University of Isfahan
Biological Science and Technology
Department of Cell and Molecular Biology
Cellular and Molecular Laboratory
Farzaneh Forouharfar

عنوان

PCR

POLYMERASE CHAIN REACTION

بررسی واکنش زنجیره‌ای پلیمراز DNA

اهداف

1. تکثیر اختصاصی یک ناحیه مشخص از DNA جهت شناسایی و آنالیز ژنتیکی
2. بررسی کاربردهای PCR

مقدمه

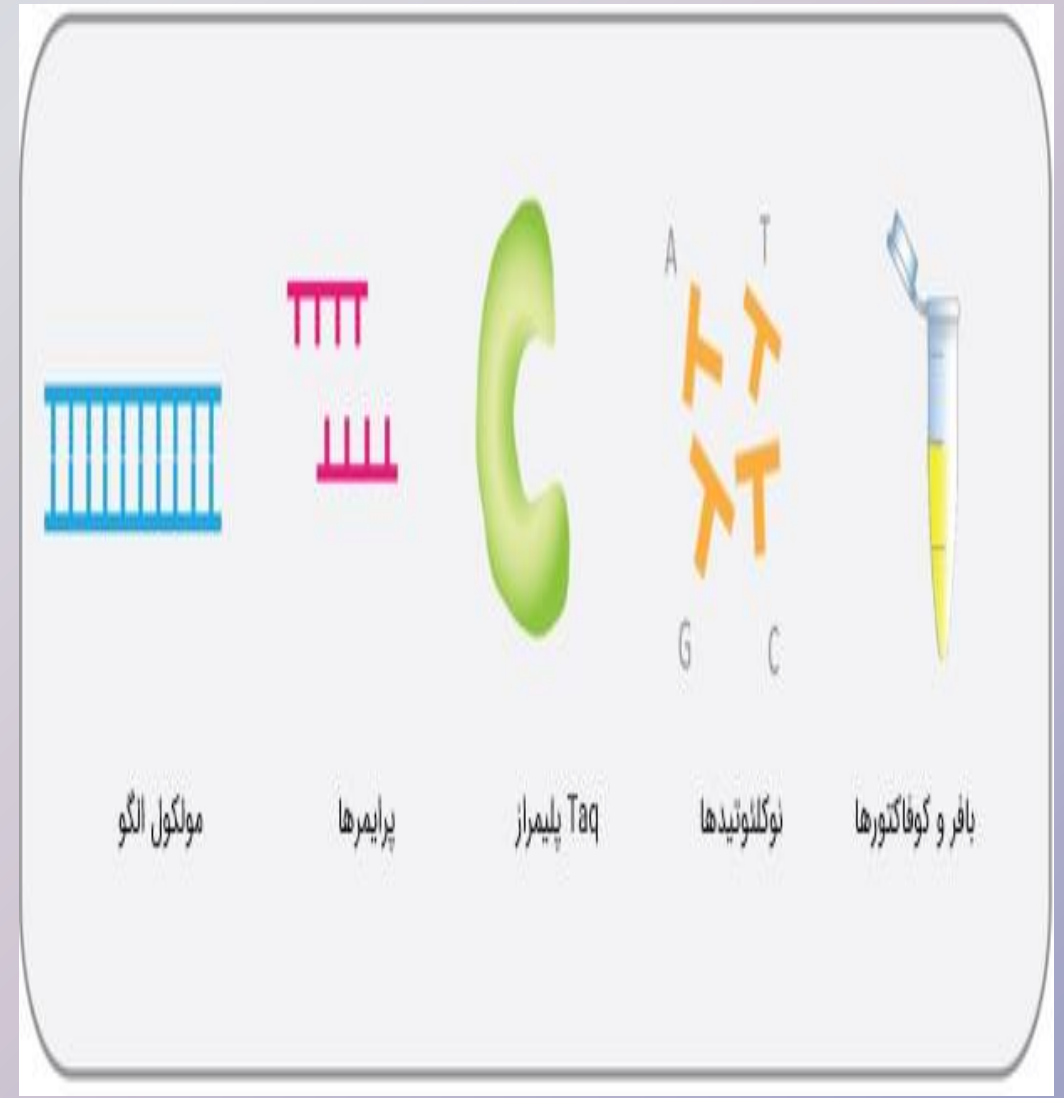
PCR یک روش قدرتمند سریع و مقرون بصرفه در زیست‌شناسی مولکولی است که برای تکثیر قطعات مشخصی از DNA بدون نیاز به سیستم زنده طراحی شده است. این روش بر مبنای همانندسازی DNA توسط آنزیم DNA پلیمراز عمل می‌کند و با استفاده از چرخه‌های دمایی کنترل‌شده در دستگاه ترموسایکلر اجرا می‌شود.

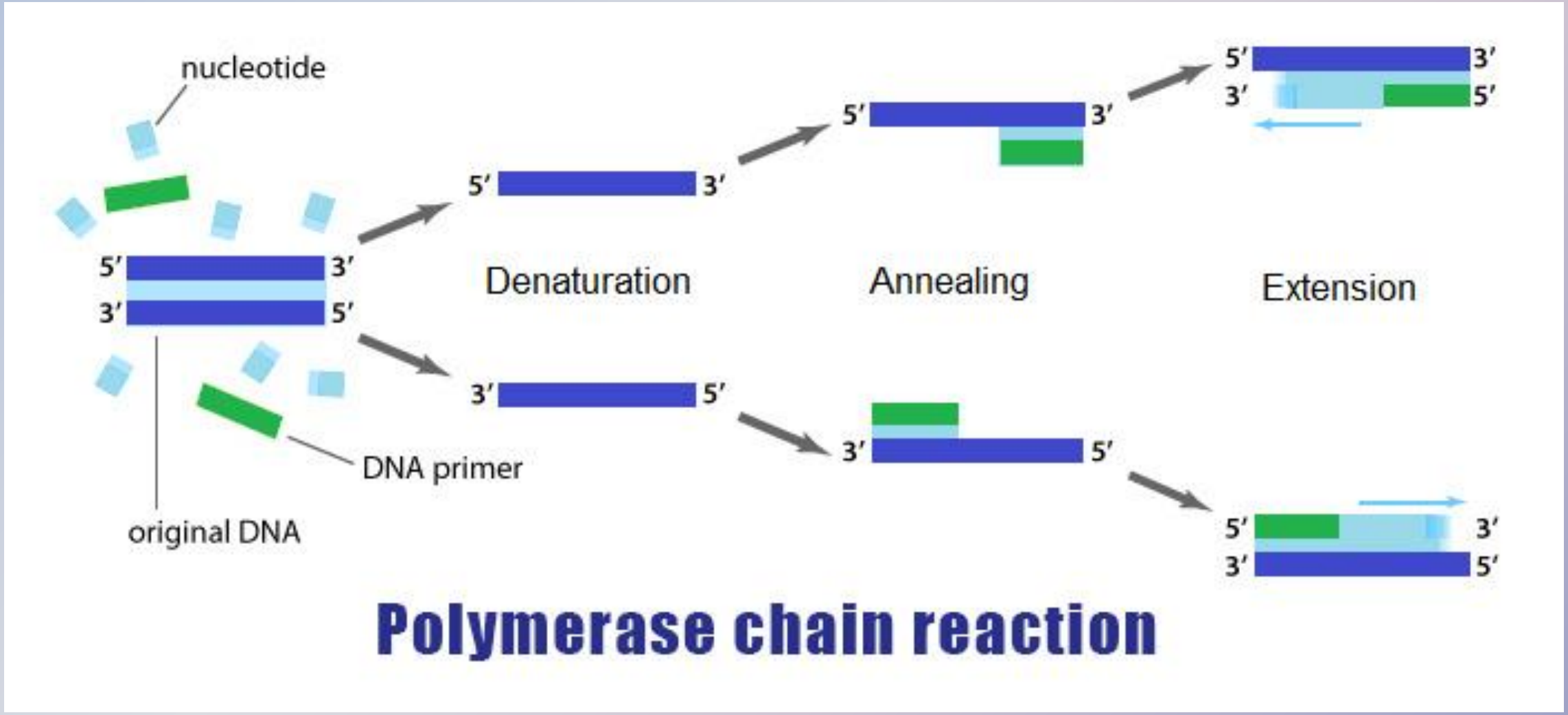
اجزا PCR شامل: DNA الگو یا هدف،آنزیم DNA پلیمراز،نوکلئوتیدها بعنوان واحدهای ساختاری DNA، کوفاکتورهای مورد نیاز آنزیم وپرایمرهای مناسب در یک تیوب کوچک، جمع می‌شوند و سپس، یک چرخه متناوب از گرمایش و سرمایش، بارها و بارها تکرار می‌شود.

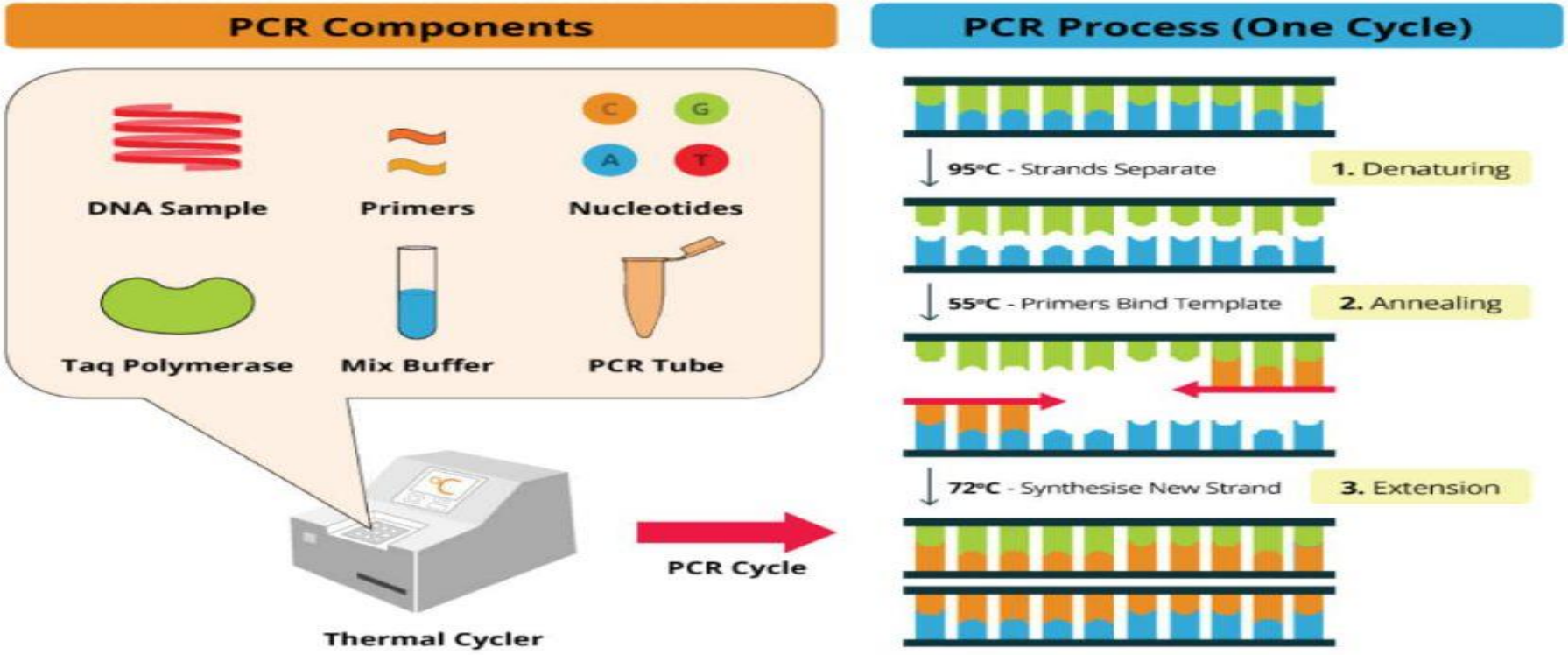
هر واکنش، بین 2 تا 4 ساعت طول می‌کشد و طی آن، مراحل سه‌گانه فوق، بین 25 تا 35 بار تکرار خواهند شد.
اگر PCR موفقیت‌آمیز باشد، تعداد کپی‌های ناحیه هدف، از یک یا تعدادی معدود، به میلیاردها نسخه خواهد رسید.
این رشد تصاعدی تعداد نسخه‌ها به این دلیل است که در هر بار تکرار، این تنها مولکول‌های اولیه نیستند که به عنوان الگو به کار می‌روند، بلکه در هر دور، مولکول‌های ساخته شده در تکرارهای پیشین نیز به این مجموعه اضافه می‌شوند. از طرفی، تیوب آزمایش، حاوی مقادیر فراوانی پرایمر و آنزیم است که به این رشته‌ها متصل می‌شوند و سنتز رشته‌های جدید را کاتالیز می‌کنند.

اجزای PCR

PCR Machine
(PCR machine or DNA amplifier) is a laboratory apparatus most commonly used to amplify segments of DNA via the polymerase chain reaction (PCR).


A
T
G
C
مولکول الگو
پرایمرها
Taq پلیمراز
نوکلئوتیدها
بافر و کوفاکتورها

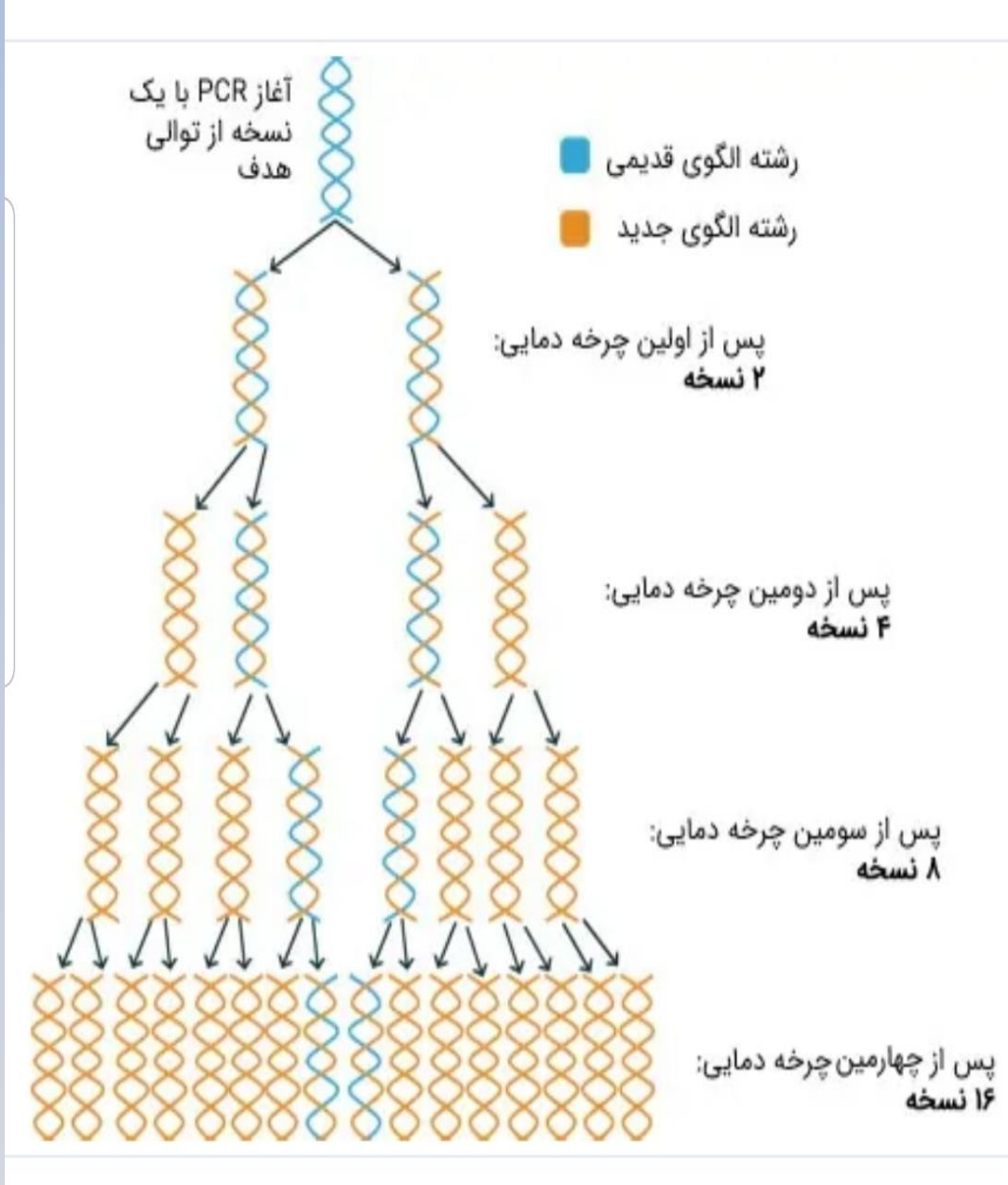

nucleotide
5′
3′
3′
5′
DNA primer
original DNA
5′
3′
Denaturation
3′
5′
5′
3′
Annealing
3′
5′
5′
3′
3′
5′
Extension
5′
3′
3′
5′
Polymerase chain reaction


PCR Components
DNA Sample
Primers
C
G
A
T
Nucleotides
Taq Polymerase
Mix Buffer
PCR Tube
Thermal Cycler
PCR Cycle
PCR Process (One Cycle)
95°C - Strands Separate
1. Denaturing
55°C - Primers Bind Template
2. Annealing
72°C - Synthesise New Strand
3. Extension

ROYAN IRAN

ویژگی‌های کلیدی پی سی آر عبارتند از:

- ✔ امکان تکثیر مقادیر بسیار کم DNA
- ✔ سرعت بالا (چند ساعت برای تکثیر میلیون ها کپی)
- ✔ حساسیت و دقت بالا
- ✔ قابلیت اجرا در آزمایشگاه‌های تحقیقاتی و تشخیصی



به طور کلی انجام واکنش زنجیره ای پلیمراز با اهداف مختلفی صورت می گیرد که برخی از پرکاربردترین آنها عبارتند از:

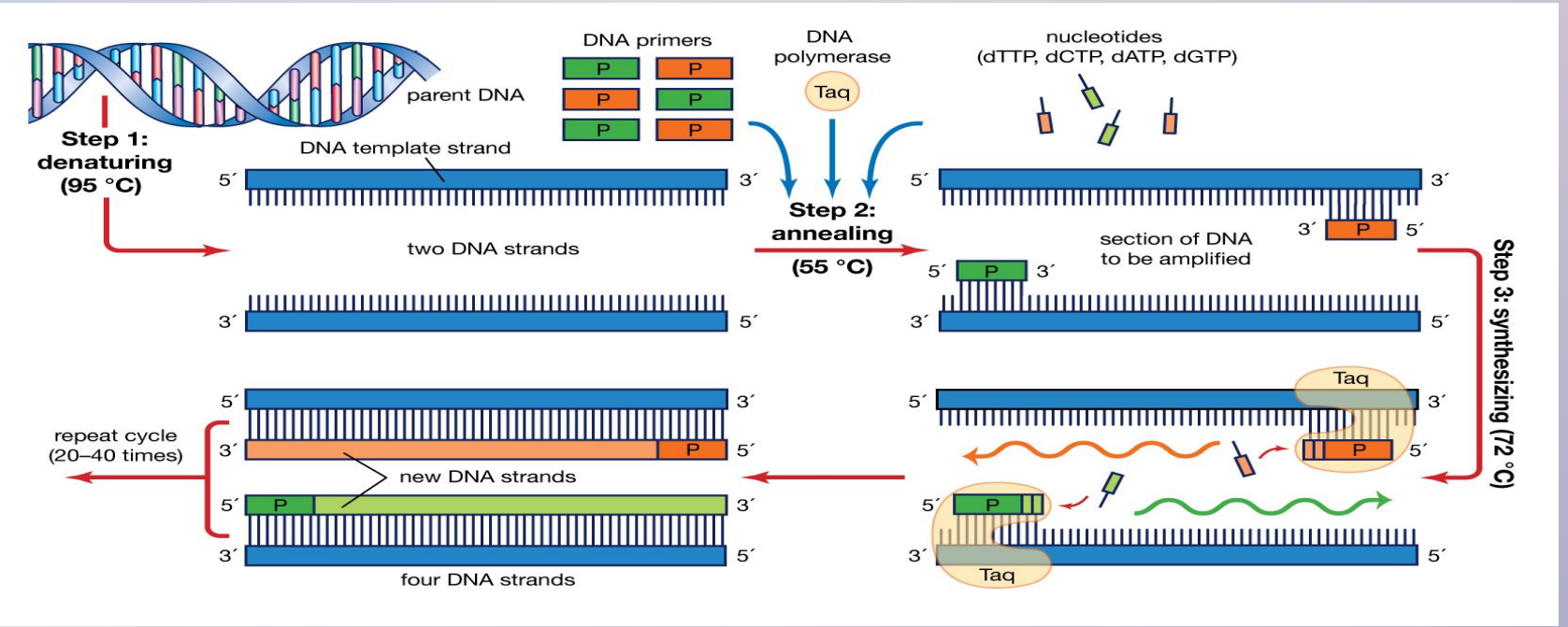
. تکثیر مقادیر بسیار کم DNA

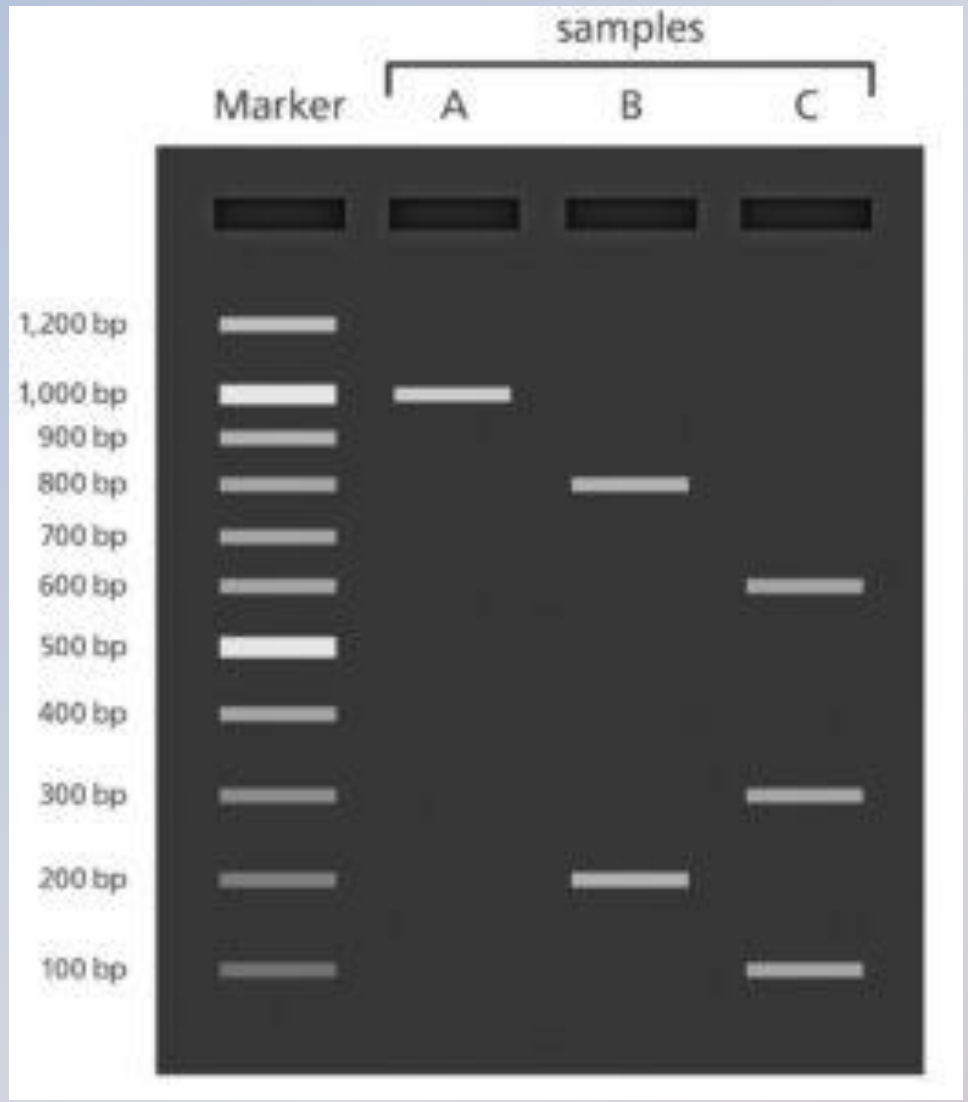
- بررسی تغییرات بیان ژن ها و مقایسه شرایط نرمال و بیماری های مختلف.
- تهیه نسخه های متعدد از یک ژن جهت کلون کردن آن در پلاسمید و بیان ژن مورد نظر در ارگانیسمی دیگر.
- بررسی حضور یا عدم حضور یک ژن خاص در یک قطعه DNA
- تشخیص بیماری های ژنتیکی قبل از تولد.
- تعیین جنسیت.
- بررسی عفونت‌های باکتریایی و ویروسی.

PCR انواع مختلفی دارد که دونوع از مهمترین ان ها عبارتند از:

Traditional PCR

در این تکنیک، محصولات PCR استفاده از روش الکتروفورز بر روی ژل آگارز قابل شناسایی خواهند بود. این روش کیفی بوده و حضور باند بر روی ژل تنها بیانگر حضور ژن یا قطعه DNA تکثیر شده می باشد.





از محدودیت های روش traditional PCR می توان به موارد زیر اشاره کرد:

- **مشاهده نتایج بر مبنای اندازه باند مشاهده شده روی ژل است که ممکن است دقیق نباشد.**
- **ژل آگارز ممکن است قدرت تفکیک باندهایی با اندازه های کوچک و نزدیک به هم را نداشته باشد.**
- **ومراحل پس از PCR جهت مشاهده نتایج حاصل متعدد بوده و شامل الکتروفورز بر روی ژل آگارز، رنگ آمیزی ژل با اتیدیوم برماید یا رنگهای مشابه و مشاهده ژل با استفاده از دستگاه UV می شوند.**

Real-Time PCR یا qPCR

در این تکنیک از ترموسایکلرهای مجهز به سیستم فلورومتری استفاده می شود که امکان پایش پیوسته فلورسانس ساطع شده از محصول PCR را فراهم می کنند. در این روش از رنگ های فلورسانت متصل شونده به DNA دو رشته ای یا پروب‌های نشان دار شده با رنگ‌های فلورسانس در انتهای ´۵ به ´۳ استفاده می‌شود که امکان پایش پیوسته محصول PCR را بدون نیاز به روش‌های الکتروفورز در ژل آگارز یا پلی‌آکریل‌آمید را فراهم می آورد.

این روش به دلیل قابلیت هایی نظیر کاهش زمان سیکل‌های PCR، حذف مرحله و روش‌های حساس آشکارسازی تابشی، به سرعت مورد استقبال و استفاده گسترده قرار گرفت.

کاربردها وفواید استفاده از Real-Time PCR عبارتنداز:

1. مشاهده یا مانیتورینگ در لحظه نتایج در حین انجام فرآیند PCR
2. حساسیت بالا
3. عدم نیاز به فرآیندهای پس از PCR

اصول انجام واکنش زنجیره ای پلیمراز

بر مبنای یک برنامه دمایی شامل سه مرحله تکرار شونده در ۳۰ الی ۴۰ سیکل است که شامل موارد زیر می باشد:

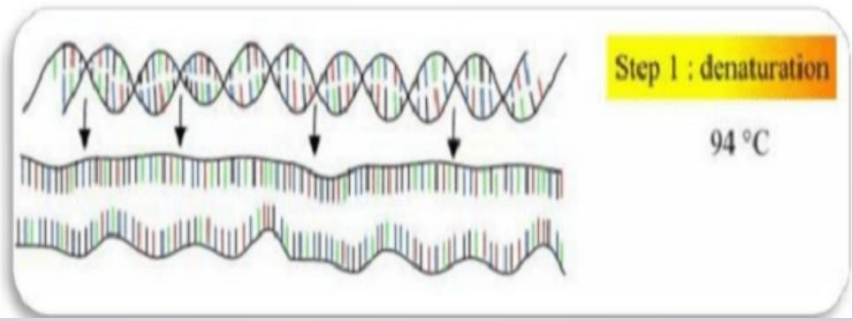
مرحله ۱ : دناتوراسیون (Denaturation)

در طی این مرحله DNA دو رشته‌ای به واسطه اعمال حرارت از هم جدا می‌شوند.

- **دمای مورد نیاز: ۹۶-۹۰ درجه سانتی‌گراد**
- **مدت‌زمان: ۶۰-۳۰ ثانیه**
- **هدف: جدا کردن دو رشته دی اِن اِی الگو به صورت تک‌رشته‌ای**
- **شرح فرایند: در دمای بالا، پیوندهای هیدروژنی بین جفت‌بازهای آدنین-تیمین (A-T) و سیتوزین-گوانین (C-G)شکسته شده و دو رشته DNA از هم جدا می‌شوند. این مرحله مشابه فرآیند دناتوراسیون پروتئین‌ها است که در آن ساختار ثانویه و سوم تخریب می‌شود.**
- **این مرحله:**

✔ **برای فراهم کردن تک‌رشته‌های الگو که پرایمرها بتوانند به آن‌ها متصل شوند.**

✔ **اگر این مرحله ناقص انجام شود، تکثیر DNA مختل شده و نتایج نادرست به دست می‌آید.**



آزمایشگاه زیست شناسی مولکولی .فرزانه فروهر فر

مرحله ۲ : اتصال پرایمرها (Annealing)

در این مرحله، دما به ۵۰ الی ۶۵ درجه سانتی‌گراد رسیده تا پرایمرها در محل مناسب خود روی رشته الگو متصل شوند.

- دمای مورد نیاز: ۶۵-۵۰ درجه سانتی‌گراد
- مدت‌زمان: ۴۵-۳۰ ثانیه
- هدف: اتصال پرایمرهای اختصاصی به نقاط هدف روی رشته‌های الگو

شرح فرایند:

پس از دناتوراسیون، دمای واکنش کاهش می‌یابد تا شرایط برای اتصال پرایمرها فراهم شود. پرایمرها (توالی‌های کوتاه DNA سنتزی) به نقاط مکمل خود روی رشته‌های الگو متصل می‌شوند.

عوامل موثر در این مرحله:

✔ دمای بهینه اتصال پرایمرها: باید طوری تنظیم شود که پرایمرها به‌طور اختصاصی به توالی هدف متصل شوند و اتصالات غیراختصاصی کاهش یابد.

✔ طراحی مناسب پرایمرها: طول پرایمرها معمولاً بین ۲۵-۱۸ نوکلئوتید است و باید از ایجاد دایمر جلوگیری شود.

این مرحله:

✔ مشخص می‌کند که کدام بخش از DNA تکثیر شود.

✔ اگر پرایمرها به‌درستی طراحی نشوند، باندهای غیراختصاصی ایجاد شده و دقت آزمایش کاهش می‌یابد.

مرحله ۳: گسترش یا تکثیر (Extension)

در این مرحله که دمای آن مناسب فعالیت آنزیم DNA پلیمراز است، تکثیر DNA هدف صورت می‌گیرد. در دمای حدود ۷۲ درجه سانتی‌گراد آنزیم پلیمراز مقاوم به حرارت با مصرف چهار نوع نوکلئوتید dATP، dGTP، dTTP، dCTP موجود در محیط بافری حاوی پرایمرهای جفت شده به DNA و در حضور MgCl به عنوان کوفاکتور آنزیم، واکنش پلیمریزاسیون را کاتالیز می‌نماید و سبب طویل شدن رشته DNA جدید می‌گردد.

پس از حدود ۳۰ الی ۴۰ سیکل، از مقدار بسیار کم DNA صدها هزار نسخه DNA ساخته می شود.

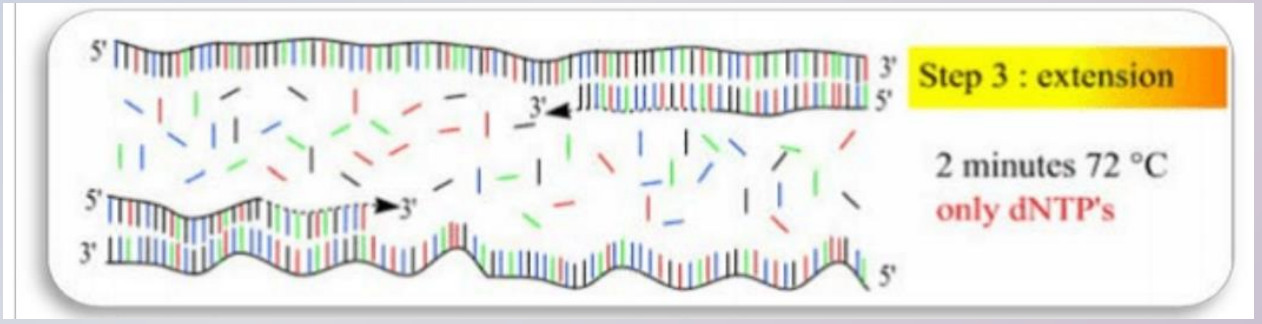
- دمای مورد نیاز: ۷۲ درجه سانتی‌گراد
- مدت‌زمان: ۶۰-۳۰ ثانیه برای هر ۱۰۰۰ جفت‌باز
- هدف: سنتز رشته جدید دی اِن اِی به کمک آنزیم تک پلیمراز

شرح فرایند:

در این مرحله، آنزیم تک پلیمراز با استفاده از پرایمر به‌عنوان نقطه شروع، نوکلئوتیدهای آزاد (dNTPs) را به‌صورت مکمل به رشته الگو اضافه می‌کند و یک رشته جدید را در جهت ۵’ → ۳’ می‌سازد.

این مرحله:

- ✔ **مهم‌ترین مرحله برای تکثیر DNA**
- ✔ **استفاده از تک پلیمراز به دلیل مقاومت آن به دمای بالا (بیش از ۹۵ درجه سانتی‌گراد)**



چرخه‌های پی سی آر:

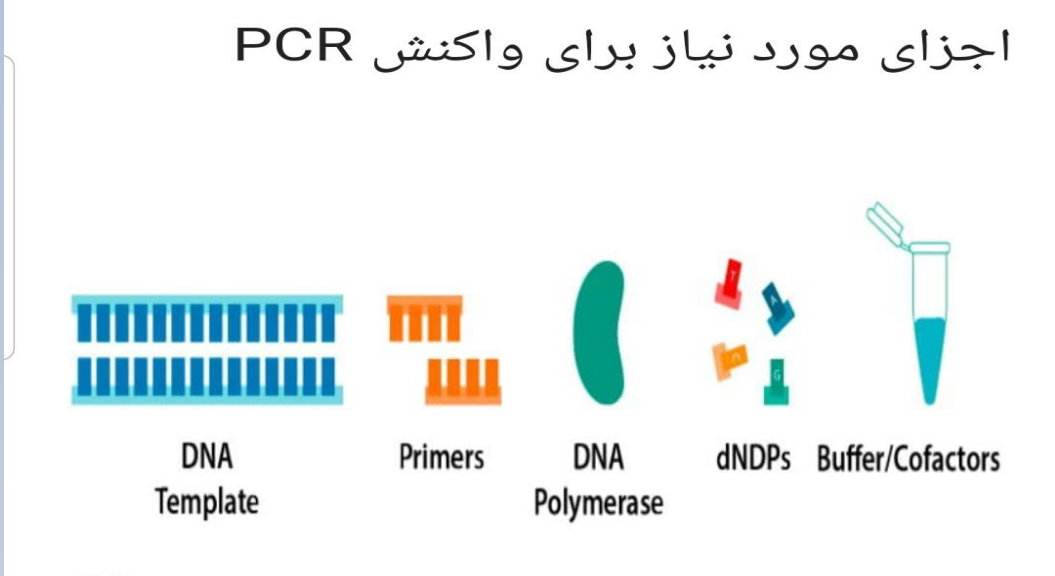
سه مرحله فوق ۳۵-۲۵ بار تکرار می‌شوند تا تعداد نسخه‌های DNA افزایش یابد.

ویژگی‌های کلیدی پی سی آر عبارتند از:

- ✔ **امکان تکثیر مقادیر بسیار کم DNA**
- ✔ **سرعت بالا (چند ساعت برای تکثیر میلیون ها کپی)**
- ✔ **حساسیت و دقت بالا**
- ✔ **قابلیت اجرا در آزمایشگاه‌های تحقیقاتی و تشخیصی**

وسائل مواد و تجهیزات
مورد نیاز

وسایل و مواد مورد نیاز



DNA الگو یا هدف (Template DNA)

نمونه DNA استخراج‌شده از سلول‌های انسانی، باکتریایی یا ویروسی که قرار است تکثیر شود.

کیفیت و کمیت DNA باید مناسب باشد (غلظت معمول: ۵۰-۱۰ نانوگرم در هر واکنش).

مستر میکس PCR شامل:

پرایمرهای اختصاصی (Forward & Reverse Primers):

الیگونوکلئوتیدهای مصنوعی (۲۵-۱۸ نوکلئوتید) که توالی هدف را مشخص می‌کنند.

غلظت معمول: ۱-۰,۱ میکرومولار.

آنزیم DNA پلیمراز مقاوم به حرارت (Taq DNA Polymerase)

آنزیم اصلی برای سنتز رشته جدید DNA در دمای بالا.

نوکلئوتیدهای آزاد (dNTPs - dATP, dTTP, dGTP, dCTP)

مواد اولیه برای ساخت رشته جدید DNA.

غلظت معمول: ۰,۲-۰,۴ میلی‌مولار.

بافر واکنش PCR:

محیط مناسب برای فعالیت آنزیم تک پلیمراز که معمولاً شامل:

Tris-HCl: حفظ pH مناسب (pH 8.3-9.0)

$MgCl_2$: کوفاکتور ضروری برای عملکرد تک پلیمراز (غلظت معمول: ۱,۵-۳ میلی‌مولار)

KCl: برای تنظیم فعالیت آنزیم و افزایش اختصاصیت پرایمرها.

مستر میکس PCR

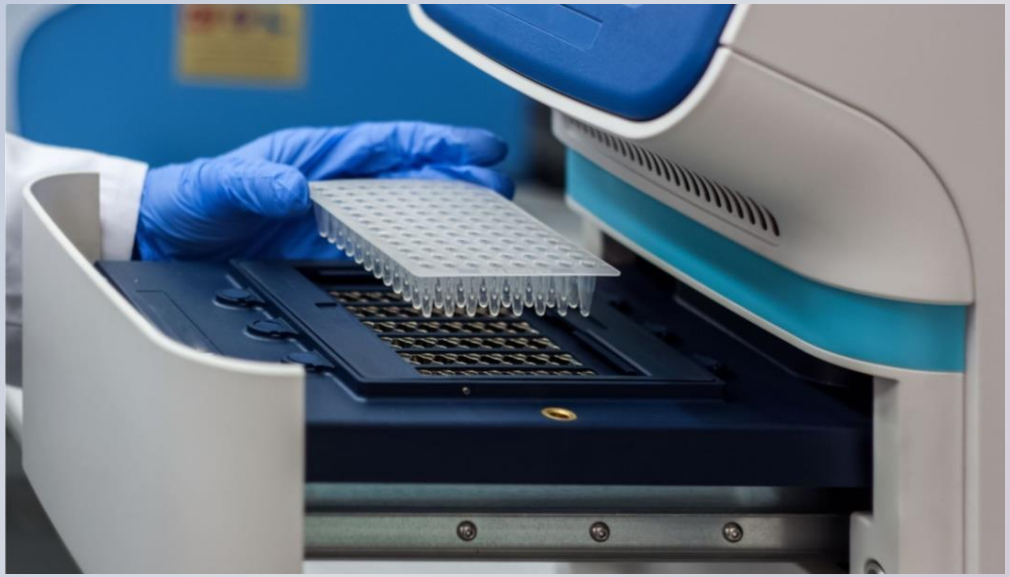
آب فوق خالص (Nuclease-Free Water)

برای رقیق‌سازی و تهیه مخلوط واکنش بدون آلودگی به نوکلئازها.

ترموسایکلر یا PCR

دستگاه ترموسایکلر Thermocycler یا PCR Machine:

برای تنظیم دما و انجام چرخه‌های دمایی PCR.



میکروپیپت و سرسمپلرهای استریل:

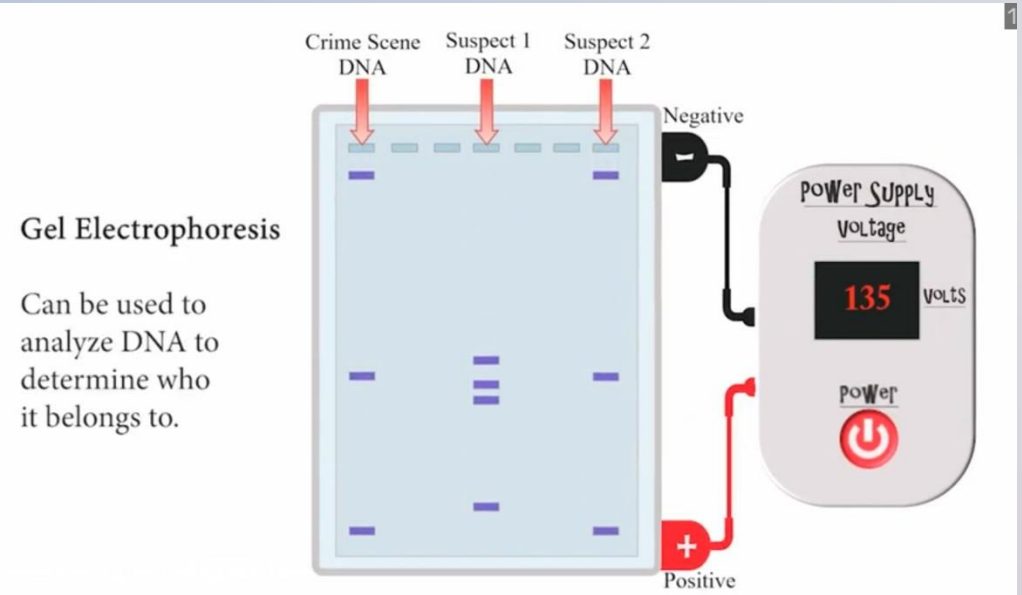
برای انتقال دقیق نمونه‌ها و مواد شیمیایی.

لوله‌های مخصوص PCR (PCR Tubes - 0.2 mL)

لوله‌های کوچک مقاوم به حرارت برای انجام واکنش.

سانتریفیوژ میکروتیوب(MicroCentrifuge)

برای جمع کردن نمونه‌ها در ته لوله‌های PCR قبل از شروع آزمایش.



الکتروفورز ژل آگارز + دستگاه UV ترانس‌ایلومیناتور:

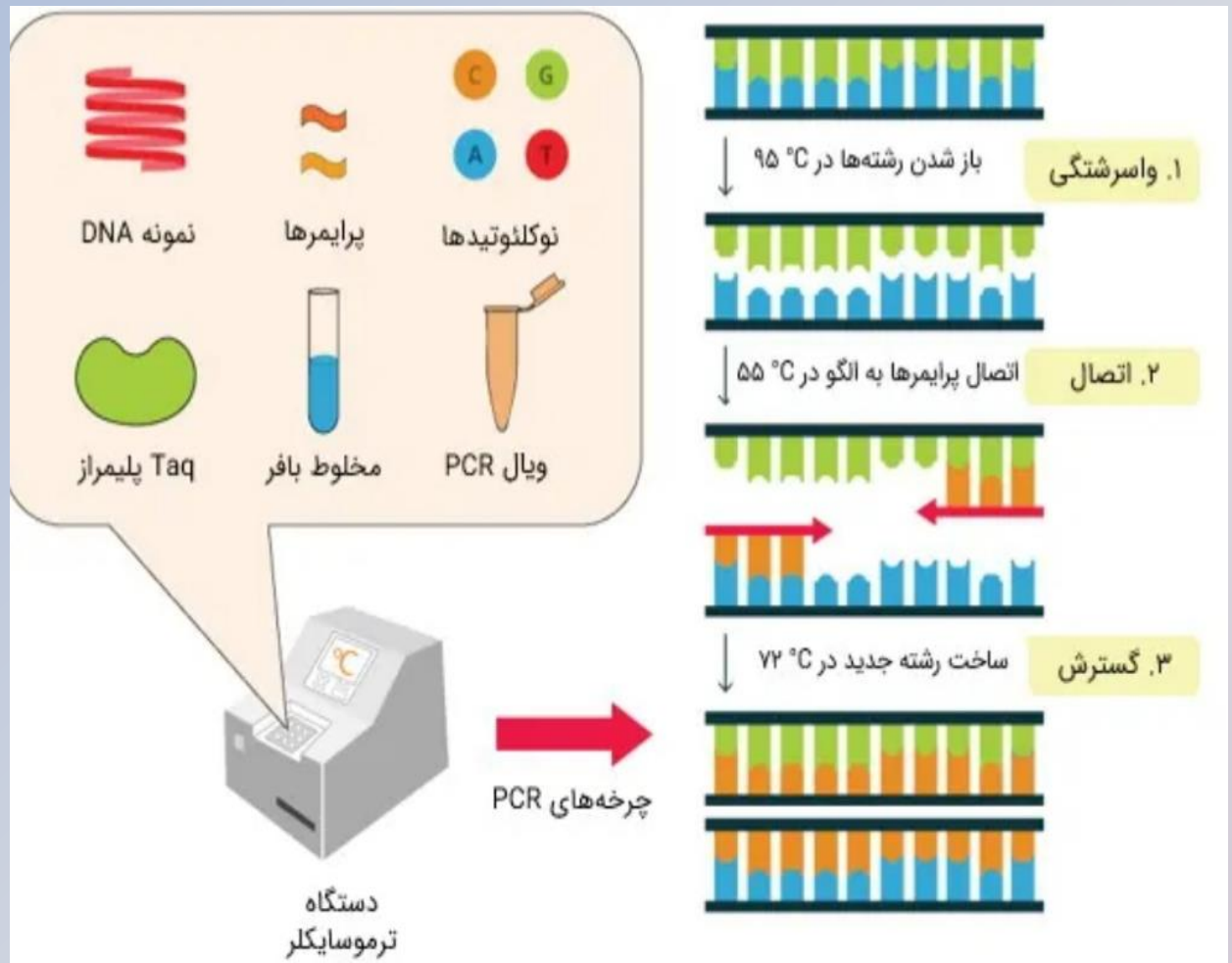
برای بررسی و تفسیر نتایج PCR از طریق مشاهده باندهای DNA.

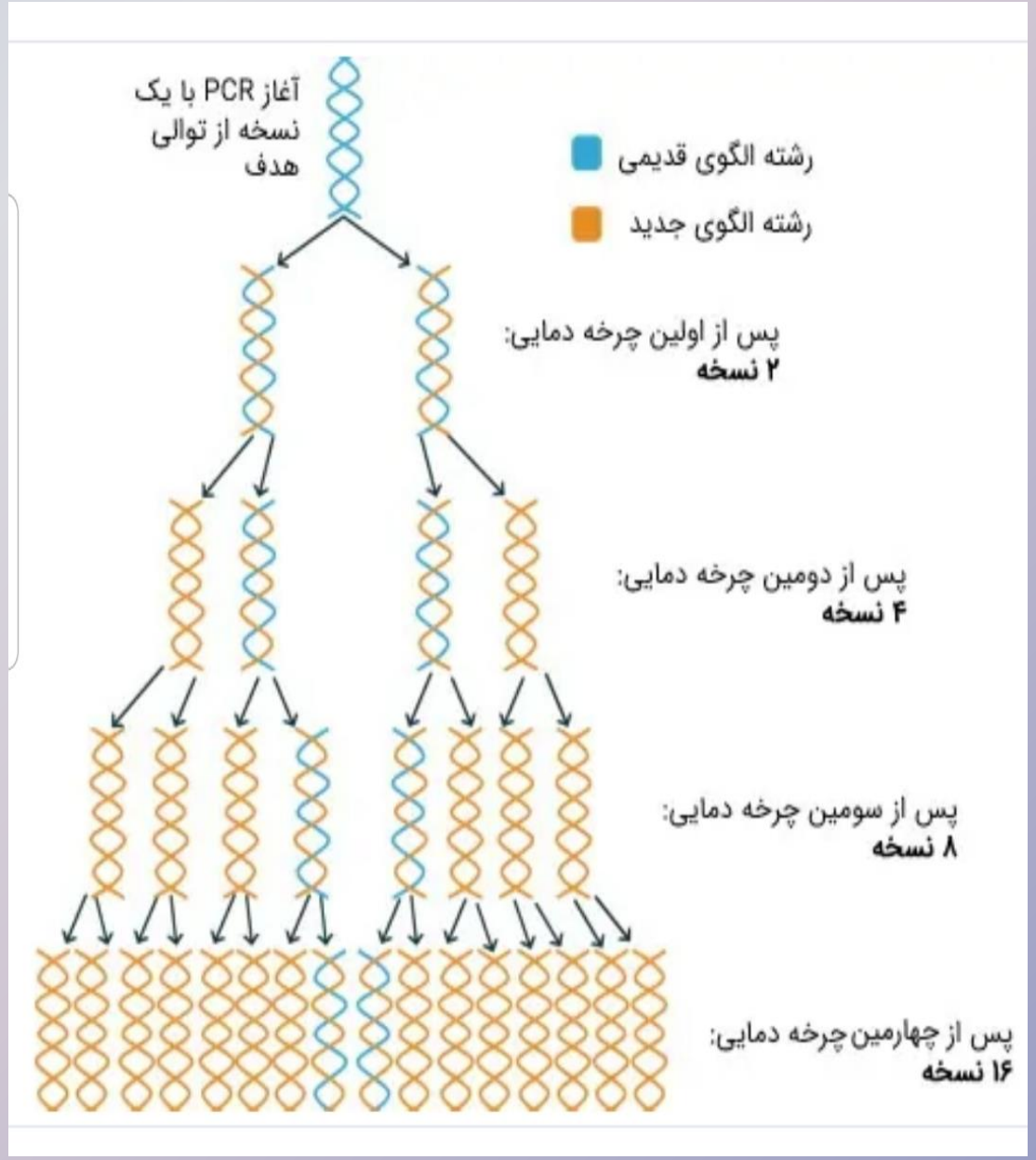
ژل آگارز: برای انجام الکتروفورز.

مارکر اندازه (DNA Ladder): برای مقایسه اندازه قطعات DNA.

اتیدیوم بروماید یا رنگ‌های جایگزین سایبر سیف: برای رنگ‌آمیزی و مشاهده DNA.

آزمایشگاه زیست شناسی مولکولی .فرزانه فروهر فر





مراحل و اجزای PCR. این چرخه دمایی PCR، معمولا بین ۲۵ تا ۳۵ بار تکرار می‌شود.

روش کار

ابتدا برای انجام واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) بایستی مستر میکس آماده کنید.

PCR Master Mix: مستر میکس شامل تمام اجزای ضروری برای انجام واکنش PCR است که به‌صورت یکجا آماده شده و به هر واکنش اضافه می‌شود.

این روش باعث کاهش خطای پیپت‌کردن، افزایش دقت، وتسریع روند آزمایش می‌شود.

مستر میکس PCR یک محلول آماده و از پیش ترکیب شده است که برای انجام واکنشهای PCR استفاده میشود.

این محلول شامل تمام اجزای لازم برای انجام یک واکنش PCR موفق است، از جمله:

- آنزیم DNA پلیمراز: برای سنتز
- dNTP ها: مولکولهای نوکلئوتیدی DNAبرای تشکیل دئوکسی نوکلئوزید تری فسفات.
- بافر واکنش: شرایط pH و یونی مناسب برای فعالیت آنزیم را فراهم میکند.
- MgCl2: به عنوان کوفاکتور برای فعالیت آنزیم DNAپلیمراز عمل میکند.
- پرایمرها: شامل پرایمرهای رو به جلو و معکوس مخصوص توالی DNAهدف می باشد.

تهیه مستر میکس:

برای تهیه مسترمیکس، میتوانید از دو روش استفاده کنید:

- روش اول این است که مواد مورد نیاز را تهیه کنید و با غلظت های مناسب مخلوط کنید.
- روش دوم این است که از مسترمیکس های آماده که در بازار موجود هستند، استفاده کنید.

دقت حجم برداری در تهیه مسترمیکس بسیار مهم است.

اگر حجم برداری صحیح انجام نشود، ممکن است غلظت مواد مورد نیاز برای تست PCR تغییر کند و باعث کاهش کارایی و دقت آزمایش شود.

برای دقت حجم برداری، باید، سمپلر وسر سمپلرمناسب را انتخاب و از تشکیل آلودگی جلوگیری کنید. با استفاده از مسترمیکس آماده، دقت افزایش می یابد.

شرایط نگهداری مستر میکس های PCR

مستر میکس های PCR معمولاً در دمای 20- یا 80- درجه سانتیگراد ذخیره می شوند تا پایداری اجزای خود را حفظ کرده و از تخریب جلوگیری کنند. پس از ذوب، مسترها باید بلافاصله استفاده شوند یا در دمای 4 درجه سانتیگراد تا 24 ساعت نگهداری شوند. از تکرار چرخه های انجماد و ذوب باید اجتناب شود، زیرا می تواند به معرف ها آسیب برساند و بر عملکرد واکنش PCR تأثیر بگذارد.

برای اطمینان از کیفیت و عملکرد میکس اصلیPCR ، نکات زیر را انجام دهید:

میکس های اصلی را در بسته بندی اصلی خود نگهداری کنید تا در برابر نور و رطوبت محافظت شوند. از یک پیپت تمیز و استریل برای پخش مخلوط اصلی استفاده کنید. برای به حداقل رساندن خطر آلودگی از پیپت کردن بیش از حد خودداری کنید. از ورتکس مستر میکس خودداری کنید، زیرا می تواند باعث ایجاد حباب های هوا شود که می تواند در واکنش PCR اختلال ایجاد کند. اگر نیاز به ذخیره بخشی از مخلوط اصلی ذوب شده دارید، آن را به حجم های کوچکتر تقسیم کنید و در دمای 4 درجه سانتی گراد نگهداری کنید. با پیروی از این دستورالعمل ها، می توانید با اطمینان از مخلوط های اصلی PCR برای به دست آوردن نتایج قابل اعتماد و قابل تکرار در آزمایش های زیست شناسی مولکولی خود استفاده کنید.

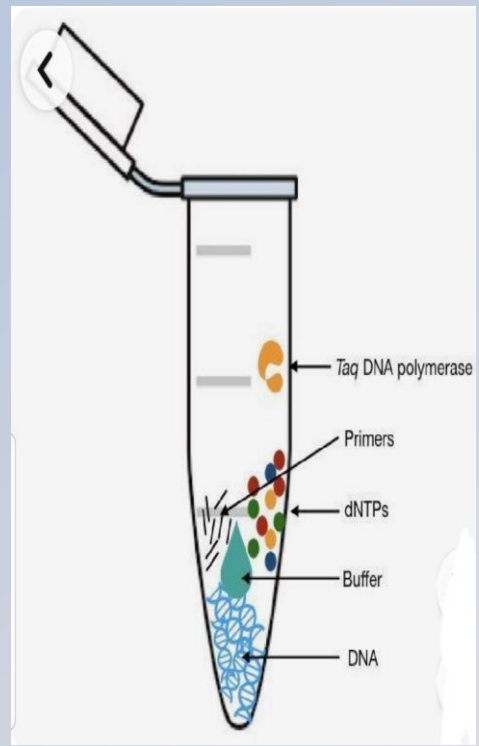
مقدار مناسب از ترکیبات مستر میکس را بر اساس دستورالعمل در هر لوله PCR توزیع کنید.

DNA الگو را به هر واکنش در لوله ها اضافه کنید.

وبا اب بدون نوکلئاز به حجم نهایی برسانید.

اجزاء را به آرامی با هم مخلوط کنید تا از یک ترکیب اصلی همگن بدون حباب هوا مطمئن شوید.

لوله ها را در دستگاه قرار داده و با دادن برنامه مناسب واکنش را آغاز کنید.



نگهداری محصول PCR:

پس از اتمام PCR، نمونه‌ها معمولاً در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری می‌شوند تا از تخریب DNA جلوگیری شود. سپس، محصولات PCR می‌توانند برای آنالیز بیشتر، مانند الکتروفورز ژل آگارز، توالی‌یابی یا کلونینگ،و یا موارد دیگر استفاده شوند.

نکات کلیدی در انجام PCR

✔ همیشه روی یخ کار کنید تا آنزیم تک پلیمراز تخریب نشود.

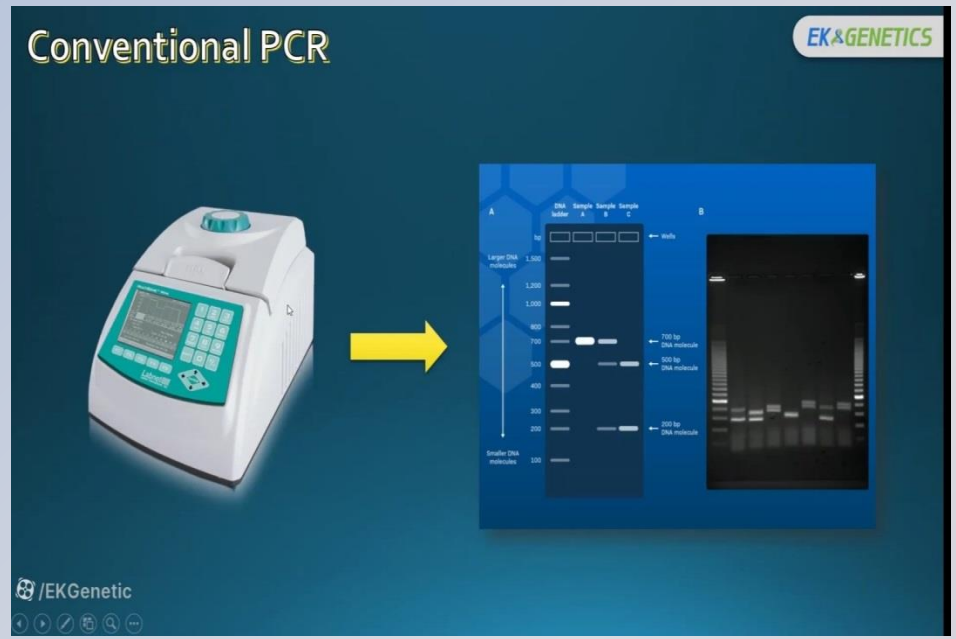
✔ از پیپت‌های استریل و نوک سمپلرهای فیلتردار استفاده کنید تا آلودگی کاهش یابد.

مراحل یک واکنش PCR ساده در جدول زیر آورده شده است.

تکرار	مرحله	دما	زمان
1	واسرشتگی اولیه	$95^{\circ}C$	5 دقیقه
30	واسرشتگی	$95^{\circ}C$	30 ثانیه
	اتصال	$55^{\circ}C$	۳۰ ثانیه
	گسترش	$72^{\circ}C$	30 ثانیه
1	گسترش نهایی	$72^{\circ}C$	10 دقیقه
1	نگهداری نهایی	$10^{\circ}C$	تا خاموش کردن دستگاه

بررسی نتایج PCR

الکتروفورز ژل یکی از روش‌های کلیدی برای تجزیه و تحلیل محصولات PCR است.



- تعیین اندازه قطعات DNA : با مقایسه محصولات PCR با یک مارکر مولکولی (DNA Ladder) می‌توان اندازه قطعات تکثیر شده را بررسی کرد.

- بررسی اختصاصیت تکثیر: با مشاهده تعداد و الگوی باندها، می‌توان از صحت و اختصاصیت واکنش PCR اطمینان حاصل کرد.

بررسی کیفی محصولات PCR به روش الکتروفورز

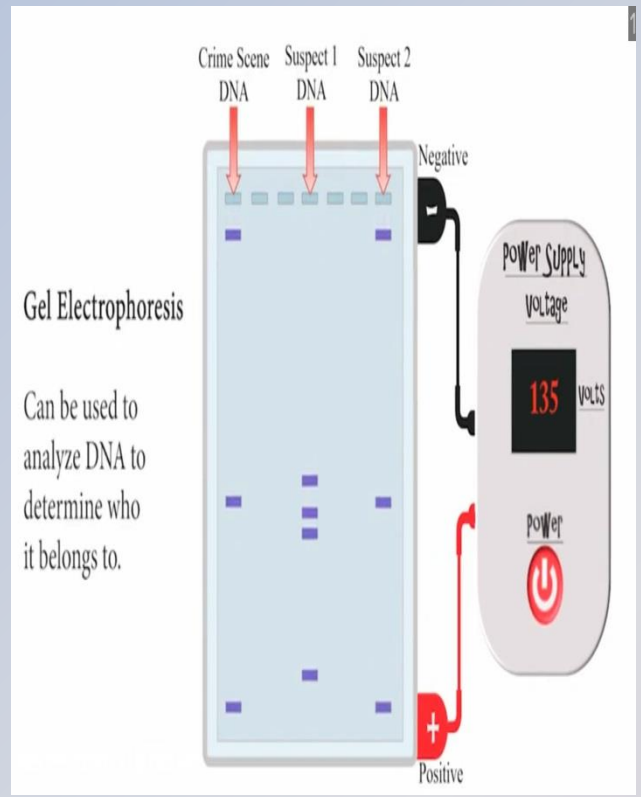
جهت بررسی کیفی محصولات PCR بایستی الکتروفورز ژل آگارز به روش زیر انجام شود:

۱. تهیه ژل آگارز ٪۲-۱

۲. بارگذاری محصولات PCR همراه با مارکر تعیین اندازه

۳. اعمال ولتاژ (۱۰۰ ولت برای ۴۵-۳۰ دقیقه)

۴. مشاهده نتایج در دستگاه UV ترانس‌ایلومیناتور



نتایج محتمل:

✔ باند در محل مورد انتظار: تکثیر موفق بوده است.

✔ عدم مشاهده باند: مشکلاتی مانند غلظت نامناسب پرایمر، عدم وجود DNA هدف یا خرابی آنزیم ممکن است رخ داده باشد.

✔ باندهای غیراختصاصی: ممکن است پرایمرها به توالی‌های نامربوط متصل شده باشند.

تحلیل و تفسیر نهایی:

✔ PCR روشی سریع، دقیق و حساس برای آنالیز ژن‌ها و مطالعه DNA است.

✔ موفقیت آزمایش وابسته به طراحی مناسب پرایمر، شرایط بهینه واکنش و کنترل دقیق مراحل است.

Polymerase Chain Reaction (PCR) - A quick look

Definition

PCR is an enzymatic process in which a specific region of DNA is replicated over and over again to yield many copies of a particular sequence.

The most widely used target nucleic acid amplification method is the polymerase chain reaction (PCR).

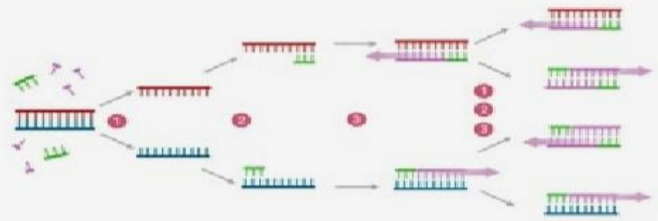
Principle

The target sequence of nucleic acid is denatured to single strands, primers specific for each target strand sequence are added, and DNA polymerase catalyzes the addition of deoxynucleotides to extend and produce new strands complementary to each of the target sequence strands (cycle 1).

In cycle 2, both double-stranded products of cycle 1 are denatured and subsequently serve as targets for more primer annealing and extension by DNA polymerase.

After 25 to 30 cycles, at least 10^7 copies of target DNA may be produced by means of this thermal cycling.

Steps of PCR

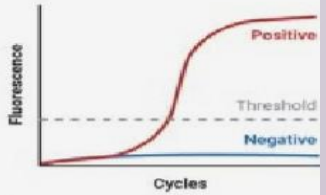


1. Denaturation at 95-96°C
2. Annealing at 68°C
3. Elongation at 72°C

The Biology Notes | The Chemistry Notes | biology LIBRARY | Created with bio By Sagar Aryal

Types of PCR

- Amplified fragment length polymorphism (AFLP) PCR
- Allele-specific PCR
- Alu PCR
- Assembly PCR
- Asymmetric PCR
- COLD PCR
- Colony PCR
- Conventional PCR
- Digital PCR (dPCR)
- Droplet digital PCR (ddPCR)
- Fast-cycling PCR
- High-fidelity PCR
- High-Resolution Melt (HRM) PCR
- Hot-start PCR
- In situ PCR
- Intersequence-specific (ISSR) PCR
- Inverse PCR
- LATE (linear after the exponential) PCR
- Ligation-mediated PCR
- Long-range PCR
- Methylation-specific PCR (MSP)
- Miniprimer PCR
- Multiplex-PCR
- Nanoparticle-Assisted PCR (nanoPCR)
- Nested PCR
- Overlap extension PCR
- Real-Time PCR (quantitative PCR or qPCR)
- Repetitive sequence-based PCR
- Reverse-Transcriptase (RT-PCR)
- Reverse-Transcriptase Real-Time PCR (RT-qPCR)
- RNase H-dependent PCR (rhPCR)
- Single cell PCR
- Single Specific Primer-PCR (SSP-PCR)
- Solid phase PCR
- Suicide PCR
- Thermal asymmetric interlaced PCR (TAIL-PCR)
- Touch down (TD) PCR
- Variable Number of Tandem Repeats (VNTR) PCR

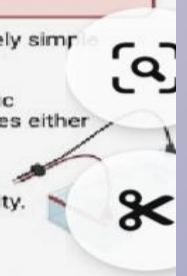


Advantages of PCR

PCR (polymerase chain reaction) is an extremely simp... yet immensely powerful technique.

It allows enormous amplification of any specific sequence of DNA provided that short sequences either side of it are known.

Allow faster diagnosis and identification while enhancing sensitivity and maintaining specificity.



References and more details on:

https://microbenotes.com/types-of-pcr/
https://microbenotes.com/polymerase-chain-reaction-pcr-principle-steps-applications/

Note: *Pictures and images does not represent the text. Contents should be used for educational purposes only.*