

# Comparison of Different DNA Extraction and Preparation Methods of Blood Samples for Criminal Sciences and Forensic Application

## ARTICLE INFO

### Article Type

Original Research

### Authors

Jalili Sh.\* PhD,  
Shirzad H.<sup>1</sup> PhD

### How to cite this article

Jalili Sh, Shirzad H. Comparison of Different DNA Extraction and Preparation Methods of Blood Samples for Criminal Sciences and Forensic Application. Journal of Police Medicine. 2018;7(4):167-172.

## ABSTRACT

**Aims** DNA Extraction from forensic samples is the first and one of the most crucial steps of any genetic forensic tests. Hence, obtaining a suitable protocol of DNA extraction that is easy to extract, cheap, time-consuming, and qualified is essential in the forensic genetic research. The present study was carried out with the aim of achieving a suitable, faster, and low-cost method of DNA extraction from different sample for further molecular study in criminal sciences and forensic application.

**Materials & Methods** After preparation of samples, 3 different DNA extraction methods, including chelex, non-enzymatic, and modified rapid alkaline lysis were evaluated. In order to compare the above-mentioned methods for evaluation of being easy to extract, low-cost, and time-consuming, the quality and quantity of DNA obtained from each method considering OD, DNA concentration, and PCR efficiency were investigated.

**Findings** The common 16S rRNA fragment was replicated in all tested samples.

**Conclusion** Given the ease of access to materials used in each of these methods, as well as their cost-effectiveness in terms of time and cost, these methods can be an appropriate alternative to DNA extraction kits.

**Keywords** DNA Extraction; Chelex; Modified Rapid Alkaline; Non-enzymatic; Forensic

## CITATION LINKS

[1] Extraction of DNA from forensic biological samples for genotyping [2] Extraction of DNA from forensic biological samples for genotyping [3] Extraction of DNA from human remains [4] Extracting DNA from all forensic samples with KingFisher® technologies [5] Forensic implications of genetic analyses from degraded DNA—a review [6] Genomic DNA isolation from human whole blood samples by non enzymatic salting out method [7] Methods for extracting genomic DNA from whole blood samples: Current perspectives [8] The Rapid & Non-Enzymatic isolation of DNA from the Human peripheral whole blood suitable for Genotyping [9] Evaluation of salt-out method for the isolation of DNA from whole blood: A pathological approach of DNA based diagnosis [10] A rapid and efficient DNA extraction protocol from fresh and frozen human blood samples [11] Single lysis-salting out method of genomic DNA extraction from dried blood spots [12] Modified salting-out method for DNA isolation from newborn cord blood nucleated cells [13] Simple salting-out method for genomic DNA extraction from whole blood [14] Modified salting-out method: High-yield, high-quality genomic DNA extraction from whole blood using laundry detergent [15] Chelex 100 as a medium for simple extraction of DNA for PCR-based typing from forensic material [16] DNA extraction from forensic samples using chelex. Cold Spring Harb Protoc [17] A study of the DNA extraction from bloodstain samples using chelex 100 [18] Rapid, simple alkaline extraction of human genomic DNA from whole blood, buccal epithelial cells, semen and forensic stains for PCR [19] Evaluation of an alkaline lysis method for the extraction of DNA from whole blood and forensic stains for STR analysis [20] Direct amplification of plant genomic DNA from leaf and root pieces using PCR [21] A rapid method for the purification of DNA from blood [22] High efficiency DNA extraction from bone by total demineralization [23] An inexpensive, automation-friendly protocol for recovering high-quality DNA [24] Developmental validation of the PrepFiler™ forensic DNA extraction kit for extraction of genomic DNA from biological samples [25] Evaluation of a new experimental kit for the extraction of DNA from bones and teeth using a non-powder method

\*Research Institute of Police Science and Social Studies, Tehran, Iran

<sup>1</sup>Research Institute of Police Science and Social Studies, Tehran, Iran

### Correspondence

Address: -

Phone: -

Fax: -

jalili.shirin@yahoo.com

### Article History

Received: June 19, 2018

Accepted: September 17, 2018

ePublished: September 29, 2018

## مقایسه روش‌های مختلف آماده‌سازی و استخراج DNA از نمونه‌های خونی به منظور به کارگیری در علوم جنایی و پزشکی قانونی

شیرین جلیلی \* PhD

پژوهشکده مدیریت فناوری، پژوهشگاه علوم انتظامی و مطالعات اجتماعی  
ناجا، تهران، ایران

هادی شیرزاد PhD

پژوهشکده مدیریت فناوری، پژوهشگاه علوم انتظامی و مطالعات اجتماعی  
ناجا، تهران، ایران

### چکیده

**اهداف:** استخراج DNA از نمونه‌های جنایی جز اولین و مهم‌ترین مراحل در هریک از تست‌های ژنتیک جنایی است. از این رو به دست آوردن روشی مناسب برای استخراج DNA که از نظر سهولت استخراج، هزینه، زمان و کیفیت به صرفه باشد، اهمیت بسزایی در تحقیقات ژنتیک جنایی دارد. هدف از این پژوهش دستیابی به روشی مناسب، سریع و کم‌هزینه برای استخراج DNA از نمونه‌های مختلف خونی در مطالعات مولکولی در علوم جنایی و پزشکی قانونی بود.

**مواد و روش‌ها:** پس از تهیه نمونه‌های مورد نظر، سه روش مختلف استخراج DNA شامل چلکس، روش تغییر یافته آلکالین و روش غیر آنزیمی مورد استفاده قرار گرفت. به منظور مقایسه روش‌های مذکور از نظر سهولت استخراج، هزینه و زمان، کیفیت و کمیت DNA حاصل از هر روش از طریق میزان OD، غلظت DNA و بازدهی PCR مورد بررسی قرار گرفت.

**یافته‌ها:** قطعه مشترک ژن S rRNA<sup>۱۶</sup> در همه نمونه‌های مورد آزمایش تکثیر شده بود.

**نتیجه‌گیری:** با در نظر گرفتن سهولت دسترسی به مواد به کار رفته در هریک از این روش‌ها و همچنین مقرون به صرفه بودن آنها از نظر زمان و هزینه، این روش‌ها می‌توانند جایگزین مناسبی برای کیت‌های استخراج DNA باشند.

**کلیدواژه‌ها:** استخراج DNA، چلکس، تغییر یافته آلکالین، غیر آنزیمی، پزشکی قانونی

تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۰۳/۲۹

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۰۶/۲۶

\*نویسنده مسئول: jalili.shirin@yahoo.com

### مقدمه

محققان و کارشناسان علوم جنایی و پزشکی قانونی متناسب با نوع کاری که انجام می‌دهند، همواره با طیف گسترده‌ای از نمونه‌های بیولوژیکی مواجه هستند. همین امر باعث شده که محققان این حوزه از روش‌های مختلف استخراج DNA استفاده نمایند. در حال حاضر، چند روش استخراج DNA توسط انجمن پزشکی قانونی توسعه یافته است که مورد استفاده قرار می‌گیرد اما بسیاری از آنها دارای محدودیت‌هایی نظیر عدم توانایی برای حذف مهارکننده‌های واکنش PCR هستند یا اینکه بعضی از آنها دارای مراحل طولانی هستند که نیازمند انتقال به لوله‌های جدید هستند که از سویی باعث افزایش هزینه و زمان کار می‌شوند و از طرف دیگر احتمال آلودگی را نیز افزایش می‌دهند [۱-۴].

با توجه به اینکه هریک از روش‌های PCR به کار رفته در آزمایشگاه‌های علوم جنایی و پزشکی قانونی جزء روش‌هایی هستند که قطعه خاصی از DNA را تکثیر می‌کنند، لذا برای انجام هریک از این آزمایش‌ها نیاز به مولکول دورشته‌ای DNA است که این مولکول با توجه به نوع نمونه ارسالی به آزمایشگاه‌های جنایی که ممکن است خون، بافت، دندان، استخوان، ناخن و غیره باشند، استخراج می‌شود. روش‌های آزمایشگاهی مختلفی برای استخراج و تخلیص DNA از اینگونه نمونه‌ها وجود دارد. به همین دلیل است

که می‌توان گفت جداسازی DNA با کیفیت مناسب از ضرورت‌های بسیاری از روش‌های عملی و موفقیت در کارهای آزمایشگاهی مرتبط با تکنیک‌های بیولوژی مولکولی، به خصوص در آزمایشگاه‌های علوم جنایی و پزشکی قانونی است. معمولاً کیفیت DNA با عواملی از قبیل عدم آلودگی ناشی از RNA، لیپید و سایر ساختارهایی که برای آنزیم‌های برشی و پلی‌مرازها مزاحمت ایجاد می‌کنند، به صرفه بودن از نظر زمان و هزینه، سنجیده می‌شود [۵، ۶]. به علت بزرگ بودن اندازه مولکول DNA، روش‌های استخراجی باید حداقل استرس مکانیکی را طی مراحل استخراج ایجاد نمایند. از این رو شیوه‌هایی که به منظور خالص‌سازی DNA مورد استفاده قرار می‌گیرند باید علاوه بر برخورداری از حداقل زمان و سرعت بالا، روش مطمئنی برای حذف ممانعت‌کننده‌ها و خالص‌نمودن کلیه اسیدهای نوکلئیک نیز باشند.

برای تخلیص DNA از نمونه‌های خونی، از گلبول‌های سفید خون استفاده می‌شود. برای این کار چندین روش از جمله فنل-کلروفرم، پروتئیناز K، جوشاندن، اسید-گوانیدیوم-فنل-کلروفرم (AGPC) و انواع کیت‌ها استفاده می‌شود [۷-۱۰]. در این پژوهش سعی شده است که با توجه به شرایط و امکانات موجود در آزمایشگاه‌های جنایی ایران، به خصوص در مناطق مرزی و محروم که دسترسی به کیت‌ها و مواد آزمایشگاهی با مشکلات خاصی همراه است، از روش‌هایی استفاده شود که علاوه بر دارا بودن کیفیت و کمیت مناسب در نمونه‌های DNA استخراج‌شده، بیشترین صرفه‌جویی در زمان، هزینه و مواد آزمایشگاهی را نیز شامل شوند. هدف از این پژوهش دستیابی به روشی مناسب، سریع و کم‌هزینه برای استخراج DNA از نمونه‌های مختلف خونی در مطالعات مولکولی در علوم جنایی و پزشکی قانونی بود.

### مواد و روش‌ها

در این پژوهش به منظور استخراج DNA، از نمونه‌های خونی انسانی و حیوانی استفاده شد. نمونه‌های مورد نظر در شرایط مختلف تهیه شدند. برای تهیه نمونه‌های حیوانی از بیمارستان حیوانات خانگی، نمونه خون حیوانات مختلف شامل موش، سگ و گربه توسط دامپزشک گرفته شد. از هر حیوان بین ۱ تا ۲ سی‌سی خون گرفته شد و خون گرفته‌شده در لوله‌های مخصوص حاوی ماده ضدانعقاد و لوله‌های بدون ماده ضدانعقاد ریخته شد. این نمونه‌ها بعد از انتقال به آزمایشگاه به چند قسمت تقسیم شد. بخشی از این نمونه‌ها در دماهای ۲۰-، ۳۰- و ۷۰°C در زمان‌های یک هفته، دو هفته، سه هفته و یک ماه برای استخراج DNA ذخیره شدند. نمونه‌های خونی انسانی مورد نیاز نیز از اعضای آزمایشگاه تهیه شد. این نمونه‌ها نیز مانند نمونه‌های حیوانی در دماهای مختلف و زمان‌های مورد نظر ذخیره شدند. علاوه بر این، به مقدار ۵ میکرولیتر از هر کدام از نمونه‌های انسانی و حیوانی مورد آزمایش، روی پارچه‌های تنظیف نخی ریخته شد. این نمونه‌ها در دمای اتاق خشک و نگهداری شدند. از این نمونه‌ها نیز به ترتیب بعد از گذشت یک هفته، دو هفته، سه هفته و یک ماه، استخراج DNA انجام شد. استخراج DNA از تمامی نمونه‌های خونی به سه روش متفاوت انجام شد.

### ۱) استخراج DNA با روش غیر آنزیمی

در این روش با استفاده از محلول‌های نمکی غلیظ [۶، ۱۴-۱۱] که همگی در آزمایشگاه تهیه شده بودند، DNA نمونه‌های مورد نظر استخراج شد. این روش شامل سه مرحله زیر است.

خون می‌شود. بعد از اتمام انکوباسیون، نمونه‌ها را به مدت ۳ دقیقه در  $14000 \text{ rpm}$  سانتریفیوژ کرده. مرحله اضافه کردن آب و انکوبه کردن برای از بین بردن گلبول‌های قرمز خون ماست. در صورت کمبود وقت و فوریت کار که معمولاً در بررسی‌های پرونده‌هایی که در محل حادثه هستند وجود دارد، می‌توان از این مرحله صرف نظر کرد. نتایج آزمایشات نشان می‌دهد که حذف این مرحله در مواقع ضروری تأثیر چندانی روی کیفیت DNA استخراج شده ندارد.

۲- بعد از سانتریفیوژ، با دقت مایع رویی را خالی کرده. در صورتیکه نمونه مورد استفاده خون خشک شده روی پارچه یا هر مورد دیگری باشد، فقط محلول رویی دور ریخته شود و پارچه حاوی نمونه خونی باید ته میکروتیوپ برای مراحل بعدی باقی بماند.

۳- به رسوب باقی‌مانده از مرحله قبل،  $100 \mu\text{L}$  میکرولیتر از محلول چلکس ۵٪ اضافه کرده. در این مرحله دقت شود که چون رزین‌های چلکس در محلول تهیه شده به سرعت رسوب می‌کند، هنگام استفاده از این محلول باید آن را با پیپت یا مخلوط کردن تا حد امکان همگون کرد سپس از آن به رسوب اضافه کرد.

۴- محلول فوق را ورتکس کرده سپس به مدت ۱۵ الی ۳۰ دقیقه این محلول را در دمای  $56^\circ\text{C}$  انکوبه کنید.

۵- بعد از اتمام انکوباسیون محلول را ورتکس کرده و به مدت ۵ دقیقه در فریز روی یخ نگهداری شود. در صورت کمبود وقت نیز این مرحله قابل صرف نظر کردن است.

۶- محلول حاصل از مرحله قبل را به مدت ۵ دقیقه با  $14000 \text{ rpm}$  سانتریفیوژ کرده. در اثر سانتریفیوژ، چلکس و همه خرده‌های سلولی به جز DNA در ته لوله رسوب می‌کنند. محلول رویی که حاوی DNA استخراج شده است را به آرامی به میکروتیوپ‌های جدید منتقل کرده، که معمولاً تا هنگام استفاده در آزمایشات بعدی در دمای  $20^\circ\text{C}$  یا  $80^\circ\text{C}$  باید نگهداری شود.

### ۳) استخراج DNA با روش تغییر یافته آلکالین

برای دستیابی به DNA نمونه‌های مورد نظر با این روش به طریق زیر عمل می‌شود [۱۸، ۱۹].

۱- نمونه‌های مختلف خون در حجم‌های ۱، ۳ و  $5 \mu\text{L}$  میکرولیتر را در میکروتیوپ‌ها ریخته. سپس به هر میکروتیوپ  $20 \mu\text{L}$  میکرولیتر از محلول  $0.2 \text{ M NaOH}$  اضافه کرده و به مدت ۶ تا ۱۰ دقیقه در دمای اتاق انکوبه شود.

۲- بعد از اتمام انکوباسیون به محلول فوق  $80 \mu\text{L}$  میکرولیتر از محلول  $0.4 \text{ M Tris-HCl}$  با pH حدود ۷/۵ اضافه کرده و سپس محلول حاصل را ورتکس نموده. بعد از انجام ورتکس محلول حاصل حاوی DNA استخراج شده از نمونه‌های مورد نظر است. از DNA استخراج شده به این روش می‌توان در کلیه کارهای مولکولی از جمله PCR استفاده کرد.

### تعیین غلظت و خلوص DNA

تمامی نمونه‌ها بعد از استخراج DNA و خشک کردن آنها، در مقدار مشخصی از بافر TE حل شدند، سپس رقت‌های مناسبی از آنها تهیه شد و غلظت آنها با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر تعیین شد. ابتدا از TE به عنوان بلانک برای کالیبره کردن استفاده شد. برای اندازه‌گیری غلظت نمونه‌های استخراج شده، از دستگاه نانودراپ و طول موج ۲۶۰ و  $280 \text{ nm}$  استفاده شد. برای این منظور ابتدا با الکل، نانودراپ را تمیز کرده و سپس با توجه به روش استخراج DNA از آب مقطر یا بافر TE به عنوان بافر شاهد برای صفر کردن دستگاه نانودراپ استفاده شد. یک میکرولیتر از نمونه استخراج شده

**مرحله اول:** ابتدا نمونه‌های مورد نظر را جداگانه به میکروتیوپ منتقل کنید. این نمونه‌ها شامل نمونه‌های خون خشک شده روی تنظیف‌های نخی و نمونه‌های خونی است که در ماده ضد انعقاد و بدون ماده انعقاد جمع‌آوری شده است. حجم‌های مختلفی از خون برای این روش انتخاب شد. سپس به نمونه‌های خونی  $100 \mu\text{L}$  میکرولیتر بافر TKM 1 و  $50 \mu\text{L}$  میکرولیتر تریتون یک ایکس اضافه نموده و چندبار فالتکون‌ها را سروته کرده تا به خوبی مخلوط شوند. سپس نمونه‌ها را به مدت ۵ دقیقه در دمای  $37^\circ\text{C}$  انکوبه کرده، در این مرحله گلبول‌های قرمز خون لیز می‌شوند. سپس میکروتیوپ‌ها را به مدت ۳ دقیقه با سرعت  $8000 \text{ rpm}$  سانتریفیوژ کرده و بعد از سانتریفیوژ محلول رویی را که حاوی گلبول‌های قرمز لیز شده است به آرامی خارج نموده، مرحله اضافه کردن بافر TKM 1 و تریتون یک ایکس را سه بار انجام داده، در هر مرحله مقدار تریتون یک ایکس را کم نموده، در پایان این مرحله گلبول‌های قرمز کاملاً لیز شده و گلبول‌های سفید به خوبی جدا شده‌اند.

**مرحله دوم:** در این مرحله به رسوب سلولی به دست آمده از مرحله اول،  $50 \mu\text{L}$  میکرولیتر بافر TKM 2 و  $20 \mu\text{L}$  میکرولیتر  $10\% \text{ SDS}$  اضافه کرده و رسوب سفید رنگ را با تکان دادن (به آهستگی) حل نموده، این محلول را در دمای  $37^\circ\text{C}$  به مدت ۵ دقیقه انکوبه کرده، بعد از پایان انکوباسیون،  $50 \mu\text{L}$  میکرولیتر از محلول  $6 \text{ M NaCl}$  به هر میکروتیوپ افزوده و با سروته کردن میکروتیوپ مواد را کاملاً مخلوط نموده. در این مرحله می‌توان از ورتکس کوتاه نیز استفاده کرد تا پروتئین‌های موجود رسوب کنند. برای استخراج بهتر می‌توان میکروتیوپ‌ها را به مدت ۵ دقیقه روی یخ گذاشت. این محصول غلیظ نمکی در این دما سبب آزاد شدن DNA در محیط می‌شود. سپس میکروتیوپ‌ها را به مدت ۵ دقیقه با سرعت  $8000 \text{ rpm}$  سانتریفیوژ و محلول فوقانی را به میکروتیوپ‌های جدید منتقل کنید.

**مرحله سوم:** به محلول حاصل از مرحله قبل  $100 \mu\text{L}$  میکرولیتر از ایزوپروپانول سرد به هر میکروتیوپ اضافه کرده و به آهستگی آنها را سروته نموده، ایزوپروپانول سرد در این مرحله DNA موجود در محیط را آگیری کرده و با فشردن شدن DNA به هم، قابل رویت می‌شود. محلول حاصل را به مدت ۱۵ دقیقه روی یخ گذاشته (ترجیحاً داخل فریزر) سپس محلول فوق را با دور  $10000 \text{ rpm}$  به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ کرده، سپس به آرامی محلول رویی را دور ریخته، به رسوب به دست آمده  $1 \text{ mL}$  لیتر الکل  $70\%$  اضافه و محلول حاصل را به مدت ۵ دقیقه با دور  $10000 \text{ rpm}$  سانتریفیوژ کرده، به آرامی الکل رویی دور ریخته شود، سپس میکروتیوپ‌ها در زیر هود یا در هوای آزاد خشک شوند. بعد از خشک شدن میکروتیوپ‌ها، به رسوب به دست آمده،  $25 \mu\text{L}$  میکرولیتر آب مقطر یا بافر TE 1X اضافه کرده و به آرامی تکان داده شود تا رسوب حل شود.

### ۲) استخراج DNA با روش چلکس

برای استخراج DNA به روش چلکس [۱۷-۱۵] به ترتیب زیر عمل می‌شود.

۱- نمونه‌های خونی که شامل خون خشک شده، لخته شده و منجمد شده است را در حجم‌های مختلف ۱، ۳، ۵ و  $10 \mu\text{L}$  میکرولیتر به میکروتیوپ‌های  $1.5 \text{ mL}$  لیتر منتقل کرده. به هر میکروتیوپ  $1 \text{ mL}$  لیتر آب دیونیزه اضافه نموده. نمونه‌ها را به آرامی تکان داده و به مدت ۱۵ الی ۳۰ دقیقه در محیط اتاق انکوبه کرده و هر چند دقیقه یکبار نمونه‌ها را ورتکس کرده. این عمل باعث لیز سلول‌های قرمز

را روی دستگاه قرار داده و غلظت آن در طول موج ۲۶۰ و ۲۸۰ نانومتر مورد بررسی قرار گرفت.

### بررسی کیفیت DNA استخراج شده

برای اطمینان از اینکه تمامی نمونه‌های استخراج شده حاوی DNA مناسب و با کیفیتی به‌منظور استفاده در واکنش‌های مولکولی از جمله PCR بودند، آزمایش واکنش زنجیره‌ای پلیمرز ژن 16S rRNA برای تکثیر قطعه ۳۰۰ جفت بازی روی نمونه‌های مورد نظر انجام شد. توالی پرایمرهای مورد استفاده در این واکنش PCR به شرح زیر بود (جدول ۱):

Forw L16S 300: 5'-GCCTGTTTACCAAAAACATCAG-3'  
Revs H16S 300: 5'-CTCCATAGGGTCTTCTCGTCTT-3'

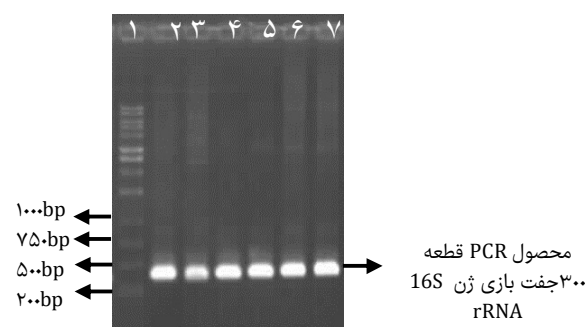
جدول ۱) شرایط و چگونگی انجام واکنش زنجیره‌ای پلی‌مرز از ترموسیکلر برای تکثیر قطعه ۳۰۰ جفت بازی از توالی ژن 16S rRNA

| مرحله               | حرارت | زمان     | چرخه |
|---------------------|-------|----------|------|
| دنا توره کردن اولیه | ۹۵°C  | ۸ دقیقه  | ۱    |
| دنا توره کردن       | ۹۴°C  | ۳۰ ثانیه |      |
| جفت شدن پرایمرها    | ۶۴°C  | ۳۵ ثانیه | ۳۰   |
| پلی‌مریزه شدن       | ۷۲°C  | ۳۵ ثانیه |      |
| پلی‌مریزه شدن نهایی | ۷۲°C  | ۱۰ دقیقه | ۱    |

پس از اتمام واکنش لوله‌ها، بلافاصله به ۴°C منتقل و آماده الکتروفورز شدند. محصول حاصل از این واکنش PCR تکثیر یک قطعه ۳۰۰ جفت بازی است که در صورت وجود DNA استخراج شده در هر نمونه قابل مشاهده است. بعد از انجام PCR، محصولات حاصل از PCR روی ژل آگارز ۱/۵٪ مشاهده شد.

### یافته‌ها

قطعه مشترک ژن 16S rRNA در همه نمونه‌های مورد آزمایش تکثیر شده بود (شکل ۱).



شکل ۱) ژل الکتروفورز محصول PCR مربوط به تکثیر قطعه ۳۰۰ جفت بازی از ژن 16S rRNA نمونه‌های حیوانی و انسانی روی ژل آگارز ۲٪. ستون یک استاندارد وزن مولکولی DNA، ستون ۲ و ۳ نمونه‌های انسانی، ستون ۴ تا ۷ مربوط به نمونه‌های حیوانات مختلف

استخراج DNA در این پژوهش، با توجه به به‌کارگیری این روش‌ها در آزمایشگاه‌های علوم جنایی و پزشکی قانونی، روی نمونه‌های مختلفی که شرایط نگهداری متفاوتی داشتند، صورت گرفت. این نمونه‌ها شامل نمونه‌های خونی خشک شده روی پارچه‌های تنظیف نمی، نمونه خون‌های فریز شده در دماهای مختلف، نمونه‌های خونی حاوی ماده ضد انعقاد، نمونه‌های خونی بدون ماده ضد انعقاد و نمونه‌هایی که به تریبیت به مدت یک، دو و سه هفته در دمای اتاق

نگهداری شده، بودند. نمونه‌هایی که به مدت طولانی‌تری در دمای اتاق نگهداری شده بودند مقدار DNA ای کمتری نسبت به نمونه‌های دیگر از آنها استخراج شد. بیشترین OD و غلظت DNA با استفاده از روش غیرآنزیمی حاصل شد. بازدهی و کیفیت PCR در هر سه روش تقریباً برابر بود. از نظر بازه زمانی، روش تغییر یافته آلکالین از تمامی روش‌ها به صرفه‌تر بود، به طوریکه می‌توان گفت این روش در بازه زمانی کمتر از ۲۰ دقیقه قابل انجام بود. همچنین این روش از نظر سهولت و سادگی از دو روش دیگر مناسب‌تر بود تا جایی که با ساده‌ترین وسایل در هر آزمایشگاهی قابل انجام بود.

### بحث

نقطه شروع بسیاری از روش‌های بیولوژی مولکولی و تشخیصی، جداسازی DNA با کیفیتی مناسب از نظر درجه خلوص، میزان آلودگی و غیره، به‌منظور انجام کارهای مولکولی است. از طرفی روش‌های به‌کار رفته در استخراج DNA باید کمترین استرس مکانیکی را طی مراحل استخراج به نمونه وارد کرده و تا حد امکان دارای مراحل کمتری بوده که از نظر آلودگی و بازه زمانی به صرفه باشد [۲۰-۲۲]. همان طور که مشخص است، روش‌های بسیار متفاوتی و نیز کیت‌های متعددی برای استخراج DNA از نمونه‌های آزمایشگاهی در موارد مختلف از جمله علوم جنایی وجود دارد [۲۳-۲۵] که با توجه به امکانات و شرایط هر آزمایش توسط کاربر قابل استفاده است. در این پروژه با توجه به به‌کارگیری این روش‌ها در آزمایشگاه‌های علوم جنایی و پزشکی قانونی ایران، سعی شده است که روش‌های کاربردی مناسبی برای استخراج و تخلیص DNA از نمونه‌های خونی بهینه‌سازی شود که سه نکته مورد نظر (صرفه جویی در زمان، وابسته نبودن به کیت و دردسترس بودن مواد مورد نیاز در آزمایشگاه‌های مناطق محروم) با توجه به کیفیت مناسب DNA در آنها رعایت شده باشد.

دانستن روش‌های مختلف استخراج DNA از نمونه‌های مورد نظر در زمینه‌های مختلف کاری بسیار حایز اهمیت و ضروری است به طوری که کارشناس مربوطه با دانستن انواع روش‌های مختلف استخراج با توجه به امکانات و شرایط آزمایشگاهی که در آزمایشگاه‌های جنایی کشور به خصوص آزمایشگاه‌هایی که در مناطق محروم واقع شده‌اند و دسترسی آسانی به کیت‌های استخراج DNA ندارند، با آگاهی از این روش‌ها و با استفاده از کمترین امکانات موجود در آزمایشگاه می‌توانند DNA نمونه‌های بیولوژی کشف شده از صحنه جرم را استخراج نمایند. ویژگی‌های بارز این روش‌ها این است که بدون استفاده از هر نوع کیتی انجام شده‌اند. از سوی دیگر، سعی شده روش‌هایی برای استخراج استفاده شوند که کمترین وابستگی به مواد آزمایشگاهی داشته باشند و از موادی استفاده شود که امکان دسترسی اکثر آزمایشگاه‌ها به آنها امکان‌پذیر باشد. همچنین سعی شده در این روش‌ها زمان مورد نیاز استخراج کوتاه‌ترین زمان ممکن باشد به طوری که در یکی از این روش‌ها (آلکالین)، در زمانی کمتر از ۲۰ دقیقه با کمترین مواد مورد نیاز، استخراج DNA از نمونه‌های مورد نظر انجام می‌شود.

از سوی دیگر در انتخاب روشی مناسب برای استخراج DNA، سعی شده از روش‌هایی استفاده شود که با کمترین مقدار نمونه بتوان DNA مورد نظر را استخراج کرد زیرا اکثر نمونه‌های کشف شده از صحنه جرم مقادیر کمی دارند. علاوه بر این، یکی دیگر از اولویت‌های کاری کارشناسان جنایی، بحث محدودیت زمانی است، به همین دلیل ایجاد روش‌های استخراجی که به زمان کوتاهی نیازمند باشند جز ضرورت‌های آزمایشگاه‌های جنایی است.

## منابع

- 1- Stray JE, Liu JY, Brevnov MG, Shewale JG. Extraction of DNA from forensic biological samples for genotyping. *Forensic Sci Rev.* 2010;22(2):159.
- 2- Willard JM, Lee DA, Holland MM. Recovery of DNA for PCR amplification from blood and forensic samples using a chelating resin. *Methods Mol Biol.* 1998;98:9-18.
- 3- Stray JE, Shewale JG. Extraction of DNA from human remains. *Forensic Sci Rev.* 2010;22(2):177-85.
- 4- Delefosse T, Hienne R. Extracting DNA from all forensic samples with KingFisher® technologies. *Int Congr Ser.* 2004;1261:577-9.
- 5- Alaeddini R, Walsh SJ, Abbas A. Forensic implications of genetic analyses from degraded DNA—a review. *Forensic Sci Int Genet.* 2010;4(3):148-57.
- 6- Suguna S, Nandal D, Kamble S, Bharatha A, Kunkulol R. Genomic DNA isolation from human whole blood samples by non enzymatic salting out method. *Int J Pharm Pharm Sci.* 2014;6(6):198-9.
- 7- Chacon-Cortes D, Griffiths LR. Methods for extracting genomic DNA from whole blood samples: Current perspectives. *J Biorepository Sci Appl Med.* 2014;2014(2):1-9.
- 8- Madhad VJ, Senthil KP. The Rapid & Non-Enzymatic isolation of DNA from the Human peripheral whole blood suitable for Genotyping. *Eur J Biotechnol Biosci.* 2013;1(3):1-16.
- 9- Maurya R, Kumar B, Sundar S. Evaluation of salt-out method for the isolation of DNA from whole blood: A pathological approach of DNA based diagnosis. *Int J Life Sci Biotechnol Pharma Res.* 2013;2(2).
- 10- Guha P, Das A, Dutta S, Chaudhuri TK. A rapid and efficient DNA extraction protocol from fresh and frozen human blood samples. *J Clin Lab Anal.* 2018;32(1):e22181.
- 11- Shaik M, Shivanna DK, Kamate M, Ab V, Tp KV. Single lysis-salting out method of genomic DNA extraction from dried blood spots. *J Clin Lab Anal.* 2016;30(6):1009-12.
- 12- Noguera NI, Tallano CE, Bragós IM, Milani AC. Modified salting-out method for DNA isolation from newborn cord blood nucleated cells. *J Clin Lab Anal.* 2000;14(6):280-3.
- 13- Gaaib JN, Nassief AF, Al-Assi AH. Simple salting-out method for genomic DNA extraction from whole blood. *Tikrit J Pure Sci.* 2011;16(2):9-11.
- 14- Nasiri H, Forouzandeh M, Rasaee MJ, Rahbarizadeh F. Modified salting-out method: High-yield, high-quality genomic DNA extraction from whole blood using laundry detergent. *J Clin Lab Anal.* 2005;19(6):229-32.
- 15- Walsh PS, Metzger DA, Higuchi R. Chelex 100 as a medium for simple extraction of DNA for PCR-based typing from forensic material. *Biotechniques.* 1991;10(4):506-13.
- 16- Butler JM. DNA extraction from forensic samples using chelex. *Cold Spring Harb Protoc.* 2009;2009(6):pdb.prot5229.
- 17- Im CB, Lee JK, Kim JW, Kwon KC, Koo AH, Park JW, et al. A study of the DNA extraction from bloodstain samples using chelex 100. *Korean J Clin Pathol.* 1993;13(2):311-20. [Korean]
- 18- Rudbeck L, Dissing J. Rapid, simple alkaline

اگر این روش‌ها وابسته به کیت نباشند و با ساده‌ترین مواد موجود در آزمایشگاه‌ها بتوان این استخراج‌ها را انجام داد، مشکل بسیاری از مراکز جنایی مناطق محروم ایران که به کیت‌ها دسترسی ندارند برطرف می‌شود.

البته شایان ذکر است هر یک از روش‌های استخراجی به‌کار رفته شده در این پژوهش دارای یکسری معایب و محاسن هستند. به‌طور مثال روش جوشاندن با رزین چلکس دارای معایب و محاسنی است؛ از جمله، این روش یا روش استخراجی تغییر یافته آلکالین اصولاً دارای مرحله‌ای تحت عنوان خالص‌سازی صددرصد نیست، اما می‌توان DNA نمونه‌های مورد آزمایش را در کمترین فاصله زمانی و با کمترین مواد مصرفی استخراج کرد. از سوی دیگر با استفاده از این روش‌ها می‌توان به‌آسانی از خون تازه، لخته‌شده، کهنه و خشک و همچنین عوامل بیماری‌زا DNA و سایر نمونه‌های بیولوژیکی DNA مورد نظر را استخراج کرد. می‌توان گفت، استخراج DNA به‌روش تغییر یافته آلکالین یکی از ساده‌ترین، ارزان‌ترین و سریع‌ترین روش برای استخراج DNA از نمونه‌های مورد نظر است. در عین حال DNA ای که با این روش استخراج می‌شود از کیفیت مناسبی برخوردار است که در کلیه کارهای مربوط به PCR بسیار مناسب است و به‌خوبی جواب می‌دهد. به همین دلیل می‌توان به‌عنوان یک روش مناسب برای استخراج DNA از نمونه‌های مختلف بیولوژیکی در آزمایشگاه‌های جنایی ایران به‌خصوص در مناطق محروم جایگزین شود. اما اگر در مواردی به DNA ای با غلظت بالا و خلوص بیشتری نیاز باشد، روش نمکی می‌تواند استفاده شود. این روش نسبت به دو روش آلکالین و چلکس زمان بیشتری برای استخراج نیاز دارد. علاوه بر این مواد مورد نیاز آن نسبت به دو روش مذکور بیشتر است اما همان‌طور که گفته شد با این روش می‌توان به‌میزان DNA بیشتر با درصد خلوص مناسب‌تری دست یافت.

## نتیجه‌گیری

در روش‌های استخراجی به‌کار رفته شده در این پژوهش، سه نکته مورد هدف در این تحقیق (صرفه‌جویی در زمان، وابسته‌نبودن به کیت و در دسترس بودن مواد مورد نیاز در آزمایشگاه‌های مناطق محروم) رعایت شده که بتوانند به‌عنوان یک روش استخراجی مناسب و کم‌هزینه در آزمایشگاه‌های جنایی به‌کار گرفته شوند. از ویژگی‌های دیگر این روش‌ها، ارزان و قابل تکرار بودن آنهاست که به‌راحتی می‌توانند هم در مطالعات پژوهشی و هم کاربردی استفاده شوند. همچنین این روش‌ها را با کمی تغییر می‌توان برای استخراج DNA از سایر نمونه‌های بیولوژیکی نیز بکار برد.

**تشکر و قدردانی:** از تمام عزیزانی که در اجرای این پروژه همکاری داشته‌اند به‌خصوص جناب آقای دکتر صادق حسن‌نیا عضو هیات علمی دانشگاه تربیت مدرس، کمال تشکر و قدردانی را دارم.

**تضاد منافع:** موردی توسط نویسندگان گزارش نشده است.

**تأییدیه اخلاقی:** موردی توسط نویسندگان گزارش نشده است.

**سهم نویسندگان:** شیرین جلیلی (نویسنده اول)، نگارنده مقدمه/پژوهشگر اصلی (۵۰٪)؛ هادی شیرزاد (نویسنده دوم)، روش‌شناس/نگارنده بحث (۵۰٪)

**منابع مالی:** پژوهشگاه علوم انتظامی حمایت مالی این پژوهش را بر عهده داشته است.

demineralization. *Forensic Sci Int Genet.* 2007;1(2):191-5.

23- Ivanova NV, Dewaard JR, Hebert PD. An inexpensive, automation-friendly protocol for recovering high-quality DNA. *Mol Ecol Resour.* 2006;6(4):998-1002.

24- Brevnov MG, Pawar HS, Mundt J, Calandro LM, Furtado MR, Shewale JG. Developmental validation of the PrepFiler™ forensic DNA extraction kit for extraction of genomic DNA from biological samples. *J Forensic Sci.* 2009;54(3):599-607.

25- T. Kitayama, Ogawa Y, Fujii K, Nakahara H, Mizuno N, Sekiguchi K, et al. Evaluation of a new experimental kit for the extraction of DNA from bones and teeth using a non-powder method. *Leg Med (Tokyo).* 2010;12(2):84-9.

extraction of human genomic DNA from whole blood, buccal epithelial cells, semen and forensic stains for PCR. *Biotechniques.* 1998;25(4):588-90.

19- Klitschar M, Neuhuber F. Evaluation of an alkaline lysis method for the extraction of DNA from whole blood and forensic stains for STR analysis. *J Forensic Sci.* 2000;45(3):669-73.

20- Berthomieu P, Meyer C. Direct amplification of plant genomic DNA from leaf and root pieces using PCR. *Plant Mol Biol.* 1991;17(3):555-7.

21- Jeanpierre M. A rapid method for the purification of DNA from blood. *Nucleic Acids Res.* 1987;15(22):9611.

22- Loreille OM, Diegoli TM, Irwin JA, Coble MD, Parsons TJ. High efficiency DNA extraction from bone by total