

مقایسه اثر چند بافر لیزکننده گلوبول قرمز بر استخراج DNA ژنومی از نمونه‌های خون منجمد در سنجش طول تلومر به روش qPCR

علیرضا هریسچی^۱، مریم قبه^۲، جعفر سلیمانی^{۳*}

تاریخ دریافت ۱۴۰۳/۰۳/۲۲ تاریخ پذیرش ۱۴۰۳/۰۵/۰۶

چکیده

پیش‌زمینه و هدف: مطالعه طول تلومر برای درک فرآیند پیری و پیشگیری از بیماری‌ها بسیار مهم است. بهینه‌سازی استخراج DNA از نمونه‌های خون منجمد برای حفظ طول تلومر اهمیت دارد. هدف از این مطالعه مقایسه اثر چند بافر لیزکننده گلوبول قرمز بر استخراج DNA ژنومی از نمونه‌های خون منجمد در سنجش طول تلومر به روش qPCR بود.

مواد و روش کار: در این مطالعه تجربی، برای استخراج DNA از شش بافر مختلف لیز گلوبول قرمز به همراه بافر استخراج CTAB استفاده شد. مقدار DNA استخراجی و خلوص آن با استفاده از اندازه‌گیری جذب و نسبت‌های A_{260}/A_{280} و A_{260}/A_{300} ارزیابی شد. یکپارچگی DNA توسط الکتروفورز ژل آگارز بررسی شد. تکرارپذیری عملکرد بافرها با استفاده از درصد ضریب (CV%) تغییرات برای کمیته DNA ارزیابی شد. همچنین، کارایی PCR با بررسی آستانه چرخه (Ct) در qPCR برای هر نمونه با استفاده از معادله رگرسیون خطی و ضریب تعیین (R^2) در نرم‌افزار GraphPad Prism v10 گزارش شد. تفاوت‌ها در سطح $p < 0.05$ معنی‌دار در نظر گرفته شد.

یافته‌ها: بافر لیز با ترکیب ۱۰ میلی‌مولار Tris-HCl pH ۷/۶ و ۱۰ میلی‌مولار KCl، منجر به استخراج بیشترین مقدار DNA ($361.01 \text{ ng}/\mu\text{L}$) شد. نتایج ژل هیچ‌گونه خردشدگی DNA در نمونه‌ها را نشان نداد. نسبت‌های جذبی در مقایسه بین بافرها تفاوت چندانی را نشان ندادند. همچنین DNA استخراجی با بافر لیز با ترکیب ۱۵۵ میلی‌مولار NH_4Cl ، ۱۰ میلی‌مولار KHCO_3 ، ۵ میلی‌مولار EDTA در مقایسه DNA استخراجی با سایر بافرها درصد ضریب تغییرات برای کمیته DNA ($\text{CV} = 6.7\%$) و میزان کارایی PCR بهتری ($\text{Efficiency} = 103\%$ ، $R^2 = 99.7\%$) و $36B4$ و ($\text{Efficiency} = 99.6\%$ ، $R^2 = 99.6\%$) برای تلومر داشت. **بحث و نتیجه‌گیری:** بافر لیز با ترکیب ۱۵۵ میلی‌مولار NH_4Cl ، ۱۰ میلی‌مولار KHCO_3 و ۵ میلی‌مولار EDTA، مؤثرترین عملکرد را در استخراج DNA از نمونه‌های خون منجمد جهت مطالعه تلومر داشت. این بافر با عملکرد بهینه خود، پس از تأیید نهایی توسط مطالعات بیشتر می‌تواند در کارآزمایی‌ها استفاده شود. **کلیدواژه‌ها:** استخراج DNA، خون منجمد، کارایی PCR، بافر لیزکننده گلوبول قرمز، طول تلومر

مجله مطالعات علوم پزشکی، دوره سی و پنجم، شماره چهارم، ص ۲۸۶-۲۷۴، تیر ۱۴۰۳

آدرس مکاتبه: مرکز تحقیقات آنالیز دارویی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران. تلفن: ۹۸۹۱۴۸۶۶۰۵۴۴

Email: jsoleymanii@gmail.com

مقدمه

هر بار تقسیم سلولی، تلومرها کوتاه‌تر می‌شوند. وقتی تلومرها به حد بحرانی کوتاه می‌شوند، سلول‌ها وارد مرحله‌ای به نام پیری سلولی (senescence) می‌شوند که در آن دیگر قادر به تقسیم نیستند. کوتاه شدن تلومر منعکس‌کننده بار جمعیتی استرس اکسیداتیو، التهابی و مکانیکی است (۳). از این رو، طول تلومر به عنوان یک نشانگر زیستی برای انواع بیماری‌ها و افزایش سن معرفی شده‌است

تلومرها ساختارهای ریبونوکلوپروتئینی متشکل از آرایه‌های پشت سر هم از توالی TTAGGG در انتهای کروموزوم هستند که از کوتاه شدن DNA در طول همانندسازی جلوگیری می‌کنند (۱،۲). تلومرها از ژنوم در برابر تخریب هسته‌ای، نوترکیبی غیرضروری و همجوشی بین کروموزومی محافظت می‌کنند. طول تلومرها نقش بسیار مهمی در بقای سلول‌ها و فرآیند پیری دارد، با

^۱ دانشجوی کارشناسی ارشد بیوشیمی، گروه علوم شناختی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

^۲ استادیار بیوشیمی، گروه علوم شناختی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

^۳ استادیار علوم دارویی، مرکز تحقیقات آنالیز دارویی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران (نویسنده مسئول)

و مطالعه‌ی تلومرها برای درک پیری و درمان بسیاری از بیماری‌ها مهم است (۴،۵).

برای هر آزمایش مرتبط با DNA، وجود DNA با کیفیت بالا ضروری است. یک پروتکل معمولی جداسازی اسید نوکلئیک شامل لیز، رسوب و تخلیص اسید نوکلئیک است (۶). کیت‌های مختلفی برای استخراج DNA از خون وجود دارند اما تعداد بسیار محدودی از آنها مناسب استخراج DNA از خون منجمد هستند. طیف گسترده‌ای از روش‌های استخراج DNA در مطالعات تلومر استفاده شده است که نشان می‌دهند روش‌های مختلف می‌تواند بر اندازه‌گیری طول نسبی تلومر تأثیرگذار باشد. یافتن روشی که کمترین آسیب را به DNA وارد کند تا طول تلومر حفظ شود از اهمیت بالایی برخوردار است (۷،۸).

برای استخراج DNA از نمونه‌های خون، از بافرهای مختلف لیز استفاده می‌شود که حاوی مواد شوینده، نمک یا آنزیم می‌باشند. این بافرها عوامل شلات کننده مانند EDTA را نیز شامل می‌شوند که به تثبیت DNA کمک می‌کنند. استفاده از بار مثبت مولکول CTAB^۱ و افزودن غلظت بالای نمک به بافر استخراج، منجر به حفظ ساختار DNA و جداسدن لیپیدها و پروتئین‌ها از آن می‌شود. این فرایند باعث بهبود کیفیت و خلوص DNA استخراج شده می‌شود (۹،۱۰).

تکنیک qPCR روشی است که توسط آن می‌توان مقدار محصول PCR را در هر لحظه‌ی واکنش تعیین کرد و برای بررسی بیان ژن بسیار مفید است. از جمله مزیت‌های qPCR این است که به تجزیه و تحلیل‌های پایین دست از جمله الکتروفورز متکی نیست و امکان ارزیابی چندین هدف را به طور همزمان فراهم می‌کند. این تکنیک می‌تواند مبتنی بر TaqMan PCR باشد که به یک جفت پرایمر و یک پروب الیگونوکلوئیدی با رنگ فلورسنت گزارشگر و یک خاموش کننده نیاز دارد. روش دیگر که در این مطالعه استفاده شده مبتنی بر SYBR Green می‌باشد. این رنگ به دورشته‌ی تازه سنتز شده DNA متصل می‌شود و فلورسانس ایجاد می‌کند. تکنیک PCR، امکان تشخیص و تولید مقادیر زیادی DNA را فراهم می‌کند. این تکنیک به طور گسترده توسط محققان برای انجام مطالعات کمی و ژنومی پیچیده استفاده می‌شود. به دلیل استفاده گسترده آن، بهینه کردن عوامل تأثیر گذار در بازده آن بسیار مهم است زیرا

از جمله عوامل محدود کننده‌ی تجزیه و تحلیل‌های صحیح، آلودگی‌های باقی مانده همراه نمونه‌ی DNA است (۱۱).

ترکیبات مورد استفاده در استخراج DNA ممکن است در فرآیندهای مهمی مانند PCR موجب اختلال شوند. این ترکیبات، که به عنوان بازدارنده‌های PCR شناخته می‌شوند، شامل بازدارنده‌های یونی، EDTA^۲، IgG^۳ و هموگلوبین هستند که تأثیرات مختلفی بر روی تکثیر DNA در PCR دارند (۱۲،۱۳). این ترکیبات می‌توانند با ایجاد اختلال در توالی‌های تکثیر یافته DNA هدف بر محاسبات طول تلومر نیز تأثیر بگذارند. برای ارزیابی دقیق تأثیر این ترکیبات باقی‌مانده بر عملکرد PCR، از تکنیک qPCR استفاده شد که این تکنیک قدرت تشخیص بالا و قابلیت تجزیه و تحلیل دقیق را داراست (۱۴). اکثر روش‌های تجزیه و تحلیل داده های PCR فرض را بر این می‌گیرند که راندمان PCR برای محصولات (آمپلیکون) مورد نظر ثابت یا حتی در مورد بعضی روش‌ها برابر با ۲ (درصد ۱۰۰) است. با این حال، رقیق‌سازی این نمونه باعث رقیق شدن آلودگی و کاهش اثر آن بر واکنش PCR می‌شود و در نتیجه راندمان PCR را با هر مرحله رقت‌سازی افزایش می‌دهد (۱۵). با توجه به اهمیت مطالعه بر روی تلومر در نمونه‌های خون منجمد، هدف از مطالعه حاضر مقایسه شش بافر مختلف لیز گلوبول قرمز در استخراج DNA با استفاده از داده‌های qPCR، منحنی استاندارد، بازده واکنش و ضریب تعیین عملکرد PCR بود.

مواد و روش کار

در این مطالعه تجربی، از شش بافر برای استخراج استفاده شد که مشخصات آن‌ها در جدول ۱ آمده است. تمام مواد شیمیایی مورد استفاده در این تحقیق، جز در موارد اشاره‌شده، از شرکت Merck آلمان تهیه شد. نمونه‌های خونی بررسی شده در این مطالعه در سال ۱۳۹۶ با اخذ رضایت آگاهانه از شرکت‌کنندگان تحت کد اخلاق IR-۹۵۷۶۶۷-NIMAD-REC-1396-032 در قالب طرح تحقیقاتی مصوب موسسه ملی توسعه تحقیقات علوم پزشکی ایران جمع‌آوری و در لوله‌های وکیومی CBC دارای EDTA در یخچال ۲۰°C- در مرکز تحقیقات سل و بیماری‌های ریه ذخیره شده بودند. در این مطالعه از نمونه‌های خون منجمد ۲۰ نفر از مردان سالم و غیرسیگاری استفاده شد.

جدول (۱): مشخصات و ترکیبات بافرهای مورد استفاده در استخراج DNA

بافر	ترکیبات بافرها ×	منابع
بافر ۱	۱۵۵ میلی‌مولار NH ₄ Cl، ۱۰ میلی‌مولار KHCO ₃ ، ۵ میلی‌مولار EDTA	(۱۶)
بافر ۲	۱۵۵ میلی‌مولار NH ₄ Cl، ۱۰ میلی‌مولار NaHCO ₃ ، ۵ میلی‌مولار EDTA	(۱۷)

³ Immunoglobulin G

¹ Cetyltrimethylammonium bromide

² Ethylenediaminetetraacetic acid

کارآمد است. در این مطالعه، از روش الکتروفورز ژل آگارز نیز استفاده شده است که در آن نمونه‌های DNA از طریق یک ماتریس ژل برای جداسازی آن‌ها بر اساس اندازه عبور می‌کنند. این روش می‌تواند ارزیابی کیفی یکپارچگی DNA را ارائه دهد و همچنین برای تخمین غلظت DNA با مقایسه شدت باندها با یک نردبان استاندارد مورد استفاده قرار گیرد.

کمیت و کیفیت DNA استخراج شده توسط نانودراپ مدل NanoDrop™ One/OneC Microvolume UV-Vis (ThermoFisher Scientific, USA) Spectrophotometer ارزیابی شد. نسبت‌های جذبی A_{260}/A_{280} و A_{260}/A_{230} مورد بررسی قرار گرفت. نسبت A_{260}/A_{280} بین $1/8$ و $1/9$ کیفیت خوبی برای DNA در نظر گرفته می‌شود. آلودگی‌های پروتئین و RNA با استفاده از نسبت جذب در 260 و 280 نانومتر تعیین شد. برای تعیین خلوص DNA، از نسبت A_{260}/A_{230} به عنوان معیار ثانویه استفاده شد و نسبت $2-2/2$ خالص در نظر گرفته شد ($21,22$). یکپارچگی gDNA با ژل الکتروفورز بررسی شد. 5 میکرولیتر gDNA استخراج شده، برای آماده سازی ژل الکتروفورز درصد 1 آگارز در 100 میلی لیتر بافر TBE ($10/8$ گرم Tris، $5/5$ گرم بوریک اسید و $0/93$ گرم EDTA) حل شده و سپس 1 میکرولیتر safe-stain به آن اضافه گردید. تانک دستگاه الکتروفورز حاوی بافر TBE بوده و پس از نیم ساعت برقراری جریان، کیفیت DNA با استفاده از نور UV بررسی شد.

مراحل انجام qPCR:

برای محاسبه طول تلوامر، انتخاب ژن مرجع 36B4 به عنوان فاکتور نرمال‌ساز در نتایج qPCR اهمیت دارد (23). غلظت DNA برای انجام qPCR از 15 ($ng/\mu L$) شروع شده و برای سه غلظت دیگر به ترتیب 10 برابر رقیق شده‌اند. برای هر واکنش حجم‌های DNA الگو، پرایمرهای (F) و (R) و مسترمیکس به ترتیب 1 ، 1 و 5 میکرومولار در نظر گرفته شد. تعداد سیکل، 35 ، حجم واکنش 10 میکرومولار و دما و زمان هر سیکل طبق برنامه زیر تنظیم شد:

شرایط چرخه‌ها برای 36B4:

۱۵ ثانیه در دمای ۹۵ درجه سانتیگراد برای denaturation
۳۰ ثانیه در ۶۰ درجه سانتیگراد برای annealing
۳۰ ثانیه در ۷۲ درجه سانتیگراد برای extension

۱۵ ثانیه در ۹۵ درجه سانتیگراد برای melt curve
شرایط چرخه‌ها برای تلوامر:
۱۵ ثانیه در دمای ۹۵ درجه سانتیگراد برای denaturation
۱۵ ثانیه در ۶۵ درجه سانتیگراد برای annealing
۱۵ ثانیه در ۷۲ درجه سانتیگراد برای extension
۱۵ ثانیه در ۹۵ درجه سانتیگراد برای melt curve

آنالیز آماری:

مقایسه‌ی داده‌های کمیت DNA و نسبت‌های جذبی با آنالیز One-way ANOVA و تست Tukey در نرم‌افزار GraphPad Prism v10 انجام گرفته است. برای هریک از بافرها معادله خط را در رگرسیون خطی درآورده و با استفاده از شیب خط میزان کارایی را برای هریک از بافرها حساب کردیم $Efficiency = 100 * (1 - 1/slope)$. جهت تعیین تکرارپذیری عملکرد بافر، درصد ضریب تغییرات (CV%) برای کمیت DNA تعیین گردید.

یافته‌ها

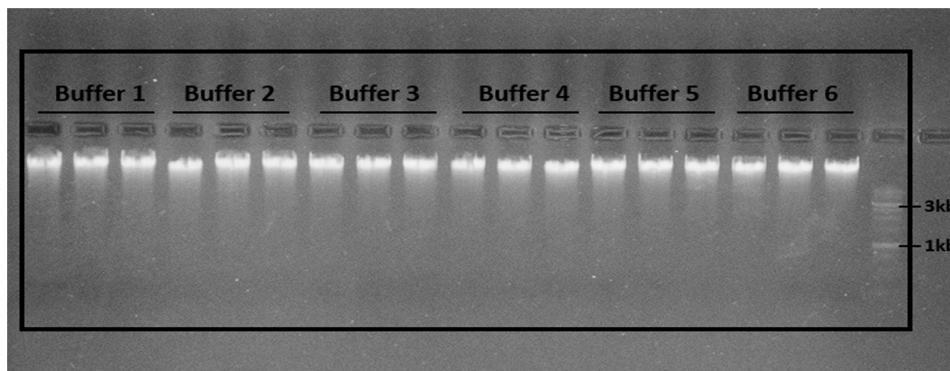
استخراج DNA از خون توسط ۶ بافر مختلف لیز RBC به همراه بافر CTAB در ۳ تکرار مورد استفاده قرار داده شد. در این مطالعه عملکرد هریک از بافرها در طول استخراج DNA توسط مقدار DNA استخراج شده، نسبت A_{260}/A_{280} ، A_{260}/A_{230} (جدول ۲) با استفاده از دستگاه نانودراپ و میزان کارایی (Efficiency) آن‌ها در qPCR (شکل ۳) مورد ارزیابی قرار گرفت. باتوجه به جدول ۲، در طی استخراج DNA بافر شماره ۶ بیشترین کمیت DNA ($361/01 ng/\mu L$) و CV ($71/22$ درصد) را در مقایسه با بافرهای لیز RBC داشته است. CV میزان تنوع در نتایج یک آزمون را نشان می‌دهد. ضریب تغییرات (CV) انحراف معیار تقسیم بر میانگین را به ما نشان می‌دهد که با درصد (CV%) بیان می‌شود $CV = (SD/Mean) * 100$. CV کمتر از ۳۰ درصد قابل قبول است ($24,25$). در این بین بافر شماره ۱ با $ng/\mu L$ $251/83$ و CV ($6/7$ درصد) بهترین عملکرد را از نظر تکرارپذیری داشته‌است. تمامی بافرها محدوده قابل قبولی از میانگین نسبت ($P=0/570$) و A_{260}/A_{280} ($P=0/356$) و A_{260}/A_{230} را از خود به جا گذاشته‌اند. در الکتروفورز ژل آگارز از gDNA های استخراج شده توسط بافرها هیچ‌گونه خردشدگی (smear) دیده نشد (شکل ۱).

جدول (۲): میانگین خلوص، کمیت DNA استخراج شده و ضریب تغییرات (CV%) توسط بافرهای مختلف

بافر	میانگین کمیت DNA ($ng/\mu L$)	ضریب تغییرات CV%	میانگین نسبت A_{260}/A_{280}	میانگین نسبت A_{260}/A_{230}
۱	۲۵۱/۸۳	۶/۷	۱/۸۶	۲/۲۰
۲	۲۳۷/۲۸	۲۰/۰۱	۱/۸۷	۲/۳۷
۳	۲۶۵/۲۲	۲۱/۳۲	۱/۸۷	۲/۳۴

مقایسه اثر چند بافر لیزکننده گلبول قرمز بر استخراج DNA ژنومی از نمونه‌های خون منجمد در سنجش طول تلومر به روش qPCR علیرضا هریسچی و همکاران

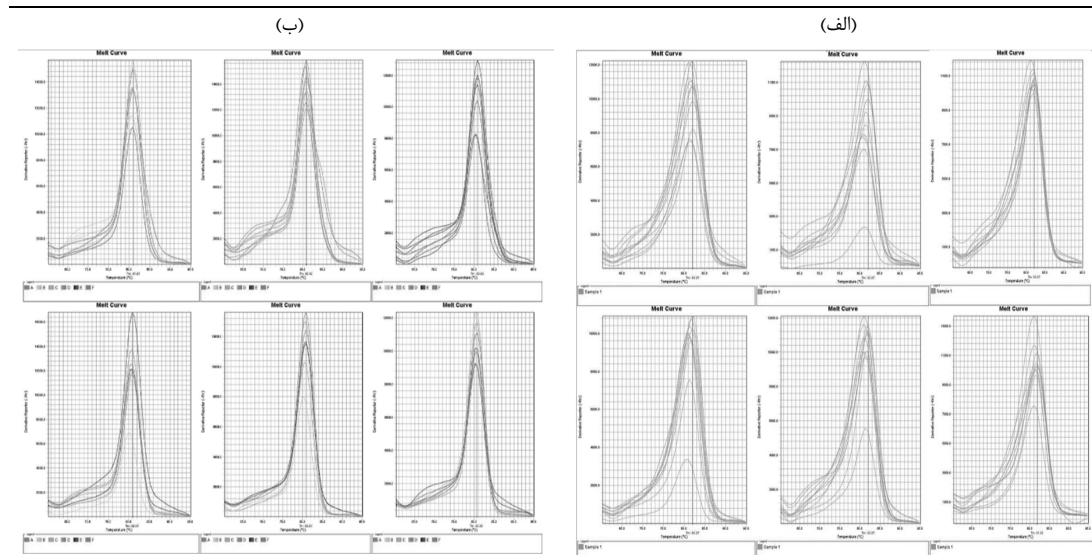
بافر	میانگین کمیت DNA (ng/μL)	ضریب تغییرات CV%	میانگین نسبت A ₂₆₀ /A ₂₈₀	میانگین نسبت A ₂₆₀ /A ₂₃₀
۴	۳۳۱/۱۸	۸/۵۴	۱/۸۷	۲/۳۳
۵	۳۲۶/۸۸	۲۶/۰۲	۱/۸۸	۲/۳۵
۶	۳۶۱/۰۱	۲۲/۷۱	۱/۸۷	۲/۲۶



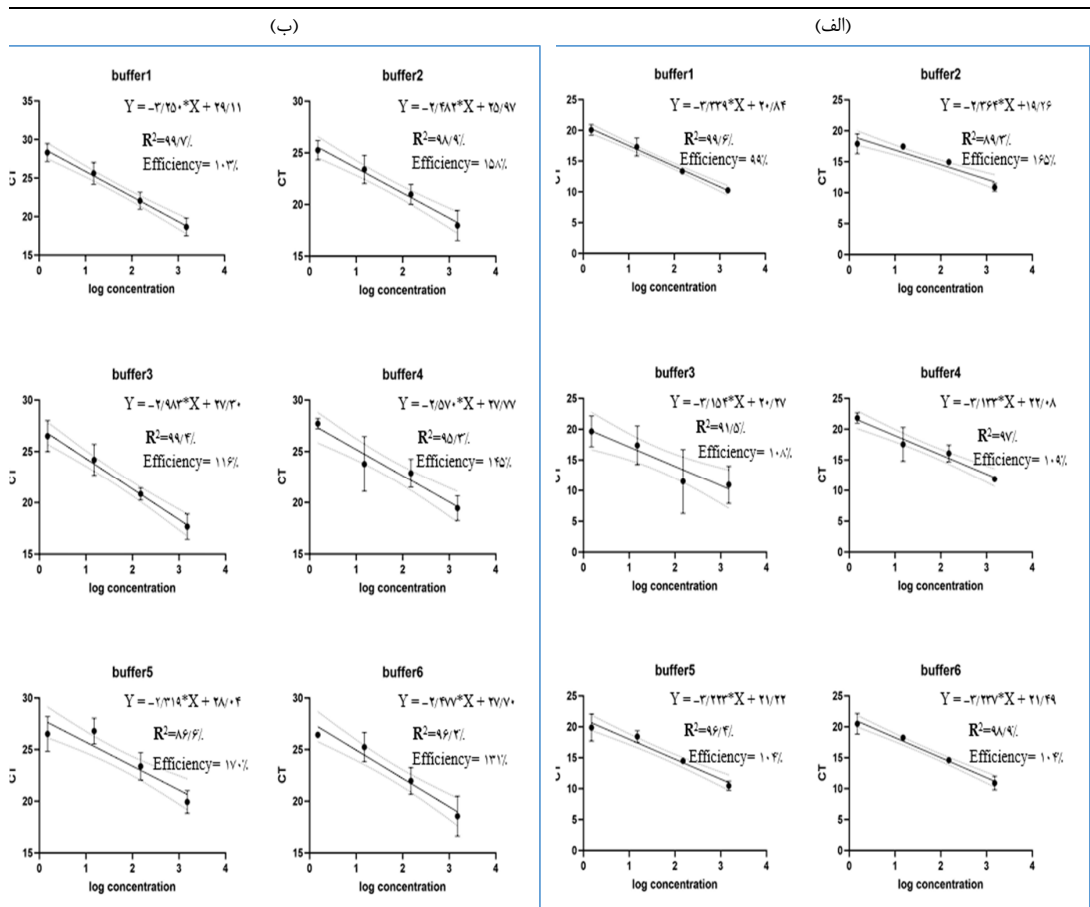
شکل (۱): الکتروفورز ژل gDNA استخراج شده از نمونه‌های خون منجمد با استفاده از روش CTAB بافر و بافرهای مختلف لیز RBC. پس از اعمال جریان الکتریکی، باندهای DNA در ژل به صورت کامل و بدون تجزیه قرار گرفتند و هیچ تجزیه‌ی قابل توجهی در باندهای DNA مشاهده نشد.

نظر و فقدان پرایمر دایمر تأیید گردید. محاسبه میزان کارایی PCR (Efficiency) برای تلومر و 36B4 cDNA با استفاده از آنالیز Simple linear regression در نرم‌افزار GraphPad Prism صورت گرفت (شکل ۳).

نمودار منحنی ذوب (Melting Curve) قبل از آنالیز داده‌ها برای هر کدام از پرایمرهای تلومر و 36B4 cDNA به دست آمد (شکل ۲) و با بررسی این منحنی‌ها صحت پیک مربوط به ژن مورد



شکل (۲): نمودار منحنی ذوب (Melting Curve) که (الف) مربوط به تلومر، (ب) مربوط به 36B4 cDNA می‌باشد. پس از انجام آزمایش PCR و شروع melt curve، نتایج نشان داد که پیک‌ها به صورت تک قله و بدون تداخل با یکدیگر برای هر دو پرایمر شکل گرفته‌اند. این نتایج نشان می‌دهد که پیک‌های melt curve به دقت و صحت مورد نیاز برای ارزیابی DNA و تغییرات فاز آن دست یافته‌اند و از این روش به عنوان یک ابزار مؤثر در تحلیل DNA استفاده شد.



شکل (۳): منحنی استاندارد به دست آمده با آنالیز رگرسیون خطی در نرم افزار GraphPad Prism برای هریک از بافرهای لیز RBC که (الف) مربوط به پرایمرهای تلومر و (ب) مربوط 36B4 cDNA می باشد. با استفاده از شیب خط میزان کارایی واکنش محاسبه شد که بافر شماره ۱ میزان کارایی و R^2 قابل قبولی داشته است.

DNA باشند. این نمونه‌ها معمولاً به عنوان یک منبع ارزشمند برای تحلیل‌های ژنتیکی و مولکولی مورد استفاده قرار می‌گیرند. از اهمیت استخراج DNA از این نمونه‌ها می‌توان به تحلیل‌های ژنتیکی مانند PCR، سیکوئنسینگ، ژنوتیپینگ و مطالعه واریانت‌های ژنتیکی، تحقیقات پزشکی مانند تشخیص بیماری‌های ژنتیکی، بررسی ارتباط بین ژنتیک و بیماری‌ها و پیش‌بینی بیماری اشاره کرد. نمونه‌های خون منجمد در مطالعات مربوط به طول تلومر به عنوان یک منبع برای تحقیق و بررسی برخی از بیماری‌ها قابل استفاده می‌باشد. بنابراین، نگهداری و استخراج DNA از نمونه‌های خونی منجمد ذخیره شده از اهمیت بالایی برخوردار است (۲۶-۲۹).

استفاده از نمونه‌های خون منجمد برای استخراج DNA دارای محدودیت‌ها و چالش‌های متعددی است. نمونه‌های خون منجمد ممکن است در طول زمان دچار تخریب شوند و منجر به شکستگی

بازدهی مقادیر واکنش بین ۹۰ تا ۱۱۰ درصد برای واکنش‌های qPCR قابل قبول در نظر گرفته می‌شود (۲۶). ضریب تعیین (R^2)، معیاری است که اطلاعاتی در مورد خوب بودن برازش یک مدل ارائه می‌دهد. در زمینه رگرسیون، این یک معیار آماری است که نشان می‌دهد خط رگرسیون چقدر به داده‌های واقعی تقریب می‌کند. بنابراین میزان کارایی qPCR با توجه به ضریب تعیین بالاتر معیار انتخاب بافر مناسب برای استخراج DNA می‌باشد. با توجه به شکل ۳، بافر شماره ۱ برای تلومر با R^2 (درصد ۹۹/۶) و Efficiency (۹۹ درصد) و برای 36B4 cDNA، R^2 (درصد ۹۹/۷) و Efficiency (۹۹ درصد) به ۱۰۰ (۱۰۳ درصد) بهترین عملکرد را در مقایسه با دیگر بافرها داشته است.

بحث و نتیجه گیری

نمونه‌های خونی منجمد ذخیره شده از اهمیت بالایی برخوردارند زیرا این نمونه‌ها می‌توانند منابع معتبری برای استخراج

در مولکول‌های DNA شود. این می‌تواند منجر به تولید کمتر DNA و کیفیت پایین DNA شود که می‌تواند بر کاربردهای پایین دستی مانند PCR و توالی‌یابی تأثیر بگذارد. نمونه‌های خون منجمد ممکن است حجم نمونه محدودی برای استخراج DNA داشته باشند، به خصوص اگر نمونه برای آنالیزهای متعدد تقسیم شده باشد. این می‌تواند چالشی را در به دست آوردن DNA کافی برای کاربردهای پایین دستی ایجاد کند (۲۷،۳۰).

در این مطالعه عملکرد ۶ بافر لیز RBC مختلف (جدول ۱) را از نظر خلوص و مقدار DNA با هم مقایسه کردیم و متوجه شدیم که بافر ۶ (۱۰ میلی‌مولار Tris-HCl pH ۷/۶، ۱۰ میلی‌مولار KCl) مقدار DNA بیشتر ولی ضریب تغییرات بزرگتر (CV%) و بافر ۱ (۱۰ میلی‌مولار Tris-HCl pH ۷/۶، ۱۰ میلی‌مولار KCl) ضریب تغییرات کمتری (CV%) را ایجاد کردند.

ترکیب شیمیایی مختلف بافرها مسئول تفاوت‌های مشاهده شده در عملکرد آنها است. تریس یک آمینو متان (هیدروکسی متیل) با فرمول مولکولی $(HOCH_2)_3CNH_2$ است که دارای سه الکل و یک گروه آمین با $pKa \approx 8$ است و در بافر مؤثر در pH ۷ تا pH ۹ عمل می‌کند. با تنظیم pH به ۸ و با استفاده از HCl، یک مخلوط از باز ضعیف و اسید مزدوجش به عنوان بافر تشکیل می‌شود که نفوذپذیری غشا را بیشتر می‌کند. این باعث گسیختگی غشای سلولی می‌شود، مواد سیتوپلاسمی آزاد می‌شوند، pH تغییر می‌کند و پایداری مولکول‌های زیستی مانند اسید نوکلئیک تحت تأثیر قرار می‌گیرند. بنابراین، بافر Tris-HCl در این شرایط، نقش حیاتی در حفظ pH محلول ایفا می‌کند (۳۱). تمام بافرهای این مطالعه، به جز بافرهای ۱ و ۲، حاوی Tris-HCl بودند (جدول ۱).

غشاهای RBC به طور مؤثری نسبت به NH_4Cl نفوذپذیر هستند و لیز سلولی به دلیل فشار اسمزی نامتعادل کلئیدهای آنها رخ می‌دهد (۳۲،۳۳). در میان تمام بافرهایی که ما آنالیز کردیم، بافرهای ۱ و ۲ حاوی NH_4Cl بودند که در کنار $KHCO_3$ و $NaHCO_3$ به ترتیب کار می‌کنند (جدول ۱). به دلیل انتشار NH_3 در سراسر غشاء، تبادل غشایی بین Cl و HCO_3 به دلیل مبدل Cl/HCO_3 روی گلبول‌های قرمز (و نه روی لکوسیت‌ها) اتفاق می‌افتد. علاوه بر این، K^+ از طریق کانال‌های پتاسیم وارد سلول می‌شود. این منجر به افزایش فشار اسمزی می‌شود تا زمانی که سلول‌ها از هجوم آب منفجر شوند (۳۴،۳۵).

گزارش شده است که ترکیب درجنت‌ها و نمک توانایی استخراج DNA را در سلول‌ها افزایش می‌دهد زیرا نمک‌هایی مانند KCl یک محیط هیپوتونیک ایجاد می‌کند که لیز سلولی را تقویت می‌کند (۳۶). بافر شماره ۱ دارای KCl است (جدول ۱).

EDTA یکی دیگر از مواد شیمیایی مهم در بافرهای لیز RBC است. در سلول، آنزیم‌هایی مانند DNase و RNase قادر به تجزیه DNA هستند. با افزودن EDTA به محلول استخراج DNA، یون‌هایی مانند Mg^{2+} و Ca^{2+} که کوفاکتورهای نوکلئازها می‌باشند را می‌توان شلات کرد و از آسیب رساندن آنزیم‌ها به DNA جلوگیری کرد. EDTA همچنین می‌تواند با جلوگیری از تشکیل گونه‌های فعال اکسیژن که می‌توانند به مولکول‌های DNA آسیب برسانند، به تثبیت DNA کمک کند. در نتیجه یکپارچگی DNA استخراج شده حفظ می‌شود. (۳۷،۳۸). بافرهای شماره ۳، ۲، ۱ و ۵ دارای EDTA می‌باشند (جدول ۱).

CTAB یک ماده شوینده کاتیونی است که دارای دم آگریز (گروه ستیل) و سر آبدوست (گروه‌تری متیل آمونیوم) است. این ساختار آمفی‌فیلیک به آن اجازه می‌دهد تا با دولایه لیپیدی غشاهای بیولوژیکی تعامل داشته باشد. دم آگریز CTAB خود را وارد دولایه لیپیدی غشای سلولی می‌کند و ساختار غشاء را مختل می‌کند. این اختلال توسط فعل و انفعالات آگریز بین دم‌های لیپیدی غشاء و گروه ستیل CTAB تسهیل می‌شود. سر مثبت‌تری متیل آمونیوم CTAB با اجزای دارای بار منفی غشای سلولی مانند فسفولیپیدها و پروتئین‌ها در تعامل است. این فعل و انفعالات الکترواستاتیکی باعث بی‌ثباتی بیشتر غشا می‌شود. همانند غشای سلولی، غشای هسته نیز از یک غشای دولایه لیپیدی تشکیل شده است. CTAB غشای هسته‌ای را از طریق مکانیسم‌های مشابه برهمکنش‌های آگریز و الکترواستاتیکی مختل می‌کند (۳۱،۳۹).

مطالعه نمونه‌های خون منجمد می‌تواند به عنوان منبعی برای بررسی‌های ژنتیکی و مولکولی مورد استفاده قرار گیرند و امکان تحلیل ژنوم و بررسی وجود بیماری‌ها را فراهم سازند (۴۰). بهینه‌سازی شرایط واکنش PCR می‌تواند بر ویژگی و کارایی این بررسی‌ها تأثیر بگذارد. از نظر تئوری میزان DNA در هر سیکل PCR دو برابر می‌شود و به همین دلیل از فرمول 2^n برای محاسبه میزان تکثیر DNA استفاده می‌شود و در بیشتر متدهای آنالیز داده‌های qPCR فرض می‌شود که کارایی آن ۲ (۱۰۰٪) Efficiency است اما در عمل این فرمول قابل استفاده نیست (۱۵). منحنی‌های استاندارد باید نشان دهنده برازش خطی قوی با مقادیر R^2 باشند. مقدار R^2 یک منحنی استاندارد تحت تأثیر دقت اندازه‌گیری‌های استاندارد Cq قرار می‌گیرد. مقادیر کمتر R^2 نشان می‌دهد که منابعی غیر از تعداد کپی مواد کنترلی نیز در تغییرات دخیل هستند (۴۱).

در مطالعه‌ای که توسط مارتین رویز و همکاران در سال ۲۰۱۵ انجام شد، نشان داده شد که عواملی همچون توالی پرایمر تلومر، غلظت پرایمرها، انتخاب ژن تک‌کپی، نوع مسترمیکس، شرایط

برنامه‌ریزی PCR و روش‌های تجزیه و تحلیل داده‌ها همگی می‌توانند بر نتایج سنجش تأثیرگذار باشند (۴۲). بررسی مطالعات مختلف، از جمله تحقیق بواردمن و همکاران در سال ۲۰۱۴ و مطالعه تولیس و همکاران در سال ۲۰۱۵، نشان می‌دهد که روش‌های استخراج DNA به ویژه در نمونه‌های خونی، از تأثیرگذارترین عوامل در سنجش طول تلومر به وسیله qPCR هستند. این مطالعات نشان داده‌اند که طول تلومر اندازه‌گیری‌شده با qPCR با استفاده از نمونه‌های DNA استخراج‌شده با کیت‌های مختلف نه تنها به‌طور سیستماتیک متفاوت است، بلکه همبستگی ضعیفی نیز دارد (۴۳،۴۴). بنابراین، تلاش برای بهینه‌سازی مراحل قبل و بعد از استخراج DNA جهت اندازه‌گیری تلومر همچنان از اهمیت بالایی برخوردار است و پژوهشگران در مطالعات مختلف به دنبال یافتن بهترین روش‌ها هستند. در این مطالعه، با ادغام شرایط بهینه تعریف‌شده در تحقیقات پیشین، از جمله مطالعه کاوتن در سال ۲۰۰۲ و مطالعه جوگلکار و همکاران در سال ۲۰۲۰ و همچنین نتایج تجربی به‌دست‌آمده از اثر بافرهای لیز مختلف در فرآیند qPCR، هدف ما دستیابی به یک روش میانگین است که بتواند نوسانات موجود در این فرآیند را به حداقل رسانده و تفاوت‌های نتایج آزمایشگاه‌های مختلف را کاهش دهد (۱۹،۴۵).

مهارکننده‌های PCR ممکن است با کاهش یا مسدود کردن فعالیت DNA پلیمراز یا با برهمکنش با اسیدهای نوکلئیک بر تکثیر اثر بگذارند و منجر به افزایش یا کاهش کارایی PCR شوند. DNA پلیمرازها نیازهای کوفاکتوری دارند که می‌تواند هدف مهار باشد. منیزیم یک کوفاکتور حیاتی است و عواملی که در دسترس بودن Mg^{2+} را کاهش می‌دهند یا با اتصال Mg^{2+} به DNA پلیمراز تداخل می‌کنند، می‌توانند PCR را مهار کنند. (۴۶). بعضی از مهارکننده‌ها می‌توانند با رنگ‌های فلورسنت مانند SYBR Green I، یا با انواع مختلف پروب‌های خاص توالی فلوروژنیک که در این واکنش‌های پیچیده استفاده می‌شوند، تداخل داشته باشند. مهارکننده‌ها می‌توانند در فرآیند استخراج DNA از نمونه‌ها وارد شده و خود به عنوان ماده‌ی مزاحم در واکنش PCR عمل کنند. به عنوان مثال، هموگلوبین و IgG از مهمترین مهارکننده‌های موجود در خون انسان هستند. (۴۷،۴۸). هر مولکول هموگلوبین حاوی چهار گروه هم است که حاوی آهن است و از این رو توانایی آزادسازی آهن دلیلی برای مهار PCR از طریق هموگلوبین و خون است (۴۷). در سال ۱۹۷۹، مشخص شد که بخش کوچکی از IgG به ssDNA متصل می‌شود (۴۹). برای کاهش اثرات مهارکننده‌های PCR، می‌توان از چندین استراتژی استفاده کرد. رقیق کردن نمونه DNA می‌تواند به کاهش غلظت بازدارنده‌های موجود کمک کند و به طور بالقوه تأثیر آنها را بر واکنش PCR به حداقل برساند. استفاده از کیت‌ها یا روش‌های

تصفیه DNA می‌تواند به حذف آلاینده‌ها و بازدارنده‌ها از نمونه DNA کمک کند و کیفیت الگوی PCR را بهبود بخشد. تنظیم شرایط PCR مانند دمای بازپخت، غلظت Mg^{2+} و طراحی پرایمر می‌تواند به غلبه بر اثرات بازدارنده آلاینده‌ها کمک کند. گنجاندن کنترل‌های مثبت و منفی در واکنش‌های PCR می‌تواند به شناسایی و عیب‌یابی مسائل مربوط به مهارکننده‌های PCR کمک کند. با اجرای این استراتژی‌ها، محققان می‌توانند تأثیر مهارکننده‌های PCR را به حداقل برسانند و کارایی و قابلیت اطمینان واکنش‌های PCR خود را بهبود بخشند (۵۰).

در این مطالعه برای هریک از DNA های استخراجی توسط بافرهای لیز RBC، PCR برای پرایمرهای تلومر و 36B4 cDNA گذاشته شد و همچنین میزان کارایی PCR به همراه R^2 تعیین گردید. با توجه به نتایج بدست آمده، بافر شماره ۱ با R^2 بیشتر و Efficiency نزدیک به ۱۰۰ برای پرایمرهای تلومر و 36B4 cDNA به ترتیب (Efficiency=۹۹٪، $R^2=۹۹/۶٪$)، (Efficiency=۱۰۳٪، $R^2=۹۹/۷٪$) بهترین عملکرد را در مقایسه با دیگر بافرها داشت. با توجه به این نتایج می‌توان گفت بافر لیز با ترکیب ۱۵۵ میلی‌مولار NH_4Cl ، ۱۰ میلی‌مولار $KHCO_3$ ، ۵ میلی‌مولار EDTA توانایی حذف مهارکننده‌های PCR بیشتری در مقایسه با سایر بافرهای لیز RBC داشته است و همچنین مقدار R^2 بزرگ‌تر نشان دهنده برازش خطی قوی از نمونه‌های PCR در منحنی استاندارد می‌باشد. در نتیجه بافر لیز با ترکیب ۱۵۵ میلی‌مولار NH_4Cl ، ۱۰ میلی‌مولار $KHCO_3$ ، ۵ میلی‌مولار EDTA برای محاسبه طول تلومر از DNA های استخراج شده از خون منجمد در مطالعات آینده که همراه با یک ژن مرجع خواهد بود بسیار مناسب می‌باشد. همچنین، کاربردهای بالینی این نتایج می‌تواند شامل توسعه روش‌های پیشبینی برای خطر ابتلا به بیماری‌ها، طراحی درمان‌های جدید، و ارتقاء استراتژی‌های پیشگیری از بیماری‌ها باشد. در نهایت، این مطالعه می‌تواند به درک عمیق‌تری از نقش تلومرها در بیماری‌ها و پیری کمک کند و به توسعه نرم‌افزارها و روش‌های جدید علمی و بالینی منجر شود. با توجه به محدودیت‌های مطالعه ما درخصوص کم بودن تنوع بافرهای لیز گلوبول قرمز برای استخراج DNA از نمونه‌های خون منجمد و تعداد کم نمونه‌های خون منجمد در دسترس، مطالعات بیشتر با جامعه آماری بیشتر برای تثبیت نتایج توصیه می‌شود.

تشکر و قدردانی

این گزارش به عنوان بخشی از پایان‌نامه کارشناسی ارشد علیرضا هریسچی، دانشجوی دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و

تحقیقات تهران منتشر شد. از اعضای محترم مرکز تحقیقات سل و بیماری های ریه دانشگاه علوم پزشکی تبریز قدردانی می گردد.

حمایت مالی تحقیق:

اعلام نشده است.

تضاد منافع:

نویسندگان اعلام می دارند که در این مطالعه تضاد منافع وجود

ندارد.

ملاحظات اخلاقی

این مطالعه با اخذ رضایت آگاهانه از شرکت کنندگان تحت کد اخلاقی IR-NIMAD-REC-1396-032 در قالب طرح تحقیقاتی ۹۵۷۶۶۷ مصوب موسسه ملی توسعه تحقیقات علوم پزشکی ایران انجام شده است.

References:

1. Lingner J, Cooper JP, Cech TR. Telomerase and DNA end replication: no longer a lagging strand problem? Science;1995;269(5230):1533-4. DOI: 10.1126/SCIENCE.7545310
2. Cech TR. Beginning to Understand the End of the Chromosome. Modern Biopharmaceuticals: Design, Development and Optimization. John Wiley & Sons, Ltd; 2008;1:36-48. DOI: 10.1002/9783527620982.CH1
3. Shamas MA. Telomeres, lifestyle, cancer, and aging. Curr Opin Clin Nutr Metab Care. NIH Public Access; 2011;14(1):28. DOI: 10.1097/MCO.0B013E32834121B1
4. Zhang W, Song M, Qu J, Liu G-H. Epigenetic Modifications in Cardiovascular Aging and Diseases. Circ Res 2018;123(7):773-86. DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.118.312497
5. Bekaert S, De Meyer T, Rietzschel ER, De Buyzere ML, De Bacquer D, Langlois M, et al. Telomere length and cardiovascular risk factors in a middle-aged population free of overt cardiovascular disease. Aging Cell 2007;6(5):639-47. DOI: 10.1111/j.1474-9726.2007.00321.x
6. Carpi FM, Di Pietro F, Vincenzetti S, Mignini F, Napolioni V. Human DNA extraction methods: patents and applications. Recent Pat DNA Gene Seq. Recent Pat DNA Gene Seq 2011;5(1):1-7. DOI: 10.2174/187221511794839264
7. Di Pietro F, Ortenzi F, Tilio M, Concetti F, Napolioni V. 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
8. Seeker LA, Holland R, Underwood S, Fairlie J, Psifidi A, Ilska JJ, et al. Method Specific Calibration Corrects for DNA Extraction Method Effects on Relative Telomere Length Measurements by Quantitative PCR. PLoS One 2016;11(10):164046. DOI: 10.1371/JOURNAL.PONE.0164046
9. Clarke JD. Cetyltrimethyl Ammonium Bromide (CTAB) DNA Miniprep for Plant DNA Isolation. Cold Spring Harb Protoc 2009;2009(3):pdb.prot5177. DOI: 10.1101/pdb.prot5177
10. Chacon-Cortes D, Haupt LM, Lea RA, Griffiths LR. Comparison of genomic DNA extraction techniques from whole blood samples: a time, cost and quality evaluation study. Mol Biol Rep 2012;39(5):5961-6. DOI: 10.1007/s11033-011-1408-8
11. Bustin SA, Benes V, Garson JA, Hellemans J, Huggett J, Kubista M, et al. The MIQE Guidelines: Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments. Clin Chem 2009;55(4):611-22. DOI: 10.1373/clinchem.2008.112797
12. Sidstedt M, Hedman J, Romsos EL, Waitara L, Wadsö L, Steffen CR, et al. Inhibition mechanisms of hemoglobin, immunoglobulin G, and whole blood in digital and real-time PCR. Anal Bioanal Chem 2018;410(10):2569-83. DOI: 10.1007/s00216-018-0931-z
13. Akane A, Matsubara K, Nakamura H, Takahashi S, Kimura K. Identification of the Heme Compound Copurified with Deoxyribonucleic Acid (DNA) from Bloodstains, a Major Inhibitor of Polymerase Chain

- Reaction (PCR) Amplification. *J Forensic Sci* 1994;39(2):362–72. DOI: 10.1520/JFS13607J
- 14 .Maddocks S, Jenkins R. Understanding PCR : a practical bench-top guide 2017 [cited 2024 Mar 19]. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B978012802683000006X>
 - 15 .Ramakers C, Ruijter JM, Lekanne Deprez RH, Moorman AFM. Assumption-free analysis of quantitative real-time polymerase chain reaction (PCR) data. *Neurosci Lett*. Elsevier Ireland Ltd; 2003;339(1):62–6. DOI: 10.1016/S0304-3940(02)01423-4
 - 16 .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
 - 17 .Qamar W, Khan MR, Arafah A. Optimization of conditions to extract high quality DNA for PCR analysis from whole blood using SDS-proteinase K method. *Saudi J Biol Sci* 2017;24(7):1465–9. DOI: 10.1016/j.sjbs.2016.09.016
 - 18 .Song Y, Fahs A, Feldman C, Shah S, Gu Y, Wang Y, et al. A reliable and effective method of DNA isolation from old human blood paper cards. *Springerplus*. Springer; 2013;2(1):1–7. DOI: 10.1186/2193-1801-2-616
 - 19 .Joglekar M V., Satoor SN, Wong WKM, Cheng F, Ma RCW, Hardikar AA. An Optimised Step-by-Step Protocol for Measuring Relative Telomere Length. *Methods Protoc* 2020;3(2):27. DOI: 10.3390/mps3020027
 - 20 .Thilagavathi J, Mishra SS, Kumar M, Vemprala K, Deka D, Dhadwal V, et al. Analysis of telomere length in couples experiencing idiopathic recurrent pregnancy loss. *J Assist Reprod Genet Springer*; 2013;30(6):793. DOI: 10.1007/S10815-013-9993-1
 - 21 .JA G. Validity of nucleic acid purities monitored by 260nm/280nm absorbance ratios. *Biotechniques* 1995 [cited 2024 Feb 5];62–3. Available from: <https://europepmc.org/article/med/7702855>
 - 22 .Liu P, Avramova L, Park C. Revisiting absorbance at 230 nm as a protein unfolding probe. *Anal Biochem* 2009 [cited 2024 Feb 5]; Available from: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0003269709001894?casa_token=NHGOkCUTQFWA AAAA:BY9csLSg7pNQb0pxGLlmWF14SczETZM FlcGg_hLYTYyM-FOKSYJhZJPkCRsaLtezjUUU_cTFBA
 - 23 .O'Callaghan NJ, Fenech M. A quantitative PCR method for measuring absolute telomere length. *Biol Proced Online* 2011;13(1):3. DOI: 10.1186/1480-9222-13-3
 - 24 .Shechtman O. The Coefficient of Variation as an Index of Measurement Reliability. Springer, Berlin, Heidelberg; 2013;39–49. DOI: 10.1007/978-3-642-37131-8_4
 - 25 .Aronhime S, Calcagno C, Jajamovich GH, Dyvorne HA, Robson P, Dieterich D, et al. DCE-MRI of the Liver: Effect of Linear and Nonlinear Conversions on Hepatic Perfusion Quantification and Reproducibility. *J Magn Reson Imaging*. V C 2013 Wiley Periodicals, Inc; 2014;40:90–8. DOI: 10.1002/jmri.24341
 - 26 .Zhou L, Lei Q, Guo J, Gao Y, Shi J, Yu H, et al. Long-term whole blood DNA preservation by cost-efficient cryosilicification. *Nat Commun* 2022;13(1):6265. DOI: 10.1038/s41467-022-33759-y
 - 27 .Madisen L, Hoar DI, Holroyd CD, Crisp M, Hodes ME. DNA banking: the effects of storage of blood and isolated DNA on the integrity of DNA. *Am J Med Genet* 1987;27(2):379–90. DOI: 10.1002/AJMG.1320270216
 - 28 .Di Pietro F, Ortenzi F, Tilio M, Concetti F, Napolioni V. 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. Mol Cell Probes 2011;25(1):44–8. DOI: 10.1016/J.MCP.2010.10.003
- 29 .Dahm R. Friedrich Miescher and the discovery of DNA. Dev Biol Academic Press; 2005;278(2):274–88. DOI: 10.1016/J.YDBIO.2004.11.028
- 30 .Møller P, Bankoglu EE, Stopper H, Giovannelli L, Ladeira C, Koppen G, et al. Collection and storage of human white blood cells for analysis of DNA damage and repair activity using the comet assay in molecular epidemiology studies. Mutagenesis 2021;36(3):193–212. DOI: 10.1093/mutage/geab012
- 31 .Heikrujam J, Kishor R, Mazumder PB, Heikrujam J, Kishor R, Mazumder PB. The Chemistry Behind Plant DNA Isolation Protocols. Biochem Anal Tools;2020:131–42. DOI: 10.5772/INTECHOPEN.92206
- 32 .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
- 33 .Phillips WA, Hosking CS, Shelton MJ. Effect of ammonium chloride treatment on human polymorphonuclear leucocyte iodination. J Clin Pathol 1983;36(7):808. DOI: 10.1136/JCP.36.7.808
- 34 .Kleiner D. The transport of NH₃ and HN₄⁺ across biological membranes. Biochim Biophys Acta 1981;639(1):41–52. DOI: 10.1016/0304-4173(81)90004-5
- 35 .Bonar PT, Casey JR. Channels Plasma Membrane Cl⁻/HCO₃⁻-exchangers: Structure, mechanism and physiology. Channels 2008;337(5):337–45. DOI: 10.4161/chan.2.5.6899
- 36 .Raven PH, RFE and SE. Raven: Biology of plants - Google Scholar Macmillan; 2005 [cited 2023 Dec 5]. Available from: https://scholar.google.com/scholar_lookup?title=Biology&author=PH+Raven&author=GB+Johnson&publication_year=2002&
- 37 .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. Biochem Genet 1993;31(7–8):321–8. DOI: 10.1007/BF02401826
- 38 .Nasrollahzadehsabet M, Esmeilzadeh E, Shirmohammady N, Heidari MF. The Effect of EDTA Buffer and Temperature on DNA Extraction from Teeth for Molecular Forensic Assessment. Ann Milit Health Sci Res 2021;19(2). DOI: 10.5812/amh.113043
- 39 .Schenk JJ, Becklund LE, Carey SJ, Fabre PP. What is the “modified” CTAB protocol? Characterizing modifications to the CTAB DNA extraction protocol. Appl Plant Sci 2023;11(3). DOI: 10.1002/APS3.11517
- 40 .Huang LH, Lin PH, Tsai KW, Wang LJ, Huang YH, Kuo HC, et al. The effects of storage temperature and duration of blood samples on DNA and RNA qualities. PLoS One 2017;12(9). DOI: 10.1371/JOURNAL.PONE.0184692
- 41 .Bustin SA, editor. AZ of quantitative PCR. La Jolla, CA: International University Line; 2004. Available from: <https://fivephoton.com/pdfs/A-Z%20Quantitative%20PCR,%20ISBN%20%200-9636817-8-8,%20Item%20QPCR-1.pdf>
- 42 .Martin-Ruiz CM, Baird D, Roger L, Boukamp P, Krunic D, Cawthon R, et al. Reproducibility of Telomere Length Assessment - An International Collaborative Study. Int J Epidemiol 2015;44(5):1749–54. DOI: 10.1093/ije/dyv171
- 43 .Cunningham JM, Johnson RA, Litzelman K, Skinner HG, Seo S, Engelman CD, et al. Telomere length varies by DNA extraction method: Implications for epidemiologic research. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev 2013;22(11):2047–54. DOI: 10.1158/1055-9965.EPI-13-0409

- 44 .Tolios A, Teupser D, Holdt LM. Preanalytical Conditions and DNA Isolation Methods Affect Telomere Length Quantification in Whole Blood. *PLoS One* 2015;10(12):e0143889. DOI: 10.1371/JOURNAL.PONE.0143889
- 45 .Cawthon RM. Telomere measurement by quantitative PCR. *Nucleic Acids Res* 2002;30(10):47e-47. DOI: 10.1093/nar/30.10.e47
- 46 .Wilson IG. Inhibition and facilitation of nucleic acid amplification. *Appl Environ Microbiol* 1997;63(10):3741. DOI: 10.1128/AEM.63.10.3741-3751.1997
- 47 .Al-Soud WA, Rådström P. Purification and Characterization of PCR-Inhibitory Components in Blood Cells. *J Clin Microbiol* 2001;39(2):485. DOI: 10.1128/JCM.39.2.485-493.2001
- 48 .Al-Soud WA, Jönsson LJ, Rådström P. Identification and characterization of immunoglobulin G in blood as a major inhibitor of diagnostic PCR. *J Clin Microbiol* 2000;38(1):345-50. DOI: 10.1128/JCM.38.1.345-350.2000
- 49 .Rubin RL, Carr RI. Anti-DNA Activity of IgG F(ab')₂ from Normal Human Serum. *J Immunol* 1979;122(4):1604-7. Available from: <https://journals.aai.org/jimmunol/article-abstract/122/4/1604/10845>
50. Rådström P, Löfström C, Lövenklev M, Knutsson R, Wolffs P. Strategies for Overcoming PCR Inhibition. *Cold Spring Harb Protoc* 2008;2008(3):pdb.top20. DOI: 10.1101/pdb.top20

COMPARATIVE STUDY ON THE EFFECTS OF SEVERAL ERYTHROCYTE LYSING BUFFERS ON THE EXTRACTION OF GENOMIC DNA FROM FROZEN BLOOD SAMPLES IN EVALUATION OF TELOMERE LENGTH BY QPCR METHOD

Alireza Herischi¹, Maryam Ghobeh², Jafar Soleymani^{*3}

Received: 11 June, 2024; Accepted: 27 July, 2024

Abstract

Background & Aim: Studying telomere length is very important for understanding the aging process and disease prevention. The aim of this study was to study the effects of several erythrocyte lysing buffers on the extraction of genomic DNA from frozen blood samples in evaluation of telomere length by qPCR method.

Materials & Methods: In this experimental study, six different erythrocyte lysis buffers along with CTAB extraction buffer were used for DNA extraction. The quantity and purity of the extracted DNA were assessed through absorbance measurements at $A_{260/280}$ and $A_{260/230}$ ratios. DNA integrity was evaluated using agarose gel electrophoresis. The consistency of buffer performance was analyzed using the coefficient of variance (CV%) for DNA quantity. Also, the efficiency of PCR was reported by checking the cycle threshold (Ct) in qPCR for each sample using the linear regression equation and coefficient of determination (R^2) in GraphPad Prism v10 software. Differences were considered significant at the $p > 0.05$ level.

Results: The lysis buffer with the combination of 10 mM Tris-HCl pH 7.6 and 10 mM KCl resulted in the extraction of the highest amount of DNA (361.01 ng/ μ L). The results of the gel did not show any fragmentation of DNA in the samples. Absorption ratios did not show much difference between buffers. DNA extracted using a lysis buffer containing 155 mM NH_4Cl , 10 mM KHCO_3 , 5 mM EDTA showed lower variance in DNA quantity (CV = 7.6%) and better PCR efficiency (Efficiency = 103%, R^2 = 99.7%) for 36B4 and (Efficiency = 99%, R^2 = 99.6%) for telomeres compared to other buffers.

Conclusion: The lysis buffer containing 155 mM NH_4Cl , 10 mM KHCO_3 , and 5 mM EDTA had the most effective performance in extracting DNA from frozen blood samples for telomere study. This buffer with its optimal performance can be used in trials after the final result by further studies.

Keywords: DNA Extraction, Frozen Blood, PCR Efficiency, Red Blood Cell Lysing Buffer, Telomere Length

Address: Pharmaceutical Analysis Research Center, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran

Tel: +989148660544

Email: jsoleymanii@gmail.com

SOURCE: STUD MED SCI 2024; 35(4): 286 ISSN: 2717-008X

This is an open-access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution-noncommercial 4.0 International License](https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/) which permits copy and redistribute the material just in noncommercial usages, as long as the original work is properly cited.

¹ MSc Student in Biochemistry, Department of Cognitive Sciences, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

² Assistant Professor of Biochemistry, Department of Cognitive Sciences, Science and Research branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

³ Assistant Professor of Pharmaceutical Biomaterials, Pharmaceutical Analysis Research Center, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran.