مجله دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی – درمانی شهید صدوقی یزد
دوره هفدهم، شماره سوم، تابستان۱۳۸۸، صفحات ۱۵۷-۱۴۹

بررسی و مقایسه روشهای استخراج DNA از نمونه خون و اسلایدهای مغز استخوان و خون محیطی

افروز اویسی[۱]، دکتر سید محمدرضا مرتضوی زاده[۲]، دکتر مهدی ارجمند[۳]، حسین فضلی[٤]، دکتر محمدحسن شیخها*[٥]

چکیده

مقدمه: روشهای استخراج DNA برای انجام تحقیقات ژنتیک و همین طور آزمایشات تشخیص طبی جهت بیماریهایی که منشاء ژنتیک دارند حائز اهمیت است. همچنین در مورد سرطانها استفاده از روشهای استخراج DNA و بررسی ژنی در طول مراحل درمان، بعنوان یکی از روشهای آزمایشگاهی مطرح می‌باشد. حال بررسی آنکه کدام روش استخراج DNA و استخراج از چه نمونه‌ای بهترین نتیجه را می دهد بسیار مهم خواهد بود.

روش بررسی: در این تحقیق از ۵ نمونه مختلف شامل ۱- خون ۲- اسلاید مغز استخوان آرشیوی رنگ شده به روش گیمسا ۳- اسلاید خون محیطی آرشیوی رنگ شده به روش گیمسا ۴- اسلاید خون محیطی تازه رنگ شده به روش گیمسا و ۵- اسلاید خون محیطی رنگ نشده، با سه روش ۱- نمک زدن۲- جوشاندن و ۳- فنل– کلروفرم، DNA استخراج شد. در این تحقیق سه پارامتر کیفیت (Optimal Density:OD)، کمیت (غلظت DNA) و بازدهی یا وضعیت PCR:Polymerase Chain Reaction مورد بررسی قرار گرفت.

نتایج: بهترین کیفیت در نمونه خون با روش نمک زدن (۱/۷۴) و کمترین کیفیت در تمام نمونه‌های مورد بررسی با روش جوشاندن حاصل شد و در مورد اکثر نمونه‌ها روش نمک زدن و فنل کلروفرم DNA کیفیت مشابهی داشت. در مورد کمیت DNA بیشترین کمیت DNA استخراج شده در تمام نمونه‌ها مربوط به روش جوشاندن بود (6.7µg/ml) و فقط در مورد نمونه اسلاید رنگ نشده بیشترین کمیت مربوط به روش فنل–کلروفرم بود. در حالیکه در برخی نمونه‌ها روش فنل–کلروفرم و در برخی دیگر روش نمک زدن کمترین کمیت DNA استخراجی را داشتند. در مورد وضعیت PCR یا بازدهی DNA استخراج شده نمونه خون با هر سه روش ۱۰۰٪ بازدهی را داشت. در حالیکه در نمونه‌های دیگر اسلاید مغز استخوان آرشیوی، اسلاید خون محیطی رنگ شده آرشیوی، اسلاید خون محیطی رنگ شده تازه و اسلاید خون محیطی رنگ نشده تازه بهترین بازدهی مربوط به روش جوشاندن بود(۱۰۰٪ ، ۸۸٪ ، ۸۴٪ ، ۷۲٪).

نتیجه‌گیری: تحقیق حاضر نشان داد که استخراج DNA از نمونه‌های اسلایدهای مختلف به غیر از نمونه اسلاید خون محیطی رنگ نشده، نتایج خیلی مطلوبی دارد و ذخیره سازی اسلاید خون محیطی رنگ شده تأثیری در نتیجه استخراج DNA نخواهد داشت که این نتیجه برای مطالعات بعدی حائز اهمیت است.

واژه‌های کلیدی: استخراج DNA، PCR، اسلاید مغز استخوان، اسلاید رنگ شده به روش گیمسا

مقدمه

پیشرفت در هر رشته علمی به در دسترس بودن تکنیک‌ها و روش‌های جدید و پیشرفته آن رشته، بستگی دارد. در سالهای اخیر با پیشرفت رشته ژنتیک، در اکثر آزمایشگاه‌های معتبر دنیا آزمایشاتی برای جدا کردن بخش ویژه‌ای از DNA از ژنوم ارگانیسم جهت پی بردن به سکانس و عملکرد آن، انجام

۱- کارشناس ارشد گروه مهندسی شیمی
۲- استادیار گروه داخلی - خون و انکولوژی
۳- استادیار گروه مهندسی شیمی
٤- کارشناس آزمایشگاه
*۵- نویسنده مسئول: دانشیار گروه ژنتیک – تلفن: ۸۲٤۷۰۸۵-۰۳۵۱
Email: sheikhha@yahoo.com
۱،۳- دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات
۵-٤- مرکز تحقیقات درمانی ناباروری دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی یزد
۵-٤-۲- دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی شهید صدوقی یزد
تاریخ دریافت: ۱۳۸۷/۸/۱٤ تاریخ پذیرش: ۱۳۸۸/٤/٤

www.SID.ir

می‌شود(۱). ژنها واحدهای اساسی اطلاعات ژنتیکی می‌باشند که اختلال در ساختمان آنها باعث بروز بیماریهای مختلف ژنتیکی می‌شود. در ضمن در موارد وجود چند شکلی یا پلی مورفیسم اثرات ژنها در تفاوت فنوتیپ در افراد مشاهده شده و جهت بررسی تفاوتها در افراد ساختمان ژنها مورد آنالیز قرار می‌گیرد(۲).

مهندسی ژنتیک براساس اطلاعات ژنتیکی قرار دارد که توسط DNA کد می‌شود و به شکل ژن‌ها منظم می‌شود. لزوم دستیابی به ساختمان DNA در مهندسی ژنتیک موجب شده است که چندین روش مختلف آزمایشگاهی برای استخراج DNA از ژنوم بوجود آید (۳).

اولین قدم در مهندسی ژنتیک جداسازی و خالص‌سازی DNA است. استخراج DNA برای انجام تحقیقات ژنتیک و همین طور آزمایشات تشخیص طبی در پاتولوژی و سیتولوژی حائز اهمیت است. بعلاوه استخراج DNA برای تشخیص بیماری‌هایی که منشأ ژنتیک دارند و همچنین انواع سرطان‌ها به عنوان یکی از روش‌های آزمایشگاهی مطرح می‌باشد. همچنین استخراج DNA در مواردی چون تشخیص هویت و مسائل جنایی و پزشک قانونی کاربرد بسیاری دارد (۶-۴).

DNA را می‌توان از هر نوع بافتی استخراج کرد ولی عموماً DNA از نمونه خون استخراج می‌شود. چون در اکثر مواقع در مورد بیماران، امکان دسترسی به بیمار و یا در مسائل پزشک قانونی و تشخیص هویت، امکان دسترسی به نمونه خون وجود ندارد و یا در مورد بیماران سرطانی که روند بهبود و مراحل درمانی آنها توسط محققین برای یافتن روش‌های مفیدتر درمان بررسی می‌شود، نیاز به نمونه‌های دیگر و حتی نمونه‌های آرشیوی برای استخراج DNA به وجود می‌آید. در اینجاست که استخراج DNA از نمونه‌های لام خون محیطی (تازه یا آرشیوی رنگ شده یا رنگ نشده) و مغز استخوان و حتی بافت‌های مختلف دیگر مانند مو، ناخن اهمیت می‌یابد(۷).

با توجه به محدودیت روش‌های مختلف استخراج DNA که عموماً شامل روش‌های: ۱. نمک زدن،۲. جوشاندن،۳. فنل- کلروفرم می‌باشد و نیز اهمیت استخراج DNA از نمونه لام خون محیطی و مغز استخوان و نیز با توجه به اینکه نمونه‌های مورد استفاده از مقیاس بسیار کوچک و محدود تهیه می‌شوند و با در نظر گرفتن این مسئله که امکان آزمون و خطا و تکرار آزمایش برای هر نمونه برای یافتن جواب مطلوب امکان‌پذیر نمی‌باشد یافتن بهترین روش استخراج از نمونه‌های ذکر بسیار مهم می‌باشد(۸،۹).

در مطالعه‌ای که توسط Vince و همکاران جهت مقایسه روشهای مختلف استخراج از اسلایدهای مغز استخوان رنگ آمیزی شده بوسیله گیمسا انجام گرفت بهترین روش نمک زدن و همچنین استفاده از کیتهای تجاری گزارش شد (۷). در حالیکه در مطالعه ای کخ توسط Boyle و همکاران بر روی اسلایدهای مغز استخوان ۱۷ بیمار مبتلا به لوسمی انجام شد از بین ۵ روش به کار گرفته شده روشهای جوشاندن و فنل-کلرفرم بهترین نتیجه را داد(۱۰).

با توجه به آنکه نتایج مطالعات قبلی با هم هماهنگ نبود و به نظر می‌رسد با توجه به مواد مختلف و تفاوت نمونه‌ها نتایج متفاوتی بدست می آید (۱۴-۱۱) لذا در این تحقیق روشهای مختلف استخراج DNA بر روی نمونه‌های مختلف خون و مغز استخوان امتحان و کارآیی آنها با همدیگر مقایسه گردید.

روش بررسی

این مطالعه به صورت مقطعی و از نوع مشاهده‌ای مقایسه‌ای انجام گرفت. تعداد ۲۵ نمونه مختلف شامل ۱- خون ۲- اسلاید مغز استخوان آرشیوی رنگ شده به روش گیمسا ۳- اسلاید خون محیطی آرشیوی رنگ شده به روش گیمسا ۴- اسلاید خون محیطی تازه رنگ شده به روش گیمسا و ۵- اسلاید خون محیطی رنگ نشده از بیماران مختلف مبتلا به بیماریهای خونی تهیه و هر کدام از نمونه‌ها به ۳ قسمت مساوی تقسیم شد. سپس از هر کدام از این قسمتها با یکی از روشهای ۱- نمک زدن۲- جوشاندن و ۳- فنل– کلروفرم، DNA استخراج شد. جهت استخراج DNA از اسلایدهای خون محیطی و مغز استخوان ۳ اسلاید از هر نمونه انتخاب و ابتدا اسلاید را به وسیله تیغ استریل تراشیده داخل

Archive of SID
www.SID.ir

میکروتیوپ ۱/۵ میلی‌لیتر ریخته و سپس مراحل استخراج طبق مراحل زیر انجام گرفت.

۱/ استخراج DNA با روش جوشاندن (Boiling)

جهت این روش مراحل زیر انجام شد:

۱- اضافه کردن آب مقطر بعنوان بافر لیزکننده RBC

۲- اضافه کردن سود (NaOH 98.5 wt.%, Merck) جهت هضم سیتوپلاسم و بیرون ریختن محتویات هسته و همچنین رسوب پروتئین‌ها

۳- حرارت بالا (دمای جوش)، حرارت به پاره شدن سیتوپلاسم سلولی کمک مؤثر می کند.

۴- اضافه کردن Tris (Boehringer)همراه با سانتریفوژ با دور بالا باعث رسوب پروتئین ها می شود در نتیجه فقط DNA باقی می ماند.

B) استخراج DNA با روش نمک زدن (Salting out)

این روش به طور کلی شامل لیز کردن سلول با یک دترجنت یا شوینده، حذف پروتئین ها با نمک و پروتئیناز k و سرانجام رسوب با اتانل میباشد (۱۳). مراحل به شرح زیر است.

۱- اضافه کردن آب مقطر بعنوان بافر لیز کننده RBC

۲- اضافه کردن بافر لیز کننده (WBC Lysing) از این بافر جهت لیز کردن و یا از بین بردن دیواره هسته استفاده می‌شودکه از ترکیب سه ماده Tris, EDTA, NaCl با غلظت‌های خاص آماده می شود.

۳- اضافه کردن(Merck) SDS%10 جهت دناتوره کردن پروتئین

۴- اضافه کردن پروتئیناز K (Merck)

۵- اضافه کردن Nacl اشباع که ضمن حذف پروتئین‌ها با اتصال به DNA، آن را از سایر قسمت‌ها جدا می کند.

۶- اضافه کردن اتانل مطلق برای کریستاله کردن DNA و ظاهر شدن رشته‌های DNA

۷- اضافه کردن بافر TE جهت حل شدن رسوب DNA

۳) استخراج DNA با روش فنل- کلروفرم (Phenol Chloroform)

مکانیسم اثر مواد در استخراج DNA با این روش تا مرحله اضافه کردن نمک یعنی تا مرحله (۵)، مشابه روش نمک زدن است. از این مرحله به بعد به شرح زیر می‌باشد:

۶- اضافه کردن محلول فنل– کلروفرم جهت حذف پروتئین‌ها

۷- اضافه کردن کلروفرم جهت شستشوی فنل احتمالی باقی مانده

۸- اضافه کردن اتانل مطلق برای رسوب دادن DNA و ظاهر شدن رشته‌های DNA

۹- اضافه کردن بافر TE جهت حل شدن رسوب DNA

اندازه گیری غلظت DNA

تعیین غلظت DNA به وسیله اسپکترفتومتر Eppendorf, (Germany) با جذب اشعه ی ماوراء بنفش به طور دقیق انجام گرفت. مقدار پرتو ماوراء بنفش جذب شده به وسیله محلول DNA در ۲۶۰ و ۲۸۰ نانومتر اندازه گیری شد. با یک نمونه خالص DNA نسبت جذب در ۲۶۰ نانومتر به ۲۸۰ نانومتر (A260/A280) برابر با ۱/۸ می‌باشد. نسبت‌های کمتر از۱/۸ نمایانگر این بود که نمونه استخراج شده از لحاظ پروتئین وغیره ناخالصی دارد.

واکنش زنجیره ای پلی مراز(PCR)

PCR: polymerase chain Reaction روش آزمایشگاهی جهت تکثیر انتخابی یک ناحیه ی معین از مولکول می‌باشد. جهت کنترل DNA استخراج شده در این تحقیق از تکثیر ژن بتا گلوبین استفاده شد. مراحل PCR طبق روشهای استاندارد قبلی انجام شد (۱۵). سپس باند بدست آمده با روش ژل الکتروفورز بر روی ژل آگاروز ۲٪ مشاهده گردید.

نتایج

بررسی کیفیت DNA استخراج شده

نتایج کیفیت در جدول ۱ نشان داده شده است. در مورد DNA استخراج شده از کلیه نمونه‌ها کمترین OD مربوط به روش جوشاندن بود. در نمونه خون (BL) و نمونه اسلایدخون محیطی تازه رنگ نشده (PU) بهترین OD مربوط به روش نمک زدن و در نمونه اسلاید آرشیوی (PA) و نمونه اسلاید خون رنگ شده (PS) و نمونه اسلاید مغز استخوان (BM) بهترین OD از روش فنل کلروفرم بدست آمد. در مقایسه بین DNA OD

Archive of SID
www.SID.ir

استخراج شده در روش نمک زدن و فنل کلروفوم تفاوت از نظر آماری معنادار نبود.

بررسی کمیت DNA استخراج شده

نتایج کمیت در جدول ۲ نشان داده شده است. برای مقایسه کمیت DNA استخراج شده از نمونه‌های مختلف از تست -mann whitney استفاده گردید. چون کمیت از توزیع نرمال تبعیت نمی‌کند به ناچار از تست های Npa (نا پارامتری) استفاده شده که مبنای مقایسه‌ها میانه های DNA استخراجی بود.

در کلیه نمونه ها بهترین کمیت مربوط به روش جوشاندن بود بجز در نمونه اسلاید خون محیطی تازه رنگ نشده (PU) که بهترین کمیت در روش فنل کلروفرم مشاهده شد.

کمترین کمیت DNA استخراج شده در نمونه خون (BL) و نمونه اسلاید مغز استخوان (BM) از روش فنل کلروفرم بود. در حالی که کمترین کمیت DNA استخراج شده در نمونه اسلاید خون محیطی آرشیوی (PA) و نمونه اسلاید خون محیطی تازه رنگ نشده (PU) و نمونه اسلاید خون محیطی رنگ شده (PS) در روش نمک زدن مشاهده شد.

بررسی وضعیت PCR یا بازدهی، DNA استخراج شده

نتایج مربوط به این بررسی، در جدول ۳ نشان داده شده است.

در مورد نمونه خون، استخراج DNA با هر سه روش، PCR، ۱۰۰٪ جواب داد.

بیشترین فراوانی مثبت در DNA استخراج شده در کلیه نمونه‌ها مربوط به روش جوشاندن بود.

کمترین فراوانی مثبت DNA استخراج شده در نمونه‌های اسلاید مغز استخوان (BM) ، اسلاید خون محیطی تازه رنگ نشده (PU) و اسلاید خون محیطی تازه رنگ شده (PS) مربوط به روش نمک زدن بود در حالیکه در نمونه اسلاید خون محیطی آرشیوی (PA) کمترین فراوانی مثبت DNA استخراج شده در روش فنل کلروفرم بدست آمد.

جدول-۱- میانگین DNA OD استخراج شده از انواع نمونه‌های تهیه شده به روش‌های مختلف

گروه	تعداد	Nacl روش (انحراف معیار) میانگین	Boiling روش (انحراف معیار) میانگین	Phenol روش (انحراف معیار) میانگین
BL	۲۵	۱/۷۴۶(۰/۰۶۲) P1=0.000	۰/۹۹۴(۰/۰۸۲) P2=0.000	۱/۶۹۴(۰/۰۵۸) P3=0.026
PA	۲۵	۱/۲۵۴(۰/۱۴۱) P1=0.000	۰/۹۹۵(۰/۰۵۴) P2=0.000	۱/۳۸(۰/۱۱۴) P3=0.000
PS	۲۵	۱/۴۰۸(۰/۱۴۵) P1=0.000	۰/۸۸۴(۰/۰۳۳) P2=0.000	۱/۴۳۳(۰/۰۷۳) P3=0.000
PU	۲۵	۱/۵۱۷(۰/۱۵۱) P1=0.000	۱/۱۱۰(۰/۰۷۶) P2=0.000	۱/۳۸۵(۰/۱۴۸) P3=0.002
BM	۲۵	۱/۳۹۷(۰/۱۳۸) P1=0.000	۰/۹۹۳(۰/۰۷۲) P2=0.000	۱/۶۳۳(۰/۱۴۱) P3=0.635

BL : نمونه خون

PA : اسلاید خون محیطی آرشیوی رنگ شده به روش گیمسا

PS : اسلاید خون محیطی تازه رنگ شده به روش گیمسا

PU : اسلاید خون محیطی تازه رنگ نشده

BM : اسلاید مغز استخوان

P1 : p-value مقایسه دو به دو میانگین DNA OD استخراج شده به روشهای Nacl و Boiling

P2 : p-value مقایسه دو به دو میانگین DNA OD استخراج شده به روشهای Boiling و Phenol

P3 : p-value مقایسه دو به دو میانگین DNA OD استخراج شده به روشهایPhenol و Nacl

Archive of SID
www.SID.ir

جدول۲: میانگین کمیت DNA استخراج شده از انواع نمونه‌های تهیه شده به روش‌های مختلف

گروه	تعداد	Nacl روش (انحراف معیار) میانگین	Boiling روش (انحراف معیار) میانگین	Phenol روش (انحراف معیار) میانگین
BL	۲۵	۲۳۹/۸۴(۲۱۹/۳۳۱)	۵۹۴/۳۲(۲۵۶/۴۰۴)	۸۲/۲۸(۴۱/۵۱۹)
		P1=0.000	P2=0.000	P3=0.026
PA	۲۵	۶۴/۶۸(۳۵/۹۴۱)	۴۹۹/۹۶(۲۵۲/۱۱۹)	۱۸۱/۸۸(۲۰۵/۵۷۷)
		P1=0.000	P2=0.000	P3=0.031
PS	۲۵	۵۰/۰۸(۲۴/۳۴۹)	۴۱۵/۸(۱۸۱/۴۹۶)	۱۲۷/۲۴(۶۵/۹۶۵)
		P1=0.000	P2=0.000	P3=0.000
PU	۲۵	۲۸/۸۴(۸/۴۰۴)	۶۰/۵۶(۳۴/۳۵۱)	۱۹۴/۲۴(۱۴۰/۵۷۷)
		P1=0.000	P2=0.000	P3=0.000
BM	۲۵	۲۱۱/۲۸(۱۸۸/۵۷۹)	۷۴۴/۲(۳۰۳/۶۹۷)	۱۹۸/۳۶(۲۲۲/۱۷)
		P1=0.000	P2=0.000	P3=0.327

BL : نمونه خون
PA : اسلاید خون محیطی آرشیوی رنگ شده به روش گیمسا
PS : اسلاید خون محیطی تازه رنگ شده به روش گیمسا
PU : اسلاید خون محیطی تازه رنگ نشده
BM : اسلاید مغز استخوان
P1 : p-value مقایسه دو به دو میانگین DNA OD استخراج شده به روشهای Nacl و Boiling
P2 : p-value مقایسه دو به دو میانگین DNA OD استخراج شده به روشهای Boiling و Phenol
P3 : p-value مقایسه دو به دو میانگین DNA OD استخراج شده به روشهایPhenol و Nacl

جدول-۳- توزیع فراوانی وضعیت PCR در انواع نمونه های تهیه شده به روش های مختلف

گروه	تعداد	Naclروش تعداد موارد مثبت (در صد)	Boiling روش تعداد موارد مثبت (در صد)	Phenol روش تعداد موارد مثبت (در صد)
BL	۲۵	۲۵ (۱۰۰٪)	۲۵ (۱۰۰٪)	۲۵ (۱۰۰٪)
PA	۲۵	۲۱ (۸۴٪)	۲۲ (۸۸٪)	۱۴ (۵۶٪)
PS	۲۵	۱۰ (۴۰٪)	۲۱ (۸۴٪)	۱۳ (۵۲٪)
PU	۲۵	۹ (۳۶٪)	۱۸ (۷۲٪)	۱۷ (۶۸٪)
BM	۲۵	۲۱ (۸۴٪)	۲۵ (۱۰۰٪)	۲۳ (۹۲٪)

BL : نمونه خون
PA : اسلاید خون محیطی آرشیوی رنگ شده به روش گیسما
PS : اسلاید خون محیطی تازه رنگ شده به روش گیسما
PU : اسلاید خون محیطی تازه رنگ نشده
BM : اسلاید مغز استخوان

بحث

استخراج از نمونه‌های مختلف دارای اهمیت فراوانی می‌باشد. جهت انجام تحقیقات مختلف نیاز به پیدا کردن روش مناسب استخراج احساس می‌شود. تا کنون مطالعات متعددی برای پیدا کردن روش مناسب استخراج از نمونه‌هایی مانند بافت (۱۶،۱۷) اسلایدهای خون محیطی و مغز استخوان (۱۰-۷) و حتی از تک سلول (۱۸،۱۹) انجام شده است.

نتایج مطالعه حاضر نشان داد که در تمام نمونه‌ها کمترین DNA (OD) مربوط به روش جوشاندن بود که منطقی هم است

Archive of SID
www.SID.ir

زیـرا در روش جوشـاندن ناخالـصی‌هـا ماننـد پـروتئین در نمونه‌های مختلـف بـه طـور کامـل حـذف نمـی‌شـود و در پایـان DNA خالصی نداریم و همراه ناخالصی‌های مختلف می باشد. بـا توجه بـه اینکـه OD مطلـوب بـرای بررسـی DNA بـین ۱/۸-۱/۵ می‌باشد در نمونه مغز استخوان روش فنل بهترین نتیجه را می‌دهـد چـون در نمونـه اسـلاید مغـز اسـتخوان ناخالـصی هـا بیـشتر از نمونه‌های اسلاید خون محیطی و خون می‌باشد و نیز در نمونه مغز استخوان غیر از گلبول قرمز و سـفید و پلاسـمای خـون ترکیبـات بـسیار زیـاد دیگـر هـم ماننـد چربـی وجـود دارد و روش فنـل- کلروفرم به بهترین نحو این مواد اضافی را حذف می‌کند.

در نمونه خـون OD حاصـل از روش فنـل- کلروفـرم و نمـک زدن بـسیار مطلـوب اسـت و تفـاوت چنـدانی بـا هـم ندارنـد و بـا اختلاف کمی روش فنل- کلروفرم بهتر است. در مورد نمونه‌های دیگـر شـامل اسـلاید خـون محیطـی تـازه رنـگ شـده و نـشده و آرشیوی تفاوتی بین دو روش فنل- کلروفرم و نمک زدن وجـود ندارد و در هر دو مورد، OD خیلی مطلوبی بدسـت نیامـد و علـت آن حجم بسیار کم نمونه خون روی اسلایدها می‌باشد.

با توجه به توضیحات فوق نمی‌تـوان OD، DNA را بـه تنهـایی معیار مناسبی برای سنجش DNA استخراج شـده قـرار داد و فقـط به آن تکیه کرد. در تحقیقات مشابهی هم که روش های مختلـف اسـتخراج DNA را مـورد بررسـی قـرار داده‌انـد OD, DNA را بررسی نکرده‌اند(۹-۷).

در مورد کمیت DNA استخراج شده در تمام نمونه‌های مـورد بررسی به غیر از اسلاید خون محیطی رنگ نشده بیشترین کمیـت DNA استخراج شده مربـوط بـه روش جوشـاندن اسـت. زیـرا در روش جوشـاندن مـا کمتـرین هـدر رفـتن نمونـه را در مراحـل جداسازی داریم در نتیجه غلظت DNA استخراجی بیشترین مقدار خواهد بود. در نمونه‌های خون و اسـلاید مغـز اسـتخوان کمتـرین کمیت DNA مربوط به روش فنل- کلروفرم می باشد در حالیکـه در نمونه‌های اسلاید خون محیطی رنگ شده و آرشیوی کمتـرین کمیت مربوط به روش نمک زدن می‌باشـد. زیـرا در روش نمـک زدن و فنل-کلروفرم مراحل استخراج تکرار مـی شـوند و حـذف عناصر نامطلوب بیشتر است، خودبخود حذف DNA هم بـه طـور ناخودآگاه بیشتر رخ می‌دهد. در نهایت غلظت DNA اسـتخراجی به طور قابل ملاحظه‌ای کـاهش مـی‌یابـد. در مـورد نمونـه اسـلاید خون محیطی رنـگ نـشده نتـایج متفـاوتی بدسـت آمـد. بیـشترین کمیت DNA استخراجی مربوط به روش فنل- کلروفرم است که می‌توان نتیجه گرفت که در مورد نمونه اسلاید رنگ نـشده روش فنل کلروفرم بهترین کمیت DNA را می‌دهد.

طبق نتایج بدست آمده کمیت یا غلظت DNA نمی تواند معیار دقیقی برای مقایـسه DNA اسـتخراج شـده از روش‌هـای مختلـف باشد. در تحقیقات مشابه انجام شده چون کمیت DNA به تنهـایی معیار کاملی برای سنجش DNA استخراجی نیست کمیـت DNA را مورد بررسی قرار نداده‌اند (۱۱-۸).

معیار اصلی برای سنجش DNA اسـتخراج شـده از نمونـه‌هـای مختلف توسط روش‌های مختلـف وضـعیت PCR بـازدهی DNA استخراج شده می‌باشد زیرا نتایج PCR است که بـه مـا مـی‌گویـد DNA اسـتخراج شـده تـا چـه حـدی سـالم مانـده و طـی مراحـل اسـتخراج تخریـب نـشده اسـت. حـال بـرای اینکـه بفهمـیم نتـایج حاصل از کمیت و DNA, OD استخراج شـده چـه مقـدار ارزش دارد و کاربردی است باید نتایج PCR را بررسی کنیم. طبق نتـایج بدست آمده درمورد نمونه خون DNA استخراج شده توسـط هـر سـه روش، PCR ۱۰۰٪ جـواب داده اسـت. در مـورد نمونـه‌هـای دیگر هم بهترین نتیجه PCR با روش جوشاندن بدسـت آمـده کـه بین ۱۰۰٪ -۷۲٪ نتیجه مثبـت داشـته اسـت. در مـورد روش فنـل- کلروفرم نتایج PCR بین ۹۲٪-۵۲٪ و در روش نمـک زدن نتـایج PCR یابازدهی DNA استخراج شده بین ۸۴٪-۳۶٪ بود.

در مطالعه‌ای که توسـط Vince و همکـاران بـر روی ۱۲۰ نمونـه اسلاید مغز استخوان رنگ شده بـه روش گیمـسا انجـام شـد. نتـایج بازدهی استخراج DNA با سه روش نمک زدن، جوشـاندن و فنـل- کلروفرم به ترتیب ۹۵٪ ، ۵۰٪ ، ۸۵٪ بوده است (۷). بـا مقایـسه ایـن نتایج با نتایج بدست آمده از تحقیق حاضر یعنـی ۸۴٪ ، ۱۰۰٪، ۹۲٪ مشاهده می‌شود بجز روش نمک زدن دو روش دیگـر نتـایج خیلـی بهتری داشته‌اند. در مورد روش نمک زدن علت کمتر شدن بازدهی با روش ما می‌تواند متفاوت بودن OD مواد مصرفی و یـا تفـاوت در OD تهیه اسلاید مغز استخوان و یا رنگ آمیزی آن باشد.

Archive of SID
www.SID.ir

در تحقیق دیگری که توسط Yokola و همکاران صورت گرفته بازدهی استخراج DNA از اسلاید مغز استخوان رنگ نشده با دو روش ۱- فنل کلروفرم ۲- جوشاندن به ترتیب ۵۷٪ و ۷۴٪ بوده است که در مقایسه با نتایج بدست آمده از تحقیق ما نتایج ضعیف‌تری است (۹). این اختلاف نتایج می‌تواند ۳ علت داشته باشد: نحوه و کیفیت تهیه لام متفاوت باشد، نوع بیماران مورد مطالعه متفاوت باشد و کیفیت مواد مصرفی متفاوت باشد.

در مورد اسلایدهای خون محیطی رنگ نشده که نتایج خیلی ضعیفی داشتند می‌توان این گونه علت را بیان کرد که چون در اسلایدهای رنگ نشده DNA تحلیل می رود بنابراین نتایج مطلوب نبودند.

در مورد اسلایدهای خون محیطی رنگ شده و آرشیوی که نتایج خیلی مطلوبی نداشتند می‌تواند مربوط به آن باشد که اسلایدها تهیه شده مورد مطالعه از OD مطلوبی برخوردار نبودند البته باید خاطر نشان کرد که آرشیو کردن اسلایدهای رنگ شده تأثیری در نتایج DNA استخراج شده نخواهد داشت(۹).

بهترین نتایج هم از نمونه خون و اسلاید مغز استخوان حاصل گردید چون حجمی که از خون DNA استخراج شد قابل ملاحظه بود و در مورد اسلاید مغز استخوان چون حجم نمونه روی اسلایدهای مغز استخوان تهیه شده بیشتر بوده لذا OD اسلایدهای مغز استخوان تهیه شده در مقایسه با اسلایدهای دیگر بسیار بیشتر و مطلوب‌تر بود.

نتایج مطالعه حاضر نشان می‌دهد که با توجه به هدف و کاربردی که از استخراج DNA خواهیم داشت باید روش استخراج DNA را انتخاب کنیم. اگر هدف از استخراج DNA فقط بررسی وجود یک ژن مشخص (در این مطالعه بتا گلوبین) باشد از روش جوشاندن استفاده می‌کنیم چون هم خیلی ارزان تر و کم خط‌تر از دو روش دیگر مخصوصا فنل-کلروفرم می‌باشد و هم نیاز به مدت زمان خیلی کوتاهتری برای نتیجه‌گیری است.

ولی اگر نیاز به DNA خالص‌تر و با OD بالا باشد مانند وقتی که می‌خواهیم خالص‌سازی DNA انجام دهیم و یا هدف سکانس کردن DNA باشد و یا Recombinant مد نظر باشد چون باید DNA OD در سطح خیلی بالایی باشد از روش دقیق تر یعنی فنل- کلروفرم استفاده می‌کنیم.

نتیجه‌گیری

چون برای پیگیری بیماران نیاز به اطلاعات ژنتیکی آنان در زمان طولانی داریم نیاز به بانک DNA احساس می‌شود که به این منظور می‌توان از بیماران خون گرفت و از خون DNA استخراج کرد و DNA استخراج شده را در دمای ۷۰- به مدت طولانی ذخیره کرد که نیاز به وقت و هزینه زیادی دارد. راه دیگر آن است از بیماران خون تهیه کرد و خون آنها را ذخیره کرد و هر وقت نیاز به بررسی DNA شد از خون ذخیره شده DNA استخراج کرد که این روش هم به علت آنکه نمونه‌های خون حجم بسیاری می‌گیرند مقرون به صرفه نیست. در ضمن با توجه به اینکه این روشها جدید می‌باشد و در مواردی جهت بررسی بیماران قدیمی‌تر تنها نمونه‌های در دسترس اسلایدهای آرشیوی خون یا مغز استخوان می‌باشد لذا در دسترس‌ترین روش اسلاید مغز استخوان و یا خون محیطی رنگ شده از بیماران است چون تکنیک استخراج DNA از اسلایدها نسبتا راحت است و نگهداری اسلایدها هم حجم زیادی را اشغال نمی‌کند و هم اینکه از این اسلایدها برای بررسی‌های پاتولوژی هم می‌توان استفاده کرد. به عنوان نمونه در صورتیکه از بیماران سرطانی در مراحل مختلف درمان و حتی بعد از بهبودی و یا بعد از عود بیماری خون گرفته شود و اسلاید آنها تهیه شود و ذخیره گردد در این صورت در مراحل مختلف از یک بیمار نمونه‌های مختلف اسلاید در دسترس خواهد بود. با این ذخیره سازی اسلایدها می توان ترکیب ژنی سلول‌ها را در مراحل مختلف اولیه، درمان، بهبودی و عود مورد بررسی دقیق قرار داد.

Archive of SID
www.SID.ir

منابع

۱- کروزر هلن، ماسی آدرین. ***بیوتکنولوژی و DNA نو ترکیب***. ترجمه دکتر شکیبایی محمدرضا، نشر: شکیبایی، محمدرضا ۱۳۸۲؛ صص ۴۶-۴۴ و ۸۰-۷۸.

۲- بی بی ترور، برک جولیان. ***ساختار ژن و رونویسی***. ترجمه دکتر الهی الله، عمادی سعید، قربانی نظامی آذین. انتشارات علمی دانشگاه صنعتی شریف ۱۳۸۵؛ صص ۹-۱.

۳- واتسون جیمیز. ***ژنتیک مولکولی***. ترجمه دکتر پاسالار، دکتر صمدی. انتشارات دانشگاه تهران. ۱۳۸۳ ج ۲ ؛صص ۱۰-۱ ، ۹۰-۸۵

4- Nicholl DST. ***An Introduction to Genetic Engineering***. Cambridge University Press 1996; 1-30.

5- Sam brook J, Russell DW. ***Molecular Cloning***. Cold Spring Harbor Laboratory Press 2001; 1(2):10-2.14 , 6.3– 6.30.

6- Sam brook J, Russell DW. ***Molecular Cloning. Gold Spring Harbor Laboratory Press*** 2001; 2: 8110.

7- Vince A, Poljak M, Seme K. ***DNA entraction from archival Giemsa- stained bone marrow slides comparison of six rapid methods.*** Br. J. Headmatol 1998; 101(2): 349-51.

8- Gari MA, Abuzenadah AM, Chaudhary AG, Al-Qahtain MH, Al- says FM, Dmanhouri, G. ***Pilot study of DNA extraction from archival unstained bone marrow slides: comparison of three rapid methods***. African J Biotech 2006; 5(6): 532-5.

9- Yokota M, Tatsumi N, Tsuda I, Yano I. ***DNA extraction and amplification from Giemsa – stained blood smears.*** J. Clin Lab Anal 1995; 9(6): 387-91.

10- Boyle EB, Steinbuch M, Tekautz T, Gutman JR, Robison LL, Perentesis JP. ***Accuracy of DNA amplification from archival hematological slides for use in genetic biomarker studies.*** Cancer Epidemiol Biomarkers Prev 1998; 7(12):1127-31.

11- Poljak M, Seme K, Gale N. ***Rapid extraction of DNA from archival clinical specimens: our experiences.*** J. Physiology 2000; 439(7): 42-4.

12- Cattaneo C, Craig O, James NT, Sokol RJ. ***Comparison of three DNA extraction methods on bone and blood stain up to 43 years old and amplification of three different gene sequences.*** J Foresic Sci 1994; 42(6): 1126-35.

13- Pol jak M, Barlic JM, Seme K, Avsic- zopanct, Zore A. ***Isolation of DNA from archival papanicolaou stained cytological smears using a simple salting- out procedure***. J. Clin. Pathol. Mol. Pathol 1995; 48: M55-M56

14- Pojak M, Barlic J. ***Rapid and simple method for extraction of DNA from archival papanicolaou stained cervical smears.*** Acta cytological 1996; 40: 374-5.

15- Sheikhha MH, Kalantar M, Tobal K, Liu Yin JA. ***Glutathion S-transferases null genotype in acute myeloid leukemia.*** Iranian Journal of Immunology 2005; 2(3): 141-51

17- Shi SR, Cote RJ, Wu L, Liu C, Datar R, Xin Liu YD, et al. ***DNA extraction from archival formalin- fixed, paraffin- embedded tissue sections based on the antigen retrieval principle: heating under the influence of PH.*** J Histoche & Cytoche 2002; 50: 1005-11.

Archive of SID
www.SID.ir

19- Roehrl MH, Becker KF, Becker I, Hofler H. ***Efficiency of single cell polymerase chain reaction from stained histologic slides and integrity of DNA in archival tissue***. Diagn Mol Pathol 1997; 6: 292-7.

18- Zanssen S. ***Single cell PCR from archival stained bone marrow slides: a method for molecular diagnosis and characterization***. J Clin Lab Anal 2004 Apr; 8(3): 171-81.

Archive of SID

www.SID.ir