

مروری جامع و ضروری بر PCR، انواع و کاربردهای آن

• رضا یهلوی خیاوی

کارشناس ارشد میکروبی شناسی دانشکاه علوم پزشکی اردبیل

شبکه بهداشت و درمان شهرستان مشکین شهر

rezaholololkhiavi@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 bohloloi khiavi, MSc in microbiology, ardebil university of medical sciences meshkin shahr city health and treatment Centre.

طور موفقیت آمیزی مورد استفاده واقع شده است.

کلمات کلیدی:

Standard PCR- Variants, RT-, PCR, qPCR, RT-PCR/qPCR combined

مقدمه

واکنش زنجیره ای پلیمرز (PCR)

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

چکیده

اختراع واکنش زنجیره ای پلیمرز (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 مشترکانه 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 متنی 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 توانایی بازی ژن های انسان، تکمیل کند که پیشتر پایه را اساس مهندسی ژنتیک شده است و حتی در حال حاضر ایجاد تغییرات مفید در ژنوم یک ارگانیسم را امکان پذیر ساخته است. وابستگی های PCR در بسیاری از پیشرفت های اخیر که علوم مدرن را ایجاد کرده اند به

از DNA را با استفاده از سیستم دو پرایمری توصیف کرد. واکنش زنجیره ای پلیمراز یک تکنیک آزمایشگاهی است که همانند سازی و تکثیر قطعه ای از DNA را به میلیون ها برابر آن امکان پذیر می سازد. تکنیک واکنش زنجیره ای پلیمراز (PCR) توسط Kary Banks Mullis، در سال ۱۹۸۳ وقتی که وی به عنوان بیوتکنولوژیست در موسسه Emeryville، Cetus کالیفرنیا آمریکا کار می کرد، ابداع شد. در سال ۱۹۸۵ سرمایه گذاری مشترک بین موسسه Cetus و Perkin-Elmer، دیگر شرکت آمریکایی بیوتکنولوژی جهت طراحی ابزار چرخه حرارتی و معرف ها برای PCR صورت 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 شیمی 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 سال ۱۹۶۹، Thomas D. Brock ترموفیلوس اکواتیکوس، گونه جدیدی از باکتری گرما دوست موجود در بخش زیرین چشمه آب گرم پارک ملی Yellowstone جداسازی کرد. در سال ۱۹۷۶ آنزیم مقاوم به حرارت «پلیمراز Taq» از *Thermus aquaticus* ایزوله شد در سال ۱۹۸۶ Henry Erlich، استفاده از پلیمراز Taq را در PCR خبر داد، چون این آنزیم می تواند فعالیت خود را در طیف وسیعی از درجه حرارت بالا حفظ کند اضافه کردن آن به مخلوط PCR، کل روند PCR را بدون نیاز به اضافه کردن دستی DNA پلیمراز تازه از اشیریشیاکلی در هر چرخه واکنش، کوتاه تر

می کند زیرا DNA پلیمراز اشیریشیا کلی قادر به تحمل گرمایش و سرمایش سریع نیست. مسیر سنتتیک Taq پلیمراز در سنتز رشته الگو با وارد کردن نوکلئوتیدی ها به وسیله Rothwell و Waksman در ۲۰۰۵ توصیف شده است. بسیاری از DNA پلیمرازهای مقاوم به حرارت نیز کشف شده اند که می توان برحسب کاربریشان از آن ها استفاده کرد (جدول ۱) معمولا 1-1.5U از DNA پلیمراز 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 تکثیر شده، لازم است.

DNA الگو

معمولا 1ng - 0.01 از DNA الگو برای DNA پلاسمید یا فاژ و 1µg - 0.1 برای DNA ژنومی در 50µl مخلوط تام واکنش مورد نیاز است. DNA الگوی بیشتر از این مقدار سبب تولید فرآورده های غیر اختصاصی PCR می شود؛ بنابراین DNA باید خالص باشد به طوری که، حتی وجود مقدار خیلی جزئی از فنول، EDTA، پروتئیناز K و غیره مورد استفاده در جداسازی DNA، شدیداً فعالیت DNA پلیمراز Taq را مهار می کند. با این حال رسوب DNA با اتانول و شستشوی پلیت DNA با اتانول ۷۰٪ معمولا در حذف این آلودگی ها از نمونه DNA مؤثر هستند.

پرایمرها

موضوع بسیار مهم برای تکثیر جایگاه های هدف در داخل یک ناحیه ای از ژنوم، طراحی پرایمر است. پرایمر موفق عمدتاً برای دستیابی به دو هدف یعنی ویژگی و کارایی طراحی می شود. در صورتی که پرایمرها جهت پیشگیری از نتایج مثبت کاذب، با دقت کافی طراحی شوند هر دوی این اهداف دست یافتنی می باشند. در زیر ملاحظات 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 است. همچنین طول پرایمر، دمایی را مشخص می کند که در آن پرایمر به DNA الگو متصل خواهد شد. معمولا پرایمرها در طولی بین ۱۸ تا ۲۴ باز طراحی می شوند اگر چه



وارد کردن جایگاه محدود کننده: ۶-۳ نوکلئوتید به انتهای 5'

پرایمر اضافه می شود بنابراین به طور موفقیت آمیزی جایگاهی برای برش محدود کننده در توالی های تکثیر شده، فراهم می کند. **مکمل بودن پرایمر:** پرایمر نباید مکمل خود یا مکمل دیگر پرایمرهای موجود در مخلوط واکنش باشد، از این رو از وجود همولوژی داخل و بین پرایمرها باید پرهیز شود زیرا می تواند منجر به ایجاد دایمر پرایمر شود.

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

نوکلئوتید انتهایی در پرایمر PCR: موقعیت انتهایی در پرایمر جهت حذف جفت شدن ناجور ضروری است. برای پرهیز از آن، از پرایمرهایی که در انتهای 3' خود مکمل هستند، اجتناب شود زیرا این امر ممکن است سبب تشکیل غیرضروری دایمر پرایمر شود.

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

حداقل طول پرایمر به وسیله اندازه ژنوم تعیین می شود.

محتوای GC: محتوای GC مهم است 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 بسیار مطلوب باید T_m بین ۴۰ تا ۶۰ درجه سانتیگراد داشته باشد. از وجود بیش از سه نوکلئوتید G یا C در انتهای 3' پرایمر باید اجتناب شود زیرا ممکن است منجر به پرایمینگ غیر اختصاصی (اتصال غیر اختصاصی پرایمر) شود.

دمای ذوب (T_m): از آنجایی که در یک واکنش PCR مجموعه ای از پرایمرها استفاده می شوند از این رو باید سعی شود تا جفت پرایمری هایی انتخاب شوند که T_m آن ها از همدیگر بیش از ۵ درجه سانتیگراد اختلاف نداشته باشند، بنابراین محتوای GC و طول پرایمر باید بر این اساس انتخاب شوند. معمولا T_m در دامنه ۷۰-۶۲ درجه سانتیگراد قرار دارد.

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

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

جدول ۱: پلیمرزهای مقاوم به حرارت و کاربرد آن ها

پلیمرزها (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 انتهای صاف، نشان دار کردن پروپ، 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 آپروتیک DNA	Bebenek et al., 1989; Wood et al., 1993
Vent/Tli (ترموکوکوس لیتالیس)	دریچه های هیدروترمال عمق دریا	۵-۱۵ برابر فعالیت بالایی نسبت به DNA پلیمرز Taq دارد، فعالیت اگزونوکلازی 3' → 5'	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 اگزونوکلازی 3' → 5'	Myers and Gelfand, 1991
Ultma (ترموتوگا ماریتیم)	ناحیه ژئوترمال (زمین گرمایی) دریایی نزدیک ولکانو، ایتالیا	فعالیت اگزونوکلازی 3' → 5'	Diaz and Sabino, 1998
KOD (ترموکوکوس کداکارانزیس)	سولفاتارا جزیره کداکارا، کاگوشیما در ژاپن	پیش روندهای بالا، صحت بالا و میزان گسترش بالا بدون هیچ پیچیدگی که توسط فعالیت ترمینال ترانسفراز اعمال می شود	Bensona et al., 2003
Pwo (پیروکوکوس وونس)	رسوبات دریایی، ساحل پورتو لوانته، جزیره ولکانو، ایتالیا	فعالیت اگزونوکلازی 3' → 5' تحمل غلظت بالای خون	Cahill, et al., 2003; Kanoksilapatham et al., 2004
Pfu (پیروکوکوس فورینسوس)	رسوبات دریایی، ساحل پورتو لوانته، جزیره ولکانو، ایتالیا	فعالیت اگزونوکلازی 3' → 5'، پایین ترین میزان خطا	Cahill, et al., 2003; Kanoksilapatham et al., 2004
HotTub (ترموس یوبیکوتوس)	تعیین نشده است	تحمل غلظت بالای خون، سنتز ssDNA، سنتز رشته دوم در جهش زایی هدایت شده به جایگاه، تولید پروپ های ssDNA (DNA تک رشته ای) توسط بسط پرایمر	Kermekchiev et al., 2009

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.

پیت‌های خودکار، ظروف پلاستیکی و دستکش

پیت‌های خودکار (1-10 μ l, 10-100 μ l & 100-1000 μ l)، 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 سايكلر (سايكلر حرارتي)

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

اصول، روش و آشکارسازی پس از تکثیر PCR

اصول PCR

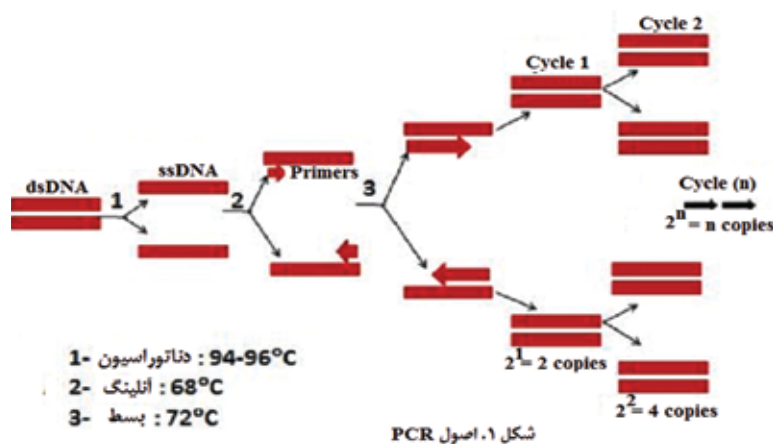
اصول PCR بر پایه این واقعیت استوار است که در دمای دناتوراسیون بالا نزدیک ۹۵ درجه سانتیگراد، دو رشته مولکول DNA هدف به علت شکستن پیوندهای A-T و G-C از هم جدا می شوند. در دمای های آنیلینگ در دامنه ۶۵-۵۰ درجه سانتیگراد، پرایمرهای مکمل جلو (Forward) و معکوس (Reverse) به انتهای 3' اتصال یافته و مولکول DNA 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 می آورد (شکل ۱). برای نتایج بهتر، دستورالعمل های عملی شبکه کیفی ژنتیک مولکولی اورپا (EMQN) باید مورد مطالعه قرار گیرد.

dNTPs

غلظت هر dNTP در مخلوط نهایی واکنش معمولاً 200 μ M 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.

MgCl₂

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 (γ و β) 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 می یابد. 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 می شوند. غیر از این ها dNTPs تمایل زیادی برای اتصال به یون Mg^{2+}



روش انجام پروژه

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

مرحله آنلینگ اجازه اتصال پرایمرهای مکمل Forward و Reverse به ناحیه طرفین DNA الگو را در دمای ۶۵-۵۰ درجه سانتیگراد در مدت ۵۵-۳۰ ثانیه می دهد.

مرحله بسط پرایمر در دمای ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۳۵-۳۰ ثانیه رخ می دهد و طی آن dNTP های مکمل به رشته های جدید اضافه می شوند. پس از چرخه نهایی، معمولا نمونه ها در دمای ۷۲ درجه سانتیگراد به مدت ۱۵-۵ دقیقه جهت پر کردن انتهای بیرون زده محصولات PCR جدیداً سنتز شده، انکوبه می شوند. ذخیره و نگهداری محصولات PCR در دمای ۴ 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. اتیدیوم بروماید سال های زیادی برای رویت اسیدهای نوکلئیک در ژل آگارز استفاده شده است. البته اتیدیوم بروماید جهش زای بالقوه بوده و سبب جهش در سلول های زنده می شود؛ بنابراین ژل باید در یک ظرف زیاله 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 واریانت های 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 برگرنده تغییرات تک نوکلئوتیدی بهره می برد. دو پرایمر ویژه آلل، یکی برای هر آلل SNP (پلی مورفیسم تک نوکلئوتیدی که به صورت snip تلفظ می شود) مورد نیاز است که یکی از دو پلی مورفسم 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)

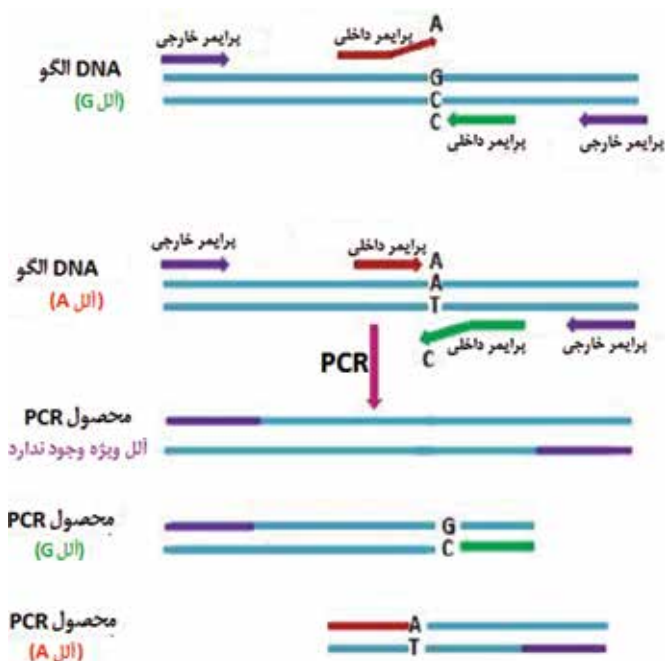
این واریانت PCR ترجیحا برای تکثیر یکی از رشته های مولکول DNA هدف با استفاده از غلظت نابرابر پرایمر به کار برده می شود به طوریکه چنین همانند سازی از روی علم ریاضیات با استفاده از پرایمر مازاد رخ می دهد.

■ 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 می شود و PCR کلونی سریعاً درج این پلاسمیدها را غربالگری می کند. این روش دارای چند مزیت بر روش های سنتی غربالگری آبی، سفید است زیرا می تواند هر دوی 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 بر این PCR کلونی به تولید مقدار کافی محصول مطلوب PCR به منظور توالی یابی کمک می کند.

■ PCR دژنره (Degenerate PCR)

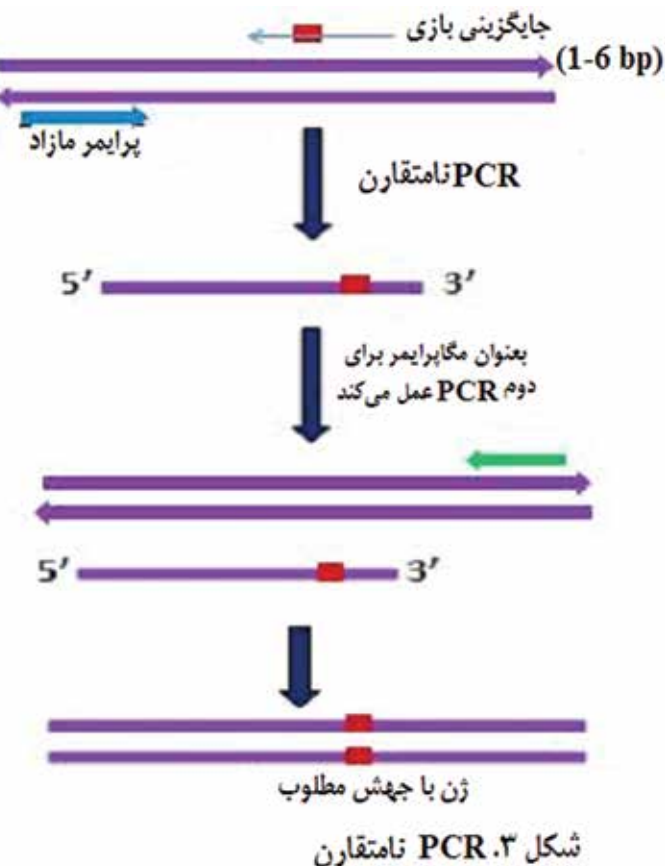
واریانتهی از PCR است که پرایمرهای دژنره را جهت تکثیر توالی ناشناخته پیوسته به توالی DNA شناخته شده، به کار می گیرد. پرایمرهای دژنره بر پایه همولوژی ژن شناخته شده و توالی یابی شده طراحی می شوند. این تکنیک شناسایی اعضای جدیدی از خانواده ژنی یا ژن های اورتولوگ از ارگانیسم مختلف را امکان پذیر می سازد.



شکل ۲. PCR ویژه آلل

■ PCR هات استارت (Hotstart PCR)

این تکنیک شامل مراحل PCR سنتی است به جز این که پلیمرز Taq زمانی به مخلوط واکنش اضافه می شود که بقیه اجزای PCR تا دمای ذوب DNA حرارت داده شده اند بنابراین از تکثیر غیر اختصاصی در دماهای پایین جلوگیری می کند. یا به طور جایگزین می توان از مهارکننده هایی با اتصال کوالان به پلیمرز استفاده کرد که فقط پس از رسیدن مخلوط واکنش به T_m از آن جدا می شوند.



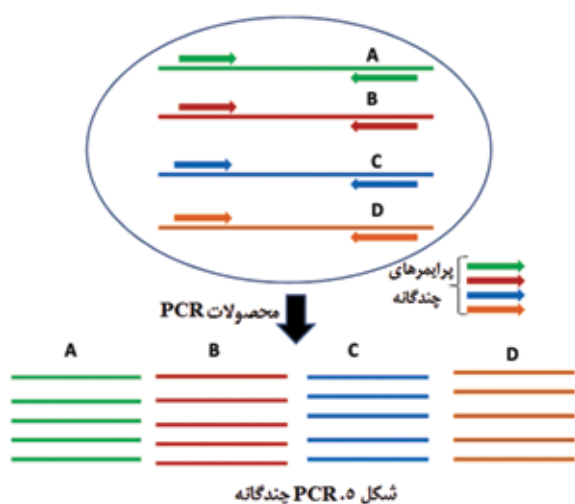
■ PCR معکوس (Inverse PCR)

در حالی که PCR مرسوم به جفت پرایمر مکمل برای هر دو انتهای 3' DNA هدف نیاز دارد، PCR معکوس امکان تکثیر DNA را فقط با یک توالی شناخته شده می دهد. این تکنیک نیازمند یک برش و اتصال محدود کننده در توالی است 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)

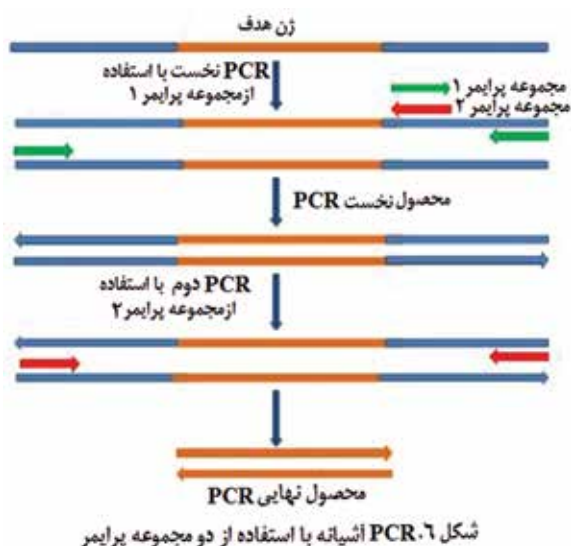
روش PCR استاندارد به پلیمرز Taq نیاز دارد که کارایی آن در سنتز DNA به علت نیاز به پرایمرهای طولی شان (۲۰-۳۰ نوکلئوتید) از دیگر آنزیم های همانند ساز کمتر است؛ بنابراین روش جدید PCR به نام PCR مینی پرایمر توسعه یافت.





■ PCR آشیانه (Nested PCR)

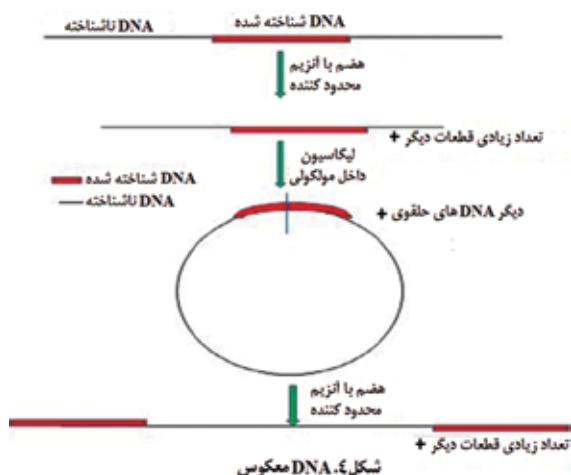
تغییر PCR جهت به حداقل رساندن تکثیر غیر اختصاصی و محصولات کاذب PCR طراحی می شود که امکان داشت سبب اتصال پرایمر به جایگاه های پیش بینی شده و ناخواسته مشابه DNA هدف شود. PCR آشیانه شامل ۲ مجموعه ای از پرایمر است که آن ها در دو اجرای (ران) پی در پی واکنش PCR استفاده می شوند (شکل ۶). عملکرد مجموعه دوم پرایمر این است که به جایگاه هدف دوم در داخل توالی تکثیر شده 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.



در این PCR پرایمر از Taq مهندسی شده و مینی پرایمر با طول ۱۰ نوکلئوتید استفاده شده است. PCR مینی پرایمر در درک بیولوژی میکروبی جهت شناسایی توالی DNA محافظت شده طی تکامل مثل 16S rRNA (18S rRNA یوکاریوتی) سودمند است که با PCR استاندارد غیر ممکن است. Xu و همکاران نقش PCR مینی پرایمر را با استفاده از تیتانیوم پرایمر Taq و پرایمرهای کوتاه برای ژنوتایپینگ (تعیین ژنوتیپ) زیرگونه پانتوا استوارتی ای ارزیابی کردند، که عامل سببی فساد باکتریایی استوارت در ذرت است.

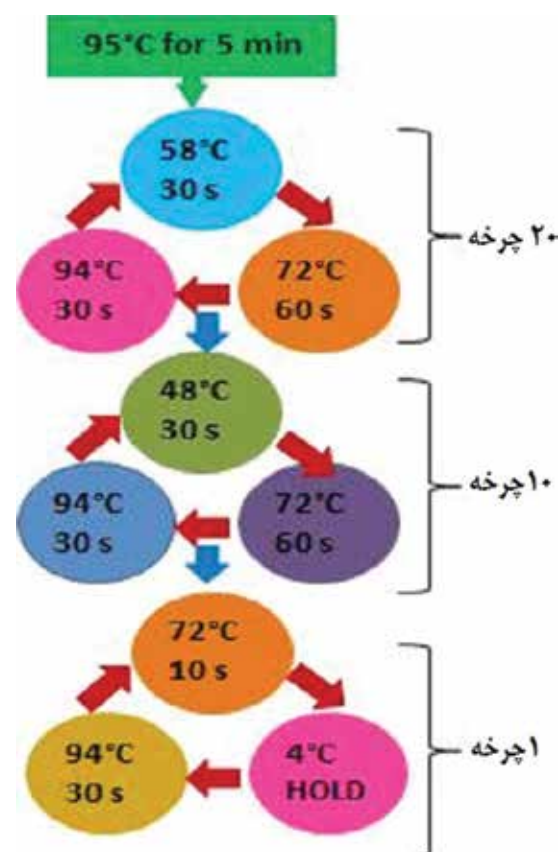
■ PCR چندگانه (Multiplex PCR)

PCR چندگانه، تغییر PCR به منظور شناسایی سریع حذف ها یا مضاعف شدگی ها در یک ژن بزرگ است، در ۱۹۸۸، حذف در ژن دیستروفین نخست با روش PCR چندگانه شناسایی شد. PCR چندگانه از مجموعه پرایمر چندگانه در داخل یک مخلوط منفرد PCR جهت تولید آمپلیکون با اندازه های مختلف و اختصاصی توالی های مختلف DNA، استفاده می کند. این واریانت PCR چندین ژن را در یک آزمون منفرد مورد هدف قرار می دهد که به عبارت 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 سازی بهتر و تشکیل باند مجزا داشته باشند تا به راحتی در ژل مشاهده شوند. PCR چندگانه در بسیاری از زمینه های آزمون DNA مثل آنالیز حذف ها، جهش ها و پلی مورفیسم ها، میکروساتلایت ها (ریز ماهواره ها) و SNP ها به طور موفقیت آمیزی استفاده شده است.



Touchdown PCR ■

این تکنیک قادر است با استفاده از انجام مراحل اولیه چرخه‌های PCR در دماهای بالا از تکثیر توالی‌های غیر اختصاصی ممانعت کند و در چرخه‌های بعدی دمای آنلینگ رفته رفته کاهش می‌یابد (شکل ۷). این امر امکان اتصال اختصاصی پرایمر در بالاترین دما را می‌دهد که حداقل مجاز برای اتصال غیر اختصاصی است و فقط توالی هدف را تولید می‌کند.



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 تولید DNA مکمل (cDNA) از RNA با کمک آنزیم رونوشت بردار معکوس و به دنبال آن تکثیر cDNA با استفاده از PCR استاندارد را ممکن می‌سازد. Howard Temin از دانشگاه Wisconsin-Madison، آنزیم رونوشت بردار معکوس را در ویروس روس سارکوما (RSA) کشف کرد که

بعداً به طور مستقل توسط David Baltimore در سال ۱۹۷۰ از دو ویروس توموری RNA دار: R-MLV (ویروس لوکمی راتوسچر مورین) و RSV جدا سازی شد. هردو دانشمند در سال ۱۹۷۵ به طور مشترک جایزه نوبل فیزیولوژی یا پزشکی را به خاطر دستاوردهای فوق الذکر دریافت کردند. آنزیم رونوشت بردار معکوس شامل یک DNA پلیمراز وابسته به RNA، یک فعالیت DNA پلیمرازی وابسته به DNA و ریبونوکلاز H هستند که جهت انجام رونویسی با هم عمل می‌کنند. علاوه بر عملکرد در فرآیند رونویسی، آنزیم‌های رونوشت بردار رتروویروسی دارای یک دومین متعلق به خانواده RNase H هستند که جهت همانند سازی آن‌ها حیاتی هست. ایده رونویسی معکوس در ابتدا زیاد مورد استقبال قرار نگرفت زیرا هسته مرکزی بیولوژی مولکولی (Central Dogma) را نقض می‌کرد اما سرانجام در سال ۱۹۷۰ زمانی که Howard Temin و David Baltimore، به طور مستقل آنزیم مسئول رونویسی معکوس به نام رونوشت بردار معکوس را کشف کردند، پذیرفته شد.

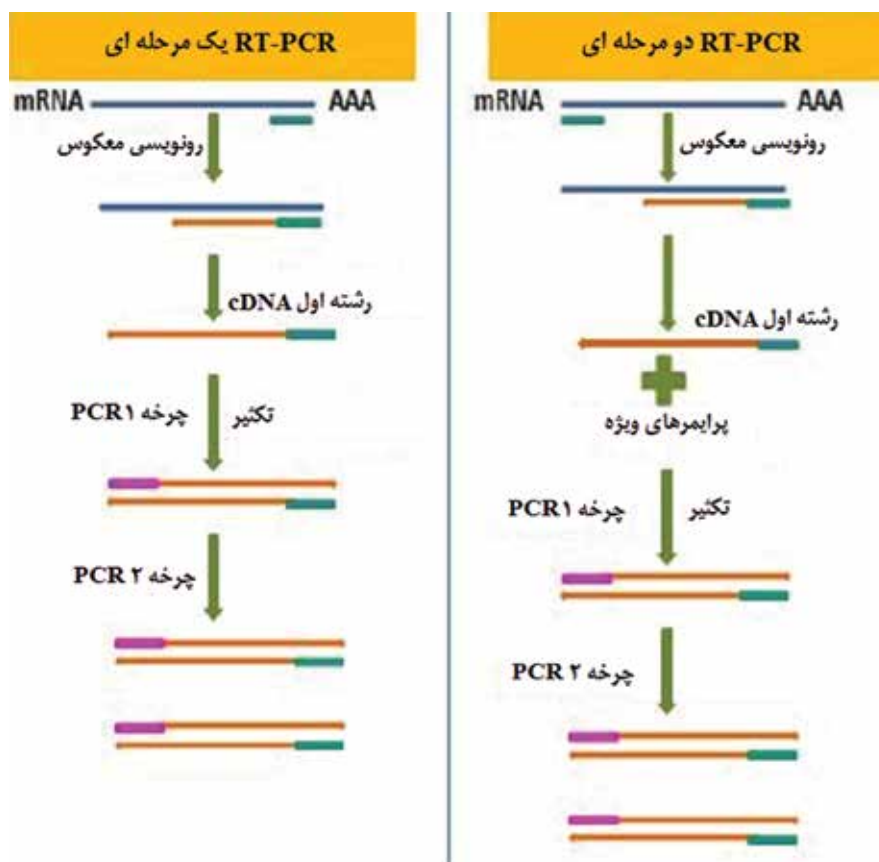
رونوشت بردارهای معکوس رتروویروسی مانند ویروس میلوبلاستوزیس ماکیان (AMV) و ویروس لوکمی موش مولونی (MMLV) از رونوشت بردارهای بسیار شناخته شده هستند که در زمینه بیولوژی مولکولی استفاده می‌شوند. رونوشت بردار معکوس بسیار رایج برای الگوهای طویل mRNA، رونوشت بردار معکوس M-MLV است زیرا فعالیت RNase H آن ضعیف‌تر از رونوشت بردار معکوس AMV (که به طور معمول استفاده می‌شود) می‌باشد. پیشرفت در زمینه مهندسی ژنتیک و گسترش بافرهای افزایشده فعالیت ترانسکریپتازی (RT) (سبب دسترسی آنزیم‌های جدیدی شد که کارایی بالاتری نسبت به ترانسکریپتازهای طبیعی داشته و دارای مقادیر بالای مقاومت حرارتی و عمر مفید طولانی در ۵۰ درجه سانتیگراد هستند. امروزه رونوشت بردار معکوس M-MLV مورد استفاده از اشریشیاکالی تلخیص می‌شود که ژن pol، M-MLV، بر روی پلاسمید را بیان می‌کند. درحالی‌که سلول‌های حشرات عفونی شده با باکولوویروس دارای ژن pol ویروس میلوبلاستوزیس ماکیان (AMV) جهت تلخیص رونوشت بردار معکوس AMV استفاده می‌شوند.

دو روش مقدماتی برای انجام RT-PCR وجود دارد یعنی روش یک مرحله‌ای و دو مرحله‌ای (شکل ۸). در روش یک مرحله‌ای، تمام اجزا شامل پرایمرهای اختصاصی در داخل یک



آنالیز بعدی ژن های هدفی است که به وسیله پرایمرهای ویژه ژن مورد استفاده در واکنش تک لوله ای جهت تشکیل و تکثیر cDNA، تکثیر نشده اند؛ بنابراین کسری RNA از نمونه های اصلی باید جهت آزمون بیشتر ذخیره شوند؛ 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.

لوله منفرد گذاشته شده و به همان صورت واکنش PCR نیز صورت می گیرد. 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 می برد و ارزان بوده و نیاز کمی به دست کاری نمونه ها دارد بنابراین خطای پدید کردن، آلودگی و غیره کاهش می یابد. با این وجود مشکل



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

آستانه 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 ناشناخته 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 پس از تکثیری را از میان می برد. مزیت های دیگر

Real time-PCR or quantitative PCR (qPCR)

(PCR در زمان واقعی یا PCR کمی)

در سال ۱۹۹۲ توسط Higuchi و همکارانش معرفی شد و قادر است به منظور اندازه گیری تکثیر DNA در هر چرخه PCR، رنگ فلورسنت گزارشگری مثل سایبر 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

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 مهم ترین عیب، هزینه آن است. در مقایسه با آزمون های 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 وارد کردن جایگاه های محدود کننده و غیره داشت. این تکنیک فقط در آزمایشگاه هایی 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 می شوند. آنالیز نمونه ها پس از PCR پژوهشگر را در معرض مواد شیمیایی مضر مثل اتیدیوم بروماید، رنگ ها، فلئوئوروکروم ها و نور UV قرار می دهد که سرطان زا هستند.

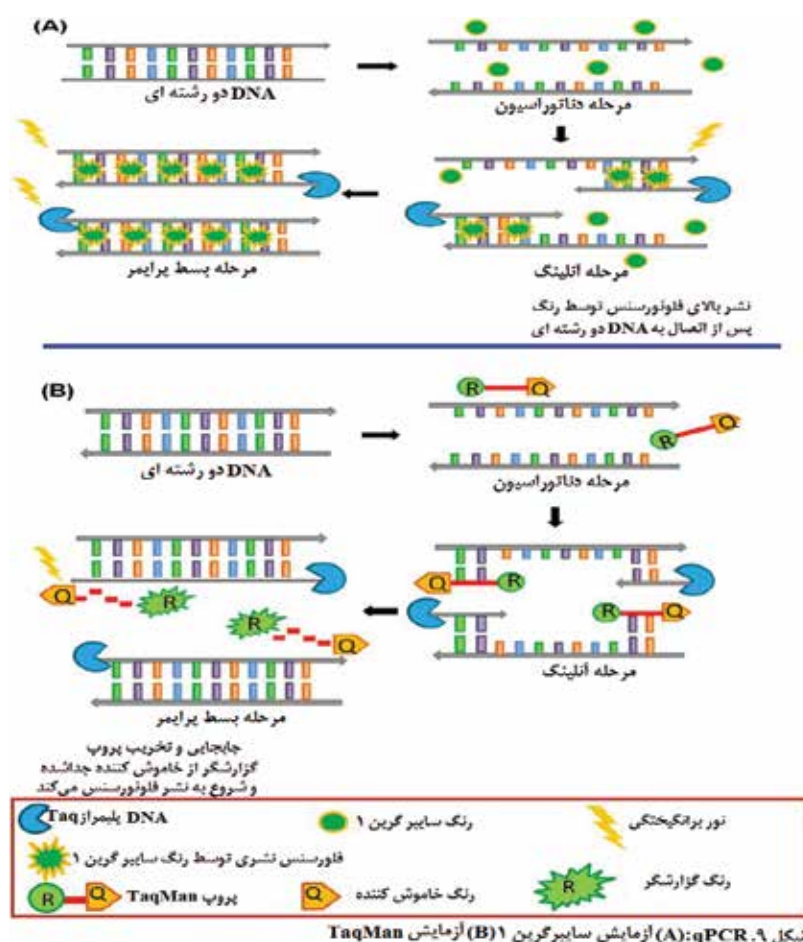
qPCR، حساسیت، تعیین پیشرفت واکنش در زمان واقعی، سرعت آنالیز و سنجش دقیق مواد مورد آزمون در نمونه است. این امر در نتیجه وجود رنگ های فلورسئنس یا پروپ های اولیگونوکلوئیدی نشان دار با فلورسانس است که شدت آن ها با مقدار محصول DNA تولید شده، متناسب می باشد. جهت تسهیل انواع مختلف واکنش های qPCR، انواع مختلف 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 فلئوئور و فورها و گرفتن فلورسئنس نشی 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 آشکار سازی 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-qPCR یا RT-PCR -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 میلیون ها 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



کاربردهای PCR

■ علم پزشکی قانونی

خون، بهبودی از بیماری و اثرات داروهای ضد ویروسی را می توان فوراً 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 ارگانیزم های زنده و غیر زنده را امکان پذیر ساخته است. علاوه بر این آنالیز دقیق ژن، شناسایی مقاومت آنتی بیوتیکی و همچنین اثرات درمانی را ممکن کرده است. آزمایشات مبتنی بر PCR شناسایی شیوع ارگانیزم های عفونی را در حیوانات اهلی و وحشی امکان پذیر ساخته است.

نتیجه گیری

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 نو ترکیب 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 پایه ای 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 به وجود خواهد آمد. بالاتر از همه این ها، نیازمند وجود دانشمندان باهوش و کنجکاوی هستیم که این اختراعات را به ثمر برسانند.

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 می توان به وسیله آمینوستز، نمونه برداری از پرزهای کوریونی یا سلول های 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 سستی 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 می توان برای بیماران خاص با استفاده از آزمایش مبتنی بر PCR به طور سفارشی تجویز کرد، به منظور مطالعه جهش در انکوژن ها 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

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.GibbslRichard, 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, Ri'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 the polymerase chain reaction. Comparison between *Thermotoga maritima* DNA polymerase 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 Reaction(PCR). From:<http://allserv.rug.ac.be/~avierstr/principles/pcr.html>: 2004.

