ارگاه دو روزه تئوری و عملی تکنیک

PCR

دانشگاه آزاد اسلامی واحد چالوس

دانشکده پزشکی

مقدمه :

پیشرفت های دو دههء اخیر در زمینه بیولوژی مولکولی موجب ارتقاء کارآیی و تکامل هر چه بیشتر آزمایش های وابسته به DNA در علوم بالینی گردیده است. استفاده از مارکرهای غیر رادیواکتیو و اولیگونوکلئوتیدهای مکمل با ژن ها و یا مترادف های ویژه بازهای آلی در DNA از جمله پیشرفت های مؤثر در بهبود و بکارگیری روزافزون تست های وابسته به DNA در طیف تشخیص بالینی محسوب می شود. یکی از مهمترین پیشرفت ها در زمینه بیولوژی مولکولی که در عین حال کاربرد تشخیصی نیز دارد (Polymerase Chain Reaction (PCR می باشد که علاوه بر سریع نمودن آزمایش های وابسته به DNA در موارد متعدد موجب افزایش حساسیت اینگونه آزمایش ها گردیده است.

با توجه به پیشرفت روزافزون علوم پزشکی در جهان امروز و استفاده وسیع از PCR بعنوان یک روش حساس، سریع و دقیق تشخیصی در آزمایشگاههای بالینی، در این گفتار سعی شده است تا PCR و مکانیسم آن به زبانی ساده و بطور اجمالی بیان شود تا پزشکان و متخصصینی که در عرصه های آزمایشگاهی از نزدیک با این تکنیک بسیار مفید کار نکرده اند با چگونگی عملکرد آن آشنایی پیدا کنند. ذکر این نکته ضروری است که راه اندازی این روش و یا روش های مشابه در زمینه بیولوژی مولکولی و بهره وری از آنها در مراکز آزمایشگاهی و تحقیقاتی، منجر به حصول نتایج چشمگیر و سودمند در زمینه تشخیص آزمایشگاهی و همچنین مطالعات اپیدمیولوژیک خواهد شد.

تعریف PCR:

به طور کلی (Polymerase Chain Reaction (PCR به روش ازدیاد مقادیر جزیی DNA یا RNA (ازدیاد RNA با روش RT-PCR امکان پذیر است) تا حد مشاهدهء آنها توسط روش های ساده و رایج آزمایشگاهی اطلاق می شود. قابلیت PCR در ازدیاد اسیدهای نوکلئیک موجود در نمونه مورد آزمایش موجب شناسایی سریع و اختصاصی نوع سلول یا میکروارگانیسم مورد نظر در نمونه مذکور می گردد که این ویژگی علاوه بر بکارگیری PCR در تشخیص آزمایشگاهی بیماریها شناسایی انواع سلولها، آنرا به عنوان ابزاری مطمئن و حساس در زمینه پژوهش های علمی مطرح می سازد.

از زمان معرفی PCR در سال ۱۹۸۵، بکارگیری آن در تحقیقات بیولوژیکی پایه و کاربردی موجب ایجاد تغییرات اساسی گردیده است. PCR یکی از جدیدترین تکنولوژی های آزمایشگاهی است که در تشخیص بیماریهای عفونی، پزشکی قانونی و ناهنجاریهای ژنتیکی مورد استفاده و توجه قرار گرفته است. در خصوص کارآیی این روش در تشخیص به عنوان مثال می توان تقلیل مدت زمان تشخیص آزمایشگاهی اختصاصی باسیل سل در نمونه های کلینیکی را از ۷-۶ هفته به ۷-۶ ساعت حتی با وجود تعداد اندک باسیل در نمونهء آزمایشگاهی ذکر کرد. از نکات جالب توجه دیگر اینکه با استفاده از تکنیک حساس PCR، DNA میکروارگانیسم هایی نظیر باسیل جذام و باسیل سل از نمونه های باستانی با قدمت بیش از ۱۰۰۰ سال شناسایی و جدا گردیده است که نتایج حاصله گامی مهم در راه شناخت و مطالعه بیش از پیش تاریخچه علم پزشکی بوده ضمن آنکه این موفقیت توانسته است راهگشای ایجاد شاخه های دیگری از علوم نظیر پالئوباکتریولوژی باشد.

این تکنِیک در اواسط دهه ی ۱۹۸۰ بوسیله ی کری مولیس معرفی شد . به دلیل کاربردها و مزیت های بسیار زیاد آن به سرعت در زیست شناسی مولکولی گسترش پیدا کرد . امروزه این روش تقریباً در تمامی آزمایشگاهها ی زیست مولکولی جزو کارهای متداول می باشد و به صورت اتوماتیک بوسیله ی کامپیوتر انجام می شود.

این تکنیک تمامی مشکلات قبلی در زیست مولکولی که ناشی از عدم دسترسی به مقادیر زیاد از DNA یکسان بود را برطرف کرد . برای مثال قبلاً برای بدست آوردن نسخه های متعدد از یک ژن خاص می بایست این ژن را به داخل حامل مناسب وارد کرده و در یک باکتری تکثیر کنند ولی امروزه این کار را به سادگی و با استفاده از PCR انجام می دهند.

PCR از نظر اصول عملی تشابه زیادی به همانند سازی DNA دارد و در واقع برگرفته از آن است . یاد آوری می شود که DNA پلیمراز DNA تک رشته ای را از جهت

5´ ۳´ به عنوان الگو مورد استفاده قرار می دهد ورشته مکمل را در جهت ۳´ ۵´

می سازد . همچنین DNA پلیمراز برای شروع احتیاج به یک قطعه اولیه (شناساگر) دارد .

برای انجام PCR، DNA پلیمراز ، نوکلئوتید تری فسفات ها و پرایمر لازم هستند . از آنجائیکه DNA دو رشته ای است ، دو نوع پرایمر در PCR مورد نیاز است . این دو پرایمر دو عمل انجام می دهند ، اول اینکه محل ژنی که باید تکثیر شود را مشخص می نمایند و دوم اینکه اندازه ی قطعات تکثیر شونده را تعیین می کنند . عمل اول کاملاً مشخص است ، در مورد عمل دوم باید گفت که وقتی این دو شناساگر به دو ناحیه ی مختلف DNA و به سمت هم قرار می گیرند DNA پلیمراز تنها قطعات را در بین این دو ناحیه همانند سازی می کند و به این ترتیب طول قطعات ساخته شده تعیین می شود .

برای شروع PCR، DNA الگو ، پرایمر ها و نوکلئوتید تری فسفات ها و DNA پلیمراز در یک لوله با هم مخلوط می شوند . سپس لوله را گرم می کنند تا دو رشته DNA از هم جدا شوند . سپس لوله را سرد می کنند تا پرایمر ها به نواحی مورد نظر متصل شوند و DNA پلیمراز شروع به همانند سازی از روی DNA بنماید . بعد از مدت زمان لازم برای همانند سازی بار دیگر پرایمر ها به نواحی مکمل خود متصل شوند . چون در مرحله ی قبل رشته DNA در ناحیه مورد نظر مضاعف شده است ، در این مرحله چهار رشته ی الگو برای همانند سازی وجود دارد و در نتیجه در پایان این مرحله بوجود می آید ، و در مرحله ی بعد ۱۶ نسخه و به همین صورت بطور تصاعدی تعداد نسخه های ژن ها زیاد می شود .

در ابتدای طراحی PCR از آنزیم DNA پلیمراز E.coli استفاده شد ولی این آنزیم به حرارت حساس می باشد و بنابراین پس از هر بار حرارت دادن محیط واکنش تا دمای ۹۴ درجه ی سانتی گراد ، افزودن دوباره ی آنزیم تازه به محیط لازم بود . یکی از مهم ترین کشفیات در این زمینه این بود که باکتریهای چشمه های آب گرم دارای DNA پلیمراز هایی هستند که نسبت به حرارت مقاوم بوده و حتی در دمای بالا فعالیت بهتری دارند . برای مثال باکتری Thermus aquaticus دارای DNA پلیمرازی است که در دمای ۹۴ درجه ی سانتی گراد کاملاً پایدار است و همچنین دمای اپتیمم عمل آن نیز ۷۲ درجه ی سانتی گراد می باشد ، این DNA پلیمراز که بطور خلاصه Taq پلیمراز نامیده می شود باعث شد که براحتی PCR به صورت اتوماتیک انجام شود و با افزودن یکبار آنزیم Taq پلیمراز دیگر نیازی به اضافه کردن مجدد آن نباشد .

مزیت بسیار مهم دیگر Taq پلیمراز افزایش حساسیت و دقت PCR می باشد . در دمای پایین (۳۰ درجه سانتی گراد) (که برای DNA پلیمراز E.coli بکار می رفت) پرایمر ها ممکن است به جایگاههایی که توالی تا حدودی مشابه دارند نیز متصل شوند ، زیرا در دمای پایین تعداد کمتری پیوند هیدروژنی برای اتصال پرایمر ها نیاز است . بنابراین پرایمر ها با اتصال به نواحی نسبتاً مشابه ، باعث ایجاد اشتباه در انجام مراحل PCR می شوند . ولی وقتی که واکنش در دمای ۷۲ درجه (دمای اپتیمم فعالیت Taq پلیمراز) انجام شود اتصال پرایمر ها به نواحی غیر از

ناحِیه ی اصلی کاهش می یابد . به این صورت پس از پایان PCR رشته های DNA کاملاً مشابه و خالص بدست خواهد آمد .
برای دیدن قطعات تکثیر شده DNA می توان براحتی از الکتروفورز برای ژل آگاروز و رنگامیزی اتیدیوم بروماید استفاده کرد .

مکانیسم PCR:

همانطوریکه می دانیم DNA، یک مولکول مارپیچی دو رشته ای پلی نوکلئوتیدی است که این دو رشته در جهت مقابل هم قرار گرفته اند و بطور ویژه ای بوسیلهء پیوندهای هیدروژنی میان بازهای آلی مکمل بیکدیگر متصل هستند (سیتوزین بوسیله سه پیوند هیدروژنی به گوانین و آدنین بوسیله دو پیوند هیدروژنی به تیمین اتصال پیدا می کند). DNA دورشته ای می تواند بوسیله حرارت از هم جدا شده و دو مولکول DNA تک رشته ای ایجاد کند که این مرحله بنام مرحلهء تغییر ماهیت (تقلیب) شناخته می شود. مولکولهای DNA تک رشته ای از طریق واکنش های متقابل ویژه بین بازهای مکمل به همدیگر متصل شده که حاصل آن ایجاد و آغاز مرحله ای بنام مرحله پیوندزنی (annealing) و یا (hybridization می باشد. دو مرحلهء فوق الذکر برای Probe technology و همچنین PCR بکار می رود. مرحله بعدی یا سوم که برای PCR بوده و این روش را از سایر تکنیک های مولکولی متمایز می سازد مرحله توسعه (extension) می باشد که طی آن یک قطعه DNA تک رشته ای بوسیله DNA پلیمراز توسعه پیدا می کند. در این مرحله یک قطعه DNA تک رشته ای کوتاه (primer) به یک مولکول DNA تک رشته ای طویل تر پیوند زده شده و DNA پلیمراز Taq) پلیمراز) قادر می شود به انتهای ۳¢ مولکول کوتاهتر یا پرایمر متصل گردیده و با استفاده از دأکسی نوکلئوتید تری فسفات ها آنرا امتداد داده و قطعه ای سنتز نماید که آن قطعه مکمل DNA تک رشته ای طویل تر باشد و بدین ترتیب DNA دو رشته ای جدید ساخته می شود .
مولکولهای DNA تک رشته ای کوتاه (اولیگونوکلئوتیدها) بوسیله تکنیک های شیمیایی به صورت سریع و ارزان ساخته می شوند. اولیگونوکلئوتیدها وقتی که به DNA تغییر ماهیت داده (تقلیب شده) افزوده می شوند، به عنوان پرایمر برای DNA پلیمراز عمل نموده و اجازه می دهند تا DNA جدید در داخل آزمایشگاه سنتز شود. بنا به دلیل فوق الذکر اولیگونوکلئوتیدها را پرایمر (primer) می نامند. در PCR دو نوع پرایمر مورد استفاده قرار می گیرد که هر کدام از آنها به محل های ویژه در دو رشتهء مکمل مولکول DNA هدف پیوند می شوند (شکل ۲). پرایمرهای مذکور به صورتی ساخته شده اند که زمانیکه DNA پلیمراز یک پرایمر را توسعه می دهد، یک مولکول DNA بوجود می آورد که آن DNA دارای یک محل اتصال جدید برای پرایمر دیگر می شود. این رشتهء DNA جدید تولید شده نیز همینطور قادر خواهد بود به عنوان الگو (template) برای سنتز DNA از پرایمر دیگر در جریان چرخه های بعدی PCR، عمل نماید.
بنابراین تا اینجا معلوم می شود که هر چرخهء PCR شامل سه مرحله می باشد .

۱– مرحله تقلیب یا تغییر ماهیت(Denaturation Step):

در این مرحله مولکولهای دو رشته ای DNA بوسیلهء حرارت بالا (حدود ۹۴ درجه سانتیگراد) از همدیگر جدا گردیده و به مولکولهای تک رشته ای تبدیل می شوند.

۲– مرحله پیوند زنی

(Annealing or Hybridization Step)

در این مرحله کاهش دمای واکنش صورت می گیرد تا اینکه پرایمرها بتوانند به مولکولهای DNA تک رشته ای پیوند زده شوند. درجه حرارت مورد استفاده برای این مرحله می تواند از ۳۰ درجه سانتیگراد تا ۷۲ درجه سانتیگراد متغیر باشد.

۳–مرحله توسعه (Extension Step):

در این مرحله که آخرین مرحلهء یک چرخهء PCR می باشد، آنزیمTaq پلیمراز (که DNA پلیمرازی است مقاوم به حرارت و از یک باکتری ترموفیل بنام ترموس آکواتیکوس Thermus aquaticus استخراج می شود) با استفاده از دأکسی نوکلئوتید تری فسفاتها، پرایمر را در روی DNA تک رشته ای امتداد می دهد تا DNA دو رشته ای جدید بسازد. درجه حرارت لازم برای این مرحله۷۲ درجه سانتیگراد می‌باشد که این درجه حرارت برای آنزیم های مقاوم به حرارتی که به طور عادی مورد استفاده قرار می گیرند مناسب می باشد.

هر چرخهء PCR نهایتاً با دو برابر شدن تعداد ترادف های DNA هدف همراه است که تکرار چرخه بدفعات زیاد (۲۰ تا ۵۰ بار) منجر به افزایش توانی در تعداد ترادف های DNA هدف و در نتیجه ازدیاد DNA هدف به میزان یک میلیون برابر یا بیشتر خواهد شد.

از زمان اختراع PCR، دو پیشرفت تکنیکی عمده به طور قابل توجهی روند PCR را اصلاح کرده است. اولین پیشرفت، بکارگیری و ترویج پلیمرازهای مقاوم به حرارت همانند Taq پلیمراز بوده است که این آنزیم توانایی مقاومت در برابر مرحله تغییر ماهیت یا تقلیب یعنی حدود ۹۴ درجه سانتیگراد را دارد. این بدان معنی است که در حال حاضر می توان بدون افزودن آنزیم پلیمراز تازه بعد از هر مرحله تغییر ماهیت (تقلیب) به لوله های PCR، آزمایش PCR را انجام داد. دومین پیشرفت عمده، توسعهء تجارتی بلوک های حرارتی قابل برنامه ریزی می باشد که این بلوک ها به ترمال سایکلرها (Thermal cycler) معروف هستند. استفاده از ترمال سایکلر در انجام PCR باعث حذف مرحلهء خسته کننده و وقت گیر انتقال لوله‌های PCR از یک بن ماری به بن ماری دیگر می شود ، زیرا این دستگاه که قبلاً بوسیله خود آزمایش کننده تنظیم و برنامه ریزی شده است به طور اتوماتیک حرارتهای لازم را برای مراحل سه گانه PCR تولید می نماید ضمن اینکه تعداد چرخه های مورد نیاز نیز برای انجام PCR و ازدیاد DNA بطور اتوماتیک در این دستگاه بوقوع می پیوندد.

با دو پیشرفت فوق الذکر اکنون ما می توانیم تمامی اجزاء PCR را که عبارتند از بافر PCR، دو نوع پرایمر، چهار نوع دأکسی نوکلئوتید تری فسفات (dCTP , dTTP , dATP و (dGTP، آنزیم Taq پلیمراز و DNA الگو (که با روش های مختلف قابل استخراج می باشد)، با همدیگر در لوله های پلی پروپیلن مخلوط کرده (شکل ۳) و پس از افزودن یک قطره روغن معدنی بر سطح مخلوط ها، بدون حضور شخص آزمایش کننده لوله های PCR را به مدت چند ساعت در ترمال سایکلر برنامه ریزی شده از قبل قرار داد تا PCR انجام شود. واکنش های تکمیل شده بر روی ژل آگارز برده شده و سپس محصولات PCR یا به عبارت دیگر DNAهای ازدیاد یافته در روی ترانسیلومیناتور ماوراء بنفش ۳۰۲ نانومتر قابل رویت می شوند.

در سالهای اخیر در زمینه اپیدمیولوژی و تشخیص میکروارگانیسم ها تغییراتی در PCR داده شده است. از جمله این تغییرات، تکثیر RNA 16S بجای DNA باکتری است. S RNA۱۶ یکی از انواع RNA ریبوزومی است. این روش نسبت به تکثیر DNA میکروارگانیسم دارای برتری هایی است که عبارتند از:

۱- واکنش ایزوترمال است یعنی در یک دما انجام می‌گیرد. بدین ترتیب نیازی به استفاده از دستگاه ترمال سایکلر نیست.

۲- از آنجائیکه هر باکتری دارای بیش از ۲۰۰۰ کپی RNA ریبوزومی است، حساسیت PCR افزایش می یابد. بنابراین به جای یک DNA در میکروارگانیسم، هزاران هدف در یک باکتری وجود دارد.

۳- محصولات PCR پایدار نیستند. در نتیجه خطر آلودگی به مراتب پائین است.
در تحقیقات اپیدمیولوژیک، شناسایی دقیق سوش عامل بیماری با روش های مختلفی از جمله روش ریبوتایپینگ (Ribotyping) (که در آن RNA ریبوزوم تکثیر می یابد) یا با تعیین الگوی انگشت نگاری DNA انجام می گیرد.

واکنش زنجیره ی پلیمراز "

انواع PCR:

بمنظور نتیجه گیری بهتر، غیر از PCR معمولی روش های جدیدی از PCR ارائه شده است که به صورت اجمالی به برخی از آنها اشاره می شود.

۱– آر تی _ پی سی آر (RT-PCR) (Reverse Transcriptase-PCR)

الگوی اولیه در RT-PCR، مولکول RNA تک زنجیره ای است. از آنجائیکه DNA پلیمراز قادر به استفاده از RNA بعنوان الگو نمی باشد، مرحله دیگری به PCR اضافه شده است. طی این مرحله، با استفاده از آنزیم رورس ترانس کریپتاز (RT (Reverse Transcriptase ، از الگوی RNA، مکمل آن DNAC (complementary DNA)
سنتز می شود و بوسیله تکنیک PCR تکثیر می یابد. بمنظور تعیین گونه و حساسیت دارویی در ویروس شناسی و مایکوباکتریولوژی، از این روش برای تکثیر RNA ریبوزومی استفاده می شود.

۲– نستد – پی سی آر (Nested-PCR)

در این روش بمنظور افزایش حساسیت PCR از دو جفت پرایمر استفاده می شود. ابتدا با یک جفت پرایمر اول در طول ۳۰-۱۵ چرخه، قطعات مشخصی از DNA هدف تکثیر می یابند. سپس محصول PCR حاصل به لوله دیگری منتقل شده و بعنوان الگو استفاده می شود و بوسیله جفت پرایمرهای دوم مرحله دوم PCR انجام می شود.

۳ – مالتیپلکس – پی سی آر (Multiplex-PCR)

در این روش از چند جفت پرایمر اختصاصی برای هدف های مختلف استفاده می شود. در میکروب شناسی بالینی، با استفاده از این روش امکان شناسایی چندین عامل بیماری در یک نمونه بطور همزمان وجود دارد و می توان عفونت های مخلوط را تشخیص داد.

۴–آرمز – پی سی آر (ARMS-PCR) (Amplification Refractory Mutation System-PCR)

روش آرمز _ پی سی آر (ARMS-PCR) برای تشخیص موتاسیون های نقطه ای بکار می رود و از دو جفت پرایمر استفاده می شود. در این روش، واکنش در دو لوله جداگانه انجام می شود که یکی از آنها حاوی پرایمرهای نوع موتاسیون یافته و دیگری حاوی پرایمرهای نوع معمولی است. چنانچه تکثیر در لوله حاوی پرایمر موتاسیون یافته انجام شود، در DNA هدف، موتاسیون اتفاق افتاده است و تکثیر در لوله حاوی پرایمر معمولی، نشان دهنده آن است که موتاسیونی اتفاق نیفتاده است. از این متد می توان در تشخیص موتاسیون های مولد مقاومت دارویی در باکتری‌ها استفاده کرد.

۵– واکنش زنجیره ی پلیمراز نسخه برداری معکوس : RT-PCR

واکنش زنجیره پلیمراز نسخه برداری معکوس (RT-PCR) تعدیلی از واکنش زنجیره پلیمراز PCR)) برای تقویت اطلاعات محتوی اسید ریبو نوکلئیک (RNA) توسط تبدیل آن به DNA و سپس تقویت آن می باشد . رشته ی RNA در ابتدا به صورت معکوس به مکمل DNA خود یا DNA مکمل نسخه برداری می شود و با تقویت DNA حاصله با استفاده از واکنش زنجیره پلیمراز دنبال می گردد . این می تواند یک فرآیند ۱ یا ۲ مرحله ای باشد .

واکنش زنجیره پلیمراز خودش فرآیندی است که برای تقویت نمونه های DNA بکار می رود ، از طریق پلیمراز DNA با واسطه ی حرارت .

PCR نسخه برداری معکوس نباید با واکنش زنجیره پلیمراز زمان واقعی که غالباً به صورت RT-PCR خرید و فروش می شود ، اشتباه شود .

۶. روش Real time PCR

به طور کلی Real Time PCR تکنیکی برای مشاهده بی وقفه ی پیشرفت واکنش PCR در طول زمان می باشد. همچنین با این روش می توان مقادیر تولیدات PCR (DNA,cDNA یا RNA) را نیز اندازه گیری نمود.

این روش بر مبنای فلوروسنت تولیدی از مولکول گزارشگر (Reporter) می باشد که در طول واکنش افزایش می یابد. مولکول ها ی گزارشگر فلوروسنت یا به صورت رنگ هایی می باشند که به DNA دو رشته ای باند می شوند مانند SYBR® Green و یا بصورت شناساگرهای توالی های خاص مانند TaqMan® Probes می باشند. این تکنیک می تواند با حداقل اسید نوکلئیک آغاز شود و مقدار تولید نهایی را با دقت زیادی تعیین نماید. محدود به زمان و ذخیره منابع نمی باشد، به راحتی قابل اجرا است و دقت و حساسیت بالاتر از PCR معمولی دارد. این روش توانایی تشخیص بسط PCR را در مرحله اولیه واکنش دارد در حالی که تشخیص در PCR معمولی در مرحله نهایی واکنش می باشد.

کاربردهای Real Time PCR

۱- تحقیقات میزان بیان . ۲mRNA- اندازه گیری میزان همانند سازی DNA در ژنوم یا DNAهای ویروسی. ۳- میزان تأثیر دارو درمانی. ۴- سنجش آسیب های . ۵DNA- تشخیص عوامل بیماری زا. ۶- تعیین ژنوتیپ افراد. ۷-سنجش تفکیک شدن آللی.

کاربردهای PCR :

تکنیک PCR کاربردهای نا محدودی در عرصه های مختلف زیست مولکولی دارد ، علت اصلی این امر این است که DNA الگوی بکار رفته در PCR را می توان از منابع مختلف تامین کرده و مورد استفاده قرار داد .

بطور کلی PCR به دو منظور اصلی بکار می رود :

۱ – تهیه ی نسخه های متعدد از یک ژن

۲ – بررسی حضور یا عدم حضور یک ژن خاص در یک قطعه DNA

- تهیه ی نسخه های متعدد از یک ژن :

برای این کار بجای اینکه هر دو پرایمر مورد نیاز برای PCR را به یک میزان به محیط واکنش اضافه کنند ، یکی از پرایمر ها را به تعداد کمتر پرایمر دیگر را به تعداد بیشتر اضافه می کنند . در هنگام انجام PCR ، در ابتدا هر دو رشته با هم همانند سازی می کنند ولی پس از تمام شدن یکی از پرایمر ها فقط رشته دیگر که هنوز پرایمر آن وجود دارد ساخته می شود و به همین دلیل نسخه های بیشتری از این رشته بوجود می آید. پس از پایان PCR چند نسخه DNA دو رشته ای از ژن مورد نظر ایجاد خواهد شد که می توان به طور مستقیم در روش سانجر بکار برد .

مثال دیگری از کاربردهای PCR بررسی پیوستگی ژنها و تعیین فاصله ی بین ژنها بر روی کروموزومهای انسان است . در ژنتیک برای تعیین فاصله ی بین ژنها از بررسی تعداد نوترکیبها به نسبت فنوتیپ والدین استفاده می شود . این روش برای مگس سرکه که زادآوری آن در هر نسل بسیار زیاد و دوره ی رشد آن نیز کوتاه است به راحتی قابل انجام است ولی در مورد انسان که زاده های آن در هر نسل بسیار محدود و با فاصله ی زمانی زیاد می باشد ، این بررسی هابه سختی و با محدودیت بسیار انجام می گیرد . ولی امروزه دانشمندان با استفاده از PCR روش جدیدی را برای این کار پیدا کرده اند . برای این کار از بررسی آللهای موجود در یک اسپرم استفاده می شود . از آنجائیکه اسپرمها هاپلوئید بوده و در هر اسپرم از هر کروموزوم یک عدد وجود دارد ، با بررسی همزمان دو ژن بر روی یک کروموزوم و تعیین میزان نوترکیبی بین این دو ژن می توان فاصله ی ژنتیکی بین دو ژن را تعیین کرد . در واقع از نظر ژنتیکی بررسی ۱۰۰۰ اسپرم با بررسی ۱۰۰۰ فرزند یک خانواده برابر است . با استفاده از این روش ثابت شده است که میزان نوترکیبی کروموزومها در مردها با میزان نوترکیبی در زنها متفاوت است .

- بررسی حضور یا عدم حضور یک ژن خاص در مخلوطی از DNA :

به جرات می توان گفت که این کاربرد دوم PCR مهمترین کاربرد آن و علت اصلی گسترش روزافزون آن در کلیه ی شاخه های علوم زیست مولکولی است . تعدادی از این کاربردها عبارتند از :

الف) تشخیص قبل از تولد بیماریهای ژنتیکی :

در این روش تعدادی از سلولهای جنین را استخراج کرده و با پرایمر اختصاصی برای یک ژن بیماری مجاور می کنند ، همچنین بطور جداگانه با پرایمر ژن سالم نیز مجاور می کنند و PCR انجام می دهند . پس از پایان PCR تفسیر آزمایش چنین خواهد بود : اگر در هردو لوله سنتز DNA انجام شود ، جنین یک ژن سالم و یک ژن بیمار دارد یعنی حامل است ولی بیمار نیست . اگر سنتز DNA فقط در لوله ای که شناساگر مخصوص ژن بیمار وجود دارد

انجام شود جنین بیمار است و باید سقط شود . اگر سنتز DNA فقط در لوله ای که حاوی شناساگر ژن سالم است انجام شود ، جنین کاملاً سالم است .

امروزه بسیاری از بیماریهای ژنتیکی مانند هموفیلی ، کم خونی داسی شکل ، سیستیک فیبروزیز (Cystic Fibrosis) ، تالاسمی ، سندرم لش – نیهان ، دیستروفی عضلانی دوشن ، فاویسم ، فنیل کتون اوری و غیره را می توان به کمک PCR تشخیص داد.

ب) تعیین جنسیت جنین :

برای این کار تعدادی از تخمک های زن را خارج می کنند و در شرایط آزمایشگاهی با اسپرمها آمیزش می دهند و هر یک از سلولهای تخم تشکیل شده را بطور جداگانه کشت می دهند تا اینکه جنین به مرحله ی ۱۰ سلولی برسد . سپس از هر جنین یک سلول را جدا کرده و همراه با پرایمرهای اختصاصی برای کروموزوم y در لوله PCR وارد می کنند.سپس PCR و در پایان الکتروفورز انجام می شود . در هر یک از لوله ها که جنین نر (یعنی کروموزوم y) وجود داشته باشد ، سنتز DNA صورت می گیرد و در لوله ی دیگر نه . حال جنسیت تمامی جنین ها مشخص می باشد و می توان به اختیار خود پسر یا دختر را انتخاب کرده و جنین مورد نظر را به مادر انتقال داد . امروزه تکنیک فوق علاوه بر تعیین جنسیت برای خانواده هایی که در معرض خطر بیماریهای وابسطه به X (مانند هموفیلی) هستند نیز استفاده می شود . به این صورت که جنین ها ی اولیه را از نظر وجود ژن بیمار با استفاده از پرایمر اختصاصی آن مورد بررسی قرار می دهند و جنین سالم را به مادر منتقل می کنند .

شاید باورنکردنی باشد که تمامی مراحل بالا یعنی استخراج تخمک از مادر ، لقاح ، تکثیر ، PCR و انتقال مجدد به مادر در مدت زمان یک روز قابل انجام است .

راه دیگر تعیین جنسیت جنین استفاده از خون مادر است . در طی دوران بارداری مقداری از سلولهای جنین وارد خون مادر می شوند . حال اگر PCR برای قطعه ی DYZl (در حدود ۵۰۰۰ نسخه از این قطعه بر روی کروموزوم y قرار دارد) بر روی خون مادر انجام شود و جواب مثبت باشد چون مادر کروموزوم y ندارد پس این ژن مربوط به کروموزوم y جنین است و جنس جنین نر تعیین می شود .

- بررسی عفونت های باکتریایی و ویروسی :

هم اکنون در بعضی از آزمایشگاهها از PCR برای تشخیص ایدز استفاده می کنند. برای این کار از خون محیطی نمونه گیری می کنند و از توالی های اختصاصی ویروس HIV نیز به عنوان شناساگر استفاده می کنند ، سنتز DNA نشان دهنده ی عفونت ایدز است.

استفاده دیگر PCR در تشخیص بیماری سل می باشد . مایکوباکتریوم توبرکلوزیس یک باکتری بسیار کند رشد است و رشد معمولی آن در آزمایشگاه حدود ۲۰ روز طول می کشد. در PCR بیماری سل از نمونه ی خلط فرد بیمار به همراه پرایمرهایی که برای توالی خاص مایکوباکتریومهای مکمل می باشند ، مورد استفاده قرار می گیرد . پس از انجام PCR قطعات DNA بدست آمده در مجاورت شناساگرهای اختصاصی برای سوشهای مختلف مایکوباکتریومها قرار می گیرد و به این صورت گونه و سوش آن تشخیص داده می شود .

- تشخیص جهش ها و سرطان ها :

در هر سلول معمولاً از یک ژن فقط یک نسخه وجود دارد ، و در صورتی که این ژن دچار جهش شود بررسی این جهش بسیار مشکل خواهد بود ، زیرا در سلولهای انسان پیدا کردن یک ژن در میان کل ژنوم انسان ، همانند پیدا کردن سوزن در انبار کاه خواهد بود و پس از پیدا کردن ژن جهش یافته نیز به دلیل محدودیت نسخه های این ژن بررسی کمیت و کیفیت جهش در آن مشکل خواد بود .

ولی امروزه PCR کار را بسیار راحت نموده است . کافی است که یک سالم و یک سلول جهش یافته بطور جداگانه برای یک ژن خاص تحت PCR قرار گیرند و محصولات حاصل با هم مقایسه شوند . به این ترتیب به راحتی می توان محل جهش ، نوع جهش و هر نوع اطلاعات لازم دیگر را به دست آورد .
استفاده دیگر PCR در بررسی مراحل درمانی سرطان می باشد . داروهای مورد استفاده در درمان سرطان داروهای سیتوتوکسیک می باشد که عوارض جانبی بسیار زیادی به همراه دارند. به همین دلیل نیز سرطان شناسان مایل اند که از مراحل بهبودی سرطان اطلاع داشته باشند تا به محض از بین رفتن سلول بدخیم درمان را متوقف نمایند ، ولی در صورتی که بهبودی کامل حاصل نشده باشد ، احتمال عود مجدد بیماری وجود خواهد داشت. با استفاده از PCR دقت تعیین سلولهای سرطانی بسیار بالا می رود که اهمیت آن ناگفته پیداست و به همین دلیل PCR منفی را می توان به معنای بهبودی کامل در نظر گرفت .

- تعیین توالیهای کروموزومی انسان در سلولهای هیبریدی (هتروکاریونها) :

یکی از تکنیکهای بررسی ژنوم انسان ، تلفیق (هیبرید کردن) هسته های سلولهای انسانی با سلولهای حیوانات دیگر مثلاً موش است . پس از انجام تلفیق دو هسته ، کروموزومهای انسان به تدریج حذف می شوند ، تا اینکه نهایتاً یک کروموزوم در درون هسته هیبریدی باقی می ماند . حال گاهی به منظور بررسی های بیشتر لازم می شود که این قسمتهای ژنوم انسان تکثیر شوند ، مثلاً وقتی که یک ژن خاص مورد بررسی قرار می گیرد . برای این کار ازنوع خاصی از PCR که به Alu-PCR معروف است استفاده می شود.
در این روش از پرایمرهایی استفاده می شود که مکمل توالیهای بسیار تکراری ژنوم ها می باشد ، این توالی های ۳۰۰ جفت بازی که گاهی تا ۹۰۰۰۰۰ بار در ژنوم انسان و دیگر پستانداران تکرار می شود را تکرارهای Alu می نامند . این توالی ها بسیار متغیر می باشند ولی در انسان قسمتی از این توالی ها اختصاصی و ثابت است و به همین دلیل به راحتی می توان از آن برای تکثیر قطعات DNA که بین دو تکرار توالی Alu قرار دارند استفاده کرد . سپس این DNA را می توان خارج نمود و از نظر نوع پروتئین مورد سنتز و یا تعیین توالی و غیره مورد بررسی قرار داد . مهمترین استفاده روش فوق تعیین مکان ژنتیکی ژنهای مختلف برروی کروموزومهای انسان است که تا قبل از این روش تقریباً
نا ممکن ویا بسیار مشکل بود .

- **مشکلات PCR :**

با تمامی مزیت های فوق PCR مشکلات خاص خود را دارد . مهمترین مشکل PCR آلودگی نمونه های مورد بررسی است . به دلیل حساسیت فوق العاده و قدرت تکثیر زیاد PCR هر قطعه DNA خارجی که وارد محیط PCR شود ، مورد تکثیر قرار گرفته و نتایج عجیب و دور از واقعیتی به وجود خواهد آورد . برای مثال در مورد تحقیقی که در تعیین جنسیت با استفاده از خون مادران باردار بیان شد ، در بین جوابها یک مورد مثبت کاذب برای یکی از زنان غیر باردار که به عنوان شاهد منفی استفاده شده بود ، وجود داشت . پس از بررسی معلوم شد که تعداد ناچیزی از سلولهای پوست یکی از کارکنان مرد آزمایشگاه وارد لوله ی PCR شده است . گاهی نیز باقیمانده ی قطعات DNA حاصل از تکثیر DNA های قبلی باعث آلودگی PCR می شود که در این مورد شستشوی زیاد و دقیق مشکل گشا است .

الکتروفورز:

الکتروفورز از دو کلمه الکترو به معنای برق و فورز به معنای حمل تشکیل شده است. بطور کلی به روشی کفته می شود که به کمک آن مواد باردار ، در یک میدان الکتریکی از هم جدا می شوند. با توجه به باردار بودن پروتئین ها و اسید های نوکلئیک ، از این روش برای جدا سازی انواع آن ها استفاده می شود. اسیدهای آمینه ترکیبات بارداری هستند و لی به دلیل کوچکی اندازه تنها عمل الکتروفورز در ولتاژ بسیار بالا می تواند باعث جداسازی آنها شود و معمولا برای جدا کردن آنها از انواع روش های کروماتوگرافی استفاده می کنند. علیرغم این که عمل الکتروفورز را میتوان در مایع هم انجام داد ولی چون پس از قطع جریان ، نمونه ها جدا شده مخلوط می شوند ، این عمل را بر روی پایه ی جامد یا نیمه جامد انجام می دهند. پایه ی فوق می تواند لایه ی نازکی از استات سلولز باشد و یا به صورت ژل نشاسته ، اگارز یا اکریل آمید و ... باشد. انتخاب نوع پایه بر حسب موادی که قرار است جدا شوند صورت می گیرد. به هر حال عمل نمونه گذاری معمولا در چاهک هایی که به همین منظور در ژل ایجاد شده است انجام می گردد pH .هایی برای الکتروفورز باید در نظر گرفته شود که بیشترین تفاوت در بار پروتئین هایی باید باشد که هدف جداسازی آنهاست را به وجود آورد. این pH بطور تجربی بدست می آید. با توجه به انجام گرفتن الکتروفورز در یک میدان الکتریکی باید محیط واجد مقدار کافی یون جهت هدایت الکتریکی باشد و همچنین برای این که نمونه بار مناسبی داشته باشد باید در محیطی با pH معیین و ثابت قرار گیرند که این دو خواسته با توجه به حضور بافرها عملی است.

الکتروفورز در ژل اگارز:

الکتروفورز به وسیله ی ژل آگارز در حرارت اتاق در حالت افقی ، روشی استاندارد برای جداسازی قطعات DNA است. ژل آگارز در مقایسه با ژل پلی آکریل آمید ، قدرت تفکیک کمتری داشته اما محدوده ی جداسازی بیشتری دارد. قطعات DNA به اندازه ی 200 bp تا 60 kbp را می توان در غلظت های متفاوت ژل آگارز از هم جدا نمود. برای ساخت ژل آگارز ، ابتدا پودر آگارز را در بافر مناسبی که دارای EDTA است ریخته و حرارت می دهند ، تا محلول شفاف و روشنی حاصل گردد. این عمل را می توان با گذاشتن مخلوط بافر و آگارز در ماکروویو انجام داد. سپس محلول را تا ۶۵ درجه ی سانتی گراد سرد کرده و بعد به درون قالب ژل الکتروفورز یا روی لام می ریزند تا سفت گردد. قبل از ریختن آگارز یک شانه ی پلاستیکی را روی لام یا درون قالب ژل آگارز قرار می دهند. این عمل بدان جهت انجام می شود تا دندانه های شانه ، چاهک های کوچکی را در آگارز قبل از سفت شدن تشکیل دهد. برای تعیین فاصله ی دندانه های شانه تا کف ظرف قالب می توان لامی را در زیر دندان های شانه قرار داد و پس از تنظیم ، لام را برداشته و آگارز را اضافه کرد. زمانی که آگارز سفت شد ماتریکس ضخیمی را تشکیل می دهد که به مقدار غلظت آگارز بستگی دارد. سپس DNA مورد نظر به درون چاهک ها وارد می شود. هنگامی که جریان برق از میان ژل عبور کند DNA که بار منفی در pH خنثی دارد به طرف کاتد حرکت می کند. میزان مهاجرتDNA در ژل به عوامل زیر بستگی دارد:

-1اندازه : DNA مولکولهای بزرگتر ، آهسته تر از مولکول های کوچکتر در زمان یکسان عبور می کنند.
-2غلظت آگارز: اندازه های مساوی از مولکول های خطی DNA با سرعت های متفاوتی در غلظت های مختلفی از ژل آگارز حرکت می کند.
-3شکل فضایی : DNA مولکلول های سوپر هیلیکال ، حلقوی و خطی DNA با اندازه های یکسان در ژلی با

غلظت مشخص با سرعت های متفاوتی حرکت می کند. اشکال مختلف به ترتیب متفاوتی حرکت می کنند که به شرایط موجود بستگی داردو هنگامی که ژل سفت شد نمونه ها به آن اضافه گردد. دستگاه تنظیم برق را وصل کرده تا جریان برق بر قرار گردد. ضروری است که جهت صحیح الکترود ها رعایت شود وگرنه DNA در جهت اشتباه حرکت خواهد کرد.

. پس از انجام عمل الکتروفورز برای مشاهده ی DNA باید رنگ آمیزی ژل با اتیدیو بروماید (EtBr) انجام گیرد. این رنگ بین بازهای دو زنجیر DNA نفوذ می کند و در زیر نور التراویولت به رنگ قرمز-نارنجی فلورسنس مشاهده می گردد. مقدار اتیدیوم بروماید مورد استفاده در ازای قطعه ی DNA بستگی دارد. بعد از انجام الکتروفورز ، ژل در محلول اتیدیوم بروماید ، رنگ آمیزی شده و سپس با آب مقطر شست و شو داده می شود تا رنگ متصل نشده به DNA که به درون ژل وارد شده ، حذف گردد. سپس از آن ژل ، عکس برداری می شود.

روش :

-1ژل آگارز را با غلظت مورد نیاز جهت انجام الکتروفورز تهیه کنید. برای مثال ۰/۳ گرم را در ۳۰ میلی لیتر (غلظت ۱ درصد) از محلول TAE ریخته بعد آن را وزن کرده و درون ماکروویو گذاشته تا خوب حل شود. دوباره وزن کرده و مقدار آب بخار شده را با افزودن آب مقطر جبران کنید. سپس آن را درون قالب ژل الکتروفورز که حاوی شانه می باشد بریزید. شان باید مختصری بالاتر از کف ظرف قالب و در یک طرف باشد.

-2برای تهیه ی ژل کوچک می توان از لام استفاده کرد. برای انجام آن محلول آگارز را تا ۵۰ درجه ی سانتی گراد سرد کرده و به آرامی و با دقت آن را روی سطح لام بریزید. توجه داشته باشید که شانه مختصری از سطح لام بالاتر باشد.

-3باید دقت شود که حباب هوا ایجاد نشود. مدت زمان بستن ژل حدو ۲۰ تا ۳۰ دقیقه می باشد .

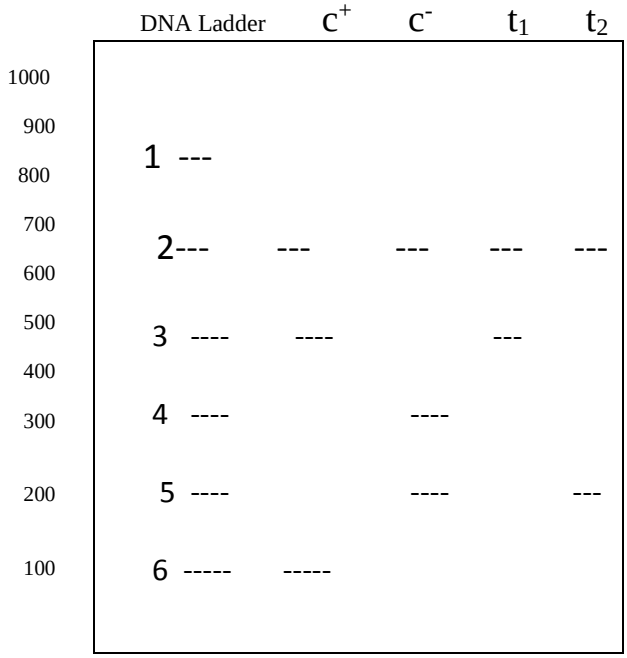
-4برخی از پژوهشگران ، قبل از ریختن ژل در روی لام یا درون قالب ژل ، مقدار ۵/. میکروگرم در میلی لیتر از اتدیوم بروماید را به آن اضافه می کنند. در این حالت ، باندهای DNA در هنگام الکتروفورز ، رنگ را به خود می گیرد. این عمل به علت آلودگی ظروف با اتدیوم بروماید که ماده ی خطرناکی است مورد تایید قرار نگرفته و بهتر است که انجام نشود.

-5هنگامی که ژل به درون قالب ژل الکتروفورز ریخته شد حدود ۲۰ تا ۳۰ دقیقه بعد (زمانی که ژل بسته شد) ژل را با مقدار کمی از بافر TAE بپوشانید و سپس شانه را بردارید.

-6پس از این که اطمینان حاصل شد که نمونه مورد نظر حاوی ماده ی نشانگر(Loding Buffer) می باشد آن را به درون چاهک های ژل وارد کنید. در این حالت ، ۲۰ میکرولیتر از نمونه را با ۲ میکرولیتر از LB در درون یک لوله اپندروف یا در روی سطح کیسه ی پلاستیکی مخلوط کنید. سپس ، مواد اضافه را در یخچال قرار دهید. در ضمن ، سعی شود که اندازه ی مارکر متناسب با اندازه ی DNA موجود در نمونه باشد. لودینگ بافر دارای گلیسرول یا ساکارز یا فایکول یا SDS به همراه یک رنگ ردیابی کننده (برومو فنیل یا گزیلن سیانول) است.

مواد لازم ساخت ژل : ۲۰cc باز TCR، ۰/۴gr پودر آگار ،**λ**۲ اتیدیوم بروماید

تفسیر PCR



تفسیر ۶ مورد بالا :

۱: آزمایش اشتباه ، به طور کلی pcr انجام نشده است زیرا c^+ که در صورت درستی آزمایش باید خطی تشکیل دهد خالی مانده.

۲: آزمایش اشتباه زیرا آلودگی در هنگام آماده سازی آزمایش وارد c^- شده و آن را آلوده به بیماری کرده است.

۳: pcr به درستی انجام شده و t_1 بیمار است.

۴: pcr به درستی انجام نشده است و جای c^+ و c^- عوض شده.

۵: آزمایش اشتباه زیرا جای c^+ و c^- عوض شده.

۶: آزمایش به درستی انجام شده و t_1 و t_2 بیمار نیستند .