الكلية	التربية للعلوم الصرفة
القسم	علوم حياة
المادة باللغة الانجليزية	Practical Molecular Biology
المادة باللغة العربية	البايولوجي الجزيئي العملي
المرحلة الدراسية	الرابعة
اسم التدريسي	م.م. حسين رياض عبدالكريم
عنوان المحاضرة باللغة الانجليزية	Polymerase Chain Reaction (PCR)
عنوان المحاضرة باللغة العربية	تفاعل البلمرة المتسلسل المتبلمر
رقم المحاضرة	8
المصادر والمراجع	Watson, J.D.; Baker, T.A,; Bell, S.P.; Gann, A. (2004). Molecular .Biology of the Gene. 5th Ed. Pearson edution
	Clark, D. (2006). Molecular Biology Understanding the Genetic Revolution. Elsevier Inc.
	Santos, D.M. (2011). Genetic Engineering, Recent Developments in application. Apple Academic press.
	عماش، هدى صالح مهدي.(١٩٩٤). مبادئ علم الحياة الجزيئي. كلية العلوم . جامعة بغداد.
	البكري ، غالب حمزة.(١٩٩٠). مبادئ الهندسة الوراثية. جامعة البصرة.

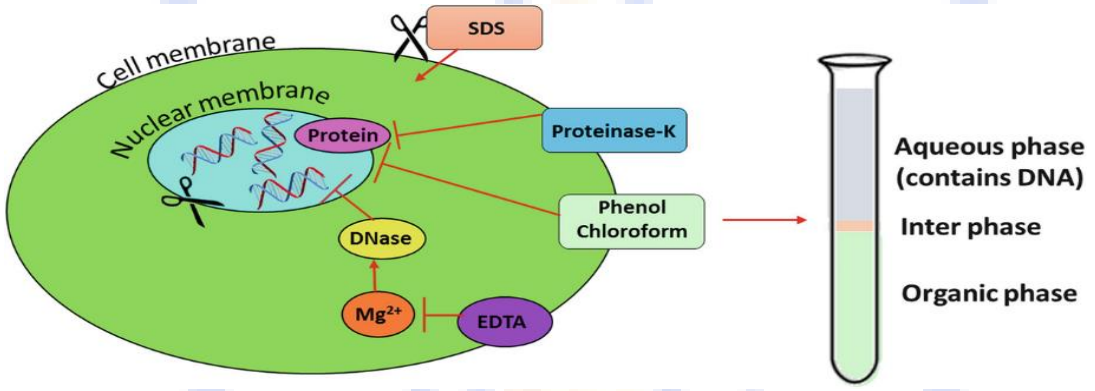
محتوى المحاضرة

UNIVERSITY OF ANBAR

UNIVERSITY OF ANBAR

البايولوجي الجزيئي العملي

لطلاب كلية التربية للعلوم الصرفة \ قسم علوم الحياة \ المرحلة الرابعة



UNIVERSITY OF ANBAR

Polymerase Chain Reaction (PCR):

هي أحد التقنيات المستخدمة في البيولوجيا الجزيئية التي طورت من قبل العالم Kary Mullis التي تتضمن تضخيم نسخة أو نسخ قليلة من قطعة معينة من الـ DNA إلى أضعاف عديدة قد تصل إلى 10^{11} أو 10^{12} ضعفاً خارج النظام الحيوي Invitro. أي أنها طريقة لنسخ الحمض النووي في المختبر. أي أنها 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.

تتم هذه العملية في العادة عن طريق سلسلة خطوات تتكرر من 20-40 مرة يتم فيها تغيير درجات الحرارة ويسمى كل تكرار دورة Cycle. وتشمل كل دورة ثلاث خطوات تتغير فيها درجات الحرارة وتستمر كل خطورة لفترة زمنية معينة تعتمد على خصوصية التفاعل.

هناك عددٌ من تطبيقات الـ PCR، وتتضمن :

1-الكشف عن الطفرات الوراثية :وذلك عن طريق وضع البوادئ الخاص بالطفرة او الجين المطلوب .

2-تعيين البصمة الوراثية.

3-الكشف عن الفيروسات.

5-تعتبر هذه التقنية العنصر الاهم في عملية التجميع الجيني (Recombinant).

6-استخدامة في نهايات الجين لتصبح متوافقة مع انزيمات القطع (Restriction enzymes).

7-تحديد تتابع القواعد النيتروجينية للحامض النووي.

8-معرفة طول الحمض النووي.

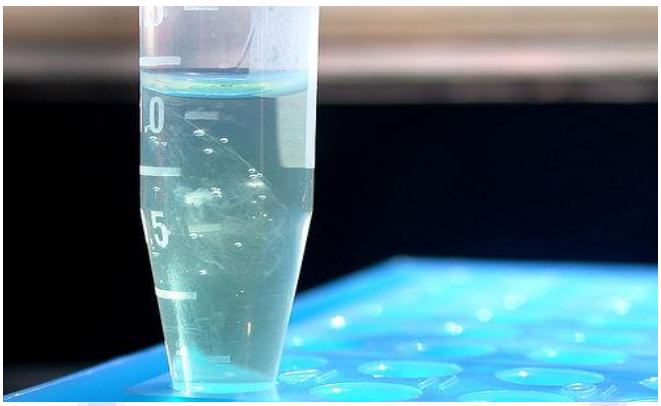
9-يستخدم في مشروع الخارطة الجينية البشرية(Human genome project).

10-يستخدم في Southern plot.

11- في مجال الطب الشرعي (اختبار الامومة – الادلة الجنائية – حالات الاغتصاب – تحديد الهوية ...الخ)

مكونات او متطلبات تفاعل البلمرة

- ☆ **قالب الدنا DNA template:** قطعة الـ DNA التي تعمل كقالب للاستنساخ.



☆ **البادئ The primer:** يعرف البادئ بكونه قطعة صغيرة من الحامض النووي ترتبط بقالب شريط الدنا المفرد عند النهاية -3، وهي ضرورية للشروع بتضاعف الـ DNA

البوادئ نوعان :

☆ **• أمامي (Forward)**

☆ **• خليف (Reverse)**

☆ **وهي تسلسل من القواعد النيتروجينيه في شريط واحد قصير**

☆ **(20-25 bp) مكمل لبداية الجزء المراد تضخيمه في الحمض النووي .**

☆ **أنزيم البلمرة او انزيم البناء Taq polymerase:** وهو الإنزيم الذي يقوم ببناء وترتيب القواعد النيتروجينية (وحدات الحمض النووي DNA). يستخرج من سلالة بكتيرية تسمى ***Thermus aquaticus*** التي تتواجد طبيعياً في الينابيع الحارة، ولا يتأثر بدرجات الحرارة المرتفعة (درجة الحرارة المثلى له 72 °م).

☆ **النيوكليوسيدات ثلاثية الفوسفات (dNTPs):** مجموعة متفرقة من القواعد النيتروجينية (A T C G) ليتمكن الإنزيم من ترتيبها في مواقعها أثناء عملية نسخ الحمض النووي.

✯ **المحلول المنظم Buffer solution:** يوفر بيئة كيميائية مناسبة لتحقيق النشاط والثبوتية الأمثَلين لبوليميريز الدنا.

✯ **أيونات فلزية مناسبة:** أهمها المغنيسيوم Mg^{+2} الذي يعتبر عامل مساعد cofactor في تفاعل الـ PCR.

✯ **جهاز البلمرة المتسلسلة Thermal cycler:** ويقوم هذا الجهاز بتغير درجة الحرارة بشكل سريع ، لأن تغير درجة الحرارة هو الأساس الذي تقوم عليه فكرة هذه التقنية.

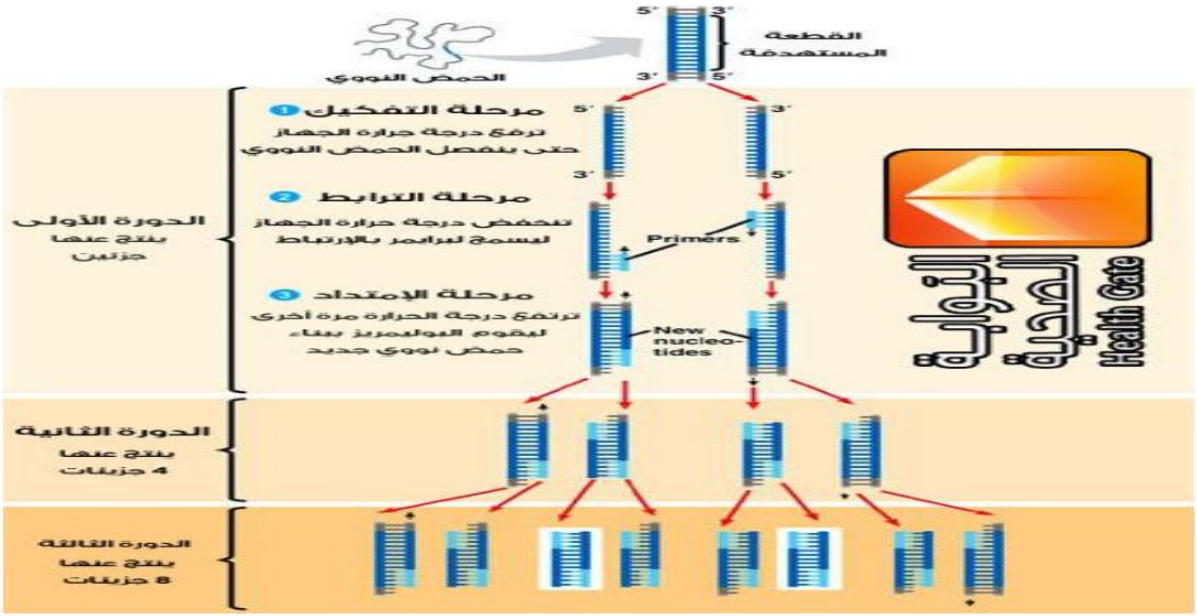
مراحل تقنية PCR ثلاث مراحل في الدورة الواحدة

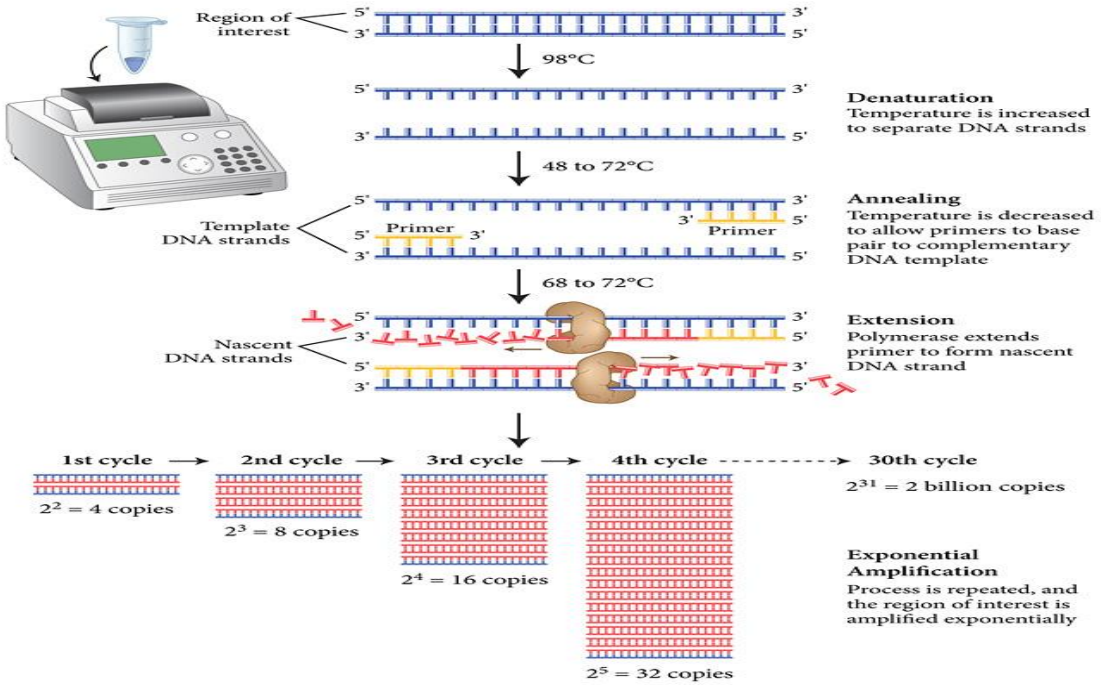
✯ **1.مرحلة التفكيك Denaturation** : رفع الحرارة إلى 94˚م وذلك لفك الحمض النووي (DNA) الأصل .

✯ **2. مرحلة الالتصاق annealing** : إنزال الحرارة إلى ما بين 55-60˚م ليقوم البرايمر البادئ بالألتساق فيزيائياً بواسطة الروابط الهيدروجينية مع الحمض النووي (DNA) الأصل .

✯ **3. مرحلة الامتداد extension** : ثم يقوم برفع درجة الحرارة إلى 75˚م ليقوم البلمريز بعمله في بناء الحمض النووي (DNA) الجديد .

✯ وهذه المراحل الثلاث تعتبر دورة كاملة وفيها يصبح الحمض النووي (DNA) الأصل قد تضاعف ، وتعتمد كمية ناتج الحمض النووي (DNA) على عدد الدورات (والصورة التالية توضح العملية) .





UNIVERSITY OF ANBAR

يجهيز Master Mix في أنبوبة وذلك بوضع جميع المكونات ما عدا عينة التفاعل

	المكونات	الكمية بالمايكروليتر (X 1)
1	ماء مقطر (d.H2O)	17
2	محلول منظم (PCR buffer 10x)	2.5
3	خليط القواعد النتروجنية (dNTPs)	2
4	بادئ أمامي (forward Primer)	0.6
5	بادئ خلفي أو عكسي (reverse primer)	0.6
6	إنزيم عديد البلمرة (Taq polymerase)	0.3
7	عينة التفاعل (DNA sample)	2
	المجموع الكلي بالمايكروليتر µl	25 µl

طريقة عمل جهاز PCR

☆ نضيف 23 مايكروليتر من المزيج الرئيسي على كل أنبوب من أنابيب PCR ثم نضيف 2 مايكروليتر من عينه الدنا (DNA).

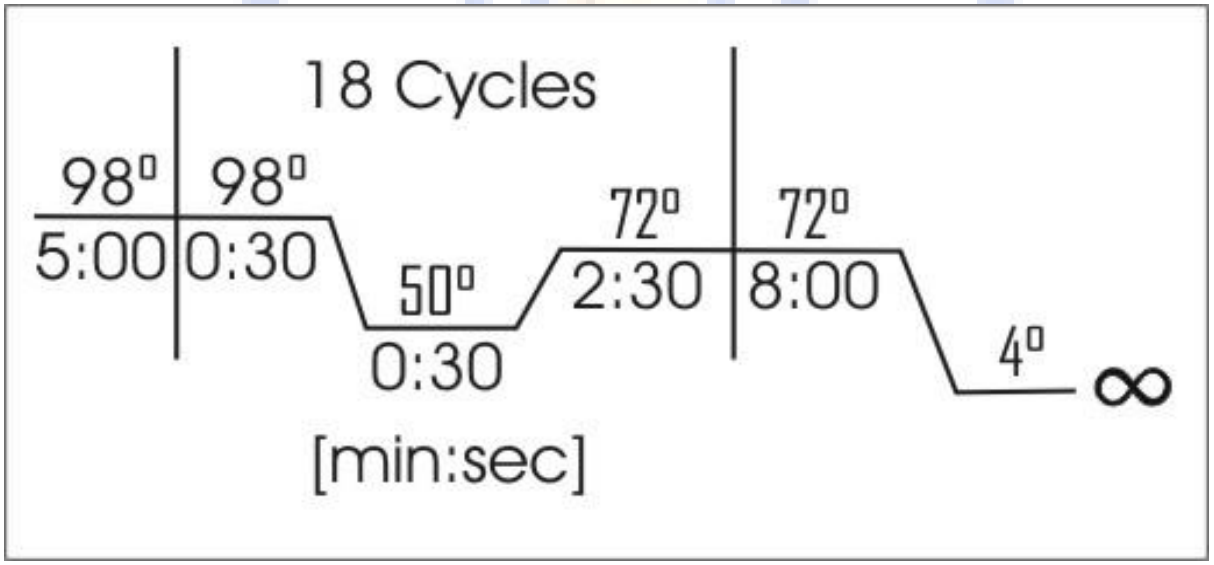
☆ نضع جميع الأنابيب في جهاز الطرد المركزي 3000 دورة في الدقيقه لمدة دقيقه واحدة لخلط جميع العينات وإزالة جميع الفقاعات .

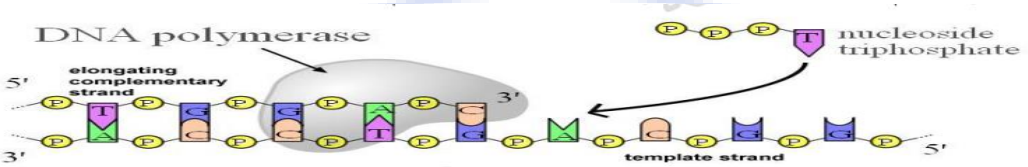
☆ باستخدام لوحة المفاتيح وشاشة عرض الجهاز يتم ادخال الدورة المصممة لأي قطعة من الحمض النووي المفصول .

خطوات تفاعل PCR:موضحة كما في الجدول الاتي:

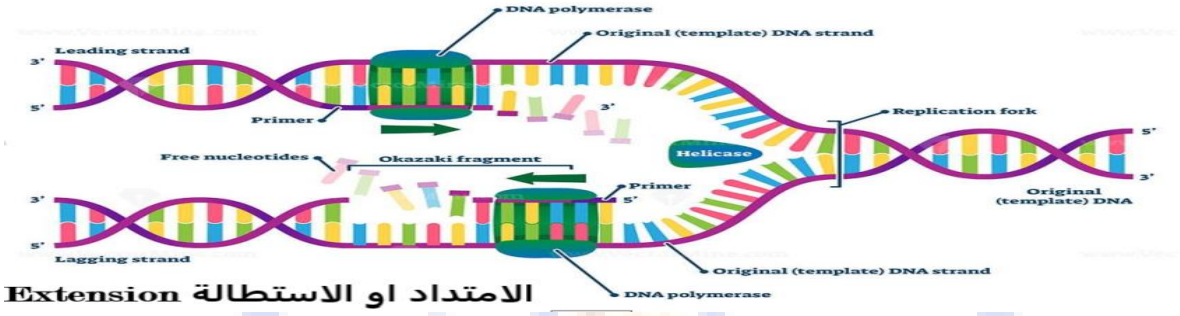
الخطوات	درجة الحرارة	الوقت	التفاعل
1	98°c	5:00	تنشيط الأنزيم والتهيئة لمرحة تفكيك الحمض النووي DNA
2	98 °c	0:30	مرحلة التفكيك
3	50°c	0:30	مرحلة الإلتصاق (درجة البادئ)
4	72 °c	2:30	مرحلة الإمتداد
5			إعادة الخطوة رقم 2 الى 4 لـ 18 - 20 دورة
6	72°c	8:00	ضمان اكتما مرحلة الإمتداد وإعادة التصاق الشريطين مع بعضهما واكمال عدد الدورات للنسخ
7	4°c	∞	حفظ العينة

مخطط خطوات تفاعل الـ PCR





DNA POLYMERASE



Extension الامتداد او الاستطالة

أنواع PCR

1. PCR العادي : وهو ما تم شرحه والتطرق اليه في الخطوات السابقة .

2. rtPCR : وهو اختصار لـ (Real Time PCR) : وهذا النوع يقوم على نفس المبدأ ولكن الخلاف الوحيد يكون مربتط الجهاز بكمبيوتر لتحديد الوقت الحقيقي لبدا التفاعل ومن ثم الكمية الحقيقية لعدد نسخ الحمض النووي (DNA) ويعتمد ذلك على وجود قواعد نيتروجينية حرة مشعة لتحديد ذلك . مما يسهل على الباحثين الوقت لتحدد وجود الجين المطلوب أو لا ، وكمية الجين بدون الوصول إلى نهاية الدورات الحرارية المحددة

3- الطريقة التقليدية Traditional PCR

4- تفاعل البلمرة المتسلسل المتضاعف Multiplex PCR

5- تفاعل البلمرة المتسلسل عكس الاتجاه Inverse PCR

6- تفاعل البلمرة المتسلسل المتداخل Nested PCR

7- تفاعل البلمرة المتسلسل شبه المتداخل Semi-Nested PCR

8- تفاعل البلمرة المتسلسل البداية الساخنة Hot Start PCR

9- تفاعل البلمرة المتسلسل الخاص بالمستعمرات Colony PCR

10- تفاعل البلمرة المتسلسل القطع الطويلة Long PCR

11- تفاعل البلمرة المتسلسل القطع الطويلة الدقيق Long Accurate PCR

12- تفاعل البلمرة المتسلسل غير المتناسق Asymmetric PCR

13- تفاعل البلمرة المتسلسل Specific Allele PCR

14- تفاعل البلمرة المتسلسل في الموقع In Situ PCR

1987 1408
UNIVERSITY OF ANBAR