مروری جامع و ضروری بر PCR، انواع و کاربردهای آن

• رضا بهلولی خیاوی
کارشناس ارشد میکروب شناسی دانشگاه علوم پزشکی اردبیل
شبکه بهداشت و درمان شهرستان مشگین شهر
rezabohlolikhiavi@yahoo.com

This is a translation into Farsi of an article originally published in English: Jaghtar Singh, Nitii Birbian, Shweta Sinha, Akshera Goswami, A critical review on PCr, it's types and applications, International Journal of Advanced Research In Biological Science,1(7), 63-80, 2014.
This article is translated by Reza bohlloloi khiavi , MSc in microbiolgy, ardebil university of medical sciences meshkin shahr city health and treatment Centre.

چکیده

اختراع واکنش زنجیره ای پلیمراز (PCR) نقطه عطفی در تاریخ علوم زیستی و پزشکی است. کاربرد PCR نه تنها به طور کامل در زمینه تحقیقات ژنتیک مولکولی به خصوص در بیوتکنولوژی جانوری و گیاهی انقلابی ایجاد کرده است بلکه این تکنیک، ارتباط و کارایی مبتکرانه خود را در زمینه های دیگر علم پزشکی قانونی، سیستماتیک مولکولی، اپیدمیولوژی مولکولی، باستان شناسی، مردم شناسی، ژنتیک، تکاملی و غیره نیز ثابت کرده است. PCR سنتی منجر به ظهور RT-PCR، qPCR و ترکیب RT-PCR/qPCR شده است. همچنین PCR قادر است به موفقیت پروژه ژنوم انسان را از طریق توانایی تکثیر و توالی یابی ژن های انسان، تکمیل کند که بیشتر پایه و اساس مهندسی ژنتیک شده است و حتی در حال حاضر ایجاد تغییرات مفید در ژنوم یک ارگانیسم را امکان پذیر ساخته است. واریانت های PCR در بسیاری از پیشرفت های اخیر که علوم دوره مدرن را ایجاد کرده اند به طور موفقیت آمیزی مورد استفاده واقع شده است.

کلمات کلیدی:
Standard PCR- Variants. RT-, PCR, qPCR, RT-PCR /qPCR combined

مقدمه

واکنش زنجیره ای پلیمراز (PCR)

سنگ بنا در زمینه ژنتیک مولکولی توسط Francis Crick و James D. Watson در سال ۱۹۵۳ با ارائه مدل ساختار دو رشته‌ای DNA گذاشته شد. در اوایل ۱۹۶۰، توسط دکتر Gobind Khorana، برنده جایزه نوبل در سال ۱۹۶۸پیشرفت های قابل‌توجهی جهت روشن سازی کد ژنتیکی و سنتز اولیگونوکلئوتیدها که به عنوان الگوی پرایمری برای DNA پلیمراز استفاده می شد، وجود حاصل شد. در سال ۱۹۷۱، Kjell Kleppe پژوهشگر آزمایشگاه Khorana، همانند سازی قطعه ای

از DNA را با اســـتفاده از سیســـتم دو پرایمری توصیف کرد. واکنش زنجیره ای پلیمراز یک تکنیک آزمایشـــگاهی است که همانند سازی و تکثیر قطعه ای از DNA را به میلیون ها برابرآن امکان پذیر می سازد. تکنیک واکنش زنجیره ای پلیمراز (PCR) توسط Kary Banks Mullis، در ســـال ۱۹۸۳ وقتی که وی به عنوان بیوتکنولوژیســـت در موسسه Cetus، Emeryville کالیفرنیای آمریکا کار می کرد، ابداع شد. در سال ۱۹۸۵ سرمایه گذاری مشـــترک بین موسســـه Cetus و Perkin-Elmer، دیگر شرکت آمریکایی بیوتکنولوژی جهت طراحی ابزار چرخه حرارتـــی و معرف ها برای PCR صـــورت گرفت و در ۱۹۸۷ مطبوعات خبر دسترسی تجاری «PCR-1000 Thermal Cycler» و «DNA پلیمراز AmpliTaq» منتشر کردند، این اختراع، جایزه نوبل افتخارات خود را در شـــیمی و همچنین جایزه ژاپن را در سال ۱۹۹۳ از آن خود کرد.

اجزای لازم برای PCR استاندارد

اجزای مخلوط واکنش:

- Taq/دیگر پلیمرازهای مقاوم به حرارت
- DNA الگو
- پرایمرها
- داکسی نوکلئوتید تری فسفات ها (dNTPs)
- $MgCl_2$
- پیپت خودکار/ظروف پلاستیکی/دستکش
- دستگاه چرخه حرارتی (ترمال سایکلر)

Taq و دیگر پلیمرازهای مقاوم به حرارت

در ســـال ۱۹۶۹، Thomas D. Brock ترموفیلـــوس اکواتیکـــوس، گونه جدیـــدی از باکتری گرما دوســـت موجود در بخش زیرین چشـــمه آب گرم پـــارک ملی Yellowstone جداســـازی کرد. در سال ۱۹۷۶ آنزیم مقاوم به حرارت «پلیمراز Taq» از Thermus aquaticus ایزوله شـــد در سال ۱۹۸۶ HenryErlich، اســـتفاده از پلیمـــراز Taq را در PCR خبر داد، چون این آنزیم می‌تواند فعالیت خود را در طیف وسیعی از درجه حرارت بالا حفظ کند اضافه کردن آن به مخلوط PCR، کل رونـــد PCR را بدون نیاز به اضافه کردن دســـتی DNA پلیمـــراز تازه از اشریشـــیاکلی در هر چرخـــه واکنش، کوتاه تر می‌کند زیرا DNA پلیمراز اشریشیا کلی قادر به تحمل گرمایش و ســـرمایش سریع نیست. مسیر سنتیکی Taq پلیمراز در سنتز رشته الگو با واردکردن نوکلئوتیدی ها به وسیله Rothwell و Waksmanدر ۲۰۰۵ توصیف شـــده است. بسیاری از DNA پلیمرازهای مقاوم به حرارت نیز کشـــف شـــده اند که می‌توان برحســـب کاربردشان از آن‌ها اســـتفاده کرد (جدول ۱) معمولا 1-1.5Uاز DNA پلیمـــراز Taq در 50µl از مخلوط واکنش مورد نیاز است. با این حال اگر مهارکننده ها (مثل درجه خلوص پایین DNA الگو) در مخلوط واکنش وجود داشته باشد، مقدار بالای DNA پلیمراز Taq (2-3U) جهت حصول بازده بهتر محصولات تکثیرشده، لازم است.

DNA الگو

معمولا 1ng- 0.01 از DNA الگو برای DNA پلاسمید یا فـــاژ و 1µg- 0.1 برای DNA ژنومـــی در 50µl مخلوط تام واکنش مورد نیاز است. DNA الگوی بیشتر از این مقدار سبب تولید فـــرآورده های غیر اختصاصی PCR می شـــود؛ بنابراین DNA باید خالص باشد به طوری که، حتی وجود مقدار خیلی جزئی از فنول، EDTA، پروتئیناز K و غیره مورد اســـتفاده در جداســـازی DNA، شدیدا فعالیت DNA پلیمراز Taq را مهار می کند. با این حال رســـوب DNA با اتانول و شستشوی پلیت DNA با اتانول ۷۰% معمولا در حذف این آلودگی ها از نمونه DNA مؤثر هستند.

پرایمرها

موضوع بســـیار مهم برای تکثیر جایگاه های هدف در داخل یک ناحیه ای از ژنوم، طراحی پرایمر است. پرایمر موفق عمدتا برای دستیابی به دو هدف یعنی ویژگی و کارایی طراحی می‌شود. در صورتی که پرایمرها جهت پیشـــگیری از نتایج مثبت کاذب، با دقت کافی طراحی شـــوند هردوی این اهداف دســـت یافتنی می‌باشند. در زیر ملاحظاتی که هنگام طراحی پرایمر باید در ذهن داشته باشیم آورده شده است.

طول پرایمر: طول یک پرایمر به طور مستقیم با ویژگی واکنش PCR متناسب اســـت. همچنین طول پرایمر، دمایی را مشخص می‌کند که در آن پرایمر به DNA الگو متصل خواهد شد. معمولا پرایمرها در طولی بین ۱۸ تا ۲۴ باز طراحی می شـــوند اگر چه

حداقل طول پرایمر به وسیله اندازه ژنوم تعیین می شود.

محتوای GC: محتوای GC مهم اســت زیرا مقدار T_m یک توالی را تعیین می کند. اولیگونوکلئوتیدی با طول ۲۰ جفت بازی و حاوی ۵۰% CG معمولا مقدار T_m بین ۵۶-۶۲ درجه سانتیگراد دارد. محتوای GC بســیار مطلوب باید T_m بین ۴۰ تا ۶۰ درجه ســانتیگراد داشته باشــد. از وجود بیش از سه نوکلئوتید G یا C در انتهای '3 پرایمر باید اجتناب شــود زیرا ممکن است منجربه پرایمینگ غیر اختصاصی (اتصال غیراختصاصی پرایمر) شود.

دمــای ذوب (T_m): ازآنجایی‌کــه در یــک واکنش PCR مجموعه‌ای از پرایمرها اســتفاده می‌شــوند از این رو باید سعی شــود تا جفت پرایمری هایی انتخاب شــوند که T_m آن ها از همدیگر بیش از ۵ درجه ســانتیگراد اختلاف نداشــته باشــند، بنابراین محتوای GC و طول پرایمر باید بر این اســاس انتخاب شوند. معمولا T_m در دامنه ۷۰-۶۲ درجه سانتیگراد قرار دارد.

برآورد دمای ذوب و دمای آنلینگ پرایمر: برای پرایمرهای کمتــر از ۲۵ نوکلئوتید، تقریبا T_m با اســتفاده از فرمول زیرین محاسبه می شــود: که در A، T، G، C تعداد نوکلئوتیدی های مربوطه در پرایمر هست:

$$T_m = 4(G+C) + 2(A+T)$$

وارد کردن جایگاه محدود کننده: ۶-۳ نوکلئوتید به انتهای '5 پرایمر اضافه می شــود بنابراین به طور موفقیت آمیزی جایگاهی برای برش محدود کننده در توالی های تکثیر شده، فراهم می کند.

مکمــل بودن پرایمر: پرایمر نباید مکمل خود یا مکمل دیگر پرایمرهای موجود در مخلوط واکنش باشــد، از این رو از وجود هومولوژی داخل و بین پرایمرها باید پرهیز شــود زیرا می تواند منجر به ایجاد دیمر پرایمر شود.

تکرار بازها: از تکرار باز منفرد یا دو باز برای ۴ مرتبه یا بیشتر باید پرهیز شود.

نوکلئوتیــد انتهایی در پرایمــر PCR: موقعیت انتهایی در پرایمر جهت حذف جفت شــدن ناجور ضروری اســت. برای پرهیــز از آن، از پرایمرهایی کــه در انت‌هاهای '3 خود مکمل هســتند، اجتناب شــود زیرا این امر ممکن است سبب تشکیل غیرضروری دیمر پرایمر شود.

ساختارهای ثانویه: از ایجاد ساختارهای ثانویه حتی المقدور باید پرهیز شود، ســاختارهای ثانویه در نتیجه واکنش های بین مولکولی یا درون مولکولی به وجود می آیند. ســنجاق ســرها، دیمرهای خودی، دیمرهای متقابل، همه در نتیجه ســاختارهای ثانویه حاصل می شوند.

جدول ۱: پلیمرازهای مقاوم به حرارت و کاربرد آن ها

پلیمرازها (منبع)	زیستگاه	کاربردها	منابع
Tfl (ترموفیلوس فلاوس)	تعیین نشده است	تحمل غلظت های بالای خون، توالی یابی DNA در دمای بالا	Kaledin et al., 1980
T4 (باکتریوفاژ T4 اشریشیاکلی)	تعیین نشده است	پر کردن انتهای آویزان '3 و '5 جهت تشکیل انتهاهای صاف، نشان‌دار کردن پروب، ساب کلونینگ حذف تک رشته، سنتز رشته دوم در جهش زایی هدایت شده به جایگاه (جهش زایی جهت دار نیز گفته می شود)	Dale et al., 1985; Kunkel et al., 1987; Sambrook et al., 1989
T7 (باکتریوفاژ T7 و ژن **trxA** اشریشیاکلی)	تعیین نشده است	بسط رشته در جهش زایی هدایت شده به جایگاه، حذف در جای قطعات آپوپتوتیک DNA	Bebenek et al., 1989; Wood et al., 1993
Vent/Tli (ترموکوکوس لیترالیس)	دریچه‌های هیدروترمال عمق دریا	۵-۱۵ برابر فعالیت بالایی نسبت به DNA پلیمراز Taq دارد، فعالیت اگزونوکلئازی'5→ '3	Mattila et al., 1991
rTth (ترموس ترموفیلوس)	چشمه آبگرم در ایزو ژاپن	تحمل غلظت بالای خون، فعالیت ترانسکریپتاز معکوس علاوه بر فعالیت'3→ '5 پلیمرازی، فعالیت اگزونوکلئازی '3→ '5	Myers and Gelfand, 1991
Ultma (ترموتوگا ماریتیم)	ناحیه ژئوترمال (زمین‌گرمایی) دریایی نزدیک ولکانو، ایتالیا	فعالیت اگزونوکلئازی'5→ '3	Diaz and Sabino, 1998
KOD (ترموکوکوس کداکارائنزیس)	سولفاتارا جزیره کداکارا، کاگوشیما در ژاپن	پیش روندگی بالا، صحت بالا و میزان گسترش بالا بدون هیچ پیچیدگی که توسط فعالیت ترمینال ترانسفرازی اعمال می شود	Bensona et al., 2003
Pwo (پیروکوکوس ووئسی)	رسوبات دریایی، ساحل پورتو لوانته، جزیره ولکانو، ایتالیا	فعالیت اگزونوکلئازی '5→ '3، تحمل غلظت بالای خون	Cahill, et al., 2003; Kanoksilapatham et al., 2004
Pfu (پیروکوکوس فوریئوسوس)	رسوبات دریایی، ساحل پورتو لوانته، جزیره ولکانو، ایتالیا	فعالیت اگزونوکلئازی '5→ '3، پایین ترین میزان خطا	Cahill, et al., 2003; Kanoksilapatham et al., 2004
HotTub (ترموس یوبیکوئیتوس)	تعیین نشده است	تحمل غلظت بالای خون، سنتز cDNA، سنتز رشته دوم در جهش زایی هدایت شده به جایگاه، تولید پروب های ssDNA (DNA تک رشته ای) توسط بسط پرایمر	Kermekchiev et al., 2009

dNTPs

غلظت هر dNTP در مخلوط نهایی واکنش معمولا 200µM است و غلظت هر (dNTPs ,dATP, dCTP, dGTP, dTTP) باید یکسان باشد. غلظت نادرست حتی یک dNTP منفرد ممکن است سبب افزایش درج اشتباه نوکلئوتیدها در رشته جدید شود.

$MgCl_2$

در طی همانند سازی یک جفت الکترون منفرد در ناحیه 3'-OH زنجیر در حال تکثیر ظاهر می شود که برای تشکیل پیوند فسفودی استر توسط پلیمراز Taq استفاده می شود. این جفت الکترون منفرد جهت تبدیل dNTP به dNMP از طریق حمله نوکلئوفیلی بر روی اتم فسفات گروه α- فسفات استفاده شده و پیروفسفات (β و γ) آزاد می گردد؛ اما dNTP ورودی چهار بار منفی دارد و به علت وجود این بارهای منفی، از حمله نوکلئوفیلی جلوگیری به عمل می آید، بنابراین، Mg^{2+} با شلاته کردن بارهای منفی اضافی نوکلئوتید ورودی، حمله نوکلئوفیلی (هسته دوستی) و تشکیل پیوند و در نتیجه پلیمریزاسیون را تسهیل می کند. همچنین همه آنزیم ها برای فعالیتشان نیاز به کوفاکتور دارند و یون فلزی Mg^{2+} به عنوان کوفاکتور ضروری برای DNA پلیمراز در PCR عمل می کند. یون Mg^{2+} جهت اتصال و ایجاد نیرو، وارد پروتئین شده و پلیمراز را قوی تر کرده تا بتواند به dNTP متصل شود اما به صورت اختصاصی این کار را انجام می دهد؛ بنابراین افزایش غلظت Mg^{2+} در PCR سبب پیوند قوی می شود اما احتمال تکثیر غیر اختصاصی نیز افزایش می‌یابد. بدین خاطر غلظت آن باید برای هر سیستم پرایمر الگو بهینه شود. همچنین اجزای دیگر واکنش PCR شامل پرایمرهای، الگو، محصولات PCR و dNTPs به یون Mg^{2+} متصل می‌شوند. غیر از این ها dNTPs تمایل زیادی برای اتصال به یون Mg^{2+} دارند و به خاطر همین یون Mg^{2+} آزاد لازم است تا به عنوان کوفاکتور آنزیم در PCR عمل کند بنابراین غلظت تام یون Mg^{2+} باید بیشتر از غلظت تام dNTP باشد. دامنه غلظت توصیه شده برای $MgCl_2$ در مخلوط استاندارد واکنش 1-4mM است.

پیپت‌های خودکار، ظروف پلاستیکی و دستکش

پیپت های خودکار (1 -10µl, 10-100µl & 100-1000µl)، لوله‌های میکروسانتریفیوژی 0.2ml-1.5ml، سرسمپلرها، محل PCR و غیره در طول PCR و برای بارگذاری محصولات تکثیر یافته در ژل آگارز لازم هستند.

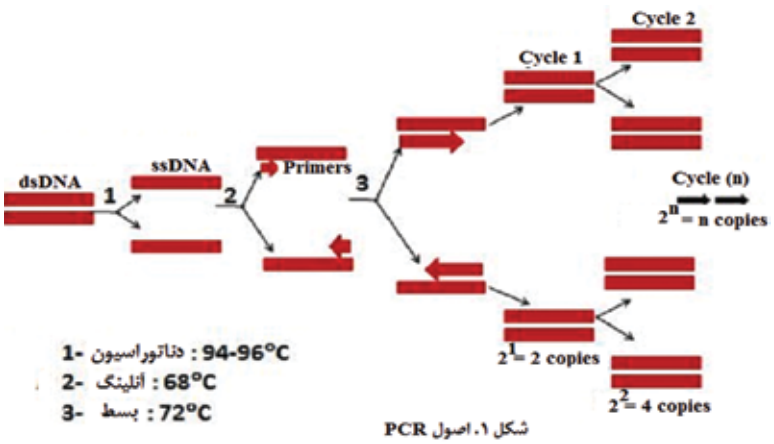
ترمال سایکلر (سایکلر حرارتی)

ابزاری است که دما را در طول هر چرخه برای دناتوراسیون، آنلینگ، بسط و روند نگهداری بسیار سریع تغییر می دهد.

اصول، روش و آشکارسازی پس از تکثیر PCR

اصول PCR

اصول PCR بر پایه این واقعیت استوار است که در دمای دناتوراسیون بالا نزدیک ۹۵ درجه سانتیگراد، دو رشته مولکول DNA هدف به علت شکستن پیوندهای A–T و G–C از هم جدا می شوند. در دمای های آنلینگ در دامنه ۶۵-۵۰ درجه سانتیگراد، پرایمرهای مکمل جلو (Forward) و معکوس (Reverse) به انتهای '3 اتصال یافته و مولکول DNA هدف تک رشته‌ای را از دو طرف محصور می کنند. سپس پلیمراز Taq رشته جدید DNA را با اضافه کردن dNTP ها توسعه داده و مولکول دو رشته ای خودش را در دمای توسعه ۷۲ درجه سانتیگراد بازسازی می کند. این روند چند بار تکرار شده و چندین نسخه از مولکول DNA هدف را به وجود می‌آورد (شکل ۱). برای نتایج بهتر، دستوالعمل های عملی شبکه کیفی ژنتیک مولکولی اروپا (EMQN) باید مورد مطالعه قرار گیرد.



شکل ۱. اصول PCR

روش انجام پروژه

ابتدا دناتوراسیون در دمای ۹۵-۹۰ درجه سانتیگراد به مدت ۵-۳ دقیقه صورت می گیرد و طی آن دو رشته مولکول DNA دو رشته ای هدف از هم جدا می شوند. دناتوراسیون اولیه توسط ۳۵-۳۰ چرخه دناتوراسیون، آنلینگ و توسعه دنبال می شود. تعداد چرخه PCR بستگی به مقدار DNA الگو در مخلوط واکنش و بازده مورد انتظار محصول PCR دارد. دناتوراسیون شامل حرارت دادن مولکول DNA دو رشته ای هدف در دمای95-90 به مدت 35-30 ثانیه است.

مرحله آنلینگ اجازه اتصال پرایمرهای مکمل Forward و Reverse به ناحیه طرفین DNA الگو را در دمای 65-50 درجه سانتیگراد در مدت 55-30 ثانیه می دهد.

مرحله بسط پرایمر در دمای ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت 55-30 ثانیه رخ می دهد و طی آن dNTP های مکمل به رشته‌های جدید اضافه می شوند. پس از چرخه نهایی، معمولا نمونه‌ها در دمای ۷۲ درجه سانتیگراد به مدت 15-5 دقیقه جهت پر کردن انتهاهای بیرون زده محصولات PCR جدیدا سنتز شده، انکوبه می شوند. ذخیره و نگهداری محصولات PCR در دمای ٤ درجه سانتیگراد به مدت زمان نامحدود می تواند صورت بگیرد.

آشکارسازی پس از تکثیر

پس از الکتروفورز محصول PCR توسط ژل آگارز، ژل آگارز با محلول اتیدیوم بروماید (EtBr) رنگ آمیزی می شود و سپس در زیر تابش نور UV محصول PCR در ژل به صورت رنگ صورتی مشاهده می شود. اتیدیم بروماید سال های زیادی برای رویت اسیدهای نوکلئیک در ژل آگارز استفاده شده است. البته اتیدیم بروماید جهش زای بالقوه بوده و سبب جهش در سلول های زنده می شود؛ بنابراین ژل باید در یک ظرف زباله اختصاصی گذاشته شود که با علامت خطر نشان دار شده و تاریخ گذاری شده و به بخش زیست محیطی و ایمنی تحویل داده شود.

انواع PCR

- واریانت های PCR استاندارد
  - PCR- رونویسی معکوس (RT-PCR)
  - PCR در زمان واقعی یا PCR کمی (qPCR)
- ترکیب RT-PCR/qPCR
- واریانت های PCR استاندارد

تغییر در تکنیک پایه ای PCR منجر به پیشرفت واریانت‌های PCR شد که در زیر توصیف شده اند:

PCR ویژه آلل
(Allele specific PCR (Tetra-primer ARMS PCR))

PCR ویژه آلل امکان شناسایی مستقیم جهش نقطه ای در DNA را می دهد. این تکنیک به دانش قبلی درباره توالی DNA هدف مثل اختلاف بین آلل ها نیاز دارد و از پرایمری با انتهای '3 ناجور در برگیرنده تغییرات تک نوکلئوتیدی بهره می‌برد. دو پرایمر ویژه آلل، یکی برای هر آلل SNP (پلی مورفیسم تک نوکلئوتیدی که به‌صورت snip تلفظ می شود) مورد نیاز است که یکی از دو پلیمورفسیم تک نوکلئوتیدی موجود در انتهای '3 را پوشش می دهد (شکل ۲). ممکن است پرایمر معمول Forward و Reverse استفاده شوند. به طور کلی دو واکنش PCR برای شناسایی دو آلل یک SNP لازم است.

■ PCR نامتقارن (Asymmetric PCR)

این واریانت PCR ترجیحا برای تکثیر یکی از رشته های مولکول DNA هدف با استفاده از غلظت نابرابر پرایمر به کاربرده می‌شود به طوریکه چنین همانند سازی از روی علم ریاضیات با استفاده از پرایمر مازاد رخ می دهد.

■ PCR کلونی(Colony PCR)

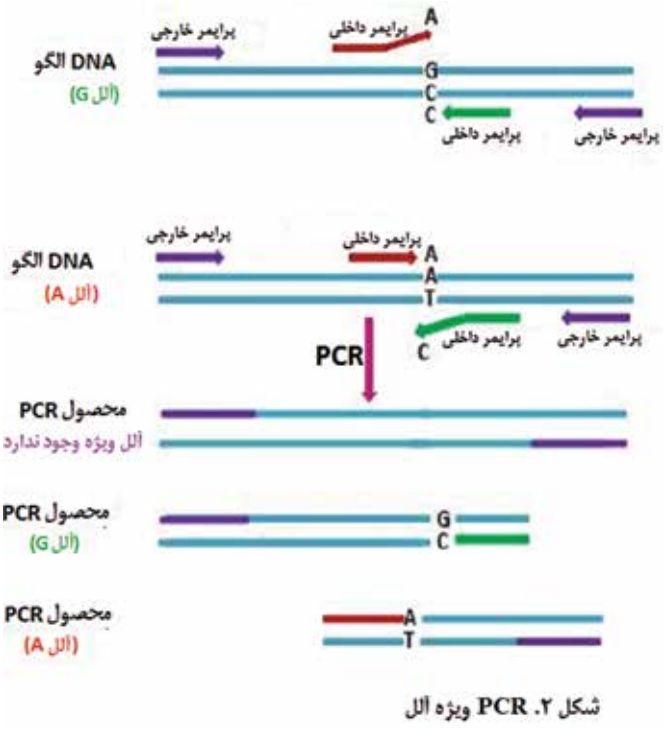
نوعی از PCR است که به طور روتین در مطالعات ژنوم باکتریایی استفاده می شود. درج پلاسمیدهای دارای تعداد نسخه بالا مثل pUC18، pUC19 یا pBluescript در باکتری ها به طور معمول برای هدف های مختلف انجام می‌شود و PCR کلونی سریعاً درج این پلاسمیدها را غربالگری می‌کند. این روش دارای چند مزیت بر روش‌های سنتی غربالگری آبی،سفید است زیرا می‌تواند هردوی اندازه و جهت درج ناقل را تعیین کند. در حقیقت کلونی های سفید علاوه بر غربالگری از طریق روش آبی سفید سنتی، توسط روش PCR کلونی هم غربالگری می شوند تا از توالی یابی کلون های مثبت کاذب پرهیز شود. علاوه براین PCR کلونی به تولید مقدار کافی محصول مطلوب PCRبه منظور توالی یابی کمک می کند.

■ PCR دژنره(Degenerate PCR)

واریانتی از PCR اســت کــه پرایمرهای دژنره را جهت تکثیر توالی ناشــناخته پیوسته به توالی DNA شناخته شده، به کار می گیرد. پرایمرهای دژنره بر پایه همولوژی ژن شناخته شده و توالی یابی شده طراحی می شــوند. این تکنیک شناســایی اعضای جدیدی از خانواده ژنی یا ژن های اورتولوگ از ارگانیسم مختلف را امکان پذیر می سازد.

■ PCR هات استارت (Hotstart PCR)

این تکنیک شامل مراحل PCR سنتی است به جز این که پلیمــراز Taq زمانی به مخلوط واکنش اضافه می شــود که بقیه اجزای PCR تا دمای ذوب DNA حرارت داده شــده‌اند بنابراین از تکثیر غیر اختصاصی در دماهــای پاییــن جلوگیــری می کند. یــا به طور جایگزین می توان از مهارکننده هایی با اتصال کوالان به پلیمراز استفاده کرد که فقط پس از رسیدن مخلوط واکنش به T_m از آن جدا می شوند.



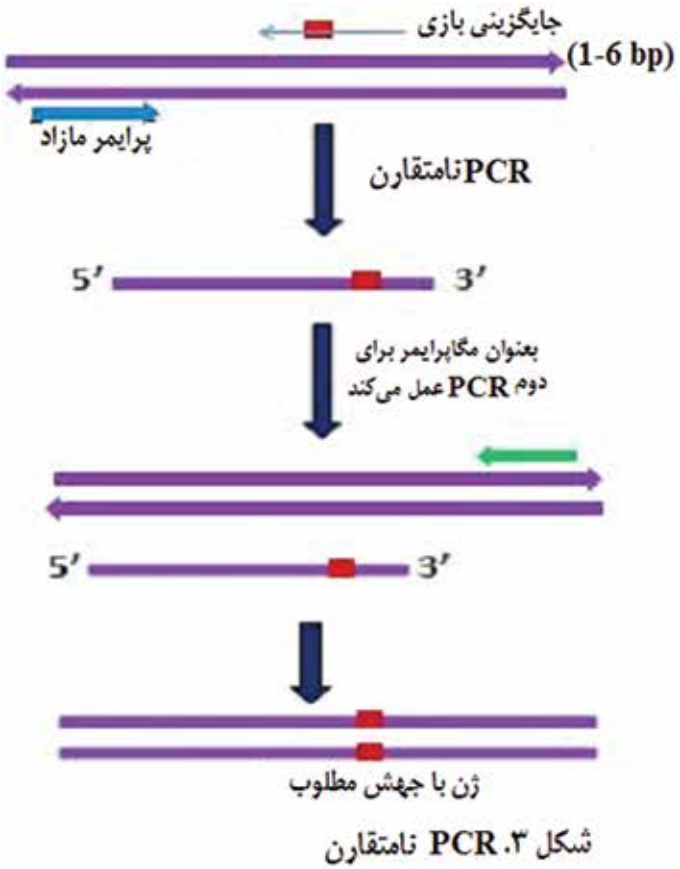
شکل ۲. PCR ویژه الل

■ PCR معکوس(Inverse PCR)

در حالی‌که PCR مرسوم به جفت پرایمر مکمل برای هر دو انتهای '3 DNA هدف نیاز دارد، PCR معکوس امکان تکثیــر DNA را فقط با یک توالی شناخته شده می دهد. این تکنیک نیازمند یک برش و اتصال محدود کننده در توالی اســت که منجر به تشکیل قطعه DNA حلقوی می شود که می توان از توالی شناخته شده آن به عنوان جایگاه اتصال پرایمر جهت انجام PCR استفاده کرد.

■ PCR مینی پرایمر (Miniprimer PCR)

روش PCR اســتاندارد به پلیمــراز Taq نیاز دارد که کارایی آن در ســنتز DNA به علت نیاز به پرایمرهای طویلشــان (۲۰-۳۰ نوکلئوتید) از دیگر آنزیم های همانند ســاز کمتر است؛ بنابراین روش جدید PCR به نام PCR مینی پرایمر توسعه یافت.

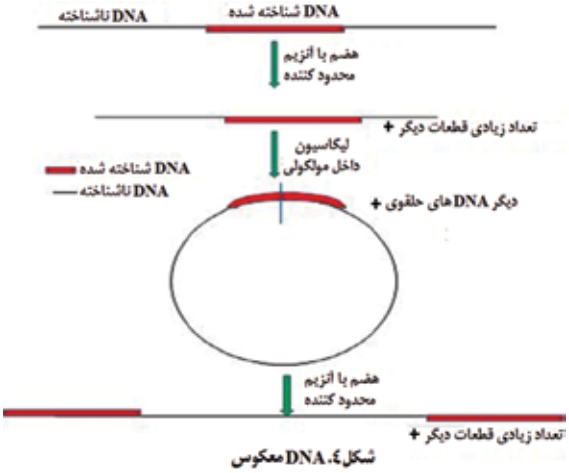


شکل ۳. PCR نامتقارن

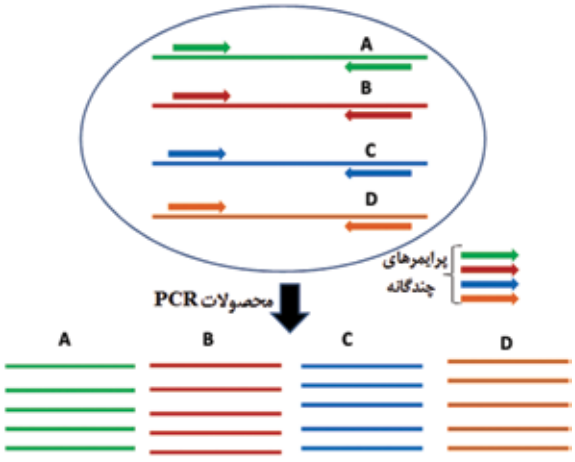
در ایـــن PCR پلیمراز Taq مهندســـی شـــده و مینی پرایمر با طول ۱۰ نوکلئوتید استفاده شـــده است. PCR مینی پرایمر در درک بیولوژی میکروبی جهت شناسایی توالی DNA محافظت شده طی تکامل مثل 16S rRNA(18S rRNA یوکاریوتی) ســـودمند است که با PCR اســـتاندارد غیر ممکن است. Xu و همکاران نقش PCR مینی پرایمر را با استفاده از تیتانیوم پلیمراز Taq و پرایمرهـــای کوتاه برای ژنوتایپینـــگ (تعیین ژنوتیپ) زیرگونه پانتوآ استوارتی ای ارزیابی کردند، که عامل سببی فساد باکتریایی استوارت در ذرت است.

■ PCR چندگانه (Multiplex PCR)

PCR چندگانه، تغییر PCR به منظور شناسایی سریع حذف‌ها یا مضاعف شدگی ها در یک ژن بزرگ است، در ۱۹۸۸، حذف در ژن دیســـتروفین نخســـت با روش PCR چندگانه شناسایی شـــد. PCR چندگانه از مجموعه پرایمر چندگانه در داخل یک مخلوط منفرد PCR جهت تولید آمپلیکون با اندازه‌های مختلف و اختصاصی توالی های مختلف DNA، اســـتفاده می کند. این واریانـــت PCR چندین ژن را در یک آزمون منفرد مورد هدف قرار می دهد که به عبـــارت دیگر جهت انجام آن چندین برابر معرف و زمان بیشتر مورد نیاز خواهد بود (شکل ۵). طول جفت باز آمپلیکون ها باید تفاوت کافی را جهت جدا ســـازی بهتر و تشکیل باند مجزا داشته باشند تا به راحتی در ژل مشاهده شوند. PCR چندگانه در بســـیاری از زمینـــه های آزمون DNA مثل آنالیز حذف ها، جهش‌ها و پلی مورفیســـم ها، میکروساتلایت ها (ریز ماهواره ها) و SNP ها به طور موفقیت آمیزی اســـتفاده شده است.



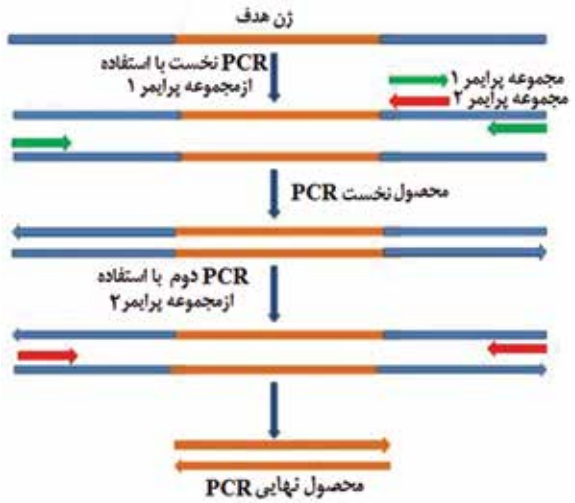
شکل ٤. DNA معکوس



شکل ۵. PCR چندگانه

■ PCR آشیانه (Nested PCR)

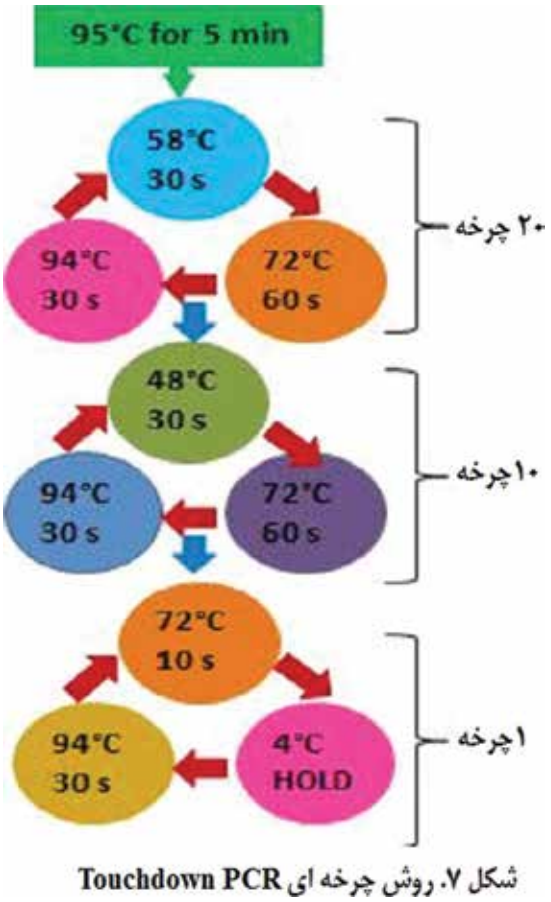
تغییر PCR جهت به حداقل رســـاندن تکثیر غیر اختصاصی و محصولات کاذب PCR طراحی می شـــود که امکان داشت ســـبب اتصال پرایمر به جایگاه های پیش بینی شده و ناخواسته مشابه DNA هدف شود. PCR آشیانه شامل ۲ مجموعه‌ای از پرایمر است که آن‌ها در دو اجرای (ران) پی‌درپی واکنش PCR اســـتفاده می شوند (شکل ٦). عملکرد مجموعه دوم پرایمر این اســـت که به جایگاه هدف دوم در داخل توالی تکثیر شـــده با مجموعه اول پرایمر اتصال یابند. به طوری که بسیار بعید است که توالی کاذب یا ناخواسته، جایگاه اتصال برای هر دو مجموعه پرایمر ها داشته باشد.



شکل ٦. PCR آشیانه با استفاده از دو مجموعه پرایمر

Touchdown PCR

ایـــن تکنیک قادر اســـت با اســـتفاده از انجـــام مراحل اولیه چرخه‌هـــای PCR در دماهای بـــالا از تکثیر توالـــی های غیر اختصاصی ممانعت کند و در چرخه های بعدی دمای آنلینگ رفته رفته کاهش می یابد (شکل ۷). این امر امکان اتصال اختصاصی پرایمـــر در بالاترین دما را می دهد که حداقل مجاز برای اتصال غیر اختصاصی است و فقط توالی هدف را تولید می کند.



شکل ۷. روش چرخه ای Touchdown PCR

PCR رونویسی معکوس
Reverse Transcription-PCR (RT- PCR)

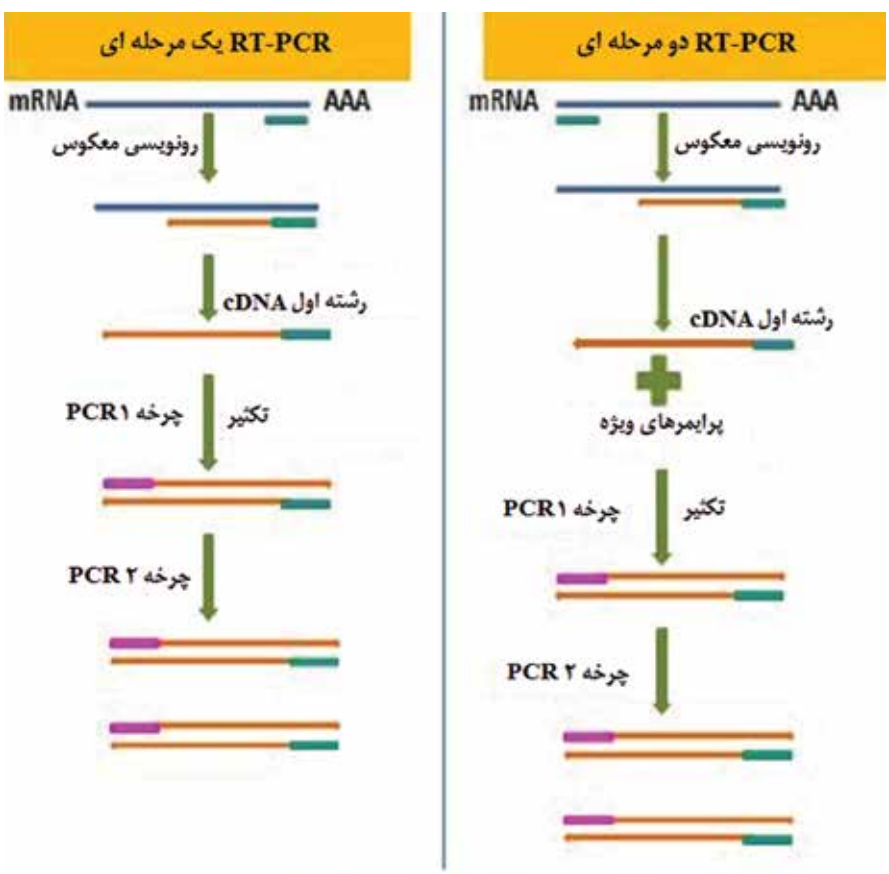
این تکنیک آشکارسازی کمی مقدار بیان RNA را به وسیله تولیـــد DNA مکمـــل (cDNA) از RNA بـــا کمک آنزیم رونوشت بردار معکوس و به دنبال آن تکثیر cDNA با استفاده از PCR اســـتاندارد را ممکن می ســـازد. Howard Temin از دانشـــگاه Wisconsin–Madison، آنزیم رونوشت بردار معکوس را در ویروس روس ســـارکوما (RSA) کشف کرد که بعدا به طور مستقل توســـط David Baltimore در سال ۱۹۷۰ از دو ویروس تومـــوری RNA دار: R–MLV (ویروس لوکمی رائوســـچر مورین) و RSV جدا سازی شـــد. هردو دانشمند در سال ۱۹۷۵ به طور مشـــترک جایزه نوبل فیزیولوژی یا پزشکی را به خاطر دســـتاوردهای فوق الذکر دریافت کردند. آنزیم رونوشت بردار معکوس شـــامل یک DNA پلیمراز وابسته به RNA، یک فعالیت DNA پلیمرازی وابسته به DNA و ریبونوکلئاز H هستند که جهت انجام رونویســـی با هم عمل می کنند. علاوه بر عملکرد در فرآیند رونویسی، آنزیم های رونوشت بردار رتروویروسی دارای یک دومین متعلق به خانواده RNase H هستند که جهت همانند سازی آن‌ها حیاتی هست. ایده رونویســـی معکوس در ابتدا زیاد مورد اســـتقبال قرار نگرفت زیرا هسته مرکزی بیولوژی مولکولی (Central Dogma) را نقض می کرد اما سرانجام در سال ۱۹۷۰ زمانـــی که Howard Temin و David Baltimore، به طور مســـتقل آنزیم مسئول رونویســـی معکوس به نام رونوشت بردار معکوس را کشف کردند، پذیرفته شد.

رونوشـــت بردارهای معکـــوس رتروویروســـی مانند ویروس میلوبلاستوزیس ماکیان (AMV) و ویروس لوکمی موش مولونی (MMLV) از رونوشت بردارهای بسیار شناخته شده هستند که در زمینه بیولوژی مولکولی استفاده می‌شوند. رونوشت بردار معکوس بســـیار رایج برای الگوهـــای طویل mRNA، رونوشـــت بردار معکوس M–MLV است زیرا فعالیت RNase H آن ضعیف‌تر از رونوشـــت بردار معکوس AMV (که به طور معمول استفاده می‌شـــود) می باشد. پیشرفت در زمینه مهندسی ژنتیک و گسترش بافرهای افزاینده فعالیت ترانســـکریپتازی (RT) ســـبب دسترسی آنزیم‌های جدیدی شد که کارایی بالاتری نسبت به ترانسکریپتازهای طبیعی داشـــته و دارای مقادیر بالای مقاومت حرارتی و عمر مفید طولانی در ۵۰ درجه ســـانتیگراد هســـتند. امروزه رونوشت بردار معکـــوس M–MLV مورد اســـتفاده از اشریشـــیاکلی تلخیص می‌شود که ژن pol، M–MLV بر روی پلاسمید را بیان می کند. درحالی‌که سلول های حشرات عفونی‌شده با باکولوویروس دارای ژن pol ویروس میلوبلاستوزیس ماکیان (AMV) جهت تلخیص رونوشت بردار معکوس AMV استفاده می شوند.

دو روش مقدماتـــی برای انجـــام RT–PCR وجود دارد یعنی روش یـــک مرحله ای و دو مرحله ای (شـــکل ۸). در روش یک مرحله ای، تمام اجزا شـــامل پرایمرهای اختصاصی در داخل یک

لوله منفرد گذاشـــته شـــده و به همان صورت واکنش PCR نیز صورت می‌گیرد. در روش دو مرحله ای، واکنش اول شامل تشکیل cDNA با کمک واکنش مجزای ترانسکریپتاز معکوس است سپس cDNA به واکنش PCR اضافه می شود.

روش یک مرحله ای بسیار سودمند است زیرا زمان کمی می‌برد و ارزان بوده و نیاز کمی به دست‌کاری نمونه ها دارد بنابراین خطای پیپت کردن، آلودگی و غیره کاهش می یابد. با این وجود مشـــکل آنالیز بعدی ژن های هدفی اســـت که به وســـیله پرایمرهای ویژه ژن مورد اســـتفاده در واکنش تک لوله ای جهت تشـــکیل و تکثیر cDNA، تکثیر نشـــده اند؛ بنابراین کسری RNA از نمونه های اصلی باید جهت آزمون بیشـــتر ذخیره شـــوند؛ اما انجام روش دو مرحله ای این مزیت را دارد که در این روش نمونه RNA در یک مرحله استفاده نمی شود و آنالیز بیشتر ژن هدف را امکان پذیر می سازد.



شکل ۸. روش های یک مرحله ای و دو مرحله ای RT-PCR

Real time-PCR or quantitative PCR (qPCR)qPCR

(PCR در زمان واقعی یا PCR کمی)

در سال ۱۹۹۲ توســـط Higuchi و همکارانش معرفی شد و قادر اســـت به منظور اندازه گیری تکثیر DNA در هر چرخه PCR، رنگ فلورســـنت گزارشـــگری مثل ســـایبر گرین I را آشکارسازی کند در طول فاز خطی لگاریتمی تکثیر، فلورسنس تا نقطه ای افزایش می یابد که قابل سنجش می شود و به عنوان آســـتانه چرخه (C_T) یا نقطه تقاطع نامیده می شود؛ بنابراین با استفاده از رقت های متوالی DNA استاندارد با مقدار مشخص، می توان مقدار DNA یا cDNA نمونه ناشـــناخته را به عنوان ارزش C_T با استفاده از ترسیم منحنی استاندارد لگاریتم غلظت در مقابل C_T محاسبه کرد. qPCR تکثیر و آشکارسازی نمونه را در یک مرحله انفرادی با هم انجام می دهد از این رو نیاز به هر فرآیند پـــس از تکثیری را از میان می برد. مزیت های دیگر

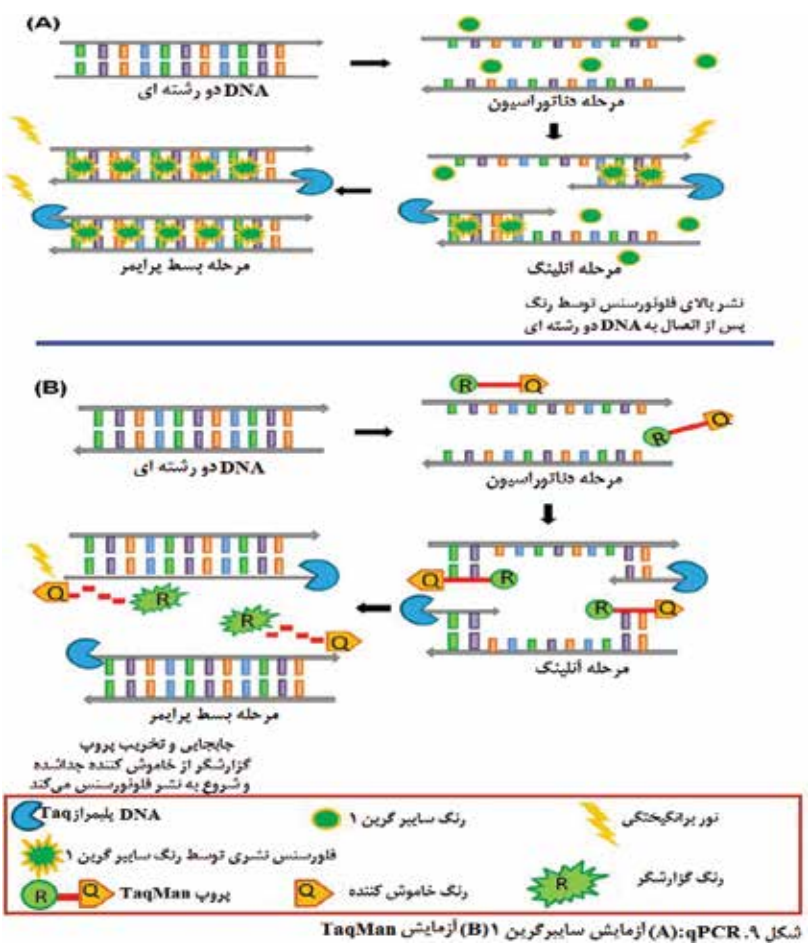
qPCR، حساسیت، تعیین پیشرفت واکنش در زمان واقعی، سرعت آنالیز و سنجش دقیق مواد مورد آزمون در نمونه است. این امر در نتیجه وجود رنگ های فلورسنس یا پروب های اولیگونوکلئوتیدی نشان دار با فلورسانس است که شدت آن ها با مقدار محصول DNA تولید شده، متناسب می باشد. جهت تسهیل انواع مختلف واکنش های qPCR، انواع مختلف پلیمراز استفاده می شوند که این پلیمرازها دارای صحت بالا، سرعت و مقاومت حرارتی بالایی هستند؛ بنابراین، تجهیزات PCR در زمان واقعی جهت انجام این واکنش ها طراحی می شوند که شامل ترمال سایکلر برای تکثیر DNA، سیستم نوری برای برانگیختن فلوئور وفورها و گرفتن فلورسنس نشری از شیمی آشکار سازی (شکل ۹) و نرم افزار ویژه برای جمع آوری و آنالیز داده های کمی تولید شده است.

■ **ترکیب RT-PCR/qPCR (RT-PCR/ qPCR combined)**

در آشکارسازی کمی بیان RNA، واکنش زنجیره ای پلیمراز رونویسی معکوس (RT-PCR) از طریق تبدیل الگوی RNA به DNA برای تعیین کمی بیان RNA استفاده می شود. هر دو تکنیک RT-PCR و qPCR ادغام شده و این تکنیک ترکیبی، RT-PCR -qRT/PCR کمی یا RT-qPCR نامیده می شود.

مزایا و معایب تکنیک PCR

به خاطر اینکه تکثیر با پرایمرهای مکمل، انجام می شود تکنیک بسیار اختصاصی است. به علت تولید میلیون‌ها نسخه از طریق تکثیر در کمتر از سه ساعت، روش نسبتا سریعی است. براساس نوع ماده ژنتیکی (DNA یا RNA) تغییرات مناسب را می توان به راحتی اعمال کرد و تکنیک به راحتی برای طیف وسیعی از کاربردها تقریبا در تمام رده های موجودات از میکروارگانیسم ها تا سلسله گیاهان و جانوران قابل استفاده است. در کنار این مزایا و قابلیت اجراء تکنیک معایب بالقوه ای نیز دارد. اولین و مهم‌ترین عیب، هزینه آن است. در مقایسه با آزمون‌های سنتی تکنیکی گران قیمت است. نیز انجام PCR به درجه بالایی از مهارت و تخصص نیاز دارد. علاوه براین جهت انجام PCR باید دانش دقیقی از بیوانفورماتیک برای طراحی پرایمرها، برای واردکردن جایگاه های محدود کننده و غیره داشت. این تکنیک فقط در آزمایشگاه‌هایی قابل دسترس است که به طور ویژه ای تکنیک های آزمون و آنالیز بیولوژی مولکولی را دارند. در بیشتر مواقع اسیدهای نوکلئیک از ارگانیسم های غیر زنده نیز همراه با نمونه مورد نظر تکثیر می‌شوند. آنالیز نمونه ها پس از PCR پژوهشگر را در معرض مواد شیمیایی مضری مثل اتیدیوم بروماید، رنگ‌ها، فلوئوروکروم‌ها و نور UV قرار می دهد که سرطان زا هستند.



شکل ۹. qPCR: (A) آزمایش سایبرگرین ۱ (B) آزمایش TaqMan

کاربردهای PCR

■ علم پزشکی قانونی

PCR ابزار مهمی در پروفایل نمودن DNA، انگشت نگاری، تعیین نوع DNA و آزمایش DNA هست. این تکنیک قادر به شناسایی یک فرد از میان میلیون ها افراد دیگر است. نمونه های DNA استخراج شده از صحنه جرم را می توان با DNA افراد مظنون یا پایگاه DNA مقایسه کرد. انگشت نگاری DNA، آزمون تعیین ابوت جهت شناسایی والد بیولوژیکی کودک را امکان پذیر می سازد.

■ پزشکی و تشخیصی

در یک مطالعه آینده نگر برای اثبات وجود بیماری های ژنتیکی والدین را می توان مورد آزمایش ژنی قرار داد و از این رو می توانیم احتمال حامل بودن فرزندان آن ها را برای همان بیماری ژنتیکی معین کنیم. آزمایش پیش از تولد را می‌توان به وسیله آمینوسنتز، نمونه برداری از پرزهای کوریونی یا سلول‌های جنینی موجود در گردش خون مادر جهت تعیین احتمال وجود جهش در جنین انجام داد. نیز بافت را می توانیم پیش از انجام پیوند اندام با استفاده از PCR برای بررسی سازگاری بین دهنده و گیرنده، تعیین نوع (منظور تعیین نوع HLA است) کرد. این روش جایگزین آزمایش سنتی تعیین نوع خون بر پایه آنتی بادی به منظور شناسایی آنتی ژن های موجود بر روی سطح سلول های بدن و بافت ها، شده است. رژیم های درمانی را می‌توان برای بیماران خاص با استفاده از آزمایش مبتنی بر PCR به طور سفارشی تجویز کرد، به منظور مطالعه جهش در انکوژن‌ها در شکل خاصی از سرطان می توان از PCR استفاده کرد. آنتی بادی های علیه HIV تا هفته ها پس از عفونت ظاهر نمی شوند، آزمایش های مبتنی بر PCR طوری گسترش یافته اند که شناسایی حتی یک ژنوم منفرد ویروسی را از میان سلول های میزبان امکان پذیر می سازند. به طور مشابه اهدای خون، بهبودی از بیماری و اثرات داروهای ضد ویروسی را می توان فورا بررسی کرد. علاوه بر این می توان خون اهدا شده را برای وجود آلودگی باکتریایی با استفاده از Real Time PCR بررسی کرد.

در مورد بیماری سل که نیازمند جمع آوری نمونه خلط و کشت در آزمایشگاه است، آزمایش های مبتنی بر PCR شناسایی هردوی ارگانیسم های زنده و غیر زنده را امکان‌پذیر ساخته است. علاوه براین آنالیز دقیق ژن، شناسایی مقاومت آنتی بیوتیکی و همچنین اثرات درمانی را ممکن کرده است.

آزمایشات مبتنی بر PCR شناسایی شیوع ارگانیسم های عفونی را در حیوانات اهلی و وحشی امکان پذیر ساخته است.

نتیجه‌گیری

PCR یک تکنیک بسیار پیشرفته و در عین حال ساده است که تطبیق پذیری آن در اکثر زمینه های بیولوژی و علوم پزشکی به علت توانایی آن در ارائه نتایج کیفی و نتایج کمی نیز اثبات شده است. ابداع PCR همراه با قابلیت اجرای آن در تشخیص های بالینی، انگشت نگاری DNA، پروفایلینگ DNA، تکنولوژی DNA نوترکیب صرف نظر از نقش آن در زمینه های دیگر مثل باستان شناسی، مردم شناسی، جنایی، یک هدیه به علم مدرن بوده است. تعیین توالی ژنوم انسان و ژنوم بسیاری از موجودات دیگر شامل چندین گونه گیاه باعث شده است که PCR به طور قدرتمند در یک شکل یا در اشکال دیگر جهت آنالیز دقیق علوم کاربرد داشته باشد. این پیشرفت ها در نتیجه تغییر در تکنیک پایه‌ای PCR همراه با qPCR، RT-PCR و ترکیب RT-PCR/qPCR حاصل شده است. در آینده کاربرد جدید بیشتری از PCR در علوم بیولوژیکی همراه با طراحی ابزار پیشرفته دارای ظرفیت پذیرش بالای نمونه و ریز سازی به‌وجود خواهد آمد. بالاتر از همه این ها، نیازمند وجود دانشمندان باهوش و کنجکاوی هستیم که این اختراعات را به ثمر برسانند.

References

1- Singh Jagtar Birbian, Niti Sinha, Shweta, Goswami Akshra: A critical review on PCR, its types and applications. International Journal of Advanced Research in Biological Sciences:1(7):65-80:2014.

2- Chou Quin, Russell Marion, E.Birch David, Raymond Jonathan, Bloch Will: Prevention of pre-PCR mis-priming and primer dimerization improves low-copy-number amplifications. Nucleic Acids Research:((20):(7)1717-1723:1992.

3- S.Chamberlainl Jeffrey , A.Gibbs1Richard, E.Ranierl Joel, Nga Nguyen , Caskey C.Thomas : Deletion screening of the Duchenne muscular dystrophy locus via multiplex DNA amplification. Nucleic Acids Research:(16): 1988.

4- D. BROCK THOMAS AND FREEZE HUDSON: Thermus aquaticus gen. n. and sp. n., a Nonsporulating Extreme Thermophile. JOURNAL OF BACTERIOLOGY:: 289-297:1969.

5- Diefenbach C.W, Lowe T.M.J, Dveksler G.S: General concepts for PCR primer design. Downloaded from genome.cshlp. Published by Cold Spring Harbor Laboratory Press org on May 9:2016 .

6- A. Isenbarger Thomas, Finney Michael, Rı´os-Vela´zquez Carlos,

Handelsman Jo, Gary Ruvkun: Miniprimer PCR, a New Lens for Viewing the Microbial World.APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY:(74):(3) :2008.

7- Diaz R.S, Sabino E.C: Accuracy of replication in thepolymerase chain reaction. Comparison between Thermotoga maritima DNApolymerase and Thermus aquaticus DNA polymerase. Brazilian Journal of Medical and Biological Research :(31): 1239-1242:1998.

8- Joshi Mohini , J.D Deshpande: POLYMERASE CHAIN REACTION: METHODS, PRINCIPLES AND APPLICATION. International Journal of Biomedical Research: available online at www.ssjournals.com.

9- Stephen A. Bustin: Real-Time Reverse Transcription PCR. Encyclopedia of Diagnostic Genomics and Proteomics:2005.

10- Polymerase Chain Raction(PCR). From:http://allserv.rug.ac.be/~avierstr/principles/pcr.html: 2004.