تفاعل البلمرة المتسلسل

(Polymerase Chain Reaction PCR)

المصادر :

الشهيب ، محمد باقر واخرون ، مبادئ الوراثة الجزيئية (2013)وزارة التعليم العالي والبحث العلمي ، جامعة بابل ، كلية العلوم – العراق

الجنابي ، عباس عبد الله ، البايلوجي الجزيئي (2013)وزارة التعليم العالي والبحث العلمي ، الجامعة التكنولوجية ، قسم العلوم التطبيقية - العراق

تفاعل البلمرة المتسلسل (PCR):- هو عبارة عن تضخيم جزيئة واحدة أو بضع نسخ من قطعة من الحمض النووي عبر عدة أوامر، لتوليد آلاف الملايين من النسخ من تسلسل الحمض النووي بصفة خاصة ,وهي تقنية لا يمكن الاستغناء عنها في كثير من الأحيان وتستخدم في مختبرات البحوث الطبية والبيولوجية لمجموعة متنوعة من التطبيقات.

وتشمل هذه الطريقة استنساخ DNA وتكثيره لغرض التحليل الوظيفي للجينات ، وتشخيص الأمراض الوراثية ، وتحديد البصمات الوراثية (المستخدمة في علوم الطب الشرعي واختبار الأبوة) ، وكشف وتشخيص الأمراض المعدية .ابتكرت التقنية عام 1993من قبل كيري موليس حيث ان أسلوب عمله يعتمد على الدرجات الحرارية ، ويتألف من دورات التسخين والتبريد المتكررة للتفاعل مع الحمض النووي.

ان الهدف من استخدام تقنية تفاعل البلمرة المتسلسل Polymerase Chain Reaction (PCR) هو لتضخيم عدد نسخ الجين للوصول الى عدد معين من النسخ لاستعماله كقالب لتكثير وتضاعف DNA.

يمكن اجمال عمل الفحص كالاتي :-

تفاعل الدورات The cycling reaction

هناك ثلاث مراحل رئيسية في تفاعل (PCR) والتي تتكرر حوالي 30 الى 40 مرة وهذه المراحل تحدث في جهاز الدورات الاوتوماتيكي والذي يستطيع ان يهيئ ظروف حرارة وتبريد على التوالي للأنابيب الخاصة بالجهاز لبدء التفاعلات الخاصة بنسخ الجين المطلوب في وقت قصير.

1-مسخ الجين Denaturation عند درجة 94◦ C

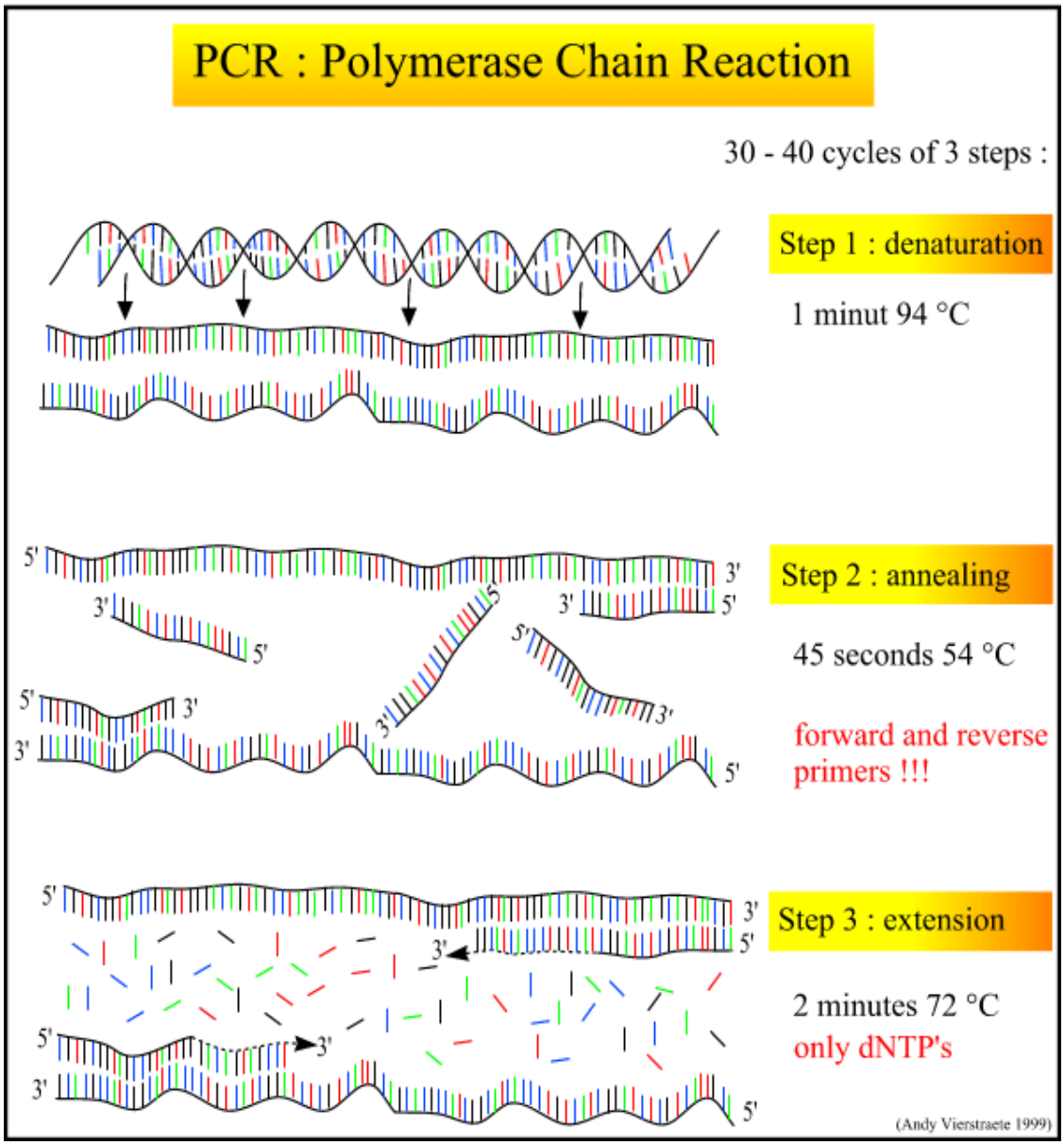
بعد بدء عملية النسخ تبدا الجديلة المزدوجة لل DNA بالتباعد والانفتاح لينتج خيطان مفردان من نفس الجين الاصلي .

2- مرحلة الالتئام Annealing عند درجة 54 ◦C

يبدا البرايمر Primers بالاهتزاز والاقتراب من القالب Template حيث يكون هذا الاهتزاز على شكل حركة بروانية Brownian motionحيث تبدا اصرة ايونية بالتكوين بين الشريط المفرد من البرايمر والقالب ,وهنا يعمل انزيم البوليميريز على بدء النسخ للقالب لتكوين نسخ جديدة كثيرة, ان الاصرة الايونية بين البرايمر والقالب تكون قوية جدا بحيث يصعب تفككها في درجات الحرارة الاعتيادية .

3-التمدد Extensionعند درجة 72 ◦ C

تعتبر هذ الدرجة هي الدرجة المثالية لعمل انزيم البوليميريز حيث تبدا هنا القواعد النيتروجينية بالإضافة بواسطة البوليميريز (اضافة المتمم للقالبComplementary to the template) وبهذه الطريقة تبدا اشرطة الDNA بالتضاعف والتزايد الاسي حيث تتضاعف من شريط واحد (القالب Template)الى شريطين ثم اربعة ثم ثمانية اشرطة وهكذا.



تضاف المواد الكيمياوية التالية الى العينة وحسب الكميات المذكورة في الجدول:-

المادة الكيمياوية	الحجم
Master mix	12.5 µl
DNA	4 µl
Forward primer	1.5 µl
Revers primer	1.5 µl
Deionizer D.W.	5.5 µl
Total	25 µl

يضبط مراحل وعدد دورات جهاز Thermo cycler حسب الجدول الاتي :

Stage 1	Stage 2	Annealing	Extension	
95◦	95◦	54◦	70 ◦	70◦
5 min	30 sec	1 min	1 min	7 min

35 cycle