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- بخش۲

در شماره قبل بخش نخست این مقاله بچاپ رسید که به مباحثی ازقبیل اصول و مبانی PCR، واکنش زنجیره ی پلیمراز و ... پرداخت. در این شماره بخش دوم این مقاله تقدیم خوانندگان محترم ماهنامه می گردد.

وسایل مورد نیاز برای واکنش PCR

حداقل وسایل مورد نیاز برای انجام واکنش PCR، دستگاه ترموسایکلر (ایجاد کننده چرخه های دمایی)، میکروپیپت، ظرف یخ و وسایل یکبار مصرفی مانند تیپ (جز پلاستیکی که برای کشیدن محلول به میکرو پیپت متصل می شود) و ویال (لوله های درب دار کوچک، در دو اندازه بر اساس گنجایش آنها یعنی ۲۰۰ و ۵۰۰ میکرو لیتر، که واکنش PCR در آنها انجام می شود) و ظروف نگهداری آنها می باشد. دستگاه ترموسایکلر برای ایجاد دماهای مختلف در مدت زمان مورد نظر، قابل برنامه ریزی می باشد. قبل از تولید این دستگاه، دانشمندان برای انجام PCR از سه حمام آب گرم با دماهای مختلف استفاده می کردند که کار بسیار پر زحمتی بود. میکروپیپت برای برداشتن مقادیر اندک مورد نیاز برای واکنش PCR در مقیاس میکرولیتر استفاده می شود. بر روی این دستگاه که کار کردن با آن بسیار راحت است، تیپ های یک بار مصرف قرار داده می شود و بدین وسیله حجم مورد نظر از آن برداشته و به واکنش PCR افزوده می شود.

کاربردهای PCR

تکنیک PCR کاربردهای نامحدودی در عرصه های مختلف زیست مولکولی دارد، علت اصلی این امر این است که DNA الگوی بکار رفته در PCR را می توان از منابع مختلف تامین کرده و مورد استفاده قرار داد.

بطور کلی PCR به دو منظور اصلی بکار می رود:

۱- تهیه نسخه های متعدد از یک ژن

۲- بررسی حضور یا عدم حضور یک ژن خاص در یک قطعه DNA

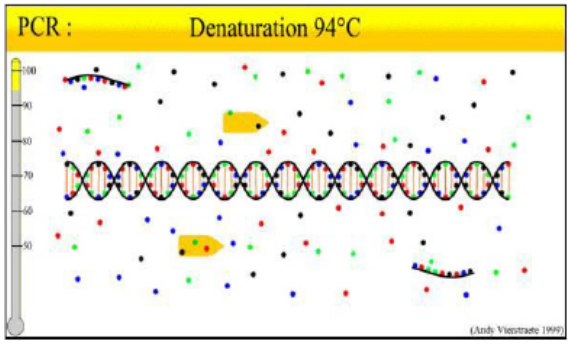
اساس کارPCR

آزمایش واکنش زنجیره ای پلی مراز (Polymerase Chain-Reaction) یا به اختصار PCR، در حقیقت یک دستگاه تکثیر DNA یا RNA می باشد که همانند یک موتور محرک سرعت پیشرفت تحقیقات ژنتیکی-مولکولی را افزایش داده است. ایده راه اندازی PCR در سال ۱۹۸۳ توسط Mulis ارائه شده و اولین آزمایش های عملی آن در شرکت Cetus انجام گردید. این تکنیک که بصورت گسترده در بیولوژی ملکولی و تمامی آزمایشگاه های تحقیقاتی زیست شناسی و تشخیص بیماری های خاص ژنتیکی در آزمایشگاه های ژنتیك، تشخیص سرطان و تشخیص بیماریهایی که در آنها سرعت و دقت نقش مهمی دارند کاربرد دارد. همچنین این روش در تشخیص انواع بیماریهای انسان و دام شامل دامهای بزرگ، طیور و حتی آبزیان در اغلب آزمایشگاههای تشخیص طبی بطور رایج انجام می شود. در روش PCR، با استفاده از اجزای همانند سازی طبیعی DNA نظیر Oligo nucleotide primer و Taq-DNA polymerase در تیوب، DNA تکثیر می گردد. در این آزمایش در یك محیط بافری ساده، ناحیه خاصی از ملکول DNA الگو یا به اصطلاح Template، به وسیله یك آنزیم DNA پلی مراز، بر اساس قوانین شیمیایی جفت

شدن بازها، مولکولهای دی اکسی نوکلئوتید نظیر بلوکهای ساختمانی، جهت ایجاد رشته جدیدDNA ایجاد شده و پیوند می یابند. اساس PCRاستفاده از دماهای مختلف در یک واکنش سه مرحله ای می باشد. معمولاً درمرحله اول (تقلیب)، در دمای ۹۵-۹۴ درجه، جداشدن رشته های DNA الگو انجام می شود، سپس دما در جهت اتصال پرایمرها به توالی مکمل بر روی رشته الگو در حد ۷۲-۴۰ درجه پایین آورده شده که این دما بستگی به پرایمرهای مورد استفاده دارد و نهایتاً برای ساختDNA ، دما در حد دمای مطلوب فعالیت آنزیمDNA پلی مراز تنظیم می شود. جهت تکثیرDNA هدف، لازم است که این سه مرحله دمایی طی چندین چرخه تکرار شود که این کار توسط دستگاه ترموسایکلر (Thermocycler) انجام می گردد. تقریباً در همه سیستمهای PCR از یك DNA پلی مراز مقاوم به حرارت استفاده که یکی از رایج ترین آنها آنزیم poly-merase Taq است. این آنزیم، از باکتری Thermus aquaticus استخراج شده است.

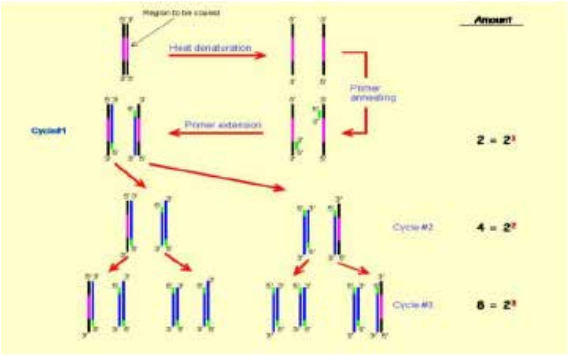
مرحله اول: مرحله تقلیب(Denaturation)

پیوندهای هیدروژنی بین جفت بازهایDNA دو رشته ای در دمای حدود ۹۴ درجه سانتی گراد از هم جدا شده و هر رشته از DNAاولیه به عنوان الگوی ساخت یک رشته مکمل جدید استفاده می شود. این مرحله تکثیر، بر اساس توانایی نوکلئوتیدها برای جفت شدن با باز مقابل خود، طبق قانون واتسون-کریک که همیشه A با T و Gبا C جفت می شوند، استوار است. بنابراین رشته الگوهمیشه توالی بازی رشته مقابل را تعیین می کند.



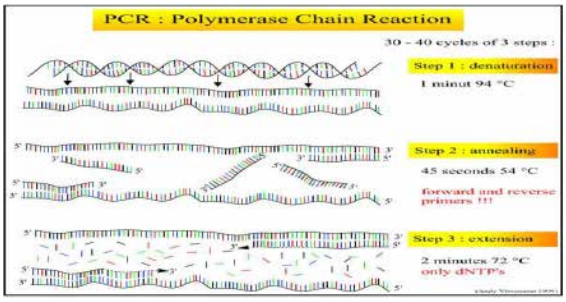
مرحله دوم: اتصال (Anealing)

با پایین آوردن دما تا ۷۲الی۴۰ درجه سانتی گراد، پرایمرهای الیگو نوکلئوتیدی اختصاصی که بر اساس قوانین کلی جفت شدن بازها به رشته DNAالگو متصل می شوند، ناحیه مورد نظر ازDNA الگو را جهت تکثیر مشخص کرده و نهایتا DNA پلی مراز با اضافه کردن دی اکسی نوکلئوتیدها بر روی عامل ۳- OHپرایمرها، ملکولهای جدید از روی هر دو رشته را در امتداد هم قرار می دهد. طی مرحله اتصال،DNA پلی مراز مقاوم به حرارت(Taq) فعال بوده و به محض اتصال پرایمرها به DNAالگو، افزایش طول آنها را آغاز خواهد کرد.



مرحله سوم

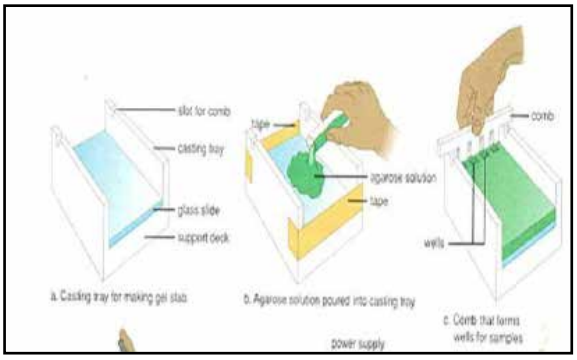
در این مرحله، واکنش تا رسیدن به دمای بهینه فعالیت آنزیم پلی مراز که در حدود ۷۲ درجه می باشد، افزایش می یابد و در اولین چرخه به ازای هر رشته الگو، یک DNAدو رشته ای جدید ایجاد می شود. به این ترتیب تعداد نسخه های ناحیه هدف ۲ برابر می گردد و به همین صورت در هر چرخه، تعداد نسخه های رشته DNA هدف، ۲ برابر می شود. اگر بازده PCR به ۱۰۰٪ برسد، در طی ۲۰ چرخه واکنش PCR، DNA هدف به میزان یک میلیون برابر تکثیر خواهد شد که البته معمولاً تکثیر به میزان ۱۰۵ برابر یا بیشتر انجام می شود.

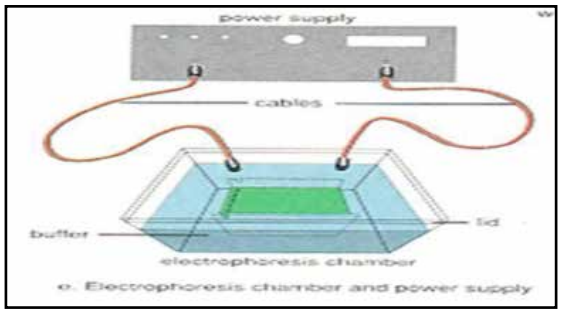


پس از اتمام مراحل تکثیرDNA ، یکی از رایجترین و سریعترین روشهای بررسی محصولات PCR، روش الکتروفورز روی ژل آگاروز می باشد. در این روش، اغلب محصول نهایی واکنش PCR، با نسبت حجمی ۱:۱۰ یا ۱:۵، بر روی ژل آگارز ۰٫۸ تا ۳٪ برده می شود. برای کمك به قرار دادن نمونه بر روی ژل و دیدن حرکت نمونه درون ژل، باید مقداری loading buffer

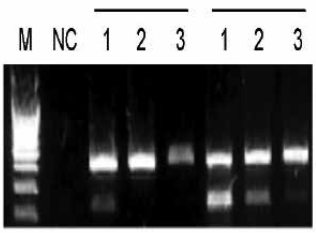
حاوی گلیسرول و رنگ شاخصی همانند بروموفنل بلو، به نمونه های فوق اضافه می شود. اگر PCR در شرایط خوبی انجام شده باشد باید باند قوی و باریکی مشاهده گردد. در برخی از موارد تمایز بین محصولات تکثیر اختصاصی و غیر اختصاصی مشکل می باشد که ممکن است به علت غلظت مشابه باندها و یا اسمیری از محصولات غیر اختصاصی تکثیر DNA باشد که می تواند به علت کیفیت پایین DNA یا پایین بودن تعداد نسخه های الگو و یا ترکیبی از این عوامل رخ دهد.

تصاویر زیر مراحل الکتروفورز را نشان می دهند:





نمونه ای از تصویر نهایی حرکت محصول **PCR** در الکتروفورز



تشخیص جهش ها و سرطان ها

در هر سلول معمولاً از یک ژن فقط یک نسخه وجود دارد ، و در صورتی که این ژن دچار جهش شود بررسی این جهش بسیار مشکل خواهد بود، زیرا در سلولهای انسان پیدا کردن یک ژن در میان کل ژنوم انسان، همانند پیدا کردن سوزن در انبار کاه خواهد بود و پس از پیدا کردن ژن جهش یافته نیز به دلیل محدودیت نسخه های این ژن بررسی کمیت و کیفیت جهش در آن مشکل خواد بود. ولی امروزه PCR کار را بسیار راحت نموده است. کافی است که یک سالم و یک سلول جهش یافته بطور جداگانه برای یک ژن خاص تحت PCR قرار گیرند و محصولات حاصل با هم مقایسه شوند. به این ترتیب به راحتی می توان محل جهش، نوع جهش و هر نوع اطلاعات لازم دیگر را به دست آورد. استفاده دیگر PCR در بررسی مراحل درمانی سرطان می باشد. داروهای مورد استفاده در درمان سرطان داروهای سیتوتوکسیک می باشد که عوارض جانبی بسیار زیادی به همراه دارند. به همین دلیل نیز سرطان شناسان مایل اند 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 عود مجدد بیماری وجود خواهد داشت. با استفاده از PCR دقت تعیین سلولهای سرطانی بسیار بالا می رود که اهمیت آن ناگفته پیداست و به همین دلیل PCR منفی را می توان به معنای بهبودی کامل در نظر گرفت.

بررسی عفونت های باکتریایی و ویروسی

هم اکنون در بعضی از آزمایشگاهها از PCR برای تشخیص ایدز استفاده می کنند. برای این کار از خون محیطی نمونه گیری می کنند و از توالی های اختصاصی ویروس HIV نیز به عنوان شناساگر استفاده می کنند، سنتز DNA نشان دهنده عفونت ایدز است. استفاده دیگر PCR در تشخیص بیماری سل می باشد. مایکوباکتریوم توبرکلوزیس یک باکتری بسیار کند رشد است و رشد معمولی آن در آزمایشگاه حدود ۲۰ روز طول می کشد. در PCR بیماری سل از نمونه ی خلط فرد بیمار به همراه پرایمرهایی که برای توالی خاص مایکوباکتریومهای مکمل می باشند، مورد استفاده قرار می گیرد. پس از انجام PCR قطعات DNA بدست آمده در مجاورت شناساگرهای اختصاصی برای سوشهای مختلف مایکوباکتریومها قرار می گیرد و به این صورت گونه و سوش آن تشخیص داده می شود.

تعیین توالی های کروموزومی انسان در سلول های هیبریدی (هتروکاریون ها)

یکی از تکنیک های بررسی ژنوم انسان، تلفیق (هیبرید کردن) هسته های سلول های انسانی با سلول های حیوانات دیگر مثلاً موش است. پس از انجام تلفیق دو هسته، کروموزومهای انسان به تدریج حذف می شوند، تا اینکه نهایتاً

یک کروموزوم در درون هسته هیبریدی باقی می ماند. حال گاهی به منظور بررسی های بیشتر لازم می شود که این قسمتهای ژنوم انسان تکثیر شوند، مثلاً وقتی که یک ژن خاص مورد بررسی قرار می گیرد. برای این کار ازنوع خاصی از PCR که به Alu-PCR معروف است استفاده می شود. در این روش از پرایمرهایی استفاده می شود که مکمل توالیهای بسیار تکراری ژنوم ها است، این توالی های ۳۰۰ جفت بازی که گاهی تا ۹۰۰۰۰۰ بار در ژنوم انسان و دیگر پستانداران تکرار می شود را تکرارهای Alu می نامند. این توالی ها بسیار متغیر می باشند ولی در انسان قسمتی از این توالی ها اختصاصی و ثابت است و به همین دلیل به راحتی می توان از آن برای تکثیر قطعات DNA که بین دو تکرار توالی Alu قرار دارند استفاده کرد. سپس این DNA را می توان خارج نمود و از نظر نوع پروتئین مورد سنتز و یا تعیین توالی و غیره مورد بررسی قرار داد. مهمترین استفاده روش فوق تعیین مکان ژنتیکی ژنهای مختلف برروی کروموزومهای انسان است که تا قبل از این روش تقریباً نا ممکن ویا بسیار مشکل بود.

مهار کننده‌ها و افزایش دهنده‌های PCR

مواد لیست شده در جدول ذیل می‌توانند درPCR حاوی نقش باشند.ژلاتین یا آلبومین سرم ۱۰۰ نانوگرم در ۵۰ میکروگرم واکنش فرمامید ۵٪، دی‌متیل سولفوکساید (DMSO) ۰۱-۲٪ پیروفسفاتاز واکنش‌واحد ۰/۱۰۰–۰۱، ترامتیل آمونیوم کلراید (TMAC 001-01) میکرومول پلی‌اتیلن گلایکول ۵۱۰۰۰۶-۵ درصد، گلیسرول ۵-۱ درصد، توین ۲/۵۰۲-۱ درصد، پروتئین ژن ۲۲۳ نانومول، ۷ دی‌اَز - ´dGTP۲-با ۵۷٪ جایگزین، پروتئین تك رشته DNA ۱ واحد، کلی‌باسیل ۱ واحد، بتائین ۵ میکروگرم در میلی‌لیتر، ژلاتین یا آلبومن سرم حیوانی به غلظت ۱۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر و شوینده غیریونی مانند توین)۰۲ یا 1/0 Laurth-21 تا ۰/۵۰) درصد برای ثبوت پایداری آنزیم اضافه می‌شود. DMSO ساختمان ثانویه DNA هدف را کاهش می‌دهد. آزمایشات نشان داد. بطور سطحی اثر بازدارندگی بر روی Taq داشته و باعث کاهش بازده کل شده است. شوینده‌های‌غیریونی نظیرTritonX100 و توین۲۰ تا غلظت ۵٪ مهار کننده نیست شوینده‌های یونی مانند سدیم دودسیل سولفات (SDS) فقط در غلظت‌های بسیار پایین قابل تحمل است و این شوینده با روش استخراج فنل و رسوب اتانل قبل ازPCR از DNA حذف می‌شود. SDS در غلظت ۲-۱ درصد استفاده می‌شود در حالیکهTaq پلی‌مراز در غلظتهای بالاتر ۱ر۰ درصد SDS مهار می‌شود.

Taq

پلی‌مراز به عمل هضمی پروتیئنازK حساس است، بنابراین پروتیئنازK بایستی حذف یا غیرفعال شود. دمای ۵۹ درجه سانتیگراد برای رسیدن به چنین هدفی کفایت می‌کند. تیمار کردن حرارتی و سپس استخراج بوسیلهِ فنل پروتیئناز K را واسرشت می‌کند. آثار باقیماندهِ فنل می‌تواند باعث مهارPCR شود که توسط کلروفورم حذف می‌شود.

انواع PCR

- PCR) Asymmetric PCR(نامتقارن
- (ARMS PCR) Amplification Refractory Mutation System
- Hot-Start PCR
- RT-PCR
- Randomly amplification polymorfic DNA (RAPD-PCR)
- PCR) Nested PCR(داخلی یا لانه ای
- PCR) Inverse PCR (معکوس
- PCR) Multiplex PCR (چندتایی
- Real time PCR

منابع

- اصفهانی، کسری. ۱۳۹۰. آموزش PCR. زیست فناوری.
-رفیع، عبدالناصر. واکنش زنجیره پلیمراز (PCR) و مکانیسم آن. ۱۳۸۴. پزشک و آزمایشگاه، شماره ۱۳، سال سوم، صص ۳۵-۳۹.
- Acha , P.N. , and B . Szyfres , 1987 . Zoonosis and communicable diseases common to man and animals , 2 nd ed ., P . 24 – 45 . Scientific publication Series no . 503 . pan -American health organization , Washington , D.C.
Laboratory Techniques. world Health organization Monograph Series No,55.
- Baily G.G.j Trop. Med. Hyg. 1992. vol 95, 271-275.
- Baron Ellen. Diagnostic Microbiclo1991.
- Davies ,G and Gasey, A. 1975: The survival of brucella abortus in milk and milk products . Br.Vet.J129:345-353.
-Fakete . A., J.A. Bantle . and S.M . Halling . 1992. detection of Brucella by polymerase ch ain reaction in bovine fetal and matemal tissues . J. Vet . Diag Invest . 4:79- 83.
-Mullis, K.B. 1990. The unusual origin of the Polymrase chain reaction . sci . Am. 262(Apr): 56-65.
- Persing , D.H. 1991. Polymerase chain reaction : trenches to benches . J. Clin. Microbiol/29: 1281-1285.