جمهوری اسلامی ایران

وزارت جهاد کشاورزی

سازمان حفظ نباتات کشور

راهنمای شناسائی و ردیابی

آفت قرنطینه خارجی

روش های آزمون PCR

PCR (Polymerase chain reaction)

تهیه و تنظیم:

معصومه فرجی

دفتر پایش و تحلیل خطر

زمستان ۱۳۹۳

روش‌های آزمون PCR
PCR (Polymerase chain reaction)

مقدمه:

پیشرفت های دو دهه‌ی اخیر در زمینه بیولوژی مولکولی موجب ارتقاء کارآیی و تکامل هر چه بیشتر آزمایش های وابسته به DNA گردیده است. امروزه در تمامی پژوهش های مرتبط با زیست شناسی(اعم از پزشکی، کشاورزی، گیاه شناسی، جانورشناسی و غیره) به نحوی از این روش استفاده می شود. این واکنش از آن روی ارزشمند است که عمل آن بسیار اختصاصی است و به سادگی قادر است عمل تکثیر را از مقادیر فوق العاده کم DNA الگو آغاز کند. به کمک این روش میتوان نزدیک به ۵ کیلوباز از ژنوم را بدون هیچ مشکلی تکثیر نمود. استفاده از مارکرهای غیر رادیواکتیو و اولیگونوکلئوتیدهای مکمل با ژن ها و یا مترادف های ویژه بازهای آلی در DNA از جمله پیشرفت های مؤثر در بهبود و بکارگیری روزافزون تست های وابسته به DNA محسوب می شود. خود واکنش PCR نقطه آغاز یک سلسله آزمایشات و آنالیزهایی است که در آنها از محصول تکثیر شده در روش PCR استفاده می شود و اطلاعاتی از از آن در مورد مولکول DNA به دست می آورند. نظیر آزمایشات انگشت نگاری DNA ، تهیه نقشه های ژنتیکی، توالی یابی و غیره. در واقع PCR مقدمه انجام آزمایشات بسیار مهم دیگر است. این واکنش الگو گرفته از روش همانندسازی DNA در طبیعت(در سلولهای موجودات زنده) است.

تعریف PCR :

به طور کلی Polymerase Chain Reaction (PCR) به روش ازدیاد مقادیر جزیی DNA یا RNA (ازدیاد RNA با روش RT-PCR امکان پذیر است) تا حد مشاهده آنها توسط روش های 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 یا میکروارگانیسم مورد نظر در نمونه مذکور می‌گردد که این ویژگی علاوه بر بکارگیری PCR در تشخیص آزمایشگاهی بیماریها و شناسایی انواع سلولها، آنرا به عنوان ابزاری مطمئن و حساس در زمینه پژوهش های علمی مطرح می سازد.

مکانیسم PCR :

همانطوریکه می دانیمDNA ، یک مولکول مارپیچی دو رشته ای پلی نوکلئوتیدی است که این دو رشته در جهت مقابل هم قرار گرفته اند و بطور ویژه ای بوسیله‌ی پیوندهای هیدروژنی میان بازهای آلی مکمل به یکدیگر متصل هستند (سیتوزین بوسیله سه پیوند هیدروژنی به گوانین و آدنین بوسیله دو پیوند هیدروژنی به تیمین اتصال پیدا می کند. DNA دورشته ای می تواند بوسیله حرارت از هم جدا شده و دو مولکول DNA تک رشته ای ایجاد کند که این مرحله بنام مرحله‌ی واسرشت سازی (Denaturing) شناخته می شود. مولکولهای DNA تک رشته ای از طریق واکنش های متقابل ویژه بین بازهای مکمل به همدیگر متصل شده که حاصل آن ایجاد و آغاز مرحله ای بنام مرحله اتصال (annealingو یا hybridization) می باشد. دو مرحلهء فوق الذکر برای Probe technology و همچنین PCR بکار می رود. مرحله بعدی یا سوم که برای PCR بوده و این روش را از سایر تکنیک های مولکولی متمایز می سازد مرحله توسعه (extension) می باشد که طی آن یک قطعه DNA تک رشته ای بوسیله DNA پلیمراز توسعه پیدا می کند. در این مرحله یک قطعه DNA تک رشته ای کوتاه (primer) به یک مولکول DNA تک رشته ای طویل تر پیوند زده شده و DNA پلیمراز (Taq پلیمراز) قادر می شود به انتهای ′۳ مولکول کوتاهتر یا پرایمر (آغازگر) متصل گردیده و با استفاده از دأکسی نوکلئوتید تری فسفات ها آنرا امتداد داده و قطعه ای سنتز نماید که آن قطعه مکمل DNA تک رشته ای طویل تر باشد و بدین ترتیب DNA دو رشته ای جدید ساخته می شود .مولکولهای DNA تک رشته ای کوتاه یا آغازگرها (اولیگونوکلئوتیدها) بوسیله تکنیک های شیمیایی به صورت سریع و ارزان ساخته می‌شوند. اولیگونوکلئوتیدها وقتی که به DNA واسرشت شده افزوده می-

شوند، به عنوان پرایمر برای DNA پلیمراز عمل نموده و اجازه می‌دهند تا DNA جدید در داخل آزمایشگاه سنتز شود. بنا به دلیل فوق الذکر اولیگونوکلئوتیدها را پرایمر (primer) می نامند. در PCR دو نوع پرایمر مورد استفاده قرارمی گیرد که هر کدام از آنها به محل های ویژه در دو رشته مکمل مولکول DNA هدف پیوند می شوند . پرایمرهای مذکور به صورتی 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 می‌شود. این رشته DNA جدید تولید شده نیز همینطور قادر خواهد بود به عنوان الگو (template) برای سنتز DNA از پرایمر دیگر در جریان چرخه های بعدیPCR ، عمل نماید. بنابراین تا اینجا معلوم می شود که هر چرخه PCR شامل سه مرحله می باشد.

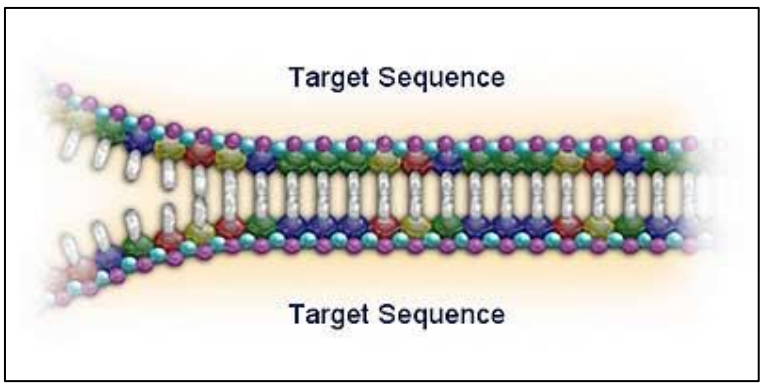
۱- مرحله واسرشت سازی(Denaturation Step):

۲- مرحله اتصال آغازگر (Annealing or Hybridization Step):

۳- مرحله توسعه (Extension Step):

۱- مرحله واسرشت سازی(Denaturation Step):

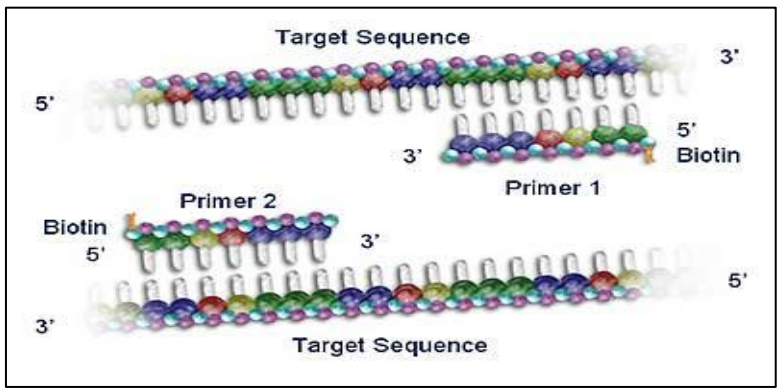
در این مرحله مولکولهای دو رشته ای DNA بوسیله حرارت بالا (حدود ۹۴ درجه سانتیگراد) از همدیگر جدا گردیده و به مولکولهای تک رشته ای تبدیل می شوند.



PCR step 1: denaturation

۲- مرحله اتصال آغازگر (Annealing or Hybridization Step):

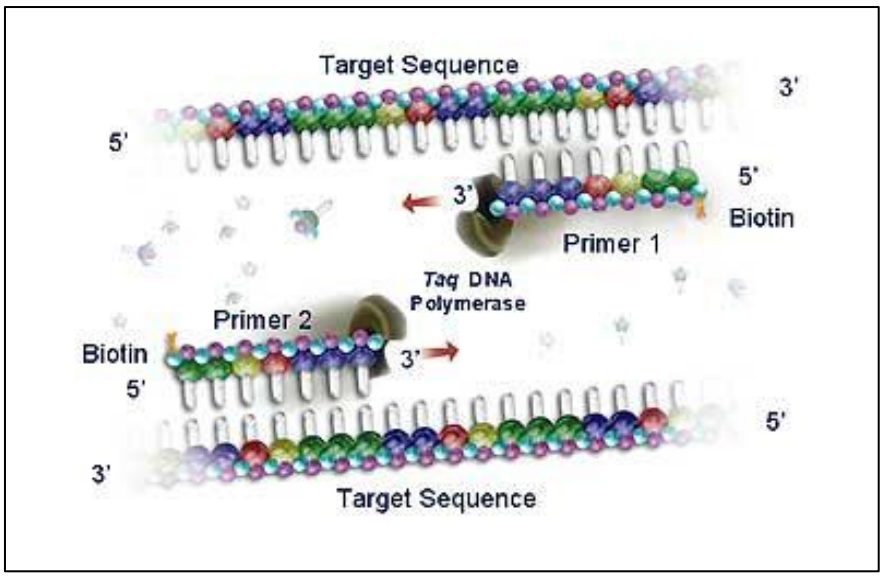
در این مرحله کاهش دمای واکنش صورت می گیرد تا اینکه آغازگرها بتوانند به مولکولهای DNA تک رشته ای پیوند زده شوند. درجه حرارت مورد استفاده برای این مرحله می تواند از ۳۰ درجه سانتیگراد تا ۷۲ درجه سانتیگراد متغیر باشد.



PCR step 2: annealing

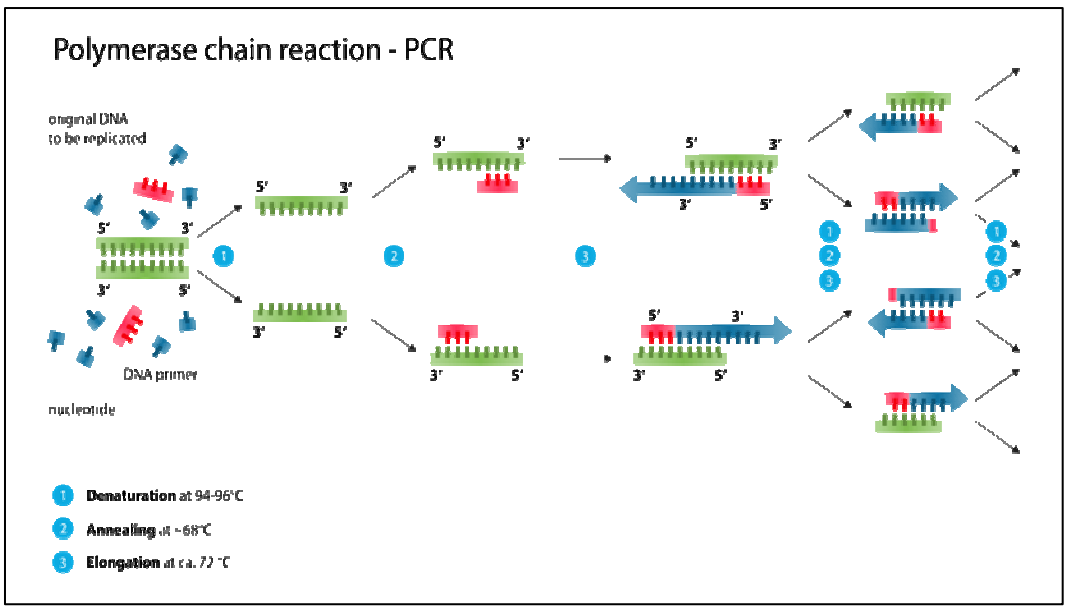
۳- مرحله توسعه (Extension Step) :

در این مرحله که آخرین مرحلهء یک چرخه PCR می باشد، آنزیم Taqپلیمراز (که DNA پلیمرازی است مقاوم به حرارت و از یک باکتری ترموفیل بنام ترموس آکواتیکوس Thermus aquaticus استخراج می شود) با استفاده از دأکسی نوکلئوتید تری فسفاتها (dNTPs)، پرایمر را در روی DNA تک رشته ای امتداد می دهد تا DNA دو رشته ای جدید بسازد. درجه حرارت لازم برای این مرحله۷۲ درجه سانتیگراد می‌باشد که این درجه حرارت برای آنزیم های مقاوم به حرارتی که به طور عادی مورد استفاده قرار می گیرند مناسب می باشد.



PCR step 3: extension

هر چرخهی PCR نهایتاً با دو برابر شدن تعداد ترادف های DNA هدف همراه است که تکرار چرخه به دفعات زیاد (۲۰ تا ۵۰ بار) منجر به افزایش توانی در تعداد ترادف های DNA هدف و در نتیجه ازدیاد DNA هدف به میزان یک میلیون برابر یا بیشتر خواهد شد.



طرح کلی مراحل PCR

سیر تحول تکنیک PCR:

از زمان اختراع PCR ، دو پیشرفت تکنیکی عمده به طور قابل توجهی روند PCR را اصلاح کرده است. اولین پیشرفت، بکارگیری و ترویج پلیمرازهای مقاوم به حرارت همانند Taq پلیمراز بوده است که این آنزیم توانایی مقاومت در برابر مرحله واسرشت سازی یعنی حدود ۹۴ درجه سانتیگراد را دارد. این بدان معنی است که در حال حاضر می توان بدون افزودن آنزیم پلیمراز تازه بعد از هر مرحله واسرشت سازی به لوله هایPCR ، آزمایش PCR را انجام داد. دومین پیشرفت عمده، توسعهء تجارتی بلوک های حرارتی قابل برنامه ریزی می باشد که این بلوک ها به ترمال سایکلرها (Thermal cycler) معروف هستند .استفاده از ترمال سایکلر در انجام PCR باعث حذف مرحلهی خسته کننده و وقت گیر انتقال لولههای PCR از یک بن ماری به بن ماری دیگر می شود ، زیرا این دستگاه که قبلاً بوسیله خود آزمایش کننده تنظیم و برنامه ریزی شده است به طور اتوماتیک حرارتهای لازم را برای مراحل سه گانه PCR تولید می نماید ضمن اینکه تعداد چرخه های مورد نیاز نیز برای انجام PCR و ازدیاد DNAبطور اتوماتیک در این دستگاه بوقوع می پیوندد.

با دو پیشرفت فوق الذکر اکنون ما می توانیم تمامی اجزاء PCR را که عبارتند از بافرPCR ، دو نوع پرایمر، چهار نوع دأکسی نوکلئوتید تری فسفات (dATP , dTTP , dCTP وdGTP) ، آنزیم Taq پلیمراز و DNA الگو (که با روش های مختلف قابل استخراج می باشد)، با همدیگر در لوله های پلی پروپیلن مخلوط و پس از افزودن یک قطره روغن معدنی بر سطح مخلوط ها بدون حضور شخص آزمایش کننده لوله های PCR را به مدت چند ساعت در ترمال سایکلر برنامه ریزی شده از قبل قرار داد تا PCR انجام شود. با افزودن روغن معدنی از تبخیر نمونه در دستگاه thermal cycler جلوگیری می شود . معمولا ۵۰ ـ ۶۰ میکرولیتر به محلول واکنش ۱۰۰ میکرولیتری اضافه می‌شود . مع ذالک امروزه ترموسایکلرهای PCR با درپوش داغ در دسترس هستند که نیازی به استفاده از روغن معدنی در واکنش ها نیست.

انواع دستگاه ترموسایکلر

روش انجام تکنیک PCR:

استخراج اسید نوکلوئیک(DNA یا RNA) به دو روش سنتی و یا استفاده از کیت استخراج DNA یا RNA :

اولین گام برای شروع آزمون PCR استخراج اسید نوکلئیک از بافت اندام گیاهی آلوده یا مشکوک به آلودگی است. این عمل یا به صورت سنتی و یا با استفاده از کیت های استخراج انجام می شود. یکی از روشهای سنتی رایج استخراج اسیدنوکلئیک (DNA)، **استخراج DNA به روش CTAB** است. که به صورت خلاصه شرح داده می شود:

۱- وزن کردن ۰,۳ گرم از بافت برگی یا رگبرگی خرد شده در ازت مایع و انتقال به میکروتیوب استریل ۱,۵ میلی لیتری
۲- افزودن ۷۰۰ میکرولیتر بافر CTAB
۳- ورتکس محدود و نگهداری در دمای ۶۰ درجه (درون حمام آبگرم) به مدت ۴۵ دقیقه
۴- سپس نگهداری در دمای اتاق به مدت ۱۵ دقیقه
۵- افزودن ۷۰۰ میکرولیترکلروفرم ایزوآمیل الکل
۶- سانتریفیوژ (۱۳۰۰۰g به مدت ۱۰ دقیقه)
۷- انتقال محلول رویی به یک میکروتیوپ جدید
۸- افزودن ۱۵۰ میکرولیترکلروفرم ایزوآمیل الکل
۹- سانتریفیوژ (۱۳۰۰۰g به مدت ۱۰ دقیقه)
۱۰- انتقال محلول رویی به یک میکروتیوپ جدید
۱۱- افزودن ایزوپروپانل ($-20^{\circ}C$) تا پر شدن میکروتیوپ
۱۲- نگهداری در $-20^{\circ}C$ به مدت ۱ ساعت
۱۳- سانتریفیوژ یخچالدار(۵ درجه) برای رسوب دادن ژنوم (۱۳۰۰۰g به مدت ۱۰ دقیقه)
۱۴- دور ریختن محلول رویی
۱۵- خشک کردن پلیت به طور وارونه بر روی دستمال کاغذی در دمای اتاق به مدت ۳۰ دقیقه
۱۶- افزودن ۵۰ میکرولیتر آب مقطر استریل و حل کردن آن تا رسوب DNA به آرامی حل شود

نحوه ساخت بافر CTAB (Cetyl Trimethyl Lumonium Bromide):

۰/۱۵۷ گرم تریس را در ۵ میلی لیتر آب مقطر استریل حل کرده و پس از تنظیم pH ، حجم نهایی را با آب مقطر به ۱۰ میلی لیتر می رسانیم. سپس مواد زیر را جداگانه وزن نموده ، باهم مخلوط کرده و حجم محلول را با آب به ۹۰ میلی لیتر رسانده و روی شیکر مگنت دار حرارتی حل می کنیم. سپس ۱۰ میلی لیتر تریس را به آن اضافه میکنیم تا حجم نهایی به ۱۰۰ میلی لیتر برسد. مجددا pH را روی ۸ تنظیم می کنیم. در زمان استفاده از این بافر، باید ۱٪ از حجم بافر، مرکاپتواتانول نیز اضافه شود(برای ۷۰۰ میکرولیتر بافر CTAB، ۷۰ میکرولیتر مرکاپتواتانول نیاز است) و سپس نمونه های برگی درون این محلول نهایی له می شود.

مواد لازم برای تهیه بافر CTAB:

نوع ماده	مقدار
CTAB	2 gr
Nacl	8.18 gr
EDTA-Na	0.7 gr
PVP(polyvinyipyrrolidone)	1 gr
Tris (100mM)	0.157 gr

استخراج RNA کل بـا اسـتفاده از کیـت اسـتخراج: Total RNeasy Plant Mini Kit

(Cat. NO. 74904- 50 reaction) ساخته شده در شرکت کیاژن

خلاصه ای از مراحل استخراج به شرح زیر است:

۱- وزن نمودن نمونه و خرد کردن آن در ازت مایع و انتقال به یک فالکون تیوپ
۲- افزودن ۴۷۰ میکرولیتر بافر RLT به ازاء هر نمونه
۳- افزودن۵ میکرولیتر مرکاپتواتانول به ازاء هر نمونه
۴- انتقال به میکروتیوپهای ۱/۵ میکرولیتری
۵- ورتکس به مدت ۲ دقیقه
۶- قرار دادن در حمام آبگرم ۵۶ درجه به مدت ۲ دقیقه و۳۰ ثانیه
۷- انتقال به ستون اول (میکروتیوپهای بنفش کمرنگ موجود در داخل کیت)
۸- سانتریفیوژ به مدت ۲-۳ دقیقه با دور۱۲۵۰۰ دور در دقیقه
۹- برداشتن فاز رویی به کمک تیپ زرد استریل و انتقال به میکروتیوپهای ۱/۵ میکرولیتری
۱۰- افزودن نصف حجم فاز رویی، الکل مطلق و پایپت کردن آن
۱۱- انتقال به ستون دوم (میکروتیوپهای پررنگ)
۱۲- سانتریفیوژ به مدت ۱۷ ثانیه با دور۱۲۵۰۰ دور در دقیقه
۱۳- دور ریختن مایع رد شده از فیلترستون دوم و قرار دادن ستون در داخل یک میکروتیوپ ۱/۵ میکرولیتری
۱۴- افزودن بافر RW1 به میزان۳۰۰ میکرولیتر
۱۵- سانتریفیوژ به مدت ۱۷ ثانیه با دور۱۲۵۰۰ دور در دقیقه
۱۶- دور ریختن مایع رد شده از فیلتر
۱۷- افزودن بافر RW1 به میزان۳۵۰ میکرولیتر
۱۸- سانتریفیوژ به مدت ۱۷ ثانیه با دور۱۲۵۰۰ دور در دقیقه
۱۹- دور ریختن مایع رد شده از فیلتر
۲۰- افزودن بافر RPE به میزان۵۰۰ میکرولیتر(قبلا به این بافر الکل مطلق اضافه کرده ایم).
۲۱- سانتریفیوژ به مدت ۱۷ ثانیه با دور۱۲۵۰۰ دور در دقیقه
۲۲- دور ریختن مایع رد شده از فیلتر
۲۳- افزودن بافر RPE به میزان۵۰۰ میکرولیتر
۲۴- سانتریفیوژ به مدت ۲ دقیقه با دور۱۲۵۰۰ دور در دقیقه
۲۵- انتقال به میکروتیوپهای۲ میلی لیتری موجود در کیت
۲۶- سانتریفیوژ به مدت ۱ دقیقه با دور۱۳۰۰۰ دور در دقیقه
۲۷- انتقال به میکروتیوپهای ۱/۵ میلی لیتری موجود در کیت
۲۸- افزودن ۳۵ میکرولیتر RNease –free water
۲۹- سانتریفیوژ به مدت ۱ دقیقه با دور۱۰۰۰۰ دور در دقیقه
۳۰- انتقال نمونه ها به فریزر۸۰- یا۲۰- درجه تا زمان استفاده

تکثیر اسید نوکلوئیک به کمک دستگاه ترموسایکلر (PCR) :

پس از استخراج اسیدنوکلئیک نوبت به تکثیر آن توسط تکنیک PCR می رسد. همانگونه که گفته شد از این تکنیک برای تکثیر قطعه ای از DNA یا RNA که بین دو منطقه با توالی مشخص قرار دارد و دو آغازگر نوکلئوتیدی به دلیل برخورداری از توالی بازهای مکمل در این دو ناحیه به دو رشته DNA مختلف الجهت متصل می شوند، استفاده می‌گردد. واکنش تکثیر توسط آنزیم Taqپلیمراز انجام می‌شود. در ابتدا با افزایش درجه حرارت به دمای ۹۴ درجه سانتیگراد دو رشته‌ی DNA الگو از هم باز شده و سپس مخلوط واکنش تا دمایی که اجازه دهد آغازگرها به توالی های هدف بچسبند، سرد می شود. سپس آغازگرهای متصل شده، توسط DNA پلیمراز تک، بسط می‌یابند.

ترکیبات یا اجزای اصلی واکنش PCR:

۱- آب استریل: برای نهایی کردن DH_2O که باید کل ان حجم ml۵۰ یا ml۲۵ باشد .

۲- بافر PCR : بافر استاندارد PCR حاوی KCL و TrisCl. شرایط یونی و pH مناسب را برای واکنش PCR فراهم می کند. بافر به صورت 10 x ساخته می گردد . این بافر شامل موادی با غلظت های زیر می باشد . دارای گلیسیرول برای سنگینی کار و دارای رنگ برای مشهود سازی DNA دارد .

۳- نمک ($MgCl_2$): حضور یونهای دوظرفیتی منیزیوم برای حفظ pH بسیار ضروری است. کلرید منیزیم نقش کوفاکتوری در فعالیت آنزیم Taq دارد

نکته: غلظت زیاد ان اثر بازدارندگی برروی فعالیت آنرزیم تک دی ان آپلی مراز دارد و مقدار محصول نهایی را کاهش می‌دهد. رابطه مستقیمی بین افزایش غلظت dNTPs و $MgCl_2$ در محلول واکنش وجوددارد و مقدار مناسب آن باید به طور عملی در آزمایشگاه بدست آید .

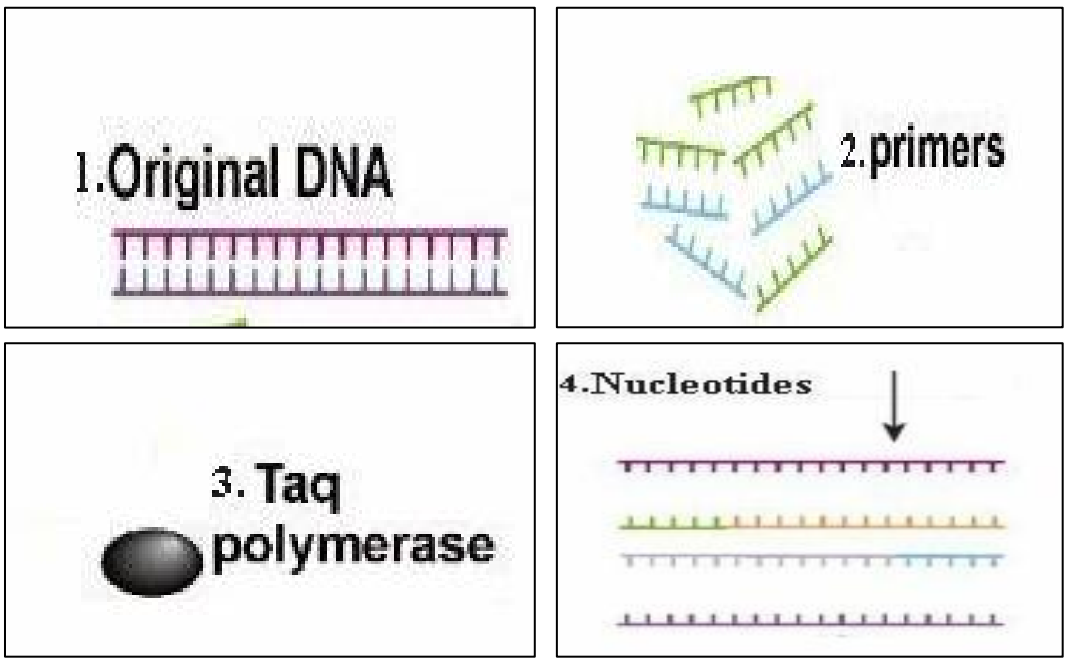
۴- داکسی ریبونوکلئوتید تری فسفات ها (dNTPs) : که به صورت مخلوطی از چهار باز A-T-C-G در بازار وجود دارد تا کنار هم چیده شوند . و رشته مکمل را ایجاد کنند. dntpها با غلظت اشباع ۲۰۰ میکرولیتر برای هر dntp مورد استفاده قرار می گیرند.

۵- آغازگر الیگومر مستقیم (forward) و آغازگر الیگومر معکوس (revers): دارای ۱۶-۲۴ نوکلئوتید طول و معمولا با غلظت ۱ میکرولیتر استفاده می شوند و این مقدار حداقل برای ۳۰ سیکل تکثیر کفایت می‌کند. به محض اتصال آغازگرها به رشته های الگو در دمای کم (۴۴- ۶۴ درجه سانتی‌گراد) آنزیم DNA پلیمراز تک شروع به فعالیت می کند.

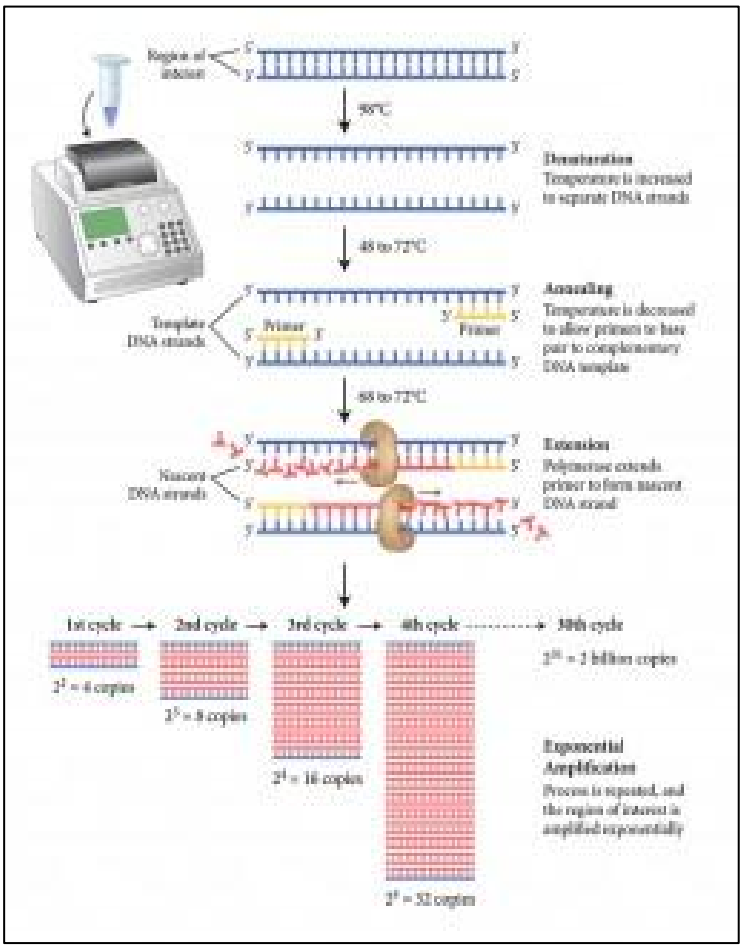
نکته: طول پرایمرها بسیار مهم است هر چه طول پرایمر بلند باشد اختصاصی تر عمل می‌کند. برای تعیین طول مناسب می توان از رابطه (تعداد بازها در ژنوم هدف ۴،۴،۴...=>x2) استفاده کرد . که n برابر تعداد بازهای مناسب برای اغازگر می باشد . این دو پرایمر دو عمل انجام می دهند . اول این که محل ژنی که باید تکثیر شود را مشخص می نمایند و دوم این که اندازه قطعات تکثیر شونده را تعیین می کنند. باید توجه داشت دو پرایمر دارای نقطه ذوب نزدیک به هم باشند پرایمر مورد نظر توسط کامپیوتر انتخاب می‌گردد.

۶- DNA پلیمراز تک: برای انجام واکنش PCR ایده آل، تقریبا به ۲ واحد از این آنزیم نیاز می باشد. افزودن آنزیم اضافی ممکن است منجر به تکثیر توالی های غیر هدف شود. این آنزیم فعالیت اگزونوکلئازی وابسته به پلیمراز از جهت ´۳ به ´۵ انجام می دهد.

۷- توالی هدف یا الگو: غلظت توالی هدف در واکنش PCR معمولا در حد نانوگرم (۵-۱۰۰ نانوگرم) است. بسته به هدف ازمایش از منابع مورد نیاز با استفاده از یکی از روشهای مرسوم استخراج می شود.



برخی از اجزای واکنش PCR : DNA الگو (Original DNA) اولیگونوکلئوتیدها (پرایمرها)، DNA پلیمراز (Taq polymerase) و نوکلئوتیدها



طرح کلی واکنش PCR

واکنش PCR طبق مواد ذکر شده در جدول زیر (به عنوان نمونه) با در نظر گرفتن واکنش‌های مورد نظر بـه همـراه کنترل منفی و مثبت تهیه می شود، لوله شاهد مثبت حاوی DNA الگـویی اسـت کـه قـبلا کـارایی ان در واکـنش PCR تایید شده است. لوله شاهد منفی بدون الگو می باشد . حجـم نهـایی واکـنش PCR معمـولا ۲۰ میکرولیتـر می باشد. تمام اجزاء فوق(به جز DNA) ابتدا دریک لوله mix و سپس محلـول مـادری در میکروتیـوپ‌هـای۰/۲ تقسیم و به خوبی مخلوط گردیده و پس از افزودن ۲ میکرولیتر DNA الگو به آنها ، یک سـانتریفوژ کوتـاه انجـام شده و در دستگاه PCR قرار می‌گیرند.

ترکیبات	مقدار بر حسب میکرولیتر
آب مقطر ۲ بار تقطیر اتوکلاو شده	۱۱/ ۵
بافر PCR با غلظت ۱۰ برابر	۲
۲/۵$MgCl_2$ میلی‌مولار	۱/۲
مخلوط ۲۰۰dNTP میکرومولار	۱
آنزیم تک پلیمراز	۰/۲۵
آغازگر رو به جلو ۱۰ پیکومولار	۱
آغازگر برگشتی ۱۰ پیکومولار	۱
DNA الگو	۲
حجم نهایی	۲۰

ترکیب محلول مادری (Master mix) واکنش PCR(به عنوان نمونه)

زمان	درجه حرارت	
4 min	94°	
45 second	**94°**	**30 cycles**
40 second	**60°**	
60 second	**72°**	
7 min	72°	
Hold	4°	

درجه حرارت و زمان مناسب برای دستگاه PCR (به عنوان نمونه)

بازدارنده های فعالیت PCR:

۱- مواد موجود در نمونه های متفاوت موجودات زنده مانند وجود ترکیبات فنلی و غیره که باید با انتخاب صحیح روش استخراج از محلول DNA جداشود .

۲- شوینده های موجود در بافر استخراج : در مراحل استخراج DNA از شوینده های غیر یونی مانند triton x و twen و... استفاده می شود . که برروی PCR اثر باز دارندگی ندارند ولی شوینده های یونی مثل sds (سدیم دودسیل سولفات) فقط به مقدار کم در محلول قابل تحمل می باشد . بنابراین با استفاده از فنل و یا شستشو با الکل باید این مواد را از DNA جداکرد . مقدار ۱٪ از ان برای پی سی ار عامل بازدارنده محسوب می شود .

۳- آنزیم پروتئیناز k که در مراحل استخراج DNA همراه با مواد شوینده برای هضم پروتئین استفاده می شود . به عنوان بازدارنده فعالیت PCR می باشد . زیرا انزیم taq نسبت به این انزیم حساس می باشد . و این انزیم باید حذف یا غیر فعال شود . با تیمار گرمایی می توان سبب غیر فعال شدن این انزیم شد که در این صورت بایستی بعد از تلخیص DNA با فنل و کلروفوم ان را هم سانتریوفوژ نمود که در این صورت باقیمانده پروتئیناز k به داخل فاز فنلی وارد شده و DNA در فاز مایع باقی می ماند .

۴- باقیمانده فنلی : فنل نیز بایستی از محیط خارج شود زیرا بازدارندگی بر فعالیت انزیم Taq DNA polymerase دارد . که به این منظور پس از استفاده از فنل و کلروفرم از ایزو پروپانول استفاده کرد.

افزاینده های فعالیت PCR:

فورمامید ٪۵

دی متیل سولفوکسید کمتر از ٪۱۰

تترامتیل امونیوم کلراید ۱۰۰ – ۱۰ ٪

پلی اتیلن گلیکول ۶۰۰۰ ٪۵ ـ ۱۵

گلیسرول ٪۱۰- ۱۵

تووین۲۰ ۵/۲ – ۱/۰ ٪

انواع PCR :

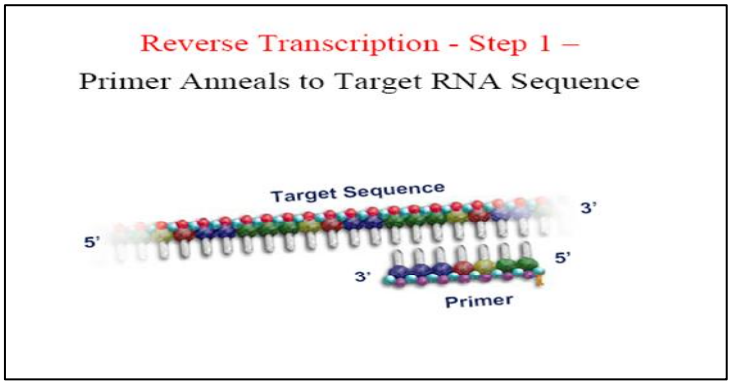
بمنظور نتیجه گیری بهتر، غیر از PCR معمولی روش های جدیدی از PCR ارائه شده است که به صورت اجمالی به برخی از آنها اشاره می شود.

۱– آر تی _ پی سی آر (RT-PCR)(Reverse Transcriptase-PCR) :

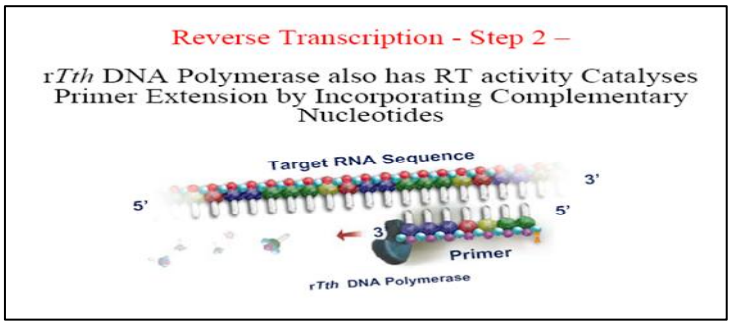
RT-PCR روشی بسیار حساس در مطالعه تظاهر ژن در سطح RNA به شمار می آید. در این روش برای تکثیر DNA از مولکول RNA به عنوان الگو استفاده می شود. در واقع الگوی اولیه درRT-PCR ، مولکول RNA تک زنجیره ای است. این تکنیک بیشتر برای شناسایی ویروسهای بیماریزای گیاهی که دارای ژنوم از نوع RNA هستند به کا ر می رود. از آنجائیکه DNA پلیمراز قادر به استفاده از RNA بعنوان الگو نمی باشد، مرحله دیگری به PCR اضافه شده است. طی این مرحله، تکثیر به وسیله اتصال یک آغازگر به الگوی RNA و سنتز یک نسخه مکمل آن با استفاده از آنزیم ریورس ترانس کریپتاز RT (Reverse Transcriptase)، آغاز می شود. در واقع از الگویRNA ، مکمل آن cDNA (complementary DNA) سنتز می شود و بوسیله تکنیک PCR تکثیر می یابد. برای سنتز cDNA می توان از آغازگرهای هگزامری تصادفی (برای تکثیر ژنوم پروکاریوتها که فاقد انتهای پلی آدنین A هستند) یا از آغازگرهای خاص ژن Gene-specific-primer و یا از آغازگر الیگو dt استفاده کرد. آنزیم نسخه بردار معکوس ابتدا از دو ویروس به دست آمد به نام های : Avian=(AMV.) Myeloblastosis Virus و Moloney Murine Leukemia Virus=(MMLV.). کاربرد آنزیم های این دو ویروس دارای اشکالاتی بود از جمله اینکه این آنزیمها حساس به حرارت هستند . لذا محققین سعی می‌کردند شرایط PCR را با سختی و اختصاصیت پایینی انجام دهند . ولی بعدها از باکتری حرارت دوستی به نام ترموس ترموفیلوس یک DNA پلیمراز مقاوم به حرارت به نام Tth جدا شد که در حضور یون Mn^{2+} دارای فعالیت نسخه برداری معکوس بود . این آنزیم می تواند در 72^oC در حضور Mn^{2+} ، از روی RNA ، DNA بسازد. سپس این Mn^{2+} اضافه شده را با استفاده از یک مهار کننده با خاصیت شلاتینگ به نام EGTA حذف کرده و سپس این آنزیم از cDNA که خود ساخته است استفاده کرده آن را تکثیر می نماید . بنابراین همان گونه که مشاهده می شود یک آنزیم می تواند به تنهایی از روی RNA ، cDNA بسازد و سپس cDNA ساخته شده در اثر یک تغییر ساده در شرایط بافری (اضافه کردن EGTA) توسط تکنیک PCR تکثیر می شود . استفاده از دمای بالا به دلیل ایجاد شرایط سخت تر موجب حساسیت و اختصاصیت بیشتری می شود .

اولین گام استخراج RNA از بافتهای گیاهی آلوده است. تا کنون روشهای گوناگون برای استخراج RNA از بافتهای گیاهی آلوده بیان شده است که از نظر کیفیت و کمیت RNA استخراج شده و نوع روش به کار رفته باهم تفاوت دارند. از این رو اختصاص دادن زمان کافی در بهینه کردن روش استخراج RNA خالص مفید خواهد بود. همچنین اخیرا از کیت های آماده ی استخراج RNA نیز استفاده می شود که پروتوکل های استخراج بر اساس شرکت سازنده تا حدودی متفاوت می باشد. پس از استخراج ژن مورد نظر اقدام به انجام آزمایش T-PCR می کنیم.

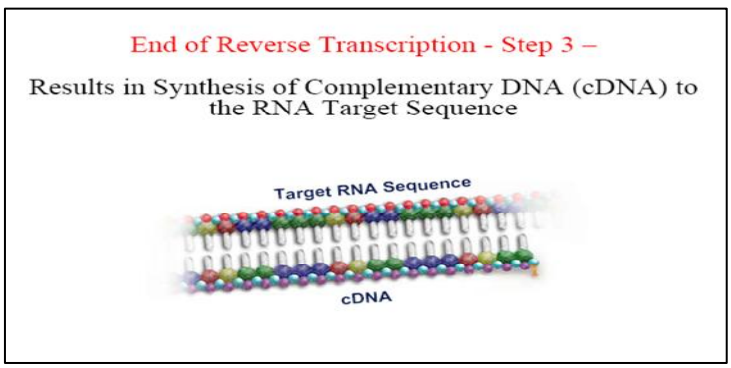
طرح کلی از مراحل واکنش RT-PCR در ذیل نشان داده شده است:



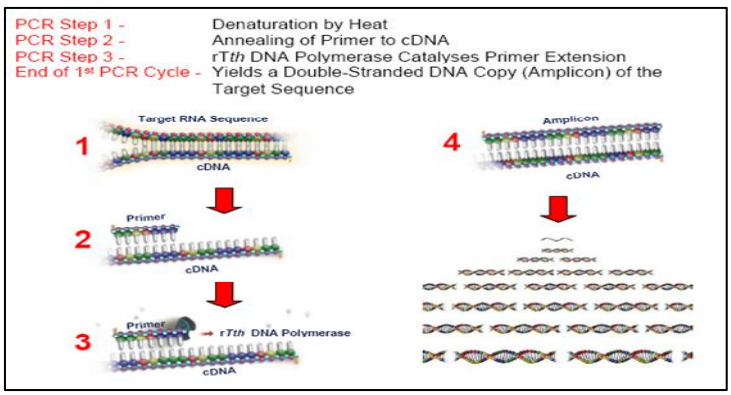
مرحله ۱– اتصال پرایمر معکوس (Revers) به رشته RNA الگو



مرحله ۲– ترجمه معکوس به توسط AMV-Revers transcriptase



مرحله ۳– سنتز cDNA از روی RNA در جهت ´۳ به ´۵



مرحله نهایی: تکثیر cDNA سنتز شده به وسیله واکنش PCR

پروتوکل سنتز یک نمونه cDNA با استفاده ازکیت سنتز cDNA (Thermo scientific, K1621, K1622):

مرحله اول: اضافه کردن ترکیبات زیر در یک میکروتیوپ استریل و nuclease-free بر روی یخ، طبق مقادیر ارائه شده	
Water RNase free	3.5 µL
Template RNA(total RNA or poly(A) mRNA or specific RNA)	8 µL
Primer (oligo(dT) or random hexamer or gene-specific primer)	1 µL
حجم محلول واکنش در داخل میکروتیوپ جمعا ۱۲/۵ میکرولیتر، انتقال به دستگاه ترموسایکلر ۷۰ درجه سانتیگراد به مدت ۵ دقیقه، بلافاصله انتقال به روی یخ	

مرحله دوم: اضافه کردن ترکیبات زیر طبق مقادیر ارائه شده	
Reaction buffer (5x)	4 µL
dNtp(10mM)	2 µL
Ribolock(RNase inhibitor)	0/5 µL
حجم محلول واکنش در داخل میکروتیوپ جمعا ۱۹ میکرولیتر ، انتقال به دستگاه ترموسایکلر ۳۷ درجه سانتیگراد به مدت ۵ دقیقه	

مرحله سوم: اضافه کردن آنزیم طبق مقدار ارائه شده
Revers Transcriptase(M-MuLV) 1 µL
حجم محلول واکنش در داخل میکروتیوپ جمعا ۲۰ میکرولیتر، انتقال به دستگاه ترموسایکلر ۴۲ درجه سانتیگراد به مدت ۶۰ دقیقه و سپس ۷۰ درجه به مدت ۱۰ دقیقه

به این ترتیب cDNA سنتز شده و آماده برای انجام واکنش RT-PCR است که طبق پروتوکل ذیل شرح داده شده است. در واقع پس از استخراج RNA و سنتز cDNA از روی آن به روش های ذکر شده فوق، اقدام به انجام آزمون PCR می کنیم. اولین مرحله تهیه محلول مادری (Master mix) است. که مقادیر آن در جدول ذیل نشان داده شده است. این مخلوط شامل تمامی ترکیبات ذکر شده در جدول به استثنای cDNA است. سپس Master mix تهیه شده به نسبت مساوی در میکروتیوپ ها توزیع شده و به هر میکروتیوپ ۲ میکرولیتر از cDNA سنتز شده را اضافه کرده و بدین ترتیب حجم مخلوط واکنش در هر میکروتیوپ ۲۵ میکرولیتر خواهد شد.

سپس طبق برنامه زمانی و حرارتی مشخصی (طبق پروتوکل ذیل) که به دستگاه ترموسایکلر داده ایم، میکروتیوپ ها را در داخل دستگاه قرارداده و دستگاه را ران می کنیم.

ترکیبات	مقدار بر حسب میکرولیتر
PCR Buffer(10x)	2.5 µl
Mgcl2(50 mM)	1 µl
dntp(10 mM)	0.5 µl
Forward Primer 10µM	1 µl
Reverse Primer 10µM	1 µl
Taq DNA Polymerase	0.4 µl
cDNA	2 µl
Water	16.6 µl
Total	25 µl

جدول ترکیبات و مقادیر استفاده شده در فرآیند RT-PCR (Material components RT-PCR)

زمان	درجه حرارت	
5 min	94°	
75 second	**92°**	**40 cycles**
30 second	**44°**	
80 second	**72°**	
20 min	72°	
Hold	4°	

یک نمونه از برنامه حرارتی و زمانی PCR:

دستگاه ترموسایکلر (PCR)

۲– نستد – پی سی آر (Nested-PCR) :

در این روش بمنظور افزایش حساسیت PCR از دو جفت پرایمر استفاده می شود. ابتدا با یک جفت پرایمـر اول در طول ۳۰-۱۵ چرخه، قطعات مشخصی از DNA هدف تکثیر می یابند. سپس محصول PCR حاصل به لوله دیگری منتقل شده و بعنوان الگو استفاده می شود و بوسیله جفت پرایمرهای دوم مرحله دوم PCR انجام می شود.

۳– مالتیپلکس – پی سی آر (Multiplex-PCR):

در این روش از چند جفت پرایمر اختصاصی برای هدف های مختلف استفاده می شود. با استفاده از این روش امکـان شناسایی چندین عامل بیماری در یک نمونه بطور همزمان وجود دارد و می توان آلودگیهای کمـپلکس را تـشخیص داد.

۴–آرمز– پی سی آر (Amplification Refractory Mutation System-PCR)(ARMS-PCR):

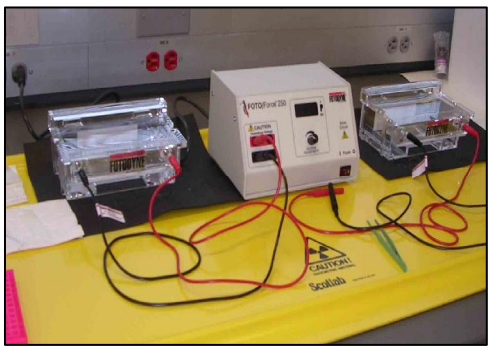
روش آرمز _ پی سی آر (ARMS-PCR) برای تشخیص موتاسـیون هـای نقطـه ای بکـار مـی رود و از دو جفـت پرایمر استفاده می شود. در این روش، واکنش در دو لوله جداگانه انجام می شود که یکی از آنهـا حـاوی پرایمرهـای نوع موتاسیون یافته و دیگری حاوی پرایمرهای نوع معمولی است. چنانچه تکثیر در لولـه حـاوی پرایمـر موتاسـیون یافته انجام شود، در DNA هدف، موتاسیون اتفاق افتاده است و تکثیر در لوله حاوی پرایمر معمولی، نـشان دهنـده آن است که موتاسیونی اتفاق نیفتاده است. از این متد می توان در تشخیص موتاسیون های مولد مقاومت دارویی در باکتری‌ها استفاده کرد.

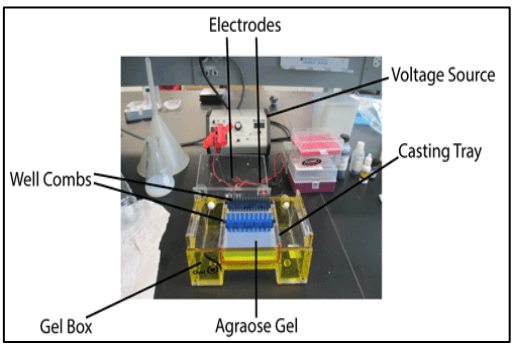
مشاهده محصول PCR روی ژل:

پس از تکثیر PCR می توان الگوی باندی نمونه ها را در ژل مناسب مورد بررسی قرار داد. لذا با استفاده از الکتروفورز ژل آگارز و رنگ آمیزی با اتیدیوم بروماید، موفقیت تکنیک و کسب اطمینان از تکثیر قطعه مورد نظر به اندازه کافی، مورد آزمایش قرار می‌گیرد.

نمای ساده از دستگاه الکتروفورز:

دستگاه الکتروفورز شامل یک محیط خلاء، یک الکترود منفی و یک الکترود مثبت در دو طرف ذره باردار می باشد. اسیدهای نوکلئیک دارای بار الکتریکی هستند. گروه های فسفات روی اسیدهای نوکلئیک دارای بار منفی هستند. بنابراین رشته DNA دارای بار الکتریکی منفی می باشد. وقتی کلید باز است یا به عبارتی جریان الکتریکی قطع می باشد ذره موردنظر در میدان الکتریکی ثابت است و زمانی که کلید بسته است یا به عبارتی جریان الکتریکی وصل باشد ذره موردنظر به تنهایی و با سرعت شتابدار تا رسیدن به الکترود مثبت حرکت کرده و برقراری جریان الکتریکی در تانک الکتروفورز همواره از الکترود منفی به سمت الکترود مثبت است. البته این مطلب در مورد رشته DNA که دارای بارالکتریکی منفی است صادق است. تحرک الکتریکی معیار اصلی سنجش در جداسازی مولکول هاست. وجود ضریب اصطکاک f یک عامل مقاوم برای تحرک است. درحالی که وجود بار باعث زودتر رسیدن ذره به قطب است. هرچه ذره بزرگتر باشد و شکل آن از حالت کروی دور باشد ضریب اصطکاک f بیشتری داشته و تحرک الکتریکی کمتری داراست. درواقع تحرک الکتریکی هر ذره وابسته به شکل و اندازه ذره و بار ذره است و ضریب اصطکاک نیز کمیتی است که ارتباط مستقیم با اندازه و شکل ذرات دارد هرچه ذره به شکل کروی نزدیکتر باشد ضریب اصطکاک کمتری دارند.

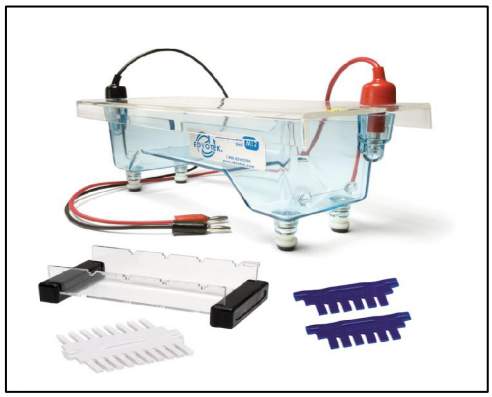




نمایی از دستگاه الکتروفورز افقی

مواد و وسایل لازم برای انجام الکتروفورز ژل آگارز:

پودر آگارز، بافر TBE، سینی (Tray) و شانه مخصوص ژل آگارز، تانک الکتروفورز افقی، منبع تغذیه الکتروفورز، DNA، بافر نمونه گذاری(Loading dye) ، مارکر ملکولی(Ladder) ، اتیدیوم بروماید، دستگاه مشاهده و عکس برداری از ژل (ترانس ایلومیناتور و Documentation Gel).



تهیه بافر TBE (10 x):

برای تهیه TBE(10 X) مقادیر ۲۷ گرم Tris-base، 75/13 گرم اسید بوریک و ۱۳/۲ گرم EDTA را در ۲۲۵ میلی لیتر آب مقطر حل کرده و pH را روی ۸ تنظیم می‌کنیم لازم به ذکر است که هنگام مصرف از (TBE 1 X) استفاده می‌شود.

نوع ماده	مقدار
Tris-base	27 gr
Boric acid	75/13 gr
EDTA	2/13 gr

تهیه ژل آگارز ۱٪ :

برای تهیه ژل آگارز یک درصد، یک گرم از پودر آگارز (شرکت Merck) در ۱۰۰ میلی لیتر (TBE 1 X) مخلوط شده و به کمک حرارت حل شد تا نهایتاً محلول شفافی بدست آمد. حدود ۱۰ الی ۲۰ دقیقه صبر کرده تا محلول خنک شود. سپس با آماده کردن شانه مخصوص مورد نیاز و قرار دادن بر روی سینی مخصوص، محلول را در سینی ریخته بطوریکه در دمای آزمایشگاه سفت و محکم شد. پس از آن شانه را خارج و از چاهکهای برجای مانده بعنوان محل قرار دادن نمونه استفاده گردید.

قدرت جداسازیDNA	درصد آگارز
100-1000bp	3
200- 1500bp	2
300- 3000bp	1.5
500 – 5000bp	1
1000- 7000bp	0.8
10 – 30kbp	0.6
30 – 50kbp	0.4

قدرت جداسازی مولکولهای DNA توسط غلظتهای مختلف آگارز

تهیه بافر نمونه گذاری (Loading dye):

برای پر کردن نمونه های DNA در چاهک ها، لازم است ابتدا نمونه ها با بافر نمونه گذاری مخلوط شوند، تا بدین وسیله با اضافه شدن چگالی، محلول DNA بتواند به ته چاهک رسوب نماید. یکی از فرمولهای این بافر دارای اجزای زیر است:

گلیسرول	(W/V) ٪۳۰
رنگ برومو فنل بلو Bromo Phenol Blue	(W/V) ٪۰/۲۵
زایلن سیانولXylen Cyanol	(W/V) ٪۰/۲۵

افزایش چگالی نمونه DNA به دلیل وجود گلیسیرین در بافر می‌باشد. بروموفنل بلو و زایلن سیانول مواد رنگی می‌باشند که در ژل نوارهای رنگی تولید می‌کنند و پیشرفت الکتروفورز را نشان می‌دهند. سرعت حرکت نوار سرمه‌ای برموفنول بلو و آبی رنگ زایلن سیانول در ژل ۱-۰/۸٪ به ترتیب معادل سرعت حرکت ملکول DNA با طول ۲۵۰و۴۴۶۰ جفت باز می‌باشد. محل حرکت نوارهای رنگی، تخمینی از نحوهٔ الکتروفورز و جدا شدن ملکولهای DNA از یکدیگر می‌باشد.

محلول اتیدیوم بروماید

مقدار ۱ گرم از پودر اتیدیوم بروماید را در ۱۰۰ میلی لیتر آب مقطر حل کرده و در یک ظرف دربسته و در تاریکی نگهداری گردید. مقدار ۱۰ میکرولیتر از این محلول (با غلظت 10mg/ml) را می‌توان در یک لیتر آب مقطر رقیق کرده و در ظرفی در بسته و دور از نور برای رنگ آمیزی DNA استفاده کرد. از امواج U.V برای مشاهده DNA رنگ شده با اتیدیوم بروماید بوسیله دستگاه عکس برداری از ژل استفاده می شود.

روش کار الکتروفورز:

۱. پودر آگارز را وزن کرده و درون بشر یا ارلن بریزید.

۲. TBE lox را که در دسترس است توسط آب مقطر به نسبت ۱۰:۱ رقیق کرده و بدین طریق TBE lx را بسازید.

۳. شانه (Comb) را بر روی سینی موردنظر قرار دهید و فاصله بین سینی و شانه را ۱mm درنظر گرفته وبراساس این فاصله جایگاه شانه بر روی سینی را تنظیم کنید.

۴. TBE lx را براساس حجم موردنظر توسط استوانه مدرج داخل ارلن یا بشر ریته و به آهستگی تکان دهید.

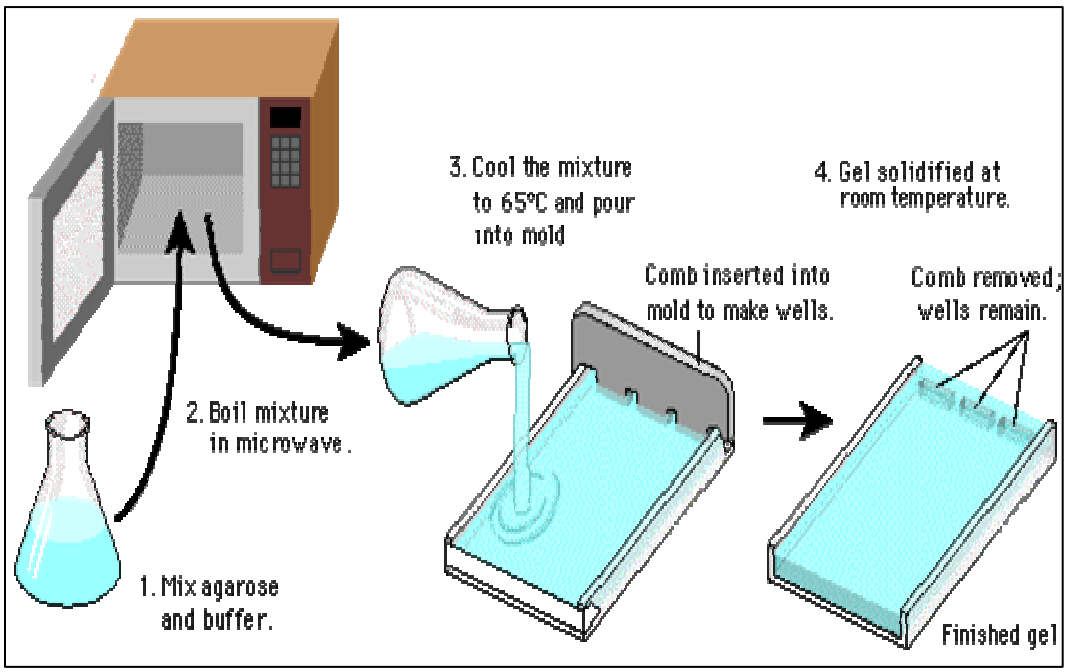
۵. محلول داخل ارلن را در داخل ماکروویو قرار داده یا بجوشانید بطوری که ذرات آگار داخل آن کاملاً حل شده و ذره ای داخل آن نباشد و محلول یکنواخت گردد. و سپس محلول موردنظر را سرد کنید.

۶. به محلول درون بشر در حدود (۱-۲μL) از اتیدیوم بروماید توسط سمپلر اضافه کنید.

۷. محلول را تکان دهید تا اتیدیوم بروماید کاملاً در آن حل شده و محلول یکنواخت گردد.

۸. محلول درون بشر را به آرامی درون سینی ریخته و در حدود ۲۰ دقیقه صبر کنید تا ژل آگارز بسته شود.

۹. ژل را به همراه سینی داخل تانک الکتروفورز قرار دهید و جای آن را ثابت کنید و سپس تانک را تا کمی بالاتر از ژل توسط TBE lx پر کنید.



تهیه ژل آگارز و نحوه ریختن آن در سینی تانک الکتروفورز

طریقه ران کردن (Running Procedure):

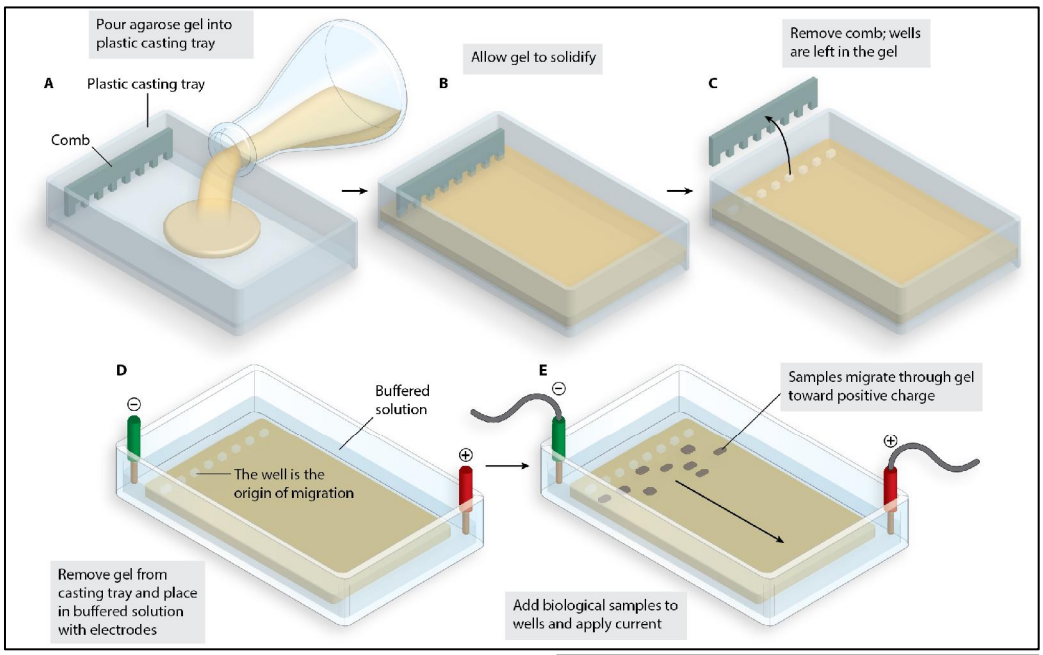
۱. به تیوبهای حاوی نمونه به ازاء هر ml۵ از نمونه موردنظر در حدود ml۱ از Loading Buffer به آن اضافه کرده و خوب Pipeting کنید.

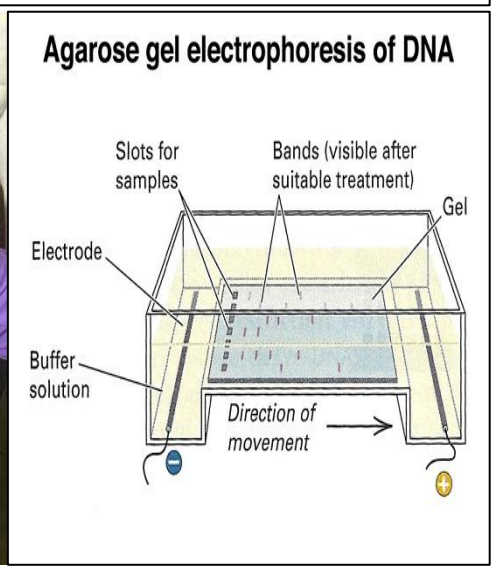
۲. بوسیله سمپلر محتویات درون هر tube را داخل چاهک از سمت چپ به راست از ژل run کنید و در آخرین چاهک نیز مارکر را ران کنید.

۳. جریان الکتریکی در حدود ۱۲۰ ولت به تانک وصل کنید تا محلول run شده از چاهکها خارج شود و سپس ولتاژ را پائین آورید و در ولتاژ حدوداً بین ۸۰ تا ۹۰ ولت قرار دهید.

۴. پس از حدوداً ۴۵ دقیقه ژل را از تانک خارج کنید و سپس از سینی نیز خارج کرده و در داخل دستگاه Gel Doc قرار دهید.

۵. پس از قراردادن ژل در داخل دستگاه عکس ژل را بگیرید.





نحوه run (لود) کردن نمونه ها درون چاهک های ژل آگارز

کار دستگاه ژل داک(Gel Cod):

۱- ژل را از سینی خارج کرده و داخل دستگاه Gel Doc قرار داده و جایگاه ژل را تنظیم کرده و درب دستگاه را ببندید.

۲- مانیتور را روشن کرده و از طریق مانیتور محل قرارگرفتن ژل را تنظیم کنید.

۳- سپس اشعه uv را روشن کرده تا باندها نمایان شوند.

۴- با کلید (+) و (-) نور را زیاد و کم کنید.

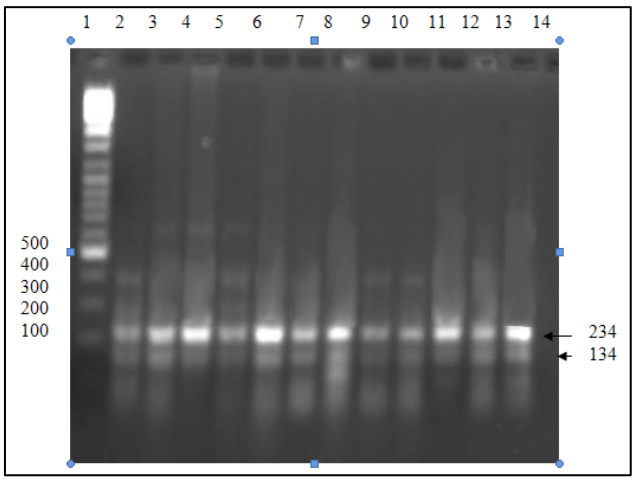
۵- وقتی باندها مشخص شد ابتدا کلید save را فشار دهید و سپس کلید print را روی دستگاه printing فشار دهید و عکس ژل را بگیرید.

۶- سپس uv را خاموش کرده و تمام دستگاه ها را نیز خاموش کرده و ژل را از دستگاه Gel Doc خارج نمائید.

یک نمونه از دستگاه عکسبرداری (ژل داک)

نتیجه گیری:

از مقایسه باندها با باندهای دیگر و همچنین مارکر(marker) و نمونه normal می‌توان تغییرات را تشخیص داد و یا حتی وجود یا عدم وجود DNA را نیز را مشخص کرد. ایجاد باند و تأثیر uv روی آن وجود DNA را ثابت می کند.



الکتروفورز محصول PCRحاصل از تکثیر یک قطعه bp ۲۴۳ در ژل آگارز ۲ درصد

کاربردهای PCR :

تکنیک PCR کاربردهای نا محدودی در عرصه های مختلف زیست مولکولی دارد ، علت اصلی این امر این است کـه DNA الگوی بکار رفته در PCR را می توان از منابع مختلف تامین کرده و مورد استفاده قرار داد .

بطور کلی PCR به دو منظور اصلی بکار می رود :

۱ – تهیه ی نسخه های متعدد از یک ژن

۲ – بررسی حضور یا عدم حضور یک ژن خاص در یک قطعه DNA

۳- در نقشه یابی DNA

۴- در ردیف یابی DNA

۵- در فیلوژنتیک مولکولی

منابع:

- فارسی، م.، ذوالعلی، ج.. ۱۳۸۶. اصول بیوتکنولوژی گیاهی". انتشارات دانشگاه فردوسی مشهد. شماره ۳۹۲.
- نقوی، م.ر.، قره یاضی، ب. حسینی سالکده، ق. ۱۳۸۶ ،نشانگرهای مولکولی، انتشارات دانشگاه تهران، شماره ۲۷۱۶.

Diagnostic protocols for regulated pests, EPPO Standards. 2004.OEPPO/EPPO, Bulletin OEPPO/EPPO Bulletin 34, 155-157..

http://yakhteh.net/?p=1691#sthash.B6me7pWV.dpuf

http://www.cell-biology.blogsky.com/PCR

http://www.bbook.ir/article68.html

http://www.40cheragh.blogfa.com/post-44.aspx

http://en.wikipedia.org/wiki/Polymerase_chain_reaction

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/probe/docs/techpcr

file:///C:/Documents%20and%20Settings/m.faraji/Desktop/cdna/cDNA%20Synthesis/%20Selection%20Guide.htm

file:///C:/Documents%20and%20Settings/m.faraji/Desktop/cdna/cDNA%20Synthesis%20and%20Cloning.htm

http://www.qiagen.com/resources/download.aspx?id=14e7cf6e-521a-4cf7-8cbc-bf9f6fa33e24&lang=en

http://www.thermoscientific.com/fermantas

mfaraji@ut.ac.ir