

المختبر السادس:

تفاعل البوليمريز المتسلسل (PCR) Polymerase Chain Reaction

هي اهم طريقة تستخدم لتشخيص الاحماض النووية من خلال تضخيم جين او منطقة معينة ذات تسلسل معروف داخل انابيب خاصة يوضع فيها خليط التفاعل Reaction mixture في جهاز يدعى التدوير الحراري Thermal cyler او PCR يعمل ذاتيا بواسطة ظروف التفاعل Reaction condition ، وهو برنامج معين غالبا له ثلاث خطوات رئيسية، والعملية تتم بوقت قصير نسبيا. وله عدة انواع:

1. تفاعل البوليمريز المتسلسل التقليدي Conventional PCR

يستخدم في تضخيم دنا الفيروسات مباشرة، ويعد النوع التقليدي. والعملية تتم من خلال ثلاث مراحل تتضمن: استخلاص المادة النووية وتضخيمها ثم اجراء الترحيل الكهربائي. يتكون خليط التفاعل من:

1. اثنان من البادىء Primers

2. انزيم DNA polymerase من نوع Taq غالبا

3. القواعد النتروجينية deoxynucleotide triphosphates (dNTP's)

4. المادة النووية المستخلصة المراد تشخيصها المسماة القالب Template

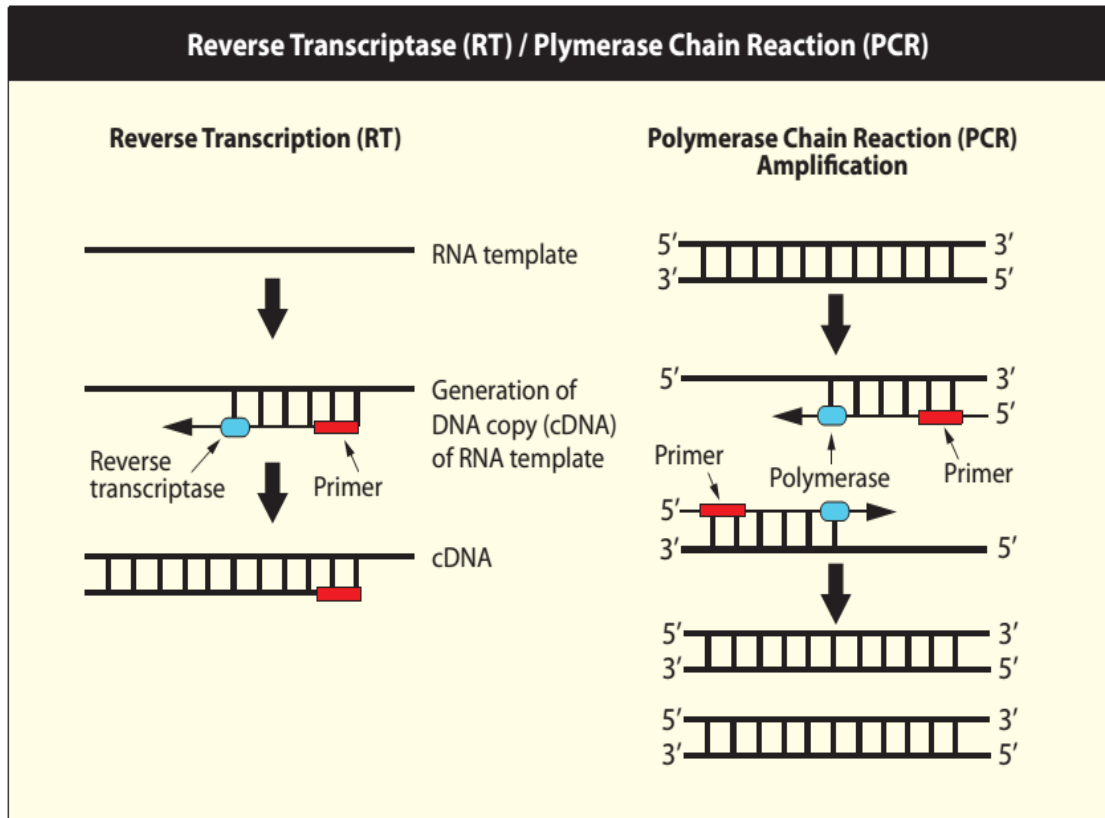
5. محلول المنظم Buffer solution المتكون من مواد كيميائية وايونات لاعطاء بيئة ملائمة للتفاعل.

اما ظروف التفاعل له ثلاث خطوات:

1. مرحلة المسخ او التفكك Denaturation: غالبا تحدث بدرجة 94°C حيث يبدأ شريطا DNA بالانفصال عن بعضهما البعض إلى خيطين منفردين، وتتم لمدة دقيقة او اكثر.

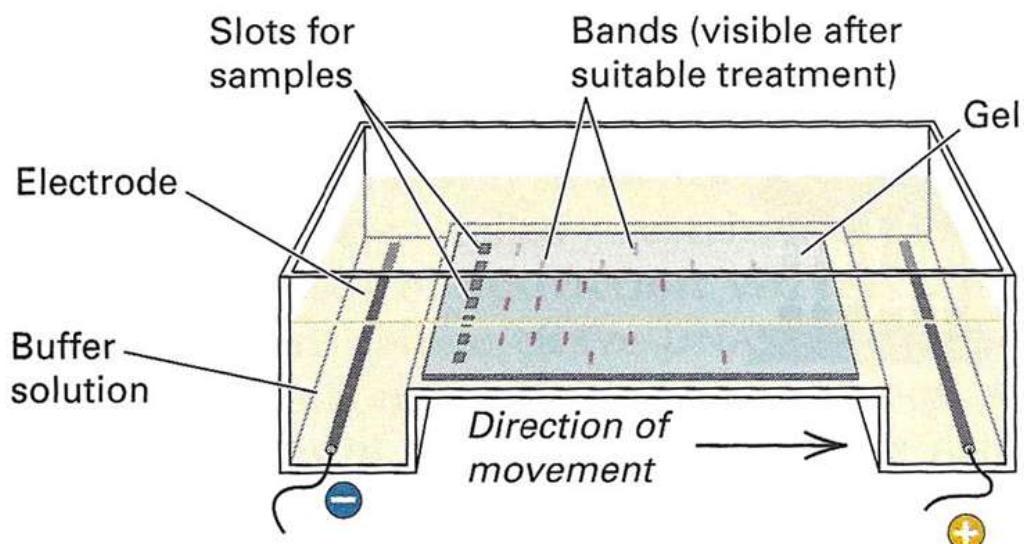
2. مرحلة الالتصاق Annealing: وفي هذه المرحلة يبدأ البادىء بالالتصاق على خيط DNA وتتم بدرجة حراريه اقل من مرحلة التفكك $50-65^{\circ}\text{C}$ ، وتتم لمدة عدة ثواني.

3. مرحلة التمدد او التوسع Extension: تعد هذه المرحلة الاخيرة وتحدث غالبا في درجة 72°C وهذه هي الدرجة الحرارية المناسبة لعمل الانزيم DNA polymerase لبناء خيط الحامض النووي الجديد، وتتم لمدة عدة دقائق. وتعاد هذه الخطوات الثلاث عادة 30-40 دورة. ثم يتم عملية ترحيل للمادة المضخمة.



تفاعل البوليمريز المتسلسل التقليدي و الاستنساخ الرجعي

Agarose gel electrophoresis of DNA



الترحيل الكهربائي للاحماض النووية

2. تفاعل البوليميريز المتسلسل-الاستنساخ الرجعي RT-PCR

يستخدم في تضخيم الرنا الفيروسي، بالبداية يبدأ انزيم الاستنساخ الرجعي باستنساخ شريط دنا مكملًا لشريط الرنا يدعى cDNA، ثم يعمل انزيم RNase على تحطيم الرنا، ثم يعمل انزيم DNA polymerase بصناعة شريط دنا مزدوج، وبعد ذلك يحدث كما في السابق.

3. تفاعل البوليميريز المتسلسل - الوقت الحقيقي Real Time PCR

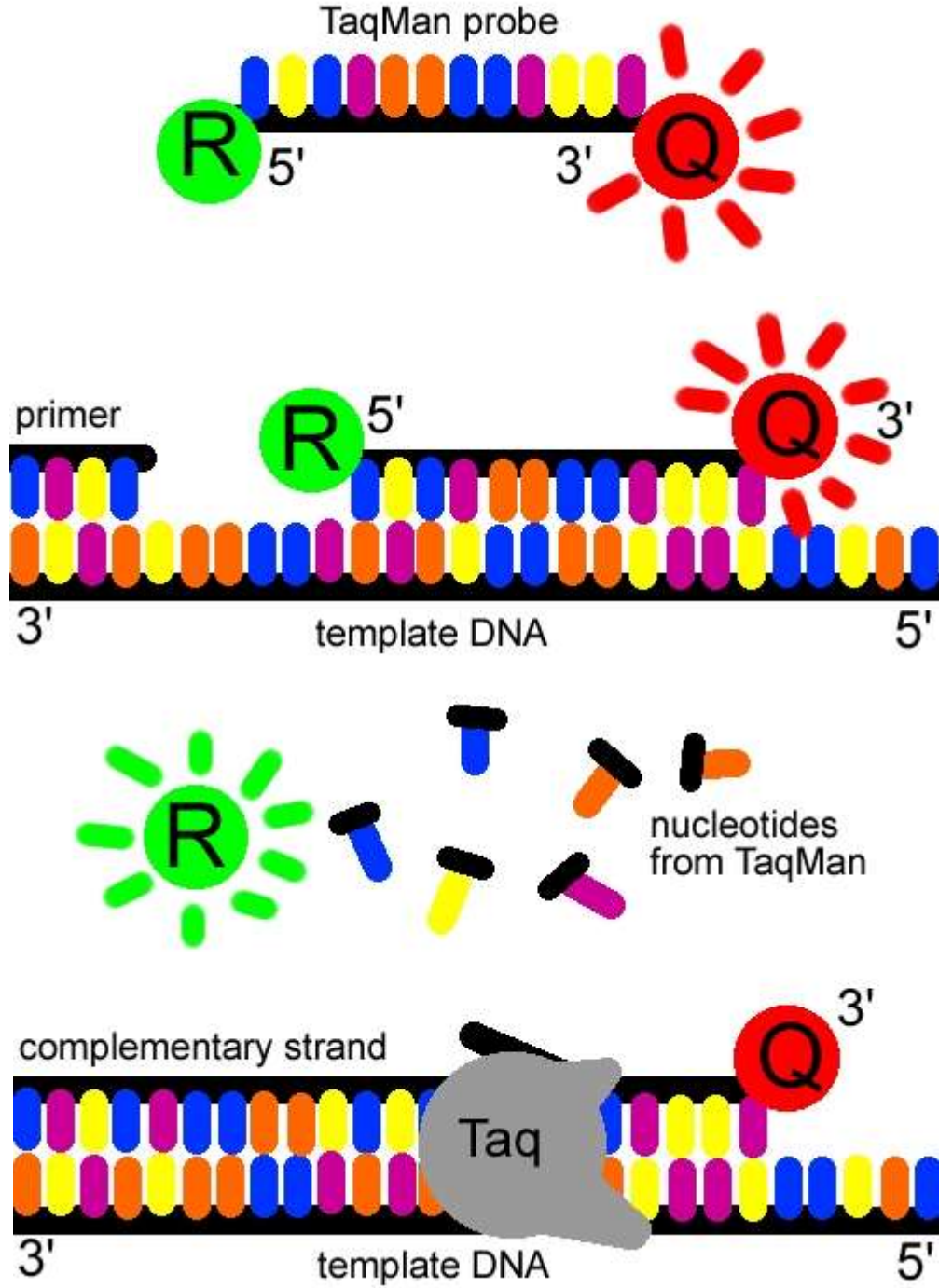
هو جهاز يستخدم لغرض تضخيم او تضاعف اعداد نسخ قطع DNA الهدف وتشخيص كميتها واعطاء تقرير مفصل عن عدد الدورات ومايقابلها من تزايد وتضخم لنسخ الجين الهدف، لذلك يدعى الكمي quantitative PCR (qPCR). واستعمال هذه التقنية مفيد جدا بسبب القدرة على مشاهدة عمليات التضاعف والاستغناء عن عملية ترحيل DNA في الاكاروز. هناك العديد من الطرق التي نستطيع من خلالها متابعة ورصد تضاعف DNA في العينة:

A. الصبغات المضيئة او المشعة غير المتخصصة Non-specific fluorescent dyes

ان استعمال الصبغة المشعة في هذه تقنية يعد الارخص والابسط لرصد التضاعف حيث ان ارتباط هذه الصبغة يتزايد مع تزايد اشربة DNA المزدوجة المنسوخة حديثا، لكن الغير مفيد في هذه الطريقة هو ان الصبغة ترتبط مع اي تضاعف لاشربة DNA بدون تخصص للجين المطلوب.

B. بروب الدنا المتخصص التسلسل Sequence-specific DNA probe

هو قطعة DNA منفردة الشريط ومتممة للجين المطلوب تضخيمه، تكون معلمة بالصبغة المشعة fluorescent . يعد Taqman البروب الابسط والاكثر شيوعا، حيث يتكون من قطعه من DNA تحتوي على جزيئة Reporter مشعة في احد الاطراف وجزيئة Quencher ماصة للاشعاع في طرفها الاخر، تمتص الاشعة المنبعثة من الجزيئة الباعثة للاشعاع Reporter. لذلك فان الاشعاع المنبعث من البروب يكون واطئ او ضعيف في الظروف الطبيعية، عندما يبدي الجهاز بالعمل وتبدأ اشربة DNA بالتضاعف يبدأ البروب بالارتباط مع الجين المطلوب لكن سرعان ما يتحطم بفعل نشاط 5'-3'-exonuclease التابع لانزيم البوليميريز Polymerase لذلك فان Reporter و Quencher سوف ينفصلان فيزيائيا ثم سيتزايد انبعاث الاشعاع بسبب الابتعاد بينهما حيث يبدأ الاخير بالاشعاع بصورة طبيعية. ويتم تشخيص العينة الموجبة من خلال تركم الاشارة المتألقة Fluorescent signal .



ويعرف عتبة الدورة **Cycle threshold (Ct)** بأنه عدد الدورات المطلوبة للإشارة المتألفة لعبور العتبة التي تزيد من المستوى الاساسي اسفل خط **Ct** والتي يمكن قياس كميتها. ولل **Ct** نسبة عكسية لكميات الحامض النووي الهدف في العينة، فكلما زادت نسبة **Ct** قلت كميات الحامض النووي. في جهاز **WVDL** Real Time التي طورته **Wisconsin Veterinary Diagnostic Laboratory** هناك 40 دورة من التضخيم، تكون نسب **Ct**:

Cts < 29 are strong positive

Cts of 30-37 are positive

Cts of 38-40 are weak

والنسبة الاخيرة دليل نسبة واطئة او تلوث.

