تفاعل إنزيم البلمرة التسلسلي
POLYMERASE CHAIN REACTION (PCR)

Reham Alahmadi

fppt.com

في الطبيعة

- تحفظ المعلومات الوراثية و انتاج المواد لصنع الخلايا و الحفاظ عليها في داخل الحمض النووي (DNA). و تقوم الخلية بمضاعفة كمية الحمض النووي وقت 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) وهي 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)

fppt.com

مكتشف تقنية الـ PCR

كانت فكرة بواسطة عالم كيميائي تتضمن فصل الحمض النويو DNA و صنع نسخ كثيره منه .. وفعلا تحققت هذه الفكرة المبدعة..... بواسطة العالم د. كري مولس Dr. Kerry Mullis في عام 1985 (و قد حصل على جائزة نوبل في الكيمياء عام 1993) خطرت بباله فكرة أن يفصل الحمض النووي DNA ويصنع منه نسخ كثيرة .. وقام بنشر اختراعه لتقنية البي سي ار PCR فكانت هذه التقنية بوابة لكثير من التطورات المتسارعة في مجال التكنولوجيا الحيوية ، من أهم الأسباب التي ساعدت هذه التقنية على الانتشار عدم اعتمادها على النظام الحيوي(أي الخلية) و التحكم بكمية الحمض النووي (DNA) و سرعة في الإنتاج ولكن كان من عيوب هذه التقنية عدم وجود نظام إصلاح أخطاء الارتباط الخاطئ miss match .

fppt.com

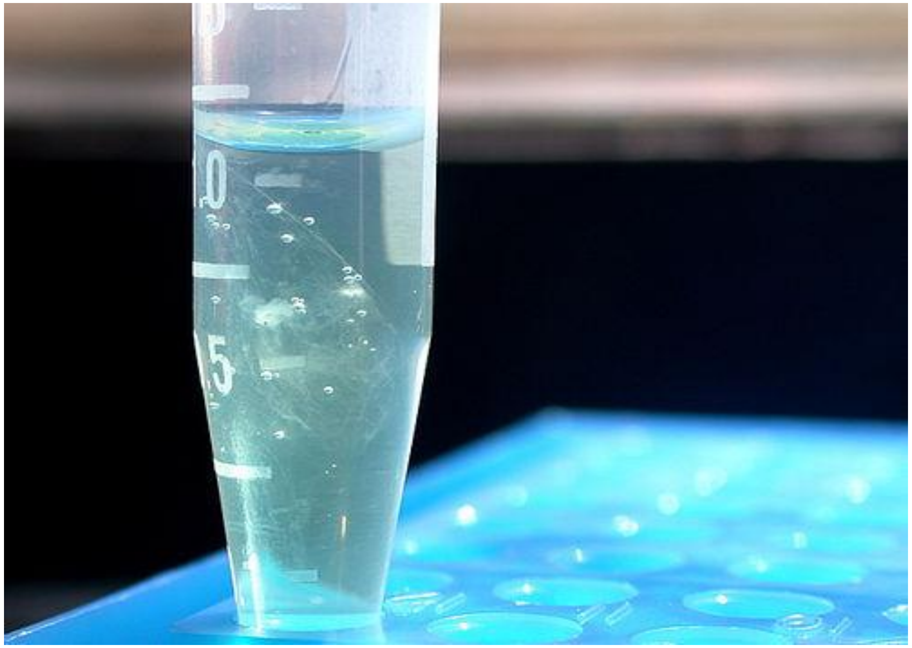
ما هو PCR

هو تقنية مخبريه تم اكتشافها عام 1983م تقريباً تقوم على إكثار نسخ الحمض النووي (DNA) خارج النظام الحيوي . أي أنها طريقة لنسخ الحمض النووي في المختبر. و لذلك فهي تقنية حيوية لاستنساخ قطعة من محددة من الحمض النووي و مضاعفة إنتاجها لكي يتسنى إجرى عليه اختبارات و فحوصات إضافية.

fppt.com

ما هي متطلبات PCR

1- التفاعل او يسمى قالب الحمض النويو (DNA Sample).



fppt.com

ما هي متطلبات PCR

2- البادئات (Primers) :

نوعان :

- أمامي (Forward)
- خليف (Reverse)

وهي تسلسل من القواعد النيتروجينيه في شريط واحد قصير

(20-25 bp) مكمل لبداية الجزء المراد تضخيمه في الحمض النووي .

fppt.com

ما هي متطلبات PCR

3- انزيم التفاعل (Taq plymerase) :

- مستخرج من سلالة بكتيرية تسمى *Thermus aquaticus* التي تتواجد طبيعيا في الينابيع الحارة.
- وهو الإنزيم الذي يقوم ببناء وترتيب القواعد النيتروجينية (وحدات الحمض النووي (DNA).
- لا يتأثر بدرجات الحرارة المرتفعة .
- درجة الحرارةالمثلى له 72 °م.

fppt.com

ما هي متطلبات PCR

4- القواعد النتروجينية (Nitrogen Base dNTPs):

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

fppt.com

ما هي متطلبات PCR

5- محلول منظم (PCR Buffer 10x)

شوارد مناسبه أهمها شارد المغنزيوم Mg+2 التي تعتبر عامل متمم Cofactor لتنظيم البوليمراز.

6- ماء مقطر (DDW)

fppt.com

ما هي متطلبات PCR

7- جهاز تفاعل البلمرة التسلسلي (Thermocycler) :

يقوم هذا الجهاز بتغير درجة الحرارة بشكل سريع ودقيق و متتالي لأن درجة الحرارة مهمة في عملية التضاعف .

fppt.com

خطوات تقنية PCR
ثلاث مراحل في الدرورة الواحدة

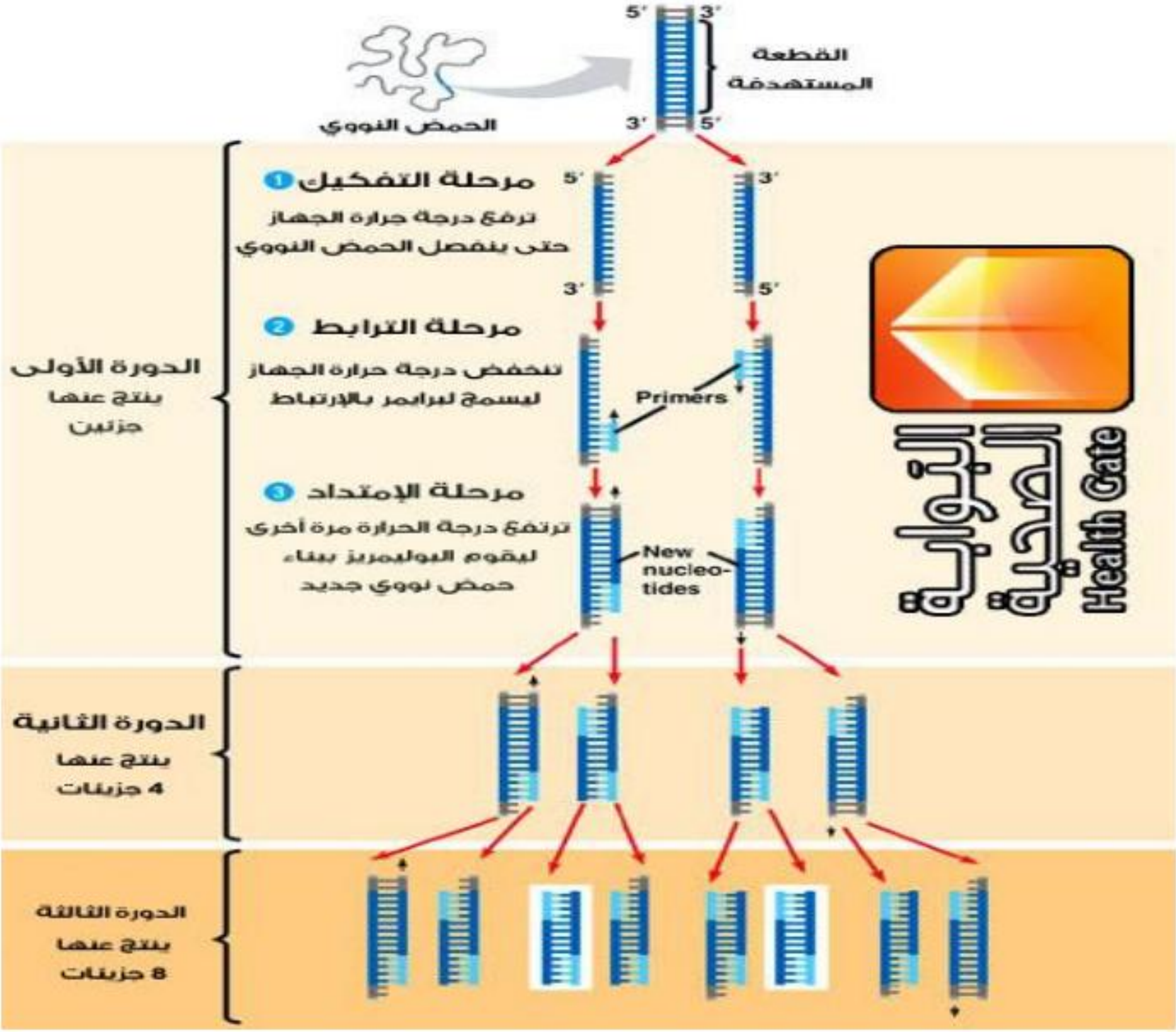
1. مرحلة التفكيك Denature : رفع الحرارة إلى 94 ْم وذلك لفك الحمض النووي (DNA) الأصل .

2. مرحلة الالتصاق anneal : إنزال الحرارة إلى ما بين 55-60 ْم ليقوم البريمر بالألتزاق فيزيائياً بواسطة الروابط الهيدروجينية مع الحمض النووي (DNA) الأصل .

3. مرحلة الامتداد extend : ثم يقوم برفع درجة الحرارة إلى 75 ْم ليقوم البلمريز بعمله في بناء الحمض النووي (DNA) الجديد .

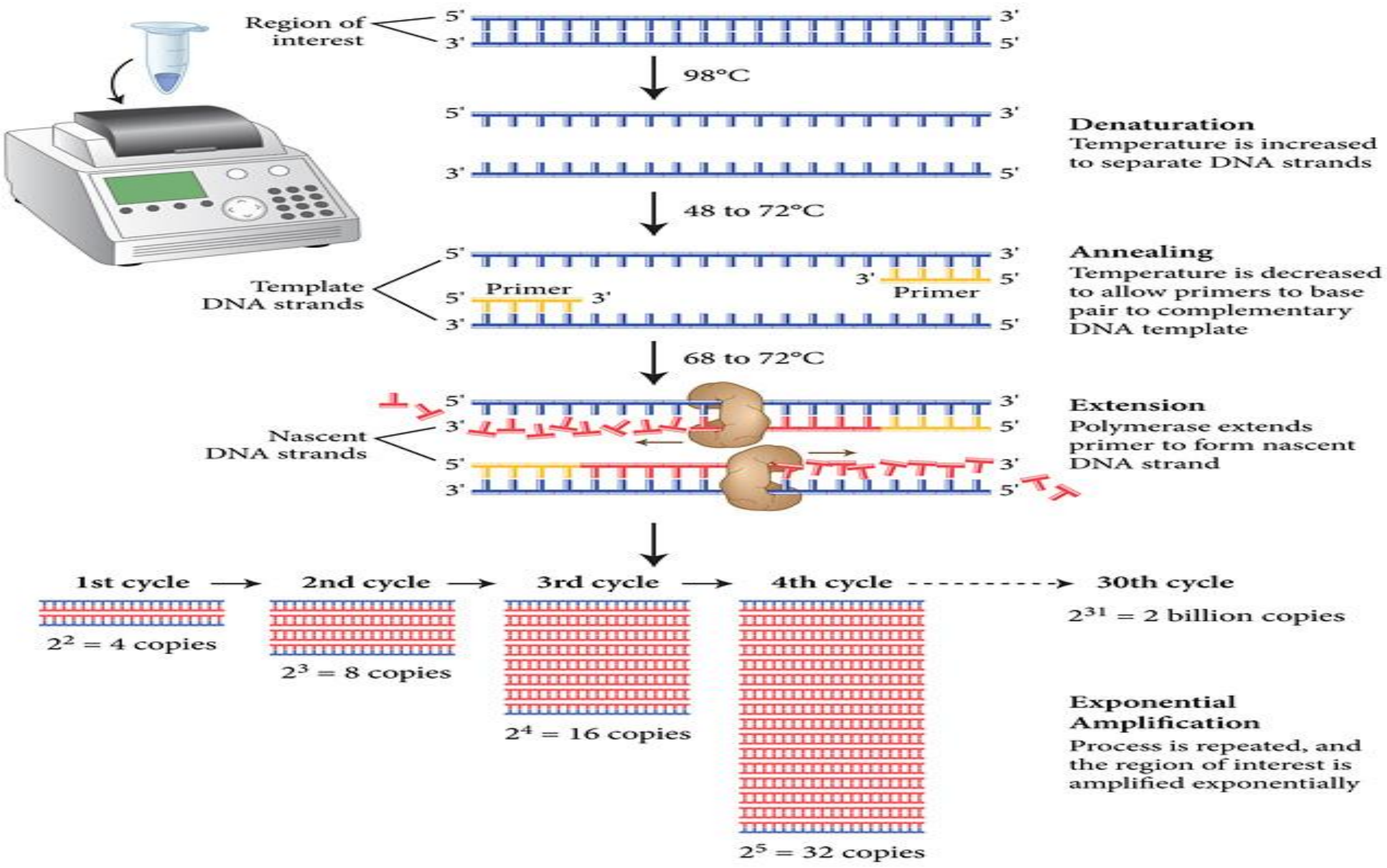
وهذه المراحل الثلاث تعتبر دورة كاملة وفيها يصبح الحمض النووي (DNA) الأصل قد تضاعف ، وتعتمد كمية ناتج الحمض النووي (DNA) على عدد الدورات (والصورة التالية توضح العملية) .

fppt.com


الحمض النووي
5'
3'
3'
5'
القطعة المستهدفة
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

fppt.com

خطوات تقنية PCR
ثلاث مراحل في الدورة الواحدة



fppt.com

طريقة عمل جهاز PCR

يجهيز Master Mix في أنبوبة وذلك بوضع جميع المكونات ما عدا عينة التفاعل

الكمية بالمايكروليتر (X 1)	المكونات	
17	ماء مقطر (d.H2O)	1
2.5	محلول منظم (PCR buffer 10x)	2
2	خليط القواعد النتروجنية (dNTPs)	3
0.6	بادئ أمامي (forward Primer)	4
0.6	بادئ خلفي أو عكسي (reverse primer)	5
0.3	إنزيم عديد البلمرة (Taq polymerase)	6
2	عينة التفاعل (DNA sample)	7
25	المجموع الكلي بالمايكروليتر µl	

fppt.com

طريقة عمل جهاز PCR

- نضيف 23 مايكرولتر 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 وإزلة جميع الفقاعات ..

fppt.com

نظام التفاعل

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

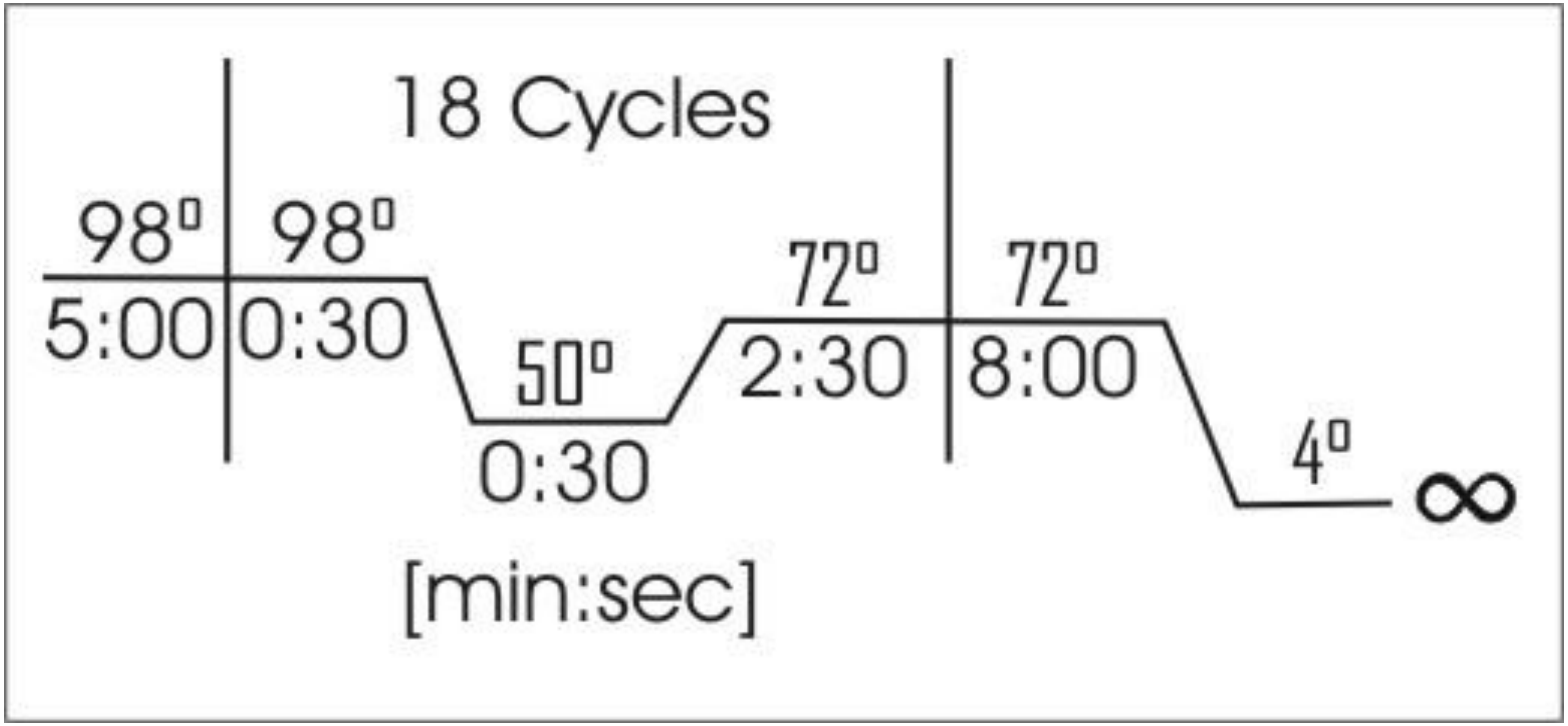
الخطوات	درجة الحرارة	الوقت	التفاعل
1	98˚c	5:00	تنشيط الأنزيم والتهيئة لمرحة تفكيك الحمض النووي DNA
2	98 ˚c	0:30	مرحلة التفكيك
3	50˚c	0:30	مرحلة الإلتصاق (درجة البادئ)
4	72 ˚c	2:30	مرحلة الإمتداد
5	إعادة الخطوة رقم 2 الى 4 لـ 18 دورة		
6	72˚c	8:00	ضمان اكتما مرحلة الإمتداد وإعادة التصاق الشريطين مع بعضهما واكمال عدد الدورات للنسخ
7	4˚c	∞	حفظ العينة

fppt.com

نظام التفاعل

fppt.com

نظام التفاعل



fppt.com

تطبيقات PCR

لتقنية PCR تطبيقات كثيرة في مجال أبحاث الحمض النووي (DNA) و الوراثة ومنها :

1. 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) .
2. تعين البصمة الوراثية .
3. الكشف عن الفيروسات : وهذه الطريق هي الأدق في تحديد نوع وجنس الفيروس وكميته.
4. هو العنصر الأهم في عملية التجميع الجيني (Recombinant الحمض النووي (DNA)) : حيث نقوم بتكثير الجين المراد إدخاله على البلازمد أو الحمض النووي (DNA) المضيف .
5. استخدامه في تغير نهايات الجين لتصبح متوافقة مع إنزيمات القطع (Restriction enzyme) .
6. هو العملية الأساس في تحديد تتابع القواعد النيتروجينية في الحمض النووي (DNA) (DNA Sequenc) .
7. معرفة طول الحمض النووي (DNA) .

fppt.com

تطبيقات PCR

8. الحمض النووي (DNA) المكمل (cالحمض النووي (DNA)) .
9. تحديد الجين المطلوب من خليط من الجينات .
10. يستخدم في تقنية (microarrays).
11. في مشروع الخارطة الجينية البشرية (human genome project) .
12. الساوثرين بلوت (southern plot) .
13. تقنية ارتباط الحمض النووي (DNA) – بروتين (الحمض النووي (DNA) -Protein Interaction) .
14. في مجال الطب الشرعي (اختبار الأمومة ، حالات الاغتصاب ، تحديد الهوية ... الخ) .

وغيرها من التطبيقات المخبرية والبحثية .

fppt.com

أنواع PCR

1. PCR العادي : وهو ما تم شرحه والتطرق اليه في الخطوات السابقة .
2. rtPCR : وهو اختصار لـ (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

fppt.com