DOI: 10.1234/knh.v0i0.350

مقاله پژوهشی

مجله دانش و تندرستی، دوره ۹، شماره ۲، تابستان ۱۳۹۳
دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی شاهرود

بهینه‌سازی روش فنول کلروفرم سیلیکا برای استخراج DNA از نمونه استخوان‌های قدیمی

مرتضی صادقی*[۱]، علیرضا صبوری[۲]

۱- دانشگاه اصفهان- دانشکده علوم- گروه زیست‌شناسی- دانشجوی دکترا.

۲- پزشکی قانونی اصفهان- دکترای علوم آزمایشگاهی.

تاریخ دریافت: ۱۳۹۱/۸/۱۴، **تاریخ پذیرش:** ۱۳۹۲/۵/۲

چکیده

مقدمه: *استخراج DNA از نمونه استخوان‌های قدیمی همواره با مشکلات زیادی همراه است. روش فنول کلروفرم سیلیکا یکی از روش‌هائی است که به‌طور معمول برای این منظور استفاده می‌شود. در این مطالعه هدف بررسی و بهینه‌سازی مراحل این روش است.*

مواد و روش‌ها: *DNA ۶۲ نمونه استخوان (دارای عمر ۳ تا ۱۱ سال) ابتدا با روش فنول کلروفرم معمولی و سپس با تغییر بعضی پارامترها استخراج شد. DNA حاصل در هشت منطقه STR به نام‌های CD4, vWA, LPL, D5S818, D16S539, D13S317, F13, FES توسط واکنش PCR تکثیر شد و نتایج حاصل برروی ژل اکریلامید مقایسه شد.*

نتایج: *میانگین بازدهی واکنش PCR، برای روش جدید و روش معمولی در هشت منطقه پلی‌مورفیک ذکر شده به‌ترتیب ۷۵٪، ۷۸٪، ۸۱٪، ۷۶٪، ۸۵٪، ۷۱٪، ۸۹٪، ۸۶٪و ۶۴٪، ۳۹٪، ۷۰٪، ۴۹٪، ۶۸٪، ۷۶٪، ۷۱٪، ۲۸٪ بود. متوسط میزان DNA حاصل از روش بهینه شده (در غلظت ۳۵µl ذرات سیلیکا) و معمولی به‌ترتیب برابر ۲۶۷/۵ µg/ml با خلوص ۱/۱۲ و ۱۹۲/۷۶ µg/ml با خلوص ۰/۸۴ بود.*

نتیجه‌گیری: *طبق یافته‌های این مطالعه به‌نظر می‌رسد تیمار طولانی‌تر با EDTA یکی از عوامل مؤثر حذف بهتر کلسیم باشد و همچنین غلظت مناسب ذرات محلول سیلیکا می‌تواند تأثیر مهمی در حذف مهارکننده‌های PCR داشته باشد.*

واژه‌های کلیدی: واکنش PCR، پلی‌مورفیسم STR، روش استخراج فنل کلروفرم سیلیکا.

***نویسنده مسئول:** اصفهان، دانشگاه اصفهان، دانشکده علوم-۲، گروه زیست‌شناسی، بخش ژنتیک، **تلفن:** ۰۳۱۱-۷۹۳۲۴۶۵، **Email:** ms.sadeghi@yahoo.com

ارجاع: صادقی مرتضی، صبوری علیرضا. بهینه‌سازی روش فنول کلروفرم سیلیکا برای استخراج DNA از نمونه استخوان‌های قدیمی. مجله دانش و تندرستی ۱۳۹۳؛۹(۲):۲۱-۲۶.

Archive of SID

www.SID.ir

مقدمه

انگشت‌نگاری DNA که امروزه آن را به‌عنوان DNA Typing یا DNA Profiling می‌شناسیم یکی از روش‌های اساسی و بدون خطا در تعیین هویت است. قسمت اعظم مولکول DNA (۹۹/۹ درصد) در بین همه افراد یکسان است و تنها نواحی خاصی از DNA انسان دارای توالی‌هایی است که بارها و بارها پشت سر هم تکرار شده‌اند و تعداد این توالی‌های تکراری از فردی به فرد دیگر متفاوت است این مناطق پلی‌مورفیک یا چند شکل هر یک از ما را منحصر به فرد ساخته است. در واقع این نواحی متغیر DNA، امکان تعیین هویت بر اساس مولکول DNA را فراهم می‌سازند (۱-۳). پلی‌مورفیسم‌های طولی DNA شامل نواحی تکرار شونده پشت سر هم می‌باشند که تعداد این واحدهای تکرار شونده متغیر می‌باشد و شامل دو گروه عمده می‌باشند. مینی‌ساتلیت‌ها (VNTR,Variable Number Tandem Repeat) هر واحد تکرار شونده از ۱۵ تا ۶۵ جفت باز تشکیل شده است و معمولاً در مجموع اندازه‌ای در حدود چند کیلو باز (تا ۲۰ کیلو باز) دارد. مایکروساتلیت‌ها (Short Tandem Repeat, STR) طول واحد تکرار شونده ۲ تا ۶ جفت باز می‌باشد و به‌طور کلی ۱۰۰ تا ۴۰۰ جفت باز می‌باشند. مارکرهای STR به‌علت اندازه کوچکشان و قابلیت تکثیر آسان‌تر به‌وسیله PCR بر مارکرهای VNTR ارجحیت دارند و امروزه از مارکرهای STR در تشخیص هویت قانونی استفاده می‌شود. تاکنون هزاران نشانگر STR شناسایی و ثبت شده‌اند و محققین از بین آنها ۱۳ نشانگر که بهترین کاربرد را دارند به‌عنوان نشانگرهای اصلی STR برای آزمایشات تشخیص هویت استفاده می‌کنند (۴-۶).

میزان DNA موجود در نمونه استخوان‌های قدیمی برای انجام آزمایشات DNA Typing معمولاً، اندک می‌باشد. عوامل خارجی همچون میکروارگانیسم‌ها، رطوبت و ترکیبات آلی باعث کاهش DNA قابل دسترس در این بافت‌ها می‌شوند از طرف دیگر استخوان‌ها به‌علت عمر طولانی مدتشان، منبع با ارزشی برای استخراج DNA و در خیلی از موارد تنها بافت باقی‌مانده برای شناسایی هویت فرد هستند که این موضوع خود دلیلی بر اهمیت ایجاد روش‌های استخراج با کارایی بالا است. استخراج DNA در واقع اساسی‌ترین مرحله در DNA Typing می‌باشد و موفقیت در مراحل بعدی بستگی به کارایی مناسب روش استخراجی دارد (۷-۱۱).

علیرغم اهمیت زیاد تکنیک‌های استخراجی، بحث‌های بسیار کمی در مورد مناسب‌ترین روش استخراجی وجود دارد. ۴ استراتژی عمده برای استخراج DNA از استخوان‌های فرسوده عبارتند از روش جوشاندن (Boiling)، روش سیلیکا (Silica)، روش کلروفرم (Chloroform) و روش فنول (Phenol)، در همه این روش‌ها ابتدا استخوان پودر شده و سپس در بافرهای استخراجی مختلف انکوباسیون می‌گردد. به‌طور کلاسیک در مرحله بعد DNA با فنل وکلروفرم استخراج می‌شود و یا استخراج در EDTA و محلول بافری Tris-HCl دیالیز می‌گردد. بعد از استخراج، فاز آبی به‌وسیله اتانول یا ایزوپروپانول یا ریز تغلیظ‌کننده‌ها (microconcentrators) تغلیظ می‌گردد و یا با استفاده از راهکار دیگری بعد از مرحله‌ی انکوباسیون، DNA با glass-milk یا سوسپانسیون سیلیکا جدا می‌شود و سپس نمونه PCR می‌شود. باتوجه به اینکه در بررسی هویت بعضی از اجساد و نمونه‌ها تنها بافت در دسترس بافت استخوان می‌باشد و از طرفی معمولاً به‌دلیل وجود مهارکننده‌ها و ترکیبات ناشناخته زیاد موجود در استخوان‌های قدیمی استخراج DNA با کیفیت مطلوب و مناسب برای انجام PCR از این بافت‌ها با مشکلات زیادی مواجه است و حتی در بعضی مواقع غیرممکن است، ما در مطالعه حاضر تصمیم به بهینه‌سازی روش استخراج DNA فنل- کلروفرم- سیلیکا و بررسی تأثیر غلظت‌های متفاوت ذرات سیلیکا و زمان تیمار با EDTA در حذف مهارکننده‌های PCR موجود در DNA بقایای استخوان‌های فرسوده، پرداختیم.

مواد و روش‌ها

نمونه‌گیری و استخراج DNA

۶۲ نمونه استخوان که دارای عمر ۳ تا ۱۱ سال بودند از سردخانه پزشکی قانونی تهیه و پس از تمیز شدن تا زمان استفاده در ۲۰- درجه سانتیگراد نگهداری شد. سپس با استفاده از روش فنل-کلروفرم- سیلیکا استاندارد و روش فنل کلوروفرم بهینه شده، DNA ژنومی استخراج شد (۱۲). ۰/۴ گرم پودر استخوان یک تا دو بار با کلروفرم و یک تا دو بار با محلول NaOH ۰/۰۵ مولار شستشو داده شد. آنگاه لوله‌ها در زیر هود لامینار قرار داده شدند تا کاملاً خشک گردند.

سپس برای تجمع کلسیم بافت در ۴/۵ میلی‌لیتر EDTA ۰/۵ مولار (pH:8.3) در دمای اتاق و برروی روتاتور به مدت ۱۲۰ دقیقه قرار گرفت. بعد از سانتریفیوژ، سوپرناتانت دور ریخته شد و ته‌نشین باقی‌مانده با انکوباسیون در ۵۶° C در محلول 2×lysis buffer (n-luryl sarcosin 2%, NaCl 100mM, Tris HCl 10mM, EDTA 10mM, pH:8.0) و پروتئیناز K به مدت ۳ ساعت لیز گردید. سپس ۳ میلی‌لیتر از ترکیب فنل: کلروفرم: ایزوآمیل الکل اضافه شد و به آرامی مخلوط گردید، و بعد از انکوباسیون لوله‌ها به مدت ۱۰ دقیقه در ۵۶° سانتیگراد، فاز آبی و آلی از یکدیگر جدا گردید. فاز آبی به لوله‌های جدید منتقل شد و ۴/۵ میلی‌لیتر کلروفرم اضافه شد و به آرامی مخلوط شدند، سپس با انکوباسیون لوله‌ها به مدت ۱۰ دقیقه در ۵۶° C، فاز آبی و آلی از یکدیگر جدا گردید. در مرحله بعد فاز آبی به لوله‌های جدید منتقل و به‌ترتیب به آنها ۱۰۰ میکرولیتراستات سدیم ۲ مولار (pH: 4.5) و ۳/۳

Archive of SID
www.SID.ir

میلی‌لیتر ایزوپروپانول الکل ۱۰۰٪ و ۵۰-۳۰ میکرولیتر محلول ذرات سیلیکا اضافه و به مدت ۱۰ دقیقه در حرارت اتاق شیک (shake) گردید. پس از سانتریفوژ، محلول رویی دور ریخته شد و سپس پلیت حاصله ۲ بار با اتانول ۸۰٪ شستشو داده شد و در نهایت اجازه داده شد رسوب به مدت ۳۰ تا ۶۰ دقیقه در حرارت اتاق بماند تا خشک شود. سپس ۱۰۰ میکرولیتر آب مقطر اضافه گردید. کمیت DNA تخلیص شده از نمونه‌های فوق با دستگاه Specgene (England, Techne) اندازه‌گیری شد و میزان خلوص و کیفیت آن برآورد شد. تغییرات در پارامترهای مختلف پروتکل استاندارد و مقایسه نتایج آن با نتایج پروتکل استاندارد حاصل از نمونه‌های مشابه که منجر به تعیین پارامترهای استاندارد شد در جدول ۱ خلاصه شده است.

جدول ۱- پارامترهای بهینه‌شده در پروتکل استخراجی فنل- کلروفرم- سیلیکا

شاخص	تغییرات اعمال شده
انکوباسیون با EDTA (مرحله ۱)	۱۲۰ دقیقه
میزان EDTA (مرحله ۱)	۴/۵ میلی‌لیتر
ماده مورد آنالیز در مرحله ۳	رسوب ایجاد شده پس از سانتریفیوژ
	انکوباسیون با پروتئیناز K (مرحله ۶) ۳ ساعت
ماده مورد استفاده در مرحله ۷	ترکیب آماده فنل: کلروفرم: ایزوپروپانول الکل
میزان محلول ذرات سیلیکا (مرحله ۱۵)	۳۰-۵۰ µl

واکنش PCR

به‌منظور بررسی طول توالی‌های موردنظر ۲۶ جفت پرایمر مخصوص این نواحی استفاده گردید واکنش کلی PCR به‌صورت: DNA با غلظت‌های ۷۰۰-۱۲۰ نانوگرم در میکرولیتر DNA، ۲۵ میکرو مولار از هر پرایمر، ۵۰ میلی مولار Mgcl2، بافر PCR ۱۰X، ۱۰ میلی‌مولار dNTP و ۵ واحد آنزیم Smar taq در شرایط ۹۴ درجه سانتیگراد ۵ دقیقه، ۹۴ درجه سانتیگراد ۳۰ ثانیه، ۵۳ تا ۵۹ درجه سانتیگراد برای قطعات مختلف به مدت ۴۵ ثانیه، ۷۲ درجه سانتیگراد به مدت ۴۵ دقیقه و در ۳۰ سیکل PCR، تکثیر شد. وجود محصولات PCR به‌وسیله ژل آگارز ۲٪ تأیید گردید.

بررسی محصولات PCR به‌وسیله ژل پلی اکریلامید:

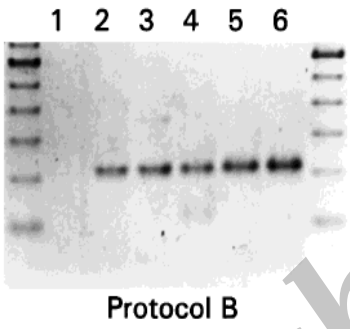
به‌منظور بررسی طول قطعات تکثیر شده، ۱۰ میکرولیتر از محصولات PCR به همراه ۱۰ میکرولیتر بافر TBE حاوی فرمامید، برروی ژل آکریل آمید ۱۰٪ برده شد. ژل در دمای ۴ درجه سانتیگراد و با ولتاژ ۱۷۵ به‌مدت ۱۸ ساعت اجرا گردید و سپس به‌روش نیترات نقره رنگ‌آمیزی شد.

نتایج

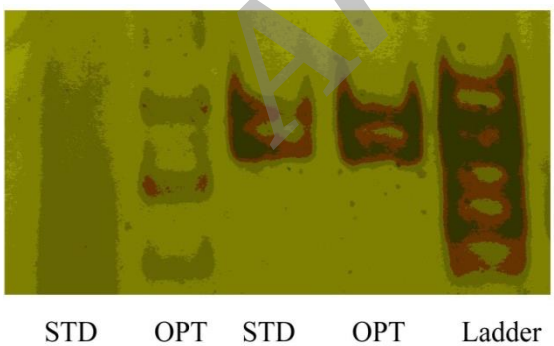
متوسط میزان DNA حاصل از روش فنل کلروفرم سیلیکا اپتیمایز شده در غلظت ۳۵µl ذرات سیلیکا برابر ۲۶۷/۵ µg/ml و میزان متوسط خلوص آن ۱/۱۲ می‌باشد. متوسط میزان DNA حاصل از روش معمولی برابر ۱۹۲/۷۶ µg/ml و میزان متوسط خلوص آن ۰/۸۴ می‌باشد.

جدول ۳- غلظت و میزان خلوص DNA استخراج شده در ۱۰ نمونه تصادفی با دو روش فنل کلروفرم سیلیکا بهینه‌شده و روش استخراج فنل کلروفرم معمولی

نمونه‌ها	فنل-کلروفرم-سیلیکا بهینه شده		روش معمولی	
	غلظت DNA (µg/ml)280	خلوص (OD260/OD)	غلظت DNA (µg/ml)	خلوص DNA OD260/OD) (280
۱	۵۱۵	۱/۳۲	۱۰۶/۵	۱/۰۳
۲	۵۹/۱	۱/۰۷	۱۴۸/۶	۰/۹۲
۳	۱۴۰/۷۶	۱/۰۸	۴۱۴	۰/۹۸
۴	۴۸۸/۵۲	۱/۰۵	۱۳۲/۴۸	۰/۸۴
۵	۱۱۵/۹۲	۱/۱۴	۲۰/۷	۰/۵۹
۶	۴۹۶/۸	۱/۰۱	۴۱۴	۰/۹۸
۷	۳۲۲/۹۲	۱/۰۱	۲۴۸/۴	۱/۰۲
۸	۱۱۵/۹۲	۱/۰۶	۹۵/۲۲	۱/۰۲
۹	۲۵۶/۶۸	۱/۰۵	۲۷۳/۲۴	۰/۶۲
۱۰	۱۶۵/۶	۱/۰۸	۷۴/۵۲	۰/۷۵



شکل ۱- تکثیر DNA استخراج شده با دو روش فنل کلروفرم سیلیکا معمولی (A) و روش بهینه‌شده (B) در منطقه پلی‌مورفیک CD4



شکل ۲- نتایج تکثیر DNA استخراج شده با دو روش فنل کلروفرم سیلیکا (STD) و روش بهینه‌شده (OPT) در منطقه پلی‌مورفیک D16S539

نتایج حاصل از PCR نواحی موردنظر با DNA حاصله از استخراج دو روش مورد.

Archive of SID
www.SID.ir

بحث

در بررسی نواحی پلی‌مورفیسم توسط PCR در ۱۵ نمونه تصادفی ۱۵ نمونه DNA حاصل از روش بهینه همگی باندهای مناسبی دادند. در ۴ نمونه از نمونه‌های استخراج شده توسط روش معمولی نتایج قابل قبولی برای منطقه CD4 به‌دست نیامد (شکل ۱) در PCR ۱ نمونه روش معمولی نسبت‌به روش بهینه باندهای مناسب و قابل تفکیکی مشاهده نشد (شکل ۲).

میانگین بازدهی واکنش PCR، برای DNA استخراج شده از ۶۲ نمونه استخوانی با روش‌های استخراجی فنل کلروفرم سیلیکا بهینه‌شده و معمولی در هشت منطقه پلی‌مورفیک F13, D13S317, D16S539, D5S818, LPL, vWA, CD4 و FES به‌ترتیب ۷۵٪، ۷۸٪، ۸۱٪، ۷۶٪، ۸۵٪، ۷۱٪، ۸۹٪، ۸۶٪، ۶۴٪، ۳۹٪، ۷۰٪، ۴۹٪، ۶۸٪، ۷۶٪، ۷۱٪ و ۲۸٪ درصد می‌باشد.

مطالعه حاضر برروی بهینه‌سازی روش استخراجی فنل–کلروفرم و بررسی تأثیر غلظت‌های مختلف ذرات سیلیکا در حذف مهارکننده‌های PCR و افزایش کیفیت DNA حاصل از نمونه‌های استخوان قدیمی برای بهبود ارائه خدمات معمول آزمایشگاهی در آنالیز نمونه‌های استخوانی انجام شد. موفقیت در تکثیر مناطق پلی‌مورفیک STR به‌عنوان یک شاخص اصلی در بررسی‌های جنایی و پزشکی قانونی مطرح می‌باشد؛ ما در مطالعه خود علاوه‌بر میزان DNA استخراج شده و میزان خلوص آن، لذا این شاخص را برای ارزیابی روش استخراجی مذکور انتخاب نمودیم.

DNAهای موجود در بافت‌های استخوانی قدیمی برای DNA Typing دارای مشکلاتی هستند که از آن جمله می‌توان به شکستگی زیاد قطعات DNA این بافت‌ها و به اندازه‌ی کوتاه شده آنها اشاره کرد که آنها را برای واکنش PCR غیرقابل استفاده می‌کند. در بعضی موارد ممکن است DNA دپورینه شده باشد که این عامل خود باعث توقف پیش از موعد واکنش تکثیر می‌گردد. با این وجود می‌توان گفت موفقیت در تکثیر DNA از بقایای اسکلتی تا حد زیادی به روش‌های به‌کار گرفته شده در استخراج DNA بستگی دارد (۷–۹).

در سال‌های اخیر، آزمایشگاه‌های DNA و تشخیص هویت، تکنیک‌های مختلف را در جهت تلاش برای مشکلات ذکر شده در بالا مورد آزمون قرار داده‌اند. این تکنیک‌ها شامل دکلسیفیکاسیون، خالص‌سازی مجدد، آزمودن روش استخراجی جدید و ارزیابی سیستم‌های مختلف تکثیر می‌باشد. با وجود مشکلات اقتصادی و سیاسی تهیه کیت‌های پیشرفته استخراج در کشور ما همواره با مشکلاتی مواجه است از این رو ما به بهینه‌سازی به روش دستی مذکور پرداختیم.

در این مطالعه خود، روش فنل–کلروفرم–سیلیکا استاندارد را با ایجاد تغییراتی در غلظت مواد و محلول‌ها به متد (جدول ۱) بهینه تغییر دادیم. یافته‌های حاصل از تعیین غلظت DNA حاصل از ۶۲ نمونه استخوانی استخراج شده با دو روش مورد مطالعه نشان داد که متوسط میزان غلظت DNA (µg/ml ۲۶۷/۵۰ (حاصل از روش فنل–کلروفرم–سیلیکا بهینه شده در مقایسه با میزان DNA (µg/ml ۱۹۲/۷۶) حاصل از روش معمولی بسیار بیشتر است. و میزان کلی موفقیت در واکنش PCR در هر هشت منطقه پلی‌مورفیک مورد بررسی با به‌کارگیری روش فنل–کلروفرم–سیلیکا (۸۲٪) نسبت‌به به‌کارگیری روش معمولی (۶۷٪) بیشتر می‌باشد.

همانطور که در قسمت نتایج ذکر شد، DNA Profiling کامل در هر هشت منطقه STR مورد بررسی برای ۱۵ نمونه به‌طور تصادفی انجام شد که همگی نمونه‌های حاصل از روش بهینه باندهای قابل تفکیکی دادند ولی در ۴ نمونه حاصل از روش معمولی باندهای منطقه CD4 قابل تفکیک نبود که به‌نظر می‌رسد به خاطر کیفیت بد DNA استخراج شده باشد. طبق یافته‌های این مطالعه روش فنل کلروفرم سیلیکا در غلظت ۳۵µl ذرات سیلیکا نتایج بهتری را در رابطه با STR Typing از نمونه‌های تجزیه شده اسکلتی نسبت‌به روش معمولی نشان می‌دهد.

Hummel و همکارانش در مطالعه‌ای که برروی استخراج DNA از بقایای اسکلتی انجام دادند گزارش کردند که پروتکل فنل کلروفرم می‌تواند با مقداری بهینه‌سازی روشی بسیار مناسب برای انگشت‌نگاری DNA باشد و به‌خصوص این روش را برایSTR Typing پیشنهاد کردند (۱۳) که این نتایج با یافته‌های ما در یک راستا است. Butler و همکارانش در مطالعه‌ای دیگر با مقایسه دو روش فنل کلروفرم و گوانیدین تیوسیانات که برروی ۴۵ نمونه استخوان انجام دادند، اعلام نمودند که متد گوانیدین تیوسیانات نسبت‌به متد فنل کلروفرم برای نمونه‌های استخوان پوسیده نتایج ضعیف‌تری را نشان می‌دهد (۱۴). در مطالعه ما، ۴ نمونه استخوانی که در منطقه CD4 با روش استاندارد قبلی جواب نداده بودند با روش فنل کلروفرم بهینه جواب دادند و در کل محصولات PCR در یک روش ایجاد آلل‌های کاذب کمتری نسبت به روش استاندارد می‌کنند که به‌نظر می‌رسد یکی از عوامل مؤثر حذف بهتر کلسیم با تیمار طولانی‌تر EDTA و مهمتر از ان حذف مهارکننده‌های PCR با استفاده از غلظت مناسب ذرات محلول سیلیکا در روش بهینه شده باشد که این خود عاملی مهم در به‌دست‌آوردن نتایج مطلوب‌تر در انگشت‌نگاری DNA است. به‌طور خلاصه طبق یافته‌های ما در مطالعه نمونه‌های استخوانی قدیمی روش فنل کلروفرم سیلیکا بهینه شده با غلظت‌های ارائه شده در این مقاله نتایج بهتری را در رابطه با STR Typing این نمونه‌ها می‌دهد و برای استفاده‌های

Archive of SID
www.SID.ir

بعدی در آزمایشگاه‌هایی که امکان استفاده از کیت‌های خارجی وجود ندارد پیشنهاد می‌شود.

References

1. Davoren J, Vanek D, Konjhodzic R, Crews J, Huffine E, Parsons TJ. Highly effective DNA extraction method for nuclear short tandem repeat testing of skeletal remains from mass graves. Croat Med J 2007;48(4):478-85.

2. Parsons Tj, Huel R, Davoren J, Katzmarzyk C, Milos A, Selmanovic A, et al. Application of novel “mini-amplicon” STR multiplexes to high volume casework on degraded skeletal remains. Forensic Science International 2007;1:175-179.

3. Holland MM, Cave CA, Holland CA, Bille TW. Development of a quality, high throughput DNA analysis procedure for skeletal samples to assist with the identification of victims from the world trade center attacks. Croat Med J 2003;44(3):246-72.

4. Hochmeister MN, Budowle B, Borer UV, Eggmann V, Comey CT, Drinhofer R. Typing of deoxyribonucleic acid (DNA) extracted from compact bone from human remains. Journal of Forensic Sciences 1991;36(6):1649-1661.

5. Pancorbo MM, Castro A, Alonso S, Fernandez I, Barbero C, Garcia-Orad A, et al. Genetic typing with HUMTHO1, HUMvWA31A and HUMFES/FPS short tandem repeat loci, D1S80 variable number tandem repeat locus and HLA-PQα of recent and from XII-XIII centuries spongy bone. Elecrophoresis 1995;16:1612-1616.

6. Hänni C, Brousseau T, Laudet V, Stehelin D. Isopropanol precipitation removes PCR inhibitors from ancient bone extracts. Nucleic Acids Research 1995;23(5):881-882.

7. Anzai T, Naruse TK, Tokunaga K, Honma T, Baba H, Akazawa T, et al. HLA genotyping of 5000-and 6000-year-old ancient bones in Japan. Tissue Antigens 1999;54:53-58.

8. Yoder AD. Ancient DNA in subfossil lemurs: methodological challenges and their solutions. In: Rakotosamimanana E. New directions in Lemur studies. New York: Kluwer Academic/Plenum pub;1999.

9. Schmerer WM, Hummel S, Hermann B. Optimized DNA extraction to improve reproducibility of short tandem repeat gonotyping with highly degraded DNA as target. Electrophoresis 1999;20:1712-1716.

10. Cattaneo C, Craig OE, James NT, Sokol RJ. Comparison of three DNA extraction methods on bone and blood stains up to 43 years old and amplification at three different gene sequences. J Forensic Sci 1997;42:1126-1135.

11. Höss M, Paabo S. DNA extraction from pleistocene bones by a silica-based purification method. Nucleic Acids Res 1993;21:3913-3914.

12. Baron H, Hummel S, Herrmann B. Mycobacterium tuberculosis complex DNA in ancient human bones. J Archaeol Sci 1996;23:667-671.

13. Hummel S. Ancient DNA typing. Berlin: Springer 2003;57-80.

14. Hoss M, Paabo S. DNA extraction from pleistocene bones by a silica-based purification method. Nucleic Acids Res 1993;21(16):3913-3914.

Archive of SID

www.SID.ir

Journal of Knowledge & Health 2014;Vol 9, No 2
Shahroud University of Medical Sciences

DOI: 10.1234/knh.v0i0.350
Original Article

Optimization of the Phenol -Chloroform Silica DNA Extraction Method in Ancient Bones DNA Extraction

Morteza Sadeghi (M.Sc.)[1*], Alireza Sabouri (Ph.D.)[2]
1- Dept .of Biology, School of Basic Sciences, Isfahan University, Isfahan, Iran.
2- Legal Medicine Center, Isfahan, Iran.

Received: 4 November 2012**, Accepted:** 24 July 2013

Abstract:

Introduction: *DNA extraction from the ancient bones tissues is currently very difficult. Phenol chloroform silica method is one of the methods currently used for this aim. The purpose of this study was to optimize the assessment method.*
Methods: *DNA of 62 bone tissues (average 3-11 years) was first extracted with phenol chloroform silica methods and then with changing of some parameters of the methods the extracted DNA was amplified in eight polymorphisms area including FES, F13, D13S317, D16, D5S818, vWA and CD4. Results from samples gained by two methods were compared in acrylamide gel.*
Results: *The average of PCR yield for new method and common method in eight polymorphism regions was 75%, 78%, 81%, 76%, 85%, 71%, 89%, 86% and 64%, 39%, 70%, 49%, 68%, 76%, 71% and 28% respectively. The average of DNA in optimized (in 35l silica density) and common method were 267.5 µg/ml with 1.12 purity and 192.76 g/ml with 0.84 purity respectively.*
Conclusions: *According to the findings of this study, it is estimated that longer EDTA attendance is an efficient agent in removing calcium and also adequate density of silica particles can be efficient in removal of PCR inhibitors.*

Keywords: PCR reaction, STR polymorphism, Phenol chloroform silica extraction method.

Conflict of Interest: No
***Corresponding author:** M. Sadeghi**, Email:** ms.sadeghi@yahoo.com*

Citation: Sadeghi M, Sabouri A. Optimization of the phenol -chloroform silica DNA extraction method in ancient bones DNA extraction. Journal of Knowledge & Health 2014;9(2):21-26.

Archive of SID

www.SID.ir