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

شهرام منتظری[1*]، شهاب سادات[2]

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد اصلاح نباتات، دانشگاه آزاد اسلامی، اهواز ۲- استاد گروه اصلاح نباتات، دانشگاه آزاد اسلامی، اهواز

*نویسنده مسئول: Shahram.montazeri@gmail.com

چکیده

جداسازی RNA از گیاهانی که دارای مقدار زیادی ترکیبات پلی‌ساکارید و پلی‌فنل می‌باشند به علت اتصال و رسوب این ترکیبات با RNA مشکل است. بنابراین در این مطالعه ۱۱ پروتکل مختلف استخراج RNA از برگ‌های سیب مورد بررسی قرار گرفت. کیفیت RNA از باندهای ۱۸S و ۲۸S rRNA با الکتروفورز ژل آگارز۱٫۲٪ بررسی گردید. کمیت و خلوص RNA استخراجی با اسپکتروفتومتری در طول موج ۲۳۰، ۲۶۰ و ۲۸۰ نانومتر و نسبت جذب A_{260}/A_{280} و A_{230}/A_{260} تعیین شد. همچنین برای بررسی کیفیت RNA استخراجی سنتز cDNA و آنالیز RT-PCR با پرایمر اختصاصی ژن اکتین سیب انجام گرفت. نتایج نشان داد که روش استخراج جمی چات چائو و همکاران (۲۰۱۲) و راجاکانی و همکاران (۲۰۱۳) مناسب‌ترین روش‌های استخراج RNA از سیب بودند. عملکرد RNA کل استخراج شده با روش جمی چات چائو و همکاران (۲۰۱۲) و روش راجاکانی و همکاران (۲۰۱۳) به ترتیب بین ۱۵۲,۴ تا ۸۰۰,۲ نانوگرم در میکرولیتر و ۳۶۲,۱ تا ۴۵۲,۶ نانوگرم در میکرولیتر بدست آمد. در هر دو روش نسبت ۲۶۰ به ۲۸۰ و ۲۳۰ به ۲۶۰ به ترتیب بین ۱,۹۹تا۲,۰۳ و ۲,۰۷ تا ۲,۱۷ بود که نشان داد RNA خلوص بالایی داشته و فاقد آلودگی پلی‌فنلی، پروتئینی و پلی‌ساکاریدی می‌باشد. باندهای ۱۸S و ۲۸S در الکتروفورز افقی مشاهده شدند. همچنین کیفیت بالای واکنش RT-PCR در هر دو روش نشان می‌دهد که RNA استخراج شده می‌تواند با اطمینان جهت آزمایش‌های مولکولی پائین دستی مورد استفاده قرار گیرد.

کلمات کلیدی: جداسازی RNA، سیب، RT-PCR

مقدمه

استخراج RNA ژنومی با کیفیت بالا از گیاهان دارویی و محصولات کشاورزی که حاوی آلکالوئیدها و پلی‌فنل‌های بالا می‌باشند همیشه یک چالش بزرگ برای دانشمندان بوده است. محتویات بالای پلی‌ساکاریدها، تانن‌ها و پلی‌فنل‌ها می‌تواند استخراج و خالص‌سازی RNA را مهار کند و منجر به ضعف عملکرد در استخراج RNA گردند (راجاکانی و همکاران[1] ، ۲۰۱۳). 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 (کسینجا گاسیک و همکاران[2]، ۲۰۰۴). 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 ترکیبات پلی‌فنلی، پلی‌ساکاریدها و 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 دارد. این روش‌ها معمولاً بر اساس CTAB، SDS، گوآنیدینیوم تیوسیانات، گوانیدین هیدروکلراید، فنل و کلروفرم استوار می‌باشند .وجود ترکیبات پلی‌فنلی در گیاهانی مانند سیب مانع استخراجRNA با کیفیت بالا می‌گردد زیرا ترکیبات 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. از این جهت روش‌های مختلف استخراج RNA باید آزمایش و بهینه شوند و روشی انتخاب شود که سریع، ساده و اقتصادی بوده و آلودگی آن به مواد شیمیایی مورد استفاده کم باشد.

[1] Rajakani et al.

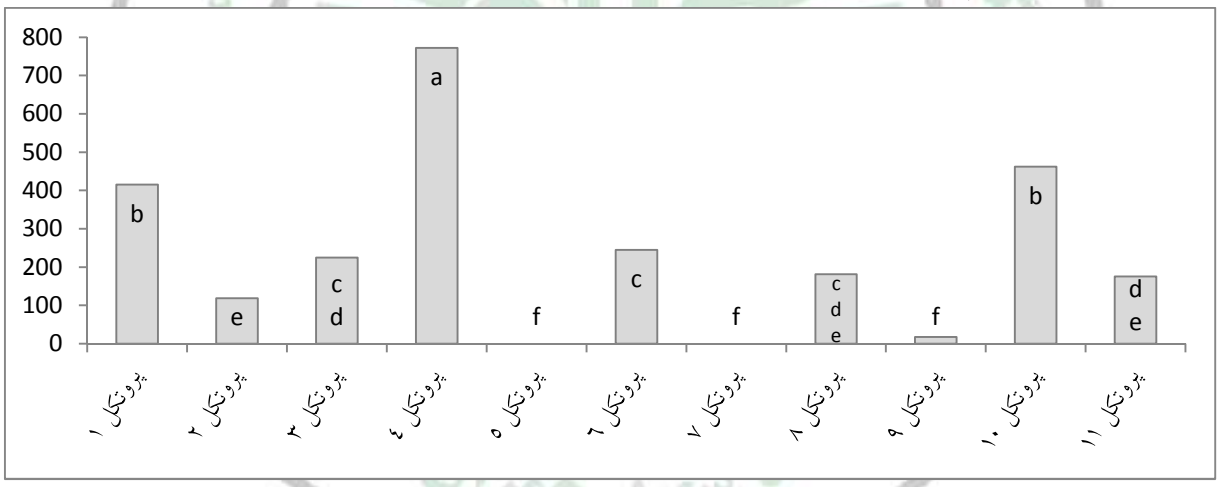
[2] Ksenija Gasic et al.

مواد و روش‌ها

این تحقیق در قالب طرح کاملاً تصادفی نامتعادل در آزمایشگاه ژنتیک مولکولی دانشکده کشاورزی دانشگاه آزاد اسلامی واحد اهواز در سال ۱۳۹۳ انجام گرفت. در این تحقیق یازده روش استخراج RNA شامل: ۱- راجاکانی و همکاران (۲۰۱۳) ۲- لوژائو و همکاران (۲۰۱۲) ۳- گاسیک و همکاران (۲۰۰۴) ۴- جمی چات چائو 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 گرفت. کمیت و کیفیت RNA استخراجی با استفاده از اسپکتروفتومتری نانودراپ در طول موج ۲۳۰، ۲۶۰ و ۲۸۰ نانومتر و الکتروفورز بر روی ژل آگارز ۱٫۲٪ تعیین شد. تجزیه داده‌های آماری با نرم اقزارSAS نسخه ۹٫۳ انجام گردید و با توجه به نتایج مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون T-Test و کیفیت RNA استخراجی، دو پروتوکل انتخاب شد. در نهایت به منظور بررسی کیفیت و کارایی RNAهای استخراج شده در دو پروتکل برتر، سنتز cDNAو واکنش RT-PCR با استفاده از کیت Vivantis و آغازگرهای اختصاصی ژن اکتین انجام گردید.

نتایج و بحث

از میان یازده پروتکل مورد بررسی با توجه به درجه خلوص RNA استحصالی، نداشتن شکستگی (کیفیت RNA) به علت هضم RNAیی و کمیت RNA دو پروتکل به عنوان برترین انتخاب شدند. نتایج تجزیه واریانس داده ها نشان داد بین پروتکل‌های مختلف، اختلاف آماری معنی‌داری در سطح ۱درصد وجود دارد. 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.



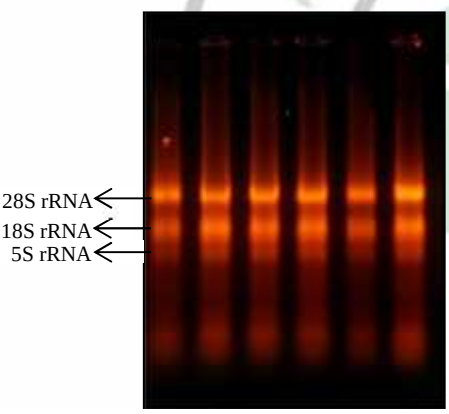
شکل۱- نتایج حاصل از مقایسه میانگین دانکن، برای ۱۱ پروتکل استخراج RNA

در پروتکل ۴، نسبت‌های جذب نور در طول موج‌های A_{260}/A_{280} (۱٫۹۹ تا ۲٫۰۳)و A_{260}/A_{230} (۱٫۹۹ تا ۲٫۰۳) نانومتر به ترتیب نشان دهنده عدم آلودگی پروتئینی و عدم آلودگی پلی‌فنلی، پلی‌ساکاریدی می‌باشند. همچنین وجود باندهایی مجزا برای ۱۸Sو rRNA ۲۸S بدون شکستگی روی ژل آگارز کیفیت بسیار خوب RNA استخراجی را نشان می‌دهد. 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(۱٫۴۷-۱٫۹۴)، پلی‌فنلی و پلی‌ساکاریدی(۰٫۵-۱٫۱۷) شرایط لازم را نداشته و دارای مقادیر زیادی آلودگی می‌باشدکه 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 میکرولیتر بدست آمد. همچنین وضوح باندهای ۱۸S و ۲۸S

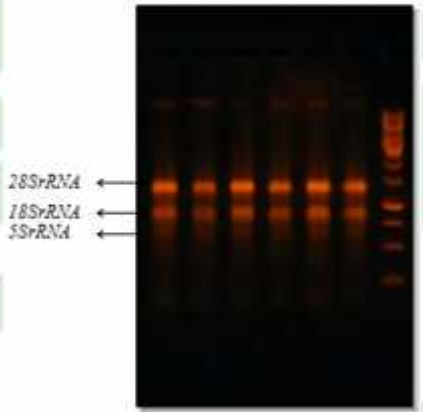
RNA ریبوزومی در ژل آگارز ۱٫۲٪ کاملاً مشهود بود. نتایج بدست آمده برای مقدار A_{260}/A_{230} نیزدر دامنه ۱٫۹۴ تا ۲٫۳۲ و همچنین نسبت A_{260}/A_{280} بین ۲٫۰۶ تا ۲٫۱۳ بود که نشان دهنده عدم آلودگی پروتئینی و خلوص RNA استحصالی می‌باشد.

جدول۱- عملکرد RNA کل استخراج شده در گیاه سیب

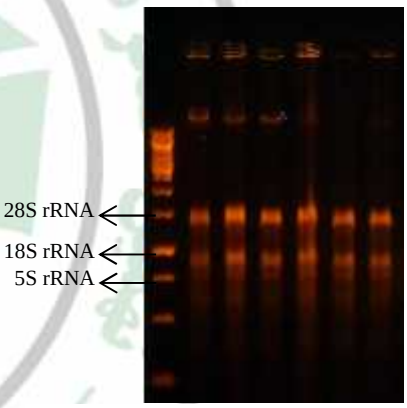
پروتکل	A_{260}	A_{280}	A_{260}/A_{280}	A_{260}/A_{230}	Yield(ng/µl)
۱	۱۱,۲۵۶	۵,۴۷۲	۲,۰۶	۱,۹۴	۴۵۰,۲
۱	۱۱,۳۱۶	۵,۳۶۹	۲,۱۱	۲,۳۲	۴۵۲,۶
۱	۹,۸۹۹	۴,۶۴۲	۲,۱۳	۲,۲۵	۳۹۶
۴	۱۸,۸۴	۹,۴۹	۱,۹۹	۲,۰۷	۷۵۳,۶
۴	۲۰,۰۰۵	۹,۸۶۴	۲,۰۳	۲,۱۷	۸۰۰,۲
۴	۱۹,۰۷۲	۹,۴۶۹	۲,۰۱	۲,۱	۷۶۲,۹
۱۰	۱۲,۹۸۱	۸,۱۸۵	۱,۵۹	۰,۵۹	۵۱۹,۲
۱۰	۱۰,۸۱۲	۵,۵۶	۱,۹۴	۱,۱۷	۴۳۲,۵
۱۰	۱۲,۷۴۸	۸,۶۴۵	۱,۴۷	۰,۵۰	۵۰۹,۹



شکل ۲- کیفیت RNA استخراج شده توسط پروتکل شماره ۱ (راجاکانی و همکاران، ۲۰۱۳)، بارگیری شده بر روی ژل آگارز ۱٫۲٪

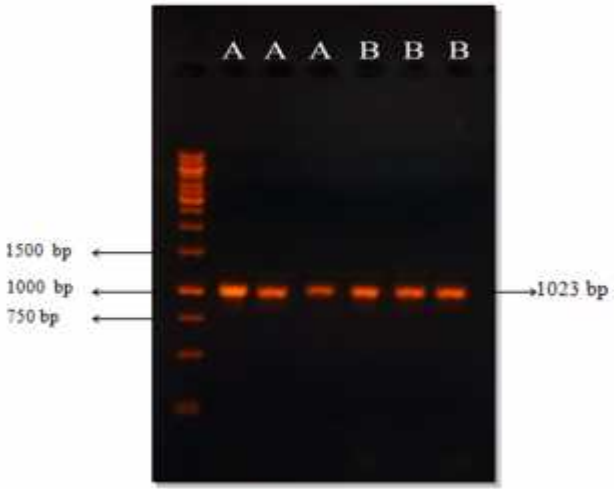


شکل ۳- کیفیت RNA استخراج شده توسط پروتکل شماره ۴ (جمی چات چائو و همکاران، ۲۰۱۲)، بارگیری شده بر روی ژل آگارز ۱٫۲٪



شکل ۴- کیفیت RNA استخراج شده توسط پروتکل شماره ۱۰ (مالوری و همکاران، ۲۰۰۷)، بارگیری شده بر روی ژل آگارز ۱٫۲٪

از آنجائیکه 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 فراورده های RT-PCR ارزیابی شدند .پس از سنتز موفقیت آمیز cDNA، 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 ۵). وجود تک باندهای مربوط به قطعات ژن مربوطه تأیید کننده کیفیت مطلوب cDNA سنتز شده و در نهایت معرف کیفیت بالای RNA استخراج شده می‌باشد.



شکل ۵. نتایج حاصل از RT-PCR برای دو پروتکل شماره ۱ (پروتکل راجاکانی و همکاران، ۲۰۱۳ =A) و نیز پروتکل شماره ۴ (پروتکل جمی چات چائو و همکاران، ۲۰۱۲=B)

منابع

1. Allison C. Mallory. (2007). Total RNA extraction from Arabidopsis and tobacco. Bartel Lab Whitehead Institute.
2. Antikainen, M., & Pihakaski, S. (1994). Early developments in rna, protein, and sugar levels during cold stress in winter rye (Secale Cereale) leaves. Annals of Botany, 74(4): 335-341.
3. Djami-Tchatchou, A. T., & Straker, C. J. (2012). The isolation of high quality RNA from the fruit of avocado (Persea americana Mill.). South African Journal of Botany, 78: 44–46.
4. 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(4): 437-438.
5. Hu, C., Honda, C., Kita, M., Zhang, Z., Tsuda, T., & Moriguchi, T. (2012). A simple protocol for RNA isolation from fruit trees containing high levels of polysaccharides and polyphenol compounds. Plant Molecular Biology Reporter, 20(1): 69.
6. Kansal, R., Kuhar, K., Verma, I., Gupta, R. N., Gupta, V. K., & Koundal, K. R. (2008). mproved and convenient method of RNA isolation from polyphenols and polysaccharide rich plant tissues. Indian Journal of Experimental Biology, 46(12): 842-845.
7. Lu Zhao, Ding Q, Zeng J, Wang FR, Zhang J, Fan SJ, et al. (2012). An improved CTAB-ammonium acetate method for total RNA isolation from cotton. Phytochemical Analysis, 23(6):647-50.
8. Malnoy, M., Reynoird, J. P., Mourgues, F., Chevreau, E., & Simoneau, P. (2001). A method for isolating total RNA from pear leaves. Plant Molecular Biology Reporter, 19(1): 69.
9. 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. BMC Research Notes, 6:125.
10. Sharma AD, Gill PK, & Singh P. (2003). RNA isolation from plant tissues rich in polysaccharides. Analytical Biochemistry, 319–321.
11. Singh, G., Kumar, S., & Singh, P. (2003). A quick method to isolate RNA from wheat and other carbohydrate-rich seeds. Plant Molecular Biology Reporter, 21(1): 93.

Comparative study of different protocols for isolation of RNA from apple leaves (*Malus domestica*)

Shahram Montazeri[1*] , Shahab Sadat[1]

1 Department of Plant Breeding, Faculty of Agriculture, Islamic Azad University, Ahwaz, Iran.

* corresponding author: Shahram.montazeri@gmail.com

Abstract

RNA isolation is difficult in plant that contain large amounts of polysaccharides and polyphenol compounds that bind and co-precipitate with RNA. Therefore, in this study eleven different methods were evaluated to extract RNA from leaves of apple. The integrity of the RNA was checked from 28 s and 18 s rRNA bands by 1.2% agarose gel electrophoresis with ethidium bromide (EB) staining. The purity and quantity of extracted RNA from all samples were tested by determining the spectrophotometric absorbance at 230, 260 and 280nm and the ratios of A260/A280 and A260/A230. cDNA synthesis and RT-PCR analysis by specific primer for apple Actin and cotton GH-E6 genes were performed with the objective of determining if the extracted RNAs possess good enough quality to be submitted to more sensitive analysis. The results indicated that methods of Djami-Tchatchou et al., (2012) and Rajakani et al.,(2013) were the most suitable methods for RNA extraction from apple leaves. The yield of total RNA extracted by method of Djami-Tchatchou et al., (2012) and Rajakani et al., (2013) varies from 753.6 ng/µl to 800.2 and 362.1 to 452.6ng/µl in apple leaves , respectively. While, Yield of RNA was in apple by method of Rajakani et al., (2013). In two protocols, their A260/A280 ratios ranged from 1.99 to 2.03 and A260/A230 ratios ranged from 2.07 to 2.17. This is indicative of a high RNA purity and the absence of contamination with polyphenolic, protein and polysaccharide compounds. Distinct bands of 28S and 18S ribosom¬al RNA were also observed in electrophoresis picture. The high quality for RT-PCR reaction by two methods showed the extracted RNA can be used with assurance in downstream molecular techniques.

Key words: RNA isolation, Apple , RT-PCR.