روش کاربردی استخراج DNA از خون انسان

تجربه

الهه فلفلی، شهره سلیمی، غلامحسین رستگارنسب
دانش‌آموزان: زهرا حسینی، حمیده حیدری، زهرا صمدی، نازنین‌السادات هاشمی، مهسا اعتصامی‌راد، محدثه ساکی
پژوهش‌سرای دانش‌آموزی محمدبن زکریای رازی ناحیه یک شهرری
Salimi_sh@yahoo.com

چکیده

پروژهٔ استخراج DNA خون انسان توسط دانش‌آموزان در قالب چهار مرحلهٔ اصلی استخراج عصاره و هستهٔ سلول، تخلیص DNA، تغلیظ DNA و شناسایی اختصاصی DNA انجام شد. مراحل کار و مواد به گونه‌ای انتخاب و طراحی شد که انجام این آزمایش در دبیرستان‌ها قابل اجرا باشد و با رنگ‌آمیزی اختصاصی DNA کارایی مواد و روش به وسیلهٔ دبیر انجمن زیست‌شناسی و استادان ژنتیک دانشگاه تهران تأیید شد.

کلیدواژه‌ها: استخراج DNA، مواد شوینده، نمک اشباع، آکریدین اورنج.

مقدمه

DNA مادهٔ وراثتی موجود در هستهٔ سلول‌ها، مولکولی دو رشته‌ای است که از اتصال میلیون‌ها جفت نوکلئوتید به یکدیگر ساخته شده است. نوکلئوتیدها مانند نردبان پشت سر هم ردیف شده‌اند و بازهای آلی در دو رشته به فاصله مشخص پله‌های این نردبان را تشکیل داده‌اند. DNA به علت داشتن گروه‌های فسفات دارای بارالکتریکی منفی است. مولکول DNA به وسیلهٔ آنزیم DNA آز تجزیه می‌شود. نمک‌های دو ظرفیتی مثل نمک‌های حاوی یون منیزیم به عمل تجزیه کمک می‌کنند، اما نمک‌های یک ظرفیتی مثل نمک‌های حاوی یون سدیم باعث حفاظت DNA در مقابل آنزیم تجزیه‌کننده‌می‌شوند.

همهٔ سلول‌های هسته‌دار، DNA دارند. بنابراین، در بافت‌هایی مثل خون فقط گلبول‌های سفید DNA دارند و گلبول‌های قرمز و پلاکت‌ها که فاقد هسته‌اند DNA ندارند. در عصارهٔ سلولی، سلول‌های خون علاوه بر DNA، مقادیر زیادی پروتئین دارند، مثل آنتی‌بادی‌ها در گلبول‌های سفید، هموگلوبین در گلبول‌های قرمز، پروتئین‌های انعقادی در پلاکت‌ها.

سلول‌های خون جزء سلول‌های جانوری هستند و به خلاف سلول‌های گیاهی دیوارهٔ سلولی ندارند. برای استخراج DNA از عصارهٔ هسته، در اولین مرحله باید غشای سلول و هسته، تجزیه و کافت شود. معمولاً از روش‌های فیزیکی، مکانیکی و شیمیایی برای این کار استفاده می‌شود. کاربرد DNA استخراج شده و نوع سلول هدفی که DNA از آن استخراج می‌شود، روش تجزیه کردن سلول را تعیین می‌کنند.

در روش‌های فیزیکی و مکانیکی از روش‌هایی مثل له‌کردن، شکســت غشا با انجماد، شوک گرمایی و در روش‌های شیمیایی از آنزیم‌ها و بعضی مواد شوینده استفاده می‌شود. محلول‌های نمکی با ایجاد تورژسانس و مواد شوینده با حذف میان کنش‌های قطبی بین پروتئین‌ها و لیپیدهای غشا یا حذف لیپیدها باعث از هم‌گسیختگی مواد شوینده می‌شوند. انتخاب نوع مادهٔ شوینده‌ای که کمترین آسیب را به DNA برساند و هم‌چنین DNA را از اثر آنزیم‌های نوکلئازی حفظ کند، بسیار اهمیت دارد. از این ترکیبات می‌توان EDTA یا اتیلن دی‌آمین تترااستیک اسید را نام برد. این ترکیب با حذف یون منیزیوم مانع فعالیت DNA آز می‌شود.

مرحلهٔ اساسی دوم: جداسازی DNA از سایر ترکیبات عصارهٔ سلولی و هسته است. در سلول‌های جانوری RNA و پروتئین‌ها و در سلول‌های گیاهی کربوهیدرات‌ها از مواد ناخالصی اصلی همراه DNA هستند که باید حذف شوند.

این مواد در روش‌های اندازه‌گیری مقدار DNA با دستگاه اسپکتروفتومتر خطا ایجاد می‌کنند و مانع فعالیت آنزیم‌های محدودکننده در روش انتقال سادرن و کلون کردن ژن می‌شوند. برای تخلیص DNA از حلال‌ها و آنزیم‌های تجزیه‌کننده پروتئین و RNA استفاده می‌شود. مثلاً، پروتئین‌ها در فنل حل می‌شوند، اما DNA حل نمی‌شود یا نمک‌های اشباع باعث رسوب پروتئین‌ها و جداشدن آن‌ها از DNA می‌شوند.

مرحلهٔ سوم استخراج DNA: تغلیظ DNA به معنای بالابردن غلظت DNA در حجم محلول است. معمولاً برای تغلیظ DNA از اتانول و استات سدیم و دمای ۲۰- و یا استون و ایزوپروپانل در دمای پائین استفاده می‌شود. با استفاده از اتانل RNA حذف می‌شود و ارزان‌تر از ایزوپروپانل است. در ضمن ایزوپروپانل به DNA آسیب می‌رساند، اما ایزوپروپانل بهتر از اتانل الیگو نوکلئوتیدها را تغلیظ می‌کند.

مرحلهٔ آخر: شناســایی اختصاصی DNA در محلول است. اگر مقدار DNA زیاد باشد، یا DNA با وزن ملکولی بالا استخراج شود، توده‌های دراز و سفیدرنگ DNA در محیط سرد تشکیل می‌شوند. اگر محلول سانتریفیوژ شود، رسوب سفید نشان می‌دهد، در حین کار DNA را از دست نداده‌ایم. برای تأیید بیشتر می‌توانیم از معرف‌های رنگی برای تشخیص DNA در محلول استفاده کنیم. معرف‌هایی مانند اتیدیوم بروماید در حضور پرتو U.V، DNA را به رنگ بنفش و فنل‌رد DNA و پروتئین‌های اسیدی را به رنگ قرمز نشان می‌دهد. مادهٔ آکریدین اورنج، DNA را به رنگ سبز فسفری و RNA را به رنگ قرمز آجری نشان می‌دهد.

مواد و روش

نمونه‌های ما نمونه‌های خون دبیر انجمن زیست‌شناســی بود. معیار انتخاب ایشــان اطمینان به عدم ابتلای ایشان به ایدز و هپاتیت بود. گزارش ســازمان انتقال خون پس از خون دادن ایشــان و رعایت نکات ایمنی، مانند اســتفاده از دستکش‌های لاتکس توســط دانش‌آمــوزان باعث اطمینان‌خاطــر در مقابل خطرات کار با خون بود.

نمونه‌گیری

ابتدا سرنگ را برای منعقد نشدن خون هپارینه کردیم. آمپول هپارین تهیه شده از داروخانه را شکستیم سرنگ را درون آمپول و هپارین را درون سرنگ کردیم و دوباره آن را خالی کردیم و سپس از ایشان خون گرفتیم. هپارین مانع عمل PCR می‌شود، اما در کار تحقیقی ما چون فقط هدف استخراج DNA بود، مانعی به حساب نمی‌آمد. چون دانش‌آموزان در کتاب زیست‌شناسی و آزمایشگاه ۱ این ماده را خوانده بودند، استفاده از آن در طراحی آزمایش توسط دانش‌آموزان برای ما خیلی مهم بود.

مواد

۱. مواد لازم برای تجزیه‌کردن غشــای سلول: سوکروز ۰/۳۲مــولار، منیزیــوم کلراید ۵ میلی‌مولار و یــک قطره مایع ظرفشویی. مایع ظرفشویی درست در هنگام اضافه‌کردن محلول به خون اضافه می‌شــود. در این مرحله از بافر تریس HCL و مواد شوینده‌ای مثل X-100 استفاده نکردیم.

۲. مــواد لازم برای تهیهٔ بافر PBS: ایــن بافر برای ثبات DNA و عدم تغییر pH محیط اســتفاده می‌شود. سدیم کلراید ۰/۱٤ مولار، پتاســیم کلراید ۲/۷ میلی‌مولار، فسفات هیدروژن دی ســدیم ۰/۰۱ مولار، در این مرحله ما از KH_2PO_4 که برای تهیهٔ این بافر استفاده می‌شود، استفاده نکردیم.

۳. مواد لازم برای تجزیه‌کردن غشــای هســته: ســدیم هیدروکسید ۵۰ میلی‌مولار و یک قطره مایع ظرفشویی. در این مرحله ما از EDTA و بافر تریس استفاده نکردیم.

۴. مواد لازم برای جدا کردن DNA از پروتئین‌ها: سدیم کلراید ٦ مولار. در این مرحله از موادی مانند فنل ـ کلروفرم یا پروتئیناز K استفاده نکردیم.

۵. مــواد لازم برای تغلیــظ DNA: اتانل ۹۷ درصد که از شب قبل در فریزر یخچال گذاشته شده بود.

۶. مواد لازم برای رنگ‌آمیزی DNA: آکریدین اورنج، در این مرحله ما از موادی چون اتیدیوم بروماید استفاده نکردیم.

محلول‌های شــمارهٔ ۱ و ۲ و ۳ را اتوکلاو و بعد اســتفاده کردیم. محلول شمارهٔ ۲ را پس از اتوکلاو در یخچال گذاشتیم. در این آزمایش بعضی از موادی که در استخراج DNA استفاده می‌شود، توسط ما استفاده نشد. مهم‌ترین دلیل برای عدم استفاده از مــوادی مثل تریس، EDTA این بود که در آزمایشــگاه‌های مــدارس موجود نبــود و برای ما مهم بود کــه از مواد موجود در مــدارس اســتفاده کنیم. بعضی از این مــواد مثل پروتئیناز k یا RNA آز بســیار گران‌قیمت هســتند و خرید آن‌ها از نظر اقتصادی برای مدارس مقرون به صرفه نیســت. بعضی از این مواد مثل اتیدیوم بروماید سمی و سرطان‌زا هستند و استفاده از مواد ایمن‌تر دارای اهمیت بود. بعضی مواد مثل فنل‌رد ویژگی اختصاصی موردنظر ما را، نداشتند. در این روش pH هیچ یک از محلول‌ها را به علت نداشتن pHسنج تنظیم نکردیم.

وسایل لازم

ســرنگ، لولهٔ آزمایش، ســانتریفیوژ، بشــر، چراغ گازی، اتوکلاو، ترازو، استوانهٔ مدرج، ارلن

همهٔ لوله‌های آزمایش و سانتریفیوژ اتوکلاو شدند. در این روش هیچ‌یک از مواد اســتفاده شــده درصد خلوص بالا مثل مواد شرکت‌های سیگما و مرک نداشتند. مواد استفاده شده مواد ارسال شده توسط صنایع آموزشی به مدارس بود. اضافه کردن محلول‌ها نیز با سرنگ‌های استریل انجام شد.

روش کار

۱. بــه یک سی‌ســی خــون هپارینه، ۵ سی‌ســی محلول تجزیه‌کنندهٔ غشای ســلول و یک قطره مایع ظرفشویی اضافه کردیم و لوله را به مدت ۱۵ دقیقه با دســت سروته کردیم. این عمل را به این علت انجام دادیم که دستگاه شیکر نداشتیم.

۲. لوله را به مدت ۵ دقیقه روی یخ گذاشتیم و لوله را چند بار سروته کردیم.

۳. لولــه را به مــدت ۱۵ دقیقه با دور ۳۰۰۰ ســانتریفیوژ کردیم.

٤. پس از ســانتریفیوژ محلول رویــی را دور ریختیم و به رسوب ته لوله ۵۵ سی‌ســی بافر PBS سرد اضافه کردیم و به رسوب ضربه زدیم تا رسوب معلق شود.

۵. لولــه را بــه مدت ۳۰ ثانیــه با دور ۱۲۰۰ ســانتریفیوژ کردیم.

٦. محلول رویی را دور ریختیم.

۷. مراحل ٦-۱ را ۳ بار تکرار کردیم تا همهٔ رسوب ته لوله سفید شد. به کمک مراحل ۷-۱ غشای گلبول‌های قرمز و سفید و پلاکت‌ها پاره شده و سیتوپلاسم سلول‌ها و اندامک‌های آن‌ها آزاد می‌شود. با عمل سانتریفیوژ هسته‌های گلبول‌های سفید از سایر اجزای سیتوپلاسم جدا شد.

۸. به رسوب ته لوله ۰/۲ هیدروکسید سدیم اضافه کردیم.

۹. لوله را به مدت ۲۰ دقیقه در آب جوش قرار می‌دهیم.

۱۰. صبر می‌کنیم تا لوله ســرد شود. مراحل ۱۰-۸ را برای تجزیه‌کردن غشای هستهٔ گلبول‌های سفید انجام دادیم.

۱۱. به لوله سدیم کلراید اشباع اضافه می‌کنیم (٦ مولار) و چندین بار لوله را سروته می‌کنیم.

۱۲. لوله را به مدت ۳۰ ثانیه با دور ۱۲۰۰ سانتریفیوژ کردیم (مرحلهٔ یازده و ۱۲ را برای رسوب کردن پروتئین‌ها و جدا شدن از DNA انجام دادیم).

۱۳. محلــول رویی را بــه درون لولهٔ دیگر ریختیم، ۲ برابر حجم آن اتانل سرد اضافه کردیم و در حمام یخ به شکل دورانی حرکت دادیم تا ملکول‌های دراز DNA جمع و تغلیظ شوند.

١٤. به نمونهٔ معرف رنگی آکردین اورنج اضافه کردیم.

نتایج

با توجه به عکس‌های گرفته شـــده از نمونه‌های تهیه شده با روش اجرا شده، با مواد توضیح داده شده، توانستیم DNA را استخراج کنیم. دانش‌آموزانی که مراحل ۷-۱ را یک بار و بعضی ۲ بار انجام دادند و دانش‌آموزانی که یک قطره مایع ظرفشویی را اضافه نکرده بودند، رسوب سفیدی به دست نیاورده بودند و هسته‌های آن‌ها با گلبول‌های قرمز و هموگلوبین آلوده بود.

نمونه‌های اســـتخراج شـــده هنگامی که بـــا آکردین اورنج رنگ‌آمیزی شدند، آلودگی با RNA را نشان ندادند. از آن‌جا که سرعت دستگاه سانتریفیوژ ما مشخص نبود، بهترین سرعت‌های موردنظر به‌طور تجربی با این دستگاه تعیین شد، با این سرعت‌ها توانستیم بهترین حالت استخرج DNA را داشته باشیم.

بحث و نتیجه‌گیری

با حذف موادی مانند تریس یا فسفات دی هیدروژن پتاسیم یا نداشـــتن کنترل بر pH محلول‌ها نگران بودیم که DNAهای خارج شده از هسته در طی کار تجزیه شوند، اما عملاً نتیجه نشان داد با غلظت‌های اســـتفاده شده از مواد، pH در محدوده‌ای قرار می‌گیرد که اثری روی DNA ندارد. ما محلول‌های حاوی DNA را نگـــه‌داری نکردیم. چنانچه مایل به نگهداری آن بودیم، باید از محلول‌هایی که پیشنهاد شده، مثل بافر تریس اسیدی استفاده می‌کردیم، که ما نداشتیم و باید روی این ماده کار می‌کردیم و از بافرهای دیگری استفاده می‌کردیم. مزیت روشی که ما استفاده کردیم قابل اجرا بودن آن در دبیرســـتان‌ها بود. یافتن و استفاده از آکردین اورنج به عنوان معرف رنگی نقطهٔ مهمی برای کار ما بود. این ماده از یک طرف دارای ایمنی بیشتر نسبت به اتیدیوم بروماید است و از طرف دیگر با رنگ‌آمیزی اختصاصی DNA به رنگ سبز فسفری، نسبت به فنل‌رد که پروتئین‌ها و DNA را هر دو به رنگ قرمز درمی‌آورد، ارجحیت دارد.

منابع

1. www.life.uiuc.edu/hughes/footlooker
2. www.ncbnlm.nih.go
3. www.biomedcentral.com/
4. www.biomedcentral.com/

ایران

قانون و شکستگی استخوان

عبدالناصر کعدان

ترجمه: محمدعلی- ابوعلی

کلیدواژه‌ها: ابن‌سینا، شکستگی استخوان، قانون فی‌الطب.

اشاره

هر سال روز نخست شهریورماه روز پزشک و روز بزرگداشـــت ابن‌سیناست. فصل‌نامهٔ رشد آموزش زیست‌شناسی به مناسبت این روز ضمن عرض تبریک به همهٔ پزشکان زحمتکش، بویژه پزشـــکانی که در کســـوت معلم زیست‌شناسی به آمـــوزش نوجوانان و جوانان ما مشـــغول‌اند، مرور مختصری دارد به شـــرح علائم، روش‌های تشخیص و درمان شکســـتگی‌های استخوان در کتاب قانون ابن‌سینا.