

عنوان دستورالعمل :

نحوه انجام آزمایشات مولکولی (PCR)

کد: WIM 13-36	شماره ویرایش: ۶	تاریخ تصویب و ابلاغ: ۱۴۰۵/۲/۲۰
حوزه تولید: آزمایشگاه	تعداد صفحه ها: ۸	تاریخ آخرین ویرایش: ۱۴۰۵/۲/۱۷
هدایت کننده: مسئول آزمایشگاه ژنتیک		تاریخ بازبینی بعدی: ۱۴۰۶/۲/۲۰

اهداف:

آزمایشات عفونی

- استخراج DNA یا RNA
- PCR کیفی و کمی
- الکتروفورز

دامنه کاربرد :

آزمایشگاه

تعریف واژگان و کلمات کلیدی:

- استخراج: جدا سازی ژنوم ویروس یا باکتری
- PCR (Polymerase Chain Reaction): واکنش های زنجیره ای پلیمرازی
- الکتروفورز: تفکیک قطعات تکثیر شده بر مبنای تعداد باز

روش انجام کار :

- این آزمایشات نیاز به ناشتا بودن ندارند.
- نمونه خون محیطی در لوله دارای ماده ضد انعقاد (EDTA) و یا نمونه از مایعات بدن، خلط و یا بافت در لوله و ظرف استریل فاقد هرگونه مواد دیگر، نمونه های کووید و آنفلانزا در ظروف حاوی VTM و سواپ داکرون باشند.
- میزان خون و مایعات مورد نیاز برای تست از ۲ تا ۵ سی سی و میزان بافت و نمونه خلط نباید کمتر از ۰,۲۵ گرم باشد.
- در صورت لخته بودن و یا استفاده از ضد انعقادی غیر از EDTA (۱۰ درصد)، نمونه رد شده و نیاز به نمونه گیری مجدد می باشد. نمونه فاقد تاریخ و مشخصات بیمار رد و غیر قابل قبول است.

• مراحل انجام به ترتیب شامل:

- استخراج DNA و یا RNA
- تعیین غلظت و کیفیت DNA
- انجام PCR
- الکتروفورز

• پذیرش و آماده کردن نمونه

- کلیه نمونه های دریافتی بایستی از نظر شرایط فیزیکی و اطلاعات نوشته شده بر روی لوله و فرم درخواست آزمایش را بررسی کنید.
- به هر نمونه شماره بدهید.
- کلیه اطلاعات مربوط به بیمار را وارد دفتر ثبت اطلاعات بیمار و درخواست کامپیوتر را چک کنید.
- در صورت نشت محتوی لوله آزمایش حتما دستکش بدست داشته باشید.
- اگر برگه درخواست آلوده است آن را در پوشش پلاستیکی قرار داده و سرش را کاملاً با نوار چسب ببندید. یک فتوکپی از برگه بگیرید. تمام اطلاعات برای استفاده ی آزمایشگاه را بر روی برگه ی فتوکپی بنویسید.
- تمام مشاهدات خود را در مورد نمونه بر روی برگه ی درخواست آزمایش بنویسید. بطور مثال شکستگی لوله یا محفظه ی نمونه، نشست کردن محتوی، وجود لخته یا همولیز، رنگ نمونه، حرارت، تاخیر در انتقال، تحویل نمونه و غیره.

• تایید اطلاعات

- فرم درخواست آزمایش را بایستی به طور کامل پر کنید.
- تمام اطلاعات ناقص را بایستی از طریق تماس با پزشک و بیمار کامل کنید.
- تمام نمونه های دریافتی را با شماره شماره گذاری کنید.

• نحوه نگهداری نمونه های بیمار

- نمونه های دریافتی را داخل یخچال ۴ درجه نگهداری و در کمترین زمان استخراج انجام گیرید.
- نمونه را حداقل تا زمان گزارش جواب در یخچال ۴ درجه نگهداری کنید. در صورت نگهداری طولانی تر نمونه در فریز ۲۰- و یا ۷۰- نگهداری شود. (تمامی نمونه ها طبق جدول ارائه شده از مرجع سلامت نگهداری و بایگانی شود)

- تعیین غلظت و کیفیت DNA

ارزیابی توسط نانودراپ : در مواردی که واکنش PCR در تست های عفونی منفی شده باشد نیاز به بررسی غلظت و کیفیت DNA استخراج شده با نانودراپ می باشد ، در مواردی هم که DNA استخراج شده از کیفیت و کمیت مناسبی برخوردار نباشد باید از مرحله استخراج مجدد تکرار شود.

تست های عفونی : در روش RT PCR مثبت بودن کنترل داخلی باعث ارزیابی اسید نوکلئیک استخراج شده و مرحله PCR از نظر وجود مواد مهارکننده می باشد.

- دستور العمل استخراج DNA و RNA

- مرحله اساسی و مهم در انجام PCR و مطالعات مولکولی، تخلیص DNA می باشد، لذا برای جلوگیری از اشتباهات نیاز به وقت و دقت خاصی می باشد.

- استفاده از کیت های تجاری (رفرانس داده شده است).

دستگاه استخراج اسید نوکلئیک (Zybio Extractor (EXM3000):

- این دستگاه جهت انجام استخراج نوکلئیک اسید می باشد و نباید جهت موارد غیر مربوطه استفاده شود.
- کیت را از یخچال خارج کرده و به مدت ۳ تا ۵ دقیقه در دمای محیط قرار می دهیم.
- قبل از باز کردن ، چند مرتبه با کف پلیت ها روی میز ضربه می زنیم. با این کار در صورتیکه مواد داخل پلیت به دیواره ها چسبیده باشند ، به داخل چاهک ها بر می گردند.
- در صورت لزوم با توجه به نوع کیت انتخابی مقدار ۱۵ میکرولیتر از محلول پروتئیناز K به ستون های ۱ و ۷ (Lysis) اضافه می گردد.
- مقدار ۲۰۰ میکرولیتر از نمونه به ستون های ۱ و ۷ اضافه می نماییم. (برای استفاده از نمونه های کنترلی درست مانند نمونه های حقیقی ۱۵ میکرولیتر از محلول پروتئیناز K به آن ها اضافه مینماییم)
- برای روشن نمودن دستگاه کلید Power پشت دستگاه را روشن نموده و سپس صفحه نمایشی لمسی نمایان می شود.
- ابتدا پلیتها و سپس Sleeve ها را به شکل صحیح در جایگاه مربوطه قرار داده. (به ازای هر پلیت دو Sleeve جاگذاری می شود)
- با فشردن کلید Run از بین متدهای نمایش داده شده و تعریف شده در صفحه مانیتور، با توجه به نوع کیت مصرفی و انتخابی متد ZYBIO-B-200 یا ZYBIO-FFPE-B-۲۰۰ را برای شروع به کار دستگاه انتخاب می نماییم.
- پس از پایان عمل استخراج و قبل از باز کردن درب دستگاه و خارج نمودن پلیت ها ، فن را به مدت ۳ تا ۵ دقیقه روشن نمایید.
- پس از خاموش کردن فن ، برای خارج نمودن نمونه ها ابتدا Sleeve ها و پس از آن پلیت ها را خارج نموده.
- جهت خاموش نمودن دستگاه پس از پایان مرحله استریلیزه نمودن کلید خاموش (قرمز رنگ) روی صفحه را فشرده و بعد از ظاهر شدن Power off با استفاده از کلید Power پشت دستگاه آن را خاموش می نماییم.
- پس از اتمام کار با دستگاه ، اگر لازم بود دستگاه با الکل ۷۰ درصد تمیز گردد.
- توجه : استخراج اسید نوکلئیک به روش دستی بسته به نوع کیت تغییر میکند و حتما طبق دستورالعمل مربوط به کیت انجام گیرد.

- واکنش زنجیره ای پلی مر از (PCR)

- مواد لازم برای واکنش PCR

- استفاده از مستر میکس آماده (رفرانس داده شده است)

- استفاده از کیت برای Real time (رفرانس داده شده است)

- روش انجام PCR

- طبق پروتوکل کیت مورد استفاده مواد مورد نیاز استفاده می شوند.
- نمونه ها را در دستگاه مولد چرخه های حرارتی قرار می دهیم تا با تنظیم دستگاه و روشن نمودن آن واکنش زنجیره ای PCR پلی مرز آغاز گردند.
- برای اطمینان از صحت عمل، بخصوص در مورد مراحل بعدی، استفاده از نمونه های کنترل، که DNA یک فرد سالم، مبتلا و بلانک ضروری است.
- در انجام تمامی مراحل تهیه نمونه برای PCR، باید میکروتیوبها و آنزیم پلی مرز در ظرف یخ قرار داشته باشند.

- سیکل های PCR:

- مرحله واسرشت

- هرچه درصد G+C بیشتر باشد دمای بالاتری جهت جدا کردن رشته های DNA مورد نیاز است.
- بطور معمول دمای C ۹۵ به مدت ۳۰ ثانیه برای این مرحله در نظر گرفته می شود.
- در برخی موارد دمای C ۹۷ یا بالاتر به مدت ۱۵ - ۱۰ ثانیه نیز مورد استفاده قرار می گیرد.

- مرحله اتصال

- دمای مورد استفاده در مرحله اتصال بسیار مهم است.
- اگر دمای (اتصال پرایمرها) Annealing خیلی بالا باشد، پرایمرها به صورت ضعیف متصل می شوند و محصول PCR خیلی ضعیف خواهد بود.
- اگر دمای خیلی پایین باشد اتصال غیراختصاصی پرایمرها اتفاق می افتد و قطعات غیراختصاصی DNA ایجاد می شود.
- هرچه مقدار GC پرایمر، غلظت و طول آن بیشتر باشد، دما و زمان گرفته شده در این مرحله بیشتر خواهد بود.
- بالا بودن دمای اتصال به ویژه در سیکل های اولیه (۵ سیکل اول) باعث افزایش اختصاصی بودن واکنش می شود.

- مرحله گسترش:

- دما در این مرحله C ۷۲ در نظر گرفته می شود و زمان مورد نیاز به هدف و غلظت آن بستگی دارد.
 - معمولاً برای قطعات کوچکتر از ۵۰۰ bp مدت ۳۰ ثانیه جهت Extension کافی است
 - برای قطعات ۱ kb مدت زمان ۶۰ ثانیه کافی خواهد بود.
 - برای مواردی که از کیت استفاده شده است برنامه طبق پروتوکل کیت استفاده میشود
- در سیکل آخر یک Final Extension در نظر گرفته می شود که حدود ۷-۵ دقیقه می باشد که باعث کامل شدن کلیه محصول های تکثیر شده می گردد.

• روش انجام PCR کیفی

- ابتدا در هر میکروتیوب ۰/۵ میلی متری ۲۴ میکرولیتر از مخلوط واکنش PCR می ریزیم. میتوانیم از مستر میکس های آماده استفاده کنیم (به پروتکل مراجعه شود)
- سپس از DNA ژنومی هر بیمار را به مخلوط واکنش اضافه کرده و کاملاً آنرا مخلوط می نماییم.

- نمونه‌ها را در دستگاه مولد چرخه‌های حرارتی قرار می‌دهیم تا با تنظیم دستگاه و روشن نمودن آن واکنش زنجیره‌ای PCR پلیمراز آغاز گردند.

• روش انجام PCR کمی

دستگاه Quantstudio5 Real Time PCR:

- این دستگاه جهت انجام آزمایشات RT-PCR می باشد و نباید جهت موارد غیر مربوطه استفاده شود.
- برای روشن نمودن دستگاه کلید Power پشت دستگاه را روشن نموده و سپس صفحه نمایشی لمسی نمایان میشود.
- سیستم کامپیوتر را روشن نموده و سپس وارد برنامه Real Time PCR می شویم، با توجه به آزمایش مورد نظر برای وارد نمودن برنامه جدید روی گزینه Create New Experiment کلیک کرده و طبق پروتکل کیت مورد نیاز اطلاعات دمایی و تعداد سیکل های مورد نظر و نکات مورد نظر برای دستگاه تعریف می نماییم.
- سپس وارد پنجره Run شده و جایگاه (چاهک مربوط به گذاشتن میکروتیوب حاوی نمونه آماده شده جهت PCR) را انتخاب نموده ، سپس اطلاعات مورد نیاز کیت مورد نظر شامل رنگ های خوانش و نوع ژن ها را مشخص نموده و همچنین اطلاعات مربوط به بیمار در گزینه های مربوطه را وارد می نماییم.
- سپس از روی صفحه نمایش دستگاه کلید باز شدن درب را می زنیم و نمونه های آماده شده را درون دستگاه طبق الگوی پذیرششان قرار داده و درب دستگاه را می بندیم.
- در مرحله بعد گزینه Save سمت راست پنجره را (حتما گزینه Quantstudio5 دیده شود) کلیک می نماییم.
- پس از طی کردن پروتکل مربوطه ، دستگاه به صورت اتوماتیک وارد مرحله آنالیز می شود.
- در این مرحله به بررسی داده های مربوط به هر بیمار می پردازیم و پس از بررسی نتایج و اطمینان از جوابها و چک نمودن سوابق بیماران آن ها را وارد سیستم جوابدهی بیمارستان می نماییم.
- در پایان کار نمونه ها را از دستگاه خارج نموده.
- جهت خاموش نمودن دستگاه کلید Shut Down را زده و سپس کلید Power پشت دستگاه را می زنیم.

الکتروفورز

الکتروفورز ژل آگارز

- برای تفکیک اسیدهای نوکلئیک در صورت امکان از ژل آگارز استفاده می‌شود.
- معمولاً برای تفکیک قطعات بزرگ DNA (بزرگ‌تر از ۵۰۰ جفت باز) از ژل آگارز استفاده می‌شود.
- برای تفکیک قطعاتی به اندازه ۱۰۰ جفت باز از آگارز ۳٪ و برای قطعات حدود ۲۰۰۰ جفت باز از آگارز ۰/۸٪ استفاده می‌شود.
- محلول‌ها و بافرهای مورد نیاز برای الکتروفورز آگارز
- آگارز
- محلول TAE1X
- رنگ
- مارکر ۱۰۰ bp یا ۵۰ bp
- محصول PCR

- وسایل مورد نیاز :

- تانک الکتروفورز
- پلیت
- شانه ژل
- دستگاه تولید کننده نور ماوراءبنفش (ژل داکت)
- تامین کننده جریان الکتریسیته

- روش کار :

- جهت تهیه آگارز ۲٪، برای حجم ۴۰ سی سی، مقدار ۰/۸ گرم پودر آگارز را با ترازو وزن میکنیم
- در ارلن حاوی ۴۰ سی سی بافر TAE 1X می ریزیم.
- ارلن حاوی این مواد درون میکروویو تا مرز جوشیدن حرارت داده می شود (حدود ۲ دقیقه) تا این مجموعه با هم ترکیب گردند.
- زمانیکه خنک شد (C ۴۰±) داخل پلیت ریخته شود.
- باید توجه داشت که سطح قالب کاملاً تراز باشد.
- قطر ژل تا ۵ میلی متر کافی می باشد.
- درون قالب با استفاده از شانه های پلاستیکی حفراتی ایجاد می کنیم.
- ژل را همراه با قالب آن در تانک الکتروفورز، که حاوی است، می گذاریم. تا این که محلول کاملاً سطح آنرا بپوشاند.
- دستگاه مولد برق را به تانک الکتروفورز متصل می کنیم. در این حالت بایستی توجه داشت که جهت حرکت از قطب منفی به مثبت باشد. سپس دستگاه را روشن نموده و بر روی ولتاژ ۱۰۰ - ۵۰ ولت تنظیم میکنیم
- هنگامیکه رنگ یک سوم طول ژل را طی کرد ژل را از تانک خارج و آنرا با استفاده از نور UV در دستگاه ژل داک بررسی می نماییم.

- الکتروفورز ژل پلی اکریل آمید (PAGE)

- الکتروفورز PAGE دارای قدرت تفکیک بسیار بالائی بوده و برای تفکیک پروتئین ها و اسید های نوکلئیک به کار گرفته می شود
- برای تفکیک قطعات کوچک DNA دو رشته ای و قطعات DNA تک رشته ای از ژل پلی اکریل آمید استفاده می شود.
- از روش PAGE برای بررسی جهش ها و تعیین توالی DNA استفاده می شود.
- محلولهای لازم در الکتروفورز ژل پلی اکریل آمید
- اکریل آمید ۳۰٪: برای تهیه ۱۰۰ میلی لیتر از این محلول، ۳۰ gr از پودر اکریل آمید را با ۱gr از پودر بیس اکریل آمید مخلوط کرده و حجم آنرا با آب مقطر به ۱۰۰ میلی لیتر می رسانیم
- TBE5X: برای تهیه ۱۰۰۰ میلی لیتر از این محلول، ۵۴gr از پودر Tris را با ۲۷/۵gr بوریک اسید مخلوط کرده و ۲۰ میلی لیتر EDTA5 (۰/M) به آن اضافه می کنیم و با آب مقطر حجم محلول را به ۱۰۰۰ میلی لیتر می رسانیم.

- TEMED بصورت آماده وجود دارد که این محلول بسیار بد بو و جهش‌زا می‌باشد. بنابراین هنگام استفاده بایستی زیر هود کار شود و خیلی سریع کار انجام گیرد
- بافر لود: $200 \mu\text{M}$ EDTA 0.05M با $\text{PH } 8$ ، 15mg گزین سیانول و 3mg برومو فینول بلو را مخلوط می کنیم
- وسایل لازم برای الکتروفورز
 - تانک
 - شیشه‌های ساخت ژل
 - شانه‌های مخصوص برای ایجاد چاهک‌هایی در ژل
 - گیره برای نگهداری شیشه‌های ژل
 - Spacer
- طرز تهیه ژل ۸-۵٪ برای PAGE در حجم 30 cc :
 - در این روش ابتدا شیشه‌های مورد استفاده جهت تهیه ژل عمودی را با آب مقطر به خوبی شستشو داده و با استفاده از الکل به خوبی تمیز می کنیم .
 - شیشه ها را به شکل عمودی توسط گیره به هم متصل کرده و آنها را برای تهیه ژل آماده می کنیم
 - جهت پرکردن شکاف‌های موجود بین فاصله دهنده ها (Spacer) استفاده می کنیم .
 - 1.5 سی سی محلول ژل که به آن 15 میکرولیتر TEMED اضافه کردیم را بین شیشه ها میریزیم و چند دقیقه صبر میکنیم
 - سپس به بقیه محلول مقدار 30 میکرولیتر TEMED اضافه کرده و آنرا بین شیشه ها می ریزیم
 - شانه را درون ژل قرار می دهیم . باید دقت داشته باشیم که حباب هوا درون ژل وجود نداشته باشد.
 - پس از بستن ژل شانه و فاصله دهنده پایین را به دقت از درون آن خارج می کنیم و شیشه حاوی ژل را با استفاده از گیره روی تانک محکم می کنیم
 - باید توجه داشته باشیم که در قسمت پایین تانک و در زیر شیشه حباب هوا وجود نداشته باشد.
 - از $1\times$ TBE به عنوان بافر استفاده می کنیم.
 - محصول هضم آنزیم را درون چاله های بدست آمده می ریزیم . در این مرحله مقدار $3 \mu\text{L}$ از Loading buffer را به $3 \mu\text{L}$ از هر یک از محصولات PCR هضم آنزیمی اضافه می کنیم . پس از مخلوط کردن بافر با محتویات هرتیوپ را درون هر چاله لود می کنیم .
 - بر اساس سایز باندهای خود، با ولتاژ $180-200$ ولت Run می کنیم.

دستگاه ژل داک:

- این دستگاه جهت مشاهده و تائید تکثیر DNA می باشد و نباید جهت موارد غیر مربوطه استفاده شود.
- ابتدا برای روشن نمودن دستگاه دکمه POWER را از صفحه دستگاه روشن مینمائیم.
- سپس بعد از بالا آمدن ویندوز دستگاه برنامه IVMS24 را باز کرده و ژل خود را وارد دستگاه مینمائیم.
- سپس UV دستگاه را روشن مینمائیم.
- برای عکس گرفتن از ژل در 4 اندازه موجود اندازه مورد نظر را انتخاب کرده و بر روی دوربین کلیک کرده و عکس گرفته میشود.

برای دیدن عکس و ذخیره و یا انتقال عکس بر روی برنامه PISCASC3 کلیک کرده و کد عکس مربوطه را میتوانیم پیدا کنیم.

- در انتهای کار ژل داک را با الکل ۷۰ درصد ضدعفونی می نماییم.

نام و نام خانوادگی تهیه کنندگان و سمت :

- دکتر مهشید حسامی : مسئول فنی آزمایشگاه

- هادی خلج : سوپروایزر آزمایشگاه

- سمانه حیدری : مسئول بخش مولکولی

(منابع و امکانات لازم):

هود کلاس دو- سانتریفیوژ- میکروپیوژ- هیتر بلاک- بن ماری- دستگاه ترموسایکلر- دستگاه استخراج - دستگاه Real Time
دستگاه ترانس لومیناتور- پاور ساپلای (مولد جریان برق)- تانک الکتروفورز- میز کار PCR (Work Station)- سمپلرهای متغیر-
یخچال و فریزر

مراجع:

۱) Simple Method of Genomic DNA Extraction from Human Samples for PCR-RFLP Analysis Souvik Gated, Journal of Bimolecular Techniques 24:224-231 © 2013 ABRF

2) Agarose Gel Electrophoresis for the Separation of DNA Fragments Pei Yun Lee¹, John Costumbrado¹, Chih-Yuan Hsu¹, Yong Hoon Kim¹ Department of Molecular, Cell, and Developmental Biology, University of California Los Angeles

3) Saiki R.K. et al. (1985). *Science*. 230, 1350-1354.

4) Powell, L.M. et al. (1987). *Cell*. 50, 831-840.

نام و امضاء تایید کننده رئیس بخش آزمایشگاه تشخیص طبی: دکتر سیامک میراب سمیعی	نام و امضاء سرپرست تهیه کنندگان: مسئول فنی بخش مولکولی : دکتر مهشید حسامی
نام و امضاء تصویب و ابلاغ کننده رئیس انستیتو : دکتر فریدون نوحی	مهر و امضاء دفتر بهبود کیفیت دکتر بهزاد مومنی