راهنماي جمع آوري، انتقال، آماده سازي و نگهداري نمونه ها براي آزمايش هاي مولكولي

اين راهنما به منظور ارائه اطلاعات علمي و فني لازم در ارتباط با نمونه هايي كه براي آزمايش هاي ملكولي تهيه شده است. اين مجموعه ترجمه پروتكل MM13-A بوده كه در كميته ويروس شناسي و بيولوژي ملكولي مورد بررسي و تأييد قرار گرفته است.

مترجمين به ترتيب حروف الفبا:
دكتر مسعود حاجيا عضو هيئت علمي آزمايشگاه مرجع سلامت
دكتر نادر شاهرخي عضو هيئت علمي انيستيتوپاستور- بخش بيولوژي ملكولي
دكتر فرزانه صباحي عضو هيئت علمي دانشگاه تربيت مدرس – دانشكده پزشكي
دكتر سيد عليرضا ناجي عضو هيئت علمي دانشگاه علوم پزشكي شهيد بهشتي – پژوهشكده سل و بيماريهاي ريوي

اعضاء كميته ويروس شناسي و بيولوژي ملكولي به ترتيب حروف الفبا عبارتند از:
دكتر صفيه اميني عضو هيئت علمي انيستيتوپاستور- بخش هپاتيت و ايدز
دكتر مسعود حاجيا عضو هيئت علمي آزمايشگاه مرجع سلامت
دكتر سيامك ميراب سميعي عضو هيئت علمي معاونت دارو و غذا و آزمايشگاه مرجع سلامت
دكتر نادر شاهرخي عضو هيئت علمي انيستيتوپاستور- بخش بيولوژي ملكولي
دكتر فرزانه صباحي عضو هيئت علمي دانشگاه تربيت مدرس – دانشكده پزشكي
دكتر طلعت مختاري آزاد عضو هيئت علمي دانشگاه علوم پزشكي تهران دانشكده بهداشت
دكتر سيد علي رضا ناجي عضو هيئت علمي دانشگاه علوم پزشكي شهيد بهشتي – پژوهشكده سل و بيماريهاي ريوي

ويراستار علمي: دكتر زهرا شريفي عضو هيئت علمي سازمان انتقال خون
ويراستار ادبي: مهناز صارمي كارشناس اداره تضمين كيفيت

۱- مديريت نمونه

فرآيند مديريت نمونه بيماران نقش اساسي در دقت و صحت جوابهاي آزمايش هاي ملكولي عوامل بيماريزا ايفا مي نمايد. رعايت دستورالعمل هاي ايمني زيستي در همه مراحل جمع‌آوري و تيمار نمونه الزامي است. مراحل جمع‌آوري، نگهداري و انتقال نمونه‌هاي باليني با توجه به نوع نمونه بايد مطابق با استانداردهاي آزمايشگاهي انجام پذيرد. عدم مديريت صحيح نمونه‌هاي باليني مي تواند موجب تجزيه مواد ژنتيكي عوامل بيماريزا و دريافت جوابهاي غير قابل اعتماد گردد.

نشانه گذاري و جمع آوري نمونه:

در تمام مراحل مديريت نمونه، اطلاعات خصوصي بيمار بايد محفوظ باقي بماند ولي اطلاعات كافي براي اعضا تيم پزشكي معالج جهت انجام تستهاي مهم و در نهايت درمان بيمار ارائه گردد.

نمونه‌هايي كه براي آزمايش هاي ملكولي ارائه مي‌گردند بايد داراي برچسب حاوي اطلاعات زير باشند:

- شماره شناسايي
- تاريخ جمع آوري
- زمان جمع آوري
- نام مسئول جمع‌آوري كننده نمونه (به طور دلخواه)
- نوع نمونه (در صورتي كه نمونه بافت باشد نوع بافت ارسالي مي بايد مشخص شود)

اطلاعاتي كه در فرم درخواست آزمايش گنجانده مي گردد عبارتند از:

- شماره شناسايي اختصاصي
- نام بيمار
- تاريخ تولد
- تاريخ جمع آوري نمونه
- جنس (مخصوصا براي آزمايش هاي ژنتيكي)
- نژاد/قوم (بستگي به نوع تست)
- نوع نمونه (خون، مايع آمنيوتيك و غيره)
- اطلاعات باليني و آزمايشگاهي كمك كننده به تشخيص بهتر
- نام پزشك معالج
- محل يا بخش جمع آوري كننده نمونه
- اطلاعات مربوط به بيمه و حسابداري (در صورت نياز)

توجه: در بعضي موارد، اطلاعات ديگري مورد نياز است. مثلا در خصوص آزمايش هاي ژنتيكي، اگر درصورت روشن بودن درخواست يك آزمايش خاص براي مدير آزمايشگاه، وي مي تواند نظر خود را در مورد منطقي بودن درخواست موردنظر با توجه به سن و وضعيت بيمار ابراز نمايد. در بعضي آزمايش هاي ژنتيكي مانند Linkage analysis، اطلاعات شجره نامه‌اي نيز مورد نياز مي باشد.

۲- جمع آوري نمونه

در تمام مراحل كار با نمونه‌هاي باليني بايد از دستكش استفاده گردد. دستكش از انتقال پاتوژنهاي خطرناك و قابل انتقال از راه خون (blood-borne) به كادر آزمايشگاه و همچنين آلوده شدن احتمالي نمونه‌ها با سلولهاي فرد آزمايش كننده جلوگيري مي‌كند. تمام موارد ايمني زيستي بايد رعايت گردد.

آزمايش هاي اختصاصي ممكن است دستورالعمل هاي اختصاصي خود را داشته باشند كه از آن جمله مي توان نمونه برداري از سرويكس براي انجام تست ويروس پاپيلوماي انساني (HPV) را نام برد.

معرفي تمام موارد و مواد مداخله گر در اين نوشتار نمي‌گنجد. مسئولين آزمايشگاه بايد پزشكان و ساير افراد تيم پزشكي از جمله افراد شاغل در آزمايشگاه را از اين عوامل مداخله گر و يا آلوده كننده آگاه سازند و در صورت لزوم اطلاعات را بصورت ارائه كارگاه يا تهيه به روشورهاي اختصاصي در اختيار كاربران قرار دهند.

هر نمونه‌اي كه وارد آزمايشگاه باليني مي گردد بايد بلافاصله در سيستم اطلاع رساني/ كامپيوتر بيمارستان يا آزمايشگاه ثبت شود. كادر آزمايشگاه بايد حداكثر سعي خود در استفاده از نمونه‌ها و

اطلاع رساني به موقع و درست را به عمل آورند ولي در موارد زير، نمونه‌ها غيرقابل قبول مي باشند نظير: خون همولیز شده، خون فريز شده و نمونه‌هايي كه به درستي نشانه گذاري نشده‌اند.
توجه: در صورتي كه نمونه از محلي خاص اخذ شده و امكان نمونه گيري مجدد وجود نداشته باشد، مانند نمونه‌هاي بيوپسي و بافتهاي خاص، با صلاحديد پزشك معالج و دستور مدير آزمايشگاه، موضوع قابل بررسي است.
در هر آزمايشگاه، براي هر تست بايد شرايط رد كردن نمونه، در كتاب راهنماي آزمايشگاه نوشته شده و در دسترس كادر آزمايشگاه باشد.

۱-۲- ملزومات نمونه گيري از بافت

از نمونه هاي بافت در موارد زير استفاده مي شود:
الف) نمونه سلولهاي خون و سلولهاي حفره دهاني[1] در دسترس نباشند (مثلا در صورت مرگ بيمار)
ب) زمانيكه سلولهاي بافت و سلولهاي خون يا دهاني داراي ژنوتيپ متفاوت از بافت مورد آزمايش باشند. (مثلا موتاسيون سوماتيک در بيماريهاي نئوپلاستيک يا موزائيسم)
ج) زمانيكه بافت تنها منبع شناسائي اسيد نوكلئيک عوامل عفوني بالقوه است.
مقدار مناسب بافت معمولا بين ۱ تا ۲ گرم است. اما مقدار مناسب به طبيعت بافت وابسته مي باشد زيرا مقدار وزني RNA و DNA شديدا از بافتي به بافت ديگر متغير است. بافت هاي پر سلول مثل مغز استخوان، غده لنفاوي و طحال منابع مناسب تهيه ژنوم بوده و ممكن است به بافت كمتري احتياج باشد. اگرچه بايد در نظر داشت غده لنفاوي پائين دست يک تومور اوليه، ممكن است محتوي تعداد كمي از سلول توموري باشند كه اينچنين در آزمايش هاي ميكروسكوپيک از تک برش بافت قابل شناسائي نباشند. نمونه هاي كم سلول مثل بافت هاي عضله، فيبري و چربي منبع مناسبي جهت تهيه DNA ژنوميک نبوده و ممكن است به بيش از ۱ تا ۲ گرم بافت احتياج باشد. اما به طور كلي در صورت عدم وجود گستره اي از نفوذ چربي در منابع بافتي، از هر مقدار بافت كه بيش از ۱۵ ميلي گرم وزن داشته باشد، بيش از ۱۰ ميكرو گرم RNA يا DNA بدست مي آيد.
به علت مقادير متفاوت و نوع پروتئينهاي موجود در منابع بافتي، دستورالعمل هاي استخراج اسيدنوكلئيک نيز اختصاصي بافت هستند. در اين زمينه بايد به توصيه هاي كمپاني سازنده كيت تجاري خالص سازي RNA و DNA جهت بافت به خصوص توجه شود.
نمونه بافتهاي بزرگ (بيش از ۱ تا ۲ گرم) و بافت بيوپسي توسط پزشكان و جراحان جهت تشخيص هاي پاتولوژيک به روشهاي ميكروسكوپ نوري، الكتروني و يا ايمنوفلورسنس گرفته مي شود. اگر RNA و DNA از نمونه بافتي بزرگ يا بيوپسي استخراج مي شود، تمهيدات لازم جهت خشک نشدن بافت بايد صورت پذيرد. بافت بايد در پارچه تنظيف يا كاغذ استريل خيسانده شده در نرمال سالين استريل بسته بندي شود.
معمولا پاتولوژيست برش هائي از نمونه هاي بافتي بزرگ يا از بافت بيوپسي را جهت فيكس كردن، مطالعه ميكروسكوپيک بعد از رنگ آميزي و تشخيص پاتولوژيک تهيه مي كند. همچنين از اين برش ها جهت استخراج RNA و DNA در تشخيص ملكولي نيز استفاده مي شود. نمونه هاي بافتي مورد نظر در تهيه رده سلولي و يا بازيابي زيست ملكولها (RNA ، DNA و پروتئين) كاربرد دارد.
پايداري RNA و DNA در نمونه بافتي بسته به نوع بافت متغير مي باشد. عموماً نگه داري بافت در دماي ۲۲ تا ۲۵ درجه سانتيگراد توصيه نمي شود. جهت اخذ نتايج مطلوب، بافت بايد سريعا در نيتروژن مايع منجمد شده و يا در مواد نگه دارنده مناسب نوكلئيک اسيد قرارداده شود. چنانچه اين تدابير ميسر نباشد، نمونه بافت بايد سريعا بر روي يخ مرطوب قرارداده شود و جهت حفاظت بهتر اسيد نوكلئيک به خصوص RNA، متعاقباً بر روي يخ به آزمايشگاه ارسال گردد. بافتهاي كوچک در پارچه تنظيف استريل آغشته به نرمال سالين استريل بسته بندي شود تا از خشک شدن بافت

[1] Bucal Cell

جلـوگيري گـردد. معمـولاً نمونـه بافـت جهـت بررسـي هـاي آسـيب شناسـي توسـط پاتولوژيسـت هـا مـورد بررسـي قـرار مـي گيرنـد. چنانچـه نمونـه بـراي بررسـي RNA و DNA پـذيرش مـي شـود جهـت جلـوگيري از تخريـب اسـيدنوكلئيک، بايـد بافـت سـريعاً در محلـول هـاي مناسـب تثبيـت كننـده قـرارداده شـود. امـا قابـل ذكـر اسـت كـه اكثـر محلولهـاي تثبيـت كننـده موجـود بـه انـدازه فيكسـاتورهاي مرسـوم بررسـي بافـت شناسي يا ايمنوشيمي بافت مؤثر نمي باشند.

بايـد يـادآور شـد بـه علـت بيهوشـي مـورد نيـاز در هنگـام عمليـات جراحـي و نبـود تكنولـوژي هـاي اسـتاندارد ثبـات سـازي اسـيدنوكئيک، ممكـن اسـت بافـت دچـار كمبـود اكسـيژن شـده كـه بـه نوبـه خـود موجـب تغييـر در سـطح بيـان بسـياري از ژنهـا مـي شـود. كمبـود اكسـيژن طـولاني مـدت، pH بافـت را بـه طـور موضـعي كاهش داده و باعث كاهش حاصل و مقدار اسيدنوكلئيک خواهد شد.

۱-۲-۲- نمونه‌هاي پرناتال[2]

ايـن نمونـه‌هـا شـامل نمونـه‌هـاي CVS[3] ، سـلولهاي CVS كشـت داده شـده، مـايع آمنيوتيـك، سـلولهاي كشـت داده شـده از مـايع آمنيوتيـك و هرگونـه نمونـه سـلولي جـدا شـده از جنـين قبـل از زايمـان مـي باشـد. ايـن نمونـه‌هـا جهـت پـيش بينـي ژنوتيـپ و فنوتيـپ جنـين قبـل از زايمـان و اقـدامات مداخلـه گرايانـه بـاليني و يـا جراحـي مـورد اسـتفاده قـرار مـي گيـرد. نمونـه خـون مـادر بايـد بـه همـراه ايـن نمونـه‌هـا ارسـال گـردد تـا بررسـي هـاي لازم در خصـوص عـدم مخلـوط شـدن ميـزان قابـل ملاحظـه‌اي از سـلولها و يـا DNA مـادر بـا نمونـه جنينـي انجـام پـذيرد. نگهـداري يـك كشـت سـلولي تـا زمـان اتمـام آزمايشـها ضـروري اسـت و از گرفتن نمونه مجدد حتي المقدور بايد پرهيز گردد.

مـايع آمنيوتيـك را از هفتـه ۱۵ حـاملگي بـدون كشـت دادن و بـه طـور مسـتقيم مـي تـوان بررسـي نمـود. ميزان استاندارد مايع آمنيوتيك مورد نياز حداقل ۱۰ ميلي ليتر است.

نمونـه‌هـاي CVS را بايـد قبـل از ارسـال و انجـام آزمـايش، تميـز و عـاري از بافتهـاي مـادري (خصوصـا بافـت decidual endometrial) نمـود. ميـزان اسـتاندارد نمونـه CVS حـداقل ۱۵ ميلـي گـرم بعـد از برداشـت بافتهـاي مـادري اسـت. نمونـه CVS را بايـد در محـيط كشـت يـا سـالين اسـتريل در دمـاي اتـاق بـه آزمايشـگاه فرسـتاد. سـلولهاي كشـت داده شـده از مـايع آمنيوتيـك يـا نمونـه‌هـاي CVS را بايـد در دو فلاسـك پلاسـتيكي مخصـوص كشـت سـلول كـه داراي ۷۵ درصـد لايـه سـلولي زنـده باشـد و بـا محـيط كشت پر شده‌اند (جهت اجتناب از كنده شدن لايه سلولي) ارسال نمود.

بـراي بررسـي عـدم وجـود بافتهـاي مـادري، نمونـه CVS بايـد توسـط ميكروسـكوپ بـه دقـت بررسـي گـردد. در صـورت يكدسـت بـودن نمونـه بايـد آنـرا همـان روز آزمـايش نمـود و در صـورت آلـوده بـودن بـه بافتهـاي مـادري، آنهـا را جـدا و بعـد آزمـايش كـرد. اگـر نمونـه را نتـوان در روز دريافـت، بررسـي كـرد، بايـد در دمـاي ۲ تا ۸ درجه سانتي گراد تا زمان استخراج DNA در روز بعد نگهداري نمود.

DNA موجـود در مـايع آمنيوتيـك را بايـد در همـان روز دريافـت اسـتخراج نمـود، در غيـر ايـن صـورت نمونـه بايـد در دماي ۲ تا ۸ درجه سانتي گراد تا زمان استخراج DNA نگهداري شود.

كشـت CVS يـا مـايع آمنيوتيـك، بايـد بـراي بررسـي وضـعيت مناسـب سـلولها توسـط ميكروسـكوپ معكـوس[4] بررسـي شـوند. در صـورتيكه ايـن گونـه كشـتها را نتـوان در فاصـله زمـاني ۲ سـاعت بعـد از دريافـت آزمـايش نمـود، آنهـا را بايـد در دمـاي ۲ تـا ۸ درجـه سـانتي گـراد نگهـداري كـرد. بطـور كلـي، حـداقل ۷۵ درصـد فلاسـك كشـت بايـد از سـلول پوشـيده شـده باشـد. در غيـر ايـن صـورت، بـا صـلاحديد مـدير آزمايشـگاه، كشـت سـلول را مـي تـوان تـا رسـيدن بـه ايـن حـد رشـد سـلولي در انكوبـاتور ۳۷ درجـه سـانتي گـراد نگهـداري نمـود و سـپس آزمـايش هـاي ملكـولي را بـه انجـام رسـانيد. در مـورد نمونـه‌هـاي مناسـب، آزمايش در همان روز دريافت نمونه بايد انجام پذيرد.

---

[2] Prenatal
[3] Chorionic Villus Sampling
[4] Inverted Microscope

۲-۲-۲- سوابهاي دهانه رحمي و مجاري ادراري

نمونه هاي مجاري ادراري مردان با استفاده از سوابهاي حاوي سر پلي استر (Polyester tipped) با دسته استيل ضد زنگ يا دسته پلاستيكي انعطاف پذير گرفته مي شوند. نمونه هاي واژينال و اندوسرويكس با سوابهاي حاوي سر پلي استر يا رايون (Rayon) گرفته و در محيط انتقالي مناسب قرارداده مي شوند. نمونه جهت آزمايش HPV بايد با استفاده از سوابهاي توصيه شده توسط كمپاني سازنده كيت آزمايش گرفته شده و جهت انتقال به آزمايشگاه در مجموعه اختصاص يافته يا توصيه شده توسط سازنده كيت ارسال شوند.

۲-۳- انتقال و نگهداري نمونه‌ها براي انجام آزمايش هاي مولكولي

به طور عمومي، آزمايشگاه ها موظف به رعايت دستورالعمل هاي شركتهاي توليد كننده مواد و كيتهاي آزمايشگاهي مصرفي خود براي جمع آوري و انتقال نمونه جهت انجام تستهاي ملكولي مي باشند. در عين حال ساير مقررات و ضوابط قانوني نيز بايد رعايت گردند. راهنماي انتقال و نگهداري نمونه‌ها بايد توسط آزمايشگاهها در اختيار افراديكه مسئول جمع آوري و انتقال نمونه‌ها هستند و همچنين اشخاصي كه نمونه‌ها را انتقال مي دهند، قرار گيرد.

در مورد هر نمونه بايد موارد زير نيز توسط پرسنل آزمايشگاه بررسي و ثبت گردند:

۱- تاريخ و زمان جمع آوري
۲- تاريخ ارسال نمونه
۳- تاريخ دريافت نمونه
۴- دماي تقريبي نمونه در زمان دريافت توسط آزمايشگاه

در ضمن، تجربيات هر آزمايشگاهي در زمينه آزمايش هاي ملكولي نيز بسيار با اهميت مي باشد.

يكي از موارد مهم براي رسيدن به جواب دقيق و صحيح، نحوه نگهداري نمونه‌هاي خوني و ساير نمونه‌ها است. در زمان انتقال و يا نگهداري، نمونه نبايد در معرض شرايطي قرار گيرد كه باعث تجزيه اسيدهاي نوكلئيك مي‌گردند. شرايط نگهداري بسته به نوع نمونه، آناليت (DNA يا RNA) و يا ميكروارگانيسم مورد بررسي متفاوت است. اصول انتقال و نگهداري صحيح بايد توسط شركت توليدكننده و يا در صورتيكه آزمايش در آزمايشگاه راه اندازي شده باشد (home brewed)، توسط آزمايشگاه تعيين گردد.

RNA، شديدا به تجزيه حساس است و تشخيص آن از DNA دشوارتر مي باشد. به علاوه، افزايش ميزان نسخه برداري از بعضي ژنها در طي فرآيند نمونه گيري، مي تواند باعث تشخيص خطاي ميزان بالاي mRNA اين ژنها گردد. اين موضوع مخصوصا در زمان آناليز بيان كمي ژنها در نمونه‌هاي بافتي يا خون بايد مدنظر قرار گيرد.

۲-۴- دستورالعمل هاي كلي انتقال نمونه

قوانين: ضوابط و قوانين چگونگي بسته بندي و ارسال نمونه‌هاي باليني از كشوري به كشور ديگر متفاوت مي باشند. اما در سايتهاي اينترنتي زير اطلاعات لازم در اين مورد وجود دارد:

http://www.cdc.gov/od/ohs/biosfty/biosfty.htm

http://www.cdc.gov/od/ohs/pdffiles/DOTHAZMAT8-14-02.pdf

http://www.who.int/csr/resources/publications/WHO_CDS_CSR_LYO_2004_9/en/

به دليل وقايعي كه در برخي از كشورها در هنگام انتقال نمونه بيمار رخ داده است مي توان از اشعه جهت استريل نمودن نمونه استفاده نمود. اما از آنجا كه تحقيقات اندكي در مورد اثرات اشعه گاما براي استريل كردن نمونه‌ها بر روي نتايج تستهاي ملكولي در دسترس مي باشد، اين موضوع در حال حاضر نياز به تحقيقات بيشتري دارد.

۲-۴-۱- دستورالعمل هاي كلي براي نگهداري DNA خالص شده

نمونه‌هاي DNA خالص شده را بايد در زير درجه يخ زدن آب نگاهداري نمود تا توانايي تجزيه كنندگي DNase هرچه كمتر باشد. DNA خالص شده بايد در لوله‌هاي پلاستيكي داراي درب واشردار قرار گيرد تا از تبخير نمونه جلوگيري شود. مطالعات نشان داده است كه لوله‌هاي پلي پروپيلين باعث جذب DNA مي شوند. جذب DNA توسط جداره لوله‌هاي پلي اتيلن حتي شديدتر از لوله‌هاي پلي پروپيلني است. لوله‌هاي پلي آلومري و بعضي از انواع اختصاصي لوله‌هاي پلي پرونيلين براي نگهداري DNA، مناسب معرفي شده‌اند.

DNA خالص شده را مي توان در بافر TE (Tris-EDTA) در دماي اتاق به مدت ۲۶ هفته، در دماي ۲ تا ۸ درجه سانتي گراد براي حداقل يك سال (در صورت عاري بودن محيط از DNase) و تا ۷ سال در دماي ۲۰- درجه سانتي گراد و حداقل براي ۷ سال در ۷۰- درجه سانتي گراد يا دماي پايين تر نگهداري نمود. نمونه‌هايي را كه ميزان خلوص آنها مورد سؤال است را بايد در دماي ۲۰- درجه سانتي گراد يا پايين تر براي حفظ ثبات DNA نگهداري كرد. از فريزرهاي بدون برفك "frost-free" نبايد براي نگهداري DNA استفاده كرد چون تغييرات متناوب دمايي در آنها سبب آسيب رساندن به DNA مي گردد.

۲-۴-۲- دستورالعمل هاي كلي براي مطالعات بر روي RNA

تخريب RNA و القاء بيان بعضي ژنها بعد از جمع آوري نمونه خوني و حتي نمونه‌هاي بافت و مايعات بدن انجام مي پذيرد. در نتيجه توصيه شده است كه اينگونه نمونه‌ها بطور مستقيم درون ويالهاي حاوي مواد پايدارکننده RNA ريخته شوند. نمونه‌هاي بافت را مي توان به سرعت به نيتروژن مايع نيز انتقال داد. نمونه‌هاي فريز شده را بايد روي يخ خشك انتقال داد. به دليل فعاليت بعضي ريبونوكلئازها (RNases) در دماي ۲۰- درجه سانتي گراد RNA را بايد در ۷۰- درجه سانتي گراد يا پايين تر نگهداري كرد.

۲-۴-۳- دستورالعمل نمونه گيري، انتقال و نگهداري نمونه‌هاي خاص

درستي و قابل اعتماد بودن نتايج تستهاي ملكولي بستگي به عوامل مختلفي مانند نمونه گيري، انتقال و نگهداري دارد. اينها شامل روشهاي جمع آوري نمونه، ماهيت و محل اسيد نوكلئيك هدف (RNA يا DNA، ژنوم ميزبان يا اسيد نوكلئيك هاي عامل عفوني)، و نوع تست مورد استفاده دارد.

اگر هدف از انجام آزمايش، شناسايي اسيدنوكلئيك هاي يك عامل پاتوژن باشد، چرخه زندگي عامل عفوني و نوع سلول هايي كه توسط آن مورد حمله قرار مي گيرند در تصميم گيري در خصوص نوع نمونه، طريقه نمونه گيري و تيمار آن اثرگذار مي باشد.

دستورالعمل ها و بحثهايي كه در زير در مورد انواع نمونه‌ها ذكر گرديده، به طور عمومي تدوين شده است، در نتيجه متغيرهاي آناليتيكي و باليني و ويژگي آزمايشي كه قرار است انجام گيرد، حتماً بايد در كنار اين دستورالعمل ها در نظر گرفته شوند. در ضمن چون آنچه در كتابچه راهنماي كيتهاي مختلف آزمايشگاهي نيز آورده شده براي شرايط خاص مي باشد، لازم است هر آزمايشگاهي، تجربياتي را كه در طي استفاده از اين آزمايش ها بدست آورده مدنظر قرارداده، موارد و نكته‌هاي ضروري، در كتاب راهنماي آزمايشگاه مربوطه ثبت و درج گردند. در زير، چگونگي مديريت انواع مختلف نمونه‌ها براي تستهاي مختلف اسيد نوكلئيك/ ملكولي شرح داده شده است.

۲-۲-۳- نمونه‌هاي خون كامل، سرم و پلاسما

ماده ضد انعقاد EDTA براي جمع آوري خون تام و جداسازي پلاسما جهت انجام آزمايش هاي ملكولي توصيه مي گردد. اما به دليل احتمال تأثير آن در مراحل بعدي، دستورالعمل همراه كيت يا كتاب راهنماي آزمايشگاه بايد رعايت گردد. اگر از تيوبهاي حاوي EDTA (بدون ژل جداكننده) استفاده شود، تيوبهاي حاوي نمونه‌هاي خون جهت تشخيص ويروسهاي RNAدار مانند HIV و HCV، بايد در

فاصله ۴ ساعت بعد از خونگيري سانتريفيوژ گردند و پلاسماي جدا شده در لوله‌اي ديگر نگهداري شود. در صورتي كه از لوله‌هاي حاوي ژل جداكننده استفاده گردد[5]، پلاسما براي حداكثر ۵ روز در دماي ۲ تا ۸ درجه سانتي گراد و در موارد طولاني‌تر در صورت فريز كردن در ۲۰- يا ۷۰- درجه سانتي گراد يا پايين تر قابل استفاده است. نمونه‌هاي خوني كه قرار است براي DNA مورد بررسي قرار گيرند، مي توان تا ۲۴ ساعت در دماي اتاق و تا ۷۲ ساعت در دماي ۲ تا ۸ درجه سانتي گراد نگهداري نمود.

براي آناليز RNA سلولي، نمونه‌هاي خوني بايد حاوي مواد نگهدارنده RNA باشند. جمع آوري و نگهداري خون فاقد مواد نگهدارنده براي بررسي هاي نسخه برداري ژني (توليد mRNA) توصيه نمي گردد، چون در اين صورت RNA به راحتي تخريب مي گردد.

براي بررسي RNA و DNA، بايد بصورت فريز شده بر روي يخ خشك جهت مطالعه حمل شود. پلاسما بايد در دماي ۲ الي ۸ درجه حمل شده و در ۲۰- درجه سانتي گراد ذخيره گردد.

براي بررسي RNA، استخراج RNA بايد حداكثر ۴ ساعت بعد از خونگيري انجام پذيرد. در صورت به تعويق افتادن جداسازي RNA، فريز كردن نمونه‌هاي سرم، پلاسما يا هسته سلولهاي خوني در ۲۰- يا ۷۰- درجه سانتي گراد يا دماي پايين تر توصيه شده است.

نمونه‌هاي پلاسما را نبايد در فريزرهاي بدون برفك[6]، فريز نمود. در انواع گوناگوني از اين فريزرها، دما در طول مدت شبانه روز چندين بار تغيير مي نمايد و اين امر موجب تخريب اسيدهاي نوكلئيك هدف مي گردد. در اين زمينه، بطور اختصاصي بايد به آزمايش اندازه گيري مقادير كمي ويروس[7] براي HIV و HCV اشاره نمود كه بسيار متأثر از چگونگي نگهداري نمونه است.

استاندارد كردن روشهاي جمع آوري و تهيه نمونه‌هاي خوني در هر آزمايشگاه و استفاده از يك روش برتر در حين بررسي تيتر ويروسي به طور درازمدت در اين بيماران از اهميت ويژه‌اي برخوردار مي باشد. در نهايت، به دليل گزارشهايي مبني بر اثرات ممانعت كنندگي ماده ضد انعقاد و هپارين و "heme"، استفاده از مواد ضد انعقاد EDTA يا Acid Citrate Dextrose (ACD) براي انجام آزمايش هاي ملكولي در خون، توصيه مي گردد.

۲-۲-۴- نمونه خون خشک شده (بر روي فيلتر كاغذي)

اين نمونه‌ها فقط براي آناليز DNA كاربرد دارند. نمونه‌هاي حاوي خون خشك شده[8] يا DBS را بعد از خشك كردن كامل بايد در ظروفي قرارداد كه اجازه ورود رطوبت را ندهد و حاوي مواد ضدرطوبت يا انديكاتورهاي نشان دهنده ميزان رطوبت باشد.

براي جلوگيري از آغشته شدن چند نمونه، بايد توسط پوشاندن DBS بوسيله كاغذهاي مخصوص اندازه گيري وزن آزمايشگاهي (glassine)، لامل يا قراردادن آنها به طوري كه از ارتباط آنها با يكديگر جلوگيري به عمل آيد، از تماس آنها جلوگيري نمود. DBS معمولا در دماي اتاق انتقال مي‌يابد. نمونه‌هايي كه به اين صورت بر روي كاغذ فيلتر جمع آوري شده‌اند، براي حداقل ۱۹ ماه بعد، جهت آناليز DNA و انجام PCR مناسب تشخيص داده شده‌اند.

۲-۲-۵- شستشوي برونكوآلوئولار[9]

---

[5] با توجه به عدم گزارش هايي كه مورد پذيرش بين المللي باشد هر آزمايشگاه موظف است اثرات فريز كردن نمونه در تيوبهاي حاوي ژل جدا كننده و چرخه هاي فريز كردن و ذوب كردن[5] نمونه را در نتايج آزمايشهاي مولكولي كه اعلام مي نمايد را تعيين كند.

[6] Frost-free

[7] Viral load

[8] Dried Blood Spots

[9] Bronchoalveolar Lavage (BAL)

نمونه هاي شستشوي برونش بايد طبق دستورکار سازنده دستگاه و يا دستورالعمل آزمايشي که انجام مي شود تهيه شده و تقسيم شوند. نمونه ها بايد طي ٢٤ ساعت بعد از جمع آوري به آزمايشگاه منتقل شده و مورد آزمايش قرارگيرند. نمونه هايي که انجام آزمايش در طي اين مدت امکان پذير نيست بايد تا انجام آزمايش يا در شرايط يخچالي يعني ٢ تا ٨ درجه سانتيگراد (تا حداکثر مدت ٧٢ ساعت)، و يا بصورت منجمد در دماي ٧٠- درجه سانتيگراد يا دماي پايين تر نگهداري شوند. نمونه هاي مربوط به مايکوباکتريوم بايد قبل از منجمد شدن يا نگهداري طولاني مدت، آلودگي زدايي شوند.

۶-۲-۲- نمونه آسپيره مغز استخوان

DNA: مغز استخوان در سرنگهاي حاوي EDTA کشيده مي شود (نبايد از هپارين استفاده گردد). پرسنل آزمايشگاه بايد بلافاصله بعد از دريافت نمونه مغز استخوان مطلع شده و آماده انجام آز مايش گردند. براي استخراج نمونه هاي مغز استخوان قبل از پردازش مي توان براي مدت کوتاهي در دماي ٢ تا ٨ درجه سانتي گراد نگهداري نمود، اما پردازش اين نمونه تا مرحله ليز سلولي بايد در عرض ٧٢ ساعت بعد از جمع آوري انجام پذيرد. چنانچه احتياج به نگهداري طولاني مدت باشد، پس از حذف اريتروسيت ها نمونه مغز استخوان را مي توان براي ماهها در ٢٠- درجه سانتيگراد نگهداري نمود.

در کل فريز کردن نمونه‌هاي داراي خون حاوي EDTA از جمله خون تام، مغز استخوان و يا بيوپسي آن قبل از ليز کردن سلولهاي قرمز توصيه نمي شود. در صورت حضور سلولهاي قرمز، فريز و ذوب کردن مجدد اين نمونه‌ها موجب آزاد شدن 'Heme' مي گردد که براي انجام آزمايش هاي PCR ممانعت کننده شناخته شده‌اي به شمار مي‌رود.

RNA-۲-۲-۷

براي بررسي RNA در نمونه‌هاي مغز استخوان، علاوه بر رعايت موارد بالا، بايد نمونه بلافاصله در مايع ثابت کننده RNA قرارداده شود. در غير اين صورت، بايد آسپيره مغز استخوان را بلافاصله بر روي يخ به آزمايشگاه انتقال داد و در فاصله زماني يك تا ۴ ساعت RNA را استخراج نمود و نمي توان آن را قبل از حذف اريتروسيت فريز کرد.

۸-۲-۲- سلولهاي حفره دهاني (Buccal Cells)

هر دو RNA و DNA را مي توان از سلولهاي حفره دهاني استخراج کرد. از نمونه هاي حاصل از شستشوي دهان نيز بطور معمول به عنوان منبع سلولهاي دهاني استفاده مي کنند. جهت محافظت از RNA در سلولهاي دهاني و نمونه هاي شستشوي دهان بايد از يکي از عوامل پايدارساز RNA استفاده کرد. چنانچه سلولهاي دهاني در برنامه آزمايش DNA قرار دارند مي توان با سواب مناسب نمونه را برداشته و بصورت خشک در درجه حرارت محيط به آزمايشگاه منتقل نمود. نمونه هاي شستشوي دهان که در برنامه آزمايش DNA قرار دارند را نيز مي توان در دماي محيط به آزمايشگاه منتقل کرد که در دماي اتاق تا حدود ١ هفته پايدار مي مانند.

نمونه بزاق را که در برنامه آزمايش RNA قرار دارند بايد در يک ماده پايدارساز RNA مناسب جمع آوري نموده و به آزمايشگاه انتقال داد.

۹-۲-۲- نمونه Buffy Coat:

بـــراي آزمـــايش هـــاي بررســـي DNA، اگـــر نمـــي تـــوان در عـــرض ســـه روز بعـــد از جمـــع آوري نمونـــه، اســـيد نوكلئيـــك را از خـــون اســـتخراج كـــرد، Buffy Coat را جـــدا نمـــوده و در دمـــاي ۷۰- درجـــه ســـانتي گـــراد يـــا پـــايين تر تا انجام آزمايش DNA نگهداري نمود[۱۰].

RNA بايـــد در عـــرض يـــك تـــا چهـــار ســـاعت بعـــد از جمـــع آوري نمونـــه اســـتخراج گـــردد. در غيـــر ايـــن صـــورت، ســـلولها را مـــي تـــوان در محلـــول حـــاوي مـــاده پايـــدار كننـــده RNA قـــرارداد و تـــا قبـــل از جداســـازي RNA در دمـــاي اتـــاق نگهـــداري نمـــود. در بيمـــاراني كـــه دچـــار eosinophilia هســـتند، ســـطوح بـــالاي ريبونوكلئـــاز انـــدوژن مي تواند در نمونه‌هاي Buffy coat مشكل آفرين باشد.

۱۰-۲-۲- نمونه‌هاي مايع مغزي- نخاعي (CSF)

۱-۱۰-۲-۲- DNA

CSF بايـــد در دمـــاي ۲ تـــا ۸ درجـــه ســـانتي گـــراد بـــه آزمايشـــگاه انتقـــال يابـــد. اگـــر نمونـــه را نتـــوان بلافاصـــله بررســـي نمـــود، بـــراي بررســـي حضـــور ويروســـهاي DNA دار ماننـــد VZV و EBV و CMV و HSV، بايـــد آن را در دماي ۲۰- تا ۷۰- درجه سانتي گراد يا پايين تر قرارداد.

۲-۱۰-۲-۲- RNA

بـــراي بررســـي حضـــور ويروســـهاي RNAدار ماننـــد انترووير وســـها بايـــد نمونـــه‌هـــاي CSF را بلافاصـــله ســـرد نمـــود و در فاصـــله يـــك تـــا چهـــار ســـاعت RNA را اســـتخراج كـــرد. در غيـــر ايـــن صـــورت، بعـــد از جـــدا كـــردن گلبولهاي قرمز، نمونه‌هاي فريز شده CSF را مي توان بر روي يخ خشك به آزمايشگاه ارسال نمود.

۱۱-۲-۲- نمونه سلولهاي كشت داده شده (Cultured cells)

ادامـــه نگهـــداري ايـــن ســـلولها در دمـــاي ۳۷ درجـــه ســـانتي گـــراد تـــا هنگـــام اســـتخراج DNA يـــا RNA توصـــيه مـــي گـــردد. در غيـــر ايـــن صـــورت، بعضـــي از انـــواع ســـلولها ماننـــد، آمينوســـيتها و لنفوبلاســـتها را مـــي تـــوان در حجـــم مناســـب از محـــيط كشـــت ســـلولي و در دمـــاي اتـــاق بـــه آزمايشـــگاه انتقـــال داد. بعضـــي از انـــواع ديگـــر ســـلولها ماننـــد سوسپانســـيون هـــاي كندروســـيتهاي انســـاني، ممكـــن اســـت بـــه نگهـــداري و انتقـــال در شـــرايط يخچـــالي نيـــاز داشـــته باشـــند. دســـتورالعمل هـــاي نحـــوه پايـــدار كـــردن DNA و يـــا RNA در مـــورد ايـــن نمونه‌ها بايد رعايت گردد.

۱۲-۲-۲- نمونه آسپيره با استفاده از سر سوزن نازک (FNA[۱۱])

بـــراي اســـتخراج DNA مطـــابق دســـتورالعمل آســـپيره مغـــز اســـتخوان عمـــل مـــي شـــود (بـــه بخـــش ۳۱-٤-٦ مراجعـــه شـــود). جهـــت مطالعـــه RNA، RNA را بايـــد بلافاصـــله خنـــک كـــرده يـــا در محلـــول پايدارکننـــده RNA قـــرار دهـــيم. اگـــر نمونـــه، حـــاوي گلبـــول قرمـــز باشـــد عمليـــات پاكســـازي گلبـــول قرمـــز قبـــل از اضـــافه كـــردن محلول پايدار كننده RNA بايد صورت پذيرد.

اســـتخراج RNA از نمونـــه هـــاي خنـــک شـــده بايـــد ظـــرف مـــدت ۲ تـــا ٤ ســـاعت پـــس از نمونـــه بـــرداري انجـــام شـــود. چنانچـــه در ايـــن حالـــت نمونـــه حـــاوي گلبـــول قرمـــز اســـت بايـــد قبـــل از منجمـــد كـــردن نمونـــه، گلبـــول قرمـــز از نمونـــه حـــذف شـــود. نمونـــه هـــاي منجمـــد حـــدود ۲ تـــا ٤ هفتـــه پايـــدار مـــي ماننـــد. درصـــورت اســـتفاده از محلولهاي تجاري پايدار كننده RNA به دستورالعمل هاي كمپاني سازنده بايد توجه شود.

۱۳-۲-۲- بافت

DNA: بـــراي اســـتخراج DNA، بافـــت را بايـــد ســـريعا خنـــک كـــرده و بـــر روي يـــخ مرطـــوب بـــه آزمايشـــگاه منتقـــل كـــرد. در آزمابشـــگاه بافـــت را مـــي تـــوان ٢٤ ســـاعت در ۲ تـــا ۸ درجـــه ســـانتيگراد پـــيش از شـــروع عمليـــات آمـــاده ســـازي نگـــه داري كـــرد. همچنـــين مـــي تـــوان بافـــت را بـــه ســـرعت در مكـــان نمونـــه بـــرداري در نيتـــروژن

---

[۱۰] نمونه هاي Buffy Coat كه براي ناميرا كردن (immortalization) با ويروس اپشتن- بار (EBV) مورد استفاده قرار مي‌گيرند بايد به صورت فريز شده و بر روي يخ خشك به آزمايشگاه انتقال يابند

[11] Fine Needle Aspirate

مـــايع منجمـــد كـــرد. نمونـــه هـــائي كـــه در برنامـــه بررســـي هـــاي ملكـــولي inSitu مثـــل FISH قـــرار دارنـــد بايـــد در محيط مناسب برش يا OCT[12] قرارداد و در وضعيت منجمد تا پردازش آتي نگهداري نمود.

عمومـــا DNA در بافـــت تـــا ٢٤ ســـاعت در دمـــاي ٢ تـــا ٨ درجـــه ســـانتيگراد، حـــداقل ٢ هفتـــه در ٢٠- درجـــه ســـانتيگراد و بـــراي مـــدت حـــداقل ٢ ســـال در ٧٠- درجـــه ســـانتيگراد يـــا دمـــاي پـــائين تـــر پايـــدارمي مانـــد. اگـــر بخـــواهيم اســـتخراج DNA بلافاصـــله پـــس از دريافـــت نمونـــه بافـــت تـــازه صـــورت پـــذيرد، بايـــد فـــرد مســـئول را آگـــاه ســـاخت تـــا هنگـــام رســـيدن نمونـــه عمليـــات اســـتخراج را ســـريعاً شـــروع كنـــد. بافتهـــاي جامـــد خصوصـــا بافـــت تومـــوري، منبـــع غنـــي از انـــدونوكلئاز مـــي باشـــند. چنانچـــه امكـــان شـــروع عمليـــات اســـتخراج وجـــود نـــدارد بايـــد بافـــت را در ٧٠- درجـــه ســـانتيگراد يـــا دمـــاي پـــائين تـــر تـــا زمـــان انجـــام عمليـــات آزمايشـــگاهي نگهـــداري كـــرد. نمونـــه بافـــت تـــازه جهـــت انجـــام اســـتخراج DNA در آينـــده، بايـــد بـــه ســـرعت منجمـــد شـــود. بافـــت خـــوني ابتـــدا قبـــل از منجمـــد كـــردن بايـــد بـــا نرمـــال ســـالين اســـتريل شســـته شـــود. جهـــت اخـــذ نتـــايج مطلـــوب، بافـــت را در نيتـــروژن مـــايع و يـــا در حمـــام ايـــزوپنتين در ٧٠- درجـــه ســـانتيگراد بـــه ســـرعت منجمـــد مـــي كننـــد. بـــراي نگـــه داري طـــولاني مـــدت، دمـــاي ٧٠- درجـــه ســـانتيگراد يـــا پـــائين تـــر توصـــيه مـــي شـــود. نمونـــه بافـــت نبايـــد در فريزرهـــاي "بـــدون برفـــك" نگهـــداري شـــوند، زيـــرا برنامـــه دوره اي دمـــائي دســـتگاه جهـــت آب كـــردن برفـــك موجب تخريب اسيدنوكلئيک مي شود.

عمليـــات آمـــاده ســـازي نمونـــه هـــاي بافـــت تـــازه كـــه در محـــيط كشـــت RPMI[13] ارســـال مـــي شـــوند بايـــد ســـريعا شـــروع شـــود. اگـــر نمونـــه بـــافتي تنهـــا جهـــت بررســـي اســـيدنوكلئيک مـــي باشـــد، بايـــد بـــر روي يـــخ بـــه آزمايشـــگاه منتقـــل شـــود. چنانچـــه نمونـــه بافـــت تـــازه عـــلاوه بـــر آزمـــايش هـــاي ملكـــولي جهـــت بررســـي هـــاي ســـيتوژنتيک و فلوســـايتومتري ارســـال شـــده اســـت، جهـــت زنـــده نگـــه داشـــتن ســـلول انتقـــال آن در دمـــاي محيط صورت مي پذيرد.

RNA-٢-٢-١۴

چنانچـــه اســـتخراج RNA از نمونـــه بـــافتي مـــورد نظـــر اســـت، بايـــد نمونـــه هـــا را قبـــل از ذخيـــره ســـازي در محلـــول پايدارســـاز قـــرارداده و در ٧٠- درجـــه ســـانتيگراد يـــا پـــائين تـــر، بـــه ســـرعت منجمـــد نمـــود و يـــا حـــداكثر در مـــدت كمتر از ١ ساعت بعد از نمونه برداري، بايد عمليات استخراج RNA شروع شود.

RNA پـــس از انجمـــاد فـــوري بافـــت حـــداقل بـــه مـــدت ٢ ســـال در ٧٠- درجـــه ســـانتيگراد يـــا دمـــاي پـــائين تـــر پايـــدار مـــي مانـــد. دمـــاي ٧٠- درجـــه ســـانتيگراد يـــا پـــائين تـــر، دمـــاي ترجيحـــي نگهـــداري نمونـــه هـــاي محتـــوي RNA مـــي باشـــد. نمونـــه هـــاي منجمـــدي كـــه در برنامـــه بررســـي ملكـــولي inSitu (مثـــل FISH) قـــرار دارنـــد بايـــد در محـــيط OCT قـــرارداده شـــده و تـــا شـــروع عمليـــات آتـــي بصـــورت منجمـــد نگهـــداري شـــوند. نمونـــه هـــاي بـــافتي كـــه توســـط نيتـــروژن مـــايع بـــه ســـرعت منجمـــد شـــده انـــد بايـــد بـــر روي يـــخ خشـــک ارســـال شـــده و در ٧٠- درجـــه ســـانتيگراد يـــا دمـــاي پـــائين تـــر تـــا زمـــان اســـتخراج RNA نگهـــداري شـــوند. نمونـــه هـــاي منجمـــد نبايـــد قبـــل از اســـتخراج از حالـــت منجمـــد درآينـــد، بلكـــه بايـــد مســـتقيماً در بـــافر گوانيـــديوم ايزوتيوســـيانات[14] يـــا ســـاير محـــيط هـــاي مناســـب اســـتخراج همـــوژنيزه شـــوند. چنانچـــه انجمـــاد يـــا پايـــدار ســـازي فـــوري بافـــت امكـــان پـــذير نمـــي باشـــد، اســـتخراج RNA بايـــد ظـــرف مـــدت ٤ ســـاعت (ترجيحـــا ١ ســـاعت) بعـــد از نمونـــه گيـــري صـــورت پـــذيرد. بهترين شرايط نگهداري RNA خالص شده در دماي ٧٠- درجه سانتيگراد يا پائين تر مي باشد.

نمونـــه بافـــت منجمـــد در محـــيط OCT را بايـــد بـــر روي يـــخ خشـــک منتقـــل كـــرده و حـــداكثر ٢ ســـاعت پـــس از دريافـــت نمونـــه، ذخيـــره ســـازي در دمـــاي ٧٠- درجـــه ســـانتيگراد يـــا پـــائين تـــر صـــورت پـــذيرد. چنانچـــه نمونـــه منجمـــد بـــر روي يـــخ بـــه آزمايشـــگاه ارســـال شـــود بايـــد ســـريعا در فريـــزر ٧٠- درجـــه ســـانتيگراد يـــا دمـــاي پـــائين تـــر قـــرارداده تـــا از بـــاز شـــدن نمونـــه از حالـــت انجمـــاد جلـــوگيري شـــود. چنانچـــه نمونـــه در حـــين انتقـــال از حالـــت انجمـــاد درآيـــد، بايـــد هرچـــه ســـريعتر عمليـــات اســـتخراج بـــر روي نمونـــه شـــروع شـــده يـــا در صـــورتي كـــه ميســـر نيست بلافاصله در دماي ٧٠- درجه سانتيگراد يا دماي پائين تر در فريزر قرارداده شود.

---

12 Optimal Cutting Temperature
13 Roswell Park Memorial Institute
14 Guanidinium Isothiocyanate

از آنجـــائي كـــه RNA توســـط RNase هـــا تخريـــب مـــي شـــود، نمونـــه هـــاي بافـــت را در تيوبهـــاي پلاســـتيكي اســـتريل و نفوذناپـــذير نســـبت بـــه آب نگهـــداري كنيـــد و مطمـــئن شـــويد كـــه لولـــه هـــا بـــا دســـت برهنـــه برخـــورد نداشـــته انـــد. فريـــزر مـــورد اســـتفاده در نگهـــداري نمونـــه هـــاي بافـــت و يـــا اســـيدنوكلئيک اســـتخراج شـــده نبايـــد از نـــوع "بـــدون برفـــک" باشـــند، زيـــرا برنامـــه دوره دمـــائي ايـــن دســـتگاه هـــا جهـــت رفـــع برفـــک موجـــب شكســـت و تخريب اسيدنوكلئيک مي شود.

بافـــت جامـــد خصوصـــا بافـــت تومـــوري منبـــع غنـــي از نوكلئازهـــا مـــي باشـــند. بنـــابراين جهـــت اســـتخراج RNA، نمونـــه بافـــت تـــازه بايـــد هرچـــه ســـريعتر در نيتـــروژن مـــايع يـــا در حمـــام ايـــزوپنتين در دمـــاي ۷۰- درجـــه ســـانتيگراد يـــا دمـــاي پـــائين تـــر بطـــور ناگهـــاني منجمـــد شـــوند. درضـــمن نمونـــه هـــائي كـــه تنهـــا جهـــت اســـتخراج RNA گرفتـــه شـــده انـــد را مـــي تـــوان در مـــواد پايداركننـــده RNA قـــرارداد. بهتـــر اســـت بافـــت خـــوني را قبـــل از انجمـــاد ناگهاني با نرمال سالين شستشو داد.

صـــرف نظـــر از مـــدت زمـــان نگـــه داري نمونـــه هـــا، توصـــيه مـــي شـــود دمـــاي نگهـــداري بافـــت در ۷۰- درجـــه سانتيگراد يا پائين تر باشد زيرا RNase حتي در دماي ۲۰- درجه سانتيگراد نيز قادر به فعاليت است.

۲-۲-۱۵- مايعات دهاني (Oral Fluids)

بطـــوركلي ذخيـــره ســـازي و انتقـــال مايعـــات دهـــان جهـــت انجـــام آزمـــايش هـــاي DNA و RNA مشـــابه نمونـــه ســـلولهاي بوكـــال (دهـــاني) مـــي باشـــد، بـــا ايـــن اســـتثناء كـــه اگـــر نمونـــه جهـــت آزمـــايش RNA درنظرگرفتـــه شـــده اســـت بايـــد نمونـــه در محـــيط انتقـــالي يـــا محلـــول پايداركننـــده و يـــا در دمـــاي يخچـــالي ۲ تـــا ۸ درجـــه ســـانتيگراد بـــه آزمايشـــگاه منتقـــل شـــود. نمونـــه مايعـــات دهـــاني بايـــد ظـــرف مـــدت ۲٤ ســـاعت از نمونـــه بـــرداري مورد آزمايش قرار گيرند.

۲-۲-۱۶- بافتهاي پارافينه فيكس شده با فرمالين (FFPET[15])

نمونـــه FFPET بصـــورت بلـــوک بافـــت را مـــي تـــوان در دمـــاي اتـــاق بـــدون محـــدوديت زمـــاني جهـــت آنـــاليز آتـــي DNA، نگهـــداري كـــرد. امكـــان اســـتخراج DNA بـــا وزن ملكـــولي بـــالا از نمونـــه FFPET بـــه روش خشـــک كـــردن بافـــت در نقطـــه بحـــران جهـــت زدودن فرمـــالين وجـــود دارد. از اســـتفاده از هرگونـــه فيكســـاتور حـــاوي جيـــوه (مثل فيكساتور B5) بايد خودداري كرد.

اگرچـــه نمونـــه هـــاي FFPET جهـــت مطالعـــه RNA توصـــيه نمـــي شـــود، امـــا امكـــان اســـتخراج RNA از ايـــن گونـــه نمونـــه هـــا چـــه بصـــورت يـــک بلـــوک بـــافتي و يـــا بـــر روي يـــک اســـلايد رنـــگ آميـــزي نشـــده وجـــود دارد. نمونـــه FFPET تنهـــا درصـــورت در دســـترس نبـــودن ســـاير نمونـــه هـــا اســـتفاده مـــي شـــود زيـــرا نمونـــه مناســـب جهـــت آزمايش هاي ملكولي نمي باشد.

۲-۲-۱۷- نمونه Semen

ايـــن نمونـــه بايـــد بلافاصـــله ســـرد گـــردد و در همـــان روز جمـــع آوري بـــه آزمايشـــگاه انتقـــال داده و تـــا زمـــان اســـتخراج DNA در دمـــاي بـــين ۲ تـــا ۸ درجـــه ســـانتي گـــراد نگهـــداري گـــردد. آنـــاليز DNA در semen را مـــي تـــوان بـــر روي نمونـــه خشـــك شـــده و همچنـــين لامهـــاي فـــيكس شـــده بـــراي آنـــاليز ســـيتولوژيكي و يـــا بـــا استفاده از روشهاي in situ hybridization انجام داد.

۲-۲-۱۸- خلط

نمونـــه خلـــط جهـــت بررســـي DNA بايـــد در ظـــروف اســـتريل جمـــع آوري شـــده و در دمـــاي اتـــاق بـــه آزمايشـــگاه منتقـــل شـــود. در صـــورت تـــأخير در ارســـال نمونـــه بـــيش از ۳۰ دقيقـــه، نمونـــه بايـــد در شـــرايط دمـــائي يخچـــالي (۲ تـــا ۸ درجـــه ســـانتيگراد) تـــا زمـــان ارســـال نگهـــداري شـــود. چنانچـــه طـــول زمـــان انتقـــال نمونـــه بـــه آزمايشـــگاه نيز بيش از ۳۰ دقيقه باشد، انتقال نيز در شرايط دمائي خنک صورت مي پذيرد.

---

[15] Formalin- Fixed Paraffin Embedded Tissue

بـــه محـــض رســـيدن نمونـــه خلـــط بـــه آزمايشـــگاه چنانچـــه امكـــان انجـــام فـــوري آزمـــايش وجـــود نـــدارد بايـــد در شـــرايط دمـــائي يخچـــال نگهـــداري شـــود. چنانچـــه نمونـــه جهـــت بررســـي ملكـــولي مايكوبـــاكتريوم اســـت، مـــي توانـــد تـــا دوره هـــاي زمـــاني طـــولاني پايـــدار بمانـــد، امـــا درصـــورتيكه هـــردو روش كشـــت و بررســـي ملكـــولي مـــورد نظـــر اســـت مراحـــل آمـــاده ســـازي نمونـــه بايـــد هرچـــه ســـريعتر انجـــام شـــود تـــا بـــه حـــداقل زمـــان جوابـــدهي دســـت يـــابيم (قابليـــت جوابـــدهي مايكوبـــاكتريوم كمـــپلكس در طـــي زمـــان ١٤ تـــا ٢١ روز پـــس از دريافـــت نمونه).

اگـــر نمونـــه خلـــط در زمـــان طـــولاني تـــري تـــا انجـــام آزمـــايش نگهـــداري مـــي شـــود، آن را مـــي تـــوان بـــه مـــدت حـــداقل ١ ســـال در دمـــاي ٧٠- درجـــه ســـانتيگراد و يـــا پـــائين تـــر نگهـــداري كـــرد. هماننـــد ســـاير نمونـــه هـــا، در صـــورت اســـتفاده از كيـــت تجـــاري جهـــت اســـتخراج بايـــد بـــه توصـــيه هـــا و دســـتورالعمل ســـازنده كيـــت در مـــوارد شرايط نگهداري، ذخيره سازي و انتقال نمونه ها توجه شود.

٢-٢-١٩- نمونه مدفوع

ايـــن نمونـــه بايـــد بـــا رعايـــت ضـــوابط در خواســـت شـــده در كتـــاب يـــا كتابچـــه‌هـــاي راهنمـــا بـــه آزمايشـــگاه ارســـال گـــردد. در بعضـــي روشـــها، نيـــاز بـــه اســـتفاده از ظـــروف حـــاوي مـــواد نگهدارنـــده مـــي باشـــد و در بعضـــي روشـــهاي ديگـــر توصـــيه شـــده اســـت كـــه مـــدفوع در ظـــرف درپـــيچ دار بـــدون مـــواد نگهدارنـــده جمـــع آوري گـــردد و در دماي بين ٢ تا ٨ درجه سانتي گراد به آزمايشگاه انتقال يابد.

٢-٢-٢٠- سوابهاي دهانه رحمي و مجاري ادراري

بطـــور كلـــي كيفيـــت نمونـــه مناســـب و مكفـــي اندوســـرويكس، كـــه حـــاوي ســـلولهاي متاپلاســـتيک و يـــا ســـلولهاي مخروطـــي و ســـتوني اندوســـرويكس اســـت، وابســـته بـــه روشـــهاي مناســـب نمونـــه گيـــري اســـت. ســـوابها، بـــرس يـــا ديگـــر لـــوازم نمونـــه گيـــري (ماننـــد جاروهـــا Brooms) بايـــد در محيطهـــاي انتقـــالي قـــرار گرفتـــه و بـــه آزمايشـــگاه منتقـــل شـــوند. چنانچـــه بصـــورت خشـــک در لولـــه درب بســـته منتقـــل مـــي شـــوند بايـــد بـــه توصـــيه هـــاي ســـازنده كيـــت و يـــا آزمايشـــگاه انجـــام دهنـــده توجـــه شـــود. بعضـــي از انـــواع ســـوابها موجـــب تـــداخل در بعضـــي از آزمـــايش هـــاي ملكـــولي مـــي شـــوند. بســـته بـــه نـــوع آزمـــايش پـــائين دســـت، DNA ممكـــن اســـت در ٢ تـــا ٨ درجـــه ســـانتيگراد تـــا حـــداكثر ١٠ روز در نمونـــه پايـــدار بمانـــد. بـــه محـــض رســـيدن نمونـــه ســـواب بـــه آزمايشـــگاه، آن را در محـــيط انتقـــالي معلـــق كـــرده و جهـــت ادامـــه مراحـــل بعـــدي آزمـــايش، يـــا مـــي تـــوان مـــايع انتقـــالي حاصـــل را در دمـــاي ٧٠- درجـــه ســـانتيگراد و يـــا كمتـــر نگهـــداري كـــرد و يـــا بلافاصـــله پـــس از ســـانتريفيوژ كـــردن، رســـوب حاصـــله را جهـــت آزمـــايش RNA و DNA مـــورد اســـتفاده قـــرارداد. نمونـــه هـــاي منجمـــد را پـــس از ذوب كـــردن، ســـانتريفيوژ كـــرده و هماننـــد روش ذكـــر شـــده در نمونـــه تـــازه مـــورد اســـتفاده قرار مي دهيم.

بايـــد توجـــه داشـــت محـــيط هـــاي انتقـــالي كـــه بـــراي آزمـــايش هـــاي ملكـــولي تهيـــه مـــي شـــوند ممكـــن اســـت حـــاوي دترجنتهـــائي باشـــند كـــه باعـــث متلاشـــي شـــدن ســـلولهاي مـــورد نيـــاز جهـــت مطالعـــات ســـلول شناسي مي گردد.

جهـــت اســـتفاده مســـتقيم محصـــول تجزيـــه ســـلول (محصـــول بـــدون خـــالص ســـازي، جداســـازي و تغلـــيظ اســـيد نوكلئيـــک) در واكـــنش هـــاي PCR، بايـــد بـــه شـــرايط مطلـــوب شناســـائي هـــدف مـــورد نظـــر توجـــه داشـــته باشـــيم. همچنـــين چنانچـــه هـــدف ژنـــوم ميكروبـــي اســـت، نســـبت DNA ســـلول ميزبـــان، حضـــور يـــا عـــدم حضـــور ساير ارگانيسمها و مقدار ترشحات، ممكن است بر موفقيت مراحل پائين دست آزمايش تأثير بگذارد.

٢-٢-٢١- نمونه ادرار

حجـــم ادرار، فاصـــله زمـــاني نمونـــه گيـــري بعـــد از آخـــرين ادرار، وجـــود التهـــاب و ســـاير عوامـــل بـــر شناســـايي وجـــود اســـيدهاي نوكلئيـــك مـــورد نظـــر تـــأثير گذارنـــد. از نگهـــداري نمونـــه ادرار تـــازه در دمـــاي اتـــاق و بـــالاتر (٢٥ درجـــه ســـانتيگراد و بـــالاتر) بايـــد پرهيـــز نمـــود چـــون pH پـــايين و وجـــود مقـــادير بـــالاي اوره، DNA را بـــه ســـرعت تجزيـــه مـــي نمايـــد. تيمـــار ادرار بـــراي آمـــاده ســـازي جهـــت انجـــام آزمـــايش هـــاي ملكـــولي بســـتگي بـــه مـــوارد

پیشنهاد شده در کتابچه راهنماي کيت توليد کننده يا دستورالعمل هاي اجرايي آزمايشگاه دارد. بعد از تيمار خاص، نمونه‌ها بايد در دماي بين ۲ تا ۸ درجه سانتي گراد نگهداري گردند. براي مطالعات RNA نيز، دستورالعمل هاي خاص جمع آوري، انتقال و طريقه نگهداري مکتوب شده بايد موردنظر قرار گيرند.

در صورت نياز به غليظ سازي نمونه‌ها، مي توان از سانتريفيوژ، اولتراسانتريفيوژ و يا فيلتراسيون استفاده نمود، اما به دليل وجود مواد احتمالي ممانعت کننده، جداسازي اسيدهاي نوکلئيک بلافاصله بعد از انجام عمل تغليظ پيشنهاد مي گردد.

۲-۲-۲۲- خرد جداسازي (جداسازي تکه اي از) بافت با استفاده از ليزر LCM[16]

روش LCM محققين را قادر به استخراج اسيدنوکلئيک از سلولهاي بخصوصي از نمونه بافت کرده است. اساس اين روش نسبتا ساده مي باشد. عموما نمونه بافت بر روي اسلايد شيشه اي خوابانده شده، پس از پوشانده شدن با فيلم شفاف پلاستيکي، با ميکروسکوپ نوري مورد مطالعه قرار مي گيرد. هنگامي که محققين سلولهاي مورد نظر خود را شناسائي کردند، با استفاده از پرتو ليزر مادون قرمز متمرکز تکه بافت مورد نظر خود را جدا مي کنند. گرماي پرتو موجب آب شدن فيلم پلاستيکي شفاف و چسبيدن سلول منتخب به آن مي شود. بدين صورت آن تکه از بافت به راحتي کنده شده و مابقي برش بافت دست نخورده باقي مي ماند. امروزه سامانه هاي تجاري موجود از اين روش، ابزار مفيدي جهت جداسازي سلولهاي بخصوص و مطالعه و بازيابي زيست ملکول هاي آن مي باشند.

DNA ژنوميک را مي توان از تکه هاي حاصل از اين روش از نمونه هاي فريز شده (فروزن) رنگ آميزي شده که با روشهاي مرسوم پردازش مي شوند و همچنين از برشهاي بافتي پارافينه فيکس شده با فرمالين، بطور موفقيت آميز استخراج کرد. استخراج کل RNA و mRNA از برشهاي رنگ آميزي شده و يا نشده با استفاده از انواع روشهاي استخراج RNA و يا کيتهاي تجاري استخراج شرح داده شده است.

کاربردهاي LCM در تحقيقات پزشکي به سرعت در حال افزايش است و مي توان در حال حاضر به موارد زير اشاره کرد:

۱. تحقيق رابطه بين ژن و بيماري
۲. تحقيقات سرطان شناسي از طريق مورفولوژي و بررسي ژن
۳. بيان ژن بخصوص در طي دوره اوليه تولد
۴. مطالعات پروتئوميکس

LCM ما را قادر به مقايسه ميزان تکثير ژن و بيان پروتئين در سلولهاي نرمال و بيمار در يک نمونه واحد بافتي مي کند. کتابخانه cDNA از تکه بافت حاصل از روش LCM را مي توان جهت تخمين الگوي واقعي بيان ژن در جمعيت هاي خالص سلولهاي مورد نظر در بافت واقعي مورد استفاده قرارداد. تلفيق LCM با تمامي روش هاي ملکولي توانائي بالقوه ما را در دستيابي به تشخيص ملکولي، تخمين پيش آگهي بيماري، انتخاب درمان و پايش پاسخهاي درماني در دسته هاي بالیني مختلف افزايش مي دهد.

۲-۵- روشهاي افزايش غلظت و غني سازي عوامل بيماريزا

با توجه به حساسيت بالاي روشهاي آمپليفيکاسيون در تستهاي ملکولي، عموماً نياز به غني سازي يا غليظ نمودن نمونه نمي باشد. همچنين مي توان با بکارگيري روش هاي آمپليفيکاسيون نظير Nested در تستهاي مولکولي که اسيدنوکلئيك ابتدا در مرحله اول آمپليفيکاسيون غني سازي شده و به دنبال آن توسط ران دوم PCR، آمپليفاي مي شود، ميزان حساسيت را بطور قابل ملاحظه اي افزايش داد. گاهي اوقات غني سازي در PCR اشاره به فرآيندي دارد که با انجام آن، مواد ممانعت کننده که مي توانند درطي مراحل آمپليفيکاسيون تداخل ايجاد نمايند، توسط پروتکل هاي اختصاصي کار با نمونه، حذف مي-گردند.

---

[16] Laser Capture Micro-dissection

در آزمايشگاه، براي جداسازي مواد مداخله كننده از عوامل بيماريزا در نمونه هايي مثل خون، مواد مخاطي، مايعات بافتي محل التهاب، مي توان از تركيبي از روشهاي جداسازي با استفاده از وزن مخصوص (فايكل) و سانتريفيوژ استفاده نمود.

۲-۵-۱- تغليظ اسيدهاي نوكلئيك (DNA/RNA) در مايعات بيولوژيكي فاقد سلول

ميزان بالاي DNA سلول ميزبان در ناهنجاريهاي گوناگوني مثل سرطان، بيماريهاي خودايمني و عفونتها ديده مي شود. بعلاوه، مقدار ناچيز DNA جنيني در پلاسما/ سرم خانمهاي حامله مشاهده شده است. اخيرا، تكامل در تكنيكهاي ملكولي موجب شناسايي بهتر DNA در حال گردش در اين شرايط شده است. يافته‌هاي جديد نيز ديد علمي تازه‌اي درخصوص DNA در گردش به محققين داده‌اند كه توسط آن شناسايي DNA و رديابي انواع ناهنجاريها امكان پذير مي باشد.
تغليظ اسيدهاي نوكلئيك بوسيله اولتراسانتريفيوژ كردن پلاسما يا مايعات فاقد سلول در سرعت بالا، امكان پذير مي باشد. تغليظ نهايي با كم كردن حجم نهايي ماده‌اي كه در آن اسيدنوكلئيك بعد از جدا سازي قرارداده مي شود، امكانپذير است.

۲-۵-۲- تغليظ پاتوژنها در سرم و پلاسما توسط سانتريفيوژ كردن در سرعت بالا

هنگاميكه تعداد پاتوژنها در نمونه‌اي كم باشد، بهتر است نمونه‌اي كه براي تشخيص يا ارزيابي كمي پاتوژن خاص مورد استفاده قرار مي گيرد، غني گردد. اين اصول در بعضي آزمايش هاي كمي تشخيصي HIV و HBV كاربرد دارد. حدود ۰/۵ تا ۱ ميلي ليتر از نمونه بوسيله سانتريفيوژ كردن در دور بالا (حدود ۲۴۰۰۰ g) براي ۶۰ دقيقه غليظ مي گردد. ويروس رسوب داده شده و قبل از آزمايش در ميزان كمي بافر دوباره حل مي گردد. بايد درنظر داشت كه روشهاي غني سازي نمونه را مي توان براي پروتئينها و يا ساير مواد ماتريكس كه در روشهاي ملكولي تداخل ايجاد مي‌نمايند بكار برد.

۲-۵-۳-تغليظ پاتوژن توسط فيلتراسيون

از روش الترافيلتراسيون براي تغليظ محلولي كه در آن تعداد اندكي از ميكرواورگانيسم ها وجود دارند، استفاده مي گردد. اين روش به دو صورت مكش (Vacuum) و سانتريفيوژ صورت مي پذيرد.

۲-۵-۴- تغليظ سازي پاتوژن در نمونه‌هاي مدفوع

ابتدا نمونه‌هاي مدفوع در محلولهاي بافري (PH 7/4) رقيق شده و سانتريفيوژ مي‌گردند. سپس نمونه براي جدا كردن قطعات اضافي سلولي فيلتر مي شود. بعد از فيلتر كردن، اغلب آنچه باقي مي ماند حاوي ميكروارگانيسم هاست. البته مي توان آنرا باز هم بوسيله سانتريفيوژ كردن با دور بالا غليظ نمود. اسيدهاي نوكلئيك توسط پروتكل هاي استاندارد قابل جداسازي مي باشند.

۲-۵-۵- تغليظ پاتوژنها در CSF و ساير مايعات بدن حاوي سلول

CSF، ادرار، bronchoalveolar lavage، مايع زجاجيه، كشت و ساير مايعات بدن ممكن است به علت داشتن مواد ممانعت كننده كه در آزمايش هاي ملكولي اختلال ايجاد مي كنند، به روشهاي مختلف احتياج به تيمار داشته باشند. پس از تغليظ و غني سازي اين نمونه ها توسط سانتريفيوژ و فيلتراسيون، استخراج اسيدنوكلئيک به روشهاي شرح داده شده در بخش ۳-۷ صورت مي پذيرد.

۲-۵-۶- ثابت كردن نمونه هاي بافت و بيوپسي

۲-۵-۶-۱- فرمالدئيد (فرمالين): فرمالدئيد بصورت بافر خنثي فرمالين ۱۰% (NBF; Neutral Buffered Formalin) پرمصرف ترين فيكساتور مي باشد. حتي تيمار كوتاه مدت برشهاي بافتي با فرمالين نشان داده است كه حلاليت DNA را كاهش مي دهد. تعدادي مطالعه بازده استخراج DNA با وزن ملكولي بالا از بافت ثابت شده با فرمالين را بررسي كرده و نشان داده اند كه تيمار بافت با فرمالين عموما تخريب قابل ملاحظه اي در DNA را دربرداشته و بنابراين استفاده از اين ماده به عنوان ثابت كننده در مطالعات ملكولي در بافت توصيه نمي شود.

ساير ثابت كننده هاي بافت

۲ -۶-۵-۲- گلوتارآلدئيد

اگرچه به طور وسيعي به عنوان فيكساتور استاندارد در مطالعات ميكروسكوپ الكتروني استفاده مي شود، اما نفوذ آهسته اين ماده و زمان لازم جهت استفاده از اين ماده در اعمال خاصيت خود، استفاده از اين ماده را به عنوان فيكساتور بيولوژيک محدود کرده است. اين درحاليست که نشان داده شده است گلوتارآلدئيد ۱% با pH=۷ نسبت به فرمالين ۱۰% حفاظت بهتري از DNA با وزن ملكولي بالا دارد.

۳ -۶-۵-۲- اتانول و متانول

اتانول و متانول ۱۰۰% فيكساتورهاي بسيار خوب جهت حفظ DNA هاي با وزن ملكولي بالا و RNAمي باشند، زيرا باعث تغيير شيميائي كوچكي در اسيد نوكلئيک مي شوند. سنجش هاي فيزيكي- شيميائي نشان داده اند كه DNA شديدا از نظر فيزيكي در اتانول v/v ۶۵% و متانول متلاشي شده و ماده اي نيز جهت برگشت DNA تخريب شده به فرم اصلي در هنگام آبدهي مجدد وجود دارد.

۴ -۶-۵-۲- فيكساتور كارنوي Carnoy's fixative

اين فيكساتور مخلوطي از اتانول (۶۰%)، كلروفرم (۳۰%) و اسيد استيک گلاسيال (۱۰%) است. در مقايسه با بافت فيكس شده با فرمالين، فيكساتور كارنوي از RNA در بافت بهتر حفاظت كرده و RNA راحت تر استخراج مي شود.

۵ -۶-۵-۲- فيكساتور متاكارن Methacarn

فيكساتور متاكارن مخلوطي از متانول (۶۰%)، كلروفرم (۳۰%) و اسيد استيک گلاسيال (۱۰%) است. نشان داده شده است كه كارائي استخراج و تماميت ساختماني RNA استخراج شده از بافت فيكس شده با متاكارن قابل مقايسه با RNA استخراج شده از سلول منجمد فيكس نشده مي باشد.

٦ -٦-٥-٢- استون

استون به عنوان فيكساتور در تكنيک AMeX[۱۷] استفاده مي شود، كه مراحل آن شامل انكوباسيون بافت در استون در دماي ۲۰- درجه سانتيگراد و سپس شستشوي آن در متيل بنزوات و گزيلول قبل از پارافينه كردن بافت مي باشد. روش AMeX بازده خوبي در تهيه DNA با وزن ملكولي بالا داشته و همچنين مي توان mRNA را با روش هيبريداسيون نقطه اي با استفاده از RNA استخراج شده از بافت فيكس شده با AMeX شناسائي كرد.

۷ -۶-۵-۲- فيكساتور هوپ Hope[۱۸]

تكنيک هوپ شامل انكوباسيون بافت تازه به مدت يک شب در محلول محافظت كننده محتوي مخلوطي از اسيدهاي آمينه در pH ۵/۸ تا ۶/۴ مي باشد.

مرحله حياتي در اين تكنيک، انكوباسيون به مدت يک شب در محلول هوپ در دماي ۲ تا ۸ درجه سانتيگراد مي باشد. اگر ملكول هدف RNA باشد بايد آگاه بود كه سلول ها در خلال ساعت اوليه انكوباسيون هنوز زنده بوده و چنانچه مقصود آناليز بيان و رونويسي RNA مي باشد، استفاده از اين روش مي تواند بر نمودار بيان RNA تأثيرگذار باشد. پس از انكوباسيون در محلول هوپ به مدت مقرر، مراحل بعدي با تيمار بافت در استون در دماي ۰ تا ٤ درجه سانتيگراد جهت آبگيري ادامه پيدا كرده و متعاقبا بافت پارافينه مي شود. DNA و RNA حاصل از بافت فيكس شده با هوپ جهت بررسي هاي ملكولي با تكنيک هاي PCR، RT_PCR و هيبريداسيون inSitu مناسب مي باشد.

---

[17] Acetone– Methylbenzoate- Xylen

[18] Hepes-glutamic acid buffer- mediated Organic solvent Protection Effect

۸ -۶-۵-۲-تابش دهي با مايكروويو

امـــواج الكترومغنـــاطيس بـــا فركـــانس بـــين ۳۰۰ مگـــاهرتز تـــا ۳۰۰ گيگـــاهرتز تحـــت عنـــوان امـــواج ميكـــرو طبقـــه بنـــدي مـــي شـــوند. فـــيكس كـــردن نمونـــه هـــا بـــا مـــايكروويو وابســـته بـــه عـــواملي همچـــون محـــيط شـــيميائي اطـــراف نمونـــه در خـــلال تـــابش دهـــي، طـــول زمـــان پرتـــوگيري، تـــوالي تـــابش دهـــي بـــا امـــواج مـــايكرو و ديگـــر روش هـــاي شـــيميائي و فيزيكـــي فـــيكس كـــردن مـــي باشـــد. پـــنج روش فـــيكس ســـازي نمونـــه بـــا اســـتفاده از مايكروويو شرح داده شده اند:

- پايـــدار ســـازي: كـــه در آن نمونـــه هـــا تحـــت تـــابش مـــايكروويو بصـــورت inSitu يـــا هنگـــامي كـــه در يـــک محلـــول فيزيولوژيـــک نمكـــي غوطـــه ور اســـت قـــرار گيرنـــد. در ايـــن روش تـــلاش مـــي شـــود ســـاختمان بافت بدون در معرض قرار گرفتن فيكساتورهاي شيميائي حفظ شود.
- فـــيكس كـــردن در مـــواد شـــيميائي بـــا تيمـــار كوتـــاه مـــدت اوليـــه بـــه همـــراه مـــايكروويو: در ايـــن روش نمونـــه هـــا در يـــک محـــيط شـــيميائي بـــراي مـــدت زمـــان بســـيار كوتـــاه (هـــزارم ثانيـــه تـــا چنـــد ثانيـــه) تحت تابش انرژي مايكروويو قرار مي گيرند.
- پرتـــو دهـــي قبـــل از ثابـــت ســـازي بـــا مـــواد شـــيميايي: در ايـــن روش بعـــد از تحـــت تـــأثير قـــراردادن بافـــت بـــا مـــايكروويو، جهـــت بهبـــود يكنـــواختي فـــيكس ســـازي، بـــا غوطـــه ور كـــردن بافـــت در فيكساتورهاي شيميائي مثل فرمالين عمليات ادامه پيدا مي كند.
- پرتـــودهي بعـــد از ثابـــت ســـازي بـــا مـــواد شـــيميايي: كـــه موجـــب تســـهيل اثـــرات فيكســـاتورها در نمونه خواهد شد.
- تـــابش اشـــعه مـــايكروويو بـــه همـــراه فـــيكس ســـازي بـــا انجمـــاد كـــه اثـــرات تصـــنعي (artifact) انجمـــاد را محدود مي سازد.

بطـــور كلـــي زمـــان تـــابش كمتـــر از ٦٠ ثانيـــه، دمـــاي نهـــائي تـــابش بـــين ۵۰ تـــا ۵۵ درجـــه ســـانتيگراد و حجـــم محلـــول كمتـــر از ۵۰ ميلـــي ليتـــر در ظرفـــي كـــه حـــداقل يـــک بعـــد آن حـــدود ۱ ســـانتيمتر باشـــد توصـــيه مـــي شـــود. فـــيكس كـــردن بافـــت بـــا مـــايكروويو در بـــافر PBS نشـــان داده اســـت كـــه از ثابـــت ســـازي در فرمـــالين جهت دستيابي به DNA ژنوميک ويروسي با كيفيت بالا بهتر است.

اســـتفاده از دســـتگاه هـــاي مـــايكروويو خـــانگي از نظـــر امنيـــت و همچنـــين تكرارپـــذيري داراي محـــدوديت هـــاي جـــدي اســـت. جهـــت فـــائق آمـــدن بـــر ايـــن محـــدوديتها، ابزارهـــاي آزمايشـــگاهي جهـــت اســـتاندارد ســـازي و درجـــه بنـــدي آون هـــاي مـــايكروويو بـــراي فـــيكس كـــردن بافـــت ســـاخته شـــده انـــد. ابـــزار تنظيمـــي لامـــپ نئـــون نـــواحي بـــا قـــدرت بـــالا و پـــائين در آون مـــايكروويو را شناســـائي مـــي كننـــد. جعبـــه هـــاي بـــافتي Agar-Saline-Giemsa در تأمين شرايط يكنواخت گرمادهي به بافت كمک مي كنند.

۹ -۶-۵-۲- بافت پارافينه فيكس شده با فرمالين FFPET[۱۹]

FFPET اساســـا جهـــت تعيـــين ژنوتيـــپ بافـــت ســـرطاني بايگـــاني شـــده مـــورد اســـتفاده قـــرار مـــي گيـــرد. FFPET بايگـــاني شـــده منبـــع بزرگـــي از DNA جهـــت انجـــام تحقيقـــات ســـرطاني شناســـي اســـت. همچنـــين ايـــن بافتهـــا جهـــت تعيـــين ژنوتيـــپ افـــراد فـــوت شـــده كـــه تنهـــا منبـــع مـــورد اســـتفاده از آنهـــا بافتهـــاي FFPET بايگـــاني شـــده اســـت كـــاربرد دارنـــد. از نمونـــه FFPET جهـــت مطالعـــه گذشـــته نگـــر يـــا در مـــوقعيتي كـــه در آن بافـــت تـــازه يـــا منجمـــد در دســـترس نيســـت اســـتفاده مـــي شـــود. بـــه ايـــن ترتيـــب معمـــولا ايـــن نمونـــه هـــا از قبـــل جهـــت اســـتفاده در مطالعـــات ملكـــولي در نظـــر گرفتـــه نمـــي شـــوند. تنهـــا در صـــورتي كـــه مطالعـــات هيســـتوپاتولوژيک يافتـــه هـــاي غيـــر منتظـــره اي را نشـــان دهنـــد نمونـــه FFPET تحـــت بررســـي ملكـــولي قـــرار مـــي گيـــرد و اينچنـــين بررســـي هـــاي ملكـــولي آتـــي جهـــت رســـيدن بـــه يـــک تشـــخيص قطعـــي ضـــروري مـــي شود.

---

[19] Formalin Fixed Paraffin- Embedded Tissue

نمونه هاي FFPET را مي توان بدون اشكال در دماي محيط منتقل كرد. براي رسيدن به حداكثر كارآئي در بررسي هاي ملكولي، بافت تازه را بايد در برشهاي نازك (بطور ايدآل به ضخامت ۰/۲ سانتيمتر و نه بيشتر از ۰/۳ سانتيمتر كه فرمالين بتواند در به راحتي در بافت نفوذ كرده و به خوبي بافت را فيكس كند) قطع كرده و در بافر فرمالين خنثي تا حداكثر ۱۲ ساعت فيكس كرد. اگر بخواهيم بافت نازك يا نمونه بزرگ را قبل از انجام آزمايش هاي متعدد فيكس كرده و بافت را پارافينه كنيم، مي توان بافت را شكاف داده تا فرمالين بتواند از درز شكافها به راحتي نفوذ كرده و بافت به طور مطلوب فيكس شود. فيكساتورهاي حاوي جيوه مانند B5 و فيكساتورهائي كه موجب كلسيم گيري از بافت مي شوند به طور بارز كيفيت و كميت DNA را كاهش مي دهند.

بطور كلي نمونه هاي FFPET، منبع مناسب تهيه DNA و RNA ژنوميک با كيفيت بالا (مثلا جهت استفاده در Southern Blotting) نمي باشند. DNA موجود FFPET به علت فيكس شدن با فرمالين تا حدودي تخريب و قطعه قطعه مي شود. قطعات DNA كمتر از ۲۰۰ جفت باز را مي توان به خوبي از نمونه هاي FFPET تكثير كرد. مطلوب آن است بخصوص در مواقعي كه مقدار DNA هدف كم باشد، طراحي پرايمر به گونه اي صورت پذيرد تا قطعات حاصله از PCR بين ۱۰۰ تا ۲۰۰ جفت باز باشند.

اگر هيچ نمونه بافت تازه در دسترس نباشد از FFPET مي توان جهت استخراج RNA و انجام RT-PCR استفاده كرد، ولي توصيه مي شود اندازه آمپليكون بيش از ۱۳۰ جفت باز نباشد.

ضخامت مناسب برش ها از نمونه FFPET جهت استخراج اسيدنوكلئيک به اندازه و پرسلول بودن بافت بستگي دارد. بطور كلي برش ۲۰ ميكرومتري از بافت هاي بزرگ (با مقطع عرضي بيش از ۱ سانتيمتر مربع) يا برشهاي ٤٠ تا ۸۰ ميكرومتر از بافتهاي كوچک جهت استفاده در PCR كافي است. براي استخراج DNA، برش از بلوكها به ضخامت ۲۰ ميكرومتر يا بيشتر زده شده و در لوله هاي پلاستيكي، ترجيحاً درپيچ دار قرار مي دهيم. تيغه ميكروتوم بايد در فاصله زماني برش بين نمونه ها با اتانول ۱۰۰% پاک شوند. درست قبل از برش از بلوک مورد نظر، يک بلوک پارافينه بدون بافت را ابتدا حداقل ۲ برش زده و در ۲ تيوب جهت بررسي پاک بودن تيغه ها و جلوگيري از انتقال آلودگي از بلوكهاي قبلي قرار مي دهيم. حداقل يكي از اين لوله ها جهت بررسي آلودگي به همراه ساير نمونه ها جهت استخراج مورد استفاده قرار مي گيرد.

سپس برش هاي بافت را توسط گزيلول پارافين زدائي كرده، بافت حاصله را در اتانول شستشو داده، در هواي محيط خشک كرده و توسط پروتئيناز "K " جهت استخراج DNA هضم مي كنيم. براي جدا سازي دستي قسمت مشخصي از بافت و استخراج DNA از آن، از روش .L.C.M استفاده مي شود.

۶-۲- آماده سازي اسيدهاي نوكلئيك

ژنومهاي ويروسي در سايز و تركيب بسيار متغير بوده و مي توانند به فرم RNA يا DNA هاي دو رشته‌اي يا تك رشته‌اي باشند. ويروسها داراي ژنوم بفرم خطي يا حلقوي بوده و اندازه‌ي ويريون آنها بسيار متغير است. چرخه تكثير آنها متغير بوده و بعضي از آنها در ژنوم سلول ميزبان داخل شده و بعضي فقط با وارد نمودن ژنومشان در مراحل مختلف چرخه سلولي ميزبان تكثير مي يابند. ويروس‌ها را مي توان از اجزاء سلولي و خارج سلولي نمونه‌هاي بيولوژيك جدا كرد.

روش جداسازي DNA ويروس داخل ژنومي درست شبيه جداسازي DNA ژنومي است در صورتيكه روش جداسازي نوع خارج كروموزومي شبيه جداسازي RNA مي باشد. جداسازي DNA ويروس خارج ژنومي در تمامي ويروس ها مشابه است، فقط در بعضي موارد نياز به رعايت نكات خاصي مي باشد. اين موارد عبارتند از: انتخاب نمونه اوليه، نياز به تغليظ پارتيكل هاي ويروس ها قبل از جداسازي و متدهاي ليز سلولي به منظور آزادسازي ويريون‌هاي داخل سلولي. بعلاوه بايد توجه داشت كه در مواقعي كه اندازه ژنوم ويروس بسيار كوچك مي باشد و يا بوسيله پروتئين‌هاي خاصي پوشيده شده، با مشكلاتي در جداسازي روبرو مي‌باشيم.

جداسازي اسيدهاي نوكلئيك ويروسي غالبا كاري مشكل مي باشد چون معمولا با نمونه‌هاي بيولوژيكي سروكار داريم كه حاوي مقدار كمي ويروس و مقادير متنابهي از پروتئين و تركيبات ديگر است. روش جداسازي بايد بتواند اين آلودگي ها را حذف كرده و نمونه نهايي از لحاظ تيتراسيون (اندازه‌گيري كمي) ويروس مناسب باشد.

روش‌ها

۲-۶-۱- روش‌هاي جداسازي با استفاده از مواد ارگانيک

روش‌هاي جداسازي آلي جهت خالص سازي اسيدهاي نوکلئيك کروموزومي و ويروسي از سلول‌هاي ليز شده، و يا خالص سازي ژنوم ويروسي از نمونه‌هاي عاري از سلول مورد استفاده قرار مي گيرند. فنل يا مخلوطي از فنل - کلروفرم - ايزوآميل الکل مي تواند محلول‌هاي حاوي اسيدهاي نوکلئيك را به دو فاز آبي حاوي اسيدهاي نوکلئيك و آلي حاوي پروتئين تفکيک کند و سپس اسيدهاي نوکلئيك محلول در فاز آبي توسط الکل رسوب داده مي شوند.

روش تغيير يافته جداسازي آلي براي اولين بار بوسيله Chomezynski & Sacchi براي جداسازي RNA توضيح داده شد، اين روش و روش‌هاي تغيير يافته آن بطور گسترده‌اي به منظور جداسازي RNA ويروسي استفاده مي شوند.

بطور مثال تعدادي معرف‌هاي تجاري يك فازي از فنل و گوانيدين تيوسيانات در دسترس مي باشد. ابتدا نمونه‌ها هموژنيزه و بعد باکلروفرم مخلوط مي شوند. اين محلول سپس بوسيله سانتريفيوژ کردن، به فاز آلي و آبي تفکيك مي شود. در مرحله بعد RNA موجود در فاز آبي بوسيله ايزوپروپانول رسوب داده شده و بعد از شستشو در آب عاري از RNA حل مي شود.

۲-۶-۲- روش Target Capture

در اين روش اسيد نوکلئيك ويروسي هدف با پروب (نشانگر) هومولوگ که به بستر جامد متصل شده است هيبريد مي شود. از آنجائيکه براي هر ويروس، بايد پروب اختصاصي ويژه طراحي و توليد شود، استفاده از اين روش داراي محدوديت‌هايي است. ولي از آنجائيکه اين روش بسيار اختصاصي و حساس مي باشد، در آناليزهايي که نياز به تشخيص دقيق و معتبر تکرارپذير دارند، روش مناسبي قلمداد مي شود. يك روش رايج در جداسازي و خالص سازي DNA ويروسي در نمونه‌هاي سرمي استفاده از اليگونوکلئوتيدهاي بيوتينه که به ذرات مغناطيسي پوشيده از استرپتاويدين متصل مي شوند، مي باشد. نمونه‌هاي سرمي به منظور غيرفعال کردن DNAase و RNAase، با گوانيدين تيوسيانات تيمار شده، سپس به آن اوليگونوکلئوتيدهاي بيوتينه اختصاصي اضافه کرده و در 96^{c} حرارت داده مي شود. اين محلول پس از سرد کردن در يخ، با ذرات مغناطيسي پوشيده شده، با استرپتاويدين مخلوط مي شود. آلودگيها طي مراحل شستشو حذف شده و در نهايت ژنوم‌هاي اسيدهاي نوکلئيك از پروب اختصاصي جدا مي شوند.

چنين پروتکل‌هايي بسيار مؤثر بوده و براحتي قابل اتوماسيون مي باشند.

۲-۶-۳- تکنولوژي سيليکا Silica Technology

ذرات سيليکا نخستين بار توسط Boom جهت جداسازي اسيدهاي نوکلئيك از نمونه‌هاي باليني استفاده شد. اين روش بسيار ساده، سريع و قابل اعتماد بوده و اسيدهاي نوکلئيك با خلوصي بالا که قابل استفاده در روش‌هاي حساس ملکولي بعدي مي باشند، بدست مي دهد. اساس آن اتصال اسيدهاي نوکلئيك موجود در ليز سلولي يا عصاره عاري از سلول با ذرات سيليکا تحت شرايط غلظتهاي بالاي نمك‌هاي کائوتروپيك نظير يديد سديم، پرکلرات، يا نمك‌هاي گوانيديوم است. نمك‌هاي کائوتروپيك موجود در محلول ليز کننده سبب تقليب و غيرفعال شدن RNAase موجود در نمونه مي گردد.

قدرت يوني و pH محلول‌هاي ليز کننده و اتصال(lysis and binding buffer)، قابل تنظيم بوده بطوريکه سبب اتصال اسيدهاي نوکلئيك به ذرات سيليکا شده و پروتئين‌ها و ساير متابوليت‌هاي موجود در نمونه در محلول باقي مي‌مانند و بعد از مراحل شستشوي سيليکا، اسيدهاي نوکلئيك تحت شرايط غلظت نمکي پايين از آن جدا مي شوند.

بر اساس اين متد مقدار زيادي کيت‌هاي تجاري در دسترس مي باشند. نمونه‌ها ابتدا تحت شرايط تقليب کننده‌ي قوي قرار گرفته سپس شرايط بافري طوري تغيير پيدا مي‌کند که اسيدهاي نوکلئيك آماده‌ي اتصال به سيليکا باشند که با عبور نمونه از ستون‌هاي حاوي فيلترهاي سيليکا انجام مي گيرد. در مرحله بعد آلودگيها بوسيله محلول‌هاي شستشو حذف و اسيدهاي نوکلئيك توسط محلول بافري حل کننده (جدا کننده) مناسب، آزاد شده و آماده‌ي استفاده‌ي مستقيم و يا ذخيره سازي مي باشند.

۲-۶-۴- تغليظ نمونه‌هاي اوليه

بسياري از نمونه‌هاي باليني مثل مدفوع، پلاسما، ادرار، مايع نخاع و ساير مايعات بدن اغلب حاوي تعداد بسيار پايييني از سلول يا ويروس مي باشند در اين موارد تغليظ نمونه‌ها (بوسيله سانتريفيوژ يا فيلتر) قبل از شروع خالص سازي در افزايش ميزان جداسازي بسيار حائز اهميت مي باشد.

۲-۶-۵- سانتريفيوژ كردن

سانتريفيوژ كردن معمولا در تغليظ اسيدهاي نوكلئيك ويروسي در مايعات بدن استفاده شده و براي اين منظور تغليظ كننده‌هاي كوچك (Micro Concentrator) بصورت تجاري وجود دارند. بعد از تغليظ، روشهاي استاندارد جداسازي قابل انجام است. موقع جداسازي اسيدهاي نوكلئيكي ويروس از ادرار، استفاده از بافرهاي واجد نمك‌هاي كائوتروپيك ضروري است، چون ادرار حاوي مهار كننده هاي ناشناخته زيادي است.

از اولتراسانتريفيوژ در افزايش حساسيت جداسازي ژنوم ويروسي از پلاسما مي توان استفاده كرد. اضافه كردن مرحله سانتريفيوژ قبل از استخراج RNA سبب بدست آوردن يك رسوب از ذرات ويروسي در ته لوله مي شود. اين رسوب سپس در PBS يا يك محلول ليز كننده مناسب حل شده و مراحل بعدي جداسازي دنبال مي گردد.

۲-۶-۶- فيلتراسيون

فيلتراسيون براي تغليظ ويروس‌ها در نمونه مدفوع استفاده مي شود. براي اين منظور، مدفوع را در محلول كلريدسديم حل كرده و سانتريفيوژ مي‌كنند. سپس مايع شفاف روئي را از يك فيلتر ۰/۲۲ نانومتري عبور داده تا سلول‌هاي آن گرفته شوند و DNA سلولي از آن حذف گردد. سپس اسيدهاي نوكلنوئيك ويروسي از فيلتر جدا مي شود.

فيلتراسيون و سانتريفيوژ نمونه در يك ريزتغليظ كننده (Micro Concentrator) در بررسي نمونه هاي آب كه حاوي تعداد بسيار پايييني ويروس مي باشند استفاده مي شود. اگر چه آب بصورت روتين جهت آلودگي باكتريايي آزمايش مي شود و بررسي وجود ويروس در آن رايج نيست، زيرا متدهاي مورد استفاده براي اين منظور حساس نبوده و معمولاً پيچيده و گران مي باشند.

۲-۶-۷- دترجنت‌هاي كاتيونيك

اضافه كردن دترجنت‌هاي كاتيوني به نمونه در شروع كار سبب افزايش پايداري و تغليظ اسيدهاي نوكلئيك مي شود. اين پديده ناشي از تشكيل كمپكس بواسطه اتصال بين سرهاي كاتيوني دترجنت‌ها با گروههاي فسفات با بار منفي اسيدهاي نوكلئيك مي باشد. دنباله‌ي آبگريز اين دترجنت‌ها در خارج كمپكس حاصل سبب تركيب و تغليظ آنها مي شود. پروتئين‌ها با دترجنت‌ها اتصال برقرار نكرده و محلول باقي مي‌مانند. بنابراين استفاده از دترجنت‌ها سبب حذف يكسري آلودگيها و پايداري بيشتر اسيدهاي نوكلئيك مي شود. نمونه‌هاي داراي پروتئين بالا نظير خون، ممكن است نياز به روش‌هاي بيشتري جهت پايداري اسيدهاي نوكلئيك داشته باشند.

بعد از تغليظ و افزايش پايداري با دترجنت هاي كاتيونيک، اسيدهاي نوكلئيك بايد از اين كمپلكس جدا شوند. در هنگام جداسازي اسيدهاي نوكلئيك ويروس اين عمل بوسيله استخراج آلي يا روش‌هاي مورد استفاده در تخليص بوسيله سيليكا مهيا مي شود.

۲-۶-۸- جداسازي DNA ژنومي (پستانداران و يوكاريوت ها)

نكات كلي هنگام جداسازي DNA ژنوميك

متدهاي رايج در جداسازي DNA از ليزسلول‌هاي حيواني، انساني، مخمر و باكتريايي اساسا شبيه جداسازي DNA از بافت مي باشد كه پيشتر توضيح داده شد.

نمونه‌هاي مختلف خصوصيات متفاوتي داشته كه جداسازي DNA را تحت تأثير قرار مي دهد، بويژه ليز نمونه‌ها و حذف محتويات اختصاصي سلولها. بعلاوه كيفيت نمونه و چگونگي نگهداري نمونه بر ميزان DNA قابل جداسازي تأثير مي‌گذارد. در زير نكات كلي استخراج DNA ژنومي ذكر شده است.

۲-۶-۹- نمونه‌هاي اوليه:

طراحي و اصول آزمايش غالبا تعيين كننده‌ي نوع نمونه اوليه مورد استفاده است. به عبارتي نمونه‌هاي تازه، ذخيره شده و يا پزشكي قانوني و نيز نوع بافت و عمر آن در اين انتخاب تعيين كننده است. كيفيت نمونه اوليه، ميزان و كيفيت DNA استخراج

شده را تحت تأثير قرار مي دهد. ميزان DNA استخراجي در صورت نگهداري نمونه اوليه در شرايط نامناسب، كاهش مي‌يابد و DNA جدا شده ممكن است تخريب شود. بعلاوه از انجماد و ذوب مكرر نمونه نيز بايد اجتناب شود، چون اين عمل سبب كاهش اندازه DNA ژنومي شده و در نمونه‌هاي باليني ميزان DNA پاتوژن كاهش مي يابد. ميزان DNA استخراج همچنين به اندازه، نوع و عمر نمونه اوليه بستگي دارد. محتوي اسيد نوكلئيك به نوع سلول نيز بستگي دارد، بطوريكه اين ميزان در بافت سلولي كه از سلول‌هاي ريز تشكيل شده است به مراتب بيشتر از حجم مساوي از بافتي است كه از سلول‌هاي بزرگتري تشكيل شده باشد. محتوي DNA يك نمونه همچنين به ساير ژنوم هاپلوئيدي و پلوئيدي سلول ها بستگي دارد.

۱۰-۶-۲- ليز و متلاشي نمودن نمونه

ليز و متلاشي نمودن كامل سلول بعد از آزاد سازي DNA از نمونه‌هاي بافتي ضروري است و ناكافي بودن آنها سبب كاهش ميزان DNA تخليصي مي گردد. اين فرايند عموما بوسيله محلول‌هاي ليز كننده حاوي دترجنت (جهت شكستن غشاهاي سلولي) و يك پروتئيناز (براي هضم پروتين‌هاي سلولي و پاتوژن) صورت مي پذيرد. بعضي نمونه‌ها براي اينكه بصورت كافي ليز شوند، نياز به تيمارهاي اضافي دارند. راهنماي روش هاي تخريب مكانيكي نمونه‌ها، دراين بخش آورده شده است و توصيه‌هاي اختصاصي براي انواع نمونه‌ها، در بخش بعدي مورد بحث قرار مي گيرد.

۱۱-۶-۲- هموژنيزه كردن بوسيله سرنگ و سوزن

محلول‌هاي ليز شده سلول و بافتي را مي توان بوسيله سرنگ و سوزن، يكنواخت (هموژنيزه) كرد. DNAهايي با وزن ملكولي بالا را مي توان با عبور نمونه از يك سوزن نمره ۲۰ خرد كرد. براي اين كار ۱۰-۵ مرتبه انجام دادن كافي به نظر مي‌رسد. افزايش حجم بافر ليزكننده سبب تسهيل در كاركردن با نمونه وكاهش ميزان از دست دادن آن مي شود.

روش‌ها

آناليز ارگانيسم‌هاي پيچيده با استفاده از روش‌هاي بيولوژي ملكولي نياز به DNA ژنومي با وزن ملكولي بالا و خالص دارد. براي اين منظور روش‌ها و فن آوريهاي گوناگوني در دسترس مي باشد و عموما در تمامي اين روش‌ها نمونه اوليه متلاشي و ليز شده، پروتئين‌ها و ساير آلودگيها از آن حذف و نهايتا DNA بازيافت مي شود.

۱۲-۶-۲- روش‌هاي استخراج با استفاده از مواد ارگانيک

استخراج آلي يك روش كلاسيك است كه در طي آن بوسيله محلول‌هاي آلي آلودگيها از ليز سلولي جدا مي گردد. سلول‌ها بوسيله يك دترجنت ليز شده و سپس با فنل، كلروفرم و ايزوآميل الكل مخلوط مي گردد. استفاده از غلظت مناسب نمك و pH سبب مي شود تا آلودگيهاي موجود در ليز سلولي در فاز آلي حل شده و DNA در فاز آبي باقي بماند. معمولا DNA بوسيله الكل از فاز آبي رسوب داده شده و خالص مي گردد. DNA جدا شده در اين روش ممكن است حاوي مقداري فنل يا كلروفرم باشد كه مي تواند واكنشهاي آنزيمي بعدي را مهار كند و بنابراين ممكن است آنقدر خالص نباشد كه در فرآيندهاي حساس پايين دستي مثل PCR مورد استفاده قرار گيرد. بعلاوه، اين روش مي تواند روشي حساس و وقت گير بوده كه تركيبات توكسيك مورد استفاده در آن در ميزان كارايي آن تأثير زيادي دارد.

۱۳-۶-۲- روش‌هاي Salting – out

در اين روشها، پروتئين‌ها و ساير آلودگيهاي موجود در نمونه، با كمك غلظت‌هاي بالاي نمك رسوب داده مي شوند. رسوب توليدي بوسيله سانتريفيوژ جدا شده و DNA باقي مانده در محلول با استفاده از رسوب دهي با الكل بازيافت مي شود. حذف پروتئين و ساير آلودگيها، با اين روش مي تواند ناكافي بوده و تيمار RNase، ديالیز و نيز تكرار رسوبگذاري با الكل غالباً ضروري مي باشد. خلوص و ميزان DNA جدا شده با اين روش غالبا بسيار متغير مي باشد.

۱۴-۶-۲- شيب غلظتي سزيم كلراید[۲۰]

[20] Cesium Chloride Density Gradients

DNA ژنومي را مي توان با كمك شيب غلظتي كلريدسزيم خالص كرد. در اين متد سلول‌ها با كمك دترجنت، ليز شده و DNA با كمك الكل رسوب داده مي شود. DNA مجددا بصورت محلول درآمده و با CsCl و اتيديوم بروماید مخلوط و چندين ساعت سانتريفيوژ مي گردد. باند DNA از لوله سانتريفيوژ جمع آوري شده و سپس اتيديوم بروماید موجود در آن با كمك ايزوپروپانول حذف، سپس با الكل رسوب دهي شده تا DNA آن بازيافت شود. DNA بدست آمده با اين روش داراي خلوص بالايي است ولي روش، بسيار خسته كننده و وقت گير و گران است و اين معايب، سبب شده تا بطور روتين مورد استفاده قرار نگيرد.

۱۵-۶-۲- روش‌هاي بر پايه سيليكا [21]

تكنولوژيهايي كه اساس آنها استفاده از سيليكا مي باشند، روش‌هايي ساده براي جداسازي DNA باكيفيت مي باشند. اين روش‌ها بر اساس جذب انتخابي اسيدهاي نوكلئيك به سيليكا در حضور غلظت بالاي نمكهاي كائوتروپيك (نظير گوانيدين هيدوكلوراید، گوانيدين ايزوتيوسيانات ، يديد سديم و پركلرات سديم) مي باشد. استفاده از بافرهاي مناسب در مرحله ليز سبب مي شود كه تنها DNA به سيليكا متصل و RNA، پروتئين‌ها و ساير متابوليت‌هاي سلولي به فرم محلول باقي مي‌مانند. اين محلول‌ها در مراحل بعد شستشو شده و سپس DNA در غلظت پايين نمك از ذرات يا غشاهاي سيليكا جدا مي گردد. اين DNA آماده استفاده در فرايندهاي بعدي مي باشد.

كمپانيهاي متفاوت، كيتهاي مختلفي بر اين اساس توليد كرده‌اند كه كيفيت DNA تخليص شده بوسيله اين كيتها به كيفيت كيت مورد استفاده بستگي دارد. در اين كيت ها، سيليكا بصورت ذرات ژل يا فيلترهاي تعبيه شده در ستونهاي مخصوص سانتريفيوژ شدن، استفاده مي‌گردند كه فرمت‌هاي چند حفره‌اي آن قابليت استفاده در دستگاههاي اتوماتيك را دارند. استفاده از ستونهاي سانتريفيوژي معمولاً بسيار بيشتر از سيليكاژل كه مي تواند موقع جداسازي DNA از آن، بهمراه DNA وارد محصول نهايي شود، كاربرد دارد. همچنين مي توان از ذرات مغناطيسي كه بوسيله سيليكاژل پوشيده شده، كه در روش‌هاي اتوماتيك بيشتر كاربرد دارد، نيز استفاده كرد. سايز متوسط DNA كه بوسيله سيليكا جدا مي شود غالبا بين ۵۰-۲۰ كيلو باز مي باشد كه اين DNA براي PCR و ساترن بلات مناسب است. بطور كل، اين روش براي جداسازي DNA ژنوميك با وزن ملكولي بالا (قطعات بالاتر از ۱۰۰kb) مناسب نيست.

۱۶-۶-۲- روش‌هاي بر پايه تبادل آنيوني[22]

اساس كروماتوگرافي تبادل آنيوني فاز جامد برهم كنش بين بار منفي گروههاي فسفات اسيدهاي نوكلئيك و بار مثبت سطحي ملكولهاي سوبسترا مي باشد. در شرايط غلظت نمكي پائين DNA با سوبسترا باند شده و ناخالصي‌هايي نظير RNA، پروتئين‌ها و متابوليت‌هاي سلولي طي مرحله شستشو حذف مي شوند و DNA خالص در شرايط نمكي بالا جدا مي شود. DNA جدا شده با كمك الكل، ترسيب و بعد از حل شدن براي واكنش‌هاي بعدي نظير ترانسفكشن، ميكرواينجكشن،تعيين توالي و ژن درماني مورد استفاده قرار مي گيرد.

تكنولوژي تبادل آنيوني DNA اي توليد مي‌كند كه خلوص آن معادل DNA اي است كه دوبار بوسيله كلريدسزيم تخليص شود ولي در زمان كمتر. در اين روش از هيچ نوع ماده سمي، استفاده نشده و DNA تخليص شده، مناسب نيازهاي مختلف بوده و در مقياس هاي مختلف قابل اجراء است، قادر به خالص سازي DNA تا اندازه ۱۵۰kb بوده و توسط چندين كمپاني عرضه مي گردد، كه از نظر زمان انجام، كيفيت محصول نهايي، و اندازه‌ي DNA جدا شده با هم متفاوتند.

۱۷-۶-۲- روشهاي مبتني بر پايه فيلتر كاغذي

استفاده از ابزارهاي جمع آوري خون با فيلتر كاغذي راهي است متداول جهت ذخيره نمونه‌هاي بيولوژيكي و سپس جداسازي DNA از اين نمونه‌ها جهت انجام PCR. متون زيادي وجود دارد كه استفاده از روش DBS را جهت غربال نمونه‌هاي جنسي مورد بحث قرار مي دهند. نمونه بصورت نقاطي روي كاغذ قرارداده شده و خشك مي‌گردند. DNA نمونه بعد از شستشوي فيلتر كاغذي آن جدا مي گردد و يا نمونه بوسيله متانول فيكس و سپس DNA آن آزاد مي شود. همچنين كيتهاي تجاري وجود دارد كه براي اين منظور مي توان از آنها استفاده كرد. DNA را مي توان توسط تركيبات مختلف روي فيلتر كاغذي تثبيت و سپس از

---

[21] Silica- Based Methods
[22] Anion – Exchange Method

آن جدا کرد. این فیلترها حاوي موادي هستند که نمونه را لیز کرده و DNA به آنها متصل مي شود. نمونه‌هاي خشك شده را براي سالها مي توان نگهداري کرد، بدون اینکه DNA آن خراب شود. در یك مطالعه نشان داده شده است که استفاده از فیلترهاي تیمار شده و تیمار نشده قادرند حداقل ۱۹ ماه در درجه حرارت اتاق DNA را نگهداري نمایند.

۲-۶-۱۸- حذف RNA

RNA بسته به نوع روش جداسازي DNA مي تواند همراه آن تخلیص گردد. RNA ممکن است روي بعضي آزمایش هاي انجام گرفته روي DNA اثر مهارکنندگي داشته باشد ولي روي آزمایش PCR چنین اثري ندارد. تیمار نمونه با RNase A قادر است که RNA آلوده کننده را حذف نماید که این عمل مي تواند در ضمن جداسازي DNA و یا بر روي DNA خالص شده انجام پذیرد. RNase عاري از DNase بصورت تجاري قابل خرید مي باشد.

۲-۷- جداسازي DNA از بافت حیواني و انساني

۲-۷-۱- متلاشي نمودن بافت انساني وحیواني: بیشتر بافتهاي انساني وحیواني را مي توان بوسیله بافر لیزکننده و پروتئیناز K لیز کرد. متلاشي نمودن بافتهاي تازه یا منجمد شده سبب افزایش میزان لیز آنها مي شود. خرد کردن مکانیکي به وسیله هموژنایزرها، مخلوط کردن با ذرات مغناطیسي به قطر ۷-۳ میلیمتر، و هاون مي توانند سبب کاهش زمان لیز شدن شود. بافتهاي پوست، قلب، ماهیچه‌ها حاوي مقادیر زیادي پروتئین‌هاي کششي، پیوندي و کلاژن بوده و باید دقت داشت که این نمونه‌ها بطور کامل بوسیله پروتئیناز K و پروتئاز هضم گردند.

۲-۷-۲- متلاشي نمودن با استفاده از Rotor Stator Homogenize

این نوع هموژنایزرها مي تواند بافتهاي انساني وحیواني را در مدت ۹۰-۵ ثانیه با توجه به سفتي و سختي آن تخریب کنند.

چرخش سریع روتور با کمك برش مکانیکي و توربولانس سبب تخریب نمونه مي شود. با قراردادن پروانه روتور در زیر سطح نمونه و انتخاب اندازه ظرف مناسب باید از تشکیل کف تا حد ممکن جلوگیري کرد. این هموژنایزرها داراي اندازه‌ي متفاوتي هستند که قادرند با توجه به حجم نمونه از پروب‌هایي با سایز مختلف استفاده نمایند. براي حجم‌هاي حدود ۳۰۰ میکرولیتر، پروب‌هاي با قطر ۷-۵ میلي‌متر و میکروتیوبهاي ۱/۵ میلي‌لیتري مناسب مي باشند. پروبهاي با قطر بیش از ۱۰ میلي‌متر نیاز به ظرفهاي بزرگتر دارند.

۲-۷-۳- خرد کردن با آسیاب

بافتها و سلول‌ها را مي توان بوسیله آسیاب کردن در حضور بافر لیز کننده و ذرات بید شکست. شکستن و خرد شدن بوسیله ذرات مخلوط شده با سلول‌ها انجام مي گیرد. خرد شدن به عواملي چون اندازه و شکل ذرات، سرعت و نوع آسیاب و نسبت بافر به ذرات بید، زمان آسیاب کردن و میزان نمونه اولیه بستگي دارد. این پارامترها در هر مورد باید معلوم شوند.

۲-۷-۴- جدا کردن DNA ژنومي از خون

نمونه‌هاي خون معمولا جهت آنالیزهاي بالیني استفاده مي شوند. خون حاوي مهارکننده‌هاي آنزیمي است که مي توانند فرایندهاي پایین دستي کار با DNA را تحت تأثیر قرار دهند. بعلاوه، ضدانعقادهاي رایج مثل هپارین و EDTA نیز مي توانند بعنوان مهار کننده عمل نمایند. بنابراین روش‌هاي مورد استفاده در جداسازي DNA از خون باید تولید DNA با کیفیت بالا نماید که فاقد هر گونه آلودگي با مهار کننده هاي آنزیمي باشد.

۲-۷-۵- حذف گلبول‌هاي قرمز از نمونه‌هاي خون پستانداران

درحالیکه گلبول‌هاي قرمز پرندگان، ماهیها و قورباغه، داراي هسته و بنابراین DNA ژنومي مي باشد گلبول‌هاي قرمز بالغ پستانداران فاقد هسته مي باشند. بنابراین جدا کردن و حذف گلبول‌هاي قرمز که تعدادشان تقریبا ۱۰۰۰ برابر گلبول سفید است، سبب افزایش بازدهي جداسازي DNA مي گردد که این عمل را مي توان به طرق مختلف انجام داد.

یك روش لیز انتخابي گلبول‌هاي قرمز بوسیله بافر هیپوتونیك مي باشد که نسبت به گلبولهاي سفید به شوك هیپوتونیك بسیار حساس‌ترند. روش دیگر، استفاده از سانتریفیوژ با کمك گرادیان غلظتي است که سبب جدا کردن گلبول‌هاي سفید تك هسته‌اي و لنفوسیت‌ها از گلبول‌هاي قرمز مي شود. این روش سبب برداشتن گرانولوسیت‌ها نیز مي شود.

روش سوم، سانتريفيوژ كردن نمونه خون در g ۳۳۰۰ بمدت ۱۰ دقيقه و توليد لايه بافي كوت حاوي گلبول‌هاي سفيد است. بعد از سانتريفيوژ سه لايه قابل تمايز است. لايه بالايي پلاسما است، لايه حد وسط همان بافي كوت است و لايه زيرين، گلبول‌هاي قرمز مي باشد.

۲-۷-۶- تخريب نمونه‌هاي خون

نمونه‌هاي خون، از جمله آنهايي كه گلبول قرمز آنها جدا شده‌اند را مي توان بوسيله بافر ليزكننده پروتئاز يا پروتئيناز K بطور كامل ليز كرد.

۲-۸- روش‌هاي جداسازي DNA از نمونه‌هاي خون

همانطور كه اشاره شد جداسازي DNA از خون بايد حاوي روش‌هايي باشد كه سبب حذف مهار كننده‌هاي بالقوه خون و نيز ضدانعقادها باشد، تا بتواند DNA با كيفيت مطلوب خالص نمايد. بيشتر متدهاي غيرتجاري (Home Made)، بر پايه استفاده از بافي كوت استوار بوده كه بعدا توسط روش‌هايي كه براي جداسازي DNA از بافت مورد استفاده قرار مي گيرند، DNA آنها استخراج مي گردد.

كيت‌هاي مبتني بر فيلترهاي سيليكا براي جداسازي DNA باكيفيت از خون تام به فرم تجاري موجود مي باشد. در اين روش جداسازي گلبول‌هاي قرمز ضروري نيست. باتوجه به ميزان و كيفيت DNA مورد نياز، كيت‌هاي مختلفي در دسترس مي باشد.

۲-۹- جداسازي DNA ژنومي از ساير نمونه‌هاي باليني

علاوه بر خون، ساير مايعات بيولوژيك، سواب و نمونه‌هاي مدفوع بطور روتين براي آناليزهاي باليني مورد استفاده قرار مي گيرند. بعضي نمونه‌ها بويژه نمونه‌هاي مدفوع حاوي مهاركننده‌هاي زيادي مي باشند كه براي بدست آوردن DNA باكيفيت بايد از نمونه حذف شوند. كيتهاي تجاري موجود حاوي موادي است كه سبب حذف اين مهاركننده ها از مدفوع مي شود. بيشتر مايعات بيولوژيك را مي توان شبيه نمونه خون مورد استفاده قرارداد.

۲-۱۰- جداسازي DNA از عوامل بيماريزا

DNA باكتريها، قارچها، انگل‌ها و ويروس‌ها را مي توان از نمونه‌هاي باليني جدا كرد. DNA ويروس‌هاي اينتگره شده در ژنوم ميزبان با همان روشي كه براي جداسازي DNA ژنومي در بالا توضيح داده شده جدا مي شود. DNA پارتيكل‌هاي ويروسي عمدتا از مايعات عاري از سلول نظير پلاسما و CSF كه در آنها تيتر ويروس پائين است جدا مي شوند. گاهي نياز است تا پارتيكل‌هاي ويروسي با روش‌هايي نظير اولتراسانتريفيوژ، اولترافيلتراسيون، و يا پرسي پيتاسيون تغليظ گردد. اضافه كننده حاملين DNA (Carries) در مواردي كه ميزان DNA موجود در نمونه كم است نيز كمك كننده است. بايد توجه كرد DNA يا RNA عوامل بيماريزا كه از نمونه‌هاي باليني جدا مي شوند هميشه با DNA ژنومي همراه است، مگر اينكه از روش‌هاي جداسازي اختصاصي استفاده گردد.

براي جداسازي DNA باكتريايي از مايعات بيولوژيك، ابتدا اين باكتريها بايد رسوب داده شود و سپس جداسازي DNA، نظير جداسازي از كشت سلول‌هاي باكتريايي انجام شود.

۲-۱۱- جداسازي DNA از كشت سلولهاي حيواني، انساني، مخمر و باكتريايي

كشت سلول‌هاي انساني و حيواني را مي توان با استفاده از بافر ليزكننده و پروتئيناز K بطور قابل قبولي ليز كرد. كشت سلول‌هاي مخمر ابتدا بايد بوسيله ليتيكاز يا زيمولاز به منظور هضم ديواره‌ي سلولي آنها تيمار گردد. اسفروبلاست‌هاي توليدي بوسيله سانتريفيوژ كردن جمع آوري و بوسيله بافر ليزكننده و پروتئيناز K ليز مي شود. سلول‌هاي مخمري (يا ساير تك سلولهاي جانوري) را بايد قبل از ليزكردن بوسيله مخلوط كن و ذرات شيشه‌اي به قطر ۰/۵ ميليمتر خرد كرد. بيشتر سلول‌هاي باكتريايي نيز بطور قابل قبولي، با بافر ليزكننده و پروتئيناز K قابل ليز شدن مي باشند. بعضي باكتري‌ها بويژه باكتريهاي گرم مثبت نيز به يك انكوباسيون اوليه با آنزيم‌هايي نظير ليزوستافين نياز دارند تا ديواره‌ي سخت سلولي و چند لايه آنها ليز شود. براي تسهيل در ليز شدن سلول‌هاي باكتريايي نيز مي توان از مخلوط كردن آنها با ذرات شيشه‌اي به قطر ۰/۵ ميليمتر استفاده كرد. ضروري است كه ذرات شيشه با شستشوي آنها در اسيد نيتريك غليظ براي اين كار آماده شوند.

۲-۱۲- جدا سازي RNA

۲-۱۲-۱- متلاشي و هموژن نمودن مواد اوليه براي جداسازي RNA

متلاشي و هموژن نمودن مواد اوليه براي تمام روشهاي جداسازي RNA ضروري مي باشد. در ادامه متلاشي و هموژن نمودن تخليص RNA با يکي از متدهاي ذيل مي تواند انجام پذيرد. متلاشي و هموژن نمودن در حضور يک حلال آلي يا عوامل کائوتروپيک (Chaotropic) جهت ممانعت از RNase ها انجام مي گيرد که در طي مراحل آزاد مي شود. با اين وجود تغييرات در الگوي بيان RNA قبل از متلاشي نمودن و يا در طي آن و با هموژن نمودن مي تواند رخ دهد. لذا براي آناليز دقيق بيان ژن، نمونه بايد ابتدا تثبيت شود. درصورت حجم اندک نمونه هاي متلاشي شده، افزودن ممانعت کننده RNase ممکن است ضروري باشد. برخي از روش هاي متلاشي کننده، بطور همزمان نمونه را هموژن نيز مي نمايد، در حاليکه برخي ديگر نيازمند يک مرحله اضافي براي هموژن نمودن مي باشند که در ذيل جزئيات آن بيشتر تشريح مي گردد.

۲-۱۲-۲- متلاشي و هموژن نمودن با استفاده از Rotor-Stator Homogenizer

اين نوع از هموژنايزرها مي توانند بصورت کامل سلول ها را متلاشي نموده و همزمان هموژن نمايند. زمان مورد نياز در حضور بافر ليز کننده بافتهاي حيواني بسته به سفتي و سختي ۵ الي ۹۰ ثانيه مي باشد. اين نوع از هموژنايزرها مي توانند ليز سلولي را هموژن نمايد. روتور در سرعت بالا باعث متلاشي و هموژن شدن نمونه مي شود. براي به حداقل رساندن توليد حباب بايد لوله، مناسب با حجم نمونه بوده و نوک پروب در داخل ظرف نمونه (در يک طرف ظرف) غوطه ور باشد.

تذکر: با استفاده از نوک هاي يکبار مصرف و با اتخاذ روشهاي دقيق براي تميز نمودن هموژنايزر، مي توان احتمال انتقال آلودگي از نمونه به نمونه ديگر را کاهش داد.

۲-۱۲-۳- متلاشي و هموژن نمودن با استفاد ه از Bead Mills

در اين روش سلولها و بافت مي تواند به سرعت با استفاده از به همزدن سريع در حضور ذرات[۲۳] بيد و بافر ليز کننده متلاشي گردند. متلاشي و هموژن نمودن در اثر برخورد و سايش مداوم ذرات بيد با سلول رخ مي دهد. متلاشي نمودن مؤثر، به اندازه و ترکيب ذرات، سرعت و شکل بندي همزن، نسبت بافر به ذرات، زمان از هم پاشيدگي، مقدار مواد اوليه مرتبط مي باشد. ذرات مناسب براي استفاده باکتري ها، ذرات شيشه اي به قطر ۰/۱ ميلي متر بوده و براي مخمرها و تک ياخته اي ها ۰/۵ ميلي متر براي مي باشد. براي سلولهاي حيواني و بافت گياهي ذرات ضدزنگ فولادي با قطر ۳ الي ۷ ميلي متر مورد نياز مي باشد.

بيدهاي شيشه اي بايد ابتدا توسط اسيدنيتريک غليظ شسته شود. بيدهاي شيشه اي شسته شده با اسيد را مي توان بصورت تجارتي تهيه نمود. مواد گياهي (همچنين بيدها و ظروف) بايد قبل از استفاده در نيتروژن مايع سرد شده، و متلاشي نمودن بايد بدون بافر ليزکننده انجام گردد. ساير پارامتر ها متلاشي نمودن متناسب با نوع نمونه بايد درنظر گرفته شود.

۲-۱۲-۴- متلاشي نمودن با استفاده از هاون

بدين منظور نمونه ها فورا در نيتروژن مايع منجمد شده و تحت نيتروژن مايع خرد شده و بصورت پودر درمي آيند. سوسپانسيون را (پودر بافت و نيتروژن مايع) در داخل نيتروژن مايع، سرد نموده، سپس به لوله متناسب انتقال دهيد و اجازه دهيد نيتروژن تبخير شود بدون اينکه نمونه ذوب گردد. بافر ليزکننده اضافه نموده، سريعا بصورتي که احتمال هموژنيزه شدن با يکي از متدهاي ذيل را فراهم مي نمايد، ادامه دهيد. توجه نماييد که خرد کردن نمونه با استفاده از هاون و دسته آن مي تواند نمونه را متلاشي نمايد، اما نمي تواند آنرا هموژن کند. هموژن نمودن بايد قبل از اين بطور جداگانه انجام يابد.

۲-۱۲-۵- هموژن نمودن با استفاده از هموژنايزر Spin-Column

برخي از شرکت ها تکنيک هموژنايزر spin-column با غشاء سيليکا را پيشنهاد مي کنند. اين يک روش سريع و مؤثر براي هموژن نمودن سلول و ليز بافت بدون آلودگي متقاطع نمونه ها مي باشد. نمونه ليز شده به spin-column منتقل شده و اين مجموعه در داخل لوله هاي جمع آوري، سانتريفيوژ مي گردد.

---

[23] Beads

۲-۱۲-۶- روش هاي جدا سازي

تکنیک ها و روشهاي گوناگوني براي جدا سازي RNA و یا تمیز نمودن (clean up) آن از واکنش هاي آنزیماتیک در دسترس مي باشد. بطور کلي روشها شامل متلاشي نمودن و لیز مواد اولیه مي باشند که با حذف پروتئین، DNA و دیگر آلوده کننده ها ادامه مي یابد. در این بخش تکنیک هاي متفاوت مورد بحث قرار مي گیرد. پروتکل هاي دلخواه از ترکیبي از چند تکنیک استفاده مي کنند. انتخاب دستورالعمل بخصوص بستگي به نوع RNA (RNA کامل، RNA سیتو پلاسمیک، mRNA، RNA با وزن ملکولي پایین)، خلوص مورد نیاز در کاربردهاي پایین دستي، زمان دلخواه و هزینه هر نمونه و اینکه RNA دست نخورده مورد نیاز باشد یا نه، دارد.

۲-۱۲-۷- هضم آنزیمي

یک متد ساده براي جداسازي RNA از سلول شامل لیز سلولي و هضم پروتئینها با استفاده از پروتئینار K در حضور سدیم دودسیل سولفات (SDS) و یک مهار کننده RNase مي باشد. پس از غیرفعال نمودن پروتئیناز K (توسط حرارت و یا مواد آلي خالص سازي) DNA آلوده کننده توسط DNase I به مدت ۳۰ دقیقه الي یک ساعت هضم مي گردد. آلوده کننده ها ممکن است سبب ممانعت از کاربردهاي پایین دستي شوند. این متد نمي تواند براي بافت مورد استفاده قرار گیرد، زیرا لیز با استفاده از پروتئینار K آهسته و کم تأثیر بوده و ممانعت از تخریب RNA توسط RNase خودي، مشکل مي باشد.

راه جایگزین، متلاشي نمودن سلول با استفاده از مواد کائوتروپیک[۲۴] است، که متعاقب رقیق سازي مواد لیز شده و توسط یک آنزیم (نظیر پروتئیناز K) صورت مي پذیرد و مي تواند میزان RNA را بدون تخریب شدن در طي تیمار آنزیمي افزایش دهد.

اغلب در انتهاي پروتکل براي خارج نمودن هر DNA هضم توسط DNase I مورد استفاده قرار مي گیرد. متعاقب تیمار با DNase ، مي توان آنزیم DNase را توسط هر تکنیکي که پروتئین ها را از اسید نوکلئیک جدا مي کند، خارج نمود (نظیر استخراج آلي و انجام رسوب با الکل، تخلیص با استفاده از متد هاي مبتني بر silica و یا متد تعویض یوني). خروج کامل DNase I دقیقا براي RNA و آنالیز صحیح RT-PCR ضروري است. هر باقي مانده اي از DNase I مي تواند cDNA را در طي سنتز تخریب نموده و به شدت در تولید آن و کمیت آن تأثیر بسزایي داشته باشد.

۲-۱۲-۸- استخراج آلي

استخراج آلي تکنیکي است که اغلب با هضم پروتئیناز K، استخراج با دناتوره کننده هاي (denaturant) قوي، رسوب با الکل یا کلرور لیتیم و یا شیب غلظتي کلرورسزیم ترکیب مي گردد. بطور نمونه، نمونه در pH اسیدي با فنل ترکیب مي شود. فنل سلول را لیز نموده و پروتئین ها را دناتوره مي نماید.

در pH اسیدي DNA نمونه پروتونه شده، شارژ آن خنثي شده و باعث جداسازي آن از RNA با قرار گرفتن در فاز آلي مي شود. RNA شارژ شده در فاز مایع آبي مي ماند. این دو فاز توسط سانتریفیوژ جدا شده و فاز مایع توسط مخلوط فنل کلروفرم مجددا تخلیص مي گردد و سپس با استفاده از کلروفرم از باقیمانده فنل جدا مي شود. RNA موجود در فاز مایع توسط اتانول و ایزوپروپانول و یا شیب غلظتي کلرور سزیم رسوب مي نماید.

RNA جدا شده با از استفاده روش تخلیص آلي ممکن است حاوي باقیمانده اي از فنل، و یا کلروفرم باشد که واکنش هاي پایین دستي را مهار نموده و مي تواند در خواندن تیتر نهایي میزان ژنوم تأثیر اصلي داشته باشد. این روش بواسطه استفاده از مواد سمي و تراتوژنیک داراي محدودیت بوده و علاوه بر وقتگیر بودن، نیازمند وجود مهارت براي انتقال فاز مایع مي باشد.

۲-۱۲-۹- تخلیص با استفاده از دناتوره کننده هاي قوي

مواد کائوتروپیک نظیر ایزوتیوسیانات گوانیدیوم و هیدروکلراید گوانیدیوم دناتوره کننده هاي قوي مي باشند که به سرعت RNase را غیرفعال نموده و اطمینان لازم براي جداسازي RNA دست نخورده را فراهم مي نماید. نمک گوانیدیوم براي تخریب سلولي کافي مي باشد. استخراج با استفاده از مواد کائوتروپیک معمولا با استخراج آلي و رسوب توسط الکل و یا کلرورسزیم شیب غلظتي کلرورسزیم، متدهاي مبتني بر سیلیکا، تعویض یوني و یا گزینش هیبریدي همراه مي باشد.

---

[24] Chaotropic

۲-۱۲-۱۰- رسوب با الکل و یا کلرور لیتیم

هر دو روش رسوب با الکل و یا کلرورلیتیم مبتني بر salting out اسید نوکلئیک مي باشد. در بسیاري از روش هاي جداسازي RNA، از رسوب الکلي یا ایزوپروپانول در حضور سدیم و یا آمونیم استات استفاده مي شود. RNA قبل از رسوب ابتدا تاحدودي تخلیص شده، زیرا پروتئین ها و DNA نیز رسوب مي کند. این رسوب سپس با استفاده از الکل۷۰ درصد جهت خارج نمودن نمک هاي باقي مانده شسته شده، خشک مي شود و مجددا حل مي گردد. این روش به ما این اجازه را مي دهد که RNA را تغلیظ نموده و نمک ها را خارج نماییم، البته این روش وقتگیر مي باشد. بطور کلي این روش براي تخلیص حجم فراوان RNA بسیار خوب عمل مي کند. پلت رسوب داده شده ممکن است در طي مرحله خارج نمودن الکل و یا در مرحله خشک نمودن از دست برود. این حالت بویژه در حجم هاي اندک RNA و یا وقتي پلت کوچک مي باشد و یا زمانیکه حلال هاي آلي باقیمانده (نظیر کلروفرم) در پلت وجود دارند، دیده مي شود.

در زمانیکه DNA در محلول باقي مانده، کلرورلیتیم مي تواند براي رسوب افتراقي RNA مورد استفاده قرار گیرد. این روش اگرچه در مقایسه با رسوب الکلي به چندین ساعت زمان براي اجرا نیاز دارد، معهذا خلوص بالاتري را در مقایسه با روش تخلیص آلي فراهم مي نماید. بعلاوه رسوب به غلظت بالایي از کلرورسزیم نیاز دارد که مي تواند در واکنش آنزیمي پایین دستي نظیر RT-PCR تداخل نماید. رسوب الکلي معمولا در ادامه رسوب با کلرورلیتیم به کار گرفته مي شود.

۲-۱۲-۱۱- شیب غلظتي کلرورسزیم و سوکروز

RNA مي تواند توسط سانتریفیوژ از طریق شیب غلظتي کلرورسزیم تخلیص گردد. RNA اي که تاحدودي تخلیص شده با کلرورسزیم و اتیدیوم برماید مخلوط شده در به مدت چندین ساعت و معمولا یک شب (۱۴ الي ۱۲ ساعت) سانترویفوژ مي شود (36000-(40000 x g. در حالي که DNA و پروتئین ها در فاز محلول (supernatant) قرار دارند. RNA در ته لوله سانتریفیوژ بصورت پلت جدا مي شود. پلت RNA، جمع آوري شده و توسط الکل جهت خارج نمودن باقیمانده کلرورسزیم رسوب داده مي شود. این روش امکان جداسازي RNA در کیفیت بالا را فراهم مي نماید. اگرچه بواسطه آنکه بسیار وقتگیر، پر زحمت و گران مي باشد، استفاده از آن براي آماده سازي نمونه هاي متعدد مشکل است. از دیگر محدودیت هاي این روش، استفاده از اتیدیوم بروماید و کلرورسزیم است که خاصیت سمي دارد. ملکول هاي کوچک RNA نظیر tRNA و 5s rRNA، در گرادیان کلرورسزیم ته نشین نمي گردند. این ملکول هاي کوچک مي توانند از طریق گرادیان سوکروز و یا ژل آگارزي که شامل متیلن مرکوریک مي باشد جدا شوند. هیدروکسیدمتیلن مرکوریک شدیدا توکسیک و فرار بوده، لذا استفاده از آن خطرناک مي باشد و دفع آن به همراه مواد شیمیایي مشکل است.

۲-۱۲-۱۲- کروماتوگرافي تعویض یوني

فاز جامد کروماتوگرافي تعویض یوني مبتني بر واکنش بین شارژ منفي فسفات اسید نوکلئیک، و شارژ مثبت ملکول هاي سطحي سوبسترا مي باشد. RNA به سوبسترا تحت شرایط نمکي معین متصل شده، دیگر آلوده کننده ها نظیر DNA، پروتئین ها و متابولیت ها با غلظت هاي متفاوت نمکي شسته مي شوند (پاک سازي مي شوند). این روش، تخلیص موازي RNA، DNA و دیگر ملکول هاي کوچک RNA از نمونه را امکان پذیر مي نماید. اسیدنوکلئیک شسته شده (تصفیه شده) توسط رسوب، با الکل بازیافت شده که براي ادامه کار مناسب مي باشد.

تکنولوژي تعویض یوني RNA با خلوص و فعالیت بیولوژیکي معادل حداقل دو نوبت تخلیص در گرادیان کلرورسزیم بوده ولي در زمان بسیار کوتاهتري قابل انجام مي باشد. RNA جدا شده شامل ملکول هاي کوچکتر، که در گرادیان کلرورسزیم و یا روشهاي مبتني بر سیلیکا بدست نمي آید، نیز هست. ملکول هاي کوچک RNA مي توانند بصورت انتخابي جدا شوند. علاوه بر این، تکنیک مذکور از مواد سمي اجتناب نموده و مي تواند براي احتیاجات گوناگون و همچنین مقیاس هاي گوناگون تخلیص مورد استفاده قرار گیرد.

برخي از شرکت ها کیت هایي براي جدا سازي RNA و DNA پیشنهاد مي نمایند که مبتني بر تکنیک تعویض یوني مي باشد. روش هایي که بصورت کیت توسط شرکت هاي گوناگون در مراحل زماني متفاوت و کیفیت و اندازه هاي گوناگون، RNA جدا مي نماید عرضه شده است.

۲-۱۲-۱۳- روش مبتني بر سیلیکا

تکنولوژي مبتني بر سیلیکا مي تواند یک روش سریع و مطمئن جداسازي RNA را فراهم نماید. این روش مبني بر جذب انتخابي اسید نوکلئیک به سیلیکا در حضور غلظت بالاي نمک هاي کائوتروپیک نظیر گوانیدیوم هیدروکلراید و گوانیدیوم

ايزوتيوسيانات سديم، نمک يددار و سديم پرکلرايد مي باشد. استفاده بافر اختصاصي در روش ليز اين اطمينان را فراهم مي نمايد تا تنها RNA جذب شود، درحاليکه DNA، پروتئين هاي سلولي و متابوليت ها در محلول باقي مي ماند. اين آلوده کننده ها با شستشو پاک شده و خارج مي شوند و RNA با کيفيت بالا با استفاده از يک بافر کم نمک شسته مي شود. با استفاده از مواد مناسب و يا کيت ها RNA شسته شده براي واکنش هاي پايين دستي آماده مي گردد.

توجه: در نمونه هاي واجد مقادير اندک RNA ممکن است DNA در عوض RNA جذب گردد. لذا آزمون براي آلودگي RNA به DNA ژنوميک ممکن است براي ادامه کار ضروري باشد.

چندين تکنولوژي مبتني بر سيليکا که در روش و کميت RNAي جدا شده متفاوت مي باشد، در حال بکارگيري است. بعنوان مثال ذرات سيليکا ممکن است در شکل سوسپانسيون و يا در غشاء در شکل spin column و يا واحدهاي چند حفره اي[25] از جمله روشهاي اتوماتيک براي حداکثر ميزان بازدهي طراحي گردد. به هرحال استفاده از spin column راحت تر بوده و از انتقال ذرات سيليکا به RNA که در مرحله آخر جدا مي شود اجتناب مي نمايد.

۲-۱۲-۱۴- جداسازي mRNA با استفاده از کروماتوگرافي متمايل به اوليگو[26]

کشف اينکه mRNA يوکاريوتيک شامل ترادف کووالاني متصل به پلي آدنيليک اسيد [poly(A)] در انتهاي `3 مي باشد منجر به بکارگيري روشهاي تخليص تمايلي گرديد. اين روش ها هيبريدايزيشن poly A را به ترادف اوليگو (dT) مجتمع در ماتريکس جامد مورد استفاده قرار مي دهد. روش هاي اوليه الحاق يافته ترادف اوليگو (dT) را بطور کووالاني به سلولز متصل نموده است. علاوه بر اوليگو هاي واجد سلولز، کيت هاي در دسترس تجارتي نيز از اوليگو (dT) متصل به ذرات مغناطيسي، ذرات پلي استرن-لاتکس يا پليت هاي پلي استرن ميکروتايتر بهره مي گيرند. بطور نمونه mRNA کامل از نمونه کلينيکي جدا شده و براي تخليص کششي توسط حرارت در ۶۵ درجه سانتيگراد بمدت ۵ دقيقه تخليص مي گردد. پس از سرد نمودن سريع در روي يخ براي حذف ساختمان ثانويه آماده مي گردد. RNA آماده شده سپس براي ماتريکس مجتمع شده از اوليگو، بکار گرفته مي شود. ماتريکس چندين بار شسته شده تا موادي که بطور غير اختصاصي متصل شده اند، خارج گردد. mRNA نيز شسته مي شود. سپس با استفاده از رسوب توسط الکل يا تبخير در تغليظ کننده خلأيي سانتريفيوژي[27]، تغليظ مي شود. روشهاي تخليص کششي اوليگو (dT) براي تخليص mRNA غير پلي آدنيله مناسب نمي باشد.

۲-۱۳- ملاحظات اختصاصي براي جدا سازي RNA از منابع نمونه اي متفاوت

نمونه هاي باليني در مقدار RNA و محتويات آن متفاوت مي باشند که مي تواند سبب مشکلاتي در RNA جدا شده و آناليز شده شود. اين نوع نمونه ها نيازمند ملاحظات اختصاصي بوده که معمولا در نمونه هاي استاندارد رعايت آن مورد نياز نمي باشد. در اين بخش اين ملاحظات در نمونه هايي که از منشاء هاي گوناگون بدست مي آيد مورد بحث قرار مي گيرد.

۲-۱۳-۱- بافت قلب، عضله و پوست

جداسازي RNA از عضلات اسکلتي و بافت پوست بواسطه وفور پروتئين هاي انقباضي، بافت پيوندي و کولاژن مي تواند مشکل باشد، به گونه اي که در جداسازي RNA تداخل نمايد. اين نمونه ها بايد با پروتئيناز K تحت تأثير قرارداده شوند. اين پروتئازها بايد در ادامه واکنش غير فعال شده تا سبب تخريب RNA نگردد (رجوع به ۷.۳.۳.۲.۱).

۲-۱۳-۲-خون

نمونه خون بطور معمول براي بررسي هاي باليني جمع آوري مي گردد. خون واجد مجموعه اي از آنزيم هاي مهار کننده مي باشد که مي تواند در ادامه آناليز RNA تداخل نمايد. علاوه بر اين مواد ضد انعقاد معمول نظير EDTA و هپارين مي تواند در ادامه کار تأثير نمايد. جداسازي RNA از خون نيازمند روشي است که RNA، با کيفيت بالا بدون حضور هر آلوده کننده اي و يا آنزيم هاي مهار کننده را فراهم نمايد.

اريتروسيت ها (سلول هاي گلبول قرمز رسيده) ممکن است از رتيکولوسيت هايي (سلول هاي نابالغ گلبول قرمز) تشکيل شده باشند که واجد mRNA (اکثرا globin RNA) بوده و در جداسازي RNA از اهميت کمتري برخوردار باشد. لکوسيت ها شامل سه نوع سلول اساسي لنفوسيت، منوسيت و گرانولوسيت مي باشند.

---

[25] Multiwell units
[26] Oligo Affinity Chromatography
[27] Centrifugal vacuum concentrator

خارج نمودن اريتروسيت ها ممكن است جداسازي RNA را ساده گرداند. اين مهم مي تواند با ليز انتخابي اريتروسيت ها كه به شك هيپوتونيك در مقايسه با لكوسيت ها حساس تر مي باشند، انجام گردد. آنها به سرعت در حضور بافر هيپوتونيك متلاشي مي شوند. لكوسيت هاي دست نخورده، سپس توسط سانتريفيوژ جدا شده و استخراج RNA انجام مي گردد. متد جايگزين متداول ديگر سانتريفيوژ شيب غلظتي[۲۸] است. برخلاف روشهاي مبتني بر ليز اريتروسيت، سانتريفيوژ شيب غلظتي تنها سبب بازيافت سلولهاي منونوكلئر (لنفوسيت و منوسيت) مي گردد و گرانولوسيت ها را، خارج مي نمايد. سلولهاي تك هسته اي جدا شده توسط سانتريفيوژ شيب غلظتي مي تواند براي جداسازي RNA با استفاده از همان روشي كه نظير هر نوع سلول ديگر است، ادامه يابد. بايد توجه نمود كه اگر مراحل تثبيت نمودن نمونه بلافاصله پس از خونگيري انجام نگيرد، پروفايل نسخه برداري ژني در نمونه خون تام ذخيره شده مي تواند تغيير يابد. معرف هاي تثبيت كننده اختصاصي براي نمونه خون تام بصورت تجارتي در دسترس مي باشند و اگر تثبيت mRNA و rRNA در نظر است بايد انجام شود.

۲-۱۳-۳- باكتري ها

ويژگي mRNA باكتريايي در مقايسه با mRNA يوكاريوت ها در تعدادي از جنبه هاي ضروري متفاوت مي باشد. mRNA پروكاريوت ها فاقد سر `5 بوده و به ندرت داراي دنباله پلي A مي باشند كه به معني اين است كه جداسازي mRNA توسط روش هيبريد اوليگو (dT) امكان پذير نمي باشد. علاوه بر اين پرايمر اوليگو (dT) نمي تواند براي سنتز cDNA مورد استفاده قرار گيرد و بايد از پرايمر هاي راندوم[۲۹] استفاده شود.

علاوه بر اين mRNA باكتريايي با طول عمري معادل ۳ دقيقه براي رشد سريع باكتري، بصورت فزاينده اي ناپايدار مي باشد. گاهي اوقات mRNA باكتريايي زمانيكه براي ترجمه مورد نياز مي باشد شروع به تجزيه مي نمايد. به اين دليل مطالعات بيان ژن در پروكاريوت ها در مقايسه با يوكاريوت ها مشكل تر است. بر اين اساس نمونه ها بايد پس از جدا نمودن و قبل از انجام مراحل كار بر روي نمونه به سرعت تثبيت شوند.

۲-۱۳-۴- RNA آزاد در حال گردش[۳۰] در سرم

RNA همراه با پروتئوليپيدها در سرم برخي از بيماران سرطاني شناسايي مي گردد. غلظت آن بطور تقريب ده برابر بيش از DNA شناور آزاد در پلاسماي انساني مي باشد. اين RNA با طول عمري بطور متوسط دو روز در خون تام نسبتا پايدار مي باشد. با اين حال اين RNA مي تواند در طي سيكل هاي ذوب و انجماد متوالي تجزيه گردد. نظير RNA ويروسي در مايعات بدني فاقد سلول، افزودن حاملين RNA ممكن است براي جدا سازي اين نوع از RNA ضروري باشد.

۲-۱۳-۵-بافتهاي چرب

جداسازي RNA از بافت هاي چرب (بطور مثال بافت، مغز و ...) با بافرهاي ليز كننده مي تواند بواسطه تداخل حجم ليپيد مشكل باشد. بافت هاي واجد حجم بالاي چربي بطور كامل توسط بافرهاي ليزكننده مايع ليز نمي گردند، لذا درصورت محتويات بالاي بافت و انباشت در غشاي spin column و درنتيجه سبب مسدود شدن آن غشا شده و بازده پايين استخراج RNA مي شود. بنابراين استخراج آلي بافت چرب ضروري است زيرا فنل مي تواند اين نمونه هاي چرب را بطور كامل ليز نمايد.

تركيب استخراج آلي با روش مبتني بر سيليكا مي تواند از محدوديت هاي توصيف شده روش آلي (نظير حضور فنل، و كلروفرم در RNA و يا احتمال از دست دادن RNA در طي رسوب) جلوگيري نمايد. بافت در فنل و يا مخلوط فنل و GTC[۳۱] هموژن شده، كه با جداسازي فاز توسط كلروفرم ادامه مي يابد. پس از تنظيم شرايط اتصال، فاز آبي مي تواند مستقيما به غشاء سيليكا افزوده شده و مراحل استخراج ادامه يابد.

---

[28] Density –Gradian Centrifugation
[29] Random Primer
[30] Free Circulating RNA
[31] Guanidium Thiocyanate