مقایسه روش‌های مختلف استخراج RNA ژنومی از گیاه دارویی بومادران (*Achillea millefolium*)

مریم جاودان اصل[۱]، حمید رجبی معماری[۲]*، داریوش نباتی احمدی[۳] و افراسیاب راهنما قهفرخی[۴]

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد زراعت و اصلاح نباتات، دانشگاه شهید چمران اهواز

۲*- **نویسنده مسئول:** استادیار، گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی دانشگاه شهید چمران اهواز (memary2004@yahoo.com)

۳- استادیار، گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی دانشگاه شهید چمران اهواز

۴- استادیار، گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی دانشگاه شهید چمران اهواز

تاریخ دریافت: ۱۳۹۳/۰۲/۲۰ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۴/۱۲/۱۲

چکیده

در مطالعات مولکولی، استخراج RNA یک مرحله بسیار مهم به شمار می‌رود و نتایج کارهای بعدی مانند Real-TIME PCR و RACE PCR به کیفیت و کمیت RNA استخراج شده بستگی دارد. تعدادی روش استاندارد استخراج RNA کل از بافت گیاه که برای گیاهان عادی مؤثر هستند، در دسترس می‌باشد، اما استخراج RNA کل در گیاهان با سطوح بالای کربوهیدرات و متابولیت‌های ثانویه مانند ترکیبات فنولی مشکل می‌باشد. بومادران از گیاهان دارویی و صنعتی ارزشمند در مراتع ایران است که حاوی سطوح بالایی ار متابولیت‌های ثانویه می‌باشد ولی تاکنون روش مناسبی جهت استخراج RNA کل از آن معرفی نگردیده است. این پژوهش با هدف شناسایی بهترین روش از بین سه روش استخراج RNA کل شامل استخراج با بافر (RNX^{TM}(-Plus، لیتیم‌کلراید و فنل-کلروفورم از بافت‌های گل و برگ بومادران انجام گردید. نتایج نشان داد که از بین سه روش، RNA استخراج شده با روش فنل-کلروفورم دارای کمیت و کیفیت بالایی (با طول موج ۲۶۰/۲۸۰) در محدوده قابل قبول ۲-۱/۸ می‌باشد. این موضوع به دلیل حذف پلی‌ساکاریدها و متابولیت‌های ثانویه به‌ویژه پلی‌فنل‌ها از محتویات سلولی بافت گیاه موجب استخراج بهتر RNA می‌گردد. به همین دلیل این روش جهت استخراج RNA از این گیاه ارزشمند در مطالعات بعدی پیشنهاد می‌گردد.

کلید واژه‌ها : بومادران، استخراج RNA، فنل-کلروفورم، لیتیم‌کلراید، بافر (RNX^{TM} (-Plus.

مقدمه

با وجود تنوع بیولوژیکی و شیمیایی زیاد در گیاهان، تاکنون هیچ روش عمومی استخراج RNA در دسترس نمی‌باشد (Gonzalez-Mendoza *et al.*, 2008؛ Jones *et al.*, 1997). از آنجایی که گونه‌های مختلف و بافت‌های متفاوت گیاهان، رفتار متفاوتی در طول استخراج RNA (و یا DNA) برای استفاده در مطالعات مولکولی دارند، از این رو روش‌های مختلفی برای استخراج RNA ابداع گردیده است (MacRae, 2007).

جداسازی RNA کل گیاه می‌تواند مشکل و زمان بر باشد (Wadsworth *et al.*, 1998). زیرا این روش‌ها با مشکلاتی مانند وجود مقادیر زیاد پلی‌ساکارید، سطوح زیادی از آنزیم RNase، انواع مختلف ترکیبات فنولی مانند تانن‌ها، غلظت کم اسید نوکلئیک (مقدار زیاد آب)، بافت‌هایی مانند لیگنین (چوب)، که تجزیه آن مشکل است و غیره مواجه می‌باشند. به‌علاوه روش‌های نمونه‌برداری، با توجه به

این‌که بافت‌های مورد استفاده از طیف گسترده‌ای از انواع سلول و کارکرد تشکیل شده‌اند، می‌تواند روی میزان بازدهی و کاهش تجزیه RNA، در استخراج اثرگذار باشد (MacRae, 2007).

روش‌های متفاوتی برای استخراج RNA ژنومی کل در گونه‌های مختلف گیاهان پیشنهاد گردیده است، به عنوان مثال از روش فنل-کلروفورم برای استخراج RNA از گیاهانی مثل مانگو؛ ذرت؛ و سویا استفاده شده است (Lopez-Gomez and Gomez-Lim, 1992؛ Wadsworth *et al.*, 1998؛ Ahangaran *et al.*, 2009؛ Wang and Ghabrial, 2002). هم‌چنین برای استخراج RNA از گیاهانی مانند گیاه مدل آرابیدوپسیس؛ نارگیل؛ و گیاه *Aeluropus littoralis*؛ از روش ترایزول[1] و جهت استخراج RNA از گیاه *Fritillaria unibracteata*؛ و درختانی مانند کاج از روش CTAB استفاده گردیده است (MacRae, 2007؛ Cruz *et al.*, 2011؛ Nasiri *et al.*, 2011؛ Hou *et al.*, 2011؛ Chang *et al.*, 1993).

به دلیل ویژگی‌های خاص بافت‌های گیاهان دارویی که دارای سطوح مختلفی از متابولیت‌های ثانویه به‌ویژه پلی‌فنول‌ها می‌باشند، استخراج RNA از آن‌ها با کیفیت و کمیت مناسب جهت واکنش‌های زنجیره‌ای پلی‌مراز، با مشکلات زیادی همراه است (MacRae, 2007؛ Sharma *et al.*, 2002) و بسیاری از محققان باید زمان زیادی را صرف یافتن روشی مناسب برای استخراج RNA از گیاه مدنظرشان نمایند. هرچند روش‌های گوناگونی جهت استخراج RNA ژنومی از بافت‌های گیاهان دارویی مختلف صورت گرفته است، اما تا به‌حال گزارشی مبنی بر استفاده از چند روش استخراج RNA ژنومی از گیاه دارویی بومادران هزار برگ[2] و مقایسه و معرفی بهترین روش ارائه نشده است. بومادران از گیاهان خانواده گل‌ستاره‌ای‌ها[3] است که به‌طور خودرو در دشت‌ها، کنار جاده‌ها و نواحی کوهستانی نقاط مختلف ایران و اروپا می‌روید (Zargari, 1996). گل‌ها، برگ‌ها و پیکر رویشی بومادران خاصیت دارویی دارند. در ایران گیاه بومادران از اهمیت بسزائی در صنایع آرایشی، بهداشتی و دارویی برخوردار است. این گیاه در درمان اختلالات روده، معده، بیماری کبد و صفرا استفاده شده و علاوه برآن به‌عنوان داروی افزایش‌دهنده اشتها، درمان زخم و التهاب‌های پوستی استفاده می‌گردد (Benedek and Kopp, 2007). Tozyo و همکاران (۱۹۹۴) اعلام داشتند، عصاره گل‌های بومادران دارای تأثیر مثبت بر روی سلول‌های سرطانی می‌باشد. گیاه بومادران در بیماری‌های عصبی مانند ضعف اعصاب، هیستری، صرع و قولنج‌های تشنج‌آور اثر مفید دارد (Zargari, 1996).

فرآورده‌های مختلف بومادران اثرات ضد میکروبی، ضد التهاب، ضد تومور و خواص آنتی اکسیدانی نشان داده‌اند (Potrich *et al.*, 2010). دسترسی به RNA ژنومی با کیفیت مناسب جهت انجام کارهای مرتبط با مهندسی ژنتیک (مانند real-time PCR، Northern blot) از جمله نیازهای ضروری محققین است. جهت رسیدن به این هدف پارامترهای زیادی از جمله مواد شیمیایی مورد استفاده، هزینه‌ی انجام کار و هم‌چنین مدت زمان استخراج بسیار مهم است. با توجه به اهمیت بسیار گیاه ارزشمند بومادران، استخراج RNA مطلوب از این گیاه به‌منظور بررسی بیان ژن، مهندسی متابولیک و مطالعات بیولوژی مولکولی امری ضروری است. هدف از این تحقیق مقایسه روش‌های استخراج با بافر RNX^{TM}(-Plus)، لیتیم‌کلراید و فنل-کلروفورم و انتخاب بهترین گزینه برای استخراج RNA ژنومی با کیفیت و کمیت مطلوب در گیاه بومادران هزار برگ می‌باشد.

1- Trizol
2- Achillea millefolium
3- Asteraceae

مواد و روش‌ها

موادگیاهی

نمونه‌های گل و برگ بومادران (*Achillea millefolium*) مورد استفاده در این تحقیق از باغ گیاه‌شناسی دانشکده داروسازی دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور در مرحله گلدهی جمع‌آوری گردید. نمونه‌ها پس از برداشت در فویل آلومینیوم بسته‌بندی 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 کل از بافت گل و برگ گیاه بومادران

به‌منظور حذف آنزیم RNase قبل‌از شروع استخراج RNA، کلیه وسایل مربوطه از قبیل تیوب، هاون و فالکون، دو مرتبه به‌مدت۲۰ دقیقه در دمای ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد و فشار ۱/۲ بار[1]، اتوکلاو شدند تا به‌طور کامل استریل شوند. تمام محلول‌های مورد استفاده از قبیل اتانول ۷۵ درصد با آب تیمار شده با DEPC (به نسبت ۱ به ۱۰۰۰) تهیه شدند. در ابتدا برای به‌کارگیری همه روش‌های استخراج، ۱۰۰ میلی‌گرم از بافت گل و برگ بومادران را به وسیله نیتروژن مایع، درون هاون چینی دارای دمای پایین و استریل، پودر نموده و به تیوب های ۲ میلی‌لیتری سرد انتقال داده شد.

روش استخراج RNA کل با استفاده از لیتیم کلراید

در این روش RNA کل نمونه های گل طبق روش Channuntapipat و همکاران (۲۰۰۱) استخراج شد. در ابتدا برای تهیه بافر لیتیم‌کلراید، مواد لازم طبق جدول (۱) با آب مقطر به حجم ۱ لیتر رسانده شد، آن‌گاه مراحل استخراج RNA به‌شرح زیر انجام گرفت. ۱۰۰۰ میکرولیتر بافر لیتیم‌کلراید و ۸۰۰ میکرولیتر از مخلوط فنل اشباع با بافر تریس (Tris-HCl، pH=۸) به‌اضافه کلروفرم و ایزوآمیل الکل به‌ترتیب به‌نسبت ۱:۲۴:۲۵ و ۱۰ میکرولیتر مرکاپتواتانول[2] به هر نمونه پودر شده (۱۰۰ میلی‌گرم) در تیوب اضافه گردید. مخلوط حاضر به‌مدت یک دقیقه ورتکس و سپس به‌مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد با ۱۴۰۰۰ دور در دقیقه (rpm) سانتریفیوژ شد. مایع روشناور به میکروتیوب ۲ میلی‌لیتری جدید منتقل شد و هم‌حجم آن لیتیم‌کلراید ۴ مولار افزوده شد. نمونه‌ها به‌مدت ۲ ساعت در فریزر ۲۰- درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند. نمونه‌ها به مدت ۱۵ دقیقه با ۱۴۰۰۰ دور در دقیقه و دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ گردیدند. سپس رسوب حاصل در ۴۰۰ میکرولیتر آب مقطر استریل، دو برابر حجم، اتانول ۷۰ درصد سرد به مقدار۸۰۰ میکرولیتر و ۴۰ میکرولیتر استات سدیم[3] سه مولار با pH =۵/۴ حل شد. تیوب‌ها به مدت ۱۵ دقیقه در ۱۴۰۰۰ دور در دقیقه و دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ شدند. سپس مایع روشناور دور ریخته شد و رسوب با اتانول ۷۰ درصد سرد شستشو داده شد و به مدت ۵ دقیقه با ۴۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شد. پس از خارج کردن مایع روشناور و خشک شدن تیوب‌ها، رسوب حاوی RNA در ۴۰ میکرولیتر آب مقطر استریل تیمار شده با DEPC حل و برای استفاده طولانی مدت به فریزر ۸۰- درجه سانتی‌گراد منتقل گردید.

استخراج RNA کل با استفاده از روش فنل-کلروفرم

در این روش استخراج RNA کل نمونه‌های گل و برگ بومادران طبق روش Wang and Ghabrial (۲۰۰۲) صورت گرفت. برای تهیه بافر استخراج، مواد لازم طبق جدول (۲) استفاده گردید. این مواد را در آب تیمار شده با DEPC حل نموده و pH آن با استفاده از اسید کلریدریک ۱ مولار و سود[4] و دستگاه pH سنج به ۹ رسانده شد. ۳۰۰ میکرولیتر بافر عصاره‌گیری ذکرشده

1- Bar

2- Mercaptoethanol

3- NaOAc

4- NaOH

در بالا به میکروتیوب حاوی ۰/۱ گرم بافت گل بومادران پودر شده اضافه شد. به محتویات میکروتیوب ۳۰۰ میلی‌لیتر فنل کالیبره شده با بافر TE که pH آن ۸-۷ بود (ساخت شرکت سیناژن) اضافه‌گردید و تیوب به‌آرامی چندبار سروته‌شد. سپس ۱۵۰ میکرولیتر کلروفرم و ۶ میکرولیتر ایزوآمیل‌الکل اضافه نموده (نسبت ۱:۲۴)، میکروتیوب چند بار سروته گردید. میکروتیوب به مدت ۵ دقیقه در فریزر نگهداری و سپس به مدت ۴ دقیقه در ۱۳۰۰۰ دور در دقیقه و با دمای ۴ درجه سانتی‌گراد با استفاده از دستگاه، سانتریفیوژ شد. در این حالت سه فاز تشکیل گردید (شکل ۱). مایع روشناور به‌آرامی از سطح رسوب جدا شد و به یک میکروتیوب استریل جدید منتقل و در صورت شفاف نبودن دوباره فنل-کلروفرم ایزوآمیل الکل اضافه و پس از ۵ دقیقه ماندن در فریزر مجدداً سانتریفیوژ گردید. پس از انتقال مایع رویی شفاف به یک میکروتیوب جدید ۲-۱/۵ برابر حجم مایع رویی اتانول مطلق سرد و ۰/۱ حجم مایع رویی استات سدیم ۳ مولار با pH= ۵ اضافه گردید. میکروتیوب به‌مدت یک ساعت در فریزر قرار داده شد (می‌توان در صورت کمبود وقت در این مرحله یک شب میکروتیوب را در فریزر نگه داشت) تا RNA رسوب کند. پس از بیرون آوردن میکروتیوب از فریزر، به مدت ۱۶ دقیقه در ۱۳۰۰۰ دور در دقیقه و دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ گردید. پس از حذف مایع روشناور، با اضافه کردن ۱ میلی لیتر اتانول ۷۰ درصد سرد رسوب شسته شد، سپس میکروتیوب‌های حاوی اتانول به‌مدت ۴ دقیقه با ۱۳۰۰۰ دور در دقیقه ودمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ گردید. مجدداً مایع روشناور حذف و میکروتیوب‌ها در زیر هود قرار گرفت تا اتانول کاملاً تبخیر و میکروتیوب عاری از آن گردد. در این حالت RNA رسوب یافته‌است و به صورت گلوله سفیدی دیده می‌شود. در نهایت ۴۰-۲۰ میکرولیتر آب مقطراستریل یا آب تیمار شده با DEPC به رسوب RNA اضافه و رسوب در آب کاملاً حل گردید و نمونه RNA استخراج شده برای استفاده‌های بعدی در فریزر ۸۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد.

جدول ۱- مواد مورد استفاده در تهیه ۲۵ میلی‌لیتر بافر لیتیم کلراید

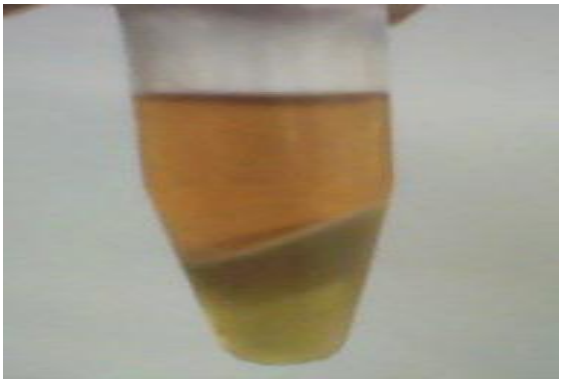
Table 1. Reagents for preparation of 25 ml of lithium chloride buffer

میزان مورد نیاز Quantity	غلظت مورد استفاده Concentraction	مواد لازم Reagents
۰/۳۹۴گرم	۰/۱ مولار pH ۸ =	Tris-HCl
۰/۱۰۵ گرم	۰/۱ مولار	LiCl
۰/۰۹۳ گرم	۰/۰۱ مولار pH ۸ =	Ethylene Diamine Tetraacetic Acid (EDTA)
۰/۲۵ میلی‌لیتر	۱٪ حجمی	Sodium Dodecyl Sulfate (SDS)
۱/۲۵ میلی‌لیتر	۵٪ حجمی	Polyvinyl Pyrrolidine (PVP)
۰/۵۰ میلی‌لیتر	۲٪ حجمی	Sodium Sulfite (Na_2So_3)

جدول ۲- مواد مورد استفاده در تهیه ۵۰ میلی‌لیتر بافر استخراج به روش فنل-کلروفورم

Table 2. Reagents for preparation of 50 ml of extraction buffer by phenol-chloroform method

میزان مورد نیاز Quantity	غلظت مورد استفاده Concentraction	مواد لازم Reagents
0.375 g	0.1 M	Glycine
0.292 g	0.1 M	NaCl
0.186 g	0.1 M	EDTA
0.50 ml	0.1 v/v	Mercaptoethanol
0.50 ml	1 % v/v	SDS



شکل ۱- تشکیل ۳ فاز در استخراج RNA
Fig. 1. Formation of three phases in RNA extraction

استخراج RNA به روش RNX^{TM}(-Plus)

با استفاده از بافر RNX^{TM}(-Plus) (شرکت سیناژن)، RNA طبق دستورالعمل زیر استخراج شد: به میکروتیوب ۲ میلی‌لیتری حاوی ۱۰۰ میلی‌گرم بافت پودر شده، ۱۰۰۰ میکرولیتر از محلول استخراج RNX^{TM}(-Plus) سرد اضافه‌گردید. ۲۰۰ میکرولیتر کلروفورم به میکروتیوب حاوی بافت هموژنیزه‌شده اضافه شد. میکروتیوب۱۰- ۵ ثانیه ورتکس شد تا بافت گیاهی کاملاً هموژنیزه شود و به مدت ۵ دقیقه در دمای اتاق قرار داده شد. به مدت ۱۵ ثانیه میکروتیوب با دست به آرامی سروته شد (بدون ورتکس کردن). نمونه به مدت ۵ دقیقه روی یخ یا دمای ۴ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. نمونه به مدت ۱۵ دقیقه با سرعت ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ شد. پس از سانتریفیوژ، فاز روشناور به یک میکروتیوب ۱/۵ میلی‌لیتری جدید عاری از RNase انتقال داده شد، (بدون تخریب فاز میانی) و به میزان هم‌حجم آن ایزوپروپانول سرد به آن اضافه شد. میکروتیوب به آرامی سروته شد و به مدت ۱۵ دقیقه روی یخ قرار داده شد. نمونه به مدت ۱۵ دقیقه با سرعت ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه در درمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ شد. سپس مایع روشناور دور ریخته شده و به میزان ۱ میلی‌لیتر اتانول ۷۵ درصد به آن اضافه شد و به‌آرامی ورتکس گردید تا رسوب از ته میکروتیوب جدا شود و سپس به مدت ۸ دقیقه با سرعت ۷۵۰۰ دور در دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ شد. پس از سانتریفیوژ، مایع روشناور دور ریخته شد و به‌منظور خشک شدن رسوب به‌مدت کم در دمای اتاق گذاشته شد. (در صورت خشک شدن کامل، انحلال‌پذیری رسوب کاهش می‌یابد). رسوب در ۵۰ میکرولیتر آب تیمار شده با DEPC حل شد. برای حل‌شدن کامل RNA میکروتیوب به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۶۰-۵۵ درجه سانتی‌گراد در حمام آب گرم قرار داده شد.

تیمار DNase برای حذف آلودگی ژنومی در RNA

RNAی کل استخراج‌شده ممکن‌است دارای آلودگی DNA باشد. درنتیجه قبل از انجام RT-PCR و یا RACE PCR و غیره حتماً باید آلودگی حذف گردد. به‌منظور حذف DNA از RNA استخراج‌شده از آنزیم DNase شرکت Fermentas آلمان طبق دستورالعمل موجود در کیت استفاده شد.

بررسی کیفیت و کمیت RNA استخراجی

RNA استخراج شده از عصاره گل و برگ طی فرآیند خالص‌سازی و جداسازی دارای ناخالصی بوده که موجب کاهش غلظت آن و عدم واکنش با آنزیم‌های همانندسازی می‌شود. بنابراین برای تعیین کیفیت و کمیت RNA استخراجی از دو روش الکتروفورز ژل آگارز و اسپکتروفتومتر استفاده شد. به‌منظور بررسی

کیفیت RNA استخراج‌شده از ژل آگارز ۱ درصد استفاده شد. مقدار پنج میکرولیتر از RNA با دو میکرولیتر بافر بارگذاری[1] مخلوط شد و در داخل چاهک تزریق گردید والکتروفورز با ولتاژ ۹۰ به مدت ۳۰ دقیقه انجام شد. سپس توسط دستگاه ژل داکیومنتیشن[2] به وسیله پرتو فرابنفش باند RNA مشاهده و تصویربرداری انجام شد. هم‌چنین بررسی وجود RNA در محلول و اندازه‌گیری غلظت آن به روش اسپکتروفتومتری که راحت‌ترین روش بررسی کیفیت و غلظت RNA است، انجام گردید. ابتدا دستگاه با استفاده از ۱۰۰ میکرولیتر آب مقطر (حلال RNA) کالیبره شد. زمانی‌که در طول موج‌های $A_{۲۶۰}$ و $A_{۲۸۰}$ دستگاه عدد صفر را نشان دهد، کالیبره شده است. پس از کالیبره‌کردن دستگاه، داخل کووت به نسبت ۹۸ میکرولیتر آب مقطر استریل و ۲ میکرولیتر از RNA ژنومی ریخته و با سمپلر به‌آرامی مخلوط شد (باید دقت شود که RNA نشکند) و در طول موج ۲۶۰/۲۸۰ نانومتر مورد آزمایش قرار گرفت و چگالی نوری[3] تعیین گردید. حداکثر جذب نوری توسط اسیدهای نوکلئیک (RNA) در طول موج ۲۶۰ نانومتر است. اگر نسبت جذب نوری $A_{۲۶۰}/A_{۲۸۰}$ در محدوده ۲-۱/۸ باشد، جذب نور صرفاً توسط اسیدهای نوکلئیک صورت گرفته و نشانگر خلوص بالای اسید نوکلئیک است، پس RNA از کیفیت مطلوبی برخوردار است و می‌توان در کارهای بعدی استفاده نمود (Gonzalez-Mendoza *et al.*, 2008). نسبت‌های کمتر از ۱/۸ نمایان‌گر این است که نمونه‌ها از لحاظ پروتئین، فنل و یا دیگر جذب کننده‌های اشعه ماورای بنفش ناخالصی داشته‌است. نسبت‌های بیشتر از ۲، نشان‌دهنده آلودگی DNA است و باید از آنزیم DNase استفاده شود.

1- Loading Buffer
2- Gel Documentation
3- Optical Density (OD)

نتایج و بحث

RNA استخراجی از بافت‌های گل و برگ بومادران با بارگذاری بر روی ژل آگارز ۱ درصد کیفیت‌یابی شدند. از بین سه روش مورداستفاده، در نتایج مربوط به روش فنل-کلروفورم، وجود باندهای مجزای مربوط به ۲۸S و۱۸S ریبوزومی که در شکل (۲) به‌وضوح و بدون تخریب و شکستگی و به‌صورت سالم و یکپارچه نشان داده شده‌اند، وجود اسمیر بین دو باند ۲۸S و۱۸S و هم‌چنین دو برابر بودن ضخامت باند ۲۸S نسبت به باند ۱۸S حاکی از بالا بودن کیفیت RNA استخراج شده دارد. البته گاهی میزان بالای RNA استخراج شده و وجود RNAهای خرد شده مانع از مشاهده واضح باندها می‌شود. به‌دلیل متفاوت بودن اندازه mRNAها، این نوع RNAها به‌وضوح بر روی ژل قابل مشاهده نبوده و به‌صورت اسمیر در بین باندهای مربوط به RNAهای ریبوزومی دیده می‌شوند. نتایج به‌دست آمده از روش اسپکتروفتومتری که غلظت و کیفیت نمونه‌ها پس از رقیق شدن در طول موج ۲۶۰ نانومتر اندازه‌گیری شده، با یکدیگر مقایسه گردیدند.

برای محاسبه‌ی غلظت RNA استخراج شده از فرمول زیر استفاده شد.

$$X_{ng/\mu l} = OD_{۲۶۰} \times ۵۰$$

(X = غلظت RNA تک‌رشته‌ای در نمونه)

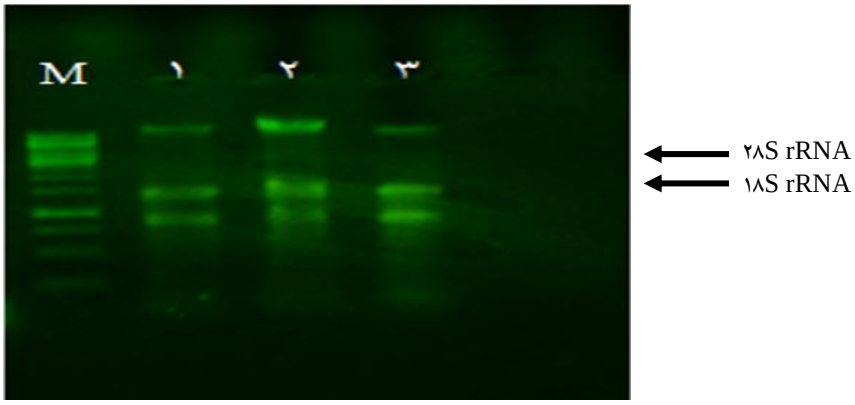
کیفیت RNA استخراجی توسط روش‌های لیتیم کلراید، RNX^{TM}(-Plus)، فنل-کلروفرم به‌ترتیب ۱/۸۴، ۱/۹۷، ۱/۹۳ نانوگرم بر میکرولیتر بود. این نتایج نشان داد که روش استخراجی با بافر RNX^{TM}(-Plus) دارای بالاترین کیفیت RNA استخراج‌شده را در بین این سه روش است. غلظت RNAهای استخراج‌شده نیز محاسبه گردید که به ترتیب ۱۷۱۵، ۲۱۲۰ و ۲۹۰۵ نانوگرم بر میکرولیتر بود. روش لیتیم کلراید دارای کمترین میزان کل RNA استخراجی بود. هر چند روش

استخراج با بافر RNX^{TM}(-Plus) میزان کیفیت معقولی برای ادامه کار و ساخت cDNA و به دنبال آن انجام روش PCR را دارا بود، ولی روش فنل- کلروفرم با داشتن کیفیت خوب و هم‌چنین، میزان RNA استخراج شده بالا انتخاب شد و تنها RNA استخراج شده از این روش برای مراحل بعدی تحقیق مورد استفاده قرار گرفت. بهترین حالت جدا شدن RNA مطابق شکل (۱) بود. این حالت شامل سه فاز کاملاً مجزا از یکدیگر است که فاز اول، مایع روشناور محتوی اسید نوکلئیک (فاز شفاف)، فاز دوم رسوب حاصل از تجمع کربوهیدرات، پروتئین‌ها، رنگدانه‌ها و سایر بقایای سلولی و فاز سوم که در انتها قرار دارد شامل فنل-کلروفرم ایزوآمیل‌الکل است. درصورت اختلاط این فازها با فاز روشناور شفافیت این فاز کمتر شده و آلودگی‌های حاصل مانع از انجام درست بقیه مراحل تحقیق می‌شوند. در صورت آلودگی فاز رویی در روش فنل-کلروفرم، می توان با اضافه‌کردن مجدد مخلوط فنل-کلروفرم ایزوآمیل الکل و پس از ۵ دقیقه قرار دادن در فریزر دوباره عمل سانتریفیوژ را انجام داد تا مایع روشناور شفافی به‌دست آید. پوست دست انسان همواره آغشته به RNAase است و لذا کلیه تجهیزات آزمایشگاهی به این آنزیم آلوده می‌شوند. بنابراین هنگام کار با RNA استفاده از دستکش موجب افزایش راندمان کار می‌شود. در کل نمونه‌های تازه گل و برگ کیفیت بالاتری از خود طی فرآیند کیفیت سنجی توسط اسپکتروفتومتر و ژل الکتروفروز نشان دادند. در طی مشاهدات انجام گرفته مشخص شد، کیفیت RNA استخراجی با توجه به چگالی نوری اندازه‌گیری شده آن‌ها توسط اسپکتروفتومتر در نمونه‌های یخ‌زده به مراتب پایین‌تر از نمونه‌های تازه بوده و میزان تجزیه‌پذیری RNA به‌ازای هر بار ذوب شدن افزایش و میزان چگالی نوری کاهش می‌یابد. نتایج متعدد ژل هم نشان داد، افزایش عمر یخچالی نمونه‌های یخ‌زده و ذوب و منجمد شدن متوالی آن‌ها باعث کاهش ضخامت باندهای مشاهده شده روی ژل و گاهی عدم وجود آن می‌شود. برای حذف پلی‌ساکاریدها و متابولیت‌های ثانویه به ویژه پلی‌فنل‌ها از محتویات سلولی بافت گیاه، استخراج RNA با فنل-کلروفورم روش بسیار مؤثری است (Wang *et al.*, 2005). مرکاپتواتانول به کار رفته در این روش برای جلوگیری از فعالیت RNase به وسیله احیا پیوندهای دی‌سولفیدی (این پیوندهای دی‌سولفیدی برای فعالیت RNase ضروری هستند) و به‌علاوه برای جلوگیری از اکسیداسیون نمونه به‌کار رفته و به‌عنوان آنتی‌اکسیدان از اکسیده‌شدن مواد پلی‌فنلی که باعث قهوه‌ای شدن رسوب[1] RNA استخراج شده می‌گردد، جلوگیری می‌کند (Wang *et al.*, 2005). هم‌چنین می‌توان اثر بازدارندگی فنل را با شستشوی خوب اسید نوکلئیک و حذف فنل از بین برد و از RNA با کیفیت برای فرآیند PCR سود جست.

قابل ذکر است که EDTA مورد استفاده در این روش، از فعالیت یون‌های منیزیم که به‌عنوان کوفاکتور جهت فعالیت آنزیم‌های نوکلئاز هستند، جلوگیری می‌کند و ماده SDS به‌عنوان حذف‌کننده‌ی لیپیدهای غشایی، شکستن دیواره سلولی و دیواره هسته، مطرح بوده و هم‌چنین به جدا شدن ترکیبات پروتئینی از RNA کمک می‌کند.

لازم به ذکر است که RNA استخراج شده از گل و برگ هر دو دارای کیفیت و کمیت مناسبی بودند، ولی RNA استخراجی از گل دارای کیفیت و کمیت بیشتری نسبت به برگ بود و این به‌دلیل بیان بیشتر ژن‌های مورد نظر در اندام گل گیاه بومادران است. به همین جهت، RNA استخراج‌شده از گل برای ساخت cDNA مورد استفاده قرار گرفت.

1- Pellet



شکل ۲- نتایج RNA استخراج شده روی ژل آگارز بیانگر باندهای ۲۸s و۱۸s، چاهک ۱: RNA برگ، چاهک‌های ۲و ۳: RNA گل، چاهک M: مارکر مولکولی kb ۱ شرکت فرمنتاز

Fig. 2. Results of extracted RNA on agarose gel shows 18s and 28s bands, Well 1: Leaf RNA, wells 2 and 3: Flower RNA

به‌طورکلی نتایج حاصل از این پژوهش نشان می‌دهد که در میان سه روش انجام‌شده، روش فنل-کلروفورم، روش مناسب برای استخراج RNA، از گیاه بومادران است. در این روش مقدار RNA ژنومی بالا برای PCR، آنالیز بیان ژن، real-time PCR و تجزیه و تحلیل‌های مولکولی به‌دست می‌آید. مجموعه عوامل فوق باعث گردیدند تا RNA ژنومی استخراج شده از برگ‌ها و گل‌های گیاه بومادران از کیفیت و کمیت مناسبی برخوردار باشد.

نتیجه‌گیری

در کل می‌توان گفت روش فنل-کلروفورم جهت استخراج RNA با کیفیت و کمیت مطلوب از نمونه‌های برگی و گل گیاه بومادران بهترین و کم‌هزینه‌ترین روش استخراج RNA در مقایسه با سایر روش‌ها محسوب گردید.

References

1. Ahangaran, A., Mosahebi Mohammadi, G., Koohi Habibi, M., Khezri1, S., and Shahraeen, N. 2009. Use of rapid serological and nucleic acid-based methods for detecting the soybean mosaic virus. Journal of Agricultural Science and Technology, 11: 91-97.

2. Benedek, B. and Kopp, B. 2007. *Achillea millefolium* L. revisited: Recent findings confirm the traditional use. Wien Med Wochenschr, 157(13-14): 312-314.

3. Chang, S., Puryear, J., and Cairney, J. 1993. A simple and efficient method for isolating RNA from pine trees. Plant Molecular Biology Reporter, 11(2): 113-116.

4. Channuntapipat, C., Sedgley, M., and Collins, G. 2001. Sequences of the cDNAs and genomic DNAs encoding the S_1, S_7, S_8, and S_f alleles from almond, *Prunus dulcis*. Theoretical and Applied Genetics, 103(6-7): 1115-1122.

5. Cruz, R.Y., Laude, R.P., Diaz, M.G., Laurena, A.C., Mendioro, M.S., and Mendoza, E.M. 2011. Gene for actin is a suitable internal reference for relative rt-pcr based expression analysis in normal and mutant makapuno endosperms of coconut (*Cocos nucifera* L.). Philippine Agricultural Scientist, 94(2): 118-123.

6. Gonzalez-Mendoza, D., Quiroz Morenob, A., and Zapata-Perez, O. 2008. An improved method for the isolation of total RNA from *Avicennia germinans* leaves. Zeitschrift Fur Naturforschung, 63(3): 124-126.

7. Hou, P., Xie, Z., Zhang, L., Song, Z., Mi, J., He, Y., and Li, Y. 2011. Comparison of three different methods for total RNA extraction from Fritillaria unibracteata: A rare Chinese medicinal plant. Journal of Medicinal Plants Research, 5(13), 2834-2838.

8. Jones, C.S., Iannetta, P.P., Woodhead, M., Davies, H.V., McNicol, R.J., and Taylor, M. A. 1997. The isolation of RNA from raspberry (*Rubus idaeus*) fruit. Molecular Biotechnology, 8(3), 219-221.

9. Lopez-Gomez, R. and Gomez-Lim, M.A. 1992. A method extracting intact RNA from fruits rich in polysaccharides using ripe mango mesocarp. Hort Science, 27(5): 440-442.

10. MacRae, E. 2007. Extraction of plant RNA. Methods in Molecular Biology, 353: 15-24.

11. Nasiri, N., Shokri, E., and Nematzadeh, G. 2011. Molecular cloning and characterization of vacuolar H^+-ATPase subunit C gene in halophyte plant, *Aeluropus Littoralis*. New Cellular and Molecular Biotechnology, 2(5): 15-23. [In Farsi]

12. Potrich, F.B., Allemand, A., da Silva, L.M., dos Santos, A.C., Baggio, C.H., Freitas, C.S., Mendes, D.A.G., Andre E., Werner, M.F., and Marques, M.C.A. 2010. Antiulcerogenic activity of hydroalcoholic extract of *Achillea millefolium* L.: Involvement of the antioxidant system. Journal of Ethno Pharmacology, 130(1): 85-92.

13. Sharma, A.D., Gill, P.K., and Singh, P. 2002. DNA isolation from dry and fresh samples of polysaccharide-rich plants. Plant Molecular Biology Reporter, 20(4): 415-415.

14. Tozyo, T., Yoshimura, Y., Sakurai, K., Uchida, N., Takeda, Y., Nakai, H., and Ishii, H. 1994. Novel antitumor sesquiterpenoids in *Achillea millefolium*. Chemical and Pharmaceutical Bulletin, 42(5): 1096-1100.

15. Wadsworth, G.J., Redinbaugh, M.G., and Scandalios, J.G. 1988. A procedure for the small-scale isolation of plant RNA suitable for RNA blot analysis. Analytical Biochemistry, 172(1): 279-283.

16. Wang, R.Y. and Ghabrial, S.A. 2002. Effect of aphid behavior on efficiency of transmission of soybean mosaic virus by the soybean-colonizing aphid, *Aphis glycines*. Plant Disease, 86(11): 1260-1264.

17. Wang, T., Zhang, N., and Du, L. 2005. Isolation of RNA of high quality and yield from *Ginkgo biloba* leaves. Biotechnology Letters, 27(9): 629-633.

18. Zargari, A. 1996. Medicinal plants. University of Tehran Press. 3: 106-113. [In Farsi]