



University of Isfahan
Biological Science and Technology
Department of Cell and Molecular Biology
Cellular and Molecular Laboratory
Farzaneh Forouharfar

عنوان

استخراج DNA ژنومی از خون انسان



اهداف

- 1- آشنایی با روش استخراج DNA بوسیله کیت استخراج
- 2- آشنایی با تکنیک استفاده از ستون های استخراج سیلیکایی
- 3- استفاده از DNA استخراج شده جهت آنالیز کیفی و کمی DNA
- 4- انجام آزمایشات پایین دستی Downstream Experiment مانند:
تکثیر ژنهای موجود بر DNA و انجام PCR و REAL TIME و سایر آزمایش های ژنتیکی و تحلیل های مولکولی

DNA استخراج شده از خون، پایه‌ای برای مطالعات مولکولی، بیوتکنولوژی، ژنتیکی و پزشکی است و با پیشرفت فناوری‌های زیستی، اهمیت آن روزبه‌روز افزایش می‌یابد. این روش، ابزار کلیدی برای درک بیماری‌ها، توسعه درمان‌های هدفمند و کاربردهای قانونی و زیست‌فناوری به شمار می‌رود. اهمیت انجام این آزمایش:

- 1- کاربرد در پزشکی و تشخیص بیماری‌ها: استخراج DNA از خون برای شناسایی جهش‌های ژنتیکی، بررسی بیماری‌های ارثی، و تشخیص بیماری‌های عفونی (مانند ویروس HPV و HIV) استفاده می‌شود. در پزشکی قانونی،
- 2- تحقیقات ژنتیکی و بیولوژی مولکولی: مطالعه ساختار ژن‌ها و بررسی تغییرات ژنتیکی در بیماران. استفاده در پروژه‌های ژنومیک برای مقایسه تنوع ژنتیکی بین جمعیت‌های مختلف.
- 3- کاربرد در بیوتکنولوژی و مهندسی ژنتیک: اصلاح ژنتیکی، کلونینگ، و تولید داروهای زیستی و بررسی مکانیسم بیان ژن‌ها.
- 4- آزمایش‌های قانونی قضایی و تعیین قرابت خویشاوندی و پزشکی قانونی: استخراج DNA برای تعیین هویت و اثبات روابط خانوادگی. استفاده در موارد جنایی برای شناسایی مجرمان یا تشخیص بقایای انسانی.

اساس روش های استخراج DNA

روشهای استخراج DNA مبتنی بر حلال و یا مبتنی بر فاز فاز جامد طراحی می شوند.

Solution based method : در روش های مبتنی بر حلال تکنیک نمک زدایی انجام می شوند (Salting Out).

Solid phase method : در این تکنیک با استفاده از ذرات نامحلول بر پایه سیلیس، امکان خالص سازی DNA فراهم می شود و به آن کالمن بیس متد Column-based methods یا Silica column method می گویند.

معمولاً از کیت های تجاری برای این روش استفاده می شود، که DNA را به وسیله فرایندهای مانند جذب و شستشو از دیگر مواد جدا می کنند. ستون استفاده شده در این تکنیک ستون سیلیکایی می باشد. DNA به سیلیکا جذب می شود و پس از شستشو، خالص می گردد.

وسائل مواد و تجهیزات مورد نیاز

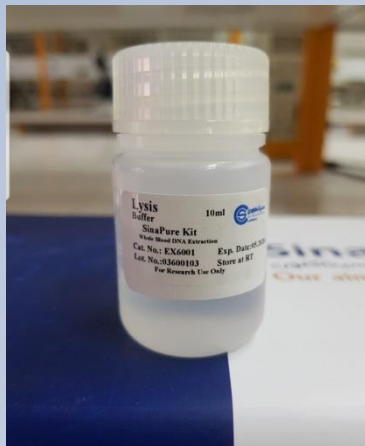


وسایل و مواد مورد نیاز

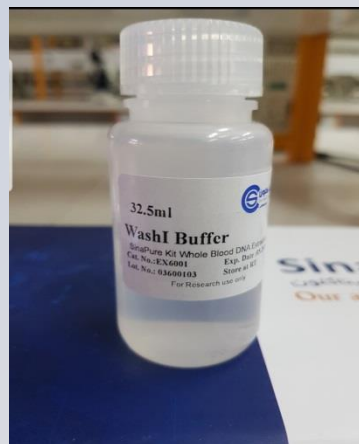
وسایل استخراج DNA ژنومی از خون انسان با استفاده از کیت عبارتند از:

- ستون‌های چرخشی (Spin Columns)
- لوله‌های جمع‌آوری (Collection tubes)
- آنزیم پروتئیناز K (K Proteinase)
- بافر لیز (Lysis Buffer)
- بافر بارش (Precipitation Buffer)
- بافر شستشوی یک (Wash Buffer)
- بافر شستشوی دو (Wash Buffer)
- بافر شستشوی نهایی (Elution Buffer)





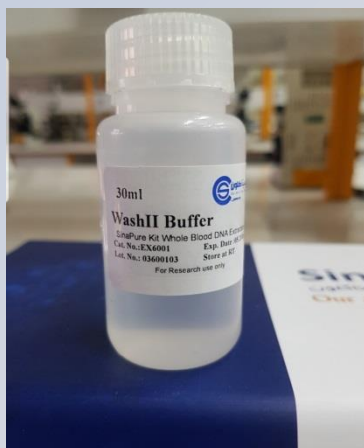
بافر لیز (Lysis Buffer)



بافر بارش (Precipitation Buffer)



بافر شستشوی یک (Wash Buffer)



بافر شستشوی دو (Wash Buffer)



بافر سشتشوی نهایی (Elution Buffer)



آنزیم پروتییناز K

تجهيزات مورد نیاز:

بلوک حرارتی یا حمام آب (70°C)
میکروسانتریفیوژ (حداقل 12,000 دور در دقیقه)
میکروپیپت یا سمپلرهای دقیق
رک سمپلر
رک سر سمپلر
لوله‌های میکروتیوب 1.5 میلی‌لیتری استریل
نمونه خون تازه و تام



روش کار



هشدارها و اقدامات احتیاطی:

هنگام انجام استخراج اسید نوکلئیک از نمونه های بیولوژیکی از قوانین GLP (Good Laboratory Practice) پیروی کنید.

از تماس مواد و محلول های معرف کیت با پوست و چشم خودداری کنید.

قبل از استفاده از هر کیت استخراج از PPE1 استفاده کنید هنگام کار با نمونه های بیولوژیکی از روش های توصیه شده برای مواد خطرناک زیستی پیروی کنید.

مراحل اصلی در این تکنیک عبارتند از:

۱- نمونه خون در طول انکوباسیون در دماهای مناسب و در دور و زمانهای مناسب سانتریفیوژ شده و در حضور بافر لیز تجزیه میشود.

همزمان آنزیم پروتئیناز کی واکنش لیز شدن را تسریع می کند.

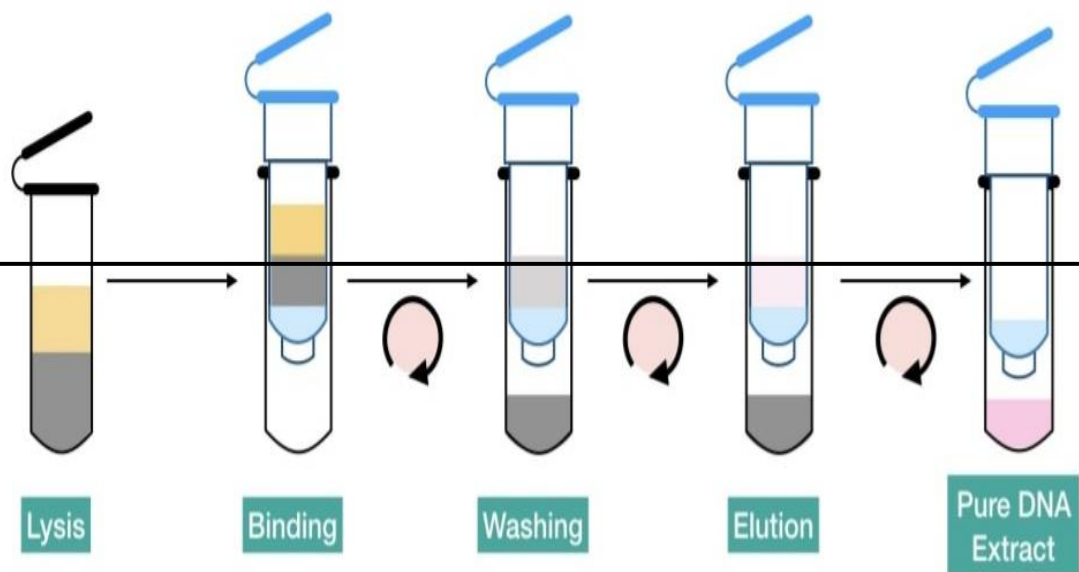
2- محتویات پروتئینها و ترکیبات ناخواسته سلولها در شستشوی مکرر حذف می شوند.

۳- DNA آزاد شده به غشای سیلیکایی متصل می شود.

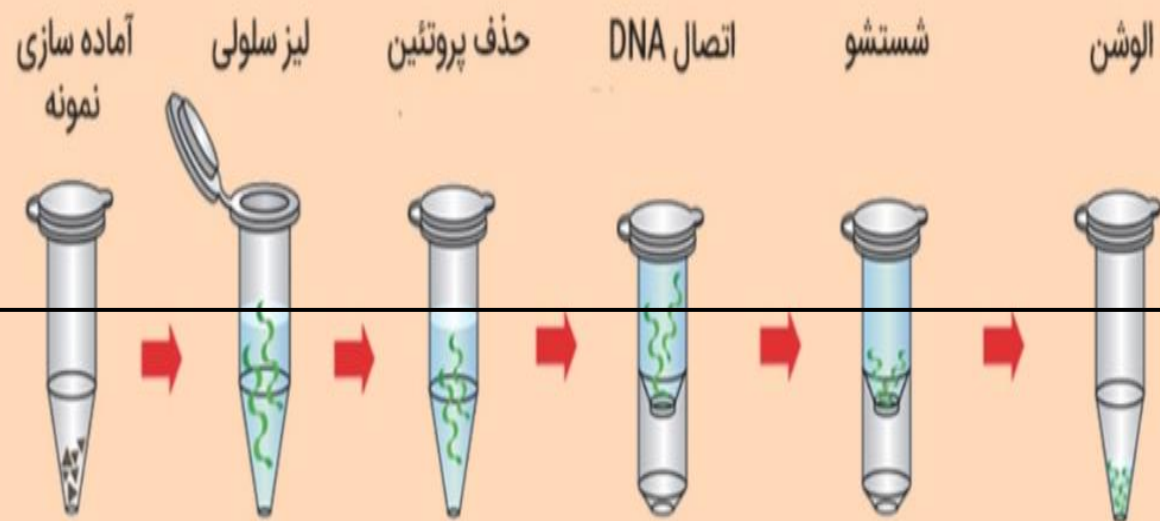
4- سپس توسط بافر مخصوص شستشوی نهایی DNA و خالص سازی انجام می شود.



Spin-Column DNA extraction



Steps in spin column DNA extraction.



BEHGENE

مراحل خالص سازی DNA در این تکنیک بر روی نمونه های خون تازه و فریز شده قابل اجرا می باشد.

DNA خالص استخراج شده در دمای منهای 20- درجه سانتیگراد دیپ فریز شده و جهت انجام آزمایشات پایین دستی بعدی از جمله بررسی و کنترل کیفی و کمی DNA، PCR، تکثیر DNA، ریل تایم، کلونینگ، تعیین توالی و سایر آزمایشات مولکولی مورد استفاده قرار می گیرد.

جهت انجام این تکنیک بایستی شرایط زیر رعایت شود:

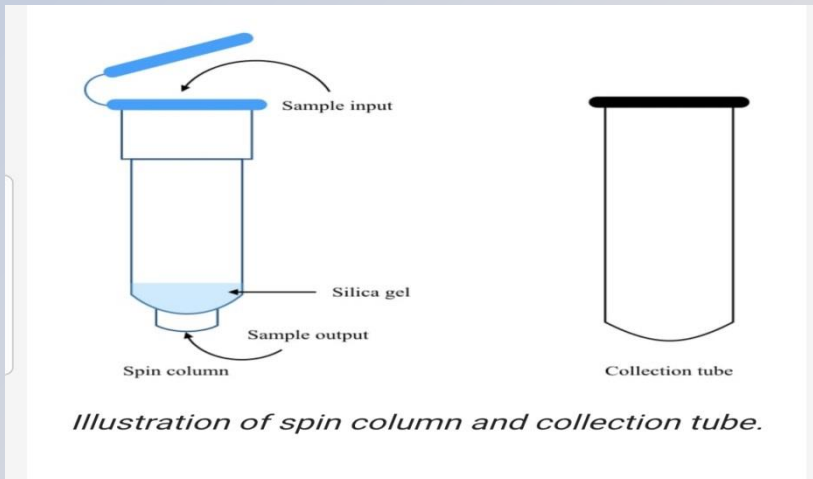
- ترجیحا از نمونه تازه و تام خون استفاده کنید.

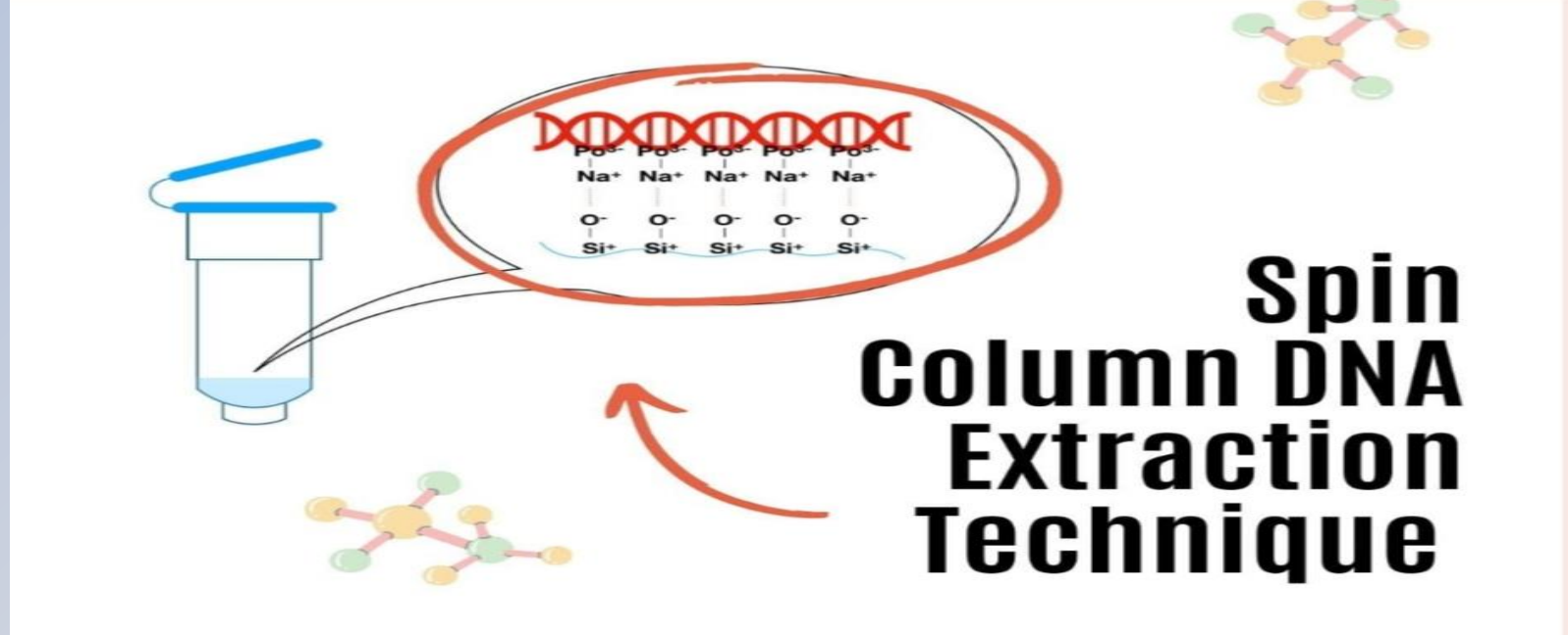
- خون باید درلوله های ضد انعقاد EDTA(1mg/ml) جمع آوری شود. خون هپارینه توصیه نمی شود.

- خون را در منفی 20- میتوان جهت استفاده در آزمایش نگهداری کرد.

- تمامی مراحل آزمایش را در دمای اتاق انجام دهید.

- ستون های چرخشی استریل بوده و فقط قبل از استفاده باز شوند.





در ابتدا با روش فلبوتومی خون تازه و تام را در لوله حاوی ضد انعقاد قرار داده و چندین بار به آرامی لوله را سر و ته کنید تا مطمئن شوید بافت خون هموژن می باشد سپس مراحل زیر را به دقت انجام دهید:

روش کار

1- 25 میکرولیتر پروتئیناز k را به لوله خالی کالکشن تیوب (Collection tube) اضافه کنید.

2- 200 میکرولیتر خون تازه اضافه کنید.

3- 200 میکرولیتر بافر لیز اضافه کنید.

4- جهت تخریب سلولی و آزادسازی DNA مخلوط را به مدت 20 ثانیه ورتکس کنید.

5- لوله را در 70°C به مدت 10 دقیقه انکوبه کنید

6- سپس به مدت 2 دقیقه در دمای اتاق خنک کنید.

7- 200 میکرولیتر بافر بارش یا رسوب دهی اضافه کنید و به آرامی 3 تا 5 مرتبه مخلوط را اینورت یا سر و ته کنید.



8- مخلوط را سریعاً به ستون چرخشی یا spin column انتقال دهید و با سرعت 12000 دور در دقیقه به مدت 1 دقیقه سانتریفیوژ کنید.

9- جهت شستشوی ناخالصی‌ها : 650 میکرولیتر بافر شستشوی I اضافه کنید و 1 دقیقه سانتریفیوژ کنید. پس از سانتریفیوژ بخش فیلتر شده را در ظرف مشخص و با رعایت اصول بهداشتی اوت کنید.

10- 600 میکرولیتر بافر شستشوی II اضافه و 1 دقیقه در دور و زمان قبلی سانتریفیوژ کنید و بخش فیلتر شده را دور بریزید.

11- ستون چرخشی خالی را 3 دقیقه با دور 12,000 سانتریفیوژ کنید تا بافر شستشوی اضافی باقیمانده حذف شود و کالکشن تیوب را دور بریزید.



مرحله هضم بافت و لیز سلول
انتقال مایع به ستون فیلتردار



مرحله هضم بافت و لیز سلول
افزودن SE بافر



مرحله هضم بافت و لیز سلول
سانتریفیوژ



مرحله هضم بافت و لیز سلول
دور ریختن مایع خارج شده از فیلتر



مرحله شستشو
افزودن Wash بافر



مرحله شستشو
سانتریفیوژ

12- در این مرحله لوله ها را با درب بازمدت 3 تا 5 دقیقه جهت تبخیر قطرات احتمالی الکل اتانل که در محلولهای قبلی استفاده شده وجود داشته بر روی هیتر بلوک یا در دمای محیط قرار دهید.

13- ستون های چرخشی را بدقت به لوله های 1.5 میکرولیتری تمیز انتقال دهید.

14- جهت خالص سازی DNA 70- 100 میکرولیتر بافر گرم شده ایلوشن را از قسمت مرکزی به ستون چرخشی اضافه کنید.

ایلوشن به مرحله ای اطلاق می شود که در آن DNA پس از شستشوی ناخالصی ها توسط بافر، از ستون جدا شده و به یک محلول انتقال داده می شوند. این فرایند شرایط مناسبی را برای جدا شدن از سطح ستون و خالص سازی فراهم می کند.

15- درب لوله را بسته و حدود 5 تا 7 دقیقه در دمای آزمایشگاه انکوبه کنید.



مرحله خشک کردن
دور ریختن مایع خارج شده از فیلتر



مرحله خشک کردن
سانتریفیوژ



مرحله خشک کردن
انتقال فیلتر به یک میکروتیوب جدید



مرحله رقیق سازی DNA
افزودن Elution بافر



مرحله رقیق سازی DNA
سانتریفیوژ



مرحله آخر بدست آمدن
DNA خالص شده

16- جهت خالص سازی نهایی دی ان ای لوله را به مدت 1 دقیقه با دور 12000 سانتریفیوژ کنید.

در پایان سانتریفیوژ ستون چرخشی را دور ریخته و لوله زیرین که حاوی در ان ای خالص شده است را در دمای منهای 20 درجه سانتیگراد نگهداری کنید.

تفسیر و تحلیل نتایج بدست آمده

کنترل کیفیت دی ان ای (DNA quality control)

ماده ژنتیکی استخراج شده در این تکنیک قابل نگهداری به روش استاندارد بوده و جهت کنترل و بررسی کیفیت و کمیت آن در جلسات آینده با روشهای استاندارد مورد بررسی قرار می گیرد.

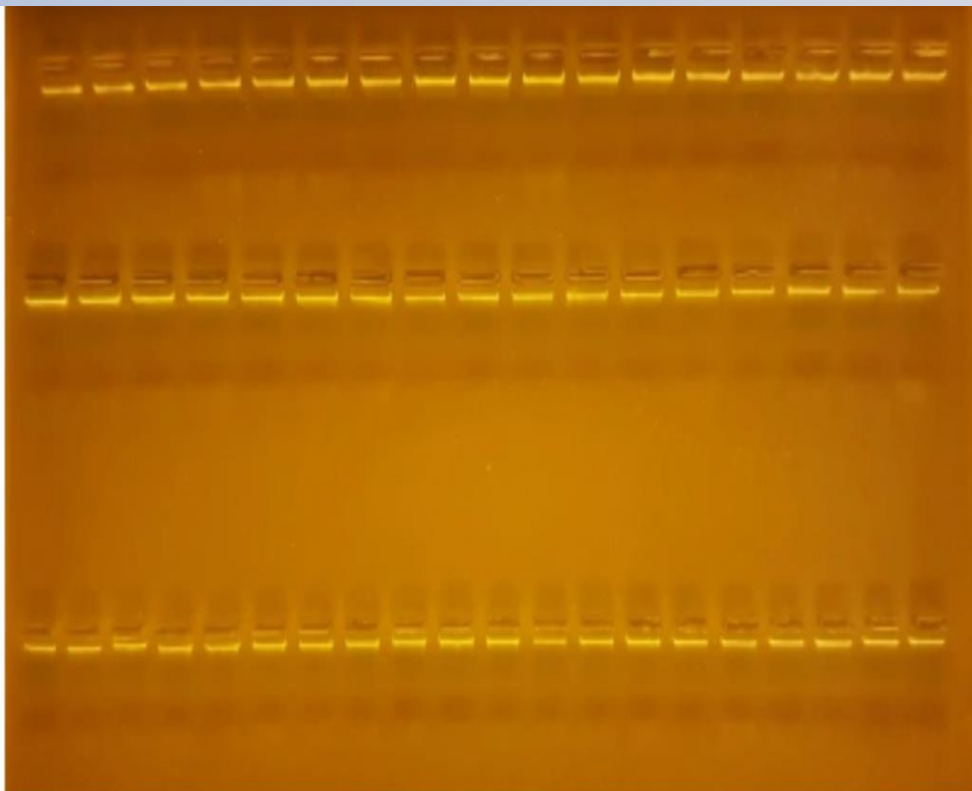
DNA quality control (Electrophoresis)

بررسی کیفیت به روش الکتروفورز ژل آگارز:

جهت بررسی کیفیت و اندازه دی ان ای، الکتروفورز ژل آگاروز انجام می شود. با این تکنیک 3 تا 5 میکرولیتر دی ان ای خالص شده، بر روی ژل آگاروز یک درصد الکتروفورز می گردد.

DNA quantity control (Photometric determination of DNA concentration)

جهت بررسی کمیت و غلظت دی ان ای توسط روش طیف سنجی نوری، با دستگاه اسپکتروفوتومتر یا نانودراپ تحت امواج ماورا بنفش، میزان جذب در طول موج 260 و 280 نانومتر، اندازه گیری شده و با روش استاندارد و محاسبه میزان جذب در نسبت 260 به 280، غلظت و میزان خلوص دی ان ای تعیین می گردد. عدد بدست آمده برای دی ان ای خالص شده در محدوده 1.7 تا 2 قابل قبول می باشد.



DNA استخراج شده از چندین نمونه خون به وسیله کیت
استخراج DNA از خون



کیفیت DNA استخراج شده با نانو دراپ بررسی می شود

ترکیبات احتمالی موجود در بافرها و نقش آنها در استخراج DNA از خون

1- بافر لیز (Lysis Buffer) با PH=8

ترکیبات احتمالی:

SDS (سدیم دودسیل سولفات): جهت تخریب و دناتوره کردن پروتئینها

Triton X-100: دترجنت جهت تخریب و حل کردن چربیهای غشاهای سلولی و هسته‌ای

EDTA: جلوگیری از فعالیت نوکلئازها با مهار یون‌های فلزی موردنیاز برای آنزیم‌های تخریب‌کننده DNA

NaCl (کلرید سدیم): کمک به پایداری DNA و جلوگیری از دناتوراسیون DNA و تخریب غشاهای گلبول‌ها و آزادسازی محتویات سلولی

Mgcl2: مهار نوکلئازها برای حفظ یکپارچگی DNA پس از تخریب غشا

تریس حفظ PH و نفوذپذیری غشا

2- آنزیم پروتئیناز K: هضم پروتئین‌های سلولی و هسته‌ای که به DNA متصل هستند

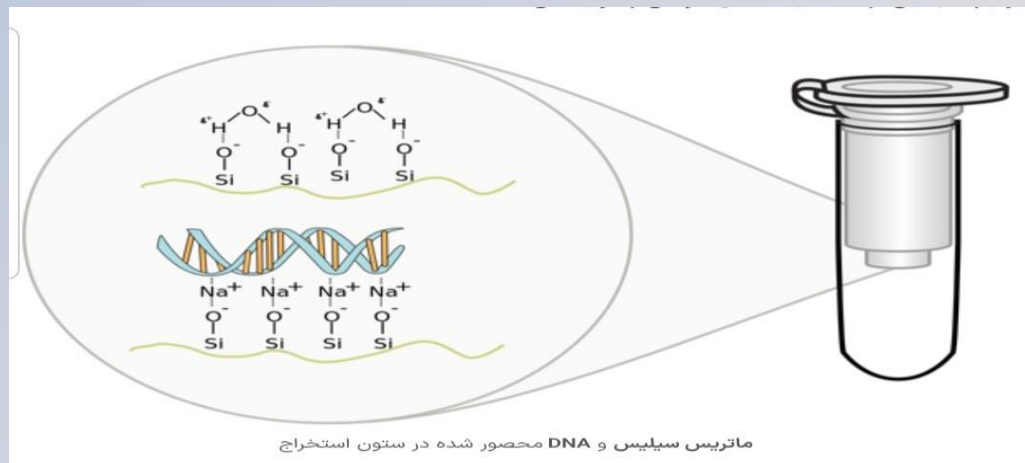
افزایش بازدهی استخراج با کاهش آلودگی پروتئینی

3- بافر بارش (Precipitation Buffer) با PH 6 تا 7

ترکیبات احتمالی:

ایزوپروپانول یا اتانول: کمک به ته نشینی پروتئین ها و سایر ناخالصی ها و رسوبدهی DNA

استات سدیم یا استات آمونیوم و یا نمک های گوانیدینیوم: بهبود فرایند رسوبدهی DNA و افزایش پایداری آن بدلیل ایجاد بار مثبت توسط یون سدیم و بدام انداختن DNA در ماتریس سیلیکایی. چون DNA و ستون سیلیکایی بار منفی دارند.



4- بافر شستشوی 1 (Wash Buffer I)

ترکیبات احتمالی:

نمک های سبک + اتانول کم

اتانول (حدود 70%): حذف ترکیبات ناخواسته و نمک های اضافی

و حفظ اتصال DNA به ستون در حین شستشو و حذف چربی ها و پروتئین های باقی مانده.

5- بافر شستشوی 2 (Wash Buffer II)

ترکیبات احتمالی:

اتانول 80-100%: حذف نهایی نمک‌ها و آلاینده‌های باقی‌مانده و کاهش آلودگی نمکی که ممکن است در مراحل پایین‌دستی مانند PCR تداخل ایجاد کند.

6- بافر شستشو (Elution Buffer) با PH بالا

ترکیبات احتمالی:

Tris HCL (10 میلی مولار - 8/5-8 ph): پایداری DNA و جلوگیری از تخریب آن با حفظ PH جهت جداسازی آن از ستون

EDTA: مهار آنزیم‌های نوکلئازی برای نگهداری طولانی‌مدت DNA با کلات کردن یونهای مورد نیاز آنزیمها

آب عاری از Rnase: آزادسازی DNA از ستون چرخشی و حل کردن آن برای استفاده در آزمایش‌های بعدی و بازیابی DNA خالص از ستون سیلیکایی

جمع‌بندی کلی

بافر لیز = تخریب سلول‌ها و آزادسازی DNA

پروتئیناز K = تجزیه پروتئین‌های مزاحم

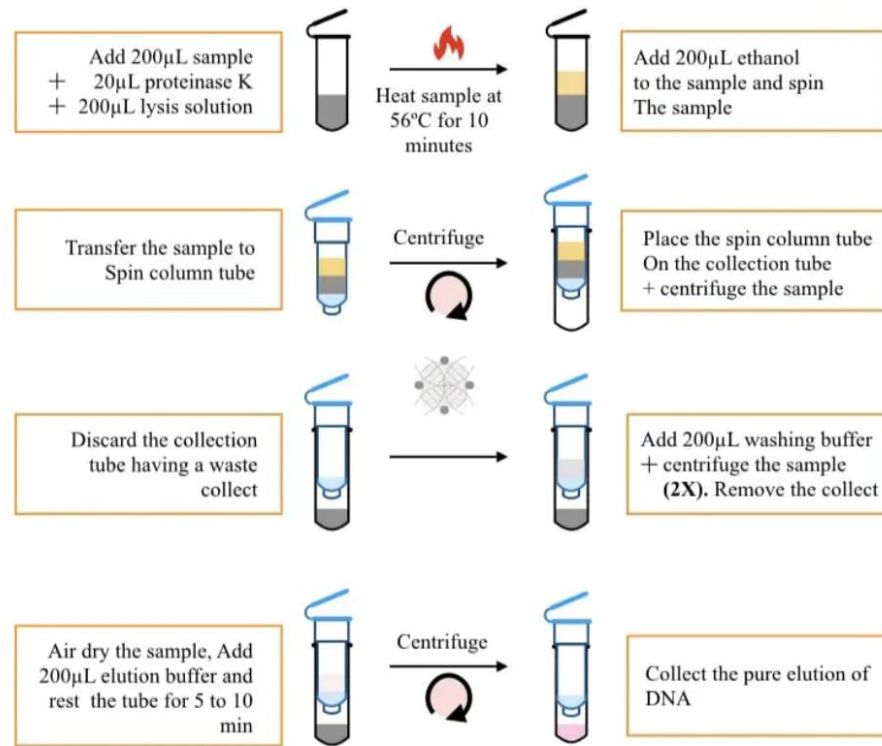
بافر بارش = حذف ناخالصی‌ها و رسوب DNA

بافرهای شستشو = حذف پروتئین‌ها، نمک‌ها و آلاینده‌ها

بافر شستشو نهایی = بازیابی و شستشوی نهایی DNA در محیط پایدار

نقش و تأثیر در استخراج DNA	ترکیبات احتمالی/ عملکرد	نام بافر/ ماده/ تجهیزات
تخریب غشاهای سلولی و هسته‌ای، آزادسازی DNA، مهار نوکلئازها	SDS یا Triton X-100، EDTA، NaCl	بافر لیز (Lysis Buffer)
هضم پروتئین‌های سلولی و هسته‌ای، افزایش خلوص DNA	آنزیم پروتئیناز K	پروتئیناز K
حذف پروتئین‌ها و سایر ناخالصی‌ها، رسوب DNA و افزایش غلظت آن	ایزوپروپانول/ اتانول، استات سدیم	بافر بارش (Precipitation Buffer)
حذف چربی‌ها و پروتئین‌های باقی‌مانده، جلوگیری از آلودگی RNA	اتانول (۷۰٪)، نمک‌های Guanidine-HCl	بافر شستشوی ۱ (Wash Buffer I)
حذف نهایی نمک‌ها و آلاینده‌های باقی‌مانده از مرحله قبل	اتانول (۸۰-۱۰۰٪)	بافر شستشوی ۲ (Wash Buffer II)
آزادسازی DNA از ستون سیلیکا و حفظ پایداری آن برای استفاده‌های بعدی	Tris-HCl، EDTA (اختیاری)	بافر شستشوی نهایی (Elution Buffer)
اتصال و جداسازی DNA از ناخالصی‌ها در حضور نمک بالا	غشای سیلیکا	ستون چرخشی (Spin Column)
عبور مایعات از ستون و جداسازی لایه‌های مختلف	اعمال نیروی گریز از مرکز	سانتریفیوژ (Centrifuge)

Spin-Column DNA extraction



Graphical representation of spin column DNA extraction protocol.