

فهرست مطالب

پیشگفتار..... ۱۷

فصل اول: روش های مولکولی در تشخیص..... ۱۹

استخراج اسیدهای نوکلئیک..... ۱۹

تفاوت استخراج DNA و RNA از نظر انجام نوع تست های مولکولی..... ۲۰

بررسی انواع نمونه های اولیه جهت استخراج اسید نوکلئیک..... ۲۰

استخراج اسیدهای نوکلئیک از سلول های خون محیطی..... ۲۰

استخراج اسیدهای نوکلئیک از مغز استخوان..... ۲۱

استخراج اسیدهای نوکلئیک از سرم و پلاسما..... ۲۱

استخراج DNA و RNA از بافت..... ۲۲

استخراج اسیدهای نوکلئیک از بافت تازه..... ۲۳

استخراج اسیدهای نوکلئیک از بافت های پارافینی (FFPE Blocks)..... ۲۴

مراحل کلی استخراج..... ۲۵

نحوه بررسی کیفیت استخراج اسیدهای نوکلئیک..... ۲۶

غلظت و تعیین خلوص DNA و RNA..... ۲۶

بررسی کیفیت با ژل الکتروفورز..... ۲۷

واکنش زنجیره ای پلیمرز PCR..... ۲۷

Real-time PCR..... ۲۷

۲۹.....	مراحل کلی Real-Time PCR و اهمیت رقت‌سازی
۲۹.....	ایجاد نمودار استاندارد و تعیین کارایی واکنش
۳۰.....	کاربرد نمودار استاندارد در تحلیل کمی نمونه‌های ناشناخته
۳۰.....	کنترل کیفیت و دقت در اجرای رقت‌سازی‌ها
۳۰.....	تحلیل کمی نمودار استاندارد
۳۰.....	بررسی شیب خط استاندارد
۳۱.....	بررسی ضریب همبستگی (R^2)
۳۲.....	تفسیر کارایی واکنش
۳۲.....	استفاده از نمودار استاندارد برای محاسبه غلظت نمونه‌های ناشناخته
۳۲.....	کنترل کیفیت
۳۲.....	سنتر cDNA (complementary DNA)
۳۳.....	PCR with DMSO
۳۳.....	Multiplex PCR
۳۴.....	Touch Down PCR
۳۴.....	Nested PCR
۳۵.....	Hot Start PCR
۳۶.....	عیب‌یابی مشکلات رایج در PCR
۳۷.....	افزایش بازده PCR با افزودنی‌های شیمیایی
۳۷.....	نکات کلیدی برای بهینه‌سازی و پیشگیری از آلودگی در واکنش PCR
۳۸.....	راهکارهای مؤثر برای پیشگیری از آلودگی در PCR
۳۹.....	تحلیل انواع روش‌های الکتروفورز ژل و توالی‌یابی
۳۹.....	ژل الکتروفورز
۳۹.....	انواع الکتروفورز ژل
۳۹.....	الکتروفورز ژل آگاروز
۴۰.....	الکتروفورز ژل پلی‌اکریل‌آمید (PAGE)
۴۰.....	SDS-PAGE
۴۰.....	اصول کار الکتروفورز ژل
۴۰.....	حرکت مولکول‌ها در میدان الکتریکی
۴۱.....	مشاهده مولکول‌ها پس از الکتروفورز

کاربردهای الکتروفورز ژل.....	۴۱
تحلیل قطعات DNA پس از هضم آنزیمی.....	۴۱
جداسازی RNA و پروتئین‌ها برای تحلیل ساختاری و عملکردی.....	۴۱
کاربردهای تشخیصی.....	۴۱
تکنیک قطعات Fragment.....	۴۲
استخراج DNA.....	۴۲
تقویت توسط PCR.....	۴۲
الکتروفورز موئینه (Capillary Electrophoresis).....	۴۳
شناسایی و تحلیل داده‌ها.....	۴۳
تفسیر داده‌ها.....	۴۳
توالی‌یابی.....	۴۳
توالی‌یابی سنگر.....	۴۴
توالی‌یابی نسل بعدی (Next generation sequencing analysis).....	۵۶
توالی‌یابی کل ژنوم.....	۶۰
توالی‌یابی کل اگزون.....	۶۰
توالی‌یابی نسل بعدی هدفمند.....	۶۱
توالی‌یابی جابه جایی میکس.....	۶۱
توالی‌یابی اپی ژنومیکس.....	۶۳
توالی‌یابی متاژنومیکس.....	۶۵

فصل دوم: ژنتیک سرطان..... ۷۷

سرطان خون.....	۷۷
لوسمی (Leukemia).....	۷۸
لوسمی حاد لنفوبلاستیک (ALL).....	۷۹
لوسمی حاد میلوئیدی (AML).....	۸۹
لوسمی مزمن لنفوسیتی (CLL).....	۱۰۴
ژن TP53.....	۱۰۴
حذف در کروموزوم 13q14.....	۱۰۵
لوسمی مزمن میلوئیدی (CML).....	۱۰۶

۱۰۷.....	نئوپلاسم‌های میلوپرولیفراتیو MPN
۱۰۸.....	ژن JAK2
۱۰۹.....	ژن MPL
۱۱۰.....	ژن CALR
۱۱۳.....	درمان پلی‌سایتمی‌ورا (PV)
۱۱۳.....	درمان ترومبوسیتوز اساسی (ET)
۱۱۴.....	درمان میلوفیبروز اولیه (PMF)
۱۱۴.....	لنفوما (Lymphoma)
۱۱۴.....	لنفوم هوچکین (HL)
۱۱۵.....	لنفوم غیرهوچکین (NHL)
۱۱۷.....	میلوما (Myeloma)
۱۱۸.....	جابه‌جایی کروموزومی t(۱۴؛۴)
۱۱۸.....	جابه‌جایی کروموزومی t(۱۴؛۱۱)
۱۱۹.....	جابه‌جایی کروموزومی t(۱۶؛۱۴)
۱۱۹.....	ژن KRAS و NRAS
۱۱۹.....	ژن p53
۱۱۹.....	سرطان پستان
۱۲۱.....	زیرگروه‌های مولکولی سرطان پستان
۱۲۵.....	جهش‌های ژنتیکی شناخته شده در بروز سرطان پستان:
۱۲۵.....	ژن‌های BRCA1 و BRCA2
۱۲۹.....	ژن TP53
۱۲۹.....	ژن PTEN
۱۲۹.....	ژن CHEK2
۱۲۹.....	ژن HER2
۱۳۴.....	تست‌های تشخیصی مولکولی
۱۳۶.....	راه‌های درمان
۱۳۷.....	سرطان تخمدان
۱۳۷.....	تومورهای اپی‌تلیالی تخمدان
۱۳۸.....	تومورهای مزانشیمی

تومورهای استرومای سلول‌های جنسی.....	۱۳۹
تومورهای سلول‌های جنسی.....	۱۳۹
ضایعات متفرقه و شبیه تومور.....	۱۴۰
ژن‌های ترمیم DNA و سندرم‌های مرتبط با سرطان تخمدان ارثی.....	۱۴۲
روش‌های تشخیصی.....	۱۴۵
الگوهای تغییرات ژنتیکی و بیان mRNA.....	۱۴۵
نشانه‌های اپی‌ژنتیکی.....	۱۴۶
آزمایش میکرو هسته.....	۱۴۷
سرطان معده.....	۱۴۷
عوامل ژنتیکی و جهش‌های معروف.....	۱۴۸
سندروم‌های ارثی.....	۱۴۹
تست‌های تشخیصی سرطان معده.....	۱۴۹
تست‌های ژنتیکی و مولکولی.....	۱۴۹
روش‌های درمانی سرطان معده.....	۱۵۰
سرطان کولون.....	۱۵۱
انواع سرطان کولون.....	۱۵۱
آدنوکارسینوم کولون.....	۱۵۱
کارسینوم سلول سنگفرشی.....	۱۵۲
تومورهای نورواندوکراین.....	۱۵۲
سارکوم کولون.....	۱۵۲
علل ژنتیکی و عوامل خطر سرطان کولون.....	۱۵۲
ژن‌های دخیل در سرطان کلورکتال.....	۱۵۳
سندروم‌های ژنتیکی ارثی.....	۱۵۴
سندروم لینچ.....	۱۵۴
پولیپوز آدنوماتوز خانوادگی (FAP).....	۱۵۵
سندرم پی‌جی‌اس (PJS).....	۱۵۶
سندرم کُودن و سندرم بانیان-رایلی-رووالکابا (BRRS).....	۱۵۶
سندرم آدنوماتوز پلی‌پوزی (MAP).....	۱۵۷

عوامل خطر ژنتیکی.....	۱۵۸
تشخیص سرطان کولون.....	۱۵۸
درمان سرطان کولون.....	۱۵۹
پیشگیری از سرطان کولون.....	۱۶۰
تومورهای استرومال دستگاه گوارش (GIST).....	۱۶۰
ژن KIT.....	۱۶۱
ژن PDGFRA.....	۱۶۲
سرطان پروستات.....	۱۶۷
علل ژنتیکی و جهش‌های معروف ژنی.....	۱۶۸
ژن‌های BRCA1 و BRCA2.....	۱۶۸
ژن HOXB13.....	۱۶۸
ژن‌های ATM و CHEK2.....	۱۶۸
تست‌های تشخیصی مولکولی.....	۱۶۹
تست‌های ژنتیکی BRCA.....	۱۶۹
تست PCA3.....	۱۶۹
تست Oncotype DX Prostate.....	۱۶۹
FoundationOne.....	۱۷۰
روش‌های درمانی.....	۱۷۰
جراحی (پروستاتکتومی).....	۱۷۰
سرطان ریه.....	۱۷۱
جهش‌های ژنی دخیل در سرطان ریه.....	۱۷۲
تست‌های تشخیصی.....	۱۷۵
راه‌های درمان.....	۱۷۶

فصل سوم: درمان سرطان و مقاومت دارویی..... ۱۷۷

درمان نئوآدجوانت و آدجوانت در سرطان.....	۱۷۷
کاربرد درمان‌های نئوآدجوانت و آدجوانت در انواع سرطان‌ها.....	۱۷۸
ایمنی درمانی.....	۱۸۰
واکسن‌های شخصی‌سازی شده مبتنی بر mRNA.....	۱۸۲

نقش مشاوره ژنتیک در درمان	۱۸۳
مفهوم شیمی درمانی و تحول آن تا درمان هدفمند	۱۸۴
انواع داروهای درمان هدفمند	۱۸۶
ایماتینیب	۱۸۶
داساتینیب	۱۸۹
نیلوتینیب	۱۹۲
بوسوتینیب	۱۹۴
پوناتینیب	۱۹۶
دانوسرتیب (PHA-739358)	۱۹۷
ایبروتینیب	۱۹۸
کویزارتینیب	۱۹۹
سورافنیب	۲۰۰
سفیتینیب	۲۰۲
کریزوتینیب	۲۰۳
میردامتینیب و PD0325901	۲۰۴
آلکتینیب	۲۰۵
سریتینیب	۲۰۶
آفاتینیب	۲۰۸
ارلوتینیب	۲۱۰
اولموتینیب (HM61713)	۲۱۲
گفیتینیب	۲۱۳
اوسیمرتینیب	۲۱۴
تسواتینیب (XL647)	۲۱۵
کاپماتینیب	۲۱۶
سلولیتینیب	۲۱۷
سیرولیموس (راپامایسین)	۲۱۸
تلموکسیفن	۲۲۰
آبیراترون	۲۲۳

۲۲۴.....	انزالوتامید.....
۲۲۵.....	فلوتامید.....
۲۲۵.....	گنادورلین (LRHR).....
۲۲۸.....	مقاومت دارویی در مسیر درمان.....
۲۲۹.....	DNA خارج کروموزومی و ایجاد مقاومت دارویی.....
۲۳۱.....	مکانیسم‌های مقاومت دارویی در سرطان لوسمی.....
۲۳۱.....	مهارکننده‌های تیروزین کیناز در درمان لوسمی میلوئید مزمن.....
۲۴۳.....	انتقال‌دهنده‌های کاست اتصال (ABC).....
۲۴۵.....	انتقال‌دهنده‌های کاتیون آلی (hOCT1).....
۲۴۶.....	نقش سرامید.....
۲۵۰.....	رویکردی نوین برای غلبه بر مقاومت دارویی در CML.....
۲۵۴.....	مقاومت به مهارکننده‌های هدفمند در سایر سرطان‌های خون.....
۲۵۴.....	کیناز تیروزینی (Bruton (BTK).....
۲۵۶.....	FLT3 (FMS-like Tyrosine Kinase 3).....
۲۶۳.....	رویکردهای نوین در مقابله با مقاومت دارویی و بازگشت تومور.....
۲۶۵.....	درمان و مقاومت دارویی در سرطان پستان.....
۲۶۵.....	درمان در سرطان پستان سه‌گانه منفی.....
۲۶۵.....	کاربرد بالینی گیرنده‌های هورمونی در درمان سرطان پستان.....
۲۶۸.....	نقش جهش‌های ESR1 در مقاومت به درمان اندوکراین در سرطان پستان.....
۲۷۲.....	کاربردهای درمانی هدفمند در مسیر سیگنالینگ HER2.....
۲۷۷.....	بررسی ژن‌های BRCA1 و BRCA2 و نقش آن‌ها در درمان هدفمند سرطان پستان با مهارکننده‌های PARP.....
۲۷۹.....	جهش در ژن KRAS در ایجاد مقاومت دارویی.....
۲۸۱.....	مقاومت درمانی در تومورهای استرومایی دستگاه گوارش (GISTs).....
۲۸۷.....	مقاومت دارویی در سرطان پروستات.....
۲۹۱.....	مقاومت درمانی در سلول‌های سرطان ریه غیر کوچک.....
۲۹۱.....	گیرنده فاکتور رشد اپیدرمی (EGFR).....
۲۹۳.....	مکانیسم‌های مقاومت دارویی مرتبط با مهارکننده‌های EGFR در سرطان ریه سلول غیرکوچک (NSCLC).....

گیرنده فاکتور رشد هپاتوسیت (HGFR, c-Met).....	۲۹۷
لنفوم کیناز آناپلاستیک (ALK).....	۲۹۹
پزشکی فردمحور: گامی به سوی درمان‌های هدفمند در سرطان.....	۳۱۱

فصل چهارم: آزمایشات مولکولی در تشخیص سرطان..... ۳۱۳

پروتکل استخراج DNA از سلول‌ها و بافت‌ها.....	۳۱۳
آماده‌سازی نمونه.....	۳۱۴
وسایل و تجهیزات مورد نیاز.....	۳۱۴
استخراج DNA از طریق Salting Out.....	۳۱۵
محلول‌های مورد نیاز.....	۳۱۵
مراحل استخراج DNA به روش دستی Salting Out.....	۳۱۵
استخراج DNA از طریق ستون.....	۳۱۶
محلول‌های مورد نیاز.....	۳۱۶
محلول‌های شستشوی DNA.....	۳۱۷
مراحل پروتکل استخراج DNA به روش ستون.....	۳۱۷
پروتکل استخراج RNA از سلول‌ها و بافت‌ها.....	۳۱۸
آماده‌سازی نمونه.....	۳۱۹
وسایل و تجهیزات مورد نیاز.....	۳۱۹
استخراج RNA به روش دستی.....	۳۲۰
محلول‌های مورد نیاز.....	۳۲۰
مراحل استخراج RNA با ترايزول.....	۳۲۰
مراحل استخراج RNA با استفاده از کیت ستونی (Silica Column-Based RNA Extraction).....	۳۲۲
(Kit).....	۳۲۲
واکنش زنجیره‌ای پلیمراز.....	۳۲۴
تجهیزات مورد نیاز.....	۳۲۵
مواد مورد نیاز برای انجام تست‌های مربوط به PCR.....	۳۲۵
DNA قالب (Template DNA).....	۳۲۵
جفت آغازگر (Primer Forward و Primer Reverse).....	۳۲۶
دئوکسی نوکلئوتید تری فسفات‌ها (dNTPs: dATP, dTTP, dCTP, dGTP).....	۳۲۶

۳۲۶	آنزیم DNA پلیمراز (معمولاً Taq Polymerase).....
۳۲۶	بافر واکنش (PCR Reaction Buffer).....
۳۲۶	یون منیزیم (MgCl ₂).....
۳۲۷	آب بدون نوکلئاز (Nuclease-free Water).....
۳۲۸	بررسی عملی تست Real-Time PCR اصول، مراحل، مواد و تنظیمات دستگاه
۳۲۹	تنظیم منحنی ذوب (Melt Curve Analysis).....
۳۳۰	پروتکل سنتز cDNA
۳۳۱	پروتکل ۱: سنتز cDNA با استفاده از پرایمرهای رندوم هگزامر.....
۳۳۱	مواد لازم و نقش هر کدام.....
۳۳۱	مراحل اجرای پروتکل.....
۳۳۲	پروتکل ۲: سنتز cDNA با استفاده از پرایمرهای Oligo-dT.....
۳۳۲	مواد لازم و نقش هر کدام.....
۳۳۳	مراحل اجرای پروتکل.....
۳۳۴	تست شناسایی جابه‌جایی کروموزوم ۲۲:۹.....
۳۳۵	تست شناسایی جابه‌جایی کروموزوم ۱۱:۴، ۱۹:۱، ۲۱:۱۲ و ۲۱:۸.....
۳۳۶	تست شناسایی جهش‌ها در ژن ABL1 برای مقاومت دارویی ایماتینیب.....
۳۳۷	تست شناسایی جهش در ژن CALR.....
۳۳۸	تست شناسایی جهش در ژن MPL.....
۳۳۸	تست شناسایی جهش در ژن JAK2-Exon12.....
۳۳۹	تست شناسایی جهش در ژن JAK2-Exon14.....
۳۴۰	تست شناسایی جهش در ژن CEBPA.....
۳۴۰	تست شناسایی جهش در ژن c-KIT.....
۳۴۱	تست شناسایی جهش در ژن NPM1.....
۳۴۱	تست شناسایی جهش در ژن FLT3-ITD.....
۳۴۲	تست شناسایی جهش در ژن FLT3-TKD.....
۳۴۴	پروتکل الکتروفورز ژل آگاروز
۳۴۵	مواد و تجهیزات مورد نیاز.....
۳۴۶	مراحل پروتکل الکتروفورز ژل آگاروز.....

تهیه بافر 10x و 1x از بافر TBE.....	۳۴۶
مراحل تهیه بافر 1X.....	۳۴۶
تهیه بافر 1X TBE از محلول 10X.....	۳۴۶
محاسبه مقدار آگاروز.....	۳۴۷
حل کردن آگاروز.....	۳۴۸
آماده‌سازی نمونه‌ها برای بارگذاری در ژل.....	۳۴۸
اعمال الکتروفورز.....	۳۴۹
مشاهده و تجزیه و تحلیل نتایج.....	۳۴۹
بررسی عملی توالی‌یابی DNA و تحلیل قطعات فرگمنت.....	۳۵۱
مراحل انجام توالی‌یابی.....	۳۵۲
نحوه بررسی نتایج توالی‌یابی.....	۳۵۳
فرمت داده و نرم‌افزارهای مورد استفاده.....	۳۵۳
تطابق با توالی رفرنس.....	۳۵۳
روش انجام Fragment Analysis با استفاده از پرایمر فلورسنت‌دار.....	۳۵۶
بررسی نتایج در خوانش قطعات Fragment.....	۳۵۷
تفسیر داده‌های قطعات فرگمنت.....	۳۵۸
مارکر اندازه و نقش آن.....	۳۵۹
تحلیل کمی در جهش‌های افزایشی.....	۳۶۰
آزمون Oncotype DX.....	۳۶۱
تحلیل جامع مولکولی برای درمان هدفمند سرطان.....	۳۶۲
منابع.....	۳۶۷

تقدیر

باسپاس فراوان از آموزشگاه بیوتکنولوژی زیست فناوری نوین اصفهان که شرایط لازم جهت نگارش این کتاب ارزشمند را فراهم نمود و مسبب تالیف کتاب حاضر در جهت افزایش آگاهی دانشجویان و افراد مشغول در آزمایشگاه ژنتیک پزشکی شد.

کتاب حاضر با هدف بررسی جامع تکنیک‌های مولکولی و نقش آن‌ها در تشخیص و درمان بیماری‌ها تدوین شده است. در دوران کنونی که علم پزشکی با تحولات گسترده‌ای در حوزه زیست‌فناوری و علوم ژنومیک روبروست، تکنیک‌های مولکولی به عنوان ابزارهایی نوین و دقیق، جایگاه ویژه‌ای در فهم بیماری‌ها، تشخیص زودهنگام، و بررسی پاسخ به درمان یافته‌اند. این کتاب تلاش دارد تا با تکیه بر آخرین یافته‌های علمی تا زمان نگارش، تصویری روشن و علمی از این تکنیک‌ها و کاربردهای آن‌ها در حوزه‌های مختلف بیماری، به‌ویژه سرطان، ارائه دهد. مطالب کتاب به گونه‌ای طراحی شده‌اند که هم برای پژوهشگران حوزه زیست‌پزشکی و هم برای دانشجویان رشته‌های مرتبط قابل استفاده باشند و درک عمیق‌تری از بنیان‌های زیستی و مولکولی بیماری‌ها فراهم آورند.

در فصل نخست، تمرکز اصلی بر تکنیک‌های مولکولی تشخیصی است. در این فصل، روش‌هایی مانند واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (PCR)، توالی‌یابی نسل جدید (NGS)، تکنیک‌های مبتنی بر میکروآرایه، و روش‌های هیبریداسیون مولکولی مورد بحث قرار گرفته‌اند. این روش‌ها به عنوان پایه‌های اصلی در شناسایی دقیق عوامل ژنتیکی بیماری‌ها، تشخیص زودهنگام سرطان‌ها، و بررسی جهش‌های ژنی شناخته می‌شوند. همچنین، نقش آن‌ها در افزایش دقت و سرعت فرآیندهای تشخیص پزشکی با ارائه شواهد علمی معتبر مورد تأکید قرار گرفته است.

فصل دوم به بررسی مولکولی بیماری‌های نئوپلاستیک اختصاص دارد و در آن، سرطان‌های شایع نظیر سرطان خون، ریه، پستان، پروستات، معده و کولورکتال از منظر ژنتیکی و مولکولی تحلیل

می‌شوند. این فصل با تمرکز بر ژن‌های کلیدی دخیل در ایجاد و پیشرفت تومورها، به بررسی مسیرهای سیگنالینگ سلولی، نقش آنکوژن‌ها و ژن‌های سرکوب‌گر تومور، و الگوهای بیانی غیرطبیعی می‌پردازد. هدف این فصل، تبیین پایه‌های مولکولی پاتولوژی سرطان‌ها و درک سازوکارهایی است که در رفتار تهاجمی و مقاومت‌پذیری این بیماری‌ها نقش دارند.

در فصل سوم، موضوع درمان سرطان و مقاومت دارویی در سرطان‌ها از منظر ژنتیکی و مولکولی مورد بررسی قرار می‌گیرد. با تمرکز بر جهش‌های مولد مقاومت، تغییرات ساختاری گیرنده‌ها، مسیرهای جایگزین سیگنال‌دهی و سازوکارهای تطبیقی سلولی، این فصل به تحلیل علمی دلایل شکست درمان‌های هدفمند و کلاسیک در برخی بیماران می‌پردازد. همچنین، داروهای نسل جدید و رویکردهای درمانی ترکیبی که برای مقابله با این مقاومت‌ها توسعه یافته‌اند، بررسی و تحلیل می‌شوند.

فصل چهارم به جمع‌بندی تکنیک‌های کاربردی در تشخیص بیماری‌ها اختصاص دارد. در این بخش، بر نقش کاربردی فناوری‌های مولکولی که در فصول پیشین معرفی شده‌اند، تأکید شده و شیوه‌های به‌کارگیری آن‌ها در آزمایشگاه‌های تشخیصی مدرن بررسی می‌گردد.

شایان ذکر است که کتاب حاضر صرفاً با هدف افزایش آگاهی علمی و ارتقاء دانش نظری در حوزه زیست‌پزشکی و ژنتیک مولکولی نگاشته شده و به هیچ وجه جنبه درمانی یا تجویزی ندارد. مطالب ارائه‌شده در این کتاب مبتنی بر شواهد علمی و منابع معتبر موجود تا زمان نگارش آن می‌باشند و برای بهره‌برداری بالینی یا انتخاب شیوه‌های درمانی، لازم است همواره از مقالات و دستورالعمل‌های به‌روز و معتبر پزشکی بهره گرفته شود. بنابراین، مخاطبان گرامی توصیه می‌شود جهت استفاده عملی یا درمانی، حتماً با متخصصان حوزه سلامت مشورت نموده و از آخرین منابع علمی بهره بگیرند.

بهار ۱۴۰۵

فصل اول

روش‌های مولکولی در تشخیص

استخراج اسیدهای نوکلئیک

استخراج اسیدهای نوکلئیک DNA^۱ و RNA^۲ از نمونه‌های زیستی جزء روش‌های پایه و اساسی در تکنیک‌های مولکولی محسوب می‌شود. DNA، RNA و یا حتی پروتئین را می‌توان از هر ماده بیولوژیکی مانند بافت‌های زنده یا حفاظت شده، سلول‌ها، ذرات ویروس یا سایر نمونه‌ها برای اهداف تحلیلی یا آماده‌سازی جدا کرد. نکته مهمی که قبل از استخراج بایستی حتما در نظر بگیریم این است که به چه منظور و برای کدام یک از تکنیک‌های مولکولی قرار است استخراج اسید نوکلئیک را انجام دهیم. روش‌های استخراج معمولا بر حسب اینکه کدام یک از اسیدهای نوکلئیک را می‌خواهیم جداسازی کنیم، نمونه اولیه به چه صورتی (بافت، بلوک‌های پارافینی، مغز استخوان، خون محیطی، سرم، پلاسما و غیره) باشد، و برای چه هدفی استخراج قرار است انجام گردد، دارای تفاوت‌هایی می‌باشد. مشخص شدن این مسئله می‌تواند در انتخاب روش استخراج و انتخاب نوع نمونه اولیه بسیار موثر باشد. تکنیک‌های استخراج در طی زمان پیشرفت‌های زیادی داشته است و این پیشرفت‌ها به تخلیص با کیفیت بالا کمک شایانی کرده است. در حال حاضر، روش‌های تخصصی زیادی برای استخراج DNA، RNA یا پروتئین خالص وجود دارد. به طور کلی، آنها به پروتکل‌های مبتنی بر راه حل یا مبتنی بر ستون تقسیم می‌شوند. بیشتر این پروتکل‌ها در کیت‌های تجاری ایجاد شده‌اند که فرآیند استخراج بیومولکول‌ها را تسهیل می‌کنند (۱). در این

1. Deoxyribonucleic acid

2. Ribonucleic acid

بخش از کتاب در مورد، تفاوت استفاده از انواع اسیدهای نوکلئیک (DNA و RNA) در آزمایشات مولکولی، نمونه‌های اولیه‌ی مختلف، علل استفاده از هر کدام نمونه‌ها و روش‌های استخراج به صورت کلی اطلاعاتی شرح داده خواهد شد و در فصل ۳ در مورد روش‌های عملی استخراج جهت انجام آزمایشات مولکولی به صورت جامع توضیح داده خواهد شد.

■ تفاوت استخراج DNA و RNA از نظر انجام نوع تست‌های مولکولی

هنگامی که هدف ما از انجام آزمایشات در تحقیقات و تشخیص‌های مولکولی، بر روی وجود و یا عدم وجود ژن و یا قسمتی از مولکول DNA و حتی بررسی یک تک نوکلئوتید بر روی DNA باشد، به استخراج DNA نیازمند هستیم. از جمله این آزمایشات می‌توان به آزمایشات PCR و توالی‌یابی‌ها اشاره نمود (در ادامه همین فصل در مورد این آزمایشات صحبت خواهد شد) (۲-۴). ولی زمانی که هدف اصلی بررسی میزان تجزیه و تحلیل بیان ژن باشد، به خالص‌سازی RNA از خون نیاز است. برای مثال برای انجام آزمایشات RT-qPCR، RT-PCR و برخی توالی‌یابی‌ها به RNA به عنوان ماده ژنتیکی نیاز است (۵،۶).

استخراج RNA نسبت به DNA دارای حساسیت‌های بیشتری دارد برای مثال نمونه‌های جمع‌آوری شده جهت استخراج RNA را می‌توان در دمای $-70/80^{\circ}\text{C}$ درجه سانتی‌گراد برای یک ماه نگهداری کرد چرا که اعتقاد بر این است که زمان طولانی کنترل نشده در شرایط خارج از بدن قبل از انجماد اثرات قابل توجهی بر یکپارچگی RNA و سطوح بیان mRNA دارد و در نتیجه می‌تواند نتایج در مطالعات بیان ژن را تحت تاثیر قرار دهد همچنین نگهداری نمونه‌ها در دمای پایین تأثیری بر به حداقل رساندن فعالیت RNase‌های درون‌زا دارد که یک اقدام احتیاطی مرتبط برای استخراج موفق RNA است (۷).

■ بررسی انواع نمونه‌های اولیه جهت استخراج اسید نوکلئیک

استخراج اسیدهای نوکلئیک از سلول‌های خون محیطی^۱

خون محیطی یا همان خون کامل شامل سلول‌های خونی و پلاسما است که در طیف وسیعی از مطالعات ژنتیکی از آن استفاده می‌شود (۳). نمونه‌های خون کامل یکی از منابع اصلی مورد استفاده برای به دست آوردن اسیدهای نوکلئیک هستند و پروتکل‌های مختلفی برای استخراج اسید نوکلئیک روی این نمونه‌ها وجود دارد. این روش‌ها از پروتکل‌های دستی بسیار ابتدایی تا روش‌های

1. Peripheral blood

2. whole blood