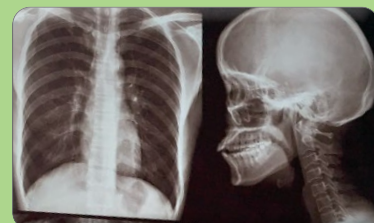


بررسی تاثیر برخی از عوامل موثر در نتایج DLS و راهکارهای کاهش خطا

ارتقا و توسعه شبکه آزمایشگاهی در سومین دهه فعالیت



بررسی اثر شرایط کاشت آرماتور با
چسب‌های شیمیایی در بتن بر میزان
مقاومت بیرون‌کشی



تفسیر فیلم رادیوگرافی با استفاده از هوش
مصنوعی و روش‌های پردازش تصویر



کاربرد فیلتراسیون در آماده‌سازی نمونه‌ها در
کروماتوگرافی (بخش اول)



مقایسه دو روش هضم اسیدی و هضم خشک
در تعیین فلزات سنگین سرب و کادمیوم به
روش جذب اتمی کوره گرافیت در برنج



واکنش زنجیره‌ای پلیمراز قطره‌ای، گامی نو در
تشخیص مولکولی

واکنش زنجیره‌ای پلیمراز قطره‌ای، گامی نو در تشخیص مولکولی

نویسندگان

شکوفه حبیبی منش^۱

محمد شفيعی^{۲*}

۱. کارشناس فنی بخش ژنتیک آزمایشگاه مرکزی، دانشگاه

شهید چمران اهواز

۲. مدیریت آزمایشگاه مرکزی، دانشگاه شهید چمران اهواز

*Sh.habibi2520@gmail.com

تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۰۶/۲۸

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۰۸/۱۹

واژه‌های کلیدی

واکنش زنجیره‌ای پلیمراز قطره‌ای، واکنش زنجیره‌ای پلیمراز، زیست‌شناسی مولکولی، ژنتیک، DNA.



چکیده

واکنش زنجیره‌ای پلیمراز از زمان معرفی‌اش در دهه ۱۹۸۰، انقلابی در زیست‌شناسی مولکولی، ژنتیک و تحقیقات پزشکی ایجاد کرده است. با این حال، واکنش زنجیره‌ای پلیمراز سنتی^۱ با محدودیت‌هایی از جمله مشکلات دقت، حساسیت پایین به جهش‌های نادر و آسیب‌پذیری به بازدارنده‌ها مواجه است. واکنش زنجیره‌ای پلیمراز قطره‌ای^۲ با تقسیم نمونه‌های DNA به هزاران یا میلیون‌ها محفظه جداگانه، این چالش‌ها را برطرف کرده و امکان اندازه‌گیری دقیق مولکول‌های DNA یا RNA بدون نیاز به نمودارهای کالیبراسیون یا کنترل‌های داخلی را فراهم می‌کند. این مقاله به بررسی مزایای واکنش زنجیره‌ای پلیمراز قطره‌ای نسبت به واکنش زنجیره‌ای پلیمراز سنتی، از جمله دقت بالاتر در کمیت‌سنجی مولکول‌ها، حساسیت بیشتر، کاهش تأثیر بازدارنده‌ها و قابلیت اندازه‌گیری مقادیر مطلق می‌پردازد. توانایی منحصر به فرد واکنش زنجیره‌ای پلیمراز قطره‌ای در شناسایی جهش‌های نادر ژنتیکی، تحلیل تغییرات پیچیده ژنتیکی و انجام تحلیل‌های محیطی و قانونی، آن را به ابزاری ارزشمند تبدیل کرده است. با وجود مزایای آن، واکنش زنجیره‌ای پلیمراز قطره‌ای با چالش‌هایی مانند هزینه‌های بالا، زمان پردازش طولانی‌تر و نیاز به آماده‌سازی دقیق نمونه‌ها مواجه است. در کل، واکنش زنجیره‌ای پلیمراز قطره‌ای پیشرفت قابل توجهی در زیست‌شناسی مولکولی است و انتظار می‌رود با پیشرفت‌های فناوریانه و کاهش هزینه‌ها، به‌طور گسترده‌تری در آزمایشگاه‌های زیست‌شناسی و پزشکی مورد استفاده قرار گیرد.

مقدمه

واکنش زنجیره‌ای پلیمراز یکی از پیشگامان مهم در فناوری زیست‌شناسی مولکولی است که انقلابی در حوزه‌های زیست‌شناسی، ژنتیک، و تحقیقات پزشکی ایجاد کرده است. از زمان معرفی این روش در دهه ۱۹۸۰ توسط کاری مولیس^۳، واکنش زنجیره‌ای پلیمراز به‌عنوان ابزاری اصلی برای تکثیر و شناسایی قطعات DNA در طیف وسیعی از کاربردها مورد استفاده قرار گرفته است. با این حال، ظهور فناوری‌های نوین مانند واکنش زنجیره‌ای پلیمراز قطره‌ای موجب بهبود قابلیت‌ها و کاهش محدودیت‌های واکنش زنجیره‌ای پلیمراز سنتی شده‌است. در این مقاله، به بررسی مزایای واکنش زنجیره‌ای پلیمراز قطره‌ای نسبت به واکنش زنجیره‌ای پلیمراز سنتی پرداخته و کاربردهای عملی آن را در حوزه‌های مختلف توضیح می‌دهیم [۱].

واکنش زنجیره‌ای پلیمرز سنتی و چالش‌های آن

واکنش زنجیره‌ای پلیمرز سنتی فرآیندی است که طی آن توالی‌های خاصی از DNA از طریق تکرار مراحل گرم و سرد شدن، تکثیر می‌شوند. این روش به دلیل سادگی و کارایی بالا در کاربردهای گسترده‌ای همچون ژنوتایپینگ، کلونینگ، تشخیص بیماری‌ها و تحقیقات پایه به کار می‌رود. با این حال، واکنش زنجیره‌ای پلیمرز سنتی با چالش‌هایی همچون عدم دقت در اندازه‌گیری کمیت DNA، حساسیت پایین به جهش‌های نادر و تأثیرات بازدارنده‌ها مواجه است [۲].

واکنش زنجیره‌ای پلیمرز قطره‌ای (dPCR)

واکنش زنجیره‌ای پلیمرز قطره‌ای یک فناوری پیشرفته‌تر و اصلاح شده از واکنش زنجیره‌ای پلیمرز سنتی است که نمونه DNA را به هزاران یا میلیون‌ها محفظه کوچک تقسیم می‌کند. هر یک از این محفظه‌ها به‌طور جداگانه در فرآیند واکنش زنجیره‌ای پلیمرز قرار می‌گیرد و پس از پایان واکنش، تعداد محفظه‌های حاوی محصول واکنش زنجیره‌ای پلیمرز شناسایی می‌شود. این فرآیند منجر به شناسایی و اندازه‌گیری دقیق تعداد مولکول‌های DNA یا RNA می‌شود، بدون نیاز به استفاده از نمودار کالیبراسیون یا کنترل داخلی که در واکنش زنجیره‌ای پلیمرز کمی^۴ مورد نیاز است [۳].

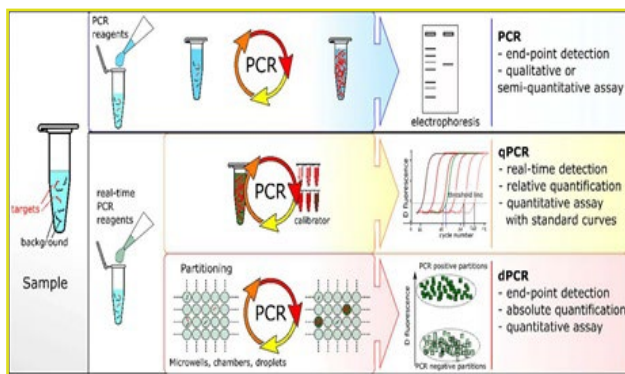
مزایای واکنش زنجیره‌ای پلیمرز قطره‌ای نسبت به واکنش زنجیره‌ای پلیمرز سنتی

• دقت بالاتر واکنش زنجیره‌ای پلیمرز قطره‌ای در اندازه‌گیری تعداد مولکول‌ها:

یکی از بزرگترین مزایای واکنش زنجیره‌ای پلیمرز قطره‌ای نسبت به واکنش زنجیره‌ای پلیمرز سنتی، دقت بسیار بالا در اندازه‌گیری تعداد مولکول‌های DNA یا RNA است. در واکنش زنجیره‌ای پلیمرز قطره‌ای، به دلیل تقسیم‌بندی دقیق نمونه به محفظه‌های کوچک، امکان شمارش مستقیم تعداد مولکول‌ها فراهم می‌شود. برخلاف واکنش زنجیره‌ای پلیمرز سنتی که نتایج به‌صورت نسبی ارائه می‌شوند، واکنش زنجیره‌ای پلیمرز قطره‌ای نتایج را به‌صورت مطلق ارائه می‌دهد. در واکنش زنجیره‌ای پلیمرز سنتی، تخمین کمیت DNA

براساس منحنی استاندارد و مقایسه با نمونه‌های کنترل صورت می‌گیرد. این روش وابسته به کارایی واکنش است که ممکن است تحت تأثیر عوامل مختلف مانند ترکیبات نمونه، غلظت آغازگرها و مواد بازدارنده قرار گیرد. از سوی دیگر، واکنش زنجیره‌ای پلیمرز قطره‌ای از این مشکلات بی‌نیاز است و شمارش مستقیم از محفظه‌های واکنش زنجیره‌ای پلیمرز دقیق‌تر و مستقل از کارایی واکنش است [۳ و ۴].

در شکل (۱) سه نوع مختلف از روش‌های واکنش زنجیره‌ای پلیمرز سنتی، واکنش زنجیره‌ای پلیمرز کمی و واکنش زنجیره‌ای پلیمرز قطره‌ای را مقایسه می‌کند. در قسمت بالایی شکل، واکنش زنجیره‌ای پلیمرز سنتی نشان داده شده که پس از تکثیر DNA، محصول نهایی با روش ژل الکتروفورز ارزیابی می‌شود و نتایج کیفی یا نیمه‌کمی ارائه می‌دهد. در بخش میانی، واکنش زنجیره‌ای پلیمرز کمی یا واکنش زنجیره‌ای پلیمرز در زمان واقعی به تصویر کشیده شده که از منحنی‌های استاندارد برای اندازه‌گیری نسبی مقدار DNA استفاده می‌کند و به‌طور هم‌زمان تکثیر DNA و اندازه‌گیری را انجام می‌دهد. در بخش پایینی شکل، واکنش زنجیره‌ای پلیمرز قطره‌ای نشان داده شده که نمونه DNA به هزاران بخش کوچک تقسیم می‌شود و تکثیر در هر بخش به‌طور جداگانه صورت می‌گیرد و نتایج کمی مطلق و با دقت بالا ارائه می‌شود. این فناوری‌ها از نظر حساسیت، دقت و چگونگی تحلیل نتایج با یکدیگر تفاوت دارند و به نیازهای مختلف در زیست‌شناسی مولکولی پاسخ می‌دهند.



شکل (۱): مقایسه روش‌های مبتنی بر واکنش زنجیره‌ای پلیمرز [۵].

• حساسیت بیشتر واکنش زنجیره‌ای پلیمرز قطره‌ای

واکنش زنجیره‌ای پلیمرز قطره‌ای به دلیل قابلیت شناسایی دقیق مولکول‌های DNA در مقادیر بسیار کم، حساسیت بالاتری نسبت به واکنش زنجیره‌ای پلیمرز سنتی دارد. این ویژگی به‌خصوص در کاربردهایی که نیاز به تشخیص تغییرات نادر ژنتیکی و یا ویروس‌هایی با بار ویروسی کم دارند، بسیار

پلیمرز قطره‌ای، قابلیت شناسایی و تشخیص جهش‌های نادر ژنتیکی است. در بسیاری از کاربردهای پزشکی، به ویژه در تشخیص سرطان و بیماری‌های ژنتیکی، شناسایی جهش‌های نادر اهمیت زیادی دارد. واکنش زنجیره‌ای پلیمرز قطره‌ای به دلیل حساسیت بالا و توانایی شمارش مستقیم مولکول‌ها، این امکان را فراهم می‌کند که حتی جهش‌های نادر که در غلظت‌های بسیار کم در نمونه وجود دارند، به صورت دقیق شناسایی شوند.

این توانایی به خصوص در تشخیص جهش‌های مهم مرتبط با سرطان، مانند جهش‌های نقطه‌ای یا تغییرات در تعداد کپی ژنوم تومور، مفید است. در مقایسه با واکنش زنجیره‌ای پلیمرز سنتی که ممکن است به دلیل تعداد کم جهش‌ها از تشخیص باز بماند، واکنش زنجیره‌ای پلیمرز قطره‌ای می‌تواند تغییرات ژنتیکی را با دقت بیشتری شناسایی کند [۸].

• قابلیت تحلیل پیچیده‌تر واکنش زنجیره‌ای پلیمرز قطره‌ای

واکنش زنجیره‌ای پلیمرز قطره‌ای قابلیت انجام تحلیل‌های پیچیده‌تر را فراهم می‌کند. به دلیل استفاده از محفظه‌های جداگانه و واکنش‌های مستقل، امکان بررسی توالی‌های چندگانه و انواع مختلف مولکول‌ها در یک نمونه واحد فراهم است. این ویژگی باعث می‌شود که واکنش زنجیره‌ای پلیمرز قطره‌ای در مطالعات ژنتیکی پیچیده، مانند بررسی توالی‌های هموزیگوت و هتروزیگوت، بررسی میکروبیوم‌ها و تحلیل تغییرات اپی‌ژنتیکی به کار گرفته شود.

به عنوان مثال، واکنش زنجیره‌ای پلیمرز قطره‌ای می‌تواند در تعیین تعداد نسخه‌های ژنی که در بسیاری از بیماری‌های ژنتیکی نقش دارند، موثرتر عمل کند. در این فرآیند، نمونه به محفظه‌های متعدد تقسیم می‌شود و هر محفظه به طور جداگانه برای تعیین تعداد نسخه‌های ژنی تحلیل می‌شود که نتایج بسیار دقیق‌تری را نسبت به واکنش زنجیره‌ای پلیمرز سنتی ارائه می‌دهد [۲].

کاربردهای واکنش زنجیره‌ای پلیمرز قطره‌ای در تحقیقات و صنعت

• تشخیص بیماری‌های عفونی

در تشخیص بیماری‌های عفونی، واکنش زنجیره‌ای پلیمرز قطره‌ای به عنوان یک ابزار بسیار دقیق و حساس مطرح است. برای مثال، در تشخیص ویروس‌هایی مانند ایدز، هپاتیت و سارس واکنش زنجیره‌ای پلیمرز قطره‌ای می‌تواند ویروس‌ها

مهم است. برای مثال، در تشخیص سرطان‌هایی که از تغییرات ژنتیکی نادر در سلول‌ها شروع می‌شوند، واکنش زنجیره‌ای پلیمرز قطره‌ای می‌تواند به سرعت و با دقت بیشتری این تغییرات را شناسایی کند.

این حساسیت بالا همچنین برای شناسایی جهش‌های نادر و مقادیر پایین ویروس‌ها در نمونه‌های بالینی بسیار مفید است. واکنش زنجیره‌ای پلیمرز قطره‌ای می‌تواند در شرایطی که واکنش زنجیره‌ای پلیمرز کمی و واکنش زنجیره‌ای پلیمرز سنتی ممکن است به دلیل غلظت کم مولکول‌های هدف ناموفق باشند، نتایج مثبتی ارائه دهد [۶].

• کاهش اثرات بازدارنده‌ها در واکنش زنجیره‌ای پلیمرز قطره‌ای

در واکنش زنجیره‌ای پلیمرز سنتی، وجود مواد بازدارنده در نمونه (مانند پروتئین‌ها، نمک‌ها و یا سایر ترکیبات آلی) می‌تواند باعث کاهش کارایی واکنش شود. این مسئله به ویژه در کار با نمونه‌های زیستی پیچیده مانند خون، بافت‌های آلوده یا فاضلاب‌ها مشکل‌ساز است. واکنش زنجیره‌ای پلیمرز قطره‌ای به دلیل تقسیم‌بندی نمونه به محفظه‌های کوچک، اثرات بازدارنده‌ها را به حداقل می‌رساند و واکنش‌های موفق‌تری در هر محفظه ایجاد می‌شود.

این ویژگی به واکنش زنجیره‌ای پلیمرز قطره‌ای اجازه می‌دهد تا حتی در حضور مواد بازدارنده، نتایج دقیق و قابل اعتمادی ارائه دهد. از این رو، این فناوری برای کاربردهایی که نمونه‌های زیستی پیچیده و آلوده دارند، مانند آنالیزهای محیطی یا تشخیص بیماری‌های عفونی، بسیار مناسب است [۷].

• اندازه‌گیری مطلق بدون نیاز به استاندارد داخلی در روش واکنش زنجیره‌ای پلیمرز قطره‌ای

در واکنش زنجیره‌ای پلیمرز کمی و واکنش زنجیره‌ای پلیمرز سنتی، برای اندازه‌گیری دقیق، نیاز به استفاده از یک استاندارد داخلی یا نمودار کالیبراسیون است. این استانداردها برای محاسبه کمیت نسبی DNA استفاده می‌شوند، اما خود می‌توانند منبع خطا باشند. واکنش زنجیره‌ای پلیمرز قطره‌ای نیازی به استاندارد داخلی ندارد و کمیت DNA به صورت مطلق و مستقیم اندازه‌گیری می‌شود. این امر، فرآیند را ساده‌تر و دقیق‌تر می‌کند، زیرا از تاثیرات نوسانات استاندارد داخلی بر نتیجه نهایی جلوگیری می‌شود [۶].

• کاربرد واکنش زنجیره‌ای پلیمرز قطره‌ای در تشخیص جهش‌ها و توالی‌های نادر

یکی از ویژگی‌های منحصر به فرد واکنش زنجیره‌ای

آلوده‌کننده مانند نفت یا فلزات سنگین را دارند، استفاده شود. این فناوری می‌تواند با دقت بالا، وجود یا عدم وجود این میکروارگانیسم‌ها را در محیط‌های آلوده تعیین کرده و به مهندسان زیست‌محیطی کمک کند تا راه‌حل‌های مؤثرتری برای تصفیه محیط‌زیست ارائه دهند. در فرآیند زیست‌تصفیه، باکتری‌ها و قارچ‌های خاصی می‌توانند به تجزیه ترکیبات پیچیده و آلوده‌کننده بپردازند. این میکروارگانیسم‌ها نقش مهمی در پاکسازی زیست‌محیطی دارند، اما شناسایی آن‌ها در محیط‌های آلوده می‌تواند دشوار باشد. واکنش زنجیره‌ای پلیمرز قطره‌ای به محققان و مهندسان محیط‌زیست امکان می‌دهد که به دقت نوع و مقدار میکروارگانیسم‌های تجزیه‌کننده را شناسایی کنند. این کار با شمارش مستقیم تعداد مولکول‌های DNA میکروارگانیسم‌ها در نمونه‌های آلوده انجام می‌شود [۱۲].

• واکنش زنجیره‌ای پلیمرز قطره‌ای و کاربردهای پزشکی قانونی

واکنش زنجیره‌ای پلیمرز قطره‌ای همچنین در زمینه پزشکی قانونی اهمیت بالایی دارد. در موارد جنایی، توانایی واکنش زنجیره‌ای پلیمرز قطره‌ای در تشخیص DNA از نمونه‌های بسیار کوچک و حتی به شدت تخریب شده، آن را به ابزاری حیاتی در تحقیقات جرم‌شناسی تبدیل کرده است. به‌عنوان مثال، در صحنه‌های جرم که تنها مقادیر بسیار کمی از DNA باقی‌مانده است، واکنش زنجیره‌ای پلیمرز قطره‌ای می‌تواند با دقت بیشتری این نمونه‌ها را تقویت و شناسایی کند و به تعیین هویت افراد کمک کند. این فناوری به دلیل توانایی شناسایی جهش‌ها و تغییرات کوچک ژنتیکی، می‌تواند در شناسایی و تطبیق DNA مجرمان با نمونه‌های DNA یافت شده در صحنه جرم بسیار موثر باشد [۱۲].

• تعیین کیفیت محصولات زیستی و دارویی

در صنعت فناوری زیستی و داروسازی، واکنش زنجیره‌ای پلیمرز قطره‌ای می‌تواند برای کنترل کیفیت محصولات زیستی و دارویی استفاده شود. به‌عنوان مثال، در تولید واکسن‌ها و یا داروهای مبتنی بر DNA و RNA، کنترل دقیق تعداد مولکول‌ها اهمیت زیادی دارد. واکنش زنجیره‌ای پلیمرز قطره‌ای به تولیدکنندگان این امکان را می‌دهد که تعداد مولکول‌های فعال در هر دوز از یک دارو یا واکسن را به‌صورت دقیق تعیین و از یکدست بودن کیفیت محصولات اطمینان حاصل کنند. این موضوع به ویژه در تولید داروهای ژنی و واکسن‌های جدید مبتنی بر mRNA بسیار حائز اهمیت است [۱۳].

را در غلظت‌های بسیار پایین شناسایی کند. این ویژگی به‌خصوص برای تشخیص زودهنگام و کنترل بیماری‌ها بسیار مهم است [۹].

• تحقیقات سرطان

یکی از کاربردهای مهم واکنش زنجیره‌ای پلیمرز قطره‌ای در تحقیقات سرطان است. این فناوری برای شناسایی و اندازه‌گیری تغییرات ژنتیکی که در سلول‌های سرطانی رخ می‌دهد، استفاده می‌شود. به‌عنوان مثال، در تشخیص سرطان‌های مرتبط با جهش‌های ژنی مانند جهش در ژن‌های EGFR، KRAS و یا BRAF واکنش زنجیره‌ای پلیمرز قطره‌ای می‌تواند جهش‌های نادر را با دقت بالایی شناسایی کند. این ویژگی به پژوهشگران و پزشکان کمک می‌کند تا درمان‌های هدفمند و دقیق‌تری برای بیماران طراحی کنند [۱۰].

• ژنتیک و مطالعات مرتبط با تنوع تعداد نسخه‌های ژنی

در مطالعات ژنتیکی، واکنش زنجیره‌ای پلیمرز قطره‌ای برای اندازه‌گیری دقیق تنوع تعداد نسخه‌های ژنی که در بسیاری از بیماری‌های ژنتیکی و سرطان‌ها نقش دارند، به کار می‌رود. تنوع تعداد نسخه‌های ژنی می‌تواند نقش مهمی در بروز بیماری‌ها و تنوع ژنتیکی انسان داشته باشند. به کارگیری دقیق واکنش زنجیره‌ای پلیمرز قطره‌ای در اندازه‌گیری تنوع تعداد نسخه‌های ژنی، امکان بررسی بهتر و جامع‌تری از تغییرات ژنتیکی را فراهم می‌کند. این تغییرات می‌توانند بر عملکرد ژن‌ها تأثیرگذار باشند و با بیماری‌هایی نظیر سرطان، بیماری‌های خودایمنی و اختلالات عصبی مرتبط شوند. در واکنش زنجیره‌ای پلیمرز سنتی و حتی واکنش زنجیره‌ای پلیمرز قطره‌ای، شناسایی تنوع تعداد نسخه‌های ژنی به‌طور معمول چالش‌برانگیز است، چرا که این روش‌ها حساسیت و دقت کافی برای تعیین تعداد نسخه‌ها در سطح مولکولی ندارند. واکنش زنجیره‌ای پلیمرز قطره‌ای با قابلیت شمارش دقیق مولکول‌های DNA این امکان را فراهم می‌کند که تعداد نسخه‌های ژنی را به‌صورت مطلق اندازه‌گیری کنیم، که این موضوع برای تحلیل ژن‌های مختلف در بیماری‌های ژنتیکی بسیار مفید است [۱۱].

• زیست‌شناسی محیطی و زیست‌تصفیه

در زیست‌شناسی محیطی، واکنش زنجیره‌ای پلیمرز قطره‌ای نقش مهمی در پایش آلودگی‌های محیطی و تشخیص میکروارگانیسم‌های مسئول تجزیه آلاینده‌ها ایفا می‌کند. به‌عنوان مثال، در مطالعات زیست‌تصفیه، واکنش زنجیره‌ای پلیمرز قطره‌ای می‌تواند برای شناسایی گونه‌های خاصی از باکتری‌ها و یا قارچ‌ها که توانایی تجزیه مواد

چالش‌ها و محدودیت‌های واکنش زنجیره‌ای پلیمرز قطره‌ای

با وجود مزایای فراوان واکنش زنجیره‌ای پلیمرز قطره‌ای، این فناوری همچنان با چالش‌هایی مواجه است. یکی از محدودیت‌های واکنش زنجیره‌ای پلیمرز قطره‌ای، هزینه‌های بالای تجهیزات و مواد مصرفی است. تجهیزات واکنش زنجیره‌ای پلیمرز قطره‌ای نیاز به فناوری‌های پیشرفته‌تری نسبت به واکنش زنجیره‌ای پلیمرز کمتی و واکنش زنجیره‌ای پلیمرز سنتی دارند و در نتیجه هزینه خرید و نگهداری آنها بالاتر است. همچنین، زمان لازم برای انجام واکنش‌ها در واکنش زنجیره‌ای پلیمرز قطره‌ای به‌طور معمول طولانی‌تر از واکنش زنجیره‌ای پلیمرز کمتی بوده که ممکن است در برخی موارد کارایی را کاهش دهد.

علاوه بر این، واکنش زنجیره‌ای پلیمرز قطره‌ای نیازمند روش‌های دقیق‌تری برای آماده‌سازی نمونه‌ها است. تقسیم‌بندی دقیق نمونه‌ها به تعداد زیادی محفظه، نیاز به تجهیزات و مهارت‌های ویژه دارد که این موضوع می‌تواند زمان‌بری فرآیند را افزایش دهد. در عین حال، حساسیت بالای این روش نسبت به آلودگی‌های احتمالی نیز ممکن است به خطاهای آزمایشی منجر شود [۲].

مقایسه دقیق‌تر واکنش زنجیره‌ای پلیمرز قطره‌ای و واکنش زنجیره‌ای پلیمرز کمتی

واکنش زنجیره‌ای پلیمرز قطره‌ای در مقایسه با واکنش زنجیره‌ای پلیمرز کمتی که خود نسخه‌ای پیشرفته‌تر از واکنش زنجیره‌ای پلیمرز سنتی است و توانایی اندازه‌گیری نسبی DNA را با استفاده از فلورسانس در هر چرخه فراهم می‌کند، واکنش زنجیره‌ای پلیمرز قطره‌ای به‌صورت مطلق تعداد مولکول‌های هدف را در هر نمونه شمارش می‌کند. این ویژگی باعث می‌شود که واکنش زنجیره‌ای پلیمرز قطره‌ای در شرایطی که نیاز به اندازه‌گیری دقیق و بدون وابستگی به استانداردهای خارجی است، برتری پیدا کند. در واکنش زنجیره‌ای پلیمرز کمتی، تخمین تعداد مولکول‌های DNA براساس نمودار کالیبراسیون صورت می‌گیرد که ممکن است به دلیل نوسانات فنی و یا شرایط مختلف آزمایشگاهی دچار تغییر شود. در حالی که واکنش زنجیره‌ای پلیمرز قطره‌ای با تقسیم نمونه به محفظه‌های جداگانه و انجام واکنش زنجیره‌ای پلیمرز در هر محفظه به‌صورت مستقل، نتایج دقیق‌تری به‌دست می‌آورد [۲ و ۳].

نتیجه‌گیری

واکنش زنجیره‌ای پلیمرز قطره‌ای ابزاری قدرتمند و دقیق در حوزه زیست‌شناسی مولکولی است که بر بسیاری از چالش‌های مرتبط با واکنش زنجیره‌ای پلیمرز سنتی غلبه کرده است. توانایی این فناوری در اندازه‌گیری دقیق تعداد مولکول‌های DNA و RNA، شناسایی جهش‌های نادر و کاهش اثرات مواد بازدارنده، آن را به یک روش انقلابی تبدیل کرده است. واکنش زنجیره‌ای پلیمرز قطره‌ای با وجود چالش‌های موجود، در حال گسترش کاربردهای خود در حوزه‌های پزشکی، زیست‌محیطی، قانونی و صنعت فناوری زیستی است. با این حال، هزینه‌ها و پیچیدگی‌های فنی واکنش زنجیره‌ای پلیمرز قطره‌ای به‌عنوان چالش‌های اصلی این روش محسوب می‌شوند. اما با پیشرفت‌های فناوری‌ها و افزایش دسترسی به تجهیزات پیشرفته‌تر، انتظار می‌رود که واکنش زنجیره‌ای پلیمرز قطره‌ای به‌عنوان ابزاری استاندارد در آزمایشگاه‌های زیست‌شناسی مولکولی و پزشکی مورد استفاده گسترده‌تری قرار گیرد [۵].

پی‌نوشت

1. Polymerase Chain Reaction (PCR)
2. Digital PCR (dPCR)
3. Kary Mullis
4. Quantitative polymerase chain reaction (qPCR)
5. Copy number variation (CNV)
6. Human immunodeficiency virus (HIV)
7. SARS-CoV-2
8. Copy number variation (CNVs)

مراجع

- [1] Pinheiro, L.B., Coleman, V.A., Hindson, C.M., Herrmann, J., Hindson, B.J., Bhat, S. and Emslie, K.R., 2012. Evaluation of a droplet digital polymerase chain reaction format for DNA copy number quantification. *Analytical chemistry*, 84(2), pp.1003-1011.
- [2] Mao X, Liu C, Tong H, Chen Y, Liu K. Principles of digital PCR and its applications in current obstetrical and gynecological diseases. *American journal of translational research*. 2019;11(12):7209.
- [3] Hindson BJ, Ness KD, Masquelier DA, Belgrader P, Heredia NJ, Makarewicz AJ, Bright IJ, Lucero MY, Hiddessen AL, Legler TC, Kitano TK. High-throughput droplet digital PCR system for absolute quantitation of DNA copy number. *Analytical chemistry*. 2011 Nov 15;83(22):8604-10.
- [4] Kuypers J, Jerome KR. Applications of digital PCR for clinical microbiology. *Journal of clinical microbiology*. 2017 Jun;55(6):1621-8.
- [5] Quan PL, Sauzade M, Brouzes E. dPCR: a technology review. *Sensors*. 2018 Apr 20;18(4):1271.
- [6] Day E, Dear PH, McCaughan F. Digital PCR strategies in the development and analysis of molecular biomarkers for personalized medicine. *Methods*. 2013 Jan 1;59(1):101-7.
- [7] Huggett JF, Novak T, Garson JA, Green C, Morris-Jones SD, Miller RF, Zumla A. Differential susceptibility of PCR reactions to inhibitors: an important and unrecognised phenomenon. *BMC research notes*. 2008 Dec;1:1-9.
- [8] Vogelstein B, Kinzler KW. Digital pcr. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1999 Aug 3;96(16):9236-41.
- [9] Rashid SA, Nazakat R, Muhamad Robat R, Ismail R, Suppiah J, Rajendran K, Raj Louis Masalamany AS, Muhamad Hendri NA, Mohamad N, Khairul Hasni NA, Suib FA. Droplet digital PCR application for the detection of SARS-CoV-2 in air sample. *Frontiers in Public Health*. 2023 Oct 27;11:1208348.
- [10] Huerta M, Rosello S, Sabater L, Ferrer A, Tarazona N, Roda D, Gambardella V, Alfaro-Cervello C, Garcés-Albir M, Cervantes A, Ibarrola-Villava M. Circulating tumor DNA detection by digital-droplet PCR in pancreatic ductal adenocarcinoma: a systematic review. *Cancers*. 2021 Feb 27;13(5):994.
- [11] Woon ST, Mayes J, Quach A, Longhurst H, Ferrante A, Ameratunga R. Droplet digital PCR for identifying copy number variations in patients with primary immunodeficiency disorders. *Clinical and experimental immunology*. 2022 Mar 1;207(3):329-35.
- [12] Kuypers J, Jerome KR. Applications of digital PCR for clinical microbiology. *Journal of clinical microbiology*. 2017 Jun;55(6):1621-8.
- [13] Whitley J, Zwolinski C, Denis C, Maughan M, Hayles L, Clarke D, Snare M, Liao H, Chiou S, Marmura T, Zoeller H. Development of mRNA manufacturing for vaccines and therapeutics: mRNA platform requirements and development of a scalable production process to support early phase clinical trials. *Translational Research*. 2022 Apr 1;242:38-55.

Authors

Shokoufeh Habibi Manesh¹,
Mohammad Shafiei^{2*}

*Sh.habibi2520@gmail.com

1. Technical Expert genetics Central Laboratory, Shahid Chamran University of Ahvaz
2. Director Central Laboratory, Shahid Chamran University of Ahvaz



Droplet Polymerase Chain Reaction; A New Step in Molecular Diagnosis

Abstract

Since its introduction in the 1980s, the polymerase chain reaction (PCR) has revolutionized molecular biology, genetics, and medical research. However, traditional PCR faces limitations, including issues with accuracy, low sensitivity to rare mutations, and susceptibility to inhibitors. Droplet digital polymerase chain reaction (dPCR) addresses these challenges by partitioning DNA samples into thousands or millions of individual compartments, enabling precise quantification of DNA or RNA molecules without the need for calibration curves or internal controls. This paper explores the advantages of dPCR over traditional PCR, including higher accuracy in molecular quantification, increased sensitivity, reduced impact of inhibitors, and the ability to measure absolute quantities. The unique ability of dPCR to detect rare genetic mutations, analyze complex genetic variations, and perform environmental and forensic analyses makes it a valuable tool. Despite its advantages, dPCR faces challenges such as high costs, longer processing times, and the need for precise sample preparation. Overall, dPCR represents a significant advancement in molecular biology and is expected to become more widely utilized in biology and medical laboratories with technological improvements and cost reductions.

Keywords

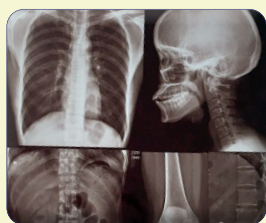
Droplet digital polymerase chain reaction, polymerase chain reaction, molecular biology, genetics, DNA



Investigation of Key Factors Affecting DLS Results and Error Reduction Strategies



Investigation of the Effect of Reinforcement Installation Conditions Using Chemical Adhesives in Concrete on Pull-Out Resistance



Radiographic Film Interpretation Using Artificial Intelligence and Image Processing Techniques



Sample preparation on filtration in chromatography (Part 1)



Comparison of Acid Digestion and Dry Ashing Methods for Determination of Lead and Cadmium Heavy Metals in Rice by Graphite Furnace Atomic Absorption Spectrometry



Droplet Polymerase Chain Reaction; A New Step in Molecular Diagnosis