دانشگاه علوم پزشکی
و خدمات بهداشتی و درمانی بوشهر

مرکز تحقیقات
طب گرمسیری و عفونی خلیج فارس

CrossMarck

مقاله پژوهشی

بهینه‌سازی استخراج DNA برای مطالعه طول تلومر از نمونه‌های خون منجمد

ساجده سبحان‌پرست[۱،۲]، جعفر سلیمانی[۳]، یونس آفتابی[۲]، نادر چاپارزاده[*۱]

[۱] گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه شهید مدنی آذربایجان، تبریز، ایران
[۲] مرکز تحقیقات سل و بیماری‌های ریه، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران
[۳] مرکز تحقیقات آنالیز دارویی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران

چکیده

زمینه: بهینه‌سازی استخراج DNA در راستای حفظ طول تلومر به‌عنوان زیست‌نشانگر پیری و انواع بیماری‌ها بسیار مهم است. نمونه‌های خونی که به‌طور طولانی مدت نگهداری شده‌اند، منبع بسیار مهمی برای مطالعات ژنتیکی محسوب می‌شوند. در این مطالعه با استفاده از بافرهای لیز مختلف به همراه بافر استخراج CTAB، کیفیت DNA استخراجی و اثر بازدارنده‌های همراه آن بر روی PCR کمی در مطالعات تلومر بررسی شد.

مواد و روش‌ها: استخراج DNA با ۶ بافر لیزکننده گلبول قرمز و بافر استخراج بر پایه CTAB، انجام شد. یکپارچگی DNA با ژل الکتروفورز، کمّیت با جذب در ۲۶۰ نانومتر و خلوص آن با مقادیر مورد انتظار ۱/۸ و ۲-۲/۲ برای نسبت‌های $A_{۲۶۰}/A_{۲۸۰}$ و $A_{۲۶۰}/A_{۲۳۰}$ ارزیابی گردید. ارزیابی کمّی اثر هر بافر در واکنش q-PCR و تکرارپذیری نتایج به ترتیب با محاسبه بازده واکنش، ضریب تعیین (R^2) و درصد ضریب تغییرات (%CV) محاسبه شد.

یافته‌ها: بیش‌ترین مقدار DNA استخراج شده (۳۲۴/۹۳ نانوگرم بر میلی‌لیتر، CV%:۱۱/۵۳) با استفاده از بافر ۵ (۱۰ میلی‌مولار Tris-HCL، pH=۷/۶، ۵۰ میلی‌مولار NaCl) به‌دست آمد. تمامی بافرها مقادیر مطلوب برای $A_{۲۶۰}/A_{۲۸۰}$ و $A_{۲۶۰}/A_{۲۳۰}$ داشتند و از نظر خلوص DNA تفاوتی (p>۰/۰۵) نداشتند. طبق نتایج ژل، DNA استخراج شده همه بافرها به جز یکی، فاقد خردشدگی بود. مولکول DNA استخراج شده با بافر ۱ (۱۵۵میلی‌مولار NH_4Cl، ۱۰میلی‌مولار $KHCO_3$ و ۵EDTA میلی‌مولار) بهترین عملکرد را در واکنش q-PCR برای ژن *HBG* (E=۰/۱۲۶ و R^2=۰/۹۷) و تلومر (۰/۹۹= بازده، R^2=۰/۹۹) داشت.

نتیجه‌گیری: مولکول DNA استخراج شده با بافر ۱ از نمونه خون منجمد جهت مطالعه تلومر کم‌ترین بازدارندگی q-PCR را نشان داد.

واژگان کلیدی:
تلومر
استخراج
هموگلوبین
خون
بافر

***نویسنده مسئول:**
نادر چاپارزاده
دانشگاه شهید مدنی آذربایجان
Nchapar@azaruniv.ac.ir

کد اخلاق
IR-NIMAD-REC.1396.032

دریافت: ۱۴۰۳/۰۳/۱۳
پذیرش: ۱۴۰۳/۰۶/۲۵

پیام کلیدی: روش استخراج DNA مبتنی بر بافر CTAB با بهبود کمیت و کیفیت DNA، به ویژه در کاهش بازدارنده‌های q-PCR، راهکار موثری برای مطالعات مولکولی طول تلومر از خون‌های منجمد ارائه می‌دهد.

[Downloaded from ismj.bpums.ac.ir on 2026-09-11]

[DOI: 10.61186/ismj.27.1.37]

Original Research

Optimizing DNA Extraction from Frozen Blood Samples for Studying Telomere Length

S. Sobhanparast[1,2], J. Soleymani[3], Y. Aftabi[2], N. Chaparzadeh[1*]

[1] Department of Biology, School of Basic Sciences, Azarbaijan Shahid Madani University, Tabriz, Iran

[2] Tuberculosis & Lung Disease Research Center, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran

[3] Pharmaceutical Analysis Research Center, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran

Abstract

Background: Optimizing DNA extraction for the preservation of telomere length – as a biomarker for ageing and vari-ous diseases – is highly important. Long-term stored blood samples are considered essential resources for genetic studies. In this study, different lysis buffers were used along with CTAB extraction buffer to inves-tigate the quality of extracted DNA and the effect of its accompanying inhibitors on quantitative PCR (q-PCR) in telomere studies.

Materials and Methods: DNA extraction was performed using six RBC lysis buffers and CTAB-based extraction buffer. DNA integrity was evaluated by gel electrophoresis, quantity by absorbance at 260 nm and its purity with expected values of 1.8 and 2-2.2 for the ratios of A_{260}/A_{280} and A_{260}/A_{230}. The quantitative effect of each buffer in q-PCR and the repeatability of the results were assessed by calculating the reaction efficiency, coefficient of determination (R^2), and percentage of coefficient of variation (%CV).

Results: Buffer number 5 (10 mM Tris-HCl, pH 7.6, 50 mM NaCl) yielded the highest amount of DNA extraction (324.93 ng/ml, %CV 11.53). All the extracted DNA samples were pure, as indicated by the acceptable A_{260}/A_{280} and A_{260}/A_{230}ratios ($p>0.05$). Gel analysis revealed that the extracted DNA of all the buffers ex-cept one was intact. The DNA molecule extracted with buffer number 1 (155 mM NH4Cl, 10 mM $KHCO_3$, and 5 mM EDTA) showed the best performance in q-PCR for *HBG* gene (efficiency=0.126, R^2=0.97) and telomere (efficiency=0.99, R^2=0.99).

Conclusion: The DNA molecule extracted from frozen blood samples by buffer number 1 showed the least q-PCR inhibition for telomere study.

Keywords:
Telomere
DNA extraction
Hemoglobin
Blood
Buffer

***Corresponding author:**
Nader Chaparzadeh
Nchapar@azaruniv.ac.ir

Ethical code:
IR-NIMAD-REC.1396.032

Received: 2024/06/02
Accepted: 2024/09/15

[Downloaded from ismj.bpums.ac.ir on 2026-09-11]

[DOI: 10.61186/ismj.27.1.37]

مقدمه

تلومرها، توالی نوکلئوتیدی هستند که با محافظت از انتهای کروموزوم‌ها در برابر تخریب و همجوشی، نقش حیاتی در حفظ ثبات ژنومی ایفا می‌کنند. طول تلومرها با افزایش سن و تنش‌های محیطی کوتاه می‌شود. از این‌رو، مطالعه طول تلومر برای درک پیری و درمان بسیاری از بیماری‌ها مهم است (۱). مطالعه طیف وسیعی از تکنیک‌های استخراج DNA، به‌عنوان اولین قدم برای مطالعات تلومر، نشان داده‌اند که روش استخراج DNA می‌تواند بر طول نسبی تلومر و خلوص DNA تاثیرگذار باشد (۲).

نمونه‌های خون ذخیره شده به مدت طولانی (LTS: Long Term Stored)، از طرفی به دلیل وجود گلبول‌های سفید، غنی از DNA ژنومی (g-DNA) و از طرف دیگر به دلیل حذف دو مرحله زمان‌بر و هزینه‌بر نمونه‌گیری و طبقه‌بندی نمونه‌ها از منابع مقرون‌به‌صرفه از نظر زمانی و اقتصادی برای استخراج DNA (۳) جهت مطالعات اپیدمیولوژیک ژنتیکی و مطالعات طول تلومر می‌باشند (۴) و امکان تعریف مطالعات جدید با هزینه کمتر را فراهم می‌سازند. با این حال پروتکل‌ها و کیت‌های تجاری موجود برای استخراج g-DNA علاوه‌بر هزینه‌بر بودن، اختصاصیت کافی جهت استخراج از خون LTS را ندارند (۳)؛ بنابراین باتوجه به این محدودیت‌ها، بهینه‌سازی روش‌های استخراج دستی همچنان از اهمیت بالایی برخوردار است. تیمارهای شیمیایی و فیزیکی به کار برده شده طی مراحل مختلف استخراج، کمیت و کیفیت DNA را تحت تأثیر قرار می‌دهند (۵). از جمله این موارد می‌توان به ترکیبات موجود در بافرهای لیز مانند انواع نمک‌ها، شوینده‌ها، یون‌ها و همچنین pH، زمان و دمای انکوباسیون اشاره کرد (۶) که بر روی غشا و اجزای سلولی طی فرایند استخراج اثر می‌گذارند.

در عین حال که این ترکیبات جهت استخراج هر چه بهتر DNA ضروری هستند اما باید توجه داشت که باقی‌ماندن آن‌ها همراه DNA سبب اختلال در انجام صحیح فرایندهایی همچون انواع PCR می‌شوند که از آن‌ها به‌عنوان بازدارنده‌ها یاد می‌شود. بازدارنده‌ها با کاهش اختصاصیت پرایمرها، کلاته کردن Mg^{2+} و با اثر بر فعالیت DNA پلیمراز تکثیر DNA در PCR را تحت تأثیر قرار می‌دهند (۷-۹). واکنش زنجیره‌ای کمی (q-PCR) که در این مطالعه از آن استفاده شده است به‌عنوان روشی سریع و حساس امکان تشخیص و تولید مقدار زیادی DNA را فراهم می‌کند. مهارکننده‌های باقی‌مانده طی مراحل استخراج می‌توانند بر اندازه‌گیری نسبی طول تلومر در q-PCR با ایجاد اختلال در توالی‌های تکثیر یافته DNA هدف اثر بگذارند (۱۰). این مسئله منجر به عدم دقت در تعیین کمیت تکرارهای تلومر نسبت به یک ژن تک کپی می‌شود. با محاسبه بازده واکنش و ضریب تعیین (R^2)، میزان اثرگذاری این بازدارنده‌ها بر عملکرد q-PCR بررسی می‌شود. همچنین بافر لیز مناسب باید بتواند تا حد امکان تمام هموگلوبین موجود در نمونه را بدون آسیب رساندن به DNA گلبول‌های سفید حذف کند تا بیش‌ترین مقدار DNA بدون شکستگی برای مطالعه طول تلومر استخراج شود. از این رو در این پژوهش ارتباط بین میزان حذف شدن هموگلوبین و مقدار DNA استخراج شده نیز بررسی گردیده است.

مطالعات مختلف نشان داده‌اند که یکی از مهم‌ترین عوامل اثرگذار در سنجش طول تلومر با q-PCR به‌ویژه از نمونه‌های خون، نوع روش استخراج DNA می‌باشد (۲، ۱۱ و ۱۲)؛ زیرا روش‌های مختلف خالص‌سازی طی این فرایند باعث ایجاد تفاوت در کیفیت و اندازه DNA می‌شود (۴). از جمله عوامل دیگر توالی پرایمر تلومر، نوع ژن تک کپی، نوع مستر میکس و شرایط برنامهq-PCR می‌باشد (۱۳). با

[Downloaded from ismj.bpums.ac.ir on 2026-09-11]
[DOI: 10.61186/ismj.27.1.37]

وجود مشخص شدن این عوامل روش‌های موجود جهت مطالعه تلومر و حتی کیت‌های استخراج نیز دارای محدودیت‌ها و معایبی هستند و گاه نتایج متضادی در طول تلومر اندازه‌گیری شده ارائه می‌دهند که ممکن است همخوانی چندانی با یکدیگر نداشته باشند (۴). بررسی بازدارنده‌ها و تلاش در جهت کاهش تأثیر آن‌ها برای به‌دست‌آوردن نتایج قابل‌اعتماد و دقیق در مطالعات طول تلومر با استفاده از q-PCR و به‌دست‌آوردن مقدار زیادی DNA خالص بسیار مهم است؛ بنابراین پژوهشگران همچنان در حال تلاش برای بهینه ساختن مراحل قبل و بعد استخراج DNA برای مطالعه طول تلومر هستند. در این مطالعه، علاوه بر اینکه اثر شش بافر متفاوت لیز اختصاصاً جهت استخراج تلومر از نمونه‌های LTS در q-PCR بررسی شده است، شرایط بهینه q-PCR به‌دست‌آمده از سایر تحقیقات از جمله مطالعه جوگلکار (Joglekar) و همکاران و مطالعه کاوتن (Cawthon) و همکاران به کار گرفته شده است (۱۴ و ۱۵) تا ساده‌ترین، در دسترس‌ترین و مطلوب‌ترین روش استخراج معرفی گردد و تا حد امکان عواملی که باعث ایجاد تفاوت در نتایج حاصل از تحقیقات مختلف شده است به حداقل برسد.

مواد و روش‌ها

نمونه‌های خون

این مطالعه به صورت یک تحقیق تجربی با نمونه‌های خونی منجمد، مربوط به بیماران مبتلا به آسم که توسط مرکز تحقیقات سل و بیماری‌های ریه دانشگاه علوم پزشکی تبریز در سال ۱۳۹۶ با کد اخلاق ۰۳۲. ۱۳۹۶- IR-NIMAD-REC جمع‌آوری شده بود و فرم رضایت آگاهانه امضا شده برای مطالعات ژنتیکی متعاقب داشتند، انجام گردید. نمونه‌ها به مدت ۶ سال در دمای ۲۰- درجة سانتی‌گراد نگهداری شده بودند.

آماده‌سازی انواع بافرها

تمام مواد شیمیایی مورد استفاده در این پژوهش محصول شرکت Merck آلمان بودند. بافرهای مورد استفاده در مطالعات مختلف برای روش‌های متنوع استخراج به کار رفته‌اند که در بسیاری از موارد، هدف اصلی این استخراج‌ها بررسی تلومر نبوده و اهداف دیگری دنبال شده‌اند؛ بنابراین، در این مطالعه به‌طور اختصاصی تأثیر این بافرها بر استخراج تلومر و روش q-PCR از نمونه‌های LTS مورد بررسی قرار گرفته است. بافر ۱ (NH_4Cl با غلظت ۱۵۵میلی‌مولار، $KHCO_3$ ۱۰میلی‌مولار و EDTA ۵ میلی‌مولار) (۱۶)، بافر ۲ (Tris-HCl با غلظت ۱۰ میلی‌مولار، KCl ۱۰ میلی‌مولار و MgCl2 ۴ میلی‌مولار) (۱۷)، بافر ۳ (NH4Cl ۱۵۵میلی‌مولار و Tris-HCl ۱۰ میلی‌مولار) (۱۸)، بافر ۴ (Tris-HCl ۱۰ میلی‌مولار و NaCl ۱۰ میلی‌مولار) (۱۷)، بافر ۵ (Tris-HCl ۱۰ میلی‌مولار و NaCl ۵۰ میلی‌مولار) (۱۷) و بافر ۶ (Na_2CO_3 ۰/۱ میلی‌مولار) (۱۹) تهیه شدند. بافر CTAB (NaCl ۱/۴ میلی‌مولار، Tris-HCl ۱۰۰ میلی‌مولار، ۲۰EDTA میلی‌مولار و CTAB دو درصد) به‌عنوان بافر استخراج (۲۰) به کار برده شد. pH تمامی بافرها در ۷/۶ تنظیم گردید.

جهت حذف باقی‌مانده بافرهای لیز و یکسان‌سازی شرایط برای همه نمونه‌ها در بررسی جذب هموگلوبین در طول موج ۵۴۰ و ۵۷۰ نانومتر، از بافر Tris-HCl ۲۰ میلی‌مولار با pH=۷/۶ (۲۱) به‌عنوان بافر شست‌وشو استفاده شد.

[Downloaded from ismj.bpums.ac.ir on 2026-09-11]

[DOI: 10.61186/ismj.27.1.37]

روند استخراج DNA

لیز گلبول‌های قرمز با ۶ بافر مختلف

نمونه‌های خون به مدت ۱۵ دقیقه در دمای اتاق قرار داده شدند تا ذوب شوند. سپس یک مخلوط یکنواخت با حجم ۷ میلی‌لیتر به‌عنوان منبع خون تهیه گردید. به هر ۳۰۰ میکرولیتر از این منبع خون، ۱ میلی‌لیتر بافر لیز اضافه شد. این کار برای هر بافر به صورت جداگانه و در سه تکرار تکنیکی انجام شد.در نهایت این مخلوط‌ها به مدت ۵ دقیقه در سانتریفیوژ (Centrifuge Universal 320R Hettich, Germany) با دور ۶۰۰۰g قرار داده شدند. بعد از سانتریفیوژ محتوای رویی به آرامی دور ریخته شد و رسوب باقی‌مانده در ۱ میلی‌لیتر بافر حل شد. این فرآیند شست‌وشو ۳ بار تکرار شد و رسوب حاصل در ۵۰۰ میکرولیتر بافر Tris-HCl ۲۰ میلی‌مولار، حل شد و میزان حذف گلبول‌های قرمز در طول موج ۵۴۰ و۵۷۰ نانومتر توسط دستگاه NanoDropTMOne /OneC Micro volume UV-Vis Spectrophotometer (USA، TermoFisher Scientific) بررسی گردید. تمامی نمونه‌ها به مدت ۵ دقیقه در سانتریفیوژ با دور ۶۰۰۰g قرار داده شدند. پس از این مرحله مایع‌رویی با احتیاط دور ریخته شد، بدون اینکه به رسوب ایجاد شده آسیبی وارد شود. سپس رسوب حاصل در ۵۰۰ میکرولیتر بافر CTAB حل گردید. این عمل با استفاده از پیپت کردن انجام شد. در نهایت نمونه‌ها به مدت یک ساعت در دمای ۶۵ درجه سانتی‌گراد در هیتر بلاک (South Korea، Dihan Scientific) قرار داده شدند. پس از این زمان، نمونه‌ها در دمای اتاق خنک شدند. (۲۵-۲۲).

تیمارکردن با کلروفرم

۲۰۰ میکرولیتر کلروفرم به هر نمونه اضافه و میکروتیوب‌ها به خوبی تکان داده شدند تا مخلوط شیری رنگ تشکیل شود. ۱۰ دقیقه در دمای ۲۱ درجه، با دور ۱۶۸۰۰g سانتریفیوژ شدند. سپس ۴۰۰ میکرولیتر از فاز رویی بدون مخلوط شدن با فاز آلی میانی، به آرامی به میکروتیوب‌های جدید انتقال یافت (۳) و حجم مساوی ایزوپروپانول به آن اضافه شد. این نمونه‌ها به مدت ۵ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد در ۱۶۸۰۰g سانتریفیوژ شدند تا رسوب DNA بدست آید. ایزوپروپانول را به آرامی دور ریخته و به رسوب بدست آمده ۲۰۰ میکرولیتر اتانول ۷۰٪ اضافه شد. بعد از ۱۰ دقیقه انکوباسیون در دمای اتاق، آن‌ها ۵ دقیقه در دمای ۴ درجة سانتی‌گراد و با دور ۱۶۸۰۰g، سانتریفیوژ گردیدند. در مرحله بعد اتانول را دور ریخته و رسوب باقی‌مانده در ۲۰ میکرولیتر آب دیونیزه حل گردید (۲۸-۲۶).

تعیین کیفیت و کمیت DNA

نسبت‌های جذبی $A_{۲۶۰}/A_{۲۸۰}$ و $A_{۲۶۰}/A_{۲۳۰}$ هر نمونه، در دو تکرار، با استفاده از دستگاه نانودراپ اندازه‌گیری شدند. مقدار جذب DNA خالص برای این نسبت‌ها به ترتیب ۱/۸ و ۲-۲/۲ می‌باشد. مقادیر خارج از این محدوده‌ها نشان دهنده وجود آلودگی‌هایی همچون RNA، پروتئین، نمک، و سایر ترکیبات می‌باشد. همچنین غلظت DNA در طول موج ۲۶۰ نانومتر بوسیله خود دستگاه با استفاده از قانون بیر- لامبرت محاسبه شده است (۱۰).

ژل الکتروفورز

یکپارچگی DNA ژنومی با استفاده از دستگاه ژل الکتروفورز (Payapajoohesh 40-1214، Iran) بررسی شد. ژل آگارز ۱ درصد (DNAbiotech ،Iran Pro:2023.7) در بافر TBE (۱۰/۸ گرم Tris، ۵/۵ گرم بوریک اسید و ۰/۹۳ گرم EDTA) تهیه شده و ۱ میکرولیتر رنگ بی‌خطر (Safe Stain) (Iran، SinaClon) به آن اضافه گردید. ۵ میکرولیتر از

[Downloaded from ismj.bpums.ac.ir on 2026-09-11]
[DOI: 10.61186/ismj.27.1.37]

g-DNA داخل چاهک ژل ریخته و پس از نیم ساعت برقراری جریان، کیفیت DNA زیر نور UV (Syngene ،UK) بررسی شد. مولکول DNA استخراج شده توسط همهٔ بافرها به جز بافر ۲، یکپارچه و فاقد شکستگی بود. جهت تعیین اندازه قطعات DNA بر روی ژل از لدر (Ladder) SinnaClon ،bp ،500 ul-SL7052 ،Iran 1 250-10000 Ladder استفاده گردید.

واکنش زنجیره‌ای کمّی (q-PCR)

تکنیک q-PCR یک روش پرکاربرد و معتبر برای ارزیابی طول تلومر است که به دلیل حساسیت بالا می‌تواند حتی تغییرات کوچک در طول تلومر را در مقایسه با یک ژن مرجع ارائه دهد. این تکنیک امکان بررسی کمّی اثر بازدارنده‌ها را از طریق محاسبه بازده واکنش فراهم می‌کند. واکنش q-PCR، در دو تکرار برای هر بافر و حجم نهایی ۱۰ میکرولیتر توسط دستگاه (Applied Biosystem،USA) Step OneTM q-PCR انجام و نتایج حاصل از سیگنال فلورسانس مبتنی بر سایبر گرین (SYBR Green) با نرم‌افزار Step One™ v.2.1 بررسی گردید. طی واکنش‌های جداگانه با استفاده از پرایمرهای تلومر و ژن تک کپی *HBG*، که مسئول ایجاد بخش‌های بتای پروتئین هموگلوبین است، طول نسبی تلومر اندازه‌گیری شد. از ژن‌های تک کپی به‌عنوان فاکتور نرمال‌سازی در نتایج q-PCR استفاده می‌شود. چنین ژن‌هایی برخلاف تلومر در همهٔ سلول‌ها به صورت تک کپی وجود داشته و دارای طول مشخصی هستند؛ بنابراین به‌عنوان مرجع در نظر گرفته می‌شوند.

مدت زمان و دمای مربوط به هر یک از مراحل اصلی در واکنش q-PCR شامل مرحله واسرشت‌سازی، اتصال و طویل شدن در جدول ۱ ارائه شده است. همچنین، زمان و دمای مورد نیاز برای انجام مرحله توقف (Hold stage) و مرحله مربوط به منحنی مذاب (Melt curve) نیز در این جدول مشاهده می‌شود. تجزیه و تحلیل منحنی مذاب پس از اتمام چرخه‌های تکثیر انجام می‌شود و نشان می‌دهد که سیگنال فلورسانس مشاهده شده حاصل یک محصول منفرد اختصاصی است یا خیر.

جدول ۱. برنامه زمانی و دمایی تعریف شده برای q-PCR

مرحله		زمان (ثانیه)	دما (درجه سانتی‌گراد)
HBG	واسرشت‌سازی	۳۰	۹۵
	اتصال	۳۰	۶۰
	طویل شدن	۳۰	۷۲
تلومر	واسرشت‌سازی	۱۵	۹۵
	اتصال	۱۵	۶۵
	طویل شدن	۱۵	۷۲
	مرحله توقف	۶۰۰ (۱۰ دقیقه)	۹۵
	منحنی مذاب	۱۵	۹۵

برای هر پرایمر، غلظت‌های DNA ۱۵، ۱/۵، ۰/۱۵ و ۰/۰۱۵ نانوگرم بر میلی‌لیتر تهیه شد. حجم DNA الگوی مورد استفاده در هر واکنش ۳ میکرولیتر بود. غلظت پرایمرهای پیش‌رو (F) و پس‌رو (R) برای ژن تک کپی *HBG*، به‌ترتیب ۳ و ۷ میکرومولار و برای تلومر ۱ میکرومولار بود که از هر کدام به حجم ۱ میکرولیتر در هر واکنش مورد استفاده قرار گرفت. توالی پرایمرها (Zist Fanavari Pishgam ،Iran) در ادامه آورده شده است (۱۴).

[Downloaded from ismj.bpums.ac.ir on 2026-09-11]

[DOI: 10.61186/ismj.27.1.37]

نام پرایمر	توالی نوکلئوتیدی
Telomere (F)	5`CGGTTTGTTTGGGTTTGGGTTTGGGTTTGGGTTTGGGTT 3`
Telomere (R)	5`GGCTTGCCTTACCCTTACCCTTACCCTTACCCTTACCCT 3`
HBG (F)	5`GCTTCTGACACAACTGTTCACTAGC 3`
HBG (R)	5` CACCAACTTCATCCACGTTCACC 3`

مستر میکس 2X Q-PCR Master (SMOBIO ،Taiwan) ExcelTaqTM Mix (SYBER ،No ROX) به حجم ۵ میکرولیتر در هر واکنش به کار برده شده است.

تجزیه و تحلیل آماری

در این پژوهش تجزیه‌وتحلیل‌های آماری با نرم‌افزار GraphPad Prism ویرایش ۹ انجام شده است. مقایسه داده‌های کمی DNA و نسبت‌های جذبی بافرها با یکدیگر، با استفاده از One-way ANOVA و تست Tukey انجام شده است. ارتباط بین میزان حذف هموگلوبین با مقدار DNA استخراج شده توسط هر بافر از طریق همبستگی (Correlation) و رگرسیون خطی (Simple Linear Regression) بررسی شد. برای بررسی تکرارپذیر بودن نتایج، درصد ضریب واریانس (%CV) محاسبه گردید.CV کمتر از ۱۰ درصد بسیار مناسب است و CV بین ۲۰-۱۰ درصد محدوده قابل قبول و بیش از ۳۰ درصد غیر قابل قبول می‌باشد (۲۹).

منحنی استاندارد، نمایش گرافیکی رابطه بین غلظت DNA الگو و مقادیر چرخه آستانه (Ct) به‌دست‌آمده از واکنش می‌باشد. سری مشخص از غلظت‌های مختلف DNA تهیه، تکثیر و سپس منحنی استاندارد با یک رابطه خطی بین مقادیر Ct و غلظت الگو ایجاد شد. پس از تعیین شیب نمودار، بازده (E) واکنش با فرمول $E=-1+10^{(-1/slope)}$ محاسبه شد. بازده ایده‌آل ۱۰۰ درصد است اما به‌طور کلی بازده قابل قبول بین ۹۰ تا ۱۱۰ درصد در نظر گرفته می‌شود. از دیگر شاخص‌های مورد بررسی، ضریب تعیین (R^2) می‌باشد. این ضریب نشان دهنده میزان تناسب داده‌های تجربی با خط رگرسیون است (میزان خطی بودن داده‌ها). خطی بودن، معیاری برای تغییرپذیری در بین تکرارهای مورد سنجش است و حاکی از یکسان بودن بازده تکثیر برای مقادیر مختلف DNA است.

میزان بازدارندگی آلودگی‌های باقی مانده همراه DNA بر روی q-PCR از طریق محاسبه بازده واکنش قابل بررسی می‌باشد.

یافته‌ها

میانگین تکرارهای هر نمونه در بررسی مقدار و خلوص DNA استخراج شده توسط هر شش بافر با استفاده از نانودراپ با احتساب %CV و انحراف معیار (SD) در جدول ۲ آمده است. به جز بافر ۶ (۴۵/ ۲۰۵ نانوگرم بر میکرولیتر، %CV:۳۵/۷۱)، که به‌طور معناداری ($p<0/05$) مقدار DNA استخراج شده با آن کمتر از بقیه می‌باشد، مقدار استخراج شده در سایر بافرها با هم تفاوت معنی‌دار نداشتند ($p>0/05$). بیش‌ترین مقدار مربوط به بافر ۵ (۳۲۴/۹۳ نانوگرم بر میکرولیتر، %CV:۱۱/۵۳) می‌باشد (جدول ۲). همه بافرها از نظر خلوص DNA با یکدیگر یکسان بوده ($p>0/05$) و مقادیر مطلوب ۱/۸ و ۲-۲/۲ را برای نسبت‌های $A_{۲۶۰}/A_{۲۸۰}$ و $A_{۲۶۰}/A_{۲۳۰}$ نشان دادند (جدول ۲).

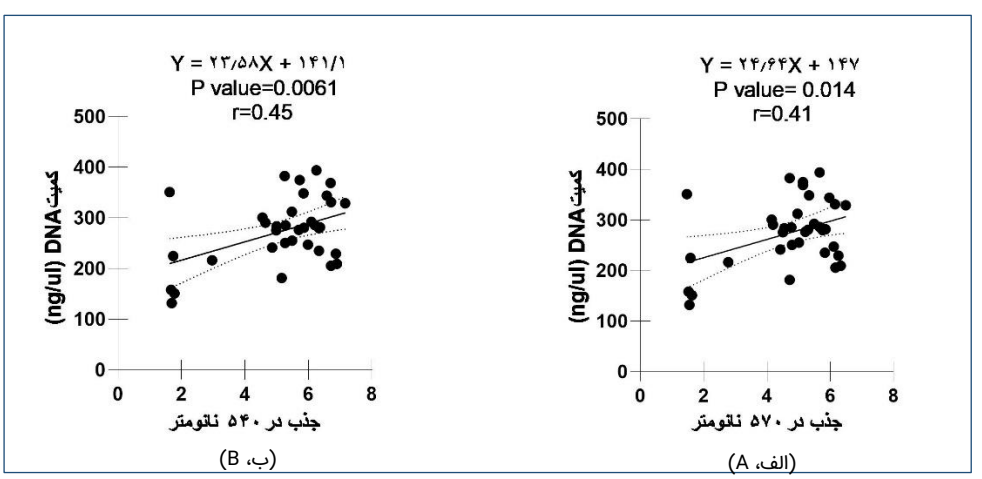
طبق شکل ۱ با افزایش لیز گلبول‌های قرمز و حذف هموگلوبین، در دو بیشینه جذب شاخص (۵۴۰ و ۵۷۰ نانومتر) آن (۳۰) مقدار DNA کاهش می‌یابد. مطابق شکل، میزان حذف هموگلوبین همبستگی ($r=0/41$ و

[Downloaded from ismj.bpums.ac.ir on 2026-09-11]
[DOI: 10.61186/ismj.27.1.37]

(r=۰/۴۵ ،p=۰/۰۱۴ ،p=۰/۰۰۶۱) معناداری DNA استخراج شده دارد. در این خون‌ها علاوه بر غشای گلبول‌های قرمز، غشای گلبول‌های سفید نیز در اثر انجماد آسیب دیده و محتوی سلولی آن‌ها در تماس با سایر اجزای خون از جمله هموگلوبین قرار گرفته است. در نتیجه هنگام استفاده از بافر لیز بخشی از DNA حذف می‌شود. طبق آنالیزهای آماری برخلاف سایر بافرها، بافر ۶ به‌طور معنی‌داری کمترین مقدار DNA را دارا بود و بیش‌ترین میزان لیز گلبول‌های قرمز را نسبت به بقیه از خود نشان داد (p<۰/۰۵).

جدول ۲. مقایسه کمیت DNA استخراج شده به روش CTAB با بافرهای لیزکننده مختلف

بافر	میانگین ng/ml	انحراف معیار (STDEV)	درصد ضریب تغییرات (%CV)	میانگین A۲۶۰/۲۸۰	انحراف معیار (STDEV)	درصد ضریب تغییرات (%CV)	میانگین A۲۶۰/۲۳۰	انحراف معیار (STDEV)	درصد ضریب تغییرات (%CV)
۱	۲۵۱/۸۳	۱۵/۰۹	۵/۹۹	۱/۸۶	۰/۰۲	۱/۰۹	۲/۲۰	۰/۲۴	۱۰/۹۲
۲	۲۳۶/۹۶	۴۲/۹۲	۱۸/۱۱	۱/۸۷	۰/۰۱	۰/۵۹	۲/۳۳	۰/۰۷	۲/۹۹
۳	۳۰۸/۵۰	۴۵/۴۷	۱۴/۷۴	۱/۸۸	۰/۰۱	۰/۴۸	۲/۳۳	۰/۰۵	۲/۱۲
۴	۳۱۵ /۱۷	۴۵/۲۴	۱۴/۳۵	۱/۸۷	۰/۰۱	۰/۵۰	۲/۲۲	۰/۰۶	۲/۴۶
۵	۳۲۴/۹۳	۳۷/۶۶	۱۱/۵۹	۱/۸۸	۰/۰۱	۰/۵۹	۲/۳۶	۰/۰۶	۲/۵۴
۶	۲۰۵/۴۵	۷۳/۳۷	۳۵/۷۱	۱/۸۷	۰/۰۰	۰/۲۰	۲/۳۶	۰/۰۴	۱/۵۸



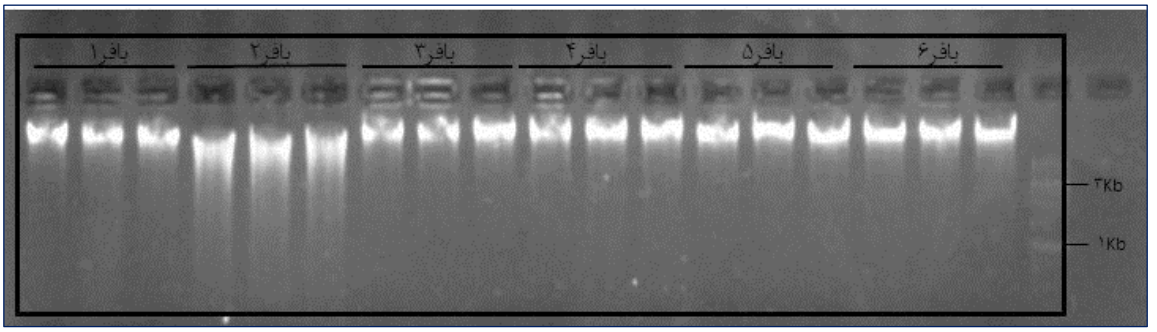
شکل ۱. بررسی همبستگی بین مقدار هموگلوبین باقی‌مانده بر اساس جذب در الف) ۵۷۰ نانومتر و ب)۵۴۰ نانومتر با میزان DNA استخراج شده

Fig 1. Evaluation of the correlation between remained hemoglobin and the amount of extracted DNA based on absorbance of A) 570 nm and B) 540 nm

ژل الکتروفورز

همان‌طور که در شکل ۲ مشاهده می‌شود کیفیت DNA استخراج شده توسط همه بافرها بالا است و مطابق لدر ، قطعات بزرگی از DNA به‌دست‌آمده است. آلودگی همراه DNA همان‌طور که نتایج نانودراپ هم‌نشان داد، دیده نمی‌شود. مولکول DNA استخراج شده در بافر ۲ برخلاف سایر بافرها دچار شکستگی زیاد و در نتیجه اسمیر بر روی ژل می‌باشد؛ بنابراین این بافر از نظر حفظ DNA و جلوگیری از تجزیه آن خوب عمل نکرده است.

[Downloaded from ismj.bpums.ac.ir on 2026-09-11]
[DOI: 10.61186/ismj.27.1.37]



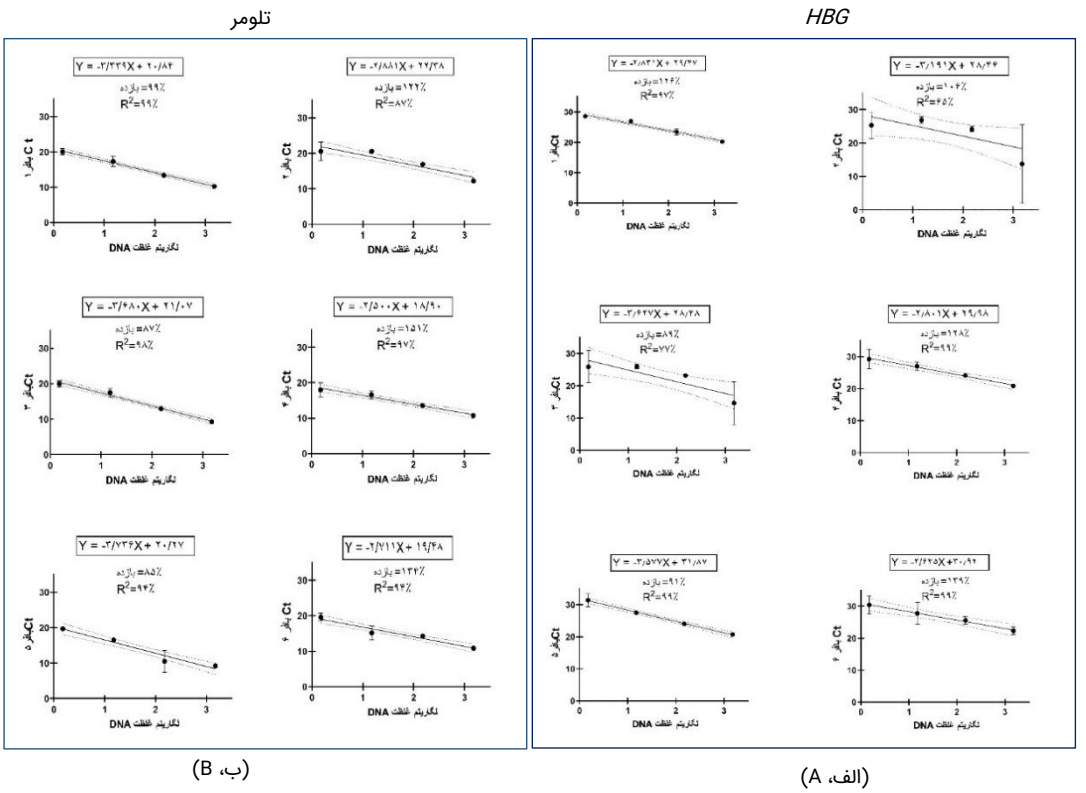
شکل ۲. تصویر g-DNA استخراج شده توسط شش بافر لیز مختلف روی ژل الکتروفورز

Fig 2. Image of extracted g-DNA on gel electrophoresis, using six different lysis buffers

بافر ۱ E=۰/۹۹ و R^2=۰/۹۹ برای تلومر و E=۰/۱۲۶ و R^2=۰/۹۷ برای *HBG* نشان می‌دهد (شکل ۳)؛ بنابراین کمترین میزان بازدارنده را همراه DNA استخراج شده به جای گذاشته است. طبق شکل ۳- الف، مولکول DNA استخراج شده با بافر ۵ دارای E=۰/۹۱ و R^2=۰/۹۹ برای ژن *HBG*، نسبت به بافر انتخاب شده ۱ نتیجه مطلوب‌تری از خود نشان می‌دهد؛ اما برای تلومر، عملکرد مناسبی نداشته است (E=۰/۸۵ و R^2=۰/۹۴) لذا با مقایسه نتایج q-PCR برای DNAهای استخراج شده توسط هر شش بافر هم برای *HBG* و هم برای تلومر، نتیجه‌گیری می‌شود که DNA استخراج شده با بافر ۱ بازدارنده‌های کمتری با خود به همراه دارد. این بافر برای مطالعات بعدی از جمله محاسبه طول نسبی تلومر به همراه ژن تک کپی *HBG* مناسب می‌باشد. وجود مهارکننده‌ها از جمله هموگلوبین بر بازده واکنش اثر می‌گذارند؛ در نتیجه بافری که گلبول‌های قرمز را بهتر حذف کند از اهمیت زیادی برخوردار است. اجزای تشکیل دهندهٔ بافر انتخاب شده باید به گونه‌ای باشد که کمترین تداخل و بازدارندگی را در چرخه‌های PCR ایجاد کند (۳۱). شکل ۴ اختصاصیت تکثیر پرایمرهای تلومر و *HBG* را برای نمونه‌های استخراج شده با هر بافر را نشان می‌دهد. طبق این شکل تکثیر همگی اختصاصی بوده و پرایمر- دایمر دیده نمی‌شود.

[Downloaded from ismj.bpums.ac.ir on 2026-09-11]

[DOI: 10.61186/ismj.27.1.37]



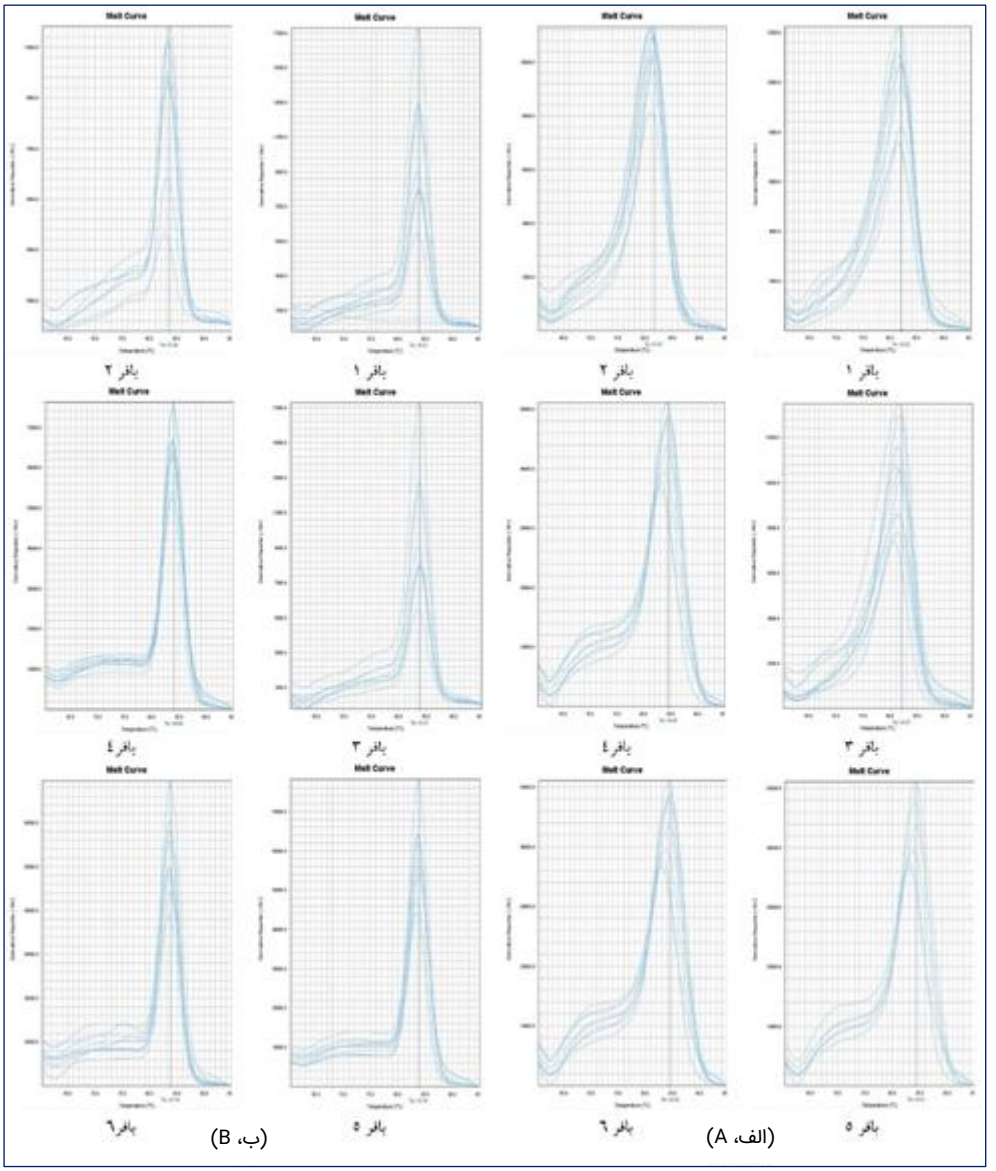
(ب، B) (الف، A)

شکل ۳. منحنی استاندارد مربوط به DNA استخراج شده با هر بافر با استفاده از رگرسیون خطی برای نتایج q-PCR رسم شده است. با استفاده از شیب‌خط، بازده واکنش محاسبه شده است. الف) منحنی‌های استاندارد مربوط به ژن *HBG* ب) منحنی‌های استاندارد مربوط به تلومر.

Fig 3. The Standard curves related to extracted DNA with each buffer are plotted using simple linear regression for the q-PCR results. The efficiency of each reaction is calculated using slope of the line A) Standard curves related to the *HBG* gene B) Standard curves related to telomeres.

[Downloaded from ismj.bpums.ac.ir on 2026-09-11]

[DOI: 10.61186/ismj.27.1.37]



شکل ۴. منحنی ذوب تکثیر q-PCR. نشان‌دهنده اختصاصیت تکثیر DNA استخراج شده توسط هر بافر در واکنش q-PCR می‌باشد. (الف) منحنی ذوب تکثیر ژن *HBG* (ب) منحنی ذوب تکثیر تلومر

Fig. 4. Melting curve of q-PCR. This demonstrates specificity of extracted DNA from each buffer in a single q-PCR reaction. A) Melt curve of *HBG*. B) Melt curve of Telomere.

بحث

داده‌های این مطالعه نشان داد که از میان شش نوع بافر لیز، بافر شماره ۱ با ترکیب NH4Cl به غلظت ۱۵۵ میلی‌مولار، $KHCO_3$ ۱۰ میلی‌مولار و EDTA میلی‌مولار، بهترین عملکرد را در استخراج DNA از نمونه‌های خون منجمد دارد. این ترکیب به طور قابل توجهی کیفیت و کمیت DNA استخراج شده را برای مطالعات آینده در زمینه بررسی طول تلومر با استفاده از q-PCR بهبود می‌بخشد زیرا تا حد قابل قبولی به‌طور تکرارپذیر موفق به حذف بازدارنده‌های PCR از جمله هموگلوبین شد.

نمونه‌های خون LTS، امکان مطالعه و ردیابی تغییرات ژنتیکی را به دلیل در دسترس بودن تسهیل می‌کنند. این

[Downloaded from ismj.bpums.ac.ir on 2026-09-11]
[DOI: 10.61186/ismj.27.1.37]

نمونه‌ها کمک می‌کنند که محققان به بررسی فاکتورهای ژنتیکی و زیست نشانگرهای مرتبط با بیماری‌های مختلف از جمله طول تلومر، با هدف توسعه آزمایش‌ها و درمان‌های تشخیصی بپردازند (۳۲). انتخاب یک روش استخراج DNA مناسب برای به‌دست‌آوردن یک نتیجه قابل اعتماد ضروری است و باید با توجه به هدف‌های پایین دستی همانند PCR انجام شود. همه روش‌های استخراج یک‌سری مراحل مشترک از جمله لیز مؤثر سلول‌ها، دناتوره کردن کمپلکس‌های پروتئینی، حذف آلودگی‌های سلولی و در نهایت دست پیدا کردن به DNA خالص دارند. از رایج‌ترین روش‌های استخراج DNA می‌توان به روش‌های مکانیکی، شیمیایی و آنزیمی و یا ترکیبی از این روش‌ها اشاره کرد. بسیاری از کیت‌های تجاری موجود جهت استخراج به روش شیمیایی گران هستند و تمامی آزمایشگاه‌ها نمی‌توانند به‌راحتی به آن‌ها دست پیدا کنند و از طرف دیگر در نتایج PCR به‌خصوص در مطالعه طول تلومر تضاد زیادی با یکدیگر نشان می‌دهند (۴). همچنین از آن جایی که نتیجه استخراج DNA با روش‌های مختلف متعارف با یکدیگر متفاوت هستند (۱۱ و ۱۲)؛ بنابراین در این مطالعه سعی شده است علاوه بر استفاده از بافرهایی با ترکیب شیمیایی ساده و در دسترس‌تر در راستای معرفی بافر لیزکننده بهینه برای استخراج تلومر به بررسی اثر ترکیبات موجود در شش بافر مختلف بر روی کیفیت DNA استخراج شده در q-PCR نیز بپردازد. هنگام استخراج DNAبرای اندازه‌گیری طول تلومر، مهم است که اطمینان حاصل شود که DNA استخراج شده با کیفیت بالا و عاری از آلاینده‌هایی است که می‌توانند بر بازده تکثیر PCR تأثیر بگذارند. برخی از بافرها ممکن است حاوی موادی باشند که تکثیر PCR را مهار می‌کنند یا در تعیین کمیتDNA در طول q-PCR اختلال ایجاد می‌کنند (۳۳).

بافر ۱ و ۳ حاوی NH_4Cl می‌باشند. NH4Cl منجر به فشار اسمزی روی گلبول‌های قرمز و ترکیدن آن‌ها می‌شود. به دلیل عدم وجود کانال‌های آنیونی Cl^-/HCO^{3-} در غشای لوکوسیت‌ها بر خلاف گلبول‌های قرمز، این سلول‌ها از ترکیدن در اثر فشار اسمزی در امان می‌مانند. حضور $KHCO_3$سرعت تورم گلبول‌های قرمز را افزایش داده و می‌تواند به‌عنوان یک جزء بافر عمل کند (۱۶). به دلیل حضور تریس در ترکیب بافر ۳، این بافر بین pHهای ۷ تا ۹ عمل می‌کند و زمانی که با HCl تنظیم شود، حاوی مخلوطی از باز ضعیف و اسید ضعیف مزدوج آن می‌شود. هنگامی که غشاها و دیواره سلولی آسیب می‌بینند و محتوی سیتوپلاسمی آزاد می‌شود، pH تغییر می‌کند و پایداری مولکول‌های زیستی مانند DNA مختل می‌شود. بافر Tris-HCl در چنین شرایطی pH محلول را حفظ می‌کند (۳۴). بافرهای ۲، ۳، ۴و ۵ حاوی Tris-HCl هستند.

شوینده‌ها و نمک‌ها توانایی استخراج DNA از سلول‌ها را افزایش می‌دهند. نمک KCl و $MgCl_2$ در بافر ۲ به‌ترتیب باعث ایجاد یک محیط هیپوتونیک در راستای افزایش لیز سلولی و جداسازی DNA بیشتر از خون می‌شود (۳۵). هر چند مقدار DNA استخراج شده با این بافر زیاد است اما بر روی ژل از خود اسمیر نشان می‌دهد و DNA آن خرد شده محسوب می‌شود (جدول ۲ و شکل ۲). این بافر در نتایج q-PCR هم طبق شکل ۳ برای ژن *HBG* بر اساس R^2 تکرارپذیری خوبی از خود نشان نمی‌دهد که احتمال می‌رود به علت غلظت بالای $MgCl_2$ (۴ میلی‌مولار) در ترکیب این بافر باشد (۳۶). بافر ۶ حاوی Na_2CO_3 می‌باشد. مقدار DNA استخراج شده و تکرارپذیری (۲۰۵/۴۵ نانوگرم بر میکرولیتر، %CV:۳۵/۷۱) در این بافر به‌طور چشمگیری نسبت به سایر بافرها کمتر است ($p<0/05$). علت این امر می‌تواند به دلیل

[Downloaded from ismj.bpums.ac.ir on 2026-09-11]
[DOI: 10.61186/ismj.27.1.37]

آنیون‌های تشکیل شده توسط Na_2CO_3 (HCO^{3-} و CO_3^{2-}) باشد که باعث ناپایداری مارپیچ دوگانه DNA می‌شوند. مولکول CTAB به‌عنوان یک شوینده کاتیونی، دارای یک زنجیره هیدروکربنی آب‌گریز و یک سر آب‌دوست است و به همین دلیل در آب تشکیل میسل می‌دهد. مولکول CTAB پلی‌ساکاریدها و لیپیدها را جذب کرده و باعث از بین رفتن غشا، واسرشته شدن پروتئین‌ها و آزاد شدن محتوی داخلی سلول‌ها از جمله DNA می‌شود. با این حال CTAB به دلیل داشتن بار مثبت، می‌تواند با DNA کمپلکس تشکیل داده و آن را رسوب دهد. با افزایش غلظت NaCl در محلول بافر استخراج، تشکیل کمپلکس CTAB-DNA مختل شده و DNA به‌صورت محلول باقی می‌ماند و CTAB با پلی‌ساکاریدها و لیپیدها کمپلکس تشکیل می‌دهد. غلظت بالای تریس در بافر استخراج CTAB باعث حفظ pH و جلوگیری از آسیب رسیدن به DNA می‌شود. بعلاوه EDTA موجود در بافر استخراج به کاتیون‌های دو ظرفیتی مانند کلسیم و منیزیم متصل می‌شود و از این طریق باعث از بین رفتن یکپارچگی غشای لوکوسیت‌ها می‌شود (۱۶ و ۳۵).

برای جداسازی بهتر آلودگی‌ها از DNA از کلروفرم استفاده شده است. کلروفرم باعث ایجاد یک فاز آلی حاوی پروتئین‌ها و لیپیدهای غشایی و یک فاز آبی حاوی DNA می‌شود (۳). نتیجه مشاهده شده به این صورت است که به جز بافر ۶، سایر بافرها برخلاف ترکیبات ساختاری متفاوت، از نظر کمیت (جذب در ۲۶۰ نانومتر)، و کیفیت بر اساس نسبت‌های جذبی $A_{۲۶۰}/A_{۰}$ و $A_{۲۶۰}/A_{۲۳۰}$ و ژل الکتروفورز با همدیگر تفاوت آماری ($p>۰/۰۵$) نداشتند (جدول ۲ و شکل ۲). نکته قابل‌توجه این است که با توجه به شکل ۱ و جدول ۲ به دلیل آسیب غشاهای تمامی سلول‌های خونی در اثر نگهداری طولانی‌مدت در دمای منفی ۲۰ درجه سانتی‌گراد هرچه بافر لیز در حذف هموگلوبین ضعیف عمل کرده است مقدار DNA استخراج شده با آن بیش‌تر بوده است؛ زیرا محتوی سلولی لکوسیت‌ها از جمله DNA در خارج از سلول در تماس با سایر اجزای خون ازجمله هموگلوبین است. با توجه به ترکیب بافرها، عملکرد موفق در حذف هموگلوبین به‌عنوان یکی از بازدارنده‌های q-PCR، منجر به از دست رفتن بخشی از DNA مورد نظر در استخراج از این نمونه‌های خونی می‌شود ($p<۰/۰۵$).

بازدارنده‌ها از جمله مواردی هستند که در عملکرد PCR اثر می‌گذارند. آن‌ها باعث تخریب DNA، مهار تکثیر DNA از طریق اتصال به DNA پلیمراز و برهم‌کنش با مولکول DNA می‌شوند (۳۶). بازدارنده‌ها با تحت تأثیر قرار دادن سیگنال فلورسنت در q-PCR، مطالعات تلومر بر اساس یک ژن تک کپی را برای رسیدن به هدف دچار خطا می‌کنند. از بازدارنده‌ها که طی فرآیند استخراج باقی می‌مانند، می‌توان به KCl، NaCl، شوینده‌ها، اتانول و ایزوپروپانول اشاره کرد. با توجه به شکل۳، بافر ۵ ($E=۰/۹۱$ و $R^2=۰/۹۹$) برای ژن *HBG* کمترین میزان بازدارندگی و در نتیجه قابل قبول‌ترین بازده و R^2 را طی فرآیند استخراج از نمونه‌های LTS داشته است. طبق شکل ۳-ب در واکنش q-PCR تلومر، عملکرد این بافر قابل قبول نمی‌باشد ($E=۰/۸۵$ و $R^2=۰/۹۴$). بافر ۱ با $E=۰/۹۹$ و $R^2=۰/۹۹$ مطلوب‌ترین عملکرد را در استخراج DNA از نمونه‌های LTS، جهت مطالعه تلومر نشان داده است. این بافر برای ژن *HBG* (شکل ۳-الف)، $E=۰/۱۲۶$ و $R^2=۰/۹۷$ را نشان می‌دهد. با مقایسه عملکرد هر شش بافر در q-PCR، هم برای ژن *HBG* و هم برای تلومر، مشاهده می‌کنیم که بافر ۱ نسبت به بافرهای دیگر در غلظت‌های مختلف DNA استخراج شده و تکثیر یافته توسط PCR کمّی علاوه‌بر تکرارپذیری (بر اساس R^2) بازده بهتری نیز از خود نشان می‌دهد.

[Downloaded from ismj.bpums.ac.ir on 2026-09-11]
[DOI: 10.61186/ismj.27.1.37]

تهیه DNA خالص و عاری از آلودگی از جمله اهداف بسیاری از پژوهش‌ها می‌باشد و هر گونه آلودگی در ارزیابی نتایج اثرگذار خواهد بود. توجه به این مورد در مطالعات مربوط به طول تلومر دوچندان می‌شود؛ زیرا ناخالصی‌های موجود در DNA می‌تواند منجر به اندازه‌گیری نادرست طول تلومر شود. در این مطالعه با بررسی اثر بافرهای لیز مختلف، سعی شد بهینه‌ترین ترکیب جهت استخراج DNA از نمونه‌های خون منجمد ارائه شود تا در مطالعات بعدی اندازه‌گیری طول نسبی تلومر به همراه ژن تک کپی *HBG* قابل اطمینان‌ترین نتیجه با کمترین خطا را ارائه دهد. از جمله محدودیت‌های این مطالعه عدم دسترسی به کیت‌های تجاری استخراج تلومر و محدود بودن تعداد بافرهای به‌کار رفته جهت مقایسه بهتر نتایج به‌دست آمده بوده است.

نتیجه‌گیری

استفاده از خون‌های منجمد در انواع مطالعات به‌عنوان منبع مقرون به صرفه استخراج DNA و همچنین مطالعه طول تلومر به‌عنوان زیست‌نشانگر بسیاری از بیماری‌ها، اهمیت وافری در تحقیقات پزشکی مولکولی دارند. نتیجه‌گیری این مطالعه نشان داد که بافر لیز با فرمول NH4Cl ۱۵۵ میلی‌مولار، $KHCO_3$ ۱۰ میلی‌مولار و EDTA ۵ میلی‌مولار هم از نظر تکرار پذیری (%CV) و هم از نظر عملکرد q-PCR، نتایج بهتری در مقایسه با پنج ترکیب دیگر از خود نشان داده و توانسته است به بهبود کمیت و کیفیت DNA به‌ویژه در حفظ طول تلومر کمک کند. علاوه‌بر این، این روش استخراج مبتنی بر بافر CTAB منجر به کاهش میزان بازدارنده‌های q-PCR گردیده است. این یافته‌ها اهمیت استفاده از ترکیب بهینه بافر لیز را در فرایند استخراج DNA تأیید می‌کنند و می‌توانند راهکارهای موثری برای مطالعات آتی فراهم آورند.

سپاس و قدردانی

این گزارش به‌عنوان بخشی از پایان‌نامه کارشناسی ارشد ساجده سبحان‌پرست، دانشجوی دانشگاه شهید مدنی آذربایجان منتشر شد. از اعضای محترم مرکز تحقیقات سل و بیماری‌های ریه دانشگاه علوم پزشکی تبریز قدردانی می‌گردد. این پروژه پژوهشي با حمايت مالي كامل مركز تحقيقات سل و بيماري‌هاي ريه، دانشگاه علوم پزشكي تبريز با مجوز شماره ۷۲۰۲۴ با کد اخلاق: ۵۸۰. ۱۴۰۲. IR.TBZMED.REC اجرا شد.

تضاد منافع

هیچ‌گونه تعارض منافع توسط نویسندگان بیان نشده است.

References

1.Shammas MA. Telomeres, lifestyle, cancer, and aging. Curr Opin Clin Nutr Metab Care 2011; 14(1): 28–34. doi: 10.1097/MCO.0b013e32834121b1

2.Denham J, Marques FZ, Charchar FJ. Leukocyte telomere length variation due to DNA extraction method. BMC Res Notes 2014; 7: 877. doi: 10.1186/1756-0500-7-877

3.Di Pietro F, Ortenzi F, Tilio M, et al. Genomic DNA extraction from whole blood stored from 15- to 30-years at -20 °C by rapid phenol-chloroform protocol: A useful tool for genetic epidemiology studies. Mol Cell Probes 2011; 25(1): 44–8. doi: 10.1016/j.mcp.2010.10.003

4.Lin J, Smith DL, Esteves K, et al. Telomere length measurement by qPCR – Summary of critical factors

[Downloaded from ismj.bpums.ac.ir on 2026-09-11]

[DOI: 10.61186/ismj.27.1.37]

and recommendations for assay design. Psychoneuroendocrinology 2019; 99: 271–8. doi: 10.1016/j.psyneuen.2018.10.005

5.Goldberg S. Mechanical/physical methods of cell distribution and tissue homogenization. Methods Mol Biol 2014; 1295: 1–20. doi: 10.1007/978-1-4939-2550-6_1.

6.Posch A. Sample preparation guidelines for two-dimensional electrophoresis. Arch Physiol Biochem 2014;120(5):192–197.doi: 10.3109/13813455.2014.955031

7.Akane A, Matsubara K, Nakamura H, et al. Identification of the heme compound copurified with deoxyribonucleic acid (DNA) from bloodstains, a major inhibitor of polymerase chain reaction (PCR) amplification. J Forensic Sci1994;39(2):362–372.
doi: https://DOI.org/10.1520/JFS13607J

8.de Franchis R, Cross NCP, Foulkes NS, et al. A potent inhibitor of Taq polymerase copurifies with human genomic DNA. Nucleic Acids Res 1988; 16(21): 10355. doi: 10.1093/nar/16.21.10355

9.Sidstedt M, Hedman J, Romsos EL, et al. Inhibition mechanisms of hemoglobin, immunoglobulin G, and whole blood in digital and real-time PCR. Anal Bioanal Chem 2018; 410(10): 2569–2583. doi: 10.1007/s00216-018-0931-z

10.Lucena-Aguilar G, Sánchez-López AM, Barberán-Aceituno C, et al. DNA source selection for downstream applications based on dna quality indicators analysis. Biopreserv Biobank 2016; 14(4): 264–270. doi: 10.1089/bio.2015.0064

11.Boardman LA, Skinner HG, Litzelman K. elomere length varies by DNA extraction method: Implications for epidemiologic research - Response. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev 2014; 23(6): 1131. doi: 10.1158/1055-9965.EPI-14-0234

12.Cunningham JM, Johnson RA, Litzelman K, et al. Telomere length varies by DNA extraction method: Implications for epidemiologic research. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev 2013; 22(11): 2047–2054. doi: 10.1158/1055-9965.EPI-13-0409

13.Martin-Ruiz CM, Baird D, Roger L, et al. Reproducibility of telomere length assessment: An international collaborative study. Int J Epidemiol 2015; 44(5): 1749–1754. doi: 10.1093/ije/dyv171

14.Joglekar MV, Satoor SN, Wong WKM, et al. An optimised step-by-step protocol for measuring relative telomere length. Methods Protoc 2020; 3(2): 27. doi: 10.3390/mps3020027

15.Cawthon RM. Telomere measurement by quantitative PCR. Nucleic Acids Res 2002; 30(10): e47. doi: 10.1093/nar/30.10.e47

16.Guha P, Das A, Dutta S, et al. A rapid and efficient DNA extraction protocol from fresh and frozen human blood samples. J Clin Lab Anal 2018; 32(1): e22181. doi: 10.1002/jcla.22181

17.Chacon-Cortes D, Haupt LM, Lea RA, et al. Comparison of genomic DNA extraction techniques from whole blood samples: A time, cost and quality evaluation study. Mol Biol Rep 2012; 39(5): 5961–5966. doi: 10.1007/s11033-011-1408-8

18.Brown WE, Hu JC, Athanasiou KA. Ammonium-chloride-potassium lysing buffer treatment of fully differentiated cells increases cell purity and resulting neotissue functional properties. Tissue Eng - Part C Methods 2016; 22(9): 895–903. doi: 10.1089/ten.tec.2016.0184

19.Galyuk EN, Lando DY, Egorova VP, et al. Na2CO3 influence on DNA double helix stability: Strong anion destabilizing effect. J Biomol Struct Dyn 2003; 20(6): 801–809. doi: 10.1080/07391102.2003.10506896

20.Borges A, Rosa MS, Recchia GH, et al. CTAB methods for DNA extraction of sweetpotato for microsatellite analysis. Sci Agric 2009; 66(4): 529–534. doi: 10.1590/S0103-90162009000400015

21.Song Y, Fahs A, Feldman C, et al. A reliable and effective method of DNA isolation from old human blood paper cards. Springerplus 2013; 2: 616. doi: 10.1186/2193-1801-2-616

22.Terry CF, Harris N, Parkes HC. Detection of genetically modified crops and their derivatives: Critical steps in sample preparation and extraction. J AOAC Int. 2002; 85(3): 768–774.
doi: 10.1093/jaoac/85.3.768

23.Budelier K, Schorr J. Purification of DNA by Anion-Exchange Chromatography. Curr Protoc Mol Biol 2001: Chapter 2: Unit2.1B.
doi: 10.1002/0471142727.mb0201bs42

[Downloaded from ismj.bpums.ac.ir on 2026-09-11]

[DOI: 10.61186/ismj.27.1.37]

24.Carpi FM, Di Pietro F, Vincenzetti S, et al. Human DNA extraction methods: Patents and applications. Recent Patents DNA Gene Seq 2011; 5(1): 1–7. doi: 10.2174/187221511794839264

25.Demeke T, Jenkins GR. Influence of DNA extraction methods, PCR inhibitors and quantification methods on real-time PCR assay of biotechnology-derived traits. Anal Bioanal Chem 2010; 396(6): 1977–1990. doi: 10.1007/s00216-009-3150-9

26.Thomas JC, Khoury R, Neeley CK, et al. A fast CTAB method of human DNA isolation for polymerase chain reaction Applications. Biochem Educ 1997; 25(4): 233–235. doi: 10.1016/S0307-4412(97)00122-2

27.Shokrzadeh M, Mohammadpour A. Evaluation of a modified salt-out method for DNA extraction from whole blood lymphocytes: A simple and economical method for gene polymorphism. Pharm Biomed Res 2018; 4(2): 28–32. doi: 10.18502/pbr.v4i2.218

28.Ebadi Z, Ghaffarian S. Association of WDR79 (rs2287497C>T) Poly-morphism with Breast Cancer Susceptibility in Northwest of Iran. Iran South Med J 2023; 26(1): 1-13. doi: 10.61186/ismj.26.1.1

29.Aronhime S, Calcagno C, Jajamovich GH, et al. DCE-MRI of the liver: Effect of linear and nonlinear conversions on hepatic perfusion quantification and reproducibility. J Magn Reson Imaging 2014; 40(1): 90–8. doi: 10.1002/jmri.24341

30.Liu P, Zhu Z, Zeng C, et al. Specific absorption spectra of hemoglobin at different PO2 levels: potential noninvasive method to detect PO2 in tissues. J Biomed Opt 2012; 17(12): 125002. doi: 10.1117/1.JBO.17.12.125002

31.Al-Soud WA, Rådström P. Purification and characterization of PCR-inhibitory components in blood cells. J Clin Microbiol 2001; 39(2): 485–493. doi: 10.1128/JCM.39.2.485-493.2001

32.Zhou L, Lei Q, Guo J, et al. Long-term whole blood DNA preservation by cost-efficient cryosilicification. Nat Commun 2022; 13: 6265. doi: 10.1038/s41467-022-33759-y

33.Kuffel A, Gray A, Daeid NN. Impact of metal ions on PCR inhibition and RT-PCR efficiency. Int J Legal Med 2021; 135(1): 63–72. doi: 10.1007/s00414-020-02363-4

34.Heikrujam J, Kishor R, Behari Mazumder P. the chemistry behind plant dna isolation protocols. In: Boldura OM, Baltă C, Awwad NS eds. Biochemical analysis tools - Methods for bio-molecules studies. IntechOpen, 2020. doi: 10.5772/intechopen.92206

35.Lahiri DK, Schnabel B. DNA isolation by a rapid method from human blood samples: Effects of MgCl2, EDTA, storage time, and temperature on DNA yield and quality. Biochem Genet 1993; 31(7): 321–328. doi: 10.1007/BF02401826

36.Opel KL, Chung D, McCord BR. A study of PCR inhibition mechanisms using real time PCR. J Forensic Sci 2010; 55(1): 25–33. doi: 10.1111/j.1556-4029.2009.01245.x

[Downloaded from ismj.bpums.ac.ir on 2026-09-11]

[DOI: 10.61186/ismj.27.1.37]