Archive of SID

مجله تازه‌های بیوتکنولوژی سلولی - مولکولی
دوره پنجم، شماره نوزدهم - تابستان ۱۳۹۴

NCMBJ
Research Article
مقاله تحقیقی

مقایسه سه روش استخراج RNA از پوست میوه انار

سپیده روح الامین*[۱]، بهمن زاهدی[۲]، علی ساعی[۳]، فر هاد نظریان فیروز آبادی[۴]

۱- کارشناس ارشد رشته تولیدات گیاهی گرایش اصلاح گیاهان باغبانی، دانشگاه لرستان
۲- استادیار گروه تولیدات گیاهی، دانشگاه لرستان
۳- استادیار بخش ژنومیکس پژوهشکده بیوتکنولوژی منطقه مرکزی کشور، (ایران – اصفهان)
۴- دانشیار گروه زراعت و اصلاح نباتات دانشگاه لرستان

چکیده

سابقه و هدف: استخراج RNA ی با کمیت وکیفیت مطلوب از نیاز های بنیادی زیست شناسی مولکولی است. جداسازی RNA از بافت های گیاهان چوبی به علت حضور مقادیر زیادی از کربوهیدارات ها، تانن ها و ترکیبات پلی فنلی با مشکلاتی روبرو می باشد. بنابراین دستیابی به یک روش استخراج مناسب که بتواند RNA ی کیفی مطلوبی را تولید کند، از اهمیت بالایی برخوردار است.

مواد و روش ها: در این تحقیق سه روش استخراج RNA شامل: ۱- زارعی و همکاران، ۲-IHBT و ۳- روش تغییر یافته CTAB-LiCl مورد بررسی و از پوست میوه های رسیده به عنوان مواد گیاهی برای استخراج RNA استفاده گردید.

یافته ها در نهایت با توجه به کمیت و کیفیت RNA استخراجی و نتایج حاصل، روش زارعی و همکاران به منظور استخراج RNA با خلوص بالا از پوست انار انتخاب شد. بیشترین مقدار RNAبا کیفیت مطلوب از ۱۰۰ میلی گرم بافت پوست میوه به مقدار ۶۴۲ نانوگرم با روش زارعی و همکاران بدست آمد.

نتیجه گیری: از میان روش های مورد آزمایش، روش زارعی و همکاران مناسب ترین روش برای گیاهان با ترکیبات فنلی بالا به ویژه انار می باشد. از این رو نیازی به استفاده از کیت های استخراج و مواد شیمیایی خطرناک احساس نمی شود.

کلمات کلیدی: اسپکتروفتومتری، استخراج RNA، الکتروفورز ژل آگارز، انار، مواد پلی فنلی

مقدمه

در دو دهه اخیر بیوتکنولوژی کشاورزی چشم انداز های امیدوارکننده ای را ارایه نموده است. با دستیابی به روش های مهندسی ژنتیک برای جداسازی و انتقال ژن ها، مقدمات لازم جهت ایجاد گیاهان تراریخت ایجاد گردیده است. بنابراین چنانچه مشخص است مباحث مولکولی از اهمیت روزافرونی در مطالعات علوم مختلف زیستی برخوردار بوده و شاید بتوان گفت استخراج اسید نوکلئیک اولین گام در جهت انجام این مطالعات باشد. دربسیاری از موارد استخراج مواد ژنتیکی با محدودیت هایی همراه است که تغییر در ترکیب و pHبافر استخراج توانسته است در بهبودکمیت و کیفیت RNAو DNA استخراج شده موثر باشد (۱۲). روش های مختلفی برای استخراج RNA از گیاهان وجود دارد. در بیشتر این روش ها سه نکته اساسی مد نظر است که شامل کیفیت RNA، سرعت استخراج و میزان آن می باشد. گیاهان دارویی به علت داشتن ترکیبات فنولی فراوان و ناخالصی های زیاد نیازمند به کارگیری روش مناسبی برای استخراج RNA جهت جلوگیری از اکسید شدن می‌باشد(۱۱). وجود ناخالصی هایی نظیر ترکیبات فنلی در محلول RNA استخراج شده باعث جلوگیری از فعالیت آنزیم های DNA پلیمراز مانند *Taq* پلیمراز در واکنش زنجیر های پلیمراز (PCR) می شود (۶).

انار (*Punica granatum* L.) یکی از قدیمی ترین و مهم ترین گیاهان باغی در ایران است. انار علاوه بر مصرف خوراکی به عنوان یکی از ده میوه برتر از لحاظ محتوای فیتوشیمیایی شناخته شده است (۱۰). اثرات سلامت بخش ترکیبات موجود در انار شامل فعالیت آنتی اکسیدانی، ممانعت از رشد بی رویه سلول ها و محرک مرگ برنامه ریزی شده سلول های سرطانی

نویسنده مسئول : دانشگاه لرستان
پست الکترونیکی :sepidehrouholamin@yahoo.com
تاریخ دریافت : ۱۳۹۲/۰۹/۲۳
تاریخ پذیرش :۱۳۹۴/۰۲/۰۹

www.SID.ir

Archive of SID

می باشد. هم چنین از درخت انار به عنوان منبع مهمی برای استخراج متابولیت های ثانویه از جمله ترکیبات فنلی، تانن ها، رنگ ها و آلکالوئید ها یاد شده است (۱۴). ایران در زمینه صادرات انار در جهان مقام اول را دارا می باشد و با توجه به جمع آوری بیش از ۷۶۰ ژنوتیپ انار از مناطق مختلف ایران شامل رقم های خوراکی، زینتی و وحشی که هر یک از نظر طعم و مزه، زودرسی، خواص انبارداری، مقاومت به آفات و بیماری ها، خشکی، شوری و آفتاب سوختگی دارای صفات ویژ های هستند. ایران دارای متنوع ترین ارقام انار می باشد (۱). این تنوع ژنتیکی گسترده می تواند برای تشخیص خصوصیات مطلوب انار بسیار مفید واقع شده و منبع ژنی مناسبی را برای کار های به نژادی این گیاه فراهم نماید (۲). از آنجا که تقاضا برای این میوه به دلیل خصوصیات دارویی فوق العاده آن در حال افزایش است، بنابراین لازم است برنامه های اصلاحی جهت برآورده کردن خواسته های مصرف کنندگان، تولیدکنندگان و صادرکنندگان آن تدوین شود. تحقیقات مولکولی در مورد انار بسیار ناچیز است و اغلب مطالعات مربوط به طبقه بندی انار از لحاظ رقم و ... می باشد و از طرفی این گیاه معجونی قوی از ترکیبات ارزشمند است لذا می بایست تحقیقات مولکولی و ژنتیکی به دنبال شناخت ترکیبات مفید از انار، شناسایی مسیر بیوسنتز مواد موثره در انار، بررسی و شناسایی ژن های دخیل در مسیر بیوسنتز مواد موثره انار و... صورت گیرد.

در پژوهش با اهداف بالا و هم چنین پژوهش هایی مانند همسانه سازی ژن، سنتز cDNA، ساخت کتابخانه های سنتز cDNA، سنجش میزان بیان ژن و واکنش RT-PCR است (۹). استخراج RNA پیش از این با استفاده از روش زارعی و همکاران در سال ۲۰۱۲ از قسمت های مختلف انار و به طور ویژه از هسته انار گزارش شده است (۱۶). هم چنین روش CTAB-LiCl به طور موفقیت آمیزی برای جداسازی RNA از اندام های مختلف گیاهان چوبی با ترکیبات فنلی نظیر سیب، هلو و انگور استفاده شده است (۸). روشی برای استخراج RNA از گیاهان دارویی (*Rheum australe*) و(*Arnebia euchroma*)، چای، سیب زمینی، آرابیدوپسیس، ریشه استویا، برگ استویا و کتان که سرشار از متابولیت های ثانویه هستند در سال ۲۰۱۱ ارایه شد (۹).

از آنجا که روش های ذکر شده در استخراج RNA از گیاهان دارای متابولیت ثانویه و ترکیبات فنلی کاربرد دارند در این پژوهش هدف مقایسه این روش ها در استخراج RNA از پوست میوه انار و انتخاب بهترین روش می باشد.

روش کار

سه روش استخراج RNA به ترتیب ۱- زارعی و همکاران (۱۶). ۲- IHBT (۹) و ۳- روش تغییر یافته. CTAB-LiCl (۸). بر روی نمونه های بالغ گیاه انار مورد بررسی قرار گرفت. آزمایش روی پوست میوه بالغ انار به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملا تصادفی در سه تکرار انجام شد. برای تجزیه داده های آماری از نرم افزار SASاستفاده گردید.

مواد گیاهی:

نمونه های میوه بالغ در اواخر شهریور ماه ۱۳۹۱ از دو ژنوتیپ انار پوست سفید شیرین و پوست سیاه ساوه جمع آوری شدند و پس از جداسازی از درخت به آزمایشگاه انتقال داده شدند. مقدار ۱۰۰ میلی گرم پوست میوه انار برای استخراج RNA مورد استفاده قرار گرفت. این آزمایش در بخش ژنومیکس پژوهشکده بیوتکنولوژی منطقه مرکزی کشور (اصفهان) انجام شد.

محلول ها و تجهیزات مورد نیاز:

برای استخراج RNA با روش های ذکر شده از چندین ماده شیمیایی در ترکیب با یکدیگر یا در مراحل مختلف استخراج و مراحل بعد از آن استفاده شد که اساس آن به شرح زیر می باشد: آب تیمار شده با DEPC[1]، نیتروژن مایع[2]،۲ ([3] CTAB٪ و ۲/۵٪)، اتیلن دی آمین تترااستیک اسید[4] (۰/۰۲۵، ۰/۰۰۱ و ۰/۰۱ مولار)، سدیم دودسیل سارکوسینات[5] (۰/۱٪ و۰/۵٪) تریس اسید کلریدریک Tris-HCl (۰/۱ و ۰/۰۱ مولار)، فنول اشباع[6] با ۷/ =pH۶، بتامرکاپتواتانول[7]، پلی وینیل پیرولیدون[8]، زغال فعال[9]کلروفرم ایزو آمیل الکل[10] با نسبت حجمی ۲۴ به ۱، اتانول[11] ۷۰٪، ایزوپروپانول[12]، کلرید سدیم[13] (۱ و ۲ مولار)، لیتیم کلراید[14] ، استات سدیم[15] ۳ مولار، ، اسپرمیدین[16] به غلظت gr/ litre ۰/۵، آگارز، پروتئینار ۵۰ µg/ml K[17]، دستگاه سانتریفیوژ (MPW_۳۵۰R high speed brushless centrifuge)، حمام آب گرم[18] ۶۵ درجه سانتی گراد، ، دستگاه الکتروفورز افقی ساخت

[1] Diethyl Pyrocarbonate
[2] Liquid nitrogen
[3] Cetyl trimethylammonium bromide
[4] Ethylendiaminetetraacetic acid disodium salt dehydrate
[5] Sodium dodecyle sarcosinate
[6] Phenol saturated [7] mercaptoethanol
[8] Polyvinylpyrolidone
[9] Active charcoal
[10] Chloroform-isoamyle alcohol
[11] Ethanol
[12] Isopropanol
[13] Sodium chloride
[14] Lithium chloride
[15] Sodium acetate
[16] Spermidine
[17] Proteinase
[18] Waterbath

www.SID.ir

Archive of SID

شرکت (Bio-Rad MOD: SH ۵۰۳) و دستگاه اسپکترو فتومتر (Lambda ۲۵ uv/vis).

لازم به ذکر است که مواد شیمیایی مورد استفاده از شرکت های Roche و SIGMA آلمان تهیه شدند.

روش های مورد استفاده در استخراج RNA

۱-روش زارعی و همکاران (۱۶)

در این روش ابتدا پوست نمونه های گیاهی در داخل هاون چینی کاملا پودر شدند و بافر استخراج اول (NaCl به غلظت M۲، Tris-HCl به غلظت ۱۰۰ mM و دارای pH معادل هشت، EDTA به غلظت۲۵ mM و دارای pH معادل هشت، CTAB ۲٪، PVP ۲٪ و اسپرمیدین به غلظت gr/litre ۰/۵) که از قبل در حمام آب گرم به دمای ۶۵ درجه رسیده بود و پروتئیناز K ۵۰ µg/ml و بتامرکاپتواتانول به هر نمونه اضافه و به خوبی مخلوط شدند. سپس نمونه ها به مدت ۱۵ دقیقه درون بن ماری با دمای ۶۵ درجه قرار گرفتند و پس از آن سانتریفیوژ در دمای چ هار درجه سلسیوس به مدت ۱۰ دقیقه در ۱۰۰۰۰ دور (۱۰۰۰۰ rpm) انجام گرفت، فاز رویی به تیوب جدید منتقل و هم حجم آن محلول ایزوآمیل الکل کلروفرم ۲۴:۱ اضافه گردید. مجددا سانتریفیوژ در دمای چ هار درجه سلسیوس به مدت ۱۰ دقیقه در ۱۳۰۰۰ دور (۱۳۰۰۰ rpm) انجام گرفت. (این مرحله دوبار تکرار شد). پس از انتقال فاز رویی به تیوب جدید ۱۰ مولار Licl به نسبت ۱/۴ به هر میکروتیوب اضافه شد و نمونه ها به مدت یک شبانه روز در یخچال با دمای ۴ درجه سانتی گراد قرار گرفتند. در روز دوم ابتدا سانتریفیوژ در دمای چ هار درجه سلسیوس به مدت ۴۰ دقیقه در ۲۰۰۰۰ دور (۲۰۰۰۰ rpm) بر روی نمونه ها انجام شد و پس از آن فاز رویی دور ریخته و ۵۰۰ میکرولیتر اتانول ۷۰ درصد به آن ها اضافه و مجددا سانتریفیوژ در دمای ۴ درجه سلسیوس به مدت ۱۰ دقیقه در ۱۲۰۰۰ دور (۱۲۰۰۰ rpm) انجام شد (این مرحله دوبار تکرار شد). پس از دور ریختن فاز رویی محلول استخراج دوم (NaCl به غلظت Tris-HCl،۱ M به غلظت ۱۰ M و دارای pH معادل هشت، EDTA به غلظت ۱mM و دارای pH معادل هشت، SDS ٪۰/۵) به هر نمونه اضافه شد سپس به مدت ۱۵ دقیقه درون بن ماری با دمای ۶۵ درجه قرار گرفتند. هم حجم آن محلول ایزوآمیل الکل کلروفرم ۲۴:۱ به هر میکروتیوب اضافه شد و سانتریفیوژ در دمای چ هار درجه سلسیوس به مدت ۱۰ دقیقه در ۱۳۰۰۰ دور (۱۳۰۰۰ rpm) انجام گرفت (این مرحله دوبار تکرار شد). سپس فاز رویی به تیوب جدید انتقال و به هر میکروتیوب استات سدیم ۳ مولار با pH=۵/۲ به نسبت ۱/۱۰ و ایزوپروپانول به نسبت ۶/۱۰ اضافه شد. میکروتیوب ها به مدت حداقل ۲ ساعت در فریزر با دمای۲۰- درجه سانتی گراد قرار گرفتند، مجددا سانتریفیوژ در دمای چ هار درجه سلسیوس به مدت ۳۰ دقیقه در ۲۰۰۰۰ دور (۲۰۰۰۰ rpm) انجام شد. فاز رویی خارج شده و رسوب سفید رنگ بدست آمد.

۲- روش IHBT (۹)

بافر استخراج در این روش حاوی فنل اشباع شده با تریس دارای pH=۷/۶ ، SDS ٪۰/۱ استات سدیم ۰/۳۲ مولار و EDTA ۰۱/۰ مولار بود. ابتدا پوست نمونه های گیاهی در داخل هاون چینی توسط ازت مایع کاملا پودر شدند. سپس بافر استخراج را به نمونه اضافه نموده و مجددا با نمونه مخلوط شد. سپس ۸۰۰ میکرولیتر DEPC water به آن اضافه و سپس به دو تیوب ۲ میلی لیتری انتقال داده شد و به مدت ۵ دقیقه در دمای اتاق قرار گرفت. سپس ۲۰۰میکرو لیتر کلروفرم به آن اضافه نموده و مجددا به مدت ۱۰ دقیقه در دمای اتاق قرار داده شد. در مرحله بعد آن ها را به مدت ۱۰دقیقه با دمای ۴ درجه سانتی گراد با دور ۱۳۰۰۰(۱۳۰۰۰ rpm) سانتریفوژ نموده سپس فاز رویی را به تیوب های جدید منتقل و ۰/۶ حجم محلول به آن ایزوپروپانول اضافه کرده و ۱۰ دقیقه آن را در دمای اتاق قرار داده و مجددا سانتریفوژ با دور ۱۳۰۰۰ (۱۳۰۰۰ rpm) انجام شد و در مرحله بعد فاز رویی ار نمونه ها جدا شد.

۳- روش تغییر یافته CTAB-LiCl (۸)

محتویات بافر استخراج مشابه بافر اول در روش زارعی و همکاران می باشد (بدون پروتئیناز K). ۱۵ میلی گرم به ازای هر ۱۰۰ میلی گرم بافت گیاهی ذغال فعال به نمونه ها اضافه و پس از آنکه نمونه ها به مدت ۱۵ دقیقه درون بن ماری با دمای ۶۵ درجه قرار گرفتند سانتریفیوژ در دمای چ هار درجه سلسیوس به مدت ۱۰ دقیقه در ۱۰۰۰۰ دور (۱۰۰۰۰ rpm) انجام گرفت، فاز رویی به تیوب جدید منتقل و هم حجم آن محلول ایزوآمیل الکل کلروفرم ۲۴:۱ اضافه گردید. مجددا سانتریفیوژ در دمای چ هار درجه سلسیوس به مدت ۱۵ دقیقه در ۱۰۰۰۰ دور (۱۰۰۰۰ rpm) انجام گرفت. (این مرحله دوبار تکرار شد). پس از انتقال فاز رویی به تیوب جدید LiCl ۷/۵ مولار به نسبت ۱/۳ به هر میکروتیوب اضافه شد و نمونه ها به مدت یک شبانه روز در یخچال با دمای ۴ درجه سانتی گراد قرار گرفتند. سپس در روز دوم سانتریفیوژ در دمای چ هار درجه سلسیوس به مدت ۳۰ دقیقه در ۱۲۰۰۰ دور (۱۲۰۰۰ rpm) انجام گرفت و پس از آن فاز رویی دور ریخته و به هر میکروتیوب استات سدیم ۳ مولار با pH=۵/۲ به نسبت ۱/۱۰ و ایزوپروپانول به نسبت ۶/۱۰ اضافه شد. میکروتیوب ها به مدت حداقل ۲ ساعت در فریزر با دمای ۸۰- درجه سانتی گراد قرار گرفتند مجددا سانتریفیوژ

www.SID.ir

Archive of SID

در دمای چهار درجه سلسیوس به مدت ۳۰ دقیقه در۱۲۰۰۰ دور(۱۲۰۰۰ rpm) انجام شد. در مرحله بعد فاز رویی جدا شد و رسوب باقی ماند.

پس از استخراج RNAبا روش های یاد شده و رسوب دادن آن، رسوب بدست آمده با اتانول ۷۰٪ شستشو داده شد. پس از خشک کردن پلت مقدار۳۰ میکرولیتر آب DEPC برای حل کردن RNAبه آن اضافه شد و به مدت چند ساعت در دمای ۴ درجه سانتی گراد نگه داری شد. محلول RNAبرای استفاده در مراحل بعدی در فریزر نگهداری شد. با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر میزان جذب محلول های رقیق شده RNAبه نسبت ۲:۵۸ (۲ میکرولیتر محلول ذخیره RNA+ ۵۸ میکرولیتر آب مقطر سترون رقیق) در طول موج ۲۶۰ نانومتر (طول موج جذب اسید های نوکلئیک) و ۲۸۰ نانومتر (طول موج جذب پروتئین ها) اندازه گیری و نسبت جذب نوری محلولRNA در طول موج ۲۶۰ به ۲۸۰ نانومتر(r = A۲۶۰/A۲۸۰ که شاخص میزان خلوص RNA می باشد) به دست آمد. هم چنین غلظت محلول ذخیره RNA با استفاده از فرمول زیر:

مقدار جذب نور در ۲۶۰nm ×ضریب تصحیح دستگاه× ضریب رقت = غلظت RNA(ng/µl)

محاسبه گردید. برای هر نمونه سه میکرولیتر RNA استخراج شده با یک و نیم میکرولیتر رنگ بارگذاری[۲] آمیخته شد و در چاهک ژل آگارز ۱٪ در شرایط بافری TAE[۳] قرار داده شد ژل آگارز به مدت یک ساعت و با ولتاژ ثابت ۸۰ ولت الکتروفورز شد .پس از پایان زمان از ژل با دستگاه ژل داک در زیر نور فرا بنفش با طول موج ۳۱۲ نانومتر عکسبرداری انجام شد. برای تایید روش گزیده شده RNA مورد نظر برای سنتز cDNA مورد استفاده قرار گرفت و با cDNA سنتز شده با استفاده از آغازگر تصادفی AN۲ (MYB) (R:۵'_GCAATCAACGTCCATCTGT_۳') و(F: ۵'CGACCTTCTTCGGAAATGTG_۳') (۵) واکنش PCR انجام شد. واکنش PCRبا حجم µl۲۰ شامل بافر واکنش PCR به صورت ۱X،۵ mM / ۱MgCl۲ mM، ۴/ dNTPs ۰،۵ µM آغازگر، ۱ واحد آنزیم *Taq* پلیمراز و ۱ میکرو لیتر cDNA سنتز شده و شرایط PCR با چرخه دمایی به صورت یک دوره ۳ دقیقه در دمای ۹۴ درجه سانتی گراد، تعداد۴۰ سیکل به صورت ۹۴ درجه سانتی گراد ۳۰ ثانیه، ۵۵ درجه سانتی گراد ۳۰ ثانیه، ۷۲ درجه سانتی گراد ۴۵ ثانیه و در نهایت یک دوره ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۲ دقیقه با استفاده از دستگاه ترموسایکلر شرکت Applied Biosystem انجام شد.

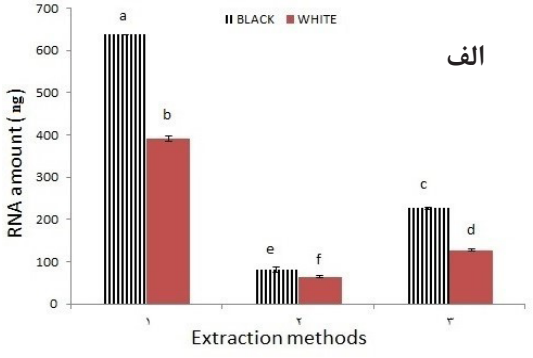
یافته ها

بررسی کمیت و کیفیت RNA

کمیت و کیفیت RNA استخراج شده با استفاده از روش اسپکتروفتومتری و الکتروفورز روی ژل آگارز مورد بررسی قرار گرفت که در زیر شرح داده می شود.

۱- اسپکتروفتومتری[۴]

در روش اسپکتروفتومتری RNA، اگر نسبت مقدار جذب محلول RNA در طول موج ۲۶۰ نانومتر به مقدار جذب در طول موج ۲۸۰ نانومتر در محدوده ۱/۸-۲ باشد نشان دهنده این است که جذب بیشتر توسط اسید های نوکلئیک صورت گرفته و کیفیت RNA به دست آمده مطلوب و از خلوص لازم برخوردار است (۳). نتایج اسپکتروفتومتری نشان داد که RNA با روش زارعی و همکاران برای پوست ژنوتیپ های مختلف از کیفیت و کمیت بهتری نسبت به سایر روش ها برخوردار بود. میزان RNA بدست آمده از روش CTAB-LiCl، در ژنوتیپ پوست سیاه به طور میانگین ۲۲۰ نانوگرم بود که کمتر از میزان RNA به دست آمده از روش زارعی و همکارن بود. در استخراج RNA با روش IHBT، نسبت جذب ۲۶۰ به ۲۸۰ نانومتر بین ۱ تا ۱/۲ را نشان داد که این موضوع در الکتروفورز RNA نیز تایید گردید و روش مناسبی برای استخراج RNA از پوست انار به نظر نمی رسد. نتایج بدست آمده از اسپکتروفتومتری در قالب طرح کاملا تصادفی با استفاده از نرم افزار SAS تجزیه شدند (جدول شماره ۱ و ۲). بر اساس مقاسیه میانگین ها (سطح احتمال ۰/۰۵) در سه روش استخراج RNA۱- زارعی و همکاران، ۲- IHBT، ۳- روش تغییر یافته CTAB-LiClمی توان روش زارعی و همکاران را به عنوان روش مناسبی از نظر کمیت و کیفیت RNA برای نمونه های پوست انار انتخاب نمود (شکل شماره ۱).



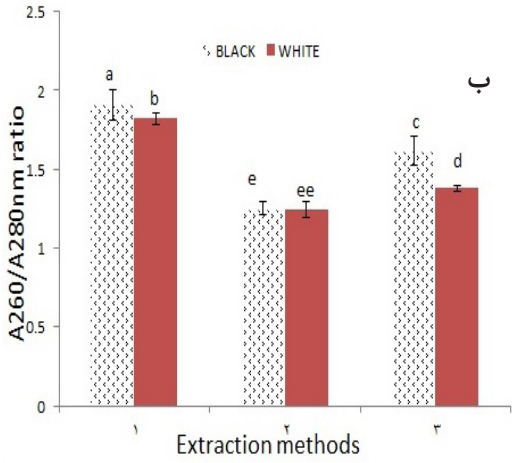
۲ [19] Loading Buffer (dye)

۳ [20] Tris-acetate EDTA

۴ [21] Spectrophotometry

www.SID.ir

Archive of SID



شکل -۱ مقایسه میانگین میزان RNA حاصله به نانوگرم از یک گرم بافت گیاهی (نمودار الف) و کیفیت آن بر اساس نسبت جذب در طول موج ۲۶۰ به ۲۸۰ نانومتر (نمودار ب) از پوست میوه های بالغ انار با سه روش استخراجی RNA به ترتیب ۱- زارعی و همکاران (۱۶)، ۲- HIBT (۹) و ۳ - روش تغییر یافته CTAB-LiCl (۸).

میانگین هایی که دارای حروف مشابه هستند در سطح احتمال ۰/۰۵ با آزمون چند دامن های دانکن دارای اختلاف معنی داری نمی باشد.

منبع تغییرات	درجه آزادی	مجموع مربعات	میانگین مربعات	نسبت F	Pr > F	ضریب تغییرات
رنگ پوست	۱	۰/۰۵۵۵۵۶	۰/۰۵۵۵۵۶	۱۱/۵۷	۰/۰۰۶۸	۴/۴۹
روش استخراج	۲	/۵۸۸۵۰۶	۱/۱۷۷۰۱۱	۱۲۲/۵۵	<۰/۰۰۰۱	
رنگ پوست* روش استخراج	۲	۰/۰۲۱۵۰۶	۰/۰۴۳۰۱۱	٤/٤٨	۰/۰٤۰۹	
خطای آزمایش	۱۰	۰/۰٤۸۰۲۲	۰/۰۰٤۸۰۲			
خطای کل	۱۷	۱/۳۲۳۹۱۱				

جدول ۱_ نتایج تجزیه واریانس رنگ پوست و روش استخراج RNAبر کیفیت RNA استخراج شده از پوست انار

۲- الکتروفورز بر روی ژل آگارز[5]

با مقایسه ضخامت باند های به دست آمده از روش های مورد استفاده در استخراج RNA غلظت باند ها تخمین زده شد. شکستگی قطعه های RNA در طی مراحل استخراج که به صورت دنباله در روی ژل دیده می شود به عنوان معیاری برای کیفیت پایین تر برای نمونه های RNA تلقی می گردد. مشاهده ژل به دست آمده از بارگذاری حجم های مساوی از RNA استخراجی بافت پوست نتایج اسپکتروفتومتری را تایید نمود و

منبع تغییرات	درجه آزادی	مجموع مربعات	میانگین مربعات	نسبت F	Pr > F	ضریب تغییرات
رنگ پوست	۱	۶۵۲۲۰/۶۸	۶۵۲۲۰/۶۸	۲۹۷۵/۵۹	<۰/۰۰۰۱	۱/۸۳۸۵۷۵
روش استخراج	۲	۶۳۷۰۰۰/۶	۳۱۸۵۰۰/۳	۱۴۵۳۱/۱	<۰/۰۰۰۱	
رنگ پوست* روش استخراج	۲	٤۰۳۹۱/۸۵	۲۰۱۹۵/۹۳	۹۲۱/٤۱	<۰/۰۰۰۱	
خطای آزمایش	۱۰	۲۱۹/۱۸۵٦	۲۱/۹۱۸٦			
خطای کل	۱۷	۷٤۲۸۳٦/۱				

جدول ۲_ نتایج تجزیه واریانس رنگ پوست و روش استخراج RNAبر کمیت RNA استخراج شده از پوست انار

RNA استخراجی از روش زارعی و همکاران بیشترین ضخامت نوار را نشان داد (شکل ۲ سمت چپ).

واکنش زنجیر های پلیمراز[6] (PCR)

نتایج بدست آمده از واکنش زنجیر های پلیمراز نشان داده RNA استخراج شده با روش زارعی و همکاران برای پوست میوه نمونه های انار از کیفیت لازم برای سنتز cDNA نیز برخوردار هستند. شکل ۲ سمت راست واکنش زنجیر های پلیمراز بدست آمده بر روی cDNAسنتز شده از RNA روش زارعی و همکاران از نمونه های پوست انار را نشان می دهد.

بحث

همانطور که مشاهده شد نتایج حاصل از این پژوهش در مقایسه سه روش استخراج RNA نشان داد که RNA استخراج شده از روش زارعی و همکاران کیفیت وکمیت بهتری نسبت به سایر روش های مورد آزمایش دارد. یکی از مزایای روش زارعی و همکاران استفاده از دو بافر استخراج می باشد که ترکیب این دو بافر کارایی این روش را افزایش می دهد که تفاوت آن با روش تغییر یافته CTAB-LiCl به ویژه در استفاده ار بافر استخراجی دوم می باشد. بافر استخراجی دوم در روش زارعی و همکاران حاوی ماده شیمیایی SDS بود که باعث جداسازی پروتئین از اسید های نوکلئیک می گردد (۱۳). هم چنین سانتریفیوژ در روش زارعی و همکاران در زمان و دور طولانی تری در مقایسه با دو روش دیگر انجام گرفت. در روش HIBT تن ها از یک بافر استخراجی و ماده پر خطر فنول استفاده شد و در زمان کوتاهتری RNAاستخراج گشت، ولی نتایج الکتروفورز نشان دهنده کیفیت و کمیت نامناسب RNA در پوست میوه انار بود. در روش استخراجی زارعی و همکارن از سه ماده شیمیایی CTAB، PVPو غلظت بالای کلرید سدیم و بتامرکاپتواتانول استفاده شده است که از عوامل موثر در افزایش کمیت و کیفیت RNA استخراج شده محسوب می شوند (۱۶). ماده شیمیایی

[22] Gel electrophoresis of RNA ۵

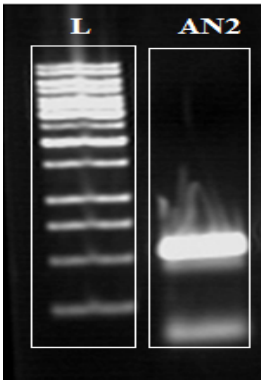
[23] Polymerase Chain Reaction(PCR) ٦

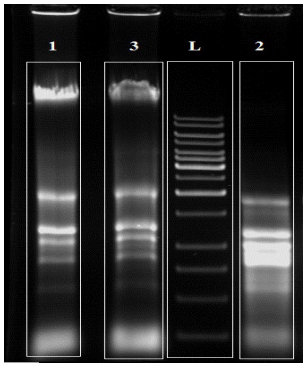
www.SID.ir

Archive of SID

CTAB به عنوان یک ماده شوینده با مولکول RNA کمپلکس تشکیل داده و آن را از موادی همچون کربوهیدرات، پروتئین و غیره جدا می کند (۷). ماده PVP از راه ایجاد پیوند های هیدروژنی با مواد پلی فنلی کمپلکسی را به وجود آورده و امکان جداسازی آن ها را از RNA فراهم می نماید (۴). پلی ساکارید های باقی مانده از جمله مواد دیگری هستند که باعث کاهش کیفیت RNAمی شوند، از نمک NaCl با غلظت ۱ تا ۲ مولار و رسوب در شرایط نمک بالا برای برداشتن مواد استفاده می شود (۷). در روش زارعی و همکاران هم چنین از غلظت بالای بتامرکاپتواتانول که به عنوان آنتی اکسیدان عمل کرده و از اکسید شدن مواد پلی فنلی جلوگیری می کند، استفاده شده است (۱۵) و ۶ که در افزایش کارایی این روش موثر است. هم چنین ماده شیمیایی SDS مانع فعالیت ریبونوکلئاز ها شده و باعث جداسازی پروتئین از اسید های نوکلئیک می گردد (۱۳). پروتئیناز K نیز باعث از بین رفتن آلودگی های پروتئینی گشته و باعث محافظت نوکلئیک اسید از نوکلئاز ها می گردد (۱۶). در روش زارعی و همکاران استفاده از بافر دوم منجر به حل شدن مناسب تر رسوب RNA می گردد و در مرحله پایانی به جای استفاده از اتانول از ماده ایزوپروپانول و استات سدیم استفاده شد که باعث افزایش رسوب و غلظت RNA می گردد. عدم وجود ماده فنول در بافر استخراجی مانع آسیب این ماده به دم پلی A در RNA گشته و مضرات استفاده از این ماده پرخطر را از بین می برد. وجود باند S۱۸ و S۲۸ به صورت قابل تفکیک و عدم مشاهده حالت اسمیر نشان دهنده کیفیت مناسب RNAبر روی ژل آگارز است (۱۶).

موارد یاد شده عواملی هستند که باعث شده RNA استخراج شده از روش زارعی و همکاران از پوست میوه های انار از کیفیت و کمیت مناسبی برخوردار باشد و پیشنهاد می شود این روش در گیاهانی نظیر انگور، سیب و ... با ترکیبات فنلی بالا نیز استفاده شود





شکل ۲- الکتروفورز ژل آگارز مربوط به نمونه های پوست بالغ انار به دست آمده از سه روش استخراج.

در هر چاهک میزان مساوی از محلول RNA استخراجی (۳ میکرولیتر) که از ۱۰۰ میلی گرم ماده گیاهی استخراج و با ۱/۵ میکرولیتر رنگ بارگذاری مخلوط و بارگذاری شده است. شماره خط ها به ترتیب ۱- زارعی و همکاران (۱۶)، ۲ –(IHBT) (۹) و ۳- روش تغییر یافته CTAB-LiCl (۸) L که به عنوان مارکر اندازه در ژل بارگذاری شده است (سمت چپ). واکنش زنجیر های پلیمراز بر روی RNA به دست آمده از نمونه پوست انار بالغ که با روش زارعی و همکاران استخراج گردیده است. میزان یک میکرولیتر cDNA برای واکنش PCR استفاده گردید (سمت راست).

نتیجه گیری

از آنجا که دستیابی به RNA به ویژه mRNA در بافت پوست انار مشکل می باشد و از طرفی میزان کلی RNA در این بافت اندک است. با استخراج از پوست به دلیل میزان بالای پلی ساکارید ها و مواد مزاحم دیگر ناگزیر مقداری از RNA از دست می رود و با توجه به استفاده از روش های متعدد و نتایج حاصل از آن ها روش زارعی و همکاران روش مناسبی برای استخراج تشخیص داده شد و لذا نیازی به استفاده از کیت های استخراج و مواد شیمیایی خطرناک احساس نمی شود.

سپاسگزاری

بدین وسیله از تمامی اساتید و همکاران که در انجام این پژوهش همکاری و مساعدت داشتند تشکر و قدردانی می گردد.

www.SID.ir

Archive of SID

منابع

۱- بهزادی شهر بابکی، ح. پراکندگی و تنوع ارقام انار در ایران. نشر آموزش کشاورزی. ۱۳۷۷، ۲۶۶ صفحه.

۲- طالبی بداف، م. ۱۳۸۱، تنوع ژنتیکی ارقام انار در ایران بر اساس تجزیه و تحلیل RAPD. پایان نامه کارشناسی ارشد، دانشکده کشاورزی دانشگاه صنعتی اصفهان.

۳- فارسی م و ذوالعلی ج. اصول بیوتکنولوژی گیاهی. انتشارات دانشگاه مشهد. ۱۳۸۲، ۴۹۵ صفحه.

۴- کدخدایی، س. روش ساده و کم هزینه جهت جداسازی اسید های نوکلئیک از گیاهان حاوی مواد پلی ساکاریدی و پلی فنلی زیاد: بهینه سازی روش استخراج DNA در بادام، مجموعه مقالات سومین کنگره بیوتکنولوژی ایران، ۴۱۷-۴۱۹. ۱۳۸۲.

5- Ben-Simhon Z, Judeinstein S, Nadler-Hassar T, Trainin T, Bar-yaakov I, Borochov-Neori H, Holland D. A Pomegranate (*puniva granatum* L) WD40-repeat gene is a functional homologue of Arabidopsis TTG1 and is involved in the regulation of anthocyanin biosynthesis during pomegranate fruit development. Planata, 2011; 234: 865-881.

6- Bushra C, Afshan Y, Tayyab H, Riazuddin S. Mini-scale genomic DNA extraction from cotton. Plant Mol Biol, 1999; Rep. 17:1-7.

7- Cheng Y.J, Guo W.W, Yi H.L, Pang X.M, Deng X. An efficient protocol for genomic DNA extraction from *Citrus* species. Plant Mol. Bio, 2003; 21:177-186.

8- Gasic k, Hernandez A, Korban S. S. RNA extraction from different apple tissues rich in polyphenols and polysaccharides for cDNA library construction Plant Mol. Biol. Reporter, 2004; 22: 437a–437g.

9- Ghawana S, PaulHitesh A, Kumar H, Kumar A, Singh H, Bhardwaj P. K, Rani A, Singh R. S, Raizada J, Singh K, Kumar S. An RNA isolation system for plant tissues rich in secondary metabolites. BMC Research Notes, 2011; 4:85.

10- Herber D, Schulman R.N, Seeram N.P. Pomegranates ancient roots to modern medicine medicinal and aromatic plants industrial profiles. CRC Press, 2006.

11- Kansal R, Kuhar K, Verma I, Niwas Gupta R, Kumar Gupta V, Ram Koundal K. Improvement and convenient method of RNA isolation from polyphenols and polysacaride rich plant tissues. Indian j. Experimen Biol, 2008.

12- Lodi M, G. N. Ye A, Weeden N. F, Reisch B. I. A simple and efficient method DNA extraction from grapevine caltivars and vitis species. Plant Mol. Bio Rep, 1994; 12.:6-13.

13- Rio DC, Ares M. Jr, GJ H, Nilsen TW. Purification of RNA by SDS solubilization and phenol extraction. Cold Spring Harb Protoc, 2010; (6): 5438.

14- Seeram NP, Adams LS, Henning SM, Niu Y, Zhang Y, Herber D. In vitro antiproliferative, apoptotic and antioxidant activities of punicalagin, ellagic acid and a total pomegranate tannin extract are enhanced in combination with other polyphenols as found in pomegranate juice. Nutr Biochem, 2005; 16(6): 360-7.

15- Struss D, Ahmad R, Southwick S. Analysis of sweet cherry (*prunus avium L*) cultivars using SSR and AFLP markers. J. Amer. Soc. Hort. Sci, 2003; 128:904-90.

16- Zarei A, Zamani Z, Mousavi A, Fatahi R, Karimi Alavijeh M, Dehsara B, Salami S.A. An effective Protocol for isolation of high_quality RNA from pomegranate seeds. The Asian and Australasian J. plant science and biotech, 2012; 6:32-37

www.SID.ir