

گزارش فنی

استخراج مولکول های اسید ریبونوکلئیک با کیفیت بالا از مغز موش صحرایی با استفاده از یک روش ارزان قیمت

سیامک بهشتی^{*}، سحر توحیدلو، آزاده قربان پور شکامی

گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه اصفهان، اصفهان

دریافت: ۶ شهریور ۹۶

پذیرش: ۲۱ شهریور ۹۶

چکیده

زمینه و هدف: استخراج مولکول های اسید ریبونوکلئیک (RNA) با کیفیت بالا از بافت های دارای چربی فراوان مثل مغز یکی از چالش های جدی محققین علوم اعصاب به شمار می رود. به این منظور کیت های تجاری گران قیمتی تولید شده است که بسیاری از محققین به دلیل کمبودهای منابع مالی قادر به استفاده از آنها نیستند. در این مقاله ما یک روش ساده و ارزان قیمت را پیشنهاد می کنیم.

روش ها: موش های صحرایی نر نژاد ویستار یک ماهه مورد استفاده قرار گرفتند. حیوانات توسط کلروفورم بیهوش شده و سپس هیپوکمپ مغز آن ها خارج گردید. RNA کل بافت مغز توسط کیت RNX-Plus شرکت سیناکلون استخراج شد. کیفیت RNA استخراج شده با تهیه طیف جذبی مولکول با استفاده از اسپکتروفتومتر نانودراپ و اندازه گیری نسبت های جذبی $260/280$ و $260/230$ ارزیابی شد.

یافته ها: میانگین وزن هیپوکمپ های جدا شده $60/2 \pm 1/2$ میلی گرم بود. میانگین نسبت جذبی $260/280$ برابر با $0/02 \pm 1/88$ و میانگین نسبت جذبی $260/230$ برابر با $0/02 \pm 1/9$ بود. الکتروفورز ژل آگارز نشان داد که RNA های ریبوزومی 28S و 18S وجود داشته و RNA استخراج شده کیفیت خوبی دارد. همچنین میانگین غلظت RNA کل استخراج شده از نمونه ها $60/8$ نانوگرم در میکرولیتر بود.

نتیجه گیری: نتایج نشان دادند که با استفاده از روشی ارزان قیمت، امکان استخراج مولکول های RNA با کیفیت بالا از بافت مغز امکان پذیر است. از این رو پروتکل ارائه شده در این مطالعه به محققین نوروبیولوژی مولکولی توصیه می شود.

واژه های کلیدی: اسید ریبونوکلئیک، تخلیص، مغز، موش صحرایی، هیپوکمپ

مقدمه

پیشرفت های شگرف در دانش نوروبیولوژی مدیون کشف روش های آزمایشگاهی مدرن بوده است. یکی از این روش های مدرن روش های مولکولی هستند که به محققین امکان بررسی عملکرد بافت عصبی و تغییرات ایجاد شده در آن

متعاقب شرایط مختلفی زیستی را در سطح مولکولی می دهند. یکی از مولکول های مهم که نقش حیاتی در عملکرد بافت عصبی دارد مولکول های اسید ریبونوکلئیک (RNA) هستند. این مولکول ها به صورت های مختلفی از جمله RNA پیامبر، RNA ریبوزومی، RNA ناقل، میکرو RNA و RNA های طولیل غیر کد شونده وجود دارند و هریک نقش بخصوصی را در سلول ایفا می کنند [۱]. با این وجود، مشکل اصلی در مطالعات مربوط به RNA ناپایداری و تجزیه شدن آن در صورت عدم رعایت نکاتی کلیدی در هنگام دست ورزی های

^{*} نویسنده مسئول مکاتبات: s.beheshti@sci.ui.ac.ir
siamak.beheshti@yahoo.com
وبگاه مجله: http://ijpp.phypha.ir
پست الکترونیکی: ijpp@phypha.ir

آزمایشگاهی است [۲].

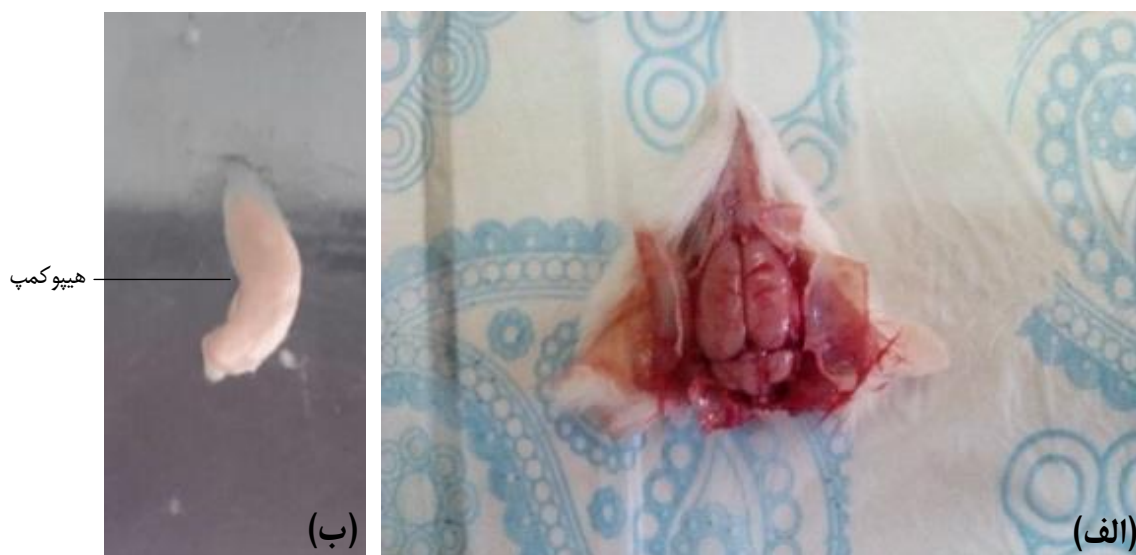
برای موفقیت آنالیزهای مربوط به RNA، ضرورت دارد که RNA استخراج شده کیفیت بالایی داشته باشد. RNA نباید توسط ریبونوکلازها تجزیه شده باشد [۳]. این مسئله را می توان از طریق الکتروفورز RNA در ژل آگارز و مشاهده باندهای RNA ریبوزومی (Ribosomal Ribonucleic acid = rRNA) مشخص نمود. در صورتیکه RNA دست نخورده باشد RNA یوکاریوتی باندهای مشخص 28s rRNA و 18s را نشان می دهد که دانسیته باند 28s تقریباً دو برابر باند 18s است. به علاوه DNA ژنومی نیز باید حذف شود. کیفیت و کمیت نمونه های RNA، توسط اسپکتروفتومتری نیز تعیین می شود. به این منظور طیف جذبی آن بین ۲۳۰-۳۵۰ نانومتر بدست می آید. هر مولکولی دارای بیشترین میزان جذب در یکی از طیف های جذبی در اسپکتروفتومتر است. برای مثال مولکول های RNA بیشترین جذب را در طول موج ۲۶۰ نانومتر نشان می دهند. دو نسبت طیف جذبی ۲۶۰/۲۸۰ و ۲۶۰/۲۳۰ اهمیت داشته و نشان دهنده میزان خلوص RNA استخراج شده می باشند. اگر نسبت طیف جذبی ۲۶۰/۲۸۰ برابر $0.15 \pm 2/1$ باشد نشان دهنده آن است که نمونه ها عاری از پروتئین هستند. اگرچه مقادیر ۲-۱/۸ نیز قابل قبول هستند. همچنین اگر نسبت طیف جذبی ۲۶۰/۲۳۰ حداقل ۰/۱۵ بیشتر از نسبت طیف جذبی ۲۶۰/۲۸۰ باشد، نمونه ها عاری از نمک های گوانیدین و فنول هستند [۴].

متداول ترین و موفق ترین روش های جداسازی RNA کل بصورت خالص و دست نخورده استفاده از تغییراتی است که در روش اصلی گوانیدینیوم تیوسیانات چیرگوین و همکارانش داده شده است [۵]. در روش اصلی سلول ها و بافت ها در غلظت های بالای گوانیدینیوم تیوسیانات گسیخته می شوند تا ریبونوکلازها به سرعت غیر فعال شوند. سپس لیز سلولی (Lysate) حاصل توسط التراسانتریفیوژ در حضور سزیوم کلراید سانتریفیوژ می شود. مولکول های RNA، رسوبی (Pellet) را در ته لوله تشکیل می دهند. به دنبال این روش، یک روش تغییر یافته گوانیدینیوم تیوسیانات ایجاد شد که نیازمند التراسانتریفیوژ نیست و شامل استخراج هم زمان با فل در pH کاهش یافته است تا پروتئین و DNA را حذف کند [۶]. این روش اغلب زمانی که استخراج RNA از مقادیر ناچیز سلول یا

بافت انجام می شود انتخاب می گردد. از نظر تجاری شرکت های مختلفی محلول هایی را بر اساس این روش تغییر یافته تهیه کرده اند. در عین حال کیفیت RNA استخراج شده توسط این محلول ها بستگی زیادی به دقت عمل و نحوه درست استخراج طبق پروتکل های اعلامی دارد. این روش برای حدود ۳۰ سال همچنان مورد استفاده قرار می گیرد [۷]. علاوه بر این، کیت های آزمایشگاهی دیگری که مراحل استخراج را ساده تر کرده اند نیز توسط شرکت های مختلف تولید شده اند. با این حال این کیت ها معمولاً قیمت بالایی دارند و بخصوص برای محققین ایرانی که منابع مالی محدودی دارند قابل تهیه نمی باشند. محلول استخراج RNA تولید شده توسط شرکت سیناکلون بر پایه همان روش سنتی تهیه شده و در حال حاضر قیمت نسبتاً مناسبی دارد. با این حال، استخراج RNA با کیفیت بالا توسط این محلول بستگی زیادی به نحوه عملکرد محقق دارد. در این مطالعه با ایجاد تغییراتی در پروتکل ارائه شده توسط شرکت سازنده سعی بر این بوده است تا RNA با خلوص و کیفیت بالا استخراج شود.

مواد و روش ها

در این مطالعه از ۹ سر موش صحرایی نر یک ماهه از نژاد ویستار در محدوده وزنی ۱۰۰ گرم استفاده شد. حیوانات در قفس های استاندارد نگهداری شده و دسترسی آسان به آب و غذای کافی داشتند. حیوانات در حیوانخانه گروه زیست شناسی دانشگاه اصفهان در شرایط تهویه مناسب و دوره روشنایی/تاریکی ۱۲ ساعته و دمای ۲۴ درجه سانتی گراد پرورش یافتند. جنبه های اخلاقی کار با حیوانات منطبق با راهنمای مراقبت و استفاده از حیوانات آزمایشگاهی (موسسه ملی سلامت ایالات متحده آمریکا، بازنگری ۲۰۱۱) بوده [۸] و به وسیله کمیته تحصیلات تکمیلی گروه زیست شناسی دانشگاه اصفهان مورد تأیید قرار گرفت. برای جدا کردن هیپوکمپ ابتدا موش های صحرایی توسط دوز بالای کلروفورم بی هوش شده و قربانی شدند. سپس سر از بدن جدا شده و پس از باز کردن جمجمه، مغز از جمجمه خارج و با سرم فیزیولوژی شسته شد و به کمک تیغ اسکالپل دو نیم کره مغز از هم جدا گردیدند. مغز میانی کنار زده شده و هیپوکمپ جداسازی شد (شکل ۱). هیپوکمپ های نیمکره راست خارج



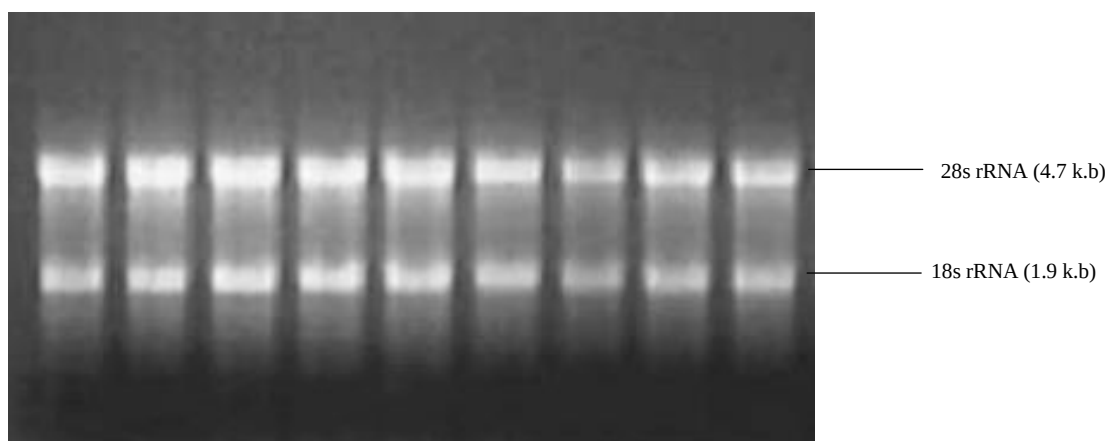
شکل ۱- خارج کردن هیپوکمپ از مغز موش صحرایی. (الف) کنار زدن استخوان های جمجمه و نمایان شدن مغز (ب) هیپوکمپ.

شده به طور جداگانه به میکرو تیوپ های ۱/۵ میلی لیتری انتقال داده شدند و بلافاصله در ازلت مایع فریز شده و به فریزر -۷۰ درجه سانتی گراد انتقال یافتند و تا زمان استخراج RNA در آنجا نگهداری شدند. مراحل استخراج مولکول های RNA طبق دستورالعمل کیت استخراج RNX-Plus RNA (شرکت سیناکلون) با برخی تغییرات به ترتیب زیر انجام گرفت.

بافت هیپوکامپ به تیوپ های RNase free ۱/۵ میلی لیتری انتقال یافت. دویست و پنجاه میکرولیتر بافر فسفات (PBS) استریل به تیوپ اضافه شد و بافت توسط سرنگ ۲/۵ میلی لیتری هموژن گردید. به این ترتیب که ابتدا توسط نوک سوزن به طور کامل له شده و سپس چندین بار با کشیدن محلول بافتی به داخل سرنگ و تخلیه آن هموژن گردید. عصاره بافتی هموژن شده به چهار قسمت تقسیم شده و یکی از میکروتیوپ های حاوی بافت برداشته شد و سه میکروتیوپ دیگر به فریزر -۷۰ درجه سانتی گراد منتقل شد. نیم میلی لیتر از محلول RNX-Plus به نمونه اضافه شد. میکروتیوپ به مدت ۵ دقیقه در دمای آزمایشگاه قرار داده شد. سپس ۲۰۰ میکرولیتر کلروفرم به میکروتیوپ اضافه گردید. محتویات میکروتیوپ به مدت ۱۵ ثانیه تکان داده شد، سپس ۵ دقیقه روی یخ قرار داده شد. نمونه به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۴°C با سرعت ۱۲۰۰rpm توسط سانتریفوژ یخچال دار، سانتریفوژ گردید. پس از پایان سانتریفوژ ۱۵۰μl از فاز رویی کشیده شد و به یک میکروتیوپ RNase free جدید انتقال داده شد. هم حجم آن (۱۵۰μl) ایزوپروپانول سرد اضافه گردید.

میکروتیوپ به آرامی تکان داده شد و به مدت ۱۵ دقیقه روی یخ قرار داده شد. نمونه مجدداً به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۴°C با سرعت ۱۲۰۰rpm سانتریفوژ گردید. مایع رویی دور ریخته شد و ضربه ملایمی به تیوپ رسوب را معلق نمود، سپس یک میلی لیتر اتانول ۷۵٪ افزوده شد. نمونه به مدت ۸ دقیقه در دمای ۴°C با سرعت ۷۵۰۰rpm سانتریفوژ گردید. مایع رویی دور ریخته شد و مجدداً یک میلی لیتر اتانول ۷۵٪ افزوده شد. نمونه بار دیگر به مدت ۸ دقیقه در دمای ۴°C با سرعت ۷۵۰۰rpm سانتریفوژ گردید. پس از پایان سانتریفوژ، مایع رویی دور ریخته شد و باقیمانده آن توسط سرنگ انسولین به طور کامل خارج شد. رسوب به مدت ۴-۵ دقیقه در دمای محیط و زیر هود خشک شد. در نهایت رسوب در ۵۰μl از DEPC treated water حل شد و میکروتیوپ به مدت ۱۰ دقیقه در بن ماری ۶۰-۵۵°C قرار گرفت تا RNA به طور کامل حل شود.

پس از استخراج، برای تعیین کیفیت نمونه های RNA، از الکتروفورز ژل آگارز استفاده شد. جهت تهیه ژل آگارز ۱٪، ۰/۳ گرم آگارز در ۳۰ میلی لیتر محلول بافر TAE حل شد. سپس مخلوط مزبور با مایکروویو حرارت داده شد تا محلول کامل شفاف گردد. پس از خنک شدن، محلول داخل سینی الکتروفورز ریخته شد و شانه الکتروفورز تنظیم گردید. پس از تشکیل ژل شانه برداشته شد و ژل همراه با سینی در تانک الکتروفورز قرار داده شد. محلول بافر TAE 1x به آرامی داخل تانک اضافه گردید به صورتی که روی ژل را بپوشاند، سپس



شکل ۲- الکتروفورز ژل آگارز نمونه های RNA استخراج شده از بافت هیپوکمپ.

مولکول های RNA به دلیل ناپایداری و همچنین به دلیل پایداری زیاد آنزیم تجزیه کننده آن ها یعنی آنزیم RNase به سرعت تجزیه شده و از بین می روند. از این رو یکی از مهمترین چالش های پیش روی محققین استخراج مولکول های RNA دست نخورده بوده است. یکی از نکات مهم در استخراج RNA با استفاده از کیت های موجود، توجه به میزان سلول یا بافت مورد استفاده می باشد که به طور معمول در پروتکل ارائه شده در کیت ذکر می شود. چنانچه میزان بافت از مقدار تعیین شده در کیت بیشتر باشد می تواند در کیفیت نتایج استخراج تاثیر بگذارد. برای مثال در کیت استفاده شده در این تحقیق مقدار یک میلی لیتر از محلول RNX-Plus به ازای ۵۰-۳۰ میلی گرم بافت توصیه شده است. همچنین RNA بدست آمده نسبت مستقیم با میزان تخریب سلول دارد و لیز ناقص سلولی کاهش قابل توجه RNA استخراجی را به همراه

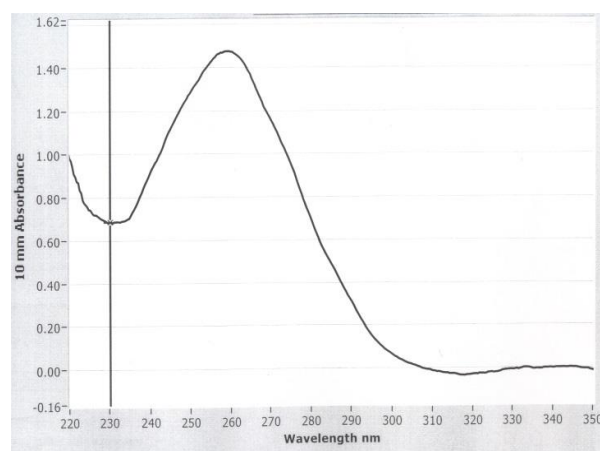
نمونه RNA همراه با رنگ اریترورژل به نسبت ۵ به ۲ داخل چاهک بارگذاری گردید. سپس ولتاژ الکتروفورز روی ۵۰ ولت تنظیم شد و حرکت نمونه ها روی ژل آغاز گردید. پس از پایان الکتروفورز ژل از تانک خارج شد و نتایج توسط دستگاه ژل داکيومنتیشن مشاهده گردید و از آن عکس برداری شد. همچنین برای تعیین غلظت و طیف جذبی RNA استخراج شده از اسپکتروفوتومتر نانودراپ استفاده شد.

یافته ها

میانگین وزن هیپوکمپ های جدا شده 60.2 ± 1.2 میلی گرم بود. الکتروفورز ژل آگارز نشان داد که مولکول های RNA استخراج شده کیفیت خوبی دارند (شکل ۲). نتایج حاصل از اسپکتروفوتومتر نانودراپ نشان داد که میانگین نسبت جذبی $260/280$ برابر با 0.2 ± 1.88 و میانگین نسبت جذبی $260/230$ برابر با 0.2 ± 1.9 است (شکل ۳). همچنین میانگین غلظت RNA کل استخراج شده از نمونه ها 60.8 نانوگرم در میکرولیتر بود.

بحث

نتایج مطالعه حاضر نشان داد که با در نظر گرفتن برخی نکات کلیدی می توان با استفاده از روش سنتی و ارزان قیمت، مولکول های RNA با کیفیت مطلوب را استخراج کرد. استخراج مولکول های RNA با کیفیت بالا از بافت مغز جهت مطالعات بعدی بخصوص مطالعات کمی برای ارزیابی میزان بیان ژن ها اهمیت بالایی دارد. در بین اسیدهای نوکلئیک



شکل ۳- نمونه طیف جذبی بدست آمده از مولکول های RNA استخراج شده.

مرحله انجام شود و باقیمانده الکل در ته میکروتیوب به طور کامل توسط سرنگ انسولین برداشت شود. همچنین به مقدار بافت مورد استفاده جهت استخراج و حجم متناسب از محلول کیت باید توجه شود.

نتیجه گیری

در مجموع نتایج حاصل از مطالعه حاضر نشان می دهد که این امکان وجود دارد که RNA با کیفیت بالا و با هزینه کم از بافت مغز توسط روش سنتی استخراج کرد، به شرط اینکه شرایط لازم بخوبی رعایت شود. لذا پروتکل ارائه شده در این مطالعه به محققینی که در زمینه نوروبیولوژی مولکولی تحقیق می کنند توصیه می شود.

ملاحظات مالی

این تحقیق با حمایت مالی معاونت پژوهشی دانشگاه اصفهان انجام شده است.

تعارض در منافع

نویسندگان این مقاله تعارض در منافع ندارد.

سهم نویسندگان

س.ب: ایده، طراحی و نظارت بر حسن اجرای مطالعه، نگارش مقاله و آنالیز آماری؛ س.ت و آ.ق: ش: انجام مطالعه.

دارد. از این رو در مرحله لیز سلولی باید دقت کافی به عمل آید تا سلول ها به طور کامل تخریب شده باشند. از طرفی در اولین سانتریفیوژ باید دقت شود که مقدار سوپ رویی حاوی مولکول های RNA که برداشت می شود به حداقل تقلیل یابد تا خطر آمیختگی با فازهای زیرین که حاوی فنل و ترکیبات دیگر هستند کاهش یابد. نکته مهم دیگر در مراحل استخراج توجه به شستشوی کامل رسوب RNA بدست آمده است که با دو مرحله شستشو توسط اتانول خالص تامین می شود. در این مرحله توصیه می شود که حتما از اتانول خالص از برندهای معتبر استفاده شود. همچنین پس از شستشوی با اتانول تمامی مولکول های اتانول باید به طور کامل از رسوب RNA جدا شوند. این مرحله را می توان با استفاده از سرنگ انسولین مشابه آنچه در این مطالعه انجام شد انجام داد. نتایج این مطالعه نشان داد که مقدار RNA کل استخراج شده برای سنتز cDNA کفایت می کند. از این رو، با توجه به اینکه به طور معمول برای تولید cDNA با استفاده از کیت های سنتز cDNA به مقدار ناچیزی از RNA کل نیاز است (حداکثر ۱ میکروگرم)، در استخراج مولکول های RNA نیاز چندانی به استفاده از کیت های گران قیمت استخراج RNA (که بازدهی استخراج RNA توسط آن ها بالاتر است) نمی باشد.

به طور خلاصه با توجه با نتایج حاصل از مطالعه حاضر پیشنهاد می شود که جهت استخراج مولکول های RNA با کیفیت بالا به روش سنتی، مرحله شستشوی با اتانول در دو

فهرست منابع

- [1] Elliot D, Lodomery M, Molecular Biology of RNA. Oxford: Oxford University Press, 2011.
- [2] Brooks G, Biotechnology in Healthcare: An Introduction to Biopharmaceuticals. London: Pharmaceutical Press, 1998.
- [3] Fleige S, Pfaffl MW, RNA integrity and the effect on the real-time qRT-PCR performance. *Mol Aspects Med* 27 (2006) 126-139.
- [4] Achilles J, Stahl F, Harms H, Muller S, Isolation of intact RNA from cytometrically sorted *Saccharomyces cerevisiae* for the analysis of intrapopulation diversity of gene expression. *Nat Protoc* 2 (2007) 2203-2211.
- [5] Chirgwin JM, Przybyla AE, MacDonald RJ, Rutter WJ, Isolation of biologically active ribonucleic acid from sources enriched in ribonuclease. *Biochemistry* 18 (1979) 5294-5299.
- [6] Chomczynski P, Sacchi N, Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 162 (1987) 156-159.
- [7] Chomczynski P, Sacchi N, The single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction: twenty-something years on. *Nat Protoc* 1 (2006) 581-585.
- [8] Guide for the care and use of laboratory animals. 8th Edition. Washington DC: The National Academies Press, 2011.

Technical report

Extraction of high quality ribonucleic acid molecules from the rat brain by means of an inexpensive method

Siamak Beheshti*, Sahar Tohidloo, Azadeh Ghorbanpour-Shakakomi

Department of Biology, Faculty of Sciences, University of Isfahan, Isfahan, Iran

Received: 28 August 2017

Accepted: 12 September 2017

Abstract

Background and aim: Extraction of high quality ribonucleic acid (RNA) molecules from the high fat tissues such as brain has been a great challenge for neuroscience researchers. Expensive kits have been developed to overcome this challenge. However, many researchers are unable to use due to lack of financial resources. In this study a simple and inexpensive method is suggested.

Methods: One month old male Wistar rats were anesthetized by chloroform and their hippocampus was removed. Total RNA of the brain tissue was extracted by RNX-Plus solution from Sinaclon Company. The quality of the extracted RNA was evaluated by Nanodrop spectrophotometer and measuring the 260/280 and 260/230 absorbance ratios.

Results: The mean weight of the dissected hippocampi was 60.2 ± 1.2 mg. The mean absorbance ratio of 260/280 and that of 260/230 were obtained 1.88 ± 0.02 and 1.9 ± 0.03 , respectively. The agarose gel electrophoresis indicated presence of the ribosomal RNAs 28s and 18s and the extracted RNA had a good quality. The mean concentration of the extracted total RNA was 608 ng/ μ l.

Conclusion: The results indicate that it is possible to extract high quality RNA molecules from the brain tissue by an inexpensive method. Therefore, the presented protocol is recommended to molecular neurobiologists.

Keywords: Brain, Extraction, Hippocampus, Rat, Ribonucleic acid

Please cite this article as follows:

Beheshti S, Tohidloo S, Ghorbanpour-Shakakomi A, Extraction of high quality ribonucleic acid molecules from the rat brain by means of an inexpensive method. *Iran J Physiol Pharmacol* 2 (2018) 152-157.

*Corresponding author e-mail: siamak.beheshti@yahoo.com; s.beheshti@sci.ui.ac.ir

Available online at: <http://ijpp.phypha.ir>

E-mail: ijpp@phypha.ir