

جلسہ ۱۱



PCR

Polymerase Chain Reaction

مقدمه:

پیشرفت های دو دهه اخیر در زمینه بیولوژی مولکولی موجب ارتقاء کارایی و تکامل هر چه بیشتر آزمایشهای وابسته به DNA در علوم بالینی گردیده است .

استفاده از مارکرهای غیر رادیواکتیو و اولیگونوکلوئوتیدهای مکمل با ژن ها و یا مترادف های ویژه بازهای آلی در DNA از جمله پیشرفت های موثر در بهبود و بکارگیری روزافزون تست های وابسته به DNA در طیف تشخیص بالینی محسوب می شود .



یکی از مهمترین پیشرفتهای در زمینه بیولوژی مولکولی که در عین حال کاربرد تشخیصی نیز دارد، واکنش های زنجیره ای پلیمرازی (polymerase chain reaction) PCR می باشد . که علاوه بر سریع نمودن آزمایشهای وابسته به DNA در موارد متعدد موجب افزایش حساسیت این گونه آزمایش ها گردیده است

PCR توسط آقای Kary mullis در سال ۱۹۸۳ اختراع شده است

در سال ۱۹۹۳ برنده جایزه نوبل شیمی شد

PCR یک روش آزمایشگاهی رایج است که سادگی بی نظیر و راحتی استفاده از آن به آزمایشگاه های غیرمولکولی اجازه دستیابی به قدرت مولکولی داده است



PCR را یک دستگاه فتوکپی DNA می نامند چرا که نسخه های بسیار زیادی را از یک قطعه مشخص DNA در یک لوله آزمایش می سازد. اگرچه مفهوم کلی آن ساده است، ولی فرآیندی پیچیده با تعداد زیادی واکنشگر می باشد

Development/Invention of PCR Technique



1993 Nobel Prize in Chemistry

PCR: Polymerase Chain Reaction

- Allows amplification of specific DNA molecules (fragments) in vitro through cycles of enzymatic DNA synthesis
- The most popular and widely used technique in all fields of biological studies probably.
- Why?



1. simple

2. powerful

A. sensitive – sensitivity

B. specific – specificity

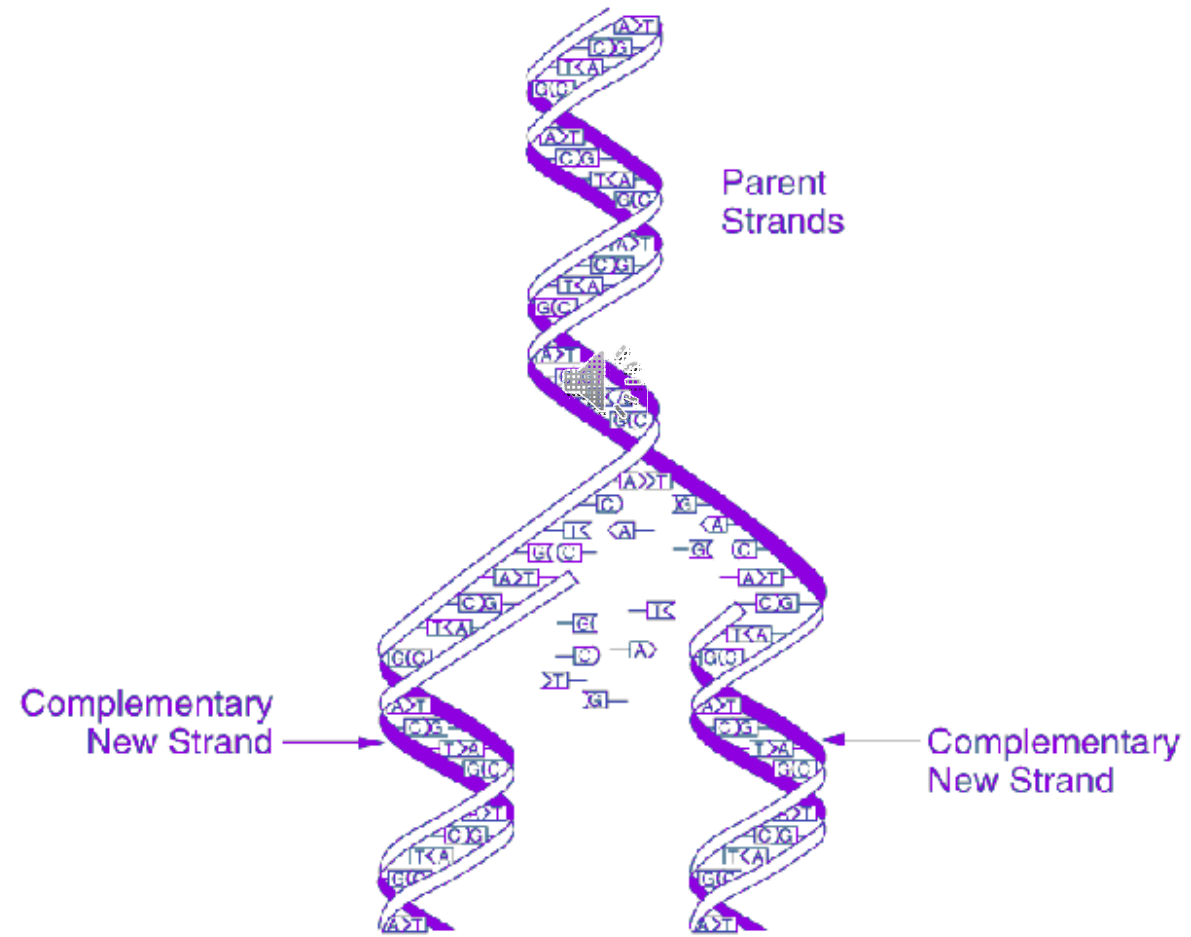
C. reliable – reliability; fidelity

3. fast

DNA Replication

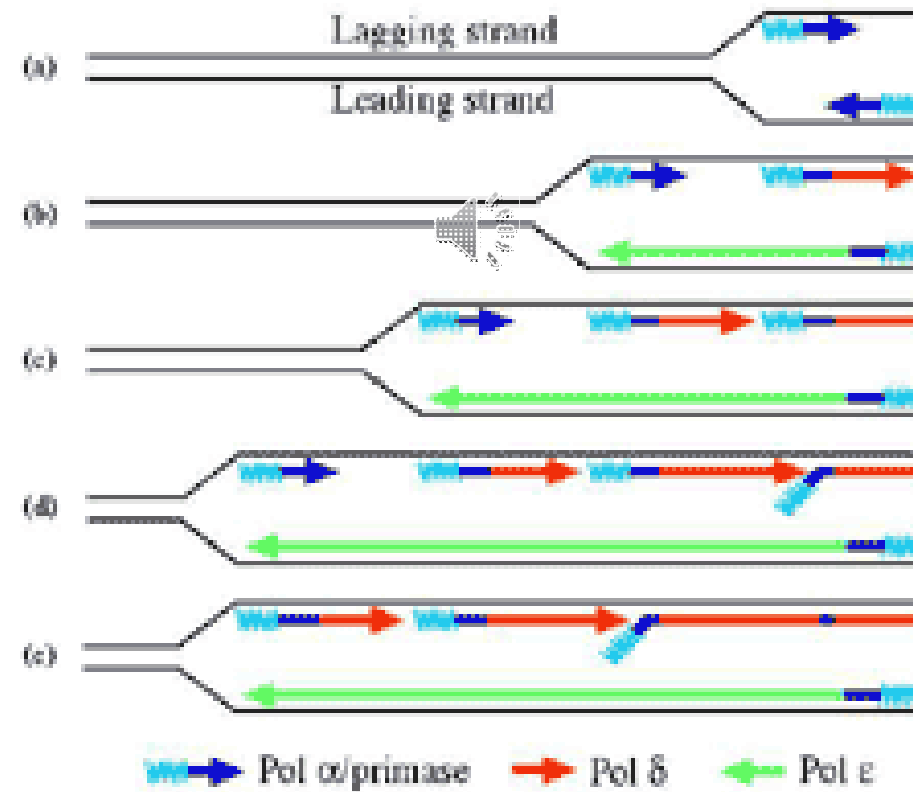
- Purpose: To duplicate DNA molecule
- Principle:
 - Separation of DNA double-stranded template
 - Primer formation
 - Extension of new DNA strands by a DNA polymerase and deoxyribonucleoside triphosphates (dNTPs)
 - Other proteins involved







Role of three DNA polymerases at replication fork



Principle of PCR

- Purpose:
- Condition:
- Components:



Purpose

- To amplify a lot of double-stranded DNA molecules (fragments) with same (identical) size and sequence by enzymatic method and cycling condition.



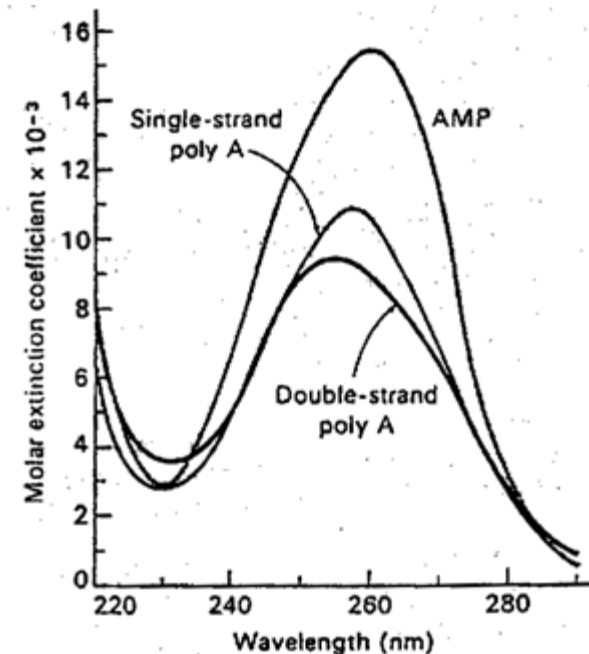
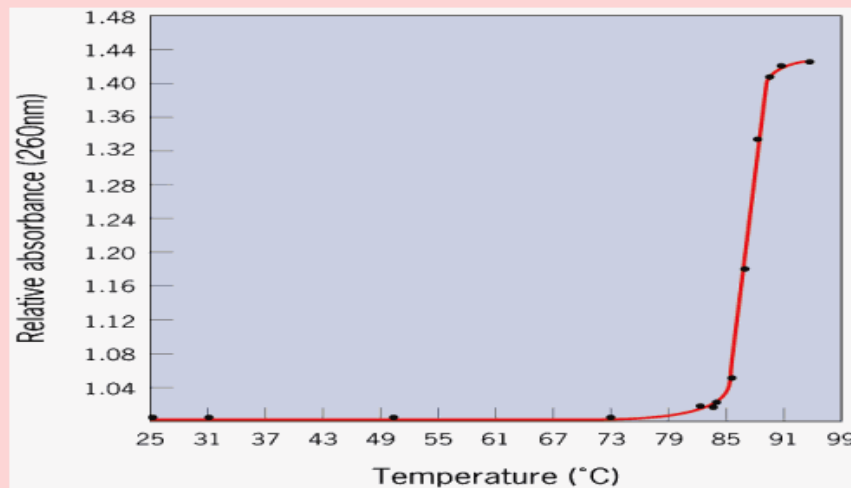
Condition

- 1. Denaturation of ds DNA template
- 2. Annealing of primers
- 3. Extension of ds DNA molecules



Denaturation

- Melt of ds DNA
- T_m : melting temperature
- **Consequences of DNA Strands Separation**
- Decrease in hydrophobic interactions between DNA bases
- **Increase in UV absorbance**



Annealing

Primers anneal to denatured template DNA



• Primer properties

- PRIMER LENGTH
- MELTING TEMPERATURE
- GC CONTENT
- SECONDARY STRUCTURE
- REPEATS
- RUN
- STABILITY 3



- **PRIMER LENGTH**
- **TM**
- **ANEALING TEMP**

- **GC%**

- GC CONTENT



- **SECONDARY STRUCTURE**
 - **HAIR PAIN**
 - **SELF-DIMER**
 - **CROSS-DIMER**

- **REPEATS**

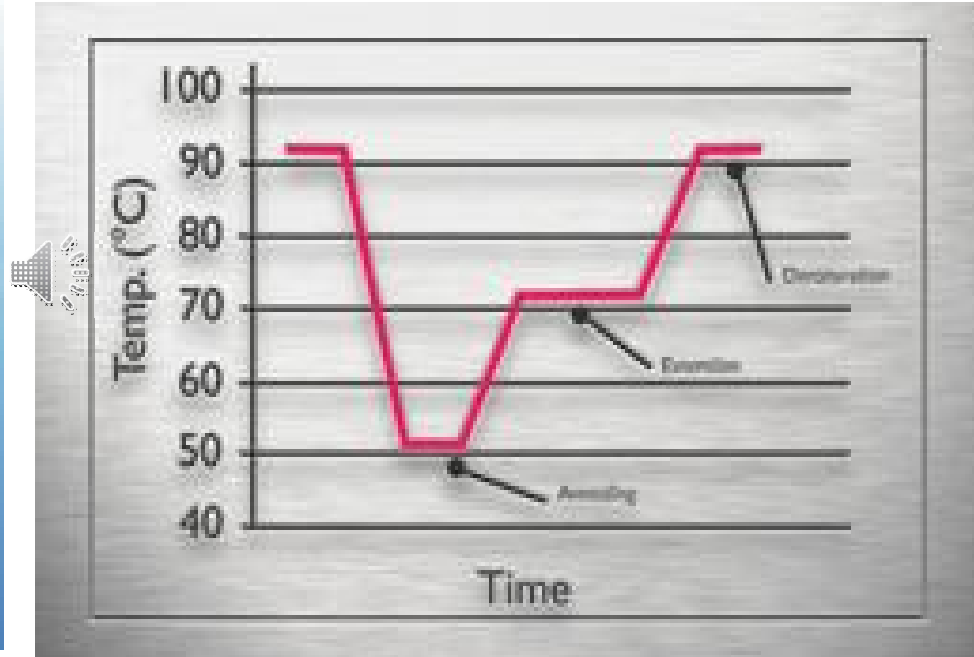
- **RUN**

Extension

- DNA polymerase synthesizes (polymerizes) new DNA molecule by adding deoxyribonucleoside complementary to the corresponding template base in a 5' to 3' direction.



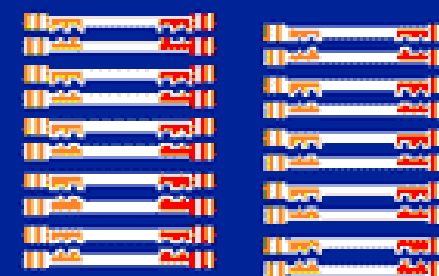
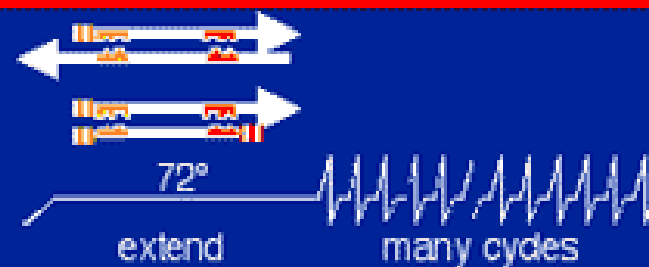
Cycling



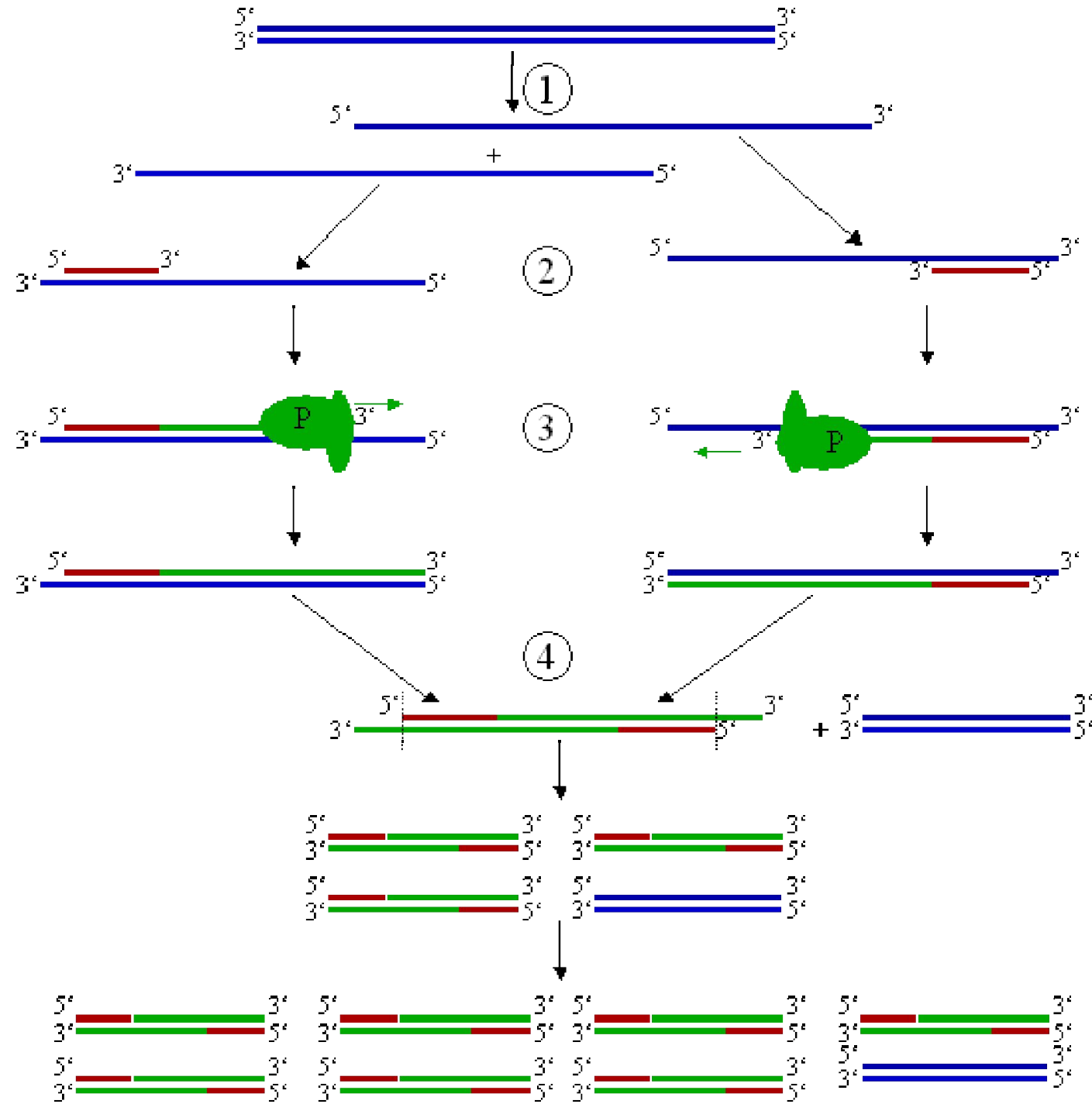
Cycle number

Ramp time

Basic PCR



many, many products

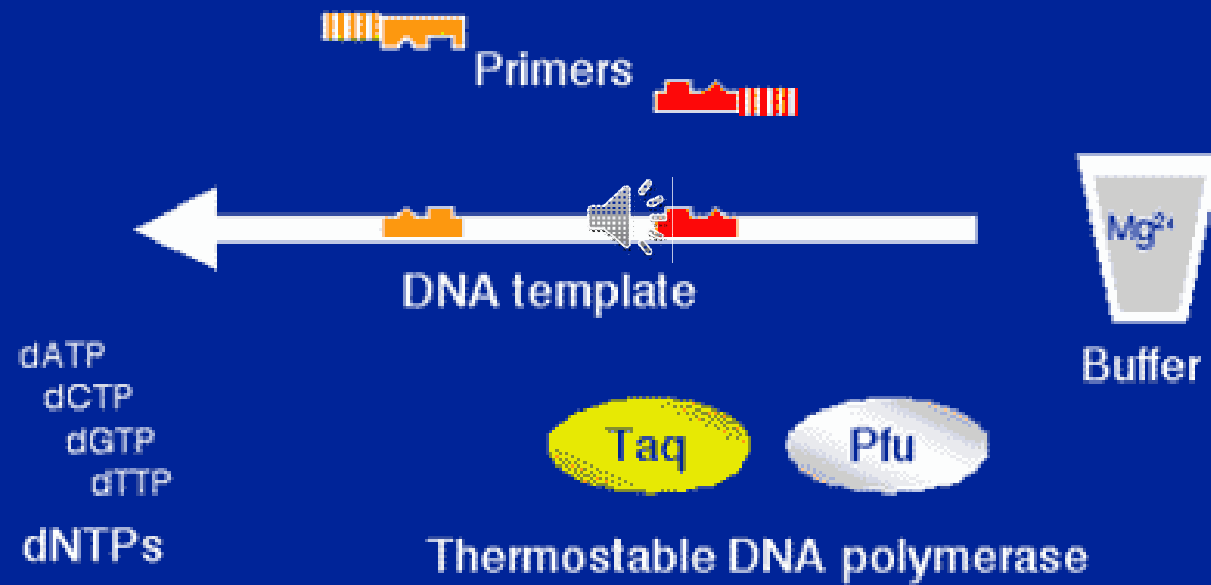


Chemical Components

- Enzyme
- Buffers and MgCl_2
 - 100 mM Tris-HCl, pH 8.3
 - 500 mM KCl
 - 15 mM MgCl_2
 - 0.1% gelatin
- Deoxynucleoside triphosphates (dNTPs)
- Template DNA
- Primers



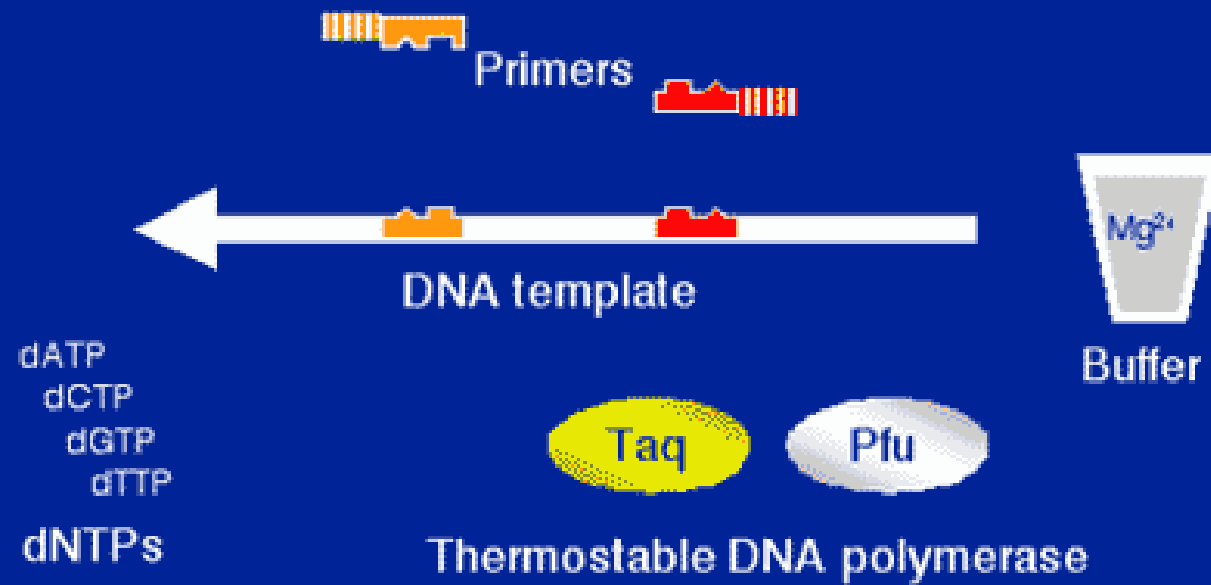
PCR ingredients



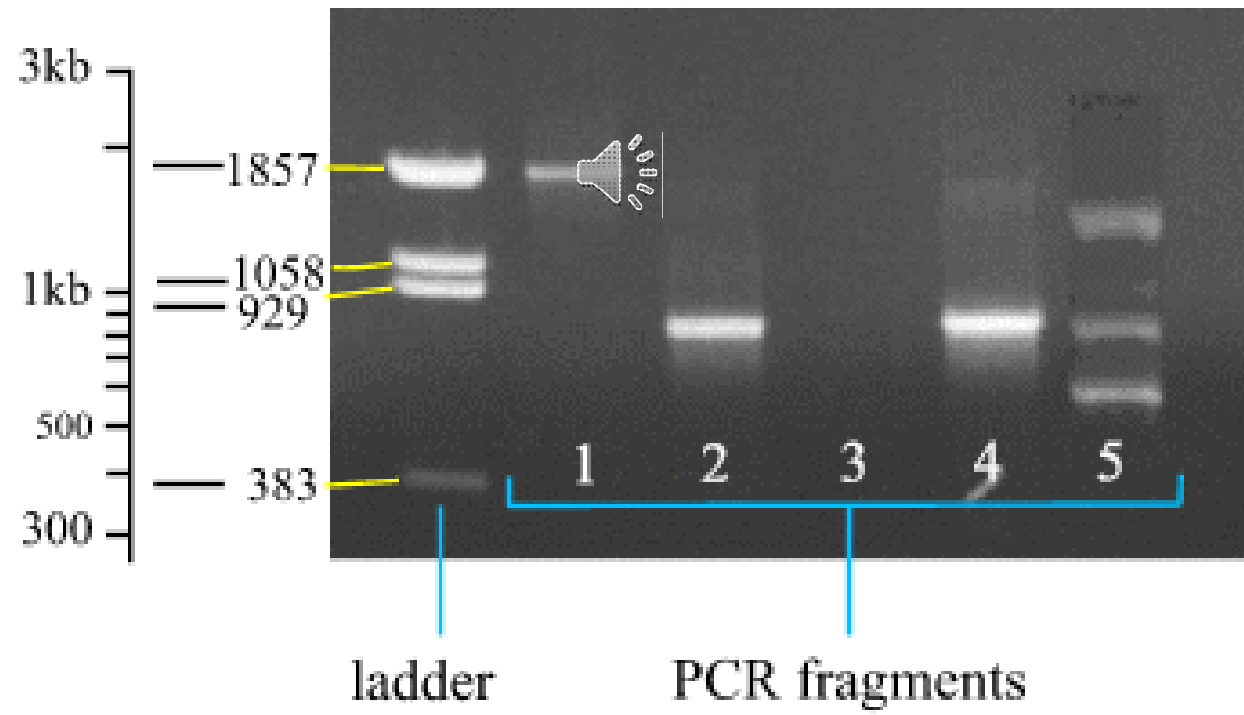
Instrumentation

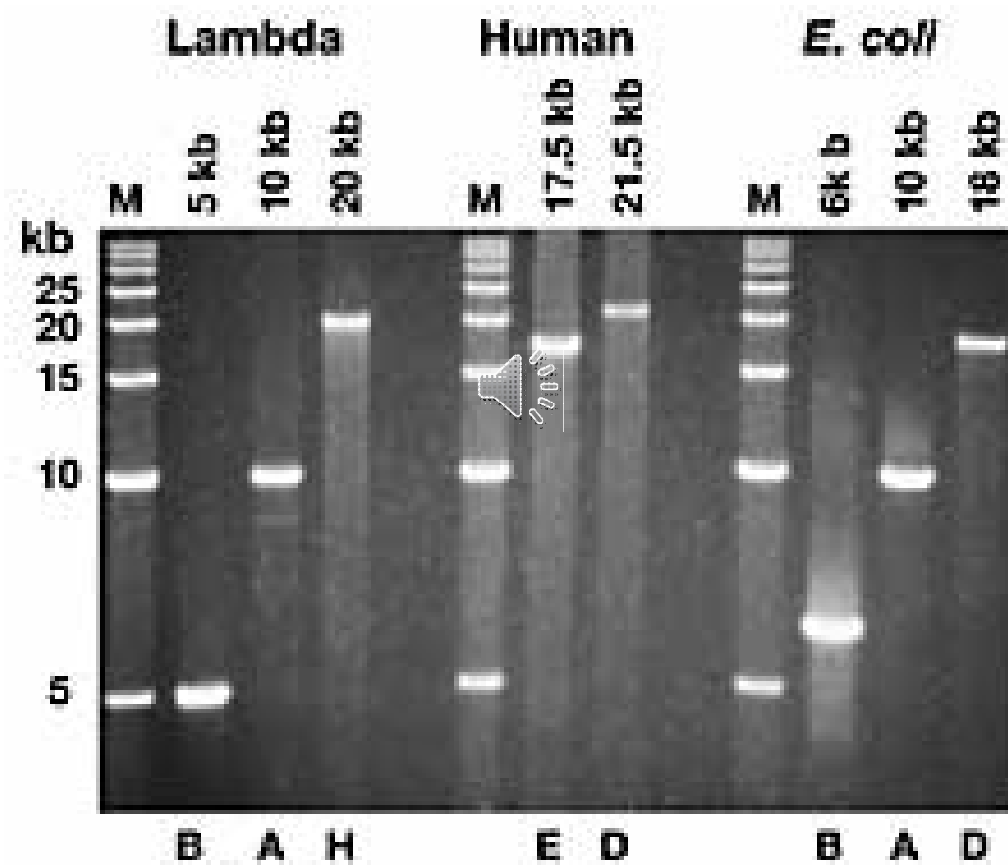


PCR ingredients



Verification of PCR product on agarose or separide gel





FailSafe PCR 2X PreMix

• پایان

