



University of Isfahan
Biological Science and Technology
Department of Cell and Molecular Biology
Cellular and Molecular Laboratory
Farzaneh Forouharfar

عنوان استخراج RNA از سلول‌های گیاهی

اهداف

۱. استخراج RNA کل از سلول‌های گیاهی با روش تریزول

۲. جداسازی RNA از DNA و پروتئین‌ها

۳. حفظ کیفیت و کمیت RNA برای آزمایش‌های بعدی

۴. ارزیابی خلوص و غلظت RNA به کمک نانودراپ و الکتروفورز ژل آگارز

مقدمه

(RNA ریبونوکلیک اسید) یکی از مهم‌ترین مولکول‌های زیستی است که نقش اساسی در بیان ژن‌ها، تنظیم فرآیندهای سلولی و تولید پروتئین‌ها ایفا می‌کند. استخراج RNA از بافت‌های گیاهی یکی از مراحل کلیدی در تحقیقات زیست‌شناسی مولکولی، بیوتکنولوژی و مطالعات ژنتیکی است. RNA استخراج‌شده می‌تواند برای بررسی الگوهای بیان ژن، کلونینگ، توالی‌یابی نسل جدید (NGS) و آزمایش‌های PCR معکوس (RT-PCR) مورد استفاده.

گیاهان، به دلیل ساختار پیچیده دیواره سلولی، حضور ترکیبات پلی‌ساکاریدی و پلی‌فنولی، چالش‌های خاصی را در استخراج RNA ایجاد می‌کنند. این ترکیبات می‌توانند با RNA برهم‌کنش داشته و کیفیت آن را کاهش دهند. از این رو، انتخاب روش مناسب و استفاده از معرف‌های شیمیایی مانند تریزول (Trizol) که قادر به حفظ RNA و جداسازی آن از سایر اجزای سلولی است، اهمیت ویژه‌ای دارد.

در این آزمایش، با استفاده از روش تریزول و نیتروژن مایع، RNA کل از بافت گیاهی استخراج می‌شود. این روش بر پایه لیز سلولی، جداسازی RNA از DNA و پروتئین‌ها، رسوب‌دهی و شستشوی RNA استوار است. در نهایت، کیفیت و کمیت RNA به کمک روش‌های نانودراپ و الکتروفورز ژل آگارز ارزیابی می‌شود تا از خلوص و عدم تخریب آن اطمینان حاصل گردد.



وسائل مواد و تجهیزات مورد نیاز



مواد شیمیایی

۱. محلول تریزول (حاوی فنول، گوانیدین ایزوتیوسیانات و کلروفرم)
۲. ایزوپروپانول (برای رسوبدهی RNA)
۳. اتانول ۷۵٪ (برای شستشوی RNA)
۴. آب دیونیزه (DEPC-treated water) (برای حل کردن RNA)
۵. نیتروژن مایع (برای فریز کردن سریع نمونه گیاهی)

وسایل آزمایشگاهی

۱. لوله‌های میکروسانتریفیوژ (۱,۵ یا ۲ میلی‌لیتری)
۲. پیپت و نوک پیپت RNase-free
۳. میکروپیپت (برای اندازه‌گیری دقیق حجم‌ها)
۴. هاون چینی و دسته هاون (برای آسیاب نمونه گیاهی در نیتروژن مایع)
۵. ویورتکس (برای مخلوط کردن نمونه‌ها)
۶. حمام یخ (برای حفظ پایداری RNA در برخی مراحل)
۷. میکروسانتریفیوژ (با توانایی چرخش در ۱۲,۰۰۰ تا ۱۴,۰۰۰ rpm)

تجهیزات حفاظتی و ایمنی

۱. دستکش یکبار مصرف (برای جلوگیری از آلودگی RNA)
۲. عینک ایمنی (برای محافظت در برابر مواد شیمیایی)
۳. روپوش آزمایشگاهی (برای حفظ ایمنی شخصی)

تجهیزات ارزیابی RNA

۱. نانودراپ یا اسپکتروفوتومتر (برای اندازه‌گیری غلظت و خلوص RNA)
۲. دستگاه الکتروفورز ژل آگارز (برای بررسی کیفیت RNA)

این لیست شامل تمامی مواد و تجهیزات موردنیاز برای استخراج RNA از سلول‌های گیاهی است.

روش کار





جمع‌آوری نمونه گیاهی

۱. انتخاب نمونه: برای استخراج RNA از گیاه، معمولاً از بخش‌های تازه و سالم گیاه مانند برگ‌ها، ساقه‌ها یا ریشه‌ها استفاده می‌شود. این بخش‌ها باید بدون آسیب یا آلودگی به دست آید.

۲. آماده‌سازی نمونه: گیاه باید بلافاصله پس از برداشت فریز شود (در فریزر یا در نیتروژن مایع) تا RNA از تخریب توسط آنزیم‌های RNase جلوگیری شود.

۳. اندازه‌گیری مقدار نمونه: حدود ۱۰۰ میلی‌گرم از نمونه گیاهی برای استخراج RNA کافی است.

آماده‌سازی مواد و تجهیزات

۱. محلول Trizol (Tri reagent): این محلول حاوی فنول، گوانیدین ایزوتیوسیانات و کلروفرم است.

۲. یخ خشک و نیتروژن مایع: برای فریز کردن نمونه‌های گیاهی.

۳. لوازم استریل: پیمپت‌ها، لوله‌های سانتریفیوژ، دستکش و تجهیزات دیگر باید استریل باشند تا از آلودگی نمونه جلوگیری شود.

۴. سانتریفیوژ و یخچال: برای مراحل جداسازی فازها و نگهداری RNA در دمای مناسب.

استخراج RNA از نمونه گیاهی

۱. آسیاب کردن نمونه گیاهی:

آسیاب نمونه: به منظور سهولت در استخراج RNA و جلوگیری از تخریب آن، نمونه گیاهی باید به صورت پودر شده درآید. برای این کار از آسیاب‌های دستی یا مکانیکی همراه با نیتروژن مایع استفاده می‌شود. احتیاط: آسیاب کردن نمونه باید در دمای پایین انجام شود تا از تخریب RNA جلوگیری شود. پس از آسیاب، نمونه‌ها باید فوراً به محلول Trizol اضافه شوند.

۲. اختلاط نمونه با محلول Trizol :

مخلوط کردن با محلول Trizol: به نمونه پودر شده گیاهی حدود ۱ میلی‌لیتر محلول Trizol به ازای هر ۵۰ میلی‌گرم از ماده گیاهی اضافه می‌شود. همزدن: نمونه باید به مدت ۵ دقیقه در دمای اتاق هم زده شود تا RNA به طور کامل از سلول‌ها آزاد شود.

۳. سانتریفیوژ و جداسازی فازها:

سانتریفیوژ: پس از همزدن، نمونه به مدت ۵ دقیقه در ۱۲,۰۰۰ rpm سانتریفیوژ می‌شود تا نمونه به سه فاز تقسیم شود:

- فاز آبی: RNA در این فاز قرار دارد.
- فاز آلی: پروتئین‌ها و چربی‌ها در این فاز باقی می‌مانند.
- رسوب: DNA در این فاز پلت رسوب می‌کند.

جدا کردن فاز آبی: فاز آبی به آرامی از فاز آلی جدا شده و در لوله جدید منتقل می‌شود.

۴. رسوب RNA :

افزودن ایزوپروپانول: به فاز آبی ایزوپروپانول (حدود ۰,۵ برابر حجم محلول) اضافه می‌شود.
مخلوط کردن و نگهداری در دمای منفی ۲۰ درجه سانتی‌گراد: محلول به مدت ۱۰ دقیقه در دمای منفی ۲۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده می‌شود تا RNA رسوب کند.

۵. سانتریفیوژ و جمع‌آوری RNA :

سانتریفیوژ مجدد: بعد از مدت ۱۰ دقیقه، نمونه دوباره سانتریفیوژ می‌شود به مدت ۱۰ دقیقه با سرعت ۱۲,۰۰۰ rpm.
جمع‌آوری RNA RNA رسوب شده در ته لوله جمع می‌شود. این رسوب باید با دقت از محلول جدا شود.

۶. شستشوی RNA :

شستشو با اتانول ۷۵٪: RNA رسوب شده با ۱ میلی‌لیتر اتانول ۷۵٪ شسته می‌شود تا هرگونه آلودگی باقی‌مانده حذف شود.
سانتریفیوژ: نمونه مجدداً به مدت ۵ دقیقه در سرعت ۷,۵۰۰ rpm سانتریفیوژ می‌شود.

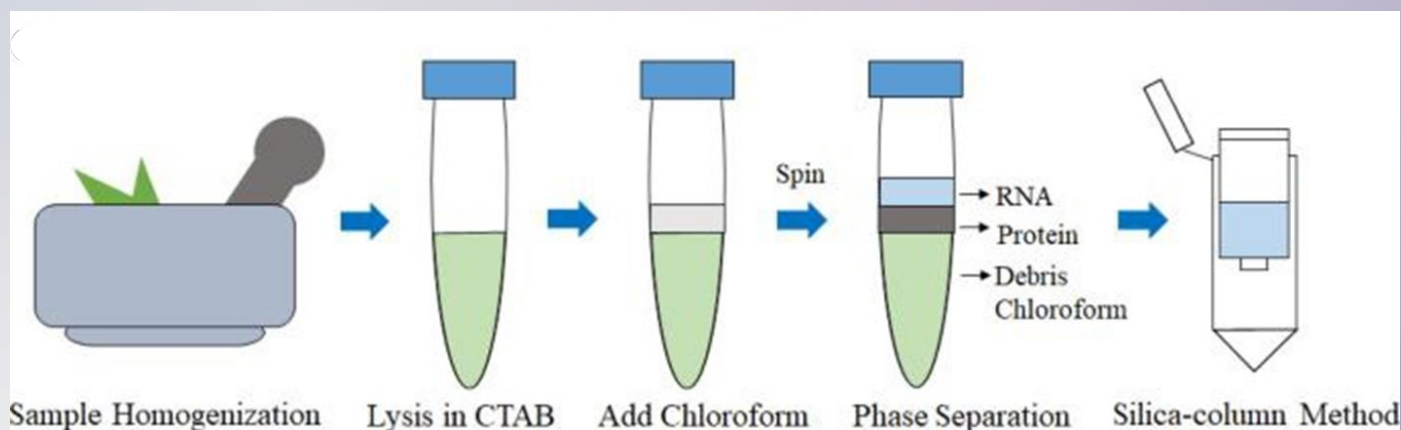
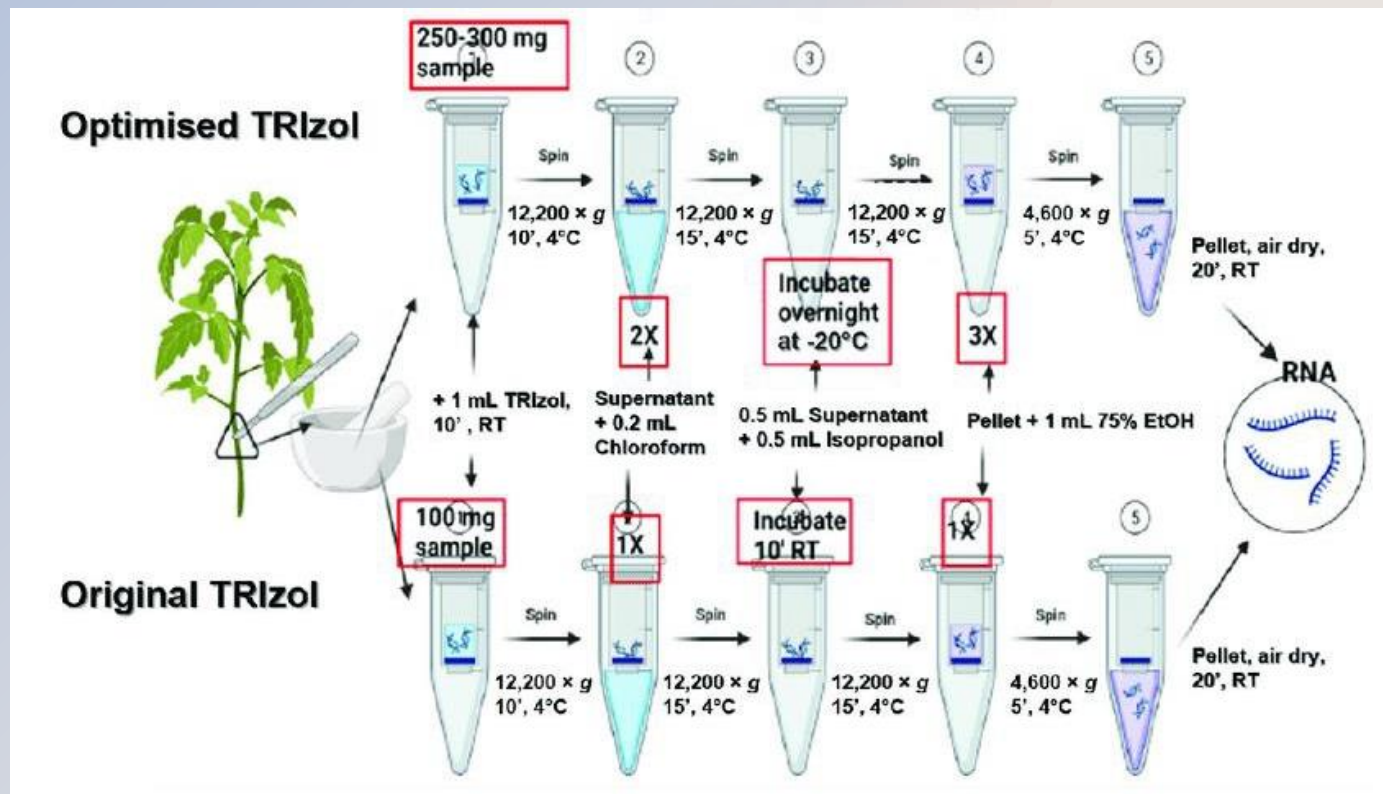
۷. خشک کردن RNA :

پس از شستشوی RNA با اتانول، رسوب RNA باید در دمای اتاق یا در هواکش خشک شود. خشک کردن کامل RNA بسیار مهم است زیرا حتی وجود مقادیر کم اتانول می‌تواند در اندازه‌گیری دقیق RNA اختلال ایجاد کند.

۸. حل کردن RNA :

حل کردن RNA: RNA رسوب‌شده در آب دیونیزه یا بافر خاص حل می‌شود. معمولاً برای این کار از بافر DEPC-treated water یا بافرهای مخصوص RNA استفاده می‌شود.

RNA باید به سرعت در دمای منفی ۸۰ درجه سانتی‌گراد ذخیره شود تا از تخریب آن جلوگیری شود.



اندازه‌گیری غلظت و کیفیت RNA

۱. اندازه‌گیری غلظت RNA:

برای اندازه‌گیری غلظت RNA استخراج‌شده از دستگاه نانودراپ یا اسپکتروفوتومتر استفاده می‌شود. خواندن جذب در طول موج ۲۶۰ نانومتر برای اندازه‌گیری غلظت RNA انجام می‌شود.

غلظت مناسب: غلظت RNA معمولاً باید بین ۵۰ تا ۵۰۰ نانوگرم در میکرولیتر باشد تا برای آزمایش‌های بعدی مناسب باشد.

۲. تحلیل کیفیت RNA:

نسبت جذب ۲۶۰/۲۸۰ نانومتر: RNA خالص باید نسبت جذب ۲۶۰/۲۸۰ نانومتر بین ۱,۸ و ۲,۰ داشته باشد.

الکتروفورز RNA: برای بررسی کیفیت RNA و وجود آلودگی‌های احتمالی از تکنیک الکتروفورز ژل آگارز استفاده می‌شود. باندهای واضح و بدون شکستگی نشان‌دهنده RNA با کیفیت بالا هستند.

نکات مهم و احتیاط‌ها

۱. محیط استریل: برای جلوگیری از آلودگی RNA به آنزیم‌های RNase، تمامی مراحل باید در محیط استریل و با استفاده از تجهیزات استریل انجام شود.
۲. کار در دمای پایین: تمامی مراحل آسیاب کردن و مخلوط کردن باید در دمای پایین انجام شود تا از تخریب RNA جلوگیری شود.
۳. احتیاط در استفاده از مواد شیمیایی: از مواد شیمیایی سمی مانند فنول و کلروفرم باید با دقت استفاده شود و از تجهیزات ایمنی مانند دستکش و عینک استفاده کنید.

نتیجه‌گیری

با استفاده از این روش می‌توانید RNA با کیفیت بالا از گیاه استخراج کنید. این RNA برای استفاده در تکنیک‌های مختلف مانند RT-PCR، تحلیل بیان ژن و RNA-Seq مورد استفاده قرار می‌گیرد.

