

روش ساده و کارا برای جداسازی DNA ژنومیک از بافت‌های کهنه میگو ببری سبز (*Penaeus semisulcatus*)، مناسب برای PCR معکوس

- نوید طحان‌زاده: گروه زیست فناوری دریا، دانشکده علوم و فنون دریایی، دانشگاه خلیج فارس، بوشهر
- سیدجواد حسینی*: گروه بیوتکنولوژی، پژوهشکده خلیج فارس، دانشگاه خلیج فارس، بوشهر
- رؤیا علیزاده: گروه علوم سلولی و مولکولی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه خلیج فارس، بوشهر
- فریبا غلامی‌دشتی: گروه علوم سلولی و مولکولی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه خلیج فارس، بوشهر
- محمد نظریان: گروه علوم سلولی و مولکولی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه خلیج فارس، بوشهر

تاریخ دریافت: خرداد ۱۳۹۴ تاریخ پذیرش: شهریور ۱۳۹۴

چکیده

انتخاب روش مناسب جهت استخراج DNA سالم و دست‌نخورده از بافت‌هایی که مدت طولانی در الکل نگه‌داری شده‌اند، نقش مهمی در موفقیت آنالیزهای مولکولی دارد. هدف از این مطالعه، بهینه‌سازی یک روش ساده، تکرار پذیر، ایمن و قابل اعتماد جهت استخراج DNA ژنومیک با کیفیت از بافت‌های قدیمی ماهیچه‌ای میگو ببری سبز (*Penaeus semisulcatus*) بود. از مهم‌ترین مزایای این روش، پودر نمودن بافت در هاون چینی پس از خشک کردن در درجه حرارت ۴۰ درجه سانتی‌گراد، عدم استفاده از نیتروژن مایع جهت پودر کردن بافت و کاهش زمان استخراج تا حدود ۵ ساعت بود. به‌دلیل این که موفقیت در واکنش PCR معکوس، به شدت وابسته به کیفیت DNA الگو است، جداسازی بخشی از ژن بتا اکتین با استفاده از این واکنش، جهت ارزیابی کیفیت DNA استخراج شده، مورد توجه قرار گرفت. موفقیت در تکثیر و تعیین توالی بخشی از ژن بتا اکتین میگو ببری سبز، حاکی از آن است که DNA حاصل از این روش از کیفیت لازم جهت واکنش فوق‌برخوردار است. با توجه به موفقیت‌آمیز بودن واکنش PCR معکوس، DNA حاصل از این روش را می‌توان با موفقیت جهت انجام سایر مطالعات مولکولی از قبیل AFLP، RFLP و تکثیر قطعات بلند که نیازمند DNA با کیفیت است، به‌عنوان الگو مورد استفاده قرار داد.

کلمات کلیدی: استخراج DNA، بافت‌های قدیمی، پودر کردن، میگو ببری سبز



مقدمه

به موازات پیشرفت ژنتیک مولکولی در دهه ۱۹۷۰ و توسعه و ابداع روش‌های مولکولی و کاربرد آن در صنعت تکثیر و پرورش (Vaseeharan و همکاران، ۲۰۱۳؛ Burton، ۲۰۰۹)، فناوری تکثیر و پرورش نیز، برای حدود ۲۰ گونه از اعضای خانواده پنائیده توسعه پیدا کرد که مهم‌ترین آن‌ها شامل *Fenneropenaeus Penaeus* و *Marsupenaeus japonicas*، *F.indicus*، *chinensis* و *monodon* در آسیا و *L. stylirostris*، *Litopenaeus vannamei* و *L. Schmitti* در کشورهای آمریکایی است (Benzei، ۲۰۰۹). تکثیر و پرورش میگوها، از یک طرف در ایجاد کسب و کار و از طرف دیگر در تامین نیازهای غذایی انسان‌ها، سهم قابل توجهی را در بین آبزیان به خود اختصاص داده است (FAO، ۲۰۱۴).

علی‌رغم اختصاص سهم بسیار بالایی از صید میگو در خلیج فارس (Niamaimandi و همکاران، ۲۰۱۴)، ارزش غذایی قابل توجه (Hosseini و همکاران، ۲۰۰۴) و دارا بودن پتانسیل جهت تکثیر و پرورش در استخرهای پرورشی (حسینی، ۱۳۷۶؛ نفیسی، ۱۳۷۴)، به‌جز در دوره کوتاهی (دهه ۱۳۷۰)، میگو ببری سبز مورد استقبال دست‌اندرکاران صنعت تکثیر و پرورش قرار نگرفت. عدم استقبال از گونه فوق را می‌توان به ظهور بیماری ویروسی و عدم شناخت کامل از بیوتکنیک تکثیر و پرورش این گونه نسبت داد. از طرف دیگر، در مقایسه با سایر گونه‌ها از قبیل *Litopenaeus vannamei*، *Marsupenaeus japonicas* و *Penaeus monodon* دانش در مورد ساختار ژنتیکی و زیست‌شناسی مولکولی و فیزیولوژی پایه و اکولوژی آن بسیار کم است، لذا یکی از دلایل عدم موفقیت در تکثیر و پرورش میگو ببری سبز را می‌توان به کافی نبودن دانش زیست‌شناسی گونه مذکور نسبت داد. تکثیر و پرورش آبزیان، به‌ویژه میگوها، زمانی با موفقیت همراه است که پرورش‌دهندگان به دانش جامعی از اکولوژی، فیزیولوژی (فیزیولوژی رفتار، تولیدمثل و تغذیه)، مسائل تغذیه‌ای و بهداشتی گونه کاندید پرورش، دست یافته باشند. نظر به این که ابعاد مختلف زیست‌شناسی یک موجود، به‌وسیله ژن‌های آن کنترل می‌شود، بنابر این شناخت ژنتیک پایه گونه‌های پرورشی، امکان استفاده اقتصادی از آن را بیش‌تر می‌کند (طحان‌زاده، ۱۳۹۳).

کاربردهای ژنتیک و بیوتکنولوژی در صنعت شیلاتی مرتبط با میگوها، سال‌ها است که مورد توجه قرار گرفته است. در اوایل، تاثیر عملی ژنتیک و بیوتکنولوژی، در کنترل تولیدمثل، توسعه سوش‌های اهلی شده، شناسایی و کنترل بیماری‌ها تصور می‌شد (Benzei، ۱۹۹۸)، اما با معرفی PCR در اواخر دهه ۱۹۸۰ میلادی

(Saiiki و همکاران، ۱۹۸۸) و ظهور انواع نشانگرهای مولکولی، نقش ژنتیک و بیوتکنولوژی در تکثیر و پرورش آبزیان به‌ویژه میگوها پر رنگ‌تر شده است. برای نشانگرهای مولکولی، علاوه بر ارزیابی تنوع ژنتیکی، تفکیک گونه‌ها و جمعیت‌ها از هم‌دیگر و تعیین رابطه فیلوژنتیک و تکاملی آبزیان (Vaseeharan و همکاران، ۲۰۱۳؛ Kumar و Chachan، ۲۰۱۰؛ Liu و Cordes، ۲۰۰۴)، کاربردهای مهم‌تری از قبیل حفاظت و مدیریت ذخایر و برنامه‌های اصلاحی ژنتیکی (Castello-Jarez و همکاران، ۲۰۱۵) نیز مطرح است.

یکی از عوامل تاثیرگذار و محدودکننده استفاده از نشانگرهای مولکولی در آنالیزهای ژنومیک و سایر مطالعات مولکولی، کیفیت و کمیت DNA استخراج شده است (Chen و Xin، ۲۰۱۲؛ Jaferian و همکاران، ۲۰۱۰؛ Psifidi و همکاران، ۲۰۱۰؛ Choudhary و همکاران، ۲۰۰۸). لذا، انواع روش‌های عمومی جهت استخراج DNA ژنومیک در موجودات از جمله جانوران توسعه یافته است (Borges و همکاران، ۲۰۰۹؛ Sambrook و Russell، ۲۰۰۱؛ Aljanabi و Martinez، ۱۹۹۷؛ Dellaporta و همکاران، ۱۹۸۳). گاهی اوقات محقق مجبور است، جهت انجام مطالعات مولکولی یا تکمیل آن مطالعات و یا جداسازی ژن‌های موثر در رشد و عناصر تنظیمی ناشناخته آن‌ها، که نیازمند DNA با کیفیت بالا است، از بافت‌های کهنه استفاده کند و ممکن است DNA استخراج شده، از کیفیت قابل قبولی برخوردار نباشد (Bouchan و همکاران، ۱۹۹۴). لذا، واکنش‌های بعدی مولکولی مانند AFLP، PCR معکوس و RFLP که نیازمند الگوی با کیفیت است را با مشکل مواجه سازد (Muller و McPherson، ۲۰۰۰). یکی از راه‌ها جهت غلبه بر مشکل فوق استفاده از کیت‌های تجاری است. استفاده از این کیت‌ها، در آنالیزهای مولکولی و فیلوژنتیک میگوها و سایر ده‌پایان، در سطح زیادی مورد توجه قرار گرفته است (Lin و همکاران، ۲۰۱۲؛ Pascoal و همکاران، ۲۰۰۸؛ Lavery و همکاران، ۲۰۰۴؛ Tong و همکاران، ۲۰۰۰). با آن که DNA حاصل از کیت‌های تجاری در مقایسه با روش‌های مرسوم استخراج، از کیفیت بالایی برخوردار هستند، اما هزینه‌های بالا و عدم دسترسی آسان، استفاده از این کیت‌ها را با محدودیت مواجه نموده است (Artyukhin و Woo، ۲۰۱۲). از طرف دیگر، روش‌های عمومی استخراج DNA (Borges و همکاران، ۲۰۰۹؛ Sambrook و Russell، ۲۰۰۱؛ Dellaporta و همکاران، ۱۹۸۳). کیت‌های تجاری نیز معمولاً توصیه به استفاده از نیتروژن مایع، جهت پودر کردن بافت نموده‌اند. استفاده از نیتروژن مایع، مشکلات خاص خود را دارا است، زیرا از یک طرف کار با آن نیز خطرناک و منوط به رعایت موارد احتیاطی و ایمنی خاصی است و از طرف دیگر تهیه آن نیز برای

استخراج مورد استفاده قرار گرفتند.

آنزیم‌ها و آغازگرها: آنزیم‌های پروتئیناز *K*، *EcoRI*، *T4* DNA ligase و Taq DNA Polymerase از شرکت سیناکلون (ایران) خریداری شدند. آغازگرهای اختصاصی استفاده شده در این پژوهش، که ترادف نوکلئوتیدی آن‌ها در جدول ۱ ارائه شده، توسط شرکت متابیون (آلمان) سنتز شدند. این آغازگرها براساس نواحی حفاظت شده cDNA بتا اکتین گونه‌های *P.monodon* (JN۸۰۸۴۴۹)، *F.chinensis* (DQ۲۰۵۴۲۶)، *L. vannamei* (AF۳۰۰۷۰۵) و *M.japonocus* (Gu۶۴۵۲۴۷) طراحی شده‌اند.

استخراج DNA: در این تحقیق، روش مرسوم استخراج DNA (Sambrook و Russell، ۲۰۰۱؛ Aljanabi و Martinez، ۱۹۹۷) به عنوان روش پایه، پس از انجام تغییراتی، مورد استفاده قرار گرفت. بافر لیزکننده نیز شامل Tris، EDTA و SDS بود (جدول ۲، ردیف‌های ۱ و ۲). هم‌چنین روش مرسوم استخراج DNA، با استفاده از CTAB، که توسط Doyle و Doyle (۱۹۸۷) برای گیاهان ارائه شده و با تغییراتی جهت استخراج DNA ژنومیک آریزان در آزمایشگاه بیوتکنولوژی این پژوهشکده بهینه‌سازی شده (Faqih Ahmadani و همکاران، ۲۰۱۴؛ Jaferian و همکاران، ۲۰۱۰) و در حال حاضر به صورت مرسوم مورد استفاده قرار می‌گیرد نیز جهت مقایسه مورد استفاده قرار گرفت (جدول ۱، ردیف ۳).

همه افراد امکان‌پذیر نیست. بنابراین، بهینه‌سازی روشی ساده، کم هزینه، سریع و ایمن جهت پودر کردن بافت، بدون استفاده از نیتروژن مایع نقش مهمی در توسعه روش‌های مولکولی ایفای می‌کند. در این مقاله، یک روش ساده، نسبتاً کم هزینه و تقریباً کوتاه، جهت استخراج DNA ژنومیک با کیفیت بالا از بافت ماهیچه بدنی میگو ببری سبزی که دوره طولانی (بیش از ۱۲ ماه) در الکل ۹۶ درصد نگهداری شده، ارائه می‌شود. هدف اصلی این مقاله، معرفی روش خشک کردن بافت میگو در درجه حرارت ملایم و سپس پودر نمودن بافت خشک شده در هاون چینی و جایگزینی روش مذکور، به جای نیتروژن مایع است. در نهایت کیفیت DNA استخراج شده حاصل از این روش، با استفاده از تکنیک PCR معکوس مورد تأیید قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

نمونه‌ها، بافرها و محلول‌ها: نمونه‌هایی که جهت استخراج مورد استفاده قرار گرفتند، از بیش از یک سال پیش، در الکل ۹۶٪ (ساخت ایران) قرار داده شده بودند. بافرهای لیزکننده براساس روش‌های مرسوم استخراج، ساخته شدند (جدول ۲). محلول ۵ مولار NaCl، کلروفرم، ایزوپروپانول و اتانل ۷۰٪ جهت مراحل بعدی

جدول ۱: آغازگرهای استفاده شده در این تحقیق (طحان‌زاده، ۱۳۹۳)

نام آغازگر	ترادف نوکلئوتیدی	نقطه ذوب (درجه سانتی‌گراد)
actF۱	۵'-CTGGTGACGATGCACCACG-۳'	۶۲
actF۲	۵'-CGTCATCAGGGTGTGATGG-۳'	۵۹
actR۲	۵'-GCCTTGACATGCCGGAG-۳'	۶۱
actR۳	۵'-CCATTGTCTACAACCAGGG-۳'	۵۷

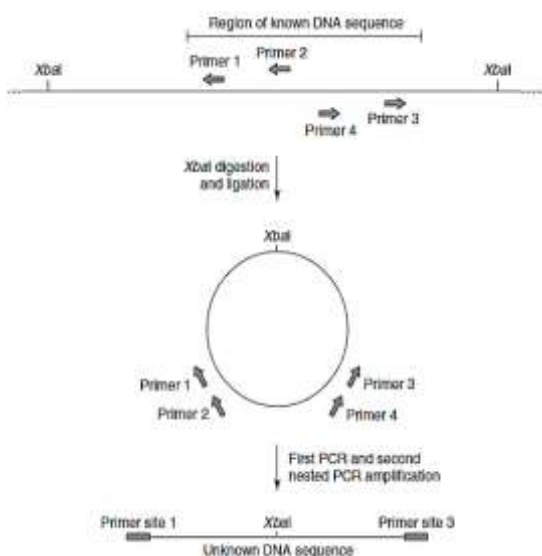
جدول ۲: ترکیبات بافرهای لیزکننده جهت استخراج DNA

ردیف	نام بافر	Tris	EDTA	SDS	CTAB	NaCl
۱	A	۱۰۰mM	۲۰mM	٪۰/۵	-	-
۲	B	۱۰۰mM	۲۰mM	٪۱	-	-
۳	C (CTAB)	۱۰۰mM	۲۰mM	٪۱	٪۲	۱/۴ M

عنوان A۱، A۲ و A۳)، درون ۳ ویال دیگر نیز، ۷۰۰ میلی‌لیتر از محلول B (این ویال‌ها تحت عنوان B۱، B۲ و B۳) افزوده شد. به سه ویال دیگر نیز (تحت عنوان C۱، C۲ و C۳) حدود ۶۰ میلی‌لیتر بافت ماهیچه ای میگو اضافه، و با قیچی ریز ریز گردید. سپس به همه ویال‌ها ۷ میکرولیتر آنزیم پروتئیناز K (۲۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر) اضافه و همه آن‌ها در ترمومیکسر با سرعت

ابتدا چندین گرم بافت ماهیچه بدنی، با استفاده از اسکالپل روی شیشه تمیز تا حد امکان ریش‌ریش و به مدت ۳۰ و ۴۰ دقیقه درون انکوباتور با دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد تیمار گردید. بافت خشک شده با استفاده از هاون چینی پودر و حدود ۶۰ میلی‌گرم از پودر حاصله به ۶ ویال و ۲ میلی‌لیتری اضافه شد. سپس درون ۳ تا از ویال‌ها، ۷۰۰ میلی‌لیتر از محلول A (این ویال‌ها تحت





شکل ۱: تصویر شماتیک PCR معکوس (Ochman و همکاران، ۱۹۸۸)

این واکنش به صورت خلاصه به شرح زیر انجام شد. ۵۰۰ نانوگرم از DNA با استفاده از آنزیم *EcoRI*، مطابق با دستورالعمل شرکت تولیدکننده هضم گردید. با هدف تخلیص، محصول واکنش هضم با استفاده از مخلوط فنل و کلروفرم (۵۰:۵۰) و کلروفرم استخراج، و پس از رسوب توسط اتانل خالص و شستشو توسط اتانل ۷۰ درصد، در ۵۰ میکرولیتر آب مقطر تزریقی حل گردید. محصول واکنش هضمی، سپس به وسیله آنزیم *DNA ligase* T4 دریک واکنش لیگاسیون، حلقوی گردید. در PCR اول، محصول واکنش هضمی، به عنوان الگو جهت انجام واکنش PCR با استفاده از زوج آغازگر *actR2/actF1* مورد استفاده قرار گرفت. پس از بهینه‌سازی شرایط با استفاده از گرادیانت دمایی، واکنش PCR در حجم ۲۵ میکرولیتری حاوی ۵ میکرولیتر محصول هضم، ۱۰ پیکومول از هر آغازگر، ۲ واحد آنزیم *Taq DNA Polymerase*، ۲۰۰ پیکومول مخلوط dNTPs، ۱/۵ میلی مولار $MgCl_2$ و بافر (۱X) PCR انجام شد. PCR طبق برنامه حرارتی زیر انجام شد: ۹۴ درجه سانتی‌گراد (۳ دقیقه)، در طی ۳۵ چرخه، ۹۴ درجه سانتی‌گراد ۱ دقیقه، ۵۸ درجه سانتی‌گراد ۱ دقیقه و ۷۲ درجه سانتی‌گراد ۲ دقیقه. ۵ دقیقه نیز جهت بسط نهایی در نظر گرفته شد. موفقیت واکنش PCR با استفاده از الکتروفورز محصول PCR روی ژل آگارز ۱٪ بررسی و ۵ میکرولیتر از آن، به عنوان الگو جهت PCR دوم (لانه‌ای) با استفاده از زوج آغازگر داخلی *actR2/actF2* مورد استفاده قرار گرفت. به جز الگو و آغازگرها، سایر ترکیبات و برنامه حرارتی مشابه واکنش پیشین بود. محصول واکنش فوق با استفاده از آغازگرهای

۳۵۰ rpm و درجه حرارت ۵۵ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند. تیمار فوق برای نمونه‌های A۱ و B۱ به مدت ۲ ساعت، A۲ و B۲ به مدت ۳ ساعت و A۳ و B۳ نیز به مدت ۵ ساعت ادامه یافت. تیمار ویال‌های گروه C نیز حدود ۱۶ ساعت انجام شد. سپس، مراحل بعدی استخراج برای هر دو روش به شرح ذیل ادامه یافت: ۲۴۰ میکرولیتر ۵ M NaCl به بافت لیز شده، اضافه و پس از مخلوط نمودن، به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد تیمار گردید. به مخلوط فوق، ۲۵۲ میکرولیتر کلروفرم اضافه و پس از مخلوط نمودن، به مدت ۱۰ دقیقه با دور ۱۲۰۰ rpm در درجه حرارت اتاق، سانتریفیوژ شد. حدود ۷۰۰ میکرولیتر از محلول رویی به ویال جدیدی منتقل، ۷۰۰ میکرولیتر ایزوپروپانول سرد به آن اضافه و پس از مخلوط نمودن، به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. پس از سانتریفیوژ نمودن نمونه مانند مرحله قبل، محلول رویی دور ریخته و رسوب DNA با ۵۰۰ میکرولیتر اتانول ۷۰٪ شستشو و به مدت ۵ دقیقه با سرعت ۸۰۰۰ rpm سانتریفیوژ شد. در نهایت پس از خارج کردن الکل به رسوب فوق، ۵۰ تا ۱۰۰ میکرو لیتر آب مقطر تزریقی اضافه شد.

آنالیز DNA: برای آنالیز DNA استخراج شده، سه پارامتر

غلظت، درجه خلوص و یک‌پارچگی آن و انجام واکنش PCR معکوس مورد توجه قرار گرفت.

غلظت و درجه خلوص DNA به ترتیب به وسیله اندازه‌گیری در طول موج ۲۶۰ نانومتر (A₂₆₀) و نسبت طول موج ۲۶۰ نانومتر (A₂₆₀) به ۲۸۰ نانومتر (A₂₈₀) با استفاده از اسپکتروفوتومتر مدل WPA (آلمان) تخمین زده شد. یک‌پارچگی و یکدستی DNA استخراج شده نیز با استفاده از الکتروفورز روی ژل آگارز ۱٪ در بافر ۱X TAE ارزیابی گردید (Devi و همکاران، ۲۰۱۳).

کارایی کیفیت DNA استخراج شده با استفاده از PCR معکوس، جهت جداسازی بخشی از ترادف نوکلئوتیدی ژن بتا اکتین، تحت آزمون قرار گرفت. این واکنش، برای جداسازی قطعات ناشناخته، مجاور قطعات شناخته شده، مورد استفاده قرار می‌گیرد (Ochman و همکاران، ۱۹۸۸). در PCR استاندارد، نواحی‌ای از DNA که بین دو جایگاه آغازگر رو به یکدیگر قرار دارند، تکثیر می‌شود. اما در PCR معکوس، جفت آغازگرهایی به کار گرفته می‌شوند که در ابتدا از یکدیگر دور می‌شوند، اما پس از هضم الگو با آنزیم محدودالثر مناسب و حلقوی شدن محصول واکنش هضمی به وسیله آنزیم لیگاز، آغازگرها در DNA حلقوی شده، به سمت یکدیگر حرکت می‌کنند (شکل ۱). سپس با انجام دو PCR، امکان تکثیر قطعات ناشناخته فراهم می‌گردد.

۳ نشان می دهد، DNA ژنومیک استخراج شده از درجه خلوص قابل قبولی برخوردار نیستند، یا دارای RNA ویا پروتئین هستند. البته نمونه A۳، که نسبت A_{۲۶۰} به A_{۲۸۰} آن، ۱/۷۶۳ تخمین زده شده است وضعیت خوبی دارد، هرچند الگوی الکتروفورزی آن حضور RNA را نشان می دهد.

جدول ۳: میزان جذب نوری و غلظت DNA در نمونه‌ها

نمونه	A _{۲۶۰}	A _{۲۶۰} /A _{۲۸۰}	ngDNA/ μ l
A _۱	۱/۵۰۶	۱/۶۸۲	۱۵۰۶
A _۲	۱/۱۰۱	۱/۹۸۲	۱۱۰۱
A _۳	۱/۴۹۸	۱/۷۶۲	۱۴۹۸
B _۱	۱/۵۲۰	۱/۵۹۵	۱۵۲۰
B _۲	۱/۴۰۳	۱/۵۶۰	۱۴۰۳
B _۳	۱/۵۰۱	۱/۶۴۷	۱۵۰۱
C _۱	۱/۴۶۱	۱/۶۰۲	۱۴۶۱
C _۲	۱/۴۶۱	۱/۵۲۷	۱۴۶۱
C _۳	۱/۴۹۸	۱/۶۲۵	۱۴۹۸

ارزیابی سلامت و یکدستی DNA به وسیله الکتروفورز

روی ژل آگارز: سنجش DNA با استفاده از اسپکتروفوتومتر، فقط اطلاعاتی در زمینه غلظت و درجه خلوص (ناخاصی با RNA یا پروتئین) در اختیار قرار می دهد، ولی اطلاعاتی در زمینه سلامت و یک پارچگی آن ارائه نمی دهد. لذا، سلامتی و یکدستی DNA استخراج شده، به وسیله الکتروفورز روی ژل آگارز ۱٪ بررسی شد. الگوی حرکتی DNA روی ژل آگارز، نشان داد، در تیمارهایی که SDS نیم و یک درصد برای حداکثر مدت ۵ ساعت انجام شده است (شکل‌های ۲الف و ۳)، یک پارچگی DNA ژنومیک استخراج شده، بهتر از تیمارهایی است که SDS یک درصد به صورت توام با CTAB، در مدت یک شبانه روز (۱۶ تا ۲۰ ساعت) به خدمت گرفته شده است (شکل ۲ب).

actR۳/actF۲ توسط شرکت بیونیر (کره جنوبی) از هر دو طرف تعیین توالی شد. سپس صحت توالی‌های حاصل از این تحقیق، از طریق مقایسه با سایر توالی‌ها، با استفاده از نرم‌افزار Blast بررسی گردید (Altschul و همکاران، ۱۹۹۰).

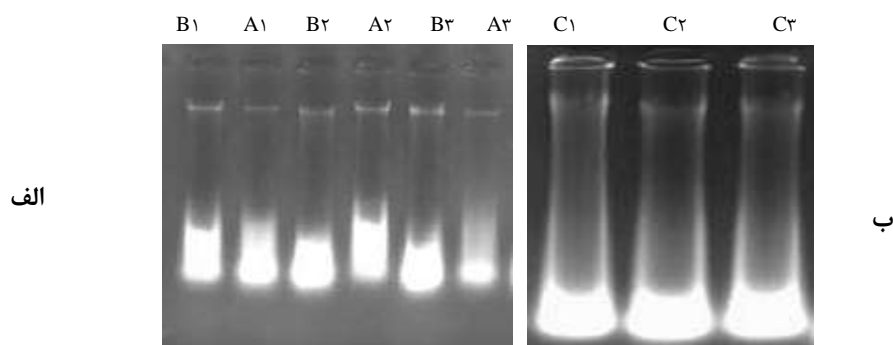
نتایج

تیمار مناسب جهت خشک کردن: نتایج نشان داد که

تیمار بافت به مدت ۴۰ دقیقه در درجه حرارت ۴۰ درجه سانتی گراد، جهت خشک شدن بافت مناسب تر از ۳۰ دقیقه است. تیمار در مدت ۴۰ دقیقه به اندازه کافی باعث خشک شدن بافت، جهت پودر شدن به وسیله هاون چینی گردید، در صورتی که، در مدت زمان ۳۰ دقیقه، بافت به طور کامل خشک نشده بود و پیرو پودر کردن در هاون چینی، له می شد.

ارزیابی غلظت و درجه خلوص DNA ژنومیک به

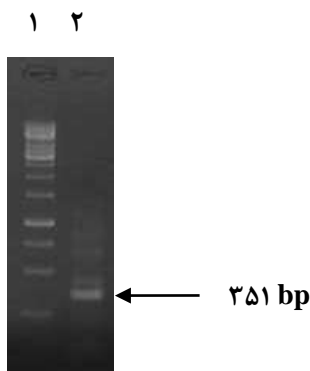
وسیله اسپکتروفوتومتری: غلظت و درجه خلوص DNA استخراج شده، با استفاده از دستگاه اسپکتروفوتومتر مورد ارزیابی قرار گرفت. غلظت DNA بر حسب مقدار نانوگرم به ازای هر میکرولیتر برای هر نمونه (وقتی که نمونه جهت قرائت دانسیته نوری، ۲۰ برابر رقیق شده باشد) برابر با حاصل ضرب ۱۰۰۰ و A_{۲۶۰} است. نسبت A_{۲۶۰}/A_{۲۸۰}، نیز بیانگر درجه خلوص DNA استخراج شده است. اگر این نسبت بین ۱/۷-۱/۸ باشد بیانگر کیفیت مناسب DNA است. نسبت بالاتر از ۱/۸ باشد نشان دهنده ناخالصی با RNA و کمتر از ۱/۷ نیز بیانگر ناخالصی با فنل یا پروتئین است. به جز نمونه A_۲ که با ۱۱۰۱ نانوگرم در میکرولیتر کم ترین میزان استخراج را به خود اختصاص داده است، غلظت سایر نمونه‌ها، به هم نزدیک و در محدوده ۱۴۰۳ تا ۱۵۲۰ نانوگرم در میکرولیتر بود و تفاوت‌های قابل توجه میان استخراج‌ها مشاهده نشد (جدول ۳). همان طور که جدول



شکل ۲: الگوی حرکتی DNA ژنومیک استخراج شده حاصل از این روش الف: (B_۱, A_۱, B_۲, A_۲, B_۳ و A_۳) و روش مرسوم CTAB/SDS ب: (C_۱, C_۲ و C_۳).



شده در این مقاله، که به‌عنوان الگو جهت PCR معکوس استفاده شده، در شکل ۳ نشان داده شده است (تصویری از DNA استخراج شده حاصل از CTAB/SDS که به‌عنوان الگو جهت انجام PCR معکوس مورد استفاده قرار گرفت، ارائه نشده است ولی الگوی حرکتی آن مانند شکل ۲ بود). پس از هضم DNA و حلقوی شدن آن به‌وسیله واکنش الحاقی، این محصول به‌عنوان الگو جهت انجام اولین PCR معکوس با استفاده از زوج آغازگر actR۲/actF۱ مورد استفاده قرار گرفت. الگوی حرکتی محصول واکنش فوق، واجد چندین باند با اندکی اسمیر در زمینه ژل، فقط برای DNA حاصل از روش ارائه شده توسط این مقاله، مشاهده شد (شکل نشان داده نشده است). محصول دور اول PCR معکوس به‌عنوان الگو با استفاده از آغازگرهای actR۳/actF۲ در یک PCR لانه‌ای برای استخراج با روش اول موفقیت‌آمیز بود و منجر به تکثیر قطعه‌ای به‌طول تقریبی ۳۵۰ جفت باز گردید (شکل ۴).



شکل ۴: الگوی حرکتی محصول حاصله از PCR معکوس لانه‌ای. ردیف ۱- نشانگر ۲- محصول PCR لانه‌ای

شکل ۳ نیز الگوی حرکتی DNA استخراج شده پیرو کافت بافت در بافر A (جدول ۱) به‌مدت ۲ ساعت را نشان می‌دهد. از دو استخراج دیگر نشان می‌دهد. همان‌طور که الگوی الکتروفورزی نشان می‌دهد در تیمارهایی که SDS نیم و یک درصد جهت لیز بافت استفاده شده، باند DNA استخراج شده واضح و آشکار و کشیدگی و اسمیر در مقایسه با استخراج حاصل از کاربرد توام CTAB/SDS بسیار کم‌تر مشاهده می‌شود.



شکل ۳: الگوی حرکتی DNA استخراج شده حاصل از این روش از دو تکرار متفاوت که از بافر لیزکننده A استفاده شده است. این DNA به‌عنوان الگو جهت انجام PCR معکوس مورد استفاده قرار گرفت.

پس از برش از روی ژل، ترادف نوکلئوتیدی محصول فوق با استفاده از آغازگرهای اختصاصی actR۳/actF۲، از هر دو طرف تعیین توالی شد. نتایج تعیین توالی نشان داد که اندازه قطعه مذکور دقیقاً ۳۵۱ نوکلئوتید است. آزمون BLAST، جهت تأیید نهایی موفقیت آزمایش PCR معکوس انجام شد. همان‌طور که انتظار می‌رفت، توالی حاصل از این تحقیق، بخشی از ژن بتا اکتین است و یکسانی نوکلئوتیدی بسیار بالایی (۹۱ تا ۱۰۰ درصد) با cDNA اکتین از سایر موجودات دارد (شکل نشان داده نشده است). مطابق انتظار، بیش‌ترین یکسانی، با بتا اکتین گونه‌های جنس پنهوس مشاهده شد. شکل ۵ نتیجه هم‌ردیفی، ترادف نوکلئوتیدی حاصل از این تحقیق، با بتا اکتین گونه *Fenneropenaeus chinensis* (DQ۲۰۵۴۲۶)، با استفاده از نرم افزار Blast را نشان می‌دهد.

بررسی نتایج PCR معکوس: PCR معکوس، جهت سنجش کیفیت DNA ژنومیک استخراج شده از هر دو روش، مورد استفاده قرار گرفت. DNA ژنومیک استخراج شده با روش بهینه

Fenneropenaeus chinensis beta actin mRNA, complete cds

Sequence ID: [gb|DQ205426.1|](#) Length: 1358 Number of Matches: 2Range 1: 227 to 490 [GenBank](#) [Graphics](#) ▼ Next Match ▲ Previous Match

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
483 bits(261)	1e-132	263/264(99%)	0/264(0%)	Plus/Plus
Query 1	CGTCATCAGGGTGTGATGGTCGGCATGGGCCAGAAGGACTCGTACGTCGGCGACGAGGCC			60
Sbjct 227	CGTCATCAGGGTGTGATGGTCGGCATGGGCCAGAAGGACTCGTACGTCGGCGACGAGGCC			286
Query 61	CAGAGCAAGCGAGGTATCCTCACCTCAAATACCCCATCGAGCACGGCATCGTCACCAAC			120
Sbjct 287	CAGAGCAAGCGAGGTATCCTCACCTCAAATACCCCATCGAGCACGGCATCGTCACCAAC			346
Query 121	TGGGACGACATGGAGAAGATCTGGCATCATACTTCTACAACGAGCTCCGCGTGGCCCC			180
Sbjct 347	TGGGACGACATGGAGAAGATCTGGCATCATACTTCTACAACGAGCTCCGCGTGGCCCC			406
Query 181	GAGGAGCACCCCGTCTGCTGACCGAGGCTCCCTCAACCCCAAGGCCAACCGCGAGAAG			240
Sbjct 407	GAGGAGCACCCCGTCTGCTGACCGAGGCTCCCTCAACCCCAAGGCCAACCGCGAGAAG			466
Query 241	ATGACACAGATCATGTTTCGAGACG	264		
Sbjct 467	ATGACACAGATCATGTTTCGAGACG	490		

Range 2: 98 to 150 [GenBank](#) [Graphics](#) ▼ Next Match ▲ Previous Match ▲ First Match

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
99.0 bits(53)	5e-17	53/53(100%)	0/53(0%)	Plus/Plus
Query 299	AACAACAACAAGATGTGTGACGACGAAGTAGCCGCCCTGGTTGTAGACAATGG			351
Sbjct 98	AACAACAACAAGATGTGTGACGACGAAGTAGCCGCCCTGGTTGTAGACAATGG			150

شکل ۵: نتیجه هم‌ردیفی ترادف نوکلئوتیدی حاصل از این تحقیق با بخشی cDNA بتا اکتین گونه

Blast با Fenneropenaeus chinensis (DQ205426) استفاده از

بحث

(۲۰۱۵). بنابراین محققان، جهت دستیابی به DNA با کیفیت دلخواه، یک روش را تغییر می‌دهند، یا دو یا چند روش مختلف را ترکیب می‌کنند (Ansari و Salman Khan, ۲۰۱۲). علی‌رغم این که کیفیت نامناسب DNA استخراج شده از میگوها به نگهداری طولانی مدت آن‌ها نسبت داده شده است (Bouchan و همکاران، ۱۹۹۴)، گاهی اوقات محقق مجبور است، جهت انجام مطالعات مولکولی یا تکمیل آن مطالعات و یا جداسازی ژن‌های موثر در رشد و عناصر تنظیمی ناشناخته آن‌ها، که نیازمند DNA با کیفیت بالا است، از بافت‌های کهنه استفاده کند. بنابراین ضرورت بهینه‌سازی روش‌های ساده در این حوزه نمود پیدا می‌کند.

با توجه به موارد فوق، بهینه‌سازی شرایط استخراج DNA از بافت کهنه میگو، با استفاده از ساده‌ترین بافر لیزکننده (ردیف‌های ۱ و ۲ جدول ۱)، که معمولاً در اکثر آزمایشگاه‌ها یافت می‌گردد، انجام شد. از طرف دیگر خواص ذاتی ماهیچه بدنی میگو این امکان را فراهم می‌کند که پس از نگهداری در الکل به راحتی ریش‌ریش و پیرو نگهداری در حرارت معتدل کاملاً خشک و مستعد پودر شدن در هاون گردد و به این ترتیب این روش جایگزین

اصول کلی استخراج DNA در همه موجودات مشابه و شامل تخریب سلول توسط بافر لیزکننده (حداقل واجد درجنت‌هایی از قبیل SDS یا CTAB، جهت تخریب سلول، Tris به‌عنوان بافر نگه‌دارنده DNA و EDTA به‌عنوان مهارکننده DNAase)، در حضور پروتئازمانند پروتئیناز K، تخلیص DNA با استفاده از کلروفرم (بدون استفاده از فنل یا با استفاده از فنل)، رسوب توسط الکل و شستشوی رسوب حاصله است (رضانی و همکاران، ۱۳۸۸؛ نیکبخت بروجنی و همکاران، ۱۳۸۸). قابل اطمینان بودن، امکان پذیری و تکرار پذیری مطالعات ژنتیک مولکولی اغلب تحت تاثیر مرحله استخراج DNA قرار می‌گیرد (Pereira و همکاران، ۲۰۱۱). یک روش خوب جهت استخراج DNA، بایستی ساده، سریع و کارا بوده و به‌مقدار کافی DNA با کیفیت جهت مطالعات مولکولی در اختیار قرار دهد (Sablok و همکاران، ۲۰۰۹). هم‌چنین کم هزینه بودن فرایند استخراج یکی از معیارهای یک روش خوب جهت استخراج DNA است (Zarei و Hosseini،



مرحله لیز سلولی، مولکول‌های فوق بیش‌تر در معرض SDS قرار گرفته و لذا تخریب شده‌اند.

موفقیت بعضی از آزمایش‌های مولکولی از قبیل تکثیر قطعات بلند، AFLP و PCR معکوس، شدیداً وابسته به کیفیت DNA الگو است (Russell و Sambrook، ۲۰۰۱؛ McPherson و Muller، ۲۰۰۰؛ Ochman و همکاران، ۱۹۸۸). نظر به این‌که، وابستگی PCR معکوس به کیفیت DNA الگو، بیش‌تر از سایر واکنش‌های مولکولی است، از این واکنش جهت ارزیابی کیفیت DNA استفاده شد. تکثیر و تعیین توالی بخشی از ژن بتا اکتین با استفاده از PCR معکوس، حاکی از کیفیت قابل قبول DNA ژنومیک استخراج شده بوده است. هم‌چنین، DNA استخراج شده حاصل از این روش، با موفقیت جهت تکثیر نشانگر هسته‌ای، Internal Transcribed Spacer I مورد استفاده قرار گرفت (شکل نشان داده نشده است).

در مجموع نتایج حاصل از این تحقیق، نشان داد که روش خشک کردن بافت میگو در درجه حرارت ۴۰ درجه سانتی‌گراد و سپس پودر کردن آن در هاون چینی می‌تواند جایگزین بسیار مناسبی برای نیتروژن مایع گردد. با توجه به تحلیل نتایج به‌دست آمده از کمیت و کیفیت DNA ژنومیک به‌دست آمده از این روش، و تکثیر و تعیین توالی قطعه‌ای از ژن بتا اکتین به‌وسیله واکنش PCR معکوس، DNA الگوی حاصل از این روش را احتمالاً می‌توان در سایر آزمایش‌های مولکولی از قبیل AFLP، RFLP، تکثیر انواع قطعات بلند و لکه گذاری سادرن مورد استفاده قرار داد. هم‌چنین، این روش جهت جداسازی DNA ژنومیک برای سایر میگوها و سخت‌پوستان نیز پیشنهاد می‌شود.

منابع

- حسینی، س.ج.، ۱۳۷۶. مطالعه کروموزومی و تهیه کاریوتیپ میگو ببری سبز خلیج فارس. پایان‌نامه کارشناسی ارشد در رشته علوم سلولی و مولکولی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه تهران. ۱۶۲ صفحه.
- رمضانی، م.؛ مصفا، ف.؛ پرهیز، ب.ب.ج. و منتظری، ح.، ۱۳۸۸. (ترجمه) راهنمای آزمایشگاهی بیولوژی مولکولی. چاپ اول. انتشارات دانشگاه علوم پزشکی مشهد. ۶۸۶ صفحه.
- طحان زاده، ن.، ۱۳۹۳. امکان‌سنجی جداسازی پروموتور بتا اکتین از میگو ببری سبز. پایان‌نامه کارشناسی ارشد رشته زیست فناوری دریا. دانشکده علوم و فنون دریایی دانشگاه خلیج فارس. ۱۰۴ صفحه.

نیتروژن مایع گردد. در این آزمایش، مدت زمان مناسب جهت خشک شدن بافت در درجه حرارت ۴۰ درجه سانتی‌گراد، ۴۰ دقیقه بود و افزایش زمان (بیش‌تر از ۴۵ دقیقه) باعث سوخته شدن بافت گردید. هرچند در این آزمایش سایر تیمارهای حرارتی و مدت زمان آن تحت آزمون قرار نگرفت، ولی می‌توان شرایط را به دلخواه جهت پودر شدن بافت بهینه نمود (مثلاً کاهش درجه حرارت و افزایش مدت زمان تیمار). به‌صورت تقریبی ۶۰ میلی‌گرم بافت جهت استخراج DNA استفاده شد. تیمار بافت در بافر لیز کننده واجد CTAB و SDS در یک شبانه روز کاملاً باعث تخریب بافت و رهاشدن محتوی DNA آن گردید. بنابراین، می‌توان انتظار داشت که بیش‌ترین غلظت DNA، از نمونه‌های C۱، C۲ و C۳ حاصل شود. هم‌چنین انتظار می‌رفت که غلظت DNA در نمونه‌های A۱ و B۱ کم‌تر از C۱، C۲ و C۳ باشد، اما نتایج نشان داد به‌جز نمونه A۲، مقدار DNA حاصل از تیمارهای فوق، تقریباً مشابه بود (جدول ۳). لذا می‌توان چنین استنباط کرد که در همه تیمارهای فوق، بافت کاملاً لیز شده و تمام محتوی DNA آن رها و رسوب داده شده است. بنابراین، می‌توان چنین استدلال کرد که بافر لیزکننده حاوی SDS نیم‌درصد در مدت حداقل ۲ ساعت، جهت استخراج DNA ژنومیک کفایت می‌کند و لازم به افزایش زمان و استفاده از بافرهای لیزکننده دیگر نیست. احتمالاً، پیرو پودر شدن در هاون چینی، بافت میگو به قطعات بسیار ریز و یا سلول‌های تک تبدیل و مستعد تخریب پیرو تیمار کوتاه مدت شده است. نسبت A۲۶۰ به A۲۸۰ در همه نمونه‌ها به‌جز A۲ و A۳، پائین‌تر از ۱/۷ بود و این حاکی از وجود پروتئین است. این نتیجه دور از انتظار نیست، زیرا جهت تخلیص، فنل مورد استفاده قرار نگرفت و فقط از کلروفورم استفاده شد، در صورتی که DNA عاری از پروتئین، پیرو استفاده از فنل به‌دست می‌آید.

الگوی حرکتی DNA ژنومیک استخراج شده با استفاده از الکتروفورز روی ژل آگارز، نشان داد که DNA استخراج شده حاوی RNA نیز است. وجود RNA مورد انتظار است، زیرا در این آزمایش از آنزیم RNAase استفاده نشد. هم‌چنین الگوی حرکتی DNA در نمونه‌های C۱، C۲ و C۳، دارای کشیدگی و اسمیر بود که ناشی از تخریب مولکول مذکور است (شکل ۲ب)، در صورتی که نمونه‌های بهینه‌سازی شده در این تحقیق (شکل‌های ۲الف و ۳)، تقریباً فاقد شکستگی و اسمیر بودند. به‌دلیل این‌که تاثیر SDS بر تخریب مولکول DNA به‌اثبات رسیده است (Brown، ۲۰۱۰)، می‌توان چنین استدلال کرد که پس از تخریب بافت و رها شدن محتوی DNA در محلول لیزکننده، پیرو تیمار طولانی

- suitable for diverse PCR based downstream applications. Springer. Plus. Vol. ۲, ۶۶۹ p.
۲۰. Doyle, J.; Doyle, A.; Doyle, J.L., ۱۹۸۷. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochrom Bulletin*. Vol. ۱۹, pp: ۱۱-۱۵.
 ۲۱. Faqih Ahmadani, A.; Hosseini, S.J. and Qasemi, S.A., ۲۰۱۴. Genetic diversity and population structure of *Liza klunzingeri* from the northern Persian Gulf based on AFLP analysis. *Journal of the Persian Gulf (marine science)*. Vol. ۵, No. ۱۷, pp: ۲۷-۳۶.
 ۲۲. Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO), ۲۰۱۴. The State of Food and Agriculture ۲۰۱۴, Rome: Food and Agriculture Organization of the United Nations.
 ۲۳. Gjedrem, T.; Robinson, N. and Rye, M., ۲۰۱۲. The importance of selective breeding in aquaculture to meet future demands for animal protein: a review. *Aquaculture*. Vol. ۳۵۰, pp: ۱۱۷-۱۲۹.
 ۲۴. Hosseini, S.J.; Elahi E. and Raei, M., ۲۰۰۰. The chromosome number of the Persian Gulf shrimp *Penaeus semisulcatus*. *Iranian Int. J. Sci.* Vol. ۵, pp: ۱۳-۲۳.
 ۲۵. Jaferian, A.; Mohammadi, M.; Qasemi, S.A. and Hosseini, S.J., ۲۰۱۰. Simple and improved method of DNA extraction from *Eleutheronema tetradactylum*. *World Journal of Fish and Marine Sciences*. Vol. ۵, pp: ۴۰۱-۴۰۳.
 ۲۶. Lavery, S.; Chan, T.K.; Tam, Y.K. and Chu, K.H., ۲۰۰۴. Phylogenetic relationship and evolutionary of the shrimp genus *Penaeus* derived from mitochondrial DNA. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. Vol. ۳۱, pp: ۳۹-۴۹.
 ۲۷. Lin, F.J.; Liu, Y.; Sha, Z.; Tsang, L.M.; Chu, K.H.; Chan, T.Y. and Liu, R., ۲۰۱۲. Evolution and phylogeny of the mud shrimps (crustacean: Decapoda) revealed from complete mitochondrial genomes. *BMC Genomics*. Vol. ۱۳, pp: ۶۳۱-۶۴۲.
 ۲۸. Liu, Z.J. and Cordes, J.F., ۲۰۰۴. DNA marker technologies and their applications in aquaculture genetics. *Aquaculture*. Vol. ۲۳۸, pp: ۱-۳۷.
 ۲۹. McPherson, M.J. and Moller, S.G., ۲۰۰۰. PCR, Basics: from Background to Bench. Springer-Verlag Telos. ۲۷۶ P.
 ۳۰. Niamaimandi, N.; Aziz, A.; Khalijah, D.S.; Roos, S.C. and Kiabi, B., ۲۰۰۸. Reproductive biology of the green tiger prawn (*Penaeus semisulcatus*) in coastal waters of Bushehr, Persian Gulf. *ICES journal of marine science*. Vol. ۶۵, pp: ۱۵۹۳-۱۵۹۹.
 ۳۱. Ochman, H.; Gerber, A.S. and Hartl, D.L., ۱۹۸۸. Genetic applications of an inverse polymerase chain reaction. *Genetics*. Vol. ۱۲۰, pp: ۶۲۱-۶۲۳.
 ۳۲. Pereira, J.C.; Chaves, R.; Bastos, E.; Leitao, A. and Guedes-Pinto, H., ۲۰۱۱. An efficient method for genomic DNA extraction from different mollusks species. *Int. J. Mil. Sci.* Vol. ۱۲, pp: ۸۰۸۶-۸۰۹۵.
 ۳۳. Psifidif, A.; Dovas, C.I. and Bonas, G., ۲۰۱۰. A comparison of six methods for genomic DNA extraction suitable for PCR-based genotyping applications using ovine milk samples. *Molecular Cell Probes*. Vol. ۲۴, No. ۲, pp: ۹۳-۹۸.
 ۳۴. Pascoal, A.; Barros-Velazquez, J.; Cepeda, A.; Gallardo J.M. and Calo-mata, P., ۲۰۰۸. Survey of the authenticity of prawn and shrimp species in commercial food products by PCR-RFLP analysis of a ۱۶S rRNA/tRNA^{val} mitochondrial region. *Food Chemistry*. Vol. ۱۰۹, pp: ۶۳۸-۶۴۶.
 ۳۵. Sablok, G.; Gaholt, P.; Gupta, A.K.; Pareek, K. and Shekhawat, N.S., ۲۰۰۹. Extraction of PCR
 ۴. نفیسی، م.، ۱۳۷۴. مقایسه میزان رشد میگو ببری سبز و میگو سفید هندی با استفاده از غذای کنسانتره در استخرهای پرورشی خاکی (بندر کلاهی). پایان نامه کارشناسی ارشد در رشته مهندسی شیلات. دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه تهران. ۱۷۸ صفحه.
 ۵. نیکبخت بروجنی، غ.؛ امام، س.م. و برجسته، ن.، ۱۳۸۸. (ترجمه) زیست شناسی مولکولی تحلیلی، کیفیت و اعتبار سنجی. چاپ اول. انتشارات دانشگاه تهران. ۳۰۰ صفحه.
 ۶. Aljanabi, S.M. and Martinez, I., ۱۹۹۷. Universal and rapid salt-extraction of high quality genomic DNA for PCR-based techniques. *Nucleic Acids Research*. Vol. ۲۵, No. ۲۲, pp: ۴۹۶۲-۴۹۶۳.
 ۷. Altschul, S.F.; Gish, W.; Miller, W.; Myers, E.W. and Lippman, D.J., ۱۹۹۰. Basic local alignment search tools. *Molecular Biology*. Vol. ۲۱۵, No. ۳, pp: ۴۰۳-۴۱۰.
 ۸. Ansari, I.A. and Salman Khan, M., ۲۰۱۲. An efficient protocol for isolation of high quality genomic DNA from seeds of apple cultivars (*Malus Domestica*) for random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis. *Pharmaceutical Crops*. Vol. ۳, pp: ۷۸-۸۳.
 ۹. Artyukhin, A.B. and Woo, Y.H., ۲۰۱۲. DNA extraction method with improved efficiency and specificity using DNA methyltransferase and click chemistry. *Anal Biochem*. Vol. ۴۲۵, No. ۲, pp: ۱۶۹-۱۷۴.
 ۱۰. Benzie, J.A.H., ۲۰۰۹. Use and exchanging of genetic resources of penaeid shrimps for food and aquaculture. *Reviews in Aquaculture*. Vol. ۱, pp: ۲۳۰-۲۵۰.
 ۱۱. Benzie, J.A.H., ۱۹۹۸. Penaeid genetics and biotechnology. *Aquaculture*. Vol. ۱۶۳, pp: ۲۴-۴۷.
 ۱۲. Borges, A.; Rosa, M.S.; Recchia, G.H.; Queiroz-Silva, J.R.D.; Bressan, E.D.A. and Veasey, E.A., ۲۰۰۹. CTAB methods for DNA extraction of sweetpotato for microsatellite analysis. *Scientia Agricola*. Vol. ۶۶, pp: ۵۲۹-۵۳۴.
 ۱۳. Burton, R.S., ۲۰۰۹. Molecular markers, natural history and conservation of marine animals. *Bio Science*. Vol. ۵۹, No. ۱۰, pp: ۸۳۱-۸۴۰.
 ۱۴. Brown, T.E., ۲۰۱۰. Gene cloning and DNA analysis, An Introduction. Wiley-Blackwell. ۳۲۰ P.
 ۱۵. Castello-Jarez, H.; Campos-Montes, G.R.; Caballero Zamora, A. and Montaldo, H. H., ۲۰۱۵. Genetic improvement of Pacific white shrimp [*Penaeus (Litopenaeus) vannamei*]: perspectives for genomic selection. *Front Genet*. Vol. ۶, pp: ۹۳-۹۶.
 ۱۶. Chauhan, T. and Kumar, R., ۲۰۱۰. Molecular markers and their applications in fisheries and aquaculture. *Advances in Bioscience and Biotechnology*. Vol. ۲۰۱۰, No. ۱, pp: ۲۸۱-۲۹۱.
 ۱۷. Choudhary, K.; Mathur, N.; Choudhary, O.P. and Pillai, U., ۲۰۰۸. Protocol for isolation of genomic DNA from Dry and fresh leaves of Vigna species suitable for RAPD and restriction digestion. *Advanced in Biological Research*. Vol. ۲, No. ۵-۶, pp: ۸۳-۸۹.
 ۱۸. Dellaporta, S.L.; Wood, J. and Hicks, J.B., ۱۹۸۳. A plant DNA miniprep: Version II. *Plant Molecular Biology Reporter*. Vol. ۱, No. ۴, pp: ۱۹-۲۱.
 ۱۹. Devi, K.D.; Punyarani, K.; Singh, N.S. and Devi, H.S., ۲۰۱۳. An efficient protocol for total DNA extraction from the members of order Zingiberales



- usable DNA from trees adapted to arid environment. *Plant Omics Journal*. Vol. ۲, No. ۳, pp: ۱۰۳-۱۰۹
۳۶. **Saiki, R.K.; Gelfand, D.H.; Stoffel, S.; Scharf, S.J.; Higuchi, R.; Horn, G.T.; Mullis, K.B. and Erlich, H.A., ۱۹۸۸.** Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*. Vol. ۲۹, pp: ۴۸۷-۴۹۱.
۳۷. **Sambrook, J.F. and Russell, D.W., ۲۰۰۱.** *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, ۳rd Ed, Cold Spring Harbor Laboratory Press. ۲۱۰۰ p.
۳۸. **Tong, J.G.; Chan, T.Y. and Chu, K.H., ۲۰۰۰.** A Preliminary phylogenetic analysis of metapenaeopsis (Decapoda; Penaeidae) based on mitochondrial DNA sequences of selected species from the indo-west pacific. *Journal of Crustacean Biology*. Vol. ۲۰, pp: ۵۴۱-۵۴۹.
۳۹. **Vaseeharan, B.; Rajakamaran, P.; Jayaseelan, D. and Vincent, A.Y., ۲۰۱۳.** Molecular markers and their application in genetic diversity of penaeid shrimp. *Aquacult International*. Vol. ۲۱, pp: ۲۱۹-۲۴۱.
۴۰. **Xin, Z. and Chen, J., ۲۰۱۲.** A high throughput DNA extraction method with high yield and quality. *Plant Methods*. Vol. ۸, pp: ۲۶-۳۲.
۴۱. **Zarei, E. and Hosseini, S.J., ۲۰۱۵.** A simple, rapid and inexpensive DNA extraction method from green tiger shrimp (*Penaeus semisulcatus*). *International Journal of Biology, Pharmacy and Allied Sciences*. Vol. ۴, No. ۵, pp: ۳۲۱۱-۳۲۱۷.

