



السنة الثالثة

هندسة وراثية

د. شادي سكرية

4م



كلية 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*

Saiki R. K., Scharf A., Arnheim N., Erlich H. A. Specific sequences and restriction sites for DNA amplification. *Science*, 1986, 232(4773):1329-1332.


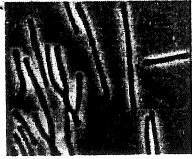

Mullis K. B., Faloona A. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the practical application of the polymerase chain reaction. *Quantitative Biochemistry*, 1987, 10(3):165-172.

Scharf S. J., Horn G. S. Rapid determination of DNA sequences. *Science*, 1985, 230(4761):1322-1326.

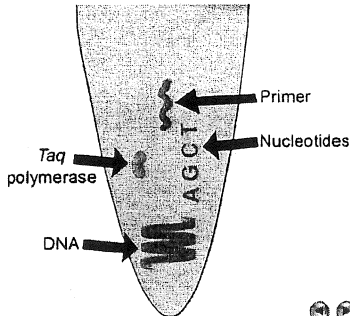
Kary Mullis, the inventor of PCR, was awarded the Nobel Prize in Chemistry
مخترع PCR وحامل جائزة نوبل في الكيمياء

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 95°.

Hot water bacteria: *Thermus aquaticus* *Taq* DNA polymerase



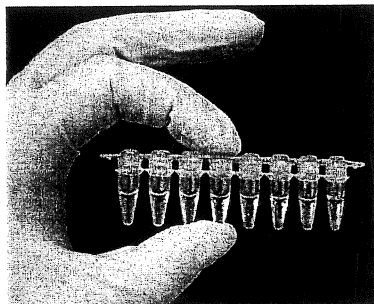
المواد اللازمة لتفاعل PCR:

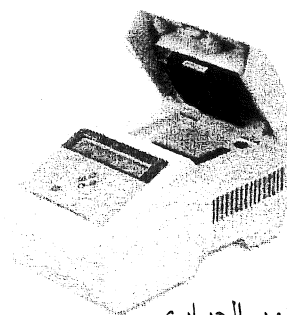
-DNA القالب.

-شفع من المرئسات (البادئات).

-أنزيم DNA بوليمراز، من نمط Taq بوليمراز مع البفر المناسب.

-نكليوتيدات حرة dNTPs.



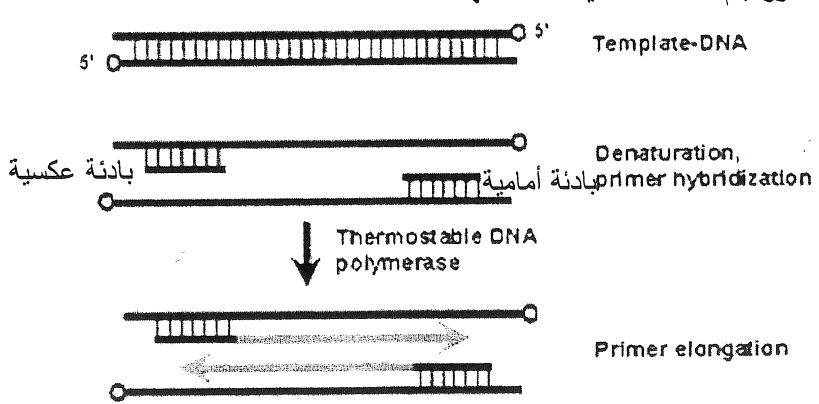


المدور الحراري

يقوم تفاعل PCR على تتالي دورات من ثلاث مراحل:

- المرحلة الأولى فصل شريطي DNA التمسح Denaturation فك التشافع برفع درجة الحرارة (بدل استعمال الهليكان).
- المرحلة الثانية تشافع البادئات Annealing مصنعة جاهزة (بدل استعمال البريماز).
- المرحلة الثالثة اصطناع DNA الجديد (Taq بوليمراز بدل البوليمراز III).

في نهاية كل دورة يتم مضاعفة كمية DNA الهدف.

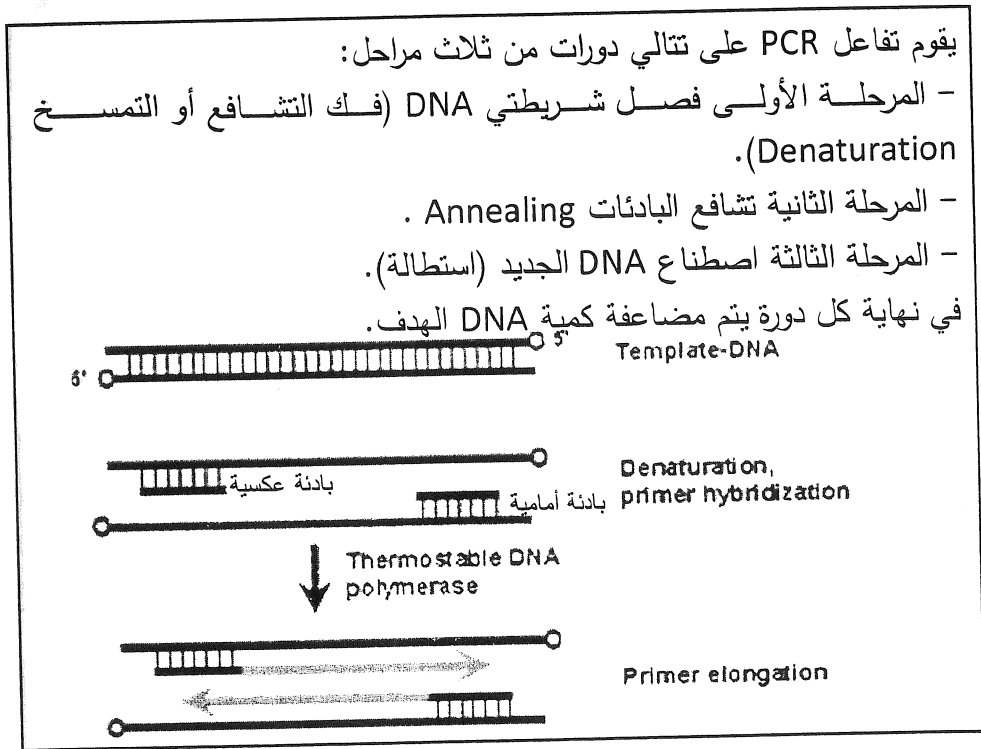


5' Template-DNA

Denaturation, primer hybridization

Thermo-stable DNA polymerase

Primer elongation



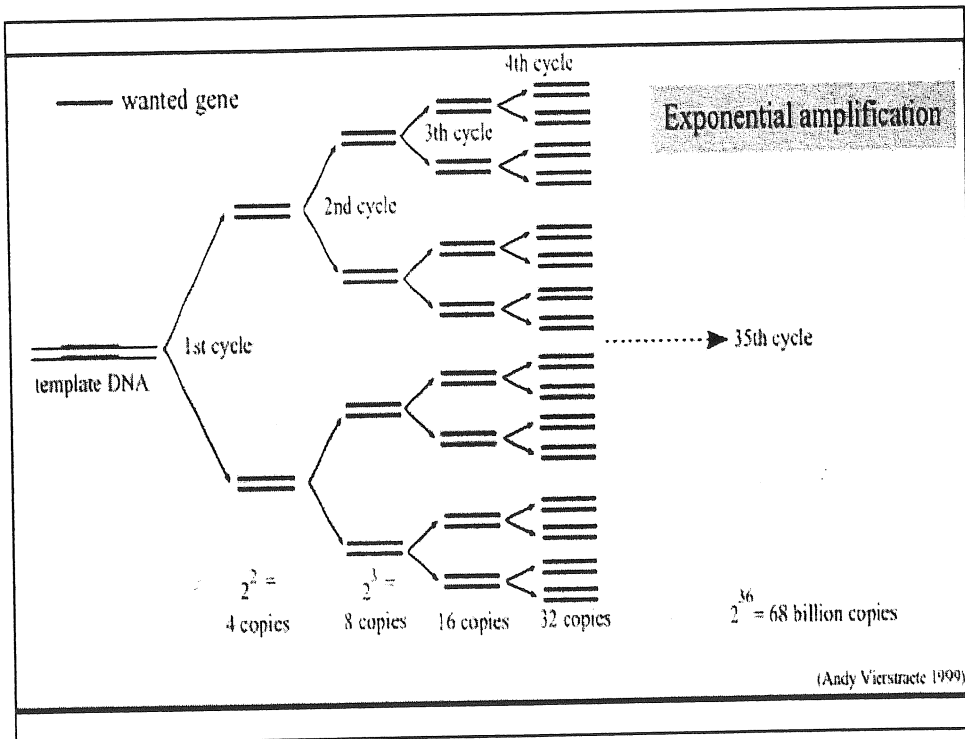
تُسخن شذفة DNA المراد تضخيمها أو تضخيم أجزاء منها إلى نحو 94م° حيث تُحطم الروابط الهيدروجينية بين الأسس المتشافعة للحلزون المزدوج لـDNA عند هذه الدرجة.

تسمى هذه العملية فك التشافع أو التمسوخ Denaturation.

يتم بعدها تبريد الجملة إلى درجة حرارة تتراوح بين 55 و70م° (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.

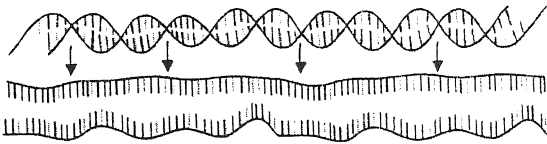
بعدها يتم رفع الحرارة إلى الدرجة 72م° حيث عند هذه الدرجة يعمل أنزيم DNA بوليميراز الخاص الذي تم إضافته إلى التفاعل على اصطناع شريطة جديدة من DNA.

- تستخدم الشدفة المصنعة حديثاً في نهاية كل دورة كقالب في الدورة التالية وتكرر تفاعلات الاصطناع دورة بعد دورة مضاعفة عدد الشدفة 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 الشدفة الناتجة هو 2^n حيث n هو عدد الدورات وبهذا الشكل يكون تزايد عدد شدفة DNA المضخم وفقاً لمتوالية هندسية.
- لا تستغرق عادةً الدورة الواحدة أكثر من 5 دقائق، فإذا كان من المفترض القيام بـ 30 دورة فخلال حوالي ثلاث ساعات نكون قد ضخمنا التسلسل الهدف من DNA عدة ملايين من المرات.



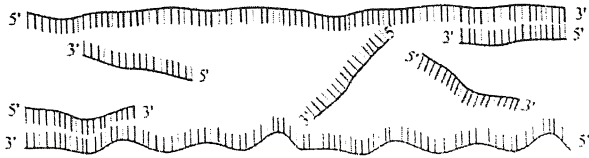
PCR : Polymerase Chain Reaction

30 - 40 cycles of 3 steps :



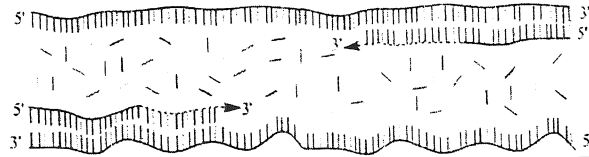
Step 1 : denaturation

1 minut 94 °C
فك التشافع أو التمسح



Step 2 : annealing

45 seconds 54 °C
تشافع المرئسات
forward and reverse primers !!!



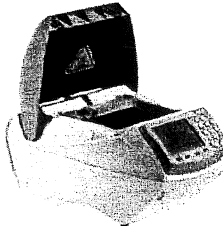
Step 3 : extension

2 minutes 72 °C
only dNTP's
الاستطالة

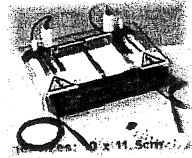
(Andy Viersma 1999)

كيفية قراءة النتائج: رحلان كهربائي تحليلي

PCR

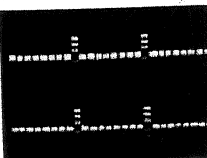


Agarose gel electrophoresis

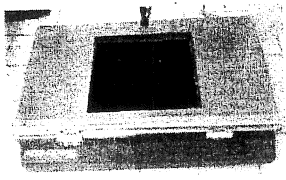


3-4 hours

Reliable PCR from Every Sample



The final product

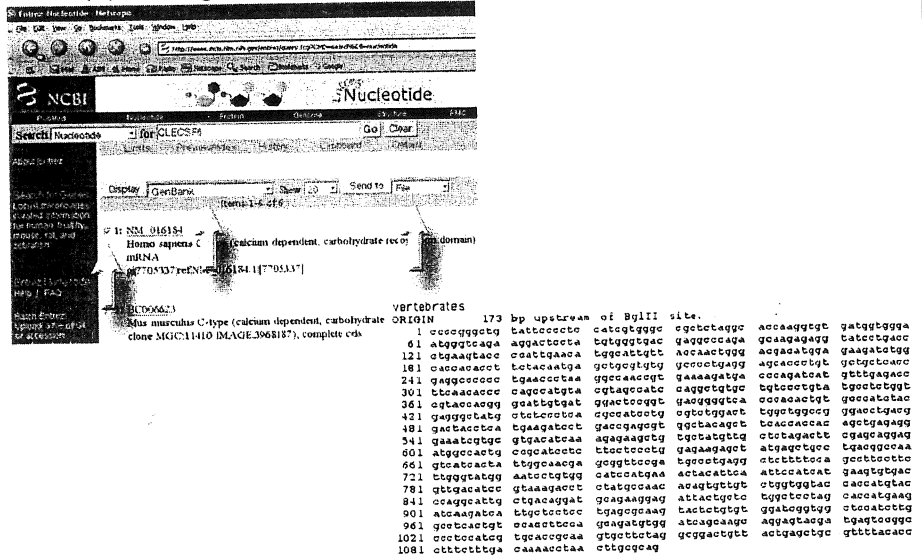


UV visualisation

- 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 التقنية في تشخيص الكثير من الأمراض الجينية قبل الولادة وبعدها كما وتستخدم بشكل دوري في مختبرات الأوبئة والطبيليات للكشف عن الأمراض الفيروسية والجرثومية والطفيلية المختلفة بحساسية عالية جداً، إذ تعد تقنية عالية الدقة في الكشف المبكر عن الأمراض حتى قبل أن تستطیع 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 البنية حيث تعطي نتيجة مضمونة 100%.

فكرة عن خطوات العمل

- الحصول على التسلسل المراد تضخيمه من البنوك الجينية.



The screenshot shows the NCBI Nucleotide search results for the query 'JLECS24'. The search results display the sequence of the human gene JLECS24, which is a calcium-dependent, carbohydrate receptor. The sequence is displayed in a table format with columns for the sequence, the gene name, and the accession number. The sequence is: 1 cccgggctg tttccctcc catcgtggc cgcctagcc accaaggct gatgtggga 61 atgggtcaga aggaactca tctggtgac ggggccaqa gcaagaggg tctctgacc 121 ctgaaatgac cacttgaaa tggcactgt actaacctg agcaactgt gctgtcaac 181 caccacact tctacaatg gctgctgtg gccctgagg gcacctctg gctgtcaac 241 gaggccccc tgaccctaa ggcacacct gaagaatga cccagatcat gtttgagcc 301 tbcnaaaccc cagccatga cgtagccac caggctgpc tglccctga tgcctgtgt 361 ctaccacagg gactgtgtg gactcctgt aaagggtca ocaaacctg gccatgat 421 gagggtatg ctctctcca gccacatgt cgtctgagt tggctggccg ggaactgag 481 gactaccta tgagatctt gaccagagt ggcacagct taccaccac agctgagag 541 gaactgtgc gtgacatca agagaagct cgtctgctg gactagact cagcagagg 601 atggcaatg ccgacatct tctctctgt gagaagctt atgagctgc tgaagcaca 661 gctctacta tggcaacga ggggtctga tggcctgagg cctctctca gctctctca 721 tgggtatgg aatctgttg catcctgaa actacatca atctcatc gactgagac 781 gttgacacc gtaagacct ctatgcaac acagctgtg ctgtgggac caccatgac 841 ccaggatbg ctgacagat gagaagagg tactctgtg ggtatgtg cccatgag 901 atcaagatca ttgtctctc tgagatgag atcagcaag agagtaga tgaactgac 961 gctcactgt ccacatcca gtagatggg atcagaagu agagtaga tgaactgac 1021 ccctccatg tgaccgcga gtcctctag gggactctt actgagctg gtttcaac 1081 cttctctga caaacctca cctgtgag

• تصميم المرئسات إما يدوياً أو باستخدام أحد البرامج الحاسوبية

- يجب أن يتوفر في شفع المرئسات المستخدمة مجموعة من الشروط:
- ١- أن تكون قيمة T_m 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 T_m المتراوحة بين 55 و 68 درجة أفضل النتائج.
 - ٢- يجب أن لا يسمح لها تسلسل نكليوتيداتها بأن تتثنى 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%.

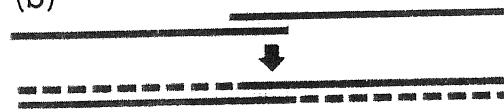
تتشافع مع ذاتها self-annealing فتتثنى على نفسها لتشكل بنية ثانوية معيقة للتشافع مع قالب DNA.

(a)



hairpin loops
عروة الدبوس

(b)



primer dimers

تتشافع مع بعضها، وتشكيل لثنائي قسيم primer dimers

حساب قيمة T_m المرئسة يدوياً:

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

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

The screenshot displays the Primer3 web application interface. On the left, there is a text input field for the DNA sequence, with a 'Paste Sequence' button and a 'Select left and/or right primer' dropdown menu. The main area shows the 'Primer3 Output' section, which includes a table of primer pairs and their characteristics. A callout box highlights the 'Detail of primer sequence and their characteristics (starting position, length, Tm and GC%)'.

Primer	Start	End	Length	Tm	GC%
LEFT PRIMER	149	23	89.99	57.05	3.25
RIGHT PRIMER	308	40	88.99	52.32	3.00
HYB CLIQ	247	23	60.15	58.26	3.68

Product size: 172 bps

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 multiple pairs of primers 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 تمييزها كعصائب مختلفة على هلامة الرحلان الكهربائي.
- من أهم تطبيقاتها: الكشف عن العديد من العوامل الممرضة Pathogens Identification، وتحليل الطفرات Mutation Analysis.

