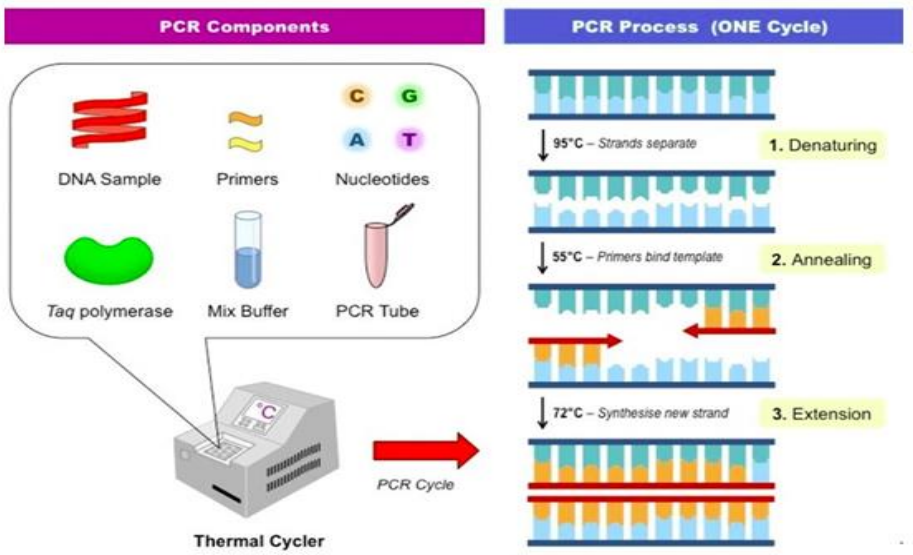
المحاضرة الخامسة+ السادسة

البلمرة وتضاعف الدنا



اعداد أستاذ المادة

م .م. تغريد هادي ماهود

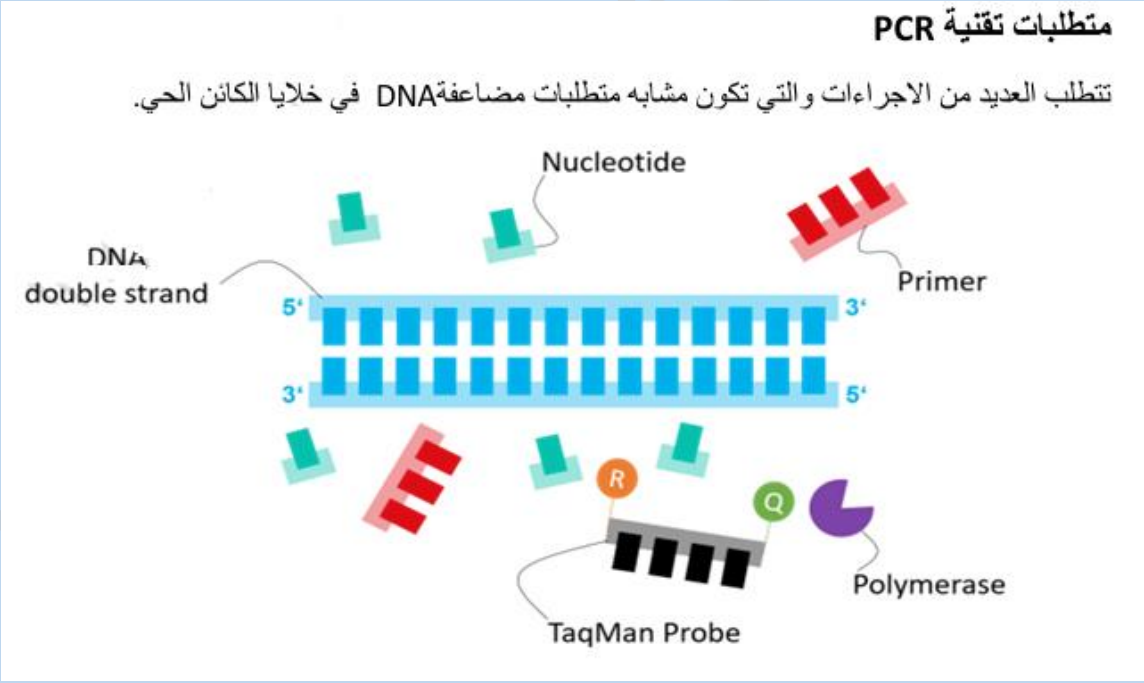
م. هبة جمعه

تفاعل البلمرة المتسلسل(PCR)

هي طريقة مستعملة بشكل واسع في علم الاحياء الجزيئي. حيث تعمل على انتاج سريع لمليارات النسخ من عينة خاصة للحمض النووي الريبوزي منقوص الاوكسجين "(DNA) مما يمكن العلماء من اخذ عينة صغيرة جدا من الدنا وتضخيمها الى كمية كبيرة تكفي لدراستها بالتفصيل.

تم اختراع تفاعل البوليمريز المتسلسل في عام 1983 من قبل الكيميائي الحيوي الأمريكي كاري موليس ويعتبر هذا التفاعل أساسا للعديد من الفحوصات الجينية . وتتضمن تحليل عينات قديمة من الدنا وتحديد العوامل المسببة للعدوى باستخدام تفاعل البوليمريز المتسلسل. يتم تضخيم نسخ بكميات صغيرة جدا من تسلسلات الحمض النووي في تسلسلات او دورات من تغيرات درجة الحرارة حيث يعتبر تفاعل سلسلة البوليمريز المتسلسل شائعا حاليا و لا غنى عنه في كثير من الأحيان حيث يستخدم في المختبرات الطبية والبحوث المخبرية السريرية في مجموعة واسعه من التطبيقات العملية والتي تتضمن البحوث الطبية الحيوية والطب الشرعي الجنائي

تعتمد غالبية طرق تفاعل البوليمريز المتسلسل على التدوير الحراري. تعرض الدورة الحرارية المواد المتفاعل لدورات متكررة من التدفئة والتبريد للسماح بتفاعلات مختلفة تعتمد على درجة الحرارة . على وجه التحديد. انصهار الدنا وتناسخ الحمض النووي الريبي منقصو الاوكسجين المتحكم عن طريق الانزيم



1.القالب:Template

يمثل في DNA المراد تضخيمه، وهذا التضخيم لا يشمل على القالب بأكمله وإنما جزء منه، وهذا يُسمى بالجزء المستهدف.

2.البادئ:Primer

يمثل بقطعة صغيرة من DNA بشريط مفرد يكون مكملاً في تسلسله للقواعد النيتروجينية على طرفي الجزء المستهدف، وهي ضرورية لبدء تضاعف الـDNA.

يتطلب تحضير الـ Primer معرفة بعض تسلسلات القواعد النيتروجينية على طرفي الجزء المستهدف من القالب.تتراوح أطوال الـ Primer المستخدمة في تقنية الـ PCR ما بين 20 – 30 قاعدة نيتروجينية.

3.إنزيم:DNA polymerase

وهو أساسي في هذه التقنية إذ يحفز عملية التضاعف وبالتالي عملية تضخيم الـDNA.

ينبغي أن يكون هذا الإنزيم مقاوماً لدرجات الحرارة، يعد إنزيم Taq Polymerase المستخلص من بكتيريا Thermus aquaticusمن أكثر الأنواع استخداماً.

4.النيوكليوتيدات:

يتم تجهيزها على شكل نيوكليوسيدات ثلاثي الفوسفات معقمة - (deoxynucleosides triphosphate dNTPs)، بأنواعها الأربعة التي تدخل في بناء.DNA

5.المحاليل المنظمة وملح كلوريد المغنيسيوم:($MgCl_2$)

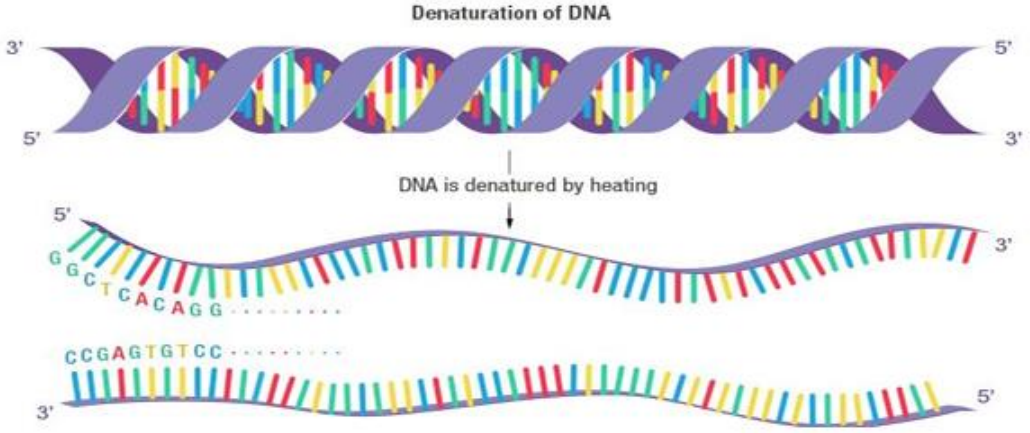
هناك العديد من المحاليل المستخدمة في هذه التقنية من ضمنها المحلول المنظم (Tris-HCl) وإنزيم Taq Polymerase.

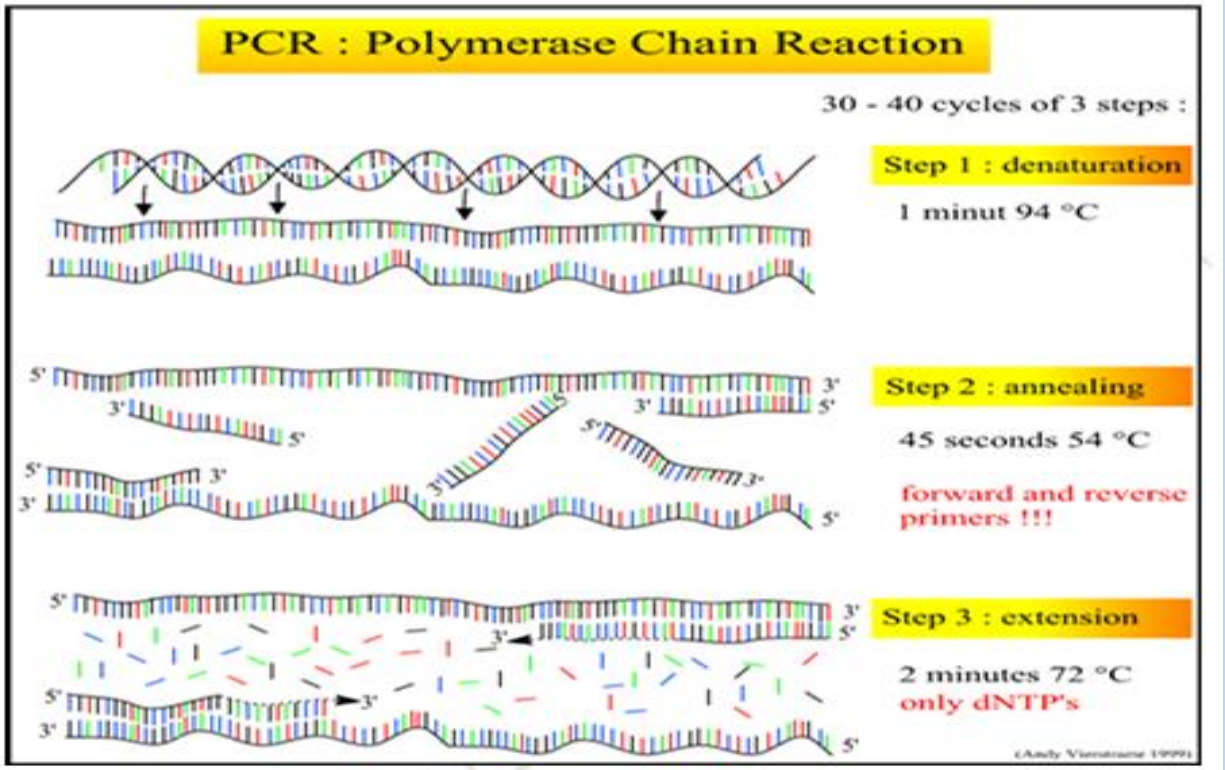
6.تقنية التفاعل المتسلسل بالإنزيم:

تحتاج إلى جهاز يقوم بتنظيم الحرارة وبرمجتها في ضوء مراحل التفاعل المختلفة، وعبر كل دورة يُسمى Thermocycl جهاز التدوير الحراري

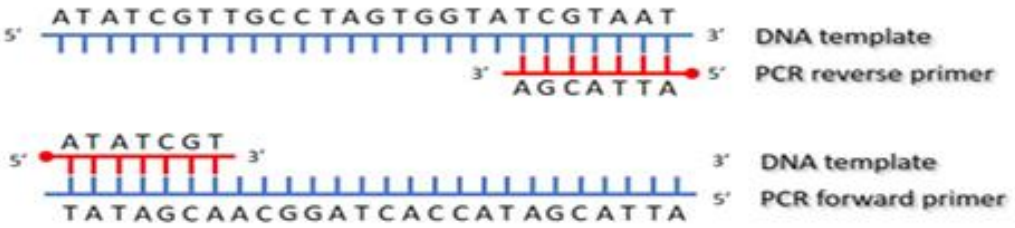
خطوات التفاعل

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.

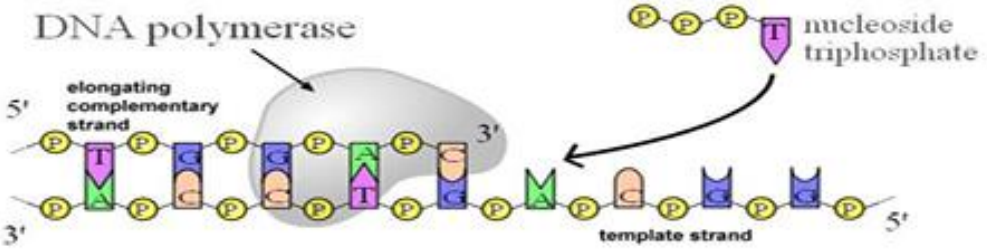


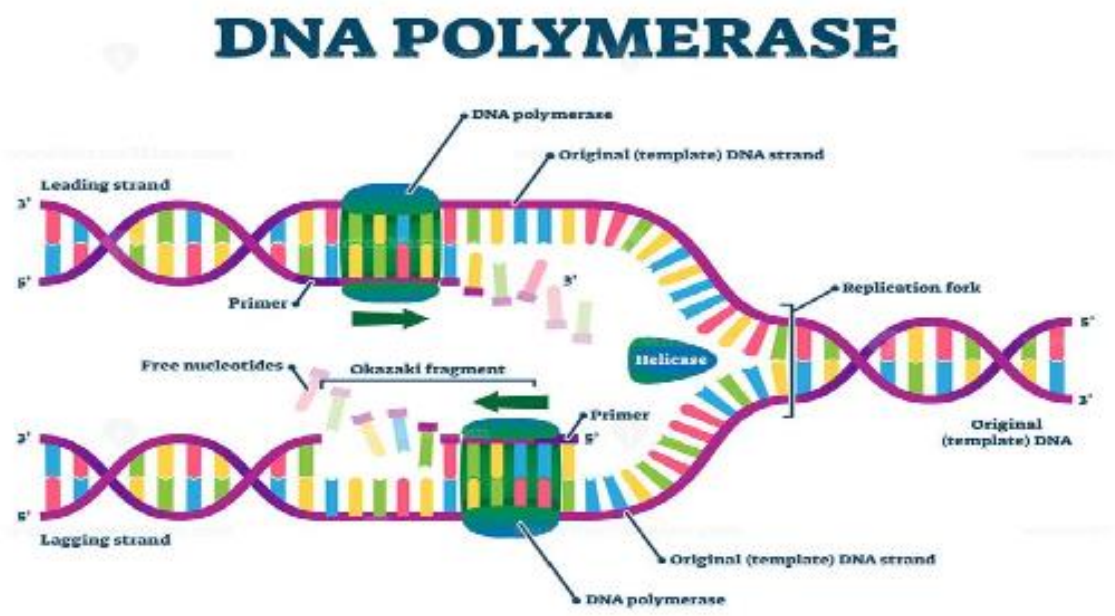


2. **ارتباط البوادئ:** تتم بخفض درجة الحرارة الى°C 50 – 60 تؤدي الى تكوين اواصر هيدروجينية بين البوادئ وبين التتابعات المكملة لها على اشرطة القالب.



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.





تطبيقات تفاعل البلمرة

- الكشف عن الفيروسات، وهذه الطرق هي الأدق في تحديد نوع وجنس الفيروس وكميته.
- معرفة طول الحامض النووي.(DNA)
- تحديد الجين المطلوب من خليط من الجينات.
- في مشروع الخارطة الجينية البشرية.(Human Genome Project)
- في مجال الطب الشرعي (اختبار الأمومة، حالات الاغتصاب، تحديد الهوية) وغيرها من التطبيقات المخبرية والجينية.
- تحديد الأنماط الجينية (Genotyping) للفيروس الكبدي.C
- تشخيص الأمراض السرطانية بالكشف الجيني للتوضّع غير الطبيعي للأسس الأزوتية للجينات الورمية.(Oncogenes)
- تعيين الأنماط النسيجية (HLA – Tissue Typing) في مجال زراعة الأعضاء.

م.م. تغريد هادي ماهود