بهارمرادی جوشقان،کارشناس بیوتکنولوژی

واکنش زنجیره ای پلیمراز؛
اصول، چالش ها و نوآفرینی های تازه

از زمانی که دانشمند بیوشیمیست، کری مولیس روش واکنش زنجیره ای پلیمراز یا PCR (Polymerase chain reaction) را در سال ۱۹۸۳ ابداع کرد، این روش جایگاه ویژه ای در پژوهش های علوم زیستی پیدا کرد، بطوری که باعث شد شناسایی ژن ها، تکثیر و آنالیز آنها با سرعت بسیار بالاتری انجام شود. مولیس در ادامه پیشرفت هایش توانست همراه با مایکل اسمیت جایزه نوبل بیوشیمی را در ۱۹۹۳ از آن خود کند. هم اکنون PCR دقیق ترین و قابل اعتماد ترین روش در تشخیص آزمایشگاهی بوده و از آن بعنوان استاندارد طلائی (Gold Standard) یاد می شود.

اصول اولیه کار در واکنش زنجیره ای پلیمراز، سیکل های حرارتی شامل گرم و سرد شدن های پی در پی است که طی آن الگو DNA در حرارت های مختلف قرار گرفته و تکثیر می شود. تغییر شرایط دمایی شامل سرد و گرم شدن های متوالی توسط دستگاه خودکاری بنام «ترموسایکلر» انجام می شود. ۲جزء اصلی در فرآیند PCR، پرایمر و آنزیم پلیمراز مقاوم به حرارت هستند. برای هر ژن یک جفت پرایمر طراحی می شود. هر پرایمر شامل ۱۴-۲۲ نوکلئوتید است که یکی مکمل ناحیه مجاور ژن مورد نظر و دیگری مکمل چنین ناحیه ای در رشته مقابل آن بوده و حین فرآیند با آن هیبرید می شود. ناحیه مورد جستجو در ژن نیز، بهتر است طولی بین ۱-۳ کیلو باز داشته باشد تا کار اتصال پرایمرها به درستی انجام شده و از اتصالات غیر اختصاصی جلوگیری شود. در شکل شماره ۱، مراحل ۳ گانه در یک سیکل این واکنش را ملاحظه می کنید که هر کدام شرایط دمایی مخصوص به خود دارند. تنظیم دقیق دما در هر کدام از مراحل ۳گانه کلید رسیدن به بازدهی مناسب در تکثیر ژنوم مورد نظر است. با اتمام سیکل اول واکنش، قطعات سنتز شده خودشان میتوانند با هم جفت شده و ۲رشته ای شوند. این قطعات نیز همانند ژنوم اولیه، الگوی سنتز نسخه های بعدی می شوند. این سیکل های مشابه ۲۰-۴۰ بار تکرار شده و در انتهای کار، ژنوم موجود در نمونه اولیه تکثیر لگاریتمی شده است. تعداد ژنوم تکثیر شده، توانی از تعداد سیکل ($2^{\text{cycle number}}$) خواهد بود.

مواد مورد استفاده در PCR

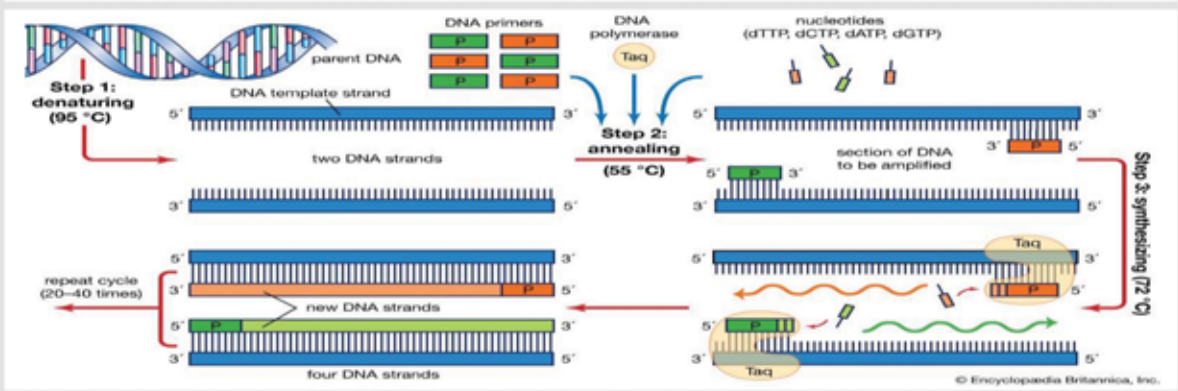
۱- آنزیم پلیمراز مقاوم به حرارت (Taq polymerase)
۲- DNA یا RNA الگو
۳- پرایمر (مکمل هر دو رشته DNA الگو، forward و reverse)
۴- واحدهای نوکلئوتیدی ۴گانه (dNTP یا deoxynucleotide phosphates)
۵- بافر PCR

واکنش زنجیره ای پلیمراز در محیط بافری مایع حاوی یون های دو و تک ظرفیتی منیزیم و پتاسیم انجام می شود. واکنش در لوله های درب دار کوچک ۰٫۲ تا ۰٫۵ میلی لیتری انجام می شود. حجم مایع واکنش بین ۱۰ تا ۲۰۰ میکرولیتر می تواند متغیر باشد.

بافر PCR به شکل معمول شامل این مواد است [3]:

- 10-50 mM pH=8.3 Tris-HCl
- KCl up to 50 mM
- MgCl2+ 1.5 mM or higher

شکل شماره ۱) مراحل اصلی در واکنش زنجیره ای پلیمراز



1- Denaturation (تغییر ماهیت یا واسرشتی): دمای ۹۴-۹۶ درجه سانتیگراد برای جدا شدن ۲ رشته DNA مورد آزمایش.

2- Annealing (سرد کردن): دمای ۵۴-۵۵ درجه برای اتصال پرایمرها به محدوده مکمل بر روی ژن

3- Elongation (Synthesizing or Extension) (گسترده سازی): دمای ۷۲ درجه برای همانندسازی ۲ رشته.

- each primer 0.2-1 micro M
- dNTP 50-200 micro M
- gelatin / BSA up to 100 microgram/ml
- non-ionic detergent (tween 20) / nonidet p-40 / tritom x-100

در پایان کار، اگر نمونه اضافه شده به لوله حاوی ژن مورد جستجو باشد، میلیاردها نسخه سنتز شده یکسان از آن ژن را خواهیم داشت. در این صورت محصول تکثیر شده قابل ردیابی است. یکی از مرسوم ترین روش ها در تشخیص قطعات تکثیر شده ژن ها، انتقال محتویات لوله ها به بستری بنام «ژل آگارز» است. این ژل دارای ساختار مشبک بوده و ذرات مختلف از جمله قطعات DNA می توانند در آن بر اساس سایز و وزنشان حرکت کرده و تفکیک شوند. نام این روش «ژل الکتروفورز» است.

وجود خطاهای انسانی در حین ردیابی محصول PCR باعث شد دانشمندان با ابداع روش های جدیدتر به آن سر و شکل ماشینی بیشتری بدهند. در همان زمان که کری مولیس سرخوش از دریافت جایزه نوبل بود، Higuchi و همکارانش در شرکت Roche موفق به ابداع روش Real-tim PCR شدند. این روش نیاز به انجام الکتروفورز بعد از PCR را مرتفع کرد.

qPCR (روش کمّی یا Quantitative)

یک روش کمّی است که با عنوان Real-tim PCR نیز شناخته می شود. این روش برای سنجش مقدار محتوای ژنتیکی در نمونه های ناشناخته بکار می رود. این روش در تشخیص میزان حدت عفونت ها مانند عفونت کروناویروس بر سایر روش های ملکولی ارجحیت دارد[4]. در روش Real-tim PCR در هر لحظه می توان از تکثیر ژن مورد نظر و میزان تکثیر آن مطلع شد. در واقع این روش دیگر نیازی به الکتروفورز ندارد و به جای آن از رنگ فلوئورسانس (فلوئوروفور) + فلوئورومتر استفاده می کند.

رنگ فلوئورسانس در اینجا قابلیت اتصال غیر اختصاصی به DNA دو رشته ای را دارد و بعد از اتصال بعنوان ریپورتر عمل می کند. به طوریکه پس از اتصال به DNA دو رشته ای از خود نور ساطع می کند. ۲ نمونه از این رنگ ها سایبرگرین و اواگرین هستند. زمانی که سیکل های تکثیر DNA بشکل زنجیره ای جلو می رود، تعداد DNA های دو رشته ای بیشتر شده، میزان اتصال رنگ فلوئورسانس به آنها بیشتر و میزان نور ساطع شده هم بیشتر می شود. وظیفه دستگاه فلوئورومتر هم اینست که شدت نور ساطع شده در هر لحظه را به عدد تبدیل کند.

در روشی دیگر بجای رنگ فلوئورسانس از "پروب های وابسته به نوکلئاز" استفاده می شود. به یک انتهای این پروب رنگ فلوئورسانس و طرف دیگر آن یک خاموش کننده فلوئورسانس (کوئنچر) متصل شده است. زمانیکه ژن مورد بررسی در نمونه موجود باشد، پس از جدایی ۲ رشته، پرایمر به مکان مورد نظر چسبیده و پروب نیز به مکانی جلوتر از آن متصل می شود. سپس در امتداد پرایمر و حین ساخت رشته مکمل زمانیکه

آنزیم ترانسکریپتاز به پروب می رسد، نوکلئوتید های پروب را با خاصیت نوکلئازی تک به تک جدا و در مایع آزاد می کند. در این حالت ملکول فلوئورسانس از خاموش کننده (کوئنچر) فاصله گرفته و شروع به تابش نور می کند. سپس این نور که رفته رفته در سیکل های بالاتر شدیدتر می شود، توسط فلوئورومتر دستگاه به عدد تبدیل می شود.

میزان پیشرفت سیکل ها و تکثیر ژن در نمونه را به صورت نمودار می توان نمایش داد. زمانی که میزان فلوئورسانس تولید شده به سطح قابل تشخیص و بالاتر از آن برسد، دستگاه قادر به شناسایی و ثبت آن می باشد. این سطح را اصطلاحاً Cycle Treshold یا Ct می نامند[5]. اگر ژن مورد بررسی در نمونه اولیه به لحاظ تعداد زیاد باشد، فلوئورسانس زودتر خط Treshold را رد می کند. بعنوان مثال اگر از بیمار مبتلا به Covid-19 در مرحله حاد بیماری که میزان ویروس در حلق و بینی بیمار بالا است نمونه برداری شود، هنگام ردیابی با PCR، می توان فلوئورسانس را خیلی زود و در سیکل های پائین تر مشاهده کرد (عدد Ct پائین می آید). اما در مراحل ابتدایی و انتهایی بیماری که میزان ویروس کرونا در نمونه بیمار کم است، عدد Ct در آزمایش بالا می رود. در واقع در آزمایشگاه ها از عدد Ct برای بیان شدت عفونت یا بیماری استفاده می شود و پزشک مربوطه بر اساس آن توصیه های درمانی و مراقبتی لازم را به بیمار ارائه می کند.

به دنبال ابداع PCR، واکنش مشابهی بنام RT-PCR (Reverse-Transcription PCR) نیز ابداع شد که مورد استفاده آن در تکثیر و تشخیص قطعات mRNA یا ژنوم RNA برخی ویروس ها است. RT-PCR یک مرحله اولیه دارد برای تبدیل قطعه RNA به DNA و باقی مراحل آن کاملاً شبیه PCR است. این تبدیل توسط آنزیم RT (Reverse Transcriptase) انجام شده و قطعه RNA مورد نظر به cDNA (complementary DNA) تبدیل شده و پس از آن تکثیر می شود.

کاربرد واکنش زنجیره ای پلیمراز در پزشکی:

استفاده در پزشکی قانونی و کشف جرم از موارد مهم استفاده این روش است که با یافتن مقادیر بسیار اندکی از ترشحات بدن یا تارهای مو در مکان وقوع جرم و تطابق آن با محتوای ژنتیکی مجرمین امکان کشف جرم را فراهم می کند.

- تشخیص روابط خانوادگی که در آن والد یا فرزند اطلاع دقیق از وضعیت خانوادگی خود ندارند نیز به مدد این روش امکان پذیر می شود.
- آزمایشات ژنتیکی قبل از ازدواج نشان می دهند که زوجین حامل ژن بیماری هایی مثل تالاسمی و هموفیلی هستند یا خیر و احتمال ابتلای فرزندان آنها به بیماری چقدر است.
- درتشخیص عفونت عوامل مختلف باکتریایی، ویروسی، قارچی و انگلی در حیوان و انسان یا در منابع آب و غذا می توان از PCR استفاده کرد.

گسترش استفاده از PCR در آزمایشگاه باعث شد تا اشکال مختلفی از آن ابداع شود:

Multiplex PCR: این کار با استفاده همزمان از چند سری مختلف پرایمر انجام می شود. کاربرد این روش زمانیست که به صورت همزمان به دنبال هدف های متعدد در ژنوم هستیم مانند ردیابی اگزون ها، پلی مورفیسم و جهش های یک ژن. به همین علت مشکلات همیشگی کار PCR مانند مهار شدن پرایمرها به واسطه تشکیل دایمر و کاهش سریع مواد داخل لوله در آن بیشتر دیده می شود. از دیگر موارد مهم استفاده از آن در ژنوتایپینگ SNP (Single Nucleotide Polymorphysm) و ردیابی میکرو ساتلایت ها (قسمت های تکرار شونده داخل یک ژن) است.

Nested PCR: اگر بدنبال قطعاتی از DNA یا RNA بگردیم که فراوانی کمی دارند بناچار با پیچیدگی های بیشتری رودررو خواهیم بود. این نوع از PCR که به آن روش تودرتو اطلاق می شود روشی است که هدف آن کاهش خطای اتصال پرایمرها به نقاط غیر اختصاصی است. در واقع PCR در اینجا ۲ راند متوالی را طی می کند. ابتدا با یک سری پرایمر با اختصاصیت کمتر کار شروع شده و قطعات تکثیر شده آن در راند دوم کار با پرایمرهای اختصاصی ردیابی می شوند.

Colony PCR: بعد از ایجاد ترانسفورماسیون در یک باکتری یا مخمر، می توان با این روش پی برد که قطعه ژن یا پلاسمید مورد نظر ما وارد میکروارگانیسم شده یا خیر. تفاوت آن با PCR معمولی در اضافه شدن یک مرحله ابتدایی جهت لیز شدن باکتری یا مخمرها توسط حرارت است که یا در لوله PCR همزمان با مرحله heating خود PCR یا بصورت جداگانه در ظرفی دیگر انجام می شود.

Digital droplet PCR: گاهی نیاز است مقادیر بسیار اندک از محتوای ژنتیکی یک میکروارگانیسم را ردیابی کرده

و به میزان قطعی آن در نمونه دست پیدا کنیم. در این روش دیگر نیازی به رسم منحنی های استاندارد وجود ندارد اما انجام آن پیچیدگی های خاص خود را دارد. در واقع اینجا هم مانند Real-time PCR یک کار کمّی (Quantitative) انجام می شود. ابتدا نمونه موجود بشکل متوالی رقیق سازی شده و رقت های پائین تر در ظروف یا چاهک های مجزا همراه با مواد لازم PCR وارد دستگاه ترموسایکلر می شود. سپس آخرین ظرفی که دارای سیگنال فلوئورسانس است را به عنوان واحد در نظر گرفته و با ضرب در ضریب رقت، میزان میکروارگانیسم در نمونه اولیه محاسبه می شود. در این روش در واقع از توزیع احتمال پواسون استفاده می شود. کاربرد آن در تشخیص مقادیر بسیار کم از پاتوژن های موجود در مواد غذایی، عفونت های پس از عمل جراحی یا پیوند عضو، مقاومت های میکروبی و غیره است.

PCR array: این روش در غربالگری پانل های mRNA و میکرو RNA (miRNA) بشکل کمّی کاربرد دارد. بررسی نوع و میزان miRNA بویژه در مقایسه سلول سالم و بیمار بسیار حائز اهمیت است. از آنجا که Pcr array در تشخیص کمّی miRNA قابلیت تکرار پذیری بالایی دارد، نسبت به روش microarray oligonucleotide microchip برتری دارد.

ChIP PCR (Chromatin immunoprecipitation):

در این روش PCR کمک می کند تا نحوه و میزان برهمکنش DNA-protein را مانند فاکتور رونویسی، کوفاکتورهای مختلف و هیستون ها با نقاط خاصی از DNA در کروماتین یا برهمکنش protein-protein در آن مکان مشخص شود. در واقع با ChIP تنظیمات بیان ژن و تغییرات اپی ژنتیکی با این روش مورد بررسی قرار می گیرد. روش کار ChIP به اینصورت است که در زمان های مختلف از سیکل سلولی، ژنوم سلول استخراج شده و با آنزیم های اندونوکلئاز آن را هضم می کنند. در این حالت به هر کدام از قطعات DNA پروتئین های مختلفی متصل شده است. با افزودن آنتی بادی علیه این پروتئین ها و رسوب کمپلکس پروتئین –DNA آنها را از هم مجزا می کنند. سپس قطعات DNA که به آنها متصل بوده را با PCR کمّی مورد سنجش قرار داده و متوجه می شوند کدام پروتئین با کدام قطعه از DNA و در چه زمانهایی بیشترین برهمکنش را داشته است.

چالش های تکنیکی PCR

♦ دما و زمان denaturation:

بسته به ماهیت DNA الگو و نوع بافر بکار رفته در PCR، دمای دناتوراسیون ۹۴-۹۸ درجه سانتیگراد و طول زمان آن ۱-۳ دقیقه است. اگر در بافر PCR غلظت NaCl از ۱۵۰ میلی مولار بیشتر باشد، دناتوره شدن دو رشته DNA در دمای زیر ۱۰۰ درجه سانتیگراد انجام نمی شود و در این حالت آنزیم Taq polymerase به غیر فعال شدن در دمای بالا حساس تر می شود. این آنزیم در دمای ۹۵ درجه بعد از ۳۰ دقیقه نیمی از فعالیتش را از دست می دهد. بهمین علت رسانیدن دمای دناتوراسیون به زیر ۹۰ درجه کمک زیادی به پایداری آنزیم پلیمراز می کند. اگر طول DNA هدف کمتر از ۳۰۰ جفت باز باشد، می توان دمای دناتوراسیون را تا حدود ۸۸ درجه هم کاهش داد و مطمئن شد که فرآیند تا سیکل ۴۰ براحتی پیش می رود. از طرفی اگر زمان دناتوراسیون نیز طولانی شود باز هم فعالیت پلیمراز را مختل می کند. بنابراین توجه همزمان به دما و زمان در این مرحله بسیار مهم است. استفاده از برخی مواد مانند گلیسرول، فرمامید، بتائین یا DMSO دناتوراسیون دو رشته را تسهیل کرده و ضمن بالا تر بردن اختصاصیت تکثیر ژن می تواند زمان و دمای مورد نیاز این مرحله را کاهش دهد.

♦ دما و زمان annealing:

مناسب ترین دمای جفت شدن پرایمر با تک رشته های DNA حدود ۶۰-۶۴ درجه است، یعنی ۵-۷ درجه کمتر از محدوده پائین دمای ذوب پرایمرها. اینجا هم دمای مورد نیاز برای جفت شدن به طول پرایمر و میزان C+G در آن دارد. پائین آوردن دما از میزان فوق باعث اتصال پرایمر به نقاط غیراختصاصی می شود و بالا رفتن آن هم کیفیت اتصال پرایمرها را کاهش می دهد. اگر جفت پرایمرها در دمای Tm اختلاف زیادی داشته باشند، نتیجه مناسب به دست نمی آید.

♦ طراحی پرایمر[6]:

پرایمر در PCR عامل تعیین کننده برای شروع فعالیت آنزیم پلیمراز است. طول پرایمرها معمولاً ۱۸-۲۲ نوکلئوتید است. طول بیشتر باعث اشکال در Annealing شده و طول کمتر اتصالات غیر اختصاصی را بیشتر می کند.

پرایمرهای ساخته شده دارای دمای ذوب یا Tm مشخص و قابل محاسبه هستند. در این دما نیمی از پرایمرها در محیط آزمایش با DNA جفت شده و نیمی از آن آزاد است.

سایر عوامل تاثیر گذار در نقطه ذوب پرایمر شامل مولاریته میزان پرایمر، غلظت یون +Na و pH محیط آزمایش هستند.

پرایمرهای درست طراحی شده در کمتر از ۳۰ ثانیه با DNA مکمل خود جفت (anneal) می شود. طول مناسب، میزان مکمل بودن با توالی هدف و محتوای کافی G+C در annealing هر چه بهتر موثر است.

♦ **دما و زمان elongation:**

مشخصات این مرحله، دمای ۷۰-۷۲ درجه و به مدت ۰٫۵-۳ دقیقه است. در این محدوده دمایی elongation می تواند با سرعت ۱۰۰ نوکلئوتید / ثانیه انجام شود. در این حالت ساخت رشته مکمل توالی مورد نظر تا 2-3 kb براحتی انجام می شود.

بافر وغلظت مواد در آن: اگر KCl بیشتر از مقدار ذکر شده در آزمایش باشد باعث مهار آنزیم پلیمراز می شود. مقادیر خارج از اندازه +Mg2 هم بر دمای ذوب و annealing پرایمر، اختصاصیت کار و کارکرد پلیمراز تاثیر منفی می گذارد. با این حال غلظت +Mg2 باید ۰٫۵-۲٫۵ میلی مولار بیشتر از غلظت dNTPs باشد. وجود مقادیر مشخصی از دترجنت غیر یونی مانند Tween 20 در بافر کمک میکند تا از تمایل قطعات آنزیم برای چسبیدن به هم کم کند. غلظت مناسب برای پرایمرها ۰٫۲-۱ میکرومولار است. غلظت های بالاتر باعث اتصال آنها به هم یا به مکان های غیر اختصاصی بر روی ژن و تولید محصولات نامرتبط می شود. غلظت dNTPs ۲۰-۲۰۰ میلی مولار مناسب است و مقادیر بیشتر از آن باعث مهار واکنش آنزیمی می شود.

تعداد سیکل

به شکل معمول نتیجه لازم در سیکل ۲۵-۳۵ بدست می آید. اما اگر تعداد کپی اولیه DNA در نمونه کمتر از ۱۰ عدد باشد، حدود ۴۰ سیکل لازمست تا بتوان نتیجه را بدرستی تفسیر کرد. با این حال ممکن است برخی عوامل در رسیدن به تعداد سیکل مناسب اختلال ایجاد کنند. مصرف شدن تدریجی مواد اولیه مثل dNTPs، آنزیم پلیمراز و پرایمر و یا تجزیه شدن آنها از این موارد است. تکثیر نواحی غیر اختصاصی هم باعث می شود این مواد سریعتر مصرف شوند. با اضافه شدن هر نوکلئوتید به رشته DNA در حال ساخت، یک مولکول پیروفسفات آزاد می شود و انباشت تدریجی آنها در سیکل های بالا اثر مهار کنندگی بر روی آنزیم پلیمراز دارد. غلظت مناسب مواد اولیه می تواند فاز plateau در تکثیر ژنوم را به تعویق بیاندازد. از طرفی بهم چسبیدن (self-annealing) پرایمرها یا قطعات تکثیر شده باعث میشود تعداد دفعات تکثیر در واکنش، از یک عدد خاص بالاتر نرود. ممکنست پرایمر های مشابه هم (همولوگ) دایمر شوند و یا یک ریورس با یک فوروارد (هترولوگ) دایمر تشکیل دهند.

آلوده شدن با اسید نوکلئیک بیگانه

وجود آلودگی به DNA یا RNA بیگانه ولو در مقادیر اندک نیز می تواند باعث اختلال در کار PCR شود. این آلودگی ها در ژل الکتروفورز خود را بصورت باندهای منتشر و پخش شده نشان می دهند. منشاء این آلودگی ها می تواند وسائل آلوده، هوای آلوده و یا کار کردن غیر اصولی حین آزمایش باشد. برای اجتناب از این آلودگی ها، اتاق کار PCR می بایست جدا از سایر قسمت های آزمایشگاه باشد. محلول های آن در یخچال جداگانه ای نگهداری شوند. وسائل آن جداگانه شستشو و نگهداری شوند. میز و محیط کار آن قبل از شروع کار با سدیم هیپوکلریت (بلیچ یا وایتکس) ۱٪ بمدت ۳۰ دقیقه [7] گندزدایی شود. کلیه پرسنل این آزمایشگاه باید آموزش های جداگانه ای در این ارتباط ببینند. کسانی که رعایت بهداشت فردی را نمی کنند یا حین کار از ماسک و دستکش مناسب استفاده نمی کنند نباید در این آزمایشگاه مشغول به کار شوند چون باعث آلودگی و اختلال در کسب نتایج صحیح می شوند.

چالش ها و محدودیت های واکنش زنجیره ای پلیمراز

امروزه انتظار علم پزشکی از فناوری های ملکولی اینست که در سریع ترین زمان ممکن، نمونه های بیولوژیکی را آزمایش و به پاسخ برسد. بعنوان مثال عفونت کرونا را به سرعت و در بالین بیمار یا در منزل به شکل قطعی تشخیص داده و روند درمان را بر اساس آن آغاز نماید. همان طور که پیداست فراهم کردن شرایط برای این روش

شکل۲) PCR قابل حمل و قابل اعتماد

آزمایشگاهی محدودیت های خود را داشته، تجهیزات و مواد آزمایشگاهی خاصی نیاز دارد که امکان انجام آن در بالین بیمار (Point-of-Care) را با چالش روبرو می کند. از آن گذشته برای دستیابی به نتایج صحیح و قابل اعتماد، پرسنل آموزش دیده و با تجربه نیاز دارد. پاسخ PCR ساعت ها و حتی روزها به طول می انجامد و در بهترین شرایط حداقل ۲ساعت زمان نیاز دارد که انجام آن در خارج از آزمایشگاه نیز یک چالش بزرگ بوده و بویژه به بیماران مبتلا به کرونا حاد کمکی نمی کند. از اینرو به ناچار از روشهای موسوم به Rapid-test استفاده می شود که بیشتر مبتنی بر تشخیص آنتی ژن ویروس کرونا است.

با این رویکرد که بتوان به یک پاسخ سریع، صحیح و در منزل یا کنار تخت بیمار دست یافت، محققان دانشگاه کلمبیا در سال ۲۰۲۲ موفق به ابداع دستگاهی شدند که قادر است از طریق روشی موسوم به Nano PCR بسیاری از عفونت ها از جمله کرونا را در زمانی حدود ۲۳ دقیقه تشخیص دهد. این دستگاه وزنی کمتر از ۱ کیلوگرم داشته و کاملاً قابل حمل است. در این دستگاه بجای روش سنتی گرمایش الکتریکی، از پدیده plasmonic thermocycling استفاده شده و از تبدیل انرژی نور به حرارت (Photothermal process) برای گرم کردن لوله ها بهره می برد. این کار را نانوپارتیکل هایی از جنس طلا، نقره یا تیتانیوم انجام می دهند که همراه با سایر مواد به لوله ها افزوده می شوند. این یعنی تشخیص دقیق عفونت در کنار تخت بیمار و در کمترین زمان ممکن که در نوع خود ارزشمند است.

شرکت Visby Medical در آمریکا یک Personal PCR ساخته که در کف دست انسان جا شده و قادر است عواملی مانند کرونا و عفونت های مقاربتی (سوزاک، کلامیدیا و ترکوموناس) را در هر مکانی (Point-of-Need) و در کمتر از نیم ساعت تشخیص دهد. کار با ایت دستگاه ساده بوده و نیاز به مهارت یا تجربه خاصی ندارد (شکل شماره ۲).

در ۲۰۲۲ نیز یک شرکت آمریکایی و اتریشی با همکاری هم نسخه ابتدایی دستگاهی را ساخته اند که با استفاده از فناوری ریز تراشه دارای میکروسیالات، زمان انجام ۴۰ سیکل در RT-PCR را از حدود ۵۰ دقیقه به کمتر از ۱۰ دقیقه کاهش می هد. این ریز تراشه اطلاعات هر ۲ مرحله سیکل های گرمایی و تشخیص نور فلوئورسانس ناشی از تکثیر قطعات DNA را ثبت و آن را به دیتای نهایی تبدیل می کند.[8]

منابع:

1. PCR Optimization for Beginners: A Step by Step Guide . Research in Molecular Medicine. Asif S, Khan M, Arshad MW, Shabbir MI. 2021; 9(2):81-102.

2. Research techniques made simple: Polymerase chain reaction. Garibyan L, Avashia N. J Invest Dermatol. 2013; 133(3).

3. Real-Time PCR: Revolutionizing Detection and Expression Analysis of Genes. Current Genomics. S.A. Deepak, K.R. Kottapalli, R. Rakwal, G. Oros, K.S. Rangappa, H. Iwahashi, Y. Masuo and G.K. Agrawal. 2007, 8, 234-251.

4. Minzhe Shen et al. Recent advances and perspectives of nucleic acid detection for coronavirus: Journal of Pharmaceutical Analysis, Volume 10, Issue 2, April 2020.

5. Shrestha I et al. Increasing SARS-CoV-2 RT-qPCR testing capacity by sample pooling. Int J Infect Dis. 2021 Feb;103:19-22.

6. Bustin SA, Mueller R, Nolan T. Parameters for successful PCR primer design: Methods Mol Biol. 2020; 2065.

7. Evaluation of Different Cleaning Strategies for Removal of Contaminating DNA Molecules. Martina Nilsson, Hanne De Maeyer, Marie Allen. Genes (Basel). 2022 Jan; 13(1).

8. Ultra-rapid real-time microfluidic RT-PCR instrument for nucleic acid analysis. Renna L. Nouwairi et al. Lab on a Chip. Issue 18, 2022.