تقنية تفاعل إنزيم البلمرة التسلسلي
POLYMERASE CHAIN REACTION (PCR)

العام الجامعي 1438 – 1439 هـ

إعداد: أمل الغامدي

في الطبيعه

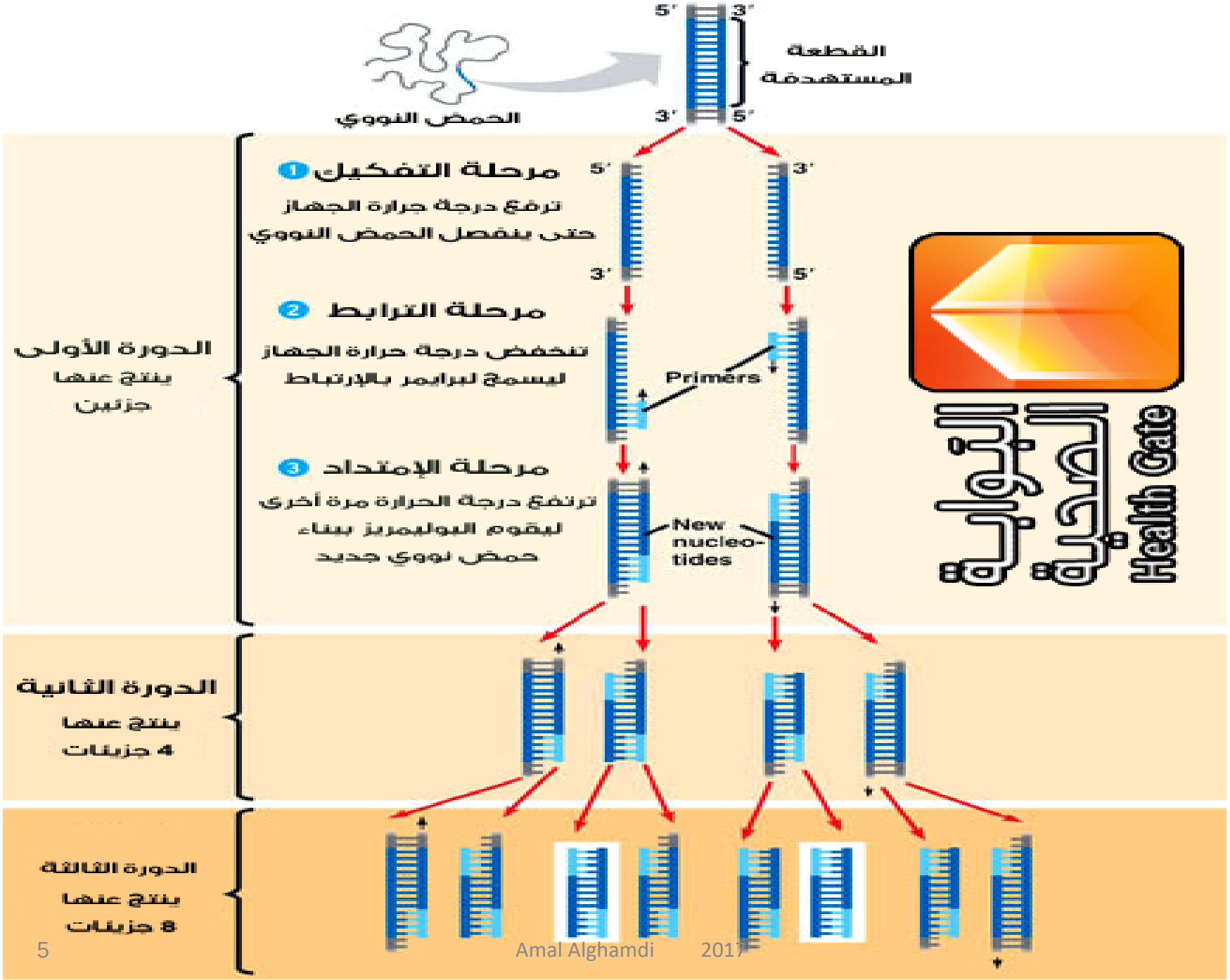
- تقوم الخلية بمضاعفة كمية الحمض النووي عند انقسام الخلية بشكل تلقائي و بشكل سريع مع وجود نظام تصحيح للأخطاء خلال النسخ.
- تبلغ سرعة النسخ والمضاعفة إلى 1000 قاعدة نيتروجينية بالثانية (داخل النظام الحيوي) و هي كما ذكرنا تحدث في الخلية في وقت التكاثر والانقسام فقط.
- ومع التطور في مجال التكنولوجيا الحيوية 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.

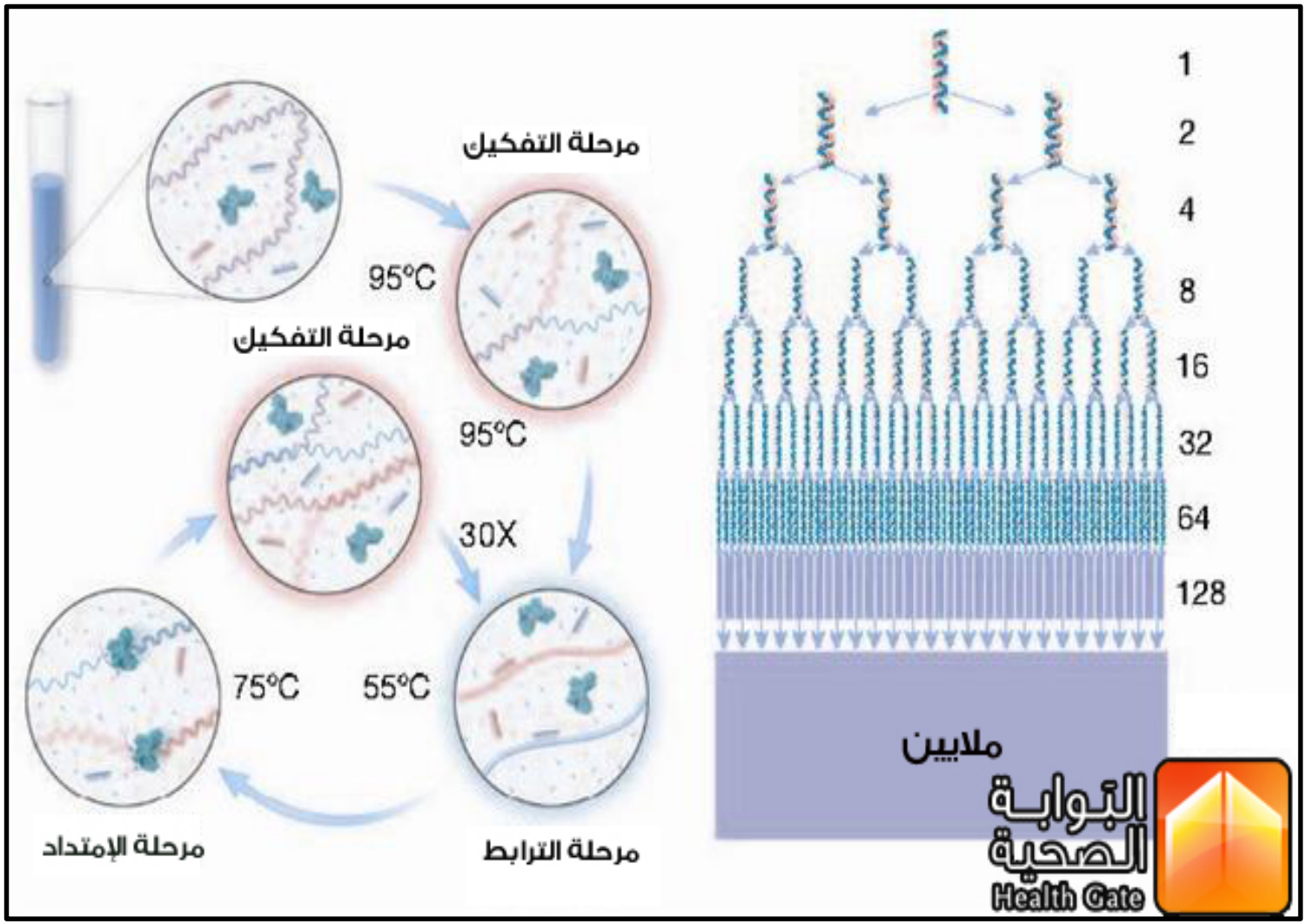
ما هو PCR ؟

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

ملخص لمبدأ تقنية PCR



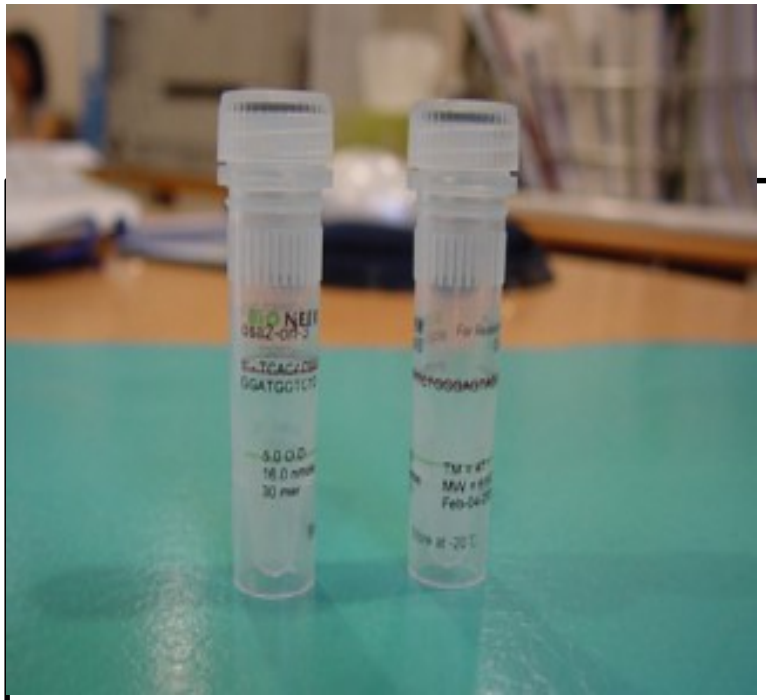
مبدأ عمل الجهاز

- 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.
- ليتم هذا الانتساخ، لا بد من توفر مواد محددة.

متطلبات تقنية PCR

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

متطلبات تقنية PCR



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

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

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

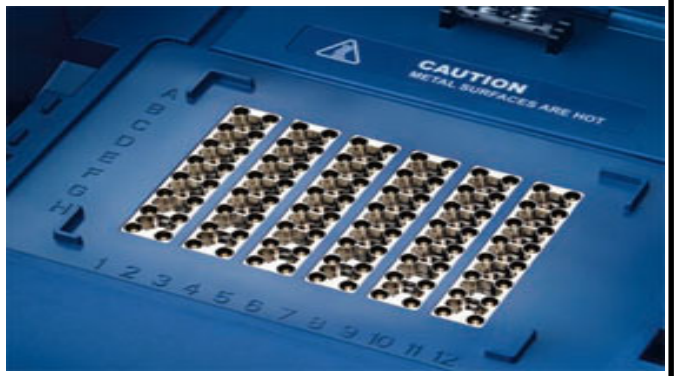
- **5- محلول منظم (PCR Buffer10x).**
- **6-** أيونات مناسبة، أهمها المغنيزيوم Mg+2 التي تعتبر عامل متمم Cofactor لأنظيم البلمرة.

- **6- ماء مقطر (DDW).**

متطلبات تقنية PCR

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

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



خطوات تقنية PCR

ثلاث مراحل في الدورة الواحدة

1- مرحلة التفكيك الحراري Denaturation :

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:

تخفض درجة الحرارة إلى ما بين 55-60 ْم لتلصق البادئات فيزيائياً بواسطة الروابط الهيدروجينية مع الحمض النووي (DNA) الأصل.

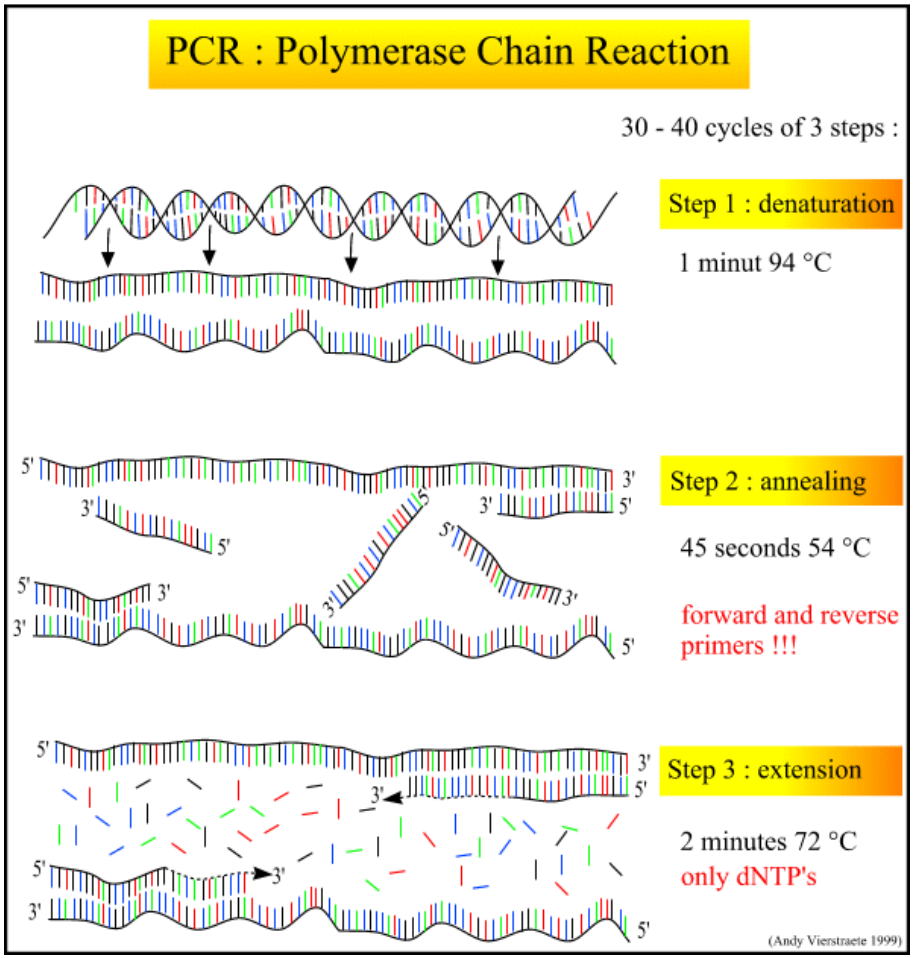
3- مرحلة الامتدادExtension:

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

تمثل المراحل الثلاث دورة كاملة ونتيجة لها يتضاعف الحمض النووي (DNA) الأصل، 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

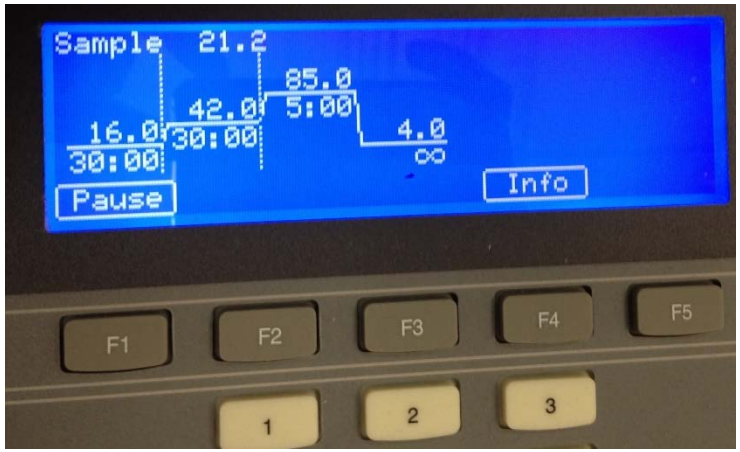
- ويعطى عامل التضخيم بالمعادلة التالية
- $x = n (1+E)$
- حيث = nالكمية البدئية للحمض النووي الهدف
  = Eفعالية التضخيمEfficiency))
  = Xعدد دوراتPCR

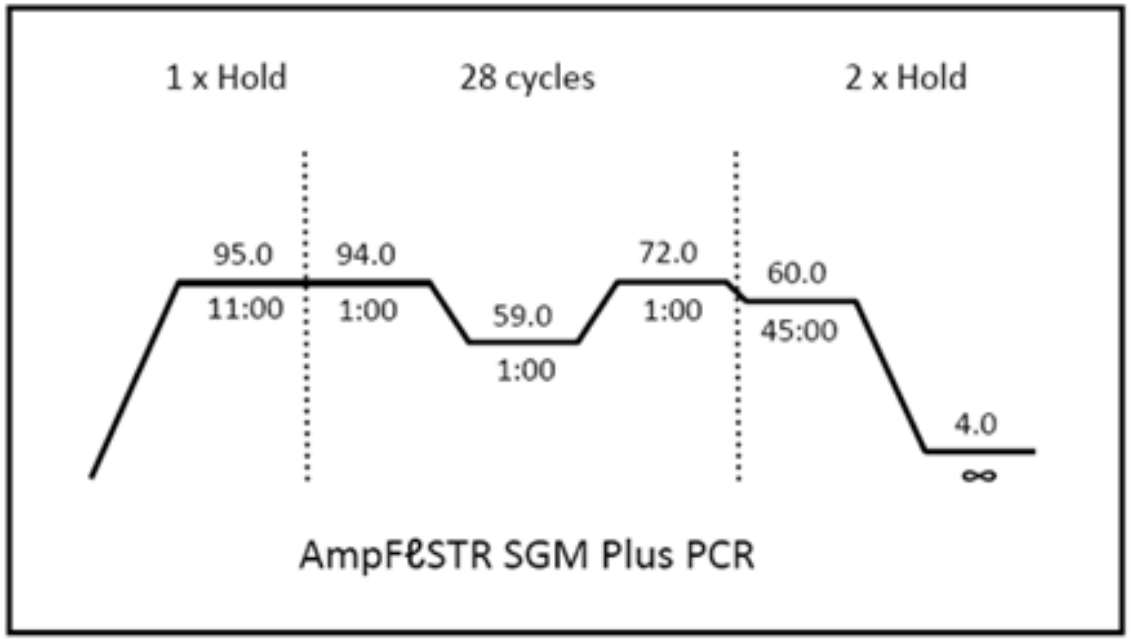
طريقة العمل

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

طريقة عمل جهاز PCR

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





نظام التفاعل

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

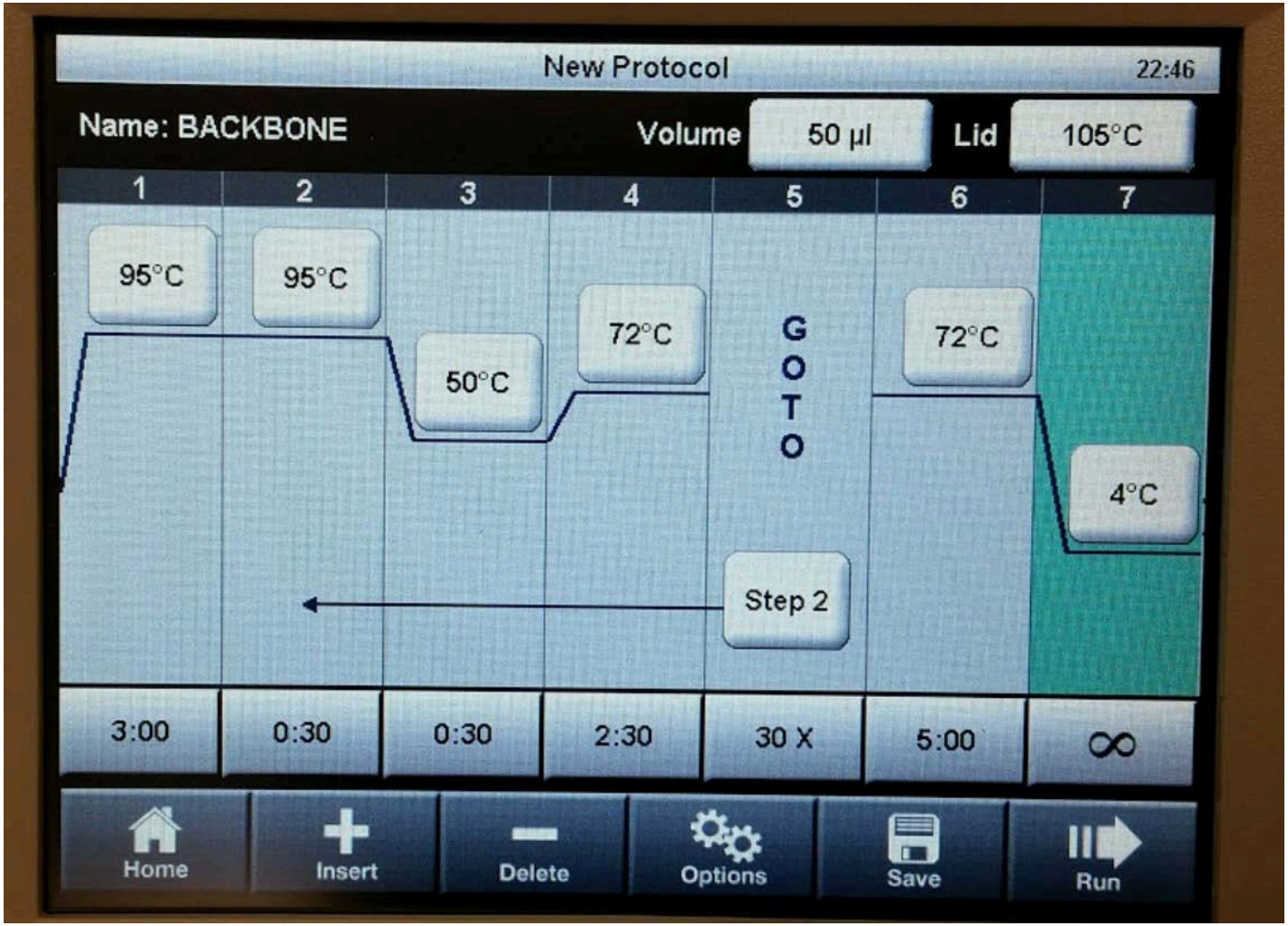
طريقة العمل

- نضيف 23 مايكروليتر من المزيج الرئيسي لكل أنبوب من أنابيب PCR ثم نضيف 2 مايكروليتر من عينه الحمض النووي (DNA) المراد مضاعفتها.

❖**كيف يتم تجهيز المزيج الرئيسي Master Mix ؟**

- تطرد جميع الأنابيب بسرعة 3000 لفه/دقيقة لمدة دقيقه واحدة لخلط جميع العينات وإزاله جميع الفقاعات.

طريقة العمل

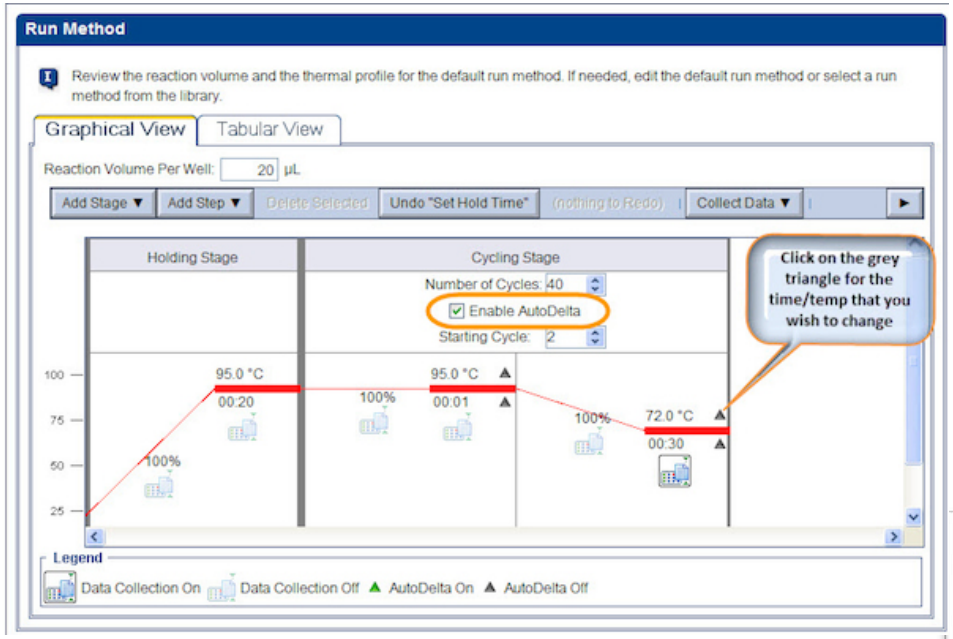

New Protocol
22:46
Name: BACKBONE
Volume
50 µl
Lid
105°C
1
2
3
4
5
6
7
95°C
95°C
50°C
72°C
GOTO
72°C
4°C
Step 2
3:00
0:30
0:30
2:30
30 X
5:00
∞
Home
Insert
Delete
Options
Save
Run

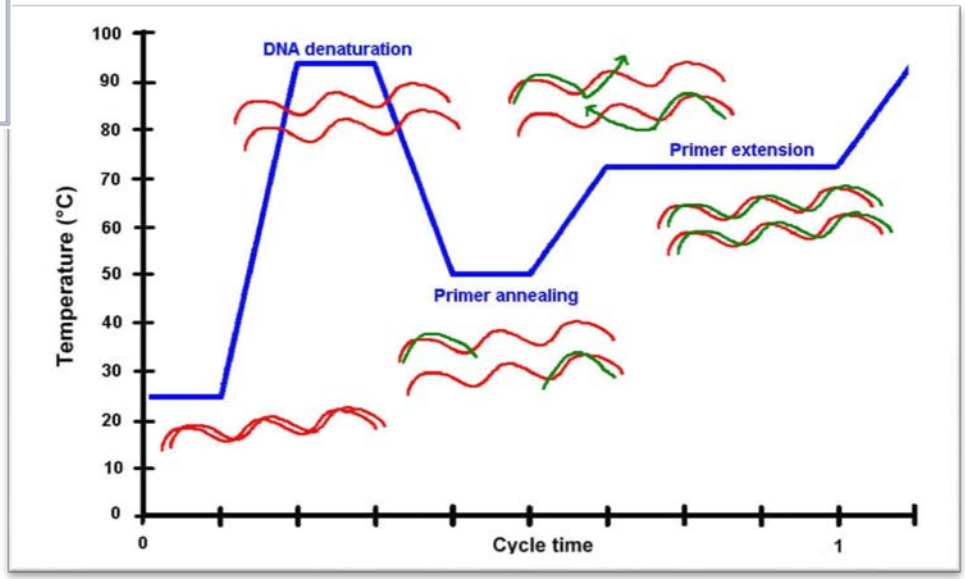
أنواع تقنية الـ PCR

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

Real-Time PCR : وهذا النوع يقوم على نفس المبدأ ولكن الخلاف الوحيد بان الجهاز يربط بجهاز كمبيوتر لتحديد الوقت الحقيقي لبدأ التفاعل ومن ثم حساب الكمية الحقيقية لعدد نسخ الحمض النووي (DNA) ويعتمد ذلك على وجود قواعد نيتروجينية حرة مشعة لتحديد ذلك . مما يقلل من وقت الباحثين لتحديد وجود الجين المطلوب أو لا ، وكمية الجين قبل الوصول إلى نهاية الدورات الحرارية المحددة في الجهاز!

Real-Time PCR (qPCR)





أقسام المختبر الخاص بتقنية الـ PCR

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

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

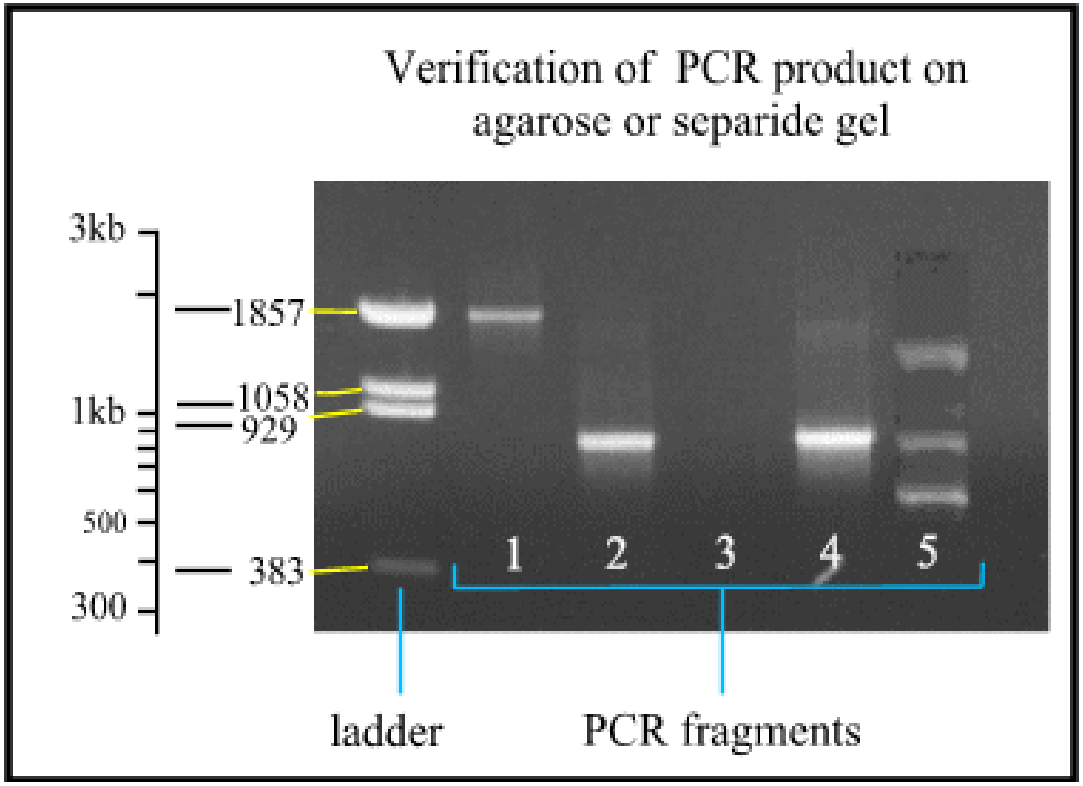
وهذان القسمان يعرفان بـــ (Pre – PCR sector)

3. قسم التضخيم والتحقق Amplification + Detection sector

ويعرف هذا القسم بـــ (Post- PCR Sector)

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

Figure2 : Verification of the PCR product on gel



تطبيقات تفاعل انزيم البلمرة التسلسلي

- الكشف عن الطفرات الوراثية : وذلك عن طريق وضع بريمر خاص للطفرة لتكثير الجين الخاص بها .
- تعيين البصمة الوراثية.
- يساعد في تشخيص بعض الأمراض والتي تسببها بكتيريا أو فيروسات. تعد التقنية الأدق في تحديد نوع وجنس الفيروس وكميته
- يستخدم في الإستنساخ وإنتاج خلايا أكثر
- العنصر الأهم في عملية التجميع الجيني (Recombinant (DNA حيث نقوم بإنتاج نسخ عديدة من الجين المراد دمجه بالبلازميد أو الحمض النووي (DNA) المضيف.
- استخدامه في تغيير نهايات الجين لتصبح متوافقة مع إنزيمات القطع (Restriction enzyme) .
- عملية أساسية لتحديد تتابع القواعد النيتروجينية في الحمض النووي DNA (DNA) Sequencer.

تطبيقات تفاعل انزيم البلمرة التسلسلي

- معرفة طول الحمض النووي(DNA) .
- تقنية الحمض النووي المكمل (cDNA)
- تحديد الجين المطلوب من خليط من الجينات.
- يستخدم في مشروع الخارطة الجينية البشرية. (human genome project)
- الساوثرين بلوت. (Southern plot)
- تقنية ارتباط الحمض النووي مع البروتين . (DNA) -Protein Interaction)
- في مجال الطب الشرعي (اختبار الأمومة ، حالات الاغتصاب ، تحديد الهوية ... الخ).
- تحديد الأنماط الجينية Genotyping للفيروس الكبدي ج
- تشخيص الأمراض السرطانية بالكشف الجيني Oncogenes
- تعيين الأنماط النسيجية HLA- tissuc typing في مجال زراعة الأعضاء.