDNA product from different organs of Iranian cyclamen on agarose (1.5%) gel. Well no. 1 and 2: cDNA product of extracted RNA from leaf by modified Trizol method. Well no. 3 and 4: cDNA product of extracted RNA from leaf by RNX-Plus method. Well no. 5: 1Kb DNA Ladder.

بررسی امکان بیان ژن اکتین در گیاه سیکلامن ایرانی با استفاده از آزمون RT-PCR

پس از ساخت موفقیت‌آمیز cDNA با استفاده از آغازگرهای ژن اکتین، واکنش زنجیره‌ای پلیمراز انجام و قطعه های مورد نظر به‌طول ۵۰۱ جفت باز با الکتروفورز برروی ژل آگارز ۱ درصد بار گذاری شد. همان طور که در شکل ۸ دیده می‌شود، وجود نوارهای مربوط به قطعه‌های ژن اکتین مربوطه تایید کننده کیفیت خوب cDNA ساخته شده در برگ، گلبرگ و هیپوکوتیل می‌باشد.

[Downloaded from journal-irshs.ir on 2025-12-05]

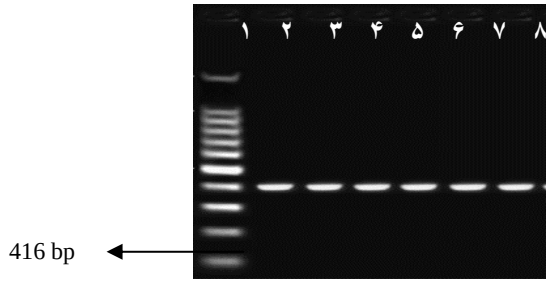


شکل ۸- تکثیر بخشی از cDNA ژن اکتین با استفاده از RNA استخراج شده از اندام‌های گوناگون سیکلامن ایرانی به کمک روش‌های مختلف. چاهک شماره ۱) نشانگر وزن مولکولی (1Kb DNA Ladder Mix, Fermantas)، ۲) cDNA ژن اکتین ساخت شده از RNA حاصل از روش RNX-Plus. در هیپوکوتیل، ۳) کنترل منفی (آب)، ۴) cDNA ژن اکتین ساخت شده از RNA حاصل از روش RNX-Plus. در برگ، ۵) cDNA ژن اکتین ساخت شده از RNA حاصل از روش RNX-Plus.در گلبرگ، ۶) cDNA ژن اکتین ساخت شده از RNA حاصل از روش Trizol تغییریافته در برگ، ۷) cDNA ژن اکتین ساخت شده از RNA حاصل از روش Trizol تغییریافته در هیپوکوتیل، ۸) cDNA ژن اکتین ساخت شده از RNA حاصل از روش Trizol تغییریافته در گلبرگ، ۹) cDNA ژن اکتین ساخت شده از RNA حاصل از روش Trizol تغییریافته در برگ.

Fig. 8. Amplification of a cDNA segment of *ACT* by using extracted RNA from different organs of Iranian cyclamen. Well no. 1: 1Kb DNA Ladder. Well no. 2: cDNA product of *ACT* by using extracted RNA from hypocotyl by RNX-Plus method. Well no. 3: Negative control. Well no. 4: cDNA product of *ACT* by using extracted RNA from leaf by RNX-Plus method. Well no. 5: cDNA product of *ACT* by using extracted RNA from petal by RNX-Plus method. Well no. 6: cDNA product of *ACT* by using extracted RNA from leaf by modified Trizol method. Well no. 7: cDNA product of *ACT* by using extracted RNA from hypocotyl by modified Trizol method. Well no. 8: cDNA product of *ACT* by using extracted RNA from petal by modified Trizol method. Well no. 9: Positive control.

بررسی امکان بیان ژن *18S* در گیاه سیکلامن ایرانی با استفاده از آزمون RT-PCR

پس از ساخت موفقیت‌آمیز cDNA با استفاده از آغازگرهای ذکر شده *18S*، واکنش زنجیره‌ای پلیمراز انجام و قطعات مورد دید به طول ۴۱۶ جفت باز با الکتروفورز ژل آگارز ۱ درصد دیده شد. در شکل ۹، وجود تک نوارهای مربوط به قطعه‌های ژن *18S* تایید کننده کیفیت خوب cDNA ساخته شده و همچنین بیانگر کیفیت بالای RNA استخراج شده از برگ، گلبرگ و هیپوکوتیل سیکلامن ایرانی است.



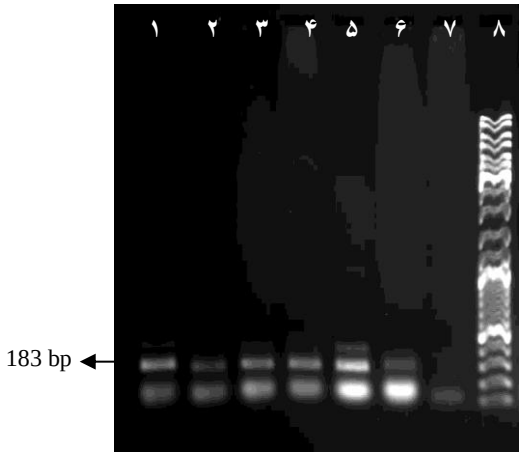
شکل ۹- تکثیر بخشی از رونوشت (cDNA) ژن *18S* با استفاده از RNA استخراج شده از اندام‌های گوناگون سیکلامن ایرانی به کمک روش‌های مختلف. چاهک شماره ۱) نشانگر وزن مولکولی (1Kb DNA Ladder Mix, Fermantas)، ۲) cDNA ژن *18S* ساخت شده از RNA حاصل از روش RNX-Plus. در برگ، ۳) cDNA ژن *18S* ساخت شده از RNA حاصل از روش RNX-Plus. در گلبرگ، ۴) cDNA ژن *18S* ساخت شده از RNA حاصل از روش RNX-Plus. در هیپوکوتیل، ۵) cDNA ژن *18S* ساخت شده از RNA حاصل از روش Trizol تغییریافته در برگ، ۶) cDNA ژن *18S* ساخت شده از RNA حاصل از روش Trizol تغییریافته در گلبرگ، ۷) cDNA ژن *18S* ساخت شده از RNA حاصل از روش Trizol تغییریافته در هیپوکوتیل.

Fig. 9. Amplification of a cDNA segment of *18S* by using extracted RNA from different organs of Iranian cyclamen. Well no. 1: 1Kb DNA Ladder. Well no. 2: cDNA product of *18S* by using extracted RNA from leaf by RNX-Plus method. Well no. 3: cDNA product of *18S* by using extracted RNA from petal by RNX-Plus method. Well no. 4: cDNA product of *18S* by using extracted RNA from hypocotyl by RNX-Plus method. Well no. 5: cDNA product of *18S* by using extracted RNA from leaf by modified Trizol method. Well no. 6: cDNA product of *18S* by using extracted RNA from petal by modified Trizol method. Well no. 7: cDNA product of *18S* by using extracted RNA from hypocotyl by modified Trizol method.

[Downloaded from journal-irshs.ir on 2025-12-05]

بررسی امکان بیان ژن *EF-1a* در در گیاه سیکلامن ایرانی با استفاده از آزمون RT-PCR

نتایج واکنش زنجیره‌ای پلیمراز برای ژن *EF-1a* در نمونه‌های cDNA ساخته شده از نمونه گلبرگ و برگ سیکلامن ایرانی مثبت بود و در نمونه مربوط به کنترل هیچ قطعه‌ای دیده نشد. همان طور که در شکل ۱۰ نشان داده شده است، نوارهای ۱۸۳ جفت بازی حاصل از تکثیر مربوط به ژن *EF-1a* از cDNA ساخته شده از برگ، گلبرگ و هیپوکوتیل سیکلامن ایرانی است.



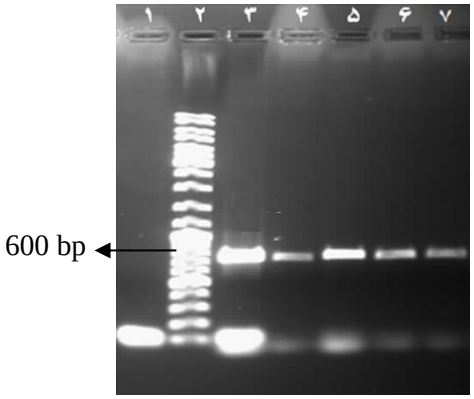
شکل ۱۰- تکثیر بخشی از رونوشت (cDNA) ژن *EF-1a* با استفاده از RNA استخراج شده از اندام‌های گوناگون سیکلامن ایرانی به کمک روش‌های مختلف. چاهک شماره ۱) cDNA ژن *EF-1a* ساخت شده از RNA حاصل از روش Trizol تغییریافته در برگ، ۲) cDNA ژن *EF-1a* ساخت شده از RNA حاصل از روش Trizol تغییریافته در گلبرگ، ۳) cDNA ژن *EF-1a* ساخت شده از RNA حاصل از روش Trizol تغییریافته در هیپوکوتیل، ۴) cDNA ژن *EF-1a* ساخت شده از RNA حاصل از روش RNX-Plus. در برگ، ۵) cDNA ژن *EF-1a* ساخت شده از RNA حاصل از روش RNX-Plus. در گلبرگ،۶) cDNA ژن *EF-1a* ساخت شده از RNA حاصل از روش RNX-Plus. در هیپوکوتیل، ۷) کنترل منفی (آب)، ۸) نشانگر وزن مولکولی (1Kb DNA Ladder Mix, Fermantas).

Fig. 10. Amplification of a cDNA segment of *EF-1a* by using extracted RNA from different organs of Iranian cyclamen. Well no. 1: cDNA product of *EF-1a* by using extracted RNA from leaf by modified Trizol method. Well no. 2: cDNA product of *EF-1a* by using extracted RNA from petal by modified Trizol method. Well no. 3: cDNA product of *EF-1a* by using extracted RNA from hypocotyl by modified Trizol method. Well no. 4: cDNA product of *EF-1a* by using extracted RNA from leaf by RNX-Plus method. Well no. 5: cDNA product of *EF-1a* by using extracted RNA from petal by RNX-Plus method. Well no. 6: cDNA product of *EF-1a* by using extracted RNA from hypocotyl by RNX-Plus method. Well no. 7: Negative control. Well no. 8: 1Kb DNA Ladder.

بررسی امکان بیان ژن توبولین در در گیاه سیکلامن ایرانی با استفاده از آزمون RT-PCR

پس از ساخته موفقیت‌آمیز cDNA با استفاده از آغازگرهای گفته شده واکنش زنجیره‌ای پلیمراز برای ژن توبولین انجام و قطعات مورد نظر به طول ۶۰۰ جفت باز با الکتروفورز ژل آگارز ۱ درصد دیده شد. در شکل ۱۱ وجود تک نوارهای مربوط به قطعه ژن توبولین تایید کننده کیفیت خوب cDNA ساخته شده و همچنین بیانگر کیفیت بالای RNA استخراج شده از از برگ، گلبرگ و هیپوکوتیل سیکلامن ایرانی است.

[Downloaded from journal-irshs.ir on 2025-12-05]



شکل ۱۱- تکثیر بخشی از رونوشت (cDNA) ژن توبولین با استفاده از RNA استخراج شده از اندام‌های گوناگون سیکلامن به کمک روش‌های مختلف. چاهک شماره ۱) کنترل منفی، ۲) نشانگر وزن مولکولی (1Kb DNA Ladder Mix, Fermanta)، ۳) cDNA ژن توبولین ساخت شده از RNA حاصل از روش Trizol تغییریافته در برگ، ۴) cDNA ژن توبولین ساخت شده از RNA حاصل از روش RNX-Plus. در برگ، ۵) cDNA ژن توبولین ساخت شده از RNA حاصل از روش Trizol تغییریافته در گلبرگ، ۶) cDNA ژن توبولین ساخت شده از RNA حاصل از روش RNX-Plus. در گلبرگ، ۷) cDNA ژن توبولین ساخت شده از RNA حاصل از روش Trizol تغییریافته در هیپوکوتیل.

Fig. 11. Amplification of a cDNA segment of *TUB* by using extracted RNA from different organs of Iranian cyclamen. Well no. 1: Negative control. Well no. 2: 1Kb DNA Ladder. Well no. 3: cDNA product of *TUB* by using extracted RNA from leaf by modified Trizol method. Well no. 4: cDNA product of *TUB* by using extracted RNA from leaf by RNX-Plus method. Well no. 5: cDNA product of *TUB* by using extracted RNA from petal by modified Trizol method. Well no. 6: cDNA product of *TUB* by using extracted RNA from petal by RNX-Plus method. Well no. 7: cDNA product of *TUB* by using extracted RNA from hypocotyl by modified Trizol method.

بحث و نتیجه گیری

استخراج اسیدهای نوکلئیک، نخستین مرحله در اجرای پژوهش‌های مهندسی ژنتیک می‌باشد و به‌دست آوردن روش مناسب برای استخراج ، اهمیت دارد. در این پژوهش، بهینه‌سازی استخراج اسیدهای نوکلئیک از گیاه سیکلامن ایرانی با کیفیت بالا و همچنین ارزیابی بیان ژن‌های خانه‌دار انجام شد. نوارهای DNA استخراج شده از نمونه گلبرگ سیکلامن ایرانی با روش SDS تغییریافته در مقایسه با دیگر روش‌ها، از کیفیت بهتری برخوردار بود. نوار DNA در هیپوکوتیل کم رنگ‌تر و غلظت آن نسبت به بقیه اندام‌ها کمتر بود. DNA به دست آمده در روش SDS تغییریافته دارای عملکرد و کیفیت بهتری بود. تفاوت دیده شده در میزان DNA استخراج شده بین روش‌های تغییریافته CTAB و SDS از سیکلامن ایرانی با استفاده از نانودراپ نشان داد که در بین نمونه‌های هیپوکوتیل، برگ و گلبرگ سیکلامن ایرانی، کمترین غلظت DNA (میانگین ۹۸۱ نانوگرم در میکرولیتر) مربوط به روش CTAB تغییریافته و نمونه هیپوکوتیل بود. استخراج DNA با استفاده از SDS تغییر یافته نه تنها خلوص بالایی (نسبت A260/280 دامنه ۲ الی ۲/۱) داشت بلکه از عملکرد به نسبت بالایی (غلظت ۱۸۲۹ نانوگرم در هر میکرولیتر) نیز برخوردار بود. بیشترین میانگین غلظت DNA از این روش به دست آمد. بسیاری از پژوهش‌ها در تعیین مقدار و کیفیت بیان می‌کنند که مقدار زیادی DNA با کیفیت بالا با جذبUV به دست آمد، اما بررسی‌ها نشان می‌دهد UV در اندازه‌گیری DNA موجود در نمونه استخراج شده سیکلامن، دقیق نیست. تجزیه و تحلیل کمی و کیفی عصاره‌های DNA باید هم از روش اسپکتروفتومتر و جذب UV انجام شود و هم با استفاده از روش‌های دیگر مانند الکتروفورز ژل، بررسی شود. چرا که استفاده از جذب UV در اندازه‌گیری DNA موجود در نمونه استخراج شده به تنهایی کافی و دقیق نیست. گاهی در کنار محتوی DNA، آلودگی‌هایی ناشی از پروتئین، پلی ساکاریدها، ترکیبات فنولی و نمک‌ها در عصاره باقی می‌ماند که می‌تواند باعث کاهش کارایی DNA در آزمون‌های مولکولی شود. هنگامی که حالت اسمیر در نوار مشخص باشد احتمال خرد شدن DNA در فرایند استخراج وجود دارد و نمی‌تواند به عنوان رشته الگوی مناسبی در فرایند واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز به کار رود. روش‌های گوناگون استخراج

[Downloaded from journal-irshs.ir on 2025-12-05]

اسیدهای نوکلئیک باید آزمایش و بهینه شوند و روشی انتخاب گردد که سریع، ساده و اقتصادی بوده و آلودگی آن به مواد شیمیایی مورد استفاده کم باشد. به طور معمول، کیفیت DNA با عواملی مانند نبود آلودگی ناشی از RNA، پروتئین، لیپید و دیگر ساختارهایی که برای آنزیم تک پلیمراز (Taq DNA polymerase) در واکنش زنجیره‌ای پلیمراز و آنزیم‌های برشی مزاحمت ایجاد می‌کند، سنجیده می‌شوند (D´Angelo *et al*., 2007).

در بررسی تنوع ژنتیکی ۷ ژنوتیپ گل‌مریم، به منظور استخراج DNA از بافت برگ از روش CTAB با اعمال تغییراتی (Murray and Thompson, 1980) استفاده شد (Kameswari *et al*., 2014). پژمردگی سریع گلبرگ‌ها و برگ‌ها در اثر گرفتگی آوندی و کاهش آب در گیاهان زینتی موجب کاهش کیفیت در استخراج DNA می‌شود. روش CTAB در این بررسی اگر چه توانایی خوبی برای استخراج DNA داشت اما در بررسی‌ها روش CTAB را برای استخراج DNA از گیاهانی که دارای سطوح بالایی از ترکیبات پلی‌فنولی و پلی‌ساکاریدی هستند، معرفی کردند.

نتایج کیفیت و کمیت‌سنجی RNA استخراج شده از سیکلامن ایرانی، نشان داد که کمترین غلظت RNA کل استخراج شده (۴۳/۹۷ نانوگرم در میکرولیتر) مربوط به روش CTAB-LiCl از اندام هیپوکوتیل بود. روش Trizol استفاده شده برای استخراج RNA کل از نمونه‌های سیکلامن ایرانی غلظت به نسبت بهتری در مقایسه با روش RNX-Plus داشت. استخراج RNA کل برگ با استفاده از روش Trizol نه تنها خلوص بالایی (نسبت A260/280 دامنه ۲ الی ۲/۱) داشت بلکه از عملکرد به نسبت بالایی نیز برخوردار بود. ساخت cDNA از RNA استخراج‌شده از سیکلامن ایرانی با دو روش Trizol و RNX با موفقیت انجام شد. بررسی‌ها نشان می‌دهد به دست آوردن RNA با کیفیت و کمیت بالا برای اطمینان از بیان همه ژن‌ها در کتابخانه cDNA الزامی است (Gasic *et al*., 2004 و Ghawana *et al*., 2011). همچنین، آنالیز ژنتیک مولکولی مانند انگشت نگاری DNA، توالی‌یابی و غیره، نیاز به DNA با وزن مولکولی و کیفیت بالا دارد (Lutz *et al*., 2011).

همان طور که نتایج نشان دادند DNA استخراجی با روش SDS تغییر یافته از کیفیت و کمیت بهتری برخوردار بودند که با نتایج Alaey و همکاران (2015) همسو نبود. به نظر می‌رسد استفاده از شوینده‌های یونی مثل سدیم دودسیل سولفات (SDS) به خاطر قدرت بالایی که در تخریب پروتئین‌های سلولی و پروتئین‌های متصل شونده به DNA دارند، منجر به خالص‌سازی بیشتر فراورده DNA نسبت به بقیه روش‌ها شده است. از طرفی اضافه کردن استات آمونیوم به روش عادی SDS باعث افزایش خلوص DNA و افزایش تجزیه ترکیبات پلی فنولی، پروتئینی، تانن‌ها و دیگر بازدارنده‌ها شده است (Singh *et al*., 2018). DNA استخراج شده حاصل از بافرهای CTAB نسبت به بافر پایه SDS، کیفیت مناسبی نداشتند که با نتایج دیگر پژوهشگران که روش CTAB را به عنوان روشی کارآمد در استخراج DNA از گیاه سیکلامن و برگ‌های بالغ گل آفتابگردان گزارش کردند؛ همراستا نیست (Alaey *et al*., 2005 و Li *et al*., 2007). در روش‌های استخراج DNA با کیفیت بالا از گیاهان برای خرد کردن نمونه‌ها و تخریب دیواره یاخته ای و هسته، به طور معمول یکی از روش‌های نیتروژن مایع، سرد ـ خشک کردن و یا هضم آنزیمی مورد استفاده قرار می‌گیرد (Arbi *et al*., 2009 ، Biswas and Biswas, 2011 و Chakraborti *et al*., 2006) که اخیرا برای صرفه‌جویی در هزینه سعی بر آن است که با جایگزینیِ روشی کم‌هزینه، کاربرد این روش‌ها محدود شود (Agbagwa *et al*., 2012).

پژوهش‌ها نشان دادند افزایش میزان حجم بافر استخراج نسبت به نمونه پودر شده در از بین بردن بهتر ترکیبات پلی‌ساکاریدی از محلول کمک می‌کند (Agbagwa *et al*., 2012)، همچنین گزارش شد برای استخراج DNA خالص‌تر بهتر است نسبت بافر به نمونه گیاهی دارای ترکیبات فنولی بالا، به نسبت حجمی/وزنی (۱:۴w/v) در نظر گرفته شود (Puchooa, 2004). از آنجا که PVP به جدا شدن پلی‌ساکاریدها از اسیدهای نوکلئیک بسیار کمک می‌کند (Zhang and Stewart, 2000)؛ PVP از راه پیوندهای هیدروژنی با مواد پلی‌فنولی کمپلکس ایجاد نموده و امکان استخراج آن‌ها را از DNA فراهم می‌نماید (Kodkhodaei, 2003). بنابراین، افزودن PVP به محلول پایه CTAB در افزایش کیفیت DNA استخراج شده بسیار کارا است. در همه مراحل استخراج و پس از استخراج، DNA باید از تخریب آنزیم‌های نوکلئازی محافظت شود که برای آن EDTA موجود در بافر استخراج با اتصال به یون‌های منیزیمی که به عنوان کوفاکتور آنزیم‌های نوکلئازی کنش می‌کنند، سبب غیرفعال شدن همه نوکلئازها می‌شوند (Richard and Rogers, 1993).

[Downloaded from journal-irshs.ir on 2025-12-05]

بر اساس نتایج به دست آمده، کیفیت و غلظت RNA به دست آمده از روش Trizol تغییر یافته از بقیه روش‌ها بهتر بود. اضافه کردن استات آمونیوم به ایزوپروپانول در مرحله شستشو منجر به خالص‌سازی بیشتر و کاهش آلودگی‌های پروتئینی شد. نتایج دیگر پژوهش‌ها نیز بیانگر بهبود رفع آلودگی‌های پروتئینی در مرحله شستشو و افزایش کیفیت و کمیت RNA استخراج شده در روش‌هایی است که در آن‌ها از استات آمونیوم استفاده شده است (Osterburg *et al*., 1975 و Zhao *et al*., 2012). استخراج RNA از برخی بافت‌های گیاهی بسیار سخت و دشوار است. در پژوهش‌ها روش‌های گوناگونی برای از بین بردن ناخالصی طی فرآیند استخراج صورت گرفته است. یکی از بهترین روش‌های از بین بردن ناخالصی‌ها، از بین بردن آن‌ها به شیوه جذب سطحی می‌باشد. برای نمونه، در یک بررسی از زغال فعال که یک نوع جاذب قوی با جذب سطحی فوق‌العاده می‌باشد و در هیچ حلال شناخته شده‌ای حل نمی‌شود؛ استفاده شده است. زغال فعال ویژگی جذب ترکیب‌هایی مانند رنگیزه‌ها و مولکول‌های آلی بزرگ را دارد. ترکیب‌های ثانویه از جمله پلی‌فنل‌ها به زغال فعال متصل می‌شوند و آلودگی‌ها به همراه ذرات زغال فعال به طور کامل پس از نخستین دور سانتریفیوژ از بین بردن می‌گردند (Rajakani *et al*., 2013).

برخی بررسی‌ها نشان می‌دهد به دلیل وجود پلی‌ساکارید، پلی‌فنل و سایر متابولیت‌های ثانویه با روش‌های سنتی مانند CTAB نمی‌توان به RNA با کیفیت خوب و عملکرد بالا از RNA کل دست یافت. یکی از دلایل اختلاف در مقدار RNA استحصالی نوع گونه گیاهی است. استخراج RNA در گیاهانی که دارای مقادیر بالای پلی‌ساکارید، ترکیبات فنولی و رنگدانه هستند، بسیار مشکل است. روش‌های رایج برای استخراج RNA اغلب طولانی و خسته کننده هستند و به طور معمول برای گیاهان سخت (recalcitrant) و دارای بافت حساس کیفیت پایینی دارند (Jahormi and Azadi, 2013). از آنجایی که کیفیت و کمیت استخراج RNA در موفقیت سنجش های مولکولی مانند RT-PCR بسیار دارای اهمیت است، بهینه‌سازی روش‌های گوناگون استخراج RNA به صورت ساده و سریع از بافت‌های سخت گیاهی مانند گلبرگ ضروری به دید می‌رسد. در پژوهشی، Jahormi و Azadi (2013) در پژوهشی برای بهینه‌سازی استخراج RNA از گلبرگ چهار گل زینتی بنفشه، اطلسی سفید، رز محمدی و زنبق گزارش کردند که در بین نمونه‌ها گلبرگ گل رز سخت‌ترین نمونه برای استخراج RNA با کمترین غلظت RNA (میانگین ۵۰۰ نانوگرم در میکرولیتر) بود. استخراج RNA از گلبرگ گل رز تنها از دو روش استخراج RNA به دست آمد که بهترین نمونه استخراج شده مربوط به روش تغییریافته چهارم Trizol (با اضافه کردن نمک لیتیوم کلراید) بود. بیشترین میانگین غلظت RNA ا (۲۲۰۰ نانوگرم در میکرولیتر) از گلبرگ گل اطلسی و پس از آن به ترتیب از گل بنفشه (۱۱۰۰ نانوگرم در میکرولیتر) و زنبق (۶۵۰ نانوگرم در میکرولیتر) به دست آمد (Jahormi and Azadi, 2013).

در این پژوهش پس از ساخت موفقیت‌آمیز cDNA با استفاده از آغازگرهای ژن مرجع واکنش زنجیره‌ای پلیمراز انجام و قطعات مورد نظر با الکتروفورز بر روی ژل آگارز دیده شد. وجود نوارهای مربوط به قطعه‌های ژن‌های مربوطه تایید کننده کیفیت خوب cDNA ساخته شده و در پایان بیانگر کیفیت بالای RNA استخراج شده می‌باشد. نتایج واکنش زنجیره‌ای پلیمراز برای ژن اکتین، *EF-1a*، ژن *18S* و توبولین در نمونه‌های DNA و cDNA ساخته شده از نمونه گلبرگ و برگ سیکلامن ایرانی در همه روش‌ها به تقریب مثبت بود. بیشترین غلظت cDNA و بیشترین بیان ژن‌های خانه‌دار در بافت گلبرگ دیده شد. سطح بیان ژن‌های مرجع ممکن است در میان بافت‌ها و یا یاخته‌ها متفاوت باشد و نیز ممکن است در شرایط آزمایشگاهی گوناگونی زیادی داشته باشد، بنابراین در استفاده از آن‌ها برای نرمال‌سازی محدودیت وجود دارد و سطوح رونوشت ژن‌های خانه‌دار بطور قابل ملاحظه‌ای در شرایط گوناگون و تنش‌های زیستی و مراحل نموی گیاه تغییر می‌کند. برای رسیدن به این منظور می‌توان از یک ژن منفرد و یا چندین ژن استفاده نمود. در طول دهه‌های اخیر، ژن‌ها بتا- اکتین، گلیسرآلدهید ۳- فسفات دهیدروژناز (GAPDH)، 18Sr RNA و 26S rRNA، Ubiquitin C، alpha tubulins، فاکتور رونویسی آلفا و پروتئین نوارشونده به TATA باکس به عنوان ژن‌های مرجع مناسب برای فرآیند Real time PCR و هم‌چنین ریزآرایه ارزیابی شده‌اند. در پژوهشی برای شناسایی مناسب‌ترین ژن مرجع در سه رقم گوناگون برنج زیر تنش شوری ۷ ژن زیر: *18S*rRNA، *UBQ*، *ACT*، *ACT1*، TUB، *CYC* و *EF-1a* که معمولاً به عنوان ژن خانه‌دار در گیاهان استفاده می‌شود انتخاب شدند. به جز *CYC* که مقدار M (شاخص میانگین پایداری برای ژن) برابر با ۱/۸۸ داشت همه ژن‌های خانه‌دار دیگر مقادیر زیر آستانه ۱/۵ را داشتند که ثبات خود را اثبات کردند (Biswas and Biswas, 2011). بر اساس مطالعات ژن *EF-1a* بیان پایداری داشته و به عنوان بهترین ژن مرجع می‌باشد. به‌منظور انتخاب ژن خانه‌دار در گیاه کنجد، ده ژن کاندید *SiACT*، *SiUBQ6*، *SiTUB*، *Si18S*، *rRNA*، *SiEF1a*،

[Downloaded from journal-irshs.ir on 2025-12-05]

SiCYP، *SiHistone*، *SiDNAJ*، *SiAPT* و *SiGAPDH* را در ۳۲ نمونه شامل بافت‌ها و تنش‌های گوناگون بررسی نمودند و به این نتیجه رسیدند که ده ژن کاندید را می‌توان به عنوان ژن خانه‌دار در کنجد استفاده کنند (Wei *et al*., 2013). میزان بیان این ژن‌های مرجع در میان بافت‌ها و اندام‌های مختلف؛ متفاوت است و برای هر نوع نژادگان و بافتی، باید یک یا چند ژن مرجع مناسب به دقت انتخاب شود (Rahnama *et al*., 2018). موفقیت در اجرای شیوه‌های مهندسی ژنتیک و بیوتکنولوژی، به منبع DNA با غلظت خوب و بدون هرگونه ناخالصی، بستگی دارد. تاکنون روش‌های متفاوتی برای استخراج DNA به وسیله پژوهشگران ارائه شده است که مهمترین آن‌ها استخراج دستی و استفاده از کیت‌های تجاری مانند RNX برای استخراج RNA می‌باشد. با این حال علت کیفیت و کمیت پایین محصول استخراج DNA و RNA از بافت‌های هیپوکوتیل می‌تواند تولید متابولیت‌های ثانویه زیاد در این بافت‌ها مانند پلی‌فنول‌ها، لیگنین‌ها، کربوهیدرات‌ها و روغن‌های اتری باشد که در زمانی که بافت‌ها لیز می‌شوند با اسیدهای نوکلئیک ترکیب می‌شوند، افزون بر این حضور ریبونوکلئازها در بافت‌های هیپوکوتیل موجب تخریب سریع RNA می‌شود. خالص سازی و جدا کردن DNA با کیفیت، یکی از نخستین گام های همسانه‌سازی و ایجاد کتابخانه ژنومی به شمار می‌رود. در استخراج DNA، به دست آمدن نمونه‌های کافی و با کیفیت، در کوتاه‌ترین زمان ممکن و حداقل در یک روز کاری (به طور معمول ۸ ساعت) بسیار مهم است. خیلی از روش‌های تغییریافته CTAB، تعداد مراحل بیشتری دارند و فرایند استخراج RNA و DNA حداقل ۲ روز زمان می‌برد. از طرفی آماده نمودن محلول CTAB و بافرهای شستشو در این روش‌ها به زمان و هزینه بالاتری نیاز دارد. در حالیکه در روش عادی و تغییر یافته SDS برای استخراج DNA و نیز روش Trizol برای استخراج RNA بازه زمانی کمتری نیاز است. بنابراین، پیشنهاد می‌شود که دیگر روش‌های موجود برای استخراج اسیدهای نوکلئیک برای گیاه سیکلامن ایرانی ارزیابی شود.

References منابع

Agbagwa, I. O., S. Datta, P. G. Patil, P. Singh and N. Nadarajan. (2012). A protocol for highquality genomic DNA extraction from legumes. *Genetic Molecular Research*, *11*, 4632–4639.

Alaey, M., Naderi R., Vezvaei, A. and Khalighi, A. (2005). Comparing study between four different methods of genomic DNA extraction from *Cyclamen persicum*. *International Journal of Agriculture and Biology*, *6*, 882 -884.

Alaey, M., Naderi, R., Khalighi, A., Vazawai, V. & Salami, S. A., (2015). Investigating the effective components in the quantity and quality of genomic DNA extracted from cyclamen species in Iran. *Research and Construction in Agriculture and Horticulture*, *73*, 11-16. (In persion).

Arbi, G., B. Naceur, M. Chokri & Mohamed, B. (2009). A simple, rapid and efficient method for the extraction of genomic DNA from *Allium roseum* L. (Alliaceae). *African Journal of Biotechnology*, *8*, 4020-4024.

Biswas, K. & Biswas, R. (2011). A modified method to isolate genomic DNA from plants without liquid nitrogen. *Current Science*, *100*, 1622–1624.

Chakraborti, D., A. Sarkar, S. Gupta & Das, S. (2006). Small- and large-scale genomic DNA isolation protocol for chickpea (*Cicer arietinum* L.), suitable for molecular marker and transgenic analyses. *African Journal of Biotechnology*, *5*, 585-589.

Cornea-Cipcigan, M., Bunea, A., Bouari, C. M., Pamfil, D., Páll, E., Urcan, A. C., & Mărgăoan, R. (2022). Anthocyanins and carotenoids characterization in flowers and leaves of *cyclamen* genotypes linked with bioactivities using multivariate analysis techniques. *Antioxidants*, *11*(6), 1126.

d'Angelo, F., Santillo, A., Sevi, A., & Albenzio, M. (2007). A simple salting-out method for DNA extraction from milk somatic cells: investigation into the goat CSN1S1 gene. *Journal of Dairy Science*, *90*(7), 3550-3552.

Dellaporta, S. L., Wood, J., & Hicks, J. B. (1983). A plant DNA minipreparation: version II. *Plant Molecular Biology Reporter*, *1*, 19-21.

Dong, J. Z., & Dunstan, D. I. (1996). A reliable method for extraction of RNA from various conifer tissues. *Plant Cell Reports*, *15*, 516-521.

Gasic, K., Hernandez, A., & Korban, S. S. (2004). RNA extraction from different apple tissues rich in polyphenols and polysaccharides for cDNA library construction. *Plant Molecular Biology Reporter*, *22*, 437-438.

Ghawana S, A. PaulHitesh, H. Kumar, A. Kumar, H. Singh, P. K. Bhardwaj, A. Rani, R. S. Singh, J. Raizada, K. Singh and S. Kumar. (2011). An RNA isolation system for plant tissues rich in secondary metabolites. *BMC Research Notes*, *4*, 85.

Gudenschwagera, O., González-Agüeroab, M., Defilippi, B.G. (2012). A general method for high-quality RNA isolation from metabolite-rich fruits. *South African Journal of Botany*, *83*, 186-192.

[Downloaded from journal-irshs.ir on 2025-12-05]

Hu, C., C. Honda, M. Kita, Z. Zhang, T. Tsuda & Moriguchi, T. A. (2012). Simple protocol for RNA isolation from fruit trees containing high levels of polysaccharides and polyphenol compounds. *Plant Molecular Biology Reporter*, *20*, 69.

Huang Y. C., W. L. Huang, C. Y. Hong, H. S. Lur & Chang, M. C. (2012). Comprehensive analysis of differentially expressed rice actin depolymerizing factor gene family and heterologous overexpression of *OsADF3* confers *Arabidopsis thaliana* drought tolerance. *Rice*, *5*, 33.

Jahormi, M.G. and P. Azadi. (2013). Optimization of RNA extraction from petal tissue with the aim of investigating the expression of effective genes in flower color change. The First National Congress of Flowers and Ornamental. www.civilica.com/paper-Isop01:264 (In persion).

Jaradat, N. A., Al-Masri, M., Hussen, F., Zaid, A. N., Ali, I., Tammam, A., ... & Rajabi, A. (2017). Preliminary phytochemical and biological screening of *Cyclamen coum* a member of Palestinian flora. *Pharmaceutical Sciences*, *23*(3), 231-237.

Kameswari, P. L., Girwani, A., & Rani, K. R. (2014). Genetic diversity in tuberose (*Polianthes tuberosa* L.) using morphological and ISSR markers. *Electronic Journal of Plant Breeding*, *5*(1), 52-57.

Kandylis, P. (2022). Phytochemicals and antioxidant properties of edible flowers. *Applied Sciences*, *12*(19), 99

Kasajima, I., Sasaki, K., Tanaka, Y., Terakawa, T., & Ohtsubo, N. (2013). Large-scale extraction of pure DNA from mature leaves of *Cyclamen persicum* Mill. and other recalcitrant plants with alkaline polyvinylpolypyrrolidone (PVPP). *Scientia Horticulturae*, *164*, 65-72.

Kodkhodaei, S. (2003). A simple and low-cost method for isolating nucleic acids from plants containing high polysaccharide and polyphenolic substances: optimization of the DNA extraction method in almonds. Proceedings of the 3rd Iranian Biotechnology Congress. (In persion).

Li, J. T., J. Yang, D. C. Chen, X. L. Zhang & Tang, Z. S. (2007). An optimized mini-preparation method to obtain high-quality genomic DNA from mature leaves of sunflower. *Genetics and Molecular Research*, *6*, 1064-1071.

Li, Y., & Chen, X. J. (2008). Comparison of methods for RNA extraction from papaya fruit. *Subtropical Agriculutre Research*, *4*(3), 229-232.

Liao, X., Li, H., Khan, A., Zhao, Y., Hou, W., Tang, X., Akhtar, A., & Zhou, R. (2020). A simple and rapid method for isolating high-quality RNA from kenaf containing high polysaccharide and polyphenol contents. bioRxiv preprint. https://doi.org/10.1101/2020.07.06.189506

Lutz, K., W. Wang, A. Zdepski & Michael, T. P. (2011). Isolation and analysis of high-quality nuclear DNA with reduced organellar DNA for plant genome sequencing and resequencing. *BMC Biotechnology*, *11*, 54.-13

Mahomoodally, M. F., Picot-Allain, M. C. N., Zengin, G., Llorent-Martínez, E. J., Stefanucci, A., Ak, G., ... & Mollica, A. (2021). Chemical profiles and biological potential of tuber extracts from *Cyclamen coum* Mill. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, *33*, 102008.

Makari Khaje Dizj, A. (2016). The Type of Explant and Culture Medium in the *in vitro* Propagation of Iranian Cyclamen, *Cyclamen persicum*. PhD Thesis. (In persion).

McCouch, S.R. (2002) A Brief Introduction to Rice DNA Technology, (http://www.ricelab.plbr.cornell.edu)

Murray, H. G. & Thompson, W. F. (1980). Rapid isolation of high molecular weight DNA. *Nucleic Acids Research*, *8*, 4321-4325.

Naderi, R. (2001). Investigating Nutritional Treatments and Gibberellic Acid Hormone, Temperature and Chemical Treatments on the Quantitative and Qualitative Characteristics of Cut Flowers in Four Iranian Cyclamen Genotypes. PhD Thesis. 128 pages. (In persion).

Osterburg, H.G., Allen, J.K. & Finch, C.E. (1975). The use of ammonium acetate in the precipitation of ribonucleic acid. *Biochemical Journal*, *147*, 367–368.

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.

Puchooa, D. (2004). A simple, rapid and efficient method for the extraction of genomic DNA from lychee (*Litchi chinensis* Sonn.). *African Journal of Biotechnology*, *3*, 253–255.

Rahnama H., Ma'ali Amiri, R., Salehijozani. (2018). Plant genetic engineering and selective markers. *Publications of the Agricultural Biotechnology Research Institute of Iran*. pp.406. (In persion).

Rajakani, R., Narnoliya, L., Sangwan, N. S., Sangwan, R. S., & Gupta, V. (2013). Activated charcoal-mediated RNA extraction method for *Azadirachta indica* and plants highly rich in polyphenolics, polysaccharides and other complex secondary compounds. *BMC Research Notes*, *6*, 1-10.

Reichardt, M. J., & Rogers, S. J. (1993). Plant DNA isolation using CTAB. *Current Protocols in Molecular Biology. USA: John Wiley and Sons, Supplement*, *22*.

Semagn, K., Bjørnstad, Å., & Ndjiondjop, M. N. (2006). An overview of molecular marker methods for plants. *African Journal of Biotechnology*, *5*(25).

Singh, U. A., Kumari, M., & Iyengar, S. (2018). Method for improving the quality of genomic DNA obtained from minute quantities of tissue and blood samples using Chelex 100 resin. *Biological Procedures Online*, *20*(1), 1-8.

[Downloaded from journal-irshs.ir on 2025-12-05]

Turan, M., Secme, M., & Mammadov, R. (2022). Antioxidant and anti-proliferative activities of different parts of *Cyclamen cilicium*. *Balıkesir Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, *24*(2), 436-447.

Wei, L., Miao, H., Zhao, R., Han, X., Zhang, T., & Zhang, H. (2013). Identification and testing of reference genes for Sesame gene expression analysis by quantitative real-time PCR. *Planta*, *237*, 873-889.

Zhang, J., & Stewart, J. M. (2000). Economical and rapid method for extracting cotton genomic DNA. *Journal of Cotton Science*, *4*(3), 193-201.

Zhao, L., Ding, Q., Zeng, J., Wang, F. R., Zhang, J., Fan, S. J., & He, X. Q. (2012). An improved CTAB–ammonium acetate method for total RNA isolation from cotton. *Phytochemical Analysis*, *23*(6), 647-650.

[Downloaded from journal-irshs.ir on 2025-12-05]

Iranian Journal of Horticultural Science and Technology 24 (4): 503-524 (2023)
Research article

Optimization of Nucleic Acid Extraction from *Cyclamen coum* Miller

Mohammad Sadegh Tamkin[1], Marzieh Ghanbari Jahromi[1*], Amir Mousavi[2]
[1]Department of Horticultural Sciences and Agronomy, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran
[2]National Institute of Genetic Engineering and Biotechnology, Tehran, Iran
Corresponding Author, Email: (ghanbari@srbiau.ac.ir)

Most molecular genetic tests begin by extracting DNA and RNA. To achieve this, obtaining a suitable, reliable, and repeatable extraction method is of great importance. In this regard, optimization of the extraction of nucleic acids from the Iranian cyclamen plant (*Cyclamen coum* Miller) and the introduction and expression of housekeeping genes was performed. After collecting plant samples from the three organs of leaf, petal and hypocotyl, modified CTAB and SDS methods were used for DNA isolation and modified Trizol, CTAB-LiCl and RNX-Plus methods were used for RNA isolation. The quality of isolated DNA and RNA was checked by electrophoresis and their concentration was measured with nanodrop. The presence of 18S ribosomal, actin (ACT), tubulin (TUB) and elongation factor (EF-1a) gene fragments was investigated using polymerase chain reaction (PCR). Based on the results, the lowest DNA concentration was related to the CTAB method. The DNA concentration and quality of Iranian cyclamen leaf, petal and hypocotyl samples were higher in the modified SDS method than in the CTAB method. The isolation of DNA using the modified SDS method not only had a high purity but also had relatively high performance. According to quality analysis of the RNA isolated from leaf, petal, and hypocotyl samples using Trizol, CTAB-LiCl, and RNX-Plus protocols, all three strategies may be used to isolate RNA from Iranian cyclamen tissues. However, the Trizol method is superior to other methods in terms of high band resolution and RNA concentration. The production of cDNA from RNA isolated from three Iranian cyclamen tissues was successfully performed only by Trizol and RNX-Plus methods. Based on the results, cDNA made from RNA isolated by Trizol method had better quality. To check the efficiency of RNA samples in RT-PCR reaction and the expression of housekeeping genes, RT-PCR test was performed. Based on the results, the presence of the bands related to the housekeeping genes fragment in the electrophoresis stage confirmed the good quality of the produced cDNA and also indicated the high quality of the isolated RNA from the Trizol and RNX-Plus methods. RT-PCR results showed that the expression of actin, *EF-1a*, *18S* and *tubulin* gene was positive in most Iranian cyclamen organs. Among housekeeping genes, *tubulin* and *18S* genes, had higher band resolution and higher quality in all samples and tissues.
Keywords: Nucleic acid, RNA extraction, Phenol-Chloroform, RNX, Tarizol, CTAB.

[Downloaded from journal-irshs.ir on 2025-12-05]