انتشارات وارستگان

الفبای علوم ۱۳

R
DNA
A

اصول و روش‌های کاربردی استخراج اسیدهای نوکلئیک (RNA و DNA)

دکتر فاطمه واحدی
دکترای تخصصی ایمونولوژی

فاطمه کیفی
کارشناس ارشد بیوتکنولوژی

سرشناسه: واحدی، فاطمه، ۱۳۴۹ -

عنوان و نام پدیدآور: اصول و روشهای کاربردی استخراج اسیدهای نوکلئیک (RNA و DNA)

پدیدآورندگان: فاطمه واحدی، فاطمه کیفی

مشخصات نشر: مشهد: وارستگان، ۱۳۹۰

مشخصات ظاهری: ۱۰۳ص.: مصور(رنگی)؛ ۱۱×۱۷س.م.

فروست: راهنمای والدین؛ الفبای علوم؛ ۱۳

شابک: ۱-۰۰-۶۲۵۲-۶۰۰-۹۷۸

وضعیت فهرست نویسی بر اساس اطلاعات فیپا

موضوع: اسیدهای نوکلئیک -- تجزیه و تحلیل

موضوع: دی.ان.ا

موضوع: آر.ان.آ

موضوع : ژنتیک -- مهندسی

شناسه افزوده: کیفی، فاطمه، ۱۳۶۰ -

رده بندی کنگره: QP۶۲۰/و۲الف۶ ۱۳۹۰

رده بندی دیویی: ۵۷۲/۸۴

شماره کتابشناسی ملی: ۲۱۳۲۷۲۲

نام کتاب	اصول و روشهای کاربردی استخراج اسیدهای نوکلئیک (DNA وRNA)
پدیدآورندگان	دکتر فاطمه واحدی/ فاطمه کیفی
ناشر	انتشارات وارستگان (وابسته به مرکز آموزش عالی علوم پزشکی وارستگان)
طراح و صفحه آرا	الهه نوری / نسرین شفائی
ناظر فنی چاپ	الهه نوری
قطع	جیبی
تاریخ چاپ	تابستان ۱۳۹۰
شمارگان	۵۰۰ نسخه
شابک	۹۷۸-۶۰۰-۶۲۵۲-۰۰-۱
سایت	www.varapress.com
لیتوگرافی، چاپ و صحافی	چاپ دقت
بها	۲۰۰۰۰ ریال

حق چاپ برای انتشارات وارستگان محفوظ می‌باشد.

ناشر از همکاری آزمایشگاه تشخیص طبی پردیس مشهد در چاپ این کتاب به منظور کمک به توسعه فرهنگ کتابخوانی در کشور قدردانی می کند.

مرکز پخش: مشهد، خیابان احمدآباد، بابک ۱، مرکز آموزش عالی علوم پزشکی وارستگان

تلفن: ۶-۸۴۶۲۱۴۱ ۰۵۱۱ (واحد انتشارات)

مقدمه ناشر

ای که با نامت جهان آغاز شد　　دفتر ما هم به نامت باز شد

کیست که نداند، کتاب یک دوست همیشگی است و کیست که بتواند بیش از عدد انگشتان یک دست بشمارد دوستان این چنینی را، دوستانی که پس از گذشت سال‌ها، اگر ببینیمشان نه لب به گلایه می‌گشایند و نه روی برمی‌گردانند، بلکه آغوش گرمشان را به نشانه استقبال می‌گشایند.

با وجود چنین دوستانی، چرا ما کمتر سراغ آن‌ها می‌رویم و کمتر با آن‌ها انس می‌گیریم؟ ممکن است این پاسخ به ذهن بیاید که لحظات به سرعت از ما می‌گریزند، و فرصت مطالعه را از ما می‌ستانند.

به نظر می‌رسد اگر قدر ثانیه‌های بدون بازگشت را می‌دانستیم و از لحظه‌های با شکوه موفقیت چیزی شنیده بودیم، وقتی را برای با کتاب بودن کنار می‌گذاشتیم، و با خواندن کتاب، انگیزه بیشتری برای پیمودن قله‌های موفقیت یکی پس از دیگری کسب می‌کردیم، اما هنوز دیر نشده است. بدون شک هیچ‌گاه برای یک شروع دوباره و آن هم خواندن کتاب دیر نیست. اگر به جای تلاش دوباره، حسرت ایام از دست رفته را بخوریم مانند این است که تمام شب را برای از دست دادن خورشید گریه کنیم که در این صورت، لذت دیدن ستاره‌ها را از دست خواهیم داد.

اینک برای گریز از این بن بست، انتشارات وارستگان قصد دارد دریچه‌ای نو به سوی خوانندگان خود بگشاید و مجموعه کتاب‌های الفبای علوم را با وزن علمی بالا، حجم پایین و بهای اندک منتشر نماید.

خواندن کتاب‌های الفبای علوم وقت چندانی از خوانندگان نمی‌گیرد و چون به زبان ساده‌ای نگاشته شده است، آن‌ها را در پیچ و خم دشواری‌های متن گرفتار نمی‌کند، با توجه به اندازه جیبی آن، در همه زمان‌ها و مکان‌ها قابل خواندن است و به دلیل راحتی حمل و نقل، همراه همیشگی خوانندگان خواهد بود.

کتاب‌های الفبای علوم در قالبی فشرده، موضوعات و مطالب تخصصی را به شیوه‌ای نوین به مخاطبانش انتقال می‌دهد. از آن‌جا که این مجموعه موضوعات گوناگونی را شامل می‌شود، در کنار هم، دایره‌المعارف علوم را برای استفاده همگان تشکیل می‌دهند.

در انتها، انتشارات وارستگان دست همه نگارندگانی که تمایل به انتقال یک پیام، کلام، تجربه و مهارت را در قالب مجموعهٔ الفبای علوم دارند به گرمی می‌فشارد.

امید بر آن می‌رود که به فضل الهی الفبای علوم مقبول خاطر دوستان افتد و باشد که کوچه باغ‌های خاطری را طراوت بخشد.

دکتر احمد ابوالحسنی
مدیر انتشارات وارستگان

مقدمه پدیدآورنده

مولکول‌های DNA و RNA در تکنیک‌های مهندسی ژنتیک و روش‌های نوترکیبی، به عنوان ماده اولیه محسوب می‌شوند. انجام واکنش‌های PCR، تعیین توالی قطعات DNA و ژن‌ها نیاز به DNA به صورت خالص و عاری از آلودگی دارند. استفاده از DNA آلوده و ناخالص، سبب ایجاد خطا در واکنش‌ها می‌گردد. اهمیت این مسأله وقتی چشم‌گیر است که قرار باشد بر مبنای تکنیک انجام شده، قضاوت‌های حیاتی و حیثیتی انجام شود؛ مانند تعیین ناهنجاری‌های شدید ژنتیکی جنین و تصمیم بر دستور توقف ادامه‌ی حیات یک جنین، تشخیص و تعیین بیماری و تصمیم بر نحوه‌ی درمان، بررسی صحنه‌های جرم با استفاده از نمونه‌ی DNA موجود در محل و تشخیص مجرم و اثبات روابط فرزند و والدین.

تنوع منابع حاوی DNA سبب ابداع روش‌های متنوعی برای خالص سازی اسیدهای نوکلئیک شده است. فهم خصوصیات بیوشیمیایی اسیدهای نوکلئیک و درک مکانیسم روش‌های مختلف، سبب تصمیم‌گیری منطقی‌تر و راحت‌تر در روش استخراج DNA می‌شود.

از آن‌جا که آشنایی با روش‌های مختلف استخراج DNA گام اول برای شروع فعالیت در آزمایشگاه‌های بیولوژی مولکولی می‌باشد، این کتاب به طور مختصر به ارائه‌ی این روش‌ها و بیان مشکلات می‌پردازد. با توجه به این‌که دانستن علت استفاده از مواد شیمیایی و درک واکنش آن‌ها، منجر به خلاقیت و ارائه‌ی روش‌های دیگر و تصمیم‌گیری منطقی‌تر در روش استخراج می‌شود، در این کتاب بر مکانیسم عمل مواد و روش‌های ارائه‌شده تأکید شده است.

امید است این نوشتار مختصر بتواند پاسخ‌گوی سؤالات ذهن مشتاقان، کارشناسان آزمایشگاه‌های بیولوژی مولکولی و تشخیص طبی و نیز دانشجویان علاقه‌مند به رشته‌های زیست‌شناسی باشد. دریافت نظرات خوانندگان موجب سپاس‌گزاری پدیدآورندگان این تلاش مختصر می‌باشد.

فرصت را مغتنم شمرده از همکاری های صمیمانه تک تک دوستان گرامی، جناب آقای دکتر ابوالحسنی مدیر انتشارات وارستگان، خانم الهه نوری ناظر فنی و کارشناس مسئول انتشارات و خانم نسرین شفائی صفحه آرای کتاب تشکر و قدردانی می نمائیم.

من هستم و این هستی موجی است ز دریایی
کان‌را نبود قعری و کان‌را نبود ساحل!

پدیدآورندگان
تابستان ۹۰

فهرست

فصل	عنوان	صفحه
	DNA	
	استخراج DNA	۱۶
	منابع استخراج DNA	۱۷
	میزان بازیابی DNA	۲۲
	میزان مورد نیاز DNA	۲۲
	اهداف اصلی استخراج DNA	۲۲
	مراحل کلی استخراج DNA	۲۳
	حذف RNA از DNA خالص	۴۳
اول ...	جداسازی انواع DNA	۴۳
	جداسازی DNA اندامک‌ها	۴۸
	تغلیظ DNA	۴۸
	حذف پروتئین‌ها از محلول‌های نوکلئیک اسید	۵۰
	حذف آب از DNA خالص‌شده	۵۰
	دیالیز	۵۰
	نگه‌داری و ذخیره‌سازی DNA	۵۱

فصل	عنوان	صفحه
	DNA ...	
	اهمیت بافر TE (Tris-EDTA)	۵۳
	استخراج DNA در خانه	۵۳
	تعیین غلظت DNA	۵۵
	استخراج DNA از خون تام به روش غیر آنزیمی	۵۶
	استخراج DNA از خون با روش جوشاندن	۶۱
	استخراج DNA از خون با استفاده از سیلیکا ژل	۶۳
	استخراج DNA از ژل آگارز	۶۴
	روش الکتروالوشن	۶۵
... اول	استخراج DNA از ژل آگارز با استفاده از سیلیکا ژل	۶۶
	جداسازی مقادیر بسیار کم DNA از مقاطع بافتی به روش سیلیکا ژل	۶۸
	روش الکتروفورز بر روی غشاهای سلولزی DEAE	۷۱
	روش استفاده از ژل آگارز با نقطه ذوب پایین	۷۳
	استخراج DNA از ژل اکریل آمید	۷۳
	روش استفاده از استخراج DNA از اسپرم و ریشه مو	۷۴
	استخراج پلاسمید	۷۴
	خالص‌سازی DNA از ذرات فاژ	۸۴

فصل	عنوان	صفحه
	DNA ...	
... اول	بازیابی DNA از واکنش‌های PCR	۸۵
	عیب‌یابی در روش‌های استخراج از ژل	۸۶
	RNA	
	استخراج RNA	۹۰
	روش‌های حذف و غیر فعال‌کردن ریبونوکلئازها	۹۵
	تهیه‌ی آب فاقد RNase	۹۶
دوم	استفاده از ممانعت‌کننده‌های ریبونوکلئازها	۹۷
	عیب‌یابی در استخراج RNA	۹۸
	بررسی RNA استخراج شده	۹۹
	نکات ایمنی	۱۰۰
	منابع و مآخذ	**۱۰۱**

فصل ۱

DNA

۱-۱) استخراج DNA

در تمام سلول‌های هر موجودی DNA وجود دارد. به منظور تهیه‌ی DNA، سلول‌ها باید شکسته شده و پروتئین‌های ساختمانی و آنزیم‌ها که با ساختمان DNA تداخل پیدا می‌کنند حذف شوند. در سلول‌های یوکاریوتی، DNA درون هسته قرار دارد؛ اما در سلول‌های پروکاریوتی در سیتوپلاسم شناور می‌باشد. روش‌های استخراج DNA معمولاً با هدف تهیه‌ی DNA جهت آنالیزهای بعدی مانند تشخیص‌های مولکولی، ردیابی بیماری‌های ژنتیکی و یا بررسی‌های پزشکی قانونی انجام می‌شود. در واقع در دست‌داشتن DNA خالص، نقطه‌ی شروع آنالیزهای متعدد در سطح ژن‌ها می‌باشد. به عنوان مثال می‌توان نوزادی را از نظر احتمال ابتلا به بیماری‌های ژنتیکی بررسی کرد و یا ژنی را از نظر نقش آن در ایجاد سرطان مطالعه نمود.

۲-۱) منابع استخراج DNA

DNA را می‌توان با توجه به نمونه‌ی مورد بررسی و در دسترس آن از منابع گوناگونی استخراج کرد. از کلیه‌ی سلول‌ها و بافت‌های مختلف انسانی و یا حیوانی مانند خون، مایع منی، بزاق، ادرار، مدفوع، مو، دندان و استخوان می‌توان DNA را استخراج نمود. هم‌چنین از بافت‌های مختلف گیاهی شامل برگ، میوه‌ها و چوب‌های سخت و نرم نیز می‌توان DNA را تهیه کرد.

در بررسی‌های جنایی و پزشکی قانونی از ته سیگارها، آدامس، ناخن، تمبرها و حتی ذرات گرد و خاک موجود در فضای مورد بررسی، که احتمال حضور سلول‌های پوستی و موی مظنونین و یا متهمین در آن‌ها وجود دارد، DNAهای به‌جا مانده استخراج می‌گردد.

DNA حاوی اطلاعات بسیاری است و در پزشکی با استخراج DNA و بررسی آن می‌توان جهش‌های سوماتیک، استعداد ابتلا به بیماری‌ها، نوع بیماری‌های ژنتیک و انواع HLA را دریافت.

نمونه‌های متداول آزمایشگاهی

سلول‌های خونی: از جمله بیماری‌های ژنتیکی که امروزه در آزمایشگاه‌های تشخیصی پزشکی، با در دست‌داشتن DNA و با انجام PCR قابل شناسایی هستند، می‌توان به کم‌خونی تالاسمی، دیستروفی یا تحلیل عضلانی دوشن، هانتینگتون و سیستیک فیبروسیس اشاره نمود. برای بررسی این‌گونه اختلالات، DNA معمولاً از خون استخراج می‌شود.

سرم: استخراج DNA از سرم و پلاسما معمولاً برای بررسی وجود عفونت‌های ویروسی مانند CMV, HBV و HIV به‌کار می‌رود.

نمونه‌های پاتولوژی: نمونه‌های پاتولوژی خارج‌شده از بدن در طی جراحی‌ها و یا نمونه‌هایی که به وسیله‌ی بیوپسی سوزنی و یا نمونه‌ی اتوپسی به‌دست می‌آیند، منبع مناسبی از DNA و RNA برای بررسی بیان ژن‌ها و جهش‌ها می‌باشند.

میتوکندری: از آن‌جایی که DNA میتوکندری متفاوت از DNA سلولی می‌باشد، استخراج و مطالعه‌ی این DNA انحصاری، تشخیص ژنتیکی و شناسایی جهش‌های ژن‌های میتوکندری مهم است. سندرم ملاس (MELAS)، بیماری ژنتیکی است که به دلیل جهش در DNA میتوکندری اتفاق می‌افتد و در نتیجه تنفس سلولی دچار اختلال می‌شود.

مایع مغزی-نخاعی (CSF[1]): از مایع مغزی-نخاعی در موارد انسفالیت برای تشخیص علت بیماری -به عنوان مثال حضور ویروس‌های هرپس- DNA و RNA استخراج می‌گردد.

ترشحات دستگاه تنفسی: برای بررسی پاتوژن‌هایی مانند ویروس‌های آنفلوانزا و باکتری سل و تعیین سویه‌ی آن‌ها، می‌توان RNA و DNA را از ترشحات ریه و بینی استخراج کرد.

بزاق: جهت جست‌وجوی آلودگی‌های ویروسی و باکتریایی، بزاق منبع خوبی از RNA و DNA می‌باشد.

1- Cerebro Spinal Fluid

اشک و ترشحات چشم: RNA و DNA موجود در آن، به‌خصوص برای بررسی آلودگی‌های کلامیدیایی، مناسب می‌باشند.

ادرار: RNA و DNA ادرار منبع مناسبی برای بررسی وجود سلول‌های توموری، ویروسی و باکتریایی می‌باشد.

مدفوع: می‌توان حضور سلول‌های توموری، باکتری‌هایی مانند هلیکوباکترپیلوری، ویروس‌هایی مانند انواع روتاویروس‌ها و انگل‌ها را با استخراج RNA و DNA از مدفوع بررسی کرد.

مایع سرویکس: ترشحات واژن و رحم و نمونه‌های حاصل از پاپ اسمیر منبع مناسبی از RNA و DNA برای بررسی آلودگی با ویروس‌هایی مانند خانواده‌ی پاپیلوما و تعیین نوع آن‌ها و احتمال سرطان‌زایی می‌باشند.

نمونه‌های مورد بررسی در آزمایشات پیش از تولد

در مواردی مانند سقط‌های مکرر، وجود فرزند مبتلا به بیماری ژنتیکی در خانواده، سابقه‌ی بیماری ژنتیکی در خانواده و حاملگی‌های بالاتر از ۴۰ سال، بررسی DNA جنین مورد توجه می‌باشد. برای دست‌یابی به DNA جنین می‌توان به نمونه‌ها و روش‌های نمونه‌گیری زیر اشاره نمود:

❖ **آمنیوسنتز**[1]: در این روش به وسیله‌ی سوزن‌های بلند مخصوص، مقداری از مایع کیسه‌ی آمنیون گرفته شده و سلول‌های آن به وسیله‌ی سانتریفیوژ

1- Amniocentesis

جدا و جهت افزایش آن‌ها کشت شده و در نهایت تکثیر می‌شوند. این سلول‌ها به عنوان منبع DNA برای بررسی‌های کروموزومی و یا در PCR استفاده می‌شوند (شکل ۱-۱).

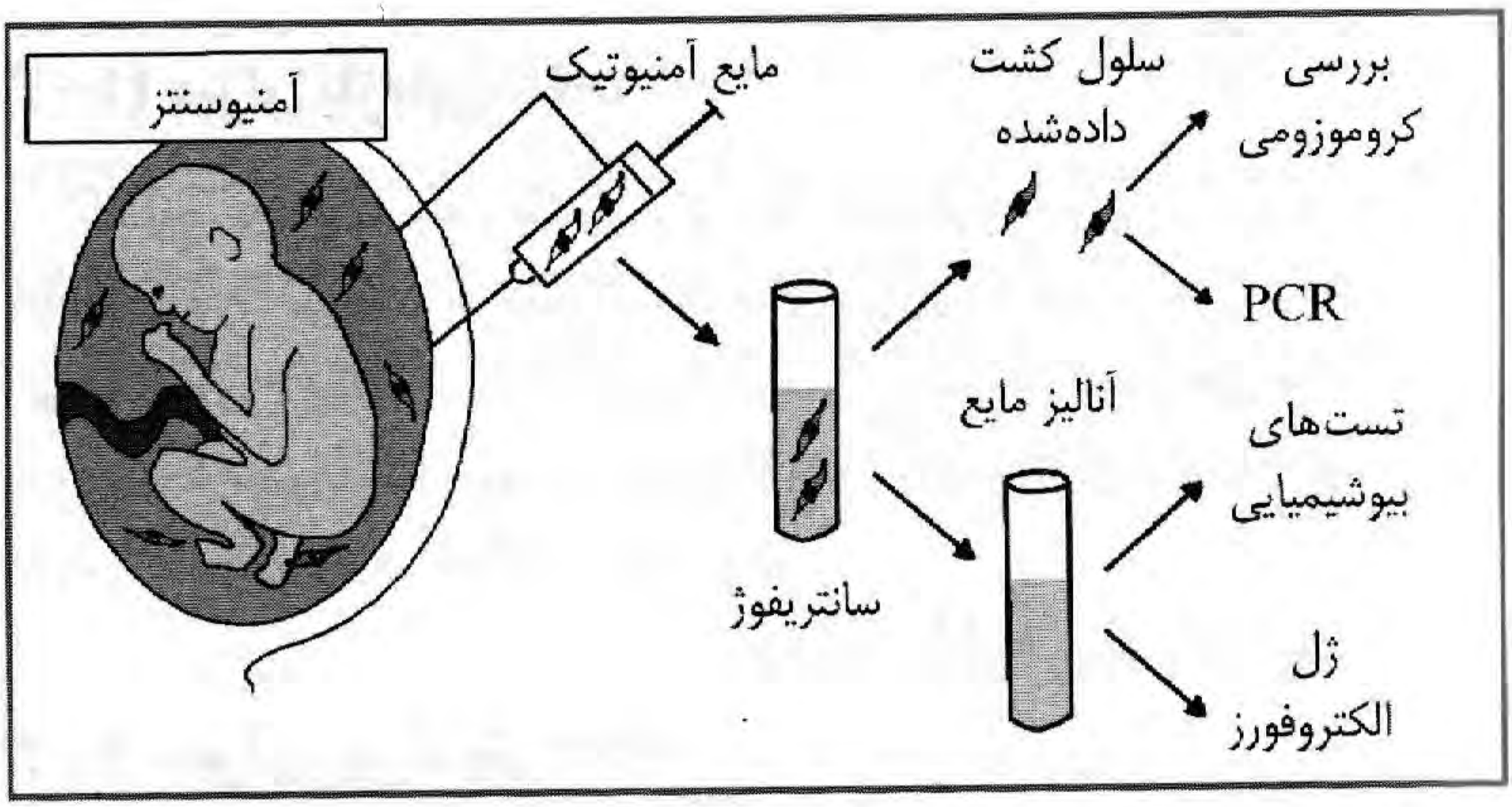
❖ **پرزهای جنینی**[1]: پرزهای جنینی توسط پزشک جراح زنان گرفته شده و از آن DNA استخراج می‌گردد.

❖ **بلاستومر:** زمانی که جنین در حد ۸-۶ سلولی باشد با جداکردن یک سلول آن، که بلاستومر نامیده می‌شود، آنالیزهای بیولوژی مولکولی و ژنتیکی انجام می‌شود. این روش به خصوص در آزمایشگاه‌های IVF که در طی لقاح مصنوعی جنین به‌دست می‌آید، برای اطمینان از سلامت جنینی که قرار است به رحم مادر منتقل شود، انجام می‌شود.

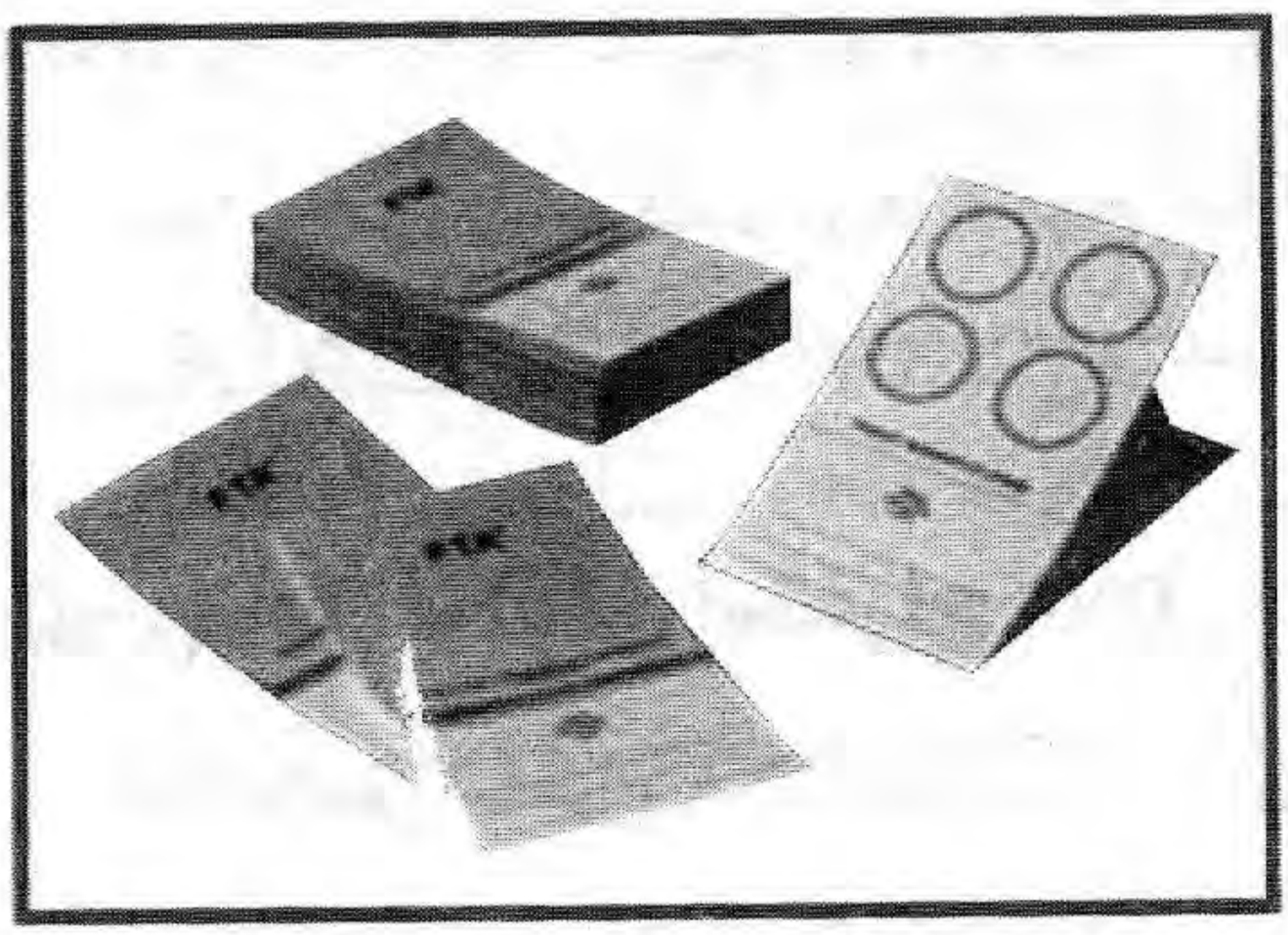
❖ **جداسازی سلول‌های جنینی از خون مادر:** در طی بارداری، مقدار کمی از سلول‌های جنین وارد خون مادر می‌شوند. این روش تهاجمی نبوده و تنها با خون‌گیری از مادر می‌توان آزمایشات را بر روی DNA جنینی انجام داد.

❖ **Flinders Technology Associates Filter Papers (FTA®Cards)** کاغذهای FTA فیلترهایی هستند که برای نگه‌داری نمونه‌های خون، با توجه به جابه‌جایی آسان آن‌ها، بسیار مناسب هستند و برای نمونه‌گیری از نوزادان مورد استفاده قرار می‌گیرند (شکل ۲-۱).

1-Chorionic Villus



شکل ۱-۱: روش آمنیوسنتز. در این روش به وسیله‌ی سوزن‌های بلند، مقداری از مایع کیسه‌ی آمنیون گرفته شده و سلول‌های آن به وسیله‌ی سانتریفیوژ جداشده و جهت افزایش آن‌ها کشت و در نهایت تکثیر می‌شوند. از سلول‌های تکثیرشده، DNA استخراج می‌شود که برای بررسی‌های کروموزومی و یا در PCR استفاده می‌شود.



شکل ۲-۱: فیلترهای FTA. این فیلترها جهت بایگانی خون استفاده می‌شوند و دارای مواد محافظی هستند که DNA برای مدت‌های طولانی بر روی آن‌ها نگه‌داری می‌شود.

۳-۱) میزان بازیابی DNA

با توجه به نوع نمونه و سلول و نیز روش استخراج، میزان بازیابی و استحصال DNA متفاوت می‌باشد؛ اما معمولاً سلول‌های دیپلوئید حاوی حدود ۶ پیکوگرم و هر اسپرم حاوی ۳ پیکوگرم، DNA می‌باشد. میزان متوسط گلبول‌های سفید انسان حدود ۱۰-۵ میلیون سلول بوده و بنابراین از نظر تئوری می‌توان از هر میکرولیتر خون حدود ۳۰ تا ۶۰ نانوگرم، DNA به‌دست آورد.

۴-۱) میزان مورد نیاز DNA

بسته به نوع و تعداد آنالیزها، میزان DNA موردنیاز متغیر می‌باشد. معمولاً برای انجام انواع PCR، به طور متوسط، به یک نانوگرم DNA تک رشته و یا دو رشته نیاز است که این میزان معادل ۱/۲۰ یک میکرولیتر خون و یا ۳۵۰ اسپرم است. بسیاری از کیت‌های تجاری PCR دارای حساسیت بیشتری هستند و برای استفاده از آن‌ها مقادیر DNA در حد ۱۰۰ تا ۲۵۰ پیکوگرم لازم است.

جهت بررسی پلی‌مورفیسم ژن‌ها با انجام RFLP حدود ۵۰ نانوگرم از DNA دو رشته‌ای لازم است که معادل دو میکرولیتر خون و یا ۲۰۰۰۰ اسپرم می‌باشد.

۵-۱) اهداف اصلی استخراج DNA

اهداف اصلی استخراج DNA عبارتند از:

- افزایش میزان بازیابی و کیفیت DNA

- حذف عواملی که در مراحل آنالیز بعدی مزاحمت ایجاد می‌کنند.
- حذف نوکلئازها و یا ممانعت از عمل آن‌ها؛ افزودن چلاتورهایی مانند EDTA سبب خروج یون‌های دو ظرفیتی کلسیم و منیزیم از محیط می‌شود که در نتیجه از تجزیه‌ی DNA توسط آنزیم‌های DNAse ممانعت می‌شود.
- جداسازی DNA تک رشته از دو رشته

۶-۱) مراحل کلی استخراج DNA

گرچه می‌توان DNA را از منابع گوناگون و با روش‌های مختلف تهیه نمود، اما مراحل اصلی با اهداف مشابهی انجام می‌شوند. این مراحل عبارتند از:

۱- شکستن و لیز سلول‌ها برای رهاشدن DNA: این مرحله از تخریب سلول‌ها به روش‌هایی فیزیکی مانند خردکردن یا آسیاب‌کردن و استفاده از امواج فراصوتی، به‌وسیله‌ی سونیکاتور انجام می‌شود.

۲- خالص‌سازی DNA که شامل مراحل زیر است:
- حذف چربی‌ها با استفاده از دترجنت‌ها
- حذف پروتئین‌ها؛ این مرحله اصلی نیست؛ اما معمولاً استفاده می‌شود. پروتئین‌های سلولی و هیستونی، که به DNA متصل می‌باشند، با افزودن پروتئاز تجزیه شده و یا با استفاده از نمک‌های استات سدیم یا پتاسیم جداشده که با کمک مخلوط فنل-کلروفرم رسوب‌داده شده و حذف می‌شوند.

۳- رسوب دادن، شست‌وشو و تغلیظ DNA با استفاده از الکل مانند اتانول و یا ایزوپروپانول، با توجه به این‌که DNA در الکل نامحلول می‌باشد معمولاً به صورت تجمعاتی درآمده و در اثر سانتریفیوژ رسوب می‌کند. در این مرحله نمک‌های محلول در نیز حذف می‌شوند.

روش‌های تهیه لیز سلولی (عصاره سلولی) و آزادسازی ترکیبات داخل سلول و DNA

برای آزادسازی DNA از درون سلول، از دو نوع روش اصلی فیزیکی و شیمیایی استفاده می‌شود:

۱- روش‌های فیزیکی

- استفاده از فشارهای فیزیکی و مکانیکی مانند خردکردن بافت در هاون‌های چینی و یا مخلوط‌کن‌های برقی
- استفاده از امواج فرا صوتی با استفاده از دستگاه‌های اولتراسوند
- استفاده از تغییر حرارت، انجماد و ذوب‌کردن‌های متوالی که سبب ترکیدن سلول‌ها و آزادشدن محتویات آن‌ها می‌شود.

۲- روش‌های شیمیایی

- استفاده از آنزیم‌ها جهت تخریب و هضم غشا سلول‌ها
- استفاده از دترجنت‌ها که سبب اختلال در آرایش مولکولی دیواره‌ها و غشاهای سلولی و در نتیجه تخریب آن‌ها می‌شوند.

در نتیجه‌ی این مرحله سلول‌ها لیز شده و عصاره‌ی سلولی[1] حاصل می‌شود که مخلوط ناهمگنی از قطعات دیواره‌ی سلولی، چربی‌ها، پروتئین‌ها و اسیدهای نوکلئیک می‌باشد. با استفاده از فیلتراسیون و یا سانتریفیوژ می‌توان ذرات درشت و نامحلول را حذف کرده و عصاره‌ی سلولی شفافی به‌دست آورد.

استفاده از روش‌های فیزیکی و سانتریفیوژهای متوالی سبب شکستن DNA می‌شود؛ بنابراین در روش‌های حساس که نیاز به قطعات سالم و کامل DNA است استفاده از روش‌های شیمیایی و بهتر است.

انواع روش‌های استخراج و خالص‌سازی DNA

در هنگام تهیه‌ی عصاره‌ی سلولی به همراه DNA، مقادیر زیادی پروتئین، لیپید و RNA از سلول آزاد می‌گردد؛ پاک‌نمودن DNA از وجود این ترکیبات را خالص‌سازی DNA گویند. روش‌های متنوعی برای خالص‌سازی DNA استفاده می‌شود. روش مورد استفاده به نوع نمونه، مواد در دسترس و انتخاب کارشناس آزمایشگاه بستگی دارد. عمده‌ترین روش‌های مورد استفاده عبارتند از:

روش‌های آلی

❖ استفاده از فنل-کلروفرم (۱:۱)

در این روش، مرحله‌ی اصلی استخراج (یعنی حذف پروتئین‌ها) با استفاده از فنل-کلروفرم انجام می‌شود. مراحل اصلی آن به این ترتیب است:

1- Crude Extract

الف-تخریب یا لیز سلولی که در طی آن غشاهای سلولی تخریب می‌شوند؛ اما هسته دست نخورده می‌ماند و در نتیجه رسوب می‌کند.

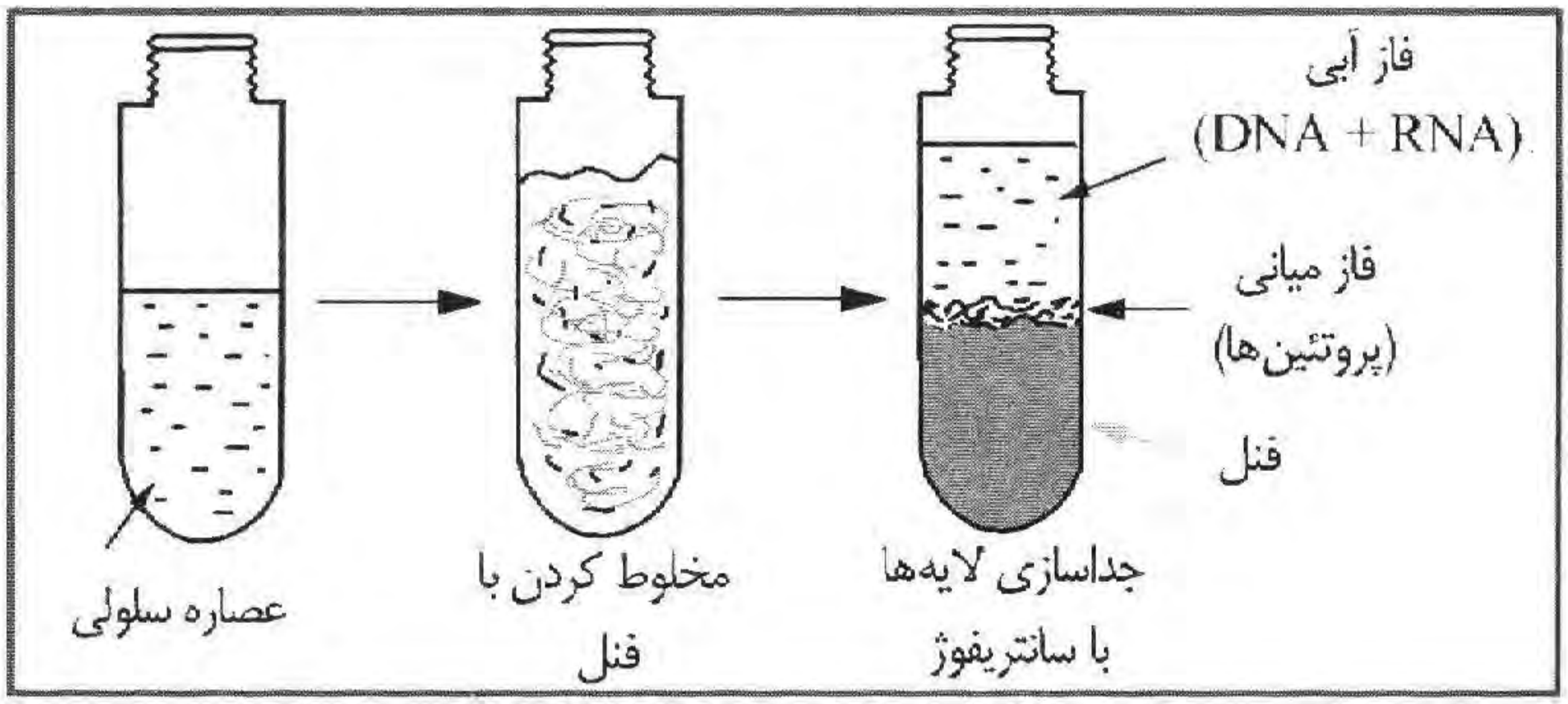
ب-غشای هسته با استفاده از دترجنت‌هایی مانند سدیم دودسیل سولفات یا سدیم لوریل سولفات (SDS) و پروتئینازهایی مانند پروتئیناز K تخریب می‌گردد.

ج- DNA به درون محلول رها می‌شود و به وسیله‌ی محلول آلی فنل-کلروفرم از پروتئین‌های درون مخلوط جدا می‌گردد.

د- DNA از فاز آبی به کمک الکل سرد ۹۵٪ و نمک رسوب‌داده شده و جدا می‌شود.

ه- DNA با استفاده از الکل ۷۰٪ شست‌وشو داده شده و سپس با حرارت و یا با کمک خلأ خشک شده و در بافر یا آب خالص حل می‌گردد.

پس از مخلوط‌شدن فنل-کلروفرم با عصاره‌ی سلولی، دو فاز آبی و آلی به وجود می‌آید. DNA به فاز آبی که در بالا قرار می‌گیرد مهاجرت کرده، لیپیدها در فاز آلی و پروتئین‌ها در بین دو فاز قرار می‌گیرند. این مکانیسم جداسازی، بر اساس تفاوت قطبیت و حلّالیت مولکول‌های مختلف است. مولکول‌های اسید نوکلئیک به دلیل قطبیت در فاز قطبی آب وارد می‌شوند (شکل ۳-۱).



شکل ۳-۱: روش فنل-کلروفرم. این روش یکی از روش‌های آلی است که بسیار مورد استفاده قرار می‌گیرد؛ وقتی عصاره‌ی سلولی با فنل-کلروفرم مخلوط می‌شود دو فاز آبی و آلی به وجود می‌آید. بر اساس تفاوت در قطبیت، DNA به فاز آبی که در بالا قرار می‌گیرد مهاجرت کرده، لیپیدها در فاز آلی و پروتئین‌ها در بین دو فاز قرار می‌گیرند.

❖ فنل

فنلی که در بیولوژی مولکولی استفاده می‌شود باید شفاف و بدون رنگ باشد. فنل‌هایی که به رنگ صورتی و یا زرد می‌باشند مناسب نیستند. فنل‌های کریستاله نیز به دلیل این‌که حاوی ترکیبات اکسیدشده مانند کوئینون‌ها هستند مناسب نمی‌باشند. این فنل‌ها، برای استفاده، باید در $160\ ^{\circ}C$ تبخیر و دوباره تقطیر گردند که به دلیل سمی بودن و احتمال سرطان‌زایی آن‌ها، نیاز به کار در فضاهای خاص، برای تهویه و فیلتر می‌باشد. کوئینون‌ها سبب شکستن پیوندهای فسفودی‌استری شده و یا سبب ایجاد اتصالات متقاطع بین مولکول‌های RNA و DNA می‌گردند.

فنل دارای خاصیت خورندگی بسیار زیادی بوده و در صورت تماس و تنفس سبب آسیب جدی می‌شود.

❖ نحوه‌ی تهیه‌ی فنل متعادل

قبل از استفاده، فنل باید به pH بالاتر از ۷/۸ رسانده شود تا DNA به درون فاز اسیدی آلی منتقل شود.

فنل مایع باید در دمای $-20\ ^{\circ}C$ نگه‌داری شود؛ در موقع استفاده از فریزر خارج شود و تا دمای اتاق گرم شود. سپس ماده‌ی آنتی اکسیدان هیدروکسی کوئینولین تا غلظت نهایی ۰/۱ درصد اضافه گردد. این ماده ممانعت‌کننده‌ی RNAase و نیز یک چلاتور فلزات یونی است. ضمناً سبب ایجاد رنگ زردی می‌شود که می‌توان فاز آلی را به راحتی از فاز آبی تشخیص داد. به فنل مذاب، باید حجم برابری از بافر ۰/۵ مولار Tris-Cl با pH 8 اضافه شود؛ سپس مخلوط به مدت ۱۵ دقیقه در دمای اتاق هم‌زده شود و بعد هم‌زن خاموش شده و اجازه داده شود که دو فاز آبی و آلی تشکیل گردد و با یک پیپت شیشه‌ای، فاز آبی رویی حذف گردد. مجدداً مرحله‌ی افزودن بافر و حذف آن باید تکرار شود تا pH فاز فنلی، بالاتر از ۷/۸ شود. پس از آخرین تعویض بافر و حذف فاز آبی، حدود ۰/۱ حجم آن از بافر ۰/۱ مولار Tris-Cl با pH 8 حاوی ۰/۲ درصد 2-ME افزوده گردد. برای نگه‌داری فنل به‌تعادل‌رسیده، می‌توان بر روی آن مقداری بافر ۰/۱ مولار Tris-Cl با pH 8 اضافه کرد و در شیشه تاریک و در یخچال برای مدت یک ماه نگه‌داری نمود.

مخلوط فنل-کلروفرم:

ایزوآمیل الکل شامل قسمت‌های برابری از فنل (۲۵) با کلروفرم حاوی ایزوآمیل الکل (۲۴:۱) می‌باشد. کلروفرم سبب دی‌نیچرشدن پروتئین‌ها و تسهیل جداشدن فازهای آبی و آلی می‌شود و ایزوآمیل الکل سبب ممانعت از ایجاد کف در طی مراحل استخراج می‌شود. این مخلوط هم همانند فنل باید در زیر بافر تریس در تاریکی و در یخچال

نگه‌داری شود.

❖ پروتئیناز K

پروتئیناز K در واقع نوعی سرین پروتئاز است که از نوعی کپک[1] به نام Tritirachium Album Var. Limber ترشح می‌شود. K در نام آنزیم اشاره به کراتین[2] است که توسط باکتری مذکور هیدرولیز شده و کربن و نیتروژن خود را تأمین می‌کند. این نوع پروتئاز انواع زیادی از پیوندهای پپتیدی، به خصوص پیوندهایی که انتهای کربوکسی آن‌ها به آمینواسیدهای حلقوی و بدون بار متصل هستند را هیدرولیز می‌کند. این آنزیم دارای ۲۷۹ اسید آمینه و وزن تقریبی حدود ۲۹ کیلو دالتون است؛ دارای دو محل اتصال به یون‌های دو ظرفیتی کلسیم می‌باشد که در حفظ ساختمان فضایی آنزیم نقش دارند. با وجود این‌که این یون‌ها به طور مستقیم در فعالیت آنزیمی اثر ندارند اما در صورت حذف آن‌ها، مقداری از فعالیت آنزیم کاهش می‌یابد. از آن‌جا که این مقدار فعالیت برای هضم بسیاری از پروتئین‌ها کافی است واکنش در حضور EDTA نیز قابل انجام است. این آنزیم بر روی پروتئین‌های دی‌نیچرشده، ۱۰ برابر فعالیت بیشتری دارد؛ بنابراین بهتر است قبل از اثر آن‌ها، پروتئین‌ها به وسیله‌ی حرارت و یا دترجنت‌ها دی‌نیچر شوند. این آنزیم در حضور اوره تا حد ۴ مولار و دترجنت‌هایی که برای لیز سلول‌های پستانداران استفاده می‌شود مانند SDS ۰/۵ درصد یا تریتون X-100 ۱ درصد فعال می‌باشد. این آنزیم، خیلی سریع، آنزیم‌های DNAase و RNase را غیرفعال کرده و در نتیجه سبب سهولت جداسازی DNA و RNA از یک‌دیگر می‌شود.

1- Mold
2- Keratin

پروتئیناز K معمولاً به شکل لیوفیلیزه، به صورت تجاری در دسترس است که برای استفاده، بهتر است در بافری حاوی ۵۰ میلی‌مولار Tris-Cl با pH 8 و ۱/۵ میلی‌مولار استات کلسیم استریل حل شده و غلظت 20 mg/ml تهیه گردد و سپس این محلول در حجم‌های کم‌تر تقسیم شده و در فریزر ۲۰- نگه‌داری شود. در هر بار استفاده، یک ویال ذوب شده و باقی‌مانده بهتر است حذف گردد. این آنزیم برخلاف آنزیم‌هایی مانند پروناز خاصیت خودهضمی ندارد. فعالیت این آنزیم در دمای 50 °C چندین برابر فعالیت آن در 37 °C است.

❖ لیزوزیم‌ها

دسته‌ای از آنزیم‌ها هستند که پیوند بین N- استیل گلوکز آمین و N- استیل‌مورامیک اسید در پروتئوگلیکان دیواره‌ی سلولی باکتری‌ها را هیدرولیز می‌کنند و اولین بار به وسیله‌ی فلمینگ کشف گردیدند. این دسته از آنزیم‌ها دارای گستردگی زیادی در طبیعت هستند؛ مثلاً در ترشح مخاط مهره‌داران و یا به وسیله‌ی باکتریوفاژها هنگام رهایی از سلول‌ها ترشح می‌شوند. بین انواع گوناگون این لیزوزیم‌ها، تفاوت‌های ساختمانی زیادی وجود دارد. لیزوزیم مورد استفاده در بیولوژی مولکولی، نوع استخراج-شده از سفیده‌ی تخم مرغ می‌باشد.

جدول ۴-۱ بهترین شرایط نگه‌داری و واکنش سه آنزیم پروتئیناز K و پروناز و لیزوزیم را نشان می‌دهد.

آنزیم	غلظت پایه	دمای نگهداری و ذخیره	غلظت مناسب در واکنش	بافر مناسب واکنش	دمای مناسب واکنش (°C)	آماده‌سازی پیش از واکنش
پروناز	20 mg/ml در آب	-20 °C	1 mg/ml	۰/۰۱ مولار Tris-HCl 7 pH ۰/۰۱ مولار EDTA SDS ٪ ۰/۵	۳۷	نیاز به خود هضمی دارد.
پروتئیناز K	20 mg/ml در آب	-20 °C	50 µg/ml	۰/۰۱ مولار Tris-HCl 7.8 pH ۰/۰۰۵ مولار EDTA SDS ٪ ۰/۵	۳۷-۵۶	نیاز به خود هضمی ندارد.
لیزوزیم	10 mg/ml در ۱۰ میلی‌مولار Tris-HCl 8 pH	-20 °C	10 mg/ml	۰/۲ میلی‌مولار NaCl ۲۵ میلی‌مولار Tris-HCl ۵ میلی‌مولار ایمیدازول 8 pH	۳۷	نیاز به خود هضمی ندارد.

جدول ۴-۱: شرایط نگه‌داری و واکنش سه آنزیم پروتئیناز K و پروناز و لیزوزیم

جهت آماده‌سازی پروناز و انجام خودهضمی، که سبب حذف آلودگی‌های احتمالی با آنزیم‌های DNase و RNase نیز می‌شود، باید آنزیم در بافر Tris-HCl ۱۰ میلی‌مولار با pH 7.5 که حاوی ۱۰ میلی‌مولار NaCl با غلظت نهایی 20 mg/ml باشد، در دمای $37\ ^{\circ}C$ به مدت یک ساعت انکوبه گردد.

لازم به ذکر است که لیزوزیم در pH زیر ۸ فعالیتی ندارد.

SDS

سدیم دودسیل سولفات یا سدیم لوریل سولفات ($C_{12}H_{25}SO_4Na$) یک سورفکتانت آنیونی است که در بسیاری از محصولات بهداشتی و شوینده کاربرد دارد. این مولکول دارای یک دم دوازده‌کربنی است که به یک گروه سولفات چسبیده است و سبب می‌شود مولکول خصوصیات آمفی پاتیک داشته و در واقع دترجنت باشد.

CTAB[1] یا ساولن یک سورفکتانت کاتیونی است که بیشتر در استخراج DNA از منابع گیاهی به جای SDS استفاده می‌شود و سبب حذف بهتر مواد آلی مانند پلی‌ساکاریدها می‌شود.

روش‌های غیر آلی

در این روش‌ها از مواد آلی مانند فنل و یا کلروفرم استفاده نمی‌شود. چند نمونه از این روش‌ها عبارتند از:

❖ ترسیب پروتئین توسط غلظت بالای نمک و pH پایین[2]: در این روش پروتئین‌ها با استفاده از غلظت بالای نمک‌ها رسوب‌داده شده و از محلول

1- Hexadecyltrimethylammonium Bromide
2- Salting Out

خارج می‌شود. از نمک‌های مورد استفاده می‌توان به استات سدیم و کلرید لیتیم اشاره نمود. به علت استفاده از نمک‌ها در غلظت‌های بالا، DNA استخراج‌شده باید به خوبی شسته شود. حضور نمک‌های اضافه، به خصوص در RFLP، سبب ایجاد پدیده‌ی جابه‌جایی باندها[1] یا تغییر حرکت DNA شده و در نتیجه‌ی آزمایش تأثیر می‌گذارد. مراحل اصلی آن به ترتیب زیر است:

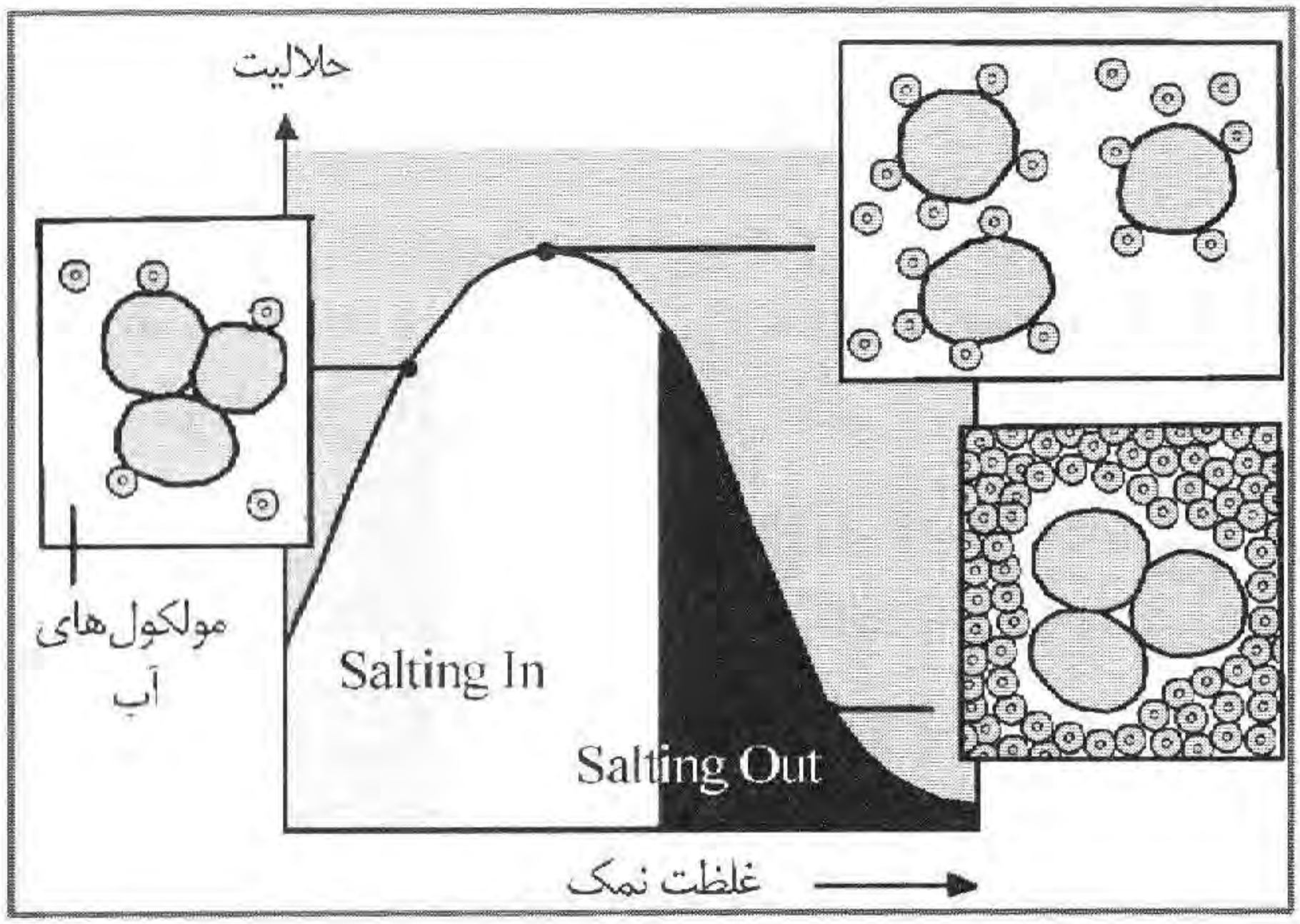
الف-تخریب یا لیز سلولی با استفاده از بافرهای لیزکننده، که غشاهای سلولی را تخریب می‌کنند؛ اما هسته‌ها دست‌نخورده مانده و در نتیجه رسوب می‌کنند.

ب-غشای هسته در بافر لیزکننده‌ی پروتئین‌ها و غلظت بالای پروتئیناز در دمای $65^{\circ}C$ در طی ۲ ساعت تخریب می‌شود. حرارت به دی‌نیچرشدن پروتئین‌ها کمک کرده و سبب خودهضمی پروتئیناز می‌شود.

ج-برای حذف پروتئین‌ها، کلرید لیتیم تا غلظت نهایی ۲/۵ مولار استفاده می‌شود که در نتیجه پروتئین‌ها رسوب کرده و با کمک سانتریفیوژ از محلول حذف می‌شوند.

❖ **مکانیسم رسوب با نمک:** افزودن یک نمک خنثی مانند آمونیم سولفات سبب افزایش برهم کنش بین پروتئین‌ها می‌شود. با افزایش غلظت نمک در محلول، بیشتر مولکول‌های آب، اطراف یون‌ها را احاطه کرده و باعث تجمع پروتئین‌ها و رسوب آن‌ها می‌شوند. این پروسه در زمان استفاده از غلظت مناسب نمک به‌صورت، خودبه‌خود انجام می‌شود (شکل ۵-۱).

1- Band Shift



شکل ۵-۱: روش غیر آلی رسوب DNA با نمک. افزودن یک نمک خنثی سبب افزایش برهم کنش بین پروتئین‌ها می‌شود. با افزایش غلظت نمک در محلول، مولکول‌های نمک اطراف پروتئین‌ها را احاطه کرده و باعث تجمع پروتئین‌ها و رسوب آن‌ها می‌شوند. دایره‌های کوچک مولکول‌های نمک و دایره‌های بزرگ پروتئین‌ها را نشان می‌دهند.

❖ **شیب کلرید سزیوم:** در این روش از CsCl در تکنیک "سانتریفوژ ایزوپیکنیک[1]" استفاده می‌شود. نیروهای سانتریفیوژ و انتشار، شیب دانسیته‌ای را ایجاد می‌کنند که سبب جداسازی مخلوط بر اساس دانسیته‌ی مولکولی آن‌ها می‌شود. یک شیب غلظت بر اساس رسوب تعادلی خودبه‌خودی ایجاد می‌شود و سپس مولکول‌های مورد بررسی به صورت باندهایی در مناطقی که با آن‌ها

1- Isopycnic

دانسیته‌ی برابر دارند قرار مـی‌گیرند.

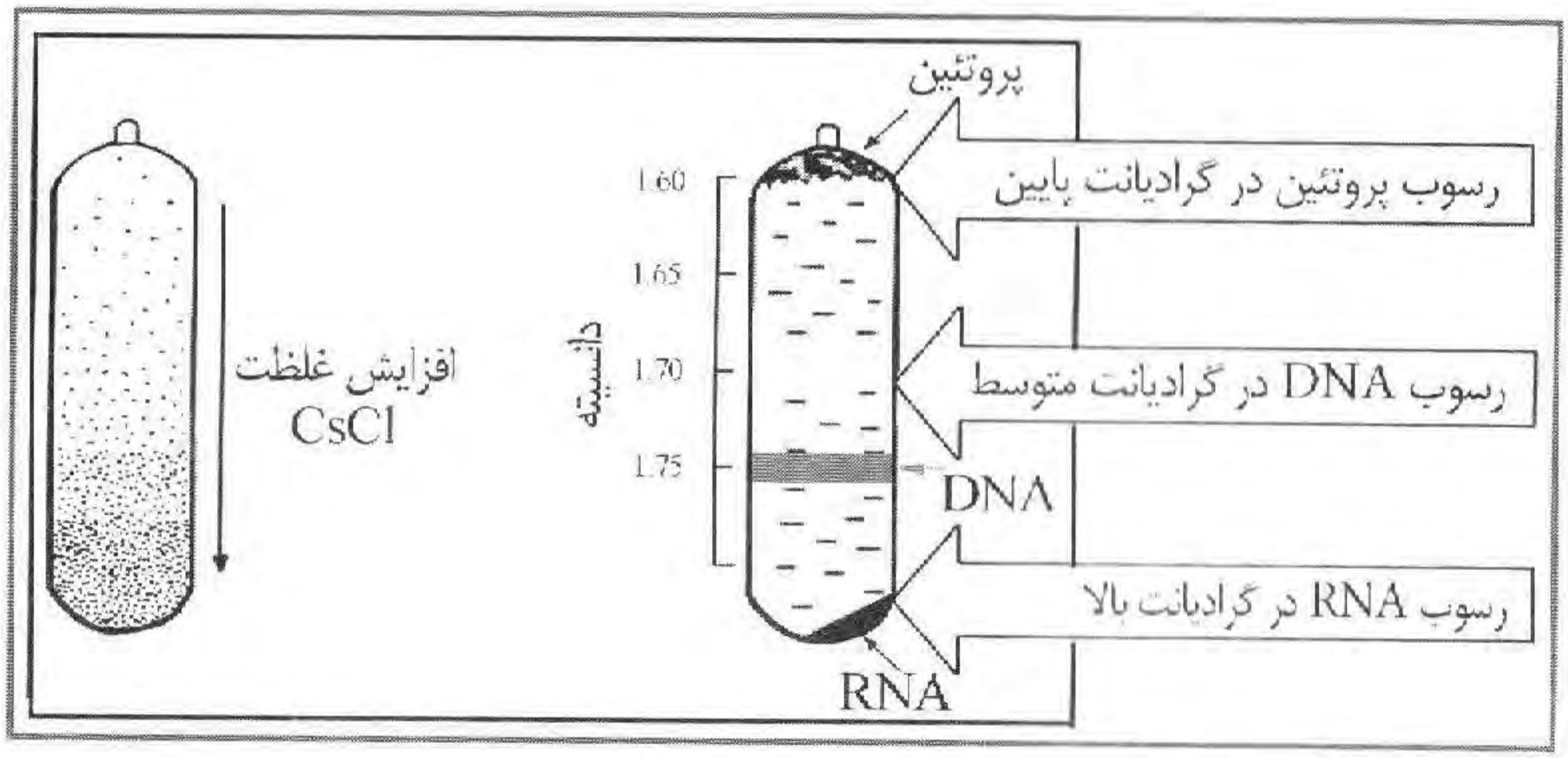
اصـطلاح ایزوپیکنیک به معـنی دانسـیته‌ی برابر است. برای خالـص‌سازی DNA، مخـلوط کلریـد سزیـم و DNA برای چنـدین ساعـت در سانتریفـیوژ در سرعـت بـالا حـدود 100000 g قرار می‌گیرد. علت استـفاده از کلرید سزیم تشـابه دانسـیته‌ی آن در غلظت 1.7 mg/ml با دانسیته‌ی DNA است. بعد از مدتی که شیب کلـریدسزیم ایجاد می‌شـود دو نیروی مخالف هم، انتـشار و سانتریفیوژ، ایجاد می‌شـوند که نزدیک انتهای لوله متمرکز می‌شوند. نیروی انتشار با توجه به شیب غلظت کلریـدسزیم حل‌شده افزایش می‌یابد و به سمت مرکز روتور دستگاه سانتریفیوژ متمایل می‌شود. توازن میان این دو نیروی تولیدشده، سبب ایجاد شیب دانسیـته‌ی پایداری می‌گردد کـه در انتـهای لـوله دارای دانسـیته‌ی بیشـتری اسـت و در بـالای لـوله دانسـیته‌ی کـم‌تری دارد. مولکـول‌های DNA سپس بر اساس نسبت AT (آدنین و تیمین) به GC (گوانـین و سیتـوزین) جـدا می‌شـوند. یـک AT دارای وزن مولـکولی کـم‌تری نسبـت بـه GC می‌باشد؛ بنابراین برای دو مولکول DNA با طول برابر، مولکولی که دارای نسبت AT بیشتری است دانسیته‌ی کم‌تری دارد.

پروتئیـن‌ها دارای دانسیـته‌ی کم‌تر هستند و RNA و پلاسمـیدهای سوپـرکویل از مولکول‌های خطی DNA، دارای دانسیته‌ی بیشتری می‌باشند (شکل ۶-۱).

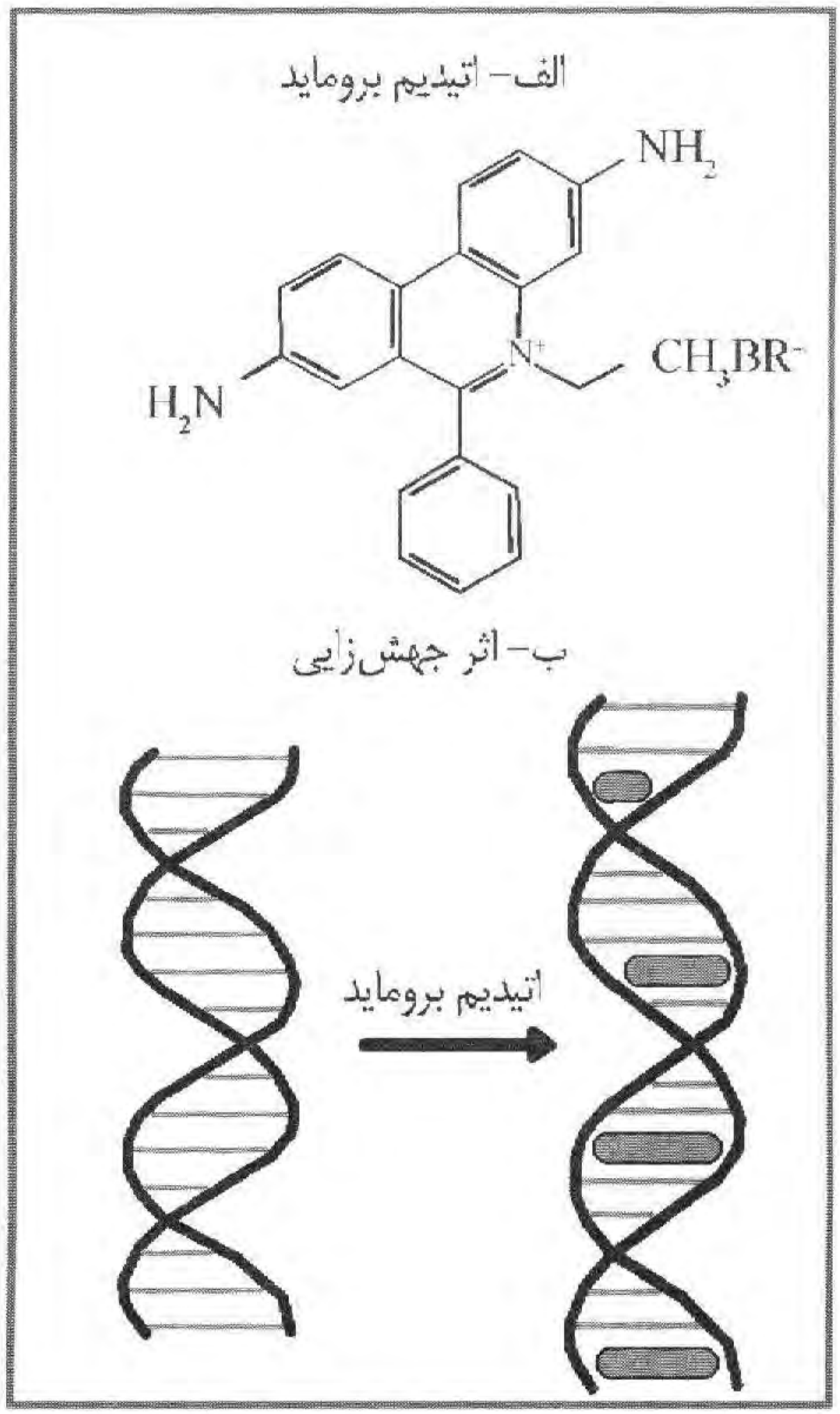
برای مشـاهده‌ی باندهای DNA از اتیدیم برمایـد استـفاده می‌شـود کـه با تابـش اشعه‌ی UV قابل دیدن می‌گردند.

این روش بسیار دقیق است؛ اما برای کارهـای روتین آزمایشگاهی مقرون به صرفه نیست؛ ضمن آن‌که استفاده از اتیدیم برماید خطرات ایمنی خاص خود را دارد.

اتیدیم برماید به واسطه‌ی ساختمان مسطحی که دارد در بین بازهای متصل بین دو رشته، خود را جای داده و سبب بازشدن مختصر دو رشته‌ی مارپیچ DNA می‌شود. حاصل این بازشدن پیچش، کاهش دانسیته در حد $0.125\ g/cm^3$ است. DNA سوپرکویل که دو انتهای آن بسته است آزادی کمی برای باز شدن دارد و به مقدار کمی DNA متصل می‌شوند. کاهش دانسیته‌ی مولکول سوپرکویل کم‌تر و حدود $0.085\ g/cm^3$ است؛ در نتیجه مولکول‌های سوپرکویل در شیب کلریدسزیم در مکان متفاوتی از DNA خطی و حلقوی بدون پیچش قرار می‌گیرند (شکل ۷-۱).



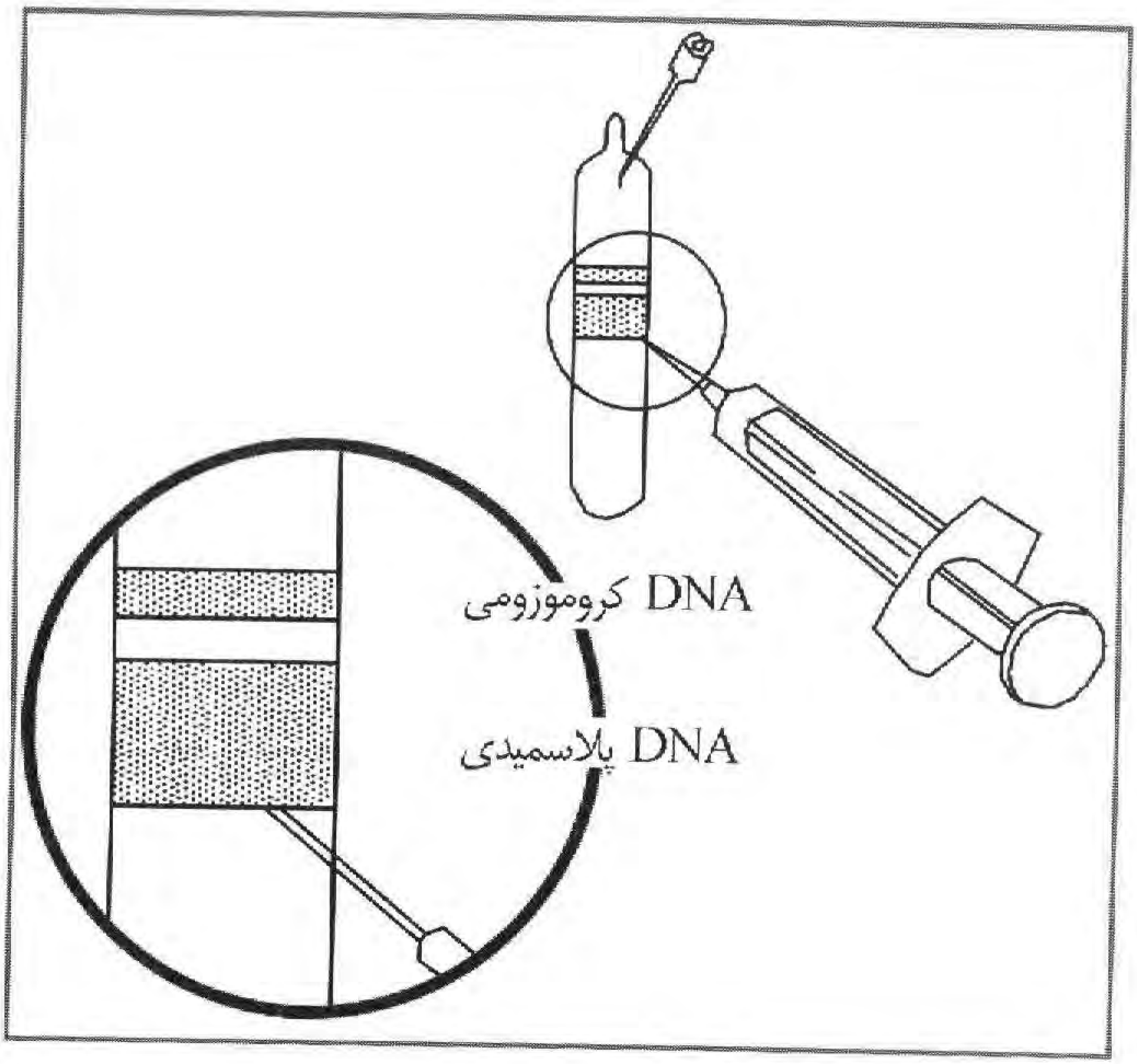
شکل ۶-۱: روش استفاده از کلرید سزیم: مولکول‌های مختلف در شیب نمک کلرید سزیم بر اساس دانسیته جدا می‌شوند. دانسیته‌ی DNA در غلظت 1.7 mg/ml با دانسیته‌ی DNA برابر است.



شکل ۷-۱: اتیدیم برماید. این ماده به واسطه‌ی ساختمان مسطحی که دارد، در بین بازهای متصل بین دو رشته، خود را جای می‌دهد و در اثر تابیدن نور UV، به صورت فلورسنس دیده می‌شود.

موقعیت باندهای DNA با تاباندن نور UV، که سبب می‌شود اتیدیم برماید به

صورت فلورسنس دیده شود، قابل مشاهده است. لوله‌ی حاوی سزیم‌کلرید به وسیله‌ی یک سرنگ سوراخ شده و DNA بیرون کشیده می‌شود (شکل ۸-۱). اتیدیم برماید متصل‌شده به DNA با استفاده از بوتانل و کلرید سزیم به وسیله‌ی دیالیز حذف می‌شود (شکل ۹-۱). حاصل این روش، DNA با خلوص ۱۰۰٪ می‌باشد.



شکل ۸-۱: نحوه‌ی جداسازی DNA از شیب کلرید سزیم. بعد از مشاهده‌ی باند DNA، لوله‌ی پلاستیکی به‌وسیله‌ی یک سرنگ سوراخ شده و DNA جدا می‌شود.

- کروماتوگرافی با استفاده از رزین‌های مبادله‌ی یونی یا ماتریکس‌های متصل‌شونده به DNA: استفاده از ذرات سیلیکا یا شیشه از ساده‌ترین راه‌های خالص‌سازی DNA است.

❖ **استفاده از ذرات سیلیکا:** در این روش، DNA در حضور ترکیبات نمک کائوتروپیک[1] به ذرات سیلیکا متصل می‌شود؛ در حالی‌که پروتئین‌ها و لیپیدها به ذرات سیلیکا متصل نمی‌شوند. علت اتصال DNA به ذرات سیلیکا وجود بارهای منفی در سطح آن‌ها و حضور بارهای مثبت در سطح ذرات سیلیکاست. پس از شست‌وشوی ذرات سیلیکا، مولکول‌های DNA آزاد شده و به صورت خالص جمع‌آوری می‌شوند (شکل ۱۰-۱).

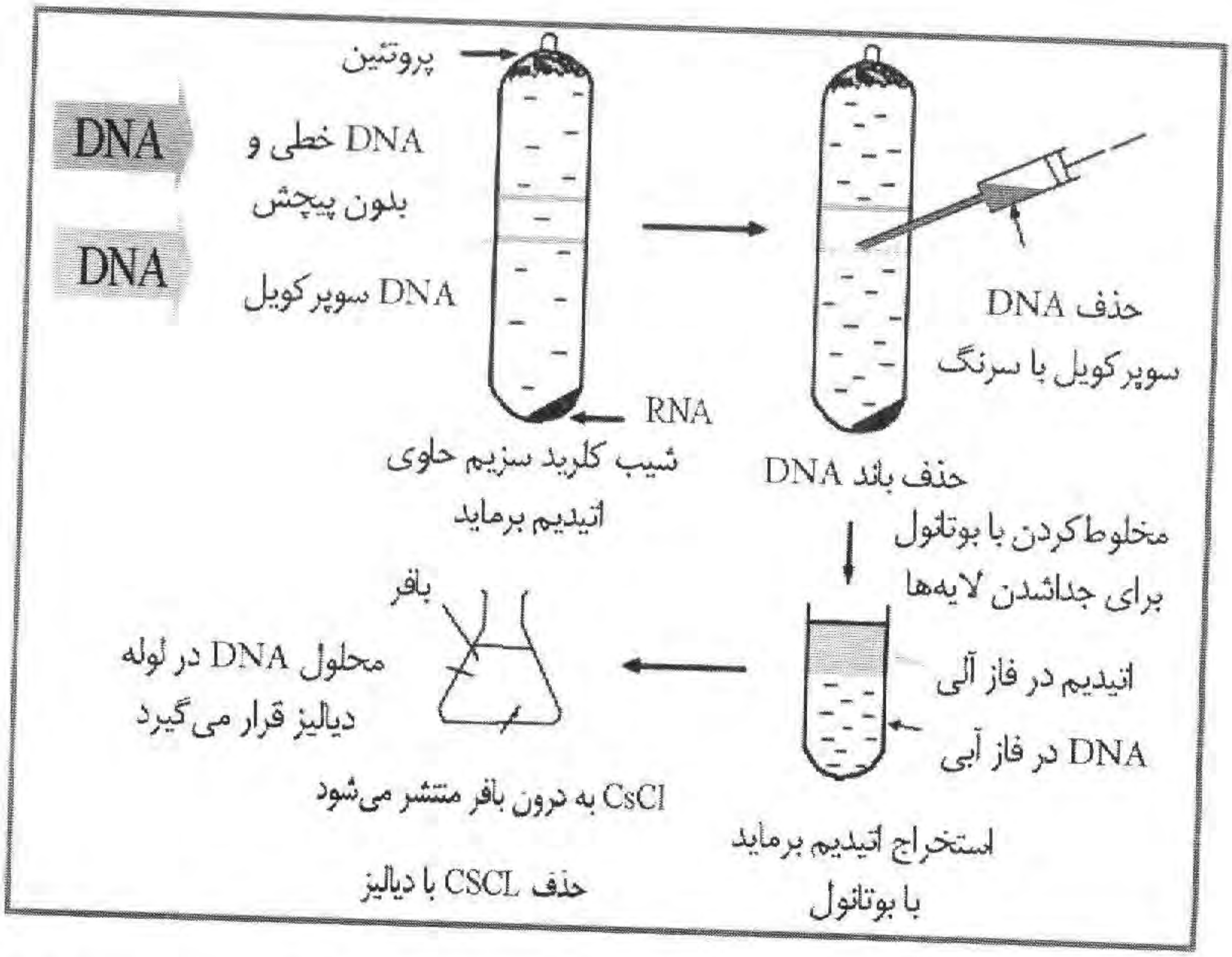
- یک ماده‌ی کائوتروپ[2] به ماده‌ای اطلاق می‌شود که ساختمان سه بعدی ماکرومولکول‌هایی مانند پروتئین‌ها، DNA و RNA را تخریب و دی‌نیچر می‌کند. مواد کائوتروپ با پیوندهای بین‌مولکولی غیرکووالان، مانند پیوندهای هیدروژنی، واندروالس و هیدروفوب تداخل می‌کنند (شکل ۱۱-۱).

مهم‌ترین مواد و نمک‌های کائوتروپ شامل مواد زیر می‌باشند:

- اوره ۸-۶ مول بر لیتر
- تیواوره[3] ۲ مول بر لیتر
- کلرید گوانیدیم[4] ۶ مول بر لیتر

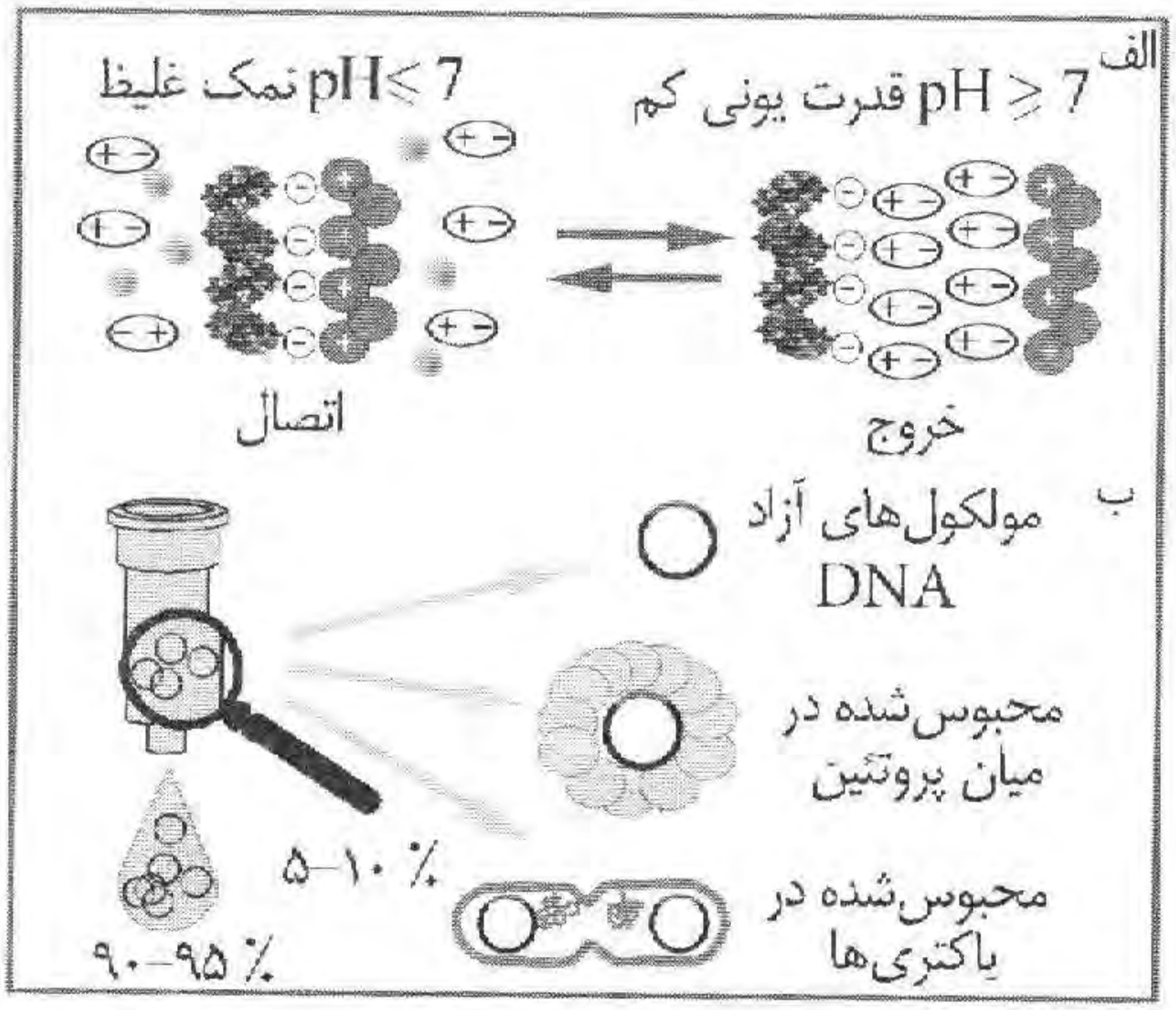
1- Chaotropic Salt
2- Chaotrope
3- Thiourea
4- Guanidinium Chloride

- پر کلرات لیتیم[1] ۴/۵ مول بر لیتر

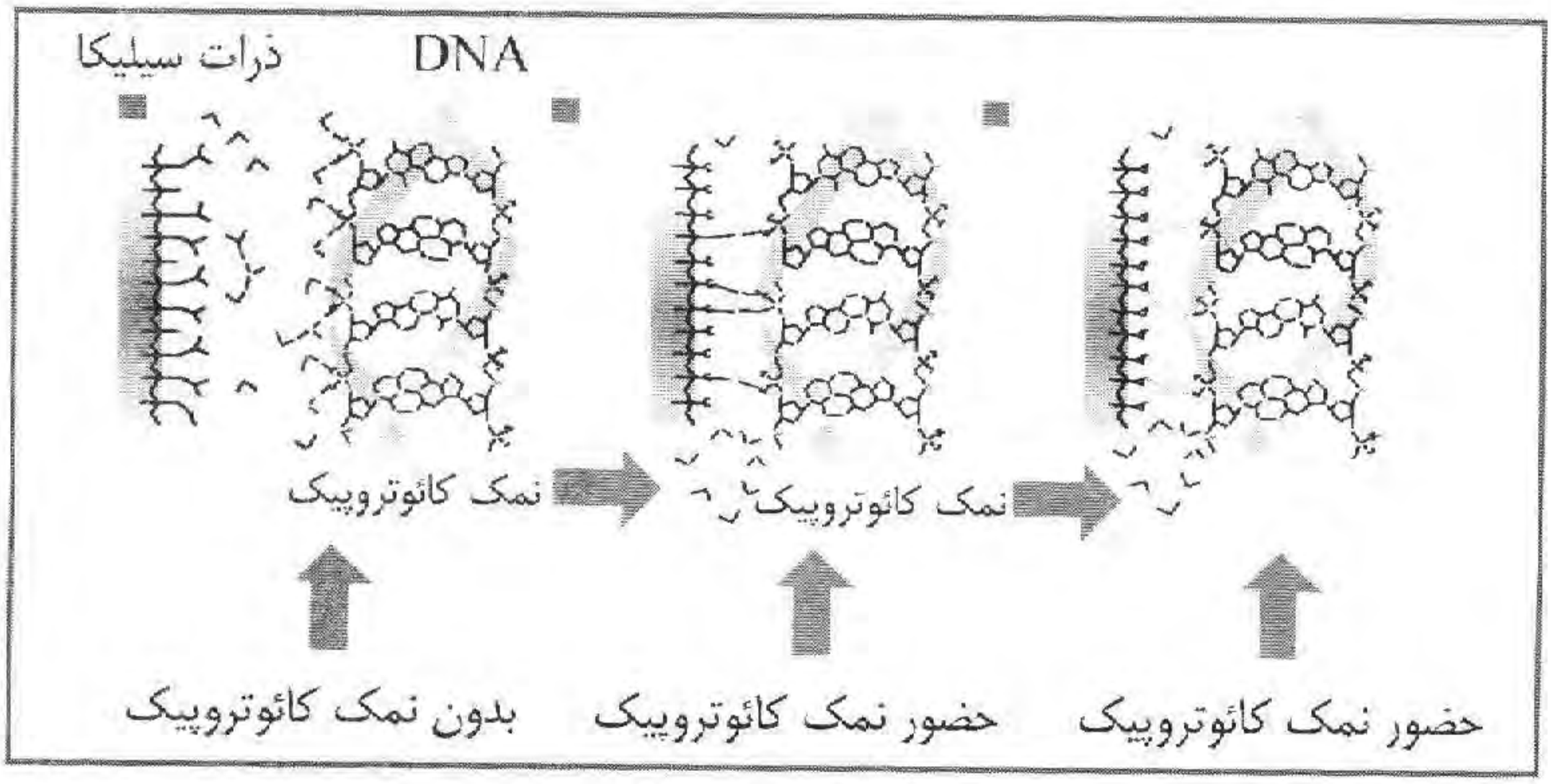


شکل ۹-۱: نحوه‌ی خالص‌سازی DNA جدا شده از شیب کلرید سزیم. نمک به‌وسیله‌ی دیالیز و اتیدیم برماید به‌وسیله‌ی بوتانل حذف می‌شوند.

1- Lithium Perchlorate

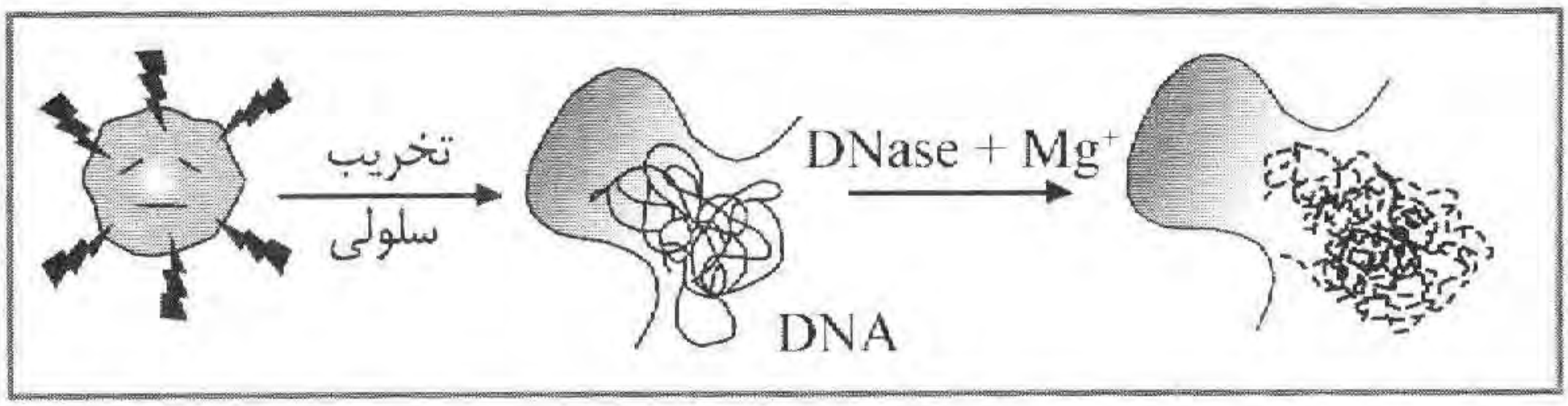


شکل ۱۰–۱: روش استفاده از ذرات سیلیکا. در این روش DNA دارای بار منفی به ذرات سیلیکای دارای بار مثبت متصل می‌شود؛ در حالی‌که پروتئین‌ها و لیپیدها به ذرات سیلیکا متصل نمی‌شوند.



شکل ۱۱–۱: مکانیسم ماده‌ی کائوتروپ. در روش استفاده از سیلیکا، از مواد کائوتروپ استفاده می‌شود که ساختمان سه‌بعدی ماکرومولکول‌هایی مانند پروتئین‌ها، DNA و RNA را بر هم می‌ریزد.

❖ **استفاده از ذرات چلکس**[1]: چلکس ذرات آنیونی مصنوعی یا رزین‌هایی با قابلیت تعویض یونی بوده که از نوعی کوپلیمر حاوی یون‌هایی با بار منفی[2] ساخته شده‌اند. این ذرات به صورت گروه‌های جاذب یون‌های فلزی چند ظرفیتی مانند منیزیم عمل می‌کنند. حذف منیزیم سبب تخریب و غیرفعال‌شدن آنزیم‌های هیدرولیزکننده‌ی DNA می‌شود (شکل ۱۲-۱).



شکل ۱۲-۱: نیاز DNase به یون منیزیم. از آن‌جا که آنزیم DNase برای فعالیت به یون منیزیم نیاز دارد، با حذف این یون می‌توان فعالیت آن را متوقف نمود.

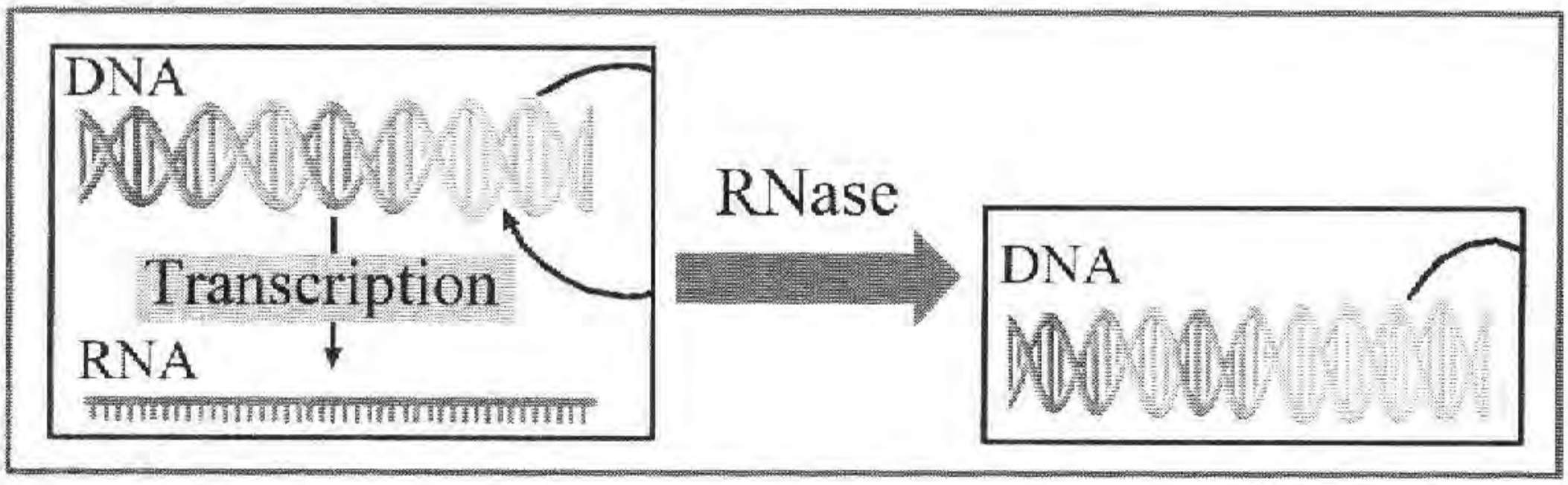
- Chelex-100 محصولی از Bio-Rad بوده که تمایل زیادی به جذب یون‌های کلسیم، منگنز و منیزیم دارد.
- ذرات فلزات سنگین در صورت حضور در محلول حاوی DNA در دماهای بالا، حدود 100 °C، سبب آسیب‌رساندن به DNA می‌شوند.
- حضور یون منیزیم برای فعالیت آنزیم DNase ضروری می‌باشد.

1- Chelex

2- Styrene Divinylbenzene Copolymers Containing Paired Iminodiacetate Ions

۷-۱) حذف RNA از DNA خالص

RNA در طی روش‌های خالص‌سازی DNA نیز جدا می‌شود. چنان‌چه RNA، موجود در DNA استخراج شده، سبب ایجاد خطا در آزمایشات شود، می‌بایست آن را از محلول DNA خالص‌شده حذف نمود. حذف RNA توسط آنزیم لیزکننده‌ی آن، یعنی RNase انجام می‌گیرد که در واقع به واسطه‌ی عمل آن، RNA تجزیه می‌شود (شکل ۱۳-۱).

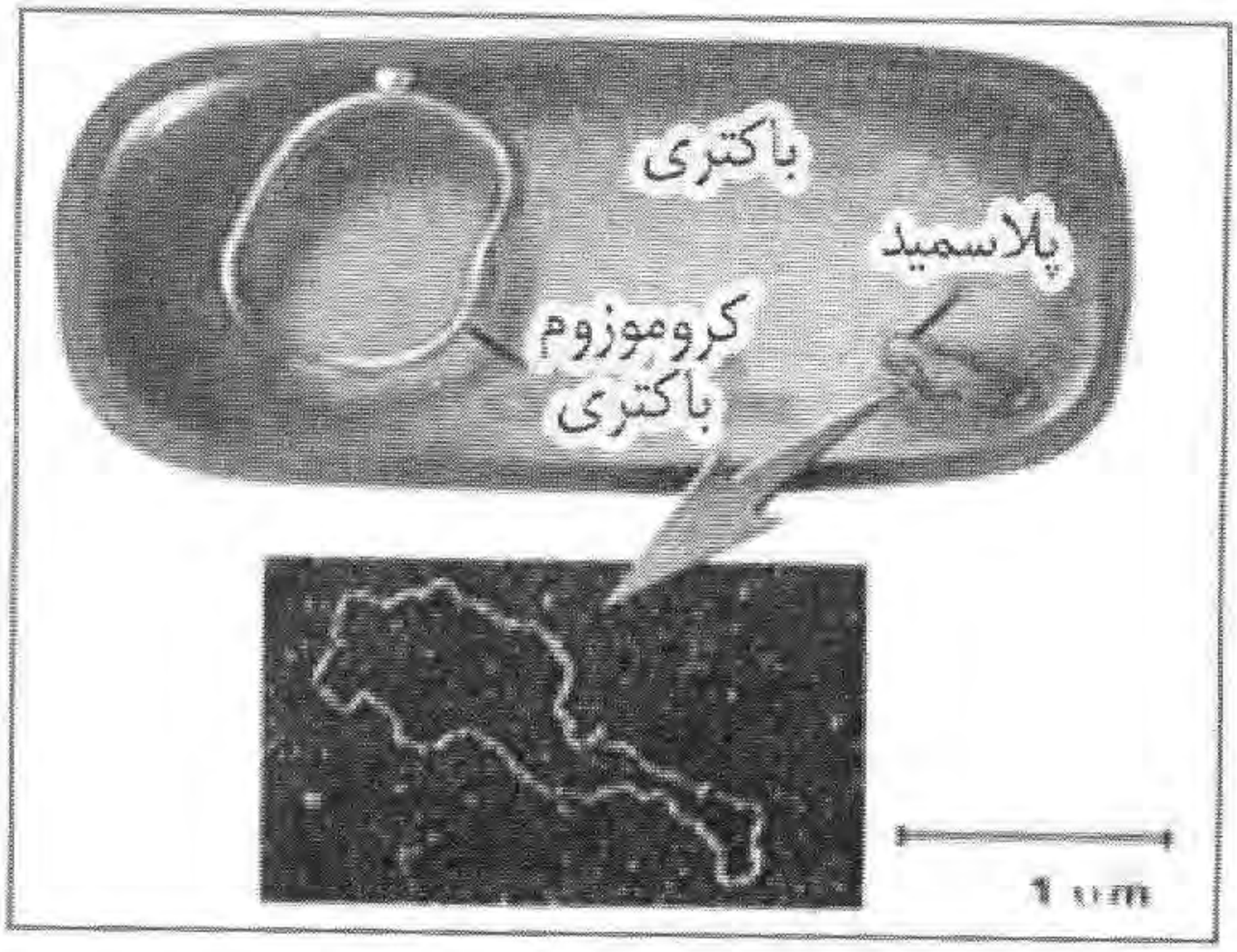


شکل ۱۳-۱: حذف RNA. جهت حذف RNA از DNA استخراج‌شده، از آنزیم Rnase استفاده می‌شود.

۸-۱) جداسازی انواع DNA

در طی روش‌های استخراج شرح‌داده شده، انواع DNA در اندازه‌ها و شکل‌های مختلف به‌دست می‌آید. هنگام استخراج DNA از یک باکتری، پلاسمیدهای حلقوی نیز به همراه انواع کروموزومی جدا می‌شوند. برای جداسازی این انواع DNA، از تفاوت‌های فیزیکی مانند اندازه و شکل آن‌ها استفاده می‌شود. در حالی‌که پلاسمیدها ساختارهای حلقوی دارند، کروموزوم‌ها به صورت خطی می‌باشند (شکل ۱۴-۱).

برای جداسازی DNAهای متفاوت، می‌توان از شیب کلرید سزیم، الکتروفورز و کروماتوگرافی استفاده کرد.



شکل ۱۴-۱: استفاده از تفاوت‌های فیزیکی مانند اندازه و شکل برای جداسازی انواع DNA: پلاسمیدها ساختارهای حلقوی دارند اما کروموزوم‌ها به صورت خطی می‌باشند.

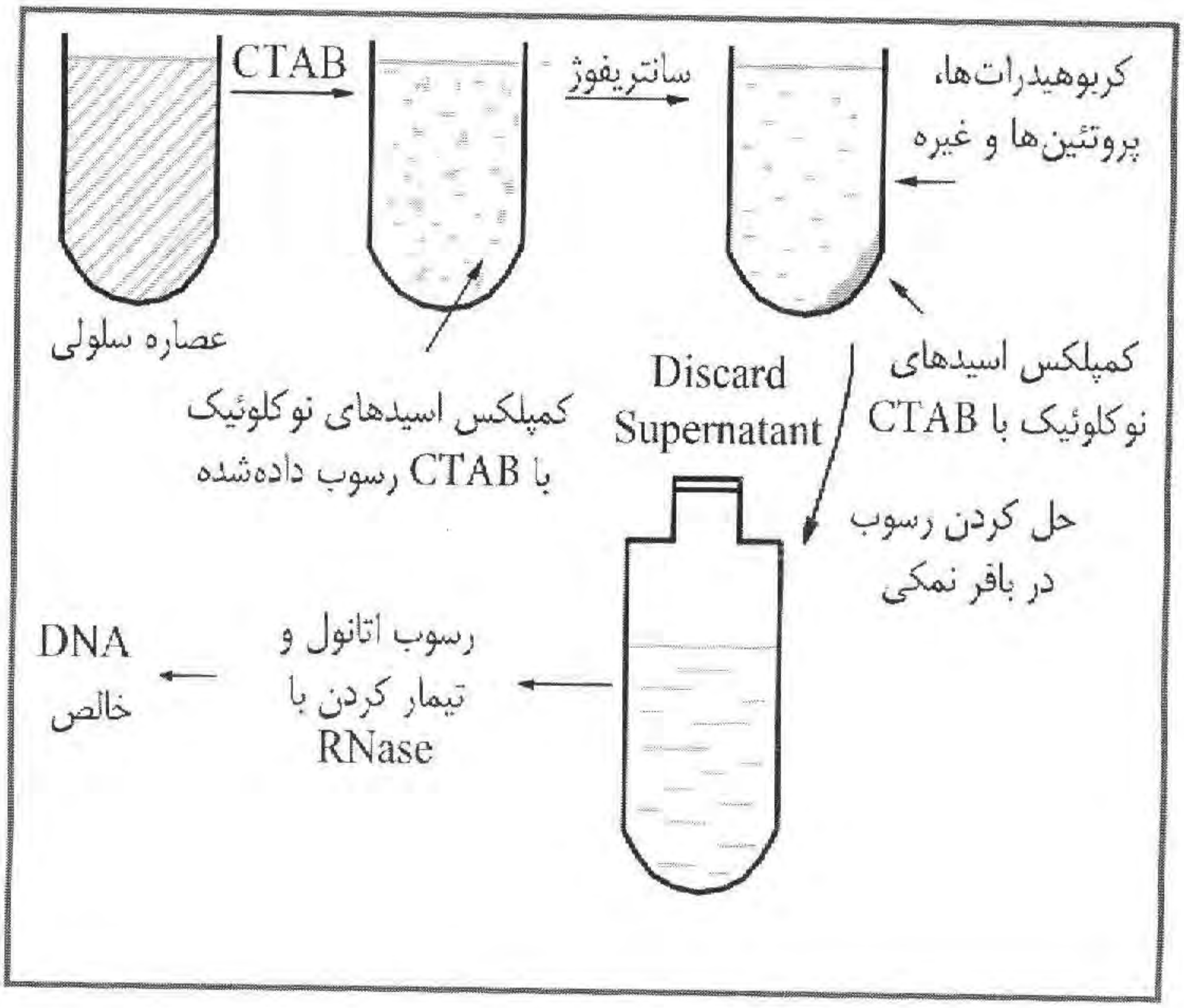
- جداسازی DNA از سلول‌های گیاهی و جانوری با جداسازی آن از باکتری‌ها متفاوت است. این تفاوت‌ها مخصوصاً در مرحله‌ی شکستن سلولی وجود دارد. مواد شیمیایی مؤثر بر دیواره‌ی باکتری‌ها، معمولاً بر ارگانیسم‌های دیگر اثر ندارند. به عنوان مثال لیزوزیم بر سلول‌های گیاهی اثر ندارد؛ آنزیم‌های تجزیه‌کننده‌ی خاصی برای سلول‌های گیاهی مانند پکتولیاز و سلولاز در دسترس هستند اما روش‌های فیزیکی مانند له‌کردن مؤثرترند. سلول‌های حیوانی، دیواره‌ی سلولی ندارند و به سادگی با استفاده از دترجنت‌ها لیز می‌شوند.

- نکته‌ی مهم دیگر، توجه به محتویات بیوشیمیایی سلول‌هایی است که DNA از آن‌ها استخراج می‌شود. در سلول‌های باکتریایی، مهم‌ترین مواد شیمیایی پروتئین‌ها، DNA و RNA هستند؛ بنابراین استفاده از روش‌های فنل-کلروفرم و یا استفاده از پروتئازها کافی می‌باشد. این روش‌ها برای سلول‌هایی که حاوی مقادیر زیادی مواد بیوشیمیایی دیگر هستند، کارآمد نمی‌باشند. سلول‌های گیاهی دارای مقادیر زیادی کربوهیدرات هستند که به روش فنل-کلروفرم استخراج نمی‌شوند و روش‌های دیگری باید استفاده شوند.

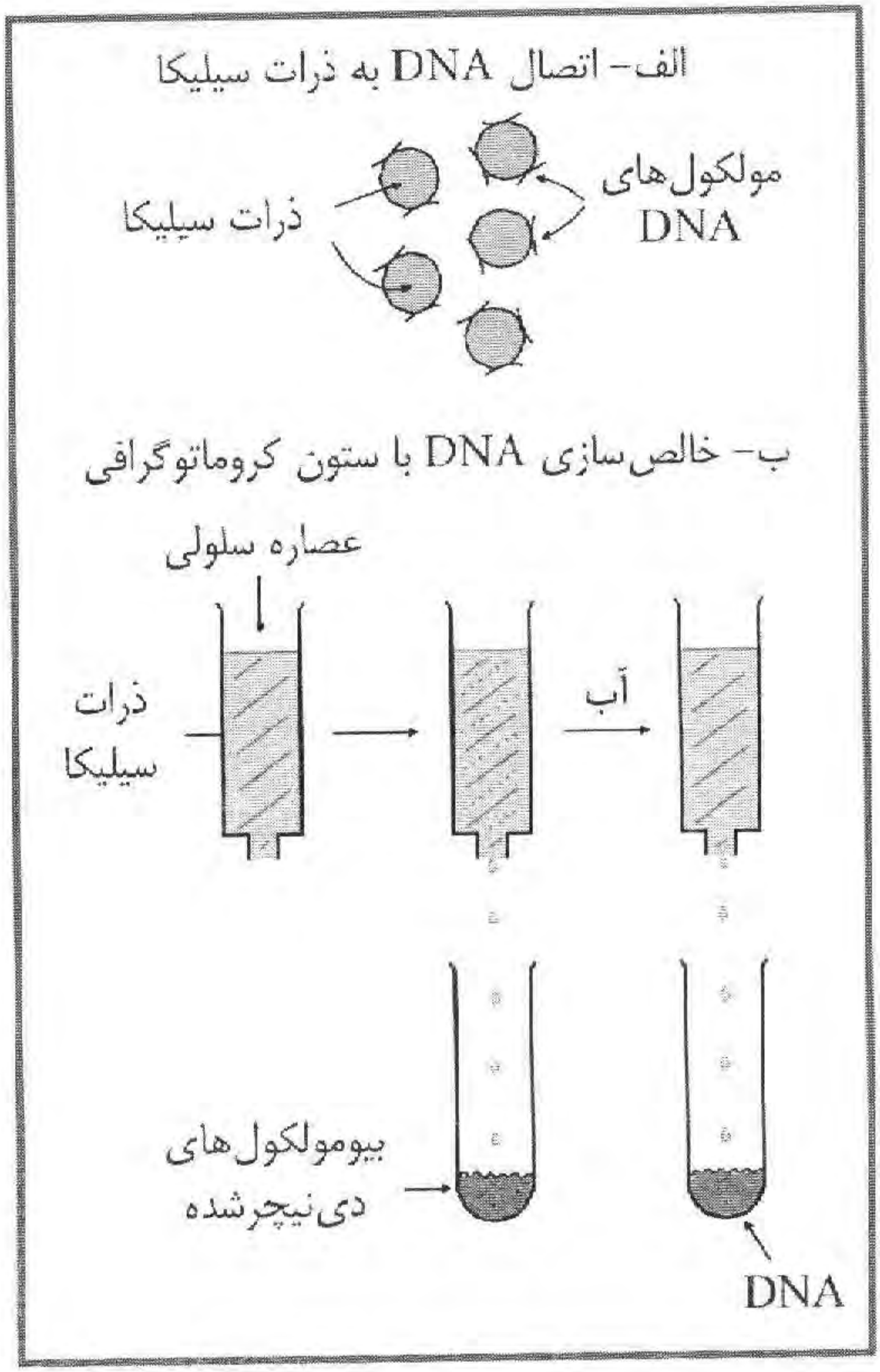
- استفاده از ساولن یا Cetyltrimethylammonium (CTAB) که نوعی دترجنت است که با اسیدهای نوکلئیک، کمپلکس نامحلول می‌دهد، روشی مناسب برای سلول‌های گیاهی است. وقتی ساولن به عصاره‌ی سلولی گیاهی افزوده می‌شود، کمپلکس تشکیل‌شده رسوب می‌کند؛ در حالی‌که بقیه‌ی مواد مانند کربوهیدرات‌ها و پروتئین رسوب نمی‌کنند (شکل ۱۵-۱). سپس رسوب به‌وسیله‌ی سانتریفیوژ جمع‌آوری‌شده و با محلول نمک طعام ۱ مولار شسته می‌شود که این عمل سبب شکسته‌شدن کمپلکس و آزادشدن DNA می‌شود. سپس اسیدهای نوکلئیک به وسیله‌ی اتانول رسوب‌داده شده و تغلیظ می‌گردند و RNA نیز با استفاده از RNAse حذف می‌شود.

- روش دوم استفاده از ترکیبی به نام گوانیدیم تیوسیانات است که دارای دو خاصیت ویژه است که در خالص‌سازی DNA به‌کار می‌رود. خاصیت اول این است که همه‌ی مواد بیوشیمیایی، به غیر از نوکلئیک اسیدها را دی‌نیچر و نامحلول می‌کند و بنابراین برای جداسازی DNA از هر سلول و بافتی به‌کار می‌رود. دوم این‌که در حضور این ماده، DNA به سختی به ذرات سیلیکا،

متصل می‌شود. با استفاده از کروماتوگرافی با ذرات سیلیکا، همان‌طور که در شکل ۱۶-۱ دیده می‌شود، تنها DNA متصل‌شده که با شست‌وشو به وسیله‌ی آب، DNA خالص به‌دست می‌آید.



شکل ۱۵-۱: استفاده از CTAB جهت خالص‌سازی DNA از سلول‌های گیاهی. CTAB با DNA کمپلکس تشکیل داده که در نتیجه رسوب می‌کنند.



شکل ۱۶-۱: روش استفاده از گوانیدیم تیوسیانات. این ماده همه‌ی مواد بیوشیمیایی به غیر از نوکلئیک اسیدها را دی‌نیچر و نامحلول می‌کند و بنابراین برای جداسازی DNA از هر سلول و بافتی به‌کار می‌رود؛ ضمناً در حضور این ماده DNA به ذرات سیلیکا متصل می‌شود.

۹-۱) جداسازی DNA اندامک‌ها

انـدام‌های سلـولی مانند میتوکندری و کلروپلاست در گیاهان دارای DNA هستند که از DNA ژنومی متفاوت می‌باشند.

DNA میتوکندری دارای احتمال جهش فراوانی است و با بیماری‌های خاصی مانند دیابـت، آلزایـمر و اختـلالات ماهیـچه‌ای مرتبـط مـی‌باشـد. بـرای جـداسـازی DNA میـتوکندری و کلروپلاسـت، ابتـدا این اندامـک‌ها با استفاده از سانتریفوژهای در دور بالا جدا شـده و سپـس DNA آن‌ها جدا می‌شود.

۱۰-۱) تغلیظ DNA

محلول‌های DNA و RNA به وسیله‌ی اتانول به شرح زیر تغلیظ می‌شوند:

حجم DNA اندازه‌گیری شده و حدود ۲/۵-۲ برابر حجـم آن اتانول یا ایزوپروپانول افزوده می‌شـود. مخلـوط به خوبی هم‌زده شـده و روی یـخ یا در $-20\ ^{\circ}C$ به مـدت ۲۰ دقیقـه تا یک ساعت انکوبه می‌شـود. پس از سانتریفـوژ، DNA رسوب می‌کـند که با افزودن مقداری اتانول ۷۰٪ جهت حذف نمک‌های همـراه با DNA، شست‌وشوی مجدد انجام می‌شود. پس از حذف الکل و خشک‌کردن DNA می‌توان آن را در حجم دل‌خواه بافر تریس حاوی EDTA و یا آب عاری از DNase حل نمود.

بهتر است قبل از افزودن الکل ۱۰۰٪ غلظت کاتیون‌های تک‌ظرفیتی در این حجم تنظیم گردد. جدول ۱۷-۱ غلظت مناسب نمک‌ها و علت افزودن آن‌ها را بیان می‌کند.

نمک	مولاریته‌ی نهایی در محلول	اثر
استات آمونیم	۲-۲/۵	ممانعت T4 Polynucleotide kinase
استات سدیم	۳	ممانعت Klenow
کلرید سدیم	۰/۲	ممانعت RNA-Dependent DNA Polymerases
کلرید لیتیم	۰/۸	ممانعت RNA-Dependent DNA Polymerases
کلرید منیزیم	۰/۰۱	کمک در رسوب قطعات کوچک DNA و الیگونوکلئوتیدها

جدول ۱۷-۱: نمک‌های مورد استفاده در تغلیظ DNA که در صورت عدم حذف سبب مشکلاتی می‌شود.

- استات آمونیم در اتانول خیلی پایدار است و معمولاً با شست‌وشو در اتانول ۷۰٪ حذف می‌شود. قابلیت حذف نمک‌های استات‌سدیم و کلریدسدیم با این روش کم‌تر است.
- معمولاً استفاده از اتانول نسبت به ایزوپروپانول بهتر است؛ زیرا در هنگام استفاده از ایزوپروپانول، مقداری از نمک‌ها رسوب می‌کنند؛ هم‌چنین قابلیت تبخیر آن از اتانول کم‌تر است. اما چون مقدار کم‌تری ایزوپروپانول مصرف می‌شود در موارد استخراج حجم‌های بسیار بالایی از DNA، مانند استخراج پلاسمید،

استفاده از ایزوپروپانول مقرون به صرفه می‌باشد.

۱۱-۱) حذف پروتئین‌ها از محلول‌های نوکلئیک اسید

برای حذف پروتئین‌ها از محلول‌های نوکلئیک اسید، راه‌های زیر استفاده می‌شوند:

- استفاده از هضم آنزیمی
- خالص‌سازی روی ستون‌های سیلیکا
- استفاده از شیب کلرید سزیم و اتیدیم برماید
- استخراج با فنل، که ساده‌ترین راه خالص‌سازی است. در این روش، فنل پروتئین‌ها را دی‌نیچر می‌کند و کلروفرم بقایای فنل را حذف می‌کند.

۱۲-۱) حذف آب از DNA خالص‌شده

می‌توان به وسیله‌ی قراردادن DNA در هوای آزاد در دمای اتاق آن را خشک نمود. با حرارت‌دادن ملایم یا قراردادن در درای بلاک نیز می‌توان DNA را خشک کرد. با استفاده از پمپ‌های خلأ نیز می‌توان آب همراه DNA را حذف کرد اما به دلیل این‌که در این روش، DNA بسیار خشک‌شده و حل‌کردن مجدد آن در بافر سخت است، توصیه نمی‌شود.

۱۳-۱) دیالیز

کیسه‌های دیالیز برای نمک‌زدایی و خالص‌سازی DNA استفاده می‌شوند. برای این منظور باید از کیسه دیالیز با اندازه cut-off 6000-8000 استفاده شود؛ این

کیسه‌ها باید قبل از استفاده، آماده و مرطوب شوند.

مراحل خالص‌سازی DNA با استفاده از کیسه‌های دیالیز:

الف- شست‌وشو در $60\ ^{\circ}C$ به مدت ۳۰ دقیقه در حجم بالایی از سدیم بی‌کربنات ۲٪ (حدود یک لیتر) حاوی EDTA ۱٪.

ب- شست‌وشوی غشاهای دیالیز با آب مقطر

ج- نگه‌داری غشا در $4\ ^{\circ}C$ و در محلول فرمالدئید ۱٪ و سدیم بنزوات ۱٪ یا سدیم آزید ۱٪ در آب مقطر دیونیزه یا اتانل ۱۰۰٪.

د- حرارت‌دادن غشاهای دیالیز در دماهای بالاتر از $80\ ^{\circ}C$ سبب کاهش تراوایی غشاها می‌شود.

ه- برای ممانعت از چسبندگی پروتئین‌های باردار به غشا بهتر است در محلول BSA ۰/۰۵٪ در بافر تریس خیسانده شوند.

❖ کیسه‌های دیالیز نوعی غشای نیمه تراوا هستند که از سلولز یا سلوفان قابل تجزیه درست شده‌اند و برای انتشار یا اسمز استفاده می‌شود. در حالت انتشار، مولکول‌های کوچک مانند نمک، از محل دارای غلظت زیاد به محل با غلظت کم نمک منتقل می‌شوند. اندازه‌ی سوراخ‌های این غشاها متفاوت بوده و بسته به اندازه‌ی مولکول‌های هدف انتخاب می‌شوند. اندازه‌ی این حفره‌ها با میزان Cut-Off بیان می‌شود.

۱۴-۱) نگه‌داری و ذخیره‌سازی DNA

در نظرگرفتن نکات زیر در ذخیره‌سازی مولکول‌های DNA و RNA مهم است:

- فلزات سنگین سبب شکستن پیوندهای فسفو دی استر می‌شوند.

- EDTA چلاتور فلزات دو ظرفیتی می‌باشد.
- رادیکال‌های آزاد که از شکستن مواد شیمیایی و نیز تشعشعات حاصل می‌شوند سبب شکستن پیوندهای فسفودی استر می‌شوند.
- نور UV در ۲۶۰ نانومتر سبب ایجاد ضایعاتی از قبیل ایجاد دایمرهای تیمینی و پیوندهای متقاطع و ازدست‌رفتن خصوصیات بیولوژیکی آن‌ها می‌شود. تشعشع UV در ۳۲۰ نانومتر نیز، با قدرت کم‌تری، سبب این پیوندهای متقاطع می‌شود.
- اتیدیم برماید با استفاده از نور مرئی و اکسیژن، سبب پدیده‌ی فتواکسیداسیون می‌شود. محصولات اکسیداسیون سبب شکستن پیوندهای فسفودی استری می‌شوند.
- در غیاب فلزات سنگین اتانول به DNA آسیبی نمی‌رساند.
- نوکلئازها روی پوست انسان یافت می‌شوند؛ بنابراین از تماس مستقیم یا غیرمستقیم بین دست و اسیدهای نوکلئیک باید جلوگیری شود.
- بیشتر DNaseها خیلی پایدار نیستند اما اکثر RNaseها دارای پایداری بالایی بوده و در سطح دست‌کش و وسایل پلاستیکی، فعال باقی می‌مانند.
- نگه‌داری DNA در دمای $4\ ^{\circ}C$ یکی از بهترین و ساده‌ترین روش‌ها است.
- نگه‌داری طولانی‌مدت DNA در دمای $-20\ ^{\circ}C$ سبب شکستن و آسیب به DNA می‌شود و برای نگه‌داری طولانی‌مدت، دمای $-70\ ^{\circ}C$ مناسب‌تر است.
- برای نگه‌داری طولانی‌مدت بهترین راه، ذخیره‌سازی در غلظت بالای نمکی (>1M) و در حضور غلظت بالای EDTA (>10mM) و در pH 8/5 است.

- نگـه‌داری DNA در کلریـدسزیم بدون اتیـدیم‌برماید، در تاریـکی و دمـای $4^{\circ}C$ بهترین راه نگه‌داری DNA است.
- نگه‌داری DNA درون فاژ، بهتر از نگه‌داری آن به صورت خالص است.
- متداول‌ترین راه نگه‌داری DNA، افزودن بافر TE و ذخیره‌سازی در دمای ۲۰- است.

۱۵-۱) اهمیت بافر TE (Tris-EDTA)

بافر تریس از بافرهای بسیار مورد استفاده در بیولوژی مولکولی می‌باشد. تریس یک بافر مناسـب اسـت و EDTA نیز با جـذب یون منـیزیم مانـع فعـالیت آنزیـم DNase می‌شود؛ در واقع این بافـر، DNA و RNA را از تجزیه حفـظ می‌کـند. برای نگـه‌داری RNA مناسب‌ترین pH بافر TE، ۷/۵ است و برای DNA، ۸/۰ می‌باشد. برای تهیه‌ی ایـن بافر ابتدا محـلول تریس ۱۰ میلی‌مولار را با اسید کلریـدریک به pH 8 رسانـده و سپس ۱ میلی‌مولار EDTA افزوده شود. بهتر است این محلول قبل از استفاده استریل گردد.

۱۶-۱) استخراج DNA در خانه

بـه دلیـل ایـن‌که گریـگور منـدل، پـدر علـم ژنتـیک، مطالعـات خـود را بـر روی دانه‌های نخود انجـام داد و نیز این‌که ایـن منـبع در دسـترس و عـاری از آلودگـی‌های احتمالی و دارای بافـتی نرم مـی‌باشد، در آزمایشـگاه‌های زیست‌شناسی جهت استخراج DNA از دانه‌های نخود سبز تازه استفاده می‌شود. این روش را می‌توان برای میوه‌ها و نیز گوشت به‌کار برد.

این روش صرفاً جنبه‌ی آموزشی داشته و به دلیل کیفیت پایین آن جهت بررسی‌های آزمایشگاهی استفاده نمی‌شود. مراحل این روش، به شرح زیر است:

❖ مرحله‌ی اول: مخلوط‌کردن و خردکردن بافت‌ها

حدود نصف فنجان نخود سبز به همراه یک فنجان آب سرد و کمی نمک طعام (در حد ۱/۸ قاشق چای‌خوری) را در یک آسیاب ریخته و به مدت ۱۵ ثانیه با دور بالا مخلوط کنید که در نتیجه سوپی به‌دست آمده که با عبور از یک صافی نرم مانند چای‌صاف‌کن، مایعی یکنواخت حاصل می‌شود.

❖ مرحله‌ی دوم: افزودن دترجنت

حدود ۲ قاشق از دترجنت‌های در دسترس مانند مایع ظرف‌شویی و یا پودر رخت‌شویی را به مایع افزوده و مخلوط کنید. به مخلوط اجازه دهید که حدود ۵–۱۰ دقیقه در محیط بماند.

در مرحله‌ی آسیاب‌کردن، سلول‌ها به روش فیزیکی از هم‌دیگر جدا می‌شوند اما DNA هم‌چنان درون سلول‌ها محبوس می‌باشد. DNA در واقع به واسطه‌ی دو غشای سلولی و هسته، درون سلول حفظ می‌شود. برای استخراج DNA، این دو غشا باید تخریب شوند. دترجنت‌ها مانند صابون دارای خاصیت آمفی پاتیک بوده و سبب تخریب ساختار مولکول‌های چربی و پروتئین موجود در غشاها می‌شوند.

❖ مرحله‌ی سوم: افزودن یک آنزیم

می‌توان از آنزیم‌های موجود در خانه، مانند آب میوه‌های کیوی و آناناس که حاوی آنزیم‌های پروتئاز می‌باشند استفاده نمود. محلول‌های شست‌وشوی

لنزهای تماسی نیز حاوی آنزیم می‌باشند. تنها استفاده از یک تا دو قطره کافی است. پس از افزودن آنزیم مخلوط را به آرامی هم بزنید.
این پروتئازها سبب تجزیه‌ی سریع پروتئین‌های هیستونی شده و DNA رها می‌گردد.

❖ مرحله‌ی چهارم: رسوب با الکل

هم حجم مخلوط الکل طبی را به آرامی افزوده که در نتیجه DNA رهاشده به صورت کلاف‌هایی سفید رنگ دیده می‌شود که آن‌ها را با یک میله‌ی شیشه‌ای یا چوبی می‌توان جمع نمود. چون چگالی آب از الکل بیشتر است، آب در پایین لوله قرار می‌گیرد که پروتئین‌ها و چربی‌ها را نیز در خود دارد.

۱۷-۱) تعیین غلظت DNA

❖ روش طیف‌سنجی: برای محلول‌های خالص DNA، ساده‌ترین روش تعیین غلظت؛ خواندن جذب در ۲۶۰ نانومتر است. میزان جذب یا OD برابر یک در طول مسیر ۱ سانتی‌متر برای DNA دو زنجیره‌ای ۵۰، برای RNA و DNA تک‌زنجیره‌ای ۴۰ و برای الیگونوکلئوتیدها 20-33 μg/ml می‌باشد. جذب نسبی ۲۶۰/۲۸۰، تخمینی از خلوص محلول را نشان می‌دهد. این نسبت برای محلول‌های خالص RNA و DNA به ترتیب ۲ و ۱/۸ است. این روش برای مقادیر کم RNA و DNA (یعنی کم‌تر از 1 μg/ml) مناسب نیست. مقادیر کم‌تر از ۱/۸، بیان‌گر آلودگی نمونه با پروتئین و یا فنل است.

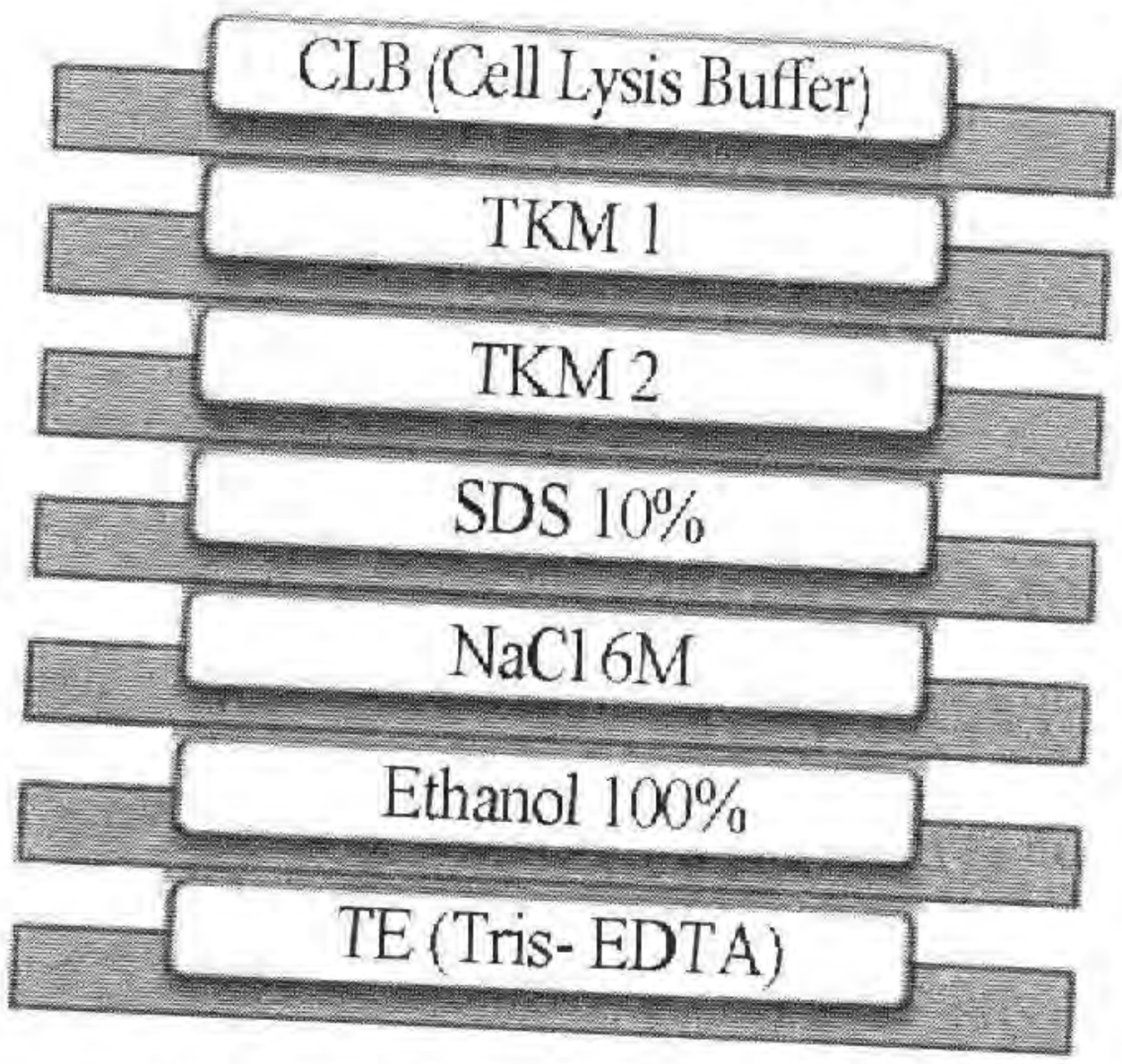
❖ روش سنجش فلورسنس با استفاده از اتیدیم برماید: میزان DNA موجود در یک محلول با میزان فلورسنس ساطع‌شده به‌وسیله‌ی اتیدیم برماید در آن

محلول نسبت دارد. رقت‌های نامعلوم DNA در حضور 2 μg/ml اتیدیم برماید با رقت‌های معلوم یک DNA استاندارد در ژل آگارز مقایسه و محاسبه می‌شود.

۱۸-۱) استخراج DNA از خون تام به روش غیر آنزیمی[1]

در این روش در ابتدا گلبول‌های قرمز و سفید لیز شده و سپس به وسیله‌ی بافرهای نمکی پروتئین‌ها حذف می‌شوند. DNA توسط اتانول استخراج و نمک‌زدایی شده و در نهایت به صورت محلول نگه‌داری می‌شود.

مواد مورد نیاز در نمودار نشان داده‌شده است:



محلول‌های فوق به جز اتانول پس از تهیه، اتوکلاو می‌گردند.

1- Salting Out

روش تهیه محلول‌های مورد نیاز در جدول ۱۸-۱ نشان داده‌شده است:

نام بافر	مواد تشکیل دهنده
CLB (Cell Lysis Buffer)	Sucrose: Tris HCl (2M, pH=7.7), $MgCl_2$ (1M) Triton X100: H_2O
TKM1	Tris HCl (2M, pH=7.6), KCl (3M), $MgCl_2$ (1M), EDTA (0.5M), H_2O
TKM2	Tris HCl (2M, pH=7.6), KCl (3M), $MgCl_2$ (1M) EDTA (0.5M), NaCl (5M), H_2O
TE	Tris HCl (2M, pH=7.7), EDTA (0.5M, pH=8), H_2O
SDS 10%	SDS, ddH_2O

جدول ۱۸-۱

دستگاه‌های مورد نیاز نمودار زیر نشان داده‌شده است:

روش کار: برای جلوگیری از انعقادخون، ۱ میلی‌لیتر از EDTA ۱۰٪ به 10 ml خون اضافه می‌شود. در این روش از هپارین به دلیل مهارکنندگی PCR استفاده

نمی‌شود. برای استخراج DNA از ۳ میلی‌لیتر خون تام، ابتدا ۹ میلی‌لیتر از محلول CLB را در یک لوله آزمایش ریخته و خون تام را به آن اضافه می‌کنیم (این مرحله جهت لیزکردن سلول‌ها انجام می‌شود)، سپس نمونه‌ها را با دور 2500 RPM به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ می‌کنیم. پس از آن محلول رویی را سریعاً دور ریخته و رسوب انتهای لوله را نگه می‌داریم. در صورت لیزنشدن گلبول‌های قرمز، مرحله فوق را با مقدار CLB 2 ml، که به رسوب اضافه می‌شود، تکرار می‌کنیم.

در مرحله بعد بر روی رسوب مقدار 5 ml از محلول TKM1 اضافه می‌کنیم تا دیواره‌ی هسته لنفوسیت‌ها پاره شده و محتویات آن جهت استخراج DNA آزاد شود. این لوله را به مدت ۱۰ دقیقه در دور 500 RPM سانتریفیوژ می‌کنیم و سپس محلول رویی آن را دور می‌ریزیم که این بار رسوب سفیدرنگی در انتهای لوله باقی خواهد ماند.

در این مرحله بر روی رسوب مقدار TKM2 1.5 ml اضافه کرده و مقدار 100 µl SDS ۱۰٪ اضافه می‌کنیم و لوله را به مدت نیم ساعت در دمای 65 °C درون بن ماری حرارت می‌دهیم. در این مرحله پروتئین‌ها از محیط حذف شده و DNA خالص‌تری به‌دست می‌آید. در صورت حل نشدن رسوب، انکوباسیون را ادامه می‌دهیم تا رسوب کاملاً حل شود. این مرحله را می‌توان در 37 °C به صورت طولانی و انکوباسیون شبانه[1] نیز انجام داد.

پس از این‌که محلول داخل لوله تقریباً شفاف شد، به مقدار 570 µl از NaCl 6M را به آن افزوده و مخلوط می‌کنیم و در دور 2900 RPM، به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ می‌کنیم.

1- Overnight

در مرحله بعد، ابتدا در یک لوله آزمایش استریل، مقدار 4 ml الکل ۹۶° سرد می‌ریزیم. پس از اتمام سانتریفیوژ محلول رویی آن را به لوله حاوی الکل ۹۶ اضافه می‌کنیم. در لوله را با پارافیلم مسدود کرده و به آرامی آن را تکان می‌دهیم تا ابر DNA در آن تشکیل شود.

در یک میکروتیوب 1.5 ml، مقدار 1 ml الکل ۷۰٪ می‌ریزیم و DNA تشکیل-شده در لوله را با نوک سمپلر به آرامی به میکروتیوب منتقل می‌کنیم.

در این مرحله، میکروتیوب‌ها را در دور 14000 RPM به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ می‌کنیم. از الکل ۷۰٪ برای شست‌وشوی محیط از ناخالصی‌ها استفاده می‌کنیم. پس از اتمام سانتریفیوژ، رسوب سفیدرنگی در انتهای میکروتیوب دیده می‌شود. محلول رویی آن را دور ریخته و میکروتیوب را با در باز به مدت ۱۵-۱۰دقیقه می‌گذاریم تا در محیط خشک شود. الکل باید کاملاً خشک شود؛ زیرا الکل از عوامل مهارکننده در PCR است. البته DNA نباید خیلی خشک شود چون ساختمان مولکولی آن شکسته می‌شود.

در این مرحله بر روی رسوب، مقدار 300 µl از TE که مایع نگه‌دارنده DNA است اضافه می‌کنیم؛ سپس میکروتیوب را یک شب در دمای 37 °C در انکوباتور قرار می‌دهیم تا DNA کاملاً حل شود. روز بعد DNA آماده‌ی استفاده جهت انجام مراحل PCR است.

در مواردی که میزان خون کم است می‌توان با کاهش مقادیر بالا به نسبت مشخص استخراج را انجام داد.

جدول ۱۹-۱ اشکالات و راه‌های رفع اشکالات را در این روش نشان می‌دهد.

اشکال	علت	رفع اشکال
در مرحله ۱ رسوب زیاد و قرمز پُر رنگ مشاهده می‌شود.	RBCها کاملاً لیز نشده‌اند.	در مواردی که از خونی استخراج می‌کنید که مدت زمانی در یخچال یا فریزر نگه‌داری شده است، بروز این مشکل غیرمنتظره نیست و معمولاً با تکرار مرحله ۱ مشکل برطرف می‌شود؛ اما اگر خون تازه تهیه شده است، علت تشکیل این لخته، خوب مخلوط نکردن خون با CLB است.
رسوب مرحله ۲ سفید رنگ نیست.	محلول رویی از مرحله قبل کاملاً خالی نشده است و بقایای RBCها هنوز باقی مانده است.	می‌توانید مرحله ۲ را با 1/5 ml TKM1 تکرار کنید.
محلول رویی در مرحله ۵ کاملاً از رسوب جدا نشده‌است و برداشتن محلول رویی به سختی امکان‌پذیر است.	در مرحله ۴ NaCl به خوبی با محلول TKM_2 و SDS مخلوط نشده است.	بهتر است برای اطمینان از خوب مخلوط شدن، آن‌ها را چند بار با سمپلر پیپت کنید و بعد سانتریفوژ نمایید.

جدول ۱۹-۱

۱۹-۱) استخراج DNA از خون با روش جوشاندن

محلول مورد نیاز در جدول ۲۰-۱ نشان داده شده است.

نام بافر	مواد تشکیل دهنده
بافر A	تریس هیدروکلریک ۱۲ میلی‌مولار، گلوکز (یا ساکارز): ۰/۳۲ مولار، $MgCl_2$ ۵ میلی‌مولار، تریتون X-100 ۱٪
بافر B	کلرید سدیم ۰/۳۷ مولار، EDTA ۰/۱۲ مولار
بافر C	محلول NaOH ۵۰ مولار
بافر D	تریس هیدروکلریک یک مولار
بافر Lysis	تریس هیدروکلریک ۰/۱ مولار، EDTA ۵۰ میلی‌مولار، SDS ۱٪
بافر TE	تریس هیدروکلریک ۱۰ میلی‌مولار و EDTA یک میلی‌مولار

جدول ۲۰-۱

مراحل انجام کار:

- به میزان ۰/۵ میلی‌لیتر از محلول ۵٪ EDTA مولار را به ۵ میلی‌لیتر خون اضافه کرده خوب تکان دهید تا مخلوط شود.

- ۰/۵ میلی‌لیتر از محلول فوق را به میکروتیوب ۱/۵ منتقل کنید.
- ۱ میلی‌لیتر از بافر A اضافه کرده ورتکس کنید.
- به مدت ۲ دقیقه در دور 12000 RPM سانتریفیوژ کنید. محلول رویی را دور بریزید.
- مراحل ۳ و ۴ را یک‌بار دیگر تکرار کنید.
- به رسوب سفید، ۱۰۰میکرولیتر محلول C اضافه کرده و ورتکس کنید.
- تیوب‌ها را در حالت در بسته، به صورت شناور(با استفاده از یونولیت) در آب جوش حرارت دهید.
- تیوب‌ها را از آب جوش خارج کرده و ۲۰ میکرولیتر از بافر D به آن اضافه کنید.
- به مدت ۳۰ ثانیه در میکروسانتریفوژ، سانتریفیوژ کنید. محلول رویی حاوی DNA است.
- ۰/۵ میلی لیتر از محلول رویی را به لوله جدیدی منتقل کرده و با دو حجم (۱ میلی‌لیتر) اتانول ۹۵٪ سرد، DNA را رسوب دهید.
- لوله‌ها را به مدت ۱۰ دقیقه در ۱۲۰۰۰ دور سانتریفوژ کنید.
- محلول رویی را دور ریخته و رسوب را با الکل ۷۰٪ شسته و خشک نمایید.
- رسوب DNA را در ۵۰ میکرولیتر بافر TE حل کنید.

نکات مهم

- جهت لیز مؤثرتر RBCها می‌توان در ابتدا آب مقطر اضافه کرد.
- NaOH موجود در بافر D سبب تخریب دیواره هسته شده و محتویات آن بیرون می‌ریزد. ضمناً سبب رسوب پروتئین‌ها می‌شود. جوشاندن نیز سبب تخریب و لیز

بیشتر می‌شود.

- استفاده از بافر تریس در انتها سبب رسوب پروتئین‌ها می‌شود.

۲۰-۱) استخراج DNA از خون با استفاده از سیلیکا ژل

مواد مورد نیاز در جدول ۲۱-۱ نشان داده شده است.

نام بافر	مواد تشکیل دهنده
محلول گوانیدین	M GuSCN, 20 mM EDTA, 10 mM Tris-HCl (6.5 pH), 40 g/lTriton X-100 and 10 g/l DTT
مخلوط اتصال‌دهنده	4 g ژل سیلیکا در 100 ml محلول گوانیدین
محلول شست‌وشو	25% Ethanol, 100 mM NaCl and ایزوپروپانل 10 mM Tris-HCl (pH 8.0)

جدول ۲۱-۱

تمام مواد فوق در دمای اتاق نگه‌داری شوند.

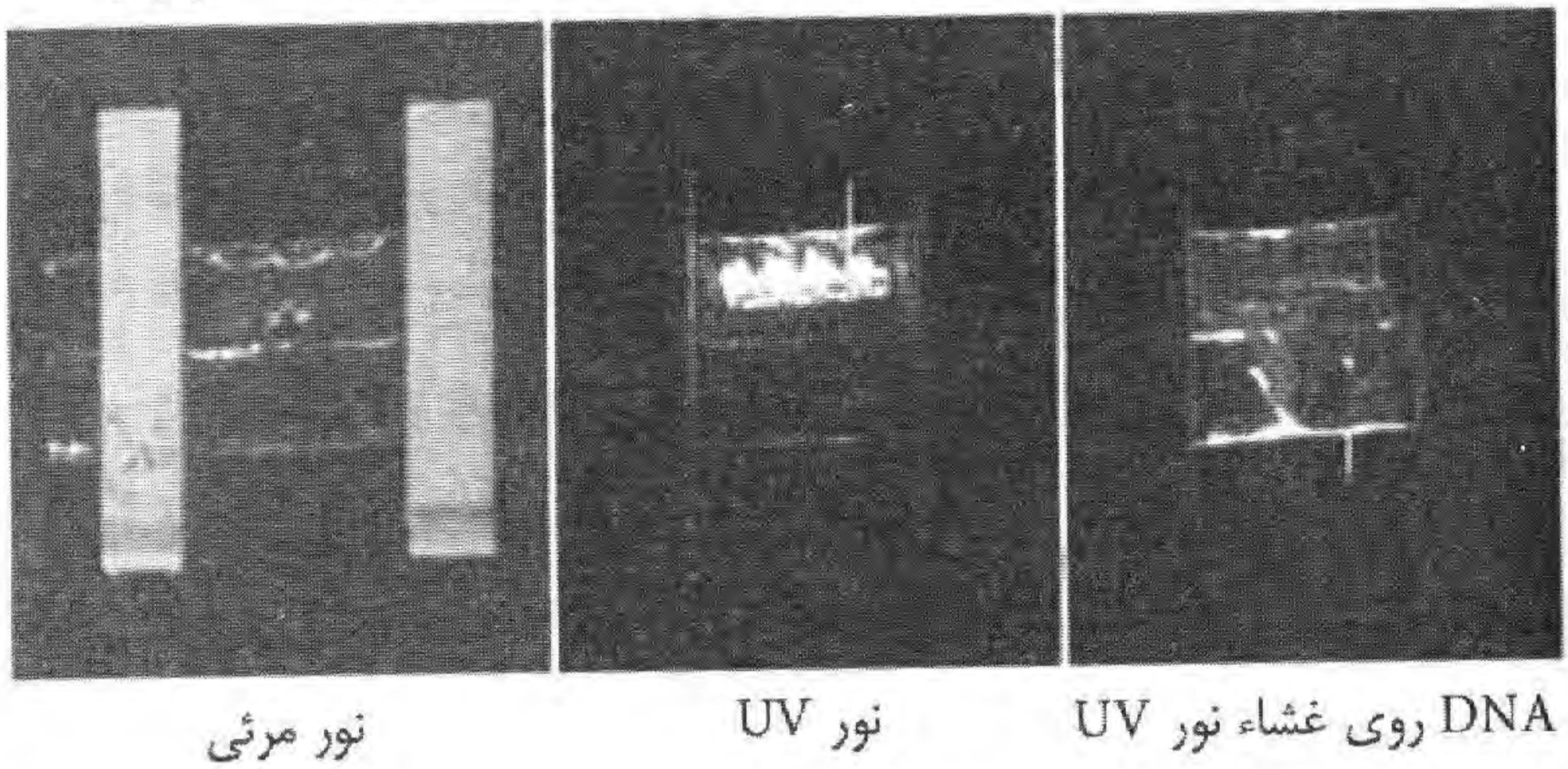
روش کار:

- در لوله‌ای به 0.5 ml از خون حاوی EDTA 50 mM به عنوان ضد انعقاد، 1 ml از مخلوط اتصال‌دهنده افزوده و خوب مخلوط کنید.

- در دمای اتاق به مدت ۳ دقیقه انکوبه کنید.
- لوله را به مدت کوتاهی سانتریفیوژ نمایید (۳ ثانیه 5000 g).
- محلول رویی را دور ریخته و شست‌وشوی ژل را با محلول گوانیدین انجام دهید.
- ژل را دو مرتبه با محلول ایزوپروپانل شستشو دهید.
- ژل را یک مرتبه با اتانول مطلق شست‌وشو دهید. اتانول را به طور کامل با حرارت یا خلأ حذف نمایید و ژل را خشک کنید.
- 100 µl بافر TE را به ژل سیلیکا افزوده و آن را مخلوط کنید و به مدت ۳ دقیقه در 65 °C گرم نمایید.
- مخلوط را دوباره به‌هم زده و سپس برای ۱۰ ثانیه سانتریفیوژ کنید.
- محلول رویی حاوی DNA است که به لوله‌ی جدیدی منتقل می‌شود.

۲۱-۱) استخراج DNA از ژل آگارز

برای خالص‌سازی DNA از ژل آگارز از روش‌های مختلفی استفاده می‌شود. در همه‌ی آن‌ها ابتدا قسمتی از ژل رنگ‌آمیزی‌شده با اتیدیم برماید که در زیر نور UV دیده می‌شود حاوی باند دل‌خواه است، با استفاده از تیغ جدا می‌گردد و تا جایی‌که ممکن است، قسمت‌های اضافه حذف می‌شوند. از آن‌جایی‌که نور UV سبب شکستن DNA می‌شود باید سعی شود مواجهه DNA با نور UV به حداقل برسد (شکل ۲۲-۱).



شکل ۲۲-۱: استخراج DNA از ژل آگارز. قسمتی از ژل رنگ‌آمیزی‌شده با اتیدیم برماید که در زیر نور UV دیده می‌شود و حاوی باند دل‌خواه است، با استفاده از تیغ جدا می‌گردد و حداکثر قسمت‌های اضافه حذف می‌شود.

۲۲-۱) روش الکتروالوشن[1]

قطعه‌ی آگارز در کیسه‌ی دیالیز با مقدار کمی از بافر الکتروفورز تازه قرار می‌گیرد و دو طرف کیسه دیالیز مسدود شده و کیسه درون تانک الکتروفورز قرار می‌گیرد. جریان الکتریسیته سبب خروج DNA از ژل شده، اما درون کیسه محبوس می‌ماند. قبل از خروج کیسه از تانک برای مدت کوتاهی جریان برق معکوس شده تا

1- Electroelution

مولکول‌های DNA از دیواره‌ی کیسه جدا شوند و به درون بافر کیسه وارد شوند. سپس بافر کیسه جمع‌آوری شده و DNA با استفاده از اتانل رسوب داده می‌شود.

این روش نسبت به روش‌های دیگر زمان‌بر است اما بازده آن مناسب بوده و بهترین تکنیک جمع‌آوری قطعات بزرگ DNA بزرگ‌تر از 5 Kb می‌باشد.

۲۳-۱) استخراج DNA از ژل آگارز با استفاده از سیلیکا ژل

در یک محیط با غلظت بالای نمک که خنثی است یا pH پایین دارد، DNA به ژل سیلیکا (پودر شیشه) یا خاک دیاتومه، به طور محکمی، متصل می‌شود. از این پدیده، که در واقع اتصال مولکول‌های با بار منفی DNA به ذرات سیلیکا با بار مثبت می‌باشد، برای خالص‌سازی DNA از ناخالصی‌ها استفاده می‌شود. این روش برای قطعات کوچک زیر 100 bp مناسب نمی‌باشد؛ زیرا جداسازی و الوشن این قطعات از ذرات شیشه به سختی انجام می‌شود. ذرات شیشه یا سیلیکا را می‌توانیم خودمان تهیه کنیم و یا به صورت تجاری خریداری نماییم.

مواد و محلول‌های مورد نیاز در جدول ۲۳-۱ نشان داده شده است.

نام بافر	مواد تشکیل دهنده
سوسپانسیون سیلیکا	2 g سیلیکا را باید در 15 ml آب ریخته و ۳ مرتبه با سانتریفیوژ در دور ۲۰۰۰ به مدت ۲ دقیقه می‌شوییم و پس از حذف آب به اندازه‌ی دو برابر حجم سیلیکا، به آن آب افزوده می‌افزاییم.
محلول شست‌وشوی سیلیکا	۵۰ میلی‌مولار NaCl، ۱۰ میلی‌مولار تریس 7.5 pH و ۵/۲ EDTA میلی‌مولار در اتانل ۵۰٪ می‌باشد.
محلول ۶ مولار NaI	به دلیل حساسیت به نور باید در تاریکی و در شیشه‌ی تیره نگه‌داری شود. اگر این محلول زرد شده باشد می‌توانید با افزودن محلول ۱۰٪ اسید استیک به اندازه‌ی ۱/۲۰۰ حجم اولیه، کارایی آن را به حال اول برگردانید.

جدول ۲۳-۱

روش کار

این روش برای پاک‌سازی نمونه‌های حاوی DNA مانند حذف‌کردن مواد واکنش PCR، واکنش‌های هضم آنزیمی و نیز به منظور تغلیظ آن‌ها نیز استفاده می‌شود.

❖ مرحله‌ی آماده‌سازی نمونه: قطعه‌ی ژل حاوی DNA به مدت ۵ دقیقه در 55°C حرارت داده شده تا ذوب شود. اگر نمونه محلول است در حد ۱/۱۰ حجم آن، باید

محلول هیدروکسید سدیم ۳ مولار افزوده شود تا pH آن به زیر ۷ برسد.

❖ مرحله‌ی اتصال به سیلیکا: حجم مناسبی از سوسپانسیون سیلیکا به نمونه افزوده شود. حدود 200 ng از DNA به هر ul از سوسپانسیون DNA متصل می‌شود. پس از افزودن سوسپانسیون خوب هم‌زده می‌شود. سپس رسوب سیلیکا با سانتریفیوژ کوتاه و در دور حداکثر جدا شده و سه مرتبه با 500 ul محلول شست‌وشو شسته می‌شود و با برگرداندن تیوب محلول شست‌وشو، کاملاً از رسوب حذف می‌شود و با خشک‌کردن در هوا اتانول آن کاملاً تبخیر می‌شود.

❖ مرحله‌ی جداسازی DNA از سیلیکا: مقدار دل‌خواه از بافر تریس ۱۰ میلی‌مولار یا بافر TE یا بافر آنزیم‌های محدودکننده در صورت این‌که قرار است DNA توسط آنزیمی هضم رسوب سیلیکا شود، به رسوب سیلیکا اضافه شود. مخلوط به مدت ۵ دقیقه در 60 °C گرم شده سپس با سانتریفوژ به مدت ۲ دقیقه در حداکثر دور سیلیکا رسوب داده شده و محلول رویی که حاوی DNA است به یک تیوب جدید منتقل شود.

۲۴-۱) جداسازی مقادیر بسیار کم DNA از مقاطع بافتی به روش سیلیکا ژل

DNA را می‌توان از هر بافتی استخراج و تهیه نمود که البته با توجه به محتویات اصلی بافت‌ها، روش‌ها متفاوت می‌شوند. جهت مطالعات ژنتیکی، DNA معمولاً از نمونه خون جدا می‌شود. در مواردی که دسترسی به بیمار نبوده می‌توان از نمونه‌های آرشیوی که معمولاً پارافینه و یا اسلایدهای رنگ‌شده هستند، خالص‌سازی را انجام داد.

برای بازیابی DNA در حد کم‌تر از یک میکروگرم برای PCR از بافت‌هایی که با مواد شیمیایی متفاوتی مانند پارافین، چسب‌های اسلاید آغشته شده‌اند، ابتدا بافت باید در معرض حلال‌های آلی مانند تولوئن و گزیلن قرار گیرد تا آن عوامل حذف و پاک شوند. گزیلن اکثر مواد شیمیایی در چسب‌ها و پارافین را حل می‌کند.

به این منظور، بافت را در حداقل ۱۰ حجم گزیلن قرار داده و در دمای اتاق به مدت ۳۰ دقیقه با ورتکس متناوب مخلوط نمایید. با سانتریفیوژ در 10000 RPM به مدت ۳۰ ثانیه بافت رسوب می‌کند. بافت را مجدداً در گزیلن تازه قرار داده و دوباره ورتکس و سانتریفیوژ کنید. بافت را در اتانول ۹۵٪ قرار داده و مجدد سانتریفیوژ نمایید. شست‌وشو با اتانول را حداقل یک‌بار دیگر تکرار کنید. بافت را با استفاده از خلأ خشک نمایید. حداقل 100 µl از محلول 6 M Gu-HCl یا 6 M GuSCN به بافت اضافه شود و مخلوط گردد. مخلوط به مدت ۱۵–۱۰ دقیقه در دمای اتاق و اگر بافت حاوی مقدار زیادی کراتین است (مانند ناخن) در دمای 60 °C انکوبه شود تا پروتئین‌ها حل شوند. 10 µl از پودر سیلیکا را اضافه کرده و برای ۵ دقیقه در 57 °C انکوبه کنید و گاه گاهی مخلوط نمایید تا ذرات سیلیکا با محلول در تماس کامل باشند. بقیه‌ی مراحل مانند آن‌چه در قسمت‌های قبل گفته شد، ادامه می‌یابد.

چند نکته‌ی مهم

- ترکیبات گوانیدین مانند گوانیدین هیدروکلرید یا گوانیدین تیوسیانات سبب حل‌شدن ژل آگارز (چه از نوع استاندارد و چه آگارز با نقطه ذوب پایین) می‌شوند.
- روش‌های استفاده از سیلیکا ژل بسیار سریع بوده (حدود ۲۰ دقیقه) و از سایر روش‌ها آسان‌تر است.

- استفاده از یدید پتاسیم می‌تواند سبب تغییراتی در مولکول DNA شود.
- وقتی از روش سیلیکا استفاده می‌شود نباید از بافر تریس بورات (Tris-Borate-EDTA) استفاده شود؛ زیرا مانع اتصال DNA به سیلیکا می‌گردد.
- با استفاده از سیلیکا می‌توان قطعات بزرگ DNA را جدا نمود البته باید در مورد قطعات بسیار بزرگ بالاتر از 20 Kb، به دلیل احتمال شکستن آن‌ها احتیاط نمود.
- از آن‌جا که سایر مولکول‌ها مانند RNA و پروتئین‌ها به ذرات سیلیکا نمی‌چسبند، این روش برای خالص‌سازی DNA از مخلوطهای واکنش بسیار مناسب می‌باشد.
- از آن‌جا که قطعات کوچک DNA (حدود زیر 50 bp) به ذرات سیلیکا نمی‌چسبند برای جداسازی الیگونوکلئوتیدها یا نوکلئوتیدهای کوچک استفاده می‌شود. پرایمرها، نوکلئوتیدهای آزاد، اضافات لینکرها، آنزیم‌ها و نمک‌ها، بقایای فنل، کلروفرم و اتیدیم برماید از DNA جدا می‌شوند. این روش برای جداسازی یک محصول PCR، وقتی فقط یک باند تکثیر می‌شود، مناسب است؛ اما برای جداسازی چند محصول باید از روش الکتروفورز استفاده کرد. DNA خالص‌شده برای هر واکنش بیولوژی مولکولی مانند هضم آنزیمی، کلونینگ، سکوئنسینگ و غیره مناسب است. ذرات ریز سیلیکا واکنش‌ها را منع نمی‌کنند و بنابراین می‌توان از ذرات سیلیکای متصل‌شده به DNA برای واکنش‌های مختلف بدون الوشن DNA استفاده کرد.

❖ از روش سیلیکا می‌توان در اهداف زیر استفاده نمود:

- خالص‌سازی از هر نوع آگارز
- تغلیظ DNA یا تعویض بافر و یا حذف نمک‌ها
- حذف پروتئین‌ها بعد از واکنش‌های هضم آنزیمی یا دفسفریلاسیون
- حذف نوکلئوتیدهای آزاد، پرایمرها، پرایمر دایمر و آنزیم‌های استفاده شده در واکنش PCR و یا واکنش‌های نشان‌گذاری[1]
- حذف لینکرهای اضافه
- حذف بقایای فنل، کلروفرم و اتیدیم برماید
- خالص‌سازی DNA پلاسمید آزاد از لیز باکتریایی
- اگر سوسپانسیون پودر سیلیکا آب خود را از دست داده و خشک شده بود تنها با افزودن آب مقطر هم حجم پودر سیلیکا می‌توان آن را استفاده نمود.
- پودر سیلیکا باید در یخچال نگه‌داری شود.

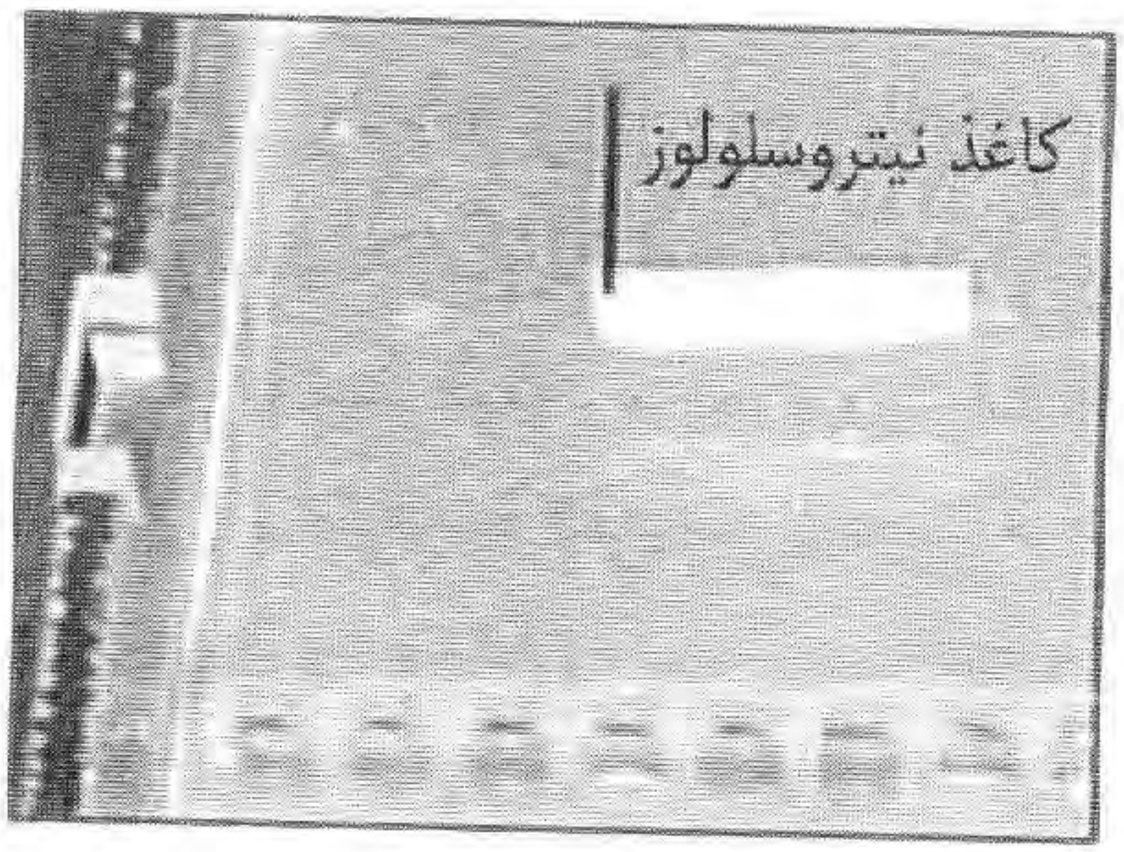
۲۵-۱) روش الکتروفورز بر روی غشاهای سلولزی DEAE

در غلظت‌های کم نمک، مولکول‌های DNA با اتصالات قوی به غشاهای سلولزی DEAE می‌چسبند. قطعات DNA بر روی ژل آگارز الکتروفورز می‌شوند تا کاملاً جدا-سازی انجام شود. سپس قطعه کاغذ نیتروسلولزی را جلوی قطعه فیکس کرده تا حرکت نکند. در طی الکتروفورز باند موردنظر روی کاغذ نیتروسلولز قرار می‌گیرد و سپس کاغذ برداشته شده و در بافر نمکی با غلظت کم (150 mM NaCl, 50 mM Tris, 10 mM EDTA) قرار گرفته و شسته می‌شود. سپس در محلول نمکی با غلظت بالا

1- Labellling

(1 M NaCl, 50 mM Tris, 10 mM EDTA) به مدت ۳۰ دقیقه در دمای 60 °C انکوبه می‌شود تا DNA از کاغذ خارج شود. پیشرفت اتصال DNA به غشا و خروج آن را می‌توان در زیر نور UV بررسی نمود. DNA درون محلول به وسیله‌ی اتانول رسوب داده می‌شود (شکل ۲۴-۱).

این روش بسیار ساده است و DNA بسیار تمیز و خالصی حاصل می‌شود؛ اما برای قطعات بزرگ‌تر از 5 Kb مناسب نمی‌باشد؛ زیرا جداسازی آن‌ها از غشا به راحتی انجام نمی‌شود.



شکل ۲۴-۱: روش الکتروفورز بر روی غشاهای سلولزی در غلظت‌های کم نمک. مولکول‌های DNA با اتصالات قوی به غشاهای نیتروسلولزی می‌چسبند. قطعات DNA بر روی ژل آگارز الکتروفورز شده تا کاملاً جداسازی انجام شود. سپس قطعه کاغذ سلولزی را جلوی قطعه فیکس می‌کنیم تا حرکت نکند. در طی الکتروفورز، باند مورد نظر روی کاغذ قرار می‌گیرد و سپس کاغذ برداشته شده و در بافر نمکی با غلظت کم قرار گرفته و شسته می‌شود. پس از آن کاغذ در محلول نمکی با غلظت بالا انکوبه می‌شود تا DNA از کاغذ خارج شود. پیشرفت اتصال DNA به غشا و خروج آن را می‌توان در زیر نور UV بررسی نمود.

۲۶-۱) روش استفاده از ژل آگارز با نقطه ذوب پایین[1]

آگارز با نقطه ذوب پایین نسبت به آگارزهای استاندارد، نقطه ذوب پایین‌تری داشته و در دمای $65^{\circ}C$ ذوب می‌شود که پایین‌تر از نقطه ذوب بسیاری از مولکول‌ها، به جز مولکول‌های دو رشته‌ای کوچک DNA، می‌باشد. بعد از الکتروفورز روی این نوع ژل، قطعه‌ی ژل بریده شده و پس از افزودن مقدار کمی بافر در دمای $65^{\circ}C$ ذوب می‌شود. سپس DNA را می‌توان به روش‌هایی با استفاده از فنل و کلروفرم و یا سیلیکاژل خالص نمود و یا با استفاده از اتانل رسوب داد.

❖ این نوع آگارز نیز از واحدهای مکرر گالاکتوز ساخته شده است، اما پیوندهای متقاطع آن کم‌تر از آگارز معمولی است و در نتیجه در دمای پایین‌تری ذوب می‌شود.

۲۷-۱) استخراج DNA از ژل اکریل آمید

در این روش برش ژل پلی اکریل آمید در یک میکروتیوب، با نوک سمپلر پلاستیکی خرد می‌شود و در محلول الوشن نمکی با غلظت بالا در دمای $37^{\circ}C$ برای چندین ساعت انکوبه می‌گردد. قطعات ژل به‌وسیله‌ی سانتریفیوژ یا با عبور از فیلتر حذف می‌گردند و DNA به واسطه‌ی اتانل و یا روش سیلیکا ژل رسوب داده می‌شود.

1- Low Melting Point

۲۸-۱) روش استفاده از استخراج DNA از اسپرم و ریشه مو

استخراج DNA از اسپرم با روش‌های متداول ذکرشده امکان‌پذیر است؛ اما به جهت این‌که اسپرم مقدار زیادی کلسترول و نمک دارد، با استفاده از بافر فسفات نمکی، مقادیر کلسترول و نمک از رسوب شست‌وشو داده می‌شود و سپس از روش‌های ذکرشده می‌توان در ادامه استخراج استفاده نمود. در مورد ریشه مو قبل از استفاده از روش‌های ذکرشده، باید با اتانل ۷۰ ٪ چربی‌زدایی شود. سپس در روی یک کاغذ صافی در دمای 65 C خشک گردد. ۰/۵ سانتی‌متر از قسمتی که حاوی ریشه‌های مو است را با قیچی جدا می‌کنیم و در داخل تیوب حاوی ۱۰۰ میکرولیتر بافر 200 mM NaoH و 50 mM DTT قرار داده و ۱۵ دقیقه در دمای 97 C حرارت می‌دهیم و سپس سایر مراحل، طبق روش‌های ذکرشده انجام می‌شود. این نمونه‌ها به خصوص در پزشکی قانونی و مطالعات دام‌پزشکی اهمیت زیادی دارند.

۲۹-۱) استخراج پلاسمید

روش‌های کلاسیک جداسازی پلاسمید DNA از میکروب‌ها، برای تهیه‌ی پلاسمید در مقیاس‌های کم آزمایشگاهی مناسب می‌باشند. این روش‌ها شامل مراحل لیز قلیایی سلول‌های میزبان حاوی پلاسمید، خنثی‌سازی به وسیله‌ی نمک‌های استات که منجر به رسوب DNA ژنومی و پروتئین‌ها می‌گردد و سانتریفیوژ برای حذف رسوب می‌باشند. بعد از این مراحل، فاز آبی حاوی پلاسمیدهای DNA بوده که به وسیله‌ی الکل رسوب داده می‌شوند.

در روش لیز قلیایی، سوسپانسیون‌های باکتریایی در معرض دترجنت‌های آنیونی با

pH بالا قرار می‌گیرند که در نتیجه دیواره‌ی سلولی آن‌ها شکسته و کروموزوم ژنومی و پروتئین‌ها دی‌نیچر می‌شوند و پلاسمید به درون سوپرنیتانت رها می‌گردد. بعد از تغییر pH و خنثی‌شدن آن، زنجیره‌های پلاسمید که از هم باز شده‌اند، مجدداً شکل اولیه‌ی خود را باز می‌یابند.

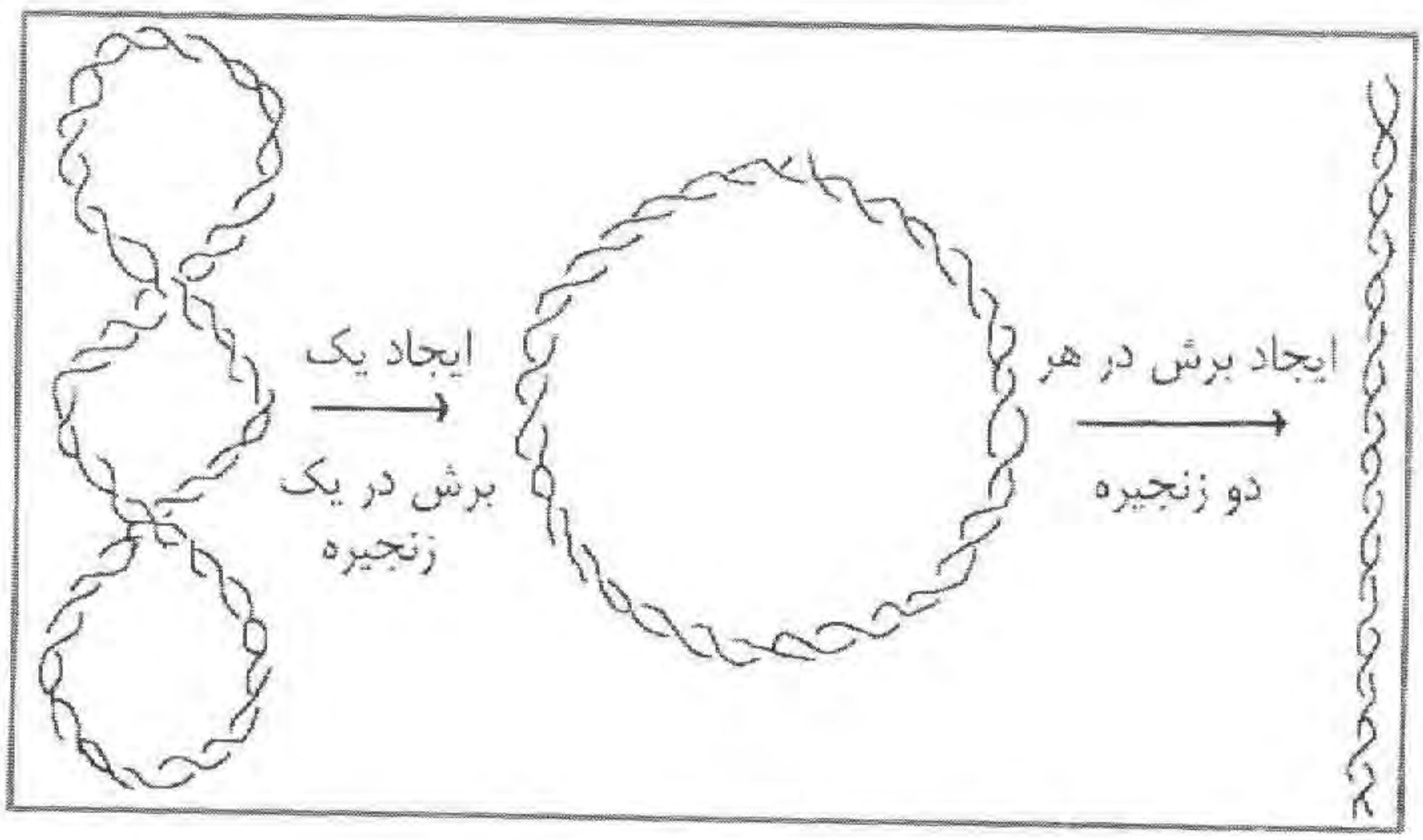
نکته‌ی اساسی که استخراج پلاسمید را از DNA متفاوت می‌کند، مرحله‌ی جداسازی DNA ژنومی از پلاسمیدهای حلقوی است.

- جداسازی بر اساس شکل: به روش لیز قلیایی تمام فرم‌های پلاسمید شامل فرم ۱: سوپرکویل[1]، فرم ۲: حلقوی فاقد پیچش[2] و فرم ۳: خطی‌شده[3] با هم رسوب کرده و برای جداسازی آن‌ها می‌توان از روش‌های مختلفی مانند الکتروفورز بر روی ژل آگارز و خالص‌سازی از روی ژل، استفاده از شیب سزیم-کلرید و سانتریفیوژ ایزوپیکنیک، کروماتوگرافی بر اساس اندازه، تعویض یون و کروماتوگرافی فاز معکوس استفاده کرد. شکل ۲۵-۱ انواع پلاسمید را نشان می‌دهد.

- جداسازی بر اساس اندازه: اگر سلول‌ها در شرایط کنترل‌شده و با احتیاط لیز شوند، فقط مقدار اندکی از DNA کروموزومی شکسته می‌شود. قطعات DNA حاصل، معمولاً به اندازه‌ای بزرگ (بزرگ‌تر از پلاسمیدها هستند) که پس از سانتریفیوژ به همراه بقایای سلولی حذف می‌شوند. این پروسه با این واقعیت که کروموزوم‌های باکتریایی به طور فیزیکی به غشای سلولی متصل می‌باشند

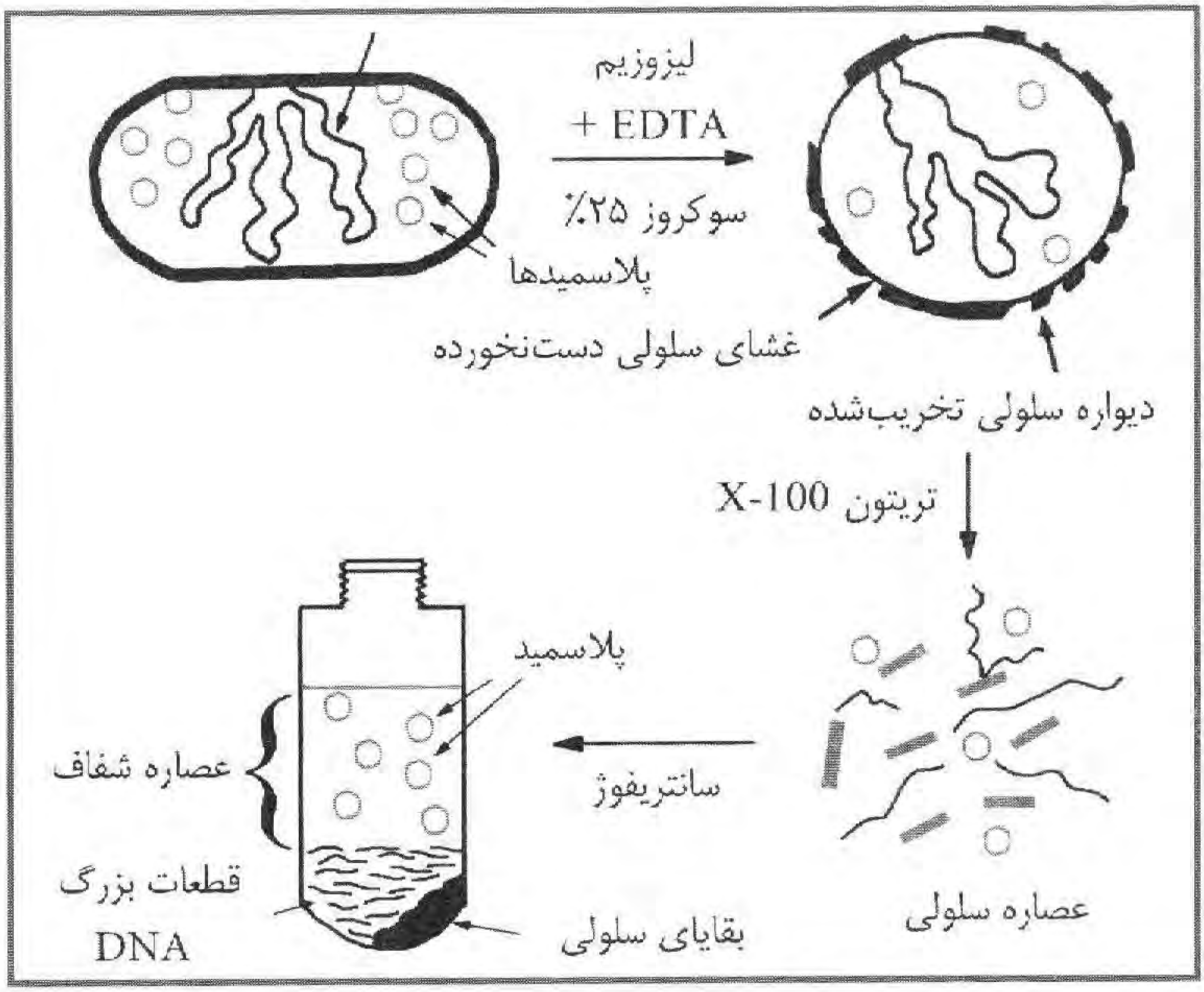
1- Supercoiled
2- Nicked Circle
3- Linearized

نیز تشدید می‌شود. روش استفاده از اندازه، همیشه به تنهایی مناسب نیست و بهتر است از راه‌های دیگر مانند تفاوت‌های شکلی استفاده شود.

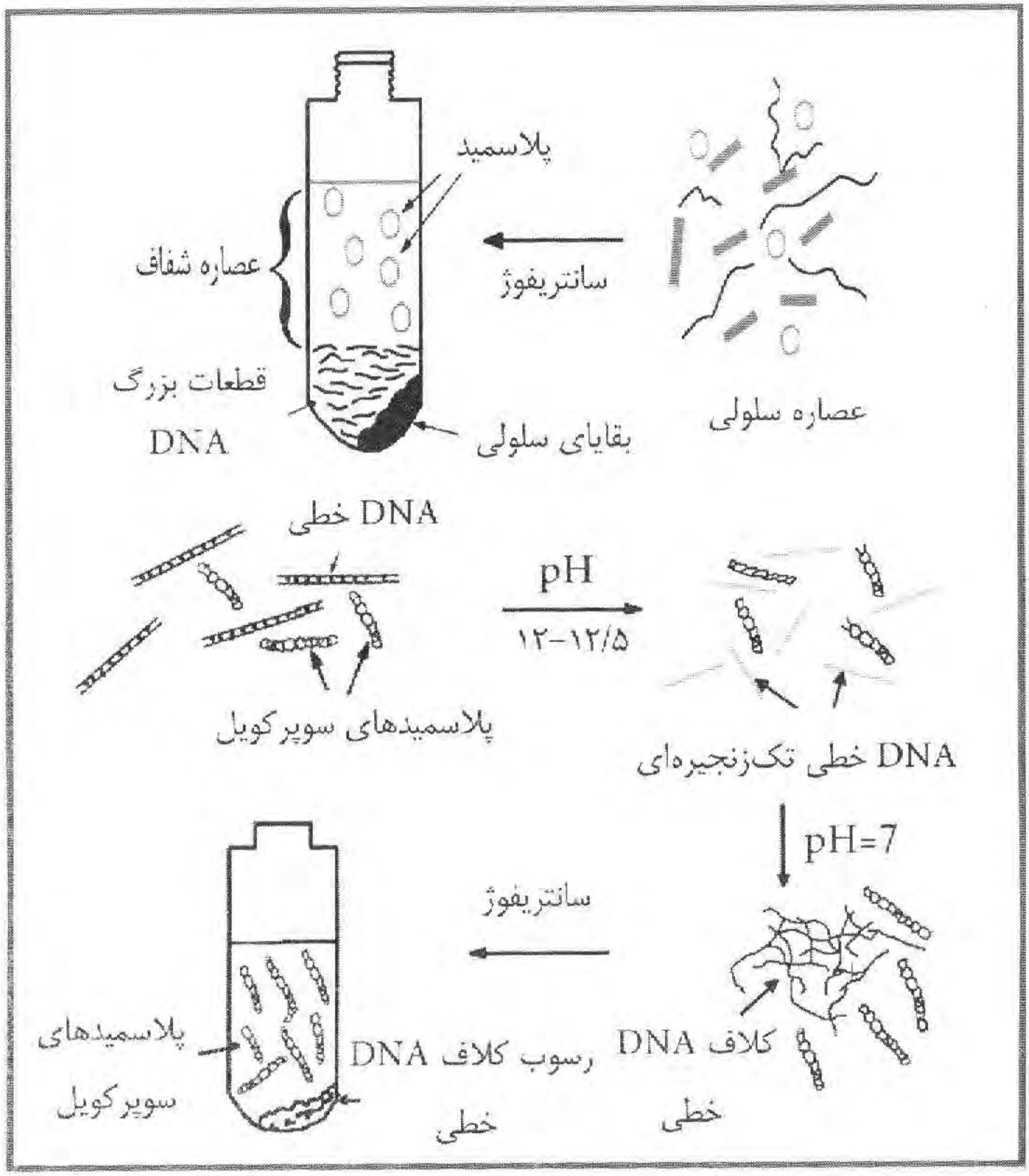


شکل ۲۵-۱: شکل‌های مختلف یک پلاسمید. پلاسمیدها در صورتی‌که دارای پیچش‌های زیاد در رشته‌های خود باشند سوپرکویل نامیده می‌شوند بوده و در صورتی‌که یک رشته آن‌ها بریده شود پیچش‌ها باز شده و در صورتی‌که در هر دو رشته برشی ایجاد شود پلاسمید به صورت خطی در می‌آید. از تفاوت در شکل پلاسمید می‌توان در جداسازی آن‌ها بهره جست. حرکت این شکل‌های متفاوت پلاسمید در الکتروفورز نیز متفاوت است.

- لیز کنترل‌شده‌ی باکتری‌ها: تخریب سلولی اگر به آرامی و کنترل‌شده صورت گیرد از شکستن DNA ممانعت می‌شود. تیمارکردن باکتری E. coli با EDTA و لیزوزیم در حضور سوکروز از تخریب انفجاری باکتری‌ها ممانعت می‌کند و اسفروپلاست‌ها حاصل می‌شوند که در واقع دارای دیواره‌های سلولی نیمه تخریب‌شده و غشای سلولی کامل و دست‌نخورده هستند. سپس لیز سلولی با استفاده از دترجنت‌های غیر یونی، مانند تریتون X-100 انجام می‌شود. دترجنت‌های یونی مانند SDS، سبب شکسته‌شدن کروموزوم‌ها می‌شوند. در این روش، DNA کروموزومی شکسته نمی‌شود و در نتیجه عصاره‌ی بسیار شفافی به‌دست می‌آید که حاوی پلاسمیدهای سلولی می‌باشد (شکل ۲۶-۱).
- روش لیز قلیایی: این روش گرچه دارای مراحل متعدد است و نیاز به بافرها و محلول‌های مختلفی دارد، اما متداول‌ترین روش جهت جداسازی پلاسمید در آزمایشگاه‌ها می‌باشد. کیت‌های تجاری متعددی نیز بر اساس همین روش در دسترس می‌باشند. شکل ۲۷-۱ مراحل جداسازی پلاسمید را نشان می‌دهد.
- روش دیگر بهره برداری از روش سزیم کلرید می‌باشد.



شکل ۲۶-۱: لیز کنترل‌شده‌ی باکتری‌ها. تیمارکردن باکتری E. coli با EDTA و لیزوزیم در حضور سوکروز از تخریب انفجاری باکتری‌ها ممانعت می‌کند و اسفروپلاست‌ها حاصل می‌شوند که در واقع حاوی دیواره‌های سلولی نیمه تخریب‌شده و غشای سلولی کامل و دست‌نخورده هستند. سپس لیز سلولی با استفاده از دترجنت‌های غیریونی مانند تریتون X-100 انجام می‌گردد. (دترجنت‌های یونی مانند SDS سبب شکسته‌شدن کروموزوم‌ها می‌شوند). در این روش DNA کروموزومی شکسته نمی‌شود و در نتیجه عصاره‌ی بسیار شفافی بدست می‌آید که حاوی پلاسمیدهای سلولی می‌باشد.



شکل ۲۷-۱: روش لیز قلیایی جهت جداسازی DNA پلاسمیدی

دستورالعمل استخراج پلاسمید به روش لیز قلیایی در (مقیاس کم)

مواد مورد نیاز در جدول ۲۸-۱ نشان داده شده است.

نام بافر	مواد تشکیل دهنده
محیط کشت مایع LB[1]	تریپتون 10 g، عصاره‌ی مخمر 5 g، 10 g NaCl مواد فوق با آب مقطر به حجم ۱ لیتر رسانیده می‌شود. برای درست‌کردن محیط جامد، ۱۵ گرم آگار به مواد فوق افزوده می‌شود.
محلول STE	Tris-Cl ۱۰ میلی‌مولار، pH=8، NaCl ۰/۱ مولار، EDTA ۱ میلی‌مولار pH=8
محلول شماره ۱	گلوکز ۵۰ میلی‌مولار، تریس (pH=8) ۲۵ میلی‌مولار، EDTA (pH=8) ۱۰ میلی‌مولار مواد فوق را در ۱۰۰ میلی‌لیتر آب دو بار تقطیرشده حل کرده، اتوکلاو نموده و در یخچال نگه‌دارید.

1- Leuria Bertani

نام بافر	مواد تشکیل دهنده
محلول شماره ۲	هیدروکسید سدیم ۵ نرمال ۱۰ میکرولیتر، SDS ۲٪ ۵۰۰ میکرولیتر مواد فوق را در ۴۹۰ میکرولیتر آب دوبار تقطیرشده استریل حل کنید. این محلول را باید به صورت تازه تهیه کنید.
محلول شماره ۳	پتاسیم استات ۵ مولار ۶۰ میلی‌لیتر، گلاسیال استیک اسید ۱۱/۵ میلی‌لیتر مواد فوق را در ۲۸/۵ میلی‌لیتر آب دوبار تقطیرشده استریل حل کرده و در یخچال نگه‌داری کنید.

جدول ۲۸-۱

روش کار

- باکتری مورد نظر را روی پلیت محیط کشت جامد کشت دهید.
- تک‌کلنی از کشت مورد نظر را در ۱/۵ میلی‌لیتر محیط کشت مایع LB کشت دهید.
- ظرف حاوی محیط کشت را به مدت ۱۸-۱۶ ساعت در انکوبه 37 °C در حالی‌که به آرامی تکان‌داده می شود، قرار دهید.

- هود را روشن کنید و وسایل لازم را به زیر هود منتقل کنید.
- ۱/۵ میلی لیتر از کشت شبانه را در میکروتیوب ۱/۵ میلی‌لیتری وارد کنید.
- به مدت ۳۰ ثانیه در سانتریفیوژ یخچال‌دار ($4^{\circ}C$) با حداکثر سرعت سانتریفیوژ کنید.
- سپس مایع بالایی را دور ریخته و رسوب را نگه دارید.
- ۵۰۰ میلی لیتر از محلول سرد STE به رسوب اضافه کنید.
- مایع موردنظر را به مدت ۳۰ ثانیه در سانتریفیوژ یخچال‌دار، با حداکثر سرعت، سانتریفیوژ کنید.
- مایع بالایی را دور بریزید و رسوب را نگه دارید.
- ۱۰۰ میکرولیتر از محلول سرد شماره ۱ را به رسوب اضافه کنید.
- رسوب را در این محلول ورتکس کنید.
- ۲۰۰ میکرولیتر از محلول تازه‌تهیه‌شده شماره ۲ به مخلوط فوق اضافه کنید.
- ۵ مرتبه میکروتیوب را وارونه کنید.
- میکروتیوب را روی یخ نگه دارید.
- ۱۵۰ میکرولیتر محلول سرد شماره ۳ به میکروتیوب اضافه کنید.
- چند مرتبه میکروتیوب را وارونه کنید.
- به مدت ۵-۳ دقیقه روی یخ قرار دهید.

- به مدت ۵ دقیقه در سانتریفیوژ یخچال‌دار با حداکثر سرعت، سانتریفیوژ کنید.
- مایع بالایی را به میکروتیوب تمیز دیگری منتقل کنید.
- یک حجم فنل-کلروفرم-ایزوآمیل الکل به آن اضافه کنید.
- مخلوط فوق را خوب تکان دهید.
- سپس ۱۰ دقیقه روی یخ نگه دارید.
- به مدت ۱۰ دقیقه در سانتریفیوژ یخچال‌دار، با حداکثر سرعت، سانتریفیوژ کنید.
- فاز مایع بالایی را در میکروتیوب تمیز دیگری بریزید.
- یک حجم کلروفرم-ایزوآمیل الکل با آن اضافه کنید.
- به مدت ۵ دقیقه در سانتریفیوژ بدون یخچال با حداکثر سرعت، سانتریفیوژ کنید.
- فاز مایع بالایی را در میکروتیوب تمیز دیگری بریزید.
- دو حجم اتانل ۱۰۰ درصد به آن اضافه کنید و ورتکس کنید.
- دو دقیقه در دمای اتاق نگه دارید.
- به مدت ۵ دقیقه در سانتریفیوژ یخچال‌دار با حداکثر سرعت، سانتریفیوژ کنید.
- مایع بالایی را دور بریزید و رسوب را نگه دارید.
- ۱ میلی‌لیتر اتانل ۷۰ درصد به رسوب اضافه کنید.
- به مدت ۲ دقیقه در سانتریفیوژ بدون یخچال با حداکثر سرعت، سانتریفیوژ کنید.
- مایع بالایی را دور بریزید و رسوب را نگه دارید.

- رسوب را در مقدار مورد نیاز آب دو بار تقطیر استریل که حاوی 20 μg/ml RNase A باشد، حل کنید.
- سپس در فریزر 20- °C نگه‌دارید.
- بازده استحصال پلاسمید با این روش به تعداد کپی آن در باکتری بستگی دارد و حدود ۵-۳ میکروگرم از هر میلی‌لیتر کشت اولیه‌ی باکتری می‌باشد. بازده پلاسمیدهای نوترکیب با توجه به اندازه و نوع قطعه‌ای که وارد پلاسمید شده است، معمولاً کم‌تر است. بازده کم‌تر از 0.1 μg/ml، نشان‌گر سمی‌بودن پلاسمید برای باکتری است. در مواردی که پلاسمید دارای اندازه‌ی بزرگ باشد احتمال رسوب و حذف آن به همراه DNA وجود دارد.
- در صورتی‌که مراحل شست‌وشوی پلاسمید به دقت انجام نشود، احتمال بروز مشکلات در آزمایشات بیولوژی مولکولی زیاد است؛ مانند مقاومت به هضم توسط آنزیم‌ها.
- پلاسمیدها مستعد هضم در برابر DNase می‌باشند و کلیه‌ی محلول‌ها باید عاری از آن و استریل باشند.
- این روش برای خالص‌سازی پلاسمید از حدود ۲-۱ میلی‌لیتر محیط کشت مناسب است.

۳۰-۱) خالص‌سازی DNA از ذرات فاژ

تفاوت اصلی استخراج DNA فاژ از استخراج پلاسمید این است که فاژها در واقع از یک عصاره‌ی سلولی جدا نمی‌شوند؛ بلکه از محیط کشت جدا می‌شوند؛ بنابراین باکتری‌ها با سانتریفیوژ رسوب‌داده شده و ذرات فاژ از سوسپانسیون جدا شده و DNA با

یک مرحله‌ی حذف پروتئینی پروتئین‌های کپسید فاژ خالص می‌شوند. خالص‌سازی DNA از فاژها نسبت به روش‌های خالص‌سازی پلاسمید و DNA آسان‌تر می‌باشد ولی مشکل اصلی کشت فاژهاست. ذرات فاژ به اندازه‌ای هستند که می‌توان آن‌ها را با سانتریفوژ در سرعت‌های بالا رسوب داد. با استفاده از پلی اتیلن گلیکول (PEG) نیز می‌توان فاژها را رسوب داد. PEG یک پلیمر است که در حضور نمک آب را جذب می‌کند و سبب ایجاد تجمع ماکرومولکول‌ها مانند ذرات فاژ می‌شود. فاژهای رسوب‌داده‌شده سپس با سانتریفیوژ رسوب داده شده و می‌توان در حجم کمی بافر حل کرد. معمولاً رسوب، حاوی مقدار کمی از بقایای سلول‌ها و نیز DNA باکتریایی هستند. برای خالص‌سازی بیشتر می‌توان از شیب سزیم‌کلرید استفاده کرد. جهت حذف پروتئین‌های کپسید فاژ از روش‌های فنل-کلروفرم استفاده می‌شود.

۳۱-۱) بازیابی DNA از واکنش‌های PCR

اگر واکنش PCR حاوی روغن مینرال باشد برای حذف آن ابتدا باید هم‌حجم واکنش، کلروفرم افزود و تیوب را به مدت ۱۵-۱۰ ثانیه ورتکس نمود تا لایه‌ها خوب مخلوط شوند. سانتریفیوژ تیوب واکنش به مدت ۲ دقیقه در یک میکروفیوژ در دور 10000 RPM سبب جداسازی دو فاز آبی و آلی از هم می‌شود. فاز بالایی حاوی DNA یا محصول PCR است و به یک لوله‌ی جدید منتقل شود.

برای خالص‌سازی DNA می‌توان از روش‌های مختلف مانند سیلیکا ژل و یا فنل-کلروفرم استفاده نمود.

۳۲-۱) عیب‌یابی در روش‌های استخراج از ژل

جدول ۲۹-۱ مشکلات عمده در استخراج DNA از ژل را نشان می‌دهد.

بازده کم DNA	
راه حل	**مشکل احتمالی**
دمای انکوباسیون برای حل‌کردن باید 57°c باشد. میزان محلول اضافه‌شده به ژل کافی نیست. میزان گوانیدین هیدروکلرید افزوده‌شده، حداقل باید سه برابر حجم ژل باشد.	ژل آگارز کاملاً حل نشده است.
مخلوط DNA با سیلیکا باید هر ۳-۲ دقیقه به‌هم زده شود. سیلیکای رسوب‌کرده نمی‌تواند با محلول DNA تماس داشته باشد.	مخلوط‌کردن کافی نیست.
مطمئن باشید که اتانل استفاده‌شده برای درست‌کردن محلول شست‌وشو ۹۵٪ یا ۱۰۰٪ باشد. محلول شست‌وشو را در 20°c- نگه‌داری کنید تا از تبخیر و تغییر درصد الکل ممانعت شود.	غلظت اتانل در محلول شست‌وشو کم‌تر از ۵۰٪ است.

راه حل	مشکل احتمالی
قبل از الوشن DNA، محلول شست‌وشو باید با استفاده از نوک پیپت کاملاً حذف شود و رسوب کاملاً در هوای به طور کامل آزاد خشک شود.	اتانل محلول شست‌وشو در رسوب در طی مراحل الوشن باقی می‌ماند.
رسوب را با استفاده از خلأ به مدت طولانی خشک نکنید.	رسوب خیلی خشک شده است.
مقداری از بافر شست‌وشو در طی الوشن در رسوب DNA باقی مانده است. قبل از الوشن باید محلول شست‌وشو با پیپت حذف شده و رسوب کاملاً در هوای آزاد خشک شود.	واکنش‌های آنزیمی با استفاده از DNA استخراجی انجام نمی‌شود.

جدول ۲۹-۱

یادداشت:

فصل ۲

RNA

۱-۲) استخراج RNA

استخراج RNA، همانند خالص‌سازی DNA، به چند مرحله‌ی اصلی مانند تخریب سلول‌ها و بافت‌ها، دناتوراسیون کمپلکس‌های نوکلئوپروتئینی و غیرفعال کردن نوکلئازها (RNase برای RNA) وابسته است.

RNA مولکولی ناپایدار است و نیمه عمر کوتاهی دارد، بنابراین باید از نمونه‌های تازه یا فیکس‌شده استخراج شود. RNA در مقابل آنزیم‌هایی چون RNase ناپایدار است؛ بنابراین تکنیک‌های آزمایشگاهی استخراج RNA باید مبتنی بر روش‌های عاری از RNase باشد. دناتورانت‌های قوی برای جلوگیری از فعالیت‌های RNase استفاده می‌شوند که روی RNA تأثیر مخرب چندانی ندارند. هم‌چنین RNaseها مقاوم به حرارت‌اند و اگر تحت دناتوراسیون قرار بگیرند دوباره می‌توانند فعالیت خود را به‌دست آورند، نیاز به کوفکتور ندارند و به سختی غیرفعال می‌شوند. بنابراین در استخراج RNA حذف مواد زائد اهمیت زیادی دارد و استفاده از ترکیباتی چون تریزول (TRIZOL)، کلروفرم و ایزوپروپانل باعث حذف لیپیدها، کربوهیدرات‌ها، پروتئین‌ها،

DNA و سایر ناخالصی‌ها می‌شود. روش‌های متفاوتی برای استخراج RNA وجود دارد که بسته به نوع بافت (بافت پارافینه یا تازه)، نوع RNA استخراج‌شده (RNA ویروسی) و استفاده از کیت‌های تجاری، متنوع است.

- در صورت آلودگی RNA استخراج‌شده با DNA و انجام نسخه‌برداری معکوس و سپس PCR، DNA نیز می‌تواند به عنوان الگویی برای PCR عمل کند و سبب نتایج نادرست گردد. کنترل مناسب جهت بررسی آلودگی واکنش با DNA ژنومی یک واکنش شاهد است که در آن مرحله‌ی نسخه برداری معکوس انجام نشده است. مرحله هضم با DNaseI عاری از RNase، می‌تواند سبب این آلودگی گردد.

- درصورتی‌که یک ژن شناخته‌شده مورد بررسی می‌باشد، می‌توان پرایمرها را به صورتی طراحی کرد که یک اینترون را در بر بگیرند؛ لذا در صورتی‌که آلودگی DNA وجود داشته باشد محصول به‌دست‌آمده حاوی اینترون خواهد بود؛ ولی محصولات تکثیرشده از روی نسخه‌های mRNA فاقد آن می‌باشند. به این ترتیب، DNA محصول بزرگ‌تری نسبت به محصول mRNA را تولید خواهد کرد. این روش RT-PCR تمایزی اینترون[1] نامیده می‌شود.

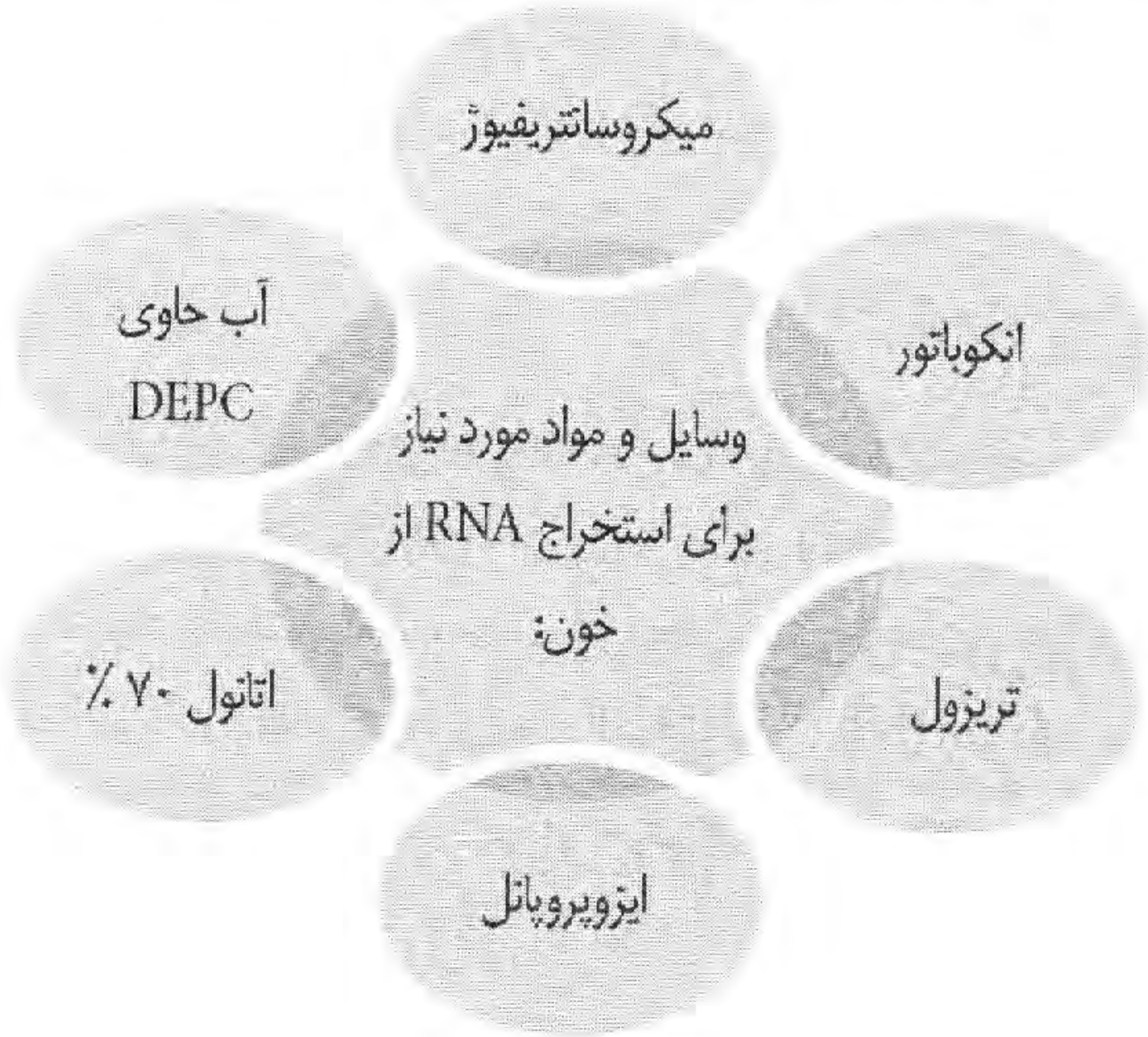
- در صورتی‌که نسخه‌های یک mRNA با فراوانی کم مورد بررسی است، استفاده از mRNA خالص‌شده، سبب افزایش موفقیت کار می‌شود؛ زیرا غلظت نسبی mRNA هدف، بسیار بیشتر از RNA تام سیتوپلاسمی خواهد بود. انواع بسیاری از کیت‌ها با کاربری آسان را، که اساس آن‌ها اتصال Oligo-dT به دم پلی A

1- Intron–Differential RT-PCR

موجود در انتهای ′۳ mRNA یوکاریوت‌ها می‌باشد، می‌توان برای خالص‌سازی mRNA استفاده نمود.

۱-۱-۲) دستورالعمل استخراج RNA از خون

نمودار زیر وسایل و مواد مورد نیاز جهت استخراج RNA از خون را نشان می‌دهند.



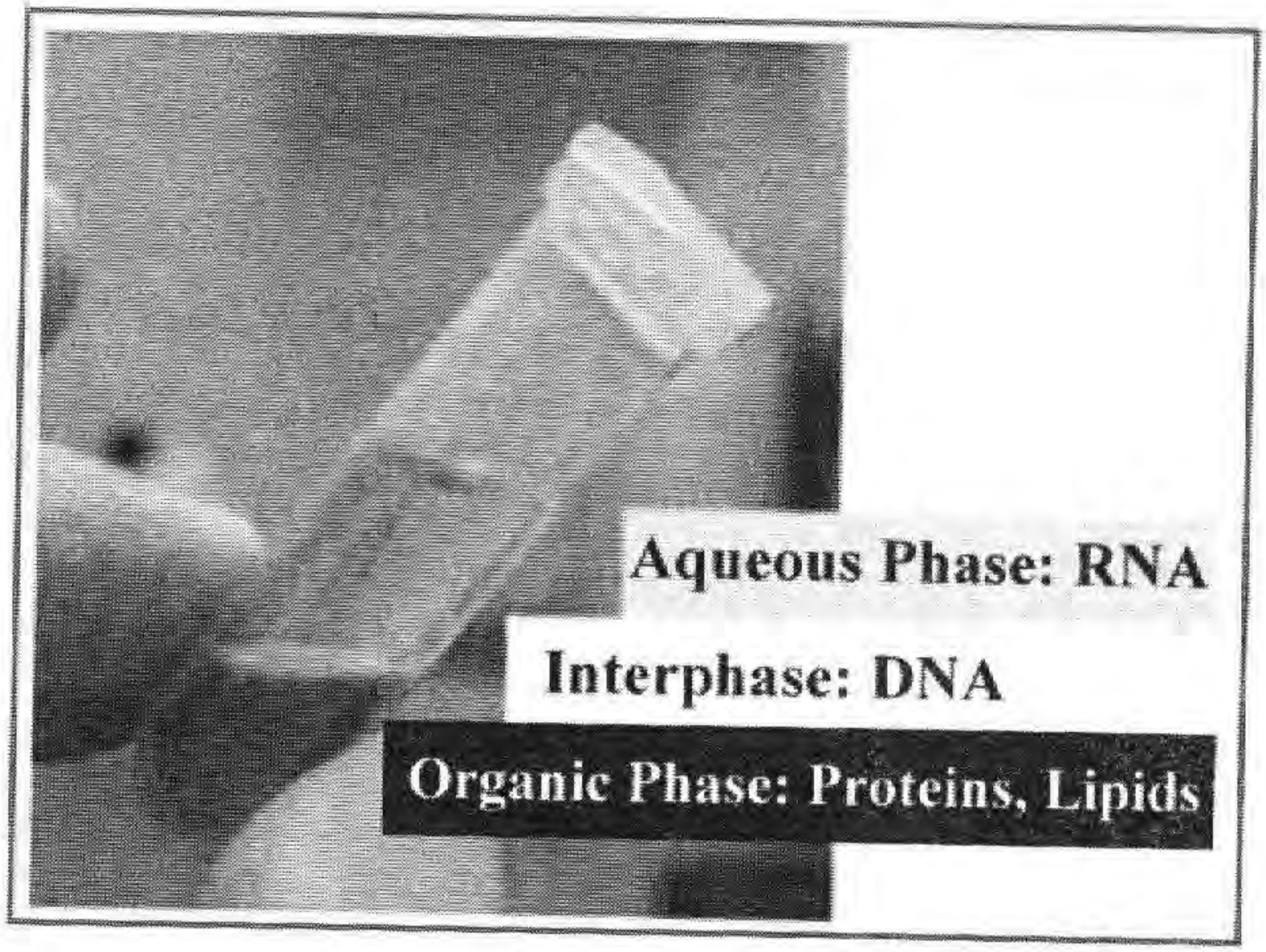
روش کار

- ابتدا 1 ml از تریزول را به 100 µl خون اضافه می‌کنیم. پس از اضافه‌کردن تریزول بهتر است چند بار پیپتینگ انجام دهیم و ۵ دقیقه بگذاریم در دمای محیط بماند. اضافه‌کردن 200 µl کلروفرم، باعث ایجاد سه فاز می‌شود که RNA در بالای فاز قرار می‌گیرد و لایه سفید میانی حاوی پروتئین‌های

دناتوره می‌باشد. DNA در همـان فازی قرار می‌گیرد که RNA وجود دارد؛ اما چون سبک‌تر است در قسمت پایین فاز بالایی قرار می‌گیرد.

- بهـتر اسـت کلروفرم را پس از اضـافه‌کردن تکان دهـیم و ۵ دقیقـه در محیط بگذاریم تا فاز بالایی تشکیل شود.
- مخلوط را سانتریفیـوژ بـه مـدت ۵ دقیـقـه در دمـای یخـچال یـا استـفاده از سانتریفـیوژ یخچال‌دار، سانتریفیوژ می‌کنیم.
- لایه‌ی بـالایی را، به طـوری‌که از لایـه‌ی وسـطی برداشـته نشـود، جداسازی می‌کنیم.
- لایه‌ی بالایی را به تیوب جدیـدی منتـقل نموده و به آن 600 µl ایزوپروپانول اضافه می‌کنـیم. مایع را چند بار وارونه می‌کنـیم. و به مدت ۳۰ دقیقه در فریزر قرار می‌دهیم. ایزوپروپانول به رسوب RNA و شست‌وشوی آن کمک می‌کند.
- تیوب را در دمای 4°c به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ می‌کنیم.
- رسوب سفیـدرنگ RNA در این زمـان قابـل دیـدن است. مایع رویـی را دور ریخـته و به آن 1 ml اتانول ۷۰ ٪ اضافه می‌کنـیم. اتانـول بـرای شسـت‌وشو اضافه می‌شود. سپس ۸–۵ دقـیقه سانتریفـیوژ می‌کنیم و لایـه رویی را تا حد ممکن جدا کرده و رسوب را انکوبه می‌کنیم تا خشک شود.
- به رسوب DEPC 100 µl اضافه می‌کنیم.

شکل ۱–۲ این مراحل را نشان می‌دهد.



شکل ۱-۲: جداسازی RNA با استفاده از تریزول. RNA در فاز آبی قرار می‌گیرد.

❖ تریزول یا TRI Reagent، ماده‌ای است که از ترکیباتی چون Phenol Guanidinium Isothiocyanate و مواد دیگری که بسته به نوع کمپانی آن متفاوت است تشکیل شده است. Guanidinium Isothiocyanate دناتوره‌کننده‌ی قوی پروتئین‌ها و به خصوص RNase است و فنل هم به همراه کلروفرم ایجاد فاز می‌کند. 1 ml تریزول تقریباً برای ۱۰ میلیون سلول استفاده می‌شود. هم‌چنین تریزول به لیز سلولی کمک می‌کند.

❖ Diethylpyrocarbonate (DEPC) با اسامی Diethyl Dicarbonate Diethyl Oxydiformateethoxyformic Anhydride, Pyrocarbonic Acid Diethyl Ester نیز شناخته می‌شود. این ماده به عنوان غیر فعال‌کننده‌ی RNAse شناخته می‌شود که با ایجاد تغییرات کووالانسی در رزیجوهای هیستیدین

آن‌ها را ناکارآمد می‌کند. DEPC توسط بافرهای تریس و HEPES غیرفعال می‌شود؛ اما می‌توان آن را با بافرهایی مانند فسفات نمکی PBS یا MOPS استفاده نمود. یک نکته‌ی اساسی این‌که برای حذف RNase از بافرها یا آنزیم‌هایی که دارای گروه‌های فعال اکسیژن، نیتروژن یا سولفور باشند، نمی‌توان از DEPC استفاده کرد زیرا با آن‌ها واکنش می‌دهد. در نتیجه‌ی واکنش با این گروه‌ها مواد حد واسطی درست می‌شوند که مانع واکنش‌های رونویسی و نسخه‌برداری می‌شوند.

۲-۲) روش‌های حذف و غیرفعال‌کردن ریبونوکلئازها

اتوکلاوکردن بافرها و محلول‌ها، سبب غیرفعال‌شدن این آنزیم‌ها نمی‌شود و حتی ممکن است سبب تشدید آلودگی با رهاشدن از باکتری‌ها شود. نپوشیدن دست‌کش، سبب ورود باکتری‌ها به درون محلول‌ها شده و حتی سبب ورود RNaseهای سلولی انسانی به درون محیط می‌شود. آلودگی‌ها و غبارهایی که بر سطح محلول‌های بافرها می‌نشیند نیز حاوی این آنزیم‌ها می‌باشد؛ بنابراین برای کاهش آلودگی این آنزیم‌ها، همیشه باید هنگام کار با RNA دست‌کش پوشیده، محدوده‌ی مکانی خاصی برای کار با RNA در نظر گرفته و مجموعه پیپت‌ها و وسایل و مواد مخصوص کار با RNA استفاده شوند که عاری از RNA باشند؛ به خصوص اگر در حین کار از RNase استفاده شود مانند هنگام تهیه‌ی پلاسمید.

بهتر است از وسایل یک‌بار مصرف عاری از RNase و در اتاق با شرایط تمیز استفاده شود.

وسایل فلزی مانند قاشک‌ها با شعله تمیز می‌شوند و وسایل شیشه‌ای با قرار

گرفتن در حرارت 180°C یا بالاتر به مدت ۸ ساعت عاری از آنزیم‌ها می‌شوند. برای وسایل شیشه‌ای باید وسایل در محلول DEPC ۱٪ تازه یا اتانول به مدت ۱ ساعت قرار داده شوند، خشک شده و اتوکلاو گردند. از آن‌جایی‌که DEPC سبب خوردگی وسایل پلاستیکی ساخته‌شده از پلی‌کربنات و پلی‌استیرن (مانند لوله‌های سانتریفوژ و میکروپلیت‌ها) می‌شود می‌توان این وسایل را به مدت ۱۰ دقیقه در محلول پراکسید هیدروژن ۳٪ قرار داد و سپس با آب حاوی DEPC شست. هم‌چنین می‌توان در محلول سود ۱ نرمال به مدت ۱ ساعت در دمای 37 °C قرار داد و بعد با آب حاوی DEPC شست‌وشو داد.

برای برداشتن تیپ‌های سمپلرها از پنس استریل و حرارت‌داده‌شده استفاده شود.

تانک‌های الکتروفورز با اتانل شسته شوند و سپس با پراکسید هیدروژن ۳٪ به مدت ۱۰ دقیقه پر شوند و با آب عاری از RNase شسته شوند.

۳-۲) تهیه‌ی آب فاقد RNase

آب‌های فاقد DNase و RNAse خالص، به صورت تجاری موجود هستند؛ اما می‌توان در آزمایشگاه نیز به روش زیر تهیه نمود.

- افزودن ۰/۱٪ حجمی از DEPC به آب و هم‌زدن محلول
- انکوبه‌کردن آب به مدت حداقل ۱ ساعت در 37 °C و البته انکوبه در زمان طولانی‌تر بر روی هم‌زن حتی به مدت یک شب بهتر است.
- اتوکلاوکردن آب به مدت ۱۵دقیقه به منظور غیرفعال‌کردن DEPC

اتوکلاوکردن DEPC سبب تولید آب، CO_2 و اتانل می‌شود. استفاده از

غلظت‌های بالای DEPC و باقی‌ماندن بقایای احتمالی آن، سبب توقف واکنش‌های بیوشیمیایی مانند ترجمه می‌شود. ضمناً تغییرات شیمیایی RNA مانند کربوکسی متیلاسیون نیز انجام می‌شود.

برای تهیه‌ی بافرهای تریس باید از آب حاوی DEPC به‌صورت اتوکلاوشده استفاده کرد و بهتر است از پودر تریسی استفاده شود که به طور مجزا برای کار با RNA در نظر گرفته شده است و pH نیز با الکترودی تنظیم گردد که برای کار با RNA در نظر گرفته شده است. پس از تهیه‌ی بافر مجدداً اتوکلاو انجام شود تا استریل گردد.

کلاً موادی که مقاوم به حرارت نیستند مانند نوکلئوتیدها، DTT و نمک‌های منگنز به همین روش تهیه می‌گردند اما به جای استریل با اتوکلاو از فیلترهای ۰/۲ میکرون برای استریل‌کردن استفاده می‌شود.

۴-۲) استفاده از ممانعت‌کننده‌های ریبونوکلئازها

Prime RNase Inhibitor یک پروتئین غیرانسانی است که به صورت غیرکووالان به Rnaseها چسبیده و انواع محدودی را غیرفعال می‌کند. معمولاً در دامنه‌های متفاوت pH و دما فعال هستند و حدود ۵۰٪ فعالیت RNase را در واکنش‌ها منع می‌کند.

Placental Rnase Inhibitors (HPRI) با منشأ انسانی است که انواع RNase A, B, C را غیرفعال کرده و بیش از ۹۰٪ فعالیت RNase را غیرفعال می‌کند.

۵-۲) عیب‌یابی در استخراج RNA

جدول ۲-۲ مشکلات و راه حل مشکلات در استخراج RNA را نشان می‌دهند.

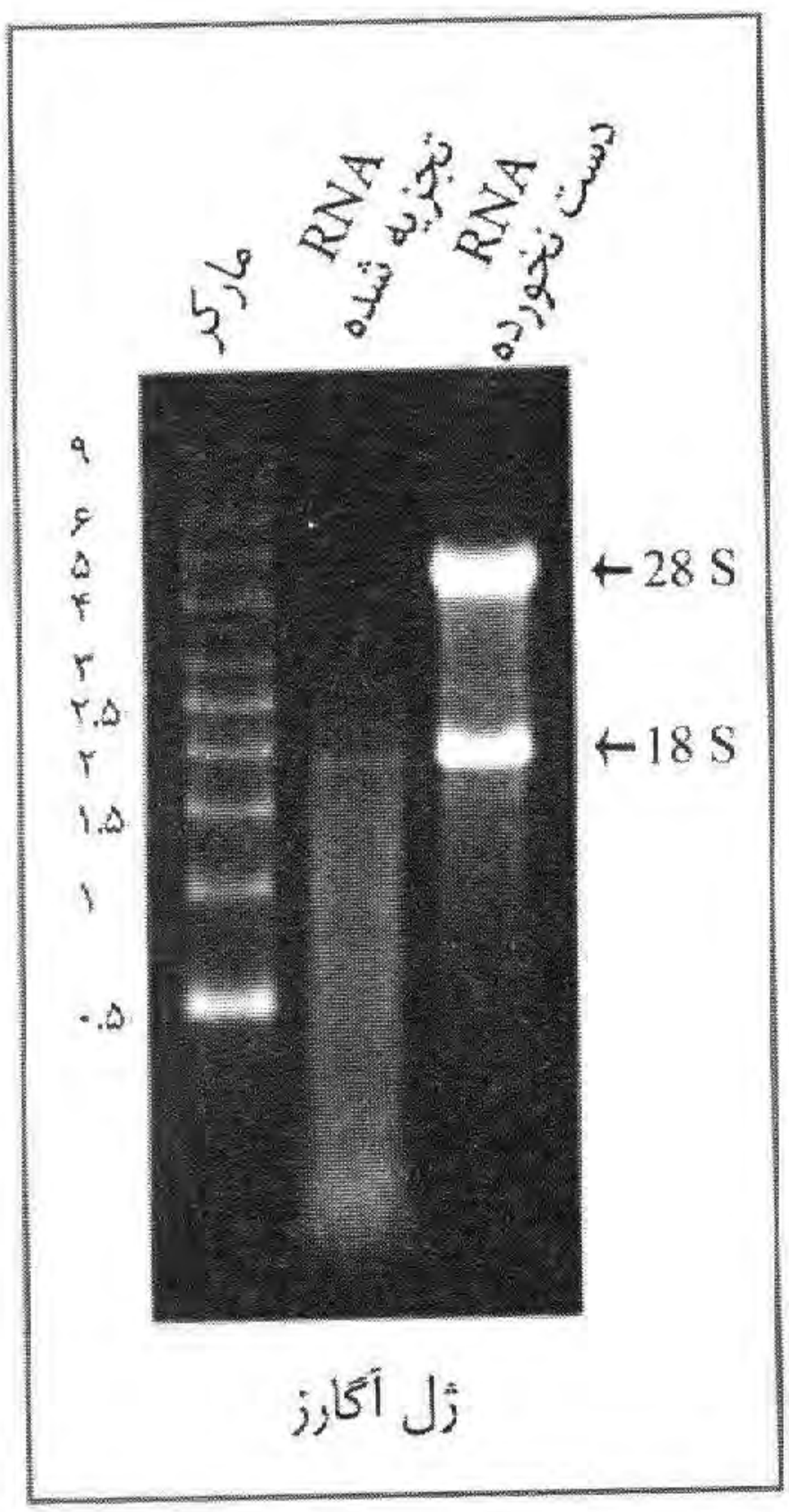
مشکل	علت	رفع مشکل
رسوب RNA دیده نشود.	اشتباه در یکی از مراحل یا کم‌بودن تعداد سلول‌های خونی	بررسی مراحل انجام شده یا اضافه‌کردن حجم بیشتر خون
رسوب سفیدرنگ نباشد.	در مرحله‌ی ۵ از لایه‌ی وسط هم برداشت‌شده است.	در مرحله‌ی ۵ دقت شود که فقط از لایه‌ی بالایی برداشته شود
لایه‌ی رویی در مرحله‌ی ۵ به سختی جدا شود.	تعداد سلول‌های خونی در نمونه زیاد است این در مورد نمونه‌های سرطانی بیشتر صدق می‌کند.	نمونه‌ی خون را با آب مقطر استریل رقیق کنید

جدول ۲-۲

۶-۲) بررسی RNA استخراج‌شده

پس از انجام مراحل استخراج RNA، با چند روش می‌توان آن‌را بررسی کرد:

- با استفاده از الکتروفورز روی ژل آگارز. که در مورد نمونه‌های انسانی باید دو باند 18 S و 28 S دیده شود. در صورتی‌که RNA در حین کار تجزیه شده باشد به صورت اسمیر گسترده دیده می‌شود (شکل ۳-۲).
- استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر. RNAی با کیفیت RNAیی است که نسبت ۲۶۰/۲۸۰ آن کم‌تر از ۲ باشد.



شکل ۳-۲: الکتروفورز RNA روی ژل آگارز. در مورد نمونه‌های انسانی دو باند 18 S و 28 S دیده شود. در صورتی‌که RNA در حین کار تجزیه شده باشد به صورت اسمیر گسترده دیده می‌شود.

۷-۲) نکات ایمنی

رعایت نکات ایمنی زیر در آزمایشگاه‌های استخراج DNA و بیولوژی مولکولی برای به حداقل‌رساندن خطرات، الزامی است:

- آگار و آگارز استفاده‌شده نباید در فاضلاب وارد شوند و لازم است در ظرف مخصوصی حذف گردند.
- تمام مواد آلوده جهت رفع آلودگی باید قبل از حذف اتوکلاو شوند.
- کار با مواد آلی مانند فنل باید در زیر هود انجام شود و آلودگی نباید به فاضلاب راه یابد.
- اتیدیم برماید یک ماده‌ی سرطان‌زاست. هنگام کار با آن حتماً از دست‌کش استفاده شود. مواد و وسایل آلوده به آن باید قبل از حذف، غیرفعال شوند.

منابع و مآخذ

1. Albarino, C. G. and V. Romanowski (1994). "Phenol extraction revisited: a rapid method for the isolation and preservation of human genomic DNA from whole blood." Mol Cell Probes 8(5): 423-427.

2. Birnboim, H. C. (1983). "A rapid alkaline extraction method for the isolation of plasmid DNA." Methods Enzymol 100: 243-255.

3. Brown, T. (2005). Gene Cloning and DNA Analysis Blackwell publishing.

4. Chomczynski, P. and N. Sacchi (1987). "Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction." Anal Biochem 162(1): 156-159.

5. Chomczynski, P. and N. Sacchi (2006). "The single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction: twenty-something years on." Nat Protoc 1(2): 581-585.

6. Gemmell, N. J .and S. Akiyama (1996). "An efficient method for the extraction of DNA from vertebrate tissues." Trends Genet 12(9): 338-339.

7. Grisvard, J. and E. Guille (1973). "A new DNA extraction method for plant cells." Prep Biochem 3(1): 83-94.

8. Gubin, A. N. and R. L .Kincaid (1998). "A pressure-extrusion method for DNA extraction from agarose gels." Anal Biochem 258(1): 150-152.

9. Hoss, M. and S. Paabo (1993). "DNA extraction from Pleistocene bones by a silica-based purification method." Nucleic Acids Res 21(16): 3913.٣٩١٤-

10. Kadokami, Y., M. A. Colgin, et al. (1994). "ScreenMax plasmid mini-prep: super rapid plasmid DNA extraction method." Biotechniques 17(3): 580-584.

11. Li, Q. and C. L. Ownby (1993). "A rapid method for extraction of DNA from agarose gels using a syringe." Biotechniques 15(6): 976-978.

12. Planelles, D., F. Llopis, et al. (1996). "A new, fast, and simple DNA extraction method for HLA and VNTR genotyping by PCR amplification." J Clin Lab Anal 10(3): 125-128.

13. Russell, D. W. and T. Maniatis (2006). Molecular Cloning: A Laboratory Manual Cold Spring.

14. Syn, C. K., W. L. Teo, et al. (1999). "Three-detergent method for the extraction of RNA from several bacteria." Biotechniques 27(6): 1140-1141, 1144-1145.

15. Yokota, M., K. Sindo, et al. (1998). "A convenient method of DNA extraction from blood anticoagulated with EDTA." Biochem Mol Biol Int 45(3): 617-622.