استخراج بهینه شده RNAی کل از بافت های مختلف گیاه انگور در مقیاس کوچک

رضا حیدری (۱)، رحیم حداد (۲) و قاسمعلی گروسی (۳)

۱- رضا حیدری، دانشجوی کارشناسی ارشد بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشگاه بین المللی امام خمینی (ره)، قزوین، ۲- گروه بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشگاه بین المللی امام خمینی (ره)، قزوین

چکیده

مرحله حیاتی در انجام موفقیت آمیز تکنیک های مربوط به RNA در بیولوژی مولکولی و آزمایشات ژنومیک، از قبیل واکنش زنجیره‌ای پلی مراز نسخه برداری معکوس (RT-PCR)، ساخت کتابخانه cDNA و بررسی میکرواری، جداسازی RNA با کیفیت بالا می باشد. در انگور، کمیت و کیفیت RNA، بطور معنی داری توسط آلودگی هایی مانند پلی ساکاریدها، پلی فنولها و پروتئین ها، که میزان آنها در طول مراحل مختلف رشد و نمو حبه و برگ فراوان می باشد، کاهش می یابد. در این بررسی، روشی بهینه استخراج RNA در مقیاس کوچک ارائه شد که منجر به استخراج RNAی کل با کیفیت بالا، از بافت های مختلف گیاه انگور، مانند حبه، برگ، ریشه، ساقه و خوشه، گردید. RNAی کل استخراج شده با این روش، بطور موفقیت آمیزی برای سنتز cDNA و واکنش زنجیره ای پلی مراز نسخه برداری معکوس (RT-PCR) استفاده شد.

مقدمه

در بافت های گیاهی غنی از پلی ساکاریدها، پلی فنولها و پروتئین ها، کمیت و کیفیت RNAی استخراج شده، می تواند بطور معنی داری کاهش یابد. ترکیبات پلی فنولیک می توانند بطور برگشت ناپذیری به پروتئین ها و اسید های نوکلئیک متصل شده و مجموعه هایی با وزن مولکولی بالا را تشکیل دهند، در حالی که پلی ساکاریدها در حضور الکل ها، گرایش به رسوب همزمان با RNA دارند که شدیدا برای فعالیت آنزیم هایی چون نسخه بردار معکوس وابسته به RNA، DNA پلی مراز و اندونوکلئازهای برشی ایجاد مزاحمت می کنند. امروزه پروتکل های مختلفی برای استخراج RNAی کل از بافت های مختلف گیاه انگور، توسعه یافته اند که اکثر آنها دارای مشکلاتی از قبیل: پیچیده بودن از نظر تکنیکی، نیاز به انجام دورهای بالای سانتریفیوژ برای رسوب RNAی کل، هزینه بر بودن و بهینه بودن برای یک بافت یا اندام خاص را دارند. اما در این بررسی، یک روش بهینه شده معرفی می گردد که فاقد مشکلات فوق می باشد.

مواد و روش‌ها

بافت مورد نظر با استفاده از هاون و ازت مایع بصورت پودر در آمده وبه میزان ۰/۱ گرم برای بافت حبه و ۰/۰۵ گرم برای سایر بافت ها، به یک تیوب ۲ml حاوی ۱ml بافر استخراج(PVP, 2% CTAB,25mM EDTA pH 8,2M ٪۲NaCl,300mM Tris-HCl pH 8 ،2%β-mercaptoethanol) اضافه گردیده و شدیدا تکان داده شده و بمدت ۳۰ دقیقه در حمام آب گرم با دمای ٦٥ درجه سانتیگراد قرار داده و هر ۵ دقیقه به آرامی ورتکس گردید.

– پروتئین ها دومرتبه با یک حجم برابر از کلروفرم: ایزوآمیل الکل (۱:۲٤ v/v) استخراج گردیده و به مدت ۵ دقیقه در دمای ٤ درجه سانتیگراد با دور ۱٤۰۰۰ rpm سانتریفیوژ شدند، سپس لایه بالایی به یک تیوب جدید منتقل گردیده و ۰/۱ مقدارسدیم استات ۳M و ۰/٦ مقدار ایزوپروپانول به آن افزوده و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۸۰- درجه سانتیگراد نگهداری گردید.

- پلیت اسید نوکلئیک بوسیله سانتریفیوژ با دور rpm ۱٤۰۰۰ بمدت ۳۰ دقیقه در دمای ٤ درجه سانتیگراد جمع آوری شده و در l۲۰۰ آب DEPC شده حل گردیده و مجددا پروتئین ها یک مرتبه با یک حجم برابر از کلروفرم: ایزوآمیل الکل (v/v ۱:۲٤) استخراج گردیده و به مدت ۵ دقیقه در دمای ٤ درجه سانتیگراد با دور rpm ۱٤۰۰۰ سانتریفیوژ شدند.

- در مرحله بعد ۰/۳ حجم لیتیوم کلراید M ۸ به نمونه ها اضافه گردید وتیوب ها به مدت یک طول شب در دمای ٤ درجه سانتیگراد نگهداری شدند. پس از Overnight، RNAی کل به وسیله سانتریفیوژ با دورrpm ۱٤۰۰۰ به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ٤ درجه سانتیگراد رسوب داده شده و با استفاده از الکل اتانول ۷۰٪ شسته شده و در زیر هود لامینارفلو خشک و در مقدار مناسب آب DEPC شده حل گردید و کمیت و کیفیت RNAی کل استخراج شده با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج های ۲۳۰، ۲٦۰ و ۲۸۰ نانومتر و نیز الکترو فورز ژل آگاروز ۱/۲٪ مورد بررسی قرار گرفت.

نتایج و بحث

با توجه به اینکه این روش در مقیاس کوچک می باشد و نیاز به مصرف مقادیر ناچیزی از ماده گیاهی و مواد و محلول های شیمیایی دارد، بنابراین، از طرفی موجب کاهش میزان آلودگی و افزایش بازده کار می شود، و از طرف دیگر سبب افزایش صرفه اقتصادی می گردد. برخلاف اکثر روش های متداول، که ازنظر تکنیکی بسیار پیچیده اند و نیاز به استفاده از کیت های خالص سازی یا جداسازی در مراحل مختلف استخراج دارند، این روش از نظر تکنیکی بسیار ساده بوده و برای تمام بافت های گیاه انگور قابل استفاده می باشد.از دیگر ویژگی های این روش، عدم استفاده از فنول به دلیل ناسازگار بودن آن با PVPی محلول و عدم کاربرد اسپرمیدین در بافر استخراج به دلیل گران قیمت بودن و دشوار بودن نگهداری آن است. به هر حال نتایج بدست آمده حاکی از کمیت و کیفیت بالای RNAی کل استخراج شده با استفاده از این روش است و با روش هایی که در آنها از PVPی نامحلول (PVPP) و اسپرمیدین در بافر استخراج استفاده می شود، و نیز روش هایی که نیاز به دورهای بالای سانتریفیوژ دارند، قابل مقایسه است. به منظور نشان دادن کیفیت بالای RNAی استخراج شده، اقدام به سنتز cDNA، جداسازی cDNAی مورد نظر (ژن بتا- گالاکتوزیداز) و همسانه سازی آن نمودیم که نتایج بررسی ها کیفیت مطلوب RNAی کل را ثابت نمودند.

منابع

1- **Cara A., Gambino G. and Schubert A. (2007)**. "A cetyltrimethylammonium bromide based method to extract low- molecular- weight RNA from polysaccharide- rich plant tissues". *Analytical Biochemistry.* **360**: 318- 320.

2- **Iandolino A.B., Goes da Silva F., Lim H., Choi H., Williams L.E. and Cook D.R. (2004)**. "High-quality RNA, cDNA and derived EST libraries from Grapevine (*Vitis vinifera* L.)". *Plant Molecular Biology Reporter* **22**: 269- 278.

3- **Reid K.E., Olsson N., Schlosser J., Peng F. andLund S.T. (2006).** "An optimized grapevine RNA isolation procedure and statistical determination of reference genes for real- time RT- PCR during berry development". *BMC Plant Biology.* **6**: 27- 37.

4- **Salzman R.A., Fujita T., Zhu- Salzman K., Hasegawa P.M. and Bressan R.A. (1999)**. "An improved RNA isolation method for plant tissues containing high levels of phenolic compounds or carbohydrates". *Plant Molecular Biology Reporter*. **17**: 11- 17.

Optimized total RNA extraction from different tissues of grapevine in mini-prep scale

Abstract

A critical step in the successful implementation of RNA-based techniques for molecular biology and functional genomic experiments (e.g., reverse transcription polymerase chain reaction [RT- PCR], generation of expressed sequence tags, microarray analysis) is the routine isolation of high- quality RNA. In grape vines, the yield and quality of RNA can be significantly reduced by contaminants such as polyphnols, polysaccharides and proteins, wich are abundant during different stages of berry and development. In this research project, an extraction method has been described to optimize RNA extraction protocol in mini-prep scale to allow effective extraction of high- quality total RNA from a wide range of grapevine tissues such as berry, leaf, root, stem and bunch. Total RNA extracted with this protocol was successfully used for cDNA synthesis and reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) amplification.