

دو فصلنامه علمی-پژوهشی تحقیقات ژنتیک و اصلاح گیاهان مرتعی و جنگلی ایران  
جلد ۲۴، شماره ۱، صفحه ۱۱۳-۱۰۲ (۱۳۹۵)

## بهبودسازی روش استخراج RNA از بافت پوست شاخه درختان خانواده مخروطیان

فائزه حائری زاده<sup>۱</sup>، اسد معصومی اصل<sup>۲\*</sup>، پژمان آزادی<sup>۳</sup>، حمید رجبی معماری<sup>۴</sup> و نفیسه ابوفاضلی<sup>۵</sup>

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد، اصلاح نباتات، دانشگاه یاسوج، یاسوج

۲- نویسنده مسئول مکاتبات، استادیار، دانشکده کشاورزی، دانشگاه یاسوج، یاسوج

پست الکترونیک: Masoumiasl@yu.ac.ir

۳- استادیار، پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی ایران، کرج

۴- استادیار، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید چمران، اهواز

۵- عضو شرکت دانش بنیان زیست فناوران نوین گیتی ژن، تهران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۴/۰۵/۲۵ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۴/۰۹/۲۹

### چکیده

فرآیند استخراج RNA از بافت‌های سخت چوبی و به‌طور خاص درختان خانواده مخروطیان به دلیل داشتن غلظت‌های بالایی از ترکیبات فنولیک، پلی‌ساکاریدها، متابولیت‌های ثانویه و لیگنین، بسیار مشکل است و تا به حال هیچ‌گونه کیت تجاری برای این منظور ساخته نشده است. در این مطالعه مشکلات فوق برطرف گردیده و روشی سریع، ساده و اقتصادی برای استخراج RNA از بافت ساقه گونه‌های *Abies grandis* و *Cedrus deodara* که هر دو از خانواده مخروطیان می‌باشند، ارائه شده است. نسبت جذب نوری در طول موج‌های ۲۶۰ به ۲۸۰ و ۲۶۰ به ۲۳۰ نانومتر، به ترتیب ۱/۸۸ و ۱/۱ برای گونه *Cedrus deodara* و ۱/۸ و ۰/۹ برای گونه *Abies grandis* به دست آمد. تغییرات صورت گرفته در جهت بهبودسازی استخراج RNA نیز شامل استفاده از تیمار پیش‌گرما روی بافر استخراج، کاهش دور سانتریفیوژ حذف آلودگی DNA و حذف DEPC می‌باشد. ساخت cDNA با استفاده از RNA استخراج شده با موفقیت انجام و واکنش RT-PCR باندهای مورد انتظار را تولید نمود. لذا به نظر می‌رسد این روش برای استخراج RNA از بافت‌های چوبی مناسب است.

واژه‌های کلیدی: بافت چوبی، ترکیبات فنولیک، درخت نراد، DEPC.

### مقدمه

استخراج اسید نوکلئیک سالم و با کیفیت، یکی از پیش‌نیازهای مهم تحقیقات زیست‌شناسی مولکولی می‌باشد ولی چالش بزرگ استخراج RNA از بافت‌های چوبی، حضور مقادیر زیاد پلی‌ساکاریدها که همراه با RNA رسوب می‌کنند، انواع مختلف ترکیبات فنولیک مانند تانن‌ها و اولئوسین تری‌نوئیدها، سطوح بالای RNase، غلظت پائین اسید نوکلئیک و حضور لیگنین (که شکستن آن بسیار مشکل

درختان سوزنی برگ از جمله درختان خانواده مخروطیان، طی پاسخ دفاعی در برابر حشرات گیاه‌خوار و بیمارگرها مقادیر زیادی تری‌نوئید تولید می‌کنند که بسیاری از این ترکیبات به‌خاطر تنوع ساختاری و خواص فیزیکی و شیمیایی مختلفشان در تولید دارو، رایحه، طعم‌دهنده و سوخت زیستی مورد استفاده قرار می‌گیرند (Dean & Tanford, 1978).

است) می‌باشد (Loomis *et al.*, 1974; Harsiah *et al.*, 2012). با این‌که ساختار RNA تقریباً در تمام گونه‌ها مشابه است ولی ناخالصی‌ها و یا مقدار نسبی آنها بسته به میزان حلالیتشان متفاوت بوده و در عمل، عوامل بسیار زیادی بر استخراج RNA اثر می‌گذارند. بعضی از این عوامل باعث افزایش درجه خلوص RNA استخراجی می‌شوند ولی در مقابل برخی ترکیبات از خلوص آن می‌کاهند. از اینرو، آگاهی از نقش این مواد و اثرات آنتاگونیستی احتمالی آن‌ها در مراحل مختلف استخراج، می‌تواند باعث صرفه جویی در وقت و هزینه شده و کیفیت استخراج را بالا ببرد (Kamaloddini *et al.*, 2006).

از آنجائی که حفاظت اسمزی سلول توسط اسمولیت‌های کوچکی نظیر گلیسین بتائین یا الیگوساکاریدها ایجاد می‌شود، این امکان وجود دارد که مشکلات اصلی مربوط به استخراج RNA، به دلیل وجود الیگوساکاریدها و یا حتی مونوساکاریدهای موجود در سلول باشد (Robiu-Pina & Zapata-Perez, 2011). برای بهینه‌سازی فرآیند استخراج RNA نیز راهکارهای مختلفی ارائه شده است. مثلاً Claros و Canovas (۱۹۹۸) برای به حداقل رساندن تخریب RNA، در مرحله برداشت و آماده‌سازی نمونه‌ها تغییراتی اعمال کردند به این ترتیب که پس از کشت بافت گیاه در محیط آزمایشگاهی، از جوانه آن جهت نمونه‌گیری استفاده کردند. در برخی روش‌ها، مراحل رسوب‌دهی برای بالا بردن کیفیت RNA افزایش یافت (Le-Provast *et al.*, 2007). روش‌هایی مانند روش Chang و همکاران (۱۹۹۳) و Steele و همکاران (۱۹۹۸) نیز که در آنها از فنل یا بتا-مرکاپتواتانول جهت بهینه‌سازی استخراج استفاده شده، به دلیل سمیت و حساسیت‌زایی این دو ماده، توصیه نمی‌گردند (Budavari, 1996; Warner & Harper, 1985; Baker, 2001). به‌طور کلی، ترکیبات موجود در بافر استخراج موجب حذف انواع آلودگی‌ها از RNA کل می‌شوند طوریکه برای مثال تریس هیدروکلراید موجود در بافر استخراج به‌عنوان یک تامپون عمل کرده و موجب تنظیم pH بافر می‌شود. وجود برخی ترکیبات اضافی نیز روی عملکرد

RNA در فرآیندهایی چون ساختن cdNA تاثیر منفی دارد، زیرا آنزیم رونویسی معکوس به خلوص RNA حساس می‌باشد و در صورتی که RNA کیفیت خوبی نداشته باشد، cdNA ساخته نمی‌شود (Kiosava *et al.*, 2004). تاکنون روش‌های زیادی برای استخراج RNA از بافت‌های چوبی ارائه شده است، اما این روش‌ها غالباً با توجه به شرایط و نوع بافت تغییر می‌کنند (Rubio-Pina *et al.*, 2011). در حال حاضر، پرکاربردترین روش‌های استخراج RNA از گیاهان چوبی روش Paula و همکاران (۲۰۱۲) و روش Kolosava و همکاران (۲۰۰۴) می‌باشند که هر دو مبتنی بر استفاده از CTAB (Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide) می‌باشند. این ترکیب، یک شوینده کاتیونی قوی برای تجزیه دیواره سلولی و حذف پلی‌ساکاریدها می‌باشد و برای استخراج RNA از بافت‌های غنی از پلی‌ساکارید بسیار مناسب است (Ky *et al.*, 2012). دستورالعمل‌های بسیاری مانند استفاده از گوانیدیوم تیوسیانات، فنل/SDS، سزیم کلراید و پلی‌وینیل‌پلی‌پیرولیدون نیز ارائه شده‌اند اما باز هم برای گونه‌های مختلف نیاز به اصلاح و تغییر دارد. بیشتر این روش‌ها در مقیاس زیاد، انرژی بر و زمان‌بر هستند و در هر روز کاری تنها از تعداد محدودی نمونه می‌توان RNA استخراج نمود (Le-Provast *et al.*, 2007).

در مجموع، میزان موفقیت در استفاده از کیت‌های تجاری و یا روش‌های مختلف ارائه شده بسته به ترکیبات موجود در بافت گیاهی، متفاوت است. لذا با توجه به مشکلاتی که در استخراج RNA از نمونه‌های درختی وجود دارد، این تحقیق با هدف معرفی یک روش موفقیت آمیز و کارآمد برای استخراج RNA با کمیت و کیفیت مطلوب در درختان خانواده مخروطیان طراحی و اجرا شد.

### مواد و روش‌ها

این آزمایش در آزمایشگاه شرکت زیست فناوریان نوین گیتی ژن واقع در مرکز رشد زیست فناوری پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری انجام گردید.

## ضد عفونی وسایل و محلول‌ها

به منظور تهیه کلیه محلول‌ها و بافرها از آب مقطر دو بار استریل (بدون DEPC) اتوکلاو شده استفاده شد. کلیه ظروف شیشه‌ای و پلاستیکی دو بار اتوکلاو شده و وسایل فلزی به مدت ۴ ساعت درون آن در دمای ۱۸۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند.

### مواد گیاهی

به منظور نمونه‌گیری بافت پوست درخت، از نهال‌های چهار ساله *Abies grandis* و نهال‌های شش ساله *Cedrus deodara* استفاده شد. ابتدا پوست بیرونی ساقه با استفاده از اسکالپل تراشیده شد و سپس لایه نازکی از زیر پوست بیرونی به میزان ۱۰۰ میلی‌گرم برداشت شد.

### بافر و محلول‌های استخراج

جدول ۱ محتویات بافر و غلظت مواد تشکیل دهنده آن را نشان می‌دهد. برای تهیه بافر، ابتدا ترکیبات تریس، سدیم‌دی‌اکسی‌کولایت، لیتیم کلراید، اتیلن‌دی‌آمین تترا استیک اسید، سدیم دودسیل سولفات و تریتون مخلوط و اتوکلاو شدند. سپس ترکیبات تیواوره، اورین‌تری‌کربوکسیلیک اسید (ATT)، دی‌تیوتری‌اتول (DTT) و پلی‌وینیل‌پلی‌پیرولیدون نیز به محلول اضافه شدند. ترکیب PVPP قبل از استفاده از بافر، به آن اضافه شد.

جدول ۱- ترکیبات و غلظت بافر استخراج

غلظت	ترکیبات
۲۰۰mM	Tris-HCl (pH=8)
۲٪ w/v	Sodium Dodecyl Sulfate
۳۰۰mM	LiCl
۱۰ mM	EDTA
۱٪ w/v	Sodium deoxycholate
۱٪ w/v	Triton 10-X
mM۵	Thiourea
۱ mM	Aurintricarboxylic acid (ATT)
۱۰ mM	Dithiothritol (DTT)
۲٪ w/v	Polyvinylpirolidone(PVPP)

## استخراج RNA

مراحل استخراج به شرح زیر بود:

۱- ابتدا به میزان ۱۰۰ الی ۲۰۰ میلی‌گرم از نمونه بافت گیاهی درون هاون چینی ریخته شد و با استفاده از نیتروژن مایع در حداقل زمان پودر شد. سپس ۱۰۰۰ میکرولیتر از بافر استخراج به پودر حاصله اضافه شده و به مدت ۱۰ ثانیه ورتکس شد.

۲- تیوب‌های ۲ میلی‌لیتری حاوی مواد فوق به مدت ۵ دقیقه در بن ماری با دمای ۶۵ درجه سانتی‌گراد قرار گرفته و پس از آن به مدت ۲۰ دقیقه با سرعت ۷۰۰۰ دور در دقیقه و در دمای اتاق سانتریفیوژ شدند. این مرحله تا زمانی که فاز رویی شفاف مشاهده شود، تکرار گردید. سپس فاز شفاف رویی برداشته شده و با استفاده از فیلتر پلاستیکی ۰/۲ میکرونی (ساخت شرکت چریوا آلمان) فیلتر شد.

۳- به فاز شفاف حاصله میزان ۲۰ میکرولیتر سدیم استات ۳ مولار و یک میلی‌لیتر اتانول ۱۰۰ درصد (با دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد) اضافه گردید و به مدت ۲ دقیقه با دست تکان داده شد. سپس تیوب‌ها در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد به مدت یک ساعت و یا در دمای ۸۰- درجه به مدت ۳۰ دقیقه قرار گرفتند و سپس به مدت ۱۰ دقیقه با سرعت ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه و در دمای اتاق سانتریفیوژ شده و فاز رویی حذف شد.

۴- یک میلی‌لیتر ایزوپروپانول (با دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد) به تیوب‌ها اضافه شده و به مدت ۵ دقیقه با سرعت ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شد و فاز رویی حذف شد.

۵- رسوب حاصله در یک میلی‌لیتر بافر TE حل شده و یک میلی‌لیتر ۱۰٪ CTAB به آن افزوده شده و با دست تکان داده شد.

۶- مقدار ۳۰۰ میکرولیتر NaCl یک مولار به آن اضافه شده و به مدت ۵ دقیقه با سرعت ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه در دمای اتاق سانتریفیوژ و سپس فاز مایع رویی حذف گردید.

۷- رسوب به دست آمده به وسیله ۲۰۰ میکرولیتر کلروفرم (به تنهایی) شستشو داده شد و سانتریفیوژ مثل

**ساخت cDNA:**

ساخت cDNA با استفاده از یک میکروگرم RNA استخراج شده و دستورالعمل شرکت سازنده کیت (شرکت بایونیر) با استفاده از آنزیم رونویسی معکوس M-MLV، طی مدت ۶۰ دقیقه در دمای ۴۲ درجه سانتی‌گراد انجام شد.

**واکنش زنجیره‌ای پلیمراز:** با استفاده از دو آغازگر رفت (F1 و F2) (که آغازگر F2 برای تکثیر قطعه کوچکی از ژن بود) و یک آغازگر برگشت (R)، که همگی با استفاده از نرم افزار Primer3 و بر اساس توالی mRNA کامل و ناقص ژن *ag1BIS* موجود در NCBI با شماره دستیابی AF006195.1 طراحی گردیده بودند (جدول ۲)، واکنش PCR در میکروتیوب‌های ۰/۲ میلی لیتری و در حجم نهایی ۵۰ میکرولیتر انجام شد (جدول ۳ و ۴).

مرحله قبل صورت گرفت. به میزان یک چهارم حجم، لیتیم کلراید به فاز مایع رویی اضافه شده و به مدت ۲ ساعت در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. سپس تیوب‌ها به مدت نیم ساعت با سرعت ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه و در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ شدند.

۸- به رسوب حاصله میزان یک میلی‌لیتر اتانول ۱۰۰ درصد اضافه شده و با دست تکان داده شده و سپس تیوب‌ها به مدت نیم ساعت روی یخ قرار گرفتند.

۹- رسوب‌ها با ۲۰۰ میکرولیتر اتانول ۷۰٪ شستشو داده شد و سپس روی دستمال کاغذی به صورت واژگون قرار داده شدند تا رسوب خشک شود، سپس ۵۰ میکرولیتر آب مقطر دوبار استریل (عاری از RNase) به آن‌ها اضافه شد.

۱۰- کمیت و کیفیت RNA به دست آمده با استفاده از دستگاه نانودراپ (مدل ۲۰۰۰، ساخت شرکت لیومد آلمان) و بارگذاری آن روی ژل آگارز ۱ درصد و انجام الکتروفورز مورد ارزیابی قرار گرفت.

جدول ۲- مشخصات آغازگرها

آغازگر	توالی	درصد GC	دمای اتصال (درجه سانتی‌گراد)
F1	5'- ATGGCTGCGTTTCTGC -3'	۵۸/۸	۵۶
F2	5'- GTT CTC ACA GAG CTG AAT AGC CTC -3'	۵۰	۷۲
R	5'- TTA CAG TGG CAGCGGTC -3'	۵۵/۵	۵۴

جدول ۳- چرخه حرارتی PCR

مرحله	دما (سانتی‌گراد)	زمان (ثانیه)	تعداد چرخه
واسرشت سازی ابتدایی	-	۲۴۰	۱
واسرشت سازی	۹۴	۶۰	-
اتصال	۴۸/۵	۶۰	۴۵
تکثیر	۷۲	۱۵۰	-
تکثیر نهایی	۷۲	۶۰۰	۱

جدول ۴- مقدار و غلظت ترکیبات PCR

غلظت نهایی	حجم ترکیبات (حجم کل ۵۰ μl)	ترکیبات
۱۵۰ ng	۲	DNA الگو (ng/μl)
۰/۵ pm	۲	آغازگر برگشت
۰/۵ pm	۲	آغازگر رفت
mmol/L ۰/۱	۲	dNTP
mmol/L ۳	۱	MgCl <sub>2</sub>
U ۲/۵	۱	Taq Polymerase
-	۵	10X buffer PCR
-	۳۵	آب مقطر استریل

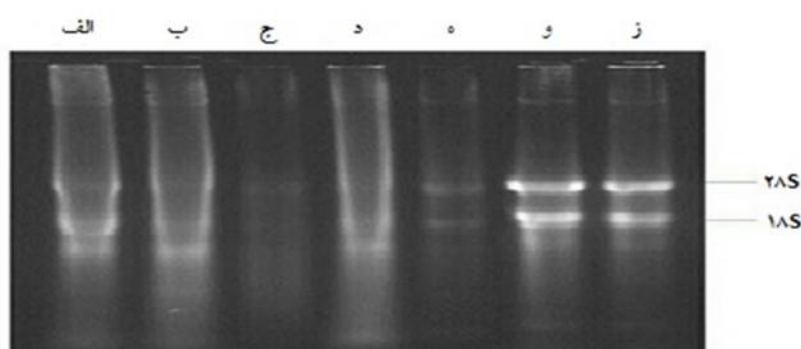
## نتایج

ژل آگارز ۱ درصد نشان داده شده است. وجود باندهای ۱۸S و ۲۸S به صورت قابل تفکیک و عدم مشاهده حالت اسمیر، نشان دهنده کیفیت مناسب RNA استخراج شده به روش حاضر بر روی ژل آگارز است (چاهک‌های و، ز). وجود اسمیر و شکستگی در دیگر چاهک‌ها نشان می‌دهد که سایر روش‌ها در استخراج RNA مورد نظر موفق عمل نکرده‌اند.

غلظت و جذب نوری قرائت شده در طول موج‌های ۲۸۰، ۲۶۰ و ۲۳۰ نانومتر و نسبت جذب‌های نوری قرائت شده برای تعیین کیفیت RNA استخراجی برای هر دو نمونه گیاهی با روش معرفی شده در جدول ۵ ارائه گردیده است. در شکل ۱ کمیت و کیفیت RNA استخراجی با روش‌های مختلف و روش معرفی شده در این تحقیق، روی

جدول ۵- غلظت و جذب نوری قرائت شده

نسبت ۲۶۰ به ۲۸۰	نسبت ۲۶۰ به ۲۳۰	غلظت (نانوگرم در میکرولیتر)	نام گیاه
۱/۸	۰/۹	۴۳۵/۹	<i>Abies grandis</i>
۱/۸۸	۱/۱	۴۶۸/۸	<i>Cedrus deodara</i>

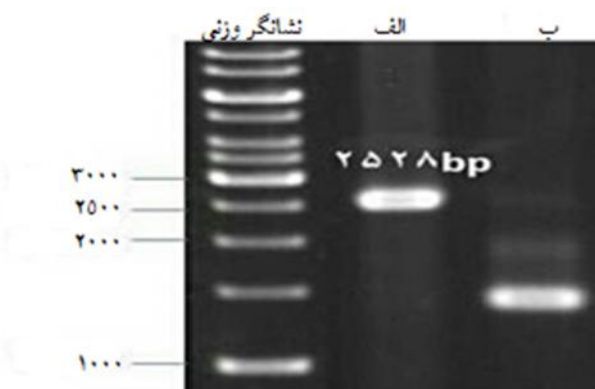


شکل ۱- RNA استخراج شده (الف) از بافت چوبی ساقه *Cedrus deodara* با روش Tattersall و همکاران، (ب) از بافت چوبی ساقه *Cedrus deodara* با روش Claros و Canovas، (ج) از بافت چوبی ساقه *Cedrus deodara* با استفاده از کیت RNX-Plus، (د) از بافت چوبی ساقه *Cedrus deodara* با روش Lorenz و همکاران، (ه) از بافت چوبی ساقه *Cedrus deodara* با روش Sambrook و همکاران، (و) از بافت چوبی ساقه *Cedrus deodara* با استفاده از روش حاضر (ز) از بافت چوبی ساقه *Abies grandis* به روش حاضر

مطالعه Chang و همکاران (۱۹۹۳)، از پیش‌گرمای بافر استخراج استفاده شده که این تیمار در روش حاضر نیز اعمال شد ولی برخلاف آنچه که Kolosava و همکاران (۲۰۰۴) گزارش کرده‌اند، هیچ‌گونه فعالیتی از قبیل فعال شدن نوکلئازها و در نتیجه تجزیه RNA نشان نداد، در واقع تیمار پیش‌گرمای بافر برای افزایش حلالیت و تجزیه دیواره سلول‌ها استفاده می‌شود. در تحقیق حاضر از ترکیب PVPP نیز استفاده شد. بر اساس گزارش Lewinsohn و همکاران (۱۹۹۴) استفاده از ترکیب PVPP جهت حذف و رسوب دادن ترکیبات فنولی موثر است اما استفاده از آن در یک مرحله جداگانه مانند آنچه که در پژوهش Claros و Canovas (۱۹۹۸) ذکر شده، هم به دلیل عدم حلالیت آن و هم افزایش احتمال حضور RNase‌ها توصیه نمی‌شود و افزودن آن به بافر استخراج مناسب‌تر است چراکه در آن زمان وجود اورین تری کربوکسیلیک اسید مانع از فعالیت RNase خواهد شد.

در این آزمایش از ۱۰۰ میلی‌گرم بافت استفاده شد چرا که هر قدر میزان بافت برداشتی بیشتر باشد، به همان میزان آلودگی‌ها (از نظر ترکیبات فنولی و پلی‌ساکاریدها و...) بیشتر بوده و حذف آن مشکل‌تر خواهد بود. روش‌هایی همچون روش Tattersall و همکاران (۲۰۰۵)، Lorenz و همکاران (۲۰۱۰) و Claros و Canovas (۱۹۹۸) وقت گیر و پرهزینه‌اند، در این روش‌ها استفاده از بافرهای استخراج در دو مرحله، ساترifiوژهای متعدد و برداشت مقادیر بالا از بافت چوبی، کیفیت RNA استخراجی را کاهش داده و RNA خالص و با کیفیتی را به دست نمی‌دهد (شکل ۱-ب)، لذا در این آزمایش تا حد امکان مراحل استخراج کوتاه شده و در مصرف مواد و محلول‌های شیمیایی نیز صرفه‌جویی شد. در ضمن Claros و Canovas (۱۹۹۸) گزارش کردند که استفاده از فنل برای تجزیه پروتئین‌ها به جای دیگر ترکیبات تجزیه‌کننده شیمیایی، یک روش مناسب برای استخراج می‌باشد، نتایج این مطالعه نشان داد که استخراج بدون استفاده از فنل نیز روشی موفق است چرا که اشباع کردن فنل خود دشوار بوده و برای برخی افراد حساسیت‌زاست و

شکل ۲ نتایج واکنش RT-PCR با استفاده از آغازگرهای اختصاصی ژن *agIE BIS* را نشان می‌دهد. همانطور که مشاهده می‌شود، باند موردنظر به خوبی تکثیر شده که نشان‌دهنده تولید cDNA با کمیت و کیفیت قابل قبول می‌باشد. در ستون "ب" دو باند غیراختصاصی هم دیده می‌شود ولی با دمای اتصال ۴۸ درجه سانتی‌گراد باند غیر اختصاصی تولید نشد.



شکل ۲- نتایج واکنش RT-PCR با استفاده از آغازگرهای اختصاصی ژن *agIE BIS* نشانگر وزن مولکولی یک کیلوبازی، ستون الف دمای اتصال ۴۸ درجه سانتی‌گراد را با آغازگر F1 بر روی cDNA سنتز شده از *Abies grandis* و ستون ب دمای اتصال ۶۴ درجه سانتی‌گراد را با آغازگر F2 بر روی cDNA سنتز شده از *Cedrus deodara*

## بحث

در این مطالعه ابتدا از کیت تجاری RNX-PLUS (شرکت سیناکلون) استفاده شد ولی با وجود گزارش‌های فراوان مبنی بر کارا بودن این کیت برای استخراج RNA در گیاهان مختلف، در مورد گیاهان مورد مطالعه در این تحقیق موفقیت‌آمیز نبوده و طی اجرای آن مقدار رسوب به دست آمده به طور غیرعادی زیاد و قهوه‌ای تیره بود که هیچ‌گونه جذبی را در طول موج‌های ۲۶۰ و ۲۸۰ نانومتر نشان نداد (شکل ۱-ج). در بسیاری از گزارش‌های موجود همچون

مرکاپتو اتانول نیز به دلیل سمیت حذف شد. این پژوهش با بهره‌گیری از ویژگی‌های کلیدی روش‌های مذکور و ایجاد تغییراتی مثبت در روند کار، RNA با کیفیتی را به دست می‌دهد.

طی مطالعه‌ای بر روی گیاه *Aegiceras corniculatum*، گزارش شد که افزودن LiCl به بافر استخراج موجب حذف پلی‌ساکاریدهای درگیر با RNA می‌شود (Fu et al., 2004). این تغییر در مورد گیاهان مورد بررسی در این تحقیق نیز مناسب بوده و بر خلاف مطالعه Chang و همکاران (۱۹۹۳) که به کم شدن کمیت و کیفیت RNA و ایجاد ناخالصی در آن اشاره کرده بودند، هیچ گونه محدودیتی نشان نداد.

در ضمن RNA استخراج شده با روش Tattersall و همکاران (۲۰۰۵) تجزیه شد (شکل ۱- الف) و رنگ رسوب به دست آمده قهوه‌ای و حل کردن آن در آب مشکل بود، این کیفیت پائین RNA را می‌توان به رسوب همزمان پلی‌ساکاریدها و اکسیداسیون ترکیبات فنلی که به‌طور برگشت ناپذیر با RNA واکنش می‌دهند، نسبت داد (Robiu-Pina and Zapata-Perez, 2011)، رنگ قهوه‌ای در فاز مایع رویی نیز به دلیل اکسیداسیون ترکیب هموژنیزه شده سلولی می‌باشد (Vasanthai et al., 2008). در حالی که رنگ قهوه‌ای رسوب نشان دهنده حضور پروتئین، کربوهیدرات و ترکیبات فنلی مخلوط شده با RNA است (Robiu-Pina and Zapata-Perez, 2011). در روش حاضر رنگ قهوه‌ای رسوب و آلودگی فنلی با افزودن PVPP به بافر استخراج به صورت معنی‌داری کاهش یافت. اجرای روش ارائه شده توسط Lorenz و همکاران (۲۰۱۰) اسامیر غلیظی را روی ژل آگارز نشان داد (شکل ۱- د) و نسبت‌های جذب نوری ۲۶۰ به ۲۸۰ و ۲۶۰ به ۲۳۰ نیز حاکی از آلودگی بالای DNA و پروتئین بود. نتایج تحقیق حاضر نشان داد که استفاده از بافر استخراج در دو مرحله، موجب افزایش میزان آلودگی نمکی شده و رسوب‌ها رنگ سفید و کدر به خود می‌گیرند، همچنین جذب نوری قرائت شده توسط دستگاه نانودراپ نیز به‌طور غیر عادی بالا بود.

امروزه تولیدکنندگان کیت‌های تجاری سعی در حذف این ماده دارند (Mousazade Moghadam, 2012). همچنین برخی مولکول‌های RNA، مخصوصاً RNA پیام رسان، با تیمار فنل خارج می‌شوند (Brown, 2006). از طرف دیگر، استفاده از فنل برای استخراج RNA از بافت‌های مخروطیان (Sambrook & Russel., 2001) منجر به تشکیل رسوب قهوه‌ای رنگ می‌شود که در این صورت عملکرد و کیفیت RNA بسیار پائین خواهد آمد (شکل ۱- ه). کاربرد فنل به همراه گوانیدیوم ایزوتیوسیانات، عملکرد بالاتری می‌دهد اما کیفیت همچنان پائین می‌باشد (Chang et al., 1993). کمیت و کیفیت پائین به‌طور عمده به دلیل اکسیداسیون ترکیبات فنولیک است که می‌تواند به‌طور برگشت ناپذیر به اسیدهای نوکلئیک متصل شوند و همزمان با آن‌ها رسوب نمایند (Schneiderbauer et al., 1991). به‌منظور غلبه بر این مشکل، از پلی‌وینیل پلی‌پیرولیدون (PVPP) در بافر استخراج استفاده می‌شود. این ترکیب با ایجاد کمپلکس با پلی‌فنول‌ها از طریق پیوندهای هیدروژنی، آن‌ها را از اسید نوکلئیک جدا می‌کند (Wang et al., 2005). استفاده از کلروفرم به جای فنل برای حذف پروتئین‌ها و لیپیدها نیز RNA استخراج شده را بدون رنگ می‌کند.

پرکاربردترین روش‌های استخراج RNA از گیاهان چوبی مانند روش‌های Canovas و Claros (۱۹۹۸)، Chang و همکاران (۱۹۹۳)، HarSiah و همکاران (۲۰۱۲)، Robiu-Pina و Zapata-Perez (۲۰۱۱)، Le Provast و همکاران (۲۰۰۷)، Yang و همکاران (۲۰۰۸) و Rodrigues و همکاران (۲۰۰۷)، همگی مبتنی بر استفاده از CTAB و SDS هستند که برای بافت‌های غنی از پلی‌ساکارید و ترکیبات پلی‌فنولیک تنظیم شده‌اند، در روش Yang و همکاران (۲۰۰۸) از ترکیب CTAB برای تجزیه غشای سلول و از بتا-مرکاپتو اتانول جهت جلوگیری از هر گونه واکنش اکسیداسیون نامطلوب استفاده شد ولی در روش حاضر همچون روش ارائه شده توسط Kolosava و همکاران (۲۰۰۴) از CTAB ۱۰ درصد در مرحله‌ای جداگانه برای حذف پلی‌ساکاریدها استفاده و ترکیب بتا-

محللول‌ها و ضدعفونی تجهیزات استفاده نشد و نتایج آزمایش نشان داد که استفاده نکردن از آن تأثیر چندانی در نتیجه آزمایش ندارد. در تحقیق Celaros و Canovas (۱۹۹۸) نیز از ماده DEPC استفاده نکرده‌اند. بر اساس این گزارشات استفاده از DEPC زمانی ضروری است که مدت زمان اتوکلاو کافی نباشد. از طرف دیگر، این ماده به‌طور کامل هم فعال باشد فقط ۰/۱ درصد RNase ها را از بین می‌برد و خودش نیز توسط تریس که یکی از اجزای بسیاری از بافرهاست، تجزیه می‌شود. این ماده در آب ناپایدار است و با یون‌های اکسیژن و نیتروژن و فسفر واکنش می‌دهد و در نهایت اینکه، چون سرطان‌زاست و برای پوست و چشم ضرر دارد، تلاش در جهت حذف آن لازم است.

در این مطالعه سرعت سانتیفریوژ در مرحله اول استخراج به ۷۰۰۰ دور در دقیقه کاهش یافت در این سرعت پروتئین و DNA به دلیل جرم مولکولی بیشتر نسبت به RNA در فاز پائین تر رسوب می‌کنند بنابراین فاز آبی کاملاً شفاف، در سطح رویی محلول موجود در تیوب مشاهده می‌شود که فقط حاوی RNA می‌باشد. از سوی دیگر برای جلوگیری از آلودگی DNA، برای برداشت فاز مایع رویی و اجرای مراحل بعدی استخراج، نوک سرسمپلر با قیچی استریل بریده شد تا سطح مقطع بزرگتر شود و امکان آلوده شدن به فاز میانی حاوی DNA به حداقل برسد. به همین دلیل در پایان مراحل استخراج نیازی به استفاده از DNAase نیز نبود.

برای بررسی کیفیت RNA استخراجی، ساخت cDNA نیز انجام و سپس برای جداسازی ژن مورد نظر واکنش PCR انجام شد. اگرچه برای انجام واکنش PCR مقادیر استاندارد از DNA لازم است، اما برای تکثیر یک محصول خاص و جلوگیری از ایجاد باندهای ناخواسته و غیراختصاصی باید شرایط آزمایش بهینه شود (Roux, 2015). مهم‌ترین عامل در بهینه‌سازی PCR، دمای اتصال آغازگر به رشته الگوی DNA است (Roux, 2015) که به‌روشنی‌های مختلفی تعیین می‌شود، اما در عمل به‌خاطر اینکه این دما به‌شدت تحت تأثیر ترکیبات بافر، آغازگرها و

طبق روش ارائه شده توسط Kolosava و همکاران (۲۰۰۴)، برای حذف پلی‌ساکاریدها، از ترکیب سدیم استات و اتانول ۱۰۰ درصد به تناوب و در چندین مرحله استفاده می‌شود که در تحقیق حاضر جهت سرعت بخشیدن به روند کار، این مراحل ادغام شدند.

نسبت جذب نوری در طول موج‌های ۲۶۰ به ۲۸۰ (جدول ۳) نشان‌دهنده عاری بودن نمونه از آلودگی پروتئینی می‌باشد، نسبت جذب در طول موج ۲۶۰ به ۲۳۰ نیز نشان می‌دهد RNA استخراج شده توسط روش حاضر بدون آلودگی‌های پلی‌ساکاریدی و پلی‌فنولی است. کیفیت RNA از طریق تکنیک الکتروفورز نیز بررسی شد که زیرواحدهای ۱۸S و ۲۸S rRNA ریوزومی را به‌طور واضح نشان داد (شکل ۱- و، ز).

به‌طور کلی، حساسیت کار با RNA به مراتب بیشتر از DNA بوده و تکنیک نمونه‌برداری روی کیفیت نتایج بسیار موثر بود، همچنین طی مراحل استخراج باید حداقل تنش مکانیکی را ایجاد نمود تا بتوان RNA سالم و با کیفیت به‌دست آورد، بنابراین کوتاه کردن مراحل استخراج و حذف برخی ترکیبات شیمیایی غیر ضروری تأثیر مثبتی بر روی کیفیت و کمیت RNA دارد و می‌توان جهت حذف برخی آلودگی‌ها نظیر آلودگی DNA از پائین آوردن دور سانتیفریوژ و دقت در جداسازی فازهای تشکیل شده در تیوب در هنگام عمل استخراج و یا جهت حذف آلودگی پلی‌ساکاریدی از تیمار سرمادهی (همانند روش ارائه شده توسط Kolosava و همکاران، ۲۰۰۴) استفاده کرد. روش حاضر در مقایسه با روش‌هایی که از نظر تکنیکی بسیار پیچیده‌اند (مثل روش‌های Asif و همکاران (۲۰۰۰)، Cara و همکاران (۲۰۰۷))، روش‌هایی که نیاز به استفاده از کیت‌های خالص سازی در مراحل مختلف استخراج دارند (مثل روش Gelrig و همکاران (۲۰۰۰)) و روش‌هایی که در آن‌ها از پلی‌وینیل پلی‌پیرولیدین و اسپرمیدین در بافر استخراج استفاده می‌شود (مثل روش‌های Reid و همکاران (۲۰۰۶) و Gasic و همکاران (۲۰۰۴)) از لحاظ کمیت و کیفیت برتری دارد. در روش حاضر از DEPC در تهیه



از طرفی روشی بی‌خطر از نظر زیست‌محیطی بوده و از طرف دیگر از لحاظ اقتصادی مقرون به صرفه می‌باشد و در هر آزمایشگاهی با امکانات محدود قابل اجراست.

### سپاسگزاری

نویسندگان این مقاله از همکاری شرکت دانش‌بنیان زیست‌فناوران نوین‌گیتی‌ژن واقع در مرکز رشد پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست‌فناوری ایران کمال تشکر را دارند.

### منابع مورد استفاده

- Asif, M.H., Dhuan, P. and Nath, P., 2000. A simple procedure for the isolation of high quality RNA from ripening banana fruit plant. *Molecular Biology Reporter*, 18: 109-115.
- Baker, J.T., Sanders, A.L., Maccotta, L. and Buckner, R.L., 2001. Neural correlates of verbal memory encoding during semantic and structural processing tasks. *Neuro Report*, 12: 1251-1256.
- Bell, D.A. and DeMarini, D., 1991. Excessive cycling converts PCR products to random-length higher molecular weight fragments. *Nucleic Acids Research*, 19: 5079-5079.
- Beutler, E., Gelbart, T. and Kuhl, W., 1990. Interference of heparin with the polymerase chain reaction. *BioTechniques*, 9: 166-166.
- Brown, T.A., 2006. Gene cloning an introduction. Translated by: AhmadianTehrani, P., University of Tehran Press. 415pp.
- Budavari, S., 1996. The Merck index- Encyclopedia of chemicals, Drugs and Biologicals. 12th edition.. Merck and Co., Inc., Rahway, N.J. U.S. 1175pp.
- Cara, A., Gambino, G. and Schubert, A., 2007. A cetylmethylammonium bromide based method to extract low-molecular-weight RNA from polysaccharide-rich plant tissue. *Analytical Biochemistry*, 360: 318-320.
- Chang, S., Puryear, J. and Carney, J., 1993. A simple and efficient method for isolation RNA from pine trees. *Plant Molecular Biology*, 11: 113-116.
- Claros, M.G. and Canovas, F.M., 1998. Rapid high quality RNA preparation from Pine seedlings. *Plant Molecular Biology Reporter*, 16:9-18.
- Dean, W.L. and C. Tanford. 1978. Properties of a delipidated detergent-activated Ca-ATPase. *Biochemistry*, 17: 1683-1690.

غلظت DNA الگو قرار می‌گیرد، هر دمای اتصالی به‌طور تقریبی در نظر گرفته شده و معمولاً ۵ درجه سانتی‌گراد پایین‌تر از دمای محاسبه شده را در نظر می‌گیرند (Roux, 2015). در پژوهش حاضر پس از محاسبه دمای  $T_m$ ، با بکارگیری روش شیب حرارتی، دمای واقعی مشخص شد. دیگر عاملی که PCR را محدود می‌کند حضور مهارکننده‌ها در رشته الگو می‌باشد. مهارکننده‌های متعددی از قبیل شوینده‌های یونی (مانند SDS و Sarkosyl)، (Weyant et al., 1990)، فنول و هپارین (Beutler et al., 1990)، برموفنل بلو و زایلن سیانول (Hoppe et al., 1992) می‌باشند که در این پژوهش حداقل آلودگی به این عوامل نشان داده شد، با اینحال در صورت وجود آلودگی می‌توان با یک مرحله رسوب‌دهی توسط اتانول و انجام سانتریفیوژ این مشکل را رفع کرد (Roux, 2015). عامل دیگر در بهینه‌سازی واکنش PCR تعداد چرخه‌ها می‌باشد که در این آزمایش تا ۴۵ چرخه به‌منظور تقویت باند مورد نظر افزایش یافت. اگرچه Bell و DeMarini در سال ۱۹۹۱ گزارش کردند که افزایش تعداد چرخه ممکن است منجر به تولید باندهای غیر اختصاصی شود، اما مطالعات Kaniz, Sullivan, (۲۰۰۰) و همکاران (۲۰۰۶)، Saiki و همکاران (۱۹۸۵)، Powell و همکاران (۱۹۸۷)، Sun و همکاران (۱۹۹۳) و Sarkar و همکاران (۱۹۹۰) نشان داده‌اند که افزایش تعداد چرخه‌ها تا ۴۵، زمانی که تعداد کپی‌های رشته الگو کم است، ضروری بوده و اثر مهارکنندگی در اثر افزایش محصول PCR فقط در موارد نادری رخ می‌دهد که تعداد چرخه‌ها بیشتر از ۴۵ باشد.

نتیجه کلی آنکه روش ارائه شده در پژوهش حاضر بر مشکلات استخراج RNA از بافت‌های سرشار از ترکیبات پلی‌فنولیک، پلی‌ساکاریدی و متابولیت‌های ثانویه فائق آمده و در هر آزمایشگاهی به آسانی قابل اجراست. از مزایای این روش می‌توان به سریع، آسان، ایمن و کم هزینه بودن آن اشاره کرد، چرا که مواد گیاهی کم و محلول‌های شیمیایی کمتری نیاز دارد و استفاده از ترکیبات مضر چون فنل و بتا مرکاپتو اتانول و DEPC در آن محدود شده است. بنابراین،

- bacterial genome of *Staphylococcus aureus* using laundry detergents and assessment of the efficiency of DNA in downstream process using. *Journal of Medical Laboratory Sciences*, 6: 35-42.
- Paula, M.F.B., Sagio, S.A., Lazzari, F., Barreto, H.G., Pavia, L.V. and Chalfun-Junior, A., 2012. Efficiency of extraction protocols in different types of coffee plant tissues. *Coffee Science*, 7:284-293.
  - Powell, L.M., Wallis, S.C., Pease, R.G., Edwards, Y.H., Knott, T.J. and Scott, J., 1987. A novel form of tissue-specific RNA processing produces apolipoprotein-B48 in intestine. *Cell*, 50: 831-840.
  - Reid, K.E., Olsson, N., Schlosser, J., Peng, F. and Lund, S.T., 2006. An optimized grapevine RNA isolation procedure and statistical determination of reference genes for real-time RT-PCR during berry development. *Plant Biology*, 6: 27-37.
  - Rodrigues, S.M., Soares, V.L., De Oliveira, T.M., Gesteira, A.S., Otoni, W.C. and Costa, M.G., 2007. Isolation and purification of RNA from tissues rich in polyphenols, polysaccharides, and pigments of annatto (*Bixa orellana* L.). *Molecular Biotechnology*, 37: 220-224.
  - Roux, K.H., 2009. Optimization and Trouble shooting in PCR. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Vol. 4, Issue 4. 7pp.
  - Rubio-Pina, J. and Zapata-Perez, O., 2011. Isolation of total RNA from tissues rich in polyphenols and polysaccharides of mangrove plants. *Plant Biotechnology*, 14:-11-11.
  - Saiki, R.K., Scharf, S., Faloona, F., Mullis, K., Glenn, B., Horn, T., Erlich, H.A. and Arnheim, N., 1985. Enzymatic Amplification of  $\beta$ -Globin genomic sequence and restriction site analysis for diagnosis of Sick Cell Anemia. *Science*, 230: 1350-1354.
  - Sambrook, J. and Russel, D.W., 2001. *Molecular Cloning: A laboratory manual*. Third edition. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press. 2100p.
  - Sarkar, G., Kapelner, S. and Sommer, S.S., 1990. Formamid can dramatically improve the specificity of PCR. *Nucleic Acid Research*, 18:7465-7465.
  - Schneiderbauer, A., Sanderman H.Jr. and Ernst, D., 1991. Isolation of functional RNA from plant tissues rich in phenolic compounds. *Annual Biochemistry*, 197: 91-95.
  - Steele, C.L., Katoh, S., Bolmann, J. and Croteau, R., 1998. Regulation of oleosinosis in Grand fir (*Abies grandis*) differential transcriptional control of monoterpene, sesquiterpene, and diterpene synthase gene in response to wounding. *Plant Physiology*. 116: 1497-504.
  - Sullivan, D., Fahey, B. and Titus, D., 2006. Fast PCR: General considerations for minimizing run times and
  - Fu, X., Deng, S., Su, G., Zeng, Q. and Shi, S., 2004. Isolating high-quality RNA from mangroves without liquid nitrogen. *Plant Molecular Biology Reporter*, 22: 197-198.
  - Gasic, K., Hernandez, A. and Korban, S., 2004. RNA extraction from different apple tissues rich in polyphenols and polysaccharides for cDNA library construction. *Plant Molecular Biology*, 22: 437-437.
  - Gelrig, H.H., Winter, K., Cusman, J., Borland, A. and Taybi, T., 2000. Improved RNA isolation method for succulent plant species rich in polyphenol and polysaccharides. *Plant Molecular Biology Reporter*, 18: 369-376.
  - Harsiah, C., Namasivayam, P. and Mohamed, R., 2012. Comparisons of different RNA extraction methods on woody tissues of the tropical tree, *Aquilaria malaccensis*. *Asia-Pacific Journal of Molecular Biology and Biotechnology*, 20 : 107-113.
  - Hoppe, B.L., Conti-Tronconi, B.M. and Horton R.M., 1992. Gel-loading dyes compatible with PCR. *BioTechniques*, 12: 679-680.
  - Kainz, P., 2000. The PCR plateau phase-towards an understanding of its limitations. *Biochemistry and Biophysics Acta*, 1494: 23-27.
  - Kamaloddini, H., Solooki, M., Riginegad, N. and Haddadi, F., 2006. *Plant Biotechnology*. Golbon Publication. Tehran, Iran. 238pp.
  - Kolosava, N., Miller, B., Ralph, S., Elis, B.E., Douglas, C., Ritland, K. and Bohlmann, J., 2004. Isolation of high-quality RNA from gymnosperm and Angiosperm trees. *Biotechniques*, 35: 821-824.
  - Ky, H., Yeap, S.K. and Napis, S.B., 2012. The best method for isolated total RNA from durian tissues. *International Food Research Journal*, 19: 1181-1183.
  - Le Provast, G., Herrera, R., Pavia, G., Chaumeil, P., Salin, F. and Plomion, C., 2007. A micromethod for high throughput RNA extraction in forest trees. *Biological Research*, 40: 291-297.
  - Lewinsohn, E., Steele, C.L. and Croteau, R., 1994. Simple isolation of functional RNA from woody stem of gymnosperms. *Plant Molecular Biology Report*, 12:20-25.
  - Loomis, W.D., 1974. Overcoming problems of phenolics and quinones in the isolation of plant enzymes and organelles. *Methods in Enzymology*, 31:528-544.
  - Lorenz, W.W., Yu, Y.S. and Dean, J.F.D., 2010. An improved method of RNA isolation from Loblolly Pine (*P. taeda* L.) and other conifer species. *Journal of Visualized Experiments*, 36: 1751-1756.
  - Mousazade Moghadam, M., Babavalian, H., Mirnejad, R. and Shakeri, F., 2012. Rapid DNA extraction of

- Wang, T., Zhang, N. and Du, L., 2005. Isolation of RNA of high quality and yield from *Ginkgo biloba* leaves. *Biotechnology Letters*, 27: 629-633.
- Warner, M.A. and Harper, J.V., 1985. Cardiac dysrhythmias associated with chemical peeling with phenol. *Anesthesiology*, 62: 366-367.
- Weyant, R.S., Edmonds, P. and Swaminathan, B., 1990. Effect of ionic and nonionic detergents on the *Taq* polymerase. *BioTechniques*, 9: 308-309.
- Yang, G., Zhou, R., Tang, T. and Shi, S., 2008. Simple and efficient isolation of high-quality total RNA from *Hibiscus tiliaceus*, a mangrove associate and its relatives. *Preparative Biochemistry and Biotechnology*, 38: 257-264.
- maximizing throughput. Bio-Rad Laboratories, Inc. Hercules, CA, USA. 36pp.
- Sun, Y., Hegamyer, G. and Colburn, N.H., 1993. PCR-directed sequencing of a GC-rich region by inclusion of 10% DMSO: application to c-jun. *Biotechniques*, 15: 372-374.
- 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 of Enology and Viticulture*, 56: 400-406.
- Vasanthaiah, H.K.N., Katam, R. and Sheikh, M.B., 2008. Efficient protocol for isolation of functional RNA from different grape tissue rich in polyphenols and polysaccharides for gene expression studies. *Electronic Journal of Biotechnology*, 11:1-8.

## Optimization of RNA extraction protocol for trees bark tissue of coniferous family

F. Haerizadeh<sup>1</sup>, A. Masoumi-Asl<sup>2</sup>, P. Azadi<sup>3</sup>, H. Rajabi-Memari<sup>4</sup> and N. Abofazeli<sup>5</sup>

1- M.Sc., Plant Breeding, Yasouj University, Yasouj, I. R. Iran.

2\*- Corresponding author, Assis. Prof., College of Agriculture, Yasouj University, I.R. Iran,

Email: Masoumiasl@yu.ac.ir

3- Assis. Prof., Agricultural Biotechnology Research Institute, Karaj, I.R. Iran.

4- Assis. Prof., College of Agriculture, Chamran University, Ahvaz, I.R. Iran.

5- Member of Novin Giti Gene Biotechnology Company, Tehran, I.R. Iran.

Received: 16.08.2015

Accepted: 20.12.2015

### Abstract

RNA extraction from hard wood tissues, especially in coniferous family trees, is very hard because they have high concentrations of phenolic compounds, polysaccharides, secondary metabolites and lignin. Moreover, up to now, no commercial kit is made for the mentioned purpose. In this study, the problems were resolved and a rapid, simple, and economic protocol is presented for RNA extraction from bark tissue of *Cedrus deodara* and *Abies grandis*, which belong to conifer family. Ratios of optical density of 260/280 nm and 260/230 nm were respectively obtained as 1.88 and 1.1 for *Cedrus deodara* and 1.8 and 0.9 for *Abies grandis*. Modifications for optimization of RNA extraction were preheating treatment of extraction buffer, and decreasing centrifuge rounds to eliminate DNA contaminations and DEPC. Synthesis of cDNA was performed using extracted RNA. RT-PCR successfully produced expected bands. Therefore, it seems that the presented protocol is suitable for RNA extraction from woody tissues.

**Keywords:** *Abies grandis*, bark tissue, DEPC, phenolic compounds.