بهینه سازی استخراج و تکثیر DNA از بلوکهای بافتی پارافینی با ارائه یک روش ترکیبی

آزاده لهراسبی نژاد[۱]، محمد مهدی یعقوبی*[۲] و حبیب اله ناظم[۱]

[۱] تهران، دانشگاه پیام نور، گروه بیوشیمی

[۲] کرمان، مرکز بین المللی علوم و تکنولوژی پیشرفته و علوم محیطی، پژوهشکده علوم محیطی، بخش بیوتکنولوژی

تاریخ دریافت: ۸۷/۶/۱۳ تاریخ پذیرش: ۸۸/۳/۲٤

چکیده

بافتهای پارافینه موجود در آرشیو بخشهای آسیب‌شناسی منبع بسیار غنی از نمونه‌های انسانی برای مطالعات مولکولی به روشهایی مانند واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز (PCR) در بیماریهایی همچون سرطان می‌باشند. اما مشکل موجود آن است که اسیدهای نوکلئیک در این بافتها در مسیر تثبیت‌شدن و پارافینه‌نمودن، آسیب دیده و در بسیاری از موارد کیفیت DNA استخراج شده برای PCR مناسب نمی‌باشد. در این تحقیق سعی شد با بررسی چند روش متداول استخراج و تکثیر DNA از بافتهای پارافینه، نقاط ضعف آنها برطرف شده و یک روش ترکیبی جدید معرفی شود. همچنین اثر آنزیمهای مختلف Taq polymerase، pfu و pwo و مخلوط آنها در تکثیرDNA بافت پارافینه مقایسه شد. نتایج نشان داد بازدهی استخراج روش ترکیبی در مقایسه با روشهای قبلی بیشتر بوده و DNA حاصل از آن قابلیت تکثیر بهتری در واکنش PCR دارد.

واژه های کلیدی: بلوک پارافینه، استخراج DNA، واکنش زنجیره ای پلی مراز، بافت سرطانی

*نویسنده مسئول، تلفن: ۰۳٤۲٦۲۲٦٦۱۱ ، پست الکترونیکی yaghoobim@icst.ac.ir

مقدمه

بسیاری از نمونه‌هایی که برای اهداف درمانی با جراحی یا نمونه‌برداری تشخیصی (Biopsy) از بدن افراد خارج می‌شوند در آزمایشگاههای آسیب‌شناسی تثبیت شده و در پارافین نگهداشته می‌شوند. در این حالت می‌توان نمونه‌ها را برای مدت زمان طولانی حفظ کرد(۳، ۵ و ۱٤). این بافتهای بایگانی شده، منبع فوق العاده‌ای برای مطالعات ژنتیک مولکولی، سرطانها و بیماریهای متنوع، اطلاعات مربوط به عوامل ایجاد کننده عفونتها مثل هرپس ویروسها و پاپیلوما ویروسهای انسانی هستند(٤، ۹ و ۱٦).

بیشتر نمونه‌های آسیب‌شناسی به طور عادی در فرمالین تثبیت شده و در پارافین نگهداشته می‌شوند و سپس برای مطالعات بافت‌شناسی به کار می‌روند. اگرچه ساختار بافت و پروتئینهای آن در بافت پارافینه حفظ شده و سلولها شکل و ریخت خود را حفظ می‌کنند، ولی مراحل تثبیت به اسیدهای نوکلئیک آسیب زده و استخراج آنها را با دشواری همراه می کند و در نتیجه بازده PCR را کاهش می‌دهند. زیرا فرمالین باعث ایجاد پیوستگی بین پروتئینها و رشته DNA می‌شود (۱، ٤ و ۱۱).

عوامل اصلی که باعث عدم موفقیت PCR روی نمونه DNA استخراج شده از این بافتها می‌شوند عبارت اند از: ۱-کافی نبودن مقدار DNA الگو در نمونه‌های کوچک مثل بیوپسی، زیرا استخراج DNA از بافتهای کوچک بازده کمی دارد و همراه با آلودگی زیادی است(۱). ۲-حضور مواد مهارکننده مانند هموگلوبین همراه با DNA استخراج شده ۳-تجزیه DNA الگو که مهمترین عامل شکست در انجام PCR روی چنین نمونه‌هایی است (۱، ۲ و ۱۲).

مهم ترین عوامل مؤثر بر تجزیه DNA الگو عبارت اند از:

Archive of SID
www.SID.ir

۱- نوع تثبیت‌کننده‌ای که برای آماده‌سازی بافتها به کار می‌روند (اتانول، استن، Omnifix، فرمالین الکلی، مخلوط فرمالین/الکل/استیک اسید، Bouni's و ...). هرچه تثبیت کننده بکار رفته اسیدی‌تر باشد آسیب بیشتری به مولکولهای DNA وارد می‌کند. از این رو تثبیت‌کننده‌هایی مانند اتانل و استن بهتر هستند. ۲- مدت زمان تثبیت شدن. نتایج یک بررسی نشان می‌دهد که پس از ۲٤ ساعت تثبیت، احتمال انجام PCR موفق روی نمونه‌های تثبیت شده در تمام تثبیت کننده‌ها به جز اتانل و استن کاهش می‌یابد. این در حالی است که برخی نمونه‌ها در آزمایشگاههای آسیب شناسی تا چند روز در محلول تثبیت کننده باقی می‌مانند و این خود احتمال استخراج DNA با کیفیت خوب را به شدت کاهش می‌دهد. ۳- قدمت بلوکهای پارافینه. هرچه از زمان تثبیت نمونه‌ها بیشتر گذشته باشد احتمال تکثیر قطعات DNA بزرگتر کاهش می‌یابد. در همان مطالعه نشان داد که تنها در ٦۰ درصد از نمونه‌هایی که از زمان تثبیت‌شان ۵ سال می‌گذشت تکثیر قطعات به طول ۵۳٦ جفت باز امکان پذیر است، اما در نمونه‌هایی با قدمت ۲۰ سال تنها ٤۵ درصد قابلیت تکثیر DNA به طول ۲٦۷ جفت باز را داشتند(۸ و ۹).

٤- طول قطعات DNA به دست آمده. از آنجا که در فرآیند تثبیت مولکولهای DNA آسیب می‌بینند هرچه طول قطعه مورد مطالعه در PCR بزرگتر باشد احتمال تکثیر آن کاهش می‌یابد. بنابراین در مطالعه روی چنین نمونه‌هایی باید به قطعات حتی الامکان کوچکتر بسنده نمود (۸، ۹ و ۱۲).

بیشتر روشهای مورد استفاده در استخراج DNA شامل سه مرحله هستند: پارافین زدایی، هضم با پروتئاز، خالص‌سازی. در روشهای سنتی برای پارافین‌زدایی از زایلن-اتانول استفاده می‌شود (۲ و ٤). اما امروزه روشهای دیگری مثل ذوب کردن پارافین به کمک حرارت و یا حل کردن آن در حلالهای آلی به کمک تغییر pH بکار می روند (٤، ۱۳ و ۱۵). هضم بافتهای پارافینه به کمک پروتئیناز K بازده واکنش را افزایش می‌دهد. در نهایت از فنل-کلروفرم برای خالص‌سازی استفاده می‌شود که زحمت زیادی داشته و بعلت چند مرحله شستشو خطر آلودگی DNA را افزایش می‌دهد (۲، ٤ و ۱٤). علاوه بر این در این روشها ممکن است عوامل مهارکننده PCR مانند فنل، هموگلوبین و ... در نمونه وارد شده و جلوی انجام PCR را بگیرند. به همین دلیل توصیه می‌شود از روشهای مبتنی بر ستون کروماتوگرافی که DNA خالص‌تری به دست می‌دهند استفاده شود. هدف تحقیق حاضر تغییر این روشها برای بازیافت DNA با بازده بالا و کیفیت مناسب برای PCR می‌باشد.

مواد و روشها

در این مطالعه ۵۳ بلوک تثبیت شده در فرمالین و نگهداری شده در پارافین مربوط به بیماران مبتلا به سرطان کارسینومای روده بزرگ که طی سالهای ۷۳ تا ۸٦ در بیمارستانهای شهر کرمان بستری شده بودند جمع‌آوری شد. بلوکهایی که حاوی مقدار کافی از بافتهای طبیعی و توموری هر بیمار (در مرحله کارسینومای IIIA) بودند برای مقایسه روشهای مختلف مورد استفاده قرار گرفتند. برای پارافین‌زدایی از یک پروتوکل ترکیبی از منابع (۵، ٦، ۷، ۹ و ۱٦) استفاده شد.

پارافین زدایی: حدود ۲۵ میلی‌گرم از نواحی مربوط به بافت توموری و طبیعی هر بیمار به کمک تیغ جراحی جدا شده و پس از اینکه به صورت برشهای نازکی درآمد به لوله‌های ۱/۵ میلی‌لیتری استریل منتقل گردید.

برای حذف پارافین، نمونه‌ها سه مرتبه به کمک زایلن خالص به مدت ۱۵ دقیقه شستشو داده شده و پس از پایان هر مرحله در دستگاه سانتریفوژ با دور ۱٤۰۰۰ rpm رسوب داده شد.

Archive of SID

www.SID.ir

حذف زایلن: برای حذف زایلن نمونه‌ها دو بار با اتانول مطلق به مدت ۱۵ دقیقه شستشو داده شده و با همان شرایط مرحله قبل سانتریفوژ انجام شد.

مرحله آبدهی: از این به بعد دو روش مختلف به کار رفت. مرحله آبدهی در روش الف بر روی نمونه‌ها صورت نگرفت.

روش ب: هریک از نمونه‌ها به ترتیب به مدت ۱۰ دقیقه در اتانول ۸۰، ٦٠ و ٤٠ درصد شستشو داده و با همان شرایط مرحله قبل سانتریفوژ شده تا نمونه‌ها رسوب کند.

خشک شدن: لوله‌ها به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد قرار داده شد تا اتانول موجود در بافتها کاملاً خارج شود.

هضم: برای نشان دادن تأثیر این مرحله در کیفیت DNA به دست آمده از دو روش زیر استفاده گردید:

روش الف: ۱۸۰ میکرولیتر از بافر هضم کننده به هریک از لوله‌ها افزوده شد و سپس ۲۰ میکرولیتر آنزیم پروتئیناز K (کیت Qiagen DNeasy) به هریک از آنها اضافه و کاملاً با یکدیگر مخلوط شدند و لوله‌ها در طول شب در دمای ٥٦ درجه سانتی گراد قرار گرفتند(طبق دستورالعمل شرکت سازنده کیت).

روش ب : ۱۸۰میکرولیتر از بافر هضم کننده به هر یک از لوله‌ها افزوده و به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۹۸ درجه سانتی گراد قرار داده شدند. سپس لوله‌ها سریعاً به روی یخ منتقل شدند و ۲۰ میکرولیتر پروتئیناز K به محتوای لوله اضافه شد و لوله‌ها در طول شب در دمای ٥٦ درجه سانتی گراد قرار گرفتند.

استخراج DNA: بقیه مراحل استخراج بر طبق روش کیت DNeasyو با کمک ستونهای کروماتوگرافی اختصاصی موجود در کیت دنبال شد. در پایان برای اطمینان از کیفیت DNA استخراج شده، جذب نمونه‌های خالص شده در طول موجهای ٢٦٠ و ۲۸۰ نانومتر به وسیله دستگاه طیف‌سنج خوانده شد. دراین مرحله دقت لازم صورت گرفت تا نمونه‌های توموری و طبیعی هر بیمار با پس از مطابقت با لام هر نمونه درست انتخاب شده و با سایر نمونه‌ها مخلوط نشوند و همچنین آلودگی با سلولهای خود محقق هم بوجود نیاید. کلیه وسایل مصرفی استریل شده و فقط برای یکبار مصرف می‌شدند.

الکتروفورز DNA : پس از انجام مراحل فوق برای مشاهده کیفیت DNA استخراج شده ۷ میکرولیتر از آن را روی الکتروفورز افقی ژل آگارز ۱ درصد (تهیه شده در بافر TBE 1X) برده و پس از رنگ آمیزی با اتیدیوم برماید با کمک دستگاه GBOX HR (شرکت Syngene)عکس برداری شد (۱۵).

واکنش PCR : پرایمرهای زیر به صورت اختصاصی برای اگزونهای شماره ۵ ، ۷ و ۸ ژن tp53 طراحی و توسط کمپانی Isogen هلند ساخته شدند. طول محصول PCR برای این اگزونها به ترتیب ۱۹۳، ۲۰۲ و ۱۵۸ جفت باز می‌باشد.

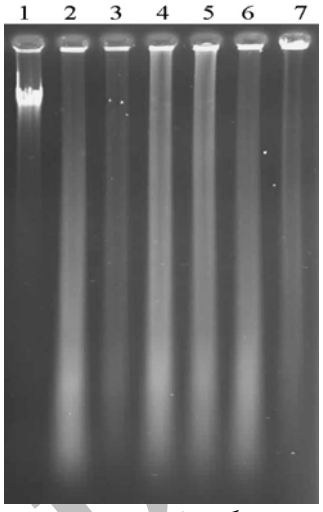
EXON 5 F: GTACTCCCCTGCCCTCAACA
EXON 5 R: CTGCTCACCATCGCTATCTG
EXON 7 F: GGCTCTGACTGTACCACCAT
EXON 7 R: GGAAGAAATCGGTAAGAGG
EXON 8 F: GGTAATCTACTGGGACGGAAC
EXON 8 R: GCTTCTTGTCCTGCTTGCTT

واکنش PCR در حجم ۲۵ میکرولیتر با شرایط زیر صورت گرفت:

$MgCl_2$ ۱/۵ میلی‌مولار، مخلوط dNTP ۲۰۰ میکرومولار، پرایمرهای رشته پایه و پیرو هر کدام ۰/٤میکرومولار،، DMSO به میزان ۳ درصد حجم واکنش، DNA الگو به میزان ۲۰۰ تا ۹۰۰ نانوگرم. ۱/۲۵ واحد آنزیم Taq DNA polymerase (سیناژن) یا آنزیم pfu شرکت Fermentas، آنزیم pwo شرکت Roche و یا مخلوط آنها به نسبت های مختلف.

Archive of SID

www.SID.ir



شکل ۱- الکتروفورز ژل آگارز DNA استخراج شده از بافت خون تازه (چاهک شماره یک) و بافت پارافینه (چاهکهای ۷-۲) با کیت DNeasy. DNA استخراج شده از خون سالم که به صورت یک نوار مشخص با وزن مولکولی بالا در ابتدای چاهک باقی می‌ماند. اما DNA بافتهای پارافینه چون تجزیه شده است به صورت نواری کشیده دیده می‌شود.

ابتدا مخلوط واکنش به مدت ۵ دقیقه در دمای ۹٤ درجه سانتی گراد قرار گرفت و سپس ۳۵ سیکل PCR با شرایط زیر ادامه پیدا کردند:

۹٤ درجه سانتی گراد به مدت ۳۰ ثانیه، ٥٦ درجه سانتی گراد ۳۵ ثانیه، ۷۲ درجه سانتی گراد ٤٥ ثانیه، و در پایان مخلوط واکنش به مدت ۵ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتی گراد قرار گرفت. نمونه افراد مختلف در زمانهای متفاوتی تکثیر شد تا از انتشار آلودگی بین نمونه‌ها پیشگیری شود. تمام اجزای مشترک واکنش PCR مانند dNTP، منیزیوم، آنزیم و بافر آن در master mix تهیه شده و بین نمونه ها توزیع شد (به جزء موقع کار کردن با آنزیم pwo). درب لوله هر نمونه DNA تنها هنگام ضرورت باز شده و بلافاصله بسته شد. در تمام واکنشهای PCR از نمونه کنترل منفی استفاده گردید. DNA خون هم به عنوان کنترل مثبت برای PCR نمونه های پارافینه به کار رفت. محصولات حاصل از PCR نمونه‌ها به همراه نشانگر اندازه DNA روی الکتروفرز افقی ژل آگارز ۱ درصد به مدت ۹۰ دقیقه با ولتاژ ۷۰ الکتروفرز شد و پس از عکس‌برداری اندازه باندهای تکثیر شده مورد بررسی قرار گرفت.

نتایج و بحث

DNA نمونه‌های مختلف بافت توموری و نرمال پارافینه به کمک کیت DNeasy استخراج شده و روی الکتروفرز بررسی شد. نتایج نشان داد که این روش برای استخراج از خون و بافتهای تازه روده از بازدهی بالایی برخوردار بوده و کیفیت و کمیت DNA حاصل از آن بالا می‌باشد. DNA استخراج شده از خون یا بافتهای تازه توموری و طبیعی که بلافاصله از اتاق عمل جراحی بیمارستانها اخذ شده بود به صورت یک نوار مشخص که حاکی از DNA با وزن مولکولی بالاست در نزدیکی چاهک ژل دیده می‌شد (شکل ۱). اما این روش در استخراج DNA از بافتهایی که در فرمالین ثابت شده‌اند بازدهی بالایی ندارد. به طوری که DNA بافتهای پارافینه حاصل با این کیت به صورت نوار کشیده اما با شدتهای متفاوتی روی ژل آگارز مشاهده گردید که حاکی از تجزیه DNA است. در اغلب نمونه‌ها میزان DNA بافت توموری بیشتر از بافت نرمال همان فرد و یا سایر نمونه‌های نرمال بود (شکل ۱).

در روش تغییر یافته از کیت DNeasy شرکت Qiagen استفاده شد. اما در مرحله آبدهی تغییر کوچکی داده شده و قبل از افزودن پروتئیناز K نمونه‌ها به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۹۸ درجه سانتی گراد قرار داده شده و سریعاً روی یخ منتقل شدند. نتایج نشان داد که با این روش میزان بیشتری از DNA با قابلیت تکثیر در واکنش PCR استحصال می‌شود. پس از استخراج DNA از بلوکهای پارافینه به دو روش فوق، جذب نمونه‌های استخراج شده در طول موجهای ۲٦۰ و ۲۸۰ نانومتر خوانده شد. نتایج جذب حاکی از آن است که هر دو روش در بافت توموری DNA خالص داده و آلودگی با پروتئین وجود ندارد (نسبت ۲٦۰ به ۲۸۰ نانومتر حدود ۲ است). اما غلظت DNA استخراج شده (چه از بافت نرمال و چه از بافت

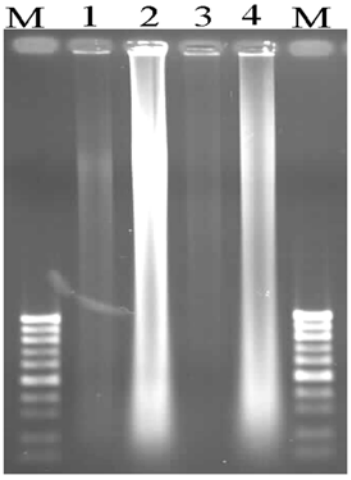
Archive of SID

www.SID.ir

توموری) به روش معمولی بیشتر از روش ترکیبی می‌باشد (جدول ۱). در اینجا نیز همچون نمونه‌های بافت تازه، میزان DNA استخراج شده از بافت توموری پارافینه نسبت به بافت طبیعی معادلش بیشتر بود. DNA حاصل از بافت توموری در هر دو روش به صورت کشیده شده در ژل جاری شده است. اما DNA حاصل از بافت پارافینه طبیعی به صورت نوار ضعیف تری دیده می‌شود (شکل ۲).

جدول ۱ - اطلاعات حاصل از اسپکتروفوتومتر DNA استخراج شده از یک نمونه به دو روش متفاوت الف و ب. بافت توموری با T و بافت نرمال با N نشان داده شده است.

		OD 260 nm	OD 280 nm	OD 260/280	DNA µg/µl
روش الف	N4	۰/۰۲۱	۰/۰۱۲	۱/۷۹۷	۰/۰۵۲
	T4	۰/۲۳۲	۰/ ۱۰۲	> ۲	۰/۵۸۰
روش ب	N4	۰/۰۱۲	۰/۰۱۰	۱/۱۹۶	۰/۰۳۰
	T4	۰/۱۱۰	۰/۰۴۶	> ۲	۰/۲۷۵



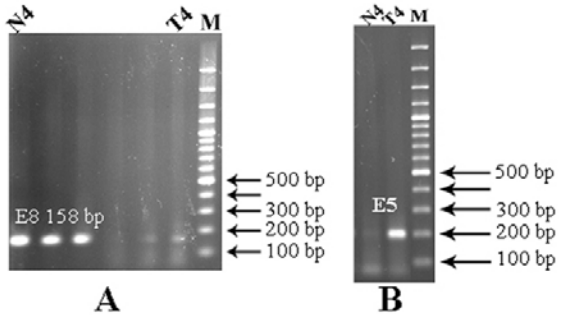
شکل ۲ - الکتروفورز ژل آگارز DNA استخراج شده با روش ترکیبی و کیت DNeasy. از چپ به راست به ترتیب مارکر اندازه DNA، سپس به ترتیب DNA استخراج شده از بافت نرمال (چاهک ۱) و توموری (چاهک ۲) متعلق به یک بیمار و در ادامه DNA استخراج شده از بافت نرمال (چاهک ۳) و توموری (چاهک ۴) متعلق به بیماری دیگر. همانطور که مشخص است DNA حاصل از نمونه بافت توموری اسمیر پررنگتری نسبت به بافت نرمال همان فرد به دست می‌دهد.

علت این یافته احتمالاً آن است که در بافت سرطانی تکثیر سلولها بیشتر بوده و مقدار سلول (و به تبع آن مقدار DNA) نسبت به بافت طبیعی در واحد حجم بیشتر می‌باشد. لذا DNA بیشتری از بافت سرطانی به دست می‌آید.

نتایج تکثیر با آنزیم Taq polymerase نشان داد این آنزیم توانایی تکثیر هر سه اگزون ۵ ،۷ و ۸ را روی DNA حاصل از بافت خون و یا بافت تازه روده بزرگ را دارد (نتایج نشان داده نشده‌اند). اما توانایی آن در تکثیر DNA حاصل از بافتهای پارافینه که به روش کیت DNP استخراج شده بود بسیار پایین است. براساس داده‌های جذب DNA در طول موج ۲۶۰ نانومتر انتظار می رفت که DNA حاصل از روش الف نسبت به روش ب بازدهی تکثیر بیشتری داشته باشد چراکه نتیجه جذب وجود مقدار بیشتری از DNA را نشان می‌داد. اما عملاً کیفیت مطلوب برای انجام مراحل بعدی را نداشت. حتی با به کار بردن غلظتهای متفاوت تا میزان ۸۴۰ نانوگرم نتیجه دلخواه به دست نیامد. یادآور می‌شود یکی از دلایل بالاتر بودن جذب DNA در طول موج ۲۶۰ نانومتر می‌تواند تجزیه آن باشد. به طوری جذب DNA تجزیه یافته بیشتر از DNA سالم می‌باشد، اما عملاً میزان DNA با کیفیتی که قابلیت PCR داشته باشد کمتر است(۱۴). تغییر روش استخراج و استفاده از کیت DNeasy با استفاده از روش ترکیبی منجر به تکثیر موفق روی برخی نمونه‌های DNA بافت پارافینه (به میزان ۴۴۰ نانوگرم) نیز شد(شکل ۳). بر اساس نتایج به دست آمده DNA های استخراج شده به روش ترکیبی (علی رغم شدت باند کمرنگ تر برروی ژل آگارز و جذب پایین تردر طول موج ۲۶۰ نانومتر) دارای توانایی بیشتری در تکثیر قطعات مورد نظر نسبت به DNA های استخراج شده با کیت DNeasy بود. در این مقایسه قطعات مربوط به اگزونهای ۵ و۸ ژن p53 به کمک PCR تکثیر شد (شکل۳). لذا برای استخراج DNA بقیه نمونه‌ها از روش ترکیبی استفاده شد. نتایج مشابهی روی سایر نمونه‌ها نیز به

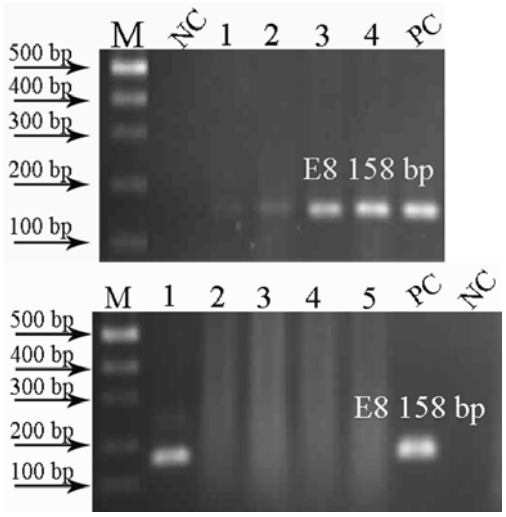
Archive of SID
www.SID.ir

دست آمد به طوری که اختلاف بازدهی دو روش کاملاً مشهود بود.



شـکل۳ - مقایسـه محصـولات PCR اگزونهـای ۵ و۸ ژن p53 در الکتروفورز ژل آگاروز ۱/۵ درصد. M مارکر مولکولی 100bp. در ژل سمت چپ قطعات اگزون ۸ مربوط به DNA نرمال و توموری بیمار مبتلا به سرطان روده بزرگ که به روش ترکیبی (سه چاهک سمت چپ) و روش عادی(سه چاهک بعدی) استخراج شده و با آنزیم Taq polymerase تکثیر شده‌اند مشاهده می‌شود. در ژل سمت راست قطعات تکثیر شده اگزون ۵ (193bp) مربوط به DNA نرمال و توموری همان بیمار که با روش عادی استخراج شده بودند نشان داده شده است. همانطور که پیداست روش ترکیبی بازدهی بالاتری برای تکثیر قطعات نسبت به روش عادی دارد.

آزمایشهای اولیه تکثیر با آنزیم pfu روی DNA استخراج شده از خون نشان داد این آنزیم با برنامه و شرایطی که آنزیم Taq polymerase عمل می‌نمود قادر به تکثیر نمی-باشد. تنها افزایش همزمان غلظت DNA به میزان ۱/۵ برابر و افزایش مدت زمان تطویل از چرخه پانزدهم به بعد به میزان ۵ ثانیه در هر چرخه توانست DNA ژنومی خون را تکثیر نماید. اما همچنان توانایی این آنزیم در تکثیر DNA بافتهای پارافینه ضعیف بود(نتایج نشان داده نشده-اند). لذا برای تکثیری که ضمن داشتن خاصیت اگزونوکلئازی ′3→′5 از قدرت بیشتری برخوردار باشد از آنزیم pwo استفاده گردید.



شکل۴- الکتروفورز ژل آگارز ۱ درصد محصولات PCR اگزون ۸ ژن p53. ژل بالا از چپ به راست: مارکر مولکولیbp 100(M)،NC کنترل منفی بدون الگو، چاهکهای ۴،۳،۲،۱ DNA استخراج شده از بافت پارافینه،PC قطعه تکثیر شده DNA خون (کنترل مثبت).

ژل پایین از چپ به راست: مارکرمولکولیbp 100(M)، چاهک ۱ مربوط به DNA بافت تازه، چاهکهای۵،۴،۳،۲ مربوط به DNA استخراج شده از بافت پارافینه و PC قطعه تکثیر شده DNA خون (کنترل مثبت)،NC کنترل منفی بدون الگو. همانگونه که پیداست آنزیم pwo با برنامه جدید هم توانایی تکثیر همه نمونه‌ها را ندارد. بعضی از نمونه های بافت پارافینه تکثیر نشده و تنها اسمیر تشکیل می‌شود. از طرفی شدت بالاتر محصول بافت تازه نسبت به بافت پارافینه بیانگر عملکرد بهتر آنزیم روی این نمونه‌ها می باشد.

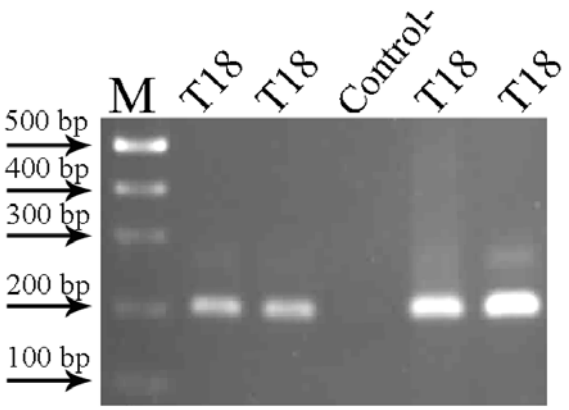
آزمایشهای اولیه تکثیر DNA بافت پارافینه با آنزیم pwo نشان داد برنامه PCR و بهینه‌سازیهایی که از نظر مدت زمان، درجه حرارت، غلظت DNA و تعداد چرخه‌ها روی آنزیم Taq polymerase انجام شده بود برای تکثیر با آنزیم pwo مناسب نیست. بنابراین برای بهینه‌سازی مجدد شرایط این آنزیم نیاز به برنامه ایی جدید بود که با تغییر در مدت زمان فعالیت آنزیم pwo تکثیر DNA استخراج شده از بافت خون به دست آید. این تغییر به این صورت در برنامه PCR اعمال شد که در ۱۵ چرخه اول مدت زمان فعالیت آنزیم، ٤٥ ثانیه باشد و از چرخه ۱۵ به بعد تا چرخه ۳۵ در هر چرخه، ۵ ثانیه به مدت زمان این مرحله از واکنش افزوده شود تا در آخرین چرخه این زمان به ١٤٥ ثانیه برسد. همچنین اثر بافر GC-rich با این برنامه جدید

Archive of SID
www.SID.ir

بررسی شد و یافته‌ها حاکی از آن بود که تنها در حضور این بافر قطعات تکثیر می‌شوند. با برنامه جدید DNA استخراج شده از خون به راحتی تکثیر می‌شد ولی برخی از DNA های بافت پارافینه تکثیر شده و برخی همچنان تنها اسمیر تشکیل می‌دادند و یا محصول محسوسی دیده نمی-شد(شکل ٤). به منظور پیدا کردن بهترین غلظت از DNA بافت پارافینه که قابلیت تکثیر با آنزیم pwo و با برنامه جدید را داشته باشد، غلظتهای مختلف در محدوده ۹۰۰- ۲۰۰ نانوگرم مقایسه شد تا بهترین جواب بدون تشکیل اسمیر به دست آید. نتایج نشان داد غلظت بهینه برای هر نمونه متفاوت بوده و نمی‌توان محدوده مشخصی را تعیین نمود.

با توجه به شرایط مناسب برای تکثیر قطعات مورد نظر از DNA بافت پارافینه با آنزیم pwo برخی نمونه‌ها تکثیر نشده و یا محصول ضعیفی به دست می‌آمد. عدم تکثیر روی برخی نمونه‌ها می‌تواند در اثر آسیب شدید DNA در مراحل تثبیت، باقی ماندن نمونه به مدت چند روز در فرمالین و یا کهنه بودن برخی نمونه‌ها باشد. از آنجا که آنزیمهای pfu و pwo دارای خاصیت اصلاح نوکلئوتیدهای اشتباهی(Proofreading) وارد شده هستند. به همین میزان نیز سرعت آنها کاهش می‌یابد. از این رو تکثیر در حضور مخلوط دو آنزیم pwo و Taq ضروری بود. از نمونه‌هایی که با هریک از دو آنزیم فوق به تنهایی قادر به تشکیل محصولات تک نواری قوی نبودند در حضور دو آنزیم باندهای قوی و مشخصی بدون تشکیل اسمیر به دست می‌آمد (شکل ۵). از میان نسبتهای بررسی شده تنها نسبت ۱ به ۲/۵ از آنزیم pwo به Taq در تکثیر نمونه‌های سخت موفق بود.

روش PCR یک ابزار قدرتمند برای بررسی بافتهای تثبیت‌شده و تعبیه‌شده در پارافین می‌باشد. اما همه روشهای تثبیت،DNA با کیفیت مناسب برای PCR ارائه نمی‌دهند. به همین دلیل تکثیر آن به روش PCR کار دشواری است و تحقیقات زیادی برای افزایش احتمال تکثیر قطعات DNA موجود در بافتهای پارافینه انجام شده است (۸).



شکل ۵ - الکتروفورز ژل آگارز محصول PCR اگزون هفت یکی از بیماران با مخلوط دو آنزیم pwo و Taq به نسبت ۱ به ۲/۵. از چپ به راست: مارکر اندازه 100 bp، دو چاهک بعدی محصول PCR با آنزیم pwo به تنهایی و دو چاهک سمت راست محصول PCR همان نمونه با مخلوط دو آنزیم. سایر شرایط مشابه بوده است. همانطور که پیداست مخلوط دو آنزیم سبب تشکیل محصول قویتری شده است.

با توجه به اینکه فرمالین به کار برده شده در انجام مراحل تثبیت باعث اتصال مولکول DNA با پروتئینها می‌شود(۱۱)، انجام PCR بر روی آن را با مشکل همراه می‌کند. گاهی پروتئینها بعنوان مهارگر نیز در انجام این فرآیند تداخل ایجاد می‌کنند. حال اگر بتوان به کمک روش مؤثری DNA را از این نوع اتصالات رها کرد باند مورد نظر به راحتی تکثیر می‌شود. به نظر می‌رسد که تیمار دمای ۹۸ درجه سانتی‌گراد قبل از افزودن پروتئیناز K منجر به آزادسازی مولکولهای DNA از پروتئینها و در دسترس بودن آن برای انجام موفقیت‌آمیز واکنش PCR می‌شود. بنابراین با آزاد شدن DNA از اتصالات مهارکننده، حتی با مقادیر کم DNA نیز می‌توان PCR موفقی داشت. اما اگر مولکولهای DNA درگیر اتصالات با پروتئینها باشند حتی مقادیر بالای آنها هم نمی‌تواند در واکنش PCR تکثیر شود. به هر حال روش ترکیبی فوق بازدهی PCR روی نمونه‌های DNA استخراج شده از بافت پارافینه را بالا می برد.

Archive of SID
www.SID.ir

در بخش دیگر مرحله PCR تأثیر آنزیمهای مختلف پلی-مراز در تکثیر قطعات بررسی شد. آنزیم Taq polymerase توانایی تکثیر روی نمونه‌های DNA خون و یا بافت تازه را دارد. اما این آنزیم خاصیت اگزونوکلئازی ′3→′5 و اصلاح نوکلئوتیدهای اشتباهی وارد شده را ندارد و برای بررسی جهش مناسب نیست. از طرف دیگر برای تکثیر DNA از بافتهای پارافینه باید از آنزیم قدرتمندی استفاده نمود که توانایی تکثیر مقادیر کم DNA و یا الگوی با کیفیت پایین را داشته باشد. نتایج این تحقیق نشان داد آنزیم pfu قدرت لازم برای این کار را ندارد و قدرت تکثیری آنزیم pwo بیشتر است. اما هر دوی این آنزیمها نیاز به مدت زمان بیشتری در مرحله تطویل برای تکثیر دارند. در برخی مطالعات قبلی نیز از مخلوط دو آنزیم Taq polymerase و pwo برای تقویت و افزایش احتمال تکثیر روی نمونه‌های سخت استفاده کرده‌اند(۱۰). در این تحقیق نیز از این ایده کمک گرفته شد و نتایج نشان داد در حضور دو آنزیم محصول قوی‌تری تشکیل می‌شود (شکل ۵). این بدان علت است که سرعت تکثیر آنزیم Taq polymerase بیشتر از آنزیم pwo است و تکثیر توسط این آنزیم انجام شده و مسئولیت اصلاح نوکلئوتیدهای اشتباهی وارد شده به عهده آنزیم pwo قرار می‌گیرد. در مجموع با روش ترکیبی فوق بازدهی استخراج و تکثیر DNA از نمونه‌های بافت پارافینه بالا رفته و احتمال تکثیر نمونه‌هایی که با روش عادی تکثیر نمی‌شدند بالا می رود. در ادامه این تحقیق جهشهای ژن p53 در نمونه‌های سرطان روده بزرگ در دست بررسی می‌باشد.

منابع

1. Cawkwell L, Quirke P, (2000) Direct multiplex amplification of DNA from a formalin fixed, paraffin wax embedded tissue section. *J Clin Pathol Mol Pathol* 53:51–52.
2. Chan P K S, Chan D P C, To K-F (2001) Evaluation of extraction methods from paraffin wax embedded tissues for PCR amplification of human and viral DNA. *J Clin Pathol* 54(5):401–403.
3. Chen BF and Clejan S, (1993) Rapid preparation of tissue DNA from paraffin-embedded blocks and analysis by polymerase chain reaction. *J Histochemistry and Cytochemistry* 41(5) 765-768.
4. Coombs N J, Gough A C, Primrose J N, (1999) Optimisation of DNA and RNA extraction from archival formalin-fixed tissue. *Nucleic Acid Research* 27(16):e12.
5. Coura R, Prolla J C, Meure L, (2005) An alternative protocol for DNA extraction from formalin fixed and paraffin wax embedded tissue. *J Clin Pathol* 58(8):894-895.
6. Davidsson K (2007) Evaluation of genomic DNA from paraffin embedded tissue and desmin as candidate gene for dilated cardiomyopathy in Newfoundland dogs. University essay from SLU/Dept. of Animal Breeding and Genetics. Institutionen för husdjursgenetik.
7. Gilbert M T P, Haselkorn T, Bunce M (2007). The isolation of nucleic acids from fixed, paraffin- embedded tissues–which methods are useful when? *PLoS ONE* 2(6): e537.
8. Greer C E, Lund J K, Manos M M (1991) PCR Amplification from paraffin _embedded tissues: recommendations on fixatives for long-term storage and prospective studies. *PCR Methods and Applications* 1:46-50.
9. Greer C E, Wheeler C M, Manos M M (1994) Sample preparation and PCR amplification from paraffin-embedded tissue. *PCR Methods and Applications* S: 113-122.
10. Gunther S, Sommer G, Breunig F V, Iwanska A, Kalinina T, Sterneck M & Will H. (1998) Amplification of full-length hepatitis B virus genomes from samples from patients with low levels of viremia: frequency and functional consequences of PCR-introduced mutations. *J Clin Microbiol* 36, 531–538.
11. Kwonil J, Yoonchul H, Sung-Honn K (2004) Development of polymerase chain reaction and comparison with in situ hybridization for the detection of Haemophilus Parasuis in formalin fixed paraffin embedded tissue. *Full paper Pathology* 66(7):841-845.
12. Merkelbach SA, Gehlen J, Handt S (1997) Novel enzyme Immunoassay and optimized DNA Extraction for the detection of polymerase chain reaction amplified viral DNA from paraffin–embedded tissue. *American J Pathology*150 (5):1537-46.
13. Morgan K, Lam L, Kalsheker N (1996) A rapid and efficient method for DNA extraction from paraffin wax embedded tissue for PCR

Archive of SID
www.SID.ir

amplification. *J Clin Pathol Mol Pathol* 49(3): M 179-180.

14. Pinto Á P, Villa L L (1998) A sp in cartridge system for DNA extraction from paraffin wax embedded tissues. *J Clin Pathol Mol Pathol* 51(1):48–49.
15. Sambrook J & Russell DW (2001). *Molecular Cloning* New York, Cold Spring Harbor Laboratory Prss.
16. Shi S, Cote R, Lin W (2002) DNA Extraction from archival formalin-fixed, paraffin-embedded tissue section based on the antigen retrieval principle: heating under the Influence of pH. *J Histochemistry & Cytochemistry*, 50(8):1005-1011.

Optimization of amplification and extraction of DNA from paraffin embedded tissues By a combinatory procedure

Lohrasbi Nejad A. [1], Yaghoobi M.M.[2], and Nazem H.[1]

[1] biochemistry Dept., Payam Noor University, Tehran, I.R. of IRAN

[2] Biotechnology Dept., International Center for Science, High Technology and Environmental Sciences, Kerman, I.R. of IRAN

Abstract

Paraffin embedded tissue found in archives of the pathology departments are valuable resources of human specimens for molecular studies of diseases such as cancer. However, fixation and parafination steps of tissue damage nucleic acids seriously and give rise to DNA with low quality, which is unsuitable for PCR method. In this research, we investigated some usual methods of extracting and amplifying DNA from paraffin-embedded tissue in order to identify and improve their weaknesses and propose a new combined method. The efficiency of different enzymes including Taq, pfu and pwo polymerases or their mixtures in amplifying DNA extracted from paraffin embedded tissues were also compared. The results shows the efficiency of combined method is higher than previous methods and gives DNA that could be amplified more during PCR reaction.

Keywords: paraffin block, DNA extraction, polymerase chain reaction, cancerous tissue

Archive of SID

www.SID.ir