(DOI): 10.22034/AEJ.2020.122652

بهینه‌سازی استخراج DNA از نمونه‌های جانوری موزه‌ای و قدیمی شامل پوست و استخوان پستانداران با روش اصلاحی فنل‌کلروفرم (مطالعه موردی: فوک خزر)

- **آریا خزاعی**: گروه محیط‌زیست، دانشکده منابع طبیعی و علوم دریایی، دانشگاه تربیت مدرس، نور، ایران
- **سیدمحمود قاسمپوری***: گروه محیط‌زیست، دانشکده منابع طبیعی و علوم دریایی، دانشگاه تربیت مدرس، نور، ایران
- **امیر صیادشیرازی**: مرکز حفاظت فوک خزری ایران، جزیره آشوراده، بندرترکمن، ایران

تاریخ دریافت: آبان ۱۳۹۸ تاریخ پذیرش: بهمن ۱۳۹۸

چکیده

امروزه مطالعه DNA نمونه‌های موزه‌ای به‌دلیل اطلاعات مفیدی که در اختیار محققان قرار می‌دهد، از اهمیت خاصی برخوردار است. علاوه‌براین، از آن‌جا که محتوای ژنتیکی این نمونه‌ها به‌دلیل مرور زمان بسیار شکننده و بعضاً غلظت‌شان نیز بسیار اندک است، از گذشته تاکنون نیاز به‌روش‌های موثرتر همراه با بازدهی بالاتری برای استخراج کمی و کیفی مطلوب احساس می‌شد. از این‌رو محققان بسته به گونه یا بافت هدف، اغلب با اصلاح و بهینه‌سازی پروتکل‌های استخراج به‌دنبال یافتن روش مناسبی برای تحقق اهداف‌شان هستند. در این مطالعه با تغییر بعضی پارامترها در روش فنول‌کلروفرم محتوای ژنتیکی تعداد ۲۲ نمونه فوک‌خزری که شامل بافت‌های تازه و نمونه‌های موزه‌ای بودند استخراج گردید. هم‌چنین میانگین غلظت DNA بافت‌های تازه و نمونه‌های موزه‌ای براساس میانگین و اشتباه معیار (M±SE) به‌ترتیب برابر با ۱۸۲/۹۱±۶۳۲/۹۰ و ۷۵/۶۲±۲۲۶/۸۷ نانوگرم بر میکرولیتر و میانگین نسبت جذبی طول موج ۲۶۰ به ۲۸۰ نانومتر در نمونه‌های تازه به ۱/۸ نزدیک‌تر بود. محصول DNA نمونه‌های حاصل از بافت عضله تازه به‌طور معنی‌داری از غلظت بالاتری برخوردار بودند. سپس DNA حاصل با استفاده از دو آغازگر اختصاصی فوک‌خزری (Hg6.3 و Hg8.9) با واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز پس از رسیدن به گرادیان دمایی مطلوب تکثیرشدند. نتایج حاصل از مستندسازی باندهای مولکولی بر روی ژل آکریل‌آمید ۸ درصد، حاکی از موفقیت‌آمیز بودن تکثیر همه نمونه‌ها اعم از بافت‌های تازه و نمونه‌های موزه‌ای با حداقل ۲ دهه قدمت بود. باتوجه به قابلیت ژنوتایپ موفق برای مطالعات ژنتیک جمعیت، حفظ نمونه‌های موزه‌ای تحت هر شرایطی توصیه می‌شود.

کلمات کلیدی: غلظت DNA، بافت موزه‌ای، روش فنول کلروفرم، فوک خزری، واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز

* پست الکترونیکی نویسنده مسئول: ghasempm@modares.ac.ir

(DOI): 10.22034/AEJ.2020.122652

مقدمه

ظهور و پیداش واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز (PCR)، امکان آنالیز و تکثیر DNA حاصل از بافت، پوست (De-Wit و همکاران، ۱۹۹۱)، مو (Bengtsson و همکاران، ۲۰۰۲) و استخوان‌های باستانی (Ruane و Austin، ۲۰۱۷) را فراهم کرده است. مولکول DNA یکی از مهم‌ترین اجزای این‌واکنش است و مطالعه برروی آن اطلاعات کاربردی و مهمی را برای تحقیق در زمینه‌های انسان‌شناسی، باستان‌شناسی، علوم پزشکی قانونی، زیست‌شناسی و علوم تکاملی فراهم می‌کند (Lassen و همکاران، ۱۹۹۴). امروزه، نشانگرهای مولکولی مبتنی بر پروتئین یا DNA، در تحقیقات فیلوژنی، رده‌بندی، بوم‌شناسی، ژنتیک و اصلاح نژاد کاربرد وسیعی دارند (Callow و همکاران، ۱۹۹۷). ابداع نشانگرهای مولکولی و تحلیل‌های مرتبط با آن‌ها، از سال ۱۹۵۰ آغاز شده و تا به امروز نیز ادامه دارد. با ظهور روش‌های توالی‌یابی DNA و آنالیز قطعات برشی از سال ۱۹۷۰، کاربرد نشانگرهای DNA به‌طورگسترده‌ای رایج شد (Avise، ۲۰۱۲). به‌طورکلی برای به‌دست آوردن نتایج رضایت‌بخش در مطالعات نشانگرهای مولکولی در جانوران و تمامی روش‌های مبتنی بر PCR، نیاز به مقدار زیادی DNA با خلوص و کیفیت بالا است (Lemke و همکاران، ۲۰۱۱). از اولویت‌های شاخه تنوع زیستی در نخستین گام، به‌دست آوردن DNA موردنیاز از طریق جمع‌آوری نمونه مورد نظر بدون آسیب رساندن به آن است (Frankham و همکاران، ۲۰۰۲). به‌طورکلی مقدار و کیفیت DNA حاصل از نمونه‌های تازه جانوران (بافت، پوست، مو و مدفوع) بسیار بیشتر از استخوان‌های قدیمی و نمونه‌های تاکسیدرمی و موزه‌ای است. افزایش گذر زمان برای نمونه‌ها، روش‌های نگه‌داری غیراستاندارد و هم‌چنین وجود عوامل خارجی مانند میکروارگانیسم‌ها، رطوبت و ترکیبات‌آلی باعث سرعت بخشیدن به روند قطعه‌قطعه شدن و کاهش کیفیت DNA این نمونه‌ها می‌گردند (Höss و Pääbo، ۱۹۹۳). اگرچه DNA استخوان‌های قدیمی و نمونه‌های موزه‌ای دارای کیفیت نامطلوبی هستند ولی محققین به دلایل زیادی ناگزیر به استفاده از آن هستند که مهم‌ترین آن‌ها عبارت است از: ۱- در مواردی که گونه موردنظر منقرض‌شده و یا بسیار نادر است (Anmarkrud و Lifjeld، ۲۰۱۷). ۲- در موارد دیگری که لازم باشد DNA نمونه‌های تاریخی برای پوشش خلاء اطلاعاتی تبارشناختی گونه استفاده شوند (Hofreiter و همکاران، ۲۰۱۵). لذا چنین نمونه‌های قادرند به‌طورگسترده به‌عنوان پایه‌ای برای تغییرات ژنتیکی و تکاملی گونه درطول زمان، مطالعات تبارشناسی- فیلوژنی و اهداف مدیریتی و حفاظتی استفاده می‌گردند (Buerki و همکاران، ۲۰۱۵). از آن‌جا که این نمونه‌ها بسیار ارزشمند و غیرقابل بازگشت هستند و از طرفی مقدار محتوای ژنتیکی‌شان بسیار اندک می‌باشد، لذا محققان با اصلاح پروتکل‌های موجود به‌دنبال دستیابی به روش‌های موثرتری برای استخراج DNA هستند (Wood و همکاران، ۲۰۱۸). به‌منظور انتخاب هریک از روش‌های استخراج باید کیفیت، کمیت، سرعت، سادگی و هزینه آن درنظرگرفته شود (Mi و Vanderpuye، ۲۰۱۳). در مطالعه‌ای روش‌های استخراج DNA فنول‌کلروفرم و سیلیکا بر روی پوست، استخوان و پنجه ۱۰ نمونه پرنده موزه‌ای مورد مقایسه قرار گرفت که نتایج حاصل نشان داد: مقدار DNA در روش فنول‌کلروفرم در هر سه بافت پوست، استخوان و پنجه به‌طور قابل‌ملاحظه‌ای بیش‌تر بود (Tsai و همکاران، ۲۰۱۹). هم‌چنین در مطالعه دیگر بر روی نمونه‌های موزه‌ای سه پستاندار متفاوت از ۴ نوع کیت متفاوت و هم‌چنین روش فنول‌کلروفرم استفاده شد. نتایج حاصل از این تحقیق هیچ تفاوت معنی‌داری بین این روش‌ها نشان نداد، ولی علی‌رغم کمیت بالای DNA در روش فنول‌کلروفرم، کیفیت آن در مقایسه با سایر روش‌ها پائین‌تر بود (Singh و Bahuguna، ۲۰۱۴). هم‌چنین در مطالعه‌ای دیگر نیز به خلوص بالاتر DNA استخراج شده توسط کیت‌ها اشاره شده‌است (Serrone و همکاران، ۲۰۰۷). به‌طورکلی به‌دلیل دستیابی به‌مقدار ماده ژنتیکی بالا و ارزان بودن روش فنول‌کلروفرم نسبت به سایر روش‌ها، استفاده از آن متداول شده است (Tsai و همکاران، ۲۰۱۹). اما به‌دلیل عدم‌سادگی، وقت‌گیر بودن و سمیت شدید فنول، بیش‌تر محققان تمایل به استفاده از سایر روش‌ها را دارند (Lickfeldt و همکاران، ۲۰۰۲). در مطالعه حاضر چنین فرض می‌شود که امکان استخراج موفق DNA از بافت‌های مورد اشاره وجود دارد و روش اصلاحی در انجام PCR نیز بر روی جایگاه‌های میکروستلایت موفقیت‌آمیز خواهد بود. لذا هدف از انجام این مطالعه، به‌دست آوردن DNA با کیفیت و کمیت مناسب برای انجام مطالعات مولکولی به‌ویژه مطالعات جمعیتی بر پایه بخش میکروستلایت ژنوم جانور بوده است که بدین‌منظور از گونه فوک دریای خزر استفاده شد.

مواد و روش‌ها

فوک‌خزری تنها پستاندار دریای‌خزر است که در لیست قرمز اتحادیه بین‌المللی حفاظت از طبیعت و منابع طبیعی (IUCN) در رده در خطر انقراض قرار دارد (IUCN، ۲۰۱۷). از آن‌جا که زیست‌تخریب پذیری بافت‌های چربی این گونه بسیار بالاست و هم‌چنین استخراج DNA از بافت‌های موزه‌ای آن دشوار است، لذا به‌عنوان گونه هدف برای بررسی کارایی و بهینه‌سازی روش استخراج فنولی انتخاب شد. پس از کسب مجوزهای لازم از سازمان حفاظت محیط زیست و مرکز تحقیقات فوک خزری، تعداد ۲۱ نمونه از فوک‌خزری که شامل نمونه‌های موزه‌ای، استخوان‌های پودرشده قدیمی، بافت و پوست از لاشه‌های تازه بود، جمع‌آوری و به آزمایشگاه منتقل گردید. سپس نمونه‌های بافت و موزه‌ای با الکل ۷۵٪ شستشو داده شده و

(DOI): 10.22034/AEJ.2020.122652

در الکل ۹۶٪ تا زمان استخراج DNA نگه‌داری شدند. برای استخراج محتوای ژنتیکی نمونه‌ها ابتدا استخوان‌هایی که به‌خوبی پودر نشده بودند به‌مدت یک ساعت درون مخزن ازت قرار داده شدند تا به‌خوبی سست شوند، سپس برای هریک از نمونه‌ها از یک هاون اختصاصی و مجزا برای به حداقل رساندن آلودگی ژنومی استفاده‌گردید. لازم به ذکر است که ابتدا ماده ژنومی از نمونه‌های استخوان پودر شده، بافت موزه‌ای (پوست تاکسیدرمی شده) و بافت تازه لاشه فوک با روش فنول‌کلروفرم معمولی استخراج گردید (Hagelberg و Clegg، ۱۹۹۱) که نتایج حاصل از برخی نمونه‌ها در نانودراپ مطلوب نبود. لذا این نمونه‌ها به‌طور مجزا به‌مدت یک شبانه‌روز درون EDTA ۰/۰۵ مولار قرار گرفتند. سرانجام به‌منظور هضم نمونه‌ها پروتئیناز K، SDS و STE اضافه گردید و بهمدت ۱۲ ساعت در دمای ۵۵ درجه انکوبه شدند. در مرحله‌بعدی فقط به نمونه‌های‌استخوانی مرکاپتواتانول اضافه و به‌مدت سی دقیقه در دمای ۶۰ درجه قرار گرفتند تا کلسیم‌شان ته‌نشین گردد. سپس پس از افزودن phenol: chloroform: isoamilic alcohol به همه نمونه‌ها و سانتریفیوژ به‌مدت ۱۰ دقیقه، لایه رویی آن که حاوی DNA بود درون ویال دیگری قرار گرفت و ویال‌های قبلی دور انداخته شد. هم‌چنین دوباره کلروفرم‌ایزومیل به نمونه‌ها اضافه گردید و پس از سانتریفیوژ، محلول رویی آن به ویال جدیدی منتقل گردید. سپس به اندازه یک پنجم حجم نمونه ها سدیم‌استات و نصف حجم‌شان الکل ۹۶٪ اضافه گردید و به‌مدت ۱/۵ ساعت درون فریزر ۲۰- درجه قرار داده شد و پس از آن نمونه‌ها در دمای ۴ درجه سانتریفیوژ و الکل آن را به‌آرامی تخلیه گردید.در مرحله آخر به‌میزان هم حجم نمونه، اتانول ۷۰٪ اضافه و پس از سانتریفیوژ، دوباره الکل آن تخلیه گردید. ویال‌ها درون هیتر به‌مدت ۱۵ دقیقه قرار داده شد تا الکل به‌طور کامل تبخیر گردد و پس از خشک‌شدن، به همه ویال‌ها بافر TE اضافه نموده و در نهایت ویال‌ها برای نگه‌داری به فریزر ۲۰- انتقال داده‌شدند (شکل ۱). سپس DNAهای استخراج‌شده با استفاده از دو آغازگر (Primer) اختصاصی فوک‌خزری (Hg6.3 و Hg8.9) با واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز اختصاصی(PCR) تکثیر شدند (جدول ۱) (Gemmell و همکاران، ۱۹۹۷). حجم واکنش PCR انجام‌شده، ۲۰ میکرولیتر بود که شامل: ۱۰ میکرولیتر مسترمیکس، یک میکرولیتر DNA رقیق‌شده، یک میکرولیتر از هر جفت آغازگرهای forward وReverse و ۷ میکرولیتر آب دو بار تقطیر شده می‌شد (جدول۲). این واکنش با استفاده از دستگاه ترموسایکلر و با برنامه دمایی که شامل ۴۰ چرخه بود انجام گرفت، که مراحل آن شامل: ۱- واسرشته‌کردن اولیه (Deneturation) در دمای ۹۵ درجه به‌مدت ۵ دقیقه ۲- واسررشته‌سازی در دمای ۹۴ درجه به‌مدت ۳۰ ثانیه ۳- اتصال آغازگرها (Annealing) در دمای ۴۸ درجه به‌مدت ۵۰ ثانیه ۴- تکثیر ژنوم (Extention) موردنظر در دمای ۷۲ درجه به‌مدت ۳۰ ثانیه ۵- تکثیر نهایی در دمای ۷۲ درجه به‌مدت ۵ دقیقه بود. در نهایت برای مشاهده محصول PCR مقدار ۳ میکرولیتر از آن در ژل آکریل‌آمید ۸ درصد به‌مدت ۳ ساعت با ولتاژ ۱۷۰ ولت الکتروفورز گردید و برای مشاهده باندهای حاصل از روش رنگ‌آمیزی نیترات نقره استفاده‌شد.

جدول ۱: آغازگرهای اختصاصی فوک خزری، استفاده شده در این تحقیق

نام آغازگر	توالی نوکلئوتیدی	دمای نقطه ذوب
Hg6.3	F: CAGGGGACCTGAGTGCTTATG R: GACCCAGCATCAGAACTCAAG	۵۶
Hg8.9	F: TGTTAACTATCTGGCACAGAGTAAG R: TTTCCTATGGGTTCTACTCTC	۵۲

جدول ۲: مواد لازم جهت واکنش PCR با نسبت‌های حجمی

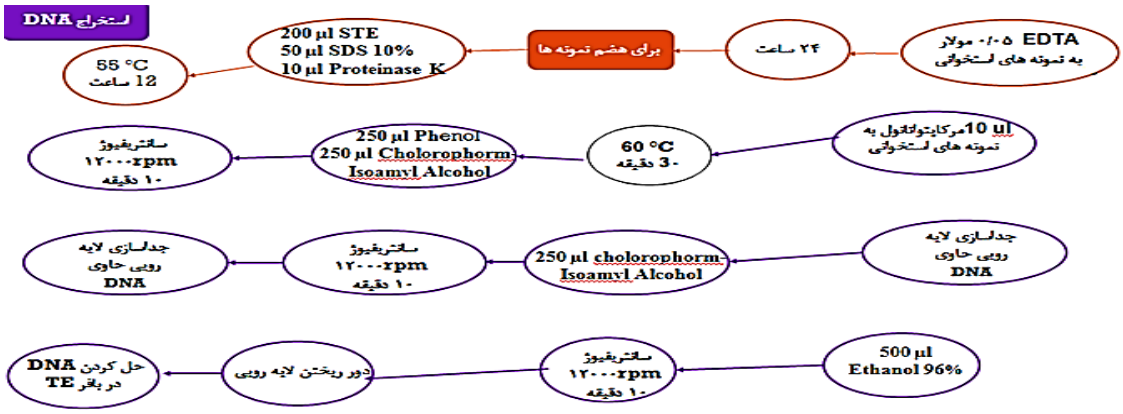
مواد واکنش	غلظت پایه	حجم برای یک واکنش (میکرولیتر)
مسترمیکس	۲X	۱۰
آغازگر FORWARD	۱۰ پیکومول	۱
آغازگر REVERSE	۱۰ پیکومول	۱
DNA ژنومی	۴۰ نانوگرم بر میکرولیتر	۱
آب دوبار تقطیرشده	-	۷
حجم کل واکنش	-	۲۰

نتایج

میزان غلظت DNA و جذب آن در طول‌موج های ۲۶۰ و ۲۸۰ نانومتر پس از اتمام مراحل استخراج با دستگاه نانودراپ Thermo Scientific NanoDrop مورد ارزیابی قرار گرفت (جدول۳). ستون‌های جدول ۳ به‌ترتیب از راست به چپ شامل نوع بافت، غلظت ماده ژنومی، جذب در طول‌موج ۲۶۰ نانومتر، جذب در طول‌موج۲۸۰ نانومتر، نسبت‌های‌جذبی ۲۶۰ به ۲۸۰ نانومتر و نسبت‌های‌جذبی ۲۶۰ به ۲۳۰ نانومتر می‌باشد. شکل ۲ نمودار جذب ۴ نمونه بافت تازه و استخوانی را نشان می‌دهد که دارای بیش‌ترین و کم‌ترین جذب در طول موج‌های

(DOI): 10.22034/AEJ.2020.122652

۲۶۰ و ۲۳۰ نانومتر هستند. میانگین غلظت DNA در نمونه‌های تازه و نمونه‌های استخوان قدیمی به‌ترتیب برابر ۶۳۲/۹۰ و ۲۲۶/۸۷ نانوگرم بر میکرولیتر اندازه‌گیری شد (جدول ۴). هم‌چنین میانگین نسبت جذبی ۲۶۰ به ۲۸۰ در نمونه‌های تازه به ۱/۸ نزدیک‌تر بود که بیانگر عدم وجود آلودگی فنولی و خلوص بیش‌تر ماده ژنتیکی آن‌ها نسبت به استخوان‌های قدیمی است. هم‌چنین پس از اطمینان از نرمال بودن داده‌های مربوط به غلظت DNA استخراج‌شده، آزمون پارامتریک مقایسه میانگین‌ها بین دو گروه انجام‌شد که میانگین مقادیر غلظت DNA در بافت‌های تازه به‌طور معنی‌داری (P-value<۰/۰۵) از میانگین بافت‌های موزه‌ای بیش‌تر بود (شکل ۳ و جدول ۵). به‌منظور تکثیر ماده ژنومی استخراج‌شده از واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز با دو آغازگر اختصاصی Hg6.3 و Hg8.9 استفاده شد که حاکی از تکثیر موفق همه DNAهای استخراج شده بود، که به‌طور باندهای مجزا براساس وزن ملکولی‌شان بر روی ژل آکریل‌آمید تفکیک شدند (شکل ۴). هم‌چنین پس از قرار دادن نمونه‌های استخوانی و موزه‌ای مدت یک شبانه روز در EDTA پنج صدم مولار، و اضافه کردن مرکاپتواتانول به آن‌ها کیفیت و کمیت ماده ژنومی‌شان به‌طور قابل ملاحظه‌ای بهبود یافت. در شرایط پیاده کردن تیمار آماده‌سازی در EDTA (یک شبانه‌روز) وافزودن مرکاپتواتانول (به‌مدت ۳۰ دقیقه در ۶۰ درجه سانتی‌گراد) میزان متوسط غلظت DNA استخراج شده نمونه‌ها از متوسط ۲۶ به ۵۰۷ نانوگرم بر میکرولیتر افزایش یافت.

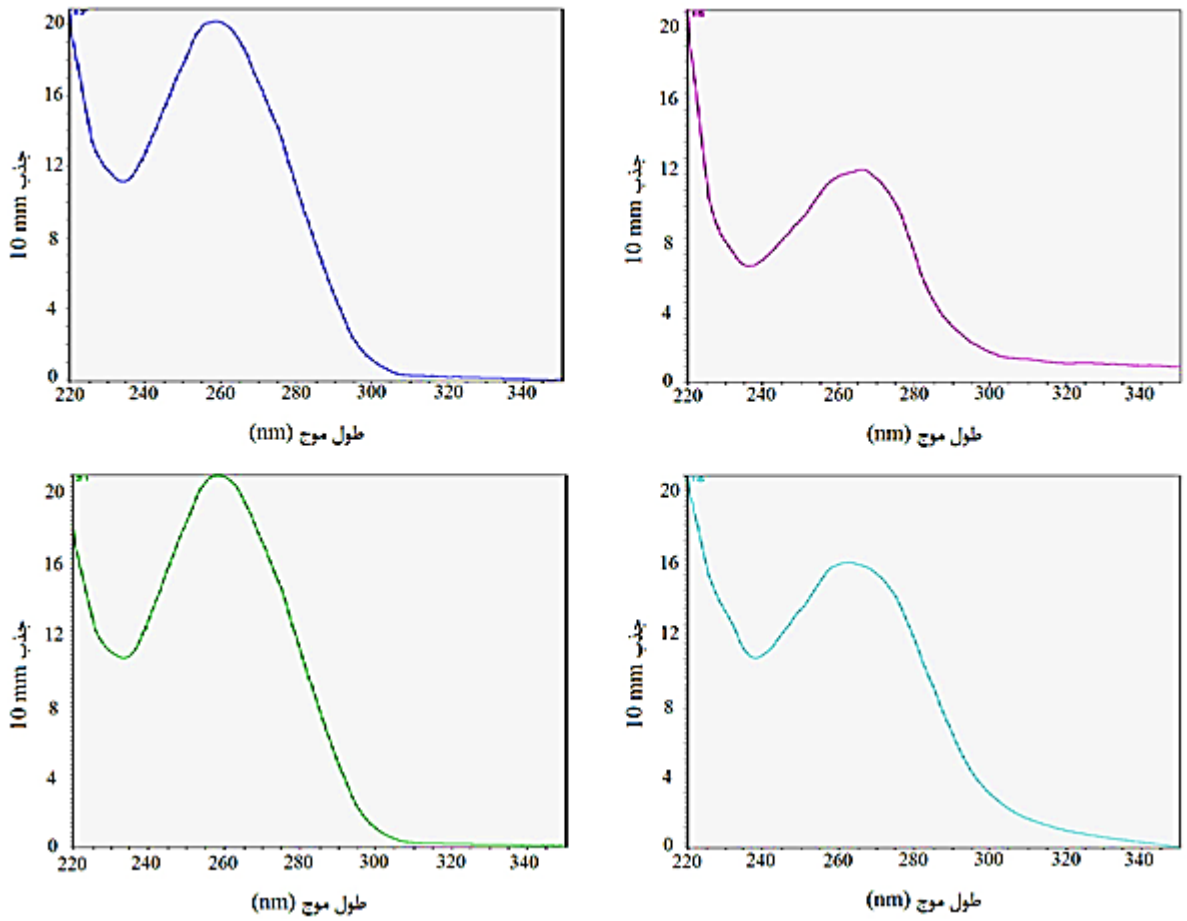


شکل ۱: خلاصه مراحل بهینه شده استخراج DNA (حلقه‌های تیمار نمونه‌های استخوانی در سمت راست مربوط به بهینه سازی است)

جدول ۳: نتایج سنجش کمیت و کیفیت DNA در بافت‌های تازه و موزه‌ای فوک‌خزری با استفاده از نانودراپ

نوع بافت	غلظت DNA (نانوگرم بر میکرولیتر)	جذب ۲۶۰ (نانومتر)	جذب ۲۸۰ (نانومتر)	۲۶۰/۲۸۰	۲۶۰/۲۳۰
عضله	۲۷۸/۱۰	۵/۵۶	۳/۰۳	۱/۱۶	۱/۸۴
عضله	۲۱۰/۱	۴/۲۰	۳/۰۳	۰/۵۴	۱/۳۸
عضله	۳۹/۲	۰/۷۸	۰/۴۱	۱/۰۷	۱/۸۷
عضله	۵۲۱/۷	۱۰/۴۳	۷/۳۱	۰/۵۵	۱/۴۳
عضله	۱۰۹۶/۴	۲۱/۹۲	۱۱/۷۳	۱/۷۹	۱/۸۷
عضله	۶۲۰/۸	۱۲/۴۱	۶/۶۰	۱/۹۳	۱/۸۸
عضله	۶۱۱/۷	۱۲/۲۳	۶/۴۷	۱/۹۳	۱/۸۹
عضله	۱۳۸۴/۸	۲۷/۶۹	۱۴/۶۷	۱/۸۱	۱/۸۹
عضله	۱۰۰۴/۵	۲۰/۰۹	۱۰/۹۱	۱/۷	۱/۸۴
عضله	۱۵۳۹	۳۰/۷۸	۱۶/۴۴	۱/۹	۱/۸۷
عضله	۲۴۵/۱	۴/۹۰	۲/۶۰	۱/۲۹	۱/۸۹
عضله	۴۳/۵	۰/۸۷	۰/۴۳	۱/۶۵	۱,۹۹
تاکسیدرمی	۵۱۳	۱۰/۲۶	۵/۵۷	۱/۲۳	۱/۸۴
تاکسیدرمی	۲۶۶/۱	۵/۳۲	۲/۹۴	۱/۰۴	۱/۸۱
پودر استخوان	۱۵۵/۹	۳/۱۱	۲/۴۰	۰/۵۶	۱/۲۹
پودر استخوان	۴۸/۱	۰/۹۶	۰/۷۱	۰/۴۶	۱/۳۵
پودر استخوان	۶۸۱/۳	۱۳/۶۲	۷/۹۲	۱/۲۱	۱/۷۲
پودر استخوان	۱۲۲/۳	۲/۴۴	۱/۳۶	۱/۶۸	۱/۷۹
پودر استخوان	۱۱۶	۲/۳۲	۱/۲۹	۱/۹۴	۱/۷۹
پودر استخوان	۴۰/۳	۰/۸۰	۰/۵۲	۰/۵۲	۱/۵۳
پودر استخوان	۹۹	۱/۹۷	۱/۵۹	۱/۱۳	۱/۲۴

(DOI): 10.22034/AEJ.2020.122652



شکل الف- نمودارهای جذب مربوط به دو نمونه پودر استخوان

شکل ب- نمودارهای جذب مربوط به دو نمونه بافت تازه

شکل ۲: نمودارهای اندازه‌گیری میزان جذب حاصل از دستگاه نانودراپ: سمت راست شامل قدیمی (الف)، سمت چپ شامل بافت تازه (ب)

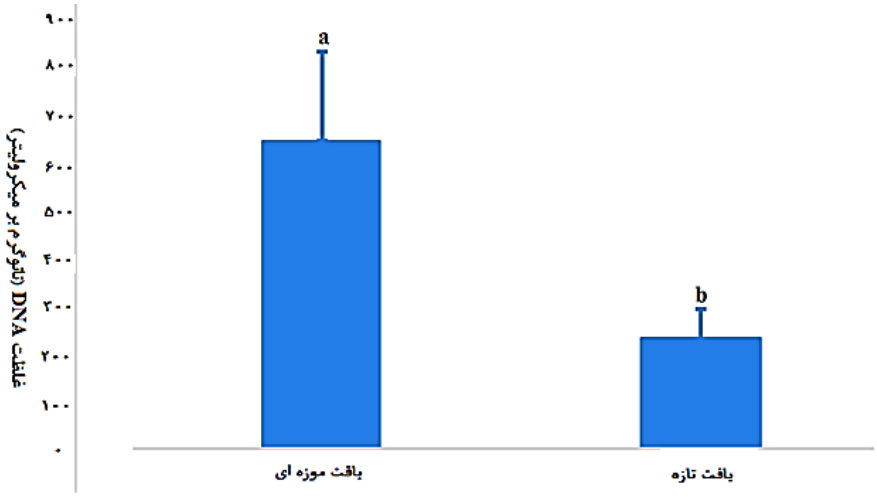
جدول ۴: مقایسه غلظت و کیفیت بافت‌های تازه و نمونه‌های قدیمی فوک‌خزری

نوع نمونه‌ها	تعداد نمونه	میانگین غلظت DNA میکروگرم بر میلی‌لیتر	انحراف معیار از غلظت DNA	میانگین نسبت ۲۶۰/۲۸۰	انحراف معیار از نسبت ۲۶۰/۲۸۰	میانگین نسبت ۲۶۰/۲۳۰	دامنه غلظت DNA
بافت تازه	۱۲	۶۳۲/۹۰	۵۱۴/۸۰	۱/۸۱	۰/۱۹	۱/۴۴	۳۹/۱۵۳۹-۲
بافت موزه‌ای	۹	۲۲۶/۸۷	۲۲۳/۹۷	۱/۵۹	۰/۲۴	۱/۸۰	۴۰/۳-۶۸۱/۳

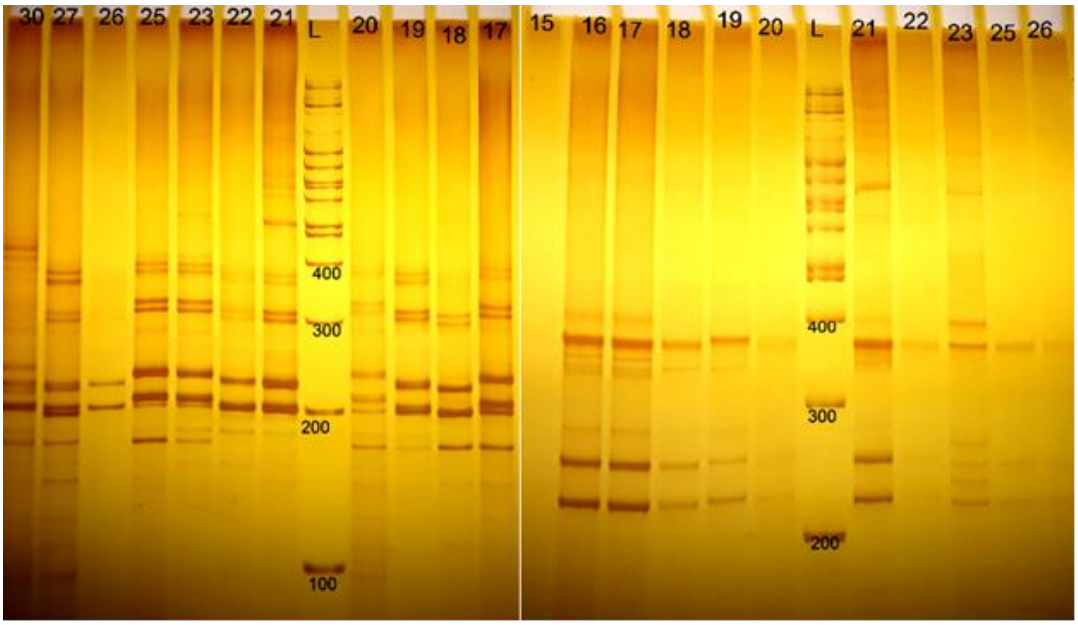
جدول ۵: نتایج آزمون t غیر جفتی برای مقایسه میانگین غلظت DNA بین دو گروه بافت‌های تازه و موزه‌ای

مقایسه تفاوت غلظت‌ها	نتایج آزمون همگنی واریانس Leven		مقایسه میانگین دو گروه از طریق t-test					
	مقدار F	سطح معنی داری	مقدار T	درجه آزادی	Sig دو دامنه	میانگین اختلاف	تفاوت اشتباه معیار	حد پایین	حد بالا
با واریانس معادل	۵/۹۳۲	۰/۰۲۵	۲/۲۰۷	۱۹	۰/۰۴۰	۴۰۶/۰۳۰	۱۸۴/۰۰۷	۲۰/۸۹۹	۷۹۱/۱۶
با واریانس غیرمعادل			۲/۴۴۴	۱۵/۸۷۴	۰/۰۲۷	۴۰۶/۰۳۰	۱۶۶/۱۲۵	۵۳/۶۳۲	۷۵۸/۴۲

(DOI): 10.22034/AEJ.2020.122652



شکل ۳: نمودار تفاوت میانگین غلظت DNA به‌دست آمده از نمونه‌های تازه و موزه‌ای



شکل الف- پرایمر Hg6.3 با دامنه باندی ۲۲۱-۲۲۵ شکل ب- پرایمر **Hg8.9** با دامنه باندی بین ۲۰۱-۲۱۱

شکل ۴: تصاویر باندهای محصول PCRهای نمونه‌های فوک خزری با استفاده از پرایمرهای Hg6.3 (الف) و Hg8.9 (ب)

بحث

مطالعات نمونه‌های کمیاب یا در معرض تهدید که در رده‌های حفاظتی قرار دارند از چالش‌های جدی محققین و دست اندرکاران حفاظت می‌باشد. نه تنها گونه‌های حفاظت شده، بلکه براساس استانداردهای اخلاق در تحقیق، هر گونه مطالعه‌ای که موجب به‌خطر افتادن بقای یک گونه یا تلف شدن فردی از آن جمعیت شود به‌شدت مورد نقد و حساسیت قرار می‌گیرد. در طول سال‌های اخیر کمیته‌های اخلاق و مجلات علمی-پژوهشی مانع نشر پژوهش‌هایی می‌شوند که خارج از قوانین استاندارد وضع شده باشند. در همین راستا، توجه به نمونه‌هایی که از سال‌ها قبل در موزه‌های جانوری یا تاریخ طبیعی نگه‌داری می‌شود به‌طور محسوسی رو به افزایش است (Tsai و همکاران، ۲۰۱۹). آلودگی‌های حاصل از فعالیت‌های بشری باعث انقراض بسیاری از گونه‌های ارزشمند در جهان شده است (Khazaee و همکاران، ۲۰۱۶). فوک خزری تنها پستاندار باقی‌مانده دریای خزر است که جمعیت آن در سال‌های اخیر به‌دلایل گوناگونی مانند آلودگی‌های دریایی به‌طور محسوسی کاهش یافته است، به‌طوری‌که این گونه اکنون در لیست قرمز IUCN در طبقه گونه در خطر انقراض قرار گرفته است (Kennedy و همکاران، ۲۰۰۰). لذا برای حفاظت موثر از این گونه ارزشمند نیاز به بررسی تنوع ژنتیکی و ساختار جمعیتی آن با استفاده از روش‌های

(DOI): 10.22034/AEJ.2020.122652

ملکولی می‌باشد. به‌طورکلی روش‌های ژنتیک ملکولی نیاز به استخراج DNA ژنومی با عملکرد مناسب و خلوص بالا دارد (Ghaheri و همکاران، ۲۰۱۶). به‌طور طبیعی انتظار می‌رود یک نمونه بافت با بیش‌ترین خلوص DNA تنها در ۲۶۰ نانومتر جذب بالایی داشته باشد و نسبت جذب ۲۶۰ به ۲۸۰ آن برابر ۱/۸ باشد (Abdel-Latif و Osman، ۲۰۱۷) علاوه بر کمیت و کیفیت DNA معیار اصلی برای سنجش استخراج موفقیت‌آمیز، تکثیر موفق DNA استخراج‌شده می‌باشد (Poljak و همکاران، ۲۰۰۰). . از طرف دیگر خلوص و کیفیت DNA استخراج‌شده به تنهایی تضمین‌کننده تکثیر موفق آن نخواهد بود، لذا بررسی فاکتورهای دیگری مانند غلظت نوکلئیک‌اسید نیز ضرورت دارد (Holden و همکاران، ۲۰۰۳). بنابراین مطالعه حاضر با اصلاح پروتکل فنول کلروفرم برای نمونه‌های استخوان قدیمی سعی در بهینه‌سازی روش استخراج DNA ژنومی داشت. کلسیم، منیزیم و سایر کاتیون‌ها از جمله عوامل مهم اختلال و عدم تکثیر DNA در واکنش PCR هستند. لذا در این مطالعه به‌منظور حذف این محدود کننده و به حداکثر رساندن کمیت و کیفیت ماده ژنومی از EDTA ۰/۰۵ مولار استفاده شد تا کلسیم و منزیم استخوان‌ها با رسوب‌دهی حذف گردد. در نهایت نتایج PCR حاصل از استخراج بهینه‌سازی‌شده نشان‌دهنده تکثیر موفق و عدم دخالت این محدودکننده‌ها بر روی فرآیند تکثیر بود. به‌طورکلی در بین روش‌های استخراج DNA استخوان‌های قدیمی سه روش فنول‌کلروفرم، سیلیکا و کیت‌های استخراج DNA نسبت به سایر روش‌ها متداول‌تر هستند. تاکنون مطالعات متعددی بر روی روش‌های استخراج ژنوم نمونه‌های باستانی صورت گرفته‌است که با تغییر و افزودن مراحلی به این روش‌ها باعث بهبود و بهینه‌سازی‌شان گردیده‌اند (Tsai و همکاران، ۲۰۱۹). از طرفی در انتخاب استراتژی استخراج مواد ژنومیک بین نمونه‌های موزه‌ای و باستانی به‌دلیل موجودی بسیار اندک این ترکیبات و تخریب‌پذیری بالای آن‌ها که به‌دلیل مرور زمان رخ داده است تفاوت‌هایی وجود دارد (Tsai و همکاران، ۲۰۱۹). هر چقدر عمر نگه‌داری نمونه مورد مطالعه از حالت موزه‌ای به باستانی نزدیک شود، خلوص مقدار اندک DNA به‌دست آمده اهمیت دوچندان خواهد یافت. در شرایط حاضر روش‌های کیت برای محققین داخلی گران و تهیه کیت مناسب اغلب دشوار است (Yari و همکاران، ۲۰۱۷). در مطالعه‌ای که توسط Yang و همکاران (۱۹۹۸) انجام گرفت، ژنوم استخوان‌های باستانی مربوط به انسان که قدمت بین ۱۵ تا ۵۰۰۰ سال داشت، با استفاده از چندین روش فنول‌کلروفرم، کیت و سیلیکا استخراج گردید. که نتایج حاصل از آن نشان‌داد، ماده ژنومی حاصل از روشی که نمونه‌های آن ابتدا با پروتئیناز K هضم شده و با کیت‌های QIAquick برمبنای روش سیلیکا استخراج شده بودند، دارای خلوص بیش‌تری نسبت به سایر روش‌ها هستند. این درحالی‌است که برای تمامی موارد قابل استخراج از بافت موزه‌ای اعم از مو، پوست و استخوان با به‌کار بستن روش‌های اصلاحی و بهینه شده تنها با افزایش ۱ روز به زمان استخراج نتایج مطلوب‌تری به‌دست‌خواهد آمد. در روش به‌کار بسته شده توسط Rohland و Hofreiter (۲۰۰۷) روش مناسب برای استخراج DNA از پودر استخوان‌های قدیمی، محققین به‌دلیل حذف بیش‌تر محدودکننده‌های PCR، استفاده از روش سیلیکا در حضور مقدار زیاد گوانیدین تیوسیانات را لازمه روش اصلاحی خود دانستند.این روش مشابه با روش بهینه‌سازی شده که در تحقیق حاضر به‌کار بسته شد نیاز به ۲ روز زمان داشته اما از نظر مواد مصرفی گران‌تر از روش اصلاحی اخیر می‌باشد.در مطالعه‌ای که توسط Sadeghi و Sabouri (۲۰۱۴) به‌منظور بهینه‌سازی استخراج فنول‌کلروفرم انجام گرفت، تصریح شد که هرچه نمونه‌های استخوانی به‌مدت بیش‌تری درون EDTA بمانند کلسیم‌شان بهتر حذف می‌گردد.در روش اصلاحی اخیر ضمن تائید این موضوع، اذعان می‌دارد افزودن مرکاپتواتانول هیچ‌گونه پیامد منفی بر فرآیند PCR برای انجام مطالعات ژنتیک جمعیت و ژنوتایپ کردن نشانگرهای ریزماهواره نداشته است به‌طوری‌که پس از رنگ‌آمیزی نیترات نقره و ظهور باندهای مولکولی در دامنه‌های مورد انتظار، باندهای هموزیگوت و هتروزیگوت هر دو به‌وضوح قابل مشاهده بود(شکل ۵). در خاتمه می‌توان گفت روش بهینه‌شده استخراج DNA که در شکل ۱ به آن اشاره شده در مطالعات مولکولی به‌ویژه تحقیقات مرتبط با ژنتیک جمعیت جانوری و گونه‌های کمیابی که نمونه‌های موزه‌ای آن در دسترس می‌باشد قابل استفاده است. این روش به‌عنوان یک روش غیرتهاجمی که به بقای گونه به‌ویژه گونه‌های حمایتی و در معرض خطر آسیبی وارد نمی‌کند توصیه می‌شود.

تشکر و قدردانی

این تحقیق به‌کمک حمایت مالی دانشگاه تربیت مدرس صورت گرفته است. هم‌چنین، نگارندگان مقاله بر خود لازم می‌دانند از آقای مهندس کوروس ربیعی، کارشناس مسئول معاونت محیط طبیعی اداره کل محیط زیست استان مازندران، سرکار خانم مهندس سمانه فایزی در مرکز حفاظت فوک خزری (جزیره آشوراده) و آقای دکتر علیرضا میرزاجانی عضو هیات علمی پژوهشکده آبزی پروری آب‌های داخلی واقع در بندرانزلی بابت همکاری ارزشمندشان در تهیه نمونه و اطلاعات مکانی لاشه‌های تلف شده فوک صمیمانه تشکر نمایند.

منابع

۱. **Anmarkrud, J.A. and Lifjeld, J.T., 2017.** Complete mitochondrial genomes of eleven extinct or possibly extinct bird species. Molecular Ecology Resources. Vol. 17, No. 2, pp: 334-341.

(DOI): 10.22034/AEJ.2020.122652

۲. **Avise, J.C., 2012.** Molecular markers, natural history and evolution. Springer Science Business Media. 92 p.

۳. **Bengtsson, C.F.; Olsen, M.E.; Brandt, L.Ø.; Bertelsen, M.F.; Willerslev, E.; Tobin, D.J. and Gilbert, M.T.P., 2012.** DNA from keratinous tissue. Part I: hair and nail. Annals of Anatomy-Anatomischer Anzeiger. Vol. 194, No. 1, pp: 17-25.

۴. **Buerki, S.; Callmander, M.W.; Bachman, S.; Moat, J.; Labat, J.N. and Forest, F., 2015.** Incorporating evolutionary history into conservation planning in biodiversity hotspots. Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences. Vol. 370, No. 1662, pp: 20140014.

۵. **Callow, J.A. and Ford Lloyd, B.V., 1997.** Biotechnology and plant genetic resources: conservation and use, CAB International, University of Birmingham, U.K. 380 p.

۶. **De Wit, M.Y.; Faber, W.R.; Krieg, S.R.; Douglas, J.T.; Lucas, S.B.; Montreewasuwat, N. and Hartskeerl, R.A., 1991.** Application of a polymerase chain reaction for the detection of *Mycobacterium leprae* in skin tissues. Journal of clinical microbiology. Vol. 29, No. 5, pp: 906-910.

۷. **Frankham, R.; Briscoe, D.A. and Ballou, J.D., 2002.** Introduction to conservation genetics. Cambridge University Press. 257 p.

۸. **Gemmell, N.J.; Allen, P.J.; Goodman, S.J. and Reed, J.Z., 1997**. Interspecific microsatellite markers for the study of pinniped populations. Molecular Ecology. Vol. 6, No. 7, pp: 661-666.

۹. **Ghaheri, M.; Kahrizi, D.; Yari, K.; Babaie, A.; Suthar, R.S. and Kazemi, E., 2016.** A comparative evaluation of four DNA extraction protocols from whole blood sample. Cellular and Molecular Biology. Vol. 62, No. 3, pp: 120-124.

۱۰. **Hagelberg, E. and Clegg, J.B., 1991.** Isolation and charac terization of DNA from archaeological bone. Proceeding of Royal Society of London. Vol. 244, No. 3, pp: 45-52.

۱۱. **Hofreiter, M.; Paijmans, J.L.; Goodchild, H.; Speller, C.F.; Barlow, A., Fortes, G. G. and Collins, M.J., 2015.** The future of ancient DNA: Technical advances and conceptual shifts. BioEssays. Vol. 37, No. 3, pp: 284-293.

۱۲. **Holden, M.J., 2003.** Evaluation of extraction methodologies for corn kernel (*Zea mays*) DNA for detection of trace amounts of biotechnology-derived DNA. J of Agricultural and Food Chemistry. Vol. 51, No. 9, pp: 2468-2474.

۱۳. **Höss, M. and Pääbo, S., 1993.** DNA extraction from Pleistocene bones by a silica-based purification method. Nucleic Acids Research. Vol. 21, No. 16, pp: 3913.

۱۴. **IUCN. 2017.** Antelope Specialist Group. Hippotragus *niger* ssp. variani. The IUCN Red List of threatened species.

۱۵. **Kennedy, S.; Kuiken, T.; Jepson, P.D.; Deaville, R.; Forsyth, M.; Barrett, K. and Kydyrmanov, A., 2000.** Mass die-off of Caspian seals caused by canine distemper virus. Emerging Infectious Diseases. Vol. 6, pp: 637-639

۱۶. **Khazaee, M.; Hamidian, A.H.; Shabani, A.A.; Ashrafi, S.; Mirjalili, S.A.A. and Esmaeilzadeh, E., 2016.** Accumulation of heavy metals and as in liver, hair, femur, and lung of Persian jird (*Meriones persicus*) in Darreh Zereshk copper mine, Iran. Environmental Science and Pollution Research. Vol. 23, No. 4, pp: 3860-3870.

۱۷. **Lassen, C.; Hummel, S. and Herrmann, B., 1994.** Comparison of DNA extraction and amplification from ancient human bone and mummified soft tissue. International Journal of Legal Medicine. Vol. 107, No. 3, pp: 152-155.

۱۸. **Lemke, L.; Rex, M.; Zyprian, E. and Töpfer, R., 2011.** A simple, inexpensive and environmentally friendly method for high throughput DNA extraction from grapevine (*Vitis* spp.). Vitis. Vol. 50, No. 1, pp: 7-10.

۱۹. **Lickfeldt, D.W.; Hofmann, N.E.; Jones, J.D.; Hamblin, A.M. and Voigt, T.B., 2002.** Comparing three DNA extraction procedures for cost, efficiency, and DNA yield. Hort Science. Vol. 37, No. 5, pp: 822-825.

۲۰. **Mi, Y. and Vanderpuye, O., 2013.** Comparison of different DNA extraction methods for forensic samples. Journal of Natural Sciences Research. Vol. 3, No. 11, pp: 32-38.

۲۱. **Poljak, M.; Seme, K. and Gale, N., 2000.** Rapid extraction of DNA from archival clinical specimens: our experiences. Pflügers Archiv-European Journal of Physiology. Vol. 439, No. 7, pp: R42-R44.

۲۲. **Ruane, S. and Austin, C.C., 2017.** Phylogenomics using formalin-fixed and 100+ year-old intractable natural history specimens. Molecular Ecology Resources. Vol. 17, No. 5, pp: 1003-1008.

۲۳. **Sadeghi, M. and Sabouri, A., 2014.** Optimization of the phenol -chloroform silica DNA extraction method in ancient bones DNA extraction. Journal of Knowledge & Health. Vol. 9, No. 2, pp: 21-26.

۲۴. **Serrone, P.D., Attorri, L. and Palazzino, G., 2007.** Easy DNA extraction for rapid detection of Panax ginseng CA Meyer in commercial ginseng products. Natural Product Research. Vol. 21, No. 12, pp: 1099-1103.

۲۵. **Singh, A. and Bahuguna, A., 2014.** Digging out treasure from museum specimen: A comparison of extraction methods and PCR polymerase enzymes for DNA from old taxidermy samples. International Journal of Advanced Research. Vol. 2, No. 9, pp: 700-707.

۲۶. **Tsai, W.L.E.; Schedl, M.E.; Maley, J.M. and McCormack, J.E., 2019.** More than skin and bones: Comparing extraction methods and alternative sources of DNA from avian museum specimens. Molecular Ecology Resources. Vol. 10, pp: 1-8.

۲۷. **Wang, D.Y.; Eng, B.; Waye, J.S.; Dudar, J.C. and Saunders, S.R., 1998.** Technical note: improved DNA extraction from ancient bones using silica-based columns. American Journal of Physical Anthropology. Vol. 105, pp: 539-543.

۲۸. **Wood, H.M.; González, V.L.; Lloyd, M.; Coddington, J. and Scharff, N., 2018.** Next-generation museum genomics: Phylogenetic relationships among palpimanoid spiders using sequence capture techniques (Araneae: Palpimanoidea). Molecular phylogenetics & evolution. Vol. 127, pp: 907-918.

۲۹. **Yari, P.; Valiee, T.; Bashiri, H.; Kahrizi, D. and Yari, K., 2017.** An efficient and optimized protocol for DNA extraction from animal tissues. Biological, Environmental and Agricultural Sciences. Vol. 2, No. 4, pp: 41-44.

(DOI): 10.22034/AEJ.2020.122652

Scientific Research Journal of Animal Environment Vol. 12, No. 4, Winter 2020

Optimization of DNA Extraction from Animal Museum Specimens Including Mammals' Skins and Bones with Modified Phenol-Chloroform Method (Case Study: The Caspian Seal)

- **Aria Khazaee:** Department of Environmental Sciences, Faculty of Natural Resources and Marine Sciences, Tarbiat Modares University, Noor, Iran
- **Seyed Mahmoud Ghasempouri*:** Department of Environmental Sciences, Faculty of Natural Resources and Marine Sciences, Tarbiat Modares University, Noor, Iran
- **Amir Sayadshirazi:** Caspian Seal Treatment and Research Center, Ashooradeh Island, Bandar Torkaman, Iran

Received: November 2019 Accepted: February 2020

Key words: DNA concentration, Museum tissue, Phenol-chloroform method, Caspian seal, Polymerase chain reaction

Abstract

The study of museum specimens' DNA, is so important today because of the useful information it provides researchers. In addition, because of the genetic content for these samples is very fragile over time and sometimes low in their concentration, they need to more efficient methods with higher yields for optimal quantitative and qualitative extraction needed from the past. Therefore, depending on the target species or tissues, researchers often search to find a suitable way to achieve their goals by modifying and optimizing extraction protocols. In this study, by changing some parameters in the phenol chloroform method, the genetic content of 22 Caspian Seal samples containing fresh tissues and museum specimens was extracted. Also, the average of DNA concentration of fresh tissues and museum specimens according to the mean and standard error (M±SE) was 632.90±75.62 and 222.87±182.91 respectively and the mean of 260/280 wavelength ratio was closer to 1.8 nm in fresh tissue samples, then the DNA product of fresh muscle tissue samples had significantly higher concentration (P-value<0.05). The extracted DNA was amplified using two specific non-universal primers (Hg6.3 and Hg8.9) by polymerase chain reaction upon achievement to suitable temperature gradient. The results of molecular band documentation on 8% acrylamide gel indicated that all specimens, both fresh tissue and museum specimens with at least two decades, were successfully amplified. Given the ability of a successful genotype for population genetic studies, preservation of museum specimens under any circumstances is recommended.

* Corresponding Author's email: ghasempm@modares.ac.ir