القسم: علوم الحياة المادة: بايولوجي جزيئي عملي عنوان المختبر: انواع PCR

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي جامعة الانبار كلية العلوم

المختبر السابع

انحداد مدرس مسانحد هاله مهدي حمد المحداد عدرس مسانحد عداد عدرس مسانحد العداد عدرس مسانحد هاله مهدي حمد

(Polymerase Chain Reaction) PCR تفاعل البوليميراز التسلسلي

الـPCR هو إكثاراكـ DNA في المخبر In vitro خارج النظام الحيوي (الخلية) In vivo

قبل عملية الإنقسام الخلوي تقوم الخلية بمضاعفة المادة الوراثية الـDNA بشكل تلقائي و سريع مع وجود نظام تصحيح للأخطاء خلال النسخ و تبلغ سرعة النسخ والمضاعفة إلى 1000 أساس آزوتي بالثانية، و مع التطور في مجال التقانة الحيوية والذي يقوم على التعامل مع الـ DNA بشكل أساسي استدعى ذلك العلماء أن يبحثوا عن طريقة أو تقنية تقوم على مضاعفة كمية الـDNA ، إلى أن توصل العالم كارى موليس Dr. Kerry Mullis في عام 1985 (حصل على جائزة نوبل في الكيمياء عام 1993) إلى تقنية تعتمد على استخدام أنزيم بلمرة مأخوذ من بكتريا Escherichia coli وإجراء عمليات تضاعف للـDNA في أنبوب، ومن أهم الأسباب التي ساعدت هذه التقنية على الانتشار عدم اعتمادها على النظام الحيوي (أي الخلية) و التحكم بكمية الـ DNA والسرعة في الإنتاج.

يمكن تعريف تفاعل الـPCR بأنه تضخيم Amplification لمنطقة محددة من الـDNA لا يكون طولها كبير جداً بحدود 500 زوج أساس ويدعى الناتج عن التفاعل بمنتَج PCR product) PCR بمنتَج الله عن التفاعل بمنتَج عن التفاعل بمنتَب عن التفاعل بمن التفاعل بمنتَب عن التفاعل بمن التفاعل بمنتَب عن التفاعل بمن ا

الطريقة القياسية Standard PCR

الطريقة الأكثر شيوعا من حيث الاستعمال ويتم تضخيم قطع تتراوح بين 100-1000 قاعدة نتروجينية ، وتضخيم قطع اكبر يلزمه أنواع خاصة من إنزيمات الكوثرة . وختاج العملية الى بعض المعلومات حول التوالي المراد تضخيمه لغرض تصميم البوادئ . وتستعمل في تضخيم الأشرطة المزدوجة او المفردة . وتعتمد طريقة التحليل عند استعمالها على النواتج النهائية End-point products وذلك بفصلها على الهلام او أي طريقة أخرى وبهذا فهي تعاني من بعض المشاكل التي سيرد ذكره في موقع آخر .

طريقة (AFLP PCR)

طريقة Amplified fragment length polymorphism PCR لها تطبيقات عدة والطريقة حساسة جدا وتعتمد على تفاعل الكوثرة لتحديث التغيرات في جزيئة DNA لذلك تستعمل في التنميط الجيني Genotyping للأشخاص لتحديد العديد من المواقع Loci باستعمال عدد قليـل مـن تفـاعلات PCR . وملخـص الطريقـة ان جزيئـات DNA الخلوي يتم تقطيعها بإنزيم قاطع واحد او أكثر والتى يفضل ان تكون مواقع تعرفها او تمييزها Restriction sites مكونة من أربعة قواعد نتروجينية مثل MseI ويمكن استعمال إنزيمات قاطعة أخرى لها مواقع تعرف اوتمييز مكونة من ست قواعد نتروجينية مثل EcoRI ثم تربط القطع الناجّة من الهضم الى مكيفات Adaptors أو وصلات Linkers ثم إجراء تفاعل PCR أولى الذي يحتوي على بوادئ ملائمة للارتباط بالقطع الموصلة بجزيئات DNA (لتؤدي الى تضخيمها) ، ثم تفصل المتضخمات Amplicons على الهلام وإظهار الحزم.

Alu PCR

طريقة تستعمل لتضخيم تواليات Alu sequences) من الجينوم البشري والثديبات القريبة منه . وبهذا التفاعل يتم تحديد المواقع الجينومية المحاطة بتواليات Alu توالثديبات القريبة منه . وبهذا التفاعل يتم تحديد المواقع الجينومية أي تحديد البصمة التساعد في تحديد التغايرات والطفرات في الجينات قيد الدراسة أي تحديد البصمة الوراثية Fingerprinting من DNA غير معروف . وقد طورت الطريقة لتعتمد على التحديد الكمي كما في استعمال RT-PCR (الذي سيأتي ذكره لاحقا) باستعمال صبغات SYBR الحساسة لكميات صغيرة بين مدى بيكوغرام — نانوغرام لتوفر فرص جيدة في العمل الجنائي .

تفاعل الكوثرة غير المتناظر Asymmetric PCR

يهدف التفاعل الى تضخيم شريط واحد من DNA الأصلي أكثر من الشريط الثاني لأغراض عدة مثل تحديد تواليات معينة او تهجين الجسات Probe hybridization ، ويجري التفاعل مثل مثل ما هو في تفاعل الكوثرة القياسي عدا إضافة تراكيز عالية من بادئ الشريط المراد تضخيمه ، وبذا تكون عملية التضخيم بطيئة وتحتاج الى عدد إضافي من الدورات .

الكوثرة الخاصة بالأليلات Allele specific PCR

تفاعل يتخصص بتحديد الصور او الأليلات المختلفة للجينات ويستعمل في التشخيص والكلونة وتحديد SNPs ويكون معتمدا على تصميم بواديء متخصصة جدا Allele والكلونة وقديد (ASO) specific oligonucleotide (Digonucleotide) التي تلتحم مع التوالي الذي يلائمها او يكملها تماما وعند وجود حالة عدم تلاؤم Mismatch ولو في قاعدة واحدة فان ذلك سيمنع التهجين او الارتباط تحت الظروف الملائمة.

ويستعمل التفاعل لتحديد التغاير في نيوكليوتيد واحد Single nucleotide (SNP) بنا التفاعل التعمل بواديء خاصة بالتغاير الذي تكون النهاية ' 3 من البادئ حاوية على التغاير (SNP) ، وهذا يعني الحاجة الى معرفة سابقة بتوالي DNA الذي يشمل الفروق بين الأليلات وبذا يمكن في هذه الحالة الرجوع قواعد البيانات الخاصة بها .

تفاعلات الكوثرة التجميعية Assembly PCR

ختلف أهداف هذه الطريقة عن عموم الاستعمال وذلك لانها تستعمل لتخليق تواليات طويلة من DNA أي قطع صناعية خارج الأنظمة الحية وتكون البوادئ في هذه الطريقة هي جزيئات DNA القالب نفسه و تستعمل هذه الطريقة لبناء الجينات التي يكون طولها عادة اكبر من الطول الذي يمكن إنتاجه بتفاعل PCR الاعتيادي حيث يتم تضخيم أجزاء منفصلة من الجين نفسه ومن ثم جعل نهايات نواتج تفاعل PCR ذات قابلية للتكامل مع بعضها ومن ثم جمع سوية بتفاعل الكوثرة التجميعية للحصول أخيرا على جين كامل الطول ويمكن عندها استخدامه في عمليات الكلونة.

تفاعلات الكوثرة التجميعية Assembly PCR

قتلف أهداف هذه الطريقة عن عموم الاستعمال وذلك لانها تستعمل لتخليق تواليات طويلة من DNA أي قطع صناعية خارج الأنظمة الحية وتكون البوادئ في هذه الطريقة هي جزيئات DNA القالب نفسه و تستعمل هذه الطريقة لبناء الجينات التي يكون طولها عادة اكبر من الطول الذي يمكن إنتاجه بتفاعل PCR الاعتيادي حيث يتم تضخيم أجزاء منفصلة من الجين نفسه ومن ثم جعل نهايات نواتج تفاعل PCR ذات قابلية للتكامل مع بعضها ومن ثم قمع سوية بتفاعل الكوثرة التجميعية للحصول أخيرا على جين كامل الطول ويمكن عندها استخدامه في عمليات الكلونة.

تفاعل الكوثرة العكسي Inverse PCR

إحدى التحويرات لعملية الكوثرة الاعتيادية ، ولكن يتم تضخيم المناطق الحيطة بمنطقة معروفة . وتشمل العملية عدد من خطوات الهضم بالإنزيات القاطعة . والقطع المعروفة التوالي قد تكون مقحمات Inserts وهذا يسهل معرفة المناطق غير المعروفة التى استقرت فيها .

تفاعل كوثرة المستعمرة Colony PCR

تفاعلات تجري على مستعمرات البكتريا الخاصة التي تكون قد تعرضت لعمليات تغير وراثي مثل إجراء عمليات التحول الوراثي اليوراثي Genetic transformation ، أي إجراء مسح للتحري عن المستعمرات التي التقطت الجين او الصفة ، وفيها يتم تعليق الخلايا المأخوذة من مستعمرات مختلفة كل على حدة في محلول لتحليل الخلايا او تعرض الى درجات حرارية عالية لتكسير الخلايا وانطلاق DNA منها .

تفاعل الكوثرة الموضعي In situ PCR

تفاعل كوثرة يتم داخل الخلايا او الأنسجة المثبتة على وسائل صلدة مثل الشرائح الزجاجية ، ويمكن ان يتم بشكل مباشر على DNA وبشكل غير مباشر على RNA بعد نسخه العكسى الى DNA .

وتفيد التقنية في الكشف عن الأمراض في بدايتها حيث تكون التغييرات في الكميات صغيرة جدا مقتصرة على تجمعات صغيرة من الخلايا او الأنسجة الأساسية في توليد الأمراض ، وذلك لان بعض الأمراض تكون بطيئة التطور وتحتاج الى شهور او سنين لتصبح واضحة سريريا . ومثل هذه الخلايا وكما وجد تكون غير فعالة من ناحية الانتساخ Transcription . وتستعمل طرق التهجين او تفاعلات الكوثرة او الاثنين معا لفحص التعبير وأيجاد الجين المتأثر أثناء حدوث المرض . ويتم عزل الحوامض النووية من مجموعة الخلايا او مجموعة ثانوية من الخلايا التي تحتوي على نسخ بعدد قليل (حتى ولو نسخة واحدة) ثم تضخم بتقنية تفاعل الكوثرة ، ثم يتم الكشف عن نواتج التضخيم .

تفاعلات كوثرة التواليات الداخلية InterSequence-Specific PCR تفاعلات كوثرة التواليات الداخلية

طرق تعمد الى تحدد البصمة الوراثية DNA fingerprinting المناطق البينية مثل المكررات الواقعة بين تواليات بسيطة Simple sequence repeat المناطق البينية مثل المكررات الواقعة بين تواليات بسيطة SSR) لإعطاء البصمة الوراثية للقطع المتضخمة ، وتكون وسيلة ملائمة للتصنيف التطوري لجينومات الأحياء مثل خلايا بدائية النواة ، فضلا عن استخدامها في التشخيص وتحديد النمط الجيني للأحياء الجهرية المرضة ، وتستخدم في تقنيات Alu – PCR

تفاعلات الكوثرة الطويلة Long PCR

طريقة استبدلت فيها قطعة Klenow التي تضخم بحدود 400 قاعدة بإنزيمات أخرى لتضخيم قطع من DNA طولها أكثر من 5 كيلوقاعدة وعادة تكون بحدود 10 كيلوقاعدة ، في هذه الحالة تؤخذ الاحتياطات لإنجاح التضخيم مثل استعمال إنزيمات كوثرة خاصة مثل polymerase او غيره من الإنزيمات التي لها القابلية على بناء قطع DNA اكبر من 5 كيلوقاعدة مثل F polymerase و FF polymerase و DNA و DNA و DNA و DNA لأغراض و مختلفة مثل بناء الجينات والتي لا تتمكن الطرق الاعتيادية من ققيقه .

تفاعل كوثرة المناطق المثيلة Methylation specific PCR

طريقة تستعمل لتضخيم المناطق التي تحصل فيها إضافة لجاميع المثيل مثل تشخيص جزر CpG في DNA الجينومي (gDNA) بدلا من استعمال الإنزيات الحساسة لوجود مجموعة المثيل وفيها تعامل جزيئات DNA القالب بمادة Na-bisulfite الذي يحول قواعد السايتوسين الخالية من المثيل الى يوراسيل . ثم يتم تصميم نوعين من البوادئ احدهما يضخم الجزيئات غير الحاوية على المثيل والأخرى تضخم الأهداف الحاوية على المثيل ، ثم خلل نواتج تفاعلات الكوثرة .

تفاعل الكوثرة المتعدد Multiplex PCR

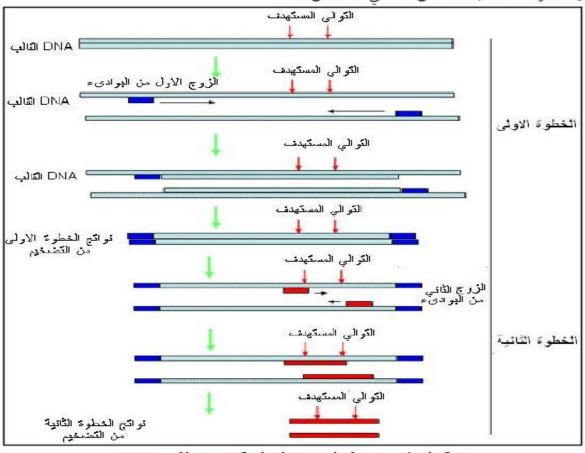
في هذه التقنية يتم تضخيم أكثر من هدف في تفاعل واحد لإنتاج قطع DNA مختلفة بإحجام مختلفة الخاصة بتواليات مختلفة (استهداف مجموعة من الجينات او أي تواليات أخرى). ويعتمد ثجاح التفاعل على البوادئ المصممة، ويفضل استعمال بادئ خاص لكل هدف مع التلاعب بدرجات حرارة الالتحام لتلاؤم كل بادئ والمتضخم الناتج عنه كي تعمل بشكل صحيح في تفاعل واحد ويجب ان تكون النواتج بإحجام مختلفة لإعطاء حزم واضحة عند الترحيل الكهربائي على الهلام او عند استعمال أي وسيلة إظهار أي

تفاعلات كوثرة النسخ العكسى Reverse transcription PCR تستعمل لغاية التعامل مع RNA لذلك يحول الأخير الى cDNA بإنزيم النسخ العكســى Reverse transcriptase فالتفاعل مكن ان يقسم الى مرحلتين الأولى تفاعل الشريط الأول وفيه يتم نسخ mRNA الى DNA باستعمال Oligo dT كبادئ والذي يرتبط الى poly A '3' الموجودة في المنطقة غير القابلة للترجمة UTR '3 من جزيئة mRNA والــتي تكون موجودة في معظم هذه الجزيئات ويكون الخليط حاويا على إنزيم النسخ العكسي و dNTPs وهذه تتم في دارئ خاص بإنزيم النسخ العكسي وتتم العملية في حوالي ساعة بدرجة حرارة 37° م . بعد ذلك يتم إضافة إنزيم RNase H الذي يهضــم جزيئـات RNA وبذا يفك RNA من مزدوجات RNA وبذا

Nested PCR تضخيم العنقدة

عملية تضخيم لجزيئة DNA تساعد في تقليل الخلفية الناجّة من التضخيم غير المتخصص لجزيئات DNA. والطريقة تشبه طريقة الكوثرة الاعتبادية ولكن يستعمل فيها زوجين من البوادئ لتكبير قطعة ما ويكون على خطوتين:

1- تضخيم قطعة معينة من جزيئة DNA بطول يتعدى الطول المستهدف في النهاية 2- تضخيم منطقة تقع ضمن المنطقة التي تم تضخيمها في الخطوة الأولى، وبدلك تكون نواتج التضخيم اقصر بما في الخطوة الأولى وختوي التوالي المستهدف فقط . لذلك فان كانت النواتج في الخطوة الأولى قد خمل أخطاء ، فمن المستبعد ان تكون الخطوة الثانية كذلك ، وبذا يكون تضخيم العنقدة عملية تضخيم متخصصة جدا . والعملية موضحة بالشكل التالى (شكل 4) .



شكل 4 : خطوات تفاعل كوثرة العنقدة

تفاعل الكوثرة العشوائي Arbitrarily primed PCR مناعل معالى الكوثرة يطلق عليه أيضا Arbitrarily primed PCR متستعمل الفيه بواديء عشوائية قصيرة والتي يمكن ان تضخم مواقع عدة في جزيئة DNA وقد أمكن تطوير عددا من الواسمات التي تستعمل الأغراض مختلفة نتيجة للدراسات ضمن حقل البايولوجي الجزيئي . يكون طول البوادئ المستعملة بحدود 10 قواعد في العادة وتضخم كميات بالنانوغرام من DNA الجينومي بدرجات حرارة التحام واطئة باستعمال تفاعل الكوثرة والتي يصبح بالإمكان فصلها وتصبيغها ببروميد الاثيديوم

طريقة الكوثرة الكمية qPCR) Quantitative PCR

يطلق عليها تسميات مختلفة RT-QPCR ، QRT-PCR ، RT-PCR ، RQ-PCR . و تستعمل الطريقة لقياس نواتج الكوثرة الآني Real Time – PCR (التي سيأتي ذكرها لاحقا) .

والأفضل فيها هو قياسها كميات البدء لجزيئات DNA او RNA او cDNA وتستعمل لعرفة فيما اذا كان توالي معين موجودا في النموذج وعدد نسخه. ويمكن ان تستعمل مع طريقة كوثرة النسخ العكسي Reverse transcriptase PCR كما ذكر آنفا. وتستعمل الطريقة في تضخيم وتحديد تواليات جزيئات DNA النادرة والغريبة.

تفاعل كوثرة الخلية المفردة Single cell PCR

تعمد الطريقة الى تضخيم الأهداف القليلة جدا كما في حالة المواد الوراثية الغريبة الموجودة في خلية مفردة . وعندها تتخذ الإجراءات اللازمة للتعامل مع هذه الكميات القليلة . تستعمل الطريقة في الفحوص قبل الولادة اذ يتم التحليل الوراثي باستعمال خلايا الجنين لتحديد الاضطرابات الوراثية المندلية على سبيل المثال ، وفي الوقت الحاضر تتوفر عدد خاصة للجينوم الكامل للخلايا المفردة .

تفاعل كوثرة الطور الصلب Solid – phase PCR

في هذه الحالة يعنى بتصميم البوادئ التي تكون تقييد على سطوح خاصة والمكملة لأهداف من DNA ذائبة وغير مقيدة وبعدها يتم إطالة البوادئ، وبذا تكون في التفاعل نوع من التقيدات ولكن مع هذا تجد تطبيقات مهمة مثلا في تصميم وصناعة رقائق DNA (DNA chips) DNA وكذلك في الكشف عن المرضات الميكروبية، وكذلك تستعمل في تشخيص الأمراض، ودراسة التنميط الجيني Genotyping والتعبير الجيني، وكذلك تستعمل في التعرف على الطفرات الـتي قد تكون تافهة Nonsense mutations او الطفرات الخاطئة Missense mutations، وقد يكون بالإمكان توسيع مدى استعمالات هذه الطريقة وفق الحاجة.

طريقــة الكــوثرة غــير المتنــاظرة الحراريــة Thermal asymmetric interlaced PCR (TAIL PCR)

طريقة تستعمل لعزل وتقدير المناطق غير المعروفة التي تخيط او تجنح Flanking توالي معروف وذلك بمساعدة أزواج من بواديء العنقدة وبدرجات حرارة التحام مختلفة . ويمكن استعمال البوادئ المشتتة Degenerated primers لتضخيم مناطق اتجاهات أخرى من التوالى غير المعروف .

طريقة كوثرة الهبوط TD-PCR) Touchdown PCR)

ويعني هنا الهبوط بدرجات حرارة الالتحام Annealing وهنالك نوع مشابه يسمى down PCR . وتمثل إحدى تفاعلات الكوثرة التقليدية والتي ترافقها بعض الأحيان ظهور نواتج غير متخصصة وبذلك فهي تؤثر في الخلفية غير المتخصصة . وتتم باستعمال درجات حرارة التحام أعلى من الدرجة المثلى (واقل من درجة حرارة الانصهار) ، في الدورات المبكرة ثم يتم تخفيض الحرارة درجة واحدة او اقل (عادة يتم خفض الحرارة بمقدار نصف درجة مئوية لكل دورة) لحين الوصول الى درجة حرارة الالتحام المناسبة والتي تبقى ثابتة لكل الدورات اللاحقة (وأحيانا تخفيض درجة حرارة الالتحام اقل من الحرارة المناسبة في دورات العشر الأخيرة للحصول على كمية منتج PCR كيرة ألا المرادة المناسبة في دورات العشر الأخيرة المحصول على كمية منتج PCR المؤمرة والمناسبة في دورات العشرة كيثرة من حزرة التراكم المؤمرة والمناسبة في دورات العشرة كيثرة من حزرة التراكم المؤمرة والمناسبة في دورات العشرة الأخيرة المحسول على كمية ومنت والمناسبة في دورات العشرة والمناسبة والمناسبة في دورات العشرة والمناسبة والمناسبة والمناسبة في دورات العشرة والمناسبة والمناسبة والمناسبة والمناسبة في دورات العشرة والمناسبة والمناسبة والمناسبة والمناسبة والمناسبة والمناسبة في دورات العشرة والمناسبة والمناسبة والمناسبة والمناسبة والمناسبة والمناسبة في دورات العشرة والمناسبة وليا والمناسبة والمن

المناسبة والتي تبقى ثابتة لكل الدورات اللاحقة (وأحيانا تخفض درجة حرارة الالتحام اقل من الحرارة المناسبة في دورات العشر الأخيرة للحصول على كمية منتج PCR كبيرة). لذلك تسمح هذه الطريقة بعمل نسخ كثيرة من جزيئات DNA المرغوبة عن طريق السماح للبواديء للارتباط بمناطق DNA الأكثر تكاملا معها فقط في الدورات الأولى من تفاعل الكوثرة.

كوثرة المناطق المتغايرة VNTR-PCR

يتم فيها تضخيم مناطق خاصة مثل VNTR او STRs لتحديد البصمة الوراثية للأحياء وبناء قواعد بيانات مثل CODIS . التي تستعمل عادة في الأغراض الجنائية ، ويستخدم mtDNA بشكل أساسي ، ويتم البحث عادة عن STRs التي تقارن بالمراجع الموجودة في قواعد البيانات ، ويمكن ان تستبدل عند الحاجة بمصادر أخرى مثل كروموسوم الجنس Y او غيرها من المصادر للمقارنة .

أهم تطبيقات الـ PCR

لتقنية PCR تطبيقات كثيرة في مجال أبحاث الحمض النووي DNA و الوراثة ومنها:

1- التقنية الأهم في عملية تأشيب الـDNA حيث نقوم بتكثير الجين المراد إدخالها ضمن البلاسيمد أو الحمض النووي (DNA) المضيف

- 2- استخدامه في تغير نهايات الجين لتصبح متوافقة مع إنزيمات القطع
 - 3- تحديد تتابع الأسس الأزوتية في الحمض النووي
 - 4- معرفة طول الحمض النووي DNA
- الكشف عن الفيروسات وهذه الطريقة هي الأدق في تحديد نوع وجنس الفيروس وكميته
- 6- في مجال الطب الشرعي (اختبار الأمومة ، حالات الاغتصاب ، تحديد الهوية ... الخ).
- 8- الكشف عن الأمراض الوراثية كمعرفة الحاملين والمصابين بها قبل ظهور الاعراض والعلامات
 - وكذلك الكشف عنها عند الجنين أثناء الحمل

المصادر

- الخفاجي, زهرة محمود وابو المعالي, حسن محمود تفاعلات الكوثرة وتصميم البوادئ 2013. وزارة التعليم العالي والبحث العلمي جامعة بغداد معهد الهندسة الوراثية والتقنيات الحيوية للدراسات العليا
- العجوري, رنا بيولوجيا 2019 جامعة الشام الخاصة كلية الصيدلة