مقاله پژوهشی

# مقایسه کارآیی روش استخراجی فنل کلروفرم سیلیکا با روش گوانیدین تیوسیانات سیلیکا در بازیابی DNA از بقایای اسکلتی

**دکتر علیرضا صبوری*- دکتر محمد فضیلتی**- حمیده یادگاری*****

* دکترای علوم آزمایشگاهی، سرپرست آزمایشگاه ژنتیک پزشکی قانونی استان اصفهان

** دکترای بیوشیمی بالینی، دانشیار دانشگاه صنعتی اصفهان

*** کارشناس ارشد ژنتیک انسانی، کارشناس آزمایشگاه ژنتیک پزشکی قانونی استان اصفهان

## چکیده

**زمینه و هدف:** تست‌های DNA Typing نقش بسیار مهمی در تعیین هویت اجساد و شناسایی قربانیان بلایای دسته‌جمعی و اجساد سربازان جنگی دارند. به دست آوردن DNA با وزن مولکولی مناسب برای انجام آزمایشات DNA Typing در اجساد سوخته، اجسادی که مدتی طولانی از مرگ آنها گذشته یا مدتی در آب غوطه ور بوده‌اند به علت تجزیه DNA با مشکلات زیادی همراه می‌باشد. هدف از این بررسی، مقایسه و ارزیابی دو روش استخراجی مختلف به نام‌های فنل -کلروفرم سیلیکا و گوانیدین تیوسیانات سیلیکا به منظور بررسی DNA استخوان‌های قدیمی می‌باشد.

**روش بررسی:** از بیست نمونه استخوانی از اجساد مجهول الهویه که به طور تصادفی انتخاب شده بودند و به طور میانگین هشت سال از زمان مرگ آنها می‌گذشت، با استفاده از روشهای فنل کلروفرم سیلیکا و گوانیدین تیوسیانات سیلیکا، مولکول DNA استخراج گردید. کمیت DNA با استفاده از روش اسپکتروفتومتری تعیین شد. سپس DNA استخراج شده درهشت منطقه پلی مورفیک کوتاه تکرارشونده متوالی (STRs)به نام‌های CD4, vWA, LPL, D5S818, D16S539, D13S317, F13, FES در واکنش زنجیره‌ای پلیمرازی (PCR) تکثیر گردید. نرخ موفقیت در انجام DNA پروفایلینگ نمونه ها، به وسیله محاسبه تعداد آلل های قابل شماره‌گذاری بر روی ژل اکریل آمید بعد از الکتروفورز در هر مورد اندازه‌گیری شد.

**یافته‌ها:** میزان DNA استخراج شده و میزان خلوص آن بوسیله روش فنل -کلروفرم به طور متوسط به ترتیب ۲۵۶/۲۷ میکروگرم بر میلی‌لیتر و ۱/۰۷ به دست آمد؛ در مقایسه، غلظت و میزان خلوص DNA استخراج شده با روش گوانیدین - تیوسیانات به طور متوسط به ترتیب ۱۷۰/۸۶ میکروگرم بر میلی لیتر و ۰/۹۴ به دست آمد. نتایج ما بر اساس نرخ موفقیت کلی تکثیر در واکنش PCR در هشت منطقه STRs اشاره شده در بالا نشان می‌دهد که روش فنل کلروفرم (۷۶٪) نسبت به روش گوانیدین تیوسیانات سیلیکا (۶۴٪) کارآتر می‌باشد.

**نتیجه‌گیری:** هرچند روش فنل کلروفرم سیلیکا نتایج بهتری را نسبت به روش گوانیدین تیوسیانات سیلیکا در STR Typing از نمونه‌های استخوان تجزیه شده ارایه می‌دهد، ولیکن ما استفاده همزمان از هر دو روش را در آنالیز بافت‌های استخوان قدیمی برای بهبود تفسیر نتایج پیشنهاد می‌کنیم.

**واژگان کلیدی:** استخوان، DNA پروفایلینگ، واکنش زنجیره ای پلیمرازی ، توالی کوتاه تکرار شونده

وصول مقاله: ۱۳۸۷/۲/۷ تأیید مقاله: ۱۳۸۷/۷/۲۰

نویسنده پاسخگو: اصفهان، فلکه فیض، اداره کل پزشکی قانونی - sabouri45alireza@yahoo.com

## مقدمه

استخراج مولکول DNA از بقایای اسکلتی و انجام DNA Typing بر روی استخوان‌ها، کاربردهای زیادی در زمینه‌های مختلف به خصوص باستان شناسی، انسان شناسی، بیولوژی، تکوین مولکولی، پزشکی قانونی و علوم جنایی (تعیین هویت اجساد و شناسایی قربانیان آتش‌سوزی ها، سوانح هوایی، و دیگر بلایای دسته‌جمعی و شناسایی سربازانی که مدتها از زمان مرگشان سپری می‌شود) دارد. از این رو استخراج و تکثیر موفقیت آمیز DNA از بقایای اسکلتی اهمیت بالایی دارد. میزان DNA با وزن مولکولی مناسب برای انجام آزمایشات DNA Typing در اجسادی که مدتی از مرگ آنها می‌گذرد به علت

تجزیه مواد ژنتیکی که بلافاصله پس از مرگ اتفاق می‌افتد، اندک می‌باشد. ولیکن ازآنجایی که استخوان‌ها نسبت به فرسایش فیزیکی و شیمیایی محیط مقاوم تر می‌باشند، منبع با ارزشی برای استخراج DNA می‌باشند (۳-۱).

البته سه مشکل عمده برای بازیابی DNA و انجام DNA Typing روی بقایای اسکلتی قدیمی و یا سوخته وجود دارد که عبارتند از: ۱- میزان بالای تجزیه DNA، ۲- وجود آلودگی‌های DNA و۳- استخراج فاکتورهای مهارکننده همزمان با استخراج DNA. وجود DNA تجزیه شده و میزان کم آن در واکنش زنجیره‌ای پلیمرازی (PCR)[1] می‌تواند منجر به عدم تکثیر هر دو آلل و ایجاد هموزیگوت کاذب گردد (۶-۴). به علاوه، آنزیم DNA پلی مراز مولکول‌های DNA خارجی (کامل وتجزیه نشده) را به مولکول‌هایDNA شکسته شده نمونه موردنظر ترجیح می‌دهد، و در بهترین حالت باعث تکثیر هر دو نوع مولکول DNA خارجی و مولکول DNA نمونه موردنظر می‌گردد، که این امر باعث می‌شود در تکرار واکنش‌هایPCR از یک نمونه نتایج ظاهراً متفاوتی بدست آید (۹-۷).

بنابراین با توجه به نکات ذکر شده در بالا، بهینه‌سازی و انتخاب یک روش استخراجی که قادر به استخراج DNA با کمیت و کیفیت مناسب و حذف مهارکننده‌های PCR باشد، یک مرحله اساسی در تعیین هویت موفقیت‌آمیز از بقایای اسکلتی می‌باشد (۱۰).

با یک مرور کوتاه بر روی مقالات با موضوع استخراج DNA از استخوان می‌توان دریافت که تقریباً به تعداد مقالات چاپ شده روش استخراجی وجود دارد؛ که البته این تفاوت‌ها در اساس راهکار نیست بلکه در جزییات چگونی انجام پروتکل می‌باشد. هرچند ارایه یک پروتکل به عنوان بهترین پروتکل استخراجی برای همه نمونه‌های استخوان قابل توجیه و امکان‌پذیر نمی‌باشد؛ ولیکن مقایسه و ارزیابی استراتژی‌های اساسی استخراج DNA اهمیت زیادی دارد. پروتکل-هایی که ادعا می‌کنند به صورت موفقیت‌آمیزی قادر به استخراج DNA مناسب از استخوان‌ها شده‌اند را می‌توان به طور اساسی به چهار استراتژی عمده تقسیم‌بندی کرد. این استراتژی‌ها با نام‌های فنل، سیلیکا، جوشاندن و کلروفرم شناخته می‌شوند (۱). هدف مطالعه ما مقایسه نمودن روش‌های استخراجی فنل کلروفرم سیلیکا و گوانیدین تیوسیانات سیلیکا در بدست آوردن DNA با کمیت و کیفیت مناسب برای انجام PCR قابل تکرار و انجام DNA Typing روی بقایای اسکلتی انسانی می‌باشد.

## روش بررسی

**مواد و نمونه‌ها:** نمونه‌ها شامل تعداد بیست قطعه استخوان از بقایای کاملاً اسکلتی شده انسانی بودند که در طی سالیان متمادی گذشته به اداره کل پزشکی قانونی استان اصفهان ارسال گردیده و تقریباً به طور میانگین بیش از هشت سال از فوت آنها می‌گذشت. قطعات استخوانی انتخاب شده ابتدا با محلول هیپوکلرید سدیم (bleach) شستشو داده شد و سطح آنها با استفاده از تیغ بیستوری و کاغذ سمباده ساییده و عاری از انساج و سایر آلودگی‌های محیطی (از قبیل خاک و گل ....) شد. تکه‌های برداشت شده با آب مقطر استریل و دو بار تقطیر، آبکشی و سپس در دمای اتاق خشک شدند. آنگاه نمونه‌ها در پلیت‌های یکبار مصرف و به مدت ۲۰ دقیقه در زیر اشعه UV قرار داده شدند. نمونه‌ها پس از چندبار انجماد در دمای $70^{\circ}C$ - و ذوب در دمای آزمایشگاه (freeze & thaw)، به روش مکانیکی و در شرایط کاملاً استریل پودر گردیدند.

**جلوگیری از آلودگی:** مهم‌ترین نکته در فرآیند کار اجتناب از آلودگی محلول‌ها و لوازم به ذرات DNA خارجی است که می‌تواند از راه پوست، عطسه و سرفه به نمونه‌ها انتقال یابد. لذا کار با دستکش، ماسک دهان و صورت الزامی است. کلیه وسایل و محلول‌ها اتوکلاو شده و در مواردی که محدودیت برای اتوکلاو وجود داشت تحت تابش اشعه UV قرار داده شدند.

### روش۱ - گوانیدین تیوسیانات سیلیکا

روش استاندارد سیلیکا (Höss & Pääbo Method) (۱۱) به عنوان اساس کار قرار داده شد و سپس تغییراتی برای حصول نتیجه بهتر اعمال شد.

### ساخت محلول ها

- **معرف شماره ۱:** ۱/۰۵ گرم پودر گوانیدین تیوسیانات (guanidinium thiocyanate) + ۳ میلی لیتر آب مقطر دو بار تقطیر + ۲/ ۲ میلی لیتر از معرف شماره ۴.
- **معرف شماره ۲:** ۱/۰۵ گرم پودر گوانیدین تیوسیانات + ۰/۶ میلی لیتر استات آمونیوم یک مولار + ۵/۴ میلی لیتر آب مقطر دو بار تقطیر استریل
- **معرف شماره ۳:** ۰/۱ میلی لیترتریس (Tris) یک مولار + ۱ میلی لیتر EDTA یک مولار + ۰/۵ میلی لیتر SDS ده درصد + ۸/۴ میلی لیتر آب مقطر دو بار تقطیر استریل.
- **معرف شماره ۴:** ۲ میلی لیتر محلول EDTA (ethylenediaminetetraacetic acid) ۰/۵ مولار + ۰/۵ میلی لیتر Tris ۰/۰۱ مولار + ۱/۲ میلی لیتر از Triton X ۶/۳ + میلی لیتر آب مقطر دو بار تقطیر استریل.

### روش استخراج

در دو میکروتیوب جداگانه حدود ۵۰ میلی‌گرم پودر استخوان ریخته و یک تا دو بار با کلروفرم و یک تا دو بار با محلول NaOH ۰/۰۵ مولار شستشو داده شدند. آنگاه لوله‌ها در زیر هود لامینار قرار داده شدند تا کاملاً خشک گردند. سپس ۰/۵ میلی‌گرم پودر پروتئیناز

1 - Polymerase Chain Reaction

K در هزار میکرولیتر از معرف شماره ۳ حل شد و به هر میکروتیوپ ۵۰۰ میکرولیتر از آن اضافه گردید. نمونه‌ها به مدت ۲ شبانه روز در دستگاه بن ماری ۳۷ °C با حرکت یکنواخت قرار داده شدند. بعد از سانتریفیوژ فاز رویی به میکروتیوب‌های جدید منتقل شد. و به هر یک از لوله‌ها یک میلی‌لیتر از معرف شماره ۱ افزوده شد و به مدت ۲۴ ساعت در دمای اتاق روی روتاتور قرار گرفت. آنگاه به هر میکروتیوپ ۴۰ میکرولیتر از سوسپانسیون سیلیکا اضافه و به مدت ۲۰ دقیقه در حرارت اتاق به آرامی روتاتور شدند سپس فاز رویی پس از سانتریفیوژ دور ریخته شد. و رسوب ذرات سیلیکا در سه نوبت و هر بار با ۳۰۰ میکرولیتر از معرف شماره (۲) شستشو داده شد. رسوب مجدداً به حالت سوسپانسیون درآورده شد و با ۴۰۰ میکرولیتر اتانول ۷۰ درجه در ۴ نوبت شستشو داده شد. درآخرین مرحله به رسوب، ۴۰۰ میکرولیتر اتانول ۷۰ درجه اضافه و به مدت یک ساعت در دمای ۲۰ - °C قرار داده شد. آنگاه با خالی کردن فاز رویی و قرار دادن لوله‌ها در زیر هود (air flow laminar) به مدت ۳۰ دقیقه اجازه داده شد تا اتانول از محیط خارج گردد. یکبار شستشو با ۴۰۰ میکرولیتر استون ادامه یافت، و بعد از سانتریفیوژ، استون از محیط عمل خارج گردید. و میکروتیوپ‌ها به مدت ۵ دقیقه در بن ماری ۵۵ °C قرار داده شدند تا کاملاً خشک گردند. در مرحله بعد به هر میکروتیوپ ۵۰ میکرولیتر از محلول Tris HCl ۱۰ میلی مولار با pH= ۸ اضافه و انکوباسیون به مدت ۱۰ دقیقه در ۶۰ °C انجام گرفت. و بعد از سانتریفیوژ، فاز رویی برای انجام PCR به میکروتیوب‌های جدید منتقل گردید.

**روش ۲- فنل کلروفرم سیلیکا**

پروتکل استخراج DNA استاندارد فنل (۱۲) به عنوان پایه قرار داده شد. سپس با تغییراتی در پارامترهای اصلی روش زیر بهینه گردید.

۰/۳ گرم پودر استخوان یک تا دو بار با کلروفرم و یک تا دو بار با محلول NaOH ۰/۰۵ مولار شستشو داده شد. آنگاه لوله‌ها در زیر هود لامینار قرار داده شدند تا کاملاً خشک گردند.

سپس دکلسیفیکاسیون در ۴/۵ میلی لیتر EDTA ۰/۵ مولار با pH = ۸/۳ در دمای اتاق و روی دستگاه روتاتور به مدت ۱۲۰ ساعت انجام شد. بعد از سانتریفیوژ، محلول رویی دور ریخته شد و ته نشین باقی مانده با انکوباسیون در ۵۶° C در محلول بافری لیزکننده (ان- لوریل سارکوزین ۲٪، کلرید سدیم ۱۰۰ میلی مولار، تریس HCl ۱۰ میلی مولار و ۱۰ EDTA میلی مولار[ pH= ۸]) و پروتئیناز K به مدت ۳ ساعت قرار داده شد. سپس ۳ میلی‌لیتر از ترکیب فنل- کلروفرم- ایزوآمیل الکل اضافه شد و به آرامی مخلوط گردید، و بعد از انکوباسیون لوله‌ها به مدت ۱۰ دقیقه در ۵۶° سانتیگراد، فاز آبی و آلی از یکدیگر جدا گردید. فاز آبی به لوله‌های فالکون جدید منتقل شد و ۴/۵ میلی لیتر کلروفرم اضافه شد و به آرامی مخلوط شدند، سپس با انکوباسیون لوله‌ها به مدت ۱۰ دقیقه در ۵۶° C ، فاز آبی و آلی از یکدیگر جدا گردید. در مرحله بعد فاز آبی به لوله‌های فالکون جدید منتقل و به ترتیب به آنها ۱۰۰ میکرولیتراستات سدیم ۲ مولار (pH = ۴/ ۵) و ۳/۳ میلی لیتر ایزوپروپانول الکل ۱۰۰٪ و ۳۰ میکرولیترمحلول ذرات سیلیکا اضافه و به مدت ۱۰ دقیقه در حرارت اتاق با حرکات یکنواخت مخلوط گردید.

پس از سانتریفوژ، محلول رویی دور ریخته شد. و سپس پلیت حاصله ۲ بار با اتانول ۸۰٪ شستشو داده شد. و در نهایت اجازه داده شد رسوب به مدت ۳۰ تا ۶۰ دقیقه در حرارت اتاق بماند تا خشک شود. سپس ۱۰۰ میکرولیتر آب مقطر اضافه گردید.

کمیت DNAتخلیص شده از نمونه‌های فوق با دستگاه Specgene (England, Techne) اندازه‌گیری شد و میزان خلوص و کیفیت آن برآورد شد.

هشت منطقه پلی مورفیک STRs به اسامی CD4, vWA, LPL, D5S818, D16S539 D13S317, f13, FES با استفاده از ترموسایکر (England, Gradiant: Touchgen) تکثیر شدند. تکثیر هر یک از هشت لوکوس ذکر شده در حجم ۵۰ میکرولیتر شامل مواد با غلظت‌های زیر و پرایمر اختصاصی هر محل (۱۳) در ۴۰ سیکل انجام گرفت:

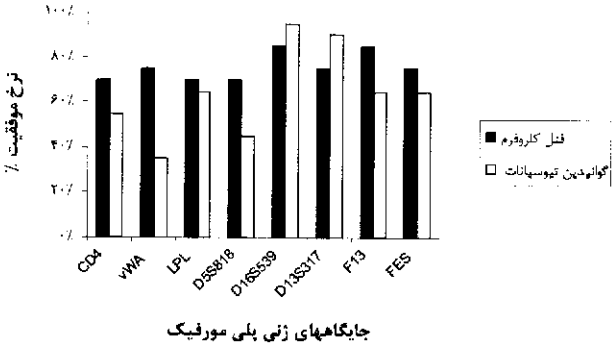
- ۱۰ × بافر PCR (تریس ۱۰ میلی مولار، کلرید پتاسیم ۵۰۰ میلی مولار، pH= ۸/۳) (دارای $MgCl_2$) ۸/ ۴ میکرولیتر
- dNTP Mix- ( ۱۰ میلی مولار هر dNTP) ۰/۹۶ میکرولیتر
- $MgCl_2$ ۵۰ میلی مولار ۱/۵میکرولیتر
- BSA (Bovine Serum Albumin) ۱۶۰میکروگرم بر میلی لیتر
- پرایمر رو به جلوبرای لوکوس STR مورد نظر ۰/۲ میکرومولار
- پرایمر رو به عقب برای لوکوس STR مورد نظر ۰/۲ میکرومولار
- Taq DNA polymerase ۲ واحد
- DNA هدف ۲۰ میکرولیتر

سپس حجم واکنش بوسیله آب مقطر دو بار تقطیر استریل به حجم ۵۰ میکرولیتر رسانده شد.

جداسازی قطعات تکثیر شده بر روی ژل پلی آکریل آمید ۸٪ به طول ۳۵ سانتی‌متر به مدت زمان یک شبانه روز و در کنار Allelic Ladder هر لوکوس انجام گرفت و حاصل کار با رنگ آمیزی نیترات نقره نمایان گردید.

## یافته‌ها

نتایج حاصل از این مطالعه نشان می‌دهد که متوسط میزان DNA حاصل از روش فنل کلروفرم سیلیکا ۲۵۶/۲۷ میکروگرم بر میلی‌لیتر و میزان متوسط خلوص آن ۱/۰۷ می‌باشد. متوسط میزان DNA حاصل از روش گوانیدین تیوسیانات سیلیکا ۱۷۰/۸۶ میکروگرم بر میلی‌لیتر و




**نمودار ۱- نرخ موفقیت تکثیر DNA استخراج شده با دو روش فنل کلروفرم سیلیکا و گوانیدین تیوسیانات سیلیکا در ۸ منطقه STR**

میزان متوسط خلوص آن ۰/۹۴ می‌باشد (جدول ۱).

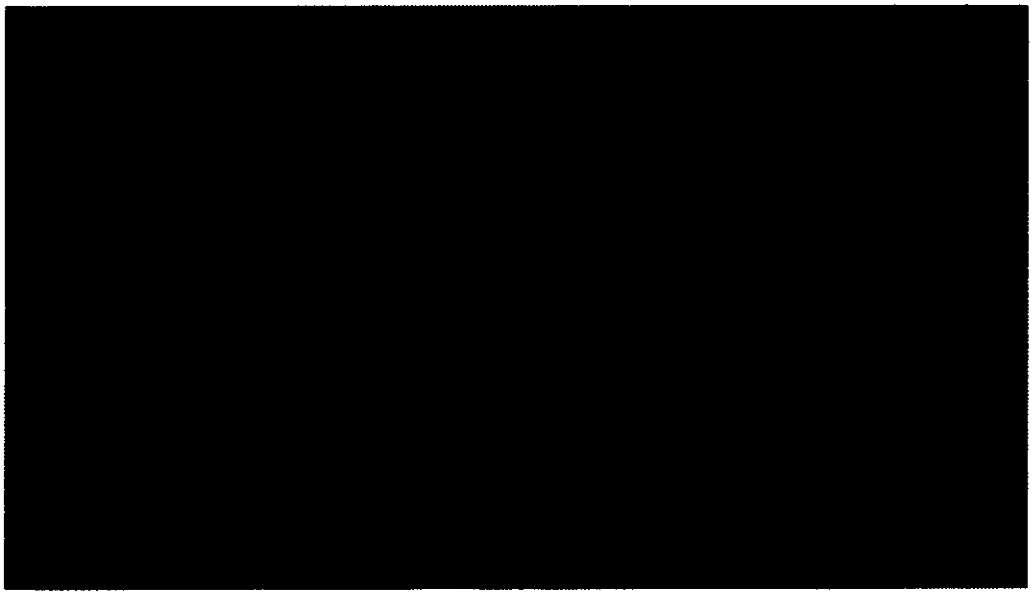
همانطور که در نمودار ۱ مشاهده می‌شود، نرخ موفقیت در تکثیر DNA استخراج شده از بیست نمونه استخوانی با روش استخراجی فنل کلروفرم سیلیکا در هشت منطقه پلی مورفیک، F13, D13S317, D16S539, D5S818, LPL, vWA, CD4 و FES به ترتیب ۷۰، ۷۵، ۷۰، ۷۰، ۸۵، ۷۵، ۸۵ و ۷۵ درصد می‌باشد؛ و با روش استخراجی گوانیدین تیوسیانات سیلیکا به ترتیب ۵۵، ۳۵، ۶۵، ۴۵، ۹۵، ۹۰، ۶۵ و ۶۵ درصد می‌باشد. بعضی از نمونه‌ها در بعضی از مناطق STR (توالی کوتاه تکرار شونده) با هر دو روش استخراجی جواب می‌دهند (تصویر ۱). بعضی از نمونه‌ها در بعضی از مناطق با یک روش نتایج قابل قبولی را ارایه می‌دهند در حالی که با روش دیگر نتایج قابل قبولی بدست نمی‌آید (تصویر ۲،۳،۴) (جدول ۲).

## بحث

مطالعه حاضر بر روی آنالیز دو راهکار استخراجی فنل- کلروفرم- سیلیکا و گوانیدین تیوسیانات سیلیکا برای بهبود ارایه خدمات متداول آزمایشگاه پزشکی قانونی در آنالیز نمونه‌های استخوانی به منظور تشخیص هویت افراد مجهول‌الهویه انجام شده است. موفقیت در تکثیر مناطق پلی مورفیک STR به عنوان یک پارامتر اصلی در بررسی‌های جنایی و پزشکی قانونی مطرح می‌باشد؛ ما در مطالعه خود علاوه بر میزان DNA استخراج شده و میزان خلوص آن، نرخ موفقیت تکثیر را برای ارزیابی روش‌های استخراجی مذکور انتخاب نمودیم.

ما در بررسی خود، ابتدا دو روش فنل-کلروفرم- سیلیکا و گوانیدین تیوسیانات سیلیکا را با ایجاد تغییراتی نسبت به روش استاندارد بهینه نمودیم. در این بررسی، تعیین غلظت و خلوص DNA از بیست نمونه استخوانی استخراج شده با دو روش فنل کلروفرم سیلیکا و گوانیدین تیوسیانات سیلیکا نشان داد که متوسط میزان DNA و متوسط میزان خلوص DNA بدست آمده از نمونه‌های اسکلتی با روش فنل کلروفرم سیلیکا از متوسط میزان DNA و متوسط میزان خلوص DNA بدست آمده از نمونه‌های اسکلتی با روش گوانیدین تیوسیانات سیلیکا بیشتر می‌باشد (جدول ۱). به علاوه، نرخ کلی موفقیت در تکثیر DNA در هر هشت منطقه پلی‌مورفیک مورد بررسی با به کار گیری روش فنل کلروفرم سیلیکا (۷۶٪) نسبت به به کارگیری روش گوانیدین تیوسیانات سیلیکا (۶۴٪) بیشتر می‌باشد.

**تصویر ۱- نتایج تکثیر DNA استخراج شده نمونه‌های ۱۲ و ۱۳ با دو روش فنل کلروفرم سیلیکا (Ph-Ch) و گوانیدین تیوسیلنات سیلیکا (GuSCN) در مناطق پلی مورفیک D5S818 و vWA**




**تصویر ۲- نتایج تکثیر DNA استخراج شده نمونه‌های ٦ و ۱۸ با دو روش فنل کلروفرم سیلیکا (Ph-Ch) و گوانیدین تیوسیانات سیلیکا (GuSCN) در منطقه پلی مورفیک CD٤**

**تصویر ۳- نتایج تکثیر DNA استخراج شده از نمونه‌های ۲،۹ و ۱۵ با دو روش فنل کلروفرم سیلیکا (Ph-Ch) و گوانیدین تیوسیانات سیلیکا(GuSCN) در منطقه پلی مورفیک LPL**

به طور کلی، روش فنل کلروفرم سیلیکا نتایج بهتری را در رابطه با STR Typing از نمونه‌های تجزیه شده اسکلتی نسبت به روش گوانیدین تیوسیانات سیلیکا نشان می‌دهد.

نتایج ما با نتایج بدست آمده از مطالعات وسیعی که Hummel و همکارانش در آزمایشگاه Göttingen آلمان روی استخراج DNA از بقایای اسکلتی در طی یک دهه انجام دادند، مطابقت داشت. آنها اعلام نمودند که پروتکل فنل کلروفرم در ایجاد STR Typing کامل بسیار بهتر از روش گوانیدین تیوسیانات سیلیکا عمل می‌کند (۱).

این در حالی است که Davoren و همکارانش با مقایسه دو روش فنل کلروفرم و گوانیدین تیوسیانات که بر روی بیست نمونه

**تصویر ٤- نتایج تکثیر DNA استخراج شده نمونه‌های ۵ و ۱۱ با دو روش فنل کلروفرم سیلیکا (Ph-Ch) و گوانیدین تیوسیانات سیلیکا (GuSCN) در منطقه پلی مورفیک D13S317**

استخوان انجام دادند، اعلام نمودند که روش گوانیدین تیوسیانات نسبت به روش فنل کلروفرم نتایج بهتری را نشان می‌دهد (۱۴).

هرچند، در مطالعه ما روش فنل کلروفرم نتایج بهتری را نشان می‌دهد، لیکن به دلایل زیر ما انجام هر دو روش را برای استخراج DNA از بقایای اسکلتی که برای تعیین هویت ارسال شده‌اند را پیشنهاد می‌کنیم:

- برای برخی از نمونه‌ها و در بعضی از مناطق مولکولی در روش گوانیدین تیوسیانات نتیجه حاصل شد ولیکن در روش فنل کلروفرم جوابی بدست نیامد و بالعکس در مواردی در روش فنل کلروفرم جواب حاصل شد ولی در روش گوانیدین تیوسیانات جوابی به دست نیامد. برای مثال، نمونه استخوان شماره ۲ در منطقه LPL با روش فنل کلروفرم جواب داده ولی با روش گوانیدین تیوسیانات جواب نداده است (تصویر۳).

- گاهی محصولات PCR در یک روش ایجاد آلل‌های کاذب می‌نمایند که در روش دیگر این آلل‌های کاذب وجود ندارد. برای مثال استخوان شماره ۵ در منطقه D۱۳S۳۱۷ با روش فنل کلروفرم دارای چهار آلل ۸،۹،۱۱،۱۲ بود در حالی که با روش گوانیدین تیوسیانات تنها آلل‌های ۸ و ۱۲ دیده شد (تصویر۴). و یا بالعکس، نمونه شماره ۹ در منطقه LPL با روش گوانیدین تیوسیانات دارای آلل‌های ۶،۷،۸ بود ولیکن با روش فنل کلروفرم تنها آلل‌های ۶ و ۸ دیده شد (تصویر۴).

- گاهی اوقات به دلیل تجزیه و تخریب مولکول DNA، تکثیر هر دو آلل در واکنش PCR صورت نمی‌گیرد، که این امر منجر به ایجاد هموزیگوت کاذب در نمونه‌های هتروزیگوت می‌گردد. این وضعیت را می‌توان در مورد نمونه ۱۸ در منطقه CD۴ مشاهده نمود که در روش فنل کلروفرم آلل‌های ۴ و ۱۰ به خوبی دیده می‌شوند در حالی که در روش گوانیدین تیوسیانات تنها آلل ۴ دیده می‌شود (تصویر۲) (جدول ۲).

## نتیجه‌گیری

هرچند روش فنل کلروفرم سیلیکا نتایج بهتری را در رابطه با STR Typing از نمونه‌های تجزیه شده اسکلتی نسبت به روش گوانیدین تیوسیانات سیلیکا نشان می‌دهد، ولیکن با توجه به یافته‌ها و نتایج حاصله به کلیه آزمایشگاه‌هایی که در زمینهDNA Typing از بقایای اسکلتی بویژه استخوانهای قدیمی فعالیت دارند توصیه می‌شود برای نیل به نتایج قطعی تر و تفسیر بهتر نتایج از هر دو روش فنل کلروفرم سیلیکا و گوانیدین تیوسیانات سیلیکا برای استخراج DNA استفاده نمایند. ضمناً از آنجایی که حجم DNA استخراج شده از نمونه‌های استخوانی زیاد نمی‌باشد، توصیه می‌شود برای کار بر روی مناطق مولکولی بیشتر (۱۳ یا ۱۶ منطقه پلی‌مورفیک STR) از کیت‌های تجاری استاندارد تکثیر PCR و دستگاه ژنتیک اتوآنالیزر ABI استفاده شود. همچنین برای افزایش سرعت و کاهش میزان آلودگی در مرحله پودر نمودن قطعات استخوان بهتر است از دستگاههای ویژه همچون Barocycler که از تکنولوژی سیکل‌های فشاری بهره می‌گیرد، برای این امر استفاده شود.

### تقدیر و تشکر

این مقاله حاصل طرح پژوهشی شماره ۱/۲/۱۸۳۶۷ مصوب

معاونت پژوهشی سازمان پزشکی قانونی کل کشور می‌باشد که در آزمایشگاه ژنتیک اداره کل پزشکی قانونی استان اصفهان انجام گردیده است. بنابراین در پایان از معاونت محترم پژوهشی و معاونت محترم اداری مالی سازمان پزشکی قانونی کشور در خصوص تأمین مالی طرح پژوهشی فوق و نیز ناظر طرح جناب آقای دکتر کاظمی‌فر تشکر و قدردانی می‌نمائیم.

## References

1- Hummel S. Ancient DNA Typing. Berlin: Springer; 2003: 57-80.

2- Parsons Tj, Huel R, Davoren J, Katzmarzyk C, Milos A, Selmanovic A, et al. Application of novel "mini-amplicon" STR multiplexes to high volume casework on degraded skeletal remains. Forensic Science International. 2007;1:175-9.

3- Holland MM, Cave CA, Holland CA, Bille TW. Development of a quality, high throughput DNA analysis procedure for skeletal samples to assist with the identification of victims from the world trade center attacks. Croat Med J. 2003;44(3):246-72.

4- Hochmeister MN, Budowle B, Borer UV, Eggmann V, Comey CT, Drinhofer R. Typing of Deoxyribonucleic Acid (DNA) extracted from compact bone from human remains. Journal of Forensic Sciences. 1991;36(6):1649-61.

5- Pancorbo MM, Castro A, Alonso S, Fernandez I, Barbero C, Garcia-Orad A, et al. Genetic typing with HUMTHO1, HUMvWA31A and HUMFES/FPS short tandem repeat loci, D1S80 variable number tandem repeat locus and HLA-PQα of recent and from XII-XIII centuries spongy bone. Electrophoresis, 1995;16:1612-16.

6- Hänni C, Brousseau T. Laudet V, Stehelin D. Isopropanol precipitation removes PCR inhibitors from ancient bone extracts. Nucleic Acids Research, 1995;23(5):881-2.

7- Anzai T, Naruse TK, Tokunaga K, Honma T, Baba H, Akazawa T, et al. HLA genotyping of 5000- and 6000-year-old ancient bones in Japan. Tissue Antigens. 1999;54:53-8.

8- Yoder AD. Ancient DNA in sub fossil lemurs: methodological challenges and their solutions. In: Rakotosamimanana E. New directions in Lemur studies. New York: Kluwer Academic/Plenum publishers;1999.

9- Schmerer WM, Hummel S, Hermann B. Optimized DNA extraction to improve reproducibility of short tandem repeat genotyping with highly degraded DNA as target. Electrophoresis. 1999;20:1712-16.

10- Cattaneo C, Craig OE, James NT, Sokol RJ. Comparison of three DNA extraction methods on bone and blood stains up to 43 years old and amplification at three different gene sequences. J Forensic Sci. 1997;42:1126-35.

11- Höss M, Pääbo S. DNA extraction from Pleistocene bones by a silica-based purification method. Nucleic Acids Res, 1993;21:3913-14.

12- Baron H, Hummel S, Herrmann B. Mycobacterium tuberculosis complex DNA in ancient human bones. J Archaeol Sci. 1996;23:667-671.

13- Butler JM, Reeder DJ. Short Tandem Repeat DNA Internet Database. 1997;[STR Fac tSheets]. Available from: http://www.cstl.nist.gov/biotech/strbase.06 28,2006.

14- Davoren J, Vanek D, Konjhodzic R, Crews J, Huffine E, Parsons TJ. Highly effective DNA extraction method for nuclear short tandem repeat testing of skeletal remains from mass graves. Croat Med J. 2007;48(4):478-85.