Basic Medical Sciences Research Center
Histogenotech

Basic Medical Sciences Research Center Histogenotech Co., Tehran, Iran

مرکز پژوهشی جامع علوم پایه پزشکی

شرکت دانش بنیان بافت و ژن پاسارگاد

روش‌های مختلف استخراج RNA از نمونه های بیولوژی (سلول و بافت)

فهرست **صفحه**

استخراج RNA ۳

چگونگی انجام استخراج RNA ۳

انواع روش های استخراج آر ان ای (RNA) ۴

پروتکل استخراج RNA با کلروفرم ۷

نقش کلروفرم در استخراج RNA ۸

چطور RNase موجود در بافت و یا سلول مورد استخراج غیرفعال می‌شود؟ ۸

افزایش غلظت RNA ۹

جمع بندی ۹

سوالات متداول ۹

استخراج RNA

استخراج RNA، DNA و پروتئین تکنیک پایه ای و اساسی در زیست شناسی مولکولی است. این بیومارکرها می توانند از نمونه های بیولوژیکی برای اهداف مختلف تحقیقاتی و تشخیصی و درمانی بیماریها جداسازی گردند. استخراج RNA ، جداسازی و خالص سازی RNA از نمونه های مختلف بیولوژیکی از جمله بافت های بدن، سلولها، مایعات بدن، خون و غیره می باشد. کیفیت و کمیت RNA استخراج شده فاکتورهای بسیار مهم جهت اطمینان از صحت آنالیز بیان ژن و دیگر کاربردهای آن در تحقیقات مولکولی می باشد. حضور آنزیم ریبونوکلئاز (Ribonuclease) در بافت ها و سلولها به عنوان بزرگترین مانع در استخراج RNA است. چون آنزیم ریبونوکلئاز به سرعت RNAهای تک رشته ای را تجزیه می کند.

چگونگی انجام استخراج RNA

روشهای استخراج DNA را نمی توان جهت استخراج RNA استفاده نمود. چون از نظر ساختاری بسیار متفاوت از DNA است. RNA یک مولکول زیستی تک رشته ای است ولی DNA دو رشته ای می باشد. همچنین نسبت به DNA، RNA حساسیت بالایی نسبت به عوامل محیطی مانند دما و ریبونوکلئازها دارد بنابراین مراحل استخراج RNA تحت شرایط ویژه می بایست انجام شود.

پروتکل استخراج RNA از نمونه های زیستی مختلف تقریبا یکسان می باشد. اما تفاوت های جزئی در پروتکل بر اساس نوع نمونه هدف است. به عنوان مثال استخراج RNA از بافت مراحل بیشتری نسبت به استخراج از رسوب سلولی دارد چرا که می بایست روی نمونه بافتی باید چند مرحله آماده سازی انجام داد. نمونه ای دیگر از این تفاوت ها، استخراج RNA از سلولهای عصبی و بافت مغز است چون این بافت غنی از لیپیدها است بنابراین استخراج از RNA با کیفیت بالا سخت می باشد.

جهت استخراج RNA با کیفیت و درصد خلوص بالا، چند فاکتور می بایست در نظر گرفته شود که عبارتند از: RNA نهایی می بایست عاری از هر گونه آلودگی، شامل پروتئین، DNA ژنومی و یا بازدارنده های آنزیم سنتز cDNA و DNA پلیمرازها باشند که این بازدارنده ها شامل فنل، کلروفرم و اتانول می باشند. همچنین عدم وجود نوکلئازها در RNA استخراج شده جهت جلوگیری از تجزیه RNA ها بسیار با اهمیت می باشد. واکنش های PCR و دیگر تکنیک های مولکولی بسیار

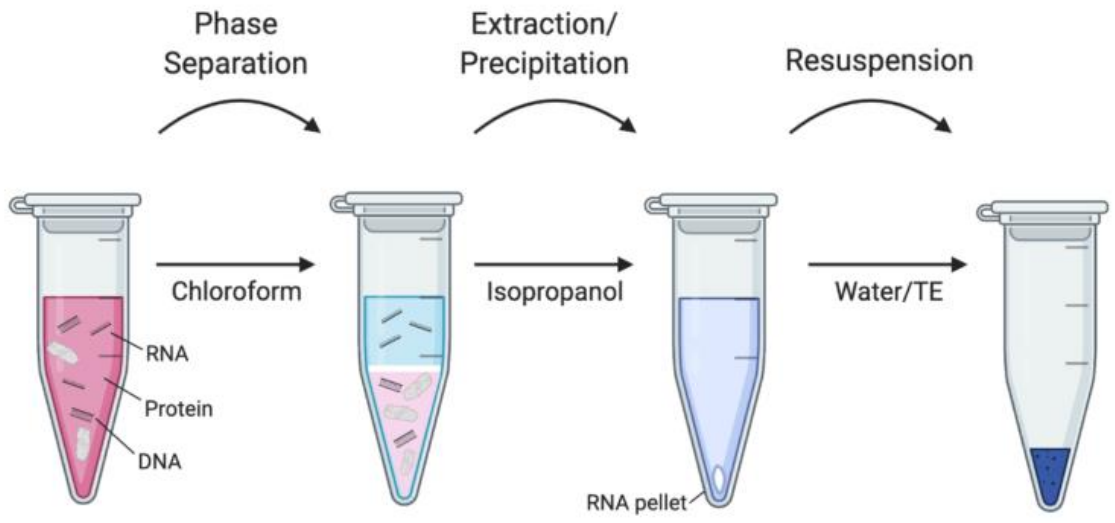
تحت تاثیر مراحل استخراج RNA و حضور آلودگیهای مختلف از جمله هموگلوبین، چربی، یون کلسیم و غیره قرار می گیرند. بنابراین ستاپ پروتکل استخراج RNA از سلول و بافت در روند کسب نتایج قابل قبول مهم می باشد.

انواع روش های استخراج آر ان ای (RNA)

سه تکنیک اساسی جهت استخراج آر ان ای (RNA) مورد استفاده قرار می گیرد که عبارتند از:

- ✓ روش استخراج بر اساس کلروفرم- فنل (phenol-Guanidine Isothiocyanate (GITC)-based solutions)
- ✓ تکنیک استخراج به روش ستون چرخشی مبنی بر غشای سیلیکا (silica-membrane based spin column technology)
- ✓ سومین روش با استفاده از ذرات مغناطیسی (magnetic particle)

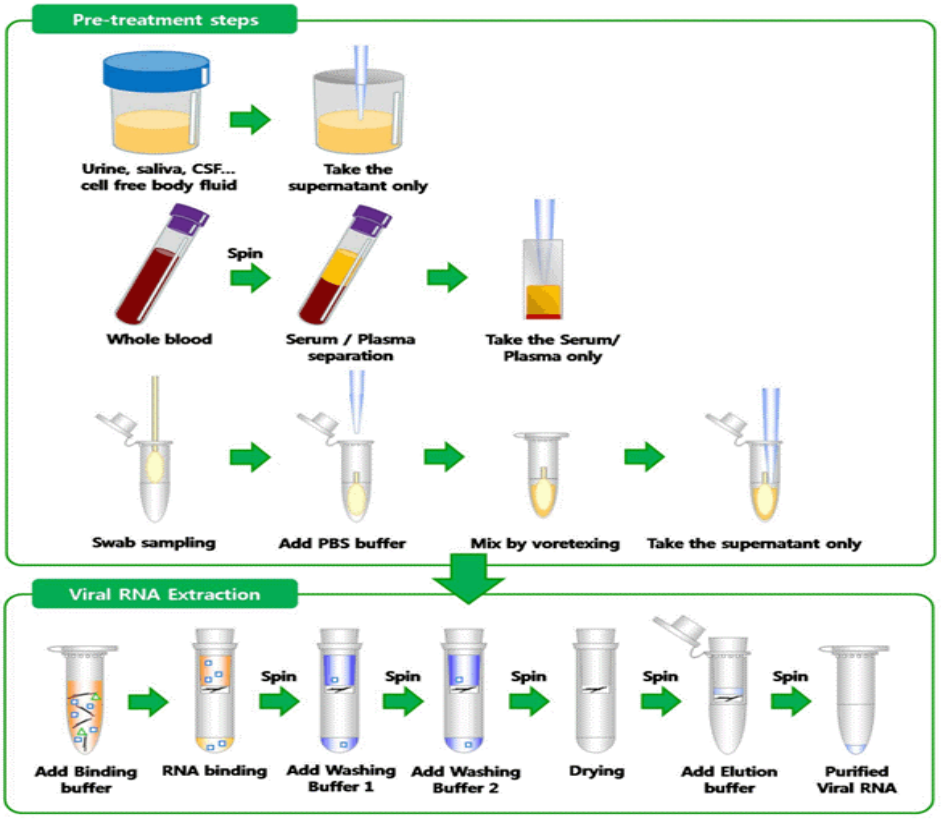
روش استخراج بر اساس کلروفرم- فنل: تکنیک استخراج مایع- مایع بر اساس کلروفرم-فنل متداول ترین روش است که جهت استخراج RNA از بافت و سلول استفاده می شود و اساس اکثر کیت های استخراج مورد استفاده، همین روش می باشد. این روش استخراج RNA مزایا و معایبی دارد. بزرگترین عیب این روش آلودگی با اجزای سلولی و حلال های دیگر است. همچنین این روش به شرایط محافظتی استاندارد در آزمایشگاه مانند دسترسی به هود شیمیایی نیاز دارد. عمده مزیت این روش، استخراج RNA با کیفیت و کمیت بالا است و نیز می توان این روش را به راحتی ستاپ کرد.



شکل۱ : استخراج RNA با روش کلروفرم

تکنیک استخراج به روش ستون چرخشی مبنی بر غشای سیلیکا: تکنیک استخراج RNA بر پایه ستون سیلیکا نیازی به حلال های سمی ندارد و میزان آلودگی با اجزای دیگر نمونه هدف در RNA استخراج شده با این روش کمتر می باشد. ستونهای اسپین خالص سازی نوکلئیک اسید ها شامل رزین سیلیکا می باشد که به RNA متصل می شود. تحت pH پایین، مولکولهای RNA به طور اختصاصی به غشای سیلیکا متصل شده و پروتیئن ها و پلی ساکاریدها از آن عبور می کنند. سپس ناخالصی ها با شستشو حذف می شوند و نهایتا در شرایط نمکی پایین، RNAها از غشا جدا شده و قابل نگهداری می باشد.

شکل ۲: مدلی از ستون استخراج RNA



شکل ۳ : تکنیک استخراج به روش ستون چرخشی مبنی بر غشای سیلیکا

روش استخراج RNA با استفاده از ذرات مغناطیس: جداسازی مغناطیسی RNA روشی ساده و کارآمد است که امروزه مورد استفاده قرار می گیرد. در حال حاضر بسیاری از حامل های مغناطیسی به صورت تجاری و تعبیه شده در کیت ها در دسترس هستند. حامل های مغناطیسی دارای لیگاندهای تهیه شده از پلیمرهای زیستی که میل ترکیبی به اسیدهای نوکلئیک هدف دارند برای فرآیند جداسازی استفاده می شوند. استخراج RNA با کمک بید مگنتی (Magnetic Bead) از نمونه های مختلف علی الخصوص ویروس، باکتری و خون انجام می شود. بیدهای مغناطیسی اندازه ای بسیار ریز دارند و سطح آنها پوشیده شده با مواد باردار است که می توانند به RNA متصل شوند. هنگامی که بیدهای مغناطیسی به نمونه بیولوژیکی مورد نظر اضافه می شود. اجزای سلولی لیز شده با عبور از میدان مغناطیسی، به سمت قطب ها جذب شده و در نتیجه اجزای دیگر سلول از RNA جدا می شوند و RNA های متصل شده به بیدهای مغناطیسی در بافرهای نمکی قرار می دهند تا RNAها از بیدها جدا شود. اگرچه درصد خلوص RNA استخراج شده با این تکنیک بالا است، روشی گران است بنابراین هنوز به متدی روتین در آزمایشگاه تبدیل نشده است.

شکل ۴: روش استخراج RNA با استفاده از بید مگنتی

پروتکل استخراج RNA با کلروفرم

به منظور تخلیص RNA از نمونه‌های سلولی و بافت ، استخراج RNA انجام می‌شود. این تکنیک به واسطه‌ی حضور آنزیم‌های ریبونوکلئاز بسیار حساس و پیچیده است، به همین منظور توصیه می‌شود قبل از شروع کار همه‌ی وسایل با محلول‌های خنثی کننده‌ی RNase مانند محلول DEPC شستشو داده شده و یا از مواد و وسایل استریل RNase-free استفاده می کنیم. همچنین تمامی مراحل با دستکش استریل و زیر هود شیمیایی و روی یخ انجام می دهیم.

مهمترین روش استخراج RNA ، فنل _ کلروفرم است. این روش، **استخراج مایع–مایع** بوده که برای خالص سازی RNA، حذف پروتئین‌ها و لیپیدها کاربرد دارد.

در اینجا به پروتکل استخراج RNA به روش فنل–کلروفرم می پردازیم.

۱. اولین مرحله آماده سازی نمونه مورد نظر است. اگر نمونه ما بافت باشد ابتدا مقدار کوچکی حدود ۱۰۰ میلی‌گرم از بافت را در نیتروژن مایع هموژن می کنیم. برای نمونه های سلولی کشت داده شده، ابتدا سلول ها را جمع آوری و رسوب می دهیم. سپس محلول حاوی مواد لیز کننده را به نمونه اضافه می کنیم تا پس از انکوبه سلولها لیز شوند.

۲. در این روش بافت‌های هموژن، سلول‌های لیز شده و نمونه‌های محلول با حجم مساوی از فنل و کلروفرم ترکیب شده، پس از سانتریفوژ دو **فاز مجزای آبی و آلی** شکل می‌گیرد. پروتئین و لیپیدهای هیدروفوب در فاز آلی پایینی قرار می‌گیرند و در فاز آبی (بالایی) اسیدهای نوکلئیک و سایر آلاینده‌ها مانند نمک، قند و... قرار دارند. هنگام پیپت کردن و

جداسازی فاز آبی باید نهایت دقت صورت گیرد تا از فاز آلی، خصوصا قسمت فوقانی آن که حاوی پروتئین است وارد فاز آبی نشود.

۳. **مقدار pH** محلول برای خالص سازی RNA از DNA تعیین کننده است. در شرایط اسیدی DNAبه **فاز آلی** انتقال می‌یابد و RNAدر فاز آبی می‌ماند، در شرایط بازی هر دو در فاز آبی باقی خواهند ماند.

۴. با استفاده از ایزوپروپانول، RNAرسوب داده می‌شود. در این مرحله، ایزوپروپانول سرد اضافه کرده و به آرامی تیوب ها را سروته می کنیم. در این مرحله برای افزایش میزان رسوب RNAمی توانیم آن را در فریز به مدتی انکوبه می‌کنیم.

۵.در مرحله‌ی آخر با اتانول ۷۰٪–۸۰٪ شستشو و خالص‌سازی صورت می‌گیرد. در نهایت رسوب حاصل از RNA در حجم معینی از آب فاقد RNase حل کرده و در دمای منفی ۲۰ برای مدت کمتر از دو ماه و برای طولانی مدت در دمای منفی ۸۰ نگهداری می‌کنیم.

نقش کلروفرم در استخراجRNA

فنل به تنهایی می‌تواند ۱۰ تا ۱۵ درصد آب را حفظ کند و به دنبال آن RNA کاهش می‌یابد، اضافه کردن کلروفرم باعث اتصال متراکم آن با فنل شده و منجر به رهاسازی آب می‌شود .**ترکیب کلروفرم** با فنل روند تخریب پروتئین‌ها را شدت می‌بخشد و لیپید را حل می‌کند.

پیشنهاد می‌شود برای تفکیک بهتر فاز آبی از آلی و جلوگیری از آلودگی آن با پروتئین وDNA ، بعد از اضافه کردن کلروفرم میکروتیوب را به مدت ۲۰ ثانیه به شدت تکان دهید. برای کاهش آلودگی فنولی می‌توان شستشو با اتانول ۷۵٪ را تکرار کرد. نشان داده شده که آلودگی با ترکیبات فنولی به برنامه‌های پایین دست آسیب چندانی نمی‌زند و قابل چشم پوشی است

چطور RNase موجود در بافت و یا سلول مورد استخراج غیرفعال می‌شود؟

ایزوتیوسیانات گوانیدین موجود در معرف‌های مختلف مانند ترایزول یک ترکیب موثر در غیرفعال سازی پروتئین‌ها است که منجر به غیرفعال‌سازی آنزیم RNase می‌شود. علاوه بر این در جداسازی rRNA از پروتئین‌های ریبوزومی نقش دارد.

افزایش غلظتRNA

با کم بودن غلظت RNA می‌توان با اضافه کردن گلیکوژن مقدار آن را افزایش داد. گلیکوژن در الکل نامحلول است، می‌توان در زمان اضافه کردن الکل‌ها رسوب‌پذیری RNA را با آن افزایش داد. روش دیگر اضافه کردن محلول لیتیم کلراید در مرحله اضافه کردن ایزوپروپانول است تا رسوب RNA را افزایش دهد.

برخی از بافت ها دارای گلیکوژن هستند که روند استخراج RNA را از آن بافت بهبود می‌بخشد. باید به این نکته توجه شود افزایش بیش از حد گلیکوژن باعث افزایش آلودگی RNA استخراج شده می‌شود. مقدار مناسب برای این کار یک میکرولیتر از گلیکوژن با غلظت ۲۰ mg/mlاست.

جمع بندی

استخراج RNA با کیفیت بالا اولین قدم و اساسی ترین مرحله جهت انجام بسیاری از تکنیک‌های مولکولی مانند Reverse Transcription real-time PCR (RT-qPCR)، آنالیز ترنسکریپتوم با استفاده از توالی‌یابی، آنالیز array، تکنیک Northern blot و سنتز cDNA است. علاوه بر پروتکل استخراج RNA، عوامل مختلفی در کیفیت این بیومارکر زیستی موثر است که می توان به کیفیت نمونه بیولوژیکی و مواد مورد استفاده، روش نگهداری RNA استخراج شده اشاره کرد. علاوه بر انتخاب صحیح روش استخراج و ستاپ روش کار، برخی نکات مهم در استخراج RNA می بایست در نظر گرفته شود تا RNA ایی که استخراج می شود از نظر کمی و کیفی قابل قبول باشد.

سوالات متداول

۱. چرا استخراج RNA نسبت به DNA دشوارتر است؟ بیومارکر RNA از نظر ساختاری متفاوت از DNA است

۲. نقش محلول DEPC در استخراج RNA چیست؟ آب دپسDEPC-Treated water جهت غیر فعال کردن آنزیم های RNase استفاده می شود.

۳. روش های سنجش کیفیت RNA استخراج شده کدام است؟ دو روش برای سنجش کیفیت RNA است یکی با لود کردن مقداری از RNA استخراج شده در ژل الکتروفورز و دوم سنجش با روش جذبی و محاسبه خلوص است.

مرکز پژوهشی جامع علوم پایه پزشکی

شرکت دانش بنیان بافت و ژن پاسارگاد

Email: histogenotechlab@gmail.com
www.histogene.ir
www.histogene.co

۰۹۲۲۶۳۸۳۳۴۱