مقایسه روش‌های استخراج DNA از بافت‌های ثابت شده در فرمالین

فرزانه تفویضی*[۱]، رضا عصاره[۲]

چکیده

نقطه شروع بسیاری از روش‌های بیولوژی مولکولی، ضرورت جداسازی DNA با کیفیت عالی است. معمولا کیفیت DNA با عواملی از قبیل عدم آلودگی ناشی از RNA، پروتئین، لیپید و سایر ساختارهائی که برای آنزیم‌های برشی و پلی مرازها مزاحمت ایجاد می‌کنند سنجیده می‌شود. معمولا DNA استخراج شده از بلوک های پارافین و بافت‌های فیکس شده در فرمالین بخاطر اثرات تخریبی وارد شده بر DNA، از کیفیت مطلوبی برخوردار نیستند. هدف از مطالعه، معرفی روش کارآمد در استخراج DNA از بافت‌های نگهداری شده در فرمالین می‌باشد. جهت استخراج DNA از بافت‌های نگهداری شده در فرمالین، دو پروتکل مختلف از کیت Bioneer و کیت طراحی شده General Genomic Extraction توسط نویسندگان مقاله مورد مقایسه قرار گرفتند. ارزیابی کمی و کیفی بر روی DNA های استخراج شده انجام گرفت. جهت تایید و ارزیابی DNA استخراج شده، واکنش PCR با پرایمرهای ژن بتاگلوبین بر روی تمام نمونه‌ها انجام شد. نتایج آزمایش کیفی و کمی نشان داد که DNA استخراج شده با استفاده از کیت General Genomic Extraction از کمیت و کیفیت مطلوبتری در مقایسه با کیت Bioneer برخوردار بود. میزان تکثیر نمونه‌ها با پرایمر بتاگلوبین، حاکی از غلظت و خلوص بیشتر DNA استخراج شده با کیت مذکور در مقایسه با کیت Bioneer بود. با توجه به آسیب ناشی از نگهداری بافت در فرمالین، کیت General Genomic Extraction کارایی بیشتری در استخراج DNA داشت. این روش می‌تواند برای استخراج DNA از بافت‌های نگهداری شده در فرمالین و بلوک‌های پارافین به صورت روتین در آزمایشات تحقیقاتی و بالینی مورد استفاده قرار گیرد.

واژگان کلیدی : *استخراج DNA، بافت، فرمالین*

تاریخ دریافت: ۹٤/۸/٤ تاریخ پذیرش: ۹٤/۱۱/۲۵

مقدمه

پیشرفت در هر رشته علمی به در دسترس بودن تکنیک‌ها و روش‌های جدید و کارآمد در آن رشته بستگی دارد. در سال‌های اخیر با پیشرفت روش‌های سلولی و مولکولی، در اکثر آزمایشگاه‌های معتبر دنیا آزمایشاتی برای جدا کردنDNA ژنومی جهت پی بردن به سکانس و عملکرد آن انجام می‌شود. امروزه مباحث ملکولی از اهمیت روز افزونی در بررسی‌های علوم زیستی برخوردار می‌باشد. استخراج DNA ژنومی خالص، پایدار و با کمیت و کیفیت مناسب، اولین و مهمترین گام در بسیاری از تحقیقات بیولوژیکی و ژنتیکی به ویژه در واکنش PCR،Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP)، تکنولوژی توالی‌یابی ژنومی، تعیین ژنوتیپ افراد و شناسایی موتاسیون‌ها می‌باشد (۹).

نقطه شروع بسیاری از روش‌های بیولوژی مولکولی، ضرورت جداسازی DNA با کیفیت عالی است. معمولا کیفیت DNA با عواملی از قبیل عدم آلودگی ناشی از RNA، پروتئین، لیپید و سایر ساختارهائی که برای آنزیم‌های برشی و پلی مرازها مزاحمت ایجاد می‌کنند سنجیده می‌شود (۱و ٤).

بسیاری از تحقیقات و مطالعات بالینی بر روی بافت‌های ثابت شده در فرمالین و یا تهیه شده در قالب پارافین انجام می‌گیرد. از مزایای این نمونه‌ها می‌توان به دسترسی آسان به گنجینه غنی از نمونه‌های بالینی در سالیان متوالی اشاره کرد. از سویی، جهت انجام تحقیقات مستمر و متوالی بستر مناسبی برای محققین فراهم می‌باشد.

به علت بزرگ بودن اندازه DNA ژنومی در پستانداران، روش‌های استخراج DNA باید حداقل استرس مکانیکی را در طی استخراج ایجاد نمایند. از طرفی مشکلاتی نیز در خصوص استفاده از بافت‌های ثابت شده نسبت به بافت‌های تازه وجود دارد که از آن جمله می‌توان به شکست DNA به قطعات کوچکتر و تجزیه شدن DNA اشاره کرد. بنابراین بهینه سازی و انتخاب روش استخراجی که کمترین آسیب را به DNA اینگونه بافت‌ها برساند از اهمیت بالایی برخوردار است (٦). یکی از مشکلات اساسی در استخراج DNA از اینگونه بافت‌ها، وجود پیوندهای قوی بین پروتئین و DNA می‌باشد که بایستی در طی

*۱- استادیار، گروه زیست شناسی، واحد پرند، دانشگاه آزاد اسلامی ، پرند، ایران (farzanehtafvizi54@gmail.com)
۲- کارشناس ارشد، گروه زیست شناسی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

پروسه استخراج شکسته شوند (١٤). همواره مطالعات و تحقیقات متعددی در دنیا با هدف به حداقل رساندن آسیب‌های DNA طی فرآیند استخراج در حال انجام است. در این راستا، روش‌ها و کیت‌های متعددی توسط شرکت‌های مختلف عرضه می‌شوند که معمولا گرانقیمت هستند و بعضی حتی بازده مناسب ندارند. هدف از این تحقیق، بررسی مقایسه‌ای کمیت و کیفیت DNA استخراج شده توسط کیت بیونیر (Bioneer) و کیت General Genomic Extraction (GGE) ابداع شده توسط نویسندگان می‌باشد.

مواد و روش کار

نمونه‌برداری

در این مطالعه، نمونه‌های بافتی شامل آدنوکارسینومای کلورکتال قرار گرفته در فرمالین از بخش پاتولوژی بیمارستان امام خمینی تهیه شدند.

استخراج DNA بر اساس کیت Bioneer

استخراج DNA بر اساس روش کیت استخراج Bioneer (شرکت بیونیر کره جنوبی) انجام شد.

استخراج DNA بر اساس کیت (GGE) General Genomic Extraction:

کل DNA سلولی بر طبق دستورالعمل کیت General Genomic Extraction (شرکت زیست دانش یاران)، استخراج شد. بطور خلاصه، ٠/٠٥ گرم از بافت‌های مورد بررسی با تیغ اسکالپل خرد شدند و با بافر لیز کننده (Solution A) مخلوط شدند، سپس ٣٠ میکرولیتر پروتئیناز K (20 mg/ml)، به مخلوط اضافه شد و بمدت ٣ ساعت در دمای ٦٥°C انکوبه شدند. میکروتیوپ‌ها هر ١٥ دقیقه یکبار وارونه شدند. ٦ میکرولیتر از Binding Buffer (Solution B) به مخلوط اضافه شد و در ١٢٠٠٠ rpm بمدت ٥ دقیقه سانتریوفوژ شدند. فاز رویی جدا شد. این مرحله دوباره تکرار شد. فاز رویی به میکروتیوپ‌های جدیدی انتقال یافت. ٦ میکرولیتر از بافر رسوب دهنده (Solution C) اضافه شد و بمدت ٢٠ دقیقه وارونه شدند. نمونه‌ها بمدت ١٠ دقیقه در ١٢٠٠٠ rpm سانتریوفوژ شدند و فاز رویی دور ریخته شد. رسوب DNA با بافر شستشو دهنده (Solution D) شستشو داده شد و سپس در ١٢٠٠٠ rpm بمدت ١٠ دقیقه در ٤°C سانتریوفوژ شد. رسوب DNA در دمای ٣٧°C خشک شدند.

بررسی کیفیت و کمیت DNA

برای بررسی کیفیت DNA های استخراج شده با دو روش، از ژل آگارز ١٪ رنگ آمیزی شده با ژل رد استفاده شد. جهت تعیین کمیت و کیفیت DNA استخراج شده از نانودراپ NanoDrop™ ND-2000 با اندازه‌گیری میزان جذب نوری 260/230 nm و 260/280 nm غلظت DNA، خلوص و آلودگی پروتئینی DNA استخراج شده تعیین شد.

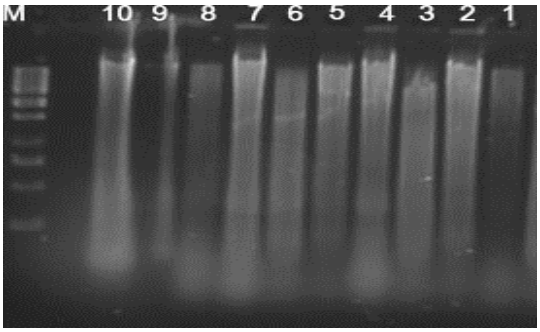
PCR ژن بتاگلوبین به عنوان کنترل

واکنش PCR در حجم نهایی ٢٥ µl شامل، ١٢/٥ µl بافر آمپلیکون، ٠/٥ µl (٠/٤ میکرومولار) از پرایمر اختصاصی ژن بتاگلوبین GH20 (5' GAA GAG CCA AGG ACA GGT AC 3')، PC04 (5' CAA CTT CAT CCA CGT TCA CC 3')، ٥٠ ng از DNA نمونه‌های استخراج شده، جهت اثبات استخراج DNA از نمونه‌ها انجام شد. تکثیر DNA با استفاده از دستگاه ترموسایکلر (Bio Rad PCR System, USA) مطابق برنامه دمایی مرحله دناتوراسیون ابتدایی در ٩٥°C به مدت ٣ دقیقه، ٤٥ چرخه اتصال پرایمر شامل اعمال دمای ٩٥°C به مدت ٣٠ ثانیه، دمای ٥٣°C به مدت ٤٠ ثانیه و دمای ٧٢°C به مدت ٤٠ ثانیه صورت گرفت و در پایان مرحله گسترش نهایی پرایمر با اعمال دمای ٧٢°C به مدت ٥ دقیقه انجام گردید. محصولات PCR، پس از رنگ آمیزی با gel red بر روی ژل آگارز ٢٪ در تانک الکتروفورز حاوی بافر TBE (Tris Base, Boric acid, Na EDTA, Deionized Water) با ولتاژ ١٠٠V به مدت ١ ساعت مورد بررسی کیفی قرار گرفتند که نتایج به وسیله دستگاه ژل داک و با اشعه UV مشاهده گردید.

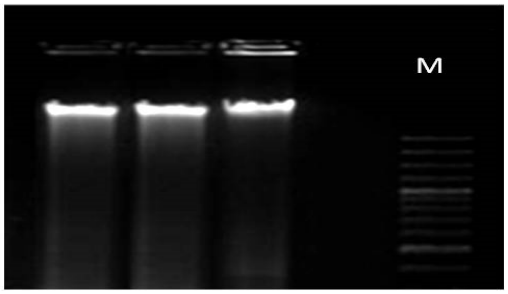
نتایج

کیفیت و کمّیت DNA استخراج شده از هر نمونه با الکتروفورز ژل آگارز ۱٪ و سنجش نانودراپ بررسی شد. میزان جذب نوری 260/280 توسط کیت Bioneer در محدوده 0.06-1.8 قرار داشت در حالیکه همین جذب نوری توسط کیت GGE بین 1.8-2 محاسبه شد. در بررسی غلظت DNA استخراج شده نیز کیت GGE نتایج بهتری داشت، بطوریکه میزان غلظت DNA های استخراج شده بین 124-3500 ng/µl برآورد شد در حالیکه غلظت DNA استخراج شده توسط کیت Bioneer بسیار پایین‌تر بود (1.01-23.78).

کیفیت DNA استخراج شده با دو کیت مورد نظر در نگاره ۱ و ۲ ارائه شده است. در نگاره ۱، کیفیت DNA استخراج شده با کیت Bioneer و در نگاره ۲، کیفیت DNA استخراج شده با کیت GGE نمایش داده شده است. همانطور که مشاهده می‌شود DNA استخراج شده با کیت Bioneer از کیفیت مناسبی برخوردار نیست و بسیار شکسته شده و حالت اسمیر دارد.

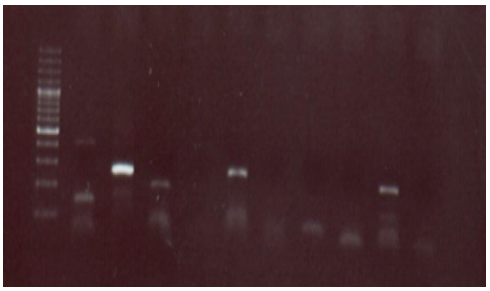


نگاره ۱– DNA استخراج شده با کیت Bioneer . چاهک ۱۰–۱، نتیجه استخراج DNA مربوط به ۱۰ نمونه. M: مارکر۱۰۰bp.

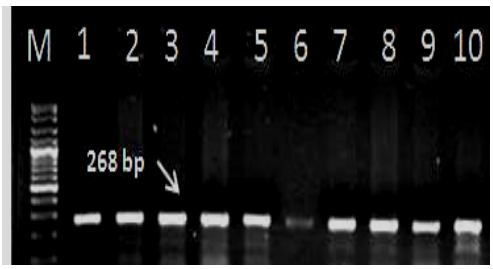


نگاره ۲– DNA استخراج شده با کیت GGE . M: مارکر۱۰۰bp.

جهت تایید استخراج DNA و مقایسه کارایی دو کیت نامبرده از PCR ژن بتاگلوبین (ژن کنترل داخلی) استفاده شد. در نگاره ۳، PCR نمونه‌های استخراج شده با کیت Bioneer نشان داده شده است. از ۱۰ نمونه، ۳ نمونه با باند ضعیف PCR شدند. در نگاره ٤، PCR انجام شده ۱۰ نمونه استخراج شده با کیت GGE ارائه شده است. تمامی نمونه‌ها PCR شده‌اند. لازم به ذکر است در روش کیت GGE، ۱ ماکرولیتر از DNA برای PCR استفاده شده است ولی ۸ میکرولیتر DNA استخراج شده از کیت Bioneer برای انجام PCR استفاده شده است که با این حال تمامی نمونه‌ها موفق به انجام PCR نشدند.



نگاره ۳ – محصول PCR ژن بتاگلوبین (قطعه ۲٦۸bp) با استفاده از کیت Bioneer، چاهک های ۱–۱۰ محصول PCR بافت‌های ثابت شده در فرمالین، M : مارکر۱۰۰bp.



نگاره ٤– محصول PCR ژن بتاگلوبین (قطعه ۲٦۸bp) با استفاده از کیت GGE. چاهک‌های ۱–۵ محصول PCR بافت‌های ثابت شده در فرمالین، M: مارکر۱۰۰bp.

بحث

استخراج DNA ژنومی خالص از نمونه‌های بیولوژیک، مرحله ابتدایی و البته بحرانی برای انجام موفقیت‌آمیز سایر روش‌های

مولکولی همچون PCR، Real Time PCR، RFLP، بررسی پلی مورفیسم، ژنوتایپینگ، توالی یابی، کلونینگ و غیره می‌باشد (۸و ۱۳). از طرفی استخراج DNA از نمونه‌های بافتی و قالب‌های پارافینی جهت بررسی سیتوژنتیکی، ژنتیک پزشکی، پلی مورفیسم ها، ویروس شناسی و باکتری شناسی پزشکی و غیره بسیار ارزشمند است (۵). چندین عامل کلیدی در انتخاب روش مناسب جهت استخراج DNA، بایستی در نظر گرفته شود که از آن جمله می‌توان به مقرون به صرفه بودن (کم هزینه بودن)، سریع بودن و سهولت انجام روش و توانایی تکنیک مورد نظر در حذف ممانعت کننده‌های در واکنش‌های پایین دستی اشاره کرد. همچنین روش انتخابی بایستی به سهولت قابل اجرا در تمامی آزمایشگاه ها با حداقل امکانات باشد. همواره روش‌های مختلف و کیت های متعددی معرفی می‌گردد ولی متاسفانه یک دستورالعمل جامع و کلی که تمامی معیارهای فوق الذکر را برآورده سازد وجود ندارد (۲). معمولا در بیشتر روش‌ها برای هضم آنزیمی از پروتئیناز K بصورت overnight استفاده می‌شود. همچنین آنزیم RNAase A جهت تجزیه RNA استفاده می‌شود. از معایب بکارگیری این روش‌ها می‌توان به وقت گیر بودن و پرهزینه بودن اشاره کرد (۷). از مزایای روش بکار رفته توسط کیت GGE می‌توان به عدم استفاده از RNAase A اشاره نمود که خللی نیز در فرآیند استخراج DNA و میزان خلوص آن ایجاد نکرد. از سویی با بهینه‌سازی پروتئیناز K در زمان سه ساعت به جای overnight، در زمان نیز صرفه جویی شد. در سال‌های اخیر بکارگیری ستون های کروماتوگرافی یا جاذب DNA، جهت استخراج متداول شده است. لازم به ذکر است که اشکالاتی در خصوص استفاده از این ستون‌ها دیده می‌شود که از آن جمله می‌توان به غلظت کم DNA استخراج شده اشاره کرد، چرا که همواره مقداری از DNA در فیلتر به دام می‌افتد که قابل جداسازی نیست. بنابراین در مواردی که به غلظت‌های زیاد DNA جهت انجام فعالیت‌های پایین دستی نیاز می‌باشد، استفاده از روش ستونی توصیه نمی‌شود (۷). نتایج حاصل از تحقیق حاضر توسط کیت Bioneer نیز تاییدی بر این یافته می‌باشد. بطوری که DNA استخراج شده توسط این کیت هم از نظر خلوص و هم از نظر غلظت از بازده و کارایی پایینی برخوردار بود. از کیت GGE جهت استخراج DNA از نمونه‌های بالینی ثابت شده در فرمالین در چندین مطالعه استفاده شده است (۱۰و ۱۱و ۱۲).

در بافت‌های ثابت شده در فرمالین و بلوک پارافینی ممانعت کننده‌های PCR به وفور یافت می‌شود. با توجه به نتایج PCR ژن بتاگلوبین با استفاده از DNA استخراج شده توسط دو کیت مورد نظر (نگاره ۳و ٤)، حذف کامل ممانعت کننده‌ها توسط روش بکار رفته با کیت GGE مشهود است. چرا که تمامی نمونه‌های استخراج شده توسط کیت GGE در واکنش PCR تکثیر شدند در حالیکه توسط کیت Bioneer این چنین نبود. هم غلظت DNA برای تکثیر بسیار کم بود و هم از خلوص مناسبی برخوردار نبود. از سویی در غلظت‌های کم DNA استخراج شده تشکیل پرایمر دایمر در واکنش PCR به چشم می خورد که این پرایمر دایمرها با DNA الگو رقابت کرده و در نهایت مانع از انجام PCR و ایجاد محصول PCR خواهند شد (۳).

با توجه به نتایج این تحقیق در کارایی بالای استخراج DNA با استفاده از کیت GGE، از نظر غلظت DNA، خلوص بالای DNA، سهولت انجام کار، صرفه‌جویی در هزینه و زمان، استفاده از این کیت جهت استخراج DNA از بافت‌های فیکس شده در فرمالین و یا بلوک‌های پارافین توصیه می‌شود.

تشکر و سپاسگزاری

از دانشگاه آزاد اسلامی واحد پرند جهت تأمین هزینه تحقیق و دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم تحقیقات جهت در اختیار گذاشتن امکانات جهت انجام طرح قدردانی می‌شود.

فهرست منابع

1. Berthomieu, P., Meyer, C. (1991): Direct amplification of plant genomic DNA from leaf and root pieces using PCR. Plant. Mol. Biol. 17: 555–557.
2. Clements, D.N., Wood, S., Carter, S.D., Ollier, W.E.R. (2008): Assessment of the quality and quantity of genomic DNA recovered from canine blood samples by three different extraction methods. Res. Vet. Sci. 85(1):74-79.
3. Diaz-Cano, S.J., Brady, S.P. (1997):DNA extraction from formalin-fixed, paraffin-embedded tissues: protein digestion as a limiting step for retrieval of high-quality DNA. Diagn. Mol. Pathol. 6 (6):342-6.
4. Jeanpierre, M. (1987). A rapid method for the purification of DNA from blood. Nucleic. Acids. Res. 25;15(22):9611.
5. Lewis, C.M., Cler, L.R., Bu, D.W., Zochbauer-Mnller, S., Milchgrub, S., Naftalis, E.Z. et al. (2005): Promoter hypermethylation in benign breast epithelium in relation to predicted breast cancer risk. Clin. Cancer. Res. 11(1): 166-172.
6. Liborio, T., Etges, A., Costa, D., Neves, A., Mesquita, R., Daumas, F. (2005):Evaluation of the genomic DNA extracted from formalin-fixed, paraffin-embedded oral samples archived for the past 40-years. J. Bras. Patol. Med. Lab. (41):405-10.
7. Nasiri, H., Forouzandeh, M., Rasaee, M.J., Rahbarizadeh, F. (2005):Modified salting out method: high yield, high quality genomic DNA extraction from whole blood using laundry detergent. J. Clin. Lab. Anal. 19(6): 229-232.
8. Phillips, H.A., Howard, G.C.W., Miller, W.R. (2000): P53 mutations as a marker of malignancy in bladder washing samples from patients with bladder cancer. Br. J. Cancer. 82(1): 136-141.
9. Pietro, F.D., Ortenzi, F., Tilio, M., Concetti, F., Napolioni, V. (2011): Genomic DNA extraction from whole blood stored from 15 to 30 years at -20 C by rapid phenolechloroform protocol: A useful tool for genetic epidemiology studies. Molecular. Cellular. Probes. 25: 45-48.
10. Tafvizi, F., Tahmasebi Fard, Z., Asareh, R. (2015): Epstein-Barr virus DNA in colorectal carcinoma in Iranian patients. Pol. J. Pathol. 66(2):154-160.
11. Tafvizi, F., Tahmasebi Fard, Z. (2014): Detection of human cytomegalovirus in patients with colorectal cancer by nested-PCR. Asian. Pac. J. Cancer. Prev.15(3):1453-7
12. Taherian, H., Tafvizi, F., Tahmasebi Fard, Z., Abdirad, A. (2014): Lack of association between human papillomavirus infection and colorectal cancer. Prz. Gastroenterol. 9(5):280-4.
13. Wang, S.S., Thornton, K., Kuhn, A.M., Nadeau, J.G. Hellyer, T.J. (2003). Homogeneous real-time detection of single-nucleotide polymorphisms by strand displacement amplification on the BD probe tec system. Clin. Chem. 49(10): 1599-1607.
14. Weiss, A.T., Delcour, N.M., Meyer, A., Klopfleisch, R. (2011). Efficient and cost effective extraction of genomic DNA from f ormalin-fixed and paraffin-embedded tissues. Vet. Pathol. 48(4):834-8.