بهشته غریبی: کارشناس آزمایشگاه، مرکز بهداشت شهرستان اردبیل، دانشگاه علوم پزشکی اردبیل
داود کاظمی جبدرقی: کارشناس علوم آزمایشگاهی، بیمارستان ولیعصر مشگین شهر، دانشگاه علوم پزشکی اردبیل
نرگس پارسا: کارشناس علوم آزمایشگاهی، مرکز بهداشت شهرستان اردبیل، دانشگاه علوم پزشکی اردبیل
احمد گل محمدی دوکش: کاردان علوم آزمایشگاهی؛ مرکز آموزشی درمانی و درمانی امام خمینی ره، دانشگاه علوم پزشکی اردبیل

نگاهی گذرا بر واکنش زنجیره‌ای پلیمراز

واکنش زنجیره‌ای پلیمراز که PCRنامیده می شود، تکنیکی نوین در زیست‌شناسی مولکولی است و برای تکثیر یک نسخه منفرد یا نسخه‌های کمی از یک قطعه DNA با توالی خاص به تعداد هزاران یا میلیون‌ها نسخه، به کار می‌رود. کاربرد واکنش زنجیره‌ای پلیمراز نه‌تنها درزمینه تحقیقات ژنتیک مولکولی، همچنین بیوتکنولوژی حیوانی و گیاهی انقلاب ایجاد کرده، بلکه کارایی خود را در زمینه‌های دیگر علم پزشکی قانونی، سیستماتیک مولکولی، اپیدمیولوژی مولکولی، باستان‌شناسی، مردم‌شناسی و ژنتیک تکاملی ثابت کرده است. همچنین PCR قادر است با موفقیت، پروژه ژنوم انسانی را از طریق توانایی تکثیر و توالی یابی ژن‌های انسان، تکمیل کند که پایه و اساس مهندسی ژنتیک است.

اساس تکنیک PCR

پایه‌ی روشPCR چرخه‌های حرارتی است. این چرخه‌ها شامل چرخه‌های گرمایی و سرمایی تکراری، ذوب DNA و تکثیر آنزیمی DNA است. پرایمرها که قطعات کوتاه DNA حاوی توالی مکمل ناحیه هدف اند به همراه یک DNA پلیمراز، اجزای اصلی واکنش PCR برای انتخاب و تکثیر قطعه مورد نظر را تشکیل می‌دهند. طی فرایندPCR الگوی DNA به صورت لگاریتمی تکثیر می‌شود و DNA تکثیرشده خود به عنوان الگویی برای همانندسازی استفاده می‌شود. PCR می‌تواند به شکل گسترده‌ای برای انجام مراحل مختلف در دستکاری‌های ژنتیکی استفاده شود.

کمابیش در همه ی کاربردهای PCR، از یک DNA پلیمراز مقاوم به حرارت مانند Taq polymerase که آنزیمی استخراج شده از باکتری Thermus aquaticus است استفاده می‌شود. این DNA پلیمراز از یک DNAی تک‌رشته‌ای به عنوان الگو استفاده کرده و با کمک پرایمرها و با به‌کارگیری نوکلئوتیدها که بلوک‌های ساختاری DNA هستند، یک رشته DNAی جدید می‌سازد. در اغلب روش‌های PCR، از چرخه‌های حرارتی یعنی گرم و سرد کردن متناوب نمونه‌های PCR طبق مراحل دمایی مشخص استفاده می‌شود.

اجزای یک واکنش PCR پایه ای

- DNA الگو که دارای ناحیه DNA ی هدف برای تکثیر است.
- Taq polymerase که یک DNA پلیمراز مقاوم به حرارت است.
- دو پرایمر DNA که مکمل انتهای ۳ پریم رشته‌های سنس و آنتی سنس DNA ی الگو هستند، بدون پرایمرها، جایگاه آغاز دورشته‌ای که DNA پلیمراز بتواند به آن متصل شود شناخته نمی‌شود. پرایمرهای خاصی که مکمل DNA هدف هستند از قبل انتخاب شده و به شکل سفارشی در آزمایشگاه ساخته یا از تأمین کنندگان خریداری می‌شود.
- دزوکسی نوکلئوتیدهای سه فسفاته یا dNTPs بلوک‌های ساختاری هستند که DNA پلیمراز با استفاده از آن‌ها رشته‌های جدید را می‌سازد.
- یک محلول بافری که محیط شیمیایی مناسبی برای بهبود فعالیت و پایداری DNA پلیمراز فراهم می‌کند.
- کاتیون‌های دوظرفیتی مانند منیزیوم (Mg) یا منگنز (Mn) که از بین آنها کاتیون Mg^{2+} متداول‌تر است. همچنین کاتیون Mn^{2+} می‌تواند برای جهش زایی DNA ی حاصل از PCR استفاده شود و غلظت بالای این یون نرخ خطا را در طول سنتز افزایش می‌دهد.
- کاتیون‌های تک ظرفیتی که معمولاً یون‌های پتاسیم است.
- بافر 10X

روش انجام تکنیک PCR

به‌طور کلی PCR شامل مجموعه‌ای از ۴۰–۲۰ بار تغییر دمایی تکرارشونده به نام سیکل است که هر سیکل به طور معمول از دو یا سه مرحله دمایی مستقل تشکیل شده‌است.

مراحل مشترک اغلب روش‌های PCR

آغاز

این مرحله برای DNA پلیمرازی که نیازمند فعالسازی گرمایی به‌وسیله Hot-start PCR است لازم می‌باشد و شامل گرم کردن محفظه واکنش تا دمای ۹۶–۹۴ درجه سانتی گراد یا ۹۸ درجه سانتی گراد برای پلیمرازهای بسیار مقاوم به حرارت است. این مرحله ۱۰–۱ دقیقه به طول می‌انجامد.

دناتوراسیون

این مرحله اولین مرحله سیکل است و شامل گرم کردن محفظه واکنش تا ۹۸–۹۴ درجه سانتی گراد به مدت ۳۰–۲۰ ثانیه می‌شود که بوسیله شکستن پیوندهای دورشته‌ای بین بازهای مکمل باعث ذوب شدن یا دناتوراسیون DNA الگوی دورشته‌ای شده و به این ترتیب دو مولکول DNA تک رشته‌ای حاصل می‌شود.

اتصال پرایمرها(Annealing)

در این مرحله دمای واکنش به مدت ۴۰–۲۰ ثانیه به ۶۵– ۵۰ درجه سانتی گراد کاهش می‌یابد، که باعث می‌شود پرایمرها به هریک از الگوهای تک رشته DNA متصل شوند. اتصال بیشتر حدود ۵–۳ درجه سانتی گراد زیر دمای ذوب(Tm پرایمرها انجام می‌شود. در طول این فرایند DNA پلیمراز به ترکیبی از الگو و پرایمر متصل و شروع به ایجاد رشته‌های جدید می‌کند.

مرحله بسط پرایمر

مرحله بسط پرایمر در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰–۵۵ ثانیه رخ می‌دهد و طی آن dNTP های مکمل به رشته‌های جدید اضافه می‌شود. پس از چرخه نهایی، نمونه‌ها در دمای ۷۲ درجه سانتیگراد به مدت ۵–۱۵ دقیقه جهت پر کردن انتهاهای بیرون زده فرآوردهای PCR تازه سنتز شده، انکوبه می‌شود. ذخیره و نگهداری محصولات PCR در دمای ٤ درجه سانتیگراد به مدت نامحدود می‌تواند صورت بگیرد.

آشکارسازی پس از تکثیر

پس از الکتروفورز محصول PCR توسط ژل آگارز، ژل آگارز با محلول اتیدیوم بروماید (EtBr) رنگ‌آمیزی می‌شود و سپس در زیر تابش نور UV محصول PCR در ژل به‌صورت رنگ صورتی مشاهده می‌شود. EtBr سالهای زیادی برای رویت اسیدهای نوکلئیک در ژل آگارز استفاده‌شده است. همچنین EtBr بالقوه جهش‌زا هست و سبب جهش در سلول‌های زنده می‌شود؛ بنابراین ژل باید در یک ظرف زباله اختصاصی گذاشته شود که با علامت خطر نشان‌دار شده و تاریخ‌گذاری شود وبه بخش محیط‌زیست و ایمنی تحویل داده شود.

انواع PCR استاندارد

تغییر در تکنیک پایه ای PCR منجر به پیشرفت واریانت های PCR شده است:

۱–PCR ویژه آلل یا چها ر پرایمری (ARMS PCR)

PCR ویژه آلل امکان شناسایی مستقیم جهش نقطه‌ای در DNA را می‌دهد. این تکنیک به دانش قبلی درباره توالی DNA هدف مثل اختلاف بین آلل ها نیاز دارد و از پرایمری با انتهای ۳' ناجور دربرگیرنده تغییرات تک نوکلئوتیدی بهره می‌برد. دو پرایمر ویژه آلل، یکی برای هر آلل موردنیاز است که یکی از دو پلیمورفسیم تک نوکلئوتیدی موجود در انتهای ۳' را پوشش دهد.

۲– PCR نامتقارن

این واریانت PCR ترجیحاً برای تکثیر یکی از رشته‌های مولکول DNA هدف با استفاده از غلظت نابرابر پرایمر بکاربرده می‌شود به‌طوریکه چنین همانندسازی با استفاده از پرایمر مازاد رخ می‌دهد.

۳– PCR کلونی

نوعی از PCR است که به‌طور روتین در مطالعات ژنوم باکتریایی استفاده می‌شود. درج پلاسمیدهای دارای تعداد نسخه بالا مثل pUC18، pUC19 یا pBluescript در باکتری‌ها به‌طور معمول برای هدف‌های مختلف انجام می‌شود و PCR کلونی سریعاً درج این پلاسمیدها را غربالگری می‌کند. این روش به تولید مقدار کافی محصول مطلوب PCR به‌منظور توالی یابی کمک می‌کند.

٤– PCR دژنره

واریانتی از PCR است که پرایمرهای دژنره را جهت تکثیر توالی ناشناخته پیوسته به‌توالی DNA شناخته‌شده، به‌کار می‌گیرد. پرایمرهای دژنره بر پایه همولوژی ژن شناخته‌شده و توالی یابی شده طراحی می‌شوند. این تکنیک شناسایی اعضای جدیدی از خانواده ژنی یا ژن‌های اورتولوگ از ارگانیسم مختلف را امکان‌پذیر می‌سازد.

۵- PCR هات استارت

این تکنیک شامل مراحل PCR سنتی است به جز اینکه پلیمراز Taq زمانی به مخلوط واکنش اضافه می‌شود که بقیه اجزای PCR تا دمای ذوب DNA حرارت داده‌شده‌اند، بنابراین از تکثیر غیراختصاصی در دماهای پایین جلوگیری می‌کند.

٦- PCR معکوس

PCR مرسوم به جفت پرایمر مکمل برای هردو انتهای[۳] از DNA هدف نیاز دارد، ولی PCR معکوس تکثیر DNA را فقط با یک توالی شناخته‌شده امکان پذیر می سازد. این تکنیک نیازمند یک برش و اتصال محدودکننده در توالی است که منجر به تشکیل قطعه DNA حلقوی می‌شود که می‌توان از توالی شناخته‌شده آن به‌عنوان جایگاه اتصال پرایمر جهت انجام PCR استفاده کرد.

۷- PCR مینی پرایمر

به پلیمراز Taq نیاز دارد که کارایی آن در سنتز DNA به علت نیاز به پرایمرهای طویل (۲۰-۳۰ نوکلئوتید) از دیگر آنزیم‌های همانندساز کمتر است؛ بنابراین روش جدید PCR بنام PCR مینی پرایمر توسعه یافته است. در این PCR بر خلاف روش PCR استاندارد ازپلیمراز Taq مهندسی‌شده و مینی پرایمر با طول کوتاهتر که معمولا" ۱۰ نوکلئوتید است استفاده‌شده است. این روش در بیولوژی میکروبی جهت شناسایی توالی اسیدهای نوکلئیک محافظت‌شده طی تکامل مثل ١٦S rRNA ۱۸S rRNA) یوکاریوتی) سودمند است که با PCR استاندارد غیرممکن است.

۸- PCR چندگانه

PCR چندگانه در بسیاری از زمینه‌های آزمون DNA مثل آنالیز حذف‌ها، جهش‌ها و پلی مورفیسم ها، میکروساتلایت ها (ریز ماهواره‌ها) و SNP ها به‌طور موفقیت‌آمیزی استفاده‌شده است. این تکنبک از مجموعه پرایمر چندگانه در داخل یک مخلوط منفرد PCR جهت تولید آمپلیکون با اندازه‌های مختلف و اختصاصی توالی‌های مختلف DNA، استفاده می‌کند. این واریانت PCR چندین ژن را در یک آزمون منفرد درمدت زمان بسیار کوتاهی مورد هدف قرار می‌دهد.

۹- PCR آشیانه (PCR با پرایمر داخلی)

PCR آشیانه شامل ۲مجموعه از پرایمر است که در دو مسیر پی‌درپی واکنش PCR استفاده می‌شود. عملکرد مجموعه دوم پرایمر این است که به جایگاه هدف دوم در داخل توالی تکثیرشده با مجموعه اول پرایمر اتصال می یابد.

۱۰- Touchdown PCR

این تکنیک قادر است با استفاده از انجام مراحل اولیه چرخه‌های PCR در دماهای بالا از تکثیر توالی‌های غیراختصاصی ممانعت کند و در چرخه‌های بعدی دمای آنلینگ رفته‌رفته کاهش می‌یابد. این روش امکان اتصال اختصاصی پرایمر در بالاترین دما را می‌دهد.

مزایا و معایب تکنیک PCR

- به خاطر اینکه تکثیر با پرایمرهای مکمل، انجام می‌شود تکنیک بسیار اختصاصی است.
- به خاطر تولید میلیون‌ها کپی از طریق تکثیر در کمتر از سه ساعت، نسبتاً سریع است. براساس نوع ماده ژنتیکی (DNA یا RNA) تغییرات مناسب را می‌توان به راحتی اعمال کرد و تکنیک به راحتی برای طیف وسیعی از کاربردها تقریباً در تمام رده‌های موجودات از میکروارگانیسم‌ها تا سلسله گیاهان و جانوران قابل استفاده است.
- اولین و مهم‌ترین عیب، هزینه آن است. در مقایسه با آزمون‌های سنتی تکنیک گران قیمتی است. انجام PCR به درجه بالایی از مهارت و تخصص نیاز دارد.
- جهت انجام PCR باید دانش دقیقی از بیوانفورماتیک برای طراحی پرایمرها، برای واردکردن جایگاه‌های محدودکننده و غیره داشت.
- این تکنیک فقط در آزمایشگاه‌هایی قابل دسترس است که به‌طور ویژه ای تکنیک‌های آزمون و آنالیز بیولوژی مولکولی رادارند.
- در بیشتر مواقع اسیدهای نوکلئیک از ارگانیسم‌های غیرزنده نیز همراه با نمونه مورد نظر تکثیر می‌شوند. آنالیز نمونه‌ها پس از PCR پژوهشگر را در معرض مواد شیمیایی مضری مثل EtBr، رنگ‌ها، فلوئوروکروم ها و نور UV قرار می‌دهد که سرطان‌زا هستند.

منابع:

1. Singh Jagtar Birbian, Niti Sinha, Shweta, Goswami Akshra: A critical review on PCR, its types and applications. International Journal of Advanced Research in Biological Sciences, 1(7):65-80, 2014.
2. Chou Quin, Russell Marion, E.Birch David, Raymond Jonathan, Bloch Will: Prevention of pre-PCR mis-priming and primer dimerization improves low-copy-number amplifications. Nucleic Acids Research:((20):(7)1717-1723:1992.
3. S.Chamberlainl Jeffrey , A.Gibbs1Richard, E.Ranierl Joel, Nga Nguyen , Caskey C.Thomas : Deletion screening of the Duchenne muscular dystrophy locus via multiplex DNA amplification. Nucleic Acids Research:(16): 1988.
4. D. BROCK THOMAS AND FREEZE HUDSON: Thermus aquaticus gen. n. and sp. n., a Nonsporulating Extreme Thermophile. JOURNAL OF BACTERIOLOGY:: 289-297:1969.
5. Diefenbach C.W, Lowe T.M.J, Dveksler G.S: General concepts for PCR primer design. Downloaded from genome.cshlp. Published by Cold Spring Harbor Laboratory Press org on May 9:2016 .