Polymerase Chain Reaction (PCR)

تفاعل البلمرة المتسلسل

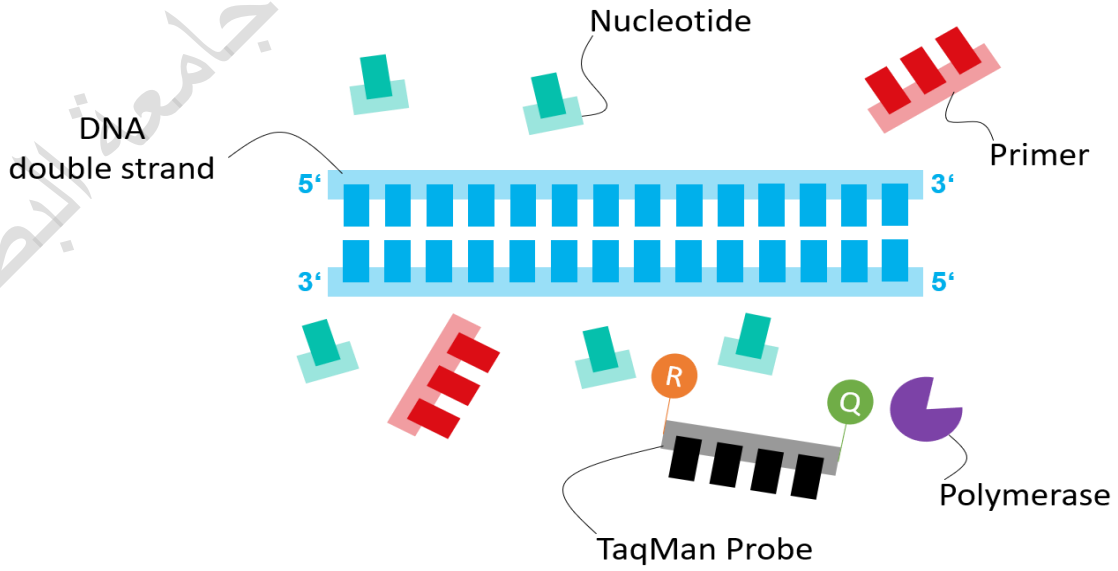
تفاعل البوليمراز المتسلسل اختصارًا (**PCR**) :هي طريقةٌ مُستعملةٌ بشكلٍ واسعٍ في علم الأحياء الجزيئي، حيثُ تعمل على إنتاجٍ سريعٍ لمليارات النُسخ من عينةٍ خاصةٍ للحمض النووي الريبوزي منقوص الأكسجين (DNA) مما يُمكن العلماء من أخذ عينةٍ صغيرةٍ جدًا من الدنا وتضخيمها إلى كميةٍ كبيرةٍ تكفي لدراستها بالتفصيل.

تم اختراع تفاعل البوليمريز المتسلسل في عام 1983 من قبل الكيميائي الحيوي الأمريكي كاري موليس في شركة سيتوس . يُعتبر هذا التفاعل أساسًا للعديد من الفحوصات الجينية، وتتضمن تحليل عيناتٍ قديمة من الدنا وتحديد العوامل المُسببة للعدوى. باستخدام تفاعل البوليمراز المتسلسل، يتم تضخيم نُسخٍ بكميات صغيرة جدًا من تسلسلات الحمض النووي في تسلسلاتٍ أو دوراتٍ من تغيرات درجة الحرارة. يُعتبر تفاعل البوليمراز المتسلسل شائعًا حاليًا ولا غنًى عنه في كثيرٍ من الأحيان حيثُ يستخدم في المختبرات الطبية والبحوث المخبرية السريرية في مجموعةٍ واسعة من التطبيقات العملية والتي تتضمن البحوث الطبية الحيوية والطب الشرعي الجنائي.

تعتمد غالبية طرق تفاعل البوليمريز المتسلسل على التدوير الحراري . تعرض الدورة الحرارية المواد المتفاعلة لدورات متكررة من التدفئة والتبريد للسماح بتفاعلات مختلفة تعتمد على درجة الحرارة - على وجه التحديد ، انصهار الدنا وتناسخ الحمض النووي الريبي منقوص الأكسجين المتحكم عن طريق الإنزيم .

متطلبات تقنية PCR

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

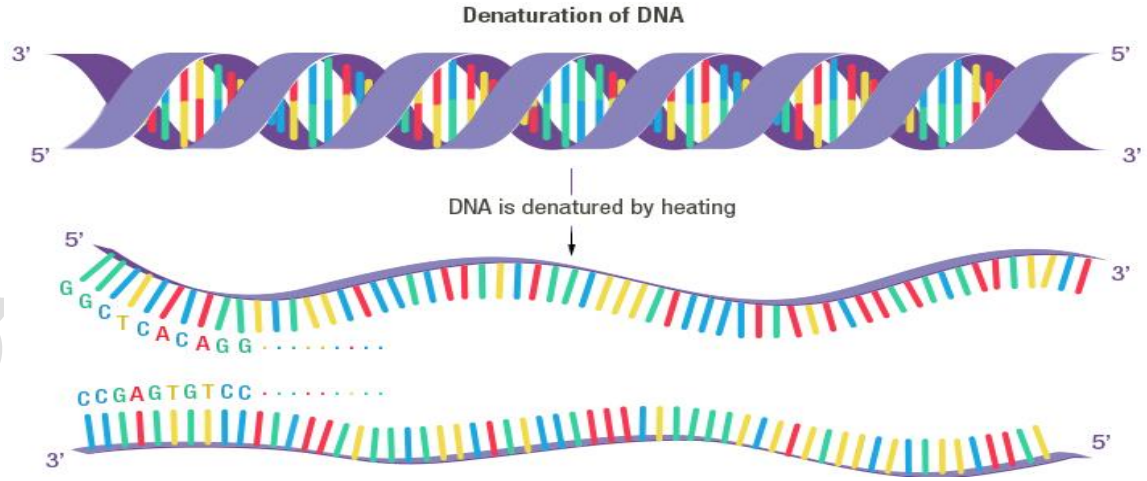


د. أحمد يوسف لفته - كلية الزراعة - جامعة البصرة

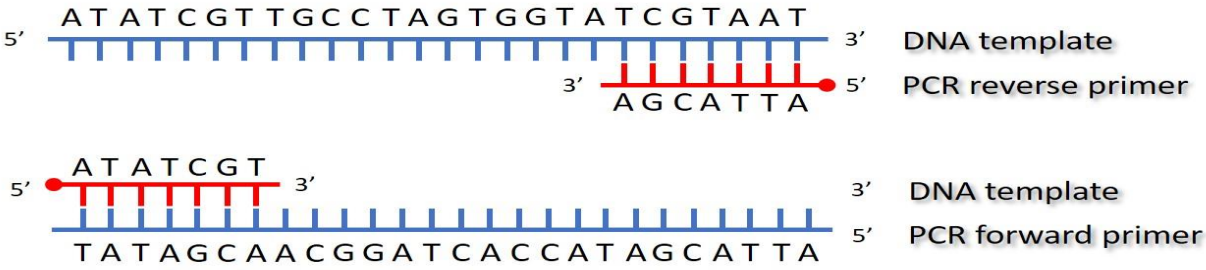
1. **القالب Template:** يتمثل في DNA المراد تضخيمه وهذا التضخيم لا يشمل على القالب بأكمله وانما جزء منه وهذا يسمى بالجزء المستهدف.
2. **البادئ Primer:** يتمثل بقطعة صغيرة من DNA بشريط مفرد يكون مكملا في تتابعاته للقواعد النيتروجينية على طرفي الجزء المستهدف، وهي ضرورية للشروع بتضاعف DNA. يتطلب تحضير Primer معرفة بعض تتبعات القواعد النيتروجينية على طرفي الجزء المستهدف من القالب. تتراوح اطوال Primer المستخدمة في PCR ما بين 20 – 30 قاعدة نيتروجينية.
3. **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 Thermusaquacticus من اكثر الانواع استخداما.
4. **النيوكليوتيدات:** يتم تجهيزها على شكل نيوكليوسيدات ثلاثي الفوسفات منقوصة الاوكسجين DNA. وبانواعها الاربعة التي تدخل في بناء(deoxynucleosidestriphosphate (dNTPs
5. **المحاليل المنظمة وملح كلوريد المغنسيوم ($MgCl_2$):** هناك العديد من المحاليل المستخدمة في هذه التقنية مع Polymerase Taq منها المحلول المنظم (Tris – HCl).
6. 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

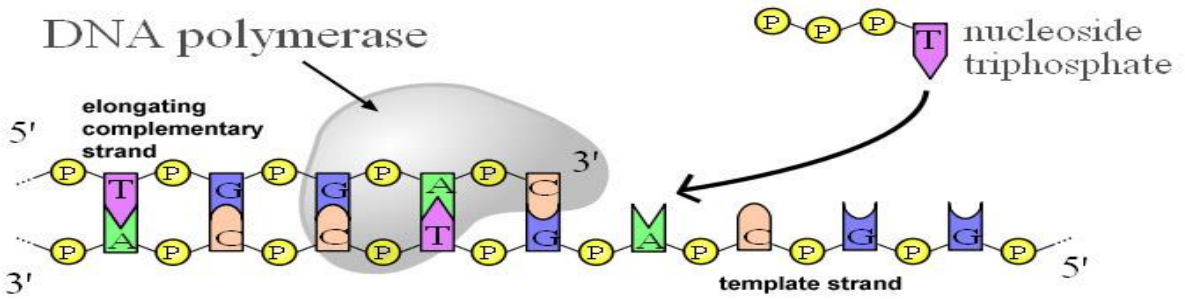
1. **الدنتره:** هي الخطوة الاولى التي يتم صهر جزيئة DNA اي فصل الاشرطة المزدوجة وابعادها عن بعضها وذلك برفع حرارة التفاعل الى $90\ C^{\circ}$ او اكثر بقليل لحوالي دقيقتين.

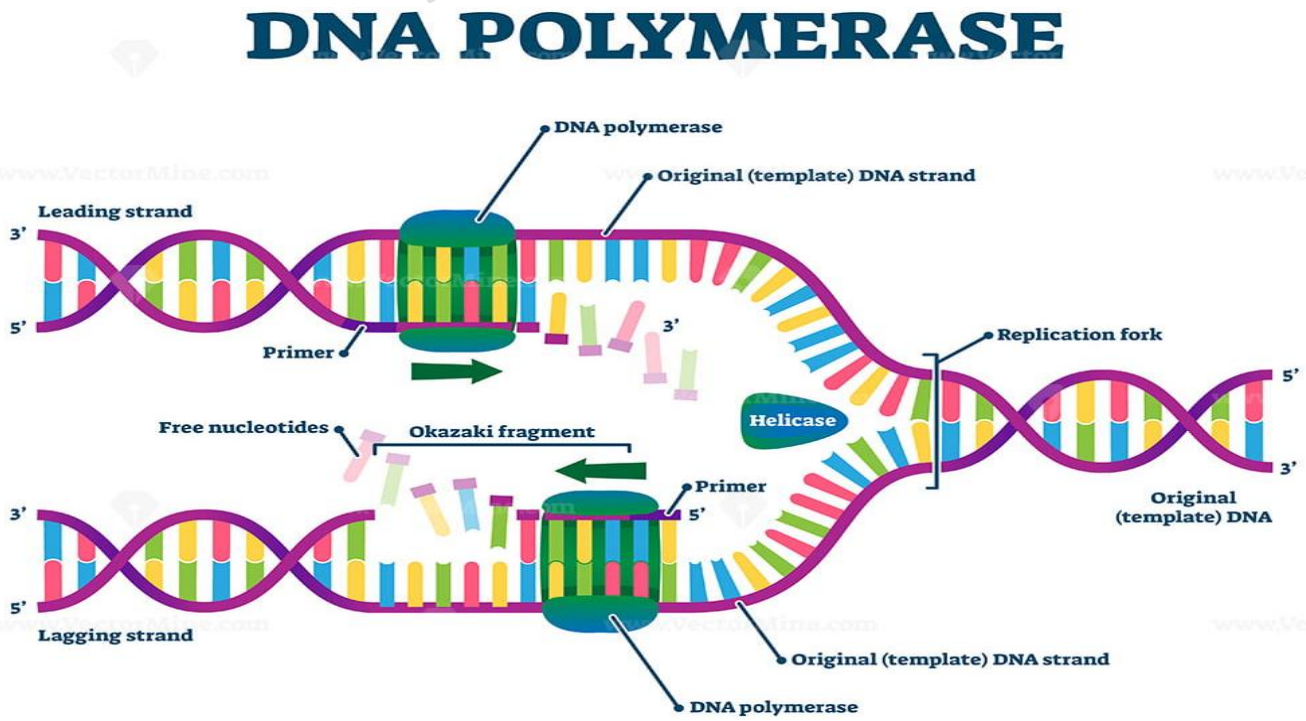


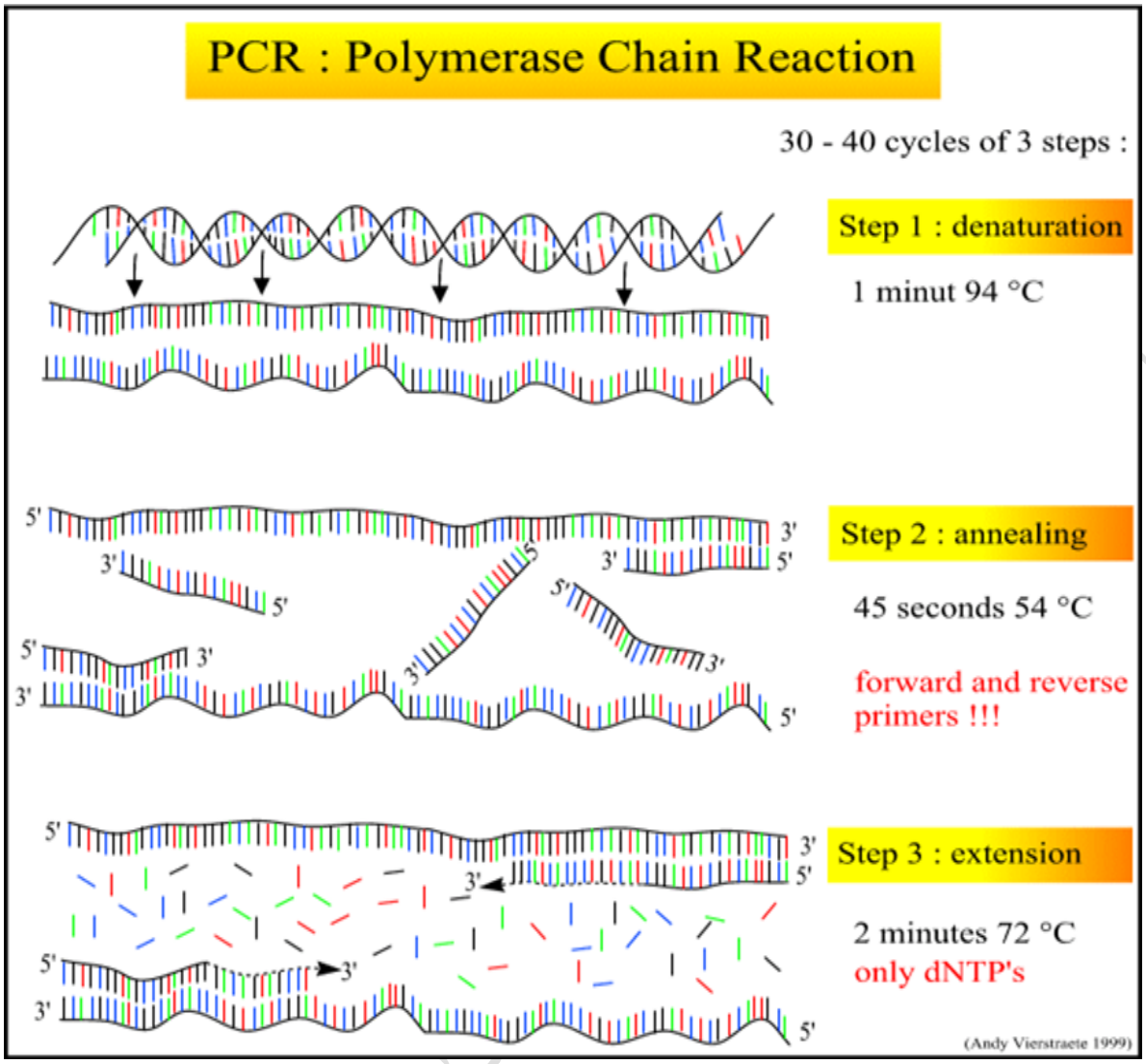
2. **ارتباط البوادئ**: تتم بخفض درجة الحرارة الى C° 50 – 60 تؤدي الى تكوين اواصر هيدروجينية بين البوادئ وبين التتابعات المكملة لها على اشرطة القالب.



3. **الاستطالة:** تتم على درجة حرارة 72م 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 بإضافة القواعد النيتروجينية الى البوادئ باتجاه 5 الى 3. وبانتهاء هذه المرحلة يتم الحصول عل اعداد كبيرة من DNA قيد التضخيم.

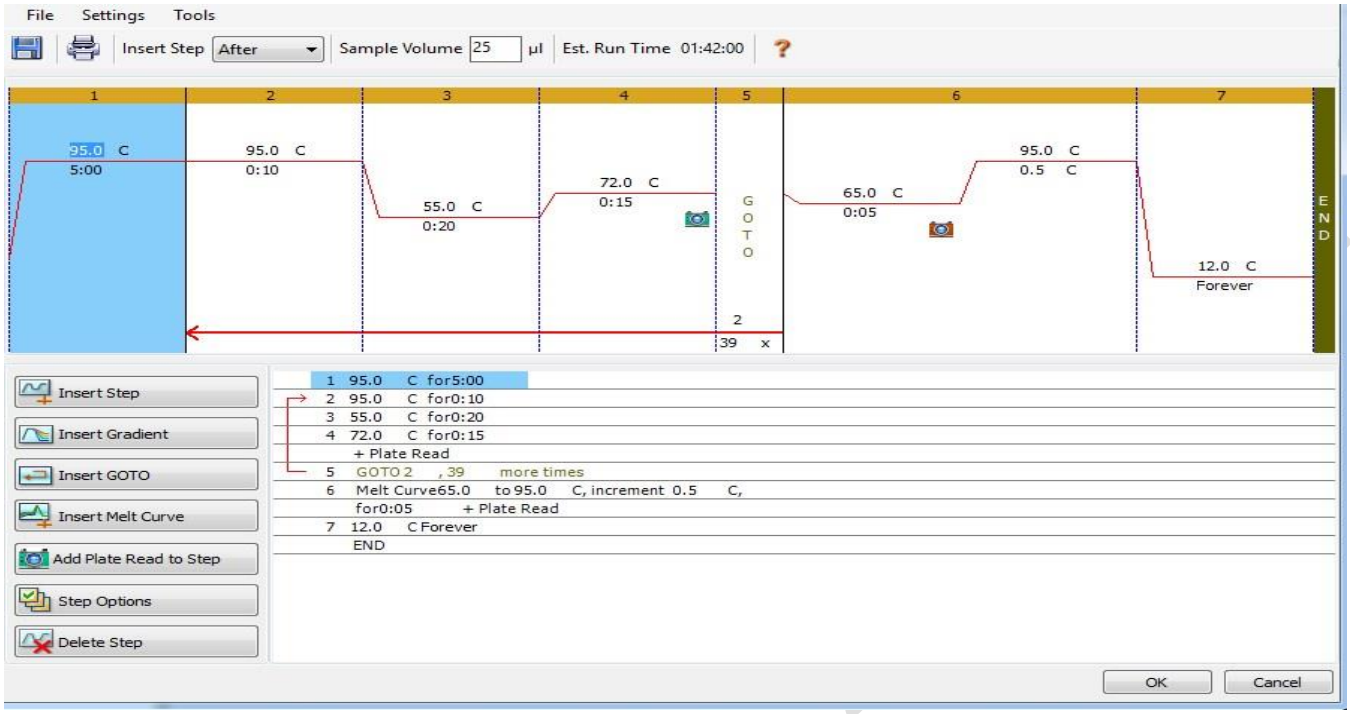






طريقة عمل جهاز PCR

يتكون تفاعل البوليميراز المتسلسل عادةً من 20-40 تغير متكرر في درجة الحرارة، وتُسمى هذه التغيرات الدورات الحرارية، وتتكون كل دورة عادةً من قياسين أو ثلاثة قياسات منفصلة لدرجات الحرارة .غالبًا ما يسبق الدورة خطوة درجة حرارة واحدة عند درجة حرارة عالية جدًا 94 C^{o} ويتبعها انتظار واحد في النهاية لتمديد المنتج النهائي أو التخزين القصير. تعتمد درجات الحرارة المستخدمة وطول مدة تطبيقها في كل دورة على مجموعة متنوعة من الثوابت، بما في ذلك الإنزيم المستخدم في تخليق الدنا، وتركيز الأيونات ثنائية التكافؤ و dNTPs في التفاعل، ودرجة حرارة انصهار. (Tm) .



الخطوات الشائعة لمعظم طرق تفاعل البوليميراز المتسلسل هي على النحو الآتي:

- **التهيئة**: هذه الخطوة مطلوبة فقط لبوليميرازات الدنا التي تتطلب التنشيط الحراري عن طريق تفاعل البوليميراز المتسلسل البادئ الساخن. وتتكون من تسخين حجرة التفاعل إلى درجة حرارة 94-96 درجة مئوية (201-205 درجة فهرنهايت)، أو 98 درجة مئوية (208 درجة فهرنهايت) إن استُخدمت بوادئ عالية الحرارة، والتي يُحتفظ بها بعد ذلك لمدة 1-10 دقائق.
- **الافساد او الذوبان:** هذه الخطوة هي أول حدث تدوير منتظم، وتتكون من تسخين حجرة التفاعل إلى 94-98 درجة مئوية (201-208 درجة فهرنهايت) لمدة 20-30 ثانية. يؤدي هذا إلى ذوبان قالب الدنا ثنائي الشريط، أو إفساده، عن طريق كسر روابط الهيدروجين بين الأسس المكملة، ما يُنتج جزيئَي دنا أحادي الشريط.
- **التصلب** :في الخطوة التالية، تنخفض درجة حرارة التفاعل إلى 50–65 درجة مئوية (122-149 درجة فهرنهايت) لمدة 20-40 ثانية، ما يسمح بتصليب البوادئ لكل من قوالب الدنا أحادي الشريط. يتضمن خليط التفاعل عادةً اثنين من البوادئ : واحد لكل من المكملات أحادية الشريط التي تحتوي على المنطقة الهدف. البوادئ هي تسلسلات أحادية الشريط بحد ذاتها ولكنها أقصر بكثير من المنطقة الهدف، تكمل بذلك تسلسلات قصيرة جدًا في النهاية 3' لكل شريط.

من الضروري تحديد درجة حرارة ملائمة لمرحلة التصليب لأن الكفاءة والخصوصية تتأثران بشدة بدرجة حرارة التصليب. يجب أن تكون درجة الحرارة هذه منخفضة بما يكفي لتسمح بتهجين البادئ إلى الشريط، وعالية بما يكفي

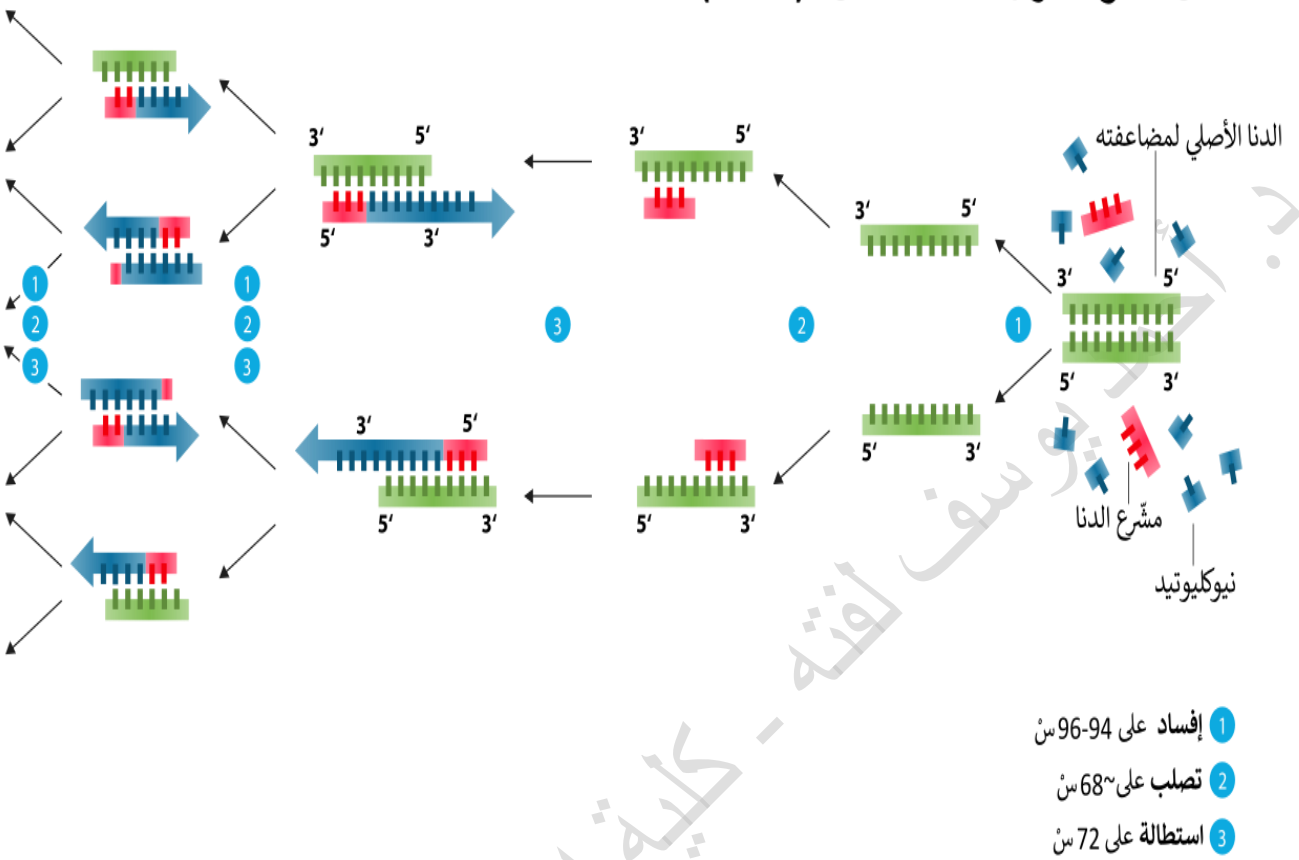
ليكون هذا التهجين محددًا، أي يجب أن يرتبط البادئ بجزء محدد مكمل من الشريط لا في أي مكان آخر. إن لم تكن درجة الحرارة كافية، فإن البادئ سيرتبط بصورة شاذة. وإن كانت مرتفعة جدًا، فقد لا يرتبط البادئ أساسًا.

درجة الحرارة المثلى للتصليب هي 3-5 درجة مئوية وهي أقل من درجة حرارة البوادئ المستخدمة. لا تتكوّن روابط الهيدروجين المستقرة بين الأسس المكملة إلا عندما يكون تسلسل البوادئ متطابقًا مع تسلسل القالب. خلال هذه الخطوة، يرتبط البوليميراز بقالب البادئ الهجين ويبدأ تشكيل الدنا.

- **التمديد/الإطالة**: تعتمد درجة الحرارة في هذه الخطوة على بوليميراز الدنا المستخدم؛ درجة حرارة النشاط المثلى لبوليميراز الدنا المستقر حراريًا لبوليميراز المستحرة المائية هي 75-80 درجة مئوية (167-176 درجة فهرنهايت) تقريبًا،مع أن درجة الحرارة التي يشيع استخدامها مع هذا الإنزيم هي 72 درجة مئوية (162 درجة فهرنهايت). في هذه الخطوة، يصنّع بوليميراز الدنا شريط دنا جديدًا مكملًا لقالب شريط الدنا عن طريق إضافة dNTPs حرة من خليط التفاعل المكمّل للقالب في الاتجاه من 5' إلى 3'، ما يكثف مجموعة 5'-فوسفات من dNTPs مع مجموعة 3'-هيدروكسيل الدنا الناتج (الممدد).

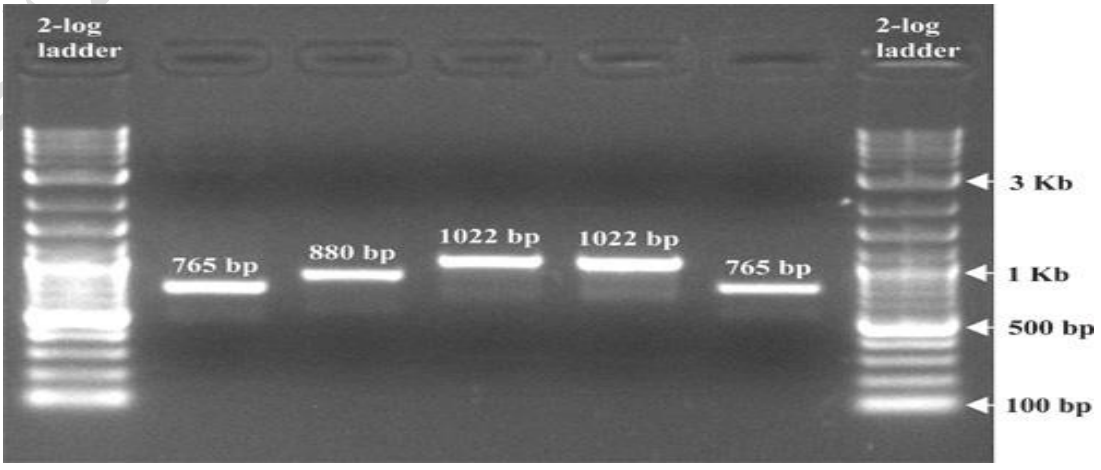
  يعتمد الوقت الدقيق المطلوب للتمديد على بوليميراز الدنا المستخدم وعلى طول منطقة الدنا الهدف المراد تضخيمها. كقاعدة عامة، عند درجة الحرارة المثلى، فإن معظم بوليميراز الدنا يبلمر ألف أساس نيوكليوتيدي في الدقيقة. في ظل الظروف المثلى (على سبيل المثال، إذا لم تكن هناك قيود متعلقة بنقص الركائز أو الكواشف)، يتضاعف عدد تسلسلات الدنا المستهدف في كل خطوة من التمديد/الإطالة. مع كل دورة ناجحة، تصبح أشرطة القالب الأصلية بالإضافة إلى جميع الأشرطة المنتجة حديثًا أشرطة قالب للدورة التالية من التمديد، ما يؤدي إلى تضخيم أسي (هندسي) لمنطقة الدنا المستهدف المحددة.
- **تشكل عمليات الإفساد والتمديد والتصليب دورة واحدة**. تحصل الدورات المتعددة عندما يستوجب تضخيم منطقة الدنا المستهدف إلى ملايين النسخ. الصيغة المستخدمة لحساب عدد نسخ الحمض النووي المتشكلة بعد عدد معين من الدورات هي 2^n، حيث n هو عدد الدورات. ومن ثم فإن التفاعل الذي يحصل على 30 دورة ينتج عنه 2^{30}، أو 1073741824، نسخة من منطقة الدنا ثنائي الشريط المستهدف.
- **الاستطالة النهائية**: هذه الخطوة اختيارية، ولكنها تُنفذ عند درجة حرارة 70-74 درجة مئوية (158-165 درجة فهرنهايت) (نطاق درجة الحرارة المطلوب للنشاط الأمثل لمعظم البوليمرات المستخدمة في تفاعل البوليميراز المتسلسل) لمدة 5-15 دقيقة بعد دورة تفاعل البوليميراز المتسلسل الأخيرة للتحقق من أن أي دنا أحادي الشريط متبقٍّ قد مُدد بالكامل.
- **الانتظار الأخير**: يتم من خلال الخطوة الأخيرة تبريد حجرة التفاعل إلى 4-15 درجة مئوية (39-59 درجة فهرنهايت) لفترة غير محددة، ويمكن استخدامها للتخزين قصير المدى لنواتج تفاعل البوليميراز المتسلسل.

تفاعل البوليمراز المتسلسل (PCR)



* الدنا أو الحمض النووي الريبوزي منقوص الأكسجين (DNA)

للتحقق مما إذا كان تفاعل البوليميراز المتسلسل قد نجح في إنشاء المنطقة المستهدفة المتوقعة من الدنا (التي يُشار إليها أحيانًا باسم المنطقة المُضخمة أو أمبليكون)، يمكن استخدام الرحلان الكهربائي باستخدام جيل الأغاروز لفصل نواتج تفاعل البوليميراز المتسلسل بناءً على حجمها. يُحدد حجم منتجات تفاعل البوليميراز المتسلسل من خلال المقارنة على دنا مدرج، مؤشر الوزن الجزيئي الذي يحتوي على شظايا دنا معروفة الحجم تُقاس على جيل الأغاروز إلى جانب نواتج تفاعل البوليميراز المتسلسل.



تطبيقات تفاعل انزيم البلمرة التسلسلي

- الكشف عن الطفرات الوراثية : وذلك عن طريق وضع بريمر(بادئ) خاص للطفرة لتكثير الجين الخاص بها.
- تعيين البصمة الوراثية.
- يساعد في تشخيص بعض الأمراض والتي تسببها بكتيريا أو فيروسات. تعد التقنية الأدق في تحديد نوع وجنس الفيروس وكميته.
- يستخدم في الإستنساخ وإنتاج خلايا أكثر.
- العنصر الأهم في عملية التجميع الجيني (Recombinant (DNA حيث نقوم بإنتاج نسخ عديدة من الجين المراد دمجها بالبلازميد أو الحمض النووي (DNA) المضيف.
- استخدامه في تغيير نهايات الجين لتصبح متوافقة مع إنزيمات القطع. (Restriction enzyme).
- عملية أساسية لتحديد تتابع القواعد النيتروجينية في الحمض النووي (DNA) . DNA .Sequencer
- معرفة طول الحمض النووي(DNA) .
- تقنية الحمض النووي المكمل (cDNA)
- تحديد الجين المطلوب من خليط من الجينات.
- يستخدم في مشروع الخارطة الجينية البشرية. (human genome project)
- . (Southern plot) الساوثرين بلو
- تقنية ارتباط الحمض النووي مع البروتين . (DNA) -Protein Interaction)
- في مجال الطب الشرعي (اختبار الأمومة ، حالات الاغتصاب ، تحديد الهوية ...الخ).
- تحديد الأنماط الجينية Genotyping للفيروس الكبدي ج
- تشخيص الأمراض السرطانية بالكشف الجيني Oncogenes
- تعيين الأنماط النسيجية HLA- tissuc typing في مجال زراعة الأعضاء.

د. أحمد يوسف لفته - كلية الزراعة - جامعة البصرة