

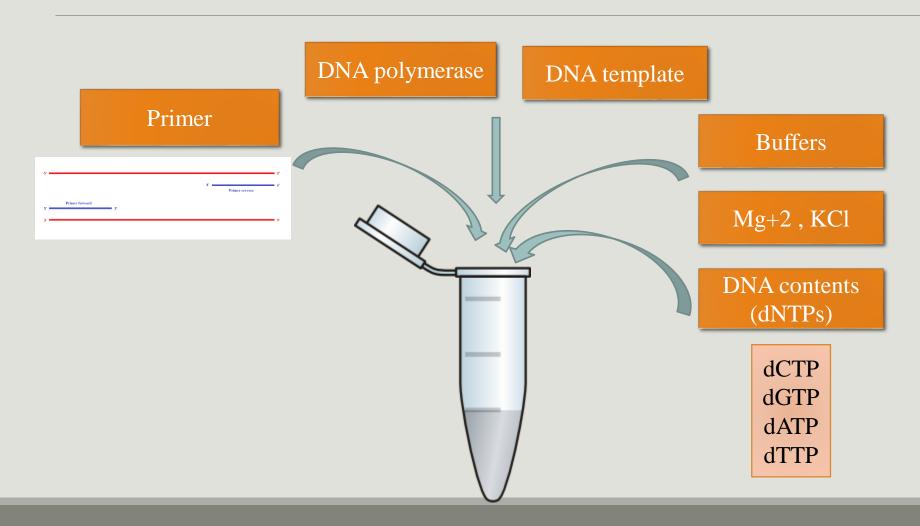
### المصادر Reference

- 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 الحدبثة.

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

### متطلبات تقنية تفاعل البوليميراز المتسلسل PCR Requirements







#### 1.قالب الحمض النووي DNA template

او ما يسمى الحمض النووي الهدف target DNA، وهو جزء صغير من الحمض النووي يعمل كنموذج template التصنيع شريط الحمض النووي الجديدة. حيث يكون بشكل

أ- شريط مزدوج ، ولكي يتم فك ارتباط denaturation الشريطين يتم رفع درجة الحرارة 94-96 م 30-60 ثانية.

ب- يجب استخدام 100- 500 نانوغرام من الحمض النووي الهدف، لتضخيم سلسلة مفردة خلال 20-30 دورة.

ت- يستخلص الحمض النووي من كائنات مختلفة ، لذا تحضير عينة DNA من خلايا او انسجة مختلفة يتطلب استخدام محللات Lysing للتخلص من الشوائب و اغشية الخلايا.



#### البادئPrimer

تحتاج عملية تضخيم الجين الى بوادئ Primersليتمكن الانزيم من بدء البناء والنسخ عليه، وهو عبارة عن قطعة صغيرة من الحمض النووي oligonucleotide.

#### تصميم البادئ:

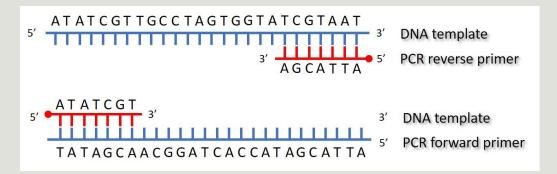
أ- طول البادئ Primer length: يتكون من 16-30 bp، وهو الطول المناسب للارتباط بسهولة مع الشريط القالب template.

ب- يحتوي البادئ على نهاية OH 3'OH التي تساعد على ربط البادئ مع القواعد النايتروجينية.



أ- كما يصمم البادئ ليرتبط مع بداية ونهاية قطعة الـDNA المراد تضخيمها. بما ان تقنية الـ PCR تضخم (تضاعف) كلا شريطى الـ DNA، لذا يجب تصميم بوادئ لكلا الشريطين. وهذه البوادئ هي:

- البادئ الامامي Forward primer: يرتبط مع الجزء الامامي من الجين المراد تضخيمه.
  - البادئ الرجعي Reverse primer: يرتبط مع الجزء المكمل للجين المراد تضخيمه.





# أ- درجة انصهار البادئ $T_{\rm m}$ ) Primer melting temperature درجة الحرارة 22-58 مْ افضل درجة حرارة لعمل البادئ.

- ب- درجة حرارة الالتحام (Annealing temperature (Ta): تعتمد درجة حرارة الالتحام على تركيب وطول البادئ. حيث يجب ان تكون Ta اقل 5مْ عن درجة حرارة انصهار البادئ.
- ت- محتوى GC: يجب ان يحتوي البادئ على القواعد النيتروجينة GC بنسبة 40-60 %. كما يجب تجنب استخدام ثلاث قواعد كوانين او سايتوسين في النهاية 3′ من البادئ.
  - ث- يجب ان يحتوي تقريبا اعداد متساوية من النيوكليوتيدات.



## Polymearase انزيمات البلمرة

وهي انزيمات تستخدم لبناء وترتيب القواعد النيتروجينية ، يجب ان يكون هذا الانزيم مقاوم للحرار العالية ليتمكن من العمل.

يعد Tag polymerase من الانزيمات المقاومة للحرارة العالية، نصف عمر الانزيم 40 دقيقة في 95 مْ.





#### :Nucleotides

النيوكليوتيدات ثلاثية الفوسفات منقوصة الاوكسجين Deoxynuleoside triphosphates (dNTPs) مثل

(dATP, dGTP, dCTP, dTTP). توجد بتراكيز ΔΑΤΡ, dGTP, dCTP, dTTP)، وينصح باستخدام 200 μM من كل نوع. يقوم

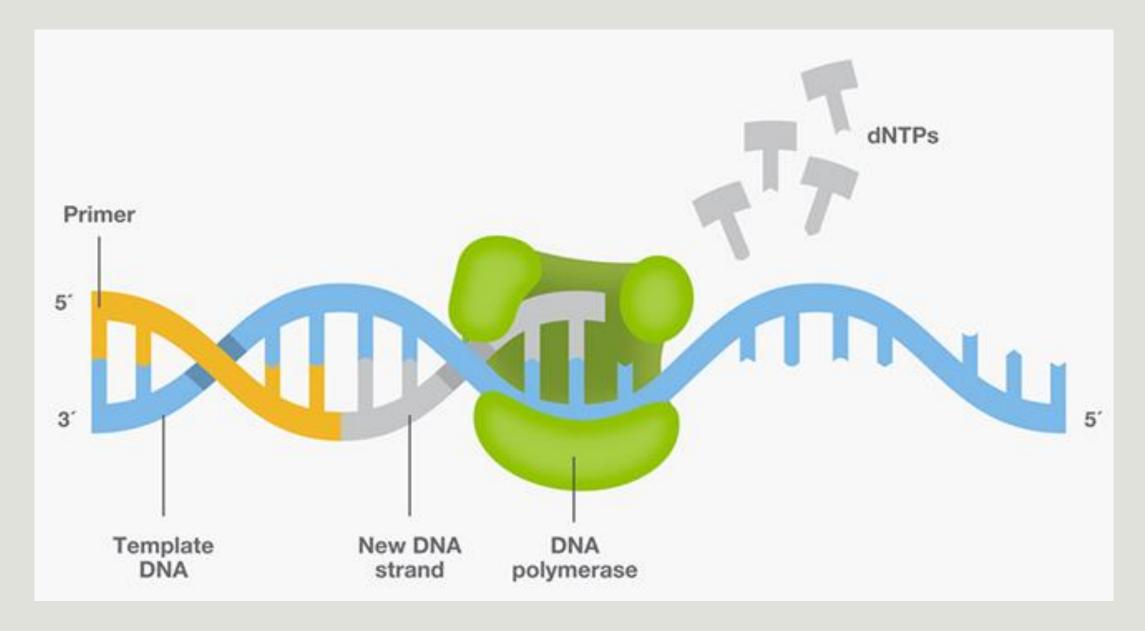
انزيم البلمرة بتحويلها الى DNA.



### محالیل التنظیم Buffers

- أ- KCl يساعد على تحفيز التحام البادئ مع القالب primer-template annealing.
- ب- +Mg<sup>2</sup>: يعتبر من اهم الايونات في تقنية PCR. حيث يستعمل كعامل متمم cofactor لانزيم البلمرة. كما اظهرت افضل فعالية للانزيم عند توفر ما يقارب 1.2-1.3 mM ايون المغنيسيوم الحر. يستخدم ايوم المغنيسيوم بشكل MgCl<sub>2</sub>.
- ت- Tris-EDTA (TE) Buffer: يستخدم هذا المحلول المنظم في استخلاص الـDNA حيث يساعد على اذابة ال DNA ويث يساعد على اذابة ال RNA كما يحافظ عليها من التحلل. كما يستخدم كمحلول محلل lysis الغشاء الخلوي والنووي ويساعد على اعادة فعالية البادئات DNA primers.







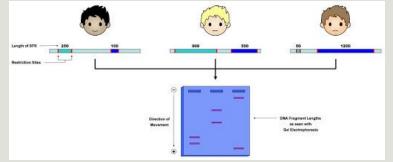
### Applications of PCR تطبيقات تقتية التفاعل البنائي (البوليميراز) التتابعي





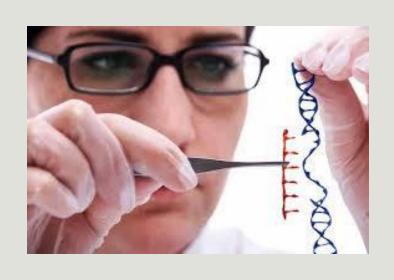
#### لتقنية الـ PCR استخدامات عديدة في مجال ابحاث الحمض النووي والوراثة ومنها:

1. الكشف عن الطفرات الوراثية: وذلك عن طريق وضع بادئ خاص للطفرة لاكقار الجين الخاص بها، ومنه نقوم بمعرفة المرض اذا كان على زوجي الكروموسومات او احداهما (Allele).



- 2. تحديد البصمة الواثية.
- 3. الكشف عن الفيروسات: وهي الوسيلة الادق في تحديد نوع وجنس الفيروس وكميته.
  - 4. تغيير نهايات الجين ليصبح متوافق مع انزيمات القطع Restriction enzymes.
- 5. تحديد تتابع القواعد النيتروجينية في الحمض النووي منقوص الاوكسجين DNA Sequencer.
- 6. اكثار الجين المراد ادخاله على البلازميد او الحمض النووي DNA المضيف وهو العنصر الاهم في عملية التجميع الجيني DNA.





- 1. معرفة طول الحمض النووي DNA.
- 2. تحديد الجين المطلوب من خليط من الجينات.
  - .Microarrays يستخدم في تقنية
- 4. في مشروع الخريطة الجينية Genome map.
  - 5. تهجين الاحماض النووية.
- . DNA-protein interaction بالبروتين DNA بالبروتين 6.



- 1. في مجال الطب الجنائي.
- 2. الكشف عن الامرض الوراثية كمعرفة الحاملين والمصابين والكشف عنها قبل ظهورها، والكشف عن الامراض عند الجنين اثناء الحمل.
  - 3 تشخيص الامراض السرطانية.
  - 4. تعيين الانماط النسيجية في مجال زراعة الاعضاء.
  - 5. في مجال الطب الشرعي (اختبار الابوة، تحديد الهوية .. الخ)

