پژوهشی

# بهینه سازی روش استخراج DNA از استخوان برای به دست آوردن ماده ژنتیکی از استخوان و دندان‌های باستانی

دکترحسین صمدی کفیل* - دکتر محمد اصغرزاده** - الهام زینال زاده*** - سید بهاء حسینی سرتشنیزی****

* دکترای تخصصی میکروب شناسی ، مرکز تحقیقات کاربردی دارویی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران
** دکترای تخصصی فراورده‌های بیولوژیک ، مرکز تحقیقات بیماری‌های عفونی وگرمسیری، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران.
*** کارشناسی علوم آزمایشگاهی، مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران.
**** کارشناسی ارشد باستان شناسی ،گروه باستان شناسی، دانشکده علوم انسانی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران.

## چکیده

**زمینه و هدف:** واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) یکی از مهم‌ترین ابزارهای تشخیصی ملکولی مدرن می‌باشد که ما را قادر می‌سازد تا به بررسی ابعاد مختلف ملکولی یک یاخته بپردازیم. از اصلی‌ترین اجزاء آزمون واکنش زنجیره‌ای پلیمراز، DNA می‌باشد که با استفاده از آن و تکثیر بخش‌های اختصاصی آن قادر خواهیم بود تا ابعاد مختلف حیاتی یک یاخته را مورد بررسی قرار دهیم. در این مطالعه ما با استفاده از بررسی گروهی از نمونه‌های باستانی متعلق به ۳۶۰۰ سال پیش شامل نمونه‌های استخوان و دندان باستانی کشف شده در منطقه بهشهر استان مازندران، به بررسی و بهینه سازی روش استخراج DNA پرداختیم تا بتوانیم با کسب حداکثر ژنوم استخراج شده سالم به بررسی‌های بالینی و ژنومی بر روی آن‌ها بپردازیم.

**روش بررسی:** در این مطالعه با استفاده از پروتکل تخلیصی قبل از استخراج و حذف مهارکننده‌های واکنش زنجیره‌ای پلیمرازو سپس استخراج با استفاده از ذرات سیلیکا بید به بررسی نتایج استفاده از این روش بهینه شده پرداختیم.

**یافته‌ها:** نتایج استخراج DNA در نمونه‌های مورد مطالعه در مطالعه حاضر به ترتیب ۳۷ng/µl، ۲۵ng/µl، ۷ng/µl، ۳۲ng/µl، ۱۸ng/µl، ۴۲ng/µl بودند که در ۶۷٪ موارد دارای خلوص عالی و میزان جذب نوری ۱/۸ بودند. همچنین ژنوم استخراج شده در این مطالعه جهت بررسی‌های ژنومیک واکنش زنجیره‌ای پلیمراز مورد استفاده قرار گرفتند که در تمامی نمونه‌ها نتایج قابل قبولی را ارائه نمودند.

**نتیجه‌گیری:** نتایج حاصل نشان از استخراج مناسب و خالص و قابلیت استفاده از این ژنوم در مطالعات ژنومی می‌داد. لذا این روش برای استخراج از انواع نمونه‌های استخوانی، دندانی و غیره که بافت قابل استخراج به سادگی در دسترس نمی‌باشد توصیه می‌گردد.

**واژگان کلیدی:** استخراج DNA، استخوان، دندان، باستانی، سیلیکا، ژنوم، واکنش زنجیره‌ای پلیمراز.

نویسنده پاسخگو: گروه میکروب شناسی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران. شماره تماس: ۰۹۸۴۱۱۳۳۶۴۶۶۱+ kafilhs@tbzmed.ac.ir

## مقدمه

واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) یکی از مهم‌ترین ابزارهای تشخیصی ملکولی مدرن می‌باشد که ما را قادر می‌سازد تا به بررسی ابعاد مختلف ملکولی یک یاخته بپردازیم (۱). این ابزار با استفاده از تکثیر بخش اختصاصی ژنوم پروکاریوتی و یوکاروتی امکان تعیین گونه، نژاد و به نحوی تاریخچه یاخته را فراهم می‌نماید (۱،۲). از اصلی‌ترین اجزاء آزمون واکنش زنجیره‌ای پلیمراز DNA می‌باشد که با استفاده از آن و تکثیر بخش‌های اختصاصی آن قادر خواهیم بود تا ابعاد مختلف حیاتی یک یاخته را مورد بررسی قرار دهیم (۳). از ابعاد کاربردی و تشخیصی آن می‌توان به تشخیص گونه، اصالت، جنسیت، ناسازگاری‌های ژنومی، موتاسیون‌ها، بیماری‌ها و تشخیص انواع عوامل عفونی حاضر در نمونه‌ها پرداخت (۴،۵). توالی ژنومی یا همان DNA در فرآیند تشخیص با این روش اهمیت ویژه و اساسی دارد به نحوی که وجود هرگونه مهار کننده به همراه DNA، کیفیت پایین DNA استخراج شده با توجه به شکنندگی DNA باستانی، عدم رعایت دمای استخراج و یا شرایط pH استخراج DNA نقش بسیار مهمی در یک آزمون موفق ایفاء می‌نماید (۵،۶). در واقع غالب روش‌های موجود استخراج DNA برای استخراج DNA از نمونه‌های بافت طبیعی و یا DNA به هم پیوسته با وزن

Archive of SID

www.SID.ir

ملکولی بالا می‌باشند در حالی که نمونه‌های باستانی غالبا حاوی DNA شکسته با وزن ملکولی پایین و به مقدار بسیار پایین و به همراه انواع مختلفی از مهار کننده‌های آزمون واکنش زنجیره‌ای پلیمراز می‌باشند (۸-۶) لذا روش استخراج مناسب برای استخراج این نوع از DNA باید به دور از انواع محلول‌های شوینده قوی، دماهای بالا یا پایین و بسیار حساس باشد، به خوبی بتواند حداکثر DNA ژنومی را جذب نماید، قادر به حذف حداکثر مهارکننده‌های آزمون واکنش زنجیره‌ای پلیمراز باشد و فارغ از مراحل متکی به حرکت‌های سریع و تند باشد (۹،۱۰). لذا در این مطالعه ما با استفاده از بررسی گروهی از نمونه‌های باستانی متعلق به ۳۶۰۰ سال پیش شامل نمونه‌های استخوان و دندان باستانی کشف شده در منطقه به‌شهر استان مازندران، به بررسی و بهینه‌سازی روش استخراج DNA پرداختیم تا بتوانیم با کسب حداکثر ژنوم استخراج شده سالم به بررسی‌های بالینی و ژنومی بر روی آن‌ها بپردازیم. در این مطالعه ما با استفاده از روش استخراج سیلیکا ژل با استفاده از پروتکل تخلیصی قبل از استخراج به بررسی نتایج با استفاده از این روش بهینه شده پرداختیم.

## روش بررسی

نمونه‌های استخوان و دندان اجساد کشف شده در سایت مطالعاتی در منطقه بهشهر مازندران (گوهر تپه) پس از کسب مجوزهای لازم به آزمایشگاه مرکز مطالعاتی انتقال داده شد. این اجساد متعلق به اجساد بخش AH2XX1 بودند (شکل ۱)، دندان‌های مورد استفاده دندان First premolar, First Molar, Second Molar از اجساد و همچنین استخوان لگن و استخوان بازو مورد استفاده قرار گرفتند (جدول ۱) و با استفاده مطالعات رادیوکربنی که توسط دانشگاه کمبریج انگلستان انجام گرفته است متعلق به ۳۵۵۰ سال پیش می‌باشند. تمامی نمونه‌ها برای جلوگیری از هرگونه آلودگی ژنومی و یا سایر آلودگی‌ها با استفاده از ظروف پلاستیکی درب زیپ دار و کاملا جدا از هم انتقال یافتند. سطح رویی تمامی دندان‌ها و استخوان‌ها با استفاده از سوهان و سر

**شکل ۱- نمونه جسد مورد استفاده در این مطالعه**

دریل‌های یکبار مصرف برداشته شد تا از هرگونه انتقال ژنوم بین نمونه‌ها جلوگیری شود (۱۱). ترجیحا محل رویه برداری و حذف پوسته سطحی در مکان‌های متفاوت نیز انجام گرفت تا امکان آلودگی ژنومی به حداقل برسد. همچنین جهت هرکدام از نمونه‌ها از یک هاون کاملا اختصاصی و مجزا که برای اولین بار استفاده می‌شدند ،استفاده گردید تا با استفاده از آن بخش داخلی دندان‌ها و یا استخوان‌ها پودر شده و مورد استفاده قرار گیرد. در این مرحله نیازمند به دست آوردن یک پودر یک دست و کاملا منفک شده می‌باشیم تا بتوان از آن حداکثر ژنوم DNA را استخراج نمود.

جهت استخراج ژنوم ابتدا مرحله‌ای برای حذف مواد زاید همراه استفاده گردید بدین شرح که بافری حاوی ۰،۴۵M از EDTA و ۰،۲۵ mg ml-۱ از پروتئیناز K با pH:۸ تهیه گردید. سپس ۱۰ میلی لیتر از این بافر با ۵۰۰ میلی گرم از پودر حاصل از مراحل بالا مخلوط گردیده و پس از بستن درب لوله با استفاده از پارافیلم به مدت ۲۴ ساعت بر روی همزن با سرعت آهسته در دمای اتاق قرار داده شد و سپس برای ۱ الی ۳ ساعت در دمای ۵۶ درجه سانتی گراد قرار داده و پس از آن نمونه‌ها به مدت ۲ دقیقه در ۵۰۰۰g سانتریوفوژ شدند. در این مرحله تمامی DNA مورد نیاز ما در مایع سطحی حل شده و با حذف رسوبات مایع سطحی برای مراحل تخلیص DNA مورد استفاده قرار گرفتند. توجه شود که نمونه مورد استفاده باید در مرحله قبل از سانتریوفوژ کامل سفید شفاف باشد و کدورت بیش از حد نشان آلودگی بالای نمونه است که امکان استخراج را کاهش و دارای مهار کننده‌های آزمون واکنش زنجیره‌ای پلیمراز می‌باشد (شکل ۲).

برای حداکثر تخلیص DNA موجود در محلول رویی از دانه‌های سیلیکا استفاده شد که بدین منظور از کیت سیلیکا بید شرکت فرمنتاس تحت عنوان GenejetTM silica bead ( شرکت فرمنتاس- آلمان) استفاده شد بدین شرح که محلول رویی به یک لوله جدید منتقل شد به آن ۳۰ میلی لیتر از بافر اتصال موجود در کیت و ۲۰ میکرولیتر از سیلیکابید اضافه شد. برای تنظیم pH از محلول سدیم استات استفاده شد تا از کاهش یا افزایش بیرویه pH جلوگیری شود. سپس لوله‌ها برای یک ساعت در دمای ۵۵ درجه سانتی گراد و در شرایط تاریکی نگهداری شدند. پس از آن نمونه‌ها برای ۱۵ ثانیه در ۱۶۰۰۰g سانتروفوژ شدند و محلول رویی باقیمانده دور ریخته شد و به سیلیکابیدهای باقیمانده ۱ میلیلیتر از بافر شستشو که در فریزر نگهداری می‌شد افزوده شد . سیلیکا بیدها از نظر وجود هرگونه ناخالصی یا مهارکننده شستشو داده شده و این فرآیند برای تمامی نمونه‌ها دو بار تکرار شد . سپس در دمای اتاق با استفاده از باز ماندن درب تیوب‌ها کاملا خشک شدند. در نهایت ۵۰ میکرولیتر از بافر الوشن که به همراه سیلیکا بیدها در کیت عرضه شده است، افزوده شده و به مدت ۵ دقیقه در ۵۵ درجه سانتی گراد نگهداری شد تا DNA به داخل بافر رها شود سپس برای مدت ۳۰ ثانیه در ۱۶۰۰۰g سانتروفوژ شد و محلول رویی به تیوب ۱/۵ میلی لیتری جدید انتقال یافت که حاوی DNA تخلیص شده بود. همچنین



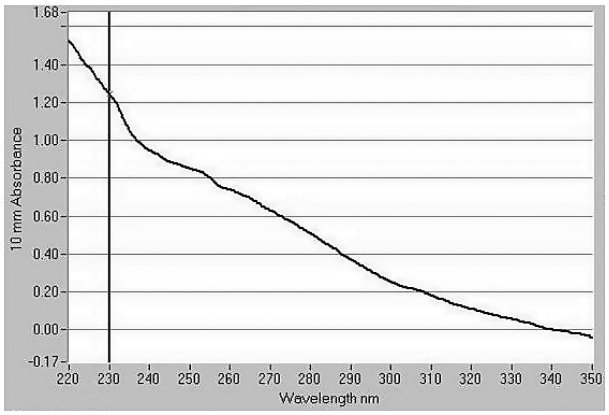
www.SID.ir

**شکل ۲- نمونه غیر قابل قبول و نمونه قابل قبول در مرحله حذف کلسیم و سایر مهارکننده‌ها ( به ترتیب از راست به چپ).**

چهار نمونه که نتایج آن با روش بالا کسب شده بودند با استفاده از کیت معمولی استخراج DNA شرکت سیناژن مورد استخراج قرار گرفتند که تمامی مراحل مطابق راهنمای کاربرد کیت انجام گردید. جهت بررسی کیفیت و میزان DNA استخراج شده از دستگاه نانودراپ استفاده شد و همچنین بر روی ژل آگارز ۱/۲٪ الکتروفورز انجام گردید و رنگ آمیزی نمونه با استفاده از رنگ GelRed انجام گردید. همچنین DNA مورد استخراج جهت آزمون Realtime PCR اختصاصی ژن بتا اکتین مورد استفاده قرار گرفت که با استفاده از دستگاه Realtime PCR مدل ۷۵۰۰ شرکت Applied Biosystems و با استفاده از پرایمرها و پروتکل ارائه شده توسط لی و همکاران انجام گردید (۱۲).

## یافته‌ها

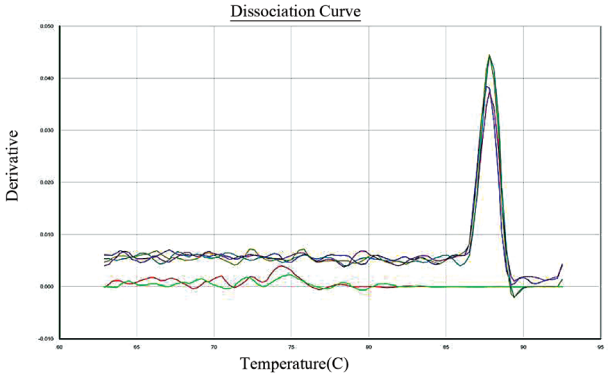
نتایج استخراج DNA در نمونه‌های مورد مطالعه در مطالعه حاضر به ترتیب ۳۷ng/µl ، ۲۵ng/µl، ۷ng/µl ، ۳۲ng/µl ، ۱۸ng/µl ، ۴۲ng/µl بودند (جدول ۱) که در ۶۷٪ موارد دارای خلوص عالی و میزان جذب نوری ۱/۸ بودند (شکل ۳) و در دو مورد دیگر دلیل عدم




**شکل ۳- نمودار آزمون اندازه گیری خلوص DNA با استفاده از دستگاه نانودراپ**

**جدول ۱- نمونه‌های مورد مطالعه و جذب نوری آن‌ها با استفاده از دستگاه طیف سنجی نانودراپ**

| استخوان یا دندان | شماره جسد | محوطه باستانی | جذب نوری |
|---|---|---|---|
| First Molar | F5AH2XX1-1 | AH2XX1 | 25ng/µl |
| Second Molar | F5AH2XX1-2 | AH2XX1 | 37ng/µl |
| First Molar | F18AH2XX1 | AH2XX1 | 32ng/µl |
| First Molar | F12AH2XX1 | AH2XX1 | 42ng/µl |
| Femur bone | F4AH2XX1 | AH2XX1 | 18ng/µl |
| Humeus bone | F9AH2XX1 | AH2XX1 | 7ng/µl |




**شکل ۴- آزمون Realtime PCR ژن بتا اکتین با استفاده از نمونه DNA استخراج شده در این مطالعه**



Archive of SID
www.SID.ir

کسب بهترین جذب نوری وجود آلودگی خاکی مختصر و یا کم بودن مقدار ۵۰۰ میلی گرم بود. آزمون نمونه‌های استخراج شده بر روی ژل آگارز در هیچکدام از نمونه‌های استخراج شده باند قابل مشاهده ایجاد نکرد در حالیکه نمونه کنترل مثبت رنگ آمیزی به خوبی رنگ آمیزی شده بود. نمونه هایی که با استفاده از روش معمولی استخراج DNA با استفاده از کیت استخراج سیناژن انجام شد هیچ ژنوم قابل شناسایی با نانودراپ استخراج ننموده بودند. همچنین ژنوم استخراج شده در این مطالعه جهت بررسی‌های ژنومیک واکنش زنجیره‌ای پلیمراز مورد استفاده قرار گرفتند که در تمامی نمونه‌ها نتایج قابل قبولی را ارایه نمودند (شکل ۴). هرچند به دلیل محدودیت نمونه‌های مورد بررسی در این مقاله، نیازمند بررسی‌های بیشتر با حجم نمونه‌های بیشتر می‌باشیم.

## بحث و نتیجه گیری

استفاده از ابزارهای ملکولی به عنوان یک انقلاب در شناخت ما از گذشته می‌باشد. در این میان واکنش زنجیره‌ای ملکولی یک روش بسیار حساس و مناسب جهت شناسایی ژنتیکی و ترسیم گذشته و حال و حتی آینده می‌باشد (۱). این روش با استفاده از حتی یک تار مو، قادر به شناسایی پیشینه ژنتیکی موجودات می‌باشد. اما در این میان ماده اولیه و اصلی مورد نیاز برای این گروه از مطالعات وجود ژنوم DNA می‌باشد تا بتوانیم با بررسی بخش‌های مختلف آن پی به پیشینه ژنتیکی موجودات ببریم (۱۰،۱۱). در نمونه‌های باستانی مهمترین مشکل از میان رفتن اکثر DNA و عدم وجود DNA قابل استفاده در آزمون زنجیره‌ای پلیمراز می‌باشد (۹). این امر می‌تواند به دلیل از میان رفتن اکثریت ژنوم موجود زنده بر اثر فرسایش و یا وجود مهارکننده‌های متعدد واکنش زنجیره‌ای پلیمراز می‌باشد لذا پروتکل بهینه استخراج ژنومی از اهمیت بالایی برخوردار است تا بتوان به طبع آن ابعاد مختلف ژنومی نمونه مورد مطالعه را بررسی نمود (۱۱). تا حال روش‌های متعددی برای استخراج ژنوم باستانی ارائه شدند که غالبا بر اساس روش هایی می‌باشند که باعث صدمه به DNA می‌شوند (۸-۶) یا قادر به حذف کامل مهارکننده‌ها نیستند، پرهزینه هستند و یا پروتکل شامل مراحل سخت و طاقت فرسا می‌باشد (۱۱). در این مطالعه ما با استفاده از سیلیکا بیدهای ارزان قیمت قابل تهیه در کشور که به همراه خود بافرهای آزادسازی را نیز به همراه خود دارند استفاده نموده و در ابتدا با استفاده از بافرهایی مواد مهارکننده و مضر آزمون را حذف نمودیم. نتایج بررسی نمونه‌ها با استفاده از نانودراپ نشان از خلوص مناسب نمونه‌های مورد استفاده بودند (جدول ۱). این روش را می‌توان به عنوان یک روش ساده و کاربردی که در عین سادگی اجراء حداکثر ژنوم را استخراج نموده و DNAهای موجود در نمونه را جمع آوری می‌نماید، محسوب نمود. همچنین محصولات ژنومی حاصل از استخراج با این روش برای استفاده در آزمون RealTime PCR برای آزمودن ژن بتا اکتین مورد استفاده قرار گرفتند (شکل ۴) که نتایج حاصل ، استخراج مناسب و خالص و قابلیت استفاده از این ژنوم را در مطالعات ژنومی نشان می‌داد. لذا این روش برای استخراج از انواع نمونه‌های استخوانی، دندانی و ... که بافت قابل استخراج به سادگی در دسترس نمی‌باشد توصیه می‌گردد. همچنین مطالعات با حجم بیشتر برای تایید این روش توصیه می‌گردد.

## پیشنهادات

بر اساس نتایج مطالعه حاضر توصیه می‌شود از این روش برای انواع مطالعات بر روی ژنوم‌های باستانی و اجسادی که بافت نرم به طور کامل تخریب شده است، استفاده گردد.

### تقدیر و تشکر

این مطالعه با حمایت مالی مرکز تحقیقات کاربردی دارویی دانشگاه علوم پزشکی تبریز و طی طرح تحقیقاتی مصوب این مرکز اجرا گردیده است. بدینوسیله از تمامی کارکنان سایت باستان شناسی گوهر تپه، همکاران سازمان میراث فرهنگی و گردشگری، گروه باستان شناسی دانشگاه تربیت مدرس و همکاران آزمایشگاه میکروب شناسی مرکز تحقیقات دارویی تبریز کمال تقدیر و تشکر را داریم.

Archive of SID



www.SID.ir

## References


1. Saiki R. Gelfand D. Stoffel S. et al. "Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase". Science .1988; 239: 487–91.
2. Noonan JP. Genomic sequencing of Pleistocene cave bears. Science .2005; 309: 597–99.
3. Noonan, J.P. et al. Sequencing and analysis of Neanderthal genomic DNA. Science. 2006; 314: 1113–18.
4. Green, R.E. et al. Analysis of one million base pairs of Neanderthal DNA. Nature 2006; 444: 330–336.
5. Geigl, EM. On the circumstances surrounding the preservation and analysis of very old DNA. Archaeometry .2002; 44: 337–42.
6. Margulies M. et al. Genome sequencing in microfabricated high-density picolitre reactors. Nature 2005; 437: 376–380.
7. Poinar, HN. et al. Metagenomics to paleogenomics: large-scale sequencing of mammoth DNA. Science 2006; 311: 392–4.
8. Rogaev, EI. et al. Complete mitochondrial genome and phylogeny of Pleistocene mammoth Mammuthus primigenius. PLoS Biol. 2006; 4: e73.
9. Höss M. Dilling A. Currant A. Pääblo S. Molecular phylogeny of the extinct groundsloth Mylodon darwinii. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1996; 93: 181–5.
10. Pääbo S. Ancient DNA: extraction, characterization, molecular cloning, and enzymatic amplification. Proc Natl Acad Sci. USA 1989; 86: 1939–43.
11. Rohland N & Hofreiter M. Ancient DNA extraction from bones and teeth. Nature Protocols 2007; 2: 1756 - 62.
12. Li Z. Yang L. Wang J. et al. Beta-Actin is a useful internal control for tissue-specific gene expression studies using quantitative real-time PCR in the half-smooth tongue sole Cynoglossus semilaevis challenged with LPS or Vibrio anguillarum. Fish Shellfish Immunol. 2010; 29: 89-93.


Archive of SID



www.SID.ir

# Optimizing Bone DNA Extraction for Obtaining High Yield Genome of Ancient Teeth and Bones

**Hossein Samadi Kafil*† - Mohammad Asgharzadeh** - Elham Zeinalzadeh*** - Seyed-Baha Hossein Sarteshnizi****

* PhD in Medical Microbiology, Drug Applied Research Center, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran.

** PhD in Molecular Biology, Infectious Disease and Tropical Medicine Research Center, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran.

*** BSc in Medical Laboratory, Biotechnology Research Center, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran.

**** MSc in Archeology, Department of Archeology, Faculty of Humanities, Tarbiat Modarres University, Tehran, Iran.

Archive of SID

## Abstract

***Background***: *Polymerase chain reaction (PCR) is one of important molecular methods that let us to understand more about molecular aspects of cells. DNA is the most important part of PCR reaction, that its quality and amount has direct effect on final results. In this study, we aimed to develop a protocol for extracting DNA from samples of tooth and bone belong to 3600 years ago.*

***Method***: *After grilling and cleaning all surface parts of bones and teeth we used buffers for removing calcium and other PCR inhibitors; then, we used Silica beads for collecting all DNA in our samples.*

***Findings***: *DNA extraction amounts were 37ng/µl, 25ng/µl, 7ng/µl, 32ng/µl, 18ng/µl, 42ng/µl. In 67% of samples, we had extractions with high purity according to nano-drop results. Extracted DNA were examined for Real Time PCR, beta-actin gene that we had good results.*

***Conclusion***: *Results of this study showed that this developed protocol has a good yield of DNA with enough purity and removing PCR inhibitors. We recommend this protocol for applying in same samples and studies.*

***Keywords***: *DNA Extraction, Polymerase Chain Reaction, Ancient, Bone, Teeth, Silica.*

*†Correspondence: Department of Medical Microbiology, Faculty of Medicine, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran.*

*Tel: +98 411 3364661* *E-mail: kafilhs@tbzmed.ac.ir*



www.SID.ir