تفاعل البوليمراز المتسلسل
Polymerase chain reaction(PCR)

قسم علوم الحياة - المرحلة الثالثة
د. هبة عباس جاسم

علم الوراثة الجزيئي العملي
المختبر الثالث 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.

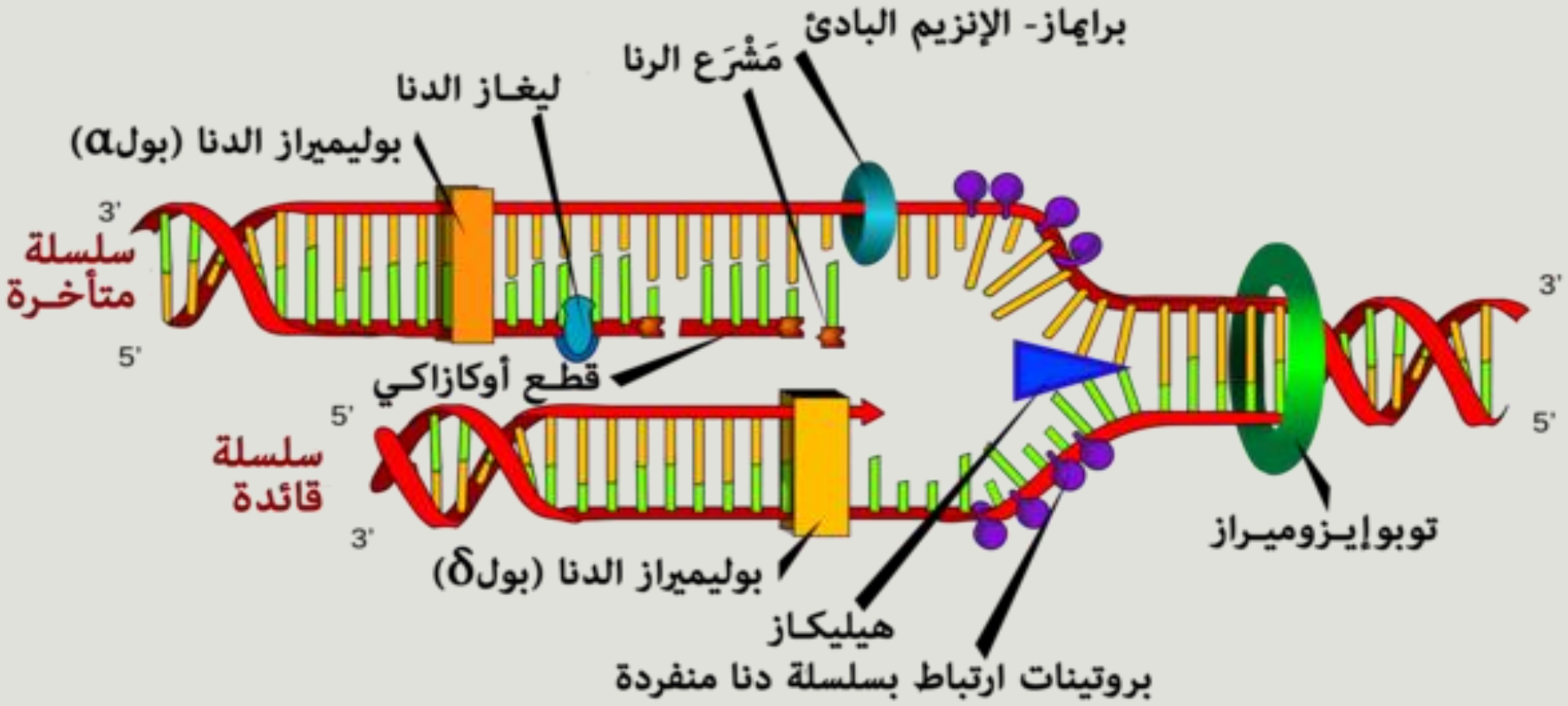
4- عبيدة، علي ابراهيم و محمود ، احمد عبد الفتاح (2012) اساسيات التقنية الحيوية . مكتبة لمعارف الحديثة.

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

تضاعف الحمض النووي DNA Replication

تحفظ المعلومات الوراثية و انتاج المواد لصنع الخلايا في داخل الحمض النووي (DNA)، حيثو تقوم الخلية بمضاعفة كمية الحمض النووي وقت 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 تحدث في الخلية في وقت التكاثر والانقسام فقط .

مع 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 . إلى أن توصل العالم كري مولس Kary Mullis في عام 1983 الى اختراعه لتقنية تفاعل البوليمراز المتسلسل Polymerase chain reaction(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) وسرعة في الإنتاج ولكن كان من عيوب هذه التقنية عدم وجود نظام إصلاح أخطاء الارتباط الخاطئ miss match.


برايماز- الإنزيم البادئ
مَشْرَع الرنا
ليغاز الدنا
بوليميراز الدنا (بولα)
3'
سلسلة متأخرة
5'
قطع أوكازاكي
5'
سلسلة قائدة
3'
بوليميراز الدنا (بولδ)
هيليكاز
بروتينات ارتباط بسلسلة دنا منفردة
توبوإيزوميراز
3'
5'

تفاعل البوليمراز المتسلسل Polymerase (PCR) chain reaction

تهدف تقنية ال PCR الى تضخيم جزيئات قليلة من الحمض النووي DNA، بعد استخلاصه من خلايا او سوائل الجسم وبالتالي الحصول على كميات كبيرة منه بحيث يمكن اجراء التحليل عليها.

تعتبر تقنية الـPCR ترجمة مبسطة لعملية استنساخ الحمض النووي الـ DNA اثناء الانقسام الخلوي (لكن هذا الاستنساخ يتم خارج الجسم ، حيث يتم السيطرة على البيئة الخارجية للكائن الحي) ولكي يتم هذا الاستنساخ لابد من توفر مواد معينة تساعد على ذلك وهي:

1. جزء صغير من الحمض النووي يعمل كنموذج template لتصنيع شريط الحمض النووي الجديدة.

2. البادئات Primers: هي عبارة عن نيوكليوتيدات قليلة Oligonucleotides(18-20) bp، قادرة على الارتباط مع الحمض النووي المراد تضخيمه.

---

3. كميات وافرة من النيوكليوتيدات ثلاثية الفوسفات منقوصة الاوكسجين Deoxynuleoside triphosphates (dNTPs) مثل (dATP, dGTP, dCTP, dTTP).

4. انزيمات البلمرة Polymearase وهي انزيمات مقاومة للحرارة

5. محاليل منظمة Buffers مثل Tris-HCl (pH6.8-8.3).

6. ايونات مناسبة اهمها KCl التي تساعد في عملية الالتحام البادئات مع الشريط النموذج، و المغنيسيوم Mg^{+2} التي تعتبر عامل متمم Cofactor لانزيم البلمرة.

يعتمد ال PCR على التبادل المتناوب لطبيعة جزيئات الـDNA الثنائية على التفكيك-التحام ، كذلك يعتمد على القدرة على تركيب Oligonucleoteide كبادئة و ارتباطها مع سلسة الـ DNAبوجود dNTPs وانزيم البلمرة.

اساسيات عمل الـ PCR Principle of

تتم تفاعلات PCR في جهاز يسمى Thermal cycler، تتكرر هذه التفاعلات عدة مرات تسمى كل مجموعة من هذه التفاعلات بـ(دورة التفاعلات Cycle reactions) قد يصل عدد هذه الدورات الى 20-40 دورة تفاعل. في كل دورة تجري ثلاث انواع من التفاعلات وهي الانفكاك Denaturation الالتحام Annealing و الاستطالة Extension اضافة الى درجة الحرارة والوقت التي تعتمد على درجة حرارة اذابة البادئة Melting temperature (TM)، انزيم البلمرة، النيوكليوتيدات dNTPs و تركيز الايونات.

خطوة التهيئة Initiation step

غالبا تستخدم درجة حرارة 94-96 °C لمدة 10 دقائق لتنشيط انزيمات البلمرة قبل البدأ بعملية التضاعف.

التفاعل الاول (الانفكاك) Denaturation

في هذا التفاعل يتم فصل الشريط الدنا المزدوج ds-DNA الى جزئين منفصلين ss-DNA عن طريق كسر الاواصر الهيدروجينة ، حيث يتم فك شريط الدنا على درجة حرارة 96– 94°C لمدة 30- 60 ثانية.

التفاعل الثاني (الالتحام) Annealing

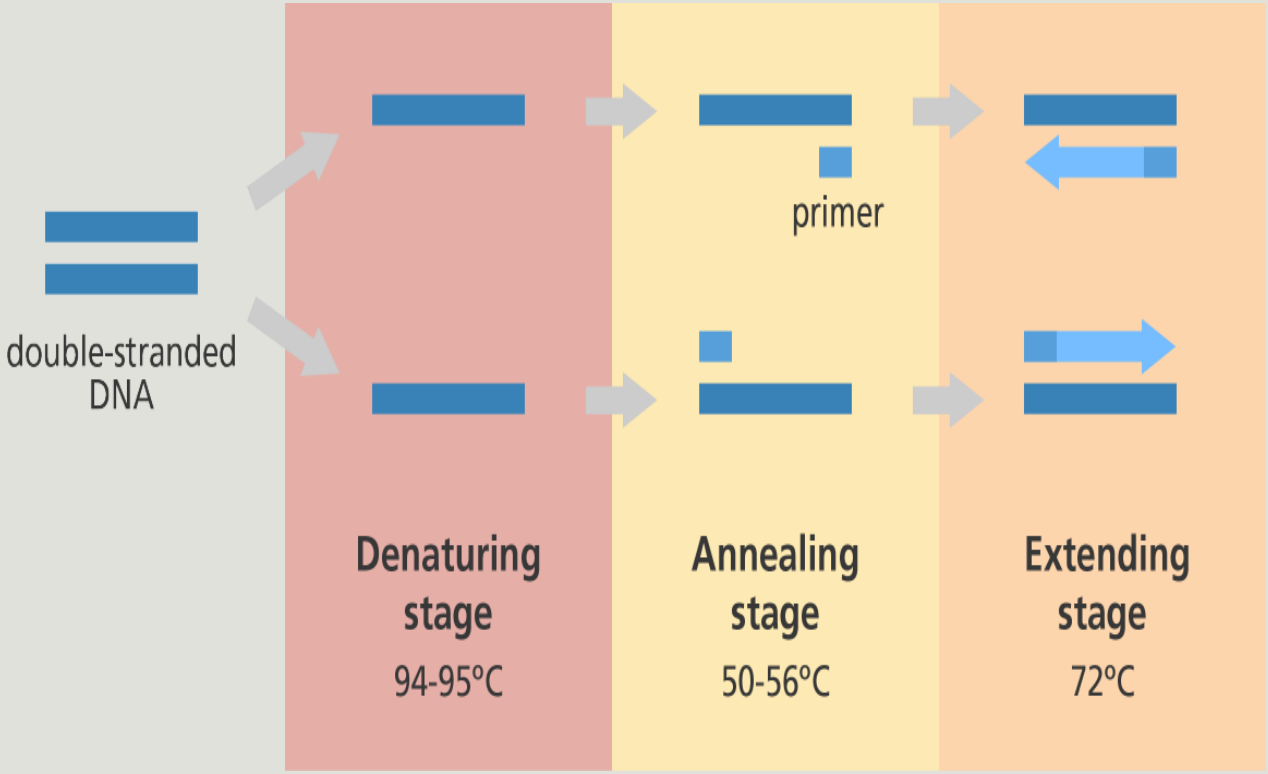
حيث يتم ارتباط كلا البادئتين مع الجزئين المنفصلين لشريط الدنا المراد تضخيمه عند درجة حرارة

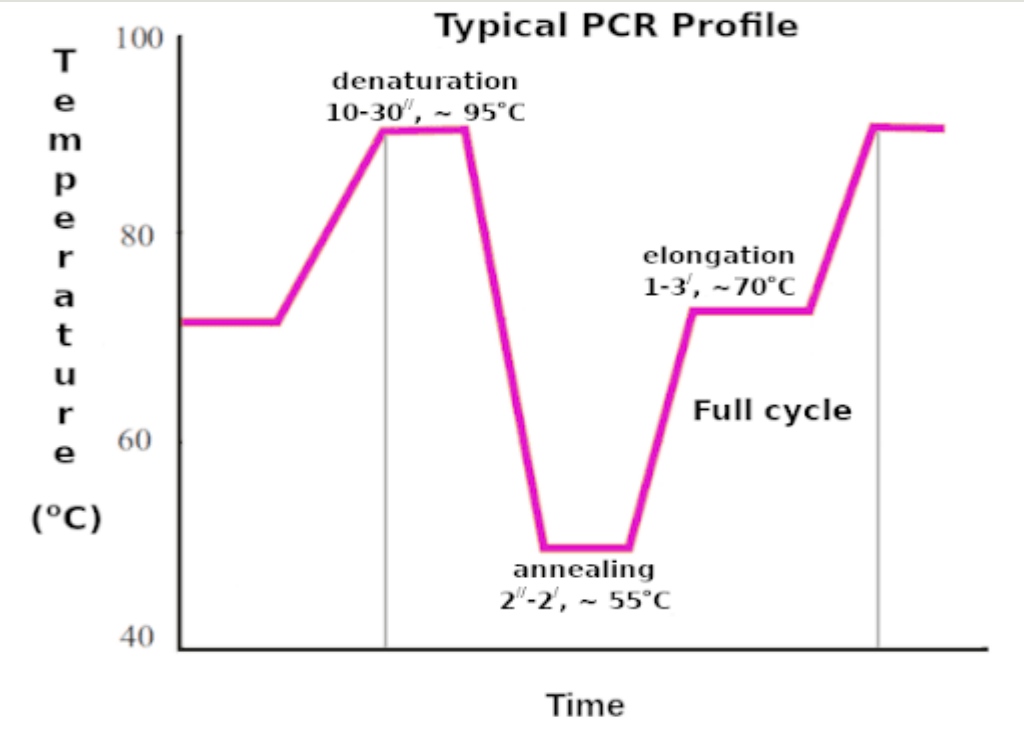
65-50 °C لمدة 20-40 ثانية.

التفاعل الثالث (الاستطالة) Extension

في هذا التفاعل يتم تطاول البادئات الملتحمة مع شريط الدنا المفرد بمساعدة انزيم البلمرة وذلك باضافة dNTPsابتداءا من البادئة وفي الاتجاه 3´ -5´. يتم هذا التفاعل تحت درجة حرارة 75-80 °C .

الوقت اللازم للاستطالة يعتمد على انزيم البلمرة، طول قطعة الدنا المراد تضاعفها.


double-stranded DNA
primer
Denaturing stage
94-95°C
Annealing stage
50-56°C
Extending stage
72°C


Typical PCR Profile
Temperature (°C)
100
80
60
40
denaturation
10-30//, ~ 95°C
elongation
1-3/, ~70°C
Full cycle
annealing
2//-2/, ~ 55°C
Time

سرعة تضخيم السلسلة

في كل دورة عدد نسخ السلاسلة بين مواقع مبادئ القراءة تكون مضاعفة، لذا تزداد السلسلة تصاعديا حوالي مليون ضعف بعد 20 دورة تضاعف ، وهكذا في كل مرة يتم مضاعفة كمية من الدنا التي بدأ بها التفاعل كمتوالية هندسية.

عامل التضخيم

يحسب عامل التضخيم من المعادلة التالية

$$A = n(1 + E)X$$

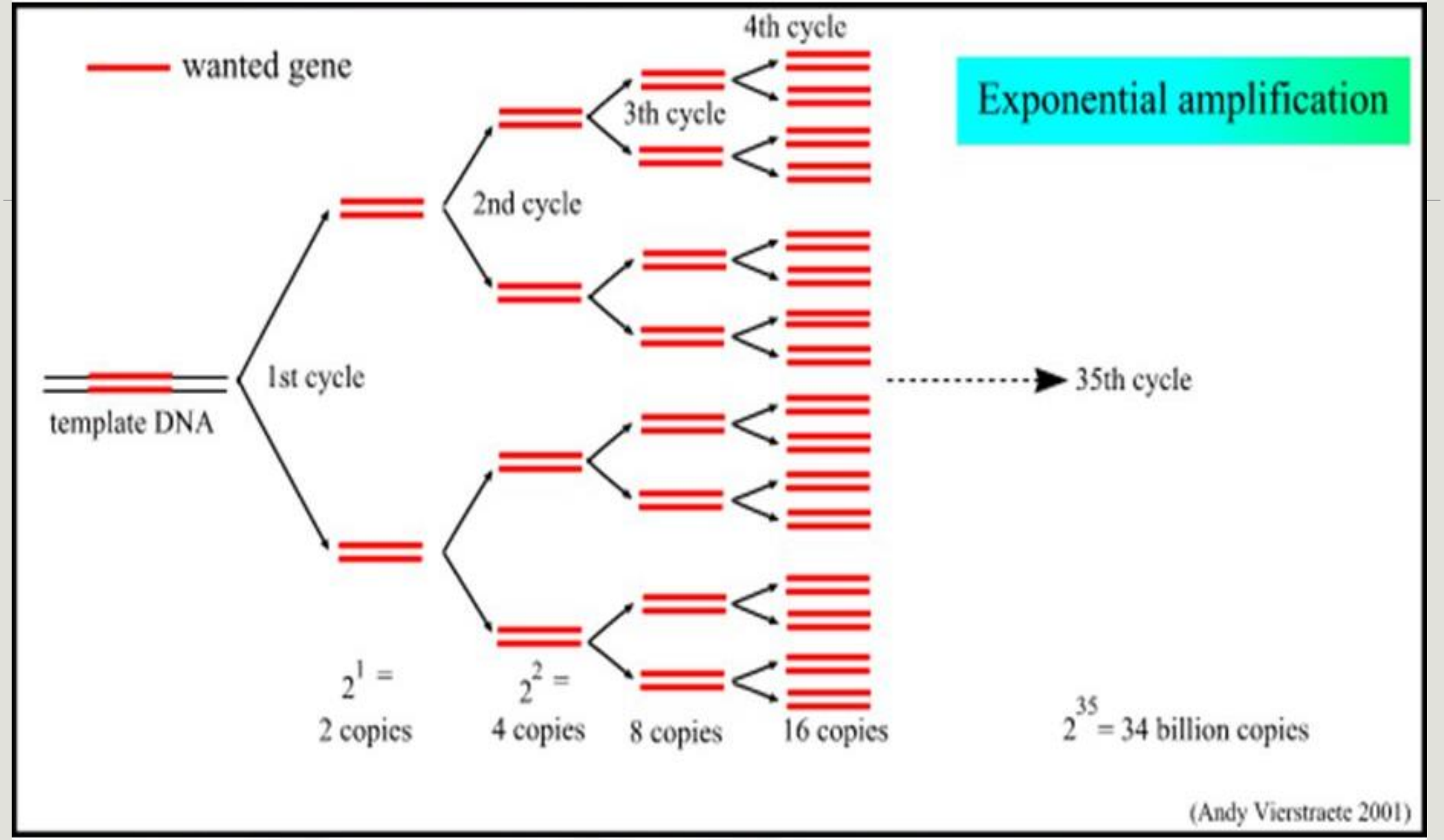
حيث ان :

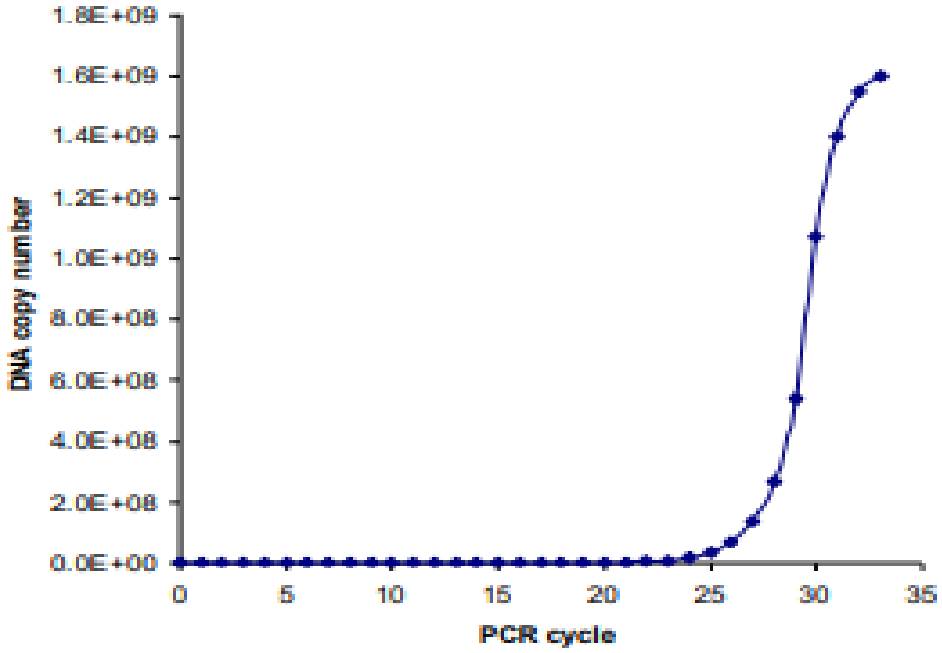
A= عامل التضخيم

n= الكمية المبدئية من الحامض النووي المستهدف

E= (Efficiency) فعالية التضخيم

X= عدد دورات الPCR


wanted gene
Exponential amplification
4th cycle
3th cycle
2nd cycle
1st cycle
template DNA
35th cycle
2^1 =
2 copies
2^2 =
4 copies
8 copies
16 copies
2^{35} = 34 billion copies
(Andy Vierstraete 2001)

CYCLE NUMBER	DNA copy number
0	1
1	2
2	4
3	8
4	16
5	32
6	64
7	128
8	256
9	512
10	1,024
11	2,048
12	4,096
13	8,192
14	16,384
15	32,768
16	65,536
17	131,072
18	262,144
19	524,288
20	1,048,576
21	2,097,152
22	4,194,304
23	8,388,608
24	16,777,216
25	33,554,432
26	67,108,864
27	134,217,728
28	268,435,456
29	536,870,912
30	1,073,741,824
31	1,400,000,000
32	1,500,000,000
33	1,550,000,000
34	1,580,000,000

Copies of DNA=2^N