واکنش زنجیره ای پلیمراز

Polymerase chain reaction

(PCR)

مقدمه

- تشخيص، تمايز و شناسايي ميكروارگانيسم ها مي تواند توسط روش هاي متعددي از جمله آزمايش هاي فنوتيپی، بيوشيميايي و ايمونولوژيكي انجام شود.

- البته این روشها به دلیل اینکه گاهی نتایج واضح و قابل استنادی ندارند ,همچنین اینکه نیازمند صرف وقت زیادی می باشند تقریبا با روشهای جدید شناسایی که به وسیله تکنیک های مولکولی انجام میشوند جایگزین گردیده اند.

- افزايش حساسيت و فرآيند اختصاصي تشخيص, احتمال خطا در اين روش ها را نسبت به روش هاي فنوتيپي و بيوشيميايي تا حد زيادی كاهش مي دهد.

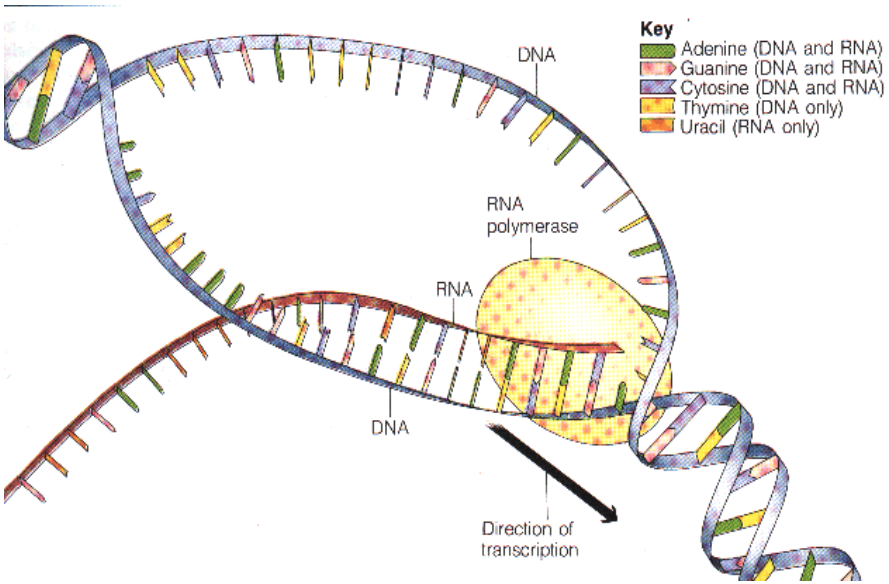
تاریخچه

- تکنیک PCR در سال 1984 توسط کری مولیس(kary Mullis) ارائه شده است در این تکنیک یک مولکول DNAمیلیونها بار تکثیر میشود.
- ابتدا این کار توسط سه بن ماری با حرات دهی مختلف انجام میگرفت و از آنزیم کلنو بعنوان DNA POLYMERASE استفاده میشد. این آنزیم در اثر حرارت دناتوره میشود و اجبارا با ید دوباره در هر سیکل به واکنش اضافه شود.
- Saiki از آنزیم DNA POLYMERASE مقاوم به حرارت

که اصطلاحا Taq DNA POLYMERASEگفته میشود

استفاده کرد وامروزه واکنش PCR بصورت اتوماتیک انجام

میگیرد .

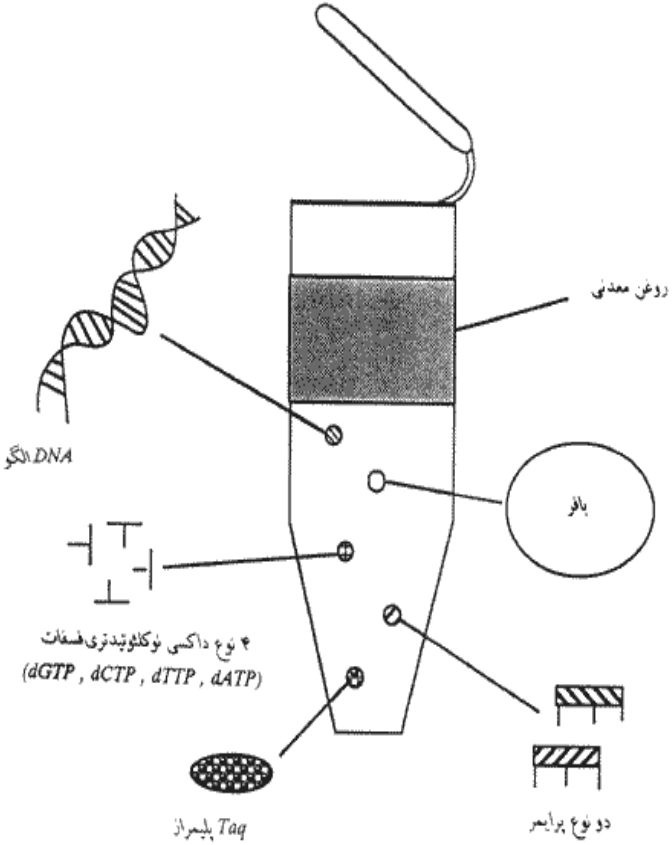


واکنش زنجیره ای پلیمراز

- واکنش ارزان ،سریع و فراگیر ، که به کمک آن محققین توانسته اند آنرا برای بررسی مولکولی میکروبها ، گیاهان ، جانوران، نمونه های باستانشناسی و غیره به کار ببرند

مکانیسم PCR

واکنش زنجیره ای پلیمراز(PCR) به سادگی در یک لوله آزمایش با مخلوط کردن DNAبا مجموعه ای از عوامل واکنش دهنده و قرار دادن لوله آزمایش در یک سایکلر حرارتی انجام میشود.



اساس این روش بسیار ساده بوده و مانند واکنش همانندسازی DNAدر موجودات زنده توسط آنزیم DNA پلیمراز صورت می گیرد.

در موجودات زنده، مجموعه ای از چند پروتئین و آنزیم در فرآیند همانند سازی DNAنقش دارند ،در حالی که در واکنش PCRتنها نوع خاصی آنزیم DNA پلیمراز مقاوم به حرارت به نام Taq polymerase به همراه بافر، کلرید منیزیم و نوکلئوتیدها,آب مقطر جهت تکثیر قطعات DNA استفاده می شود.

نمونه DNA الگو

تکثیر از روی نمونه DNA انجام می شود. این نمونه می تواند، قطعه ای DNA ، محصول استخراج DNA ژنومی، DNAپلاسمیدی یا حتی محصول PCR دیگری باشد.
معمولاً حدود یک نانوگرم از DNA پلاسمیدی یا یک میکروگرم از DNA ژنومی برای یک واکنش PCRکافی است.

بیش از مقدارتعیین شده، باعث تولید محصولات غیر اختصاصی (قطعات DNA دیگری غیر از قطعه مورد نظر) شده و مقدار کم نمونه DNA نیز باعث کاهش دقت واکنش PCR یا عدم تکثیر قطعه مورد نظر می گردد.

کیفیت نمونه DNA نیز مهم است به طوری که باقی ماندن ترکیبات مورد استفاده در مرحله استخراج DNA مثل فنل وEDTA ، باعث کاهش فعالیت آنزیم Taq polymerase و عدم حصول نتیجه مورد نظر می گرددو همچنین آلوده شدن واکنش PCR با مقادیر بسیار اندک DNA از هر منبع دیگری ممکن است به تولید قطعات غیر قابل انتظار بیانجامد.

آغازگرها(Primer)

پرايمرها قطعات سنتز شده اي از بازهاي آلي اند كه بر اساس قطعه مورد نظرDNA الگو ساخته مي شوند. طول پرايمرها بسيار مهم است و هر چه طول پرايمر بلند باشد اختصاصي تر عمل مي كند .
پرايمرها دو عمل انجام مي دهند. اول اين كه محل ژني را كه بايد تكثير شود مشخص مي‌كنند و دوم اين كه اندازه قطعات تكثير شونده را تعيين مي كنند.
غلظت بهینه پرایمرها برای واکنش PCR از 100نانو مولار تا یک میکرو مولار متغییر است. غلظت بیش از محدوده، منجر به تولید قطعات غیر اختصاصی می شود.

نرم افزارهایی وجود دارد که طراحی پرایمر را انجام میدهند بعد از طراحی پرایمر بهتر است توسط نرم افزارهایی مانند Blastآنها را چک نمود تا مشخص شود که با چه ژنهای دیگر میتوانند Anneal گردند.

بافر
مهمترین نقش بافر PCR تنظیم pH مناسب واکنش PCR و آنزیم Taq polymerase می باشد. اجزای این بافر نقش های دیگری نیز دارند.

از جمله کلرید پتاسیم که به اتصال پرایمر به DNA الگو (نمونه) کمک می کند. بافر داراي گليسرول ميباشد كه براي مشهود سازي DNA است.

کاتیونهای دو ظرفیتی: **یون منیزیم**

یون منیزیم یکی از اساسی ترین اجزا واکنش PCR می باشد واثر متقابل رشته DNA الـگــو و آغـازگـر را افـزایـش مـي دهـد. انواع مختلف آنزیم DNA polymerase برای فعالیت خود بـه این یون نیاز دارند و این یون برای اتصال پرایمر و قطعه DNA لازم است. برای تکثیر با Taq polymeraseاین یون عمدتاً بـه صـورت ترکیب کلرید منیزیم در واکنش PCR استفاده مـی شود. این ترکیب گـاهی در همـان بـافر PCR قرار داده مـی شود ولـی از آنجـا کـه بـرای برخـی واکنش های PCR لازم است که غلظت این یون تغییر نماید، این ترکیب بـه طـور جداگانـه تهیـه و به واکنش PCR افزوده می شود.

غلظـت کلـریـدمنیـزیـم اثـر زیـادي بـرروي اختصاصـي شدن و در نهایت بـازده واکنش PCR دارد. غلظت بهینه یون منیزیم در واکنش PCR یک تا چهار میلی مولار است.

غلظت بـالاتر از مقدارتعیین شده، باعث تکثیر قطعـاتی غیـر از قطعـه مـورد نظـر (قطعـات غیـر اختصاصی)شده و غلظت پایین این یون نیز ممکن است بـه کـاهش کـارایی واکنش و میزان تولید قطعـــــــــــه مـــــــــــورد نظـــــــــــر منجـــــــــــر شـــــــــــود.

آنزیم Taq polymerase

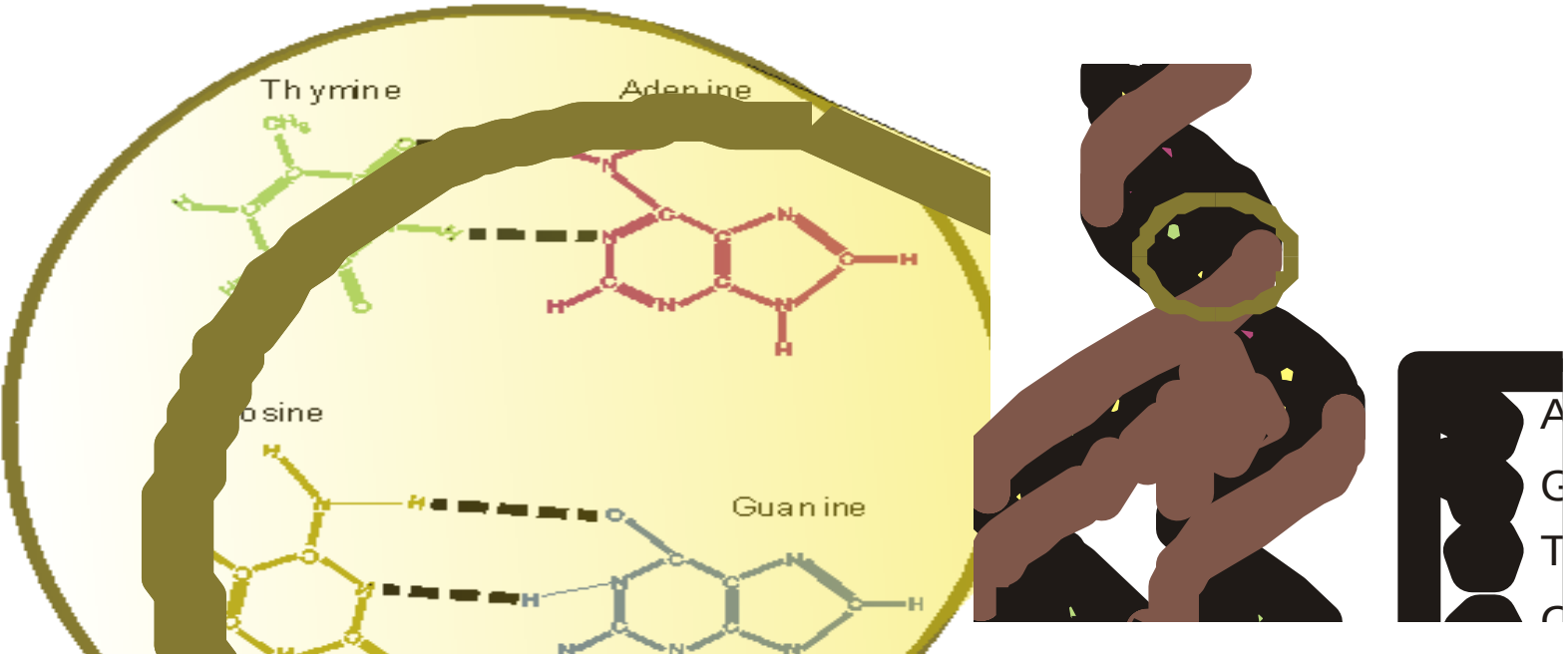
این آنزیم برای تکثیر قطعات کمتر از سه هزار جفت باز توصیه شده است.

به طور معمول حدود یک واحد از این آنزیم در 50 میکرو لیتر از واکنش PCR استفاده می شود. اگر نمونه DNA حاوی مواد ممانعت کننده PCR باشد، می توان مقدارتعیین شده را دو تا سه برابر افزایش داد ، ولی مقادیر بالاتر آنزیم باعث تولید محصولات غیر اختصاصی می گردد.

گرچه دمای مناسب برای این آنزیم 70 درجه سانتیگراد می باشد ولی چون این آنزیم در دمای معمولی نیز قادر به تکثیر می باشد، برای جلوگیری از اتصال قطعات پرایمر به نقاط دیگری روی توالی نمونه DNA و امکان تولید قطعات غیر اختصاصی، توصیه می شود که تمامی مراحل آماده سازی واکنش PCR بر روی یخ صورت گیرد .چون واکنش زمانی به طور کارآمد انجام می شود که DNA پلی مراز بتواند در حین چرخه‌های گرم کردن پایدار بماند,پژوهشگران از یک DNA پلی مراز مقاوم به حرارت تحت عنوان Taq پلی مراز استفاده می کنند.

نوکلئوتید ها

چهار نوکلئوتید تشکیل دهنده قطعه DNA از اجزا واکنش PCR می باشند که به عنوان واحد های ساختمانی مورد نیاز در ساخت قطعه DNA استفاده می شوند. غلظت مورد نیاز از هر یک از نوکلئوتیدها برای واکنش PCR یکسان و برابر 200 نانو مولار می باشد. برای این منظور از مخلوط های آماده واجد هر چهار نوکلئوتید که با غلظت های مختلف مثل دو میلی مولار، 10 میلی مولار و 25 میلی مولار موجود است، استفاده می شود. به طور



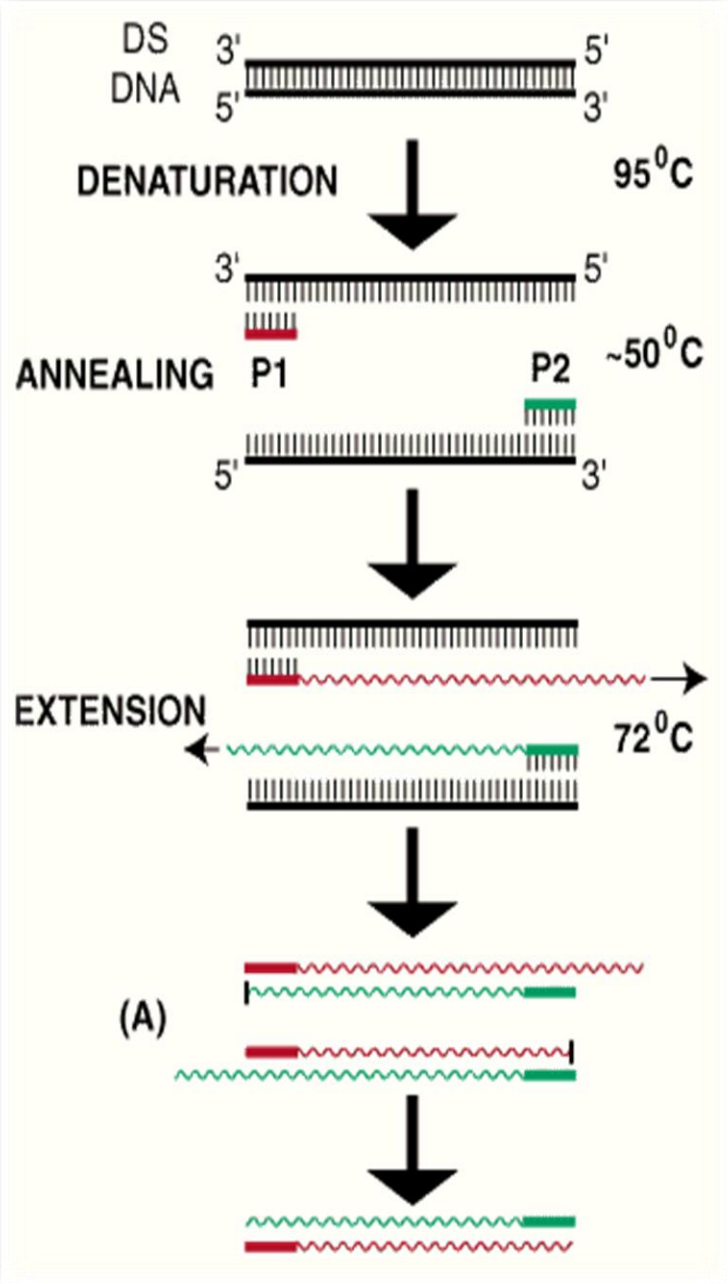
روغن معدنی :Mineral Oil

يك قطره روي مخلوط واكنش اضافه مي شود تا از تبخير نمونه در دستگاه چرخش حرارتي Thermal Cycler جلوگيري مي شود. معمولا 50 تا 60 ميكروليتر به محلول واكنش 100 ميكروليتري اضافه مي شود .

eppendorf
5330 plus
Run
Stop
Caution!
Hot Base
eppendorf
Mastercycler 5330
Run
Stop
Prg
Data
Track
Run
Stop
Prg
Data
7
8
9
4
5
6
1
2
3
.
0
Clr

eppendorf
Mastercycler gradient

PCR



مراحل اصلی در یک واکنش PCR

1) **مرحله اول :** (Denaturation)

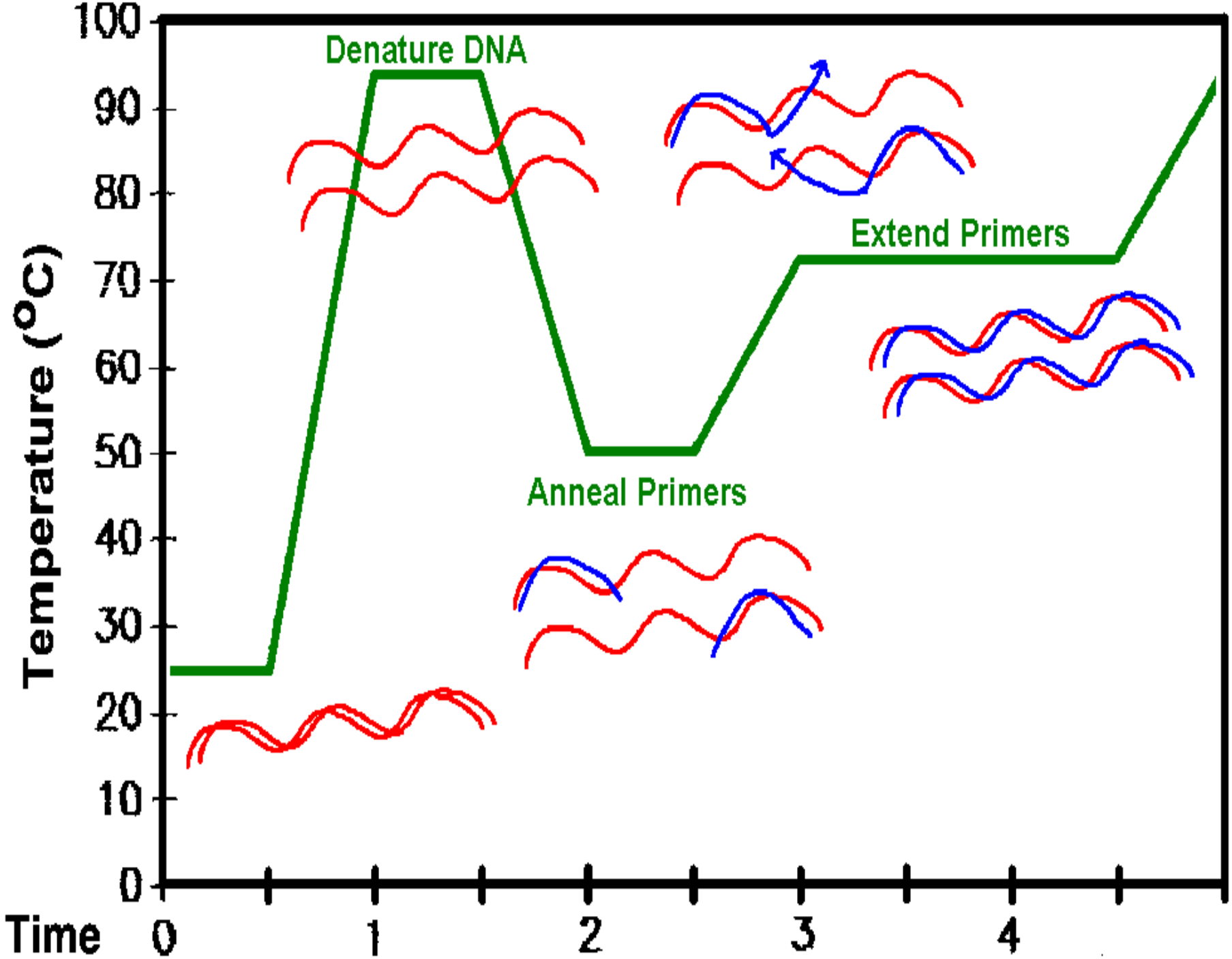
جدا شدن دو رشته DNA 94 -95°C (30-60 ثانیه)

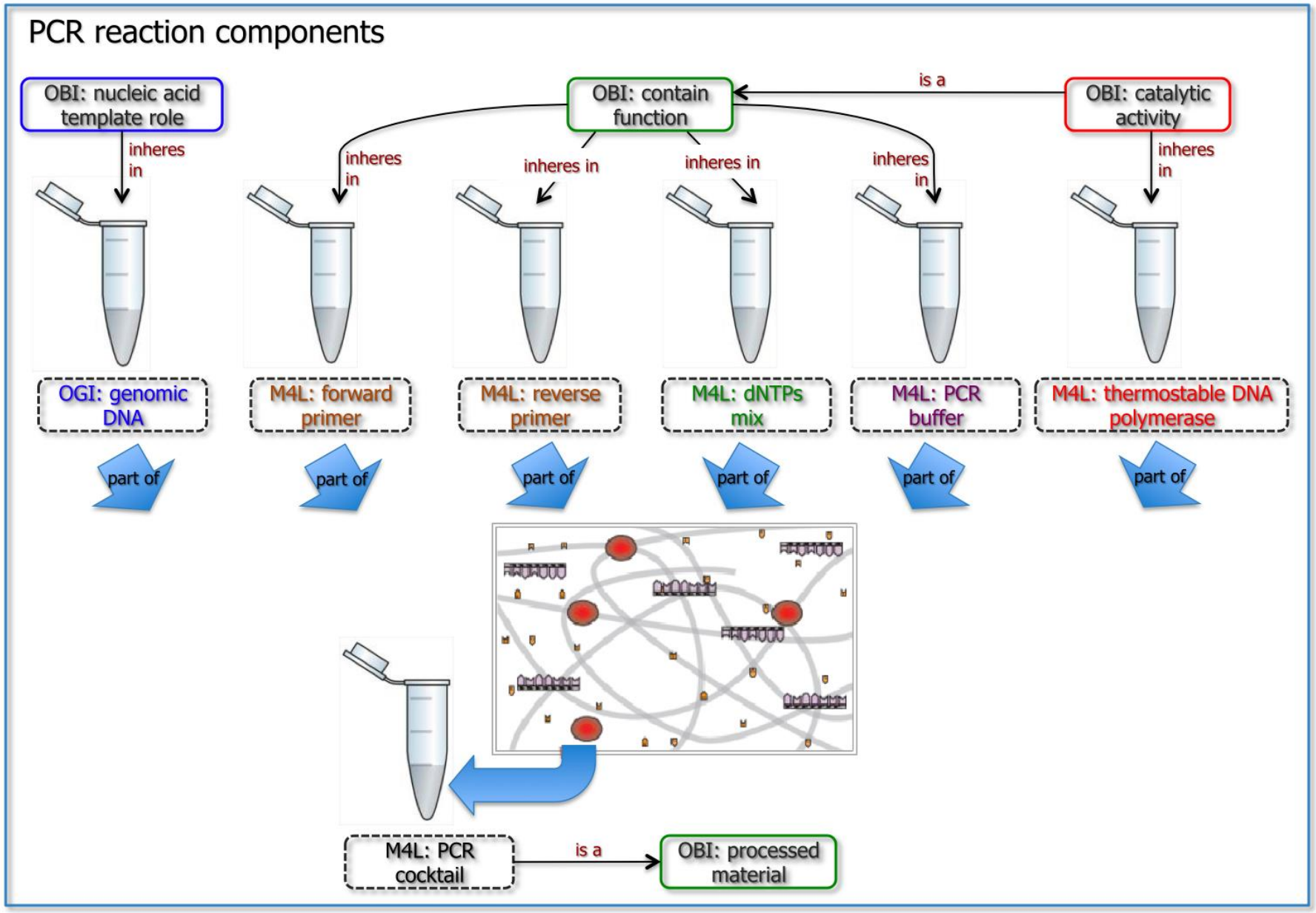
2) **مرحله دوم** (Annealing) :

اتصال پرایمرها به نواحی مکمل روی DNA و تعیین محدوده تکثیر قطعه DNA 60-40 °C (30-60 ثانیه)

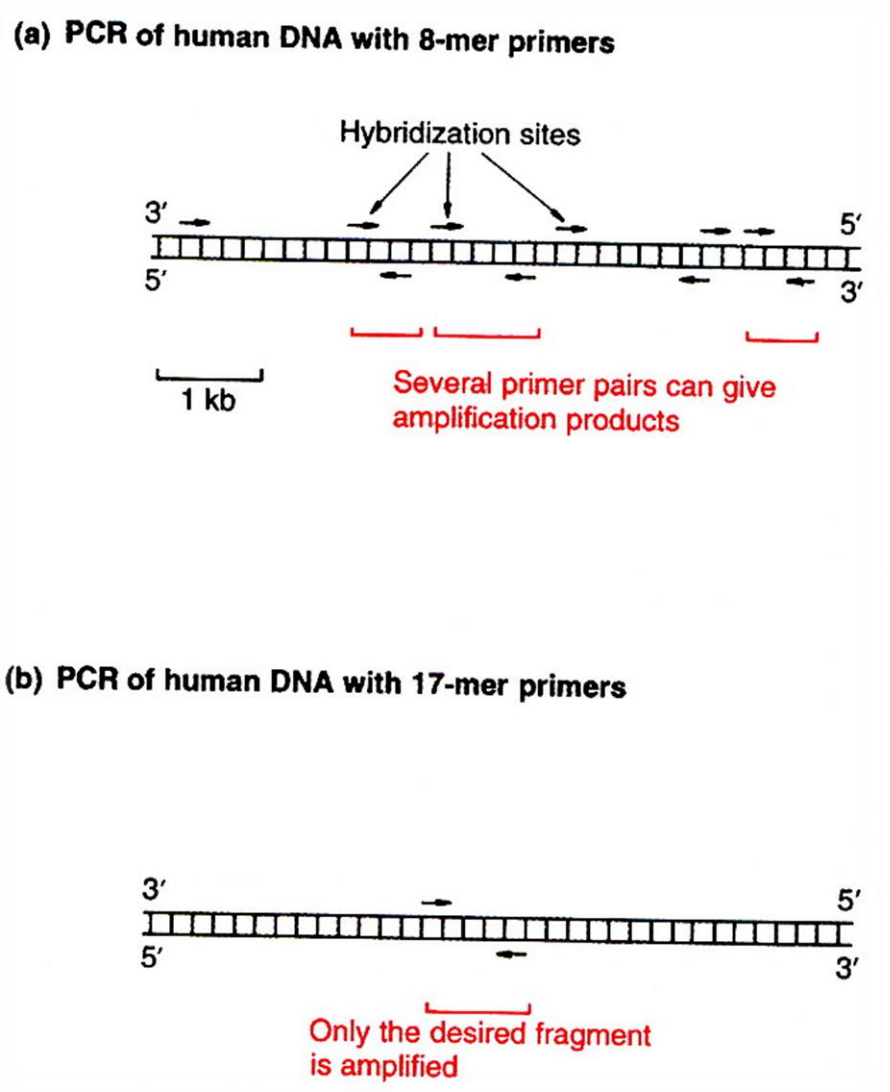
3) **مرحله سوم** (Elongation) :

تکثیر قطعه DNA مورد نظر 70 -74 °C (5 تا 15 دقیقه)


Denature DNA
Anneal Primers
Extend Primers
Temperature (°C)
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
Time
0
1
2
3
4


PCR reaction components
OBI: nucleic acid template role
OBI: contain function
is a
OBI: catalytic activity
inheres in
inheres in
inheres in
inheres in
inheres in
OGI: genomic DNA
M4L: forward primer
M4L: reverse primer
M4L: dNTPs mix
M4L: PCR buffer
M4L: thermostable DNA polymerase
part of
part of
part of
part of
part of
part of
M4L: PCR cocktail
is a
OBI: processed material

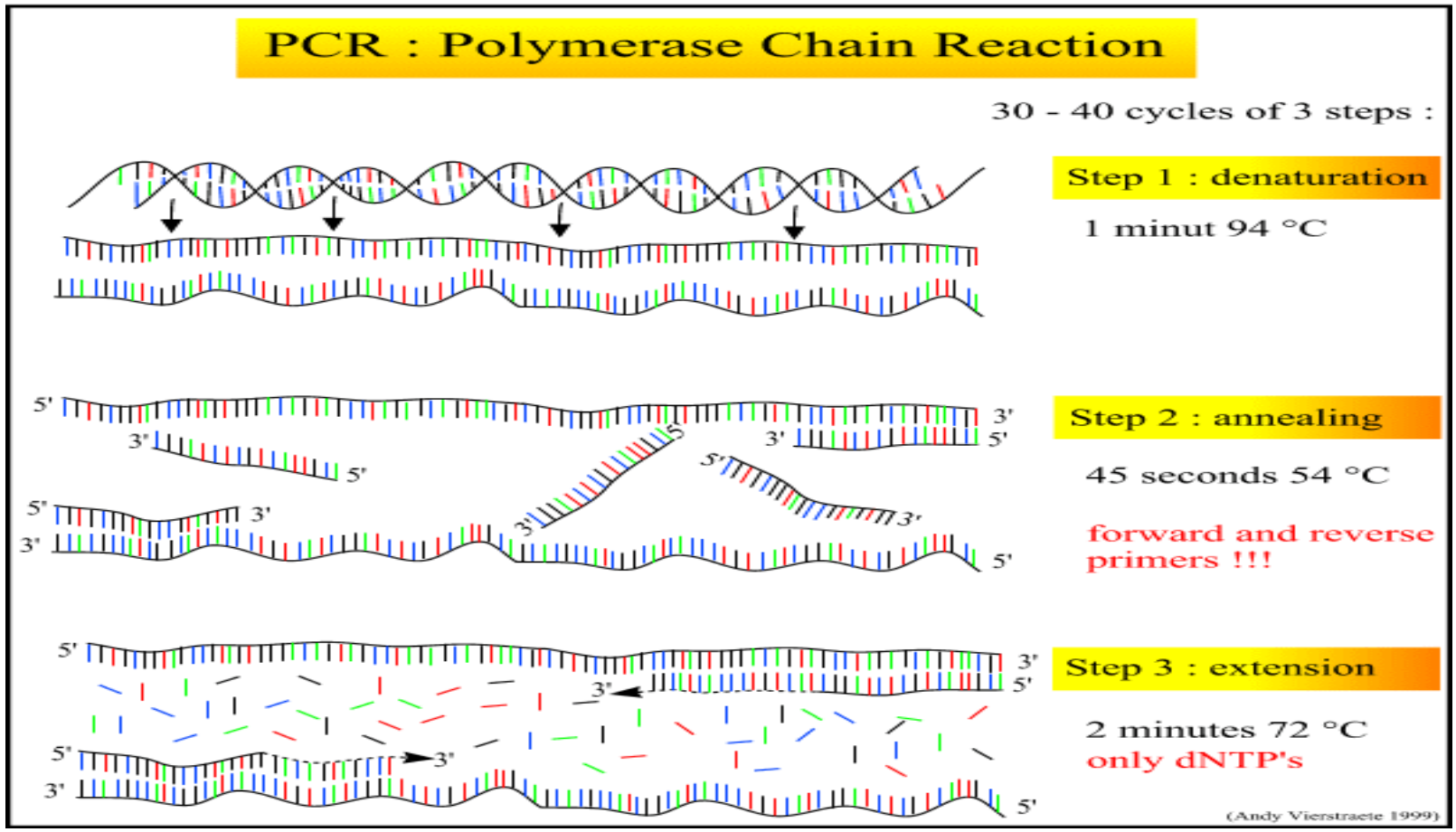
- اساس واکنش PCRبراي تکثیر توالی DNA دو رشته ای، **تغییرات دمایی** می باشد.
- در ابتدا پیوندهای هیدروژنی دو رشته توالی DNA با حرارت (94-95 درجه سانتیگراد) شکسته و دو رشته از یکدیگر جدا می شوند.
- سپس دمای واکنش پایین آورده می شود (معمولاً 50 تا 60 درجه سانتیگراد). در این مرحله، دو قطعه کوتاه DNAتک رشته ای (معمولاً بین 18 تا 30 نوکلئوتید) که دقیقاً مشابه دو طرف قطعه DNA مورد نظر برای تکثیر طراحی شده اند (با نام پرایمر یا آغازگر)، به توالی های مکمل خود در دو رشته باز شده DNA متصل می گردند. این دو قطعه انتهای 3’ آزاد جهت فعالیت آنزیم DNA پلیمراز را فراهم می نماید. در این دما دو رشته هر مولکول میتوانند دوباره به یکدیگر متصل شوند ولی این اتفاق نمی افتد زیرا مخلوط حاوی مقدار بیشتری مولکولهای کوچک DNAبه نام پرایمر(Primer)است که درمحلهای ویژه ای به مولکولهای DNAاتصال میابند.
- در مرحله بعد، دمای واکنش تا 72 درجه سانتیگراد افزایش یافته . این مناسبترین دما برای عملکرد آنزیم DNAپلیمرازTaqموجود در مخلوط واکنش است. عمل تکثیر قطعه DNA مورد نظر بین دو پرایمر با استفاده از نوکلئوتیدهای موجود، توسط آنزیم Taq polymerase مقاوم به حرارت انجام می پذیرد. درطی این مرحله این آنزیم به هر پرایمر میچسبد و رشته جدیدی ازDNAرا میسازد.با این رشته ها میتوانیم واکنش دیگری را شروع کنیم.
- این 3 مرحله بین 25 تا 40 بار تکرار می شود که به آن چرخه های PCR می گویند.

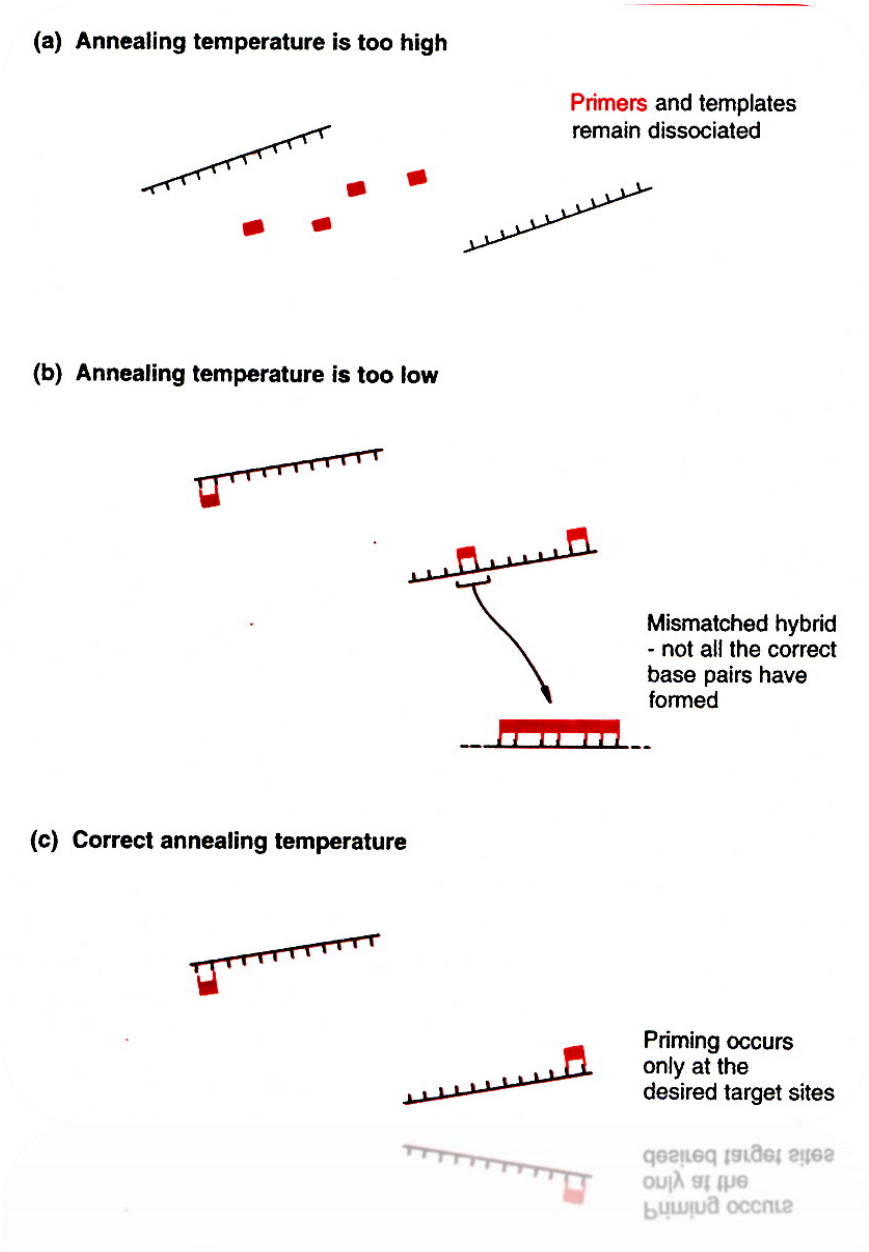


- ✓ **طول پرایمر** در PCRبسیار مهم است.اگر پرایمرها خیلی کوتاه باشند ممکن است با بخشهای غیر هدف هیبرید شوند و سبب تکثیر محصولات نا خواسته شوند.

- ✓ **پرایمرهای بلند** با اینکه موجب تولید محصول اختصاصی میشوند ولی باعث کاهش سرعت هیبرید شدن آن با DNAمیشود.به همین دلیل در عمل از پرایمرهایی با طول بیش از 30نوکلئوتید بندرت استفاده میشود.

- ✓ پرایمرها کلید موفقیت یا عدم موفقیت واکنش PCRهستند .اگر پرایمرها بطور صحیحی طراحی نشوند یا اصولا هیچ قطعه ای تکثیر نخواهد شد و یا قطعاتی اشتباهی تکثیر خواهد شد.
- ✓ پرایمرها باید با توالی دو سر ناحیه هدف روی مولکول الگو مطابقت داشته باشد،هر **پرایمر باید مکمل رشته الگو باشد** تا هیبرید شدن صورت گیرد.





✓دمـای اتصـال (50-60C) یکـی ازنقـاط بسیار مهم است کـه میتوانـد در اختصاصـی بودن واکنش تاثیر داشته باشد. اگر دما بسیار بـالا باشـد هیچگونـه هیبریداسـیونی صـورت نمیگیـرد و پرایمـر و DNAالگو جدا از هم باقی میمانند.

✓اگـر دمـا بسـیار پـایین باشـد هیبریـدهای اختصاصـی غیر پایدار تشکیل خواهد شدکه در آنها همه جفت بازها بطور صحیح تشکیل نشده اند.

PCR

- ✓ دمای اتصال را میتوان با **تعیین دمای ذوب شدن** (دمایي که در آن هیبرید های دارای جفت باز صحیح از هم جدا میشوند)هیبرید الگو –پرایمر محاسبه نمود.دمای مناسب برای تشکیل هیبریدهای صحیح الگو وپرایمر باید 1-2Cپایین تر از دمای ذوب شدن (Tm)باشد.

Primer sequence: 5′ AGACTCAGAGAGAACCC 3′

4Gs 5Cs 7As 1T

$$T_m = (4 \times 9) + (2 \times 8)$$
$$= 36 + 16$$
$$= 52°C$$

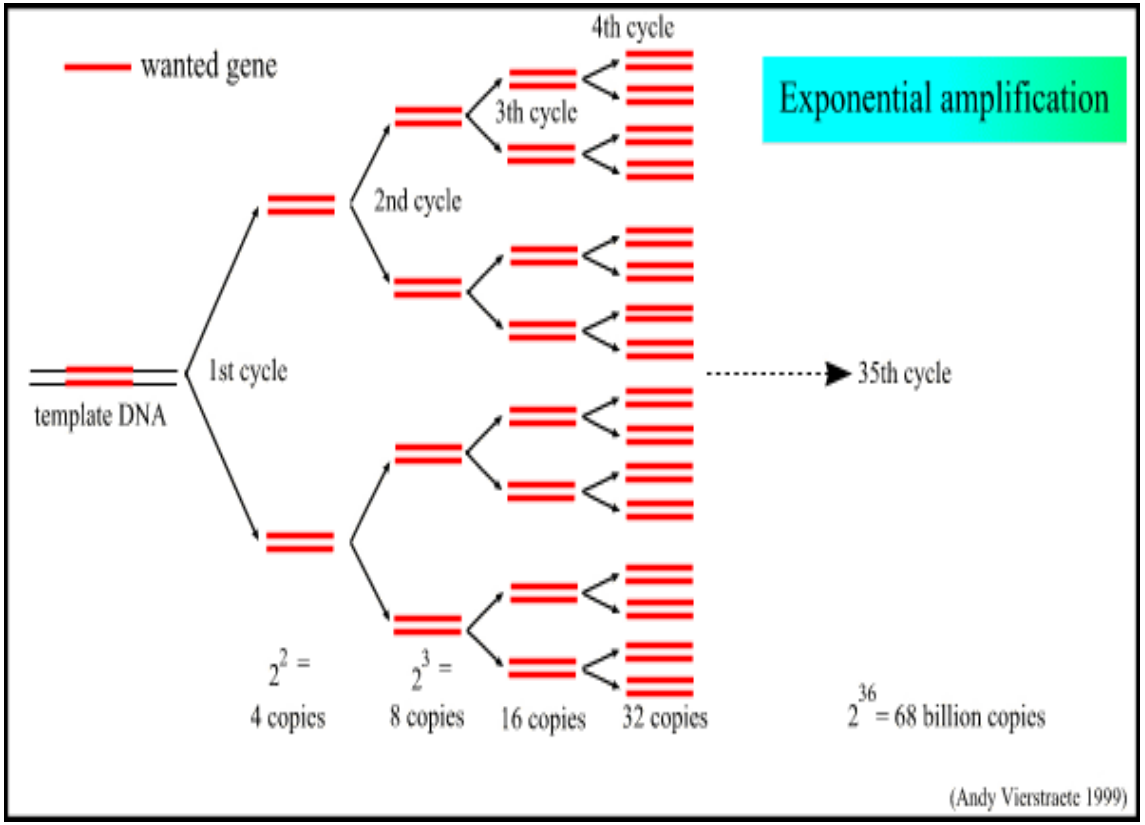
فرمول محاسبه دمای اتصال ویک مثال :

Tm=4(G+C)+2(A+T)

- ✓ (A+T)مجموع نوکلئوتیدهای آدنین و تیمین موجود در پرایمر
- ✓ (C+G)مجموع نوکلئوتیدهای گوانین وسیتوزین موجود در پرایمر

اين روش يك روش تصاعدي ميباشد.

برای دیدن قطعات تکثیر شده DNA می توان براحتی از الکتروفورز درژل آگاروز و رنگ آمیزی اتیدیوم بروماید استفاده کرد .



✓ RT-PCR (Reverse Transcriptase-PCR)

الگوي اوليه در RT-PCR، مولكول RNA تك زنجيره اي است. از آنجائيكه DNAپليمرازقادر به استفاده از RNAبعنوان الگو نمي باشد، مرحله ديگري به PCRاضافه شده است. طي اين مرحله، با استفاده ازآنزيم (RT -Reverse Transcriptase)، از الگوي RNA، مكمل آن CDNA سنتز مي شود و بوسيله تكنيك PCRتكثير مي يابد.

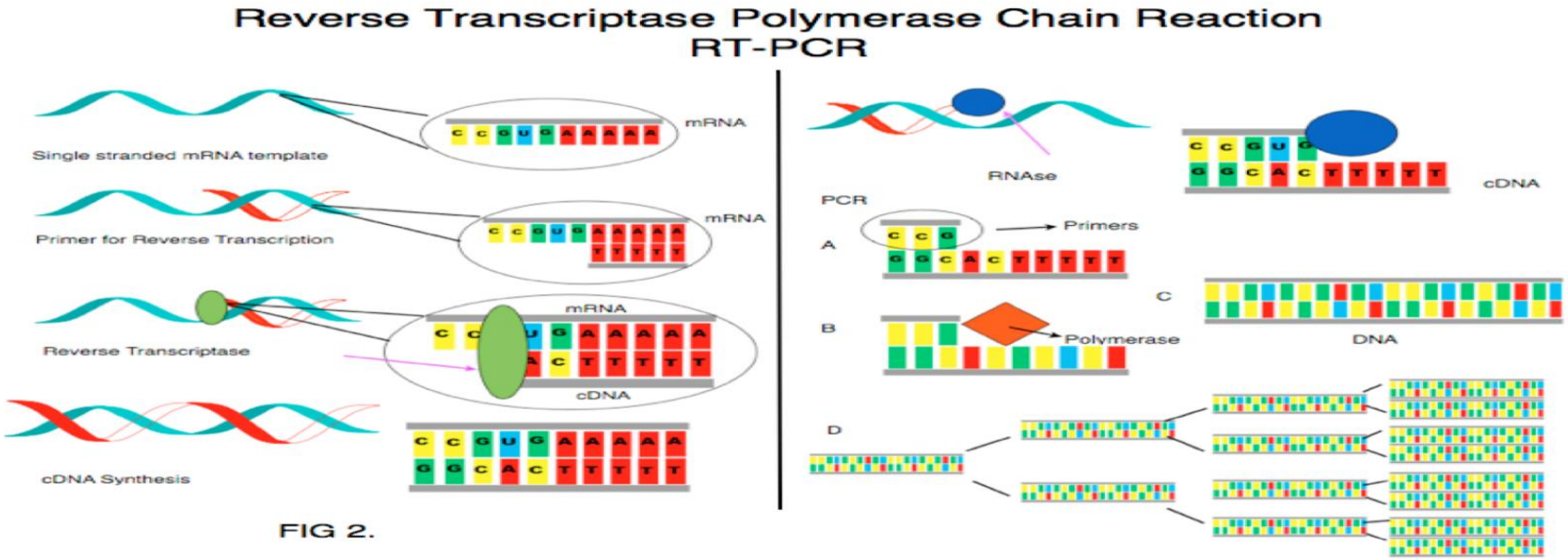
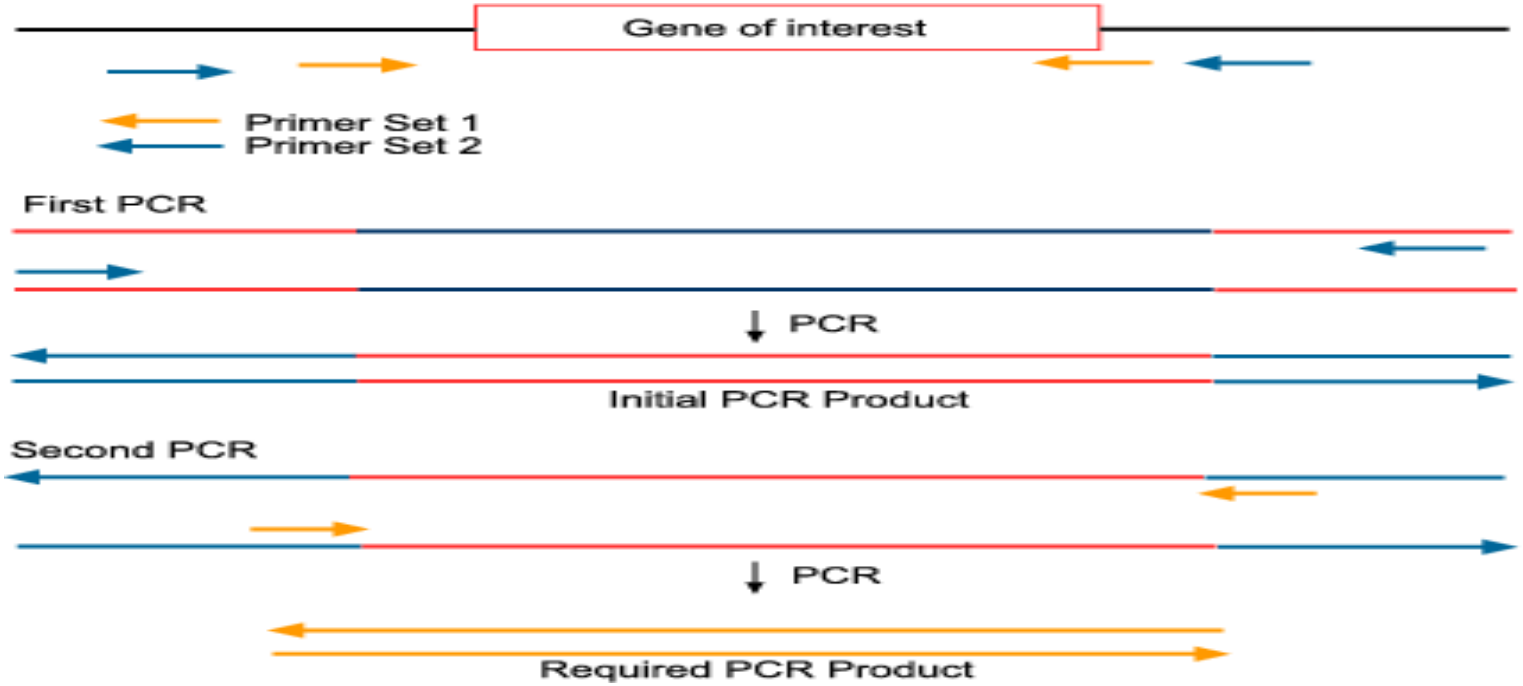


FIG 2.

:Nested-PCR

در اين روش بمنظور افزايش حساسيت PCRاز دو جفت پرايمر استفاده مي شود. ابتدا با يك جفت پرايمر اول در طول 30-15 چرخه، قطعات مشخصي از DNAهدف تكثير مي يابند. سپس محصول PCRحاصل به لوله ديگري منتقل شده و بعنوان الگو استفاده مي شود و بوسيله جفت پرايمرهاي دوم مرحله دوم PCRانجام مي شود.



PCR

: Multiplex-PCR

در اين روش از **چند جفت پرايمر اختصاصي** براي هدف هاي مختلف استفاده مي شود.

در ميكروب شناسي باليني، با استفاده از اين روش امكان شناسايي چندين عامل بيماري در يك نمونه بطور همزمان وجود دارد و مي توان عفونت هاي مخلوط را تشخيص داد

: HOT-START **PCR**

برای جلوگیری از تکثیر DNA های ناخواسته مخصوصا در مراحل اولیه PCR استفاده می شود.
بدین منظور قبل از افزودن پلیمراز، دمای محلول به نقطه ذوب رسانده می شود.

کاربردهای PCR:

- ✓ تهیه ی نسخه های متعدد از یک ژن
- ✓ تشخیص بیماریهای ژنتیکی قبل از تولد
- ✓ بررسی حضور یا عدم حضور یک ژن در سلول
- ✓ تعیین جنسیت جنین
- ✓ باستان شناسي
- ✓ تعیین توالي DNA
- ✓ تشخیص اختلالات کرموزومي
- ✓ انگشت نگاری ژنتیک
- ✓ تشخیص بیماریها :امروزه بسیاری از بیماریهای ژنتیکی مانند :تشخیص جهش ها و سرطان ها ،هموفیلی ،ایدز، کم خونی داسی شکل ، سیستیک فیبروزیز (Cystic Fibrosis) ، تالاسمی ،سل، دیستروفی عضلانی دوشن ، فاویسم ، فنیل کتون اوری و ...را می توان به کمک PCR تشخیص داد.حساسیت این روش ده هزار برابر روش معمول است.
- ✓ مطالعات تکاملي موجودات و....

- PCR را می توان به منظور شناسائی میکروارگانیسم هایی به کار برد که قابل کشت نیستند و یا سرعت رشد آنها در محیط کشت خیلی کند است از جمله مایکوباکتریها، باکتریهای غیر هوازی و ویروسها

- استفاده دیگر PCR در بررسی مراحل درمانی سرطان می باشد .

داروهای مورد استفاده در درمان سرطان داروهای سیتوتوکسیک (باکتری کشته یا ضعیف شده)می باشد که عوارض جانبی بسیار زیادی به همراه دارند. به همین دلیل نیز سرطان شناسان مایلند 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 برگشت مجدد بیماری وجود خواهد داشت. با استفاده از PCR دقت تعیین سلولهای سرطانی بسیار بالا می رود. به همین دلیل PCR منفی را می توان به معنای بهبودی کامل در نظر گرفت .

رنگ آمیزی :

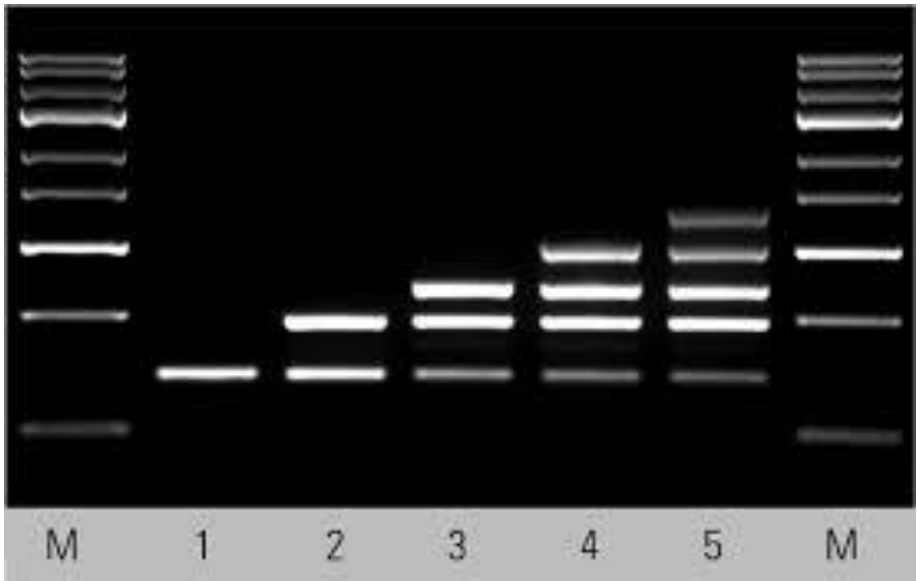
- ساده ترین راه برای مشاهده نتیجه یک آزمایش در الکتروفوروز باژل رنگ کردن ژل با ماده ای است که DNA را قابل رویت میسازد. اتیدیوم بروماید، سایبر گرین به عنوان ابزار مشاهده DNA در ژل است

- باندها (نوارها) وضعیت دسته های قطعات DNA با اندازه های مختلف را نشان میدهند که بعد از رنگ شده با EtBr تا آنجائیکه DNA وجود دارد در برابر نور ماورای بنفش به راحتی قابل رویت میباشد.

الکتروفورز

- الکتروفورز را در دمای اتاق و در ولتاژ و شدت برق مناسب انجام دهید.(معمولا یک ولتاژ ثابت، حداکثر برابر با 5 ولت برسانتی متر با توجه به فاصله بین الکترودها) توصیه می شود. تحت این شرایط ، DNA که دارای بار منفی است از کاتد به طرف آند حرکت می کند. مدت زمان الکتروفورز بستگی به فاصله انتقال، جریان تولید شده توسط منبع برق بافر مورد استفاده ،وغلظت آگارز در ژل دارد.

- پس از اتمام الکتروفورز، ژل را به مدت 15-50 دقیقه در محلول اتیدیوم بروماید و در دمای اتاق، در صورت امکان در تاریکی (ترجیحا در ظروف استیل در پوش دار) با تکان دادن آرام نگهداری کنید و در صورت لزوم با نگهداری ژل به مدت 10-30 دقیقه رنگ پس زمینه را حذف کنید.

الکتروفورز

- در الکتروفورز وقتی DNA بر روی یک غربال مولکولی مثل ژل آگارز در حضور بافر و تحت تاثیر یک میدان الکتریکی قرار داده می شودبر اساس بار و جرم مولکولی اس جدا می شود اتیدیوم بروماید بین زنجیرDNA قرار گرفته و هنگامی که توسط پرتو فرا بنفش برانگیخته می شود نور فلور سانت نارنجی ساطع می کند از آنجائی که میزان نور فلورسانت متناسب با جرم کلی DNA است. می توا ن میزان DNA موجود در نمونه را با نور فلورسانت ساطع شده توسط یک نمونه ناشناخته با یک سرس استاندارد های کمی برآورد کرد.