مختبر ٧

التفاعل التضاعفي لسلسلة الدنا

Polymerase Chain Reaction (PCR)

تعتبر تقنية الـ PCR من الطرق المهمة في مجال البايولوجي الجزيئي Molecular genetics والهندسة الوراثية اذ تستخدم لتضخيم أو اكثار جزئ واحد من الـ DNA أو اكثار نسخة واحدة من الجينات المحددة والتي تم عزلها على شكل حزم مميزة على الهلام بتقنية الترحيل الكهربائي.

يعتبر العالم Kary Mullis هو أول من اكتشف وصمم هذه التقانة عام 1983.

ويمكن تعريف هذه التقانة بأنها القدرة على تضاعف نوعي وكمي لقطعة أو قطع من الـ DNA انزيميا ملايين المرات خارج جسم الكائن الحي in vitro بوجود البادئات وبزمن قصير وبالتالي هي طريقة تشخيصية لكثير من الأمراض الوراثية من خلال تشخيص الجينات المسببة لها.

*** فائدة الـ PCR:**

١- يمكن الاستفادة من الـ PCR في تطبيقات الهندسة الوراثية كالكلونة.

٢- الاستنساخ البشري والحيواني.

٣- العلاج الجيني.

٤- رسم الخرائط الجينية.

*** مبدأ عمل تقنية الـ PCR:**

١- فك شريطي الارتباط.

٢- اعادة الارتباط مع البادئ Primer وبوجود انزيم Taq DNA polymerase.

٣- التضاعف بمساعدة الحرارة.

*** تحتاج عملية تكرار أو تضخيم الـ DNA الى توفر بعض الأمور:**

١- قالب الـ DNA (Template DNA).

٢- انزيم البلمرة الثابت حراريا Taq- DNA polymerase.

٣- البادئ Primer.

٤- القواعد النتروجينية المفسفرة dNTPs.

٥- وجود الدارئ المنظم للتفاعل PCR buffer والمكون من $MgCl_2$ والـ Tris- Hcl.

أن الحصول على انزيم DNA polymerase متحمل لدرجات حرارة عالية من المشاكل التي واجهت هذا العالم الا أنه استطاع عزل الـ DNA من بكتريا تعيش في المياه الساخنة تسمى *Thermus aquaticus* وقد تم الاستفادة من DNA هذه البكتريا كمصدر للـ DNA polymerase . اعتمد العالم في هذه التقنية على تصميم جهاز المبلمر الحراري (مدور حراري) Thermocycler، تتوفر فيه عدد من الأسس:

١- التحكم بدرجة الحرارة والوقت.
٢- سهولة زيادة ونقصان درجات الحرارة.
٣- التحكم بعدد الدورات.

*** يمكن تقسيم الـ PCR الى ثلاث مراحل متتابعة ومتكررة ضمن برنامج يعمل به الجهاز وهي:**

١- مرحلة المسخ Denaturation

وهي مرحلة تعريض محلول الـ DNA الحاوي على الجين المرغوب تكثيره الى درجات حرارة عالية تتراوح بين (94-97 م°) بوقت يتراوح بين (2-5 د) للحصول على DNA مفردة السلسلة لتعمل كل سلسلة منه كقالب لبناء القطعة المكملة لها وتعتمد عملية المسخ على عدد من العوامل كنوعية ومصدر DNA القالب ، نوع الانزيم المستخدم.

٢- مرحلة ارتباط البادئ Primer annealing

وهي عملية ارتباط البادئ مع التتابعات من القواعد النتروجينية المكملة له في الشريط المفرد من DNA القالب من خلال بناء الأواصر الهيدروجينية بينهما . تكون بدرجة حرارة من (50-65 م°) وتعتمد درجة الحرارة وطول الفترة الزمنية اللازمة لهذه المرحلة على العديد من العوامل منها تركيز وطول البادئ ونسبة احتوائه من قواعد (G + C) ويتم حساب درجة الحرارة اللازمة للارتباط من خلال المعادلة الآتية :

$$Tm = 4 (G+C) + 2 (T+A)$$

*Tm: Melting temperature

٣- مرحلة الاستطالة Extension (elongation)

وهي عملية بدء عمل انزيم البلمرة لبناء السلسلة المكملة لدنا القالب، وتتراوح درجة الحرارة الملائمة للاستطالة (70-80 م°) وبفترة زمنية (1-2 د) وتعتمد عملية الاستطالة أيضا على عدد من العوامل منها:

تركيز كل من الانزيم و dNTPs والـ MgCl2 والبادئات (فائدة MgCl2: يعمل على تنظيم عمل انزيم البلمرة ويحافظ على نشاطه ، وينظم أيضا عمل المكونات الأخرى في التفاعل من خلال تأثيره على ارتباط البادئ).

*** توجد هناك بعض الشروط التي تتعلق بتصميم البادئ Primer وهي :**

١- يجب أن تكون تتابعات البادئ لاتقل عن (18) زوج قاعدي ولاتزيد عن 30 زوج قاعدي والسبب لأن التركيز العالي من Primer في التفاعل الواحد الى ايجاد الارتباطات الخاطئة وبالتالي الى تراكم النواتج غير المخصصة وكذلك قد يؤدي الى زيادة احتمال توليد مايدعى بالاتحادات الحرة غير المرغوبة لجزيئات البادئ مع بعضها Primer-dimer وهذا يؤدي الى هبوط للناتج المستهدف أو المرغوب فيه.

٢- يجب أن تكون تتابعات الجين المراد تكثيره معروفة وذلك لتصميم البادئ بحيث يرتبط به.

٣- يجب أن تكون نسبة (G+C) في البادئ لاتقل من 40% ولاتزيد من 60% لتمنح القوة والثبات لمناطق الارتباط فاذا قلت النسبة عن 40% يكون الـ DNA معرض للكسر.

٤- يجب أن تكون نسب (G+C) و (A+T) متوفرة وموزعة بالتساوي.

٥- تستخدم في طريقة الـ PCR نوعين من البادئ احداهما Forward والآخر Reverse ويجب أن لايكونان متعاكسان بتسلسل القواعد النتروجينية لكي نضمن عدم ارتباطهما معا.

٦- يجب معرفة كل من الـ Tm و TA:

*** العوامل التي تؤثر على الارتباط:**

١- تركيز MgCl2 يفيد في تحفيز الارتباط بين القالب والبادئ مع انزيم البلمرة.

٢- وقت التفاعل.

٣- تركيز الـ Primer: يجب أن يكون تركيز البادئ متناسب مع عدد الدورات.

٤- طول الناتج من الـ DNA المضخم.

٥- عدد الدورات ، يجب أن لاتكون أكثر من 40 دورة لأن هذا يؤدي الى زيادة كمية الاتحادات غير النظامية واذا قل عن 25 دورة تعطي كميات قليلة من الناتج المرغوب.

*** ماهو الدايمر Dimer وما هي أنواعه ؟**

الدايمر هي ظاهرة تجمع بقايا القواعد النتروجينية والـ Primer وارتباطهما مع بعضهما وظهورها على شكل حزمة band عند عمل الترحيل الكهربائي.

أنواعه:

١- Product dimer: ناتج عن تكامل بقايا من القواعد النتروجينية مع بعضها البعض.
٢- Primer dimer: ناتج عن ارتباط Primer مع بعضها البعض مكونا تضخما.

تكون حزمة الـ Dimer تحت آخر حزمة من Ladder في جهاز الترحيل الكهربائي.

Stage I: Denaturation

Step 1: 95 C° for 1 min 1 Cycle

Stage II:

Step 1: 95 C° for 1 min

Step 2: 55 C° for 1 min 30 Cycle

Step 3: 72 C° for 1 min

Stage III: Extention

Step 1: 72 C° for 10 min 1 Cycle

No. of Cycles	Time	Temperature	Steps	Stage
1	60 sec.	95 ºC	Denaturation 1	I
25-30	60 sec.	95 ºC	Denaturation 2	II
	60 sec.	50-65 ºC	Anealing	
	45-60 sec.	72 ºC	Extention 1	
1	7 min.	72 ºC	Extention 2	III

طريقة العمل:

يضاف الى أنبوبة الـ PCR كل من المكونات التالية:

١- 12.5 µl من مادة الـ Master mix والذي يحتوي على كل من dNTPs و Taq-DNA polymerase و Buffer.
٢- 5 µl من DNA template.
٣- Primer ويشمل (1 µl من forward و 1 µl من reverse).
٤- 9.5 µl من d. d. w. (free water) يجب أن يكون خالي من الشحنات لكي لايتداخل مع شحنة الـ DNA السالبة.
٥- 25 µl من Mineral oil ويستخدم لمنع تبخر المكونات السابقة.