ترموسایکلر (واکنش زنجیره‌ای پلیمراز)

یکی از مهم‌ترین و پرکاربردترین تجهیزات در آزمایشگاه‌های زیست‌شناسی مولکولی است. این دستگاه با تغییر سریع و دقیق دما، فرآیند تکثیر DNA را خودکار می‌کند.

۱. هدف و کاربرد (Purpose and Applications)

واکنش زنجیره‌ای پلیمراز ((PCRتکنیکی برای **تکثیر مقادیر بسیار کم DNA** تا میلیون‌ها کپی است . این روش برای اولین بار در سال ۱۹۸۳ توسط کری مولیس ابداع شد و امروزه در تمام آزمایشگاه‌های ژنتیک و زیست‌شناسی مولکولی استفاده می‌شود.

کاربردهای اصلی در آزمایشگاه:

زمینه	کاربرد
پاتوژن‌های بیماری‌زا	تشخیص و شناسایی عوامل بیماری‌زا (باکتری‌ها، ویروس‌ها، قارچ‌ها)
پزشکی قانونی	شناسایی DNA در صحنه جرم و تعیین هویت مجرمان
ردیابی و تنوع زیستی	مطالعه گونه‌های جانوری و گیاهی، حفاظت از گونه‌های در خطر انقراض
انسان‌شناسی و دیرین‌شناسی	مطالعه DNA باستانی و بررسی تکامل انسان‌ها

۲. اصول عملکرد (Working Principle)

PCR شامل **سه مرحله اصلی** است که در هر سیکل تکرار می‌شوند:

مراحل سه‌گانه PCR

مرحله	دما	زمان	عملکرد
Denaturation (دناتوره شدن)	۹۴-۹۸ درجه سانتی‌گراد	۱۰-۳۰ ثانیه	جداسازی دو رشته DNA از یکدیگر (شکستن پیوندهای هیدروژنی)
Annealing (اتصال پرایمر)	۴۵-۶۸ درجه سانتی‌گراد	۱۰-۶۰ ثانیه	اتصال پرایمرها (آغازگرها) به توالی مکمل روی DNA
Extension (بسط/سنتز)	۶۸-۷۲ درجه سانتی‌گراد	۳۰ ثانیه تا ۱ دقیقه/کیلوباز	آنزیم DNA پلیمراز رشته جدید DNA را سنتز می‌کند

مراحل اضافی

مرحله	دما	زمان	عملکرد
Initial Denaturation (دناتوره اولیه)	۹۸-۹۴ درجه سانتی‌گراد	۳۰ ثانیه تا ۵ دقیقه	دناتوره کامل DNA قالب قبل از شروع سیکل‌ها
Final Extension (بسط نهایی)	۷۲-۶۸ درجه سانتی‌گراد	۱۰-۲ دقیقه	تکمیل سنتز تمام قطعات DNA
Hold (نگهداری)	۱۰-۴ درجه سانتی‌گراد	نامحدود	نگهداری موقت محصول PCR تا خارج شدن از دستگاه

۳. اجزای اصلی دستگاه (Components)

جزء	توضیح و عملکرد
Sample Block (بلوک نمونه)	صفحه آلومینیومی با حفره‌هایی که لوله‌های PCR در آن قرار می‌گیرند. قابلیت گرم و سرد شدن سریع را دارد. ظرفیت معمولاً ۹۶ یا ۳۸۴ نمونه
Heated Lid (درپوش گرم‌شونده)	درپوشی که روی لوله‌ها را می‌پوشاند و تا حدود ۱۰۵ درجه سانتی‌گراد گرم می‌شود. از تبخیر و چگالش نمونه در بالای لوله جلوگیری می‌کند
عناصر پلتیر (Peltier Elements)	قطعات الکترونیکی که با عبور جریان الکتریکی، دما را بسیار سریع تغییر می‌دهند. قلب اصلی فناوری ترموسایکلر
کنترل‌پنل و نمایشگر	برای برنامه‌ریزی و نمایش دما و زمان لحظه‌ای
سیستم خنک‌کننده (فن)	برای خنک‌سازی سریع بلوک بین سیکل‌ها
سنسورهای دما	پایش دقیق دمای بلوک برای اطمینان از صحت برنامه

۴. مواد و تجهیزات مورد نیاز (Materials Required)

قلم	توضیحات
دستگاه ترموسایکلر	با بلوک ۹۶ یا ۳۸۴ چاهی
لوله‌های PCR (PCR tubes)	۰٫۲ میلی‌لیتر، ترجیحاً نازک‌جدار (thin-walled) برای انتقال حرارت بهتر
سیستم Master Mix	مخلوط آماده شامل آنزیم، بافر، dNTPs و مواد افزودنی
پرایمرهای Forward و Reverse	۱۰ میکرومولار
Template DNA (DNA الگو)	۱۰۰-۱ نانوگرم برای DNA پلاسمیدی، ۱۰۰۰-۱ نانوگرم برای DNA ژنومی
آب عاری از نوکلئاز (Nuclease-Free Water)	برای تکمیل حجم واکنش

پیپت و نوک فیلتردار	برای جلوگیری از آلودگی
دستکش نیتریل	برای جلوگیری از آلودگی DNA اپراتور
خنک‌کننده (Cooler/Ice)	برای نگهداری نمونه‌ها قبل از شروع

۵. روش کار گام به گام (Step-by-Step Procedure)

□ مرحله ۰: آماده‌سازی اولیه

۱. **برنامه را در دستگاه تنظیم کنید** (قبل از شروع کار با نمونه‌ها)
۲. دستگاه را روشن کنید و اجازه دهید گرم شود
۳. تمام مواد را روی یخ یا خنک‌کننده قرار دهید
۴. هود را روشن کنید و سطوح را با اتانول ٪۷۰ ضدعفونی کنید
۵. دستکش بپوشید (از دست زدن به سطوح بدون دستکش خودداری کنید)

□ مرحله ۱: تنظیم برنامه (Programming the Thermal Cycler)

۱. از منوی اصلی **Create New Program** یا **Edit** را انتخاب کنید
۲. برنامه را بر اساس جدول زیر تنظیم کنید:

مرحله	دما	زمان	تعداد تکرار
Initial Denaturation	C۹۵-۹۸°	۳۰ ثانیه - ۲ دقیقه	۱
Denaturation	C۹۴-۹۸°	۱۰-۳۰ ثانیه	۲۵-۴۰ سیکل
Annealing	C (۴۵-۶۸° طبق Tm پرایمرها)	۱۰-۶۰ ثانیه	↺
Extension	C۶۸-۷۲°	۳۰ ثانیه/کیلوباز	↺
Final Extension	C۶۸-۷۲°	۲-۱۰ دقیقه	۱
Hold	C۴-۱۰°	∞	۱

نکات کلیدی در برنامه‌ریزی:

- دمای Annealing معمولاً ۵ درجه پایین‌تر از Tm پرایمرها تنظیم می‌شود
- برای تعیین دمای دقیق از **NEB Tm Calculator** آنلاین استفاده کنید
- زمان Extension: هر کیلوباز (۱۰۰۰ جفت باز) ۳۰ ثانیه تا ۱ دقیقه زمان نیاز دارد

□ مرحله ۲: تهیه مخلوط واکنش (Master Mix Preparation)

دستورالعمل استاندارد برای واکنش ۲۵ میکرولیتری:

Component	Volume	Final Concentration
Master Mix (۲X)	۱۲٫۵ µL	۱ X
Primer Forward (۱۰ µM)	۱٫۲۵ µL	۰٫۲–۰٫۵ µM
Primer Reverse (۱۰ µM)	۱٫۲۵ µL	۰٫۲–۰٫۵ µM
Template DNA	متغیر	۱–۱۰۰ ng
Nuclease-Free Water	تا ۲۵ µL	—

نکات مهم:

- مخلوط واکنش را روی یخ آماده کنید (برای آنزیم‌های معمولی)
- برای آنزیم‌های Hot Start، می‌توان در دمای اتاق کار کرد
- همیشه یک **کنترل منفی (Negative Control)** بدون DNA قالب نیز آماده کنید

□ مرحله ۳: چیدمان لوله‌ها در دستگاه (Loading)

۱. لوله‌های PCR را در بلوک دستگاه قرار دهید
۲. اطمینان حاصل کنید که لوله‌ها کاملاً در حفره‌ها نشسته‌اند
۳. درپوش گرم‌شونده (Heated Lid) را ببندید و محکم کنید
۴. اگر دستگاه درپوش گرم‌شونده ندارد، روی نمونه‌ها روغن معدنی (Mineral Oil) بریزید تا از تبخیر جلوگیری شود

□ مرحله ۴: اجرای برنامه (Running the Program)

۱. برنامه ذخیره شده را انتخاب کنید
۲. دکمه **Run** یا **Start** را فشار دهید
۳. **حداقل ۱۰ دقیقه** پای دستگاه بمانید تا اطمینان حاصل کنید برنامه به درستی شروع شده و پروفایل دمایی پایدار است
۴. زمان پایان برنامه را یادداشت کنید

□ مرحله ۵: پس از پایان برنامه (Post-Run)

۱. بلافاصله پس از پایان، لوله‌ها را از دستگاه خارج کنید
۲. محصولات PCR را می‌توان در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد برای ۲–۱ روز نگهداری کرد
۳. برای نگهداری طولانی‌مدت، در ۲۰- درجه سانتی‌گراد فریز کنید
۴. دستگاه را خاموش کنید یا در حالت Standby بگذارید

□ مرحله ۶: خاموش کردن و تمیزکاری (Shutdown & Cleaning)

۱. پس از خنک شدن بلوک (زمان کافی برای فن)، دستگاه را خاموش کنید
۲. در صورت وجود نشتی، بلوک را با اتانول ٪۷۰ تمیز کنید
۳. درپوش دستگاه را ببندید
۴. دفترچه ثبت استفاده را تکمیل کنید

۶. راهنمای دمای Annealing) محاسبه دمای بهینه (Annealing

دمای Annealing مهم‌ترین پارامتر در موفقیت PCR است. دمای خیلی بالا باعث عدم اتصال پرایمرها و دمای خیلی پایین باعث اتصال غیراختصاصی می‌شود.

فرمول تقریبی برای محاسبه دمای Annealing اولیه:

```
Ta = (Tm - ۵) درجه سانتی‌گراد
```

مقادیر مرجع برای انواع مختلف آنزیم:

آنزیم پلیمراز	دمای Annealing مرجع	دمای Extension	منبع
Q۵ High-Fidelity	۶۰-۷۲°C	۷۲°C	
Taq DNA Polymerase	۴۵-۶۸°C	۶۸°C	
Hot Start Taq	۴۵-۶۸°C	۶۸°C	
OneTaq	۴۵-۶۸°C	۶۸°C	

ابزارهای آنلاین کمکی:

- NEB Tm Calculator: https://tmcalculator.neb.com/
- Primer۳: برای طراحی و آنالیز پرایمر

اگر بهینه‌سازی لازم است:

- انجام **Gradient PCR** (آزمایش با دماهای مختلف Annealing در یک ران) بهترین روش برای یافتن دمای بهینه است
- شروع با محدوده ±۵ درجه سانتی‌گراد از Tm توصیه می‌شود

۷. نگهداری و تمیزکاری (Maintenance & Cleaning)

تمیزکاری روتین

بخش	روش تمیزکاری	تعداد دفعات
سطح بیرونی	با پارچه مرطوب یا اتانول ٪۷۰	هفتگی
حفره‌های بلوک (Wells)	با سواپ پنبه آغشته به ٪۱۰ بلیچ و سپس اتانول	ماهانه
Heated Lid (زیر درپوش)	با کیموپ آغشته به ٪۱۰ بلیچ و سپس اتانول	ماهانه
فن‌ها و دریچه‌های هوا	با هوای فشرده یا جاروبرقی	سه‌ماهه

روش صحیح تمیزکاری حفره‌های بلوک

بر اساس SOP رسمی آزمایشگاه پزشکی قانونی : Maine

۱. دستگاه را خاموش کنید و حداقل ۳۰ دقیقه صبر کنید تا خنک شود
۲. درپوش را به عقب بلغزانید (حدود ۳/۱) و به سمت بالا خم کنید
۳. کف درپوش و روی بلوک را با کیموپ آغشته به ٪۱۰ بلیچ تمیز کنید
۴. با سواپ پنبه آغشته به ٪۱۰ بلیچ، هر حفره را تمیز کنید
۵. با سواپ پنبه آغشته به اتانول، بلیچ باقیمانده را پاک کنید
۶. صبر کنید تا اتانول کاملاً تبخیر شود

شرایط نگهداری

فاکتور	مقدار ایده‌آل
دما	دمای اتاق (۲۰-۲۵ درجه سانتی‌گراد)
رطوبت	کمتر از ٪۶۰
محل قرارگیری	سطح صاف، بدون لرزش، دور از نور مستقیم خورشید

۸. کالیبراسیون و کنترل کیفیت (Quality Assurance) & Calibration

کالیبراسیون منظم ترموسایکلر برای تضمین صحت و دقت نتایج ضروری است. طبق مستندات شرکت Thermo Fisher، کالیبراسیون باید در فواصل منظم انجام شود .

فواصل کالیبراسیون

نوع کالیبراسیون	بازه زمانی	توضیح
Temperature Verification (ماهانه)	هر ماه	بررسی دمای یک نقطه مرجع (معمولاً چاه A۶)
Temperature Non-Uniformity (سه‌ماهه)	هر ۳ ماه	بررسی دمای نقاط مختلف بلوک
Performance Check (سالانه)	هر ۱۸-۱۲ ماه	بررسی کامل عملکرد دستگاه توسط تکنسین متخصص
ROI/Spatial Calibration	هر ۶ ماه	برای دستگاه‌های Real-Time PCR

معیارهای پذیرش

پارامتر	محدوده قابل قبول
دقت دما (نسبت به دمای تنظیمی)	±۰٫۷۵ درجه سانتی‌گراد
یکنواختی دما در کل بلوک	کمتر از ۱٫۰ درجه سانتی‌گراد

علائم نیاز به کالیبراسیون مجدد

در صورت مشاهده هر یک از موارد زیر، دستگاه باید کالیبره شود :

- عدم تکرارپذیری نتایج
- باندهای غیراختصاصی مکرر در ژل الکتروفورز
- عدم تکثیر قطعات مورد انتظار
- پس از جابجایی یا ضربه به دستگاه
- پس از تعمیرات اساسی

نکته: اگر ترموسایکلر در آزمون کالیبراسیون رد شود، باید برچسب "خراب - نیاز به سرویس" بزنید و با نماینده شرکت سازنده تماس بگیرید .

۹. عیب‌یابی مشکلات رایج (Troubleshooting)

مشکل	علت احتمالی	راه‌حل
بدون باند در ژل	۱. آنزیم غیرفعال ۲. دمای Annealing نامناسب ۳. DNA قالب تخریب شده	۱. از Master Mix تازه استفاده کنید ۲. Gradient PCR انجام دهید ۳. DNA تازه استخراج کنید
باندهای غیراختصاصی متعدد	۱. دمای Annealing خیلی پایین ۲. تعداد سیکل زیاد ۳. آلودگی DNA	۱. دمای Annealing را افزایش دهید ۲. سیکل را کاهش دهید (مثلاً ۲۵ به جای ۳۰) ۳. از کنترل منفی استفاده کنید
اسمیر (Smear) در ژل	۱. تخریب DNA ۲. فعالیت نوکلئاز ۳. آنزیم بیش از حد	۱. از آب عاری از نوکلئاز استفاده کنید ۲. مواد را عاری از نوکلئاز تهیه کنید ۳. مقدار آنزیم را بهینه کنید
هیچ محصولی پس از ۳۵ سیکل	۱. پرایمر طراحی ضعیف ۲. DNA قالب خیلی کم	۱. پرایمرها را با ابزارهای آنلاین چک کنید ۲. مقدار DNA را افزایش دهید
دقت دما خارج از محدوده	۱. کالیبراسیون منقضی شده ۲. سنسور دما خراب	۱. کالیبراسیون انجام دهید ۲. با تکنسین تماس بگیرید

یکنواختی دما > ۱°C	۱. المنت پلتیر خراب ۲. کالیبراسیون نامناسب	۱. دستگاه را خاموش کنید ۲. با نماینده شرکت تماس بگیرید

۱۰. نکات کلیدی برای موفقیت در PCR

نکته	توضیح
⚠ آلودگی (Contamination)	همیشه از کنترل منفی (بدون DNA قالب) استفاده کنید. از نوک فیلتردار (Filter Tips) استفاده کنید و هر بار نوک را عوض کنید.
❄ نگهداری بر روی یخ	کلیه مواد را روی یخ یا خنک‌کننده قرار دهید تا از فعالیت آنزیم قبل از شروع جلوگیری شود
🌡 برنامه‌ریزی صحیح	دقت کنید که مرحله Extension زمان کافی بر اساس طول قطعه مورد نظر داشته باشد
🧼 تمیزی	حفره‌های بلوک را مرتباً تمیز کنید تا از آلودگی متقابل جلوگیری شود
🔢 تعداد سیکل	برای اکثر واکنش‌ها ۳۰-۲۵ سیکل کافی است. سیکل بیشتر باعث افزایش باندهای غیراختصاصی می‌شود
📝 ثبت اطلاعات	تمام تنظیمات برنامه و تاریخ کالیبراسیون را در دفترچه ثبت کنید

۱۱. آنزیم‌های پلیمراز رایج (Common DNA Polymerases)

آنزیم	ویژگی	کاربرد
Taq DNA Polymerase	استاندارد، بدون فعالیت تصحیح (Proofreading)	PCR معمولی، کلونی PCR
Hot Start Taq	غیرفعال در دمای محیط، فعال در ۹۵°C	افزایش اختصاصیت، کاهش باندهای غیراختصاصی
High-Fidelity ۵Q	دارای فعالیت تصحیح، خطای بسیار کم	کلoning، توالی‌یابی، جهش‌زایی
OneTaq	مخلوط Taq + proofreading	قطعات طولانی (تا ۶ کیلوباز)

۱۲. چک‌لیست سریع برای کاربران

مرحله	اقدام	انجام شد؟
۱	دستکش پوشیده شده و سطوح با اتانول ضدعفونی شده؟	☐
۲	Master Mix و پرایمرها از فریزر خارج و روی یخ قرار داده شده؟	☐
۳	برنامه PCR در دستگاه تنظیم و ذخیره شده؟	☐
۴	مواد واکنش طبق دستورالعمل به لوله اضافه شده؟	☐
۵	کنترل منفی (بدون DNA) نیز آماده شده؟	☐
۶	لوله‌ها به درستی در بلوک دستگاه قرار گرفته و درپوش بسته شده؟	☐

۷	برنامه Run شده و حداقل ۱۰ دقیقه پای دستگاه مانده؟	☐
۸	پس از پایان، لوله‌ها خارج و در یخ یا C۴° قرار داده شده؟	☐
۹	دستگاه خاموش و تمیز شده؟	☐
۱۰	نتایج در دفترچه ثبت شده؟	☐

✨ جمع‌بندی نهایی

ترموسایکلر قلب تپنده هر آزمایشگاه زیست‌شناسی مولکولی است. با رعایت اصول زیر می‌توانید نتایج قابل اعتماد و تکراری از PCR خود داشته باشید:

۱. **برنامه‌ریزی صحیح** - دمای Annealing مناسب را محاسبه کنید و از Gradient PCR برای بهینه‌سازی استفاده کنید
۲. **کالیبراسیون منظم** - هر ۱۲-۶ ماه یکبار کالیبراسیون انجام دهید و یکنواختی دما را بررسی کنید
۳. **تمیزی مطلق** - از کنترل منفی استفاده کنید و حفره‌های بلوک را ماهانه تمیز کنید
۴. **ثبت اطلاعات** - تمام جزئیات برنامه و نتایج کالیبراسیون را مستند کنید