

مقایسه روش های مختلف استخراج RNA در برگ سیب (*Malus domestica*)

شهرام منتظری^{۱*}، شهاب سادات^۲

۱. گروه اصلاح نباتات، پردیس علوم و تحقیقات خوزستان، دانشگاه آزاد اسلامی، اهواز، ایران

۲. گروه اصلاح و نباتات، واحد اهواز، دانشگاه آزاد اسلامی، اهواز، ایران

چکیده

سابقه و هدف: جداسازی RNA از گیاهانی که دارای مقدار زیادی ترکیب های پلی ساکارید و پلی فنل می باشند به علت اتصال و رسوب این ترکیب های با RNA مشکل است. بنابراین در این مطالعه ۱۱ پروتکل مختلف استخراج RNA از برگ های سیب غنی از ترکیب های فنلی مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش ها: کیفیت و کمیت RNA با الکتروفورز ژل آگارز ۱/۲٪ و اسپکتروفتومتری نانودراپ در طول موج ۲۳۰، ۲۶۰ و ۲۸۰ نانومتر تعیین شد و سنتز cDNA و آنالیز RT-PCR با پرایمر اختصاصی ژن اکتین سیب انجام گرفت.

یافته ها: نتایج نشان داد که روش استخراج جمی چات چائو و همکاران (۲۰۱۲) و راجا کانی و همکاران (۲۰۱۳) مناسب ترین روش های استخراج RNA از برگ سیب بودند. عملکرد RNA کل استخراج شده در این روش ها به ترتیب بین ۱۵۲/۴ تا ۸۰۰/۲ و ۳۶۲/۱ تا ۴۵۲/۶ نانوگرم در میکرولیتر به دست آمد. باندهای ۱۸S و ۲۸S در الکتروفورز افقی مشاهده شدند.

بحث: در هر دو روش نسبت ۲۶۰ به ۲۸۰ و ۲۶۰ به ۲۳۰ به ترتیب بین ۱/۹۹ تا ۲/۰۳ و ۲/۰۷ تا ۲/۱۷ بود که نشان دهنده خلوص بالای RNA و عدم آلودگی به پلی فنلی، پروتئینی و پلی ساکاریدی می باشد.

نتیجه گیری: کیفیت بالای واکنش RT-PCR در هر دو روش نشان داد که RNA استخراج شده می تواند با اطمینان جهت آزمایش های مولکولی پائین دستی مورد استفاده قرار گیرد.

واژه های کلیدی: جداسازی RNA، سیب، RT-PCR.

مقدمه

استخراج RNA ژنومی با کیفیت بالا از گیاهان دارویی و محصول های کشاورزی که حاوی آلکالوئیدها و پلی فنل های بالا می باشند همیشه یک چالش بزرگ برای دانشمندان بوده است. سیب از جمله گیاهانی است که حاوی مقادیر زیادی از ترکیب های پلی ساکارید و پلی فنلی از قبیل فلاونوئیدها و فنلیک اسیدها می باشد (۴،۱۶).

نویسنده مسئول:

پردیس علوم و تحقیقات خوزستان، دانشگاه آزاد اسلامی، اهواز، ایران
پست الکترونیکی: shahram.montazeri@gmail.com

تاریخ دریافت: ۹/۱۲/۱۳۹۴

تاریخ پذیرش: ۱۹/۳/۱۳۹۵

محتویات بالای پلی ساکاریدها، تانن ها و پلی فنل ها می توانند استخراج و خالص سازی RNA را مهار کنند و منجر به ضعف عملکرد در استخراج RNA گردند (۱۵). همچنین استخراج RNA با کیفیت و کمیت بالا برای مطالعات بعدی از قبیل بیان ژن، دورگه سازی نورتون، خالص سازی qRT-PCR، RT-PCR، و ایجاد کتابخانه cDNA ضروری می باشد (۷). بررسی ها نشان می دهد استخراج RNA نسبت به DNA بسیار دشوارتر می باشد زیرا مولکول RNA تک رشته ای بوده و حساسیت بالایی نسبت به گرما و فعالیت آنزیم RNase دارد که باعث تخریب آن می گردد. به علاوه بافت های گیاهی مختلف از نظر مقدار و نوع ترکیب های پلی فنلی، پلی ساکاریدها، متابولیت های ثانویه و پروتئین ها باهم فرق دارند، بنابراین روش های مختلفی بسته به نوع ژنوتیپ گیاهی و یا اندام های مختلف گیاهی برای استخراج RNA کل وجود

همکاران (۲۰۰۳) به منظور انتخاب بهترین روش استخراج RNA از برگ‌های سیب مورد ارزیابی قرار گرفتند. کمیت و کیفیت RNA استخراجی با استفاده از اسپکتروفوتومتری نانودراپ^۱ در طول موج ۲۶۰ و ۲۸۰ نانومتر و نسبت‌های A₂₆₀/A₂₃₀ و A₂₆₀/A₂₈₀ جهت بررسی آلودگی‌های پلی‌فنلی، پلی‌ساکاریدی، پروتئینی و متابولیت‌های ثانویه انجام شد. برای نمونه‌های RNA نسبت A₂₆₀/A₂₃₀ باید بالاتر از ۲ و کم‌تر از ۲٫۴ باشد. نسبت A₂₆₀/A₂₃₀ پایین‌تر نشان دهنده آلودگی به پلی‌ساکاریدها و پلی‌فنل‌ها می‌باشد. هم‌چنین نسبت جذب A₂₆₀/A₂₈₀ می‌بایست در محدوده ۱±۰٫۲ قرار گیرد. غلظت A₂₆₀/A₂₈₀ پائین‌تر از ۱/۸ به‌طور کلی نشان دهنده آلودگی پروتئین در طی مراحل استخراج می‌باشد.

هم‌چنین جهت بررسی کیفیت RNA استحصالی از الکتروفورز افقی بر روی ژل آگارز ۱٪/۱/۲ استفاده گردید. حذف آلودگی DNA ژنومی با کیت DNase I تهیه شده از شرکت Fermentas انجام گرفت. تجزیه داده‌های آماری با نرم افزار SAS نسخه ۹/۳ انجام گردید و با توجه به نتایج مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون T-Test و کیفیت RNA استخراجی، دو پروتکل برتر انتخاب شد. در نهایت به منظور بررسی کیفیت و کارایی RNAهای استخراج شده در دو پروتکل برتر، سنتز cDNA و واکنش RT-PCR با استفاده از کیت Vivantis و آغازگر اختصاصی ژن اکتین (جدول ۱) انجام گردید.

جدول ۱. توالی آغازگر اختصاصی ژن اکتین

آغازگر	توالی آغازگر
Actin - forward	(5'-CTACAAAGTCATCGTCCAGACAT-3')
Actin - reverse	(5'-TGGGATGACATGGAGAAGATT-3')

دارد. این روش‌ها معمولا بر اساس SDS، CTAB، گوانیدین تیوسیانات، گوانیدین هیدروکلراید، فنل و کلروفرم استوار می‌باشند. وجود ترکیب‌های پلی‌فنلی در گیاهانی مانند برگ سیب مانع استخراج RNA با کیفیت بالا می‌گردد زیرا ترکیب‌های فنلی به راحتی به شکل کوئینون اکسید شده و به اسیدهای نوکلئیک متصل می‌گردند که در نتیجه آن، کیفیت و کمیت RNA به شدت کاهش می‌یابد و غیر قابل استفاده برای سنتز cDNA، RT-PCR و Real-time PCR می‌شود. در دنیا روش متداول استفاده از کیت می‌باشد، ولی کیت معمولا گران‌قیمت است و برای هر گیاهی به صورت اختصاصی باید مورد بررسی قرار گیرد. اگر چه چندین پروتکل برای جداسازی RNA در گیاهانی با ترکیب‌های پلی‌فنل و پلی‌ساکارید بالا گزارش شده است، اما کیفیت و عملکرد RNA استخراج شده در آن‌ها مطلوب نمی‌باشد (۸). از این جهت، روش‌های مختلف استخراج RNA 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.

هدف از این تحقیق مقایسه پروتکل‌های مختلف و ارائه یک روش مناسب برای استخراج RNA از برگ گیاه سیب می‌باشد که علاوه بر کیفیت مطلوب و کمیت بیشتر، آلودگی پلی‌فنلی و پلی‌ساکاریدی کم‌تری داشته و در زمان و هزینه‌ها نیز صرفه جویی نماید.

مواد و روش‌ها

این تحقیق در قالب طرح کمابیش تصادفی نامتعادل در آزمایشگاه ژنتیک مولکولی دانشکده کشاورزی دانشگاه آزاد اسلامی واحد اهواز در سال ۱۳۹۳ انجام گرفت. نمونه‌های برگگی از درختان سیب دانشگاه کشاورزی و منابع طبیعی رامین تهیه و بلافاصله در نیتروژن مایع منجمد شدند و تا زمان استفاده در دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند. کلیه ظروف پلاستیکی قبل از استفاده، دو بار اتوکلاو شدند. هم‌چنین ظروف شیشه‌ای به مدت ۴ ساعت در دمای ۲۲۰ درجه سانتی‌گراد درون آون قرار گرفتند. همه محلول‌های مورد استفاده جهت استخراج RNA به وسیله آب تیمار شده با DEPC تهیه شدند. در این تحقیق یازده روش استخراج RNA شامل: ۱- راجاکانی و همکاران (۲۰۱۳) ۲- لوژائو و همکاران (۲۰۱۲) ۳- گاسیک و همکاران (۲۰۰۴) ۴- جمی‌چات‌چائو و همکاران (۲۰۱۲) ۵- هیلا یافه و همکاران (۲۰۱۲) ۶- آصیف و همکاران (۲۰۰۶) ۷- مروی آنتی‌کاپین و همکاران (۱۹۹۴) ۸- وینتا رای (۲۰۱۰) ۹- آرون دو شارما (۲۰۰۳) ۱۰- مالوری و همکاران (۲۰۰۷) ۱۱- سینگ و

¹Thermo Scientific NanoDrop 2000 spectrophotometer; Software NanoDrop 2000/2000c v1.4.0.1

یافته‌ها

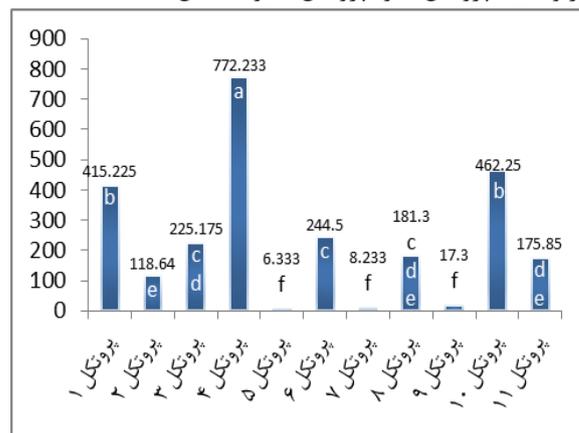
از میان یازده پروتکل مورد بررسی با توجه به درجه خلوص RNA استحصال، نداشتن شکستگی (کیفیت RNA) به علت هضم RNase و کمیت RNA دو پروتکل به عنوان برترین انتخاب شدند. نتایج تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد بین پروتکل‌های مختلف، اختلاف آماری معنی‌داری در سطح ادرصد وجود دارد (جدول ۲).

جدول ۲. تجزیه واریانس ۱۱ پروتکل استفاده شده جهت استخراج

RNA در گیاه سیب

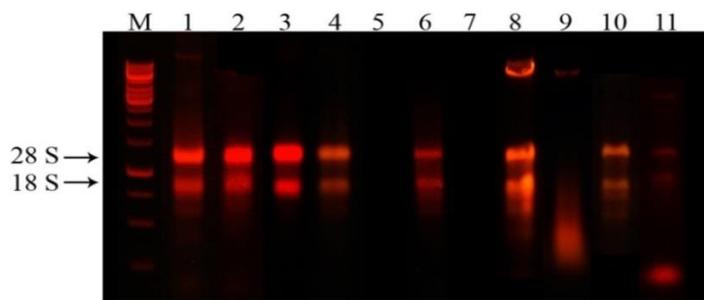
منابع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات (سیب)
تیمار (پروتکل)	۱۰	۱۷۲۹۹۱/۵۲**
خطای آزمایشی	۲۷	۹۷۸/۰۸
کل تصحیح شده	۳۷	۴۷۴۶۸/۱۹

بیشترین مقدار RNA (۷۷۲/۲۳) نانوگرم در میکرولیتر) و کمترین مقدار RNA (۶/۳۳) نانوگرم در میکرولیتر) به ترتیب مربوط به پروتکل ۴ و پروتکل ۵ بود (شکل ۱).



شکل ۱- نتایج حاصل از مقایسه میانگین دانکن، برای ۱۱ پروتکل استخراج RNA

از آنجایی که کمیت و کیفیت RNA، در انتخاب پروتکل برتر حائز اهمیت می‌باشد لذا در این تحقیق دو پروتکلی که از نظر استانداردهای تعریف شده، نسبت به سایر پروتکل‌ها برتری محسوسی نشان دادند (پروتکل شماره ۴ و ۱)، از نظر توانایی تولید فراورده‌های RT-PCR ارزیابی شدند. پس از سنتز موفقیت آمیز cDNA (جدول ۴)، با استفاده از پرایمرهای اختصاصی ژن اکتین واکنش PCR انجام و قطعه مورد نظر به طول ۱۰۲۳ جفت باز با الکتروفورز ژل آگارز ۱/۲٪ رویت شد (شکل ۳). وجود تک باندهای مربوط به قطعه‌های ژن مربوطه تأیید کننده کیفیت مطلوب cDNA سنتز شده و در نهایت معرف کیفیت بالای RNA استخراج شده می‌باشد.



شکل ۲. الکتروفورز ژل آگارز ۱،۲٪؛ ۱- راجاکانی و همکاران (۲۰۱۳)؛

۲- لوژائو و همکاران (۲۰۱۲)؛ ۳- گاسیک و همکاران (۲۰۰۴)؛ ۴-

جمی‌چات‌چائو و همکاران (۲۰۱۲)؛ ۵- هیلا یافه و همکاران (۲۰۱۲)؛

۶- آسیف و همکاران (۲۰۰۶)؛ ۷- مروی آنتی‌کابین و همکاران (۱۹۹۴)؛

۸- وینتا رای (۲۰۱۰)؛ ۹- آرون دو شمارا (۲۰۰۳)؛ ۱۰- مالوری و

همکاران (۲۰۰۷)؛ ۱۱- سینگ و همکاران (۲۰۰۳).

جدول ۳. عملکرد RNA کل استخراج شده در ۱۱ پروتکل اجرا شده

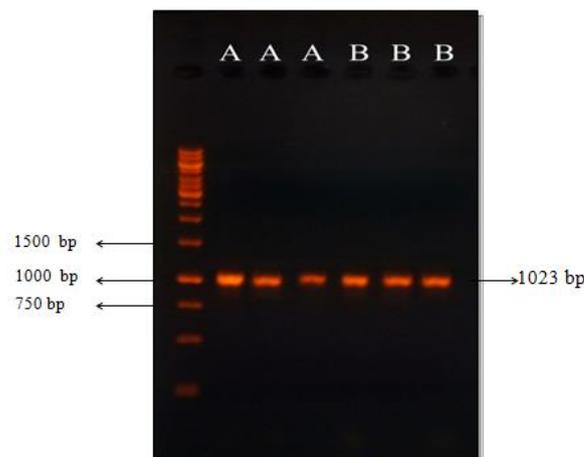
پروتکل	A ₂₆₀	A ₂₈₀	A ₂₆₀ /A ₂₈₀	A ₂₆₀ /A ₂₃₀	Yield(ng/μl)
۱	۱۰/۳۸	۴/۹۳	۲/۱	۲/۱۷	۴۱۵/۲۲۵
۲	۲/۹۶	۲/۲۸	۱/۳۱	۱/۰۸	۱۱۸/۶۴
۳	۵/۶۲	۲/۶۹	۲/۰۹	۲/۱۴	۲۲۵/۱۷۵
۴	۱۹/۳	۹/۶	۲/۰۱	۲/۱۱	۷۷۲/۲۳۳
۵	۰/۱۵	۰/۲	۰/۷۶	۰/۲۷	۶/۳۳۳
۶	۶/۱۱	۳/۰۱	۲/۰۲	۲/۳۲	۲۴۴/۵
۷	۰/۲	۰/۳۵	۰/۶۶	۰/۶۳	۸/۲۳۳
۸	۵/۱۵	۲/۴۵	۲/۰۹	۲/۳۶	۱۸۱/۳
۹	۰/۴۶	۰/۴۲	۱/۰۴	۰/۲۷	۱۷/۳
۱۰	۱۱/۵۵	۷/۰۸	۱/۶۵	۰/۷۴	۴۶۲/۲۵
۱۱	۳/۹۴	۳/۴۲	۱/۱۵	۰/۸۳	۱۵۷/۸۵

جدول ۴. نتایج حاصل از سنتز cDNA با استفاده از RNA های استحصالی از دو پروتکل شماره ۱ و ۴

پروتکل	A ₂₆₀	A ₂₈₀	A ₂₆₀ /A ₂₈₀	A ₂₆₀ /A ₂₃₀	Yield(ng/μl)
۱	۲۹/۳۴۶	۱۷/۴۲۱	۱/۶۸	۱/۹۸	۱۴۶/۳
۱	۳۰/۳۳۱	۱۷/۹۱۵	۱/۶۹	۲/۰۱	۱۵۱۶/۵
۱	۲۳/۵۸	۱۴/۳۰۲	۱/۶۵	۱/۹۳	۱۱۹۷
۴	۳۱/۵۸۶	۱۸/۵۶۴	۱/۷	۲/۰۲	۱۵۷۹/۲
۴	۲۴/۸۸۵	۱۴/۹۱۹	۱/۶۷	۱/۹۷	۱۲۴۴/۲
۴	۳۴/۰۷۷	۲۰/۰۳۶	۱/۷	۲/۰۶	۱۷۰۳/۸

است که نشان دهنده کیفیت قابل قبول cDNA تکثیر شده می باشد. مقدار cDNA سنتز شده با استفاده از واکنش رونویسی معکوس نیز در ۷۵٪ نمونه های تکثیر شده نزدیک و یا بالای ۱۵۰۰ نانوگرم در میکرولیتر است که این عدد برای انجام مطالعه های ترانس کریپتومیکس عدد بسیار بالا و قابل توجهی است.

پروتکل شماره ۱ به علت برخورداری از زغال فعال مد نظر قرار گرفت. یکی از بهترین روش های حذف ناخالصی ها، حذف آن ها به شیوه جذب سطحی می باشد. زغال فعال یک نوع جاذب قوی با جذب سطحی فوق العاده می باشد و در هیچ حلال شناخته شده ای حل نمی شود. زغال فعال خاصیت جذب ترکیب هایی مانند رنگیزه ها و مولکول های آلی بزرگ را دارد. ترکیب های ثانویه از جمله پلی فنل ها به زغال فعال متصل می شوند و آلودگی ها به همراه ذرات زغال فعال به طور کامل پس از اولین دور سانتریفیوژ حذف می گردند (۱۵). نتایج حاصل از این تحقیق با استفاده از این پروتکل منجر به دستیابی به مقدار قابل قبولی از RNA و نیز کیفیت بسیار مناسب گردید. هر چند نتایج گزارش های پیشین توسط این محققین مقدار RNA استخراج شده را تا ۷۰۸ نانوگرم در میکرولیتر نیز گزارش نموده است، لکن نتایج این تحقیق این مقدار را در دامنه ۳۵۰ تا ۴۵۰ قرار داده است. یکی از دلایل این اختلاف در مقدار RNA استحصالی به نوع گونه گیاهی استفاده شده بر می گردد. نتایج گزارش پیشین از یک گیاه دارویی بومی هندوستان با نام *Azadirachta* به دست آمده است، در حالی که گیاه مورد استفاده در این تحقیقات از لحاظ جنس و گونه نسبت به گیاه اشاره شده به طور کلی متفاوت و به طور حتم از لحاظ ترکیب های پیچیده اشاره شده نیز اختلاف های چشم گیری دارند. نکته دیگر در موفقیت این پروتکل در دستیابی به کمیت و کیفیت بالای RNA استحصالی، به سایر اجزاء بافر استخراجی با غلظت های متفاوت نسبت به استانداردها بر می گردد. تغییر غلظت Tris-HCL از ۱۰۰ به ۲۰۰ میلی مولار، استفاده از PVP که دارای گیرنده هیستونی بسیار قوی و از بین برنده پلی فنل می باشد (۹) و نیز استفاده از بتامرکاپتواتانول با غلظت بالای ۳٪ تا ۴٪ جهت فراهم نمودن یک محیط کاهشی قوی جهت جلوگیری از تبدیل شدن پلی فنل ها به کوئین ها (۱۰) در کنار زغال فعال مجموعه ای مؤثر را در یک بافر استخراجی RNA گرد هم آورده است. استفاده از پروتکل دوم نیز تحت عنوان روش CTAB بهبود یافته (با CTAB استات آمونیوم) است. نکته جالب آن که، گزارش منتشر شده بر روی گیاه پنبه انجام



شکل ۳. نتایج حاصل از RT-PCR برای دو پروتکل شماره ۱ (پروتکل راجاگانی و همکاران، A=۲۰۱۳) و نیز پروتکل شماره ۴ (پروتکل جمی چات چائو و همکاران، B=۲۰۱۲)

بحث

در پروتکل ۴، نسبت های جذب نور در طول موج های A_{260}/A_{230} (۱/۹۹ تا ۲/۰۳) و A_{260}/A_{280} (۲/۱ تا ۲/۱۷) نانومتر به ترتیب نشان دهنده عدم آلودگی پروتئینی و عدم آلودگی پلی فنلی، پلی ساکاریدی می باشند (جدول ۳). هم چنین وجود باندهایی مجزا برای ۱۸S و ۲۸S rRNA بدون شکستگی روی ژل آگارز کیفیت بسیار خوب RNA استخراجی را نشان می دهد (شکل ۲). پروتکل دوم که توسط آزمون مقایسه میانگین دانکن معرفی شد، پروتکل شماره ۱۰ بود. هر چند که این پروتکل از نظر وضوح باندهای ریبوزومی و عملکرد کل (۴۶۲/۲۵ نانوگرم در میکرولیتر) دارای شرایط مناسبی می باشد ولی از لحاظ حذف آلودگی های پروتئینی (۱/۴۷ تا ۱/۹۴)، پلی فنلی و پلی ساکاریدی (۰/۵ تا ۱/۱۷) شرایط لازم را نداشته و دارای مقادیر زیادی آلودگی می باشد که وجود این آلودگی ها باعث می شود RNA استحصالی برای کارهای متعدد مولکولی مناسب نباشد. سومین پروتکل معرفی شده توسط آزمون دانکن، پروتکل شماره ۱ بود که عملکرد RNA کل در محدوده ۳۶۲/۱ تا ۴۵۲/۶ نانوگرم در میکرو لیتر به دست آمد. هم چنین وضوح باندهای ۱۸S و ۲۸S rRNA ریبوزومی در ژل آگارز ۱/۲٪ کاملاً مشهود بود. نتایج به دست آمده برای مقدار A_{260}/A_{230} نیز در دامنه ۱/۹۴ تا ۲/۳۲ و هم چنین نسبت A_{260}/A_{280} بین ۲/۰۶ تا ۲/۱۳ بود که نشان دهنده عدم آلودگی پروتئینی و خلوص RNA استحصالی می باشد. همان گونه که از جدول ۴ پیداست نسبت جذب در ۲۶۰ نانومتر به ۲۸۰ نانومتر در بیش تر موارد به عدد ۱/۷ نزدیک

گرفته بود لذا انتخاب این پروتکل با توجه به پلی فنلیک و پلی ساکارید بودن پنبه و سیب می توانست بسیار مفید فایده باشد.

روش CTAB به طور گسترده ای برای استخراج DNA و RNA از بافت های گیاهی مورد استفاده قرار گرفته است (۶,۲۱). با این حال، بافت های پنبه به خصوص تخمک، غنی از پلی ساکارید، پلی فنل و سایر متابولیت های ثانویه هستند. بنابراین با روش های سنتی مانند CTAB نمی توان به RNA با کیفیت خوب و عملکرد بالا از RNA کل دست یافت (۲۰). به نظر می رسد تغییرهای ایجاد شده در این پروتکل و رسوب RNA توسط استات آمونیوم، مدت زمان کوتاه ۱ تا ۲ ساعته در کل مرحله استخراج و نیز هزینه اندک مواد مورد استفاده می تواند از دلایل موجه جهت استفاده از این پروتکل باشد.

نتایج گزارش منتشر شده توسط ژائو و همکاران (۲۰۱۲) برای تمامی نمونه ها نتایج نانودراپ را در محدوده ۱/۸۰ تا ۱/۸۵ و نسبت A_{260}/A_{230} را در محدوده ۱/۹۳ تا ۲/۳۳ قرار داد، که نشان دهنده حذف قابل قبول پروتئین ها بوده است. به علاوه مقدار RNA به دست آمده توسط این محققین تا پیک ۲۲۹/۱۲ نانوگرم در میکرولیتر گزارش گردید. این در حالی است که عملکرد RNA کل اندازه گیری شده از این پژوهش در پیک ۶۲۶/۲ نانوگرم در میکرو لیتر قرار داشت. هر چند نتایج حاصل از الکتروفورز ژل آگارز کیفیت باندهای به دست آمده ۱۸S و ۲۸S را با کیفیت متوسط نشان می دهد لکن نسبت های خلوص اندازه گیری شده این تحقیق نسبت به نتایج منتشر شده پیشین بسیار پایین تر و نشانگر آلودگی های قابل توجه در نمونه های استحصالی به همراه RNA بود.

پروتکل شماره ۳ که متعلق به گاسیک و همکاران (۲۰۰۴) می باشد نیز یکی از پروتکل های مؤثر در استحصال RNA به خصوص بر روی گیاه سیب است. این پروتکل نیز مبتنی بر روش CTAB با اندکی تغییر است. افزوده شدن اسپرمیدین که کمک شایانی به رسوب اسید نوکلئیک می کند توانسته است این پروتکل را جزء پروتکل های مؤثر در استخراج RNA قرار دهد. ۳۸۸/۵ نانوگرم در میکرولیتر برای جوانه، ۱۸۲-۳۴۵/۵ نانوگرم در میکرولیتر برای ساقه و میان گره، ۳۰۰-۳۴۰ نانوگرم در میکرولیتر برای گل و ۱۲/۵ - ۴۹۴/۵ نانوگرم در میکرو لیتر برای میوه نتایج کمی RNA استحصالی از گزارش پیشین بوده است. این در حالی است که عملکرد RNA کل اندازه گیری شده این پژوهش در دامنه ۱۸۰/۸ تا ۲۴۶ نانوگرم در میکرولیتر بوده است که برای سنتز cDNA کفایت می کند. همچنین، مقادیر به دست آمده از نسبت های

A_{260}/A_{230} و A_{260}/A_{280} با مقادیر گزارش شده توسط گاسیک و همکاران (۲۰۰۴) یکسان بودند. نتایج حاصل از الکتروفورز نیز کیفیت مطلوب باندهای به دست آمده RNA ریبوزومی را تأیید می کند. با این حال گزارش شده است مقدار RNA بافت میوه رسیده برای ساخت کتابخانه cDNA مربوطه ناکافی است (۷) و برای به دست آوردن مقدار مطلوب RNA از گوشت میوه به ۲۴ تا ۳۶ گرم وزن تر آن نیاز می باشد (۷). پروتکل شماره ۴ توسط جمی چات چائو و همکارانشان (۲۰۱۲) بر روی گیاه آووکادو انجام شده است. مشکلاتی که در استخراج RNA از گیاهان حاوی پلی فنل و پلی ساکارید بالا وجود دارد در این روش از طریق اضافه کردن PVP40، بتامرکاپتواتانول و CTAB به بافر استخراجی بر طرف گردیده است. همچنین در این روش از کلروفورم و ایزوآمیل الکل به جای فنل برای حذف پروتئین ها استفاده گردیده که خطر کار کردن با این پروتکل را به نحو محسوسی می کاهد (جمی چات چائو و همکاران، ۲۰۱۲). مشکل آلودگی پلی ساکاریدی با استفاده از NaCl ۲ مولار به جای کم تر از ۱ مولار در بافر استخراج و نیز حضور NaCl ۱ مولار در بافر SDS، Tris-EDTA، HCL منجر به حذف پلی ساکاریدها و حل رسوب RNA شده است. افزایش غلظت NaCl در بافر استخراجی به حذف پلی ساکاریدها (فانگ و همکاران، ۱۹۹۲) و حل کردن کمپلکس CTAB-RNA کمک می کند. زیرا اجازه می دهد CTAB و پلی ساکاریدهای بیش تری در مرحله استخراج با کلروفورم حذف گردند. علاوه بر این، رسوب دهی یک شب در دمای 20°C - به جای 4°C باعث شده که RNA با کیفیت بالاتری به دست آید. نتایج حاصل از نانودراپ نشان داد که این پروتکل توانسته است برای گیاه سیب با پیک ۸۰۰ نانوگرم کمیت قابل ملاحظه ای از RNA را نشان دهد. مقدار RNA استحصالی از این روش بالاتر از مقدار استحصال شده از گزارش پیشین است. همچنین در خلوص به دست آمده و نیز کیفیت ژل آگارز، این پروتکل توانست به عنوان یک پروتکل مؤثر عمل نماید. پروتکل شماره ۵ توسط هیلا یافه و همکاران (۲۰۱۲) بر روی گیاه آرابیدوپسیس انجام گرفت. امکان دارد که دلیل جواب نگرفتن از این پروتکل نسبت به هیلا یافه این باشد که سیب یک گیاه پلی فنلیک می باشد و مقادیر بسیار زیادی پلی فنل و پلی ساکارید در ترکیب هایش وجود دارد ولی گیاه آرابیدوپسیس فاقد این ترکیب های پلی فنل و پلی ساکاریدی است. در این پروتکل از گوانیدین هیدروکلراید و MES در بافر استخراجی استفاده گردید. نتایج گزارش شده توسط هیلا یافه و همکاران در مقدار جذب نسبت A_{260}/A_{280}

گرفته بود لذا انتخاب این پروتکل با توجه به پلی فنلیک و پلی ساکارید بودن پنبه و سیب می توانست بسیار مفید فایده باشد.

روش CTAB به طور گسترده ای برای استخراج DNA و RNA از بافت های گیاهی مورد استفاده قرار گرفته است (۶,۲۱). با این حال، بافت های پنبه به خصوص تخمک، غنی از پلی ساکارید، پلی فنل و سایر متابولیت های ثانویه هستند. بنابراین با روش های سنتی مانند CTAB نمی توان به RNA با کیفیت خوب و عملکرد بالا از RNA کل دست یافت (۲۰). به نظر می رسد تغییرهای ایجاد شده در این پروتکل و رسوب RNA توسط استات آمونیوم، مدت زمان کوتاه ۱ تا ۲ ساعته در کل مرحله استخراج و نیز هزینه اندک مواد مورد استفاده می تواند از دلایل موجه جهت استفاده از این پروتکل باشد.

نتایج گزارش منتشر شده توسط ژائو و همکاران (۲۰۱۲) برای تمامی نمونه ها نتایج نانودراپ را در محدوده ۱/۸۰ تا ۱/۸۵ و نسبت A_{260}/A_{230} را در محدوده ۱/۹۳ تا ۲/۳۳ قرار داد، که نشان دهنده حذف قابل قبول پروتئین ها بوده است. به علاوه مقدار RNA به دست آمده توسط این محققین تا پیک ۲۲۹/۱۲ نانوگرم در میکرولیتر گزارش گردید. این در حالی است که عملکرد RNA کل اندازه گیری شده از این پژوهش در پیک ۶۲۶/۲ نانوگرم در میکرو لیتر قرار داشت. هر چند نتایج حاصل از الکتروفورز ژل آگارز کیفیت باندهای به دست آمده ۱۸S و ۲۸S را با کیفیت متوسط نشان می دهد لکن نسبت های خلوص اندازه گیری شده این تحقیق نسبت به نتایج منتشر شده پیشین بسیار پایین تر و نشانگر آلودگی های قابل توجه در نمونه های استحصالی به همراه RNA بود.

پروتکل شماره ۳ که متعلق به گاسیک و همکاران (۲۰۰۴) می باشد نیز یکی از پروتکل های مؤثر در استحصال RNA به خصوص بر روی گیاه سیب است. این پروتکل نیز مبتنی بر روش CTAB با اندکی تغییر است. افزوده شدن اسپرمیدین که کمک شایانی به رسوب اسید نوکلئیک می کند توانسته است این پروتکل را جزء پروتکل های مؤثر در استخراج RNA قرار دهد. ۳۸۸/۵ نانوگرم در میکرولیتر برای جوانه، ۱۸۲-۳۴۵/۵ نانوگرم در میکرولیتر برای ساقه و میان گره، ۳۰۰-۳۴۰ نانوگرم در میکرولیتر برای گل و ۱۲/۵ - ۴۹۴/۵ نانوگرم در میکرو لیتر برای میوه نتایج کمی RNA استحصالی از گزارش پیشین بوده است. این در حالی است که عملکرد RNA کل اندازه گیری شده این پژوهش در دامنه ۱۸۰/۸ تا ۲۴۶ نانوگرم در میکرولیتر بوده است که برای سنتز cDNA کفایت می کند. همچنین، مقادیر به دست آمده از نسبت های

محدوده ۱/۸ تا ۲/۰ بود. همچنین، عملکرد RNA کل گزارش شده توسط آرون دو شارما و همکاران (۲۰۰۳) بین ۶۷/۷۳ تا ۱۰۰/۸۵ قرار داشت. نتایج به دست آمده ما از پروتکل آرون دو شارما و همکاران (۲۰۰۳) در مقادیر نسبت A_{260}/A_{280} در حد مطلوبی نبودند همچنین عملکرد RNA کل با توجه به عدم تشکیل باندهای tRNA (شکل ۲) رضایت بخش نبود. این اختلاف نتایج نشان می دهد گیاهان انتخاب شده توسط آرون دو شارما و همکاران (۲۰۰۳) از نظر ترکیب های پلی فنلی و پلی ساکاریدی فقیر هستند.

پروتکل شماره ۱۰ توسط مالوریو و همکاران (۲۰۰۷) معرفی گردید. در این روش تنها از SDS به عنوان ماده اصلی بافر استخراج استفاده شد. این پروتکل توسط مالوریو و همکاران (۲۰۰۷) بر روی گیاه آراییدوپسیس و تنباکو انجام گرفت. در این پروتکل نتایج به دست آمده توسط مالوریو و همکاران (۲۰۰۷) گزارش نشد. نتایج به دست آمده ما از نسبت A_{260}/A_{280} در حد مطلوبی بودند. هر چند نسبت A_{260}/A_{230} پایین بود. عملکرد RNA کل در محدوده ۳۸۷/۴ تا ۵۱۹/۲ اندازه گیری شد. این پروتکل هر چند که از عملکرد خوبی در نسبت A_{260}/A_{230} از خود نشان نداد ولی با اضافه کردن یک فاز شستشو با کلروفرم/ایزوامیل الکل می توان مقادیر زیادی از ترکیب های پلی فنل، پلی ساکارید و سایر متابولیت های ثانویه را حذف کرد و منجر به بالا آمدن این نسبت در حد مطلوب شد. در پروتکل شماره ۱۱ که توسط گورپریت سینگ و همکاران (۲۰۰۳) انجام گردید، RNA از بذر گندم و سایر کربوهیدرات ها استخراج شد. نسبت به دست آمده A_{260}/A_{280} توسط گورپریت سینگ و همکاران (۲۰۰۳)، از ۱/۳۵ تا ۱/۸۵ متغیر بود که نشان دهنده آلودگی پروتئینی می باشد. عملکرد RNA کل به دست آمده توسط گورپریت سینگ و همکاران (۲۰۰۳) بین ۳۰/۸ تا ۱۴۸ قرار داشت. نتایج به دست آمده ما نیز با نتایج گورپریت سینگ و همکاران (۲۰۰۳) مشابهت داشت. مقادیر به دست آمده ما از نسبت A_{260}/A_{280} (جدول ۲) با مقادیر گزارش داده شده توسط گورپریت سینگ یکسان بودند که نشان دهنده آلودگی پروتئینی می باشد. شاید دلیل این آلودگی پروتئینی استفاده از DDT در بافر اولیه به جای بتامرکاپتواتانول باشد. عملکرد RNA کل ما از میزان بالاتری برخوردار بود و در محدوده ۱۳۸/۲ تا ۱۷۹ قرار داشتند.

نتیجه گیری

انتخاب ۱۱ پروتکل گزارش شده در این پژوهش به طور عمده بر اساس مواد و یا ترکیب هایی بوده است که حضور آن ها در بافر استخراجی توانسته است تا حدودی منجر به حذف

۲/۰۸ و در نسبت A_{260}/A_{230} ، ۲/۰۹ بود. عملکرد کل نیز ۲۸/۷ نانوگرم در میکرولیتر اندازه گیری شد. نتایج این پروتکل خلاف این ادعا را ثابت می نمود. پس از تکرار چندین بار پروتکل مذکور و روی ژل بردن باند دیده نشد. (شکل ۲). پروتکل ۶ توسط مهر آصیف و همکاران (۲۰۰۶) بر روی گیاه سیب انجام شد. RNA استخراجی توسط مهر آصیف و همکاران (۲۰۰۶) دارای کیفیت بالایی بود و مقدار نسبت A_{260}/A_{280} بین ۱/۸ تا ۲/۱ بود و عملکرد RNA کل بین ۴۴ تا ۸۲ نانوگرم در میکرولیتر گزارش شد. نتایج به دست آمده ما از پروتکل مهر آصیف و همکاران (۲۰۰۶) در نسبت A_{260}/A_{280} از عملکرد خوبی برخوردار بود همچنین در نسبت A_{260}/A_{230} در حد عالی بود و فاقد آلودگی پلی فنلی و متابولیت های ثانویه بود. عملکرد RNA کل در سیب در محدوده ۲۳۳/۵ تا ۲۳۳/۵ نانوگرم در میکرو لیتر قرار داشت. عملکرد RNA کل به دست آمده حتی از عملکرد RNA کل گزارش شده توسط مهر آصیف و همکاران (۲۰۰۶) نیز بالاتر بود.

پروتکل ۷ توسط مروی و همکاران (۱۹۹۴) بر روی چاودار زمستانه انجام شد. عملکرد RNA کل گزارش شده توسط مروی و همکاران (۱۹۹۴) بین ۲۵۰ تا ۳۳۵ نانوگرم در میکرو لیتر بود. متأسفانه سایر مقادیر توسط آن ها گزارش نشد. از این رو اطلاعاتی در مورد آلودگی های احتمالی در دست نیست. مقادیر به دست آمده از این روش چندان رضایت بخش نبود و اندک RNA استحصالی برای سنتز cDNA کافی نمی باشد. پروتکل شماره ۸ توسط وینتا رای و همکاران (۲۰۱۰) انجام گرفت. در روش وینتا رای و همکاران (۲۰۱۰)، RNA از بافت سخت بامبو (دومین، پنجمین و دهمین میان گره) استخراج شد. نسبت A_{260}/A_{280} در محدوده ۱/۹۷ تا ۱/۸۹ و نسبت A_{260}/A_{230} بین ۱/۹ تا ۲/۱۰ اندازه گیری شد که نشان دهنده این است که هیچ پروتئین و نمک حلالی به عنوان آلودگی در آن وجود ندارد (۱۴). عملکرد RNA کل به دست آمده توسط وینتا رای و همکارانشان (۲۰۱۰) در محدوده ۱۵۸/۷۲ تا ۱۸۶/۸۸ بود. نتایج به دست آمده ما از پروتکل وینتا رای و همکاران (۲۰۱۰) در نسبت A_{260}/A_{280} و A_{260}/A_{230} از عملکرد خوبی برخوردار بود. همچنین، عملکرد RNA کل بین ۱۴۰/۴ تا ۲۱۹ بود. نتایج به دست آمده عملکرد RNA کل مشابه نتایج وینتا رای و همکاران (۲۰۱۰) بود.

پروتکل شماره ۹ توسط دو شارما و همکاران (۲۰۰۳)، RNA از بافت برگ و بذر سورگوم، نخود و سویا استخراج شد. مقدار نسبت A_{260}/A_{280} به دست آمده توسط آرون دو شارما در

ترکیب‌های پیچیده پلی‌فنلی، پلی‌ساکاریدی و یا متابولیت‌های ثانویه گردد. در این پژوهش سعی گردید تا از میان تعدادی پروتکل معرفی شده از گزارش‌های پیشین، بهترین و مؤثرترین پروتکل برای استخراج RNA در برگ گیاه سیب که دارای ترکیب‌های پلی‌ساکاریدی و یا پلی‌فنل بالا می‌باشد، انتخاب گردد. علت انتخاب گیاه سیب نیز به علت برخورداری از این ترکیب‌های پیچیده بدین منظور بوده است. نکته بسیار مهمی که نباید از نظر دور نگه داشت، آن است که دستیابی به RNA با کمیت و کیفیت بالا برای یک گیاه با استفاده از یک پروتکل، به معنای تعمیم یافته بودن آن پروتکل برای سایر گیاهان نیست. پروتکلی که پیش‌تر بر روی یک گیاه زراعی مانند گندم مفید و مؤثر بوده است به احتمال فراوان نمی‌تواند به‌طور مؤثری منجر به حصول RNA با کمیت و کیفیت بالا در یک گیاه دارویی، روغنی و یا گیاهی با ترکیب‌های پلی‌فنلی و یا پلی‌ساکاریدی بالا گردد. حتی ژنوتیپ‌ها و گاهی اکوتیپ‌های مختلف یک جنس و یا گونه گیاهی ممکن است از لحاظ مقادیر ترکیب‌های پلی‌فنلیک و یا متابولیت‌های ثانویه متفاوت باشند که می‌تواند تاثیرات متفاوتی بر کمیت و کیفیت RNA استحصالی به همراه داشته باشد.

سپاسگزاری

از خانم دکتر مریم بروجردنیا که در انجام این کار ما را یاری دادند قدردانی می‌کنیم.

منابع

1. Allison C. Mallory. (2007). Total RNA extraction from Arabidopsis and tobacco. Bartel Lab Whitehead Institute, 2007.
2. Antikainen, M., & Pihakaski, S. Early developments in rna, protein, and sugar levels during cold stress in winter rye (*Secale Cereale*) leaves. *Annals of Botany*, 1994. 74(4): 335-341.
3. Asif M, Trivedi P, Solomos T, & Tucker M. Isolation of high-quality RNA from apple (*Malus domestica*) fruit. *Agricultural and Food Chemistry*, 2006. 54(15): 5227-5229.
4. Boyer, J., & Liu, R. H. Apple phytochemicals and their health benefits. 2004. 3:5.
5. C. Huang, J. F. Picimbon, H. Q. Li, Z. Li, Q. Liu, & W. Liu. An efficient method for total RNA extraction from peanut seeds. *Russian J. Plant Physiology*, 2012. 59(1): 129-133.
6. Gambino, G., Perrone, L., & Gribaudo, L. A rapid and effective method for RNA extraction from different tissues of grapevine and other woody plants. *Phytochemical Analysis*, 2008. 19:520-525.
7. Gasic, K., Hernandez, A., & Korban, S. S. RNA extraction from different apple tissues rich in polyphenols and polysaccharides for cDNA library construction. *Plant Molecular Biology Reporter*, 2004. 22(4): 437-438.
8. Hu, C., Honda, C., Kita, M., Zhang, Z., Tsuda, T., & Moriguchi, T. A simple protocol for RNA isolation from fruit trees containing high levels of polysaccharides and polyphenol compounds. *Plant Molecular Biology Reporter*, 2012. 20(1): 69.
9. Kansal, R., Kuhar, K., Verma, I., Gupta, R. N., Gupta, V. K., & Koundal, K. R. mproved and convenient method of RNA isolation from polyphenols and polysaccharide rich plant tissues. *Indian J. Experimental Biology*, 2008. 46(12): 842-845.
10. Kolosova, N., Miller, B., Ralph, S., Ellis, B. F., Douglas, C., Ritland, K., et al. Isolation of high-quality RNA from gymnosperm and angiosperm trees. *Biotechniques*, 2004. 35:821-824.
11. Lal, L., Sahoo, R., Gupta, R. K., Sharma, P., & Kumar, S. RNA isolation from highphenolic tea leaves and apical buds. *Plant Molecular Biology Reporter*, 2001. 19:181a-f.
12. Lu Zhao, Ding Q, Zeng J, Wang FR, Zhang J, Fan SJ, et al. An improved CTAB-ammonium acetate method for total RNA isolation from cotton. *Phytochemical Analysis*, 2012. 23(6):647-50.
13. Malnoy M. A method for isolating total RNA from pear leaves. *Plant Molecular Biology Reporter*, 2001. 19: 69a-69f.
14. Rai, V., Ghosh, J. S., & Dey, N. Isolation of total RNA from hard bamboo tissue rich in polyphenols and polysaccharides for gene expression studies. *Plant Biotechnology*, 2010. 13(5): 17.
15. Rajakani, R., Narnoliya, L., Sangwan, N. S., Sangwan, R. S., & Gupta, V. Activated charcoal-mediated RNA extraction method for *Azadirachta indica* and plants highly rich in polyphenolics. *BMC Research Notes*, 2013. 6:125.
16. Salzman, R. A., Fujita, F., Zhu-Salzman, K., Hasegawa, P. M., & Bressan, R. A. An improved RNA isolation method for plant tissues containing high levels of phenolic compounds or carbohydrates. *Plant Molecular Biology Reporter*, 1999. 11-17.
17. Sharma AD, Gill PK, & Singh P. RNA isolation from plant tissues rich in polysaccharides. *Analytical Biochemistry*, 2003. 319-321.
18. Singh, G., Kumar, S., & Singh, P. A quick method to isolate RNA from wheat and other carbohydrate-rich seeds. *Plant Molecular Biology Reporter*, 2003. 21(1): 93.
19. Yaffe, H., Buxdorf, K., Shapira, I., Ein-Gedi, S., Moyal-Ben Zvi, M., Fridman, E., et al. A simple, economical and fast method for RNA isolation from infected or healthy plants and other eukaryotic tissues. *BMC Research Notes*, 2012. 5:45.
20. Zeng, Y., & Yang, T. RNA isolation from highly viscous samples rich in polyphenols and polysaccharides. *Plant Molecular Biology Reporter*, 2002. 20(4): 417.
21. Zhou, Z. X., Wei, D. F., Guan, Y., Zheng, A. N., & Zhong, J. J. Damage of *Escherichia coli* membrane by bactericidal agent polyhexamethylene guanidine hydrochloride: micrographic evidences. *J. Applied Microbiology*, 2010. 108(3):898-907.