University of Isfahan

Faculty of Biological Science and Technology

Department of Cell and Molecular Biology and Microbiology

Farzaneh Forouharfar

عنوان:

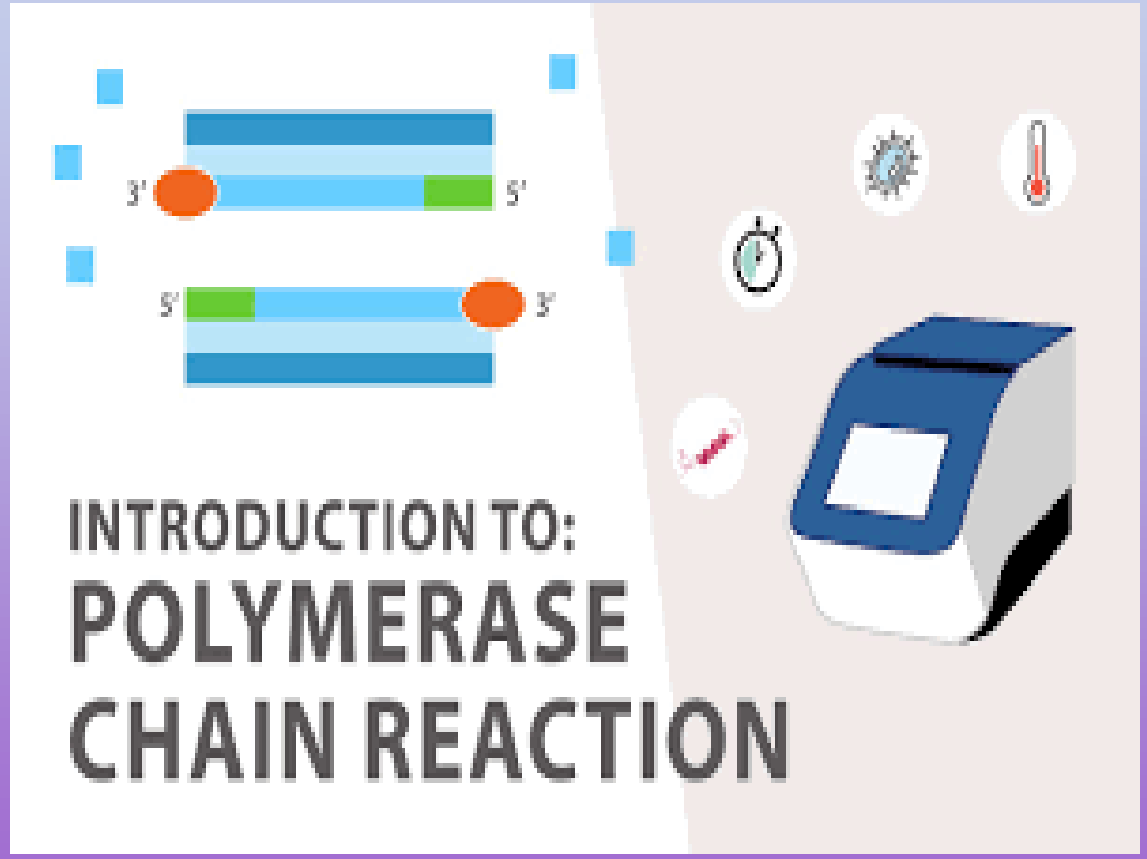
POIYMERASE CHAIN REACTION

تکثیر دی ان ای با روش PCR

Farzaneh Forouharfar

اهداف آزمایش

- ✓ آشنایی با اصول PCR
- ✓ تکثیر ژن بتاگلوبین انسان با PCR


3'
5'
5'
3'
INTRODUCTION TO:
POLYMERASE
CHAIN REACTION

مقدمه

به منظور فهمیدن اساس مولکولی بیماری‌ها لازم است که ژن یا ژن‌های درگیر، شناسایی شده،

ساختمان آن‌ها آنالیز و تغییرات ژنتیکی نیز در آن‌ها مشخص گردد. لذا بایستی مکان ژن بر روی

کروموزوم تعیین و سپس ژن موردنظر به طریقی تکثیر یافته و ترتیب نوکلدئوتیدی آن بدست آید. این سری آزمایشات جهت تشخیص افرادی که حامل ژن معیوب بوده ولی بدون علامت خاصی می‌باشند؛ کمک‌کننده خواهد بود.

یک روش برای تکثیر قطعات دنا روش PCR (Polymerase Chain Reaction) می‌باشد. این تکنیک در اواسط دهه‌ی 1980 توسط کری مولیس (Kary Mulis) معرفی شد و به دلیل کاربرد و مزیت زیاد آن در علوم مولکولی گسترش پیدا کرد.

PCR یا واکنش زنجیره‌ای پلیمراز یک تکنیک آطمایشگاهی است که به کمک آن می‌توان ناحیه‌ی به خصوصی از داکسی ریبو نوکلئیک (DNA) را که بین دو قسمت شناخته‌شده‌ی دنا قرار دار، تکثیر نمود. تکثیر دنا با استفاده از پرایمرهای اولیگونوکلئوتیدی به نام «آمپلی‌مر» انجام می‌پذیرد. پرایمرهای دنا، مولکول‌های دنای تک‌رشته‌ای کوتاهی (15-35 نوکلدئوتید) هستند که مکمل یک ناحیه‌ی معین از دنای الگو می‌باشند.

تحت شرایط مناسب، پرایمرها بر روی دنای الگو، که زنجیره‌های آن از هم جدا شده و به شکل زنجیره‌های منفرد در آمده‌اند، متصل شده و در حضور دناپلیمراز و داکسی نوکلئوتید تری‌فسفات (dNTPS)، سنتز رشته‌ی دنای جدیدی مشابه با رشته‌ی دنای الگو را هدایت می‌کنند. (یادآوری می‌شود که دناپلیمراز دی ان ای تک‌رشته‌ای را از جهت 3’ به سمت 5’ به عنوان الگو مورد استفاده قرار می‌دهد و رشته‌ی مکمل را در جهت 5’ به سمت 3’ می‌سازد و برای شروع احتیاج به یک قطعه رشته‌ی اولیه (شناساگر) دارد.

عمل تکثیر را می‌توان با جداسازی دو رشته‌ی دنا به وسیله‌ی حرارت و اتصال مجدد پرایمرها به دنا به کمک کاهش درجه حرارت و سرانجام گسترش پرایمر بر روی رشته دی ان ای با آنزیم پلیمراز و در یک حرارت مناسب، تکرار نمود.

یک چرخه تکثیر شامل سنتز مجدد یک رشته‌ی جدید از روی یک رسته‌ی قدیمی‌تر می‌باشد. هر رشته از دنای تازه سنتز شده به عنوان الگویی برای چرخه‌ی بعدی تکثیر عمل می‌کند.

Farzaneh Forouharfar

به طور کلی مراحل انجام PCR عبارتند از:

1- مرحله‌ی اول: جداسازی دو رشته‌ی دی ان ای به کمک حرارت (Denaturation):

که در حضور چهار نوع dNTP و بافر PCR، دناپلیمراز مقاوم به حرارت و در دمای 95-93 درجه سانتی‌گراد انجام می‌گیرد.

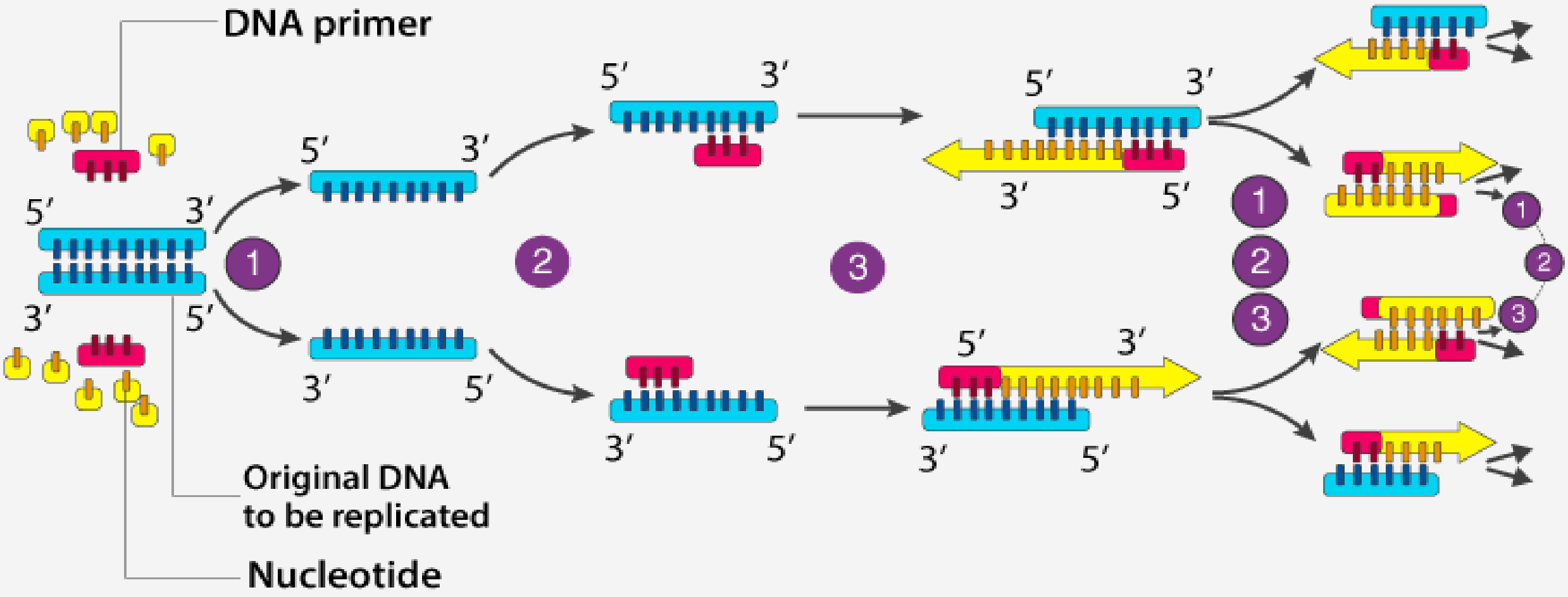
2- مرحله‌ی دوم: اتصال پرایمرهای اولیگونوکلئوتیدی به رشته‌ی جداشده (Annealing):

به کمک کاهش حرارت تا حدود 65-35 درجه سانتی‌گراد که به Melting Temperature پرایمرهای اولیگونوکلئوتیدی بستگی دارد.

3- مرحله‌ی سوم: گسترش پرایمرها (Extension) به کمک دناپلیمراز مقاوم به حرارت در 72 درجه سانتی‌گراد. سنتز دنای جدید در امتداد پرایمرها انجام می‌شود.

مرحله‌ی اول تا سوم یک PCR را تشکیل می‌دهند و این مراحل برای حداقل 20 چرخه تکرار می‌شود. در چرخه‌ی آخر مرحله‌ی سوم ممکن است چند دقیقه‌ای افزایش پیدا کند تا تمام رشته‌های سنتز شده تکمیل گردند. باید توجه شود که اگر در مرحله‌ی اول دنا در اثر حرارت دچار آسیب شود، خطای ترکیب نوکلئوتیدها در حین انجام PCR افزایش می‌یابد، بنابراین بهتر است در آزمایشاتی که نیاز به دقت دارد از حرارت بالا اجتناب شود؛ ولی در مواردی مانند دنای پلاسمیدی که به صورت سوپر کویل می‌باشد؛ لازم است نمونه‌ی موردنظر جهت جداسازی کامل رشته‌های دی ان ای چند دقیقه در حرارت 95-92 درجه سانتی‌گراد قرار داده شود.

POLYMERASE CHAIN REACTION (PCR)



1 Denaturation | 2 Annealing | 3 Elongation

کاربردهای PCR:

به دلیل اینکه الگوی به کار گرفته شده در PCR از منابع مختلف می‌تواند تهیه شود؛ تکنیک PCR کاربردهای نامحدودی در عرصه‌های مختلف علوم مولکولی دارد. دو کاربرد مهم و اصلی آن عبارتند از:

1- تهیه‌ی نسخه‌های متعدد از یک ژن

2- بررسی حضور یا عدم حضور یک ژن خاص در یک قطعه دنا

بررسی پیوستگی ژن‌ها، کاربردهای جنایی برای تعیین هویت مجرم، رد یا تعیین رابطه‌ی خویشاوندی، مطالعات باستان‌شناسی، مطالعات تکاملی وجودات زنده، تشخیص بیماری‌های ژنتیکی قبل از تولد نوزادان، تعیین جنسیت جنین، تشخیص عامل بیماری‌های عفونی باکتریایی و ویروسی (از جمله ایدز).

مشکلات PCR:

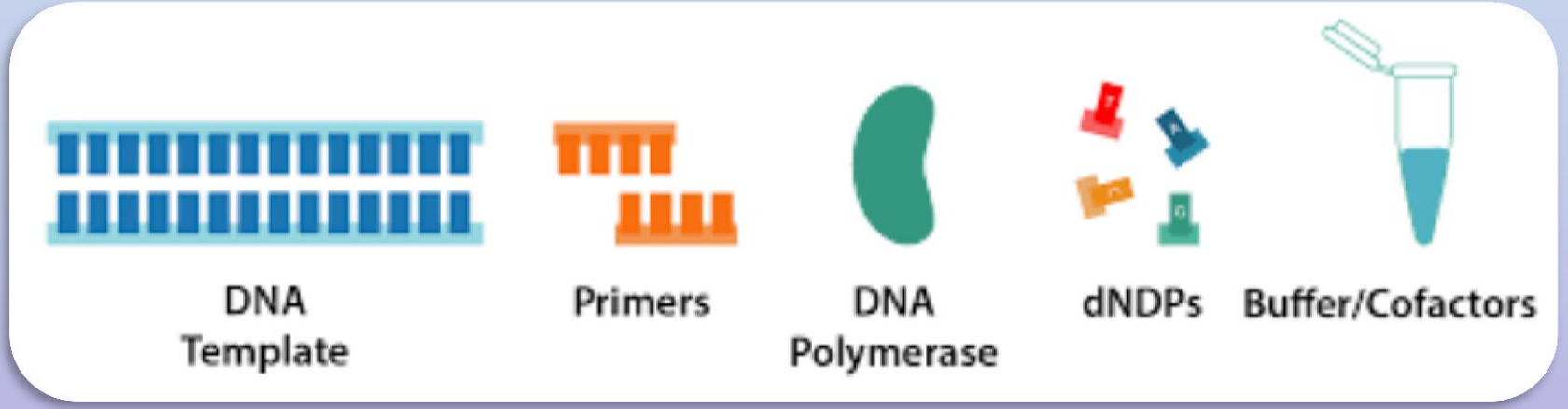
با تمامی مزیت‌های فوق PCR مشکلات خاص خود را دارد. مهم‌ترین مشکل PCR آلودگی نمونه‌های مورد بررسی است. به دلیل حساسیت فوق‌العاده و قدرت تکثیر زیاد PCR هر قطعه دنای خارجی که وارد محیط PCR شود؛ مورد تکثیر قرار گرفته و نتایج عجیب و دور از واقعیتی را به وجود خواهد آورد. مثلا ورود سلول‌های پوست دست در لوله PCR و یا باقی ماندن قطعات دنای حاصل از تکثیر دناهای قبلی باعث آلودگی PCR می‌شود؛ که در این موارد شست‌وشوی دقیق و دقت زیاد در انجام آزمایشات مشکل‌گشا است.

یکی دیگر از مشکلات PCR وجود اشتباهات در همانندسازی است. دناپلیمراز هنگام همانندسازی مرتکب اشتباهاتی می‌شود و چون رشته‌های حاصل، الگوی رشته‌های بعدی هستند؛ این اشتباهات بین قطعات بعدی نیز وجود خواهند داشت.

به طوری که قطعات نهایی نسبت به ژن اصلی به میزان زیاد متفاوت خواهند بود. (آنزیم Tag پلیمراز در شرایط دما و غلظت نمک PCR در هر 2*10^4 نوکلئوتید تقریبا مرتکب یک اشتباه می‌شود).

تنها راه مقابله با این مشکل استفاده از تعداد بیشتر رشته‌های الگوی اولیه و کاهش تعداد چرخه‌های PCR و در نتیجه کاهش اشتباهات است. همینطور استفاده از آنزیم‌های خوب با دقت بالا تا حدودی این مشکل را مرتفع نموده است.

Farzaneh Forouharfar



محلول‌های لازم جهت واکنش PCR

1- بافر * 10 حاوی:

KCl 500 mM

Tris-HCl 200 mM pH=8.4

2-MgCl2 50 or 25 mM

3- dNTP(مخلوطی از dGTP، dTTP، dCTP، dATP) با غلظت 10 میلی‌مولار از هر یک از چهار نوکلئوتید.

4-پرایمرها: در غلظت 100 میلی‌مولار به صورت استوک تهیه و 5 میلی‌مولار از آن در هر واکنش 25 میکرولیتری استفاده می‌شود.

5-آنزیم دناپلیمراز Tag (مقاوم به حرارت)

Farzaneh Forouharfar

مواد و وسایل لازم:

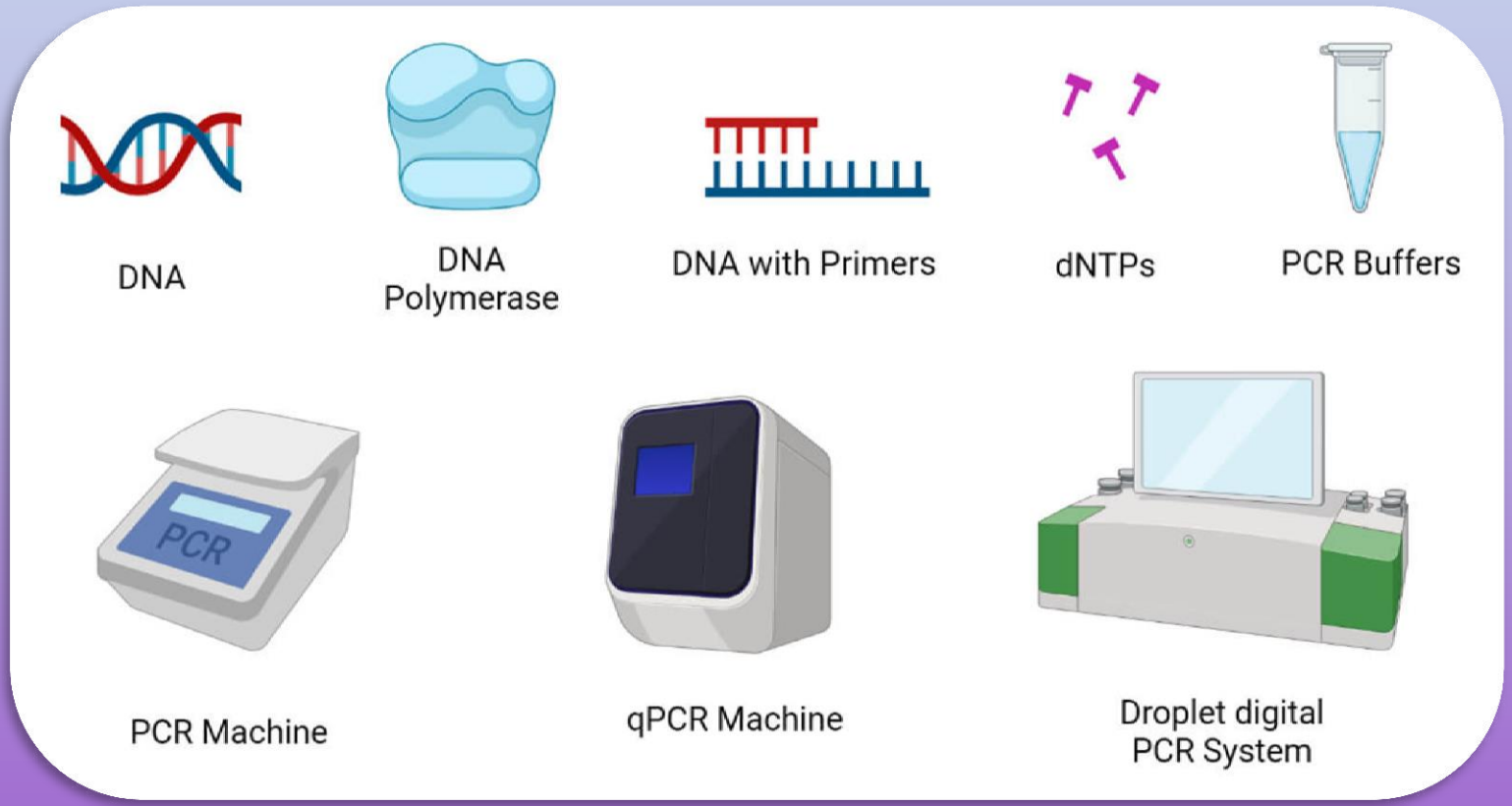
1- مخلوط واکنش PCR شامل:

بافر PCR، کلرید منیزیم،آنزیم دناپلیمراز Tag، پرایمرها،آب دو بار تقطیر شده استریل، DNA ژنومی (الگو)

2- دستگاه ترموسیکلر

3- سمپلر و سرسمپلر استریل

4- لوله‌های PCR



Farzaneh Forouharfar

روش کار:

فرآیند تکثیر PCR در سه مرحله‌ی پشت سر هم به صورت یک چرخه صورت می‌گیرد. ابتدا دو رشته‌ی دنادر دمای 95-94 درجه سانتی‌گراد از هم جدا شده؛ سپس پرایمرها در دمایی خاص (دمای anniling) که وابسته به توالی نوکلئوتیدی آن‌هاست به ناحیه‌ی مکملی در دنا هیبرید می‌شوند و در مرحله‌ی سوم در دمای مناسب برای فعالیت دناپلیمراز (72 درجه سانتی‌گراد)، فرآیند تکثیر صورت می‌گیرد.

35-+5 بار تکرار می‌شود و چون هر بار محصولات چرخه‌ی قبل به عنوان الگو قرار می‌گیرند؛ لذا تکثیر به صورت تصاعدی بالا می‌رود.

در این جلسه برای PCR ژن بتاگلوبین به ترتیب زیر عمل کنید:

1- مطابق جدول زیرمواد موردنیاز واکنش PCR را در یک لوله اپندرف مخصوص PCR اضافه نمایید.

2- لوله‌ها را سانتریفیوژ نموده تا مواد به ته لوله‌ها منتقل شوند.

3- لوله‌ها را در دستگاه PCR قرار دهیدو واکنش PCR را شروع نمایید (دستگاه از قبل برنامه‌ریزی شده است).

4- پس از انجام PCR محصولات PCR را جهت آنالیز در یخچال نگهداری نمایید.

سوالات:

1- کاربردهای PCR را برشمارید.

2- نقش بافر *10 برای PCR چیست؟

3-MgCl2 چه نقشی در واکنش pcr دارد؟

4- چه راه‌های دیگری برای تکثیر د دی ان ای می‌شناسید؟

Farzaneh Forouharfar

روش کار:

با استفاده از اتورادیوگراف آماده که در اختیار شما قرار می‌گیرد؛ ترادف دی ان ای تعیین توالی شده را مشخص نمایید.