# بررسی دو روش موثر در استخراج RNA ژنومی در ارقام تجاری انگور

**بهاره قربانی[۱*]، رقیه نجف‌زاده[۲]**

[۱]دانش‌آموخته‌ی دکتری باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ارومیه

[۲]استادیار گروه باغبانی و بیوتکنولوژی، دانشگاه ارومیه، واحد میاندوآب

*نویسنده مسؤل: ghorbani.bahareh@ymail.com

**چکیده**

در مطالعات مولکولی، استخراج RNA یک مرحله بسیار مهم به شمار می‌رود و نتایج کارهای دیگر مانند PCR و Real Time-PCR وابسته به کمیت و کیفیت RNA می‌باشد. استخراج RNA در گیاهان مختلف نیازمند پروتکل خاص همان گیاه است و بسته به میزان کربوهیدرات، متابولیت ثانویه و ترکیبات فنلی متفاوت می‌باشد. انگور دارای ترکیبات فنلی متعدد بوده و حضور این ترکیبات در گیاه استخراج را کاری سخت نموده است. این مقاله به مقایسه دو روش متداول استخراجی(Plus) RNX™، CTAB در دو رقم انگور می‌پردازد. هدف شناسایی بهترین روش استخراج در دو رقم ریش بابا و رقم یاقوتی انگور و بررسی کمیت و کیفیت آن می‌باشد. نتایج نشان داد روش CTAB در صورت استفاده از ترکیبات عاری از آلودگی کیفیت و کمیت بالایی نسبت به روش (Plus) RNX™ در رقم ریش بابا دارا می‌باشد. علت این امر می‌تواند به قدرت شست شوی بالای ترکیبات پلی ساکاریدی و فنلی باشد.

**واژه‌های کلیدی:** استخراج RNA، انگور، CTAB، (Plus) RNX™، PCR.

## مقدمه

با وجود تنوع بیولوژیکی و شیمیایی در گیاهان هیچ روش عمومی استخراج RNA در دسترس نیست. بررسی‌های مولکولی با هدف ارتقا کیفیت و کمیت در گیاهان زراعی و باغی صورت می‌پذیرد. از این رو یافتن روشی نوین و در عین حال با قدرت کیفی بالا سبب مطالعات گسترده و پیشرفت‌های توام می‌شود. استخراج RNA از آن‌ها با کیفیت و کمیت مناسب جهت واکنش‌های زنجیرهای پلیمراز، با مشکلات زیادی همراه است که بسته به گیاه و اندام هدف مورد استخراج می‌تواند زمان بر باشد. این روش‌ها با مشکلاتی مانند وجود مقادیر زیاد پلی‌ساکارید، سطوح زیادی از آنزیم ،RNase انواع مختلف ترکیبات فنلی مانند تانن‌ها، غلظت کم اسید نوکلئیک (مقدار زیاد آب)، بافت‌هایی مانند لیگنین (چوب)، که تجزیه آن مشکل است و غیره مواجه می‌باشند. گونه وینیفرا یکی از مهم‌ترین محصولات باغبانی در کل دنیا می‌باشد. شاخه‌های یکساله از جوانه‌های اصلی و فرعی رشد می‌کنند. بر روی گره‌های شاخه یک‌ساله پیچک، خوشه و برگ حاصل می‌شود. انگور ارزش اقتصادی و تغذیه‌ای بالایی دارد و ترکیبات غذایی انگور بسته به رقم و منطقه و آب و هوای کشت متفاوت است (Yilmaz and Toledo, 2004). انگور جزء محصولات مناطق معتدله گرم است و گیاهان نیمه گرمسیری و حتی معتدله گاهاً با دمای بالای صفر هم دچار خسارات جبران ناپذیر می‌شوند. این صدمات شامل اختلال در فرآیندهای متابولیسمی، ساختارسلولی و افزایش رادیکال‌های آزاد درگیاه می‌باشد (Sangwan *et al*., 2002).

برای مطالعات مولکولی مانند آشکارسازی تغییرات بیان ژن در پاسخ به استرس‌های زیستی و غیرزیستی، تجزیه و تحلیل بیان ژن طی مراحل مختلف رشد و نمو، بررسی الگوی بیان در اندام‌های مختلف، شناسایی و توالی‌یابی ژن‌های مهم دخیل در مسیرهای متابولیکی در سطحmRNA باشد. دسترسی به RNA با کمیت و کیفیت مطلوباز گیاه که دارای مقادیر فراوان ترکیبات پلی فنلی ضرورت دارد. امکان ورود آلودگی‌های نسبتا کم پلی‌ساکاریدی به فاز آبی باعث رسوب همزمان آن‌ها با RNA می‌شود و در مراحل بعدی کاربرد RNA تداخل ایجاد می‌کند (Wang and Stegemann,2009). همچنین RNA با ترکیبات پلی- ساکاریدی و پلی فنلی کمپلکس تشکیل می‌دهد و پلیت‌های RNA حاصل غیرقابل حل می‌شوند. رنگ یا حالت پلیت‌های RNA می‌تواند بیانگر آلودگی‌های مختلف باشد. مثلاً برخی به‌دلیل آلودگی پلی‌ساکاریدی حالت ژلاتینی دارند و یا پلیت‌های مایل به قرمز نشان‌دهنده آلودگی‌های پلی‌فنلی هستند (Sabir, 2012). برای افزایش میزان بازدهی و کاهش تجزیه ،RNA در استخراج، روش‌های متفاوتی برای استخراج RNA ژنومی‌کل در

گونه‌های مختلف گیاهان پیشنهاد گردیده است، در این مقاله دو روش استخراجی(Plus) RNX™، CTAB در گیاه انگور مورد بررسی قرار گرفت.

## مواد و روش‌ها

نمونه‌ها پس از برداشت در فویل آلومینیوم بسته بندی و فوراً در فلاسک حاوی نیتروزن مایع (با دمای ۱۹۶- درجه سانتی‌گراد) قرار گرفته و به آزمایشگاه بیوتکنولوژی منتقل شدند و جهت نگهداری طولانی مدت در دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند. استخراج RNA از بافت برگ جوان انگور صورت گرفته است. قبل از شروع استخراج، RNA کلیه وسایل مربوطه از قبیل تیوب، هاون و فالکون، دو مرتبه به‌مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد اتوکلاو شدند تا به‌طور کامل استریل شوند.

**روش اول: استخراج RNA با روش RNX™ (Plus)**

در ابتدا به ۱۰۰ میلی‌گرم بافت برگ پودر شده، ۱۰۰۰ میکرولیتر از محلول استخراجی(Plus) RNX™، سرد اضافه گردید. سپس ۲۰۰ میکرولیتر کلروفورم به میکروتیوب حاوی بافت هموژنیزه اضافه شد. در مرحله بعد میکروتیوب با دست به آرامی ورتکس شد تا بافت گیاهی کاملاً هموژنیزه شود، سپس. به مدت ۵ دقیقه روی یخ یا دمای ۴ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. سپس نمونه به مدت ۱۵دقیقه با سرعت ۱۲۰۰۰دور در دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ شد. پس از سانتریفیوژ، فاز بالایی به آرامی به میکروتیوب دیگری منتقل شده و سپس به میزان هم حجم محتویات منتقل شده ایزوپروپانول سرد به آن اضافه شد و مجدد به مدت ۵ دقیقه روی یخ یا دمای ۴ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. سپس نمونه به مدت ۱۵دقیقه با سرعت ۱۲۰۰۰دور در دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ شد، سپس مایع روشناور دور ریخته شده و به میزان ۱ میلی‌لیتر اتانول ۷۵ درصد به آن اضافه شد و به آرامی ورتکس گردید تا رسوب از ته میکروتیوب جدا شود و سپس به مدت ۵ دقیقه با سرعت ۱۲۰۰۰دور در دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ شد. پس از سانتریفیوژ، مایع روشناور دور ریخته شد و پلیت با ۵۰ میکرولیتر با آب DEPCحل شد.

**روش دوم: استخراج RNA با روش CTAB**

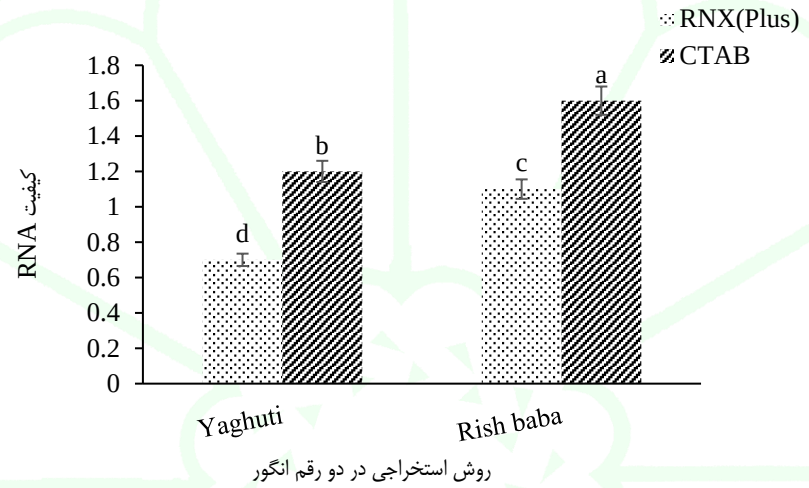
در ابتدا به ۱۰۰ میلی‌گرم بافت برگ پودر شده، ۸۰۰ میکرولیتر از بافر CTAB اضافه گردید و سپس همزمان یک درصد PVP وزنی/ حجمی و یک درصد بتا- مرکاپتواتانول اضافه شده و به آرامی اینورت می‌کنیم. نمونه را به مدت ۳۰ دقیقه تحت دمای۶۰ درجه قرار داده در حین حرارت دیدن چند بار به آرامی اینورت می‌کنیم. سپس به محلول فوق ۱۰۰ میکرولیتر استات سدیم ۲ مولار و ۲۰۰ میکرولیتر کلروفرم/ایزوآمیل الکل ۲۴:۱ اضافه کرده و مجدد اینورت می‌کنیم. نهایتاً نمونه به مدت ۱۵ دقیقه با سرعت ۱۲۰۰۰دور در دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ می‌نماییم. می‌توان این مرحله را دو بار انجام داد. سپس فاز بالایی به آرامی به میکروتیوب دیگری منتقل شده سپس به میزان هم حجم محتویات منتقل شده ایزوپروپانول سرد به آن اضافه شد و به مدت ۱ ساعت در دمای ۸۰- قرار داده شدند. سپس نمونه به مدت ۱۵ دقیقه با سرعت ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ شد، سپس مایع روشناور دور ریخته شده و به میزان ۱ میلی‌لیتر اتانول ۷۵ درصد به آن اضافه شد و به آرامی ورتکس گردید تا رسوب از ته میکروتیوب جدا شود و سپس به مدت ۵ دقیقه با سرعت ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ شد. پس از سانتریفیوژ، مایع روشناور دور ریخته شد و پلیت با ۵۰ میکرولیتر با آب DEPC حل شد (Ghangal *et al*., 2009).

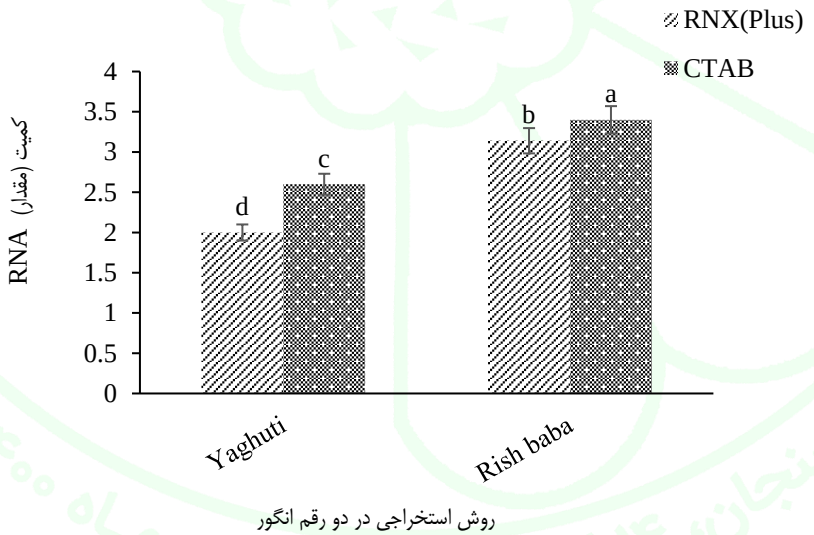
تجزیه آماری

داده‌های حاصل در قالب طرح کاملاً تصادفی نامتعادل با۳ تکرار تجزیه شدند و مقایسه میانگین‌ها با آزمون LSD در سطح احتمال ۵ درصد انجام شد. از نرم افزار SAS نسخه۹/۴ برای تجزیه آماری استفاده شد.

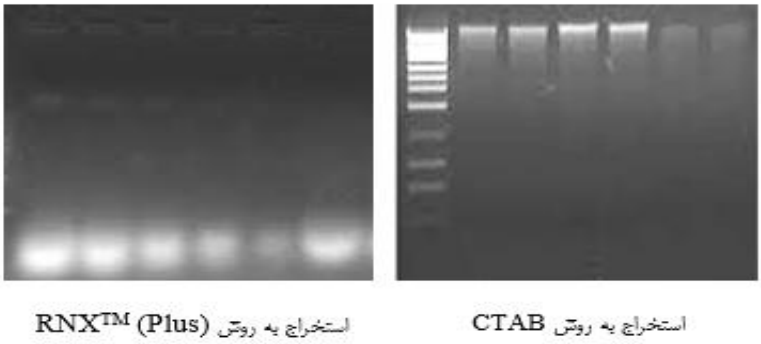
## نتایج و بحث

نتایج تجزیه واریانس داده‌های مربوط به نمونه‌های نگهداری شده در دمای ۸۰- نشان داد که بین تیمارهای مختلف از نظر فاکتورهای مقدار، RNA نسبت‌های جذب 260/280 و 260/230 نانومتر اختلاف معنی‌دار بود و برترین روش در این بررسی روش CTAB بود (شکل ۱). در روش CTAB بافر حاوی PVP، CTAB و بتا- مرکاپتواتانول است که هر کدام عملکرد خاصی دارند. PVPموجود در آن از طریق تشکیل پیوند هیدروژنی با ترکیبات پلی فنلی و تشکیل کمپلکس، باعث جداسازی ترکیبات پلی فنلی از اسیدهای نوکلئیک می‌شود و بتا- مرکاپتواتانول موجود در آن نیز ازاکسیداسیون فنل‌ها و آزادسازی کوئینون‌ها ممانعت می‌کند. لذا بهترین استخراج در روش CTAB دیده شده است (شکل ۲).




**شکل ۱: بررسی نمودار کمی و کیفی دو روش استخراجی RNA در دو رقم انگور (یاقوتی و ریش بابا).**




**شکل ۲: بررسی کیفی دو روش استخراجی RNA.**

## نتیجه‌گیری کلی

بهترین نوع استخراج حالتی که شامل سه فاز کاملاً مجزا از یکدیگراست که فاز اول، مایع روشناور محتوی اسید نوکلئیک (فاز شفاف،) فاز دوم رسوب حاصل از تجمع کربوهیدرات، پروتئین‌ها، و بقایای سلول است و فاز سوم که در انتها قرار دارد شامل فنل–کلروفرم ایزوآمینو الکل است. در کل میتوان گفت روش استخراجی با بافرCTAB جهت استخراج RNA با کیفیت و کمیت مطلوب از نمونه‌های برگی گیاه انگور بهترین در مقایسه با روش RNX™ (Plus) محسوب گردید.

## منابع

Ghangal, R., Raghuvanshi, S., Sharma, P.C. 2009. Isolation of good quality RNA from a medicinal plant seabuckthorn rich in secondary metabolites. Plant Physiology and Biochemistry, 47:113-115.

phenols in juice of five Sabir, A., Kafkas, E., Tangolar, S. 2010. Distribution of major sugars, acids and total development. Spanish Journal of Agricultural grapevine (Vitis spp.) cultivars at different stages of berry Research, 8(2): 425-433.

Sangwan, V., Orvar, B.L., Beyerly, J., Flirt, H., Dhindsa, R.S. 2002. Opposite changes in membrane fluidity mimic cold and head stress activation of distinct plant MAP kinase pathways. Plant Journal, 31: 629-638.

Wang, L., Stegemann, J.P. 2009. Extraction of High Quality RNA from Polysaccharide Matrices using Cetlytrimethylammonium Bromide. Elsevier Ltd, Biomaterials, 31: 12-16.

Yilmaz, Y., Toledo, R.T. 2004. Major flavonois in grape seeds and skins: antioxidant capacity of catechin, epicatechin and gallic acid. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 52(2): 255- 260.

# Investigation of two effective methods in extracting genomic RNA in commercial grape cultivars

Bahareh Ghorbani[1*], Roghaieh Najafzadeh[2]
[1]Ph.D. in Horticulture, Faculty of Agriculture and Natural Resources, Urmia University.
[2]Associate Professor Department of Horticulture and Biotechnology, Urmia University, Miandoab Branch.
**Corresponding Author: ghorbani.bahareh@ymail.com*

**Abstract**

In molecular studies, RNA extraction is a very important step and the results of other tasks such as PCR and Real Time-PCR depend on the quantity and quality of RNA. RNA extraction in different plants requires a specific protocol of the same plant and varies depending on the amount of carbohydrates, secondary metabolites and phenolic compounds. Grapes have many phenolic compounds and the presence of these compounds in the extraction plant has made it difficult. This article compares two common extraction methods RNX$^{TM}$(Plus), CTAB in two grape cultivars. The aim is to identify the best extraction method in Rish Baba and Yaghuti grape cultivars and evaluate its quantity and quality. The results showed that the CTAB method has a higher quality and quantity than the RNX$^{TM}$ (Plus) method in Rish Baba cultivar if it uses non-contaminated compounds. This can be due to the high washing power of polysaccharide and phenolic compounds.

***Keywords:*** CTAB, Grapes, PCR, RNA extraction, RNX$^{TM}$(Plus).