مجله دانشکده پزشکی اصفهان
سال بیست و نهم/شماره ۱۳۳/هفته اول خرداد ماه ۱۳۹۰
مقاله پژوهشی
تاریخ دریافت: ۸۹/۱۰/۱۱ تاریخ پذیرش: ۹۰/۱/۲۰

ارزیابی و بهینه‌سازی روش‌های مختلف استخراج RNA از بافت‌های منجمد انسانی

فائزه محمدهاشم[۱]، دکتر پروانه نیک پور[۲]، دکتر مجتبی عمادی بایگی[۳]

خلاصه

مقدمه: استفاده از RNAی سالم جهت به کارگیری در روش‌های ژنتیک مولکولی مانند میکرواری و Real-time polymerase chain reaction یا RT-PCR کمی، ضروری به نظر می‌رسد. کار با RNAیی با کیفیت پایین، ممکن است نتایج بعدی حاصل از کار بر روی این RNA را تحت تأثیر قرار دهد. در مطالعه‌ی حاضر بر آن شدیم با مقایسه و بهینه‌سازی روش‌های مختلف استخراج RNA با استفاده از کیت‌های متفاوت و تیمار با آنزیم DNase، به روشی استاندارد جهت استخراج RNAی از بافت‌های منجمد انسانی دست یابیم.

روش‌ها: با استفاده از کیت‌های RNX plus سیناژن، RNeasy Mini و RNeasy Plus Mini کیاژن، استخراج RNAی کل از بافت‌های منجمد انسانی شامل معده (۴۰ عدد)، گلیوما (۵ عدد) و پستان (۱۵ عدد) صورت گرفت و به منظور از بین بردن DNAی ژنومی، از تیمار با DNase استفاده شد. پس از استخراج RNA، کیفیت و کمیت آن با استفاده از اسپکتروفوتومتری و ژل الکتروفورز مورد بررسی قرار گرفت. بعد از سنتز cDNA، روش RT-PCR با استفاده از پرایمرهای اختصاصی طراحی شده برای ژن *TBP* انجام شد و نتایج با استفاده‌ی از الکتروفورز ژل آگارز مورد بررسی قرار گرفت.

یافته‌ها: RNAی استخراج شده با کیت RNX plus سیناژن بعد از تیمار با DNase نتایج مناسبی در واکنش RT-PCR نشان نداد. RNAی استخراجی با کیت RNeasy Mini کیاژن به دلیل استفاده‌ی از DNase در مراحل استخراج RNA و کیت RNeasy Plus Mini نیز به دلیل داشتن ستون حذف کننده‌ی DNA ژنومی کیفیتی خوب برای واکنش RT-PCR داشتند.

نتیجه‌گیری: ترکیب کیت RNaesy Mini، محلول کیازل و استفاده‌ی از DNase طی مراحل استخراج، مناسب‌ترین روش جهت استخراج RNA از بافت‌های منجمد انسانی بوده و RNAی استخراجی می‌تواند با اطمینان جهت آزمایش‌های مولکولی پایین دستی مورد استفاده قرار گیرد.

واژگان کلیدی: استخراج RNA، بافت انسانی، بیان ژن.

مقدمه

از آن جایی که سطح بیان RNA نشانگر خوبی از وضعیت فیزیولوژیک سلول و بافت است، صحت اندازه‌گیری میزان بیان ژن به شدت متأثر از کمیت و کیفیت RNAی آغازی می‌باشد. خلوص و تمامیت RNA، عناصر مهم برای موفقیت کلی آنالیزهای پایین دستی هستند که بر پایه‌ی RNA می‌باشند. شروع کار با RNAیی که دارای کیفیت پایینی است، نتایج آنالیزهای بعدی را که سخت، زمان‌بر و گران قیمت هستند، تحت تأثیر قرار می‌دهد (۲-۱). لذا در مطالعات زیست‌شناسی مولکولی و کاربردهای تشخیصی باید از RNAیی با کیفیت بالا به عنوان نقطه‌ی شروع (Starting point) استفاده کرد. به خصوص در تکنیک Real-time polymerase chain reaction یا RT-PCR کمی، میکرواری، هیبریدیزاسیون درجا، آنالیز نورترن بلات، نقشه‌برداری RNA، کتابخانه‌ی cDNA و هر نوع کاربرد آرایه‌ای، تمامیت RNAی کل استفاده شده باید کنترل شود. مطالعات مختلفی اثرات

[۱] کارشناسی ارشد ژنتیک، بخش ژنتیک، گروه زیست پزشکی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران.
[۲] دکتری تخصصی ژنتیک، بخش ژنتیک، گروه زیست پزشکی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران.
[۳] دکتری تخصصی ژنتیک، گروه ژنتیک، دانشکده‌ی علوم پایه و پژوهشکده‌ی زیست فناوری، دانشگاه شهرکرد، شهرکرد، ایران.
نویسنده‌ی مسؤول: : دکتر پروانه نیک پور
Email: pnikpour@med.mui.ac.ir

Archive of SID
www.SID.ir

مجزای تمامیت RNAی کل را روی الگوی بیان ژنی با استفاده از RT-PCR کمی و میکروواری بررسی کرده‌اند (۵-۳). همچنین در کاربرد کلینیکی که میزان نمونه‌ی بافتی محدود و منحصر به فرد است، نظیر نمونه‌ی به دست آمده از عمل جراحی، RNA با کیفیت قابل قبول مورد نیاز است (۶). به دلیل ساختار متفاوت RNA نسبت به DNA (وجود گروه هیدروکسیل به جای اکسیژن در کربن شماره '۲)، این مولکول به نسبت فعال‌تر بوده و نسبت به هیدرولیز حساس‌تر است. علاوه بر این، آنزیم تجزیه‌کننده‌ی RNA یعنی RNase در محیط به وفور وجود داشته و باعث تجزیه‌ی سریع RNA می‌شود. RNaseها آنزیم‌های بسیار پایدار و فعالی هستند که اغلب برای عملکرد خود به کوفاکتورها نیاز ندارند، به همین دلیل در تمامی مراحل کار باید تمامی شرایط دست ورزی بافت به دقت کنترل شود تا کیفیت و تمامیت RNA حفظ شود (۷). برای تشخیص خلوص RNA، از نسبت جذب نوری ۲۶۰ نانومتر به ۲۸۰ نانومتر (OD260/OD280) استفاده می‌شود. با این حال، این پارامتر تنها اطلاعاتی در رابطه با آلودگی فنل یا پروتئین داده و اطلاعات دقیقی از تمامیت RNA در اختیار قرار نمی‌دهد. برای بررسی تمامیت RNA، بهترین روش استفاده از الکتروفورز RNAی استخراج شده بر روی ژل آگارز است (۸).

برای یک اندازه‌گیری کمی قابل اعتماد و حساس از mRNA با میزان بیان پایین، تکنیک RT-PCR کمی روش انتخابی در اولویت اول است. این تکنیک بسیار حساس و قادر به شناسایی مقادیر بسیار کم RNA در نمونه می‌باشد. شناسایی دقیق غلظت RNAی کل برای اندازه‌گیری تعداد کپی mRNA بسیار مهم بوده است و هر گونه آلودگی DNA می‌تواند منجر به کمی کردن غیردقیق میزان RNA شود (۹). بنابراین، هر نوسانی در تعداد کپی mRNA بسیار مهم می‌باشد و تفاوت در نتایج میزان بیان ژن می‌تواند ناشی از سطوح متفاوت آلودگی با DNA میان نمونه‌ها باشد. برای رفع این مشکل، از تیمار RNA با آنزیم DNase استفاده می‌شود، اگرچه بسیاری از محققان به خاطر ترس از RNase موجود در DNase و تجزیه RNAی استخراج شده در حین ذخیره‌سازی طولانی مدت، از تیمار با آنزیم DNase استفاده نمی‌کنند (۷). نتایج مطالعات متعدد پیشنهاد می‌کنند که چنان‌چه پرایمرهای مورد استفاده در PCR، روی دو اگزون متفاوت طراحی شده باشند، به طوری که حداقل یک اینترون را در بر بگیرند، در این صورت با اتصال پرایمرها به DNAی ژنومی محصولی با طول متفاوت نسبت به cDNA ایجاد می‌شود و نیازی به تیمار با آنزیم DNase نمی‌باشد. ولی با این وجود، به خاطر اطمینان از عدم حضور هر گونه آلودگی و تأثیر آن بر نتایج RT-PCR کمی، بهتر است از تیمار با آنزیم DNase استفاده شود (۱۰-۹). با توجه به نقش مهم تمامیت و کیفیت RNAی استخراجی بر روی مراحل بعدی آزمایش‌هایی که بر مبنای RNA هستند، در این مطالعه بر آن شدیم با مقایسه و بهینه‌سازی روش‌های مختلف استخراج RNAی کل از بافت‌های منجمد انسانی و تأثیر تیمار با آنزیم DNase روی آزمایش‌های پایین دستی، بهترین روش استخراج RNA از بافت را بر اساس کیت‌های موجود در بازار مورد ارزیابی قرار دهیم.

روش‌ها

نمونه‌های بافتی انسانی از معده (۴۰ عدد)، گلیوبلاستوما (۵ عدد) و پستان (۱۵ عدد)، با در نظر گرفتن کلیه‌ی

Archive of SID
www.SID.ir

شرایط عاری از RNase با استفاده از تانک نیتروژن به آزمایشگاه منتقل و با استفاده از سه کیت مختلف RNX plus (Cat#RN7713C سیناژن)، RNeasy Mini (Cat#74104 کیاژن) و RNeasy Plus Mini (Cat#74134 کیاژن) استخراج RNAی کل صورت گرفت. در کلیه‌ی موارد، با توجه به پروتکل شرکت‌های سازنده عمل شد؛ با این تفاوت که به منظور بالا بردن میزان بازده‌ی استخراج توسط کیت RNeasy Mini، به جای استفاده از محلول RLT همراه کیت، از محلول استخراج RNA کیازل (Cat#79306 کیاژن) استفاده شد. لازم به ذکر است کیت RNeasy Plus Mini به دلیل داشتن یک ستون جدا کننده‌ی DNA نیازی به تیمار بعدی با آنزیم DNase نداشته و در همان مرحله‌ی اول، آلودگی ژنومی را از RNA جدا می‌کند، ولی در رابطه با دو کیت استخراج دیگر، از تیمار با آنزیم DNase به منظور حذف DNAی ژنومی استفاده شد. در مورد محلول RNX plus، بعد از انجام مراحل استخراج و قبل از سنتز cDNA، از تیمار با آنزیم DNase I (Cat#EN0521 فرمنتاز) و در مورد کیت RNeasy Mini از آنزیم RNase-Free DNase set (Cat#79254 کیاژن) استفاده شد. تفاوت DNase مورد استفاده در کیت RNeasy Mini در مقایسه‌ی با محلول RNX plus در این بود که آنزیم DNase در مورد اولی طی مراحل استخراج استفاده شده و بر روی ستون‌هایی که در این کیت وجود دارند باقی مانده و اثری از DNase در مراحل بعدی باقی نمی‌ماند. پس از استخراج RNA، در مرحله‌ی اول، کمیت و کیفیت آن با استفاده از اسپکتروفوتومتری و ژل الکتروفورز مورد بررسی قرار گرفت و سپس به منظور بررسی تأثیر کیفیت RNAی استخراجی در آزمایش‌های پایین دستی، از سنتز cDNA و انجام روش RT-PCR با استفاده از پرایمرهای اختصاصی طراحی شده برای ژن سرای گردان (House keeping) *TBP* استفاده گردید و نتایج با استفاده از الکتروفورز ژل آگارز مورد بررسی قرار گرفت. جهت بررسی آماری داده‌ها از نرم‌افزار SPSS نسخه‌ی ۱۶ (version 16, SPSS Inc., Chicago, IL) استفاده شد. به منظور مقایسه‌ی کمیت و کیفیت RNAی استخراجی از بافت‌ها و کیت‌های مختلف از آزمون آماری ANOVA استفاده شد. برای تمامی‌محاسبات آماری انجام شده، مقدار P کمتر از ۰/۰۵ به عنوان اختلاف معنی‌دار در نظر گرفته شد.

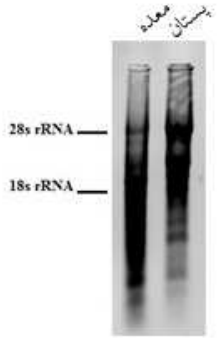
یافته‌ها

در فاز اول پروژه، RNAی کل از بافت‌های منجمد انسانی با استفاده از محلول RNX Plus محصول شرکت سیناژن (ساخت ایران) استخراج گردید. برای اطمینان از کیفیت RNAی استخراج شده از بافت، علاوه بر استفاده از اسپکتروفوتومتر (تعیین غلظت و میزان آلودگی با پروتئین و ...)، ۵ میکرولیتر از RNA نیز روی ژل آگارز ۱ درصد برده و در دستگاه Gel doc مشاهده شد. همان طور که در شکل شماره‌ی ۱ مشاهده می‌شود، باند RNAهای ریبوزومی ۱۸s و ۲۸s قابل تشخیص بوده و اسمیر میان این دو باند مربوط به mRNAها می‌باشد که نشان دهنده‌ی کیفیت مناسب RNAی استخراج شده است.

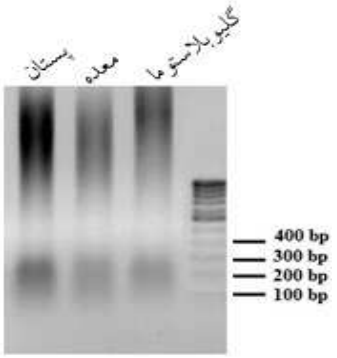
برای اطمینان از عدم حضور آلودگی DNA ژنومی، RNA استخراجی با محلول RNX Plus، با آنزیم DNase I تیمار شد. پس از تیمار، cDNA تهیه و در واکنش PCR استفاده شد. نتایج حاصل از واکنش PCR با پرایمرهای ژن *TBP* نشان داد که به جای تک

Archive of SID
www.SID.ir

باند مورد نظر برای تمامی بافت‌ها، اسمیر مشاهده می‌شود (شکل شماره‌ی ۲). لازم به ذکر است اندازه‌ی باند قابل انتظار برای ژن *TBP*، ۱۲۸ جفت باز می‌باشد.

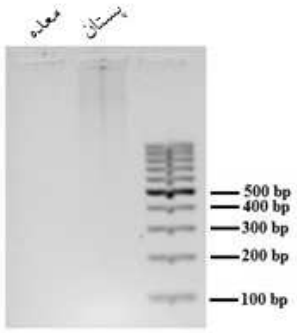


شکل ۱. الگوی RNAی استخراج شده از دو نمونه‌ی بافتی انسانی معده و پستان الکتروفورز شده روی ژل آگارز ۱ درصد. در شکل، باندهای مربوط به RNA های ریبوزومی ۲۸s و ۱۸s، قابل مشاهده‌اند.



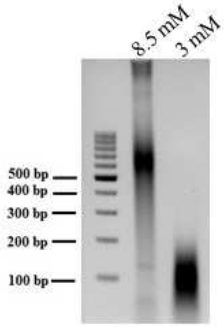
شکل ۲. نتایج حاصل از ژل الکتروفورز محصولات RT-PCR ژن *TBP* روی RNAی استخراج شده از بافت‌های مختلف با محلول RNX Plus و تیمار شده با DNase I

از آن جایی که شاید یکی از دلایل مشاهده‌ی اسمیر، وجود میزان اضافه‌ی $MgCl_2$ در واکنش باشد، در مرحله‌ی بعدی به منظور حذف اسمیر، شرایط واکنش RT-PCR تغییر داده شد و به منظور کاهش میزان $MgCl_2$ی کل ($MgCl_2$ مورد استفاده در واکنش سنتز cDNA و PCR)، در مرحله‌ی سنتز cDNA از $MgCl_2$ استفاده نشد. پس از انجام واکنش RT-PCR و الکتروفورز محصولات، هیچ محصولی روی ژل مشاهده نشد (شکل شماره‌ی ۳).



شکل ۳. نتایج حاصل از ژل الکتروفورز محصولات RT-PCR روی ژن *TBP* با حذف $MgCl_2$ در واکنش سنتز cDNA

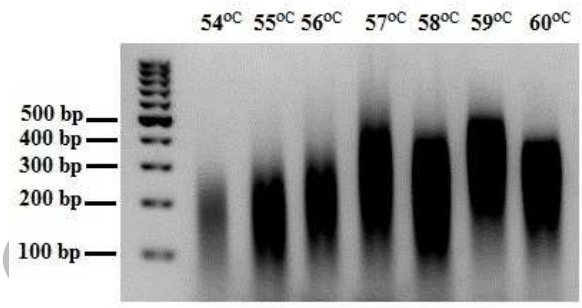
در مرحله‌ی بعدی، برای حل این مشکل از دو غلظت مختلف $MgCl_2$ در واکنش سنتز cDNA استفاده شد. با این وجود، بعد از PCR روی این cDNAها، دوباره اسمیر مشاهده شد (شکل شماره‌ی ۴).



شکل ۴. نتایج حاصل از ژل الکتروفورز محصولات RT-PCR روی ژن *TBP* با استفاده از دو غلظت متفاوت $MgCl_2$ در واکنش سنتز cDNA

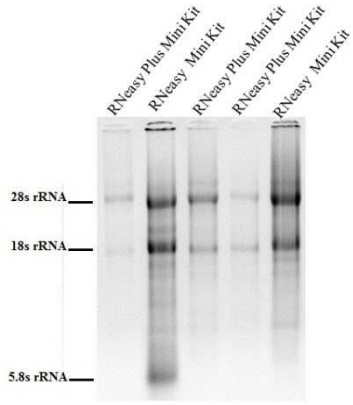
www.SID.ir

در مرحله‌ی بعدی، برای از بین بردن اسمیر حاصل از استفاده‌ی از دو غلظت مختلف $MgCl_2$، از گرادیان دمایی (مرحله Annealing) در واکنش PCR استفاده شد. با این حال هیچ تغییری در نتایج حاصل از واکنش PCR به وجود نیامد و هم‌چنان در کلیه‌ی دماهای Annealing، اسمیر مشاهده می‌شد (شکل شماره‌ی ۵).



شکل ۵. نتایج حاصل از ژل الکتروفورز محصولات RT-PCR روی ژن *TBP* با استفاده‌ی از گرادیان دمایی Annealing

در فاز دوم پروژه، از دو کیت RNeasy Mini و RNeasy Plus Mini شرکت کیاژن، به منظور استخراج RNAی کل از بافت‌های منجمد انسانی استفاده شد. کیفیت و کمیت RNAی کل با استفاده‌ی از ژل الکتروفورز و دستگاه اسپکتروفتومتری مورد بررسی قرار گرفت که نتایج حاصل، نشان از کیفیت بالای RNAی استخراجی با استفاده‌ی از کیت‌های مذکور داشت (شکل شماره‌ی۶)؛ با این تفاوت که کمیت و خلوص RNAی استخراجی با استفاده از کیت RNeasy Mini بالاتر بود (P =۰/۰۳). همان طور که پیش از این اشاره شد، به منظور بالا بردن میزان بازده استخراج توسط کیت RNeasy Mini، به جای استفاده‌ی از محلول RLT همراه کیت، از محلول استخراج RNAی کیازل (Cat#79306 کیاژن) استفاده شد. کیت RNeasy Plus Mini به دلیل داشتن یک ستون جدا کننده‌ی DNA هیچ نیازی به تیمار بعدی با آنزیم DNase نداشته و در همان مرحله‌ی اول استخراج RNA، آلودگی ژنومی را از RNA جدا می‌کند و در رابطه با کیت RNeasy Mini نیز در همان اواسط استخراج RNA، تیمار با ست جداگانه آنزیم DNase I روی ستون مخصوصی انجام می‌گیرد؛ به طوری که با شستشوهای بعدی با بافرهای مخصوص این کیت، RNAی خالص از ستون خارج می‌شود.

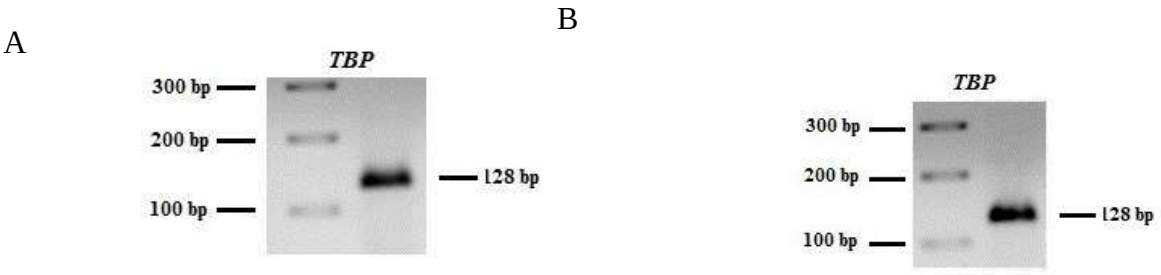


شکل۶. الگوی RNAی استخراج شده از بافت‌های انسانی مختلف با استفاده از دو کیت RNeasy Mini و RNeasy plus Mini و الکتروفورز شده روی ژل آگارز ۱ درصد. در شکل، باندهای مربوط به RNA های ریبوزومی ۲۸s، ۱۸s و ۵/۸s قابل مشاهده هستند.

برای اطمینان از عملکرد مناسب RNAهای استخراج شده توسط کیت‌های RNeasy Plus Mini و RNeasy Mini در آزمایش‌های پایین دستی، cDNA سنتز و با استفاده‌ی از پرایمرهای اختصاصی ژن *TBP*، واکنش PCR انجام شد. محصول PCR به صورت یک تک باند اختصاصی با طول ۱۲۸ باز بر روی ژل الکتروفورز مشاهده گردید (شکل شماره‌ی ۷).

Archive of SID

www.SID.ir



شکل۷. نتیجه‌ی حاصل از RT-PCR ژن *TBP* بر روی RNAی استخراج شده با استفاده از کیت A) RNeasy Mini و B) RNeasy Plus Mini.

بحث

همان طور که اشاره شد سطح بیان RNA، نشانگر خوبی از وضعیت فیزیولوژیک سلول و بافت است و صحت اندازه‌گیری میزان بیان ژن به شدت متأثر از کمیت و کیفیت RNAی آغازی می‌باشد (۲-۱). موفقیت در هر آنالیزی که بر اساس RNA است (برای مثال RT-PCR، میکرواری و ...)، وابسته به خلوص، کمیت مناسب و تمامیت RNAی استخراج شده است (۱۱). در چند سال اخیر، آنالیز RNA بخش مهمی از مطالعات را به خود اختصاص داده و روش‌های متفاوت استخراج، RNAهایی با کیفیت و کمیت متفاوت را به دست می‌دهند. به عنوان مثال، تغییر روش هموژنیزاسیون بافت، به تنهایی می‌تواند RNAهایی با کیفیت متفاوت ایجاد کند (۳). منشأ RNAی استخراجی (برای مثال انسان، حیوان یا گیاه)، روند نمونه‌گیری بافت، در کنار روش استخراج RNA، همگی روی کمیت و کیفیت RNAی استخراجی اثرگذار هستند. برای مثال استفاده از محلول تجاری Trizol برای استخراج RNA، در مقایسه‌ی با تکنیک‌های مبتنی بر ستون، RNAیی با کیفیت پایین‌تر به دست می‌دهد (۱۲، ۴). از آن جایی که استخراج RNA از نمونه‌های بافت انسانی، که بسیار ارزشمند هستند، نقطه‌ی شروع در مطالعات پایین دستی نظیر بررسی بیان ژن محسوب می‌شود؛ در این مطالعه بر آن شدیم که روش‌های مختلف در دسترس برای استخراج RNA را مقایسه کنیم تا بتوانیم به روشی بهینه و استاندارد برای استخراج RNA از بافت‌های منجمد انسانی دست یابیم.

در فاز اول مطالعه، از محلول RNX Plus (ساخت شرکت ایرانی سیناژن) جهت استخراج RNA از بافت‌های مختلف انسانی و سپس تیمار با آنزیم DNase I برای حذف آلودگی DNA ژنومی استفاده شد. با وجود تغییر دادن شرایط مختلف جهت بهینه‌سازی شرایط استخراج و واکنش‌های پایین دستی نظیر سنتز cDNA و RT-PCR، استفاده از این محلول نتوانست نتایج قابل قبولی را به دست آورد. لذا در فاز دوم مطالعه، از دو کیت تجاری شرکت کیاژن به نام‌های RNeasy Plus Mini و RNeasy Mini که تکنولوژی استخراج RNA و حذف DNAی ژنومی در آن‌ها مبتنی بر ستون‌های RNeasy Mini Spin می‌باشد، استفاده شد. نتایج نشان داد که ترکیب کیت RNeasy Mini، محلول لیز بافت کیازل (Qiazol) به همراه استفاده از RNase-Free DNase set بهترین نتایج را از نظر کمیت و کیفیت RNAی استخراجی و نیز واکنش RT-PCR، به بار می‌آورد. در مطالعه‌ای در سال ۲۰۰۹،

Archive of SID
www.SID.ir

Jakovljevic و همکاران به مقایسه‌ی کیفیت و تمامیت RNAی استخراج شده از نمونه‌های خون و لکوسیت‌های مربوط به بیماران مبتلا به لوکمی مایلوئید با استفاده از سه روش: گوانیدیوم تیوسیونات-فنل-کلروفرم (TRI Reagent®)، PrepStation 6100 و QIAamp® پرداختند. نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که روش مبتنی بر گوانیدیوم تیوسیونات-فنل-کلروفرم (TRI Reagent®) نسبت به دو کیت دیگر از کارایی بالاتری برخوردار است (۱۳). در مطالعه‌ی دیگری در سال ۲۰۰۹، Muyal و همکاران با بررسی استخراج RNA از سه نمونه‌ی بافت منجمد شده و سه نمونه‌ی بافت تازه‌ی ریه به مقایسه‌ی دو روش گوانیدین تیوسیونات-فنل- کلروفرم (GTC) و ستون ژل سیلیکا (SGC) پرداختند. آن‌ها دریافتند RNAی به دست آمده از هر دو روش GTC و SGC از نظر خلوص و تمامیت از کیفیت خوبی برخوردار بوده است؛ ولی تمامیت RNAی استخراج شده با روش SGC از نظر حفظ تمامیت هر سه نوع RNAی ریبوزومی موجود در سلول نسبت به روش GTC دارای مزیت است (۱۴). همچنین در سال ۲۰۱۰، Abdel Nour و همکاران به منظور بهینه‌سازی استخراج RNA از خون خرگوش، پنج روش مختلف استخراج RNA را مورد بررسی قرار دادند. آن‌ها در مطالعه‌ی خود از کیت‌های تجاری شامل TRIzol - LS Reagent (# 10296-010, Invitrogen)، QIAamp RNA Blood Mini (#52304, Qiagen)، RiboPure- Blood (#AM1928, Applied Biosystems)، RNeasy Protect Animal Blood (#73224, Qiagen) و RNeasy Lipid Tissue استفاده نمودند. نتایج آن‌ها نشان داد که استفاده از کیت RNeasy Lipid Tissue مناسب‌ترین روش جهت استخراج RNA از خون خرگوش محسوب می‌شود (۱۵). در مطالعه‌ی حاضر با مقایسه‌ی نتایج به دست آمده و بررسی کیفیت RNAی استخراجی توسط کیت‌های مختلف، به نظر می‌رسد ترکیب کیت RNaesy Mini، محلول کیازل به همراه استفاده‌ی از RNase-Free DNase set طی مراحل استخراج، مناسب‌ترین روش جهت استخراج RNA از بافت‌های منجمد انسانی بوده و RNAی استخراجی می‌تواند با اطمینان جهت آزمایش‌های مولکولی پایین دستی نظیر بررسی کمی بیان ژن مورد استفاده قرار گیرد.

لازم به ذکر است که یکی از محدودیت‌های این مطالعه استفاده از تنها سه نوع متفاوت بافت منجمد انسانی می‌باشد. در صورتی که بتوان مطالعه‌ی مشابهی بر روی سایر بافت‌های انسانی طراحی نمود و به انجام رسانید، با اطمینان بیشتری می‌توان ترکیب "کیت RNaesy Mini، محلول کیازل به همراه استفاده از RNase-Free DNase set" را جهت استخراج RNA از سایر بافت‌های منجمد انسانی توصیه نمود. علاوه بر این، استفاده از نانوچیپ‌هایی که کیفیت RNA را به صورت کمی و به شکل "عدد تمامیت RNA" (RNA Integrity Number = RIN) نشان می‌دهند، می‌تواند تصویر کمی و دقیق‌تری از وضعیت RNA به ما ارائه نماید. در حال حاضر دستگاه Agilent Bioanalyzer قادر به محاسبه‌ی "عدد تمامیت RNA" می‌باشد که متاسفانه هنوز امکان استفاده از نانوچیپ‌های مذکور در ایران وجود ندارد.

تشکر و قدردانی

از جناب آقای وحید بهرام بیگی که در تهیه‌ی بافت‌های منجمد انسانی مشارکت نمودند، تشکر و قدردانی می‌گردد.

Archive of SID
www.SID.ir

References

1. Raeymaekers L. Quantitative PCR: theoretical considerations with practical implications. Anal Biochem 1993; 214(2): 582-5.
2. Imbeaud S, Graudens E, Boulanger V, Barlet X, Zaborski P, Eveno E, et al. Towards standardization of RNA quality assessment using user-independent classifiers of microcapillary electrophoresis traces. Nucleic Acids Res 2005; 33(6): e56.
3. Fleige S, Pfaffl MW. RNA integrity and the effect on the real-time qRT-PCR performance. Mol Aspects Med 2006; 27(2-3): 126-39.
4. Fleige S, Walf V, Huch S, Prgomet C, Sehm J, Pfaffl MW. Comparison of relative mRNA quantification models and the impact of RNA integrity in quantitative real-time RT-PCR. Biotechnol Lett 2006; 28(19): 1601-3.
5. Sarkar D, Parkin R, Wyman S, Bendoraite A, Sather C, Delrow J et al. Quality assessment and data analysis for microRNA expression arrays. Nucleic Acids Res 2009; 37(2): e17.
6. Bustin SA, Nolan T. Pitfalls of quantitative real-time reverse-transcription polymerase chain reaction. J Biomol Tech 2004; 15(3): 155-66.
7. Becker C, Hammerle-Fickinger A, Riedmaier I, Pfaffl MW. mRNA and microRNA quality control for RT-qPCR analysis. Methods 2010; 50(4): 237-43.
8. Bevilacqua C, Makhzami S, Helbling JC, Defrenaix P, Martin P. Maintaining RNA integrity in a homogeneous population of mammary epithelial cells isolated by Laser Capture Microdissection. BMC Cell Biol 2010; 11: 95.
9. Bustin SA. Quantification of mRNA using real-time reverse transcription PCR (RT-PCR): trends and problems. J Mol Endocrinol 2002; 29(1): 23-39.
10. Bauer P, Rolfs A, Regitz-Zagrosek V, Hildebrandt A, Fleck E. Use of manganese in RT-PCR eliminates PCR artifacts resulting from DNase I digestion. Biotechniques 1997; 22(6): 1128-32.
11. Bustin SA, Benes V, Nolan T, Pfaffl MW. Quantitative real-time RT-PCR--a perspective. J Mol Endocrinol 2005; 34(3): 597-601.
12. Santiago-Va'zquez LZ, Ranzer LK, Kerr RG. Comparison of two total RNA extraction protocols using the marine gorgonian coral Pseudopterogorgia elisabethae and its symbiont Symbiodinium sp. Electron J Biotechnol 2006; 9(5): 598-603.
13. Jakovljevic KV, Spasic MR, Malislic EJ, Dobricic J, Krivokuc AM, Jankovic RN. Comparison of phenol-based and alternative RNA isolation methods for gene expression analyses. Journal of the Serbian Chemical Society 2010; 75(8): 1053-61.
14. Muyal JP, Muyal V, Kaistha BP, Seifart C, Fehrenbach H. Systematic comparison of RNA extraction techniques from frozen and fresh lung tissues: checkpoint towards gene expression studies. Diagn Pathol 2009; 4: 9.
15. Abdel Nour AM, Barbour EK, Depint F, Dooms M, Niang K, Dulac A, et al. Comparison of five RNA extraction methods from rabbit's blood. Agriculture and Biology Journal of North America 2010; 1(4): 448-50.

Archive of SID

www.SID.ir

Journal of Isfahan Medical School Original Article

Vol 29, No 133, 1st week, June 2011 Received: 1.1.2011 Accepted: 9.4.2011

Evaluation and Optimization of Various Procedures of RNA Extraction from Human Frozen Tissues

Faezeh Mohammad Hashem MSc[1], Parvaneh Nikpour PhD[2], Modjtaba Emadi-Baygi PhD[3]

Abstract

Background: Utilizing an intact RNA is essential while performing molecular genetics methods like microarray and quantitative Real-time polymerase chain reaction (RT-PCR). Using RNA with poor quality may affect the results of downstream manipulations. Our aim in the current study was to compare and optimize various procedures for RNA extraction by using different kits and DNase treatment to find a standard method for RNA extraction from human frozen tissues.

Methods: Using Cinnagen RNX plus solution, Qiagen RNeasy Mini Kit and Qiagen RNeasy Plus Mini Kit, total RNA was extracted from human frozen tissues comprising stomach (#40), glioma (#5) and breast (#15). For genomic DNA elimination, extracted RNA was treated with DNase enzyme. After RNA extraction, its quantity and quality was assessed by spectrophotometry and gel electrophoresis. After cDNA synthesis, RT-PCR technique by specific primers designed for *TBP* gene was performed and results were assessed by agarose gel electrophoresis.

Findings: Extracted RNA by Cinnagen RNX plus solution did not show good results in RT-PCR after DNase treatment. Extracted RNAs by Qiagen RNeasy Mini Kit and Qiagen RNeasy Plus Mini Kit were of high quality for RT-PCR reaction because of using DNase treatment during the extraction procedure and an additional genomic DNA elimination column respectively.

Conclusion: Combining Qiagen RNeasy Mini Kit, Qiazol solution and DNase treatment during the extraction procedure is the most suitable method for RNA extraction from human frozen tissues and the extracted RNA can be used with assurance in downstream molecular techniques.

Key words: RNA extraction, Human tissue, Gene expression.

Archive of SID

[1] Division of Genetics, Department of Biomedical Sciences, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran.
[2] Division of Genetics, Department of Biomedical Sciences, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran.
[3] Department of Genetics, School of Basic Sciences and Research Institute of Biotechnology, Shahrekord University, Shahrekord, Iran.
Corresponding Author: Parvaneh Nikpour PhD, Email: pnikpour@med.mui.ac.ir

www.SID.ir