تحقیقی

مقایسه روشهای استخراج DNA از بافتهای پارافینه با استفاده از روش سنتی استفاده از حرارت و روش تجاری استفاده از کیت

هما داودی
دکترای ایمونولوژی(PhD)، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی گلستان

سید رضا هاشمی
دکترای فیزیولوژی(PhD)، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گلستان

سیااوهنگ فونگ
استاد ، دانشکده پیراپزشکی و بهداشت، دانشگاه ویکتوریا استرالیا

مصطفی قربانی
دانشجوی PhD اپیدمیولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی گلستان

نویسنده مسئول: هما داودی
تلفن : ۰۹۱۱۲۶۹۱۹۹۴
پست الکترونیک:
homdavoodi@yahoo.com

آدرس: گرگان، بلور هیرکان، ابتدای جاده شصت کلا، دانشگاه علوم پزشکی گلستان، دانشکده پزشکی

وصول مقاله:۸۹/۳/٤
اصلاح نهایی:۸۹/۵/۲۳
پذیرش مقاله:۸۹/٦/١٤

چکیده

زمینه و هدف *: بلوکهای پارافینه بافتها و نمونه های کلینیکی منابع بسیار خوبی برای مطالعات ژنتیک ملکولی هستند اما استخراج DNA باکیفیت بالا از این بافتها با مشکلاتی مواجه است. هدف از این مطالعه مقایسه دو روش سنتی استخراج DNA با استفاده از حرارت و پروتئیناز K و روش تجاری استفاده از کیت از نظرمیزان بازدهی و درصد خلوص DNA استخراج شده و همینطور میزان موفقییت در تکثیر قطعات ژنی مورد نظر بوده است.*

روش بررسی *: تعداد پنجاه نمونه از بافت پارافینه سرطان کلون که حدود پنج سال از نگهداری آ نها می گذ شت ،مورد استفاده قرار گرفت. DNA با روش سنتی استفاده از حرارت و پروتئیناز K و روش تجاری استفاده از کیت (Qiagen Kit) استخراج شد سپس درصد خلوص و مقدار DNA نمونه ها با استفاده از اسپکتروفتومتر اندازه گیری شد. نمونه ها برای تکثیر دو قطعه از ژن TLR4 که از مهمترین گیرندها در سیستم ایمنی ذاتی هستند مورد آزمایش PCR قرار گرفتند. قطعه SH-1 با طول bp ۱۸۸ و قطعه SH-2 با طول ۱۲۴bp تکثیر شدند. DNA تکثیر یافته برای بررسی با الکتروفورز روی ژل آگاروز ۲٪ قرار گرفت.*

یافته ها *نتایج حاصله نشان داد که بازده DNA استخراج شده با روش سنتی (۲۹۷ug/ml) نسبت به روش تجاری استفاده از کیت (۱۷۶ug/ml) به صورت معنی داری بیشتر است ($p<0.01$). اما میزان خلوص DNA با استفاده از کیت (۱/۷) در مقایسه با روش سنتی(۱/۲) بیشتر است ($p<0.01$). درصد میزان موفقیت در تکثیر DNA در آزمایش PCR با روش سنتی در مقایسه با روش کیت بیشتر بود ($p<0.01$). طول قطعه بر موفقیت آزمایش PCR موثر بود به طوری که قطعه کوچکتر به صورت معنی دار نتایج مثبت بیشتری در آزمایش PCR داشت.*

نتیجه گیری *: از آنجا که در روش سنتی قطعات ژنی مورد نظر درنمونه های بیشتری تکثیر یافتند و این روش ساده تر و کم هزینه تر از روش استفاده از کیت است، پیشنهاد می شود برای نمونه های پارا فینی که چندین سال از تهیه آنها می گذرد از روش سنتی برای استخراج DNA استفاده شود. در انتخاب قطعات ژنی برای تکثیر DNA استخراج شده ازبلوکهای پارافینه بهتر است قطعات کوچکترانتخاب شوند تا احتمال تکثیر موفق قطعه افزایش یابد.*

واژه های کلیدی: *استخراج DNA ، بافت پارافینه شده ، PCR*

مقدمه

بلوکهای پارافینه بافتهای فیکس شده با فرمالین یکی از مهمترین روشهای نگهداری و ذخیره نمونه های کلینیکی است. تخمین زده می شود که در دنیا بالغ بر یک بیلیون نمونه بافت که اغلب آنها با فرمالین فیکس شده و سپس به صورت بلوک پارافینه نگهداری شده اند در بانکهای نگهداری بافتها و بیمارستانها و آزمایشگاههای تحقیقاتی وجود داشته باشد. استخراج DNA از بافتهای فیکس شده با فرمالین این امکان را به پاتولوژیست ها می دهد که بتوانند بافتهای ذخیره شده را برای اهداف گوناگون از جمله مطالعات گذشته نگر ژنتیک ملکولی استفاده کنند(۱). اهمیت استفاده از بلوکهای پارافینه در مطالعات ژنتیک ملکولی روز به روز بیشتر احساس می شود اما تکثیر قطعات ژنی با استفاده از روش PCR در این نمونه ها به چند دلیل با مشکل مواجه بوده است(۲).

۱) به دلیل کوچک بودن نمونه ها و بافتهای بیوپسی پارافینه مقدار قابل ملاحظه ای از DNA هدف در آنها وجود ندارد (۳).

۲) وجود بعضی مواد ممانعت کننده در نمونه ها مثل هموگلوبین (۴) .

۳) احتمال تخریب قطعه ای از DNA که برای تکثیر مورد نظر است در مراحل فیکس کردن نمونه ها (۲و۵ و۶ و۷) . این عوامل استفاده از نمونه های پارافینه را برای آنالیز PCR در مطالعات ژنتیک ملکولی محدود کرده است. به خاطر این مشکلات روشهای مختلف استخراج DNA برای بافتهای پارافینه پیشنهاد شده است از جمله روش فنل کلروفرم، رسوب با آمونیوم استات یا اتانول، روش سنتی استفاده از حرارت و پروتئیناز K (۸ و۹) و کیت های تجارتی که اساس کار آنها بر اتصال DNA به یک غشاء Silica است. لذا شناسایی روشهای بهتر استخراج DNA از این بافتها در زمینه تحقیقات ژنتیک ملکولی از اهمیت خاص برخوردار است. هدف این مطالعه مقایسه دو روش سنتی استفاده از حرارت و پروتئیناز K و استفاده از کیتهای تجاری در استخراج DNA از بلوک های پارافینه بوده است.

روش بررسی

در این مطالعه تعداد پنجاه بلوک پارافینه بافت سرطان کلون که بیش از پنج سال از نگهداری آنها می گذشت انتخاب شدند، مقاطع پنج تا ده میکرون از این بلوکها با میکروتوم تهیه شده، DNA با استفاده از دو روش سنتی استفاده از حرارت و پروتئیناز K و روش تجاری استفاده از کیت (Qiagen DNA Extraction Kit) استخراج شد.

استخراج DNA با روش سنتی در سه مرحله به شرح ذیل انجام شد:

پارافین زدائی با استفاده ازگزیلن و اتانول ؛ یک سی سی گزیلن به مقاطع برش داده شده اضافه شد و در دمای اتاق به مدت۵ دقیقه قرار داده شد،سپس برای رسوب بافت نمونه ها با سرعت زیاد سانتریفوژ شدند(۵ دقیقه) ، عمل پارافین زدایی با گزیلن برای بار دوم تکرار شد سپس با اضافه کردن۱ سی سی اتانل ۱۰۰ درصد و ۵ دقیقه سانتریفوژ با سرعت بالا بافتها دو بار شستشو داده شدند. الکل که به عنوان مایع روی بافت قرار می گیرد از بافت جدا شده .برای تسریع در تبخیر الکل یک قطره استون به بافتها اضافه شد. در مرحله بعد جهت تجزیه پروتئینها ۱۰۰µl بافرحاوی آنزیم پروتئیناز K (ug/ml ۲۰۰) و حرارت ۵۵ درجه سانتیگراد به مدت ۴ ساعت استفاده شد . سپس آنزیم پروتئیناز K در حرارت ۹۵ درجه سانتی گراد خنثی گردیده ، پس از سانتریفوژ مایع رویی به عنوان منبع DNA جهت مطالعات بعدی در۲۰- درجه نگهداری شد(۹).

در روش تجاری ، مقاطع ۵- ۱۰ میکرونی از بافتها تهیه شد و در میکروتیوبهای ۱/۵ ml قرار گرفت. مراحل استخراج DNAپس از پارافین زدایی با استفاده از گزیلن و اتانول به ترتیب بر اساس دستورالعمل کیت (Qiagen DNA Extraction Kit) صورت گرفت. DNA استخراج شده برای آزمایشهای بعدی در ۲۰- درجه نگهداری شد.

میزان خلوص و بازده DNA استخراج شده از نمونه ها با استفاده از اسپکتروفتومتر اندازه گیری شد. میزان OD نمونه ها درnm ۲۶۰ و nm ۲۸۰ تعیین شد. نسبت۲۶۰/۲۸۰ نشان دهنده

میزان خلوص و مقدار OD در nm ۲۶۰ نشان دهنده غلظت DNA در نمونه هاست.

نمونه ها سپس برای تکثیر دو قطعه از ژن TLR4 "از مهمترین گیرنده ها در سیستم ایمنی ذاتی" مورد آزمایش PCR قرار گرفتند . قطعه SH-1 با طول ۱۸۸bp و قطعه SH-2 با طول ۱۲۴bp تکثیر شدند. DNA تکثیر یافته برای بر رسی با الکتروفورز روی ژل آگاروز ۲٪ قرار گرفت. محصو لات PCR نمونه های منفی و یا دارای نا خالصی زیاد برای بار دوم مورد آزمایش PCR قرار گرفتند. جدول ۱ لیست پرایمر های استفاده شده و طول قطعات تکثیر یافته را نشان می دهد. نتایج حاصل با استفاده از نرم افزار آماری SPSS 11.5 مورد تجزیه آماری قرار گرفتند.آزمون T برای مقایسه میزان خلوص و بازده DNA و آزمون کای مربع برای بررسی تاثیر طول قطعه بر موفقیت آمیز بودن آزمایش PCR استفاده گردید.

یافته ها

نتایج حاصل نشان داد که بازده DNA استخراج شده با روش سنتی با میانگین ۲۹۷ ug/ml در مقابل ۱۷۶ ug/ml در روش کیت به صورت معنی دار بیشتر است($p<0.01$). میزان خلوص DNA در روش استفاده از کیت با میانگین ۱,۷ در مقابل روش سنتی با میانگین ۱,۲ بیشتر بود ($p<0.01$) (جدول ۲). از تعداد پنجاه نمونه در روش کیت برای قطعه SH-1 با طول ۱۸۸ bp، ۴۲ ٪ و SH-2 با طول ۱۲۴ bp، ۷۰٪ مثبت شدند. در روش سنتی قطعه SH-1 در ۵۶٪ از نمونه ها و قطعه SH-2 در ۹۶ ٪ از نمونه ها تکثیر شدند. درصد موفقیت در تکثیر DNA در روش سنتی به صورت معنی داری بیشتر از روش کیت بود($p<0.01$)و قطعه SH-2 با طول کمتر در درصد بیشتری از نمونه ها تکثیر شد ند(جدول ۳) . تکثیر قطعه کوچکتر با طول ۱۲۴ bp با روش سنتی به صورت معنی دار موفقیت آمیز تر از کیت بود($p<0.01$) اما برای تکثیر قطعه بزرگتر نوع روش تأثیر معنی دار نداشت (جدول ۴). نمونه هایی که در PCR اول تکثیر نشده بودند ویا ناخالصی زیادی روی ژل الکترو فورز داشتند در PCR دوم باندهای قوی و خالص تولید کردند.

بحث

بلوکهای پارافینه منابع بسیار غنی برای مطالعات گذشته نگر ژنتیک ملکولی هستند اما گزارشها یی مبنی بر کاهش احتمال موفقییت آمیز بودن تکثیر DNA در نمونه هایی که بیش از ۵ سال از عمر آنها می گذرد وجود دارد(۷).روشهای مختلفی برای استخراج DNA از بافتهای پارافینه ذکر شده اما در زمینه مقایسه این روشها و پیشنهاد روشهای کارآمد تر کمتر مطالعه شده است لذا پیشنهاد روشهای موفق تر استخراج DNA از این بافتها حائز اهمیت است. مطالعه حاضر نشان داد که روش سنتی استخراج DNA با استفاده از حرارت و پروتئیناز K برای بلوکهایی که چندین سال از عمر آنها می گذرد مناسبتر از روش تجاری استفاده از کیت است. در روش سنتی مقدار DNA استخراج شده بیشتر از کیت بود اما میزان خلوص DNA در روش کیت بیشتر از روش سنتی بود. نتایج به دست آمده از این مطالعه با نتایج به دست آمده از Cao و همکاران، (۲۰۰۳) مطابقت دارد. آنها نشان دادند که روش سنتی و ساده استفاده از حرارت (Boiling Method) در تکثیر DNA موفق تر از کیت بوده اما درجه خلوص DNA در صورت استفاده از کیت بیشتر می باشد(۶). در مطالعه حاضر همچنین نشان داده شد که طول قطعات DNA بر موفقیت در تکثیر DNA موثربوده به طوری که قطعه کوچکتر با درصد موفقیت بیشتری در آزمایش PCR تکثیر شد.نوع روش استخراج DNA در تکثیر موفق قطعه کوچکتر DNA موثر بود اما روی تکثیر قطعه بزرگتر تاثیر معنی دار نداشت. دریک مطالعه از Sepp و همکاران(۱۹۹۴) نشان داده شد که روش استفاده از حرارت تنها برای قطعات کمتر از bp ۴۰۰ مناسب است امابرای قطعات بزرگتر بهتر است از کیت استفاده شود . قطعات بزرگتر احتمالاً در اثر حرارت تخریب شده ، احتمال تکثیر موفق آنها در PCR کاهش می یا بد. از آنجا که در روش سنتی درجه خلوص DNA کم است(۲و۶و۹) اضافه کردن یک مرحله خالص سازی به مراحل استخراج DNA توصیه می شود. در این مطالعه برای حل این مشکل و همینطور افزایش قابل ملاحظه مقدار بازده ، نمونه ها ی تکثیر یافته دو باره PCR شدند.

جدول ۱. لیست پرایمرهای استفاده شده وطول قطعه

طول قطعه	نام پرایمر	توالی پرایمر
bp۱۸۸	(SH-1)	5'- AGCATACTTAGACTACTACCTCCATG-3' 5'- GAGAGATTTGAGTTTCAATGTGGG-3'
۱۲٤bp	(SH-2)	5'GGTTGCTGTTCTCAAAGTGATTTTGGGAGAA3' 5'GGAAATCCAGATGTTCTAGTTGTTCTAAGCC3'

جدول ۲. مقایسه دو روش استخراج DNA از نظر خلوص و بازده (میانگین±خطای معیار)

پارامتر	روش استخراج	میانگین
خلوص	روش سنتی استفاده از حرارت و پروتئناز K	۱/۲۳±۰/۰۲۵[b]
	روش تجاری استفاده از کیت	۱/۷۱±۰/۰۲٤[a]
بازده	روش سنتی استفاده از حرارت و پروتئناز K	[a]۳۰٤±۷/٤٤
	روش تجاری استفاده از کیت	۱۵۸±٦/۳۳[b]

در هر ستون تفاوت بین دو میانگین که حروف غیر مشترک دارند در سطح احتمال خطای یک درصد معنی دار است ($p<0.01$).

جدول ۳. مقایسه دو روش از نظر میزان موفقیت در آزمایش PCR

روش استخراج	نتیجه	SH-1 تعداد (درصد)	SH-2 تعداد (درصد)	*P -value*
روش سنتی استفاده از حرارت و پروتئناز K	مثبت	۲۸ (٪٥٦)	٤۸ (٪۹٦)	<۰/۰۱
	منفی	۲۲ (٪٤٤)	۲ (٪٤)	
روش تجاری استفاده از کیت	مثبت	۲۱ (٪٤۲)	۳۵ (٪۷۰)	<۰/۰۱
	منفی	۲۹ (٪٥۸)	۱۵ (٪۳۰)	

جدول ٤. بررسی تأثیر روش استخراج DNA بر تکثیر قطعات مختلف DNA

قطعات مختلف DNA	نتیجه	نوع روش: روش سنتی تعداد (درصد)	نوع روش: روش تجاری تعداد (درصد)	*P -value*
SH-1	مثبت	۲۸ (٪٥٦)	۲۱ (٪٤۲)	<۰/۱٦۱
	منفی	۲۲ (٪٤٤)	۲۹ (٪٥۸)	
SH-2	مثبت	٤۸ (٪۹٦)	۳۵ (٪۷۰)	<۰/۰۱
	منفی	۲ (٪٤)	۱۵ (٪۳۰)	

References

1- Mies C. *Molecular biological analysis of paraffin- embedded tissues*.Hum Pathol. 1994; 25:555–560.

2-Merkelbach S, Gehlen J, Handt S. *Novel enzyme immunoassay and optimized DNA extraction for the detection of polymerase- chain-reaction-amplified viral DNA from paraffin-embedded tissue*. Am J Pathol. 1997; 150; 1537 -46.

3-Sepp R, Szabo I, Uda H. *Rapid techniques for DNA extraction from routinely processed archival tissue for use in PCR*. J Clin Pathol .1994; 47; 318–23.

4-Franchis R, Cross NC, Foulkes NS. *A potent inhibitor of Taq polymerase copurifies with human genomic DNA*. Nucleic Acids Res. 1988:16;103-55.

5-Lehmann U, Kreipe H . *Real-time PCR analysis of DNA and RNA extracted from formalin-fixed and paraffin-embedded biopsies*. Methods. 2001; 25; 409–18.

6-Cao M, Hashibe M, Rao M, Morgenstein H. Zhang M. *Comparison of methods for DNA extraction from paraffin embedded tissues and buccal cells*. Cancer Detec. Prev. 2003; 27; 397–404.

7-Greer CE, Peterson SL, Kiviat NB. Manos MM. *PCR amplification from paraffin-embedded tissues Effects of fixative and fixation time*. Am J Clin Pathol. 1991; 95; 117–124.

8-Rivero E, Neves AC. Silva-Valenzuela MG, Sousa S, Nunes FD. *Simple salting-out method for DNA extraction from formalin-fixed, paraffin-embedded tissues.* Pathology Research and Practice. 2006; 7; 523-529.

9-Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ. *PCR Protocol; A Guide to Methods and Applications. 1st. Academic Press*, Inc. New York, 1990.