تفاعل إنزيم البلمرة التسلسلي
POLYMERASE CHAIN REACTION (PCR)

العام الجامعي 1431 – 1432 هـ

إعداد: أمل الغامدي

في الطبيعه

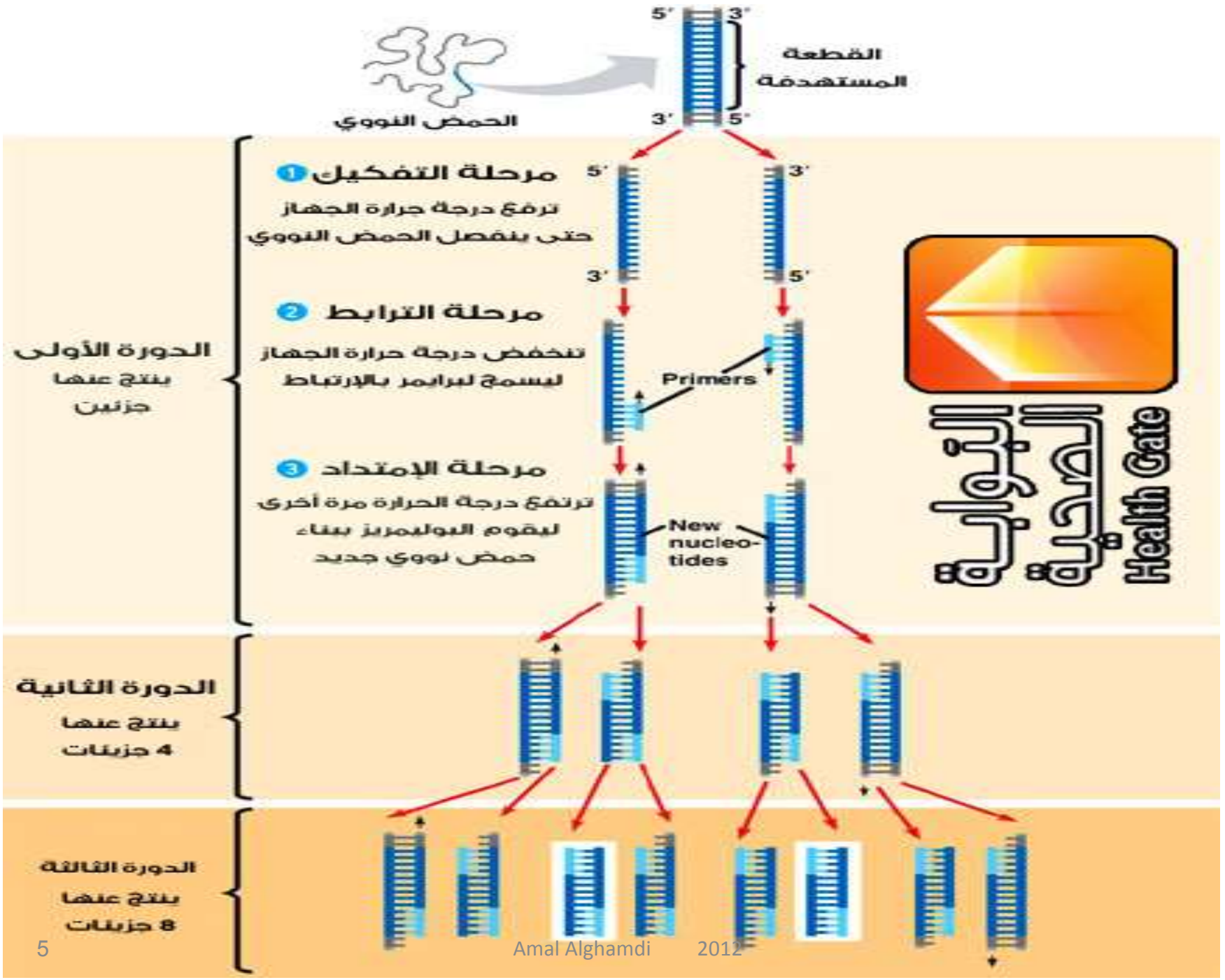
- تقوم الخلية بمضاعفة كمية الحمض النووي عند انقسام الخلية بشكل تلقائي و بشكل سريع مع وجود نظام تصحيح للأخطاء خلال النسخ. . و تبلغ سرعة النسخ والمضاعفة إلى 1000 قاعدة نيتروجينية بالثانية (داخل النظام الحيوي) و هي كما ذكرنا تحدث في الخلية في وقت التكاثر والانقسام فقط.
- ومع التطور في مجال التكنولوجيا الحيوية والذي يقوم على التعامل مع الحمض النووي (DNA) بشكل أساسي ، استدعى ذلك العلماء على أن يبحثوا عن طريقة أو تقنية تقوم على مضاعفة كمية الحمض النووي (DNA) بشكل كبير، خارج النظام الحيوي (الخلية).

مكتشف تقنية الـ PCR

كانت فكرة بواسطة عالم كيميائي
تتضمن فصل الحمض النوويDNA
وصنع نسخ كثيره منه ..
وفعلاً تحققت هذه الفكرة المبدعة ..
بواسطة د.كاري مولس Kary Mullis
خطرت بباله فكرة أن يفصل الحمض
النووي DNA
ويصنع منه نسخ كثيرة ..
ليقلد في عام 1993 م جائزة نوبل في
الكيمياء.

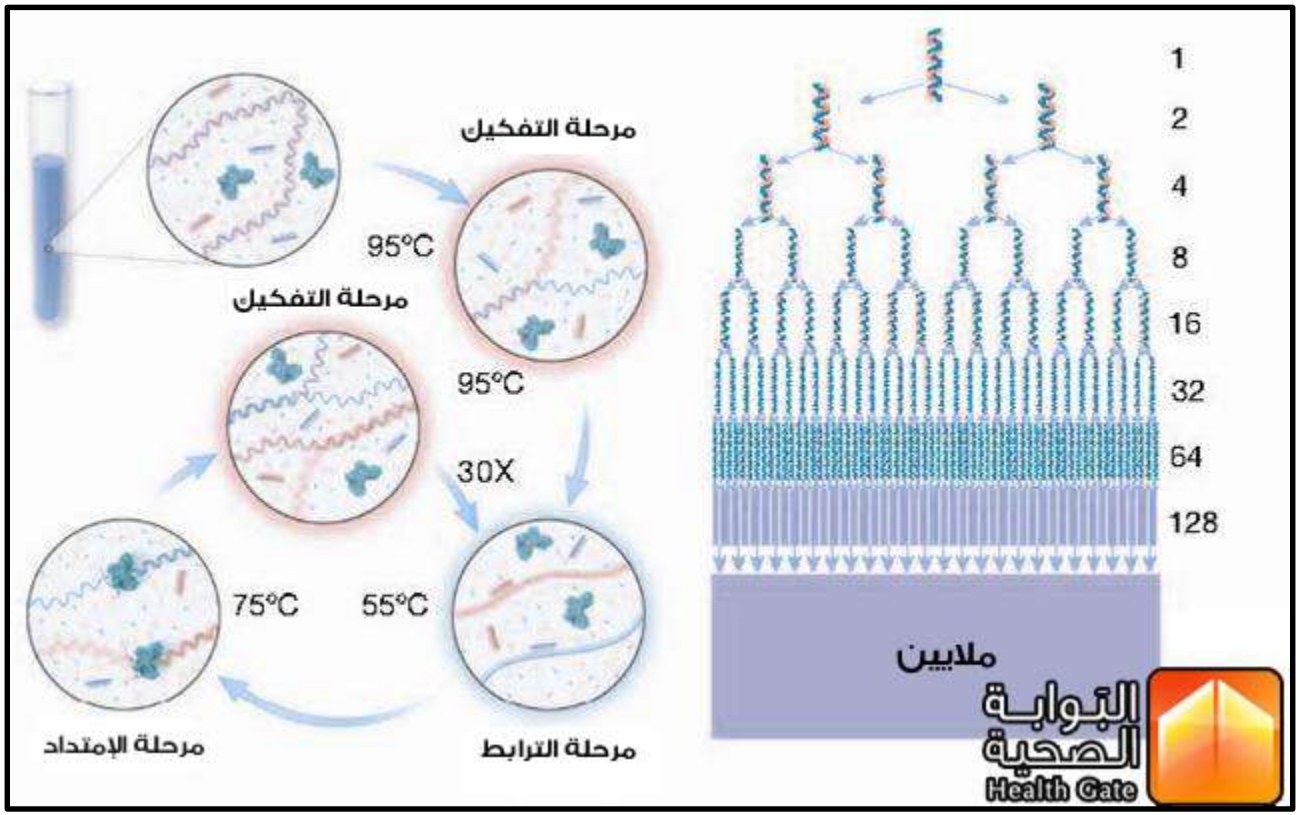
ما هو PCR ؟

- هوتقنية مخبريه تقوم على أساس تصنيع نسخ عديدة من قطع الحمض النووي DNA في المختبر (in vitro).
- بحيث يقوم الجهاز برفع درجة الحرارة إلى 95 درجة مؤية
- فينفصل الحمض النووي إلى جزئين ..
- وبإضافة إنزيمات لكل جزء تساعد على إنتاج مئات النسخ من النسخة الأصلية
- الهدف : تسهيل إجراء الاختبارات و الأبحاث وفحوصات إضافية.
- وهذه صور توضح خطوات عمل الجهاز :



الحمض النووي
5'
3'
القطعة
المستهدفة
3'
5'
مرحلة التفكيك 1
ترفع درجة جرارة الجهاز
حتى ينفصل الحمض النووي
مرحلة الترابط 2
تنخفض درجة حرارة الجهاز
ليسمح لبرايمر بالإرتباط
Primers
مرحلة الإمتداد 3
ترتفع درجة الحرارة مرة أخرى
ليقوم البوليمريز ببناء
حمض نووي جديد
New
nucleo-
tides
الدورة الأولى
ينتج عنها
جزئين
الدورة الثانية
ينتج عنها
4 جزيئات
الدورة الثالثة
ينتج عنها
8 جزيئات
البوابة الصحية
Health Gate

ملخص لمبدأ تقنية PCR



تطبيقات تفاعل انزيم البلمرة التسلسلي

- الكشف عن الطفرات الوراثية : وذلك عن طريق وضع بريمر خاص للطفرة لتكثير الجين الخاص بها . ومنه نقوم بمعرفة المرض إذا كان على زوجين الكروموسومات أو على احدهما. (allele)
  تعيين البصمة الوراثية.
  الكشف عن الفيروسات : وهذه الطريق هي الأدق في تحديد نوع وجنس الفيروس وكميته
- يساعد في تشخيص بعض الأمراض والتي تسببها بكتيريا أو فيروسات .
- ويستخدم في الإستنساخ وإنتاج خلايا أكثر
- هو العنصر الأهم في عملية التجميع الجيني Recombinant) الحمض النووي : ((DNA) حيث نقوم بتكثير الجين المراد إدخاله على البلازمد أو الحمض النووي (DNA) المضيف.
- استخدامه في تغير نهايات الجين لتصبح متوافقة مع إنزيمات القطع) Restriction enzyme) .
- هو العملية الأساس في تحديد تتابع القواعد النيتروجينية في الحمض النووي) (DNA)الحمض النووي Sequencer (DNA) .

تطبيقات تفاعل انزيم البلمرة التسلسلي

- معرفة طول الحمض النووي. (DNA)
- تقنية الحمض النووي (DNA) المكملc) الحمض النووي. ((DNA)
- تحديد الجين المطلوب من خليط من الجينات.
- يستخدم في تقنية.(microarrays)
- في مشروع الخارطة الجينية البشرية. (human genome project)
- الساوثرين بلوت. (southern plot)
- تقنية ارتباط الحمض النووي – (DNA) بروتين (الحمض النووي Protein- (DNA) Interaction) .
- في مجال الطب الشرعي (اختبار الأمومة ، حالات الاغتصاب ، تحديد الهوية ... الخ. (وغيرها من التطبيقات المخبرية والبحثية
- تحديد الأنماط الجينية Genotyping للفيروس الكبديC
- تشخيص الأمراض السرطانية بالكشف الجيني للتوضع الغير طبيعي للأسس الآزوتية للجينات الورميه Oncogenes
- تعيين الأنماط النسيجية HLA- tissuc typing في مجال زراعة الأعضاء

مبدأ عمل الجهاز

- يمكن اعتبار تقنية PCR محاكاة مبسطة لعملية انتساخ الحمض النووي DNA أثناء الانقسام الخلوي
- تهدف تقنية PCR إلى تضخيم جزيئات قليلة من الحمض النوويDNA ، بعد استخلاصه من خلايا أو سوائل الجسم وبالتالي الحصول على كميات كبيرة منه يمكن إجراء التحليل عليه. يمكن اعتبار تقنية PCR ترجمة مبسطة لعملية انتساخ الحمض النووي DNA أثناء الانقسام الخلوي.ولكي يتم هذا الانتساخ، لا بد من توفر مواد معينة تساعد على ذلك:

متطلبات تقنية PCR

- **1- عينة التفاعل او يسمى قالب الحمض النووي(DNA Sample).**

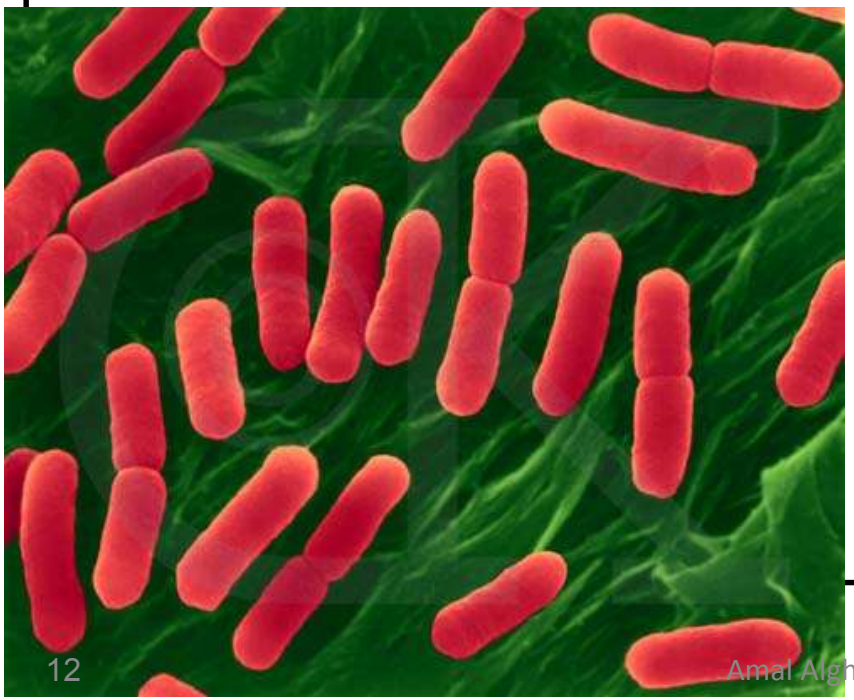
متطلبات تقنية PCR

- **2- البادئات (Primers):-**
- نوعان :
- أمامي (Forward).
- خلفي (Reverse).

- وهي تسلسل من القواعد النيتروجينيه في شريط واحد قصير(20-25 bp) مكمل لبداية الجزء المراد تضخيمه في الحمض النووي.

متطلبات تقنية PCR

- **3-انزيم التفاعل (Hot Star Taq polymerase) أو(Taq polymerase):**
- مستخرج من سلالة بكتيريه تسمى ***Thermus aquaticus*** التي تتواجد طبيعياً في الينابيع حارة.
- لايتأثر بدرجات الحرارة المرتفعه.
- درجه الحراة المثلى له 72 ºم.



متطلبات تقنية PCR

- **4- القواعد النيتروجينية (*Nitrogen Base dNTPs):-**

- أدنين **Adenine**
- ثايمين **Thymine**
- جوانين **Guanine**
- سايتوسين **Cytosine**

*dNTPs :Deoxynuleoside triphosphates

متطلبات تقنية PCR

- **5- محلول منظم (PCR Buffer10x).**
- **6-** شوا رد مناسبة، أهمها شاردة المغنيزيوم Mg+2 التي تعتبر عامل متمم Cofactor لأنظيم البوليمراز

- **6- ماء مقطر (DDW).**

متطلبات تقنية PCR

- **7-جهاز تفاعل البلمرة التسلسلي(Thermocycler):-**

يقوم هذا الجهاز بتغير درجة الحرارة بشكل سريع و دقيق و متتالي لأن تغير درجة الحرارة مهم في عمليه التضاعف.

خطوات تقنية PCR
ثلاث مراحل في الدورة الواحدة

1- مرحلة التفكيك Denaturation الحراري:

يتم رفع درجة الحرارة إلى 94 ْم وذلك لفك الشكل المزدوج للحمض النووي (DNA) الأصل.

d.s. DNA الى s.s.DNA

2- مرحلة التصاق البادئات Primers annealing:

يجب خفض درجة الحرارة إلى ما بين 55-60 ْم ليقوم البادئات بالألتصاق فيزيائياً بواسطة الروابط الهيدروجينية مع الحمض النووي (DNA) الأصل.

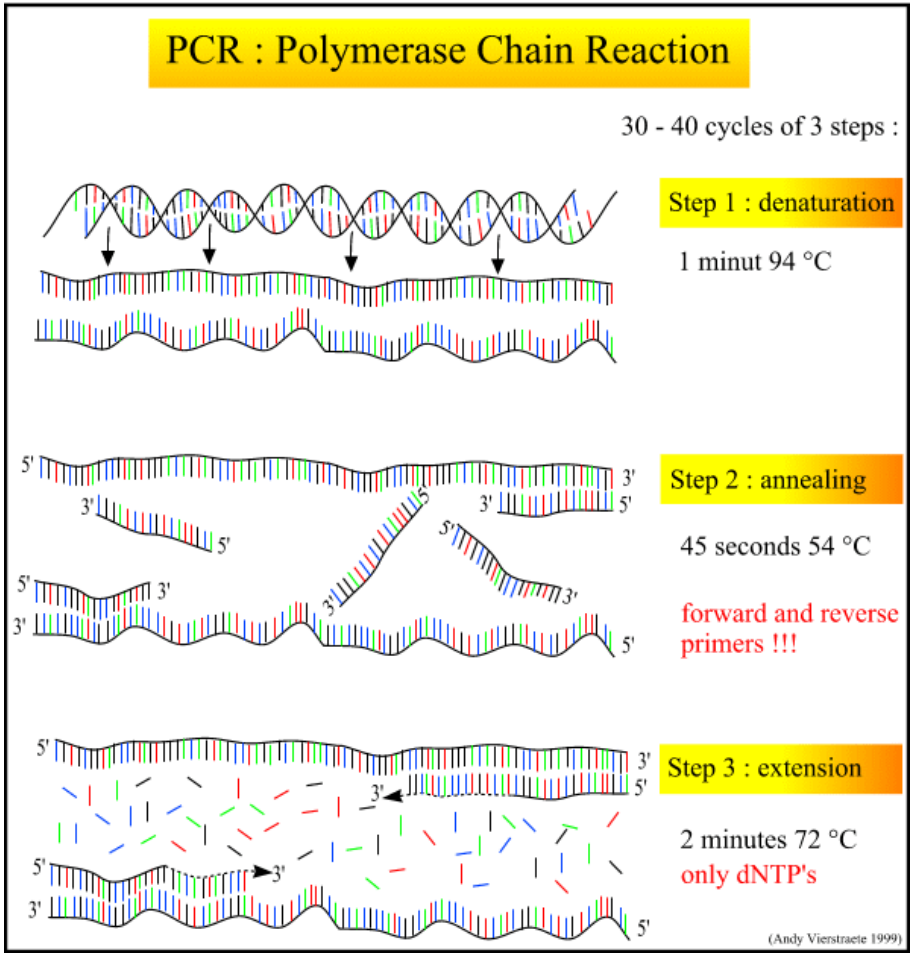
3- مرحلة الامتدادExtension:

يقوم برفع درجة الحرارة إلى 72 - 75 ْم ليقوم انزيم البلمرة بعمله في بناء الحمض النووي (DNA) الجديد. في وجود dNTPs.

وهذه المراحل الثلاث تمثل دورة كاملة وفيها يصبح الحمض النووي (DNA) الأصل قد تضاعف ، وتعتمد كمية ناتج الحمض النووي (DNA) على عدد الدورات بشكل أسي .

صوره (1): توضح خطوات تقنية PCR

Figure 1: The different steps in PCR.



لحساب عدد الدورات اللازمة في جهاز الـ PCR

- ويعطى عامل التضخيم بالمعادلة التالية
- $x = n (1+E)$
- حيث = nالكمية البدئية للحمض النووي الهدف
  = Eفعالية التضخيمEfficiency))
  = Xعدد دوراتPCR

طريقة عمل جهاز PCR

- باستخدام لوحة المفاتيح وشاشة عرض الجهاز ، يتم ادخال الدورة المصممة لأي قطعه من الحمض النووي المفصول.

	المـــــــكـــــــونـــــــات	الكميه بالمايكروليتر(١ x)
١	ماء مقطر(d.H2O)	١٧
٢	محلول منظم ١٠X (PCR buffer10x)	٢,٥
٣	خليط القواعد النيتروجينيه (dNTPs)	٢
٤	بادئ أمامي (forward primer)	٠,٦
٥	بادئ خلفي أو عكسي (reverse primer)	٠,٦
٦	أنزيم عديد البلمرة (Taq polymerase)	٠,٣
٧	عينه التفاعل (DNA sample)	٢
	المجموع الكلي بالمايكروليتر (μl)	٢٥

طريقة العمل

- نضيف 23 مايكروليتر من المزيج الرئيسي على كل أنبوب من أنابيب PCR ثم نضيف 2 مايكروليتر من عينه الدنا (DNA) .

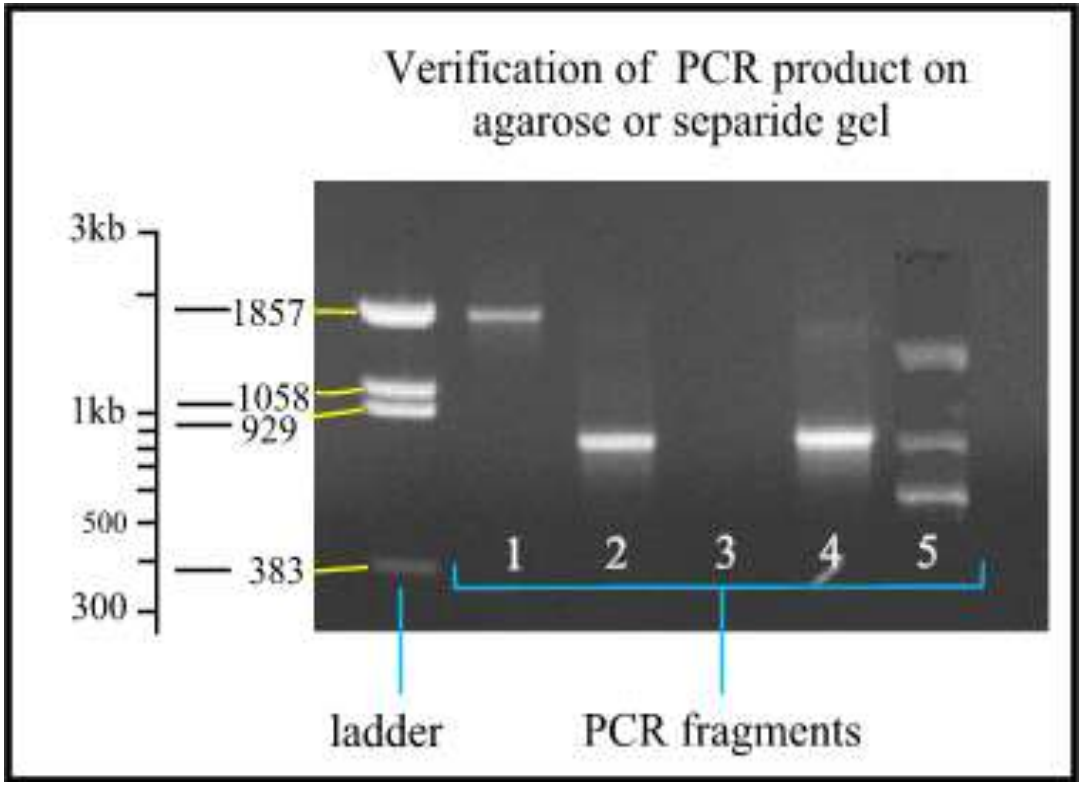
- نضع جميع الأنابيب في جهاز الطرد المركزي 3000 دورة في الدقيقه لمدة دقيقه واحدة لخلط جميع العينات وإزاله جميع الفقاعات.

نظام التفاعل

	الوقت	درجه الحراره	الخطوات
تنشيط الأنزيم والتهيئة مرحله تفكك الحمض النووي DNA	١٥دقيقه	٩٥ °م	١
مرحله التفكيك	١دقيقه	٩٥ °م	٢
مرحله الالتصاق (درجه البادئ)	١دقيقه	٤٠ - ٦٠ °م	٣
مرحله الامتداد	١دقيقه	٧٢ °م	٤
إعادة الخطوة رقم ٢ إلى ٣٤ دورة			٥
ضمان اكتمال مرحله الامتداد واعادة التصاق الشريطين مع بعضهما واكمال عدد الدورات للنسخ	١٠دقائق	٧٢ °م	٦
	∞	٤ °م	٧

صورة (2): توضح التأكد من وجود الحمض النووي DNA المنتج بالفصل الكهربي

Figure2 : Verification of the PCR product on gel



أنواع تقنية الـ PCR

PCR العادي : وهو ما تم شرحه والتطرق اليه في الخطوات السابقة.

Real-Time PCR : وهذا النوع يقوم على نفس المبدأ ولكن الخلاف الوحيد يكون مربتط الجهاز بكمبيوتر لتحديد الوقت الحقيقي لبدا التفاعل ومن ثم الكمية الحقيقية لعدد نسخ الحمض النووي (DNA)ويعتمد ذلك على وجود قواعد نيتروجينية حرة مشعة لتحديد ذلك . مما يسهل على الباحثين الوقت لتحدد وجود الجين المطلوب أو لا ، وكمية الجين بدون الوصول إلى نهاية الدورات الحرارية المحددة .

أقسام المختبر الخاص بتقنية الـ PCR

- يمكن تجنب التلوث بالاعتماد على تقسيم مكان العمل إلى ثلاثة أقسام منفصلة عن بعضها بشكل تام:

1. قسم الاستنهاض Extraction sector
2. قسم تحضير الكواشف Reagent preparation sector

وهذان القسمان يعرفان بـــ (Pre – PCR sector)

3. قسم التضخيم والمعايرة + Amplification Detection sector

ويعرف هذا القسم بـــ (Post- PCR Sector)

اسم الجهاز المستخدم لتقنية الـ PCR هو:

A thermal cycler for PCRs