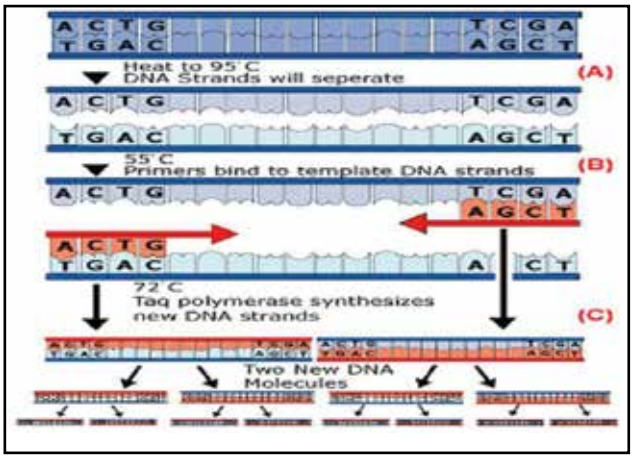
دکتر علیرضا فرخ ، دانشگاه علوم پزشکی آزاد تهران
دکتر هادی فرخ ، پزشک، ریاست سابق مرکز بهداشت شهرستان فومن، استان گیلان
پروین آقازادگان ، نویسنده همکار
دکتر محمد رضا فرخ ، پزشک، دانشگاه علوم پزشکی آزاد تهران
دکتر آتوسا فرخ ، دانشگاه آزاد اسلامی قزوین، دانشکده صنایع و مهندسی مکانیک، گروه مهندسی صنایع قزوین، عضو هیات علمی دانشگاه آزاد اسلامی قزوین
دکتر پریسا فرخ ، عضو هیات علمی دانشگاه آزاد اسلامی لاهیجان، استان گیلان
دکتر عبدالوحید میرمعزی، کارشناس رسمی دادگستری استان قزوین، مدرس دانشگاه آزاد اسلامی قزوین
آیشن آقازادگان، کارشناس بیولوژی

اهمیت RCP در آزمایشگاه های تشخیصی و تحقیقاتی- بخش۱

واکنش های زنجیره ای پلی مراز یا PCR تکنیکی علمی در زیست مولکولی است که انقلابی در دانش و فناوری های زیست مولکولی ایجاد کرد. به عقیده بیولوژیست هاPCR وسیله‌ای است که سوزنی را در کوهی از کاه پیدا می‌کند. PCR از نظر اصولی عملی تشابه زیادی به همانند سازیDNA دارد و در واقع برگرفته از آن است. بطورکلی دو فرق بینPCR و همانندسازی وجود دارد: همانند سازی در بدن در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد با آنزیمDNA پلی مراز و آنزیم های دیگر صورت می‌گیرد در PCRبه علت نیاز به درجه حرارت بالا جهت واسرشت شدن از آنزیم مقاوم به حرارت همانند Taq استفاده می‌شود و به جای سایر آنزیمها از تغییرات درجه حرارت استفاده می‌شود. PCR تکنیکی برای تکثیر یک یا تعداد اندکی از نسخه های یک قطعه DNA به میلیون ها نسخه است. اساس PCR استفاده از توانایی آنزیم DNA پلیمراز برای سنتز رشته های جدید DNA مکمل DNA ای که به عنوان رشته ی الگو در نظر گرفته شده بود، است. PCR یا واکنش زنجیره ای پلیمرازChain Reaction (Polymerase)، تکنیکی است که با استفاده از آن می توان در مدت زمان کوتاهی قطعه خاصی از مولکول DNA را در شرایط آزمایشگاهی میلیون ها بار تکثیر نمود. این قطعه DNA ممکن است یک ژن، بخشی از یک کروموزوم یا بخش هایی از ژنوم یک موجود باشد. البته در تکثیر DNA با روش PCR محدودیت هایی نیز وجود دارد که مهمترین آنها اندازه قطعات قابل تکثیر می باشد به طوری که حداکثر اندازه قطعه هایی که با روش PCR معمولی تکثیر می گردد، ۵ هزار نوکلئوتید (kb۵) و در روش های بهینه شده تا ۲۰ هزار نوکلئوتید (kb۲۰) می باشد. با این تعریف، PCR همانند یک دستگاه فتوکپی عمل می کند که بوسیله آن می توان صفحاتی از کتاب ژنوم هر موجود را به تعداد دلخواه و مشابه نسخه اصلی (البته در مواردی همراه با خطاهای جزئی) تکثیر نمود. اساس این روش بسیار ساده بوده و مانند واکنش همانندسازی DNA در موجودات زنده توسط آنزیم DNA پلیمراز صورت می گیرد. در موجودات زنده، مجموعه ای از چند پروتئین و آنزیم در فرآیند همانند سازی DNA نقش دارند در حالی که در واکنش PCR تنها نوع خاصی آنزیم DNA پلیمراز مقاوم به حرارت به نامTaq polymerase به همراه بافر، کلرید منیزیم و نوکلئوتیدها جهت تکثیر قطعات DNA استفاده می شود. مخترع واکنش PCR کَری مولیس (Kary Mullis) است که در سال ۱۹۸۳ این روش را جهت تکثیر DNA معرفی کرد. قبل از این کشف، ساخت قطعات DNA با روش های کند و پرهزینه شیمیایی انجام می گرفت. به دلیل اهمیت این اختراع، کاربردهای فراوان و نقش ارزنده آن در پیشرفت علم ژنتیک و زیست شناسی مولکولی، وی جایزه نوبل شیمی را در سال ۱۹۹۳ دریافت کرد. واکنش PCR به طور روزمره در اکثر آزمایشگاه های تشخیصی و تحقیقاتی استفاده می شود و در موارد بسیاری مثل شناسایی و جداسازی ژن ها، کلونینگ، طبقه بندی و شناسایی موجودات زنده، تشخیص بیماری های ژنتیکی و حتی پرونده های جنایی و تعیین هویت کاربرد دارد. در حال حاضر و نزدیک به ۳۰ سال پس از کشف PCR، تحقیقات ژنتیک مولکولی بدون استفاده از این تکنیک قابل تصور نیست.



واکنش زنجیره ی پلیمراز

اصول و مبانی PCR

واکنش زنجیره پلی‌مراز مبتنی بر تکثیر آنزیمی قطعه‌ای ازDNA است که با استفاده ازآغازگر صورت می‌گیرد. طول آغازگر بایستی به اندازهٔ کافی بزرگ باشد تا توالی های مشابه به آنها درنواحی غیر هدف یافت نگردد پرایمرها دو عمل را انجام می‌دهند.

نمونه های مورداستفاده برای آزمایشگاه مولکولیPCR

طیف وسیعی از مواد بیولوژیک، لکه های خون، سرم، بزاق، منی، مو، مایع نخاعی، استخوان، مایع آمنیون، سلولهای خود جنین در مرحله بلاستولا، نمونه های بیوپسی و یا آتوپسی باشند هرچه آلودگی کمتر باشد حساسیت و دقت نتایج بیشتر خواهد بود.

طراحی پرایمر

پرایمرهای PCR به صورت کاملاً اختصاصی و مکمل ناحیه مورد نظر DNA هدف طراحی می‌گردند. پرایمرها ۳۰-۲۰ باز دارند و پرایمرهای بیش از ۳۰ باز اختصاصیت خوبی ندارند. همچنین پرایمرها باید دمای انیلینگ بالا داشته باشند. بهتراست تعداد بازهای دو پرایمر مساوی باشند و از پلی پورین یا پلی پیریمیدین نباشند، همچنین نواحی تکرارشونده نداشته باشند چنانچه بازهای G یا C به صورت تکراری و پشت سرهم باشند پرایمربه صورت لوپ در می آید وعملاً سیستم کار نمی کند. نرم افزارهایی وجود دارد که طراحی پرایمر را انجام می دهند. بعد از طراحی پرایمربهتر است توسط نرم افزارهایی مانند Blastآنها را چک نمود تا مشخص شود که با چه ژن های دیگر می توانندAnneal گردند.

استخراج DNA از خون

۱- مقدار ۱۰۰ میکرولیتر خون (خون لخته نشده باشد– برای کارهای PCR از EDTA بعنوان ضدانعقاد استفاده شود زیرا مواد ضدانعقاد دیگر مهارکننده آنزیم پلیمراز می باشند).

۲- مقدار ۷۰۰ میکرولیترDNG (ماده ای برای استخراج DNA که به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه که این ماده معرف اصلی کیت می باشد) اضافه می کنیم.

۳- به مدت ۱۵ ثانیه آن را ورتکس می کنیم.

۴- به مدت ۵ دقیقه در دور ۳۰۰۰ سانتریفیوژ می کنیم.

۵- سپس خون را از میکروتیوب به میکروتیوب دیگر انتقال می دهیم بدون اینکه لخته ها وارد شود.

۶- به داخل خون ۵۰۰ میکرولیتر ایزوپروپانل اضافه می کنیم سپس تکان می دهیم تا هاله سفیدرنگی تشکیل شود.

۷- در فریز ۲۰- درجه به مدت ۲۰ دقیقه قرار می دهیم.

۸- بعد از فریز به مدت۱۰ دقیقه در دور۱۳۰۰۰ سانتریفیوژ می کنیم.

۹- محلول رویی را دور ریخته و به لکه پایین cc1 اتانل ۷۵ درصد اضافه می کنیم.

۱۰- مقدار ۵-۲ میکرولیتر آن را برای واکنش PCR استفاده می کنیم.

استخراج DNA از بافت

۱– مقدار۱۰۰ میلی گرم بافت توسط ازت مایع پودر می کنیم (به بافت ازت مایع اضافه می کنیم و بوسیله هاون به هم می زنیم) و از این ۱۰۰ میکرولیتر بر می داریم و داخل میکروتیوب می ریزیم.

۲- ۴۰۰ میکرولیتر DNG به بافت اضافه می کنیم.

۳- به مدت ۱۵ ثانیه ورتکس می کنیم.

۴- ۳۰۰ میکرولیتر ایزوپروپانل اضافه می کنیم.

۵- یک لایه شیری رنگ تشکیل می شود که DNA است به مدت ۲۰ دقیقه داخل فریزر ۲۰- قرار می دهیم.

مراحل PCR

مرحله دناتوراسیون DNA: در مرحله اول برای مدت کوتاهی (۳۰S) قطعات DNA را در درجه حرارت ۹٤ درجه سانتیگراد حرارت می‌دهند تا دو زنجیره DNA از هم باز نشود. مرحله پرایمر و مرحله اتصال دو قطعه نوکلئوتیدی: این قطعات معمولا از ۲۵ - ۱۸ باز آلی تشکیل می‌شوند و می‌توانند به قطعات مکمل خود که بر روی ژن مورد نظر قرار می‌گیرند، اتصال یابند. قطعه‌ای که در آن PCR به تعداد زیاد ساخته می‌شود. ما بین دو پرایمر ساخته می‌شود. مرحله اتصال پرایمرها کوتاه بوده و حدودا ۳۰S در دمای ٦٥ - ۳۰ درجه سانتیگراد صورت می‌گیرد. مرحله پلیمریزاسیون یا مرحله سنتز: در این مرحله با دخالت آنزیم DNA پلیمر از بر روی رشته DNA الگو. سنتز DNA با استفاده از نوکلئوتید تری فسفات‌هایی که در محلول وجود دارند، صورت می‌گیرد و برای سنتز DNA همیشه یک رشته DNA به صورت الگو و یک قطعه پلی نوکلئوتیدی به عنوان پرایمر مورد نیاز است. اندازه قطعات

تکثیر شونده را مشخص می‌کنند، محل ژنی که باید تکثیر شود را مشخص می‌کنند. بعد از اتصال آغازگر به مکمل های خود در توالی هدف، انتهای هیدروکسیل ۳ آنها رو به سوی ناحیه هدف قرار می‌گیرد. PCRطی سه دورهِ متوالی واسرشت سازیرشتهِ الگو، اتصال آغازگر و بسط توسط آنزیم پلی‌مراز انجام می‌گیرد. در چرخه اول و دوم فرآوردهِ حاصل از بسط دارای طول مشخصی نیست. در چرخه سوم قطعاتی ساخته می‌شود که طول آنها مشخص است از چرخهِ چهارم تکثیر به صورت نمائی است.

ساز و کار (برنامه) واکنش PCR

اساس واکنش PCR جهت تکثیر توالی DNA دو رشته ای، تغییرات دمایی است. در ابتدا پیوندهای هیدروژنی دو رشته توالی DNA با حرارت (۹۴-۹۵ درجه سلسیوس) شکسته و دو رشته از یکدیگر جدا می شود. سپس دمای واکنش پایین آورده می شود (معمولاً ۵۰ تا ۶۰ درجه سلسیوس). در این مرحله، دو قطعه کوتاه DNA تک رشته ای (معمولاً بین ۱۸ تا ۳۰ نوکلئوتید) که دقیقاً مشابه دو طرف قطعه DNA مورد نظر برای تکثیر طراحی و ساخته 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 ۳' آزاد جهت فعالیت آنزیم DNA پلیمراز را فراهم می نماید، کاری که در همانند سازی در موجودات زنده توسط آنزیم پریماز و توالی اولیه ساخته شده توسط آن انجام می گیرد. در مرحله بعد، دمای واکنش تا ۷۲ درجه سلسیوس (دمای مناسب آنزیم Taq polymerase) افزایش یافته و عمل تکثیر قطعه DNA مورد نظر بین دو پرایمر با استفاده از نوکلئوتیدهای موجود، توسط آنزیم Taq polymerase مقاوم به حرارت انجام می پذیرد.

مرحله اول: واسرشت سازی (Denaturation)، ۳۰ تا ۶۰ ثانیه.

عمل انجام شده در این مرحله: جدا شدن دو رشته DNA.

مرحله دوم: اتصال (Annealing)، ۳۰ تا ۶۰ ثانیه.

عمل انجام شده در این مرحله: اتصال پرایمرها به نواحی مکمل روی DNA و تعیین محدوده

تکثیر قطعه DNA

مرحله سوم: گسترش (Extension یا Elongation)، به ازای هر ۱۰۰۰ نوکلئوتید طول قطعه ۶۰ ثانیه. عمل انجام شده در این مرحله: تکثیر قطعه DNA مورد نظر. این ۳ مرحله بین ۲۵ تا ۴۰ بار تکرار می شود که به آن چرخه های PCR می گویند.

۱-بافر (PCR-X10) PCR در حجم ۲۵ یا ۵۰ میکرولیترانجام می گیرد برای حجم ۲۵ میکرولیتر ۲٫۵ میکرولیتر بافر نیاز است.

۲-DNTP-نوکلئوتیدها :۰٫۵ میکرولیتر

۳- Mgcl:1-2 میکرولیتر

۴-پرایمرF :۱ میکرولیتر

۵ - پرایمرR :۱ میکرولیتر

۶-DNA: 1 میکرولیتر

۷- آنزیم :۰٫۲ میکرولیتر

۸ -آب مقطر :۱۷٫۸ میکرولیتر (مجموع مواد بالا منهای ۲۵ می شود ۱۷٫۸ که آب است.)

بعد از ریختن مواد بالا در لوله های مخصوص PCR لوله ها را داخل Block دستگاه ترموسایکلر قراردهید و دستگاه را روشن کنید (مقدار ۱۰۰ میکرولیتر روغن معدنی روی واکنش بریزید تا از بخار شدن مواد ممانعت بعمل آورد.

لازم به ذکر است که دستگاههای ترموسایکلرجدید به صورت Heated lid ساخته شده اند یعنی درب دستگاه که روی لوله های واکنش قرار می گیرد حدود ۱۰۵ درجه گرم می شود در نتیجه بالای لوله گرمتر از پایین آن است و از بخار شدن مواد داخل لوله جلوگیری می شود) پس از اتمام کار محصول آمپلی فای شده را با اگارز ۳ درصد الکتروفورز کنید.

نمونه DNA (الگو)

تکثیر از روی نمونه DNA انجام می شود. این نمونه می تواند، قطعه ای DNA، محصول استخراج DNA ژنومی، DNA پلاسمیدی یا حتی محصول PCR دیگری باشد. معمولاً حدود یک نانوگرم از DNA پلاسمیدی یا فاژی یا یک

میکروگرم از DNA ژنومی برای یک واکنش PCR کافی است. بیش از این مقدار، باعث تولید محصولات غیراختصاصی (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 و EDTA، باعث کاهش فعالیت آنزیم Taqpolymerase و عدم حصول نتیجه مورد نظر می گردد. همچنین آلوده شدن واکنش PCR با مقادیر بسیار اندک DNA از هر منبع دیگری، به دلیل حساسیت فوق العاده این تکنیک، ممکن است به تولید قطعات غیر قابل انتظار بیانجامد.

آنزیم Taqpolymerase

این آنزیم برای تکثیر قطعات کمتر از سه هزار جفت باز توصیه شده و پر مصرف ترین آنزیم مورد استفاده در PCR می باشد. به طور معمول حدود یک واحد از این آنزیم در ۵۰ میکرو لیتر از واکنش PCR استفاده می شود. اگر نمونه DNA حاوی مواد ممانعت کننده PCR باشد، می توان این مقدار را دو تا سه برابر افزایش داد ولی مقادیر بالاتر آنزیم باعث تولید محصولات غیر اختصاصی می گردد. گرچه دمای مناسب برای این آنزیم ۷۲ درجه سلسیوس 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 غیراختصاصی، توصیه می شود که تمامی مراحل آماده سازی واکنش PCR بر روی یخ صورت گیرد.

نوکلئوتیدها

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 ۲۰۰ نانو مولار است. برای این منظور از مخلوط های آماده واجد هر چهار نوکلئوتید که با غلظت های مختلف مثل دو میلی مولار، ۱۰ میلی مولار و ۲۵ میلی مولار موجود است، استفاده می شود. به طور مثال، در یک واکنش ۵۰ میکرولیتری PCR باید ۵ میکرولیتر از مخلوط دو میلی مولار نوکلئوتیدها برای دستیابی به مقدار مورد نیاز در واکنش استفاده کرد.

بافر

مهمترین نقش بافر PCR تنظیم pH مناسب واکنش PCR و آنزیم Taq polymerase است. اجزای این بافر نقش های دیگری نیز دارند از جمله کلرید پتاسیم که به اتصال پرایمر به DNA الگو (نمونه) کمک می کند.

یون منیزیم

یون منیزیم یکی از اساسی ترین اجزا واکنش PCR است. انواع مختلف آنزیم DNA polymerase برای فعالیت خود به این یون نیاز دارند و این یون برای اتصال پرایمر و قطعه DNA لازم است. برای تکثیر با Taq polymerase این یون عمدتاً به صورت ترکیب کلرید منیزیم در واکنش PCR استفاده می شود. این ترکیب گاهی در همان بافر PCR قرار داده می شود ولی از آنجا که برای برخی واکنش های PCR لازم است که غلظت این یون تغییر نماید، این ترکیب به طور جداگانه تهیه و به واکنش PCR افزوده می شود. غلظت بهینه یون منیزیم در واکنش PCR یک تا چهار میلی مولار است. غلظت بالاتر از این مقدار باعث تکثیر قطعاتی غیر از قطعه مورد نظر (قطعات غیر اختصاصی) شده و غلظت پایین این یون نیز ممکن است به کاهش کارایی واکنش و میزان تولید قطعه مورد نظر منجر شود.

پرایمرها

غلظت بهینه پرایمرها برای واکنش PCR از ۱۰۰ نانو مولار تا یک میکرو مولار متغیر است. غلظت بیش از این، منجر به تولید قطعات غیر اختصاصی می شود. طراحی پرایمر نیازمند دقت فراوانی است و مرحله بسیار مهمی در امکان پذیر شدن و صحت تکثیر قطعه مورد نظر دارد. دمای مرحله اتصال در برنامه PCR به توالی پرایمرها ارتباط دارد.