نام دستگاه: Gradient thermal cyclers

کمپانی:BIO-RAD

کشور سازنده: آمریکا

مدل: T100

آشنایی با دستگاه:

این دستگاه جهت انجام واکنش زنجیره ای پلی مراز بکار می رود. سیستم دارای بلوک ۹۶ خانه ای سازگار با تیوپهای استاندارد، استریپ و پلیت با امکان انجام واکنش در حجمهای ۱۵ تا ۱۰۰ میکرولیتر است. مزیت اصلی این دستگاه امکان انجام واکنش در دماهای مختلف آنلینگ (Annealing) می باشد.

اساس کار دستگاه:

روش PCR به طور معمول از چرخه های حرارتی (Thermal Cycling) استفاده می کند که شامل درجه حرارتهای مختلفی است که در هر چرخه جهت انجام اعمال خاصی تکرار می شوند. بطور کلی هر چرخه کامل حرارتی با زمانهای مشخص را یک سیکل می گویند.

واکنش PCR شامل مراحل زیر می باشد (شکل ۱):

Denaturation یا طبع برگشتگی: در این مرحله در دمای ۹۶-۹۴ درجه سانتیگراد رشته DNA الگو با ذوب باندهای هیدروژنی به حالت تک رشته ای در می آید.

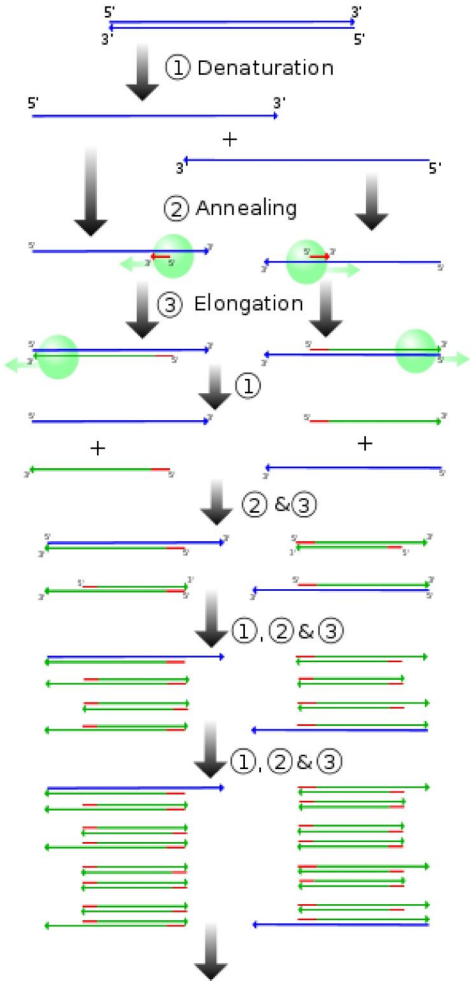
Annealing یا اتصال: در این مرحله در دمای مناسب پرایمرهایی که اختصاصی ژن و یا قطعه مورد نظر هستند به توالی اختصاصی در رشته DNA الگو متصل می شوند.

Extension یا گسترش: در این مرحله دمای مطلوب برای فعالیت آنزیم DNA polymerase یعنی ۷۲ درجه سانتیگراد فراهم شده و رشته مورد نظر ساخته می شود.

Final extension یا طویل شدن نهایی: جهت اطمینان از تکثیر کامل کلیه قطعات DNA انجام می پذیرد.

اساس کار:

Polymerase Chain Reaction(PCR) : تکنیکی است که به طور گسترده در بیولوژی مولکولی به کار برده می شود. این تکنیک نام خود را از یکی از ترکیبات کلیدی خود یعنی آنزیم DNA پلیمراز گرفته است. این آنزیم مقاوم به حرارت قادر است DNA هدف را الگوبرداری نماید. در طی واکنش PCR توالی الگو به صورت تصاعدی تکثیر یافته و محصول نهایی برروی ژل آگارزو یا پلی آکریلامایدقابل رویت می گردد.

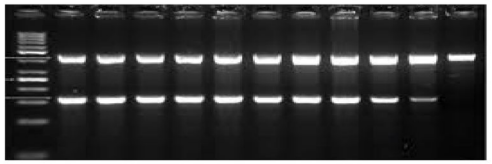


شکل۱ مراحل پی سی آر: واکنش پی سی آر شامل تکرار چرخه های حرارتی میباشد که در نهایت منجر به افزایش تصاعدی DNA الگو میشود.

کاربرد دستگاه:

۱). بهینه سازی واکنش PCR: این دستگاه امکان انجام یک برنامه PCR در دماهای مختلف آنلینگ را فراهم نموده و در نهایت کاربر را قادر می سازد که در یک مرحله انجام PCR دمای مناسب را جهت انجام واکنش بدست بیاورد (شکل ۲).

۲). Touch-down PCR : این نوع واکنش PCR یک روش سریع و ساده جهت بهینه سازی واکنش PCR می باشد. در این نوع PCR دمای اتصال در سیکلهای اول بالاتر از دمای ذوب پرایمرها آغاز شده و با کاهش آن در سیکلهای بعدی باعث افزایش اختصاصیت و حساسیت واکنش می شود.



شکل۲: بهینه سازی دمای اتصال پرایمرها با استفاده از گرادیانت PCR: واکنش به صورت همزمان در دماهای مختلف انجام شده و دمای اتصال مناسب به دست می آید

۳). بررسی بیان ژن:

۱,۳. سنتز cDNA(complementary DNA) جهت انجام RT-PCR(reverse transcription polymerase chain reaction) و PCR Real Time: RNA های استخراج شده را می توان به کمک این دستگاه تبدیل به DNA مکمل آن (cDNA) نموده و در مراحل بعدی برای بررسی بیان ژن مورد استفاده قرار داد.

۲,۳. انجام Reverse Transcription PCR(RT-PCR)

دستگاه مورد نظر می تواند جهت انجام RT-PCR به منظور بررسی بیان ژن به شکل نیمه کمی نیز مورد استفاده قرار گیرد.

٤). مطالعات ژنتیک و سرطان: با کمک این دستگاه می توان موتاسیونها و پلی مورفیسم ها ی دخیل در بیماریهای ژنتیکی و سرطان را مورد بررسی قرار داد. بدین ترتیب که محصول واکنش در روشهای مختلف مولکولی مانند تعیین توالی، PCR-RFLP(PCR-restriction fragment length polymorphism) و یا ARMS PCR(amplification refractory mutationsystem PCR جهت بررسی تغییرات ژنتیکی مورد استفاده قرار می گیرد.

۵. ردیابی عوامل عفونی: بررسی وجود عوامل بیماریزا در نمونه های زیستی و تعیین نوع آنها از کاربردهای دیگر این دستگاه می باشد.

٦Molecular cloning: روش PCR جهت تکثیر قطعات DNA و یا cDNA ژن مورد نظر برای استفاده در کلونینگ و تولید پروتئینهای نوترکیب بکار می رود.

منابع:

1. Molecular Cell Biology. 4th edition, Section 7.7, Polymerase Chain Reaction: An Alternative to Cloning. Lodish H, Berk A, Zipursky SL, et al.2000.

2. PCR, a Practical Approach, M. J. McPherson, .Graham R. Taylor, Philip Quirke.1991.

تهیه کننده:

لیلا محمدنژاد دانشجوی دکتری تخصصی بیوتکنولوژی

محمد کریمی دانشجوی ارشد ایمنی شناسی

آزمایشگاه جامع تحقیقات

دانشگاه علوم پزشکی تبریز

GRADIENT THERMAL CYCLERS

آزمایشگاه جامع تحقیقات

CORE RESEARCH LABORATORY

TABRIZ UNIVERSITY OF MEDICAL SCIENCES