

بهینه‌سازی آزمون کامت قلیایی برای مطالعه DNA سلول‌های منفرد کبدی در ماهی سفید دریای خزر (*Rutilus frisii kutum*)

میلاذ اسماعیل بیگی^۱، محمد رضا کلباسی^{۲*}

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد شیلات، گروه شیلات، دانشکده علوم دریایی، دانشگاه تربیت مدرس

۲- استاد گروه شیلات، دانشکده علوم دریایی، دانشگاه تربیت مدرس

چکیده

الکتروفورز سلول‌های منفرد روشی است که برای سنجش آسیب DNA استفاده می‌شود. این روش به علت سهولت و سرعت بالا نسبت به روش‌های دیگر مورد توجه قرار گرفته است. در مطالعه حاضر با اعمال برخی از تغییرات، روش مرسوم سنجش کامت قلیایی با استفاده از سلول‌های منفرد کبد ماهی سفید دریای خزر (*Rutilus frisii kutum*) بهینه‌سازی شد. برای این منظور ۱۰ عدد ماهی انگشت قد با وزن متوسط 7 ± 1 گرم و میانگین طول کل 10 ± 2 سانتی‌متر تهیه شد و از بافت کبد آن‌ها نمونه‌برداری شد. نمونه‌ها تا شروع آزمایش‌ها در فریزر -80 قرار داده شدند. در بهینه‌سازی روش مذکور برای دستیابی به سلول‌های انفرادی مراحل مختلف سانتیفریوژ حذف شد، مدت زمان انجماد ژل روی اسلایدها کاهش و مدت زمان حذف دیواره سلولی با بافر لیز کننده افزایش پیدا کرد و در نهایت روشی ساده برای آرشیو لام‌های رنگ‌آمیزی شده با اتیدیوم بروماید به مدت حداقل دو هفته ارائه شد. نتایج نشان داد علاوه بر کاهش مدت زمان و مواد و وسایل مصرفی، احتمال خطا نیز کاهش یافت. همچنین شاخص‌های آزمون کامت مانند طول کامت، ارتفاع کامت، طول دنباله، درصد DNA در دنباله و Tail Moment در مقایسه با روش بهینه‌سازی شده اختلاف معنی‌داری را نشان نداد ($P > 0.05$).

واژگان کلیدی: ژل الکتروفورز تک سلولی، DNA، ماهی سفید دریای خزر، *Rutilus frisii kutum*.

تاریخ پذیرش: آذر ۹۳

تاریخ دریافت: شهریور ۹۳

* نویسنده مسئول: kalbassi_m@modares.ac.ir

مقدمه

در دهه‌های گذشته پژوهش برای یافتن روش‌های جدیدی که بتواند میزان سلامت و یا آسیب DNA را اندازه‌گیری کند، توسعه یافت. روش‌های متعددی برای سنجش ناهنجاری‌های ژنتیکی در ساختمان DNA وجود دارد که از مرسوم‌ترین آن‌ها می‌توان به روش سنجش کامت^۱ اشاره کرد. روش سنجش کامت یکی از روش‌های بسیار کارآمد و دقیق به منظور بررسی آسیب در ساختمان DNA است. در واقع در این روش با استفاده از الکتروفورز محتوای ژنومی DNA سلول‌های بافت مورد نظر، بسته به شدت آسیب و نوع عامل مخرب، دنباله‌هایی ناشی از حرکت ذرات باردار DNA در صفحه ژل باقی‌مانده که توسط روش‌های رنگ‌آمیزی، با میکروسکوپ‌های حساس قابل آشکارسازی و در نهایت کمی شدن هستند. این روش برای اولین بار در سال ۱۹۷۸ توسط Ostling و Rydberg با استفاده از سلول‌های پستانداران انجام شد. در سال ۱۹۸۴ Johanson و Rydberg برای بهبود روش سنجش کامت و افزایش حساسیت آن در شناسایی آسیب‌های DNA تغییراتی در این روش ایجاد کردند که به سنجش کامت^۲ یا الکتروفورز سلول‌های منفرد^۳ شهرت یافت (Rojas et al., 1999). نام کامت یا دنباله به علت تشکیل هاله‌ای است که در اثر حرکت رشته‌های DNA در بستری از ژل آگارز تحت جریان الکتریکی ایجاد می‌شود. در بین روش‌های مختلفی که برای تجزیه و تحلیل میزان آسیب‌های ژنوتوکسیک آلاینده‌ها بر DNA در شرایط آزمایشگاهی و محیط طبیعی بکار می‌رود، این روش برای شناسایی آسیب‌های کوچک DNA، شکستگی‌های تک رشته، شکستگی‌های دو رشته و سایت‌های قلیایی ناپایدار از سلول‌های منفرد مورد استفاده قرار می‌گیرد. این روش در دو محیط خنثی (pH ۷/۴) و قلیایی (pH > ۱۳) قابل انجام است اما الکتروفورز آن در محیط خنثی فقط می‌تواند شکستگی‌های دو رشته‌ای DNA را نشان دهد در حالی که با الکتروفورز آن در محیط قلیایی علاوه بر شکستگی‌های دو رشته‌ای، شکستگی‌های تک رشته‌ای نیز شناسایی می‌شود (Singh et al., 1988). مهم‌ترین مزیت این تکنیک برای بررسی خواص ژنوتوکسیک سموم و آلاینده‌های زیست محیطی، بهره‌گیری از هر نوع بافت یا اندام برای آزمایش است. در واقع هر بافتی از بدن آبزیان که به راحتی قابلیت تبدیل

1- Comet Assay

2- Comet Assay

3- Single Cell Gel Electrophoresis

شدن به سلول‌های منفرد را داشته باشد می‌تواند به عنوان بافت هدف در این روش به کار گرفته شود. از میان اندام‌های داخلی می‌توان بافت‌های مهم دخیل در متابولیسم از جمله کبد را نام برد که در بسیاری از مطالعات سنجش کامت آبیان استفاده شده است (Dhawan et al., 2009). اولین مطالعات روش سنجش کامت در آبیان، سال ۱۹۹۶ توسط Nacci و همکاران روی کفشک ماهی دریایی صورت گرفته است. روش سنجش کامت، روند تکاملی و تغییرات زیادی را برای بهینه‌سازی و ایجاد شرایطی که بتوان از آن در موجودات و سلول‌های مختلف استفاده کرد، پیموده است. در همین راستا Rydberg و Johanson در سال ۱۹۷۸ روش سنجش کامت را معرفی کردند. پس از مدتی Ostling و Johanson در سال ۱۹۸۴ این روش را در شرایط بافر خنثی به کار بردند و در ادامه Singh و همکاران در سال ۱۹۸۸ نسخه قلبیایی آن را معرفی کردند که بعدها Olive در سال ۱۹۸۹ آن را تکمیل کرد. Bauch و همکاران در سال ۱۹۹۹ از روش سنجش کامت برای بررسی بازسازی ساختار DNA با استفاده از سلول‌های لنفوسیت، استفاده کردند. Garcia و همکاران در سال ۲۰۰۷ روش رنگ‌آمیزی با نیترات نقره را مطرح کردند. Xu و همکاران در سال ۲۰۱۳ با استفاده از سلول‌های اسپرم ماهی طلائی (*Carassius auratus*) اقدام به بهینه‌سازی برخی از مراحل این روش کردند. در سال ۱۳۹۲ سامانی با استفاده از سلول‌های تخم چشم زده و جنین ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Onchorhynchus mykiss*) دو روش رنگ‌آمیزی نیترات نقره و اتیدیوم بروماید را در روش سنجش کامت بررسی کرد. رنگ اتیدیوم بروماید از جمله رنگ‌های فلورسنت است که خطرات زیادی برای سلامت انسان دارد. به نظر می‌رسد هنوز هم با وجود خطرات و قیمت بالای مواد رنگی فلورسنت، به علت راحتی در رنگ‌آمیزی، وضوح و کیفیت تصاویر و سرعت بالا نسبت به رنگ آمیزی نیترات نقره، ارجحیت دارد. اخیراً رنگ‌های فلورسنت جدیدی ارائه شده است که برای مطالعه کیفیت DNA استخراجی در الکتروفورز استفاده می‌شوند (Safe Stain) و استفاده از آن‌ها برای رنگ‌آمیزی در آزمایش کامت نیز توصیه می‌شود. مهم‌ترین مزیت روش رنگ‌آمیزی نیترات نقره، امکان تهیه آرشیو از تصاویر عنوان شده است که تا کنون در روش رنگ‌آمیزی اتیدیوم بروماید امکان پذیر نبوده است.

از زمان آغاز استفاده از این روش، در مراحل مختلف آن از جمله شرایط الکتروفورز و شکستن دیواره سلول‌ها تغییراتی ایجاد شده است تا برای انواع مختلفی از آسیب‌ها در سلول‌های متفاوت،

مناسب‌تر شود. با توجه به این که اولین نسخه از روش کامت در شرایط خنثی ارائه شد، بنابراین فقط می‌توانست شکست‌های دورشته‌ای را آشکار کند و شکست‌های تک رشته‌ای با این روش قابل شناسایی نبود، بنابراین برای اولین بار نسخه قلیایی روش کامت توسط Singh و همکاران (۱۹۸۸) گزارش شد. همچنین Xu و همکاران (۲۰۱۳) با استفاده از سلول‌های منجمد شده اسپرم ماهی در غلظت‌های افزایشی ماده نگه‌دارنده دی‌متیل‌سولفواکساید^۱ (DMSO) اقدام به بهینه‌سازی روش کامت قلیایی کردند. مهم‌ترین اهمیت روش سنجش کامت، استفاده از آن در مطالعات سم‌شناسی ژنتیکی و سرطانی شدن سلول‌ها است. به علاوه، این روش می‌تواند در مطالعات سلامت سنجی سلول‌های اسپرم انسانی نیز به کار رود. ارزیابی آسیب DNA در تک تک سلول‌های یک بافت و قابلیت انجام آن با در اختیار داشتن حداقل نمونه (در حد چند میلی‌گرم یا میکرولیتر) و همچنین سهولت، سرعت، دقت و در عین حال صرفه اقتصادی، از جمله مزیت‌های این روش است.

به نظر می‌رسد کماکان بتوان با اعمال تغییرات بیشتر، این روش را به صورت ساده‌تر و با کارایی بالاتر اجرا کرد. هدف از این مطالعه اعمال تغییراتی در مراحل مختلف روش مرسوم سنجش کامت است تا بتوان با حصول نتایج مشابه، روش جدیدی را برای کاهش مدت زمان انجام آزمایش و صرفه‌جویی در وقت، کاهش مواد و وسایل آزمایشگاهی و در عین حال افزایش کیفیت تصاویر حاصل ارائه کرد. در این راستا با توجه به اهمیت بافت کبد به عنوان اندام دخیل در متابولیسم موجودات و تصفیه خون، مطالعه حاضر بر روی سلول‌های منفرد این بافت در ماهی سفید دریای خزر انجام شد.

مواد و روش‌ها

تعداد ۱۰ قطعه ماهی انگشت‌قد ماهی سفید دریای خزر (*Rutilus frisii kutum*) با وزن 1 ± 7 گرم و طول کل 2 ± 10 سانتی‌متر از مرکز بازسازی ذخایر شهید رجایی ساری تهیه و به سالن تحقیقاتی آبزیان دانشکده علوم دریایی دانشگاه تربیت مدرس منتقل شد. ماهی‌ها قبل از آزمایش‌های، برای سازگاری با شرایط جدید، به مدت یک هفته در مخزن ۱۰۰ لیتری حاوی آب کلرزدایی شده و هوادهی شده نگه‌داری شدند. در طول این مدت غذادهی ماهیان به میزان ۲٪ وزن

1- Dimethyl Sulfoxide

بدن با غذای تجاری بیومار انجام شد. همچنین سایر شرایط مانند دوره نوری تاریکی- روشنایی ۱۲:۱۲ و دمای 20 ± 2 درجه سانتی‌گراد لحاظ شد.

نمونه‌برداری

با اتمام دوره سازگاری، ۱۰ قطعه بچه ماهی با استفاده از پودر گل میخک به میزان ۱۵۰ میلی‌گرم بر لیتر (ppm) به طور کامل بیهوش شدند. بعد از تشریح، قسمتی از بافت کبد آن‌ها جدا شد و پس از یک بار شستشو با نمک بافر فسفات (PBS)؛ ۸ گرم سدیم کلرید، ۰/۲ گرم پتاسیم کلرید، ۱/۴۴ گرم سدیم فسفات و ۰/۲۴ گرم پتاسیم فسفات) به میکروتیوب حاوی بافر PBS (pH ۷/۴) و ۱۰٪ DMSO منتقل شد. در ادامه نمونه‌ها تا زمان شروع آزمایش‌های کامت در فریزر ۸۰- نگهداری شدند.

آزمایش‌های سنجش کامت قلبیایی

الف) روش مرسوم کامت قلبیایی (گروه شاهد)

روش مرسوم سنجش کامت طبق دستورالعمل Singh و همکاران (۱۹۸۸) و Tice و همکاران (۲۰۰۰) انجام شد. برای این منظور از آگارز نقطه ذوب نرمال، نقطه ذوب پایین و رنگ اتیدیوم بروماید (محصول شرکت سیگما) استفاده شد. ابتدا نمونه‌های بافت کبد با استفاده از یخ (۴ درجه سانتی‌گراد) برای جلوگیری از آسیب‌های احتمالی، به تدریج ذوب شدند. برای دستیابی به سوسپانسیون سلولی و سلول‌های منفرد با استفاده از بافر PBS (pH ۷/۴) به عنوان لیز کننده و محلول ایزوتونیک، بافت کبد به روش قیچی زدن هموژن شد. سپس برای دستیابی به سلول‌های منفرد، سانتریفیوژ اول با دور ۱۱۷۰rpm به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد انجام شد. پس از جدا کردن محلول رویی، ۱۰۰ میکرولیتر PBS به رسوب موجود اضافه شد و مرحله دوم سانتریفیوژ با دور ۱۱۳۰ به مدت ۷ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد انجام شد. برای بارگذاری سلول‌ها روی لام‌ها، محلول رویی حذف شد و ۱۰ میکرولیتر PBS و ۱۰۰ میکرولیتر

آگاروز نقطه ذوب پایین^۱ (LMPA) به آن اضافه شد و با یک مرتبه پیپت کردن به سرعت روی لام‌های آغشته به آگارز که از قبل با آگارز نقطه ذوب نرمال^۲ (NMPA) ۱/۲٪ روپوش‌دار شده بودند، بارگذاری شد. به منظور بسته شدن ژل، نمونه‌ها به مدت ۶۰ دقیقه (دمای ۴ درجه سانتی‌گراد) در یخچال قرار داده شدند. پس از این مدت با استفاده از بافر لیز کننده به مدت ۶۰ دقیقه (۱۴/۶ گرم سدیم کلرید، ۳/۲۷ گرم اتیلن دی آمین تترا استیک اسید EDTA، ۱۲/۱ گرم تریس، ۸/۱ گرم هیدروکسید سدیم، ۱۰٪ DMSO و ۱ میلی‌لیتر تریتون X-100) اقدام به حذف دیواره سلولی و سایر محتویات سیتوپلاسم سلول‌ها شد. به منظور باز شدن پیچش DNA، لام‌ها به مدت ۲۰ دقیقه در بافر سرد قلیایی (pH > ۱۳؛ بافر الکتروفورز حاوی ۱۲ گرم هیدروکسید سدیم، ۰/۳۷ گرم EDTA) قرار داده شدند و در نهایت الکتروفورز با جریان ۲۰-۲۱ ولت به مدت ۲۰ دقیقه انجام شد. برای رنگ‌آمیزی از روش رنگ‌آمیزی اتیدیوم بروماید استفاده شد. پس از خنثی‌سازی لام‌ها با بافر خنثی (pH ۷/۴؛ ۴/۸۵ درصد تریس) روی هر ژل ۱۰ میکرولیتر از محلول ۱X اتیدیوم بروماید ریخته شد. ۵ تا ۱۰ دقیقه پس از اضافه کردن رنگ، لام‌ها آماده عکس‌برداری شدند. به منظور آشکارسازی دنباله‌های کامت از میکروسکوپ فلورسنت (Nikon E200) مجهز به دوربین (Olympus DP72) و بزرگنمایی X100 استفاده شد. مشخصات مراحل مختلف روش مرسوم سنجش کامت در جدول ۱ خلاصه شده است. برای کمی‌سازی و تبدیل پیکسل‌های تصاویر به اعداد، از نرم افزار Comet Score نسخه ۱/۵ استفاده شد.

ب) روش بهینه‌سازی شده کامت قلیایی

فرایند هموزن‌سازی بافت برای دستیابی به سلول‌های منفرد، با استفاده از محلول هموزنایزر PBS و قیچی انجام شد. در این روش از سانتریفیوژ و مراحل مختلف آن استفاده نشد. پس از فرایند هموزن‌سازی بافت، محلول حاصل به مدت ۱۰ دقیقه روی یخ به حالت آرامش رها شد. سپس به منظور دستیابی به سلول‌های منفرد، ۱۰ میکرولیتر از قسمت فوقانی سوسپانسیون سلولی با ۹۹۰ میکرولیتر بافر PBS به طور کامل مخلوط شد تا غلظت ۱٪ از سوسپانسیون سلولی به

1- Low Melting Point Agarose

2- Normal Melting Point Agarose

دست آید. سپس ۲۰ میکرولیتر از آن با ۸۰ میکرولیتر آگارز نقطه ذوب پایین مخلوط شد و فرایند بارگذاری ژل روی لام‌ها به سرعت و مطابق روش مرسوم انجام شد. مدت زمان بسته شدن ژل‌ها در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد به ۵ تا ۱۰ دقیقه کاهش یافت. همچنین مدت زمان قرارگیری در بافر لیز کننده از ۶۰ دقیقه به ۹۰ دقیقه افزایش یافت. کلیه شرایط الکتروفورز اعم از مدت زمان، ولتاژ و جریان و pH بافر مطابق روش مرسوم انجام شد. با توجه به حساس بودن رنگ اتیدیوم بروماید به نور و احتمال نیاز مجدد به لام‌ها اقدام به تهیه آرشیو شد. به این صورت که لام‌های رنگ‌آمیزی شده در رک مخصوص لام چیده شدند و داخل جعبه لام حد اقل به مدت دو هفته نگهداری شدند. مشخصات مراحل مختلف روش بهینه‌سازی شده سنجش کامت در جدول ۲ خلاصه شده است.

در این روش با استفاده از میکروسکوپ فلورسنت (Nikon E200) مجهز به دوربین (Olympus DP72) و بزرگنمایی X1۰۰ تصاویر کامت بررسی شد. به منظور مقایسه مراحل اساسی روش سنجش کامت دو روش مرسوم و بهینه‌سازی شده با هم مقایسه شدند (جدول ۱).

جدول ۱: مقایسه مراحل اساسی روش‌های مرسوم و بهینه‌سازی شده سنجش کامت*

روش بهینه‌سازی شده	روش مرسوم (شاهد)	نوع آزمایش
انجام شد	انجام نشد	تهیه گسترش سلولی از سوسپانسیون سلولی
بدون استفاده از سانتریفیوژ	دو مرحله سانتریفیوژ	نحوه استحصال سلول‌های انفرادی
با استفاده از PBS (غلظت ۱٪)	انجام نشد	رقیق‌سازی سوسپانسیون سلولی
۱/۲٪	۱٪	غلظت آگارز نرمال برای پوشش‌دار کردن لام‌ها
۵ تا ۱۰ دقیقه	معمولاً ۶۰ دقیقه	مدت زمان انجماد ژل
ترکیب یکسان ۹۰ دقیقه	ترکیب یکسان ۶۰ دقیقه	ترکیبات و مدت زمان استفاده از بافر لیز کننده
اتیدیوم بروماید به مدت ۲ هفته آرشیو شد	اتیدیوم بروماید آرشیو نشد	محلول رنگ‌آمیزی و انجام آرشیو لام‌ها
۳۳۰ دقیقه	۴۰۰ دقیقه	مجموع زمان لازم برای انجام آزمایش

* سایر مراحل روش کامت که در جدول ذکر نشده در دو روش مرسوم و بهینه‌سازی شده یکسان بوده است.

جدول ۲: جدول زمانی مراحل مختلف آزمایش سنجش کامت به روش مرسوم و بهینه سازی شده

روش بهینه سازی شده		روش مرسوم (شاهد)		
زمان (دقیقه)	مراحل آزمایش کامت	زمان (دقیقه)	مراحل آزمایش کامت	
۹۰	تهیه محلول‌ها- ذوب نمونه‌ها و هموژن کردن بافت	۹۰	تهیه محلول‌ها- ذوب نمونه‌ها و هموژن کردن بافت	۱
۱۰	رقیق سازی برای دستیابی به غلظت ۱٪	۶۰	انجام دو مرحله سانتریفیوژ و بارگذاری لام‌ها	۲
۲۰	انجماد ژل لام‌ها- تهیه محلول لیز کننده	۶۰	انجماد ژل لام‌ها- تهیه محلول لیز کننده	۳
۹۰	قرار دادن لام‌ها در بافر لیز کننده	۶۰	قرار دادن لام‌ها در بافر لیز کننده	۴
۲۰	شستشو لام‌ها و قرار دادن در بافر سرد قلیایی	۳۰	شستشو لام‌ها و قرار دادن در بافر سرد قلیایی	۵
۲۰	انجام الکتروفورز	۲۰	انجام الکتروفورز	۶
۱۰	شستشو و خنثی سازی لام‌ها	۱۰	شستشو و خنثی سازی لام‌ها	۷
۱۰	رنگ آمیزی اتیدیوم بروماید	۱۰	رنگ آمیزی اتیدیوم بروماید	۸
۶۰	مشاهده لام‌ها زیر میکروسکوپ	۶۰	مشاهده لام‌ها زیر میکروسکوپ	۹

تجزیه و تحلیل آماری

برای کمی سازی و تبدیل پیکسل‌های تصاویر به اعداد از نرم افزار Comet Score نسخه ۱/۵ استفاده شد. برای مقایسه دو روش مرسوم و بهینه سازی شده، برای هر کامت پنج پارامتر طول کامت^۱ (px)، ارتفاع کامت^۲ (px)، طول دنباله^۳ (px)، درصد DNA در دنباله^۴ و Tail Moment در نظر گرفته شد. برای انجام آنالیزهای آماری در هر اسلاید ۵۰ تا ۱۰۰ کامت مورد ارزیابی قرار گرفت. اختلاف میانگین داده‌های حاصل از روش مرسوم و روش بهینه سازی شده با آزمون t در

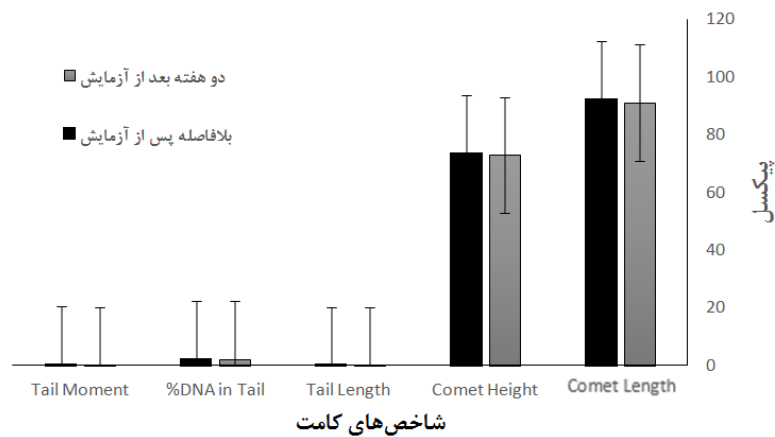
-
- 1- Comet Length
 - 2- Comet Height
 - 3- Tail Length
 - 4- DNA% in Tail

سطح معنی‌داری ۹۵٪ در نرم افزار SPSS نسخه ۱۸ بررسی شد. همچنین نمودارها با استفاده از نرم افزار Microsoft Office Excel 2013 رسم شد.

نتایج

در این مطالعه اختلاف معنی‌داری در مقادیر طول کامت، ارتفاع کامت، طول دنباله، درصد DNA در دنباله و Tail Moment تصاویر به دست آمده از روش مرسوم سنجش کامت و روش بهینه‌سازی آن مشاهده نشد (شکل ۱).

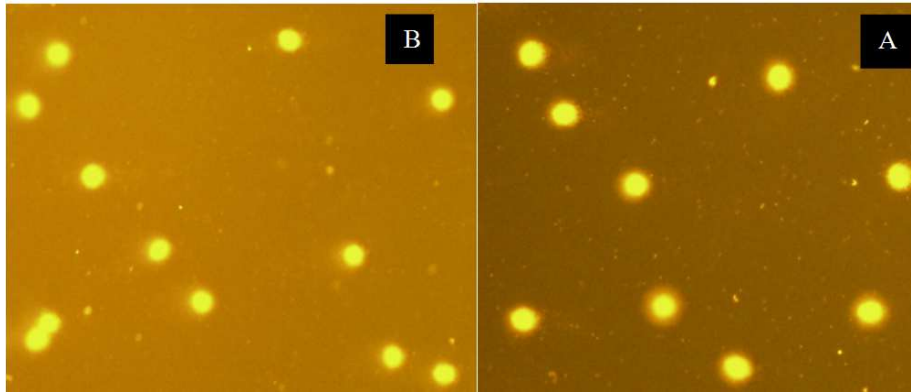
همچنین آنالیزهای آماری مقادیر میانگین شاخص‌های اصلی دنباله کامت، اختلاف معنی‌داری را نشان نداد ($P > 0.05$). نتایج حاصل از آزمون t غیرجفتی نیز در شکل ۱ آمده است.



شکل ۱: مقایسه میانگین‌های پنج شاخص اصلی دنباله کامت در دو روش مرسوم و بهینه‌سازی شده

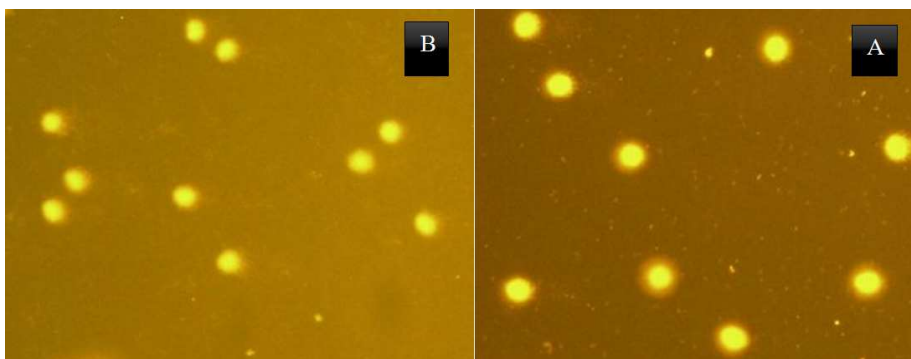
تصاویر به دست آمده از میکروسکوپ فلورسنت نیز از نظر کیفی اختلافی را در کیفیت تصاویر

نشان نداد (شکل ۲).



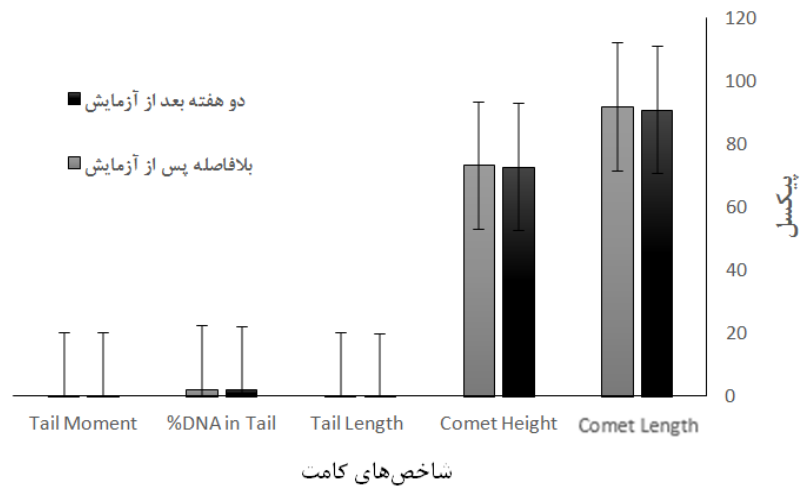
شکل ۲: سلول‌های کبد ماهی سفید دریای خزر *Rutilus frisii Kutum* به روش مرسوم کامت قلیایی (A) و روش بهینه‌سازی شده کامت قلیایی (B)؛ بزرگنمایی X100.

همچنین کیفیت تصاویر لام‌های تهیه شده بلافاصله پس از آزمایش کامت به روش بهینه‌سازی شده با لام‌های آرشیو شده پس از ۱۴ روز مقایسه شد (شکل ۳).



شکل ۳: سلول‌های کبد ماهی سفید دریای خزر *Rutilus frisii Kutum* کیفیت تصاویر تهیه شده بلافاصله پس از آزمایش کامت (A) و لام‌های آرشیو شده پس از ۱۴ روز (B) در روش بهینه‌سازی شده؛ بزرگنمایی X100.

همچنین آنالیز آماری آزمون t جفتی برای شاخص‌های اصلی سنجش کامت در لام‌هایی که بلافاصله پس از آزمایش عکس‌برداری شدند و لام‌هایی که ۱۴ روز پس از آن آرشیو شدند، اختلاف معنی‌داری را در سطح ۹۵٪ نشان نداد ($P > 0.05$).



شکل ۴: مقایسه میانگین‌های پنج شاخص اصلی دنباله کامت در دو زمان: بلافاصله پس از آزمایش و ۱۴ روز پس از آزمایش

بحث

در طی دهه‌های گذشته پیشرفت‌های سریع در عرصه زیست‌شناسی ملکولی تولیدمثل به ایجاد و تکامل چند روش برای ارزیابی آسیب ژنومی DNA منجر شده است. یکی از این روش‌ها سنجش کامت است. از مهم‌ترین کاربردهای این روش در علوم مربوط به آبزیان می‌توان به بررسی اثرات ژنوتوکسیک مواد جهش‌زا، ماده‌زایی، تشخیص مواد غذایی پرتو دیده و مطالعات مربوط به یک‌پارچگی DNA اسپرم طی نگهداری کوتاه یا بلند مدت اشاره کرد. علاوه بر این به منظور پایش اکوسیستم‌های آبی و بررسی اثرات ژنوتوکسیک آلاینده‌ها و سموم، از بافت‌های مختلف آبزیان استفاده می‌شود. خون آبزیانی مانند ماهی به علت تک سلولی بودن برای روش سنجش کامت بسیار مناسب است (Buschini et al., 2004). بافت کبد به علت دخیل بودن در امر متابولیسم و

سمزدایی از بدن، شاخص مناسبی برای مطالعات آسیب‌شناسی ژنتیکی است (Devaux et al., 1997). بافت کلیه نیز همانند کبد به علت دارا بودن نقش دفع ترکیبات مضر و جریان خون بالا می‌تواند در این دست از مطالعات به کار رود (Belpaeme et al., 1998). سلول‌های آبشش از حساسیت بالایی در مقابل ترکیبات و عوامل مخرب برخوردارند. این اندام یکی از اولین بافت‌هایی است که به صورت مستقیم در معرض آسیب‌های محیطی قرار دارد (Fassbender and Braunbeck, 2013). بافت خون به علت دارا بودن ماهیت تک‌سلولی (سلول‌های منفرد) گلبول‌های قرمز به راحتی در روش کامت قابل استفاده است. اما به منظور به دست آوردن سلول‌های منفرد از بافت‌هایی مانند کبد، باید بافت به سلول‌های منفرد تبدیل شود (Tice et al., 2000). در این مطالعه علاوه بر محلول هموژنایزر و ایزوتونیک PBS از ابزار فیزیکی مانند قیچی نیز برای هموژن کردن بهتر بافت استفاده شد. در این خصوص Guilherme و همکاران در سال ۲۰۱۲ نیز برای تهیه سوسپانسیون سلولی از قیچی‌های تیز برای هموژن‌سازی بافت‌های کبد و آبشش مار ماهی حقیقی (*Anguilla anguilla*) که تحت تاثیر سموم آفت‌کش قرار گرفته بودند، استفاده کردند. استفاده از قیچی برای هموژن‌سازی بافت کبد روند دستیابی به سلول‌های منفرد را سریع‌تر می‌کند. در حالی که در روش مرسوم، به دست آوردن سلول‌های منفرد با استفاده از سانتریفیوژ انجام می‌شود. در این مطالعه نیاز به دستگاه سانتریفیوژ بدلیل دستکاری، تغییرات و شوک‌های دمایی و همچنین احتمال از دست رفتن سلول‌ها و بروز آسیب و احتمال ایجاد خطا، مراحل سانتریفیوژ حذف شد. با استفاده از رقیق‌سازی قسمتی از سوسپانسیون سلولی و بدون استفاده از سانتریفیوژ علاوه بر صرفه جویی در زمان، خطاهای احتمالی حین کار کاهش یافته و نتایج بهتری به دست می‌آید. انجماد ژل‌های بارگذاری شده روی لام فقط با هدف بسته شدن ژل صورت می‌گیرد که در منابع مختلف مدت زمان ۶۰ دقیقه ذکر شده است (Singh et al., 1991; Olive and Banath, 2006; Tice et al., 2000) اما در روش بهینه‌سازی شده با توجه به نقطه ذوب پایین آگارز، مدت زمان ۵ تا ۱۰ دقیقه برای انجماد ژل کفایت می‌کند. مدت زمان بیش‌تر در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد علاوه بر خشک شدن سطح ژل و احتمال کنده شدن و از دست رفتن نمونه‌ها، احتمال آسیب و خطا را افزایش می‌دهد. همه مراحل روش کامت نهایتاً باید منجر به دستیابی به DNA سلول‌های بافت هدف شود. برای این منظور دیواره سلولی، محتویات سیتوپلاسم و غشای

هسته سلول‌ها باید شکسته و حذف شود تا محتویات ژنتیکی هسته بیرون بریزد. برخی از پژوهشگران برای حذف و شکستن دیواره سلولی از آنزیم‌های خاصی استفاده کرده‌اند. در این خصوص Hughes و همکاران (۱۹۹۶) و Cabrita و همکاران برای حذف دیواره سلولی از آنزیم‌های پروتئیناز K و سارکوزیناز استفاده کرده‌اند. نوع بافر لیز کننده تقریباً در همه مطالعات کامت قلبیایی یکسان بوده، حداقل تغییرات در آن انجام شده است. در این مطالعه نیز ترکیب بافر لیز کننده با تحقیقات انجام شده در زمینه سنجش کامت یکسان بود (Collins, 2014). مدت زمان لازم برای شکستن دیواره سلولی و حذف محتویات سیتوپلاسمی سلول‌ها در این مطالعات ۶۰ دقیقه ذکر شده است (Tice et al., 2000; Kilemade et al., 2004; Olive and Banath, 2006; Garcia et al., 2007; Kosmehl et al., 2008; Guilherme et al., 2012). در این مطالعه مدت زمان بافر لیز کننده به ۹۰ دقیقه افزایش یافت. به نظر می‌رسد بافر لیز کننده به علت دارا بودن شوینده‌های قوی، برای حذف کامل دیواره سلولی و از بین بردن محتویات و مواد اضافی، با افزایش مدت زمان بهتر بتواند فرایند آزادسازی DNA سلول‌ها را بهبود بخشد. در نتیجه افزایش مدت زمان بافر لیز کننده ضمن این که هیچ اثر سوئی روی DNA سلول‌ها ندارد بلکه موجب تکمیل فرایند شکست و اطمینان از حذف دیواره سلولی می‌شود (Kosmehl et al., 2008). این نتایج با مطالعات Xu و همکاران در سال ۲۰۱۳ که روی سلول‌های اسپرم انجام شده بود، نیز مطابقت دارد. در اثر فرآیند الکتروفورز تحت میدان الکتریکی، بسته به شدت آسیب و شکستگی‌های DNA، هاله‌ای روی صفحه ژل تشکیل می‌شود. آشکارسازی این هاله‌ها با روش رنگ‌آمیزی است که معمولاً به علت وضوح بیشتر تصاویر، از رنگ‌هایی با قابلیت فلورسنت مانند اتیدیوم بروماید استفاده می‌شود (Sestili et al., 2006; De Cavas and Konen, 2007; Collins et al., 2008; Kumari et al., 2008). Garcia و همکاران در سال ۲۰۰۷ روش رنگ‌آمیزی نیترات نقره را برای لام‌های کامت ارائه کرد. در واقع به علت ایمنی بیشتر و همچنین عدم نیاز به میکروسکوپ‌های فلورسنت، رنگ‌آمیزی با نیترات نقره انجام شد. همچنین سامانی در سال ۱۳۹۲ دو روش رنگ‌آمیزی اتیدیوم بروماید و نیترات نقره را در سلول‌های تخم چشم زده و جنین ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان بررسی کرد. در این مطالعه با استفاده از جعبه مخصوص لام، لام‌های رنگ‌آمیزی شده به صورت آرشیو نگه‌داری شد. نتایج نشان داد حداقل تا مدت ۱۴ روز هیچ گونه

کاهش در کیفیت تصاویر رخ نداد. همچنین آنالیز آماری پنج شاخص اصلی کامت، تفاوت معنی‌داری را در دو مدت زمان بلافاصله پس از آزمایش و ۱۴ روز پس از آرشو کردن، نشان نداد. مدت زمان ۱۴ روز در این آزمایش به صورت تصادفی انتخاب شد و مطالعات بعدی مستلزم این است که در مدت زمان‌های بیش‌تر این بررسی صورت گیرد. در واقع یکی از عوامل موثر در کاهش کیفیت تصاویر تجزیه نوری رنگ اتیدیوم بروماید است که با روش مونتاژ کردن و نگهداری در جعبه لام و شرایط تاریکی، آسیبی به لام‌ها وارد نشده است.

در روش مرسوم از نظر زمانی و با در نظر گرفتن امکان انجام آزمایش کامت در یک روز کاری و برای ۱۲ عدد لام، ۴۰۰ دقیقه از ابتدا تا انتهای آزمایش زمان نیاز است که این مقدار در روش بهینه‌سازی شده به ۳۳۰ دقیقه کاهش یافته است. تکنیک سنجش کامت روش دقیق و مناسبی برای ارزیابی اثرات ژنوتوکسیک سموم و آلاینده‌های زیست‌محیطی است که آبزیان و به ویژه ماهیان به علت حساسیت بالا و دسترسی راحت‌تر می‌توانند برای این آزمایش استفاده شوند تا از این طریق پایش مناسبی از وضعیت زیست‌محیطی اکوسیستم آبی بر اساس ویژگی‌های فیزیولوژیکی آبزیان به دست آید. تا کنون مطالعات اندکی در زمینه روش‌های بهینه‌سازی سنجش کامت انجام شده است و مطالعه فوق زمینه‌ساز ادامه این دست از مطالعات است.

به طور کلی نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که می‌توان با اعمال تغییراتی در مراحل متعدد روش سنجش کامت قلیایی بدون آن که اثر نامطلوبی در نتیجه آن داشته باشد، روش فوق را بهینه‌سازی کرد. به طوری که مدت زمان انجام آزمایش به میزان حدود یک ساعت در مقایسه با روش مرسوم کاهش یافته، احتمال خطا و از بین رفتن نمونه کاهش یابد، امکان نگهداری لام‌های تهیه شده فراهم شود و امکان انجام این آزمایش با حداقل مواد و وسایل گران قیمت و کمیاب میسر شود.

منابع

- سامانی پ. ۱۳۹۲. ارزیابی تأثیر پرتوهای گاما و ماوراءبنفش بر آسیب‌های DNA در جنین و لارو ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*) به روش سنجش الکتروفورز سلول‌های منفرد. پایان‌نامه کارشناسی ارشد، دانشگاه تربیت مدرس، ۱۵۰ص.
- Bauch T., Bocker W., Mallek U., Muller W.U. and Streffer C. 1999.** Optimization and standardization of the “comet assay” for analyzing the repair of DNA damage in cells. *Strahlentherapie und Onkologie*, 175(7): 333–340.
- Belpaeme K., Cooreman K. and Kirsch-Volders M. 1998.** Development and validation of the in vivo alkaline comet assay for detecting genomic damage in marine flatfish. *Mutation Research*, 415(3): 167–184.
- Buschini A., Martino A., Gustavino B., Monfrinotti M., Poli P., Rossi C., Santoro M., Dorr A.J.M., Rizzoni M. 2004.** Comet assay and micronucleus test in circulating erythrocytes of *Cyprinus carpio* specimens exposed in situ to lake waters treated with disinfectants for potabilization. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 557(2): 119–129.
- Cabrera E., Robles V., Rebordinos L., Sarasquete C., and Herraiz M.P. 2005.** Evaluation of DNA damage in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and gilthead sea bream (*Sparus aurata*) cryopreserved sperm. *Cryobiology*, 50(2): 144–53.
- Collins A.R., Oscoz A.A., Brunborg G., Gaivao I., Giovannelli L., Kruszewski M., Smith C.C., and Stetina R. 2008.** The comet assay: Topical issues. *Mutagenesis*, 23(3): 143–151.
- Collins A.R. 2014.** Measuring oxidative damage to DNA and its repair with the comet assay. *Biochimica et Biophysica Acta* 1840(2): 794–800.
- De Cavas T. and Konen S. 2007.** Detection of cytogenetic and DNA damage in peripheral erythrocytes of goldfish (*Carassius auratus*) exposed to a glyphosate formulation using the micronucleus test and the comet assay. *Mutagenesis*, 22(4): 263–68.
- Devaux A., Pesonen M. and Monod G. 1997.** Alkaline comet assay in rainbow trout hepatocytes. *Toxicology in Vitro*, 11(1-2): 71–79.

- Dhawan A., Bajpayee M. and Parmar D. 2009.** Comet assay: A reliable tool for the assessment of DNA damage in different models. *Cell Biology and Toxicology*, 25(1): 5–32.
- Fassbender C. and Braunbeck T. 2013.** Assessment of genotoxicity in gonads, liver and gills of zebrafish (*Danio rerio*) by use of the comet assay and micronucleus test after in vivo exposure to methyl methanesulfonate. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 91(1): 89–95.
- Garcia O., Romero I., Gonzalez J.E. and Mandina T. 2007.** Measurements of DNA damage on silver stained comets using free Internet software. *Mutation Research*, 627(2): 186–190.
- Guilherme S., Gaivao I., Santos M.A. and Pacheco M. 2012.** DNA damage in fish (*Anguilla anguilla*) exposed to a glyphosate-based herbicide-Elucidation of organ-specificity and the role of oxidative stress. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 743(1-2): 1–9.
- Hughes C.M., Lewis S.E., McKelvey-Martin V.J. and Thompson W. 1996.** A comparison of baseline and induced DNA damage in human spermatozoa from fertile and infertile men, using a modified comet assay. *Molecular Human Reproduction*, 2(8): 613–619.
- Kilemade M.F., Hartl M.G., Sheehan D., Mothersill C., van Pelt F.N., O'Halloran J. and O'Brien N.M. 2004.** Genotoxicity of field-collected inter-tidal sediments from Cork Harbor, Ireland, to juvenile turbot (*Scophthalmus maximus* L.) as measured by the comet assay. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 44(1): 56–64.
- Kosmehl T., Hallare A.V., Braunbeck T. and Hollert H. 2008.** DNA damage induced by genotoxicants in zebrafish (*Danio rerio*) embryos after contact exposure to freeze-dried sediment and sediment extracts from Laguna Lake (The Philippines) as measured by the comet assay. *Mutation Research*, 650(1): 1–14.
- Kumari S., Rastogi R.P., Singh K.L. and Singh S.P. Sinha R.P. 2008.** DNA damage: Detection strategies, Review Article. *Experimental and Clinical Sciences Journal*, 7: 44–62.
- Singh N.P., McCoy M.T., Tice R.R. and Schneider E.L. 1988.** A Simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Experimental Cell Research*, 175: 184–191.

- Nacci D.E., Cayula S. and Jackim E. 1996.** Detection of DNA damage in individual cells from marine organisms using the single cell gel assay. *Aquatic Toxicology*, 35: 197–210.
- Olive P.L. 1989.** Cell proliferation as a requirement for development of the contact effect in Chinese hamster V79 spheroids. *Radiation Research*, 117: 79–92.
- Olive P.L. and Banath J.P. 2006.** The comet assay: A method to measure DNA damage in individual cells. *Nature Protocols*, 1(1): 23–29.
- Ostling O. and Johanson K.J. 1984.** Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 123: 291–298.
- Rojas E., Lopez M.C. and Valverde M. 1999.** Single cell gel electrophoresis assay: Methodology and applications. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, 722(1): 225–54.
- Rydberg B. and Johanson K.J. 1978.** Estimation of DNA strand breaks in single mammalian cells. In: Hanawalt P.C., Friedberg E.C. and Fox C.F. (Eds). *DNA repair mechanisms*. New York, Academic Press, Pp: 465–468.
- Singh N.P., Tice R.R., Stephens R.E. and Schneider E.L. 1991.** A microgel electrophoresis technique for the direct quantitation of DNA damage and repair in individual fibroblasts cultured on microscope slides. *Mutation Research/Environmental Mutagenesis and Related Subjects*, 252(3): 289–296.
- Sestili P., Martinelli C. and Stocchi V. 2006.** The fast halo assay: An improved method to quantify genomic DNA strand breakage at the single-cell level. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 607(2): 205–14.
- Singh N.P., McCoy M.T., Tice R.R. and Schneider E.L. 1988.** A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Experimental Cell Research*, 175: 184–191.
- Tice R.R., Agurell E., Anderson D., Burlinson B., Hartmann A., Kobayashi H., Miyamae Y., Rojas E., Ryu J.C. and Sasaki Y.F. 2000.** Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 35(3): 206–221.
- Xu X.R., Zhu J.Q., Ye T., Wang C.L., Zhu Y.F., Dahms H.U., Jin F. and Yang W.X. 2013.** Improvement of single-cell gel electrophoresis (SCGE) alkaline comet assay. *Aquatic Biology*, 18(3): 293–295.

Optimization of single-cell gel electrophoresis (SCGE) method for study of liver single cell DNA in Caspian kutum (*Rutilus frisii kutum*)

Milad Esmailbeigi¹, Mohammad Reza Kalbassi^{2*}

1-M.Sc. in Fisheries, Department of Aquaculture, Marine Sciences Faculty, Tarbiat
Modares University, Noor, Mazandaran, Iran.

2- Professor in Department of Aquaculture, Marine Sciences Faculty,
Tarbiat Modares University, Noor, Mazandaran, Iran.

Received: September 2014

Accepted: December 2014

Abstract

Single-cell gel electrophoresis (SCGE) is a method that used to evaluate DNA damage in single cells. This method due to its great precision and high operating speed, considered than to other methods. The present study was performed to optimize some of the alkaline comet assay steps by using Caspian kutum (*Rutilus frisii kutum*) liver single cells. Hence, one batch of the fish fingerlings was used for the experiment (n=10, 7±1g) and fish liver tissues were dissected and transferred to freezer (-80C°) until starting the optimizing procedure and other common methods for comet assay tests. In optimization of conventional method for obtain single cells, centrifuging steps were deleted. Also, the solidification of gel on slides decreased and lysing time of cell membrane increased. Finally, a simple way to archive slides stained with ethidium bromide was present for at least two weeks. In addition to reducing experimental time and consumption materials, the optimized method led to lower cell damage and possibility of artificial error. No significant differences were observed between comet indexes, such as comet length (px), comet height (px), tail length (px), DNA% in tail and tail moment, achieved from the optimized and conventional method.

Key words: *Single-cell Gel Electrophoresis, SCGE, DNA, Caspian kutum, Rutilus frisii kutum.*

*Corresponding Author: kalbassi_m@modares.ac.ir