

# 25<sup>ο</sup> Συνέδριο

## Ελληνικής Εταιρείας

# Επιστήμης Οπωροκηπευτικών



01-04 Κύπρος  
Νοεμβρίου Λεμεσός



Τεύχος Περιλήψεων

**ΣΥΓΚΡΙΣΗ ΔΙΑΦΟΡΕΤΙΚΩΝ ΜΕΘΟΔΩΝ ΑΠΟΜΟΝΩΣΗΣ RNA ΑΠΟ ΜΙΚΡΕΣ ΠΟΣΟΤΗΤΕΣ ΚΑΡΠΟΥ ΕΛΙΑΣ**Α. Γεωργιάδου<sup>1</sup>, Χ. Μιχαηλίδης<sup>2</sup>, Γ.Α. Μαγγανάρης<sup>1</sup> & Β. Φωτόπουλος<sup>1</sup><sup>1</sup>Τμήμα Γεωπονικών Επιστημών, Βιοτεχνολογίας & Επιστήμης Τροφίμων, Τεχνολογικό Πανεπιστήμιο Κύπρου, 3603 Λεμεσός<sup>2</sup>Τμήμα Επιστημών Υγείας, Πανεπιστήμιο Λευκωσίας, Λεωφόρος Μακεδονίτισσας 46, 1700 Λευκωσία

Ευαίσθητες τεχνικές μεταγραφικής ανάλυσης, όπως η αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (qPCR) και άλλες προηγμένες τεχνικές γενωμικής ανάλυσης, απαιτούν RNA υψηλής ποιότητας, καθώς επίσης και επαναληψιμότητα ανάμεσα στις απομονώσεις δειγμάτων του ίδιου ιστού. Αν και υπάρχουν αρκετά πρωτόκολλα για απομόνωση RNA από καρπούς ελιάς (*Olea europaea* L.), είναι σχετικά περιορισμένος ο αριθμός δημοσιευμένων εργασιών οι οποίες συγκρίνουν διαφορετικές τεχνικές και αντιδραστήρια για τη βέλτιστη εξαγωγή RNA από μικρές ποσότητες φυτικού ιστού. Στην παρούσα εργασία παρουσιάζεται η εκχύλιση RNA από τον καρπό της ελιάς με διάφορες μεθόδους, όπως με τη χρήση του αντιδραστηρίου τριζόλης, την απομόνωση και κατακρήμνιση με χλωριούχο λίθιο (LiCl) και άλλες συνδυαστικές μεθόδους, με απώτερο σκοπό την εκτίμηση της ποιότητας/ποσότητας και απόδοσης του RNA για βελτιστοποίηση του τελικού πρωτοκόλλου. Η εκτίμηση της ποιότητας του RNA έγινε μέσω της αντίδρασης αντίστροφης μεταγραφής και της περαιτέρω ανάλυσης με PCR, χρησιμοποιώντας διάφορα δομικά γονίδια αναφοράς (*β-actin II*, *EF-1*, *18S* και *GAPDH*). Προηγούμενα πρωτόκολλα έδειχναν χαμηλή ικανότητα εξαγωγής RNA και παρουσίαζαν είτε πρόσμιξη σε DNA ή μερική αποικοδόμηση του RNA, οδηγώντας σε αναστολή της αντίδρασης αντίστροφης μεταγραφής και των μετέπειτα μοριακών αναλύσεων. Η προτεινόμενη μέθοδος βελτιστοποιήθηκε ειδικά για ιστούς με υψηλή περιεκτικότητα σε πολυσακχαρίτες και φαινολικούς δευτερογενείς μεταβολίτες, που συχνά κατακρημνίζονται μαζί με το RNA και αναστέλλουν την μετέπειτα αντίστροφη μεταγραφή του. Ο απώτερος σκοπός ήταν η απομόνωση υψηλών συγκεντρώσεων RNA από μικρές ποσότητες ιστού και η απομάκρυνση των παραπάνω ενώσεων-παρεμποδιστών. Το τροποποιημένο πρωτόκολλο της παρούσας μελέτης βασίστηκε σε πολλαπλές εκχυλίσεις με φαινόλη και/ή χλωροφόρμιο και τη διαδικασία κατακρήμνισης με βάση το οξικό νάτριο/αιθανόλη, δίνοντας υψηλής ποιότητας και αυξημένης ποσότητας RNA καθώς επίσης και υψηλή επαναληψιμότητα ανάμεσα σε ανεξάρτητες εκχυλίσεις RNA.