فهرست مطالب

عنـوان **صفحـه**

فصل اول: مقدمه‌ای بر واکنش زنجیره‌ای پلیمراز ۷

فصل دوم: مقدمات Real-time PCR ۴۱

فصل سوم: طراحی آزمایش ۷۲

فصل چهارم: آماده‌سازی پلیت و آنالیز داده‌ها ۹۳

فصل پنجم: عیب‌یابی ۱۱۱

فصل ششم: Real-time immunoassay PCR ۱۲۵

فصل هفتم: میکروبیولوژی بالینی ۱۳۹

فصل هشتم: ویروس‌شناسی بالینی ۱۴۸

فصل نهم: نظارت بر پیوند عضو جامد ۱۷۰

واژه‌نامه ۱۸۴

نمایه ۱۹۱

مقدمه

با نام خداوند بخشنده و مهربان و با صلوات بر حضرت محمد مصطفی (ص) آخرین فرستاده او، از صمیم قلب و با خلوص نیت خداوند بلند مرتبه را هزاران بار شکرگزار هستیم که توفیق این را به ما عطا فرمود تا بتوانیم با به تحریر در آوردن کتاب «اصول آزمایش PCR و RT-qPCR» قدم کوچکی در راستای ادای دین در حوزه علم برداریم.

کتاب حاضر در برگیرنده اصول واکنش‌های زنجیره‌ای پلیمراز، نیازمندی‌ها، مواد و روش‌ها، تفسیر نتایج بعد از انجام آزمایش و برخی رفع اشکالات بوجود آمده در زمان انجام آزمایش است. علاوه براین، در این کتاب سعی شده است که بطور خلاصه و بدون اضافه گویی انواع روش‌های انجام واکنش‌های زنجیره‌ای پلیمرازی و کاربرد هر یک از این روش‌ها توضیح داده شود. کتاب حاضر به دانشجویان کارشناسی ارشد و دکترا که علاقه‌مند به کار در زمینه آزمایشات مولکولی در سطح ژنوم هستند کمک می‌کند تا اصول این روش‌ها را بیاموزند و به بهترین شکل و اتلاف کمترین وقت، تحقیق خود را به سرانجام برسانند

درنهایت، تمام تلاش ما این بوده است که دانشجویان با استفاده از این کتاب بتوانند مدیریت زمان بیشتری داشته باشند و بدون استرس با روش های تکثیر ژنوم را بیاموزند.

از اساتید و دانشجویان گرامی خواهشمندم نظرات، انتقادات و پیشنهادات خود را از طریق پست الکترونیکی Mohsen_h43@yahoo.com با اینجانب در میان بگذارند. در پایان بر خودم لازم می‌دانم از تمامی افرادی که در تهیه این کتاب همکاری داشته‌اند کمال تشکر و قدردانی را داشته باشم.

کتاب حاضر در برگیرنده اصول واکنش‌های زنجیره‌ای پلیمراز، نیازمندی‌ها، مواد و روش‌ها، تفسیر نتایج بعد از انجام آزمایش و برخی رفع اشکالات بوجود آمده در زمان انجام آزمایش است. علاوه براین، در این کتاب سعی شده است که بطور خلاصه و بدون اضافه گویی انواع روش‌های انجام واکنش‌های زنجیره‌ای پلیمرازی و کاربرد هر یک از این روش ها توضیح داده شود. همچنین در فصل‌های انتهایی کتاب، با توجه به تست‌های مورد نیاز چندین تست qRT-PCR ست-آپ شده برای استفاده دانشجویان و اساتید آورده شده است.

و من الله توفیق
دکتر محسن همتی
دکترای تخصصی بیوشیمی بالینی
دانشگاه علوم پزشکی کاشان

فصل ۱

مقدمه‌ای بر واکنش زنجیره‌ای پلیمراز

اهداف آموزشی

۱. آشنایی با تاریخچه و مفهوم پایه واکنش زنجیره‌ای پلیمراز .
۲. درک مکانیسم اساسی PCR و تشبیه آن به فرآیند همانندسازی DNA در سلول.
۳. شناخت کاربردهای گسترده و کلیدی PCR در حوزه‌های مختلف علوم زیستی، پزشکی و فراتر از آن.
۴. معرفی و شناخت انواع مختلف تکنیک‌های PCR مانند Multiplex PCR، Nested PCR، RT-PCR و غیره.
۵. درک تفاوت‌های اصلی بین PCR پایانی (End-point) و PCR کمی زمان واقعی (Real-time qPCR).
۶. آشنایی با تکنیک‌های تکثیر ایزوترمال مانند NASBA، HDA، LAMP و مزایای آنها.

مقدمه‌ای بر واکنش زنجیره‌ای پلیمراز

محتوای ژنتیک موجودات زنده (ژنوم) در برگیرنده اساسی‌ترین اطلاعات زیستی مورد نیاز برای زندگی و ادامه حیات است. ژنتیک موجودات زنده ساختار پروتئین‌ها، آنزیم‌ها و سایر موکول‌های زیستی را که محصولی از توالی اسید نوکلئیکی هستند را تعیین می‌کنند. تا کنون فعالیت‌های زیادی در جهت شناخت، بررسی و مطالعه محتوای ژنتیکی موجودات زنده انجام شده تا با ایجاد تعامل بین علوم زیستی، مانند زیست شناسی و تکنولوژی و علوم

زیست‌فناوری، دستیابی به سریع‌تر و مطمئن‌تر محققان به حقایق علمی نهفته در محتوای ژنتیکی را محقق سازد. در میان این فعالیت‌ها در چند دهه گذشته، واکنش زنجیره‌ای پلیمراز یا PCR، یکی از مهمترین روش‌های توسعه داده شده و استفاده شده در تحقیقات ژنتیکی و مولکولی است.

خورانا و همکارانش توانستند در سال ۱۹۷۱ با استفاده از دو آغازگر مصنوعی، بخشی از یک مولکول دو رشته‌ای DNA را در آزمایشگاه همانندسازی کنند؛ این کشف پیش‌زمینه‌ای برای کشف و توسعه واکنش PCR بود. ۱۲ سال بعد دکتر کری مولیس به یک روش چرخه‌ای برای تکثیر تصاعدی بخشی از مولکول DNA پی برد و آن را به جامعه بیوشیمی معرفی کرد. هرچند روش مولیس عملکردی بود، اما ایراداتی داشت که آن را تکثیر قطعه DNA را دچاد مشکل می‌کرد. در نهایت در سال ۱۹۸۵، سایکی مشکلات پیشین را رفع کرد و روش PCR کنونی را تشریح کرد. در سال ۱۹۹۳، دکتر کری مولیس به دلیل اختراع روش PCR، برنده جایزه نوبل شیمی شد. تا امروزه حق تجاری و امتیاز انحصاری این اختراع به شرکت رش و هافمن لارشی متعلق است.

واکنش زنجیره‌ای پلیمراز

آزمون PCR به مجموعه‌ای از واکنش‌های شیمیایی پشت سر هم گفته می‌شود که قادر است در زمان کوتاه، میلیون‌ها بار، از یک توالی خاص از مولکول DNA را تکثیر نمایند. به عبارت دیگر این واکنش می‌تواند همانند یک دستگاه کپی DNA در نظر گرفت که می‌تواند نسخه‌های انتخابی را به تعداد زیاد تکثیر کند. از آن‌جایی که محتوای ژنتیکی هر موجود زنده منحصر به خودش است و تنها در گونه‌های مخصوص خودشان یافت می‌شود، با استفاده از این تکنیک می‌تواند به راحتی گونه و حتی نژاد آن را شناسی کرد.

در PCR، مقدار ناچیز مولکول DNA که با روش‌های معمول آزمایشگاهی غیرقابل بررسی است به اندازه‌ای که بتوان آن را تجزیه و تحلیل کرد تکثیر می‌شود و افزایش می‌یابد. بررسی بیان آن قطعه و تعیین پروتئین حاصل از آن در سلول زنده، طبقه‌بندی موجودات زنده است. همانطور که می‌دانیم ژنوم در اغلب سلول‌های زنده مجموعه‌ای از موکول‌های دو رشته‌ای DNA است.

حین تقسیم سلولی، محتوای ژنتیک سلول با همانندسازی که به شکل نیمه‌حفاظتی[1] است تکثیر می‌شود. در ابتدای تقسیم سلولی دو رشته مارپیچ DNA از هم جدا شده و هر رشته به عنوان الگو برای تولید رشته جدید مورد استفاده قرار می‌گیرد. این روش تکثیر نیمه‌حفاظتی است زیرا یک رشته از دو رشته دختری، مربوط به DNA مادری است که به عنوان الگوی همانندسازی استفاده شده است. به بیان ساده‌تر در این مارپیچ دو رشته‌ای، یکی از رشته‌ها قدیمی و دیگری جدید و مکمل رشته قدیمی است. بنابراین، نوع و ترتیب قرار گرفتن نوکلئوتیدهای جدید بر اساس نوع و ترتیب نوکلئوتیدهای رشته نوکلئیک اسید الگو تنظیم می‌شود. جفت شدن بازهای مکمل خاصیتی است که DNA را قادر می‌سازد تا به عنوان منبع اطلاعات ژنتیکی پایدار عمل کند.

در واکنش PCR، ناحیه ژنی تکثیر شده (Amplicon) می‌تواند یک ژن، بخشی از ژن، یا حتی توالی غیر کد کننده باشد. به طور معمول، در موارد ردیابی و تشخیص، نیاز به تکثیر کل واحد رونویسی (شامل توالی‌های پروموتر، کدون آغاز(AUG)، توالی کد کننده پروتئین، کدون پایان و ترمیناتور) نمی‌باشند. بلکه می‌تواند از بخشی از ژن و یا حتی نواحی جداکننده داخل ژنی در DNA ریبوزومی باشند.

1. Semi-conservative replication

تکثیر DNA در PCR مانند همانندسازی در سلول‌های زنده توسط DNA پلیمراز انجام می‌شوند. این آنزیم، پروتئینی است که مهمترین مسئولیت را در تکثیر موکول DNA بر عهده دارد. وظیفه این آنزیم متصل کردن نوکلئوتیدهای منفرد به یکدیگر و ساخت رشته جدید DNA است. در موجودات زنده و حین همانندسازی مجموعه‌ای از پروتئین‌ها و آنزیم‌ها نقش دارند؛ در صورتی که در واکنش PCR تنها از نوع خاصی آنزیم مقاوم به حرارت به همراه با بافر، منیزیم کلرید و نوکلئوتیدها جهت تکثیر رشته DNA استفاده می‌شود. در هنگام ساخت رشته‌های DNA، از اتصال مونونوکلئوتیدهای کوچک و متعدد، رشته‌های کوتاه الیگونوکلئوتیدی یا بلند پلی‌نوکلئوتیدی ساخته می‌شود. الیگونوکلئوتیدها به رشته‌ای گفته می‌شود که کمتر از ۵۰ نوکلئوتید داشته باشد، در حالی که رشته پلی‌نوکلئوتیدی یک رشته بلند از نوکلئیک اسید است. در هر واکنش همانندسازی به منظور ساخت یک رشته پلی‌نوکلئوتیدی جدید، چه داخل سلول چه به شکل PCR در آزمایشگاه، وجود مونونوکلئوتید (واحد ساختمانی)، الیگونوکلئوتیدها (تأمین کننده گروه OH-۳ آزاد) و پلی‌نوکلئوتید (الگو) ضروری است.

به طور کلی طول یک رشته پلی‌نوکلئوتیدی بر اساس تعداد جفت بازهای آن تعیین می‌شود. برای مثال ۱kb برابر با ۱۰۰۰ جفت باز و ۱Mb برابر با یک میلیون جفت باز است. باید به این نکته توجه داشت که در تکثیر DNA به روش PCR می‌بایست همیشه طول ناحیه هدف را در نظر گرفت، زیرا حداکثر طول قطعه‌ای که با روش معمول PCR تکثیر می‌شود ۱۰۰۰ نوکلئوتید و در روش‌های بهینه شده تا ۴۰۰۰۰ نوکلئوتید می‌باشد. این مقدار هنوز بسیار کمتر از کل محتوای DNA در هسته سلول یوکاریوتی است.

کاربردهای واکنش زنجیره پلیمراز

کاربردهای روزمره PCR در بسیاری از آزمایشگاه‌های زیست‌شناسی مولکولی، تشخیص پزشکی و علوم دیگر مانند کشاورزی، حقوق، باستان شناسی و ... حاکی از اهمیت این روش ساده و در حین حال قابل اطمینان می‌باشد. در واقع می‌توان گفت که استفاده از روش PCR به جای روش‌های پرزحمت و زمان‌بری که در گذشته به کار می‌رفت، توانسته به طور چشمگیری به تحقیقات سرعت ببخشد. علاوه بر سرعت و حساسیت بالای PCR، می‌توان به توانایی این روش در استفاده از منابع مختلف توالی‌های نوکلئیک اسید (سلول‌های پروکاریوتی، یوکاریوتی و یا ویروس‌ها) نیز اشاره کرد. در نتیجه، این روش توانسته به طور مستقیم و یا با اندکی تغییرات در عرصه‌های مختلف زیست‌شناسی به کار گرفته شود. از میان کاربردهای متنوع PCR می‌توان به موارد زیر اشاره کرد:

تشخیص و رده‌بندی موجودات، جهش‌زایی، تشخیص جهش، تعیین توالی نوکلئیک اسید، تحقیق در حوزه سرطان، تشخیص بیماری‌ها، انگشت‌نگاری DNA[2]، کشف داروها و مهندسی ژنتیک.

البته لازم به ذکر است که علی‌رغم مزایای فوق‌العاده این روش، مانند سایر روش‌های آزمایشگاهی دارای معایبی نیز هست. از جمله این معایب می‌توان به حساسیت بسیار زیاد این روش به آلاینده‌های PCR، مانند آلودگی به DNA خارجی که احتمالا در وسایل یا دستگاه باقی مانده اشاره نمود. در این گونه موارد مقدار جزئي آلودگیDNA خارجی و مکمل بودن آن با توالی اولیگونوکلئوتیدهای موجود در محلول واکنش، منجر به تکثیر قطعه‌ای ناخواسته از DNA می‌شود. همچنین نیاز به آگاهی از توالی‌های مرزی منطقه ژنی و محدودیت در طول قطعه تکثیر شده، از دیگر محدودیت‌های این روش هستند.

2. DNA fingerprinting

واکنش زنجیره‌ای پلیمراز به چندین شکل مانند End-point یا Real-time قابل انجام است. می‌توان گفت که کلیت این روش بین انواع مختلف PCR ثابت است، اما جزئیات هر روش با روش دیگر متفاوت است. در این کتاب ما با ترجمه و گردآوری مطالب مختلف، از منابع مختلف مانند مقالات و کتب تألیف شده در حوزه Real-time PCR، به تألیف یک کتاب جامع درباره این روش، کاربردهای آن، روش‌های انجام تست، تفسیر نتایج و عیب‌یابی این روش پرداخته‌ایم. امیدواریم که این کتاب بتواند به عنوان راهنمایی در درک و فهم این روش، انجام تست، تفسیر نتایج و عیب‌یابی واکنش‌ها عمل کند و کمک کننده محققان زیست‌شناس و سایر رشته‌ها باشد.

● واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) و انواع آن

PCR یک واکنش ساده شیمیایی خارج از محیط داخل موجود زنده (in vitro) است که اجازه تولید مقادیر نامحدود از توالی نوکلئیک اسید هدف را می‌دهد. این کار در راستای عمل آنزیم پلیمراز انجام می‌شود. این آنزیم تحت شرایط مناسب می‌تواند یک رشته از DNA را کپی کند. در ساده‌ترین حالت، یک واکنش زنجیره‌ای پلیمراز از الگو، پرایمرهای مستقیم و معکوس با طول ۳۰-۱۸ نوکلئوتید، دئوکسی نوکلئوتیدهای تری‌فسفاته، $MgCl_2$، KCl و بافر Tris-HCL هست.

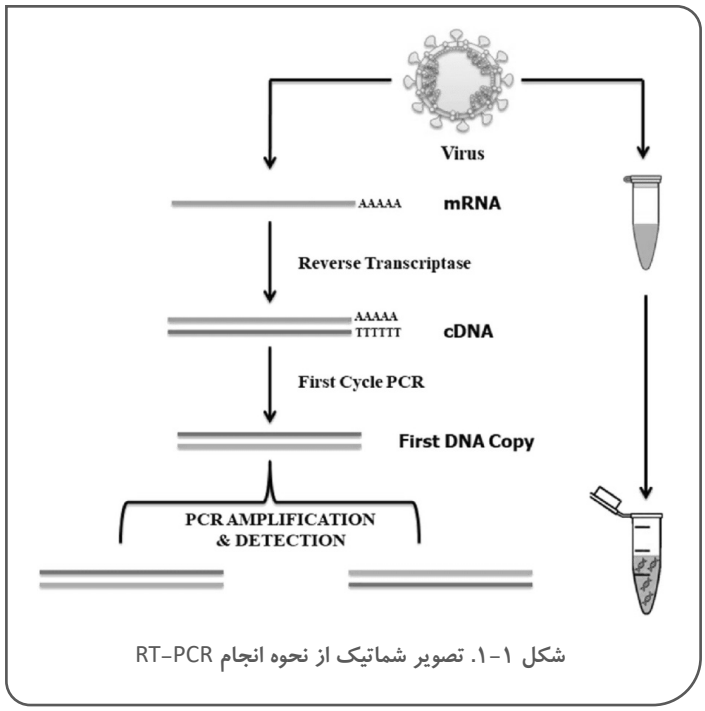
برای آغاز واکنش ابتدا باید دو رشته DNA الگو با گرما دیدن از یکدیگر جدا می‌شوند (Denaturation) و پس از سرد شدن پرایمرهای اختصاصی به الگو متصل می‌شود (Annealing). در مرحله بعد DNA پلیمراز شروع به طویل سازی پرایمر از سر ′۳ آن می‌کند (Extension). در مراحل بعد با استفاده از گرما محصولات گسترش یافته از یکدیگر جدا می‌شوند و به عنوان الگو برای اتصال پرایمرها در چرخه بعد استفاده می‌شوند. این مراحل در چرخه‌های بعدی تا پایان واکنش به طور متوالی انجام می‌شود.

● رونوشت‌بردار معکوس (RT)[3]

واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) به‌عنوان یک تکنیک برای تکثیر DNA توصیف شد. واکنش زنجیره‌ای پلیمراز رونوشت‌بردار معکوس (RT-PCR) برای تکثیر اهداف RNA توسعه یافت. در این فرآیند، DNA مکمل (cDNA) ابتدا از اهداف RNA با استفاده از رونوشت‌برداری معکوس تولید می‌شود و سپس cDNA با استفاده از PCR تکثیر می‌شود. RT-PCR، همان‌طور که در ابتدا توصیف شد، از دو آنزیم استفاده می‌کرد: یک رونوشت‌بردار معکوس حساس به حرارت، مانند رونوشت‌بردار معکوس ویروس مایلو بلاستوز مرغی (AMV-RT)، و یک پلیمراز DNA مقاوم به حرارت. به دلیل نیازهای دمایی آنزیم حساس به حرارت، سنتز cDNA باید در دماهای پایین‌تر انجام می‌شد. این موضوع مشکلاتی را هم از نظر چسبندگی غیراختصاصی پرایمر و هم از نظر گسترش ناکارآمد پرایمر به دلیل تشکیل ساختارهای ثانویه RNA ایجاد کرد. این مشکلات عمدتاً با توسعه پلیمرازهای DNA مقاوم به حرارت که از گونه‌های Thermus استخراج شده‌اند، برطرف شده است؛ که تحت شرایط مناسب می‌توانند به‌طور مؤثر به‌عنوان هم RT و هم پلیمراز DNA عمل کنند. RT-PCRهایی که از این آنزیم‌ها استفاده می‌کنند، نسبت به پروتکل‌های قبلی که از آنزیم‌های RT حساس به حرارت معمولی استفاده می‌کردند، خاص‌تر و کارآمدتر هستند. کیت‌های تجاری موجود که از این RT-PCR با آنزیم واحد استفاده می‌کنند، برای شناسایی انواع مختلف اهداف RNA در نمونه‌های بالینی در دسترس هستند. اهداف RNA ممکن است به دلیل ساختارهای ثانویه یا

3. Reverse transcriptase

سه‌گانه مشکلاتی ایجاد کنند که ممکن است نیاز به شرایط خاص یا سایت‌های هدف جایگزین برای سنتز مؤثر cDNA داشته باشند.



شکل ۱-۱. تصویر شماتیک از نحوه انجام RT-PCR

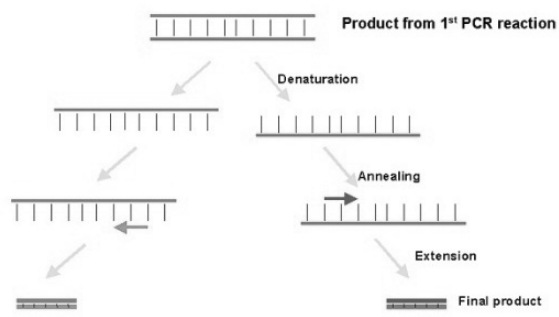
در حالی که RT-PCR با آنزیم واحد، خاصیت و کارایی را برای اهداف مشکل‌ساز بهبود بخشیده است، هنوز بسیاری از کاربردها وجود دارند که از سیستم دو آنزیمی استفاده می‌کنند. آنزیم‌های RT حساس به حرارت اصلاح‌شده و مخلوط‌های بهینه‌شده‌ای از رونوشت‌بردار های معکوس با خاصیت و کارایی بهتر اکنون به‌طور تجاری در دسترس هستند. انجام یک واکنش RT جداگانه با پرایمرهای توالی تصادفی اجازه می‌دهد تا تجزیه و تحلیل PCR از چندین هدف از یک واکنش RT واحد انجام شود. واکنش RT ممکن است با پرایمرهای oligo-dT انجام شود که فقط cDNA های mRNA را فراهم می‌کند. این طرح همچنین اجازه می‌دهد تا PCR برای چندین هدف از یک واکنش RT واحد انجام شود (شکل ۱-۱).

واکنش زنجیره‌ای پلیمراز تو در تو (Nested PCR)

واکنش زنجیره‌ای پلیمراز تو در تو (Nested PCR) برای افزایش حساسیت و خاصیت PCR توسعه یافته است. این روش از دو جفت پرایمر تکثیری و دو دور متوالی PCR استفاده می‌کند. به‌طور معمول، یک جفت پرایمر در دور اول PCR که شامل ۱۵ تا ۳۰ چرخه است، استفاده می‌شود. محصولات دور اول تکثیر سپس به دور دوم تکثیر منتقل می‌شوند که در آن از مجموعه دوم پرایمرها استفاده می‌شود، که به توالی داخلی توالی تکثیرشده توسط مجموعه اول پرایمرها متصل می‌شوند. حساسیت افزایش‌یافته ناشی از تعداد بالای چرخه‌های کل است. خاصیت

افزایش‌یافته نیز ناشی از چسبندگی مجموعه دوم پرایمرها به توالی‌هایی است که تنها در محصولات دور اول یافت می‌شوند و هویت محصول دور اول را تأیید می‌کنند. در PCR نیمه تو در تو (hemi-nested PCR)، یکی از پرایمرها در PCR دوم با اولین پرایمر یکسان است.

معایب عمده PCR Nested، نرخ بالای آلودگی است که ممکن است در هنگام انتقال محصولات دور اول به لوله دوم برای دور دوم تکثیر رخ دهد. این مشکل می‌تواند با جداکردن فیزیکی مخلوط‌های تکثیر دور اول و دوم با یک لایه موم یا روغن یا طراحی پروتکل‌های تکثیر و شناسایی در لوله‌های بسته، جلوگیری شود. آزمایش Cepheid (Sunnyvale، CA) برای شناسایی مایکوباکتریوم توبرکلوزیس و ژن rpoB مرتبط با مقاومت به ریفامپین و پنل‌های سندرومیک BioFire Diagnostics FilmArray به‌ترتیب از PCR نیمه تو در تو استفاده می‌کنند (شکل ۲-۱).



شکل ۲-۱: اصل تکنیک واکنش زنجیره‌ای پلیمراز تو در تو (Nested PCR): در این روش، مقادیر اندک مواد ژنتیکی که در مرحله اول (واکنش تقویت استاندارد) تکثیر یافته‌اند، به عنوان الگو برای دور دوم PCR مورد استفاده قرار می‌گیرند. پرایمرهای مورد استفاده در PCR تو در تو، در ناحیه‌ای داخلی‌تر نسبت به پرایمرهای مرحله اولیه تکثیر قرار می‌گیرند. این روش عموماً منجر به افزایش حساسیت و ویژگی آزمایش می‌شود، اما حساسیت بالا ممکن است منجر به شناسایی DNA آلوده کننده یا DNA فلور طبیعی شود.

واکنش زنجیره‌ای پلیمراز چندگانه (Multiplex PCR)

در واکنش زنجیره‌ای پلیمراز چندگانه (Multiplex PCR)، دو یا چند مجموعه پرایمر که برای تکثیر اهداف مختلف طراحی شده‌اند، در یک مخلوط واکنش گنجانده می‌شوند. با این تکنیک، می‌توان بیش از یک توالی هدف در یک نمونه بالینی را در یک لوله به‌طور همزمان تکثیر کرد. موفقیت یک واکنش Multiplex PCR به طراحی پرایمرهای خاص استفاده شده بستگی دارد. ترجیح داده می‌شود که پرایمرها دماهای چسبندگی مشابهی داشته باشند و باید غیرمکمل هم باشند تا از تشکیل پرایمر-دایمرها و واکنش‌های ناکارآمد جلوگیری شود. توسعه Multiplex PCRها

پیچیده‌تر است و معمولاً حساسیت کمتری نسبت به واکنش‌های PCR با مجموعه پرایمر واحد دارند، اما این امکان را فراهم می‌کنند که اهداف متعدد از یک نمونه واحد در یک واکنش شناسایی شوند (شکل ۳-۱).

تحلیل Multiplex PCR معمولاً با توالی‌یابی موازی انبوه، جداسازی محصولات بر اساس اندازه با الکتروفورز ژل یا الکتروفورز مویرگی، جداسازی فضایی روی یک سطح یا دانه، یا با رنگ پروب در Real-time PCR انجام می‌شود. Real-time PCR معمولاً به ۲ تا ۶ رنگ محدود است، اما با ترکیب رنگ با دمای ذوب پروب‌ها، multiplexing بیشتری ممکن است. پیشرفت‌های فناوری اخیر در رمزگشایی واکنش‌های PCR بسیار چندگانه بعداً توضیح داده خواهد شد. این نوآوری‌ها راه را برای توسعه پانل‌های بزرگ سندرومیک برای تشخیص بیماری‌های عفونی هموار کرده‌اند.

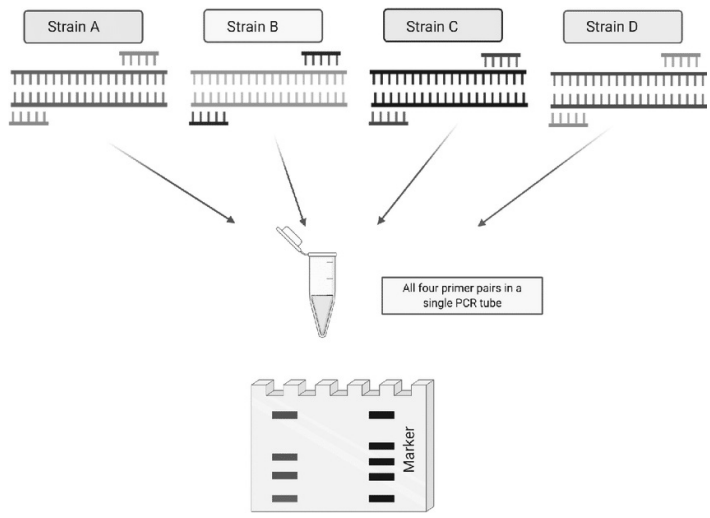
یکی از اولین پلتفرم‌های بسیار چندگانه برای تحلیل PCR، سیستم xMAP (شرکت Luminex، آستین، TX) بود. سیستم xMAP شامل یک فرآیند اختصاصی برای رنگ‌آمیزی داخلی میکروسفرهای پلی‌استایرن با دو فلورکروم طیفی متمایز است. با استفاده از نسبت‌های دقیق این فلورکروم‌ها، آرایه‌ای ایجاد می‌شود که شامل ۱۰۰ مجموعه میکروسفر مختلف با آدرس‌های طیفی خاص است. هر مجموعه میکروسفر می‌تواند یک واکنش‌دهنده متفاوت روی سطح خود داشته باشد. برای تحلیل اسید نوکلئیک، پروب‌های الیگونوکلئوتیدی به‌صورت کووالان به سطح میکروسفر متصل می‌شوند. از آنجا که هر مجموعه میکروسفر می‌تواند بر اساس آدرس طیفی خود شناسایی شود، این مجموعه‌ها می‌توانند ترکیب شوند و اجازه دهند تا حداکثر ۱۰۰ آنالیت مختلف به‌طور همزمان در یک محفظه واکنش اندازه‌گیری شوند. فلورکروم سومی که به یک مولکول گزارشگر متصل است، تعامل بیومولکولی که در سطح میکروسفر رخ می‌دهد را کمی‌سازی می‌کند.

میکروسفرها به‌صورت جداگانه در یک جریان مایع سریع مورد بررسی قرار می‌گیرند زیرا از دو لیزر جداگانه در سیتومتر جریان Luminex xMAP عبور می‌کنند. پردازش سیگنال دیجیتال با سرعت بالا هر میکروسفر را بر اساس آدرس طیفی آن طبقه‌بندی کرده و واکنش روی سطح آن را کمی‌سازی می‌کند. هزاران میکروسفر در هر ثانیه بررسی می‌شوند که منجر به ایجاد سیستمی برای تحلیل و گزارش تا ۵۰۰ واکنش مختلف در یک محفظه واکنش در چند ثانیه می‌شود.

آزمایش‌های چندگانه اجرا شده بر روی پلتفرم Luminex معمولاً شامل سه مرحله اصلی هستند: تکثیر نوکلئیک اسید توسط PCR، گسترش خاص هدف و رمزگشایی آرایه مایع دانه‌ای. پس از تکثیر PCR، محصولات تکثیری با مجموعه دوم پرایمرهای علامت‌دار خاص برای هر هدف مخلوط می‌شوند. اگر هدف موجود باشد، پرایمر علامت‌دار از طریق فرآیندی به نام گسترش خاص هدف گسترش خواهد یافت. در طول این گسترش، یک برچسب به محصول گسترش اضافه می‌شود. دانه‌های رنگی برای شناسایی محصولات گسترش علامت‌دار و برچسب‌گذاری شده اضافه می‌شوند. به هر دانه رنگی متفاوت یک الیگونوکلئوتید متصل است که مکمل توالی برچسب برای هر هدف است. سپس نمونه‌ها در سیتومتر جریان Luminex xMAP قرار داده می‌شوند، جایی که دانه‌ها توسط دو لیزر رنگی خوانده می‌شوند. یکی از لیزرها رنگ دانه را شناسایی کرده و لیزر دیگر وجود یا عدم وجود محصول گسترش برچسب‌گذاری شده روی آن دانه را تشخیص می‌دهد. آزمایش‌های تأیید شده توسط سازمان غذا و داروی ایالات متحده (FDA) برای جهش‌های فیبروز کیستیک، آزمایش آنتی‌ژن لکوسیت انسانی (HLA[4])، ویروس‌های تنفسی و پاتوژن‌های دستگاه گوارش و داروشناسی ژنتیکی با استفاده از این فناوری از Luminex در دسترس هستند.

4. Human leakucyte antigene

Luminex همچنین آزمایش‌های چندگانه‌ای برای پاتوژن‌های تنفسی، پاتوژن‌های روده‌ای و شناسایی باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی از کشت خون مثبت بر اساس فناوری Verigene NanoGrid دارد. در این سیستم بسته، اسیدهای نوکلئیک استخراج و/یا تکثیر شده، دناتوره و با الیگونوکلئوتیدهای خاص هدف هیبریدیزه می‌شوند که به صورت کووالان به یک لام شیشه‌ای ریزآرایه داخل کارتریج آزمایش متصل شده‌اند. مراحل اضافی شامل هیبریدیزاسیون با الیگونوکلئوتیدهای واسطه و پروب‌های نشاندار شده با نانوذرات طلا است. این پروب‌های نانوذرات طلا سپس با نقره پوشش داده شده تا تجمعات نانوذرات طلا تکثیرشده نقره‌ای تشکیل دهند که نور را با کارایی بالا پراکنده کنند. نانوذرات طلا تکثیرشده نقره‌ای به‌طور اپتیکی در موقعیت‌های نسبی روی ریزآرایه شناسایی می‌شوند و از Verigene Reader استفاده می‌شود.



شکل ۳-۱: نمایش شماتیک مراحل اصلی تکنیک PCR چندگانه (Multiplex PCR). در این روش، چندین الگو (A، B، C، D) و مجموعه‌های پرایمر متعدد در یک لوله واکنش واحد مورد استفاده قرار می‌گیرند.

● واکنش زنجیره‌ای پلیمراز چندگانه (Multiplex PCR)

یک فناوری دیگر برای واکنش زنجیره‌ای پلیمراز چندگانه با درجه بالا، سیستم FilmArray است که توسط BioFire Diagnostics و (bioMérieux، سالت‌لیک‌سیتی، UT) توسعه یافته است. این سیستم یک آزمایشگاه کاملاً خودکار، یکپارچه و مستقل در یک کیسه است. بخش فیلم کیسه دارای ایستگاه‌هایی برای لیز سلولی، تصفیه اسید نوکلئیک، ترانسکریپشن معکوس برای شناسایی اهداف PCR، RNA چندگانه مرحله اول و آرایه‌ای از حداکثر ۱۲۰ PCR تو در تو مرحله دوم است. پس از استخراج و تصفیه اسیدهای نوکلئیک از نمونه غیر پردازش شده، FilmArray یک PCR چندگانه تو در تو را در دو مرحله اجرا می‌کند. در مرحله اول FilmArray، PCR یک واکنش بزرگ‌حجم و بسیار چندگانه را انجام می‌دهد. محصولات حاصل از PCR مرحله اول سپس رقیق شده و با یک میکس مستر بدون پرایمر تازه ترکیب می‌شوند. مقادیر معینی از این محلول میکس مستر دوم به هر چاهک آرایه توزیع می‌شود. هر چاهک آرایه به‌طور پیش‌فرض با یک مجموعه پرایمر مشخص شده است. در مرحله دوم، PCR با حجم کوچک به‌صورت تک‌پلاکی در هر چاهک آرایه انجام می‌شود.