عنوان دوره آموزشی :

PCR

و تضمین کیفیت در بخش مولکولی آزمایشگاه

بهار ۱۳۹۹

فهرست

مقدمه ۴

چکیده ۴

اساس کار PCR ۷

PCR موجب سنتز DNA می شود. PCR ، DNA را درون یک لوله آزمایش کپی می کند و از عناصر اصلی و طبیعی فرآیندهای ساخت و همانند سازی DNA استفاده می کند ۷

چرخه های اولیه (E) : ۱۱

چرخه های میانی (M) : مرحله نمایی ۱۲

چرخه های پایانی (L) : مرحله کفه ۱۲

تفسیر اولیه نتایج روی ژل آگاروز : ۱۳

نوکلئوتیدهای تغییر یافته (Modified) ۱۷

مخلوط های اولیه PCR ۱۸

دمای ذوب (Tm) ۱۸

دمای بهینه جفت شدن (Tp) ۱۸

DNA پلیمرازهای مقاوم به حرارت ۱۹

صحت DNA پلیمراز Taq ۱۹

DNA پلیمرازهای ویرایش گر مقاوم به حرارت ۱۹

انتخاب آنزیم ویرایشگر ۲۰

پلیمرازها و واکنش گرهای سبز و قرمز ۲۰

مخلوط های پلیمراز ۲۰

تکنیک ها و روش های PCR ۲۳

مشکلات آلودگی ۲۸

جلوگیری از آلودگی ۲۹

راهنمای حل مشکلات ۳۰
آنالیز محصولات PCR ۳۰
تأیید محصول تکثیر شده اولیه ۳۰
توالی یابی مستقیم محصولات PCR ۳۱
نشان دار کردن مستقیم محصولات PCR و اندازه گیری های هموجنوس ۳۲
جهش زایی با PCR ۳۲
تکنولوژی DNA ۳۲
روشهای بررسی DNA ۳۵
بررسی دوز (Dosage analysis) ۳۸
Insitu PCR (PCR داخلی سلولی) ۴۰
تکنیک ARMS سیستم جهش مقاوم به تکثیر : ۴۱
تکنیک چند تایی (Multiplex method) ۴۱
ترانس کریپتاسیون معکوس واکنش زنجیره ای پلیمراز (Reverse Transcription PCR) ... ۴۲
PCR-RFLP: (Restriction Fragment Length polymorphism) ۴۲
کاربرد های PCR ۴۴
آشکار نمودن بقایای بیماری بعد از درمان سرطان : ۴۷
آزمایش یک سلول برای تشخیص در مرحله Pre implantation ۴۷
تشخیص قبل از تولد بیماریهای ژنتیکی ۴۷
تجزیه و تحلیل مولکولی نمونه های تاریخی ۴۸
تعیین جنسیت جنین ۴۸
تشخیص جهش ها و سرطانها ۴۹
تضمین کیفیت در بخش مولکولی آزمایشگاه ۵۰
کنترل کیفیت و نگه داری تجهیزات در بخش مولکولی آزمایشگاه ۵۳

مقدمه

پیشرفت های دو دهه اخیر در زمینه بیولوژی مولکولی موجب ارتقاء کارایی و تکامل هر چه بیشتر آزمایش‌های وابسته به DNA در علوم بالینی گردیده است . استفاده از مارکرهای غیر رادیواکتیو و اولیگو نوکلئوتیدهای مکمل با ژن ها و یا مترادف های ویژه بازهای آلی در DNA از جمله پیشرفت های موثر در بهبود و بکارگیری روزافزون تست های وابسته به DNA در طیف تشخیص بالینی محسوب می شود . یکی از مهمترین پیشرفت‌ها در زمینه بیولوژی مولکولی که در عین حال کاربرد تشخیصی نیز دارد، واکنش های زنجیره ای پلیمراز یا polymerase chain reaction (PCR) می باشد . که علاوه بر سریع نمودن آزمایشهای وابسته به DNA در موارد متعدد موجب افزایش حساسیت این گونه آزمایش ها گردیده است .

راه اندازی این روش و یا روشهای مشابه در زمینه بیولوژی مولکولی و بهره وری از آنها در مراکز آزمایشگاهی و تحقیقاتی، منجر به حصول نتایج چشمگیر و سودمند در زمینه تشخیص آزمایشگاهی و همچنین مطالعات اپیدمیولوژیک خواهد شد .

چکیده

PCR به روش ازدیاد مقادیر جزیی DNA یا RNA تا حد مشاهده آنها توسط روشهای ساده و رایج آزمایشگاهی اطلاق می شود. قابلیت PCR در ازدیاد اسیدهای نوکلئیک موجود در نمونه مورد آزمایش موجب شناسایی سریع و اختصاصی نوع سلول با میکرو ارگانسیم مورد نظر در نمونه مذکور می گردد که این ویژگی علاوه بر بکارگیری PCR در تشخیص آزمایشگاهی بیماریها ، آن را بعنوان ابزاری مطمئن و حساس در زمینه پژوهش های علمی مطرح می سازد .

PCR

PCR یکی از جدیدترین تکنولوژی های آزمایشگاهی است که در تشخیص بیماریهای عفونی ، پزشکی قانونی و ناهنجاریهای ژنتیکی مورد استفاده و توجه قرار گرفته است.

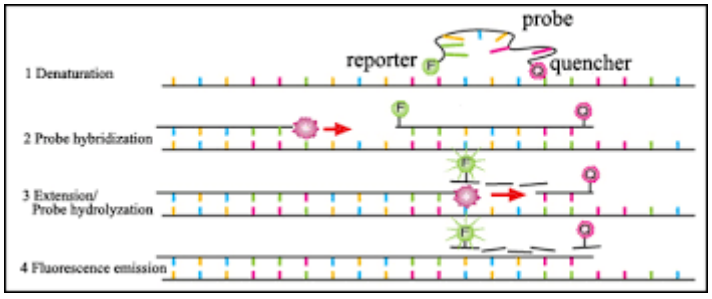
هر چرخه PCR شامل سه مرحله می باشد :

۱- **مرحله تقلیب** (**Denaturation**) که در این مرحله مولکول های دو رشته ای DNA بوسیله حرارت بالا

(حدود ۹۴ درجه سانتی گراد) از همدیگر جدا گردیده و به مولکول های تک رشته ای تبدیل می شوند.

۲- **مرحله پیوند زنی** (**Hybridization**) که در این مرحله کاهش دمای واکنش صورت می گیرد تا اینکه پرایمرها بتوانند به مولکول های DNA تک رشته ای پیوند زده شوند . درجه حرارت مورد استفاده برای این مرحله می تواند از ۳۰ درجه سانتی گراد تا ۷۲ درجه سانتی گراد متغیر باشد.

۳- **مرحله توسعه** (**Extension**) که در این مرحله آنزیم Taq پلیمر از DNA، پرایمرها را در روی DNA تک رشته ای امتداد می دهد تا DNA دو رشته ای جدید بسازد. درجه حرارت لازم برای این مرحله ۷۲ درجه سانتی گراد می باشد.



پرایمر چیست؟

مولکول های DNA تک رشته ای کوتاه (اولیگو نوکلئوتیدها) بوسیله تکنیک های شیمیایی بصورت سریع و ارزان ساخته می شوند. اینها وقتی به DNA تقلیب شده افزوده می شوند، DNA پلیمراز Taq از آنها به عنوان پرایمر استفاده کرده و DNA جدید در داخل آزمایشگاه سنتز می شود. در PCR دو نوع پرایمر مورد استفاده قرار می گیرد که هر کدام از آنها به محل های ویژه در دو رشته مکمل مولکول DNA هدف پیوند می شوند.

پرایمر های مذکور بصورتی ساخته شده اند که زمانیکه DNA پلیمراز یک پرایمر را توسعه می دهد، یک مولکول DNA بوجود می آورد که آن DNA دارای یک محل اتصال جدید برای پرایمر دیگر می شود. این رشته DNA جدید تولید شده نیز همینطور قادر خواهد بود بعنوان الگو برای سنتز DNA از پرایمر دیگر در جریان چرخه های بعدی PCR عمل نماید.

نکته : دو پیشرفت تکنیکی عمده بطور قابل توجهی روند PCR را اصلاح کرده است. اولین پیشرفت بکارگیری پلیمرازهای مقاوم به حرارت بوده و دومین پیشرفت بکارگیری ترمال سایکلرها (Thermal cycler) است. با این دو پیشرفت می توان تمامی اجزاء PCR که عبارتند از بافر PCR، دو نوع پرایمر، چهار نوع داکسی نوکلئوتید تری فسفات، آنزیم Taq پلیمراز و DNA الگو با همدیگر در لوله های پلی پروپیلن مخلوط کرده و در ترمال سایکلر برنامه ریزی شده قرار داد تا PCR انجام شود. واکنش تکمیل شده روی ژل آگارز برده می شود و با روشهای مختلف رویت DNA های ازدیاد یافته امکان پذیر می شود.

PCR توسط آقای Kary mullisدر سال ۱۹۸۳ اختراع شده است و ایشان برای این دست آوردش برنده جایزه نوبل شیمی در ۱۹۹۳ شد.

PCR یک روش آزمایشگاهی رایج است که سادگی بی نظیر و راحتی استفاده از آن به آزمایشگاه های غیر مولکولی اجازه دستیابی به قدرت مولکولی داده است.

PCR را یک دستگاه فتوکپی DNA می نامند چرا که نسخه های بسیار زیادی را از یک قطعه مشخص DNA در یک لوله آزمایش می سازد. اگرچه مفهوم کلی آن ساده است، ولی فرآیندی پیچیده با تعداد زیادی واکنشگر می باشد.

اساس کار PCR

PCR موجب سنتز **DNA** می شود. **PCR** ، **DNA** را درون یک لوله آزمایش کپی می کند و از عناصر اصلی و طبیعی فرآیندهای ساخت و همانند سازی **DNA** استفاده می کند .

برای همانند سازی ژنوم کامل در یک سلول زنده، سیستم بسیار پیچیده ای لازم است که مشتمل بر پروتئین‌های زیادی می باشد. به بیان ساده، **DNA** باز می شود و هر رشته از مولکول اولیه (مادر) به عنوان الگویی برای ایجاد رشته مکمل دختری بکار می رود. این کپی برداری بر طبق قوانین شناخته شده واکسون وکریک در جفت شدن نوکلئوتیدها با هم، استوار است. (آدنین همیشه با تیمین و گوانین همیشه با سیتوزین جفت می شود)

سنتز **DNA** بوسیله **DNA** پلیمراز باید القاء شود لذا به توالی کوتاهی از **DNA** نیاز داریم که پرایمر نامیده می شود و مکمل توالی الگو است.

پرایمر ها، توالی هایی از جنس **DNA** با طولی حدود ۲۰ نوکلئوتید هستند که بصورت مصنوعی ساخته می‌شوند .

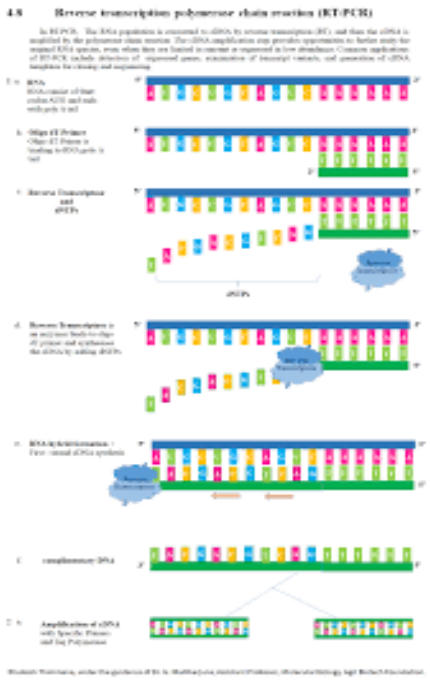
گسترش پرایمر توسط DNA پلیمراز

پرایمر که مکمل توالی الگو است، روی رشته الگو جفت می شود و **DNA** پلیمراز با استفاده از رشته الگو، دزوکسی نوکلئوتیدهای صحیح را بر طبق قوانین جفت شدن بازها به آن افزوده و پرایمر را گسترش می دهد.

در فرآیند PCR فقط بعضی از اجزاء پیچیده ماشین همانند سازی برای کپی کردن قطعات کوتاه DNA در یک سیستم بافری ساده و درون یک لوله آزمایش نیاز است.

نکته : باز شدن DNA در یک سلول نیازمند یک مجموعه چند جزئی شامل تعداد زیادی آنزیم و پروتئین است ، اما در PCR به سادگی با یک مرحله حرارت دادن بنام Denaturation که منجر به شکستن پیوندهای هیدورژنی بین جفت بازها در DNA دو رشته ای می شود . جایگزین شده است .

بعد از دناتوره شدن الگو ، دو پرایمر الیگو نوکلئوتیدی با توالی اختصاصی به توالی های مکمل خود روی رشته های DNA الگو ، متصل می شوند.



با اضافه شدن دزوکسی نوکلئوتیدهای صحیح ، تولید DNA های جدید دو رشته ای توسط DNA پلیمراز آغاز می شود.

در اولین چرخه PCR ، مولکول الگوی دو رشته ای باز می شود، پرایمرها به توالی مکمل خود روی الگوی تک رشته ای می چسبند و ساخت DNA با DNA پلیمراز مقاوم به حرارت آغاز می شود. نتیجه این چرخه از PCR این است که به ازای هر کپی اولیه، دو کپی از توالی هدف تولید می شود.

در چرخه حرارت دادن بعدی مولکول های دو رشته ای Heteroduplex (ناهمسان) شامل یک رشته الگوی اصلی و یک رشته ساخته شده جدید که طی اولین واکنش سنتز DNA تولید شده اند، دناتوره می شوند. اکنون هر کدام از رشته های DNA به عنوان الگویی برای دور بعدی ساخت DNA عمل می کنند .

در چرخه سوم اولین محصولات PCR دو رشته ای با طول صحیح تشکیل می شوند. در چرخه های بعدی تعداد کپی های DNA هدف، بصورت نهایی افزایش می یابند. در هر چرخه PCR تعداد کپی های توالی هدف دو برابر می شود یعنی بعد از ۲۰ چرخه PCR با کارایی ۱۰۰ درصد، هر الگوی موجود در شروع واکنش به یک میلیون رشته جدید تبدیل خواهد شد.

نکته : تعداد ناچیزی از مولکول های الگوی اولیه در شروع PCR به مقدار زیادی محصول DNA ختم می شود که حدود یک میکروگرم است یعنی یک توانایی تکثیر بسیار بالا که اگر بصورت اتفاقی با چند مولکول از محصول DNA واکنش قبلی آلوده شود ممکن است به نتیجه اشتباه منجر گردد.

کنترل واکنش های PCR با حرارت دادن و سرد کردن

PCR مبتنی بر استفاده از دماهای مختلف برای ۳ مرحله از واکنش (دناتوره کردن، جفت شدن و گسترش) می باشد. از دمای بالا و در حدود ۹۵ درجه برای دناتوره کردن رشته های DNA الگو استفاده می شود. سپس دما کاهش می یابد تا به پرایمرها امکان داده شود با توالی های ممکن خودشان روی رشته های الگو جفت شوند. این دما بسته به نوع پرایمرها متغیر است. (اختصاصی بودن واکنش به دمای جفت شدن پرایمرها وابسته است. هر چه دمای جفت شدن بالاتر باشد واکنش اختصاصی تر خواهد بود) معمولا از دمای ۵۵ درجه سانتی گراد استفاده می شود، اما در خیلی موارد دمای بالاتر بهتر است و برای بعضی آزمایشها تا ۷۲ درجه سانتی گراد افزایش می یابد که به PCR دو دمایی منجر می شود.

برای تکثیر DNA هدف این چرخه دمایی چندین بار تکرار می شود (۲۵ تا ۴۰ بار) و برای راحتی، از یک ترموسایکلر استفاده می شود. این دستگاه می تواند بسرعت دما را تغییر دهد و نمونه ها را به مدت زمان مناسب در دمای دلخواه نگه دارد یعنی کاملاً قابل برنامه ریزی است. قبل از اختراع این دستگاه از سه محفظه آبی با دماهای ۹۵ و ۵۵ و ۷۲ استفاده می شد و لوله های واکنش بصورت دستی بین این محفظه ها جابجا می شدند.

PCR در سه مرحله مجزا که با دما کنترل می شود ، پیش می رود.

۱- دناتوره شدن : DNA الگوی دو رشته ای حرارت داده می شود (تا ۹۴ درجه سانتیگراد) تا دناتوره شده و رشته های مکمل جدا شوند.
۲- جفت شدن : واکنش به سرعت تا دمای جفت شدن ، سرد می شود تا امکان هیبرید شدن پرایمرهای الیگو نوکلئوتیدی با الگو فراهم شود .
۳- ساخت DNA : معمولا دمای واکنش تا ۷۲ درجه افزایش می یابد تا ساخت DNA به وسیله DNA پلیمراز مقاوم به حرارت بهینه شود .

چرخه های PCR

در اولین چرخه PCR از هر رشته الگو یک دو رشته ای جدید بوجود می آید که خود باعث مضاعف شدن تعداد کپی های ناحیه هدف می شود، یعنی در پایان هر چرخه (پس از دناتوره شدن، جفت شدن و گسترده شدن) تعداد کپی های DNA هدف به صورت تئوری مضاعف می شود.

چرخه ۱ : محصولات حاصل از DNA الگو طول معین ندارند .

چرخه ۲ : اولین محصولات تک رشته ای با طول معین در نتیجه اتصال پرایمر روی محصولات تک رشته ای تولید شده در چرخه ۱ تولید می شود.

چرخه ۳ : منجر به تولید اولین محصولات دو رشته ای با طول معین می شود.

چرخه ۴ و چرخه های بعدی : منجر به تکثیر نمایی محصولات با طول معین می شوند .

دو پرایمر الیگو نوکلئوتیدی در PCR استفاده می شوند و به عنوان محل هایی برای شروع ساخت DNA به وسیله DNA پلیمراز عمل می کنند . این پرایمرها منطقه ای از DNA الگو که باید کپی برداری شود را مشخص می نمایند. DNA پلیمرازها برای شروع ساخت DNA به پرایمر نیاز دارند. لذا به منظور طراحی این پرایمرها لازم است که حداقل توالی بخش های کوچکی از DNA ناحیه هدف را بدانیم.

پرایمر ها مکمل توالی رشته مخالف DNA الگو هستند. DNA پلیمراز در یک روند وابسته به الگو ، چهار دزوکسی نوکلئوتید را به پرایمرها افزوده و آن را گسترش می دهد. بنابراین در هر چرخه از PCR ، توالی DNA بین محل اتصال دو پرایمر همانند سازی خواهد شد.

یک مرحله دناتوره کردن طولانی با دمای ۹۴ درجه سانتی گراد به مدت دو تا پنج دقیقه، در شروع PCR وجود دارد تا از دناتوره شدن موثر DNA الگو اطمینان حاصل شود. معمولاً بعد از آن سه مرحله کنترل شده دمایی وجود دارد :

۱- ۹۴ درجه سانتی گراد برای دناتوره کردن رشته های الگو
۲- ۴۰ درجه سانتی گراد تا ۷۲ درجه سانتی گراد (اغلب ۵۵ درجه سانتی گراد) برای جفت شدن پرایمرها
۳- ۷۲ درجه سانتی گراد برای ساخت موثر DNA توسط بسیاری از DNA پلیمرازهای مقاوم به حرارت

کنیتیک PCR

می توانیم PCR را در سه مرحله مجزا در نظر بگیریم .

چرخه های ابتدایی (E): که طی آن پرایمرها، DNA الگو را برای توالی مکمل شان جستجو می کنند و بسیاری شبیه پروب ها در آزمایش هیبریداسیون عمل می کنند.

چرخه های میانی (M): که فرایند تکثیر محصول با عملکرد همزمان دو پرایمر انجام می شود تا یک تجمع نمایی از قطعه محصول را ممکن سازد.

چرخه های پایانی (L): بعضی اوقات کفه نامیده می شود وقتی که میزان تکثیر بدلیل محدود بودن واکنشگرها (معمولا DNA پلیمراز مقاوم به حرارت) یا مهار واکنش پایین تر از حد بهینه شود .

نکته ۱ : باید کاری کنیم که اختصاصی بودن اتصال پرایمرها در مرحله E افزایش یابد ، بیشترین کارایی تکثیر را در مرحله E بدست آوریم و واکنش را قبل از مرحله L متوقف کنیم.

چرخه های اولیه (E) :

برای PCR یک DNA ژنومی ، نسخه های نسبتا محدودی از DNA الگو و تعداد زیادی از دو پرایمر تعیین کننده ناحیه هدف داریم. اگر این هدف یک ژن منحصر بفرد باشد ، آنگاه برای هر کپی از ژنوم، فقط یک محل اتصال اختصاصی برای هر پرایمر وجود خواهد داشت (مثل جستجوی دو سوزن در یک انبار کاه) یعنی نسبت پرایمرها به الگو بسیار زیاد است.

اولین کار پرایمرها این است که توالی های مکمل شان را پیدا کنند و بصورت موقت به توالی های تصادفی، متصل خواهند شد. اگر توالی، مکمل پرایمر نباشد به سرعت جدا شده و مجدداً با توالی دیگری جفت می شود و در نهایت یک پرایمر توالی مکمل صحیح را پیدا خواهد کرد و به مدت زمان کافی بصورت کمپلکس دو تایی با الگو متصل خواهد ماند تا میان کنش بعدی با مولکول DNA پلیمراز مقاوم به حرارت اتفاق افتد و کمپلکس سه تایی تشکیل شود که با افزایش دما به ۷۲ درجه سانتی گراد دناتوره نخواهد شد.

پرایمرهایی که فقط بصورت موقتی با DNA متصل شده به محض اینکه دما افزایش می یابد از الگو جدا می‌شوند .

نکته : جفت شدن نادرست پرایمر (Mispriming)

بعضی پرایمرها در مرحله جفت شدن ممکن است محل های دیگری را روی رشته الگو پیدا کند که بصورت نسبی با آنها مکمل باشند و می توانند به آنها متصل شوند. زمان اتصال پرایمر به الگو آنقدر خواهد بود تا مولکول DNA پلیمراز با منطقه دو رشته ای میان کنش دهد و ساخت DNA شروع شود. یک پدیده که به جفت شدن نادرست پرایمر یا جفت شدن غیر اختصاصی پرایمر معروف است. در واقع DNA پلیمراز نمی تواند بین دو رشته پرایمر الگوی کاملا منطبق و یا دو رشته حاوی تعدادی اتصال نادرست، تفاوتی قائل شود. در بسیاری از موارد اینگونه جفت شدن های نادرست پرایمر باعث ایجاد مشکلاتی در PCR می شوند.

چگونه می توان مانع از جفت شدن نادرست پرایمر شد؟

۱ـ انتخاب وطراحی پرایمر ها با دقت زیاد

۲ـ انتخاب دمای چسبیدن بالا تا فقط با توالی کاملا مکمل جفت شده و دو رشته ای پایدار تشکیل دهند .

۳- استفاده از روشهای اختصاصی تر کردن جفت شدن پرایمر ها مثل استفاده از افزودنی های بهبود دهنده (Enhancers) شروع داغ (Hot start PCR) و فرایند touch down .

۴-بهینه سازی دمای جفت شدن با استفاده از یک دستگاه ترموسایکلر گرادیان نیز یک راهکار مناسب است.

چرخه های میانی (**M**) : مرحله نمایی

به دنبال چرخه های اولیه **PCR** مرحله تکثیری واکنشی شروع می شود. تکثیر نمایی در چرخه های میانی **PCR** اتفاق می افتد و در حالت ایده آل، توالی هدفی که طی چرخه های اولیه انتخاب شده اند دو برابر می شوند. با پیشرفت این مرحله از **PCR** ، فرایند جستجوی محل های مکمل توسط پرایمرها آسان تر می شود زیرا تعداد کپی هایی که حاوی محل جفت شدن برای پرایمرها هستند، رو به افزایش است. تجمع سریع قطعات محصول ادامه می یابد تا زمانی که کارایی این تکثیر مختل شود و نهایتاً واکنش به حالت کفه برسد. لازم است که **PCR** را قبل از رسیدن به مرحله کفه و در مرحله نمایی متوقف نماییم.

چرخه های پایانی (L) : **مرحله کفه**

مرحله کفه در اثر تغییر غلظت های نسبی برخی از اجزاء واکنش، حاصل می شود، به ویژه همه مولکول های پلیمراز مقاوم به حرارت در ساخت DNA درگیر خواهند شد. اگر رشته های محصول نسبت به مولکول های DNA پلیمراز بیشتر باشند، همه رشته های DNA به عنوان الگو برای ساختن محصول بیشتر استفاده نخواهند شد و بنابراین تکثیر نمایی ادامه نمی یابد. علاوه بر این با تجمع محصول DNA و کاهش نسبت پرایمر به محصول، بین رشته های محصول تمایل بیشتری برای جفت شدن با خودشان بوجود می آید که مانع از جفت شدن آنها با پرایمر می شود. از آنجایی که محصولات بلندتر از پرایمر هستند، جفت شدن رشته های مکمل محصول در دماهایی بالاتر از دمای جفت شدن پرایمر الگو آغاز می شود. بنابراین رشته های محصول از واکنش خارج می شوند. این احتمال نیز وجود دارد که بعضی محصولات غیر اختصاصی نیز تجمع یابند زیرا در نتیجه جفت شدن مجدد محصولات صحیح با خودشان، میزان الگوی صحیح کاهش می یابد ولی محصولات غیر اختصاصی در غلظت های پائین تری نسبت به محصولات صحیح بوده و به عنوان الگوهای جایگزین برای تکثیر عمل می کنند. این محصولات غیر هدف ممکن است با سرعت نمایی افزایش یابند در حالی که محصولات صحیح با سرعت کمتر زیاد می شوند در

بعضی موارد و در غلظت های بالا، رشته های محصول می توانند به گونه ای با هم متصل شوند که محصولات پلیمری بوجود آورند که بلندتر از محصول مورد نظر هستند و می توانند بصورت اسمید با جرم مولکولی بالاتر روی ژل آگاروز ظاهر شوند.

نکته : در مجموع بهترین زمان توقف PCR بعد از ۳۰ الی ۳۵ چرخه می باشد در موارد استثنایی که مقادیر کمی از DNA الگو در دسترس است، دستور العمل هایی برای چرخه های بیشتر بکار می رود .

قابل ذکراست حتی وقتی از آنزیم ویرایشگر (proofreading enzyme) استفاده می شود. افزایش تعداد چرخه ها خطر ایجاد جهش ها را بیشتر می نماید.

یک فرآیند پایه PCR می تواند نقطه شروع مناسبی برای انواع مختلف PCR باشد . هر الگویی مثل DNA ژنومی ، پلاسمید خطی ، پلاسمید حلقوی یا DNA فاژی را می توان بدین منظور استفاده کرد.

کنترل های PCR

شامل لوله هایی می باشند که فاقد یکی از اجزاء واکنش اند. بویژه باید یک لوله بدون DNA الگو و یکی بدون پرایمر در نظر گرفته شود. لوله های دیگر که فقط یکی از دو پرایمر به آنها اضافه شده می توانند از کنترل های دیگر باشند. باید واکنش های کنترل در آخر کار تهیه شوند تا هرگونه آلودگی که در طول آماده سازی لوله های نمونه بوجود می آید قابل ردیابی باشد.

ارزیابی بعد از PCR

محصولات باید پس از پایان PCR ارزیابی شوند، روش معمول برای این کار تعیین اندازه قطعه DNA روی ژل آگاروز است. آزمایش روی ژل مدرکی دال بر موفقیت یا شکست است. روشهایی مثل real –time PCR وجود دارند که به ارزیابی روی ژل نیاز ندارند و این امکان را می دهند که بتوان کینتیک تجمع محصول را در هر چرخه از PCR دنبال کرد.

تفسیر اولیه نتایج روی ژل آگاروز :

۱- آیا یک تک باند از محصول وجود دارد ؟

آیا اندازه باند در حدود مورد انتظار است ؟

اینها شاخصهای خوبی برای ارزیابی موفقیت هستند اما شما باید با ارزیابی بیشتر PCR مثل آنالیز نقشه هضم با آنزیم محدود کننده (restriction map) یا توالی یابی DNA قبل و بعد از کلون سازی این موضوع را تائید کنید.

۲- آیا چند محصول وجود دارند ؟

آیا باند اصلی محصول شما است ؟

این شکل ممکن است نشان دهنده پائین تر بودن دمای جفت شدن نسبت به دمای بهینه باشد. اما مطمئنا نشان دهنده مشکلی در PCR است . اگر احتمالا باند اصلی، محصول شما باشد می توانید آن را از ژل جدا کرده و همانند بالا آن را ارزیابی نمائید. راه حل دیگر تکرار PCR با تنظیم شرایط و با سخت گیری بیشتر می باشد.

۳- آیا یک باند قوی با وزن مولکولی خیلی پائین وجود دارد ؟

این باند معمولاً دیمرپرایمر است که از جفت شدن یکی یا هر دو پرایمر با خودشان حاصل می شود و این محصول کوچک بصورت کار آمد تکثیر شده است. ولی اگر بتوانید مقادیر کافی از محصول تان را روی ژل ببینید، دیمر پرایمر مشکل ساز نخواهد بود.

اگر شدت باند محصول کم باشد، واکنش را با سخت گیری بیشتری تکرار کنید یا یکی از پرایمرها را مجدداً طراحی کنید و مکمل بودن آن را با خودش و با جفت شدن آن را به پرایمر شریک خود کنترل نمایید.

روش انجام PCR پایه

۱- تجهیزات :

- ظرف حاوی یخ
- میکروسانتریفوژ
- دستگاه ترموسایکلر
- تانک الکتروز

۲- مواد و واکنش گرها

- DNA پلیمراز مقاوم به حرارت به همراه بافر
- محصول ۲ میلی مولار dNTP
- پرایمرهای الیگو نوکلئوتیدی شماره ۱و ۲
- DNA الگو
- روغن معدنی

- ژل آگاروز

۳- روش انجام

- مواد و واکنش گرها را داخل یک لوله میکرو سانتریفوژ می ریزیم (۰/۵ میلی لیتری) و حجم نهایی را به ۵۰ میکرولیتر می رسانیم .
- برای مخلوط کردن اجزاء واکنش ، لوله را در یک میکرو سانتریفوژ قرار می دهیم .
- اگر ترموسایکلر در پوش حرارتی ندارد، به منظور جلوگیری از تبخیر محلول طی چرخه های دمایی ۵۰ میکرولیتر روغنی معدنی سبک اضافه می کنیم .
- لوله را داخل ترموسایکلر قرار داده و برنامه دمایی زیر را طراحی می کنیم .

۱- ۹۴ درجه سانتی گراد به مدت ۵ دقیقه برای دناتوره کردن الگو

۲- ۹۴ درجه سانتی گراد به مدت ۱ دقیقه ۲۵ تا ۳۵ بار تکرار شود.

۳- ۵۵ درجه سانتی گراد به مدت ۱ دقیقه ۲۵ تا ۳۵ بار تکرار شود .

۴- ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۱ دقیقه ۲۵ تا ۳۵ بار تکرار شود.

۵- ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۲ دقیقه برای اطمینان از اینکه همه مولکولها بطورکامل ساخته شده اند .

- نمونه ها را می توان در دمای اتاق (مناسب تر است) یا در یخچال ۴ درجه سانتی گراد تا انجام فرایندهای بعدی نگهداری نمود.
- لوله ها را از ترموسایکلر بر دارید و مواظب باشید روغن معدنی برداشته نشود.
- مقادیر مناسب از نمونه را با استفاده از مارکرهای مناسب تعیین اندازه مولکولی DNA روی ژل آگاروز آنالیز نمایید.

نکته : بافرها حاوی Mgcl2 می باشند که در ساخت DNA اهمیت دارد.

نکته : بطور کلی برای الگوهای پلاسمیدی ۲۵ چرخه کافی است و برای DNA ژنومی بین ۳۰ تا ۳۵ چرخه لازم خواهد بود.

در کل پیشرفت های تکنیکی اصلی که PCR را به یک ابزار رایج و قابل دسترس تبدیل کرده است. عبارتند از :

۱- DNA پلیمرازهای مقاوم به حرارت

۲- خودکار شدن فرایند چرخش دمایی

امروزه PCR از نظر تکنیک ، فرآیند ساده ای است که در آن واکنشگرها مخلوط می شوند و در دستگاه ترموسایگلر گرما گذاری می شوند (ترمو سایکلر بطور خودکار و براساس یکسری تنظیمات از پیش برنامه ریزی شده دمای چرخه های واکنش را تنظیم می کند) .

قوانین ساده که در طراحی یک پرایمر باید مدنظر باشد.

۱- از نظر طول بین ۱۶ تا ۳۰ نوکلئوتید باشد تا برای یک توالی هدف منحصر بفرد ، اختصاصی عمل کند و حتی برای الگوی پیچیده ای مثل DNA ژنومی انسان مناسب باشد.
۲- تقریبا تعداد مساوی از هر نوکلئوتید در آن وجود داشته باشد.
۳- از توالی های تکراری یا مناطق طویل حاوی نوکلئوتیدهای یکسان اجتناب شود زیرا منجر به لغزش پرایمر روی الگو می شود.
۴- از قرار گیری سه یا بیش از سه G یا C در انتهای ۳ پریم جلوگیری شود زیرا منجر به اتصال نادرست پرایمر به مناطق غنی از GC می شود.
۵- نباید قادر به ایجاد ساختارهای ثانویه ناشی از وجود نواحی مکمل داخلی باشد.
۶- نباید در انتهای ۳ پریم توالی هایی داشته باشد که باعث جفت شدن پرایمر با خود یا با پرایمر دیگر مورد استفاد در PCR شود. زیرا در این صورت ممکن است دیمرهای پرایمری تشکیل شوند.

در خیلی از موارد نیاز نیست که توالی پرایمر کاملا با توالی الگو مکمل باشد. منطقه ای از پرایمر که باید کاملا با الگو منطبق باشد، انتهای ۳ پریم است زیرا که این قسمت انتهایی پرایمر است که بوسیله DNA پلیمراز طویل می شود و بنابراین برای اطمینان از جفت شدن اختصاصی با توالی هدف صحیح بسیار اهمیت دارد. انتهای ۵ پریم در تعیین جفت شدن اختصاصی با توالی هدف اهمیت کمتری دارد و لذا می توان توالی آن را به دلخواه برای هدف هایی مثل تسهیل کلون سازی بعدی محصول دستکاری ، جهش زایی ، نوترکیبی یا بیان محصول PCR تغییر داد.

۴- بافرهای PCR

بیشتر تامین کننده های DNA پلیمراز ، بافر واکنش را نیز همراه آنزیم می فروشند . در غیر این صورت میتوان از بافر زیر برای DNA پلیمراز Taq استفاده کرد.

- **تریس هیدروکلراید :** یک بافر یونی دو قطبی است و PH آن با دما تغییر می کند. DNA پلیمراز Taq در PH پایین تر صحیح تر عمل می کند (این PH در دماهای بالاتر حاصل می شود)
- **پتاسیم کلراید (KCL)** : به جفت شدن پرایمرو الگو کمک می کند ولی در غلظت های بالا ، موجب تثبت اتصالات نادرست پرایمر به محل های غیر هدف و تولید محصولات ناخواسته می شود.

- **منیزیم (mg)** یکی از حیاتی ترین اجزاء PCR است که غلظت آن می تواند اختصاصی بودن و کارایی واکنش را تحت تاثیر قرار دهد . فعالیت DNA پلیمراز Taq وابسته به حضور منیزیوم است وبالاترین فعالیت را در غلظتی حدود ۱/۲ تا ۱/۳ میلی مولار آن نشان می دهد. DNA پلیمراز Taq در حضور منیزیوم اضافه ، نسبت به غلظت های پائین تر آن به خطا مستعد تر است.
- **دترجنت های غیر یونی** مثل توئین -۲۰ و NP – ۴۰ : قبل از اضافه کردن آنها باید با فررا اتوکلاو کنید و سپس آن را تقسیم بندی کرده و در ۲۰- درجه سانتی گراد ذخیره نمائید.
- **ژلاتین** ۱ میلی گرم در میلی لیتر

۵- نوکلئوتیدها

محلول ها پایه باید در دمای ۷۰ – درجه سانتی گراد ذخیره شوند ومحلول کاربردی (working solution) باید با رقیق کردن محلولهای پایه بین ۵۰ تا ۲۰۰ میکرومولار از هر dNTP در آب استریل دوبار تقطیر تهیه شوند. محلولهای کاربردی در شرایط ایده آل به مدت ۲ تا ۳ هفته در دمای ۲۰ – درجه سانتیگراد پایدارند . لذا توصیه می شود که حجم های نسبتاً کم از این محلولها ساخته شوند. وجود چهار dNTP در غلظت های مساوی برای یک PCR ضروری است در غیر این صورت صحت PCR تحت تاثیر قرار می گیرد.

غلظت dNTP ها همچنین باید حدود ۵۰ تا ۲۰۰ میکرو مولار باشد. اگر غلیظ تر باشد ، DNA پلیمراز Taq را با سرعت بیشتری نسبت به حالت طبیعی به سمت وارد کردن بازهای اشتباه سوق می دهد و صحت فرابند تحت تاثیر قرار می گیرد. در حالی که اگر غلظت پایین تر استفاده شود ممکن است که کارایی PCR را تحت تاثیر قرار دهد.

نوکلئوتیدهای تغییر یافته (Modified)

هدف از وارد کردن آنها طی تکثیر PCR چیست ؟

۱- حذف ساختار ثانویه
۲- جلوگیری از آلودگی
۳- استفاده از برچسب رادیواکتیو درمحصولات PCR
۴- استفاده از برچسب غیر رادیو اکتیو در محصولات PCR
۵- توالی یابی DNA
۶- جهش زایی تصادفی

مخلوط های اولیه PCR

این مخلوطها شامل بافر ، dNTP ها و DNA پلیمراز Taq می باشند که با افزون DNA الگو و پرایمرها امکان ایجاد حجم نهایی واکنش فراهم می شود . در بعضی موارد بافرها هیچ منیزیمی ندارند ، درنتیجه باید با اضافه کردن محلولهای پایه منیزیوم ، بهینه سازی انجام شود.

دمای ذوب (Tm)

Tm دمایی است که در آن نیمی از پرایمرها به منطقه هدف می چسبند (برای پرایمرهایی که حدود ۲۰ نوکلئوتید طول دارند)

دمای بهینه جفت شدن (Tp)

۵-۲ ± درجه سانتی گراد (برای پرایمرهایی که حدود ۳۵-۲۰ نوکلئوتید طول دارند)

۶- DNA پلیمرازهای PCR

DNA پلیمراز ، نوکلئوتید صحیح را انتخاب کرده و آنها را طی ساخت DNA به پرایمر می افزاید تا زنجیره DNA را بر طبق اصول استاندارد جفت شدن باز واستون و کریک طویل سازد (C, A: T:G)

معمولا دو دسته DNA پلیمراز براساس الگوی مورد استفاده لازم هستند .

۱- DNA پلیمرازهای وابسته به DNA

۲- DNA پلیمرازهای وابسته به RNA که ترانس کریتپازهای معکوس (reverse) نیز نامیده می‌شوند.

ساختار DNA به کمک DNA پلیمراز ، همیشه در جهت ۵ پریم به ۳ پریم انجام می شود. بعضی DNA پلیمرازها فعالیت اگزو نوکلئازی ۳ پریم به ۵ پریم نیز دارند که فعالیت ویرایش گری نامیده می شود و اضافه شدن باز صحیح به رشته DNA در حال رشد را کنترل می کند.

وقتی یک باز اشتباه متصل شود فعالیت ویرایشگری باز اشتباه را جدا خواهد کرد تا این که فعالیت پلیمرازی آنزیم باز صحیح را متصل کند (این مکانیسم تصحیح ، دقت و صحت کار پلیمراز در کپی کردن رشته الگو را افزایش می دهد).

وقتی DNA پلیمرازهای مختلف باهم مقایسه می شوند، دو مشخصه کلی صحت (Fidelity) و کارایی (Efficiency) ساخت برای PCR ، از اهمیت بالایی برخوردار می شوند.

کارایی (Efficiency) نتیجه تداوم (Processivity) و سرعت ساخت است. تداوم، معیاری از تمایل آنزیم به رشته الگو است. هرچه میان کنش قوی تر باشد، پلیمراز تداوم بیشتری دارد و بنابراین قبل از جدا شدن از الگو DNA بیشتری را سنتز خواهد کرد.

DNA پلیمرازهای مقاوم به حرارت

آنزیم DNA پلیمراز Taq از باکتری گرما دوست ترموس آکواتیکوس (aquaticus) جدا شده است. این آنزیم در دماهای بالاتر PCR پایداری دارد و این امکان را به ما می دهد که با یک بار افزودن آنزیم در شروع واکنش، چرخه های تکثیر مکرری داشته باشیم (دمای بهینه آنزیم برای ساخت DNA حدود ۷۲ درجه سانتی گراد است).

این آنزیم خاصیت DNA پلیمرازی در جهت ۵ پریم به ۳ پریم ولی فعالیت اگزونوکلئازی ۳ پریم به ۵ پریم « ویرایش گر » ندارد. یعنی خطاهای ایجاد شده بوسیله فعالیت پلیمراز تصحیح نمی شوند. این آنزیم با نامهای تجاری متفاوت و تحت لیسانس "ها فمن" ، "رش" که امتیاز انحصاری استفاده از آنزیم برای PCR را دارد فروخته می شود. پروتئین های نوترکیب در باکتری Ecoli از این آنزیم بدست آمده که برای تولید محصول اختصاصی تر و ممانعت از تولید محصولات ناخواسته بکار می رود. از جمله AmpliTaq و AmpliTaqGold و قطعه Stoffel

صحت DNA پلیمراز Taq

برای ارزیابی این پدیده از سه روش استفاه می شود.

۱- سنجش برگشتی (reversion assay): بطور گسترده ای برای تخمین میزان خطای DNA پلیمراز استفاده می شوند.
۲- سنجش جهش پیشرو (Forward mutation assay): مکانیسمی برای تخمین محدوده و فرکانس خطاهای ایجاد شده بوسیله DNA پلیمراز درون توالی DNA فراهم می کند.
۳- سنجش ژل گرادیانت (Gradient gel assay): مبتنی بر سیستم ارزیابی روی ژل پلی آکریلامید است و حتی مولکولهایی را که فقط در یک نوکلئوتید دچار تغییر شده اند را نیز براساس حرکت متفاوت آنها در ژل گرادیانت از هم تشخیص می دهد.

DNA پلیمرازهای ویرایش گر مقاوم به حرارت

آنزیم های ویرایش گر علاوه بر صحت بالاتر اغلب به تغییرات شرایط بافر وحرارت نیز مقاوم ترند لذا استفاده از دماهای دناتوره کننده بالاتر و یا گرما گذاری طولانی تر در دماهای بالا را برای الگوهای حاوی GC زیاد فراهم می کنند. بدون آنکه فعالیت عمده ای از آنزیم از دست برود. Km پایین این آنزیم ها برای DNA موجب می شود که غلظت های بسیار پائین DNA را به صورت کارآمد تکثیر کنند.

انتخاب آنزیم ویرایشگر

- DNA پلیمراز Vent یا Tli از ترموکوکوس لیتورالیس بدست می آید.

پایداری حرارتی بیشتری نسبت به DNAپلیمراز Taq دارد. محصولات بلندتر تولید می کند و صحت عملکرد آن حدود ۵ برابر DNA پلیمراز Taq است.

- DNA پلیمراز Deep Vent نسبت به بالایی به حرارت مقاوم تر است.
- DNA پلیمراز Pfu از پیروکوکوس فیوریوسوس جدا شده است و صحت عملکرد این آنزیم ۱۲ برابر DNA پلیمراز Taq است.
- DNA پلیمراز Pwo از پیروکوکوس ووازی جدا شده است و صحت عملکرد ۱۰برابر DNA پلیمراز Taq دارد (ترجیحاً از Mgso 4 بجای Mgcl2 استفاده می کند).
- DNA پلیمراز UlTma
- DNAپلیمراز Accuzyme
- DNA پلیمراز KOD HiFi
- DNA پلیمراز Tth جدا شده از ترموس ترموفیلوس یک DNA پلیمراز مقاوم به حرارت با تداوم بالاست که آن را برای تولید محصولات بلند PCR مناسب می سازد، فعالیت ویرایش گری ندارد و بنابراین صحت آن مشابهِ DNA پلیمراز Taqاست. با این حال فعالیت رونویسی معکوس مناسبی دارد و برای PCR همراه با رونویسی معکوس (RT- PCR) مناسب است.

پلیمرازها و واکنش گرهای سبز و قرمز

بعضی از ترکیبات آنزیمی یا مخلوط واکنشگرهای PCR دارای رنگ می باشند که از اضافه شدن آنزیم یا واکنشگرها و مخلوط شدن صحیح آنها اطمینان می دهد و در ارزیابی بعد از PCR کمک می کند. به عنوان مثال، معمولا نیازی به افزودن بافر بارگیری (Loading buffer) به نمونه قبل از ارزیابی محصولات واکنش روی ژل آگاروز نمی باشد چرا که دانسیته این نمونه ها افزایش یافته و این رنگ ها در طول ژل حرکت می کنند و به عنوان مارکری برای حرکت نمونه ها در طول ژل عمل می نمایند.

مخلوط های پلیمراز

مخلوطی از DNAپلیمراز Taq و آنزیم ویرایشگر صحت را در مقایسه با DNA پلیمراز Taq تنها بهبود می بخشد و همچنین ساخت محصولات بلند را امکان پذیر می سازد.

اهداف استفاده از مخلوط های پلیمراز :

- تکثیر الگوهای طویل
- بهبود صحت (ایجاد صحت بالا)
- تکثیر الگوی غنی از GC : بدلیل اینکه مناطق غنی از GC الگوهای سرسختی برای کپی برداری محسوب می شوند و بعنوان ژنوم های مشکل دار در PCR مطرح هستند .
- RT- PCR : مخلوطی از دو آنزیم رونویسی معکوس و DNA پلیمراز Taq

۷- الگوهای اسید نوکلئیک

طیف وسیعی از نمونه های RNA و DNA می توانند به عنوان الگوی PCR استفاده شوند که شامل DNA های ژنوم، mRNA ها ، cDNA ها ، پلاسمید ، فاژ ، کاسمید و غیره می باشد.

- منابع DNA الگو می تواند از هر منبع حیوانی یا انسانی و بافت گیاهی و باکتریایی و غیره باشد.
- روشهای زیادی برای جداسازی RNA جهت رونویسی معکوس وجود دارند . روشهای استاندارد شامل لیز سلولها و بافتها ، استخراخ RNA و بدنبال آن رسوبگیری با اتانل است .
- نمونه های آسیب شناسی و پزشکی قانونی : DNA معمولا به راحتی و با یک فرآیند هضم پروتیناز K از بافت های تازه یا نمونه های خونی استخراج می شود . همچنین جداسازی DNA از بافتهای تثبیت شده روی لایه های میکروسکوپی و نمونه های موزه ای نیز امکان پذیر است.
- نمونه های باستان شناسی : چنین مطالعاتی اغلب روی DNA های میتوکندریایی یا کلرو پلاستی یا RNA ریبوزوی ژنوم متمرکز است. با گذشت زمان ، کیفیت DNA الگو از بین می رود و فقط تکثیر محصولات کوتاه ممکن می گردد اما با بررسی همپوشانی تعداد زیادی از قطعات کوتاه تر می توان توالی های بلندتر را بازسازی کرد.

روش دیگر بازسازی اولیه الگوی بلندتر ، بوسیله PCR نوترکیب ، از روی محصولات PCR کوتاهی است که در مرحله اول خالص شده بودند.

نوع لوله ای که استفاده می شود روی الگوی دمایی PCR تاثیر خواهد گذاشت بعنوان مثال شکل زیر مقایسه ای از یک سری چرخه دمایی روی یک دستگاه را نشان می دهد که علاوه بر دمای واکنش ، دمای بلوک را نیز نشان می دهد. دمای واکنش در دو نوع مختلف از لوله ها شامل لوله پلی پروپیلنی استاندارد ۵ /۰ میلی لیتری ولوله PCR با دیواره نازک نشان داده شده است . علایم نشان می دهند که دمای دورن لوله معمولی قبل از انتقال به مرحله بعدی ، هرگز به دمای از پیش تنظیم شده نمی رسد. بعنوان مثال واکنش ها در دمای جفت شدن بالاتر از دمایی که تنظیم شده است ، انجام می شوند . در مقابل لوله های با دیواره نازک ظرف ۳۰ثانیه به دماهای از پیش تنظیم شده می رسند و ۳۰ ثانیه در دمای تنظیم شده نگهداشته می شوند.

۸- خودکار کردن PCR

دستگاههای اولیه PCR نسبتا ساده و معمولاً دارای یک بازوی مصنوعی بودند که برای انتقال جا لوله ای حاوی لوله های واکنش بین حمام های آب با دماهای مختلف استفاه می شدند. این دستگاهها عموما کارایی مناسبی نداشتند و لذا با بلوک های حرارتی قابل برنامه ریزی که ترموسایکلر نامیده می شوند، جایگزین شدند. این دستگاهها براساس مکانیسم های سردوگرم کردن سریع لوله های واکنشی به دمای تعیین شده و نگهداری دما تا مدت مشخص و سپس انتقال به دمای بعدی عمل می کنند .

در بعضی از این دستگاهها سرعت گرم و سرد شدن که به زمان Ramping معروف است، قابل تنظیم بوده و برای برخی آزمایشات مثل استفاده از پرایمرهای بلند مهم است. برخی دستگاههای ممکن است . قابلیت های اضافی نظیر توقف های از پیش برنامه ریزی شده داشته باشند که نمونه برداری از مخلوط واکنش یا افزودن واکنش گرهای دیگر را بعد از تعداد چرخه مشخص ممکن می سازد. بعضی دستگاهها نمونه ها را در انتهای کار تا دمای ۴ تا ۶ درجه سانتی گراد خنک می کنند. این مزیت زمانی مهم خواهد بود که واکنش ها به مدت یک شب ادامه یابد و نمونه ها ممکن است چندین ساعت پس از اتمام PCR در دستگاه باقی بمانند.

در پوش های حرارتی (Heated lids) : بهتر است از ترموسایکلرهایی که دارای درپوش حرارتی می باشند استفاده شود زیرا که باعث تعادل حرارتی مناسب می گردد. اگر دستگاه بدون درپوش حرارتی است یک قطره روغن معدنی سبک به مخلوط واکنش اضافه می شود که با ایجاد یک سد حرارتی از تبخیر محلول واکنش جلوگیری می کند .

ترموسایکلرهای قدیمی تر براساس سیستم بلوک حرارتی کار می کنند و ترموسایکلرهای جدیدتر مجهز به دستگاههای هواگردان هستند که از یک منبع حرارتی مثل لامپ یا سیم پیچ حرارتی استفاده می کنند که هوای گرم را به داخل محفظه هدایت می کند و مراحل سرد کردن توسط یک فن انجام می شود و هوای گرم را خارج کرده و هوای سرد را به محفظه وارد می کند تا به دمای جفت شدن مورد نظر برسند. سریع بودن تغییرات دمایی با واسطه هوا و از طرفی نسبت بالای سطح به حجم در لوله های موئین منجر به تغییر سریع دمای مخلوط PCR می شود و زمان های چرخش تا حد زیادی کاهش می یابد.

نشان دادن تجمع محصول و کنیتیک PCR

دستگاههای جدید هم PCR را انجام می دهند و هم تجمع محصول را درست بعد از چرخه PCR نشان می دهند. این سیستم ها بر پایه تشخیص فلورسنس DNA دو رشته ای یا بوسیله اندازه گیری انتقال انرژی رزونانس فلورسنس در توالی هدف عمل می کنند.

۹- بهینه سازی PCR

واکنش های کنترل : برای نشان دادن وجود مشکل در اختصاصی بودن و یا وجود آلودگی انجام آزمایشات کنترل به موازات نمونه های مورد آزمایش اهمیت دارد.

حداقل دو کنترل یکی واکنش بدون DNA و دیگری در غیاب پرایمرها ضروری است.

تکنیک ها و روش های PCR

همه پرایمرها در شرایط واکنش یکسان عمل نمی کنند. مثلا یک جفت پرایمر در شرایط استاندارد با کارایی بالا کار می کند و مقادیر زیادی از محصول اصلی را بوجود می آورد. یک جفت پرایمر دیگر در همین زمان و در شرایط یکسان واکنش با همان رشته الگو ، هیچ محصولی نمی دهد یا الگوی پیچیده ای از محصولات بی ربط ایجاد می کند.

وقتی که PCR بهینه نباشد، باید برای افزایش یا کاهش شرایط سخت گیری (stringency) ، یکی از عوامل واکنش را به مقدار مناسب تغییر داد. اگر هیچ باندی مشاهده نشود ممکن است سخت گیری خیلی شدید بوده است، درحالی که اگر باندهای متعددی دیده شود باید میزان سخت گیری را شدیدتر کرد.

دمای جفت شدن، روش کار و اجزاء بافر مهمترین عواملی هستند که اختصاصی بودن واکنش را تحت تاثیر قرار می دهند.

اختصاصی کردن PCR :

اختصاصی بودن بالای PCR با عملیات ذیل حاصل می شود :

۱- غلظت بهینه یون منیزیوم ، سایر یونها ، پرایمرها ، دزدکسی نوکلئوتیدها و DNA پلیمراز
۲- دناتوره کردن کارآمد ، دماهای بالای جفت شدن و سرعت بالای جابجایی بین چرخه ها
۳- Touchown PCR
۴- PCR با شروع داغ (Hot start)
۵- PCR تقویت کننده (Booster PCR)
۶- محدود کردن تعداد و زمان چرخه ها
۷- کارایی ترمو سایکلر
۸- افزودنی های PCR
۹- کیفیت رشته الگو
۱۰- PCR لانه گزین (Nested PCR)

یون منیزیوم (Mg^{2+}): غلظت این یون بسیار اهمیت دارد . این یون فعالیت DNA پلیمراز را تحت تاثیر قرار می دهد. اگر غلظت این یون خیلی کم باشد احتمالاً بازده نیز پائین خواهد بود، در حالی که غلظت اضافی آن موجب کاهش صحت DNA پلیمراز و در نتیجه تکثیر محصولات غیر اختصاصی می شود.

سایر یونها: افزایش غلظت پتاسیم کلراید از طریق تاثیر روی خصوصیات ذوب و خنثی سازی بار منفی گروههای فسفات روی اسکلت DNA ، منجر به کاهش سخت گیری و لذا اهمیت پیدا کردن نقش باندهای هیدروژنی بین بازها می گردد.

غلظت DNA پلیمراز: اگر در نهایت هیچ باندی ندارید یا باندهای شما ضعیف هستند ممکن است که مقدار DNA پلیمرازتان خیلی کم بوده است. DNA پلیمرازهای مقاوم به حرارت در دماهای بالا غیر فعال می شوند که خود منجر به کاهش میزان محصول می گردد. بنابراین سعی کنید با بکارگرفتن زمان کوتاه دناتوره شدن (حدود ۱۵ ثانیه) در ۹۴ درجه سانتی گراد، مدت زمانی که آنزیم در دمای بالای ۹۰ درجه سانتی گراد می گذراند. محدود نمایید یا دما را از ۹۴ به ۹۲ درجه سانتی گراد کاهش دهید.

دناتوره کردن کارآمد : برای بدست آوردن الگوهای تک رشته ای مورد نیاز برای PCR ، دناتوره کردن کارآمد الگو از اهمیت فراوانی برخوردار است. این هدف با حرارت دادن نمونه (۵ دقیقه) در دمای حدود ۹۴ درجه سانتی گراد حاصل می شود. اگر این مرحله کارآمد نباشد مولکولهای دو رشته ای که بطور نسبی دناتوره شده اند ، خیلی سریع بهم خواهند پیوست و مانع از اتصال پرایمرها و تکثیر DNA خواهند شد. اما نمونه های غنی از GC ممکن است به دماهای بالاتر نیز نیاز داشته باشند (بهتر است از پائین ترین دمای موثر و کوتاهترین زمان مناسب برای حفظ حداکثر فعالیت DNA پلیمراز در واکنش استفاده شود).

جفت شدن : این که یک پرایمر فقط به ناحیه کاملا مکمل خودش متصل می شود یا این که به توالی هایی با یک یا چند جفت باز اشتباه (Mismatch) بچسبد ، شدیداً به دمای جفت شدن بستگی دارد. در کل هرچه دمای جفت شدن پرایمر بالاتر باشد اختصاصی تر به الگوی کاملا منطبق خود می چسبد و بنابراین شانس تکثیر توالی هدف بیشتر خواهد بود. هر چه دما کمتر باشد، تعداد اتصالات غیر اختصاصی بین الگو و پرایمر که منجر به تکثیر توالی های غیر هدف می شود، بیشتر می گردد. زمان جفت نباید خیلی طولانی باشد چون خطر تکثیر محصولات غیر اختصاصی افزایش می یابد. بهترین زمان جفت شدن در روشهای عمومی ۳۰ تا ۶۰ ثانیه گزارش شده است.

Touchdown PCR:

در این روش، ابتدا PCR با دمای جفت شدن بالاتر از نقطه ذوب پرایمرها شروع می شود سپس در چرخه های اولیه PCR دمای جفت شدن به تدریج به زیر نقطه ذوب کاهش داده می شود. این موضوع از جفت شدن اختصاصی پرایمرها به توالی هدف شان، قبل هرگونه جفت شدن غیر اختصاصی اطمینان می دهد.

Hot start PCR:

راحت ترین روش برای جلوگیری از جفت شدنهای نادرست پرایمر - الگو و پرایمر – پرایمر و کمک کردن به جفت شدن صحیح پرایمر، استفاده از روش شروع داغ می باشد که بر اساس جداسازی فیزیکی واکنشگرها تا رسیدن به دمای بالا استوار شده است.

ارزانترین روش: آماده سازی همه اجزای واکنش بدون DNA پلیمراز و گرما گذاری لوله ها در دمایی بالاتر از ۹۰ درجه سانتی گراد در ترموسایکلر برای مرحله دناتوره شدن اولیه است. سپس در حالی که لوله ها در دمای بالاتر از ۷۰ درجه سانتی گراد نگهداری می شوند، مقادیر مناسب از DNA پلیمراز با پیپت به واکنش افزوده می شود. این روش بدلایل زیر برای انجام نمونه های زیاد ، مناسب نیست:

۱- زمان زیاد لازم برای اضافه کردن جداگانه آنزیم به هر یک از لوله ها
۲- ممکن است به یک یا چند لوله اضافه کردن آنزیم فراموش شود.
۳- احتمال وقوع آلودگی بدلیل باز کردن لوله ها

متداولترین روشی که برای شروع داغ استفاده می شود. DNA پلیمرازی است که فعالیت پلیمرازی آن و حتی در مواردی فعالیت اگزو نوکلئازی آن بوسیله اتصال فیزیکی یک آنتی بادی مونوکلونال غیر فعال کننده، مهار شده و موجب جلوگیری از واکنش آن با سوبسترا می شود. در این روش تمامی اجزاء واکنش در غیاب فعالیت پلیمرازی مخلوط می شوند، زمانی که دمای واکنش بالا می رود. آنتی بادی دناتوره شده و فرم فعال DNA پلیمراز آزاد می شود.

روش استفاده از دانه های موم: دانه های موم مثل Ampliwax , Dynawax باعث جداسازی فیزیکی برخی از اجزاء واکنش تا زمان رسیدن تمامی واکنش به دمای بالا می باشد . بنابراین پدیده جفت شدن اشتباه اتفاق نخواهد افتاد .

علاوه براین مزیت دیگرموم ها همانند روغن معدنی ایجاد یک سد محافظت کننده در مقابل تبخیر در طی چرخه های دمایی است . همچنین یک سد فیزیکی برای محافظت نمونه ها از آلودگی در جریان نگهداری و عملیات بعدی ایجاد می کند .

نکته : پلیمراز تگ بید (Taq Bead) با شروع داغ : این دانه های کروی موم هایی هستند که DNA پلیمراز Taq را در درون خود جای داده اند و هنگامی که دمای واکنش به ۶۰ درجه سانتی گراد برسد آنرا آزاد می سازند. چون حجم موم کم است سد محافظتی بالای محلول ایجاد نمی کند لذا استفاده از روغنی معدنی در دستگاه ضروری بنظر می رسد.

PCR تقویت کننده

میان کنش بین پرایمرها و الگو در غلظت های خیلی پائین الگو کمتر اتفاق می افتد ولی در عوض بین خود پرایمرها به نحو چشمگیری افزایش می یابد که ممکن است موجب تولید ناخالص های پرایمری نظیر دیمر پرایمر می گردد. برای بهبود اختصاصی بودن اتصال پرایمر به الگو در غلظت های پائین DNA ، باید روشی بنام PCR تقویت کننده به خدمت گرفته شود . در این روش اولین چرخه های PCR با غلظت پائین پرایمر انجام می شود . این فرآیند موجب جفت شدن اختصاصی تر پرایمر می شود و نهایتاً می توان غلظت پرایمرها را در جریان فاز تکثیر افزایش داد.

تعداد و طول چرخه

در کل باید از حداقل چرخه های PCR برای تولید محصول لازم جهت دستکاری یا آنالیزهای بعدی بهره روی گرفت که احتمال خطا و تجمع محصولات غیر اختصاصی را کاهش می دهد. اگر مقدار کافی از محصول بوجود نیامد در اولین قدم سعی کنید میزان الگو را افزایش دهید. در مرحله بعدی می توان تعداد چرخه های PCR را افزایش داد. عامل قابل توجه دیگری که روی اختصاص بودن PCR موثر است زمان لازم برای تغییرات دما در طول هرچرخه می باشد. بطور کلی هر چه سرعت تغییر دما بیشتر باشد اختصاصی بودن بیشتر است و واکنش ها زودتر کامل می شوند.

کارایی ترموسایکلر

اگر PCR هایتان جواب ندادند باید بررسی کنیم ترموسایکلر به دماهای صحیح می رسد یا خیر .

ترموسایکلر های جدید ابزارهای تشخیص داخلی دارند ولی قدیمی ترها نیاز به سیستم های کنترل دمایی مجزا دارند. یک روش ساده استفاده از ترموکوپلی است که به دماسنج دیجیتال متصل شده است و داخل لوله آزمایش حاوی آب قرار گرفته است. روش کم هزینه تر دیگر استفاده از یک دماسنج باریک قابل استفاده در لوله آزمایش حاوی آب است.

بهینه سازی PCR و افزودنی ها

از کیت های بهینه سازی PCR می توان کیت اپتی پرایم تولید شرکت استراتاژن و کیت Failsafe تولید شرکت اپیژن را نام برد (اینها دارای بافرها و افزودنی های زیادی هستند).

Enhancer ها با تشدید کننده های مختلف که موجب اختصاصی تر و کاراتر شدن PCR می شدند گزارش شده اند. این ترکیبات شامل مواد شیمیایی افزایش دهنده کارایی جفت شدن دمایی واکنش ، پروتئین های متصل به DNA و واکنش گرهای تجاری قابل دسترسی می باشند. این افزودنی ها را می توان برای تقویت جفت شدن اختصاصی پرایمر، کاهش خطای اتصال پرایمر و همچنین بهبود راندمان و طول محصول بکار برد.

افزودنی هایی که منجر به ناپایداری جفت شدن بازها می شوند. خصوصاً در الگوهای سر سخت نظیر توالی های غنی از CG موجب بهبود PCR می شوند و همچنین ممکن است با ناپایدارتر کردن جفت شدن های نادرست، موجب اختصاصی تر شدن کمپلکس های پرایمر با الگو شوند .

دو افزودنی که شاید از بقیه مفیدتر باشند دی متیل سولفوکساید و بتائین هستند که اولی باعث باز شدن و پیوند بین بازها می گردد و دومی موجب مساوی شدن نقش جفت بازهای AT , GC در پایداری دو رشته ای می گردد.

از افزودنیهای دیگر می توان محصول Q ساخت شرکت کیاژن را نام برد که موجب بهبود رفتار ذوب شدن DNA الگو می شود و با یک غلظت خاص برای هر مخلوط پرایمر و الگویی قابل استفاه است و اثر سمی ندارد.

همچنین Taq Extender ساخت شرکت استراتاژن که موجب افزایش ظرفیت طویل سازی آنزیم DNA پلیمراز Taq می شود و تشدید کننده Perfect Match ساخت شرکت استراتاژن که موجب ناپایداری کمپلکس های نادرست پرایمر و الگو در نزدیکی انتهای ۳پریم (جایی که جفت شدن نادرست بوجود می آید) می شود ولی روی کمپلکس های صحیح پرایمر و الگو در انتهای ۵ پریم تاثیری ندارند و بنابراین محصول با راندمان خوب بوجود خواهد آمد.

تهیه DNA الگو و مهار کننده های PCR

نمونه های زیستی متداول که برای PCR استفاده می شوند از بافتهای حیوانی، گیاهی، باکتریایی تا نمونه های جنایی و باستان شناسی می توانند باشند. اغلب PCR ها روی مخلوط های نسبتاً خام DNA که حاوی مهار کننده های نامشخص هستند انجام می پذیرد.

رقیق کردن نمونه DNA در بسیاری موارد موجب رفع مهار می شود.

با این عمل هم DNA الگو و هم مهارکننده رقیق می شوند. اگر مهار کننده تا زیر غلظت تداخل با PCR رقیق گردد. محصولات PCR از روی DNA الگو بدست می آیند.

خون یک منبع متداول برای DNA انسان است که برای جلوگیری از انعقاد آن از لوله های حاوی EDTA به مقدار ۱mg به ازای هر میلی لیتر آن استفاده می شود. هپارین نیز یک ضد انعقاد متداول است ولی چون روی PCR اثر مهار کنندگی شدید دارد بکار نمی رود. سایر مواد موجود در خون مثل ترکیبات پورفیرین نیز ممکن است PCR را مهار کنند که به هنگام تهیه DNA می توان آنها را با تخریب گلبولهای قرمز و جمع آوری سلولهای سفید به وسیله سانتریفوژ از نمونه خارج کرد.

برداشتن یا غیرفعال کردن پروتئاز قبل از PCR مهم است (در بیشتر دستورالعمل های عصاره گیری از پروتئاز K برای هضم پروتئین های دناتوره شده استفاده می شود) برای حذف این پروتئاز نمونه را تا دمای ۹۰ تا ۹۵ درجه سانتی گراد حرارت داده سپس با فنل عصاره گیری و با اتانل رسوب گیری می نمایند.

PCR لانه گزین

وسیله ای برای افزایش حساسیت بوده و اجازه می دهد یک محصول تکثیر شده اختصاصی را از میان دریایی از محصولات غیر اختصاصی خارج نمایید. پرایمرهای لانه گزین به گونه ای طراحی می شوند تا به توالی های موجود در محصول صحیح PCR بچسبند. محصولات صحیح دارای توالی های هدف برای پرایمر لانه گزین خواهند بود در حالی که توالی های غیر هدف آن را ندارند. بنابراین با استفاده از پرایمرهای لانه گزین و طراحی PCR دوم محصولات اصلی تکثیر می شوند که باید موجب افزایش ده هزار برابری محصولات صحیح در مقابل محصولات غیر اختصاصی گردد.

مشکلات آلودگی

توانایی PCR در تکثیر مقادیرکم الگوی DNA مزیت مهم آن برای شناسایی توالی هدف است اما امکان تکثیر مقادیر کم از DNA آلوده نیز از معایب آن بشمار می آید.

- منابع مختلف آلودگی DNA : سطح میز آزمایشگاه ، تجهیزات آزمایشگاهی ، پیپت ها ، ذرات معلق در هوا نظیر میکروبها ، سلولهای مرده پوست یا محلولهای آلوده.

- عمومی ترین منشاء های آلودگی به شرح ذیل است .

۱- الگوی DNA اصلی

۲- مولکولهای کلون شده که ژن هدف را حمل می کنند.

۳- مولکولهای تکثیر شده از PCR قبلی

در کل برای جلوگیری از انواع آلودگی ها قوانین یکسانی بکار برده می شود. هر چند که برای جلوگیری از نوع سوم آلودگی که معمولاً بنام آلودگی انتقالی (carry over) شناخته می شود، مراحل اضافه تری میتوان اتخاذ کرد.

آلودگی در آزمایشگاه بالینی خیلی راحت تر بوجود می آید تا یک آزمایشگاه تحقیقاتی.

شاید باقی مانده های PCR پیشین مهمترین منبع اصلی آلودگی باشد.

واکنش های کنترل : بهتر است که نمونه های کنترل بعنوان آخرین سری تهیه شدند. به عنوان مثال، اگر در حین آماده سازی PCR آلودگی در مخلوط اولیه اتفاق بیفتد، آنگاه ممکن است نمونه های اول آلوده نباشند ولی آخری ها آلوده شوند و این امر با آماده سازی نمونه های کنترل در آخر کار قابل شناسایی خواهد بود.

انتخاب محل راه اندازی PCR : از قاعده « جداسازی به ممانعت از آلودگی کمک می کند » تبعیت می کند. استفاده از اتاقهای جداگانه یا اتاقی که در هر مرحله با UV آلودگی زدایی می شود. یا استفاده از میز آزمایشگاهی جداگانه در هر مرحله یا پوشیدن دستکش تازه و یا شستن سطوح کار با هیپوکلریت سدیم یک درصد و اتانل. همه اینها به جلوگیری از یکسان بودن محل راه اندازی PCR با محیط عملیات پس از PCR کمک می کند.

سمپلرها و سرسمپلرها: اگر فقط یکسری سمپلر دارید که هم برای PCR و هم برای دستکاری محصولات PCR از آنها استفاده می کنید مشکل عمده شما آلودگی سمپلرها خواهند بود بنابراین یک سری سمپلر اختصاصی برای انجام PCR ضروری می باشد. استفاده از سرسپملرهای مخصوص حاوی فیلتر و سمپلرهای جابجایی مثبت نیز خوب هستند. سرسپملر نباید در اتانل غوطه ور شود یا اتانل داخل آنها کشیده شود بلکه بایستی با یک دستمال آغشته به اتانل آنها را پاک کنیم.

محلول ها: برای انجام هر کاری مرتبط با DNA همه محلولها را در صورت امکان اتوکلاو و سپس در حجم های ۰/۱ تا ۰/۲ میلی لیتری ذخیره نمایید. با این عمل فقط لازم است که یک لوله را برای PCR از فریزر خارج کنید در حالی که مابقی محصول بصورت دست نخورده یخ زده باقی می ماند.

سایر منابع آلودگی: منابع آلودگی خاصی در ارتباط آنالیز DNA انسان وجود دارند. یک قطعه میکروسکپی از پوست یا حتی شوره برای آلوده کردن PCR کافی است که بصورت بالقوه منجر به نتیجه نادرست می گردد. بنابراین باید هنگام انجام PCR دستکش پوشید یا از هود مناسب PCR استفاده کرد.

جلوگیری از آلودگی

۱- مخلوط واکنش را قبل از PCR با اوراسیل N گلیکوزیداز مجاور می کنیم تا محصولات قبلی PCR تخریب کردند این آنزیم موجب آزادسازی اوراسیل می شود و هنگامی که DNA در طول PCR حرارت می بیند، شکسته می شود. چنین عملی خصوصاً در آزمایشگاههای تشخیصی که روزانه نمونه های مشابه تکثیر می شوند و احتمال آلودگی متقابل زیاد می باشد حیاتی است و از نتایج مثبت کاذب جلوگیری می نماید.

۲- مخلوط واکنش را قبل از PCR با نور فرابنفش مجاور می کنیم تا آلودگی احتمالی برطرف شود. این عمل عمدتا موجب جفت شدن دو تایی تیمیدن و در نتیجه ناتوانی DNA در عمل کردن بعنوان الگو در طول PCR می شود.

۳- مخلوط واکنش را قبل از انجام PCR با سورالن و ایزو سورالن مجاور می کنیم. اینها بین دورشته DNA جا گرفته و موجب اتصال متقاطع بین دو رشته می شوند که حین PCR دناتوره نشده و بنابراین چنین مولکولهایی بعنوان الگو عمل نمی کنند.

مجاور کردن مخلوط پس از PCR نیز در مهار آلودگی انتقالی محصولات PCR بکار می رود.

نکته : همراهی مورد ۳ با مورد ۲ نتیجه بهتری را به همراه خواهد داشت.

راهنمای حل مشکلات

اگر PCR انجام نشود، احتمالاً یکی از اجزاء واکنش شامل DNA الگو، پرایمرها، پلیمراز یا شرایط انتخابی مشکل دارند. بهتر است در ابتدا آزمایش را در همان شرایط تکرار کنید تا مطمئن شوید هیچ اشتباه ساده ای منجر به شکست در PCR نشده باشند.

استفاده از کنترل ها اهمیت دارند. کنترل مثبت که حاوی الگویی با قدرت تکثیر خوب می باشد، و از اضافه شدن تمامی واکنش گرها و عملکردی بودن آنها اطمینان ایجاد می کند. کنترل منفی (یکی فاقد DNA الگو و دیگری فاقد پرایمر) و جود هر گونه آلودگی را آشکار می کند، احتمال تشکیل دیمر پرایمر را روشن ساخته و ما را از وقوع پدیده جفت شده غیر اختصاصی مطمئن می سازد.

آنالیز محصولات PCR

ژل الکترو فورز استاندارد معمول ترین و سریع ترین راه ارزیابی محصولات PCR است .

اگر شرایط PCR بهینه بوده و خوب کار کرده باشد باید قادر به مشاهده یک نوار قوی و باریک در اندازه مورد انتظار باشید . اگر یک محصول اختصاصی بدست نیاید ممکن است محصولات کوچک دیمرپرایمر را در انتهای ژل مشاهده کنید .

نوارهای اضافی ممکن است در اثر پدیده جفت شده غیر اختصاصی پرایمر باشد. دلیل معمول ایجاد اینگونه محصولات دماهای پایین جفت شدن غلظت های بالای یون منیزیم و یا وجود توالی های مشابه برای جفت شدن در یک الگوی پیچیده میباشد .

تأیید محصول تکثیر شده اولیه

محصولات PCR اغلب برای آزمایشهای بعدی مورد استفاده قرار می گیرند و بنابراین ضروری است که از وجود توالی مورد نظر در قطعه تکثیر شده اطمینان یابیم این روشها شامل :

۱- **آنالیز لکه گذاری ساترن (Southern):** مستلزم انتقال مؤینه قطعات DNA از ژل آگاروز به غشاء نایلونی می باشد. قطعه DNA هدف سپس با هیبرید کردن آن با یک پروب ویژه شناسایی می شود

(پروب های رادیو اکتیو یا غیر رادیو اکتیو) یک روش جایگزین و سریع تر از آنالیز لکه گذاری ساترن، لکه گذاری صفحه ای (Slot) می باشد. در اینجا یک نمونه از واکنش، مستقیماً به غشاء منتقل می شود و بدنبال آن هیپریداسیون DNA با یک پروب مخصوص انجام می پذیرد. این کار مستلزم الکتروفوزر روی ژل آگاروز یا انتقال مؤینه نیست بنابراین بسیار سریع تر است .

۲- **PCR لانه گزین:** یک راه مطمئن و سریع برای تأیید محصول PCR است.

در این روش معمولا از دو پرایمر داخلی برای تکثیر محصول PCR اول استفاده می شود و محصول PCR اول به عنوان الگویی برای دومین PCR بکار می رود. محصول دوم در مقایسه با محصول اولیه کوتاه تر است . پیش بینی می شود که PCR لانه گزین حساسیت شناسایی محصول صحیح را ده هزار برابر می نماید. حتی اگر محصول اولیه PCR ضعیف و همراه زمینه ای از محصولات غیر اختصاصی باشد، در مرحله دوم بهبود خواهد یافت. زیرا پرایمرهای PCR لانه گزین تنها تکثیر کارآمد الگوی اختصاصی را فراهم می آورند.

۳- آنالیز محصول PCR به کمک آنزیم محدود کننده

با مخلوط کردن ساده محصول PCR بافر محدود کننده، آنزیم محدود کننده و گرما گذاری آن برای انجام واکنش هضم و در نهایت آشکار سازی آنها روی ژل آگاروز به کمک الکتروفروز، به نتایج روشن و نسبتا سریعی بدست می آید (البته این کار فقط زمانی مفید است که یک نقشه از محل های اثر آنزیم محدود کننده روی DNA تکثیر شده وجود داشته باشد).

توالی یابی مستقیم محصولات PCR

برای آنکه محصولات واکنش قابل شناسایی باشند باید آنها را (معمولا با نشانگرهای رادیو اکتیو یا فلورسنت) نشان دار نمائیم . معمولا نشانگرهای رادیواکتیو برای توالی یابی های دستی بکار می روند اما روش هایی که امروزه بیشتر متداول هستند بکار بردن رنگهای فلورسنت و سیستم های شناسایی خودکار می باشد.

- پرایمرهای بکار رفته در توالی یابی مستقیم : برای این منظور یکی از پرایمرهای اولیه PCR و یا بهتر است یک پرایمر لانه گزین که به قسمت داخلی قطعه تکثیر شده متصل می شود مورد استفاده قرار گیرد.
- تهیه الگوی تک رشته ای DNA : یک روش ساده ، استفاده از PCR نامتقارن است که یکی از پرایمرها به مقادیر بسیار بیشتر (۱۰ تا ۵۰ برابر) نسبت به دیگری اضافه می شود. در طول ۲۰ چرخه اول PCR محصول دو رشته ای تجمع می یابد ، اما در چرخه های بعدی با کاهش شدید پرایمر کم غلظت، تجمع یکی از رشته ها به وقوع می پیوندد.

- یک روش کارآمدتر این است که محصول PCR به صورت دو رشته ای تکثیر شده و سپس قسمتی از آن به همراه یکی از پرایمرها برای تهیه محصول تک رشته ای بکار رود.

نشان دار کردن مستقیم محصولات PCR و اندازه گیری های هموجنوس

نشان دار کردن محصولات PCR در حین تکثیر با اضافه کردن dNTP نشان دار یا پرایمرهای نشان دار شده با مواد رادیو اکتیو، فلور سنت یا بیو تینه شده امکان پذیر است که وارد محصلو PCR می شوند.

محصولات PCR در برخی موارد مثل DNA foot printing و Insitu PCR باید مستقیما نشان دار شود. نشان دار کردن مستقیم محصولات PCR خصوصا هنگامی که میزان تکثیر پایین باشد، حساسیت آشکار سازی را افزایش می دهد. این روش در مقایسه با روشهای لکه گذاری ساترن و هیبریداسیون ساده تر و سریع تر است.

شناسایی ایمونولوژیکی محصولات PCR : روشهای الایزا برای شناسایی محصولات PCR می تواند مورد استفاده قرار گیرد. این روشها حساسیت بالایی دارند و شناسایی محصولات را تا حدود ۱۰ پیکوگرم مقدور می سازند.

جهش زایی با PCR

این امکان را فراهم می آورد که DNA هدف را به آسانی و با کارایی بالا تغییر داده و دست کاری کنیم و برای موارد مختلف ذیل استفاده نماییم .

۱- حذف یا اضافه کردن یک توالی شامل بازسازی ژن ها با آزمایشات تعویض Domain
۲- تغییر یک یا چند نوکلئوتید خاص
۳- جهش دادن تصادفی یک منطقه از توالی نوکلئوتیدی شامل یک منطقه کدگذار کامل

در اکثر موارد باید DNA الگو برای واکنش جهش زایی تک رشته ای شود تا امکان اتصال به توالی مکمل الیگونوکلئوتیدی فراهم شود واین الیگونوکلئوتید بعنوان یک پرایمر ساخت DNA عمل کند.

تکنولوژی DNA

به دو بخش تقسیم می شود : کلونینگ DNA و روشهای بررسی DNA

کلونینگ DNA : تکثیر انتخابی یک قطعه یا توالی DNA خاص به منظور تولید مقادیر نسبتاً زیاد از آن DNA می باشد تا بتوان ساختار و عملکرد آن را بطور مفصل بررسی نمود.

۱-کلونینگ DNA بصورت invivo و در داخل سلول

این روش ۶ مرحله اساسی دارد.

- تولید قطعات DNA : با روشهای مکانیکی خرد کردن و بریدن قطعات با اندازه متفاوت حاصل می شود ولی هضم DNA تهیه شده از یک منبع خاص توسط یک آنزیم محدوده کننده (restriction enzym) مشخص همواره یک نوع مجموعه قطعات DNA بدست خواهد آمد. این آنزیم ها توالی پالیندرمی DNA را که بین ۴ تا ۸ نوکلئوتید دارند را شناسایی می کنند. توالی پالیندرمی به این معنی است که اگر توالی را درهر یک از رشته ها در یک جهت مثلاً ۵ پریم به ۳ پریم بخوانیم توالی هر دو رشته در این محل یکسان خواهد بود. بیش از ۳۰۰ آنزیم محدود کننده مختلف از باکتریهای مختلف جداسازی شده اند و براساس نام باکتری که از آن جدا شده اند نام گذاری شده اند. مثل EcoRI که از باکتری Ecoli استخراج شده است.

- نوترکیبی قطعات DNA : DNA از هر منبعی بدست آید هنگامی که توسط یک نوع آنزیم محدود کننده هضم گردد قطعات DNA که تولید می کند دارای انتهاهای مکمل خواهند بود. اگر DNA بوسیله آنزیمی که در محل برش ، انتهاهای چسبیده ایجاد می کند بریده شود قطعات حاصل، قطعات چسبیده نامیده میشوند. ابتدا انتهاهای چسبیده بوسیله پیوندهای هیدروژنی بهم متصل می شوند، سپس توسط آنزیم لیگاز بصورت کووالان بهم متصل می شوند. اتصال قطعات DNA بدست آمده از منابع مختلف، به مولکولی می انجامد که به مولکول DNA نوترکیب مرسوم است.

- ناقل ها (Vector): ناقل اصطلاحی است که به مولکول DNA ناقل مورد استفاده در فرآیند کلونینگ که با همانند سازی مستقل خود در سلول میزبان کپی های فراوانی ایجاد می کند، اطلاق می شود. الحاق DNA هدف یا بیگانه به درون ناقل امکان تولید تصایر زیادی از این قطعه را فراهم می کند پنج نوع اصلی ناقل های رایج شامل پلاسمید ها، باکتریوفاژها، کازمید ها، کروموزوم های مصنوعی باکتری و مخمر(YACs , BACs) می باشند. بعضی وکتورهای اولیه نظیر پلاسمیدها و باکتریوفاژها از لحاظ اندازه قطعه هدف که باید در ناقل وارد شود ، به شدت محدودیت داشتند. نسل های بعدی ناقل ها نظیر کازمیدها قادرند قطعاتی تا ۵۰kb را در خود جای دهند. با ساختار کروموزمهای مصنوعی باکتری و مخمری امکان کلونینگ قطعات DNA ۳۰۰kb تا ۱۰۰۰ kb فراهم شده است.

- ترانسفورماسیون موجود میزبان: پس از وارد کردن قطعه DNA خارجی به ناقل، ناقل نوترکیب را به سلول باکتریایی یا مخمری که تغییراتی روی آن انجام شده است وارد می کنند. غشاء سلولی باکتری بصورت طبیعی نسبت به مولکولهای بزرگ مثل قطعات DNA نفوذناپذیر است ولی

می توان با روشهای گوناگون نظیر قرار دادن در معرض نمک های خاص و با ولتاژ بالا آن را نفوذ پذیر کرد. به این پدیده مستعد شدن (Becoming compo tent) گویند. معمولا فقط یک مولکول DNA بوسیله سلول میزبان که متحمل ترانسفورماسیون شده است، جذب می شود. اگر به این سلولهای ترانسفورم شده اجازه تکثیر داده شود مقادیر زیادی از کپی های یکسان از مولکول DNA هدف اولیه یا کلون ها تولید خواهد شد.

- غربالگری ناقل های نوترکیب: وقتی که سلولهای ترانسفورم شده در محیط کشت تکثیر شدند آنها را روی محیط کشت آگار مغذی کشت می دهند. ناقل های نوترکیب را می توان با یک روش تشخیص غربالگری کرد. مثلا از دست رفتن مقاومت به آنتی بیوتیک را می توان با کشت Replica در آگار حاوی آنتی بیوتیک مناسب غربالگری کرد.
- انتخاب کلون های خاص: چند تکنیک برای شناسایی کلون های حاوی قطعات DNA هدف خاص ، بوجود آمده اند. رایج ترین آنها هیبریداسیون اسید نوکلئیک می باشد. کلونی های باکتری میزبان ترانسفورم شده را برای تهیه کشت رپلیکا بکار برده، سپس آنها را لیز کرده و روی یک فیلتر نیتروسلولزی که اسیدهای نوکلئیک به آن متصل می شوند لکه گذاری می کنند. سپس DNA روی این فیلتر واسرشت می شود تا DNA تک رشته ای گردد که می تواند به پروب های تک رشته ای نشان دار شده با رادیو اکتیو متصل شود. اتصال پروب به DNA روی فیلتر بوسیله اتورادیوگرافی آشکار می شود. منابع مختلفی از DNA را می توان برای تهیه DNA نوترکیب استفاده کرد. DNAحاصل از سلولهای هسته دار را DNA تام یا ژنومی می نامند. DNA که به وسیله آنزیم رونوشت بردار معکوس از روی mRNA ساخته می شود را DNA مکمل یا cDNA گویند. مجموعه مولکولهای DNA نوترکیب حاصل از یک منبع معین را یک کتابخانه DNA می نامند (مثل کتابخانه ژنومی یا کتابخانه cDNA).

۲- کلونینگ DNA بدون نیاز به سلول

PCR می تواند برای تولید مقادیر عظیمی از یک قطعه DNA هدف در صورت معین بودن توالی نوکلئوتیدی آن قطعه بکار برده شود. از اطلاعات توالی DNA برای طراحی دو پرایمر (آمپلی مر) الیگونوکلئوتیدی با طول تقریبی ۲۰bp که مکمل دو انتهای توالی DNA هدف هستند، استفاده می شود. در مرحله اول دو رشته DNA به کمک حرارت واسرشت می شوند. سپس پرایمرها به توالیهای DNA مکمل خود در رشته DNA الگو که تک رشته ای شده است، متصل می شوند. DNA پلیمراز در حضور دئوکسی نوکلئوتیدتری فسفاتها (dTTp, dGTP, dCTP, d ATP) سنتز را از انتهای ۳ پریم پرایمرها شروع کرده آنها را طویل می

سازد. با واسرشت کردن مجدد مولکولهای دو رشته ای سنتز شده توسط حرارت و متعاقب آن اتصال پرایمرها به مولکولهای تک رشته ای ایجاد شده، کپی های بیشتری از DNA الگو ایجاد می شوند. با تکرار تقریباً ۳۰ تا ۳۵ چرخه متوالی بیش از یک میلیون کپی (Amplicons) از DNA هدف بوجود می آید. این مقدار برای قابل رویت شدن توسط انعکاس فلورسانسی در اثر تابش اشعه ماورای بنفش پس از رنگ آمیزی با ۱ تیدیوم برمایه کافی است و نیازی به روشهای غیر مستقیم جهت آشکار سازی نیست .

PCR امکان آنالیز DNA حاصل از هر منبع سلولی حاوی هسته را فراهم می کند. علاوه برخون می توان از نمونه هایی که با تهاجم کمتر بدست می آیند، نظیر خراشیدن بافت پوشش دهان یا نمونه های پاتولوژیک بایگانی شده استفاده کرد. همچنین مقدار DNA الگوی اولیه می تواند به اندازه DNA یک سلول کم باشد نظیر آنچه در تشخیص های پیش از لانه گزینی انجام می گیرد.

در انجام PCR باید زیاد دقت شود زیرا ممکن است DNA از منابع دیگر غیر از DNA مورد نظر نظیر سلولهای شاخی پوست فرد آزمایش کننده هم تکثیر شده و ایجاد آلودگی کند . این موضوع باعث نتیجه مثبت کاذب خواهد شد مگر اینکه کنترل های مناسبی جهت تشخیص چنین خطاهایی در نظر گرفته شده باشد.

مزیت دیگر PCR زمان کوتاه مورد نیاز برای بررسی نمونه هاست . با استفاده از Taq DNA پلیمراز مقاوم به حرارت که از باکتری گرما دوست aquaticus ساکن چشمه های آب گرم استخراج شده است . می توان تکثیر DNA هدف را طی چند ساعت توسط PCR انجام داد . در حالیکه جهت کلونینگ DNA بوسیله روشهای in vivo که برپایه استفاده از سلولها هستند باید چند روز یا چند هفته زمان صرف کرد.

دستگاههای Real-tim PCR این زمان را به کمتر از یک ساعت تقلیل داده اند که در آنها از فن آوری فلورسانس برای کنترل تولید محصولات PCR در هر سیکل PCR استفاده می شود، در نتیجه نیازی به الکتروفورز روی ژل وجود ندارد.

روشهای بررسی DNA

- **پروب های اسید نوکلئیک** : اینها معمولاً DNA تک رشته ای هستند که بصورت رادیو اکتیو یا غیررادیواکتیو نشاندار شده اند و برای آشکار سازی قطعات DNA یا RNA دارای همولوژی با آنها بکار می روند. پروبهای DNA را میتوان از منابع مختلف نظیر توالیهای تصادفی DNA ژنومی ژنهای خاص ، توالیهای DNA ، یا الیگونوکلئوتیدهای سنتز شده از روی توالی اسید آمینه ای پروتئین ها تهیه کرد. پروب های DNA به روشهای مختلف نشاندار می شوند مثلا مواد رادیو اکتیو یا فلورسنت که برای آشکار کردن اولی اتورادیو گرافی و دومی بکارگیری طول موج مناسب لازم است.

- **هیبریداسیون اسید نوکلئیک** : برای اینکار DNA حاصل از دو منبع را که قبلاً بوسیله حرارت یا قلیا واسرشت شده و به شکل تک رشته ای در آمده اند ، با هم مخلوط می کنند که تحت شرایط مناسب براساس رابطه

مکملی بین توالیهای همولوگ ، با هم تشکیل جفت باز می کنند . اگر یکی از منابع DNA به طریقی نشاندار شده باشد (پروب) می توان وجود توالیهای خاص در منبع دیگر را آشکار نمود. دو روش اصلی و رایج ساترن بلات و نورترن بلات هستند .

ساترن بلات: این روش که به افتخار کاشف آن ادوین ساترن نام گذاری شده است به شرح زیر می باشد. پس از برش DNA توسط آنزیم محدود کننده و الکتروفورز قطعات حاصل از برش برروی ژل آگاروز ، قطعات براساس اندازه روی ژل از هم جدا می شوند . قطعات بزرگتر چون آهسته تر حرکت می کنند بالاتر از قطعات کوچکتر قرار می گیرند . قطعات DNA روی ژل بوسیله تیمار با قلیا واسرشت و به شکل تک رشته ای در می آیند . نسخه دائمی از این قطعات تک رشته با انتقال آنها روی فیلتر نیترو سلولوزی که DNA بآن متصل می شوند بدست می آید که به آن ساترن بلات گفته می شود.

قطعه DNA خاص مورد نظر از میان مجموعه قطعات متصل به فیلتر را می توان با پروب نشاندار شده رادیو اکتیو که تک رشته ای شده است و برای هیبریداسیون در مجاورت قطعات موجود روی فیلتر قرار داده می شود و متعاقب آن با انجام اتورادیوگرافی آشکار نمود . روشهای ساترن بلات غیر رادیو اکتیو با استفاده از DNA پروب های نشاندار شده با مواد کمی لومینسانس نیز مطرح هستند .

نورترن بلات: تفاوت این روش با ساترن بلات استفاده از mRNA به عنوان اسید نوکلئیک هدف در همان فرآیند می باشد . بعلت وجود ریبونوکلئازهای سلولی mRNA بسیار ناپایدار است . استفاده از مهار کننده های ریبو نوکلئازها امکان استخراج mRNA را فراهم می کند که اگر این mRNA روی ژل الکتروفورز شود می تواند روی فیلتر منتقل شود. هیبریداسیون فیلتر حاوی بلات با پروب DNA نشاندار شده با رادیو اکتیو امکان تعیین اندازه و مقدار رونوشت mRNA موجود در روی فیلتر را فراهم می کند به این روش نورترن بلات گفته می شود. با ابداع Real-time PCR و فن آوری ریز آرایه برای مطالعات بیان ژن نورترن بلات کمتر استفاده می شود.

تشخیص جهش ها

انتخاب روش بستگی به این موضوع دارد که آیا هدف ، تشخیص جهش های شناخته شده است یا تشخیص هر نوع جهش در یک ژن خاص ، روشهای مختلفی را می توان بکار برد که تفاوت آنها در سادگی استفاده آنها و میزان قابل اعتماد بودن نتایج حاصل از آنهاست . انتخاب روش آزمایش به عوامل مختلفی نظیر حساسیت لازم ، هزینه ، ابزار، اندازه و ساختمان ژن (شامل تعداد چند شکلی ها) بستگی دارد. اگر یک واریانت از یک توالی توسط یکی از روشهای غربالگری جهش شناسایی شود باید آن جهش توسط تعیین توالی DNA تایید شود.

نکته : PCR سیستم جهش مقاوم به تکثیر (Amplification – refractory mutation system) که بطور مخفف ARMS- PCR نامیده می شود. معمولترین شیوه آن سنجش دو تیوبی است که در یکی از آنها پرایمرهای اختصاصی توالی طبیعی و در دیگری پرایمرهای ویژه توالی جهش یافته همراه با پرایمرهای کنترل که

جهت اطمینان از انجام واکنش PCR بکار می روند می باشد. از مهمترین کاربردهای این روش تشخیص جهش های عامل فیبروز کیستیک است .

نکته: یک روش دیگر برای شناسایی جهش های عامل فیبروز کیستیک سنجش اتصال الیگو نوکلئوتیدها است .

نکته: Real – time PCR روشی برای شناسایی جهش ها است به عنوان مثال تشخیص جهش فاکتور پنج Leiden

نکته: ریز آرایه های DNA (DNA microarray) یا تراشه های DNA (DNA chips) شامل الیگو نوکلئوتیدهای ۲۰ تا ۲۵ جفت بازی طراحی شده برای توالی DNA طبیعی و جانشینی های تک نوکلئوتیدی شناخته شده و یا احتمالی موجود در یک ژن می باشند آنها به یک تراشه و با آرایش مشخص متصل می شوند که به ریز آرایه موسوم است .

DNA نمونه که باید جهت جهش غربالگری شود ، بوسیله PCR تکثیر شده و با فلورسانس نشاندار گشته و با الیگونوکلئوتیدهای ریز آرایه هیبریداسیون انجام می گیرد. الگوی رنگ ریز آرایه پس از هیبریداسیون با کامپیوتر بررسی شده و امکان تشخیص سریع جهش ها فراهم می گردد. این روش در تشخیص جانشینی های بازی شناخته شده یا SNP ها (Single nucleotide polymorphism) بسیار موفق بوده است .

نکته: الکترو فورز موئینه حساس به شکل فضایی (Conformation – sensitive capillary electrophoresis) که بطور خلاصه CSCE نامیده می شود برای آشکار سازی وجود هترودابلکس به کمک فن آوری فلورسانس بکار می رود . می توان با استفاده از رنگ های فلورسانس متعدد چندین نوع محصول PCR را همزمان بررسی کرد وجود یک تغییر در توالی DNA باعث ایجاد شکل فضایی متفاوت می گردد که حرکت الکتروفورزی متفاوتی دارد و میتوان از یک پلیمر مناسب برای شناسایی استفاده کرد. نکته : بررسی منحنی ذوب با قدرت تفکیک بالا (High- resolution melt curve analysis) این روش گروه جدیدی از رنگ های فلورسنت را که بین دو رشته DNA جای می گیرند اما قابل اتصال به DNA تک رشته نیستند را به کار می گیرند . رنگ فلورسنت بین دو رشته DNA محصول PCR جای می گیرد . پس محصولات PCR بوسیله حرارت بصورت تک رشته ای در می آیند . سطح فلورسانی به موازات واسرشت شدن DNA کاهش می یابد و این الگوی ذوب شدن به توالی و طول محصول PCR بستگی دارد.

نکته: توالی یابی سانگر روش استاندارد طلایی برای غربال گری جهش ، تعیین توالی DNA با روش خاتمه سنتز زنجیره توسط دی دئوکسی نوکلئوتیدهاست که در ۱۹۷۰ توسط فرد سانگر ابداع شده است. در ابتدا نشاندار کردن با مواد رادیو اکتیو و تفسیر دستی بود ولی حالا استفاده از فلورسانس و سیستم های کامپیوتری جای آن را

گرفته است. تعیین توالی دی دئوکسی شامل استفاده از یک DNA الگوی تک رشته ای مثلاً محصولات PCR واسرشت شده برای سنتز رشته های مکمل توسط DNA پلیمراز و یک پرایمر مناسب می باشد.

نکته: توالی یابی پایرو (Pyro sequencing) با یک روش سنتزی عمل می کند که در آن نوکلئوتیدهای تغییر یافته یک به یک به واکنش اضافه شده و در آن واحد متعاقب آن از واکنش خارج می شوند در این فرآیند بعد از افزایش هر نوکلئوتید سیگنالهای کمی لومینسانس تولید می شود. این فناوری به سرعت اطلاعات کمی از توالی ها ایجاد می کند و نمونه ای از کاربرد آن در شناسایی جهش های KRAS در بیماران مبتلا به سرطان کلورکتال در شکل ۲۴ نشان داده شده است (لازم به ذکر است فناوری توالی یابی پایرو توسط پروفسور رونقی دانشمند ایرانی مقیم امریکا ابداع شده است .)

نکته: توالی یابی کلونال نسل بعدی (Next – generation clonal sequencing): تقاضا برای توالی یابی کم هزینه باعث شده است تا فناوری های توالی یابی ظرفیت بالا که قادرند میلیونها توالی را بطور همزمان تولید کنند، بوجود آیند. توالی یاب های کلونال نسل بعدی یک مرحله کلونینگ در لوله آزمایش را به کار می گیرند تا مولکولهای DNA خاص را بوسیله PCR تکثیر دهند. سپس مولکولهای DNA کلون شده یا بوسیله توالی یابی پایرو با استفاده از پایان دهنده های قابل برگشت و یا با توالی یابی به روش لیگاسیون به موازات هم توالی یابی می شدند.

بررسی دوز (Dosage analysis)

اغلب روشهایی که در بالا شرح داده شده اند می توانند جهش های نقطه ای حذف ها و درج های کوچک را شناسایی کنند. حذف یک یا چند اگزون که در پسران مبتلا به دیستروفی عضلانی دوشن رایج است بوسیله انجام یک PCR چندگانه و عدم وجود یک یا چند تا از محصولات PCR قابل تشخیص می باشد (اما این جهش ها در افراد مونث ناقل به علت حضور ژن طبیعی بر روی کروموزوم X نرمال ، بسیار سخت تر تشخیص داده می شوند).

جهش های از نوع حذف ها یا درج های بزرگ در تعدادی از بیماریها گزارش شده اند وممکن است شامل یک اگزون، چند اگزون و یا یک ژن کامل باشند. چندین روش برای شناسایی چنین جهش هایی ایجاد شده است.

روش تکثیر پروب وابسته به اتصال بصورت چندگانه (Multiplex ligation dependent probe amplification) که بطور خلاصه MLPA نامیده می شود یک روش جدید با قدرت تفکیک بالاست که برای شناسایی حذف ها و درج ها بکار می رود. هر پروب MLPA شامل دو الیگونوکلئوتید نشاندار شده با فلورسانس است که میتوانند مجاور هم با توالی ژن هدف دو رگه شوند . پس از دورگه شدن ، دو الیگو نوکلئوتید بوسیله لیگاز بهم متصل می شوند و سپس بوسیله PCR پروب تکثیر می شود .پروب ها حاوی یک قطعه توالی با طول متغیر هستند که امکان جداسازی محصولات PCR را بوسیله الکترو فورز موئینه فراهم می کند . تا ۴۰ پروب می توانند در یک واکنش تکثیر شوند.

بررسی دوز بوسیله PCR فلورسانس کمی (Quantitative fluoresent) که بطور خلاصه QF- PCR نامیده می شود بطور روزمره برای غربالگری آنیلوپلوئیدی بکار می رود . مثلا جهت تشخیص پیش از تولد ، میکروستلایت های واقع در کروموزوم های ۱۳و۱۸و۲۱ می توانند در یک آزمایش PCR چندگانه تکثیر شوند و تریزومی ها از طریق وجود سه آلل یا بوسیله اثر دوز که در آن یک آلل حضور قوی تری نسبت به حالت معمول دارد، تشخیص داده شوند .

آرایه CGH یا آرایه دورگه سازی ژنومی مقایسه ای ، روشی برای تشخیص حذف ها و مضاعف شدگی ها در سطح کل ژنوم مهیا می کنند . آرایه هایی که در آزمایشگاههای تشخیص طبی بکار می روند در بردارنده هم پروب های کل ژنوم برای تشخیص جهش های جدید و هم پروب های اختصاصی سندرم های حذف و مضاعف شدگی شناخته شده هستند. در صورتی که DNA ژنومی بجای محصول PCR بعنوان الگوی اولیه در تکثیر کلون ها بکار رود . امکان به دست آوردن اطلاعات مربوط به تعداد کپی از توالی یابی های نسل بعدی نیز وجود دارد.

چند شکلی های تک نوکلئوتیدی (Single nucleotide polymorphism) که بطور خلاصه SNP نامیده می شوند اغلب دوآللی بوده هم در توالی های کد کننده و هم غیر کد کننده وجود دارند. اگر یک SNP در محل شناسایی یک آنزیم محدود کننده قرار گیرد. طول قطعات حاصل از برش با آن آنزیم در افراد مختلف متفاوت خواهد بود. این تفاوت با تغییر تحرک قطعات هضم شده روی ژل اکلتروفورز قابل شناسایی است لذا به آن چند شکلی طول قطعات هضم شده (Ristrection fragment length polymorphism) گفته می شود. در مطالعات اولیه تعیین نقشه ژنتیکی، از ساترن بلات برای تشخیص RFLP ها استفاده می شد اما فن آوری کنونی امکان تشخیص هر SNP را میسر ساخته است.

تکرارهای پشت سر هم با تعداد متغیر (Variable number tandem repeats): VNTR ها به شدت چند شکل هستند و این چند شکلی به خاطر وجود تعداد متغیر از تکرارهای پشت سر هم یک توالی DNA کوتاه می باشد و به روش مندلی هم بارز (Co-dominant) به ارث می رسند.

نکته : مزیت استفاده VNTR ها نسبت به SNP ها تعداد زیاد آلل های هر VNTR در مقایسه با SNP ها که معمولا دو آللی هستند می باشد.

مینی ساتلایت ها: توالیهای تکراری با اندزه مختلف که بوسیله یک توالی مرکزی کوتاه شناخته می شوند مینی ساتلایت نامیده می شوند. مینی ساتلایت ها بشدت چند شکل هستند و الگوی منحصر به فرد مربوط به هر نفر تحت عنوان انگشت نگاری DNA (DNA fingerprint) توصیف شده است. (روش انگشت نگاری DNA در شناسایی رابطه پدر – فرزندی و موارد جنایی (پزشکی قانونی) بطور گسترده استفاده می شود).

میکرو ساتلایت ها: ژنوم انسان حدود ۵۰ تا ۱۰۰ هزار قطعه از تکرارهای پشت سرهم با تعداد متغیر از توالی دی نوکلئوتیدی CA:GT دارد که تکرارهای CA، میکرو ساتلاست نامیده می شوند. تفاوت در تعداد تکرارهای

CA در هر جایگاه بین افراد مختلف، بسیار چند شکل است و این توالی ها با الگوی هم بارزی مندلی به ارث می رسند. این میکرو ساتلایت ها را می توان با PCR بررسی کرد و استفاده از روشهای آشکار سازی فلورسانس امکان بررسی همزمان تعداد زیادی نمونه را فراهم کرده است . در نتیجه بررسی میکروساتلایتها در موارد تشخیص رابطه پدر – فرزندی واثبات تک تخمکی با دو تخمکی بودن تا حد زیادی جایگزین روش انگشت نگاری DNA شده است.

کاربردهای بالینی ردیابی ژنی: اگر یک ژن بوسیله مطالعات پیوستگی تعیین نقشه شده ولی شناسایی نشده باشد ، میتوان با استفاده از مارکرهای پیوسته به آن ، هاپلوتیپ جهش یافته در یک خانواده را ردیابی نمود . از این روش همچنین برای شناسایی جهش ناشناخته مورد بررسی در یک خانواده ، در یک ژن شناخته شده هم استفاده می شود . معمولا میکرو ساتلایت های واقع دردو طرف ژن مورد نظر و یا میکرو ساتلایتهای درون ژن استفاده می شوند ، زیرا احتمال یافتن SNP های آگاهی دهنده (informative) درون خانواده ها پائین است.

Insitu PCR (PCR داخلی سلولی)

این تکنیک ترکیبی از آزمایش PCR و هیبریداسیون در داخل سلول است . با استفاده از این تکنیک DNA ویروس و ژن های تک رشته ای و ژنهای rearrangement (با سازماندهی مجدد) و RNA ویروسی (به روش RT- PCR) قابل کشف و ارزیابی می باشد.

مشکل ترین و بحرانی ترین قسمت آزمایشات ، تهیه نمونه های سلولی یا بافتی وفیکس نمودن آنها همراه با پروسه نیمه تراوا نمودن غشاء سلولی است که رعایت آنها انجام PCR را موفق می گرداند. همچنین باید موارد زیر را رعایت نمود :

۱- انجام مراحل PCR و چرخه حرارتی نبایستی مرفولوژی سلولی را تخریب نماید.
۲- مواد لازم برای کنش PCR بایستی بتواند از دیواره نیمه تراوا عبور و به داخل سلول نفوذ نماید.
۳- محصولات PCR در درون سلول نبایستی از طریق غشاء نیمه تراوا به بیرون راه پیداکند.
۴- در حین انجام PCR و یا انجام عملیات ارزیابی ژن ، چسبندگی سلول ها یا بافت ها به لام نبایستی از بین رفته و خشک شود. واکنش های PCR با قرار دادن اسلاید بر روی جایگاه مخصوص حرارتی در ترموسایکلر انجام شده و ردیابی محصولات PCR بصورت مستقیم و یا غیر مستقیم انجام می گیرد. در صورتی که سکانس های تکثیر یافته با نوکلئوتیدهای غیر ایزوتوپیک نشان دار شده باشد، محصول PCR به روش مستقیم ایمونو هیستو شیمیایی قابل ارزیابی خواهد بود. در روشی غیر مستقیم کشف و ارزیابی محصولات PCR با استفاده از یک مرحله اضافی انجام هیبریداسیون در insitu و استفاده از پروب های اولیگونوکلئوتیدی مخصوص آمپلی کون امکان پذیر است. این روش حساسیت بیشتری دارد ولی سرعت

دسترسی به نتایج کمتر از روش مستقیم است. در روش مستقیم مواد اختصاصی و غیر اختصاصی هر دو تکثیر می یابند در صورتی که در روش غیر مستقیم تنها مواد اختصاصی مورد نظر تکثیر پیدا می کند. این روش آنالیز جهت آزمایش های روتین یا غربالگری ممکن است پایه و اساس کشف و ارزیابی ژنتیکی به طریقه مستقیم قرار گیرد که از اهمیت ویژه ای برخوردار است.

تکنیک ARMS سیستم جهش مقاوم به تکثیر :

(**Amplification Refractory Mutation system**) یک متد ساده وسریع برای کشف موتاسیون های نقطه ای و حذف یا اضافه شدن نوکلئوتیدهای کوچک در DNA مورد آزمایش می باشد. این روش ابتدا در بیماران با کمبود آلفا ۱ آنتی تریپسین و سپس جهت تشخیص قبل از تولد و کشف ناقلین سیستیک فیبروزیس و بتا تالاسمی به منظور آزمایش تک باز مورد اختلاف در DNA بیماران مذکور با افراد سالم شرح داده شده است. این تکنیک بطور موفقیت آمیزی برای آنالیز پلی مورفیسم ها ، موتاسیون ها در رده ای از سلولها و موتاسیون های سوماتیک قابل انجام است.

ARMS جهت کشف ناقلین و تشخیص بیماریهای ارثی جنین قبل از تولد و نیز وجود عامل بیماری در حین و پس از درمان کانسر کاربرد دارد.

به ARMS , Allele – specific PCR (ASP) هم گفته می شود.

تکنیک ARMS شامل دو واکنش PCR می باشد یک واکنش با یک نوع پرایمراز جفت پرایمر ویژه برای یک آلل و واکنش دیگر با پرایمر دیگر از جفت پرایمر ها برای آلل دیگری انجام می شود.

در شرایط صحیح وقتی یک پرایمر می تواند به عنوان یک الگو برای DNA پلیمراز عمل کند که نوکلئوتید انتهای ۳ پریم آن بطور کامل با سکانس هدف مکمل باشد بنابراین اگر پرایمر نرمال با DNA ژنومیک موتان و یا بر عکس پرایمر موتانت با DNA نرمال جفت گردد نمی تواند به عنوان یک الگوی صحیح برای تکثیر DNA قرار گیرد. لذا در پایان واکنش PCR محصولی مشاهده نخواهد شد.

تکنیک چند تایی (Multiplex method)

در یک آزمایش PCR ممکن است که چندین قطعه DNA هدف مورد تکثیر واقع گردد. بنابراین با استفاده از چندین جفت پرایمر در یک آزمایش توانایی تشخیص ژنتیکی بصورت مولتی پلاس فراهم می آید .

تکنیک چند تایی در سه مسیر اصلی امکان پذیر است .

۱- روش دات بلات معکوس
۲- روش تهیه نقشه ژنی نقاط حذف شده که در این مورد بیماری دیستروفی عضلانی دوشن شاخص است.

۳- آنالیز حذف های کوچک ژنی ، فریم شیفت ها و موتاسیون های نقطه ای ، جایی که تعداد متنوعی از موتاسیون ها منجر به فنوتیپ کلینیکی مشخصی می شود که بیمار سیستیک فیبروزیس مورد مثال آن می باشد.

ترانس کریپتاسیون معکوس واکنش زنجیره ای پلیمراز (Reverse Transcription PCR)

واکنش PCR را می توان بصورت ترکیب با واکنش ترانس کریتپاسیون معکوس جهت تکثیر یک mRNA اختصاصی بکار برد. محصول بدست آمده می تواند برای تشخیص سکانس و یا ترانسفر نمودن ژن استفاده شود. اولین مرحله در واکنش RT- PCR سنتز cDNA است که با کمک RNA جدا شده آنزیم ترانس کریپتاز معکوس و پرایمرهای مناسب امکان پذیر می باشد. CDNA حاصل به کمک انجام PCR و با همان تکنیکی که برای تکثیر DNA بکار می رود تکثیر می شود. برای تکثیر یک cDNA مخصوص ، پرایمر بایستی مکمل پایانه ۳ پریم cDNA برای اولین دور سنتز DNA باشد و برای ادامه عمل تکثیر می بایست پرایمرهای مکمل برای پایانه های ۳ پریم و ۵ پریم وجود داشته باشد.

هر چه پرایمرها طویل تر باشند هیبریداسیون بین cDNA و پرایمرها اختصاصی تر بوده و احتمال کمتری است که یک cDNA نامربوط تکثیر گردد.

آزمایش PCR چند تایی در دیستروفی عضلانی دوشن (DMD(Duchene Muscular Dystrophy یک بیماری وابسته به کروموزوم x و یک بیماری تحلیل برنده عضلات می باشد. معمولاً مرگ در اثر نارسایی تنفسی و تا سن ۲۰ سالگی رخ می دهد. ژن معیوب در این بیماری ژن دیستروفین می باشد. عمده موتاسیون های ژن دیستروفین حذف های می باشند و بطور عمده در ۲ ناحیه hot-spot یافت می شوند. در روش انالیز مولتی پلکس، پرایمر PCR برای تکثیر هم زمان در نزدیک اگزون هایی از ژن دیستروفین که دچار حذف شده اند قرار می گیرند.

هر ناحیه ای در DNA بیمار که بعلت نقص نتواند تکثیر شود با کمک الکتروفورز ژل آگارز مشخص می گردد. اگر کنترل های مناسبی مانند DNA مرد سالم بعنوان کنترل مثبت و نمونه فاقد DNA بعنوان کنترل منفی وارد آزمایش شود مانع از تشخیص اشتباه می گردد . این روش به کشف سریع ۹۸ ٪ نواحی دارای حذف های DMD کمک کرده و یک تشخیص سریع را در مقایسه با روشهای قبلی ساترن بلات فراهم نموده است.

PCR-RFLP: (Restriction Fragment Length polymorphism)

آزمایش RFLP در ابتدا با استفاده از روش ساترن بلات انجام می گرفت که در این صورت به یک هفته زمان نیاز داشت. در حال حاضر این آزمایش به روش PCR قابل انجام است و جهت انجام آن نیاز است که سکانس DNA مورد نظر شناخته شده باشد . در صورتی که سکانس مورد نظر شناخته نباشد. لازم است بوسیله کلون کردن قطعات DNA مورد نظر که با پروب آشکار شده اند سکانس قطعه کلون شده تعیین گردد. سکانس

های DNA اطراف قطعه مورد نظر بایستی مشخص شده و متعاقباً پرایمرهای PCR بر آن مبنا طراحی گردد. پس از انجام PCR محصول بدست آمده با آنزیم برش دهنده مناسبی هضم شده و سپس با جدا کردن قطعات تکثیر شده بوسیله الکتروفورز، با در نظر گرفتن محل اثر آنزیم ها ، وجود و یا عدم وجود قطعه مورد نظر مشخص می گردد.

کاربرد های PCR

بیماری های بدخیم

PCR میتواند به تشخیص لتوم ها ، لوسمی ها با شناسایی جابجایی ها مثلا جابجایی ۲۲: ۹ که مشخصه بیماری لوسمی میلوئیدی مزمن (CML) است کمک کند. حساسیت فوق العاده PCR گویای آن است که حداقل بیماری باقیمانده پس از درمان این بیماریها را می توان با PCR آشکار کرد و همچنین امکان تشخیص زود هنگام عود احتمالی بیماری توسط PCR امکان انتخاب روش درمان را فراهم می آورد. بعنوان مثال تمام بیماران مبتلا به CML درمان شده با داروی Imatinib که باز دارنده تیروزین کیناز است . بطور مرتب جهت بررسی بوجود آمدن کلون های مقاوم به درمان کنترل می شوند. پس از انجام پیوند مغز استخوان مارکرهای SNP یا میکرو ساتلایت ها می توانند برای کنترل موفقیت پیوند بوسیله بررسی آلل های اختصاصی فرد بیمار و فرد اهدا کننده مورد استفاده قرار گیرند.

بیماریهای عفونی

می توان از PCR برای تشخیص وجود توالی های DNA ارگانیسم عفونت زا قبل از یافتن شواهد معمول ، مثلا بررسی پاسخ آنتی بادی یا نتایج کشت ، استفاده کرد. مثلا غربالگری فرآورده های خونی برای وجود توالی های DNA اختصاصی HIV و مثال دیگر شناسایی توالیهای DNA اختصاصی باکتریها و ویروسهای عامل بیماریهای عفونی حاد . روش Real-time PCR خصوصا در مورد مبارزه با استاف اورئوس مقاوم به متی سیلین می تواند بسیار مفید باشد و بیماران ناقل در بیمارستان به سرعت شناسایی شده ، از بقیه جدا گشته ، خطر سرایت بیماری به سایرین را به حداقل برساند .PCR را می توان جهت یافتن طیف وسیعی از ارگانیسم ها در مواد غذایی ، مواد موجود در محیط زندگی ، مواد بیولوژیک یا بافت ها استفاده نمود. کشف ارگانیسم های بیماری زا در صنعت غذایی ، بررسی آلودگی های محیطی در پزشکی یا دامپزشکی و یا علوم گیاهی به عنوان کاربردهای اساسی PCR مطرح است .

اولین محدودیت در کاربرد PCR جهت مصارف تشخیصی ، قسمتی از DNA می باشد که بایستی قبلا در ارگانیسم های مورد نظر شناسایی شده و مورد مشابهی نداشته باشد زیرا سکانس های مشابه DNA باعث ایجاد پاسخ های مثبت کاذب می شود. ویژگی اساسی PCR در کشف پاتوژنها، قابلیت کشف حتی یک عدد سلول یا یک ویروس در نمونه مورد آزمایش می باشد. روش های معمولی کشت ارگانیسم های پاتوژن به چند هفته زمان نیاز دارد ولی سنجش با روش PCR در چند ساعت قابل انجام است . بعضی از ارگانیسم ها قابل کشت در آزمایشگاه نمی باشند و بعضی دارای شرایط کشت بسیار مشکل هستند لذا PCR راهی برای کشف چنین پاتوژن هایی است .

کشف و شناسایی قارچ ها بعلت مشخص نبودن سیستم ژنتیکی تمامی آنها هنوز در مرحله ابتدایی است . به هر حال آسپرژیلوس فومیگاتوس که ایجاد آسپرژیلوسیس و گاهی ایجاد پنومونی کشنده در افرادی که

ایمونوساپرس هستند می کند به طریقه PCR قابل کشف می باشد . از PCR جهت شناسایی کاندیدا آلبیکانس در مطالعات اپیدمیولوژی و بیماری های سیستماتیک کاندیدایی استفاده می گردد .

ویروسها :

۱- رتروویروسهای انسانی : مانند HIV تیپ ۱و ۲ و HTLV تیپ ۱و ۲ از طریق RNA تکثیر پیدا می کنند . جهت کشف RNA در نمونه بایستی ابتدا با استفاده از آنزیم ترانس کریتپاز معکوس یک رشته DNA مکمل برای PCR تهیه نمود . در مرحله مخفی عفونت (Latency) نسخه برداری بی اثر است با وجود آن عفونت های پنهان بارتروویروسها در حالت سیکل تکثیر رتروویروس قابل کشف است . این چرخه تکثیر شامل تبدیل RNA تک رشته ای ژنوم ویروس به یک مولکول دو رشته ای حلقوی پروویروس DNA در داخل سلول میزبان می باشد. DNA پروویروس به داخل DNA سلول میزبان ادغام می شود و بنابراین عفونت های مخفی از عفونت های در حال پرو لیفراسیون قابل تمیز بوده و این اجازه را میدهد که مراحل پیشرفت بیماری قابل پیگیری باشد. تشخیص بین مرحله مخفی با پرولیفراسیون عفونت به کمک سنجش RNA با RT PCR در مرحله پرولیفراسیون عفونت و سنجش DNA ویروسی در هر دومرحله Latent و پرولیفراسیون قابل انجام است. سنجش کمی PCR این امکان را فراهم نموده که DNA ویروسی در افرادی که دچار عفونت بوده وتحت درمان می باشند قابل پیگیری و ارزیابی باشد.

۲- سایر ویروسهای مهم از لحاظ بالینی : HBV یک ویروس hepadna است که توسط یک RNA مشابه رتروویروس ها رپلیکاسیون انجام می دهد. در این عفونت DNA ویروس در داخل DNA ژنوم سلولی ادغام می شود . حتی در نمونه های سرولوژی منفی هم PCR قابلیت کشف مارکرهای HBV را دارد.

HPV ها ویروس های واجد DNA و متعلق به گروه پاپووا ویروسها هستند که تاکنون ۴۰ نوع از آنها شناخته شده است. این ویروس ها با طیف وسیعی از نمونه های پاتولوژیک مانند زگیل ها ، تومورهای خوش خیم و تعدادی از بدخیمی ها در ارتباط می باشند . تیپ های ۱۶ و ۱۸ با دیسپلازی های سرویکس و کارسینوم آن در ارتباط هستند و تیپ های ۶ و ۱۱ باکوندیلومای خوش خیم رابطه دارد . PCR در آنالیز انواع HPV حاصل از نمونه های پاتولوژیک بکار می رود.

باکتریها :

بطور مثال سالمونلا ، ویبریو کلرا وشیگلا و همچنین لژیونلاپنوموفیلا (در آب برج های خنک کننده) PCR قابل شناسایی هستند . آزمایش PCR جهت باکتریهای پاتوژن خاک مثل باسیلوس آنتراسیس و ارگانیسم عامل سیاه زخم (آنتراکس) نیز قابل انجام است . در ضمن جهت تشخیص عامل توبرکلوزیس (مانند مایکو باکتریوم توبرکلوزیس) نیز PCR قابل استفاده است. همچنین جهت تشخیص استاف اورئوس و استرپتوکوکوس پیوژن نیز کاربرد دارد . استفاده از **PCR** در تشخیص و طبقه بندی سرو تایپ های ارگانیسم ها بسیار مفید است.

آنالیز نمونه های بافتی

مقاطع بافتی که به روشهای هماتوکسیلین – ائوزین رنگ آمیزی می شوند و اغلب درفرمالین فیکس شده اند و در بلوک های پارافینی نگهداری می شوند هدف آنالیز می توانند باشند . DNA موجود در این نمونه ها را میتوان استخراج و PCR نمود. اخیرا بکارگیری PCR جهت استفاده از RNA را برای نمونه های فیکس شده در فرمالین و بلوک های پارافینی گزارش نموده اند . تکنیک PCR این امکان را فراهم نموده که تعداد زیادی از نمونه های بافتی و عامل عفونت موجود درنمونه ها را . حتی متعلق به ۴۰ سال پیش بررسی گردد.

در ابتدا مقاطع بافتی از بلوک های پارافینی بافت ها برش داده شده و سپس پارافین اطراف مقاطع بافتی ذوب و نمونه رنگ آمیزی شده و روی لام زیر لامل قرار می گیرد (لامل با رزین روی لام نگهداری می شود) جهت استخراج DNA ازچنین نمونه هایی ابتدا بایستی رزین های نگهداری کننده لامل برروی لام را برای مدت ۱ تا۲ روز در گزیلن بصورت محلول در آورد . سپس مقاطع بافتی را در لوله میکرو سانتریفوژ تراشیده و با پروتئناز K برای حداکثر ۵ روز انکوبه نمود متعاقباً نمونه دپروتئینه شده و بقایای تجزیه شده پروتئین را با اتانول رسوب داده و برای PCR آماده نمود . این روش تنها راه استخراج DNA از این نمونه ها می باشد. امکان تخریب DNA در مقاطع حاصل از نمونه های رنگ آمیزی شده با هماتوکسیلین و ائوزین وجود دارد . با این حال اگر بلوک پارافینی نمونه پاتولوژیک غیر قابل دستیابی باشد روش فوق تنها راه حل میباشد.

در مقاطع بافتی فیکس شده در فرمالین بدلیل اینکه محلول فرم آلدئید با DNA واکنشی نشان نمی دهد برای انجام PCR خوب است مگر اینکه DNA دناتوره شده باشد یا مدت زیادی در فرمالین باقی مانده باشد از نظر استخراج DNA و انجام PCR مراحل شبیه آن درمقاطع بافتی در بلوک های پارافینی است .

گاهی DNA جدا شده در این روش به خوبی قابل تکثیر نمی باشد و علت آن را عوامل آلوده ساز احتمالی که باعث مهار DNA پلیمراز taq در نمونه ها می شود را می دانند.

مواد سلولی اگزفولیتیو : نمونه های حاصل از آسپیراسیون ، شستشو یا خراشیدن لایه های سلولی مثل (تست اسمیرسرویکال) را مواد اگزفولیتیو گویند. در صورتی که تعداد سلول ها به اندازه کافی باشد ، استخراج DNA شبیه روش گفته شده در بالا انجام می شود ولی اگر تعداد سلول ها کم باشد اطراف سلول ها را برروی اسلاید بالاک ناخن بصورت دایره ای شکل محدود نموده و ایجاد یک چاهک مینمایند. سپس پروتئیناز k را برای هضم پروتئین در روی اسلاید اضافه نموده و متعاقباً پس از انجام پروسه و گذشت زمان لازم محتوای داخل چاهک را با یک پی پت به یک لوله میکروسانتریفوژ انتقال داده و جهت انجام PCR آماده مینمایند.

آشکار نمودن بقایای بیماری بعد از درمان سرطان :

یکی ازکاربردهای مفید PCR کشف نوترکیبی های کروموزومی می باشد که با بدخیمی های هماتولوژی همراه است. مثلا CML با کروموزوم غیر عادی فیلادلفیا که از ترانس لوکیشن متقابل کروموزوم های ۹ و ۲۲ تشکیل شده و منجر به یک ترکیب ژنی می شود همراه است. این ترکیب ژنی از نظر نسخه برداری فعال بوده و می تواند به وسیله RNA PCR کشف گردد. MRNA حاصل از چنین ترکیب ژنی در یک رقت ۱ به ۱۰۰۰۰۰ و همچنین در نمونه های بیماران CML که در فاز بهبودی (remission) که داری ریسک بالایی برای برگشت به بیماری هستند می دهد.

آزمایش یک سلول برای تشخیص در مرحله Pre implantation

تشخیص بیماری ژنتیکی توسط PCR می تواند روی جنین انسان که بوسیله لقاح درمحیط خارج تولید شده است قبل از جایگزینی داخل رحمی انجام گیرد . آزمایشات نشان می دهند که بلاستومرها می توانند از جنین انسانی که در مرحله ۶ یا ۸ سلولی است حذف شوند . همچنین تعیین جنسیت با روش PCR برای تشخیص بیماریهای مادرزادی وابسته به جنس بسیار مهم می باشند. تشخیص قبل از کاشت داخل رحمی در بیماریهای مغلوب مادرزادی نیز مفید است . زیرا اگر آلل موتان در توده متقارن پیدا شد می تواند به یک آلل نرمال اووسیت منجر شود و سپس اووسیت را لقاح داده و داخل رحم کاشته شود.

تشخیص قبل از تولد بیماریهای ژنتیکی

امروزه بسیاری از بیماریهای ژنتیکی را می توان قبل از تولد در جنین از طریق تکنیک هایی همچون ARMS- PCR و یا PCR-RFLP تشخیص داد. در روش ARMS- PCR ابتدا تعدادی از سلولهای جنینی را استخراج کرده و با پرایمر اختصاصی برای یک ژن بیماری (پرایمر موتان) مجاور می کنند. همچنین بطور جداگانه با پرایمر ژن سالم (پرایمر نرمال) نیز مجاورو PCR انجام می گردد. پس از پایان PCR تفسیر آزمایش چنین خواهد بود:

اگر در هر دو لوله سنتز DNA انجام شود. جنین یک ژن سالم و یک ژن بیمار دارد یعنی حامل است و بیمار نیست. اگر سنتز DNA فقط در لوله ای که شناساگر مخصوص ژن بیمار وجود دارد انجام شود. جنین بیمار است و باید سقط شود . اگر سنتز DNA فقط در لوله ای که حاوی شناساگر ژن سالم است انجام شود. جنین کاملا سالم است. می توان برای تشخیص قبل از تولد از روش PCR-RFLP استفاده نمود به تنوعات طولی ایجاد شده در DNA توسط آنزیمهای محدود کننده و آشکار سازی آنها در بین افراد مختلف RFLP گفته می شود. برای مثال در مورد بیماری کم خونی داسی شکل ، ابتدا بوسیله PCR ژن یا بخش مورد نظر از ژن را تکثیر می نمایند و سپس تکنیک RFLP را بکار می برند . بطور مثال در آنمی داسی شکل . از آنزیم MSt II استفاده می شود که محل اثر آن دقیقا در محل جهش ژن بتا – گلو بین قرار دارد.

نکته: بسیاری از بیماریهای ژنتیکی در جنین ، مانند هموفیلی ، تالاسمی ، سیستیک فیبروزیس ، فاویسم ، فنیل کتون اوری و ... در دوران حاملگی قابل تشخیص می باشد.

تجزیه و تحلیل مولکولی نمونه های تاریخی

مثل آنالیز DNA میتوکندریایی ماموت ها و پیدا کردن قرابت آنها با فیل های آسیایی و تجزیه و تحلیل مولکولی انسانهای نئاندرتال از طریق نمونه های استخوان بسیار موفقیت آمیز بوده است و نشان داد که گونه هموساپینس با انسان فعلی از گونه نئاندرتالها مشتق نشده اند . همچنین مطالعات زیادی روی DNA میتوکندریایی بدنهای مومیایی کشف شده در نقاط مختلف بعمل آمده است.

نکته: ازمحدودیت های روشهای PCR در بررسی نمونه های تاریخی می توان به نتایج کاذب آن اشاره کرد که ناشی از حضور DNA جدید (ناشی از حضور محققین یا محیطی که نمونه در آن یافت شده است) بر روی نمونه های تاریخی است.

تعیین جنسیت جنین

تعدادی از اووسیت های زن را خارج می کنند و با اسپرم ها آمیزش می دهند و هر تخم حاصله را جداگانه کشت می دهند تا به حدود ۱۰ سلول برسند. سپس از هر جنین یک سلول را جدا کرده و همراه با پرایمرهای اختصاصی برای کروموزوم Y در لوله PCR وارد می کنند . سپس PCR و در پایان نیز الکتروفورز انجام می شود . در هر یک از لوله ها که جنین نر وجود داشته باشد سنتز DNA صورت می گیرد و در لوله های دیگر سنتز انجام نمی شود . همچنین از این تکنیک برای خانواده هایی که در معرض خطر بیماریهای وابسته به x مانند هموفیلی هستند نیز استفاه می شود . بدین صورت که جنین های اولیه را از نظر وجود ژن بیمار با استفاده از پرایمر اختصاصی آن مورد بررسی قرار می دهند و جنین سالم را به مادر منتقل می کنند .

دو راه دیگر برای تعیین جنسیت جنین در رحم مادر وجود دارد :

۱- تکنیک آمنیو سنتز که گاهی خطر سقط جنین یا آسیب به جنین دارد .
۲- استفاده از خون مادر : بدلیل اینکه در دوران حاملگی مقداری از سلولهای جنین وارد خون مادر می شوند . میتوان با PCR و پرایمرهای اختصاصی برای کرومزوم Y جنس جنین را تعیین کرد . چون مادر کروموزوم Y ندارد اگر جواب مثبت باشد پس مربوط به کروموزم Y جنین است و جنس مذکر تعیین می گردد.

تشخیص جهش ها و سرطانها

یک سلول سالم و یک سلول جهش یافته بطور جداگانه برای یک ژن خاص تحت PCR قرار گیرند ومحصولات حاصل با هم مقایسه شوند. به این ترتیب می توان محل جهش ، نوع جهش و هر نوع اطلاعات لازم دیگر را بدست آورد.

هر سلول بدن انسان بطور بالقوه دارای ژنهای سرطانی (انکوژن ها) می باشد و تنها یک تغییر جهش در این ژنها منجر به سرطان خواهد شد . گروهی مهمی از سرطانهای انسان به دلیل جهش در انکوژنهای RAS بوجود می آیند (مثلا انواع مختلفی از بدخیمی های سلولهای لنفوئیدی).

مثال دیگر بیماری رتینوبلاستوما می باشد که یک سرطان زودرس چشمی است و در دروان کودکی بوجود می آید. این بیماری هم زمینه ارثی دارد و هم میتواند در اثر جهش خود بخودی بوجود بیاید. بررسی این نکته به این صورت است که برای بروز این بیماری هر دو آلل باید جهش یافته باشند. حال اگر فرد یک آلل را بطور ارثی دریافت کرده باشد فقط یک جهش در آلل دیگر برای ایجاد بیماری کافی خواهد بود ولی اگر در یک فرد هردو آلل سالم باشند. برای ایجاد بیماری دو جهش در هر دو ژن مورد نیاز است. پس افرادی که یک ژن بیمار در ژنوم خود دارند. در معرض خطر بیشتری قرار دارند. برای بررسی این نکته، سلول سالم و سلولهای سالم و سلولهای بیمار شبکیه را PCR می کنند پرایمر مورد استفاده پرایمر اختصاصی برای ژن بیماری رتینوبلاستوما می باشد.

حال اگر هم در سلولهای سالم و هم در سلولهای بیمار سنتز DNA رخ دهد مشخص می شود که فرد حامل است. ولی اگر فقط در سلولهای بیمار سنتز DNA روی دهد نشان می دهد که فرد از نظر ارثی سالم است و در اثر جهش به بیماری مبتلا شده است.

این بررسی برای وجود احتمال بیمار شدن فرزندان بعدی خانواده دارای ارزش می باشد. پیشرفته ترین تکنیک بررسی بهبود سرطان بجز PCR، روش ساترن بلاتینگ است که وجود سلولهای سرطانی را تا حد یک درصد نشان می دهد. این نسبت بسیار بالا ست چون با توجه به کل سلولهای بدن سلولهای سرطانی هنوز به مقدار زیاد ممکن است وجود داشته باشند. ولی با استفاده از PCR ، دقت تعیین سلول های سرطانی تا حدود یک در یک میلیون بالا می رود . یعنی یک PCR منفی به معنای بهبودی کامل در نظر گرفته می شود.

تضمین کیفیت در بخش مولکولی آزمایشگاه

اقدامات بهینه جهت اطمینان از اعتبار نتایج آزمایش:

۱- ارزیابی کیفیت داخلی:

پایش تمام فرآیندهای آزمایشگاه از دریافت نمونه تا گزارش نتیجه شامل موارد زیر انجام گیرد:

- تدوین دستورالعمل مکتوب در مورد نوع نمونه مورد نیاز، زمان گرفتن نمونه، جزئیات حمل نمونه و تایید هویت بیمار (نمونه باید از حجم کافی برخوردار باشد، تمام اطلاعات لازم برای انجام تست را داشته باشد بر روی آن باید زمان جمع آوری نمونه نوشته شده باشد و نحوه نگه داری نمونه باید بررسی شود.)
- تعیین معیار های رد نمونه (مانند موارد مشکوک به آلودگی، وجود شواهد همولیز ،نمونه هپارینه و ...) و نظارت بر اجرای آن ها
- تدوین دستورالعمل مکتوب در مورد نحوه نگه داری نمونه ها و مواد(نگهداری نمونه های DNA و الیگونوکلئوتید ها در دمای ۲۰- تا ۸۰- درجه و در بافر TE یا درآب با درجه مولکولار، نگهداری محصولات PCR نیز در ۲۰- تا ۸۰- درجه، نگهداری نمونه های حاوی RNA حتما در دمای ۷۰- درجه).
- تهیه دستورالعمل نحوه ارجاع صحیح و ایمن نمونه ها در صورت نیاز به ارجاع
- ثبت اطلاعات مربوط به درخواست تست مورد نظر در سیستم اطلاعات آزمایشگاه هنگام ورود نمونه به آزمایشگاه و انجام فرآیند بر اساس گردش کار و SOP مربوطه
- تهیه دستورالعمل صحیح انجام آزمایش های مختلف
- استفاده از نمونه های تضمین کننده کنترل کیفی داخلی برای پایش و بررسی خطا در گردش کاری آزمایشگاه مولکولی، به این صورت که به طور تصادفی ۱۰ – ۵ در صد از نمونه های بالینی آزمایشگاه انتخاب شده و مجددا آزمایش شوند. در صورت وجود هرگونه تفاوت بین دو نتیجه همه نمونه ها بررسی و اقدامات اصلاحی انجام شود.

۲- کنترل کیفیت داخلی:

- استفاده از کنترل های داخلی موجود در کیت های تجاری در هر سری کاری به منظور تایید نتایج حاصل از انجام آزمایش

- در مواردی که تست توسط آزمایشگاه طراحی شده است آزمایشگاه بایستی برنامه کنترل کیفیت داخلی را تعیین و محدوده آن را مشخص کند.
- صرف نظر از اینکه تست با کیت تجاری انجام می شود یا آنکه در آزمایشگاه طراحی شده است بایستی مواد کنترل خارجی در هر سری کاری گنجانده شوند تا امکان بررسی توافق عملکرد بین سری ساخت متفاوت مربوط به کیت های یک تست و واکنش گرهای آن و رانش (Drift) و رانش بالقوه یک سنجش را فراهم سازد.
- نمودار های کنترل کیفی لوی-جنینگ برای تمام آنالیت های کمی رسم شود و در هر سری کاری خوانده های به دست آمده از انجام آزمایش بر نمونه های کنترل، روی نمودار های کنترل کیفی ثبت شود.

۳-ارزیابی کیفیت خارجی:

شرکت در برنامه های ارزیابی کیفیت خارجی ترجیحا از نوع پانل های جامع کنترل کیفی خارجی در صورت اجرایی شدن در کشور، به منظور ارزیابی جنبه های مختلف یک تست مولکولی. به عنوان مثال استفاده از حداقل دو نمونه با غلظت های نزدیک به غلظت نمونه های بالینی و دو نمونه با غلظت های خیلی پایین برای ارزیابی حساسیت آنالیتیکال، یک نمونه Duplicate در محدوده تصمیم گیری بالینی سنجش برای بررسی تکرار پذیری، وجود یک نمونه غیر مرتبط برای بررسی اختصاصیت و همین طور یک نمونه منفی برای ارزیابی مثبت کاذب و آلودگی احتمالی.

۴- صحه گذاری و تصدیق:

راه اندازی یک روش جدید با یک کیت یا روش جدید یا اصلاح شده نیازمند بررسی صحه گذاری و تصدیق است که شامل بررسی خصوصیات ذیل است: صحت، دقت، محدوده قابل گزارش، محدوده مرجع، حساسیت آنالیتیکال و اختصاصیت آنالیتیکال.

- ارزیابی صحت: با استفاده از مواد مرجع یا استاندارد یا محاسبه آن به صورت کیفی از طریق میزان بازیابی(Recovery)
- ارزیابی دقت: با استفاده از انحراف معیار یا ضریب تغییرات. برای بررسی میزان دقت در PCR کمی می توان از انحراف معیار نسبی استفاده کرد. برای این کار باید انحراف معیار یک نمونه که ۳ بار یا بیشتر به دستگاه دادهایم را از میانگین آن حساب کرده و در ۱۰۰٪ ضرب کنیم. با کاهش دقت، میزان انحراف معیار نسبی افزایش می یابد.

نکته: این مورد درباره مقادیر Real Time PCR قابل ذکر است که اگر انحراف معیار بیش از ۰/۰۲۵ باشد توانایی افتراق رقت های ده برابری کمتر از ۹۵٪ است.

- صحت آنالیتیکال: تعیین این پارامتر برای بسیاری از روش های سنجش کمی مولکولی مشکل است چون استاندارد مرجعی وجود ندارد. بنابراین برای روش های راه اندازی شده در سطح یک آزمایشگاه، آزمایشگاه کلینیکال باید به رفرانس داخلی به عنوان یک راهنما برای ارزیابی آنالیتیکال اعتماد کند و آن معیاری برای مقایسه خودش با سایر آزمایشگاههای همکار قرار دهد.

- خطی بودن و محدوده قابل گزارش: برای تعیین محدوده خطی یک سری رقت های یک یا نیم لگاریتمی از یک ماده مرجع یا استاندارد کاری در یک ماتریس مناسب تهیه می شود. هر نمونه چندین بار تست می شود(معمولا سه تا شش بار) و میانگین و انحراف معیار تعیین می شود. نمودار نتایج رسم می شود و خطی بودن و محدوده اندازه گیری با استفاده از آنالیز رگرسیون خطی اندازه گیری می شود.

در آزمایشگاه هایی که تست PCR می گذارند همراه با بررسی خطی بودن، نمودار مقادیر CT در برابر غلظت لگاریتمی (در محدوده ۷-۵ لگاریتم) ماده مرجع که حاوی اسید نوکلئیک هدف است رسم می شود و منحنی دینامیک و همچنین محاسبه کارایی PCR استفاده شود. Efficiency یا کارایی واکنش PCR از طریق شیب منحنی استاندارد استفاده می شوند. کارایی پایین به این معناست که پرایمر ها و یا پروب ها به خوبی عمل نکرده اند.

- کمترین حد تشخیص یا کمترین حد قابل اندازه گیری: می توان با رقت های سریال یک استاندارد با کیفیت یا ماده مرجع افزوده شده به یک ماتریکس طبیعی مناسب(ماتریکس های استاندارد شده) اندازه گیری کرد. رقت ها دو بار اندازه گیری می شوند و با استفاده از آنالیز PROBIT تحلیل می شوند.

- حساسیت آنالیتیکال: کمترین میزان اسید نوکلئیک هدف است که یک تست را مثبت واقعی می کند. برای تست های کیفی حساسیت عبارت است از تعداد نمونه های واقعا مثبت تشخیص داده شده توسط تست تقسیم بر تعداد کل نمونه های واقعا مثبت که به صورت در صد بیان می شود. حساسیت آنالیتیکال در سنجش های کمی معادل حد تشخیصی است که در یک محدوده اطمینان قابل محاسبه باشد تا شانس دستیابی به نتیجه مثبت واقعی را محاسبه کند.

- اختصاصیت آنالیتیکال: به صورت توانایی ارئه یک نتیجه منفی واقعی در غیاب یک هدف اسید نوکلئیک تعریف می شود. اختصاصیت با تقسیم تعداد نمونه های منفی حقیقی که توسط تست

به درستی تشخیص داده شده است بر کل نمونه های منفی قابل محاسبه است و به صورت درصد گزارش می شود. برای روش های مولکولی کمی نتایج زیر محدوده گزارش شده باید به صورت "Below the Limit of Detection" گزارش شود و از نظر آنالیتیکی منفی است.

کنترل کیفیت و نگه داری تجهیزات در بخش مولکولی آزمایشگاه

روند بررسی کیفیت شامل آموزش و ملزومات کالیبراسیون اولیه است که توسط شرکت سازنده و پشتیبان می شود. بررسی کیفیت تجهیزات در آزمایشگاه مولکولار اغلب در فرآیند صحه گذاری و تصدیق روش های آزمایشگاهی پوشش داده می شود. برای شایع ترین تجهیزات مولکولی مثل پیپت و میکرو سانتریفیوژ پیروی از توصیه شرکت های سازنده ضروری است. تجهیزات تخصصی مولکولی مثل ترمال سایکلرها گستره کاربردی وسیعی دارند و می توانند با انواع پروتکل های استخراج، کیت ها و تست های متفتوت به کار برده شوند. در این موارد توصیه می شود آزمایشگاه معیار کفایت دستگاه را با توجه به مشخصات و توصیه های شرکت سازنده، مقاصد کاربردی آزمایشگاه و الزامات قانونی مشخص کند. تمامی وسایل و تجهیزات باید کالیبر شده باشند و اطلاعات مربوط به زمان کالیبراسیون روی آن ها ثبت شده باشد. هر دستگاهی که برای تعمیر فرستاده می شود بعد از بازگشت باید مجددا کالیبر شود.

- **ترمال سایکلر**

نگه داری :

- باز بینی چاهک ها پیش از شروع استفاده از تجهیز برای اطمینان از عدم وجود آلودگی و اجسام خارجی
- تمیز کردن بلوک، چاهک ها، سینی ها و پوشش حرارتی با احتیاط، با استفاده از محلول رنگ بر ۱۰ درصد و سواب و سپس استفاده از ایزوپروپیل برای تمیز کردن هیپو کلریت سدیم باقی مانده از محلول رنگ بر

کالیبراسیون و کنترل کیفی:

- کنترل خصوصیاتی که بر نتیجه PCR اثر می گذارد از جمله صحت، یکنواختی دمایی، خارج شدن دما بالاتر یا پایین تر از حد تنظیم شده، سرعت تغییر دما و Hold Time. از حد خارج شدگی دمایی در فاز Plateau نباید از ۵ درجه سانتیگراد بیشتر و مدت آن نباید از ۱۰ ثانیه

بیشتر شود. کنترل از حد خارج شدگی دمایی در ترمال سایکلر های سریع به دلیل شایعتر بودن این امر اهمیت بیشتر دارد.

- آزمون صحه گذاری کالیبراسیون دمایی با استفاده از کیت سامانه صحه گذاری دما بر اساس دفترچه راهنمای سازنده تجهیز
- آزمون نایکنواختی دما بین چاهک ها با استفاده از دماسنج دیجیتال بر اساس دفترچه تجهیز و تماس با شرکت مربوطه در صورت عدم تطابق با مشخصات ذکر شده توسط شرکت.

نکته: در آزمایشگاه مولکولی دو نوع ترمال سایکلر وجود دارد:

۱) نوع End-Point که دمای آن باید دوبار در سال چک شود

۲) نوع QPCR که بایستی کالیبراسیون زمینه ماهیانه، بررسی طول موج دو بار در سال و RNase Verification Run سالیانه انجام شود.

- **تجهیز های Real Time PCR کمی**

نگه داری :

- باز بینی چاهک ها از نظر عدم وجود آلودگی و اجسام خارجی و تمییز نمودن تجهیز مانند شرایط ذکر شده در مورد نگه داری تجهیز ترمال سایکلر
- خارج کردن تجهیز از بسته بندی و نصب نرم افزار ارائه شده توسط شرکت در هنگام راه اندازی
- بررسی حجم و فضای باقی مانده حافظه سامانه در فواصل منظم و تعریف شده
- تعویض لامپ هالوژن و یا فیوز ها در موارد لزوم و طبق توصیه سازنده
- تهیه نسخه پشتیبان از فایل ها، به روز رسانی سامانه عامل ویندوز
- عدم استفاده از برخی شوینده های آلی در برخی از تجهیز ها و استفاده از شوینده های مجاز هر تجهیز قید شده در دفترچه راهنما

کالیبراسیون

- کالیبراسیون ROI یا نقاط مورد نظر در زمان راه اندازی، هر شش ماه یک بار و نیز پس از تعویض لامپ هالوژن

- کالیبراسیون زمینه به صورت ماهیانه و پس از تعویض لامپ هالوژن و آلودگی زدایی در صورت وجود آلودگی در زمینه و تکرار فرآیند پس از رفع آلودگی

- کالیبراسیون رنگ خالص هر شش ماه یکبار

- کالیبراسیون نوری (اپتیکال) در سامانه های 7500/7500 Fast ABI

صحه گذاری عملکرد دستگاه توسط RNase P

- این کار برای تعیین اینکه آیا تجهیز می تواند بین ۵۰۰۰ و ۱۰۰۰۰ معادل ژنومی از ژن RNase P با فاصله اطمینان ۹۹,۷ ٪ فرقی قائل شود یا خیر، پس از جابجایی تجهیز یا هر زمان که نیاز به صحه گذاری عملکرد تجهیز باشد.

کنترل کیفیت

- بررسی کیفیت RNA یا DNA استخراج شده (اطمینان از یکپارچگی اسید نوکلئیک و عدم حضور مهار کننده ها) و کار آمدی PCR با استفاده از کنترل های مثبت و منفی، کنترل داخلی و استاندارد ها

تمام نمونه های کنترل منفی باید در زیر حد آستانه پیک بدهند.

تمام نمونه های کنترل مثبت باید در CT کمتر از ۳۳ را پیک بدهند.

نمونه های کنترل داخلی باید در CT بین ۲۷ تا ۳۳ پیک بدهند. اگر خارج از این CT پیک بدهند احتمالا مشکل در خالص سازی نمونه وجود دارد.

- اطمینان از یکنواختی دما و سامانه نوری در سرتاسر بلوک با استفاده از برنامه اجرایی مشخص مطابق دفترچه راهنمای هر تجهیز مانند توزیع واکنش گر ها و مواد لازم برای PCR در تمام چاهک ها و مشخص کردن موارد عدم انطباق در نتیجه ها با محاسبه انحراف معیار، بازه Inter-Quartile و حداکثر اختلاف CT در سرتاسر بلوک

- تعیین قدرت تفکیک، با محاسبه حداقل تفاوت چند برابر شدن تعداد نسخه ای که توسط تجهیز قابل شناسایی است.

- **سامانه مستند سازی ژل (Gel Doc)**

نگه داری :

- انجام مراحل راه اندازی توسط شرکت پشتیبان
- ارائه برنامه ای برای نظافت و تمییز کردن منظم تجهیز پس از راه اندازی، بسته به میزان استفاده از تجهیز و شرایط محیطی هر آزمایشگاه که شرایط مواجهه با کیفیت بالا و ثابت پرتو فرابنفش را فراهم می کند.
- تمییز کردن اجزای تجهیز با دستمال مرطوب و در صورت وجود آلودگی زیاد، آغشته کردن دستمال با مقداری متانول
- استفاده نکردن از مصرف شوینده های قوی و مواد خورنده، استون، بنزین
- عدم استفاده از ایزوپروپانول روی شیشه فیلتر فرابنفش به علت امکان ایجاد خوردگی
- دوری از قرار داد ن اجسام تیز روی شیشه فیلتر به علت امکان آسیب عبور دهنده نور و عدم یکنواختی مواجهه فرابنفش
- رعایت دما و رطوبت مطلوب محیط برای کارکرد بهینه تجهیز بر اساس دفترچه راهنمای هر تجهیز

کنترل کیفیت

- درخواست از شرکت پشتیبان برای بررسی و اعمال تنظیمات مربوط به کنترل کیفی شامل بررسی کیفیت تابش، مواجهه و تصویر که معمولا توسط کاربر عادی قابل انجام نیست و باید توسط کارشناس فنی انجام شود.

- **هود**

در آزمایشگاه مولکولی دو نوع هود وجود دارد:

۱. هود بیولوژیکی

۲. هود Work Station (محل انجام PCR از قبیل آماده سازی نمونه و....)

کارایی هود ها باید سالانه توسط یک فرد ماهر چک شود و مهر کنترل کیفی زده شود. در هنگام استفاده از هود های Biosafety دقت شود که Gauge های فشار عدد نزدیک به عدد کالیبره شده را نشان دهند. این

فشار میزان کارایی هود را تایید می کند. افزایش قابل توجه در آن نشان دهنده کثیف شدن فیلتر هاست و کاهش زیاد فشار نشان دهنده یک اختلال الکتریکی است. اما هود Work Station بیشتر باید از نظر ضد عفونی و عاری از میکروب بودن چک شود.

- **منبع تغذیه(Power Supply)**

نگه داری، الزامات نصب و راه اندازی

- در نظر گرفتن فضای کافی در اطراف و پشت تجهیز برای جریان مناسب هوا
- توجه به دما و رطوبت مناسب تعریف شده برای عملکرد صحیح تجهیز
- قرار دادن تجهیز باید بر روی سطح صاف
- وصل کردن تجهیز به پریز برق دارای ولتاژ و فرکانس متناسب با تجهیز قید شده در کتابچه راهنما یا در پشت تجهیز
- تامین ولتاژ بدون نوسان توسط مبدل
- دوری از استفاده از مدار برق مشترک با سایر تجهیز های پر مصرف مانند یخچال، سانتریفیوژ و از این قبیل

کنترل کیفیت

- بررسی منابع انرژی و برق دستگاههای موجود در آزمایشگاه از لحاظ اتصالات
- بررسی و انجام تنظیمات مربوط به کنترل کیفی شامل بررسی درستی زمان سنج و خروجی ولتاژ توسط کارشناس فنی که معمولا توسط کاربر عادی قابل انجام نیست.
- استفاده از نمونه های کنترل که برخی شرکت ها در اختیار مصرف کننده ها قرار می دهند در هر نوبت کاری به همراه سایر نمونه ها

- **سانتریفیوژ**

سانتریفیوژ باید برای مراحل Pre PCR و Post PCR جدا باشد. با توجه به اهمیت صحت عملکردی سانتریفیوژ و دور بالا در فرایند های استخراج مخصوصا Absorption Chromatography در بخش مولکولار بررسی دور با تاکومتر بایستی به صورت ماهیانه انجام شود.

• کیت های استخراج DNA و RNA

- نمونه های بیولوژیکی باید در محلول Lysis نگه داری شوند.
- نمونه های بافتی را ترجیحا حتما قبل از ریختن در تیوپ های حاوی غشا با پروتئیناز K مواجه کنید چرا که موکوپلی ساکاریدها و مواد فیبروزی داخل بافت می توانند در غشاها گیر کنند و خالص سازی را دچار اختلال کنند.
- آب مصرفی در تمامی مراحل شست و شو باید آب با درجه بیولوژیکی باشد.
- اگر حجم نمونه ای که در چاهک های خالص سازی می خواهید بریزید از ۲۰۰ میکرولیتر کمتر است می توانید آنها را با FBS به حجم ۲۰۰ برسانید.(در مورد دستگاه های استخراج اتوماتیک)
- برای تمیز کردن مواد پلاستیکی موجود در دستگاه از آب گرم استفاده نکنید. می توانید از هیپوکلریت ۱ ٪ آن هم به مقدار کمتر از ۳۰ دقیقه استفاده کنید. صفحه جدا کننده باید شسته شود تا مطمئن شویم از DNA و RNA و مواد تجزیه کننده آن ها پاک می باشد.
- اگر قرار است روی نمونه با تاخیر یک روزه کار کرد باید آن ها را در محلول لیز به صورت هموژنیزه و در دمای ۴ درجه نگه داری کرد. اگر نیاز به نگه داری نمونه به مدت طولانی تری است، باید آن را در دمای ۲۰- تا ۸۰- درجه فریز کرد.

منابع :

۱- کاربرد انواع PCR دکتر عبدالحسین کاظمی (مرکز توسعه و هماهنگی پژوهش) ۱۳۸۸

۲- واکنش زنجیزه ای پلیمراز (PCR) مک فرسون – مولر ۱۳۸۹ ترجمه دکتر غلامرضا زرینی و دکتر سید عباس میرزایی

۳- اصول ژنتیک پزشکی EMERY چاپ چهاردهم ۲۰۱۲ ترجمه دکتر محمد خلج کندری و دکتر علی آهنی

۴- جدیدترین پیشرفت های RT-PCR نوشته 2013 Williams , Gibson

۵- PCR با پرایمرهای اختصاصی نوشته Mc pherson از دانشگاه Oxford 1998

۶- طراحی و مبانی تضمین کیفیت در آزمایشگاه پزشکی دکتر حسین دارآفرین به سفارش انجمن علمی آسیب شناسی ایران، آزمایشگاه مرجع سلامت ۱۳۹۸