مجله تازه های بیوتکنولوژی سلولی - مولکولی
دوره هفتم، شماره بیست و هفتم- تابستان ۱۳۹۶

Research Article
مقاله تحقیقی

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

شهرام منتظری[1*]، شهاب سادات[2]

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 ترکیب‌های پلی‌ساکارید و پلی‌فنل می‌باشند به علت اتصال و رسوب این ترکیب‌های با RNA مشکل است. بنابراین در این مطالعه ۱۱ پروتکل مختلف استخراج RNA از برگ‌های سیب غنی از ترکیب‌های فنلی مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها: 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.

یافته‌ها: نتایج نشان داد که روش استخراج جمی‌چات‌چائو و همکاران (۲۰۱۲) و راجاکانی و همکاران (۲۰۱۳) مناسب‌ترین روش‌های استخراج RNA از برگ سیب بودند. عملکرد RNA کل استخراج شده در این روش‌ها 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 پلی‌فنلی، پروتئینی و پلی‌ساکاریدی می‌باشد.

نتیجه‌گیری: کیفیت بالای واکنش RT-PCR در هر دو روش نشان داد که RNA استخراج شده می‌تواند با اطمینان جهت آزمایش‌های مولکولی پائین دستی مورد استفاده قرار گیرد.

واژه‌های کلیدی: جداسازی RNA، سیب، RT-PCR.

مقدمه

استخراج RNA ژنومی با کیفیت بالا از گیاهان دارویی و محصول‌های کشاورزی که حاوی آلکالوئیدها و پلی‌فنل‌های بالا می‌باشند همیشه یک چالش بزرگ برای دانشمندان بوده است. سیب از جمله گیاهانی است که حاوی مقادیر زیادی از ترکیب‌های پلی‌ساکارید و پلی‌فنلی از قبیل فلاونوئیدها و فنلیک اسیدها می‌باشد (۴،۱۶).

محتویات بالای پلی‌ساکاریدها، تانن‌ها و پلی‌فنل‌ها می‌توانند استخراج و خالص‌سازی 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، دورگه‌سازی نورتون، خالص‌سازی mRNA، qRT-PCR، RT-PCR و ایجاد کتابخانه cDNA ضروری می‌باشد (۷). 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. به علاوه بافت‌های گیاهی مختلف از نظر مقدار و نوع ترکیب های پلی‌فنلی، پلی‌ساکاریدها، متابولیت‌های ثانویه و پروتئین‌ها باهم فرق دارند، بنابراین روش‌های مختلفی بسته به نوع ژنوتیپ گیاهی و یا اندام‌های مختلف گیاهی برای استخراج RNA کل وجود

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

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2026-11-21]
[DOR: 20.1001.1.22285458.1396.7.27.5.7]

دارد. این روش‌ها معمولا بر اساس CTAB، SDS، گوآنیدینیوم 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، امّا 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 برگی 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 آنتی‌کاینن و همکاران (۱۹۹۴) ۸- وینتا رای (۲۰۱۰) ۹- آرون دِو شارما (۲۰۰۳) ۱۰- مالوری و همکاران (۲۰۰۷) ۱۱- سینگ و همکاران (۲۰۰۳) به منظور انتخاب بهترین روش استخراج RNA از برگ‌های سیب مورد ارزیابی قرار گرفتند. کمیت و کیفیت RNA استخراجی با استفاده از اسپکتروفتومتری نانودراپ[1] در طول موج ۲۶۰ و ۲۸۰ نانومتر و نسبت‌های A_{260}/A_{280} و A_{260}/A_{230} جهت بررسی آلودگی‌های پلی‌فنلی، پلی‌ساکاریدی، پروتئینی و متابولیت‌های ثانویه انجام شد. برای نمونه‌های RNA نسبت A_{260}/A_{230} باید بالاتر از ۲ و کم‌تر از ۲,۴ باشد. نسبت A_{260}/A_{230} پایین‌تر نشان دهنده آلودگی به پلی‌ساکاریدها و پلی‌فنل‌ها می‌باشد. هم‌چنین نسبت جذب A_{260}/A_{280} می‌بایست در محدوده ۱±۲ قرار گیرد. غلظت A_{260}/A_{280} 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 ۱/۲٪ 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 انجـام 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 (جدول۱) انجام گردید.

جدول ۱. توالی آغازگر اختصاصی ژن اکتین

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

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

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2026-11-21]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1396.7.27.5.7]

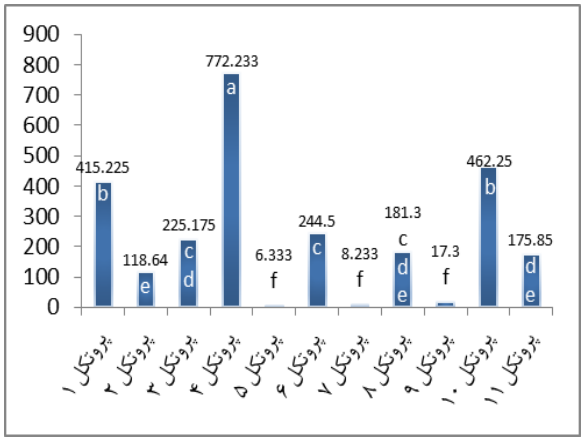
یافته‌ها

از میان یازده پروتکل مورد بررسی با توجه به درجه خلوص RNA استحصالی، 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 ۱درصد وجود دارد (جدول ۲).

جدول ۲. تجزیه واریانس ۱۱ پروتکل استفاده شده جهت استخراج RNA در گیاه سیب

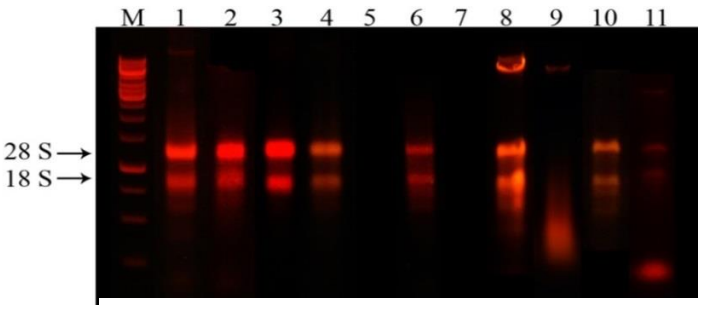
منابع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات (سیب)
تیمار (پروتکل)	۱۰	۱۷۲۹۹۱/۵۲**
خطای آزمایشی	۲۷	۹۷۸/۰۸
کل تصحیح شده	۳۷	۴۷۴۶۸/۱۹

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 وکیفیت 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 تأئید 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- آصیف و همکاران (۲۰۰۶)؛ ۷- مروی آنتی‌کاینن و همکاران (۱۹۹۴)؛ ۸- وینتا رای (۲۰۱۰)؛ ۹- آرون دِو شارما (۲۰۰۳)؛ ۱۰- مالوری و همکاران (۲۰۰۷)؛ ۱۱- سینگ و همکاران (۲۰۰۳).

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

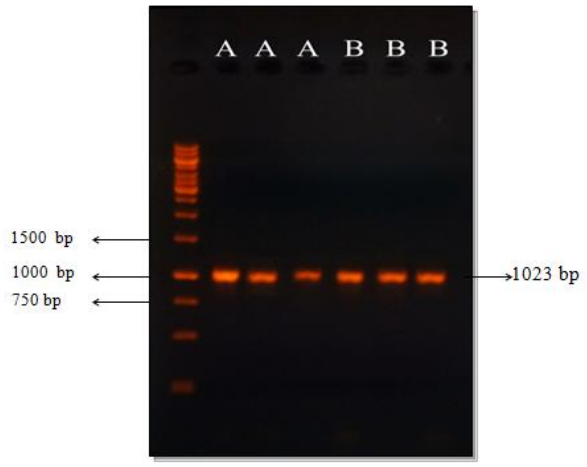
پروتکل	A_{260}	A_{280}	A_{260}/A_{280}	A_{260}/A_{230}	Yield(ng/µl)
۱	۱۰/۳۸	۴/۹۳	۲/۱	۲/۱۷	۴۱۵/۲۲۵
۲	۲/۹۶	۲/۲۸	۱/۳۱	۱/۰۸	۱۱۸/۶۴
۳	۵/۶۲	۲/۶۹	۲/۰۹	۲/۱۴	۲۲۵/۱۷۵
۴	۱۹/۳	۹/۶	۲/۰۱	۲/۱۱	۷۷۲/۲۳۳
۵	۰/۱۵	۰/۲	۰/۷۶	۰/۲۷	۶/۳۳۳
۶	۶/۱۱	۳/۰۱	۲/۰۲	۲/۳۲	۲۴۴/۵
۷	۰/۲	۰/۳۵	۰/۶۶	۰/۶۳	۸/۲۳۳
۸	۵/۱۵	۲/۴۵	۲/۰۹	۲/۳۶	۱۸۱/۳
۹	۰/۴۶	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

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2026-11-21]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1396.7.27.5.7]



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

بحث

در پروتکل ۴، نسبت‌های جذب نور در طول موج‌های A_{260}/A_{280} (۱/۹۹ تا ۲/۰۳) و A_{260}/A_{230} (۲/۱ تا ۲/۱۷) نانومتر به ترتیب نشان دهنده عدم آلودگی پروتئینی و عدم آلودگی پلی‌فنلی، پلی‌ساکاریدی می‌باشند (جدول ۳). هم‌چنین وجود باندهایی مجزا برای ۱۸S و ۲۸S rRNA بدون شکستگی روی ژل آگارز کیفیت بسیار خوب RNA استخراجی را نشان می‌دهد (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 می‌باشد ولی از لحاظ حذف آلودگی‌های پروتئینی (۱/۴۷ تا ۱/۹۴)، پلی‌فنلی و پلی‌ساکاریدی (۰/۵ تا ۱/۱۷) شرایط لازم را نداشته و دارای مقادیر زیادی آلودگی می‌باشد که وجود این آلودگی‌ها باعث می‌شود 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. هم‌چنین وضوح باندهای ۱۸S و ۲۸S rRNA ریبوزومی در ژل آگارز ۱/۲٪ کاملا مشهود بود. نتایج به دست آمده برای مقدار A_{260}/A_{230} نیز در دامنه ۱/۹۴ تا ۲/۳۲ و هم‌چنین نسبت A_{260}/A_{280} بین ۲/۰۶ تا ۲/۱۳ بود که نشان دهنده عدم آلودگی پروتئینی و خلوص RNA استحصالی می‌باشد.

همان‌گونه که از جدول ۴ پیداست نسبت جذب در ۲۶۰ نانومتر به ۲۸۰ نانومتر در بیش‌تر موارد به عدد ۱/۷ نزدیک است که نشان دهنده کیفیت قابل قبول cDNA تکثیر شده می‌باشد. مقدار cDNA سنتز شده با استفاده از واکنش رونویسی معکوس نیز در ۷۵٪ نمونه‌های تکثیر شده نزدیک و یا بالای ۱۵۰۰ نانوگرم در میکرولیتر است که این عدد برای انجام مطالعه‌های 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 روش‌های حذف ناخالصی‌ها، حذف آن‌ها به شیوه جذب سطحی می‌باشد. زغال فعال یک نوع جاذب قوی با جذب سطحی فوق العاده می‌باشد و در هیچ حلال شناخته شده‌ای حل نمی‌شود. زغال فعال خاصیت 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 اولین دور سانتریفیوژ حذف می‌گردند (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 گزارش‌های 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 می‌گردد. 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 طورحتم از لحاظ ترکیب‌های پیچیده اشاره شده نیز اختلاف‌های چشم‌گیری دارند. نکته دیگر در موفقیت این پروتکل در دستیابی به کمیت و کیفیت بالای RNA استحصالی، به سایر اجزاء بافر استخراجی با غلظت‌های متفاوت نسبت به استانداردها بر می‌گردد. تغییر غلظت Tris-HCL از ۱۰۰ به ۲۰۰ میلی‌مولار، استفاده از PVP که دارای گیرنده هیستونی بسیار قوی و از بین برنده پلی‌فنل می‌باشد (۹) و نیز استفاده از بتامرکاپتواتانول با غلظت بالای ۳٪ تا ۴٪ جهت فراهم نمودن یک محیط کاهشی قوی جهت جلوگیری از تبدیل شدن پلی‌فنل‌ها به کوئین‌ها (۱۰) در کنار زغال فعال مجموعه‌ای مؤثر را در یک بافر استخراجی RNA گرد هم آورده است. استفاده از پروتکل دوم نیز تحت عنوان روش CTAB بهبود یافته (یا CTAB استات آمونیوم) است. نکته جالب آن‌که، گزارش منتشر شده بر روی گیاه پنبه انجام

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2026-11-21]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1396.7.27.5.7]

گرفته بود لذا انتخاب این پروتکل با توجه به پلی‌فنلیک و پلی‌ساکارید بودن پنبه و سیب می‌توانست بسیار مفید فایده باشد.

روش CTAB به طور گسترده‌ای برای استخراج DNA و RNA از بافت‌های گیاهی مورد استفاده قرار گرفته است (۶,۲۱). با این حال، بافت‌های پنبه به خصوص تخمک، غنی از پلی‌ساکارید، پلی‌فنل و سایر متابولیت‌های ثانویه هستند. بنابراین با روش‌های سنتی مانند CTAB نمی‌توان به RNA با کیفیت خوب و عملکرد بالا از RNA کل دست یافت (۲۰). به نظر می‌رسد 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 می‌تواند از دلایل موجه جهت استفاده از این پروتکل باشد.

نتایج گزارش منتشر شده توسط ژائو و همکاران (۲۰۱۲) برای تمامی نمونه‌ها نتایج نانودراپ را در محدوده ۱/۸۰ تا ۱/۸۵و نسبت A_{260}/A_{230} را در محدوده ۱/۹۳ تا ۲/۳۳ قرار داد، که نشان دهنده حذف قابل قبول پروتئین‌ها 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 اندازه‌گیری 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 می‌دهد لکن نسبت‌های خلوص اندازه‌گیری شده این تحقیق نسبت به نتایج منتشر شده پیشین بسیار پایین‌تر و نشانگر آلودگی‌های قابل توجه در نمونه‌های استحصالی به همراه RNA بود.

پروتکل شماره ۳ که متعلق به گاسیک و همکاران (۲۰۰۴) می‌باشد نیز یکی از پروتکل‌های 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 می‌کند توانسته است این پروتکل را جزء پروتکل‌های موثر 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 اندازه‌گیری شده این پژوهش در دامنه ۱۸۰/۸ تا ۲۴۶ نانوگرم در میکرولیتر بوده است که برای سنتز cDNA کفایت می‌کند. هم‌چنین، مقادیر به دست آمده از نسبت‌های A_{260}/A_{280} و A_{260}/A_{230} 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 تأئید می‌کند. با این حال گزارش شده است مقدار RNA بافت میوه رسیده برای ساخت کتابخانه cDNA مربطه ناکافی است (۷) و برای به دست آوردن مقدار مطلوب RNA از گوشت میوه به ۲۴ تا ۳۶ گرم وزن تر آن نیاز می‌باشد (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 پلی‌فنل و پلی‌ساکارید 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 کلروفرم و ایزوآمیل‌الکل به جای فنل برای حذف پروتئین‌ها استفاده گردیده که خطر کار کردن با این پروتکل را به نحو محسوسی می‌کاهد (جمی چات چائو و همکاران، ۲۰۱۲). مشکل آلودگی پلی‌ساکاریدی با استفاده از NaCl ۲ مولار به جای کم‌تر از ۱ مولار در بافر استخراج و نیز حضور NaCl ۱ مولار در بافر SDS، Tris-HCL، EDTA منجر به حذف پلی‌ساکاریدها و حل رسوب RNA شده است. افزایش غلظت NaCl در بافر استخراجی به حذف پلی‌ساکاریدها (فانگ و همکاران ، ۱۹۹۲) و حل کردن کمپلکس CTAB-RNA کمک می‌کند. زیرا اجازه می‌دهد CTAB و پلی‌ساکاریدهای بیش‌تری در مرحله استخراج با کلروفرم حذف گردند. علاوه بر این، رسوب‌دهی یک شب در دمای ۲۰˚C- به جای ۴˚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 ملاحظه‌ای 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 پلی‌فنلیک می‌باشد و مقادیر بسیار زیادی پلی‌فنل و پلی‌ساکارید در ترکیب‌هایش وجود دارد ولی گیاه آرابیدوپسیس فاقد این ترکیب‌های پلی‌فنل و پلی‌ساکاریدی 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}،

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2026-11-21]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1396.7.27.5.7]

۲/۰۸و در نسبت A_{260}/A_{230}، ۲/۰۹ بود. عملکرد کل نیز ۲۸/۷ نانوگرم در میکرولیتر اندازه‌گیری شد. نتایج این پروتکل خلاف این ادعا را ثابت می‌نمود. پس از تکرار چندین بار پروتکل مذبور 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 ۲/۱بود 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 بر خوردار بود هم‌چنین در نسبت A_{260}/A_{230} در حد عالی بود و فاقد آلودگی پلی‌فنلی و متابولیت‌های ثانویه بود. عملکرد RNA کل در سیب در محدوده ۲۳۳٫۵ ۲۳۳/۵ تا ۵۹۱ 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. متاسفانه سایر مقادیر توسط آن‌ها گزارش نشد. از این رو اطلاعاتی در مورد آلودگی‌های احتمالی در دست نیست. مقادیر به دست آمده از این روش چندان رضایت بخش نبود و اندک RNA استحصالی برای سنتز cDNA کافی نمی‌باشد.

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 ۱/۹۷تا ۱/۸۹ و نسبت A_{260}/A_{230} بین ۱/۹ تا ۲/۱۰ اندازه‌گیری 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 بر خوردار بود. هم‌چنین، عملکرد RNA کل بین ۱۴۰/۴تا ۲۱۹ بود. نتایج به دست آمده عملکرد RNA کل مشابه نتایج وینتا رای و همکاران (۲۰۱۰) بود.

پروتکل شماره ۹ توسط دِو 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 دِو شارما در محدوده ۱/۸ تا ۲/۰ بود. هم‌چنین، عملکرد RNA کل گزارش شده توسط آرون دِو شارما و همکاران (۲۰۰۳) بین ۶۷/۷۳ تا ۱۰۰/۸۵ قرار داشت. نتایج به دست آمده ما از پروتکل آرون دِو 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 rRNA (شکل ۲) رضایت‌بخش نبود. این اختلاف نتایج نشان می‌دهد گیاهان انتخاب شده توسط آرون دِو شارما و همکاران (۲۰۰۳) از نظر ترکیب های پلی‌فنلی و پلی‌ساکاریدی 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 آرابیدوپسیس 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 اندازه‌گیری 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/ایزوآمیل‌الکل می‌توان مقادیر زیادی از ترکیب‌های پلی‌فنل، پلی‌ساکارید و سایر متابولیت‌های 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 کربوهیدرات‌ها 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 می‌باشد. 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 می‌باشد. 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.

نتیجه‌گیری

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

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2026-11-21]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1396.7.27.5.7]

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.

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2026-11-21]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1396.7.27.5.7]

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.

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2026-11-21]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1396.7.27.5.7]