التفاعل المتسلسل بانزيم البلمرة
Polymerase Chain Reaction (PCR)

الجزء العملي

المحاضرة السادسة

د. اسامة انور سعيد

قسم الانتاج الحيواني - جامعة الانبار

- الهدف من المحاضرة
- في نهاية المحاضرة سوف يتعلم الطالب
- متطلبات التفاعل المتسلسل بانزيم البلمرة.
- خطوات التفاعل المتسلسل بانزيم البلمرة ..

- تعد تقنية التفاعل المتسلسل بانزيم البلمرة من اهم التقنيات في علم الحياة الجزيئي الحديث. ابتكرت هذه التقنية في منتصف الثمانينات واحدثت ثورة هائلة في تجارب الاستنسال وتشكيل التوليفات الجديدة من Recombined DNA Technology DNA.
- ابتكرت هذه التقنية من قبل العالم الامريكي Kary Mullis عام ١٩٨٣.
- تهدف هذه التقنية الى مضاعفة قطعة من جزيئة DNA خارج الخلية لمرات عديدة حتى تصبح في نهاية التفاعل باعداد كبيرة وتسمى Amplification.
- كل جزيئة تتكون من هذه التفاعلات سوف تصبح هي ايضا قالبا لجزيئة اخرى يتم بنائها لاحقا.

متطلبات تقنية PCR

تتطلب العديد من الاجراءات والتي تكون مشابه متطلبات مضاعفة DNA في خلايا الكائن الحي.

١. **القالب Template:** يتمثل في DNA المراد تضخيمة وهذا التضخيم لايشمل على القالب باكملة وانما جزء منه وهذا يسمى بالجزء المستهدف.

٢. **البادئ Primer:** يتمثل بقطعة صغيرة من DNA بشريط مفرد يكون مكملا في تتابعاته للقواعد النايتروجينية على طرفي الجزء المستهدف، وهي ضرورية للشروع بتضاعف DNA. يتطلب تحضير Primer معرفة بعض تتبعات القواعد النايتروجينية على طرفي الجزء المستهدف من القالب. تتراوح اطوال Primer المستخدمة في PCR مابين ٢٠ – ٣٠ قاعدة نايتروجينية.

٣. **انزيم DNA polymerase:** وهو اساسي في هذه التقنية اذ يحفز عملية التضاعف وبالتالي عملية تضخيم DNA. ينبغي ان يكون هذا الانزيم مقاوم لدرجات الحرارة. يعد انزيم Polymerase Taq المستخلص من بكتريا *Thermus aquacticus* من اكثر الانواع استخداما.

٤. **النيوكليوتيدات:** يتم تجهيزها على شكل نيوكليوسيدات ثلاثي الفوسفات منقوصة الاوكسجين deoxynucleosides triphosphate (dNTPs) وبانواعها الاربعة التي تدخل في بناء DNA.

٥. **المحاليل المنظمة وملح كلوريد المغنسيوم ($MgCl_2$):** هناك العديد من المحاليل المستخدمة في هذه التقنية مع Polymerase Taq منها المحلول المنظم (Tris – HCl).

٦. تقنية التفاعل المتسلسل بانزيم البلمرة تحتاج الى جهاز يقوم تنظيم الحرارة وبرمجتها في ضوء مراحل التفاعل المختلفة وعبر كل دورة يسمى جهاز التدوير الحراري Thermocyclor.

خطوات التفاعل

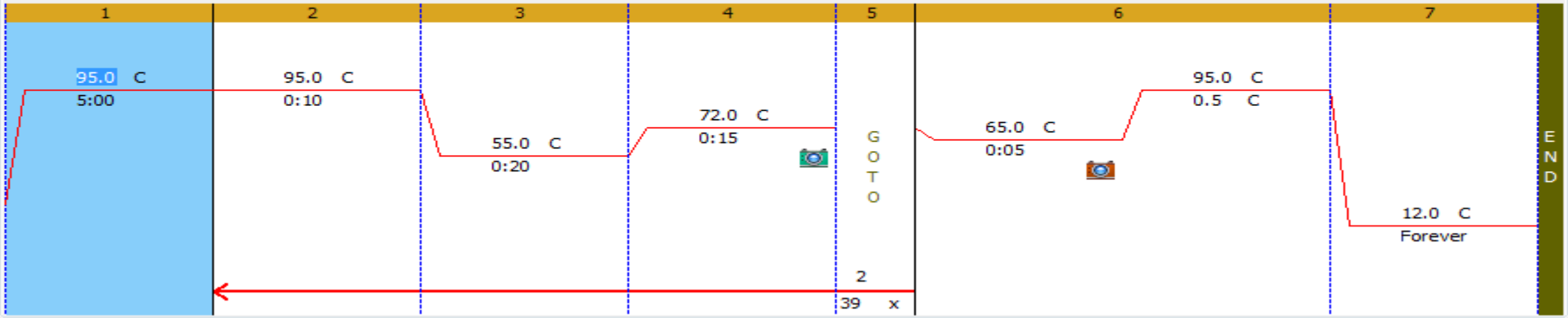
١. **الدنترة:** هي الخطوة الاولى التي يتم صهر جزيئة DNA اي فصل الاشرطة المزدوجة وابعادها عن بعضها وذلك برفع حرارة التفاعل الى ٩٠ م او اكثر بقليل لحوالي دقيقتين.

٢. **ارتباط البوادئ**: تتم بخفض درجة الحرارة الى ٥٠ – ٦٠ م تؤدي الى تكوين اواصر هيدروجينية بين البوادئ وبين التتابعات المكملة لها على اشرطة القالب.

٣. **الاستطالة:** تتم على درجة حرارة ٧٢م وتعد هذه الدرجة مثالية لعمل انزيم البلمرة. تمتلك البوادئ قوة جذب ايوني عالي تجاه DNA القالب اذا ترتبط البوادئ بالمواقع الخاصة بها على القالب ويباشر انزيم البلمرة ببناء شريط جديد مكمل للقالب باضافة القواعد النايتروجينية الى البوادئ باتجاه 5 الى 3.وبنتهاء هذه المرحلة يتم الحصول عل اعداد كبيرة من DNA قيد التضخيم.

File Settings Tools

Insert Step After Sample Volume 25 µl Est. Run Time 01:42:00



Insert Step

Insert Gradient

Insert GOTO

Insert Melt Curve

Add Plate Read to Step

Step Options

Delete Step

1	95.0 C for5:00
2	95.0 C for0:10
3	55.0 C for0:20
4	72.0 C for0:15
	+ Plate Read
5	GOTO 2 , 39 more times
6	Melt Curve65.0 to 95.0 C, increment 0.5 C,
	for0:05 + Plate Read
7	12.0 C Forever
	END

OK Cancel

- عدد خطوات التفاعل المتسلسل بانزيم البلمرة؟
- ماهي متطلبات التفاعل المسلسل بانزيم البلمرة؟

المصادر

- Payne, D. A. (2016). Basics of Molecular Biology. In *Molecular Pathology in Clinical Practice* (pp. 1-17). Springer, Cham.
- قازانجي، محمد عمر؛ جبر، حميد عبود. (٢٠١٧). علم الحياة الجزيئي. الطبعة الاولى. جامعة بغداد، كلية الزراعة. الدار الجامعية للطباعة والنشر والترجمة.
- مصطفى، نشأت غالب. (٢٠١٨). البيولجي الجزيئي. الطبعة الاولى. دار الكتاب الجامعي.

Thank You