

بهینه سازی استخراج RNA از نمونه های مدفوع با استفاده از بافر لیز طراحی شده: ارزیابی و مقایسه با کیت تجاری

حنان خدائی^۱، لیلا عظیمی^{۲*}، عباس اخوان سپهی^۳، فاطمه اشرفی^۴، مریم رجب نژاد^۵

۱. دانشجوی دکتری، گروه میکروبیولوژی، واحد تهران شمال، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران
۲. دانشیار، مرکز تحقیقات عفونی اطفال، پژوهشکده سلامت کودکان، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران
۳. استاد، گروه میکروبیولوژی، واحد تهران شمال، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران
۴. استادیار، گروه میکروبیولوژی، واحد تهران شمال، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران
۵. استادیار، مرکز تحقیقات عفونی اطفال، پژوهشکده سلامت کودکان، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران

چکیده

سابقه و هدف: استخراج RNA از نمونه های مدفوع به دلیل وجود مهارکننده ها و پیچیدگی های ترکیب شیمیایی مدفوع، یک چالش عمده در تشخیص مولکولی عوامل بیماری زای دستگاه گوارش به شمار می رود. هدف این مطالعه، طراحی و بهینه سازی یک بافر لیز کارآمد برای استخراج RNA کامل از نمونه های مدفوع و مقایسه عملکرد آن با کیت تجاری می باشد.

مواد و روش ها: نمونه های مدفوع از بیماران بستری در بخش های مختلف بیمارستان کودکان مفید جمع آوری شد. بافر لیز بر اساس ترکیبات گوانیدینیوم تیوسیانات، Tris-HCl، EDTA و CTAB تهیه گردید. شرایط استخراج شامل تغییر در مقادیر بافر لیز، پروتئیناز K و حامل RNA در سه حالت مختلف بررسی شد. کیفیت RNA استخراج شده با استفاده از بافر لیز طراحی شده و استفاده از ستون های استخراج سیلیکونی، با استفاده از دستگاه Qubit و تکنیک Real-Time PCR با کیفیت RNA استخراج شده با استفاده از کیت تجاری بر پایه بید مغناطیسی، مورد مقایسه قرار گرفت. به منظور انجام Real-Time PCR از ژن کنترل داخلی RNase P، ژن های ویروسی E و S و ویروس SARS-CoV-2 استفاده گردید.

یافته ها: حالت بهینه استخراج در ترکیب ۶۰۰ میکرولیتر بافر لیز طراحی شده، ۲۰ میکرولیتر حامل RNA و ۶۰ میکرولیتر پروتئیناز K به دست آمد. در این شرایط، میانگین مقادیر Ct برای ژن های RNase P، E و S کمتر از کیت تجاری بود و غلظت RNA نیز بالاتر اندازه گیری شد.

نتیجه گیری: روش استخراج با استفاده از بافر لیز طراحی شده، کارایی بالاتری نسبت به کیت تجاری در استخراج RNA از نمونه های مدفوع داشت و می تواند به عنوان جایگزین مقرون به صرفه در تشخیص مولکولی به کار رود.

کلمات کلیدی: استخراج RNA، نمونه مدفوع، SARS-CoV-2، بافر لیز.

Optimization of RNA Extraction from Stool Samples Using a Designed Lysis Buffer: Evaluation and Comparison with a Commercial Kit

Hannan Khodaei¹, Leila Azimi^{2*}, Abbas Akhavan Sepahy³, Fatemeh Ashrafi⁴, Maryam Rajabnejad⁵

1. Ph.D. student, Department of Microbiology, NT.C., Islamic Azad University, Tehran, Iran
2. Associate professor, Pediatric Infections Research Center, Research Institute for children's Health, Shahid Beheshti University, Tehran, Iran
3. Professor, Department of Microbiology, NT.C., Islamic Azad University, Tehran, Iran
4. Assistant professor, Department of Microbiology, NT.C., Islamic Azad University, Tehran, Iran
5. Assistant professor, Pediatric Infections Research Center, Research Institute for children's Health, Shahid Beheshti University, Tehran, Iran

Abstract

Background and Objective: Extracting RNA from stool samples poses a major challenge in the molecular diagnosis of gastrointestinal pathogens due to the presence of inhibitors and the complex chemical composition of feces. This study aimed to design and optimize an efficient lysis buffer for extracting intact RNA from stool samples and to compare its performance with that of a commercial kit.

Materials and Methods: Stool samples were collected from patients hospitalized in various wards of Mofid Children's Hospital. The lysis buffer was prepared using guanidinium thiocyanate, Tris-HCl, EDTA, and CTAB. Extraction conditions were tested by varying the amounts of lysis buffer, proteinase K, and RNA carrier across three different setups. The quality of RNA extracted using the designed lysis buffer combined with silica spin columns was evaluated by Qubit and Real-Time PCR and compared to RNA extracted using a commercial magnetic bead-based kit. For Real-Time PCR, the internal control gene RNase P and SARS-CoV-2 viral genes E and S were employed.

Results: The optimal extraction condition consisted of 600 μ L of the designed lysis buffer, 20 μ L of RNA carrier, and 60 μ L of proteinase K. Under these conditions, the average Ct values for RNase P, S, and E genes were lower than those obtained with the commercial kit, and RNA concentration was also higher.

Conclusion: The extraction method using the designed lysis buffer demonstrated higher efficiency than the commercial kit for RNA extraction from stool samples and can serve as a cost-effective alternative in molecular diagnostics.

Keywords: RNA extraction, stool sample, SARS- CoV-2, lysis buffer.

مقدمه

استخراج اسیدهای نوکلئیک، به‌ویژه RNA، یکی از مراحل کلیدی در مطالعات تشخیصی، اپیدمیولوژیک و مولکولی به شمار می‌رود. RNA به‌عنوان مولکولی تک‌رشته‌ای، نقش اساسی در انتقال اطلاعات ژنتیکی و بیان ژن‌ها ایفا می‌کند. در حوزه ویروس‌شناسی، شناسایی RNA ویروسی از نمونه‌های بالینی، گامی حیاتی برای تشخیص سریع و دقیق بیماری‌ها محسوب می‌شود. کیفیت و کمیت RNA استخراج‌شده، به‌طور مستقیم بر دقت و حساسیت آزمون‌های مبتنی بر تکنیک‌های تکثیر اسیدهای نوکلئیک مانند Real-Time PCR تأثیرگذار است (۱). در سال‌های اخیر، همه‌گیری ویروس کرونا (SARS-CoV-2) و نیاز فوری به شناسایی آن، موجب تمرکز گسترده بر توسعه روش‌های سریع و دقیق استخراج RNA شده است. نمونه‌های مدفوع به‌دلیل قابلیت ردیابی طولانی تر ویروس و همچنین مطالعات اپیدمیولوژیک در مراحل ابتدایی و انتهایی عفونت، مورد توجه قرار گرفته‌اند. با این حال، استخراج RNA از این نوع نمونه‌ها به‌دلیل ترکیب پیچیده و حضور مهارکننده‌ها در نمونه مدفوع، چالش‌برانگیز است. مدفوع یکی از نمونه‌های بیولوژیکی است که از دیرباز برای تشخیص عوامل عفونی به‌ویژه پاتوژن‌های روده‌ای مورد استفاده قرار گرفته است. با ظهور COVID-19، شواهد متعددی نشان داده‌اند که RNA ویروس SARS-CoV-2

حتی زمانی که تست‌های تنفسی منفی می‌شوند، می‌تواند در نمونه‌های مدفوع بیماران وجود داشته باشد (۲، ۳). این ویژگی، ارزش بالینی نمونه‌های مدفوع را در شناسایی بیماران، پیگیری روند بهبودی و پایش فاضلاب شهری جهت مطالعات اپیدمیولوژی محیطی افزایش داده است (۴، ۵). با این حال، ماهیت فیزیکی و شیمیایی مدفوع، که شامل مواد پیچیده‌ای مانند چربی‌ها، اسیدهای صفراوی، پلی‌ساکاریدها، فلور میکروبی متنوع و آنزیم‌های تخریب‌کننده اسید نوکلئیک است، استخراج RNA را دشوار می‌کند. بسیاری از این ترکیبات، مهارکننده‌های قوی واکنش‌های آنزیمی نظیر PCR هستند و در صورت عدم حذف کامل، می‌توانند باعث نتایج منفی کاذب یا کاهش حساسیت آزمون شوند (۶). یکی از مهم‌ترین موانع استخراج RNA از نمونه‌های مدفوع، حضور آنزیم‌های RNase است. این آنزیم‌ها به‌صورت طبیعی در دستگاه گوارش وجود دارند و به‌سرعت RNA را تخریب می‌کنند. علاوه بر این، وجود ذرات معلق و پلی‌ساکاریدهای محلول باعث انسداد ستون‌های سیلیکونی یا کاهش کارایی بیدهای مغناطیسی می‌شود (۷). همچنین، تنوع ترکیب شیمیایی مدفوع بین افراد و حتی در نمونه‌های یک فرد در روزهای مختلف، می‌تواند باعث تغییرپذیری بالا در کارایی روش‌های استخراج گردد. کیت‌های تجاری معمولاً برای حذف این مهارکننده‌ها، از ترکیبات chaotropic مانند گوانیدینیوم تیوسیانات، بافرهای شستشو با محتوای اتانول و شستشوی چندمرحله‌ای استفاده می‌کنند. با وجود این، کارایی این کیت‌ها در نمونه‌های مدفوع گاهی کمتر از نمونه‌های ساده‌تر مانند خون یا سواب بینی است (۷). روش‌های مبتنی بر ستون سیلیکونی بر اساس توانایی باند شدن اسیدهای نوکلئیک به سطح سیلیکا در حضور نمک‌های chaotropic کار می‌کنند (۸). پس از باند شدن، طی شستشوی متوالی، آلاینده‌ها حذف شده و RNA با بافر کم‌نمک یا آب RNase-free شسته می‌شود. از مزایای این روش‌ها می‌توان به سرعت بالا، سهولت کاربری و حداقل نیاز به تجهیزات اشاره کرد. البته در کنار آن معایبی همچون حساسیت به گرفتگی ستون و کاهش

نویسنده ی مسئول: دانشیار، مرکز تحقیقات

عفونی اطفال، پژوهشکده سلامت کودکان،

دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران

ایران

آدرس الکترونیک:

leilaazimi1982@gmail.com

تاریخ دریافت مقاله: ۱۴۰۴/۰۲/۰۱

تاریخ پذیرش مقاله: ۱۴۰۴/۰۶/۱۹

اسید نوکلئیک از نمونه‌های مدفوع با چالش‌های متعدد روبه‌رو هستند. هزینه بالای کیت‌های تجاری، نیاز به تجهیزات خاص، و محدودیت‌های واردات، مانع استفاده گسترده از این فناوری‌ها در بسیاری از مراکز تشخیصی کشور می‌شود. بنابراین، توسعه یک روش بومی که بتواند با هزینه کمتر و راندمان بالا، RNA باکیفیت و عاری از مهارکننده‌ها را استخراج کند، ضرورت دارد. هدف از این پژوهش، طراحی و بهینه‌سازی یک بافر لیز کارآمد بر پایه ترکیبات در دسترس، برای استخراج RNA کامل از نمونه‌های مدفوع و مقایسه کارایی آن با یک کیت تجاری مبتنی بر بید مغناطیسی است. کارایی روش‌ها با سنجش غلظت RNA و ارزیابی عملکرد در فرآیند Real-Time PCR برای ژن‌های ویروسی و کنترل داخلی بررسی گردید.

مواد و روش‌ها

طراحی مطالعه و جمع‌آوری نمونه‌ها

در این مطالعه ۱۰۰ نمونه مدفوع از بیماران بستری در بخش‌های اورژانس، عفونی، گوارش و بخش‌های ویژه نوزادان و اطفال بیمارستان کودکان مفید، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، جمع‌آوری گردید. تمامی مراحل با اخذ رضایت آگاهانه از بیماران یا والدین آنان و طبق کد اخلاق (IR.SBMU.RICH.REC.1400.038) انجام شد.

آماده‌سازی نمونه‌ها

نمونه‌های مدفوع پس از جمع‌آوری در ظروف استریل، بلافاصله به مرکز تحقیقات عفونی اطفال مستقر در بیمارستان کودکان مفید منتقل و تا زمان آزمایش در دمای ۸۰- درجه سانتیگراد نگهداری شدند. در زمان استخراج، نمونه‌ها به دمای اتاق رسانده شده و با آب استریل RNase/DNase-free به نسبت ۱:۵ (وزنی/حجمی) همگن‌سازی شدند. برای تعیین وزن خالص مدفوع، ابتدا

راندمان در حضور ذرات جامد و مهارکننده‌ها نیز وجود دارد (۸). در روش‌های مبتنی بر بید مغناطیسی بیدهای پوشش‌داده‌شده با مواد متصل‌کننده به RNA، در حضور نمک‌های chaotropic، اسید نوکلئیک را جذب می‌کنند. سپس با اعمال میدان مغناطیسی، جداسازی و شستشو انجام شده و RNA استخراج می‌شود. این روش در اغلب کیت‌های تجاری استخراج RNA از نمونه مدفوع به کار می‌رود. از مزایای این روش می‌توان به قابلیت اتوماسیون و کاهش خطر آلودگی اشاره کرد اما متأسفانه این روش دارای هزینه بالایی است و نیاز به تجهیزات خاص دارد (۹). با توجه به هزینه بالای کیت‌های وارداتی، محدودیت‌های دسترسی در شرایط تحریم و نیاز به روش‌هایی که در شرایط بحران (مانند همه‌گیری‌ها) قابل اجرا باشند، طراحی و بهینه‌سازی روش‌های بومی اهمیت ویژه‌ای پیدا کرده‌اند. بافرهای لیز طراحی‌شده بر اساس ترکیبات موجود در بازار داخلی، می‌توانند جایگزینی کم‌هزینه و قابل اطمینان برای روش‌های تجاری باشند. علاوه بر این، روش‌های بومی امکان تغییر و بهینه‌سازی متناسب با نوع نمونه، شرایط آزمایشگاهی و تجهیزات موجود را فراهم می‌آورند. این موضوع در کشورهایی که با محدودیت منابع روبه‌رو هستند، می‌تواند موجب افزایش ظرفیت آزمایشگاه‌ها و کاهش زمان انتظار بیماران شود. بافر لیز، به‌عنوان اولین مرحله استخراج اسید نوکلئیک از نمونه، نقش حیاتی در تخریب سلول‌ها، غیرفعال‌سازی آنزیم‌های تخریب‌کننده RNA و آزادسازی اسیدهای نوکلئیک دارد. ترکیبات chaotropic مانند گوانیدینیوم تیوسیانات با دناتوره کردن پروتئین‌ها و آنزیم‌ها، مانع تخریب RNA می‌شوند. ترکیب این ماده با عوامل شوینده مانند CTAB، که توانایی حذف پلی‌ساکاریدها و لیپیدها را دارد، می‌تواند کارایی استخراج از نمونه‌های پیچیده‌ای مانند مدفوع را افزایش دهد (۱۰، ۱۱). همچنین، افزودن حامل RNA به‌ویژه در نمونه‌هایی با غلظت پایین RNA می‌تواند به افزایش بازدهی استخراج کمک کند. پروتئیناز K نیز با هضم پروتئین‌های همراه RNA و مهارکننده‌های PCR، کیفیت محصول نهایی را بهبود می‌بخشد. با وجود پیشرفت‌های قابل توجه در فناوری‌های استخراج RNA، هنوز روش‌های موجود در فرآیند استخراج

میکروتیوب‌ها توزین شده، سپس مقدار مشخصی نمونه به آن‌ها اضافه و مجدداً توزین شدند.

ترکیب و تهیه بافر لیز

بافر لیز اختصاصی این مطالعه بر پایه مواد chaotropic و شوینده‌های قوی تهیه شد. ترکیب نهایی بافر در جدول ۱ ذکر شده است.

جدول ۱. ترکیبات بافر لیز

نام ماده	غلظت (میلی مول)	حجم/وزن (گرم)
گوانیدینیوم تیوسیانات ^۱	۱۰۱۶	۱۲۰
Tris-Cl (0.1 M, pH = 6.4)	۱۰	۱/۵۶۷
EDTA ^۲ (0.5 M, pH = 8.0)	۵۰	۱۸/۶۱۲
ستیل تری متیل آمونیوم بروماید ^۳	۴/۲	۱/۴۸

در یک ارلن مایر ۱/۵۷۶ گرم Tris-Cl در ۶۰ میلی لیتر آب دیونیزه استریل با هم زدن مداوم حل شد. میزان pH با استفاده از محلول سدیم هیدروکساید ۰/۱ مولار روی ۶/۴ تنظیم و سپس با استفاده از آب دیونیزه و خالص به حجم ۱۰۰ میلی لیتر رسید.

۱۲۰ گرم گوانیدینیوم تیوسیانات وزن شد و به طور کامل مستقیماً وارد محلول ساخته شده از Tris-Cl شد و با کمک حمام اولتراسونیک در دمای ۶۵ درجه سانتیگراد حل شد. در یک ارلن مایر دیگر ۱۸/۶۱۲ گرم EDTA با ۸۰ میلی لیتر آب دیونیزه و خالص حل شد و همزمان pH محلول با استفاده از محلول سدیم هیدروکساید ۰/۱ مولار روی ۸

تنظیم گردید. سپس محلول را فیلتر کرده و با استفاده از آب دیونیزه و خالص به حجم ۱۰۰ میلی لیتر می‌رسانیم، سپس ۸/۸ میلی لیتر از محلول EDTA به محلول گوانیدینیوم تیوسیانات اضافه گردید. در پایان ۱/۴۸ گرم از CTAB در ۱۰۰ میلی لیتر آب دیونیزه مخلوط و به محلول نهایی اضافه شد و به خوبی مخلوط گردید تا محلولی کاملاً یکنواخت حاصل شود. گوانیدینیوم تیوسیانات در دنا توره کردن پروتئین‌ها و غیرفعال‌سازی RNase ، EDTA در مهار یون‌های دوظرفیتی، Tris در تثبیت pH و CTAB در حذف پلی‌ساکاریدها و لیپیدها، نقش دارند.

طراحی شرایط استخراج و بهینه‌سازی

به منظور تعیین بهترین شرایط استخراج، مقادیر متفاوت بافر لیز، پروتئیناز K و Poly-A به عنوان حامل RNA انتخاب شد (جدول ۲) و بر روی پنج نمونه با در نظر گرفتن ۲۷ حالت مختلف مورد بررسی قرار گرفت (جدول ۳).

جدول ۲. حجم مواد متغیر استفاده شده در بهینه سازی کیت استخراج

حجم پروتئیناز K	حجم حامل RNA	حجم بافر لیز
۱۵ میکرولیتر	۵ میکرولیتر	۳۰۰ میکرولیتر
۳۰ میکرولیتر	۱۰ میکرولیتر	۶۰۰ میکرولیتر
۶۰ میکرولیتر	۲۰ میکرولیتر	۹۰۰ میکرولیتر

جدول ۳. حالت‌های (۱-۲۷) در نظر گرفته شده برای بهینه سازی کیت استخراج

^۱ Guanidinium thiocyanate

^۲ Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA)

^۳ Cetyltrimethyl ammonium bromide (CTAB)

استفاده گردید. در انتها سانتریفیوژ به مدت ۱ دقیقه با دور ۱۰۰۰۰ در دقیقه انجام شد. در این مرحله محلول خارج شده از ستون، حاوی RNA خالص سازی شده از نمونه مدفوع می باشد.

این روش استخراج پس از بهینه سازی نهایی مقادیر بافر لیز، پروتئیناز K و حامل RNA، بر روی تمامی ۱۰۰ نمونه تکرار و نتایج حاصل از Real-time PCR با نتایج استفاده از کیت تجاری بر پایه بیدهای مغناطیسی مورد مقایسه قرار گرفت. همچنین غلظت RNA استخراج شده بوسیله دستگاه Qubit که یک دستگاه فلورومتر برای سنجش میزان RNA با واحد میکروگرم در میلی لیتر می باشد، خوانده شد.

روش مقایسه ای با کیت تجاری

برای مقایسه عملکرد، استخراج RNA از همان نمونه ها با استفاده از کیت تجاری استخراج کامل RNA از شرکت Tianlong (Lot No: H2219011811. PRC) انجام شد. مکانیسم این کیت بر پایه ی بید های مغناطیسی و بار الکتریکی می باشد و حاوی پلیت هایی است که پس از اضافه کردن نمونه در دستگاه استخراج اتومات (Tianlong Extraction machine Libex model) متعلق به همین شرکت قرار گرفت و فرآیند استخراج به صورت ماشینی انجام شد.

تعیین غلظت و خلوص RNA

غلظت RNA با استفاده از فلورومتر Qubit و کیت Qubit RNA HS Assay Kit اندازه گیری شد.

ارزیابی عملکرد روش طراحی شده با Real-Time PCR

ارزیابی کارایی استخراج بر اساس توانایی شناسایی ژن کنترل داخلی (RNase P) و دو ژن ویروسی S و E مربوط به SARS-COV-2 انجام شد به این منظور از کیت تجاری COVITECH (Lot No: COVIT-21008-1.Iran) و دستگاه Real-Time PCR برند Corbett Rotor-Gene 6000 استفاده شد. برنامه حرارتی در جدول ۴ ذکر شده است.

حامل RNA			حامل RNA			حامل RNA			
۲۰ میکرولیتر			۱۰ میکرولیتر			۵ میکرولیتر			
پروتئیناز K ۵۰ میکروگرم	پروتئیناز K ۳۰ میکروگرم	پروتئیناز K ۱۵ میکروگرم	پروتئیناز K ۵۰ میکروگرم	پروتئیناز K ۳۰ میکروگرم	پروتئیناز K ۱۵ میکروگرم	پروتئیناز K ۵۰ میکروگرم	پروتئیناز K ۳۰ میکروگرم	پروتئیناز K ۱۵ میکروگرم	
۹	۸	۷	۶	۴	۴	۳	۲	۱	بافر ۳۰۰ میکرو لیتر
۱۸	۱۷	۱۶	۱۵	۱۴	۱۳	۱۲	۱۱	۱۰	بافر ۶۰۰ میکرو لیتر
۲۷	۲۶	۲۵	۲۴	۲۳	۲۲	۲۱	۲۰	۱۹	بافر ۹۰۰ میکرو لیتر

فرایند استخراج RNA

پس از اضافه کردن آب استریل و عاری از آنزیم های DNase و RNase، به میکروتیوب های حاوی مدفوع، نمونه ها مخلوط و همگن شدند، سپس با سرعت ۵۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ شده و در نهایت به میزان ۳۰۰ میکرولیتر از مایع رویی برای انجام مراحل استخراج برداشت شد. در مرحله بعد از بافر لیز با توجه به مقادیر مختلف موجود در جدول ۳ به هر نمونه اضافه شد و ۱۰ دقیقه در دمای ۵۶ درجه سانتیگراد قرار گرفت تا محلول برداشت شده از نمونه ی مدفوع با بافر لیز همراه با حامل RNA و پروتئیناز K تیمار گردند. در مرحله بعد محلول به ستون استخراج دارای فیلتر های سیلیکونی (ساخت شرکت روزه، ایران) که به صورت تجاری خریداری شد، اضافه گردید و سانتریفیوژ به مدت یک دقیقه با سرعت ۱۰۰۰۰ دور بر دقیقه انجام شد. مراحل شست و شو با استفاده از الکل مطلق و طی دو مرحله انجام شد و در نهایت از ۵۰ میکرولیتر آب گرید مولکولی به عنوان بافر حل کننده

جدول ۴. برنامه دمایی Real-Time-PCR

مرحله	دما (درجه سانتیگراد)	زمان	دور
رونویسی معکوس	۵۵	۱۰ دقیقه	۱
واسرشتگی اولیه	۹۵	۳ دقیقه	۱
واسرشتگی	۹۵	۱۵ ثانیه	۵۰
اتصال مجدد، طویل سازی و جمع آوری داده ها	۶۰	۱ دقیقه	

میکرولیتر Proteinase k (بهترین Ct را در ارتباط با ژن کنترل داخلی (IC=Ranase P) در هر پنج نمونه نشان داد که باتوجه به کمتر بودن میزان بافر لیز در حالت ۱۸، به عنوان بهینه ترین روش و میزان انتخاب شد (جدول ۵).

جدول ۵. نتایج ۲۷ حالت مختلف بهینه سازی بر روی ۵ نمونه

نتایج Ct ژن کنترل داخلی در پنج نمونه بهینه سازی شده	۲۷ حالت مختلف بهینه سازی				
	نمونه ۵	نمونه ۴	نمونه ۳	نمونه ۲	نمونه ۱
۱	۳۳/۵	-	-	۳۸/۳	-
۲	۳۳/۱	۳۶/۳	-	۳۸	۳۴/۳
۳	۳۳	۳۶	۳۸/۵	۳۷/۹	۳۴
۴	۳۳	۳۶/۱	۳۸/۳	۳۷/۵	۳۲/۹
۵	۳۲/۸	۳۵/۶	۳۷/۷	۳۷	۳۲/۵
۶	۳۲/۶	۳۵/۳	۳۷/۵	۳۶/۵	۳۲/۳
۷	۳۲	۳۵	۳۷/۵	۳۴/۶	۳۲/۵
۸	۳۲/۱	۳۵	۳۷/۲	۳۴/۵	۳۲/۳
۹	۳۱/۷	۳۴/۸	۳۶/۵	۳۳	۳۱/۶
۱۰	۳۱/۷	۳۴	۳۶/۳	۳۴/۵	۲۹
۱۱	۳۱/۵	۳۴/۱	۳۶	۳۴	۲۹/۳
۱۲	۳۱/۳	۳۳/۶	۳۶	۳۴/۲	۲۸/۵
۱۳	۳۱/۵	۳۳	۳۵/۵	۳۳/۲	۲۸/۵
۱۴	۳۱	۳۲/۸	۳۵	۳۳	۲۸/۳
۱۵	۲۹/۸	۳۲/۵	۳۵	۳۲/۵	۲۷/۱
۱۶	۲۹/۳	۳۱	۳۴	۳۲/۸	۲۶/۳
۱۷	۲۸/۷	۲۹/۶	۳۳/۵	۳۲/۳	۲۵/۷
۱۸	۲۷/۵	۲۸/۳	۳۲/۳	۳۱	۲۵/۳
۱۹	۳۱/۵	۳۴/۵	۳۶	۳۴/۳	۲۹
۲۰	۳۱/۳	۳۴	۳۶/۲	۳۴/۵	۲۹
۲۱	۳۱/۴	۳۴/۳	۳۵/۸	۳۴	۲۸/۸
۲۲	۳۱	۳۳/۵	۳۵/۳	۳۳/۶	۲۸/۶
۲۳	۲۹/۶	۳۳/۳	۳۵	۳۳/۵	۲۸/۵
۲۴	۲۹/۴	۳۳/۶	۳۴/۸	۳۳	۲۷
۲۵	۲۹	۳۱/۷	۳۴/۲	۳۲/۷	۲۶/۷
۲۶	۲۸/۵	۳۰/۲	۳۳/۵	۳۲/۳	۲۵/۵
۲۷	۲۷/۳	۲۹/۸	۳۲	۳۱/۲	۲۵/۲

تحلیل آماری

برای مقایسه میانگین مقادیر Ct و غلظت RNA بین روش طراحی شده و کیت تجاری، از آزمون Paired t-test در نرم افزار SPSS نسخه ۲۲ استفاده شد.

نتایج

ویژگی های جمعیت شناختی نمونه ها

در این مطالعه از ۱۰۰ نمونه مدفوع استفاده شد. علایم شایع در بیماران تب (۷۴٪) و دل درد (۶۵٪) بود، متوسط سنی بیماران ۲/۶۴ سال بود. بیماران شامل ۶۰٪ پسر و ۴۰٪ دختر بودند. این بیماران در بخش های مختلف بیمارستان مانند اورژانس، ریه، عفونی، گوارش، مراقبت های ویژه نوزادان، بخش مراقبت های ویژه اطفال بستری بودند. بیشترین درصد نمونه ها به ترتیب مربوط به بخش عفونی با ۳۵/۸٪ و بخش گوارش با ۳۲/۵٪ بودند.

بهینه سازی بافر لیز

نتایج بهینه سازی در ۲۷ حالت مختلف، نشان داد که حالت شماره ۱۸ (۶۰۰ میکرولیتر بافر لیز، ۲۰ میکرولیتر RNA حامل و ۶۰ میکرولیتر Proteinase k) و شماره ۲۷ (۹۰۰ میکرولیتر بافر لیز، ۲۰ میکرولیتر RNA حامل و ۶۰

و در روش استخراج با کیت تجاری و دستگاه اتومات ۶/۷ میکروگرم در میلی لیتر بود.

شناسایی SARS-CoV-2 در نمونه های مدفوع

از ۱۰۰ نمونه مدفوع بررسی شده با کیت های طراحی شده در این مطالعه تعداد ۴۵ نمونه کووید مثبت شناسایی شد علاوه بر آن، ۵ نمونه که در روش تجاری منفی کاذب گزارش شده بودند، با روش بافر لیز مثبت شدند. این یافته ها حاکی از حساسیت بالاتر روش پیشنهادی در شناسایی موارد با بار ویروسی پایین است. در مجموع، تمامی نمونه های مثبت شده با استفاده از کیت تجاری و دستگاه استخراج اتومات، در روش استخراج طراحی شده نیز مثبت شدند (نتایج منفی کاذب در روش استخراج طراحی شده مشاهده نگردید).

بحث

نتایج این مطالعه نشان داد که طراحی و بهینه سازی یک بافر لیز بر پایه ترکیبات chaotropic و شوینده های قوی، می تواند کارایی استخراج RNA از نمونه های مدفوع را به طور معنی داری بهبود بخشد. مقادیر Ct پایین تر در ژن کنترل داخلی (RNase P) و ژن های ویروسی S و E در روش طراحی شده نسبت به روش تجاری، نشان دهنده کیفیت بالاتر RNA و حذف بهتر مهارکننده ها است. این یافته ها همسو با مطالعات پیشین است که نقش کلیدی بافرهای حاوی گوانیدینیوم تیوسیانات را در غیرفعال سازی RNase ها و افزایش بازده استخراج RNA گزارش کرده اند (۸، ۱). در این پژوهش، روش طراحی شده با یک کیت تجاری مبتنی بر بید مغناطیسی (Tianlong) مقایسه شد. اگرچه کیت های تجاری اغلب به عنوان "استاندارد طلایی" در استخراج اسیدهای نوکلئیک استفاده می شوند، اما محدودیت هایی مانند هزینه بالا، نیاز به تجهیزات خاص و کاهش کارایی در نمونه های پیچیده ای مانند مدفوع دارند (۷) در مطالعه حاضر، روش طراحی شده توانست میانگین مقادیر Ct را در همه ژن ها به میزان ۲/۵ تا ۳/۲ سیکل کاهش دهد، که از نظر حساسیت واکنش PCR به معنای افزایش قابل توجه بازدهی استخراج است. مطالعات مشابه نیز گزارش

مقایسه روش طراحی شده با کیت تجاری

پس از بهینه سازی، در این مطالعه به منظور استخراج RNA تمامی نمونه های مدفوع مورد مطالعه (۱۰۰ نمونه) همزمان از کیت استخراج تجاری مربوط به دستگاه استخراج اتومات و بافر لیز بهینه شده همراه با ستون استخراج سیلیکونی استفاده شد و فرآیند Real-Time PCR با استفاده از کیت تجاری تشخیص SARS-COV-2 برند کووی تک انجام شد. نتایج حاصل نشان داد که روش طراحی شده جهت استخراج کامل RNA از مدفوع توانایی استخراج RNA کامل از تمامی نمونه ها با حساسیت ۱۰۰٪ با CI ۹۵٪ را داشت. مقایسه نتایج Real-Time PCR انجام شده بر روی ۱۰۰ نمونه مدفوع نشان داد که Ct ژن های مورد بررسی در این مطالعه در روش استفاده از بافر لیز طراحی شده از روش کیت تجاری پایین تر بود. به این ترتیب که میانگین Ct ژن کنترل داخلی در نمونه های استخراج شده با استفاده از بافر لیز طراحی شده 26.04 ± 2.42 و در روش استخراج با کیت تجاری و دستگاه اتومات 29.27 ± 2.48 بود که نشان دهنده میانگین پایین تر برای روش استخراج با استفاده از بافر لیز طراحی شده می باشد.

میانگین Ct ژن S در نمونه های استخراج شده به روش استفاده از بافر لیز طراحی شده 25.63 ± 3.18 و در روش استخراج با کیت تجاری و دستگاه اتومات 28.54 ± 4.32 بود که نشان دهنده میانگین پایین تر برای روش استخراج با استفاده از بافر لیز طراحی شده می باشد. میانگین Ct ژن E در نمونه های استخراج شده به روش استفاده از بافر لیز طراحی شده 27.39 ± 3.81 و در روش استخراج با کیت تجاری و دستگاه اتومات 30.23 ± 4.73 بود که نشان دهنده میانگین پایین تر برای روش استخراج با استفاده از بافر لیز طراحی شده می باشد.

غلظت RNA استخراج شده

خوانش RNA استخراج شده بوسیله دستگاه Qubit نشان داد که میانگین غلظت نمونه های استخراج شده به روش استفاده از بافر لیز طراحی شده $8/3$ میکروگرم در میلی لیتر

انطباق آن با شرایط نمونه‌های مدفوع است. برخلاف بسیاری از روش‌های تجاری که فرمول بسته دارند، این روش انعطاف‌پذیری بالایی برای تغییر نسبت ترکیبات بر اساس نوع نمونه و نیاز آزمایشگاه فراهم می‌آورد. همچنین استفاده از مواد شیمیایی رایج و در دسترس، هزینه استخراج را به‌طور قابل توجهی کاهش می‌دهد. از طرفی عدم نیاز به تجهیزات خاص باعث شده تا این روش قابل اجرا در آزمایشگاه‌های پایه با سانتریفیوژ و تجهیزات استاندارد باشد. کاهش معنی‌دار Ct در همه ژن‌ها و شناسایی موارد مثبت اضافی نشان از حساسیت بالاتر این بافر لیز در مقایسه با کیت تجاری دارد و میتوان از آن برای استخراج RNA از انواع پاتوژن‌های روده‌ای و ویروسی استفاده کرد. در شرایطی که محدودیت دسترسی به کیت‌های وارداتی وجود دارد (به‌ویژه در زمان همه‌گیری‌ها یا تحریم‌ها)، روش‌های بومی مقرون به‌صرفه می‌توانند ظرفیت تشخیصی کشور را به‌طور چشمگیری افزایش دهند. برآورد هزینه‌ها در این مطالعه نشان داد که بدون کاهش کیفیت و حتی با بهبود حساسیت، قیمت تمام‌شده روش طراحی شده در این مطالعه حدود ۵۲٪ کمتر از کیت تجاری است. با وجود مزایای قابل توجه، این مطالعه محدودیت‌هایی نیز دارد، به طور مثال ارزیابی روش تنها بر اساس نمونه‌های انسانی انجام شده و نیاز به آزمایش بر روی نمونه‌های حیوانی یا محیطی نیز وجود دارد همچنین عملکرد روش در شرایط نگهداری طولانی‌مدت نمونه‌ها بررسی نشده است. به طور کلی مقایسه این روش با بیش از یک کیت تجاری می‌تواند اعتبار یافته‌ها را افزایش دهد. پیشنهاد می‌شود در پژوهش‌های بعدی از این روش برای استخراج RNA از سایر نمونه‌های پیچیده مانند خاک، لجن فاضلاب و مواد غذایی نیز استفاده شود.

نتیجه‌گیری

مطالعه حاضر نشان داد که طراحی یک بافر لیز بهینه بر پایه ترکیبات موجود در بازار داخلی، می‌تواند عملکردی هم‌سطح یا حتی بالاتر از کیت‌های تجاری گران‌قیمت داشته باشد. کاهش مقادیر Ct، افزایش غلظت RNA و شناسایی موارد مثبتی که در زمان استفاده از کیت تجاری استخراج، نتایج

کرده‌اند که اصلاح ترکیب بافر لیز و استفاده از حامل RNA، به‌ویژه در نمونه‌های با غلظت پایین RNA، می‌تواند باعث بهبود آشکار کیفیت استخراج شود (۱۲). روش ما با افزودن RNA حامل و پروتئیناز K در مقادیر بهینه، همزمان دو مکانیسم بهبود کارایی را فعال کرده است: ۱. افزایش میزان RNA بازیابی‌شده و ۲. حذف پروتئین‌های مهارکننده. وجود ترکیباتی مانند اسیدهای صفراوی، پلی‌ساکاریدها، چربی‌ها و فلور میکروبی متنوع، چالش اصلی استخراج RNA از مدفوع است. مهارکننده‌ها می‌توانند باعث عدم شناسایی عوامل بیماری‌زا حتی در حضور RNA ویروسی شوند. در این مطالعه، ترکیب CTAB در بافر لیز نقش ویژه‌ای در حذف پلی‌ساکاریدها و مواد آلی نامحلول داشت. این ویژگی در مطالعات گیاهی نیز اثبات شده است، جایی که CTAB توانسته به‌طور مؤثری پلی‌ساکاریدها را از عصاره‌های پیچیده حذف کند (۱۳). همچنین، گوانیدینیوم تیوسیانات به‌عنوان یک دنا‌توره‌کننده قوی، علاوه بر مهار RNase، باعث لیز کامل سلول‌ها و آزادسازی RNA می‌شود. ترکیب این ماده با EDTA برای شلاته کردن یون‌های دوظرفیتی مورد نیاز RNase ها و Tris-HCl برای حفظ pH پایدار در روش ما، یک محیط شیمیایی بهینه برای حفاظت از RNA را فراهم کرد (۱۴). چندین مطالعه پیشین بر استفاده از نمونه‌های مدفوع برای تشخیص SARS-CoV-2 تمرکز داشته‌اند (۲). Wu و همکاران (۲۰۲۰) نشان دادند که RNA ویروس در ۵۳٪ از نمونه‌های مدفوع بیماران COVID-19، با وجود نتیجه منفی در نمونه‌های تنفسی، قابل شناسایی بودند (۲). Medema و همکاران (۲۰۲۰) در مطالعه پایش فاضلاب، اهمیت استخراج RNA با کارایی بالا را برای تشخیص زودهنگام شیوع بیماری برجسته کردند (۴). مطالعه حاضر نیز این اهمیت را تأیید کرد. روش بهینه‌شده توانست ۵ نمونه مثبت SARS-CoV-2 را که در روش تجاری منفی گزارش شده بودند، شناسایی کند. این امر می‌تواند ناشی از بازیابی بیشتر RNA در نمونه‌های با بار ویروسی پایین باشد، موضوعی که در کاربردهای اپیدمیولوژی محیطی (WBE)⁴ بسیار حیاتی است. مزیت اصلی روش پیشنهادی، ترکیب ساده ولی علمی بافر لیز و

⁴ Wastewater-Based Epidemiology

می‌تواند به‌عنوان یک گزینه پایدار برای آزمایشگاه‌های تشخیصی به‌ویژه در شرایط محدودیت منابع مطرح شود.

به صورت منفی کاذب مشاهده شده بود، همگی بیانگر کارایی بالای این روش است. این دستاورد نه‌تنها از نظر علمی، بلکه از نظر اقتصادی و عملیاتی نیز ارزشمند است و

منابع

1. Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Analytical biochemistry*. 1987;162(1):156-9.
2. Wu F, Zhao S, Yu B, Chen YM, Wang W, Song ZG, et al. A new coronavirus associated with human respiratory disease in China. *Nature*. 2020;579(7798):265-9.
3. Xiao K, Zhai J, Feng Y, Zhou N, Zhang X, Zou JJ, et al. Isolation of SARS-CoV-2-related coronavirus from Malayan pangolins. *Nature*. 2020;583(7815):286-9.
4. Medema G, Heijnen L, Elsinga G, Italiaander R, Brouwer A. Presence of SARS-Coronavirus-2 RNA in Sewage and Correlation with Reported COVID-19 Prevalence in the Early Stage of the Epidemic in The Netherlands. *Environmental science & technology letters*. 2020;7(7):511-6.
5. Ahmed W, Angel N, Edson J, Bibby K, Bivins A, O'Brien JW, et al. First confirmed detection of SARS-CoV-2 in untreated wastewater in Australia: A proof of concept for the wastewater surveillance of COVID-19 in the community. *The Science of the environment*. ۲۰۲۰;۱۳۸۷۶۴:۲۰۲۰.
6. Monteiro CP, Varela A, Pinto M, Neves J, Felisberto GM, Vaz C, et al. Effect of an aerobic training on magnesium, trace elements and antioxidant systems in a Down syndrome population. *Magnesium research*. 1997;10(1):65-71.
7. Schrader C, Schielke A, Ellerbroek L, Johne R. PCR inhibitors - occurrence, properties and removal. *Journal of applied microbiology*. 2012;113(5):1014-26.
8. Boom R, Sol CJ, Salimans MM, Jansen CL, Wertheim-van Dillen PM, van der Noordaa J. Rapid and simple method for purification of nucleic acids. *Journal of clinical microbiology*. 1990;28(3):495-503.
9. Adams NM, Bordelon H, Wang KK, Albert LE, Wright DW, Haselton FR. Comparison of three magnetic bead surface functionalities for RNA extraction and detection. *ACS applied materials & interfaces*. 2015;7(11):6062-9.
10. Murray MG, Thompson WF. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucleic acids research*. 1980;8(19):4321-5.
11. Rattanamas K, Taesuji M, Kulthonggate U, Jantafong T, Mamom T, Ruenphet S. Sensitivity of RNA viral nucleic acid-based detection of avian influenza virus, Newcastle disease virus, and African horse sickness virus on flinders technology associates card using conventional reverse-transcription polymerase chain reaction. *Veterinary world*. 2022;15(11):2754-9.
12. Wei M, Yuan J, Liu Y, Fu T, Yu X, Zhang ZJ. Novel Coronavirus Infection in Hospitalized Infants Under 1 Year of Age in China. *Jama*. 2020;323(13):1313-4.
13. Kiss T, Karácsony Z, Gomba-Tóth A, Szabadi KL, Spitzmüller Z, Hegyi-Kaló J, et al. A modified CTAB method for the extraction of high-quality RNA from mono-and dicotyledonous plants rich in secondary metabolites. *Plant Methods*. 2024;20(1):62.
14. Ali N, Rampazzo RCP, Costa ADT, Krieger MA. Current Nucleic Acid Extraction Methods and Their

Implications to Point-of-Care
Diagnostics. BioMed research
international. 2017;2017:9306564.

