مجله تحقیقات ژنتیک پزشکی
سال : ۱۳۹۹ - شماره : ۱
مجله تحقیقات ژنتیک پزشکی
Medical Genetic Research
www.mgr.ir

بومی سازی و بهینه سازی کیت استخراج DNA مخصوص واکنش PCR جهت انگشت نگاری ژنتیک

امیر شمس[۳،۴]، محمد حسین بیگی[۳]، حامد قمی[۳]، فرزاد سید فروتن[۱،۲]، علیرضا صبوری[۱]، * امید ایروانی[۱]

۱. مرکز تحقیقات پزشکی قانونی، سازمان پزشکی قانونی کشور، تهران، ایران.
۲. مرکز تحقیقات ژنتیک پزشکی ژنوم، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران.
۳. مرکز تحقیقات مواد پیشرفته، دانشکده مهندسی مواد، واحد نجف آباد، دانشگاه آزاد اسلامی، نجف آباد، ایران.
٤. گروه ژنتیک پزشکی، پژوهشکده زیست فناوری پزشکی، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری، تهران، ایران.

*پست الکترونیک مسئول مکاتبات: om_iravani@yahoo.com

چکیده

امروزه استخراج DNA یک روش مرسوم در بیولوژی مولکولی و آنالیزهای جرم‌شناسی است. به منظور استخراج دی ان ای، انواع مختلفی کیت وجود دارد که در زمان کمتر، امکان استخراج و انتخاب صحیح DNA را فراهم می‌کنند. کیفیت DNA استخراج شده و میزان ناخالصی های موجود در آن از عوامل بسیار مهم در آنالیز های پزشکی قانونی می باشند. در آنالیزهای جرم‌شناسی بهترین و خالص ترین DNA مورد نیاز بوده و از اینرو نیاز به تولید یک کیت بسیار دقیق با بازده استخراج بسیار بالا که بتواند از انواع بافت های مختلف DNA را استخراج نماید، وجود دارد.

در این طرح سعی بر آن شده که با بهینه سازی روش ستونی استخراج DNA ، کیتی بومی مطابق با نیاز های آنالیز های پزشکی قانونی در کشور تولید شود.از آن جا که این کیت ها موجب ۵۰ درصد صرفه جویی ارزی می شوند، به عنوان تولید داخل و بی نیازی به خارج از کشور در حوزه پزشکی قانونی معرفی شده اند. نمونه اولیه این کیت ها برای ۱۰۰ بار آزمایش استفاده می شود و تاریخ انقضای ۲ ساله دارد.

سازمان پزشکی قانونی به عنوان استفاده کننده اصلی از این کیت آزمایشگاهی با در نظر گرفتن استاندارد های کمی و کیفی ارائه شده توسط تولید کننده و مقایسه آن با کیت های مشابه خارجی از جمله کیت شرکت کیاژن کیفیت این محصول را ارزیابی خواهد کرد. امید است با تولید این کیت گام مهمی در راستای خود کفایی در کشور بر داشته شود.

کلمات کلیدی

استخراج DNA، کیت استخراج، انگشت نگاری ژنتیک، واکنش PCR ، آنالیز جرم‌شناسی

مجله تحقیقات
ژنتیک پزشکی
سال : ۱۳۹۹ - شماره : ۱

مجله تحقیقات ژنتیک پزشکی
Medical Genetic Research

www.mgr.ir

Localization and optimization of DNA extraction kit for PCR reaction for genetic fingerprinting

Amir Shams [3,4], Farzad Seyed Forootan [1,2], Mohammad Hossein Beigi [3], Hamed Qomi [3], Alireza Sabouri [1], * Omid Iravani [1]

1. Legal Medicine Research Center, Legal Medicine Organization, Tehran, Iran.
2. Genome Medical Genetics Research Center, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran.
3. Advanced Materials Research Center, Faculty of Materials Engineering, Najafabad Branch, Islamic Azad University, Najafabad, Iran.
4. Department of Medical Genetic, Medical Biotechnology Research Institute, National Institute of Genetic Engineering and Biotechnology, Tehran, Iran.

* Correspondence email: om_iravani@yahoo.com

Abstract

Today, DNA extraction is a common method in molecular biology and criminological analysis. In order to extract DNA, there are different types of kits that allow the correct extraction and selection of DNA in less time. The quality of the extracted DNA and the amount of impurities in it are very important factors in forensic analysis. Criminological analysis requires the best and purest DNA, and therefore requires the production of a highly accurate kit with very high extraction efficiencies that can extract DNA from a variety of different tissues.

In this project, we try to optimize the columnar method of DNA extraction to produce a native kit in accordance with the needs of forensic analysis in the country. Since these kits save 50% of currency, as a production Inside and without the need to go abroad have been introduced in the field of forensic medicine. The prototype of these kits is used for 100 tests and has an expiration date of 2 years.

The forensic medicine organization as the main user of this laboratory kit will evaluate the quality of this product by considering the quantitative and qualitative standards provided by the manufacturer and comparing it with similar foreign kits, including the Kiagen company kit. It is hoped that with the production of this kit, an important step will be taken towards self-sufficiency in the country.

Keywords

DNA extraction, extraction kit, genetic fingerprinting, PCR reaction, forensic analysis

مقدمه

استخراج DNA برای نخستین بار در سال ۱۸۶۹توسط فردریش میشر، پزشک سوئیسی، انجام گرفت. او تلاش کرد که به منظور آزمایشات خود، سلول‌ها را از گره‌های لنفاوی استخراج کند، اما تامین غلظت مناسبی از لنفوسیت‌ها بسیار دشوار و حتی غیرممکن بود. درنتیجه، سلول موردنظر او به لوکوسیت‌ها تغییر یافت که از چرک تجمع یافته در پانسمان‌های جراحی به دست می آمدند. در ابتدا، تمرکز میشر روی انواع مختلف پروتئین‌هایی بود که لوکوسیت‌ها را تشکیل می‌دهند و توانست نشان دهد که پروتئین‌ها ماده اصلی تشکیل‌دهنده سیتوپلاسم سلول می‌باشند. در حین این آزمایشات، وی متوجه شد که در صورت افزودن اسید به محلول، ماده‌ای ته‌نشین شده و با افزودن باز دوباره حل می‌گردد. به این ترتیب برای نخستین بار، رسوب ناخالصی از DNA به دست آمد.

میشر به منظور جدا سازی DNA از پروتئین موجود در عصاره‌های سلولی، پروتکلی جدید با هدف جدا کردن هسته از سیتوپلاسم طراحی کرد و سپس DNA را استخراج نمود. نخستین پروتکل نتوانست به تولید میزان محصول کافی منجر شود، و نیاز به پروتکل دومی بود که نوکلئین خالص‌شده بیشتری را تهیه کند. نوکلئین، بعدها توسط ریچارد آلتمن نوکلئیک‌اسید نام گرفت. پس از میشر تلاش‌های دیگری نیز به این منظور صورت گرفت و باعث پیشرفت‌های فراوان دیگری در فرایند استخراج DNA شد[۱].

نخستین پروسه‌های آزمایشگاهی روتین برای استخراج DNA، بر پایه استراتژی‌های سانتریفیوژ بر اساس چگالی توسعه یافتند. Meselson و Stahl در سال ۱۹۵۸ از این متد برای توضیح همانندسازی نیمه حفاظت شده DNA استفاده کردند. پروسه‌های بعدی از تفاوت‌های موجود در حلالیت DNA های بزرگ کروموزومی، پلاسمیدها و پروتئین‌ها در بافر قلیایی بهره بردند. هم اکنون متدهای اختصاصی فراوانی برای استخراج DNA خالص ایجاد شده‌اند و اکثرا به صورت کیت‌های تجاری موجودند[۲].

روش های مورد استفاده جهت تشخیص هویت ژنتیکی

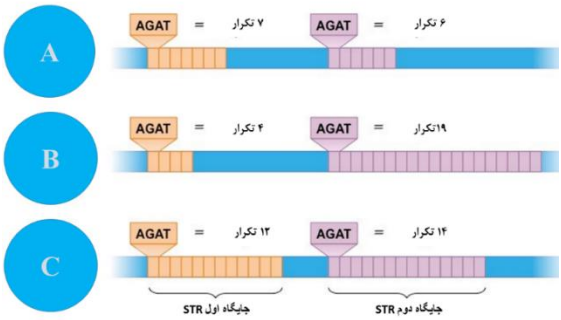
روش های مورد استفاده جهت تشخیص هویت ژنتیکی، به صورت اولیه به دو دسته ی روش RFLP و روش های مبتنی بر PCR تقسیم بندی می شدند، که با گذشت زمان و بررسی های صورت گرفته در زمینه های مختلف ژنتیک مولکولی و بالاخص ژنتیک پزشکی قانونی؛ امروزه، روش های مبتنی برPCR ، به دلیل سرعت بالای جوابدهی و امکان تهیه پاسخ از نمونه های بسیار ضعیف، فرآیندی مقبول و مورد تایید متخصصان محسوب می شود[۳].

در این میان، جدیدترین و سریعترین نشانگرهای مورد استفاده در تشخیص هویت ژنتیکی توالی های کوتاه تکراری (STR) هستند. علاوه بر موارد بالا، روش های مبتنی برSTR ها این قابلیت را دارند که به راحتی نسخه برداری شده و متعاقبا امکان بدست آوردن پاسخ از تعداد زیادی نمونه در واحد زمان را فراهم نمایند. از سوی دیگر،

نشانگرهایSTR ، به خصوص هنگامی که به تعداد کافی مورد بررسی قرار گیرند، دارای توانایی جداسازی دقیق هویت افراد و حتی تمایز بین دو فرد خویشاوند هستند و بالاخره داده های آللی به دست آمده در روش های مبتنی بر نشانگرهای STR، به راحتی و با کمک سامانه های رایانه ای بایگانی و ذخیره شده و قابلیت جست و جو دارند. در عین حال، فرآیند بالا در روش های مبتنی برRFLP ، با این سرعت و کیفیت امکان پذیر نیست[۴].

STR یا توالی های تکراری متوالی

STRها، توالی های DNAتکراری متوالی اند که در ژنوم انسان شایع بوده و دارای خاصیت پلی مورفیک هستند. این ویژگی ها،STR ها را تبدیل به مارکرهای ژنتیکی مهمی برای مطالعات نقشه برداری ژنتیکی، شناسایی بیماری و تست شناسایی انسان می کند. این توالی ها، شامل واحدهای تکراری با طول ۲ تا ۶ bp هستند و می توانند با PCRتکثیر شوند.STR ها در آزمایشگاه های پزشکی قانونی مشهور شده اند، زیرا میزان کمی ازDNA ، حتی به شکل ضعیف آن، می تواند به طور موفقیت آمیزی معین شود. آمیخته های نمونه با استفاده از نتایج STR نسبت به تکنولوژی های پیشین تعیین و گروه بندی DNA به طور راحت تری می توانند حل شوند. هاپلوتایپینگ کروموزوم Y،روشی که جهت تشخیص و تمایز DNA مذکر استفاده می شود، با استفاده از مارکرهای STR یا همان Y-STR انجام گرفت.. همچنین علم اصول همگام با آنالیزSTR های اتوزومال، برای اهداف شناسایی انسانی توسعه یافت و در یک مسیر بسیار مشابه برای آنالیزهای پزشکی قانونی ارزیابی شد. کمی بعد از تشخیص و ارزیابی اولین فراوانی STRکروموزوم Y ، سودمندی آن در پرونده های قضایی مجرمانه زمانی بیان شد که یک نمونه تهیه شده با سوآب واژینال از زنی قربانی که مورد تجاوز و قتل واقع شده بود، توسط آنالیز Y-STR بررسی و یک مرد به اشتباه محکوم، مستثنی و تبرئه گردید[۵].



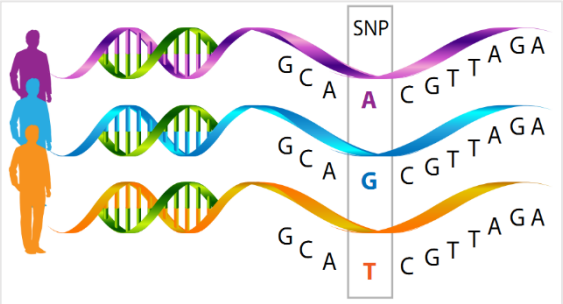
شکل ۱ : توالی هایSTR

پلی مورفیسم های تک نوکلئوتیدی یا SNP

پلی مورفیسم های تک نوکلئوتیدی (SNP) موقعیت هایی در ژنوم افراد یک جمعیت هستند که ممکن است بر اساس یک نوکلئوتید فرق کنند. برای مثال ژنوم انسان تقریبا ۳ میلیارد جفت باز را در برمیگیرد، که هر جفت شامل یکی از چهار نوکلئوتید: آدنین(A)،گوانین(G)، سیتوزین (C)یا تیمین (T) می باشد. در ساختار مارپیچ دو رشته ایDNA ، نوکلئوتیدها به صورت جفت هستند؛ A باT ، و C با G . برای سهولت، زمانی که می گوییم توالیDNA ، تنها یک رشته به عنوان اطلاعات در رشته ی دیگر استفاده میشود. بنابراین از این پس ما از توالی DNA به عنوان توالی تک رشته ای یاد می کنیم. در اغلب این ۳ میلیارد موقعیت بازی، تقریبا همه ی انسان ها دارای باز یکسان هستند، و این باز به اصطلاح در توالی مرجع نمایش داده می شود. به

علت فرآیند جهش، یک نوکلئوتید می تواند در یک فرد تغییر کند، و این تغییر ممکن است و سرانجام طی گذر نسل ها به یک فراوانی برجسته در جمعیت منجر شود.

پلی مورفیسم های تک نوکلئوتیدی کروموزوم-Y (Y-SNPs)، مارکرهای با ارزشی برای کمیت سنجی ترکیب در میان جمعیت ایالات متحده هستند. دانش گسترده ای در مورد ریشه های جغرافیاییY-SNP ها بر اساس مطالعات جمعیت های جهانی وجود دارد. بنا به دلیل اختصاصیت جغرافیایی بالایY-SNs ها، هاپلوگروپ های SNPمی توانند مستقیما جهت ارزیابی و اندازه گیری ترکیب در میان جمعیت های متنوع و بدون مرتب سازی در مدل های مختلف ترکیب به کار گرفته شوند. این چارچوب فیلوژئوگرافی جهانی برای به دست آوردن منشاء هاپلوگروه های SNP مهم است زیرا جمعیت ایالات متحده از افراد با اجدادی که از بسیاری از نقاط جهان مشتق شده اند و مهاجرت کرده اند، تشکیل شده است[۶].



شکل۲ : توالی های SNP

نمونه برداری جهت انگشت نگاری ژنتیک

در تمامی مراکز مجهز در سطح جهان، دستور کارهای استاندارد، به منظور نمونه برداری از شواهد و مدارک موجود در صحنه ی جرم، تهیه و تدوین شده اند که جهت پیشبرد بهتر کارها و پشگیری از خطاهای ناخواسته، مورد استفاده قرار می گیرند.

از آنجایی که اولین حلقه در تشخیص هویت پزشکی و مطالعات پزشکی قانونی و جنایی نمونه-برداری می باشد، لذا نمونه برداری صحیح و علمی، مبحثی مهم و اساسی در این زمینه می باشد. این نمونه ها، به کمک روش های تشخیص هویت ژنتیکی به دقت قابل تجزیه و تحلیل هستند. در بررسی این گونه شواهد، تشخیص منشا نمونه ها، با مقایسه الگو یا تایپ ژنتیکی آن ها با متهمان یا مظنونین، امکان پذیر می شود. با توجه به یکسان بودن ماده ی وراثتی در تمامی سلول های هسته دار متعلق به یک فرد، هر نمونه ی زیستی که شامل تعدادی سلول هسته دار باشد، می تواند در انجام آزمایشات ژنتیک در پزشکی قانونی به کار رود و الزامی به بررسی مطابقت بین نمونه های خون با خون یا اسپرم با اسپرم نیست. نمونه های زیستی گوناگونی جهت آزمایش ژنتیک پزشکی قانونی مورد استفاده قرار میگیرند، که مهمترین آن ها عبارتند از: خون و لکه های خونی، مایع منی و لکه های منی، بزاق، ته سیگار آغشته به بزاق، موی ریشه-دار، استخوان و ادرار. در عمل آنچه که بیشتر مورد توجه متخصصان و کارشناسان قرار می گیرد، دو نمومه ی خون و مایع منی بوده که به صورت لکه های متنوعی در صحنه های وقوع جرم یافت می شوند. در ارتباط با نمونه های مختلفی که در صحنه ی جرم یافت می شوند، رعایت اولویت، دقت در فرآیند جمع آوری نمونه ها

و حفاظت کامل از آن ها تا ارسال به آزمایشگاه مقصد، از ضرورت بالایی برخوردارند.

امروزه؛ یکی از مرسوم ترین روش های نمونه برداری در آزمایشگاه های ژنتیک قانونی، استفاده از سوآب های داخل دهانی برای جمع آوری تعدادی از سلول های مخاط دهان می باشد، که ضمن تسهیل روند نمونه برداری، به سبب وارد کردن حداقل آسیب جسمی به افراد، به لحاظ اخلاقی مناسب تر و پسندیده تر به نظر می آید.

برای بدست آوردن پاسخ قابل تفسیر، می بایست نمونه های مرجع نیز جهت آزمایش تهیه و به آزمایشگاه ارسال گردند. نمونه ی مرجع در بررسی صحنه ی جرم، نمونه ی متهمان یا مضنونین احتمالی است که در محل آزمایشگاه یا زندان از آن ها تهیه می گردد. در نهایت و با مقایسه ی الگوی ژنتیکی متهم و نمونه ی صحنه ی جرم، می توان در مورد مطابقت و یا عدم مطابقت این دو نمونه اظهار نظر نمود[۷].

روش های نمونه برداری برای استخراج DNA

بیشترین ماده ای که در این بخش جهت استخراج DNA مورد استفاده قرار می گیرد خون می باشد. روش های استخراج DNA از خون، باتوجه به نوع پرونده و نوع آزمایش مولکولی مورد نیاز آن پرونده می تواند متفاوت باشد. خونی که در این بخش مورد استفاده قرار می گیرد باید حتما دارای ماده ضد انعقاد EDTA و یا سیترات باشد. البته اگر نمونه برداری در کاغذ های FTA به صورت مستقیم انجام شودگیرد، نیازی به ضد انعقاد EDTA و یا سیترات نمی باشد.

ساده ترین راه برای جمع آوری نمونه بزاق، استفاده از سواپ است. در این روش با استفاده از یک سواب استریل، از سلول های داخل دهان در نواحی داخل گونه و اطراف آن (به جز قسمت هایی که دچار زخم یا خراش هستند) نمونه گیری می شود. سواب هایی که بدین صورت در اثر خراشیدن سطوح داخل دهانی بدست آمده اند، حاوی DNA می باشند. برای تسهیل جمع آوری بزاق از کودکان کوچک می توان از اسفنج استفاده نمود. همچنین جهت استخراج DNAاز نمونه های جنینی، می توان از پرزهای جنینی (CVS)و یا مایع آمنیوتیک استفاده کرد. نمونه های CVS شامل پرزهایی می باشد که در اطراف جفت وجود دارند و دارای ماده ژنتیکی مشابهی با جنین می باشند بهترین زمان نمونه گیری از جنین برای نمونهCVS، ۷۰ روز پس از بارداری، یعنی بین هفته ۱۱ تا ۱۲ بارداری می باشد. روش تخلیص برای این نمونه ها متفاوت می باشد.. پس از انجام نمونه گیری از پرزها، باید با دقت پرزهای جنینی از نمونه های مادری جداسازی شوند و اطمینان حاصل شود نمونه به دست آمده تنها شامل نمونه های پرز جنینی است. آسپیراسیون سوزنی نوعی روش بیوپسی است . در این روش یک سوزن نازک به یک ناحیه از بافت یا مایع بدن وارد می شود.همانند سایر انواع بیوپسی، نمونه ای که طی روش آسپیراسیون سوزنی، جمع آوری می شود می تواند به تشخیص و یا رد کردن شرایطی مانند سرطان کمک کند.این تکنیک یکی از روش های جراحی جزئی می باشد

که احتمال خطر آن بسیار کم است. از نمونه های بیوپسی استخراج شده توسط این روش میتوان DNA استخراج نموده و مورد بررسی قرار داد[۸] .

شکل۳ : روش های نمونه برداری برای استخراجDNA

استخراج ماده وراثتی

نمونه های زیستی بدست آمده، چه به صورت بافت ها و چه لکه های خون و غیره، علاوه برDNA ، شامل انواع مختلفی از مواد و ترکیبات دیگر نیز هستند. بنابراین قبل از انجام هر گونه آزمایش، می بایست DNA را از سایر ترکیبات سلولی و مواد شیمیایی جدا نموده و استخراج نمود. برای مثال باقی ماندن پروتئین های سلولی در کنار DNA استخراج شده، سبب تداخل در روند تجزیه و تحلیل DNA شده و در مرحله ی تکثیر DNA نقشی بازدارنده خواهد داشت. امروزه روش های متفاوتی جهت استخراج DNA از نمونه های مختلف به کار گرفته می شوند که از این میان سه روش مهم و متداول شامل Chelex ، FTA Paper و استخراج ارگانیک، می باشند[۹] .

در حالت کلی فرآیند استخراج DNA دو هدف اساسی را دنبال می کند:

۱. هدف اول، استخراج هر چه بیشتر DNA از یک نمونه جهت تامین غلظت مناسب و مورد نیاز برای انجام واکنش-های بعدی.
۲. هدف دوم، فرآهم آوری استخراج شده با حداکثر کیفیت ممکن.

فرآیند استخراج DNA خود شامل سه مرحله می باشد:

۱. در مرحله ی اول، با از هم گسیختن غشای سلولی که در اصطلاح لیز سلولی خوانده می شود، دستیابی به هسته ی سلول امکان پذیر می شود .
۲. در مرحله ی دوم، با تخریب و انعقاد پروتئین ها، این مواد زائد و مزاحم از ادامه ی مسیر آزمایش حذف می گردند.
۳. در مرحله ی سوم و نهایی، ماده ی وراثتی را از پروتئین های منعقد شده و سایر اجزای سلولی جدا کرده و خالص می کنیم.

روش استخراج سیلیکا

جدیدترین روش هایی که امروزه برای استخراج DNA به کار می روند، اغلب مبتنی بر فن آوری استخراج با فاز ثابت هستند. این روش ها در کیت های تجارتی شرکت های معتبری مثل Qiagene و Promega به کار گرفته شده اند. در این روش ها، با استفاده از خاصیت طبیعی ذرات شیشه (سیلیکا) برای جذب DNA در حضور غلظت های بالای برخی نمک ها در محیط آزمایش، DNAرا از سایر ترکیبات و پروتئین های سلولی جدا کرده و با تغییر شرایط، مجددا DNAرا از ذرات شیشه پس می گیرند. از فوائد و مزایای

این روش ها، می توان به توانایی آن ها در بازیابی بهتر DNA با غلظت و کیفیت مناسب اشاره نمود[۱۰].

آمار و محاسبات داده ها

در تجزیه و تحلیل نتایج و داده های آللی بدست آمده از نمونه های صحنه ی جرم و به منظور بررسی انتساب این نمونه ها به متهمان، چیزی که انطباق نتایج حاصله با یکدیگر را معنی دار می کند، بررسی های آماری است. به بیان دیگر، پس از اینکه انطباق بین پروفایل های بدست آمده از دو نمونه ی مختلف ، مشاهده گردید، میزان روایی این انطباق بوسیله ی محاسبات آماری ارزیابی می گردد .

در واقع محاسبات آماری به محقق کمک می کند تا تعیین نماید که پروفایل بدست آمده از متهم که به طور کامل با پروفایل ژنتیکی نمونه ی بدست آمده از صحنه ی جرم منطبق شده است، تا چه حد منحصر به فرد است. بدیهی است، تنها زمانی می توان نمونه ی صحنه ی جرم را به فردی خاص منتسب کرد که پروفایل ژنتیکی آن فرد کاملا منحصر به خود او باشد. از آنجایی که تفاوت های ژنتیکی همانند تفاوت های بارز فنوتیپی و ظاهری در بین نژادهای مختلف انسانی وجود دارد، لذا بررسی میزان منحصر بفرد بودن یک پروفایل باید با توجه به داده های جمعیتی محل مورد مطالعه صورت گیرد.

مــواد و روش هــا

در این مطالعه از بافت کبدی استفاده شد و در دو گروه اصلی و کنترل استخراج DNA انجام گرفت. در گروه اصلی از کیت طراحی شده استفاده گردید و در گروه کنترل از کیت شرکت کیاژن استفاده شد. در طی نمونه‌گیری، جهت انجام بهتر فرایند لیز سلولی از اسکالپ ۱۰ برای هموژنیزه کردن بافت کبدی استفاده شد. به منظور نگهداری طولانی‌مدت، نمونه‌های فوق در دمای ۲۰- درجه سانتیگراد قرار داده شدند.

روش ساخت کیت استخراجDNA

ماده لیز کننده و ستون استفاده شده در این کیت باعث کیفیت بسیار بالای این کیت شده است . از این کیت برای استخراج نمونه ها ی متنوعی مانند بافت جانوری، سلول کشت داده شده ، دی ان ای ویروسی از خون، باکتری، مخمر، لکه خون خشک شده، بافت پارافین و بزاق میتوان استفاده کرد. کیت استخراج از یک میکروتیوب برای لیز سلولی و یک میکروتیوب برای جدا سازی دی ان ای تشکیل شده است. در میکروتیوب اول نمونه بافت در مجاورت بافر لیز سلولی قرار می گیرد. در میکروتیوب جداساز ۱۰ میلی گرم سیلکاژل وجود دارد. گنجایش غشای سیلیکایی موجود در Spin column تا ۶۰ میکرو گرم می باشد. ۲ محلول بافری و ۱ محلول شستشو و ۱ محلول جدا ساز دراین کیت استفاده شده است .

جدول ۱: غلظت محلول های بافری، جدا ساز و شستشو

N-laurosylsarcosine 0.5% (Sarkosyl) (wt/vol)	Sodium citrate 25 mM	Guanidinium thiocyanate 4 M
Ethanol 75% or Isopropanol 75%	Beta-mercaptoethanol 0.1 M	NaOH 16mM

پروتکل لیز سلول های بافت

۱. ابتدا سلول ها را شمارش نموده و بافت مورد نظر را توزین نمایید.
۲. به ازای 50- 100 mg بافت و یا 1×10^6 سلول، 1 mlترایزول اضافه کنید.
۳. سلول و یا بافت را هموژن کنید.
٤. نمونه هموژن شده را 5 دقیقه در دمای اتاق انکوبه کنید.
٥. به ازای 1 ml ترایزول، 200 µl کلروفرم اضافه نموده و به مدت 15 ثانیه ورتکس کنید.
٦. 6 دقیقه در دمای اتاق انکوبه کنید.
۷. نمونه را به مدت 15 دقیقه با دور 12000 g در دمای$4^{\circ}C$ سانتریفیوژ نمایید.
۸. در این مرحله انتظار می رود که سه فاز تشکیل شود. فاز رویی که شفاف است و 50٪ از حجم کل را شامل می شود حاوی RNA است. این فاز را به یک ویال جدید منتقل نموده و پروسه استخراج RNA را با آن دنبال کنید دو فاز باقی مانده را تا انتهای مراحل استخراج RNA درون یخچال نگهداری کنید.

پروتکل استخراجRNA

۱. به ازای 1 ml ترایزول، 500 µl ایزوپروپانول به فاز رویی اضافه نمایید.
۲. نمونه را 10 دقیقه در دمای اتاق قرار دهید.
۳. به مدت 10 دقیقه با دور 12000 g در دمای$4^{\circ}C$ سانتریفیوژ کنید.
٤. فاز رویی را دور ریخته و به رسوب RNA، 1 ml اتانول 75٪ اضافه کنید.
٥. نمونه را به طور مختصر ورتکس کرده و سپس به مدت 10 دقیقه با دور 12000 g در دمای $4^{\circ}C$سانتریفیوژ کنید.
٦. فاز رویی را دور ریخته و رسوب را به مدت 10 دقیقه زیر هود قرار دهید تا خشک شود. اجازه ندهید RNA زیاد خشک شود زیرا این امر قابلیت حل شدن RNA را در آب کاهش می دهد.
۷. مقدار 50 µl آب RNase free اضافه نمایید و ویال را به مدت 30 دقیقه در دمای اتاق قرار دهید تا RNA حل شود.

پروتکل استخراجDNA

۱. از روی دو فازمربوط به DNA و Protein هر مقدار از فاز RNA که باقی مانده جدا کنید و دور بریزید.
۲. 300 µl اتانول 100% به ازای 1 ml ترایزول اضافه نمایید.
۳. درب ویال را ببندید و به آرامی مخلوط نمایید.
٤. ویال را 4 دقیقه در دمای اتاق انکوبه کنید.
٥. ویال را به مدت 5 دقیقه با دور 2000 g و دمای $4^{\circ}C$ سانتریفیوژ کنید.
٦. فاز رویی را به ویال جدید منتقل کنید و به منظور جداسازی پروتئین نگه دارید.

۷. رسوب DNA را با1 ml محلول سدیم سیترات/ اتانول 0.1 M شست شو دهید.

۸. به مدت 5 دقیقه با دورg 2000 در دمای4˚C سانتریفیوژ کنید.

۹. فاز رویی را دور بریزید و مرحله شست شو را دوباره تکرار کنید.

۱۰. 1 ml اتانول 75% به ازای 1 ml ترایزول اضافه کنید.

۱۱. 20 دقیقه در دمای اتاق انکوبه کنید و هر چند دقیقه یکبار به آرامی مخلوط کنید.

۱۲. به مدت 5 دقیقه با دور 2000 g و دمای4˚C سانتریفیوژ کنید.

۱۳. فاز رویی را دور بریزید و رسوب را به مدت 30 دقیقه زیر هود قرار دهید تا خشک شود.

۱٤. مقدار NaOH 100 lµ به رسوب اضافه نمایید و 30 دقیقه در دمای اتاق قرار دهید تا حل شود.

پروتکل استخراج پروتئین

۱. به فاز پروتئینی تا جایی که ویال پر شود استون DTT اضافه نمایید و به آرامی مخلوط کنید.

۲. ویال را به مدت 15 دقیقه در فریزر-20˚C قرار دهید و سپس 15 دقیقه با دور 16000 g در دمای4˚C سانتریفیوژ کنید.

۳. فاز رویی را دور بریزید و به رسوب پروتئین 1.5 mlاستون DTT اضافه نمایید و مرحله قبل را تکرار کنید.

٤. فاز رویی را دور بریزید و اجازه دهید رسوب پروتئین خشک شود.

٥. مقدار µl 100 آب RNase free به پروتئین اضافه نموده و ۳۰ دقیقه در دمای اتاق قرار دهید تا حل شود.

بررسی خلوص و غلظت DNA ژنومی استخراج شده

پس از اتمام استخراج DNA خون افراد بیمار و شاهد، ۵ میکرولیتر از DNA به‌منظور بررسی کیفیت آن بر روی ژل آگارز ۱ درصد الکتروفورز شد .پس از الکتروفورز یک باند شارپ و بدون اسمیر در بالای ژل دیده می‌شود که نشان‌دهنده کیفیت مناسب DNA استخراج شده است[۱۱].

روش انجام تکنیک PCR

ابتدا مخلوط اولیه شامل Master mix (1X) پرایمرهای Reverse, Forwardمربوطه و آب دیونیزه طبق جدول (۳-۳)، برای چند عدد از نمونه‌های مورد آزمایش تهیه شد و در ویال‌های ۰/۲ استریل به میزان ۱۳/۵ میکرولیتر تقسیم گردید .سپس به هر یک از ویال‌ها، به مقدار ۱/۵ میکرولیتر از DNA هدف مورد آزمایش اضافه شد .به‌منظور کنترل آزمایشات از شاهد منفی نیز استفاده شد .شاهد منفی شامل مخلوط PCR به جز DNA هدف بوده و در عوض به آن، هم‌حجم DNA هدف، dH2O اضافه گردید[۱۲] .

ژل الکتروفورز

واژه الکتروفورز از کلمه لاتین Electrocus به معنی الکتریسیته و کلمه آلمانی Phoresis به معنی حمل کردن گرفته شده است. پس در الکتروفورز قطعات DNA، به کمک جریان الکتریکی از هم تفکیک می‌شوند .مولکول DNAدارای بار منفی است و در میدان الکتریکی به سمت قطب مثبت (آند) حرکت می‌کند .الکتروفورز از طریق آگارز یا پلی آکریل آمید با همسانه سازی مولکولی عجین شده و برای جداسازی، تعیین هویت و تخلیص قطعات DNA مورداستفاده قرار می‌گیرد.

به‌علاوه جایگاه DNA بر روی ژل به‌وسیله رنگ‌آمیزی بارنگ‌های فلورسنت مثل Safe View به آسانی قابل تعیین است. رنگ Safe View در بین بازهای DNA جایگزین شده و با قرار گرفتن در معرض نور UV، رنگ فلورسنت ایجاد می‌کند..به همین دلیل باندهای DNA، با مشاهده مستقیم ژل زیر اشعه ماورای بنفش آشکارسازی می‌شود این باند ها در صورت نیاز قابل‌استخراج از ژل هستند.

ژل‌های پلی آکریل آمید برای تفکیک قطعات کوچک ۵ تا ۵۰۰bp کاملاً مفید هستند، قدرت تفکیک آن‌ها بالاست و قطعاتی از DNA که به اندازه حتی یک نوکلئوتید، با یکدیگر اختلاف طول دارند نیز از یکدیگر قابل‌تفکیک هستند .تهیه و جابجایی ژل‌های آکریل آمید نسبت به ژل‌های آگارز مشکل‌تر می‌باشد. ژل‌های پلی آکریل آمید به شکل عمودی مورداستفاده قرار می‌گیرند. ژل‌های آگارز نسبت به ژل‌های پلی آکریل آمید قدرت تفکیک کمتری دارند اما محدوده تفکیک بزرگ‌تری دارند. این ژل‌ها قادرند قطعات ۵۰ جفت باز تا چند مگاباز را تفکیک کنند[۱۳].

آگارز یک پلیمر خطی است که در آن مشتقات D و L گالاکتوز با اتصالات گلیکوزیدی به هم متصل شده‌اند. زنجیره‌های آگارز فیبرهای مارپیچی را تشکیل می‌دهند که به‌صورت ساختارهای ابر مارپیچ با شعاع۲۰-۳۰ نانومتر پلیمریزه می‌شوند .ژله ای شدن آگارز، یک شبکه سه‌بعدی از کانال‌ها را به وجود می‌آورد که قطر آن‌ها بین ۵۰-۲۰۰ نانومتر متغیر است. پلیمرهای آگارزی که به‌طور تجاری تهیه می‌شوند، حدودا دارای ۸۱۱ واحد قندی در هر زنجیره هستند. آگارز یکدست و یکنواخت نیست و میانگین طول زنجیره‌های پلی ساکاریدی در بسته‌ها و شرکت‌های مختلف متفاوت است .به علاوه آگارزهای با کیفیت پایین ممکن است با پلی ساکاریدهای دیگر و یا نمک‌ها و پروتئین‌ها آلوده شده باشند. این تفاوت‌ها ممکن است دما های ژل شدن و ذوب شدن، عبور DNA و توانایی بازیافت DNA از ژل را (که به‌عنوان سوبسترا در واکنش‌های آنزیمی مورد استفاده قرار می‌گیرد) تحت تأثیر قرار دهند. برای به حداقل رساندن مشکلات احتمالی، از آگارزهای ویژه‌ای که دارای حداقل زمینه فلورسانس پس از رنگ‌آمیزی با اتیدیوم بروماید هستند، استفاده می‌شود. پلیمرهای تشکیل‌دهنده پس از مدتی تجزیه و هیدرولیز می‌شوند. بنابراین در ژل‌های کهنه قدرت تفکیک به‌تدریج کاهش می‌یابد[۱۱].

روش الکتروفورز

در این تحقیق از ژل آگارز یک درصد استفاده شد. برای این منظور، ۱ گرم پودر آگارز در یک بشر حاوی مقدار ۱۰۰ml بافر TBE 1X ریخته شد. سپس برای حل شدن پودر آگارز در بافر TBE 1X، بشر در ماکروویو قرار داده شد تا پودر آگارز کاملاً حل شود. پس از خنک شدن محلول و زمانی که دیگر بخاری از آن متصاعد نشد، ۸ میکرولیتر Safe view اضافه شد. محلول حاصل درون قالب مخصوص ریخته و شانه نزدیک به یک انتهای آن قرار داده شد. پس از سرد شدن محلول و پلیمریزه شدن ژل، شانه به آرامی از ژل خارج گردید. سپس ظرف حاوی ژل در درون دستگاه الکتروفورز به‌صورت افقی قرار داده شد و مخزن دستگاه الکتروفورز به آرامی با بافر TBE(1X) پر گردید، به‌طوری‌که سطح بالای ژل کاملاً با بافر TBE(1X) پوشیده شود. در مرحله بعد جهت لود کردن محصولات PCR، ۶ میکرولیتر از محصول حاوی لودینگ بافر با استفاده از سمپلر، به داخل چاهک‌های ژل منتقل گردید. همچنین ۵ میکرولیتر از مارکر موردنظر برای تخمین اندازه محصول PCR، به داخل یکی از چاهک‌های ژل منتقل شد. آنگاه دستگاه الکتروفورز به منبع تغذیه متصل و ولتاژ دستگاه روی ولتاژ ۱۲۰ ولت تنظیم گردید. سپس هنگامی که که ماده رنگی نزدیک به دو سوم ژل را طی کرد، دستگاه خاموش شد[۱۴].

آشکارسازی قطعه DNA تکثیر یافته

پس از اتمام الکتروفورز، ژل از تانک و سینی الکتروفورز خارج شد و سپس با استفاده از دستگاه ژل داکیومنتیشن نتایج مشاهده گردید و هر بار، از ژل به وسیله همین دستگاه عکس گرفته شد.

تفسیر نتایج بدست آمده و گزارش دهی

نتایج حاصل از جداسازی قطعات DNA در مرحله الکتروفورز موئینه، در قالب ژنوتیپ فرد مورد بررسی مشخص می گردد. ژنوتیپ یک فرد در جایگاهی خاص عبارت است از دو آلل یکسان (هموزیگوت) یا نا همسان (هتروزیگوت). پروفایل یا نمایه ژنتیکی هر فرد، حاصل بررسی تعدادی از جایگاههای STR آن فرد است و در حقیقت اثرانگشت ژتتیکی وی محسوب می گردد.

پس از اتمام مراحل الکتروفورز، عمل شناسایی قطعات بر اساس اندازه ، وزن ملکولی و میزان رنگ فلوروسنتی که با آن نشاندار شده است، صورت می گیرد. نتایج حاصله بصورت سیگنالهای مخصوصی به رایانه همراه دستگاه ارسال شده و در نهایت به شکل نمودارهای قله ای، نمایش داده می شود. این روش با الکتروفورز همزمان نردبانهای آللی و اندازه ای، هر یک از قله ها که نمایانگر یک آلل می باشند را شناسایی کرده و ثبت می کند.

نرم افزارGene mapper IDX از جدید ترین نرم افزار های بکار رفته در این زمینه بوده که با الگو قرار دادن نردبانهای اندازه ای و آللی و با احتساب شرایط استاندارد الکتروفورز، داده های بدست آمده را بصورت خودکار مقایسه کرده و

نتایج خام حاصل را جهت تایید نهایی و تفسیر کارشناس مربوطه ارائه می دهد[۱۵] .

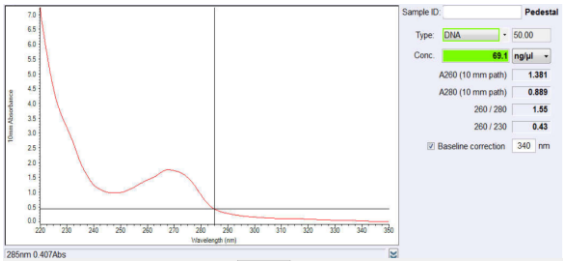
تجزیه و تحلیل داده‌ها

آنالیز نتایج حاصل از این پژوهش با استفاده از نرم‌افزار آماری SPSS V.23 با تست آماری رگرسیون لجستیک انجام شد و ارتباط ژنوتیپ‌های مختلف مربوط به پروفایل مورد نظر با بروز بیماری دیابت در سطح کمتر از ۰/۰۵ مورد بررسی قرار گرفت.

نتایج بررسی DNA استخراج شده با دستگاه نانودراپ

در این مرحله جهت اندازه گیری میزان DNA استخراج شده ۵ میکرولیتر از نمونه DNAهای استخراج شده داخل منفذ مربوط به دستگاه نانو دراپ ریخته شد و توسط دستگاه میزان جذب محلول در طول موج ۲۶۰ نانومتر اندازه گیری گردید. با توجه به ضریب جذب DNA در طول موج ۲۶۰ نانومتر مقدار DNA برحسب نانوگرم توسط نرم افزار دستگاه محاسبه شد.

همچنین نسبت جذب ۲۶۰ نانومتر به جذب ۲۸۰ نانومتر (A260/A280)به منظور بررسی میزان آلودگی RNAیا پروتئین تعیین گردید. نسبت حاصله در صورتیکه بین ۱/۸ تا۲ باشد مطلوب است که در این تحقیق نمونه های DNA با نسبت ۱/۸ – ۱/۷ مورد استفاده قرارگرفت[۱۶].



شکل ۴ : نمودار غلظت و خلوص DNA

نتایج حاصل از واکنش زنجیره ای پلی مراز(PCR)

پس از بررسی کیفیت DNA های استخراج شده، براساس پروتکل ذکر شده ، واکنش زنجیره ای پلی مراز (PCR)برای نمونه ها انجام گردید. در این واکنش از مخلوط آغازگرهای اختصاصی کروموزوم Y استفاده شد که ۱۶ جایگاه مختلف توالی های کوتاه تکرار شونده بر روی کروموزوم Y را تکثیر کردند.. محصول PCR جهت تعیین توالی در دستگاه ژن آنالایزر تحت الکتروفورز موئینه قرار گرفت.

نتایج بدست آمده ازالکتروفورز موئینه

در این مرحله قطعات تکثیر شده DNA با نرم افزار ۳۱۳۰ Data collectionدسته بندی و تفکیک گردید. سپس نتایج تعیین توالی سکانس ها با برنامه Gene Mapper تجزیه و تحلیل گردید.

نتیجه گیری

با استفاده از این کیت می‌توان تمام DNA ژنومیک گیاه را در کوتاهترین زمان و با کیفیت بالا استخراج کرد. در این روش به علت استفاده از ستون‌های سیلیکا، سرعت استخراج

افزایش یافته است و دیگر نیازی به روش‌های طولانی استخراج مانند روش CTAB نیست. DNA استخراج شده می تواند در بسیاری از واکنش های پائین دست از جمله PCR، تعیین توالی، تعیین ژنوتایپ، و انواع هیبریدیزاسیون از جمله Southern blotting مورد استفاده قرار گیرد .

ویژگی ها و فواید روش ستونی:

۱. استخراجDNA با دقت بالا و آلودگی بسیار کم
۲. امکان استخراج DNA از انواع سلول ها و نمونه های زیستی مختلف
۳. خلوص بالایDNA استخراج شده
٤. عدم استفاده از حلال های آلی مضر
٥. آماده برای استفاده در PCR، Real-time - PCR، Southern Blotting، RFLP، RFLP، AFLP، RADP

منابع

۱. John, S., et al., *A rapid procedure for extracting genomic DNA from leukocytes.* Nucleic acids research, 1991. **19**(2): p. 408.
۲. Cenis, J., *Rapid extraction of fungal DNA for PCR amplification.* Nucleic acids research, 1992. **20**(9): p. 2380.
۳. Urbanelli, S., et al., *DNA-fingerprinting (AFLP and RFLP) for genotypic identification in species of the Pleurotus eryngii complex.* Applied Microbiology and Biotechnology, 2007. **74**(3): p. 592-600.
٤. Cheng, F., S. Brown, and N. Weeden, *A DNA extraction protocol from various tissues in woody species.* HortScience, 1997. **32**(5): p. 921-922.
٥. Tang, J. and S.B. Melançon, *STR marker system for DNA fingerprinting*. 2001, Google Patents.
٦. Tian, H.-L., et al., *Development of maizeSNP3072, a high-throughput array, for DNA compatible SNP fingerprinting identification of Chinese maize varieties.* Molecular Breeding, 2015. **35**(6): p. 136.
۷. Roewer, L., *DNA fingerprinting in forensics: past, present, future.* Investigative genetics, 2013. **4**(1): p. 1-10.
۸. Amos, B. and A.R. Hoelzel, *DNA fingerprinting cetacean biopsy samples for individual identification.* Rep Int Whaling Comm Spec, 1990(12): p. 79-85.
۹. Raina, A. and T. Dogra, *Application of DNA fingerprinting in medicolegal practice.* Journal of the Indian Medical Association, ۲۰۰۲. ۱۰۰(۱۲): p. 688-694.
۱۰. Yang, D.Y., et al., *Improved DNA extraction from ancient bones using silica-based spin columns.* American Journal of Physical Anthropology: The Official Publication of the American Association of Physical Anthropologists, 1998. ۱۰۵(٤): p. 539-543.
۱۱. Aaij, C. and P. Borst, *The gel electrophoresis of DNA.* Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Nucleic Acids and Protein Synthesis, 1972. **269**(2): p. 192-200.
۱۲. Wittwer, C.T., K.M. Ririe, and R.P. Rasmussen, *Monitoring amplification of DNA during PCR*. 2001, Google Patents.
۱۳. Slater, G.W., et al., *Theory of DNA electrophoresis: A look at some current challenges.* ELECTROPHORESIS: An International Journal, 2000. **21**(18): p. 3873-3887.
۱٤. Ichiyama, S., et al., *Genomic DNA fingerprinting by pulsed-field gel electrophoresis as an epidemiological marker for study of nosocomial infections caused by methicillin-*

resistant Staphylococcus aureus. Journal of Clinical Microbiology, 1991. .**29**(12): p. 2690-2695

.١٥ Dash, H.R., P. Shrivastava, and S. Das, *Analysis of Capillary Electrophoresis Results by GeneMapper® ID-X v 1.5 Software*, in *Principles and Practices of DNA Analysis: A Laboratory Manual for Forensic DNA Typing*. 2020, Springer. p. .213-237

.١٦ Desjardins, P. and D. Conklin, *NanoDrop microvolume quantitation of nucleic acids.* JoVE (Journal of Visualized Experiments), 2010(45): p. .e2565