

مقایسه روش‌های مختلف استخراج RNA کل از سه گونه آویشن غنی از ترکیبات فنولی و متابولیت‌های ثانویه

سمیه بهادر^۱، بابک ربیعی^{۲*} و سیدحسن حسنی کومله^۳

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه زراعت و اصلاح نباتات و بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشکده علوم کشاورزی، دانشگاه گیلان، گیلان

۲- نویسنده مسئول مکاتبات، استاد، گروه زراعت و اصلاح نباتات و بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشکده علوم کشاورزی، دانشگاه گیلان، گیلان

پست‌الکترونیک: rabiei@guilan.ac.ir

۳- استادیار، گروه بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشکده علوم کشاورزی، دانشگاه گیلان، گیلان

تاریخ دریافت: ۱۳۹۲/۱۱/۰۷ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۳/۰۲/۲۷

چکیده

گیاهان دارویی منبع غنی از مواد مؤثره برای تولید فراورده‌های دارویی هستند. جنس آویشن (*Thymus*) متعلق به خانواده نعناعیان است که بیش از ۱۸ گونه آن در نواحی مختلف ایران پراکنش دارند. اثرات دارویی این گیاه مربوط به ترکیبات مختلف از جمله مونوترپن‌های فنولی کارواکرول و تیمول است، اما این ترکیبات فنولی و متابولیت‌های ثانویه دیگر به‌عنوان مشکل اصلی استخراج RNA مناسب برای تجزیه و تحلیل بیان ژن و مهندسی ژنتیک محسوب می‌شوند. هدف از انجام این پژوهش، مقایسه روش‌های مختلف استخراج RNA و معرفی یک روش مناسب جهت استخراج RNA از سه گونه آویشن غنی از ترکیبات فنولی بود. از این رو، هفت دستورالعمل استخراج RNA شامل سه روش، دو کیت و دو بافر تجاری استخراج RNA از نظر کمیت و کیفیت RNA استخراج شده، ارزیابی و مقایسه شدند. به‌منظور ارزیابی کمیت و کیفیت RNA از خواندن جذب در طول موج ۲۶۰، ۲۸۰ و ۲۳۰ نانومتر، محاسبه نسبت جذب ۲۶۰/۲۸۰ و ۲۶۰/۲۳۰، الکتروفورز ژل آگارز، واکنش‌های RT-PCR و Real-Time PCR استفاده شد. از بین روش‌های مورد مطالعه، کمیت و کیفیت RNA استخراج شده با روش فنل/SDS نسبت به روش‌های دیگر از جمله TRIzol[®] برای هر سه گونه آویشن مناسب‌تر بود. از محاسن این روش کوتاه بودن زمان استخراج و ساخت دستی بافر اشباع با تریس بود که در گزارش‌های قبلی به‌شکل آماده خریداری شده است. در نهایت، روش فنل/SDS تغییر یافته برای استخراج RNA از برگ‌های غنی از ترکیبات فنولی آویشن معرفی شد.

واژه‌های کلیدی: آویشن، استخراج RNA، فنل، SDS، متابولیت‌های ثانویه.

مقدمه

تأکید قرار گرفته است (Zargari, 1990). حدود ۲۱۵ گونه از جنس آویشن در سراسر جهان رشد می‌کند و ۱۸ گونه مختلف این جنس به صورت بومی در قسمت‌های مرکزی کشور ایران پراکنش دارد (Jamzad, 2009). کاربرد آویشن در ابعاد وسیع داروسازی، غذایی و مبارزه بیولوژیکی از جایگاه ویژه‌ای برخوردار است و در بین داروهای تولید شده در جهان، آویشن بعد از نعناع حائز رتبه دوم است

آشکارسازی سنتز متابولیت‌های ثانویه و مواد مؤثره مانند پلی‌ساکاریدها، پلی‌فنل‌ها و تانن‌ها در سطح مولکولی باعث توجه بسیاری از محققان به سمت این گیاهان شده است. گیاهان جنس آویشن از مهمترین گیاهان دارویی خانواده نعناعیان می‌باشند که در منابع معتبر از پیکر رویشی آن به‌عنوان دارو یاد شده است و خواص دارویی آن مورد

در مطالعه‌ای (Tattersall *et al.*, 2005) پانزده روش مختلف استخراج RNA از برگ انگور ارزیابی شد و روش تریس/کلراید لیتیم در حالی که زمان بر بود، به دلیل RNA با کمیت و کیفیت مناسب از برگ و ریشه پیشنهاد شد. در آزمایشی، روش CTAB با اندکی تغییرات جهت استخراج RNA از گیاه دارویی *Hippophae rhamnoides* به کار رفت و از RNA حاصل برای ساخت RT-cDNA Real-Time PCR استفاده شد (Ghangal *et al.*, 2009). در تحقیق دیگری از روش IHBT برای استخراج RNA از گیاهان دارویی غنی از متابولیت‌های ثانویه *Rheum australe* و *Arnebiaeuchroma* استفاده شد که در مقایسه با روش‌های مبتنی بر نمک‌های گوانیدینیوم (guanidinium thiocyanate)، بافر TRIzol[®] و کیت‌های استخراج RNA با عملکرد و کیفیت بسیار بهتری تولید کرد (Ghawana *et al.*, 2011).

در این پژوهش، هفت دستورالعمل مختلف استخراج RNA شامل سه روش، دو کیت و دو بافر استخراج از نظر کمیت و کیفیت و نیز زمان و هزینه استخراج در گیاه دارویی آویشن مورد مطالعه و مقایسه قرار گرفت و هدف از آن ارائه یک روش مناسب بود که بتواند ضمن استخراج RNA با کیفیت مطلوب و کمیت بیشتر، ترکیبات فنلی و متابولیت‌های ثانویه کمتری داشته و در زمان و هزینه‌ها نیز صرفه‌جویی نماید.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی و شرایط اجرای آزمایش

جمعیت‌های گیاهی مختلف آویشن از مناطق و ارتفاعات (۳۶۰۰-۱۵۰۰ متر) مختلف استان کرمان جمع‌آوری شد و پس از شناسایی دقیق، دو گونه *Thymus caramanicus* Jalas و *Thymus lancifolius* Celak که از نظر مواد مؤثره تفاوت بیشتری داشتند، انتخاب شدند. همچنین گونه اصلاح شده *Thymus vulgaris* L. از دانشکده کشاورزی دانشگاه شیراز تهیه شد. در نهایت از هر ۳ گونه قلمه‌های نیمه‌خشبی گرفته شد و در خاک حاوی دو چهارم ماسه‌بادی، یک چهارم پیت‌ماس و یک چهارم پرلیت و در شرایط گلخانه با دمای ۲۵-۲۲ درجه سانتی‌گراد ریشه‌دار شدند. سپس قلمه‌های ریشه‌دار به گلدان‌های با قطر دهانه ۲۳ سانتی‌متر و ارتفاع ۱۶ سانتی‌متر، حاوی سه چهارم خاک لومی-رسی

(Bikdelu, 2012). بنابراین، این گیاه می‌تواند گزینه مناسبی 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 متابولیسمی در سطح mRNA باشد. دسترسی به RNA با کمیت و کیفیت مطلوب از گیاه آویشن که دارای مقادیر فراوان ترکیبات پلی‌فنولی (تیمول و کارواکرول) و پلی‌ساکاریدی است، برای انجام تکنیک‌های فوق ضرورت دارد.

امکان ورود آلودگی‌های نسبتاً کم پلی‌ساکاریدی به فاز آبی باعث رسوب هم‌زمان آنها با RNA می‌شود و در مراحل بعدی کاربرد RNA تداخل ایجاد می‌کند (Wang & Stegemann, 2009). همچنین RNA با ترکیبات پلی-ساکاریدی و پلی‌فنلی کمپلکس تشکیل می‌دهد و پلیت-های RNA حاصل غیرقابل حل می‌شوند. رنگ یا حالت پلیت‌های RNA می‌تواند بیانگر آلودگی‌های مختلف باشد. مثلاً برخی به دلیل آلودگی پلی‌ساکاریدی حالت ژلاتینی دارند و یا پلیت‌های مایل به قرمز نشان‌دهنده آلودگی‌های پلی‌فنلی هستند (Sabir, 2012). در حالی که روش‌های زیادی برای استخراج RNA از گیاهان دارویی اختصاصی شده است، بسیاری از روش‌ها و کیت‌های تجاری (GeneJET Plant RNA Purification Mini Kit, TRIzol, RNAwiz و RNeasy Plant) برای جداسازی RNA از گیاهان دارویی مناسب نیستند و بسیاری از آنها برای گیاهانی مانند آرابیدوپسیس و برنج مناسب هستند (Sabir, 2012). اغلب ترکیبات فنولی و متابولیت‌های ثانویه گونه‌های دارویی، هم‌زمان با RNA رسوب می‌کنند و عملکرد و کیفیت RNA را تحت تأثیر قرار می‌دهند (Ghawana *et al.*, 2011). علاوه بر آن، ترکیبات فنولی مولکول RNA را در معرض هضم آنزیم-های RNase قرار می‌دهند و در نتیجه RNA را برای سنتز اولین رشته cDNA، RT-PCR، Real-Time PCR و غیره نامناسب می‌سازند. از این جهت روش‌های مختلف استخراج RNA باید آزمایش و بهینه شوند و در نهایت روشی انتخاب شود که سریع، ساده و اقتصادی بوده و آلودگی آن به مواد شیمیایی مورد استفاده کم باشد (Sabir, 2012).

۳۰۰ میلی گرم برگ منجمد شده به وسیله هاون چینی و در نیتروژن مایع پودر شد و بلافاصله ۱۰۰ میلی گرم از آن به لوله های سانتریفیوژ ۲ میلی لیتری حاوی ۱ میلی لیتر بافر گرم منتقل شد و پس از ۲۰ ثانیه ورتکس، به مدت ۲۵ دقیقه داخل حمام آب گرم با دمای ۶۵ درجه قرار گرفت و هر ۳-۴ دقیقه یک بار مرتب لوله ها سر و ته شدند، سپس محلول فوق به آرامی در دمای اتاق سرد شد. ۰/۱ میلی متر استات سدیم ۲ مولار که با استیک اسید خالص (۱۰۰ درصد) به $\text{pH}=4$ رسیده بود، به لوله ها اضافه شد و کاملاً مخلوط شد، سپس ۱ میلی لیتر فنل اشباع با آب اضافه شد و مجدد مخلوط شدند. در نهایت ۰/۲ میلی لیتر کلروفرم/ایزوامیل الکل (۱:۲۴) اضافه و ۱۰ ثانیه مخلوط شدند و به مدت ۱۵ دقیقه روی یخ قرار گرفتند. جداسازی فاز آبی از فاز آلی به وسیله سانتریفیوژ در 13000rpm و دمای ۴ درجه سانتی گراد به مدت ۱۵ دقیقه انجام شد. فاز آبی بدون برهم خوردن فاز میانی به لوله های سانتریفیوژ جدید منتقل شد و حجم مساوی کلروفرم/ایزوامیل الکل (۱:۲۴) به هر لوله اضافه و ۱۰ ثانیه ورتکس نرم شد و دوباره مثل مرحله قبل سانتریفیوژ انجام شد و فاز بالایی به لوله جدید منتقل شد. برای رسوب RNA، ۲ حجم اتانول ۷۵ درصد اضافه شد و مخلوط حاصل به مدت ۲ ساعت در دمای -80 قرار گرفت. برای جمع آوری پلیت RNA، لوله ها مثل مراحل قبل سانتریفیوژ شدند. شستشوی پلیت دو بار به وسیله اتانول ۷۵ درصد انجام شد و بعد پلیت زیر هود میکروبیولوژی خشک شد. برای جداسازی RNA از DNA ژنومی به پلیت حاصل ۹۰ میکرولیتر آب تیمار شده با DEPC و ۳۰ میکرولیتر نمک کلراید لیتیم (LiCl) ۸ مولار اضافه شد و ۳۰ دقیقه در دمای -20 قرار گرفت، سپس در 13000rpm و دمای ۴ درجه سانتی گراد، ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ شد. ۳۰ میکرولیتر آب تیمار شده با DEPC به پلیت تشکیل شده که بیشتر حاوی RNA است، اضافه شد و برای حل شدن پلیت ۱۰ دقیقه در حمام آب گرم با دمای ۵۵ درجه سانتی گراد قرار گرفت. فاز رویی که بیشتر حاوی DNA ژنومی بود، به لوله های سانتریفیوژ جدید منتقل شد و با استفاده از ایزوپروپانول، DNA رسوب داده شد.

۳۹ درصد رس، ۲۰ درصد سیلت و ۲۱ درصد شن) و یک چهارم خاک پیت ماس منتقل شدند و در اتاقک رشد مجموعه آزمایشگاه های دانشکده علوم کشاورزی دانشگاه گیلان با شرایط ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی با دمای ۲۰-۲۲ درجه سانتی گراد و رطوبت نسبی ۶۵-۶۰ درصد رشد کردند. برگ های جوان پنج میان گره انتهایی سه بوته از هر گونه مخلوط و بلافاصله در نیتروژن مایع منجمد شدند و تا زمان استفاده در دمای -80 درجه سانتی گراد نگهداری شدند.

استخراج RNA

تمام ظروف شیشه ای و پلاستیکی قبل از استفاده، دو بار اتوکلاو شدند. همه محلول های مورد نیاز جهت استخراج RNA به وسیله آب تیمار شده با DEPC (Diethyl Pyrocarbonate) تهیه شدند. هفت دستورالعمل استخراج RNA شامل CTAB تغییر یافته، SDS، فنل/ SDS تغییر یافته، کیت RNA GeneJET Plant RNA Purification Mini Kit (ساخت شرکت Thermo SCIENTIFIC)، کیت Simply P (ساخت شرکت Total RNA Extraction KIT (ساخت شرکت BioFlux)، بافر TRIzol[®] (ساخت شرکت Invitrogen) و بافر RNX- plusTM (ساخت شرکت سیناژن) مقایسه شدند. همه روش ها ۲-۳ بار تکرار شدند تا امکان مقایسه آنها وجود داشته باشد و نتایج ثابت و پایداری به دست آید.

روش SDS

استخراج با روش SDS مطابق روش Lock Chan و همکاران (۲۰۰۷) انجام شد.

روش CTAB تغییر یافته

بافر روش CTAB تغییر یافته بر مبنای روش Chomezynski و Sacchi (۲۰۰۶) و Ghangal و همکاران (۲۰۰۹)، حاوی ۲ درصد CTAB، تریس بیس ۱۰۰ میلی مولار ($\text{pH}=8$)، کلراید سدیم ۲ مولار و EDTA ۲۰ میلی مولار ($\text{pH}=8$) بود. یک درصد PVP (Polyvinylpyrrolidone) (وزنی / حجمی) و یک درصد بتا- مرکاپتواتانول قبل از استفاده به بافر گرم شده در دمای ۶۰ درجه اضافه شد.

بررسی RNA

کمیت و کیفیت (میزان آلودگی‌های پروتئینی و پلی-ساکاریدی) RNA ی استخراج شده به وسیله میزان جذب نمونه‌ها در ۲۶۰، ۲۸۰ و ۲۳۰ نانومتر و محاسبه نسبت‌های جذب ۲۶۰/۲۸۰ و ۲۶۰/۲۳۰ نانومتر، با استفاده از اسپکتوفتومتر مدل اپندورف بررسی شد. برای تشخیص عدم وجود شکستگی و سالم بودن RNA، مقدار یکسانی از RNA استخراج شده روی ژل آگارز ۱/۵ درصد حاوی اتیدیوم بروماید الکتروفورز شد. از آنجا که ساخت cDNA و واکنش PCR به آلودگی‌های مختلف RNA حساس است، بهترین روش استخراج با کیفیت و کمیت RNA مناسب، برای ساخت cDNA، واکنش PCR و Real-Time PCR انتخاب شد. ساخت cDNA مطابق دستورالعمل کیت سنتز cDNA (ساخت شرکت Thermo SCIENTIFIC)، همراه با یک واحد آنزیم رونوشت‌بردار معکوس و با استفاده از آغازگرهای الیگوتیمیدین (Oligo-dT₁₈) انجام شد. آلودگی DNA در روش‌های سریع غیرقابل اجتناب است، ولی از طریق تیمار RNA با آنزیم DNase قابل حل است. این مرحله یکی از مراحل معمول در روش‌های تجزیه و تحلیل و استخراج RNA است که قبل از ساخت cDNA و مطابق دستورالعمل بروشور همراه آنزیم انجام شد. صحت ساخت cDNA به وسیله انجام واکنش PCR و Real-Time PCR و با استفاده از آغازگرهای اختصاصی مربوط به ژن‌های مرجع *18srRNA* و *ovEF1alpha* و دو ژن اختصاصی *CYP71D180* و *CYP71D181* در دو تکرار انجام شد. ترکیبات واکنش شامل ۱۲/۵ میکرولیتر مسترمیکس (Real-Time Mastermix 2X)، ۰/۳ پیکومول در میکرولیتر از هر دو آغازگر، ۱ میکرولیتر cDNA الگو و در نهایت آب استریل به حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر اضافه شد. چرخه دمایی واکنش Real-Time PCR شامل ۱ مرحله واسرشت‌سازی اولیه در ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۷ دقیقه، ۴۰ چرخه واسرشت‌سازی در ۹۵ درجه به مدت ۳۰ ثانیه، ۶۰ درجه دمایی اتصال به مدت ۱ دقیقه، ۷۲ درجه بسط به مدت ۱ دقیقه بود. داده‌های حاصل جمع‌آوری و ثبت شد.

تجزیه‌های آماری

داده‌های حاصل در قالب طرح کاملاً تصادفی نامتعادل با ۲-۳ تکرار تجزیه شدند و مقایسه میانگین‌ها با آزمون LSD

روش فنل SDS/ تغییر یافته

بافر استخراج روش فنل SDS/ بر مبنای روش IHBT (Kingston, Ghawana *et al.*, 2011) و روش فنل SDS/ (Ghawana *et al.*, 2011) تغییر داده شد. بافر حاوی فنل اشباع با تریس بود که مطابق روش Sambrook و همکاران، (۱۹۸۹) و با استفاده از تریس (هیدروکسی) متیل آمینو متان ساخته شد و قبل از استفاده SDS ۱ درصد (وزنی/حجمی)، استات سدیم ۰/۳ مولار (وزنی/حجمی) و EDTA با غلظت نهایی ۰/۰۱ مولار از محلول استوک اصلی ۰/۵ مولار با pH=۸ به آن اضافه شد. ۱۰۰ میلی‌گرم برگ جوان به وسیله هاون چینی و در نیتروژن مایع کاملاً پودر شد و ۱ میلی‌لیتر بافر استخراج به آن اضافه شد. پودر گیاهی همراه با بافر یخ زده به وسیله هاون کاملاً مخلوط شد تا یک محلول کاملاً یکنواخت به دست آید. هشت صد میکرولیتر آب تیمار شده با DEPC اضافه شد و مجدداً به وسیله هاون کاملاً مخلوط شدند. سپس مخلوط حاصل به دو لوله سانتریفیوژ ۲ میلی‌متر منتقل داده شد و ۵ دقیقه در دمای اتاق قرار گرفت. ۲۰۰ میکرولیتر کلروفرم به هر لوله اضافه شد و ۱۰ دقیقه در دمای اتاق قرار گرفت. برای جداسازی فاز آبی از فاز آلی، به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ در ۱۳۰۰۰rpm و دمای ۴ درجه انجام شد. بدون برهم خوردن فاز میانی، فاز آبی برداشته شد و به لوله سانتریفیوژ جدید منتقل و ۰/۶ حجم ایزوپروپانول اضافه شد و ۲۵ دقیقه در دمای ۲۰- قرار گرفت. برای جمع‌آوری پلیت RNA، لوله‌ها مانند مراحل قبل سانتریفیوژ شدند. پلیت دو بار با اتانول ۷۵ درصد شستشو شد و زیر هود میکروبیولوژی، باقیمانده اتانول تبخیر شد. ۳۰ میکرولیتر آب تیمار شده با DEPC به پلیت اضافه شد و ۱۰ دقیقه داخل حمام گرم با دمای ۵۵ درجه قرار گرفت.

استخراج به وسیله دو کیت (GeneJET Plant RNA Purification Mini Kit و Simply P TotalRNA Extraction KIT) و دو بافر استخراج (TRIzol[®] و RNX[™] plus) مطابق دستورالعمل بروشور ارائه شده توسط شرکت‌های سازنده انجام شد.

برای بررسی اثر زمان نگهداری بافت گیاهی بر کمیت و کیفیت RNA، با استفاده از دو روش فنل SDS/ و CTAB تغییر یافته، از نمونه‌های تازه منجمد شده با ازت مایع، RNA استخراج شد و با نمونه‌های قبلی مقایسه گردید.

تغییر یافته و کیت Simply P TotalRNA Extraction KIT بود (جدول ۲). نتایج مقایسه میانگین‌ها با آزمون LSD نشان داد که روش فنل/ SDS در گونه گیاهی *T. caramanicus* Jalas. بیشترین مقدار RNA (۳/۸) میکروگرم در ۱۰۰ میلی‌گرم برگ تازه) را دارد و کمترین مقدار RNA (۰/۰۴) میکروگرم در ۱۰۰ میلی‌گرم برگ تازه) مربوط به روش GeneJET Plant RNA Purification Mini Kit و گونه *T. lancifolius* Celak. بود (شکل ۱). بعد از روش فنل/ SDS بیشترین مقدار RNA (۱/۹۵) میکروگرم در ۱۰۰ میلی‌گرم برگ تازه) از روش CTAB به دست آمد (جدول ۲). کمیت RNA استخراج شده به وسیله روش فنل/ SDS و CTAB از نمونه‌های برگ تازه منجمد شده (به ترتیب ۳/۲۶ و ۲/۲۳ میکروگرم در ۱۰۰ میلی‌گرم برگ تازه) بیشتر از نمونه‌های نگاه‌داری شده در دمای ۸۰- به مدت ۳۰ روز بود (به ترتیب ۳/۰۱ و ۱/۹۵ میکروگرم در ۱۰۰ میلی‌گرم برگ تازه) (جدول‌های ۲ و ۳).

در سطح احتمال ۵ درصد انجام شد. از نرم‌افزار SAS نسخه ۹ و نرم‌افزار Excel به ترتیب برای تجزیه‌های آماری و رسم نمودارها استفاده شد.

نتایج

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 ۲۶۰/۲۸۰ و ۲۶۰/۲۳۰ نانومتر اختلاف معنی‌دار ($p < 0.01$) بود (جدول ۱)، ولی برای نمونه‌های تازه فریز شده معنی‌دار نبود.

کمیت RNA

بیشترین مقدار RNA (۳/۰۱) میکروگرم در ۱۰۰ میلی‌گرم برگ تازه) و کمترین مقدار RNA (۰/۰۷) میکروگرم در ۱۰۰ میلی‌گرم برگ تازه) به ترتیب مربوط به روش فنل/ SDS

جدول ۱- میانگین مربعات حاصل از نتایج تجزیه واریانس مقدار و نسبت‌های جذب ۲۶۰/۲۸۰ و ۲۶۰/۲۳۰ نانومتر RNA استخراج شده از برگ‌های نگاه‌داری شده در دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد

منابع تغییرات	درجه آزادی	مقدار RNA (میکروگرم در ۱۰۰ میلی‌گرم برگ تازه)	نسبت جذب	نسبت جذب
تیمار	۲۰	۳**	۲۶۰/۲۸۰	۲۶۰/۲۳۰
خطای آزمایش	۳۳	۰/۰۱	۰/۱۶**	۰/۶۱**
درصد ضریب تغییرات (CV%)	-	۱۱/۵	۰/۰۷	۰/۰۱

** : معنی‌دار در سطح احتمال ۱ درصد

جدول ۲- میانگین کمیت و کیفیت RNA استخراج شده از برگ سه گونه گیاهی آویشن نگاه‌داری شده در دمای ۸۰- با استفاده از روش‌های مختلف استخراج

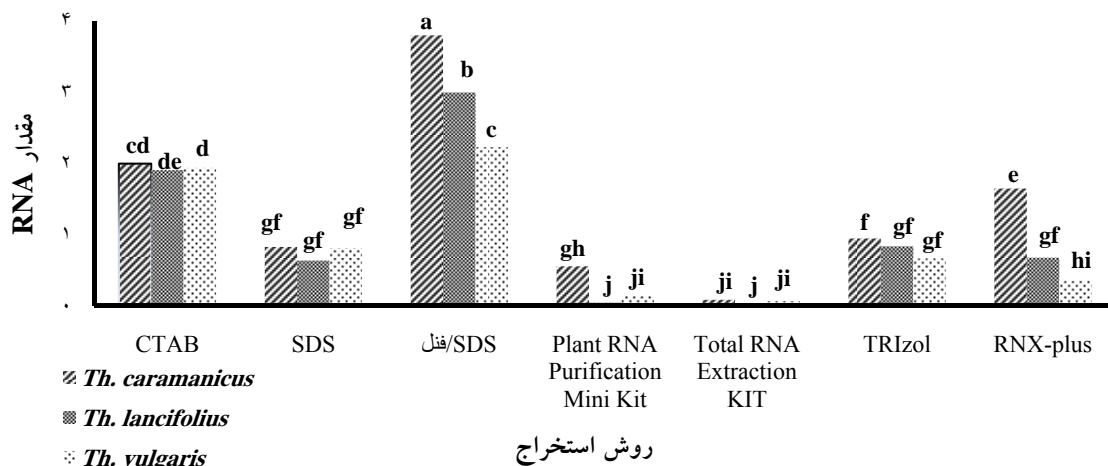
روش استخراج	مقدار RNA (میکروگرم در ۱۰۰ میلی‌گرم برگ تازه)	نسبت جذب ۲۶۰/۲۸۰	نسبت جذب ۲۶۰/۲۳۰
CTAB	۱/۹۵±۰/۰۳۸*	۱/۹۵±۰/۰۴	۱/۹۴±۰/۰۶
SDS	۰/۷۶±۰/۰۴	۱/۷۵±۰/۰۱۹	۱/۶۱±۰/۰۳۶
فنل/ SDS	۳/۰۱±۰/۰۲۳	۱/۹۶±۰/۰۶۴	۱/۸۸±۰/۰۴۷
Plant RNA Purification Mini Kit	۰/۲۶±۰/۰۸	۱/۸۳±۰/۰۲۴	۲/۱۶±۰/۰۱۳
Total RNA Extraction KIT	۰/۰۷۴±۰/۰۱	۱/۶۶±۰/۰۳۷	۱/۵±۰/۰۳۴
TRIzol®	۰/۸۲±۰/۰۸	۱/۸±۰/۰۵۷	۱/۲۳±۰/۰۱۴
RNX-plus™	۰/۹±۰/۰۲	۱/۴±۰/۰۱	۰/۸۵±۰/۰۱

* : خطای معیار

جدول ۳- میانگین کمیت و کیفیت RNA استخراج شده از برگ سه گونه گیاهی آویشن تازه منجمد شده با استفاده از روش‌های مختلف استخراج

روش استخراج	مقدار RNA (میکروگرم در ۱۰۰ میلی‌گرم برگ تازه)	نسبت جذب ۲۶۰/۲۸۰	نسبت جذب ۲۶۰/۲۳۰
CTAB	۰/۱۵۲*±۲/۲۳	۰/۰۷۹±۲/۲۲	۰/۱±۲/۲۳
SDS/فنل	۰/۲۳±۳/۲۶	۰/۰۸±۲/۲۵	۰/۰۵۷±۲/۱

* : خطای معیار



شکل ۱- مقایسه میانگین کمیت RNA استخراج شده از برگ سه گونه آویشن نگهداری شده در دمای ۸۰- درجه

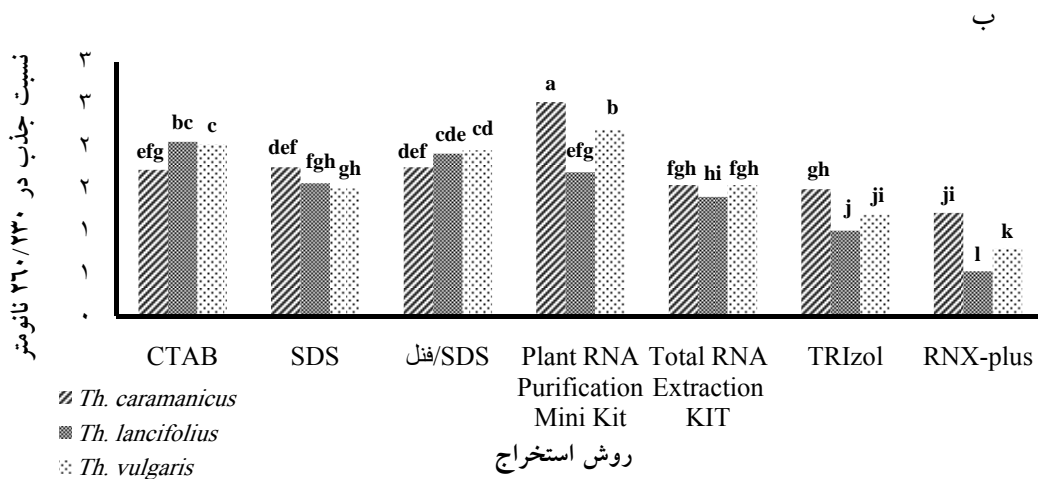
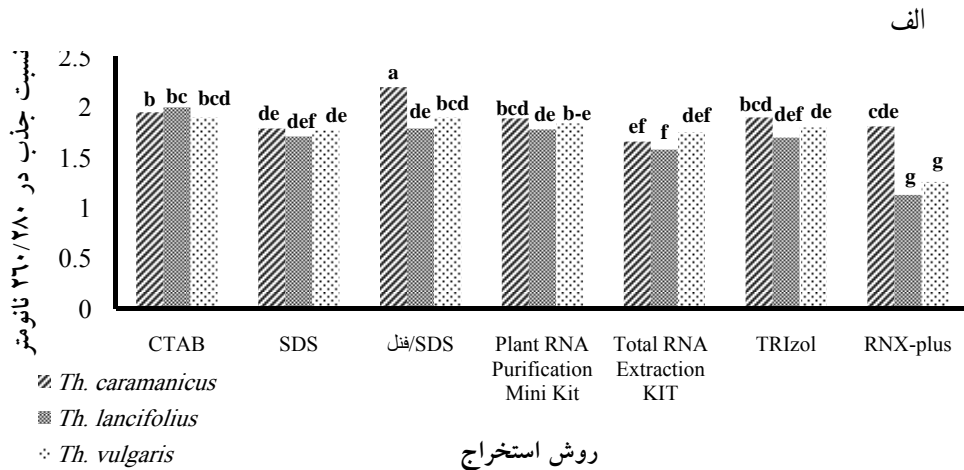
کیفیت RNA

روش فنل/SDS کمترین میزان آلودگی پروتئینی و روش GeneJET Plant RNA Purification Mini Kit کمترین میزان آلودگی پلی‌ساکاریدی/پلی‌فنلی (به ترتیب با نسبت جذب ۱/۹۶ و ۲/۱۶) را داشتند (جدول ۲)، همچنین مقایسه میانگین‌ها نشان داد که روش فنل/SDS و گونه *T. caramanicus* کمترین میزان آلودگی پروتئینی و روش GeneJET Plant RNA Purification Mini Kit و گونه *T. caramanicus* کمترین میزان آلودگی پلی-ساکاریدی/پلی‌فنلی (به ترتیب ۲/۲ و ۲/۴) را داشتند (شکل ۲). در مقابل، بیشترین میزان آلودگی پروتئینی و پلی-ساکاریدی/پلی‌فنلی (به ترتیب ۱/۴ و ۰/۸۵) مربوط به روش RNX-plusTM بود (جدول ۲)، به طوری که گونه *T. lancifolius* و روش RNX-plusTM کمترین مقدار عددی نسبت جذب ۲۶۰/۲۸۰ و ۲۶۰/۲۳۰ (به ترتیب ۱/۱۳ و ۰/۵۳) را نشان دادند (شکل ۲). در بیشتر روش‌ها الگوی باندی روی ژل واضح به نظر می‌رسید

کیفیت RNA به روش‌های ۱- محاسبه نسبت‌های جذب نور در طول موج‌های ۲۶۰/۲۸۰، ۲۶۰/۲۳۰ -۲، وجود باندهای مجزا برای 28SrRNA و 18SrRNA روی ژل آگارز و ۴- توانایی تولید فراورده‌های RT-PCR و Real-Time PCR ارزیابی شد. نمونه‌های RNA با کیفیت بسیار خوب، دو یا بیش از دو باند واضح rRNA بدون شکستگی را روی ژل نشان دادند (Tattersall et al., 2005). همچنین، میزان جذب نور در طول موج‌های ۲۶۰، ۲۸۰ و ۲۳۰ نانومتر، به ترتیب میزان اسیدهای نوکلئیک، میزان آلودگی پروتئینی و آلودگی پلی‌ساکاریدی/پلی‌فنلی را نشان داد (Winfrey et al., 1997). بنابراین نسبت‌های جذب ۲۶۰/۲۸۰ و ۲۶۰/۲۳۰ نانومتر، خلوص RNA را نشان دادند، به طوری که نمونه‌های با نسبت بین ۱/۸ تا ۲ بهترین کیفیت را از نظر میزان آلودگی داشتند (Wang & Stegemann, 2009).

تکرارپذیرتر بودن این روش نسبت به دیگر روش‌ها بود (شکل ۴).

(شکل ۳) و وجود چند باند rRNA در نمونه RNA استخراج شده به روش فنل/SDS از نمونه‌های تازه منجمد شده، بیانگر جداسازی باند 16SrRNA از 18SrRNA و



شکل ۲- مقایسه میانگین نسبت‌های جذب محاسبه شده برای روش‌های مختلف در سه گونه آویشن (الف) طول موج‌های ۲۶۰/۲۸۰ نانومتر (ب) طول موج‌های ۲۶۰/۲۳۰ نانومتر

RNA کل بود (شکل‌های ۵ و ۶). همچنین، RNA ممکن است حاوی مهارکننده‌های آنزیمی باشد که باعث کاهش بازده واکنش RT-PCR و تولید نتایج کمی اشتباه و غیرقابل اعتماد می‌شود. در نتیجه، باید برای آشکارسازی تکثیر براساس سایبرگرین (SYBER Green) یک منحنی گسستگی به دنبال Real-Time PCR رسم شود، زیرا سایبرگرین هر DNA دورشته‌ای شامل دایمر- پرایمرها، آلودگی DNA و محصول PCR حاصل از اتصال ناپجای

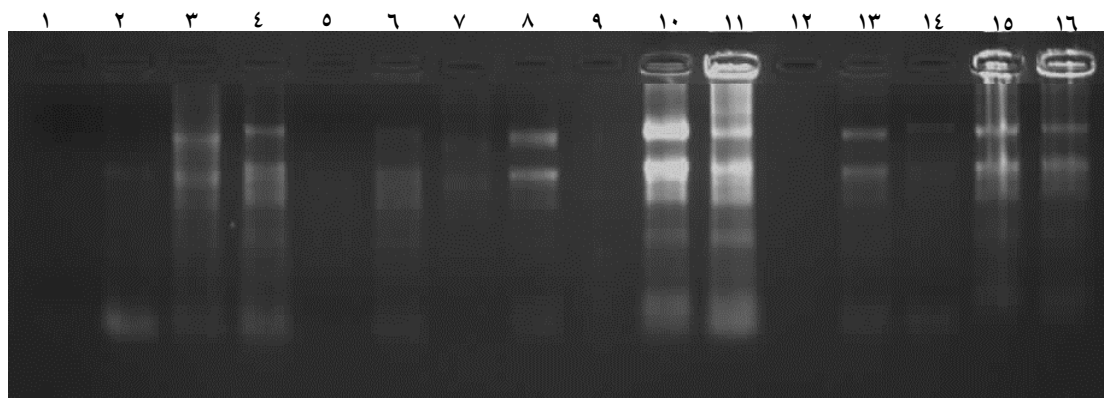
به‌منظور ارزیابی بیشتر کیفیت RNA استخراج شده با روش فنل/SDS، واکنش‌های RT-PCR و Real-Time PCR برای تکثیر دو ژن مرجع *18srRNA* و *ovEF1alpha* (به ترتیب ۱۸۰ و ۸۷ جفت‌باز) و دو ژن اختصاصی کارواکرول سینتاز *CYP71D180* و *CYP71D181* (به- ترتیب ۱۱۴ و ۹۰ جفت‌باز) انجام شد. نتایج الکتروفورز ژل آگارز بیانگر وجود تک باندهای مربوط به قطعات ژن مربوطه و وجود قطعات mRNA نسبتاً بزرگ سالم در

نتایج تجزیه و تحلیل پیک ذوب بیانگر عدم وجود آلودگی DNA و تکثیر اختصاصی آغازگرها بود، بدون اینکه آغازگرها یکدیگر را تکثیر کنند (شکل ۷-ب). همچنین مقدار C_t حاصل از واکنش Real-Time PCR با نتایج الکتروفورز فراورده‌های RT-PCR مطابقت داشت (جدول ۴). برای اطمینان از حذف آلودگی DNA، تیمار RNA با آنزیم DNase برای هر هفت روش باید انجام شود. در پژوهش حاضر این مرحله قبل از ساخت cDNA باعث حذف آلودگی‌های DNA شد و هیچ بانندی در نمونه کنترل منفی واکنش RT-PCR مشاهده نشد.

پرایمر را آشکار خواهد کرد (Pfaffl et al., 2002). بنابراین با بررسی منحنی گسستگی و مقایسه دمای ذوب مورد انتظار برای قطعه تکثیر شده و نتایج منحنی ذوب، میزان صحت واکنش PCR سنجیده می‌شود (Bustin, 2002). نتایج و نمودارهای مربوط به واکنش‌های Real-Time PCR نشان‌دهنده تکثیر خوب و صحت انجام PCR بود. منحنی تکثیر و مقادیر C_t (Cycle threshold) ژن مرجع و دو ژن اختصاصی بیانگر تکثیر بسیار خوب و سالم بودن mRNA حتی انواع با فراوانی کم (*CYP71D180* و *CYP71D181*) در نمونه RNA کل بود (شکل ۷-الف) و

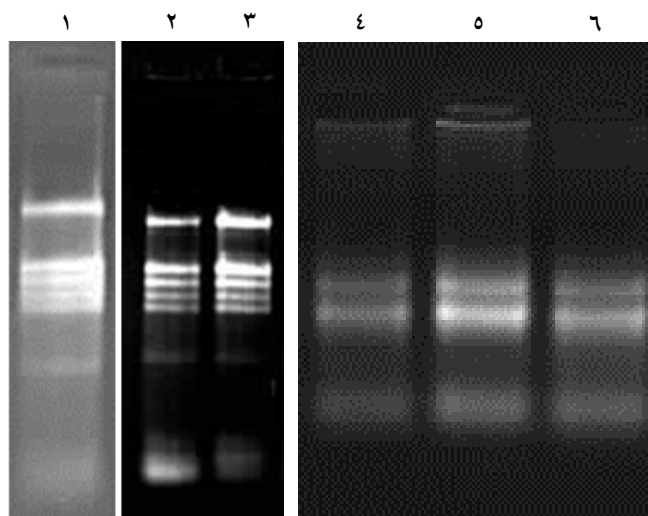
جدول ۴- مقدار C_t ژن‌های مختلف برای RNA استخراج شده از گونه *T. lancifolius* Celak. به روش فنل / SDS

<i>CYP71D181</i>		<i>CYP71D180</i>		<i>ovEF1alpha</i>		ژن
۲	۱	۲	۱	۲	۱	تکرار
۲۵/۷۵	۲۵/۰۶	۲۵	۲۴/۵۶	۱۹/۶۹	۲۰/۲۵	C_t



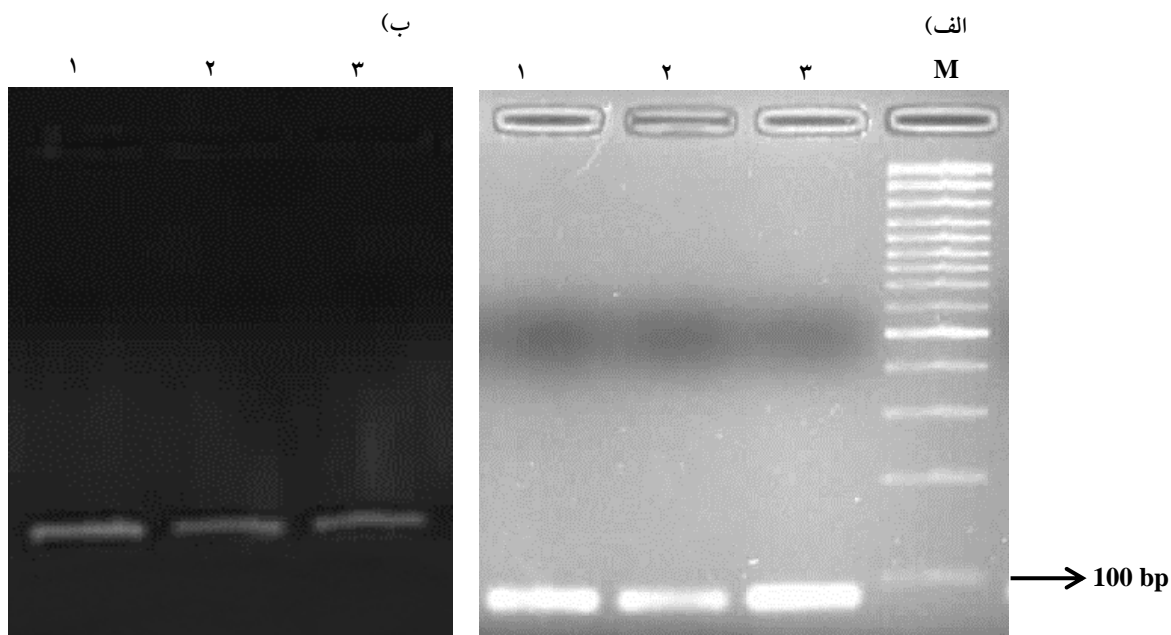
شکل ۳- الکتروفورز ژل آگارز RNA کل استخراج شده از نمونه‌های برگ نگهداری شده در دمای ۸۰- پس از ۳۰ روز.

۱) RNA کل استخراج شده از گونه *Thymus caramanicus* Jalas. به روش Simply P TotalRNA Extraction KIT، ۲) RNA کل استخراج شده از گونه *Thymus vulgaris* L. به روش TRIzol[®]، ۳) RNA کل استخراج شده از گونه *Thymus lancifolius* Celak. به روش CTAB، ۴) RNA کل استخراج شده از گونه *Thymus caramanicus* Jalas. به روش CTAB، ۵-۷) RNA کل استخراج شده از گونه *Thymus lancifolius* Celak. به ترتیب به روش Simply P TotalRNA Extraction KIT، SDS، و GeneJET Plant RNA Purification Mini Kit، ۸) RNA کل استخراج شده از گونه *Thymus caramanicus* Jalas. به روش TRIzol[®]، ۹) RNA کل استخراج شده از گونه *Thymus vulgaris* L. به روش Simply P TotalRNA Extraction KIT، ۱۰) RNA کل استخراج شده از گونه *Thymus caramanicus* Jalas. به روش فنل / SDS، ۱۱) RNA کل استخراج شده از گونه *Thymus vulgaris* L. به روش فنل / SDS، ۱۲) RNA کل استخراج شده از گونه *Thymus lancifolius* Celak. به روش RNX-plus[™]، ۱۳) RNA کل استخراج شده از گونه *Thymus caramanicus* Jalas. به روش RNX-plus[™]، ۱۴-۱۶) RNA کل استخراج شده از گونه *Thymus vulgaris* L. به ترتیب به روش RNX-plus[™]، CTAB و SDS.



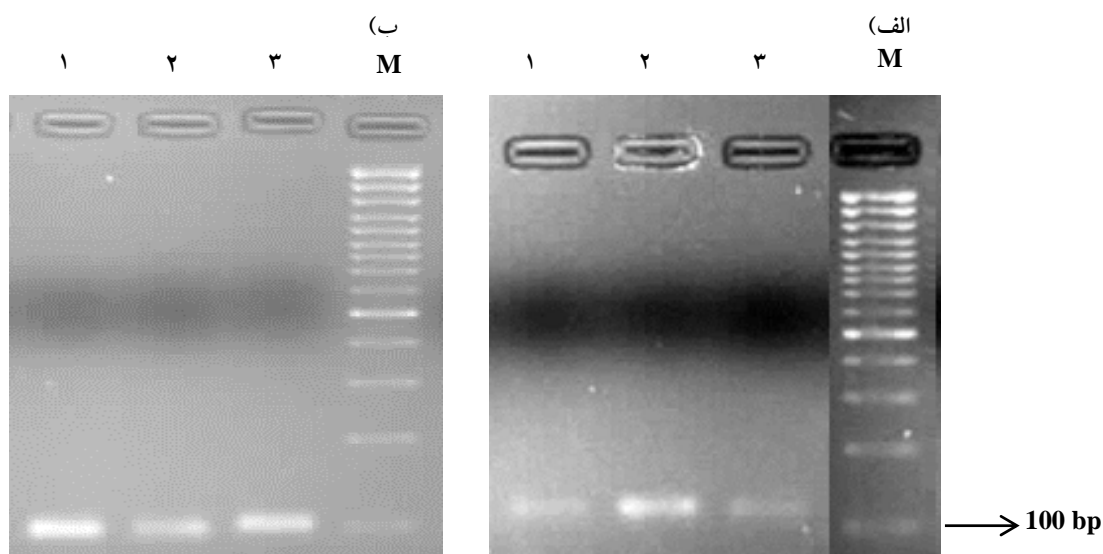
شکل ۴- الکتروفورز ژل آگارز RNA کل استخراج شده از نمونه‌های برگ تازه منجمد شده.

(۱-۳) به ترتیب RNA استخراج شده از *Thymus vulgaris* L.، *Thymus caramanicus* Jalas. و *Thymus lancifolius* Celak. با استفاده از روش فنل / SDS، (۴-۶) به ترتیب RNA استخراج شده از *Thymus lancifolius* Celak.، *Thymus caramanicus* Jalas. و *Thymus vulgaris* L. با استفاده از روش CTAB.



شکل ۵- الکتروفورز محصولات RT-PCR نمونه RNA استخراج شده به روش فنل / SDS، روی ژل آگارز.

الف- قطعه ۸۷ جفت بازی حاصل از تکثیر ژن مرجع *ovEF1alpha* در سه گونه (۱) *Thymus vulgaris* L. (۲) *Thymus lancifolius* Celak. (۳) *Thymus caramanicus* Jalas. نشانگر ۱۰۰ جفت بازی، ب- قطعه ۱۸۰ جفت بازی حاصل از تکثیر ژن مرجع *18S rRNA* در سه گونه *Thymus lancifolius* Celak. و *Thymus vulgaris* L.، *Thymus caramanicus* Jalas.

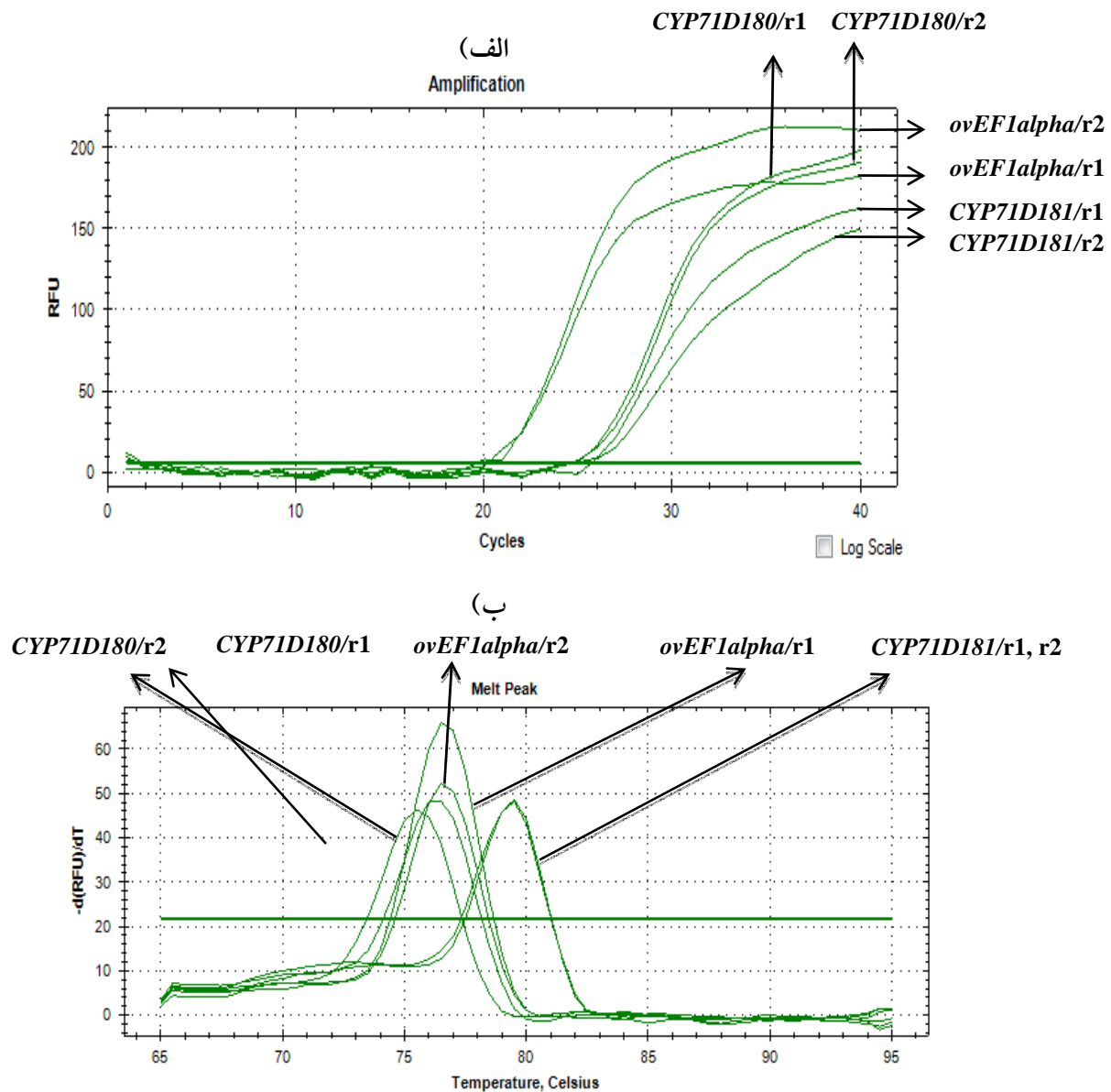


شکل ۶- الکتروفورز محصولات RT-PCR نمونه RNA استخراج شده به روش فنل / SDS، روی ژل آگارز.

الف- قطعه ۱۱۴ جفت بازی حاصل از تکثیر ژن *CYP71D180* در سه گونه (۱) *Thymus lancifolius* Celak. (۲) *Thymus caramanicus* Jalas. (۳) *Thymus vulgaris* L.M نشانگر ۱۰۰ جفت باز، ب- قطعه ۹۰ جفت بازی حاصل از تکثیر ژن *CYP71D181* در سه گونه *Thymus vulgaris* L.M و *Thymus lancifolius* Celak.M نشانگر ۱۰۰ جفت باز

جدول ۵- هزینه تمام شده هر روش استخراج به ازای یک واکنش

هزینه مواد مصرفی (ریال)	روش استخراج
۷۹۹۱۰	GeneJET Plant RNA Purification Mini Kit
۱۴۰۶۸۰	TRIzol®
۶۱۹۱۰	Simply P TotalRNA Extraction KIT
۳۶۴۶	فنل / SDS (با استفاده از بافر فنل اشباع با تریس تجاری)
۳۰۵۹۰	RNX-plus™
۱۱۴۱۰	فنل / SDS (با استفاده از بافر فنل اشباع با تریس ساخته شده به طور دستی)
۸۲۱۰	CTAB
۷۱۱۰	SDS



شکل ۷- الف) منحنی تکثیر و ب) تجزیه و تحلیل پیک ذوب سه ژن *ovEF1alpha*، *CYP71D180* و *CYP71D181* با RNA استخراج شده به روش فنل / SDS

بحث

گوآنیدینیوم تیوسیانات و فنل هستند. نتایج نشان داد که کمیت و کیفیت RNA در این روش‌ها نسبت به دو روش CTAB و فنل / SDS کمتر است (جدول ۲). نمک‌های گوآنیدینیوم دنا توره‌های پروتئین و بازدارنده‌های آنزیم‌های RNase هستند، ولی عامل مؤثری برای جداسازی RNA از کمپلکس‌های غیر پروتئینی نیستند. هنگام استفاده از بافرهای حاوی نمک گوآنیدینیوم، به علت وجود متابولیت‌های ثانویه، RNA به سختی حل می‌شود و عامل مؤثری برای جداسازی

در تحقیق حاضر از سه روش عمده استخراج RNA، دو بافر و دو کیت تجاری استخراج RNA که به طور گسترده در بیشتر آزمایشگاه‌های تحقیقاتی جهان به کار می‌روند، استفاده شد. روش‌های فوق عمدتاً بر مبنای روش‌های نمک گوآنیدینیوم تیوسیانات، CTAB و فنل / SDS هستند؛ به عنوان نمونه بافر *RNX-plus™*، *GeneJET Plant RNA Purification Mini Kit* و بافر *TRIzol®* حاوی نمک

از RNase از طریق شکستن پیوند دی‌سولفیدی می‌شود. این روش بعد از روش فنل / SDS بیشترین مقدار RNA (۱/۹۵) میکروگرم در ۱۰۰ میلی‌گرم برگ تازه) را به خود اختصاص داد (جدول ۲). در این روش، علاوه بر عملکرد اجزای بافر CTAB، استفاده از فنل در محدوده pH اسیدی باعث جداسازی DNA به فاز آلی و RNA به فاز آبی می‌شود. لازم به ذکر است که RNA به شکستگی‌های ناشی از OH⁻ در محلول‌های قلیایی حساس است و استفاده از فنل اشباع با آب (pH=۵) و اسید استیک خالص ۱ مولار باعث پایین نگه داشتن pH محیط استخراج می‌شود. همچنین استفاده از محلول کلروفرم/ ایزوامیل الکل باعث حذف ترکیبات فنلی و پلی‌ساکاریدی می‌شود. بنابراین استفاده از CTAB برای استخراج RNA از گیاه غنی از متابولیت‌های ثانویه *Hippophae rhamnoides* باعث جداسازی RNA با کمیت و کیفیت بسیار مؤثر شد که تقریباً با نتایج تحقیق حاضر مطابقت دارد (Ghangel et al., 2009).

کمیت RNA استخراج شده به وسیله روش فنل / SDS و CTAB از نمونه‌های برگ تازه منجمد شده بیشتر از نمونه‌های ننگه‌داری شده در دمای ۸۰- درجه به مدت ۳۰ روز بود (جدول ۳). بنابراین به نظر می‌رسد ننگه‌داری طولانی مدت نمونه‌های گیاهی در دمای ۸۰- درجه باعث اکسید شدن ترکیبات فنولی موجود در اندام‌های مختلف گیاهی و تشکیل کوئینون‌ها می‌شود که به اسیدهای نوکلئیک متصل می‌شوند و مانع از جداسازی RNA با کیفیت خوب می‌شوند (Ghangel et al., 2009).

فاکتور گونه گیاهی بر کمیت و کیفیت RNA تأثیر گذاشت و گونه آویشن کرمانی (*T. Caramanicus* Jalas.) نسبت به دو گونه دیگر، دارای RNA با کیفیت و کمیت بهتر بود. یکی از عوامل ایجادکننده این تفاوت‌ها می‌تواند تنوع پروفایل متابولیت‌های اولیه و ثانویه گونه‌های گیاهی فوق باشد، مثلاً MakkizadehTafti و همکاران، (۲۰۱۱) و Bikdelu (۲۰۱۲) کارواکرول را ترکیب اصلی *T. Caramanicus* Jalas گزارش کردند، درحالی‌که Neaghdi Badi و همکاران (۲۰۰۴)، تیمول را ترکیب اصلی *T. vulgaris* L. گزارش کردند.

در مجموع می‌توان گفت روش فنل / SDS نسبت به دیگر روش‌ها برای هر سه گونه مناسب‌تر و تکرارپذیرتر است و بهترین کیفیت زمانی به دست آمده که از نمونه‌های تازه منجمد

از ترکیبات پروتئینی نیستند. همچنین ممکن است زمان استخراج، RNA از بین برود (Liu et al., 1998). از این روش Ghangel و همکاران، (۲۰۰۹) برای استخراج RNA از گیاه دارویی *Hippophae rhamnoides* استفاده کردند، ولی نتوانستند RNA استخراج کنند. البته علاوه بر نمک گوانیدینیوم، عوامل دنا توره‌کننده دیگری نظیر فنل و CTAB به بافرهای استخراج اضافه می‌شوند.

روش فنل / SDS تغییر یافته بدون استفاده از نمک‌های گوانیدینیوم و بر مبنای فنل است. بافر این روش حاوی فنل، EDTA، SDS و نمک استات سدیم است. SDS و EDTA بازدارنده آنزیم‌های RNase هستند و فنل دنا توره‌کننده قوی پروتئین‌هاست و استفاده از آن در بافر استخراج باعث ممانعت از فعالیت آنزیم‌های RNase می‌شود (Ghangel et al., 2009; Wang & Stegemann, 2009). علاوه بر عملکرد هر یک از اجزای بافر روش فنل / SDS، مواد موجود در این بافر منجر به ایجاد محیطی می‌شوند که از اکسیداسیون ترکیبات فنولی جلوگیری می‌کند و باعث حذف آنها از محیط استخراج می‌شود و این احتمال را افزایش می‌دهد که RNA بدون کمپلکس‌های کوئینون / پروتئین باشد و به همین دلیل استخراج و حل شدن پلیت به راحتی انجام می‌شود (Ghawana et al., 2011). همچنین اضافه کردن آب تیمار شده با DPEC یک محیط آبی برای جداسازی RNA از DNA ایجاد می‌کند و استفاده از نمک استات سدیم در حضور ایزوپروپانول باعث رسوب RNA می‌شود (Sabir, 2012). از طرفی، بافر روش GeneJET Plant RNA Purification Mini Kit حاوی نمک گوانیدینیوم تیوسیانات است و حضور آلودگی‌های مختلف باعث کاهش کارایی ستون‌های سیلیکا برای جداسازی و تخلیص RNA و در نتیجه کاهش عملکرد RNA می‌شود.

بافر روش CTAB حاوی CTAB، PVP و بتا-مرکاپتواتانول است که هر کدام عملکرد خاصی دارند. درحالی‌که ماده CTAB موجود در این بافر باعث شکستن دیواره سلولی و جداسازی اسیدهای نوکلئیک از پلی-ساکاریدها می‌شود، PVP موجود در آن از طریق تشکیل پیوند هیدروژنی با ترکیبات پلی‌فنلی و تشکیل کمپلکس، باعث جداسازی ترکیبات پلی‌فنلی از اسیدهای نوکلئیک می‌شود و بتا-مرکاپتواتانول موجود در آن نیز از اکسیداسیون فنل‌ها و آزادسازی کوئینون‌ها از ترکیبات فنلی ممانعت می‌کند و همچنین باعث غیرفعال‌سازی آنزیم‌های

- thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Nature Protocols*, 2: 581-585.
- Ghangal, R., Raghuvanshi, S., and 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.
 - Ghawana, S., Paul, A., Kumar, H., Kumar, A., Singh, H., Bhardwaj, P.K., Rani, A., Singh, R.S., Raizada, J., and Singh, K., 2011. An RNA isolation system for plant tissues rich in secondary metabolites. *BMC research Notes*, 4:85.
 - Jamzad, Z., 2009. *Thymus* and *Satureja* species of Iran. Research Institute of Forests and Rangelands Publications, Tehran, Iran, 170pp.
 - Kingston, R.E., 2010. Current Protocols in Molecular Biology. In: Preparation and Analysis of RNA. Published online January 2010 in Wiley Interscience, 4.3.1- 4.3.3.
 - Liu, J.J., Goh, C.J., Loh, C.S., Liu, P., and Pua, E.C., 1998. A method for isolation of total RNA from fruit tissues of banana. *Plant Molecular Biology*, 16: 1-6.
 - Lock Chan, K., Ling, H., Namasivayam, C.P., and Napis, S., 2007. A simple and rapid method for RNA isolation from plant tissues with high phenolic compounds and polysaccharides. *Nature Protocol*, 184-189.
 - Makkizadeh Tafti, M., Naghdi Badi, H., Rezazadeh, Sh., Ajny, Y., and Kadkhoda, Z., 2011. Evaluation of botanical traits and yield components of *Thymus caramanicus* Jalas ecotypes in Iran. *Journal of Medicinal Plants*, 36: 57-65.
 - Neaghdi Badi, H., and Makkizadeh Tafti, M., 2003. Review of common Thyme. *Journal of Medicinal Plants*, 7: 1-13.
 - Pfaffl, M.W., 2004. Quantification strategies in Real-Time PCR. *Physiology- Weihenstephan*, Technical University of Munich, Center of Life and Food Science Weihenstephan, Freising, Germany Chapter, 3: 87-112.
 - Sabir, J.S.M., 2012. Abundant high-quality RNA from medicinal plants for molecular applications. *Journal of Medicinal Plants Research*, 6: 5214-5221.
 - Sambrook, J., Fritsch, E.F., and Maniatis, T., 1989. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Plainview, NY, 1626pp.
 - Tattersall, E.A.R., Ergul, A., AlKayal, F., DeLuc, L., Cushman, J.C., and Cramer, G.R., 2005. Comparison of Methods for Isolating High-Quality RNA from Leaves of Grapevine. *American Journal Enology and Viticulture*, 56: 400-407.
 - Wang, L., and Stegemann, J.P., 2009. Extraction of High Quality RNA from Polysaccharide Matrices using Cetyltrimethylammonium Bromide. *Elsevier Ltd, Biomaterials*, 31: 1612.
 - Winfrey, M.R., Rott, M.A., and Wortman, A.T., 1997. *Unraveling DNA: Molecular Biology for the Laboratory*, Prentice-Hall, Upper Saddle River, NJ, 369pp.
 - Zargari, A., 1990. *Medicinal Plants*. Tehran University Press, Tehran, Iran, 4:28-42.
- شده استفاده شد. از مزیت‌های دیگر روش فنل SDS/ نسبت به دیگر روش‌ها، زمان استخراج نسبتاً کوتاه (تقریباً ۴۵ دقیقه) و هزینه کم تهیه مواد مصرفی است. یکی از مواد اصلی این روش، فنل اشباع با تریس است که به صورت تجاری در بازار وجود دارد. در ضمن Ghawana و همکاران (۲۰۱۱) برای استخراج RNA با کمیت و کیفیت مناسب از گیاهان دارویی غنی از متابولیت‌های ثانویه *Rheum australe* و *Arnebiaeuchroma* از فنل اشباع با بافر تریس در بافر استخراج روش IHBT استفاده کردند، همچنین Sabir (۲۰۱۲)، از همین روش برای استخراج RNA از ۱۰ گیاه دارویی استفاده کرد. این محقق گزارش کرد که استفاده از روش IHBT باعث استخراج RNA با بیشترین عملکرد و کمترین آلودگی می‌شود. در این پژوهش، به دلیل قیمت زیاد فنل اشباع با تریس، این ماده به‌طور دستی ساخته شد (این ماده از کریستال‌های جامد فنل، ۸- هیدروکسی کوئینولین و تریس (هیدروکسی) متیل آمینومتان ساخته شد و با pH=۸ استفاده شد) و در نتیجه هزینه تمام شده این روش نسبت به اینکه فنل اشباع با تریس خریداری شود، دو برابر کاهش یافت و در بین روش‌های دیگر به- ویژه GeneJET Plant RNA Purification Mini Kit، TRIZOL® و Simply P TotalRNA Extraction KIT، کمترین هزینه تمام شده را به ازای یک واکنش داشت و کاملاً مقرون به‌صرفه بود (جدول ۵). بنابراین پیشنهاد می‌شود، برای دستیابی به RNA خالص‌تر و با کیفیت بهتر، از روش فنل SDS/ و نمونه‌های تازه منجمد شده، استفاده شود و حتماً قبل از استفاده از RNA کل در آزمایش‌های دیگر، تیمار با آنزیم DNase انجام شود. این روش می‌تواند علاوه بر آویشن، برای استخراج DNA و RNA از دیگر گونه‌های دارویی غنی از ترکیبات فنولی و پلی‌ساکاریدی از جمله جنس‌های دیگر خانواده نعناعیان استفاده شود.

منابع مورد استفاده

- Bikdelu, M., 2012. Evaluation of Morphological, Genetical and Phytochemical Diversity of *Thymus caramanicus* Jalas. MSc Thesis, Department of Horticultural Sciences, College of Agriculture & Natural Resources, University of Tehran, 112pp.
- Bustin, S., 2002. Quantification of mRNA using real-time reverse transcription PCR (RT-PCR): trends and problems. *Journal of Molecular Endocrinology*, 29:23-39.
- Chomeczynski, P., and Sacchi, N., 2006. The single-step method of RNA isolation by acid guanidinium

Comparison of different methods for isolating of total RNA from leaf of three Thyme species rich in secondary metabolites

S. Bahador¹, B. Rabiei*² and S.H. Hassani Kumleh³

1-MSc. Student, Department of Agricultural Biotechnology, Faculty of Agricultural Sciences, University of Guilan, Guilan, I.R.Iran.

2*-Corresponding author, Prof., Department of Agricultural Biotechnology, Faculty of Agricultural Sciences, University of Guilan, Guilan, I.R.Iran. Email: rabiei@guilan.ac.ir

3-Assist. Prof., Department of Agricultural Biotechnology, Faculty of Agricultural Sciences, University of Guilan, Guilan, I.R.Iran.

Received: 27.01. 2014

Accepted: 17.05. 2014

Abstract

Medicinal plants are rich sources of natural products used for production of pharmaceutical products. Thymus genus belongs to the Lamiaceae family which has more than 18 different species distributed in different areas of Iran. Pharmacological effects of thyme are related to phenolic monoterpenes such as carvacrol and thymol. Despite pharmacological effects, the phenolic compounds and other secondary metabolites are major problem for isolation of high quality RNA in gene expression analysis and genetic engineering. In the present study, seven different isolation protocols were compared to extract total RNA from three Thyme species rich in phenolic secondary metabolites in terms of quality and quantity of RNA samples with respect to spectrophotometric reading, denaturing agarose gel electrophoresis, Reverse Transcription Polymerase Chain (RT-PCR) and Real Time-PCR reactions. Three methods of isolation together with two commercial buffers and two kits that were commercially available were used. Results indicated that RNA isolated by modified SDS- phenol protocol was good quality and quantity, where standard RNA isolation methods involving GeneJET Plant RNA Purification Mini Kit and TRIZol extraction buffers failed. Finally, we proposed a new suitable protocol for isolating RNA from Thyme leaves rich in secondary metabolites.

Keyword: Thyme, RNA isolation, Method of SDS-phenol, Secondary metabolites.