واکنش زنجیر پلی‌مراز (PCR)

دکتر رضا میرنژاد: باکتریولوژیست، استادیار دانشگاه

تکنیک PCR در اواسط دهه 1980 توسط کری مولیس معرفی شد و باعث تحول مهمی در بیولوژی شد. با این روش می‌توان قطعات DNA از سلول‌های مختلف و نمونه‌های بیولوژیک مجهول و مشکوک، زنجیر مفرد DNA با ملکول‌های RNA و حتی DNA از یک سلول تنها را تکثیر نمود. اسیدهای نوکلئیک این منابع به عنوان الگو برای سنتز DNA عمـــــل می‌کنند. این روش جایگاه ویژه‌ای در میکروب شناسی تشخیصی، ویروس‌شناسی و پزشکی قانونی برای مشاهده و تکثیر قطعات مهم تشخیص از ملکول‌های DNA مفید است و امروزه روش‌های مختلف PCR جهت تشخیص عوامل میکروبی قابل کشت و غیر قابل کشت در آزمایشگاه‌های مدرن انجام می‌گیرد و یک روش تشخیصی سریع عوامل میکروبی می‌باشد. با این روش می‌توان موارد زیر را مورد بررسی قرار داد:

1- مشاهدات توالی خاصی از DNA پاتوژن‌های خاص

2- مشاهدات تغییرات ژنتیکی

3- غربالگری اختلالات ژنتیکی

4- تهیه نسخه‌های متعدد از یک ژن

روش PCR بسیار حساس است. در این روش با استفاده از یک میکروگرم از کل ژنوم DNA موجود زنده می‌توان یک تا دو میلی‌گرم از DNA مورد نظر را ساخت، حتی اگر DNA مورد نظر، درصد بسیار کمی از کل DNA بوده باشد. در هر حال تکثیر یک فرآورده می‌تواند تحت تأثیر شرایطی نظیر غلظت کاتیون مورد نیاز برای فعالیت آنزیم، وجود مهار کننده‌های پلی‌مراز و تعداد چرخش‌های بکار رفته در طی عمل PCR قرار گیرد. این روش به ویژه در تکثیر قطعه‌ای از DNA که بین دو منطقه از توالی شناخته شده قرار گرفته مفید است.

اختصاصی بودن این روش به استفاده از پرایمرهای الیگونوکلئوتید سنتزی بستگی دارد. پرایمرها، قطعات کوتاهی از زنجیر تکی DNA (15 تا 30 جفت باز) بوده که برای تولید یک مولکول دارای توالی خاص نوکلئوتیدی سنتز شده‌اند. دو پرایمر(F، R) معمولاً در روش PCR به کار می‌روند که هر کدام توالی‌های متفاوتی دارند. به طوری که توالی پرایمرها مکمل توالی‌هایی هستند که در زنجیر DNA الگو قرار دارند.

خصوصیات دیگر پرایمرهای ایده‌آل شامل موارد زیر است:

1- تا آنجا که ممکن است فاقد مناطق غنی از GC و AT باشد.

2- فاقد ساختمان ثانویه داخلی (لوپ‌ها) باشد.

3- فاقد پرایمر مکملی به ویژه در انتهای ′۳ باشد.

4- عامل دیگری که در انجام PCR به طور مؤثری تأثیر می‌گذارد، حرارت اتصال پرایمر به توالی هدف (annealing) است.

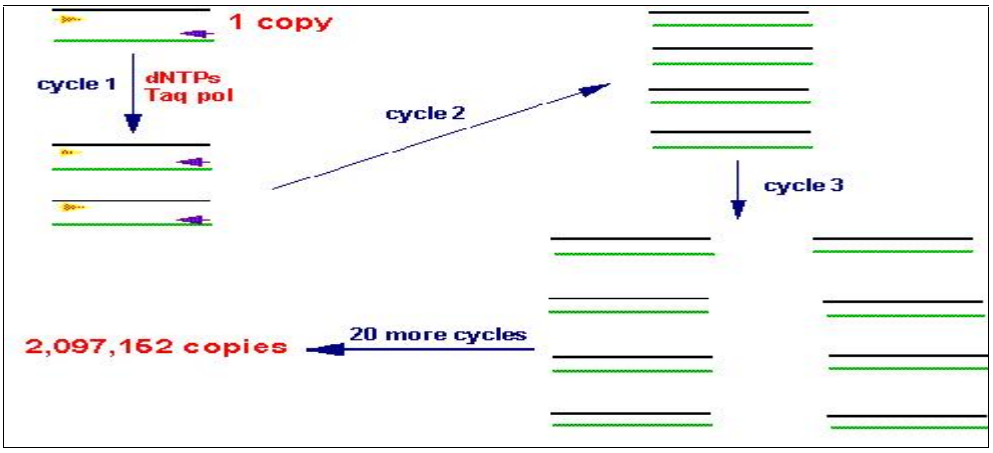
دو پرایمر مورد استفاده در روش PCR دو عمل انجام می‌دهند؛ اول اینکه محل ژنی که باید تکثیر شود را مشخص می‌نمایند و دوم اینکه اندازه قطعات تکثیر شونده را تعیین می‌کنند. عمل اول کاملاً مشخص است، در مورد عمل دوم باید گفت که وقتی این دو شناساگر به دو ناحیه مختلف DNA و به سمت هم قرار می‌گیرند DNA پلی‌مراز تنها قطعات را در بین این دو ناحیه همانند سازی می‌کند و به این ترتیب طول قطعات ساخته شده تعیین می‌شود.

لازم بذکر است که طراحی پرایمر یکی از اصلی‌ترین مراحل روش PCR می‌باشد و همانطورکه در بالا اشاره شد اختصاصی بودن روش PCR بستگی به استفاده از پرایمرهای ایده‌آل دارد، لذا بایستی برای عوامل میکروبی که احتمال آنها در نمونه‌های بالینی وجود دارد پرایمرهای مناسب طراحی گردد تا بتوان آن را سریعاً شناسائی کرد.

روش PCR با استفاده از DNA پلی‌مراز پایدار در برابر حرارت (Taq پلی‌مراز) که از باکتری گرمادوست به نام *Thermus aquaticus* بدست آمده است و ماشین‌هایی که به طور اتوماتیک، حرارت ضروری برای هر چرخه را در PCR فراهم می‌سازند تسهیل شده است. Taq پلی‌مراز، آنزیمی مناسب است زیرا در چرخه‌های حرارت

بالا (94 درجه سلسیوس) فعال باقی می‌ماند و فرآورده‌های عالی و کافی از DNA های کوتاه را فراهم می‌سازد. در هر حال، توالی‌های دراز DNA (برای مثال 2 کیلو باز) نیز می‌تواند به سادگی بوسیله این روش تکثیر یابد.

برای شروع DNA PCR الگو (نمونه مجهول، پرایمرها و نوکلئوتیدهای تری‌فسفات (dCTP، dTTP، dATP، dGTP) برای ساختن و تکثیر DNA، Taq پلی‌مراز برای تکثیر DNA جدید، یون‌های منیزیم مورد نیاز برای فعالیت آنزیم در یک لوله با هم مخلوط می‌شوند، سپس لوله را گرم می‌کنند تا دو رشته DNA از هم جدا شوند و در مرحله بعد با سرد کردن لوله حاوی محتویات فوق به پرایمرها این اجازه داده می‌شود که به نواحی مورد نظر متصل شده و DNA پلی‌مراز (آنزیم Taq) شروع به همانند سازی از روی DNA الگوی تک‌رشته‌ای بنماید. بعد از مدت لازم برای همانند سازی بار دیگر پرایمرها به نواحی مکمل خود متصل می‌شوند. چون در مرحله قبل رشته DNA در ناحیه مورد نظر مضاعف شده است، در این مرحله چهار رشته الگو برای همانند سازی وجود دارد و در نتیجه در پایان این مرحله چهار نسخه از ژن مورد نظر حاصل می‌شود، بار دیگر سیستم گرم می‌شود و در اینجا هشت نسخه به وجود می‌آید و در مرحله بعد 16 نسخه و به همین صورت بطور تصاعدی تعداد نسخه‌های ژن‌ها زیاد می‌شود. بطور کلی پس از n تکرار مادر محلول 2^n نسخه از ژن مورد نظر خواهیم داشت. مثلاً پس از 20 بار تکرار ما 2^n یعنی 262144 نسخه و پس از 30 بار تکرار 268435456 نسخه ایجاد خواهد شد که خیلی بیشتر از نیازهای معمولی برای انجام کارهای زیست شناسی مولکولی می‌باشد (شکل1) .

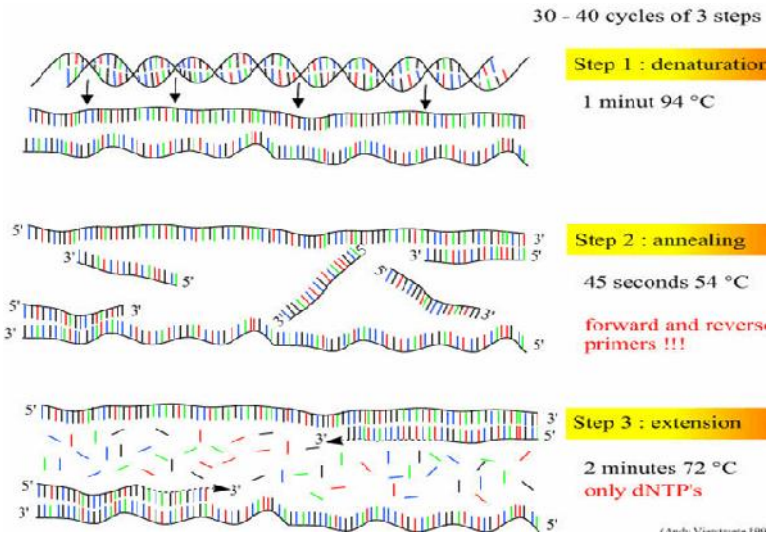


شکل1: سیکل های مختلف PCR

لازم بذکر است که در ابتدای طراحی PCR از آنزیم DNA پلی‌مراز اشریشیا کلی استفاده می‌شد، ولی این آنزیم به حرارت حساس بوده و پس از هر بار حرارت دادن محیط واکنش تا دمای 94 درجه سلسیوس، افزودن دوباره آنزیم تازه به محیط لازم بود. یکی از مهم‌ترین کشفیات در این زمینه این بود که آنزیم Taq پلی‌مراز از باکتری گرمادوست جدا شده و این آنزیم مقاوم به گرما می‌باشد. این آنزیم در 94درجه سلسیوس پایدار است ولی درجه حرارت اپتیم آن72 درجه سلسیوس می‌باشد. این آنزیم باعث شد که به راحتی PCR به صورت اتوماتیک انجام شود و با افزودن یکبار آنزیم Taq پلی‌مراز دیگر نیازی به اضافه کردن مجدد آن نباشد.

مزیت بسیار مهم دیگر Taq پلی‌مراز افزایش حساسیت و دقت PCR می‌باشد. در دمای پائین (30درجه سلسیوس که برای DNA پلی‌مراز اشریشیا کلی بکار می‌رفت) پرایمرها ممکن است به جایگاه‌هایی که توالی تا حدودی مشابه دارند نیز متصل شوند، زیرا در دمای پائین تعداد کمتری پیوند هیدروژنی برای اتصال پرایمرها نیاز است، بنابراین پرایمرها با اتصال به نواحی نسبتاً مشابه، باعث ایجاد اشتباه در انجام مراحل PCR می‌شوند. ولی وقتی که واکنش در دمای 72 درجه سلسیوس (دمای اپتیم فعالیت Taq پلی مراز) انجام شود اتصال پرایمرها به نواحی غیراختصاصی کاهش می‌یابد. به این صورت پس از پایان PCR رشته‌های DNA کاملاً مشابه و خالص بدست خواهد آمد. برای دیدن قطعات تکثیر شده DNA می‌توان به راحتی از ژل الکترفورز و

رنگ‌آمیزی اتیدیوم بروماید استفاده کرد. در شکل زیر مراحل حرارت‌دهی و زمان حرارت دهی را نشان می‌دهد. هرچند که این دماها و مدت زمان، بیشتر به عوامل مختلف مانند پرایمر می‌تواند متفاوت باشد.



شکل2: دما و زمان‌های مختلف سیکل‌های PCR

همانطور که یادآوری شد، روش PCR به ویژه در میکروب شناسی تشخیصی مفید می‌باشد. برای مثال روش‌های توسعه یافته است که مشاهده وجود میکروارگانیسم بیماری‌زای باسیلوس آنتراسیس را مقدور ساخته است. در این روش‌ها تکثیر از یک قطعه DNA (DNA نمونه) که نشان دهنده وجود ژن برای مثال ژل پلاسیمد کد کننده کپسول این باکتری است مقدور می‌باشد. این ژن نوعی کپسول پروتئینی تولید می‌کند که توسط باسیل آنتراکس بیماری‌زا بیان می‌شود.

امروزه واکنش PCR در ماشین حرارتی (ترموسایکلر) انجام می‌شود. این ماشین را می‌توان برای چرخش‌های حرارت‌های پی‌درپی که در شکل 2 نشان داده شده است برنامه‌ریزی کرد. در اولین مرحله چرخش (Denaturation) زنجیره مضاعف DNA مورد نظر در 94 درجه سلسیوس از هم جدا می‌شوند که در مرحله اول در 5 دقیقه ولی برای مراحل بعدی این عمل در 30 ثانیه انجام می‌گردد. سپس پرایمرهای اختصاصی برای

DNA هدف، اتصال (Annealing) به الگوها را در 65-30 درجه سلسیوس و متوسط 55 درجه سلسیوس مقدور می‌سازد. هنگامی که پرایمرها متصل شدند(Annealing)، تکرار (Extension سنتز DNA) از انتهای ۳′ از پرایمرها در 72 درجه سلسیوس رخ می‌دهد. این عمل به تشکیل دو مولکول از زنجیره مضاعف DNA منجر می‌شود که با تکرار مراحل فوق می‌توان تعداد نسخه‌های مورد نظر را بدست آورد.