

التقانات الأحيائية Biotechnology

الحاضرة الخامسة - تفاعل البلمرة المتسلسل
Polymerase Chain Reaction (PCR)

د. نبيد السعد - جامعة البصرة - كلية الزراعة - قسم وقاية النبات

تفاعل البلمرة المتسلسل (PCR) polymerase Chain Reaction

- ❖ وهو أحد التقنيات المستخدمة في علم التقانات الأحيائية والتي طورت من قبل العالم Kary Mullis عام ١٩٨٧ (والذي حصل على جائزة نوبل بسبب هذا الاختراع).
- ❖ يتضمن تضخيم نسخة أو نسخ قليلة من قطعة معينة من الـ DNA إلى أضعاف عديدة قد تصل إلى ١١٠ أو ١٢١٠ ضعفا.
- ❖ أي انه ببساطة عبارة عن تقنية يمكن من خلالها استشعار وجود قطعة صغيرة من الحامض النووي DNA (تتابع معين **sequence**) وتضخيم هذه القطعة إلى مستوى معين يمكن من خلاله قياسها وتوثيقها.

تفاعل البلمرة المتسلسل (PCR) polymerase Chain Reaction

- ❖ تتم هذه العملية في العادة عن طريق سلسلة خطوات تكرر من ٢٠ - ٤٠ مرة يتم فيها تغيير درجات الحرارة ويسمى كل تكرار دورة **Cycle**.
- ❖ وتشمل كل دورة ٣ خطوات تتغير فيها درجات الحرارة تسمى كل خطوة فيها (**حمل Hold**) وتستمر كل خطوة لفترة زمنية معينة تعتمد على خصوصية التفاعل .
- ❖ ترفع الحرارة في الخطوة الأولى إلى أكثر من ٩٠° م لفك ارتباط شريطي ال DNA (**Denaturation**) .
- ❖ ثم تخفض إلى (٤٠ - ٦٠° م) اعتمادا على نوع البادئ للسماح بالتصاق البادئ (**Annealing**).
- ❖ ثم ترفع درجة الحرارة إلى ٧٢° م ليبدأ العمل لنسخ القطعة المطلوبة (**Extension**).
- ❖ وقد يعقب هذه الدورة خطوة تتضمن حفظ الناتج على درجة ٤° م لفترة من الزمن لحين استخدامه.

تفاعل البلمرة المتسلسل (PCR) polymerase Chain Reaction

مكونات تفاعل البلمرة

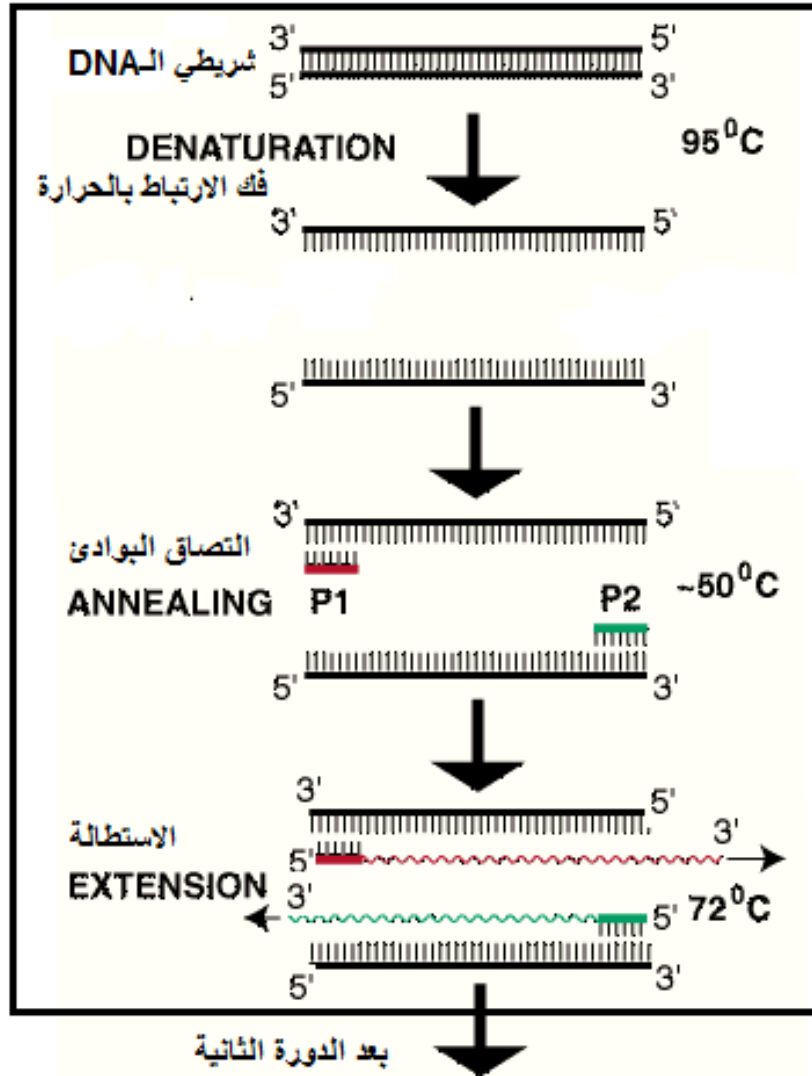
- ❖ قطعة DNA تعمل كقالب للاستنساخ .Templet
- ❖ بادئين Two primers
- ❖ إنزيم البوليمريز Taq polymerase
- ❖ النيوكليوتيدات (dNTPs) Deoxynucleotide triphosphate
- ❖ المحلول المنظم Buffer solution
- ❖ كلوريد المغنسيوم $MgCl_2$
- ❖ جهاز البلمرة المتسلسلة Thermal cycler

تفاعل البلمرة المتسلسل (PCR) polymerase Chain Reaction

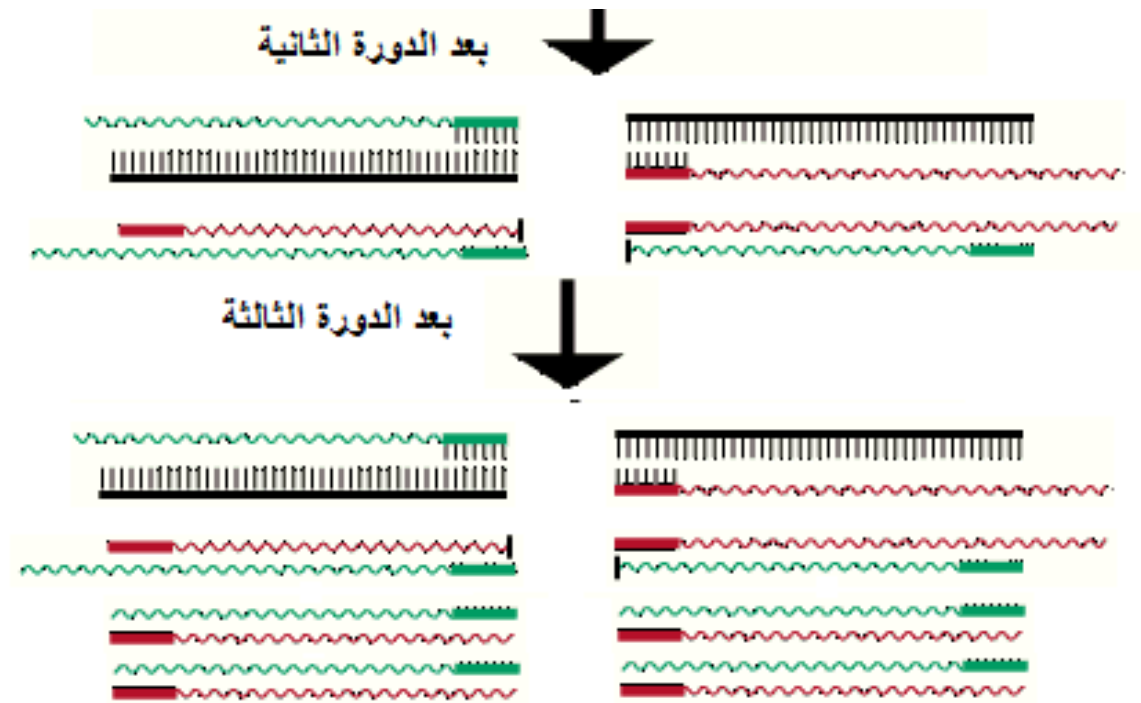
خطوات تفاعل البلمرة

- ❖ **التهيأة Initialization:** تستخدم في حالة كون الإنزيم يحتاج إلى تنشيط ابتدائي حيث ترفع درجة الحرارة ٩٤-٩٦ م° لمدة ١-٩ دقائق حسب نوع الإنزيم.
- ❖ **فك ارتباط الشريطين Denaturation:** (٩٤-٩٨ م° لمدة ٢٠-٣٠ ثانية).
- ❖ **الالتصاق Annealing:** (٥٠-٦٥ م° لمدة ٢٠-٦٠ ثانية)
- ❖ **الامتداد أو الاستطالة Extension or elongation:** (٧٥-٨٠ و غالبا ٧٢ م°) لمدة دقيقة تقريبا).
- ❖ **الاستطالة النهائية Final extension:** (٧٠-٧٤ م° لمدة ٥-١٥ دقيقة) بعد اخر دورة.
- ❖ **خطوة الحفظ Final hold:** ٤ م° لفترة معينة.

تفاعل البلمرة المتسلسل (PCR) polymerase Chain Reaction



الدورة الأولى



تفاعل البلمرة المتسلسل (PCR) polymerase Chain Reaction

Polymerase chain reaction
(PCR)

<https://www.youtube.com/watch?v=iQsu3Kz9NY>
o

الترحيل الكهربائي Gel electrophoresis

تستخدم هذه الطريقة للتأكد من تضخيم قطعة الـ DNA المستهدفة وتتضمن التالي:

❖ تحضير هلام الأكاروس.

❖ صبه في قوالب تحتوي على أمشاط خاصة لعمل حفر بأعداد وأحجام معينة.

❖ تحميل العينات في هذه الحفر بعد وضعها في أحواض الترحيل.

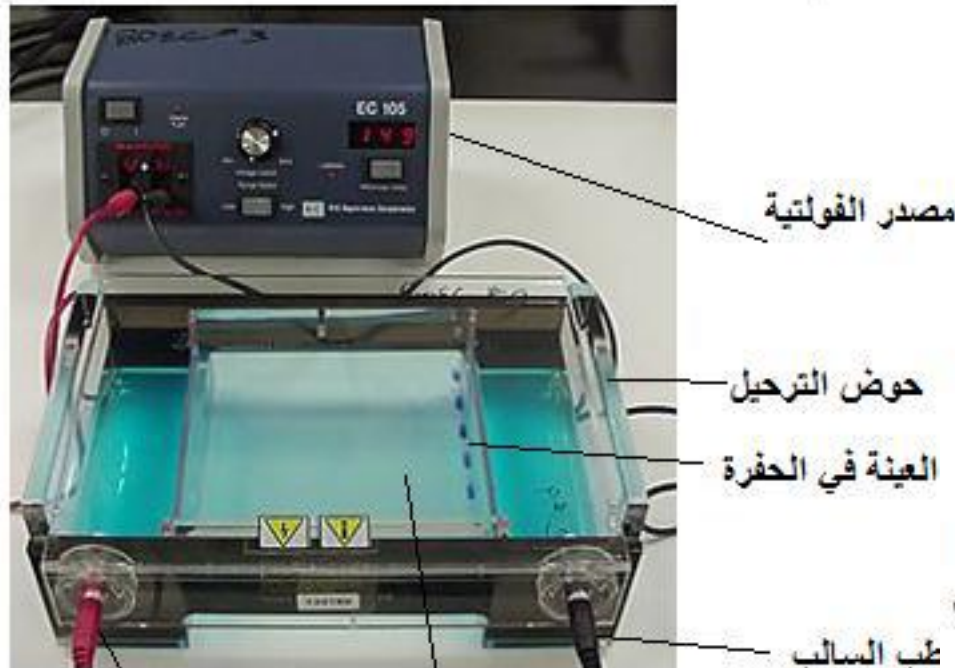
❖ أحواض الترحيل تحتوي على محلول منظم يكون غلدة TAE أو TBE.

❖ تسليط فولتية معينة ولفترة زمنية محددة فتبدأ عملية الترحيل من القطب السالب إلى القطب

الموجب حيث تنفصل جزيئات الـ DNA المضخمة حسب أحجامها على شكل حزم.

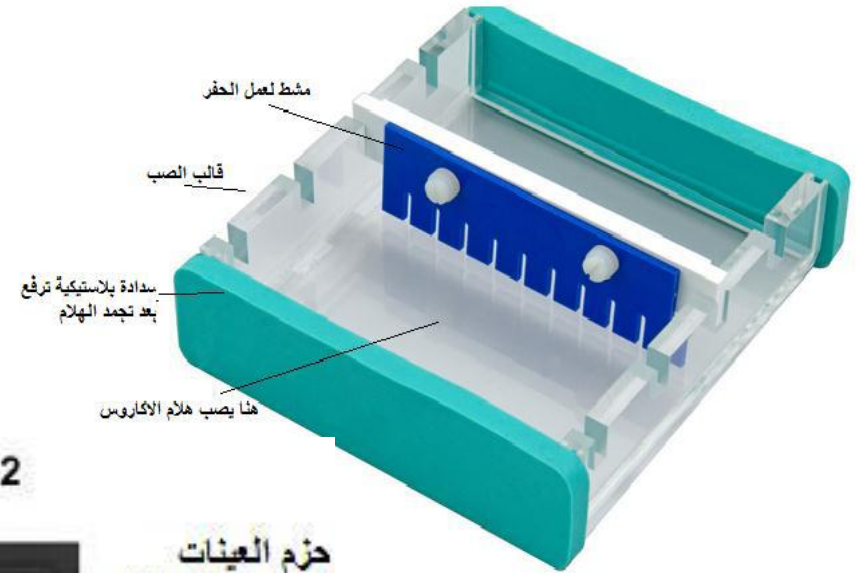
❖ يتم مقارنتها مع حزم قياسية (معروفة الحجم) يتم ترحيلها مع العينات في آن واحد تسمى بالـ Ladder.

الترحيل الكهربائي (Gel electrophoresis)



القطب الموجب

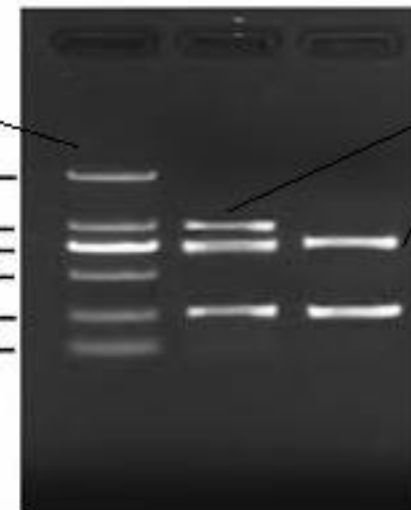
هلام الأكاروس



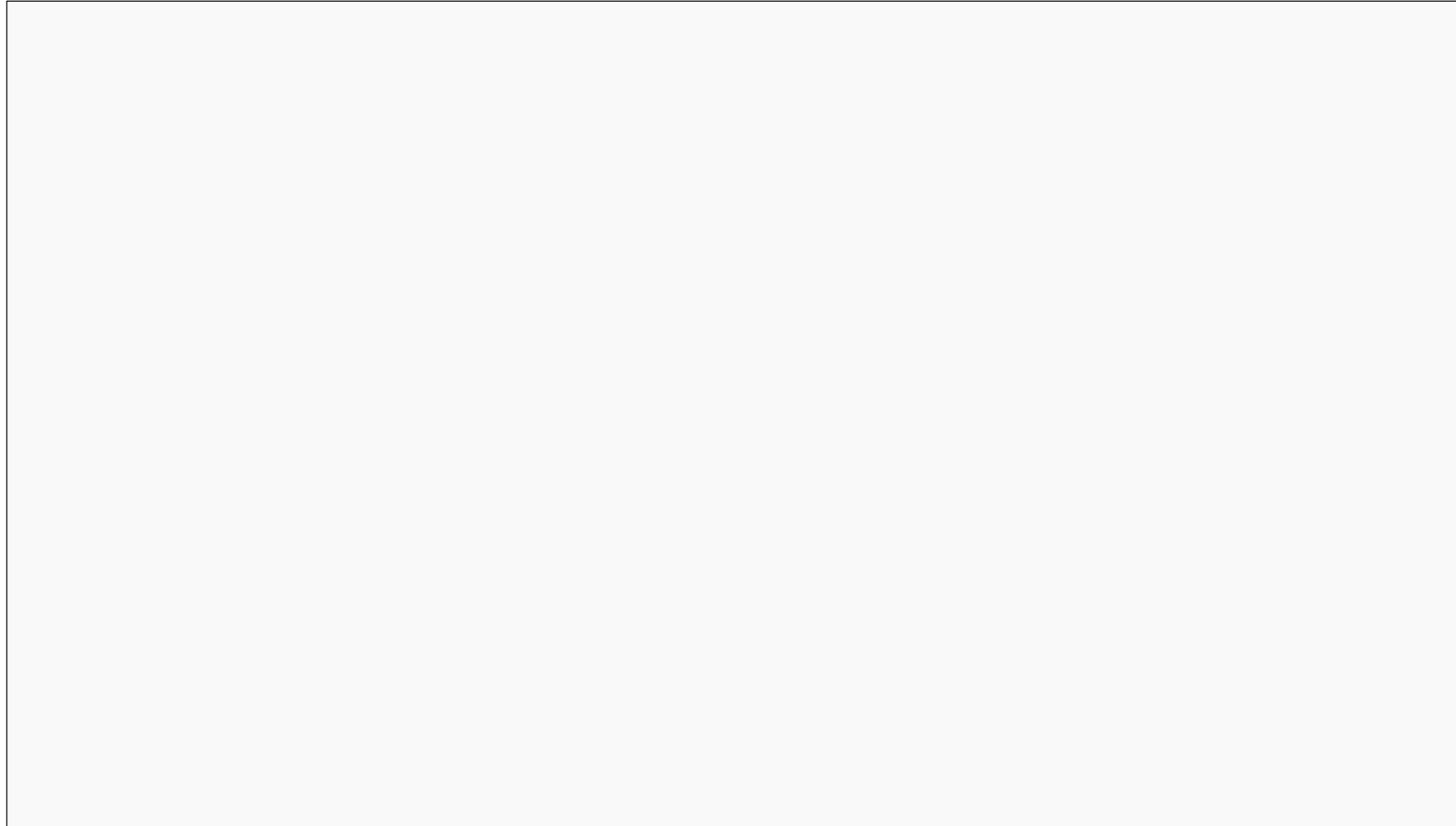
الحزم القياسية
المعروفة الحجم

2000
1000
750
500
250
100

Ladder 1 2



الترحيل الكهربائي Gel electrophoresis



<https://www.youtube.com/watch?v=kjJ56z1HeAc>

البلازميد Plasmid

❖ هو عبارة عن جزيء DNA صغير داخل الخلية وهو منفصل تماما عن الـ DNA الكروموسومي Chromosomal DNA ويعمل ويتضاعف بشك مستقل.

❖ هذا الجزيء موجود عموما في البكتريا Bacteria بشكل حلقة مكونة من شريطين وقد يتواجد في الأركيا Archaea وبعض الكائنات الحقيقية النواة Eukaryotic organisms كالخمائر Yeasts.

❖ ويتراوح حجم البلازميد ما بين (١٠٠٠ – ١٠٠٠٠٠٠) زوج من القواعد النيتروجينية.

❖ ويحمل البلازميد عدد من الجينات التي قد يحتاجها الكائن الحي للبقاء على قيد الحياة مثل مقاومة

المضادات الحيوية Antibiotic resistance أو تحمل السموم الموجودة في البيئة أو مسؤولية عن إنتاج

بروتينات تساعد على التخلص من الكائنات المنافسة الأخرى أو لها علاقة بالقدرة الأمراض للـ كائن أو

قد تؤدي مهام أخرى مثل تثبيت النيتروجين.

البلازميد Plasmid

- ❖ ويشبه البلازميد في بعض خواصه الفيروس من حيث كونه مادة وراثية قادرة على الانتقال من كائن لآخر غير انها لا تمتلك القدرة على النمو أو الاستجابة للبيئة المحيطة أو القيام بالعمليات الحيوية (الميتابولزم) بالاعتماد على نفسها لذلك لا يمكن تصنيفها على انها كائنات حية مستقلة.
- ❖ كما تختلف البلازميدات عن الفيروسات في كونها مادة وراثية DNA عارية (لا تحتوي على اغلفة بروتينية أو دهنية) كما هو الحال في الفيروسات.
- ❖ تعتبر البلازميدات من العوامل الأساسية التي تساعد على انتقال الجينات أفقيا Horizontal gene transfer (بين افراد الطائفة الواحدة للأحياء المجهرية) خلال عملية تسمى بالإقتران Conjugation.
- ❖ وبغض النظر عن طريقة انتقال البلازميد فإنها تعتبر الميكانيكية الرئيسية لنشر جينات مقاومة المضادات الحيوية بين البكتريا.

البلازميد Plasmid

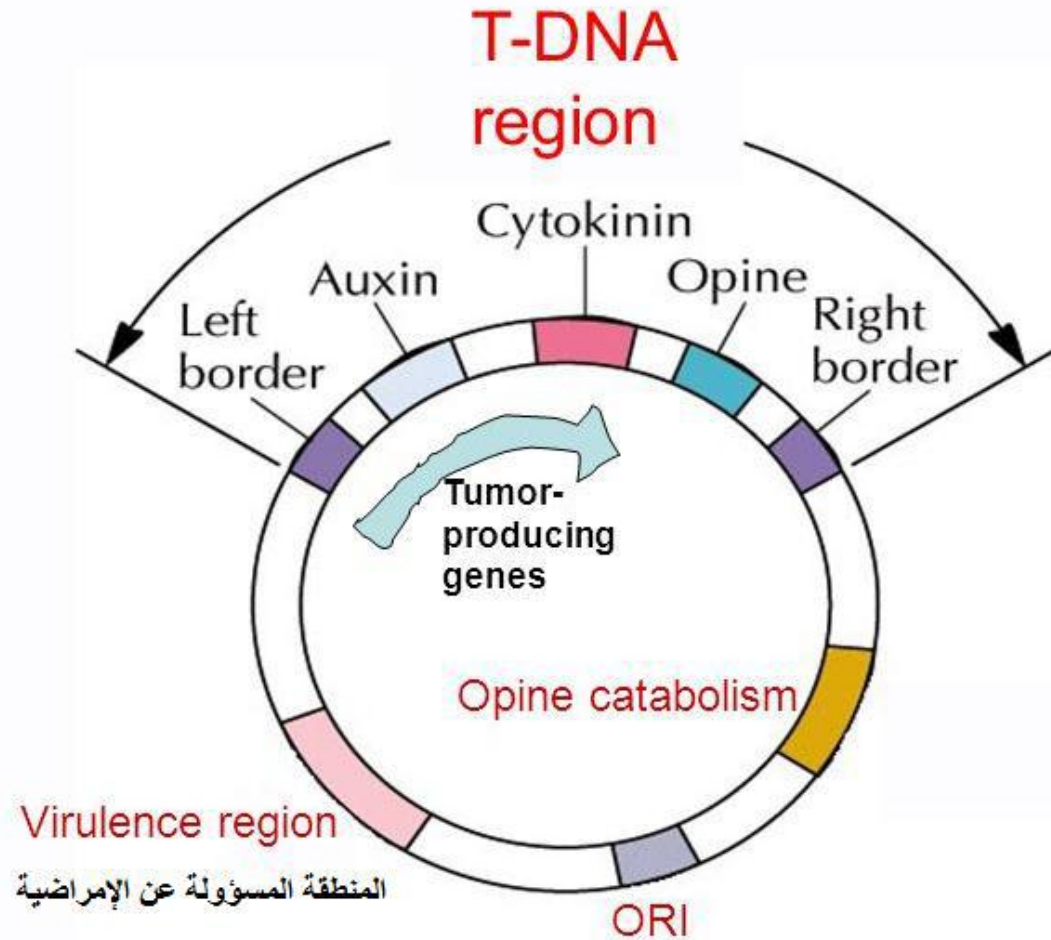
وتصنف البلازميدات إلى:

- ❖ بلازميدات الخصوبة أو الاقتران (F-plasmids) .Fertility or conjugative plasmids
- ❖ بلازميدات المقاومة : (R-Plasmids) .Resistance plasmids
- ❖ بلازميدات الكوليسين Colicin or Col plasmids
- ❖ بلازميدات الامراضية Virulence plasmids

تستخدم البلازميدات (بعد تعديلها صناعيا) في الهندسة الوراثية كنواقل للجينات في عملية الكلونة Cloning حيث تعمل على اىصال قطع ال DNA المعدل Recombinant DNA إلى العائل المستهدف.

Ti Plasmid

البلازميد



Left border المنطقة المحصورة بين
Right border وتمثل الجينات التي
تتقل إلى النبات كشرائط DNA مفرد

منطقة T-DNA المسؤولة عن تورم نسيج
النبات يمكن استبدالها بالجينات المفيدة المراد
نقلها للنبات

المنطقة المسؤولة عن الإصابة

البلازميد Plasmid

ويمتلك البلازميد سعة محدودة لنقل الجينات الخارجية حيث انه لا يستطيع نقل اكثر من ١٠٠٠٠ - ٢٠٠٠٠ زوج قاعدي وفي حالة كون القطعة المراد نقلها أكبر من هذا الحجم فيتم اللجوء إلى إحدى الطرق التالية:

- ❖ ملتهمات البكتريا Bacteriophage التي يتم ازالة جينات التحلل Lysogeny منها حيث أن هذه النواقل في حالتها الاعيادية لا تتمكن من نقل اكثر من ٥٠٠٠ - ١١٠٠٠ زوج قاعدي أما لو تم ازالة بعض الجينات غير الضرورية فيها مثل الجينات المسؤولة عن التحلل فإنها ستتسع لحوالي ٢٤٠٠٠ زوج قاعدي.

- ❖ الكروموسومات البكتيرية الصناعية Bacterial Artificial Chromosomes (BACs) وهي مشتقة من بلازميدات الخصوبة F-plasmids وتتسع لنقل ١٥٠٠٠ - ٣٠٠٠٠٠ زوج قاعدي.

البلازميد Plasmid

❖ كروموسومات الخميرة الصناعية : Yeast Artificial Chromosomes (YACs) ويستخدم لنقل قطع جينية يبلغ حجمها ١٠٠٠٠٠ - ٣٠٠٠٠٠٠ زوج قاعدي.

❖ الكوزميدات : Cosmids وهي عبارة عن بلازميدات هجينة يدمج معها مواقع التصاق خاصة بالملتهمات البكتيرية **Cohesive sites (cos)** وبسبب وجود هذه المواقع فإن الكوزميد يمكن ان يدمج في رأس الفيروس الملتهم للبكتيريا يستطيع نقل ٢٨٠٠٠ - ٤٥٠٠٠ زوج قاعدي.

❖ الكروموسوم البشري الصناعي Human artificial chromosome وقد يكون هذا الناقل مفيدا في نقل الجينات للخلايا البشرية وليس هناك حدود لحجم القطع التي يمكنه نقلها.

