الجامعة السورية الخاصة
SYRIAN PRIVATE UNIVERSITY

السنة الثالثة

هندسة وراثية

د.شادي سكرية

4م

الجامعة السورية الخاصة
SYRIAN PRIVATE UNIVERSITY

كـلـيــة الصيدلة
Faculty of Pharmacy

السنة الثالثة

مقرر الهندسة الوراثية (الجينية)
الفصل الرابع
2018 -2017
د. شادي سكرية

مبدأ تقانة PCR

يقوم مبدأ هذه التقانة على تكرار عملية تضاعف DNA في الزجاج باستخدام مرئسات (بادئات) Primers نوعية.

المرئسات (البادئات) عبارة عن شفع من قليلات النكليوتيدات Oligonucleotides تصنع بشكل كيميائي في المختبر، ويتم اختيارها بشكلٍ نوعي بحيث **تتشافع مع أطراف التسلسل المراد تضخيمه في النهاية `3.**

تستخدم قليلات النكليوتيدات هذه كبادئة لاصطناع سلسلة جديدة من DNA اعتباراً من DNA أحادي السلسلة "القالب" (Matrix أو Template) الذي ينتج عن تسخين DNA الهدف ثنائي السلسلة.

يصنع DNA الجديد بوساطة تفاعل أنزيمي في الزجاج (تفاعل اصطناع أو بلمرة) ابتداءً من البادئات المتشافعة على DNA القالب وذلك باستخدام أنزيم DNA بوليميراز خاص.

1985

Invitro amplification achieved
--with *E.coli* DNA polymerase--

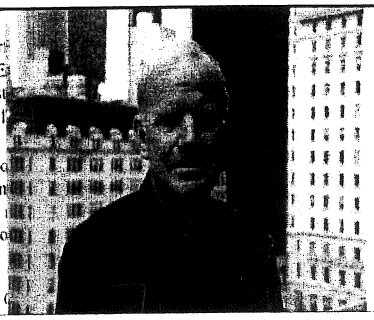
unstable with heat
فكرة رائعة لكن غير عملية.
! إضافة الأنزيم باستمرار.
لأنه يتخرب بالحرارة

1988

اكتشاف بوليميراز مقاومة للحرارة
Invitro amplification achieved
--with *Taq* DNA polymerase--

1989

Taq DNA polymerase cloned and expressed in *E.coli*



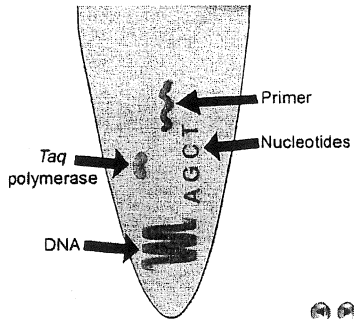
Kary Mullis, the inventor of PCR, was awarded the Nobel Prize in Chemistry
مخترع PCR وحامل جائزة نوبل في الكيمياء

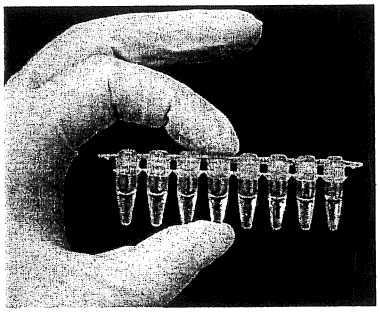
Developed automatic "thermocycler" programmable heat block
تطوير جهاز آلي يعرف بالمدور الحراري يحوي على قالب حراري قابل للبرمجة

عزل هذا الأنزيم ابتداءً من بكتيريا محبة للحرارة Thermopile، تعيش في الينابيع الحارة، حيث يبقى هذا الأنزيم فعالاً ولا يتخرب أثناء مرحلة التسخين الضرورية لفك تشافع الحلزون المزدوج لـDNA أي أنه يتحمل درجة حرارة تقارب 95م°.

Hot water bacteria: *Thermus aquaticus Taq* DNA polymerase

المواد اللازمة لتفاعل PCR:
-DNA القالب.
-شفع من المرئسات (البادئات).
-أنزيم DNA بوليمراز، من نمط Taq بوليميراز مع البفر المناسب.
-نكليوتيدات حرة dNTPs.

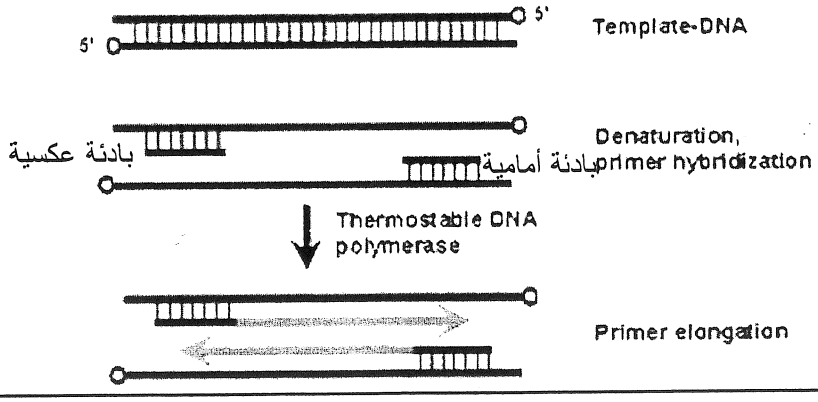




المدور الحراري

يقوم تفاعل PCR على تتالي دورات من ثلاث مراحل:
- المرحلة الأولى فصل شريطتي DNA التمسخ Denaturation فك التشافع برفع درجة الحرارة (بدل استعمال الهليكاز).
- المرحلة الثانية تشافع البادئات Annealing مصنعة جاهزة (بدل استعمال البريماز).
- المرحلة الثالثة اصطناع DNA الجديد (Taq بوليميراز بدل البوليميراز III).

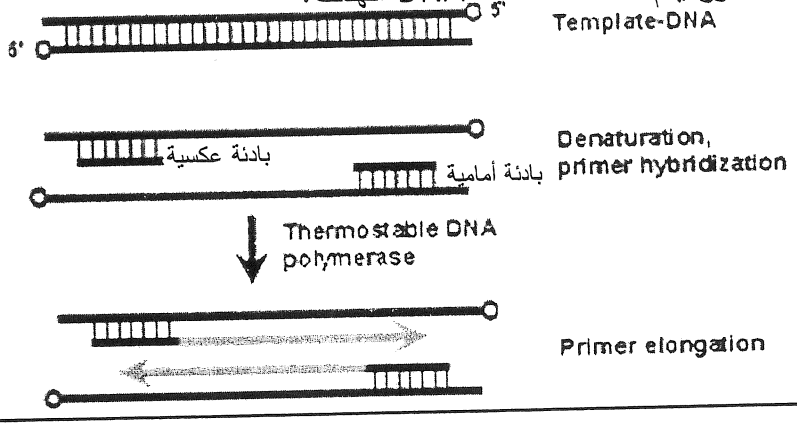
في نهاية كل دورة يتم مضاعفة كمية DNA الهدف.



يقوم تفاعل PCR على تتالي دورات من ثلاث مراحل:

- المرحلة الأولى فصل شريطتي DNA (فك التشافع أو التمسخ Denaturation).
- المرحلة الثانية تشافع البادئات Annealing .
- المرحلة الثالثة اصطناع DNA الجديد (استطالة).

في نهاية كل دورة يتم مضاعفة كمية DNA الهدف.



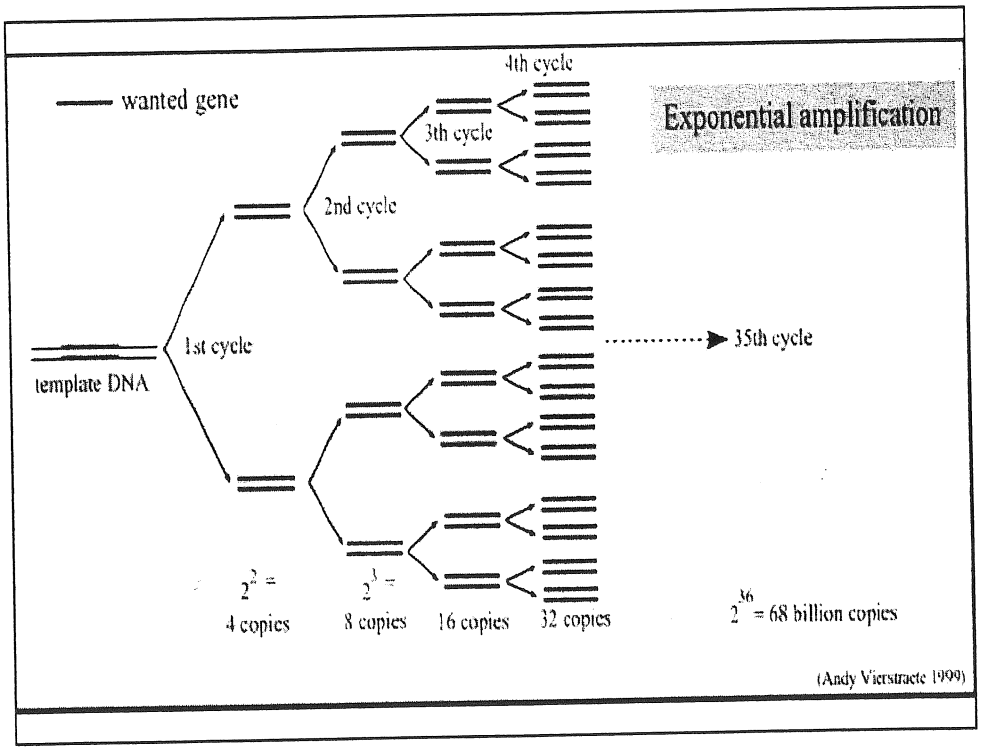
تُسخن شدفة DNA المراد تضخيمها أو تضخيم أجزاءٍ منها إلى نحو 94م°حيث تُحَطم الروابط الهيدروجينية بين الأسس المتشافعة للحلزون المزدوج لـDNA عند هذه الدرجة.

تسمى هذه العملية فك التشافع أو التمسخ Denaturation.

يتم بعدها تبريد الجملة إلى درجة حرارة تتراوح بين 55و70م° (درجة الحرارة هذه على علاقة وثيقة بطبيعة المرئسات وتدعى Tm المرئسة)، وعند درجة الحرارة هذه تتشافع المرئسات Annealing مع النهايات '3 من كل سلسلة أحادية الشريطة.

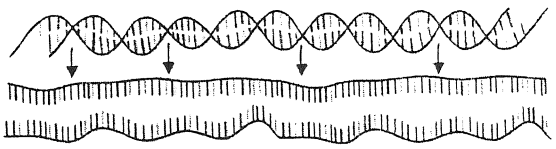
بعدها يتم رفع الحرارة إلى الدرجة 72م° حيث عند هذه الدرجة يعمل أنزيم DNA بوليميراز الخاص الذي تم إضافته إلى التفاعل على اصطناع شريطة جديدة من DNA.

- تستخدم الشدف المصنعة حديثاً في نهاية كل دورة كقالب في الدورة التالية وتتكرر تفاعلات الاصطناع دورة بعد دورة مضاعفةً عدد الشدف الناتجة بعد كل دورة.
- ومن هنا يأتي اسم التفاعل السلسلي للبوليميراز حيث يتم تكرار التفاعلات واحداً تلو الآخر بشكل سلسلة. وبصورة عملية يلزمنا تقريباً حوالي 30 دورة لتضخيم تسلسل ما من DNA بشكل فعال ويكون نظرياً عدد الشدف الناتجة هو 2^n حيث n هو عدد الدورات وبهذا الشكل يكون تزايد عدد شدف DNA المضخم وفقاً لمتوالية هندسية.
- لا تستغرق عادةً الدورة الواحدة أكثر من ٥ دقائق، فإذا كان من المفترض القيام بـ30 دورة فخلال حوالي ثلاث ساعات نكون قد ضخمنا التسلسل الهدف من DNA عدة ملاين من المرات.



PCR : Polymerase Chain Reaction

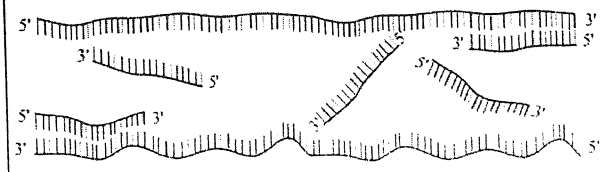
30 - 40 cycles of 3 steps :



Step 1 : denaturation

1 minut 94 °C

فك التشافع أو التمسخ

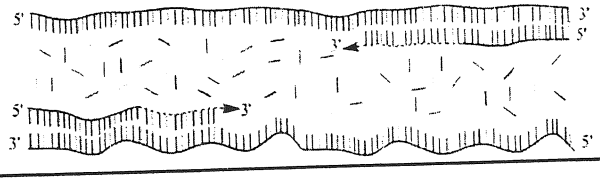


Step 2 : annealing

45 seconds 54 °C

تشافع المرنسات

forward and reverse primers !!!



Step 3 : extension

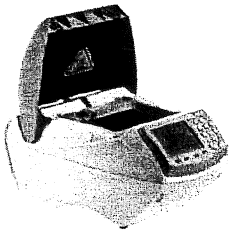
2 minutes 72 °C

only dNTP's

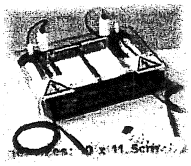
الاستطالة

كيفية قراءة النتائج: رحلان كهربائي تحليلي

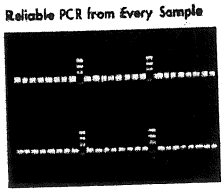
PCR



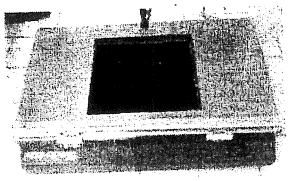
Agarose gel electrophoresis



3-4 hours



The final product

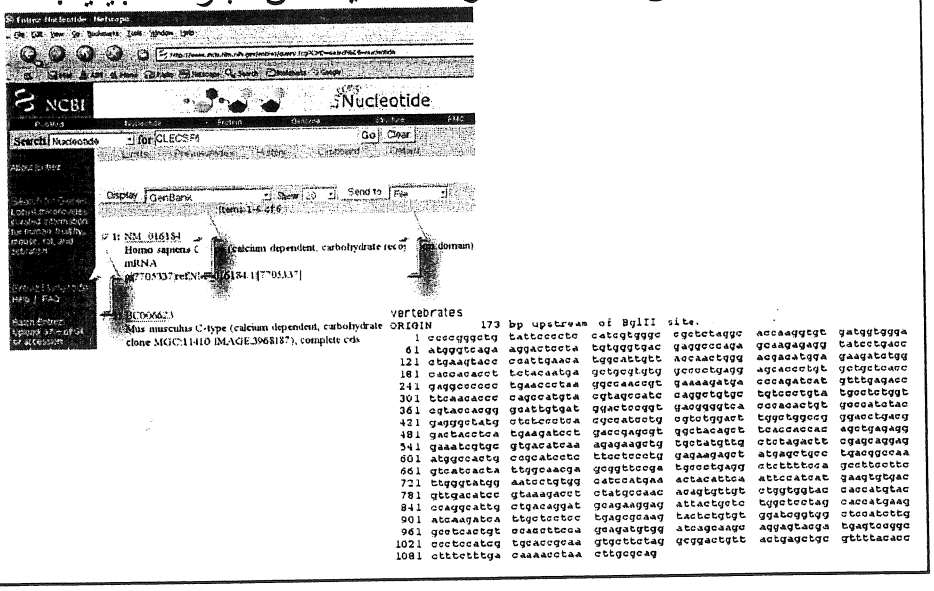


UV visualisation

- يعد PCR تفاعلاً حساساً للغاية إذ يمكن نظرياً بواسطته الكشف عن جزيء واحد من DNA ضمن عينة ما، كما يمكن الكشف عن آثار من RNA وذلك بتحليلها بنفس الطريقة بعد نسخها إلى DNA باستخدام أحد أنزيمات النسخ العكسي.
- ولقد أصبح من غير الممكن الاستغناء أو الاستعاضة عن هذه التقانة في تشخيص الكثير من الأمراض الجينية قبل الولادة وبعدها كما وتستخدم بشكل دوري في مختبرات الأوبئة والطفيليات للكشف عن الأمراض الفيروسية والجرثومية والطفيلية المختلفة بحساسية عالية جداً، إذ تعد تقانة عالية الدقة في الكشف المبكر عن الإمراضية حتى قبل أن تستطيع الطرائق المناعية التقليدية المعتمدة على تفاعل ضد مستضد أن تكشفها.
- ويستخدم PCR حالياً بكثرة في الطب الشرعي وذلك لكشف هوية المجرمين عن طريق فحص بصماتهم الجينية، وفي فحوصات تحديد البنوة حيث تعطي نتيجة مضمونة 100%.

فكرة عن خطوات العمل

- الحصول على التسلسل المراد تضخيمه من البنوك الجينية.



•تصميم المرئسات إما يدوياً أو باستخدام أحد البرامج الحاسوبية

يجب أن يتوفر في شفع المرئسات المستخدمة مجموعة من الشروط:

١- أن تكون قيمة Tm لكلا المرئستين قريبة جداً من بعضها لكي يتم التشافع مع التسلسل الهدف في درجة حرارة واحدة. كما يجب أن تكون هذه القيمة مرتفعة، فكلما كانت مرتفعة كان التفاعل نوعياً، مع مراعاة أن تبقى هذه القيمة أقل بخمس درجات على الأقل من درجة الحرارة الفضلى لعمل أنزيم البوليميراز المستخدم.

عادة ما تعطي قيم Tm المتراوحة بين 55 و ٦٨ درجة أفضل النتائج.

٢- يجب أن لا يسمح لها تسلسل نكليوتيداتها بأن تنثني على نفسها لتشكل بنية ثانوية معيقة للتشافع مع قالب DNA، وأن لا يسمح لها بأن تتشافع بعضها مع بعض.

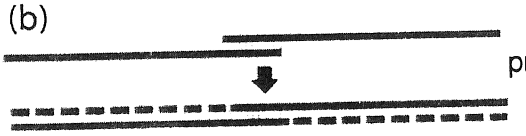
٣- من المفضل أن يكون محتواها من الأسس متوازناً وأن لا تتجاوز نسبة نكليوتيدي الستوزين والغوانين أي GC فيها 60%.

تتشافع مع ذاتها self-annealing فتنثني على نفسها لتشكل بنية ثانوية معيقة للتشافع مع قالب DNA.

(a)

hairpin loops
عروة الدبوس

(b)



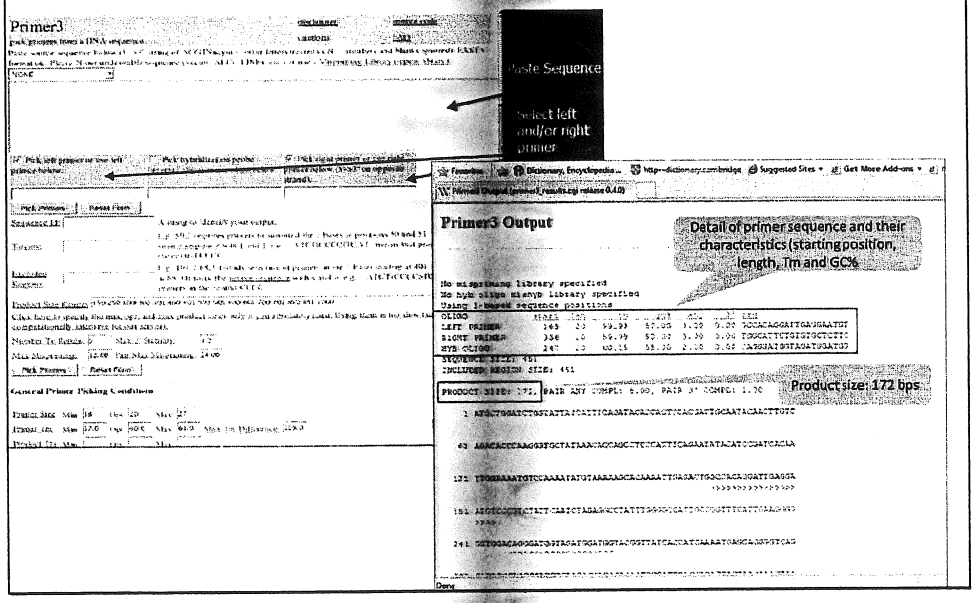
primer dimers

تتشافع مع بعضها، وتشكيل لثنائي قسيم primer dimers

حساب قيمة Tm المرئسة يدوياً:

$$T_m \approx 4(G\text{-}C) + 2(A\text{-}T)$$

يتوافر حالياً على الانترنت مجموعة من برامج المعلوماتية التي تستخدم بسهولة لتصميم المرئسات المثلى مثال Primer3



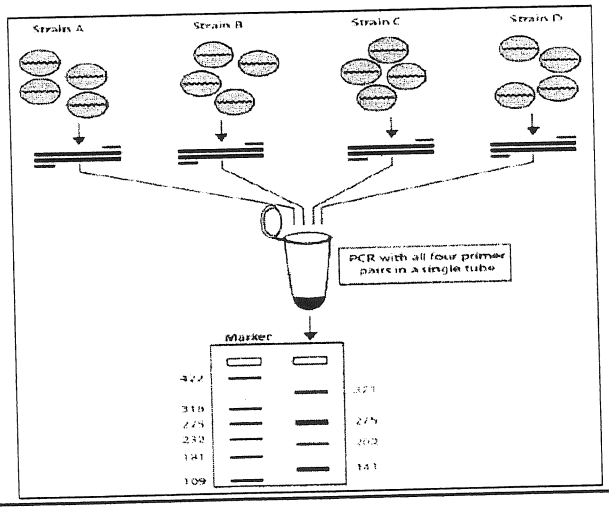
TYPES OF POLYMERASE CHAIN REACTION

- **Multiplex PCR**
  - في PCR العادي يستعمل شفع واحد من البادئات لتضخيم تسلسل معين من DNA، في حين يستعمل عدة أشفاع of primers multiple pairs لتضخيم عدة تسلسلات بنفس الوقت simultaneously في Multiplex PCR.
  - هذه التسلسلات قد تكون موجودة في DNA واحد أو في عدد من DNA.
  - أهم شروط هذا التفاعل إعطاء شدف مضخمة مختلفة بطولها amplicon sizes كفاية حتى يمكن تميزها كعصائب مختلفة على هلامة الرحلان الكهربائي.
  - من أهم تطبيقاتها: الكشف عن العديد من العوامل الممرضة Pathogens Identification، وتحليل الطفرات Mutation Analysis.

Pathogen Identification

تحديد هوية العديد من العوامل الممرضة بتفاعل واحد

توفير الوقت والجهد



Mutation Analysis

الكشف عن العديد من الطفرات في تفاعل واحد

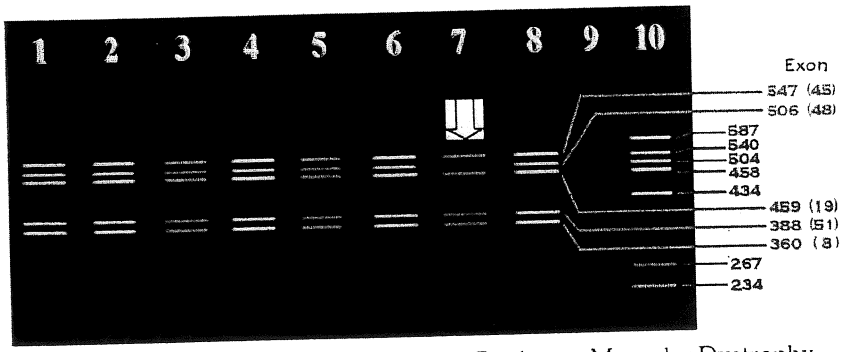


Fig. 2. Results of a multiplex PCR in a patient with Duchenne Muscular Dystrophy. Dystrophy gene has different mutations in exons; this is the cause of disease. In lane 7 is shown the absence of a band corresponding to exon 48 (506 bp) of the dystrophy gene (Hernández-Rodríguez et al., 2000; Hernández-Rodríguez & Restrepo, 2002).