اصول PCR و کاربردهای آن

مقدمه

در گذشته برای تولید قطعات نوکلئوتیدی معمولا از روش های شیمیایی استفاده می‌کردند و یا برای بدست آوردن نسخه های متعدد از یک ژن خاص، این ژن را به داخل حامل مناسب وارد کرده و در یک باکتری تکثیر می نمودند. این روش ها پر زحمت بوده و نیاز به مدت زمان طولانی داشتند. تکنیک PCR و یا واکنش زنجیره ای پلیمراز (Polymerase Chain Reaction) به منظور تکثیر یک قطعه DNA در سال ۱۹۸۴ توسط کری مولیس (Kary Mullis) کارمند شرکت Cetus ارائه شده است PCR مزایای بسیاری داشت (از جمله بررسی یک روزه نمونه ها، ارزان بودن نسبی، آسانی انجام و فوق العاده اختصاصی بودن) و انقلابی در تشخیص کلینیکی بیماری ها، پزشکی، علوم جنایی و پلیسی، میکروبیولوژی و بسیاری صنایع ایجاد کرد. این تکنیک تمامی مشکلات قبلی در زیست مولکولی که ناشی از عدم دسترسی به مقادیر زیاد از DNA یکسان بود را برطرف کرد و امروزه تقریباً در تمامی آزمایشگاههای زیست مولکولی جزو کارهای متداول بوده و به صورت اتوماتیک بوسیله ی کامپیوتر انجام می شود. به دلیل همین کشف در سال ۱۹۹۳، جایزه نوبل به کری مولیس اهداء گردید.

PCRهمانند یک دستگاه فتوکپی عمل می کند که بوسیله آن می توان صفحاتی از کتاب ژنوم هر موجود را به تعداد دلخواه و مشابه نسخه اصلی (البته در مواردی همراه با خطاهای جزئی) تکثیر نمود. با این روش می توان یک ژن را به اندازه ای تکثیر کرد تا بتوان با استفاده از روش‌هایی مانند الکتروفورز مشاهده کرد. شما یک تار مو را از فاصله ۶ متری نمی توانید ببینید اما یک دسته میلیاردی از مو کنار هم به خوبی مشاهده می شوند.

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

مواد و وسایل لازم برای**PCR**

۱) **DNA الگو**

PCR تکنیکی است که به واسطه آن می توان از یک رشته DNA الگو، تعداد زیادی رشته DNA به دست آورد به شرطی که دو انتهای رشته یDNA که قصد تکثیرش را داریم کاملا شناخته شده باشد. قطعه

ی DNA می تواند محصول استخراج DNA ژنومی، DNAپلاسمیدی یا حتی محصولPCR دیگری باشد. چنانچه DNA هدف بصورت مالتی کپی در ژنوم باشد بهتر است. معمولاً حدود یک نانوگرم از DNA پلاسمیدی یا فاژی یا یک میکروگرم از DNA ژنومی برای یک واکنش PCR کافی است. بیش از این مقدار، باعث تولید محصولات غیر اختصاصی) قطعات DNA دیگری غیر از قطعه مورد نظر (شده و مقدار کم نمونه DNA نیز باعث کاهش دقت واکنش PCR یا عدم تکثیر قطعه مورد نظر می گردد. کیفیت نمونه DNA نیز مهم است به طوری که باقی ماندن ترکیبات مورد استفاده در مرحله استخراج DNA مثل فنل وEDTA، باعث کاهش فعالیت آنزیم Taq DNA polymerase و عدم حصول نتیجه مورد نظر می گردد. همچنین آلوده شدن واکنش PCR با مقادیر بسیار اندک DNA از هر منبع دیگری، به دلیل حساسیت فوق العاده این تکنیک، ممکن است به تولید قطعات غیر قابل انتظار بیانجامد.

۲) دزوکسی نوکلئوتید تری فسفات(dNTPs)

چهار نوکلئوتید تشکیل دهنده قطعه DNA، بلوک های ساختمانی هستند که توسط DNA پلیمراز برای ساختن رشته هایDNA ی جدید بکار میروند و باید کنار هم چیده شوند تا رشته مکمل را ایجاد کنند. غلظت مورد نیاز از هر یک از نوکلئوتیدها برای واکنش PCR یکسان و برابر **۲۰۰ نانو مولار** می باشد. برای این منظور از مخلوط های آماده، واجد هر چهار نوکلئوتید که با غلظت های مختلف مثل دو میلی مولار، ۱۰ میلی مولار و ۲۵ میلی مولار موجود است، استفاده می شود. به طور مثال، در یک واکنش ۵۰ میکرو لیتر PCR باید ۵ میکرولیتر از مخلوط دو میلی مولار نوکلئوتیدها برای دستیابی به مقدار مورد نیاز در واکنش استفاده کرد.

۳) پرایمرهای Forward و Reverse

پرایمرها قطعات کوچک پلی نوکلئوتیدی هستند و در آزمایشگاه به گونه ای طراحی و سنتز شده اند که دارای سکانس نوکلئوتیدی مکمل با ناحیه ´۳ در یکی از رشته هایDNA ی مورد نظر هستند. چون آنزیم DNA پلیمراز به قطعات پرایمر متصل می شود، در نتیجه فقط مولکولDNA ی هدف، همانند سازی و تکثیر می گردد. از آنجائیکه DNA دو رشته ای است، دو نوع پرایمر در PCR مورد نیاز است. پرایمرها دو عمل انجام می دهند؛ اول این که محل ژنی را که باید تکثیر شود مشخص می‌کنند و دوم این که اندازه قطعات تکثیر شونده را تعیین می کنند. صحت نتایج PCR بستگی به انتخاب پرایمر مناسب دارد. طول پرایمرها نیز بسیار مهم است و هر چه طول پرایمر بلند باشد اختصاصی تر عمل می کند. بهتر است دو پرایمر دارای نقطه ذوب نزدیک به هم باشند. غلظت بهینه پرایمرها برای واکنش PCR از ۱۰۰ نانو مولار تا یک میکرو مولار متغیر است. غلظت بیش از این، منجر به تولید قطعات غیر اختصاصی می شود. طراحی پرایمر نیازمند دقت فراوانی است و نقش بسیار مهمی در امکان پذیر شدن و صحت تکثیر قطعه مورد نظر دارد.

طراحی پرایمر:

پرایمرهای PCR بصورت کاملا" اختصاصی و مکمل ناحیه مورد نظر DNA هدف طراحی میگردند.

پرایمرها ۳۰-۲۰ باز دارند .اگر پرایمرها خیلی کوتاه باشند ممکن است با بخشهای غیر هدف هیبرید شوند و سبب تکثیر محصولات ناخواسته شوند. پرایمرهای بلند با اینکه موجب تولید محصول اختصاصی میشوند ولی باعث کاهش سرعت هیبرید شدن آن با DNA می شود. به همین دلیل در عمل از پرایمرهایی با طول بیش از ۳۰ نوکلئوتید بندرت استفاده می شود. برای تکثیر تواليهای بزرگ از کلون کردن استفاده میشود. پرایمر باید دمای آنیلینگ بالا داشته باشد. دمای مناسب برای تشکیل هیبریدهای صحیح الگو وپرایمر ۱ تا ۲ درجه پایین تر از دمای ذوب شدن (Tm) است. فرمول محاسبه دمای ذوب (Tm=4(G+C)+2(A+T)است (A+T) . مجموع نوکلئوتیدهای آدنین و تیمین موجود در پرایمر(C+G) مجموع نوکلئوتیدهای گوانین وسیتوزین موجود در پرایمر است. بهتر است تعداد بازهای دوپرایمر مساوی باشند و از پلی پورین یا پلی پیریمیدین نباشند، همچنین نواحی تکرار شونده نداشته باشند. چنانچه بازهای G یا C بصورت تکراری و پشت سرهم باشند پرایمر بصورت لوپ در می آید و عملا" سیستم کار نمی کند. انتهای ۳پریم` دو پرایمر نباید مکمل باشد زیرا پرایمر دایمر تشکیل می شود. فاصله دو پرایمر باید کمتر از ۱۰ kb باشد. کارآیی همانند سازی برای محصول PCR بیش از ۳kbکمتر است .(برای پرایمرهایی که برای ایجاد موتاسیون در یک ژن و ایجاد تغییر در محصول PCR طراحی میگردند میتوان درسمت پایه ۵` پرایمر یک پروموتور و یا Ribosom Binding Site جایگاه اتصال ریبوزوم تعبیه نمود، همچنین می توان یک Non tanslated leader بین پروموتور و ژن قرار داد تا ناحیه برای شروع سنتز پروتئین مناسب باشد. این کاربرد بنام Expression PCR گفته می شود. نرم افزارهایی وجود دارد که طراحی پرایمر را انجام می دهند. بعد از طراحی پرایمر بهتر است توسط نرم افزارهایی مانند Blastآنها را چک نمود تا مشخص شود که با چه ژن های دیگری می توانند Annealگردند.

۴) DNA Polymerase

DNAپلیمراز آنزیمی است که با استفاده از نوکلئوتیدها، رشته الگوDNAی مورد مطالعه و یک قطعه پرایمر قادر به همانند سازی DNA است. پلیمراز DNA تک رشته ای را از جهت ۳ پریم به ۵پریم به عنوان الگو مورد استفاده قرار می دهد و رشته مکمل را در جهت ۵پریم به ۳پریم می سازد.

در مرحله همانند سازی، برای جدا نمودن دو رشتهDNA ، باید دمای محلول بالا باشد. در ابتدای طراحی PCR از آنزیم کلینو پلیمراز DNA) I پلیمراز (E.coli استفاده میشد ولی از آنجا که این آنزیم به حرارت حساس است، پس از هر بار حرارت دادن محیط واکنش تا دمای ۹۴ درجه ی سانتی گراد، افزودن دوباره ی آنزیم تازه به محیط لازم بود Saiki .یکی از مهم ترین کشفیات در این زمینه را انجام داد و متوجه شد که باکتریهای چشمه های آب گرم (برای مثال باکتری ترموس آکواتیکوس (Thermus aquaticus)

دارای DNA پلیمرازهایی هستند که نسبت به حرارت مقاوم بوده و حتی در دمای بالا فعالیت بهتری دارند. این DNA پلیمراز که بطور خلاصه Taqپلیمراز نامیده می شود در دمای ۹۴ درجه ی سانتی گراد کاملاً پایدار است و دمای اپتیمم عمل آن نیز ۷۲ درجه ی سانتی گراد می باشد. بنابراین با افزودن یکبار آنزیم Taq پلیمراز دیگر نیازی به اضافه کردن مجدد آن نیست و PCR براحتی و به صورت اتوماتیک انجام می شود. در حال حاضر Taq پلیمراز برای تکثیر قطعات کمتر از سه هزار جفت باز توصیه شده و پر مصرف ترین آنزیم مورد استفاده در PCR می باشد. به طور معمول حدود یک واحد از این آنزیم در ۵۰ میکرو لیتر از واکنش PCRاستفاده می شود. اگر نمونه DNA حاوی مواد ممانعت کننده PCR باشد، می توان این مقدار را دو تا سه برابر افزایش داد ولی مقادیر بالاتر آنزیم باعث تولید محصولات غیر اختصاصی می گردد. مزیت بسیار مهم دیگر Taqپلیمراز افزایش حساسیت و دقت PCR می باشد. در دمای پایین 30) درجه سانتی گراد که برای DNA پلیمراز E.coli بکار می رفت (پرایمرها ممکن است به جایگاههایی که توالی تا حدودی مشابه دارند نیز متصل شوند، زیرا در دمای پایین تعداد کمتری پیوند هیدروژنی برای اتصال پرایمرها نیاز است. بنابراین پرایمرها با اتصال به نواحی نسبتاً مشابه، باعث ایجاد اشتباه در انجام مراحل PCR می شوند. ولی وقتی که واکنش در دمای ۷۲ درجه (دمای اپتیمم فعالیت Taqپلیمراز انجام شود اتصال پرایمرها به نواحی غیر از ناحیه ی اصلی کاهش می یابد. به این صورت پس از پایان PCR رشته های DNA کاملاً مشابه و خالص بدست خواهد آمد.

۵) بافر

بافر شرایط محیطی مناسبی را از نظر pH و یونهای مختلف ایجاد می کند تا پایداری DNA پلیمراز و فعالیت بهینه آن تامین شود. اجزای این بافر نقش های دیگری نیز دارند از جمله کلرید پتاسیم که به اتصال پرایمر به DNA الگو (نمونه) کمک می کند. بافر به صورت 10X ساخته می شود.

۶) کاتیون های دو ظرفیتی(یون های منیزیم یا منگنز) و کاتیون های یک ظرفیتی(یون پتاسیم)

یون منیزیم یکی از اساسی ترین اجزا واکنش PCR می باشد. انواع مختلف آنزیم DNA polymerase برای فعالیت خود به این یون نیاز دارند و این یون (عمدتاً به صورت ترکیب کلرید منیزیم ((Mgcl2)برای اتصال پرایمر و قطعه DNA لازم است. این ترکیب گاهی در همان بافر PCR قرار داده می شود ولی از آنجا که برای برخی واکنش های PCR لازم است که غلظت این یون تغییر نماید، این ترکیب به طور جداگانه تهیه و به واکنش PCR افزوده می شود. غلظت بهینه یون منیزیم در واکنش PCR یک تا چهار میلی مولار است. غلظت بالاتر از این مقدار اثر بازدارندگی برروی فعالیت آنزیم Taq پلی مراز دارد و موجب تکثیر قطعاتی غیر از قطعه مورد نظر (قطعات غیر اختصاصی) می گردد و غلظت پایین این یون نیز ممکن است به کاهش کارایی واکنش و کاهش میزان تولید قطعه مورد نظر منجر شود.

۷) روغن معدنی(mineral oil)

برای جلوگیری از تبخیر محلول در دستگاه چرخش حرارتی و در نتیجه افزایش غلظت در بخش های بالائی محلول، معمولا در دستگاههای قدیمی یک لایه روغن (معمولا ۵۰ تا ۶۰ میکرولیتر به محلول واکنش ۱۰۰ میکرولیتری) بر سطح محلول اضافه می شود. در دستگاه های جدیدتر از درپوش های حرارتی(Lead) استفاده می شود.

۸) ترموسایکلر

دستگاه ترموسایکلر (ایجاد کننده چرخه های دمایی) قابل برنامه ریزی برای ایجاد دماهای مختلف در مدت زمان مورد نظر می باشد. قبل از تولید این دستگاه، دانشمندان برای انجام PCR از سه حمام آب گرم با دماهای مختلف استفاده می کردند که کار بسیار پر زحمتی بود.

۹) ظروف مورد استفاده

میکرو پیپت) برای برداشتن مقادیر اندک مورد نیاز برای واکنش PCR در مقیاس میکرولیتر(، ظرف یخ و وسایل یکبار مصرفی مانند سمپلر، سر سمپلر) تیپ -جز پلاستیکی که برای کشیدن محلول به میکرو پیپت متصل می شود)، ویال (لوله های درب دار کوچک، در دو اندازه بر اساس گنجایش آنها یعنی ۲۰۰ و ۵۰۰ میکرو لیتر، که واکنش PCR در آنها انجام می شود) و ظروف نگهداری آنها. محلول PCRمعمولا به حجم ۱۰ تا ۲۰۰ میکرولیتر در لوله های کوچک ۰/۲ تا ۰/۵ میلی لیتر تهیه می شود. این لوله ها در بلوکهای مخصوصی در دستگاه ترموسایکلر قرار داده می شوند.

مراحل **PCR**

۱- مرحله واسرشت(Denaturation step)

این مرحله اولین قسمت از سیکل های حرارتی منظم است و شامل حرارت دادن محلول به مدت ۲۰ تا ۳۰ ثانیه در دمای ۹۴ تا ۹۸ درجه است. زمان و دمای Denaturation بستگی به تعداد G و C دارد. هرچه زمان Ramp (زمانی که طول می کشد تا دمای مبدا دستگاه به دمای مقصد برسد) کمتر باشد نتیجه کار بهتر است و واکنش، زمان کمتری در دمای ناخواسته قرار می گیرد. در این مرحله بعلت گسستن پیوندهای هیدروژنی (بین نوکلئوتیدها)،DNA ی الگو و پرایمرها از هم جدا می شوند و تک رشته های DNA حاصل می گردد.

۲- مرحله اتصال (Annealing step)

دمای محلول به مدت ۲۰ تا ۴۰ ثانیه به ۳۰ تا ۶۵ درجه کاهش می یابد. در این دما دو رشته هر مولکول میتوانند دوباره به یکدیگر متصل شوند ولی این اتفاق نمی افتد زیرا مخلوط حاوی مقدار بیشتری مولکول های کوچک DNA به نام پرایمر (Primer)است که معمولا از ۲۵-۱۸ باز آلی تشکیل شده اند و بهDNA ی تک رشته ای الگو متصل می شوند. دمای اتصال در حدود ۳ الی ۵ درجه پائین تر از نقطه ذوب پرایمرها است PCR .از نظر اصول عملی تشابه زیادی به همانند سازی DNA بر اساس قوانین معروف واتسون- کریک دارد و در واقع برگرفته از آن است. همیشه A با T و G با C جفت می شود. بنابراین پیوندهای هیدروژنی پایدار فقط زمانی شکل می گیرد که سکانس پرایمر و رشته الگو مکمل یکدیگر باشند و رشته الگو همیشه توالی بازی رشته مقابل را تعیین میکند.

۳- مرحله پلیمریزاسیون یا طویل شدن(Extension/Elongation step)

آنزیم پلیمراز پس از اتصال به هیبرید پرایمر- الگو، با اضافه کردن نوکلئوتید تری فسفاتهای موجود در محلول بر روی عاملَ ۳-OH پرایمرها همانند سازی DNA را آغاز کرده و رشتهDNA ی جدید را در جهت َ۵ به َ۳ و در مقابل رشته های الگو میسازد. دمای محلول در این مرحله باید متناسب با نوع DNA پلیمراز مورد استفاده باشد. دمای اپتیمم برای آنزیم Taq DNA polymerase حدود ۷۵ الی ۸۰ درجه است که معمولا دمای ۷۲ درجه انتخاب می شود. مدت زمان این مرحله نیز باید متناسب با نوع DNA پلیمراز، تعداد بازهای بین دوپرایمر و طول رشته DNA باشد. در دمای بهینه، DNA پلیمراز در هر دقیقه، یک هزار باز را پلیمریزه می نماید. در مرحله طویل شدن در صورت وجود سوبسترای کافی و تامین شرایط بهینه، مقدار DNA در محلول PCR دو برابر می شود.

۴- ادامه PCR بعد از چرخه اول

بعد از این ۳ مرحله، چرخه اول تمام می‌شود و چرخه های بعدی تکرار چرخه اول است. چون در مرحله ی قبل رشته DNA در ناحیه مورد نظر مضاعف شده است، در این مرحله چهار رشته ی الگو برای همانند سازی وجود دارد. بار دیگر سیستم گرم می شود و در اینجا هشت نسخه بوجود می آید، و در مرحله ی بعد ۱۶ نسخه و به همین صورت به دنبال چرخه‌های متعدد قطعه DNA مورد نظر به طور تصاعدی و به نسبت n2افزایش می یابد که n تعداد سیکل های دمایی است. به طور مثال یک مولکولDNA ، پس از ۲۰ سیکل به ۱،۰۴۷،۵۸۶ مولکول تکثیر می شود. تعداد سیکل ها با توجه به مقدارDNA ی اولیه، شرایط آزمایش و مقدار محصول مورد نیاز انتخاب می شود. لازم به ذکر است که DNA های کوتاه (Short target product) یعنی رشته هایی که بین دوپرایمر محصور هستند بصورت تصاعد هندسی (exponential) و DNA های بلند (long target product)یعنی رشته هایی که از یک طرف توسط یک پرایمر محدود هستند و از سمت دیگر نامحدود می باشند بصورت تصاعد حسابی (linearly) زیاد می شوند.

۵- مرحله طویل شدن نهایی(Final elongation)

این مرحله، پس از آخرین سیکلPCR ، به مدت ۵ الی ۱۵ دقیقه در دمای ۷۰ الی ۷۴ درجه انجام می شود، تا اطمینان حاصل شود که همه تک رشته های DNA همانند سازی شده اند. دمای لوله ها و فواصل زمانی تابع عوامل مختلفی از جمله نقطه ذوب پرایمرها(Tm) ، نوع DNA پلیمراز، غلظت یونهای دو ظرفیتی و غلظتdNTP ها است.

۶- نگهداری نهایی(Final hold)

در این مرحله، محلول نهایی به مدت کوتاهی در دمای ۴ الی ۱۵ درجه قابل نگهداری است.

۷- ردیابی (detect) محصولPCR

نهایتا می توان صحت انجام PCR را از طریق الکتروفورز در ژل آگارز یا پلی اکریلامید، هیبرید شدن محصول PCR با الیگو نوکلئوتید نشاندار (پروب)، الکتروفورز نمودن همراه با مارکر وزن مولکولی DNA) (ladder که حاوی قطعات DNA با اندازه های مشخص است و یا رنگ آمیزی اتیدیوم بروماید بررسی نمود.

کاربردهایPCR

۱) تشخیص بیماری‌های قبل از تولد

با استفاده از PCR و به کار گرفتن پرایمرهای مربوط به یک ژن بیمار و پرایمرهای مربوط به ژن سالم آن، می‌توان از تولد کودکان دارای بیماری‌های ژنتیکی جلوگیری کرد. برای این کار بعد از لقاح تخمک در آزمایشگاه و بعد از رسیدن تخمک به حالت ۱۰ سلولی، تعدادی از سلولهای جنین را استخراج کرده و با پرایمر اختصاصی برای یک ژن بیماری مجاور می کنند، همچنین بطور جداگانه با پرایمر ژن سالم نیز مجاور می کنند و PCR انجام می دهند. پس از پایان PCR تفسیر آزمایش چنین خواهد بود : اگر در هردو لوله سنتز DNA انجام شود، جنین یک ژن سالم و یک ژن بیمار دارد یعنی حامل است ولی بیمار نیست. اگر سنتز DNA فقط در لوله ای که شناساگر مخصوص ژن بیمار وجود دارد انجام شود جنین بیمار است و باید سقط شود. اگر سنتز DNA فقط در لوله ای که حاوی شناساگر ژن سالم است انجام شود، جنین کاملاً سالم است. امروزه بسیاری از بیماریهای ژنتیکی مانند هموفیلی، کم خونی داسی شکل، سیستیک فیبروزی(Cystic Fibrosis)، تالاسمی، سندرم لش – نیهان، دیستروفی عضلانی دوشن، فاویسم، فنیل کتون اوری و غیره را می توان به کمک PCR تشخیص داد .

۲) تعیین جنسیت جنین

به طور معمول چند تخمک با چند اسپرم در آزمایشگاه لقاح می‌یابند و هر یک از سلولهای تخم تشکیل شده را بطور جداگانه کشت می دهند تا اینکه جنین به مرحله ی ۱۰ سلولی برسد. سپس از هر جنین یک سلول را جدا کرده و همراه با پرایمرهای اختصاصی برای کروموزوم y در لوله PCR وارد می کنند. کروموزوم y منحصرا در سلول‌های نر دیده می‌شود. قطعه تولیدشده با PCR به وسیله الکتروفورز و به طور دقیق‌تر توسط ساترن بلوتینگ تشخیص داده می شود. فقط در هر لوله که جنین نر) یعنی کروموزوم (y وجود داشته باشد، سنتز DNA صورت می گیرد. با این روش می توان به اختیار جنسیت جنین را انتخاب کرده و تخم مورد نظر را به مادر انتقال داد. تمامی مراحل بالا یعنی استخراج تخمک از مادر، لقاح، تکثیر، PCRو انتقال مجدد به مادر در مدت زمان یک روز قابل انجام است. راه دیگر تعیین جنسیت جنین استفاده از خون مادر است. در طی دوران بارداری مقداری از سلولهای جنین وارد خون مادر می شوند. حال اگر PCR برای قطعه ی) DYZl در حدود ۵۰۰۰ نسخه از این قطعه بر روی کروموزوم y قرار دارد (بر روی خون مادر انجام شود و جواب مثبت باشد چون مادر کروموزوم y ندارد پس این ژن مربوط به کروموزوم y جنین است و جنس جنین نر تعیین می شود .

۳) تشخیص بیماری ها

در مطالعات میکروبیولوژی از روش PCR برای شناسائی عوامل عفونت زا و تشخیص گونه های پاتوژن از غیر پاتوژن نیز استفاده می شود. کشت میکروب ها که جهت تشخیص بیماری‌های عفونی در بیشتر آزمایشگاه ها به کار می‌رود زمان بر بوده و همچنین باعث افزایش تعداد میکروب های بیماری زا و غیربیماری‌زا در شرایط آزمایشگاهی می شود. بدلیل حساسیت بالای PCR (حساسیت این روش ده هزار برابر روش های معمول است) می توان بلافاصله پس از عفونت و قبل از ظهور بیماری، وجود میکروارگانیسم ها را بررسی و اقدامات درمانی را آغاز کرد.

۴) تشخیص سرطان و بررسی مراحل درمان آن

در تشخیص بدخیمی هایی نظیر لوسمی (leukemia) و لنفوم(lymphomas) ، سنجش PCR مستقیما بر رویDNA ی ژنومی انجام می شود. در هر سلول معمولاً از یک ژن فقط یک نسخه وجود دارد، و در صورتی که این ژن دچار جهش شود بررسی این جهش بسیار مشکل خواهد بود، زیرا در سلول های انسان پیدا کردن یک ژن در میان کل ژنوم انسان، همانند پیدا کردن سوزن در انبار کاه خواهد بود و پس از پیدا کردن ژن جهش یافته نیز به دلیل محدودیت نسخه های این ژن بررسی کمیت و کیفیت جهش در آن مشکل خواهد بود. ولی امروزه PCR کار را بسیار راحت نموده است. کافی است که یک سلول سالم و یک سلول جهش یافته بطور جداگانه برای یک ژن خاص تحت PCR قرار گیرند و محصولات حاصل با هم مقایسه شوند. به این ترتیب به راحتی می توان محل جهش، نوع جهش و هر نوع اطلاعات لازم دیگر را به دست آورد. استفاده

دیگر PCR در بررسی مراحل درمانی سرطان می باشد. داروهای مورد استفاده در درمان سرطان داروهای سیتوتوکسیک می باشد که عوارض جانبی بسیار زیادی به همراه دارند. به همین دلیل نیز سرطان شناسان مایل اند که از مراحل بهبودی سرطان اطلاع داشته باشند تا به محض از بین رفتن سلول بدخیم درمان را متوقف نمایند، ولی در صورتی که بهبودی کامل حاصل نشده باشد، احتمال عود مجدد بیماری وجود خواهد داشت. با استفاده از PCR دقت تعیین سلولهای سرطانی بسیار بالا می رود و PCRمنفی را می توان به معنای بهبودی کامل در نظر گرفت.

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

با استفاده از روش PCRو با بررسی حضور یا عدم حضور یک ژن می توان وجود میکوباکتریها (mycobacteria)، باکتریهای غیر هوازی (anaerobic bacteria) و ویروسها (viruses) را بررسی نمود و بطور مثال تشخیص داد که آیا ویروس ایدز در داخل بدن وجود یا نه؟ فرض کنید بیمار شما به یک بیماری ناشناخته گرفتار است و شما احتمال می دهید که عامل بیماری ویروس است. این ویروس را نمی شود به راحتی در آزمایشگاه کشت داد. با روشPCR می توان احتمال این ویروس را در عرض ۱ ساعت کنترل کرد. یعنی نمونه ای از بدن بیمار و همچنین قطعه‌ای از ژن این ویروس که پرایمر نام دارد را به دستگاه می دهیم. اگر حتی فقط ۱ عدد از این ویروس در نمونه بیمار باشد دستگاه از ژن آن میلیاردها کپی تهیه می کند. سپس می توان این حجم زیاد ژن را در صفحه فیلم فلورسنت حاصل از الکتروفورز مشاهده کرد. اگر باند های DNAروی ژن دیده شد مطمئن می شویم که بیمار ناقل این ویروس است.

استفاده دیگر PCR در تشخیص بیماری سل می باشد. مایکوباکتریوم توبرکلوزیس یک باکتری بسیار کند رشد است و رشد معمولی آن در آزمایشگاه حدود ۲۰ روز طول می کشد. در PCR بیماری سل از نمونه ی خلط فرد بیمار به همراه پرایمرهایی که برای توالی خاص مایکوباکتریوم های مکمل می باشند، مورد استفاده قرار می گیرد. پس از انجام PCR قطعات DNA بدست آمده در مجاورت شناساگرهای اختصاصی برای سوش های مختلف مایکوباکتریوم ها قرار می گیرد و به این صورت، گونه و سوش آن تشخیص داده می شود.

۶) تحقیقات جنایی(forensic analysis)

در صحنه جرم، معمولا مقدار DNA بسیار کم است. بنابراین با روش PCR می توان تکثیر DNA را انجام داد تا مقادیر کافی از مولکول های ژنتیکی بدست آید. سپس ماهیت DNA بررسی می شود.

۷) انگشت نگاری ژنتیک(genetic fingerprinting)

با روش PCR می توان با توجه به ماهیت DNA به هویت اشخاص پی برد. بعنوان مثال والدین را شناسائی کرد و یا رابطه ژنتیکی افراد را بررسی نمود. همچنین رابطه تکاملی موجودات زنده نیز با روش انگشت نگاری ژنتیکی قابل مطالعه است.

۸) بررسی DNA قدیمی(ancient DNA)

با روشPCR ، مولکولهای DNA بسیار قدیمی حتی متعلق به ده ها هزار سال قبل مورد مطالعه قرار گرفته است. مثلا DNA یک ماموت از چهل هزار سال قبل، مومیایی های مصری و تزار روسیه با این تکنیک بررسی شده است.

۹) جداسازیDNA ی ژنومی

با روش PCR می توان بخش هایی ازDNA ی ژنومی را انتخاب و پس از جداسازی تکثیر نمود. مثلا برای کلونینگ DNA و یا تولید شاخص های دورگه سازی (hybridization probes) در روش های Southern وNorthern ، مقادیر زیادی از DNA مورد نیاز است که با روش PCR قابل تهیه است. همچنین در مواردی که حجم نمونه اولیه بسیار کم باشد، با روش PCR می توانDNA ی موجود را تکثیر کرد و سپس مورد مطالعه قرار داد.

۱۰) تعیین توالی DNA

پس از تکثیر DNA با روشPCR ، می توان توالی نوکلئوتیدی را تعیین کرد و در صورت لزوم به پلاسمید باکتری یاDNA ی کروموزومی در یوکاریوت ها الحاق نمود و بدین ترتیب DNA ی نوترکیب (recombinantDNA)ایجاد کرد. حتی در مرحله بعد می توان سریعا با استفاده ازPCR ، کلنی های باکتری را از نظر وجود اینDNA ی نوترکیب مورد بررسی قرار داد.

۱۱) تعیین توالی های کروموزومی انسان در سلول های هیبریدی هتروکاریوتها

یکی از تکنیک های بررسی ژنوم انسان، تلفیق (هیبرید کردن) هسته های سلول های انسانی با سلول های حیوانات دیگر مثلاً موش است. پس از انجام تلفیق دو هسته، کرومزوم های انسان به تدریج حذف می شوند، تا اینکه نهایتاً یک کروموزوم در درون هسته هیبریدی باقی می ماند. حال گاهی به منظور بررسی های بیشتر لازم می شود که این قسمت های ژنوم انسان تکثیر شوند، مثلاً وقتی که یک ژن خاص مورد بررسی قرار می گیرد. برای این کار از نوع خاصی PCRکه به Alu-PCR معروف است استفاده می شود. در این روش از پرایمرهایی استفاده می شود که مکمل توالی های بسیار تکراری ژنوم ها می باشد، این توالی های ۳۰۰ جفت بازی که گاهی تا ۹۰۰۰۰۰ بار در ژنوم انسان و دیگر پستانداران تکرار می شود را تکرارهای Alu می نامند. این توالی ها بسیار

متغیر می باشند ولی در انسان قسمتی از این توالی ها اختصاصی و ثابت است و به همین دلیل به راحتی می توان از آن برای تکثیر قطعات DNA که بین دو تکرار توالی Alu قرار دارند استفاده کرد. سپس این DNA را می توان خارج نمود و از نظر نوع پروتئین مورد سنتز و یا تعیین توالی و غیره مورد بررسی قرار داد. مهمترین استفاده روش فوق تعیین مکان ژنتیکی ژن های مختلف برروی کروموزوم های انسان است که تا قبل از این روش تقریباً ناممکن و یا بسیار مشکل بود .

۱۲) بررسی پیوستگی ژن ها و تعیین فاصله ی بین ژن ها بر روی کروموزوم های انسان

در ژنتیک برای تعیین فاصله ی بین ژن ها از بررسی تعداد نوترکیب ها به نسبت فنوتیپ والدین استفاده می شود. این روش برای مگس سرکه که زادآوری آن در هر نسل بسیار زیاد و دوره ی رشد آن نیز کوتاه است به راحتی قابل انجام است؛ ولی در مورد انسان که زاده های آن در هر نسل بسیار محدود و با فاصله ی زمانی زیاد می باشد، این بررسی ها به سختی و با محدودیت بسیار انجام می گیرد. ولی امروزه دانشمندان با استفاده از PCR روش جدیدی را برای این کار پیدا کرده اند. برای این کار از بررسی آلل های موجود در یک اسپرم استفاده می شود. از آنجائیکه اسپرم ها هاپلوئید بوده و در هر اسپرم از هر کروموزوم یک عدد وجود دارد، با بررسی همزمان دو ژن بر روی یک کروموزوم و تعیین میزان نوترکیبی بین این دو ژن می توان فاصله ی ژنتیکی بین دو ژن را تعیین کرد. در واقع از نظر ژنتیکی بررسی ۱۰۰۰ اسپرم با بررسی ۱۰۰۰ فرزند یک خانواده برابر است. با استفاده از این روش ثابت شده است که میزان نوترکیبی کرومزوم ها در مردها با میزان نوترکیبی در زن ها متفاوت است .

۱۳) کلونینگ با PCR

قرار دادن جایگاه شناسایی آنزیم های برش دهنده در طرف ۵پریم سکانس پرایمر: این روش مشکلاتی نیز دارد. این جایگاه ممکن است روی قطعه همانند سازی شده نیز وجود داشته باشد. استفاده از جایگاه دو آنزیم متفاوت در هضم اشکال ایجاد می کند که برای رفع این مشکل باید تعدادی باز به انتهای ۵پریم پراپمر اضافه شود.

Blunt end ligation: برای اینکار دو انتهای قطعه همانند سازی شده باید Polish شود. این کار توسط آنزیم های کلنو و DNA polymerase 4 (پرکردن قسمت over hang) و یا آنزیم های S1 nuclease و Mong bean nuclease انجام می شود.

T vector: پلاسمید ناقل را با آنزیم EcoRV ویا هر آنزیم دیگرکه DNA را بصورت Blunt برش می دهد هضم می کنند، سپس توسط آنزیم Terminal transferase یا آنزیم Taq poly تعدادی T به انتهاهای ۳پریم رشته های پلاسمید خطی شده اضافه می کنند). لازم به ذکراست که آنزیم Taq poly دارای خاصیت

ترمینال ترانسفرازی است و تعدادی A به انتهای ۳پریم محصول تکثیر شده اضافه می کند .(با انجام واکنش Ligation پلاسمید و محصول PCR را بهم متصل می کنند.

تولید نیمه جایگاه شناسایی یک آنزیم برش دهنده در طرف ۵پریم پرایمر. قطعات با T4 poly nucleotidkinase و ATP فسفریله میشوند و سپس بهم متصل می گردند، بعد توسط یک آنزیم هضم شده و کلونینگ انجام می گیرد.

کلون کردن محصول PCR به روش T-A cloning: پلاسمید با یک آنزیمی که DNA را بصورت blunt قطع می کند هضم می شود. سپس توسط آنزیم ترمینال ترانسفراز یا Taq پلیمراز و dTTP یک باز T به انتهاهای `3 -OH آن اضافه میگردد. واکنش Ligation از این وکتور با محصول PCR که در انتهاهای `3 -OH آن باز A قرار دارد انجام می گیرد و پلاسمید در یک باکتری ترانسفرم می شود.

انواع **PCR**

در کارهای تشخیصی در آزمایشگاههای بالینی از روش‌های مختلف PCR استفاده می‌گردد که این روش عبارتند از:

- Touchdown PCR
- Degenearte PCR
- Heminested PCR
- RT–PCR
- ARMS-PCR
- Nested-PCR
- Hot-Start PCR
- Alu-PCR
- PCR-ELISA
- Real –Time PCR
- Multiplex PCR
- و....

با ایجاد تغییراتی در تکنیک PCR، زمینه های کاربرد وسیعی ایجاد شده است. بعضی از انواع PCR بطور خلاصه بشرح زیر است:

Allele-specific PCR

به منظور بررسی تغییر در فقط یک نوکلئوتید (single-nucleotide polymorphisms) در تشخیص بیماری ها و کلونینگ DNA بکار می رود.

Assembly PCR یا (Polymerase Cycling Assembly: PCA)

یک روش آزمایشگاهی برای سنتز مولکول های DNA ی بزرگ است. بدین منظور از الیگونوکلئوتیدهایی استفاده می شود که همپوشانی دارند.

Asymmetric PCR

در این روش فقط یکی از دو رشته DNA تکثیر می شود. پلی نوکلئوتیدهای حاصل بمنظور تعیین توالی یا تولید شاخص های دو رگه مورد استفاده قرار می گیرند.

Helicase-dependent amplification

در این تکنیک برای جدا کردن دو رشته DNA ، بجای حرارت از آنزیم هلیکاز (DNA Helicase) استفاده می شود.

Hot-start PCR

برای جلوگیری از تکثیر DNA های ناخواسته مخصوصا در مراحل اولیه PCR استفاده می شود. بدین منظور قبل از افزودن پلیمراز، دمای محلول به نقطه ذوب (مثلا ۹۵ درجه) رسانده می شود و بلافاصله بعد از دناتوراسیون DNA هدف به واکنش اضافه می شود) استفاده از PCR gem و آنتی بادی آنزیم پلیمراز.(

Hot start به کمک آنتی بادی: مونوکلونال آنتی بادی ضد آنزیم پلیمراز را به واکنش اضافه میکنند درنتیجه فعالیت پلیمرازی آنزیم را مهار میکند. هنگامیکه دمای واکنش به ۹۴ درجه می رسد آنتی بادی دناتوره می شود و دوباره پلیمراز فعال می شود.

Hot start به کمک :Ampliwax به دیواره لوله های مخصوص اینکاربه نوعی واکس آغشته است که بعد از مختصری گرم کردن ذوب شده و روی واکنش را میپوشاند. آنزیم پلیمراز را روی واکس قرار می دهند. در دمای ۹۴ درجه این واکس بخار می شود و آنزیم پلیمراز با واکنش تماس پیدا میکند.

Intersequence-specific PCR

برای انگشت نگاری DNA از طریق تکثیر مناطق بین سکانس های تکراری بکار می رود.

Inverse PCR

کاربرد این تکنیک زمانی است که فقط یک سکانس داخلی شناسایی شده است.

Ligation-mediated PCR

در این روش ازDNA های رابط کوچک (small DNA linkers) که بهDNA ی مورد نظر متصل شده اند، استفاده می شود. کاربرد این روش در تعیین توالی(DNA sequencing) DNA ، genome walkingو DNA footprinting است.

Methylation-specific PCR

این تکنیک توسط Stephen Baylin و Jim Herman در دانشکده پزشکی دانشگاه جان هاپکینز ابداع شده است و بمنظور بررسی متیلاسیون در قطعات CpG (CpG islands) درDNA ی ژنومیک بکار می رود.

Miniprimer PCR

در این روش از یک نوع پلیمراز جدید بنام (S-Tbr)استفاده می شود که قادر است به پرایمرهای کوچک ۹ یا ۱۰ نوکلئوتیدی (smalligos) متصل شود. در حالیکه Taq به پرایمرهای بزرگتری متصل می شود که حدود ۲۰ نوکلئوتید دارند. بنابراین با استفاده ازS-Tbr ، پرایمرهای کوچکتری را می توان طراحی کرد.

Multiplex-PCR

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

Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification

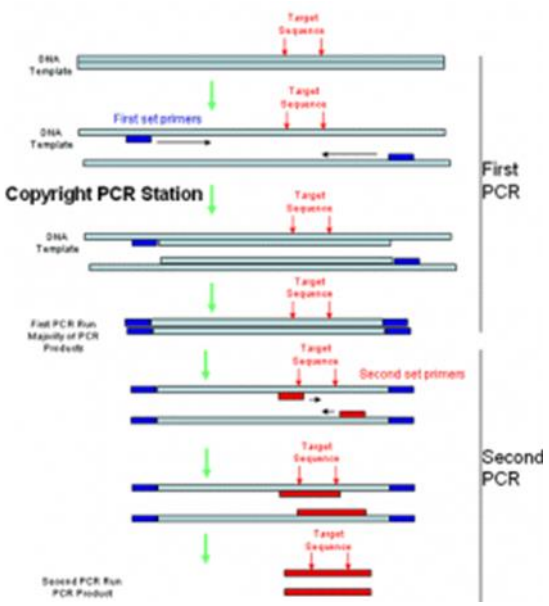
در این روش با استفاده از یک جفت پرایمر، می توان چند نوعDNA ی مختلف را تکثیر کرد.

Nested PCR

در این روش از تکثیرDNA ی ناخواسته جلوگیری شده اثرات زمینه ای کم می شود. مواقعی که DNA هدف در نمونه مورد آزمایش کم باشد برای جلوگیری از بالابردن مقدار DNA و مهار واکنش توسط پرایمرهای خارجی، قطعه طویلتری همانند سازی می شود و از محصول PCR اول که بیشتر DNA هدف همانند

سازی شده است یک واکنش دیگر با پرایمرهای داخلی انجام می گیرد. بدین ترتیب در فرآیند تکثیرDNA ی هدف، اختصاصی بودن (specificity) افزایش می یابد.

روش موفقی جهت از بین بردن محصولات ناخواسته و افزایش همزمان حساسیت PCR می‌باشد. اساس این روش ابتدا تکثیر قطعه‌ای DNA مورد نظر تحت شرایط استاندارد با دو پرایمر اولیه می‌باشد که در مرحله بعد محصول PCR اولیه با استفاده از پرایمرهای داخلی‌تر نسبت به جایگاههای دو پرایمر اولیه PCR می‌گردد (شکل ۳). در این روش ابتدا پرایمر بیرونی توالی هدف در طول ۱۵-۳۰چرخه تکثیر می‌شود، سپس محصول PCR حاصل به لوله‌ای دیگر منتقل می‌شود و به عنوان الگو و با استفاده از جفت پرایمر داخلی مرحله دوم PCR انجام شده و ترادف کوچکتری از DNA که درون PCR اولی است، به اندازه ۱۵-۴۰ چرخه تکثیر می‌گردد. در این روش به دلیل انتقال محصول PCR دور اول به لوله جدید، بازدارنده‌ها رقیق می‌شوند. اختصاصیت PCR را ویژگی پرایمرها تعیین می‌کنند. برای مثال اگر پرایمرها در یک مخلوط بزرگ DNA ژنومی به بیشتر از یک لوکوس متصل شوند، بیشتر از یک قطعه DNA تکثیر خواهد شد. به همین جهت محققان سعی می‌کنند که از Nested Primers بخاطر تأمین اختصاصیت استفاده کنند.



Quantitative PCR

این تکنیک برای بررسی وجودDNA ، cDNA یا RNA و همچنین تعیین غلظت آنها بکار می رود. یکی از شاخه های مهم این تکنیک Quantitative real-time PCR است که از نظر صحت (accuracy) در بالاترین سطح قرار دارد و در آزمایشگاه های تشخیص بالینی کاربرد وسیعی یافته است. در روش Q-PCR برای تعیین غلظت DNA از رنگهای فلورسانس) نظیر (SYBR Green یا شاخص هایDNA ی فلورسانس نظیر (TaqMan) استفاده می شود.

RT-PCR

این نوع از PCR بمنظور شناسایی، استخراج یا تکثیر RNA از نمونه های سلول یا بافت مورد استفاده قرار می گیرد. در این تکنیک از ترانس کریپتاز معکوس (reverse transcriptase) برای تبدیل RNA به cDNA استفاده می شود.

Touchdown PCR

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

واکنش زنجیره ی پلیمراز نسخه برداری معکوسRT-PCR

واکنش زنجیره پلیمراز نسخه برداری معکوس (RT-PCR) تعدیلی از واکنش PCR برای تقویت اطلاعات محتوی اسید ریبو نوکلئیک (RNA) توسط تبدیل آن به DNA و سپس تقویت آن می باشد. رشته ی RNA در ابتدا به صورت معکوس به مکمل DNA خود یا DNA مکمل نسخه برداری می شود و با تقویت DNA حاصله با استفاده از واکنش زنجیره پلیمراز دنبال می گردد. این می تواند یک فرآیند ۱ یا ۲ مرحله ای باشدPCR .نسخه برداری معکوس نباید با واکنش زنجیره پلیمراز زمان واقعی که غالباً به صورت RT-PCR اشتباه شود.

روش‌های تغییریافته PCR و کاربرد این روش‌ها در شناسایی و درمان

واکنش زنجیره‌های پلیمراز (PCR) روشی است برای تکثیر اختصاصی قطعات DNA که نخستین بار در سال ۱۹۸۵ گزارش شد. در این روش قطعه‌ای از DNA به طور انتخابی با به‌کارگیری دو پرایمر اولیگونوکلوئوتیدی و آنزیم پلیمراز Tag می‌توان تا ده هزار برابر تکثیر کرد. هریک از این دو پرایمر به رشته‌های مخالفشان در روی DNA هدف متصل شده و مکان آنها به‌گونه‌ای است که سنتز زنجیره DNA توسط آنزیم پلیمراز تنها در میان دو پرایمر انجام می‌گیرد.

از آنجا که زنجیره‌های تازه ساخته شده خود مکمل پرایمرها است، این چرخه می‌تواند پس از یک مرحله واسرشته شدن زنجیره‌های DNA از هم تکرار شود. به عبارتی PCR روشی است برای یک برنامه دوره‌ای مشتمل برای تکرار گرم و سرد کردن و DNA به‌کمک یک آنزیم DNA پلیمراز مقاوم به گرما و یک جفت پرایمر تحت تکثیر انتخابی قرار می‌گیرد و از طریق این روش DNA به صورت تصاعد هندسی زیاد می‌شود. امروزه روش PCR جایگاه بسیار مهمی را در جنبه‌های مختلف مهندسی ژنتیک، بیولوژی مولکولی، میکروب‌شناسی تشخیصی تشخیص سرطان و بیماری‌های ژنتیک، تشخیص هویت، جرم شناسی (پزشکی قانونی جهت تشخیص منشأ نمونه

اسپرم، خون و ...) تعیین ترادف، باستان‌شناسی، مطالعات تکاملی موجودات و ... پیدا کرده است. کاربرد بیشتر و دقیق‌تر تکنیک PCR در تشخیص، روش‌های تغییر یافته‌ای از آن به وجود آمده است که به تعدادی از آنها اشاره می‌شود.

مالتیپلکس پی سی آر (Multiplex-PCR)

یکی از روش‌های تغییریافته PCR است که در آن تنها یک جایگاه ژنی مورد بررسی قرار می‌گیرد، با استفاده از پرایمرهای مختلف می‌توان چندین جایگاه را مورد بررسی قرار داد و از چندین جفت پرایمر اختصاصی جهت تکثیر استفاده می‌شود. Multiplex PCR یک نوع تغییر یافته از PCR می‌باشد که در آن دو یا بیش از دو لوکوس از ژن به طور همزمان در یک واکنش تکثیر می‌شود. از سال ۱۹۸۸ که برای اولین بار این روش توصیف شد بطور موفقیت‌آمیزی در خیلی از تست‌ها شامل آنالیز جهش ناشی از حذف، سایر جهش‌ها، پلی‌مورفیسم یا سنجش کمی بکار رفته است. امروزه از این روش در شناسایی پاتوژن‌ها، تعیین جنسیت، آنالیز پیوستگی، مطالعات جرم‌شناسی، بررسی کیفیت و کمیت نمونه‌ها و تشخیص بیماریهای ژنتیکی استفاده می‌گردد. بطورکلی در شناسائی پاتوژن‌ها، Multiplex PCR باکتریها نشان دهنده یک پاتوژن خاص در میان دیگر باکتریها یا تمایز گونه‌ها یا سویه‌ها در یک جنس می باشد. در Multiplex PCR صرف زمان و معرف نسبت به PCR معمولی که در چندین لوله انجام می‌شود کمتر می‌باشد به همین دلیل واکنش مولتی‌پلکس برای استفاده کم از آنزیم و الگوها بسیار مناسب است. کاربردهای این روش می‌تواند شامل موارد زیر باشد:
۱) بخش‌های بزرگی از یک DNA (هدف)، جهت جست‌وجوی تغییرات می‌تواند بررسی شود. برای مثال کشف نقص‌ها در بیماری دیستروفی عضلانی روشن یا کشف بخش‌های مختلف IS6110 و IS986 در مایکروباکتریوم توبر کلوزیس عامل بیماری سل،

۲) بخش‌های غیرمربوط به هم در ژنوم هدف می‌تواند مورد آزمایش واقع شود و

۳) می‌توان از طریق این روش با پرایمرهای مختلف به جست‌وجوی عوامل مختلف پرداخت، مانند شناسایی عوامل شایع مننژیت. این روش بیشتر برای شناسایی جایگاه‌هایی از ژن‌ها به کار می‌رود که انواع زیادی از جهش در آنها به وقوع می‌پیوندد.

Real-Time PCR

به علت ورود نسل جدیدی از ترموسایکلرها با سیستم فلورومتری که اجازه پایش پیوسته خاصیت فلوئورسانس محصول PCR در زمان جمع شدن را می‌دهد، این روش ابداع شد. در این روش از کاوشگرها یا پروب‌های هیبریداسیون نشان‌دار شده با رنگ‌های فلورسانس در انتهای ۵ یا ۳ استفاده می‌شود. که امکان پایش پیوسته

محصول PCR را بدون جداسازی آنها در روش‌های الکتروفورز در ژل آگاروز یا ژل پلی آکریل آمید می‌دهد. این سیستم در سال ۱۹۹۲ کشف شد. این روش به دلیل کاهش زمان سیلک‌های PCR، حذف مرحله Post-PCR و کاربرد نشانگرهای فلوروژنیک و روش‌های حساس آشکارسازی تابش آنها باعث افزایش سرعت این سیستم نسبت به سیستم PCR معمولی شده است. سازندگان و کاربران این روش سعی می‌کنند محصول PCR کوچک‌تر طراحی کنند تا سرعت افزایش یابد اما تجربه نشان داده که کاهش اندازه محصول لزوماً بازده PCR را بهینه نمی‌کند. البته این روش دارای معایبی نیز است از جمله می‌توان به عدم ناتوانی در مشخص کردن اندازه محصول بدون باز کردن سیستم و ناسازگار بودن برخی پلت فرم‌ها با شیمی برخی رنگ‌های فلورژنیک اشاره کرد. برای شناسایی بسیاری از ویروس‌های عامل بیماری‌های انسان از این روش استفاده شده است.

مشکلات PCR

با تمامی مزیت های فوق در تکثیر DNA با روش PCR محدودیت هایی نیز وجود دارد که مهمترین آنها اندازه قطعات قابل تکثیر می باشد به طوری که حداکثر اندازه قطعه هایی که با روش PCR معمولی تکثیر می گردد، ۵ هزار نوکلئوتید (5 kb) و در روش های بهینه شده تا ۲۰ هزار نوکلئوتید (20 kb) می باشد.

مشکل اساسی دیگر PCR آلودگی نمونه های مورد بررسی است. به دلیل حساسیت فوق العاده و قدرت تکثیر زیاد PCR هر قطعه DNA خارجی که وارد محیط PCR شود، مورد تکثیر قرار گرفته و نتایج عجیب و دور از واقعیتی به وجود خواهد آورد. برای مثال در مورد تحقیقی که در تعیین جنسیت با استفاده از خون مادران باردار بیان شد، در بین جواب ها یک مورد مثبت کاذب برای یکی از زنان غیر باردار که به عنوان شاهد منفی استفاده شده بود، وجود داشت. پس از بررسی معلوم شد که تعداد ناچیزی از سلولهای پوست یکی از کارکنان مرد آزمایشگاه وارد لوله ی PCR شده است. گاهی نیز باقیمانده ی قطعات DNA حاصل از تکثیر DNA های قبلی باعث آلودگی PCR می شود. برای رفع مشکل، امروزه از ظروف یک بار مصرف استفاده می‌شود. کلیه ظروف قبل از استفاده اتوکلاو می‌شوند تا سلول‌ها و مولکول های موجود در آن ها، تا حد ممکن غیر فعال می‌شوند. یکی از روش‌های پیشنهادی انجام PCR داخلی یا Nested PCR است. از این روش با استفاده از دو پرایمر قطعه‌ای از DNA را تکثیر می‌دهند و سپس قطعه‌ای دیگر در داخلDNA های تکثیر شده PCR می‌شود. بدین صورت احتمال آلودگی کاهش می‌یابد.

یکی دیگر از محدودیت های روش PCR ، دناتوره و غیر فعال شدن آنزیم بعد از ۲۵ تا ۳۰ سیکل بعلت حرارت است، همچنین غلظت زیاد رشته های هدف موجب Reannealing آنها شده و باعث می شود آنها با پرایمرها رقابت کنند.حضور چربی ها، پروتئین ها، آنزیم ها، افزونی های شیمیایی، ترکیبات فیبری و محدوده های متفاوت pH بر فرایند PCR تاثیر می گذارند. ارگانیسم های غیر بیماریزای موجود در فراورده های غذایی تخمیری، ارگانیسم های موجود در خاک و کودهای مصرفی، آلودگی مدفوعی گوشت، نوعی DNA رقابتی به

وجود خواهد آورد. گاهی ترکیباتی به واکنشگرهای PCR متصل شده و آنها را تخریب می کنند به نحوی که مانع از مشارکت آنها در سنتز DNA و انجام واکنش PCR میگردند این ترکیبات بازدارنده PCR نامیده می شوند و عمدتا شامل گیرنده های کاتیونی و ترکیباتی هستند که با اتصال به پلیمراز یا DNA الگو آنها را کاهش می دهند. بازدارنده های اختصاصی در هر نوع ماده غذایی ازجمله گوشت، شیر، پنیر، فراورده های غذایی تازه و ادویه جات و ... یافت می شوند. به عنوان مثال شیر دارای مقدار بالایی کاتیون های Ca^{2+} ، پروتئاز نوکلئاز، اسیدهای چرب و DNA است. هم، نمکهای صفراوی، اسیدهای چرب، آنتی بادی و کلاژن بازدارنده های PCR هستند که در گوشت و جگر وجود دارند. برای کاهش تاثیر این عوامل جداسازی مناسب عامل بیماری زا از بافت ماده غذایی و یا استفاده از پلیمرازی که نسبت به اثرات مواد بازدارنده حساسیت کمتری داشته باشد پیشنهاد می شود. مثلا برایPCR گوشت یا پنیر تعدادی از پلیمرازها مانند Tfl و rTth بسایر راحت تر از Taq polymeraseعمل می کنند. فعالیت پلیمراز در حضور بازدارنده با استفاده از برخی تسهیل کننده ها مانند آلبومین سرم گاوی، دی متیل سولفوکسید Tween 20 و بتایین بهبود می یابد. بعضا یک مرحله غنی سازی برای افزایش عامل بیماری زا موثر خواهد بود. برای باکتری ها، ویروس ها و پروتوزواها گیرنده ایمنی (Immunocapture)می تواند مورد استفاده قرار گیرد. فیلتراسیون نمونه های مایع برای تغلیظ عوامل بیماریزایی که از صافی ۰/۴۵میکرونی عبور میکنند (کامپلیوباکتر و اجزای ویروسی) میتواند موثر واقع شود.

باید ها و نباید ها در PCR

۱) هنگام تهیه واکنش نمونه کنترل مثبت را آخر کار تهیه کنید.
۲) اعمال قبل و بعد از PCR جدا از همدیگر انجام گیرند.
۳) برای استفاده از هر ماده از پیپت جدا گانه و اختصاصی استفاده کنید.
۴) از پی پت ها و سرسمپلرهای فیلتر دار یکبار مصرف استفاده کنید.
۵) مواد ذخیره آزمایشگاه را تقسیم کرده و فریز کنید و هرچند وقت صحت آنها راکنترل کنید.
۶) هنگام استفاده، هرلوله را اسپین کنید تا موادی که به اطراف درب لوله چسبیده اند رسوب کنند.
۷) چندین کنترل منفی حین آزمایش Run کنید.
۸) برای انجام آزمایشهای تاییدی ازمواد فریز شده استفاده کنید.
۹) همیشه DNA تکثیر شده(محصول PCR) را خارج از محل آماده کردن نمونه نگهداری کنید.
۱۰) هنگام کار با محصول PCR مقداری از آن را جداگانه نگهدارید.