تفاعل البوليمراز المتسلسل
Polymerase chain reaction(PCR)

قسم علوم الحياة - المرحلة الثالثة
د. هبة عباس جاسم

علم الوراثة الجزيئي العملي
المختبر الرابع 2019-2020

Reference المصادر

1- McPherson, M. and Møller, S., 2006. *Pcr*. Taylor & Francis.

2- McPherson, M.J., Quirke, P. and Taylor, G.R. eds., 1991. *PCR: a practical approach* (pp. 171-186). Oxford–New York–Tokyo: IRL Press at Oxford University Press

3- Innis, M.A., Gelfand, D.H., Sninsky, J.J. and White, T.J. eds., 2012. *PCR protocols: a guide to methods and applications*. Academic press.

4- عبيدة، علي ابراهيم و محمود ، احمد عبد الفتاح (2012) اساسيات التقنية الحيوية . مكتبة لمعارف الحديثة.

5- الخفاجي، زهرة محمود (2008) التقنية الحيوية الميكروبية

DNA generation

Primer

DNA polymerase

DNA template

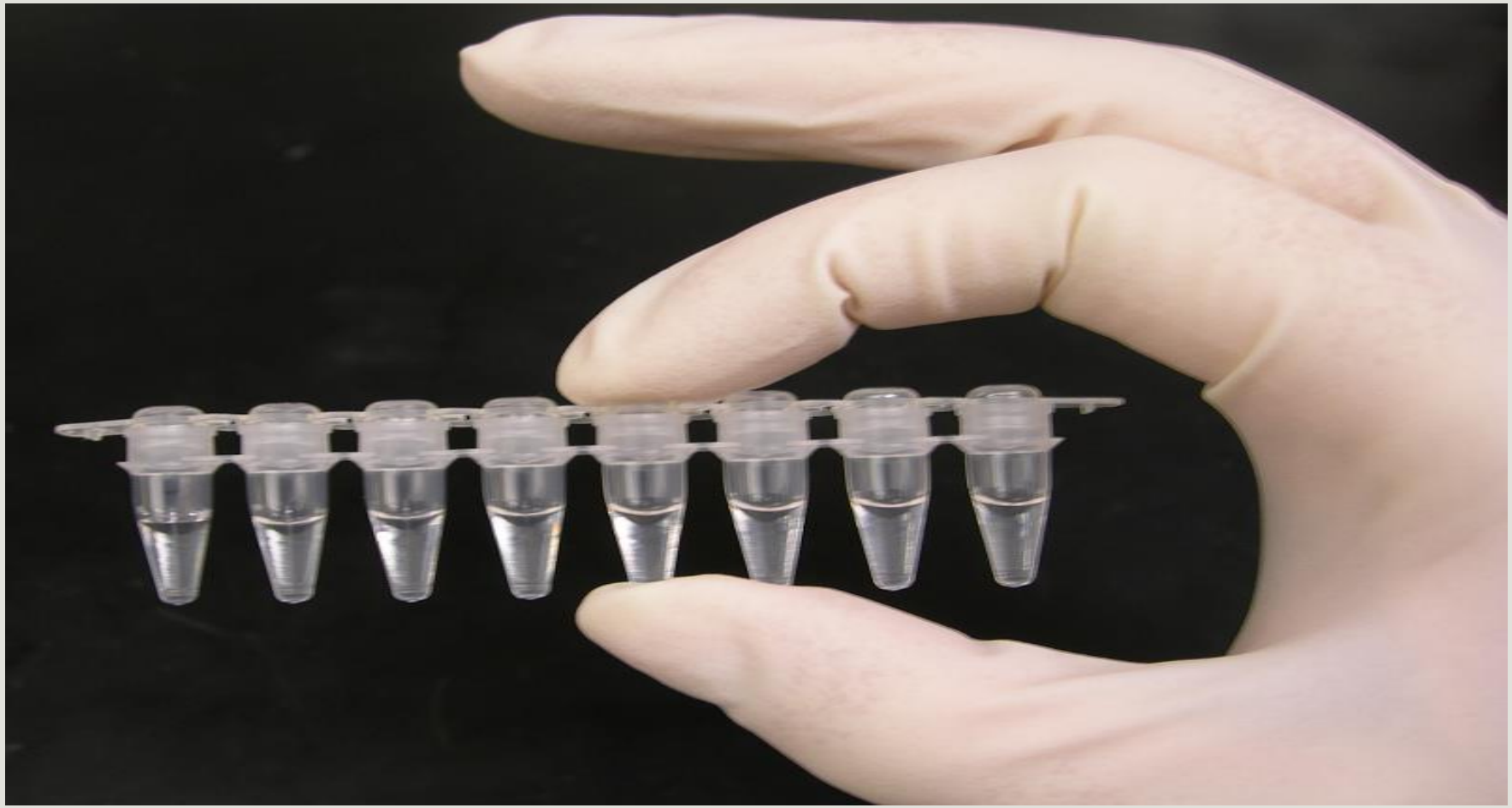
Buffers

Mg+2 , KCl

DNA contents (dNTPs)

dCTP
dGTP
dATP
dTTP

طرق القياس و الاجهزة المستخدمة



تقدير الاحماض النووية Nucleic acid quantitation

يعد تقدير الحامض النووي في العينة عملية مهمة لتحديد مقدار تركيز الـ DNAو RNA في العينة ودرجة نقاوته حيث تعتمد على هذه العملية الكثير من الفحوصات والتفاعلات الخاصة بالـ DNA مثل جهازPCR ، هناك العديد من الطرق المستعملة لقياس DNA في العينة منها:

1- جهاز الطيف الضوئيspectrophotometer

2- جهازNanodrop

لا يختلف الجهازين الا في حجم العينة المطلوبة للقياس ، واساس عملها هو قياس الامتصاصية للعينة على طول موجي 260-280 نانوميتر (A260) وتقدير تركيز الـDNA من خلال معلومات ثابتة وهي ان O.D. A260=1 تشير الى ان تركيز الدنا النقي dsDNA = 50ng/µL وبالتالي يمكن استخراج تركيز الدنا من خلال المعادلة التالية:

50ng/ µL × DNA Concentration (ng/µL) = A260 reading

اما حاصل الدنا لكل عينة DNA yield يمكن حسابه من المعادلة التالية:

DNA yield (ng) = DNA concentration(ng/ µL) × total sample volume (µL)

جهاز Nanodrop

يعتبر قياس الحامض النووي DNAاو RNA في هذا الجهاز عملية سهلة وسريعة اضافة الى انها تكشف لنا عن نسبة الخطأ

المحتمل وجودها في العينة حيث ان القراءات القياسية للحامض النووي هي كالاتي:

DNA =~ 1.8 ng/µL

RNA =~ 2.0 ng/µL

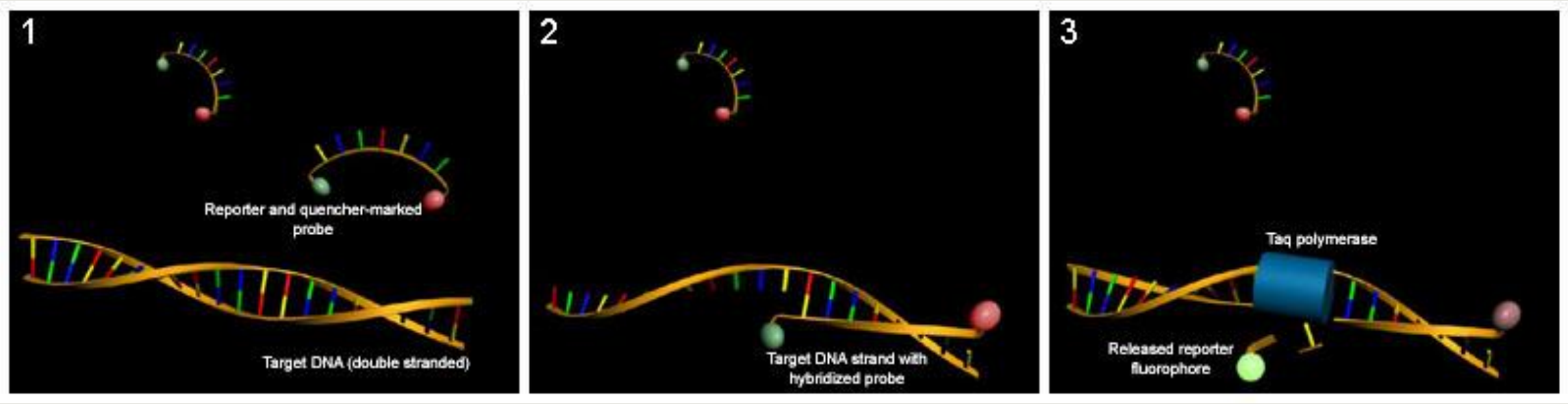
اما القراءات التي تختلف عن هذه النسب فهي دلالة على وجود تلوث في العينة، اي ان العينة لازالت حاوية على البروتين او

بعض المواد الاخرى .

جهاز الدورة الحرارية Thermocycler:

وهو جهاز للتحكم في درجات حرارة التفاعل بشكل دقيق ومتتالي ، حيث يقوم هذا الجهاز بتغيير درجة الحرارة بشكل سريع، لان تغيير درجة الحرارة هو الاساس الذي تقوم عليه تقنية الـ PCR (انفكاك، التحام ، اطالة) كما ذكرنا في المحاضرة السابقة. ترتفع درجة حرارة غطاء الجهاز الى 105 مْ، يحتوي الجهاز thermal blocks متكون من 48 او 96 حفرة .

أنواع الـPCR

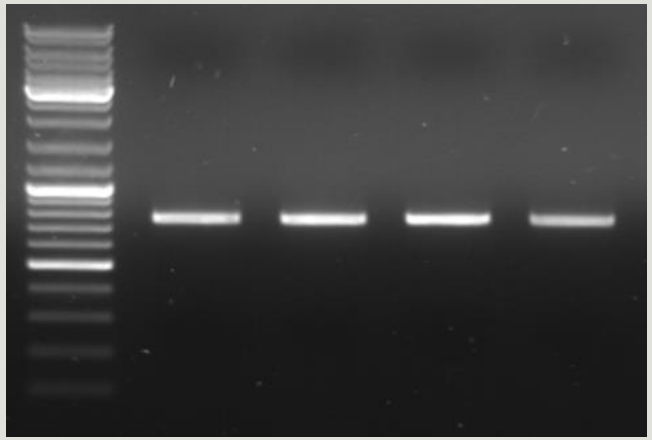


1. الطريقة القياسية Standard PCR:

وهي الطريقة الاكثر شيوعا من حيث الاستعمال ، حيث يتم تضخيم قطع تتراوح بين 100-1000 قاعدة نتروجينية .

تحتاج العملية الى معلومات حول التوالي sequences المراد تضخيمها (تضاعفها) لغرض تصميم البوادئ. تعتمد

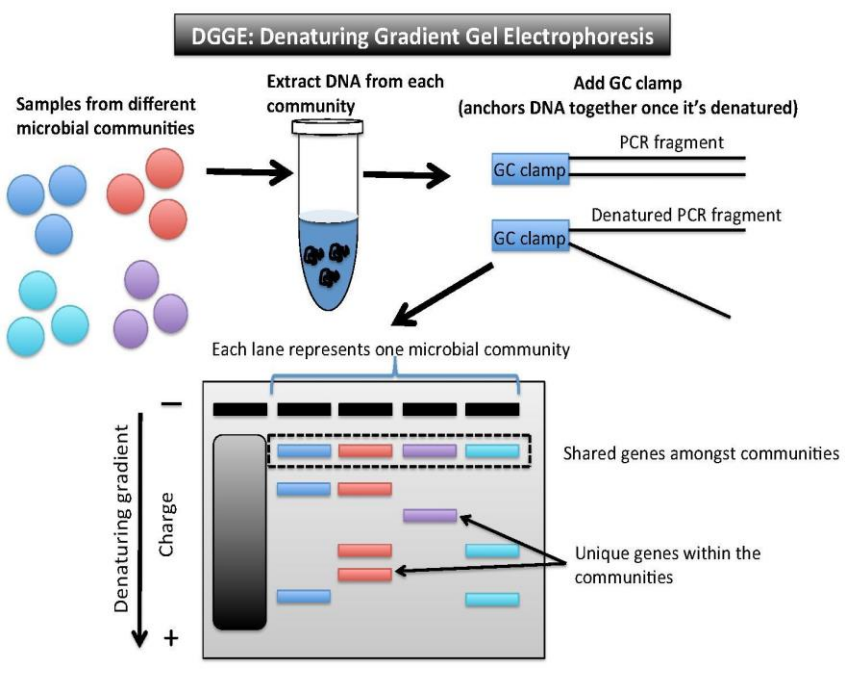
طريقة التحليل على النواتج النهائية End-point products وذلك بفصلها على الهلام باستخدام الترحيل الكهربائي.



الترحيل الكهربائي في هلام الاكاروز Agarose Gel electrophoresis

تقنية الترحيل الكهربائي تستخدم لعزل المواد حسب معدل حركتها تحت تأثير المجال الكهربائي

يستعمل الجل المكون من مادة الاكاروز، حيث يتم تحليل الحمض النووي اعتمادا على تسليط مجال كهربائي (قطب موجب وقطب سالب) لتحريكه حيث ان الـDNA ذو شحنة سالبة لذا فيبدأ الحمض النووي بالانتقال من القطب السالب الى القطب الموجب. وهذا يكون تحت عدة عوامل منها:



1- قوة فرق الجهد The applied voltage

2- تركيز الاكاروز The concentration

3- حجم قطعة الحمض النووي The molecular size of DNA

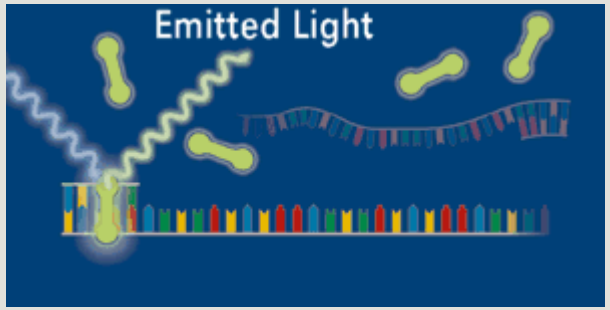
الحمض النووي غير مرئي في الهلام لهذا يتم صبغه بمادة ترتبط به قبل وضع العينات في الجل ومن امثلتها مادة الاثيديوم بروماید (مادة مسرطنة) التي تتألق عند تعرضها للأشعة فوق البنفسجية. كما يجب استخدام الواسمات الوزنية المرافقة Ladder لمقارنة الوزن الجزئي للعينة.

طريقة الكوثرة الكمية Quantitative PCR (qPCR)

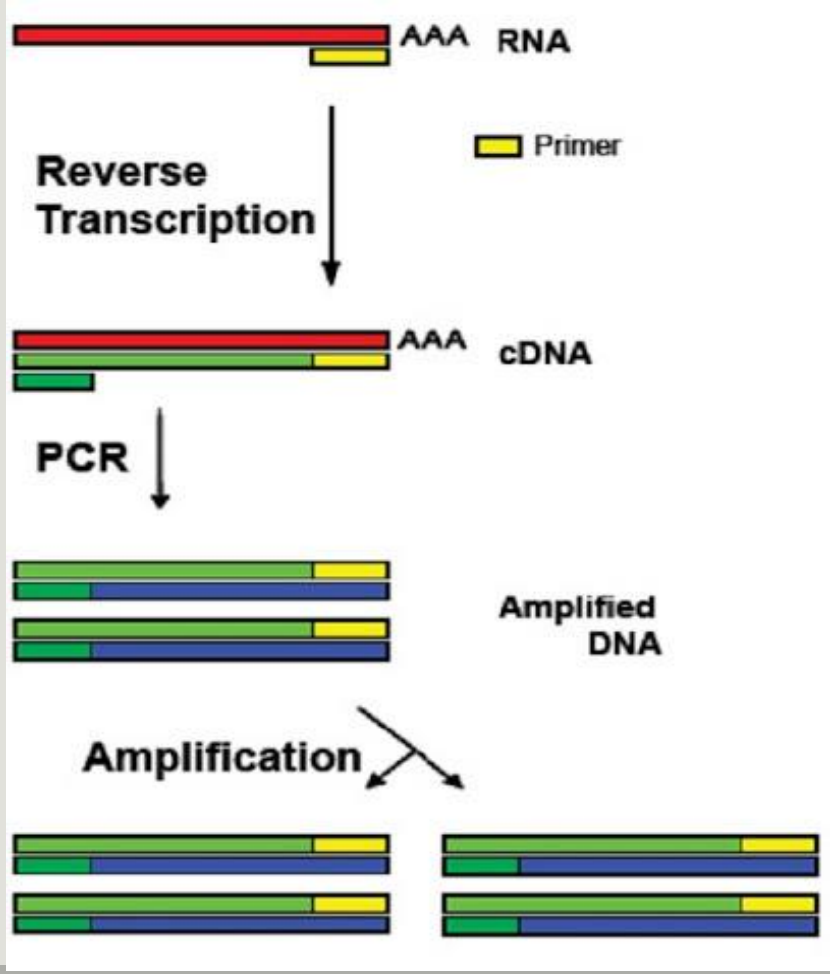
كما تسمى تفاعل البلمرة المتسلسل(الوقت الحقيقي) Real-Time PCR: هو تفاعل تضاعف وتزايد في اعداد نسخ قطع DNAالهدف مع وجود كاميرا او كاشف(الصبغات المشعة) يدون ويرصد هذه العمليات لأجل اعطاء تقرير مفصل عن عدد الدورات ومايقابلها من تزايد وتضخم لنسخ الجين الهدف .هناك العديد من الطرق التي نستطيع من خلالها متابعة ورصد تضاعف الـ DNAفي العينة اذ تستعمل المعلمات المشعة (fluorescent marker) للارتباط مع DNA المتضاعف وكلما زادت اشرطة DNA المنسوخة زاد استعمال الصبغة المشعة. لذلك تعتبر استعمال هذه التقنية مفيد جدا بسبب القدرة على مشاهدة عمليات التضاعف والاستغناء عن عملية ترحيل ال DNA في الاكاروز. وهو يشمل عدة انواع:

أ- الكشف غير المتخصص Non-specific detection مثل SyBr®green

ب- الكشف المتخصص Specific detection مثل Taqman probe



النسخ العكسي Reverse transcriptase-PCR:



في بعض تطبيقات الـPCR لا يكون القالب البادئ DNA بل قد يكون RNA. حيث ان يتم الكشف عن التعبير الجيني من خلال تصنيع complementary DNA(cDNA) مستنسخ من شريط الRNA، وذلك باستخدام انزيم reverse transcriptase. بعد ذلك يتم قياس نسبة الDNA باستخدام الترحيل الكهربائي او الـqPCR.

منحنى تضاعف الـ DNA اطوار التفاعل Amplification Curve

1. **طور البدأ Initiation phase**: في بداية التفاعل تكون المواد موجودة بوفرة كافية ما عدا DNA القوالب والنواتج، لا تظهر فيه زيادة في المنحنى الى بعد عشر دورات من التضاعف.

2. **طور التزايدي Exponential phase**:وفيه يحصل تضاعف لجزيئة الـDNA القالب والنواتج التي تتراكم. حيث ان مواد التفاعل تكون متواجدة بوفرة.

3. **طور الركود Plateau phase**: حيث تقل سمة الزيادة وقد يصل معدل التضخيم الى الصفر نتيجة انخفاض كمية dNTPsوالايونات و قلة كمية الانزيم مقارنة بعدد الاشرطة ، لتغير بيئة التفاعل، وهي تمثل النواتج التي يتم الكشف عنها بالترحيل الكهربائي او الطرق الاخرى للقياس.

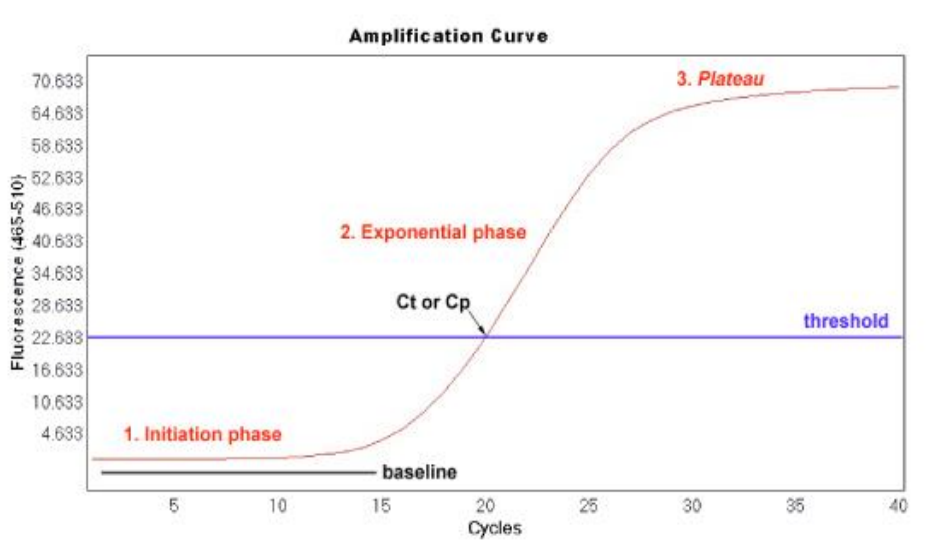
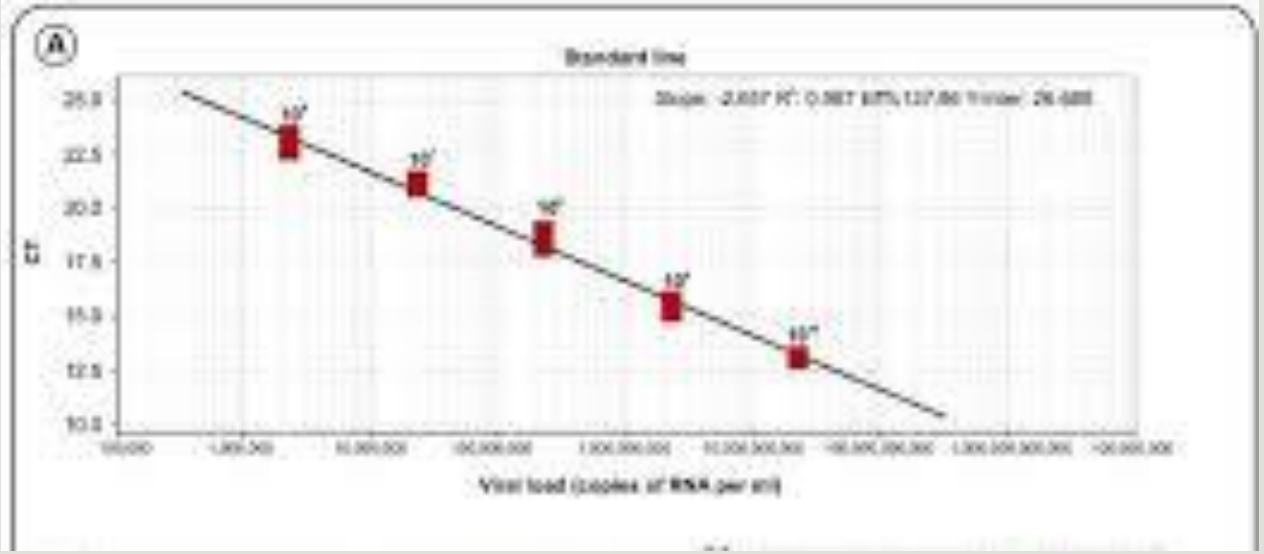


Figure 11. Phases of a PCR amplification curve. Blue: amplification curve of a positive sample. Red: negative control.

طرق تحديد كمية DNAالمتضخم بطريقة qPCR

1. Absolute Quantification: وهي استعمال منحنيات مرجعية reference curves التي تحضر بتراكيز محددة معروفة وتجري عليها القياسات. تستعمل كمرجع لمعرفة كمية جزيئات الهدف غير معروفة التركيز. وهي تشمل

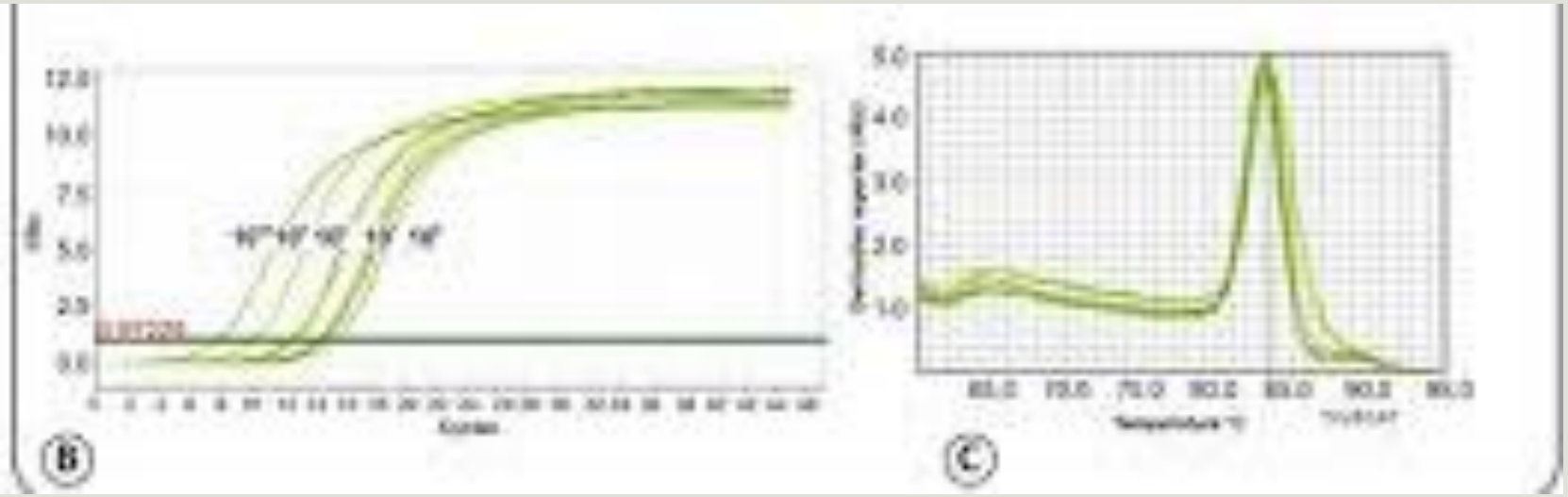


أ- شريط RNA

ب- اشرطة مزدوجة dsDNA

ت- جزيئات cDNA

ث- اشرطة دنا مفردة ssDNA

سرعة تضخيم السلسلة

1. Relative Quantificarion: طريقة النقطة الفاصلة Threshold cycle (Ct) وهي النقطة (عدد الدورات) التي يكون فيها التالق المنبعث من النواتج اكبر من الخلفية ويصبح بالامكان قياسها وهي النقطة المسؤولة عن دقة تقدير الكميات. حيث تعتمد على المقارنة لنماذج الدراسة مع منحنيات السيطرة المستعملة فيها نماذج غير معاملة وهناك معادلات خاصة لحسابها وتصحح عادة بالاعتماد على جينات الادامة Housekeeping genes.