آشنایی باPCR (Polymerase Change Reaction)

غلامرضا هدایتی - کارشناس علوم آزمایشگاهی آزمایشگاه مرجع دانشگاه علوم پزشکی مشهد

آنچه خواهید خواند تنها مختصری از این تکنیک به زبان ساده است و آشنایی با روش‌های کاربردی آزمایشگاهی را می‌توان به‌تفصیل در نوبت‌های بعد بیان کرد. بنابراین در این مقاله خواهیم داشت:

1. بیان مقدمه و ذکر اصول روش
2. بیان و نمایی ساده و کلی از یک فرایند PCR
3. ذکر کاربردهای روش

مقدمه:

همانطور که می‌دانید پایه و اساس زندگی به سلول استوار بوده و در حقیقت حیات هر سلول به مواد موجود در هسته سلول وابسته است. اولین بار در سال ۱۷۱۰ م. آقای وان لوک هوک منطقه مشخصی را که هسته نامیده شد در مرکز سلول‌های زنده یافت، اما اساساً اولین توصیف دقیق در مورد هسته را در سال ۱۸۳۱ م. آقای رابرت بران ارائه داد.

کشف ماده وراثتی DNA که زیربنای تمام مطالعات سلولی و هسته سلول است اولین بار توسط آقایان واتسون و کریک مطرح شد.

DNA یک مولکول دورشته‌ای موازی معکوس و حاوی ترادف‌های نوکلئوتیدی است که آنتی‌پارالل نامیده می‌شود

هدف PCR:

هدف PCR تکثیر یک نسخه از ژن می‌باشد.

PCR نخستین بار در سال ۱۹۸۳ توسط آقای کاری مولیس ابداع شد و انقلابی در ژنتیک مولکولی بوجود آورد. همانندسازی DNA درواقع راز بقای موجود زنده است، چرا که طی این فرآیند محتوای ژنتیکی سلول مضاعف شده و به دو سلول دختر حاصل از تقسیم سلولی وارد می‌گردد. مکانیسم و روش کار در PCR از نظر اصول عملی تشابه زیادی به همانندسازی DNA دارد و درواقع برگرفته از آن است.

برای انجام آزمایش PCR در مرحله اول Pre-PCR (DNA Extraction)، با استخراج DNA از نمونه مورد آزمایش شرایط را برای مرحله بعد، فرایند PCR آماده می‌کنیم در این مرحله از انجام آزمایش، برای همانندسازی از ژن یا DNA استخراج شده در مرحله قبل، موارد ذیل موردنیاز است:

a ـ الگو DNA Template؛ یعنی آن چیزی که باید همانندسازی شود.

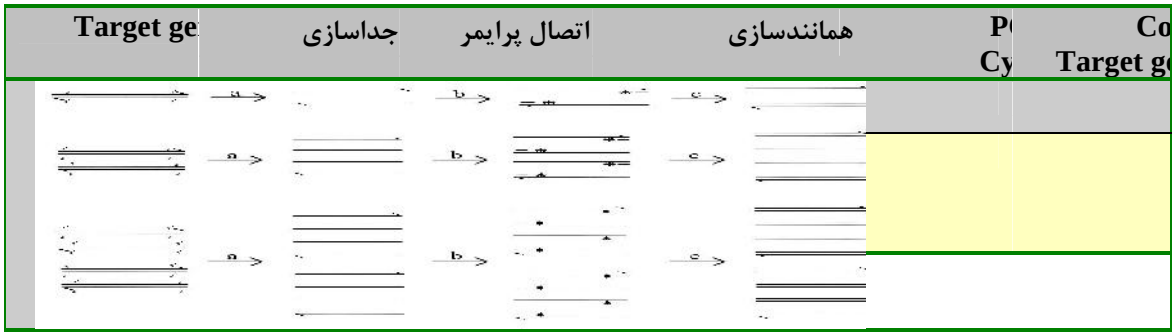
b ـ بازهای A=T و C=G نوکلئوتید تری فسفات dNTP (ATP-CTP-GTP-TTP)

c ـ پرایمر (قطعه اولیه DNA) که محل تکثیر و البته اندازه قطعات تکثیرشونده را مشخص می‌کند.

d ـ DNA پلیمراز (DNA پلیمراز همان ماشین کپی‌کننده است که تنها قطعات بین پرایمر و DNA اولیه را همانندسازی می‌کند).

در هر سیکل PCR آن‌طور که در تصویر زیر مشاهده می‌شود:

در مرحله جداسازی (Denturation) دو رشته DNA در شرایط مناسب در دمای ۹۶ درجه از هم جدا می‌شوند، آنگاه در مرحله (Annealing) در دمای ۶۵ ـ ۳۰ درجه اتصال یا چسبندگی پرایمر به بازهای ’۵ و "۳ رشته‌های بازشده DNA صورت می‌گیرد و در پایان مرحله تکثیر یا همانندسازی در شرایط مناسب دمای ۷۵ ـ ۶۵ درجه نسخه جدید رونویسی می‌شود که می‌تواند بارها تکرار شود تا از یک رشته DNA با هر سیکل حرارتی به‌طور تصاعدی ژن یا قطعه موردنظر تکثیر یابد.



نمایی ساده و کلی از یک فرایند PCR

در گذشته تأمین این حرارت‌های پشت سر هم از سه بن ماری با سه دمای متفاوت انجام می‌گرفت ولی امروزه با پیشرفت تکنولوژی می‌توان این درجه حرارت‌های بالا و متوالی را به‌طور سریع با دستگاهی به نام **ترموسایکلر** که به کمک این تکنیک آمده است، بدست آورد و البته می‌توان دمای مناسب و تعداد سیکل‌های موردنیاز را قبل از انجام کار، برنامه‌ریزی نمود. واکنش زنجیره پلیمراز PCR یک روش فنی بسیار قوی برای تکثیر و ازدیاد قطعات DNA در مدت‌زمان کوتاه و در یک محیط غیرحیاتی است.

این واکنش نظیر یک دستگاه فتوکپی زیستی تمام خودکار است که از روی یک نسخه DNA اولیه ظرف مدت کوتاهی میلیون‌ها نسخه تکثیر می‌یابد تا در تشخیص بیماری‌های عفونی، وراثتی، جرم‌شناسی و ... در اختیار پزشک یا پژوهشگر قرار گیرد.

مرحله آخر در یک آزمایش، PCR، Electrophoresis است؛ که برای مشاهده و یا به عبارتی detect نمودن قطعات تکثیرشده محصول PCR می‌توان از الکتروفورز بر روی ژل آگارز و رنگ‌آمیزی اتیدیوم بروماید استفاده نمود. اتیدیوم بروماید در کنار نفوذ بالایی که در رشته‌های DNA دارد با خاصیت فلورسنتی خود می‌تواند به‌عنوان یک نشانگر عمل کند.

آن‌طور که در تصویر مقابل مشاهده می‌شود بر اساس تابش نور U.V به ژل آگارز در دستگاه ترانس‌لومیناتور در صورت حضور اتیدیوم بروماید و البته DNA تکثیرشده در مراحل PCR، رنگ نارنجی اتیدیوم که با رشته تکثیری باند شده، نور فلورسنتی ساطع می‌شود که در مقایسه با محل توقف کنترل مثبت، منفی و نیز Lader (خط کش یا شاخصی با وزن مولکولی معین) می‌توان جایگاه احتمالی قطعه DNA تکثیری را تشخیص داد.

اهداف آموزشی: آشنایی مختصری از کاربرد تکنیک PCR:

تشخیص بیماری‌های ژنتیکی، بیولوژی مولکولی، میکروب‌شناسی تشخیصی، تشخیص سرطان و ...

تشخیص قبل از تولد جهت بیماری‌های ژنتیکی:

پس از تهیه سلول‌های جنینی و تکثیر پرایمرهای ژن بیمار با پرایمرهای ژن سالم که با روش‌های ایمنومولکولار صورت می‌گیرد، نتایج گزارش می‌گردد. با توجه به اینکه می‌توان از یک کپی DNA میلیون‌ها کپی تهیه نمود، از این روش برای تشخیص قبل از لانه‌گزینی استفاده می‌شود. در این روش لقاح خارج از رحم اتفاق افتاده و پس از تکثیر در مرحله ۸ یا ۱۶ سلولی ۱ یا ۲ سلول آن را جهت آزمایش PCR و پیدا نمودن نقص ژنتیکی که قبلاً در خانواده مشخص شده است، انجام می‌دهند.

در پزشک قانونی و آسیب‌شناسی جنایی:

کمترین مقدار DNA بدست آمده از یک قطره خون، یک مو و ... با PCR تکثیر و با نقشه ژنتیکی یا DNA فرد مظنون مقایسه می‌گردد. در جرم‌شناسی بعد از انگشت‌نگاری روش PCR بزرگترین تحول را ایجاد کرده است. همچنین در بدست آوردن نسبت پدر فرزندی یا مادری از این روش استفاده می‌گردد.

بررسی عفونت‌های باکتریایی و ویروسی:

تشخیص عفونت‌های میکروبی در آزمایشگاه معمولاً با انجام کشت و یا بررسی وجود آنتی‌بادی در خون بیمار صورت می‌گیرد که وقت‌گیر است و بررسی‌های ایمنولوژیکی نیز گاهی بدلیل عدم حساسیت لازم و نیز در مواقعی که بیمار در مراحل اولیه بیماری باشد هم قابل انجام نیست، از این رو برای تشخیص مثلاً HIV پس از نمونه‌گیری از خون محیطی، از توالی اختصاصی ویروس HIV به‌عنوان پرایمر همانندسازی آن قطعه ژن موردنظر در صورت وجود عفونت استفاده می‌گردد و تشخیص HIV با حساسیت بالا و در سریع‌ترین زمان انجام می‌شود. در تشخیص بیماری سل نیز به همین ترتیب نمونه خلط و یا هر نمونه که پزشک احتمال عفونت سلی را می‌دهد با شرایط صحیح گرفته می‌شود و به همراه پرایمرهای اختصاصی مایکوباکتریوم توبرکلوزیس طبق یک دستورالعمل مشخص استخراج و PCR انجام می‌گردد و قطعات DNA تکثیریافته مورد ارزیابی قرار می‌گیرد. این تکنیک علاوه بر سرعت بالایی که به تشخیص می‌دهد از خطرات آلودگی برای پرسنل در حین هضم و تهیه لام از نمونه موردنظر بسیار می‌کاهد.

مشکلات و موانع احتمالی در انجام PCR:

آلودگی نمونه مورد بررسی یکی از مهم‌ترین مشکلات PCR است که به دلیل حساسیت فوق‌العاده و قدرت همانندسازی بالا، هر قطعه خارجی که وارد محیط شود ممکن است مورد تکثیر قرار گرفته و نتایج دور از واقعیت را بوجود آورد، ازاین‌رو می‌بایست بسیار ایزوله و با دقت در این روش کار کرد و همچنین باید از شاهدهای مثبت و منفی و Lader استفاده نمود تا حتی‌المقدور از اشتباهات احتمالی آگاه شویم. البته در روش Nested PCR که با دو نوع پرایمر کار می‌شود (جهت بالا بردن اختصاصیت روش) نیز از ایجاد آلودگی در نتایج آزمایش کاسته می‌شود.

امروزه **PCR** در تشخیص جهش‌ها و سرطان‌ها نیز بسیار کاربردی است و کمک فراوانی به پزشک در پیش‌آگهی بیماری می‌دهد.

منابع:

- Comptony.J. 2012. Nucleic acid sequence - based amplification
- Wolcott. M.j. 2013. Advances in Nucleic acid-based detection methods. Clin. Microbial Rev.5: 370-38.
- Eisenstein. B.I. 2014 The polymerase chain reaction: anew method of using molecular Jenetics for medical diagnosis. N.Engl. J. Med. 322: 178-183.