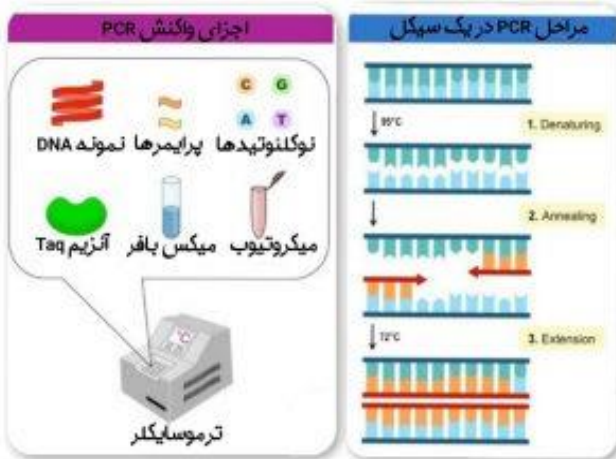




تکنیک واکنش زنجیره ای پلیمرز (PCR)



تکنیک PCR

PCR چیست و در چه کاربردهایی دارد؟

PCR، روشی غیر از کلون‌سازی است که مقادیر نامحدودی از توالی موردنظر را تولید می‌کند

این تکنیک برای بررسی حضور یا عدم حضور یک ژن خاص در مخلوطی از DNA ها، تشخیص‌های قبل از تولد (تعیین جنسیت، بیماری‌ها) و... استفاده می‌شود. تکنیک PCR همان همانندسازی در شرایط *in vitro* است در واقع یعنی تکثیر آنزیمی یک قطعه از DNA که بین دو الیگونوکلوئوتید (پرایمرها) قرار گرفته بنابراین باید با به کارگیری علم بیوانفورماتیک توالی اطراف قطعه مورد نظرم را پیدا کنیم و با طراحی پرایمر برای آنها و اعمال سیکل‌های مکرر حرارتی قطعه را تکثیر کنیم.

بعد از استخراج DNA که در مطالب قبل گفته شد، یک سری مواد و وسایل برای PCR لازم داریم مثل : بافر، آنزیم، $MgCl_2$ ، dNTP، پرایمر، آنزیم DNA پلیمرز Taq یا Pfu مقاوم به حرارت و .. و DNA الگو که همه‌ی این مواد و در تیوب مخصوص ریخته و در دستگاه ترکوسایکلر که سیکل‌های مکرر حرارتی اعمال می‌کند قرار می‌دهیم.

مراحل یک سیکل PCR :

به هر سیکل از PCR یک Stage گفته می‌شود که هر Stage شامل چندین Step می‌باشد.

مرحله واسرشت (Denaturation Step): مرحله باز شدن دو رشته DNA، که در این مرحله دمای دستگاه را معمولا تا دمای ۹۴ تا ۹۸ درجه سانتیگراد بالا برده که این دما باعث گسستن پیوندهای هیدروژنی دو رشته DNA و نهایتا دناتوره شدن مولکول می‌شود. حرارت در این مرحله به میزان نوکلئوتیدها در DNA بستگی دارد.

مرحله اتصال (Annealing Step): در این مرحله حرارت تا دمای ۵۵-۶۵ درجه سانتیگراد پایین می‌آید، در این مرحله پرایمرهای موجود در مخلوط واکنش در محل‌های ویژه‌ای از مولکول DNA اتصال پیدا می‌کنند. البته در این دما امکان دو رشته‌ای شدن مجدد DNA وجود دارد ولی عمدتا این اتفاق رخ نمی‌دهد.

مرحله پلیمریزاسیون یا طویل شدن (Extension/Elongation Step): در مرحله سوم دوباره دمای دستگاه تا ۷۲ درجه سانتیگراد افزایش پیدا می‌کند که این دما مناسب‌ترین حرارت برای عملکرد صحیح آنزیم DNA پلیمرز Taq موجود در مخلوط واکنش است. در اینجا وظیفه آنزیم پلیمرز این است که به هر پرایمر بچسبد و از DNA الگو رشته جدیدی بسازد.

مراحل بعد در واکنش زنجیره‌ای پلیمرز در واقع تکرار تمام این مراحل از ابتدا تا انتها است به طوری که با تکرار به میزان ۲۵ تا ۴۰ چرخه، میزان DNA کپی‌شده به بیش از ۱۳۰ میلیون مولکول DNA دو رشته‌ای می‌رسد.

مرحله طویل شدن نهایی (Final Elongation): این مرحله، پس از آخرین سیکل PCR در دمای ۷۲ درجه انجام می‌شود، تا اطمینان حاصل شود که همه تک رشته‌های DNA همانند سازی شده‌اند.

نگهداری نهایی (Final hold): در این مرحله، محلول نهایی به مدت کوتاهی در دمای ۴ الی ۱۵ درجه قابل نگهداری است.

در نهایت می‌توانیم صحت انجام PCR را از طریق الکتروفورز در ژل آگارز یا پلی‌اکریل امید بررسی کنیم.