واكنش زنجيره‌اي پليمراز

واكنش زنجيره‌اي پليمراز[[1]](#footnote-2) روشي است كه طي آن، قسمتي از توالي مولكول  DNA كه بين دو آغازگر[[2]](#footnote-3) قرار دارد، توسط آنزيم پليمراز و به كمك چهار داكسي نوكلئوتيد تري فسفات، در آزمايشگاه تكثير[[3]](#footnote-4) مي‌شود. DNA الگو به صورت دو رشته ای[[4]](#footnote-5) و متشكل از دو رشته آنتي پارالل مي‌باشد كه توسط اتصالات هيدروژني و به صورت كووالانت به يكديگر متصل هستند. این DNA الگو حاوی قطعه هدف به طول ده ها نوکلئوتید تا ده ها هزار نوکلئوتید هست.

همانندسازي DNA به كمك اليگونوكلئوتيدهايي به نام آغازگر انجام مي‌گيرد. این اليگونوكلئوتيدها، مولكول‌هاي DNA تك رشته‌اي كوتاهي هستند كه هر كدام از آن‌ها مكمل يك انتهاي DNA هد ف (الگو) مي‌باشند.

روش PCR  توسط کری موليس كارمند شركت Cetus  ابداع گرديد. ابتدا اين كار توسط سه بن ماري با حرارت‌هاي مختلف انجام مي‌گرفت و از آنزيم كلنو[[5]](#footnote-6) به عنوانDNA پليمراز استفاده مي‌شد.  اين آنزيم در اثرحرارت واسرشت مي‌شود و اجبارا بايد دوباره در هر چرخه به واكنش اضافه شود. Saiki از آنزيم DNAپليمراز مقاوم به حرارت كه از باكتري ترموس آكواتيكوس خالص مي‌شود و اصطلاحا" Taq DNA polymerase گفته مي‌شود، استفاده كرد. امروزه واكنشPCR به صورت اتوماتيك انجام مي‌گيرد. در این واکنش پلیمراز مقاوم به حرارت مثل Taq، با استفاده از الیگونوکلئوتید آغازگر و چهار نوع دزوکسی نوکلئوتید تری فسفات(dNTP)[[6]](#footnote-7) میلیون­ها نسخه از توالی هدف را می سازد.

فرایند PCR

PCR یک فرایند سه مرحله­ای تکراری است که تحت عنوان چرخه PCR شناخته می­شود. این سه مرحله شامل واسرشت شدن[[7]](#footnote-8) و باز شدن دو رشته DNA، اتصال دو آغازگر اولیگونوکلئوتیدی به DNA الگوی تک رشته­ای شده[[8]](#footnote-9) و طویل سازی[[9]](#footnote-10) آنزیمی آغازگر به منظور ساخت قطعه مورد نظر می­باشد. انتهای '3 آغازگر باید دقیقا مکمل رشته الگو باشد؛ اما درانتهای '5 آغازگر می­توان توالی­های غیر مکمل مثل پروموتر، توالی شناسایی آنزیم­های محدودگر و ... قرار داد. در طی چرخه­های واکنش، DNAالگو و قطعات تکثیر شده مراحل قبل به عنوان سوبسترای مراحل واسرشت شدن، اتصال آغازگر و طویل سازی مورد استفاده قرار می­گیرند. برای انجام واکنش، آغازگر و dNTP را به بافر 10mM Tris-HCl با pH=8.3(در دمای اتاق) اضافه می­کنند. علاوه بر این، 50mM KCl به منظور تامین قدرت یونی و یون منیزیم به عنوان کوفاکتور آنزیم پلیمراز به واکنش اضافه می­شود.

مرحله واسرشت سازی به سرعت در دمای 96-94 درجه سانتی گراد انجام می­شود. اتصال آغازگر بستگی به Tm[[10]](#footnote-11) یا دمای ذوب هیبرید آغازگر-الگو دارد. نرم افزارها با در نظر گرفتن توالی آغازگر و غلظت نمکی بافر، Tm را تعیین می­کنند. اما بهترین دمای اتصال آغازگر را باید به صورت تجربی به دست آورد. دمای طویل سازی برای اکثر واکنش­ها °72 سانتی­گراد است. همچنین می­توان PCR را دو مرحله­ای نمود؛ دمایی برای واسرشت شدن الگو و دمای دیگر به عنوان دمای اتصال آغازگر/طویل سازی.

مراحل يك چرخه PCR:

1- مرحله Denaturation: در اين مرحله DNA  هدف بر اثر حرارت تك رشته‌اي مي‌شود.

2- مرحله Annealing: در اين مرحله با كاهش حرارت، آغازگرها در محل مناسب روي رشته مكمل متصل مي‌شوند.

3- مرحله Extension: دماي اين مرحله براي آنزيم DNAپليمراز مطلوب مي‌باشد. در نتيجه موجب طویل سازی آغازگرها شده و همانندسازي DNA هدف انجام مي‌گيرد. محصول PCR  عبارت است از قطعه همانندسازي شده‌اي كه دو طرف اين قطعه، آغازگرها وجود دارند.

کاربرد PCR

PCR به طور گسترده در زیست شناسی مولکولی و مطالعه بیماری­های ژنتیکی به کار می رود. عوامل ویروسی از قبیل HIV و HCV را می توان با این روش شناسایی و اندازه گیری نمود. به کمک تکنیک RT-PCR محصولات ژن را شناسایی کرده و توسط Real time PCR این محصولات را اندازه­گیری می کنند. در مطالعات باستان شنانسی و تکامل، DNA قدیمی و خورد شده را PCR و تعیین توالی می نمایند. حساسیت و اختصاصیت بالای این تکنیک موجب شده است که از آن در پزشکی قانونی استفاده شود. در حوزه تولید مثل گیاهان و جانوران، این تکنیک در غربالگری صفات ژنتیکی به کار می­رود. پاتوژن­های موجود در غذا و محیط به کمک PCR شناسایی و اندازه­گیری می­شوند. PCR شناسایی ژنوم­ها را سرعت بخشید. به کمک این تکنیک، فراوانی کراسینگ اوور در یک اسپرم را می­توان تعیین کرد. همچنین می­توان جنین چهار سلولی را تعیین تایپ، جنسیت و... نمود. PCR در همسانه سازی و تعیین توالی DNA به کار می­رود.

پارامترهاي موثر در PCR:

1. زمان و دماي واسرشت سازی كه بستگي به تعداد نوكلئوتيدهاي G و C دارد.
2. دماي  اتصال آغازگرها كه بايد 4-3 درجه كمتر از دماي ذوب آغازگرها باشد.
3. زمان طویل سازی كه به تعداد بازهاي بين دو آغازگر بستگي دارد.
4. طول قطعه هدف: كارآيي PCR براي قطعات بزرگ‌تر از 3kb پائين است. در این مواقع باید از تکنیک Long PCR استفاده شود.
5. تعداد چرخه‌ها: بعد از 25 تا 30 چرخه به علت حرارت، آنزيم پليمراز واسرشت و غير فعال  مي‌شود.
6. Ramp (زماني كه طول مي‌كشد تا دماي مبدا دستگاه به دماي مقصد برسد): هرچه اين زمان كمتر باشد، نتيجه كار بهتر است و واكنش‌هاي غير اختصاصي كمتري در دماي ناخواسته انجام مي‌شود.
7. غلظت  dNTPs و يون منيزيم: اين‌ها مجموعه‌اي را تشكيل مي‌دهند كه موجب فعاليت آنزيم پليمراز مي‌شود. غلظت اين دو ماده تابعي از يكديگر مي‌باشند.
8. غلظت DNA الگو: معمولا غلظت DNA الگو در حد يك دهم تا يك ميكروگرم مي‌باشد. غلظت زياد رشته‌هاي هدف موجب  اتصال مجدد رشته ها[[11]](#footnote-12) شده و با آغازگرها رقابت مي‌كنند. چنانچه DNA هدف به تعداد چندین نسخه در ژنوم وجود داشته باشد، بهتر است.
9. اضافه كردن تشديد كننده‌هاي PCR
10. حذف مهاركننده‌هاي آنزيم از محيط
11. بهتر است نقطه ذوب آغازگرها شبيه هم باشد (Tm يكسان داشته باشند).

پیشگیری از آلودگی

PCR حساسیت بالقوه­ای برای تکثیر تک مولکول­ها دارد. بنابراین محصولات PCR می­تواند به عنوان الگوی واکنش های بعدی مورد استفاده قرار گرفته و موجب آلودگی و اشتباه شود. به همین دلیل باید محصولات PCR را از محل انجام آزمایش جدا کرد. بدین منظور باید حداقل دو اتاق pre-PCR و post-PCR تعبیه گردد. در اتاق pre-PCR نمونه­ها و مواد واکنش آماده شده و به اتاق post-PCR برده می­شود. در اتاقpost-PCR واکنش PCR و الکتروفورز انجام می­شود. جریان مواد، وسایل و نمونه­ها همیشه از pre-PCR به post-PCR است و برای جلوگیری از آلودگی نباید عکس این جریان اتفاق بیافتد. حتی کوچکترین آئروسل­های ایجاد شده می­تواند حاوی هزار مولکول از محصول PCR باشد و یک نمونه منفی را به طور کاذب مثبت نشان دهد. این نوع از آلودگی به Carryover معروف است. برای جلوگیری از این نوع آلودگی باید از پیپت­ها و سمپلرهای جداگانه، سرسمپلرهای فیلتردار، فضای کار مجزا برای تهیه نمونه، آماده سازی محلول­های واکنش، انجام PCR و آنالیز محصولات استفاده نمود. همچنین همیشه استفاده از کنترل­های مثبت و منفی الزامی است. استفاده از dUTP به جای dTTP در تمام واکنش­های PCR، این امکان را به وجود می­آورد که به توان با استفاده از روش­های بیوشیمیایی این مشکل را رفع نمود. محصول حاوی dU را می­توان به طور معمول در همسانه سازی، تعیین توالی و آنالیز نمونه­ها مورد استفاده قرار داد. در این روش قبل از هر واکنش، آنزیم یوراسیل N- گلیکوزیلاز(NUG[[12]](#footnote-13)) را به محلول واکنش اضافه می­کنند. این آنزیم باز یوراسیل را ازDNA تک رشته و دو رشته ای حذف کرده و محصولات PCR واکنش­های قبلی را از بین می­برد.

**آنزیم پلیمراز**

انتخاب آنزیم پلیمراز برای انجام PCR بستگی به نوع کار و هدف آزمایش دارد. چندین آنزیم پلیمراز به صورت تجاری وجود دارد که بسته به پایداری در دمای بالا[[13]](#footnote-14)، سرعت و صحت فعالیت، می­توان آنزیم مورد نیاز را انتخاب کرد. معمول­ترین و بیشترین آنزیم مورد استفاده Taqپلیمراز است. این آنزیم اکنون به صورت نوترکیب در باکتری *E.coli* تولید و تخلیص شده و با غلظت 5U/µl در بافر(V/V) 50% گلیسرول عرضه می­شود.

خصوصیات بیوفیزیکی: این آنزیم 94 کیلودالتون وزن داشته و فعالیت پلیمرازی '5 به '3 دارد. بهترین دما برای فعالیت این آنزیم °80-°70 سانتی­گراد است و پایداری خوبی در دمای بالا دارد. نیمه عمر آنزیم 40-35 دقیقه است. محصولاتی که با این آنزیم ساخته شده در انتهای '3 خود دارای یک نوکلئوتید آزاد(بدون مکمل)[[14]](#footnote-15) از آدنین است که از آن می­توان در همسانه سازی ژن درون ناقل[[15]](#footnote-16)T/A استفاده نمود.

واکنش بیوشیمیایی: این آنزیم به یون منیزیم به عنوان کوفاکتور نیاز داشته و واکنش طویل سازی آغازگر را در دمای °72 سانتی­گراد کاتالیز می­کند. آنزیم پلیمراز از 4 نوع dNTP (شامل dATP, dCTP, dGTP, dTTP/ dUTP) استفاده کرده و طبق قانون مکملی بازها، طویل سازی را انجام می­دهد. این آنزیم می­تواند از بازهای تغییر یافته (ddNTPs، biotin-11-dNTP، dUTP، deaza-dGTP و dNTPs نشاندار شده با فلورسنت) نیز استفاده کرده و طویل سازی را انجام دهد.

آنزیم Taqپلیمراز در ساختار چنگالی فعالیت بیشتری از خود نشان می­دهد[[16]](#footnote-17). همچنین آنزیم فعالیت '5 به '3 نوکلئازی دارد که به کمک آن آغازگرهای پایین دست را از تخریب می­کند. این فعالیت بخصوص در Real time PCR کاربرد داشته و موجب تولید سیگنال فلورسانس می­شود. این آنزیم فاقد فعالیت '3 به '5 نوکلئازی و تصحیح اشتباه[[17]](#footnote-18) است.

نوع تغییر یافته این آنزیم نیز تولید شده که حاوی تغییرات شیمیایی قابل برگشت است (AmpliTaq Gold). آنزیم تغییر یافته در دمای اتاق غیر فعال است. دمای بالا و pH پایین موجب برگشت تغییر و فعال شدن آنزیم می­شود. بافر تریس و دمای °95-°92 سانتی­گراد این شرایط برگشت را به وجود می­آورند. pH بافر تریس در دمای °25 معادل 3/8 بوده و در دمای بالای °90 به 7 می­رسد. هنگام استفاده از این آنزیم و به منظور فعال نمودن آن، یک مرحله Pre-PCR به مدت 10 دقیقه در دمای °95 به واکنش اضافه می­شود. همچنین به جای این مرحله می­توان 10 سیکل به PCR اضافه نمود که نتیجه مشابهی حاصل می­شود.

جدول خصوصیات آنزیم­های پلیمراز که به صورت تجاری موجود است

**آغازگر**

آغازگرهای مورد استفاده در PCR عبارتند از الیگودزکسی ریبونوکلئوتیدهایی که به صورت كاملا" اختصاصي و مكمل ناحيه مد نظر از DNA هدف طراحي مي‌گردند. این قطعه از DNA مصنوعی 30-15 نوکلئوتید طول داشته و حاوی 60-50% نوکلئوتیدهای G+C هست. آغازگرهاي حاوي بيش از 30 نوكلئوتيد اختصاصيت خوبي ندارند. همچنين دماي اتصال آغازگر بايد مناسب باشد. بهتر است تعداد نوكلئوتيدهاي دو آغازگر مساوي بوده و پلي پورين يا پلي پيريميدين نباشند. همچنين نواحي تكرار شونده نداشته باشند. چنانچه نوكلئوتيدهاي G يا C به صورت تكراري و پشت سرهم باشند، آغازگر به صورت حلقه در آمده و عملا" سيستم كار نمي‌كند. در طراحی آغازگر باید دقت شود که دو آغازگر تشکیل دایمر و ساختار سنجاق سر[[18]](#footnote-19) ندهند. به خصوص انتهاي '3 دو آغازگر به هیچ عنوان نبايد مكمل هم باشد؛ زيرا این آغازگر دايمر به شدت مشکل آفرین خواهد بود.

انتهای '3 آغازگر باید دقیقا مکمل DNA هدف باشد تا PCR به طور کارآمد انجام شود. از این خصوصیت در طراحی PCR اختصاصی آلل[[19]](#footnote-20) یا ARMS-PCR استفاده می­شود. انتهای '5 آغازگر الزاما مکمل رشته الگو نیست. در این انتها می­توان توالی­های فاقد مکمل از قبیل سایت برش آنزیم محدودگر و پروموتر قرار داد. برای تکثیر قطعاتی که فقط توالی اسید آمینه آن مشخص است و اطلاعاتی از توالی اسید نوکلئیک آن در دسترس نیست، می­توان با توجه به کدون­های هر یک از اسید آمینه­ها آغازگر را طراحی کرد. از آن جا که هر اسید آمینه ممکن است چند کدون داشته باشد، این آغازگر حاوی نوکلئوتیدهای بدون مکمل[[20]](#footnote-21) خواهد بود. هنگام کار با این آغازگرها، دمای اتصال آغازگر در چرخه­های اول را پایین در نظر می­گیرند تا آغازگرهای حاوی نوکلئوتید بدون مکمل نیز به DNA الگو متصل شود. سپس در چرخه­های بعدی دمای اتصال بالا رفته و شرایط سخت­تر می­شود تا تکثیر از توالی­های غیر اختصاصی انجام نشود.

آغازگر می­تواند به صورت هموپلیمرهایی مثل اولیگوdT باشد که در RT-PCR مورد استفاده قرار می­گیرد. در تکنیک دیگری تحت عنوان RAPD[[21]](#footnote-22)، از تک آغازگر کوچک(در حدود 10 نوکلئوتید) استفاده می­شود. این آغازگر دارای توالی تصادفی بوده و موجب تکثیر از هر دو رشته شده و مجموعه­ای از انواع محصولات PCR را تولید می­کند که در انگشت نگاری ژنوم کاربرد دارد.

امروزه نرم افزارهايي وجود دارد كه طراحي آغازگر را انجام مي‌دهند. بعد از طراحي آغازگر، حتما باید تو سط [نرم افزار](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast)هايي مانندBlast  آن‌ها را چك نمود تا مشخص شود كه به چه نواحي ديگري از ژنوم مي‌توانند متصل شوند. نرم افزار Blast مشابهت بین توالی آغازگر با تمام توالی های موجود در بانک اطلاعاتی اسید نوکلئیک را چک می کند. آغازگر نباید غیر از توالی هدف به دیگر توالی ها متصل شود. در غیر این صورت قطعات ناخواسته تکثیر خواهند شد. این نرم افزار به صورت *On Line* به نشانی [www.ncbi.nlm.nih.gov/blast](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast) در دسترس عموم کاربران قرار دارد.

 مواقعي كه آغازگرها كاملاً مكمل DNA هدف( الگو) نمي‌باشند:

1. آغازگرهايي كه براي ايجاد جهش در يك ژن طراحي مي‌گردند.
2. آغازگرهايي كه در سمت 5` آن‌ها جايگاه شناسايي آنزيم محدودگر تعبيه مي‌شود تا بتوان  محصول PCR  را توسط آن آنزيم برش داد. اين كار براي همسانه سازی محصول PCR  انجام مي‌شود.
3. آغازگرهايي كه لازم است محصول PCR  آن‌ها داراي پروموتر باشد و براي بيان ژن كاربرد دارند.
4. آغازگرهایی که در طراحی آن ها به جای استفاده از توالی اسید نوکلئیک از توالی پروتئینی آن استفاده می شود.

Tm

DNA دو رشته­ای از قبیل کمپلکس آغازگر-الگو دارای سطحی از پایداری است که این پایداری بسته به نوع و طول توالی دو رشته، غلظت این دو جزء و غلظت نمک بافر می­باشد. حرارت می­تواند این دو رشته را از هم گسسته و باز کند. دمایی که در آن نصف مولکول­ها تک رشته شده و نصف دیگر هنوز به صورت دو رشته­ای باقی مانده­اند را Tm کمپلکس می­خوانند. به علت وجود پیوندهای هیدروژنی بیشتر بین نوکلئوتیدهای G و C، Tm توالی­هایی با نسبت GC بالا، بیشتر است. اغلب از روی میزان CG یک توالی Tm آن را محاسبه می­کنند، اما توالی­هایی که میزان CG آن­ها یکسان است نیز Tm متفاوتی از خود نشان داده­اند. یک فرمول ساده برای محاسبه Tm عبارت است از: *T*m = 4(G+C) + 2(A+T) C امروزه نرم افزارهای متعددی طراحی شده­اند که به طور دقیق­تر Tm را محاسبه می­کنند.

از آن جا که اختصاصیت فرایند PCR وابسته به اتصال دقیق آغازگر به الگو است، دمای اتصال آغازگر بر اساس دمای ذوب[[22]](#footnote-23) آغازگرها(Tm) محاسبه می­شود. دمای اتصال آغازگر معمولا °4-2 سانتی­گراد کمتر از دمای Tm است.

نمونه مورد آزمایش

نمونه­هایی[[23]](#footnote-24) که در فرایند PCR مورد آزمایش قرار می­گیرد شامل DNA تک رشته­ای و دو رشته­ای جانوران، باکتری­ها، گیاهان و ویروس­ها می­باشد. انواع mRNA، tRNA، rRNA و RNA ویروسی نیز بعد از تبدیل شدن به cDNA[[24]](#footnote-25) توسط آنزیم رونویس معکوس[[25]](#footnote-26) می­توانند در فرایند PCR به کار روند.

میزان نمونه­ لازم برای انجام PCR، می­تواند بسیار کم و در حد یک مولکول باشد. برای انجام PCR در شرایط معمول، اگر نمونه شامل DNA همسانه سازی شده باشد در حد نانوگرم و اگر DNA ژنومیک باشد در حد میکروگرم کافی است. به طور کلی تعداد 105 مولکول از نمونه هدف باید به محلول واکنش افزوده شود.

نمونه DNA که برای انجام PCR به کار می­رود نیازی به خلوص بالا ندارد. تک سلول، لیز سلولی و یا حتی نمونه کوچکی از DNA تخریب شده نیز می­تواند به عنوان الگو برای PCR به کار رود. برای انجام PCR، خلوص نمونه باید در حدی باشد که حداقل یک مولکول DNA حاوی توالی هدف سالم و یکپارچه در نمونه وجود داشته و ناخالصی­های همراه نمونه رقیق شده و مانع فعالیت آنزیم پلیمراز نشوند. البته در بعضی از مواقع از جمله در انجام Long PCR کیفیت و کمّیت نمونه باید بالاتر باشد. اگر مقدار نمونه زیاد باشد می­تواند موجب آلودگی نمونه­ها با هم و یا با محصولات PCR قبلی شده و مثبت کاذب پدید آید. در مواقعی که نمونه الگو کم باشد، حساسیت و کارآیی واکنش کم شده و جواب منفی کاذب خواهد بود. اگر کیفیت نمونه پایین و مقدار DNA خورد شده زیاد باشد، تعیین میزان دقیق DNA الگو در واکنش مشکل خواهد بود.

کوفاکتورهای فلزی

کلرید منیزیم یک کوفاکتور اصلی برای آنزیم پلیمراز هست و مقدار مناسب آن برای هر سیستم آغازگر-الگو باید محاسبه شود. بسیاری از اجزای PCR از قبیل آغازگر، الگو، محصول PCR و dNTP به یون منیزیم متصل می­شوند. مهمترین جزء PCR که به صورت 1:1 به یون منیزیم متصل می­شود dNTP است. از آن جا که یون منیزیم به عنوان کوفاکتور پلیمراز ضروری است، بنابراین میزان منیزیم باید بیشتر از dNTP باشد. برای شروع PCR به طور معمول mM5/1 از یون منیزیم را در حضورmM 8/0 dNTP به واکنش اضافه می­کنیم. دراین شرایط حدود mM7/0 از منیزیم برای پلیمراز باقی خواهد ماند. برای بهینه سازی شرایط PCR غلظت منیزیم را در 6 واکنش مجزا، از 5/1 تا mM4 تغییر داده تا بهترین غلظت تعیین شود.

سوبسترا

آنزیم DNAپلیمراز dNTP را با کارآیی بالا درون رشته در حال ساخت قرار می­دهد. همچنین این آنزیم می­تواند همراه با dNTP، از سوبسترای تغییر یافته نیز استفاده کند. Digoxigenin-dUTP، biotin-11-dUTP، dUTP، c7deaza-dGTP و dNTP نشاندار شده با فلورسنت می­توانند به عنوان سوبسترای آنزیم پلیمراز مورد استفاده قرار گیرند. در PCR معمولی نسبت هر کدام از dNTPها یکسان در نظر گرفته شده و mM200 از هر کدام به واکنش اضافه می­شود. اما در بعضی شرایط انحراف از این حالت استاندارد می­تواند مفید واقع شود. به عنوان مثال در مواقعی که هدف از PCR جهش­زایی تصادفی[[26]](#footnote-27) است، بر هم زدن این نسبت، الحاق بازهای اشتباه[[27]](#footnote-28) به درون رشته­های در حال ساخت را تشدید می­کند.

بافر و نمک­ها

غلظت مناسب بافر، نمک و pH بافر بستگی به آنزیم پلیمراز مورد استفاده در PCR دارد. بافر مورد استفاده برای DNA پلیمراز Taq حاوی mM50 کلرید پتاسیم(KCl) و Mm10 از Tris-HCl بوده و pH آن در دمای اتاق 3/8 است. این بافر قدرت یونی و ظرفیت بافری لازم برای واکنش را فراهم می­سازد. غلظت نمک بر روی Tm دو رشته آغازگر-الگو و در نتیجه دمای اتصال آغازگر موثر است.

مواد دیگر

ترکیبات متعددی همراه با محلول PCR به کار می­روند که تحت عنوان Cosolvent شناخته شده و موجب افزایش محصول، کارآیی واکنش و اختصاصیت PCR می­شوند. اگرچه این مواد موجب بهبود شرایط واکنش می­شوند، اما پیش­بینی تاثیر مثبت یک ماده بر روی هر سیستم آغازگر-الگو تقریبا غیر ممکن است. بنابراین تاثیر هر کدام از این مواد افزودنی بر روی هر سیستم آغازگر-الگو باید به صورت تجربی به دست آید. تعدادی از این مواد در جدول زیر ذکر شده­اند.



میکروتیوب­های PCR

PCR باید درون لوله­هایی انجام شود که برای حداقل میزان آنزیم و DNA طراحی شده و خصوصیات انتقال گرمایی مناسبی داشته باشند. معمولا این لوله­ها از جنس پلی پروپیلن بوده و دارای دیواره نازک هستند. به منظور جلوگیری از تبخیر محلول واکنش می­توان روغن معدنی و موم بر روی نمونه­ها قرار داد. البته امروزه لوله­ها طوری طراحی شده­اند که مانع تبخیر محلول می­شوند. همچنین درب دستگاه­های ترموسیکلر موجود دمایی بالاتر از دمای واسرشت سازی(در حدود °105-100 سانتی­گراد) را ایجاد کرده که مانع تبخیر محلول درون لوله شود.

تعداد چرخه­های PCR

تعداد چرخه­های PCR با توجه به غلظت DNA اولیه تعیین می­شود. اگر غلظت الگوی اولیه حدود 50 مولکول باشد، 45-40 چرخه و اگر غلظت آن105× 3 مولکول باشد30-25 چرخه کافی است. این عدم تناسب به علت وجود پدیده­ای تحت عنوان اثر پلاتو[[28]](#footnote-29) است. در اثر این پدیده در مراحل انتهایی PCR، سرعت تکثیر و تولید محصول کاهش می­یاید. این پدیده ممکن است به علت تخریب و از بین رفتن مواد (مثل آنزیم پلیمراز و dNTP)، اتمام مواد(مثل آغازگر و dNTP)، مهار و اکنش توسط محصولات جانبی[[29]](#footnote-30)(پیروفسفات)، رقابت برای مصرف مواد توسط محصولات غیر اختصاصی یا رقابت بین آغازگر و محصولات تجمع یافته برای اتصال به هدف[[30]](#footnote-31) اتفاق بیفتد.

بايدها و نبايدها در PCR

1. هنگام تهيه محلول واكنش، نمونه كنترل مثبت را در آخر كار تهيه كنيد.
2. اعمال قبل و بعد از PCR، جدا از يكديگر انجام گيرند.
3. براي استفاده از هر ماده، از پيپت جداگانه و اختصاصي استفاده كنيد.
4. از پيپت‌هاي با قابليت اتوكلاو و يا از پيپت‌هاي يكبار مصرف استفاده كنيد.
5. مواد ذخيره‌اي آزمايشگاه را تقسيم كرده و فريز كنيد و هرچند وقت صحت و سلامت آن‌ها راكنترل كنيد.
6. هنگام استفاده، هر لوله را ميكروفيوژ كنيد تا موادي كه به اطراف درب لوله چسبيده‌اند رسوب كنند.
7. حتما كنترل منفي نيز در كنار نمونه‌ها قرار دهيد.
8. براي انجام آزمايش‌هاي تاييدي ازمواد فريز شده استفاده كنيد.
9. هميشه محصول PCR را خارج از محل آماده‌سازي نمونه نگهداري كنيد.
10. هنگام كار با  PCR product، مقداري از آن را جداگانه  نگهداري كنيد.

انجام واكنش [PCR](http://www.iranbiotech.com/Workshops/DNA/PCR5.htm)

توجه :  آزمايش بايد در محلي  بدون رفت و آمد انجام گيرد. سمپلرهاي مورد استفاده نبايد براي كارهاي ديگر استفاده شوند. ظروف، لوله‌ها و سر سمپلرها اتوكلاو شده و هنگام كار از دستكش استفاده شود.

 مواد زير را داخل لوله مخصوص  واكنش PCR بريزيد:

10mMdNTP                            0.5 μl (0.1mM)

10x PCR buffer                       5 μl

MgCl2                                     1.5 μl (1.5 mM)

Primer -1                                20pmmol

Primer -2                                20 pmol

Taq DNA polymerase           0.25 μl ( 1.25 U)

Template DNA                      0.1- 1 μg

dH2O                                      up to 50μl

لوله‌ها را داخل Block  دستگاه ترموسايكلر قرار داده و  دستگاه را روشن كنيد. مقدار 100μl روغن معدني روي محلول بريزيد تا از بخار شدن مواد ممانعت به عمل آورد. لازم به ذكر است كه دستگاه‌هاي ترموسايكلر جديد به صورت Heated lid ساخته شده‌اند. يعني درب دستگاه كه روي لوله‌هاي  واكنش قرار مي‌گيرد، حدود 105 درجه سانتي‌گراد گرم مي‌شود. در نتيجه بالاي لوله گرم‌تر از پايين آن است و از بخار شدن مواد داخل لوله جلوگيري مي‌شود.  پس از اتمام كار چگونگي رديابي ( detect ) محصول PCR مطرح می شود. دو روش بدین منظور وجود دارد:

1. دو رگه‌گيري محصول PCR با اليگو نوكلئوتيد نشاندار (کاوشگر)
2. الكتروفورز روي ژل آگاروز يا پلي‌اكريلاميد که در فصل قبل توضیح داده شد.

انواع PCR:

Hot start PCR: دمای Annealing تعیین کننده اختصاصیت PCR است. هر چه این دما کمتر باشد، اتصال آغازگر به توالی­های غیر اختصاصی بیشتر است. هنگام تهیه محلول واکنش در دمای اتاق یا روی یخ، تمام مواد مورد نیاز در لوله وجود دارد. پس در این دما آغازگرها به راحتی اتصالات غیر اختصاصی، آغازگر دایمر و حلقه[[31]](#footnote-32) تشکیل می­دهند. آنزیم پلیمراز در این دما به میزان کمی فعال بوده و از روی هیبریدهای حاصل واکنش را کاتالیز می­کند. آغازگری که به طور اشتباه به نقاط غیر اختصاصی متصل شده، در این شرایط طویل شده و توالی آن تغییر می­کند. هنگامی دما افزایش یابد، دیگر این آغازگر به جای توالی اختصاصی خود به توالی غیر اختصاصی متصل می­شود. زیرا '3 این آغازگر حاوی مکمل توالی غیر اختصاصی است. به منظور جلوگیری از وقوع این مشکل استراتژی­های مختلفی تحت عنوان Hot start توسعه یافته است. در این تکنیک يك يا چند تركيب مهم PCR( ترجيحا" آنزيم پليمراز) از محلول واکنش جدا شده و زمانی که دما افزایش یافت، به واکنش اضافه می­شود. استراتژی­های زیر برای این جداسازی به کار گرفته شده است:

* روش دستی

در روش دستی، یکی از اجزای کلیدی واکنش مثل پلیمراز یا کلرید منیزیم در محلول اولیه وجود ندارد و زمانی به واکنش اضافه می­شود که دمای محلول به دمای Annealing رسیده باشد. از آن جا که در این روش دوباره درب لوله واکنش باز می­شود، مقداری از محلول تبخیر شده، غلظت یونی تغییر می­کند. همچنین احتمال آلودگی واکنش وجود دارد.

* روش انسداد فیزیکی[[32]](#footnote-33)

ديواره لوله‌هاي مخصوص اين كار به نوعي واكس آغشته است كه بعد از مختصري گرم كردن ذوب شده و روي واكنش را مي‌پوشاند. آنزيم پليمراز را روي واكس قرار ميدهند . در دماي 94 درجه اين واكس بخار مي‌شود و آنزيم پليمراز با واكنش تماس پيدا مي‌كند. این تکنیک تحت عنوان Hot start  به كمك Ampliwax نیز شناخته می شود.

* به كمك آنتي بادي

منوكلونال آنتي بادي ضد آنزيم پليمراز را به واكنش اضافه مي‌كنند؛ درنتيجه  فعاليت پليمرازي آنزيم را مهار مي‌شود. هنگامي‌كه دماي واكنش به 94 درجه مي‌رسد، آنتي بادي واسرشت مي‌شود و دوباره  پليمراز فعال مي‌گردد.

* پلیمراز تغییر یافته[[33]](#footnote-34)

در این روش آنزیم DNA پلیمراز را به صورت شیمیایی تغییر داده­اند. این تغییر شیمیایی فعالیت پلیمرازی آنزیم را مهار می­کند تا هنگامی که دما افزایش یابد. در این روش یک مرحله Pre-PCR وجود دارد تا این ممانعت شیمیایی رفع شود. در این مرحله محلول به مدت 10 دقیقه در دمای °95 سانتی­گراد قرار می­گیرد. بنابراین محلول واکنش تا زمانی که به طور دقیق به دمای Annealing نرسیده است، هیچ گونه واکنش پلیمرازی نخواهد داشت. اگر این مرحله Pre-PCR حذف شود، تغییر شیمیایی به تدریج طی مراحل واسرشت سازی PCR از بین رفته و آنزیم کم کم فعال می­شود. دراین صورت نه تنهاPCR به صورت Hot start انجام می­شود، بلکه اثر آزاد سازی وابسته به زمان[[34]](#footnote-35) آنزیم را نیز به همراه دارد. با پیشرفت واکنش، سوبسترای آنزیم (محصولات PCR که خود به عنوان الگو استفاده می­شود) بیشتر شده و نیاز به پلیمراز بیشتری هست. طبق این اثر، طی PCR، پلیمراز نیز رفته رفته بیشتر شده و تعادل بین سوبسترا و آنزیم حفظ می­شود.

* اولیگونوکلئوتید مهارکننده پلیمراز

در این تکنیک اولیگونوکلئوتیدهای دارای قابلیت اتصال به پلیمراز، به واکنش اضافه می­شود. این اولیگونوکلئوتید به پلیمراز متصل شده و آنزیم را در دمای محیط غیر فعال نگه می­دارد. با افزایش دما، این مهار کننده از آنزیم جدا می­شود. در این حالت آنزیم شروع به پلیمریزاسیون می­کند.

 Touch down PCR

  در اين روش دماي اتصال آغازگر ازدماي بالاتر از Tm  شروع شده و بندرت كاهش مي‌يابد وموجب كاهش محصول كاذب و آغازگر دايمر مي‌شود.

PCR داخلي[[35]](#footnote-36)

مواقعي كه DNA هدف در نمونه مورد آزمايش كم باشد، براي جلوگيري از بالابردن مقدار DNA و مهار واكنش، توسط آغازگرهاي خارجي قطعه طويل‌تري همانندسازي مي‌شود و از محصول PCR  اول يك واكنش ديگر  با آغازگرهاي داخلي انجام مي‌گيرد. در اين روش اختصاصيت و حساسيت PCR بالا مي‌رود. این تکنیک يك روش سريع و قابل اطمينان براي تاييد محصول PCR مي‌باشد. در اين روش اغلب از دو آغازگر استفاده مي‌شود كه نسبت به محصول PCR اول، داخلي هستند. محصول PCR واكنش اول به عنوان الگو براي يك PCR دوم حاوي اين آغازگرهاي داخلي مورد استفاده قرار مي‌گيرد. اين واكنش دوم بايد محصول PCRكوچكتري درمقايسه با محصول اوليه ايجاد كند.

طبق محاسبات انجام شده، Nested PCR باعث افزايش حساسيت تشخيص محصول صحيح، به ميزان 410 برابر مي‌گردد. حتي اگر محصول PCR واكنش اول در بين پس زمينۀ محصولات غير اختصاصي محو شده باشد، با استفاده از آغازگرهاي PCR داخلی امكان تكثير موثر و اختصاصي را خواهد داشت. از طرف ديگر احتمال اين كه محصولات PCR غير اختصاصي، توالي مشابه آغازگر داخلي را داشته باشد، بسيار كم است و به همين دليل معمولا بعد از Nested PCR نبايد محصولات غيراختصاصي وجود داشته باشد. حتي اگر طراحي دو آغازگر داخلي، به دليل عدم دسترسي به توالي كامل ممكن نباشد. مثلا هنگامي كه توالي پپتيدي محدودي در دست است، باز هم استفاده از اين روش امكان‌پذير است. يك آغازگر داخلي جديد را مي‌توان همراه با يكي از آغازگرهاي اوليه استفاده كرد و همچنين استفاده از توالي همان آغازگرهاي اوليه با افزودن فقط دو يا سه نوكلئوتيد به انتهاي '3 براي بالا بردن ويژگي در Nested PCR كافي است. در واقع انتهاي '3 آغازگر است كه در تعيين ويژگي واكنش PCR نقش اصلي را به عهده دارد. در صورتي كه نوكلئوتيد انتهاي '3 با DNA جفت نشود، واكنش باعث تكثير اختصاصي توالي هدف و حذف محصولات غير اختصاصي خواهد شد. با اين كه آغازگرهاي داخلي همپوشاني قابل توجهي با آغازگرهاي اوليه دارند، باز اين سطح از اختصاصيت به دست مي‌آيد. البته در اين حالت نبايد از آنزيم‌هاي پلي‌مراز داراي فعاليت تصحيح اشتباه اگزونوكلئازي استفاده كرد تا انتهاي '3 تعيين كننده حفظ شود.

براي كاهش دستکاري و جلوگيري از مشكلات آلودگي هر دو واكنش PCR اوليه و Nested را مي‌توان در يك لوله انجام داد. براي اين كار هر دو جفت آغازگر در آغاز واكنش افزوده مي‌شوند. ولي آغازگرهاي داخلي طوري طراحي شده‌اند كه دماي ذوب پايين‌تري نسبت به جفت آغازگر اوليه دارند. اين كار اجازه مي‌دهد كه تكثير توالي هدف اوليه در دماي اتصال بالاتري نسبت به آغازگرهاي داخلي صورت گيرد. سپس يك برنامۀ PCR دوم اجرا مي‌شود كه دماي اتصال پايين‌تري دارد و اجازه مي‌دهد كه جفت آغازگر داخلي، محصول PCR اختصاصي را از روي محصول اوليه تكثير نمايند. محصولات PCR را مي‌توان بر روي ژل آگاروز بررسي كرد و در واقع بايد محصولات تكثير اوليه به همراه قطعه كوچكتر تكثير شده در Nested PCR مشاهده شوند. بهتر است كه از محصول PCR اول براي آزمايشات بعدي استفاده نشود. زيرا بالا بردن تعداد چرخه‌هاي PCR احتمال وقوع جهش‌هاي ناشي از PCR را افزايش مي‌دهد.

يك مشكل اصلي بالقوه در هنگام تاييد صحت محصولات PCR اوليه با استفاده از Nested PCR وجود DNA الگوي اوليه مي‌باشد. اگرچه محصول اوليه غير اختصاصي مي‌باشد، ولي مقدار الگوي اوليه به حدي باشد كه امكان تكثير مستقيم توسط آغازگرهاي داخلي فراهم باشد. نتيجه مثبت ممكن است باعث اين اشتباه شود كه محصول PCR اوليه در واقع همانند توالي صحيح هدف است. براي جلوگيري از هرگونه تكثير از روي DNA الگوي اوليه محصول PCR اول را مي‌توان رقيق كرد. به طوري كه مقدار كل الگوي اوليه در PCR دوم قابل اغماض باشد. در مواردي كه يك محصول PCR اوليه مشخص وجود دارد، راه مطمئن‌تر خالص سازي فيزيكي محصول PCR از DNA الگوي اوليه است. براي مثال مي‌توان از الكتروفورز روي ژل آگاروز و خالص سازي از ژل استفاده كرد.

در هر واكنش PCR قرار دادن كنترل‌هاي مناسب اهميت فوق‌العاده دارد تا دقت و ويژگي PCR قابل اطمينان باشد. در Nested PCR به دليل افزايش حساسيت وجود كنترل‌ها اهميت بيشتري دارد. زيرا هر گونه آلودگي جزيي نيز تكثير خواهد شد. انجام واكنش‌هاي تك آغازگري براي اطمينان از ويژگي آغازگرها و همچنين كنترل‌هاي بدون DNA و بدون آغازگر ضروري است. به طور خلاصه Nested PCR يك روش حساس و سريع براي تاييد واكنش‌هاي تكثيري PCR مي‌باشد. با وجود اين داده‌هاي لكه‌گذاري ساترن همراه با هضم به كمك آنزيم‌هاي محدود الاثر در شرايط اتصال سخت[[36]](#footnote-37) به دست آمده باشد. روش گوياتري براي تاييد صحت محصول مي‌باشد. بعضي از روش‌هاي تركيبي ممكن است در موارد خاص مورد نياز باشد. البته بهترین روش تاييد صحت محصول PCR تعيين توالي DNA است كه اين روش در صورت كم بودن تعداد نمونه‌ها مي‌تواند حتي سريع‌تر از لكه‌گذاري ساترن نيز باشد.

روش انجام كار:

مواد مورد نياز اين مرحله را به صورت زير آماده كنيد:

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| حجم مورد نياز | غلظت اوليه | مواد و محلول‌ها |
| Lµ1 | mM5/2 | كلريد منيزيم |
| Lµ1 | mM5/2 | Dntp |
| Lµ5/2 | X10 | بافر PCR |
| Lµ1+1 | Mm200 | آغازگر خارجي |
| Lµ25/0 | U/ml5/1 | DNAپلي‌مراز Taq |
| Lµ18 |  | D.D.W |
| Lµ2 |  | DNA |

مواد مورد نياز را از فريزر 20- بيرون آورده و بر روي يخ قرار دهيد تاذوب شود.

مواد را طبق جدول فوق آماده كنيد. دقت كنيد كه حجم نهايي هر واكنش 25 ميكروليتر باشد.

در نمونه كنترل منفي به جاي DNA آب مقطر اضافه كنيد.

يك قطره روغن معدني مخصوص PCR اضافه نماييد تا از تبخير محلول طي واكنش جلوگيري شود.

نمونه‌ها را در دستگاه قرار داده و برنامۀ PCR را به صورت زير تنظيم كنيد:

واسرشت سازي اوليه در دماي ْ94 به مدت 2 دقيقه

واسرشت سازي در دماي 94ْ به مدت 1 دقيقه

اتصال آغازگر در دماي 57ْ به مدت5/1 دقيقه

طويل سازي به مدت 1 دقيقه در دماي 72ْ سانتي‌گراد

تكرار اين سه مرحله به مدت 30 چرخه

طويل سازي نهايي در دماي 72ْ به مدت 5 دقيقه

بعد از اتمام مرحله اول PCR از محصول به دست آمده جهت مرحله دوم PCR استفاده كرده و به صورت زير عمل كنيد:

مواد مورد نياز اين مرحله را به صورت زير آماده كنيد:

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| حجم مورد نياز | غلظت اوليه | مواد و محلول‌ها |
| Lµ1 | mM5/2 | كلريد منيزيم |
| Lµ1 | mM5/2 | dNTP |
| Lµ5/2 | X10 | بافر PCR |
| Lµ1+1 | Mm200 | آغازگر داخلي |
| Lµ25/0 | U/ml5/1 | DNAپلي‌مراز Taq |
| Lµ18 |  | D.D.W |
| Lµ5 |  | محصول PCR مرحله اول |

پس از مخلوط كردن محلول‌هاي فوق، يك قطره روغن معدني به ميكروتيوب اضافه كرده و در دستگاه ترموسيكلر قرار دهيد. دستگاه را طبق برنامۀ زير تنظيم كنيد:

واسرشت سازي اوليه در دماي ْ94 به مدت 2 دقيقه

واسرشت سازي در دماي 94ْ به مدت 1 دقيقه

اتصال آغازگر در دماي 58ْ به مدت 1دقيقه

طويل سازي به مدت 1 دقيقه در دماي 72ْ سانتي‌گراد

تكرار اين سه مرحله به مدت 30 چرخه

طويل سازي نهايي در دماي 72ْ به مدت 10 دقيقه

1. Polymerase Chain Reaction ( PCR) [↑](#footnote-ref-2)
2. primer [↑](#footnote-ref-3)
3. Amplify [↑](#footnote-ref-4)
4. dsDNA [↑](#footnote-ref-5)
5. Klenow [↑](#footnote-ref-6)
6. deoxynucleoside triphosphates [↑](#footnote-ref-7)
7. Denaturation [↑](#footnote-ref-8)
8. Annealing [↑](#footnote-ref-9)
9. Extension [↑](#footnote-ref-10)
10. melting temperature, [↑](#footnote-ref-11)
11. Reannealing [↑](#footnote-ref-12)
12. uracil-N glycosylase [↑](#footnote-ref-13)
13. thermal stability [↑](#footnote-ref-14)
14. overhang [↑](#footnote-ref-15)
15. vector [↑](#footnote-ref-16)
16. fork-like structure-dependent [↑](#footnote-ref-17)
17. proofreading activity [↑](#footnote-ref-18)
18. Hairpin [↑](#footnote-ref-19)
19. allele-specific PCR [↑](#footnote-ref-20)
20. Mismatch [↑](#footnote-ref-21)
21. randomly amplified polymorphic DNA [↑](#footnote-ref-22)
22. melting temperature [↑](#footnote-ref-23)
23. Samples [↑](#footnote-ref-24)
24. complementary DNA [↑](#footnote-ref-25)
25. reverse transcriptase [↑](#footnote-ref-26)
26. random mutagenesis [↑](#footnote-ref-27)
27. misincorporations [↑](#footnote-ref-28)
28. plateau effect [↑](#footnote-ref-29)
29. end-product inhibition [↑](#footnote-ref-30)
30. reannealing [↑](#footnote-ref-31)
31. Loop [↑](#footnote-ref-32)
32. Physical Barrier [↑](#footnote-ref-33)
33. Modified polymerase [↑](#footnote-ref-34)
34. time release effect [↑](#footnote-ref-35)
35. Nested PCR [↑](#footnote-ref-36)
36. High stringency [↑](#footnote-ref-37)