

# PCR

## و طراحی پرایمر

زبان ساده و کاربردی

ویراست دوم

تألیف

دکتر حمزه چوبی

دکتری ویروس‌شناسی پزشکی و مدیر هیأت علمی و مولکولی کمپانی پیشتاز طب زمان

دکتر طراوت بامداد

دانشیار گروه ویروس‌شناسی پزشکی دانشگاه تربیت مدرس تهران

دکتر هاجر یعقوبی

استادیار و عضو هیأت علمی دانشگاه علوم پزشکی شهرداری

راضیه زارع خوش‌چهره

دانشجوی دکتری ویروس‌شناسی پزشکی دانشگاه تربیت مدرس تهران

فاطمه حسینی

دانشجوی دکتری ویروس‌شناسی پزشکی دانشگاه تربیت مدرس تهران

زیر نظر و ویرایش علمی

دکتر طراوت بامداد

دانشیار گروه ویروس‌شناسی پزشکی دانشگاه تربیت مدرس تهران



جامعه‌نگر

ناشر برتر دانشگاهی سال ۱۳۹۱  
ناشر برگزیده کشور سال ۱۳۹۲  
ناشر شایسته تقدیر ۱۳۹۳  
ناشر برگزیده حوزه جوانان سال ۱۳۹۳  
ناشر برگزیده حوزه سلامت سال ۱۳۹۳  
ناشر برگزیده کتاب سال دانشجویی ۱۳۹۴

فروش اینترنتی: [www.jph.ir](http://www.jph.ir)

دفتر مرکزی نشر جامعه‌نگر

تهران: خ انقلاب - مقابل درب اصلی دانشگاه تهران -

خ فخر رازی - خ نظری - شماره ۹۶

تلفن: ۶۶۴۹۳۷۱۶ - ۶۶۴۹۴۱۸۷

فروش‌های پزشکی سراسر کشور

تهران: رسد شرق • اردبیل: خیام • ارومیه: شهر کتاب  
پزشک • اهواز: پارسا- کیا • ایلام: رشد • بابل:  
علیزاده، اندیشه • بروجرد: ولایت • تبریز: شیرنگ  
• تنکابن: میرچی • خراسان: رشد بشر و قلم • رشت:  
دانشگاه آزاد پل طالشان • اسفند - مژده • ساری:  
دانشجو- امیرکبیر • سمنان: ارسطو - نسیم • سنجند:  
دانشمند • شیراز: جمالی - نور دانش - مرکز کتاب  
دانشگاه علوم پزشکی شیراز • قزوین: حکیم • قم:  
فانوس اندیشه • کرمان: پایپروس • کرمانشاه: دانشمند  
• گرگان: جلالی • گناباد: کتابستان • مشهد: مجد  
دانش - جهاد دانشگاهی • یزد: آرمان- شهر کتاب - فدک

عنوان و نام پدیدآور

PCR و طراحی پرایمر به زبان ساده  
و کاربردی / تألیف حمزه چوبین... (و  
دیگران)؛ زیرنظر و ویرایش علمی  
طراوت بامداد.

[ویراست ۲]

تهران: جامعه‌نگر، ۱۳۹۸.

ه: ۱۷۲ ص: مصور، جدول.

۹- ۸۱۶-۱۰۱-۶۰۰-۹۷۸

وضعیت ویراست

مشخصات نشر

مشخصات ظاهری

شابک

وضعیت فهرست نویسی

یادداشت

یادداشت

موضوع

موضوع

موضوع

موضوع

موضوع

موضوع

موضوع

موضوع

موضوع

موضوع

موضوع

موضوع

موضوع

موضوع

موضوع

موضوع

موضوع

موضوع

موضوع

موضوع

موضوع

موضوع

موضوع

موضوع

موضوع

موضوع

موضوع

موضوع

موضوع

موضوع

موضوع

موضوع

موضوع

موضوع

موضوع

موضوع

موضوع

موضوع

موضوع

موضوع

موضوع

موضوع

موضوع

موضوع

موضوع

موضوع

موضوع

موضوع

موضوع

موضوع

موضوع

PCR و طراحی پرایمر به زبان ساده و کاربردی

تألیف حمزه چوبین، طراوت بامداد، هاجر یعقوبی،

راضیه زارع خوش‌چهره، فاطمه حسینی

زیرنظر و ویرایش علمی طراوت بامداد

ویراست دوم

ناشر جامعه‌نگر

نوبت و سال چاپ اول ۱۳۹۸/

شمارگان ۳۰۰ نسخه

صفحه‌آرایی آرساکو

طرح جلد مهدی انوشیروانی

بها ۳۴۹۰۰ تومان

شابک ۹-۸۱۶-۱۰۱-۶۰۰-۹۷۸

## فهرست مطالب

|    |                                               |
|----|-----------------------------------------------|
| ۱  | فصل ۱ الزامات بخش PCR                         |
| ۱  | ۱-۱. الزامات بخش PCR                          |
| ۲  | ۲-۱. چیدمان تأسیسات، جریان هوا و گردش کار     |
| ۴  | ۳-۱. بهینه‌سازی حساسیت                        |
| ۴  | ۴-۱. بهینه‌سازی اختصاصیت                      |
| ۷  | فصل ۲ PCR استاندارد                           |
| ۷  | ۱-۲. PCR استاندارد                            |
| ۷  | ۱-۱-۲. در PCR استاندارد به اتفاقی می‌افتد؟    |
| ۹  | ۲-۲. اجزای واکنش PCR                          |
| ۹  | ۱-۲-۲. پرایمر                                 |
| ۹  | ۱-۱-۲-۲. شرایط طراحی پرایمر                   |
| ۱۳ | ۲-۱-۲-۲. شرایط طراحی پروب                     |
| ۱۴ | ۳-۱-۲-۲. راهنمای کلی برای طراحی پروب و پرایمر |
| ۱۴ | ۴-۱-۲-۲. بهینه‌سازی غلظت پرایمر               |
| ۱۵ | ۲-۲-۲. اسید نوکلئیک                           |
| ۱۷ | ۱-۲-۲-۲. روش‌های استخراج اسید نوکلئیک         |
| ۲۱ | ۲-۱-۲-۲. استخراج RNA                          |
| ۲۲ | ۳-۱-۲-۲. ذخیره‌سازی نوکلئیک اسید              |
| ۲۳ | ۴-۱-۲-۲. RT-PCR                               |
| ۲۶ | ۳-۲-۲. آنزیم‌های پلی‌مراز                     |
| ۲۶ | ۴-۲-۲. داکسی نوکلئوتید تری فسفات              |
| ۲۷ | ۵-۲-۲. بافر واکنش                             |
| ۲۷ | ۶-۲-۲. یون‌های موجود در مخلوط واکنش PCR       |
| ۲۸ | ۷-۲-۲. لوله‌ی واکنش                           |
| ۲۸ | ۳-۲. سؤالات و مشکلات احتمالی                  |

### فصل ۳ Real Time PCR و آنالیز داده‌ها ..... ۳۱

۱-۳. Real Time PCR ..... ۳۱

۲-۳. اساس روش Real Time PCR ..... ۳۲

۳-۳. انواع فلوروکروم به کار رفته در روش Real Time PCR ..... ۳۴

۴-۳. انواع پروب و پرایمر به کار رفته در روش Real Time PCR ..... ۳۶

۵-۳. اهمیت Real Time PCR ..... ۴۲

۶-۳. مشخصات ابزاری دستگاه Real Time PCR ..... ۴۳

۷-۳. Quantitative PCR ..... ۴۴

۱-۷-۳. کمی کردن مطلق با استانداردهای خارجی ..... ۴۶

۱-۱۰-۳. استاندارد RNA برای کمی سازی مطلق ..... ۴۷

۲-۱۰-۳. DNA استاندارد برای کمی سازی مطلق ..... ۴۷

۲-۷-۳. مشخصات داده های به دست آمده ..... ۴۸

۳-۷-۳. کمی کردن مطلق با استفاده از کنترل داخلی ..... ۵۱

۸-۳. کاربرد بالینی qPCR ..... ۵۲

۹-۳. Multiplex PCR ..... ۵۲

۱۰-۳. در زمان انجام واکنش در دستگاه Real Time PCR چه اتفاق می افتد؟ ..... ۵۴

۱۱-۳. اشکالات منحنی تکثیر ..... ۵۸

۱-۱۱-۳. حد پایه ..... ۵۹

۲-۱۱-۳. آستانه ..... ۶۰

۳-۱۱-۳. بررسی کنترل ها و نمونه واکنش مورد بررسی ..... ۶۰

۴-۱۱-۳. نمونه ی اصلی ..... ۶۱

۵-۱۱-۳. آنالیز منحنی ذوب ..... ۶۱

۱۲-۳. گزارش داده ها ..... ۶۳

۱۳-۳. نرم افزار REST ..... ۶۶

۱۴-۳. رفع مشکلات احتمالی در Real Time PCR ..... ۷۵

### فصل ۴ آنالیز منحنی ذوب با وضوح بالا ..... ۷۹

۱-۴. آنالیز منحنی ذوب با وضوح بالا ..... ۷۹

۲-۴. رنگ های مورد استفاده در HRM ..... ۸۰

۳-۴. مراحل انجام HRM ..... ۸۲

۴-۴. داده های به دست آمده ..... ۸۵

|    |                                                               |
|----|---------------------------------------------------------------|
| ۸۵ | ۴-۴-۱. گراف تکثیر                                             |
| ۸۵ | ۴-۴-۲. داده‌های خام متحنی ذوب                                 |
| ۸۶ | ۴-۴-۳. گراف نرمالیز شده                                       |
| ۸۶ | ۴-۴-۴. گراف تمایز                                             |
| ۸۷ | ۴-۵. ژنوتیپ بندی SNP                                          |
| ۸۸ | ۴-۵. مشکلات رایج در HRM و اصلاح روش                           |
| ۸۸ | ۴-۵-۱. انتخاب اشتباه موقعیت بین ناحیه‌ی قبل و بعد از ذوب شدگی |
| ۹۰ | ۴-۵-۲. تشکیل محصولات غیراختصاصی                               |
| ۹۰ | ۴-۵-۳. تناسم زمان اتصال و طولی سازی                           |

## فصل ۵ طراحی پرایمر به صورت عملی ..... ۹۳

|     |                                                                         |
|-----|-------------------------------------------------------------------------|
| ۹۳  | ۵-۱. طراحی پرایمر به صورت عملی                                          |
| ۹۳  | ۵-۱-۱. گرفتن توالی                                                      |
| ۹۳  | ۵-۱-۱-۱. توالی یک ژن در DNA ژنومی                                       |
| ۹۷  | ۵-۱-۱-۲. پیدا کردن موقعیت یک SN                                         |
| ۹۸  | ۵-۱-۱-۳. گرفتن یک توالی در روس با منظور تشخیص در نمونه‌های بالینی       |
| ۱۰۱ | ۵-۱-۱-۴. گرفتن توالی یک ژن در باکتری به منظور بررسی مقاومت آنتی بیوتیکی |
| ۱۰۲ | ۵-۱-۱-۵. گرفتن توالی یک mRNA برای تعیین میزان بیان                      |
| ۱۰۵ | ۵-۲. کار با نرم افزار                                                   |
| ۱۰۵ | ۵-۲-۱. هم ردیف کردن توالی                                               |
| ۱۱۲ | ۵-۲-۲. طراحی پرایمر با نرم افزار Lasergene                              |
| ۱۲۲ | ۵-۳. BLAST پرایمر                                                       |
| ۱۳۷ | ۵-۴. طراحی پروب                                                         |
| ۱۳۷ | ۵-۴-۱. نرم افزار Allele ID                                              |

## فصل ۶ راه اندازی نرم افزار سیستم StepOne & StepOnePlus ..... ۱۴۷

|     |                                                       |
|-----|-------------------------------------------------------|
| ۱۴۷ | ۶-۱. راه اندازی نرم افزار سیستم StepOne & StepOnePlus |
|-----|-------------------------------------------------------|

## فهرست منابع ..... ۱۶۱

|     |           |
|-----|-----------|
| ۱۶۳ | واژه نامه |
|-----|-----------|

## مقدمه

با وجود عمر نه چندان طولانی روش‌های تکثیر و شناسایی اسید نوکلئیک‌ها به خصوص روش کمی Real Time PCR، این تکنیک‌ها از جایگاه ویژه‌ای در میان روش‌های بیولوژی مولکولی برخوردار گشته‌اند. بشریت دانسته‌های فراوان خود را در بسیاری از جنبه‌های بیولوژی مولکولی به خصوص در زمینه‌ی شناسایی ژن‌های جدید، تغییرات بیان ژن در شرایط بیولوژیک مختلف و تشخیص بیماری‌ها مدیون این تکنیک است.

همه ساله شاهد ظهور کیت‌های جدید بر پایه‌ی این روش می‌باشیم. طراحی این تکنیک و یا استفاده‌ی صحیح از کیت‌های موجود نیازمند درک صحیح و تسلط بر اجرا و تفسیر نتایج حاصل می‌باشد. خلاء موجود در منابع فارسی که به صورت روان و به سبکی قابل فهم برای کاربران مبتدی تا ذکر جزئیات تکنیکی مشکلات احتمالی حین اجرا به بیان مطالب پرداخته باشد، انگیزه‌ای برای نگارش این کتاب شد. در بهارهای مختلف آن سعی شده است با بیانی ساده میانی PCR و Real Time PCR، نحوه‌ی آنالیز داده‌ها و رفع مشکلات احتمالی، اصول طراحی پرایمر و پروب توضیح داده شود و با ارایه‌ی مثال‌ها و شکل‌های واقعی از تجربیات نگارندگان و بررسی مرحله به مرحله نمونه‌ها از نرم‌افزارهای موجود بتواند بخشی از نیازهای پژوهشگران کشور را مرتفع سازد. این کتاب به ۶ فصل تقسیم شده، در فصول ۱ تا ۴ به بیان مبانی تئوری پرداخته شده و فصول ۵ و ۶ با ارایه‌ی مدل‌هایی از نرم‌افزارهای موجود، خواننده را به صورت عملی با کاربردهای آن‌ها آشنا می‌کند. مطمئناً این کتاب جامع نبوده، ولی سعی شده است که بر آن به سؤال‌های متداول احتمالی پاسخ داده شود. از کلیه‌ی خوانندگان دعوت می‌کنیم تا با ارسال نظرات و انتقادات سازنده‌ی خود ما را در بهبود کیفیت آن یاری کنند.

### دکتر طراوت بامداد

دانشیار گروه ویروس‌شناسی پزشکی

دانشگاه تربیت مدرس