چاپ دوم

الفبای PCR

(واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز)

دکتر فاطمه واحدی

فاطمه کیفی

بسم الله الرحمن الرحيم

۲۸

الفبای علوم

انتشارات وارستگان

الفبای PCR

(واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز)

دکتر فاطمه واحدی

دکترای تخصصی ایمونولوژی – مؤسسه واکسن و سرم‌سازی رازی مشهد

فاطمه کیفی

بخش سیتوژنتیک و مولکولی – آزمایشگاه تشخیص طبی و ژنتیک پردیس

عضو هیئت علمی مرکز آموزش عالی علوم پزشکی وارستگان

سرشناسه: واحدی، فاطمه، ۱۳۴۹-

عنوان و نام پدیدآورندگان: الفبای PCR (واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز) / فاطمه واحدی، فاطمه کیفی

مشخصات نشر: مشهد؛ وارستگان، ۱۳۹۲

مشخصات ظاهری: ۱۹۲ ص.: جدول، نمودار

فروست: الفبای علوم؛ ۲۸

شابک: ۹۷۸-۶۰۰-۶۲۵۲-۲۵-۴

وضعیت فهرست نویسی بر اساس اطلاعات فیپا

یادداشت: کتابنامه

موضوع: واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز

شناسه افزوده: کیفی، فاطمه، ۱۳۶۰

رده‌بندی کنگره: QP۶۰۶/ و۲و۲۱۵ ۱۳۹۱

رده بندی دیویی: ۵۷۴/۸۷۳۲۸۲

شماره کتابشناسی ملی: ۳۰۱۹۱۶۷

نام کتاب	الفبای PCR (واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز)
پدیدآورندگان	دکتر فاطمه واحدی، فاطمه کیفی
ویراستار ادبی	دکتر امیر بوذری
ناشر	انتشارات وارستگان (وابسته به مرکز آموزش عالی علوم پزشکی وارستگان)
طراح و صفحه آرا	نرگس محمدزاده / علی جهانگیر فیض آبادی
ناظر فنی چاپ	حمیده خواجه نظام
قطع	جیبی
تاریخ چاپ	پائیز ۱۳۹۲
شمارگان	۱۰۰۰ نسخه
شابک	۹۷۸-۶۰۰-۶۲۵۲-۲۵-۴
سایت	www.varamed.com
لیتوگرافی، چاپ و صحافی	چاپ دقت (۳۱۲۵۰۵۲) ۶ خط
قیمت	۶۰۰۰۰ ریال

حق چاپ برای انتشارات وارستگان محفوظ است.

ناشر از همکاری شرکت افراطوس مشهد در چاپ این کتاب
به منظور کمک به توسعه فرهنگ کتابخوانی در کشور قدردانی می‌کند.

مرکز پخش: مشهد- بلوار لادن- نبش لادن ۳ - مرکز آموزش عالی علوم پزشکی وارستگان

تلفن: ۵۰۹۱۱۶۰-۰۵۱۱(واحد انتشارات)

مقدمه ناشر

ای که با نامت جهان آغاز شد　　دفتر ما هم به نامت باز شد

کتاب‌ها دوستان همیشگی ما هستند؛ دوستانی که پس از گذشت سال‌ها، اگر ببینیمشان نه لب به گلایه می‌گشایند و نه روی برمی‌گردانند، بلکه آغوش گرمشان را به نشانه استقبال می‌گشایند.

با این وجود، چرا ما کمتر سراغ آن‌ها می‌رویم و کمتر با آن‌ها انس می‌گیریم؟ ممکن است بگوییم لحظات به سرعت از ما می‌گریزند و فرصت مطالعه را از ما می‌ستانند.

به نظر می‌رسد اگر قدر ثانیه‌های بدون بازگشت را می‌دانستیم و از لحظه‌های با شکوه موفقیت چیزی شنیده بودیم، وقتی را برای با کتاب بودن کنار می‌گذاشتیم، و با خواندن کتاب، انگیزه بیشتری برای پیمودن قله‌های موفقیت کسب می‌کردیم؛ هنوز هم دیر نشده است. بدون شک هیچ‌گاه برای یک شروع دوباره و آن هم خواندن کتاب دیر نیست. اگر به جای تلاش دوباره، حسرت ایام از دست رفته را بخوریم مانند این است که تمام شب را برای از دست دادن خورشید گریه کنیم که در این صورت، لذت دیدن ستاره‌ها را از دست خواهیم داد.

برای گریز از این بن بست، انتشارات وارستگان قصد دارد دریچه‌ای نو به سوی

خوانندگان خود بگشاید و مجموعه کتاب‌های الفبای علوم را با ارزش علمی بالا، حجم پایین و بهای اندک منتشر نماید.

خواندن کتاب‌های الفبای علوم، وقت چندانی از خوانندگان نمی‌گیرد و چون به زبان ساده‌ای نگاشته شده است، آن‌ها را در پیچ و خم دشواری‌های متن گرفتار نمی‌کند. با توجه به اندازه جیبی آن‌ها، در همه زمان‌ها و مکان‌ها قابل خواندن بوده و به دلیل راحتی حمل و نقل، همراه همیشگی خوانندگان خواهد بود.

کتاب‌های الفبای علوم در حجمی فشرده، موضوعات و مطالب تخصصی را به شیوه‌ای نوین به مخاطبانش انتقال می‌دهند. از آن‌جا که این مجموعه موضوعات گوناگونی را شامل می‌شود، در کنار هم، دایره‌المعارف علوم را برای استفاده همگان تشکیل خواهند داد.

انتشارات وارستگان دست همه نگارندگانی را که تمایل به انتقال یک پیام، کلام، تجربه و مهارت در قالب مجموعه‌ی الفبای علوم دارند به گرمی می‌فشارد.

امید که الفبای علوم مقبول خاطر دوستان افتد و باشد که کوچه باغ‌های خاطری را طراوت بخشد.

انتشارات وارستگان

مقدمه پدیدآورندگان

نیستی و کس نداند چیستی هستی اما در ردای نیستی

مولکول‌های اسید نوکلئیک شامل DNA و RNA در روش‌های مهندسی ژنتیک و نوترکیبی به عنوان ماده‌ی اولیه محسوب می‌شوند. استفاده از DNA ناخالص و آلوده سبب ایجاد خطا در نتیجه‌ی واکنش‌ها می‌گردد. اهمیت این مسئله وقتی چشمگیر است که قرار باشد بر مبنای روش انجام شده، قضاوت‌های حیاتی و سرنوشت ساز انجام شود، مانند تعیین ناهنجاری‌های ژنتیکی و تصمیم بر دستور توقف ادامه‌ی حیات یک جنین، تشخیص و تعیین بیماری و تصمیم بر نحوه‌ی درمان، بررسی صحنه‌های جرم با استفاده از نمونه‌ی DNA موجود در محل و تشخیص مجرم و اثبات روابط فرزند و والدین. تنوع منابع حاوی DNA سبب ابداع روش‌های گوناگونی برای خالص‌سازی آن‌ها شده است.

دوران طلایی علم مهندسی ژنتیک که با روش کلونینگ ژن‌ها آغاز شده بود با ابداع ارزنده‌ی آقای مولیس در سال ۱۹۸۵ جهت تکثیر ژن‌ها درون یک لوله‌ی آزمایش به اوج رسید. او که رویای دوران خردسالی‌اش ساختن یک موشک و سفر به فضا بود با ابداع روش "واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز" یا PCR در واقع وسیله‌ی مطالعه‌ی کهکشان درون سلول‌ها را فراهم نمود. این روش توانست مکمل و در بسیاری موارد جایگزین روش‌های کلونینگ درون موجودات زنده

شود. با نگاهی به انبوه مقالات و گزارشات علمی منتشر شده در بانک‌های مقالات علمی این نکته درک می‌شود که هنوز پس از گذشت حدود ۲۵ سال، هیجان پژوهش با این روش فروکش نکرده و در علوم مختلفی مانند باستان‌شناسی، پزشکی قانونی و کشاورزی که خارج از حیطه‌های پزشکی می‌باشند از آن استفاده می‌شود.

PCR به مثابه‌ی مشعلی است که انسان کنجکاو در تلاش خود برای دست‌یابی به مرزهای دانایی برافروخته که حاصل آن یافتن انبوه نادانسته‌ها و اعتراف به نادانی بوده است.

با توجه به این‌که آشنایی با روش‌های استخراج DNA، گام اول جهت فعالیت در آزمایشگاه‌های بیولوژی مولکولی می‌باشد، در بخش اول این کتاب به طور مختصر به ارائه‌ی روش‌های استخراج، در بخش دوم کتاب به اساس و توضیح روش PCR و در بخش سوم به روش‌های ارزیابی واکنش PCR مانند الکتروفورز پرداخته شده است.

امید است صاحب‌نظران با ارائه‌ی نظرات و پیشنهادات خود ما را در ارائه‌ی بهتر بهره‌مند سازند.

دکتر فاطمه واحدی
vahedif@yahoo.com
پائیز ۱۳۹۲

بخش	عنوان	صفحه
	استخراج اسیدهای نوکلئیک	
اول	منابع استخراج DNA	۱۵
	نمونه‌های مورد بررسی در آزمایش‌های پیش از تولد	۱۸
	میزان بازیابی و میزان مورد نیاز DNA	۱۹
	مراحل استخراج DNA	۲۰
	حذف RNA از DNA خالص	۳۷
	جداسازی انواع DNA	۳۸
	جداسازی DNA از اندامک‌های سلولی	۴۲
	تغلیظ DNA	۴۲
	نگه‌داری و ذخیره‌سازی DNA	۴۵
	استخراج DNA در خانه	۴۷
	تعیین غلظت DNA	۴۹
	روش‌های عملی استخراج DNA	۵۰
	الکتروفورز بر روی غشاهای سلولزی DEAE	۶۴
	روش استفاده از ژل آگارز با نقطه ذوب پایین (LM)	۶۵
	استخراج DNA از ژل اکریل‌آمید	۶۶
	استخراج DNA از اسپرم و ریشه‌ی مو	۶۶
	بازیابی DNA از واکنش‌های PCR	۶۷
	استخراج پلاسمید	۶۷
	خالص‌سازی DNA از ذرات فاژ	۷۶
	استخراج RNA	۷۷
	نکات ایمنی	۸۵

بخش	عنوان	صفحه
	PCR	
دوم	واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز (PCR)	۸۹
	تاریخچه‌ی PCR	۹۱
	اساس و مواد مورد نیاز واکنش PCR	۹۴
	مراحل واکنش PCR	۱۱۸
	کاربردهای PCR	۱۲۳
	انواع PCR	۱۲۵
	مراحل ساخت cDNA	۱۴۱
	بهینه کردن واکنش PCR	۱۴۳
	بهینه کردن شرایط چرخه‌های PCR	۱۴۶
	مشکلات شایع در PCR	۱۴۸
	الکتروفورز	
سوم	الکتروفورز	۱۵۵
	عوامل مؤثر بر حرکت مولکول‌ها در الکتروفورز	۱۵۸
	بسترهای ژلی جهت الکتروفورز	۱۶۳
	بافرها	۱۶۷
	مشاهده و آشکارسازی ژل‌ها	۱۶۸
	بررسی الکتروفورز	۱۷۴
	تهیه ژل آگارز	۱۷۵
	تهیه‌ی ژل پلی‌اکریل‌آمید	۱۸۲
	منابع و مآخذ	۱۸۹

بخش اول

استخراج اسیدهای نوکلئیک

مقدمه

سلول‌های موجودات علی‌رغم این‌که با یکدیگر تفاوت‌های بسیار دارند؛ اما در داشتن مولکول‌هایی که خصوصیات وراثتی را حفظ و منتقل می‌کنند یا همان DNA مشابه هستند. در بسیاری از مطالعات تجربی بر روی موجودات و سلول‌ها نیاز به جداسازی و خالص‌سازی DNA می‌باشد. به منظـور تهیـه‌ی DNA، سلـول‌ها باید شکسته شده و پروتئـین‌های ساختمانی و آنزیم‌هایی که با ساختـمان DNA تداخل پیدا می‌کنند، حذف شوند. در سلول‌های یوکاریوتی، DNA درون هسته قرار دارد؛ اما در سلـول‌های پروکاریوتی، DNA در سیتوپلاسم شناور می‌باشد. استخراج DNA معمـولاً با هدف تهیه‌ی DNA جهت بررسی‌های بعدی، مانند تشخیـص‌های مولکـولی، ردیابـی بیماری‌های ژنتیکی و یا بررسی‌های پزشکی قانونی، انجام می‌شود. در واقـع دسترسی به

DNA خالص، نقطه‌ی شروع بررسی‌های مولکولی در سطح ژن‌ها می‌باشد. DNA حاوی اطلاعات بسیاری است و با استفاده از DNA استخراج شده می‌توان ابتلای یک جنین و یا نوزاد به بیماری‌های ژنتیکی و یا نقش یک ژن در ایجاد سرطان، جهش‌های سوماتیک، استعداد ابتلا به بیماری‌ها یا نوع بیماری‌های ژنتیک را بررسی کرد. استفاده از DNA به مطالعات پزشکی و زیستی محدود نمی‌شود و در علوم بسیاری مانند کشاورزی، دامپزشکی، باستان‌شناسی و ... تأثیرگذار بوده است.

۱-۱) منابع استخراج DNA

DNA را می‌توان با توجه به هدف مطالعه و نمونه‌ی مورد بررسی و در دسترس، از منابع گوناگونی استخراج کرد. از تمام سلول‌ها و بافت‌های مختلف انسانی و یا حیوانی مانند خون، مایع منی، بزاق، ادرار، مدفوع، مو، دندان و استخوان، می‌توان DNA را استخراج نمود. همچنین از بافت‌های مختلف گیاهی شامل برگ، میوه و چوب‌های سخت و نرم نیز می‌توان DNA را تهیه کرد.

در بررسی‌های جنایی و پزشکی قانونی، امکان استخراج DNA از ته سیگار، آدامس، ناخن، تمبر و حتی ذرات گرد و خاک موجود در فضای مورد بررسی، به علت احتمال حضور سلول‌های پوستی و موی مظنونان و یا متهمان وجود دارد. با توجه به تأکید این نوشتار بر مطالعات پزشکی، به معرفی نمونه‌های متداول آزمایشگاه‌های تشخیص پزشکی به عنوان منبع DNA پرداخته می‌شود.

سلول‌های خونی: بیماری‌های ژنتیکی مانند کم‌خونی تالاسمی، دیستروفی یا تحلیل عضلانی دوشن، هانتینگتون و سیستیک فیبروسیس با مطالعه بر

روی DNA بیماران قابل تشخیص و شناسایی هستند. برای بررسی این‌گونه اختلالات، DNA معمولاً از خون استخراج می‌شود.

سرم: استخراج DNA از سرم و پلاسما، معمولاً برای بررسی وجود عفونت‌های ویروسی مانند HBV[1] ، CMV[2] و HIV[3] انجام می‌شود.

نمونه‌های پاتولوژی: نمونه‌های پاتولوژی خارج‌شده از بدن در طی جراحی‌ها و یا نمونه‌هایی که به وسیله‌ی بیوپسی سوزنی و یا اتوپسی به‌دست می‌آیند، منبع مناسبی از DNA و RNA، برای بررسی بیان ژن‌ها و جهش‌ها می‌باشند.

میتوکندری: از آن‌جایی که DNA میتوکندری از DNA سلولی متفاوت می‌باشد، استخراج و مطالعه‌ی این DNA انحصاری، در تشخیص بیماری‌های ژنتیکی و شناسایی جهش‌های ژن‌های میتوکندری، مهم است. سندرم ملاس[4]، بیماری ژنتیکی‌ای است که به دلیل جهش در DNA میتوکندری اتفاق می‌افتد و در نتیجه تنفس سلولی دچار اختلال می‌شود.

مایع مغزی- نخاعی (CSF)[5]: از مایع مغزی- نخاعی نیز می‌توان DNA و RNA را استخراج نمود و در موارد عفونت‌ها و تورم مغزی (انسفالیت)[6]، برای تشخیص علت بیماری، به‌عنوان مثال ردیابی حضور ویروس‌های هرپس،

1. Hepatitis B Virus
2. CMV: Cyto Megalo Virus
3. HIV: Human Immune Deficiency Virus
4. MELAS: Mitochondrial myopathy, Encephalopathy, Lactic acidosis and Stroke like
5. CSF: Cerebro Spinal Fluid
6. Encephalitis

استفاده کرد.

ترشحات دستگاه تناسلی: نمونه‌های سلولی برداشته شده از قسمت گردن رحم در خانم‌ها (پاپ اسمیر)[1]، منبع مناسبی از RNA و DNA برای بررسی آلودگی دستگاه تناسلی مربوط به ویروس‌هایی مانند خانواده‌ی پاپیلوما، تعیین نوع آن‌ها و احتمال سرطان‌زایی می‌باشند.

ترشحات دستگاه تنفسی: برای بررسی عوامل بیماری‌زایی مانند ویروس‌های آنفلوانزا، باکتری سل و تعیین سویه‌ی آن‌ها، می‌توان RNA و DNA را از ترشحات ریه و بینی، استخراج کرد.

بزاق: جهت جست‌وجوی آلودگی‌های ویروسی و باکتریایی، بزاق منبع خوبی از RNA و DNA می‌باشد.

اشک و ترشحات چشم: RNA و DNA موجود در ترشحات چشم، به‌خصوص برای بررسی آلودگی‌های کلامیدیایی و یافتن عامل عفونت، مناسب می‌باشند.

ادرار: RNA و DNA ادرار، منبع مناسبی برای بررسی وجود سلول‌های توموری مربوط به دستگاه دفع ادرار و عفونت‌های ویروسی و باکتریایی می‌باشند.

مدفوع: حضور سلول‌های توموری مربوط به دستگاه گوارش، باکتری‌هایی مانند هلیکوباکترپیلوری، ویروس‌هایی مانند انواع روتاویروس‌ها و انگل‌ها، با استخراج RNA و DNA از مدفوع بررسی می‌شوند.

---

1. Pop Smear

۲–۱) نمونه‌های مورد بررسی در آزمایش‌های پیش از تولد

در مواردی مانند سقط‌های مکرر، وجـود فرزند مبتلا به بیماری ژنتیکی در خانواده، سابقه‌ی بیماری ژنتیکی در خانواده و حاملگی‌های بـالاتـر از ۴۰ سال، بررسی DNA جنین، مورد توجه است. برای دست‌یابی به DNA جنین، می‌تـوان به نمونه‌ها و روش‌های نمونه‌گیری زیر اشاره نمود:

❖ **آمنیوسنتز**[1]**:** در این روش به وسیله‌ی سوزن‌هـای بلند مخصـوص، مقـداری از مایع کیسه‌ی آمنیون در هفته ۱۵ الی ۱۸ بارداری گرفتـه شده و سلول‌های آن به وسیله‌ی سانتریفوژ جدا و جهت افزایش آن‌ها، کشت شده و در نهایت تکثیر می‌شوند. این سلول‌ها به عنوان منبع DNA، برای بررسی‌های کروموزومی و یا در آزمایش‌های دیگر استفاده می‌شوند (شکل ۱–۱).

شکل ۱–۱: **روش آمنیوسنتز.** در ایـن روش به وسیـله‌ی سوزن‌های بلند، مقـداری از مایـع کیسه‌ی آمنیـون گرفته شده و سلول‌های آن جداشده و DNA استخراج می‌شود.

1. Amniocentesis

❖ **پرزهای جنینی**[1]**:** پرزهای جنینی رحم توسط پزشک جراح زنان در هفته ۱۲ بارداری از خانم باردار گرفته شده و از آن DNA استخراج می‌گردد.

❖ **بلاستومر:** زمانی که جنین در حد ۸-۶ سلولی باشد با جداکردن یک سلول آن، که بلاستومر نامیده می‌شود، بررسی‌های بیولوژی مولکولی و ژنتیکی انجام می‌شود. این بررسی‌ها به خصوص در مراکز پزشکی درمان ناباروری برای اطمینان از سلامت جنینی که در شرایط آزمایشگاهی و لقاح مصنوعی قرار است به رحم مادر منتقل شود، انجام می‌گیرد.

❖ **جداسازی سلول‌های جنینی از خون مادر:** در دوره‌ی بارداری، مقدار کمی از سلول‌های جنین، وارد خون مادر می‌شوند. با خون‌گیری از مادر می‌توان سلول‌های جنین را جدا نمود و DNA آن‌ها را استخراج کرد و آزمایشات را بر روی DNA جنینی انجام داد.

❖ **نگه‌داری سلول‌های خونی نوزادان بر روی کاغذ فیلتر:** کاغذ فیلترهای مخصوصی مانند کارت‌های FTA[2] که حاوی مواد نگه‌دارنده هستند برای حفظ طولانی مدت و جابجایی آسان سلول‌های خونی استفاده می‌شوند.

۳-۱) میزان بازیابی و میزان مورد نیاز DNA

با توجه به نوع نمونه و سلول و نیز روش استخراج، میزان بازیابی و استحصال DNA، متفاوت می‌باشد؛ اما معمولاً سلول‌های دیپلوئید حاوی حدود ۶ پیکوگرم و هر اسپرم حاوی ۳ پیکوگرم از DNA می‌باشد. میزان متوسط گلبول‌های سفید

1. Chorionic Villus
2. FTA: Flinders Technology Associates Filter Papers

خون انسان، حدود ۱۰–۵ میلیون سلول بوده و بنابـراین از نظر تئوری می‌توان از هر میکرولیتر خون، حدود ۳۰ تا ۶۰ نانوگرم DNA به‌دست آورد.

بستـه به نوع و تعداد آزمایش‌ها، میزان DNA مورد نیاز، متفاوت می‌باشد. معمولاً به طور متوسط، برای انجام انواع PCR به یک نانوگرم DNA تـک رشته‌ای و یا دو رشتـه‌ای نیاز است که این میزان معادل ۰/۰۵ یک میکرولیتر خون و یا ۳۵۰ اسپرم است. بسیاری از کیت‌های تجاری PCR، دارای حساسیت بیشتری هستند و برای استفاده از آن‌ها فقط ۱۰۰ تا ۲۵۰ پیکوگرم از DNA لازم است.

جهت بررسی چند شکلی ژن‌ها (RFLP)[1]، حدود ۵۰ نانوگرم از DNA دو رشته‌ای لازم است که معادل ۲ میکرولیتر خون و یا ۲۰۰۰۰ اسپرم می‌باشد.

۴–۱) مراحل استخراج DNA

گرچه می‌توان DNA را از منابع گوناگون و با روش‌های مختلف تهیه نمود، اما مراحل اصلی استخراج DNA با اهداف مشابهی انجام می‌شوند. در طی مراحل استخراج باید استحصال DNA با کیفیت مناسب، بازده، حذف عوامل ممانعت‌کننده در آزمایش‌های بعدی مانند نوکلئازها و یا ممانعت از عمل آن‌ها مورد توجه باشد. مراحل استخراج DNA عبارتند از:

۱. شکستن و لیز سلول‌ها برای آزاد شدن DNA: در این مرحله تخریب سلول‌ها به روش‌های فیزیکی مانند خردکردن یـا آسیاب‌کردن و استفاده از امواج فراصوتی، به‌وسیله‌ی سونیکاتور انجام می‌شود.

1. RFLP: Restriction Fragment Lentgh Polymorphism

۲. **خالص‌سازی DNA:** شامل مراحل حذف چربی‌ها با استفاده از دترجنت‌ها و حذف پروتئین‌ها می‌باشد. پروتئین‌های سلولی و هیستونی، که در سلول به DNA متصل هستند، با افزودن پروتئاز تجزیه شده و یا با استفاده از نمک‌های استات‌سدیم یا پتاسیم، جداشده و سپس با کمک مخلوط فنل–کلروفرم رسوب داده شده و حذف می‌شوند.

۳. **رسوب دادن، شستشو و تغلیظ DNA:** این مرحله با استفاده از الکل‌هایی مانند اتانول و یا ایزوپروپانول انجام می‌شود. با توجه به این که DNA در الکل نامحلول می‌باشد معمولاً DNA به صورت تجمعاتی درآمده و در اثر سانتریفوژ رسوب می‌کند. در این مرحله نمک‌های محلول در آب نیز حذف می‌شوند.

۱–۴–۱) روش‌های تهیه لیز سلولی (عصاره‌ی سلولی)[1] و آزادسازی ترکیبات داخل سلول و DNA

برای آزادسازی DNA از درون سلول، از روش‌های فیزیکی و شیمیایی ذیل استفاده می‌شود:

۱–۱–٤–۱) روش‌های فیزیکی

❖ استفاده از فشارهای فیزیکی و مکانیکی مانند خردکردن بافت در هاون‌های چینی و یا مخلوط‌کن‌های برقی؛

❖ استفاده از امواج صوتی با استفاده از دستگاه‌های اولتراسونیک؛

1. Crude Extract

❖ استفاده از تغییر حرارت، انجماد و ذوب‌کردن‌های متوالی که سبب ترکیدن سلول‌ها و آزادشدن محتویات آن‌ها می‌شود.

۲-۱-٤-۱) روش‌های شیمیایی

❖ استفاده از آنزیم‌ها جهت تخریب و هضم غشای سلول‌ها

❖ استفاده از دترجنت‌ها که سبب اختلال در آرایش مولکولی دیواره‌ها و غشـاهای سلولی و در نتیجه تخریب آن‌ها می‌شوند.

در نتیـجه‌ی این روش‌ها، سلول‌ها لیز شده و عصاره‌ی سلولی حاصـل می‌شـود که مخلـوط ناهمـگنی از قطعات دیواره‌ی سلولی، چربی‌ها، پروتئین‌ها و اسیدهای نوکلئیک می‌باشد. با استـفاده از فیلتراسیون و یا سانتریفوژ می‌توان ذرات درشت و نامحلول را حذف کرده و عصاره‌ی سلولی شفافی به‌دست آورد.

استفاده از روش‌های فیزیکی و سانتریفوژهای متوالی سبب شکستن DNA می‌شود؛ بنابراین در روش‌های حساس که نیاز به قطعات سالم و کامل DNA است، استفاده از روش‌های شیمیایی و آنزیمی بهتر است. آنزیم‌های لیزوزیم و پروتئیناز K و دترجنت‌هایی مانند SDS[1] از پراستفاده‌ترین مواد جهت تخریب سلول‌ها هستند.

1. SDS: Sodium Dodecyl Sulfate

پروتئیناز K: پروتئیناز K در واقع نوعی سرین پروتئاز است کـه از نوعی کپک[1] به نام "تریتیکوم آلبوم نوع لیمبر"[2] ترشح می‌شود. K در نام آنزیم اشاره به کراتین[3] است که توسط ارگانیسم مذکور هیدرولیز شده و کربن و نیتروژن خود را تأمین می‌کند. این نوع پروتئاز، انواع زیادی از پیوندهای پپتیدی، به خصوص پیوندهایی که انتهای کربوکسی آن‌ها بـه آمینواسیدهای حلقوی و بدون بار، متصل هستند را هیدرولیز می‌کند. این آنزیم دارای ۲۷۹ اسید آمینه و وزن تقریبی حدود ۲۹ کیلو دالتون اسـت؛ دارای دو محـل اتصال به یون‌های دو ظرفیـتی کلسیم می‌باشد که در حفظ ساختمان فضایی آنزیم نقش دارند. با وجود آن‌که این یون‌ها، به طور مستقیم در فعالیت آنزیمی اثر ندارند، اما در صورت حذف آن‌ها، مقداری از فعالیت آنزیم کاهش می‌یابد. از آن‌جایی که این مقدار فعالیـت برای هضم بسیاری از پروتئین‌ها کافی است، واکنش در حضـور چلاتورهایی مانند EDTA[4] نیز قابل انجام است. این آنزیم بر روی پروتئین‌های دناتوره شده، ۱۰ برابر فعالیت بیشتری دارد؛ بنابراین بهتر است قبل از اثر آن، پروتئین‌ها به وسیله‌ی حرارت و یا دترجنت‌ها، دناتوره شـوند. این آنزیم در حضـور اوره تا حد ۴ مولار و دترجنت‌هایی که برای لیز سلول‌های پستانداران استفاده می‌شود؛ مانند SDS (۰/۵ درصد) یا تریتون X۱۰۰ (۱ %) فعال می‌باشد. ایـن آنزیم، همچنین آنزیم‌های DNase و RNase را غیرفعال می‌کند و از

1. Mold
2. Tritirachium Album Var. Limber
3. Keratin
4. EDTA: Ethylene Diamine Tetra Acetic acid

تخریب DNA و RNA جلوگیری می‌کند.

پروتئیناز K معمولاً به شکل لیوفیلیزه، به صورت تجاری در دسترس است که برای استفاده، بهتر است در بافری حاوی Tris-HCl (pH=۸، ۵۰ mM) و استات‌کلسیم استریل ۱/۵ mM حل شده و در غلظت ۲۰ mg/ml تهیه گردد و سپس این محلول در حجم‌های کمتر تقسیم شده و در فریزر ۲۰- نگه‌داری شود. در هر بار استفاده، یک نمونه ذوب شده و بهتر است باقی‌مانده حذف گردد. این آنزیم برخلاف آنزیم‌هایی مانند پروناز[1] خاصیت خودهضمی ندارد. فعالیت این آنزیم در دمای ۵۰ °C چندین برابر فعالیت آن در ۳۷ °C است.

لیزوزیم‌ها: لیزوزیم‌ها دسته‌ای از آنزیم‌ها هستند که پیوند بین N- استیل‌گلوکز آمین و N- استیل‌مورامیک اسید در پروتئوگلیکان دیواره‌ی سلولی باکتری‌ها را هیدرولیز می‌کنند و اولین بار به وسیله‌ی فلمینگ[2] کشف گردیدند. این دسته از آنزیم‌ها دارای گستردگی زیادی در طبیعت هستند؛ مثلاً در ترشح مخاط مهره‌داران و یا به‌وسیله‌ی باکتریوفاژها هنگام رهایی از سلول‌ها، ترشح می‌شوند. بین انواع گوناگون این لیزوزیم‌ها، تفاوت‌های ساختمانی زیادی وجود دارد. لیزوزیم مورد استفاده در بیولوژی مولکولی، نوع استخراج شده از سفیده‌ی تخم مرغ می‌باشد.

جدول ۱-۱ بهترین شرایط نگه‌داری و واکنش سه آنزیم پروتئیناز K و پروناز و لیزوزیم را نشان می‌دهد.

---

1. Pronase
2. Fleming

آنزیم	غلظت پایه (ذخیره)	دمای نگهداری و ذخیره (°C)	غلظت مناسب در واکنش	محتویات بافر مناسب واکنش	دمای مناسب واکنش (°C)	آماده‌سازی پیش از واکنش
پروناز	۲۰ mg/ml در آب	-۲۰°C	۱ mg/ml	Tris-HCl (pH=۷، ۰/۰۱۰ M) EDTA (۰/۰۱ M) SDS (۰/۰۵٪)	۳۷	نیاز به خود هضمی دارد.
پروتئیناز K	۲۰ mg/ml در آب	-۲۰°C	۵۰ µg/ml	Tris-HCl (pH=۷/۸، ۰/۰۱۰ M) EDTA (۰/۰۰۵ M) SDS (۰/۰۵٪)	۵۶-۳۷	نیاز به خود هضمی ندارد.
لیزوزیم	۱ mg/ml در Tris-HCl (pH =۸)	-۲۰°C	۱۰ mg/ml	Tris-HCl (pH=۸، ۲۵ M) NaCl (۰/۲ mM) ایمیدازول (۵ mM)	۳۷	نیاز به خود هضمی ندارد.

جدول ۱-۱: شرایط نگه‌داری و واکنش سه آنزیم پروتئیناز K، پروناز و لیزوزیم

جهت آماده‌سازی پروناز و انجام خودهضمی، که سبب حذف آلودگی‌های احتمالی با آنزیم‌های DNase و RNase نیز می‌شود، باید آنزیم در بافر حاوی Tris-HCl(pH=۷/۵، ۱۰ mM) و NaCl (۱۰ mM) در غلظت نهایی ۲۰ mg/ml حل گردد و در دمای ۳۷ °C به مدت یک ساعت نگه‌داری گردد. لیزوزیم در pH زیر ۸ فعالیتی ندارد.

SDS: سدیم دودسیل سولفات یا سدیم لوریل سولفات ($C_{12}H_{25}SO_4Na$) یک کاهش‌دهنده‌ی کشش سطحی (سورفکتانت)[1] آنیونی است که در بسیاری از محصولات بهداشتی و شوینده کاربرد دارد. این مولکول دارای یک دم ۱۲ کربنی است که به یک گروه سولفات چسبیده است و سبب می‌شود مولکول خصوصیات آمفی‌پاتیک داشته و در واقع دترجنت باشد. CTAB[2] یا ساولن یک سورفکتانت کاتیونی است که بیشتر در استخراج DNA از منابع گیاهی به جای SDS استفاده می‌شود و سبب حذف بهتر مواد آلی مانند پلی‌ساکاریدها می‌شود.

سورفکتانت ماده‌ای است که کشش سطحی مایعی را که در آن حل شده است؛ کاهش می‌دهد.

۲-۴-۱) انواع روش‌های استخراج و خالص‌سازی DNA

هنگام تهیه‌ی عصاره‌ی سلولی به همراه DNA، مقادیر زیادی پروتئین، لیپید و RNA از سلول آزاد می‌گردد؛ پاک نمودن DNA از وجود این ترکیبات را خالص‌سازی DNA می‌گویند. روش‌های متنوعی برای خالص‌سازی DNA

1. Surfactant
2. Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide

وجود دارد و روش مورد استفاده به نوع نمونه، مواد در دسترس و انتخاب کارشناس آزمایشگاه بستگی دارد. این روش‌ها را می‌توان در دو دسته‌ی کلی، روش‌های آلی و غیرآلی، گروه‌بندی نمود.

۱-۲-٤-۱) روش‌های آلی استخراج DNA

❖ استفاده از فنل-کلروفرم (۱:۱)

در این روش، مرحله‌ی اصلی استخراج (یعنی حذف پروتئین‌ها) با استفاده از فنل-کلروفرم انجام می‌شود. مراحل اصلی آن به این ترتیب است:

الف) تخریب یا لیز سلولی که در طی آن غشاهای سلولی تخریب می‌شوند؛ اما هسته دست نخورده باقی مانده و در نتیجه رسوب می‌کند.

ب) غشای هسته با استفاده از دترجنت‌هایی مانند SDS و پروتئینازهایی مانند پروتئیناز K تخریب می‌گردد.

ج) DNA به درون محلول رها می‌شود و به وسیله‌ی محلول آلی فنل-کلروفرم از پروتئین‌های درون مخلوط جدا می‌گردد.

پس از مخلوط‌شدن فنل-کلروفرم با عصاره‌ی سلولی، دو فاز آبی و آلی به وجود می‌آید. DNA به فاز آبی که در بالا قرار می‌گیرد مهاجرت کرده، لیپیدها در فاز آلی و اکثر پروتئین‌ها در بین دو فاز قرار می‌گیرند. این مکانیسم جداسازی، بر اساس تفاوت قطبیت و حلّالیت مولکول‌های مختلف است. مولکول‌های اسید نوکلئیک به دلیل قطبیت در فاز قطبی آب وارد می‌شوند (شکل ۲-۱).

د) DNA درون فاز آبی به کمک الکل سرد ۹۵% و نمک، رسوب‌داده شده و جدا می‌شود.

ه) DNA با استـفاده از الکل ۷۰% شستشو داده شده و سپس با حرارت ملایم و یا با کمک خلأ خشک شده و در بافر یا آب خالص حل می‌گردد.

شکل ۲-۱: **روش فنل-کلروفرم.** این روش یکی از روش‌های آلی است که بسیار مورد استفاده قرار می‌گیرد؛ وقتی عصاره‌ی سلولی با فنل-کلروفرم مخلوط می‌شود دو فاز آبی و آلی به وجود می‌آید. بر اساس تفاوت در قطبیت، DNA به فاز آبی که در بالا قرار می‌گیرد مهاجرت کرده، لیپیدها در فاز آلی و پروتئین‌ها در بین دو فاز قرار می‌گیرند.

❖ فنل

فنلی که در بیولوژی مولکولی استفاده می‌شود باید شفاف و بدون رنگ باشد. فنل‌هایی که به رنگ صورتی و یا زرد هستند مناسب نیستند. فنل‌های کریستاله نیز به دلیل این‌که حاوی ترکیبات اکسیدشده مانند کوئینون‌ها هستند مناسب نمی‌باشند. این فنل‌ها، برای استفاده باید در ۱۶۰ $^{\circ}C$ تبخیر و دوباره تقطیر گردند که به دلیل سمی‌بودن و احتمال سرطان‌زایی آن‌ها، نیاز به کار در فضاهای خاص، برای تهویه و فیلتر می‌باشد. کوئینون‌ها سبب شکستن پیوندهای فسفودی‌استری موجود در اسیدهای نوکلئیک شده و یا سبب ایجاد اتصالات متقاطع بین مولکول‌های RNA و DNA می‌گردند. فنل دارای خاصیت خورندگی بسیار زیادی بوده و در صورت تماس و تنفس، سبب آسیب جدی می‌شود.

❖ نحوه‌ی تهیه‌ی فنل متعادل[1]

فنل قبل از استفاده، باید به pH بالاتر از ۷/۸ رسانده شود تا DNA به درون فاز اسیدی آلی منتقل شود. فنل مایع باید در دمای ۲۰- °C نگه‌داری شود؛ فقط در موقع استفاده، از فریزر خارج شود، تا دمای اتاق گرم شود. سپس ماده‌ی آنتی‌اکسیدان هیدروکسی کوئینولین تا غلظت نهایی ۰/۱ درصد اضافه گردد. این ماده، ممانعت‌کننده‌ی RNase و نیز یک چلاتور فلزات یونی است. ضمناً سبب ایجاد رنگ زردی می‌شود که می‌توان فاز آلی را به راحتی از فاز آبی تشخیص داد. به فنل مذاب، باید حجم برابری از بافر Tris-HCl (pH=۷/۵، ۰/۵ M) اضافه شود؛ سپس مخلوط به مدت ۱۵ دقیقه در دمای اتاق هم‌زده شود و بعد هم‌زن خاموش شده و اجازه داده شود که دو فاز آبی و آلی تشکیل گردد و با یک پیپت شیشه‌ای، فاز آبی رویی حذف گردد. مجدداً مرحله‌ی افزودن بافر و حذف آن باید تکرار شود تا pH فاز فنلی، بالاتر از ۷/۸ شود. پس از آخرین تعویض بافر و حذف فاز آبی، حدود ۰/۱ حجم آن از بافر Tris–HCl (pH=۸، ۰/۱ M) حاوی ۰/۲ درصد بتا مرکاپتواتانول (ME–۲) افزوده گردد. برای نگه‌داری فنل به‌تعادل‌رسیده، می‌توان بر روی آن مقداری بافر Tris-HCl (pH=۸، ۰/۱ M) اضافه کرد و در شیشه‌ی تاریک و در یخچال به مدت یک ماه نگه‌داری نمود.

مخلوط فنل– کلروفرم شامل قسمت‌های برابری از فنل (۲۵) با کلروفرم حاوی ایزوآمیل الکل (۲۴:۱) می‌باشد. کلروفرم سبب دناتوره شدن پروتئین‌ها و تسهیل جداشدن فازهای آبی و آلی می‌شود و ایزوآمیل الکل سبب ممانعت از ایجاد کف در طی مراحل استخراج می‌شود. این مخلوط هم همانند فنل باید

1. Equilibrated phenol

در زیر بافر تریس در تاریکی و در یخچال نگه‌داری شود.

- چلاتور ماده‌ای است که از طریق اتصال یون‌های خود، به فلزات متصل شده و آن‌ها را از محیط خارج می‌سازد.

۲-۲-٤-۱) روش‌های غیرآلی استخراج DNA

در این روش‌ها از مواد آلی مانند فنل و یا کلروفرم استفاده نمی‌شود. چند نمونه از این روش‌ها عبارتند از:

ترسیب پروتئین توسط غلظت بالای نمک و pH پایین[1]: در این روش پروتئین‌ها با استفاده از غلظت بالای نمک‌ها رسوب‌داده شده و از محلول خارج می‌شود. از نمک‌های مـورد استفاده می‌توان به استات‌سدیم و کلرید لیتیم اشاره نمود. به علت استفاده از نمک‌ها در غلظت‌های بالا، DNA استخراج شده، باید به خوبی شسته شود. حضور نمک‌های اضافه، به خصوص در RFLP، سبب ایجاد پدیده‌ی جابه‌جایی باندها[2] یا تغییر حرکت DNA شده و در نتیجه‌ی آزمایش تأثیر می‌گذارد. مراحل اصلی آن به ترتیب زیر است:

الف) تخریب یا لیز سلولی با استفاده از بافرهای لیزکننده، که غشاهای سلولی را تخریب می‌کنند؛ اما هسته‌ها دست‌نخورده باقی مانده و در نتیجه رسوب می‌کنند.

ب) غشای هسته در بافر لیزکننده‌ی پروتئین‌ها و غلظت بالای پروتئیناز در دمای ۶۵ $^{\circ}C$ در طی ۲ ساعت تخـریب می‌شود. حرارت به دناتوره

1. Salting Out
2. Band Shift

شدن پروتئین‌ها کمک کرده و سبب خودهضمی پروتئیناز می‌شود.

ج) برای حذف پروتئین‌ها، کلرید لیتیم تا غلظت نهایی ۲/۵ مولار استفاده می‌شود که در نتیجه، پروتئین‌ها رسوب کرده و با کمک سانتریفوژ از محلول حذف می‌شوند.

❖ **مکانیسم رسوب با نمک[1]:** افزودن یک نمک خنثی مانند آمونیم سولفات سبب افزایش برهم کنش بین پروتئین‌ها می‌شود. با افزایش غلظت نمک در محلول، بیشتر مولکول‌های آب، اطراف یون‌ها را احاطه کرده و باعث تجمع پروتئین‌ها و رسوب آن‌ها می‌شوند. به عبارتی در غلظت‌های بالای نمک، از حلالیت پروتئین کاسته می‌شود. این اتفاق در هنگام استفاده از غلظت مناسب نمک به‌صورت خودبه‌خود، انجام می‌شود (شکل ۳-۱).

شکل ۳-۱: **روش غیرآلی رسوب DNA با نمک.** افزودن یک نمک خنثی سبب افزایش برهم کنش بین پروتئین‌ها می‌شود. با افزایش غلظت نمک در محلول، مولکول‌های نمک اطراف پروتئین‌ها را احاطه کرده و باعث تجمع پروتئین‌ها و رسوب آن‌ها می‌شوند. دایره‌های کوچک، مولکول‌های نمک و دایره‌های بزرگ، پروتئین‌ها را نشان می‌دهند.

1. Salting out

❖ **شیب کلرید سزیـوم (CsCl):** در این روش از CsCl در تکنیک "سانتریفوژ ایزوپیکنیک[1]" استفاده می‌شود. نیروهای سانتریفوژ و انتشار، شیب دانسیته‌ای را ایجاد می‌کنند که سبب جداسازی مولکول‌های مخلوط بر اساس دانسیته‌ی مولکولی آن‌ها می‌شود. یک شیب غلظت بر اساس رسوب تعادلی خودبه‌خودی، به صورت لایه‌ای ایجـاد می‌شود و سپس مولکول‌ها در لایه‌هایی که با آن‌ها دانسیته‌ی برابر دارند قرار می‌گیرند.

اصطلاح ایزوپیکنیک به معنی دانسیته‌ی برابر است. برای خالص‌سازی DNA، مخلوط کلرید سزیم و DNA برای چندین ساعت در سانتریفوژ در سرعت بـالا حدود g ۱۰۰۰۰۰ قرار می‌گیرد. علت استفاده از کلرید سزیم، تشابه دانسیته‌ی آن در غلظت g/ml ۱/۷ با دانسیته‌ی DNA است. بعد از مدتی که شیب کلریدسزیم ایجاد می‌شود دو نیروی مخالف هم، انتشار و سانتریفوژ، ایجاد می‌شوند که نزدیک انتهای لوله متمرکز می‌شوند. نیروی انتشار با توجه به شیب غلظت کلریدسزیم حل‌شده، افزایش می‌یابد و به سمت مرکز دستگاه سانتریفوژ متمایل می‌شود. توازن میان این دو نیروی تولیدشده، سبب ایجاد شیب دانسیته‌ی پایداری می‌گردد که در انتهای لوله، دارای دانسیته‌ی بیشتری است و در بالای لوله، دانسیته‌ی کمتری دارد. مولکول‌های DNA سپس بر اساس نسبت AT (آدنین و تیمین) به GC (گوانین و سیتوزین) جدا می‌شوند. یک AT دارای وزن مولکولی کمتری نسبت به GC می‌باشد؛ بنابراین از دو مولکول DNA با

1. Isopycnic

طول برابر، مولکولی که دارای نسبت AT بیشتری است؛ دانسیته‌ی کمتری دارد. پروتئین‌ها دارای دانسیته‌ی کمتر هستند و RNA و پلاسمیدهای سوپرکویل از مولکول‌های خطی DNA، دارای دانسیته‌ی بیشتری می‌باشند (شکل ۴-۱). برای مشاهده‌ی باندهای DNA از اتیدیوم برماید استفاده می‌شود که با تابش اشعه‌ی نور ماورای بنفش (UV) قابل دیدن می‌گردند. این روش بسیار دقیق است؛ اما برای کارهای معمول آزمایشگاهی مقرون به صرفه نیست؛ ضمن آن‌که استفاده از اتیدیوم برماید خطرات ایمنی خاص خود را دارد.

شکل ۴-۱: **روش استفاده از کلرید سزیم:** مولکول‌های مختلف در شیب نمک کلرید سزیم بر اساس دانسیته جدا می‌شوند. دانسیته‌ی DNA در غلظت ۱/۷ mg/ml با دانسیته‌ی DNA برابر است.

اتیدیوم برماید به واسطه‌ی ساختمان مسطحی که دارد در بین بازهای متصل بین دو رشته قرار گرفته و سبب بازشدن مختصر دو رشته‌ی مارپیچ DNA می‌شود. حاصل این بازشدن پیچش، کاهش دانسیته در حد $۰/۱۲۵\ g/cm^3$ است. DNA سوپرکویل که دو انتهای آن بسته است آزادی کمی برای باز شدن دارد و به مقدار کمی از کلریدسزیم متصل می‌شود. کاهش دانسیته‌ی مولکول

سوپـر کویل کمتر و حدود $0/085\ g/cm^3$ است؛ در نتیجه مولکول‌های سوپر کویل در شیب در مکان متفاوتی از DNA خطی و حلقوی بدون پیچش قرار می‌گیرند (شکل ۵-۱).

شکـل ۵-۱: **اتیدیوم برماید.** این ماده به واسطه‌ی ساختمان مسطحی که دارد، در بین بازهای متصل بین دو رشته‌ی DNA، خود را جای می‌دهد و در اثر تابیدن نور UV، به صورت فلورسنس دیده می‌شود. اتیدیوم برماید با همین مکانیسم سبب ایجاد جهش می‌شود.

موقعیت باندهای DNA با تاباندن نور UV، که سبب می‌شود اتیدیوم برماید به صورت فلورسنس دیده شود، قابل مشاهده است. لوله‌ی حاوی سزیم کلرید به وسیله‌ی یک سرنگ سوراخ شده و DNA بیرون کشیده می‌شود. اتیدیوم برمایـد متصل‌شده به DNA با استفاده از بوتانول از محیط خارج شده و کلرید سزیم به وسیله‌ی دیالیز حذف می‌شود (شکل ۶-۱). حاصل این روش، DNA با خلوص ۱۰۰% می‌باشد.

شکل ۶-۱: **نحوه‌ی خالص‌سازی DNA جدا شده از شیب کلرید سزیم.** نمک به‌وسیله‌ی دیالیز و اتیدیوم برماید به‌وسیله‌ی بوتانول حذف می‌شوند.

❖ **کروماتوگرافی با استفاده از رزین‌های مبادله‌ی یونی یا ماتریکس‌های متصل‌شونده به DNA:** استفاده از ذرات سیلیکا یا شیشه از ساده‌ترین راه‌های خالص‌سازی DNA است. DNA در حضور ترکیبات نمک‌های کائوتروپیک[1] به ذرات سیلیکا متصل می‌شود؛ در حالی‌که پروتئین‌ها و لیپیدها به ذرات سیلیکا متصل نمی‌شوند. علت اتصال DNA به ذرات سیلیکا وجود بارهای منفی در سطح آن‌ها و حضور بارهای مثبت در سطح ذرات سیلیکاست. پس از شستشوی ذرات سیلیکا، مولکول‌های DNA آزاد شده و به صورت خالص جمع‌آوری می‌شوند (شکل ۷-۱).

1. Chaotropic Salt

- یک ماده‌ی کائوتروپ[1] به ماده‌ای اطلاق می‌شود که ساختمان سه بعدی ماکرومولکول‌هایی مانند پروتئین‌ها، DNA و RNA را تخـریب و آن‌ها را دناتوره می‌کند. مواد کائوتروپ با پیوندهای بین مولکولی غیرکووالان، مانند پیوندهــای هیدروژنی، واندروالــس و هیدروفوب تداخل می‌کنند. مهم‌تریــن مواد و نمک‌های کائوتروپ عبارتند از: اوره ، تیواوره [2]، کلرید گوانیدیم و پرکلرات لیتیم.

شکل ۷-۱: **روش استفاده از ذرات سیلیکا.** در این روش DNA دارای بار منفی به ذرات سیلیکای دارای بار مثبت متصل می‌شود؛ در حالی که پروتئین‌ها و لیپیدها به ذرات سیلیکا متصل نمی‌شوند.

1. Chaotrope
2. Thiourea

❖**ذرات چلکس**[1]: ذرات آنیونی مصنوعی یا رزین‌هایی با قابلیت تعویض یونی بوده که حاوی یون‌هایی با بار منفی[2] هستند. این ذرات به صورت گروه‌های جاذب یون‌های فلزی چند ظرفیتی مانند منیزیم عمل می‌کنند. حذف منیزیم سبب تخریب و غیرفعال‌شدن آنزیم‌های هیدرولیزکننده‌ی DNA می‌شود (حضور یون منیزیم برای فعالیت آنزیم DNase ضروری می‌باشد).

Chelex-100 محصولی از شرکت Bio-Rad بوده که تمایل زیادی به جذب یون‌های کلسیم، منگنز و منیزیم دارد و آن‌ها را از DNA دور نگه می‌دارد. ذرات فلزات سنگین در صورت حضور در محلول حاوی DNA در دماهای بالا، حدود $100\ ^{\circ}C$، سبب آسیب‌رساندن به DNA می‌شوند.

۵-۱) حذف RNA از DNA خالص

مولکول‌های RNA در طی روش‌های خالص‌سازی به همراه DNA نیز جدا می‌شود. چنانچه RNA موجود در DNA استخراج شده، سبب ایجاد خطا در آزمایش‌ها شود، بنابراین می‌بایست آن را از محلول DNA خالص‌شده حذف نمود. حذف RNA، توسط آنزیم لیزکننده‌ی آن، یعنی RNase انجام می‌گیرد که در واقع به واسطه‌ی عمل آن، RNA تجزیه می‌شود.

---

1. Chelex
2. Styrene Divinylbenzene Copolymers Containing Paired Iminodiacetate Ions

۶-۱) جداسازی انواع DNA

در طی روش‌های استخراج شرح‌داده شده، انواع DNA در اندازه‌ها و شکل‌های مختلف به‌دست می‌آید. هنگام استخراج DNA از یک باکتری، پلاسمیدهای حلقوی نیز به همراه انواع کروموزومی جدا می‌شوند. برای جداسازی انواع DNA، از تفاوت‌های فیزیکی مانند اندازه و شکل آن‌ها استفاده می‌شود. در حالی‌که پلاسمیدها ساختارهای حلقوی کوچک دارند، کروموزوم‌ها به صورت خطی یا حلقوی بزرگ می‌باشند (شکل ۸-۱).

برای جداسازی DNAهای متفاوت، می‌توان از شیب کلرید سزیم، الکتروفورز و کروماتوگرافی استفاده کرد.

شکل ۸-۱: **استفاده از تفاوت‌های فیزیکی مانند اندازه و شکل برای جداسازی انواع DNA:** پلاسمیدها ساختارهای حلقوی کوچکی دارند اما کروموزوم‌ها اندازه‌های بزرگ دارند.

- جداسازی DNA از سلول‌های گیاهی و جانوری با جداسازی آن از باکتری‌ها، متفاوت است. این تفاوت‌ها مخصوصاً در مرحله‌ی شکستن سلولی وجود دارد. مـواد شیمیایی مؤثر بر دیواره‌ی باکتری‌ها، معمولاً بر انواع سلول‌های دیگر اثر ندارند. به عنوان مثال لیزوزیم بر سلول‌های گیاهی اثر ندارد؛ آنزیم‌های تجزیه‌کننده‌ی خاصی برای سلول‌های گیاهی مانند پکتولیاز و سلولاز در دسترس هستند و روش‌های فیزیکی مانند له‌کردن نیز مؤثرترند. سلول‌های حیوانی، دیواره‌ی سلولی ندارند و به سادگی با استفاده از دترجنت‌ها لیز می‌شوند.

نکته‌ی مهم دیگر، توجه به محتویات بیوشیمیایی سلول‌هایی است که DNA از آن‌ها استخراج می‌شود. در سلول‌های باکتریایی، مهم‌ترین مـواد شیمیـایی، پروتئین‌ها، DNA و RNA هستند؛ بنابراین استفاده از روش‌های فنل–کلروفرم و یا استفـاده از پروتئازها، کافی می‌باشد. این روش‌ها برای سلول‌هایی که حاوی مقادیر زیادی مـواد بیوشیمیایی دیگر هستند، کارآمد نمی‌باشند. سلول‌های گیاهی دارای مقادیر زیادی کربوهیدرات هستند که به روش فنل–کلروفرم استخراج نمی‌شوند و روش‌های دیگری باید استفاده شوند.

- استفاده از CTAB که نوعی دترجنت است و با اسیدهای نوکلئیک، کمپلکس نامحلول می‌دهد، روشی مناسب برای سلول‌های گیاهی است. وقتی CTAB بـه عصاره‌ی سلولی گیاهی افزوده می‌شود، کمپلکس تشکیل‌شده، رسوب می‌کند؛ در حالی‌که بقیه‌ی مواد مانند کربوهیدرات‌ها و پروتئین‌ها رسوب نمی‌کنند (شکل ۹–۱). سپس رسوب به‌وسیله‌ی سانتریفوژ

جمع‌آوری‌شده و با محلول نمک طعام ۱ مولار شسته می‌شود که این عمل سبب شکسته‌شدن کمپلکس و آزادشدن DNA می‌شود. اسیدهای نوکلئیک به وسیله‌ی اتانول رسوب‌داده شده و تغلیظ می‌گردند و RNA نیز با استفاده از RNase حذف می‌شود.

شکل ۹-۱: **استفاده از CTAB جهت خالص‌سازی DNA از سلول‌های گیاهی.** CTAB با DNA، کمپلکس تشکیل داده که در نتیجه رسوب می‌کنند.

- روش دوم استفاده از ترکیبی به نام گوانیدیم تیوسیانات است که دارای دو خاصیت ویژه است که در خالص‌سازی DNA به‌کار می‌رود. خاصیت اول این است که همه‌ی مواد بیوشیمیایی، به غیر از اسیدهای نوکلئیک را دناتوره و نامحلول می‌کند و بنابراین برای جداسازی DNA از هر سلول و بافتی به کار

می‌رود. خاصیت دوم این‌که در حضـور این ماده، DNA بـه ذرات سیلیکا متصل می‌شود. با استفاده از کروماتوگرافی با ذرات سیلیکا، همان‌طور که در شکل ۱۰-۱ دیده می‌شود، تنها DNA متصل‌شده به ذرات سیلیکا خالص می‌شود که با شستشو به وسیله‌ی آب جدا می‌شود.

شکل ۱۰-۱: **روش استفاده از گوانیدیم تیوسیانات.** این ماده، همه‌ی مواد بیوشیمیایی به غیر از اسیدهای نوکلئیک را دناتوره و نامحلول می‌کند و بنابراین برای جداسازی DNA از هر سلول و بافتی به‌کار می‌رود؛ ضمناً در حضور این ماده، DNA به ذرات سیلیکا متصل می‌شود.

۷–۱) جداسازی DNA از اندامک‌های سلولی

اندامک‌های سلولی مانند میتوکندری و کلروپلاست در گیاهان، دارای DNA هستند که از DNA ژنومی متفاوت می‌باشند. در DNA میتوکندری جهش‌هایی اتفاق می‌افتد که این جهش‌ها با بیماری‌های خاصی مانند دیابت، آلزایمر و اختلالات ماهیچه‌ای مرتبط می‌باشند. برای جداسازی DNAی میتوکندری و کلروپلاست، ابتدا این اندامک‌ها با استفاده از سانتریفوژ جدا شده و سپس DNA آن‌ها جدا می‌شود.

۸–۱) تغلیظ DNA

محلول‌های DNA و RNA به وسیله‌ی اتانول به شرح زیر تغلیظ می‌شوند: حجم DNA اندازه‌گیری شده و حدود ۲/۵–۲ برابر حجم آن اتانول یا ایزوپروپانول خالص افزوده می‌شود. مخلوط به خوبی هم‌زده شده و روی یخ یا در $-۲۰^{\circ}C$ به مدت ۲۰ دقیقه تا یک ساعت نگه‌داری می‌شود. پس از سانتریفوژ، DNA رسوب می‌کند که با افزودن مقداری اتانول ۷۰% جهت حذف نمک‌های همراه با DNA، شستشوی مجدد انجام می‌شود. پس از حذف الکل و خشک‌کردن DNA، می‌توان آن را در حجم مناسبی از بافر تریس حاوی EDTA و یا آب عاری از DNase حل نمود.

بهتر است قبل از افزودن الکل ۱۰۰% ، غلظت کاتیون‌های تک‌ظرفیتی در این حجم تنظیم گردد. جدول ۲–۱ غلظت مناسب نمک‌ها و علت افزودن آن‌ها را بیان می‌کند.

نمک	مولاریته‌ی نهایی مناسب در محلول	اثر
استات آمونیم	۲-۲/۵	ممانعت از آنزیم T4 کیناز
استات سدیم	۳	ممانعت از فعالیت کلنو[1]
استات سدیم	۰/۲	ممانعت از آنزیم DNA پلی مراز وابسته به RNA
استات سدیم	۰/۸	ممانعت از آنزیم DNA پلی‌مراز وابسته به RNA
استات سدیم	۰/۰۱	کمک در رسوب قطعات کوچک DNA و الیگونوکلئوتیدها

جدول ۲-۱: نمک‌های مورد استفاده در تغلیظ DNA که در صورت عدم حذف، سبب مشکلاتی می‌شود.

- استات آمونیم در اتانول خیلی پایدار است و معمولاً با شستشو در اتانول ۷۰%، حذف می‌شود. قابلیت حذف نمک‌های استات‌سدیم و کلریدسدیم با این روش کمتر است.
- معمولاً استفاده از اتانول نسبت به ایزوپروپانول بهتر است؛ زیرا در هنگام استفاده از ایزوپروپانول، مقداری از نمک‌ها رسوب می‌کنند؛ همچنین قابلیت تبخیر آن از اتانول کمتر است. اما چون مقدار کمتری ایزوپروپانول مصرف می‌شود در موارد استخراج حجم‌های بسیار بالایی از DNA، مانند استخراج

1. Klenow

پلاسمید، استفاده از ایزوپروپانول مقرون به‌صرفه‌تر می‌باشد.

برای حذف اتانول از DNA خالص‌شده، می‌توان DNA را به وسیله‌ی قراردادن در هوای آزاد و در دمای اتاق خشک نمود. با حرارت‌دادن ملایم یا قراردادن در دستگاه درای بلاک[1] نیز می‌توان DNA را خشک کرد. با استفاده از پمپ‌های خلأ می‌توان اتانول همراه DNA را حذف کرد؛ اما به دلیل این‌که در این روش، DNA بسیار خشک‌شده و حل‌کردن مجدد آن در بافر سخت است، توصیه نمی‌شود.

برای نمک‌زدایی و خالص‌سازی بیشتر DNA از کیسه‌های دیالیز استفاده می‌شود. برای این منظور باید از کیسه دیالیز با اندازه ۸۰۰۰–۶۰۰۰ استفاده شود؛ این کیسه‌ها باید قبل از استفاده، آماده و مرطوب شوند.

مراحل خالص‌سازی DNA با استفاده از کیسه‌های دیالیز عبارتند از:

الف) شستشوی کیسه دیالیز در ۶۰°C به مدت ۳۰ دقیقه در حجم بالایی از سدیم بی‌کربنات ۲% (حدود یک لیتر) حاوی EDTA ۱%.

ب) شستشوی غشاهای دیالیز با آب مقطر.

ج) نگه‌داری غشا در ۴°C و در محلول فرمالدئید ۱% یا سدیم بنزوات ۱% یا سدیم آزید ۱% در آب مقطر دیونیزه یا اتانول ۱۰۰%.

د) حرارت‌دادن غشاهای دیالیز در دماهای بالاتر از ۸۰°C سبب کاهش تراوایی غشاها می‌شود.

ه) برای ممانعت از چسبندگی پروتئین‌های باردار به غشا، بهتر است غشای

1. Dry Block

دیالیز در بافر تریس حاوی آلبومین سرم گاوی (BSA)[1] ۰/۰۵٪ خیسانده شوند.

- کیسه‌های دیالیز نوعی غشای نیمه تراوا هستند که از سلولز یا سلوفان قابل تجزیه درست شده‌اند و برای انتشار یا اسمز استفاده می‌شود. در حالت انتشار، مولکول‌های کوچک مانند نمک، از محل دارای غلظت زیاد به محل با غلظت کم نمک منتقل می‌شوند. اندازه‌ی سوراخ‌های این غشاها متفاوت بوده و بسته به اندازه‌ی مولکول‌های هدف انتخاب می‌شوند. اندازه‌ی این حفره‌ها با میزان cut-off بیان می‌شود. این عدد نشانگر حد پایین عبور مولکول‌ها در آن اندازه هستند. به عنوان مثال یک غشای دیالیز با cut-off ۶۰۰۰ فقط اجازه‌ی عبور به مولکول‌هایی با اندازه‌ی کمتر از ۶۰۰۰ دالتون را می‌دهد. با توجه به آبگیری مولکول‌ها معمولاً cut-off دو برابر اندازه‌ی مولکول انتخاب می‌شود.

۹–۱) نگه‌داری و ذخیره‌سازی DNA

در نظرگرفتن نکات زیر در ذخیره‌سازی مولکول‌های DNA و RNA مهم هستند:

- فلزات سنگین سبب شکستن پیوندهای فسفودی استر نوکلئوتیدها می‌شوند. در غیاب فلزات سنگین، اتانول به DNA آسیبی نمی‌رساند.
- EDTA، چلاتور فلزات دو ظرفیتی می‌باشد.

1. BSA: Bovine Serum Albumin

- رادیکال‌های آزاد که از شکستن مواد شیمیایی و نیز تشعشعات، حاصل می‌شوند سبب شکستن پیوندهای فسفودی استرنوکلئوتیدها می‌شوند.
- نور UV در ۲۶۰ نانومتر سبب ایجاد ضایعاتی از قبیل ایجاد دایمرهای تیمینی و پیوندهای متقاطع و ازدست‌رفتن خصوصیات بیولوژیکی می‌شود. تشعشع UV در ۳۲۰ نانومتر نیز، با قدرت کمتری، سبب این پیوندهای متقاطع می‌شود.
- اتیدیوم برماید با استفاده از نور مرئی و اکسیژن، سبب پدیده‌ی فتواکسیداسیون می‌شود. محصولات اکسیداسیون سبب شکستن پیوندهای فسفودی استری می‌شوند.
- نوکلئازها روی پوست انسان یافت می‌شوند؛ بنابراین از تماس مستقیم یا غیرمستقیم بین دست و اسیدهای نوکلئیک باید جلوگیری شود.
- بیشتر DNaseها خیلی پایدار نیستند؛ اما اکثر RNaseها دارای پایداری بالایی بوده و در سطح دست‌کش و وسایل پلاستیکی، فعال باقی می‌مانند.
- نگه‌داری DNA در دمای $۴^{\circ}C$ یکی از بهترین و ساده‌ترین روش‌ها است.
- نگه‌داری طولانی DNA در دمای $۲۰^{\circ}C$ سبب شکستن و آسیب به DNA می‌شود و برای نگه‌داری طولانی‌مدت، دمای $-۷۰^{\circ}C$ مناسب‌تر است.
- بهترین راه برای نگه‌داری طولانی‌مدت DNA، ذخیره‌سازی در غلظت بالای نمکی (بالاتر از یک مولار) و در حضور غلظت بالای EDTA بالاتر از ۱۰ mM و در pH=۸/۵ است.

- نگه‌داری DNA در کلریدسزیم بدون اتیدیوم‌برماید، در تاریکی و دمای ۴°C بهترین راه نگه‌داری DNA است.
- نگه‌داری DNA درون فاژ، بهتر از نگه‌داری آن به صورت خالص است.
- متداول‌ترین راه نگه‌داری DNA، ذخیره‌سازی در بافر TE و در دمای ۲۰°C- است.

اهمیت بافر Tris-EDTA (TE)

بافر تریس از پرمصرف‌ترین بافرها در بیولوژی مولکولی می‌باشد. تریس یک بافر مناسب بوده و EDTA نیز با جذب یون منیزیم مانـع فعالیت آنزیم DNase می‌شود؛ در واقع این بافر، DNA و RNA را از تجزیه حفظ می‌کند. برای نگه‌داری RNA، مناسب‌ترین بافر TE، با pH =۷/۵ و برای DNA با pH =۸ است. برای تهیه‌ی این بافر ابتدا محلول تریس بازی ۱۰ mM را با اسید کلریدریک به pH=۸ رسانده و سپس ۱ mM از EDTA افزوده شود. بهتر است این محلول قبل از استفاده استریل گردد.

۱۰-۱) استخراج DNA در خانه

به دلیل این‌که گریگور مندل، پدر علم ژنتیک، مطالعات خود را بر روی دانه‌های نخود انجام داد، و این منبع، در دسترس و عاری از آلودگی‌های احتمالی و دارای بافتی نرم می‌باشد، در آزمایشگاه‌های زیست‌شناسی، جهت استخراج DNA از دانه‌های نخود سبز تازه استفاده می‌شود. این روش را می‌توان برای سایر میوه‌ها و نیز گوشت به‌کار برد. این روش صرفاً جنبه‌ی آموزشی داشته و به دلیل کیفیت پایین آن جهت بررسی‌های آزمایشگاهی استفاده نمی‌شود.

مراحل این روش، به شرح زیر است:

- **مرحله‌ی اول:** مخلوط کردن و خردکردن بافت‌ها

حدود نصف فنجان نخود سبز به همراه یک فنجان آب سرد و کمی نمک طعام (در حد یک هشتم قاشق چای‌خوری) را در یک آسیاب ریخته و به مدت ۱۵ ثانیه با دور بالا مخلوط کنید که در نتیجه سوپی به‌دست آمده که با عبور از یک صافی نرم مانند چای‌صاف‌کن، مایعی یکنواخت حاصل می‌شود.

- **مرحله‌ی دوم:** افزودن دترجنت

حدود ۲ قاشق از دترجنت‌های در دسترس، مانند مایع ظرف‌شویی و یا پودر رخت‌شویی را به مایع افـزوده و مخلوط کنید. به مخلوط اجازه دهید که حدود ۱۰–۵ دقیقه در محیط بماند.

در مرحله‌ی آسیاب‌کردن، سلول‌ها به روش فیزیکی از همدیگر جدا می‌شوند اما DNA همچنان درون سلول‌ها محبوس می‌باشد. DNA در واقع بـه واسطه‌ی دو غشـای سلولی و هسته، درون سلول حفظ می‌شود. برای استخراج DNA، این دو غشا باید تخریب شوند. دترجنت‌ها مانند صابون دارای خاصیت آمفی پاتیک بوده و سبب تخریب ساختار مولکول‌های چربی و پروتئین موجود در غشاها می‌شوند.

- **مرحله‌ی سوم:** افزودن یک آنزیم

می‌توان از آنزیم‌های موجود در خانه، مانند آب میوه‌های کیوی و آناناس که حاوی آنزیم‌های پروتئاز می‌باشند استفاده نمود. محلول‌های شستشوی لنزهای تماسی نیز حاوی آنزیم می‌باشند. تنها استفاده از یک تا دو قطره کافی

است. پس از افزودن آنزیم، مخلوط را به آرامی هم بزنید. این پروتئازها سبب تجزیه‌ی سریع پروتئین‌های هیستونی شده و DNA رها می‌گردد.

- **مرحله‌ی چهارم:** رسوب با الکل

هم حجم مخلوط، الکل طبی را به آرامی به آن افزوده که در نتیجه DNA رها شده و به صورت کلاف‌هایی سفید رنگ دیده می‌شود که آن‌ها را با یک میله‌ی شیشه‌ای یا چوبی می‌توان جمع نمود. چون چگالی آب از الکل بیشتر است، آب در پایین لوله قرار می‌گیرد که پروتئین‌ها و چربی‌ها را نیز در خود دارد.

۱۱-۱) تعیین غلظت DNA

جهت استفاده از DNA در آزمایش‌های مختلف بعد از استحصال، اغلب باید غلظت آن تعیین گردد. روش‌های طیف‌سنجی و سنجش با نور فلورسنس از مهم‌ترین روش‌های تعیین غلظت اسیدهای نوکلئیک هستند.

❖ **روش طیف‌سنجی:** برای محلول‌های خالص DNA، ساده‌ترین روش تعیین غلظت؛ خواندن جذب در ۲۶۰ نانومتر است. میزان جذب یا OD[1] برابر ۱ در طول مسیر ۱ سانتی‌متری برای DNA دو زنجیره‌ای معادل ۵۰، برای RNA و DNA تک‌زنجیره‌ای ۴۰ و برای الیگونوکلئوتیدها ۳۳-۲۰ می‌باشد. جذب نسبی ۲۶۰ به ۲۸۰، تخمینی از خلوص محلول را نشان می‌دهد. این نسبت برای محلول‌های خالص RNA و DNA به ترتیب ۲ و ۱/۸ است. این روش برای مقادیر کم RNA و DNA (یعنی

1. OD: Optical Density

کمتر از ۱μg/ml) مناسب نیست. استحصال مقادیر کمتر از ۱/۸، بیانگر آلودگی نمونه با پروتئین و یا فنل اســت. دستگاه نانودراپ[1]، طیف‌سنج بسیار دقیقی است که به منظور سنجش اسیدهای نوکلئیک در مقادیر کم طراحی شده است.

میزان جذب در ۲۶۰ × فاکتور رقت × (μg/ml)۵۰ = (DNA μg/ml) غلظت

❖ روش سنجش فلورســنس با استفاده از اتیدیوم برماید: میزان DNA موجود در یک محلول با میزان فلورسنس ساطع‌شده به‌وسیله‌ی اتیدیوم برماید در آن محلول نســبت دارد. رقت‌های نامعلوم DNA در حضور ۲ μg/ml اتیدیوم برماید با رقت‌های معلوم یک DNA استاندارد در ژل آگارز مقایسه و محاسبه می‌شود.

۱۲–۱) روش‌های عملی استخراج DNA

۱–۱۲–۱) استخراج DNA از خون تام به روش نمکی[2] و غیرآنزیمی

در این روش در ابتدا گلبول‌های قرمز و سفید، لیز شده و سپس به وسیله‌ی بافرهای نمکی، پروتئین‌ها حذف می‌شــوند. DNA توسط اتانول استخراج و نمک‌زدایی شده و در نهایت به صورت محلول نگه‌داری می‌شود. جدول ۳–۱ بافرها و مواد تشــکیل دهنده‌ی مورد نیاز به این روش را نشــان می‌دهد. این بافرها در آب مقطر دوبار تقطیر (ddH2O) تهیه شده و استریل می‌شوند.

1. Nano Drop
2. Salting Out

شماره	نام بافر	مواد تشکیل‌دهنده
۱	بافر لیزکننده‌ی سلول (CLB)[1]	سوکروز (۰/۳۲ M)
		$MgCl_2$ (۱ M)
		تریتون X-۱۰۰ (۱٪)
		بافر Tris-HCl (pH=۷/۷، ۲ M)
۲	بافر TKM۱	بافر Tris-HCl (pH=۷/۶، ۲ M)
		KCl (۳ M)
		$MgCl_2$ (۱ M)
۳	بافر TKM۲	بافر Tris-HCl (pH=۷/۶، ۲ M)
		KCl (۳ M)
		$MgCl_2$ (۱ M)
		NaCl (۵ M)
		EDTA (۰/۵ M)
۴	SDS	٪۱۰
۵	NaCL	۶ M
۶	بافر TE	بافر Tris-HCl (pH=۷/۷، ۲ M)
		EDTA (pH=۸، ۰/۵ M)

جدول ۳-۱: بافرها و مواد لازم جهت استخراج DNA از خون تام به روش نمکی

1. CLB: Cell Lysis Buffer

روش کار:

برای جلوگیری از انعقاد خون، ۱ ml از EDTA ۱۰% به ۱۰ ml خون اضافه می‌شود. برای استخراج DNA از ۳ ml خون تام، ابتدا ۹ ml از محلول CLB را در یک لوله آزمایش ریخته و خون تام را به آن اضافه می‌کنیم (این مرحله جهت لیزکردن سلول‌های قرمز انجام می‌شود)، سپس نمونه‌ها را با دور ۲۵۰۰ RPM به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ می‌کنیم. پس از آن محلول رویی را سریعاً دور ریخته و رسوب انتهای لوله را نگه می‌داریم. در صورت لیزنشدن گلبول‌های قرمز، مرحله فوق را با مقدار ۲ ml از CLB، که به رسوب اضافه می‌شود، تکرار می‌کنیم.

در مرحله بعد بر روی رسوب مقدار ۵ ml از محلول TKM1 اضافه می‌کنیم تا دیواره‌ی هسته لنفوسیت‌ها پاره شده و محتویات آن جهت استخراج DNA آزاد شود. این لوله را به مدت ۱۰ دقیقه در دور ۵۰۰ RPM سانتریفوژ می‌کنیم و سپس محلول رویی آن را دور می‌ریزیم که این بار رسوب سفیدرنگی، در انتهای لوله باقی خواهد ماند.

در این مرحله بر روی رسوب مقدار ۱/۵ ml TKM2 اضافه کرده و مقدار ۱۰۰ µl از SDS ۱۰% اضافه می‌کنیم و لوله را به مدت نیم ساعت در دمای ۶۵°C درون حمام آب گرم (بن ماری)، حرارت می‌دهیم. در این مرحله پروتئین‌ها از محیط حذف شده و DNA خالص‌تری به‌دست می‌آید. در صورت حل نشدن رسوب، انکوباسیون را ادامه می‌دهیم تا رسوب کاملاً حل شود. این مرحله

را می‌توان در ۳۷°C به صورت طولانی و انکوباسیون شبانه[1] نیز انجام داد.

پس از این‌که محلول داخل لوله تقریباً شفاف شد، مقدار ۵۷۰ µl از ۶M NaCl را به آن افزوده و مخلوط می‌کنیم و در دور ۲۹۰۰ RPM، به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ می‌کنیم.

در مرحله‌ی بعد، ابتدا در یک لوله آزمایش استریل، مقدار ۴ ml الکل ۹۶٪ سرد می‌ریزیم. پس از اتمام سانتریفوژ، محلول رویی آن را به لوله حاوی الکل ۹۶٪ اضافه می‌کنیم. درب لوله را با پارافیلم مسدود کرده و به آرامی آن را تکان می‌دهیم تا ابر DNA در آن تشکیل شود.

در یک میکروتیوب ۱/۵ ml، مقدار ۱ ml الکل ۷۰% می‌ریزیم و DNA تشکیل شده در لوله را با نوک سمپلر به آرامی به میکروتیوب منتقل می‌کنیم.

در این مرحله، میکروتیوب‌ها را در دور ۱۴۰۰ RPM به مدت ۵ دقیقه سانتریفوژ می‌کنیم. از الکل ۷۰% برای شستشوی محیط از ناخالصی‌ها استفاده می‌کنیم. پس از اتمام سانتریفوژ، رسوب سفیدرنگی در انتهای میکروتیوب دیده می‌شود. محلول رویی آن را دور ریخته و میکروتیوب را با درب باز به مدت ۱۵-۱۰ دقیقه می‌گذاریم تا در محیط خشک شود و الکل آن تبخیر شود؛ البته DNA نباید خیلی خشک شود. چون ساختمان مولکولی آن شکسته می‌شود.

در این مرحله بر روی رسوب، مقدار ۳۰۰ µl از TE که مایع نگه‌دارنده DNA است اضافه می‌کنیم؛ سپس میکروتیوب را یک شب در دمای ۳۷°C در انکوباتور قرار می‌دهیم تا DNA کاملاً حل شود. در مواردی که میزان خون

1. Overnight

کم است، می‌توان با کاهش مقادیر بالا به نسبت مشخص استخراج را انجام داد. ممکن است حین انجام این روش با اشکالاتی روبرو شویم. در ادامه به این مشکلات و روش حل آن‌ها پرداخته می‌شود.

مشکل ۱: در مرحله ۱ رسوب زیاد و قرمز پُر رنگ مشاهده می‌شود.

راه حل: احتمالاً گلبول‌های قرمز به طور کامل لیز نشده‌اند. در مواردی که نمونه‌ی خون مدت زمان طولانی در یخچال یا فریزر نگه‌داری شده است، بروز این مشکل غیرمنتظره نیست و معمولاً با تکرار مرحله ۱ مشکل برطرف می‌شود؛ اما اگر خون تازه تهیه شده است، علت تشکیل این لخته، خوب مخلوط نکردن خون با CLB است.

مشکل ۲: رسوب مرحله ۲ سفید رنگ نیست.

راه حل: محلول رویی از مرحله قبل کاملاً خالی نشده است و بقایای گلبول‌های قرمز هنوز باقی مانده است. می‌توانید مرحله ۲ را با ۱/۵ ml TKM1 تکرار کنید.

مشکل ۳: محلول رویی در مرحله ۵ کاملاً از رسوب جدا نشده‌است و برداشتن محلول رویی به سختی امکان‌پذیر است.

راه حل: در مرحله ۴ محلول NaCl به خوبی با محلول TKM2 و SDS مخلوط نشده است. بهتر است برای اطمینان از خوب مخلوط شدن، آن‌ها را چند بار با سمپلر پیپت کنید و بعد سانتریفوژ نمایید.

۲-۱۲-۱) استخراج DNA از خون به روش جوشاندن

مواد مورد نیاز در جدول ۴-۱ نشان داده شده است.

شماره	نام بافر	مواد تشکیل‌دهنده
۱	بافر A	سوکروز (۰/۳۲ M)
		$MgCl_2$ (۱ M)
		تریتون X-۱۰۰ (۱٪)
		بافر Tris-HCl (pH=۷/۷، ۲ M)
۲	بافر B	بافر Tris-HCl (pH=۷/۶، ۲ M)
		KCl (۳ M)
		MgCl۲ (۱ M)
۳	بافر C	بافر Tris-HCl (pH=۷/۶، ۲ M)
		KCl (۳ M)
		MgCl۲ (۱ M)
		NaCl (۵ M)
		EDTA (۰/۵ M)
۴	بافر D	SDS ٪۱۰
۵	بافر لیز کننده	بافر Tris-HCl (pH=۷/۷، ۲ M)
		EDTA (pH=۸، ۰/۵ M)
۶	بافر TE	بافر Tris-HCl (pH=۷/۷، ۲ M)
		EDTA (pH=۸، ۰/۵ M)

جدول ۴-۱: مواد لازم جهت استخراج DNA از خون به روش جوشاندن

روش انجام کار:

به میزان ۰/۵ ml از محلول EDTA= ۰/۵ M را به ۵ml خون اضافه کرده خوب تکان دهید تا مخلوط شود. سپس ۰/۵ ml از مخلوط را به میکروتیوب ۱/۵ منتقل کنید. ۱ ml از بافر A اضافه کرده، ورتکس کنید. به مدت ۲ دقیقه در دور ۱۲۰۰۰RPM سانتریفوژ کنید. محلول رویی را دور بریزید. اضافه کردن بافر A و شستشو را یک بار دیگر تکرار کنید. به رسوب سفید، ۱۰۰µl محلول C اضافه کرده و ورتکس کنید. میکروتیوب را در حالت شناور و در بسته، بجوشانید. جهت لیز مؤثرتر گلبول‌های قرمز، می‌توان در ابتدا آب مقطر به سلول‌ها اضافه کرد.

میکروتیوب‌ها را از آب جوش خارج کرده و ۲۰ µl از بافر D به آن اضافه کنید. به مدت ۳۰ ثانیه در میکروسانتریفوژ، سانتریفوژ کنید. NaOH موجود در بافر D سبب تخریب دیواره هسته شده و محتویات آن بیرون می‌ریزد و ضمناً سبب رسوب پروتئین‌ها می‌شود. جوشاندن نیز سبب تخریب و لیز بیشتر می‌شود.

محلول رویی حاوی DNA است. ۰/۵ ml از محلول رویی را به لوله جدیدی منتقل کرده و با دو حجم (۱ ml) اتانول ۹۵% سرد، DNA را رسوب دهید. لوله‌ها را به مدت ۱۰ دقیقه در ۱۲۰۰۰ RPM سانتریفوژ کنید. محلول رویی را دور ریخته و رسوب را با الکل ۷۰% شسته و خشک نمایید. رسوب DNA را در ۵۰ µl بافر TE حل کنید.

۳-۱۲-۱) استخراج DNA از خون با استفاده از سیلیکا ژل

مواد و محلول‌های مورد نیاز در جدول ۵-۱ نشان داده شده است که پس

از تهیه بهتر است در دمای اتاق نگه‌داری شوند.

شماره	نام بافر	مواد تشکیل‌دهنده
۱	محلول گوانیدین	(۶۰ M) GuSCN
		(۲۰ mM) EDTA
		تریتون X-۱۰۰ (۱٪)
		بافر Tris-HCl (۱۰ mM ،pH=۶/۵)
		(۱۰ g/l) DTT
۲	مخلوط اتصال‌دهنده	۴ g ژل سیلیکا در ۱۰۰ ml محلول گوانیدین
۳	محلول شستشو	(۱۰ mM ،pH=۸) Tris-HCl
		(۰/۵ M ،pH=۸) EDTA
		(۱٪) SDS
		(۱۰۰ mM) NaCl
		اتانول ۲۵٪

جدول ۵-۱: مواد لازم جهت استخراج DNA از خون به روش سیلیکا

روش کار:

- در لوله‌ای به ۰/۵ ml از خون حاوی ۵۰ mM EDTA به عنوان ضد انعقاد، ۱ ml از مخلوط اتصال‌دهنده[1] افزوده و خوب مخلوط کنید.
- در دمای اتاق به مدت ۳ دقیقه نگه‌داری کنید.
- لوله را به مدت کوتاهی سانتریفوژ نمایید (۳ ثانیه، ۵۰۰۰ g).

1. Binding buffer

- محلول رویی را دور ریخته و شستشوی ژل را با محلول گوانیدین انجام دهید.
- ژل را دو مرتبه با محلول ایزوپروپانول شستشو دهید.
- ژل را یک مرتبه با اتانول مطلق شستشو دهید. اتانول را به طور کامل با حرارت یا خلأ حذف نمایید و ژل را خشک کنید.
- ۱۰۰ µl بافر TE را به ژل سیلیکا افزوده و آن را مخلوط کنید و به مدت ۳ دقیقه در ۶۵°C گرم نمایید.
- مخلوط را دوباره به‌هم زده و سپس برای ۱۰ ثانیه سانتریفوژ کنید.
- محلول رویی حاوی DNA است که به لوله‌ی جدیدی منتقل می‌شود.

۴-۱۲-۱) استخراج DNA از ژل آگارز

برای خالص‌سازی DNA از ژل آگارز از روش‌های مختلفی استفاده می‌شود. در همه‌ی آن‌ها ابتدا قسمتی از ژل رنگ‌آمیزی‌شده با اتیدیوم برماید که در زیر نور UV دیده می‌شود و حاوی باند مورد نظر است، بـا استفاده از تیغ جدا می‌گردد و تا جایی‌که ممکن است، قسمت‌های اضافه‌ی ژل حذف می‌شوند. از آن‌جایی‌که نور UV سبب شکستن DNA می‌شود باید سعی شود مواجهه‌ی DNA با نور UV به حداقل برسد. جهت استخراج DNA از ژل از جریان الکتریکی و سیلیکا ژل استفاده می‌شود.

۱-۴-۱۲-۱) روش الکتروالوشن[1] (جداسازی بر اساس جریان الکتریکی)

در این روش قطعه‌ی ژل مورد نظر (با مقدار کمی از بافر الکتروفورز تازه)

1. Electroelution

در کیسه‌ی دیالیز قرار می‌گیرد و دو طرف کیسه دیالیز مسدود شده و کیسه درون تانک الکتروفورز قرار می‌گیرد. جریان الکتریسیته سبب خروج DNA از ژل شده، اما درون کیسه محبوس می‌ماند. قبل از خروج کیسه از تانک برای مدت کوتاهی جریان برق معکوس شده تا مولکول‌های DNA از دیواره‌ی کیسه جدا شوند و به درون بافر کیسه وارد شوند. سپس بافر کیسه جمع‌آوری شده و DNA با استفاده از اتانول رسوب داده می‌شود. ایـن روش نسبت به روش‌های دیگر زمان‌بر است اما بازده‌ی آن مناسب بوده و بهترین روش جمع‌آوری قطعات بزرگ DNA بزرگ‌تر از ۵ Kb می‌باشد.

۲-٤-۱۲-۱) استخراج DNA از ژل آگارز با استفاده از سیلیکا ژل

در محیطی با غلظت بالای نمک که خنثی است یا pH پایین دارد، DNA به ژل سیلیکا (پودر شیشه) یا خاک دیاتومه (بقایای حاصل جلبک‌های دیاتومه که غنی از سیلیس است)، به طور محکمی متصل می‌شود. از این پدیده، که در واقع اتصال مولکول‌های با بار منفی DNA به ذرات سیلیکا با بار مثبت می‌باشد، برای خالص‌سازی DNA از ناخالصی‌ها استفاده می‌شود. این روش برای قطعات کوچک زیر ۱۰۰ bp مناسب نمی‌باشد. زیرا جداسازی این قطعات کوچک از ذرات شیشه به سختی انجام می‌شود. ذرات شیشه یا سیلیکا را می‌توان در آزمایشگاه تهیه کرده یا به صورت تجاری خریداری نمود. مواد و محلول‌های مورد نیاز در جدول ۶-۱ نشان داده شده است.

شماره	نام بافر	مواد تشکیل‌دهنده
۱	سوسپانسیون سیلیکا	۲ g سیلیکا را در ۱۵ ml آب ریخته و ۳ مرتبه با سانتریفیوژ در دور ۲۰۰۰ G به مدت ۲ دقیقه شسته و پس از حذف آب به اندازه‌ی ۲ برابر حجم سیلیکا، به آن آب افزوده می‌شود.
۲	محلول NaI	NaI (۶ M) به دلیل حساسیت یدید سدیم به نور، این محلول باید در تاریکی و در شیشه‌ی تیره نگه‌داری شود. اگر این محلول زرد شده باشد می‌توانید با افزودن محلول ۱۰٪ اسید استیک به اندازه‌ی ۱:۲۰۰ حجم اولیه، کارایی آن را به حال اول برگردانید.
۳	محلول شستشوی سیلیکا	Tris-HCl (۱۰ mM ،pH=۷/۵) EDTA (۲/۵ mM) NaCl (۵۰ mM) اتانول ۵۰٪

جدول ۶-۱: مواد لازم جهت استخراج DNA به روش سیلیکا

روش کار:

از این روش برای پاک‌سازی نمونه‌های حاوی DNA، مانند حذف مواد واکنش PCR و واکنش‌های هضم آنزیمی و نیز به منظور تغلیظ آن‌ها استفاده می‌شود. این روش شامل مراحل عملی زیر است:

❖ **مرحله‌ی آماده‌سازی نمونه:** قطعه‌ی ژل حاوی DNA به مدت ۵ دقیقه در ۵۵°C حرارت داده شده تا ذوب شود. اگر نمونه محلول است

در حد ۱:۱۰ حجم آن، باید محلول هیدروکسیدسدیم ۳ مولار افزوده شود تا pH آن به زیر ۷ برسد.

❖ **مرحله‌ی اتصال به سیلیکا:** حجم مناسبی از سوسپانسیون سیلیکا، به نمونه افزوده شود. حدود ۲۰۰ ng از DNA به هر µl از سوسپانسیون سیلیکا متصل می‌شود. پس از افزودن سیلیکا، سوسپانسیون خوب هم‌زده می‌شود. سپس رسوب سیلیکا با سانتریفوژ سریع و در دور حداکثر جدا شده و سه مرتبه با ۵۰۰ µl محلول شستشو، شسته می‌شود و با برگرداندن تیوب، محلول شستشو کاملاً از رسوب حذف می‌شود و با خشک‌کردن در هوا، اتانول آن کاملاً تبخیر می‌شود.

❖ **مرحله‌ی جداسازی DNA از سیلیکا:** مقدار کمی از بافر تریس ۱۰ mM یا بافر TE (یا بافر آنزیم‌های محدودکننده در صورت این‌که قرار است DNA توسط آنزیمی هضم رسوب سیلیکا شود)، به رسوب سیلیکا اضافه شود. مخلوط به مدت ۵ دقیقه در ۶۰°C گرم شده؛ سپس با سانتریفوژ به مدت ۲ دقیقه در حداکثر دور، سیلیکا رسوب داده شده و محلول رویی که حاوی DNA است به یک تیوب جدید منتقل شود.

۵-۱۲-۱) جداسازی مقادیر بسیار کم DNA از مقاطع بافتی به روش سیلیکا ژل

DNA را می‌توان از هر بافتی استخراج و تهیه نمود که البته با توجه به محتویات اصلی بافت‌ها، روش‌ها متفاوت می‌شوند. جهت مطالعات ژنتیکی، DNA معمولاً از نمونه خون جدا می‌شود. در مواردی که دسترسی به بیمار

نباشد، می‌توان خالص سازی را از نمونه‌های آرشیوی که معمولاً پارافینه و یا اسلایدهای رنگ‌شده هستند، انجام داد.

برای بازیابی DNA در حد کمتر از یک میکروگرم از بافت‌هایی که به مواد شیمیایی متفاوتی مانند پارافین، چسب‌های اسلاید آغشته شده‌اند، ابتدا بافت باید در معرض حلال‌های آلی مانند تولوئن و گزیلن قرار گیرد تا آن عوامل حذف و پاک شوند. گزیلن، اکثر مواد شیمیایی در چسب‌ها و پارافین را حل می‌کند.

به این منظور، بافت را در حداقل ۱۰ حجم گزیلن قرار داده و در دمای اتاق به مدت ۳۰ دقیقه با ورتکس متناوب، مخلوط نمایید. با سانتریفوژ در RPM ۱۰۰۰۰ به مدت ۳۰ ثانیه، بافت رسوب می‌کند. بافت را مجدداً در گزیلن تازه قرار داده و دوباره ورتکس و سانتریفوژ کنید. بافت را در اتانول ۹۵% قرار داده و مجدد سانتریفوژ نمایید. شستشو با اتانول را حداقل یک‌بار دیگر تکرار کنید. بافت را با استفاده از خلأ، خشک نمایید.

حداقل ۱۰۰µl از محلول GuSCN Gu-HCl (۶ M) به بافت اضافه شود و مخلوط گردد. مخلوط به مدت ۱۵–۱۰ دقیقه در دمای اتاق و اگر بافت حاوی مقدار زیادی کراتین است (مانند ناخن) در دمای ۶۰ °C نگه‌داری شود تا پروتئین‌ها حل شوند. ۱۰ µl از پودر سیلیکا را اضافه کرده و برای ۵ دقیقه در ۵۷ °C نگه‌داری کنید و گاه گاهی مخلوط نمایید تا ذرات سیلیکا با محلول در تماس کامل باشند. بقیه‌ی مراحل مانند آنچه در قسمت‌های قبل گفته شد، ادامه می‌یابد. ترکیبات گوانیدین مانند گوانیدین هیدروکلرید یا گوانیدین تیوسیانات سبب حل‌شدن ژل آگارز (چه از نوع استاندارد و چه آگارز با نقطه

ذوب پایین) می‌شوند. روش‌های استفاده از سیلیکا ژل بسیار سریع بوده (حدود ۲۰ دقیقه) و از سایر روش‌ها آسان‌تر است.

وقتی از روش سیلیکا استفاده می‌شود، نباید از بافر تریس بورات[1] استفاده شود؛ زیرا مانع اتصال DNA به سیلیکا می‌گردد. با استفاده از سیلیکا می‌توان قطعات بزرگ DNA را جدا نمود. البته باید در مورد قطعات بسیار بزرگ (بالاتر از ۲۰ Kb)، به دلیل احتمال شکستن آن‌ها، احتیاط نمود. از آن‌جا که سایر مولکول‌ها مانند RNA و پروتئین‌ها به ذرات سیلیکا نمی‌چسبند، این روش برای خالص‌سازی DNA از مخلوط‌های واکنش، بسیار مناسب می‌باشد. قطعات کوچک DNA (حدود زیر ۵۰ bp) بـه ذرات سیلیکا نمی‌چسبند و بنابراین از ذرات سیلیکا برای جداسازی الیگونوکلئوتیدها یا نوکلئوتیدهای کوچک استفاده نمی‌شود. پرایمرها، نوکلئوتیدهای آزاد، اضافات لینکرها، آنزیم‌ها و نمک‌ها، بقایای فنل، کلروفرم و اتیدیوم برماید از DNA جدا می‌شوند. این روش برای جداسازی یک محصول PCR، وقتی فقط یک باند تکثیر می‌شود، مناسب است؛ اما برای جداسازی چند محصول باید ابتدا از روش الکتروفـورز استفاده کرد. DNA خالص‌شده برای هر واکنش بیولوژی مولکولی مانند هضم آنزیمی، کلونینگ، تعیین توالی و ... مناسب است. ذرات ریز سیلیکا واکنش‌ها را منع نمی‌کنند و بنابراین می‌توان از ذرات سیلیکای متصل‌شده به DNA برای واکنش‌های مختلف، بدون جداسازی DNA استفاده کرد.

از روش سیلیکا می‌توان در اهداف زیر استفاده نمود:

- حذف هر نوع آگارز

1. Tris-Borate-EDTA

- تغلیظ DNA یا تعویض بافر و یا حذف نمک‌ها.
- حذف پروتئین‌ها بعد از واکنش‌های هضم آنزیمی یا دفسفریلاسیون.
- حذف نوکلئوتـیدهای آزاد، پرایـمرها، پرایمر دایـمر و آنزیـم‌های استفاده شده در واکنش PCR و یا واکنش‌های نشان‌گذاری[1].
- حذف لینکرهای اضافه.
- حذف بقایای فنل، کلروفرم و اتیدیوم برماید.
- خالص‌سازی DNA و پلاسمید آزاد از لیز باکتریایی.

اگر سوسپانسیون پودر سیلیکا، آب خود را از دست داده و خشک شده بود تنها با افزودن آب مقطر هم حجم پودر سیلیکا می‌توان آن را استفاده نمود.

پودر سیلیکا باید در یخچال نگه‌داری شود.

۱۳–۱) الکتروفورز بر روی غشاهای سلولزی DEAE

مولکول‌های DNA در غلظت‌های کم نمک، با اتصالات قوی به غشاهای سلولزی DEAE می‌چسبند. قطعات DNA بر روی ژل آگارز، الکتروفورز می‌شوند تا کاملاً جداسازی انجام شود. سپس قطعه کاغذ نیتروسلولزی را جلوی قطعه ثابت کرده تا حرکت نکند. در طی الکتروفورز DNA مورد نظر، روی کاغذ نیتروسلولز قرار می‌گیرد و سپس کاغذ برداشته شده و در بافر نمکی با غلظت کم قرار گرفته و شسته می‌شود. بعد از این مرحله، کاغذ در محلول نمکی با غلظت بالا به مدت ۳۰ دقیقه در دمای $۶۰^{\circ}C$ نگه‌داری می‌شود تا DNA از کاغذ خارج شود. پیشرفت اتصال DNA به غشا و خروج آن را می‌توان در زیر نور UV

1. Labellling

بررسی نمود. DNA درون محلول به وسیله‌ی اتانول رسوب داده می‌شود. این روش بسیار ساده است و DNA بسیار تمیز و خالصی حاصل می‌شود؛ اما برای قطعات بزرگ‌تر از ۵ Kb مناسب نمی‌باشد؛ زیرا جداسازی آن‌ها از غشا به راحتی انجام نمی‌شود.

در زیر بافرهای مورد نیاز جهت انتقال DNA به روی غشا، در طی الکتروفورز نشان داده شده است. (جدول ۷-۱)

شماره	نام بافر	مواد تشکیل‌دهنده
۱	نمکی با غلظت کم	(۱۰ mM) EDTA
		(۵۰ mM) Tris
		(۱۵۰ mM) NaCl
۲	نمکی با غلطت زیاد	(۱۰ mM) EDTA
		(۵۰ mM) Tris
		(۱ M) NaCl

جدول ۷-۱: بافرهای مورد نیاز جهت انتقال DNA به غشاء در طی الکتروفورز

۱۴-۱) روش استفاده از ژل آگارز با نقطه ذوب پایین (LM)[1]

آگارز با نقطه ذوب پایین نسبت به آگارزهای استاندارد، نقطه‌ی ذوب پایین‌تری داشته و در دمای ۶۵ °C ذوب می‌شود که پایین‌تر از نقطه ذوب بسیاری از مولکول‌ها، به جـز مولکول‌های دو رشته‌ای کوچک DNA می‌باشد. بعد از الکتروفورز روی این نوع ژل، قطعه‌ی ژل بریده شده و پس از افزودن مقدار کمی بافر در دمای ۶۵ °C ذوب می‌شود. سپس DNA را می‌توان به روش‌هایی با استفاده از فنل و کلروفرم و

1. LM: Low Melting Point

یا سیلیکاژل خالص نمود و یا با استفاده از اتانول رسوب داد. این نوع آگارز نیز از واحدهای مکرر گالاکتوز ساخته شده است، اما پیوندهای متقاطع آن کمتر از آگارز معمولی است و در نتیجه در دمای پایین‌تری ذوب می‌شود.

۱۵–۱) استخراج DNA از ژل اکریل آمید

در این روش، نمونه‌ی حاوی DNA بر روی ژل‌های اکریل‌آمید الکتروفورز شده و قسمتی که DNA مورد نظر در آن است برش داده شده و در یک میکروتیوب، با نوک سمپلر پلاستیکی خرد می‌شود. محلول جداسازی نمکی با غلظت بالا به میکروتیوب افزوده شده و میکروتیوب در دمای ۳۷ °C برای چندین ساعت نگه‌داری می‌گردد. قطعات ژل به‌وسیله‌ی سانتریفوژ یا با عبور از فیلتر حذف می‌گردند و DNA به واسطه‌ی اتانول و یا روش سیلیکا ژل رسوب داده می‌شود.

۱۶–۱) استخراج DNA از اسپرم و ریشه‌ی مو

استخراج DNA از اسپرم با روش‌های متداول ذکرشده امکان‌پذیر است؛ اما به جهت این‌که اسپرم مقدار زیادی کلسترول و نمک دارد، با استفاده از بافر فسفات نمکی، کلسترول و نمک از رسوب شستشو داده می‌شود و سپس با استفاده از روش‌های ذکرشده می‌توان استخراج را ادامه داد. در مورد ریشه مو قبل از استفاده از روش‌های ذکر شده، باید مو با اتانول ۷۰% چربی‌زدایی شود و سپس بر روی یک کاغذ صافی در دمای ۶۵ °C خشک گردد. ۰/۵ سانتی‌متر از قسمتی که حاوی ریشه‌های مو است را با قیچی جدا می‌کنیم و به محتویات داخل تیوب ۱۰۰µl بافر (NaOH ۲۰۰mM) و (DTT ۵۰ mM) افزوده و ۱۵ دقیقه در دمای ۹۷ °C حرارت می‌دهیم. ادامه‌ی مراحل، طبق روش‌های قبلی،

انجام می‌شود. این نمونه‌ها به خصوص در پزشکی قانونی و مطالعات دامپزشکی اهمیت زیادی دارند.

۱۷–۱) بازیابی DNA از واکنش‌های PCR

اگر واکنش PCR حاوی روغن معدنی باشد، برای حذف آن ابتدا باید هم‌حجم واکنش، کلروفرم افزود و تیوب را به مدت ۱۵–۱۰ ثانیه ورتکس نمود تا لایه‌ها خوب مخلوط شوند. سانتریفوژ تیوب واکنش به مدت ۲ دقیقه در یک میکـروفیوژ در دور حدود ۷۰۰۰g سبب جداسازی دو فاز آبی و آلی از هم می‌شود. فاز بالایی حاوی DNA یا محصول PCR است و به یک لوله‌ی جدید منتقل شده و برای ادامه‌ی خالص‌سازی DNA می‌توان از روش‌های مختلف مانند سیلیکا ژل و یا فنل–کلروفرم استفاده نمود.

۱۸–۱) استخراج پلاسمید

یکی از مهمترین روش‌های جداسازی پلاسمید DNA، در مقیاس کم آزمایشگاهی روش‌های لیز قلیایی است. این روش‌ها شامل مراحل لیز قلیایی سلول‌های میزبان حاوی پلاسمید، خنثی‌سازی به وسیله‌ی نمک‌های استات که منجر به رسوب DNA ژنومی و پروتئین‌ها می‌گردد و سانتریفوژ برای حذف رسوب می‌باشند. بعد از این مراحل، فاز آبی حاوی پلاسمیدهای DNA بوده که به وسیله‌ی الکل رسوب داده می‌شوند.

در روش لیز قلیایی، سوسپانسیون‌های باکتریایی در معرض دترجنت‌های آنیونی با pH بالا قرار می‌گیرند که در نتیجه دیواره‌ی سلولی آن‌ها شکسته و کروموزوم ژنومی و پروتئین‌ها دناتوره می‌شوند و پلاسمید به درون محلول

رویی رها می‌گردد. بعد از تغییر pH و خنثی‌شدن آن، زنجیره‌های پلاسمید که از هم باز شده‌اند، مجدداً شکل اولیه‌ی خود را باز می‌یابند.

نکته‌ی اساسی که استخراج پلاسمید را از DNA متفاوت می‌کند، مرحله‌ی جداسازی DNA ژنومی از پلاسمیدهای حلقوی است. برای این مرحله از تفاوت در خصوصیات فیزیکی بین مولکول‌های DNA ژنومی و پلاسمیدها مانند شکل، اندازه و موقعیت مکانی در سلول استفاده می‌شود.

❖ **جداسازی پلاسمید بر اساس شکل:** در روش لیز قلیایی، تمام شکل‌های پلاسمید شامل سوپرکویل[1]، حلقوی فاقد پیچش[2] و خطی‌شده[3] با هم رسوب کرده و برای جداسازی آن‌ها می‌توان از روش‌های مختلفی مانند الکتروفورز بر روی ژل آگارز و خالص‌سازی از روی ژل، استفاده از شیب سزیم–کلرید و سانتریفوژ ایزوپیکنیک، کروماتوگرافی بر اساس اندازه، تعویض یون و کروماتوگرافی فاز معکوس استفاده کرد.

❖ **جداسازی بر اساس اندازه:** اگر سلول‌ها در شرایط کنترل‌شده و با احتیاط لیز شوند، فقط مقدار اندکی از DNA کروموزومی شکسته می‌شود. قطعات DNA حاصل، معمولاً به اندازه‌ای بزرگ هستند (بزرگ‌تر از پلاسمیدها) که پس از سانتریفوژ به همراه بقایای سلولی حذف شوند. این پروسه با این واقعیت که کروموزوم‌های باکتریایی به طور فیزیکی به غشای سلولی متصل می‌باشند نیز تشدید می‌شود. روش استفاده از

1. Supercoiled
2. Nicked Circle
3. Linearized

اندازه، همیشه به تنهایی مناسب نیست و بهتر است از راه‌های دیگر مانند تفاوت‌های شکلی استفاده شود.

شکل ۱۱-۱: **شکل‌های مختلف یک پلاسمید.** پلاسمیدها در صورتی‌که دارای پیچش‌های زیاد در رشته‌های خود باشند سوپرکویل نامیده می‌شوند و در صورتی‌که یک رشته آن‌ها بریده شود پیچش‌ها باز شده و در صورتی‌که در هر دو رشته برشی ایجاد شود پلاسمید به صورت خطی در می‌آید. از تفاوت در شکل پلاسمید می‌توان در جداسازی آن‌ها بهره جست. حرکت این شکل‌های متفاوت پلاسمید، در الکتروفورز نیز متفاوت است.

❖ **جداسازی بر اساس موقعیت مکانی DNA ژنومی و پلاسمید**

در سلول: با توجه به این‌که DNA ژنومی به دیواره‌ی سلول متصل است و پلاسمیدها به صورت حلقه‌هایی در سیتوپلاسم سلول آزاد می‌باشند با لیز کنترل‌شده‌ی باکتری‌ها می‌توان این دو نوع DNA را از یکدیگر تفکیک نمود. تخریب سلولی اگر به آرامی و کنترل‌شده صورت گیرد از شکستن DNA ممانعت می‌شود. تیمارکردن باکتری *E.coli* با EDTA و لیزوزیم در حضور سوکروز از تخریب انفجاری باکتری‌ها ممانعت می‌کند و اسفروپلاست‌ها[1] حاصل می‌شوند که در واقع سلول‌هایی با دیواره‌های سلولی نیمه تخریب‌شده و غشای سلولی کامل و دست‌نخورده هستند. سپس لیز سلولی با استفاده از دترجنت‌های غیریونی، مانند تریتون X-۱۰۰ انجام می‌شود. دترجنت‌های یونی مانند SDS، سبب شکسته‌شدن کروموزوم‌ها می‌شوند. در این روش، DNA کروموزومی شکسته نمی‌شود و در نتیجه عصاره‌ی بسیار شفافی به‌دست می‌آید که حاوی پلاسمیدهای سلولی می‌باشد (شکل ۱۲-۱).

1. Spheroplast

شکل ۱۲–۱: **لیز کنترل‌شده‌ی باکتری‌ها.** تیمارکردن باکتری *E. coli* با EDTA و لیزوزیم در حضور سوکروز از تخریب انفجاری باکتری‌ها ممانعت می‌کند و اسفروپلاست‌ها حاصل می‌شوند که در واقع حاوی دیواره‌های سلولی نیمه تخریب‌شده و غشای سلولی کامل و دست‌نخورده هستند. سپس لیز سلولی با استفاده از دترجنت‌های غیریونی مانند تریتون X–۱۰۰ انجام می‌گردد. در این روش عصاره‌ی بسیار شفافی به‌دست می‌آید که حاوی پلاسمیدهای سلولی می‌باشد.

شکل ۱۳-۱: روش لیز قلیایی جهت جداسازی DNA پلاسمیدی

۱-۱۸-۱) استخراج پلاسمید به روش لیز قلیایی در مقیاس کم

بازده استحصال پلاسمید با این روش به تعداد کپی آن در باکتری بستگی دارد و حدود ۵-۳ µg از هر ml کشت اولیه‌ی باکتری می‌باشد. بازده‌ی پلاسمیدهای نوترکیب با توجه به اندازه و نوع قطعه‌ای که وارد پلاسمید شده است، معمولاً کمتر است. بازده کمتر از ۰/۱ µg/ml، نشانگر سمی‌بودن پلاسمید برای باکتری است. در مواردی که پلاسمید دارای اندازه‌ی بزرگ باشد احتمال رسوب و حذف آن به همراه DNA نیز وجود دارد.

شماره	نام بافر	مواد تشکیل‌دهنده
۱	محیط کشت مایع LB[1]	۱۰g تریپتون[1]
		۵g عصاره‌ی مخمر[2]
		NaCl ۱۰g
		مواد فوق با آب مقطر به حجم ۱ لیتر رسانیده می‌شود. برای درست‌کردن محیط جامد، ۱۵ گرم آگار به مواد فوق افزوده می‌شود. می‌توان از پودر LB که به صورت آماده وجود دارد نیز استفاده نمود.
۲	محلول STE	Tris-HCl (pH=۸، ۱۰ mM)
		NaCl (۰/۱ mM)
		EDTA (pH=۸، ۱ mM)
۳	محلول شماره ۱	Tris-HCl (pH=۸، ۲۵ mM)
		EDTA (pH=۸، ۱۰ mM)
		گلوکز (۵۰ mM)
		مواد فوق در ۱۰۰ ml آب دو بار تقطیرشده حل و اتوکلاو شده و در یخچال نگه‌داری شود.
۴	محلول شماره ۲	NaOH (۵ N ،۱۰ µl)
		SDS (۲٪ ، ۵۰۰ µl)
		مواد فوق در ۴۹۰ µl آب دوبار تقطیرشده استریل حل شود. این محلول باید به صورت تازه تهیه گردد.
۵	محلول شماره ۳	KOH (۵ M ،۱۱/۵ µl)
		SDS (۲٪ ، ۵۰۰ µl)
		اسید استیک ۱۱/۵ ml
		مواد فوق در ۲۸/۵ ml آب دوبار تقطیرشده استریل حل شود و در یخچال نگه‌داری شود.

جدول ۸-۱: مواد لازم جهت استخراج و خالص‌سازی پلاسمید

1. Tryptone
2. Yeast Extract

در صورتی‌که مراحل شستشوی پلاسمید به دقت انجام نشود، احتمال بروز مشکلات در آزمایش‌های بیولوژی مولکولی مانند مقاومت به هضم توسط آنزیم‌ها زیاد است. پلاسمیدها، مستعد هضم در برابر DNase می‌باشند و کلیه‌ی محلول‌ها باید عاری از آن و استریل باشند. این روش برای خالص‌سازی پلاسمید از حدود ۲-۱ ml محیط کشت مناسب است.

مواد مورد نیاز در جدول ۸-۱ نشان داده شده است.

روش کار:

- باکتری مورد نظر را روی پلیت محیط کشت جامد کشت دهید.
- تک‌کلنی از کشت مورد نظر را در ۱/۵ ml محیط کشت مایع LB کشت دهید. ظرف حاوی محیط کشت را به مدت ۱۸-۱۶ ساعت در ۳۷ °C در حالی‌که به آرامی تکان‌داده می‌شود، قرار دهید.
- هود را روشن کنید و وسایل لازم را به زیر هود منتقل کنید. ۱/۵ ml از کشت شبانه را در میکروتیوب ۱/۵ ml بریزید.
- میکروتیوب را به مدت ۳۰ ثانیه در سانتریفوژ یخچال‌دار (۴ °C) با حداکثر سرعت سانتریفوژ کنید. سپس مایع بالایی را دور ریخته و رسوب را نگه‌دارید.
- ۵۰۰ ml از محلول سرد STE را به رسوب اضافه کنید. میکروتیوب را به مدت ۳۰ ثانیه در سانتریفوژ یخچال‌دار، با حداکثر سرعت، سانتریفوژ کنید. مایع بالایی را دور بریزید و رسوب را نگه‌دارید.

- ۱۰۰ µl از محلول سرد شماره ۱ را به رسوب اضافه کنید. رسوب را در این محلول ورتکس کنید.
- ۲۰۰ µl از محلول تازه تهیه‌شده‌ی شماره ۲ را به مخلوط فوق اضافه کنید. ۵ مرتبه میکروتیوب را وارونه کنید و میکروتیوب را روی یخ نگه‌دارید.
- ۱۵۰ µl محلول سرد شماره ۳ را به میکروتیوب اضافه کنید. چند مرتبه میکروتیوب را وارونه کنید و میکروتیوب را به مدت ۵–۳ دقیقه روی یخ قرار دهید و سپس به مدت ۵ دقیقه در سانتریفوژ یخچال‌دار با حداکثر سرعت، سانتریفوژ کنید.
- مایع بالایی را به میکروتیوب تمیز دیگری منتقل کنید و یک حجم فنل–کلروفرم ایزوآمیل الکل به آن اضافه کنید.
- مخلوط فوق را خوب تکان دهید و سپس میکروتیوب را ۱۰ دقیقه روی یخ نگه‌دارید و بعد از آن به مدت ۱۰ دقیقه در سانتریفوژ یخچال‌دار، با حداکثر سرعت، سانتریفوژ کنید.
- فاز مایع بالایی را به میکروتیوب تمیز دیگری منتقل کنید و یک حجم کلروفرم ایزوآمیل الکل به آن اضافه کنید.
- به مدت ۵ دقیقه در سانتریفوژ بدون یخچال با حداکثر سرعت، سانتریفوژ کنید و فاز مایع بالایی را به میکروتیوب تمیز دیگری منتقل کنید.
- دو حجم اتانول ۱۰۰% به آن اضافه کنید و ورتکس کنید، دو دقیقه در دمای اتاق نگه‌دارید و سپس به مدت ۵ دقیقه در سانتریفوژ یخچال‌دار با

حداکثر سرعت، سانتریفوژ کنید.

- مایع بالایی را دور بریزید و رسوب را نگه‌دارید و ۱ ml اتانول ۷۰ درصد به رسوب اضافه کنید.
- به مدت ۲ دقیقه در سانتریفوژ بدون یخچال با حداکثر سرعت، سانتریفوژ کنید.
- مایع بالایی را دور بریزید و رسوب را نگه‌دارید.
- رسوب را در مقدار کمی آب دو بار تقطیر استریل که حاوی ۲۰μg/ml RNase A باشد، حل کنید و سپس در فریزر ۲۰°C- نگه‌دارید.

۱۹-۱) خالص‌سازی DNA از ذرات فاژ

تفاوت اصلی استخراج DNA فاژ از استخراج پلاسمید این است که فاژها در واقع از یک عصاره‌ی سلولی جدا نمی‌شوند؛ بلکه از محیط کشت جدا می‌شوند بنابراین باکتری‌ها با سانتریفوژ رسوب‌داده شده و ذرات فاژ از سوسپانسیون جدا شده و DNA با یک مرحله‌ی حذف پروتئینی، پروتئین‌های کپسید فاژ، خالص می‌شوند. خالص‌سازی DNA از فاژها نسبت به روش‌های خالص‌سازی پلاسمید و DNA آسان‌تر می‌باشد ولی مشکل اصلی، کشت فاژهاست. ذرات فاژ به اندازه‌ای هستند که می‌توان آن‌ها را با سانتریفوژ در سرعت‌های بالا رسوب داد. با استفاده از پلی‌اتیلن‌گلیکول (PEG)[1] نیز می‌توان فاژها را رسوب داد. PEG یک پلیمر است که در حضور نمک آب را جذب می‌کند و سبب ایجاد تجمع ماکرومولکول‌ها مانند ذرات فاژ می‌شود. فاژهای

1. PEG: Poly Ethylene Glycol

رسوب‌داده شده سپس با سانتریفوژ جمع آوری شده و می‌توان در حجم کمی بافر حل کرد. معمولاً رسوب، حاوی مقدار کمی از بقایای سلول‌ها و نیز DNA باکتریایی هستند. برای خالص‌سازی بیشتر می‌توان از شیب سزیم‌کلرید استفاده کرد. جهت حذف پروتئین‌های کپسید فاژ از روش فنـل-کلروفرم استفاده می‌شود.

۲۰-۱) استخراج RNA

استخراج RNA همانند خالص‌سازی DNA به چند مرحله‌ی اصلی مانند تخریب سلول‌ها و بافت‌ها، دناتوراسیون کمپلکس‌های نوکلئوپروتئینی و غیرفعال کردن نوکلئازها (RNase برای RNA) وابسته است.

RNA مولکولی ناپایدار است و نیمه‌عمر کوتاهی دارد، بنابراین باید از نمونه‌های تازه استخراج شود. RNA در مقابل آنزیم‌هایی چون RNase ناپایدار است و بنابراین روش‌های آزمایشگاهی استخراج RNA باید مبتنی بر روش‌های عاری از RNase باشند. دناتورانت‌های قوی برای جلوگیری از فعالیت‌هایRNase استفاده می‌شوند که روی RNA تأثیر مخرب چندانی ندارند. همچنین RNaseها مقاوم به حرارت‌اند و اگر تحت دناتوراسیون قرار بگیرند دوباره می‌توانند فعالیت خود را به‌دست آورند، نیاز به کوفاکتور ندارند و به سختی غیرفعال می‌شوند. در استخراج RNA حذف مواد زائد اهمیت زیادی دارد و استفاده از ترکیباتی چون تریزول[1]، کلروفرم و ایزوپروپانول باعث حذف لیپیدها، کربوهیدرات‌ها، پروتئین‌ها، DNA و سایر ناخالصی‌ها می‌شود. روش‌های متفاوتی

1. Trizol

برای استخراج RNA وجود دارد که بسته به نوع بافت (بافت پارافینه یا تازه)، نوع RNA استخراج شده (RNA ویروسی) و استفاده از کیت‌های تجاری، متنوع می‌شوند.

- در صورت آلودگی RNA استخراج شده با DNA و انجام نسخه‌برداری معکوس و سپس PCR، DNA نیز می‌تواند به عنوان الگویی برای PCR عمل کند و سبب کسب نتایج نادرست گردد.
- در صورتی‌که یک ژن شناخته شده بررسی می‌شود می‌توان پرایمرها را به صورتی طراحی کرد که یک اینترون را در بر بگیرند، لذا در صورتی که آلودگی DNA وجود داشته باشد محصول به‌دست آمده حاوی اینترون خواهد بود، ولی محصولات تکثیر شده از روی نسخه‌های mRNA فاقد آن می‌باشند. به این ترتیب DNA محصول بزرگ‌تری از محصول حاصل از mRNA را تولید خواهد کرد. این روش RT-PCR تمایزی اینترون[1] نامیده می‌شود.
- در صورتی که نسخه‌های یک mRNA با فراوانی کم مورد بررسی است، استفاده از mRNA خالص شده، سبب افزایش موفقیت کار می‌شود؛ زیرا غلظت نسبی mRNA هدف، بسیار بیشتر از RNA تام سیتوپلاسمی خواهد بود. کیت‌هایی تجاری که اساس آن‌ها اتصال oligo-dT به دم پلی A موجود در انتهای ′۳ mRNA یوکاریوت‌ها می‌باشد را می‌توان برای خالص‌سازی mRNA استفاده نمود.

1. Intron differential RT-PCR

۱-۲۰-۱) استخراج RNA از خون

روش کار: ابتدا ۱ ml از تریزول را به ۱۰۰µl خون اضافه می‌کنیم. پس از اضافه کردن تریزول بهتر است چند بار پیپتینگ انجام دهیم و ۵ دقیقه لوله را دمای محیط بگذاریم. اضافه کردن ۲۰۰µl کلروفرم باعث ایجاد سه فاز می‌شود که شامل RNA در بالا و لایه سفید میانی پروتئین‌های دناتوره می‌باشد. DNA در همان فازی قرار می‌گیرد که RNA قرار می‌گیرد؛ اما چون سبک‌تر است در قسمت پایین فاز بالایی قرار می‌گیرد. بهتر است پس از اضافه کردن کلروفرم، لوله تکان داده شود و به مدت ۵ دقیقه در محیط گذاشته شود تا فاز بالایی تشکیل شود. سپس به مدت ۵ دقیقه سانتریفوژ در دمای ۴ °C سانتریفوژ شده و لایه‌ی بالایی را با احتیاط به تیوب جدیدی منتقل نموده و به آن ۶۰۰µl ایزوپروپانول اضافه کنید. مایع را چند بار وارونه کنید. لوله‌ی واکنش به مدت ۳۰ دقیقه در فریزر قرار داده شود. ایزوپروپانول به رسوب RNA و شستشوی آن کمک می‌کند. پس از سانتریفوژ در دمای ۴ °C به مدت ۱۵ دقیقه رسوب سفید رنگ RNA در پایین لوله قابل دیدن است. مایع رویی را دور بریزید و به آن ۱ ml اتانول ۷۰% اضافه کنید. اتانول جهت شستشو اضافه می‌شود. ۸-۵ دقیقه سانتریفوژ کنید و سپس لایه رویی را تا حد ممکن جدا کنید و رسوب را خشک کنید. به رسوب ۱۰۰ µl آب تیمار شده با DEPC اضافه کنید (شکل ۱۴-۱).

- تریزول، ماده‌ای است که از ترکیباتی چون فنل گوانیدیوم ایزوتیوسیانات[1] تشکیل شده‌است که دناتوره کننده‌ی قوی پروتئین‌ها و به خصوص RNase است و فنل هم به همراه کلروفرم ایجاد فاز می‌کند. ۱ ml تریزول تقریباً برای ۱۰ میلیون سلول استفاده می‌شود. همچنین تریزول به لیز سلولی کمک می‌کند.
- DEPC یا دی‌اتیل پیروکربنات[2]، این ماده به عنوان غیرفعال کننده‌ی RNAse شناخته می‌شود که با ایجاد تغییرات کووالانسی در رزیجوهای هیستیدین آن‌ها را ناکارآمد می‌کند. DEPC توسط بافرهای تریس و HEPES غیرفعال می‌شود؛ اما می‌توان آن را با بافرهایی مانند فسفات نمکی PBS یا MOPS[3] استفاده نمود. یک نکته‌ی کلی این‌که جهت حذف RNase از بافرها یا آنزیم‌هایی که دارای گروه‌های فعال اکسیژن، نیتروژن یا سولفور باشند، نمی‌توان از DEPC به دلیل واکنش با آن‌ها استفاده کرد. در نتیجه‌ی واکنش با این گروه‌ها مواد حد واسطی درست می‌شوند که سبب منع واکنش‌های رونویسی و نسخه برداری می‌شود.

در حین استخراج RNA ممکن است با مشکلات احتمالی زیر مواجه شد:

مشکل ۱: عدم تشکیل رسوب.

راه حل: احتمالاً در یکی از مراحل اشتباهی رخ داده و یا تعداد سلول‌های خونی کم بوده است. بهتر است از حجم بیشتری خون استفاده شود.

1. Phenol guanidinium isothiocyanate
2. DEPC: Diethylpyrocarbonate
3. 3-(N-morpholino) propanesulfonic acid

مشکل ۲: رسوب تشکیل شده سفید نباشد.

راه حل: احتمالاً در برداشت لایه‌ی رویی، از فاز میانی هم برداشت شده است و باید در برداشتن لایه‌ی میانی دقت شود.

مشکل ۳: لایه‌ی رویی به سختی قابل تفکیک است.

راه حل: تعداد سلول‌های خونی در نمونه زیاد است این در مورد نمونه‌های سرطانی بیشتر صدق می‌کند. بهتر است نمونه‌ی خون با آب مقطر استریل رقیق شود.

۲-۲۰-۱) روش‌های حذف و غیرفعال کردن ریبونوکلئازها

۱. اتوکلاو کردن بافرها و محلول‌ها سبب غیرفعال کردن ریبونوکلئازها نمی‌شود و حتی ممکن است با رها شدن این آنزیم‌ها از باکتری‌ها، سبب تشدید آلودگی شوند. نپوشیدن دستکش باعث ورود باکتری‌ها و نیز RNaseهای سلولی انسانی به درون محیط‌های واکنش می‌گردد. آلودگی‌ها و غبارهایی که بر سطح محلول‌های بافرها می‌نشیند نیز حاوی این آنزیم‌ها می‌باشند. بنابراین برای کاهش آلودگی این آنزیم‌ها همیشه هنگام کار با RNA، دستکش پوشیده، محدوده‌ی مکانی خاصی، برای کار با RNA در نظر گرفته و مجموعه‌ی مستقل و جداگانه‌ای برای پیپت‌ها، وسایل و مواد مخصوص کار با RNA که عاری از RNA باشند، استفاده شود. به خصوص اگر در حین کار از RNase استفاده شود (مانند هنگام تهیه‌ی پلاسمید) احتمال آلودگی افزایش می‌یابد.

۲. بهتر است از وسایل یکبار مصرف عاری از RNase و در اتاق با شرایط تمیز استفاده شود.

۳. وسایل فلزی مانند قاشک‌ها با شعله تمیز شده و وسایل شیشه‌ای با قرار دادن در حرارت ۱۸۰°C یا بالاتر به مدت ۸ ساعت عاری از آنزیم‌ها می‌شوند. برای وسایل شیشه‌ای باید وسایل در محلول DEPC ۰/۱% تازه یا اتانول به مدت ۱ ساعت قرار داده شوند، سپس خشک شده و اتوکلاو گردند. از آن‌جایی که DEPC سبب خوردگی وسایل پلاستیکی ساخته شده از پلی‌کربنات و پلی‌استیرن مانند لوله‌های سانتریفوژ و میکروپلیت‌ها می‌شود، می‌توان آن‌ها را در محلول پراکسید هیدروژن ۳% به مدت ۱۰ دقیقه قرار داد و سپس با آب حاوی DEPC شست. همچنین می‌توان در محلول سود ۱ نرمال به مدت ۱ ساعت به مدت ۳۷ °C قرار داد و بعد با آب حاوی DEPC شستشو داد.

۴. برای برداشتن تیپ‌های سمپلرها از پنس استریل و حرارت داده شده استفاده شود.

۵. تانک‌های الکتروفورز با اتانول شسته شوند و سپس با پراکسید هیدروژن ۳% به مدت ۱۰ دقیقه پر گردیده و با آب عاری از RNase شسته شوند.

❖ **تهیه‌ی آب فاقد RNase:** آب‌های فاقد DNase و RNAse خالص به صورت تجاری موجود هستند؛ اما می‌توان در آزمایشگاه نیز به روش زیر تهیه نمود.

۱. افزودن ۰/۱% حجمی از DEPC به آب و هم زدن محلول.
۲. نگه‌داری کردن آب به مدت حداقل ۱ ساعت در $37^{\circ}C$ و البته نگه‌داری در زمان طولانی‌تر بر روی همزن حتی به مدت یک شب بهتر است.

- اتوکلاو کردن آب به مدت ۱۵ دقیقه به منظور غیرفعال کردن DEPC، اتوکلاو کردن DEPC سبب تولید آب، CO_2 و اتانول می‌شود. استفاده از غلظت‌های بالای DEPC و باقی ماندن بقایای احتمالی آن سبب توقف واکنش‌های بیوشیمیایی مانند ترجمه می‌شود. ضمناً تغییرات شیمیایی RNA مانند کربوکسی‌متیلاسیون نیز انجام می‌شود.
- برای تهیه‌ی بافرهای تریس باید از آب حاوی DEPC اتوکلاو شده استفاده کرد و بهتر است از پودر تریسی استفاده کرد که به طور مجزا برای کار با RNA در نظر گرفته شده است و pH نیز با الکترودی تنظیم گردد که برای کار با RNA در نظر گرفته شده است. پس از تهیه‌ی بافر مجدداً اتوکلاو انجام شود تا استریل گردد.
- کلاً موادی که مقاوم به حرارت نیستند مانند نوکلئوتیدها، DTT و نمک‌های منگنز به همین روش تهیه می‌گردند اما به جای استریل کردن با اتوکلاو از فیلترهای ۰/۲ μm استفاده می‌شود.

❖**استفاده از ممانعت کننده‌های ریبونوکلئازها**

- از انواع متداول ممانعت کننده‌های ریبونوکلئازها می‌توان به دو نوع زیر اشاره نمود:

۱. RIP [1] یک پروتئین غیرانسانی است که به صورت غیرکووالان به ریبونوکلئازها چسبیده و انواع محدودی را غیرفعال می‌کند. معمولاً در دامنه‌های متفاوت pH و دما فعال می‌باشند و حدود ۵۰% فعالیت آن‌ها را در واکنش‌ها منع می‌کند.

۲. HPRI [2] با منشأ انسانی است که انواع ریبونوکلئازهای C, B, A را غیرفعال کرده و بیش از ۹۰% فعالیت آن‌ها را ممانعت می‌کند.

۳-۲۰-۱) بررسی RNA استخراج شده

کیفیت و کمیت RNA استخراج شده با روش‌های الکتروفورز و طیف‌سنجی سنجیده می‌شود.

❖**الکتروفورز ژل آگارز:** RNA استخراجی از نمونه‌های انسانی پس از الکتروفورز به صورت دو قطعه (۱۸S و ۲۸S) دیده می‌شود. در صورتی که RNA در حین کار تجزیه شده باشد به صورت یک لکه‌ی گسترده دیده می‌شود (شکل ۱۴-۱).

1. RNase Inhibitor Prime
2. HPRI: Human Placental RNase Inhibitors

شکل ۱۴-۱: پس از الکتروفورز RNA استخراج شده از سلول‌های انسانی به صورت دو قطعه‌ی مشخص دیده می‌شوند. اگر در حین کار RNA تجزیه شود به صورت یک لکه در سطح ژل دیده می‌شود.

❖ **طیف‌سنجی:** نسبت طول موج ۲۶۰ به ۲۸۰ برای یک RNAی با کیفیت مناسب کمتر از ۲ حاصل می‌شود.

۲۱-۱) نکات ایمنی

رعایت نکات ایمنی زیر در آزمایشگاه‌های استخراج DNA و بیولوژی مولکولی برای به حداقل رساندن خطرات الزامی است. عمومی‌ترین توصیه‌ها و احتیاطات به شرح زیر می‌باشند:

- آگـار و آگـارز استفاده شـده نبایـد در فاضـلاب وارد شـوند و در ظـرف

مخصوصی حذف گردند.

- تمام مواد آلوده جهت رفع آلودگی باید قبل از حذف اتوکلاو شوند.
- کار با مواد آلی مانند فنل باید در زیر هود انجام شود و آلودگی نباید به فاضلاب راه یابد.
- اتیدیوم برمایدیک ماده‌ی سرطان‌زاست. هنگام کار با آن حتماً از دستکش استفاده شود. مواد و وسایل آلوده به آن باید قبل از حذف غیرفعال شوند.

بخش دوم

PCR

مقدمه

پیشرفت‌های سال‌های اخیر در زمینه بیولوژی مولکولی موجب ارتقاء کارآیی و تکامل هر چه بیشتر آزمایش‌های وابسته به DNA در علوم تجربی و بالینی گردیده است. "واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز (PCR)[1]" یکی از مهم‌ترین پیشرفت‌ها در زمینه بیولوژی مولکولی می‌باشد که علاوه بر سرعت بخشیدن به آزمایش‌های وابسته به DNA، موجب افزایش حساسیت در این آزمایش‌ها گردیده است.

با تـوجه به پیشرفت روزافزون علوم در جهان امروز و استفاده‌ی وسیع از PCR به عنـوان یک روش حساس، سریع و دقیق تشخیصی در آزمایشگاه‌ها، در این کتاب سعی شده است تا PCR و مکانیسم آن به زبانی ساده و به طور اجمالی

1. PCR: Polymerase Chain Reaction

بیان شود تا متخصصین و کارشناسان علوم مختلف تجربی با این تکنیک بسیار مفید آشنایی پیدا کنند. راه‌اندازی این روش و یا روش‌های مشابـه در زمیـنه بیولـوژی مولکـولی و بهـره‌وری از آن‌هـا در مراکـز آزمایشـگاهی و تحقیقاتی، منجر به حصول نتایج چشم‌گیر و سودمند گردیده و خواهد شد.

۱–۲) واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز (PCR)

واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز روشی است که به‌طور گسترده در بیولوژی مولکولی به‌کار برده‌شده و برای تکثیر یک یا چند کپی از قطعه DNA اولیه به‌کار می‌رود. در نتیجه‌ی این عمل هزاران تا میلیون‌ها کپی از توالی DNA به‌دست می‌آید.

روش‌های کلونینگ مولکولی برای تکثیر قطعات DNA زودتر از PCR در مطالعات بیولوژی استفاده می‌شده‌اند. این روش‌ها مبتنی بر همانندسازی DNA پلاسمیدها یا حامل‌های DNA[1] در طی تقسیم میکروارگانیسم‌ها می‌باشد که روشی بسیار زمان‌بر و مشکل هستند.

روش PCR نام خود را از یکی از ترکیبات کلیدی مورد استفاده در واکنش، آنزیم DNA پلی‌مراز، گرفته است که کپی و تکثیر یک رشته DNA را انجام می‌دهد. این آنزیم نوکلئوتیدهای مخـتلف را مطابق با ترتیب الگوی DNA اولیه و با استفاده از الیگونوکلئوتیدهای اولیه (پرایمر) که برای شروع سنتز DNA مورد نیاز است، در کنار هم قرار داده تا رشته‌ی جدید DNA به وجود آید.

واکنش تکثیر و کپی‌برداری DNA متکی بر چرخه‌های حرارتی مکرر

1. Vector

شامل مراحل گرمایشی و سرمایشی به ترتیب متناسب با نقطه‌ی ذوب DNA و فعالیت آنزیمی DNA پلی‌مراز می‌باشد. این چرخه‌ها به صورت زنجیره‌وار انجام می‌شوند.

همچنین از ترکیبات ضروری این واکنش می‌توان به الیگونوکلئوتیدها یا قطعات کوتاه DNA به نام آغازگرها یا پرایمرها[1] اشاره نمود. پرایمرها شامـل توالی‌های نوکلئوتیدی مکمل با نواحـی هدف جهت تکثیر می‌باشند. DNA پلی‌مراز کار خود را از محل اتصال پرایمرها به توالی‌های مکمل هدف آغاز کرده و با اتصال نوکلئوتیدهای مکمل توالی هدف به یکدیگر، محصـول PCR حاصل می‌شود. به محصول نهایی PCR آمپلیکون[2] نیز اطلاق می‌شود. آمپلیکون به معنی ماده تقویت‌شده یا تکثیرشده می‌باشد.

در بیشتر روش‌های PCR از چرخه‌های حرارتی[3] یعنی گرمایش و سرمایش متناوب استفاده می‌شود. مراحل چرخه‌های حرارتی در ابتدا برای جداسازی دو رشته DNA در درجه حرارت‌های بالا و در نقطه‌ی ذوب DNA الگو انجام می‌شود و در درجه حرارت‌های پایین‌تر هر رشته به عنوان الگو در سنتز DNA برای تکثیر انتخابی DNA هدف به وسیله‌ی DNA پلی‌مراز مورد استفاده قرار می‌گیرد. هر چرخه‌ی کامل حرارتی که زمان‌های مشخصی نیز دارد را یک سیکل[4] گویند. به طور معمول هر عمـل PCR به حدود ۴۰–۲۰ سیکل نیاز دارد.

1. Primer
2. Amplicon
3. Thermal Cycling
4. Cycle

این چرخه‌ها جهت جداشدن دو رشته DNA از همدیگر، اتصـال پلی‌مراز و سپس انجام عمـل پلی‌مراز ضروری هستند. اختصاصیت PCR نتیجه‌ی استفـاده از پرایمرهـایی است که با نـواحی DNAی الگو مکمل بوده و تحـت شرایط حرارتی مناسب، از DNA الگو کپی‌برداری می‌شود.

هم‌اکنون این روش در اکثر آزمایشگاه‌ها جهت اهداف مختلف به‌کار گرفته می‌شود که برخی از آن‌ها شامل کلونینگ DNA برای تعیین توالی[1]، بررسی‌های تکاملی و فیلوژنی بر پایه DNA، بررسی عملکردی ژن‌ها، تشخیص بیماری‌های ارثی، شناسایی و انگشت‌نگاری ژنتیکی و تشخیص بیماری‌های عفونی می‌باشد.

۲-۲) تاریخچه‌ی PCR

در سال ۱۹۷۱ دو دانشمند به نام‌های خورانا[2] و کلپ[3] ایده‌ای مبنی بر تکثیر قطعات کوتاه DNA در لوله‌ی آزمایش را توصیف کردند. ایده‌ی آن‌ها به دلیل رویاپردازنه بودن و غیرممکن نمودن آن مورد توجه قرار نگرفت.

در سال ۱۹۸۳، آقای مولیس[4] بر اساس تجربیات و ایده‌های مطرح شده و نیز به گفته‌ی خودش یک الهام شبانگاهی، اولین آزمایش PCR را طراحی و انجام داد. مولیس در یک شرکت بیوتکنولوژی در کالیفرنیا به نام شرکت ستوس[5]، کار می‌کرد. او در این شرکت مسئول سنتز زنجیره‌های کوتاهی از

1. Sequencing
2. Khorana
3. Kleppe
4. Mullis
5. Cetus

DNA بود که به روش‌های شیمیایی و بسیار زمان‌بر و طاقت‌فرسا انجام می‌گرفت، ایده‌ی انجام واکنش در هنگام رانندگی شبانه در جاده‌ای ساحلی به ذهنش متبادر شد. " گاهی یک ایده‌ی خوب زمانی به ذهن شما می‌رسد که انتظارش را ندارید". این اولین جمله‌ی گزارش علمی PCR توسط مولیس می‌باشد. اولین آزمایش‌های عملی PCR در شرکت ستوس انجام شد، که مولیس برای آن کار می‌کرد و پس از اختراع PCR، یکی از اصلی‌ترین منابع درآمد این شرکت بود، تا این‌که در سال ۱۹۹۱ این شرکت امتیاز استفاده از PCR را به قیمت ۳۰۰ میلیون دلار واگذار کرد.

مولیس در سال ۱۹۹۳ جایزه‌ی نوبل شیمی را برای این اختراع دریافت نمود. کشف روش PCR باعث ایجـاد روشی شد که هم‌اکنون جهت تکثیر قطعات DNA استفاده می‌گردد. امروزه این تکنیک بیشتر مشکلات قبلی در زیست‌شناسی مولکولی که ناشی از عدم دسترسی به مقادیر زیاد از DNA همسان بود را برطرف کرده است. این روش که برخلاف روش‌های کلونینگ به سلول وابسته نمی‌باشد و هیجان بسیاری به مطالعه‌ی علوم زیستی بخشیده است. اکنون که حدود ۳۰ سال از این انقلاب علمی می‌گذرد این هیجان همچنان ادامه دارد. تا سال ۱۹۹۲، تنها ۷ سال پس از گزارش علمی مولیس در سال ۱۹۸۵، بیش از ۵۰۰۰ مقاله‌ی علمی با استفاده از این روش منتشر گردیده است.

روش ابتدایی که توسط آقای مولیـس توصیف گردید با استفاده از مجموعه‌ای از حمام‌های آب گرم، جهت تأمین دماهای مناسب مراحل و نیز قطعه‌ی کلنوی[1]

1. Klenow fragment

آنزیم پلی‌مراز باکتری *E. coli* بود. لوله‌ی واکنش حاوی دو پرایمر مکمل دو انتهای یک قطعه‌ی bp ۱۱۰ از ژن کلون شده‌ی بتاگلوبین انسانی، DNA انسانی، دی‌اکسی نوکلئوتیدها و قطعه‌ی کلنوی آنزیم پلی‌مراز *E. coli* بود. جهت تأمین دمای مناسب هر مرحله، لوله‌ی آزمایش به صورت دستی و متوالی وارد حمام‌های آب گرم می‌شد. جهت دناتوره کردن DNA، لوله در حمام آب گرم ۹۵ °C قرار می‌گرفت که سبب غیرفعال شدن آنزیم می‌گردید. بنابراین پس از هر سیکل، به صورت دستی مقدار اندکی آنزیم به لوله‌ی واکنش افزوده می‌شد. این روش ابتدایی، زمان‌بر بوده که در ضمن به مقدار زیادی آنزیم نیاز داشت. جهت مرتفع نمودن این مشکلات، به دنبال آنزیمی بودند که بتـواند درجـه حرارت‌هـای بالای ۹۰°C، جهت تفکیک دو رشته مارپیچ DNA بعد از هر چرخه‌ی همانندسازی را تحمل نماید.

در سال ۱۹۷۶ کشف آنزیم پلی‌مراز Taq[1] بـه‌وسیله سایکی[2] از باکتری گرمادوست "ترموس اکوآتیکوس"[3] تحول بزرگی در تکثیر DNA به روش PCR را ایجاد نمود. وی مشغول مطالعه بر روی موجودات زنده در چشمه‌های جوشان پارک ملی آمریکا[4] بود. این باکتری به طور طبیعی در چشمه‌های جوشان و دمای بالای ۸۰°C–۵۸ زندگی می‌کند. پلی‌مراز استخراج شده از این باکتری در درجه حرارت‌های بالا پایدار است و حتی بعد از دناتوره‌شدن

1. Taq DNA Polymerase
2. Saiki
3. Taq: Thermus Aquaticus
4. Yellostone National Park

DNA فعال باقی می‌ماند و بنابراین با استفاده از این نوع آنزیم، به اضافه کردن DNA پلی‌مراز بعد از هر چرخه نیازی نمی‌باشد.

مهندسین شرکت ستوس برای اتوماسیون روشی که مولیس ابداع نموده بود ابتدا دستگاهی به نام Dr. cycle را ساختند که به طور اتوماتیک آنزیم را پس از هر سیکل به لوله‌ی واکنش اضافه می‌نمود و لوله را به دماهای مناسب می‌رساند. اما پس از وارد شدن ایده‌ی استفاده از آنزیم‌های مقاوم به حرارت، طراحی دستگاه فقط به تأمین چرخه‌های حرارتی محدود گردید. در سال ۱۹۸۵ شرکت ستوس با همکاری شرکت المر[1]، دستگاه ترمال سایکلر را طراحی نمودند. با مرتفع شدن این دو مشکل جدی، در مدت زمان اندکی، PCR به یک روش کارآمد، آسان و سریع مبدل گردید و جای خود را در گستره‌ی وسیعی حتی در علوم خارج از حیطه‌ی زیست‌شناسی مانند باستان‌شناسی و پزشکی جنایی باز کرد.

۳-۲) اساس و مواد مورد نیاز واکنش PCR

۱-۳-۲) اساس PCR

PCR در واقع تقلیدی از فرآیند همانندسازی DNA درون سلول‌ها می‌باشد که در محیط خارج سلول، درون لوله‌ی آزمایش و در حضور مواد اولیه‌ی مورد نیاز انجام می‌شود. این مواد شامل موارد زیر می‌باشند:

۱. DNA الگو، شامل توالی از DNA است که تکثیر می‌شود.

۲. دو پرایمر که مکمل انتهاهای ′۳ هر یک از زنجیره‌های سنس و

1. Elmer

آنتی‌سنس DNA الگو می‌باشند.

۳. آنزیم DNA پلی‌مراز مقاوم به حرارت.

۴. دی‌اکسی‌نوکلئوتیدهای تری‌فسفات(dNTPs)[1] یا نوکلئوتیدهای حاوی گروه‌های سه فسفاته که واحدهای سازنده‌ی زنجیره‌ی جدید می‌باشند که توسط آنزیم پلی‌مراز ساخته می‌شود.

۵. محلول بافر که محیط شیمیایی مناسبی برای فعالیت بهینه و پایداری آنزیم پلی‌مراز فراهم می‌نماید.

۶. کاتیون‌های دوظرفیتی شامل یون‌های منیزیم یا منگنز، معمولاً از یون منیزیم استفاده می‌شود، اما در روش‌های "جهش‌زایی به واسطه‌ی PCR"[2] از یون منگنز استفاده می‌شود؛ زیرا میزان وارد شدن خطا و در نتیجه جهش‌زایی در سنتز DNA جدید را افزایش می‌دهد.

۷. کاتیون‌های تک ظرفیتی مانند یون پتاسیم.

واکنش PCR معمولاً در لوله‌های کوچک واکنش به نام میکروتیوب[3] با حجم ۲۰۰–۵۰۰µl انجام می‌شود. حجم واکنش معمولاً حجم ۱۰–۲۰۰ µl می‌باشد. جنس این میکروتیوب‌ها از پلاستیک شفاف پلی‌استیرن می‌باشد. به دلیل استفاده از مقادیر کم مواد در واکنش PCR، به میکروپیپت‌ها یا سمپلرهای ظریف با دقت بالا نیاز است. خطاهای اندک در برداشتن مواد واکنش سبب ایجاد خطا در واکنش می‌گردد.

1. dNTP: Deoxynucleoside triphosphates
2. PCR-mediated DNA mutagenesis
3. Microtube

۲-۳-۲) دستگاه ترمال سایکلر[1]

واکنش PCR به صورت چرخه‌ای در دماهای متناوب انجام می‌شود. دستگاه ترمال سایکلر، به صورت خودکار، لوله‌های واکنش را طبق برنامه‌ی تنظیم شده، سرد و گرم می‌کند. در دستگاه‌های جدیدتر، سرعت رسیدن به دمای تنظیم شده بسیار بالاست. هر چه زمان رسیدن دمای مبدأ به دمای مقصد یا زمان "پرش"[2] کوتاه‌تر باشد، واکنش برای مدت زمان کم‌تری در دمای ناخواسته قرار می‌گیرد و نتیجه‌ی واکنش PCR مطلوب‌تر است.

اکثر این دستگاه‌ها از اثر پلتی‌یر[3] یعنی تغییر جهت جریان سرد و گرم‌شدن متوالی میکروتیوب‌ها با استفاده از صفحات مخصوص، استفاده می‌کنند. دیواره‌ی میکروتیوب‌ها نیز معمولاً به قدری نازک هستند که انتقال گرما را به راحتی فراهم می‌نمایند. اکثر این دستگاه‌ها دارای درب‌های گرم کننده هستند که مانع میعان آب موجود واکنش، در بالای میکروتیوب می‌شود. برای حل این مشکل در هنگام استفاده از دستگاه‌های قدیمی که فاقد این درب‌ها هسستند، افزودن قطره‌ای (حدود $\frac{۱}{۲۰}$ حجم واکنش) از روغن معدنی[4] مانع تبخیر آب واکنش می‌شود و از به هم خوردن حجم واکنش جلوگیری می‌گردد.

۳-۳-۲) الگو DNA

الگو شامل قطعه‌ای از DNA است که باید تکثیر شود. نمونه‌هایی که

1. Thermal Cycler
2. Ramp
3. Peltier effect
4. Mineral oil

جهت تکثیر استفاده می‌شوند، ممکن است DNA یا RNA دو رشته‌ای یا تک رشته‌ای باشند. چنانچه DNA ژنومی با وزن مولکولی بالا استفاده شود، جهت آنالیز بهتر است که با یک آنزیم برشی به قطعات کوچک‌تر تقسیم شود. DNA الگو باید به اندازه‌ی کافی خالص باشد. بسیاری از ناخالصی‌ها مانند فنل، EDTA، پروتئیناز K و نمک‌ها که از مرحله‌ی استخراج DNA باقی می‌مانند، سبب منع واکنش PCR و یا تکثیرهای غیراختصاصی می‌شوند. شستشوی DNA با الکل اتانول معمولاً سبب حذف این آلودگی‌ها می‌شود.

معمولاً استفاده‌ی ۱ ng از DNA الگو در یک واکنش PCR کافی است. برای DNA ژنومی مقادیر بیشتر (۱ g) و DNA خالص شده، پلاسمیدی یا ویروسی مقادیر کمتری نیاز است. در صورت تکثیر ضعیف می‌توان میزان بیشتری از DNA استفاده نمود. در صورتی که از غلظت‌های بالای DNA استفاده شود ممکن است واکنش تکثیری به دلیل عدم انتشار کارآمد آنزیم در میکروتیوب منع گردد و یا تکثیرهای غیراختصاصی افزایش یابد.

۴-۳-۲) پرایمر

پرایمرهای PCR به صورت کاملاً اختصاصی و مکمل با انتهای ′۵ رشته‌های سنس و آنتی‌سنس DNA الگو طراحی و سنتز می‌شوند. معمولاً طراحی و انتخاب پرایمرها بسته به هدف توسط محقق، طراحی و انتخاب می‌گردند و سپس توسط شرکت‌های سنتز کننده‌ی DNA سنتز می‌شوند. سنتز پرایمر به روش‌های شیمیایی انجام می‌شود و سفارش آن‌ها به شرکت‌های تخصصی سازنده، بسیار ارزان و مقرون به صرفه می‌باشد.

پرایمرهایی که به انتهاهای ′۵ و سمت ′۳ توالی هدف متصل می‌شوند به ترتیب به نام‌های پرایمر پیش‌برنده (F)[1] و معکوس (R)[2] خوانده می‌شوند. این دو پرایمر دو عمل انجام می‌دهند، اول این‌که محل ژنی که باید تکثیر شود را مشخص می‌نمایند و دوم این‌که اندازه‌ی قطعات تکثیرشونده را تعیین می‌کنند. وقتی این دو شناساگر به دو ناحیه‌ی مختلف DNA و به سمت هم قرار می‌گیرند، DNA پلی‌مراز تنها قطعات را در بین این دو ناحیه همانندسازی می‌کند و به این ترتیب طول قطعات ساخته‌شده تعیین می‌شود.

پرایمرهایی که به صورت کاملاً مکمل و اختصاصی با توالی هدف طراحی می‌شوند، پرایمر اختصاصی گفته می‌شود. پرایمرهایی که برخی از بازهای آن به صورت N طراحی می‌شوند و به عبارتی با نسبت مساوی از ۴ نوع نوکلئوتید در ساخت آن استفاده شده است پرایمر دژنره[3] نام دارند. این نوع پرایمرها وقتی استفاده می‌شوند که یک ژن مشابه از موجودات مختلف تکثیر می‌شوند که مشابه هستند اما همسان نیستند. استفاده‌ی دیگر از این پرایمرها، طراحی آن‌ها بر اساس سکوئنس پروتئینی است. از آن‌جایی که کدون‌های مختلفی برای یک اسید آمینه وجود دارند اکثراً حدس توالی دقیق نوکلئوتیدی از پروتئین مشکل است. استفاده از این نوع پرایمرها، اختصاصیت واکنش را کم می‌کند و بهتر است برای رفع مشکل از روش PCR کاهشی[4] استفاده کرد.

---

1. Forward
2. Reverse
3. Degenerate
4. Touchdown PCR

علامت	توضیح	باز	
A	**A**denosine	ادنوزین	A
C	**C**ytidine	سیتیدین	C
G	**G**uanosine	گوانوزین	G
T	**T**hymidine	تیمیدین	T
U	**U**ridine	یوریدین	U
W	**W**eak	پیوندهای ضعیف	A, T
S	**S**trong	پیوندهای قوی	C, G
M	a**m**ino	آمینو	A, C
K	**k**eto	کتو	G, T
R	pu**r**ine	پورین	A, G
Y	p**y**rimidine	پیریمیدین	C, T
B	not A	غیر از A– حرف B بعد از A می‌آید.	C, G, T
D	not C	غیر از C – حرف D بعد از C می‌آید.	A, G, T
H	not G	غیر از G– حرف H بعد از G می‌آید.	A, C
V	not T	غیر از T– حرف V بعد از T و U می‌آید.	A, C, G
N/-	a**n**y base	هر گونه بازی– منظور فاصله و جای خالی نیست.	A, C, G, T

جدول ۱–۲: علائم اختصاری برای بازهای مختلف در اسیدهای نوکلئیک

جدول ۱–۲ علائم اختصاری که توسط "اتحادیه‌ی بین المللی شیمی محض

و کاربردی انجمن (IUPAC)[1] برای بازهای مختلف و پرایمرهای دژنره انتخاب شده‌اند را نشان می‌دهد.

❖ طراحی پرایمر

طراحی پرایمر با استفاده از نرم‌افزارهای مختلفی انجام می‌شود. در هنگام طراحی پرایمر باید شرایط زیر را در نظر گرفت:

- طول پرایمر حدود ۳۰-۲۰ نوکلئوتید باشد. طول بیشتر نه تنها سبب افزایش اختصاصیت نمی‌شود، بلکه سبب افزایش دمای مورد نیاز در مرحله‌ی اتصال پرایمرها به الگو یا انلینگ[2] می‌گردد.
- محتویات GC پرایمر حدود ۶۰-۴۰ درصد باشد.
- پرایمرها دارای تعداد برابری از هر کدام از ۴ نوکلئوتید باشند.
- پرایمرها بر اساس نواحی مثل ساختارهای پلی‌پورین، پلی‌پیریمیدین و یا ترادف‌های تکراری طراحی نشده باشند.
- پرایمر نباید ساختارهای ثانویه مانند سنجاق سری[3] یا حلقه[4] را در داخل خودش ایجاد کند و جفت پرایمرها نوکلئوتیدهای مکمل در انتهای ′۳ خود نداشته باشند. چنانچه این مورد رعایت شود، احتمال جفت شدن پرایمرها با یکدیگر یا ایجاد پرایمر-دایمر[5] کاهش خواهد یافت.

---

1. (IUPAC) International Union of Pure and Applied Chemistry
2. Annealing
3. Hairpin
4. Loop
5. Primer-dimer

- بازهای G یا C به صورت تکراری و پشت سرهم در پرایمر وجود نداشته باشند و به صورت مناسب در سراسر پرایمر توزیع گردند. به دلیل این‌که با داشتن توالی تکراری پرایمر به صورت حلقه در آمده و عملاً سیستم کار نخواهد کرد.
- در انتهای ′۳ پرایمر بیشتر از ۳ نوکلئوتید G یا C وجود نداشته باشد. چنانچه این مورد رعایت نشود، جفت شدن غیراختصاصی اتفاق خواهد افتاد.
- درجه حرارت ذوب پرایمرها (Tm) [1] بیشتر از ۵ درجه نباید با یکدیگر اختلاف داشته باشد.
- همه جایگاه‌های مکمل ممکن بین DNA الگو و پرایمرها باید در نظر گرفته شوند.
- فاصله‌ی بین پرایمرها هنگامی که با DNA الگو مکمل می‌شود بیشتر از ۱۰ kbp نباشد.
- در مورد پرایمرهایی که لازم است محصول PCR آن‌ها دارای پروموتر باشد و برای بیان یک ژن به‌کار روند، فاصله دو پرایمر باید کم‌تر از ۱۰ kb باشد.

در بعضی موارد، پرایمرها عمداً به طور کامل مکمل با الگو طراحی نمی‌شوند. این موارد شامل:

۱. پرایمرهایی که برای ایجاد جهش در یک ژن طراحی می‌گردند، بازهای جهش‌یافته معمولاً نـزدیک مرکز پرایمر و جایگاه‌های تشخیص

1. Tm: Melting temperature

اندونوکلئازهای برشی و یا توالی پروموتر در انتهای ′۵ طراحی می‌شود. بهتر است به انتهای ′۳ پرایمر توجه بیشتری شود، به دلیل این‌که یک اشتباه در این انتها باعث می‌شود تکثیر انجام نشود.

۲. پرایمرهایی که سمت ′۵ آن‌ها جایگاه شناسایی یک آنزیم نوکلئاز تعبیه می‌شود، به دلیل این‌که بتوان محصول PCR را توسط آن آنزیم برش داد. این کار معمولاً برای کلون کردن محصول PCR انجام می‌شود.

۳. زمانی که پرایمر دژنره[1] استفاده می‌شود، دژنرنسی طراحی شده در انتهای ′۳ باید در حداقل باشد و حداقل سه نوکلئوتید حفاظت‌شده[2] در انتهای ′۳ قرار گیرد.

❖ دمای ذوب پرایمر (Tm)[3]

Tm پرایمر برای یک جفت پرایمر با استفاده از فرمول زیر و در غلظت نمک برابر ۱ M جهت مکمل شدن محاسبه می‌شود:

$$۴ \times (\text{تعداد } G + C) + ۲ \times (\text{تعداد } T + A)$$

در حال حاضر برنامه‌ها و نرم‌افزارهای کامپیوتـری ویژه‌ای وجود دارند که اثر عوامل مختلفی مانند واکنش بین بازهای مجاور، غلظت نمک، درصد GC و طول پرایمر بر روی Tm را محاسبه می‌کنند.

1. Degenerate
2. Conservative
3. Melting Temperature

❖ محاسبه‌ی غلظت پرایمر

جهـت محاسبه غلظت پرایمر در ابتدا لازم است ضریب مولاریته پرایمر با استفاده از فرمول زیر محاسبه شود:

$$(۸۴۰۰\times T) + (۱۵۲۰۰\times A) + (۱۲۰۱۰\times G) + (۷۰۵۰\times C)$$

C, G, T, A در این فرمول‌ها تعداد دفعاتی است که به ترتیب هر کدام از بازهای آدنین، تیمین، گوانین و سیتوزین در پرایمر وجود دارنـد و ضریـب مولاریته[1] برابر با جذب یک محلول M ۱ پرایمر در nm ۲۶۰ می‌باشد.

شرکت‌های سازنده‌ی پرایمرها معمولاً جذب نوری در nm ۲۶۰ یا OD[2] پرایمرها را به مشتریان اعلام می‌کنند و دستور رقیق‌سازی پرایمرها در غلظت ۱۰۰ µm/µl که معمولاً به صورت خشک شده یا لیوفیلیزه ارسال می‌گردند، نیز ضمیمه می‌گردد. جهت استفاده در واکنش PCR، پرایمرها تا حد ۲۰ µm/µl رقیق می‌گردند.

از نکات عملی برای حفظ پرایمرها، بهتر است که میکروتیوب حاوی پرایمر غلیظ در فریزر ۷۰°C- نگه‌داری شود و پرایمر رقیق شده در حجم‌های کمتر تقسیم گردد. این عمل سبب ممانعت از آلودگی و تجزیه‌ی احتمالی پرایمرها می‌شود.

---

1. Molar Extinction Coefficient
2. OD: Optical Dencity

۵-۳-۲) آنزیم پلی‌مراز

DNA پلی‌مراز، آنزیمی است که DNA تک رشته‌ای را به عنوان الگو مورد استفاده قرار می‌دهد و رشته‌ی مکمل را در جهت ´۵ به ´۳ با واحدهای مونومر دزوکسی نوکلئوتید تری‌فسفات می‌سازد. DNA پلی‌مراز برای سنتز DNA احتیاج به پرایمر دارد.

انتخاب DNA پلی‌مراز مناسب، عامل مهمی در تکثیر مطلوب قطعه هدف می‌باشد. قبل از معرفی و کشف آنزیم‌های پایدار در حرارت، DNA پلی‌مرازهای حساس به حرارت مثل قطعه‌ی کلنو[1] DNA پلی‌مراز I باکتری *E. coli* و DNA پلی‌مراز فاژ T4 استفاده می‌شد.

در یک واکنش با حجم PCR ۲۵ µl، تقریباً به ۱-۰/۵ واحد آنزیم پلی‌مراز نیاز است. استفاده از مقدار کم آنزیم سبب ایجاد قطعات ناقص DNA می‌شود و استفاده از مقادیر زیادتر از حد مطلوب ممکن است منجر به ایجاد تکثیر قطعات ناخواسته و در نتیجه ایجاد یک لکه یا اسمیر[2] در ژل الکتروفورز و یا حتی ممانعت از انجام واکنش شود.

تعدادی از انواع DNA پلی‌مرازهای تجاری موجود، نقش و فعالیت و همچنین منشأ آن‌ها در جدول ۲-۲ معرفی شده‌اند. با توجه به هدف PCR و نیز خصوصیات آنزیم‌ها، آنزیم انتخاب می‌شود.

---

1. Klenow
2. Smear

DNA نام تجاری پلی‌مراز	Taq	Amplitaq	Amplitaq (Stoffel fragment)	Vent ™	Deep vent ™	Pfu	Tth	UIT ma ™
طبیعی / نوترکیب	طبیعی	نوترکیب	نوترکیب	نوترکیب	نوترکیب	طبیعی	نوترکیب	نوترکیب
منبع	*Thermus aquaticus*	*Thermus aquaticus*	*Thermus aquaticus*	*Thermcoccus Litorali*	*Pyrococcus GB.D*	*Pyrococcus Furiosu*	*Thermus Thermophilus*	*Thermotoga Maritima*
نیمه عمر انزیم در ۹۵°C (min)	۴۰	۴۰	۸۰	۴۰۰	۱۳۸۰	بیشتر از ۱۲۰	۲۰	۵۰
فعالیت اگزونوکلئازی از جهت ´۳ به ´۵	ندارد	ندارد	ندارد	دارد	دارد	دارد	ندارد	دارد
فعالیت اگزونوکلئازی از جهت ´۵ به ´۳	دارد	دارد	ندارد	ندارد	ندارد	ندارد	دارد	ندارد
میزان پردازش	۶۰-۵۰	۶۰-۵۰	۱۰-۵	۷	مشخص نیست.	مشخص نیست.	۴۰-۳۰	مشخص نیست.
سرعت عمل (نوکلئوتید در ثانیه)	۷۵	۷۵	بیشتر از ۵۰	بیشتر از ۸۰	مشخص نیست.	۶۰	بیشتر از ۳۳	مشخص نیست.
فعالیت نسخه برداری معکوس	ضعیف	ضعیف	ضعیف	مشخص نیست.	مشخص نیست.	مشخص نیست.	دارد	مشخص نیست.
نوع انتهای تولید شده در محصول PCR	´A۳	´A۳	´A۳	بالغ بر ۹۵٪ ته صاف	بالغ بر ۹۵٪ ته صاف	مشخص نیست.	´A۳	ته صاف
وزن مولکولی(kDa)	۹۴	۹۴	۶۱	مشخص نیست.	مشخص نیست.	۷۰	۹۴	۹۲

جدول ۲-۲: معرفی تعدادی از انـواع DNA پلی‌مرازهای تجاری

❖Taq/Amplitaq

Taq، آنزیم DNA پلی‌مراز مقاوم در برابر حرارت می‌باشد که از باکتری "ترموس اکواتیکوس"[1] به دست آمده و رایج‌ترین آنزیمی است که در PCR استفاده می‌شود. این آنزیم دارای سرعت گسترش ۱۰۰–۳۵ نوکلئوتید در هر ثانیه و فعالیت بهینه در دامنه دمایی ۸۰–۷۰ °C می‌باشد. این آنزیم دارای فعالیت ′۵ به ′۳ اگزونوکلئازی می‌باشد که باعث حذف نوکلئوتید اشتباه در حین تکثیر می‌شود. Amplitaq آنزیم نوترکیب مربوط به Taq می‌باشد که خالص‌شده و نسبت به Taq بیشتر مورد استفاده قرار می‌گیرد. اما هنگامی که هدف تکثیر ژن‌های باکتریایی باشد، بهتر است که از Taq استفاده شود، زیرا برای تهیه و تولید آنزیم نوترکیب از میزبان *E. coli* استفاده می‌شود و ممکن است به دلیل توالی‌های DNA مشابه موجود در الگو با ژنوم *E. coli* و حضور آلودگی‌های جزیی از DNA باکتری میزبان در آنزیم، نتایج مثبت کاذب حاصل شود.

یکی از معایب Taq، فقدان فعالیت تصحیح‌کنندگی[2] اگزونوکلئازی از سمت ′۳ به ′۵ است که منجر به ایجاد "میزان خطای"[3] بالا در ساخته شدن رشته‌ی مکمل می‌شود و از هر ۹۰۰۰ نوکلئوتید، ۱ نوکلئوتید اشتباه وارد رشته‌ی DNAی جدید می‌شود. به عبارتی میزان کم درستی عمل و وفاداری[4] آنزیم، منجر می‌شود که از این آنزیم در کلونینگ، تعیین توالی قطعات DNA و بررسی جهش‌ها با احتیاط استفاده نمود.

1. Thermus Aquaticus
2. Proofreading
3. Errore rate
4. Fidelity

سرعت عمل[1] آنزیم Taq یا افزوده شدن نوکلئوتیدها در یک ثانیه به رشته‌ی جدید، نسبت به سایر آنزیم‌های تجاری موجود بالاست و می‌تواند در حدود ۳۲ ثانیه در $72^{\circ}C$، یک رشته با طول bp ۱۰۰۰ را بسازد. گرچه نیمه‌عمر[2] آن حدود ۴۰ دقیقه است.

Taq باعث ایجاد محصولات PCR دارای تک رشته‌ی آویزان[3] از یک نوکلئوتید آدنین در انتهای '۳ می‌شود. از این خاصیت در روش TA کلونینگ بهره برداری می‌شود. در این روش کلونینگ، وکتور مانند پلاسمید دارای باز تیمیدین در سمت '۳ می‌باشد که با آدنین محصول PCR مکمل می‌شود و واکنش ادغام[4] دو قطعه DNA را سبب می‌شود.

❖ Vent ™

این آنزیم از باکتری" ترموکوکوس لیتورالیس"[5] استخراج شده که نوعی باکتری گرمادوست می‌باشد و در آب‌های با درجه حرارت بالای $98^{\circ}C$ زندگی می‌کند. ژن کدکننده این آنزیم کلون‌شده و در *E. coli* بیان گردیده است. این آنزیم نسبت به Taq پایدارتر می‌باشد و قادر است قطعات حدود ۸ تا ۱۳ کیلو جفت باز را تکثیر دهد. Vent دارای فعالیت '۳ به '۵ اگزونوکلئازی می‌باشد که سبب می‌شود درستی عمل آن ۵ تا ۱۰ برابر بیشتر از Taq باشد.

---

1. Extension rate
2. Half life
3. Overhang
4. Ligation
5. Thermococcus Litoralis

❖Pfu

این پلی‌مراز از باکتری "پیروکوکوس فوریوسوس"[1] استخراج شده و دارای فعالیت اگزونوکلئازی ′۵ به ′۳ و ′۳ به ′۵ می‌باشد و در نتیجه دقت آنزیم در سنتز DNA بسیار بالاست. نوکلئوتیدهای ′۳ انتهایی اشتباه، از ترکیب الگو-پرایمر جداشده و سپس نوکلئوتید مناسب قرار می‌گیرد. دقت و حساسیت این آنزیم ۱۲ برابر بیشتر از Taq می‌باشد و برای اهداف تعیین توالی قطعات و بیان ژن‌ها بهتر است از این آنزیم استفاده شود.

❖ Tth

این آنزیم از باکتری "ترموس ترموفیلوس"[2] استخراج شده، و یک پلی‌مراز مقاوم به حرارت است که به صورت نوترکیب در *E. coli* تولید می‌شود. Tth در حضور یون منگنز و در درجه حرارت حدود ۷۰°C می‌تواند برای "رونویسی معکوس از RNA[3]" استفاده شود. به عبارتی می‌تواند از RNA به عنوان الگو جهت PCR استفاده کند. Tth جهت تکثیر RNAهای دارای نواحی غنی از G-C و یا ساختارهای ثانویه و برای تشخیص و آنالیز بیان ژن در سطح RNA بسیار مناسب می‌باشد.

❖ UITma ™

این آنزیم از باکتری "ترمولوگا ماری تایم"[4] به صورت نوترکیب تهیه شده

1. Pyrococcus Furiosus
2. Thermus Thermophilus
3. Reverse Transcribe RNA
4. Thermologa Maritime

است. این باکتری در درجه حرارت‌های بالای $۹۰^{\circ}C$ رشد می‌کند و بنابراین پایداری گرمایی بیشتری نسبت به Amplitaq دارد.

۶-۳-۲) دزوکسی نوکلئوتیدهای سه فسفاته (dNTPs)

dNTPs شامل بازهای A, T, G و C می‌باشد که واحدهای سازنده‌ی DNA بوده و برای سنتز رشته‌ی جدید توسط DNA پلی‌مراز مورد نیاز هستند. این ترکیبات با خلوص بالا به‌وسیله شرکت‌های مختلف به صورت جداگانه و یا به صورت مخلوط در غلظتی برابر در اختیار مصرف‌کنندگان قرار می‌گیرد. جهت به‌دست آوردن کارآیی بهینه از واکنش PCR باید از غلظت مناسبی از dNTPs استفاده شود. غلظت مناسب dNTPs بین ۴۰ μM تا ۲۰۰ μM از هر نوع نوکلئوتید در یک واکنش PCR است. استفاده از غلظت‌های بیشتر از حد مطلوب از dNTPs سبب ممانعت از عمل آنزیم پلی‌مراز و عدم تکثیر DNA می‌شود. غلظت کمتر از حد مطلوب نیز سبب تولید محصولات ناقص می‌شود.

اگر طول قطعه‌ی هدف، بلندتر و تعداد سیکل‌های واکنش بیشتر باشد بهتر است از غلظت‌های بالاتری از dNTPs استفاده نمود. هنگام استفاده از غلظت‌های بالاتر dNTPs، برای حفظ کارآیی واکنش باید از غلظت‌های بیشتری از یون منیزیم نیز استفاده نمود. توصیه‌ی کلی جهت بهینه کردن واکنش، تعیین بهترین غلظت dNTP است.

❖ نوکلئوتیدهای تغییریافته[1]

نوکلئوتیدهای تغییریافته دارای تغییرات ساختاری نسبت به dNTPs بوده و در واکنش‌های PCR جهت اهداف خاصی استفاده می‌شوند. بعضی از این نوکلئوتیدها در ادامه معرفی می‌شوند.

1, 7-Deaza-dGTP: استفاده از این نوکلئوتید به جای dGTP سبب کاهش ساختار ثانویه در DNA تکثیر شده، می‌شود. این نوکلئوتید برای تکثیر و تعیین توالی قطعات حاوی نواحی غنی از G-C استفاده می‌گردد. به این منظور از مخلوطی از 1, 7-Deaza-dGTP و dGTP به نسبت ۱:۳ در بافر استفاده می‌شود.

dUTP: استفاده از dUTP سبب جانشین شدن بازهای dTTP به‌وسیله dUTP در فرآیند PCR می‌شود. ضمناً به واکنش، آنزیم یوراسیل N گلیکوزیلاز (UDG[2]، UNG[3]) افزوده می‌شود که باعث جلوگیری از آلودگی آمپلیکون می‌شود؛ زیرا تمام قطعات تکثیر شده، حاوی باز تغییریافته‌ی dUTP هستند. اگر آمپلیکون به عنوان منبع آلودگی باشد، استفاده از UDG قبل از PCR بعدی، سبب حذف یوراسیل می‌شود که در واقع مکان‌های فاقد باز در قطعات تکثیر شده ایجاد می‌گردند که به عنوان الگو برای PCR بعدی استفاده نخواهند شد.

---

1. Analogue
2. UDG: Uracil-DNA-Glycosylase
3. UNG: Uracil Nucleotide Glycosylase

ddNTPs: دی دی اکسی نوکلئوزید تری‌فسفات[1] فاقد گروه هیدروکسیل در کربن ′۳ و نیز کربن ′۲ دی‌اکسی ریبوز است. کربن ′۵ با نوکلئوتید قبلی در زنجیره‌ی DNA در حال رشد، یک پیوند فسفودی استری درست می‌کند در حالی که کربن ′۳ نمی‌تواند dNTP دیگری به رشته اضافه کند و در نتیجه رشد و طویل شدن زنجیره متوقف می‌شود. از این نوکلئوتیدها در واکنش‌های تعیین توالی استفاده می‌شود و به این منظور معـمولاً با نشان‌های [2]رادیواکتیوی یا غیررادیوکتیوی نشاندار می‌شوند.

dNTPs [α^{32}p], dATP [α^{35}S], dCTP [α^{35}S] از ddNTPهای رادیواکتیوی هستند. از نشان‌های غیررادیواکتیوی مانند نشان‌های بیوتین، دیگوکسی‌ژنین[3] و نشان‌های فلورسنت نیز استفاده می‌شوند.

۷-۳-۲) بافر PCR و افزودنی‌های آن

محتویات بافر PCR محیط مناسبی را جهـت فعالیت و پایداری آنزیم پلی‌مراز فراهم می‌کند. معمولاً همراه آنزیم خریداری شده، بافر آنزیم نیز دریافت می‌شود. این بافر به صورت غلیظ، معمولاً شامل ترکیباتی با ۱۰ برابر غلظـت (۱۰x) ارسال می‌شود که باید قبل از استفاده به نسبت ۱/۱۰ با آب مقطر دیونیزه رقیق شود. بهتر است قبل از انجام PCR، توضیحات لازم برای استفاده از بافر که در ضمیمه‌ی همراه بافرها یافت می‌شود به دقت مطالعه گردد.

---

1. ddNTPs: Dideoxy nucleoside triphosphates
2. Labels
3. Digoxigenin

ترکیبات بافر معمولاً شامل Tris-HCl (۱۰۰mM) و KCl (۱۰۰mM) و pH=۸/۳ می‌باشد. بافرهای با pH بالاتر (۸/۸) برای تکثیر قطعات بلندتر به منظور تسهیل دناتوره شدن DNA الگو و کاهش آسیب به آن استفاده می‌شود.

بافرها معمولاً حاوی آلبومین سرم گاوی (BSA)[1] نیز می‌باشند که اتصال DNA به دیواره‌های میکروتیوب را کاهش داده و در نتیجه DNA الگو به راحتی در دسترس آنزیم قرار می‌گیرد. ضمناً احتمال ایجاد پرایمر- دیمر را کاهش می‌دهد و می‌تواند هدفی برای پروتئازهایی باشد که در محیط وجود دارند. برای تکثیر قطعات DNA از نمونه‌های باستانی و نمونه‌های دارای آلودگی و ممانعت‌کننده‌های PCR، از BSA به منظور خنثی‌سازی آن‌ها استفاده می‌شود. در بعضی بافرها ژلاتین نیز موجود است که نقشی مشابه آلبومین دارد.

از سولفات آمونیم[2] نیز در بافر به منظور افزایش اختصاصیت و بازده واکنش استفاده می‌شود. احتمالاً برهم‌کنش یون‌های آمونیم و پتاسیم، سبب افزایش اختصاصیت در اتصال پرایمرها به جایگاه‌های مکمل در الگو می‌شود.

دی‌متیل‌سولفوکسید (DMSO)[3] برای تکثیر توالی‌های DNA غنی از G-C و دارای ساختمان‌های ثانویه استفاده می‌شود و در حد ۱۰-۲% به بافر افزوده می‌شود؛ گرچه فعالیت آنزیم پلی‌مراز را تا حد ۵۰% کاهش می‌دهد. بتائین[4] افزودنی دیگری است که به همین منظور استفاده می‌شود.

---

1. BSA: Bovine Serum Albumin
2. $(NH4)_2SO_4$
3. DMSO: Dimethyl Sulfoxide
4. Betaine

از دترجنت‌های غیریونی مانند تریتون X-۱۰۰[1]، توئین-۲۰[2] و NP-۴۰[3] در حد ۱-۰/۱% برای پایداری آنزیم پلی‌مراز در بافرها استفاده می‌شود. ضمن آن‌که از ایجاد ساختمان ثانویه در DNA جلوگیری می‌کند. ضمناً دترجنت‌ها می‌توانند آلودگی احتمالی DNA با SDS که در استخراج DNA استفاده می‌شود را خنثی نمایند.

از کلرید تترامتیل آمونیوم(TMAC)[4] در بافر PCR در غلظت mM ۱۰۰-۱۵ برای حذف اتصالات غیراختصاصی پرایمرها به الگو استفاده می‌شود.

مواد احیاکننده‌ای مانند ۲-مرکاپتواتانول(ME-۲)[5] و دی‌تری تیول(DTT)[6] نیز به بافرها افزوده می‌شود که مانع اکسید شدن آنزیم پلی‌مراز و غیرفعال شدن آن می‌شوند. گلیسرول نیز جهت پایداری بیشتر آنزیم بافرهای PCR افزوده می‌گردد.

مواد دیگری مانند فرمامید[7] و پلی‌اتیلن گلیکول (PEG)[8] ۶۰۰۰ نیز از تشدید کننده‌های دیگر واکنش PCR می‌باشند.

به طور معمول، بافرهای PCR ممکن است حاوی این مواد افزودنی نباشند

1. Triton X-100
2. Tween-20
3. NonideP40
4. TMAC: Tetramethylammonium Chloride
5. 2-ME: 2-mercaptoethanol
6. DTT: Dithiothreitol
7. Formamide
8. PEG: Poly Ethylene Glycol 6000

و می‌توان به طور جداگانه با نام "تشدید کننده‌ی PCR"[1] از شرکت‌های فروشنده‌ی مواد بیولوژی مولکولی تهیه نمود.

۸-۳-۲) کاتیون‌های دو ظرفیتی

در واکنش PCR، به طـور معمول از یون منیـزیم به صورت کلرید منیزیم استفاده می‌شود. منیزیم کوفاکتوری برای آنزیم‌های پلی‌مراز می‌باشد. ضمناً یون منیزیم سبب پایداری DNA دو رشته‌ای (dsDNA) و افزایش Tm می‌گردد، به عبارتی کنترل کننده‌ی اختصاصیت واکنش PCR می‌باشد. یون Mg^{2+} کمپلکس محلولی با dNTP تشکیل می‌دهد که بـرای الـحاق dNTP ضروری است. بنابراین استفاده از غلظت‌های بالاتری از dNTP در واکنش به استفاده از مقادیر بالاتری از کلرید منیزیم نیاز دارد. استفاده از کلرید منیزیم در غلـظت کم باعث تولید محصول کم و در غلظت زیاد باعث ایجاد باندهای غیراختصاصی می‌شود. غلظت مناسب یون منیزیم در واکنش PCR حدود ۱-۴ mM تعیین شده است.

یون منگنز نیز در روش‌های "جهش‌زایی بر اساس PCR" استفاده می‌شود. غلظت بالای میزان منگنز باعث افزایش میزان جهش و در نتیجه ایجاد خطا در قرار دادن نوکلئوتیدها توسط پلی‌مراز می‌شود.

۹-۳-۲) کاتیون‌های تک‌ظرفیتی

از کاتیون‌های تک ظرفیتی مهم در PCR، پتاسیم است که به صورت کلرید پتاسیم (KCl)، در غلظت نهایی ۵۰ mM در بافر PCR استفاده می‌شود.

1. PCR enhancer

برای بهبود تکثیر قطعات DNA به خصوص در اندازه‌ی بین bp ۱۰۰۰–۱۰۰ غلظت بالاتری از KCl، حدود mM ۱۰۰–۷۰ مورد نیاز است. برای تکثیر قطعات بزرگ‌تر، استفاده از غلظت‌های کمتر KCl، مناسب‌تر است. احتمالاً افزایش غلظت نمک سبب دناتوره شدن قطعات کوتاه‌تر DNA و تکثیر بهتر آن‌ها می‌شود. البته باید در نظر داشت که یون پتاسیم در غلظت‌های بالاتر از mM ۵۰، سبب کاهش فعالیت آنزیم پلی‌مراز می‌شود.

۱۰–۳–۲) مهارکننده‌های PCR

واکنش PCR در حضور موادی مهار می‌شود. منشأ این مهار کننده‌ها، غالباً از نمونه‌ای است که به عنوان منبع DNA مورد استفاده قرار گرفته شده است. استفاده از مواد شیمیایی در مرحله‌ی استخراج و خالص‌سازی DNA نیز منجر به ورود ممانعت‌کننده‌ها به DNA و در نتیجه واکنش PCR می‌گردد.

یکی از منابع مهم DNA، خون می‌باشد و بهتر است اگر خون به عنوان منبع DNA مورد استفاده قرار می‌گیرد با استفاده از EDTA از لخته‌شدن آن جلوگیری شود. استفاده از هپارین[1] به عنوان ماده‌ی ضد انعقاد به دلیل اثر مهار کنندگی آن در واکنش PCR توصیه نمی‌شود.

در طی مراحل استخراج برای لیزسلولی و دناتوره‌کردن DNA از دترجنت‌های مختلف استفاده می‌شود. استفاده از دترجنت‌های غیرآنیونی مانند تریتون X–۱۰۰، توئین ۲۰[2] و NP۴۰ بر دترجنت‌های یونی مثل SDS ارجح است.

1. Heparin
2. Tween 20

معمولاً استفاده از دترجنت‌های غیرآنیونی در غلظت بالا تا ۵% از واکنش PCR جلوگیری نمی‌کنند. در مورد دترجنت‌های یونی مثل SDS حتی الامکان باید از غلظت‌های کم آن‌ها استفاده شود و نیز قبل از واکنش PCR، بقایای احتمالی آن‌ها به روش استخراج با فنل و رسوب اتانول حذف شوند.

یکی دیگر از مهارکننده‌های PCR، پروتئیناز K می‌باشد. بیشتر روش‌های استخراج DNA در حضور این ماده انجام می‌شود و پروتئازی است که پروتئین‌های دناتوره‌شده را هضم می‌کند. در هنگام PCR این ماده یا باید حذف و یا غیرفعال گردد. دناتوره‌کردن اولیه در ۹۵°C برای غیرفعال کردن آن کافی می‌باشد. همچنین تیمار حرارتی که هنگام استخراج با فنل انجام می‌شود، نیز پروتئیناز K را دناتوره خواهد کرد. فنل یکی دیگر از ممانعت‌کننده‌های PCR می‌باشد که با استفاده از کلروفرم- ایزوآمیل الکل (۱:۴۹) یا در مرحله‌ی رسوب با اتانول از بین خواهد رفت.

نمونه‌های محیطی مانند زباله‌ها، رسوبات، کود، مدفوع و خاک و یا نمونه‌های آغشته به خاک حاوی موادی به نام اسیدهای هومیک[1] هستند. این اسیدها، مواد آلی تشکیل دهنده‌ی اصلی خاک هستند که حاصل تجزیه‌ی بیولوژیک مواد آلی می‌باشند. این اسیدها مخلوطی از اسیدهای حاوی گروه‌های کربوکسیل و فنولات هستند که می‌توانند با یون‌های موجود در واکنش PCR واکنش داده و آن را منع می‌کنند. اعمال مراحل اضافه‌تر برای حذف این ترکیبات در مرحله‌ی خالص‌سازی DNA از نمونه‌های آلوده به خاک ضروری است.

1. Humic acid

- در جدول ۳-۲ نمونه‌ای از یک واکنش PCR استاندارد نشان داده شده است. توجه داشته باشید که این مقادیر ممکن است در PCRهای مختلف جهت بهینه‌سازی PCR در یک دامنه مشخص تغییر کند. از آن جایی که حجم واکنش‌ها بسیار کم بوده بهتراست که در ابتدا مخلوطی از مواد مشترک تهیه کرده و سپس تقسیم نموده و مواد متفاوت به میکروتیوب‌ها افزوده شود. این کار سبب افزایش دقت در کار و نیز یکسان شدن غلظت‌های موجود در میکروتیوب‌ها می‌شود. ضمن آن‌که زمان و سر سمپلر کمتری استفاده می‌شود و منجر به صرفه‌جویی می‌گردد.
- معمولاً در یک واکنش PCR باید یک کنترل منفی که فاقد DNA الگو است و به جای آن آب افزوده می‌شود تا حجم واکنش ثابت باشد و یک کنترل مثبت، حاوی DNA الگویی که قبلاً با پرایمرهای به کار رفته، تکثیر قطعات اختصاصی دیده شده، در نظر گرفته می‌شود. کنترل منفی جهت بررسی آلودگی مواد به کار رفته در واکنش و کنترل مثبت برای تایید کارآیی مواد واکنش به کار رفته و برنامه‌ی تکثیر می‌باشد.
- به دلیل احتمال خطای سمپلینگ و پیپتینگ، معمولاً هنگام تهیه‌ی مخلوط، به جای محاسبه‌ی تعداد نمونه (ضرب کردن تعداد میکروتیوب‌های واکنش در مقدار لازم برای یک میکروتیوب)، مقدار بیشتری، حداقل ۰/۱، در نظر گرفته می‌شود.

در مثال جدول ۳-۲ با احتساب یک نمونه، یک کنترل مثبت و یک کنترل منفی (۳ میکروتیوب) مقادیر در ۳/۱ ضرب شده است.

نام ماده	غلظت نهایی	حجم واکنش برای یک میکروتیوب (۱ X)	حجم واکنش برای ۳ میکروتیوب (۳/۱ X)
بافر PCR (۱۰X)	۱ X	۲	۶/۲
dNTP (۱۰ mM)	۲۰۰µM	۰/۴	۱/۲۴
$MgCl_2$ (۱۰ mM)	۱/۵mM	۰/۶	۱/۸۶
پرایمر پیش برنده (F) (۱۰۰ pmol)	۱۰pmol	۰/۵	۱/۵۵
پرایمر معکوس (R) (۱۰۰ pmol)	۱۰pmol	۰/۵	۱/۵۵
آنزیم Taq پلی مراز (۵ U/µL)	۱U	۰/۲	۰/۶
ddH_2O	-	۱۳/۸	۴۲/۷۸
DNA یا cDNA	۵۰-۲۰۰ng	۲	-
حجم نهایی واکنش	-	۲۰	-

جدول ۳-۲: مثالی از یک واکنش PCR استاندارد

۴-۲) مراحل واکنش PCR

به‌طور معمول PCR شامل مجموعه‌ای از ۴۰-۲۰ چرخه حرارتی یا سیکل و هر چرخه شامل ۳ مرحله[1] با درجه حرارت مشخص است. درجه حرارت و مدت‌زمان انتخاب شده در هر چرخه به عوامل مختلفی از قبیل نوع آنزیم مورد استفاده، غلظت یون‌های دوظرفیتی، دزوکسی نوکلئوتیدها و درجه حرارت

1. Step

ذوب شدن پرایمرها بستگی دارد. در طی واکنش PCR در هر چرخه با فرض ۱۰۰ درصد بازده ی واکنش میزان محصول دو برابر می‌شود. به عبارتی تکثیر قطعات DNA به صورت تصاعدی[1] است (شکل ۱-۲).

مراحل تکثیر در هر چرخه عبارتند از:

۱. مرحله دناتوراسیون یا واسرشتی[2]

۲. مرحله اتصال یا انلنیگ[3]

۳. مرحله گسترش یا طویل شدن[4]

۱. مرحله دناتوراسیون یا واسرشتی: این مرحله اولین مرحله‌ی PCR بوده و شامل گرم‌کردن واکنش به میزان ۹۴-۹۸°C درجه به مدت ۳۰-۲۰ ثانیه است. این عمل باعث ذوب‌شدن DNA الگو و DNA پرایمر (جداشدن دو رشته DNA از همدیگر) از طریق از بین‌رفتن باندهای هیدروژنی بین نوکلئوتیدهای دو رشته DNA و تولید DNA تک رشته‌ای می‌شود. آنزیم پلی‌مراز برای انجام عمل سنتز DNA، به DNA تک رشته‌ای نیاز دارد.

۲. مرحله اتصال یا انلنیگ: در این مرحله دمای واکنش به ۵۰-۶۵°C به مدت ۴۰-۲۰ ثانیه کاهش می‌یابد تا امکان اتصال DNA پلی‌مراز و پرایمر به DNA الگوی تک رشته‌ای فراهم شود. به‌طور معمول درجه‌ی

1. Exponential
2. Denaturation Step
3. Annealing Step
4. Extension/Elongation Step

حرارت اتصال حدود ۵-۳ درجه کمتر از Tm پرایمر انتخاب می‌شود.

۳. **مرحله گسترش یا طویل شدن:** انتخاب درجه حرارت این مرحله به نوع آنزیم پلی‌مراز مورد استفاده و درجه حرارت بهینه مورد نیاز برای عمل آن بستگی دارد. به عنوان مثال در هنگام استفاده از آنزیم Taq پلی‌مراز از درجه حرارت ۷۲°C استفاده می‌شود. در این مرحله پلی‌مراز، نوکلئوتیدهای مکمل را بر اساس رشته الگو در جهت ′۵ به ′۳ در کنار هم قرار داده و در نهایت رشته‌ی مکمل رشته الگوی اولیه را تولید می‌کند. مدت زمان این مرحله به نوع پلی‌مراز، سرعت عمل آن و طول رشته‌ی DNA الگو بستگی دارد.

جهت آماده‌سازی واکنش، قبل و بعد از این چرخه‌ها، یک مرحله‌ی گرم کردن (مرحله‌ی آغاز) که معمولاً بالای ۹۰°C است و در انتها یک مرحله برای تکمیل رشته‌های ناقص DNA سنتز شده (مرحله‌ی طویل شدن نهایی)، افزوده می‌شود که این مراحل اضافی "مراحل نگه‌داری"[1] نامیده می‌شوند.

- **مرحله آغاز**[2]: این مرحله شامل گرم‌کردن مواد به دمای حدود ۹۶°C-۹۴ (یا ۹۸°C در زمانی که از پلی‌مراز فوق‌العاده مقاوم به حرارت استفاده می‌شود) بوده و معمولاً ۹-۱ دقیقه به طول می‌انجامد. در برخی از کیت‌های PCR که مخلوط واکنش به صورت آماده و معمولاً خشک و لیوفیلیزه وجود دارند، آنزیم پلی‌مراز به یک پروتئین متصل شده تا فعالیت آن متوقف

1. Hold
2. Initialization Step

شده باشد. جهت فعال کردن این نوع پلی‌مراز حتماً به مرحله‌ی گرم کردن آغازی نیاز است تا پروتئین متصل به آنزیم، از آن جدا و یا تجزیه شود که به "PCR با شروع داغ"[1] معروف است.

- **مرحله‌ی طویل‌شدن نهایی[2]:** این مرحله فقط یک بار و پس از آخرین سیکل PCR و در دمای ۷۰–۷۴ °C به مدت ۵–۱۵ دقیقه صورت می‌گیرد و جهت اطمینان از کامل شدن همه‌ی قطعات DNA تکثیر شده انجام می‌شود.
- **مرحله نگه‌داری نهایی[3]:** این مرحله در ۴–۱۵ °C جهت نگه‌داری کوتاه در دستگاه ترمال سایکلر مدت محصولات واکنش انجام می‌گیرد.

این سه مرحله در دستگاه PCR به عنوان "چرخه‌ی یک مرحله‌ای"[4] تعریف می‌شوند. جدول ۴–۲ مثالی از یک برنامه‌ی PCR را نشان می‌دهد.

1. Hot-Start PCR
2. Final Elongation
3. Final Hold
4. One cycle with one step

شکل ۱-۲: تکثیر تصاعدی DNA در واکنش PCR

مرحله	تعداد مراحل (Step)		دما (°C)	مدت زمان	تعداد چرخه‌ها (Cycle)
مرحله‌ی آغازی	۱		۹۵	۳ دقیقه	۱
مرحله‌ی تکثیر	۳	دناتوراسیون	۹۵	۲۰ ثانیه	۳۵
		انلینگ	۵۳	۴۰ ثانیه	
		طویل شدن	۷۲	۱ دقیقه	
مرحله‌ی طویل شدن نهایی	۱		۷۲	۵ دقیقه	۱
مرحله‌ی نگه‌داری نهایی	۱		۴	۱ ساعت	۱

جدول ۴-۲: مثالی از یک برنامه‌ی زمانی و دمایی PCR

۵-۲) کاربردهای PCR

ضریب تأثیر روش PCR چنان گسترده و عمیق بوده است که ردپای این روش را می‌توان در حوزه‌های مختلف علوم دید. در این‌جا با تأکید بر کاربردهای پزشکی، تعدادی از آن‌ها عنوان می‌شوند.

- **جداسازی قطعات DNA:** PCR باعث جداسازی اختصاصی قطعات DNA موردنظر از DNA ژنومی می‌شود. به عبارتی به وسیله‌ی پرایمرهای اختصاصی قطعه‌ی خاصی از DNA به صورت انتخابی تکثیر می‌شود. از این قطعات تکثیر شده می‌توان جهت تعیین توالی و یا کلونینگ استفاده نمود.
- **شناسایی میکروارگانیزم‌ها:** به وسیله‌ی PCR می‌توان عوامل عفونی و حتی بیماری‌زا یا غیربیماری‌زا بودن آن‌ها را شناسایی نمود. در بسیاری

موارد جداسازی میکروب‌ها از بافت‌ها، کشت و رشد دادن آن‌ها مشکل و یا حتی غیرممکن است. PCR امکان شناسایی و تشخیص سریع و دقیق میکروارگانیزم‌های با رشد آهسته، مانند مایکوباکتریوم عامل سل، را فراهم نموده است. حساسیت بالای PCR اجازه‌ی سنجش ویروس‌ها را بلافاصله بعد از آلودگی و حتی قبل از شـروع بیماری را ممکن می‌سازد و در درمان بسیار کمک می‌کند. حتی تعداد ویروس‌ها در یک بیمار به‌وسیله روش‌های کمّی PCR نیز تخمین زده می‌شود.

- **تشخیص جهش‌های ژنتیکی:** بسیاری از بیماری‌های مادرزادی ناشی از وجود جهش‌های ژنتیکی می‌باشند. شناسایی این جهش‌ها در تشخیص و شـناسایی زودهنـگام این‌گونـه بیمـاری‌ها به وسیـله‌ی PCR انـجام می‌شود. ضمناً PCR باعث تشخیص زودهنگام بیماری‌های بدخیمی مانند سرطان‌های خون می‌شود.
- **پزشکی قانونی:** در پزشکی قانونی زمانی که DNA بسیار کمی به عنوان مدرک موجود است (مثلاً درون یک تار مو)، می‌توان با PCR آن را تکثیر نمود و مطالعات بعدی مانند تشخیص هویت را انجام داد. ضمناً از PCR در تشخیص روابط خویشاوندی مانند والد- فرزند یا موارد دیگر بهره‌برداری می‌شود.
- **باستان‌شناسی:** با استفاده از PCR بر روی نمونه‌هایی که ده‌ها یا هزاران سـال عمر دارند، می‌توان قطعات DNA را تکثیر نموده و مطالعات بعدی را انجام داد. این روش با موفقیت در مورد حیواناتی از قبیل ماموت‌های ۴۰ هزار ساله و DNA انسان‌های مومیایی شده انجام شده است.

۶-۲) انواع PCR

۱. **PCR اختصاصی آلل[1]:** این نوع PCR، بر پایه‌ی شناسایی "جهش‌های تک نوکلئوتیدی (SNPs)"[2] است و برای انجام آن به اطلاعاتی شامل توالی DNA و اختلاف بین آلل‌ها نیاز می‌باشد. انتهاهای ′۳ پرایمرهای مورد استفاده باید حاوی SNP باشند.

۲. **PCR نامتقارن[3]:** در این روش یک رشته DNA بیشتر از رشته‌ی دیگر تکثیر می‌شود. این روش در توالی‌یابی DNA و دو رگه سازی با استفاده از پروب که تکثیر فقط یکی از دو رشته موردنیاز است، کاربرد دارد. در این روش PCR به‌صورت معمولی انجام می‌شود، ولی پرایمر برای رشته مورد هدف برای تکثیر به میزان زیاد وجود دارد. به عبارتی پرایمر در غلظت کمتر، عامل محدود کننده‌ی رشد و طویل شدن رشته‌ی دیگر DNA می‌شود.

۳. **PCR مجتمع کننده[4]:** محصول این نوع PCR، قطعه‌ی بلندی از DNA است که در نتیجه‌ی به هم پیوستن قطعات الیگونوکلئوتیدی کوتاه (پرایمرها) دارای قسمت‌های هم پوشاننده می‌باشد.

٤. **PCR وابسته به آنزیم هلیکاز[5]:** در این نوع PCR از آنزیم هلیکاز

---

1. Allele-Specific PCR
2. SNPs: Single Nucleotide Polymorphisms
3. Asymmetric PCR
4. Assembly PCR
5. Helicase-Dependent Amplification PCR

که بازکننده‌ی مارپیچ‌های DNA به جای DNA می‌باشد استفاده می‌شود. بنابراین می‌توان از درجه حرارت ثابت استفاده نمود و نیازی به‌دستگاه ترمال سایکلر نمی‌باشد.

۵. PCR با شروع داغ[1]: روشی است که تکثیر باندهای غیراختصاصی را کاهش می‌دهد. این کار به‌وسیله گرم‌کردن ترکیبات واکنش تا درجه حرارت ذوب (۹۰°C) قبل از اضافه‌کردن آنزیم پلی‌مراز انجام می‌شود. انجام PCR با شروع داغ به روش‌های مختلفی انجام می‌شود:

❖ **روش دستی[2]:** در این روش DNA پلی‌مراز و یا کوآنزیم آن (MgCl2) موقعی که درجه حرارت واکنش به ۷۰°C برسد، اضافه می‌گردد.

❖ **روش جدایی فیزیکی[3]:** در این روش ترکیبات واکنش به‌صورت دو مخلوط مجزا تهیه شده و سپس به‌وسیله یک غشا از هم جدا می‌شوند. این غشا در درجه حرارت‌های بالای ۷۵ °C ذوب و حل شده، سپس ترکیبات دو مخلوط در تماس باهم قرار گرفته و واکنش انجام می‌شود.

❖ **روش با استفاده از آنتی‌بادی‌های علیه پلی‌مراز:** آنتی‌بادی‌های حساس به حرارت به آنزیم DNA پلی‌مراز متصل شده‌اند که این آنتی‌بادی‌ها باعث غیرفعال‌شدن آنزیم می‌شوند. با بالا رفتن درجه حرارت و رسیدن به ۷۰°C، آنتی‌بادی غیرفعال شده و آنزیم فعالیت خود را شروع می‌کند مانند آنزیم پلی‌مراز نوع Platinum Taq.

---

1. Hot-strat PCR
2. Manually
3. Physical separation

❖ **روش استفاده از تغییرات شیمیایی در آنزیم پلی‌مراز:** در این روش گروه‌های شیمیایی بلوکه‌کننده به بعضی از اسیدآمینه‌های آنزیم پلی‌مراز متصل‌شده و در نتیجه آنزیم در درجه حرارت‌های معمولی غیرفعال می‌شود. در درجـه حرارت‌های بالا، این گروه‌ها حذف‌شده و آنزیم فعال می‌شود؛ مانند آنزیم پلی‌مراز AmpliTaq Gold.

❖ **روش استفاده از الیگونوکلئوتیدهای باندشده با پلیمر[1]:** این ترکیبات به واکنش اضافه می‌شوند و از عملکرد آنزیم جلوگیری می‌کنند. این الیگونوکلئوتیدها به‌وسیله حرارت بالا از بین رفته و آنزیم فعال می‌گردد.

۶. **PCR طولانی[2]:** این نوع PCR طولانی‌تر از PCRهای معمولی است و برای تکثیر قطعات بلندتر از ۵ kb به کار می‌رود. در این نوع PCR باید از آنزیم‌های پلی‌مراز با نیمه‌عمر و دقت بالا استفاده شود.

۷. **PCR کلونی[3]:** این نوع PCR برای ردیابی و یافتن کلون‌های باکتریایی یا مخمر که دارای پلاسمیدهای صحیح و مورد نظر هستند انجام می‌شود. به این منظور با خلال دندان یا میکروپیپت‌های استریل، کلونی‌ها از روی پلیت جدا شده و مستقیماً به درون میکروتیوب حاوی مواد PCR وارد می‌شود. در صورتی‌که تکثیر قطعه‌ی هدف با موفقیت انجام شود نشان دهنده‌ی کلونی مثبت یا حاوی قطعه‌ی ژنی مورد نظر و موفقیت کلونینگ می‌باشد.

---

1. Polymer Binding Oligo Nucleotides
2. Long PCR
3. Colony PCR

۸. **PCR سلول منفرد[1]:** این روش PCR کاربرد بسیار زیادی در تشخیص‌های جنین شناسی دارد. با استفاده از یک سلول جنینی موجود در خون مادر می‌توان بررسی‌های ژنتیکی جنین را انجام داد و پی به وجود ناهنجاری‌های ژنتیکی در جنین برد.

۹. **PCR در محل (ISH)[2]:** تکثیر درون یک سلول بافت یا سلول‌های تثبیت شده بر روی یک اسلاید انجام می‌شود.

۱۰. **PCR آشیانه‌ای[3]:** در این روش اختصاصیت تکثیر DNA به دلیل کاهش تکثیرهای غیراختصاصی DNA افزایش می‌یابد. PCR آشیانه‌ای متشکل از انجام دو واکنش PCR متوالی با استفاده از دو مجموعه پرایمر می‌باشد. در واکنش اولیه یک جفت پرایمر برای تولید محصولات DNA استفاده می‌شود که علاوه بر منطقه‌ی مورد نظر ممکن است شامل قطعات DNA غیراختصاصی نیز باشد. در واکنش دوم، پرایمرهای با قطعه‌ای کوچک‌تر از درون قطعه‌ی تکثیر شده‌ی اولیه مکمل می‌شوند. به عبارتی محصول واکنش دوم کوتاه‌تر از محصول واکنش اول است (شکل ۲-۲).

1. Single cell PCR
2. ISH: In Situ Hybridisation
3. Nested PCR

شکل ۲-۲: مراحل مختلف واکنش PCR آشیانه‌ای

۱۱. PCR چندتایی[1]: در این نوع PCR دو یا چند قطعه به طور همزمان تکثیر می‌شوند. به عبارتی واکنش حاوی چندین جفت پرایمر می‌باشد. دمای Tm همه‌ی پرایمرها باید تقریباً یکی بوده و اندازه‌ی محصولات متفاوت در نظر گرفته شوند تا تشخیص به وسیله‌ی الکتروفورز امکان‌پذیر باشد. هدف از این نوع روش صرفه‌جویی در زمان و مواد مصرفی است.

نوع تغییر یافته و پیشرفته‌تری از PCR چندتایی به نام "ادغام چندتایی

1. Multiplex PCR

وابسته به تکثیر پروب" (MLPA)[1] ابداع شده است که برای تشخیص تعداد کپی‌های بالای ۴۰ کپی از DNA ژنومی و یا RNA و همچنین حذف و الحاق ژنی (یک یا چند اگزون) استفاده می‌شود. با استفاده از این روش چند نوع از قطعات DNA را می‌توان با استفاده از یک جفت پرایمر تکثیر داد و قادر به تشخیص اختلافات توالی حتی در یک نوکلئوتید می‌باشد. در واکنش PCR چندتایی استاندارد، جهت تکثیر هر قطعه نیاز به یک جفت پرایمر ویژه می‌باشد. این پرایمرها هنگامی که در میزان زیاد استفاده شوند باعث مشکلات زیادی مانند دایمر شدن و یا جفت شدن نادرست می‌شوند. ولی در واکنش MLPA، پروب‌ها تکثیر می‌گردند. هر پروب شامل دو الیگونوکلئوتید است که باعث تشخیص مجاور هدف می‌شود. یکی از پروب‌های الیگونوکلئوتیدی شامل توالی تشخیص داده شده به وسیله پرایمر پیش برنده و توالی دیگر به وسیله پرایمر معکوس تشخیص داده می‌شود. فقط هنگامی که هر دو پروب الیگونوکلئوتیدی با هدف مربوطه هیبرید شوند، می‌توانند به صورت یک پروب کامل متصل شوند. مزیت دو بخشی کردن و از هم جدا کردن پروب این است که فقط الیگونوکلئوتیدهای متصل شده تکثیر گردند. اگر پروب‌ها از هم جدا نشوند، توالی‌های پرایمر در هر انتها باعث می‌شود که پروب‌ها بدون هیبرید شدن با DNA الگوی خود تکثیر شوند.

پروب‌های الیگونوکلئوتیدی که متصل نشـــده‌اند، فقط شامل یک توالی پرایمر هستند و قادر به تکثیر و تولید سیگنال نخواهند بود. پرایمر پیش‌برنده‌ی

1. MLPA: Multiplex Ligation Dependent Probe Amplification

اســتفاده شده برای تکثیر پروب با نور فلورسانس نشاندار شده است و هنگام تکثیر به علت نشاندار بودن با نور فلورسانس، توسط دستگاه‌های مخصوص سنجش نور فلورسانس شناسایی می‌شود و سپس با مقایسه‌ی الگوی به‌دست آمده روی یک نمونه با نمونه مرجع، تعداد هر آمپلیکون مشخص می‌شود. در این روش حذف پروب‌های غیرباند شده لازم نیست و این باعث سهولت انجام این تکنیک می‌شود (شکل ۳-۲).

شکل ۳-۲: مراحل روش MLPA

۱۲. PCR اختصاصی جایگاه‌های متیلاسیون (MSP)[1]: این روش برای تشخیص وجود متیلاسیون در CpG در DNA ژنومی استفاده می‌شود. در این روش، DNA ابتدا به‌وسیله سدیم بی‌سولفات تیمار می‌شود و در نتیجه بازهای سیتوزین غیرمتیله‌شده به یوراسیل تبدیل می‌شود. سپس دو نوع PCR با استفاده از دو مجموعه پرایمر خاص بر روی DNA تغییریافته انجام می‌شود. یک مجموعه پرایمر با DNA و با سیتوزین‌ها مکمل می‌شود و DNA متیله‌شده را تکثیر می‌دهد. مجموعه دیگر پرایمر، DNA یوراسیل‌دار یا تیمیدین‌دار را تشخیص می‌دهد تا DNA غیرمتیله‌شده را تکثیر دهد (شکل ۴-۲).

شکل ۴-۲: PCR اختصاصی جایگاه‌های متیلاسیون (MSP)

۱۳. PCR کمی (qPCR)[2]: این نوع PCR برای اندازه‌گیری محصولات PCR استفاده می‌شود. از این روش برای تعیین حضور یک توالی DNA خاص و یا تعداد کپی‌های آن در نمونه استفاده می‌شود. در این روش از رنگ‌های فلورسنس مانند سایبر گرین و یا پروب‌های متصل به فلوئوروکروم‌هایی مانند TaqMan استفاده می‌شود که به توالی‌های پرایمرها متصل شده‌اند. به این

1. MSP: Methylation-Specific PCR
2. Quantitative PCR

پرایمرهای نشاندار پروب[1] گفته می‌شود. این روش به نام Real Time PCR نیز شناخته می‌شود (شکل ۵-۲).

شکل ۵-۲: **سه مرحله از نحوه‌ی عمل پروب‌های Taq در PCR کمی:** وقتی پلی‌مراز، نوکلئوتیدها را به زنجیره‌ی الگو متصل می‌کند، سبب جدا شدن فلوئوروفور و سبب آشکار شدن رنگ آن می‌شود.

۱۴. PCR درهم آمیخته‌ی نامتقارن حرارتی (TAIL - PCR)[2]: این روش برای جداسازی یک توالی ناشناخته که در اطراف یک توالی شناخته‌شده قرار دارد استفاده می‌شود. در این روش از یک پرایمر نوع لانه‌ای و درجه

1. Probe
2. TAIL-PCR: Thermal Asymmetric Interlaced PCR

حرارت‌های انلینگ مختلف استفاده می‌شود. پرایمرهای دژنره برای تکثیر در جهت دیگر توالی ناشناخته استفاده می‌شود.

۱۵. PCR با دمای کاهشی[1]: نوعی PCR است که از باندهای غیراختصاصی به‌وسیله‌ی کاهش تدریجی درجه انلینگ در طی چرخه‌های PCR می‌کاهد. درجه‌ی حرارت انلینگ در چرخه‌های اولیه معمولاً چند درجه بالاتر از Tm پرایمر مورد استفاده (۳–۵°C) می‌باشد و در چرخه‌های بعدی پایین‌تر از Tm پرایمر می‌شود. درجه حرارت بالاتر اختصاصیت اتصال پرایمر را افزایش می‌دهد و درجه‌ی حرارت پایین باعث تکثیر کافی تولیدات اختصاصی در طی چرخه‌های اولیه می‌گردد.

۱۶. PCR نوع آرمس (ARMS-PCR)[2]: روش آرمس به عنوان PCR مخصوص آلل (ASPCR)[3] و یا تکثیر آلل ویژه (PASA)[4] نیز شناخته می‌شود که برای تشخیص جهش‌های نقطه‌ای استفاده می‌گردد. این روش، قدرت تشخیص یک کپی از آلل جهش یافته در بین ۴۰ کپی از آلل نرمال را دارد. سرعت، قابلیت تکرار پذیری و ارزان بودن از فواید این روش می‌باشد.

پرایمرهای مورد استفاده برای این روش، بر اساس تشخیص و تمایز قائل شدن بین نمونه‌هایی که تنها در یک نوکلئوتید ویژه با هم تفاوت دارند، طراحی می‌شوند. پرایمرهای آرمس به طور ویژه‌ای قادر به تکثیر یک آلل در بین یک

1. Touch down
2. ARMS:Amplification Refractory Mutation System
3. ASPCR: Allele-Specific PCR
4. PASA: PCR Amplification of Specific Allele

سیستم چند آللی می‌باشند. به عبارتی در این روش از این خاصیت آنزیم Taq پلی‌مراز که فعالیت اگزونوکلئازی ′۳ به ′۵ ندارد، بهره‌برداری می‌شود. حضور یک اشتباه بین انتهای ′۳ پرایمر و الگو باعث ناتوانی آنزیم در ادامه‌ی تکثیر خواهد شد. روش آرمس استاندارد شامل دو واکنش PCR در دو میکروتیوب جداگانه و استفاده از ۳ پرایمر می‌باشد. یکی از پرایمرها ثابت و مکمل با الگو در هر دو واکنش می‌باشد. پرایمر دیگر بر اساس نوکلئوتید انتهای ′۳ است که در فرد طبیعی سالم با جهش یافته متفاوت می‌باشد (نوکلئوتید جهش یافته). بنابراین یکی از پرایمرها مخصوص توالی DNA فرد طبیعی سالم و دیگری مخصوص توالی فرد جهش یافته در نوکلئوتید معین می‌باشد.

اگر عمل پلیمریزاسیون فقط در لوله حاوی پرایمر طبیعی انجام شود، نشان‌دهنده عدم جهش نقطه‌ای در باز مورد نظر است و اگر عمل پلیمریزاسیون در لوله حاوی پرایمر جهش یافته انجام شود، نشان‌دهنده حضور جهش نقطه‌ای در باز مورد نظر است (شکل ۶-۲).

شکل ۶-۲: مراحل مختلف واکنش ARMS - PCR

۱۷. PCR چندشکلی تصادفی (RAPD–PCR)[1]: این نوع PCR با پرایمرهایی به‌نام RAPD یا پرایمرهای اختیاری انجام می‌گردد. پرایمرهای ۱۰ جفت بازی با توالی تصادفی طراحی می‌شوند و در PCR مورد استفاده قرار می‌گیرند. توالی و اندازه محصولات مشخص نیست. با این روش می‌توان چند شکلی بودن ژن‌ها در موجـودات، بدون شناخت توالی نوکلئوتیدی آن‌ها را ردیابی کرد.

۱۸. PCR فلش[2]: روشی است که بر اساس پروب‌های فلورسنس طراحی شده و مشابه روش Real-Time PCR می‌باشد؛ اما در این روش برخلاف Real-Time PCR فقط حضور و یا عدم حضور میکروارگانیزم مدنظر می‌باشد و برای تعیین کمیت نمونه طراحی نشده است.

برای انجام فلش PCR از دستگاهی به نام Gene و همچنین از ماده فلورسنس برای مرحله‌ی آنالیز بعد از PCR استفاده می‌شود. این دستگاه قادر است با استفاده از سنجش فلورسنس در نقطه‌ی پایانی[3]، کیفیت نمونه موردنظر و همچنین حضور ویروس یا میکروارگانیزم‌های دیگر را در نمونه تشخیص دهد. این دستگاه بر خلاف دستگاه‌های دیگر نیاز به میکروتیوب ویژه بـرای سنجش فلورسنس ندارد و تمام سنجش‌های آن در میکروتیوب‌های معمولی قابل انجام می‌باشد. کاربری آسان و عملیات ساده این دستگاه باعث شده تا به طور وسیعی از آن در آزمایشگاه‌های تشخیصی و بیولوژی مولکولی استفاده شود.

---

1. RAPD: Random Amplified Polymorphic DNA
2. Flash PCR
3. Endpoint-PCR

مزایای این روش را می‌توان در موارد زیر خلاصه نمود:

تعیین کمیت نمونه، حساسیت بالا، سادگی انجام کار، عدم نیاز به مراحل بعد از PCR، صرفه‌جویی در مصرف مواد به دلیل عدم نیاز به ژل آگارز، عدم نیاز به اتیدیوم برماید و قابلیت ذخیره سازی نتایج حاصل در کامپیوتر.

۱۹. PCR معکوس[1]: این روش PCR برای تشخیص توالی‌های اطراف یک توالی شناخته شده استفاده می‌شود. پرایمرها بر اساس توالی شناخته شده طراحی می‌شوند و واکنش PCR شامل مجموعه‌ای از برش‌های DNA با آنزیم های نوکلئاز و کلونینگ می‌باشد.

۲۰. PCR نسخه‌برداری معکوس (RT-PCR)[2]: در این روش برای تکثیر DNA از الگوی RNA استفاده می‌شود. آنزیم رونویسی معکوس[3]، RNA را به DNA مکمل (cDNA)[4] تبدیل کرده و سپس cDNA به‌وسیله‌ی PCR تکثیر می‌یابد. RT-PCR برای تعیین بیان ژن و یا برای شناسایی توالی یک RNA شامل ناحیه شروع و پایان رونویسی استفاده می‌شود (شکل ۷-۲).

1. Inverse PCR
2. RT-PCR: Reverse Transcription PCR
3. RT: Reverse Transcriptase
4. cDNA: Complementary DNA

شکل ۷-۲: PCR نسخه‌برداری معکوس (RT-PCR)

برای انجام واکنش RT-PCR به الگو (RNA)، پرایمر، dNTPs و یک آنزیم DNA پلی‌مراز وابسته به RNA یا آنزیم رونویسی معکوس نیاز است. در اولین مرحله، پس از نگه‌داری کردن این مواد در ۳۷°C به مدت حدود ۱ ساعت، cDNA تک رشته‌ای از الگوی RNA ساخته می‌شود. محصول در ابتدا یک مولکول هیبرید RNA-DNA است که برای جدا کردن cDNA از RNA، از آنزیم هضم‌کننده‌ی RNA (RNase H) استفاده می‌شود که در نتیجه

RNA هضم و حذف می‌شود. در مرحله‌ی دوم مانند یک واکنش PCR استاندارد، از cDNA به عنوان الگو استفاده شده و توسط آنزیم پلی‌مراز وابسته به DNA، پرایمرهای اختصاصی و dNTPs، cDNAهای تک رشته‌ای به DNA دو رشته‌ای تبدیل شده و تکثیر می‌گردد.

از سه نوع پرایمر برای انجام واکنش های RT-PCR استفاده می‌شود:

۱. **پرایمر "الیگودی تی"[1]:** این نوع پرایمر به دم پلی A مربوط به mRNA یوکاریوت‌ها متصل شده و ساخت cDNA را از روی مولکول‌های mRNA موجود در واکنش توسط آنزیم نسخه‌برداری معکوس فراهم می‌سازد.

۲. **پرایمر "شش‌تایی‌های تصادفی"[2]:** این نوع پرایمرها الیگودی اکسی ریبونوکلئوتیدهای تصادفی شش‌تایی می‌باشند. با استفاده از این پرایمرها مکمل DNA همه‌ی انواع RNA سنتز می‌شود.

۳. **پرایمرهای اختصاصی:** پرایمرهای اختصاصی برای ناحیه‌ی خاصی از ژنوم طراحی می‌شوند و از ساخته شدن cDNAهای اضافی جلوگیری می‌شود.

مهمترین آنزیم‌های نسخه‌برداری معکوس شامل موارد زیر می‌باشند:

آنزیم Tth که از باکتری ترموس‌ترموفیلوس به‌دست می‌آید و در حضور یون منگنز فعالیت نسخه‌برداری معکوس و در حضور یون منیزیم فعالیت DNA

1. Oligo-dT
2. Random Hexamer

پلی‌مرازی دارد.

- آنـزیم AMV کـه از یـک نـوع ویـروس پرنـدگان بـه‌نـام ویـروس میلوبلاستوسیس پرندگان[1] استخراج می‌گردد و دارای فعالیت RNaseH نیز می‌باشد. دمای مطلوب فعالیت آن ۴۲ °C است و برای تهیه cDNAهای با طول کمتر از ۵۰۰ bp استفاده می‌گردد.
- آنزیم MMLV یا MuLVs از یک نوع ویروس عامل لوکمی جوندگان[2] استخراج می‌شود. فعالیت RNase H آن کمتر از آنزیم AMV می‌باشد و در ۳۷°C درجه فعالیت می‌کند.
- آنزیم سوپر اسکریپت[3] در واقع آنزیم MMLV است که دستکاری ژنتیکی شده و ژن قسمت کد کننده‌ی RNase H آن حذف گردیده است. این آنزیم برای تهیه cDNAهای طویل استفاده می‌گردد.

۷-۲) مراحل ساخت cDNA

معمولاً در ابتدا RNA با پرایمرها مخلوط شده و به مدت ۵ دقیقه در ۶۵ °C نگه‌داری می‌شوند. سپس بقیه‌ی مواد به میکروتیوب اضافه می‌شود و به مدت ۶۰ دقیقه در ۴۲ °C نگه‌داری می‌گردد. در جدول ۵-۲ مواد واکنش ساخت cDNA نشان داده شده است. از آن‌جایی‌که RNA ناپایدار است و مستعد تجزیه توسط آنزیم‌های ریبونوکلئازهای محیطی می‌باشد، باید از آب تیمارشده

1. AMV: Avian Myeloblastosis Virus
2. MMLV: Mouse Moloney Leukemia Virus
3. Superscript

با DEPC و نیز وسایل فاقد RNase استفاده گردد. به واکنش نیز معمولاً یک ممانعت کننده‌ی آنزیم RNase (RNasin)[1] افزوده می‌شود.

نام ماده	مقدار (µl)	توضیحات
الگوی RNA	۳	RNA یا نوع تام، یا mRNA و یا اختصاصی می‌باشد.
پرایمر	۱	دژنره، الیگو dT و یا اختصاصی
آب تیمار شده با DEPC	۸	
بافر ۵x	۴	
ممانعت کننده RNase	۱ (۲ u/µl)	
dNTPs	۲ (۱۰ mM)	
آنزیم RT	۱ (۲۰۰u/µl)	
حجم نهایی	۲۰	

جدول ۵-۲: مواد لازم در ساخت cDNA

مزایا و کاربردهای روش RT-PCR را می‌توان در زیر خلاصه نمود:

- راهی سریع، متنوع و فوق‌العاده حساس برای بررسی بیان ژن‌های موردنظر؛
- امکان انجام آزمایشات مولکولی متعدد با مقادیر اندک RNA؛
- فراهم ساختن اطلاعات نیمه کمی درباره‌ی میزان بیان ژن‌ها؛
- تشخیص رونوشت‌های خاص با استفاده از پرایمرهای اختصاصی؛
- بررسی و تشخیص آلودگی‌های ویروسی با ژنوم RNA مانند ویروس عامل ایدز؛

1. Ribonuclease inhibitor, RiboLock

- کلون کردن cDNAهای با بیان متفاوت و بررسی تفاوت‌های بیانی آن‌ها و ایجاد کتابخانه‌های ژنتیکی[1] از cDNA.

۸–۲) بهینه‌کردن[2] واکنش PCR

انجام یک PCR موفق و مطلوب، مستلزم دقت نظر در تأمین فضای مناسب آزمایش در آزمایشگاه برای اجتناب از آلودگی در واکنش PCR، تهیه‌ی مخلوط واکنش با غلظت‌های مناسب و صحیح از مواد، تعیین دماهای مناسب برای تکثیر و تعداد مناسب از چرخه‌ها و تعریف مراحل آن می‌باشد.

- بهتر است جهت انجام PCR از کابینت‌های مخصوص PCR[3] که مجهز به لامپ UV می‌باشد و نسبت به هودهای آزمایشگاهی لامینار فضای کمی را اشغال می‌کنند، استفاده نمود. در صورت عدم دسترسی به چنین وسایلی می‌توان محلی از آزمایشگاه که دور از جریان هوا بوده و رفت و آمد کمتری در آن قسمت است را انتخاب نمود. بهترین کار، اختصاص فضاهای مجزا برای استخراج DNA، استخراج RNA، تهیه‌ی واکنش PCR و آنالیز نتایج واکنش PCR و الکتروفورز است تا از آلودگی‌های احتمالی اجتناب شود.
- سطوح کار باید قبل و بعد از کار ضدعفونی شوند. بهترین ضد عفونی کننده برای حذف DNA و RNAهای محیط، استفاده از سفید کننده‌های رقیق شده مانند آب ژاول است. البته باید به اثر خورندگی این مواد توجه کرد. استفاده

1. cDNA library
2. Optimization
3. PCR work station

از الکل به تنهایی برای پاک سازی سطوح از DNA کافی نمی‌باشد. استفاده از لامپ‌های UV تنها سبب ممانعت از رشد میکروب‌ها می‌شوند.

- استفاده از سمپلرهای جداگانه برای کار استخراج، PCR و الکتروفورز باعث کاهش آلودگی‌ها می‌شوند. پیپت‌ها می‌توانند منشأ عمده‌ی آلودگی‌ها در PCR باشند. آموزش صحیح استفاده، نگه‌داری و تمیز کردن این پیپت‌ها به دانشجویان و کارکنان مبتدی، کمک بسیاری در گرفتن نتایج صحیح و قابل اعتماد می‌کند. از آن‌جا که حجم کلی واکنش‌های PCR کم است خطاهای به ظاهر جزئی در پیپت نمودن، سبب بهم خوردن غلظت آن‌ها در واکنش می‌شود. کالیبره کردن منظم و دوره‌ای پیپت‌ها جهت بررسی دقت آن‌ها الزامی است.
- استفاده از میکروتیوب‌ها و نوک سمپلرهای یک‌بار مصرف، با کیفیت و استریل جهت PCR الزامی است. استفاده از میکروتیوب‌های "عاری از DNA و RNA"[1] گرچه گران قیمت‌تر هستند؛ اما تضمین کننده‌ی حفظ نمونه‌ها به خصوص در مواردی که مقادیر آن‌ها بسیار کم است، می‌باشد. در میکروتیوب‌هایی که درب آن‌ها به خوبی بسته نمی‌شود در طی چرخه‌های حرارتی آب درون واکنش تبخیر شده و در اثر تغییر حجم، غلظت مواد درون واکنش بهم می‌خورد.
- استفاده از ماسک و دستکش‌های تمیز و یک بار مصرف سبب کاهش آلودگی‌ها می‌شوند. بزاق و سلول‌های پوستی ریزش شده از پوست انسان منبع RNase می‌باشند و در حین کار کردن با RNA، سبب تجزیه‌ی

1. DNase, RNase free

RNA می‌شوند.

- برای ممانعت از آلودگی‌های احتمالی متقاطع، بهتر است مواد در حجم‌های کوچک تقسیم شده[1] و هر فرد از یک مجموعه‌ی کار[2] مجزا و اختصاصی به کار خود استفاده نماید. در اختیار قرار دادن مواد ذخیره[3] جهت کار می‌تواند سبب هدر رفتن آن‌ها، تحمیل هزینه‌ی اضافه و ایجاد خطا در نتایج واکنش گردد. ضمن آن که انجماد و ذوب کردن‌های[4] مکرر مواد ذخیره، سبب کاهش فعالیت آن‌ها می‌شود.
- در نظر گرفتن کنترل‌های مثبت و منفی در واکنش PCR به تفسیر و تأیید نتایج کمک بسیاری می‌کند.
- بهتر است ابتدا مخلوطی از مواد مشترک (مانند آب، بافر، آنزیم، MgCl2 و dNTP) در واکنش‌های مختلف تهیه شود و سپس در میکروتیوب‌ها تقسیم گردد. این روش احتمال خطا در حجم مواد را کاهش داده و همچنین زمان و وسایل مورد نیاز جهت آماده‌سازی واکنش را کاهش می‌دهد.
- برای دقت عمل، تمام مواد مورد نیاز پس از ذوب شدن، باید به آرامی با ورتکس هم زده شده و با استفاده از میکروفیوژ، در پایین میکروتیوب جمع‌آوری شوند. ورتکس شدید باعث تولید کف و کاهش فعالیت آنزیم پلی‌مراز می‌گردد.

---

1. Aliquote
2. Working
3. Stock
4. Freeze- thow

- توصیه می‌شود مواد واکنش بعد از خروج از فریزر بر روی یخ نگه‌داری شوند تا از کاهش فعالیت آن‌ها جلوگیری شود. از نگه‌داشتن طولانی مدت مواد در خارج از یخچال و فریزر جلوگیری شود.
- میکروتیوب‌ها با ماژیک با رنگ پایدار شماره‌گذاری و یا نشانه‌گذاری شوند. چسباندن برچسب‌هایی که در حرارت ذوب می‌شوند سبب آلودگی دستگاه ترمال سایکلر می‌شود.
- سرسمپلرها و میکروتیوب‌های آلوده در محلول حاوی مواد سفید و ضدعفونی کننده‌ی رقیق، غیرفعال و سپس حذف شوند. بهتر است یک ظرف کوچک مخصوص پسماند حاوی مواد سفید کننده بر روی محل کار پیش‌بینی شده و به طور روزانه تخلیه شود.

۹–۲) بهینه‌کردن شرایط چرخه‌های PCR

انتخاب دما و مدت زمان مناسب در مراحل و چرخه‌های PCR و تعداد تکرار آن‌ها، سبب تکثیر صحیح قطعات مورد نظر در واکنش PCR می‌گردد.

❖ **مرحله دناتوراسیون:** جهت باز شدن DNAی الگو معمولاً دمای ۹۴–۹۵°C به مدت ۲–۰/۵ دقیقه کافی می‌باشد. اگر محتوای GC در DNA خیلی بالا باشد، زمان دناتوره‌شدن را می‌توان تا ۴–۳ دقیقه افزایش داد. مواد افزوده کننده‌ای مانند گلیسرول، DMSO یا فرمامید جهت تسهیل دناتوراسیون DNA استفاده می‌شود. روش دیگر جهت کاهش درجه حرارت ذوب تولیدات PCR، جانشین کردن dGTP با ۷–deaza-dGTP در مخلوط واکنش می‌باشد.

❖ **مرحله انلینگ:** معمولاً درجه‌ی حرارت انلینگ ۵ درجه پایین‌تر از Tm پرایمر است. این مرحله برای مدت ۲–۰/۵ دقیقه کافی می‌باشد. چنانچه باندهای غیراختصاصی به‌دست آید، بهتر است درجه حرارت انلینگ حدود ۱–۲°C افزایش یابد.

❖ **مرحله‌ی طویل شدن:** معمولاً این مرحله در ۷۰–۷۵°C انجام می‌شود. دما و مدت زمان بر اساس نوع آنزیم پلی‌مراز و اندازه‌ی قطعه‌ی هدف تعیین می‌شود. زمان معمولاً ۱ دقیقه به ازای هر bp ۱۰۰۰ در نظر می‌شود.

❖ **مرحله‌ی گسترش نهایی:** بعد از این‌که سیکل‌های PCR تمام شد، نمونه‌ها معمولاً در ۷۲°C برای ۱۵–۵ دقیقه قرار می‌گیرند تا ساخته‌شدن تولیدات PCR سنتزشده تکمیل گردد. همچنین در طی این مرحله فعالیت ترانسفراز انتهایی پلی‌مراز Taq، نوکلئوتیدهای A اضافی را به انتهای ′۳ تولیدات PCR اضافه می‌کند. بنابراین چنانچه قطعات PCR بخواهد در وکتور T/A کلون شوند، این مرحله تا ۳۰ دقیقه می‌تواند ادامه یابد.

❖ **تعداد چرخه‌های PCR:** به میزان DNA الگو در مخلوط واکنش بستگی دارد. اگر کیفیت DNA الگو در شروع واکنش مناسب باشد، معمولاً ۳۰–۲۵ سیکل کافی می‌باشد. اگر میزان DNA الگو کم باشد تعداد چرخه‌ها را می‌توان تا ۴۰ سیکل نیز افزایش داد. معمولاً افزایش تعداد چرخه‌ها بر روی میزان محصول تأثیر زیادی نمی‌گذارد که احتمالاً به دلیل کاهش فعالیت آنزیم پلی‌مراز و یا مصرف شدن مواد مورد نیاز

برای واکنش می‌باشد.

۱۰–۲) مشکلات شایع در PCR [1]

مشکل ۱: محصول واکنش PCR، قطعات غیراختصاصی بزرگ‌تر از قطعه‌ی مورد نظر است.

راه حل:

– کاهش زمان انلینگ؛

– افزایش دمای انلینگ؛

– کاهش زمان طویل شدن؛

– کاهش دمای مرحله‌ی طویل شدن به حدود ۶۸°C–۶۲؛

– افزایش غلظت KCl یا بافر تا حد ۲ برابر بدون تغییر غلظت MgCl2؛

– افزایش غلظت MgCl2 تا حد ۴/۵–۳ برابر بدون تغییر غلظت dNTP؛

– استفاده‌ی پرایمر در غلظت کمتر؛

– استفاده‌ی DNA الگو در غلظت کمتر؛

– استفاده از آنزیم پلی‌مراز در غلظت کمتر؛

اگر این تغییرات مؤثر واقع نشدند باید سکوئنس پرایمر مجدداً بررسی شده و سکوئنس پرایمرها تغییر داده شوند.

مشکل ۲: محصول واکنش PCR، قطعات غیراختصاصی کوچکتر از قطعه‌ی مورد نظر است.

1. Troubleshooting

راه حل:

– افزایش دمای انلینگ؛

– افزایش زمان انلینگ؛

– افزایش زمان طویل شدن؛

– افزایش دمای طویل شدن به ^{o}C ۷۸–۷۴؛

– کاهش غلظت KCl یا بافر به حد ۰/۸–۰/۷ برابر در حالی‌که غلظت MgCl2 در حد ۲ mM–۱/۵ باقی بماند.

– افزایش غلظت MgCl2 تا حد ۴/۵–۳ برابر بدون تغییر غلظت dNTP

– کاهش میزان پرایمر؛

– کاهش میزان الگو؛

– کاهش میزان آنزیم پلی‌مراز؛

اگر این تغییرات مؤثر واقع نشدند باید سکوئنس پرایمر مجدداً بررسی شده و سکوئنس پرایمرها تغییر داده شوند.

مشکل ۳: از واکنش PCR که قبلاً محصول به‌دست می‌آمد، محصولی به‌دست نمی‌آید.

راه حل:

– بررسی تمامی مواد واکنش که افزودن موردی فراموش نشده باشد.

– تغییر محلول dNTP، زیرا به انجماد و ذوب‌های مکرر حساس می‌باشد.

اگر از پرایمرهای جدیدی استفاده می‌شود باید از صحت سنتز آن مطمئن شد.

– افزایش میزان پرایمر؛

– افزایش میزان الگو؛

– کاهش دمای انلینگ تا حد ۱۰°C–۶ ؛

مشکل ٤: محصول واکنش ضعیف است.

راه حل:

– کاهش تدریجی دمای انلینگ تا حدی که ممکن است؛

– افزایش میزان پرایمر؛

– افزایش میزان الگو؛

– افزایش میزان آنزیم پلی‌مراز؛

– تغییر غلظت KCl یا بافر (اگر اندازه‌ی محصول کمتر از bp ۱۰۰۰ باشد، افزایش غلظت و اگر اندازه‌ی محصول بیشتر از bp ۱۰۰۰ باشد، کاهش غلظت بافر پیشنهاد می‌شود).

– افزودن مواد تشدید کننده مانند BSA یا DMSO یا گلیسرول

– بررسی سکوئنس پرایمر برای بررسی درستی سکوئنس یا افزایش طول پرایمر تا ۵ نوکلئوتید.

مشکل ٥: دو پرایمر طراحی شده دارای دمای ذوب (Tm) بسیار متفاوتی هستند و نمی‌توان سکوئنس دیگری در نظر گرفت.

راه حل:

– افزایش طول پرایمری که دارای Tm پایین‌تری است. اگر اندازه‌ی

قطعه باید ثابت بماند، بازها به سمت ´۳ اضافه شود و اگر اندازه‌ی قطعه مهم نیست، می‌توان بازها را به هر دو انتهای پرایمر افزود.

مشکل ٦: کنترل منفی نیز دارای محصول تکثیر شده است.

راه حل:

- باید از درستی انجام واکنش مطمئن شد.
- از عدم آلودگی تمام مواد واکنش مطمئن شد و یا شاید نیاز به استفاده از مواد جدید باشد.

مشکل ۷: تنظیم یک واکنش PCR چندگانه

راه حل:

- ابتدا باید هر قطعه را با یک جفت پرایمر به صورت جداگانه و با استفاده از یک برنامه‌ی PCR مشابه تکثیر نمود. اگر در واکنشی، محصولات غیراختصاصی به‌دست آمد بهتر است برنامه‌ی PCR را ثابت نگه داشت و سایر متغیرهایی که در مشکلات قبل عنوان شد تغییر داد.
- مقادیر برابری از پرایمرها را با یکدیگر مخلوط نمود و سپس PCR در شرایط ابتدایی انجام شود و فقط دمای انلینگ را تا حد ۴°C کاهش داد. اگر یکی از محصولات ضعیف بود یا دیده نمی‌شد می‌توان غلظت جفت پرایمرهای مربوطه را افزایش داد و یا میزان سایر پرایمرها را کاهش داد.
- احتمال برهم کنش سکوئنس پرایمرها با یکدیگر نیز باید بررسی شود و تا حد ممکن از آن اجتناب گردد.

یادداشت

بخش سوم

الکتروفورز

مقدمه

متداول‌ترین راهکار مشاهده‌ی قطعات DNA و بررسی کیفیت و کمیت آن‌ها پس از استخراج و تکثیر، الکتروفورز[1] می‌باشد. در الکتروفورز از تفاوت در خصوصیات فیزیکی مانند بار و اندازه‌ی قطعات DNA استفاده می‌شود. ماکرومولکول‌های زیستی مانند DNA و پروتئین‌ها باردار بوده و می‌توان با قرار دادن آن‌ها در یک میدان الکتریکی و بر اساس خواص فیزیکی مانند شکل فضایی، وزن مولکولی و بار الکتریکی، آن‌ها را تفکیک کرد.

1. Electrophoresis

۱–۳) الکتروفورز

حرکت ذرات در یک میدان الکتریکی را الکتروفورز گویند. الکتروفورز برای جداسازی مولکول‌های بزرگی چون پروتئین‌ها و اسیدهای نوکلئیک به‌کار برده می‌شود، اما در مواردی نیز برای جداسازی مولکول‌های باردار کوچک‌تری نظیر قندها، اسیدهای آمینه، پپتیدها و حتی یون‌های ساده مورد استفاده قرار می‌گیرد. معمولاً برای الکتروفورز از یک بستر دارای شبکه‌ی متخلخل که محلولی را درون خود محبوس کرده است، استفاده می‌شود و به اصطلاح به آن ژل گفته می‌شود. نمونه‌های مورد بررسی درون حفرات یا چاهک‌ها[1] در این شبکه قرار داده می‌شوند (بارگذاری)[2]. پس از برقراری میدان الکتریکی با ایجاد اختلاف پتانسیل در دو سوی این شبکه، مولکول‌های موجود در نمونه‌ها با سرعت‌های متفاوتی درون شبکه متخلخل و لابه‌لای حفرات این شبکه به صورت موازی در مسیرهای مستقیم[3] حرکت می‌کنند. اختلاف سرعت، مبنای جداسازی در الکتروفورز است که عوامل متعددی بر این سرعت تأثیر می‌گذارند. جهت بررسی معمولاً این شرایط طوری تنظیم می‌شوند که تمام این عوامل تأثیرگذار، ثابت باشند و تفاوت در یک عامل باعث جداسازی مولکول‌ها می‌شود. اسیدهای نوکلئیک به دلیل داشتن بار منفی در میدان الکتریکی به سمت الکترود مثبت (آند) حرکت می‌کنند. همچنین قطعات DNA کوچک‌تر نسبت به قطعات بزرگ‌تر سریع‌تر حرکت می‌کنند و در نتیجه جداسازی بر اساس اندازه صورت می‌گیرد.

1. Well
2. Loading
3. Lane

به عبارتی نوعی عمل غربالگری صورت می‌پذیرد.

با توجه به تعداد مولکول‌های متفاوت موجود در یک نمونه‌ی بارگذاری شده، در هر مسیر خط‌هایی به شکل نوار یا باندها[1] دیده می‌شوند. اگر نمونه حاوی فقط یک جزء باشد، فقط یک باند دیده می‌شود. اگر جداسازی به خوبی انجام نشود همپوشانی در باندها اتفاق می‌افتد و اجزای نمونه به صورت یک لکه‌ی گسترده ظاهر[2] می‌شوند.

جهت تشخیص اندازه‌ی دقیق مولکول‌های اسید نوکلئیکی جداشده، همزمان بر روی ژل از نشانگرها یا مارکرهای[3] اندازه‌ی وزن مولکولی استفاده می‌شود. این مارکرها حاوی مخلوطی از مولکول‌های با وزن مولکولی و اندازه‌ی مشخص هستند و جهت مشخص‌نمودن و اطمینان از اندازه قطعات DNA و نیز تعیین غلظت آن‌ها مورد استفاده قرار می‌گیرد. فاصله‌ی حرکت یک باند با لگاریتم اندازه‌ی مولکول نسبت معکوس دارد (شکل ۱-۳).

1. Band
2. Smear
3. Marker, Ladder

شکل ۱-۳: نشانگر اندازه یا مارکر ۱۰۰bp از شرکت فرمنتاس را نشان می‌دهد.

روش‌های الکتروفورز دارای محدودیت‌ها و مشکلاتی می‌باشد. به عنوان مثال از آن‌جایی که عبور جریان الکتریسیته از ژل سبب ایجاد گرما می‌شود، ممکن است ژل‌ها در اثر حرارت ایجاد شده ذوب شوند. بنابراین الکتروفورز در محلول‌های بافری انجام می‌شود که تا حد ممکن تغییرات pH را در میدان الکتریکی کاهش دهد. اهمیت این موضوع به این دلیل است که بار مولکول‌های DNA و RNA به pH بستگی دارد. ضمناً انجام الکتروفورز طولانی مدت و استفاده‌ی مجدد از

بافرها، سبب از دست رفتن قدرت بافری محلول می‌شود.

۲-۳) عوامل مؤثر بر حرکت مولکول‌ها در الکتروفورز

عوامل مختلفی بر سرعت حرکت مولکول‌ها مؤثر است که شامل موارد زیر می‌باشند:

❖ **بار الکتریکی و شدت جریان الکتریکی:** در الکتروفورز سرعت حرکت مولکول‌ها رابطه‌ی مستقیم با اختلاف پتانسیل یا ولتاژ اعمال‌شده دارد. قانون اهم در الکتروفورز از اهمیت زیادی برخوردار است. هر چه ولتاژ افزایش یابد، قطعات بزرگ‌تر DNA نسبت به قطعات کوچک‌تر سریع‌تر حرکت می‌کنند. به همین دلیل، بهترین تفکیک شدن قطعات حدود ۲ kb در به کارگیری ولتاژ حدود ۵ ولت به ازای هر سانتی‌متر ژل (منظور فاصله‌ی بین دو الکترود و نه طول ژل) حاصل می‌شود.

- **در قانون اهم (V=IR)؛** V ولتاژ یا اختلاف پتانسیل برحسب ولت، I شدت جریان برحسب آمپر و R مقاومت بر حسب اُهم است. معادله فیزیکی دیگر که از اهمیت برخوردار است، معادله توان (P) است. این معادله (P=VI) مقدار حرارت ایجادشده در حین الکتروفورز را مشخص می‌کند.

این حرارت ایجادشده بر اثر مقاومت الکترودها، بافر مورد استفاده و ژل می‌باشد و به گرمای ژول موسوم است. منابع الکتریکی[1] مورد استفاده در الکتروفورز، ایجاد جریان مستقیم می‌کنند و معمولاً یکی از پارامترهای

1. Power Supply

الکتریکی، یعنی جریان، اختلاف پتاتسیل یا توان را ثابت نگاه می‌دارند. بر اساس نوع بافر به‌کار رفته و پارامتر الکتریکی که ثابت نگاه داشته می‌شود، گرمای ژول در حین انجام الکتروفورز ممکن است کاهش یا افزایش یابد. انتخاب نوع پارامتر ثابت در منبع الکتریکی در حین الکتروفورز، با در نظر گرفتن متغیرهای مختلفی صورت می‌پذیرد. معمولاً پروتئین‌ها با جریان ثابت الکتروفورز می‌شوند، در حالی‌که الکتروفورز اسیدهای نوکلئیک با ولتاژ ثابت انجام می‌شود. اصولاً برای حفظ تکرارپذیری، ثابت نگاه‌داشتن حرارت در تمام مراحل الکتروفورز بسیار مهم است. وقتی‌که حرارت در تمام نقاط ژل به صورت یک‌دست نباشد، حرکت یک نمونه به صورت مستقیم و صاف نیست و حالت انحنا به خود می‌گیرد. ضمناً به دلیل تفاوت دمایی در سطح بستر، نمونه‌هایی که در میانه‌ی ژل قرار دارند از نمونه‌های کناری ژل سریع‌تر حرکت می‌کنند.

- **در الکتروفورز نوع پالسی (PFGE)** [1] جریان در محفظه‌ی الکتروفورز به‌صورت متناوب و دوره‌ای عکس می‌شود. این کار سبب جداسازی قطعات بزرگ DNA در حد ۵۰ هزار تا ۵ میلیون باز می‌شود که در الکتروفورز معمولی صورت نمی‌گیرد. این روش به دو صورت تک‌جهتی و دوجهتی انجام می‌شود.
- **در الکتروفورز پالسی تک‌جهتی**، میدان الکتریکی در فواصل زمانی معین قطع شده و دوباره برقرار می‌شود. هنگامی که میدان برقرار است مولکول DNA در جهت میدان حرکت می‌کند. بـا قطع‌شدن

1. PFGE: Pulsed Field Gel Electrophoresis

جریان الکتریکی، حرکت DNA متوقف شده و DNA فرصت می‌یابد تا به شکل فضایی خاص خود درآید، ولی با برقراری مجدد جریان حرکت مولکول آغاز می‌شود. در زمانی که میدان الکتریکی برقرار نیست همه‌ی مولکول‌ها فرصت نمی‌کنند به‌طور کامل به شکل فضایی خود درآیند. هرچه مولکول کوچک‌تر باشد سریع‌تر می‌تواند به شکل فضایی خود درآید و از آن خارج شود. بر این اساس می‌توان مولکول‌های نسبتاً بزرگ را از هم تفکیک کرد. با استفاده از این روش می‌توان مولکول‌هایی تا اندازه ۴۰۰ کیلو جفت باز را از هم تفکیک کرد. از این روش الکتروفورز در آنالیز ژن‌های بزرگ نظیر ژن کدکننده پروتئین دیستروفین که در پیدایش بیماری دیستروفی عضلانی نقش دارد، استفاده می‌شود.

- **در روش پالسی دوجهتی**، از دو میدان الکتریکی که برهم عمود هستند، در فواصل زمانی معین به‌طور متناوب استفاده می‌شود. یکی از این میدان‌ها در جهت بالا به پایین و دیگری در جهت چپ به راست قرار دارد. مولکول‌های DNA پس از آن‌که تحت‌تأثیر میدان اول حرکت کردند، در اثر میدان دوم ۹۰ درجه تغییر جهت داده و حرکت می‌کنند. در اثر این روش مولکول‌های DNA با یک حرکت چرخشی خود، در طول ژل به‌صورت زیگزاگ حرکت می‌کنند. در این روش هم می‌توان مولکول‌های بسیار بزرگی در اندازه بین ۲۰ هزار تا ۲ میلیون جفت باز را از هم تفکیک کرد.

در روش دیگری به نام الکتروفورز در میدان الکتریکی معکوس(FIGE) [1]، جهت میدان الکتریکی در فواصل زمانی معین، معکوس می‌شود. در این روش برای تفکیک مولکول‌های کوچک از دامنه‌های زمانی کم استفاده می‌شود، یعنی میدان الکتریکی به‌طور متناوب به مدت ۰/۵ ثانیه در جهت مستقیم و به مدت ۰/۲۵ ثانیه در جهت مخالف برقرار می‌شود. در مورد مولکول‌های بزرگ‌تر از زمان‌های بیشتر، ۳ ثانیه به جلو و ۱ ثانیه در جهت مخالف استفاده می‌شود. با این روش می‌توان مولکول‌هایی تا اندازه ۸۰۰ کیلو جفت باز را از هم تفکیک کرد.

❖ **اندازه و وزن مولکولی:** هر چه اندازه‌ی مولکول کمتر و یا مولکولی سبک‌تر باشد، با سهولت بیشتری می‌تواند از لابه‌لای مولکول‌های شبکه‌ی بستر عبور نماید و در نتیجه سریع‌تر حرکت می‌کند. بنابراین قطعات DNA کوچک‌تر نسبت به قطعات بزرگ‌تر، سریع‌تر حرکت می‌کنند.

❖ **شکل فضایی مولکول‌ها:** هر چه مولکول پیچیدگی کمتری داشته باشد سریع‌تر در میدان الکتریکی حرکت می‌کند. یک مولکول پلاسمید حلقوی باز شده نسبت به پلاسمید، دارای پیچش کمتری است و در نتیجه آهسته‌تر حرکت می‌کند. به عبارتی گرچه این پلاسمیدها دارای وزن مولکولی مشابه و یکسانی هستند اما به دلیل تفاوت شکل فضایی، سرعت حرکت متفاوتی دارند. شکل ۲-۳ حرکت پلاسمید در شکل‌های مختلف در ژل گار را نشان می‌دهد.

1. FIGE: Field Inversion Gel Electrophoresis

شکل ۲-۳: پلاسمید دارای پیچش دارای سرعت حرکت بیشتر از پلاسمید خطی شده و حلقوی فاقد پیچش می‌باشد.

❖ **سیستم‌های بافری و pH:** با توجه به اساس الکتروفورز بر پایه‌ی تفاوت بارها، pH محیطی که مولکول‌ها در آن حرکت می‌کنند باید ثابت نگه داشته شود. تغییر در pH سبب تغییر در بارهای الکتریکی مولکول‌ها و در نتیجه تغییر در حرکت مولکول‌ها در یک میدان الکتریکی می‌شود. بنابراین باید از محلول‌هایی با قدرت بافری بالا و قدرت یونی مناسب استفاده کرد تا pH ثابت بماند. اگر از آب به عنوان محلول الکتروفورز استفاده شود چون آب الکترولیز شده در آند یون‌های H^+ و در کاتد یون‌های OH^- ایجاد می‌کند، pH متغیر خواهد بود و ممکن است حتی حرکت مولکول‌ها انجام نشود. ضمناً اگر از بافرهای با مولاریته‌ی بالا استفاده شود به دلیل گرمای ایجاد شده، منجر به مشکلاتی مانند خراب شدن

بستر (ذوب شدن ژل) می‌شود.

❖ **غلظت ژل:** غلظت‌های بالای ژل سبب جداسازی بهتر مولکول‌های DNA کوچکتر می‌شود در حالی که ژل‌های با غلظت کمتر سبب جداسازی قطعات بزرگ‌تر می‌شود.

۳-۳) بسترهای[1] ژلی جهت الکتروفورز

دو نوع رایج ژل برای الکتروفورز شامل ژل‌های آگارز و پلی‌اکریل آمید می‌باشند.

۱-۳-۳) ژل‌های آگارز[2]

آگارز پراستفاده‌ترین بستر برای جداسازی قطعات اسید نوکلئیکی است؛ زیرا آگارز غیرسمی است، به سرعت تهیه می‌شود و برای جداسازی مولکول‌ها با اندازه‌های متفاوت استفاده می‌شود. با استفاده از غلظت‌های متفاوت آگارز می‌توان اندازه‌ی حفرات ژل را کنترل نمود و جداسازی مولکول‌ها در اندازه‌های مختلف را تسهیل نمود. مهاجرت اسیدهای نوکلئیک بر روی ژل‌های آگارز همچنین متأثر از نوع بافر به کار رفته و نیز ولتاژ است.

آگارز از جلبک‌های دریایی استخراج می‌شود که به‌صورت پودر خشک تجاری قابل تهیه است. آگارز یک ترکیب پلی‌ساکاریدی خطی است که از واحدهای قندی آگاروبیوز[3] که شامل واحدهای مکرر مشقات قند

1. Matrix
2. Agarose
3. Agarobiose

گالاکتوز[1] می‌باشد، تشکیل شده است. آگارز در آب سرد نامحلول است اما به آسانی در آب جوش حل می‌شود و موقع سرد شدن یک شبکه‌ی سه بعدی با پیوندهای غیرکووالان را می‌سازد.

دو نوع اصلی آگارز عبارتند از آگارز استاندارد و آگارزهای با دمای ذوب پایین (LM)[2]. آگارز استاندارد در دمای بالای حدود ۸۵°C ذوب می‌شود. این نوع ژل‌ها برای شناسایی اندازه‌ی قطعات DNA و بررسی محصولات PCR استفاده می‌شود. آگارزهای LM برای بازیابی قطعات DNA پس از الکتروفورز استفاده می‌شود. دمای ذوب آن‌ها ۶۵/۵ °C است که پایین‌تر از نقطه‌ی ذوب بیشتر اسیدهای نوکلئیک است و مانع تخریب این مولکول‌ها می‌شود.

جهت تهیه‌ی ژل آگارز، درصد مناسبی از پودر آگارز را در بافر مناسب ریخته و به‌وسیله گرما ذوب می‌کنند. تهیه ژل مزبور به مراتب سریع‌تر و آسان‌تر از ژل پلی‌اکریل‌آمید بوده و هزینه کمتری را در بر می‌گیرد. معمولاً برای تفکیک قطعات بزرگ DNA (بزرگ‌تر از ۵۰۰ جفت باز) در صورتی که هدف صرفاً بررسی کیفی و تفکیک باشد، استفاده از ژل آگارز انتخاب اول است. قدرت تفکیک ژل‌های مزبور ارتباط مستقیمی با غلظت آن‌ها دارد. برای مثال، برای تفکیک قطعاتی به اندازه ۱۰۰ جفت باز از آگارز ۳ درصد و برای قطعات حدود ۲۰۰۰ جفت باز از آگارز ۰/۸ درصد استفاده می‌شود. جدول ۱-۳ قدرت جداسازی قطعات DNA در ژل‌های آگارز با درصدهای مختلف را نشان می‌دهد.

---

1. 1,3-linked -D-galactopyranose, 1,4-linked 3,6-anhydro- -L-galactopyranose
2. LM: Low Melting Point Agarose

درصد آگارز	قدرت جداسازی DNA (bp)
۳	۱۰۰–۱۰۰۰
۲	۲۰۰–۱۵۰۰
۱/۵	۳۰۰–۳۰۰۰
۱	۵۰۰–۵۰۰۰
۰/۸	۱۰۰۰–۷۰۰۰
۰/۶	۱۰۰۰۰–۳۰۰۰۰
۰/۴	۳۰۰۰۰–۵۰۰۰۰

جدول ۱–۳: قدرت جداسازی مولکول‌های DNA در غلظت‌های مختلف آگارز

۲–۳–۳) ژل‌های پلی‌اکریل‌آمید[1]

پلی‌اکریل‌آمید یک پلیمر از مولکول‌های آکریل‌آمید است که قدرت تفکیک پذیری بسیار بالایی برای مولکول‌های DNA را ایجاد می‌کند (۱۰–۳۰۰۰ bp). در این ژل می‌توان حتی تفاوت اندازه در حد یک جفت باز را تشخیص داد. الکتروفورز ژل پلی‌اکریل‌آمید (PAGE)[2] برای پروتئین‌ها نیز استفاده می‌شود. اندازه‌ی حفرات در این‌گونه ژل‌ها با غلظت‌های اکریل‌آمید و بیس‌اکریل‌آمید کنترل می‌گردد.

1. Polyacrylamide
2. PAGE: Poly Acrylamide Gel Electrophoresis

اکریل‌آمید یک ماده‌ی سمی تأثیر گذار بر سیستم عصبی[1] می‌باشد و در هنگام تهیه‌ی آن باید احتیاطات لازم را رعایت نمود.

مونومرهای اکریل آمید به‌واسطه‌ی مونومرهای بیس اکریل آمید که پیوندهای عرضی بین آن‌ها را می‌سازند پلیمر می‌شوند. با استفاده از درصدهای مختلف این مواد می‌توان درصد پلیمریزاسیون را کنترل نمود. واکنش پلیمر شدن و ایجاد ژل اکریل‌آمید نیاز به فعال کننده و شروع کننده دارد که تیمید (TEMED)[2] و آمونیوم پرسولفات (APS)[3] به ترتیب این نقش‌ها را ایفا می‌کنند.

در روش‌های قدیمی تعیین توالی DNA (مانند ماکسام- گیلبرت[4] یا سنگر[5]) از ژل‌های پلی‌اکریل‌آمید برای جداسازی قطعات DNA که حتی در یک باز متفاوت بودند استفاده می‌شد. در روش‌های جدید تعیین توالی معمولاً از ژل‌های آگارز استفاده می‌شود. از ژل‌های اکریل‌آمیدی بیشتر در ایمنی‌شناسی و یا بررسی پروتئین‌ها استفاده می‌شود. پس از PAGE، پروتئین‌ها به یک غشای نایلونی یا نیتروسلولزی منتقل می‌شوند و بررسی‌های بعدی مانند وسترن بلاتینگ[6] (واکنش با یک آنتی‌بادی) بر روی غشا انجام می‌شود.

---

1. Neurotoxin
2. TEMED: N,N,N’,N’-Tetramethylethylenediamine
3. APS: Amonium Persulfate
4. Maxam-Gilbert
5. Sanger
6. Western blot

۴-۳) بافرها

رایج‌ترین بافرهای الکتروفورز جهت اسیدهای نوکلئیک بافرهای تریس استات (TAE)[1] و تریس بورات (TBE)[2] می‌باشند. TAE نسبت به TBE دارای قدرت بافری کمتری است؛ اما امکان بیشتر تفکیک قطعات بزرگ‌تر DNA را فراهم می‌کند. به عبارتی در ولتاژ پایین و زمان بیشتر، به نتیجه‌ی بهتری منجر می‌شود. بورات موجود در TBE می‌تواند پلی‌مریزه شده و یا با مولکول‌های RNA واکنش دهند. بنابراین بهتر است از بافرهای تازه استفاده کرد. جدول ۲-۳ مقایسه‌ی خصوصیات دو بافر TAE و TBE را نشان می‌دهد و در جدول ۳-۳ ترکیبات این دو بافر آورده شده است.

استفاده از بافرهای لیتیم بورات (LB)[3] برای جداسازی قطعات بر روی ژل آگارز که حتی در یک باز متفاوت هستند پیشنهاد می‌شوند. برای الکتروفورز از همان بافری استفاده می‌شود که ژل در آن تهیه شده است.

ژل‌های آگارز قلیایی[4] با افزودن هیدروکسیدسدیم به بافر تهیه می‌شوند که برای بررسی قطعات DNA تک رشته‌ای مناسب می‌باشند.

---

1. TAE: Tris Acetate EDTA
2. TBE: Tris Borate EDTA
3. Lithium borate
4. Alkaline agarose gels

خصوصیات	TBE	TAE	توضیحات
ظرفیت بافری	زیاد	کم	بافر TAE در اثر استفاده‌ی مکرر و طولانی مدت قدرت بافری خود را از دست می‌دهد.
مهاجرت DNA	آهسته	سریع	قدرت هدایت بافر TAE بهتر است.
قدرت تفکیک پذیری	برای قطعات طولانی DNA بالاست.	برای قطعات کوتاه DNA بالاست.	در TBE پیوندهای عرضی آگارز بیشتر حفظ می‌شود.
اثر ممانعت کنندگی بر عمل هضم آنزیمی	شدید	ضعیف	بورات از بافر TBE بر عمل هضم آنزیم‌ها اثر منفی دارد.
بازیابی DNA از ژل آگارز	کم	زیاد	بورات سبب حفظ کردن می‌شود.
صحت DNA	زیاد	کم	بورات از بافر TBE بر عمل هضم آنزیم‌ها اثر ممانعتی دارد.
هزینه	گران	ارزان‌تر	TBE دارای ترکیبات بیشتری می‌باشد.

جدول ۲-۳: خصوصیات بافرهای TAE و TBE

مقادیر مواد در یک لیتر آب مقطر	TBE ۱۰X (pH=۸)	TAE ۱۰X (pH=۸)
(g) Tris base	۱۰۸	۲/۲۴
(ml) ۰/۵ M- EDTA	۴۰	۱۰
اسید استیک گلاسیال (ml)	–	۵/۷۱
اسید بوریک (g)	۵۵	–

جدول ۳-۳: مواد تشکیل‌دهنده‌ی بافرهای TAE و TBE

۵-۳) مشاهده و آشکارسازی ژل‌ها

پس از اتمام الکتروفورز، مولکول‌های ژل باید رنگ آمیزی شوند تا قابل

مشاهده شوند. رایج‌ترین رنگ‌های مورد استفاده شامل موارد زیر هستند:

۱. **اتیدیوم برماید (EtBr)**[1]: این رنگ وارد ساختار مولکول‌های DNA شده و در نور فرابنفش به صورت فلورسنس دیده می‌شود. معمولاً DNA در حد ۲۰ ng قابل مشاهده است. البته EtBr به عنوان یک ماده‌ی سرطان‌زا شناخته شده است و استفاده از مواد ایمن‌تر ارجحیت دارد.

۲. **سایبرگرین**[2]: رنگی بسیار گران است که حدود ۲۵ برابر اتیدیوم برماید حساس‌تر است و دارای ایمنی خوبی است و اثرات سرطان‌زایی آن گزارش نشده است. نوع دیگری از این رنگ به نام سایبر سیف[3] است که دارای بی‌خطری بیشتری می‌باشد. سایبرگرین با تمایل کمتری به مولکول‌های اسیدنوکلئیک تک‌رشته مانند RNA متصل می‌شود.

از آن‌جایی‌که DNA رنگ شده با EtBr در نور مرئی قابل مشاهده نیست، DNA با یک بافر دارای بار منفی (بافر بارگذاری)[4] مخلوط می‌شود و سپس در حفرات ژل ریخته می‌شود. این بافرها دارای رنگ‌های نشانگر[5] و قابل مشاهده در نور مرئی هستند و می‌توان حرکت مولکول‌ها در ژل را ردیابی نمود. ضمناً حاوی گلیسرول و یا ساکاروز که سبب افزایش دانسیته‌ی مولکول‌های DNA

1. EtBr: Ethidium Bromide
2. SYBR Green
3. SYBR Safe
4. Loading buffer
5. Tracking dye

شده که سبب می‌شود نمونه در کف حفرات قرار گیرند و از پخش شدن آن‌ها در بافر ژل ممانعت می‌کنند.

در صورتی‌که نیاز بـه تفکیک DNA به‌صورت تک رشته‌ای باشد، از مواد واسرشت‌کننده نظیر اوره، فرمالدئید یا فرمامید و یا هیدروکسیدسدیم در بافرهای الکتروفورز و بارگذاری استفاده می‌شود. به این نوع ژل‌ها، ژل واسرشت‌کننده یا دناتوره گفته می‌شود. چنین ژل‌هایی پیچ و تاب‌های اسیدهای نوکلئیک را از هم باز کرده و بنابراین تفکیک مولکول‌ها فقط بر اساس طول و مستقل از ساخـتار فضایی انجـام می‌شـود. در این ژل‌ها مولکـول‌های کوچـک‌تر در مقایسـه با مولکول‌های بزرگ‌تر سریع‌تر حرکت کرده و مسافت بیشتری را طی می‌کنند.

مهم‌ترین رنگ‌های مورد استفاده در بافر بارگذاری شامل زایلن سیانول[1] و بروموفنل بلو[2] می‌باشند. این رنگ‌ها دارای سرعت مشابه با DNA به ترتیب در اندازه‌های ۵۰۰۰bp و ۳۰۰ می‌باشند. رنگ‌های دیگر شامل کرزول رد[3] و ارنج جی[4] هستند که در اندازه‌ی حدود ۱۲۵ bp و ۵۰ قرار می‌گیرند. جدول ۴-۳ ترکیبات تشکیل‌دهنده‌ی بافر بارگذاری DNA را نشان می‌دهد. میزان پایین‌آمدن رنگ‌ها و DNA در مقایسه با مارکـر به درصـد ژل بسـتگی دارد. جدول ۵-۳ حرکت رنگ‌های نشانه را روی ژل‌های مختلف نشان می‌دهد.

1. Xylene cyanol
2. Bromophenol blue
3. Cresol Red
4. Orange G

ماده‌ی تشکیل‌دهنده بافر بارگذاری	مقدار
Tris-HCl (pH ۷/۶)	۱۰ mM
برمو فنل بلو	٪۰/۰۳
زایلن سیانول	٪۰/۰۳
گلیسرول	٪۶۰
EDTA	۶۰ mM
اوره (فقط در الکتروفورز دناتوره)	۸ M

جدول ۴-۳: ترکیبات تشکیل‌دهنده‌ی بافر بارگذاری DNA

درصد ژل		حرکت تقریبی رنگ نشانه در مقایسه با مارکر (bp)	
		بروموفنل بلو	زایلن سیانول
پلی‌آکریل‌آمید غیردناتوره	۳/۵	۱۰۰	۴۶۰
	۵	۶۵	۲۶۰
	۸	۴۵	۱۶۰
	۱۲	۲۰	۷۰
	۱۵	۱۵	۶۰
	۲۰	۱۲	۴۵
پلی‌آکریل‌آمید دناتوره	۵	۳۵	۱۳۰
	۶	۲۹	۱۰۶
	۸	۲۶	۷۶
	۱۰	۱۲	۵۵
	۲۰	۸	۲۸
آگارز	۰/۷–۱/۷	۵۰	۴۰۰۰
	۲–۳	۳۰	۸۰۰

جدول ۵–۳: حرکت تقریبی رنگ‌های بروموفنل بلو و زایلن سیانول در مقایسه با مارکر

از ژل رنگ شده با استفاده از دستگاه ژل‌داک [1] می‌توان عکس تهیه نمود و نتایج را بررسی کرد (شکل ۳-۳).

شکل ۳-۳: یک نوع سیستم ژل‌داک را نشان می‌دهد.

برای رنگ‌آمیزی می‌توان، رنگ را حین ساختن ژل به آن افزود و یا پس از اتمام الکتروفورز، ژل را در محلول رنگ (به مدت ۳۰-۱۵ دقیقه) قرار داد. استفاده از روش اول، آسان‌تر است اما از آن‌جایی که رنگ سبب تغییر جزیی در حرکت مولکول‌ها می‌شود روش دوم در تعیین اندازه‌ی قطعات دقیق‌تر است.

اگر مولکول‌های اسید نوکلئیکی جداشده دارای رادیواکتیویته باشند می‌توان با تهیه‌ی رادیوگرام نتایج را حفظ نمود. یکی دیگر از راه‌های مشاهده‌ی DNA،

1. Gel Doc

ساترن‌بلاتینگ[1] یا انتقال DNA به یک غشای نیتروسلولزی و استفاده از پروب‌های نشاندار است. رنگ‌آمیزی ژل‌های اکریل‌آمید با نیترات نقره نیز یکی از روش‌های آشکارسازی DNA می‌باشد.

۶-۳) بررسی الکتروفورز

پس از الکتروفورز، به ژل نور ماورای بنفش (UV) تابانده می‌شود. DNA رنگ آمیزی شده به‌صورت درخشان دیده می‌شوند (شکل ۴-۳). معمولاً ابزار تأمین نور، مجهز به دستگاه‌های عکس‌برداری نیز می‌باشد. با توجه به احتمال آسیب‌رسانی نور UV برای انسان، نوردهی باید در محفظه‌های بسته انجام شود و برای نگاه کردن از ماسک و عینک مخصوص استفاده نمود. اگر قرار است بعد از مشاهده، DNA از ژل جدا شده و برای کارهای دیگری مانند کلونینگ استفاده گردد باید زمان تابش نور به آن در حداقل ممکن باشد تا از تخریب مولکول DNA جلوگیری شود.

شکل ۴-۳: قطعات DNA الکتروفورز رنگ آمیزی شده با EtBr در زیر نور UV به‌صورت نوارهای درخشان دیده می‌شوند.

1. Southern blotting

۷–۳) تهیه ژل آگارز

۱–۷–۳) ابزار و مواد لازم جهت تهیه‌ی ژل آگارز و الکتروفورز

۱. منبع مولد برق[1].

۲. تانک یا محفظه‌ی الکتروفورز افقی (شکل ۵–۳).

۳. سینی قالب‌بندی (قالب) ژل[2]: در اندازه‌های مختلف و از جنس پلاستیک شفاف که نور UV را عبور می‌دهد، وجود دارند و به‌صورت یک سطح مسطح است که دو دیواره مقابل دارد و برای قالب زدن ژل، دو دیواره‌ی باز آن با چسب نواری موقتاً مسدود می‌شود و پس از ریختن و بستن ژل، قبل از الکتروفورز حذف می‌شوند (شکل ۶–۳).

۴. شانه‌های نمونه[3]: برای ایجاد حفره یا چاهک در ژل استفاده می‌شود (شکل ۶–۳).

۵. بافر الکتروفورز.

۶. بافر بارگذاری.

۷. رنگ مانند EtBr.

۸. منبع نور UV [4] یا ژل‌داک (شکل ۷–۳).

---

1. Power supply
2. Gel casting trays
3. Sample combs
4. Transilluminator

شکل ۵-۳: محفظه‌ی الکتروفورز افقی

شکل ۶-۳: سینی و شانه برای تهیه‌ی ژل

شکل ۷-۳: منبع نور UV

۲-۷-۳) طرز تهیه‌ی ژل آگارز

قالب ژل را با تنظیف بدون پرز و آغشته به اتانول ۷۰% تمیز کرده و دو انتهای باز آن را با چسب نواری مسدود نمایید.

شانه‌ای با دنده‌های مناسب روی قالب قرار دهید. دقت شود که راستای شانه عمود بر دیواره‌ی قالب باشد و قالب بر روی یک سطح صاف تراز شده قرار گیرد.

بر اساس درصد و حجم قالب از پودر آگارز به بافر الکتروفورز اضافه نمایید. به عنوان مثال اگر قرار به تهیه‌ی ژل ۱% در قالبی به گنجایش ۴۰ ml باشیم باید ۰/۴ g از پودر آگارز را به ۴۰ ml بافر اضافه نماییم.

مخلوط آگارز در بافر را به صورت غیرمستقیم حرارت داده تا آگارز در بافر ذوب شود و مخلوط به صورت شفاف درآید. می‌توان از میکرو ویو نیز استفاده کرد.

قبل از انجماد ژل و بعد از کمی سرد شدن، رنگ به ژل افزوده شده و مخلوط شود (به عنوان مثال به ازای هر ۱۰ ml ژل، ۱ µl از محلول ۱۰ mg/ml اتیدیوم بروماید کافی است).

بلافاصله مخلوط در قالب ریخته شود. سعی شود که حباب در ژل ایجاد نشود. بهتر است تا انجماد ژل، جهت حفظ فعالیت رنگ، دور از نور قرار گیرد.

پس از منجمد شدن ژل، چسب‌های دو طرف جدا شده و ژل درون تانک پر از بافر الکتروفورز قرار داده شود. دقت شود که سطح ژل باید با بافر پوشانده شود. ژل را می‌توان درون یک کیسه‌ی پلاستیکی برای ممانعت از خشک

شدن برای مدتی در یخچال نگه‌داری نمود و بعد استفاده نمود.

نمونه‌ها را جهت بارگذاری با بافر بارگذاری مخلوط نموده و به مقدار مناسب (با توجه به حجم چاهک و غلظت نمونه‌ها) در چاهک‌های ژل بریزید. جهت مخلوط نمودن باید به غلظت و نسبت پیشنهادی برای بافر بارگذاری توجه کرد. معمولاً این بافرها به صورت ۶X تهیه می‌شوند. بنابراین می‌توان ۵ µl نمونه را با ۱ µl از بافر بارگذاری مخلوط کرد. مخلوط نمودن را می‌توان درون میکروتیوب و یا بر روی یک نوارچسب و یا پارافیلم تمیز انجام داد.

تانک الکتروفورز را به منبع مولد برق وصل نموده و ولتاژ را تنظیم نمایید. به جهت قرار دادن نمونه‌ها توجه شود. نمونه‌ها باید در سمت قطب منفی قرار گیرند که معمولاً با رنگ سیاه مشخص می‌شود.

وقتی رنگ نشان‌گر حدود $\frac{۳}{۴}$ طول ژل را پیمود، ژل را از بافر خارج نموده و نتیجه را با نور UV مشاهده و بررسی کنید. در صورت عدم استفاده از رنگ در مرحله‌ی درست کردن ژل، می‌توان ژل را در آخر در ظرف حاوی بافر دارای رنگ به مدت ۳۰–۱۵ دقیقه به آرامی تکان داد تا رنگ‌آمیزی انجام شود.

شکل ۸–۳ مراحل تهیه‌ی ژل آگارز را نشان می‌دهد.

تهیه‌ی بافر

توزین آگارز

افزودن آگارز به بافر و حرارت دادن

افزودن رنگ به ژل

ریختن ژل درون سینی و قالب ژل

گذاشتن شانه جهت درست کردن چاهک‌ها

برداشتن شانه پس از منجمد شدن ژل

ریختن بافر در محفظه‌ی الکتروفورز

بارگذاری نمونه‌های مخلوط شده با بافر بارگذاری

اتصال جریان برق

جداشدن رنگ‌های نشانگر

مشاهده‌ی ژل در زیر نور UV و تهیه‌ی عکس

شکل ۸-۳: مراحل تهیه ژل آگارز

۸–۳) تهیه‌ی ژل پلی‌اکریل آمید

۱–۸–۳) ابزار و مواد لازم جهت تهیه‌ی ژل پلی‌اکریل‌آمید و الکتروفورز

۱. تانک یا محفظه‌ی الکتروفورز عمودی (شکل ۹–۳).

۲. منبع مولد برق.

۳. صفحات شیشه‌ای، شانه و فضاسازهای[1] مخصوص قالب‌بندی (قالب) ژل (شکل ۱۰–۳).

۴. بافر الکتروفورز.

۵. بافر بارگذاری.

۶. بافر ۳۰% آکریل آمید: بیس‌اکریل‌آمید (۱:۲۹).

۷. آمونیوم پرسولفات (APS) ۱۰% (تازه تهیه شده).

۸. تیمید (TEMED)

۹. اوره (برای ژل دناتوره).

شکل ۹–۳: محفظه‌ی الکتروفورز عمودی

1. Spacer

شکل ۱۰-۳: صفحات شیشه‌ای، شانه و فضاسازهای مخصوص قالب‌بندی (قالب) ژل

محدوده اندازه‌ی مولکولی قابل تفکیک (bp)	٪ آکریل‌آمید در ژل
۱۰۰۰-۲۰۰۰	۳/۵
۸۰-۵۰۰	۵
۷۵-۲۰۰۰	۶
۶۰-۴۰۰	۸
۳۰-۱۰۰۰	۱۰
۴۰-۲۰۰	۱۲
۲۵-۱۵۰	۱۵
۵-۱۰۰	۲۰

جدول۶-۳: درصد پیشنهادی درصد آکریل‌آمید برای جداسازی DNA با اندازه‌های مختلف

۲-۸-۳) طرز تهیه‌ی ژل اکریل‌آمید

۱. صفحات شیشه‌ای، شانه‌ها و فضاسازها را با آب و مایع ظرفشویی بشویید و سپس با تنظیف بدون پرز و آغشته به اتانول ۷۰ ٪ تمیز کنید.

۲. قالب ژل را آماده کرده و جهت جلوگیری از نشت، با گیره محکم کنید و اطراف آن را با آگارز ۱% به دقت درزگیری نمایید.
۳. حجم ژل را با اندازه‌گیری طول وعرض قالب مشخص نمایید (قطر ژل وابسته به قطر فضاسازها است).
۴. بسته به درصد ژل موردنظر، آکریل‌آمید و بیس آکریل‌آمید و آب مقطر را داخل لوله تمیز بریزید (جدول ۶-۳).
۵. اگر قرار باشد الکتروفورز به‌صورت دناتوره انجام شود باید ماده‌ی دناتوره کننده، مانند اوره (۸-۶ مولار) یا فرمامید (۷۰%) به این مخلوط اضافه شود.
۶. تیمید و APS را به لوله‌ی واکنش اضافه کنید.
۷. مخلوط را به آرامی در قالب ریخته و سعی کنید که حباب هوا وارد آن نشود.
۸. به آرامی شانه را داخل قالب قرار دهید تا بعد از پلی‌مریزه‌شدن ژل، درون آن چاهک‌هایی جهت نمونه‌گذاری ایجاد شود.
۹. بعد از پلی‌مریزه‌شدن به آرامی شانه را درآورده و چاهک‌ها را با آب بشویید تا اگر مونومرهای پلی‌مریزه‌نشده هنوز وجود دارد شسته شوند.
۱۰. گیره پایینی را باز کنید و فضاساز پایینی را از قالب خارج کنید.
۱۱. گیره‌های طرفین را باز کرده و دستگاه را طوری داخل تانک مخصوص قرار دهید که قسمت بریده‌شده‌ی شیشه رویی به سمت محفظه بالایی (تانک فوقانی) قرار گیرد.

۱۲. شیشه‌های قالب را با نصب گیره‌های مخصوص به طرفین تانک، ثابت نمایید.

۱۳. محفظه‌های بالا و پایین تانک را با بافر (TAE یا TBE) پر نمایید، به‌طوری‌که بافر روی چاهک‌ها را بپوشاند. چنانچه بین دو شیشه‌ی قالب که در محفظه پایینی تانک قرار دارد حباب هوا مشاهده می‌شود، با یک سرنگ پر از بافر که دارای سر سوزن کج است حباب هوا را بیرون کنید تا مانع جریان الکتریکی نشود و الکتروفورز به‌خوبی انجام گیرد.

۱۴. نمونه‌ی DNA را با بافر بارگذاری مخلوط‌کرده و توسط سرنگ هامیلتون یا سر سمپلر بلند در حفرات بریزید. برای الکتروفورز دناتوره؛ به بافر بارگذاری ماده‌ی دناتوره کننده (اوره ۸ مولار) افزوده می‌شود و جهت دناتوراسیون کامل، نمونه‌ها برای مدت ۵ دقیقه تا $۹۰^{o}C$ حرارت داده می‌شوند.

۱۵. محفظه بالایی تانک را به قطب منفی و محفظه پایینی را به قطب مثبت منبع تغذیه وصل کرده و جریان برق (ولتاژ ثابت، ۵ V/cm) را برقرار کنید.

۱۶. بعد از خاتمه الکتروفورز (وقتی رنگ نشانه به پایین ژل رسید) جریان برق را قطع‌کرده و شیشه را از تانک جدا کنید. با یک تیغه‌ی فلزی نازک به آرامی بین دو شیشه فشار آورید تا دو شیشه از هم جدا شوند.

۱۷. ژل به یکی از دو شیشه می‌چسبد. سپس ژل را رنگ‌آمیزی نمایید.

شکل ۱۱-۳ نحوه‌ی بارگذاری نمونه‌ها بر روی ژل اکریل‌آمید را نشان می‌دهد.

شکل ۱۱-۳: بارگذاری نمونه‌ها در حفرات ژل عمودی

۳-۸-۳) رنگ‌آمیزی ژل اکریل‌آمید

۳-۸-۳-۱) رنگ‌آمیزی با اتیدیوم برماید

رنگ‌آمیزی ژل اکریل‌آمید با EtBr مانند روشی است که برای رنگ‌آمیزی ژل آگارز پس از الکتروفورز توضیح داده شد. ژل را به آرامی داخل بافر حاوی ۱۰μg/μl اتیدیوم بروماید قرار دهید و پس از ۱۵ دقیقه ژل را با نور UV بررسی نموده و نوارهای DNA را مشاهده کنید.

در حین کار با این رنگ باید به نکات ایمنی زیر توجه نمود.

- این ماده موتاژن و سرطان‌زاست و از طریق پوست، چشم و دستگاه تنفسی می‌تواند نفوذ کند. بنابراین هنگام کار با اتیدیوم بروماید باید از دستکش‌های پلاستیکی و عینک‌های محافظ و ماسک استفاده کرد.
- توزین اتیدیوم بروماید حتماً باید در مکان بسته بدون جریان شدید هوا با

استفاده از ماسک و دست‌کش دو لایه انجام شود.

- زباله‌های آلوده به اتیدیوم بروماید، بافرها، ژل‌های آلوده، دست‌کش و سایر لوازم آلوده به طور مجزا دفع شوند.
- در صورتی‌که لباس یا پوست به اتیدیوم بروماید آغشته شود، باید فوراً لباس آلوده را از تن خارج کرد و پوست را با مقدار فراوان آب و صابون شستشو داد.
- در صورت آلوده‌شدن چشم باید آن را با آب فراوان به مدت حداقل ۱۵ دقیقه شستشو داد.

۲-۳-۸-۳) رنگ آمیزی با نیترات نقره

این روش دارای حساسیت بالاتری نسبت به رنگ‌آمیزی با اتیدیوم برماید می‌باشد.

مواد لازم:

۱. محلول تثبیت کننده: اتانول ۱۰%؛
۲. محلول اسید نیتریک ۰/۶۵%؛
۳. محلول نیترات نقره ۰/۲%؛
۴. محلول ظاهر کننده: ۳% کربنات سدیم و ۰/۰۲۰ فرمالدئید (۲ µl فرمالدئید ۳۷%)؛
۵. محلول متوقف کننده: محلول ۳% اسید استیک؛

- تمام محلول‌های فوق در آب مقطر دوبار تقطیر و ترجیحاً دیونیزه تهیه شود.
- محلول نیترات نقره دور از نور نگه‌داری شود.
- اکثر مواد به کار رفته سمی هستند و باید احتیاط لازم را رعایت نمود.

روش کار:

۱. ژل را به مدت ۱۰ دقیقه در محلول تثبت کننده قرار دهید.

۲. ژل را به مدت ۲ دقیقه در محلول اسیدنیتریک قرار دهید.

۳. ژل را ۳ مرتبه با آب مقطر شستشو دهید.

۴. ژل را به مدت ۴ دقیقه در محلول نیترات نقره قرار دهید و در این مدت دور از نور قرار دهید.

۵. ژل را یک بار با آب مقطر بشویید. برای شستشوی بهتر به مدت ۲ دقیقه ژل را در آب مقطر قرار دهید.

۶. ژل را در محلول ظهور رنگ تا ظاهر شدن نوارهای سیاه رنگ (معمولاً بین ۲۰–۵ دقیقه) DNA قرار بدهید.

۷. ژل را به مدت ۳ دقیقه در محلول متوقف کننده قرار دهید. نوارهای DNA در نور معمولی به رنگ سیاه قابل دیدن هستند (شکل ۱۲–۳).

شکل ۱۲–۳: رنگ‌آمیزی ژل اکریل‌آمید با نیترات نقره

منابع و مآخذ

1. Bartlett, Stirling. 2003. A short history of the Polymerase Chain Reaction. Methods Mol Biol. 226:3-6
2. Birnboim HC. 1983. A rapid alkaline extraction method for the isolation of plasmid DNA. Methods Enzymol. 100: 243-255
3. Chomczynski P, Sacchi N. 1987. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. Anal Biochem. 162(1): 156-159.
4. Chomczynski P, Sacchi N. 2006. The single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction: twenty-something years on. Nat Protoc. 1(2): 581-585.
5. Milan Bier. 1959. Electrophoresis, theory, methods and applications . Academic Press. 225: 59-7676.
6. Mullis Kary. 1990. The unusual origin of the polymerase chain reaction. Scientific American 262: 56–61

7. Rychlik W, Spencer WJ, Rhoads RE. 1990. Optimization of the annealing temperature for DNA amplification In Vitro. Nucl Acids Res. 18: 6409–6412.
8. Sambrook J And Russel DW. 2001. Chapter 8: In vitro amplification of DNA by the polymerase chain reaction . Molecular Cloning: A Laboratory Manual (3rd ed.).
9. Van Pelt-Verkuil E, Van Belkum A, Hays Principles JP. Technical aspects of PCR amplification

یادداشت

بخشی از سایر عناوین منتشره

ABC of PCR

شماره اثر ۳۳

www.afratoos.com

www.varamed.com

ISBN:978-600-6252-25-4

شرکت افراطوس

۰۵۱۱-۷۲۶۷۳۳۶

انتشارات وارستگان

تلفن: ۶۰۰۰ نمابر: