

مقایسه استخراج DNA به دو روش Chelex و فنل کلروفرم از بلوک‌های پارافینی سرطانی

دکتر رحیم گل محمدی^۱، دکتر مهدی زرگریان^۲

^۱ استادیار آناتومی دانشکده علوم پزشکی سبزوار

^۲ عضو هیئت علمی رشته علوم آزمایشگاهی دانشکده علوم پزشکی سبزوار

نشانی نویسنده مسؤول: سبزوار، جنب پلیس راه، دانشکده علوم پزشکی، دکتر رحیم گل محمدی

E-mail: Rahimgolmohammadi@yahoo.com

وصول: ۸۶/۱/۱۵، اصلاح: ۸۶/۲/۲۹، پذیرش: ۸۶/۳/۱۷

چکیده

زمینه و هدف: بررسی تغییرات ژنتیکی در سرطان‌ها از دید مولکولی جهت تشخیص، پیگیری و درمان، لازم و ضروری است. برای انجام کارهای مولکولی اولین قدم استخراج DNA است. به کارگیری روش‌های عملی آسان و ارزان که بتواند استخراج DNA را برای کارهای مولکولی آسان‌تر کند، مفید خواهد بود معمولاً پس از جراحی، نمونه‌های سرطانی به طور روتین در فرمالین ثابت و در پارافین قالب‌گیری می‌شوند و استخراج DNA با کیفیت مناسب از چنین نمونه‌های مهم است. هدف ما در این پژوهش مقایسه استخراج DNA به دو روش Chelex و فنل کلروفرم از بلوک‌های پارافینی سرطان کولورکتال و تأثیر آن در PCR-SSCP می‌باشد.

مواد و روش‌ها: این مطالعه از نوع توصیفی تحلیلی است که بر روی ۶۰ نمونه سرطان کولورکتال انجام شد. ۱۰ نمونه در ناحیه رکتوم و ۵۰ نمونه در بخش‌های مختلف روده بزرگ قرار داشتند. DNA نمونه‌ها به دو روش فنل کلروفرم و Chelex استخراج گردید. با اسپکتروفتومتری کمیّت و کیفیت DNA اندازه‌گیری شد. سپس با پرایمرهای ویژه ژن P53 با PCR تکثیر گردید و متعاقب آن، الکتروفورز انجام شد. دو روش Chelex و فنل کلروفرم با ضریب توافق کاپا تجزیه و تحلیل شدند.

یافته‌ها: از ۶۰ نمونه مورد مطالعه، ۱۵ نفر خانم و ۴۵ نفر مرد بودند. سن بیماران در نمونه مورد مطالعه بین ۴۴ تا ۹۱ سال و میانگین سن آن‌ها ۶۲ سال بود. در روش Chelex از نمونه‌های فیکس شده در فرمالین، در ۴۴ نمونه DNA با کیفیت مناسب استخراج شد که PCR آن‌ها مثبت بود. در حالی که در روش فنل کلروفرم در همین نمونه‌ها در ۳۲ نمونه DNA مناسب برای PCR مثبت وجود داشت. بین روش Chelex و فنل کلروفرم ارتباط معنی‌داری مشاهده شد ($p < 0.01$).

نتیجه‌گیری: این مطالعه نشان داد که استخراج DNA از بلوک‌های پارافینی با روش Chelex بهتر از فنل کلروفرم است. (مجله دانشکده علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی سبزوار، دوره ۱۴/ شماره ۱ / صص ۱۴-۷).

واژه‌های کلیدی: Chelex ؛ PCR ؛ DNA .

مقدمه

تشخیصی را در زمینه مولکولی سرطان‌ها فراهم نموده است. سرطان کولورکتال یکی از سرطان‌های شایع جهانی

توسعه علم و پیشرفت تکنولوژی روش‌های نوین

روش‌های عملی آسان، ارزان و سریع و در عین حال با کیفیت و کمیت مناسب در این امر مفید خواهد بود. لذا هدف از این مطالعه تعیین مقایسه استخراج DNA با روش Chelex و فنل کلروفورم از نمونه‌های پارافینی سرطانی کولورکتال و تأثیر آن در PCR-SSCP می‌باشد.

مواد و روش‌ها

این مطالعه از نوع توصیفی تحلیلی است و بر روی ۶۰ نمونه سرطان کولورکتال انجام گرفت که در طول سال‌های ۸۲ تا ۸۵ به بیمارستان‌های شهر اصفهان جهت جراحی مراجعه کرده بودند.

پاساژ بافتی و رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین و

اوتوزین: پس از جراحی از هر نمونه دو قطعه یکی در فرمالین ۱۰ درصد تثبیت شد و دیگری فریز گردید. سپس به وسیله دستگاه Tissue processing پاساژ باقی انجام شد. از تمام بلوک‌های پارافینی با میکروتوم چرخشی مقاطع ۵ میکرونی تهیه و بعد از پارافین زدایی و آب‌دهی با هماتوکسیلین و اوتوزین رنگ‌آمیزی شدند. اسلایدها با میکروسکوپ نوری مورد مطالعه قرار گرفتند. تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از آزمون مجذور کای در نرم افزار SPSS صورت گرفت.

استخراج DNA با روش Chelex: ۱- دو سکشن

۱۰ میکرونی از نمونه‌های پارافینی سرطانی پس از تشخیص پاتولوژی تهیه شد و در میکروتیوب‌های استریل ۱/۵ میلی‌لیتری قرار داده شد و ۲۰۰ میکرولیتر از محلول ۰/۵ درصد Tween-۲۰ به آن اضافه شد.

۲- ورتکس کردن میکروتیوب‌ها و قرار دادن آن‌ها در درجه حرارت ۹۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه و سپس خارج کردن لایه پارافینی با سمپلر انجام گرفت.

۳- اضافه کردن ۱۵۰ میکرولیتر بافر تجزیه با ۵ میکرولیتر پروتئیناز K ۱۰ mg/ml به میکروتیوب و قرار دادن آن‌ها در دمای ۳۸ °C به مدت یک شب جهت هضم پروتئین‌ها، بهتر است در طی این مرحله چندبار ورتکس و spin انجام

و دومین علت مرگ ناشی از سرطان در آمریکا می‌باشد (۱،۲). عوامل متعدد فیزیکی، شیمیایی، ژنتیکی و عادات غذایی در ایجاد سرطان‌ها دخالت دارند (۸-۳). عموماً در بیشتر سرطان‌ها تغییرات ژنتیکی وجود دارد که حدود ۵۰ درصد موارد با موتاسیون ژن P53 همراه است. این ژن نقش محوری در پایداری ژنوم به عهده دارد (۹) به طوری که بیش از یک صد ژن را کنترل می‌کند (۱۰). آسیب فیزیکی یا شیمیایی DNA ژن P53 در مرحله G1 از طریق بیان ژن P21 موجب توقف چرخه سلولی می‌شود و از همانندسازی DNA پیشگیری می‌کند (۱۱) تا این‌که سلول خود را ترمیم کند و یا روند آپوپتوز را در سلول آسیب دیده تسهیل نماید (۱۱،۱۲). ژن P53 با کاهش بیان فاکتور رگزایی (VEGF) مهار رشد تومور را موجب می‌شود و بالعکس جهش آن در سرطان‌ها با بیان فاکتورهای آنژیوژنز همراه می‌شود که برای رشد سلول‌های سرطانی لازم و ضروری می‌باشد (۱۴،۱۵). بررسی تغییرات ژنتیکی و مقاومت دارویی در سرطان‌ها از دید مولکولی جهت تشخیص، پیگیری و درمان‌های نوین لازم و ضروری می‌باشد (۱۶). برای انجام کارهای مولکولی مانند PCR (Polymerase Chain Reaction)، SSCP (Single strand conformation polymorphism)، RFLP (Restriction Fragment Length polymorphism) و Seqencing، اولین قدم استخراج DNA از نمونه‌های سرطانی می‌باشد (۱۷،۱۸). پس از جراحی، نمونه‌ها برای جلوگیری از اتولیز و هترولیز بلافاصله در فرمالین ثابت می‌شوند و بعد از پاساژ بافتی در پارافین قالب‌گیری می‌شوند (۱۹). برای استخراج DNA از نمونه‌های فیکس شده در فرمالین به‌طور معمول سه مرحله پارافین زدایی، هضم بافتی و خالص سازی لازم است که از روش‌های مختلفی مانند کیت، فنل کلروفورم و Chelex استفاده می‌شود (۲۰). استفاده از کیت برای استخراج DNA از چنین نمونه‌هایی هزینه زیادی را در بر دارد که برای بیماران و آزمایشگاه مقرون به صرفه نمی‌باشد. بنابراین، استفاده از

شد.

۴- قطعات درشت غیرقابل هضم برداشته شد.

۵- ۱۰۰ میکرولیتر آب مقطر و حدود ۲۵-۳۰ عدد Chelex به هر میکروتیوب افزوده شد. پس از ورتکس به مدت ۱۰ دقیقه در ۹۹ در دستگاه ترموسیکلر قرار داده شد. میکروتیوب‌ها به مدت ۱۵ دقیقه در (Rapid per) rpm (minute) ۱۲۰۰۰ و دمای ۴ سانتی‌فروز شد. لایه سطحی برای ادامه کار به میکروتیوب‌های جدید و استریل منتقل شد.

۶- مقدار ۲۰۰ میکرولیتر کلروفرم به میکروتیوب‌ها اضافه شد و پس از ورتکس در بن‌ماری ۴۵ به مدت ۱۰-۵ دقیقه قرار گرفت.

۷- میکروتیوب‌ها به مدت ۱۵ دقیقه در rpm ۱۲۰۰۰ سانتی‌فروز شدند.

۸- فاز فوقانی که حدود ۱۰۰ میکرولیتر بود، به میکروتیوب‌های جدید و استریل منتقل شد. غلظت و درجه خلوص DNA با اسپکتروفوتومتری اندازه‌گیری شد (جدول ۱).

استخراج DNA با روش فنل - کلروفرم -

آیزوآمیل الکل: ۱- دو سکشن ۱۰ میکرونی در میکروتیوب‌های استریل ۱/۵ میلی‌لیتری قرار داده شد و سپس ۳۰۰ میکرولیتر گزین به آن اضافه شد و به مدت ۱۵ دقیقه در درجه حرارت ۶۰ قرار داده شد و سپس سانتی‌فروز rpm ۱۲۰۰۰ به مدت ۱۵ دقیقه انجام شد. بعد از خارج کردن فاز روی و اضافه کردن گزین، مرحله قبل تکرار شد. ۲۰۰ میکرولیتر از محلول ۰/۵ درصد ۲۰- Tween به آن اضافه شد.

۲- مقدار ۱۵۰ میکرولیتر بافر تجزیه همراه با ۵ میکرولیتر از پروتئیناز K به میکروتیوب‌ها اضافه شد. سپس عمل ورتکس و spin انجام شد.

۳- به مدت یک شب در بن‌ماری ۳۸ قرار داده شد. چند بار ورتکس و spin انجام شد تا عمل هضم بهتر انجام بگیرد و سپس هر گونه بافت حل نشده توسط سر

سمپلر استریل خارج شد.

۴- مقدار ۳۰۰ میکرولیتر فنل متعادل به میکروتیوب‌ها اضافه شد و پس از ۱۰ بار ورتکس و spin کوتاه به مدت ۱۰ دقیقه با سرعت rpm ۱۲۰۰۰ سانتی‌فروز انجام و سپس مایع رویی به میکروتیوب‌های ۱/۵ میلی‌لیتری استریل جدید منتقل شد و از فاز بینابینی در موقع کشیدن مایع صرف‌نظر شد تا پروتئین‌ها و مواد دیگر با مایع رویی مخلوط نشوند.

۵- برابر حجم مایع رویی از محلول فنل - کلروفرم- ایزوآمیل الکل تهیه شده افزوده شد و پس از ورتکس و spin، سانتی‌فروز مثل مرحله قبل تکرار و مایع رویی به میکروتیوب‌های ۱/۵ میلی‌لیتری جدید و استریل منتقل شد.

۶- مقدار ۲۰۰ میکرولیتر اتانول ۱۰۰ درصد و ۵ میکرولیتر استات سدیم ۳ مولار به میکروتیوب‌ها اضافه شد. پس از چند بار ورتکس به صورت Overnight در ۲۰- نگهداری شد.

۷- میکروتیوب‌های حاوی نمونه از فریز خارج شده و به مدت ۱۰ دقیقه در rpm ۱۲۰۰۰ در درجه حرارت ۴ به مدت ۱۰ دقیقه سانتی‌فروز انجام شد. مایع رویی خارج شد و لوله‌ها روی دستمال کاغذی تمیز به صورت وارونه قرار داده شدند به طوری که با یکدیگر اتصال نداشته باشند. با انجام این مراحل DNA در ته لوله رسوب کرد.

۸- به هر میکروتیوب، ۲۰۰ میکرولیتر الکل ۷۰ درصد سرد افزوده شد. پس از چند ضربه آهسته به میکروتیوب‌ها برای جدا شدن رسوب در rpm ۱۲۰۰۰ به مدت ۵ دقیقه، سانتی‌فروز انجام شد و سپس مایع رویی خارج شد.

۹- میکروتیوب‌ها به مدت ۵ تا ۱۵ دقیقه در درجه حرارت ۶۵ قرار داده شد تا آب و الکل بخار شود و رسوب حاصله خشک شود. سپس ۱۰۰ میکرولیتر آب مقطر دیونیزه استریل اضافه گردید، ورتکس و spin انجام شد و در بن‌ماری ۶۰ به مدت ۵ دقیقه قرار گرفت. غلظت و درجه خلوص DNA با اسپکتروفوتومتری اندازه-

گیری شد (جدول ۱).

استخراج DNA از نمونه‌های تازه همان بافت:

DNA نمونه‌های تازه به ترتیب زیر استخراج گردید. حدود ۲۵ میلی‌گرم از ناحیه مبتلا به سرطان به طور دقیق با ترازوی الکترونیکی وزن شد و در داخل تیوب ۱/۵ میلی-لیتری استریل قرار داده شد. با استفاده از بافرهای تجزیه TEN، آنزیم پروتئیناز K ۱۰ میلی مولار، تریس اسیدکلریدریک، EDTA نیم مولار، NaCl، SDS ۲ درصد (Merk) و درجه حرارت 55°C به مدت ۳ ساعت، بافت هضم شد. DNA با روش فنل، فنل کلروفرم، ایزوآمیل الکل (۱،۲۴،۲۵) و کلروفرم استخراج شد. سپس با اتانول DNA رسوب داده شده و در آب مقطر دوباره تقطیر شده، نگهداری شد. در این مطالعه، از دستگاه سانتریفوژ یخچال دار اپندورف با قدرت 12000 rpm برای جدا کردن پروتئین‌ها و رسوب دادن DNA استفاده شد. با اسپکتروفتومتر، غلظت DNA و میزان خلوص آن اندازه-گیری شد و DNA در فریزر -20°C تا زمان استفاده نگهداری شد (۲۳).

PCR: حدود ۵۰ نانوگرم (یک تا ۵ میکرولیتر) از DNA استخراج شده با ۲/۵ میکرولیتر از $10\times$ buffer با غلظت-های متفاوت ۲ تا ۳ میکرولیتری از 25 MgCl_2 میلی مولار با ۱/۵ میکرولیتر $dNTP$ ۵ میلی مولار و ۵ میکرولیتر از هر یک از پرایمرهای Forward و Reverse با غلظت‌های ۵ میلی مولار و توالی زیر

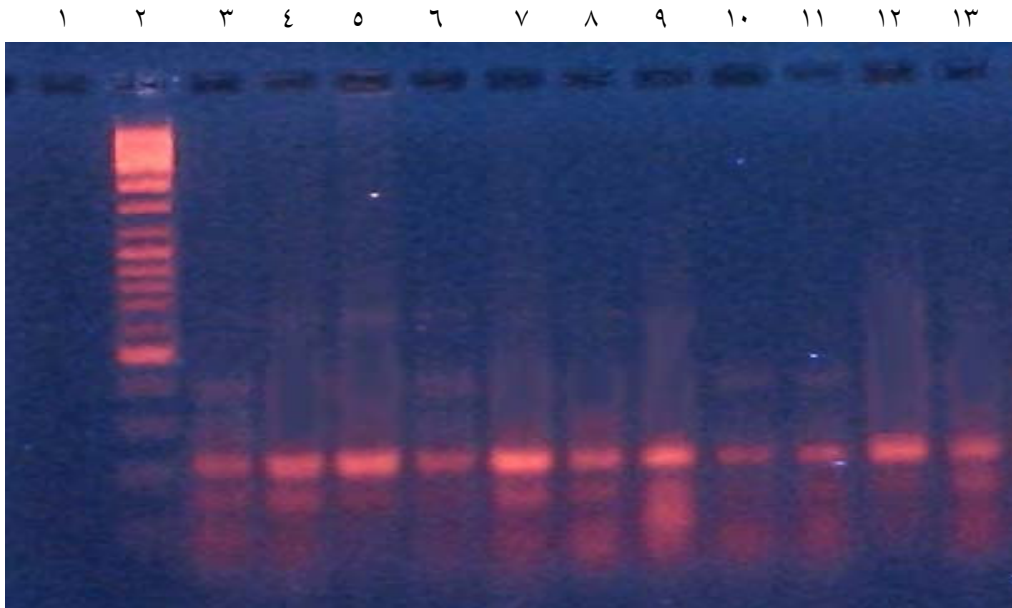
Forward: 5'-TCAGATTCACCTTTTATCACCC3'
Reverse: 3'-AGTGTTAGACTGGAAACTTT5'

(از شرکت HPSF Biotech آلمان سفارش فرآیند دانش) (۲۴). یک واحد آنزیم Taq DNA Polymerase به میکروتیوب استریل افزوده شد و با آب مقطر دو بار تقطیر شده، حجم نهایی به ۲۵ میکرولیتر رسانده شد. سپس با استفاده از دستگاه ترموسیکلر $\text{Bioered Mycycler}^{\text{USA}}$ اکسون ۹ ژن P53 متعاقب بهینه‌سازی شرایط مطلوب برای PCR از نظر گرادیانت درجه حرارتی، غلظت DNA، پرایمر، کلریدمنیزیم و زمان، اکسون ۹ ژن P53 تکثیر

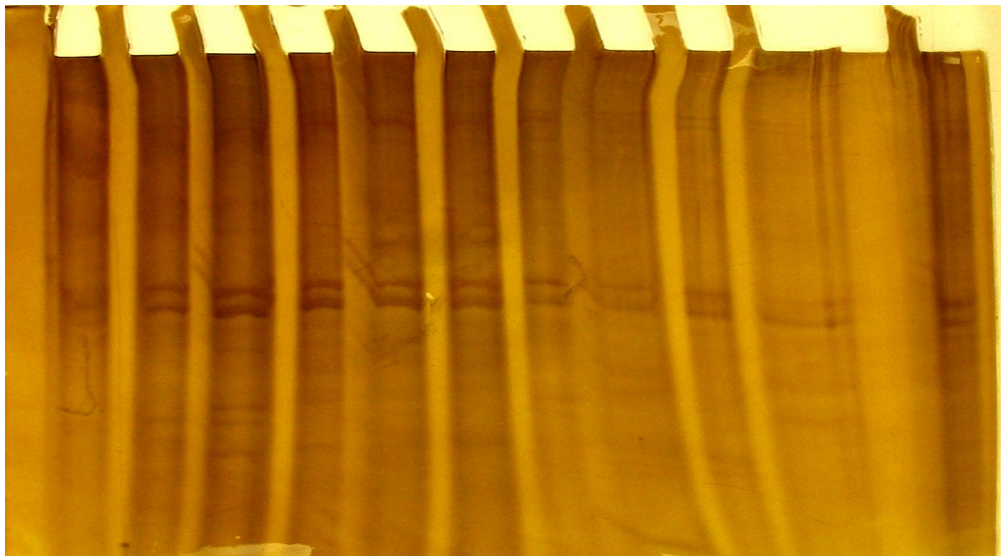
گردید. بهترین شرایط به شرح ذیل به دست آمد: سیکل اول با دمای 95°C به مدت ۵ دقیقه و 40°C سیکل بعدی با درجه حرارت 94°C به مدت ۵۰ ثانیه و درجه اتصالی پرایمر به DNA 54°C برای اکسون ۸ و 52°C برای اکسون ۹ به مدت یک دقیقه گسترش (extension) در درجه حرارت 72°C به مدت یک دقیقه و یک سیکل نهایی با درجه حرارت 72°C به مدت ده دقیقه انجام شد. پس از تکثیر، محصول PCR در یخچال قرار داده شد. شش میکرولیتر از محصول PCR با ۲ میکرولیتر از Loading dye مخلوط گردید و سپس در چاهک‌های ژل ۲ درصد آگارز قرار داده شد. از Ethidium bromide برای رنگ-آمیزی DNA استفاده گردید. الکتروفورز به مدت ۹۰ دقیقه و با ولتاژ ۸۰ جهت الکتروفورز قطعات تکثیر شده استفاده شد. پس از قرار دادن ژل در آب مقطر، عمل عکس برداری انجام شد. از نمونه کنترل منفی جهت تعیین آلودگی نیز استفاده شد که حاوی تمام مواد لازم برای تکثیر ژن به جزء DNA بود. (شکل ۱) (۲۲،۲۳).

روش SSCP: در این روش، DNA با حرارت یا

مواد شیمیایی به صورت تک رشته‌ای در می‌آید. از ژل اکریل آمید ۱۰ درصد حاوی ۰/۵ درصد بیس اکریل آمید TBE $10\times$ buffer و آمونیوم پرسولفات (Merk) که رادیکال‌های آزاد را در ژل موجب می‌شود، توأم با Temed استفاده شد که نقش یک کاتالیزور را در پلیمریزاسیون اکریل آمید و بیس اکریل آمید دارد. ژل به مدت ۱/۵ ساعت برای پلیمریزه شدن در فضای اتاق قرار داده شد. سپس ۸ میکرولیتر از محصول PCR را با ۴ میکرولیتر از Lodying dye مخلوط کرده و با استفاده از درجه حرارت 95°C به مدت ۵ دقیقه DNA به صورت تک رشته‌ای در آورده شد. سپس بر روی ظرف یخ متقل گردیده و پس از سه دقیقه در چاهک‌های ژل قرار داده شد (۲۶-۲۴). تانک به دستگاه الکتروفورز وصل گردید و در طول یک شب در اتاقک سرد با درجه 4°C با ولتاژ ۶۰ و ۶ میلی‌آمپر در ژل اکریل آمید الکتروفورز



شکل ۱: الکتروفورز محصول PCR حاصل از تکثیر اکسون ۹ ژن P53 در ژل آگارز ۲ درصد در نمونه‌های مبتلا به سرطان کولورکتال شماره ۱: کنترل منفی شماره ۲ الی ۱۳: نمونه‌های مربوط به سرطان کولورکتال باند مورد نظر توسط پیکان مشخص شده است.



شکل ۲: SSCP اکسون ۹ ژن P53 در نمونه‌های مبتلا به سرطان کولورکتال در ژل اکریل آمید ۱۰ درصد با رنگ آمیزی نقره باند مورد نظر توسط پیکان مشخص شده است.

متعاقب آن ژل در اسید استیک ۱۰ درصد ثابت و از آن عکس تهیه گردید (شکل ۲) (۲۹-۲۷).

یافته‌ها

از ۶۰ نمونه آدنوکارسینومای کولورکتال، ۴۵ نفر مرد با میانگین سن $63/51 \pm 10$ و ۱۵ نفر زن با میانگین

انجام شد. روز بعد، ژل به آهستگی از تانک خارج شده و با اسید استیک ۱۰ درصد به مدت ۲۰ دقیقه مجاورت داده شد و پس از شستشو با آب مقطر با نیترات نقره ۰/۱ درصد (Merk) در تاریکی ژل رنگ آمیزی شد. در پایان با محلول ظهور ۳ درصد (بیکربنات سدیم، تیوسولفات سدیم و فرمالدئید ۳۷ درصد) (Merk) باندها ظاهر شد و

سن $8 \pm 60/33$ بودند. ۵۰ نمونه در نواحی مختلف روده بزرگ و ۱۰ نمونه در ناحیه رکتوم قرار داشتند. دامنه سن بیماران بین ۴۴ تا ۹۱ سال بود. در روش Chelex از نمونه‌های فیکس شده در فرمالین در ۴۴ نمونه (۷۳ درصد) DNA با کمیّت و کیفیت مناسب استخراج شد که PCR آن‌ها مثبت بود در حالی که در همین نمونه‌ها با روش فنل کلروفورم در ۳۲ نفر (۵۳ درصد) از ۶۰ مورد DNA جهت PCR مثبت داشتند. در نمونه‌های تازه در ۵۸ نمونه از ۶۰ مورد DNA با کمیّت و درجه خلوص مناسب استخراج شد که PCR آن‌ها مناسب بود.

دو روش Chelex و فنل کلروفورم با ضریب توافق کاپا تجزیه و تحلیل شدند. بین دو روش فوق ارتباط معنی‌داری مشاهده شد به طوری که استخراج DNA با روش Chelex بهتر از فنل کلروفورم بود ($p < 0/01$). خصوصیات نمونه‌ها و درجه خلوص DNA آن‌ها در جدول ۱ نشان داده شده است.

جدول ۱: نتایج حاصل از کیفیت استخراج DNA از نمونه‌های سرطانی با روش chelex و فنل کلروفورم

متغیر	تعداد	دامنه تغییرات	انحراف معیار \pm میانگین
درجه خلوص DNA با روش Chelex	۶۰	۱/۳۲-۲/۷۰	۱/۷۳ \pm ۰/۲۱
فنل کلروفورم	۶۰	۱/۲۰-۲/۸۰	۱/۷۴ \pm ۰/۲۳
نمونه‌های کنترل	۶۰	۱/۱۷۰-۱/۸۶	۱/۷۸ \pm ۰/۰۶

فیکساتیو و عمر نمونه نیز رابطه معکوسی با درجه خلوص DNA استخراج شده از بلوک‌های پارافینی داشته باشد که مطالعه بیشتری را می‌طلبد.

در مطالعه‌ای که توسط رواق و همکاران در سال ۲۰۰۰ میلادی در کشور شیلی بر روی DNA نمونه‌های بیوپسی سرطان کولورکتال صورت گرفت، PCR-SSCP با موفقیت انجام شد (۳۲). در این مطالعه نیز PCR-SSCP نمونه‌های تازه بافت سرطانی روده بزرگ و رکتوم بهتر از همان نمونه‌هایی بود که در فرمالین فیکس شده بودند که می‌تواند تأییدی بر این باشد که برای کارهای مولکولی نمونه تازه بهتر از نمونه‌های فیکس شده در فرمالین است. در عین حال، استخراج DNA با روش chelex احتیاج به

بحث

به‌طور روتین پس از عمل جراحی در سرطان‌ها نمونه‌ها در فرمالین ثابت و در پارافین قالب‌گیری می‌شوند. بنابراین، استخراج DNA از چنین نمونه‌هایی که به صورت یک منبع آسان در اختیار می‌باشند، می‌تواند برای تحقیق، تشخیص و درمان مفید باشد. در این مطالعه، از ۶۰ نمونه سرطانی در روش Chelex در ۷۳ درصد نمونه‌ها DNA مناسب برای PCR استخراج گردید. در حالی که در روش فنل کلروفورم در ۵۳ درصد از نمونه‌ها DNA مناسب برای PCR استخراج شد. بنابراین، روش chelex بهتر از فنل کلروفورم برای استخراج DNA از نمونه‌های پارافینی بود ولی در مقایسه با DNA نمونه‌های تازه از

و هزینه‌ها را کاهش می‌دهد. بنابراین، این روش از نظر اقتصادی برای بیماران و آزمایشگاه‌ها مقرون به‌صرفه می‌باشد.

تشکر و قدردانی

آقایان دکتر مهاجری پاتولوژیست، کرمی کارشناس اتاق عمل بیمارستان الزهرا (س) و خانم محمودی کارشناس بخش پاتولوژی و ایمونولوژی تقدیر و تشکر می‌نماییم.

یک دستگاه PCR یا بن ماری مجهز به کنترل درجه حرارت دارد، ولی در عوض به گزیلول و الکل برای پارافین‌زدایی و میکروتیوپ مختلف نیاز نیست. ضمن این‌که استخراج DNA در روش Chelex سریع‌تر از روش فنل کلروفرم و در عین حال ارزان‌تر و بهتر برای نمونه‌های قالب‌گیری شده در پارافین می‌باشد. بنابراین، می‌توان روش chelex را به‌عنوان یک روش مطمئن در کنار سایر روش‌های معمول برای استخراج DNA مدنظر داشت. مطالعه حاضر نشان داد که استخراج DNA از نمونه‌های پارافینی با روش Chelex بهتر از فنل کلروفرم است

References

1. Shokar NK, Carlson CA, Shokar GS. Physician and patient influences on the rate of colorectal cancer screening in a primary care clinic. *J Cancer Educ.* 2006; 21(2):84-8.
2. Shokar NK, Vernon SW, Weller SC. Cancer and colorectal cancer: knowledge, beliefs, and screening preferences of a diverse patient population. *Fam Med.* 2005; 37(5):341-7.
3. Smith G, Carey FA, Beattie J, Wilkie MJ, Lightfoot TJ, Coxhead J, et al. Mutations in APC, Kirsten-ras, and p53--alternative genetic pathways to colorectal cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002; 99(14):9433-8.
4. Tang R, Wang PF, Wang HC, Wang JY, Hsieh LL. Mutations of p53 gene in human colorectal cancer: distinct frameshifts among populations. *Int J Cancer.* 2001; 91(6):863-8.
5. Lipkin M, Reddy B, Newmark H, Lamprecht SA. Dietary factors in human colorectal cancer. *Annu Rev Nutr.* 1999; 19:545-86.
6. Sandler RS. Epidemiology and risk factors for colorectal cancer. *Gastroenterol Clin North Am.* 1996; 25(4):717-35.
7. Soussi T. The p53 tumour suppressor gene: a model for molecular epidemiology of human cancer. *Mol Med Today.* 1996; 2(1):32-7.
8. Devita Jr VT, Hellman S, Rosenberg SA. *Cancer: principles and practice of oncology.* 6th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2001. pp. 1216-1312.
9. Guimaraes DP, Hainaut P. TP53: a key gene in human cancer. *Biochimie.* 2002; 84(1): 83-93
10. Adimoolam S, Ford JM. p53 and regulation of DNA damage recognition during nucleotide excision repair. *DNA Repair (Amst).* 2003; 2(9): 947-54.
11. Rowland BD, Peeper DS. KLF4, p21 and context-dependent opposing forces in cancer. *Nat Rev Cancer.* 2006; 6 (1): 11-23.
12. Hofseth LJ, Hussain SP, Harris CC. p53: 25 years after its discovery. *Trends Pharmacol Sci.* 2004; 25(4): 177-81.
13. Cadwell C, Zambetti GP. The effects of wild-type p53 tumor suppressor activity and mutant p53 gain-of-function on cell growth. *Gene.* 2001; 277(1-2): 15-30.
14. Cristi E, Perrone G, Toscano G, Verzi A, Nori S, Santini D, et al. Tumour proliferation, angiogenesis, and ploidy status in human colon cancer. *J Clin Pathol.* 2005; 58(11):1170-4.
15. Perrone G, Vincenzi B, Santini D, Verzi A, Tonini G, Vetrani A, et al. Correlation of p53 and bcl-2 expression with vascular endothelial growth factor(VEGF), microvessel density (MVD) and clinico-pathological features in coloncancer. *Cancer Lett.* 2004; 208(2):227-34.

16. Schmitt CA, Lowe SW. Apoptosis and chemoresistance in transgenic cancer models. *J Mol Med.* 2002; 80(3):137-46.
17. Chaubert P, Bautista D, Benhattar J. An improved method for rapid screening of DNA mutations by nonradioactive single-strand conformation polymorphism procedure. *Biotechniques.* 1993; 15(4):586.
18. Welsh JA, Castren K, Vahakangas KH. Single-strand conformation polymorphism analysis to detect p53 mutations: characterization and development of controls. *Clin Chem.* 1997; 43(12):2251-5.
19. Kerns BJ, Jordan PA, Moore MB, Humphrey PA, Berchuck A, Kohler MF, et al. P53 Overexpression in formalin-fixed, Paraffin-embedded Tissue Detected by Immunohistochemistry. *J Histochem Cytochem.* 1992; 40(7):1047-51.
20. Coombs NJ, Gough AC, Primrose JN. Optimisation of DNA and RNA extraction from archival formalin-fixed tissue. *Nucleic Acids Res.* 1999; 27(16): e12.
21. Shi SR, Cote RJ, Taylor CR. Antigen retrieval immunohistochemistry: past, present, and future. *J Histochem Cytochem.* 1997; 43(3): 327-43.
- ۲۲- گل محمدی رحیم، نیکبخت مهدی، صالحی منصور. بررسی فراوان جهش اکسون ۶ ژن P53 با روش PCR-SSCP در بیماران مبتلا به سرطان کولورکتال. فیض کاشان، ۱۳۸۵؛ دوره ۱۰، شماره ۲، صفحات ۱ تا ۶.
23. Leahy DT, Salman R, Mulcahy H, Sheahan K, O'Donoghue DP, Parfrey NA. Prognostic significance of p53 abnormalities in colorectal carcinoma detected by PCR-SSCP and immunohistochemical analysis. *J Pathol.* 1996; 180(4):364-70.
- ۲۴- گل محمدی رحیم، نیکبخت مهدی، صالحی منصور. بررسی موتاسیون اکسون ۵ ژن P53 در سرطان کولورکتال. مجله دانشکده علوم پزشکی اصفهان، ۱۳۸۴؛ سال ۲۳، شماره ۷۸۲، صفحات ۸۱ تا ۸۷.
- ۲۵- گل محمدی رحیم، نیکبخت مهدی. بررسی ارتباط جهش اکسون ۶ ژن P53 با بیان پروتئین و پیش آگهی بیماری در نمونه های سرطانی کولورکتال. مجله دانشکده علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی سبزوار، ۱۳۸۵؛ دوره ۱۳، شماره ۱، صفحات ۱ تا ۷.
26. Jernvall P, Makinen M, Karttunen T, Makela J, Vihko P. Conserved region mutations of the P53 gene are concentrated in distal colorectal cancers. *Int J Cancer.* 1997; 74(1):97-101.
27. Jansson A, Gentile M, Sun XF. p53 Mutations are present in colorectal cancer with cytoplasmic p53 accumulation. *Int J Cancer.* 2001; 92(3):338-41.
28. M. Schmitz I, Kayser M, Pauly P, Lagoda, Ö. Türeci, J. Weber, A. Kerschen, F. Ries and M. Dicato PCR-SSCP a sensitive and rapid method to detect mutations in the P53 tumor suppressor gene of patients with advanced colorectal cancer *European Journal of Cancer, Volume 31, Supplement 6, November 1995, Page S96.*
29. Sheffield VC, Beck JS, Kwitek AE, Sandstrom DW, Stone EM. The sensitivity of single-strand conformation polymorphism analysis for the detection of single base substitutions. *Genomics.* 1993; 16(2):325-32.
30. Williams C, Ponten F, Moberg C, Soderkvist P, Uhlen M, Ponten J, et al. A high frequency of sequence alterations is due to formalin fixation of archival specimens. *Am J Pathol.* 1999; 155(5):1467-71.
31. Ben-Ezra J, Johnson DA, Rossi J, Cook N, Wu A. Effect of fixation on the amplification of nucleic acids from paraffin-embedded material by the polymerase chain reaction. *J Histochem Cytochem.* 1991; 39(3):351-4.
32. Roa JC, Roa I, Melo A, Araya JC, Villaseca MA, Flores M, et al. [p53 gene mutation in cancer of the colon and rectum]. *Rev Med Chil.* 2000; 128(9): 996-1004.