@GeneticDisease

## تکنیکNested PCR

Nested PCRنوعی از PCR است که هدف از انجام گرفتنش، کاهش احتمال ایجاد محصولات غیراختصاصی واکنش و افزایش حساسیت آن است. این تکنیک در سال ۱۹۹۸ توسط Strom و Rechitsky ارائه شده است و کلمه Nested اشاره به طرز قرارگیری پرایمرهای مورد استفاده در واکنش اول و دوم نسبت به هم دارد. این تکنیک درصورتی به کار می‌رود که نیاز فراوانی به حساسیت و اختصاصیت در PCR احساس شود.

مشکلی که معمولا در PCR عادی رخ می‌دهد، اتصال نادرست پرایمرها و تکثیر قطعات غیراختصاصی نسبت به پرایمر مورد نظر است. هر چه تعداد چرخه‌های انجام‌گرفته در PCR بیشتر باشد، احتمال این‌گونه خطاها نیز افزایش می‌یابد Nested PCR .می‌تواند در شرایطی که نیاز فراوانی به حساسیت و اختصاصیت واکنش داریم، برای جبران چنین اشتباهاتی مورد استفاده قرار گیرد. البته استفاده از پرایمرهایی که بتوانند به خوبی به توالی هدف متصل شوند، نیاز به استفاده از این تکنیک را در بسیاری از شرایط از بین می‌برد.

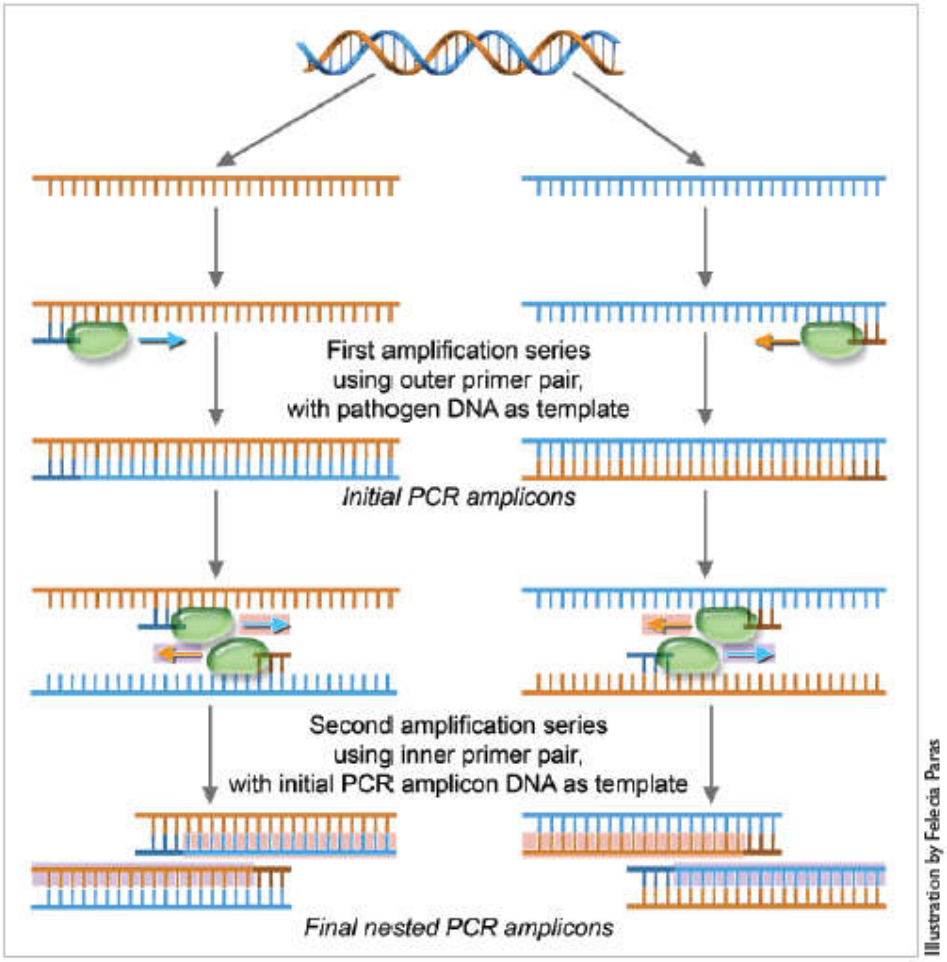



**Figure 2. Nested PCR.** An amplicon is created from the first PCR and serves as a template for the second PCR.

در Nested PCR، دو فرایند PCR متوالی که هر کدام متشکل از حدود ۳۰ چرخه است، انجام می‌گیرد. در واکنش PCR اول، از یک جفت پرایمر که نواحی خارجی‌تر نسبت به توالی موردنظرمان را هدف قرار می‌دهند، استفاده می‌شود. در واکنش دوم، جفت پرایمرهای Nestedکه به نواحی داخلی تری نسبت به پرایمرهای اول متصل می‌شوند، مورد استفاده قرار می‌گیرند و درنتیجه محصولات PCR کوتاه‌تر از واکنش اول خواهند بود. درواقع، دو جفت پرایمر برای تکثیر یک لوکوس واحد به کار می‌رود.

به عبارت دیگر، Nested PCRنوعی از PCR است که طی آن توالی‌های الگو قطعاتی هستند که در واکنش PCR قبلی به دست آمده‌اند و پرایمرها به گونه‌ای طراحی شده اند که به نواحی‌ای در داخل قطعات تولیدشده در واکنش قبلی متصل شوند. در صورتی که اتصال این پرایمرهای داخلی منجر به تولید محصول شود، نشان‌دهنده و موید درست انجام گرفتن واکنش اول و اختصاصی بودن امپلیکون حاصل از آن است.

منطق به کار گرفتن این استراتژی نیز همین است: اگر در اثر وقوع اشتباه در واکنش اول، قطعه نادرستی تکثیر شود، احتمال اینکه بتواند با پرایمرهای واکنش دوم جفت شود، بسیار اندک خواهد بود و تنها به شرطی واکنش دوم انجام می‌شود که توالی‌های الگوی آن در واکنش اول تولید شده باشند. این موضوع نشان‌دهنده اختصاصیت افزایش‌یافته این واکنش است.

بین دو مرحله اول و دوم یک مرحله انتقال وجود دارد که طی آن محصولات واکنش از لوله واکنش اول به لوله واکنش دوم منتقل می‌شوند. در بسیاری از مواقع برای حصول نتایج مورد انتظار، باید میزان پرایمرهای داخلی به مراتب بیشتر از پرایمرهای خارجی باشد. این کار معمولا با افزودن مقادیر بسیار کمی از محصولات واکنش اول به لوله واکنش دوم انجام می‌گیرد و معایبی نیز دارد که در ادامه به آن‌ها خواهیم پرداخت.

## انواعNested PCR

در صورتی که یکی از پرایمرهای واکنش دوم، پرایمر Nested و دیگری یکی از پرایمرهای مورداستفاده در واکنش اول باشد، در این صورت فرایند انجام گرفته Hemi-nested PCR نام دارد. این واکنش در صورتی انجام می‌گیرد که full-nested PCR امکان انجام نداشته باشد و در این حالت حساسیت و اختصاصیت با استفاده از پرایمرهای گفته‌شده تقویت می‌شود.

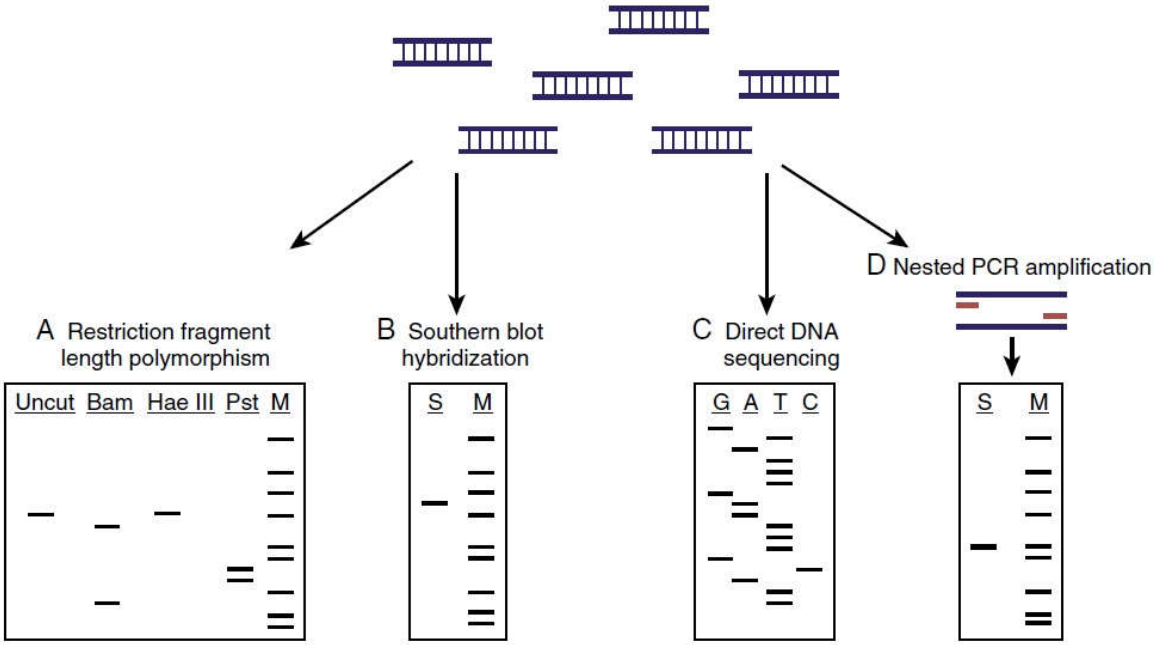
نوع بهبودیافته و موثرترNested PCR ، تکنیک Pit-stop PCRاست. در این فرایند از انجام گرفتن کامل دو چرخه پشت‌سرهم PCR جلوگیری و تعداد چرخه های واکنش اول را کاهش می‌دهند (مثلا تا حدود ۱۰ عدد). در این حالت پس از انجام گرفتن واکنش اول، حجم بسیار کوچکی از آن برداشته شده و به عنوان الگو برای واکنش دوم استفاده می‌شود. تعداد چرخه‌های واکنش دوم بیش از ۲۰ عدد است و از جفت پرایمرهای جدیدی استفاده می‌کند. در نتیجه این تکنیک، علاوه بر اینکه دقت Nested-PCR را دارد، سرعت PCRعادی را نیز دارا می‌باشد.

Nested PCRمی‌تواند برای RT-PCR نیز استفاده شود (Nested RT-PCR) و روش انجام آن‌ها تقریبا مشابه است. در این شرایط ابتدا از پرایمر خارجی با انتهای ۳' برای انجام واکنش RT و سپس از جفت پرایمرهای با انتهای ۳' و ۵' برای انجام نخستین PCR استفاده می‌شود .محصولات واکنش سپس به لوله دیگری که حاوی جفت‌پرایمرهای Nested است، منتقل می‌شوند. در واکنش دوم توالی‌های هدف روی قطعات بلندتری قرار دارند که در واکنش اول تولید شده‌اند.

## مراحلNested PCR

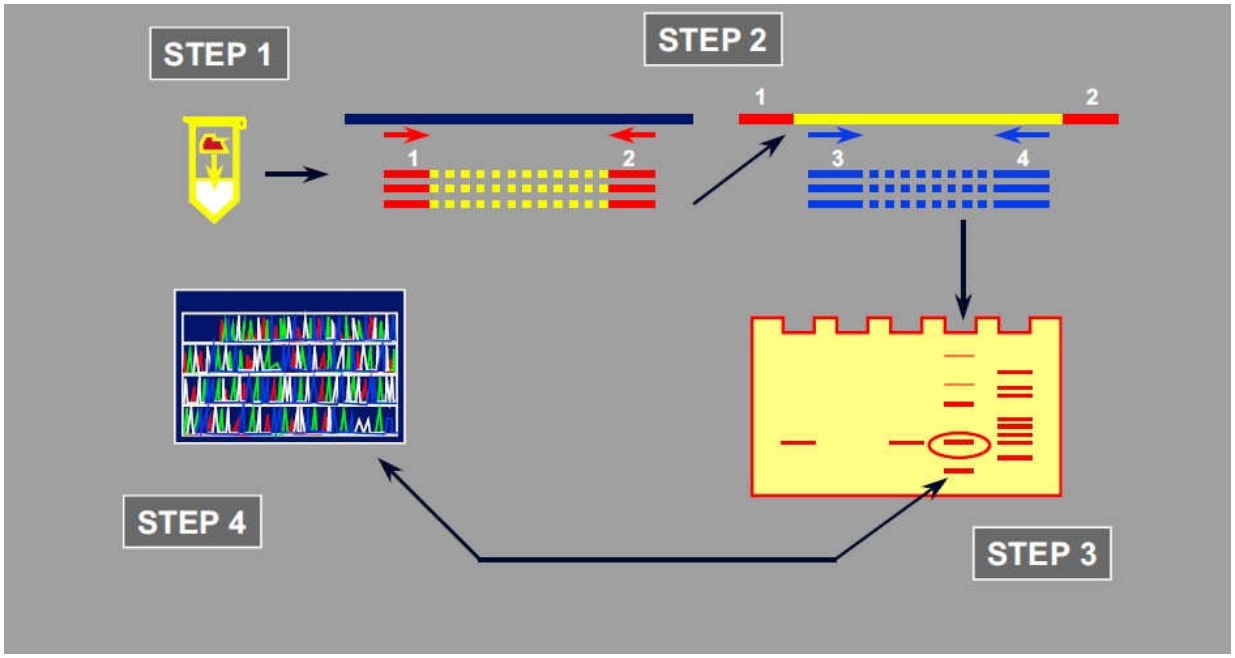
۱. استخراج DNA هدف

۲. واکنش PCR اول
۳. واکنش PCR دوم
۴. آنالیز محصولات تشکیل‌شده توسط الکتروفورز در ژل و مشاهده آن‌ها به کمک رنگ‌آمیزی اتیدیوم بروماید (تشکیل محصولات مناسب در دور دوم واکنش، تاییدکننده اختصاصیت واکنش می‌باشد)؛




شکل :Dمحصولات واکنش اول PCR دناتوره شده و توسط پرایمرهای Nested دوباره تقویت می‌شوند. سپس محصولات واکنش دوم با الکتروفورز جدا شده و توسط رنگ‌آمیزی ethidium bromide مشاهده می‌شوند. تولید محصولات با اندازه مناسب و موردنظر در دور دوم PCR تاییدکننده اختصاصیت واکنش است S .نشان‌دهنده نمونه (sample) و M نشان‌دهنده Size Markerمی‌باشد.

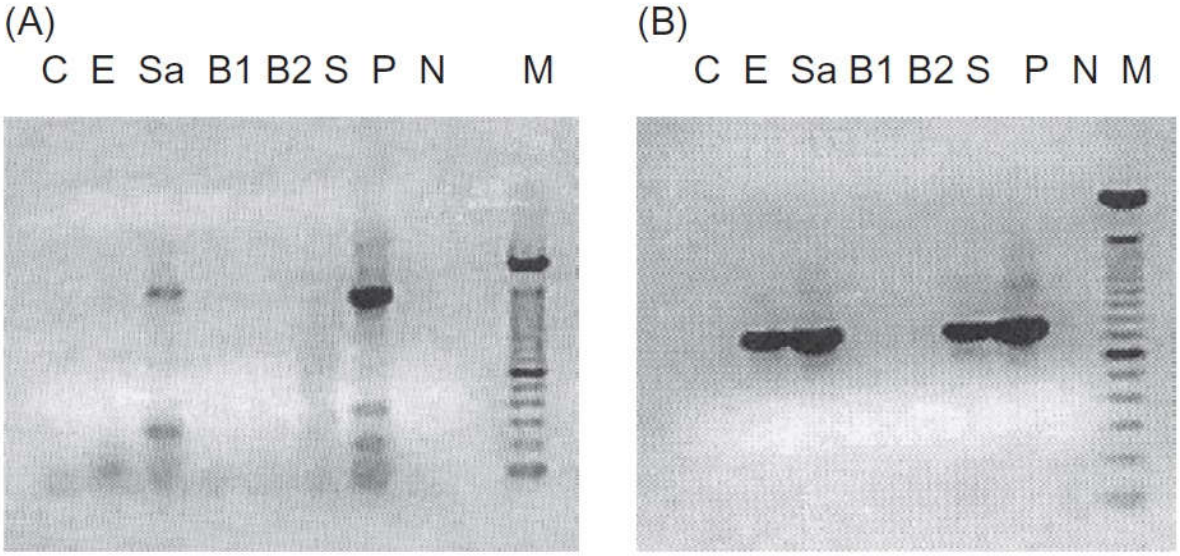
۵. استخراج محصول موردنظر از باند مربوط به آن در ژل در صورت نیاز و انجام توالی‌یابی (sequencing) به دنبال آن.




# مزایای Nested PCR

Nested PCRحساسیت و اختصاصیت تکثیر) DNA و یا RNA در (Nested RT-PCR توسط PCR را افزایش می‌دهد و می‌تواند برای تایید صحت توالی امپلیکون‌ها استفاده شود. نتیجه استفاده از این تکنیک، افزایش تولید محصول موردنظر تا چند ده برابر محصول تولیدشده در PCR عادی است؛ حتی اگر مقدار اولیه DNA موجود در نمونه کم باشد. نمونه‌های نوکلئیک‌اسید sub-optimal مانند نمونه‌ها و بافت‌های فیکس شده با فرمالین و پارافین نیز می‌توانند با استفاده از این تکنیک بررسی شوند.

برای توصیف کارایی Nested PCR ، در تصویر زیر مقایسه‌ای بین نتایج حاصل از انجام دور اول PCR و دور دوم آن در نمونه‌های به دست آمده از افراد مبتلا به هاری، انجام گرفته است. طبق تصویر، در آزمایش PCR اول، تنها نمونه‌ای که از آن نوار با اندازه درست بدون در نظر گرفتن کنترل مثبت حاصل شده است، نمونه بزاق است. پس از انجام آزمایش PCR دوم، در نمونه‌های ترشحات اشک، بزاق و بیوپسی پوست نیز نوار موردنظر ظاهر می‌شود. در هر دو واکنش، نمونه‌های) Blank کنترل منفی) و CSF منفی هستند.




## معایبNested PCR

انجام دو واکنش PCR در دو لوله جداگانه، احتمال آلودگی محیط کار با محصولات PCR را افزایش می‌دهد؛ خصوصا اگر آزمایش در مقیاسی وسیع انجام بگیرد. در صورت آلوده شدن آزمایشگاه با این مواد، پاکسازی محیط از آن‌ها بسیار دشوار خواهد بود. به همین علت است که در آزمایشگاه‌های جنایی، محل‌های انجام واکنش‌های Pre-PCR و Post-PCR به صورت فیزیکی جدا شده‌اند.

همان طور که گفته شد، تکنیک‌های Nested PCR حساسیت و اختصاصیت آزمایش را به میزان زیادی افزایش می‌دهند. این کار اما به بهای افزایش قابل توجه احتمال حصول نتیجه مثبت کاذب انجام می گیرد. علت این مورد، باز شدن لوله واکنش به منظور افزودن پرایمرهای دوم و یا انتقال محصولات از محیط اول به محیط دوم و درنتیجه آلودگی مخلوط واکنش می‌باشد.

تکنیکی که بتواند نیاز به وجود این دستکاری ها را از بین ببرد، خواهد توانست احتمال پدید آمدن نتیجه مثبت کاذب را کاهش دهد. دانشمندان برای برطرف کردن این مشکل Single tube nested PCR را پیشنهاد داده‌اند. این لوله پس از افزوده‌شدن مواد اولیه مورد نیاز، در طی انجام هر دو واکنش بسته می‌ماند. البته این روش نیز محدودیت‌هایی دارد که می‌توان به ضرورت تنظیم دقیق نسبت پرایمرهای داخلی و خارجی و عدم استفاده بیش‌ازحد از پرایمر خارجی اشاره کرد. مورد دوم به منظور جلوگیری از تداخل این پرایمرها با واکنش دوم انجام می‌گیرد. همچنین طراحی پرایمرهای خارجی باید به گونه‌ای انجام گیرد که در دمای بالاتری نسبت به پرایمر داخلی به توالی هدف متصل شوند.

@GeneticDisease