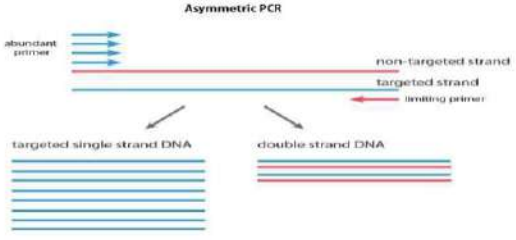
برخی تکنیک‌های PCR

به دلیل اهمیت دانش ارزیابی مولکولی در اصلاح دانه‌های روغنی در این شماره و شمارگان آتی سعی می گردد تا به برخی از مفاهیم کاربردی آن پرداخته شود.

واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز (PCR) یکی از روش‌های کاربردی در ژنتیک مولکولی بوده و اساس آن بر تغییرات متوالی دما به منظور تکثیر از رشته‌های DNA یا RNA به عنوان الگو می‌باشد. برحسب مولکول الگو، پرایمرها، دماهای اتصال (Annealing) و یا استفاده از انواع آنزیم‌های پلی‌مراز، تکنیک‌های مختلف PCR ابداع گردیده است که در این مطلب به برخی از آنها اشاره می گردد.

تکنیک Asymmetric PCR

در این روش از دو پرایمر با مقدار متفاوت (۲ به ۱) استفاده می‌شود و هدف آن سنتز DNA تک رشته‌ای می‌باشد. یکی از کاربردهای این روش بررسی نواحی بالا دستی ژن منتقل شده به ارگانیسم هدف می‌باشد.



تکنیک Hot-Start PCR

زمانی که دمای اتصال پرایمرهای مورد نظر پایین باشد و یا بنا به هر دلیلی باند غیراختصاصی ایجاد شود معمولا از تکنیک Hot-start برای رفع این مشکل استفاده می‌شود. اساس این تکنیک، جدا بودن فیزیکی اجزای واکنش پلی‌مراز (خصوصا آنزیم پلی‌مراز) تا قبل از واسرشت (denaturation) اولیه می باشد.

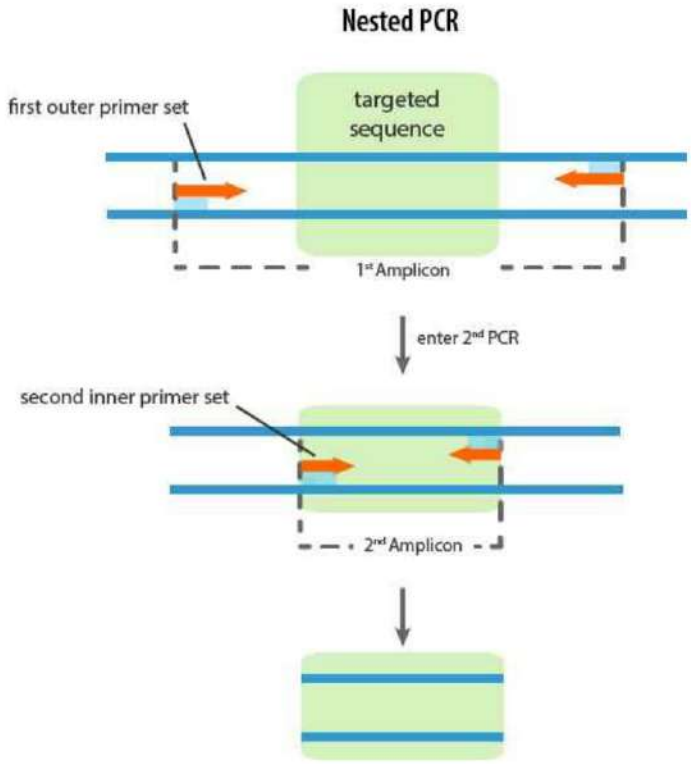
تکنیک RT-PCR

این تکنیک برای سنتز cDNA استفاده می‌شود. به دلیل استفاده از مولکول RNA در این تکنیک به عنوان رشته الگو از آنزیم رونوشت‌بردار معکوس (ReverseTranscriptase) استفاده می‌شود. نخستین بار این نوع از آنزیم‌ها در ویروس‌ها مشاهده گردید.

تکنیک Nested PCR

این تکنیک دقت و حساسیت آزمایش را افزایش می‌دهد و برای یافتن باند اختصاصی در بین انبوهی از

باندهای غیر اختصاصی استفاده می‌گردد. معمولا از دو جفت پرایمر استفاده می‌شود که جفت دوم نواحی داخلی جفت اول را تکثیر می‌کند. پرایمرهای جفت اول باندهای متعددی تکثیر می‌کند که بسیاری از آنها غیر اختصاصی می‌باشند. سپس از محصول PCR جفت پرایمرهای اول، به عنوان الگو برای جفت پرایمرهای دوم استفاده می‌شود. اگر ژن مورد نظر توالی یابی نشده باشد و طراحی جفت پرایمرهای دوم ممکن نباشد می‌توان سه تا پنج نوکلئوتید به انتهای ´۳ جفت



پرایمرهای اول اضافه کرد ولی بهتر است در این حالت از آنزیم‌هایی که خاصیت اگزونوکلئازی دارند برای تکثیر استفاده نشود.

تکنیک Inverse PCR

این تکنیک به منظور بررسی ژن (ها) مورد نظر که فقط بخش محدودی از توالی نوکلئوتیدی آن شناسایی شده است بکار می‌رود. بدین منظور ابتدا کل مولکول DNA مورد نظر با آنزیم‌های برشی محدود هضم می‌شود سپس با استفاده از آنزیم لیگاز اتصال مجدد صورت می‌گیرد. این عمل سبب بوجود آمدن مولکول‌های حلقوی DNA می‌شود که توالی مورد نظر ما در یکی از آنها قرار دارد. با استفاده از اطلاعات محدود ژنومی که از قبل در دسترس می‌باشد طراحی پرایمر در جهت مخالف هم صورت می‌گیرد. پس از تکثیر و مشاهده باند، محصول PCR جهت شناسایی کل قطعه مورد نظر توالی یابی می‌شود.