

راهنمای جمع آوری، انتقال، آماده سازی و نگهداری نمونه ها برای آزمایش های مولکولی

این راهنما به منظور ارائه اطلاعات علمی و فنی لازم در ارتباط با نمونه هایی که برای آزمایش های مولکولی تهیه شده است، این مجموعه ترجمه پروتکل MM13-A بوده که در کمیته ویروس شناسی و بیولوژی مولکولی مورد بررسی و تأیید قرار گرفته است.

مترجمین به ترتیب حروف الفبا:

دکتر مسعود حاجیا عضو هیئت علمی آزمایشگاه مرجع سلامت
دکتر نادر شاهرخي عضو هیئت علمی انیستیتوپاستور- بخش بیولوژی مولکولی
دکتر فرزانه صباحي عضو هیئت علمی دانشگاه تربیت مدرس – دانشکده پزشکی
دکتر سید علیرضا ناجي عضو هیئت علمی دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی – پژوهشکده سل و بیماریهای ریوی

اعضاء کمیته ویروس شناسی و بیولوژی مولکولی به ترتیب حروف الفبا عبارتند از:
دکتر صفیه امینی عضو هیئت علمی انیستیتوپاستور- بخش هپاتیت و ایدز
دکتر مسعود حاجیا عضو هیئت علمی آزمایشگاه مرجع سلامت
دکتر سیامک میراب سمیعی عضو هیئت علمی معاونت دارو و غذا و آزمایشگاه مرجع سلامت
دکتر نادر شاهرخي عضو هیئت علمی انیستیتوپاستور- بخش بیولوژی مولکولی
دکتر فرزانه صباحي عضو هیئت علمی دانشگاه تربیت مدرس – دانشکده پزشکی
دکتر طلعت مختاری آزاد عضو هیئت علمی دانشگاه علوم پزشکی تهران دانشکده بهداشت
دکتر سید علی رضا ناجي عضو هیئت علمی دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی – پژوهشکده سل و بیماریهای ریوی

ویراستار علمی: دکتر زهرا شریفی عضو هیئت علمی سازمان انتقال خون
ویراستار ادبی: مهناز صارمی کارشناس اداره تضمین کیفیت

۱- مدیریت نمونه

فرآیند مدیریت نمونه بیماران نقش اساسی در دقت و صحت جوابهای آزمایش های ملکولی عوامل بیماریزا ایفا می نماید. رعایت دستورالعمل های ایمنی زیستی در همه مراحل جمع آوری و تیمار نمونه الزامی است. مراحل جمع آوری، نگهداری و انتقال نمونه های بالینی با توجه به نوع نمونه باید مطابق با استانداردهای آزمایشگاهی انجام پذیرد. عدم مدیریت صحیح نمونه های بالینی می تواند موجب تجزیه مواد ژنتیکی عوامل بیماریزا و دریافت جوابهای غیر قابل اعتماد گردد.

نشانه گذاری و جمع آوری نمونه:

در تمام مراحل مدیریت نمونه، اطلاعات خصوصی بیمار باید محفوظ باقی بماند ولی اطلاعات کافی برای اعضا تیم پزشکی معالجه جهت انجام تستهای مهم و در نهایت درمان بیمار ارائه گردد. نمونه هایی که برای آزمایش های ملکولی ارائه می گردند باید دارای برچسب حاوی اطلاعات زیر باشند:

- شماره شناسایی
- تاریخ جمع آوری
- زمان جمع آوری
- نام مسئول جمع آوری کننده نمونه (به طور دلخواه)
- نوع نمونه (در صورتی که نمونه بافت باشد نوع بافت ارسالی می باید مشخص شود)

اطلاعاتی که در فرم درخواست آزمایش گنجانده می گردد عبارتند از:

- شماره شناسایی اختصاصی
- نام بیمار
- تاریخ تولد
- تاریخ جمع آوری نمونه
- جنس (مخصوصاً برای آزمایش های ژنتیکی)
- نژاد/قوم (بستگی به نوع تست)
- نوع نمونه (خون، مایع آمنیوتیک و غیره)
- اطلاعات بالینی و آزمایشگاهی کمک کننده به تشخیص بهتر
- نام پزشک معالج
- محل یا بخش جمع آوری کننده نمونه
- اطلاعات مربوط به بیمه و حسابداری (در صورت نیاز)

توجه: در بعضی موارد، اطلاعات دیگری مورد نیاز است. مثلاً در خصوص آزمایش های ژنتیکی، اگر در صورت روشن بودن درخواست یک آزمایش خاص برای مدیر آزمایشگاه، وی می تواند نظر خود را در مورد منطقی بودن درخواست موردنظر با توجه به سن و وضعیت بیمار ابراز نماید. در بعضی آزمایش های ژنتیکی مانند Linkage analysis، اطلاعات شجره نامه ای نیز مورد نیاز می باشد.

۲- جمع آوری نمونه

در تمام مراحل کار با نمونه های بالینی باید از دستکش استفاده گردد. دستکش از انتقال پاتوژنهای خطرناک و قابل انتقال از راه خون (blood-borne) به کادر آزمایشگاه و همچنین آلوده شدن احتمالی نمونه ها با سلولهای فرد آزمایش کننده جلوگیری می کند. تمام موارد ایمنی زیستی باید رعایت گردد.

آزمایش های اختصاصی ممکن است دستورالعمل های اختصاصی خود را داشته باشند که از آن جمله می توان نمونه برداری از سرویکس برای انجام تست ویروس پاپیلومای انسانی (HPV) را نام برد.

معرفی تمام موارد و مواد مداخله گر در این نوشتار نمی گنجد. مسئولین آزمایشگاه باید پزشکان و سایر افراد تیم پزشکی از جمله افراد شاغل در آزمایشگاه را از این عوامل مداخله گر و یا آلوده کننده آگاه سازند و در صورت لزوم اطلاعات را بصورت ارائه کارگاه یا تهیه به روشهای اختصاصی در اختیار کاربران قرار دهند.

هر نمونه ای که وارد آزمایشگاه بالینی می گردد باید بلافاصله در سیستم اطلاع رسانی/ کامپیوتر بیمارستان یا آزمایشگاه ثبت شود. کادر آزمایشگاه باید حداکثر سعی خود در استفاده از نمونه ها و

اطلاع رسانی به موقع و درست را به عمل آورند ولی در موارد زیر، نمونه‌ها غیرقابل قبول می‌باشند
نظیر: خون همولیز شده، خون فریز شده و نمونه‌هایی که به درستی نشانه گذاری نشده‌اند.
توجه: در صورتی که نمونه از محلی خاص اخذ شده و امکان نمونه‌گیری مجدد وجود نداشته باشد،
مانند نمونه‌های بیوپسی و بافت‌های خاص، با صلاحیت پزشک معالج و دستور مدیر آزمایشگاه،
موضوع قابل بررسی است.
در هر آزمایشگاه، برای هر تست باید شرایط رد کردن نمونه، در کتاب راهنمای آزمایشگاه نوشته
شده و در دسترس کادر آزمایشگاه باشد.

۲-۱- ملزومات نمونه‌گیری از بافت

از نمونه‌های بافت در موارد زیر استفاده می‌شود:

(الف) نمونه سلول‌های خون و سلول‌های حفره دهانی^۱ در دسترس نباشند (مثلاً در صورت مرگ بیمار)
(ب) زمانیکه سلول‌های بافت و سلول‌های خون یا دهانی دارای ژنوتیپ متفاوت از بافت مورد آزمایش
باشند. (مثلاً موتاسیون سوماتیک در بیماری‌های نئوپلاستیک یا موزائیکسم)
(ج) زمانیکه بافت تنها منبع شناسایی اسید نوکلئیک عوامل عفونی بالقوه است.
مقدار مناسب بافت معمولاً بین ۱ تا ۲ گرم است. اما مقدار مناسب به طبیعت بافت وابسته می
باشد زیرا مقدار وزنی RNA و DNA شدیداً از بافتی به بافت دیگر متغیر است. بافت‌های پر سلول
مثل مغز استخوان، غده لنفاوی و طحال منابع مناسب تهیه ژنوم بوده و ممکن است به بافت کمتری
احتیاج باشد. اگرچه باید در نظر داشت غده لنفاوی پائین دست یک تومور اولیه، ممکن است محتوی
تعداد کمی از سلول توموری باشند که اینچنین در آزمایش‌های میکروسکوپی از تک برش بافت
قابل شناسایی نباشند. نمونه‌های کم سلول مثل بافت‌های عضله، فیبری و چربی منبع مناسبی
جهت تهیه DNA ژنومیک نبوده و ممکن است به بیش از ۱ تا ۲ گرم بافت احتیاج باشد. اما به طور
کلی در صورت عدم وجود گستره‌ای از نفوذ چربی در منابع بافتی، از هر مقدار بافت که بیش از ۱۵
میلی گرم وزن داشته باشد، بیش از ۱۰ میکرو گرم RNA یا DNA بدست می‌آید.
به علت مقادیر متفاوت و نوع پروتئین‌های موجود در منابع بافتی، دستورالعمل‌های استخراج
اسیدنوکلئیک نیز اختصاصی بافت هستند. در این زمینه باید به توصیه‌های کمپانی سازنده کیت
تجاری خالص سازی RNA و DNA جهت بافت به خصوص توجه شود.
نمونه بافت‌های بزرگ (بیش از ۱ تا ۲ گرم) و بافت بیوپسی توسط پزشکان و جراحان جهت تشخیص
های پاتولوژیک به روش‌های میکروسکوپ نوری، الکترونی و یا ایمونوفلورسنس گرفته می‌شود. اگر
RNA و DNA از نمونه بافتی بزرگ یا بیوپسی استخراج می‌شود، تمهیدات لازم جهت خشک نشدن
بافت باید صورت پذیرد. بافت باید در پارچه تطیف یا کاغذ استریل خیس‌انده شده در نرمال سالین
استریل بسته بندی شود.

معمولاً پاتولوژیست برش‌هایی از نمونه‌های بافتی بزرگ یا از بافت بیوپسی را جهت فیکس کردن،
مطالعه میکروسکوپی بعد از رنگ آمیزی و تشخیص پاتولوژیک تهیه می‌کند. همچنین از این برش‌ها
جهت استخراج RNA و DNA در تشخیص ملکولی نیز استفاده می‌شود. نمونه‌های بافتی مورد نظر
در تهیه رده سلولی و یا بازیابی زیست ملکولها (RNA ، DNA و پروتئین) کاربرد دارد.

پایداری RNA و DNA در نمونه بافتی بسته به نوع بافت متغیر می‌باشد. عموماً نگره داری بافت در
دمای ۲۲ تا ۲۵ درجه سانتیگراد توصیه نمی‌شود. جهت اخذ نتایج مطلوب، بافت باید سریعاً در
نیترोजن مایع منجمد شده و یا در مواد نگره دارنده مناسب نوکلئیک اسید قراردادده شود. چنانچه این
تدابیر میسر نباشد، نمونه بافت باید سریعاً بر روی یخ مرطوب قراردادده شود و جهت حفاظت بهتر
اسید نوکلئیک به خصوص RNA، متعاقباً بر روی یخ به آزمایشگاه ارسال گردد. بافت‌های کوچک در
پارچه تطیف استریل آغشته به نرمال سالین استریل بسته بندی شود تا از خشک شدن بافت

^۱ Bucal Cell

جلوگیری گردد. معمولاً نمونه بافت جهت بررسی های آسیب شناسی توسط پاتولوژیست ها مورد بررسی قرار می گیرند. چنانچه نمونه برای بررسی RNA و DNA پذیرش می شود جهت جلوگیری از تخریب اسیدنوکلئیک، باید بافت سریعاً در محلول های مناسب تثبیت کننده قرار داده شود. اما قابل ذکر است که اکثر محلول های تثبیت کننده موجود به اندازه فیکساتورهای مرسوم بررسی بافت شناسی یا ایمنوشیمی بافت مؤثر نمی باشند.

باید یادآور شد به علت بیهوشی مورد نیاز در هنگام عملیات جراحی و نبود تکنولوژی های استاندارد ثبات سازی اسیدنوکلئیک، ممکن است بافت دچار کمبود اکسیژن شده که به نوبه خود موجب تغییر در سطح بیان بسیاری از ژنها می شود. کمبود اکسیژن طولانی مدت، pH بافت را به طور موضعی کاهش داده و باعث کاهش حاصل و مقدار اسیدنوکلئیک خواهد شد.

۲-۲-۱- نمونه های پرناال^۲

این نمونه ها شامل نمونه های CVS^۳، سلول های CVS کشت داده شده، مایع آمنیوتیک، سلول های کشت داده شده از مایع آمنیوتیک و هرگونه نمونه سلولی جدا شده از جنین قبل از زایمان می باشد. این نمونه ها جهت پیش بینی ژنوتیپ و فنوتیپ جنین قبل از زایمان و اقدامات مداخله گرایانه بالینی و یا جراحی مورد استفاده قرار می گیرد. نمونه خون مادر باید به همراه این نمونه ها ارسال گردد تا بررسی های لازم در خصوص عدم مخلوط شدن میزان قابل ملاحظه ای از سلول ها و یا DNA مادر با نمونه جنینی انجام پذیرد. نگهداری یک کشت سلولی تا زمان اتمام آزمایشها ضروری است و از گرفتن نمونه مجدد حتی المقدور باید پرهیز گردد.

مایع آمنیوتیک را از هفته ۱۵ حاملگی بدون کشت دادن و به طور مستقیم می توان بررسی نمود. میزان استاندارد مایع آمنیوتیک مورد نیاز حداقل ۱۰ میلی لیتر است.

نمونه های CVS را باید قبل از ارسال و انجام آزمایش، تمیز و عاری از بافت های مادری (خصوصاً بافت endometrial decidual) نمود. میزان استاندارد نمونه CVS حداقل ۱۵ میلی گرم بعد از برداشت بافت های مادری است. نمونه CVS را باید در محیط کشت یا سالین استریل در دمای اتاق به آزمایشگاه فرستاد. سلول های کشت داده شده از مایع آمنیوتیک یا نمونه های CVS را باید در دو فلاسک پلاستیکی مخصوص کشت سلول که دارای ۷۵ درصد لایه سلولی زنده باشد و با محیط کشت پر شده اند (جهت اجتناب از کنده شدن لایه سلولی) ارسال نمود.

برای بررسی عدم وجود بافت های مادری، نمونه CVS باید توسط میکروسکوپ به دقت بررسی گردد. در صورت یکدست بودن نمونه باید آنرا همان روز آزمایش نمود و در صورت آلوده بودن به بافت های مادری، آنها را جدا و بعد آزمایش کرد. اگر نمونه را نتوان در روز دریافت، بررسی کرد، باید در دمای ۲ تا ۸ درجه سانتی گراد تا زمان استخراج DNA در روز بعد نگهداری نمود.

DNA موجود در مایع آمنیوتیک را باید در همان روز دریافت استخراج نمود، در غیر این صورت نمونه باید در دمای ۲ تا ۸ درجه سانتی گراد تا زمان استخراج DNA نگهداری شود.

کشت CVS یا مایع آمنیوتیک، باید برای بررسی وضعیت مناسب سلول ها توسط میکروسکوپ معکوس^۴ بررسی شوند. در صورتیکه این گونه کشتها را نتوان در فاصله زمانی ۲ ساعت بعد از دریافت آزمایش نمود، آنها را باید در دمای ۲ تا ۸ درجه سانتی گراد نگهداری کرد. بطور کلی، حداقل ۷۵ درصد فلاسک کشت باید از سلول پوشیده شده باشد. در غیر این صورت، با صلاح دید مدیر آزمایشگاه، کشت سلول را می توان تا رسیدن به این حد رشد سلولی در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی گراد نگهداری نمود و سپس آزمایش های ملکولی را به انجام رسانید. در مورد نمونه های مناسب، آزمایش در همان روز دریافت نمونه باید انجام پذیرد.

^۲ Prenatal

^۳ Chorionic Villus Sampling

^۴ Inverted Microscope

۲-۲-۲- سوابهای دهانه رحمی و مجاری ادراری

نمونه های مجاری ادراری مردان با استفاده از سوابهای حاوی سر پلی استر (Polyester tipped) با دسته استیل ضد زنگ یا دسته پلاستیکی انعطاف پذیر گرفته می شوند. نمونه های واژینال و اندوسرویکس با سوابهای حاوی سر پلی استر یا رایون (Rayon) گرفته و در محیط انتقالی مناسب قرارداده می شوند. نمونه جهت آزمایش HPV باید با استفاده از سوابهای توصیه شده توسط کمپانی سازنده کیت آزمایش گرفته شده و جهت انتقال به آزمایشگاه در مجموعه اختصاص یافته یا توصیه شده توسط سازنده کیت ارسال شوند.

۲-۳- انتقال و نگهداری نمونه ها برای انجام آزمایش های مولکولی

به طور عمومی، آزمایشگاه ها موظف به رعایت دستورالعمل های شرکت های تولید کننده مواد و کیت های آزمایشگاهی مصرفی خود برای جمع آوری و انتقال نمونه جهت انجام تست های مولکولی می باشند. در عین حال سایر مقررات و ضوابط قانونی نیز باید رعایت گردند. راهنمای انتقال و نگهداری نمونه ها باید توسط آزمایشگاه ها در اختیار افرادی که مسئول جمع آوری و انتقال نمونه ها هستند و همچنین اشخاصی که نمونه ها را انتقال می دهند، قرار گیرد.

در مورد هر نمونه باید موارد زیر نیز توسط پرسنل آزمایشگاه بررسی و ثبت گردند:

- ۱- تاریخ و زمان جمع آوری
- ۲- تاریخ ارسال نمونه
- ۳- تاریخ دریافت نمونه
- ۴- دمای تقریبی نمونه در زمان دریافت توسط آزمایشگاه

در ضمن، تجربیات هر آزمایشگاهی در زمینه آزمایش های مولکولی نیز بسیار با اهمیت می باشد.

یکی از موارد مهم برای رسیدن به جواب دقیق و صحیح، نحوه نگهداری نمونه های خونی و سایر نمونه ها است. در زمان انتقال و یا نگهداری، نمونه نباید در معرض شرایطی قرار گیرد که باعث تجزیه اسیدهای نوکلئیک می گردند. شرایط نگهداری بسته به نوع نمونه، آنالیت (DNA یا RNA) و یا میکروارگانیسم مورد بررسی متفاوت است. اصول انتقال و نگهداری صحیح باید توسط شرکت تولیدکننده و یا در صورتیکه آزمایش در آزمایشگاه راه اندازی شده باشد (home brewed)، توسط آزمایشگاه تعیین گردد.

RNA، شدیداً به تجزیه حساس است و تشخیص آن از DNA دشوارتر می باشد. به علاوه، افزایش میزان نسخه برداری از بعضی ژنها در طی فرآیند نمونه گیری، می تواند باعث تشخیص خطای میزان بالایی mRNA این ژنها گردد. این موضوع مخصوصاً در زمان آنالیز بیان کمی ژنها در نمونه های بافتی یا خون باید مدنظر قرار گیرد.

۲-۴- دستورالعمل های کلی انتقال نمونه

قوانین: ضوابط و قوانین چگونگی بسته بندی و ارسال نمونه های بالینی از کشوری به کشور دیگر متفاوت می باشند. اما در سایتهای اینترنتی زیر اطلاعات لازم در این مورد وجود دارد:

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

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

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

به دلیل وقایعی که در برخی از کشورها در هنگام انتقال نمونه بیمار رخ داده است می توان از اشعه جهت استریل نمودن نمونه استفاده نمود. اما از آنجا که تحقیقات اندکی در مورد اثرات اشعه گاما برای استریل کردن نمونه ها بر روی نتایج تست های مولکولی در دسترس می باشد، این موضوع در حال حاضر نیاز به تحقیقات بیشتری دارد.

۲-۴-۱- دستورالعمل های کلی برای نگهداری DNA خالص شده

نمونه‌های DNA خالص شده را باید در زیر درجه یخ زدن آب نگاهداری نمود تا توانایی تجزیه کنندگی DNase هرچه کمتر باشد. DNA خالص شده باید در لوله‌های پلاستیکی دارای درب واشردار قرار گیرد تا از تبخیر نمونه جلوگیری شود. مطالعات نشان داده است که لوله‌های پلی پروپیلین باعث جذب DNA می شوند. جذب DNA توسط جداره لوله‌های پلی اتیلن حتی شدیدتر از لوله‌های پلی پروپیلینی است. لوله‌های پلی آلومری و بعضی از انواع اختصاصی لوله‌های پلی پروپیلین برای نگهداری DNA، مناسب معرفی شده‌اند.

DNA خالص شده را می توان در بافر TE (Tris-EDTA) در دمای اتاق به مدت ۲۶ هفته، در دمای ۲ تا ۸ درجه سانتی گراد برای حداقل یک سال (در صورت عاری بودن محیط از DNase) و تا ۷ سال در دمای ۲۰- درجه سانتی گراد و حداقل برای ۷ سال در ۷۰- درجه سانتی گراد یا دمای پایین تر نگهداری نمود. نمونه‌هایی را که میزان خلوص آنها مورد سؤال است را باید در دمای ۲۰- درجه سانتی گراد یا پایین تر برای حفظ ثبات DNA نگهداری کرد. از فریزرهای بدون برفک "frost-free" نباید برای نگهداری DNA استفاده کرد چون تغییرات متناوب دمایی در آنها سبب آسیب رساندن به DNA می گردد.

۲-۴-۲- دستورالعمل های کلی برای مطالعات بر روی RNA

تخریب RNA و القاء بیان بعضی ژنها بعد از جمع آوری نمونه خونی و حتی نمونه‌های بافت و مایعات بدن انجام می پذیرد. در نتیجه توصیه شده است که اینگونه نمونه‌ها بطور مستقیم درون ویالهای حاوی مواد پایدارکننده RNA ریخته شوند. نمونه‌های بافت را می توان به سرعت به نیتروژن مایع نیز انتقال داد. نمونه‌های فریز شده را باید روی یخ خشک انتقال داد. به دلیل فعالیت بعضی ریبونوکلازها (RNases) در دمای ۲۰- درجه سانتی گراد RNA را باید در ۷۰- درجه سانتی گراد یا پایین تر نگهداری کرد.

۲-۴-۳- دستورالعمل نمونه گیری، انتقال و نگهداری نمونه‌های خاص

درستی و قابل اعتماد بودن نتایج تستهای ملکولی بستگی به عوامل مختلفی مانند نمونه گیری، انتقال و نگهداری دارد. اینها شامل روشهای جمع آوری نمونه، ماهیت و محل اسید نوکلئیک هدف (RNA یا DNA)، ژنوم میزبان یا اسید نوکلئیک های عامل عفونی)، و نوع تست مورد استفاده دارد. اگر هدف از انجام آزمایش، شناسایی اسید نوکلئیک های یک عامل پاتوژن باشد، چرخه زندگی عامل عفونی و نوع سلول هایی که توسط آن مورد حمله قرار می گیرند در تصمیم گیری در خصوص نوع نمونه، طریقه نمونه گیری و تیمار آن اثرگذار می باشد. دستورالعمل ها و بحثهایی که در زیر در مورد انواع نمونه‌ها ذکر گردیده، به طور عمومی تدوین شده است، در نتیجه متغیرهای آنالیتیکی و بالینی و ویژگی آزمایشی که قرار است انجام گیرد، حتماً باید در کنار این دستورالعمل ها در نظر گرفته شوند. در ضمن چون آنچه در کتابچه راهنمای کیت‌های مختلف آزمایشگاهی نیز آورده شده برای شرایط خاص می باشد، لازم است هر آزمایشگاهی، تجربیاتی را که در طی استفاده از این آزمایش ها بدست آورده مدنظر قرار داده، موارد و نکته‌های ضروری، در کتاب راهنمای آزمایشگاه مربوطه ثبت و درج گردند. در زیر، چگونگی مدیریت انواع مختلف نمونه‌ها برای تستهای مختلف اسید نوکلئیک / ملکولی شرح داده شده است.

۲-۴-۳- نمونه‌های خون کامل، سرم و پلاسما

ماده ضد انعقاد EDTA برای جمع آوری خون تام و جداسازی پلاسما جهت انجام آزمایش های ملکولی توصیه می گردد. اما به دلیل احتمال تأثیر آن در مراحل بعدی، دستورالعمل همراه کیت یا کتاب راهنمای آزمایشگاه باید رعایت گردد. اگر از تیوبهای حاوی EDTA (بدون ژل جداکننده) استفاده شود، تیوبهای حاوی نمونه‌های خون جهت تشخیص ویروس‌های RNA دار مانند HIV و HCV، باید در

فاصله ۴ ساعت بعد از خونگیری سانتریفیوژ گردند و پلاسماي جدا شده در لوله‌هاي ديگر نگهداري شود. در صورتي كه از لوله‌هاي حاوي ژل جداکننده استفاده گردد^۵، پلاسما براي حداكثر ۵ روز در دماي ۲ تا ۸ درجه سانتي گراد و در موارد طولاني‌تر در صورت فریز کردن در ۲۰- يا ۷۰- درجه سانتي گراد يا پايين تر قابل استفاده است. نمونه‌هاي خوني كه قرار است براي DNA مورد بررسي قرار گيرند، مي توان تا ۲۴ ساعت در دماي اتاق و تا ۷۲ ساعت در دماي ۲ تا ۸ درجه سانتي گراد نگهداري نمود.

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

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

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

نمونه‌هاي پلاسما را نبايد در فریزرهاي بدون برفک^۶، فریز نمود. در انواع گوناگوني از اين فریزرها، دما در طول مدت شبانه روز چندین بار تغيير مي نمايد و اين امر موجب تخریب اسيدهاي نوکلئيك هدف مي گردد. در اين زمينه، بطور اختصاصي بايد به آزمایش اندازه گيري مقادير کمي ويروس^۷ براي HIV و HCV اشاره نمود كه بسيار متأثر از چگونگي نگهداري نمونه است.

استاندارد کردن روشهاي جمع آوري و تهیه نمونه‌هاي خوني در هر آزمایشگاه و استفاده از يك روش برتر در حين بررسي تیتري ويروسي به طور درازمدت در اين بيماران از اهميت ويژه‌اي برخوردار مي باشد. در نهايت، به دليل گزارشهاي مبني بر اثرات ممانعت کنندگي ماده ضد انعقاد و هپارين و "heme"، استفاده از مواد ضد انعقاد EDTA يا (ACD) Dextrose Citrate براي انجام آزمایش هاي ملکولي در خون، توصيه مي گردد.

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

اين نمونه‌ها فقط براي آناليز DNA کاربرد دارند. نمونه‌هاي حاوي خون خشک شده^۸ يا DBS را بعد از خشک کردن کامل بايد در ظروفي قرارداد كه اجازه ورود رطوبت را ندهد و حاوي مواد ضد رطوبت يا انديکاتورهاي نشان دهنده ميزان رطوبت باشد.

براي جلوگیری از آغشته شدن چند نمونه، بايد توسط پوشاندن DBS بوسیله کاغذهای مخصوص اندازه گيري وزن آزمایشگاهی (glassine)، لامل يا قراردادن آنها به طوري كه از ارتباط آنها با يکديگر جلوگیری به عمل آيد، از تماس آنها جلوگیری نمود. DBS معمولا در دماي اتاق انتقال مي يابد. نمونه‌هايي كه به اين صورت بر روي کاغذ فيلتر جمع آوري شده‌اند، براي حداقل ۱۹ ماه بعد، جهت آناليز DNA و انجام PCR مناسب تشخيص داده شده‌اند.

۲-۲-۵- شستشوي برونکوالونولار^۹

^۵ با توجه به عدم گزارش هايي كه مورد پذيرش بين المللي باشد هر آزمایشگاه موظف است اثرات فریز کردن نمونه در تيوبهاي حاوي ژل جدا کننده و چرخه‌هاي فریز کردن و ذوب کردن^۵ نمونه را در نتايج آزمایشهاي مولکولي كه اعلام مي نمايد را تعيين کند.

⁶ Frost-free

⁷ Viral load

⁸ Dried Blood Spots

⁹ Bronchoalveolar Lavage (BAL)

نمونه های شستشوی برونش باید طبق دستورکار سازنده دستگاه و یا دستورالعمل آزمایشی که انجام می شود تهیه شده و تقسیم شوند. نمونه ها باید طی ۲۴ ساعت بعد از جمع آوری به آزمایشگاه منتقل شده و مورد آزمایش قرارگیرند. نمونه هایی که انجام آزمایش در طی این مدت امکان پذیر نیست باید تا انجام آزمایش یا در شرایط یخچالی یعنی ۲ تا ۸ درجه سانتیگراد (تا حداکثر مدت ۷۲ ساعت)، و یا بصورت منجمد در دمای -۷۰ درجه سانتیگراد یا دمای پایین تر نگهداری شوند. نمونه های مربوط به میکوباکتریوم باید قبل از منجمد شدن یا نگهداری طولانی مدت، آلودگی زدایی شوند.

۲-۲-۶- نمونه آسپیره مغز استخوان

DNA: مغز استخوان در سرنگهای حاوی EDTA کشیده می شود (نباید از هپارین استفاده گردد). پرسنل آزمایشگاه باید بلافاصله بعد از دریافت نمونه مغز استخوان مطلع شده و آماده انجام آزمایش گردند. برای استخراج نمونه های مغز استخوان قبل از پردازش می توان برای مدت کوتاهی در دمای ۲ تا ۸ درجه سانتی گراد نگهداری نمود، اما پردازش این نمونه تا مرحله لیز سلولی باید در عرض ۷۲ ساعت بعد از جمع آوری انجام پذیرد. چنانچه احتیاج به نگهداری طولانی مدت باشد، پس از حذف اریتروسیت ها نمونه مغز استخوان را می توان برای ماهها در ۲۰- درجه سانتیگراد نگهداری نمود. در کل فریز کردن نمونه های دارای خون حاوی EDTA از جمله خون تام، مغز استخوان و یا بیوپسی آن قبل از لیز کردن سلولهای قرمز توصیه نمی شود. در صورت حضور سلولهای قرمز، فریز و ذوب کردن مجدد این نمونه ها موجب آزاد شدن 'Heme' می گردد که برای انجام آزمایش های PCR ممانعت کننده شناخته شده ای به شمار می رود.

RNA-۲-۲-۷

برای بررسی RNA در نمونه های مغز استخوان، علاوه بر رعایت موارد بالا، باید نمونه بلافاصله در مایع ثابت کننده RNA قرارداده شود. در غیر این صورت، باید آسپیره مغز استخوان را بلافاصله بر روی یخ به آزمایشگاه انتقال داد و در فاصله زمانی یک تا ۴ ساعت RNA را استخراج نمود و نمی توان آن را قبل از حذف اریتروسیت فریز کرد.

۲-۲-۸- سلولهای حفره دهانی (Buccal Cells)

هر دو DNA و RNA را می توان از سلولهای حفره دهانی استخراج کرد. از نمونه های حاصل از شستشوی دهان نیز بطور معمول به عنوان منبع سلولهای دهانی استفاده می کنند. جهت محافظت از RNA در سلولهای دهانی و نمونه های شستشوی دهان باید از یکی از عوامل پایدارساز RNA استفاده کرد. چنانچه سلولهای دهانی در برنامه آزمایش DNA قرار دارند می توان با سواب مناسب نمونه را برداشته و بصورت خشک در درجه حرارت محیط به آزمایشگاه منتقل نمود. نمونه های شستشوی دهان که در برنامه آزمایش DNA قرار دارند را نیز می توان در دمای محیط به آزمایشگاه منتقل کرد که در دمای اتاق تا حدود ۱ هفته پایدار می مانند. نمونه بزاق را که در برنامه آزمایش RNA قرار دارند باید در یک ماده پایدارساز RNA مناسب جمع آوری نموده و به آزمایشگاه انتقال داد.

۲-۲-۹- نمونه Buffy Coat

برای آزمایش های بررسی DNA، اگر نمی توان در عرض سه روز بعد از جمع آوری نمونه، اسید نوکلئیک را از خون استخراج کرد، Buffy Coat را جدا نموده و در دمای ۷۰- درجه سانتی گراد یا پایین تر تا انجام آزمایش DNA نگهداری نمود^{۱۰}.

RNA باید در عرض یک تا چهار ساعت بعد از جمع آوری نمونه استخراج گردد. در غیر این صورت، سلولها را می توان در محلول حاوی ماده پایدار کننده RNA قرارداد و تا قبل از جداسازی RNA در دمای اتاق نگهداری نمود. در بیمارانی که دچار eosinophilia هستند، سطوح بالای ریونوکلئاز اندوژن می تواند در نمونه های Buffy coat مشکل آفرین باشد.

۲-۲-۱۰- نمونه های مایع مغزی- نخاعی (CSF)

DNA-۲-۲-۱۰-۱

CSF باید در دمای ۲ تا ۸ درجه سانتی گراد به آزمایشگاه انتقال یابد. اگر نمونه را نتوان بلافاصله بررسی نمود، برای بررسی حضور ویروس های DNA دار مانند VZV و EBV و CMV و HSV، باید آن را در دمای ۲۰- تا ۷۰- درجه سانتی گراد یا پایین تر قرارداد.

RNA-۲-۲-۱۰-۲

برای بررسی حضور ویروس های RNA دار مانند انتروویروس ها باید نمونه های CSF را بلافاصله سرد نمود و در فاصله یک تا چهار ساعت RNA را استخراج کرد. در غیر این صورت، بعد از جدا کردن گلبول های قرمز، نمونه های فریز شده CSF را می توان بر روی یخ خشک به آزمایشگاه ارسال نمود.

۲-۲-۱۱- نمونه سلول های کشت داده شده (Cultured cells)

ادامه نگهداری این سلولها در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد تا هنگام استخراج DNA یا RNA توصیه می گردد. در غیر این صورت، بعضی از انواع سلولها مانند، آمینوسیتها و لنفوبلاستها را می توان در حجم مناسب از محیط کشت سلولی و در دمای اتاق به آزمایشگاه انتقال داد. بعضی از انواع دیگر سلولها مانند سوسپانسیون های کندروسیت های انسانی، ممکن است به نگهداری و انتقال در شرایط یخچالی نیاز داشته باشند. دستورالعمل های نحوه پایدار کردن DNA و یا RNA در مورد این نمونه ها باید رعایت گردد.

۲-۲-۱۲- نمونه آسپیره با استفاده از سر سوزن نازک (FNA^{۱۱})

برای استخراج DNA مطابق دستورالعمل آسپیره مغز استخوان عمل می شود (به بخش ۳۱-۴-۶ مراجعه شود). جهت مطالعه RNA، RNA را باید بلافاصله خنک کرده یا در محلول پایدارکننده RNA قرار دهیم. اگر نمونه، حاوی گلبول قرمز باشد عملیات پاکسازی گلبول قرمز قبل از اضافه کردن محلول پایدار کننده RNA باید صورت پذیرد.

استخراج RNA از نمونه های خنک شده باید ظرف مدت ۲ تا ۴ ساعت پس از نمونه برداری انجام شود. چنانچه در این حالت نمونه حاوی گلبول قرمز است باید قبل از منجمد کردن نمونه، گلبول قرمز از نمونه حذف شود. نمونه های منجمد حدود ۲ تا ۴ هفته پایدار می مانند. در صورت استفاده از محلول های تجاری پایدار کننده RNA به دستورالعمل های کمپانی سازنده باید توجه شود.

۲-۲-۱۳- بافت

DNA: برای استخراج DNA، بافت را باید سریعاً خنک کرده و بر روی یخ مرطوب به آزمایشگاه منتقل کرد. در آزمایشگاه بافت را می توان ۲۴ ساعت در ۲ تا ۸ درجه سانتیگراد پیش از شروع عملیات آماده سازی نگه داری کرد. همچنین می توان بافت را به سرعت در مکان نمونه برداری در نیتروژن

^{۱۰} نمونه های Buffy Coat که برای نامیرا کردن (immortalization) با ویروس اپشتن- بار (EBV) مورد استفاده قرار می گیرند باید به صورت فریز شده و بر روی یخ خشک به آزمایشگاه انتقال یابند

^{۱۱} Fine Needle Aspirate

مایع منجمد کرد. نمونه هائی که در برنامه بررسی های ملکولی inSitu مثل FISH قرار دارند باید در محیط مناسب برش یا OCT^{۱۲} قرارداد و در وضعیت منجمد تا پردازش آتی نگهداری نمود.

عموماً DNA در بافت تا ۲۴ ساعت در دمای ۲ تا ۸ درجه سانتیگراد، حداقل ۲ هفته در ۲۰- درجه سانتیگراد و برای مدت حداقل ۲ سال در ۷۰- درجه سانتیگراد یا دمای پائین تر پایداری می ماند. اگر بخواهیم استخراج DNA بلافاصله پس از دریافت نمونه بافت تازه صورت پذیرد، باید فرد مسئول را آگاه ساخت تا هنگام رسیدن نمونه عملیات استخراج را سریعاً شروع کند. بافتهای جامد خصوصاً بافت توموری، منبع غنی از اندونوکلاز می باشند. چنانچه امکان شروع عملیات استخراج وجود ندارد باید بافت را در ۷۰- درجه سانتیگراد یا دمای پائین تر تا زمان انجام عملیات آزمایشگاهی نگهداری کرد. نمونه بافت تازه جهت انجام استخراج DNA در آینده، باید به سرعت منجمد شود. بافت خونی ابتدا قبل از منجمد کردن باید با نرمال سالین استریل شسته شود. جهت اخذ نتایج مطلوب، بافت را در نیتروژن مایع و یا در حمام ایزوپنتین در ۷۰- درجه سانتیگراد به سرعت منجمد می کنند. برای نگه داری طولانی مدت، دمای ۷۰- درجه سانتیگراد یا پائین تر توصیه می شود. نمونه بافت نباید در فریزرهای "بدون برفک" نگهداری شوند، زیرا برنامه دوره ای دمائی دستگاه جهت آب کردن برفک موجب تخریب اسیدنوکلئیک می شود.

عملیات آماده سازی نمونه های بافت تازه که در محیط کشت RPMI^{۱۳} ارسال می شوند باید سریعاً شروع شود. اگر نمونه بافتی تنها جهت بررسی اسیدنوکلئیک می باشد، باید بر روی یخ به آزمایشگاه منتقل شود. چنانچه نمونه بافت تازه علاوه بر آزمایش های ملکولی جهت بررسی های سیتوژنتیک و فلوسایتومتری ارسال شده است، جهت زنده نگه داشتن سلول انتقال آن در دمای محیط صورت می پذیرد.

RNA-۲-۲-۱۲

چنانچه استخراج RNA از نمونه بافتی مورد نظر است، باید نمونه ها را قبل از ذخیره سازی در محلول پایدارساز قراردادده و در ۷۰- درجه سانتیگراد یا پائین تر، به سرعت منجمد نمود و یا حداکثر در مدت کمتر از ۱ ساعت بعد از نمونه برداری، باید عملیات استخراج RNA شروع شود.

RNA پس از انجماد فوری بافت حداقل به مدت ۲ سال در ۷۰- درجه سانتیگراد یا دمای پائین تر پایدار می ماند. دمای ۷۰- درجه سانتیگراد یا پائین تر، دمای ترجیحی نگهداری نمونه های محتوی RNA می باشد. نمونه های منجمدی که در برنامه بررسی ملکولی inSitu (مثل FISH) قرار دارند باید در محیط OCT قراردادده شده و تا شروع عملیات آتی بصورت منجمد نگهداری شوند. نمونه های بافتی که توسط نیتروژن مایع به سرعت منجمد شده اند باید بر روی یخ خشک ارسال شده و در ۷۰- درجه سانتیگراد یا دمای پائین تر تا زمان استخراج RNA نگهداری شوند. نمونه های منجمد نباید قبل از استخراج از حالت منجمد درآیند، بلکه باید مستقیماً در بافر گوانیدینوم ایزوتیوسیانات^{۱۴} یا سایر محیط های مناسب استخراج هموژنیزه شوند. چنانچه انجماد یا پایداری سازی فوری بافت امکان پذیر نمی باشد، استخراج RNA باید ظرف مدت ۴ ساعت (ترجیحاً ۱ ساعت) بعد از نمونه گیری صورت پذیرد. بهترین شرایط نگهداری RNA خالص شده در دمای ۷۰- درجه سانتیگراد یا پائین تر می باشد.

نمونه بافت منجمد در محیط OCT را باید بر روی یخ خشک منتقل کرده و حداکثر ۲ ساعت پس از دریافت نمونه، ذخیره سازی در دمای ۷۰- درجه سانتیگراد یا پائین تر صورت پذیرد. چنانچه نمونه منجمد بر روی یخ به آزمایشگاه ارسال شود باید سریعاً در فریزر ۷۰- درجه سانتیگراد یا دمای پائین تر قراردادده تا از باز شدن نمونه از حالت انجماد جلوگیری شود. چنانچه نمونه در حین انتقال از حالت انجماد درآید، باید هرچه سریعتر عملیات استخراج بر روی نمونه شروع شده یا در صورتی که میسر نیست بلافاصله در دمای ۷۰- درجه سانتیگراد یا دمای پائین تر در فریزر قراردادده شود.

¹² Optimal Cutting Temperature

¹³ Roswell Park Memorial Institute

¹⁴ Guanidinium Isothiocyanate

از آنجائی که RNA توسط RNase ها تخریب می شود، نمونه های بافت را در تیوب های پلاستیکی استریل و نفوذناپذیر نسبت به آب نگهداری کنید و مطمئن شوید که لوله ها با دست برهنه برخورد نداشته اند. فریزر مورد استفاده در نگهداری نمونه های بافت و یا اسیدنوکلئیک استخراج شده نباید از نوع "بدون برفک" باشند، زیرا برنامه دوره دمائی این دستگاه ها جهت رفع برفک موجب شکست و تخریب اسیدنوکلئیک می شود.

بافت جامد خصوصا بافت توموری منبع غنی از نوکلئازها می باشند. بنابراین جهت استخراج RNA، نمونه بافت تازه باید هرچه سریعتر در نیتروژن مایع یا در حمام ایزوپنتین در دمای -70°C درجه سانتیگراد یا دمای پائین تر بطور ناگهانی منجمد شوند. درضمن نمونه هایی که تنها جهت استخراج RNA گرفته شده اند را می توان در مواد پایدارکننده RNA قرارداد. بهتر است بافت خونی را قبل از انجماد ناگهانی با نرمال سالین شستشو داد.

صرف نظر از مدت زمان نگه داری نمونه ها، توصیه می شود دمای نگهداری بافت در -70°C درجه سانتیگراد یا پائین تر باشد زیرا RNase حتی در دمای -20°C درجه سانتیگراد نیز قادر به فعالیت است.

۲-۲-۱۵- مایعات دهانی (Oral Fluids)

بطور کلی ذخیره سازی و انتقال مایعات دهان جهت انجام آزمایش های DNA و RNA مشابه نمونه سلولهای بوکال (دهانی) می باشد، با این استثناء که اگر نمونه جهت آزمایش RNA در نظر گرفته شده است باید نمونه در محیط انتقالی یا محلول پایدارکننده و یا در دمای یخچالی 2°C تا 8°C درجه سانتیگراد به آزمایشگاه منتقل شود. نمونه مایعات دهانی باید ظرف مدت ۲۴ ساعت از نمونه برداری مورد آزمایش قرار گیرند.

۲-۲-۱۶- بافتهای پارافینه فیکس شده با فرمالین (FFPET^{15})

نمونه FFPET بصورت بلوک بافت را می توان در دمای اتاق بدون محدودیت زمانی جهت آنالیز آتی DNA، نگهداری کرد. امکان استخراج DNA با وزن ملکولی بالا از نمونه FFPET به روش خشک کردن بافت در نقطه بحرانی جهت زدودن فرمالین وجود دارد. از استفاده از هرگونه فیکساتور حاوی جیوه (مثل فیکساتور B5) باید خودداری کرد.

اگرچه نمونه های FFPET جهت مطالعه RNA توصیه نمی شود، اما امکان استخراج RNA از این گونه نمونه ها چه بصورت یک بلوک بافتی و یا بر روی یک اسلاید رنگ آمیزی نشده وجود دارد. نمونه FFPET تنها در صورت در دسترس نبودن سایر نمونه ها استفاده می شود زیرا نمونه مناسب جهت آزمایش های ملکولی نمی باشد.

۲-۲-۱۷- نمونه Semen

این نمونه باید بلافاصله سرد گردد و در همان روز جمع آوری به آزمایشگاه انتقال داده و تا زمان استخراج DNA در دمای بین 2°C تا 8°C درجه سانتیگراد نگهداری گردد. آنالیز DNA در semen را می توان بر روی نمونه خشک شده و همچنین لامهای فیکس شده برای آنالیز سیتولوژیکی و یا با استفاده از روشهای in situ hybridization انجام داد.

۲-۲-۱۸- خلط

نمونه خلط جهت بررسی DNA باید در ظروف استریل جمع آوری شده و در دمای اتاق به آزمایشگاه منتقل شود. در صورت تأخیر در ارسال نمونه بیش از ۳۰ دقیقه، نمونه باید در شرایط دمائی یخچالی (2°C تا 8°C درجه سانتیگراد) تا زمان ارسال نگهداری شود. چنانچه طول زمان انتقال نمونه به آزمایشگاه نیز بیش از ۳۰ دقیقه باشد، انتقال نیز در شرایط دمائی خنک صورت می پذیرد.

¹⁵ Formalin- Fixed Paraffin Embedded Tissue

به محض رسیدن نمونه خلط به آزمایشگاه چنانچه امکان انجام فوری آزمایش وجود ندارد باید در شرایط دمایی یخچال نگهداری شود. چنانچه نمونه جهت بررسی ملکولی مایکوباکتریوم است، می تواند تا دوره های زمانی طولانی پایدار بماند، اما در صورتیکه هردو روش کشت و بررسی ملکولی مورد نظر است مراحل آماده سازی نمونه باید هرچه سریعتر انجام شود تا به حداقل زمان جوابدهی دست یابیم (قابلیت جوابدهی مایکوباکتریوم کمپلکس در طی زمان ۱۴ تا ۲۱ روز پس از دریافت نمونه).

اگر نمونه خلط در زمان طولانی تری تا انجام آزمایش نگهداری می شود، آن را می توان به مدت حداقل ۱ سال در دمای ۷۰- درجه سانتیگراد و یا پائین تر نگهداری کرد. همانند سایر نمونه ها، در صورت استفاده از کیت تجاری جهت استخراج باید به توصیه ها و دستورالعمل سازنده کیت در موارد شرایط نگهداری، ذخیره سازی و انتقال نمونه ها توجه شود.

۲-۲-۱۹- نمونه مدفوع

این نمونه باید با رعایت ضوابط در خواست شده در کتاب یا کتابچه های راهنما به آزمایشگاه ارسال گردد. در بعضی روشها، نیاز به استفاده از ظروف حاوی مواد نگهدارنده می باشد و در بعضی روشهای دیگر توصیه شده است که مدفوع در ظرف درپنج دار بدون مواد نگهدارنده جمع آوری گردد و در دمای بین ۲ تا ۸ درجه سانتی گراد به آزمایشگاه انتقال یابد.

۲-۲-۲۰- سوابهای دهانه رحمی و مجاری ادراری

بطور کلی کیفیت نمونه مناسب و مکفی اندوسرویکس، که حاوی سلولهای متاپلاستیک و یا سلولهای مخروطی و ستونی اندوسرویکس است، وابسته به روشهای مناسب نمونه گیری است. سوابها، برس یا دیگر لوازم نمونه گیری (مانند جاروها Brooms) باید در محیطهای انتقالی قرار گرفته و به آزمایشگاه منتقل شوند. چنانچه بصورت خشک در لوله درب بسته منتقل می شوند باید به توصیه های سازنده کیت و یا آزمایشگاه انجام دهنده توجه شود. بعضی از انواع سوابها موجب تداخل در بعضی از آزمایش های ملکولی می شوند. بسته به نوع آزمایش پائین دست، DNA ممکن است در ۲ تا ۸ درجه سانتیگراد تا حداکثر ۱۰ روز در نمونه پایدار بماند. به محض رسیدن نمونه سواب به آزمایشگاه، آن را در محیط انتقالی معلق کرده و جهت ادامه مراحل بعدی آزمایش، یا می توان مایع انتقالی حاصل را در دمای ۷۰- درجه سانتیگراد و یا کمتر نگهداری کرد و یا بلافاصله پس از سانتریفیوژ کردن، رسوب حاصله را جهت آزمایش RNA و DNA مورد استفاده قرارداد. نمونه های منجمد را پس از ذوب کردن، سانتریفیوژ کرده و همانند روش ذکر شده در نمونه تازه مورد استفاده قرار می دهیم.

باید توجه داشت محیط های انتقالی که برای آزمایش های ملکولی تهیه می شوند ممکن است حاوی دترجنتهایی باشند که باعث متلاشی شدن سلولهای مورد نیاز جهت مطالعات سلول شناسی می گردد.

جهت استفاده مستقیم محصول تجزیه سلول (محصول بدون خالص سازی، جداسازی و تغلیظ اسید نوکلئیک) در واکنش های PCR، باید به شرایط مطلوب شناسایی هدف مورد نظر توجه داشته باشیم. همچنین چنانچه هدف ژنوم میکروبی است، نسبت DNA سلول میزبان، حضور یا عدم حضور سایر ارگانیسمها و مقدار ترشحات، ممکن است بر موفقیت مراحل پائین دست آزمایش تأثیر بگذارد.

۲-۲-۲۱- نمونه ادرار

حجم ادرار، فاصله زمانی نمونه گیری بعد از آخرین ادرار، وجود التهاب و سایر عوامل بر شناسایی وجود اسیدهای نوکلئیک مورد نظر تأثیر گذارند. از نگهداری نمونه ادرار تازه در دمای اتاق و بالاتر (۲۵ درجه سانتیگراد و بالاتر) باید پرهیز نمود چون pH پایین و وجود مقادیر بالای اوره، DNA را به سرعت تجزیه می نماید. تیمار ادرار برای آماده سازی جهت انجام آزمایش های ملکولی بستگی به موارد

پیشنهاد شده در کتابچه راهنمای کیت تولید کننده یا دستورالعمل های اجرایی آزمایشگاه دارد. بعد از تیمار خاص، نمونه ها باید در دمای بین ۲ تا ۸ درجه سانتی گراد نگهداری گردند. برای مطالعات RNA نیز، دستورالعمل های خاص جمع آوری، انتقال و طریقه نگهداری مکتوب شده باید موردنظر قرار گیرند.

در صورت نیاز به غلیظ سازی نمونه ها، می توان از سانتریفیوژ، اولتراسانتریفیوژ و یا فیلتراسیون استفاده نمود، اما به دلیل وجود مواد احتمالی ممانعت کننده، جداسازی اسیدهای نوکلئیک بلافاصله بعد از انجام عمل تغلیظ پیشنهاد می گردد.

۲-۲-۲۲- خرد جداسازی (جداسازی تکه ای از) بافت با استفاده از لیزر LCM^{۱۶}

روش LCM محققین را قادر به استخراج اسیدنوکلئیک از سلولهای خصوصی از نمونه بافت کرده است. اساس این روش نسبتاً ساده می باشد. عموماً نمونه بافت بر روی اسلاید شیشه ای خوابانده شده، پس از پوشانده شدن با فیلم شفاف پلاستیکی، با میکروسکوپ نوری مورد مطالعه قرار می گیرد. هنگامی که محققین سلولهای مورد نظر خود را شناسایی کردند، با استفاده از پرتو لیزر مادون قرمز متمرکز تکه بافت مورد نظر خود را جدا می کنند. گرمای پرتو موجب آب شدن فیلم پلاستیکی شفاف و چسبیدن سلول منتخب به آن می شود. بدین صورت آن تکه از بافت به راحتی کنده شده و مابقی برش بافت دست نخورده باقی می ماند. امروزه سامانه های تجاری موجود از این روش، ابزار مفیدی جهت جداسازی سلولهای بخصوص و مطالعه و بازیابی زیست ملکول های آن می باشند.

DNA ژنومیک را می توان از تکه های حاصل از این روش از نمونه های فریز شده (فروزن) رنگ آمیزی شده که با روشهای مرسوم پردازش می شوند و همچنین از برشهای بافتی پارافینه فیکس شده با فرمالین، بطور موفقیت آمیز استخراج کرد. استخراج کل RNA و mRNA از برشهای رنگ آمیزی شده و یا نشده با استفاده از انواع روشهای استخراج RNA و یا کیت های تجاری استخراج شرح داده شده است.

کاربردهای LCM در تحقیقات پزشکی به سرعت در حال افزایش است و می توان در حال حاضر به موارد زیر اشاره کرد:

۱. تحقیق رابطه بین ژن و بیماری
۲. تحقیقات سرطان شناسی از طریق مورفولوژی و بررسی ژن
۳. بیان ژن بخصوص در طی دوره اولیه تولد
۴. مطالعات پروتئومیکس

LCM ما را قادر به مقایسه میزان تکثیر ژن و بیان پروتئین در سلولهای نرمال و بیمار در یک نمونه واحد بافتی می کند. کتابخانه cDNA از تکه بافت حاصل از روش LCM را می توان جهت تخمین الگوی واقعی بیان ژن در جمعیت های خالص سلولهای مورد نظر در بافت واقعی مورد استفاده قرارداد. تلفیق LCM با تمامی روش های ملکولی توانایی بالقوه ما را در دستیابی به تشخیص ملکولی، تخمین پیش آگهی بیماری، انتخاب درمان و پایش پاسخهای درمانی در دسته های بالینی مختلف افزایش می دهد.

۲-۵- روشهای افزایش غلظت و غنی سازی عوامل بیماریزا

با توجه به حساسیت بالای روشهای آمپلیفیکاسیون در تستهای ملکولی، عموماً نیاز به غنی سازی یا غلیظ نمودن نمونه نمی باشد. همچنین می توان با بکارگیری روش های آمپلیفیکاسیون نظیر Nested در تستهای مولکولی که اسیدنوکلئیک ابتدا در مرحله اول آمپلیفیکاسیون غنی سازی شده و به دنبال آن توسط ران دوم PCR، آمپلیفای می شود، میزان حساسیت را بطور قابل ملاحظه ای افزایش داد. گاهی اوقات غنی سازی در PCR اشاره به فرآیندی دارد که با انجام آن، مواد ممانعت کننده که می توانند در طی مراحل آمپلیفیکاسیون تداخل ایجاد نمایند، توسط پروتکل های اختصاصی کار با نمونه، حذف می گردند.

¹⁶ Laser Capture Micro-dissection

در آزمایشگاه، برای جداسازی مواد مداخله کننده از عوامل بیماریزا در نمونه هایی مثل خون، مواد مخاطی، مایعات بافتی محل التهاب، می توان از ترکیبی از روشهای جداسازی با استفاده از وزن مخصوص (فایکل) و سانتریفیوژ استفاده نمود.

۲-۵-۱- تغلیظ اسیدهای نوکلئیک (DNA/RNA) در مایعات بیولوژیکی فاقد سلول

میزان بالای DNA سلول میزبان در ناهنجاریهای گوناگونی مثل سرطان، بیماریهای خودایمنی و عفونتها دیده می شود. علاوه، مقدار ناچیز DNA جنینی در پلاسما/ سرم خانمهای حامله مشاهده شده است. اخیراً، تکامل در تکنیکهای ملکولی موجب شناسایی بهتر DNA در حال گردش در این شرایط شده است. یافته های جدید نیز دید علمی تازه ای در خصوص DNA در گردش به محققین داده اند که توسط آن شناسایی DNA و ردیابی انواع ناهنجاریها امکان پذیر می باشد. تغلیظ اسیدهای نوکلئیک بوسیله اولتراسانتریفیوژ کردن پلاسما یا مایعات فاقد سلول در سرعت بالا، امکان پذیر می باشد. تغلیظ نهایی با کم کردن حجم نهایی ماده ای که در آن اسیدنوکلیک بعد از جدا سازی قرار داده می شود، امکانپذیر است.

۲-۵-۲- تغلیظ پاتوژنها در سرم و پلاسما توسط سانتریفیوژ کردن در سرعت بالا

هنگامیکه تعداد پاتوژنها در نمونه ای کم باشد، بهتر است نمونه ای که برای تشخیص یا ارزیابی کمی پاتوژن خاص مورد استفاده قرار می گیرد، غنی گردد. این اصول در بعضی آزمایش های کمی تشخیصی HIV و HBV کاربرد دارد. حدود ۰/۵ تا ۱ میلی لیتر از نمونه بوسیله سانتریفیوژ کردن در دور بالا (حدود ۲۴۰۰۰ g) برای ۶۰ دقیقه غلیظ می گردد. ویروس رسوب داده شده و قبل از آزمایش در میزان کمی بافر دوباره حل می گردد. باید در نظر داشت که روشهای غنی سازی نمونه را می توان برای پروتئینها و یا سایر مواد ماتریکس که در روشهای ملکولی تداخل ایجاد می نمایند بکار برد.

۲-۵-۳- تغلیظ پاتوژن توسط فیلتراسیون

از روش الترافیلتراسیون برای تغلیظ محلولی که در آن تعداد اندکی از میکروارگانیسم ها وجود دارند، استفاده می گردد. این روش به دو صورت مکش (Vacuum) و سانتریفیوژ صورت می پذیرد.

۲-۵-۴- تغلیظ سازی پاتوژن در نمونه های مدفوع

ابتدا نمونه های مدفوع در محلولهای بافری (PH 7/4) رقیق شده و سانتریفیوژ می گردند. سپس نمونه برای جدا کردن قطعات اضافی سلولی فیلتر می شود. بعد از فیلتر کردن، اغلب آنچه باقی می ماند حاوی میکروارگانیسم هاست. البته می توان آنرا باز هم بوسیله سانتریفیوژ کردن با دور بالا غلیظ نمود. اسیدهای نوکلئیک توسط پروتکل های استاندارد قابل جداسازی می باشند.

۲-۵-۵- تغلیظ پاتوژنها در CSF و سایر مایعات بدن حاوی سلول

CSF، ادرار، bronchoalveolar lavage، مایع زجاجیه، کشت و سایر مایعات بدن ممکن است به علت داشتن مواد ممانعت کننده که در آزمایش های ملکولی اختلال ایجاد می کنند، به روشهای مختلف احتیاج به تیمار داشته باشند. پس از تغلیظ و غنی سازی این نمونه ها توسط سانتریفیوژ و فیلتراسیون، استخراج اسیدنوکلیک به روشهای شرح داده شده در بخش ۷-۳ صورت می پذیرد.

۲-۵-۶- ثابت کردن نمونه های بافت و بیوپسی

۲-۵-۶-۱- فرمالدئید (فرمالین): فرمالدئید بصورت بافر خنثی فرمالین ۱۰% (Neutral NBF; Buffered Formalin) پرمصرف ترین فیکساتور می باشد. حتی تیمار کوتاه مدت برشهای بافتی با فرمالین نشان داده است که حلالیت DNA را کاهش می دهد. تعدادی مطالعه بازده استخراج DNA با وزن ملکولی بالا از بافت ثابت شده با فرمالین را بررسی کرده و نشان داده اند که تیمار بافت با فرمالین عموماً تخریب قابل ملاحظه ای در DNA را دربرداشته و بنابراین استفاده از این ماده به عنوان ثابت کننده در مطالعات ملکولی در بافت توصیه نمی شود.

سایر ثابت کننده های بافت

۲-۵-۶-۲- گلو تارآلدئید

اگرچه به طور وسیعی به عنوان فیکساتور استاندارد در مطالعات میکروسکوپ الکترونی استفاده می شود، اما نفوذ آهسته این ماده و زمان لازم جهت استفاده از این ماده در اعمال خاصیت خود، استفاده از این ماده را به عنوان فیکساتور بیولوژیک محدود کرده است. این درحالیست که نشان داده شده است گلو تار آل دیید ۱٪ با pH=۷ نسبت به فرمالین ۱۰٪ حفاظت بهتری از DNA با وزن ملکولی بالا دارد.

۳-۵-۶-۲ اتانول و متانول

اتانول و متانول ۱۰۰٪ فیکساتورهای بسیار خوب جهت حفظ DNA های با وزن ملکولی بالا و RNA می باشند، زیرا باعث تغییر شیمیائی کوچکی در اسید نوکلئیک می شوند. سنجش های فیزیکی- شیمیائی نشان داده اند که DNA شدیداً از نظر فیزیکی در اتانول ۷۰٪ و متانول متلاشی شده و ماده ای نیز جهت برگشت DNA تخریب شده به فرم اصلی در هنگام آبدهی مجدد وجود دارد.

۴-۵-۶-۲ Carnoy's fixative فیکساتور کارنوی

این فیکساتور مخلوطی از اتانول (۶۰٪)، کلروفرم (۳۰٪) و اسید استیک گلاسیال (۱۰٪) است. در مقایسه با بافت فیکس شده با فرمالین، فیکساتور کارنوی از RNA در بافت بهتر حفاظت کرده و RNA راحت تر استخراج می شود.

۵-۵-۶-۲ Methacarn فیکساتور متاکارن

فیکساتور متاکارن مخلوطی از متانول (۶۰٪)، کلروفرم (۳۰٪) و اسید استیک گلاسیال (۱۰٪) است. نشان داده شده است که کارائی استخراج و تمامیت ساختمانی RNA استخراج شده از بافت فیکس شده با متاکارن قابل مقایسه با RNA استخراج شده از سلول منجمد فیکس نشده می باشد.

۶-۵-۶-۲ استون

استون به عنوان فیکساتور در تکنیک AMeX^{۱۷} استفاده می شود، که مراحل آن شامل انکوباسیون بافت در استون در دمای ۲۰- درجه سانتیگراد و سپس شستشوی آن در متیل بنزوات و گزیرلول قبل از پارافینه کردن بافت می باشد. روش AMeX بازده خوبی در تهیه DNA با وزن ملکولی بالا داشته و همچنین می توان mRNA را با روش هیبریداسیون نقطه ای با استفاده از RNA استخراج شده از بافت فیکس شده با AMeX شناسائی کرد.

۷-۵-۶-۲ Hope^{۱۸} فیکساتور هوپ

تکنیک هوپ شامل انکوباسیون بافت تازه به مدت یک شب در محلول محافظت کننده محتوی مخلوطی از اسیدهای آمینه در pH ۵/۸ تا ۶/۴ می باشد. مرحله حیاتی در این تکنیک، انکوباسیون به مدت یک شب در محلول هوپ در دمای ۲ تا ۸ درجه سانتیگراد می باشد. اگر ملکول هدف RNA باشد باید آگاه بود که سلول ها در خلال ساعت اولیه انکوباسیون هنوز زنده بوده و چنانچه مقصود آنالیز بیان و رونویسی RNA می باشد، استفاده از این روش می تواند بر نمودار بیان RNA تأثیرگذار باشد. پس از انکوباسیون در محلول هوپ به مدت مقرر، مراحل بعدی با تیمار بافت در استون در دمای ۰ تا ۴ درجه سانتیگراد جهت آبگیری ادامه پیدا کرده و متعاقباً بافت پارافینه می شود. DNA و RNA حاصل از بافت فیکس شده با هوپ جهت بررسی های ملکولی با تکنیک های PCR، RT-PCR و هیبریداسیون inSitu مناسب می باشد.

¹⁷ Acetone- Methylbenzoate- Xylen

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

۸-۶-۲- تابش دهی با مایکروویو

امواج الکترومغناطیس با فرکانس بین ۳۰۰ مگاهرتز تا ۳۰۰ گیگاهرتز تحت عنوان امواج میکرو طبقه بندی می شوند. فیکس کردن نمونه ها با مایکروویو وابسته به عواملی همچون محیط شیمیایی اطراف نمونه در خلال تابش دهی، طول زمان پرتوگیری، توالی تابش دهی با امواج مایکرو و دیگر روش های شیمیایی و فیزیکی فیکس کردن می باشد. پنج روش فیکس سازی نمونه با استفاده از مایکروویو شرح داده شده اند:

- پایدار سازی: که در آن نمونه ها تحت تابش مایکروویو بصورت inSitu یا هنگامی که در یک محلول فیزیولوژیک نمکی غوطه ور است قرار گیرند. در این روش تلاش می شود ساختمان بافت بدون در معرض قرار گرفتن فیکساتورهای شیمیایی حفظ شود.
- فیکس کردن در مواد شیمیایی با تیمار کوتاه مدت اولیه به همراه مایکروویو: در این روش نمونه ها در یک محیط شیمیایی برای مدت زمان بسیار کوتاه (هزارم ثانیه تا چند ثانیه) تحت تابش انرژی مایکروویو قرار می گیرند.
- پرتو دهی قبل از ثابت سازی با مواد شیمیایی: در این روش بعد از تحت تأثیر قرار دادن بافت با مایکروویو، جهت بهبود یکنواختی فیکس سازی، با غوطه ور کردن بافت در فیکساتورهای شیمیایی مثل فرمالین عملیات ادامه پیدا می کند.
- پرتو دهی بعد از ثابت سازی با مواد شیمیایی: که موجب تسهیل اثرات فیکساتورها در نمونه خواهد شد.
- تابش اشعه مایکروویو به همراه فیکس سازی با انجماد که اثرات تصنعی (artifact) انجماد را محدود می سازد.

بطور کلی زمان تابش کمتر از ۶۰ ثانیه، دمای نهایی تابش بین ۵۰ تا ۵۵ درجه سانتیگراد و حجم محلول کمتر از ۵۰ میلی لیتر در طرفی که حداقل یک بعد آن حدود ۱ سانتیمتر باشد توصیه می شود. فیکس کردن بافت با مایکروویو در بافر PBS نشان داده است که از ثابت سازی در فرمالین جهت دستیابی به DNA ژنومیک ویروسی با کیفیت بالا بهتر است. استفاده از دستگاه های مایکروویو خانگی از نظر امنیت و همچنین تکرارپذیری دارای محدودیت های جدی است. جهت فائق آمدن بر این محدودیتها، ابزارهای آزمایشگاهی جهت استاندارد سازی و درجه بندی آن های مایکروویو برای فیکس کردن بافت ساخته شده اند. ابزار تنظیمی لامپ نئون نواحی با قدرت بالا و پائین در آن مایکروویو را شناسائی می کنند. جعبه های بافتی Agar-Saline- Giemsa در تأمین شرایط یکنواخت گرمادهی به بافت کمک می کنند.

۹-۶-۲- بافت پارافینه فیکس شده با فرمالین^{۱۹} FFPET

FFPET اساساً جهت تعیین ژنوتیپ بافت سرطانی بایگانی شده مورد استفاده قرار می گیرد. FFPET بایگانی شده منبع بزرگی از DNA جهت انجام تحقیقات سرطانی شناسی است. همچنین این بافتها جهت تعیین ژنوتیپ افراد فوت شده که تنها منبع مورد استفاده از آنها بافتهای FFPET بایگانی شده است کاربرد دارند. از نمونه FFPET جهت مطالعه گذشته نگری یا در موقعیتی که در آن بافت تازه یا منجمد در دسترس نیست استفاده می شود. به این ترتیب معمولاً این نمونه ها از قبل جهت استفاده در مطالعات ملکولی در نظر گرفته نمی شوند. تنها در صورتی که مطالعات هیستوپاتولوژیک یافته های غیر منتظره ای را نشان دهند نمونه FFPET تحت بررسی ملکولی قرار می گیرد و اینچنین بررسی های ملکولی آتی جهت رسیدن به یک تشخیص قطعی ضروری می شود.

¹⁹ Formalin Fixed Paraffin- Embedded Tissue

نمونه های FFPET را می توان بدون اشکال در دمای محیط منتقل کرد. برای رسیدن به حداکثر کارآئی در بررسی های ملکولی، بافت تازه را باید در برش های نازک (بطور ایدآل به ضخامت ۰/۲ سانتیمتر و نه بیشتر از ۰/۳ سانتیمتر که فرمالین بتواند در به راحتی در بافت نفوذ کرده و به خوبی بافت را فیکس کند) قطع کرده و در بافر فرمالین خنثی تا حداکثر ۱۲ ساعت فیکس کرد. اگر بخواهیم بافت نازک یا نمونه بزرگ را قبل از انجام آزمایش های متعدد فیکس کرده و بافت را پارافینه کنیم، می توان بافت را شکاف داده تا فرمالین بتواند از درز شکافها به راحتی نفوذ کرده و بافت به طور مطلوب فیکس شود. فیکساتورهای حاوی جیوه مانند B5 و فیکساتورهای که موجب کلسیم گیری از بافت می شوند به طور بارز کیفیت و کمیت DNA را کاهش می دهند.

بطور کلی نمونه های FFPET، منبع مناسب تهیه DNA و RNA ژنومیک با کیفیت بالا (مثلاً جهت استفاده در Southern Blotting) نمی باشند. DNA موجود FFPET به علت فیکس شدن با فرمالین تا حدودی تخریب و قطعه قطعه می شود. قطعات DNA کمتر از ۲۰۰ جفت باز را می توان به خوبی از نمونه های FFPET تکثیر کرد. مطلوب آن است بخصوص در مواقعی که مقدار DNA هدف کم باشد، طراحی پرایمر به گونه ای صورت پذیرد تا قطعات حاصله از PCR بین ۱۰۰ تا ۲۰۰ جفت باز باشند. اگر هیچ نمونه بافت تازه در دسترس نباشد از FFPET می توان جهت استخراج RNA و انجام RT-PCR استفاده کرد، ولی توصیه می شود اندازه آمپلیکون بیش از ۱۲۰ جفت باز نباشد.

ضخامت مناسب برش ها از نمونه FFPET جهت استخراج اسیدنوکلئیک به اندازه و پرسلول بودن بافت بستگی دارد. بطور کلی برش ۲۰ میکرومتری از بافت های بزرگ (با مقطع عرضی بیش از ۱ سانتیمتر مربع) یا برش های ۴۰ تا ۸۰ میکرومتر از بافت های کوچک جهت استفاده در PCR کافی است. برای استخراج DNA، برش از بلوکها به ضخامت ۲۰ میکرومتر یا بیشتر زده شده و در لوله های پلاستیکی، ترجیحاً در پیچ دار قرار می دهیم. تیغه میکروتوم باید در فاصله زمانی برش بین نمونه ها با اتانول ۱۰۰٪ پاک شوند. درست قبل از برش از بلوک مورد نظر، یک بلوک پارافینه بدون بافت را ابتدا حداقل ۲ برش زده و در ۲ تیوب جهت بررسی پاک بودن تیغه ها و جلوگیری از انتقال آلودگی از بلوکهای قبلی قرار می دهیم. حداقل یکی از این لوله ها جهت بررسی آلودگی به همراه سایر نمونه ها جهت استخراج مورد استفاده قرار می گیرد.

سپس برش های بافت را توسط گزیلول پارافین زدائی کرده، بافت حاصله را در اتانول شستشو داده، در هوای محیط خشک کرده و توسط پروتئیناز "K" جهت استخراج DNA هضم می کنیم. برای جدا سازی دستی قسمت مشخصی از بافت و استخراج DNA از آن، از روش L.C.M. استفاده می شود.

۲-۶- آماده سازی اسیدهای نوکلئیک

ژنومهای ویروسی در سائز و ترکیب بسیار متغیر بوده و می توانند به فرم RNA یا DNA های دو رشته ای یا تک رشته ای باشند. ویروسها دارای ژنوم بفرم خطی یا حلقوی بوده و اندازه ی ویرون آنها بسیار متغیر است. چرخه تکثیر آنها متغیر بوده و بعضی از آنها در ژنوم سلول میزبان داخل شده و بعضی فقط با وارد نمودن ژنومشان در مراحل مختلف چرخه سلولی میزبان تکثیر می یابند. ویروسها را می توان از اجزاء سلولی و خارج سلولی نمونه های بیولوژیک جدا کرد.

روش جداسازی DNA ویروس داخل ژنومی درست شبیه جداسازی DNA ژنومی است در صورتیکه روش جداسازی نوع خارج کروموزومی شبیه جداسازی RNA می باشد. جداسازی DNA ویروس خارج ژنومی در تمامی ویروس ها مشابه است، فقط در بعضی موارد نیاز به رعایت نکات خاصی می باشد. این موارد عبارتند از: انتخاب نمونه اولیه، نیاز به تغلیظ پارتیکل های ویروس ها قبل از جداسازی و متدهای لیز سلولی به منظور آزادسازی ویرونهای داخل سلولی. بعلاوه باید توجه داشت که در مواقعی که اندازه ژنوم ویروس بسیار کوچک می باشد و یا بوسیله پروتئین های خاصی پوشیده شده، با مشکلاتی در جداسازی روبرو می باشیم.

جداسازی اسیدهای نوکلئیک ویروسی غالباً کاری مشکل می باشد چون معمولاً با نمونه های بیولوژیکی سروکار داریم که حاوی مقدار کمی ویروس و مقادیر متناهی از پروتئین و ترکیبات دیگر است. روش جداسازی باید بتواند این آلودگی ها را حذف کرده و نمونه نهایی از لحاظ تیتراسیون (اندازه گیری کمی) ویروس مناسب باشد.

روش‌ها

۱-۲-۲- روش‌های جداسازی با استفاده از مواد ارگانیک

روش‌های جداسازی آلی جهت خالص سازی اسیدهای نوکلئیک کروموزومی و ویروسی از سلول‌های لیز شده، و یا خالص سازی ژنوم ویروسی از نمونه‌های عاری از سلول مورد استفاده قرار می‌گیرند. فنل یا مخلوطی از فنل - کلروفرم - ایزوآمیل الکل می‌تواند محلول‌های حاوی اسیدهای نوکلئیک را به دو فاز آبی حاوی اسیدهای نوکلئیک و آلی حاوی پروتئین تفکیک کند و سپس اسیدهای نوکلئیک محلول در فاز آبی توسط الکل رسوب داده می‌شوند.

روش تغییر یافته جداسازی آلی برای اولین بار بوسیله Chomezynski & Sacchi برای جداسازی RNA توضیح داده شد، این روش و روش‌های تغییر یافته آن بطور گسترده‌ای به منظور جداسازی RNA ویروسی استفاده می‌شوند.

بطور مثال تعدادی معرف‌های تجاری یک فازي از فنل و گوانیدین تیوسیانات در دسترس می‌باشد. ابتدا نمونه‌ها هموژنیزه و بعد با کلروفرم مخلوط می‌شوند. این محلول سپس بوسیله سانتریفیوژ کردن، به فاز آلی و آبی تفکیک می‌شود. در مرحله بعد RNA موجود در فاز آبی بوسیله ایزوپروپانول رسوب داده شده و بعد از شستشو در آب عاری از RNA حل می‌شود.

۲-۲-۲- روش Target Capture

در این روش اسید نوکلئیک ویروسی هدف با پروب (نشانگر) هومولوگ که به بستر جامد متصل شده است هیبرید می‌شود. از آنجائیکه برای هر ویروس، باید پروب اختصاصی ویژه طراحی و تولید شود، استفاده از این روش دارای محدودیت‌هایی است. ولی از آنجائیکه این روش بسیار اختصاصی و حساس می‌باشد، در آنالیزهایی که نیاز به تشخیص دقیق و معتبر تکرارپذیر دارند، روش مناسبی قلمداد می‌شود. یک روش رایج در جداسازی و خالص سازی DNA ویروسی در نمونه‌های سرمی استفاده از الیگونوکلوئوتیدهای بیوتینه که به ذرات مغناطیسی پوشیده از استرپتاویدین متصل می‌شوند، می‌باشد. نمونه‌های سرمی به منظور غیرفعال کردن DNAase و RNAase، با گوانیدین تیوسیانات تیمار شده، سپس به آن اولیگونوکلوئوتیدهای بیوتینه اختصاصی اضافه کرده و در 96°C حرارت داده می‌شود. این محلول پس از سرد کردن در یخ، با ذرات مغناطیسی پوشیده شده، با استرپتاویدین مخلوط می‌شود. آلودگی‌ها طی مراحل شستشو حذف شده و در نهایت ژنوم‌های اسیدهای نوکلئیک از پروب اختصاصی جدا می‌شوند. چنین پروتکل‌هایی بسیار مؤثر بوده و براحتی قابل اتوماسیون می‌باشند.

۳-۲-۲- تکنولوژی سیلیکا Silica Technology

ذرات سیلیکا نخستین بار توسط Boom جهت جداسازی اسیدهای نوکلئیک از نمونه‌های بالینی استفاده شد. این روش بسیار ساده، سریع و قابل اعتماد بوده و اسیدهای نوکلئیک با خلوصی بالا که قابل استفاده در روش‌های حساس ملکولی بعدی می‌باشند، بدست می‌دهد. اساس آن اتصال اسیدهای نوکلئیک موجود در لیز سلولی یا عصاره عاری از سلول با ذرات سیلیکا تحت شرایط غلظت‌های بالای نمک‌های کائوتروپیک نظیر پدید سدیم، پرکلرات، یا نمک‌های گوانیدیوم است. نمک‌های کائوتروپیک موجود در محلول لیز کننده سبب تقلیب و غیرفعال شدن RNAase موجود در نمونه می‌گردد.

قدرت یونی و pH محلول‌های لیز کننده و اتصال (lysis and binding buffer)، قابل تنظیم بوده بطوریکه سبب اتصال اسیدهای نوکلئیک به ذرات سیلیکا شده و پروتئین‌ها و سایر متابولیت‌های موجود در نمونه در محلول باقی می‌مانند و بعد از مراحل شستشوی سیلیکا، اسیدهای نوکلئیک تحت شرایط غلظت نمکی پایین از آن جدا می‌شوند.

بر اساس این متد مقدار زیادی کیت‌های تجاری در دسترس می‌باشند. نمونه‌ها ابتدا تحت شرایط تقلیب کننده قوی قرار گرفته سپس شرایط بافری طوری تغییر پیدا می‌کند که اسیدهای نوکلئیک آماده‌ی اتصال به سیلیکا باشند که با عبور نمونه از ستون‌های حاوی فیلترهای سیلیکا انجام می‌گیرد. در مرحله بعد آلودگی‌ها بوسیله محلول‌های شستشو حذف و اسیدهای نوکلئیک توسط محلول بافری حل کننده (جدا کننده) مناسب، آزاد شده و آماده‌ی استفاده‌ی مستقیم و یا ذخیره سازی می‌باشند.

۴-۲-۲- تغلیظ نمونه‌های اولیه

بسیاری از نمونه‌های بالینی مثل مدفوع، پلاسما، ادرار، مایع نخاع و سایر مایعات بدن اغلب حاوی تعداد بسیار پایینی از سلول یا ویروس می باشند در این موارد تغلیظ نمونه‌ها (بوسیله سانتریفیوژ یا فیلتر) قبل از شروع خالص سازی در افزایش میزان جداسازی بسیار حائز اهمیت می باشد.

۲-۶-۵- سانتریفیوژ کردن

سانتریفیوژ کردن معمولا در تغلیظ اسیدهای نوکلئیک ویروسی در مایعات بدن استفاده شده و برای این منظور تغلیظ کننده‌های کوچک (Micro Concentrator) بصورت تجاری وجود دارند. بعد از تغلیظ، روشهای استاندارد جداسازی قابل انجام است. موقع جداسازی اسیدهای نوکلئیکی ویروس از ادرار، استفاده از بافرهای واجد نمک‌های کاترئوپیک ضروری است، چون ادرار حاوی مهار کننده های ناشناخته زیادی است.

از اولتراسانتریفیوژ در افزایش حساسیت جداسازی ژنوم ویروسی از پلاسما می توان استفاده کرد، اضافه کردن مرحله سانتریفیوژ قبل از استخراج RNA سبب بدست آوردن يك رسوب از ذرات ویروسی در ته لوله می شود. این رسوب سپس در PBS یا يك محلول لیز کننده مناسب حل شده و مراحل بعدی جداسازی دنبال می گردد.

۲-۶-۶- فیلتراسیون

فیلتراسیون برای تغلیظ ویروس‌ها در نمونه مدفوع استفاده می شود. برای این منظور، مدفوع را در محلول کلریدسدیم حل کرده و سانتریفیوژ می‌کنند. سپس مایع شفاف روئی را از يك فیلتر ۰/۲۲ نانومتری عبور داده تا سلول‌های آن گرفته شوند و DNA سلولی از آن حذف گردد. سپس اسیدهای نوکلئویک ویروسی از فیلتر جدا می شود.

فیلتراسیون و سانتریفیوژ نمونه در يك ریزتغلیظ کننده (Micro Concentrator) در بررسی نمونه های آب که حاوی تعداد بسیار پایینی ویروس می باشند استفاده می شود. اگر چه آب بصورت روتین جهت آلودگی باکتریایی آزمایش می شود و بررسی وجود ویروس در آن رایج نیست، زیرا متدهای مورد استفاده برای این منظور حساس نبوده و معمولاً پیچیده و گران می باشند.

۲-۶-۷- دترجنت‌های کاتیونیک

اضافه کردن دترجنت‌های کاتیونی به نمونه در شروع کار سبب افزایش پایداری و تغلیظ اسیدهای نوکلئیک می شود. این پدیده ناشی از تشکیل کمپکس بواسطه اتصال بین سرهای کاتیونی دترجنت‌ها با گروههای فسفات با بار منفی اسیدهای نوکلئیک می باشد. دنباله‌ی آگریز این دترجنت‌ها در خارج کمپکس حاصل سبب ترکیب و تغلیظ آنها می شود. پروتئین‌ها با دترجنت‌ها اتصال برقرار نکرده و محلول باقی می‌مانند. بنابراین استفاده از دترجنت‌ها سبب حذف یکسری آلودگیها و پایداری بیشتر اسیدهای نوکلئیک می شود. نمونه‌های دارای پروتئین بالا نظیر خون، ممکن است نیاز به روش‌های بیشتری جهت پایداری اسیدهای نوکلئیک داشته باشند.

بعد از تغلیظ و افزایش پایداری با دترجنت های کاتیونیک، اسیدهای نوکلئیک باید از این کمپلکس جدا شوند. در هنگام جداسازی اسیدهای نوکلئیک ویروس این عمل بوسیله استخراج آلی یا روش‌های مورد استفاده در تخلیص بوسیله سیلیکا مهیا می شود.

۲-۶-۸- جداسازی DNA ژنومی (پستانداران و یوکاریوت ها)

نکات کلی هنگام جداسازی DNA ژنومیک

متدهای رایج در جداسازی DNA از لیزسلول‌های حیوانی، انسانی، مخمر و باکتریایی اساسا شبیه جداسازی DNA از بافت می باشد که پیشتر توضیح داده شد.

نمونه‌های مختلف خصوصیات متفاوتی داشته که جداسازی DNA را تحت تأثیر قرار می دهد، بویژه لیز نمونه‌ها و حذف محتویات اختصاصی سلولها. علاوه کیفیت نمونه و چگونگی نگهداری نمونه بر میزان DNA قابل جداسازی تأثیر می‌گذارد. در زیر نکات کلی استخراج DNA ژنومی ذکر شده است.

۲-۶-۹- نمونه‌های اولیه:

طراحی و اصول آزمایش غالبا تعیین کننده‌ی نوع نمونه اولیه مورد استفاده است. به عبارتی نمونه‌های تازه، ذخیره شده و یا پزشکی قانونی و نیز نوع بافت و عمر آن در این انتخاب تعیین کننده است. کیفیت نمونه اولیه، میزان و کیفیت DNA استخراج

شده را تحت تأثیر قرار می دهد. میزان DNA استخراجی در صورت نگهداری نمونه اولیه در شرایط نامناسب، کاهش می یابد و DNA جدا شده ممکن است تخریب شود. بعلاوه از انجماد و ذوب مکرر نمونه نیز باید اجتناب شود، چون این عمل سبب کاهش اندازه DNA ژنومی شده و در نمونه های بالینی میزان DNA پاتوژن کاهش می یابد. میزان DNA استخراج همچنین به اندازه، نوع و عمر نمونه اولیه بستگی دارد. محتوی اسید نوکلئیک به نوع سلول نیز بستگی دارد، بطوریکه این میزان در بافت سلولی که از سلول های ریز تشکیل شده است به مراتب بیشتر از حجم مساوی از بافتی است که از سلول های بزرگتری تشکیل شده باشد. محتوی DNA یک نمونه همچنین به سایز ژنوم هاپلوئیدی و پلوئیدی سلول ها بستگی دارد.

۱۰-۶-۲- لیز و متلاشی نمودن نمونه

لیز و متلاشی نمودن کامل سلول بعد از آزاد سازی DNA از نمونه های بافتی ضروری است و ناکافی بودن آنها سبب کاهش میزان DNA تخلیصی می گردد. این فرایند عموماً بوسیله محلول های لیز کننده حاوی دترجنت (جهت شکستن غشاهای سلولی) و یک پروتئیناز (برای هضم پروتئین های سلولی و پاتوژن) صورت می پذیرد. بعضی نمونه ها برای اینکه بصورت کافی لیز شوند، نیاز به تیمارهای اضافی دارند. راهنمای روش های تخریب مکانیکی نمونه ها، در این بخش آورده شده است و توصیه های اختصاصی برای انواع نمونه ها، در بخش بعدی مورد بحث قرار می گیرد.

۱۱-۶-۲- هموژنیزه کردن بوسیله سرنگ و سوزن

محلول های لیز شده سلول و بافتی را می توان بوسیله سرنگ و سوزن، یکنواخت (هموژنیزه) کرد. DNA های با وزن ملکولی بالا را می توان با عبور نمونه از یک سوزن نمره ۲۰ خرد کرد. برای این کار ۱۰-۵ مرتبه انجام دادن کافی به نظر می رسد. افزایش حجم بافر لیزکننده سبب تسهیل در کارکردن با نمونه و کاهش میزان از دست دادن آن می شود.

روش ها

آنالیز ارگانیسمرهای پیچیده با استفاده از روش های بیولوژی ملکولی نیاز به DNA ژنومی با وزن ملکولی بالا و خالص دارد. برای این منظور روش ها و فن آوریهای گوناگونی در دسترس می باشد و عموماً در تمامی این روش ها نمونه اولیه متلاشی و لیز شده، پروتئین ها و سایر آلودگیها از آن حذف و نهایتاً DNA بازیافت می شود.

۱۲-۶-۲- روش های استخراج با استفاده از مواد ارگانیک

استخراج آلی یک روش کلاسیک است که در طی آن بوسیله محلول های آلی آلودگیها از لیز سلولی جدا می گردد. سلول ها بوسیله یک دترجنت لیز شده و سپس با فنل، کلروفرم و ایزوآمیل الکل مخلوط می گردد. استفاده از غلظت مناسب نمک و pH سبب می شود تا آلودگیهای موجود در لیز سلولی در فاز آلی حل شده و DNA در فاز آبی باقی بماند. معمولاً DNA بوسیله الکل از فاز آبی رسوب داده شده و خالص می گردد. DNA جدا شده در این روش ممکن است حاوی مقداری فنل یا کلروفرم باشد که می تواند واکنش های آنزیمی بعدی را مهار کند و بنابراین ممکن است آنقدر خالص نباشد که در فرآیندهای حساس پایین دستی مثل PCR مورد استفاده قرار گیرد. بعلاوه، این روش می تواند روشی حساس و وقت گیر بوده که ترکیبات توکسیک مورد استفاده در آن در میزان کارایی آن تأثیر زیادی دارد.

۱۲-۶-۲- Salting – out روش های

در این روش ها، پروتئین ها و سایر آلودگیهای موجود در نمونه، با کمک غلظت های بالای نمک رسوب داده می شوند. رسوب تولیدی بوسیله سانتریفیوژ جدا شده و DNA باقی مانده در محلول با استفاده از رسوب دهی با الکل بازیافت می شود. حذف پروتئین و سایر آلودگیها، با این روش می تواند ناکافی بوده و تیمار RNase، دیالیز و نیز تکرار رسوبگذاری با الکل غالباً ضروری می باشد. خلوص و میزان DNA جدا شده با این روش غالباً بسیار متغیر می باشد.

۱۴-۶-۲- شیب غلظتی سزیم کلراید^{۲۰}

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

۱۵-۶-۲- روشهاي بر پایه سيلیکا^{۲۱}

تكنولوژيهايي كه اساس آنها استفاده از سيلیکا مي باشند، روشهايي ساده براي جداسازي DNA با كيفيت مي باشند. اين روشها بر اساس جذب انتخابي اسيدهاي نوكلئيك به سيلیکا در حضور غلظت بالاي نمكهاي كانتروپيك (نظير گوانيدين **هيدوكلورايد**، گوانيدين ايزوتيسيانات ، يديد سدیم و پرکلرات سدیم) مي باشد. استفاده از بافرهاي مناسب در مرحله ليز سبب مي شود كه تنها DNA به سيلیکا متصل و RNA، پروتينها و ساير متابوليتهاي سلولي به فرم محلول باقي مي مانند. اين محلولها در مراحل بعد شستشو شده و سپس DNA در غلظت پايين نمك از ذرات يا غشاهاي سيلیکا جدا مي گردد. اين DNA آماده استفاده در فرايندهاي بعدي مي باشد.

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

۱۶-۶-۲- روشهاي بر پایه تبادل آنیوني^{۲۲}

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

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

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

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

²¹ Silica- Based Methods

²² Anion – Exchange Method

آن جدا کرد. این فیلترها حاوی موادی هستند که نمونه را لیز کرده و DNA به آنها متصل می شود. نمونه های خشک شده را برای سالها می توان نگهداری کرد، بدون اینکه DNA آن خراب شود. در یک مطالعه نشان داده شده است که استفاده از فیلترهای تیمار شده و تیمار نشده قادرند حداقل ۱۹ ماه در درجه حرارت اتاق DNA را نگهداری نمایند.

۲-۶-۱۸ حذف RNA

RNA بسته به نوع روش جداسازی DNA می تواند همراه آن تخلیص گردد. RNA ممکن است روی بعضی آزمایش های انجام گرفته روی DNA اثر مهارکنندگی داشته باشد ولی روی آزمایش PCR چنین اثری ندارد. تیمار نمونه با RNase A قادر است که RNA آلوده کننده را حذف نماید که این عمل می تواند در ضمن جداسازی DNA و یا بر روی DNA خالص شده انجام پذیرد. RNase عاری از DNase بصورت تجاری قابل خرید می باشد.

۲-۷- جداسازی DNA از بافت حیوانی و انسانی

۲-۷-۱- **متلاشی نمودن بافت انسانی و حیوانی:** بیشتر بافتهای انسانی و حیوانی را می توان بوسیله بافر لیزکننده و پروتئیناز K لیز کرد. متلاشی نمودن بافتهای تازه یا منجمد شده سبب افزایش میزان لیز آنها می شود. خرد کردن مکانیکی به وسیله هموژنایزرها، مخلوط کردن با ذرات مغناطیسی به قطر ۳-۷ میلیمتر، و هاون می توانند سبب کاهش زمان لیز شدن شود. بافتهای پوست، قلب، ماهیچه ها حاوی مقادیر زیادی پروتئین های کششی، پیوندی و کلاژن بوده و باید دقت داشت که این نمونه ها بطور کامل بوسیله پروتئیناز K و پروتئاز هضم گردند.

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

این نوع هموژنایزرها می تواند بافتهای انسانی و حیوانی را در مدت ۵-۹۰ ثانیه با توجه به سفتی و سختی آن تخریب کنند. چرخش سریع روتور با کمک برش مکانیکی و توربولانس سبب تخریب نمونه می شود. با قراردادن پروانه روتور در زیر سطح نمونه و انتخاب اندازه ظرف مناسب باید از تشکیل کف تا حد ممکن جلوگیری کرد. این هموژنایزرها دارای اندازه ی متفاوتی هستند که قادرند با توجه به حجم نمونه از پروب هایی با سایز مختلف استفاده نمایند. برای حجم های حدود ۳۰۰ میکرولیتر، پروب های با قطر ۵-۷ میلی متر و میکروتیوب های ۱/۵ میلی لیتری مناسب می باشند. پروب های با قطر بیش از ۱۰ میلی متر نیاز به ظرف های بزرگتر دارند.

۲-۷-۳- خرد کردن با آسیاب

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

۲-۷-۴- جدا کردن DNA ژنومی از خون

نمونه های خون معمولا جهت آنالیزهای بالینی استفاده می شوند. خون حاوی مهارکننده های آنزیمی است که می توانند فرایندهای پایین دستی کار با DNA را تحت تأثیر قرار دهند. بعلاوه، ضدانعقاد های رایج مثل هپارین و EDTA نیز می توانند بعنوان مهار کننده عمل نمایند. بنابراین روش های مورد استفاده در جداسازی DNA از خون باید تولید DNA با کیفیت بالا نماید که فاقد هر گونه آلودگی با مهار کننده های آنزیمی باشد.

۲-۷-۵- حذف گلبول های قرمز از نمونه های خون پستانداران

درحالی که گلبول های قرمز پرندگان، ماهیها و قورباغه، دارای هسته و بنابراین DNA ژنومی می باشد گلبول های قرمز بالغ پستانداران فاقد هسته می باشند. بنابراین جدا کردن و حذف گلبول های قرمز که تعدادشان تقریباً ۱۰۰۰ برابر گلبول سفید است، سبب افزایش بازدهی جداسازی DNA می گردد که این عمل را می توان به طرق مختلف انجام داد. یک روش لیز انتخابی گلبول های قرمز بوسیله بافر هیپوتونیک می باشد که نسبت به گلبول های سفید به شوک هیپوتونیک بسیار حساس ترند. روش دیگر، استفاده از سانتریفیوژ با کمک گرادیان غلظتی است که سبب جدا کردن گلبول های سفید تک هسته ای و لنفوسیت ها از گلبول های قرمز می شود. این روش سبب برداشتن گرانولوسیت ها نیز می شود.

روش سوم، سانتریفیوژ کردن نمونه خون در ۳۳۰۰ g بمدت ۱۰ دقیقه و تولید لایه بافی کوت حاوی گلبول‌های سفید است. بعد از سانتریفیوژ سه لایه قابل تمایز است. لایه بالایی پلاسما است، لایه حد وسط همان بافی کوت است و لایه زیرین، گلبول‌های قرمز می باشد.

۲-۷-۶- تخریب نمونه‌های خون

نمونه‌های خون، از جمله آنهایی که گلبول قرمز آنها جدا شده‌اند را می توان بوسیله بافر لیزکننده پروتیناز یا پروتیناز K بطور کامل لیز کرد.

۲-۸- روش‌های جداسازی DNA از نمونه‌های خون

همانطور که اشاره شد جداسازی DNA از خون باید حاوی روش‌هایی باشد که سبب حذف مهار کننده‌های بالقوه خون و نیز ضدانعقادها باشد، تا بتواند DNA با کیفیت مطلوب خالص نماید. بیشتر متدهای غیرتجاری (Home Made)، بر پایه استفاده از بافی کوت استوار بوده که بعداً توسط روش‌هایی که برای جداسازی DNA از بافت مورد استفاده قرار می گیرند، DNA آنها استخراج می گردد.

کیت‌های مبتنی بر فیلترهای سیلیکا برای جداسازی DNA باکیفیت از خون تام به فرم تجاری موجود می باشد. در این روش جداسازی گلبول‌های قرمز ضروری نیست. باتوجه به میزان و کیفیت DNA مورد نیاز، کیت‌های مختلفی در دسترس می باشد.

۲-۹- جداسازی DNA ژنومی از سایر نمونه‌های بالینی

علاوه بر خون، سایر مایعات بیولوژیک، سوآب و نمونه‌های مدفوع بطور روتین برای آنالیزهای بالینی مورد استفاده قرار می گیرند. بعضی نمونه‌ها بویژه نمونه‌های مدفوع حاوی مهارکننده‌های زیادی می باشند که برای بدست آوردن DNA باکیفیت باید از نمونه حذف شوند. کیت‌های تجاری موجود حاوی موادی است که سبب حذف این مهارکننده ها از مدفوع می شود. بیشتر مایعات بیولوژیک را می توان شبیه نمونه خون مورد استفاده قرارداد.

۲-۱۰- جداسازی DNA از عوامل بیماریزا

DNA باکتریها، قارچها، انگلها و ویروسها را می توان از نمونه‌های بالینی جدا کرد. DNA ویروس‌های اینتگره شده در ژنوم میزبان با همان روشی که برای جداسازی DNA ژنومی در بالا توضیح داده شده جدا می شود. DNA پارتیکل‌های ویروسی عمدتاً از مایعات عاری از سلول نظیر پلاسما و CSF که در آنها تیترو ویروس پائین است جدا می شوند. گاهی نیاز است تا پارتیکل‌های ویروسی با روش‌هایی نظیر اولتراسانتریفیوژ، اولترافیلتراسیون، و یا پرس‌ی پیتاسیون تغلیظ گردد. اضافه کننده حاملین DNA (Carriers) در مواردی که میزان DNA موجود در نمونه کم است نیز کمک کننده است. باید توجه کرد DNA یا RNA عوامل بیماریزا که از نمونه‌های بالینی جدا می شوند همیشه با DNA ژنومی همراه است، مگر اینکه از روش‌های جداسازی اختصاصی استفاده گردد.

برای جداسازی DNA باکتریایی از مایعات بیولوژیک، ابتدا این باکتریها باید رسوب داده شود و سپس جداسازی DNA، نظیر جداسازی از کشت سلول‌های باکتریایی انجام شود.

۲-۱۱- جداسازی DNA از کشت سلول‌های حیوانی، انسانی، مخمر و باکتریایی

کشت سلول‌های انسانی و حیوانی را می توان با استفاده از بافر لیزکننده و پروتیناز K بطور قابل قبولی لیز کرد. کشت سلول‌های مخمر ابتدا باید بوسیله لیتیکاز یا زیمولاز به منظور هضم دیواره‌ی سلولی آنها تیمار گردد. اسفروپلاست‌های تولیدی بوسیله سانتریفیوژ کردن جمع آوری و بوسیله بافر لیزکننده و پروتیناز K لیز می شود. سلول‌های مخمری (یا سایر تك سلول‌های جانوری) را باید قبل از لیز کردن بوسیله مخلوط کن و ذرات شیشه‌ای به قطر ۰/۵ میلیمتر خرد کرد. بیشتر سلول‌های باکتریایی نیز بطور قابل قبولی، با بافر لیزکننده و پروتیناز K قابل لیز شدن می باشند. بعضی باکتری‌ها بویژه باکتری‌های گرم مثبت نیز به يك انکوباسیون اولیه با آنزیم‌هایی نظیر لیزوستافین نیاز دارند تا دیواره‌ی سخت سلولی و چند لایه آنها لیز شود. برای تسهیل در لیز شدن سلول‌های باکتریایی نیز می توان از مخلوط کردن آنها با ذرات شیشه‌ای به قطر ۰/۵ میلیمتر استفاده کرد. ضروری است که ذرات شیشه با شستشوی آنها در اسید نیتريك غلیظ برای این کار آماده شوند.

۲-۱۲-۱- جدا سازی RNA

۲-۱۲-۱- متلاشی و هموژن نمودن مواد اولیه برای جداسازی RNA

متلاشی و هموژن نمودن مواد اولیه برای تمام روشهای جداسازی RNA ضروری می باشد. در ادامه متلاشی و هموژن نمودن تخلیص RNA با یکی از متدهای ذیل می تواند انجام پذیرد. متلاشی و هموژن نمودن در حضور یک حلال آلی یا عوامل کائوتروپیک (Chaotropic) جهت ممانعت از RNase ها انجام می گیرد که در طی مراحل آزاد می شود. با این وجود تغییرات در الگوی بیان RNA قبل از متلاشی نمودن و یا در طی آن و با هموژن نمودن می تواند رخ دهد. لذا برای آنالیز دقیق بیان ژن، نمونه باید ابتدا تثبیت شود. در صورت حجم اندک نمونه های متلاشی شده، افزودن ممانعت کننده RNase ممکن است ضروری باشد. برخی از روش های متلاشی کننده، بطور همزمان نمونه را هموژن نیز می نماید، در حالیکه برخی دیگر نیازمند یک مرحله اضافی برای هموژن نمودن می باشند که در ذیل جزئیات آن بیشتر تشریح می گردد.

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

این نوع از هموژنایزرها می توانند بصورت کامل سلول ها را متلاشی نموده و همزمان هموژن نمایند. زمان مورد نیاز در حضور بافر لیز کننده بافتهای حیوانی بسته به سفتی و سختی ۵ الی ۹۰ ثانیه می باشد. این نوع از هموژنایزرها می توانند لیز سلولی را هموژن نماید. روتور در سرعت بالا باعث متلاشی و هموژن شدن نمونه می شود. برای به حداقل رساندن تولید حباب باید لوله، مناسب با حجم نمونه بوده و نوک پروپ در داخل ظرف نمونه (در یک طرف ظرف) غوطه ور باشد. **تذکر:** با استفاده از نوک های یکبار مصرف و با اتخاذ روشهای دقیق برای تمیز نمودن هموژنایزر، می توان احتمال انتقال آلودگی از نمونه به نمونه دیگر را کاهش داد.

۲-۱۲-۳- متلاشی و هموژن نمودن با استفاده از Bead Mills

در این روش سلولها و بافت می تواند به سرعت با استفاده از به همزدن سریع در حضور ذرات^{۲۳} بید و بافر لیز کننده متلاشی گردند. متلاشی و هموژن نمودن در اثر برخورد و ساییش مداوم ذرات بید با سلول رخ می دهد. متلاشی نمودن مؤثر، به اندازه و ترکیب ذرات، سرعت و شکل بندی همزن، نسبت بافر به ذرات، زمان از هم پاشیدگی، مقدار مواد اولیه مرتبط می باشد. ذرات مناسب برای استفاده باکتری ها، ذرات شیشه ای به قطر ۰/۱ میلی متر بوده و برای مخمرها و تک یاخته ای ها ۰/۵ میلی متر برای می باشد. برای سلولهای حیوانی و بافت گیاهی ذرات ضدزنگ فولادی با قطر ۲ الی ۷ میلی متر مورد نیاز می باشد.

بیدهای شیشه ای باید ابتدا توسط اسیدنیتریک غلیظ شسته شود. بیدهای شیشه ای شسته شده با اسید را می توان بصورت تجارتي تهیه نمود. مواد گیاهی (همچنین بیدها و ظروف) باید قبل از استفاده در نیتروژن مایع سرد شده، و متلاشی نمودن باید بدون بافر لیزکننده انجام گردد. سایر پارامتر ها متلاشی نمودن متناسب با نوع نمونه باید در نظر گرفته شود.

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

بدین منظور نمونه ها فوراً در نیتروژن مایع منجمد شده و تحت نیتروژن مایع خرد شده و بصورت پودر درمی آیند. سوسپانسیون را (پودر بافت و نیتروژن مایع) در داخل نیتروژن مایع، سرد نموده، سپس به لوله متناسب انتقال دهید و اجازه دهید نیتروژن تبخیر شود بدون اینکه نمونه ذوب گردد. بافر لیزکننده اضافه نموده، سریعاً بصورتی که احتمال هموژنیزه شدن با یکی از متدهای ذیل را فراهم می نماید، ادامه دهید. توجه نمایید که خرد کردن نمونه با استفاده از هاون و دسته آن می تواند نمونه را متلاشی نماید، اما نمی تواند آنرا هموژن کند. هموژن نمودن باید قبل از این بطور جداگانه انجام یابد.

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

برخی از شرکت ها تکنیک هموژنایزر spin-column با غشاء سیلیکا را پیشنهاد می کنند. این یک روش سریع و مؤثر برای هموژن نمودن سلول و لیز بافت بدون آلودگی متقاطع نمونه ها می باشد. نمونه لیز شده به spin-column منتقل شده و این مجموعه در داخل لوله های جمع آوری، سانتریفیوژ می گردد.

²³ Beads

۲-۱۲-۶- روش های جدا سازی

تکنیک ها و روشهای گوناگونی برای جدا سازی RNA و یا تمیز نمودن (clean up) آن از واکنش های آنزیماتیک در دسترس می باشد. بطور کلی روشها شامل متلاشی نمودن و لیز مواد اولیه می باشند که با حذف پروتئین، DNA و دیگر آلوده کننده ها ادامه می یابد. در این بخش تکنیک های متفاوت مورد بحث قرار می گیرد. پروتکل های دلخواه از ترکیبی از چند تکنیک استفاده می کنند. انتخاب دستورالعمل بخصوص بستگی به نوع RNA (RNA کامل، RNA سیتو پلاسمیک، mRNA، RNA با وزن ملکولی پایین)، خلوص مورد نیاز در کاربردهای پایین دستی، زمان دلخواه و هزینه هر نمونه و اینکه RNA دست نخورده مورد نیاز باشد یا نه، دارد.

۲-۱۲-۷- هضم آنزیمی

یک متد ساده برای جداسازی RNA از سلول شامل لیز سلولی و هضم پروتئینها با استفاده از پروتئیناز K در حضور سدیم دودسیل سولفات (SDS) و یک مهار کننده RNase می باشد. پس از غیرفعال نمودن پروتئیناز K (توسط حرارت و یا مواد آلی خالص سازی) DNA آلوده کننده توسط DNase I به مدت ۳۰ دقیقه الی یک ساعت هضم می گردد. آلوده کننده ها ممکن است سبب ممانعت از کاربردهای پایین دستی شوند. این متد نمی تواند برای بافت مورد استفاده قرار گیرد، زیرا لیز با استفاده از پروتئیناز K آهسته و کم تأثیر بوده و ممانعت از تخریب RNA توسط RNase خودی، مشکل می باشد. راه جایگزین، متلاشی نمودن سلول با استفاده از مواد کائوتروپیک^{۲۴} است، که متعاقب رقیق سازی مواد لیز شده و توسط یک آنزیم (نظیر پروتئیناز K) صورت می پذیرد و می تواند میزان RNA را بدون تخریب شدن در طی تیمار آنزیمی افزایش دهد. اغلب در انتهای پروتکل برای خارج نمودن هر DNA هضم توسط DNase I مورد استفاده قرار می گیرد. متعاقب تیمار با DNase I، می توان آنزیم DNase را توسط هر تکنیکی که پروتئین ها را از اسید نوکلئیک جدا می کند، خارج نمود (نظیر استخراج آلی و انجام رسوب با الکل، تخلیص با استفاده از متد های مبتنی بر silica و یا متد تعویض یونی). خروج کامل DNase I دقیقاً برای RNA و آنالیز صحیح RT-PCR ضروری است. هر باقی مانده ای از DNase I می تواند cDNA را در طی سنتز تخریب نموده و به شدت در تولید آن و کمیت آن تأثیر بسزایی داشته باشد.

۲-۱۲-۸- استخراج آلی

استخراج آلی تکنیکی است که اغلب با هضم پروتئیناز K، استخراج با دناتوره کننده های (denaturant) قوی، رسوب با الکل یا کلرور لیتیم و یا شیب غلظتی کلرورسزیم ترکیب می گردد. بطور نمونه، نمونه در pH اسیدی با فنل ترکیب می شود. فنل سلول را لیز نموده و پروتئین ها را دناتوره می نماید. در pH اسیدی DNA نمونه پروتونه شده، شارژ آن خنثی شده و باعث جداسازی آن از RNA با قرار گرفتن در فاز آلی می شود. RNA شارژ شده در فاز مایع آبی می ماند. این دو فاز توسط سانتریفیوژ جدا شده و فاز مایع توسط مخلوط فنل کلروفرم مجدداً تخلیص می گردد و سپس با استفاده از کلروفرم از باقیمانده فنل جدا می شود. RNA موجود در فاز مایع توسط اتانول و ایزوپروپانول و یا شیب غلظتی کلرور سزیم رسوب می نماید. RNA جدا شده با از استفاده روش تخلیص آلی ممکن است حاوی باقیمانده ای از فنل، و یا کلروفرم باشد که واکنش های پایین دستی را مهار نموده و می تواند در خواندن تیترا نهایی میزان ژنوم تأثیر اصلی داشته باشد. این روش بواسطه استفاده از مواد سمی و ترانژنیک دارای محدودیت بوده و علاوه بر وقتگیر بودن، نیازمند وجود مهارت برای انتقال فاز مایع می باشد.

۲-۱۲-۹- تخلیص با استفاده از دناتوره کننده های قوی

مواد کائوتروپیک نظیر ایزوتیوسیانات گوانیدینوم و هیدروکلراید گوانیدینوم دناتوره کننده های قوی می باشند که به سرعت RNase را غیرفعال نموده و اطمینان لازم برای جداسازی RNA دست نخورده را فراهم می نماید. نمک گوانیدینوم برای تخریب سلولی کافی می باشد. استخراج با استفاده از مواد کائوتروپیک معمولاً با استخراج آلی و رسوب توسط الکل و یا کلرورسزیم شیب غلظتی کلرورسزیم، متدهای مبتنی بر سیلیکا، تعویض یونی و یا گرینش هیبریدی همراه می باشد.

²⁴ Chaotropic

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

هر دو روش رسوب با الکل و یا کلرور لیتیم مبتنی بر salting out اسید نوکلئیک می باشد. در بسیاری از روش های جداسازی RNA، از رسوب الکلی یا ایزوپروپانول در حضور سدیم و یا آمونیم استات استفاده می شود. RNA قبل از رسوب ابتدا تاحدودی تخلیص شده، زیرا پروتئین ها و DNA نیز رسوب می کند. این رسوب سپس با استفاده از الکل ۷۰ درصد جهت خارج نمودن نمک های باقی مانده شسته شده، خشک می شود و مجدداً حل می گردد. این روش به ما این اجازه را می دهد که RNA را تغلیظ نموده و نمک ها را خارج نماییم، البته این روش وقتگیر می باشد. بطور کلی این روش برای تخلیص حجم فراوان RNA بسیار خوب عمل می کند. پلت رسوب داده شده ممکن است در طی مرحله خارج نمودن الکل و یا در مرحله خشک نمودن از دست برود. این حالت بویژه در حجم های اندک RNA و یا وقتی پلت کوچک می باشد و یا زمانیکه حلال های آلی باقیمانده (نظیر کلروفرم) در پلت وجود دارند، دیده می شود.

در زمانیکه DNA در محلول باقی مانده، کلرور لیتیم می تواند برای رسوب افتراقی RNA مورد استفاده قرار گیرد. این روش اگرچه در مقایسه با رسوب الکلی به چندین ساعت زمان برای اجرا نیاز دارد، معهذاً خلوص بالاتری را در مقایسه با روش تخلیص آلی فراهم می نماید. بعلاوه رسوب به غلظت بالایی از کلرورسزیم نیاز دارد که می تواند در واکنش آنزیمی پایین دستی نظیر RT-PCR تداخل نماید. رسوب الکلی معمولاً در ادامه رسوب با کلرور لیتیم به کار گرفته می شود.

۱۱-۱۲-۲- شیب غلظتی کلرورسزیم و سوکروز

RNA می تواند توسط سانتریفیوژ از طریق شیب غلظتی کلرورسزیم تخلیص گردد. RNA ای که تاحدودی تخلیص شده با کلرورسزیم و اتیدیوم برآمید مخلوط شده در به مدت چندین ساعت و معمولاً یک شب (۱۴ الی ۱۲ ساعت) سانتریفیوژ می شود (36000-40000 x g). در حالی که DNA و پروتئین ها در فاز محلول (supernatant) قرار دارند. RNA در ته لوله سانتریفیوژ بصورت پلت جدا می شود. پلت RNA، جمع آوری شده و توسط الکل جهت خارج نمودن باقیمانده کلرورسزیم رسوب داده می شود. این روش امکان جداسازی RNA در کیفیت بالا را فراهم می نماید. اگرچه بواسطه آنکه بسیار وقتگیر، پر زحمت و گران می باشد، استفاده از آن برای آماده سازی نمونه های متعدد مشکل است. از دیگر محدودیت های این روش، استفاده از اتیدیوم بروماید و کلرورسزیم است که خاصیت سمی دارد. ملکول های کوچک RNA نظیر tRNA و 5s rRNA، در گرادیان کلرورسزیم ته نشین نمی گردند. این ملکول های کوچک می توانند از طریق گرادیان سوکروز و یا ژل آگارزی که شامل متیلن مرکریک می باشد جدا شوند. هیدروکسیدمتیلن مرکریک شدیداً توکسیک و فرار بوده، لذا استفاده از آن خطرناک می باشد و دفع آن به همراه مواد شیمیایی مشکل است.

۱۲-۱۲-۲- کروماتوگرافی تعویض یونی

فاز جامد کروماتوگرافی تعویض یونی مبتنی بر واکنش بین شارژ منفی فسفات اسید نوکلئیک، و شارژ مثبت ملکول های سطحی سوسترای می باشد. RNA به سوسترای تحت شرایط نمکی معین متصل شده، دیگر آلوده کننده ها نظیر DNA، پروتئین ها و متابولیت ها با غلظت های متفاوت نمکی شسته می شوند (پاک سازی می شوند). این روش، تخلیص موازی RNA، DNA و دیگر ملکول های کوچک RNA از نمونه را امکان پذیر می نماید. اسیدنوکلیک شسته شده (تصفیه شده) توسط رسوب، با الکل بازیافت شده که برای ادامه کار مناسب می باشد.

تکنولوژی تعویض یونی RNA با خلوص و فعالیت بیولوژیکی معادل حداقل دو نوبت تخلیص در گرادیان کلرورسزیم بوده ولی در زمان بسیار کوتاهتری قابل انجام می باشد. RNA جدا شده شامل ملکول های کوچکتر، که در گرادیان کلرورسزیم و یا روشهای مبتنی بر سیلیکا بدست نمی آید، نیز هست. ملکول های کوچک RNA می توانند بصورت انتخابی جدا شوند. علاوه بر این، تکنیک مذکور از مواد سمی اجتناب نموده و می تواند برای احتیاجات گوناگون و همچنین مقیاس های گوناگون تخلیص مورد استفاده قرار گیرد.

برخی از شرکت ها کیت هایی برای جدا سازی RNA و DNA پیشنهاد می نمایند که مبتنی بر تکنیک تعویض یونی می باشد. روش هایی که بصورت کیت توسط شرکت های گوناگون در مراحل زمانی متفاوت و کیفیت و اندازه های گوناگون، RNA جدا می نماید عرضه شده است.

۱۳-۱۲-۲- روش مبتنی بر سیلیکا

تکنولوژی مبتنی بر سیلیکا می تواند یک روش سریع و مطمئن جداسازی RNA را فراهم نماید. این روش مبنی بر جذب انتخابی اسید نوکلئیک به سیلیکا در حضور غلظت بالای نمک های کائوتروپیک نظیر گوانیدیوم هیدروکلراید و گوانیدیوم

ایزوتیوسیانات سدیم، نمک یددار و سدیم پرکلراید می باشد. استفاده بافر اختصاصی در روش لیز این اطمینان را فراهم می نماید تا تنها RNA جذب شود، درحالیکه DNA، پروتئین های سلولی و متابولیت ها در محلول باقی می ماند. این آلوده کننده ها با شستشو پاک شده و خارج می شوند و RNA با کیفیت بالا با استفاده از یک بافر کم نمک شسته می شود. با استفاده از مواد مناسب و یا کیت ها RNA شسته شده برای واکنش های پایین دستی آماده می گردد.

توجه: در نمونه های واجد مقادیر اندک RNA ممکن است DNA در عوض RNA جذب گردد. لذا آزمون برای آلودگی RNA به DNA ژنومیک ممکن است برای ادامه کار ضروری باشد.

چندین تکنولوژی مبتنی بر سیلیکا که در روش و کمیت RNA جدا شده متفاوت می باشد، در حال بکارگیری است. بعنوان مثال ذرات سیلیکا ممکن است در شکل سوسپانسیون و یا در غشاء در شکل spin column و یا واحدهای چند حفره ای^{۲۵} از جمله روشهای اتوماتیک برای حداکثر میزان بازدهی طراحی گردد. به هر حال استفاده از spin column راحت تر بوده و از انتقال ذرات سیلیکا به RNA که در مرحله آخر جدا می شود اجتناب می نماید.

۲-۱۲-۱۴- جداسازی mRNA با استفاده از کروماتوگرافی متمایل به اولیگو^{۲۶}

کشف اینکه mRNA یوکاریوتیک شامل ترادف کووالانی متصل به پلی آدنیلک اسید [poly(A)] در انتهای 3' می باشد منجر به بکارگیری روشهای تخلیص تمایلی گردید. این روش ها هیبریدایزیشن poly A را به ترادف اولیگو (dT) مجتمع در ماتریکس جامد مورد استفاده قرار می دهد. روش های اولیه الحاق یافته ترادف اولیگو (dT) را بطور کووالانی به سلولز متصل نموده است. علاوه بر اولیگو های واجد سلولز، کیت های در دسترس تجارتي نیز از اولیگو (dT) متصل به ذرات مغناطیسی، ذرات پلی استرن-لاتکس یا پلیت های پلی استرن میکروتایتر بهره می گیرند. بطور نمونه mRNA کامل از نمونه کلینیکی جدا شده و برای تخلیص کششی توسط حرارت در ۶۵ درجه سانتیگراد بمدت ۵ دقیقه تخلیص می گردد. پس از سرد نمودن سریع در روی یخ برای حذف ساختمان ثانویه آماده می گردد. RNA آماده شده سپس برای ماتریکس مجتمع شده از اولیگو، بکار گرفته می شود. ماتریکس چندین بار شسته شده تا موادی که بطور غیر اختصاصی متصل شده اند، خارج گردد. mRNA نیز شسته می شود. سپس با استفاده از رسوب توسط الکل یا تبخیر در تغلیظ کننده خلأیی سانتریفیوژی^{۲۷}، تغلیظ می شود. روشهای تخلیص کششی اولیگو (dT) برای تخلیص mRNA غیر پلی آدنیله مناسب نمی باشد.

۲-۱۲-۱۵- ملاحظات اختصاصی برای جدا سازی RNA از منابع نمونه ای متفاوت

نمونه های بالینی در مقدار RNA و محتویات آن متفاوت می باشند که می تواند سبب مشکلاتی در RNA جدا شده و آنالیز شده شود. این نوع نمونه ها نیازمند ملاحظات اختصاصی بوده که معمولا در نمونه های استاندارد رعایت آن مورد نیاز نمی باشد. در این بخش این ملاحظات در نمونه هایی که از منشاء های گوناگون بدست می آید مورد بحث قرار می گیرد.

۲-۱۲-۱۶- بافت قلب، عضله و پوست

جداسازی RNA از عضلات اسکلتی و بافت پوست بواسطه وفور پروتئین های انقباضی، بافت پیوندی و کولازن می تواند مشکل باشد، به گونه ای که در جداسازی RNA تداخل نماید. این نمونه ها باید با پروتئیناز K تحت تأثیر قرارداد شوند. این پروتئینازها باید در ادامه واکنش غیر فعال شده تا سبب تخریب RNA نگردد (رجوع به ۷.۳.۳.۲.۱).

۲-۱۲-۱۷- خون

نمونه خون بطور معمول برای بررسی های بالینی جمع آوری می گردد. خون واجد مجموعه ای از آنزیم های مهار کننده می باشد که می تواند در ادامه آنالیز RNA تداخل نماید. علاوه بر این مواد ضد انعقاد معمول نظیر EDTA و هپارین می تواند در ادامه کار تأثیر نماید. جداسازی RNA از خون نیازمند روشی است که RNA، با کیفیت بالا بدون حضور هر آلوده کننده ای و یا آنزیم های مهار کننده را فراهم نماید.

اربتروسیت ها (سلول های گلبول قرمز رسیده) ممکن است از رتیکولوسیت هایی (سلول های نابالغ گلبول قرمز) تشکیل شده باشند که واجد mRNA (اکثرا globin RNA) بوده و در جداسازی RNA از اهمیت کمتری برخوردار باشد. لکوسیت ها شامل سه نوع سلول اساسی لنفوسیت، منوسیت و گرانولوسیت می باشند.

²⁵ Multiwell units

²⁶ Oligo Affinity Chromatography

²⁷ Centrifugal vacuum concentrator

خارج نمودن اریتروسیت ها ممکن است جداسازی RNA را ساده گرداند. این مهم می تواند با لیز انتخابی اریتروسیت ها که به شک هیپوتونیک در مقایسه با لکوسیت ها حساس تر می باشند، انجام گردد. آنها به سرعت در حضور بافر هیپوتونیک متلاشی می شوند. لکوسیت های دست نخورده، سپس توسط سانتریفیوژ جدا شده و استخراج RNA انجام می گردد. متد جایگزین متداول دیگر سانتریفیوژ شیب غلظتی^{۲۸} است. برخلاف روشهای مبتنی بر لیز اریتروسیت، سانتریفیوژ شیب غلظتی تنها سبب بازیافت سلولهای منونوکلئر (لنفوسیت و منوسیت) می گردد و گرانولوسیت ها را، خارج می نماید. سلولهای تک هسته ای جدا شده توسط سانتریفیوژ شیب غلظتی می تواند برای جداسازی RNA با استفاده از همان روشی که نظیر هر نوع سلول دیگر است، ادامه یابد. باید توجه نمود که اگر مراحل تثبیت نمودن نمونه بلافاصله پس از خونگیری انجام نگردد، پروفایل نسخه برداری ژنی در نمونه خون تام ذخیره شده می تواند تغییر یابد. معرف های تثبیت کننده اختصاصی برای نمونه خون تام بصورت تجارتي در دسترس می باشند و اگر تثبیت mRNA و rRNA در نظر است باید انجام شود.

۲-۱۲-۳-۲-۲-۲ باکتری ها

ویژگی mRNA باکتریایی در مقایسه با mRNA یوکاریوت ها در تعدادی از جنبه های ضروری متفاوت می باشد. mRNA پروکاریوت ها فاقد سر 5' بوده و به ندرت دارای دنباله پلی A می باشند که به معنی این است که جداسازی mRNA توسط روش هیبرید اولیگو (dT) امکان پذیر نمی باشد. علاوه بر این پرایمر اولیگو (dT) نمی تواند برای سنتز cDNA مورد استفاده قرار گیرد و باید از پرایمر های راندوم^{۲۹} استفاده شود. علاوه بر این mRNA باکتریایی با طول عمری معادل ۳ دقیقه برای رشد سریع باکتری، بصورت فزاینده ای ناپایدار می باشد. گاهی اوقات mRNA باکتریایی زمانیکه برای ترجمه مورد نیاز می باشد شروع به تجزیه می نماید. به این دلیل مطالعات بیان ژن در پروکاریوت ها در مقایسه با یوکاریوت ها مشکل تر است. بر این اساس نمونه ها باید پس از جدا نمودن و قبل از انجام مراحل کار بر روی نمونه به سرعت تثبیت شوند.

۲-۱۲-۴-۲-۲-۴ RNA آزاد در حال گردش^{۳۰} در سرم

RNA همراه با پروتئولپیدها در سرم برخی از بیماران سرطانی شناسایی می گردد. غلظت آن بطور تقریب ده برابر بیش از DNA شناور آزاد در پلاسماي انسانی می باشد. این RNA با طول عمری بطور متوسط دو روز در خون نام نسبتا پایدار می باشد. با این حال این RNA می تواند در طی سیکل های ذوب و انجماد متوالی تجزیه گردد. نظیر RNA ویروسی در مایعات بدنی فاقد سلول، افزودن حاملین RNA ممکن است برای جدا سازی این نوع از RNA ضروری باشد.

۲-۱۲-۵-۲-۱۲-۵ بافتهای چرب

جداسازی RNA از بافت های چرب (بطور مثال بافت، مغز و ...) با بافرهای لیز کننده می تواند بواسطه تداخل حجم لیپید مشکل باشد. بافت های واحد حجم بالای چربی بطور کامل توسط بافرهای لیزکننده مایع لیز نمی گردند، لذا در صورت محتویات بالای بافت و انباشت در غشای spin column و در نتیجه سبب مسدود شدن آن غشا شده و بازده پایین استخراج RNA می شود. بنابراین استخراج آلی بافت چرب ضروری است زیرا فنل می تواند این نمونه های چرب را بطور کامل لیز نماید.

ترکیب استخراج آلی با روش مبتنی بر سیلیکا می تواند از محدودیت های توصیف شده روش آلی (نظیر حضور فنل، و کلروفرم در RNA و یا احتمال از دست دادن RNA در طی رسوب) جلوگیری نماید. بافت در فنل و یا مخلوط فنل و GTC^{۳۱} هموزن شده، که با جداسازی فاز توسط کلروفرم ادامه می یابد. پس از تنظیم شرایط اتصال، فاز آبی می تواند مستقیما به غشاء سیلیکا افزوده شده و مراحل استخراج ادامه یابد.

²⁸ Density –Gradian Centrifugation

²⁹ Random Primer

³⁰ Free Circulating RNA

³¹ Guanidium Thiocyanate