کارآیی روش‌های استخراج RNA از برگ گیاه دارویی سرخارگل

فصلنامه بوم‌شناسی گیاهان زراعی
جلد ۱۵، شماره ۱، صفحات ۸۱ – ۷۱
(بهار ۱۳۹۸)

کوثر مرادی✉، رسول امیریان

بخش تحقیقات ژنومیکس، مدیریت بیوتکنولوژی کشاورزی منطقه مرکزی کشور- اصفهان، پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی ایران، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، تهران، ایران moradi.k@abrii.ac.ir ✉ (مسؤول مکاتبات)

چکیده سرخارگل گیاه دارویی ارزشمند حاوی سطوح بالایی از متابولیت‌های ثانویه می‌باشد که تا کنون روش مناسبی جهت استخراج RNA کل از آن معرفی نشده است. در پژوهش حاضر چهار روش استخراج RNA شامل روش لیتیم کلراید، کیت RNAX-Plus، فنل/SDS و لیتیم کلراید/فنل مورد بررسی قرار گرفت. به منظور تأیید کیفیت و خلوص RNA از روش اسپکتروفتومتری و الکتروفورز روی ژل آگارز ۱/۵٪ استفاده شد. نسبت بالای جذب محلول RNA در طول‌موج ۲۶۰ نانومتر به طول موج ۲۸۰ و ۲۳۰ نانومتر، مشاهده RNA های ریبوزمی و عدم مشاهده اسمیر روی ژل به عنوان معیاری برای تعیین کیفیت نمونه‌ها در نظر گرفته شد. بالاترین کیفیت RNA حاوی ۲/۹ میکروگرم بر میکرولیتر در ۱۰۰ میلی‌گرم برگ تازه در روش فنل/SDS و کمترین کیفیت RNA حاوی ۱/۲ میکروگرم در ۱۰۰ میلی‌گرم برگ تازه در روش لیتیم کلراید/فنل مشاهده شد. بنابراین، روش فنل/SDS به عنوان مناسب‌ترین روش برای استخراج RNA برگ گیاه سرخارگل معرفی می‌گردد.

شناسه مقاله

نوع مقاله: پژوهشی

تاریخ پژوهش: ۱۳۹۶

تاریخ دریافت: ۹۷/۱۰/۲۸

تاریخ پذیرش: ۹۸/۰۳/۰۶

واژه‌های کلیدی

- روش لیتیم کلراید
- روش لیتیم کلراید/فنل
- کیت RNAX-Plus
- روش فنل/SDS

این مقاله با دسترسی آزاد تحت شرایط و قوانین The Creative Commons of BY - NC - ND انتشار یافته است.

DOI: 10.22034/AEJ.2019.665295

مقدمه سرخارگل[1] متعلق به تیره آفتابگردان، گیاهی با خاستگاه شمال آمریکا می‌باشد که به دلیل کاربرد زیاد اجزا و یا عصاره آن در تهیه داروهای گیاهی مورد توجه قرار گرفته است.[۱۴] تمام پیکر این گیاه اعم از ریشه و پیکر رویشی حاوی مواد ارزشمندی از قبیل ترکیبات آلکیل‌آمیدی[2]، ایزوبوتیل‌آمید[3]، اسید شیکوریک[4] و غیره است. مهم‌ترین مواد مؤثره سرخارگل مشتقات اسید کافئیک[5] به ویژه اسید شیکوریک می‌باشد که دارای ویژگی‌هایی آنتی‌اکسیدانی، تقویت‌کنندگی سیستم دفاعی بدن و ممانعت از تکثیر ویروس بوده و باعث افزایش میزان جذب گلوکز و در نهایت افزایش عملکرد انسولین می‌شود.[۲۰]

استخراج RNA از بافت‌های گیاهی غنی از پلی‌فنل‌ها[6]، کربوهیدرات‌ها و متابولیت‌های ثانویه بسیار سخت و دشوار می‌باشد. با توجه به این که بافت‌های گیاهی حاوی مقادیر زیاد پلی‌ساکارید، RNase و انواع مختلف ترکیبات فنولی مانند تانن‌ها[7] می‌باشند، بازدهی استخراج RNA از آنها معمولاً کم است.[۱۳] علاوه بر این، استخراج مواد ژنتیکی با مشکلاتی مثل میزان کم اسید نوکلئیک همراه است که تغییر در ترکیبات و پروتکل‌های استخراج و اسیدیته بافر استخراج توانسته در بهبود کمیت و کیفیت RNA و DNA استخراج شده مؤثر باشد. استخراج RNA با کیفیت و وضوح بالا برای مطالعات بعدی از قبیل هیبریداسیون[8] در نوردرن بلاتینگ[9]، PCR[10] رونوشت‌بردار معکوس، ایجاد کتابخانه cDNA و آنالیز بیان ژن با Real Time PCR[11] از اهمیت بسیاری برخوردار می‌باشد.[۹] روش‌های متفاوتی برای استخراج RNA کل در گونه‌های مختلف گیاهان پیشنهاد شده است. به طور مثال، کیت ترایزول[12] به منظور استخراج RNA در گیاه مدل آرابیدوپسیس[13] و نارگیل مناسب است، اما در درختانی مانند کاج روش CTAB بهتر است.[۷] در بیشتر روش‌ها سه نکته اساسی مد نظر است که شامل کیفیت و کمیت RNA و سرعت استخراج می‌باشد. گیاهان دارویی به علت داشتن ترکیبات فنولی فراوان و ناخالصی‌های زیاد نیازمند به کارگیری روش مناسبی برای استخراج RNA جهت جلوگیری از اکسید شدن می‌باشند.[۱۱] از طرفی وجود ناخالصی‌هایی نظیر ترکیبات فنلی در محلول RNA استخراج شده باعث جلوگیری از فعالیت آنزیم‌های DNA پلی‌مراز مانند Taq پلی‌مراز[14] در واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز PCR شود.[۲] نکته قابل توجه در استخراج RNA توجه به آنزیم RNase است. این آنزیم مولکول RNA را از طریق آندونوکلئاز ی[15] و اگزونوکلئاز ی[16] تخریب می‌کند. برای جلوگیری از فعالیت آنزیم RNase، از بازدارنده‌های فعالیت ریبونوکلئازها[17] استفاده به عمل آمد، از جمله این بازدارنده‌ها به لیتیم کلراید[18]، فنل و DEPC[19] می‌توان اشاره کرد.[۵،۱۸] بهترین کمیت و کیفیت RNA استخراج شده از

[1] *Echinacea purpurea* L.
[2] acyl amide
[3] isobutylamide
[4] chicory acid
[5] caffeic acid
[6] polyphenols
[7] tannins
[8] hybridization
[9] northrens Blotting
[10] polymerase chain reaction
[11] reverse transcription polymerase chain reaction
[12] Triazol kit
[13] Arabidopsis
[14] *Taq* polymerase
[15] endonuclease
[16] exonuclease
[17] ribonoclases
[18] lithium chloride
[19] diethyl pyrocarbonate

پوست انار را روش *زراعی و همکاران (۲۰۱۲)* بیان داشتند[۲۶] که در آن با توجه به کمیت و کیفیت RNA استخراجی و نتایج حاصل روش *زارعی و همکاران (۲۰۱۲)* با خلوص بالا از پوست انار انتخاب شد. *روح الامین و همکاران (۲۰۱۵)* در پژوهش خود سه روش استخراج RNA از پوست انار شامل IHBT و روش تغییریافته CTAB-LiCl را مورد بررسی قرار دادند و در نهایت با توجه به کمیت و کیفیت RNA استخراجی و نتایج حاصل [۱۸]، روش *زارعی و همکاران (۲۰۱۲)*[۲۶]، به منظور استخراج RNA با خلوص بالا از پوست انار انتخاب شد. موارد ذکر شده عواملی هستند که باعث شده RNA استخراج شده به روش فنل/SDS از کیفیت و کمیت مطلوبی برخوردار باشد و این روش روشی مناسب و ارزان برای استخراج گیاهانی با فنل بالا می‌باشد. پژوهشگران *بهادر و همکاران (۲۰۱۴)* نیز در خصوص مقایسه روش‌های مختلف استخراج RNA از سه گونه آویشن نشان داد از بین روش‌های مورد مطالعه کمیت و کیفیت RNAی استخراج شده با روش فنل/SDS نسبت به روش‌های دیگر از جمله ترایزول برای هر سه گونه آویشن مناسب‌تر بود.[۱]

استفاده از فنل برای تجزیه پروتئین‌ها به جای دیگر ترکیبات تجزیه‌کننده شیمیایی یک روش مناسب برای استخراج می‌باشد.[۶] *ساکبورک و راسل (۲۰۰۱)* نشان دادند استفاده از فنل برای استخراج RNA منجر به رسوب قهوه‌ای رنگ می‌شود که باعث کاهش عملکرد و کیفیت RNA خواهد شد.[۲۱] *اشنایدر و همکاران (۱۹۹۱)* در پژوهشی نشان دادند عملکرد پایین کیفیت و کمیت RNA عمدتا به دلیل اکسیداسیون ترکیبات فنلی که می‌توانند به طور برگشت ناپذیر به اسیدهای نوکلئیک متصل شوند و همزمان با آن‌ها رسوب کند. برای غلبه بر این مشکل استفاده از کلروفرم می‌تواند به جای فنل برای حذف پروتئین‌ها و لیپیدها نیز RNAی استخراج شده را بدون رنگ کند. روش‌های SDS و CTAB روش‌های مناسبی برای استخراج RNA از گیاهان چوبی گزارش شده‌اند.[۲۲] *رودریگز و همکاران (۲۰۰۷)* روش CTAB برای تجزیه غشای سلول و از بتا-مرکاپتو اتانول جهت جلوگیری از هر گونه واکنش اکسیداسیون نامطلوب استفاده شد.[۱۶]

دستورالعمل‌های مختلفی برای جداسازی RNA از گیاهان در دسترس هستند، گرچه اکثر آن‌ها برای گیاهان مدل استفاده می‌شوند.[۱۱]

تاکنون گزارشی مبنی بر استخراج RNA ژنومی از گیاه دارویی سرخارگل موجود نمی‌باشد. از آنجا که روش های زیادی در استخراج RNA از گیاهان دارای متابولیت ثانویه و ترکیبات فنلی کاربرد دارند، هدف این پژوهش مقایسه این روش‌ها در استخراج RNA از گیاه دارویی سرخارگل و انتخاب بهترین روش بود.

مواد و روش‌ها

این آزمایش در آزمایشگاه ژنومیکس پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی اصفهان انجام شد. بذور سرخارگل در گلخانه تحقیقاتی پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی اصفهان، کاشته شده، پس از ۴۰ روز برگ‌ها از گیاهچه‌ها برداشت و در فویل آلومینیوم بسته‌بندی و بلافاصله در فلاسک حاوی نیتروژن مایع با دمای ۱۹۶- درجه سلسیوس قرار گرفته و به آزمایشگاه منتقل و جهت نگهداری طولانی مدت در دمای ۸۰- درجه سلسیوس قرار گرفتند.

برای استخراج RNA مقدار ۱۰۰ میلی‌گرم از بافت برگ سرخارگل مورد استفاده قرار

گرفت. روش‌های مورد استفاده برای استخراج RNA در پژوهش حاضر شامل روش‌های لیتیم کلراید، کیت RNA^{X}-Plus، فنل/ SDS و کلراید/ فنل بود.

روش لیتیم کلراید

در این روش RNA کل نمونه‌های برگ طبق روش *روبیو-چینا و همکاران (۲۰۱۱)* استخراج شد.[۱۹] برای تهیه بافر لیتیم کلراید، مواد لازم طبق جدول ۱ با آب مقطر به حجم ۱ لیتر رسانده شد. برای تهیه بافر لیتیم کلراید، مواد لازم طبق جدول ۱ با آب مقطر به حجم ۱ لیتر رسانده شد، سپس مراحل استخراج RNA به شرح زیر انجام گرفت. ۸۰۰ میکرولیتر بافر لیتیم کلراید، و ۱٪ بتامرکاپتواتانول[1] به نمونه پودر شده در تیوب اضافه گردید. مخلوط حاضر ۳۰ ثانیه ورتکس و به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۶۵ درجه سلسیوس در بن ماری قرار گرفتند و در این مدت چند بار سروته انجام شد. سپس در دمای ۴ درجه سلسیوس با ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه[2] به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شد. فاز رویی رویی به میکروتیوب ۱/۵ میلی‌لیتری جدید منتقل شد و ۸۰۰ میکرولیتر فنل – کلروفرم در تیوب اضافه گردید، سپس ۳۰ ثانیه شیک شد و در دمای ۴ درجه سلسیوس با ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شد. مایع رویی به تیوب جدید انتقال یافت. سپس هم حجم آن ایزوآمیل الکل[3] ۲۴:۱ به آن اضافه شد. ۳۰ ثانیه شیک شد و با همان شرایط بالا سانتریفیوژ شد. فاز رویی به تیوب جدید منتقل شد و به ۶۰۰ میکرولیتر از حجم فاز رویی، ۲۰۰ میکرولیتر لیتیم کلراید ۸ مولار سرد اضافه شد. سپس تیوب به مدت ۴ ساعت در دمای ۲۰- درجه سلسیوس قرار گرفت. بعد از آن در دمای ۴ درجه سلسیوس با ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شد. فاز رویی دور ریخته شد و رسوب حاصله در تیوب را ابتدا با الکل ۱۰۰٪ و بعد با الکل ۷۰٪ شستشو داده شد و در سانتریفیوژ با شرایط دمای ۴ درجه سلسیوس با ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه دور در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه قرار گرفت. پلت به صورت وارونه روی دستمال به مدت ۳۰ دقیقه قرار گرفت. رسوب حاوی RNA در ۲۵ میکرولیتر آب مقطر سترون تیمار شده با DEPC حل شد. برای استفاده طولانی مدت به فریزر ۸۰- درجه سلسیوس منتقل گردید.

روش کیت RNA^{X}-Plus

بافر RNA^{X}-Plus از شرکت سیناژن RNA تهیه شد. صد میلی‌گرم بافت پودر شده به میکروتیوب‌های ۲ میلی‌لیتری حاوی ۱۰۰۰ میکرولیتر از محلول استخراج RNA^{X}-Plus سرد اضافه گردید. به مدت ۱ دقیقه ورتکس و ۱۵ دقیقه روی یخ قرار گرفتند. سپس در سانتریفیوژ به مدت ۱۰ دقیقه با دور ۷۰۰۰ دور در دقیقه در دمای ۴ درجه سلسیوس قرار گرفت. فاز رویی را به تیوب ۱/۵ میلی‌متری انتقال داده شد و ۲۰۰ میکرولیتر کلروفرم اضافه شد. چند بار سروته کرده و سپس ۵ دقیقه روی یخ قرار داده شد سپس مجدداً چند بار سروته شدند و در سانتریفیوژ به مدت ۱۵ دقیقه با ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه در دمای ۴ درجه سلسیوس قرار گرفت. مایع رویی به تیوب جدید منتقل و ۱۰۰ میکرولیتر کلروفرم به هر ویال اضافه و چند بار سروته کرده و بعد ۵ دقیقه روی یخ قرار داده شد. سپس مجدداً چند بار سروته شده و در سانتریفیوژ به

[1] betamercaptoethanol
[2] revolutions per minute (rpm)
[3] isoamyl alcohol

مدت ۱۵ دقیقه با ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه در دمای ۴ درجه سلسیوس قرار گرفت. فاز رویی به تیوب جدید منتقل و هم حجم آن ایزوپروپانول سرد اضافه شد. میکروتیوب به آرامی سروته و به مدت ۱۵ دقیقه روی یخ قرار گرفت و سپس ۳۰ دقیقه درون یخچال نگهداری شد. در ادامه به مدت ۱۵ دقیقه با ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه در دمای ۴ درجه سلسیوس سانتریفیوژ و مایع رویی خالی و روی رسوب سفید ته ویال ۱۰۰۰ میکرولیتر اتانول ۷۰٪ سرد ریخته شده و چند بار سروته شد. سپس در سانتریفیوژ به مدت ۸ دقیقه با ۷۵۰۰ دور در دقیقه در دمای ۴ درجه سلسیوس قرار گرفتند. بعد از سانتریفیوژ مجدداً لایه رویی خالی و به مدت ۳۰ دقیقه به صورت وارونه قرار گرفتند تا اتانول آن خارج شود. در نهایت روی هر نمونه ۵۰ میکرولیتر از آب سترون DEPC عاری از RNAز ریخته و به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۵۵ درجه سلسیوس قرار گرفتند. در نهایت، نمونه‌ها در دمای ۸۰- درجه سلسیوس نگهداری شدند.

روش فنل/ SDS

در این روش استخراج RNA کل نمونه‌های برگ سرخارگل طبق روش *دپا و همکاران (۲۰۱۴)* صورت گرفت.[۸] برای تهیه بافر استخراج، مواد لازم طبق جدول ۱ استفاده گردید. این مواد را در آب تیمار شده با DEPC حل نموده و pH آن با استفاده از اسید کلریدریک ۱ مولار و سود و pH به ۹ رسانده شد. ۱۰۰۰ میکرولیتر از بافر استخراج تهیه شده که در دمای ۶۵ درجه سلسیوس قرار گرفته بود را به تیوب ۲ میلی‌لیتری حاوی ۱۰۰ میلی‌گرم بافت برگ ساییده شده به همراه PVP ۲٪ اضافه شد و هم حجم آن فنل اضافه شد سپس ۱۰ ثانیه ورتکس شد و ۱۰ دقیقه در دمای اتاق باقی ماند و در سانتریفیوژ با ۱۵۰۰۰ دور در دقیقه و زمان ۱۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سلسیوس قرار گرفت. فاز رویی را جدا کرده و به تیوب ۱/۵ میلی‌لیتری منتقل و به آن ۳۰۰ مایکرولیتر استات و ۷۰۰ مایکرولیتر فنل اشباع اضافه شد و چند بار سروته کرده و ۱۰ دقیقه در یخ قرار گرفت. سپس در سانتریفیوژ به مدت ۱۰ دقیقه و ۱۵۰۰۰ دور در دقیقه در دمای ۴ درجه سلسیوس قرار گرفتند. فاز رویی را به تیوب ۱/۵ میلی‌لیتری منتقل و ۰/۱ حجم آن استات سدیم ۳ مولار و هم حجم آن ایزوپروپانول سرد اضافه شد و به مدت ۱ ساعت در دمای ۲۰- درجه سلسیوس قرار گرفت. بعد از آن نمونه‌ها به مدت ۱۰ دقیقه با ۱۵۰۰۰ دور در دقیقه و دمای ۴ درجه سلسیوس سانتریفیوژ گردیدند. سپس به رسوب حاصل ۱۰۰۰ میکرولیتر اتانول ۷۰ ٪ سرد اضافه شد و به مدت ۵ دقیقه با ۷۵۰۰ دور در دقیقه و دمای ۴ درجه سلسیوس سانتریفیوژ گردیدند. پس از خارج کردن مایع رویی و خشک شدن تیوب‌ها به مدت ۱۰-۵ دقیقه، رسوب حاوی RNA در ۲۵ میکرولیتر آب مقطر سترون تیمار شده با DEPC حل و برای نگهداری طولانی مدت به فریزر ۸۰- درجه سلسیوس منتقل گردیدند.

روش لیتیم کلراید/ فنل

در این روش استخراج RNA کل نمونه‌های برگ سرخارگل طبق روش *روساس و همکاران (۲۰۱۱)* صورت گرفت.[۳]

برای تهیه بافر استخراج، مواد لازم طبق جدول ۳ استفاده گردید. این مواد را در آب تیمار شده با DEPC حل نموده و pH بافر با استفاده از HCl ۱ مولار و NaOH به ۹ رسانده شد. ۵۰۰ میکرولیتر از بافر استخراج تهیه شده به همراه ۵۰۰ میکرولیتر فنل به تیوب ۲ میلی‌لیتری حاوی ۱۰۰

[1] sodium acetate

میلی‌گرم بافت برگ ساییده شده، اضافه شد. سپس ۱ دقیقه ورتکس شد و ۵ دقیقه در دمای ۶۰ درجه سلسیوس باقی ماند و در سانتریفیوژ با ۱۵۰۰۰ دور در دقیقه و زمان ۱۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سلسیوس قرار گرفت. فاز رویی را به تیوب ۱/۵ میلی‌لیتری منتقل و به آن ۶۰۰ میکرولیتر کلروفرم ایزوآمیل الکل اضافه شد و چند بار سروته و سپس در سانتریفیوژ به مدت ۱۰ دقیقه و ۱۵۰۰۰ دور در دقیقه در دمای ۴ درجه سلسیوس قرار گرفتند. فاز رویی را به تیوب ۱/۵ میلی‌لیتری منتقل و ۱۵ دقیقه در دمای ۶۵ درجه سلسیوس قرار گرفت. سپس به آن ۵۰ میکرولیتر NaCL ۵ مولار و ۶۳ میکرولیتر پلی‌اتیلن گلیکول اضافه شد. سپس ۱ دقیقه ورتکس و ۳۰ دقیقه در یخ قرار گرفت. در ادامه سانتریفیوژ با شرایط بالا انجام شد و فاز رویی به همراه ۵۰۰ میکرولیتر فنل ایزوآمیل الکل ۱:۲۴:۲۵ اضافه شد و در همان شرایط سانتریفیوژ قرار گرفت. در نهایت فاز رویی به همراه ۵۰ میکرولیتر استات سدیم ۳ مولار و ۱۲۰۰ میکرولیتر الکل مطلق یک شب در دمای ۲۰- درجه سلسیوس قرار گرفت و در سانتریفیوژ با ۱۵۰۰۰ دور در دقیقه و زمان ۱۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سلسیوس قرار گرفت. پس از خارج کردن مایع رویی و خشک شدن تیوب‌ها به مدت ۱۰-۵ دقیقه، رسوب حاوی RNA در ۲۰ میکرولیتر آب مقطر سترون تیمار شده با DEPC حل و برای نگهداری طولانی مدت به فریزر ۸۰- درجه سلسیوس منتقل گردیدند.

بررسی کمیت و کیفیت RNA

کمیت و کیفیت RNA استخراج شده با استفاده از روش اسپکتروفتومتری و الکتروفورز ژل آگارز مورد بررسی قرار گرفت. در روش اسپکتروفتومتری RNA، در طول‌موج ۲۶۰ نانومتر طول‌موج جذب اسیدهای نوکلئیک و ۲۸۰ نانومتر طول‌موج جذب پروتئین‌ها می‌باشد. اگر نسبت مقدار جذب محلول RNA در طول‌موج ۲۶۰ نانومتر به مقدار جذب در طول‌موج ۲۸۰ نانومتر در محدوده ۲-۱/۸ باشد نشان دهنده این است که جذب بیشتر توسط اسیدهای نوکلئیک صورت گرفته و کیفیت RNA به دست آمده مطلوب و از خلوص لازم برخوردار است. غلظت محلول ذخیره RNA با استفاده از رابطه زیر محاسبه گردید:

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

غلظت و کیفیت نمونه‌ها با استفاده از روش اسپکتروفتومتری پس از رقیق شدن در طول‌موج ۲۶۰ نانومتر اندازه‌گیری و

جدول ۱) موارد و مقادیر مورد استفاده برای تهیه ۲۵ میلی‌لیتر بافر در روش‌های مختلف استخراج RNA سرخارگل

Table 1) Chemicals used in lithium chloride buffer preparation in different RNA extraction methods from coneflower

Ingredients	RNA extraction method		
	lithium chloride	phenol/SDS	chloride/phenol
Tris-HCl	pH 8 0.1 mM	pH 8 100 mM	pH 8 100 mM
Ethylene Diamine Tetraacetic Acid (EDTA)	pH 8 0.5 mM	pH 8 25 mM	pH 8 10 mM
LiCl	8 M	-	100 mM
Sodium Dodecyl Sulfate (SDS)	%3	%2	%1
Polyvinyl Pyrrolidine (PVP)	%2	%2	-
B-Mercaptoethanol	%1	-	-
NaCl	-	-	5 M
Polyethylene glycol	-	-	%40
Sodium acetate	pH 5 3M	%1	5 M

با هم مقایسه شد.

در این پژوهش کیفیت RNA به روش‌های نسبت‌های جذب نور در طول‌موج‌های ۲۶۰/۲۸۰، ۲۶۰/۲۳۰ نانومتر و وجود باندهای مجزا برای 18SrRNAو 28SrRNA روی ژل آگارز ارزیابی شد.

حذف آلودگی ژنومی از RNA

RNAی کل استخراج شده ممکن است دارای آلودگی DNA باشد. برای اطمینان از عدم حضور آلودگی DNA ژنومی، RNA استخراج شده با آنزیم *DNase 1* تیمار شد. به منظور حذف DNA از RNA استخراج شده از آنزیم DNase شرکت Fermentas آلمان طبق دستورالعمل موجود در کیت استفاده شد.

نتایج و بحث

RNA استخراج شده حاوی tRNA، rRNA و mRNA می‌باشد و مقدار rRNA در سلول بسیار زیاد است و حدود ۸۵٪ کل RNA را تشکیل می‌دهد و میزان mRNA بسیار پایین و کمتر از ۵٪ کل RNA بود. پس وجود باندهای 18SrRNA و 28SrRNA را می‌توان دلیلی بر صحت کار استخراج RNA دانست.

نمونه‌هایی از RNA که دارای دو یا بیش از دو باند واضح rRNA و بدون شکستگی را روی ژل نشان داد، دارای کیفیت بسیار خوب بودند. همچنین نسبت‌های جذب ۲۶۰/۲۳۰ و ۲۶۰/۲۸۰ نانومتر خلوص RNA را نشان داد که

جدول ۲) غلظت کل RNA در نمونه‌های برگ سرخارگل در روش‌های مختلف استخراج

Table 2) Total RNA concentration in lemon juice samples in different methods

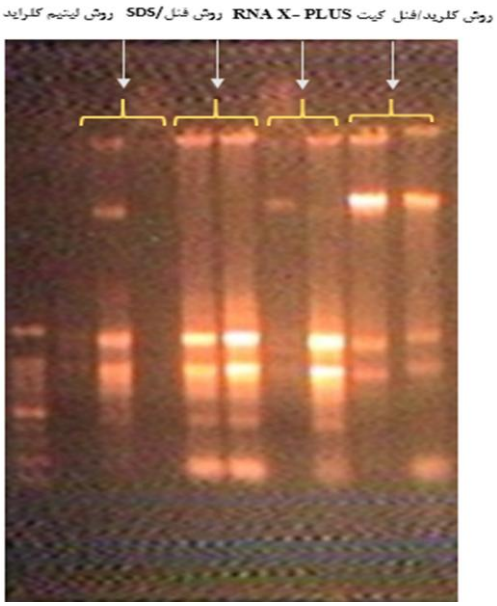
Extraction method	Total RNA Total (Ng / µl)	260/230	260/280
LiCl	1614	2.07	1.63
RNAX-Plus KIT	2230	1.1	1.13
Phenol / SDS	2907	1.15	1.17
Chloride / phenol	1223	2.28	1.94

در این مورد نمونه‌هایی با نسبت بین ۱/۸ تا ۲ بهترین کیفیت را از نظر میزان آلودگی را نشان دادند.[۲۶] میزان جذب نور در طول‌موج‌های ۲۶۰، ۲۸۰ و ۲۳۰ نانومتر به ترتیب میزان اسیدهای نوکلئیک، میزان آلودگی پروتئینی و آلودگی پلی‌ساکاریدی/پلی فنلی را نشان داد.[۲۵] (جدول ۲ و شکل ۱)

بیشترین مقدار RNA مربوط به روش فنل/ SDS و کمترین مقدار RNA مربوط به روش لیتیم کلراید/فنل بود (جدول ۲).

بعد از روش فنل/ SDS، کیت RNA X- PLUS روش مناسب‌تری برای جهت استخراج RNA بود. در این روش باندهای مجزا برای 18SrRNAو 28SrRNA روی ژل آگارز واضح بود و غلظت ۲۸۰/۲۶۰ در میان روش‌های مختلف، متفاوت بود (جدول ۲). با این حال، نسبت ۲۳۰/۲۶۰ تغییرات زیادی را نشان داد. نمونه‌های RNA از روش فنل/ SDS با کیفیت بسیار خوب دو باند واضح rRNA و بدون شکستگی را روی ژل نشان دادند (شکل ۲).

روش فنل / SDS و کیت RNA X- PLUS کمترین میزان آلودگی پروتئینی و پلی ساکاریدی را داشتند. روش فنل/SDS حاوی ماده شیمیایی SDS بود که مانع

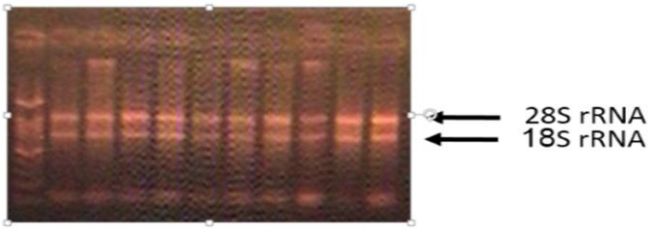


شکل ۱) الکتروفورز ژل آگارز مربوط به نمونه‌های برگ سرخارگل به دست آمده از چهار روش استخراج، روش‌های لیتیم کلراید، کیت RNA^X-Plus، فنل/SDS و کلراید/فنل.

Figure 1) Agarose gel electrophoresis of conflower leaves obtained from four extraction methods of lithium chloride, RNA^X-Plus, phenol/SDS and chloride/phenol, ladder 50bp.

فعالیت ریبونوکلئازها و باعث جداسازی پروتئین از اسیدهای نوکلئیک می‌شود.[۱۵] همچنین استفاده از PVP از عوامل مؤثر در افزایش کمیت و کیفیت RNA استخراج شده محسوب می‌شود، PVP از راه ایجاد پیوندهای هیدروژنی با مواد پلی فنلی کمپلکسی را به وجود آورده و امکان جداسازی آن‌ها را از RNA فراهم می‌نماید.[۲۶] به منظور شناسایی بهترین روش از بین سه روش استخراج RNA Plus-(RNXTM)، لیتیم کلراید و فنل-کلروفورم از بافت‌های گل و برگ بومادران نشان داد که RNA استخراج شده با روش فنل-کلروفورم دارای کمیت و کیفیت بالایی در محدوده ۲-۱/۸ بود. RNA در طول‌موج ۲۶۰ نانومتر به مقدار جذب در طول‌موج ۲۸۰ نانومتر در محدوده ۲-۱/۸ باشد نشان‌دهنده این است که جذب بیشتر توسط اسیدهای نوکلئیک صورت گرفته و کیفیت RNA به دست آمده مطلوب و از خلوص لازم برخوردار بود که به دلیل حذف پلی-ساکاریدها و متابولیت‌های ثانویه به ویژه پلی‌فنل‌ها از محتویات سلولی بافت گیاه موجب استخراج بهتر RNA می‌گردد. *فلور و همکاران (۲۰۰۴)* طی مطالعه ای گزارش دادند افزودن LiCl به بافر استخراج باعث حذف پلی ساکاریدهای درگیر با RNA شد، در صورتی که در این پژوهش باعث کم شدن کمیت و کیفیت RNA و ایجاد ناخالصی در نمونه‌های مورد نظر شد. در روش لیتیم کلراید/فنل، پلی ساکارید های باقیمانده از جمله مواد دیگری هستند که باعث کاهش کیفیت RNA می‌شوند، از نمک NaCL با غلظت ۵ مولار و رسوب در شرایط نمک بالا برای برداشتن مواد استفاده می‌شود.[۴] در این پژوهش روش لیتیم کلراید/فنل موفقیت آمیز نبوده و در مراحل اجرای آن مقدار رسوب به دست آمده زیاد و قهوه ای بود که در روی ژل آگارز باندهای بسیار ضعیفی را نشان داد.

در نهایت، روش فنل/SDS جهت استخراج RNA با کیفیت و کمیت مطلوب از برگ سرخارگل مناسب‌ترین و کم‌هزینه‌ترین روش جهت استخراج RNA در مقایسه با سایر روش‌ها تشخیص داده شده و کیت RNA^X-PLUS کیت مناسبی برای استخراج RNA ژنومی از سرخارگل می‌باشد.



شکل ۲) الکتروفورز RNA استخراج شده روش فنل/ SDS در ژل آگارز ۱/۵٪ نمونه برگ گیاه سرخارگل، نمایانگر باندهای 18SrRNA و 28SrRNA.

Figure 2) RNA extracted electrophoresis by phenol / SDS method in 1.5% agarose gel. The specimen of coneflower represents 18SrRNA bands and 28SrRNA bands, Ladder is 50bp.

نتیجه‌گیری کلی کوتاه بودن مراحل استخراج RNA و حذف برخی ترکیبات شیمیایی غیرضروری تأثیر مثبتی بر کیفیت و کمیت RNA دارد. بالاترین کیفیت RNA در روش فنل/SDS و کمترین کیفیت RNA در روش لیتیم کلراید/فنل مشاهده شد. روش فنل/SDS مناسب‌ترین و کم هزینه ترین روش برای استخراج RNA برگ گیاه‌سرخارگل در مقایسه با بقیه روش‌ها می‌باشد.

References

1. Bahador S, Rabiei B, Hasani- Kumleh SH (2014) Comparison of different methods for isolating of total RNA from leaf of three Thyme species rich in secondary metabolites. Iranian Journal of Rangelands and Forests Plant Breeding and Genetic Research 22(1): 11-24. [in Persian with English abstract]
2. Barrett B (2003) Medicinal properties of *Echinacea*: a critical review. Phytomedicine 10(1): 66-86.
3. Chaudhry B, Yasmin A, Husnain, T, Riazuddin S (1999) Mini-scale genomic DNA extraction from cotton. Plant Molecular Biology Reporter 17(3): 280-280.
4. Cheng YJ, Guo WW, Yi HL, Pang XM, Deng X (2003) An efficient protocol for genomic DNA extraction from *Citrus* species. Plant Molecular Biology Reporter 21(2): 177-178.
5. Chomczynski P, Sacchi N (1987) Single step method of RNA isolation by acid guanidinium thyocyanate–phenole-chlorophorm extraction. Analytical Biochemistry 162(1): 156-159.
6. Claros MG, Canovas FM (1998) Rapid high quality RNA preparation from pine seedlings. Plant Molecular Biology Reporter 16(1): 9-18.
7. Cruz RY, Laude RP, Diaz MGQ, Laurena AC, Mendioro MS, Mendoza EMT (2011) Gene for actin is a suitable internal reference for relative RT-PCR- based expression analysis in normal and mutant makapuno endosperms of coconut (*Cocos nucifera* L.). Philippine Agricultural Scientist 94(2): 118-123.
8. Deepa K, Sheeja TE, Santhi R, Sasikumar B, Cyriac A, Deepesh PV, Prasath D (2014) A simple and efficient protocol for isolation of high quality functional RNA from different tissues of turmeric (*Curcuma longa* L.). Physiology and Molecular Biology of Plants 20(2): 263–271.
9. Gonzalez-Mendoza D, Moreno AQ, Zapata-Perez O (2008) An improved method for the isolation of total RNA from *Avicennia germinans* leaves. Zeitschrift fur Naturforschung 63(1-2): 124-126.
10. Javdan-Asl M, Rajabi-Memari H, Nabati-Ahmadi D, Rahnama-Ghahfarokhi A (2016) Comparison of different genomic RNA extraction methods from the medicinal plant yarrow (Achillea millefolium). Plant Production (Scientific Journal of Agriculture) 39(2): 105-114. [in Persian with English abstract]
11. Kansal R, Kuhar K, Verma I, Niwas Gupta R, Kumar Gupta V, Koundal KR (2008) Improved and convenient method of RNA isolation from polyphenols and polysaccharide rich plant tissues. Indian Journal of Experimental Biology 46(12): 842-845.
12. Kolosova N, Miller B, Ralph S, Ellis BE, Douglas C, Ritland K, Bohlmann J (2004) Isolation of high-quality RNA from gymnosperm and Angiosperm trees. BioTechniques 36(5): 821-824.

13. MacRae EA (2007) Extraction of plant RNA. Methods in Molecular Biology 353: 15-24.
14. Omidbaigi, R. (2005). Production and processing of medicinal plants, Volume 2, Astan Quds Razavi Publication, 438 pages. Mashad, Iran. (in Farsi)
15. Rio DC, Ares M, Hannon GJ, Nilsen TW (2010) Purification of RNA by SDS solubilization and phenol extraction. Cold Spring Harbor Protoco 2010(6): 5438.
16. Rodrigues SM, Soares VL, Oliveira TM, Gesteira AS, Otoni WC, Costa MG (2007) Isolation and purification of RNA from tissues rich in polyphenols, polysaccharides, and pigments of annatto (*Bixa orellana* L.). Molecular Biotechnology 37(3): 220-224.
17. Rosas-Cardenas FF, Duran-Figueroa N, Vielle-Calzada JP, Cruz-Hernandez A, Marsch-Martinez N, de Folter S (2011) A simple and efficient method for isolating small RNAs from different plant species. Plant Methods 7(4): 1-7.
18. Rouholamin S, Zahedi B, Saei A, Nazarian Firouzabadi F (2015) Comparison of three genomic RNA extraction methods from pomegranate peel. New molecular cell biotechnology 5 (19): 39-45. [in Persian with English abstract]
19. Rubio–Pina JA, Zapata-Perez O (2011) Isolation of total RNA from tissues rich in polyphenols and polysaccharides of mangrove plants. Electronic Journal of Biotechnology 14(5): 1-8.
20. Tang Y, Simoneau AR, Xie J, Shahandeh B, Zi X (2008) Effects of the kava chalcone flavokawain A differ in bladder cancer cells with wild-type versus mutant p53. Cancer Prevention Research 1(6): 439-451.
21. Sambrook J, Russel DW (2001) Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 3rd edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press: New York.
22. Schneiderbauer A, Sandermann H, Ernst D (1991) Isolation of functional RNA from plant tissues rich in phenolic compounds. Analytical Biochemistry 197(1): 91-95.
23. Tousch D, Lajoix AD, Hosy E, Azay-Milhau J, Ferrare K, Jahannault C, Cros G, Petit P (2008) Chicoric acid, a new compound able to enhance insulin release and glucose uptake. Biochemical and Biophysical Research Communications 377(1): 131-135.
24. Wang L, Stegemann JP (2010) Extraction of high quality RNA from polysaccharide matrices using cetyltrim ethylammonium bromide. Biomaterials 31(7): 1612-1618.
25. Winfrey MR, Rott MA, Wortman AT (1997) Unraveling DNA: Molecular Biology for the Laboratory. Prentice-Hall, Inc: New York.
26. Zarei A, Zamani Z, Mousavi A, Fatahi R, Karimi Alavijeh M, Dehsara B, Salami SA (2012) An effective protocol for isolation of high-quality RNA from pomegranate seeds. The Asian and Australasian Journal of Plant Science and Biotechnology 6(1): 32-37.

Efficiency of RNA extraction methods from coneflower medicinal plant

Agroecology Journal

Vol. 15, No. 1 (71-81)
(spring 2019)

Kosar Moradi✉, Rasol Amirian

Department of Genomics, Agricultural Biotechnology Research Institute of Iran-Central Branch- Isfahan, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Tehran, Iran

✉ moradi.k@abrii.ac.ir **(corresponding author)**

Received: 18 January 2019 **Accepted:** 27 May 2019

Abstract Coneflower is a valuable medicinal plant containing high levels of secondary metabolites, but no suitable method for extraction of the entire RNA has been introduced yet. In present study, four methods of RNA extraction including lithium chloride, RNA^X-Plus kit, phenol/SDS and lithium chloride/phenol were investigated. For confirming the quality and purity of RNA, spectrophotometer and agarose gel electrophoresis of 1.5% were used. The high absorption ratio of RNA solution at a wavelength of 260 nM to 280 and 230 nM, observation of ribosomal RNAs and the lack of smear on the gel were considered as criteria for determining samples quality. The highest and the lowest qualities of RNA contained 2.9 µg/100 mg of fresh leaves by phenol/SDS method and 1/2 µg/100 mg of fresh leaves by lithium chloride/phenol method, respectively. Therefore, phenol/SDS method is introducing as the most suitable method for RNA extraction from coneflower.

Keywords

- *Echinacea purpurea*
- lithium chloride/phenol
- litium chloride
- phenol/SDS
- RNA^X-Plus kit

This open-access article is distributed under the terms of the Creative Commons-BY-NC-ND which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

DOI: 10.22034/AEJ.2019.665295