غلامرضا هدایتی؛ کارشناس نظارت و ارزیابی، مدیریت امور آزمایشگاه ها،
دانشگاه علوم پزشکی مشهد

مروری بر PCR در آزمایشگاه های مولکولی تشخیص طبی

در این مقاله ابتدا به زبان ساده از اصول و اهداف روش می گوییم، آنگاه نمایی ساده و کلی به جهت آشنایی با تکنیک از فرایند کارPCR و درپایان به چندکاربرد از روش های تشخیصی اشاره شده است.

همان طور که می دانیم پایه و اساس زندگی هر سلول به مواد موجود در هسته وابسته است. اولین بار در سال ۱۷۱۰میلادی وان لون هوک منطقه مشخصی را که هسته نامید، در مرکز سلول های زنده یافت، اما اولین توصیف دقیق در مورد هسته را در سال۱۸۳۱میلادی رابرت بران ارائه داد. کشف ماده وراثتی DNA اولین بار توسط واتسون و کریک مطرح شد که زیر بنای همه ی پژوهش های سلولی و هسته سلول بود.

DNA یک مولکول ۲رشته ای موازی معکوس است و حاوی ترادف های نوکلئوتیدی که آنتی پارالل نامیده می شود.

هدف PCR، تکثیرنسخه هایی ازیک ژن است. PCR نخستین بار در سال ۱۹۸۳ توسط کاری مولیس ابداع شد و انقلابی در ژنتیک مولکولی به وجود آورد. همانند سازی DNA در واقع راز بقای موجود زنده است. چرا که طی این فرآیند، محتوای ژنتیکی سلول مضاعف شده و به دو سلول دختر حاصل از تقسیم سلولی وارد می شود.

مکانیسم و روش کار در PCR از نظر اصول عملی تشابه زیادی به همانند سازی DNA دارد و در واقع برگرفته از آن است.

انجام آزمایش PCR

درمرحله اول،Pre-PCR با استخراج DNA(DNA Extraction) از نمونه مورد آزمایش، شرایط را برای مرحله بعدی که فرایند PCR است آماده می کنیم.

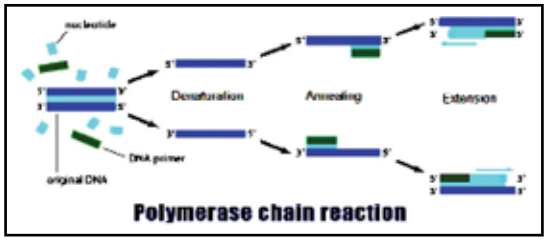
در مرحله PCR برای همانند سازی از ژن یا DNA استخراج شده، نیاز به مواد زیر داریم:

a. الگو DNA Template یعنی آن چیزی که باید همانند سازی شود.

b. بازهای A=T و C=G نوکلئوتید تری فسفات dNTP (ATP-CTP-GTP-TTP)

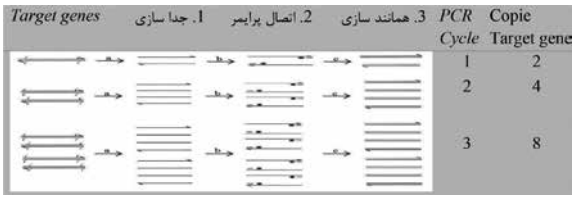
c. پرایمر اختصاصی ژن موردنظر (قطعه ای نوکلئوتیدی مکمل بخش ابتدایی ژن مورد جستجو) که محل تکثیر و البته اندازه قطعات تکثیر شونده را مشخص می کند.

d. DNA پلیمراز، DNA همان آنزیم کپی کننده است که پس ازاتصال پرایمرباDNA اولیه، همانندسازی را باعث می شود). در هر سیکل وفرایند PCR آن طور که در تصویر زیر مشاهده می شود:



ابتدا در مرحله جداسازی (Denturation) دو رشته DNA در شرایط مناسب در دمای ۹۶ درجه از هم جدا می شود، آنگاه در مرحله (Annealing) در دمای ۳۰.۶۵ درجه، اتصال یا چسبندگی پرایمر به بازهای '۵و "۳ رشته های باز شده DNA به صورت اختصاصی صورت می گیرد و در پایان مرحله تکثیر یا همانند سازی در شرایط مناسب دمای

۶۵.۷۵ درجه، نسخه جدید رونویسی می شود که می تواند بارها تکرار شود تا از یک رشته DNA با هر سیکل حرارتی، به طور تصاعدی ژن یا قطعه مورد نظر تکثیر یابد.



شکل۱) نمایی ساده و کلی از یک فرایند PCR

برای اولین بار تأمین این حرارت های پشت سر هم از سه بن ماری با سه دمای متفاوت انجام می گرفت، ولی امروزه با پیشرفت تکنولوژی می توان این درجه حرارت های بالا و متوالی را به طور سریع با دستگاهی به نام ترموسایکلر که به کمک این تکنیک آمده است، استفاده کرد و البته می توان دمای مناسب و تعداد سیکل های مورد نیاز را قبل از انجام کار برنامه ریزی کرد. واکنش زنجیره پلیمراز PCR، یک روش فنی بسیار قوی واختصاصی برای تکثیر و ازدیاد قطعات DNA در مدت زمان کوتاه و در یک محیط غیرحیاتی است.

این واکنش نظیر یک دستگاه فتوکپی زیستی تمام خودکار از روی یک نسخه DNA اولیه، ظرف مدت کوتاهی میلیون ها نسخه تکثیر می یابد تا در تشخیص بیماری های عفونی، وراثتی، جرم شناسی و... در اختیار پزشک یا پژوهشگر قرار گیرد.

مرحله آخر در یک آزمایش PCR، الکتروفورز است که برای مشاهده و یا به عبارتی detect نمودن قطعات تکثیر شده محصول PCR، می توان از الکتروفورز بر روی ژل آگاروز و رنگ آمیزی اتیدیوم بروماید استفاده کرد.

اتیدیوم بروماید در کنار نفوذ بالا و خاصیت فلورسنتی که در رشته های DNA دارد، می تواند به عنوان یک نشانگر عمل کند. DNA تکثیر شده در مراحل PCR در حضور اتدیوم بروماید رنگ نارنجی اتیدیوم که با رشته تکثیری باند شده، نور فلورسنتی ساطع می کند و در مقایسه با محل توقف کنترل مثبت، منفی و نیز Lader (خط کش یا شاخصی با وزن مولکولی معین)، جایگاه احتمالی قطعه DNA تکثیری را می توان تشخیص داد. آن طور که درشکل۲ مشاهده می شود.

شکل۲)تابش U.V به ژل آگاروز در دستگاه ترانس لومیناتور

مشکلات احتمالی در انجام PCR

آلودگی نمونه، یکی از چالش های مهم PCR است که به دلیل حساسیت فوق العاده و قدرت همانند سازی بالا هر قطعه خارجی که وارد محیط شود، ممکن است مورد تکثیر قرار گرفته و نتایج دور از واقعیت را به وجود می آورد. از این رو می بایست بسیار ایزوله و با دقت در این روش کار کرد و همچنین باید از شاهدهای مثبت و منفی و Lader استفاده کرد تا حتی المقدور از اشتباهات احتمالی آگاه شویم. البته در روش Nested PCR، جهت بالا بردن اختصاصیت روش با دو نوع پرایمر کار می شود تا درنتایج آزمایش از ایجاد آلودگی کاسته شود.

امروزه PCR در تشخیص جهش ها، سرطان ها ویافتن عامل بیماری زای عفونی نیز بسیار کاربردی است که علاوه بر سرعت در آنالیز و دقت در تشخیص، به پزشک در پیش آگاهی بیماری کمک فراوانی می دهد.

کاربردهای تکنیک PCR

می توان در بیولوژی مولکولی، به تشخیص بیماری های ژنتیکی ، میکروب شناسی تشخیصی، تشخیص سرطان و ... اشاره کرد.

تشخیص قبل از تولد جهت بیماری‌های ژنتیکی

پس از تهیه سلول های جنینی و تکثیر پرایمرهای ژن بیمار با پرایمرهای ژن سالم که با روش های ایمنو مولکولار انجام می شود ونتایج گزارش می شود، باتوجه به این که می توان از یک کپی DNA میلیون ها کپی تهیه کرد، از این روش برای تشخیص قبل از لانه گزینی استفاده می شود.

در این روش با انجام لقاح خارج از رحم و پس از تکثیر در مرحله ۸ یا ۱۶ سلولی، ۱ یا ۲ سلول آن را جهت آزمایش

PCR و پیدا کردن نقص ژنتیکی که قبلاً در خانواده مشخص شده است را انجام می دهند.

در پزشک قانونی و آسیب شناسی جنایی

کمترین مقدار DNA به دست آمده از یک قطره خون، یک مو و ... با روش PCR تکثیر شده و با نقشه ژنتیکی یا DNA فرد مظنون مقایسه می شود. در جرم شناسی بعداز انگشت نگاری، روشPCR بزرگترین تحول را ایجاد کرده است. همچنین در به دست آوردن نسبت پدر-فرزندی یا مادری، از این روش استفاده می شود.

بررسی عفونت های باکتریایی و ویروسی

به طور روزمره تشخیص عفونت های میکروبی در آزمایشگاه بیشتر با انجام کشت و یا بررسی وجود آنتی بادی در خون بیمار، آنالیز و آزمایش انجام می شود. استفاده از روش کشت وقت گیر بوده و در بررسی های ایمنولوژیکی نیز گاهی بدلیل عدم حساسیت لازم و نیز در مواقعی که بیمار در مراحل اولیه بیماری است(دوره کمون)نیز قابل اندازه گیری نیست. از این رو برای تشخیص مثلاً HIV پس از نمونه گیری از خون محیطی و استفاده از توالی اختصاصی ویروسHIV به عنوان پرایمر، همانندسازی آن قطعه ژن مورد نظر (درصورت وجود عفونت)صورت می گیرد و تشخیص HIV با حساسیت بالاو در سریع ترین زمان انجام می شود. در تشخیص بیماری سل نیز به همین ترتیب نمونه خلط و یا هر نمونه که پزشک احتمال عفونت سلی را می دهد، با شرایط صحیح گرفته می شود به همراه پرایمرهای اختصاصی مایکوباکتریوم توبرکلوزیس، طبق یک دستورالعمل مشخص، استخراج و PCR انجام می شود و قطعات DNA تکثیر یافته را مورد ارزیابی قرار می دهند.

این تکنیک علاوه بر سرعت بالایی که به تشخیص می دهد، از خطرات آلودگی برای پرسنل در حین تهیه لام از نمونه مورد نظر بسیار می کاهد.

منابع :

1-Nucleicacidsequence-basedamplification,Comptony.J. 2017.

2-Advances in Nucleic acid-based detection methods. Clin. Microbial Rev.5: 370-38 Wolcott. M.j. 2019.

3-The polymerase chain reaction: anew method of using molecular Jenetics for medical diagnosis. N.Engl. J. Med. 322: 178-183. Eisenstein. B.I. 2021

فرم اشتراک ماهنامه تشخیص آزمایشگاهی ۱۴۰۲

نام و نام خانوادگی: ..... رشته/تخصص: ..... کد ملی: .....

نام محل کار: ..... مسئولیت: .....

نشانی: .....

کدپستی: ..... تلفن: ..... فاکس: .....

موبایل: ..... ایمیل: .....

♦تکمیل تمام موارد فوق الزامی است♦

اشتراک ۶ ماهه (با پست سفارشی) ۴۲۰،۰۰۰ تومان / اشتراک یکساله (با پست سفارشی) ۸۴۰،۰۰۰تومان

مبلغ اشتراک یکساله خارج از کشور با پست سفارشی ۵۰۰ دلار است.

لطفاً برای شروع یا تمدید اشتراک، رسید فیش واریزی را همراه با فرم تکمیل شده فوق به شماره زیر واتساپ نمایید.

کارت بانک پاسارگاد به شماره کارت ۷۲۲۴-۸۲۸۷-۲۹۱۰-۵۰۲۲ و شماره حساب ۱-۱۲۰۸۴۲۳۴-۸۰۰۰-۲۰۶ به نام آقای محمود اصلانی

ایمیل: matashkhis@gmail.com **تلفن/ واتساپ:۰۹۱۲۷۳۳۳۴۰۷-۶۶۹۱۰۶۱۶-۸۸۹۸۷۵۰۱**