



PCR & Electrophoresis

Dr. Shobeiri
Ph.D in Immunology

تاریخچه PCR

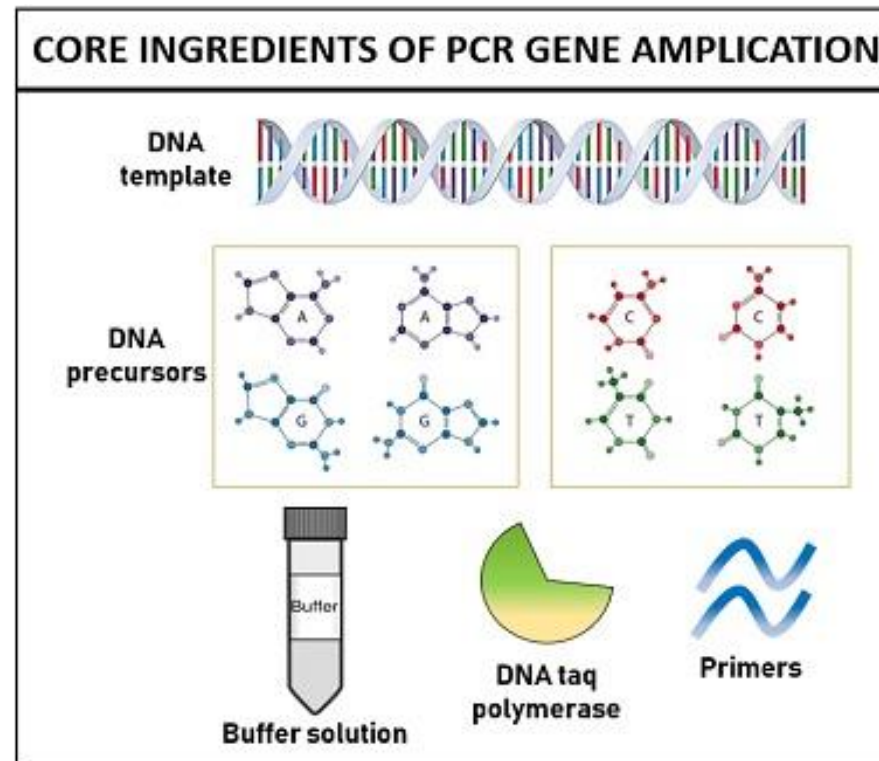
- اوایل دهه ۱۹۷۰ ایده ساخت قطعات کوتاه DNA در محیط آزمایشگاه، توسط Khorana H.G. و همکاران
- ۱۵ سال بعد Kary Mullis و همکاران با استفاده از قطعه Klenow آنزیم DNA پلی مرز باکتری E.coli و دو پرایمر که در دو طرف قطعه مورد نظر قرار می گرفت این ایده را عملی کرد
- سال ۱۹۸۸ Saiki و همکاران، استفاده از DNA پلی مرز مقاوم به حرارت را پیشنهاد نمودند، به سبب تحول ایجاد شده توسط Taq DNA Polymerase در سال ۱۹۸۸ بعنوان ملکول سال معرفی شد.

کاربردهای PCR

- شناسایی ژن‌های دخیل در یک اختلال یا بیماری
- شناسایی عامل بیماری عفونی
- تشخیص پزشکی مناسب
- تکثیر یک قطعه از رونوشت ژن Reverse Transcriptase PCR
- احراز هویت
- کلونینگ قطعه مورد نظر
- تخمین دقیق تعداد نسخه‌های رونوشت یک ژن Real-Time PCR
- تخمین تعداد نسخه‌های رونوشت یک ژن در مقایسه با ژن دیگر Semi-quantitative PCR

Polymerase chain reaction; PCR

- برای اینکه بتوان قطعه ای از یک توالی بلند DNA را در محیط آزمایشگاه تکثیر داد و از آن قطعه میلیون ها کپی ساخت، باید فرآیندی نظیر همانند سازی DNA در باکتری را تقلید نمود و بارها در یک تیوپ کوچک این فرایند تکرار شود



اجزای PCR

DNA الگو
نوکلئوتیدها (واحدهای ساختاری DNA)

- آنزیم Taq پلیمراز
- پرایمرها



مولکول الگو



پرایمرها



Taq پلیمراز



نوکلئوتیدها

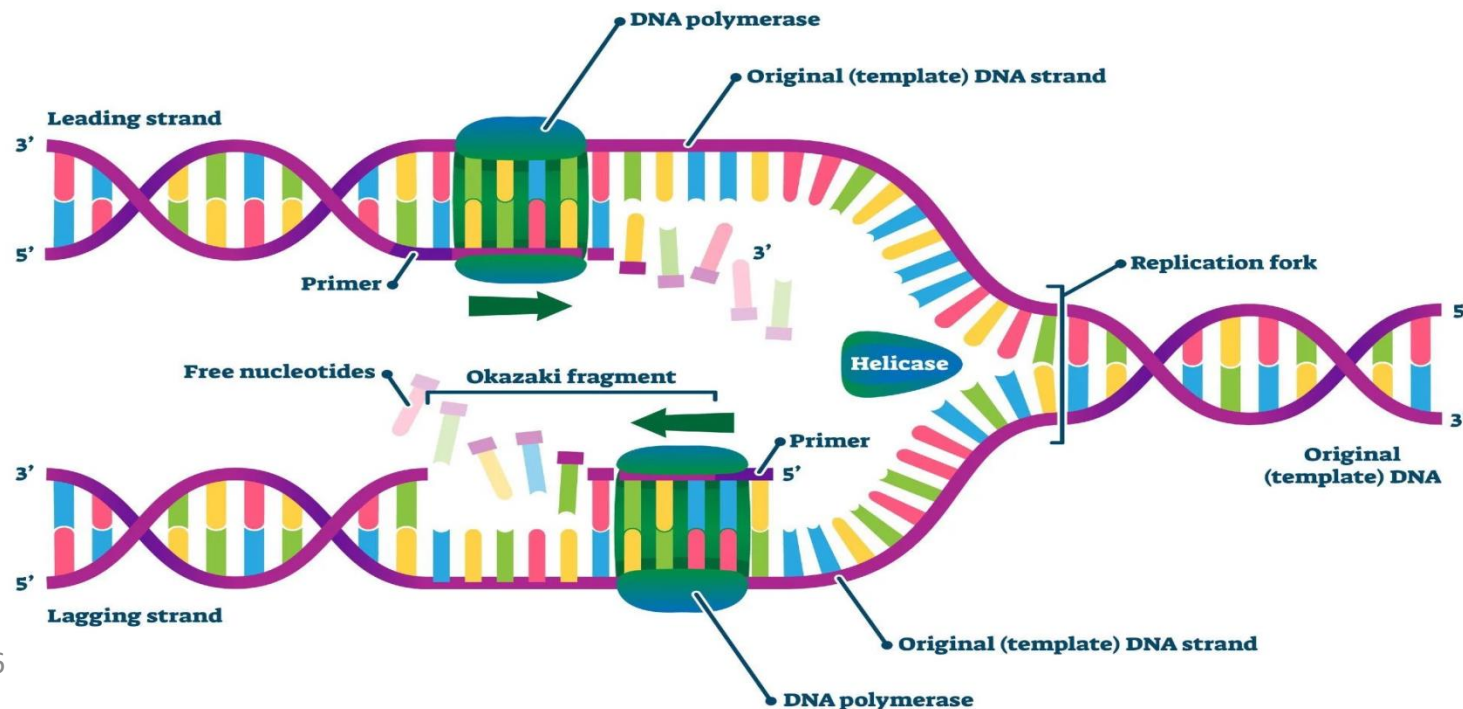


بافر و کوفاکتورها

DNA پلیمراز

- واکنش PCR نیز مانند فرایند همانندسازی DNA به آنزیم DNA پلیمراز وابسته است.
- این آنزیم، فرایند ساخته شدن رشته جدید را از روی رشته قدیمی (الگو) کاتالیز می کند.
- آنزیم DNA پلیمرازی که معمولاً در واکنش PCR به کار گرفته می شود، Taq پلیمراز نام دارد.

DNA POLYMERASE



Taq پلیمراز

- این آنزیم از یک باکتری مقاوم به گرما به نام «ترموس آکوآتیکوس» *Thermus aquaticus* گرفته شده است.
- باکتری ترموس آکوآتیکوس در چشمه‌های آب داغ و دریاچه‌های گرمابی زندگی می‌کند.
- این دریاچه‌ها در بستر دریا و اقیانوس، در نزدیکی مکان‌های فعال آتشفشانی قرار دارند و محل خروج هوای گرم هستند.
- آنزیم‌های مختلف این باکتری، از جمله DNA پلیمراز، نسبت به گرما بسیار مقاوم هستند.
- این آنزیم، در دمای ۷۰ درجه سانتیگراد، در فعال‌ترین حالت خود قرار دارد، دمایی که در آن، بیشتر آنزیم‌های انسانی، غیرفعال خواهند شد.



Taq پلیمراز (ویژگی ها)

- **پایداری گرمایی (Heat-Stability)**

توانایی آنزیم در حفظ ساختار سه بعدی و عملکرد خود در دماهای بالاتر از محیط مناسب خود.

- **قدرت پردازش (Processivity)**

توانایی آنزیم در حفظ اتصال به سوبسترا تا پایان واکنش.

✓ بالاتر بودن قدرت پردازش، به معنای آن است که آنزیم می تواند تعداد بیشتری واکنش را تا مرحله نهایی به پیش برد و پیش از آن که واکنش به پایان برسد، سوبسترا را رها نخواهد کرد.

- **صحت عملکرد (Fidelity)**

توانایی اتصال مولکول صحیح، در جای صحیح.

✓ در مورد پلیمرازها، این ویژگی، به معنای آن است که در مقابل هر نوکلئوتید، مولکول مکمل آن قرار خواهد گرفت. همانطور که مشخص است، این ویژگی در PCR دارای اهمیت فراوانی است چراکه هرگونه اشتباه در جایگذاری نوکلئوتیدها، به تغییرات قابل توجهی در نتیجه نهایی آزمایش می انجامد.

- **اضافه کردن باز به انتهای محصول**

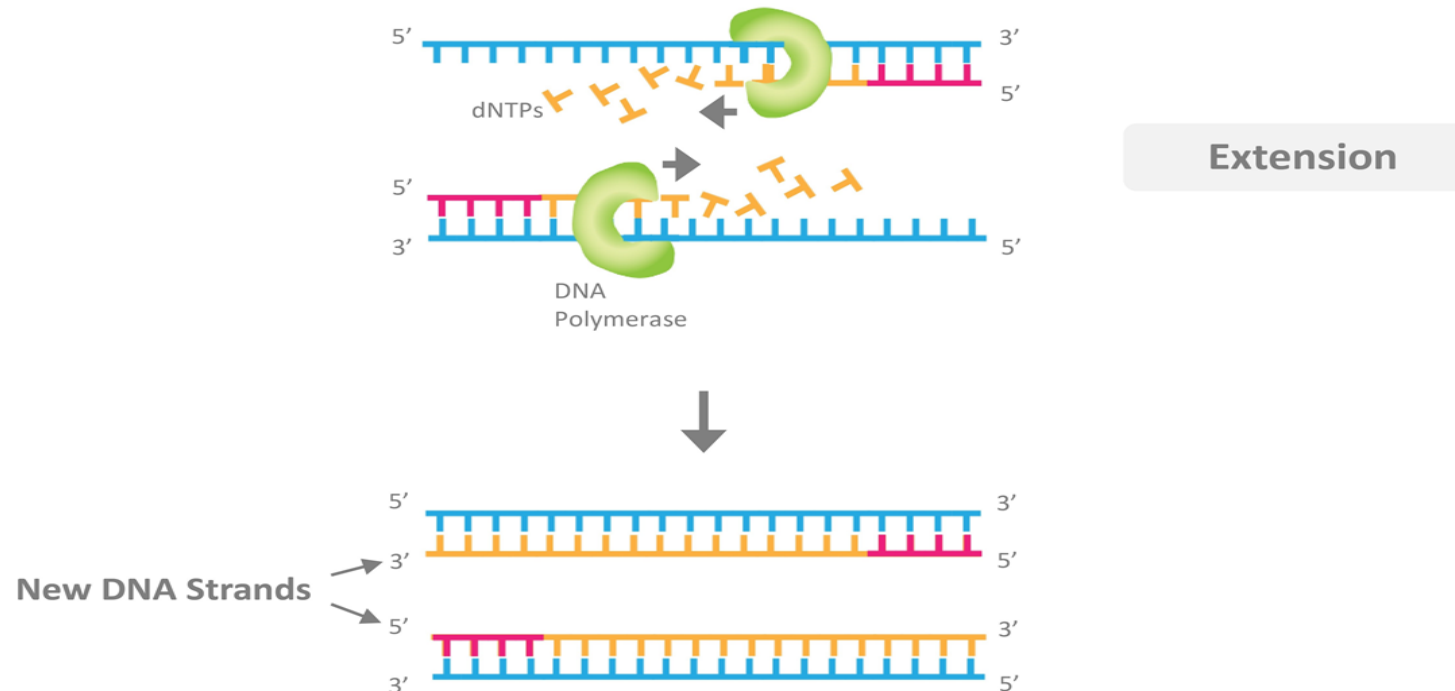
پایداری گرمایی

- پایداری گرمایی Taq پلیمراز را به یک آنزیم ایده‌آل برای PCR تبدیل می‌کند چراکه در این واکنش، دمای محیط، بارها و بارها افزایش می‌یابد تا رشته‌های الگو از یکدیگر باز شوند و دوباره واکنش تکثیر از سر گرفته شود.
- دمای حدود ۷۲ درجه سانتیگراد، نه تنها موجب کاهش فعالیت Taq پلیمراز نمی‌شود، بلکه آن را به طور چشمگیری افزایش خواهد داد.
- در دماهای حدود ۹۰ درجه سانتیگراد یا بالاتر از آن، اگرچه آنزیم، عملاً فعالیت قابل توجهی نخواهد داشت، اما ساختار خود را حفظ می‌کند و در صورت کاهش دما، دوباره به فرم فعال خود برمی‌گردد.

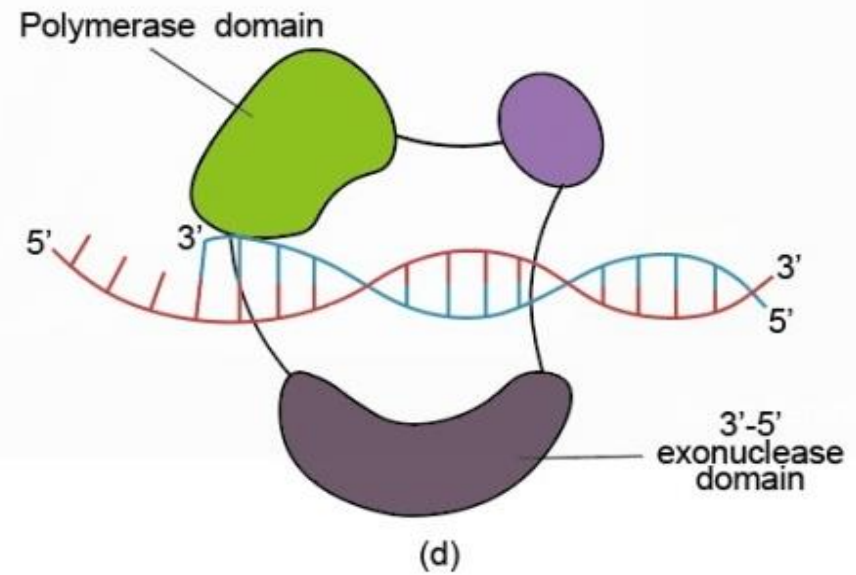
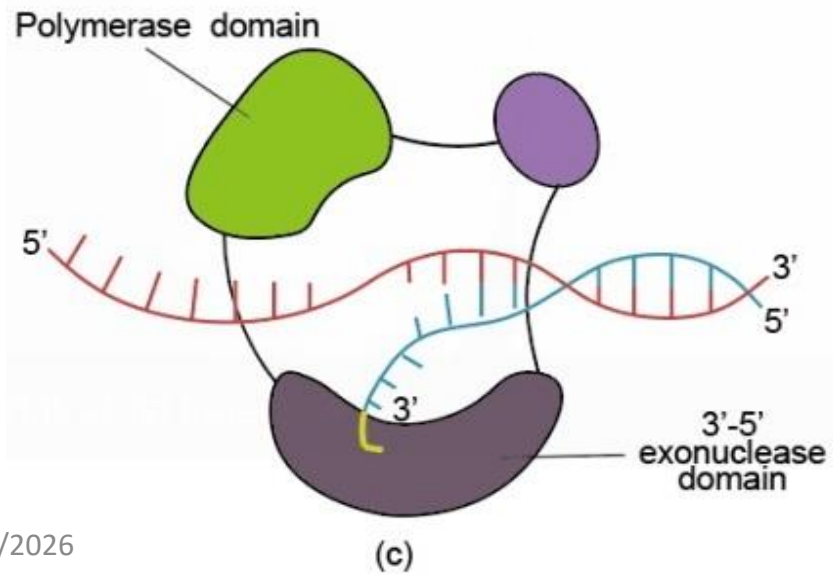
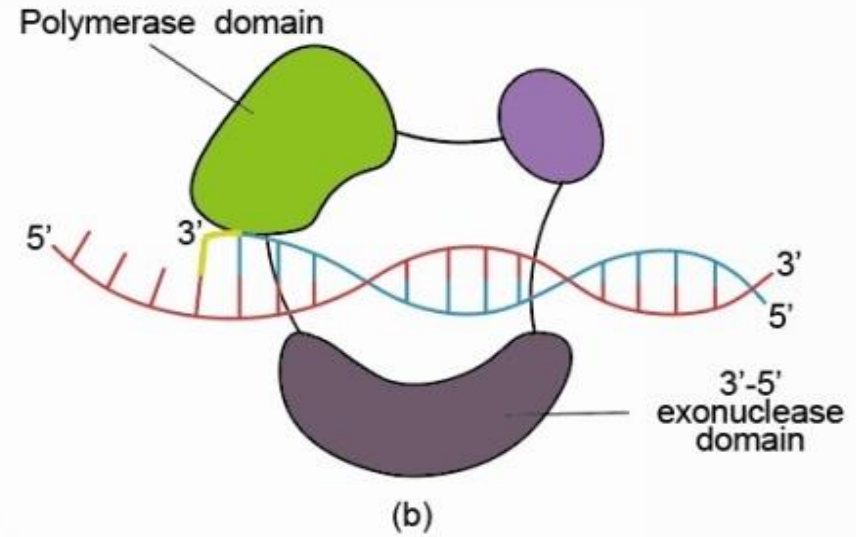
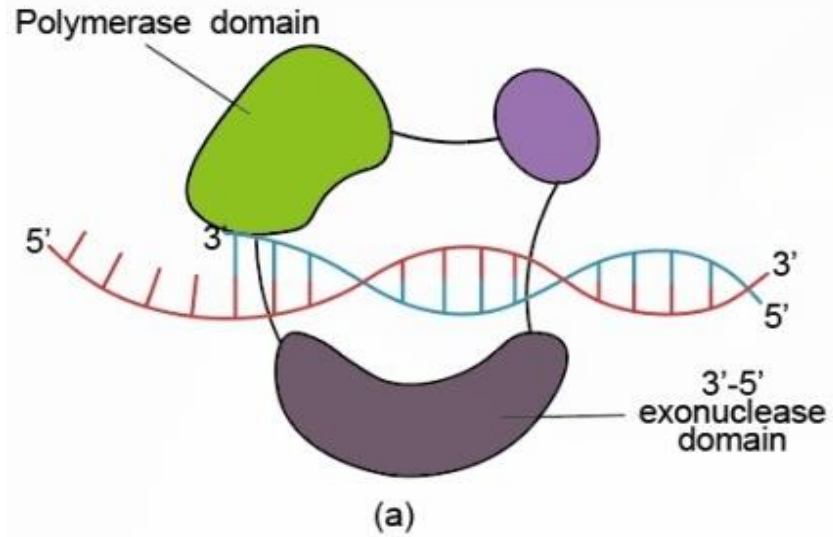
تعداد نوکلئوتید ساخته شده در هر ثانیه	دما
60	70°C
24	55°C
1/5	37°C
0/25	22°C

قدرت پردازش

- Taq پلیمرازهای پر کاربرد در آزمایشگاه می‌توانند تکثیر قطعاتی به طول حداکثر ۳۰۰۰ نوکلئوتید را به انجام برسانند.
- با اندکی تغییر در شرایط، می‌توان این عدد را تا ۴۰۰۰ نوکلئوتید نیز افزایش داد.
- امروزه، فرم‌های تغییر یافته‌ای از پلیمراز نیز در آزمایشگاه‌ها به کار گرفته می‌شوند که برای تکثیر قطعات بلندتر (حدود ۳۰ کیلو باز) بهینه شده‌اند.

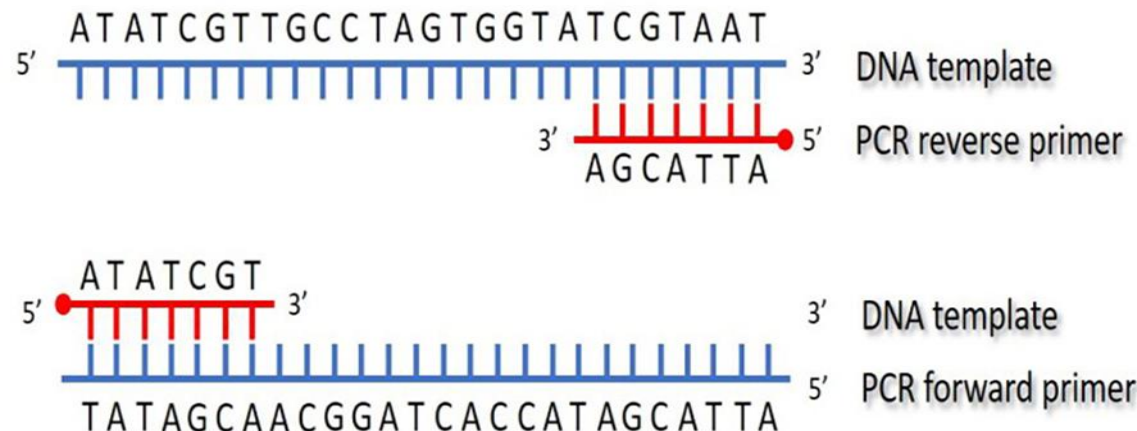


صحت عملکرد fidelity



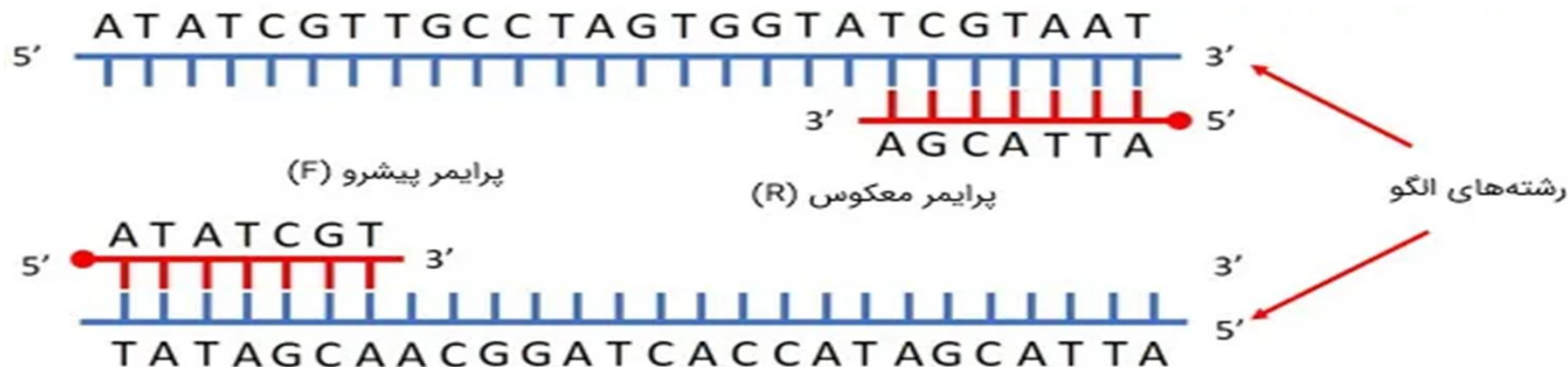
پرایمرهای PCR

- آنزیم Taq پلیمراز نیز، مانند پلیمرازهای دیگر، تنها در صورتی می‌تواند سنتز رشته جدید را کاتالیز کند که مولکول «پرایمر» را در اختیار داشته باشد.
- پرایمر، در واقع، مولکول نوکلئوتیدی کوچکی است که یک نقطه آغاز را در اختیار آنزیم قرار می‌دهد.
- این نقطه آغاز، همان گروه هیدروکسیل آزاد موجود در انتهای ۳' آخرین نوکلئوتید مولکول پرایمر است.



پرایمرهای PCR

- ✓ پرایمرها قطعه‌های کوتاهی از یک DNA تک-رشته‌ای هستند که معمولاً حدود ۲۰ نوکلئوتید طول دارند.
- ✓ این قطعه‌ها طوری طراحی می‌شوند که ناحیه هدف (Target Region) را در بر بگیرند.
- ✓ این اتصال، از طریق پیوندهای هیدروژنی بین پرایمر و الگو صورت می‌گیرد.
- ✓ در هر قطعه از ژنوم انسان، تنها یکی از دو رشته DNA، حاوی ژن رمزکننده و فعال هستند.
- ✓ پرایمری که برای اتصال به این رشته طراحی می‌شود، پیشرو Forward و پرایمری که برای اتصال به رشته مکمل طراحی می‌شود، معکوس Reverse نام دارد.



پرایمرهای PCR

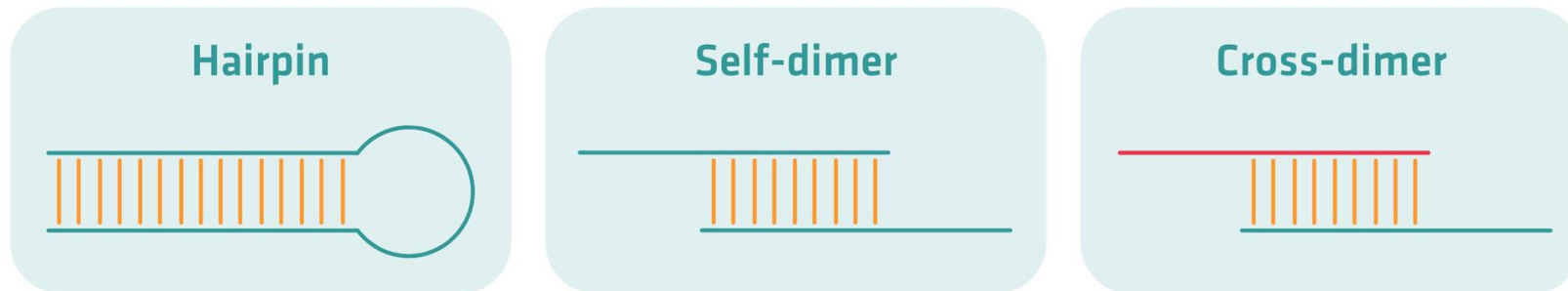
✓ طول مناسب پرایمر ۱۸ تا ۲۲ باز می باشد.

✓ دمای ذوب پرایمر T_m – Primer melting temperature موید ثبات ساختار دو رشته ای DNA است. دمای ذوب ۵۲ تا ۵۸ بهینه است و بهتر است اختلاف دمای دو پرایمر از ۵ درجه بیشتر نشود.

✓ در دمای اتصال پرایمر T_a – Primer annealing temperature، پرایمر به طور خیلی اختصاصی به تارگت اصلی خود می چسبد. ۵۵-۶۵ درجه

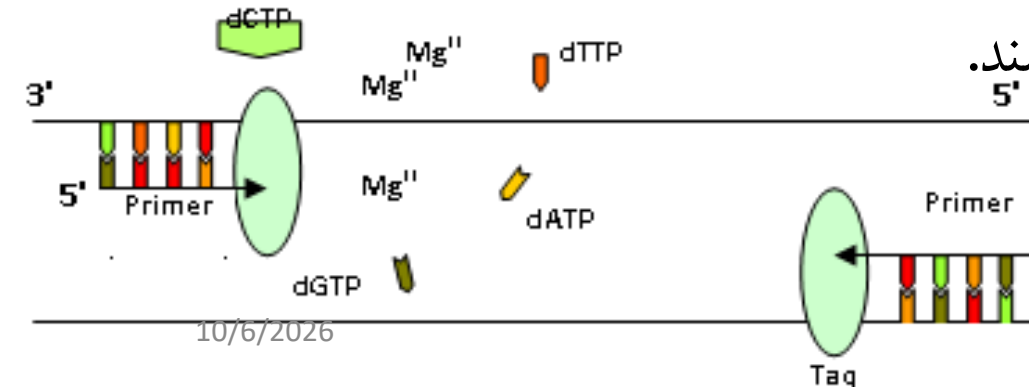
✓ محتوای GC پرایمرها بهتر است بین ۴۰ تا ۶۰ درصد باشد.

✓ قابلیت اتصال بازها درون یک پرایمر primer self-complementarity موجب تولید ساختارهای ثانویه Secondary structures نامناسبی می شود که روی موفقیت واکنش PCR اثر سوء دارند.

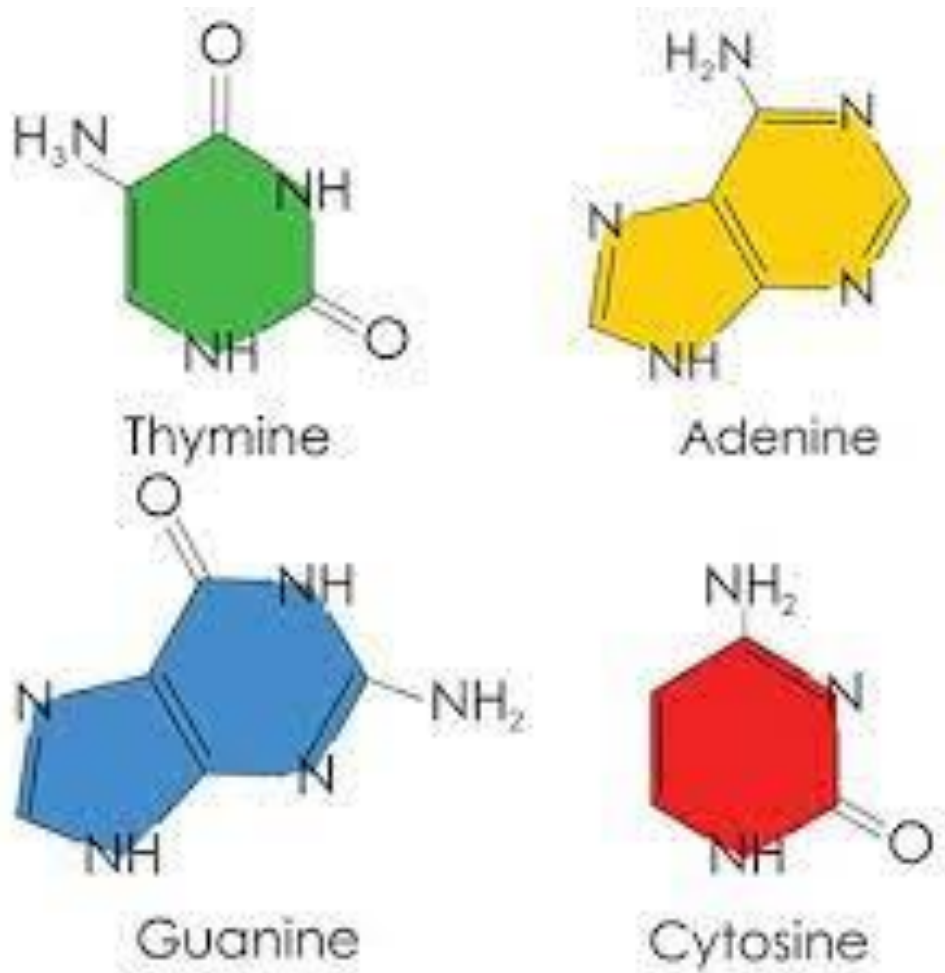


بافر PCR

- هر آنزیم در یک شرایط PH و قدرت یونی خاص، بیشترین فعالیت را نشان می‌دهد.
- بافرها این شرایط را ایجاد و تا پایان واکنش، حفظ می‌کنند.
- در مورد Taq پلیمراز، بیشتر این بافرها حاوی تریس-HCl، نمک کلرید پتاسیم KCl و نمک $MgCl_2$ هستند.
- تریس-HCl به حفظ PH بین ۸ تا ۹/۵ کمک می‌کند.
- یون پتاسیم موجود در این بافرها، موجب تقویت فرایند اتصال پرایمرها به الگو، طی مرحله آنیلینگ می‌شود
- یون منیزیم، به عنوان کوفاکتور آنزیم پلیمراز، به آن متصل خواهد شد تا آن را به فعال‌ترین حالت ساختاری خود در آورد.
- بافرهای PCR، معمولاً در غلظت 10X به فروش می‌رسند.

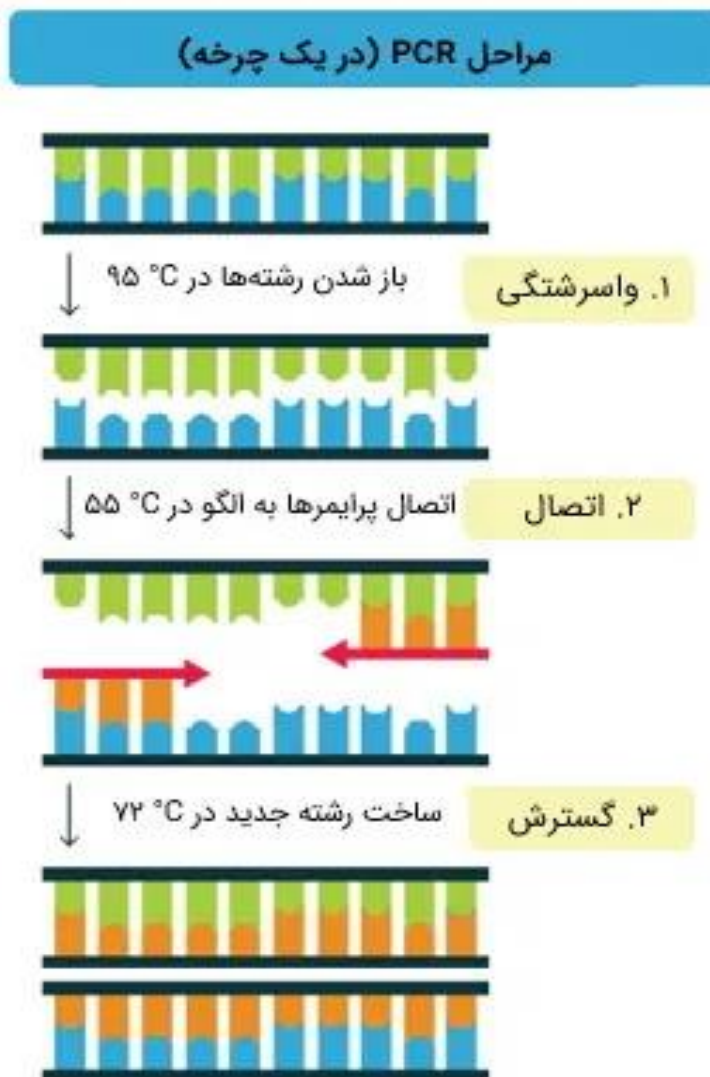
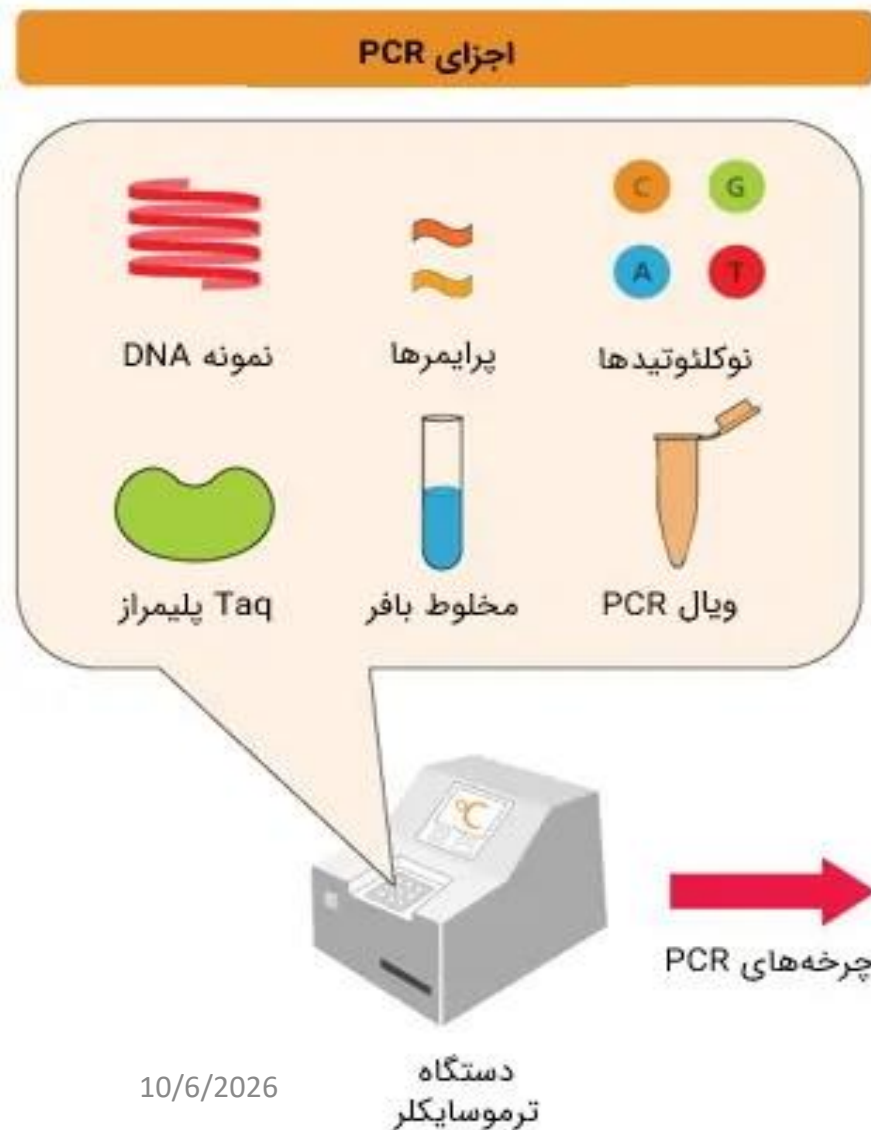


دزواکسی نوکلئوتید تری فسفات ($dNTP$)



- در یک واکنش PCR استاندارد، از مخلوطی از $dNTP$ ها که حاوی میزان مساوی از هر چهار نوع ($dATP$, $dCTP$, $dGTP$, $dTTP$) $dNTP$ استفاده می شود.
- آنزیم DNA Taq پلی مرز با توجه DNA هدف در جهت $3 \rightarrow 5$ واحدهای $dNTP$ را به پرایمر می افزاید و رشته DNA کپی را می سازد.

مراحل PCR



✓ واسرشتگی Denaturation

✓ اتصال Annealing

✓ گسترش Extension

مراحل PCR

✓ دناتوراسیون اولیه

✓ پیش از آغاز اولین چرخه دمایی، ویال حاوی اجزای واکنش، تا رسیدن به دمای ۹۵ درجه سانتیگراد، گرم می‌شود و حدود ۵ دقیقه در این دما باقی می‌ماند.

✓ هرگونه ساختارهای ثانویه یا پیچ و تاب خوردگی‌های مولکول الگو، کاملاً حذف می‌شوند و مولکول، به صورت یک تک‌رشته‌ای خالص در معرض آنزیم قرار می‌گیرد.

✓ طویل سازی نهایی

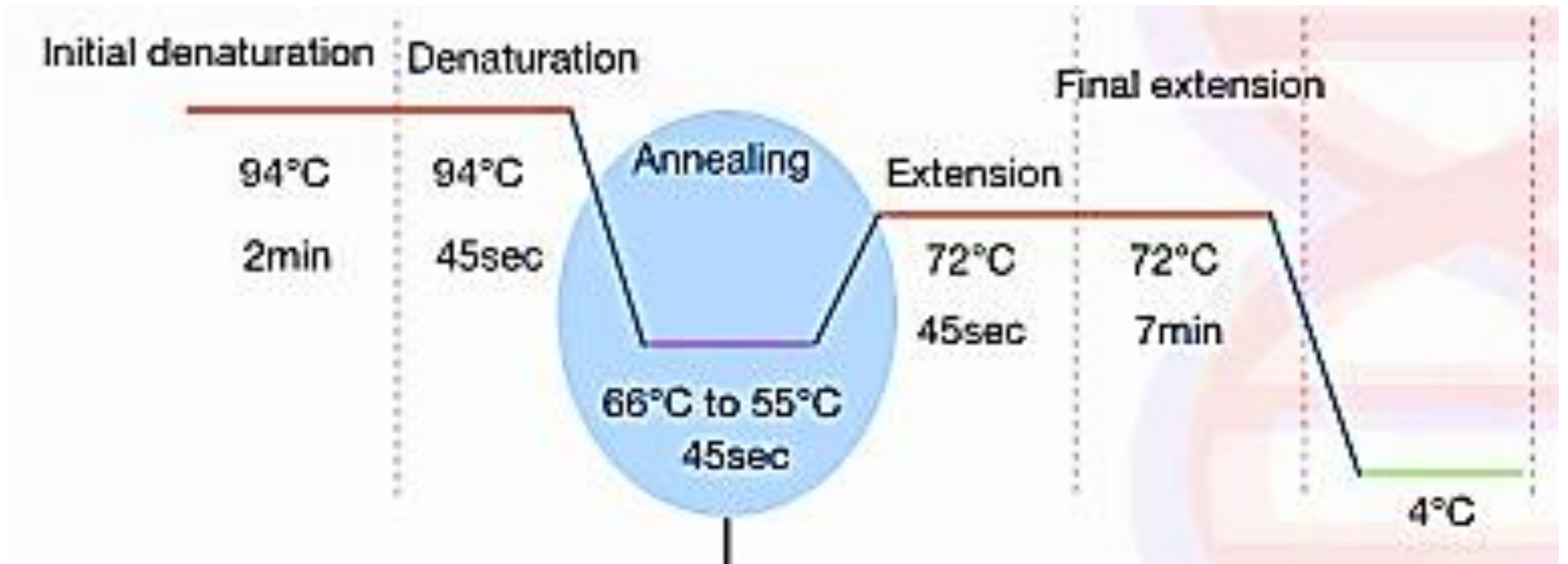
✓ پس از انجام آخرین چرخه دمایی، ویال نمونه برای مدت حدود ۵ تا ۱۰ دقیقه دیگر در دمای ۷۲ درجه سانتیگراد، باقی می‌ماند و زمان لازم را فراهم می‌کند تا آنزیم Taq پلیمراز، کار ساخت رشته‌های ناقص را تکمیل کند.

مراحل یک واکنش PCR

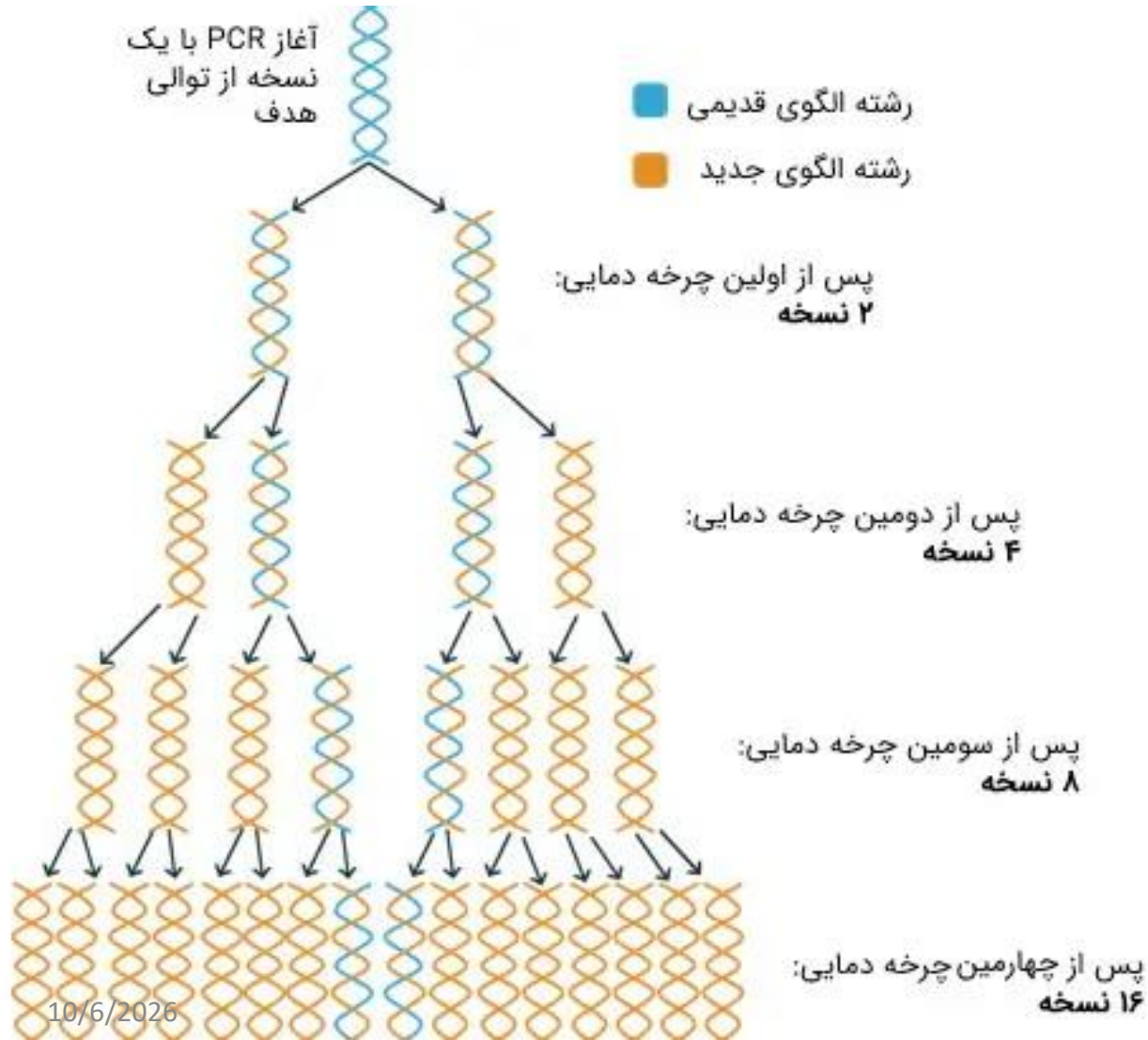
واکنش زنجیره ای پلیمراز در دستگاهی به نام ترموسایکلر انجام می‌شود. هر واکنش ساده، بین ۲ تا ۴ ساعت طول می‌کشد و طی آن، مراحل سه‌گانه فوق، بین ۲۵ تا ۳۵ بار تکرار خواهند شد.

تکرار	مرحله	دما	زمان
1	واسرشتگی اولیه	95°C	۵ دقیقه
25-30	واسرشتگی	95°C	۳۰ ثانیه
	اتصال	55°C	۳۰ ثانیه
	گسترش	72°C	۳۰ ثانیه
1	گسترش نهایی	72°C	۱۰ دقیقه
10/6/2026 1	نگهداری نهایی	10°C	۱۹ تا خاموش کردن دستگاه

مراحل یک واکنش PCR



مراحل یک واکنش PCR



- 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.
- تیوب آزمایش، حاوی مقادیر فراوانی پرایمر و آنزیم است که به این رشته‌ها متصل می‌شوند و سنتز رشته‌های جدید را کاتالیز می‌کنند.
- تعداد نسخه‌ها در هر دور PCR دوبرابر خواهد شد.

Typical PCR mix

- In a thin wall Eppendorf tube assemble the following

PCR components	Amount
Template DNA (50-1000 ng)	1 ul
10 X PCR buffer(1X final)	2 uL
10 mM dNTPs (200 uM final)	0.4 uL
50 mM MgCl2 (1.5 mM final)	0.6 uL
10 uM forward primer (0.5 uM final)	1 uL
10 uM reverse primer (0.5 uM final)	1 uL
5 units/uL Taq DNA polymerase (1 units)	0.2 uL
dH2O	13.8 ul
Final Volume	20 uL

PCR Inhibitors

- تقریباً هر چیزی در صورت وجود بیش از حد PCR را مهار می کند.
- مهار کننده های رایج عبارتند از:

✓ پروتئیناز K

✓ فنل

✓ EDTA

✓ شوینده های یونی

✓ پلی آنیون ها

✓ هموگلوبین

✓ رنگهای لودینگ مانند بروموفنول بلو و زایلن سیانول

- در بسیاری از موارد، علت اصلی بازده پایین، آلاینده های موجود در DNA الگو هستند که اغلب تنها جزء واکنش ارائه شده توسط محقق است.

الکتروفورز محصولات PCR

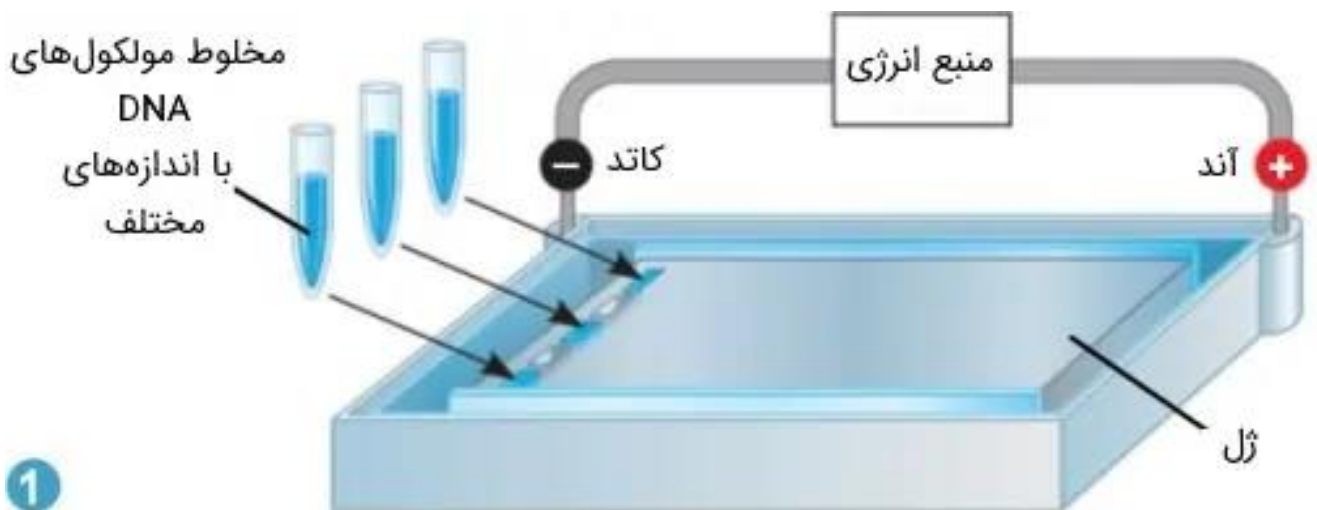
- معمولاً برای دیدن محصولات PCR از الکتروفورز بر روی ژل استفاده می‌شود.

- مولکولهای DNA و RNA بیشتر روی ژلهای آگارز (به صورت افقی) اجرا می‌شوند، در حالی که پروتئین‌ها روی ژلهای آکریلامید (عمودی) اجرا می‌شوند.

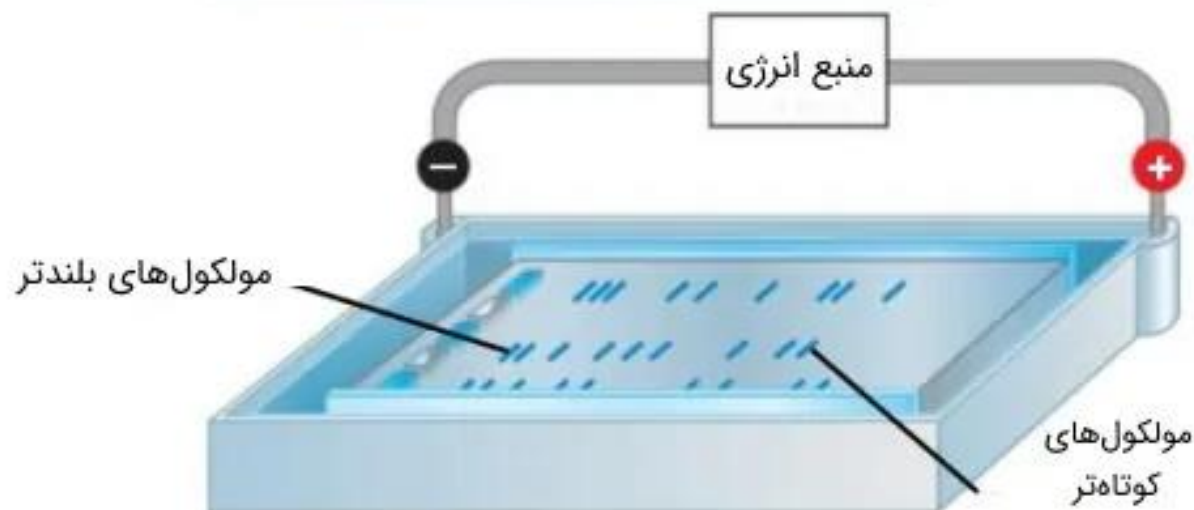
- مولکولهای DNA به دلیل وجود گروه‌های فسفات فراوان، دارای بار منفی هستند.

- با ایجاد جریان الکتریکی، از قطب منفی به سمت قطب مثبت حرکت خواهند کرد.

- مولکولهای کوچک‌تر، به راحتی از بین منافذ موجود در ژل، عبور کرده و سریعتر خود را به انتهای آن می‌رسانند. اما حرکت مولکولهای بزرگتر، به کندی انجام می‌شود.

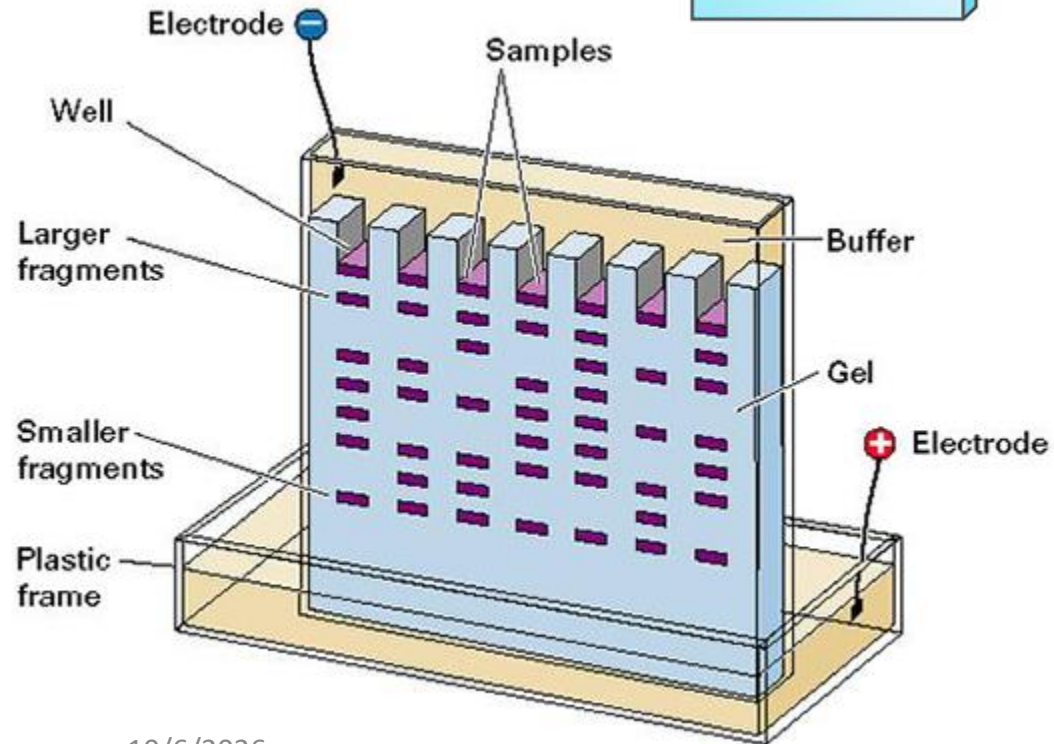
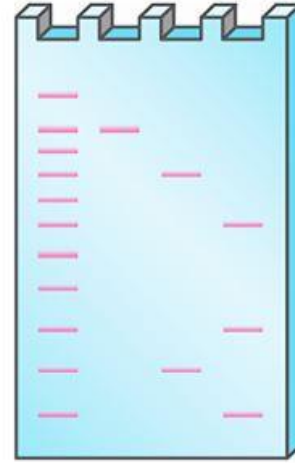


1

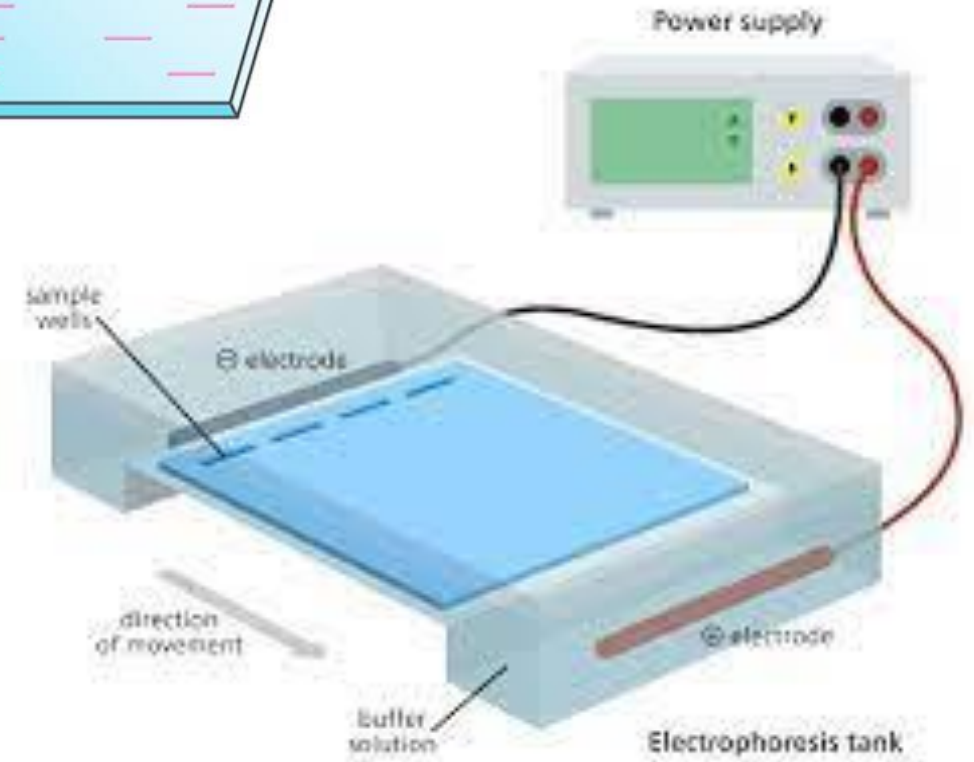
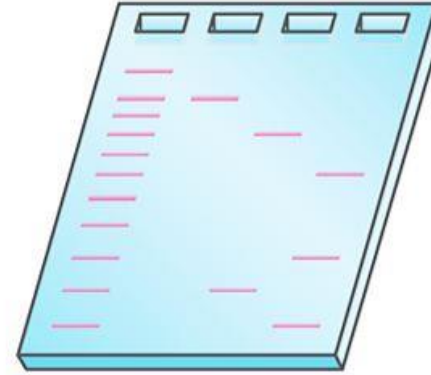


2

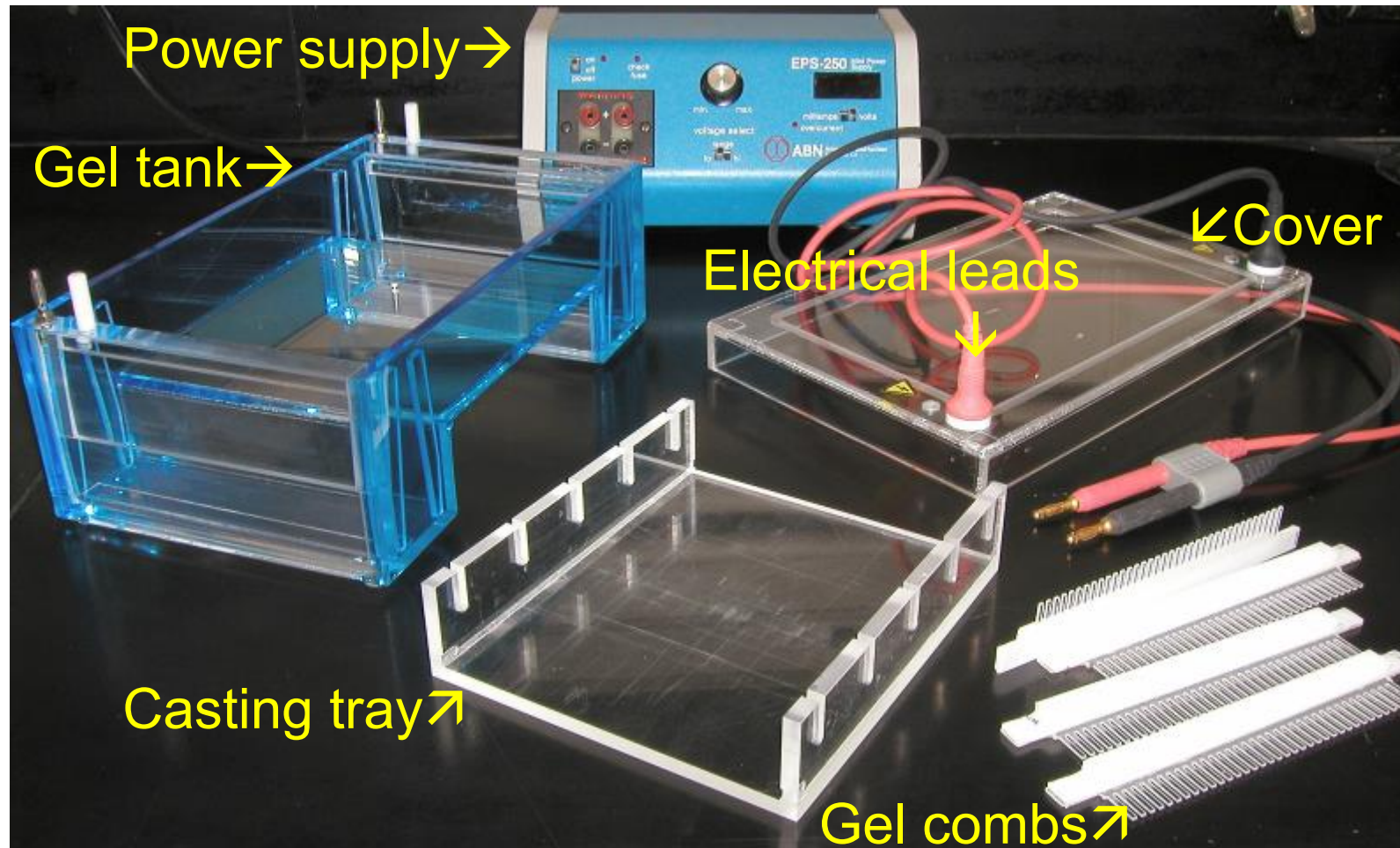
الكتروفورز عمودي



الكتروفورز افقي

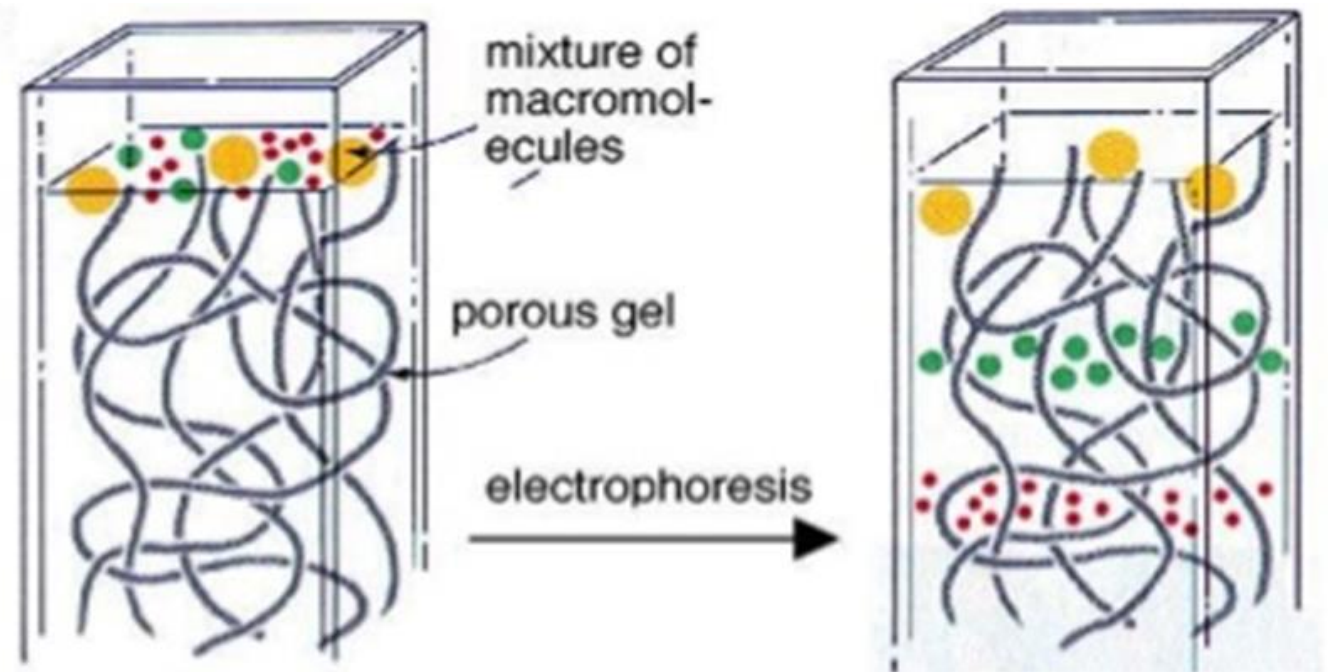


تجهيزات الكتروفورز

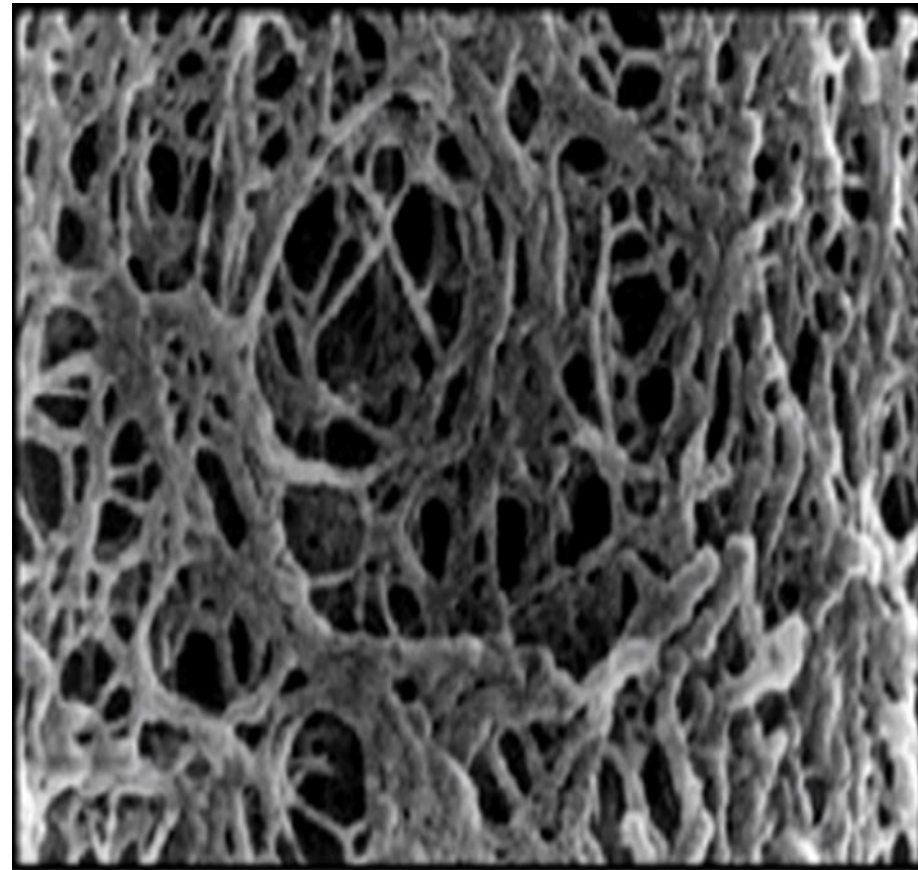
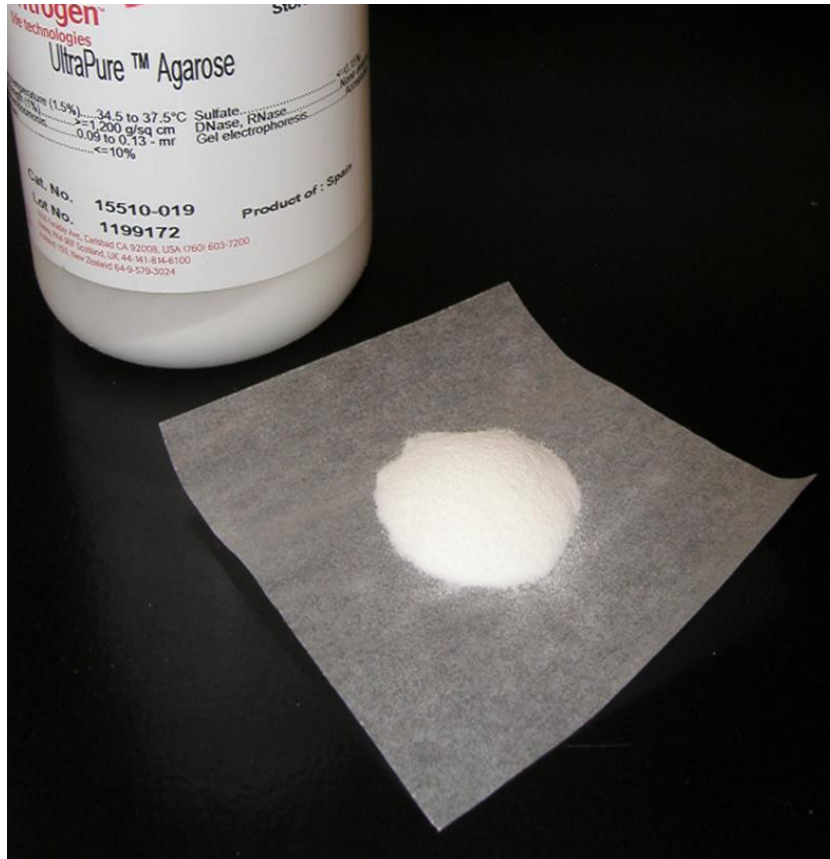


Gel Electrophoresis agarose

- Forcing DNA to travel through a porous matrix will allow the smaller fragments to run faster while slowing the rate of larger molecules.



Gel Electrophoresis

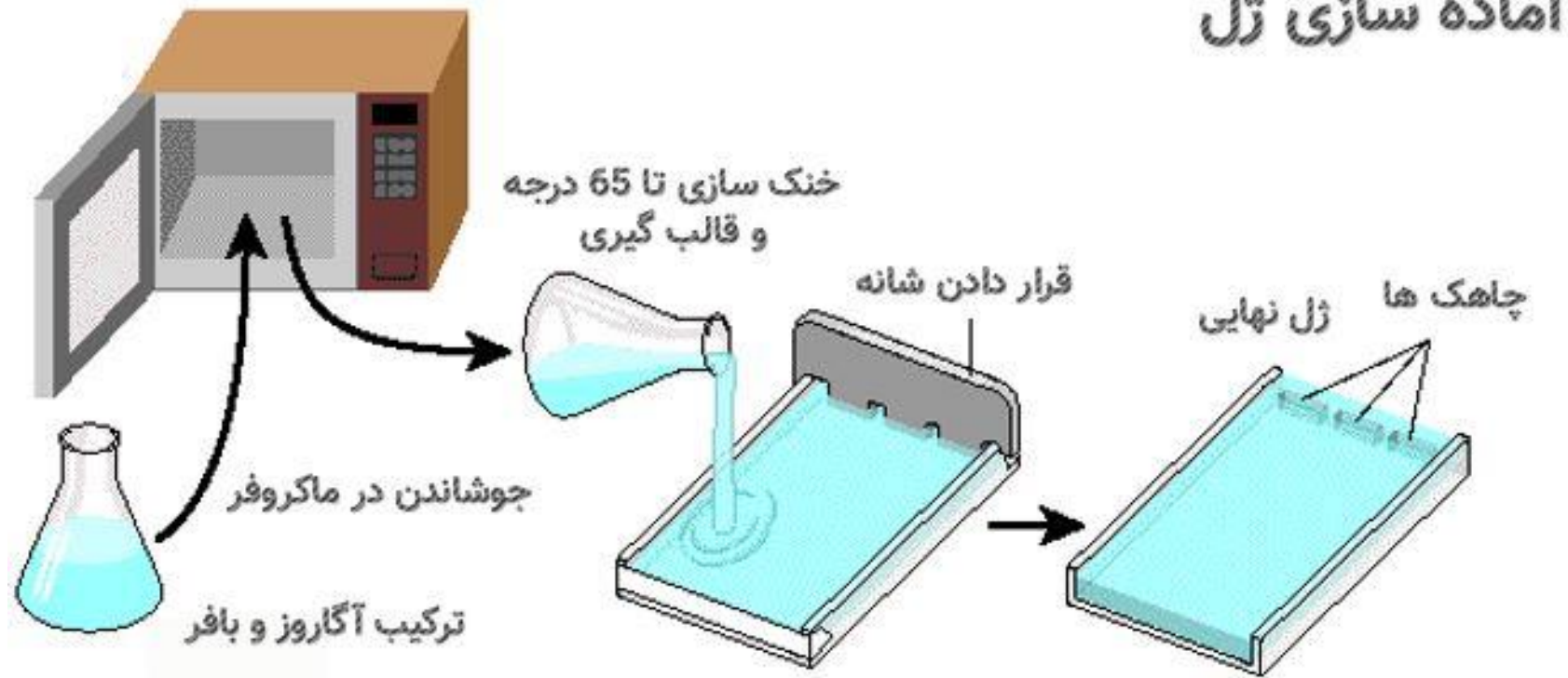


Gel Electrophoresis

- An agarose gel is prepared by combining
 - agarose powder,
 - safe stain
 - buffer solution.
- **TBE Buffer(10x)**
 - Tris base(121.14 g/mol) 890mM
 - Boric acid (61.83 g/mol) 890mM
 - EDTA (292.24 g/mol) 25mM
 - Add H₂O to 1000ml adjust pH to 8.



طرز تهیه ژل آگاروز



✓ آگاروز از پلی ساکارید جلبک های دریای تهیه میشود.

✓ غلظتی معمولاً بین ۰.۷ تا ۲ درصد که بر اساس اندازه مولکول های مورد نظر ساخته میشود.

✓ بافر TAE یا TBE

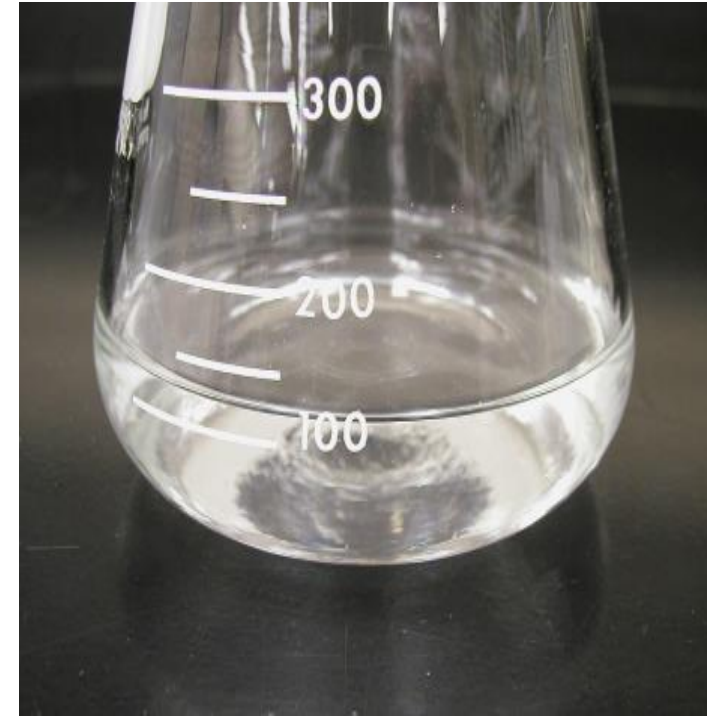
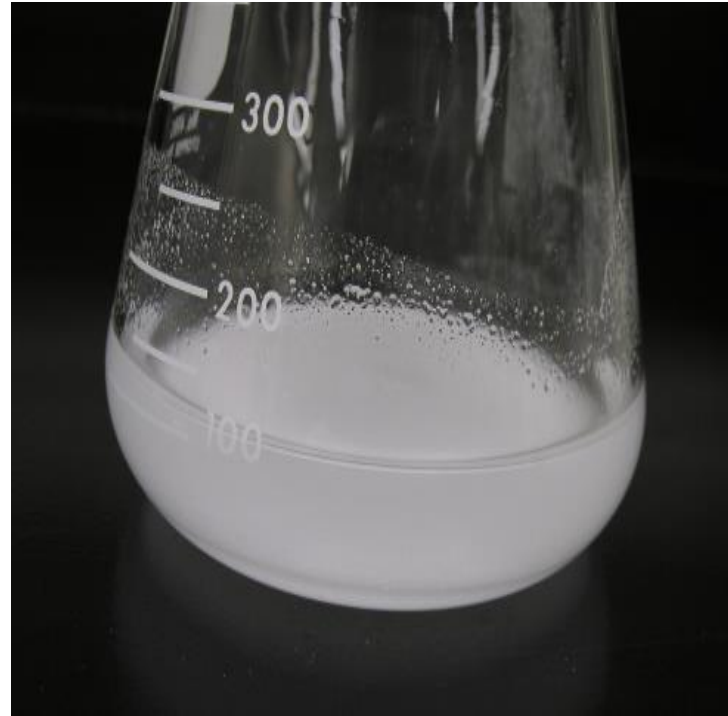
✓ تانک الکتروفورز را با همان بافری که برای تهیه ژل استفاده میکنید، پر کنید.

Resolving DNA Fragments

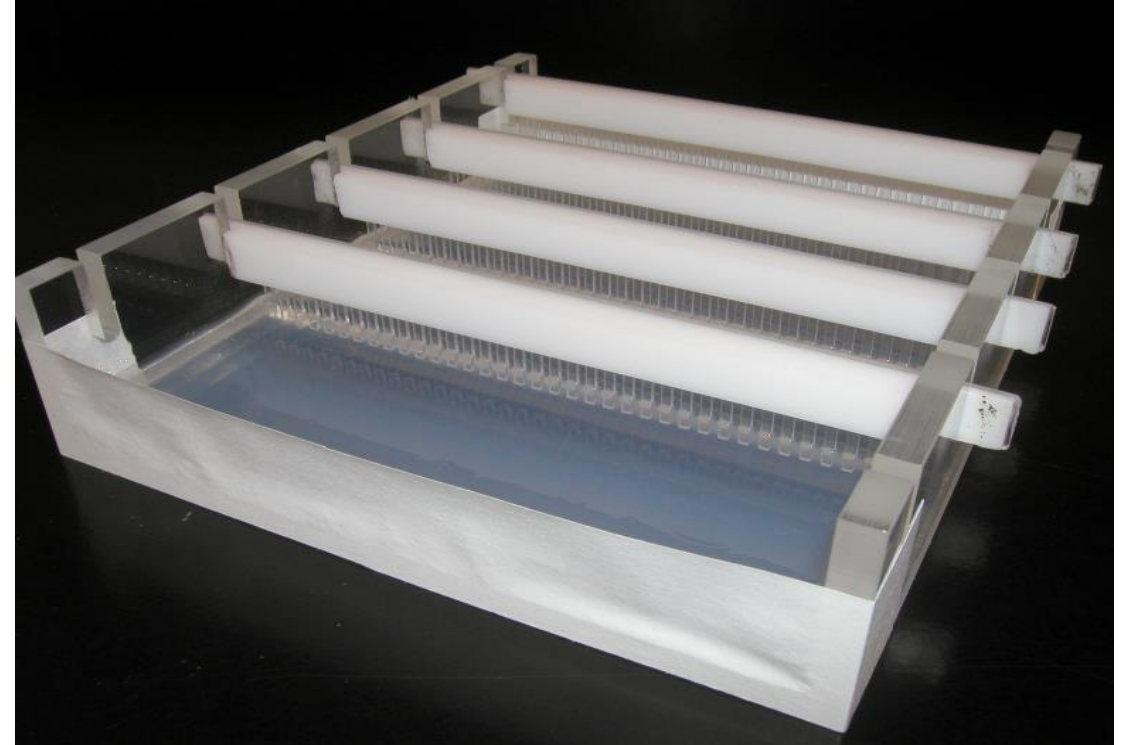
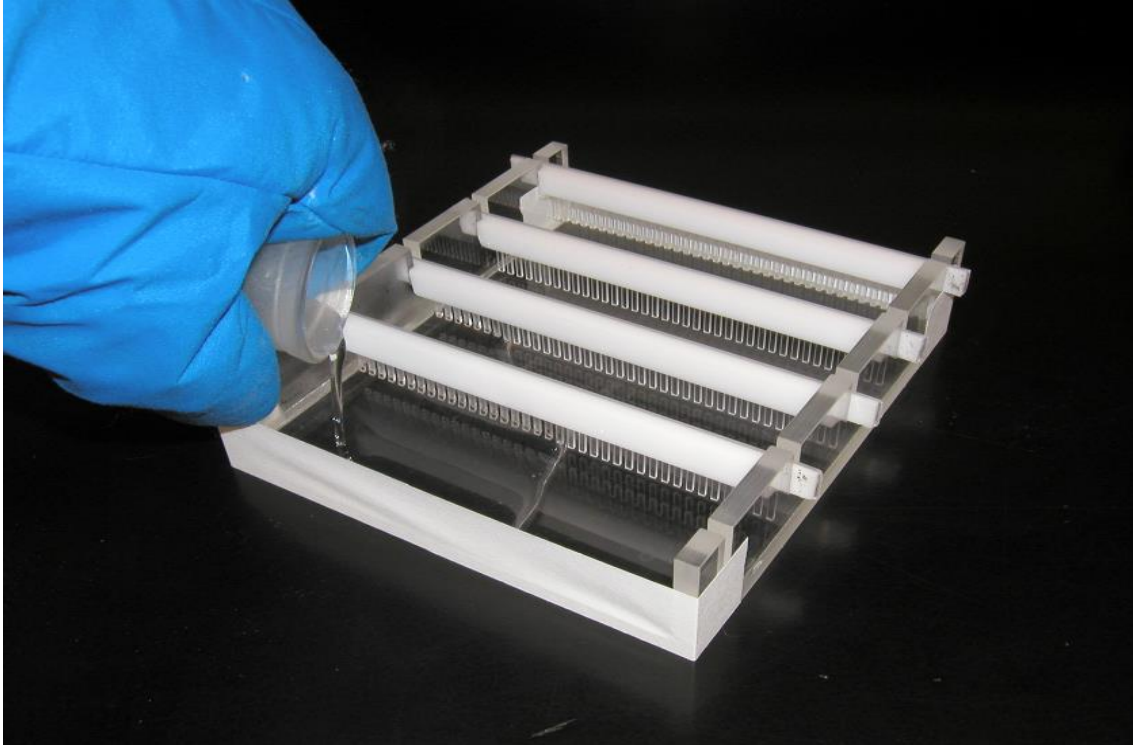
Percent Agarose Gel (w/v)	DNA Size Resolution(kb = 1000)
0.5%	1 kb to 30 kb
0.7%	800 bp to 12 kb
1.0%	500 bp to 10 kb
1.2%	400 bp to 7 kb
1.5%	200 bp to 3 kb
2.0%	50 bp to 2 kb

Table 1: Correct Agarose Gel Concentration for Resolving DNA Fragments

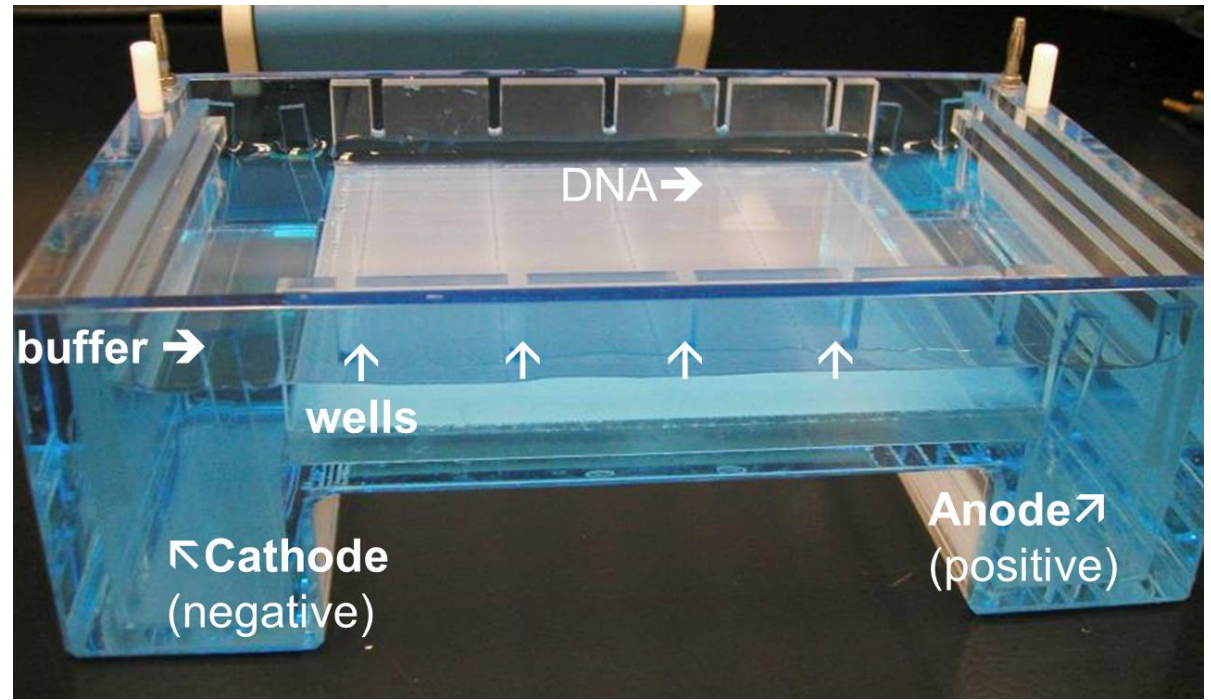
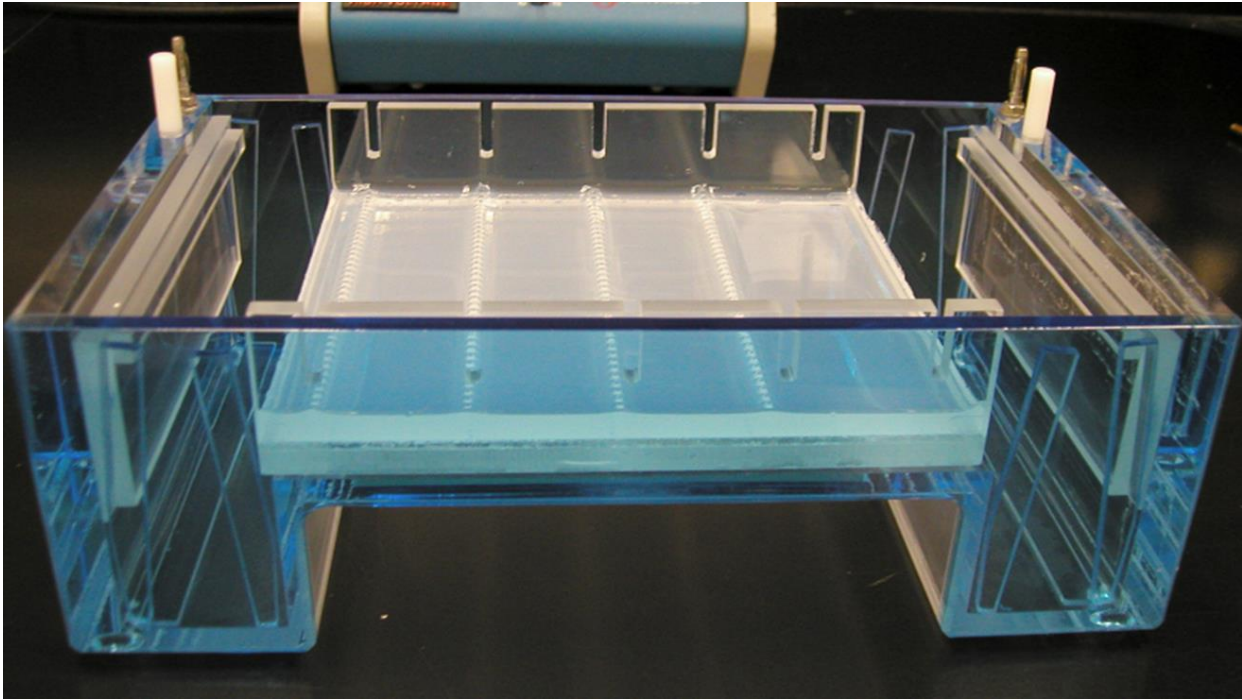
طرز تهیه ژل آگاروز



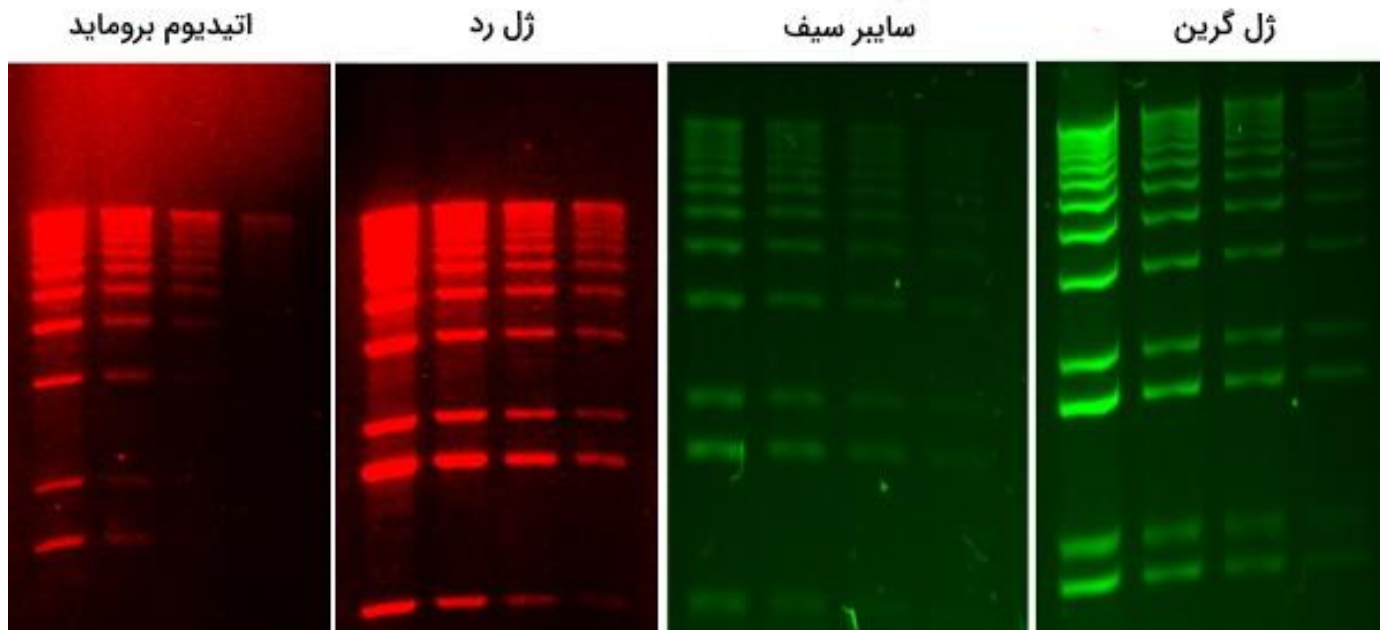
طرز تهیه ژل آگاروز



طرز تهیه ژل آگاروز

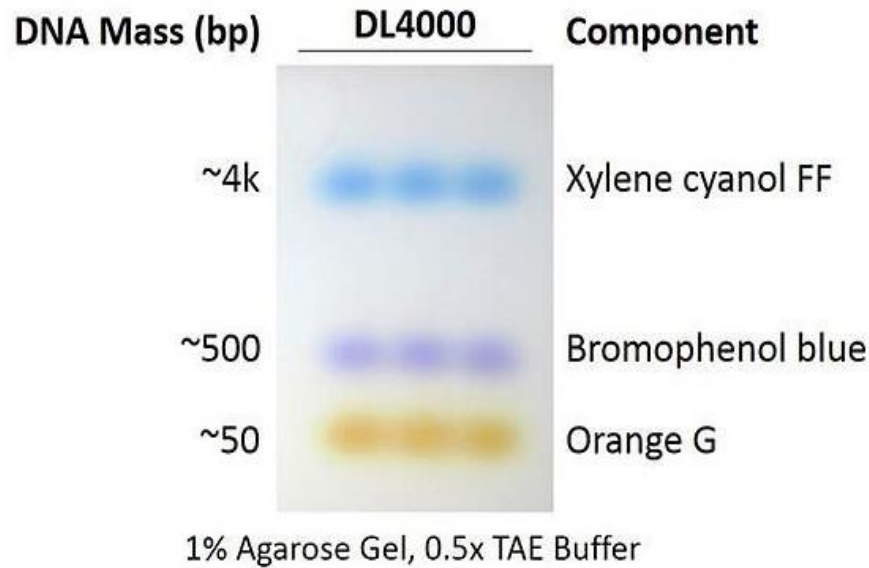


Safe stain



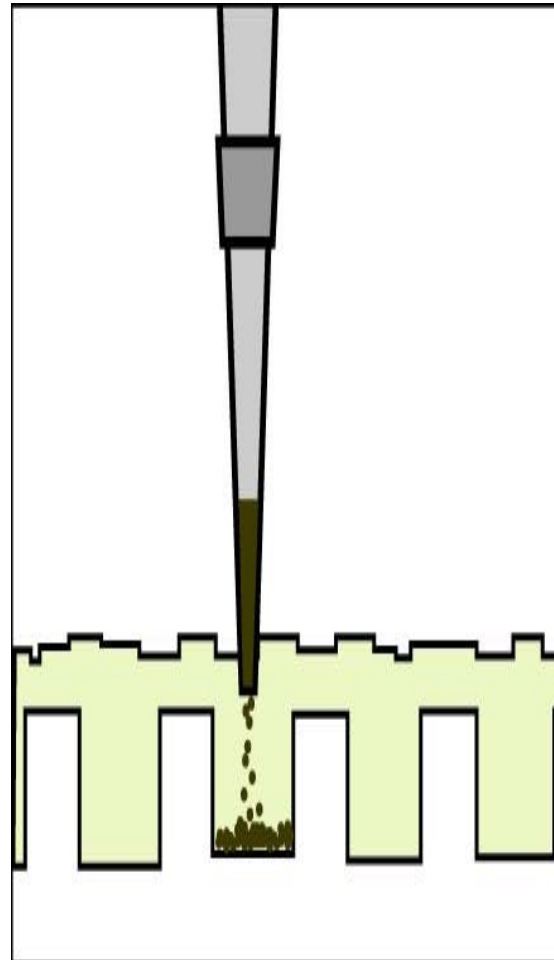
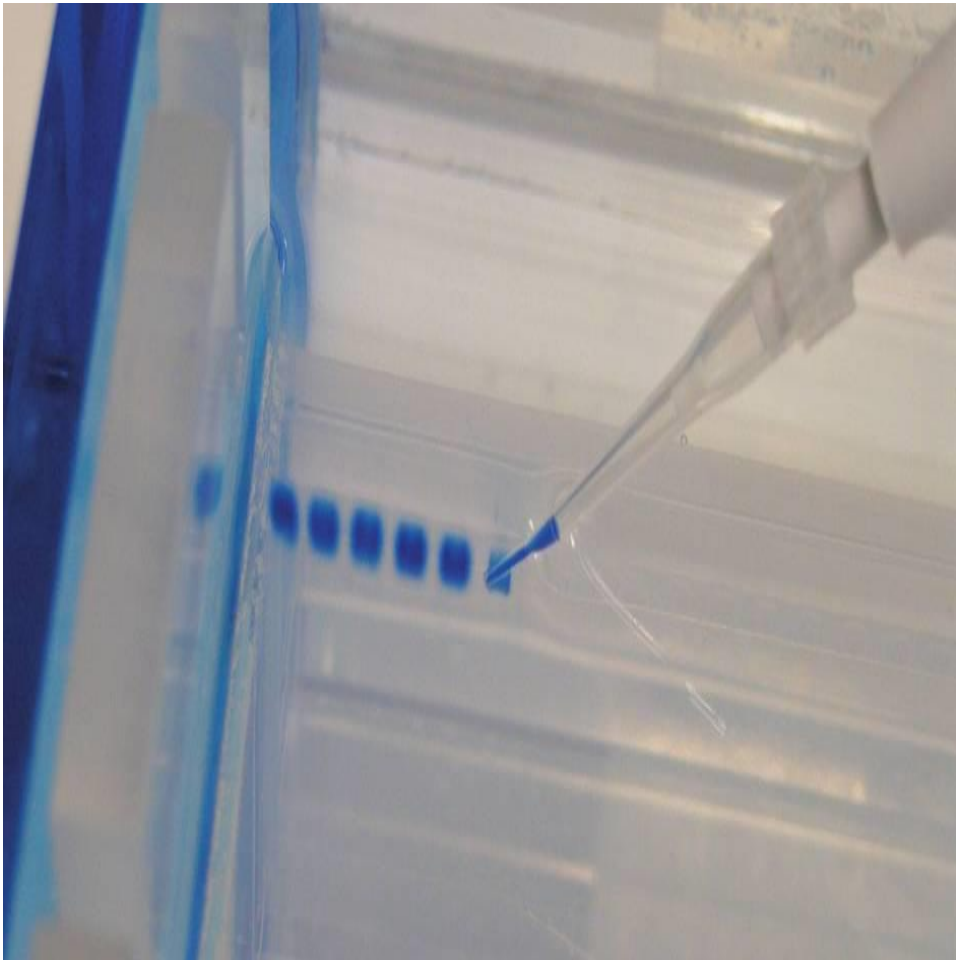
- یکی از رنگ‌های پرکاربرد در این زمینه، اتیدیوم برماید است که به مولکول DNA متصل و باعث رویت آن در حضور نور UV می‌شود. اما این رنگ، به شدت سمی است و استفاده از آن در پژوهشگاه‌های بزرگ با محدودیت‌های فراوانی همراه است.
- امروزه رنگ‌های دیگری، به عنوان جایگزین اتیدیوم برماید به بازار آمده‌اند که به رنگ‌های ایمن Safe Stain معروفند.
- رنگ سایبر-گرین یکی از این رنگ‌هاست که اتصال آن به DNA دورشته‌ای، موجب می‌شود نمونه، در حضور نور آبی (طول موج ۴۹۷ نانومتر)، به رنگ سبز (طول موج ۵۲۰ نانومتر) دیده شود.

بافر لود کننده

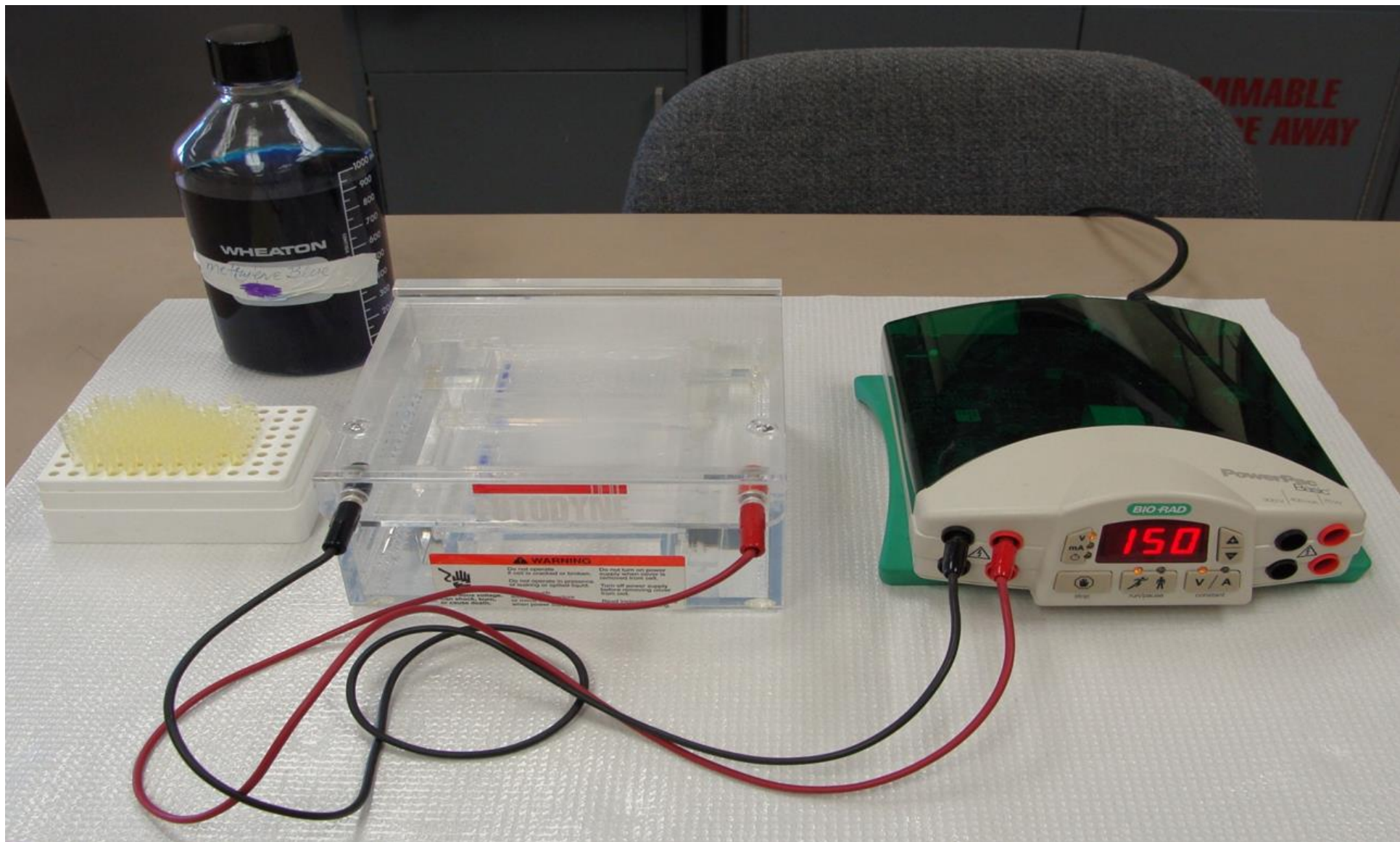


- Loading dye را می توان پیش از لود نمونه ها روی ژل و یا از قبل به نمونه ها اضافه کرد
- بافر های لود کننده عمدتاً از رنگ، فیکول یا گلیسرول و آب، با زایلن سیانول، تریس و اتیلن دی آمین تترااستیک اسید (EDTA) (اختیاری) تشکیل شده اند.
- غلظت بالای EDTA از DNA در برابر تخریب توسط نوکلئازهای وابسته به فلز همانند یون های دوظرفیتی منیزیم محافظت می کند.

لود نمونه



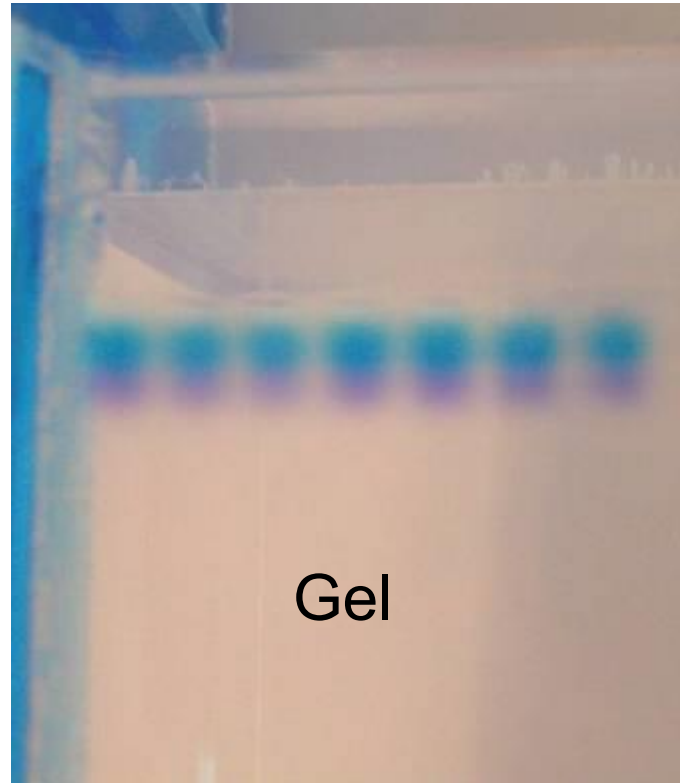
- نوک پیپت را با دقت روی یک چاهک قرار دهید و نمونه را به آرامی تخلیه کنید.
- نمونه باید در چاهک فرو رود.
- مراقب باشید ژل را با نوک پیپت سوراخ نکنید.



Cathode
(-)

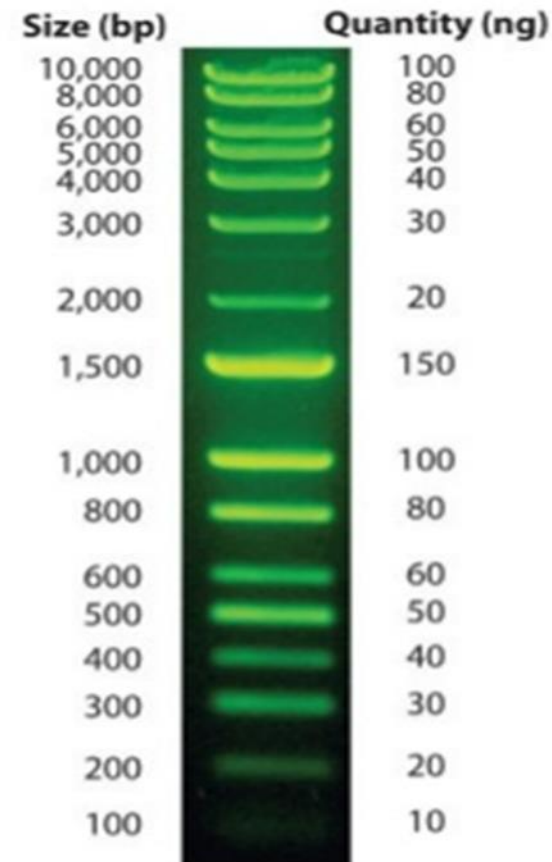
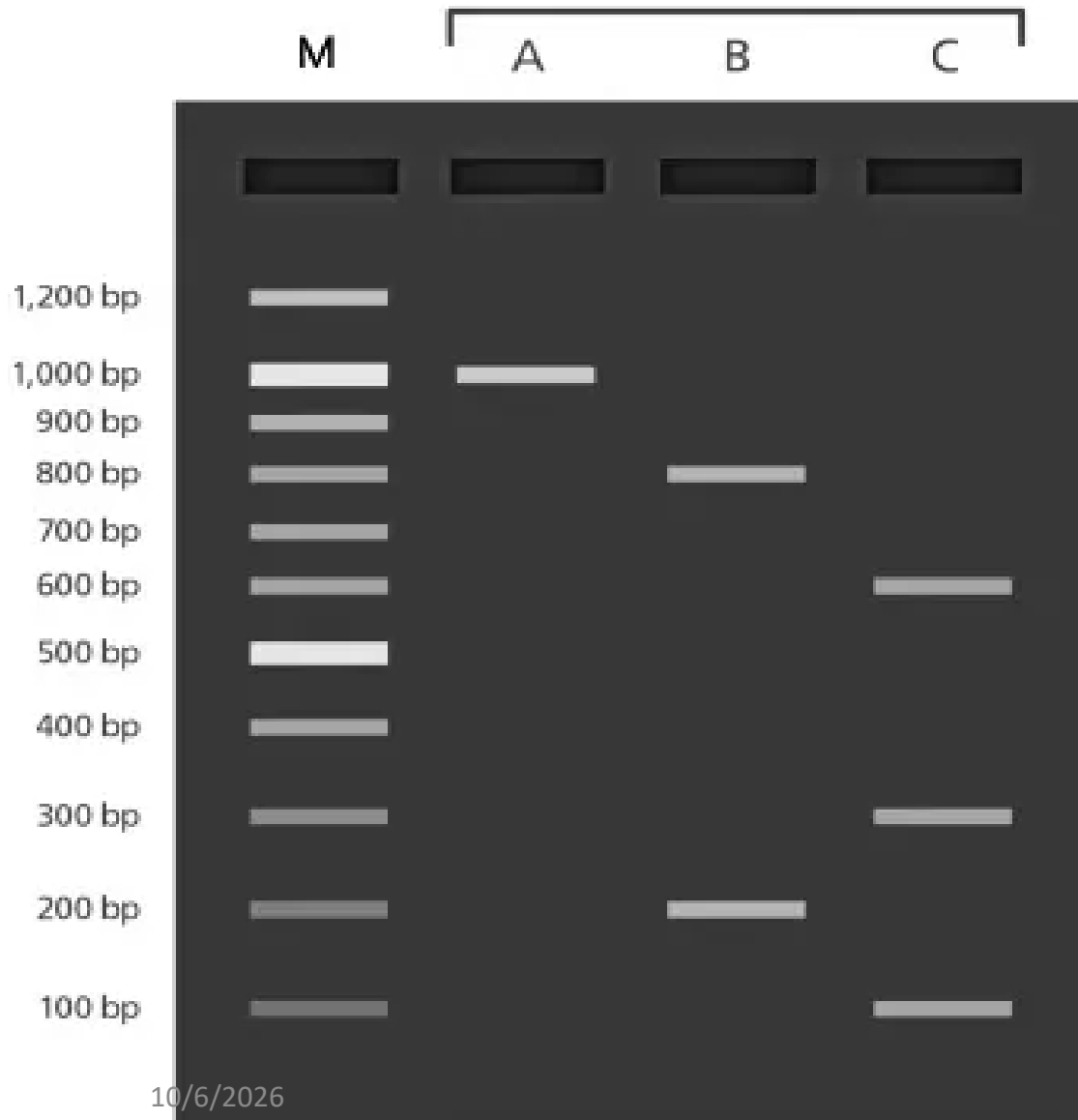
DNA
(-)
↓

Anode
(+)



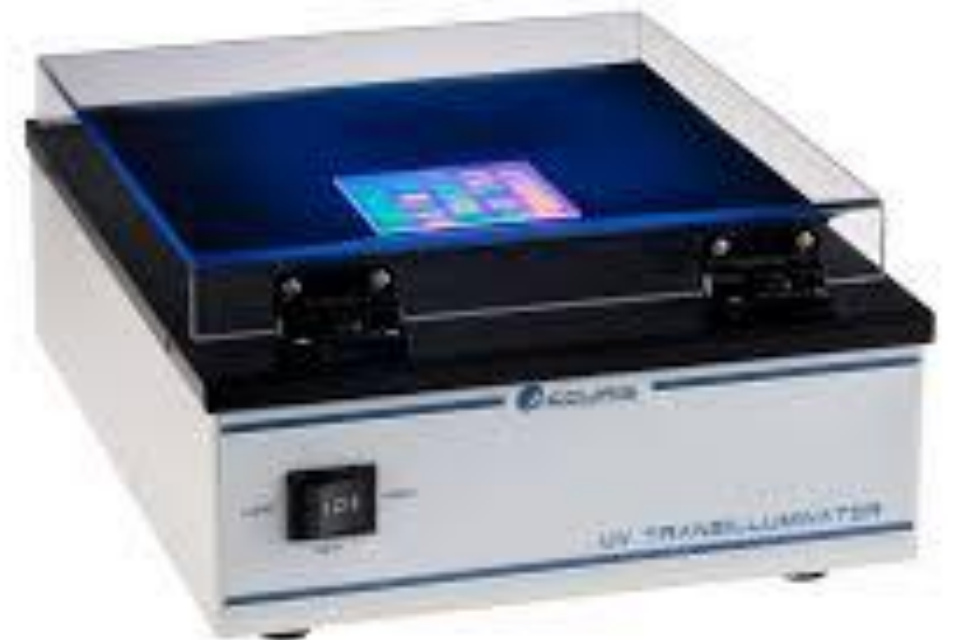
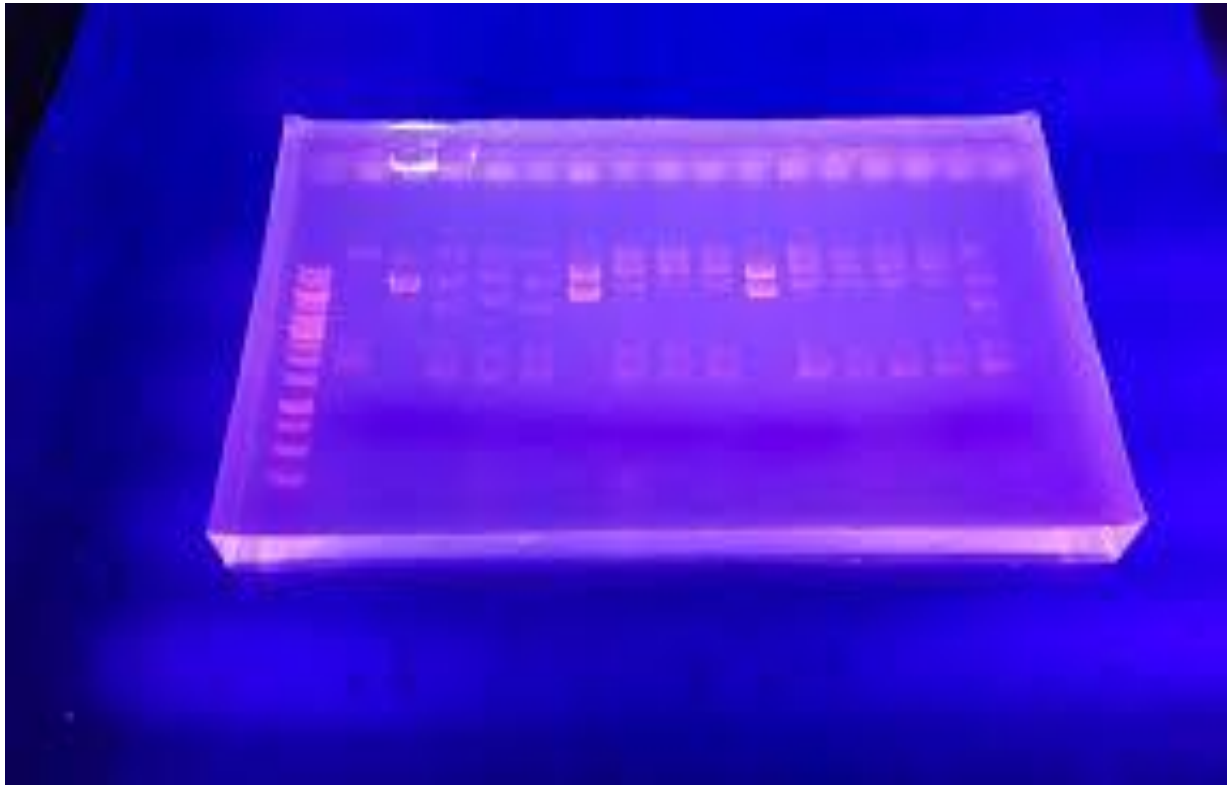
← wells
← Bromophenol Blue

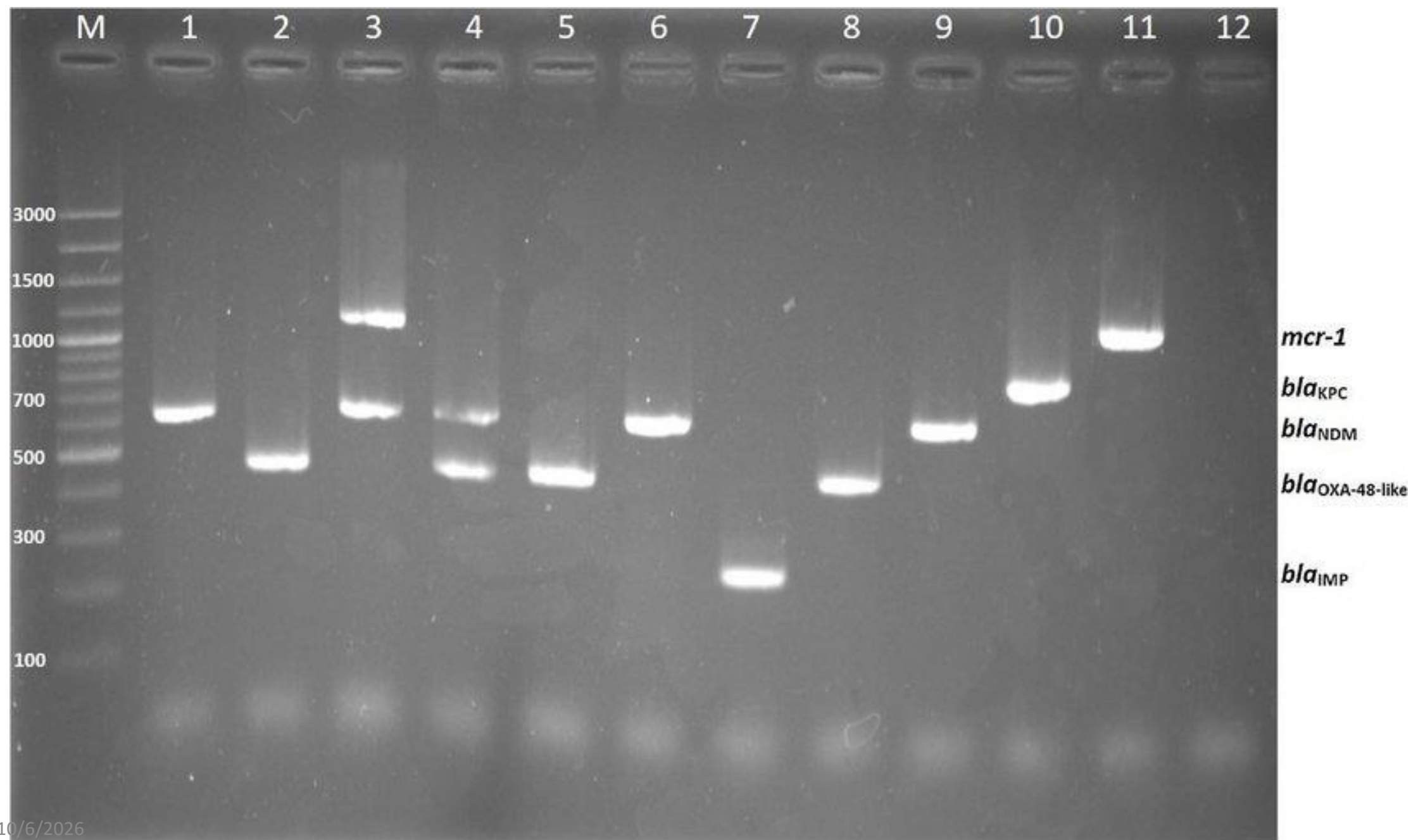
الکتروفورز محصولات PCR

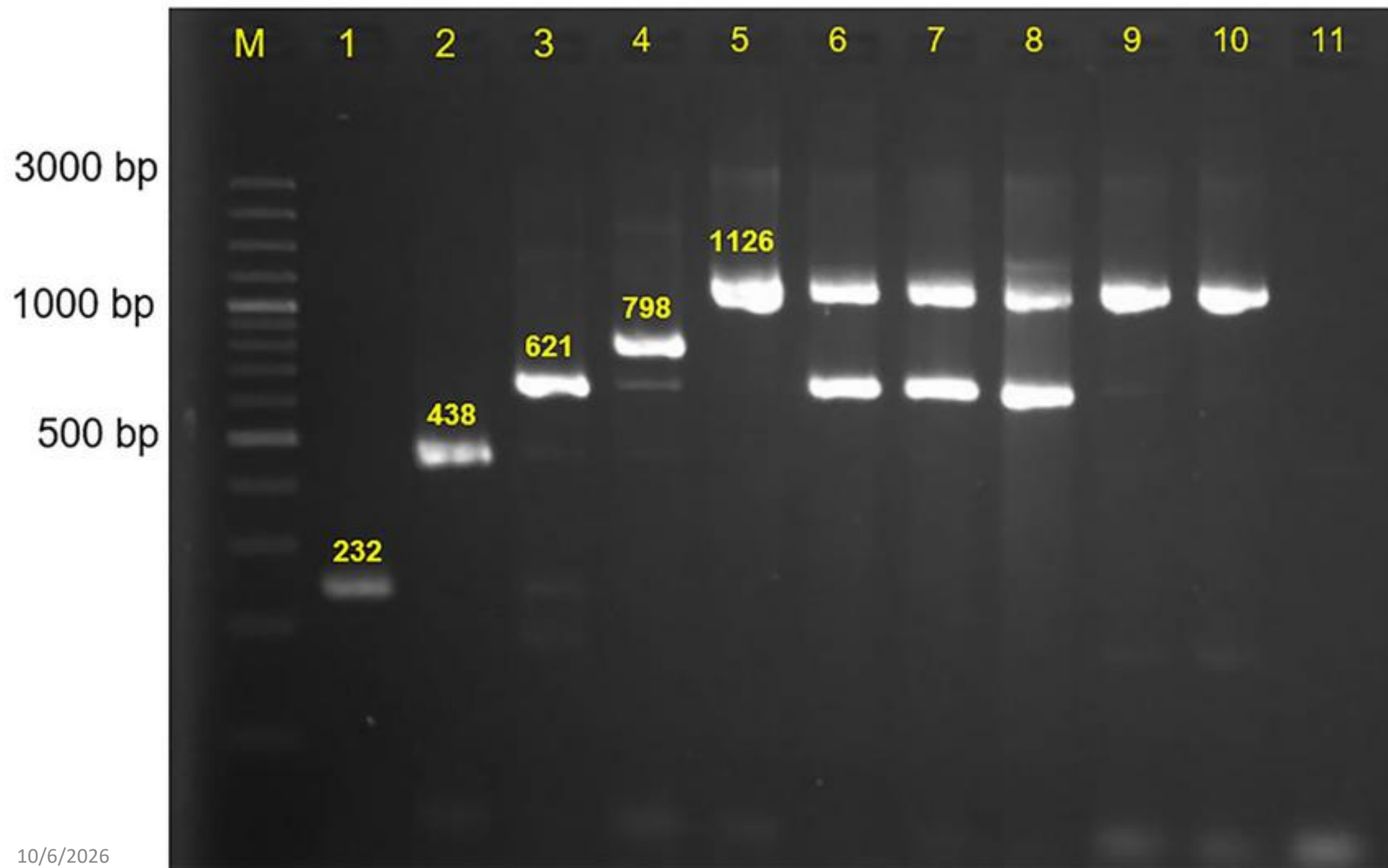


- برای تشخیص دقیق اندازه باندها می‌بایست آن‌ها را با یک مولکول استاندارد مقایسه کنیم.
- این مولکول، مارکر نام دارد که به دلیل شکل نردبانی آن، Ladder نیز نامیده می‌شود.

Transilluminator

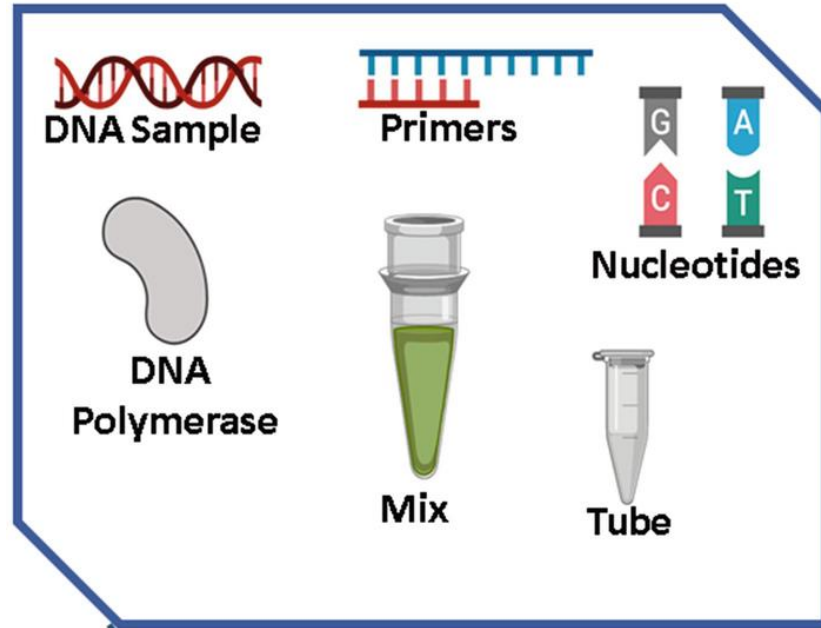




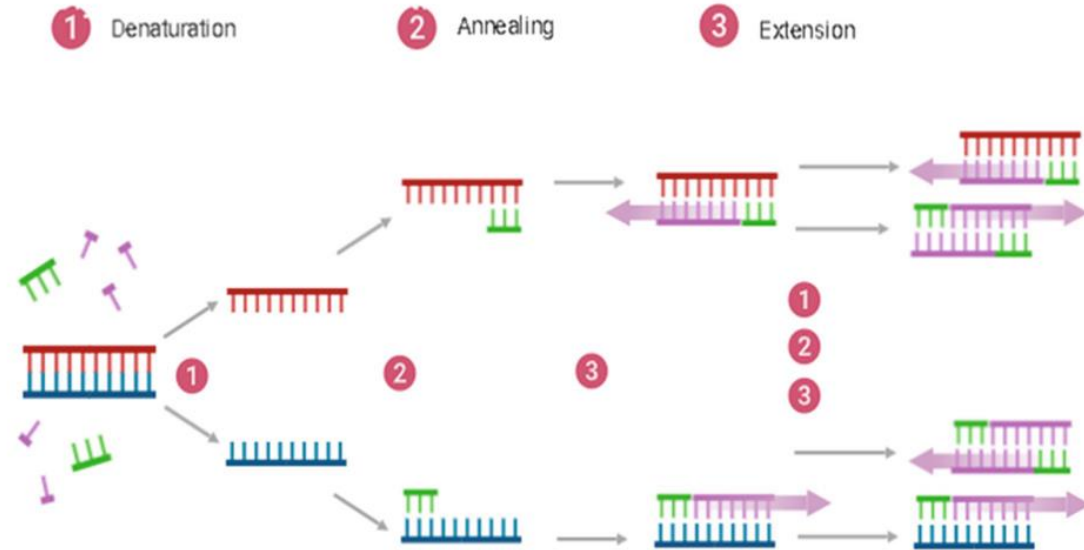


Polymerase Chain Reaction (PCR)

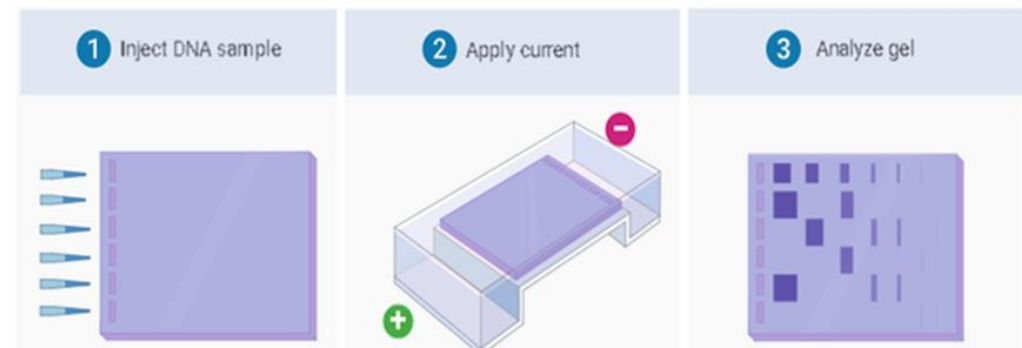
PCR components



PCR process



Agarose Gel analysis



*Thank
you*

