

بررسی دو روش موثر در استخراج RNA ژنومی در ارقام تجاری انگور

بهاره قربانی^۱، رقیه نجف زاده^۲

^۱ دانش آموخته‌ی دکتری باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ارومیه

^۲ استادیار گروه باغبانی و بیوتکنولوژی، دانشگاه ارومیه، واحد میاندوآب

* نویسنده مسؤول: ghorbani.bahareh@ymail.com



چکیده

در مطالعات مولکولی، استخراج RNA یک مرحله بسیار مهم به شمار می‌رود و نتایج کارهای دیگر مانند PCR و Real Time-PCR وابسته به کمیت و کیفیت RNA می‌باشد. استخراج RNA در گیاهان مختلف نیازمند پروتکل خاص همان گیاه است و بسته به میزان کربوهیدرات، متابولیت ثانویه و ترکیبات فنلی متفاوت می‌باشد. انگور دارای ترکیبات فنلی متعدد بوده و حضور این ترکیبات در گیاه استخراج را کاری سخت نموده است. این مقاله به مقایسه دو روش متداول استخراجی (Plus) RNXTM، CTAB در دو رقم انگور می‌پردازد. هدف شناسایی بهترین روش استخراج در دو رقم ریش بابا و رقم یاقوتی انگور و بررسی کمیت و کیفیت آن می‌باشد. نتایج نشان داد روش CTAB در صورت استفاده از ترکیبات عاری از آلودگی کیفیت و کمیت بالایی نسبت به روش (Plus) RNXTM در رقم ریش بابا دارا می‌باشد. علت این امر می‌تواند به قدرت شست شوی بالای ترکیبات پلی ساکاردی و فنلی باشد.

واژه‌های کلیدی: انگور، استخراج RNA، CTAB، RNXTM (Plus)، PCR

مقدمه

با وجود تنوع بیولوژیکی و شیمیایی در گیاهان هیچ روش عمومی استخراج RNA در دسترس نیست. بررسیهای مولکولی با هدف ارتقا کیفیت و کمیت در گیاهان زراعی و باغی صورت می‌پذیرد. از این رو یافتن روشی نوین و در عین حال با قدرت کیفی بالا سبب مطالعات گسترده و پیشرفت‌های توام می‌شود. استخراج RNA از آن‌ها با کیفیت و کمیت مناسب جهت واکنش‌های زنجیره‌ای پلیمرز، با مشکلات زیادی همراه است که بسته به گیاه و اندام هدف مورد استخراج می‌تواند زمان بر باشد. این روش‌ها با مشکلاتی مانند وجود مقادیر زیاد پلی ساکارد، سطوح زیادی از آنزیم، RNase انواع مختلف ترکیبات فنلی مانند تانن‌ها، غلظت کم اسید نوکلئیک (مقدار زیاد آب)، بافت‌هایی مانند لیگنین (چوب)، که تجزیه آن مشکل است و غیره مواجه می‌باشند. گونه وینفرا یکی از مهم‌ترین محصولات باغبانی در کل دنیا می‌باشد. شاخه‌های یکساله از جوانه‌های اصلی و فرعی رشد می‌کنند. بر روی گره‌های شاخه یک‌ساله پیچک، خوشه و برگ حاصل می‌شود. انگور ارزش اقتصادی و تغذیه‌ای بالایی دارد و ترکیبات غذایی انگور بسته به رقم و منطقه و آب و هوای کشت متفاوت است (Yilmaz and Toledo, 2004). انگور جزء محصولات مناطق معتدله گرم است و گیاهان نیمه گرمسیری و حتی معتدله گاه‌ها با دمای بالای صفر هم دچار خسارات جبران ناپذیر می‌شوند. این صدمات شامل اختلال در فرآیندهای متابولیسمی، ساختار سلولی و افزایش رادیکال‌های آزاد در گیاه می‌باشد (Sangwan *et al.*, 2002).

برای مطالعات مولکولی مانند آشکارسازی تغییرات بیان ژن در پاسخ به استرس‌های زیستی و غیرزیستی، تجزیه و تحلیل بیان ژن طی مراحل مختلف رشد و نمو، بررسی الگوی بیان در اندام‌های مختلف، شناسایی و توالی‌یابی ژن‌های مهم دخیل در مسیرهای متابولیکی در سطح mRNA باشد. دسترسی به RNA با کمیت و کیفیت مطلوب از گیاه که دارای مقادیر فراوان ترکیبات پلی فنلی ضرورت دارد. امکان ورود آلودگی‌های نسبتاً کم پلی ساکاردی به فاز آبی باعث رسوب همزمان آن‌ها با RNA می‌شود و در مراحل بعدی کاربرد RNA تداخل ایجاد می‌کند (Wang and Stegemann, 2009). همچنین RNA با ترکیبات پلی -ساکاردی و پلی فنلی کمپلکس تشکیل می‌دهد و پلیت‌های RNA حاصل غیرقابل حل می‌شوند. رنگ یا حالت پلیت‌های RNA می‌تواند بیانگر آلودگی‌های مختلف باشد. مثلاً برخی به دلیل آلودگی پلی ساکاردی حالت ژلاتینی دارند و یا پلیت‌های مایل به قرمز نشان‌دهنده آلودگی‌های پلی فنلی هستند (Sabir, 2012). برای افزایش میزان بازدهی و کاهش تجزیه، RNA در استخراج، روش‌های متفاوتی برای استخراج RNA ژنومی کل در گونه‌های مختلف گیاهان پیشنهاد گردیده است، در این مقاله دو روش استخراجی RNXTM (Plus)، CTAB در گیاه انگور مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

نمونه‌ها پس از برداشت در فویل آلومینیوم بسته بندی و فوراً در فلاسک حاوی نیتروژن مایع (با دمای ۱۹۶- درجه سانتی‌گراد) قرار گرفته و به آزمایشگاه بیوتکنولوژی منتقل شدند و جهت نگهداری طولانی مدت در دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند. استخراج RNA از بافت برگ جوان انگور صورت گرفته است. قبل از شروع استخراج، RNA کلیه وسایل مربوطه از قبیل تیوب، هاون و فالکون، دو مرتبه به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد اتوکلاو شدند تا به طور کامل استریل شوند. برای تجزیه آماری داده‌های حاصل در قالب طرح کاملاً تصادفی نامتعادل با ۳ تکرار تجزیه شدند و مقایسه میانگین‌ها با آزمون LSD در سطح احتمال ۵ درصد انجام شد. از نرم افزار SAS نسخه ۹/۴ برای تجزیه آماری استفاده شد.

روش اول: استخراج RNA با روش RNXTM (Plus)

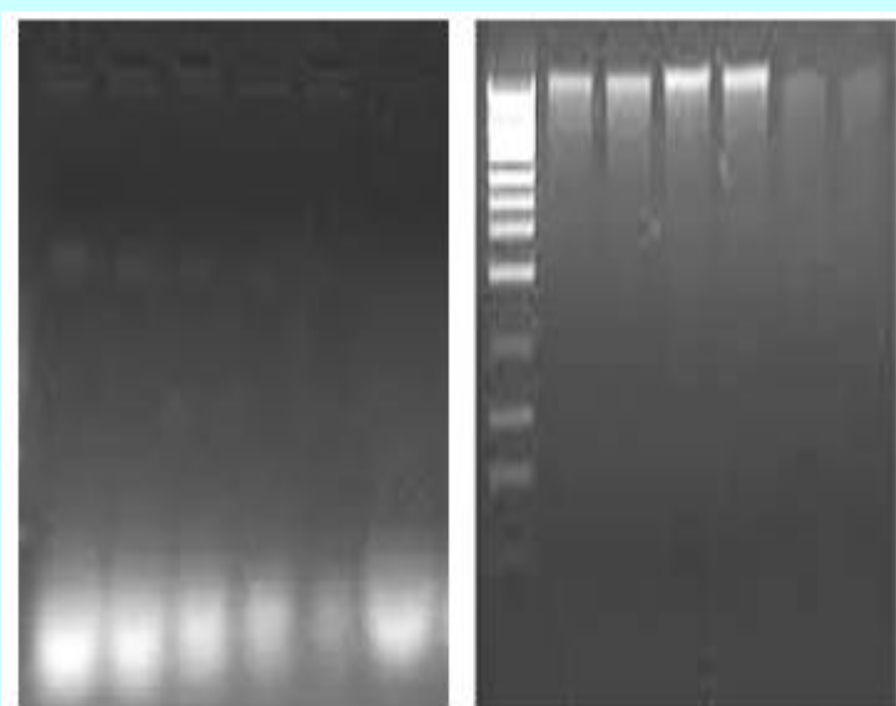
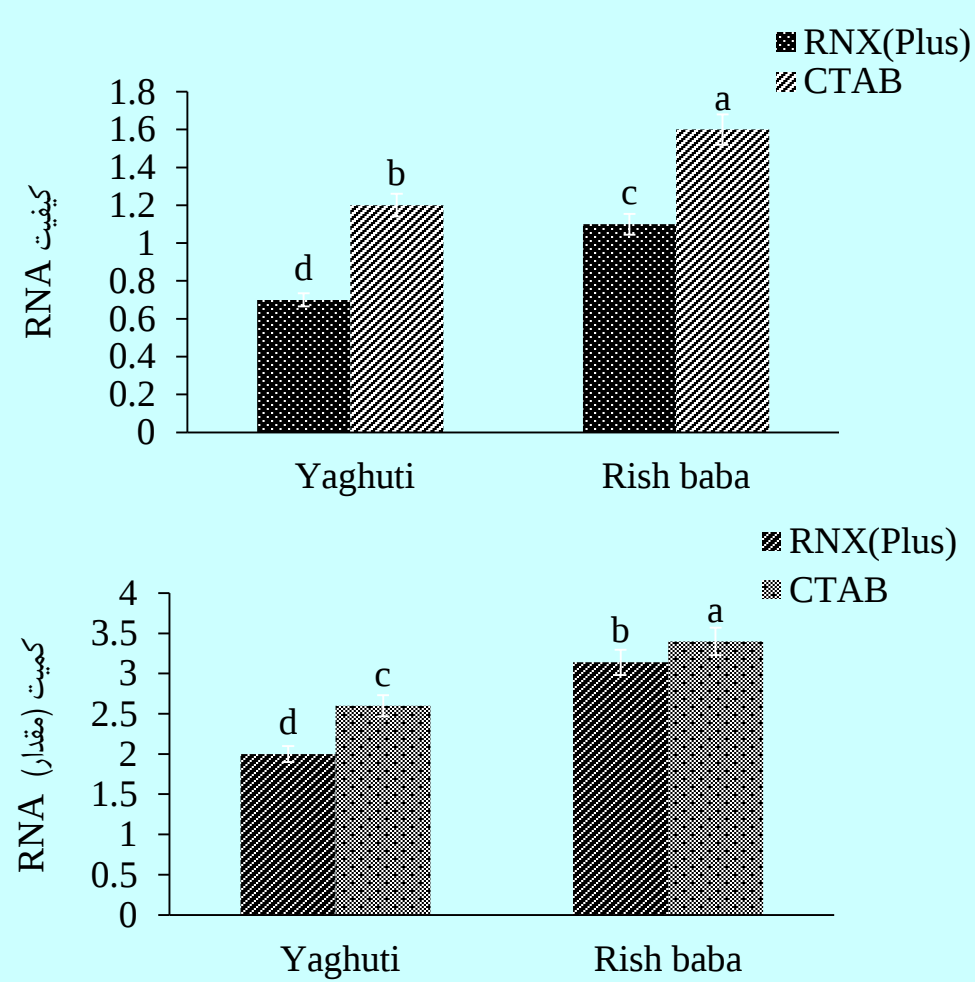
در ابتدا به ۱۰۰ میلی گرم بافت برگ پودر شده، ۱۰۰۰ میکرولیتر از محلول استخراجی RNXTM (Plus)، سرد اضافه گردید. سپس ۲۰۰ میکرولیتر کلروفرم به میکروتیوب حاوی بافت هموزنیزه اضافه شد. در مرحله بعد میکروتیوب با دست به آرامی ورتکس شد تا بافت گیاهی کاملاً هموزنیزه شود، سپس. به مدت ۵ دقیقه روی یخ یا دمای ۴ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. سپس نمونه به مدت ۱۵ دقیقه با سرعت ۱۲۰۰ دور در دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ شد. پس از سانتریفیوژ، فاز بالایی به آرامی به میکروتیوب دیگری منتقل شده و سپس به میزان هم حجم محتویات منتقل شده ایزوپروپانول سرد به آن اضافه شد و مجدد به مدت ۵ دقیقه روی یخ یا دمای ۴ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. سپس نمونه به مدت ۱۵ دقیقه با سرعت ۱۲۰۰ دور در دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ شد، سپس مایع روشن‌رنگ دور ریخته شده و به میزان ۱ میلی‌لیتر اتانول ۷۵ درصد به آن اضافه شد و به آرامی ورتکس گردید تا رسوب از ته میکروتیوب جدا شود و سپس به مدت ۵ دقیقه با سرعت ۱۲۰۰ دور در دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ شد. پس از سانتریفیوژ، مایع روشن‌رنگ دور ریخته شد و پلیت با ۵۰ میکرولیتر با آب DEPC حل شد.

روش دوم: استخراج RNA با روش CTAB

در ابتدا به ۱۰۰ میلی گرم بافت برگ پودر شده، ۸۰۰ میکرولیتر از بافر CTAB اضافه گردید و سپس همزمان یک درصد PVP وزنی/ حجمی و یک درصد بتا-مرکاپتواتانول اضافه شده و به آرامی اینورت می‌کنیم. نمونه را به مدت ۳۰ دقیقه تحت دمای ۶۰ درجه قرار داده در حین حرارت دیدن چند بار به آرامی اینورت می‌کنیم. سپس به محلول فوق ۱۰۰ میکرولیتر استات سدیم ۲ مولار و ۲۰۰ میکرولیتر کلروفرم/ایزوپانول الکلی ۱:۲۴ اضافه کرده و مجدد اینورت می‌کنیم. نهایتاً نمونه به مدت ۱۵ دقیقه با سرعت ۱۲۰۰ دور در دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ می‌نماییم. می‌توان این مرحله را دو بار انجام داد. سپس فاز بالایی به آرامی به میکروتیوب دیگری منتقل شده سپس به میزان هم حجم محتویات منتقل شده ایزوپروپانول سرد به آن اضافه شد و به مدت ۱ ساعت در دمای ۸۰- قرار داده شدند. سپس نمونه به مدت ۱۵ دقیقه با سرعت ۱۲۰۰ دور در دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ شد، سپس مایع روشن‌رنگ دور ریخته شده و به میزان ۱ میلی‌لیتر اتانول ۷۵ درصد به آن اضافه شد و به آرامی ورتکس گردید تا رسوب از ته میکروتیوب جدا شود و سپس به مدت ۵ دقیقه با سرعت ۱۲۰۰ دور در دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ شد. پس از سانتریفیوژ، مایع روشن‌رنگ دور ریخته شد و پلیت با ۵۰ میکرولیتر با آب DEPC حل شد (Ghangal *et al.*, 2009).

نتایج و بحث

نتایج تجزیه واریانس داده‌های مربوط به نمونه‌های نگهداری شده در دمای ۸۰- نشان داد که بین تیمارهای مختلف از نظر فاکتورهای مقدار، RNA نسبت‌های جذب ۲۶۰/۲۳۰ و ۲۶۰/۲۸۰ نانومتر اختلاف معنی‌دار بود و برترین روش در این بررسی روش CTAB بود (شکل ۱). در روش CTAB بافر حاوی PVP، CTAB و بتا-مرکاپتواتانول است که هر کدام عملکرد خاصی دارند PVP. موجود در آن از طریق تشکیل پیوند هیدروژنی با ترکیبات پلی فنلی و تشکیل کمپلکس، باعث جداسازی ترکیبات پلی فنلی از اسیدهای نوکلئیک می‌شود و بتا-مرکاپتواتانول موجود در آن نیز از اکسیداسیون فنل‌ها و آزادسازی کوئینون‌ها ممانعت می‌کند. لذا بهترین استخراج در روش CTAB دیده شده است (شکل ۲).



شکل ۲- بررسی کیفی دو روش استخراجی RNA
شکل راست CTAB و شکل چپ RNXTM (Plus)

شکل ۱- بررسی نمودار کمی و کیفی دو روش استخراجی RNA در دو رقم انگور (یاقوتی و ریش بابا)

منابع

- Ghangal, R., Raghuvanshi, S., Sharma, P.C. 2009. Isolation of good quality RNA from a medicinal plant seabuckthorn rich in secondary metabolites. *Plant Physiology and Biochemistry*, 47:113-115.
- Sabir, A., Kafkas, E., Tangolar, S. 2010. Distribution of major sugars, acids and total phenols in juice of five grapevine (*Vitis* spp.) cultivars at different stages of berry development. *Spanish Journal of Agricultural Research*, 8(2): 425-433.
- Sangwan, V., Orvar, B.L., Beyerly, J., Flirt, H., Dhindsa, R.S. 2002. Opposite changes in membrane fluidity mimic cold and head stress activation of distinct plant MAP kinase pathways. *Plant Journal*, 31: 629-638.
- Wang, L., Stegemann, J.P. 2009. Extraction of High Quality RNA from Polysaccharide Matrices using Cetyltrimethylammonium Bromide. *Elsevier Ltd, Biomaterials*, 31: 12-16.
- Yilmaz, Y., Toledo, R.T. 2004. Major flavonoids in grape seeds and skins: antioxidant capacity of catechin, epicatechin and gallic acid. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(2): 255- 260.