

۱- محمد جواهریان، کارشناس علوم آزمایشگاهی
۲- احمد گل محمدی دوکش، کاردان علوم آزمایشگاهی

مراحل انجام PCR ترانسفر (tPCR)

دنبال آن واکنش PCR دیگری با زمان طویل سازی افزایش یافته انجام می شود. این امر به مگاپرایمرها اجازه می دهد تا به وکتور مقصد اضافه شوند.

به طور کلی، غلظت پرایمر وابسته است به بازده محصول PCR میانی بالاتر، که برای ادغام مطلوب است. با این حال، اگر غلظت پرایمر بیش از حد بالا باشد، ادغام ضعیف تر است و برای نسبت بهینه نیاز به اصلاح و متعادل سازی دارد. در آزمایش اولیه، غلظت بهینه پرایمر ۱۰-۲۰ نانومولار بود که چند اندازه کمتر از مقدار مورد استفاده برای تقویت PCR معمولی ۲۰۰-۱۰۰۰ نانومولار است.

معرفی ژن به وکتور مقصد

مخلوط واکنش به سلول های E. coli ادغام می شود تا وکتور نو ترکیب جدید بدست آید. این کار از راه تقویت خطی انجام می شود، مادر مهندسی پروتئین این کار با استفاده از تقویت پلاسمید کامل برای جایگزینی توالی های نوع وحشی اصلی در بردار مقصد انجام می شود. آخرین مرحله شامل حذف ناقل دهنده متیله شده از طریق هضم توسط DpnI است.

مزایای tPCR

tPCR مزایای متعددی نسبت به تکنیک های LIC و شبیه سازی وابسته به لیگاز (LDC) دارد. tPCR یک روش صرفه جویی در زمان است زیرا وکتورهای اهداکننده پیش از tPCR به هیچ پیش تیماری نیاز ندارند، محصول میانی PCR نیازی به خالص سازی ندارد و tPCR را می توان برای هر ناقل دهنده و مقصدی اعمال کرد. همچنین، شبیه سازی می تواند در هر مکانی در بردار مقصد، علی رغم وجود مکان های محدود، رخ دهد و برخلاف سایر تکنیک های LIC، به هیچ کیت تجاری نیاز ندارد.

چندین مرحله از روش tPCR ساده تر از روش های دیگر است. برای نمونه، روش tPCR همه مراحل کلون سازی را در یک واکنش ترکیب می کند؛ یعنی هم ساخت قطعه DNA مورد نظر و هم وارد کردن آن به ناقل مقصد، همزمان و در یک مرحله انجام می شود. مجموعه کامل اجزای واکنش tPCR، شامل پرایمرها، dNTPs، بافر، و بردار دهنده و مقصد، در یک لوله مونتاژ می شوند. سپس از این لوله برای ایجاد بردار مقصد جدید استفاده می شود. سادگی tPCR به این معنی است که فرآیند را می توان خودکار کرد و به طور همزمان روی چندین نمونه اعمال کرد و امکان گسترش با توان بالا را ایجاد کرد.

منبع:

This is a translation into Farsi of an article originally published in English: Ryding, Sara, Transfer-PCR (tPCR) Steps. Available from <https://www.news-medical.net/life-sciences>, Last Updated: Jun, ۲۶, ۲۰۱۹.

tPCR یک روش جایگزین برای شبیه سازی DNA نو ترکیب و مهندسی پروتئین مستقل از شبیه سازی است. این یک روش انعطاف پذیر، سریع و مقرون به صرفه برای دستکاری DNA است که می تواند در طیف گسترده ای از رشته های علوم زیستی به کار رود. tPCR توسط Erijman و همکارانش در سال ۲۰۱۱ به عنوان جایگزینی برای تقویت و ادغام DNA ایجاد شد. از این تکنیک می توان برای ایجاد ناقل های کلون DNA و انجام جهش زایی پیچیده DNA استفاده کرد.

اساس تکنیک

در tPCR، DNA از یک سلول هدف جدا می شود، تکثیر شده و به یک ناقل معرفی می شود. در پژوهش اولیه، از ژن های ۵۰۰ و ۱۳۰۰ جفت باز استفاده شد، اما اکنون بیش از ۱۰۰ ژن با استفاده از برنامه TPCR در ناقل های بیانی مختلف شبیه سازی شده اند که برخی از آنها به ۲/۷ کیلوبایت بر ثانیه می رسد. tPCR به محققان اجازه می دهد تا DNA هدف را تقویت کرده و آن را در یک ناقل بدون وابستگی به DNA لیگاز ادغام کنند. این امکان دستکاری و وارد کردن جهش ها به یک ژن را بدون تأخیر زمانی ناشی از لیگاز و خالص سازی محصول فراهم می کند. به همین دلیل است که tPCR به عنوان یک روش شبیه سازی مستقل از لیگاز (LIC) شناخته می شود. بنابراین tPCR یک تکنیک بهینه برای ایجاد کتابخانه های جهش است. با این حال، tPCR همچنین می تواند برای ایجاد سلول هایی با چندین جهش خاص در سراسر ژن هدف مورد استفاده قرار گیرد.

مراحل انجام tPCR

tPCR شامل سه مرحله است. تقویت PCR، مرحله میانی و معرفی ژن به ناقل مقصد. این روش با اندکی تغییرات همسان شبیه سازی DNA و مهندسی پروتئین است.

تقویت PCR

در این مرحله، مواد PCR معمولی به همراه پرایمرها، dNTP ها، نمک ها، آب و وکتورهای دهنده و مقصد اضافه می شوند. پرایمرهایی که در اینجا استفاده می شوند برای ژن هدف بر روی ناقل دهنده و به محل ادغام ناقل مقصد هستند. در طول فرآیند مهندسی پروتئین، چندین آغازگر با جهش های مورد نظر به صورت پشت سر هم استفاده می شوند.

مرحله میانی

به جای خالص سازی واکنش و رها شدن از محصول PCR، محصول میانی به مگاپرایمر تبدیل می شود. این مگاپرایمرها در وکتور مقصد گنجانده می شوند. ژن های هدف تحت ۱۲ چرخه تکثیر محدود قرار می گیرند و به