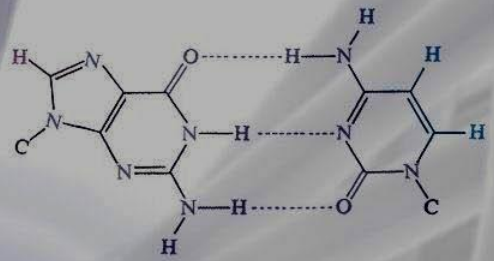
PCR

the basics

Dr Morteza Samadi

samadi.for@gmail.com

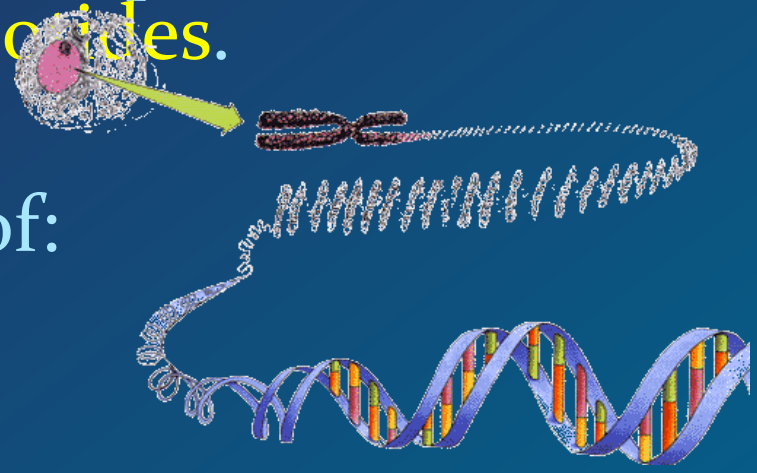


deoxyribonucleic acid

DNA Structure

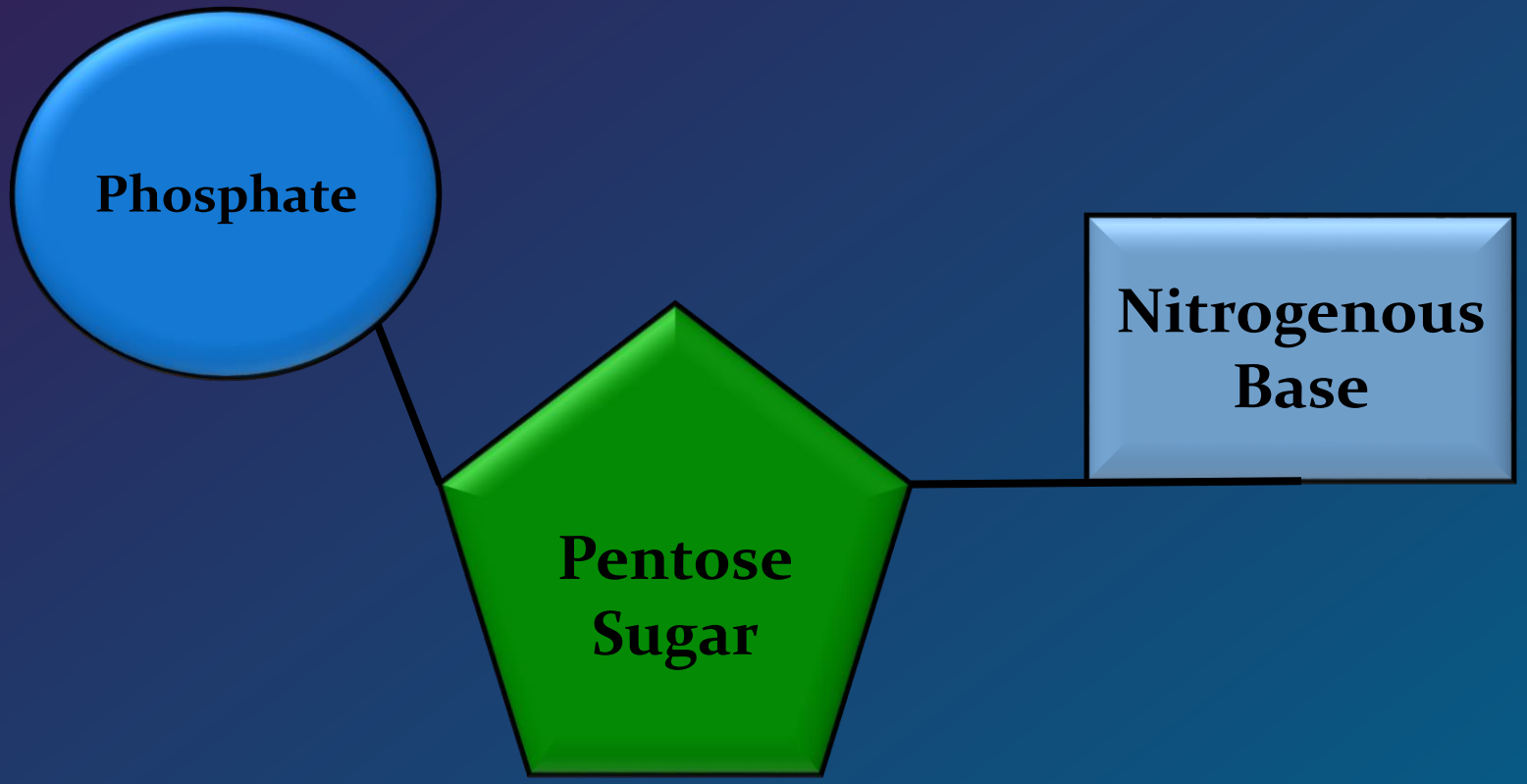
- DNA consists of two molecules that are arranged into a ladder-like structure called a Double Helix.

- A molecule of DNA is made up of millions of tiny subunits called Nucleotides.



- Each nucleotide consists of:
  1. Phosphate group
  2. Pentose sugar
  3. Nitrogenous base

Nucleotides



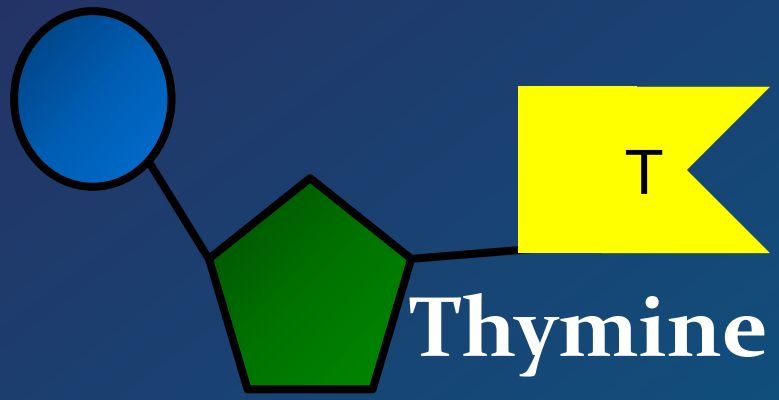
Nucleotides

- The phosphate and sugar form the backbone of the DNA molecule, whereas the bases form the “rungs”.

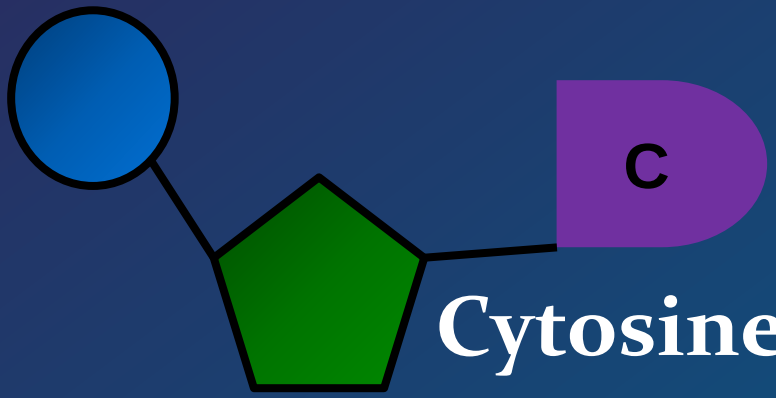
- There are four types of nitrogenous bases.

Nucleotides

Adenine



Thymine

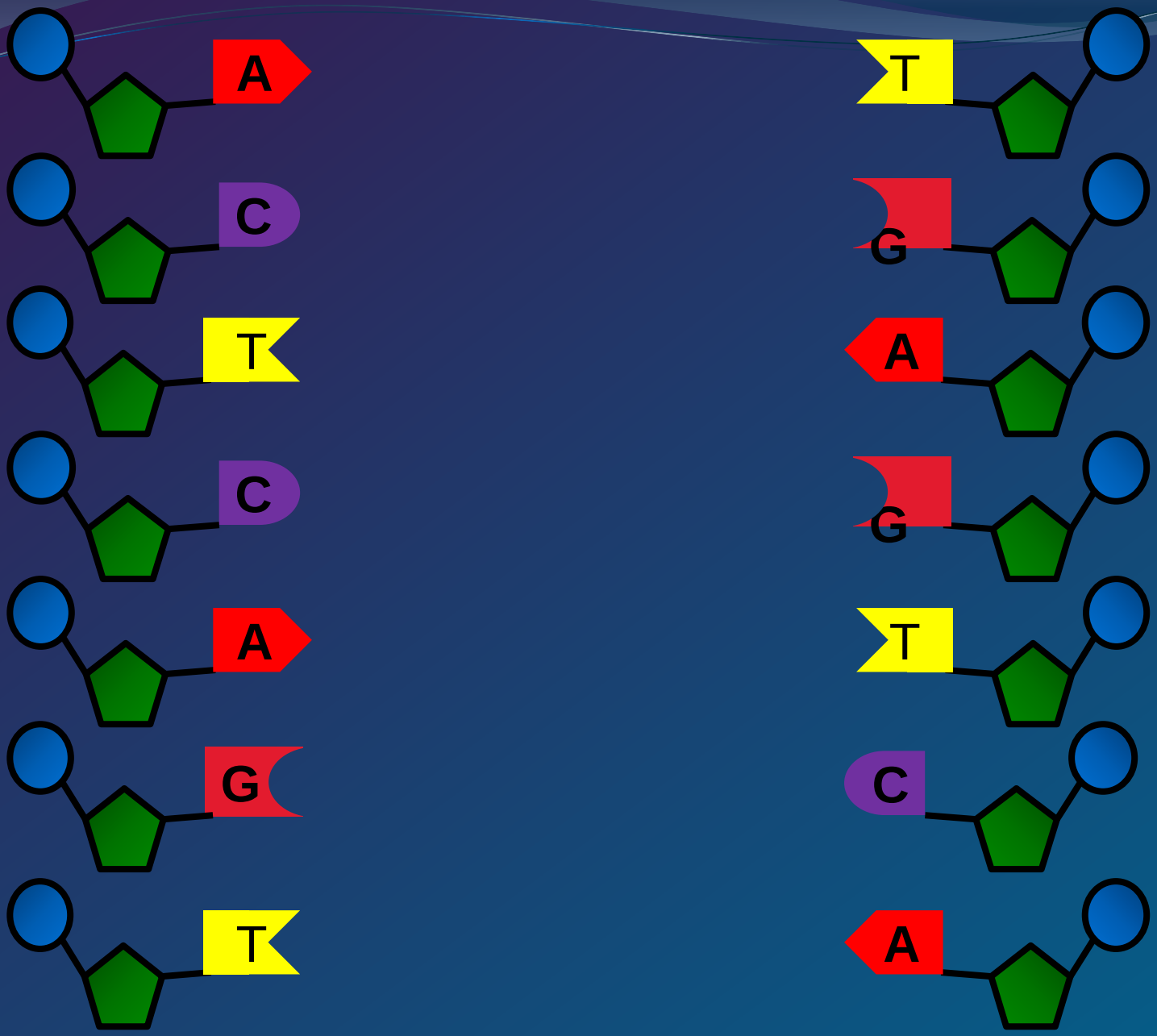


Cytosine

Guanine

DNA Structure

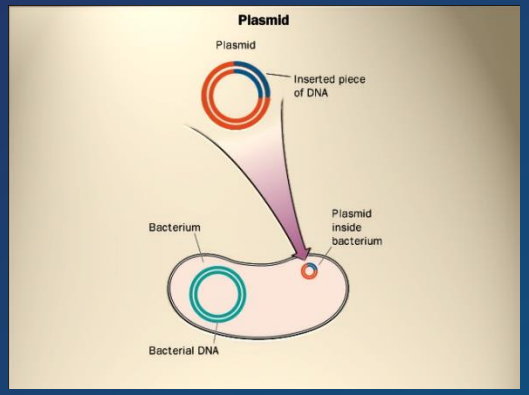
Because of this complementary base pairing, the order of the bases in one strand determines the order of the bases in the other strand.


A
C
T
C
A
G
T
T
G
A
G
T
C
A

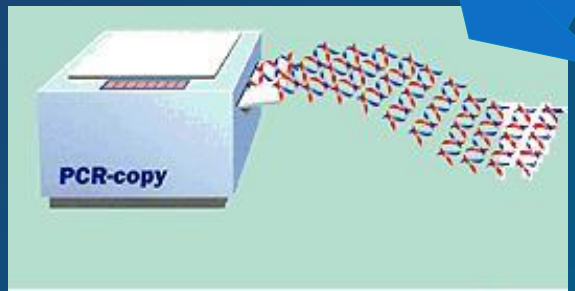
بدست آوردن نسخه های متعدد از یک ژن خاص

An introduction to PCR "Polymerase Chain Reaction"

✓ 30 years ago "Recombinant DNA Technology" depended on replication of DNA plasmids during the cell division.



✓ PCR works like a copying machine to produce large quantities of a specific DNA from a complex DNA template in an enzymatic reaction.



Advantages of PCR

- Sensitivity
- Specificity
- Speed
- Ease of use
- Robustness
  - Template DNA from any kind of specimen
    - ✓ Dried blood
    - ✓ Semen stains
    - ✓ Egyptian mummies
    - ✓ Single hair

- PCR با مزاياي بسيار، از جمله بررسي يك روزه نمونه ها، ارزان بودن نسبي، آساني انجام و فوق العاده اختصاصي بودن:

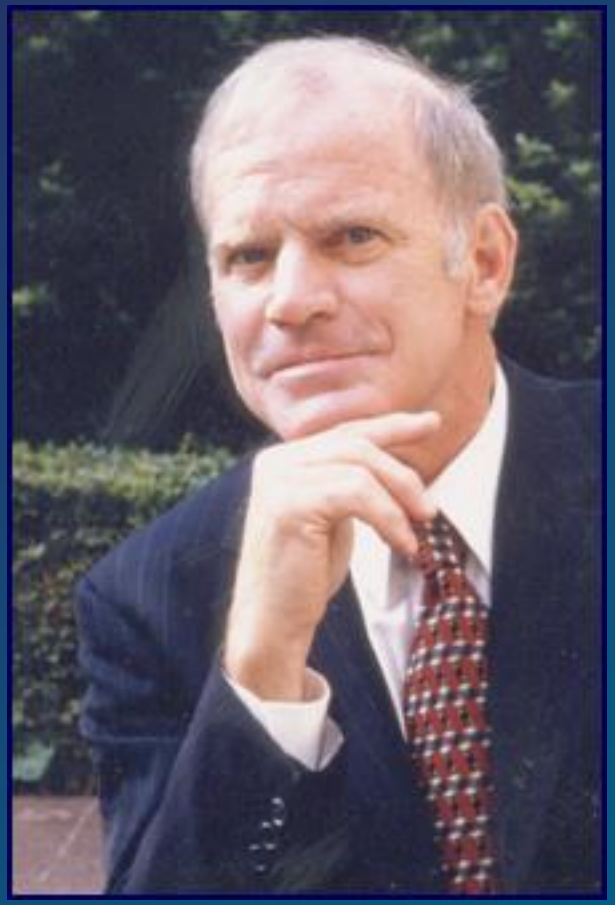
انقلابي در تشخيص كلينيكي بيماري ها، پزشكي، علوم جنايي و پليسي، ميكروبيولوژي و بسياري صنايع ايجاد كرد. این تکنیک تمامی مشکلات قبلی در زیست مولکولی که ناشی از عدم دسترسی به مقادیر زیاد از DNA یکسان بود را برطرف کرد

- PCRهمانند یک دستگاه فتوکپی عمل می کند که بوسیله آن می توان صفحاتی از کتاب ژنوم هر موجود را به تعداد دلخواه و مشابه نسخه اصلی (البته در مواردی همراه با خطاهای جزئی) تکثیر نمود.
- با اين روش مي توان يك ژن را به اندازه اي تكثير كرد تا بتوان با استفاده از روش‌هايي مانند الكتروفورز مشاهده كرد. شما يك تار مو را از فاصله 6 متري نمي توانيد ببينيد اما يك دسته ميلياردي از مو كنار هم به خوبي مشاهده مي شوند.

History of PCR

•1983, PCR, the invention of American biochemist "**Kary Mullis**" revolutionized genetic science and engineering

• 1993, Mullis was awarded the Nobel prize in chemistry



Karry Mullis

- اساس این روش بسیار ساده بوده و مانند واکنش همانندسازی DNA در موجودات زنده توسط آنزیم DNA پلیمراز صورت می گیرد.
- در موجودات زنده، مجموعه ای از چند پروتئین و آنزیم در فرآیند همانند سازی DNA نقش دارند در حالی که در واکنش PCR تنها نوع خاصی آنزیم DNA پلیمراز مقاوم به حرارت به نام Taq polymerase به همراه بافر، کلرید منیزیم و نوکلئوتیدها استفاده می شود.
- در این تکنیک ابتدا پرایمراز DNA موردنظر، طراحي مي شود و بعدا با استفاده از PCR، هدف را تکثیر کرده و توسط الکتروفورز در مقابل يك كنترل مي سنجند.

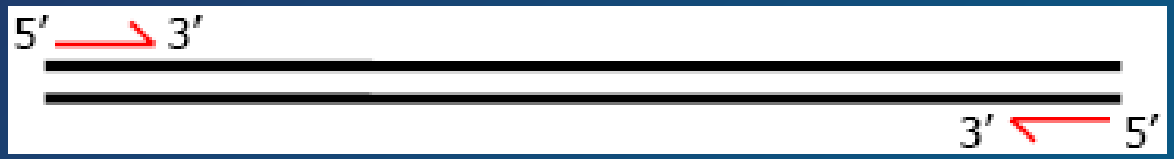
PCR Reaction Components

1. DNA polymerase
2. PCR buffer or 10X PCR buffer (pH & ionic strength):
   - ✓ 500 mM KCl; 100 mM Tris-HCl
   - ✓ 15 mM $MgCl_2$ (enzyme co-factor)
2. dNTPs (dATP + dTTP + dCTP + dGTP)
3. Template (purified genomic or Plasmid DNA)
4. Forward and reverse primers

PCR primers

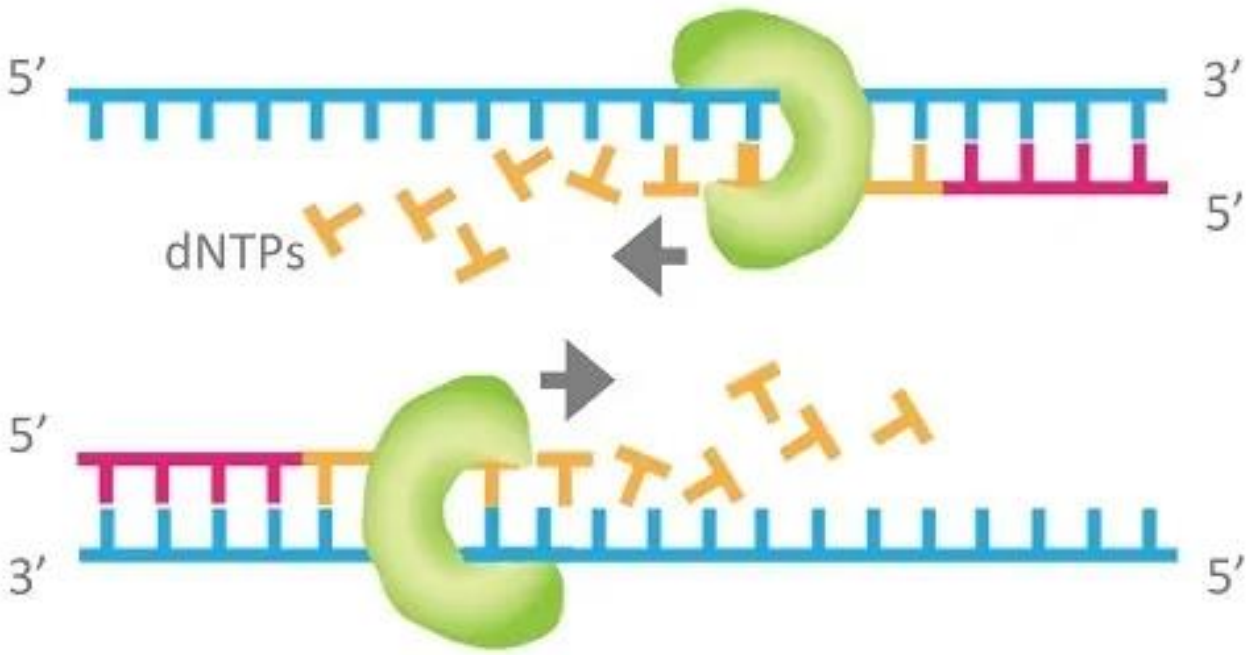
- A primer is a short strand of nucleic acid complementary to the bases at start of region to be copied.

- A primer for each target sequence on the end of your DNA is needed. This allows both strands to be copied simultaneously in both forward and reverse directions.



پرایمر(Primer) یا آغازگر

- توالی تک رشتهٔ کوتاهی از آران‌ای یا دی‌ان‌ای است که معمولاً از ۱۸ تا ۲۲ باز تشکیل شده‌است. این رشته کوتاه به عنوان نقطه‌ای برای آغاز سنتز دی‌ان‌ای عمل می‌کند.
- آغازگر جزء ضروری در سنتز DNA است زیرا آنزیم‌هایی که DNA را سنتز می‌کنند و DNAپلیمرازها نامیده می‌شوند، فقط می‌توانند نوکلئوتیدهای DNAجدید را به یک رشته نوکلئوتید موجود متصل کنند. آغازگر به مجموعه کوچکی از نوکلئوتیدهای DNAاشاره دارد که طول آن‌ها معمولاً 18 تا 24 نوکلئوتید است و از آن می‌توان برای بسیاری از فرایندهای تکثیر آزمایشگاهی استفاده کرد.



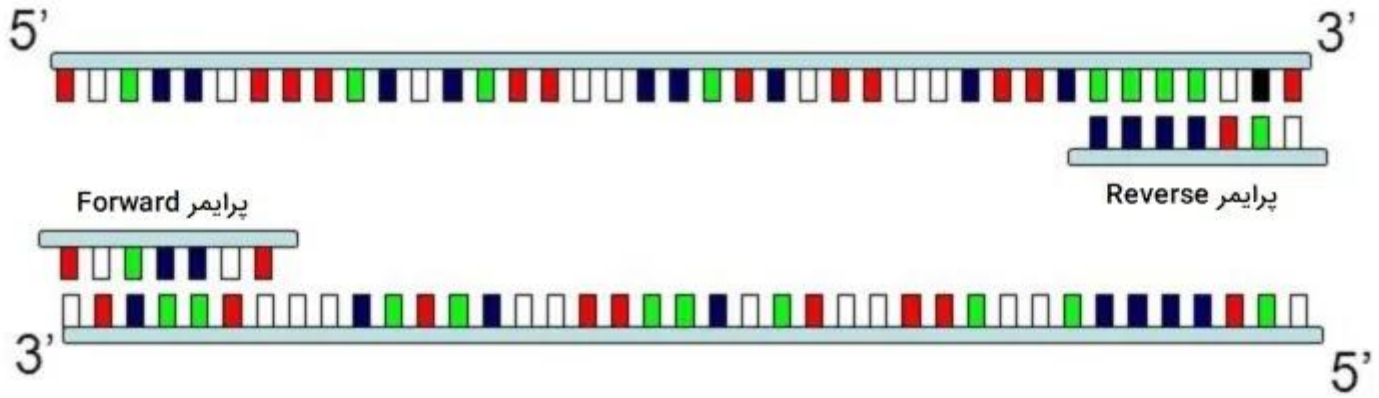
پلیمراز DNA

انواع پرایمرهای DNA و RNA

- موجودات زنده فقط از آغازگرهای RNAاستفاده می‌کنند، در حالی که آغازگرهای مورد استفاده در آزمایشگاه معمولاً آغازگرهای DNA هستند.
- دانشمندان به دلایل مختلف یا متنوعی از پرایمرهای DNAبه جای آغازگرهای RNAاستفاده می‌کنند. آغازگرهای DNAبه مراتب پایدارتر بوده و راحت‌تر ذخیره می‌شوند و برای شروع سنتز به آنزیم‌های رایج‌تری احتیاج دارند.
- اتصال آغازگرهای DNA یا RNA به رشته الگو، آنزیم مسئول سنتز DNAرا فعال می‌کند، DNA پلیمراز با شروع افزودن نوکلئوتیدها به انتهای ’۳ - هیدروکسیل (انتهای ’۳) یک اسید نوکلئیک موجود بر روی پرایمر، باعث طویل شدن و تکثیر رشته اصلی می‌شود.

ویژگی‌ها	آغازگرهای DNA	آغازگرهای RNA
استفاده	در شرایط آزمایشگاهی: تکثیر PCR، تعیین توالی DNA، کلونینگ و موارد دیگر	در بدن موجودات زنده: همانند سازی DNA
واکنش	تکثیر وابسته به دما است و به پروتئین کمتری نیاز دارد.	تکثیر یک واکنش کاتالیزوری وابسته به آنزیم است که به چندین پروتئین نیاز دارد.
طول	18 تا 24 نوکلئوتید	10 تا 20 نوکلئوتید
نحوه ایجاد	توسط پژوهشگران سنتز شیمیایی شده است.	توسط پرایماز (نوعی RNAپلیمراز) در بدن موجود زنده ساخته شده است.
قابلیت زیستن	عمر طولانی‌تر، با ثبات‌تر	عمر کوتاه‌تر، واکنش پذیرتر

- پرایمر فورووارد به رشته پایینی که در حال باز شدن از ’۳ به ’۵ است متصل می‌شود و پرایمر معکوس به رشته بالایی DNAمکمل که از ’5 تا ’3 در حال باز شدن است، متصل می‌شود.
- آغازگرهای الیگونوکلئوتیدی، لازم نیست که کاملاً به رشته الگو پیوند خورند. با این حال ضروری است که انتهای ’3 به طور کامل با DNA الگو مطابقت داشته باشد تا طویل شدن اتفاق بیفتد.



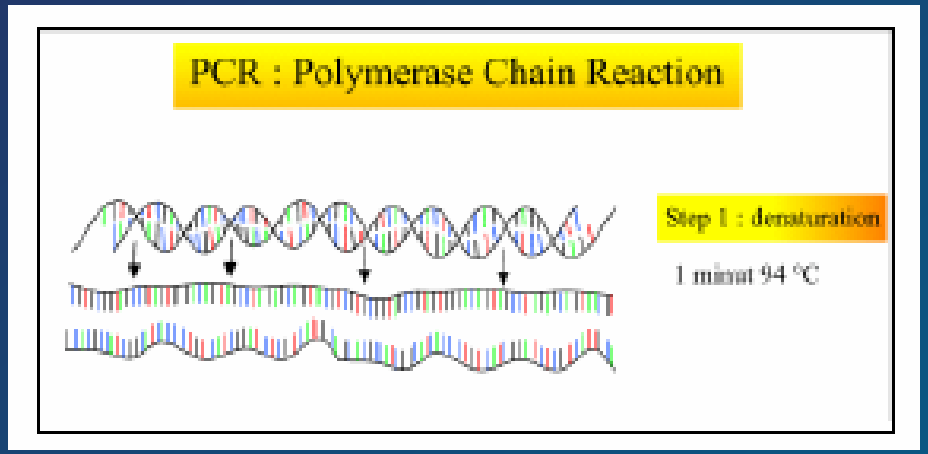
- **مراحل یک سیکلPCR**

. مرحله واسرشت یا دناتوراسیون(Denaturation Step)
. مرحله اتصال:(Annealing Step)
. مرحله پلیمریزاسیون یا طویل شدن (Extension/Elongation Step):

Steps in PCR reaction (1)

1- Denaturation

- Separate parent strands in preparation new strand synthesis

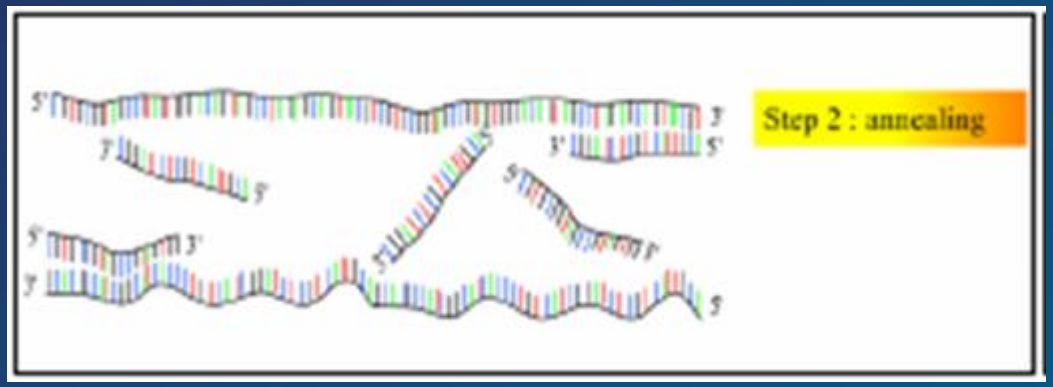


Steps in PCR reaction (2)

2- Annealing

- "Stick" primers to the parent strands to prime DNA synthesis

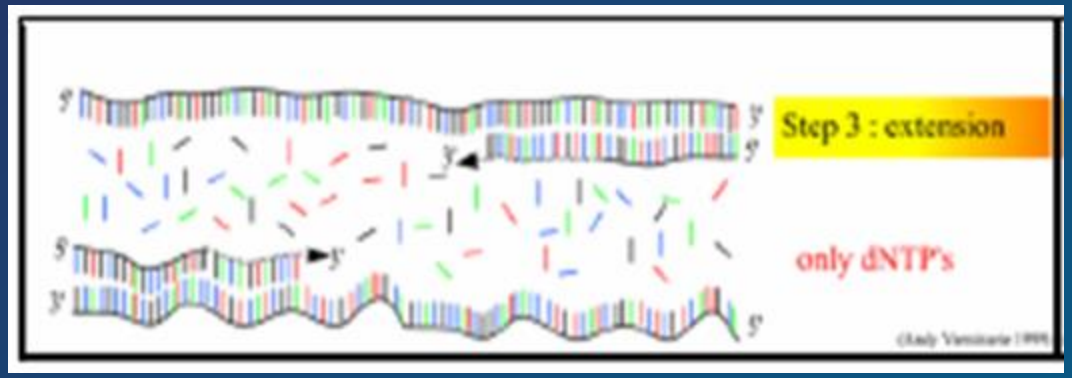
- DNA synthesis requires
a primer to start DNA synthesis



Steps in PCR reaction (3)

3- Extension

• Addition of nucleotides, to the growing end of the DNA strand (3' end) using the parent strand as the Template, by DNA polymerase



❖ Addition of *E. coli* DNA polymerase in each cycle (25-35 cycles)

PCR Machines

(the 2nd revolution)

Major disadvantages in early PCR technique

1- Time-consuming due to the inactivation of Klenow enzyme in 94 °C and thermo-cycling

2- Low specificity due to the annealing at 37 °C

3- Low efficiency due to the enzyme processivity (400 nt)

- در مرحله همانند سازی، برای جدا نمودن دو رشتهDNA ، باید دمای محلول بالا باشد.
- در ابتدای طراحی PCR از آنزیم کلینو پلیمراز I DNA پلیمراز
- (E.coli) استفاده میشد ولی از آنجا که این آنزیم به حرارت حساس است، پس از هر بار حرارت دادن محیط واکنش تا دمای 94 درجه ی سانتی گراد، افزودن دوباره ی آنزیم تازه به محیط لازم بود

- Saiki یکی از مهم ترین کشفیات در این زمینه را انجام داد و متوجه شد که باکتریهای چشمه های آب گرم برای مثال باکتری ترموس آکواتیکوس ((*Thermus aquaticus*)دارای DNA پلیمرازهایی هستند که نسبت به حرارت مقاوم بوده و حتی در دمای بالا فعالیت بهتری دارند.

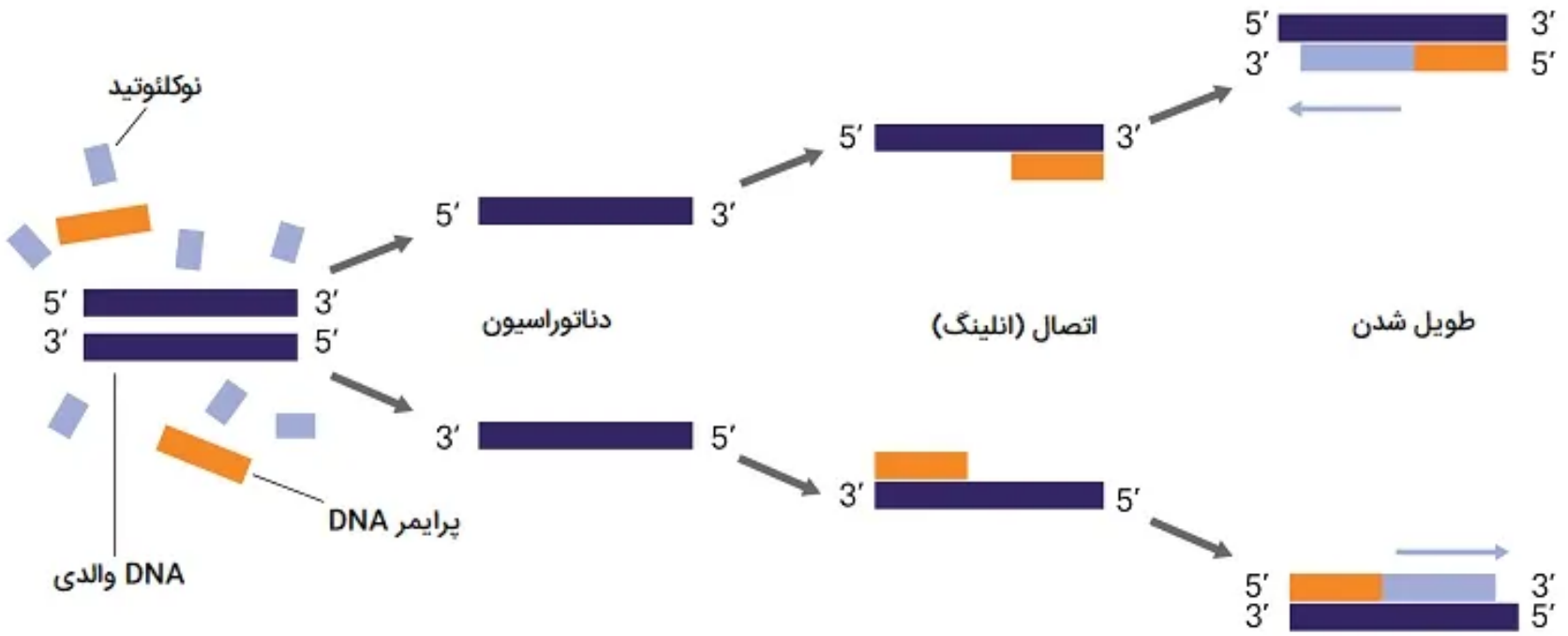
- این DNA پلیمراز که بطور خلاصه **Taq** پلیمراز نامیده می شود در دمای 94 درجه ی سانتی گراد کاملاً پایدار است و دمای اپتیمم عمل آن نیز 72 درجه ی سانتی گراد می باشد. بنابراین با افزودن یکبار آنزیم **Taq** پلیمراز دیگر نیازی به اضافه کردن مجدد آن نیست و PCR براحتی و به صورت اتوماتیک انجام می شود.

- در حال حاضر **Taq** پلیمراز برای تکثیر قطعات کمتر از سه هزار جفت باز توصیه شده و پر مصرف ترین آنزیم مورد استفاده در PCR می باشد.

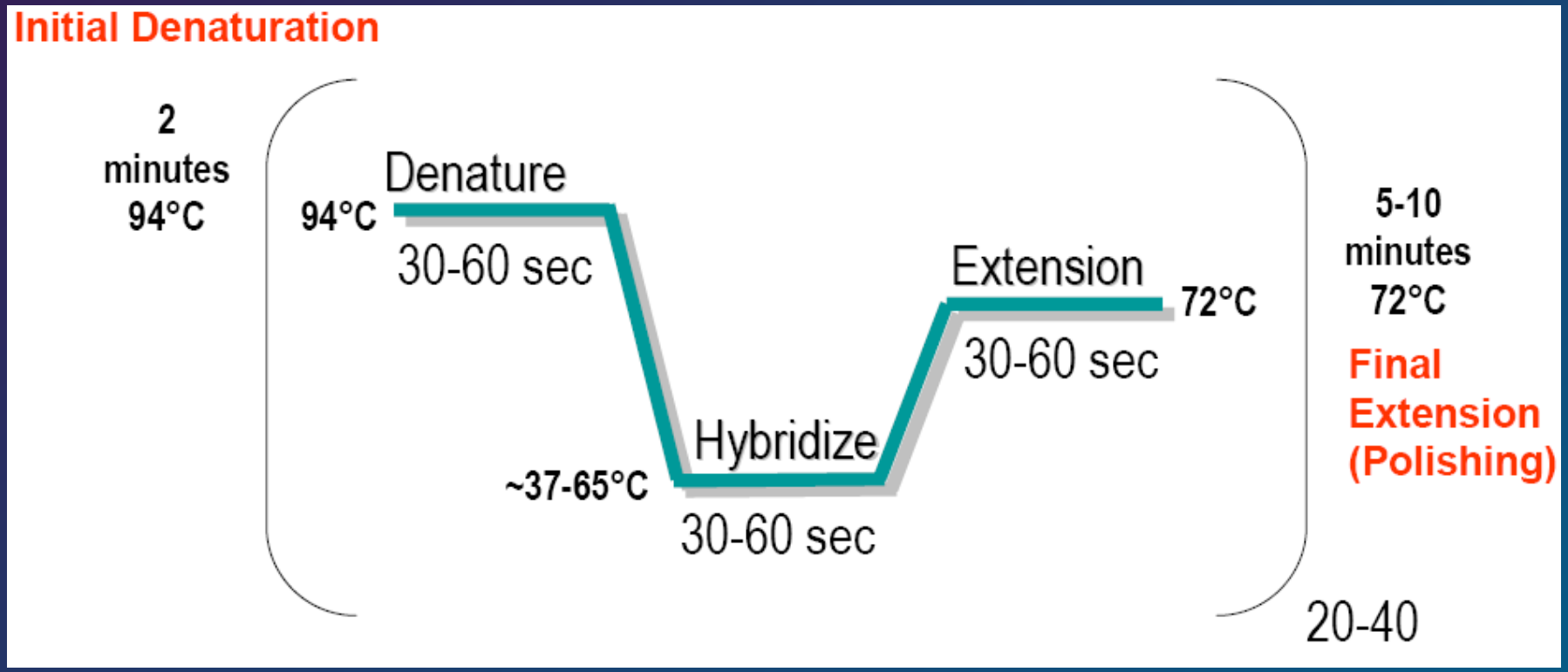
Taq DNA polymerase, the most important development in PCR method

- 1976, Bacillus *Thermus aquaticus* was isolated by Dr. Brock from Yellowstone hot springs

- 1988, the application of *Taq* DNA polymerase in PCR


نوکلئوتید
5′
3′
3′
5′
DNA والدی
پرایمر DNA
دناتوراسیون
5′
3′
3′
5′
اتصال (انلینگ)
5′
3′
3′
5′
طویل شدن
5′
3′
3′
5′
5′
3′
3′
5′

PCR thermal cycling profile



PCR Animation

- اولین مرحله برای انجام تکنیک واکنش زنجیره ای پلیمراز (PCR)پس از تعیین ژن ها طراحی پرایمر است.

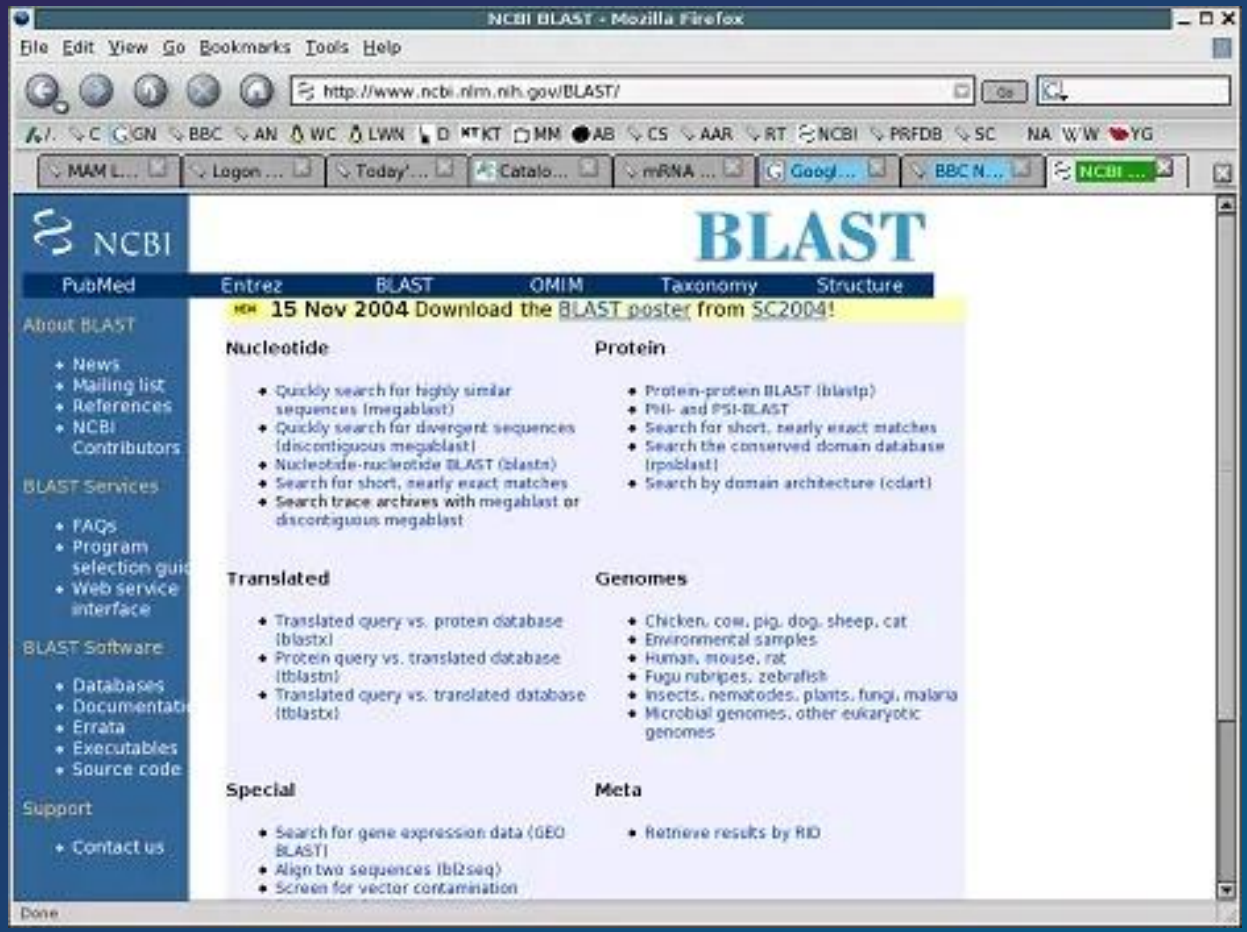
طراحی پرایمر

- جنبه‌های اصلی خصوصیات یک پرایمر در ژنتیک شامل اختصاصیت، دمای ذوب ((Tm) و همسانی درون پرایمری یا بین آن است.

اختصاصیت

- اختصاصیت جایگاه اتصال آغازگر را می‌توان با انجام یک جستجوی همسانی توالی (به عنوان مثال Blast) از طریق تمام توالی‌های الگوی شناخته شده در پایگاه داده ژنوم عمومی مانند مرکز ملی اطلاعات بیوتکنولوژی (NCBI) بررسی کرد.

- گنجاندن 8 تا 10 باز منحصر به فرد در انتهای ’۳ آغازگر بسیار مهم است.


NCBI BLAST - Mozilla Firefox
File Edit View Go Bookmarks Tools Help
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/
NCBI
BLAST
PubMed Entrez BLAST OMIM Taxonomy Structure
15 Nov 2004 Download the BLAST poster from SC2004!
About BLAST
News
Mailing list
References
NCBI Contributors
BLAST Services
FAQs
Program selection gui
Web service interface
BLAST Software
Databases
Documentati
Errata
Executables
Source code
Support
Contact us
Nucleotide
Quickly search for highly similar sequences (megablast)
Quickly search for divergent sequences (discontiguous megablast)
Nucleotide-nucleotide BLAST (blastn)
Search for short, nearly exact matches
Search trace archives with megablast or discontiguous megablast
Protein
Protein-protein BLAST (blastp)
PHI- and PSI-BLAST
Search for short, nearly exact matches
Search the conserved domain database (rpsblast)
Search by domain architecture (cdart)
Translated
Translated query vs. protein database (blastx)
Protein query vs. translated database (tblastn)
Translated query vs. translated database (tblastx)
Genomes
Chicken, cow, pig, dog, sheep, cat
Environmental samples
Human, mouse, rat
Fugu rubripes, zebrafish
Insects, nematodes, plants, fungi, malaria
Microbial genomes, other eukaryotic genomes
Special
Search for gene expression data (GEO BLAST)
Align two sequences (bl2seq)
Screen for vector contamination
Meta
Retrieve results by RID
Done

طول پرایمر

- طول متوسط هر پرایمر بین 30-18 جفت‌باز باشد، زیرا پرایمر با طول کوچک اتصال غیراختصاصی را افزایش داده و پرایمر بزرگ سرعت هیبریداسیون را کم می‌کند.

- برای انجام یک PCR اختصاصی بهتر است طول پرایمرهای طراحی شده پروتکل های طراحی پرایمر 24-18 نوکلئوتید در نظر گرفته شود، که در این بازه افزایش هر نوکلئوتید باعث تقویت 4 برابری اختصاصیت پرایمر می شود.
- پرایمرهای با طول کمتر از 15 نوکلئوتید بسیار غیر اختصاصی هستندو ممکن است به چندین نقطه از ژن متصل شوند و این موضوع باعث ایجاد باندهای غیر اختصاصی ر ژل الکتروفورز می شود. در نتیجه علاوه بر محصول خودمان، محصول غیر اختصاصی نیز بدست می آید.
- افزایش طول پرایمر نیز باعث افزایش دمای مرحله annealing در PCR می شود و زمان آن را طولانی تر می کند و احتمال تشکیل ساختارهای ثانویه و دایمرها را افزایش می دهد. بنابراین بهتر است که از یک بازه استاندارد که بین 30-18 نوکلئوتید است برای طراحی پرایمر استفاده کنیم.

- فاصله بین پرایمرهایی که با DNAی هدف هیبرید می‌شوند بطور معمول کمتر از 15 کیلو باز می‌باشد.

- در حقیقت یک کاهش اساسی در سنتز موثر هنگامی که محصول تکثیر متجاوز 1000 جفت‌باز می‌شود، مشاهده می‌گردد. به همین دلیل طول قطعه مورد تکثیر در PCRنباید بیش از 3 کیلوباز باشد وحد مطلوب کمتر از 1 کیلوباز می‌باشد. (تکثیر قطعات بسیار طویل و بالای 40 کیلوباز مقدور است اما نیاز به روش‌های ویژه‌ای دارد).

- به طور بهینه برای انجام روشهای کمی Qpcr اندازه قطعه هدف حدود 100bpوبرای PCR استاندارد اندازه ی قطعه نزدیک به 500 bpمناسب است.

طول قطعه تکثیر شده

- امپلیکون (Amplicon):
- یک قطعه از دی.ان.ای. یا آر.ان.ای. است که محصول طبیعی یا مصنوعی رخدادهای تکثیری و همانندسازی amplification & replication است.

اختصاصیت

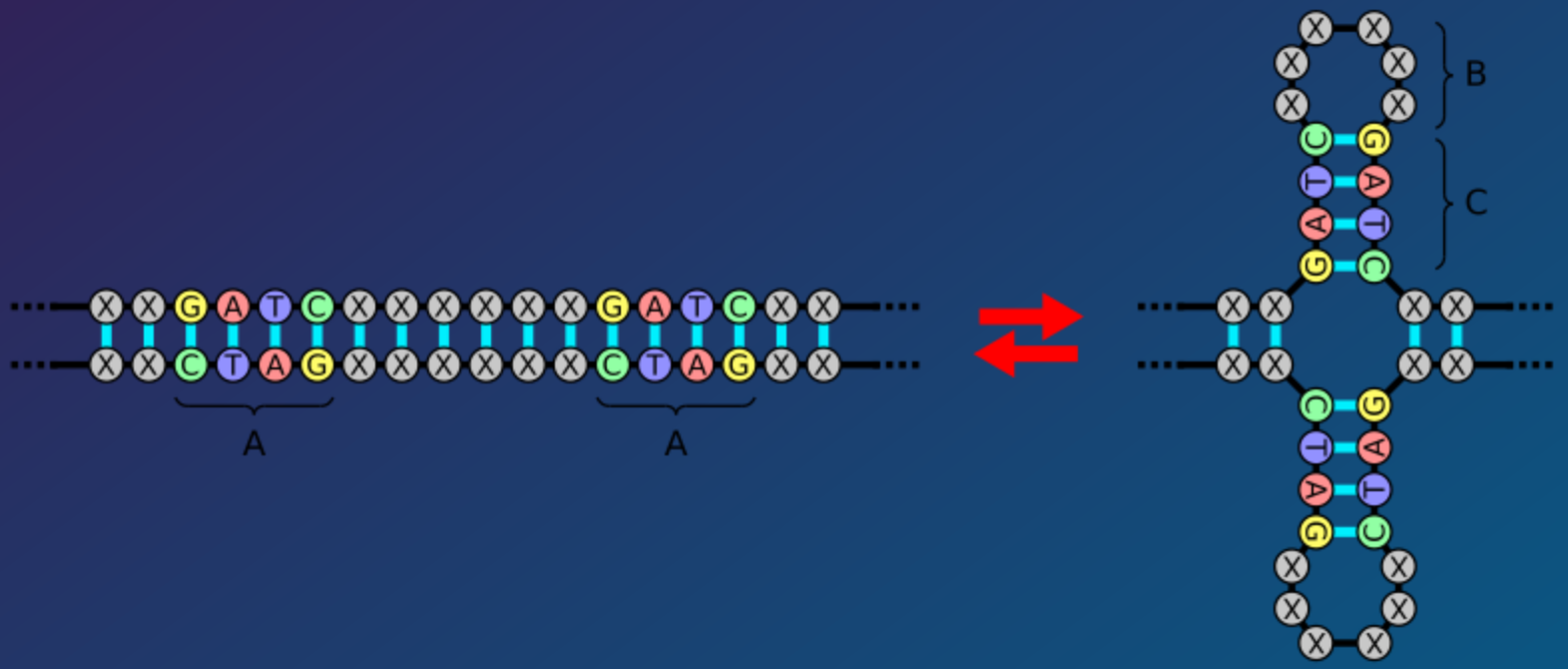
- اختصاصیت پرایمر بیشتر توسط توالی های ’۳ آن‌ها تعیین می‌شود. عدم تطابق تک نوکلئوتید داخل پرایمر تأثیر معنی داری بر عملکرد محصول PCRندارد در حالی که عدم تطابق انتهای ’3 یک پرایمر، به طور قابل توجهی عملکرد کلی محصول PCRرا کاهش می‌دهد.

- مقدار G-Cدو پرایمر با هم مشابه بوده و حدود 50-60 درصد باشد.
- نسبت چهار نوکلئوتید در آغازگر حتی‌المقدور یکسان باشد.

- در 5 باز آخر در انتهای ’۳ پرایمر، باید حداقل 2 باز Gیا Cوجود داشته باشد که این به عنوان «گیره «GCیا GC Clampشناخته می‌شود.

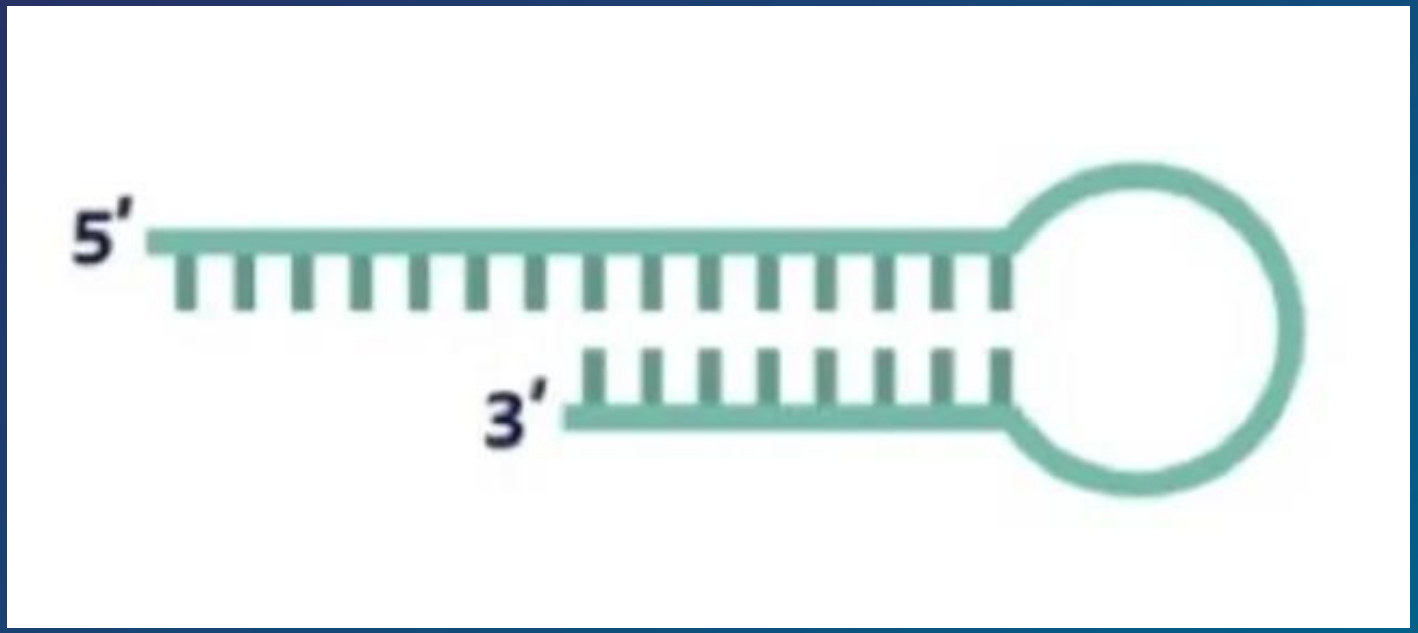
- برای اطمینان از اتصال خاص آغازگر به الگوی DNA، پرهیز از حضور 4 عدد یا بیشتر G یا C در یک ردیف در انتهای ’3 نیز مهم است.
- در انتهای َ3 توالی‌هایی که پرایمرهای آنها دارای انتهای َ3 غنی‌ا زG یا Cاست، احتمال اتصال اشتباهی افزایش می‌یابد.

باید تا حد امکان از توالی‌های پالیندرومیک داخل پرایمرها جلوگیری کرد.



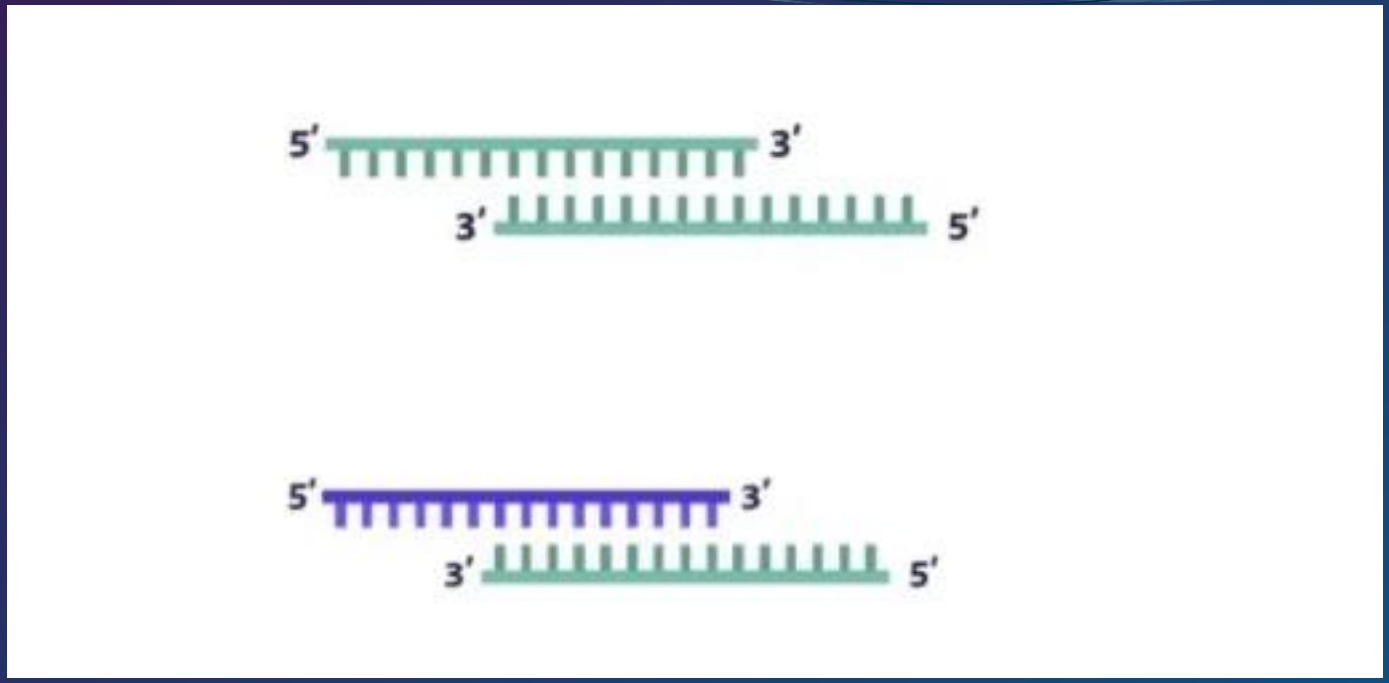
ساختار سنجاق سری
Hairpin

- این ساختار ثانویه در اثر فعل و انفعالات درون مولکولی داخل پرایمر تشکیل می‌شود و باید از آن اجتناب شود. اغلب این نوع سختار در صورت وجود همسانی درون آغازگر ایجاد شده و در آن پرایمر منفرد به خودی خود جمع می‌شود



پرایمر دایمر

- آغازگرها باید از نظر مکمل بودن با هم کنترل شوند.
- پرایمر دایمر یا آغازگر دوتایی یک تکثیر مصنوعی است که اغلب در محصول PCRمشاهده می‌شود و عبارتست از یک قطعهٔ دو رشته‌ای که طول آن تقریبا به مجموع دو پرایمر نزدیک است و هنگامی مشاهده می‌شود که یک پرایمر توسط آنزیم پلیمراز به روی پرایمر دیگر گسترش یابد.
- پرایمرها با انتهای‌مکمل َ3 مستعد تشکیل دایمر هستند.
- در هر حال چنانچه پرایمر دایمر بعنوان مانعی مشاهده شود می‌توان آن را تا حدودی با غلظت حداقل پرایمر و آنزیم کاهش داد.



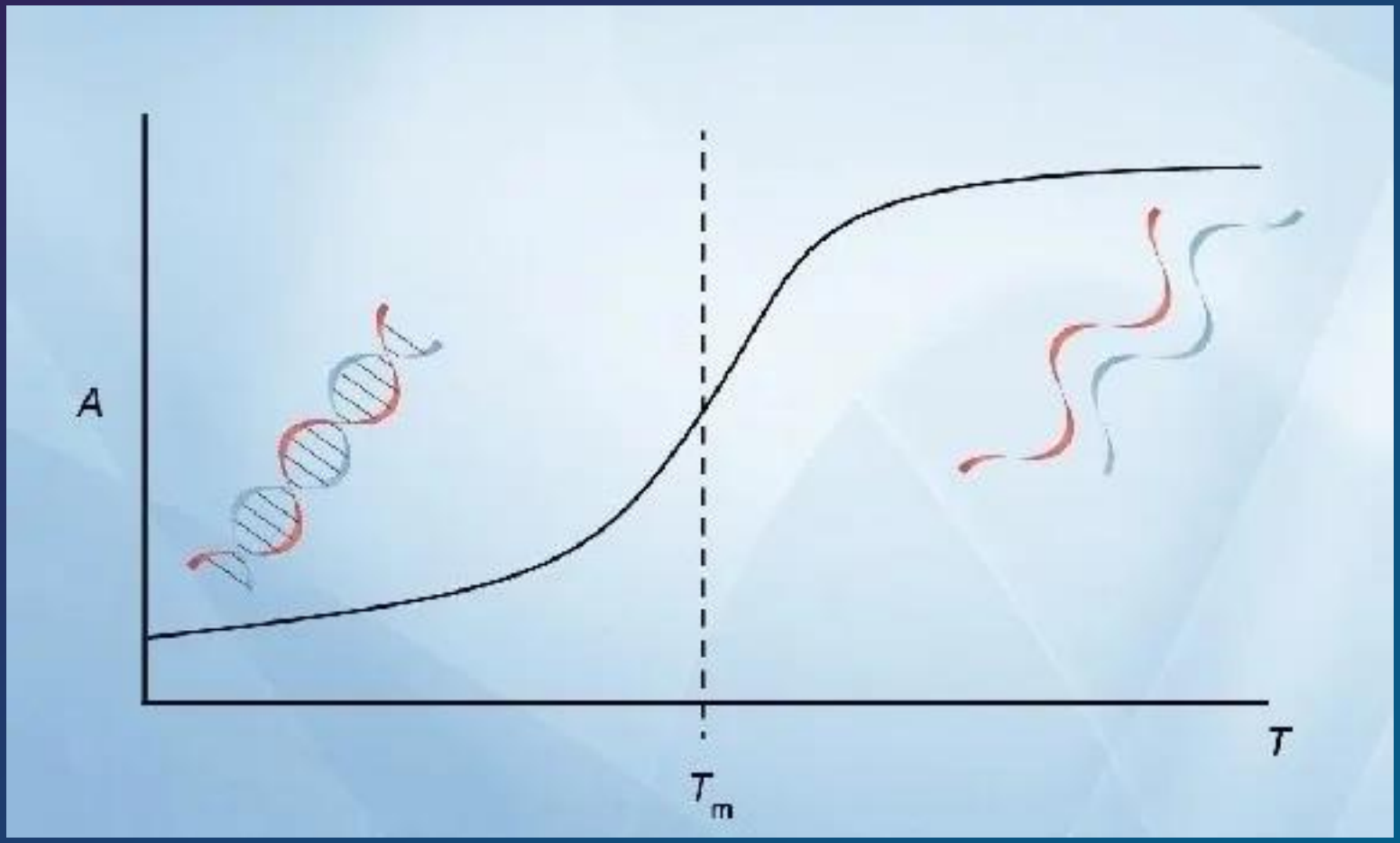
در این تصویر ساختارهای ثانویه پرایمر نشان داده شده است. تصویر بالایی ساختار خود - دایمر و تصویر پایینی ساختار دایمر متقاطع است. در هنگام طراحی پرایمر باید در نظر داشت که این ساختارها در جفت پرایمر شکل نگیرند.

Tm پرایمر

دومین نکته در طراحی پرایمر درجه حرارت ذوب مولکول DNA یا Tm است.

- Tmبه دمایی گفته می شود که در آن نیمی ازDNA های دو رشته از هم جدا می شوند و به صورت تک رشته در می آیند، در واقع نیمی از بازها با مکمل خود بر روی رشته ی مقابل درحالت جفت شدگی نیستند

- دمای ذوب به طول رشته ی DNA و میزان محتوی GC نیز بستگی دارد و همچنین عواملی مانند یون منیزیم و غلظت های نمکی بالا با خنثی سازی بارهای منفی گروه های فسفات رشته DNA باعث پایداری DNAدو رشته ای مارپیچ شوند، عواملی مانند PH بالا و غلظت نمکی پایین نیز باعث کاهش پایداری DNA دو رشته ای مارپیچ می شوند.


A
T
T_m

Primer melting temperature (Tm)

- ✓ Tm °C = Temperature at which half possible H bonds are formed

- ✓ Tm °C = 2(A/T) + 4(G/C)

- هنگام تصمیم گیری در مورد «دمای اتصال» (Ta) باید مستقیماً Tmرا در نظر بگیرید
- Ta خیلی بالا ناکافی بودن هیبریداسیون الگو - پرایمر و در نتیجه بازده کمتر محصول PCRرا موجب می‌شود. Taخیلی پایین ممکن است منجر به محصولات غیر اختصاصی ناشی از تعداد زیاد عدم تطابق نوکلئوتید شود. تحمل عدم تطابق نوکلئوتیدی بیشترین تأثیر را در اختصاصیت PCRدارد.

- دمای اتصال بهینه به صورت تجربی کشف می‌شود، اما به طور کلی حدود ۵ تا ۱۰ درجه سانتی‌گراد کمتر از دمای ذوب آغازگر (Tm) است. اگر دمای اتصال پرایمر خیلی زیاد باشد، احتمالاً پرایمرها به اندازه کافی متصل نخواهند شد و در نتیجه آمپلیکون‌ها به مقدار کم یا صفر تکثیر می‌شوند. اگر دمای اتصال آغازگر خیلی کم باشد، پرایمرها ممکن است شروع به تشکیل ساختارهای سنجاق سری یا اتصال به مناطق خارج از توالی هدف کنند که منجر به تولید محصولات غیر اختصاصی و غیر دقیق در PCRمی‌شود.
- یکی از روش‌های معمول برای یافتن دمای بهینه اتصال اولیه، انجام یک PCRبا گرادیان دمایی یا PCRبا گرادیان حرارتی است که از حدود 5 درجه سانتی‌گراد کمتر از پایین‌ترین دمای ذوب جفت پرایمر شروع می‌شود.

غلظت

- این که چه غلظتی را استفاده کنیم بستگی به خود پرایمر دارد و برای هر پرایمر مختلف است و باید ست اپ شود اما به طور معمول برای اکثر پرایمرها غلظت ۵ پیکومول در هر ماکرولیتر مناسب است

PCR product analysis

- Electrophoresis
- Sequencing
- Restriction enzyme analysis
- Southern-blotting
- ….

- الکتروفورز، روشی برای جداسازی و شناسایی مولکول‌ها از طریق اعمال جریان الکتریکی است. این روش برای جداسازی مولکول‌های باردار مانند RNA، DNAو پروتئین در آزمایشگاه‌های مولکولی و بیوشیمی کاربرد دارد.
- به منظور جداسازی DNAاز ژل آگارز، برای جداسازی RNAاز ژل PAGEو برای جداسازی پروتئین از ژل SDS-PAGEاستفاده می کنیم.

- تمام مولکولهای DNA، بر اساس جرم دارای مقدار یکسانی از بار الکتریکی هستند. به همین دلیل، الکتروفورز، قطعات DNAرا تنها براساس اندازه آنها جدا می کند.

- با استفاده از الکتروفورز، می توانیم قطعات مختلف DNAدر یک نمونه را مشاهده کنیم و به صورت نسبی، اندازه آنها را مقایسه نماییم.

- همچنین می توانیم اندازه دقیق یک قطعه DNAرا با مقایسه کردن آن در کنار یک معیار استاندارد که از قطعات DNAبا اندازه های شناخته شده ساخته شده است، بدست آوریم. به این معیار استاندارد Ladderمی گویند.

- یک نشانگر DNA (که به‌عنوان یک سایز استاندارد و یا نردبان DNA) نیز شناخته می‌شود در اولین چاهک بارگذاری می‌شود. قطعات موجود در نشانگر دارای طول مشخصی هستند، بنابراین می‌توان از آنها برای تشخیص تقریبی اندازه قطعات نمونه‌ها استفاده کرد

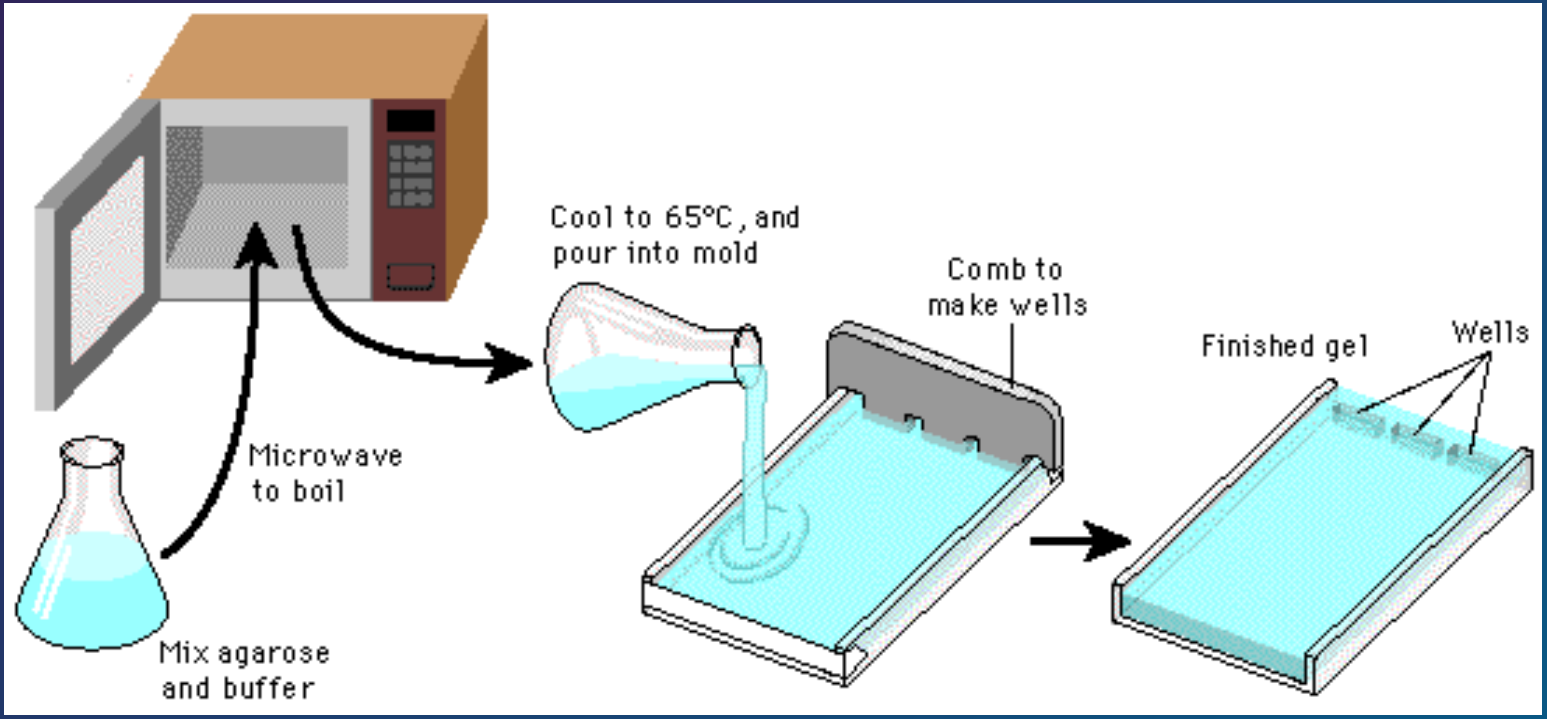
ویژگی های ژل آگارز

- ژل آگارز نوعی ماتریکس سه بعدی تشکیل شده از مولکول های هلیکسی آگارز می باشد که کنار هم قرار گرفتن به صورت سه بعدی منافذی ایجاد می نمایند که جهت جداسازی بیو مولکول ها فوق العاده مناسب می باشند. تمام این ساختار سه بعدی تشکیل شده حاصل پیوند های هیدروژنی می باشد که می‌توان با افزایش درجه حرارت آن را از بین برد.
- دمای ژله ای شدن آگارز بسیار متفاوت از دمای ذوب آن می باشد. بسته به نوع منبع، آگارز دارای دمای ژله ای شدن بین 35-42 درجه سانتیگراد می باشد و دمای ذوب آن حدود 85-95 درجه سانتیگراد می باشد.

- آگارز معمولا به صورت پودرهای آماده به فروش می رسد و در ترکیب با بافر TAEیا TBEتبدیل به ماتریکس سه بعدی متخلخلی می شود. در واقع ملکول های DNAاز بین این تخلخل ها و حفرات عبور می کنند؛ در نتیجه هر چه ژل درصد پایین تری داشته باشد حفرات بزرگتر خواهند بود و حرکت ملکول های DNAسریع تر. و برعکس هرچه درصد ژل بالاتر باشد حفرات کوچک تر خواهند شد و عبور از میان این تخلخل ها برای DNAسخت تر خواهد بود.

- مهمترین انواع ژل مورد استفاده در عمل الکتروفورز ژل آگارز و اکریل آمید می‌باشند. هر نوع ژل می‌تواند به خوبی برای انواع اندازه‌ها و گونه-های آنالیت مورد استفاده قرار بگیرد.
- ژل‌های پلی اکریل آمید معمولا برای پروتئین‌ها مورد استفاده قرار می-گیرند و نیز دارای قدرت تفکیک خیلی بالایی برای قطعات DNAبا اندازه بین 5-500 جفت باز می‌باشند.
- از طرف دیگر ژل‌های آگارز دارای قدرت تفکیک کمتری برای DNA می‌باشند ولی دارای طیف وسیع‌تری از جداسازی می‌باشند و بنابراین برای قطعاتی DNAبین 100تا 20000 جفت باز مناسب می‌باشند.

قدرت جداسازی DNA	درصد آگارز
100-1000bp	3
200- 1500bp	2
300- 3000bp	1.5
500 – 5000bp	1
1000- 7000bp	0.8
10 – 30kbp	0.6
30 – 50kbp	0.4


Cool to 65°C, and
pour into mold
Comb to
make wells
Finished gel
Wells
Microwave
to boil
Mix agarose
and buffer

- ژل جداسازی دی ان ای، اغلب از پلی ساکاریدی به نام آگاروز ساخته می شود که به صورت دانه های خشک و پودری قابل دسترس می باشد.
- هنگامی که آگارز در یک بافر (ترکیب آب با مقدار کمی نمک) گرم شده و سپس خنک می شود، یک ژل جامد و نیمه شفاف تشکیل می دهد.
- در سطح مولکولی، ساختار ژل یک به صورت یک شبکه از مولکولهای آگاروز است که توسط پیوندهای هیدروژنی به یکدیگر متصل شده و منافذی کوچک را تشکیل داده اند.

بافرها

- در واقع بار خالص ماکرومولکول های زیستی بسیار وابسته به pH محیط می باشد. به منظور کاهش تغییرات pHی ایجاد شده در اثر میدان الکتریکی، عمل الکتروفورز در محیط بافری صورت می گیرد.
- به طور معمول بافر ایده ال باید دارای هدایت پذیری بالا باشد و همچنین گرمای کمتری تولید کند و زمان ابقا طولانی داشته باشد. تعدادی از بافرها که برای الکتروفورز آگارز جهت جداسازی اسیدهای نوکلئیک استفاده می‌شوند عبارتند از: تریس استات EDTA (TAE)و تریس بورات EDTA (TBE) .

- **مواد لازم برای تهیه بافرها**
- استفاده از هر یک از این بافر ها با توجه به نوع مولکول و هدف از جداسازی انتخاب میشود.
- **بافر TAEیا**
- **Tris/Acetate/EDTA:** برای تهیه این بافر از تریس (Tris-base)، استات ((Acetateو EDTAبه همراه آب استفاده می‌شود.
- **بافر TBEیا :Tris/Borate/EDTA**
- برای تهیه این بافر تریس به همراه بوریک اسید ((Boric acidدر آب رقیق شده و با Na_2EDTA مخلوط می‌شود.

- **خصوصیات بافر :TAE**

برای جداسازی قطعات بلند DNA

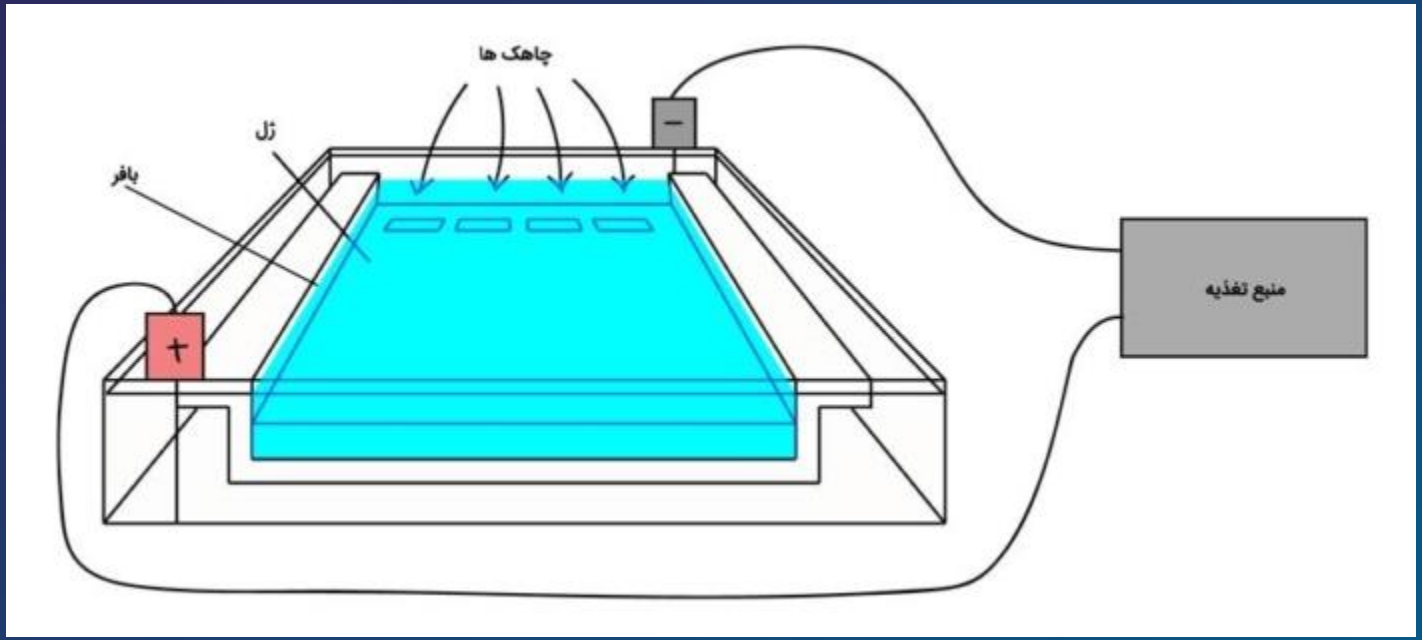
- **خصوصیات بافر :TBE**

برای شناسایی قطعات DNAبا طول kb2

ایجاد محیطی با رسانایی بالا

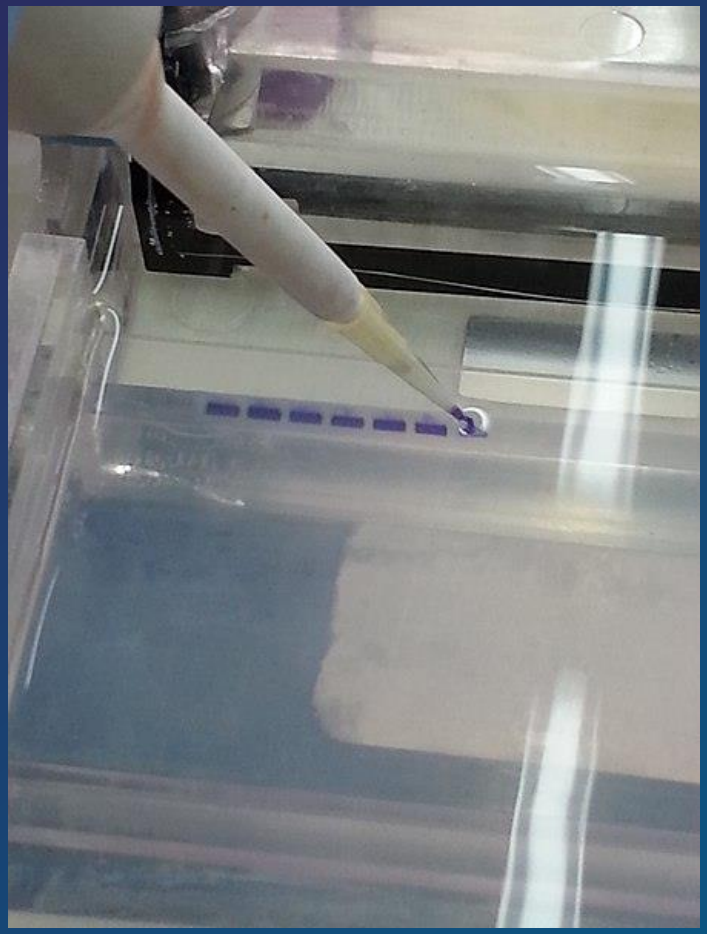
مناسب جهت الکتروفورزهای طولانی

تشکیل باندهای بهتر نسبت به بافر TAE


چاهک ها
ژل
بافر
منبع تغذیه

آماده سازی نمونه

- قبل از الکتروفورز، رنگ به نمونه DNAاضافه می‌شود تا ویسکوزیته نمونه را افزایش دهد و از شناور شدن آن در چاهک‌ها جلوگیری کند و به این ترتیب حرکت نمونه در ژل قابل مشاهده می‌شود
- پس از بستن ژل، نمونه خود را با loading dyeمخلوط کرده (معمولا برای هر 10 میکرولیتر نمونه یک تا دو میکرولیتر از لودینگ دای کافیست) و درون چاهک ها لود کنید.
- لودینگ دای دو کاربرد دارد: به علت دارا بودن گلیسرول باعث سنگین شدن نمونه و نشستن آن به انتهای چاهک می شود و با رنگی کردن آن در دنبال کردن تخمینی DNA روی ژل به صورت تقریبی به ما کمک می کند.



برای رنگ آمیزی ژل آگارز دو روش وجود دارد:

- هنگامی که ژل آگارز حل شده و تا حدی که دست را نسوزاند سرد شد (دمای 37درجه سانتی گراد)، اتیدیوم برماید به آن اضافه کنید (معمولا 3-2 میکرولیتر از استوک آزمایشگاهی برای 100 میلی لیتر ژل) و سپس آن را درون تانک الکتروفورز قرار دهید. (اما باید توجه داشته باشید، تانک الکتروفورز و تمامی وسایل آن باید جدا باشند تا اتیدیوم برماید بخش های دیگر را آلوده نکند، زیرا اتیدیوم برماید یک ماده سرطان زا بوده، با دستکش و وسایل مختص بخش الکتروفورز با آن کار کنید و محض تماس با پوستتان آن را با آب فراوان بشویید.)
- روش دیگر این است که پس از پایان الکتروفورز، ژل را درون ظرفی حاوی میزان زیاد محلول اتیدیوم برماید قرار دهید تا ژل رنگ شود.

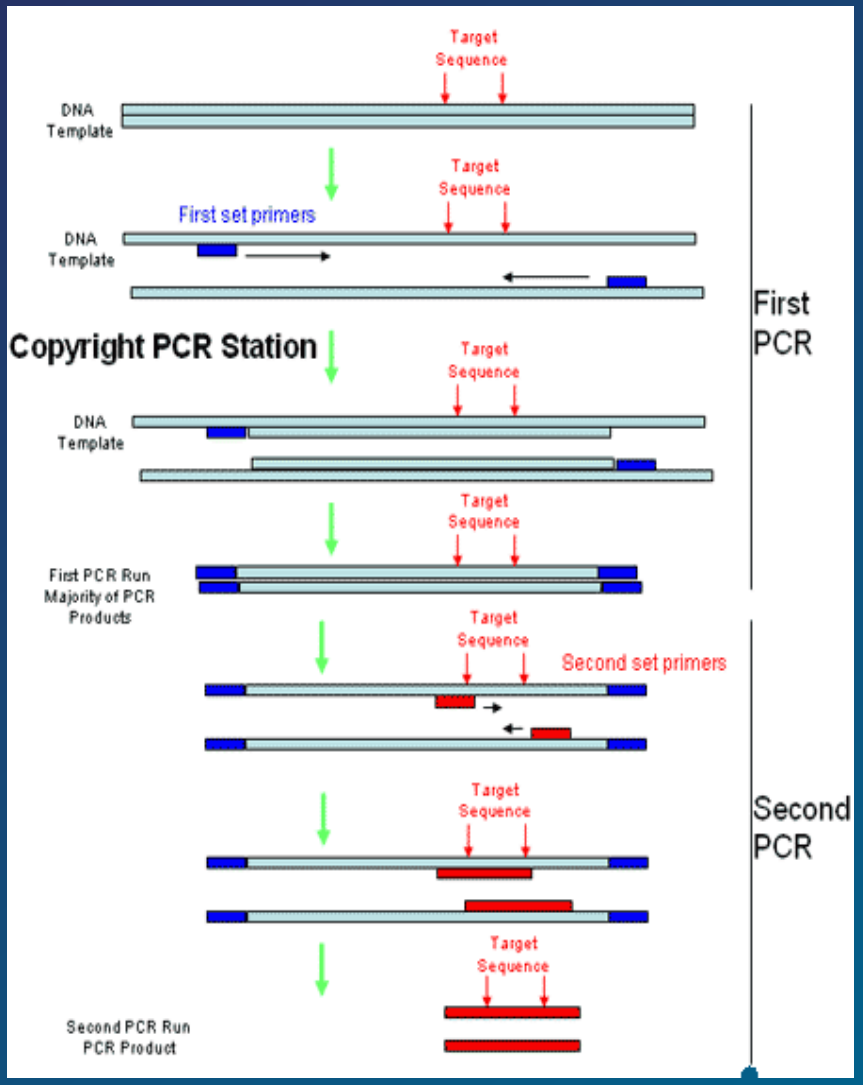
Electrophoresis

نستد پي‌سي‌آر (Nested-PCR)

- در اين روش از دو جفت پرايمر استفاده مي‌شود، طوري كه جفت دوم در بني جفت اول جاي مي‌گيرد. در اين روش ابتدا پرايمر بيروني توالي هدف در طول 15-30چرخه تكثير مي‌شود، سپس محصول PCR حاصل به لوله‌اي ديگر منتقل مي‌شود و به‌عنوان الگو و با استفاده از جفت پرايمر داخلي مرحله دوم PCR انجام شده و ترادف كوچكتري از DNA كه درون PCR اولي است، به اندازه 15-40 چرخه تكثير مي‌شود.

Nested PCR

- Two pairs of PCR primers are used to amplify a fragment.
- The first pair of PCR primers amplify a fragment similar to a standard PCR. However, a second pair of primers called nested primers bind inside the first PCR product fragment to allow amplification of a second PCR product which is shorter than the first one.
- Nested PCR is a very specific PCR amplification.



Multiplex-PCR

- در این تکنیک از چند پرایمر در یک محلول PCR استفاده می شود و آمپلیکون هایی (amplicons) تهیه می شود که اندازه های متفاوتی دارند و مختصDNA های مختلفی هستند.
- با هدف قرار دادن چندین ژن در یک محلولPCR ، می توان با آزمایشات کمتر و زمان کوتاهتر، اطلاعات بیشتری جمع آوری کرد.

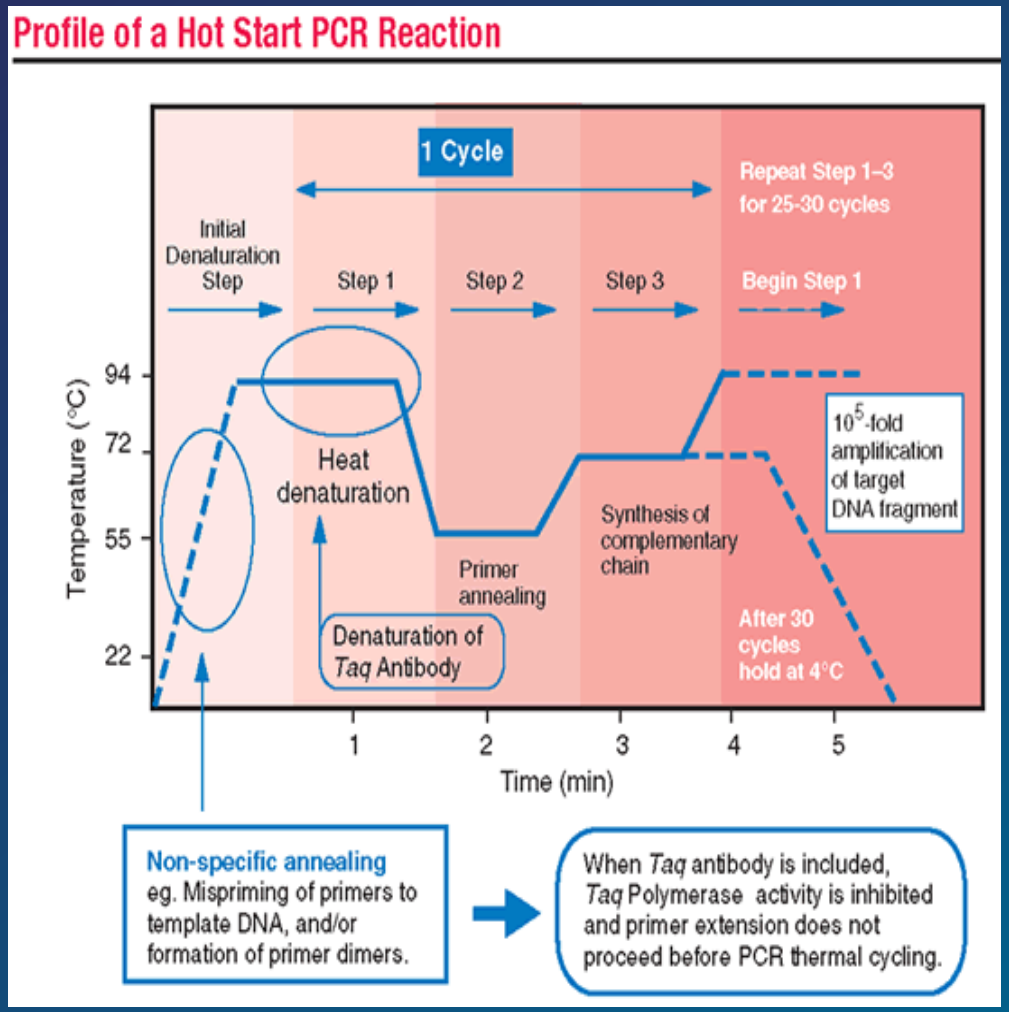
Hot-start PCR

- برای جلوگیری از تکثیرDNA های ناخواسته مخصوصا در مراحل اولیه PCR استفاده می شود.
- بدین منظور قبل از افزودن پلیمراز، دمای محلول به نقطه ذوب (مثلا ۹۵ درجه) رسانده می شود و بلافاصله بعد از دناتوراسیون DNA هدف به واکنش اضافه می شود .
- Hot startبه کمک آنتی بادی: مونوکلونال آنتی بادی ضد آنزیم پلیمراز را به واکنش اضافه میکنند درنتیجه فعالیت پلیمرازی آنزیم را مهار میکند. هنگامیکه دمای واکنش به 94 درجه می رسد آنتی بادی دناتوره می شود و دوباره پلیمراز فعال می شود.
- Hot startبه کمک :Ampliwax به دیواره لوله های مخصوص اینکاربه نوعی واکس آغشته است که بعد از مختصری گرم کردن ذوب شده و روی واکنش را میپوشاند. آنزیم پلیمراز را روی واکس قرار می دهند. در دمای 94 درجه این واکس بخار می شود و آنزیم پلیمراز با واکنش تماس پیدا میکند.

Hot Start PCR

Addition of polymerase at 95 °C

- **Specialized enzymes:**
  - AmpliTaq® Gold
  - Platinum® Taq
- **Hot Start PCR significantly improves specificity, sensitivity and yield of PCR.**



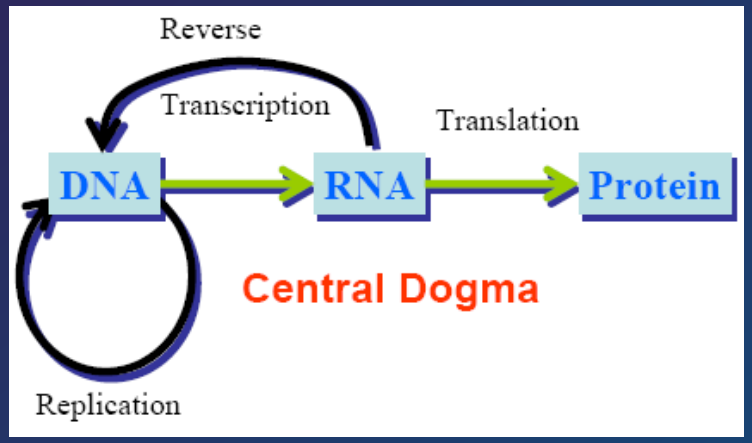
Touchdown PCR

- یک نوع تغییر یافته از PCR است که موجب کاهش محصول کاذب و پرایمر دایمر می شود.
- در این روش برنامه PCR به گونه ای طراحی می گردد که در طی سیکل های متوالی، بتدریج دمای مرحله اتصال (Annealing step) کاهش می یابد. بدین ترتیب که در سیکل های ابتدائی، دما در حدود ۳ الی ۵ درجه بالاتر از T_m پرایمر و در سیکل های انتهایی در حدود ۳ تا ۵ درجه پائینتر از T_m پرایمر تنظیم می شود.

Touch-down PCR

Touch-down increases the PCR specificity

Reverse Transcriptase-PCR



Making cDNA

PCR

Real-Time PCR

Quantitative PCR

- به علت ورود نسل جديدي از ترموسايكلرها با سيستم فلورومتري كه اجازه پايش پيوسته خاصيت فلوئورسانس محصول PCR در زمان جمع شدن را مي‌دهد، اين روش ابداع شد.

- در اين روش از كاوشگرها يا پروب‌هاي هيبريداسيون نشان‌دار شده با رنگ‌هاي فلورسانس در انتهاي 5 يا 3 استفاده مي‌شود. كه امكان پايش پيوسته محصول PCR را بدون جداسازي آنها در روش‌هاي الكتروفورز در ژل آگاروز يا ژل پلي آكريل آميد مي‌دهد.

- اين سيستم در سال 1992 كشف شد .اين روش به دليل كاهش زمان سيكل‌هاي PCR، حذف مرحله Post-PCR و كاربرد نشانگرهاي فلوروژنيك و روش‌هاي حساس آشكارسازي تابش آنها باعث افزايش سرعت اين سيستم نسبت به سيستم PCR معمولي شده است.

PCR optimization (1)

Always start with a stand ard PCR

- Template concentration:
  - 500 ng human genomic DNA
  - 1-10 ng bacterial DNA
  - 0.1-1 ng plasmid DNA
- Mg++ concentration (1-4 mM)
- Primer concentration
- dNTP (200 µM for each)
- Extension time (1 min/1 kbp Taq, 2 min/1 kbp proofreader)
- Taq polymerase (1-2 U/50 µl reaction)

PCR optimization (2)

If the specific product was not achieved, go as follow:

- Changing concentrations:
  - ✓ Mg^{2+}, dNTP, template, polymerase, primers
- Changing temperatures:
  - ✓ denaturation, annealing
  - ✓ Touchdown
  - ✓ Hot-start
- Cycling number
- Nested-PCR
- Primer re-design

Limitations of PCR

- Need for target DNA sequence information
  Boundary regions of DNA to be amplified must be known
- Infidelity of DNA replication
  Taq Pol – no Proof reading – Error rate 10^{-4}
- Short size and limiting amounts of PCR product
  Up to 5kb can be easily amplified
  Up to 20kb can be amplified with some modifications
  Cannot amplify gene >100kb
- Primer mismatch, False positive and false negative results

High fidelity DNA polymerases

- ✓ *Pwo* (*Pyrococcus woesei*)
- ✓ *Pfu* (*Pyrococcus furiosus*)
- ✓ *Tli* (*Thermococcus litoralis*)

- 3’ to 5’ exonuclease activity (proof reading)
- Lower extension rate and processivity
- Require more dNTPs (≥ 200 µM)
- Require more primers with lower annealing Temp.

Enzyme selection

- Routine amplification

– Taq DNA Polymerase (work horse of PCR)

- High fidelity (Do you really need it?)

– Pfu, Pwo DNA polymerases

- Long PCR (>3-4 kb)

– Mixture of non-proofreader (e.g. Taq) and a proofreader (e.g., Pfu)

مشکلات PCR

- با تمامی مزیت های فوق در تکثیر DNA با روش PCR محدودیت هایی نیز وجود دارد که مهمترین آنها اندازه قطعات قابل تکثیر می باشد به طوری که حداکثر اندازه قطعه هایی که با روش PCR معمولی تکثیر می گردد، 5 هزار نوکلئوتید (5 kb) و در روش های بهینه شده تا 20 هزار نوکلئوتید (20 kb) می باشد.

- مشکل اساسی دیگر PCRآلودگی نمونه های مورد بررسی است. به دلیل حساسیت فوق العاده و قدرت تکثیر زیاد PCR هر قطعه DNA خارجی که وارد محیط PCR شود، مورد تکثیر قرار گرفته و نتایج عجیب و دور از واقعیتی به وجود خواهد آورد.
- برای مثال در مورد تحقیقی که در تعیین جنسیت با استفاده از خون مادران باردار بیان شد، در بین جواب ها یک مورد مثبت کاذب برای یکی از زنان غیر باردار که به عنوان شاهد منفی استفاده شده بود، وجود داشت. پس از بررسی معلوم شد که تعداد ناچیزی از سلولهای پوست یکی از کارکنان مرد آزمایشگاه وارد لوله ی PCR شده است. گاهی نیز باقیمانده ی قطعات DNA حاصل از تکثیر DNA های قبلی باعث آلودگی PCR می شود. براي رفع مشكل، امروزه از ظروف يك بار مصرف استفاده مي‌شود. كليه ظروف قبل از استفاده اتوكلاو مي‌شوند تا سلول‌ها و مولكول هاي موجود در آن ها، تا حد ممكن غير فعال مي‌شوند.

کاربردهای PCR

تشخيص بيماري‌هاي قبل از تولد

تعیین جنسیت جنین

تشخیص بیماری ها

تشخیص سرطان و بررسی مراحل درمان آن

شناسائی میکروارگانیسم هایی که قابل کشت نیستند و یا سرعت رشد آنها در محیط کشت خیلی کند است

تعیین توالی DNA