Dr. ALI ABD SHARAD
& Msc. Almoghira K. Al-Qaysi

POLYMERASE CHAIN REACTION (PCR)

محاضرة رقم (4)

Banasik, M., Stanisławska-Sachadyn, A. & Sachadyn, P. (2016). A simple modification of PCR thermal profile applied to evade persisting contamination. *Journal Application Genetics*, **57,** 409–415.

Jami Al-Ahmadi, G., and Zahmatkesh Roodsari, R. (2016). Fast and specific detection of Pseudomonas Aeruginosa from other pseudomonas species by PCR. *Annals of burns and fire disasters*, *29*(4), 264–267.

Dr. ALI ABD SHARAD
& Msc. Almoghira K. Al-Qaysi

تفاعل إنزيم البلمرة التسلسلي

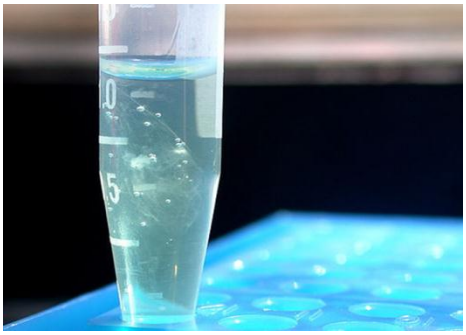
مكتشف تقنية الـ PCR كانت فكرة بواسطة عالم كيميائي تتضمن فصل الحمض النووي DNA و صنع نسخ كثيره منه .. وفعلا تحققت هذه الفكرة المبدعة بواسطة العالم د. كري مولس Dr. Kerry Mullis في عام 1985 (و قد حصل على جائزة نوبل في الكيمياء عام 1993) خطرت بباله فكرة أن يفصل الحمض النووي DNA ويصنع منه نسخ كثيرة. وقام بنشر 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 وسرعة في الإنتاج ولكن كان من عيوب هذه التقنية عدم وجود نظام إصلاح أخطاء الارتباط الخاطئ miss match .

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.

ما هي متطلبات PCR

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



2- البادئات (Primers) :

نوعان :

- أمامي (Forward)
- خليف (Reverse)

وهي تسلسل من القواعد النيتروجينية في شريط واحد قصير (20-25 bp) مكمل لبداية الجزء المراد تضخيمه في الحمض النووي.

3- انزيم التفاعل (Taq polymerase) :

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 الحرارة المثلى له 72 ˚م.

4- القواعد النيتروجينية (Nitrogen Base dNTPs):

أدنين Adenine

ثايمين Thymine

جوانين Guanine

سايتوسين Cytosine

5- محلول منظم (PCR Buffer 10x)

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

6- ماء مقطر (DDW)

7- جهاز تفاعل البلمرة التسلسلي (Thermocycler) :

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

Dr. ALI ABD SHARAD
& Msc. Almoghira K. Al-Qaysi

خطوات تقنية PCR

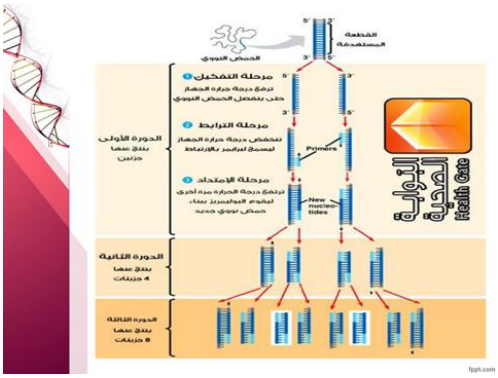
هناك ثلاث مراحل في الدرورة الواحدة

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

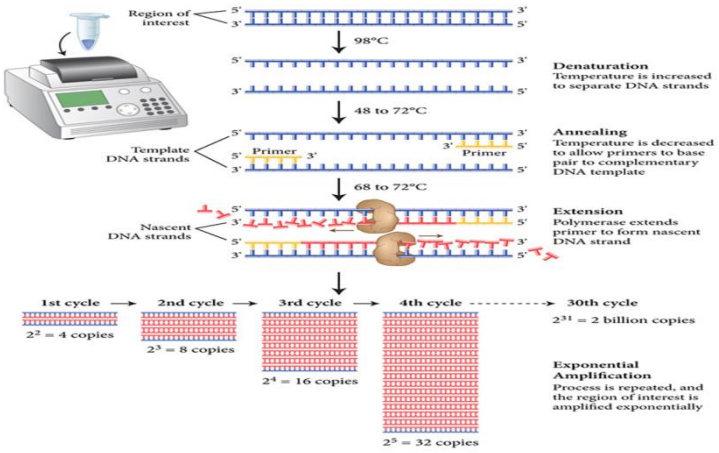
2- مرحلة الالتصاق annealing : إنزال الحرارة إلى ما بين 55-60ْم ليقوم البريمر بالالتصاق فيزيائياً بواسطة الروابط الهيدروجينية مع الحمض النووي (DNA) الأصل .

3- مرحلة الامتداد extension : ثم يقوم برفع درجة الحرارة إلى 75ْم ليقوم البولمريز 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).



Dr. ALI ABD SHARAD
& Msc. Almoghira K. Al-Qaysi



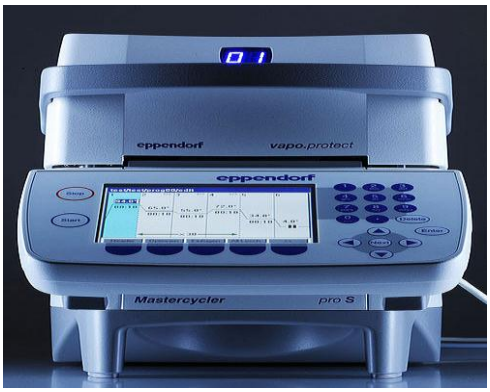
خطوات تقنية PCR

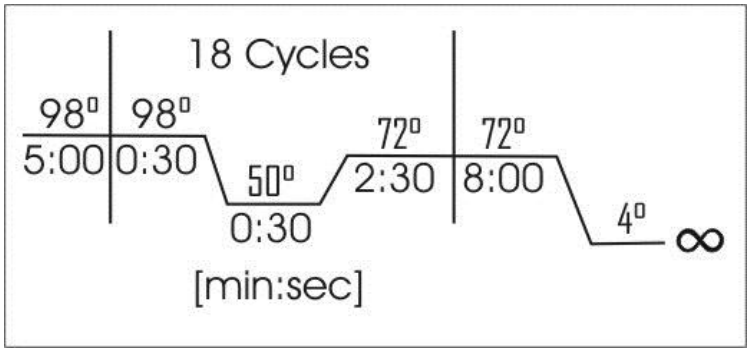
نضيف 23 مايكرو ليتر من المزيج الرئيسي على كل أنبوب من أنابيب PCR ثم نضيف 2 مايكرو ليتر من عينه الدنا (DNA)، نضع جميع الأنابيب في جهاز الطرد المركزي 3000 دورة في الدقيقة لمدة دقيقه واحدة لخلط جميع العينات وإزالة جميع الفقاعات..

	المكونات	الكمية بالمايكروليتر (X ١)
١	ماء مقطر (d.H2O)	١٧
٢	محلول منظم (PCR buffer 10x)	2.5
٣	خليط القواعد النتروجنية (dNTPs)	2
٤	بادئ أمامي (forward Primer)	0.6
٥	بادئ خلفي أو عكسي (reverse primer)	0.6
٦	إنزيم عديد البلمرة (Taq polymerase)	0.3
٧	عينة التفاعل (DNA sample)	2
	المجموع الكلي بالمايكروليتر µl	25

الخطوات	درجة الحرارة	الوقت	التفاعل
١	98°c	5:00	تنشيط الأنزيم والتهيئة لمرحة تفكيك الحمض النووي DNA
٢	98 °c	0:30	مرحلة التفكيك
٣	50°c	0:30	مرحلة الإلتصاق (درجة البادئ)
٤	72 °c	2:30	مرحلة الإمتداد
٥	إعادة الخطوة رقم ٢ الى ٤ لـ 18 - 20 دورة		
٦	72°c	8:00	ضمان اكتما مرحلة الإمتداد وإعادة التصاق الشريطين مع بعضهما واكمال عدد الدورات للنسخ
٧	4°c	∞	حفظ العينة

Dr. ALI ABD SHARAD
& Msc. Almoghira K. Al-Qaysi





تطبيقات PCR

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

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 Sequence) .
7. معرفة طول الحمض النووي (DNA).
8. الحمض النووي (DNA) المكمل (cDNA)).
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 .

أنواع PCR

1. Qualitative PCR: وهو ما تم شرحه والتطرق اليه في الخطوات السابقة.
2. rtPCR: وهو اختصار لـ (or quantitative PCR or reverse transcriptase PCR Real Time PCR) : وهذا النوع يقوم على نفس المبدأ ولكن الخلاف الوحيد يكون مرتبط 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