

## بهینه سازی روش استخراج DNA از استخوان برای به دست آوردن ماده ژنتیکی از استخوان و دندان‌های باستانی

دکتر حسین صمدی کفیل\* - دکتر محمد اصغرزاده\*\* - الهام زینال زاده\*\*\* - سید بهاء حسینی سرشنیزی\*\*\*\*

\* دکترای تخصصی میکروبی شناسی، مرکز تحقیقات کاربردی دارویی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران  
\*\* دکترای تخصصی فرآورده‌های بیولوژیک، مرکز تحقیقات بیماری‌های عفونی و گرمسیری، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران.  
\*\*\* کارشناسی علوم آزمایشگاهی، مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران.  
\*\*\*\* کارشناسی ارشد باستان شناسی، گروه باستان شناسی، دانشکده علوم انسانی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران.

### چکیده

زمینه و هدف: واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (PCR) یکی از مهم‌ترین ابزارهای تشخیصی ملکولی مدرن می‌باشد که ما را قادر می‌سازد تا به بررسی ابعاد مختلف ملکولی یک یاخته پردازیم. از اصلی‌ترین اجزاء آزمون واکنش زنجیره‌ای پلیمرز، DNA می‌باشد که با استفاده از آن و تکثیر بخش‌های اختصاصی آن قادر خواهیم بود تا ابعاد مختلف حیاتی یک یاخته را مورد بررسی قرار دهیم. در این مطالعه ما با استفاده از بررسی گروهی از نمونه‌های باستانی متعلق به ۳۶۰۰ سال پیش شامل نمونه‌های استخوان و دندان باستانی کشف شده در منطقه بهشهر استان مازنداران، به بررسی و بهینه سازی روش استخراج DNA پرداختیم تا بتوانیم با کسب حداکثر ژنوم استخراج شده سالم به بررسی‌های بالینی و ژنومی بر روی آن‌ها پردازیم.

روش بررسی: در این مطالعه با استفاده از پروتکل تخلیصی قبل از استخراج و حذف مهارکننده‌های واکنش زنجیره‌ای پلیمرز و سپس استخراج با استفاده از ذرات سیلیکا بید به بررسی نتایج استفاده از این روش بهینه شده پرداختیم.

یافته‌ها: نتایج استخراج DNA در نمونه‌های مورد مطالعه در مطالعه حاضر به ترتیب  $۱۸\text{ng}/\mu\text{l}$ ،  $۳۲\text{ng}/\mu\text{l}$ ،  $۷\text{ng}/\mu\text{l}$ ،  $۲۵\text{ng}/\mu\text{l}$ ،  $۳۷\text{ng}/\mu\text{l}$ ،  $۴۲\text{ng}/\mu\text{l}$  بودند که در ۶۷٪ موارد دارای خلوص عالی و میزان جذب نوری ۱/۸ بودند. همچنین ژنوم استخراج شده در این مطالعه جهت بررسی‌های ژنومیک واکنش زنجیره‌ای پلیمرز مورد استفاده قرار گرفتند که در تمامی نمونه‌ها نتایج قابل قبولی را ارائه نمودند.

نتیجه‌گیری: نتایج حاصل نشان از استخراج مناسب و خالص و قابلیت استفاده از این ژنوم در مطالعات ژنومی می‌داد. لذا این روش برای استخراج از انواع نمونه‌های استخوانی، دندانی و غیره که بافت قابل استخراج به سادگی در دسترس نمی‌باشد توصیه می‌گردد.

واژگان کلیدی: استخراج DNA، استخوان، دندان، باستانی، سیلیکا، ژنوم، واکنش زنجیره‌ای پلیمرز.

نویسنده پاسخگو: گروه میکروبی شناسی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران. شماره تماس: +۹۸۴۱۱۳۳۶۴۶۶۱ kafilhs@tbzmed.ac.ir

### مقدمه

یک یاخته را مورد بررسی قرار دهیم (۳). از ابعاد کاربردی و تشخیصی آن می‌توان به تشخیص گونه، اصالت، جنسیت، ناسازگاری‌های ژنومی، موتاسیون‌ها، بیماری‌ها و تشخیص انواع عوامل عفونی حاضر در نمونه‌ها پرداخت (۴،۵). توالی ژنومی یا همان DNA در فرآیند تشخیص با این روش اهمیت ویژه و اساسی دارد به نحوی که وجود هرگونه مهار کننده به همراه DNA، کیفیت پایین DNA استخراج شده با توجه به شکنندگی DNA باستانی، عدم رعایت دمای استخراج و با شرایط pH استخراج DNA نقش بسیار مهمی در یک آزمون موفق ایفاء می‌نماید (۵،۶). در واقع غالب روش‌های موجود استخراج DNA برای استخراج DNA از نمونه‌های بافت طبیعی و یا DNA به هم پیوسته با وزن

واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (PCR) یکی از مهم‌ترین ابزارهای تشخیصی ملکولی مدرن می‌باشد که ما را قادر می‌سازد تا به بررسی ابعاد مختلف ملکولی یک یاخته پردازیم (۱). این ابزار با استفاده از تکثیر بخش اختصاصی ژنوم پروکاریوتی و یوکاریوتی امکان تعیین گونه، نژاد و به نحوی تاریخچه یاخته را فراهم می‌نماید (۱،۲). از اصلی‌ترین اجزاء آزمون واکنش زنجیره‌ای پلیمرز DNA می‌باشد که با استفاده از آن و تکثیر بخش‌های اختصاصی آن قادر خواهیم بود تا ابعاد مختلف حیاتی

دریل‌های یکبار مصرف برداشته شد تا از هرگونه انتقال ژنوم بین نمونه‌ها جلوگیری شود (۱۱). ترجیحا محل رویه برداری و حذف پوسته سطحی در مکان‌های متفاوت نیز انجام گرفت تا امکان آلودگی ژنومی به حداقل برسد. همچنین جهت هر کدام از نمونه‌ها از یک هاون کاملا اختصاصی و مجزا که برای اولین بار استفاده می‌شدند، استفاده گردید تا با استفاده از آن بخش داخلی دندان‌ها و یا استخوان‌ها پودر شده و مورد استفاده قرار گیرد. در این مرحله نیازمند به دست آوردن یک پودر یک دست و کاملا منفک شده می‌باشیم تا بتوان از آن حداکثر ژنوم DNA را استخراج نمود.

جهت استخراج ژنوم ابتدا مرحله‌ای برای حذف مواد زاید همراه استفاده گردید بدین شرح که بافری حاوی EDTA ۰,۴۵M از ۰,۲۵ mg ml<sup>-1</sup> از پروتئیناز K با pH ۸ تهیه گردید. سپس ۱۰ میلی لیتر از این بافر با ۵۰۰ میلی گرم از پودر حاصل از مراحل بالا مخلوط گردیده و پس از بستن درب لوله با استفاده از پارافیلیم به مدت ۲۴ ساعت بر روی همزن با سرعت آهسته در دمای اتاق قرار داده شد و سپس برای ۱ الی ۳ ساعت در دمای ۵۶ درجه سانتی گراد قرار داده و پس از آن نمونه‌ها به مدت ۲ دقیقه در ۵۰۰۰g سانتریفوژ شدند. در این مرحله تمامی DNA مورد نیاز ما در مایع سطحی حل شده و با حذف رسوبات مایع سطحی برای مراحل تخلیص DNA مورد استفاده قرار گرفتند. توجه شود که نمونه مورد استفاده باید در مرحله قبل از سانتریفوژ کامل سفید شفاف باشد و کدورت بیش از حد نشان آلودگی بالای نمونه است که امکان استخراج را کاهش و دارای مهار کننده‌های آزمون واکنش زنجیره‌ای پلیمرز می‌باشد (شکل ۲).

برای حداکثر تخلیص DNA موجود در محلول رویی از دانه‌های سیلیکا استفاده شد که بدین منظور از کیت سیلیکا بید شرکت فرمنتاس تحت عنوان Genejet™ silica bead (شرکت فرمنتاس - آلمان) استفاده شد بدین شرح که محلول رویی به یک لوله جدید منتقل شد به آن ۳۰ میلی لیتر از بافر اتصال موجود در کیت و ۲۰ میکرولیتر از سیلیکابید اضافه شد. برای تنظیم pH از محلول سدیم استات استفاده شد تا از کاهش یا افزایش بیرویه pH جلوگیری شود. سپس لوله‌ها برای یک ساعت در دمای ۵۵ درجه سانتی گراد و در شرایط تاریکی نگهداری شدند. پس از آن نمونه‌ها برای ۱۵ ثانیه در ۱۶۰۰۰g سانتریفوژ شدند و محلول رویی باقیمانده دور ریخته شد و به سیلیکابیدهای باقیمانده ۱ میلیلیتر از بافر شستشو که در فریزر نگهداری می‌شد افزوده شد. سیلیکا بیدها از نظر وجود هرگونه ناخالصی یا مهار کننده شستشو داده شده و این فرآیند برای تمامی نمونه‌ها دو بار تکرار شد. سپس در دمای اتاق با استفاده از باز ماندن درب تیوب‌ها کاملا خشک شدند. در نهایت ۵۰ میکرولیتر از بافر الوشن که به همراه سیلیکا بیدها در کیت عرضه شده است، افزوده شده و به مدت ۵ دقیقه در ۵۵ درجه سانتی گراد نگهداری شد تا DNA به داخل بافر رها شود سپس برای مدت ۳۰ ثانیه در ۱۶۰۰۰g سانتریفوژ شد و محلول رویی به تیوب ۱/۵ میلی لیتری جدید انتقال یافت که حاوی DNA تخلیص شده بود. همچنین

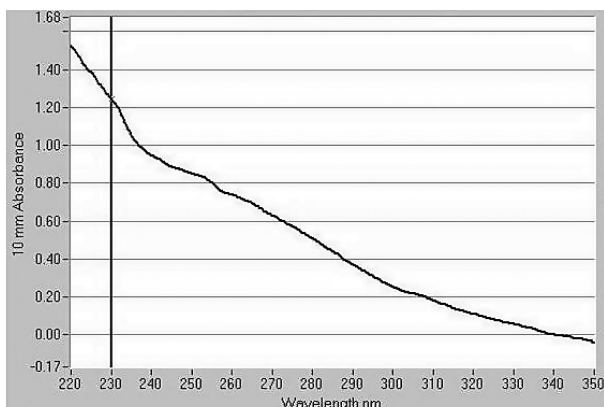
ملکولی بالا می‌باشند در حالی که نمونه‌های باستانی غالبا حاوی DNA شکسته با وزن ملکولی پایین و به مقدار بسیار پایین و به همراه انواع مختلفی از مهار کننده‌های آزمون واکنش زنجیره‌ای پلیمرز می‌باشند (۶-۸) لذا روش استخراج مناسب برای استخراج این نوع از DNA باید به دور از انواع محلول‌های شوینده قوی، دماهای بالا یا پایین و بسیار حساس باشد، به خوبی بتواند حداکثر DNA ژنومی را جذب نماید، قادر به حذف حداکثر مهارکننده‌های آزمون واکنش زنجیره‌ای پلیمرز باشد و فارغ از مراحل متکی به حرکت‌های سریع و تند باشد (۹،۱۰). لذا در این مطالعه ما با استفاده از بررسی گروهی از نمونه‌های باستانی متعلق به ۳۶۰۰ سال پیش شامل نمونه‌های استخوان و دندان باستانی کشف شده در منطقه به‌شهر مازندران، به بررسی و بهینه‌سازی روش استخراج DNA پرداختیم تا بتوانیم با کسب حداکثر ژنوم استخراج شده سالم به بررسی‌های بالینی و ژنومی بر روی آن‌ها بپردازیم. در این مطالعه ما با استفاده از روش استخراج سیلیکا ژل با استفاده از پروتکل تخلیصی قبل از استخراج به بررسی نتایج با استفاده از این روش بهینه شده پرداختیم.

## روش بررسی

نمونه‌های استخوان و دندان اجساد کشف شده در سایت مطالعاتی در منطقه به‌شهر مازندران (گوهر تپه) پس از کسب مجوزهای لازم به آزمایشگاه مرکز مطالعاتی انتقال داده شد. این اجساد متعلق به اجساد بخش AH2XX1 بودند (شکل ۱)، دندان‌های مورد استفاده دندان First premolar, First Molar, Second Molar از اجساد و همچنین استخوان لگن و استخوان بازو مورد استفاده قرار گرفتند (جدول ۱) و با استفاده مطالعات رادیوکرینی که توسط دانشگاه کمبریج انگلستان انجام گرفته است متعلق به ۳۵۵۰ سال پیش می‌باشند. تمامی نمونه‌ها برای جلوگیری از هرگونه آلودگی ژنومی و یا سایر آلودگی‌ها با استفاده از ظروف پلاستیکی درب زیپ دار و کاملا جدا از هم انتقال یافتند. سطح رویی تمامی دندان‌ها و استخوان‌ها با استفاده از سوهان و سر



شکل ۱- نمونه جسد مورد استفاده در این مطالعه



شکل ۳- نمودار آزمون اندازه گیری خلوص DNA با استفاده از دستگاه نانودراپ



شکل ۲- نمونه غیر قابل قبول و نمونه قابل قبول در مرحله حذف کلسیم و سایر مهارکننده‌ها ( به ترتیب از راست به چپ).

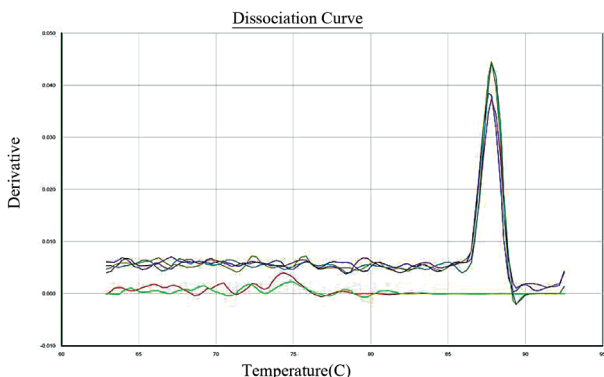
جدول ۱- نمونه‌های مورد مطالعه و جذب نوری آن‌ها با استفاده از دستگاه طیف سنجی نانودراپ

جذب نوری	محوطه باستانی	شماره جسد	استخوان یا دندان
25ng/μl	AH2XX1	F5AH2XX1-1	First Molar
37ng/μl	AH2XX1	F5AH2XX1-2	Second Molar
32ng/μl	AH2XX1	F18AH2XX1	First Molar
42ng/μl	AH2XX1	F12AH2XX1	First Molar
18ng/μl	AH2XX1	F4AH2XX1	Femur bone
7ng/μl	AH2XX1	F9AH2XX1	Humeus bone

چهار نمونه که نتایج آن با روش بالا کسب شده بودند با استفاده از کیت معمولی استخراج DNA شرکت سیناژن مورد استخراج قرار گرفتند که تمامی مراحل مطابق راهنمای کاربرد کیت انجام گردید. جهت بررسی کیفیت و میزان DNA استخراج شده از دستگاه نانودراپ استفاده شد و همچنین بر روی ژل آگارز ۱/۲٪ الکتروفورز انجام گردید و رنگ آمیزی نمونه با استفاده از رنگ GelRed انجام گردید. همچنین DNA مورد استخراج جهت آزمون Realtime PCR اختصاصی ژن بتا اکتین مورد استفاده قرار گرفت که با استفاده از دستگاه Realtime PCR مدل ۷۵۰۰ شرکت Applied Biosystems و با استفاده از پرایمرها و پروتکل ارائه شده توسط لی و همکاران انجام گردید (۱۲).

### یافته‌ها

نتایج استخراج DNA در نمونه‌های مورد مطالعه در مطالعه حاضر به ترتیب ۳۷ng/μl ، ۲۵ng/μl ، ۷ng/μl ، ۳۲ng/μl ، ۱۸ng/μl ، ۴۲ng/μl بودند (جدول ۱) که در ۶۷٪ موارد دارای خلوص عالی و میزان جذب نوری ۱/۸ بودند (شکل ۳) و در دو مورد دیگر دلیل عدم



شکل ۴- آزمون Realtime PCR ژن بتا اکتین با استفاده از نمونه DNA استخراج شده در این مطالعه

(۸-۶) یا قادر به حذف کامل مهارکننده‌ها نیستند، پرهزینه هستند و یا پروتکل شامل مراحل سخت و طاقت فرسا می‌باشد (۱۱). در این مطالعه ما با استفاده از سیلیکا بیدهای ارزان قیمت قابل تهیه در کشور که به همراه خود بافرهای آزادسازی را نیز به همراه خود دارند استفاده نموده و در ابتدا با استفاده از بافرهایی مواد مهارکننده و مضر آزمون را حذف نمودیم. نتایج بررسی نمونه‌ها با استفاده از نانودراپ نشان از خلوص مناسب نمونه‌های مورد استفاده بودند (جدول ۱). این روش را می‌توان به عنوان یک روش ساده و کاربردی که در عین سادگی اجراء حداکثر ژنوم را استخراج نموده و DNAهای موجود در نمونه را جمع آوری می‌نماید، محسوب نمود. همچنین محصولات ژنومی حاصل از استخراج با این روش برای استفاده در آزمون RealTime PCR برای آزمون ژن بتا اکتین مورد استفاده قرار گرفتند (شکل ۴) که نتایج حاصل، استخراج مناسب و خالص و قابلیت استفاده از این ژنوم را در مطالعات ژنومی نشان می‌داد. لذا این روش برای استخراج از انواع نمونه‌های استخوانی، دندانی و ... که بافت قابل استخراج به سادگی در دسترس نمی‌باشد توصیه می‌گردد. همچنین مطالعات با حجم بیشتر برای تایید این روش توصیه می‌گردد.

### پیشنهادات

بر اساس نتایج مطالعه حاضر توصیه می‌شود از این روش برای انواع مطالعات بر روی ژنوم‌های باستانی و اجساد که بافت نرم به طور کامل تخریب شده است، استفاده گردد.

### تقدیر و تشکر

این مطالعه با حمایت مالی مرکز تحقیقات کاربردی دارویی دانشگاه علوم پزشکی تبریز و طی طرح تحقیقاتی مصوب این مرکز اجرا گردیده است. بدینوسیله از تمامی کارکنان سایت باستان شناسی گوهر تپه، همکاران سازمان میراث فرهنگی و گردشگری، گروه باستان شناسی دانشگاه تربیت مدرس و همکاران آزمایشگاه میکروبی شناسی مرکز تحقیقات دارویی تبریز کمال تقدیر و تشکر را داریم.

کسب بهترین جذب نوری وجود آلودگی خاکی مختصر و یا کم بودن مقدار ۵۰۰ میلی گرم بود. آزمون نمونه‌های استخراج شده بر روی ژل آگارز در هیچکدام از نمونه‌های استخراج شده باند قابل مشاهده ایجاد نکرد در حالیکه نمونه کنترل مثبت رنگ آمیزی به خوبی رنگ آمیزی شده بود. نمونه‌هایی که با استفاده از روش معمولی استخراج DNA با استفاده از کیت استخراج سیناژن انجام شد هیچ ژنوم قابل شناسایی با نانودراپ استخراج نموده بودند. همچنین ژنوم استخراج شده در این مطالعه جهت بررسی‌های ژنومیک واکنش زنجیره‌ای پلیمرز مورد استفاده قرار گرفتند که در تمامی نمونه‌ها نتایج قابل قبولی را ارایه نمودند (شکل ۴). هرچند به دلیل محدودیت نمونه‌های مورد بررسی در این مقاله، نیازمند بررسی‌های بیشتر با حجم نمونه‌های بیشتر می‌باشیم.

### بحث و نتیجه گیری

استفاده از ابزارهای ملکولی به عنوان یک انقلاب در شناخت ما از گذشته می‌باشد. در این میان واکنش زنجیره‌ای ملکولی یک روش بسیار حساس و مناسب جهت شناسایی ژنتیکی و ترسیم گذشته و حال و حتی آینده می‌باشد (۱). این روش با استفاده از حتی یک تار مو، قادر به شناسایی پیشینه ژنتیکی موجودات می‌باشد. اما در این میان ماده اولیه و اصلی مورد نیاز برای این گروه از مطالعات وجود ژنوم DNA می‌باشد تا بتوانیم با بررسی بخش‌های مختلف آن پی به پیشینه ژنتیکی موجودات ببریم (۱۱، ۱۰). در نمونه‌های باستانی مهمترین مشکل از میان رفتن اکثر DNA و عدم وجود DNA قابل استفاده در آزمون زنجیره‌ای پلیمرز می‌باشد (۹). این امر می‌تواند به دلیل از میان رفتن اکثریت ژنوم موجود زنده بر اثر فرسایش و یا وجود مهارکننده‌های متعدد واکنش زنجیره‌ای پلیمرز می‌باشد لذا پروتکل بهینه استخراج ژنومی از اهمیت بالایی برخوردار است تا بتوان به طبع آن ابعاد مختلف ژنومی نمونه مورد مطالعه را بررسی نمود (۱۱). تا حال روش‌های متعددی برای استخراج ژنوم باستانی ارائه شدند که غالباً بر اساس روش‌هایی می‌باشند که باعث صدمه به DNA می‌شوند

## References

1. Saiki R. Gelfand D. Stoffel S. et al. "Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase". *Science* .1988; 239: 487–91.
2. Noonan JP. Genomic sequencing of Pleistocene cave bears. *Science* .2005; 309: 597–99.
3. Noonan, J.P. et al. Sequencing and analysis of Neanderthal genomic DNA. *Science*. 2006; 314: 1113–18.
4. Green, R.E. et al. Analysis of one million base pairs of Neanderthal DNA. *Nature* 2006; 444: 330–336.
5. Geigl, EM. On the circumstances surrounding the preservation and analysis of very old DNA. *Archaeometry* .2002; 44: 337–42.
6. Margulies M. et al. Genome sequencing in microfabricated high-density picolitre reactors. *Nature* 2005; 437: 376–380.
7. Poinar, HN. et al. Metagenomics to paleogenomics: large-scale sequencing of mammoth DNA. *Science* 2006; 311: 392–4.
8. Rogaev, EI. et al. Complete mitochondrial genome and phylogeny of Pleistocene mammoth *Mammuthus primigenius*. *PLoS Biol*. 2006; 4: e73.
9. Höss M. Dilling A. Carrant A. Pääbo S. Molecular phylogeny of the extinct ground sloth *Myodon darwini*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1996; 93: 181–5.
10. Pääbo S. Ancient DNA: extraction, characterization, molecular cloning, and enzymatic amplification. *Proc Natl Acad Sci. USA* 1989; 86: 1939–43.
11. Rohland N & Hofreiter M. Ancient DNA extraction from bones and teeth. *Nature Protocols* 2007; 2: 1756 - 62.
12. Li Z. Yang L. Wang J. et al. Beta-Actin is a useful internal control for tissue-specific gene expression studies using quantitative real-time PCR in the half-smooth tongue sole *Cynoglossus semilaevis* challenged with LPS or *Vibrio anguillarum*. *Fish Shellfish Immunol*. 2010; 29: 89-93.

# Optimizing Bone DNA Extraction for Obtaining High Yield Genome of Ancient Teeth and Bones

Hossein Samadi Kafil\*† - Mohammad Asgharzadeh\*\* - Elham Zeinalzadeh\*\*\* - Seyed-Baha Hossein Sarteshnizi\*\*\*\*

\* PhD in Medical Microbiology, Drug Applied Research Center, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran.

\*\* PhD in Molecular Biology, Infectious Disease and Tropical Medicine Research Center, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran.

\*\*\* BSc in Medical Laboratory, Biotechnology Research Center, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran.

\*\*\*\* MSc in Archeology, Department of Archeology, Faculty of Humanities, Tarbiat Modarres University, Tehran, Iran.

## Abstract

**Background:** Polymerase chain reaction (PCR) is one of important molecular methods that let us to understand more about molecular aspects of cells. DNA is the most important part of PCR reaction, that its quality and amount has direct effect on final results. In this study, we aimed to develop a protocol for extracting DNA from samples of tooth and bone belong to 3600 years ago.

**Method:** After grilling and cleaning all surface parts of bones and teeth we used buffers for removing calcium and other PCR inhibitors; then, we used Silica beads for collecting all DNA in our samples.

**Findings:** DNA extraction amounts were 37ng/μl, 25ng/μl, 7ng/μl, 32ng/μl, 18ng/μl, 42ng/μl. In 67% of samples, we had extractions with high purity according to nano-drop results. Extracted DNA were examined for Real Time PCR, beta-actin gene that we had good results.

**Conclusion:** Results of this study showed that this developed protocol has a good yield of DNA with enough purity and removing PCR inhibitors. We recommend this protocol for applying in same samples and studies.

**Keywords:** DNA Extraction, Polymerase Chain Reaction, Ancient, Bone, Teeth, Silica.

†Correspondence: Department of Medical Microbiology, Faculty of Medicine, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran.

Tel: +98 411 3364661

E-mail: kafilhs@tbzmed.ac.ir