بسم الله الرحمن الرحیم

آئین نامه پایان نامه (رساله) های دانشجویان دانشگاه تربیت مدرس

نظر به اینکه چاپ و انتشار پایان نامه (رساله) های تحصیلی دانشجویان دانشگاه تربیت مدرس، مبین بخشی از فعالیتهای علمی – پژوهشی دانشگاه است، بنابراین به منظور آگاهی و رعایت حقوق دانشگاه ، دانش آموختگان این دانشگاه نسبت به رعایت موارد ذیل متعهد می شوند:

ماده ۱: در صورت اقدام به چاپ پایان نامه (رساله) ی خود، مراتب را قبلا به طور کتبی به دفتر"دفتر نشر آثار علمی" دانشگاه اطلاع دهد.

ماده ۲: در صفحه سوم کتاب (پس از برگ شناسنامه) عبارت ذیل را چاپ کند:

" کتاب حاضر حاصل پایان نامه کارشناسی ارشد/ رساله دکتری وحید جاجرمی، در رشته بیوتکنولوژی پزشکی است که در سال ۱۳۸۷ در دانشکده علوم پزشکی دانشگاه تربیت مدرس به راهنمائی آقای دکتر مهدی فروزنده مقدم ، مشاوره آقای دکتر حسین تهرانی از آن دفاع شده است.

ماده ۳: به منظور جبران بخشی از هزینه های انتشارات دانشگاه، تعداد یک درصد شمارگان کتاب (درهرنوبت چاپ) را به دفتر آثار علمی دانشگاه اهداء کند. دانشگاه می تواند مازاد نیاز خود را به نفع مرکز نشر در معرض فروش قرار دهد.

ماده ۴: در صورت عدم رعایت ماده ۳، ۵۰٪ بهای شمارگان چاپ شده را به عنوان خسارت به دانشگاه تربیت مدرس، تادیه کند.

ماده ۵: دانشجو تعهد و قبول می کند در صورت خودداری از پرداختهای بهای خسارت، دانشگاه مذکور را از طریق مراجع قضائی مطالبه و وصول کند، بعلاوه به دانشگاه حق می دهد به منظور استیفای حقوق خود، از طریق دادگاه ، معادل وجه مذکور در ماده ۴ را از محل توقیف کتابهای عرضه شده نگارنده برای فروش، تامین نماید.

ماده ۶: اینجانب وحید جاجرمی، دانشجوی رشته بیوتکنولوژی مقطع کارشناسی ارشد، تعهد فوق و ضمانت اجرائی آن را قبول کرده، به آن ملتزم می شوم.

نام و نام خانوادگی

تاریخ و امضاء

دانشگاه تربیت مدرّس
دانشکده پزشکی

پایان‌نامه دوره کارشناسی ارشد بیوتکنولوژی پزشکی

طراحی روشی جدید با نام CMA (Chimeric Primer–Mediated Amplification) برای تکثیر DNA در دمای ثابت

نگارش:

وحیـد جاجـرمی

استاد راهنما:

دکتر مهـدی فروزنـده مقدم

استادان مشاور:

دکتر حسین تهـــرانی

دکتر محمد جواد رســـایی

زمستان ۱۳۸۷

تقدیم به

پدر و مادر عزیزم به خاطر محبت، صبر و فداکاری شان .

برادران عزیزم به خاطر حمایتها و راهنما ئی های ارزشمندشان.

خواهران خوب و مهربانم به خاطر محبت ها و حمایتهای بی دریغشان.

تشکر و قدردانی

با حمد و سپاس از خداوند متعال که این توانائی را در من ایجاد نمود تا این تحقیق را به اتمام برسانم و همواره در طول تحقیق، تنها منبع برای یاری خواستن بود.

در ابتدا، مراتب امتنان و سپاسگزاری خود را از استاد بزرگوار جناب آقای دکتر مهدی فروزنده مقدم که با دقت نظر و نظارت بر انجام این تحقیق و راهنمائی های خردمندانه خویش مرا یاری نمودند، ابراز نموده و سربلندی و توفیق ایشان را آرزومندم.

از استاد ارجمند جناب آقای دکتر حسین تهرانی ، که با مساعدت های علمی ارزشمند خود در طول تحقیق مرا یاری نموده‌اند تشکر می کنم و سلامتی و موفقیت ایشان را از خداوند متعال خواستارم.

از محضر استاد گرامی جناب آقای دکتر محمد جواد رسائی که در طول تحصیل و در اجرای پایان نامه مرا یاری نمودند قدر دانی نموده و از خداوند بزرگ توفیق و بهروزی ایشان را خواهانم.

همچنین لازم می دانم از زحمات فراوان و بی دریغ سرکارخانم دکتر فاطمه رهبری زاده در طول مدت تحصیل و پایان نامه تشکر کنم و سلامت و موفقیت برای ایشان آرزومندم.

از زحمات فراوان و راهنمائی های ارزشمند سرکارخانم دکتر فاطمه رجبی که در انجام این تحقیق بسیار کمک کننده بود تشکر و قدردانی کنم.

همچنین از تمامی همکلاسی عزیزم؛ محسن نواری، سعیده عسکریان، الهام صادق زاده، مهدی شکوری، لیدا لنگرودی، حورا لقمانی، فرنوش جعفری، مهدی شکری، مسعود جوانمردی و یاشار سعدیان که دوران بسیار لذت بخشی را با آنها سپری کردم، تشکر می کنم. سلامتی و موفقیتشان در زندگی، آرزوی قلبی من است.

از جناب آقای کروندیان و همچنین تمامی دانشجویان گروه بیوتکنولوژی تشکر می کنم و توفیق و سربلندی آنها را از خداوند خواستارم.

همچنین از دوستان خوبم، حسین نریمانی، علی زارع، جواد کوچعلی که مرا در نوشتن پایان نامه یاری کردند تشکر می کنم و موفقیت در زندگی را برایشان آرزو می کنم.

و در نهایت از خانواده بسیار عزیزم؛ پدر، مادر، برادران، خواهران وخانواده محترم آنها که همواره حامی و مشوق من در تمامی مراحل زندگیم بوده اند تشکر و قدر دانی می کنم و سلامتی و بهروزی را برای تک تک آنها از خداوند بزرگ خواهانم.

چکیده

متدهای تکثیر اسیدهای نوکلئیک، نقش مهمی در بیولوژی مولکولی دارند. در این بین تعدادی از تکنیک ها به صورت تک دمایی[1] و بدون نیاز به سیکل حرارتی ارائه شده اند که علاوه بر داشتن سرعت بالا در تکثیر، به سادگی قابل انجام هستند و در تشخیص های مولکولی مورد استفاده قرار می گیرند. تکنیک حاضر، با عنوان CMA، از جمله تکنیک هایی به شمار می رود که قادر است، باعث تکثیر DNA در دمای ثابت گردد. دو نوع آنزیم در این روش استفاده می گردد که عبارتند از rBst Large fragment DNA Polymerase و آنزیم Tli RNase H. پرایمرهای مورد استفاده در این روش، بصورت کایمریک می باشند و هر پرایمر از سه قسمت تشکیل یافته است. در ناحیه '۵ آن، یک قطعه ۵-۴ نوکلئوتیدی DNA قرار می گیرد، قطعه RNA به طول ۵-۴ نوکلئوتید، در وسط و نهایتا در قسمت '۳ آن، قطعه ای از جنس DNA به طول تقریبی ۲۰-۱۷ نوکلئوتید قرار دارد. در اثر اتصال پرایمر به تک رشته الگو، در ناحیه RNA پرایمر، یک هیبرید RNA/DNA ایجاد می شود. این هیبرید، مورد شناسائی و حمله آنزیم RNase H قرار می گیرد و روی رشته RNA برشهایی ایجاد می کند. بدین ترتیب، در محل برش، '۳OH آزاد ایجاد می شود. آنزیم DNA پلی مراز، این شکاف ها را مورد شناسایی قرار می دهد و از ناحیه شکاف شروع به فعالیت پلی مریزاسیون می کند. یکی از خواص آنزیم این است که در هنگام پیشروی، اگر به ناحیه دو رشته ای برخورد کند، رشته متصل به رشته الگو را کنار می زند. با کنار زدن رشته، یک تک رشته ایجاد می شود. قسمت DNA ناحیه '۳ پرایمر Backward، به این تک رشته، اتصال می یابد و توسط آنزیم DNA پلی مراز گسترش می یابد. انتهای '۳ رشته الکو نیز توسط آنزیم گسترش می یابد و ناحیه مکمل پرایمر ساخته می شود. بدین ترتیب یک دورشته ای ایجاد می گردد که در ناحیه ای از طول خود دارای هیبرید RNA/DNA است و مجددا مورد حمله آنزیم RNase H قرار می گیرد. این تکنیک قادر است، در مدت کمتر از یک ساعت باعث تکثیر DNA الگو گردد. دمای واکنش در محدوده بین ۶۰ الی ۶۵ درجه سانتی گراد است ولی آنزیم ها تا دمای ۷۰ درجه سانتی گراد را نیز تحمل می کنند و تا این حد از دما، تکثیر انجام پذیر است. از جمله خصوصیات دیگر این تکنیک، توانایی تکثیر DNA ژنومی است و میزان تکثیر، با افزایش غلظت پرایمرها افزایش می یابد. همچنین، در این تکنیک، الگوی باندها روی ژل، به صورت چند باندی است که ماحصل اتصال قطعات تکثیر شده و ایجاد قطعات بزرگتراست. ما احتمال می دهیم این حالت، در اثر پدیده Template switching آنزیم DNA پلی مراز انجام می گیرد.

کلید واژه: متد، کایمریک پرایمر، تکثیر، دمای ثابت.

[1] Isothermal

فهرست مطالب

عنوان **صفحه**

۱-۱- مقدمـــه ۲
۱-۲- تکنیکLAMP ۲
۱-۳- تکنیک NASBA ۵
۱-۳-۱- چند مزیت تکنیک NASBA ۵
۱-۴- تکنیک ICAN ۶
۱-۵- تکنیک HDA ۸
۱-۶- تکنیک SDA ۹
۱-۷- تکنیک RCA ۱۱
۱-۸- تکنیک SMART ۱۲

فصل ۲- مروری بر مطالعات انجام شده ۱۵

۲-۱- آنزیم Bst DNA Polymerase ۱۵
2-1-1- تقسیم بندی آنزیم Bst DNA Polymerase ۱۵
۲-۱-۲- کاربرد آنزیمهای DNA پلی مراز مقاوم به حرارت ۱۵
۲-۱-۳- آنزیمهای DNA پلی مراز نوترکیب ۱۶
۲-۱-۴- انواع آنزیمهای مقاوم به حرارت ۱۶
۲-۱-۵- منابع آنزیمهای مقاوم در برابر حرارت ۱۶
۲-۱-۶- آنزیم rBst Large Fragment DNA Polymerase ۱۷
۲-۲- آنزیم RNase H ۱۸
۲-۲-۱- تقسیم یندی آنزیم RNase H ۱۸
۲-۲-۲- ساختار مولکولی آنزیم RNase H ۱۹
۲-۲-۳- الگوی برش آنزیم روی RNA ناحیه هیبرید RNA/DNA ۱۹
۲-۳- تکنیک ..CMA ۲۲
۲-۳-۱- اساس واکنش ۲۲
۲-۳-۲- شرح تکنیک ۲۲
۲-۳-۳- مرا حل تکنیک ۲۴
۲-۳-۴- چند نکته در مورد این تکنیک ۲۶
۲-۴- انتخاب ژن ۲۶
۲-۴-۱- خصوصیات ژن *TSPY1* ۲۶

فصل ۳- مواد و روشها ۲۹

۳-۱- جستجو و بررسی توالی های مربوط به ژن *Tspy1* جهت انتخاب توالی مناسب برای طراحی پرایمرها ۲۹
۳-۲- مراحل طراحی پرایمرها ۲۹
۳-۳- استخراج DNA از سلولهای یوکاریوت ۲۹
۳-۴- انجام PCR با استفاده از پرایمرهای طراحی شده برای کلون سازی ناحیه ای از ژن *Tspy1* ۲۹
۳-۵- آشکار سازی محصولات PCR با استفاده از آگار رز ژل الکتروفورزیس ۳۰
۳-۶- جداسازی و تخلیص محصول واکنش از ژل آگار رز ۳۰
۳-۷- انجام مرحله کلونینگ ۳۱
۳-۷-۱- تهیه محیط LB مایع و جامد ۳۱
۳-۷-۲- طریقه تهیه باکتری Competent ۳۱
۳-۷-۳- مرحله Ligation ۳۱
۳-۷-۴- ترانسفورماسیون ۳۲
۳-۷-۵- انجام مرحله Colony PCR ۳۲
۳-۷-۶- تخلیص پلاسمید ۳۳
۳-۷-۷- بررسی پلاسمید استخراج شده با استفاده از آگار رز ژل الکتروفورزیس: ۳۳
۳-۷-۸- بررسی نتایج حاصل از تعیین توالی ۳۳
۳-۷-۹- تهیه استوک از باکتریهای ترانسفورمه ۳۳
۳-۸- زدودن RNase از وسایل و محلولهای مورد استفاده ۳۴
۳-۸-۱- لوازم شیشه ای، فلزی و پلاستیکی ۳۴
۳-۸-۲- تهیه بافرهای عاری از RNase ۳۴
۳-۹- طراحی پرایمرهای کایمریک ۳۴
۳-۹-۱- نکاتی در ارتباط با طراحی پرایمرهای کایمریک ۳۵
۳-۱۰- انجام PCR با استفاده از پرایمرهای طراحی شده کایمریک: ۳۵
۳-۱۱- انجام واکنش CMA ۳۶
۳-۱۱-۱- مواد مورد استفاده در تکنیک ۳۶
۳-۱۱-۲- روش و مراحل انجام واکنش ۳۷
۳-۱۲- بررسی تاثیر غلظت پرایمر بر واکنش ۳۷
۳-۱۳- بررسی تاثیر غلظت کلرور منیزیم بر واکنش ۳۸
۳-۱۴- بررسی شرایط واکنش در دماهای مختلف ۳۸
۳-۱۵- مقایسه میزان تاثیر دو نوع آنزیم RNase H (Tli و Hybridase) در واکنش ۳۹
۳-۱۶- بررسی تاثیر بافرهای متفاوت بر روی واکنش ۳۹
۳-۱۷- هضم آنزیمی محصول واکنش ۴۰
۳-۱۷-۱- بررسی قطعه تکثیر یافته جهت یافتن آنزیم محدود کننده ۴۰
۳-۱۷-۲- تیمار آنزیمی قطعه تکثیر شده ۴۰
۳-۱۸- بررسی میزان حساسیت تکنیک در تکثیر رشته الگو ۴۰

۳-۱۹- بررسی مدت زمان مورد نیاز برای تکثیر قطعه ۴۱
۳-۲۰- امکان سنجی تکثیر DNA با استفاده از Template حاصل از DNA ژنومی ۴۲
۳-۲۱- مقایسه روش PCR و CMA ۴۲
۳-۲۱-۱- مقایسه دو تکنیک CMA و PCR از نظر میزان حساسیت: ۴۲
۳-۲۱-۲- مقایسه دو تکنیک CMA و PCR از نظر حساسیت به غلظت پرایمر ۴۳
۳-۲۲- ترسیم منحنی ذوب با استفاده از محصول واکنش CMA ۴۳

فصل ۴- نتایج ۴۵

۴-۱- جستجو و بررسی توالی های مربوط به ژن *Tspy1* جهت انتخاب توالی مناسب برای طراحی پرایمرها ۴۵
۴-۲- طراحی پرایمر ۴۵
۴-۳- انجام PCR با استفاده از پرایمرهای طراحی شده برای کلون سازی ناحیه ای از ژن *Tspy1* ۴۷
۴-۴- جداسازی و تخلیص محصول واکنش از ژل آگار رز ۴۷
۴-۵- انجام مرحله کلونینگ ۴۸
۴-۶- انجام مرحله Colony PCR ۴۹
۴-۷- بررسی پلاسمید استخراج شده با استفاده از آگار رز ژل الکتروفورزیس ۵۰
۴-۸- بررسی نتایج حاصل از تعیین توالی ۵۰
۴-۹- طراحی پرایمرهای کایمریک ۵۱
۴-۱۰- انجام PCR با استفاده از پرایمرهای طراحی شده کایمریک ۵۲
۴-۱۱- انجام واکنش CMA ۵۳
۴-۱۲- بررسی تاثیر غلظت پرایمر بر واکنش ۵۵
۴-۱۳- بررسی تاثیر غلظت کلرور منیزیم بر واکنش ۵۶
۴-۱۴- بررسی شرایط واکنش در دماهای مختلف ۵۷
۴-۱۵- مقایسه میزان تاثیر دو نوع آنزیم Tli RNase H و Hybridase RNase H در واکنش ۵۸
۴-۱۶- بررسی تاثیر بافرهای متفاوت بر روی واکنش ۵۹
۴-۱۷- هضم آنزیمی محصول واکنش ۶۰
۴-۱۸- بررسی میزان حساسیت تکنیک در تکثیر رشته الگو ۶۱
۴-۱۹- بررسی مدت زمان مورد نیاز برای تکثیر قطعه ۶۲
۴-۲۰- امکان سنجی تکثیر DNA با استفاده از Template حاصل از Genomic DNA ۶۳
۴-۲۱- مقایسه دو تکنیک CMA و PCR از نظر میزان حساسیت ۶۴
۴-۲۲- مقایسه دو تکنیک CMA و PCR از نظر حساسیت به غلظت پرایمر ۶۷
۴-۲۳- ترسیم منحنی ذوب با استفاده از محصول تکنیک CMA ۶۸

فصل ۵- بحث و پیشنهاد ها ۷۱

۵-۱- بحث ۷۱

۵-۱-۱- مقدمه ۷۱
۵-۱-۲- مکانیسم تکنیک CMA ۷۲
۵-۱-۳- روش انجام تکنیک CMA ۷۲
۵-۱-۴- بررسی تکنیک CMA ۷۳
۵-۱-۵- مقایسه تکنیک CMA با تکنیک PCR ۷۹
۵-۱-۶- اثبات خاصیت نسخه برداری معکوس درآنزیم rBst Large Fragment DNA Polymerase .. ۷۹
۵-۱-۷- آنزیم DNA پلی مراز، نوکلئوتید اضافی به انتهای '۳ رشته، اضافه نمی کند ۸۰
۵-۱-۸- ترکیب آنزیمی مناسب در تکنیک CMA ۸۰
۵-۱-۹- تبدیل تکنیک CMA از حالت چند باندی به تک باندی ۸۰
۵-۱-۱۰- مزایای این تکنیک ۸۰
۵-۲- پیشنهاد ها ۸۱
فهرست مراجع ۸۲

فهرست شکل ها

عنوان.....صفحه
شکل۲-۱ : مراحل تکنیک LAMP ۴
شکل۲-۲: نمایی از مراحل تکنیک NASBA..... ۶
شکل۲-۳: نمایی از مراحل تکنیک ICAN..... ۷
شکل۲-۴ : نمایی از مراحل تکنیک HDA ۸
شکل۲-۵ : مراحل تکنیک SDA..... ۱۰
شکل۲-۶ : قسمتی از مراحل تکنیک RCA..... ۱۱
شکل۲-۷: قسمتی از مراحل تکثیر DNA حلقوی توسط روش RCA..... ۱۲
شکل۲-۸ : مراحل تکنیک SMART..... ۱۳
شکل۲-۱ : نمایی از الگوی برش RNA توسط *B. subtilis* RNase HII..... ۱۹
شکل۲-۲ : نمایی از الگوی برش RNA توسط *B. subtilis* RNase HII..... ۲۰
شکل۲-۳ : نمایی از الگوی برش RNA توسط E. coli RNase HI ۲۰
شکل۲-۴ : نمایی از الگوی برش RNA توسط T. Thermophilus RNase HI..... ۲۱
شکل۲-۵ : نمایی از تاثیر طول RNA بر الگوی برش RNA توسط Bst RNase HIII ۲۱
شکل۳-۱: نقشه پلاسمید PTZ 57R/T..... ۳۲
شکل۴-۱ : هم ردیفی توالی های ژن Tspy1 توسط نرم افزار Mega 3.1..... ۴۵
شکل۴-۲ : نتیجه Blastn با استفاده از پرایمرهای طراحی شده ۴۶
شکل۴-۳ : PCR ژن Tspy1 جهت کلونینگ..... ۴۷
شکل۴-۴ : DNA تخلیص شده از ژل..... ۴۸
شکل۴-۵ : مراحل کلونینگ محصول PCR..... ۴۹
شکل۴-۶ : نمایی از Colony PCR..... ۴۹
شکل۴-۷: پلاسمید تخلیص شده..... ۵۰
شکل۴-۸ : نمایی از توالی سکانس شده در نرم افزار Chromas ۵۱
شکل۴-۹ : نمایی از هم ردیفی توالی های ژن *Tspy1* و ناحیه پرایمر Forward ۵۱
شکل۴-۱۰: واکنش PCR با استفاده از پرایمرهای کایمریک..... ۵۳
شکل۴-۱۱ : نتیجه تکثیر DNA توسط تکنیک CMA..... ۵۴
شکل۴-۱۲: باندهای متعدد تشکیل یافته در واکنش CMA..... ۵۵
شکل۴-۱۳ : غلظت های متفاوت پرایمرها و تاثیر آن در واکنش CMA..... ۵۶
شکل۴-۱۴ : تاثیر غلظت های متفاوت کلرور منیزیم بر روی واکنش..... ۵۷
شکل۴-۱۵ : واکنش CMA در یک طیف دمایی..... ۵۸

شکل۴-۱۶ : اثرآنزیم های Tli RNase H و Hybridase RNase H در CMA.....۵۹
شکل۴-۱۷ : واکنش CMA در حضور بافرهای متفاوت.....۶۰
شکل۴-۱۸ : هضم آنزیمی محصول واکنش توسط آنزیم *AluI*.....۶۱
شکل۴-۱۹: واکنش CMA در غلظتهای متفاوت بر حسب پیکوگرم.....۶۲
شکل۴-۲۰ : الگوی تکثیر درتکنیک CMA در زمان های متفاوت.....۶۳
شکل۴-۲۱: واکنش CMA با استفاده از DNA ژنومیک.....۶۴
شکل۴-۲۲: نتیجه PCR در حضور غلظت های متفاوت از Template.....۶۵
شکل۴-۲۳: واکنش CMA در غلظت های متفاوت Template بعد از هضم آنزیمی.....۶۶
شکل۴-۲۴: واکنش CMA در غلظت های متفاوت Template.....۶۷
شکل۴-۲۵: Melting Curve محصول واکنش CMA بعد از ۶۰ دقیقه.....۶۹
شکل۴-۲۶: Melting Curve محصول واکنش CMA بعد از ۹۰ دقیقه.....۶۹
شکل۵-۱: نمایی از الگوی باندها در LAMP.....۷۴
شکل ۵-۲: نمایی از الگوی باندها در RCA.....۷۴
شکل۵-۳: الگوی چند باندی در تکنیک CMA.....۷۵
شکل۵-۴: قسمتی از مراحل تکنیک CMA.....۷۶

فهرست جدول ها

عنوان .....صفحه
جدول۳-۱ : مواد مورد نیاز جهت انجام واکنش PCR.....۳۰
جدول۳-۲: سیکلهای واکنش PCR.....۳۰
جدول۳-۳: مواد و مراحل انجام واکنش Ligation.....۳۱
جدول۳-۴: اجزای لازم جهت انجام واکنش Colony PCR.....۳۲
جدول۳-۵ : برنامه سیکل های Colony PCR ۳۳
جدول۳-۶ : توالی های پرایمرهای Universal جهت Sequencing.....۳۳
جدول۳-۷ : مواد مورد نیاز جهت انجام واکنش PCR.....۳۵
جدول۳-۸ : سیکلهای واکنش PCR ۳۵
جدول۳-۹ : مواد مورد نیاز جهت انجام واکنش CMA برای مرحله اول.....۳۶
جدول۳-۱۰ : مواد مورد نیاز جهت انجام واکنش CMA برای مرحله دوم.....۳۶
جدول۳-۱۱ : مراحل انجام واکنشCMA ۳۷
جدول۳-۱۲ : غلظتهای متفاوت پرایمرها در واکنش ۳۷
جدول۳-۱۳ : غلظتهای متفاوت از کلرور منیزیم در واکنش.....۳۸
جدول۳-۱۴ : انجام واکنش در شرایط بافری متفاوت.....۳۹
جدول۳-۱۵ : دستورالعمل هضم آنزیمی قطعه تکثیر شده توسط آنزیم AluI.....۴۰
جدول۳-۱۶ : واکنش CMA با استفاده از رقتهای سریال Template.....۴۱
جدول۳-۱۷ : بررسی زمان انجام واکنش CMA ۴۱
جدول۳-۱۸ : واکنش CMA با استفاده از Template حاصل از Genomic DNA.....۴۲
جدول۴-۱ : توالی های پرایمرهای طراحی شده جهت کلونینگ.....۴۵
جدول۴-۲ : مشخصات پرایمرها جهت کلونینگ.....۴۶
جدول۴-۳ : توالی های پرایمرهای کایمریک.....۵۲
جدول۴-۴ : مشخصات پرایمرهای کایمریک ۵۲
جدول۴-۵: غلظت های محصولات در PCR و CMA در حضور غلظت های متفاوت از پرایمرها.....۶۸

فصل اول

مقـــــــــدمه

۱-۱- مقدمـــــه

متدهای تکثیر DNA و RNA جزء کارآمدترین ابزارهای موجود در علوم زیستی محسوب می شوند. به عنوان نمونه می توان به کاربرد آن در علوم پزشکی اشاره نمود که در جهت تشخیص بیماریهای عفونی و یا اختلالات ژنتیکی استفاده می شود. این روشها به سه گروه تقسیم می شوند؛ روشهایی که نیازمند سیکل دمایی هستند [۱و۲]، آنهایی که براساس واکنش زنجیره ای لیگاز هستند[۳, ۴, ۵]، آنهایی که بر اساس نسخه برداری طراحی شده اند[۶] و یا بر اساس روشهای ایزوترمال، در شرایط دمای ثابت تکثیر را انجام می دهند[۴, ۷]. با ارائه متد PCR در واقع انقلابی در علوم بیولوژی مولکولی ایجاد شد. این متد علیرغم حساسیت بالا و استفاده از آن به عنوان یک مکانیسم پایه جهت طراحی تکنیکهای گوناگون، دارای محدودیت هائی است که به چند نمونه اشاره می گردد.

استفاده از دستگاه ترموسایکلر که جهت ایجاد سیکل دمائی استفاده می گردد، یکی از اجزاء اصلی در این تکنیک محسوب می گردد. این موضوع از چند جنبه قابل بررسی است: هزینه بالائی که تحمیل می کند، مدت زمانی که جهت تغییرات دما در حین واکنش مورد نیاز است و محدودیت استفاده از آن تنها در مکانهای خاص مانند آزمایشگاه. محصول نسبتا پائین در این تکنیک، از دیگر موارد می باشد که جهت رفع این مشکل می بایست تعداد سیکل ها را افزایش داد.

در ادامه، چندین روش دیگر ارائه گردیدند که هر کدام به نوبه خود سعی در برطرف کردن کاستیهای موجود در روش PCR داشتند[۸]. افزایش سرعت، صحت، حساسیت و در عین حال سادگی انجام واکنش از جمله مواردی بودند که مورد توجه قرار گرفتند. اکثر این روشها دارای یک خصوصیت مشترک هستند و آن ثابت بودن دما[۱] در حین تکثیر[۲] است. در این تکنیکها به نحوی نیاز به واسرشت کردن[۳] دو رشته برطرف شده است و ایجاد تک رشته های برای اتصال پرایمرها به نحوی و بدون نیاز به واسرشت شدن انجام می گیرد. بنابراین دیگر نیازی به سیکل دمائی نیست و این بدین معنی است که واکنش بدون دستگاه ترموسایکلر انجام می شود و مدت زمان مورد نیاز جهت تکثیر کاهش قابل توجه می یابد.

۱-۲- تکنیک LAMP[4]

این تکنیک یکی از بهترین تکنیکهای ایزوترمال است [۹, ۱۰, ۱۱]. مکانیسم آن به این صورت است: در این روش از ۴ پرایمر استفاده می شود که دو پرایمر آن خارجی و دو عدد آن داخلی هستند. دو پرایمر داخلی بصورت دو قسمتی می باشند. قسمت ' ۳ آن با رشته الگو[۵] جفت می شود ولی قسمت دوم آن که در ناحیه ' ۵ است، به عنوان پرایمر برای بخشی از قسمت داخلی رشته الگو عمل می کند و با آن جفت می شود.

[1] Isithermal
[2] Amplification
[3] Denaturation
[4] Loop Mediated Isothermal Amplification
[5] Template

آنزیمی که در این روش استفاده می شود Bst DNA Polymerase نام دارد که یکی از قوی ترین آنزیمهای پلی مرازی است. از خصوصیات این آنزیم، عملکرد آن در شرایط مختلف بافری و عدم حساسیت به مواد تولید شده توسط واکنش می باشد. از دیگر خواص آن، خاصیت کنار زدن رشته[1] است که در ضمن پلیمریزاسیون، اگر به رشته جفت شده با رشته الگو برخورد کند آنرا کنار می زند و به حرکت خود ادامه می دهد[۱, ۱۲].

از این خصوصیت آنزیم به خوبی در این روش استفاده شده است و هنگامی که ۴ پرایمر روی رشته اتصال می یابند، پرایمرهای خارجی شروع به طویل شدن می کنند و همزمان رشته جلوئی که حاوی پرایمرهای داخلی و در ادامه رشته طویل شده می باشند را کنار می زنند. بدین ترتیب در نهایت تک رشته ای تولید می شود که حاوی ساختاری به شکل ساقه- حلقه[2] است که ناحیه حلقه آن چون تک رشته است مورد استفاده مجدد پرایمرها قرار می گیرد و توسط آنزیم امتداد می یابد. نهایتا محصول تکثیر یافته آن به صورت گل کلمی و در اندازه های مختلف ایجاد می شود که پس از الکتروفورز در ژل بصورت پیوسته، منطقه وسیعی از طول ژل را در بر می گیرد.

در این روش به دلیل تکثیر زیاد، ماده ای به نام پیروفسفات تولید می شود که در مقادیر زیاد به رنگ سفید رسوب می کند. این رسوب، پیروفسفات منیزیم است. بررسی وجود یا عدم وجود این رسوب می تواند روشی برای تشخیص نتیجه تکثیر باشد هر چند که با استفاده از ژل الکتروفورزیس، turbidimetry Real time یا پروبهای فلورسنت، می توان محصول واکنش را بررسی کرد[۱۳, ۱۴].

این تکنیک چندین مزیت دارد: یکی از این مزایا، استفاده از ۴ عدد پرایمر است که در واقع ۶ ناحیه از رشته را مورد شناسائی قرار می دهند و به این ترتیب باعث افزایش اختصاصیت می شوند. در این روش در مدت کمتر از یک ساعت می توان به میزان تکثیر مورد نیاز دست پیدا کرد. همچنین نیازی به استفاده از دستگاه ترموسایکلر نیست و واکنش در درجه حرارت ۶۰-۶۵ $^{\circ}C$ انجام می گیرد. بنابراین می توان از آن در مکانهائی خارج آزمایشگاهی (در کنار تخت بیمار) استفاده نمود. با استفاده از آنزیم Reverse transcriptase می توان از این روش برای تکثیر RNA نیز استفاده نمود

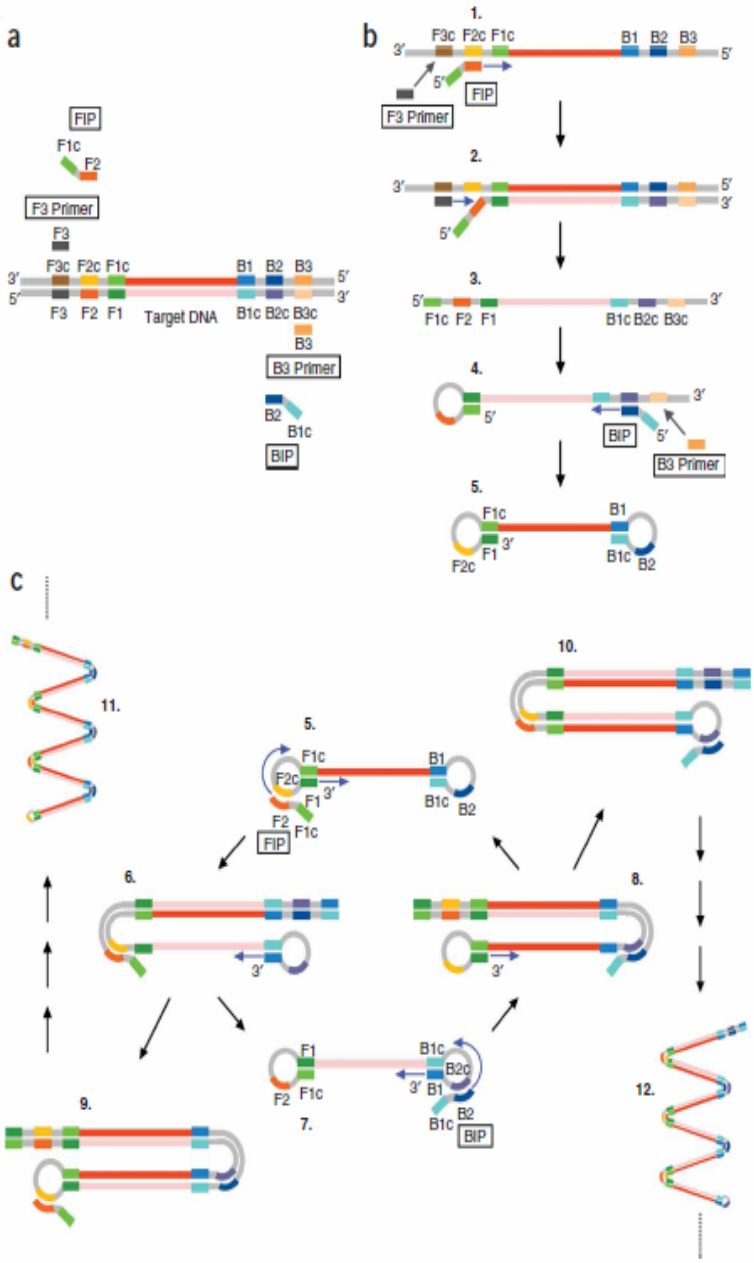
این تکنیک تا کنون در چندین مورد به عنوان تکنیک پایه، جهت تکثیر DNA مورد استفاده واقع شده است[۱۵, ۱۶].

از معایب این روش می توان به پیچیدگی طراحی پرایمر ها در این روش اشاره نمود. پرایمرها که ۴ عدد هستند و جمعا ۶ ناحیه را مورد شناسائی قرار می دهند می بایست تنها برای ناحیه ای محدود به تقریبا ۲۰۰ bp طراحی شوند و این نشانگر دشواری طراحی آن است.

شکل ۱-۱ مراحل این تکنیک را نشان می دهد:

[1] Strand displacement activity
[2] Stem-Loop

Figure 1 | Principle of loop-mediated isothermal amplification (LAMP) method. (**a**) Primer design of the LAMP reaction. For ease of explanation, six distinct regions are designated on the target DNA, labeled F3, F2, F1, B1c, B2c and B3 from the 5′ end. As c represents a complementary sequence, the F1c sequence is complementary to the F1 sequence. Two inner primers (FIP and BIP) and outer primers (F3 and B3) are used in the LAMP method. FIP (BIP) is a hybrid primer consisting of the F1c (B1c) sequence and the F2 (B2) sequence. (**b**) Starting structure producing step. DNA synthesis initiated from FIP proceeds as follows. The F2 region anneals to the F2c region on the target DNA and initiates the elongation. DNA amplification proceeds with BIP in a similar manner. The F3 primer anneals to the F3c region on the target DNA, and strand displacement DNA synthesis takes place. The DNA strand elongated from FIP is replaced and released. The released single strand forms a loop structure at its 3′ end (structure 3). DNA synthesis proceeds with the single-strand DNA as the template, and BIP and B3 primer, in the same manner as described earlier, to generate structure 5, which possesses the loop structure at both ends (dumbbell-like structure). (**c**) Cycling amplification step. Using self-structure as the template, self-primed DNA synthesis is initiated from the 3′ end F1 region, and the elongation starts from FIP annealing to the single strand of the F2c region in the loop structure. Passing through several steps, structure 7 is generated, which is complementary to structure 5, and structure 5 is produced from structure 8 in a reaction similar to that which led from structures 5–7. Structures 9 and 10 are produced from structures 6 and 8, respectively, and more elongated structures (11, 12) are also produced.



شکل۲-۱ : مراحل تکنیک LAMP

۱-۳- تکنیک NASBA[1]

این روش برای تکثیر و شناسائی RNA استفاده می گردد و ترکیبی از دو عمل نسخه برداری[۲] و نسخه برداری معکوس[۳] است که بطور همزمان انجام می گردند[۱۷,۱۸, ۱۹].

سه نوع آنزیم مورد استفاده قرار می گیرد: RNase H، AMV و T7 RNA Polymerase . .همانطور که گفته شد از RNA بعنوان رشته الگو استفاده می شود و دو پرایمر بر اساس آن طراحی می شوند طوری که در یکی از پرایمرها توالی پروموتر فاژ T7 گنجانده می شود. آنزیم AMV در ابتدا با خاصیت نسخه برداری معکوس خود و با استفاده از پرایمر اول (P1) رشته مکمل RNA را می سازد. و سپس هیبرید RNA/DNA مورد هجوم آنزیم RNase H قرار گرفته و با خاصیت ریبونوکلئازی خود رشته RNA را از میان بر می دارد و در ادامه AMV دوباره وارد عمل می شود و این بار با خصوصیت DNA پلی مرازی وابسته به DNA [4] و با استفاده از پرایمر دوم (P2) رشته مکمل را می سازد.

بدین گونه یک DNA دو رشته ای ایجاد می گردد که در ابتدای خود حاوی پروموتر T7 است. سومین آنزیم T7 RNA Polymerase است که وارد عمل شده و از روی این رشته تولید RNA می کند. در مرحله بعد روی هر کدام از RNA های تولید شده، دوباره سیکل فوق انجام می گیرد و نهایتا تعداد زیادی رشته RNA تولید می شود. تمام مراحل واکنش در دمای ۴۱°C انجام می گیرد.

محصول نهائی NASBA ، به چند صورت بررسی می گردد: ژل الکتروفورزیس، Real time NASBA که از پروبهای فلورسنت برای این منظور استفاده می شود و روش NASBA ELISA که بصورت کالریمتریک بررسی می گردد. تا کنون FDA[5] استفاده از این تکنیک را برای تشخیص مولکولی چندین میکروارگانیسم منجمله HCV و HIV-1 مورد تایید قرار داده است.

۱-۳-۱- چند مزیت تکنیک NASBA

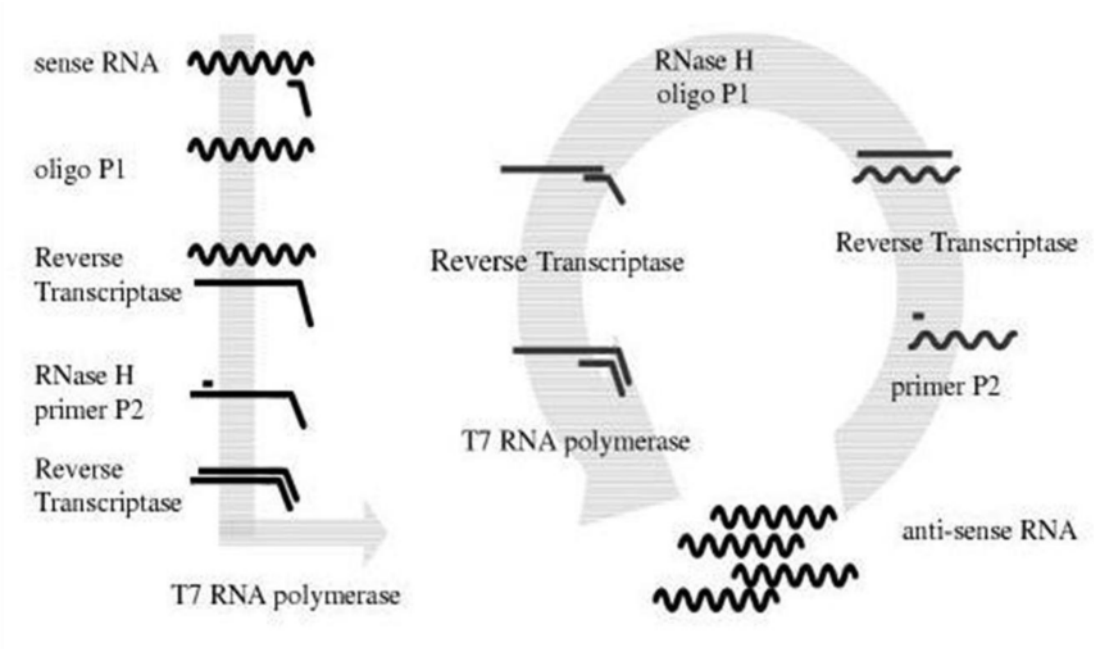
۱- بدلیل عدم وجود مرحله واسرشت شدن در تکنیک اگر DNA در محیط وجود داشته باشد قادر به ایجاد مزاحمت و ایجاد واکنشهای غیر اختصاصی نخواهد بود. بنابراین خطر آلوگی با DNA در آن وجود ندارد.
۲- بدلیل عدم وجود مرحله واسرشت شدن، تنها فرمهای RNA رتروویروسها بررسی می شوند و بنابراین فرمهای Proviral در واکنش شرکت ندارند.
۳- در مدت یک ساعت بیش از $۱۰^{۹}$ کپی از رشته RNA تولید می شود.
۴- در بررسی بیان ژن این تکنیک قابل استفاده می باشد.
۵- بدلیل وجود تک رشته های تولید شده در این روش می توان با استفاده از پروب در Real time و یا ELISA محصول را به صورت کمی اندازه گیری کرد.

[1] Nucleic Acid Sequence-Based Amplification
[2] Transcription
[3] Reverse transcription
[4] DNA Dependent DNA Polymerase
[5] Food and drug Administration office of united state of America

۶- از این تکنیک در تشخیص بسیاری از پاتوژن ها می توان استفاده نمود[۲۰].

۷- این روش جهت بررسی و تشخیص سلولهای زنده پیشنهاد شده است [۲۱, ۲۲] هر چند که تا به حال در این تکنیک، تنها rRNA مورد استفاده قرار گرفته است و rRNA حتی در سلولهای مرده نیز برای مدت طولانی پایدار است[۲۳].

شکل ۱-۲ نشانگر مراحل تکنیک NASBA است:



شکل۲-۲: نمایی از مراحل تکنیک NASBA

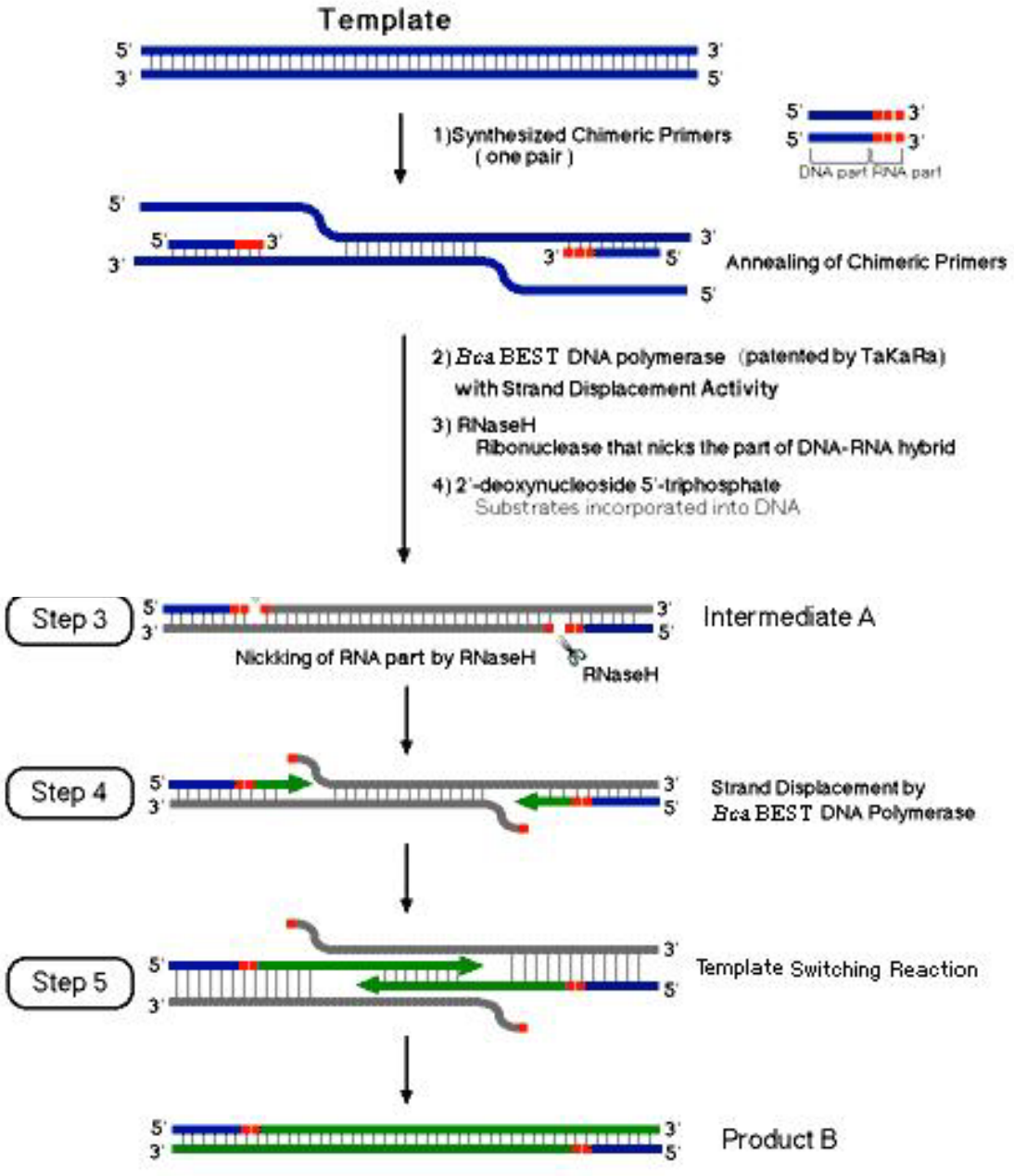
۱-۴- تکنیک ICAN[1]

این تکنیک نیز همانند تکنیکهای فوق قابلیت تکثیر DNA و یا RNA را در مدت کوتاه دارد و واکنش در شرایط دمای ثابت حدود ۵۵°C انجام می گیرد[۲۴, ۲۵]. در این تکنیک از پرایمرهای کایمریک استفاده می شود. به صورتی که در ناحیه '۵ آن، DNA و در ناحیه '۳ آن RNA قرار می گیرد. دو آنزیم مورد استفاده در این روش Bca Best DNA Polymerase و RNase H هستند.پس از اتصال پرایمرها روی رشته الگو، آنزیم RNase H روی هیبرید RNA/DNA ایجاد شکاف[2] می کند و سپس DNA Polymerase از محل OH '۳ آزاد شروع به طویل سازی می کند و همزمان رشته جلوی خود را کنار

[1] Isothermal and Chimeric primer-initiated Amplification Of Nucleic acid
[2] Nick

می زند. توسط این روش می توان میزان زیادی محصول در مدت زمان کوتاه تولید نمود. از دیگر مزایای آن تکثیر قطعات DNA در حد kb ۴ است.

در شکل ۱-۳ مراحل این تکنیک نشان داده شده است:



شکل۲-۳: نمایی از مراحل تکنیک ICAN