واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز (PCR)

دکتر بابک نعمانی - موسسه تحقیقاتی رازی

چکیده

در حال حاضر روشهای متعددی برای تشخیص بیماریهای عفونی وجود دارد که هر کدام محاسن و معایب مخصوص به خود را دارند. مثلاً" گران بودن وسائل کار و یا اتلاف وقت و معطلی بیمار و پزشک و از همه مهمتر بروز خطرات گوناگون در مراحل کاربرد روش خاص، مثلاً" در تهیه آنتی سرم نیاز به ویروس و تلقیح آن به حیوان حساس داریم که خطر اشاعه ویروس را افزایش می‌دهد و این امر برای کشورهایی که قدم در راه پاک سازی و حذف کامل عامل بیماری برداشته‌اند، مشکل آفرین خواهد شد.

اصولا" تشخیص بیماریها به دو روش صورت می‌گیرد:

۱- مستقیم
۲- غیر مستقیم

روش مستقیم شامل جداسازی ویروس و یا استفاده از میکروسکپ الکترونی است در حالی که طریقه غیر مستقیم آشکار کردن آنتی بادیهای ویژه است.

در سالهای اخیر علاقه شدیدی به استفاده از روش مستقیم در جهت یافتن اسید نوکلئوئیک (NA) ویرس یا جرم عفونی به وسیله هیبریدیزاسیون پیدا شده است.

اخیراً روشی بر مبنای استفاده از نقشه ژنتیکی ویروس و یا میکروب طرح‌ریزی شده که با وجود نوپا بودن، محققان امید زیادی به بکارگیری وسیع آن در جهات مختلف دارند و در همین راستا پیشرفت‌های شگرفی صورت گرفته و می‌گیرد این روش به نام (Polymerase Chain Reaction) خوانده می‌شود و همانطور که از نام آن بر می‌آید، واکنشهای زنجیره‌ای پلی‌مراز می‌باشد که در جهت افزایش سکانس هدف عمل می‌کند و بر اساس ژنوتیپ ارگانیسم ساخته می‌شود.

PCR برای اولین بار به وسیله Mullis کشف شد و برای بار نخست در آشکار کردن ژن هموگلوبین داسی شکل در DNA انسان مورد استفاده قرار گرفت.PCR روشی است که به تازگی و با توجه به توانایی که در تکثیر حتی یک ملکول DNA یا RNA دارد، کاربرد زیادی در علوم مختلف زیستی پیدا کرده است و از این روش در زمینه‌های بیولوژی مولکولی، آنالیز و غیره استفاده فراوان می‌شود که در آخر مقاله به آنها اشاره‌ای شده است. پزشکان و دیگر محققان، از این روش برای تشخیص دقیق، سریع و جداسازی عامل بیماری استفاده می‌کنند.

واکنش PCR برای رونوشت برداری از سکانس‌های ویژه ارگانیسم به طور انتخابی طراحی شده است، در ضمن تکثیر از روی RNA نیز با ساختن cDNA1 به وسیله ترانس کریپتاز معکوس انجام پذیر است.

اساس و پایه واکنش PCR را هیبریدیزاسیون تشکیل می‌دهد و خود عمل هیبرید کردن به وسیله پیوند هیدروژنی پروب نشان‌دار شده با ژنوم هدف صورت می‌گیرد و در نهایت تشخیص این پیوند با روشهای اتورادیوگرام یا الکتروفورز یا کالریمتری میسر می‌گردد.

مواد لازم برای واکنش

Priner: پرایمرها قطعات سنتز شده‌ای از بازهای آلی هستند که بر اساس سکانس قسمتی از ژنوم هدف سنتز شده‌اند. پرایمرها به رشته مخالف خودشان در ژنوم هدف متصل می‌شوند. موثر بودن هر سیکل بستگی به DNA سنتز شده با پرایمر در سیکل قبلی دارد.

توالی ردیفهای نوکلئوتید پرایمر باید به دقت انتخاب شود. اولین سیکل برای ادامه واکنش خیلی حیاتی است، چراکه این سیکل، الگو را برای سیکل بعدی فراهم می‌کند.

یک ردیف کردن نوکلئوتیدها حتی در یکی از بازها، ممکن است عمل تکثیر را به وضوح کاهش دهد. مقدار مناسب پرایمرها بهتر است بین ۲۰ تا ۳۰ نوکلئوتید باشد.

قطعات کوچکتر پرایمر معمولا" برای تشخیص به کار می‌روند. در ضمن پرایمرها باید در جهت مختلف هم سنتز شوند یعنی بار مخالف داشته باشند یکی در جهت مثبت (+) و یکی در جهت منفی (-).

الگو[۲]

روشهای متعددی برای تلخیص NA نمونه مرضی شرح داده شده است که بیشتر با استفاده از موارد زیر است:

الف- Boiling یا جوشاندن
ب- Freezing یا یخ‌زدن
د- اثر آنزیم پروتئاز به اضافه بافر لیزکننده

کاوشگر[۳]

انواع مختلفی از پروپ برای تشخیص محصولات واکنش PCR توصیف شده است. اصولا" پروپ نوکلئوتیدهای سنتز شده‌ای که مکمل قسمت داخلی (internal) دو پرایمر است یعنی مکمل قسمتی از زنجیره که باید تکثیر شود.

آنزیم[۴]

مرحله طویل شدن به وسیله قطعه‌ای از آنزیم پلی مراز کاتالیز می‌شود و چون دمای این مرحله بالاست و در قدیم هنوز آنزیم مقاوم به حرارت کشف نشده بود، بنابراین بعد از هر بار غیر طبیعی کردن[۵]، آنزیم تازه‌ای به مخلوط واکنش می‌افزودند که مشکلات خاص خود را داشت ولی در حال حاضر با پیدا کردن نوعی باکتری دریائی به نام *Thermus aquaticus* که یک باکتری ترموفیلیک است، این مشکل حل شده است و از باکتری فوق الذکر، آنزیم پلی‌مراز مقاوم به حرارت استخراج کرده‌اند که نام آنرا Taq polymerase گذاشته‌اند.

روش کار

ازدیاد محصولات PCR به وسیله پرایمرهای الیگونوکلئوتید سنتتیک که در اصل مکمل هر یک از رشته‌های NA مورد هدف است، انجام می‌شود.

اندازه تکثیر سکانس کاملا" بستگی به فاصله بین دو پرایمر پیوند شده به زنجیر دارد و تعداد

سیکلهای تکراری نیز در مقدار تولید بسیار موثر است.

هر سیکل PCR شامل ۳ مرحله است:

۱- دناتوره کردن رشته الگوی NA در دمای ۹۵-۹۰ درجه سانتیگراد

۲- اتصال با دوام پرایمرها (Annealing) به NA هدف که با سرد کردن مخلوط واکنش در دمای ۶۰-۴۰ ^{c} انجام می‌شود.

۳- بسط و تکثیر و طویل شدن پرایمرها به وسیله Taq پلی مراز در دمای ۷۲-۶۷ ^{c}

بنابراین واکنشهای PCR دارای سیکلهای متعددی از دناتوره کردن، پیوند بادوام ایجاد کردن و پلی‌مریزاسیون می‌باشد. ازدیاد مکانس هدف از روی قطعه‌های جدید سنتز شده که به عنوان الگو قلمداد می‌شوند انجام پذیر است.

رابطه تئوری بین میزان ازدیاد (Y) و تعداد سیکلها (n) بشرح زیر است:

$Y=2^n$

محصولات PCR به وسیله الکتروفورز ژل آگارز در حضور شاهد مناسب تجزیه شده و بعد از رنگ‌آمیزی بااتیدیم بر ماید، به وسیله فلئورسانس قابل مشاهده می‌شوند.

بعد از الکتروفورز ماحصل واکنش به فیلتر نایلون یا غشاءمامبران نیتروسلولز انتقال داده می‌شوند و با پروب‌های ویژه که اغلب آنها دارای الیگونوکلئوتیدهای نشان دار هستند، هیبرید می‌گردند.

هیبریدیزاسیون، بررسی ویژگی واکنش ازدیاد را تسهیل می‌کند، بعلاوه می‌توان NA تکثیر یافته را تحت تاثیر هضم آندونوکلئازهای محدود کننده قرار داد (Restriction Enz.) نمونه‌های تاثیر داده شده با آنزیم، بعد از الکتروفورز شدن با اتورادیوگرام به وسیله مجاورت با فیلم X-AR در ۷۰ ^{c}- برای مدت ۴-۳ ساعت نمایان می‌شوند.

یک واکنش PCR موفق توانائی تولید 10^{12} مولکول DNA را در $0/1$ ml از واکنش دارد.

روشهای نشاندار کردن

روشهای متعددی برای نشان دارکردن پروب‌ها موجود است که انواعی از آنها در زیر نامبرده می‌شود:

۱- رادیواکتیوکردن مثل P-32

۲- بیوتین آویدین پروب

۳- کونژوگه کردن‌آنزیم

۴- آنتی بادی دارکردن

شرایط مناسب برای یک تکثیر

الف - تعداد سیکل

یک واکنش استاندارد باید بین ۳۰-۲۰ سیکل داشته باشد. معمولاً تمام سیکلها بجز اولی و آخری شبیه هم هستند.

ب- حرارت سیکل:

بهترین دما برای دناتوره کردن، ۹۴ ^{c} پیشنهاد شده است.

ج- زمان سیکل

معمولاً مدت دناتوره کردن در سیکل اول ۷ دقیقه و در مراحل بعد به ۶۰ ثانیه تنزل پیدا می‌کند.

زمان مناسب برای اتصال بادوام بین ۲۰ تا ۴۰ ثانیه پیشنهاد شده است.

د- بافر مناسب سیکل:

مقادیر مناسبی از Tris- HCl با pH=۸/۳، MgCl،KCl، ژلاتین، دئوکسی نوکلئوزیدتری فسفات، پرایمرها، یک واحد از پلی‌مراز و NA هدف.

کاربرد PCR

۱- تشخیصهای اولیه در دوران جنینی مثل هموفیلی و هموگلوبینوپاتی داسی شکل (با روش Allel- specific oligo nocleotide) یا کلاً تشخیص اینکه آیا این نوزاد در آینده مثلاً مستعد مبتلا شدن به پنومونی خواهد بود یا خیر؟

۲- اختلالات کروموزومی، تشخیص انکوژنها و تومور ژنهای سرکوبگر (Supressor G.)

۳- Methodology که خود ۳ قسم دارد:

الف- کلون کردن (Clonning)

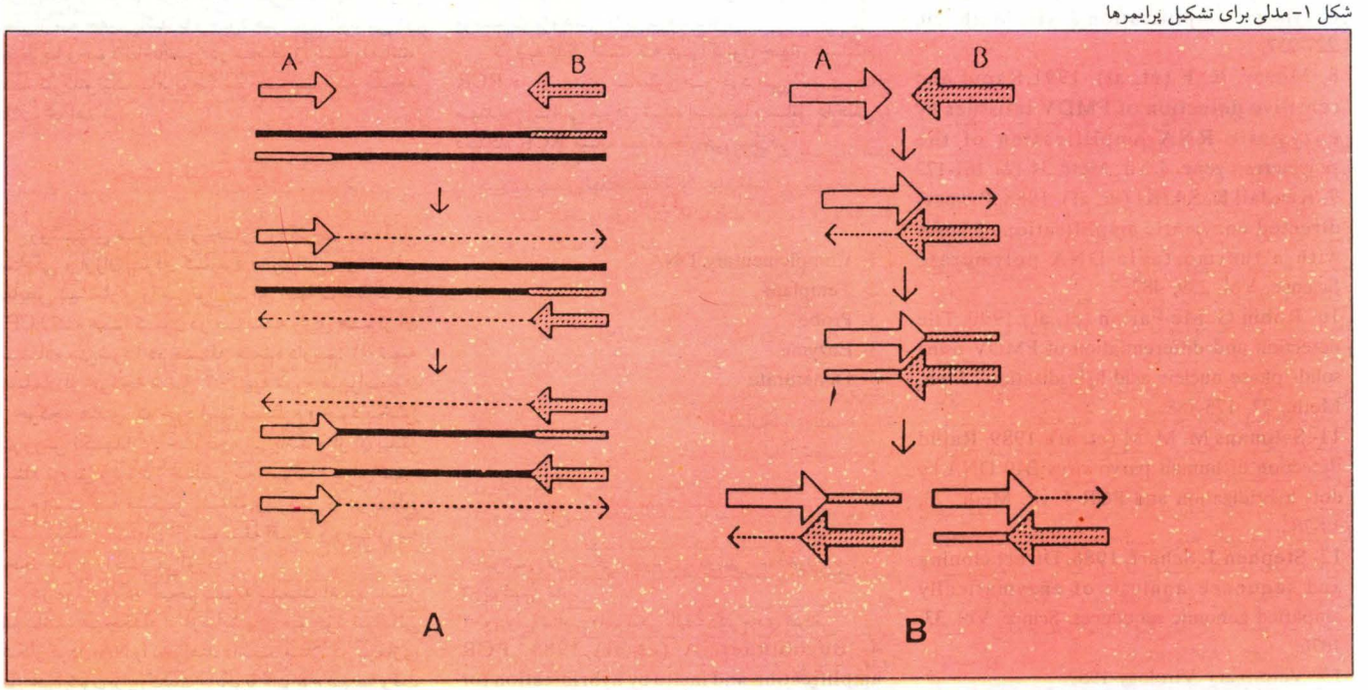
ب- Sequencing

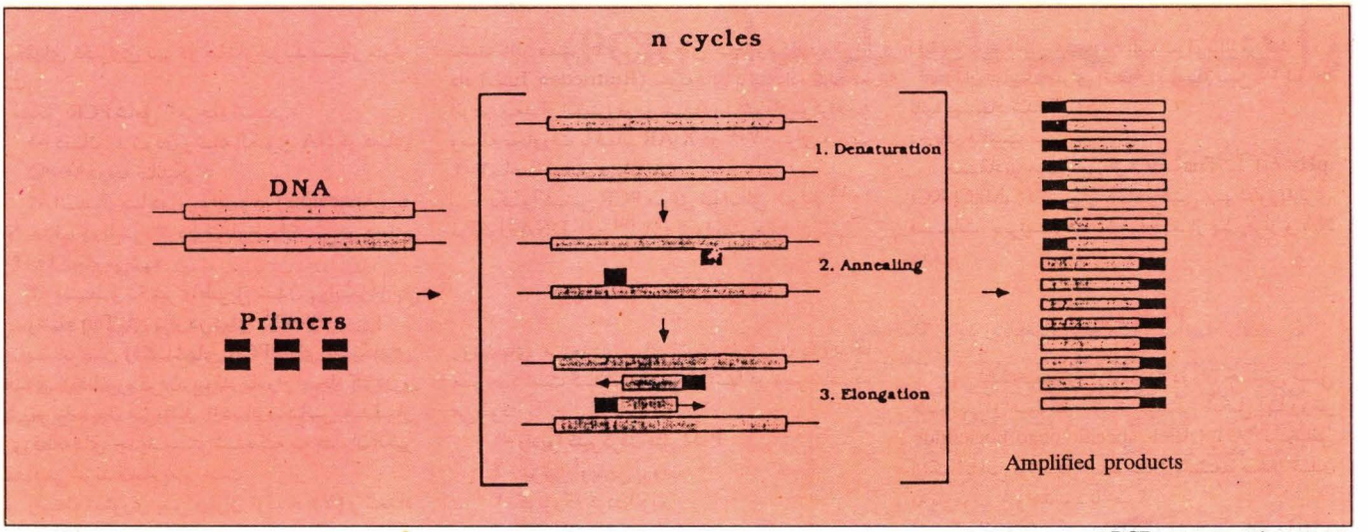
ج- Mutagenesis

۴- تشخیص بیماریهای عفونی

۵- Forensic یا پزشکی قانونی که در حال حاضر انقلابی در امور قضائی بر پا کرده است. بدین ترتیب که با بجا ماندن حتی یک مو یا قطره‌ای از اسپرم و ادرار و غیره می‌توان به تشخیص هویت پرداخت و یا اینکه در نظر است بجای اثر انگشت، فرمول ژنوتیپی هر فرد با جدا کردن حتی یک سلول،

شکل ۱- مدلی برای تشکیل پرایمرها





شکل ۲ - دیاگرامی از سیکل PCR

تعیین شود و برای سوء سابقه استفاده شود.

۶- ارزیابی تکاملی که در دو جنبه علوم زیستی و باستان شناسی کاربرد وسیع پیدا کرده است. چون مثلاً حتی با پیدا کردن یک سلول از بقایای یک گیاه از هزاران سال پیش، می‌توان پی به وجود گونه مشخصی از گیاه در آن زمان برد. یا اینکه اخیراً از اجساد مومیائی مصری، ژنومهائی شبیه عامل مولد بیماری سل *(Mycobacterium tuberclosis)* از درون اجساد کشف کرده‌اند که از نظر سیر تکاملی ویروسها و میکروبها بسیار موثر است.

مشکلاتی از قبیل پیدا شدن نتیجه مثبت کاذب، کار را دشوار خواهد کرد، مثلاً اگر تعداد پرایمرها کمتر از سه جفت باشد یا وجود هر نوع آلودگی در محیط یا وجود ناخالصی در محیط واکنش (مانند اسید نوکلئوتیک نامربوط) موجب پیدایش نتیجه کاذب خواهد شد.

بحث و نتیجه گیری

روشهای موجود و جاری، اگرچه به دلیل سادگی و ارزان بودن کاربرد فراوانی دارند ولی نقایص بیشماری را می‌توان برای آنها برشمرد. در CFT (که هم‌اکنون در مؤسسه رازی هم از آن استفاده می‌شود) دو مسئله عمده داریم: ۱- تهیه کمپلمان از خوکچه هندی ۲- تهیه سرم هیپرایمیون از خوکچه هندی. که خود اینها مستلزم وجود بخش پرورش نگهداری خوکچه می‌باشد و از آن بدتر مسئله تزریق ویروس خالص به خوکچه برای تهیه سرم است که مشکل اشاعهٔ ویروس را در سطح آزمایشگاه و انتقال آن بوسیلهٔ افراد و وسائل به محیط خارج را پیش می‌آورد.

در مواردی که حجم نمونه بدست آمده بسیار کم باشد، هیچکدام از آزمایشهای موجود توانائی آشکار کردن NA را نخواهند داشت. مثلاً در بیماری سل هم اکنون برای کشت مایکوباکتریوم مدتها وقت لازم است ولی با روش RCR در مدت ۱ روز یا حداکثر ۲ روز می‌توان به بیمار پاسخ گفت.

در روش PCR اگر کارهای اولیه مانند جدا و تخلیص کردن NA و اضافه کردن بافرها یا مراحل اولیه دیگر با دقت انجام شود، می‌توان با اطمینان گفت که صاحب حساسترین و بهترین روش خواهیم بود چراکه ویژگی بسیار بالائی دارد.

با توجه به توانایی این روش می‌توان در آیندهٔ بسیار نزدیک شاهد کنار گذاشته شدن روشهای قدیمی و حتی ELLSA در موارد تشخیصی خواهیم بود. در ضمن باید گفت که وجود حتی یک دستگاه Synthesizer قادر خواهد بود کلیه نیازهای مؤسسات پژوهشی را بر طرف سازد.

لازم به تذکر است که هم اکنون چهار دستگاه RCR در انستیتو پاستور موجود می‌باشد و یک مهندس ایرانی موفق شده است با وسائل داخلی دستگاه RCR مشابه نمونه خارجی بسازد.

پاورقی

1- Complementary DNA
2- Template
3- Probe
3- Enzyme
5- Denaturate

منابع مورد استفاده

۱- بیوشیمی در پزشکی و بیولوژی، دوستی . م، آخونی. ع
۲- بیوشیمی هارپر
۳- ویروس شناسی دامپزشکی تالیف دکتر هادی کیوانفر

4- Buchbinder. A (et al) 1988, PCR amplification and insitu by hybridization for the detection of human - B Lymphotropic virus, J. vir. Meth. 21, 191-194.

5- Chin- Yihou (et. al)- 1988, DNA amplification for direct detection of HIV-I in DNA of peripheral blood Mononuclear cells, Science, Vol. 239, 295.

6- Jung. M (et. al) 1992, PCR in human immunodeficiency virus diagnosis: principles, parameter, applications and pitfalls, Bull. Inst. pasteur, 90, 31-43.

7- Larzul. D, 1988, Detection of hepatitis B virus sequences in serum by using invitro enzymatic amplification J. vir. Meth. 20, 227-237.

8- Meyer. R. F (et. al), 1991,Rapid and sensitive detection of FMDV intissues by enzymatic RNA amplification of the polymerase gene. J. vir. Meth 34 (2) 161-172

9- Randall K. SAIKI (et. al), 1988, Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase Science, Vol. 239, 487.

10- Robin G. Mc Farlan (et. al).1990, The detection and differentiation of FMDV using solid- phase nucleic acid hybridization . J. vir. Meth., 27, 175-188.

11- Salimans M. M. M (et. al), 1989, Rapid detection of human parvo virus B19 DNA by dot- hybridization and PCR J. vir. Meth., 23, 19-28.

12- Stephen J. Scharf, 1986, Direct cloning and sequence analysis of enzymatically amplified genomic sequences, Scince, Vol. 33, 1076.

13- Veterinary Virology-1989.