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
آیشن آقازادگان، کارشناس و محقق بیولوژی

روش های تغییریافته PCR و کاربرد این روش ها در شناسایی و درمان

واکنش زنجیره‌های پلیمراز (PCR) روشی است برای تکثیر اختصاصی تکه های DNA و نخستین بار در سال ۱۹۸۳گزارش شد. در این روش تکه ای از DNA به طور انتخابی با به کارگیری دو پرایمر اولیگونوکلوئوتیدی و آنزیم پلیمراز Tag می‌توان تا میلیون ها برابر تکثیر کرد. هریک از این دو پرایمر به رشته‌های مخالفشان در رویDNA هدف پیوند شده و جایگاه آنها به‌گونه‌ای است که سنتز زنجیره DNA توسط آنزیم پلیمراز تنها در میان دو پرایمر انجام می‌گیرد. از آنجا که زنجیره‌های تازه ساخته شده خود مکمل پرایمرها است، این چرخه مي‌تواند پس از یک مرحله واسرشته شدن زنجیره‌هایDNA از هم تکرار شود. روش PCR براساس چرخه های حرارتی گرمایی و سرمایی تکراری است. این کار گرم و سرد کردن DNA به‌کمک یك آنزیم DNA پلیمراز مقاوم به گرما و یک جفت پرایمر تحت تکثیر انتخابی قرار می‌گیرد و از راه این روش DNA به صورت تصاعد هندسی زیاد می‌شود. امروزه روش PCR جایگاه بسیار مهمی را درجنبه‌های مختلف مهندسی ژنتیک، بیولوژی مولکولی، میکروب‌شناسی تشخیصی تشخیص سرطان و بیماری‌های ژنتیک، تشخیص هویت، جرم شناسی(پزشکی قانونی جهت تشخیص منشأ نمونه اسپرم، خون و ...) تعیین ترادف، باستان‌شناسی، مطالعات تکاملی موجودات و ... پیدا کرده است. کاربرد بیشتر و دقیق‌تر تکنیک PCR در تشخیص، روش‌های تغییریافته‌ای از آن به وجود آمده است که به تعدادی از آنها اشاره می‌شود.

مالتیپلکس پی سی آر (Multiplex-PCR)

در روش‌های PCR تنها یك جایگاه ژنیبررسیمی شود، در روش مولتی پلکس PCR، با استفاده از پرایمرهای مختلف می‌توان چندین جایگاه بررسی کرد و از چندین جفت پرایمر اختصاصی جهت تکثیر استفاده مي شود. از کاربردهای این روش مي‌توان به موارد زیر اشاره کرد:

۱)بخش‌های بزرگی از یک DNA (هدف)، جهت جست‌وجوی تغییرات می‌تواند بررسی شود. مانند کشف نقص‌ها در بیماری دیستروفی عضلانی روشن یا کشف بخش‌های مختلف IS6110 و IS986 در مایکروباکتریوم توبرکلوزیس عامل بیماری سل.

۲) بخش‌های غیرمربوط به هم در ژنوم هدف می‌تواند مورد آزمایش واقع شود.

۳) مي‌توان از راه این روش با پرایمرهای مختلف به جست‌وجوی عوامل مختلف پرداخت، مانند شناسایی عوامل شایع مننژیت.

این روش بیشتر برای شناسایی جایگاه‌هایی از ژن‌ها به کار می‌رود که انواع زیادی از جهش در آن ها روی می دهد.

آرتی-پی‌سی آر (RT-PCR)

این روش به PCR نسخه‌برداری معکوس نیز گفته می شود، زیرا ماده اولیه در آن RNA است. اولین مرحله در این روش تبدیل RNA به DNA (DNAای‌که مکمل توایس‌هایmRNA است) توسط آنزیم نسخه‌بردار معکوس صورت مي‌گیرد (RT). برخی از موجودات مانند برخی‌از ویروس‌هایRNAدار، ژنومشان تنها از RNA ساخته شده است. بعضی از ویروس‌ها مانند ویروس هپاتیت B هرگز به شکل DNA مابین در اثر آنزیم نسخه‌بردار معکوس درنمی‌آید. آنزیم نسخه‌بردار معکوس (RT) در این روش از

«Avian Myeloblastosis Virus (AMV)» و «Moloney Murine Leu Kemia Vi-rus (MMLV)» به‌دست آمد. کاربرد این آنزیم به‌دلیل آن‌که آنزیم به حرارت حساس بود در ابتدا پایین بود ولی با کشف باکتری به نام «ترموس ترموفیلوس» یك DNA پلیمر از مقاوم به نام (Tth) بهبود یافت که در حضور یون Mn+2 دارای فعالیت نسخه‌برداری معکوس است و در دمای۷۲ درجه سانتیگراد توسط این آنزیم از رویRNA، DNA ساخته می‌شود و سپس Mn+2 اضافی توسط اتیلن گلیکول تترااستیک اسدی(EGTA) حذف می‌شود و سپس این آنزیم از DNAای که خود ساخته استفاده و آن را تکثیر مي‌کند.

آرمز پی‌سی‌آر (ARMS-PCR)

این روش تکثیری قدرتمند برای مشخص کردن جهش‌های نقطه‌ای است. در این روش از پرایمرهای جهش یافته و طبیعی در دو لوله جداگانه استفاده می شود. اگر عمل پلیمریزاسیون در لوله حاوی پرایمر طبیعی انجام شود، نشان‌دهنده نبود جهش نقطه‌ای در باز مورد نظر است و اگر عمل پلیمریزاسیون در لوله حاوی پرایمر جهش یافته انجام شود، نشان‌دهنده حضور جهش نقطه‌ای در باز مورد نظر است. این روش نام‌های دیگری نیز دارد از جمله MAMA-PCR مخفف Mismatch Amplificatin Multation Assay و COP-PCR مخفف Competitive Oligonucleotide Primming.

نستد پی‌سی‌آر (Nested-PCR)

در این روش از دو جفت پرایمر استفاده می شود، طوریکه جفت دوم در بنی جفت اول جای می‌گیرد. در این روش ابتدا پرایمر بیرونی توالی هدف در طول ۳۰-۱۵ چرخه تکثیر می‌شود، سپس محصول PCR حاصل به لوله‌ای دیگر منتقل می‌شود و به‌عنوان الگو و با استفاده از جفت پرایمر داخلی مرحله دوم PCR انجام شده و ترادف کوچک تری از DNA که درون PCR اولی است، به اندازه ۴۰-۱۵ چرخه تکثیر مي‌شود.

مزایای این روش تغییر یافته PCR عبارت است از:

۱) نیاز به پروب (کاوشگر) و تأییدهای بعدی کمتر است،

۲) حساسیت در این روش به میزان زیادی بالاتر است و

۳) به دلیل انتقال محصول PCR دور اول به لوله جدید، ممانعت کننده‌ها رقیق مي‌شود.

این روش در تعیین جنسیت جنین در سه ماهه اول بارداری استفاده شده و از این راه توانسته‌اند بیماری‌های وابسته به جنس را تعیین کرده و از تولد کودکان بیمار جلوگیری کنند. همچنین ویروس «سیتومگالوویدوس» که می‌تواند سبب ناشنوایی در ۱٪ از کودکان شود، توسط این روش تشخیص داده شده و امکان درمان زودهنگام از این راه امکان‌پذیر است. جنین‌های مبتلا به سندروم داون نیز در مرحله بارداری مادر با این روش تشخیص داده شدند.

Real-Time PCR

با استفاده از نسل جدیدی از ترموسایکلرها با سیستم فلورومتری که اجازه پایش پیوسته خاصیت فلوئورسانس محصول PCR در زمان جمع شدن را مي‌دهد، این روش ابداع شد. در این روش از کاوشگرها یا پروب‌های هیبریداسیون نشان‌دار شده با رنگ‌های فلورسانس در انتهای ۵ یا ۳ استفاده می شود که امکان پایش پیوسته محصول PCR را بدون جداسازی آنها در روش‌های الکتروفورز در ژل آگاروز یا ژل پلیآکریل آمید می دهد. این سیستم در سال ۱۹۹۲ کشف شد. این روش به دلیل کاهش زمان سیلک‌هایPCR، حذف مرحله Post-PCR و کاربرد نشانگرهای فلوروژنیک و روش‌های حساس آشکارسازی تابش آنها باعث افزایش سرعت این سیستم نسبت به سیستم PCR معمولی شده است. سازندگان و کاربران این روش سعی می‌کنند محصول PCR کوچک‌تر طراحی کنند تا سرعت افزایش یابد اما تجربه نشان داده که کاهش اندازه محصول لزوماً بازده PCR را بهینه نمي‌کند. البته این روش دارای معایبی نیز است از جمله می‌توان به عدم ناتوانی در مشخص کردن اندازه محصول بدون بازکردن سیستم و ناسازگار بودن برخی پلت فرم‌ها با شیمی برخی رنگ‌های

فلورژنیک اشاره کرد. برای شناسایی بسیاری از ویروس‌های عامل بیماری‌های انسان، از این روش استفاده شده است.

نمونه های مورداستفاده برای آزمایشگاه PCR

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

کاربردهای PCR

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

استفاده که یکی از رایج ترین آنها آنزیم Taq polymerase است. این آنزیم، از باکتری Thermus aquaticus استخراج شده است.

مرحله اول: مرحله تقلیب (Denaturation)

پیوندهای هیدروژنی بین جفت بازهای DNA دو رشته ای در دمای حدود ۹۴ درجه سانتی گراد از هم جدا شده و هر رشته از DNA اولیه 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 G با C جفت می شود، 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 DNA الگو متصل می شوند، ناحیه مورد نظر از DNA الگو را جهت تکثیر مشخص کرده و نهایتا DNA پلی مراز با اضافه کردن دی اکسی نوکلئوتیدها بر روی عامل ۳-OH پرایمرها، ملکول های 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 DNA الگو، 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 است، افزایش می یابد و در اولین چرخه به ازای هر رشته الگو، یک DNA دو 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 این مرحله ی تکثیرDNA، یکی از رایج ترین و سریع ترین روش های بررسی محصولات PCR، روش الکتروفورز روی ژل آگاروز است. در این روش، اغلب محصول نهایی واکنش PCR، با نسبت حجمی ۱:۱۰ یا ۱:۵، بر رویژل آگارز ۰٫۸ تا ٪۳ برده می شود. برای کمک به قراردادن نمونه بر رویژل و دیدن حرکت نمونه درون ژل، باید مقداری loading buffer حاوی گلیسرول و رنگ شاخصیه مانند برومونفل بلو، به نمونه های فوق اضافه می شود. اگر PCR در شرایط خوبی انجام شده باشد باید باند قوی و باریکی مشاهده شود. در برخی از موارد تمایز بین محصولات تکثیر اختصاصی و غیراختصاصی مشکل است 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.

منابع

-رفیع، عبدالناصر. واکنش زنجیره پلیمراز (PCR) و مکانیسم آن. ۱۳۸۴. پزشک و آزمایشگاه، شماره ۱۳، سال سوم.

- Alton . G.G.; Jones . L.M . 1967 : Laboratory Techniques in Brucellosis . world Health organization Monograph Series No , 55.
- Baily G.G.j Trop. Med. Hyg. 1992. vol 95, 271-275.
- Baron -Ellen. Diagnostic Microbiclo1991. 129:345-353.
- 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.
- http://www.ampliqon.com/en/distributors.
- Parasitology Research
- www.sabiomid.org