SID

فیلم های آموزشی

سامانه ویراستاری STES

بلاگ مرکز اطلاعات علمی

کارگاه های آموزشی

سرویس ترجمه تخصصی

سرویس های ویژه

کارگاه های آموزشی مرکز اطلاعات علمی جهاد دانشگاهی

کارگاه آنلاین آشنایی با پایگاه های اطلاعات علمی بین المللی و ترفند های جستجو

کارگاه آنلاین
پرپوزال نویسی و پایان نامه نویسی

کارگاه آنلاین
بررسی مقابله ای متون (مقدماتی)

Archive of SID

هفدهمین کنفرانس سراسری و پنجمین کنفرانس بین المللی زیست شناسی ایران

بهینه سازی استخراج RNA از گیاه دارویی درمنه (*Artemisia. sp*)

اعظم موسوی*[1]، مجید طالبی[2]، بدرالدین ابراهیم سید طباطبایی[2]
۱- دانشجوی کارشناسی ارشد بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه صنعتی اصفهان
۲- عضو هیئت علمی گروه بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه صنعتی اصفهان
*moosavi.azam@yahoo.com

چکیده: در سالهای اخیر *Artemisia annua* (درمنه)، به خاطر اندوپراکسید آرتمیزینین توجه زیادی را به خود جلب کرده است که امروزه به طور وسیعی به منظور درمان مالاریا استفاده می گردد. متاسفانه تولید آرتمیزینین در گیاه بسیار پایین است و سنتز شیمیایی آن نیز بسیار مشکل و پرهزینه است. در سالهای اخیر کوششهای زیادی در زمینه بهبود بیان ژنها و آنزیمهای دخیل در تولید آرتمیزینین در گیاه صورت گرفته است. به جهت بررسی میزان تغییرات بیان ژنهای تولید کننده آرتمیزینین در اثر عوامل یاد شده از واکنش زنجیره ای پلیمراز کمی در زمان حقیقی استفاده می گردد. استخراج RNA با توجه به فراوانی مواد بازدارنده در گیاه درمنه از جمله اساسی ترین مراحل بررسی بیان ژن می باشد. جداسازی اسید نوکلئیک با کیفیت بالا از بافت های گیاهی سرشار از پلی ساکارید ها و پلی فنول ها اغلب دشوار می باشد. جهت استخراج کل محتوی RNA از بافتهای مختلف *Artemisia* از کیت Triozol با پروتکل تغییر یافته استفاده گردید. از نمونه RNA استخراج شده، پس از حذف DNA ژنومی توسط آنزیم *DNaseI*، cDNA سنتز شد. نتایج بیانگر استخراج خوب RNA کل می باشد. اثر تداخلی DNA ژنومی با استفاده از آنزیم *DNaseI* حذف وکارایی این آنزیم با انجام واکنش زنجیره ای پلیمراز با آغازگر PAL تعیین گردید.

Abstract: During the latest years, *A. annua* L. has received increasing attention due to the fact that the plant produces the endoperoxide artemisinin, which today is widely used for the treatment of malaria. UnfortunatelyArtemisinin production in plants is very low and its chemical synthesis is also very difficult and expensive. In recent years great efforts in improving the expression of genes and enzymes involved in biosynthesis of Artemisinin in plant has been performed. To determine gene expression changes in Artemisinin production mentioned effects of real-time quantitative polymerase chain reaction is used. RNA extraction according to the frequency of inhibitory substances in the *Artemisia* is the most basic stages of gene expression. Isolation of high quality nucleic acids from plant tissues rich in polysaccharides and polyphenols is often difficult. The samples were taken from different tissues of *Artemisia* used for total RNA extraction with Triozol modified protocol kit. After removal of genomic DNA by the DNaseI enzyme, cDNA were synthesized from RNA samples. results indicate good total RNA extraction. Interference effect of genomic DNA with DNase enzyme removed and efficiency of this enzyme using polymerase chain reaction with PAL primers was determined.

www.SID.ir

Archive of SID

واژگان کلیدی: *Artemisia* ، استخراج RNA ، پلی فنل، واکنش زنجیره ای پلیمراز در زمان حقیقی

مقدمه

جنس Artemisia متعلق به خانواده Asteraceae (Compositea سابق) می باشد که شمار زیادی از گیاهان معطر را شامل می شود. در دهه های اخیر *Artemisia annua* (افسنطین شیرین یا یکساله) که در فارسی درمنه نام دارد، به خاطر اندوپراکسید آرتمیزینین که یک لاکتون سسکوئیترپن است توجه زیادی را به خود جلب کرده است که امروزه به طور وسیعی به منظور درمان مالاریا استفاده می گردد[۱۱]. درمنه یک گیاه علفی یکساله بومی آسیاست اما امروزه در بسیاری از نقاط جهان گسترده شده و چندین قرن در طب سنتی چین برای درمان تب استفاده می شده است[۲ و ۵]. بیشتر ترکیبات فیتوشیمیایی *A.annua* از ترپنوئیدها (بخصوص سسکوئیترپن لاکتون)، فلاونوئیدها، کومارین ها، و دیگر متابولیتهای شیکیمات تشکیل شده است[۲]. خاصیت ضد مالاریایی عصاره *A.annua* در چین در سال ۱۹۷۲ کشف شد و آرتمیزینین به عنوان ماده اصلی معرفی شد[۵].

در کشورهای در حال توسعه و کم درآمد، مالاریا پنجمین بیماری عفونی شایع و دهمین عامل مرگ سراسری است[۱۲]. هر سال بیش از ۵۰۰ میلیون مورد جدید از مالاریا رخ می دهد که منجر به یک تا دو میلیون مرگ به خصوص در کودکان زیر پنج سال می گردد[۹]. آرتمیزینین یک پل ضروری اندوپراکسید برای جلوگیری از فعالیت عامل مالاریا (*Plasmodium flasiparum* و *Plasmodium vivax*) ایجاد می کند. اخیرا آرتمیزینین برای استفاده در برابر عامل مولد مالاریای مقاوم به دارو *P. flasiparum* استفاده می شود[۵]. آرتمیزینین و مشتقات آن با ظهور انگلهای مقاوم به دارو با رشد سریع و تصاعدی مالاریا مقابله می کنند و به عنوان داروی اصلی ضد مالاریا هستند [۱] و همچنین فعالیت آن در برابر بسیاری از ویروسها مانند *Toxoplasma gondii* و *Pnuemocystis carinii* و بیماریهای انگلی گرمسیری مانند شیستوزوما (گونه ای کرم نواری خون)، لیشمانیا (انگل سالک)، بیماری شاگاس و بیماری خواب آفریقایی [۱۲] و نیز در برابر تعداد زیادی از سرطانها مانند لوسمی انسانی، سرطان سینه، سرطان روده بزرگ و سرطان سلول کوچک ریه گزارش شده است[۹].

در حال حاضر *A.annua* تنها منبع تولید تجاری آرتمیزینین است. آرتمیزینین یک متابولیت ثانویه گیاهی با ساختار ایزوپرنوئید است و در اندامهای هوایی گیاه تولید شده و در غده های ترشحی برگها تجمع می کند[۵].

متاسفانه تولید آرتمیزینین در گیاه بسیار پایین است (٪۱/۰-٪۱ وزن خشک) و سنتز شیمیایی آن نیز بسیار مشکل و پرهزینه است. در سالهای اخیر کوششهای زیادی در زمینه بهبود تولید آرتمیزینین در گیاه و نیز

www.SID.ir

Archive of SID

مطالعات زیادی در زمینه معرفی ژنها و آنزیمهای دخیل در بیوسنتز آرتمیزینین صورت گرفته است[۵]. از اینرو افزایش محتوای آرتمیزینین در *A.annua* باعث کاهش قیمت و افزایش عرضه آن می گردد[۹]. استراتژیهایی در جهت افزایش تجمع آرتمیزینین در گیاهان و همچنین برای افزایش محصول در واحد سطح ایجاد شده اند که بازدهی تولید را بالا می برد. تولید آرتمیزینین در قسمتهایی از گیاه *A.annua* تنها تحت تاثیر ژنوتیپ نیست بلکه تحت تاثیر فاکتورهای محیطی، پرتوتابی، تنش شوری و تنش سرمایی نیز قرار می گیرد. به علاوه فیتو هورمونهایی مانند اسید آبسیزیک و اسید سالسسیلیک که در پاسخهای دفاعی گیاه دخیل هستند در تجمع آرتمیزینین نقش مهمی ایفا می نمایند[۱].

به جهت بررسی میزان تغییرات بیان ژنهای تولید کننده آرتمیزینین در اثر عوامل یاد شده از واکنش زنجیره ای پلیمراز کمی در زمان حقیقی استفاده می گردد[۱۰]. واکنش (Real-time PCR) به عنوان حساسترین روش برای سنجش الگوی بیان ژن به کار می رود که نقش مهمی در تحقیقات بیولوژیکی اخیر دارد[۳]. بزرگترین مزیت آن این است که حساسیت و اختصاصیت بیشتر و دامنه کمیت سنجی وسیعتری از تکنیکهای مولکولی قبلی دارد[۶].

استخراج RNA با توجه به فراوانی مواد بازدارنده در گیاه درمنه از جمله اساسی ترین مراحل بررسی بیان ژن می باشد. جداسازی اسید نوکلئیک با کیفیت بالا از بافت های گیاهی سرشار از پلی ساکارید ها و پلی فنول ها اغلب دشوار می باشد. ترکیبات پلی فنولی (خصوصا تانن ها) به راحتی اکسید شده و منجر به شکل گیری کوئینون می گردند که می تواند به صورت برگشت ناپذیری به پروتئین ها و اسیدهای نوکلئیک متصل شده و کمپلکس های دارای وزن مولکولی بالا ایجاد نماید[۸]. پلی ساکاریدها نیز تمایل دارند در محیط های بافری با توان یونی کم همراه با اسید های نوکلئیک رسوب نمایند[۴]. این آلودگی ها می توانند به شدت در کار آنزیم هایی همچون رونوشت بردار معکوس و پلی مراز تداخل ایجاد نمایند[۷].

هدف از این تحقیق بررسی نتایج استخراج RNA از بافت های مختلف و فراهم کردن زمینه بررسی بیان ژنهای مرجع در جنس های مختلف Artemisia می باشد.

مواد و روشها

بذرهای گونه های مختلف Artemisia از جمله *A.annua* ، *A.siberi* ، *A.druncutula* و *A.aucheri* در محیط کشت پایه MS کشت شدند. بعد از اینکه به مرحله چند برگی رسیدند از محیط کشت خارج و در گلدان حاوی دو قسمت خاک یک قسمت ماسه و یک قسمت کود حیوانی کشت گردیدند تا به مرحله رشد فعال وارد شدند. سپس نمونه گیری از بافتهای مختلف انجام گرفت و نمونه ها در فریزر ۸۰- نگهداری شد. جهت استخراج کل محتوی RNA از کیت Triozol با پروتکل تغییر یافته استفاده گردید. بدین صورت که از بتامرکاپتواتانول و PVP نیز استفاده گردید. کمیت و کیفیت RNA استخراج شده بوسیله اسپکتوفتومتر اندازه گیری شد. سپس از نمونه RNA استخراج شده با استفاده از کیت شرکت Promega

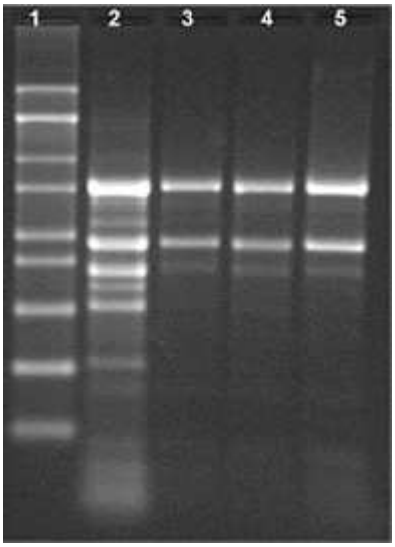
www.SID.ir

Archive of SID

،پس از حذف DNA ژنومی توسط آنزیم DNaseI، cDNA سنتز شد و

نتایج و بحث

به منظور استخراج RNA از بافتهای گیاه درمنه از روش تغییر یافته پروتکل ترایزول استفاده شد، چون پروتکل های مختلف ترایزول بدین منظور قابل استفاده نبود و حتی در استفاده از کیت بایوزول نیز که در گیاهان با مواد فنلی بالا جوابگوست باز هم مواد فنلی آزاد می گردید و استخراج RNA ناموفق بود. روش حیدری و همکاران که از CTAB برای استخراج RNA استفاده می کند نیز کاراست منتها کمیت RNA استخراجی زیاد نیست. البته لازم به ذکر است که بافتهای به کار رفته باید سالم و سبز باشند بافت کلرزه و زرد رنگ به دلیل برخورداری از مقدار زیاد آنزیم RNase منجر به عدم استخراج RNA خواهد شد.آلودگی های پلی ساکاریدی و پلی فنولی می توانند به شدت در کار آنزیمهایی همچون رونوشت بردار معکوس و پلیمراز تداخل ایجاد نمایند(۸). نتایج بررسی کمیت و کیفیت RNA در این تحقیق حاکی از کیفیت و کمیت مطلوب RNA کل استخراج شده بود.



الکتروفورز RNA استخراج شده بر روی ژل آگارز ۱٪

اثر تداخلی DNA ژنومی با استفاده از آنزیم DNase حذف ونتایج وکارایی این آنزیم با انجام واکنش زنجیره ای پلیمراز با آغازگر PAL تعیین گردید. نتایج این مرحله نشان داد که ندیدن باند DNA ژنومی دلیلی قطعی بر عدم آلودگی RNA به DNA ژنومی نمی باشد.چرا که ممکن است بر روی ژل الکتروفورز آگارز باند DNA ژنومی را مشاهده نکنیم اما اگر از آنزیم DNase استفاده نکنیم در محصول PCR نمونه های RNA، باند می بینیم. اما در این مورد چنین چیزی مشاهده نشد. پس از حذف آلودگی DNA ژنومی از RNA استخراجی نسبت به ساخت cDNA دورشته ای اقدام گردید.

همچنین با توجه به اینکه محصول حاصل از تکثیر نمونه RNA با محصول حاصل از تکثیرDNA ژنومی در مورد برخی ژنها می تواند هم اندازه باشد، بنابراین تفکیک

www.SID.ir

Archive of SID

نتایج بر اساس اندازه باند نمی تواند شاخص مناسبی برای تشخیص آلودگی باشد.

مراجع

[1]**Banyai, W., Mii, M and Supaibulwatana, K. 2011.** Enhancement of artemisinin content and biomass in *Artemisia annua* by exogenous GA3 treatment. *Plant Growth Regul*. 63: 45–54.

[2]**Brown, G. D. 2010.** The biosynthesis of artemisinin (Qinghaosu) and the phytochemistry of *Artemisia annua* L. (Qinghao). *Molecules*. 15: 7603-7698.

[3]**Bustin, S. A. 2002.** Absolute quantification of mRNA using realtime reverse transcription polymerase chain reaction assays. *J. Mol. Endocrinol*. 25: 169–193.

[4]**Carra, A., Gambino, G and Schubert, A. 2007.** A cetyltrimethylammonium bromide based method to extract low-molecularweight RNA from polysaccharide-rich plant tissues. Analytical Biochemistry, 360, 318–320.

[5]**Durante, M., Caretto, S., Quarta, A., De Paolis, A., Nisi, R and Mita, G. 2011.** β-Cyclodextrins enhance artemisinin production in *Artemisia annua* suspension cell cultures. *Appl. Microbiol. Biotechnol*. 90: 19

[6]**Gachon, C., Mingam, A and Charrier, B. 2004.** Real-time PCR: What relevance to plant studies?. *J. Exp. Bot*. 55(402):1445–1454. 05–1913.

[7]**Heidari Japelaghi, R. Haddad , R and Garoosi, G. A. 2011.** Rapid and efficient isolation of high quality nucleic acids from plant tissues rich in polyphenols and polysaccharides. Mol Biotechnol.

[8]**Iandolino, A. B., Goes Da Silva, F., Lim, H., Choi, H., Williams, L. E and Cook, D. R. 2004.** High-quality RNA, cDNA and derived EST libraries from grapevine (Vitis vinifera L.). Plant Molecular Biology Reporter, 22, 269–278.

[9]**Lei, C., Ma, D., Pu, G., Qiu, X., Du, Z., Wang, H., Li, G., Ye. H and Liu, B. 2011.** Foliar application of chitosan activates artemisinin biosynthesis in *Artemisia annua L. Industrial Crops and Products*. 33: 176–182.

[10]**Liu, D., Zhanga, L., Lia, C., Yanga, K., Wanga, Y., Sunb, X and Tang, K. 2010.** Effect of wounding on gene expression involved in artemisinin biosynthesis and artemisinin production in *Artemisia annua*. *Russian J. Plant Physiol*. 57(6): 882–886.

[11]**Olofsson, L., Engström, A., Lundgren, A and Brodelius, P. E. 2011.** Relative expression of genes of terpene metabolism in different tissues of *Artemisia annua* L. *BMC Plant Biology*. 11: 45.

[12]**Weathers, P. J., Arsenault, P. R.,**

www.SID.ir

Archive of SID

Covello, P. S., McMickle, A., Teoh, K. H and Reed, D. W. 2011. Artemisinin production in *Artemisia annua*: studies in planta and results of a novel delivery method for treating malaria and other neglected diseases. *Phytochem. Rev*. 10: 173–183.

www.SID.ir

SID

فیلم های آموزشی

سامانه ویراستاری STES

بلاگ مرکز اطلاعات علمی

کارگاه های آموزشی

سرویس ترجمه تخصصی

سرویس های ویژه

کارگاه های آموزشی مرکز اطلاعات علمی جهاد دانشگاهی

کارگاه آنلاین آشنایی با پایگاه های اطلاعات علمی بین المللی و ترفند های جستجو

کارگاه آنلاین
پرپوزال نویسی و پایان نامه نویسی

کارگاه آنلاین
بررسی مقابله ای متون (مقدماتی)