**مجله میکروب شناسی پزشکی ایران**
**سال ۳ شماره ۴ زمستان ۱۳۸۸، صفحات ۱۴- ۹**

# استخراج RNA از سلول‌های بیوفیلم *استرپتوکوکوس موتانس*

آرزو طهمورث پور[۱*]، رسول صالحی[۲] ، روحا کسری کرمانشاهی[۳] ، گیلدا اسلامی [۴]

۱) گروه میکروب شناسی ، دانشکده علوم پایه پزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی ، واحد خوراسگان اصفهان
۲) گروه ژنتیک ، دانشکده علوم پایه پزشکی ، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان
۳) گروه میکروب شناسی، دانشکده علوم ، دانشگاه الزهرا تهران
۴) گروه انگل شناسی ، دانشکده علوم پایه پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی یزد
نویسنده رابط: آرزو طهمورث پور، گروه میکروب شناسی ، دانشکده علوم پایه پزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی ، واحد خوراسگان اصفهان
تلفن:۰۳۱۱-۶۲۷۸۳۱۴ arezootahmourespour@gmail.com

تاریخ دریافت مقاله : ۸۸/۷/۵ تاریخ پذیرش مقاله : ۸۸/۱۲/۱۵

## چکیده:

**زمینه و اهداف**: استخراج RNA با کمیت و کیفیت مناسب جهت reverse transcriptas PCR ، هیبریدیزاسیون در نورترن بلاتینگ و آنالیز بیان ژن با Real Time PCR از اهمیت بسیاری برخوردار است. در بیوفیلم *استرپتوکوکوس موتانس* پلی‌ساکاریدهای خارج سلولی محلول و غیر محلول تولید شده مانع استخراج RNA می‌شوند. لذا، بدون کاربرد روش مناسب برای حذف این پلی‌ساکاریدهاروش‌های مولکولی مبتنی بر RNA برای این باکتری‌ها مقدور نیست. هدف از این مطالعه استخراج RNA از سلول‌های بیوفیلم *استرپتوکوکوس موتانس* بود.

**روش بررسی:** برای استخراج RNA از سلول‌های تشکیل دهنده بیوفیلم، *استرپتوکوکوس موتانس* ATCC35668 و یک سویه *استرپتوکوکوس موتانس* جداسازی شده از پلاک دندانی استفاده شد. پس از تشکیل بیوفیلم در پلیت‌های میکروتیتر پلی استیرنی ۲۴ خانه‌ای استخراج RNA با ۳ روش انجام شد. ۱ : روش معمول استخراج RNA از سلول‌های پلانکتونیک با محلول RNX-Plus (سیناژن). ۲: کیت و دستگاه HYBAID Ribolyser و لوله‌های حاوی انواع دانه‌های شیشه‌ای، پلاستیکی و سرامیکی به منظور لیز بهتر سلول‌ها. ۳: تلفیقی از دو روش محلول RNX-Plus ، دستگاه HYBAID Rybolyser و لوله‌های حاوی انواع دانه. میانگین نسبت جذب نوری در ۲۸۰/ ۲۶۰نانومتر هر روش با نرم افزار excel و برآورد فاصله اطمینان توافقی از خطای استاندارد مقایسه شد.

**یافته ها:** نتایج نشان داد روش معمول برای استخراج RNA (روش ۱) از سلول‌های پلانکتونیک مناسب نیست. استفاده از دستگاه HYBAID ribolyser و لوله‌های حاوی دانه‌های شیشه‌ای، پلاستیکی و سرامیکی با شکل و اندازه متفاوت، حداکثر لیز سلولی رابدون آسیب به RNA ایجاد کرد. در روش‌های ۲و۳(دستگاه HYBAID ribolyser به تنهائی و همراه با محلول RNX-Plus ) میانگین نسبت جذب نوری حاصل از RNA استخراج شده تفاوت معنی دار آماری با روش معمول (روش ۱) نشان داد( $P<0.05$ ).

**نتیجه گیری :** فناوری‌های مناسب در حذف پلی ساکاریدها و ایجاد حداکثر لیز سلولی موثرتر از روش‌های معمول استخراج RNA از سلول‌های بیوفیلم است. اما، استفاده از دستگاه و محلول تجاری RNX plus (روش سوم) به دلیل استفاده از محلول‌های ارزان تر و قابل دسترس مناسب‌تر است.

**کلید واژه ها:** استخراج RNA, *استرپتوکوکوس موتانس* ، بیوفیلم

## مقدمه:

اعضاء گروه *استرپتوکوکوس موتانس* به عنوان عمده‌ترین عوامل اتیولوژیک تشکیل پلاک و پوسیدگی دندان شناخته شده‌اند (۳-۱). مطالعات بسیاری برای بررسی بیان ژن‌های باکتری‌ها در حالت پلانکتونیک انجام گرفته است. ولی از آنجا که سلول‌های تشکیل‌دهنده بیوفیلم با همتای پلانکتونیک خود متفاوت می‌باشند، نیاز به انجام مطالعات جداگانه برای بررسی خصوصیات و بیان ژن‌های سلول‌های تشکیل‌دهنده بیوفیلم می‌باشد(۴). برای اندازه‌گیری میزان بیان ژن از فنآوری‌های متعددی می‌توان استفاده نمود که یکی از قابل اعتمادترین و حساس ترین آنها real-time PCR (qRT_PCR) quantitative reverse transcriptase می‌باشد. این روش نیاز به RNA با مقدار مناسب و خلوص بالا دارد. لذا، استخراج RNA با کمیت مناسب و کیفیت قابل قبول از اهمیت بسیاری برخوردار است(۵). تا کنون گزارشات متعددی مبنی بر استخراج RNA از سلول‌های *استرپتوکوکوس موتانس* در شرایط پلانکتونیک ارائه شده است. ولی استخراج RNA از سلول‌های تشکیل دهنده بیوفیلم از پیچیدگی بیشتری برخوردار است و با روش‌های معمول استخراج از سلول‌های پلانکتونیک قابل اجرا نمی‌باشد. زیرا پلی ساکاریدهای لوان و دکستران خارج سلولی تولید شده، که در اتصال و تشکیل بیوفیلم باکتری نقش دارند، با فرایندهای استخراج اسید نوکلئیک تداخل داشته و مانع خروج این ترکیبات از داخل سلول می‌گردند (۶). در مطالعات مختلف روش‌هایی که برای استخراج RNA از سلول‌های بیوفیلم *استرپتوکوکوس موتانس* استفاده شده‌اند بر پایه استفاده از محلول‌های هموژنیزه کننده گران‌قیمت، یا تجهیزات خاصی از جمله دستگاه‌هایی مثل سونیکاتورها و یا افزودن دانه‌های مختلف برای لیز بیشتر سلولی می‌باشد(۶). سونیکاتور با تولید امواج شدید در اثر انفجار حباب‌های داخلی باعث پراکنده شدن سلول‌های بیوفیلم و پلی ساکاریدهای موجود درماتریکس بیوفیلم می‌گردد. درنتیجه محلول هموژنی حاصل می‌شود که پس از شستشو به راحتی پلی ساکاریدها از آن خارج‌می‌گردند و استخراج RNA بهتر صورت می‌گیرد. به‌علاوه، برای حداکثر لیز سلولی محققین از دستگاه‌های دیگری چون Fast prep cell disrupter نیز استفاده نموده‌اند (۷). در این مطالعه روش‌های متعدد استخراج RNA از سلول‌های بیوفیلم *استرپتوکوکوس موتانس* مقایسه شدند.

## مواد و روش‌ها:

آماده سازی سلول‌های بیوفیلم *استرپتوکوکوس موتانس*:

در این مطالعه از *استرپتوکوکوس موتانس* ATCC35668 و یک سویه *استرپتوکوکوس موتانس* جداشده از پلاک دندانی استفاده شد.

برای تشکیل بیوفیلم، ۲۰ میکرولیتر از کشت شبانه استرپتوکوک در Brain Heart Infusion broth (BHI) به چاهک‌های پلیت‌های میکروتیتر پلی استیرنی ۲۴ خانه‌ای اضافه شد. سپس ۲ ml از BHI براث تکمیل شده با ۱٪ سوکروز به چاهک‌ها اضافه شد و در شرایط ۳۷ درجه سانتی‌گراد و اتمسفر حاوی ۵٪ $CO_2$ به مدت ۱۸ ساعت گرماگذاری گردید. سپس محلول مواد غذایی و محیط کشت از چاهک‌ها خارج و هر چاهک با محلول بافر ( PBS) شستشو داده شد تا سلول‌های غیر متصل و سلول‌های دارای اتصال ضعیف از چاهک خارج شوند. سپس محیط کشت تازه به چاهک‌ها اضافه شد و به مدت ۱۸ ساعت دیگر در ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرماگذاری شد. دوباره محلول مواد غذایی خارج، چاهک‌ها شسته شد و سلول‌های بیوفیلم با ۲ ml از BHI براث حاوی ۱٪ سوکروز به مدت ۴ ساعت دیگر گرماگذاری گردید. سپس محلول خارج شد، چاهک‌ها شسته شد و سلول‌های بیوفیلم با کمک سواب استریل از ته میکروتیتر پلیت کنده و در PBS معلق شد. برای جدا شدن سلول‌ها از سواب، ورتکس کوتاهی انجام شد تا به صورت یکنواخت در PBS توزیع گردد (۷).

سلول‌ها در ۴۰۰۰ rpm به مدت ۱۰ دقیقه و در ۴ درجه سانتی گراد سانتریفوژ شد، و دو بار با PBS شسته شد. رسوب حاصله دوباره در PBS معلق و ورتکس شد تا هموژن و یکنواخت گردد.

استخراج **RNA** :

روش ۱:استفاده از محلول تجاری RNX-Plus (۸)

به طور خلاصه، ۱ ml از محلول RNX – Plus به۱۰۰ µl سوسپانسیون سلول‌ها اضافه شد و پس از مخلوط کردن، به مدت ۵ دقیقه در دمای اتاق قرار گرفت. سپس به ازاء هر ml ۱از محلول فوق ۲۰۰ µl کلروفرم افزوده شد و به مدت ۱۵ ثانیه به شدت تکان داده شد. ۵ دقیقه روی یخ قرار داده شد و سپس ۱۵ دقیقه در ۱۲۰۰۰ ×g در ۴ درجه سانتریفوژ گردید. فاز رویی به دقت به میکروتیوب جدید انتقال یافت و هم حجم آن

ایزوپروپانل افزوده شد و ۱۵ دقیقه در ۴ درجه قرار داده شد. سپس ۱۵ دقیقه در ۱۲۰۰۰ ×g در ۴ درجه سانتریفوژ گردید. مایع رویی خارج شد و رسوب حاصله با ۲۰۰ الی ۳۰۰ میکرولیتر از اتانول ۷۵٪ شستشو داده شد. سپس الکل را باکمک سمپلر تاحد امکان خارج نموده و رسوب حاوی RNA خشک گردید. RNA استخراج شده مورد بررسی کمی ( بررسی غلظت RNA با بیوفوتومتر) و کیفی (الکتروفورز) قرار گرفت(۹).

روش ۲ : استفاده از کیت و دستگاه HyBAID ribolyser و دانه‌های شیشه‌ای، پلاستیکی و سرامیکی با شکل واندازه‌های متفاوت.

به لوله ریبولایزر حاوی دانه‌ها ۵۰۰ µl ماده تثبیت کننده RNA، ۵۰۰ µl از فاز زیرین محلول فنل اسیدی و۱۰۰ µl کلروفرم ایزوآمیل الکل افزوده شد و به مدت ۱۰ دقیقه روی یخ قرار داده شد. از سوسپانسیون سلول‌ها در PBS (۱۰۰ mg ـ ۵۰ رسوب سلولی یا $10^9$ سلول باکتری) ۲۰۰ µl به لوله ریبولایزر افزوده شد. لوله ریبولایزر با حفظ توازن و تعادل به مدت ۳۰ ثانیه در دستگاه HYBAID ribolyser قرار داده شد و سرعت دستگاه با درجه ۶ تنظیم شد. این دستگاه با سرعت بسیار زیاد لوله‌ها را درجهت های مختلف حرکت می‌دهد. در اثر این حرکت دانه‌های داخل لوله‌ها که ترکیبی از دانه‌های کروی و با شکل نامنظم و از جنس های شیشه ، سرامیک یا پلاستیک هستند باعث حداکثر لیز سلولی در کوتاه‌ترین زمان یعنی بین ۲۰ تا ۴۰ ثانیه می‌گردد. انرژی وارد شده در اثر این چرخش دمای لوله را به میزان ۲۰ تا ۴۰ درجه سانتی گراد افزایش می‌دهد. این افزایش دما غیرفعال شدن نوکلئازها توسط دترجنت‌ها را تسهیل می‌کند ولی به RNA آسیبی نمی‌رساند. علاوه بر این افزایش دما کمک می‌کند که فنل داغ، به عنوان یک روش موثر شناخته شده در جداسازی RNA، استفاده گردد.

سپس لوله به مدت ۱ الی ۲ دقیقه روی یخ قرار می‌گیرد تا از گرمای آن کاسته شده و به دمای اتاق برسد.

محلول به میکروتیوب فاقد RNase انتقال یافته و به مدت ۱۵ دقیقه در ۱۰۰۰۰ ×g و در ۴ درجه سانتی گراد سانتریفوژ گردید، تا فازها جدا شوند. سپس فاز رویی با دقت بدون برخورد با فاز میانی خارج و به میکروتیوب جدید انتقال داده شد. پس از افزودن ۳۰۰ µl کلروفرم-ایزوآمیل الکل، محلول فوق به مدت ۱۰ ثانیه ورتکس گردید و ۲ دقیقه با سرعت بالا (۱۲۰۰۰ ×g) در ۴ درجه سانتی گراد سانتریفوژ شد تا دوباره فازها از یکدیگر جدا گردند. فاز رویی مجددا به میکروتیوب جدید انتقال یافت. در این مرحله ۵۰۰ µl از محلول DEPC Isopropanol Percipitation Solution به محلول فوق اضافه شد. پس از ۱ الی ۲ دقیقه به مدت ۵ دقیقه در ۱۲۰۰۰ ×g در ۴ درجه سانتی گراد سانتریفوژ شد تا RNA رسوب نماید. رسوب حاصله قابل مشاهده بود. شستشوی RNA رسوب نموده، ۲ بار هر بار با ۲۵۰ میکرولیتر محلول نمکی اتانول ۷۵٪ انجام شد. الکل با کمک سمپلر خارج شد و رسوب خشک گردید. به رسوب کاملا خشک RNA ، ۵۰ تا ۱۰۰ میکرولیتر از آب فاقد RNase (آب تیمار شده با DEPC) اضافه شد و به کمک چند بار پر و خالی کردن سمپلر کاملا حل گردید. برای حل شدن بهتر RNA، به مدت ۱۰ دقیقه در ۶۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. در این حال RNA استخراج شده مورد بررسی کمی و کیفی قرار گرفت(Cat no. RY66050).

روش ۳ : استفاده از محلول تجاری RNX-Plus با استفاده از دستگاه HyBAID ribolyser و لوله حاوی دانه‌های شیشه و سرامیکی (تلفیقی از دو روش ۱و۲).

به لوله ریبولایزر حاوی دانه‌ها، ۱ml از RNX-Plus، ۵۰۰ µl و ۲۰۰µl کلروفرم افزوده شد و به مدت ۱۰ دقیقه روی یخ قرار داده شد. سپس ۲۰۰ µl از سوسپانسیون سلول‌ها در PBS به لوله ریبولایزر افزوده شد. لوله ریبولایزر مطابق روش ۲ در دستگاه HYBAID ribolyser به مدت ۳۰ ثانیه با درجه ۶ قرار داده شد. این روش نیز علاوه بر افزایش دما کمک می‌کند که فنل اسیدی داغ موجود در محلول RNX-Plus به عنوان یک روش موثر شناخته شده در جداسازی RNA استفاده گردد. سپس لوله به مدت ۱ الی ۲ دقیقه روی یخ قرار گرفت تا دمای آن به دمای اتاق برسد.

محلول به میکروتیوب فاقد RNase انتقال داده شد و به مدت ۱۵ دقیقه در ۱۰۰۰۰ ×g در ۴ درجه سانتی گراد سانتریفوژ گردید تا فازها جدا گردند. فاز رویی بدون برخورد با فاز میانی خارج و به میکروتیوب جدید انتقال داده شد. پس از افزودن ۳۰۰ µl کلروفرم به محلول فوق به مدت ۱۰ ثانیه ورتکس شد و سپس ۲ دقیقه با سرعت بالا( ۱۲۰۰۰ ×g ) در ۴ درجه سانتی گراد سانتریفوژ شد. تا دوباره فازها از یکدیگر جدا گردند و فاز رویی به میکروتیوب جدید انتقال یافت. هم حجم محلول فوق ایزوپروپانل افزوده شد و پس از ۱ الی ۲ دقیقه به مدت ۵ دقیقه در ۱۲۰۰۰ ×g در ۴ درجه سانتی گراد سانتریفوژ شد تا

RNA رسوب نماید. RNA رسوب نموده با µl ۵۰۰ ازمحلول اتانول ۷۵٪ ۱ شستشو داده شد. الکل به‌وسیله سمپلر خارج و رسوب خشک گردید. به رسوب کاملا خشک RNA ، ۵۰ تا ۱۰۰ میکرولیتر از آب فاقد RNase اضافه شد و با چند بار پر و خالی نمودن سمپلر حل گردید. در این حال RNA استخراج شده مورد بررسی کمی و کیفی قرار گرفت.

بررسی خلوص و تمامیت **RNA**:

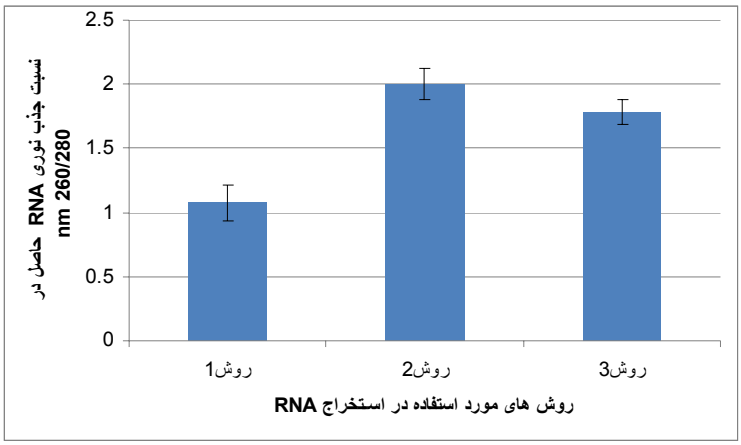
کمیت RNA استخراج شده با کمک دستگاه بیوفوتومتر اپندورف در طول موج ۲۶۰/۲۸۰ و کیفیت آن با دستگاه الکتروفورز و مشاهده RNA استخراج شده بر ژل باکمک دستگاه ژل داکیومنتیشن مورد ارزیابی قرار گرفت(۹).

آنالیز آماری:

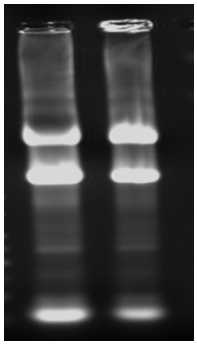
در این آزمایش سویه استاندارد *استرپتوکوکوس موتانس* ATCC35668 و سویه جداسازی شده از پلاک دندان با قدرت بالایی در تشکیل بیوفیلم در سه تکرار مورد آزمایش قرار گرفتند. مقایسه میانگین نسبت جذب نوری در ۲۶۰/۲۸۰نانومتر حاصل از هر روش با استفاده از نرم افزار excel و برآورد فاصله اطمینان توافقی از خطای استاندارد انجام شد.

## یافته‌ها:

میانگین نسبت جذب نوری RNAهای استخراج شده با ۳ روش در طول موج ۲۸۰/۲۶۰ نانومتر در نمودار ۱ نشان داده شده است. بین روش‌های ۲ و۳ تفاوت معنی‌دار مشاهده نشد ($P > 0.05$). نتایج این دو روش با روش ۱ دارای تفاوت معنی دار بودند ($P < 0.05$). در شکل ۱ تصویر RNA استخراج شده به روش‌های ۲ و۳ ارائه شده است که از کیفیت مناسبی برخوردار می‌باشند.




نمودار۱ : میانگین نسبت جذب نوری حاصل از RNAهای استخراج شده از سویه‌های *استرپتوکوکوس موتانس* در ۳ روش مورد استفاده



شکل ۱: RNA استخراج شده به روش‌های HyBAID ribolyser و HyBAID ribolyser با محلول تجاری RNX-Plus

## بحث:

در این مطالعه ۳ روش استخراج RNA از سلول‌های بیوفیلم بررسی شدند. روش اول (روش معمول ) برای سلول‌های پلانکتونیک استفاده می‌شود، روش دوم مطابق دستورالعمل کیت HYBAID ribolyser استفاده شد، و در روش سوم از تلفیق دو روش، یعنی به جای کیت، از محلول تجاری، ارزان و در دسترس RNX-Plus استفاده شد.

روش‌های معمول و موجود مورد استفاده برای استخراج RNA (مثل روش ۱) برای سلول‌های پلانکتونیک یا سلول‌های موجود در بافت‌ها و غیره طراحی شده‌اند. در حالی که استخراج RNA از سلول‌های بیوفیلم به کمک این روش‌ها نتایج خوب و قابل قبولی ندارد. زیرا تولید پلی ساکاریدهای خارج سلولی محلول و غیر محلولی که در تشکیل بیوفیلم مخصوصا بیوفیلم *استرپتوکوکوس موتانس*، برسطح دندان و نهایتا ایجاد پوسیدگی دندان و سایر بیماری‌های پریودنتال دخالت دارند، با فرایندهای استخراج RNA تداخل عمل دارند. از طرفی حضور مقادیر کم RNA استخراج شده همراه با مقدار زیاد مواد آلاینده از جمله همان پلی ساکاریدها در کیفیت روش‌های مولکولی مثل سنتز RT PCR – cDNA و هیبریدیزاسیون در نورترن بلاتینگ (۱۰) تاثیر می‌گذارد. لذا حذف این پلی ساکاریدها در مراحل استخراج RNA امری ضروری به نظر می‌رسد.

روش ۲ (کیت تجاری) در مقایسه با دو روش دیگر از قابلیت بالاتری برخوردار است. روش ۳ نیز کاملا قابل قبول است. چون در این روش از مواد ارزان‌تر و قابل دسترس‌تر استفاده می‌شود از نظر اقتصادی نیز به صرفه‌تر می‌باشد.

تام و همکاران در سال ۲۰۰۶ برای حداکثر لیز سلول‌های بیوفیلم *استرپتوکوکوس موتانس* به منظور استخراج RNA از گلوله‌های شیشه‌ای و دستگاهی به نام Fast Prep Cell Disrupter (Bio 101; Savant Instruments, Inc., NY, USA) استفاده نمودند و RNA با کیفیت مناسب به دست آوردند(۷).

کوری و همکار نیز در سال ۲۰۰۷ در تحقیق مشابهی به این نکته اشاره نمودند که برای حداکثر لیز سلول‌های بیوفیلم *استرپتوکوکوس موتانس* می‌توان از سونیکاسیون و افزودن دانه‌ها همراه با شستشوی مکرر استفاده نمود. استفاده از این روش‌ها باعث استخراج RNA با کمیت وکیفیت بهتری از روش‌های معمول موجود می‌گردد(۶).

در مطالعه حاضر نیز مشابه مطالعه کوری و همکاران، استفاده از دستگاه ریبولایزر به جای سونیکاتور باعث حصول محلول یکنواخت از سلول‌های پراکنده شده بیوفیلم و پلی ساکاریدهای پخش شده در محلول گردید. با شستشو در مراحل بعدی میزان پلی ساکاریدهای حذف شده بیشتر شد و استخراج RNA بهتر صورت گرفت. نتایج این دو روش (HyBAID ribolyser و HyBAID ribolyser با محلول تجاری RNX-Plus) با روش معمول تفاوت معنی‌دار دارند. بنابراین، بر اساس نتایج مطالعه حاضر می‌توان با استفاده از روش‌های ۲ و۳ به RNAی سلول‌های بیوفیلم *استرپتوکوکوس موتانس* با کمیت وکیفیت مناسب دست یافت.

## نتیجه‌گیری:

روش سوم یعنی استفاده از دستگاه و محلول تجاری RNX plus به دلیل حصول RNA با کمیت و کیفیت مناسب از سلول‌های بیوفیلم *استرپتوکوکوس موتانس* همچنین به دلیل استفاده از محلول‌های ارزان‌تر و قابل دسترس مناسب‌تر است.

## فهرست مراجع:


1.Rosen R., Bachrach G., Bronshteyn M., Gedalia I., Steinberg D. The role of fructans on dental biofilm formation by *Streptococcus sobrinus, Streptococcus mutans, Streptococcus gordonii and Actinomyces viscosus*. *FEMS Microbiol Lett*. 2005; **195**(2): 205–210.

2.Goodman S. D., Qian G. Characterization of the *gtfB* and *gtfC* Promoters from *Streptococcus mutans* GS-5. Plasmid 2000; **43:** 85–98.

3.Loesche W. J. Role of *Streptococcus mutans* in human dental decay. *Microbiol Rev*. 1986; **50**: 353–380.

4.Welin J. Protein expression by *Streptococcus mutans* during initial stage of biofilm formation. Appl Environ Microbiol. 2004: **70** (6): 3736-41.

5.Hunt M. Real time PCR. Microbiology and Immunology online. University of South Carolina School of Medicine. 2006; http://

pathmicro. med.SC. edu/ PCR/ real time – home. Htm. Accessed date

6.Cury J.A., Koo, H.. Extraction and purification of total RNA from *Streptococus mutans* biofilms. *Anal Biochem*. 2007; **365**: 208-214.

7.Tam A., Shemesh, M., Wormser, U., Sintove, A., Steinberg, D. Effect of different iodine formulation on the expression and activity of *S.mutans* glucosilteransferase & fructosil - transferase in biofilm & planktonic environment. *J Antimicrob Chemother*. 2006; **57**:865-71.

8.Puissant C. and L. Houdebine. An improvement of the single method of RNA isolation by acid Guanidinium Thiocyanate Phenol chloroform Extraction. Bio Techniques. 1991; **8**:148-149.

9.Sambrooke J., Frritsch EF., Manitis T. Molecular cloning: a laboratory manual, 3rd ed. 2000. Cold Spring Harbor laboratory press. Cold spring Harbor, N.Y. Chapter 7.PP:1-77

10. Wanqian L., Bochu W., Chuanren D., Biao L., A method for isolating functional RNA from callus of Dendrobium candidum contented rich polysaccharides, Colloids Surf. B Biointerfaces 2005; **42**: 259–262.