

PCR:

PCR یکی از روش هایی است که هر چند از زمان ابداع آن مدت زیادی نمی گذرد ولی به علت دارا بودن ویژگی و حساسیت بالا و سرعت و سهولت انجام آن جایگاه ویژه ای در تحقیقات و تشخیصهای مولکولی پیدا کرده و نقش کلیدی در بیولوژی مولکولی دارد.

PCR در سال 1983 توسط دکتر Kary B. Mullis ابداع شد و در سال 1993 جایزه نوبل در شیمی را نامبرده به خاطر عملی نمودن PCR در آزمایش های مولکولی دریافت نمود.

PCR روشی است که امکان تکثیر یک توالی معین از DNA که بین دو توالی مشخص قرار دارد را در شرایط *in vitro* ممکن می سازد تا اینکه DNA از نظر مقدار به حدی برسد که مطالعات دیگر از قبیل الکتروفورز در ژل آگاروز یا پلی آکرلامید، هیبریداسیون با پروب و Sequencing به راحتی امکان پذیر شود. در واقع این تکنیک تمامی مشکلات ناشی از عدم دسترسی به مقادیر زیاد از DNA یکسان را در مطالعات مولکولی برطرف نمود.

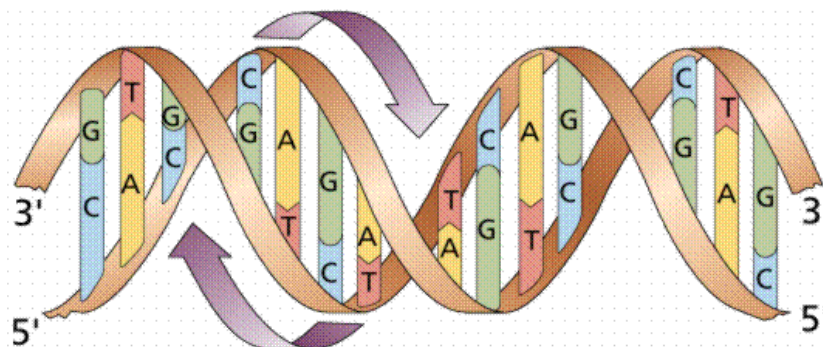
PCR از نظر عمل تشابه زیادی به همانند سازی PCR DNA دارد.

در همانندسازی DNA، آنزیم DNA پلیمراز رشته مکمل را در جهت 5' به 3' می سازد و برای شروع احتیاج به پرایمر دارد. دکتر Mullis از آنزیم DNA Polymerase (I) باکتری E.coli برای PCR استفاده نمود، اما این آنزیم در اثر حرارت غیر فعال می شد و لذا باید در هر سیکل PCR آنزیم مذکور دوباره اضافه شود. اما دو پیشرفت تکنیکی موجب شد تا PCR بتواند یک روش کلیدی در تحقیقات و آزمایشگاه شود:

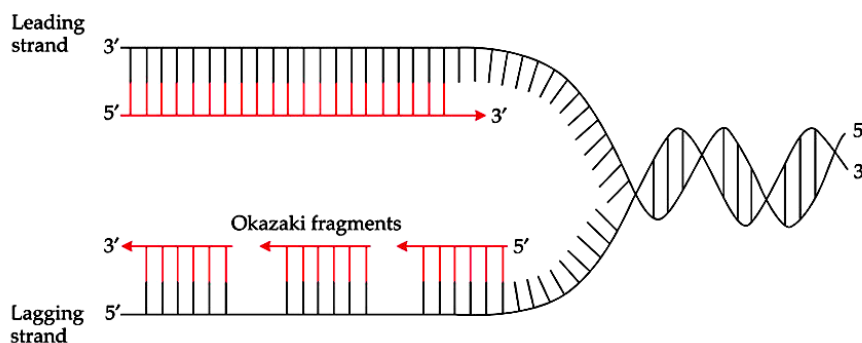
1. استفاده از آنزیم DNA پلیمراز مقاوم به حرارت که باعث شد نیازی به اضافه کردن آنزیم در هر مرحله نباشد (اولین آنزیم مقاوم به حرارت که در روش PCR بکار گرفته شده، آنزیم TaqDNA polymerase می باشد که از باکتری Thermophilus aquaticus تهیه گردید)

2. طراحی Thermal cycler یا PCR Machine که موجب شد تا PCR به طور اتوماتیک

انجام پذیر شود



دئوکسی ریبونوکلیک اسید (DNA) از دو رشته مکمل تشکیل شده است که به دور یکدیگر پیچیده شده و یک مارپیچ دوتایی به سمت راست را تشکیل می دهند. این دو زنجیره در سراسر طول خود توسط پیوندهای هیدروژنی بین جفت نوکلئوتید به هم متصل می شوند.

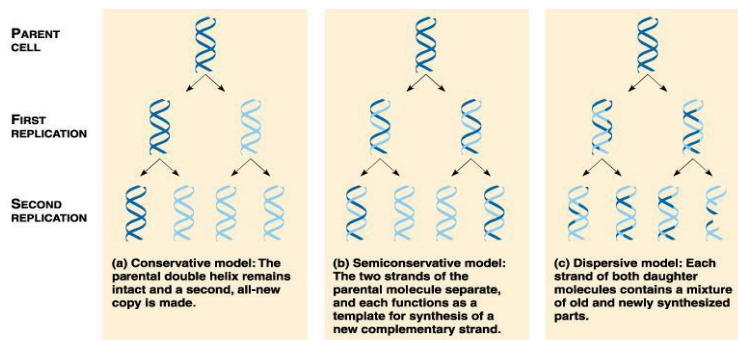


رشته پیشرو به طور مداوم تکثیر می شود. رشته عقب مانده به صورت قطعات اوکازاکی تکرار می شود.

:Okazaki fragments

1. Bacteria = 1,000 - 2,000 nucleotides

2. Vertebrates = 100 - 200 nucleotides



PCR دارای کاربردهای فراوان می باشد که از جمله می توان به موارد ذیل اشاره کرد:

1. تحقیقات مولکولی و مهندسی ژنتیک : با استفاده از این روش می توان توالی خاص از DNA را تکثیر داده و سپس وارد حامل کرده و به میزبان های خاص منتقل نموده و خصوصاً برای کلون کردن DNA و نیز برای بدست آوردن مقدار کافی DNA برای DNA sequencing استفاده نمود.
2. تشخیص عامل بیماریهای عفونی: مانند مایکوباکتریومها (عوامل سل و جذام)، ویروس هپاتیت، سیتومگالوویروس، پاپیلوما ویروس، HIV ، توکسوپلاسما، کلامیدیا، هرپس ویروس و...
3. تشخیص قبل از تولد ناهنجاریها و ناقلین بیماریهای ژنتیکی: مانند هموفیلی، تالاسمی، آنمی سیکل سل، فنیل کتونوری، دیستروفی عضلانی و...
4. استفاده در پزشکی قانونی : با استفاده از این تکنیک می توان DNA موجود در یک سلول منفرد، فولیکول مو، اسپرم ولکه خون را تکثیر داده و مورد تجزیه و تحلیل قرار داد.
5. تشخیص انواع سرطانها

PCR شامل سیکل های منظم بوده و مرکب از سه مرحله است:

1. مرحله دناتوراسیون (denaturation) : که در دمای حدود 94°C انجام می گیرد و در طی آن باندهای هیدروژنی در مولکول DNA شکسته شده و دو رشته از هم جدا می شوند

2. مرحله اتصال (annealing) : در این مرحله پرایمرها به توالی مکمل خود متصل می

شوند که دمای آن بسته به توالی نوکلئوتید پرایمرها می تواند متفاوت باشد

3. مرحله توسعه (extension) یا پلیمریزاسیون : در این مرحله آنزیم TaqDNA

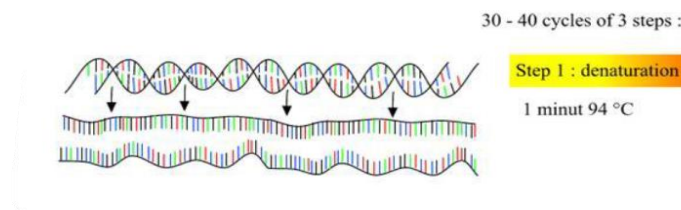
polymerase در دمای حدود 72°C چیدن بازهای مکمل رشته الگو را از جهت 5' به

3' انجام می دهد. با استفاده از یک Thermal cycler سیکل فوق چندین بار تکرار می

شود، تا قطعه مورد نظر سنتز شود

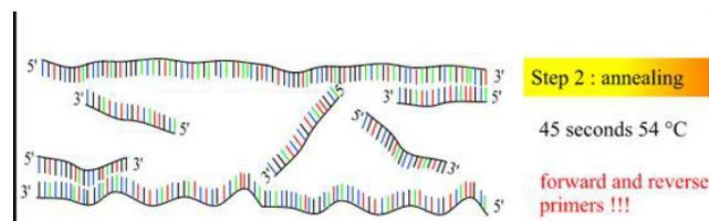
Denaturation

n DNA template



Annealing

— primer



Extension

n dNTPs

n DNA polymerase

