دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری
پژوهشهای تولیدات دامی

استخراج DNA از ریشه مو با روش نمکی بهینه یافته

مهدی مخبر یوسف آباد[۱]، مصطفی صادقی[۲]، محمد مرادی شهربابک[۳]، حسین مرادی شهربابک[۴]، جواد رحمانی[۵] و مهدیه یوسفی دارستانی[۶]

۱- استادیار، گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ارومیه
۲- دانشیار، گروه علوم دامی، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه تهران، (نویسنده مسوول: sadeghimos@ut.ac.ir)
۳، ۴، ۵ و ۶- استاد، استادیار، دانش‌آموخته دکتری تخصصی و دانش‌آموخته کارشناسی ارشد، گروه علوم دامی، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه تهران
تاریخ دریافت: ۹۲/۶/۲۴ تاریخ پذیرش: ۹۳/۱۲/۲۷

چکیده

کیفیت و کمیت DNA استخراج شده بر نتایج مطالعات ژنتیک مولکولی از جمله واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR)، هضم آنزیمی و غیره تأثیر بسزایی دارد. بعلاوه در انتخاب نوع بافت جهت انجام پژوهش‌های ژنومیک علاوه بر کیفیت و کمیت DNA استخراج شده، راحت بودن جمع‌آوری نمونه، هزینه‌های حمل و نقل، ایمن بودن نمونه‌برداری و پیش فرآوری نمونه‌ها بایستی مد نظر قرار گیرد. در این مطالعه روش کارآمد استخراج نمکی بهینه یافته از بافت ریشه‌ی مو که مقادیر بالای DNA با کمیت وکیفیت مناسب را فراهم می‌آورد، معرفی می‌گردد. در این آزمایش جهت استخراج DNA از ۴۰۰ نمونه‌ی مو و ۴۰ نمونه‌ی خون گاومیش استفاده شد. کمیت و کیفیت DNA استخراج شده از هر دو بافت با استفاده از نسبت جذب نوری (۲۶۰- ۲۸۰ OD) و ژل آگارز ۱/۲٪ و واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR)، ارزیابی شد. میانگین میزان و خلوص DNA استخراج شده از مو به‌ترتیب ۲۸/۱۲ میکروگرم و ۱/۸۷ بود. این مقادیر برای خون ۱۷/۸۶ میکروگرم و ۱/۸۳ گزارش شد. نتایج ارائه شده در مطالعه‌ی حاضر و مقایسه‌ی آن با مطالعات قبلی نشان داد که روش ساده و بهینه‌ی ارائه شده در این بررسی یک روش اقتصادی، راحت، ایمن، کارآمد بوده و قابل توصیه به آزمایشگاه‌های بیوتکنولوژی است.

واژه‌های کلیدی: استخراج DNA، واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR)، استخراج نمکی

مقدمه

قابلیت اطمینان و کارائی آزمایشات تشخیص مولکولی از قبیل واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR)، هضم آنزیمی و غیره به شدت تحت تأثیر کیفیت و کمیت DNA استخراج شده از نمونه مورد نظر است (۱). علاوه بر اینکه کیفیت و کمیت بالای DNA بدست آمده از روش استخراج بسیار مهم است، بایستی روش مورد استفاده اقتصادی بوده و قابلیت اجرایی در شرایط موجود را داشته باشد (۱۷). بخاطر کیفیت بالای DNA به دست آمده از خون و مخاط دهانی معمولاً این روش‌ها در پژوهش‌های ژنتیک مولکولی مورد توجه بوده و به طور گسترده‌ای مورد استفاده قرار گرفته‌اند (۱۷). علی‌رغم مزایای اشاره شده، عملیات جمع‌آوری و نگهداری این قبیل نمونه‌ها نسبتاً هزینه‌بر و مشکل است (۱۰). همچنین، در مواقعی امکان تهیه‌ی نمونه خون بسیار مشکل است، از قبیل تهیه نمونه‌ی خون از حیوانات وحشی (۱) و دام‌های اهلی بزرگ از قبیل گاو و گاومیش که در شرایط سنتی و در محیط روستایی نگهداری می‌شوند و امکانات کافی جهت مهار حیوان وجود ندارد، بسیار مشکل و خطرناک است. به خصوص هنگامی که تعداد نمونه‌های مورد نیاز زیاد باشد، عملاً غیرممکن است. همچنین، در شرایطی از قبیل آبستنی دام‌ها عمل نمونه‌گیری خون اغلب با ایجاد استرس برای حیوان همراه بوده و امکان سقط در اثر نمونه‌گیری وجود دارد. همه این دلایل باعث می شود که به دنبال یک روش اقتصادی‌تر، عملی‌تر و ساده‌تر جهت جمع‌آوری نمونه از دام‌های مورد مطالعه باشیم. بنابراین، علی‌رغم اینکه DNA بدست آمده از خون از لحاظ کیفیت و کمیت مناسب است، ولی پژوهشگران به دنبال منابع دیگری هستند که هزینه‌ی کمتری داشته باشد و جمع‌آوری و ذخیره‌سازی آن راحت باشد. استخراج DNA از بافت‌هایی از قبیل خون (۱۶)، خون خشک شده (۲۶)، اسپرم (۱۷،۷)، ریشه و ساقه‌ی مو (۱۹)، پر (۱۸)، پوست و کبد (۱) معمول است. هر کدام از بافت‌های مورد استفاده جهت تهیه‌ی DNA، مزایا و معایبی نسبت به دیگری دارند و تهیه نمونه از این بافت‌ها وابسته به نوع حیوان و شرایط نمونه‌برداری است. مثلاً در شرایط کشتار حیوان هر بافتی که مورد نیاز باشد، به راحتی قابل تهیه می‌باشد. از میان همه‌ی بافت‌های مورد استفاده جهت استخراج DNA، بافت مو به دلیل تهیه‌ی راحت‌تر نمونه (۲)، همچنین هزینه و خطر کمتر، نسبت به سایر موارد ترجیح داده می‌شود (۲۶). در ضمن می‌توان نمونه‌های مو را برای چندین سال در دمای ۲۰- درجه نگهداری کرد (۱۲) و در صورتی که یک روش مناسب و بهینه برای استخراج DNA از این بافت استفاده گردد، DNA با کیفیت و کمیت بسیار مناسب جهت استفاده در پژوهش‌های مولکولی به دست می‌آید. مو از دو قسمت ریشه و ساقه تشکیل شده است. بخش عمده‌ای از DNAی مو در ریشه‌ی مو، که اطراف مو را در ناحیه ابتدای ساقه پوشانده است، قرار دارد (۱۸). در بررسی صورت گرفته توسط هیگوچی و همکاران (۱۸) میزان DNA بدست آمده از ریشه‌ی موی تازه تهیه شده، ۰/۵ میکروگرم گزارش شد. همچنین، در یک بررسی دیگر، این میزان ۵۰ تا ۱۵۰۰ نانوگرم گزارش شد (۲۵). وجود مقادیر بالای DNA در ریشه‌ی مو به این دلیل است که احتمال وجود بخش زنده‌ی ساختمان مو در قسمت ریشه‌ی مو، نسبتاً بالاست و در هر لحظه ۹۵-۷۵ درصد فولیکول‌های مو در مرحله آناگون یا فاز

فعال رشد قرار دارند (۱۴). با وجود این که میزان DNAی هسته در ساقه مو بسیار ناچیز است (۸،۵)، در عوض حاوی مقادیر بالایی DNA میتوکندریایی است (۱۳). در حال حاضر برای کارهای جرم شناسی، باستان شناسی، تست والدین و مطالعات حیوانات وحشی و اهلی از DNA استخراج شده از مو استفاده می‌شود (۲۰). در چند دهه‌ی اخیر صدها روش برای تلخیص DNA از قبیل استخراج نمکی (۱۶)، فنل- کلروفرم (۴) و حالت‌های تغییر یافته این روش‌ها (۹) شناخته شده و به طور گسترده‌ای استفاده می‌شوند. همچنین، کیت‌های استخراج متنوعی نیز به طور تجاری در دسترس بوده و استفاده از این کیت‌ها هر روز در حال افزایش است. زیرا استفاده از این کیت‌ها آسان بوده و نیروی کار کمتری نیاز دارند و اغلب محصول DNA با کیفیت بالا را فراهم می‌آورند، ولی به دلیل ملاحظات حرفه‌ای تولیدکنندگان کیت‌های استخراج، برخی از مواد مورد استفاده در این کیت‌ها برای مصرف کنندگان مشخص نمی‌شود. این کیت‌ها اغلب حاوی محلول پایدار پروتئیناز K، بافرهای ناشناخته‌ی عاری از فنل/کلروفرم، ستون حاوی غشای سیلیکونی برای جداسازی و خالص سازی DNA با کیفیت بالا برای انجام آزمایشات PCR هستند و یک دستورالعمل ساده برای استخراج دارند (۱۵). در هر صورت استفاده از کیت‌های تجاری هزینه‌بر بوده و به راحتی در دسترس پژوهشگران قرار ندارند، بخصوص برای پژوهشگرانی که در کشورهای در حال توسعه و توسعه نیافته در سراسر جهان مشغول به تحقیق هستند (۱۱). در هر صورت توسعه یک روش ساده که صرفه اقتصادی داشته و زمان‌بر نباشد برای استخراج DNA جهت مطالعات مولکولی ضروری است. به‌طورکلی می‌توان اغلب پروتکل‌های استخراج تهیه DNA را به سه فاز یا مرحله‌ی اصلی تقسیم کرد. فاز اول شامل تهیه و آماده‌سازی مواد و محلول‌های ضروری استخراج، متلاشی کردن دیواره‌ی سلولی و دیواره‌ی هسته سلول‌های بافت مورد استفاده برای استخرج DNA می‌باشد. فاز دوم پروتکل‌ها در واقع مرحله‌ی اصلی و حقیقی استخراج DNA بوده و در این مرحله سایر بقایای سلولی و پروتئین‌ها به‌غیر از DNA رسوب داده می‌شود. فاز سوم شامل رسوب و تخلیص اسید نوکلئیک از سایر ناخالصی‌ها می‌باشد، در این مرحله موادی که ممکن است در ادامه روند کار با DNA اختلال ایجاد کرده و به‌عنوان ممانعت کننده‌ی مراحل بعدی آزمایشات بیوتکنولوژی از قبیل PCR باشند، حذف می‌گردند (۱۵). در مطالعه حاضر روش کارآمد استخراج نمکی بهینه یافته از بافت ریشه مو که مقادیر بالای DNA با کمیت وکیفیت مناسب را فراهم می‌آورد، معرفی می‌گردد. در این راستا ریشه‌ی مو به‌عنوان یک ماده‌ی بیولوژیکی که در مقایسه با بافت‌های دیگر از قبیل خون، نمونه‌برداری آسان‌تر، کم‌خطرتر، نگهداری راحت‌تر و اقتصادی بودن، جهت استخراج انتخاب شد. همچنین، روش استخراج نمکی به‌دلیل اینکه در مقایسه با روش‌های مبتنی بر کیت‌های تجاری اقتصادی‌تر بوده و نسبت به روش‌های مبتنی بر فنل/ کلروفرم که یک ماده بسیار سمی می‌باشد، کم خطرتر است، جهت استخراج DNA انتخاب شد. البته منبع علمی اصلی که به عنوان الگوی کار مورد استفاده قرار گرفت یک روش مبتنی بر استخراج فنل/کلروفرم بوده و به‌دلیل نتایج قابل قبول به لحاظ کیفیت و کمیت DNA استخراج شده، انتخاب گردید. در نهایت در راستای یافتن روشی بهینه، تغییرات عمده‌ای در زمان‌های ذکر شده، انواع و مقادیر مواد مورد استفاده در پروتکل استخراج صورت گرفت. در نهایت نتایج مربوط به کیفیت و کمیت DNA استخراج شده از روش معرفی شده برای بافت ریشه‌ی مو با نتایج استخراج صورت گرفته از خون و با نتایج مطالعات قبلی مقایسه شد.

مواد و روش‌ها

در مطالعه حاضر از ۴۰۰ نمونه‌ی مو و ۴۰ نمونه‌ی خون گاومیش‌های نژادهای آذری (اردبیل، ارومیه و تبریز به تعداد ۲۵۰ نمونه مو)، خوزستانی (اهواز، شوش، شوشتر و سوسنگرد به تعداد ۱۵۰ نمونه مو) و مازندرانی (بهشهر به تعداد ۴۰ نمونه خون) استفاده شد. نمونه‌های مو از بخش‌هایی از بدن دام که آلودگی کمتری داشت و در خلاف جهت رویش مو کشیده شد تا نمونه‌های مو به همراه ریشه در دسترس باشند (۳). سپس نمونه‌های تهیه شده بعد از ثبت مشخصات دام در بسته‌های پلاستیکی قرار داده شدند به‌طوری‌که امکان اختلاط بین نمونه‌ها وجود نداشته باشد. نمونه‌های مو بلافاصله بعد از برداشته شدن، در مجاورت یخ قرار گرفتند و پس از انتقال به آزمایشگاه تا زمان استخراج در دمای ۲۰- سانتی‌گراد نگهداری شدند. نمونه‌های خون نیز از ورید وداجی و زیر دمی گاومیش تهیه شده و تا زمان استخراج در دمای ۲۰- سانتی‌گراد نگهداری شدند. استخراج DNA از نمونه‌های مو بر طبق روش آلبرت و همکاران (۱) انجام شد، ولی روش نهایی ارائه شده در این بررسی تغییرات عمده‌ای نسبت به روش مرجع مورد استفاده داشت. جهت استخراج DNA از بافت ریشه‌ی مو ابتدا ۲۵ الی ۳۵ عدد ریشه‌ی مو بوسیله یک قیچی، که برای هر نمونه با الکل و شعله دادن استریل شده، تقریبا به طول ۰/۵ الی ۱ سانتی‌متر از انتهای ریشه‌دار مو برش داده شد. موها پس از برش به میکروتیوب‌های ۱/۵ میلی‌لیتری انتقال داده شد. نمونه‌ها با اضافه کردن ۱ سی‌سی الکل اتانول ۹۶٪ به مدت ۱۰ الی ۱۵ دقیقه، شسته شدند. این شستشو در ابتدای کار بسیار مهم بوده و باعث حذف آلودگی های بافت مو می‌شود و احتمالاً در نرم کردن ساختار پروتئینی کورتکس مو نقش داشته باشد. سپس الکل نمونه‌ها خالی شده و نمونه‌ها به داخل آون با دمای ۴۵ درجه سانتی‌گراد منتقل گردیدند تا الکل آنها خشک شود. در مرحله بعد ۳۰۰ میکرولیتر بافر لیزکننده (50mM Tris-HCl; 100mM NaCl; 6mM EDTA(pH= 7.5)) به علاوه ۲۰ میکرولیتر پروتئیناز K (۱۰میلی‌گرم بر میلی‌لیتر)، ۷ میکرولیتر $CaCl_2$، ۲۵ میکرولیتر SDS ۱۰٪ و ۳۰ میکرولیتر DTT (۱۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) به‌ترتیب روی نمونه‌ها اضافه شد و بعد از یک ورتکس مختصر نمونه‌ها در حمام بن ماری با دمای ۵۸ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت قرار گرفتند (در این مرحله در ساعات اولیه از هر یک ساعت یک‌بار به مدت ۱۰- ۲۰ ثانیه تب زده شدند). نمونه‌ها از بن‌ماری خارج شده و ۱۵۰

میکرولیتر نمک اشباع (۶ مولار) به محلول فوق اضافه گردیده و به مدت ۲ دقیقه ورتکس شدید شدند. سپس نمونه‌ها با دور بالا سانتریفیوژ (۱۳۰۰۰ دور به مدت ۱۲ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد) شدند. مایع رویی به میکروتیوب جدید منتقل و رسوب بدست آمده دور ریخته شد. در صورت وجود آلودگی یکبار دیگر این مرحله را تکرار کرده و در غیر این صورت روی محلول بدست آمده اتانول مطلق سرد شده به میزان ۱ سی‌سی اضافه گردید و به آرامی سر و ته شد تا DNA به حالت مجتمع درآید. سپس نمونه‌ها سانتریفیوژ (۱۳۰۰۰ دور به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد) شدند، البته در صورت وجود رسوب این مرحله باید تکرار گردد. محلول رویی را به آرامی خالی و روی رسوب باقیمانده الکل اتانول ۷۰٪ اضافه گردیده و یکبار دیگر با دور بالا سانتریفیوژ (۱۳۰۰۰ دور به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد) شدند. سپس نمونه‌ها در هوای آزاد یا آون با ۴۵ درجه‌ی سانتی‌گراد خشک شدند و در مرحله آخر نمونه‌ها با ۷۰ میکرولیتر بافر TE رقیق شدند. این محلول ۲۴ ساعت در هوای آزاد قرار داده شد تا DNA به خوبی در مایع حل گردد و در نهایت در دمای۲۰- درجه‌ی سانتی‌گراد برای مطالعات بعدی قرار داده شد. استخراج DNA از خون با استفاده از روش بهینه نمکی (۶) انجام شده و در ۷۰ میکرولیترTE بافر حل شد. کیفیت و کمیت DNA استخراج شده‌ی تمام نمونه‌ها توسط دستگاه نانودراپ (Thermo 2000C) با نسبت جذبی ($OD_{260/280}$) روی محلول DNAای که ۷۰ بار رقیق‌تر شده است، تعیین شد. برای اطمینان از عدم شکستگی و غلظت DNA، نمونه‌ها بر روی ژل آگارز ۱/۲ ٪ الکتروفورز شدند (شکل ۱). همچنین، جهت بررسی فقدان ممانعت کننده‌های PCR، جایگاه‌های ژنیATPA1 DGAT1، ACACA و جایگاه میکروستلایتی CSSM033، CSSM047، BM1818، BM1824، DRB3، ILSTS033 و ILSDTS033 تکثیر شدند. برای نمونه، مراحل مربوط به PCR قطعه ۸۹۸ جفت بازی جایگاه ACACA آورده شده است. جهت تکثیر رشته‌ی مورد نظر، واکنش PCR بوسیله مواد مخصوص PCR شرکت Gennet Bio به شرح زیر با غلظت نهایی واکنش ۲۵ میکرولیتر انجام شد: کلرید منیزیم ($MgCl_2$) ۱/۵ میکرولیتر (۱/۵mM)، بافر PCR ۲/۵ میکرولیتر (۱X)، بازهای آزاد دزوکسی نوکلئوتید تری فسفات (dNTPs) ۲ میکرولیتر(۰/۲mM)، آغازگر رفت ۱/۲۵ میکرولیتر (۰/۵µM)، آغازگر برگشت ۱/۲۵ میکرولیتر (۰/۵µM)، آنزیم DNA پلی‌مراز ۰/۳Taq میکرولیتر (۱/۵ واحد در هر واکنش)، ۲DNA میکرولیتر، آب مقطر دیونیزه (ddH2O) ۱۴/۲ میکرولیتر. با استفاده از دو آغازگر اختصاصی ژن ACACA قطعه‌ی ۸۴۰ جفت بازی از جایگاه اگزون ۴۴ و ۴۵ استیل‌کوآ کربوکسیلازآلفا با استفاده از واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز تکثیر شد. توالی آغازگرها به صورت زیر بود:

آغازگر رفت (Forward):

´5´-CCTACGACGAGATCATCACC-3

آغازگر برگشت (Reverse):

5´-TTTCGACCTGGATGGTTCTCT-3´

با استفاده از شیب دمایی و چندین بار واکنش PCR توسط دستگاه ترموسایکلر شرایط زیر به‌عنوان ایده‌آل‌ترین حالت انجام واکنش PCR مهیا گردید دمای واسرشت‌سازی اولیه ۹۵ درجه سانتی‌گراد برای ۴ دقیقه، دمای واسرشت ۹۴ درجه سانتی‌گراد برای ۵۰ ثانیه، دمای اتصال ۶۱ درجه سانتی‌گراد به مدت ۶۰ ثانیه، دمای بسط ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۷۰ ثانیه، دمای بسط نهایی ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۷ دقیقه. این شرایط در دستگاه ترموسایکلر مدل BIOER XP انجام شد. پس از انجام واکنش PCR برای اطمینان از تکثیر و صحت و میزان DNA تکثیر شده در واکنش، الکتروفورز محصولات حاصل از PCR روی ژل آگارز (۱/۲٪) انجام شد (شکل ۱).

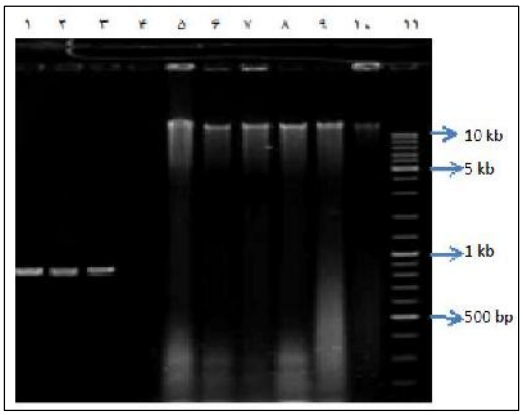
نتایج و بحث

در بررسی حاضر مقادیر مختلف مواد مورد استفاده، زمان‌های انکوباسیون و زمان و تعداد دورهای سانتریفیوژ جهت پیدا کردن حالت بهینه استخراج DNAای با کیفیت و کمیت بالا، تغییر داده شد و در نهایت حالت بهینه بدست آمده و فقط نتایج مربوط به حالت بهینه در این مطالعه گزارش گردید. نتایج مربوط به کمیت و کیفیت مربوط به DNA استخراج شده از مو و خون گاومیش در جدول ۱ آورده شده است. همان طور که در جدول آورده شده است کمیت DNA بدست آمده از بافت مو بیشتر از بافت خون است، ولی این تفاوت معنی‌دار ($P> 0.05$) نبود. کمیت استخراج‌های صورت گرفته از هر دو بافت مطلوب بوده و اکثر نمونه‌ها در حدود نسبت جذبی $OD_{260/280}$ =۱/۸ بوده و در دامنه ۱/۸ الی ۲/۰ قرار گرفته‌اند و تنها تعداد کمی از نمونه‌ها در خارج از این دامنه قرار گرفته‌اند. در مورد نمونه‌های ریشه‌ی مو این دامنه بیشتر بوده که البته بیشتر بودن این دامنه می‌تواند به‌دلیل تعداد بیشتر نمونه‌ها باشد و شاید نتوان استدلال کرد که کیفیت نمونه‌های خون بهتر است. علی‌رغم وجود روش‌های مختلف برای استخراج DNA از بافت مو روش ارائه شده توسط آلبرت و همکاران (۱) به‌دلیل اینکه نتایج قابل قبولی به دست آورده بود به عنوان مرجع انتخاب شد، ولی این روش در طی کار در آزمایشگاه و بهینه کردن روش، تغییرات عمده‌ای در مراحل انجام کار و مواد مورد استفاده صورت گرفت.

جدول ۱- میانگین خلوص و کمیت DNA استخراج شده با روش استخراج نمکی از نمونه های ریشه‌ی مو و خون گاومیش (۷۵ میکرولیتر حجم محلول)

Table 1. Average of purity and quantity of extracted DNA using salting out method from Buffalo hair root and blood samples

نوع بافت	تعداد	کمیت (ng/µL)	دامنه‌ی کمیت (ng/µL)	کیفیت ($OD_{260/280}$)	دامنه‌ی کمیت ($OD_{260/280}$)
خون	۴۰	۲۳۸/۲±۱۵۰/۷	۴۲۶/ ۵ -۱۰۰/۳	۱/۸۳	۱/۹۸ - ۱/۶۳
ریشه مو	۴۰۰	۳۷۵/۰۳±۱۸۸/۱۷	۱۳۰/ ۲-۹۵۰/۸	۱/۸۷	۲/۰۷ - ۱/۶۵



شکل ۱- کمیت و کیفیت DNA استخراج شده. چاهک شماره ۱ تا ۳ (از سمت چپ) محصول PCR جایگاه ۸۴۰ جفت بازی ژن ACACA، چاهک ۴ خالی و چاهک‌های ۵ تا ۱۰ مربوط به DNA استخراج شده و چاهک ۱۱ نشانگر اندازه ۱۰ کیلوباز فرمنتاز (GeneRuler^{TM} DNA Ladder Mix, Thermo Scientific Fermentas).

Figure 1. Quantity and quality of extracted DNA. Lane 1-3 (from left) PCR product 840 bp ACACA gene, Lane 4 empty, and Lane 5-10 extracted DNA and lane 11 size marker 10 kb (GeneRuler^{TM} DNA Ladder Mix, Thermo Scientific Fermentas)

موفقیت روش‌های مورد استفاده در واکنش زنجیره‌ای پلی مراز به عواملی از قبیل استفاده از مقادیر اندک بافت مو وابسته است. در بررسی حاضر مقادیر مختلف ریشه‌ی مو، ۵ الی۵۰ ریشه‌ی مو مورد بررسی قرار گرفت و نتایج نشان داد که تعداد ۲۵ الی ۳۵ ریشه‌ی مو که به طول ۰/۵ الی ۱ سانتی‌متر از انتهای ریشه‌دار مو برش داده شده بودند، بالاترین غلظت DNA و مناسب‌ترین کیفیت را داشتند. این تعداد در ۲-۳ ریشه‌ی مو بود که مجموعاً ۱۰ سانتی‌متر مو به ازای هر نمونه یا استخرج را شامل می‌شد (۱). این تعداد در مطالعه صلاح و السعید (۲۱) در سال ۲۰۰۷ ، ۱۰، ۳۰ و ۵۰ عدد ریشه مو، در مطالعه‌ی پفیفر و همکاران (۱۹) در سال ۲۰۰۴ ، ۱۰، ۳۰ ، ۵۰ و ۱۰۰عدد ریشه مو به طول حدوداً ۱/۵ سانتی‌متر، این تعداد در مطالعه کومار و همکاران (۱۲) ۱۰ عدد ریشه‌ی مو و در تحقیق تای و همکاران (۲۶) ۵ عدد ریشه‌ی مو بود. ریشه‌های مویی که در این بررسی مورد استفاده قرار گرفتند در یک بازه زمانی ۳ ماهه تهیه شده بودند و تفاوتی از لحاظ این‌که نمونه‌ها تازه تهیه شده باشند و یا به مدت طولانی نمونه‌برداری شده باشند، مشاهده نشد. احتمالاً به این خاطر است که موها بلافاصله بعد از تهیه نمونه از دام زنده به دمای زیر صفر انتقال داده شده و سپس این موها تا زمان استخراج در فریزر و در دمای ۲۰- نگهداری شده بودند. این نتایج با نتایج آلبرت و همکاران (۱) مطابقت داشت، ولی با نتایج تای و همکاران (۲۶) که نشان می‌داد کیفیت DNA در نمونه‌های تازه تهیه شده بیشتر است، اختلاف داشت. بافری که برای لیز کردن بافت مو استفاده شد بر اساس روش (۱) بود، ولی شستشوی نمونه‌های مو با الکل اتانول ۷۰٪ به مدت ۵۶ ساعت به شستشو با الکل اتانول ۹۶٪ به مدت ۱۰-۱۵ دقیقه کاهش یافت. همچنین، زمان انکوباسیون از دمای ۵۶ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۸ ساعت به ۵۸ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت تغییر یافت. بنابراین، با این تغییر زمان انجام آزمایش به‌مدت ۸۰ ساعت کاهش یافت که یک مزیت عمده نسبت به روش مرجع به حساب می‌آید. البته در مطالعاتی که توسط پفیفر و همکاران (۱۹) در سال ۲۰۰۴ و صلاح و السعید (۲۱) در سال ۲۰۰۷ روی استخراج DNA صورت گرفت، زمان انکوباسیون نمونه‌ها بعد از اضافه کردن بافر هضم ۲-۵ ساعت عنوان شده، ولی میزان DNA استخراجی از این روش‌ها بسیار کم و در دامنه ۷ الی ۹۰ نانوگرم و به طور میانگین ۵۸ نانوگرم در میکرولیتر بود. یکی از علل مقادیر پایین DNA استخراجی این مطالعات نسبت به روش مورد استفاده در مطالعه حاضر می‌تواند به دلیل زمان کم انکوباسیون باشد. تغییرات اعمال شده‌ی دیگر شامل استفاده از دی‌تیوتریول (DTT) به‌جای استفاده از دی‌مرکاپتواتانول است. هر دو ماده‌ی شیمیایی پیوندهای دی‌سولفیدی ساختار بافت را می‌شکنند و در حالت استفاده از این ماده‌ی شیمیایی در مقایسه با عدم استفاده از آن در بافر هضم، نتایج مطلوب‌تری بدست آمد (۱). در اکثر پژوهش های مربوط به استخراج DNA از بافت مو از دی‌مرکاپتواتانول استفاده می‌شود ولی با توجه به بوی بسیار زننده و مسمومیت‌زا بودن این ماده‌ی

شیمیایی، در این بررسی از DTT بجای دی‌مرکاپتواتانول استفاده شد. همچنین، در این بررسی از کلریدکلسیم ($CaCl_2$) در بافر استخراج استفاده شد. این ماده با فعال کردن آنزیم پروتئیناز K به فرایند هضم پروتئین‌ها کمک می‌کند (۱۹). در مطالعه‌ی پفیفر و همکاران (۱۹)، وقتی از $CaCl_2$ به‌جای EDTA استفاده شده کمیت و کیفیت DNA بدست آمده بیشتر شد. در بررسی حاضر هر دو ماده شیمیایی $CaCl_2$و EDTA در ترکیب بافر هضم استفاده شد. همچنین، اکثر پژوهش‌ها برای استخراج DNA از مو (۲۶،۱،۲۱،۲۳،۲۴) مبتنی بر استخراج فنل/کلروفرم یا استخراج DNA از بافت مو مبتنی بر کیت‌های تجاری (۱۹،۲۲،۲۳) می‌باشد. در این بررسی با در نظر گرفتن خطرناک بودن استفاده از فنل، استخراج نمکی به‌جای استخراج فنل/کلورم ترجیح داده شد.

در مطالعه‌ای که توسط تای و همکاران (۱۶) در سال ۱۹۹۸ انجام گرفت غلظت DNA استخراجی با استفاده از روش‌های نمکی و فنل/کلروفرم برای موهای تازه تهیه شده، به‌ترتیب ۴۲ نانوگرم بر میکرولیتر (۲/۱ میکروگرم) و ۸۷ نانوگرم بر میکرولیتر (۴/۳۵ میکروگرم) برای نمونه‌هایی که یک هفته قبل از استخراج DNA تهیه شده بودند، به‌ترتیب ۸ (۲/۱ میکروگرم) و ۱۷ نانوگرم بر میکرولیتر (۰/۸۵ میکروگرم) گزارش شد. خلوص بدست آمده در این بررسی برای روش استخراج نمکی برابر ۱ و برای روش فنل/کلروفرم ۱/۷ بود که نشان‌دهنده‌ی برتری روش فنل/کلروفورم بر استخراج نمکی است. در یک مطالعه‌ی دیگر که توسط سوناگا و ناکامورا (۲۲) صورت گرفت سه نوع کیت تجاری با هم مقایسه شده و غلظت DNA در سه روش انجام گرفته در دامنه ۱۲۰ الی ۱۵۰ نانوگرم متغیر بود. میزان DNAی تولیدی در روش ISOHAIR بیش از ۱۵۰ نانوگرم برای روش Chelex ۱۲۰–۱۴۰ نانوگرم و برای روش DNA Mini Kit QIAamp کمتر از ۱۲۰ نانوگرم بود. در بررسی دیگری که توسط آلبرت و همکاران در سال ۲۰۱۰ (۱) انجام شده بود، کمیت DNA استخراجی از ۵۹۹ نانوگرم بر میکرولیتر (۱۸ میکروگرم) در گربه خانگی تا ۵۴ نانوگرم بر میکرولیتر (۱/۵ میکروگرم) در روباه متفاوت بود. همچنین، میزان DNA ی استخراج شده در مطالعه‌ای که توسط درکومار و همکاران (۱۲) صورت گرفته است، در دامنه ۰/۵ الی ۲ میکروگرم قرار داشت. این میزان توسط سوزان و همکاران (۲۳) برای سه روش مورد استفاده برای استخراج DNA از بافت ریشه‌ی مو ۰/۳۴±۰/۲۲، ۱/۹۲±۲/۸۴، ۲/۰۳±۴/۸۰ میکروگرم به‌دست آمد. میانگین غلظت DNAی استخراجی در مطالعه حاضر ۲۸/۱۲ میکروگرم با دامنه ۷۱/۲۵ میکروگرم الی ۹/۷۵ میکروگرم و خلوص ۱/۸۷ با دامنه ۱/۶۵ الی ۲/۰۷ به‌دست آمد. با توجه به میزان DNA اندکی که برای هر بار PCR مورد نیاز است (۵۰ الی ۱۰۰ نانوگرم)، میزان DNA بدست آمده از مطالعه‌ی حاضر قابل قبول به‌نظر می‌رسد و مقدار DNA استخراج شده از این روش، برای صدها مورد PCR جهت تحلیل ژنوتیپی از قبیل تجزیه و تحلیل پلی‌مورفیسم جایگاه‌های ژنی و جایگاه‌های میکروستلایتی کافی است. مقایسه‌ی این نتایج با مطالعات قبلی نشان می‌دهد که کمیت DNAی استخراجی در مطالعه‌ی حاضر نسبت به همه‌ی مطالعات ذکر شده بالاتر بوده و همچنین کیفیت قابل قبول و تکثیر موفقیت‌آمیز DNAی استخراجی در PCR نشان‌دهنده‌ی کارآمدی این روش بهینه یافته است. در مرور منابع مطالعات مربوط به استخراج DNA از بافت ریشه‌ی مشخص می‌شود که اکثر پژوهش‌های صورت گرفته برای استخراج DNA از بافت ریشه‌ی مو یا مبتنی بر کیت‌های تجاری و یا مبتنی بر فنل/کلروفرم بوده‌اند و تنها مطالعات معدود و فقط برای مقایسه‌ی روش استخراج نمکی با روش‌های مبتنی بر استخراج فنل/کلروفرم صورت گرفته (۲۶) و نتایج بررسی‌ها نشان‌دهنده‌ی برتری روش استخراج فنل/کلروفرم نسبت به روش نمکی بوده و کمیت DNA به‌دست آمده برای روش استخراج نمکی بسیار پایین بوده که به‌نظر می‌رسد روش نمکی استفاده شده در این بررسی بهینه نبوده و نمی‌تواند به‌عنوان یک روش مورد تأیید ارائه شود و مبنای قضاوت قرار بگیرد. بنابراین، در روش استخراج نمکی معرفی شده در این مطالعه از مو هم به لحاظ ایمن‌تر بودن جمع‌آوری نسبت به تهیه‌ی نمونه خون و هم به لحاظ استفاده از مواد کم‌خطرتر در آزمایشگاه، حداکثر ایمنی در نظر گرفته شده است. همچنین، روش مورد بررسی به لحاظ عملیات اجرایی در آزمایشگاه توسط کاربر، نسبت به روش‌های استخراج مبتنی بر فنل/ کلروفرم و نمکی از خون راحت‌تر است. این روش یک روش اقتصادی است و نسبت به روش‌های مبتنی بر کیت‌های تجاری بسیار به‌صرفه و اقتصادی است. هم‌چنین به‌دلیل کاهش هزینه‌های نمونه‌برداری و نگهداری نسبت به روش‌های مبتنی بر استخراج از خون، به‌خصوص در مورد حیواناتی که نمونه-برداری در آن‌ها سخت است، اقتصادی می‌باشد. هر چند شاید این روش به لحاظ زمان‌بر بودن مزیتی نسبت به روش‌های رایج برای استخراج ندارد و زمان انکوباسیون در این روش نیز بالاست (۲۴ ساعت)، ولی با برنامه‌ریزی دقیق می‌توان در زمان انکوباسیون نمونه‌های دیگر را آماده نمود. بنابراین، مسئله زمان‌بر بودن این روش، عیب عمده‌ای محسوب نمی-شود. در نهایت با در نظر گرفتن همه‌ی جوانب کار، مزایا و معایب روش معرفی شده، و مقایسه‌ی نتایج به دست آمده از این روش با مطالعات قبلی می‌توان نتیجه گرفت که روش ساده و بهینه‌ی ارائه شده در این بررسی یک روش اقتصادی، راحت، ایمن و کارآمد بوده و قابل توصیه به آزمایشگاه‌های بیوتکنولوژی است.

تشکر و قدردانی

از مرکز اصلاح نژاد و بهبود تولیدات دامی کشور و مراکز امور دام استان‌های آذربایجان شرقی، آذربایجان غربی، خوزستان، گیلان، کرمانشاه و اردبیل که جهت مساعدت در نمونه‌برداری از دام‌ها همکاری نمودند، تشکر می‌گردد.

منابع

1. Alberts, C.C., J.T. Ribeiro-Paes, G. Aranda-Selverio, J.R. Cursino-Santos, V.R. Moreno-Cotuli, A.L.D. Oliveir, W.F. Porchia, Santos, Departamento and E.B. Souza. 2010. DNA extraction from hair shafts of wild Brazilian felids and canids. Genetics and Molecular Research, 9: 2429-2435.
2. Bauerova, M., M. Bauer and D. Vasicek. 1999. A simple and inexpensive DNA purification from malignant hyperthermia PCR detection in porcine hair roots. Meat Science, 51: 325-327.
3. Campbell, A.M., J. Williamson, D. Padula and S. Sundby. 1997. Use PCR & single hair to produce a "DNA fingerprint". The American Biology Teacher, 59: 172-178.
4. Chaisomchit, S., R. Wichajarn, S. Chowpreecha and W. Chareonsiriwatana. 2003. A simple method for extraction and purification of genomic DNA from dried blood spots on filter paper. Southeast Asian J Trop Med Public Health, 34: 641-645.
5. Graham, E.A.M. 2007. DNA Reviews: hair. Forensic Science, Medicine, and Pathology, 3: 133-137.
6. Grimberg, J., S. Nawoscihik, L. Belluscio, R. McKee, A. Turk and A. Eisenberg. 1989. A simple and efficient non-organic procedure for the isolation of genomic DNA from blood. Nucleic Acids Research, 17: 83-90.
7. Heyen, D.W., J.E. Beever, R.E. Evart, C. Green, S.R.E. Bates, J.S. Ziegle and H.A. Lewin. 1997. Exclusion probabilities of 22 bovine microsatellite markers in flurescent multiplexes for semi-automated parentage testing. Animal Genetics, 28: 21-27.
8. Higuchi, R., C.H. Beroldingen, G.F. Sensabaugh and H.A. Erlich. 1988. DNA typing from single hairs. Nature, 332: 543-546.
9. Huang, X., F.J. Zeller, S.L. Hsam and G. Wenzel. 2000. Chromosomal location of AFLP markers in common wheat utilizing nulli-tetrasomic stocks. Genome, 43: 298-305.
10. King, I.B., J. Satia-Abouta, M.D. Thornquist, J. Bigler, R.E. Patterson and A.R. Kristal. 2002. Buccal cell DNA yield, quality and collection costs: comparison of methods for large-scale studies. Cancer Epidemiology, Biomarkers Preventation, 11: 1130-1133.
11. Kotchoni, S.O. and E.W. Gachomo. 2009. A rapid and hazardous reagent free protocol for genomic DNA extraction suitable for genetic studies in plants. Molecular Biology Reports, 36: 1633-1636.
12. Kumar, P., V. Choudharya, T.K. Bhattacharya, B. Buushan and A. Sharma. 2005. PCR-RFLP based genotyping of cattle using DNA extracted from hair samples. Indian Journal of Biotechnology, 4: 287-289.
13. Lutz, S., H.J. Weisser, J. Heizmann and S. Pollak. 1996. mtDNA as a tool for identification of human remains. International Journal of Legal Medicine, 109: 205-209.
14. McNevin, D., L. Wilson-Wilde, J. Robertson, J. Kyd and C. Lennard. 2005. Short tandem repeat (STR) genotyping of keratinised hair. Part 1. Review of current status and knowledge gaps. Forensic Science International, 153: 237-246.
15. Michele, K., P.D. Nishiguchi, M. Egan, K. David, P. Aloysius, P. Lorenzo, C. Howard, E.T. Rosenbaum, W. Yael, D. Rob and G. Gonzalo. 2002. DNA Isolation Procedures. Methods and tools in biosciences and medicine. Birkhäuser Verlag Basel/Switzerland, pp: 250-281.
16. Miller, S.A., D.D. Dykes and H.F. Polesky. 1998. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. Nucleic Acids Research, 16: 12-15.
17. Milne, E., F.M. Bockxmeer, L. Robertson, J.M. Brisbane, L.J. Ashton and R.J. Scott. 2006. Buccal DNA collection: comparison of buccal swabs with FTA cards. Cancer Epidemiology, Biomarkers Preventation, 15: 69-81.
18. Miyaki, C.Y. 1996. Um Estudo Filogenético de Psitacídeos (Psittaciformes, Aves) Baseado em Seqüências de Genes Mitocondriais. Doctoral thesis, Instituto de Biociências. Universidade de São Paulo, São Paulo, 168 pp.
19. Pfeiffer, I., I. Volkel, H. Taubert and B. Brenig. 2004. Forensic DNA-typing of dog hair: DNA-extraction and PCR amplification. Forensic Science International, 141: 149-151.
20. Roon, D.A., D. Waits, K.C. LandKendall. 2003. A quantitative evaluation of two methods for preserving hair samples. Molecular Ecology Notes, 3: 163-166.
21. Salah, M.A.R. and E.H. Elsayed. 2007. Genetic similarity among the three Egyptian water buffalo flocks using RAPD-PCR and PCR-RFLP techniques. Research Journal of Agriculture and Biological Sciences, 3: 351-355.
22. Suenaga, E. and H. Nakamura. 2005. Evaluation of three methods for effective extraction of DNA from human hair. Journal of Chromatography B, 820: 137-141.
23. Suzanne, M., B.S. Leanza, D. Robert, M.D. Burk, E. Thomas and M.D. Rohan. 2007. Whole genome amplification of DNA extracted from hair samples: Potential for use in molecular epidemiologic studies. Cancer Detection and Prevention, 31: 480-488.
24. Takayanagi, K., H. Asamura, K. Tsukada, M. Ota, S. Saito and H. Fukushima. 2003. Investigation of DNA extraction from hair shafts. International Congress Series, 1239: 759– 764.
25. Tanigawara, Y., T. Kita, M. Hirono, T. Sakaeda, F. Komada and K. Okumura. 2001. Identification of N-acetyltransferase 2 and CYP2C19 genotypes for hair, buccal cell swabs, or fingernails compared with blood. Therapeutic Drug Monitoring, 23: 341-346.
26. Thi, Hue, H.C. Dieu, P. Tuan, T.L. Thao and D.T. Giang. 2012. Extraction of Human Genomic DNA from Dried Blood Spots and Hair Roots. International Journal of Bioscience, Biochemistry and Bioinformatics, 2: 21-26.
27. Zadworney, D. and U. Kuhnlein. 1990. The identification of the kappa casein genotype in Holstein dairy cattle using polymerase chain reaction. Theoretical Applied Genetics, 80: 631-634.

DNA Extraction from Hair Roots using Modified Salting out Method

Mehdi Mokhber[1], Mostafa Sadeghi[2], Mohammad Moradi Shahrbabak[3], Hosein Moradi Shahr-Babak[4], Javad Rahmaninia[5] and Mahdiyeh Yousefi Daerstani[6]

1- Assistant Professor, Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, Urmia University
2- Associate Professor, Faculty of Agricultural Science and Engineering, University College of Agriculture and Natural Resources (UTCAN), University of Tehran, (Corresponding author: sadeghimos@ut.ac.ir)
3, 4, 5 and 6- Professor, Assistant Professor, Graduated Ph.D. Student and Graduated M.Sc. Student, of Agricultural Science and Engineering, University College of Agriculture and Natural Resources (UTCAN), University of Tehran
Received: September 15, 2013 Accepted: March 18, 2015

Abstract

The reliability and performance of the molecular diagnostic assays such as polymerase chain reaction (PCR), enzyme digestion and other applications are influence by quantity and quality of the extracted DNA strongly. Furthermore, to choose suitable and optimal tissue for genomic experiments nevertheless consider quantity and quality of the extracted DNA, we need to consider the comfort of sample collecting, transporting costs, storing costs, safety of sampling and pre-processing. I this study an efficient salting out–modified procedure for extracting DNA from hair roots, introduced. This procedure yield high quantity of DNA with adequate quality. Four hundred Hair roots and blood samples were obtained from buffalo units experiment. The yield of extracted DNA and the purity of the DNA samples were evaluated by absorbance (A2260/A280) ratio. 1% agar gel electrophoresis and PCR amplification. Mean DNA yields and the 260/280 nm absorbance ratio for buffalo hair roots and blood were 27.67 µg and 1.85 and 17.86 µg and 1.83, respectively. Comparing this results with previous studies demonstrate that our modified procedure is cost-effectiveness, comfortable, safe, efficient and recommendable procedure to carry out in biotechnology laboratories.

Keywords: DNA extraction procedures, Polymerase chain reaction (PCR), Modified salting out