

Comparison of RNA extraction methods in order to optimize total RNA extraction from borage tissues under cadmium stress

Sh. Aboutalebi¹, N. Zare^{2*}, P. Sheikhzadeh Mosadegh³

1. Ph.D. Student, Department of Plant Production and Genetics, Faculty of Agriculture and Natural Resources, University of Mohaghegh Ardabili, Ardabil, Iran
2. Professor, Department of Plant Production and Genetics, Faculty of Agriculture and Natural Resources, University of Mohaghegh Ardabili, Ardabil, Iran
3. Associate Professor, Department of Plant Production and Genetics, Faculty of Agriculture and Natural Resources, University of Mohaghegh Ardabili, Ardabil, Iran

Received 11 January 2023; Accepted 16 April 2023

Extended abstract

Introduction

Transcriptomics studies speed up the basic and applied research on the identification of genes involved in the biosynthesis of medicinally significant primary and secondary metabolites as well as plant responses to biotic and abiotic stresses. The adequate quality and quantity of RNA are essential for successful transcriptomics investigations such as RNA sequencing (RNA-seq) and microarrays. It is extremely difficult to isolate RNA from medicinal plants with high levels of polyphenols and polysaccharides, such as *Borago officinalis*. Moreover, isolating nucleic acids from tissues exposed to stressful conditions of heavy metal toxicity such as cadmium is challenging due to the increased accumulation of reactive oxygen species (ROS) and secondary metabolites. Any RNA-seq experiment requires high-quality RNA because the isolated RNA should meet stringent quality control requirements in order to be sequenced on the various platforms. In the present study, we evaluated different RNA extraction methods to obtain an efficient protocol for isolating high-quality total RNA from borage tissue exposed to cadmium stress.

Materials and methods

The borage seedlings were grown in hydroponic containers containing half-strength Hoagland's nutrient solution in a growth chamber. Borage seedlings were exposed to 162 μM Cd using cadmium nitrate ($\text{Cd}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) at 5-6 leaves stage and sampled at 48 h after treatment. The roots and leaves were subjected to five RNA isolation methods, including phenol/chloroform-based method, CTAB-based method, SDS-based method, RNX-plus protocol, and modified RNX-plus method to obtain an efficient protocol for isolating high-quality total RNA. The concentration and purity of the RNAs extracted using the abovementioned protocols were determined using gel electrophoresis and NanoDrop spectrophotometer. The quality and integrity of selected total RNA were approved with cDNA synthesis, RT-PCR, Bioanalyzer System, and transcriptome sequencing. After evaluating the extraction methods, a quick, simple and efficient instruction based on the modified RNX-Plus extraction method was afforded.

* Corresponding author: Nasser Zare; E-Mail: zarenasser@yahoo.com



Results and discussion

The results showed that the modified RNX-plus method was a fast and efficient protocol for the isolation of RNA from the borage leaf and root when compared with other methods. The method overcame the limitations posed by poor quality and low concentration of isolated RNA from borage samples exposed to cadmium stress. The A260/A280 and A260/A230 ratios of the RNA extracted using the modified RNX-plus method were 2.1 and 2.07, respectively, revealing its high purity. The key factors in the optimized protocol that resulted in removing the impurities were included the increasing ratio of extraction buffer to the amount of the powdered plant sample, using the optimized volume of chloroform, raising the RNA precipitation time at -20°C , washing RNA with lithium chloride and washing again with ethanol. Also, the yields of 333 ± 15 and 463 ± 43 $\text{ng } \mu\text{l}^{-1}$ of RNA with RNA integrity (RIN) numbers of 8.6 and 9.05 were obtained from roots under cadmium stress and control conditions using the described optimized method, respectively.

Conclusion

In general, the results of this study showed that the modified RNX-Plus method is convenient, fast, and effective for the isolation of total RNA from borage root and leaf tissues that contain different levels of polysaccharides, polyphenols, and secondary metabolites, and no solution is needed to be prepared before, except for ethanol and Lithium chloride. Since the RNA extracted from this procedure was successfully used for cDNA library construction, RT-PCR, and RNA sequencing, it can be considered as a simple and efficient method for the isolation of RNA from medicinal plants.

Keywords: *Borago officinalis*, cDNA library, Heavy metal, RNA-seq, RNA integrity

مقایسه روش‌های استخراج RNA به منظور بهینه‌سازی استخراج RNA کل از گیاه گاوزبان اروپایی تحت تنش کادمیوم

شهربانو ابوطالبی^۱، ناصر زارع^{۲*}، پریسا شیخ‌زاده مصدق^۳

۱. دانشجوی دکتری رشته بیوتکنولوژی کشاورزی، گروه تولید و ژنتیک گیاهی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه محقق اردبیلی، اردبیل
۲. استاد، گروه تولید و ژنتیک گیاهی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه محقق اردبیلی، اردبیل
۳. دانشیار، گروه تولید و ژنتیک گیاهی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه محقق اردبیلی، اردبیل

مشخصات مقاله	چکیده
واژه‌های کلیدی: <i>Borago officinalis</i> توالی‌یابی RNA فلز سنگین کتابخانه cDNA یکپارچگی RNA	کیفیت و کمیت مناسب RNA برای انجام موفقیت‌آمیز مطالعات پروفایل بیان ژن مانند توالی‌یابی RNA و ریزآرایه‌ها مسئله ضروری است. جداسازی RNA از گیاهان دارویی مانند <i>Borago officinalis</i> که حاوی مقادیر بالایی از پلی‌فنل‌ها و پلی‌ساکاریدها هستند، چالش بزرگی است. همچنین استخراج اسیدهای نوکلئیک از بافت‌های گیاهی که در معرض شرایط تنش‌زای ناشی از سمیت فلزات سنگین از جمله کادمیوم قرار دارند به دلیل افزایش تجمع گونه‌های فعال اکسیژن و متابولیت‌های ثانویه دشوار است. در مطالعه حاضر پنج روش استخراج RNA شامل روش‌های مبتنی بر فنل-کلروفرم، SDS، CTAB، محلول استخراج RNX-Plus و تغییر یافته برای استخراج RNA از ریشه و برگ گاوزبان اروپایی در معرض تنش کادمیوم مقایسه شد. پس از بررسی روش‌های استخراج، یک دستورالعمل سریع، ساده و کارآمد مبتنی بر روش استخراج RNX-Plus تغییر یافته ارائه شد که بر محدودیت‌های ناشی از کیفیت پایین و عملکرد کم RNA جدا شده از این گیاه غلبه می‌کند. مقادیر نسبت‌های A260/A280 و A260/A230 برای RNA حاصل از روش RNX-Plus تغییر یافته به ترتیب ۲/۱ و ۲/۰۷ بود که این نتایج خلوص بالای آن را نشان می‌دهد. عوامل مؤثری که منجر به حذف ناخالصی‌ها در این روش تغییر یافته شدند عبارت‌اند از: افزایش نسبت بافر استخراج به نمونه گیاهی پودر شده، استفاده از حجم بهینه کلروفرم، افزایش زمان ته‌نشینی در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد، شستشو RNA با لیتیوم کلراید و شستشو مجدد با اتانول. همچنین غلظت 15 ± 333 و 43 ± 463 نانوگرم در میکرولیتر RNA با عدد یکپارچگی RNA برابر با ۸/۶ و ۹/۰۵ به ترتیب از ریشه‌های تحت تنش کادمیوم و شاهد به دست آمد. از آنجایی که RNA حاصل استانداردهای کنترل کیفیت را برای ساخت کتابخانه cDNA، RT-PCR و توالی‌یابی RNA گذرانده است، می‌توان آن را به‌عنوان روشی ساده و کارآمد برای استخراج RNA از این گیاه دارویی در نظر گرفت.
تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۱۰/۲۱	
تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۰۱/۲۷	
تاریخ انتشار: پائیز ۱۴۰۳ ۴۴۱-۴۵۴ (۳): ۱۷	

مقدمه

رزمارینیک اسید و اسیدهای فنولیک است (-Asadi Samani et al., 2014).

مطالعه اثر عوامل تنش‌زای محیطی مختلف بر مسیرهای متابولیسم گیاهان دارویی بینش ارزشمندی را ارائه می‌دهد. متابولیت‌های ثانویه گیاه به میزان قابل‌توجهی در معرض فلزات سنگین افزایش می‌یابد. بدین ترتیب که مکانیسم‌های

گیاه گاوزبان اروپایی (*Borago officinalis* L.) یکی از ارزشمندترین گیاهان دارویی متعلق به خانواده Boraginaceae است. گاوزبان اروپایی به دلیل دارا بودن مقادیر بسیار بالای اسید لینولئیک و اسید گامالینونیک، اهمیت درمانی و تجاری دارد. علاوه بر این، حاوی مقادیر زیادی ترکیبات فنلی با پتانسیل آنتی‌اکسیدانی مانند

پلی فنولیک‌ها تحت تأثیر آنزیم‌های اکسیداتیو گیاه و یا در طول مراحل استخراج اسیدهای نوکلئیک اکسیده می‌شوند و با تولید کینون‌ها می‌توانند پروتئین‌ها و اسیدهای نوکلئیک را به‌طور برگشت‌ناپذیر متصل کنند و کمپلکس‌هایی با وزن مولکولی بالا تشکیل دهند، علاوه بر این پلی‌ساکاریدها تمایل دارند با اسیدهای نوکلئیک در بافرهای با قدرت یونی پایین رسوب کنند (Muoki et al., 2012; Vidović and Ćuković, 2020). امروزه روش‌های استخراج RNA متعددی از روش‌های کلاسیک تا پیشرفته وجود دارند. استخراج مبتنی بر ستیل تری متیل آمونیوم بروماید (CTAB)، فنل/کلروفرم، فنل/SDS و اسید گوانیدین تیوسیانات/فنل/کلروفرم از روش‌های مرسوم استخراج RNA هستند (Yoshino et al., 2020). برخی پروتکل‌های جداسازی RNA رایج بر پایه نمک‌های گوانیدین هستند، مانند معرف TRIZol (Invitrogen, Carlsbad-CA-USA) و کیت‌های تجاری از جمله RNeasy (Qiagen, Hilden-Germany). اگرچه این روش‌ها با موفقیت برای جداسازی RNA از بافت‌های انواع گیاهان مورد استفاده قرار گرفته‌اند، برای گونه‌های خاص پروتکل‌های مبتنی بر گوانیدین قادر به جداسازی RNA با کیفیت بالا نیستند. در مقابل، پروتکل‌های مبتنی بر گوانیدین شانس پاک‌سازی هم‌زمان آلاینده‌ها را افزایش می‌دهند (Chomczynski et al., 2010; Carpinetti et al., 2021). استخراج با CTAB و بر پایه پلی وینیل پیرولیدون برای کاهش اثرات ترکیبات پلی‌فنلی و پلی‌ساکاریدها مفید است اما به مقدار زیادی بافت گیاهی به‌عنوان ماده اولیه و مراحل رسوب اتانول یا ایزوپروپیل الکل و سانتریفیوژ طولانی‌مدت نیازمند است؛ بنابراین برای جداسازی RNA با کیفیت خوب به‌منظور انجام واکنش‌های حساس، مانند Real-Time PCR و RNA-seq کارآمد نیستند (Moazzam Jazi et al., 2015; Yoshino et al., 2020).

مطالعه حاضر با هدف شناسایی و معرفی روش بهینه جداسازی RNA از گیاه گاوزبان اروپایی برای اجرای برنامه‌های بعدی در ژنومیک عملکردی انجام شد، به همین منظور چندین روش جداسازی RNA شامل روش‌های مبتنی بر CTAB، SDS، فنل-کلروفرم و محلول تجاری RNX-Plus مبتنی بر گوانیدین-فنل مورد ارزیابی قرار گرفت.

دفاعی تحت تنش فلزات سنگین باعث تحریک مسیر بیوسنتز و تجمع متابولیت‌های ثانویه می‌شود (Sinha and Saxena, 2006). در میان فلزات سنگین، کادمیوم (Cd) سمی‌ترین و رایج‌ترین آلاینده است که عمدتاً از طریق فعالیت‌های صنعتی در تماس با گیاهان قرار می‌گیرند. تنش کادمیوم باعث تولید و تجمع گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) در سلول‌های گیاهی می‌شود که تجمع آن می‌تواند باعث آسیب شدید به ماکرومولکول‌های زیستی مختلف مانند DNA/RNA شود. قرار گرفتن بیش‌ازحد ریشه در معرض کادمیوم می‌تواند منجر به تجمع لیگنین، قهوه‌ای شدن و کاهش رشد ریشه شود که می‌تواند اثرات نامطلوبی بر کیفیت و عملکرد گیاهان ایجاد کند (Kováčik et al., 2011; Zhu et al., 2018; Leng et al., 2020).

اطلاعات اندکی در مورد تنظیم بیان ژن در گیاه گاوزبان اروپایی وجود دارد و علاوه بر این پژوهشی درباره تغییرات پروفایل بیان ژن این گیاه در پاسخ به تنش کادمیوم تاکنون گزارش نشده است. استخراج RNA از اندام‌ها و بافت‌های مختلف گیاهی یک مرحله مقدماتی مهم برای بسیاری از مطالعات بیان ژن گیاهی است. در حال حاضر، توالی‌یابی RNA (RNA-seq) به‌عنوان یک ابزار کارآمد برای بررسی رونویسی گیاهان، به‌ویژه گونه‌های غیر مدل استفاده می‌شود (Healey et al., 2014). توالی‌یابی RNA در زیست‌شناسی گیاهی امکان انجام تحقیقات بنیادی و کاربردی در مورد آنزیم‌های دخیل در بیوسنتز متابولیت‌های اولیه و ثانویه مهم دارویی، نحوه تعامل ژن‌ها برای تشکیل شبکه‌های ژنی و پاسخ گیاهان به تنش‌های محیطی زیستی و غیرزیستی را فراهم کرده است (Johnson et al., 2012). توالی‌یابی نسل بعدی (NGS) به‌عنوان یک روش بسیار حساس برای تجزیه و تحلیل بیان ژن ایجاد شده است، باین حال نمونه‌های RNA با کیفیت پایین در روند توالی‌یابی اختلال ایجاد می‌کنند (Nadiya et al., 2015). دست‌یابی به RNA با کیفیت بالا و مناسب برای توالی‌یابی زمانی چالش‌برانگیز می‌شود که نمونه‌های گیاهی حاوی سطوح بالای RNase، مقادیر زیادی پلی‌ساکارید، رنگ‌دانه، انواع مختلف فنولیک‌ها و غلظت‌های پایین اسیدهای نوکلئیک باشند (Yockteng et al., 2013).

مواد و روش‌ها

بذر گاوزبان اروپایی از شرکت پاکان بذر (اصفهان، ایران) خریداری شد و جوانه‌زنی بذور در پتری‌های یک‌بارمصرف استریل حاوی کاغذ صافی مرطوب صورت گرفت. گیاهچه‌های ۵-۶ سانتیمتری، به ظرف‌های هیدروپونیک حاوی محلول غذایی نیمه هوگلند (Hoagland and Arnon, 1950) همراه با هوادهی مداوم، در اتاقک کشت با دوره روشنایی ۱۶ ساعت و دمای 25 ± 2 درجه سانتی‌گراد انتقال یافت. به‌منظور ثابت نگه‌داشتن شرایط رشد، حجم محلول و pH آن دائماً بازبینی و pH در حدود ۵/۸ حفظ شد. تیمار کادمیوم با افزودن ۰/۲ گرم $Cd(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$ (شرکت سیگما-آلدریج) به ظروف چهار لیتری حاوی محلول نیمه‌هوگلند انجام شد و غلظت نهایی ۱۶۲ میکرومولار Cd^{2+} در محلول به گیاهچه‌های ۵-۶ برگی اعمال شد. ریشه‌ها و برگ‌های گیاهچه‌ها ۴۸ ساعت پس از تنش نمونه‌برداری شدند (Sheikhzadeh et al., 2022; Aboutalebi et al., 2023). تمام نمونه‌ها بلافاصله در نیتروژن مایع منجمد و در دمای -70 درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

استخراج RNA

با هدف پیشگیری از اثر آنزیم RNase، تمامی وسایل موردنیاز برای استخراج RNA به مدت ۴۵ دقیقه اتوکلاو شدند. همچنین برای استریل کردن ظروف و تهیه محلول‌های موردنیاز آب تیمار شده با DEPC استفاده شد. در ابتدا به‌منظور یافتن روش بهینه، RNA کل هر بافت به‌صورت مخلوط نمونه‌های شاهد و تنش با استفاده از ۵ دستورالعمل مختلف زیر استخراج شد:

۱. استخراج RNA به روش مبتنی بر فنل-کلروفرم بر اساس روش دیپا و همکاران (Deepa et al., 2014) انجام شد. برای این منظور، ۱۰۰ میلی‌گرم از نمونه گیاهی به همراه ۲ درصد PVP با استفاده از نیتروژن مایع در هاون پودر شد. سپس ۲ میلی‌لیتر بافر استخراج (شامل ۲ درصد SDS، ۱۰۰ میلی‌مولار Tris-HCl - pH 8، ۲۵ میلی‌مولار EDTA - pH 8 و ۱ درصد بتا-مرکاپتواتانول) با دمای ۶۵ درجه سانتی‌گراد به نمونه درون هاون اضافه و نمونه کوبیده شد. سپس محتویات درون هاون به‌طور مساوی به دو تیوب ۲ میلی‌لیتری (به هر تیوب یک میلی‌لیتر) منتقل شدند. حجم مساوی فنل-کلروفرم اسیدی به نمونه‌ها اضافه شد و پس از ۱۰ ثانیه ورتکس، به مدت ۱۰ دقیقه در دمای اتاق قرار گرفت.

نمونه‌ها در g ۱۵۰۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ گردید. مایع رویی به تیوب تازه منتقل و ۰/۳ حجم آن استات سدیم ۵ مولار و ۰/۷ حجم آن فنل-کلروفرم اسیدی اضافه شد. پس از ۱۰ دقیقه ماندن روی یخ با همان شرایط قبلی سانتریفیوژ شد. مایع رویی در تیوب جدید با ۰/۱ حجم استات سدیم ۳ مولار و حجم مساوی ایزوپروپانول مخلوط و پس از سرمادهی تیوب‌ها به مدت ۱ ساعت در دمای -20 درجه سانتی‌گراد در g 15000 به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شدند. پلیت RNA حاصل با اتانول ۷۰ درصد در g ۷۵۰۰ به مدت ۵ دقیقه حین سانتریفیوژ شسته شد و پس از خشک شدن به مدت ۵ تا ۱۰ دقیقه در g ۲۵ میکرولیتر آب تیمار شده با DEPC حل شد.

۲. استخراج RNA به روش مبتنی بر CTAB بر اساس روش یو و همکاران (Yu et al., 2012) انجام شد. برای این منظور، ۱۰۰ میلی‌گرم نمونه گیاهی در حضور نیتروژن مایع و یک درصد PVP پودر شد. پودر حاصل به یک تیوب سانتریفیوژ استریل حاوی ۷۰۰ میکرولیتر بافر استخراج (۳ درصد CTAB، ۱۰۰ میلی‌مولار Tris-HCl - pH 8، ۰/۲ مولار NaCl، ۲۰ میلی‌مولار EDTA - pH 8، ۵ درصد PVP و ۱ درصد بتا-مرکاپتواتانول) با دمای ۶۵ درجه سانتی‌گراد منتقل شد. نمونه‌ها به مدت ۱ دقیقه ورتکس شد و سپس در دمای ۶۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه انکوبه شد تا سلول‌ها کاملاً لیز شوند. پس از سانتریفیوژ در g 15000 به مدت ۵ دقیقه، انتقال مایع رویی به یک تیوب جدید انجام شد. سپس با افزودن حجم مساوی از کلروفرم، به مدت ۱ دقیقه ورتکس و در g 15000 به مدت ۱۰ دقیقه در دمای اتاق سانتریفیوژ شد. مایع رویی به تیوب جدید انتقال، حجم مساوی آن لیتیم کلراید ۴ مولار اضافه شد. پس از ته‌نشینی به مدت ۴ ساعت در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد، در g ۱۵۰۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شد و پلیت RNA به آرامی با اتانول ۷۵٪ شسته و در هوا خشک شد. سپس در g ۲۵ میکرولیتر آب تیمار شده با DEPC حل شد.

۳. استخراج RNA مبتنی بر SDS بر اساس روش یو و همکاران (Yu et al., 2012) انجام شد. بافر استخراج شامل ۳ درصد SDS، ۱۰۰ میلی‌مولار Tris-HCl - pH 8، ۰/۲ مولار NaCl، ۲۰ میلی‌مولار EDTA - pH 8 و ۵ درصد PVP بود. کلیه مراحل مشابه روش CTAB بود با این تفاوت که پس از ۱۰ دقیقه انکوباسیون در دمای ۶۵ درجه سانتی‌گراد، حجم برابر Tris-Phenol به مخلوط اضافه شد.

پس از رنگ‌آمیزی با اتیدیوم بروماید و آشکارسازی زیر نور UV بررسی شد (Rodrigues et al., 2007).

انجام واکنش زنجیره‌ای پلیمرز معکوس RT-PCR

RNA به‌دست‌آمده از روش مناسب مرحله قبل با استفاده از واکنش زنجیره‌ای پلیمرز رونویسی معکوس مورد ارزیابی قرار گرفت. در ابتدا حذف آلودگی DNA ژنومی با آنزیم DNase I تهیه‌شده از شرکت سیناکلون انجام گرفت. سپس ساخت cDNA با استفاده از کیت ساخت cDNA شرکت پارس توس در حجم ۲۰ میکرولیتر مطابق دستورالعمل سازنده انجام شد. از cDNA های حاصل به‌عنوان الگو جهت تکثیر ژن S-18rRNA با توالی آغازگر روبه‌جلو (F) '5' ATGATAACTCGACGGATC3' و آغازگر برگشتی (R) '5' CTTGGATGTGGTAGCCGT3' استفاده شد (Masoomi-Aladizgeh et al., 2015).

توالی‌یابی RNA

RNA با کیفیت بالا استخراج‌شده از ریشه‌های گاوزبان اروپایی شاهد و تیمار کادمیوم در دو تکرار تهیه شد. همچنین یک نمونه مخلوط RNA برگ و ریشه به نسبت برابر برای تهیه ژنوم مرجع گاوزبان اروپایی استفاده شد. آماده‌سازی و توالی‌یابی کتابخانه توسط Illumina Hiseq 2000 شرکت BGI (چین) طبق دستورالعمل‌های شرکت سازنده انجام شد. RNA های ریشه به‌صورت خوانش‌های یک‌جهتی با طول ۵۰ باز و برای نمونه مخلوط RNA برگ و ریشه به‌صورت دو جهتی با طول ۱۰۰ توالی‌یابی صورت گرفت. مخلوط RNA بافت‌های مختلف به‌منظور تولید اولیه ژنوم (تعیین توالی نوپدید) برای گیاهانی که اطلاعات ژنومی بسیار اندکی در دسترس است استفاده می‌شود (Garg and Jain, 2013). پیش از توالی‌یابی، توزیع و اندازه مولکول‌های RNA خالص با استفاده از Bioanalyser Agilent 2100 ارزیابی شد که عدد یکپارچگی RNA¹ (RIN) را در محدوده ۱ تا ۱۰ (به ترتیب برای تخریب‌شده‌ترین و سالم‌ترین نمونه‌ها) تولید می‌کند (Nadiya et al., 2015). پس از مرحله توالی‌یابی کیفیت داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار CLC Bio Genomics WorkBench 10.0.1 (CLC Bio، دانمارک) بررسی شد.

۴. استخراج RNA با استفاده از روش مبتنی بر گوانیدین-فنل (محلول استخراج RNX-Plus شرکت سیناکلون) مطابق دستورالعمل انجام شد. برای این منظور، ۱۰۰۰ میکرولیتر محلول استخراج RNX-Plus به ۱۰۰ میلی‌گرم نمونه گیاهی پودر شده با ازت مایع اضافه و ورتکس گردید. پس از ۵ دقیقه نگهداری در دمای آزمایشگاه با ۲۰۰ میکرولیتر کلروفرم مخلوط شد. سپس، به مدت ۵ دقیقه روی یخ قرار گرفتند و در ۱۶۰۰۰ g به مدت ۱۵ دقیقه در ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ شد. پس از انتقال مایع رویی به تیوب ۱/۵ میلی‌لیتری، هم‌حجم آن ایزوپروپانول سرد اضافه و به‌آرامی سروته شد. سپس به مدت ۱۵ دقیقه در ۲۰- درجه سانتی‌گراد قرار داده شد و سانتریفیوژ در ۱۶۰۰۰ g، به مدت ۱۵ دقیقه در ۴ درجه سانتی‌گراد انجام شد. مایع رویی بیرون ریخته شد و ۱۰۰۰ میکرولیتر اتانول ۷۵٪ جهت شستشو به پلیت اضافه گردید. سانتریفیوژ در ۶۵۰۰ g، به مدت ۸ دقیقه در ۴ درجه سانتی‌گراد انجام شد و پس از حذف مایع بالایی و خشک شدن پلیت، ۲۵ میکرولیتر آب تیمار شده با DEPC اضافه و به مدت ۱۰ دقیقه در بن‌ماری قرار گرفت.

۵. استخراج RNA به روش محلول استخراج RNX-Plus با ایجاد تغییراتی در دستورالعمل آن به‌منظور بهبود کیفیت و کمیت RNA استخراج‌شده، تغییرات ایجادشده در این بخش شامل: کاهش مقدار نمونه اولیه (استفاده از ۸۰ میلی‌گرم نمونه اولیه)، افزایش مقدار محلول (افزودن بافر استخراج به میزان ۱۲۰۰ میکرولیتر به هر نمونه) و نیز استفاده از ۳۵۰ میکرولیتر کلروفرم بود. همچنین مدت ته‌نشینی در ایزوپروپانول از ۱۵ دقیقه به ۳۰ دقیقه افزایش یافت. پس از انجام سانتریفیوژ مایع رویی حذف و با ۵۰۰ میکرولیتر لیتیم کلراید ۴ مولار مجدد در شرایط قبلی سانتریفیوژ شد. همچنین مرحله شستشو و سانتریفیوژ RNA با اتانول دومرتبه انجام شد.

برآورد خلوص، بازده و یکپارچگی RNA

خلوص و کمیت RNA با اندازه‌گیری جذب نوری نمونه‌ها در طول موج‌های ۲۳۰، ۲۶۰ و ۲۸۰ نانومتر با استفاده از دستگاه نانودراپ (ND1000, Thermo Scientific, Delaware, USA) مورد ارزیابی قرار گرفت. یکپارچگی RNA از طریق باندهای متمایز rRNA در الکتروفورز ژل آگارز ۱/۲ درصد،

¹ RNA Integrity Number

نداشت (جدول ۱) و مقادیر همگی در محدوده ۱/۹۸-۲ بودند که نشان می‌دهد نمونه‌های RNA برگ فاقد آلودگی پروتئینی بودند (جدول ۲)؛ اما نسبت‌های A260/A280 RNA های ریشه بین ۱/۵۲ در روش مبتنی بر SDS تا ۲/۰۸ در روش RNX-Plus تغییر یافته متغیر بود و RNA ریشه استخراج شده به روش مبتنی بر SDS بیشترین میزان آلودگی پروتئینی را نشان داد. در روش مبتنی بر SDS برخلاف روش‌های مبتنی بر CTAB و فنل-کلروفرم، بتا-مرکاپتواتانول استفاده نشد و همان‌طور که گزارش شده است بتا-مرکاپتواتانول و PVP به منظور جلوگیری از تشکیل کمپلکس‌های با وزن مولکولی بالا پروتئین‌ها و اسیدهای نوکلئیک استفاده می‌شود (Xu et al., 2009).

در تجزیه و تحلیل اسپکتروفتومتری ۲۳۰ نانومتر طول موجی است که در آن کربوهیدرات‌ها، فنل‌ها و ترکیبات معطر حداکثر جذب را دارند و نسبت A260/A230 به عنوان شاخصی برای ارزیابی سطح آلودگی RNA توسط پلی‌ساکاریدها و پلی‌فنل‌ها استفاده می‌شود (Carpinetti et al., 2021). طبق اندازه‌گیری انجام شده مقادیر نسبت A260/A230 برای RNA برگ و ریشه (شکل ۱) برای پروتکل‌های مبتنی بر فنل-کلروفرم، CTAB، SDS و RNX-Plus کمتر از ۱/۶ بود که بیانگر عدم کارایی روش‌های استفاده شده در جلوگیری از آلودگی‌های پلی‌ساکاریدی و پلی‌فنلی گیاه گاوزبان اروپایی است. باین‌حال، در روش RNX-Plus تغییر یافته مقادیر A260/A230 RNA برگ و ریشه در حدود ۲ به دست آمد که نشان می‌دهد تغییرات اعمال شده در دستورالعمل اصلی در کاهش آلودگی‌های پلی‌ساکاریدی و پلی‌فنلی کارآمد بوده است؛ به عبارت دیگر افزایش نسبت بافر به نمونه در روش RNX-Plus تغییر یافته موجب لیز شدگی مؤثر نمونه‌های گیاهی، به دست آوردن مایع رویی بیشتر و کاهش غلظت آلاینده‌های پلی‌فنلی و پلی‌ساکاریدی می‌شود که منجر به افزایش مقدار RNA کل و A260/A230 گردید. علاوه بر این، شستشوی مکرر رسوب RNA با اتانول از روش‌های حیاتی برای به دست آوردن کیفیت بالا است (Wang et al., 2022) که در این روش تغییر یافته به دومرتبه افزایش یافت. از دیگر تغییرات به کار رفته انجام مرحله شستشوی رسوب RNA با لیتیم کلراید بود که طبق مطالعات متعدد آلودگی کربوهیدرات با استفاده از لیتیم کلراید در مرحله رسوب کاهش می‌یابد (Rubio-Piña and Zapata-Pérez, 2011; Nadiya et

قبل از تجزیه و تحلیل داده‌ها، نرمال بودن توزیع داده‌ها با استفاده از آزمون تک نمونه‌ای کولموگروف-اسمیرنوف (نرم افزار SPSS ver. 22) مورد بررسی قرار گرفت. آزمایش مربوط به مقایسه روش‌های استخراج RNA بر پایه طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار اجرا شد. تجزیه واریانس و مقایسه میانگین به روش آزمون چند دامنه دانکن برای برگ و ریشه به صورت جداگانه و با استفاده از نرم افزار SPSS ver. 22 انجام گردید. نمودارها با نرم افزار Excel رسم گردید.

نتایج و بحث

در این مطالعه، پنج روش جداسازی RNA مقایسه شد و موفقیت هر پروتکل بر اساس کمیت و خلوص RNA با اندازه‌گیری جذب نوری در طول موج‌های ۲۶۰، ۲۳۰ و ۲۸۰ نانومتر و نسبت‌های جذب آن‌ها مورد بررسی قرار گرفت که از نظر غلظت و A260/A230 RNA روش‌های استخراج اختلاف معنی‌داری داشتند (جدول ۱). غلظت RNA نمونه‌ها با ارزیابی جذب در ۲۶۰ نانومتر (A260) به دست آمد و طبق نتایج، روش RNX-Plus تغییر یافته با تولید $625/5 \pm 51/94$ و $1549/8 \pm 65/04$ نانوگرم بر میکرولیتر RNA به ترتیب از ریشه و برگ بالاترین عملکرد را داشتند (جدول ۲). در مقابل روش مبتنی بر CTAB با $28/3 \pm 5/42$ و $346/3 \pm 11/88$ نانوگرم بر میکرولیتر RNA از ریشه و برگ کمترین بازده را نشان داد که این کاهش بازده RNA به دلیل میل ترکیبی CTAB با سایر اسیدهای نوکلئیک و پلیمرهای زیستی می‌تواند باشد (Wang et al., 2022).

از نظر مدت زمان مورد نیاز جهت استخراج RNA روش‌های مبتنی بر CTAB و SDS با ۲۸۲ دقیقه بیشترین و روش RNX-Plus کوتاه‌ترین مدت زمان را به خود اختصاص دادند. در تمامی روش‌های استخراج RNA مورد بررسی غلظت RNA حاصل از ریشه نسبت به برگ کمتر بود زیرا بافت‌های ریشه باینکه معمولاً از نظر متابولیکی فعال هستند، اما محتوای آب سلولی آن‌ها بیشتر از بافت‌های برگ است و در نتیجه مقدار RNA کل کمتری در هر گرم بافت ایجاد می‌شود (Carpinetti et al., 2021). در بررسی استخراج RNA از بافت‌های گیاه *Psidium guajava* تحت تنش شوری و کادمیوم نیز غلظت RNA حاصل از ریشه کمتر از بافت برگ گزارش شده است (Carpinetti et al., 2021). برعکس غلظت RNA، تفاوت معنی‌داری در نسبت‌های A260/A280 RNA برگ بین پنج روش استخراج وجود

ناخالصی‌ها مؤثر بود (Laksana and Chanprame, 2015). لازم به ذکر است که غلظت و نسبت‌های A260/A280 و A260/A230 لزوماً شاخص‌های خوبی برای RNA مناسب برای RT-PCR نیستند و RNA باید از نظر تخریب نیز بررسی شود. در پژوهشی (al., 2015; Vidović and Ćuković, 2020) بافر استخراج حاوی لیتیم کلراید توانست پلی‌ساکاریدهای درهم‌تنیده با اسیدهای نوکلئیک در گیاه *Aegiceras corniculatum* را حذف کند (Rubio-Piña et al., 2011). افزایش میزان کلروفورم و نیز مدت‌زمان ته‌نشینی در ایزوپروپانول به دلیل نقش آن‌ها در حذف پلی‌فنل‌ها و سایر

جدول ۱. تجزیه واریانس غلظت و خلوص RNA کل استخراج‌شده از ریشه و برگ گاوزبان اروپایی با استفاده از روش‌های مختلف استخراج RNA

Table 1. Analysis of variance of concentration and purity of total RNA extracted from the borage root and leaf tissues using different RNA isolation methods

S.O.V	منابع تغییر درجه آزادی df	غلظت RNA		A260/A280		A260/A230	
		برگ leaf	ریشه root	برگ leaf	ریشه root	برگ leaf	ریشه root
روش استخراج	4	681056.63**	184278.02**	0.007 ^{ns}	0.131 ^{ns}	0.347*	0.986**
خطا	10	7273.08	2165.887	0.005	0.055	0.085	0.084

^{ns}, * و ** به ترتیب غیر معنی‌دار در سطح احتمال ۵٪ و معنی‌دار در سطح احتمال ۵٪ و ۱٪. ^{ns}, * and ** are non-significant at the probability level of 0.05 and significant at the probability level of 0.05 and 0.01, respectively

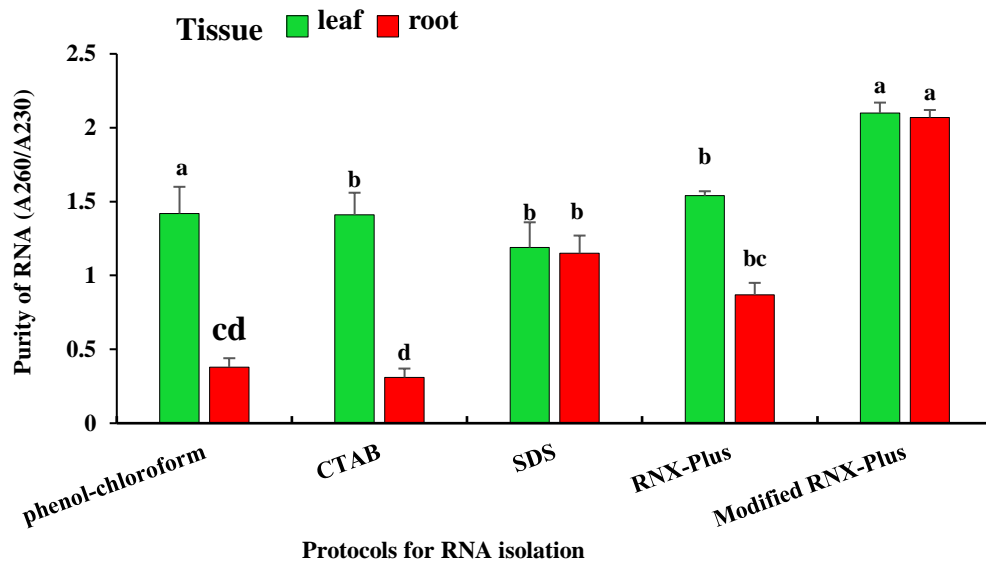
جدول ۲. مقایسه میانگین کیفیت و کمیت RNA کل استخراج‌شده از ریشه و برگ گاوزبان اروپایی با استفاده از روش‌های مختلف استخراج RNA

Table 2. Comparison of the mean of quality and quantity of total RNA extracted from root and leaf borage using different RNA isolation methods

روش Method	زمان Time (min)	غلظت RNA		A260/A280
		بافت Tissue	RNA concentration (ng μl^{-1})	
فنل-کلروفورم Phenol-chloroform	125	ریشه Root	80.26±9.6 ^d	1.8±0.14 ^{ab}
		برگ Leaf	632.07±25.11 ^d	1.98±0.08 ^a
CTAB	282	ریشه Root	28.3±5.42 ^d	1.79±0.12 ^{ab}
		برگ Leaf	346.30±11.88 ^e	2.02±0.06 ^a
SDS	282	ریشه Root	432.22±21.51 ^b	1.52±0.21 ^b
		برگ Leaf	939.43±12.55 ^c	2.05±0.02 ^a
RNX-Plus	73	ریشه Root	268.77±18.07 ^c	1.85±0.1 ^{ab}
		برگ Leaf	1238.2±43.13 ^b	1.98±0.05 ^a
تغییر یافته RNX-Plus Modified RNX-Plus	111	ریشه Root	625.5±51.94 ^a	2.10±0.01 ^a
		برگ Leaf	1549.8±65.04 ^a	2.08±0.01 ^a

میانگین‌هایی با حروف مشترک در هر ستون بر اساس آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال ۵٪ اختلاف معنی‌داری با هم ندارند. مقایسه میانگین کیفیت و کمیت RNA روش‌های استخراج هر بافت به صورت جدا آنالیز شد.

The means with common letters in each column are not significantly different based on Duncan's multiple range test at the 5% probability level. Comparison of the average quality and quantity of RNA of extraction methods for each tissue was analyzed separately.



شکل ۱. مقایسه میانگین RNA A260/A230 کل استخراج شده از ریشه و برگ گاوزبان اروپایی با استفاده از روش‌های استخراج مختلف

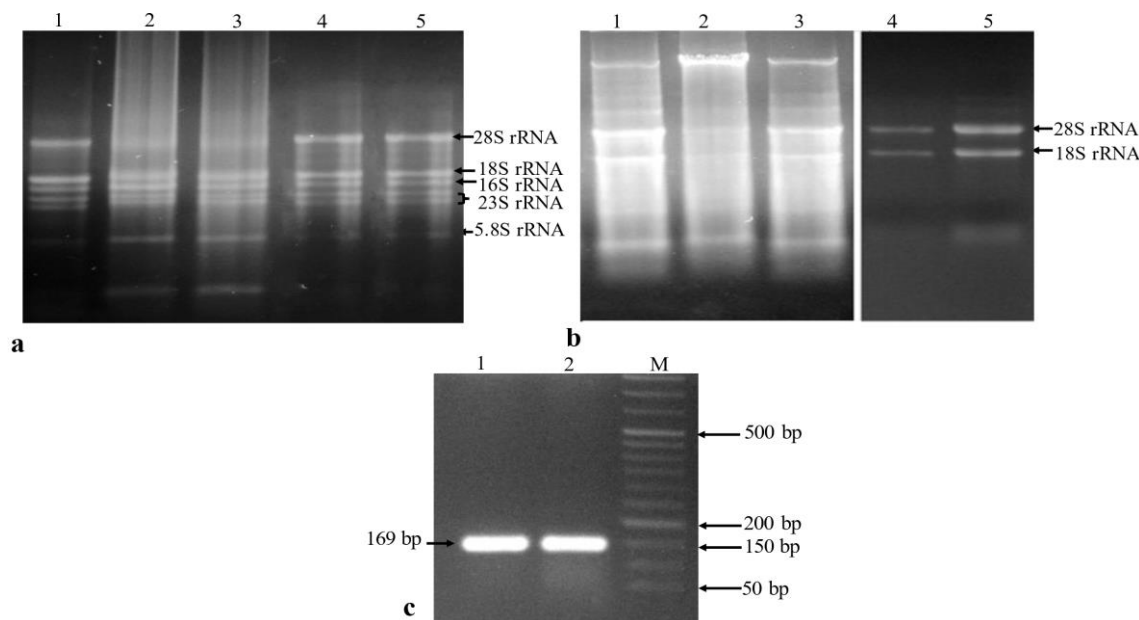
Fig. 1. Comparison of the A260/A230 of total RNA extracted from the borage root and leaf using different extraction methods

وجود آلاینده‌ها در نمونه‌ها نه تنها جداسازی و تعیین کمیت RNA را مختل می‌کند، بلکه ممکن است با فعالیت برخی از آنزیم‌ها، مانند ترانسکریپتاز معکوس در ساخت cDNA و آنزیم DNA پلیمرز در PCR نیز تداخل ایجاد کند. مواد مورد استفاده در مرحله استخراج مانند اتانول، فنل، کلروفرم و نمک‌ها دارای اثر مهارری بر این آنزیم‌ها و در نتیجه اختلال در این تکنیک‌ها گزارش شده است. با این حال موادی مانند پلی‌فنل‌ها و پلی‌ساکاریدها نیز می‌توانند با RNA رسوب کنند و بر کاربردهای پایین‌دستی تأثیر بگذارند (Wilson, 1997; Opel et al., 2010). در این راستا برای تعیین کیفیت نمونه‌ها برای کاربرد مولکولی، کیفیت نمونه‌های RNA دو بافت برگ و ریشه که به روش RNX-Plus تغییر یافته استخراج شدند از طریق RT-PCR نیز مورد ارزیابی قرار گرفتند (شکل ۲- c). دو نمونه ارزیابی شده برگ و ریشه باند حاصل از تکثیر ژن rRNA 18S با طول ۱۶۹ جفت باز را نشان دادند که بیانگر کیفیت مناسب آن‌ها برای مطالعات بیان ژن است. همان‌طور که گفته شد در برخی مطالعات، روش‌های مبتنی بر نمک‌های گوانیدین، TRIZol و کیت‌های تجاری برای استخراج RNA از گونه‌های غنی از متابولیت‌های ثانویه مؤثر نبوده (Deepa et al., 2014; Liu et al., 2018; Carpinetti et al., 2021) و در بعضی از پژوهش‌ها RNA حاصل از روش گوانیدین-فنل (TRIZol) در بررسی پروفایل بیان ژن کارا بود (Rodríguez-Serrano

طبق تجزیه و تحلیل الکتروفورز ژل آگارز باندهای RNA استخراج شده به روش‌های RNX-Plus و RNX-Plus تغییر یافته از برگ و ریشه واضح و فاقد اسمیر و آلودگی DNA بودند (شکل ۲- a, b). با این حال، RNA های استخراج شده از برگ و ریشه به روش‌های CTAB و فنل - کلروفرم دارای اسمیر و باند DNA بودند که احتمالاً به دلیل روند طولانی و زمان‌بر این روش‌ها موجب تخریب RNA شدند. همچنین روش مبتنی بر SDS هر چند که از نظر وضوح باندهای RNA ریبوزومی برگ و غلظت کل (۱۲/۵۵ ±) ۹۳۹/۴۳ نانوگرم در میکرولیتر RNA برگ) شرایط مناسبی دارد ولی از لحاظ حذف آلودگی‌های پلی‌فنلی و پلی‌ساکاریدی (A260/A230 برگ و ریشه به ترتیب ۱/۱۹ و ۱/۱۵)، پروتئینی (A260/A280 ریشه ۱/۵۲) و وجود خردشده‌گی در RNA ریشه شرایط لازم را نداشته و RNA استحصال‌ی برای مطالعات مولکولی مناسب نیست؛ بنابراین از بین این روش‌ها، روش RNX-Plus تغییر یافته در استخراج RNA با کیفیت و کمیت مطلوب از برگ و ریشه گاوزبان اروپایی کارآمد بوده است. در مطالعه وانگ و همکاران (Wang et al., 2022) استخراج RNA از برگ و ریشه *Lilium davidii* به روش TRIZol در مقایسه با روش CTAB فاقد اسمیر و باند DNA گزارش شد. در مقابل روش CTAB در استخراج RNA از برگ توت‌فرنگی موفق‌تر از روش TRIZol گزارش شده است (Yu et al., 2012).

هسته‌ای را جهت ساخت کتابخانه کامل cDNA فراهم می‌کند که این باعث دستیابی به خوانش‌های نواحی اینترونی پس از توالی‌یابی رونوشت‌های هسته‌ای می‌شود (Sultan et al., 2014).

تفاوت ترکیبات بیوشیمیایی در گونه‌های گیاهی مختلف است. همچنین مشخص شده است که روش گوانیدین-فنل بزرگترین مجموعه RNA شامل RNA سیتوپلاسمی و



شکل ۲. RNA استخراج شده از (a) برگ: (۱) روش مبتنی بر SDS، (۲) روش مبتنی بر CTAB، (۳) روش فنل-کلروفرم، (۴) روش RNX-Plus، (۵) روش تغییر یافته، (b) ریشه: (۱) روش مبتنی بر SDS، (۲) روش مبتنی بر CTAB، (۳) روش فنل-کلروفرم، (۴) روش RNX-Plus، (۵) روش تغییر یافته، (c) نتایج واکنش RT-PCR با استفاده از آغازگر 18S-rRNA روی cDNA روش RNX-Plus تغییر یافته: (۱) برگ، (۲) ریشه

Fig. 2. RNA Extracted from (a) Leaf: 1) SDS-based method, 2) CTAB-based method, 3) Phenol-chloroform method, 4) RNX-Plus method, 5) Modified RNX-Plus method, (b) Root: 1) SDS-based method, 2) CTAB-based method, 3) Phenol-chloroform method, 4) RNX-Plus method, 5) Modified RNX-Plus method, (c) RT-PCR reaction results using 18S-rRNA primer on cDNA of modified RNX-Plus method: 1) leaf, 2) root.

پستانداران که در آن RNA با کیفیت بالا دارای $RIN > 9$ است، این مقادیر برای RNA گیاه همواره ممکن نیست. گیاهان دارای تعداد زیادی زیر واحد rRNA دیگر (5.8S، 16S، 18S، 23S و 28S) از بخش‌های سیتوزولی، کلروپلاستیک و میتوکندری هستند که درجاتی از پیچیدگی را در خواندن RIN ایجاد می‌کنند، زیرا پیک‌های اضافی زیر واحد rRNA با تخریب rRNA اشتباه گرفته می‌شوند. علاوه بر این، بافت سبز برخلاف بافت‌های غیرسبز حاوی rRNA های اضافی است و مقادیر RIN پایین‌تر اندازه‌گیری می‌شود؛ بنابراین همان‌طور که انتظار می‌رود مقادیر RIN در ریشه‌ها به دلیل فراوانی بیشتر rRNA سیتوزولی (18S و 28S) و عدم وجود ریبوزوم‌های کلروپلاست (16S و 23S) بیشتر است (Gaafar et al., 2021). مطالعات مولکولی مانند

مطابق یافته‌های جدول ۳، غلظت یا بازده RNA به‌دست آمده از دستگاه بایوآنالایزر کارایی روش به‌کاررفته را نشان می‌دهد که 333 ± 15 نانوگرم RNA در میکرولیتر از بافت ریشه تحت تنش کادمیوم و 463 ± 43 نانوگرم RNA در میکرولیتر از بافت ریشه شاهد به دست آمد. کاهش غلظت RNA برای نمونه ریشه تحت تنش در مقایسه با نمونه شاهد مشاهده شد که این نتیجه قابل‌انتظار بود، زیرا کادمیوم می‌تواند باعث تخریب اسیدهای نوکلئیک در نتیجه مرگ سلولی و همچنین تغییر در محتوای شیمیایی سلول‌ها شود (Shivakrishna et al., 2018). یافته‌های حاصل از یکپارچگی RNA بین $6/3$ تا $9/05$ متغیر بود که بیشترین عدد یکپارچگی مربوط به ریشه شاهد و کمترین آن مربوط به نمونه مخلوط RNA برگ و ریشه بود. برخلاف بافت

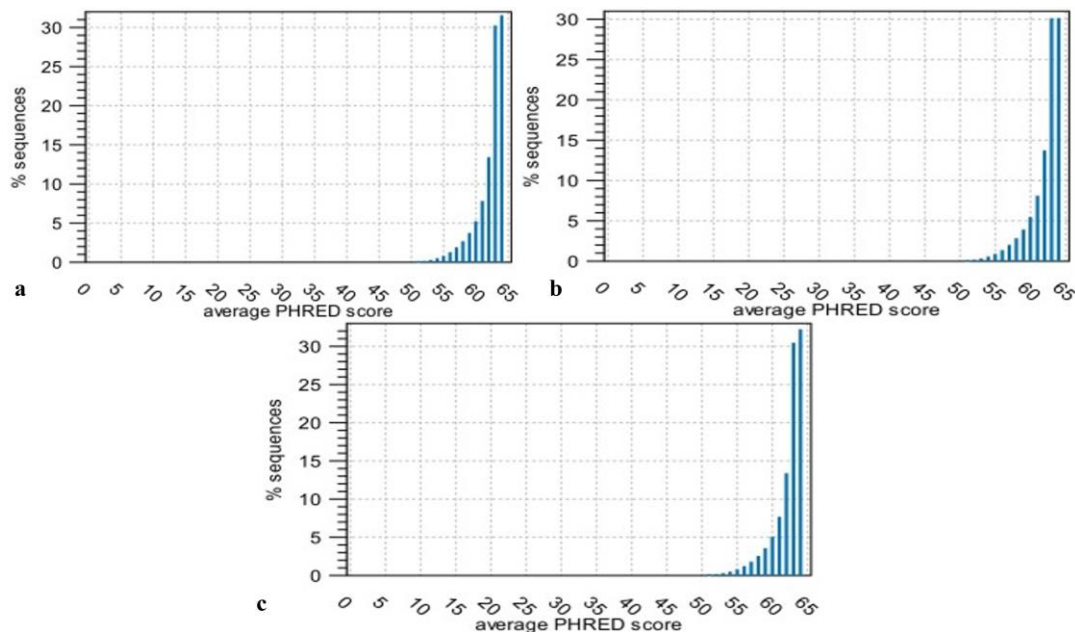
۳۰٪ از تجزیه و تحلیل ترنسکریپتوم کنار گذاشته می‌شوند (Wilhelm et al., 2010; Endrullat et al., 2016). کیفیت توالی خوانش‌ها بر اساس امتیاز Phred محاسبه می‌شود که از نظر لگاریتمی با احتمال خطای خوانش بازها در توالی‌یابی مرتبط است. به عبارتی امتیاز کیفی بالاتر نشان‌دهنده خطای توالی‌یابی کمتر است (Moazzam Jazi et al., 2015). تولید حدود ۴۴ میلیون خوانش با طول ۵۰ باز و ۱۰۵ میلیون خوانش جفتی با طول ۱۰۰ باز با بیشترین امتیاز Phred برابر با ۶۴ حاکی از دقت خوانش بازها است که می‌تواند نشان‌دهنده کیفیت بالای RNA استخراج‌شده برای آماده‌سازی کتابخانه و توالی‌یابی باشد (شکل ۳).

RNA-Seq معمولاً از نمونه‌های RNA با حداقل $RIN > 7$ برای اطمینان از کیفیت توالی استفاده می‌کنند. باین‌حال، همان‌طور که قبلاً بحث شد، حتی برای نمونه‌های حاوی کلروفیل با کیفیت و یکپارچگی بالا، RIN ممکن است به‌درستی محاسبه نشود و در این موارد پارامترهای دیگر از جمله غلظت نمونه نیز باید لحاظ شوند (Sheng et al., 2017).

نتایج توالی‌یابی به فرمت FASTQ است که به‌طور فشرده یک امتیاز کیفی را برای هر باز ذخیره می‌کند و بنابراین می‌توان از آن برای فیلتر کردن توالی‌های نادرست استفاده کرد. به‌طور معمول توالی‌های با میانگین امتیاز کیفی کمتر از

جدول ۳. میانگین عدد یکپارچگی و غلظت RNA گاوزبان اروپایی توسط دستگاه بایوآنالایزر پیش از توالی‌یابی RNA
Table 3. The mean of integrity number and RNA concentration of borage by the Bioanalyzer before RNA sequencing

نمونه Sample	بافت Tissue	عدد یکپارچگی RNA RNA Integrity Number (RIN)	غلظت RNA RNA concentration (ng.µl ⁻¹)
شاهد Control	ریشه Root	9.05±0.05	463±43
تنش کادمیوم Cadmium stress	ریشه Root	8.6±0.3	333±15
شاهد و تنش کادمیوم Control and Cadmium stress	ریشه و برگ Root and leaf	6.3	1122.445



شکل ۳. توزیع کیفی خوانش نمونه‌های گاوزبان اروپایی حاصل از توالی‌یابی Illumina HiSeq 2000: (a) ریشه گیاه شاهد، (b) ریشه گیاه در معرض تنش کادمیوم، (c) مخلوط RNA ریشه و برگ

Fig. 3. Read quality distributions of borage root samples from Illumina HiSeq 2000 sequencing (a) Root of control plant, (b) Root of plant exposed to cadmium stress, (c) Mixture of root and leaf RNA

جداسازی موفقیت‌آمیز RNA کل به‌منظور NGS هنگام کار با انواع جدید بافت یا گونه‌هایی که قبلاً مطالعه نشده، هستند. علاوه بر این در بررسی بیش از شش صد ترنسکرپتوم نشان دادند که بهینه‌سازی یکپارچگی RNA و خلوص آن اندازه رونوشت‌های چیدمان شده را بهبود می‌بخشد (Johnson et al., 2012).

نتیجه‌گیری نهایی

جداسازی RNA با کیفیت بالا از گاو زبان اروپایی پیش‌نیازی برای انجام مطالعات ترنسکرپتوم و روشن کردن مکانیسم‌های مولکولی پاسخ به تنش‌های زیست‌محیطی و بیوسنتز متابولیت‌های ثانویه است. پروتکل بهینه‌شده در مطالعه حاضر (روش RNX-Plus تغییر یافته) روشی ساده، سریع و مؤثر برای جداسازی RNA کل از بافت ریشه و برگ گاو زبان اروپایی با سطوح مختلف پلی‌ساکاریدها، پلی‌فنل‌ها و متابولیت‌های ثانویه است و به‌جز تهیه اتانول و لیتیم کلراید نیازی به مراحل آماده‌سازی بافر پیش از استخراج ندارد. همچنین مشخص شد که این روش برای جداسازی RNA یکپارچه از بافت‌های گیاه گاو زبان که در معرض انواع مختلف تنش‌ها به‌خصوص تنش کادمیوم باشند، بدون هیچ تأثیری بر کاربردهای زیست‌شناسی مولکولی پایین‌دست، مناسب است.

نتایج کیفی توالی‌یابی RNA مخلوط برگ و ریشه نیز علی‌رغم RIN برابر با ۶/۳، مطلوب بود. مطابق با نتایج ما در مطالعه گیاه *Psidium guajava* تعداد دوازده نمونه RNA برگ با $RIN < 7$ بر روی پلتفرم Illumina توالی‌یابی شد که خوانش‌های با کیفیت بالا به دست آمد (Carpinetti et al., 2021). همچنین به دلیل مناسب و یکسان بودن کیفیت دو مجموعه داده توالی‌یابی RNA ریشه گاو زبان اروپایی در شرایط بدون تنش (شاهد) و تحت تنش کادمیوم می‌توان بیان کرد که RNA استخراج‌شده با استفاده از روش تغییر یافته پیشنهادی قابل قبول بوده و برای مطالعات حساس پایین‌دستی از جمله RT-PCR و آنالیز RNA-seq این گیاه مناسب است. در توالی‌یابی ترنسکرپتوم پسته تحت تنش شوری RNA استخراج‌شده به روش بهبود یافته مبتنی بر CTAB امتیاز کیفی ۳۸ را برای توالی‌های حاصل گزارش کردند و بر اساس این میزان امتیاز، کیفیت RNA به‌دست‌آمده را برای ساخت کتابخانه و توالی‌یابی مناسب عنوان کردند (Moazzam Jazi et al., 2015).

در پژوهش حاضر بافر استخراج آماده RNX-Plus مورد بررسی از نظر انجام مراحل پروتکل سریع و راحت بود. جانسون و همکاران (Johnson et al., 2012) نیز گزارش کردند که استفاده از کیت‌های موجود تجاری و پروتکل‌های ترکیبی که به راحتی اجرا می‌شوند، کارآمدترین روش برای

منابع

- Aboutalebi, S., Zare, N., Sheikhzadeh, P., 2023. Physio-Biochemical Response of *Borago officinalis* L. Roots to Cadmium Toxicity. Russian Journal of Plant Physiology. 70, 1-11. <https://doi.org/10.1134/S1021443722601781>
- Asadi-Samani, M., Bahmani, M., Rafieian-Kopaei, M., 2014. The chemical composition, botanical characteristic and biological activities of *Borago officinalis*: a review. Asian Pacific journal of tropical medicine. 7, 22-28. [https://doi.org/10.1016/S1995-7645\(14\)60199-1](https://doi.org/10.1016/S1995-7645(14)60199-1)
- Carpinetti, P.D.A., Fioresi, V.S., Ignez da Cruz, T., de Almeida, F.A.N., Canal, D., Ferreira, A., Ferreira, M.F.D.S., 2021. Efficient method for isolation of high-quality RNA from *Psidium guajava* L. tissues. PloS one. 16, 1-19. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0255245>
- Chomczynski, P., Wilfinger, W., Kennedy, A., Rymaszewski, M., Mackey, K., 2010. RNAzol® RT: a new single-step method for isolation of RNA. Nature Methods. 7, 4-5. <https://doi.org/10.1038/nmeth.f.315>
- Deepa, K., Sheeja, T.E., Santhi, R., Sasikumar, B., Cyriac, A., Deepesh, P.V., 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, 263-271. <https://doi.org/10.1007/s12298-013-0218-y>
- Endrullat, C., Glökler, J., Franke, P., Frohme, M., 2016. Standardization and quality management in next-generation sequencing. Applied & translational genomics. 10, 2-9. <https://doi.org/10.1016/j.atg.2016.06.001>

- Gaafar, A.R.Z., Al-Qurainy, F., Alshameri, A., Khan, S., Nadeem, M., Tarroum, M., Alansi, S., Shaikhaldein, H.O., Salih, A.M., Arrak Alenezi, N., 2021. High RNA quality extracted from the tolerant crop *Cyamopsis tetragonoloba* L. despite possession of low RNA integrity number. *Biotechnology and Biotechnological Equipment*. 35, 608-618. <https://doi.org/10.1080/13102818.2021.1910567>
- Garg, R., Jain, M., 2013. RNA-Seq for transcriptome analysis in non-model plants. In: Ray, J.R. (eds.), *Legume Genomics: Methods and Protocols*, Methods in Molecular Biology. Humana Press, Totowa, NJ, pp. 43-58. https://doi.org/10.1007/978-1-62703-613-9_4
- Healey, A., Furtado, A., Cooper, T., Henry, R.J., 2014. Protocol: a simple method for extracting next-generation sequencing quality genomic DNA from recalcitrant plant species. *Plant methods*. 10, 1-8. <https://doi.org/10.1186/1746-4811-10-21>
- Hoagland, D.R., Arnon, D.I., 1950. The water-culture method for growing plants without soil. *California agricultural experiment station*. 347, 1-32. <http://hdl.handle.net/2027/uc2.ark:/13960/t51g1sb8j>
- Johnson, M.T., Carpenter, E.J., Tian, Z., Bruskiwich, R., Burris, J.N., Carrigan, C.T., Chase, M.W., Clarke, N.D., Covshoff, S., Depamphilis, C.W., Edger, P.P., 2012. Evaluating methods for isolating total RNA and predicting the success of sequencing phylogenetically diverse plant transcriptomes. *PLoS one*. 7, 1-12. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0050226>
- Kováčik, J., Klejdus, B., Štokr, F., Hedbavny, J., 2011. Nitrate deficiency reduces cadmium and nickel accumulation in chamomile plants. *Journal of agricultural and food chemistry*. 59, 5139-5149. <https://doi.org/10.1021/jf104793b>
- Laksana, C., Chanprame, S., 2015. A simple and rapid method for RNA extraction from young and mature leaves of oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.). *ISSAAS*. 21, 96-106.
- Leng, Y., Li, Y., Wen, Y., Zhao, H., Wang, Q., Li, S.W., 2020. Transcriptome analysis provides molecular evidences for growth and adaptation of plant roots in cadmium-contaminated environments. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 204, 98-111. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2020.111098>
- Liu, L., Han, R., Yu, N., Zhang, W., Xing, L., Xie, D., Peng, D., 2018. A method for extracting high-quality total RNA from plant rich in polysaccharides and polyphenols using *Dendrobium huoshanense*. *PLoS One*. 13, 1-9. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0196592>
- Masoomi-Aladizgeh, F., Aalami, A., Esfahani, M., Aghaei, M.J., Mozaffari, K., 2015. Identification of CBF14 and NAC2 genes in *Aegilops tauschii* associated with resistance to freezing stress. *Applied biochemistry and biotechnology*. 176, 1059-1070. <https://doi.org/10.1007/s12010-015-1629-8>
- Moazzam Jazi, M., Rajaei, S., Seyedi, S.M., 2015. Isolation of high quality RNA from pistachio (*Pistacia vera* L.) and other woody plants high in secondary metabolites. *Physiology and Molecular Biology of Plants*. 21, 597-603. <https://doi.org/10.1007/s12298-015-0319-x>
- Muoki, R.C., Paul, A., Kumari, A., Singh, K., Kumar, S., 2012. An improved protocol for the isolation of RNA from roots of tea (*Camellia sinensis* L.) O. Kuntze. *Molecular biotechnology*. 52, 82-88. <https://doi.org/10.1007/s12033-011-9476-5>
- Nadiya, F., Anjali, N., Gangaprasad, A., Sabu, K.K., 2015. High-quality RNA extraction from small cardamom tissues rich in polysaccharides and polyphenols. *Analytical biochemistry*. 485, 25-27. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2015.05.017>
- Opel, K.L., Chung, D., McCord, B.R., 2010. A study of PCR inhibition mechanisms using real time PCR. *Journal of forensic sciences*. 55, 25-33. <https://doi.org/10.1111/j.1556-4029.2009.01245.x>
- Rodrigues, S.M., Soares, V.L., De Oliveira, T.M., Gesteira, A.S., Otoni, W.C., Costa, M.G., 2007. Isolation and purification of RNA from tissues rich in polyphenols, polysaccharides, and pigments of annatto (*Bixa orellana* L.). *Molecular biotechnology*. 37, 220-224. <https://doi.org/10.1007/s12033-007-0070-9>
- Rodríguez-Serrano, M., Romero-Puertas, M.C., Sparkes, I., Hawes, C., Luis, A., Sandalio, L.M., 2009. Peroxisome dynamics in Arabidopsis plants under oxidative stress induced by cadmium. *Free Radical Biology and Medicine*. 47, 1632-1639. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2009.09.012>

- Rubio-Piña, J.A., Zapata-Pérez, O., 2011. Isolation of total RNA from tissues rich in polyphenols and polysaccharides of mangrove plants. *Electronic journal of Biotechnology*. 14, 11-19. <https://doi.org/10.2225/vol14-issue5-fulltext-8>
- Sheikhzadeh, P., Zare, N., Abootalebi, S., 2022. The effect of cadmium stress on photosynthetic pigments and secondary metabolites in borage (*Borago officinalis* L.). *Environmental Stresses in Crop Sciences*. 15, 1143-1160. [In Persian with English Summary] <https://doi.org/10.22077/escs.2021.4245.1996>
- Sheng, Q., Vickers, K., Zhao, S., Wang, J., Samuels, D.C., Koues, O., Shyr, Y., Guo, Y., 2017. Multi-perspective quality control of Illumina RNA sequencing data analysis. *Briefings in Functional Genomics*. 16, 194-204. <https://doi.org/10.1093/bfgp/elw035>
- Shivakrishna, P., Reddy, K.A., Rao, D.M., 2018. Effect of PEG-6000 imposed drought stress on RNA content, relative water content (RWC), and chlorophyll content in peanut leaves and roots. *Saudi journal of Biological Sciences*. 25, 285-289. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2017.04.008>
- Sinha, S., Saxena, R., 2006. Effect of iron on lipid peroxidation, and enzymatic and non-enzymatic antioxidants and bacoside-A content in medicinal plant *Bacopa monnieri* L. *Chemosphere*. 62, 1340-1350. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2005.07.030>
- Sultan, M., Amstislavskiy, V., Risch, T., Schuette, M., Dökel, S., Ralser, M., Balzereit, D., Lehrach, H., Yaspo, M.L., 2014. Influence of RNA extraction methods and library selection schemes on RNA-seq data. *BMC Genomics*. 15, 1-13. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-15-675>
- Vidović, M., Ćuković, K., 2020. Isolation of high-quality RNA from recalcitrant leaves of variegated and resurrection plants. *3 Biotech*. 10, 1-8. <https://doi.org/10.1007/s13205-020-02279-1>
- Wang, C., Hou, X., Qi, N., Li, C., Luo, Y., Hu, D., Li, Y., Liao, W., 2022. An optimized method to obtain high-quality RNA from different tissues in *Lilium davidii* var. unicolor. *Scientific Reports*. 12, 1-11. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-06810-7>
- Wilhelm, B.T., Marguerat, S., Goodhead, I., Bähler, J., 2010. Defining transcribed regions using RNA-seq. *Nature Protocols*. 5, 255-266. <https://doi.org/10.1038/nprot.2009.229>
- Wilson, I.G., 1997. Inhibition and facilitation of nucleic acid amplification. *Applied and Environmental Microbiology*. 63, 3741-3751. <https://doi.org/10.1128/aem.63.10.3741-3751.1997>
- Xu, C., Li, Z., Wang, J., 2022. Temporal and tissue-specific transcriptome analyses reveal mechanistic insights into the *Solidago canadensis* response to cadmium contamination. *Chemosphere*. 292, 1-11. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.133501>
- Yang, X., Kang, Y., Liu, Y., Shi, M., Zhang, W., Fan, Y., Yao, Y., Li, H., Qin, S., 2021. Integrated analysis of miRNA-mRNA regulatory networks of potato (*Solanum tuberosum* L.) in response to cadmium stress. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 224, 1-11. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2021.112682>
- Yockteng, R., Almeida, A.M., Yee, S., Andre, T., Hill, C., Specht, C.D., 2013. A method for extracting high-quality RNA from diverse plants for next-generation sequencing and gene expression analyses. *Applications in Plant Sciences*. 6, 1-6. <https://doi.org/10.3732/apps.1300070>
- Yoshino, K., Nishijima, R., Kawakatsu, T., 2020. Low-cost RNA extraction method for highly scalable transcriptome studies. *Breeding Science*. 4, 1-6. <https://doi.org/10.1270/jsbbs.19170>
- Yu, D., Tang, H., Zhang, Y., Du, Z., Yu, H., Chen, Q., 2012. Comparison and improvement of different methods of RNA isolation from strawberry (*Fragria × ananassa*). *Journal of Agricultural Science*. 4, 51-56. <http://dx.doi.org/10.5539/jas.v4n7p51>
- Zhu, G., Xiao, H., Guo, Q., Zhang, Z., Zhao, J., Yang, D., 2018. Effects of cadmium stress on growth and amino acid metabolism in two Compositae plants. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 158, 300-308. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2018.04.045>